

Strukturbasiertes Design und Entwicklung
kovalenter Kinaseinhibitoren zur Umgehung der durch
EGFR-T790M vermittelten Wirkstoffresistenz im
nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Julian Engel

aus Dortmund

Dortmund 2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh

2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Summerer

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2011 bis Januar 2016 unter der Leitung von Prof. Dr. Daniel Rauh im Fachbereich Chemische Biologie der Fakultät Chemie und chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

[1] **J. Engel**[‡], S. Smith[‡], J. Lategahn, H. L. Tumbrink, L. Goebel, C. Becker, E. Hennes, M. Keul, A. Unger, H. Müller, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, G. Günther, J. G. Hengstler, D. Rauh. Structure-Guided Development of Covalent and Mutant-Selective Pyrazolopyrimidines to Target T790M Drug Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60, 7725-7744.

[2] M. Günther[‡], J. Lategahn[‡], M. Juchum, E. Döring, M. Keul, **J. Engel**, H. L. Tumbrink, D. Rauh, S. Laufer. Trisubstituted Pyridinylimidazoles as Potent Inhibitors of the Clinically Resistant L858R/T790M/C797S EGFR Mutant: Targeting of Both Hydrophobic Regions and the Phosphate Binding Site. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60, 5613-5637.

[3] L. Robke, L. Laraia, M. A. Carnero Corrales, G. Konstantinidis, M. Muroi, A. Richters, M. Winzker, T. Engbring, S. Tomassi, N. Watanabe, H. Osada, D. Rauh, H. Waldmann, Y. W. Wu, **J. Engel**. Phenotypic Identification of a Novel Autophagy Inhibitor Chemotype Targeting Lipid Kinase VPS34. *Angewandte Chemie* **2017**, 56, 8153-8157.

[4] D. Plenker, M. Riedel, J. Brägelmann, M. A. Dammert, R. Chauhan, P. P. Knowles, C. Lorenz, M. Keul, M. Bührmann, O. Pagel, V. Tischler, A. H. Scheel, D. Schütte, Y. Song, J. Stark, F. Mrugalla, Y. Alber, A. Richters, **J. Engel**, F. Leenders, J. M. Heuckmann, J. Wolf, J. Diebold, G. Pall, M. Peifer, M. Aerts, K. Gevaert, R. P. Zahedi, R. Buettner, K. M. Shokat, N. Q. McDonald, S. M. Kast, O. Gautschi, R. K. Thomas, M. L. Sos. Drugging the catalytically inactive state of RET kinase in RET-rearranged tumors. *Science Translational Medicine* **2017**, 9. DOI: 10.1126/scitranslmed.aah6144.

[‡] Diese Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.

- [5] S. Smith, M. Keul, **J. Engel**, D. Basu, S. Eppmann, D. Rauh. Characterization of Covalent-Reversible EGFR Inhibitors. *ACS Omega* **2017**, 2, 1563-1575.
- [6] S. Tomassi[‡], J. Lategahn[‡], **J. Engel**, M. Keul, H. L. Tumbrink, J. Ketzer, T. Mühlenberg, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, S. Bauer, D. Rauh. Indazole-Based Covalent Inhibitors To Target Drug-Resistant Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60, 2361-2372.
- [7] **J. Engel**[‡], C. Becker[‡], J. Lategahn, M. Keul, J. Ketzer, T. Mühlenberg, L. Kollipara, C. Schultz-Fademrecht, R. P. Zahedi, S. Bauer, D. Rauh. Insight into the Inhibition of Drug-Resistant Mutants of the Receptor Tyrosine Kinase EGFR. *Angewandte Chemie* **2016**, 55, 10909-10912.
- [8] **J. Engel**[‡], J. Lategahn[‡], D. Rauh. Hope and Disappointment: Covalent Inhibitors to Overcome Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2016**, 7, 2-5.
- [9] **J. Engel**, A. Richters, M. Getlik, S. Tomassi, M. Keul, M. Termathe, J. Lategahn, C. Becker, S. Mayer-Wrangowski, C. Grütter, N. Uhlenbrock, J. Krüll, N. Schaumann, S. Eppmann, P. Kibies, F. Hoffgaard, J. Heil, S. Menninger, S. Ortiz-Cuaran, J. M. Heuckmann, V. Tinnfeld, R. P. Zahedi, M. L. Sos, C. Schultz-Fademrecht, R. K. Thomas, S. M. Kast, D. Rauh. Targeting Drug Resistance in EGFR with Covalent Inhibitors: A Structure-Based Design Approach. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58, 6844-6863.
- [10] A. Richters, D. Basu, **J. Engel**, M. S. Ercanoglu, H. Balke-Want, R. Tesch, R. K. Thomas, D. Rauh. Identification and further development of potent TBK1 inhibitors. *ACS Chemical Biology* **2015**, 10, 289-298.

[‡] Diese Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.

- [11] A. Richters, H. D. Nguyen, T. Phan, J. R. Simard, C. Grütter, **J. Engel**, D. Rauh. Identification of type II and III DDR2 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57, 4252-4262.

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Rauh für die interessante und interdisziplinäre Aufgabenstellung danken, die mir den Weg in die Medizinalchemie geebnet hat. Außerdem bedanke ich mich für die exzellente Betreuung und die konstruktiven Diskussionen während der Zeit der Promotion. Herrn Prof. Dr. Daniel Summerer möchte ich meinen herzlichen Dank für die Übernahme des Koreferats aussprechen.

Weiterhin danke ich ganz herzlich allen aktuellen und ehemaligen AG Rauh Mitarbeitern für die Zusammenarbeit, den Zusammenhalt und die schöne Zeit. Hervorheben möchte ich Debjit Basu und Zhizhou Fang, die mir speziell in der Anfangszeit der Promotion mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Ein ganz besonderer Dank geht an André Richters, der mich seit der Masterarbeit in jeglichen Situationen unterstützt hat und dadurch eine der entscheidendsten Personen während meiner Promotion war. Außerdem möchte ich mich bei Svenja Mayer-Wrangowski, Christian Becker, Steven Smith und Jonas Lategahn für die gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors bedanken.

Zudem gilt mein Dank meinen engagierten Studenten Niklas Schaumann, Jasmin Krüll, Niklas Uhlenbrock, Jonas Lategahn und Helena Kaitsiotou, die mich tatkräftig bei meinen Projekten unterstützt haben. Ein ebenfalls großer Dank geht an Christian Becker, Stefano Tomassi, Steven Smith, Marina Keul, Elisabeth Hennes, Lisa Goebel und Patrick Wolle, die durch ihre Experimente und Expertise einen maßgeblichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls bei all den Kooperationspartnern bedanken, die über die Jahre in den zahlreichen interdisziplinären Projekten involviert waren und deren großartige Zusammenarbeit diese Projekte entscheidend vorangetrieben haben. Dazu gehören Georgia Günther und Prof. Dr. Jan Hengstler vom IfADo, Laxmikanth Kollipara, Verena Tinnefeld und René P. Zahedi vom ISAS, Julia Ketzner, Thomas Mühlenberg und Prof. Dr. Sebastian Bauer vom Uniklinikum Essen, Sandra Ortiz-Cuaran, Johannes M. Heuckmann, Dennis Plenker, Prof. Dr. Martin Sos sowie Prof. Dr. Roman Thomas vom Uniklinikum Köln, Patrick Kiebies, Franziska Hoffgaard,

Jochen Heil und Prof. Dr. Stefan Kast von der TU Dortmund und Anke Unger, Heiko Müller, Sascha Menninger, Matthias Baumann vom Lead Discovery Center. Mein besonders großer Dank gilt Carsten Schultz-Fademrecht für die Unterstützung und hilfreichen Diskussionen bei diversen Syntheseplanungen. Darüber hinaus hat mir diese Kooperation entscheidende Einblicke in die Medizinalchemie ermöglicht und meine Begeisterung dafür noch verstärkt.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei den gemeinsamen Einrichtungen der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der TU Dortmund und des Max-Planck-Instituts Dortmund bedanken, die ein wichtiger Faktor während der Promotion waren. Dazu zählen unter anderem Prof. Dr. Wolf Hiller und das NMR-Team sowie Christiane Heitbrink und Malte Metz aus der HRMS-Abteilung. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Petra Janning und Jens Warmers für die jahrelange Unterstützung und Hilfsbereitschaft rund um die ESI-MS-Analytik bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Simone Eppmann und Andreas Arndt für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag sowie für die Durchführung diverser Assays und Proteinexpressionen. Bei Martina Reibner und Petra Alhorn möchte ich mich zudem ganz besonders bedanken, die bei der Bewältigung von administrativen Herausforderungen unerlässlich waren.

Ein weiterer großer Dank geht an André Richters, Christian Becker, Marko Matesic und Svenja Mayer-Wrangowski für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums und der Promotionszeit immer unterstützt und ertragen haben und ohne die all das nicht möglich gewesen wäre. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei all meinen Freunden bedanken, die mich hin und wieder daran erinnern mussten, dass auch ein Leben außerhalb des Labors existiert.

Ein ganz spezieller Dank geht an meine Freundin Roberta für die bedingungslose Unterstützung in allen Lebenssituationen besonders in der Phase des Schreibens.

Só alegria.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	i
Danksagung	v
Inhaltsverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor	1
1.2 EGFR-Mutationen als onkogene Treiber bei Lungenkrebs	8
1.3 Zielgerichtete Tumorthherapie und T790M-Wirkstoffresistenz	12
1.4 Kovalente Inhibitoren zur Umgehung der T790M-Resistenz	15
2 Motivation und Zielsetzung	21
3 Strukturbasierte Hit-Optimierung von EGFR-T790M-Inhibitoren	24
3.1 Rationales Design zur Hit-Optimierung von EGFR-T790M-Inhibitoren.....	26
3.2 Synthese von Pyrimidin-basierten Kinaseinhibitoren.....	28
3.3 Biochemische Charakterisierung der Chinazoline und Pyrimidine.....	33
3.4 MS-basierte Validierung der Alkylierung von Cys797 in EGFR-T790M	40
3.5 Komplexstrukturen im T790M-Modellsystem.....	44
3.6 Evaluierung der Pyrimidine in Krebszelllinien	46
3.7 ADME-Parameter Löslichkeit und Zellpermeabilität	47
3.8 Bindungskinetik der Inhibitoren in den Mutationsvarianten von EGFR....	49
3.9 Zusammenfassung und rationale Strategien zur Weiterentwicklung	52
4 Strukturbasiertes <i>de novo</i> Design kovalenter EGFR-T790M-Inhibitoren ...	55
4.1 Synthese von Pyrazolopyrimidin-basierten Kinaseinhibitoren.....	58
4.2 Biochemische Charakterisierung der Pyrazolopyrimidine.....	59

4.3	Profilierungsstudie zur Selektivität im Kinom	64
4.4	MS-basierte Validierung der Alkylierung von Cys797 in EGFR-T790M	66
4.5	Komplexstrukturen der Pyrazolopyrimidine in EGFR-T790M	69
4.6	Evaluierung der Pyrazolopyrimidine in Krebszelllinien	74
4.7	ADME/DMPK-Profilierung	81
4.8	C797S-Wirkstoffresistenz in EGFR bei kovalenter TKI-Therapie	87
4.9	Zusammenfassung	92
5	<i>Covalent in situ Click-Chemie (CovClick)</i>	94
5.1	CovClick-Prinzip und Design der Sonde	94
5.2	Synthese der CovClick-Sonde	97
5.3	Evaluierung der CovClick-Sonde in MKK7	98
5.4	Initialer Screen und Identifizierung neuer kovalenter Verbindung	100
6	Zusammenfassung	107
7	Abstract	109
8	Experimenteller Teil	111
8.1	Organische Synthese	111
8.1.1	Generelle Anmerkungen	111
8.1.2	Verzeichnis der synthetisierten Verbindungen	113
8.1.3	Synthese der Inhibitoren	115
8.2	IC ₅₀ -Bestimmungen und Kinetikmessungen	205
8.3	Massenspektrometrie	206
8.4	Zellkultur und Viabilitätsassay	208
8.5	Western-Blot-Analyse	209
8.6	Bestimmung der ADME/DMPK Parameter	210
8.7	CovClick-Screen	212

8.8	Dockingstudien.....	213
9	Literaturverzeichnis.....	214
10	Anhang.....	230
10.1	Azidbibliothek.....	230
10.2	Massenspektrometrie.....	232
	Eidesstattliche Erklärung.....	233

Abkürzungsverzeichnis

Abl	Abelson Kinase
Ac	Acetyl
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination
AK	Arbeitskreis
Akt	Proteinkinase B
AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphat
AREG	Amphiregulin
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
b.i.d.	<i>(bis in die; zweimal am Tag)</i>
Bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
BLK	B-lymphoid-Tyrosinkinase
BMX	<i>bone marrow-Kinase auf Chromosom X</i>
Boc	<i>tert-Butyl-oxycarbonyl</i>
Bw	<i>bodyweight</i>
BTC	Betacellulin
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
Bu	Butyl
Co	Konzentration bei Minute 0
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
Cl	Elimination (<i>clearance</i>)
C _{max}	höchste Konzentration
CMC	Carbamidomethyliertes Cystein
cMet	<i>mesenchymal-epithelial transition factor kinase</i>

CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CovClick	<i>Covalent in situ Click-Chemistry</i>
cSrc	Zelluläre Sarcoma Kinase
DBU	Diazabicycloundecen
DHP	Dihydropyran
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DM	Doppelmutante (S345C, T338M)
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMPK	<i>drug metabolism and pharmacokinetics</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
Em	Emission
EPI	Epigen
ER	<i>efflux ratio</i>
EREG	Epiregulin
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation

Et	Ethyl
F	Bioverfügbarkeit
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GSH	Glutathion
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
h	Stunde(n)
HB	<i>heparin-binding</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
HLM	<i>human liver microsomes</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (<i>insulin-like growth factor</i>)
IP	intraperitoneal
ITK	<i>IL2 inducible T cell kinase</i>
kat.	katalytisch
K_i	Inhibitionskonstante
K_{inact}	Inaktivierungskonstante
KIT	Stammzellwachstumsfaktorrezeptor
K _M	Michaelis-Menten-Konstante

LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
Me	Methyl
Min	Minute(n)
MKK7	dual-spezifische Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MLM	<i>mouse liver microsomes</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
NC	Nitrocellulose
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NRG	Neuregulin
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>non-small cell lung cancer</i>)
ORR	<i>objective response rate</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMPA	<i>artificial membrane permeation assay</i>
PD	Pharmakodynamik
PDB	<i>protein data bank</i>
PE	Petrolether
PFS	<i>progression free survival</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PKA	Proteinkinase A (cAMP-abhängige Proteinkinase)
PK	Pharmakokinetik
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO	peroral
ppm	<i>parts per million</i>
PTB	<i>phosphotyrosine-binding</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
pTsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
rpS6	ribosomales Protein S6
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase(n)
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung (<i>structure activity relationship</i>)
SH2	<i>Src homology region 2</i>
SPR	Struktur-Eigenschafts-Beziehung (<i>structure property relationship</i>)
T _(1/2)	Halbwertszeit
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethylamin
TGF α	<i>transforming growth factor alpha</i>
TGS	<i>target-guided synthesis</i>
THP	Tetrahydropyran
TK	Tyrosinkinase(n)
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor(en)

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TXK	Tyrosinkinase TXK (alternativ: <i>resting lymphocyte kinase</i>)
Vss	Verteilungsvolumen
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor

Die inter- sowie intrazelluläre Kommunikation in multizellulären Organismen besteht aus einem komplexen Netzwerk von Regulationsprozessen. Eine entscheidende Rolle nehmen dabei in der Zellmembran lokalisierte Rezeptortyrosinkinasen (RTK) ein, die ein extrazelluläres Signal über die Membran ins Zellinnere weitergeben und über verschiedene Signalwege in eine biologische Antwort translatieren. Über solche Signaltransduktionskaskaden werden essentielle zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung sowie Metabolismus, Migration und das Überleben von Zellen reguliert.¹⁻³ Der erste Meilenstein in der Erforschung von Rezeptortyrosinkinasen wurde in den frühen 1950er Jahren durch die Arbeiten von Rita Levi-Montalcini und Stanley Cohen mit der Entdeckung und Isolation der Wachstumsfaktoren NGF (*nerve growth factor*) und EGF (*epidermal growth factor*) gelegt, wofür beide 1986 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet wurden. Levi-Montalcini beobachtete 1952, dass ein aus Maustumoren stammendes Protein einen induzierenden Einfluss auf das Neuritenwachstum in Hühnerembryos besaß, was sich später als der Nervenwachstumsfaktor NGF herausstellte.⁴ Auf diese Studien aufbauend, konnte Stanley Cohen im Jahr 1957 ein weiteres Speicheldrüsen-Protein isolieren und charakterisieren, das nach Injektion in neugeborene Mäuse diverse Frühentwicklungssymptome wie vorzeitige Separation der Augenlider und Dentition hervorrief.⁵ Weitere Studien mit diesem Protein zeigten eine proliferierende Wirkung in Epithelzellen, was der Substanz den Namen Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) verlieh.⁶ Der Rezeptor des EGF (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) wurde erst 1978 als 170 kDa großes transmembran-gebundenes Protein identifiziert, dessen Stimulierung mit EGF in A431-Zellen (humanes epidermoides Karzinom) zu einem erhöhten Phosphorylierungslevel des Rezeptors führte, was zwei Jahre später mit der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors assoziiert werden konnte.⁷⁻⁹ Seit der Entdeckung des EGF-Rezeptors vor über 30 Jahren wurden im menschlichen Organismus 58 Rezeptortyrosinkinasen gefunden, die basierend auf der Sequenz der Kinsedomäne in 20 Subfamilien gegliedert werden.¹⁰ EGFR ist Teil der ErbB-Familie bestehend aus den vier Mitgliedern, ErbB1/EGFR/HER1, ErbB2/HER2/Neu,

ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4 und wird universell in Epithel-, Mesenchym- und neuronalen Zellen sowie in deren Vorläuferzellen exprimiert.¹¹

Der EGF-Rezeptor besteht strukturell wie alle Rezeptortyrosinkinasen aus einer extrazellulären Liganden Bindungsdomäne, einer Transmembrandomäne sowie einer cytoplasmatischen Region, die sich aus einer katalytischen Tyrosinkinase- und einer regulatorischen Domäne zusammensetzt. Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne des inaktiven Monomers führt zu einer Homodimerisierung- bzw. Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie (HER2, HER3 bzw. HER4), die den EGF-Rezeptor in einen aktiven Zustand überführt (Abbildung 1.1).^{12,}

13

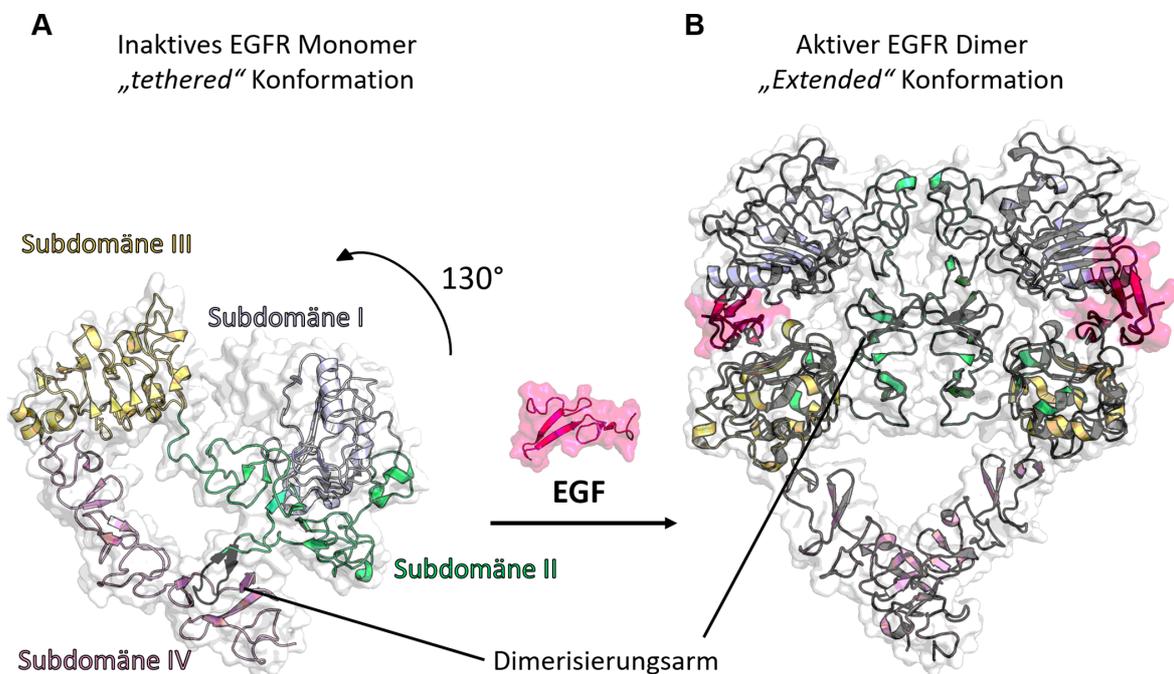


Abbildung 1.1: **A)** Struktur der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors im ligandenfreien Zustand. Im ligandenfreien Zustand liegt die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors als inaktives Monomer in einer geschlossenen (*tethered*) Konformation vor. Eine rigide β -Haarnadelschleife der Subdomäne II (grün), der Dimerisierungsarm (schwarz), ist in die Subdomäne IV (pink) eingebettet und verhindert eine Dimerisierung. **B)** Struktur der extrazellulären Domäne im EGF (magenta)- gebundenen Zustand. Infolge der Bindung des Liganden EGF an die Subdomänen I (blau) und III (gelb) kommt es zu einer Umlagerung des Dimerisierungsarms und einer Rotation der Subdomänen I und III um 130°, wodurch eine gestreckte (*extended*) Konformation und eine Dimerisierung mit einem weiteren Monomer von EGFR oder einem anderen ErbB-Familienmitglied ermöglicht wird. Die Darstellung wurde von Kovacs *et al.* adaptiert.¹³

Die Dimerisierung der extrazellulären Einheit, die sich aus den vier Subdomänen (I-IV) zusammensetzt, wird hauptsächlich über die Subdomäne II vermittelt (Abbildung 1.1). Der Dimerisierungsarm, eine rigide β -Haarnadelschleife (*β -hairpin-loop*) der Subdomäne II ist im inaktiven, monomeren Zustand über intramolekulare Wechselwirkungen in die Cystein-reiche Subdomäne IV eingebettet und bedingt eine geschlossene (*tethered*) Konformation. Die Bindung eines Liganden erfolgt bivalent an die Leucin-reichen Subdomänen I und III und bewirkt die Umlagerung des Dimerisierungsarms, der dadurch mit dem korrespondierenden Element des Dimerpartners interagiert.^{14, 15} Diese Konformationsänderung verursacht eine Rotation der Subdomänen I und II um ca. 130 ° gegenüber III und IV, die zu einer gestreckten (*extended*) Konformation und einem *back-to-back*-Dimer führt. Bei dieser Art der Dimerisierung wird der Kontakt der Monomere ausschließlich über die Rezeptoren vermittelt, wohingegen die Ligandenbindung abseits der Protein-Interaktionsflächen erfolgt.¹⁶ Zu den bedeutendsten Liganden des EGF-Rezeptors zählen die Wachstumsfaktoren EGF, *transforming growth factor α* (TGF α), Amphiregulin (AREG), Epiregulin (EREG), Betacellulin (BTC), sowie *heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF) und Epigen (EPI).^{7, 17}

Die strukturelle Umlagerung des extrazellulären Moduls wirkt sich auch auf die Transmembrandomäne aus und leitet das externe Signal weiter ins Zellinnere. Das transmembran gelagerte Segment besteht aus einer 24 Aminosäuren zählenden α -Helix, die bei der Dimerisierung über N-terminale *GxxxG-like* (GG4)-Motive mit dem Dimerpartner assoziiert (Abbildung 1.2).¹⁸ Die *GxxxG-like* (GG4)-Sequenz, bei dem zwei Glycin-Reste innerhalb von vier Aminosäuren lokalisiert sind, ist ein bei der Dimerisierung von Transmembranhelices klassisches Strukturmotiv.^{19, 20} Die N-terminale Assoziation der Helices bedingt eine Öffnung der C-terminalen Enden der Transmembranhelices und bewirkt eine konformationelle Änderung der intrazellulären Domäne, die sich aus dem Juxtamembransegment, der Kinasedomäne und dem C-terminalen Schweif (*C-terminal tail*) zusammensetzt.²¹

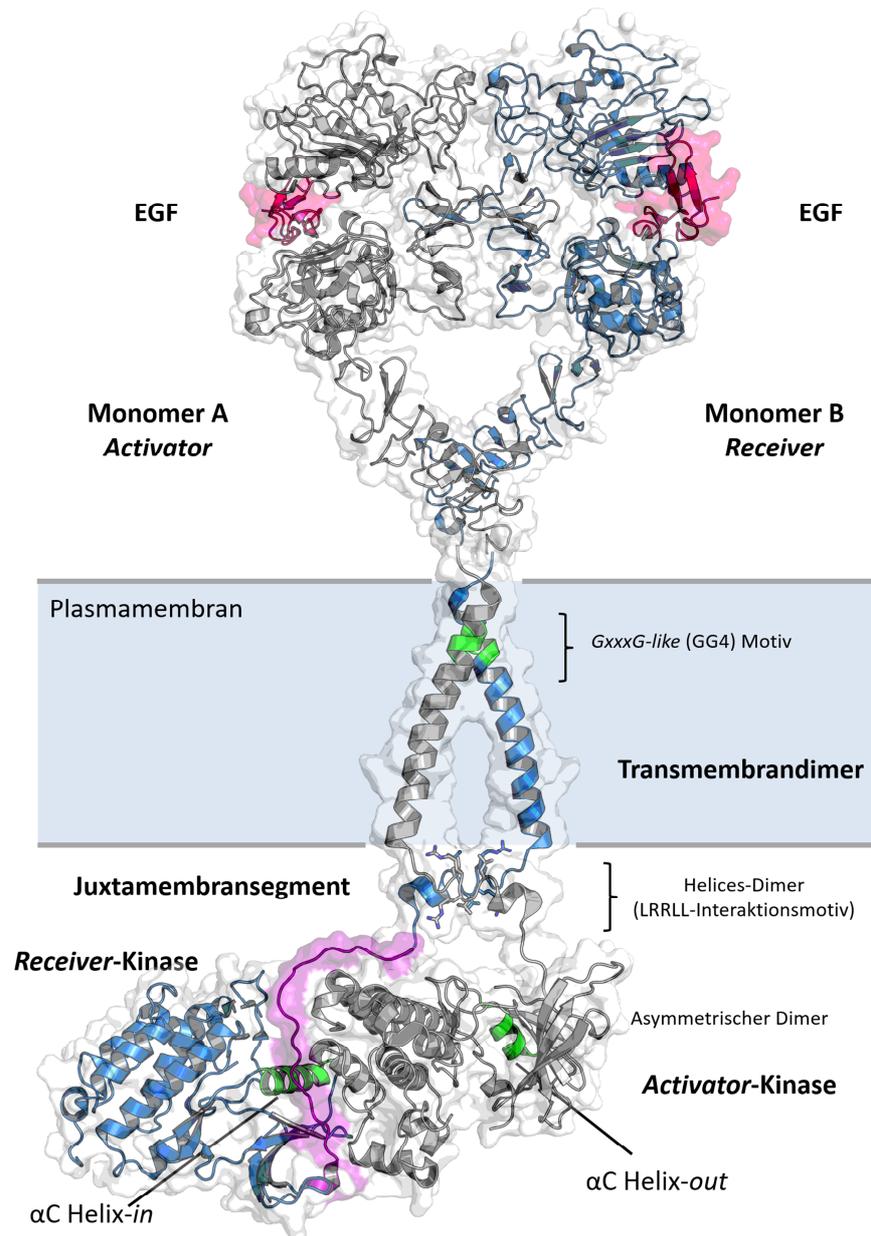


Abbildung 1.2: Modell eines aktiven Dimers des EGF-Rezeptors basierend auf den Strukturen der jeweiligen Domänen. Zur Erstellung des Modells wurden die folgenden PDB-Einträge verwendet: extrazelluläre Domänen, 3NJP; Transmembrandomänen sowie Juxtamembransegmente, 2M20; Kinasedomänen, 4RIW. Im EGF (pink)-gebundenen Zustand liegt der EGF-Rezeptor als Dimer in der aktiven, gestreckten Konformation vor. Die Dimerisierung der Transmembrandomänen über ein N-terminales *GxxxG-like* Motiv (grün) ermöglicht die Helices-Dimerisierung der Juxtamembransegmente über ein LRLL-Motiv. Infolgedessen kommt es zur Ausbildung des asymmetrischen Kinasedimers, in dem eine Kinase die *receiver* (blau)- und die andere die *activator*-Position (grau) einnimmt. In dieser Konformation bildet der C-Terminus der *activator*-Kinase die Protein-Protein-Interaktionsfläche mit einem Bereich des N-Terminus der *receiver*-Kinase (violett) in unmittelbarer Umgebung der α C Helix (grün). Diese Wechselwirkung stabilisiert die aktive Konformation der α C Helix und induziert die katalytische Aktivität der *receiver*-Kinase. Die Darstellung wurde von Kovacs *et al.* adaptiert.¹³

Die Juxtamembranregion verbindet die Transmembran- mit der Kinasedomäne und spielt bei den ErbB-Rezeptoren eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der katalytischen Kinasedomäne.²² Der durch die Dimerisierung der Transmembran-Helices entstandene C-terminale Abstand von 20 Å erlaubt den Juxtamembransegmenten der beiden Monomere die Bildung eines antiparallelen Dimers über die helicalen LRRL-Interaktionsmotive (Abbildung 1.2).²¹ Diese strukturelle Änderung leitet die Dimerisierung der Kinasedomänen zu einem asymmetrischen Dimer ein, bei dem eine Kinase die *activator*-Position einnimmt und die *receiver*-Kinase durch Stabilisierung einer für die Katalyse entscheidenden regulatorischen Helix (α C Helix) in ihre aktive Konformation (*Helix-in*) überführt (Abbildung 1.2). Durch diesen allosterischen Mechanismus wird die Kinasedomäne des EGF-Rezeptors aktiviert und die Autophosphorylierung diverser Tyrosinseitenketten im *C-terminal tail* ausgelöst.^{23, 24} Die entsprechenden Phosphotyrosine fungieren als Rekrutierungsstellen für Effektorproteine, die über Phosphotyrosin-Bindungsstellen wie SH2 (*Src homology region 2*)- und PTB-Domänen (*phosphotyrosine-binding*) gebunden werden und dadurch das extrazelluläre bzw. eingehende Signal über komplexe Signalkaskaden in der Zelle weiterleiten.^{3, 25-27} Zu den bedeutendsten Signalwegen, die vom EGF-Rezeptor reguliert bzw. initiiert werden, gehören der RAS-RAF-MEK-ERK-, der PI3K-AKT-mTOR- und der PLC- γ 1-PKC-Signalweg, über die entscheidende zelluläre Prozesse wie Proliferation, das Überleben von Zellen sowie Apoptose gesteuert werden.^{28, 29}

Die enzymatisch aktive Einheit des EGF-Rezeptors, die Kinasedomäne, besitzt eine Tyrosinkinaseaktivität und katalysiert die Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP auf die Hydroxylgruppe einer Tyrosinseitenkette spezieller Substratproteine. Proteinkinasen gehören demnach zur Enzymklasse der Phosphoryltransferasen. Neben den Tyrosinkinasen wie EGFR machen die Ser-/Thr-Kinasen, bei denen der Phosphotransfer auf Serin bzw. Threoninseitenketten erfolgt, eine weitere bedeutende Klasse dieser Transferasen aus. Aufgrund ihres einheitlichen Kosubstrats ATP weisen die Kinasedomänen der über 500 Mitglieder des menschlichen Genoms eine hoch konservierte Struktur auf.³⁰⁻³²

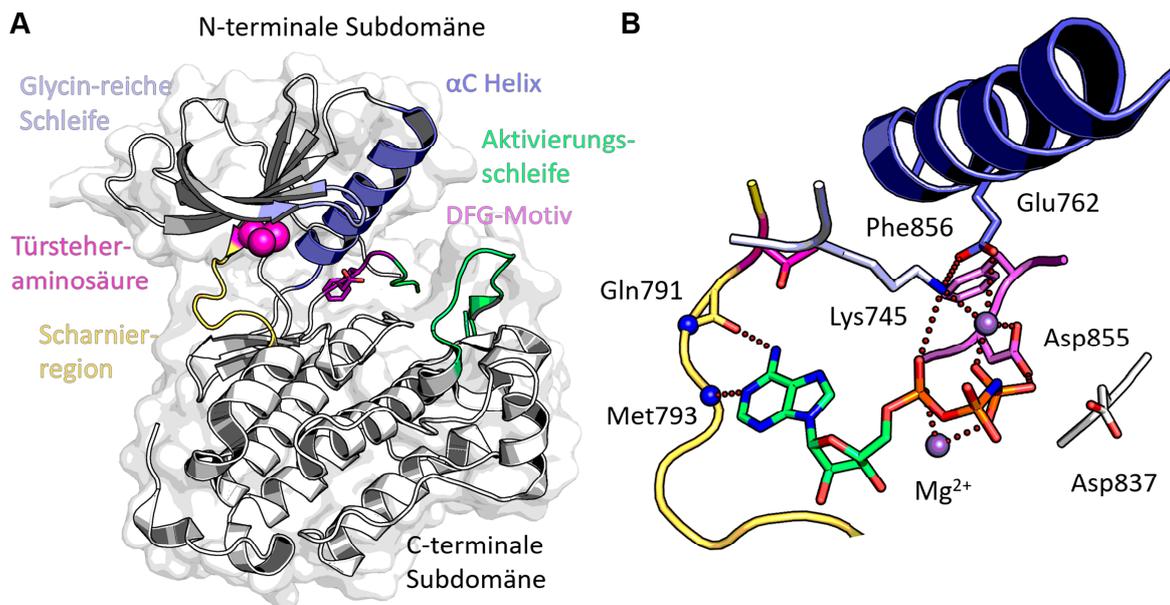


Abbildung 1.3: **A)** Struktureller Aufbau der konservierten katalytischen Domäne einer Proteinkinase am Beispiel von EGFR im Komplex mit AMP-PNP (PDB-Eintrag: 2ITX). **B)** Die Adenin-Einheit von ATP (hier: AMP-PNP) bindet über zwei Wasserstoffbrückenbindungen an die Scharnierregion (Gln791 und Met793) von EGFR (PDB-Eintrag: 2ITV). Das Triphosphat wird im katalytischen Zentrum durch ein komplexes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen und der Koordination von zwei Mg²⁺-Ionen (lila Kugeln) stabilisiert und so für den Transfer der γ -Phosphatgruppe auf ein Substratprotein orientiert. Die Mg²⁺-Ionen wurden basierend auf der PKA-Komplexstruktur (PDB-Eintrag: 1ATP) in das katalytische Zentrum modelliert.

Im Allgemeinen ist diese aus einer N-terminalen β -Faltblatt-reichen und einer vorwiegend aus α -Helices bestehenden C-terminalen Subdomäne aufgebaut, die über eine flexible Scharnierregion (*hinge region*) miteinander verbunden sind (Abbildung 1.3). Zwischen den beiden Subdomänen liegt das aktive Zentrum, der Bereich in dem der Kofaktor ATP an die Kinasedomäne bindet und in welchem die Katalyse des Phosphattransfers erfolgt. Am Übergang von der N-terminalen Subdomäne zur Scharnierregion befindet sich die sogenannte Türsteheraminosäure (*gatekeeper residue*). Durch ihre polare und sterische Beschaffenheit kontrolliert sie den Zugang zu einer hydrophoben Subtasche im hinteren Bereich des aktiven Zentrums der Kinase, wodurch sie großen Einfluss auf die Bindung klassischer Kinaseinhibitoren nimmt. Eine Mutation des Türsteherrests zu einer sterisch anspruchsvolleren Aminosäure ist ein häufig vorkommender Mechanismus bei Wirkstoffresistenzen in Kinase vermittelten Tumorerkrankungen (z. B. EGFR-T790M in NSCLC). Durch diese

Eigenschaft kommt ihr eine bedeutende Rolle in der Wirkstoffentwicklung zu.³³⁻³⁶ An den durch die Türsteheraminosäure kontrollierten hydrophoben Bereich grenzt die α C Helix, ein hochkonserviertes Strukturmotiv, das entscheidend an der Regulation der Katalyseaktivität beteiligt ist.³⁷ Für die Durchführung des katalytischen Prozesses bindet ATP über Wasserstoffbrücken des Adenins an das Peptidrückgrat der Scharnierregion. Die Phosphatgruppen werden dabei durch die flexible Glycin-reiche Schleife in der N-terminalen Subdomäne über das Strukturmotiv Gly-X-Gly-X-X-Gly stabilisiert. Das in der Aktivierungsschleife (*A-loop*) lokalisierte DFG-Motiv (Asp-Phe-Gly) stellt ein weiteres wichtiges Strukturelement dar. Während des Katalyseprozesses liegt es in einer aktiven Konformation (*DFG-in*) vor, bei der die Seitenkette des Phenylalanins zur α C Helix gerichtet ist und eine hydrophobe Tasche besetzt. Das Aspartat ist in Richtung der ATP-Bindetasche orientiert und fixiert die Phosphate über zwei Mg^{2+} -Ionen. Zusätzlich werden die Triphosphate durch ein Glutamat aus der α C Helix (Glu762) sowie über ein konserviertes Lysin (Lys745) des β 3-Strangs stabilisiert und für die Übertragung der γ -Phosphatgruppe auf ein Tyrosinsubstrat orientiert. Das Aspartat aus dem HRD-Motiv (Asp837) dient bei dem Phosphotransfer als katalytische Base.^{31, 32, 38}

In Proteinkinasen gibt es eine Vielzahl an Mechanismen zur Regulation der katalytischen Aktivität. Ein klassischer Mechanismus beruht auf der alternierenden Konformation der Aktivierungsschleife und der damit einhergehenden strukturellen Umlagerung des DFG-Motivs (*DFG-in* bzw. *DFG-out*), die üblicherweise durch Phosphorylierung eines Tyr- bzw. Ser-/Thr-Rests innerhalb des Aktivierungssegments hervorgerufen wird. Während in der aktiven Konformation (*DFG-in*) die Seitenkette des Phe856 in Richtung der α C Helix orientiert ist, besetzt es in der inaktiven Konformation (*DFG-out*) das aktive Zentrum und verhindert die Bindung des Kosubstrats ATP.³⁹ Obwohl die Phosphorylierung eines entsprechenden Tyrosins (Tyr869) innerhalb des Aktivierungssegments auch im EGF-Rezeptor beobachtet wird, spielt diese bei EGFR nur eine untergeordnete Rolle in der Regulation der enzymatischen Aktivität und ist nicht erforderlich für die Aktivierung der Kinase, die hier über einen allosterischen Regulationsmechanismus ähnlich dem der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) gesteuert wird.^{40, 41} Bei dieser allosterischen Regulation im EGF-Rezeptor stellt die α C Helix aus der N-terminalen Subdomäne die essentielle

Komponente dar, die eine aktive (α C Helix-*in*) sowie eine inaktive (α C Helix-*out*) Konformation einnehmen kann. Bei der durch Liganden induzierten Dimerisierung der Kinasedomänen zu einem asymmetrischen Dimer interagiert die Kinase in der *activator*-Position über ihren C-Terminus mit einem Bereich des N-Terminus der *receiver*-Kinase in unmittelbarer Umgebung der α C Helix. Durch diese Wechselwirkung wird die α C Helix und das für den Katalyseprozess erforderliche Glu762 in Richtung der ATP-Bindungstasche (α C Helix-*in*) orientiert. Die dort ausgebildete Salzbrücke mit der Lys745-Seitenkette ist eine Voraussetzung für die katalytische Kinaseaktivität des EGF-Rezeptors. In der inaktiven Konformation (α C-Helix-*out*) ragt die α C Helix aus der ATP-Bindungstasche heraus, wodurch der Kontakt zwischen Glu762 und Lys745 verhindert wird.^{23, 24}

1.2 EGFR-Mutationen als onkogene Treiber bei Lungenkrebs

In Bezug auf die Schlüsselrolle des EGF-Rezeptors in grundlegenden zellulären Prozessen wie Proliferation, Zellüberleben und Apoptose, ist es naheliegend, dass dessen Dysregulation bzw. erhöhte Kinaseaktivität zu unkontrolliertem Zellwachstum und der Entstehung von Tumoren führen kann.^{28, 29} In den 1980er Jahren konnte zum ersten Mal eine Genüberexpression von EGFR in Epitheltumoren nachgewiesen und die Fehlregulation des Signalweges mit der Entstehung von Krebserkrankungen im menschlichen Organismus assoziiert werden.⁴² Seitdem wurde in vielen weiteren Krebsarten wie Brust-, Eierstock-, Darm- und vor allem Lungenkrebs, der mit 20 % die häufigste krebsbedingte Todesursache weltweit darstellt, eine Amplifikation des EGF-Rezeptors identifiziert.⁴³⁻⁴⁶ Insbesondere bei einer speziellen Form, dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (*non-small cell lung cancer*, NSCLC), der 85 % aller Lungenkrebserkrankungen ausmacht, ist dieser von großer Bedeutung.⁴⁷ Bei 40-85 % der Patienten werden erhöhte EGFR-Expressionslevel beobachtet, die unter anderem durch Genamplifikation, durch einen verringerten Abbau oder auch durch eine gesteigerte Ligandenexpression entstehen können.^{47, 48} Diese Voraussetzungen, zusammen mit der einhergehenden geringen Lebenserwartung, machten den EGF-Rezeptor frühzeitig zu einem primären Zielprotein in der Wirkstoffforschung und führten zur Entwicklung EGFR-spezifischer Therapeutika. Dazu zählte neben

antikörperbasierten Ansätzen die Entwicklung niedermolekularer Substanzen (*small molecules*) als Kinaseinhibitoren.⁴⁹⁻⁵³ Mit Gefitinib und Erlotinib wurden die ersten Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) zur Inhibition der Kinaseaktivität des EGF-Rezeptors entwickelt (Abbildung 1.4).^{54, 55}

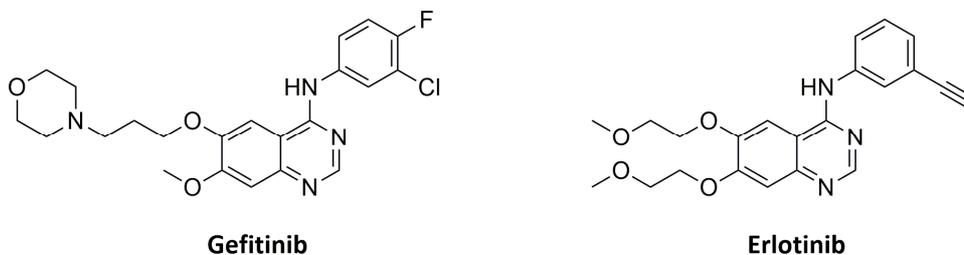


Abbildung 1.4: Tyrosinkinaseinhibitoren des EGF-Rezeptors. Die ATP-kompetitiven Chinazoline zählen zu den EGFR-Inhibitoren der ersten Generation.

Die EGFR-Inhibitoren der ersten Generation Gefitinib und Erlotinib gehören zu den klassischen Typ I Inhibitoren. Sie binden reversibel und ATP-kompetitiv im aktiven Zentrum an die Scharnierregion, wodurch die katalytische Übertragung der Phosphatgruppe von ATP auf Zielproteine verhindert und die Kinaseaktivität inhibiert wird. Beide Wirkstoffe wurden 2003 bzw. 2004 von der FDA (*Food and Drug Administration*) vorläufig zur Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom zugelassen, die durch konventionelle Chemotherapie keine Verbesserung des Krankheitsbildes zeigten.^{56, 57} Die ersten klinischen Studien waren mit einer Teilremission in nur 10 % der behandelten Patienten jedoch sehr ernüchternd. Zudem gab es hier keinen Zusammenhang zwischen dem Tumorrückgang durch TKI-Behandlung und einer EGFR-Überexpression.⁵⁸⁻⁶⁰ Erst anschließende Gensequenzierungen der Tumorgewebe erbrachten aufschlussreiche Erkenntnisse. Dabei wurden ausschließlich in den Patienten, die erfolgreich auf die TKI-Behandlung ansprachen und bei denen ein Rückgang des Tumorwachstums verzeichnet wurde, Mutationen in der Kinasedomäne des EGF-Rezeptors entdeckt.⁶¹⁻

63

Diese Mutationen treten bei ca. 15 % der Patienten (30-50 % bei Patienten asiatischer Abstammung) mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom auf und bewirken durch eine

Erhöhung der Kinaseaktivität und Überstimulierung der EGFR-Signalwege eine unkontrollierte Zellproliferation. Dieser Effekt macht sie zu starken onkogenen Treibern (*oncogenic driver mutations*), welche sich für die Entstehung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms verantwortlich zeigen. Bei über 90 % dieser Aktivierungsmutationen handelt es sich vorwiegend um eine Punktmutation in Exon 21 (L858R) und eine Deletionsmutation in Exon 19 (Dele746_A750).⁶⁴ Die in der Aktivierungsschleife lokalisierte L858R-Mutation bewirkt zwei bedeutende strukturelle Änderungen innerhalb der Kinasedomäne, die das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Konformation beeinflussen und zu einer Erhöhung der Kinaseaktivität führen (Abbildung 1.5).

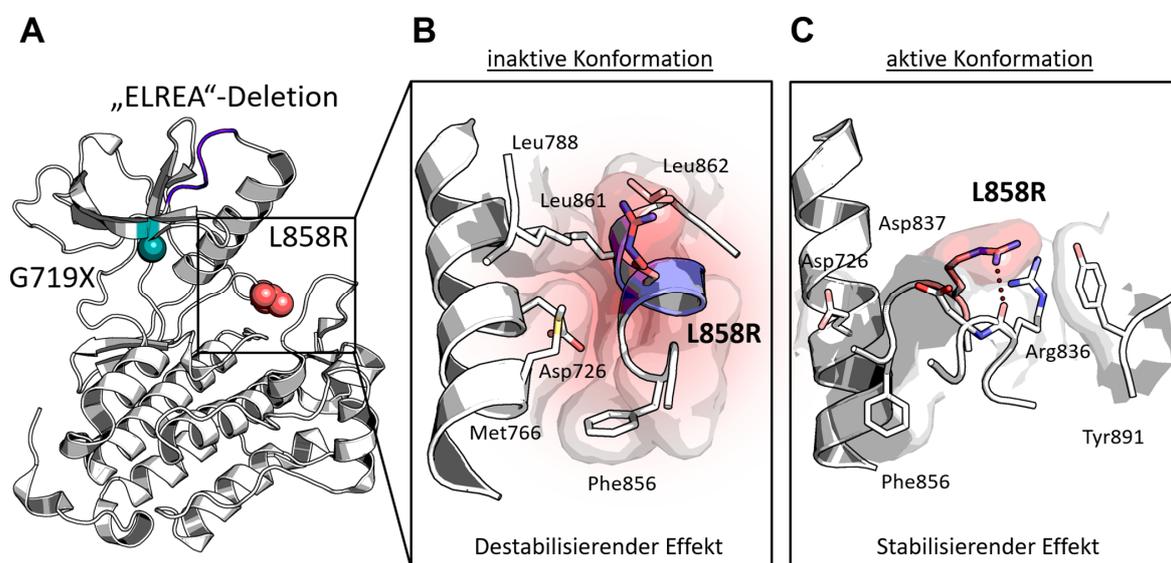


Abbildung 1.5: A) Darstellung der drei häufigsten EGFR-Aktivierungsmutationen innerhalb der Kinasedomäne im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (L858R-Punktmutation, rot; Exon 19 „ELREA“-Deletion, blau; G719X-Punktmutation, grün) (PDB-Eintrag: 2ITV). Der Aktivierungsmechanismus der L858R-Mutation ist größtenteils durch strukturelle Ursachen bedingt. Die L858R-Mutation in der Aktivierungsschleife destabilisiert die inaktive Kinasekonformation (B), während sie einen stabilisierenden Effekt auf die aktive Konformation (C) ausübt (PDB-Einträge: 1XKK und 2ITV). Die L858R-Mutation wurde durch Modellierung in die Struktur der inaktiven Konformation eingefügt.

In der inaktiven Konformation formt das Leu858 zusammen mit dem umliegenden Bereich des Aktivierungssegments eine kurze Helixstruktur und bildet einen

hydrophoben Komplex mit benachbarten lipophilen Aminosäuren (Met766, Leu788, Leu861 und Leu862), der die regulatorische α C Helix in ihrer inaktiven Konformation stabilisiert. Der Austausch des Leucins durch die räumlich anspruchsvolle und bei physiologischem pH-Wert positiv geladene Aminosäure Arginin bewirkt einen Bruch dieses hydrophoben Komplexes und resultiert in einer Destabilisierung der inaktiven Form. In der aktiven Konformation besetzt das Arginin hingegen eine polare Subtasche der N-terminalen Domäne und stabilisiert diesen Zustand über eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe des Peptidrückgrats von Arg836.⁶⁵ Diese strukturellen Veränderungen, ausgelöst durch den Austausch einer einzigen Aminosäure im gesamten EGF-Rezeptor, bewirken die Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts in Richtung der aktiven Konformation, was mit einer Erhöhung der Kinaseaktivität und letztendlich mit der Entstehung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms assoziiert ist. Die ebenso häufig auftretende Deletionsmutation im Exon 19 (DeLE746_A750) befindet sich in der Sequenz N-terminal der regulatorischen α C Helix (Abbildung 1.5). Auch wenn bisher noch keine Proteinkristallstruktur mit der Deletionsmutante gelöst werden konnte, zeigen Studien, dass die Verkürzung der Sequenz um die Aminosäuren Glu-Leu-Arg-Glu-Ala (ELREA) vermutlich zu einer Stabilisierung der aktiven α C Helix-*in*-Konformation und dadurch zur beobachteten Erhöhung der Kinaseaktivität führt. Weitere wiederholt auftretende Mutationen in der EGFR-Kinasedomäne sind eine Punktmutation im Exon 18 (G719X, X = Ser, Ala oder Cys) sowie diverse Exon 20 Insertionen die eine vergleichbare Wirkung auf die Aktivität der Kinasedomäne zeigen (Abbildung 1.5).⁶⁵ Die Aktivierungsmutationen in EGFR führen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber den kompetitiven EGFR-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib, die eine effektive Therapie ausgewählter Patientenpopulationen ermöglicht. Dadurch werden diese Mutationen in der Literatur auch häufig als *TKI-sensitizing mutations* beschrieben.⁶⁶ Eine valide Erklärung dafür lieferten kinetische Analysen der Mutationsvarianten EGFR-L858R und EGFR-DeLE746_A750, die eine reduzierte Affinität zu ATP (höherer ATP- K_m) und einen geringeren K_I für Erlotinib verglichen mit dem Wildtyp des EGF-Rezeptors zeigen.^{64, 67} Die Exon 20-Insertionen zeigen dagegen kein TKI-sensitives Verhalten.^{63, 65}

1.3 Zielgerichtete Tumortherapie und T790M-Wirkstoffresistenz

In klinischen Studien mit NSCLC-Patienten mit diagnostizierter Aktivierungsmutation in EGFR zeigten Gefitinib und Erlotinib eine eindrucksvolle Wirksamkeit mit Ansprechraten von über 70 % und einer Verdoppelung des progressionsfreien Überlebens (10 Monate) im Vergleich zur Standardchemotherapie.⁶⁸⁻⁷¹ Die Grundlage des hemmenden Effekts auf das Tumorwachstum und der Erfolg dieser EGFR-gerichteten Therapie basieren auf einem Phänomen, das als *oncogene addiction* bezeichnet wird und zum ersten Mal im Jahr 2000 von Bernard Weinstein formuliert wurde. Dieses Konzept beschreibt die Abhängigkeit der Tumorzellen von ihrem onkogenen Signal. Im Fall der NSCLC-Patienten mit EGFR-Aktivierungsmutationen ist das Wachstum und Überleben der mutierten Krebszellen direkt mit den überstimulierten EGFR-abhängigen Signalwegen verknüpft. Die gezielte Adressierung der onkogenen EGFR-Mutationsvariante führt zur Apoptose der mutierten Zellen und zur Hemmung des Tumorwachstums.⁷²⁻⁷⁴ Die neu entdeckten onkogenen Treibermutationen und die rationale Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe führten zu einem Wendepunkt in der Behandlung von NSCLC, in der in den letzten drei Jahrzehnten die Chemotherapie mit einer Kombination aus Cisplatin und Zytostatika die Standardbehandlung bei inoperablen Tumoren gewesen ist. Eine verbesserte Lebensqualität der Patienten durch die reduzierten Nebenwirkungen der TKI-Behandlung und der überlegende klinische Effekt leiteten die neue Ära der zielgerichteten Krebstherapie ein und prägten das Konzept der personalisierten Medizin in der NSCLC-Therapie. Bei diesem Behandlungskonzept erfolgt die Auswahl der Therapie nicht nur wie bisher aufgrund des histologischen Typs, sondern vor allem basierend auf onkogenen genetischen Läsionen jedes individuellen Patienten.⁷⁵ Die Tyrosinkinaseinhibitoren Gefitinib und Erlotinib stellen das Paradebeispiel der personalisierten Therapie dar und sind heutzutage als Erstmedikation (*first-line treatment*) von Patienten mit metastasiertem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und diagnostizierter Aktivierungsmutation in EGFR zugelassen.^{76, 77}

Die Exon 19 Deletion (Dele746_A750) sowie die L858R-Punktmutation sind dabei prädiktive Marker.

Die klinischen Resultate der zielgerichteten Tumorthherapie waren trotz anfänglicher Euphorie sehr ernüchternd. Sämtliche Patienten, die positiv auf eine TKI-Behandlung mit Gefitinib oder Erlotinib ansprachen, erlitten innerhalb weniger Monate ein durch Wirkstoffresistenzen bedingtes Rezidiv. Biopsien resistenter Tumore konnten in über 60 % der Patienten eine sekundäre Punktmutation (T790M) der Türsteheraminosäure in der Kinasedomäne von EGFR als Grund für die einsetzende Resistenz identifizieren.^{33, 78, 79} Durch den Austausch der Türsteheraminosäure Threonin durch ein Methionin verlieren die Wirkstoffe Gefitinib und Erlotinib vollständig ihre Wirkung und die Patienten erleiden einen Rückfall der Krebserkrankung. Der Grund dafür liegt in der Position des Türstehers im aktiven Zentrum, der Bindungsstelle der ATP-kompetitiven Inhibitoren. Das sterisch anspruchsvolle Methionin verhindert eine optimale Bindung der 4-Aminochinazolin-basierten Erstgenerationsinhibitoren an die Scharnierregion (Abbildung 1.6). Röntgenkristallstrukturen zeigen, dass der im Wildtyp von EGFR beobachtete Bindungsmodus von Gefitinib zu einer sterischen Abstoßung mit dem Met-Türsteher führen würde (Abbildung 1.6).⁸⁰⁻⁸³

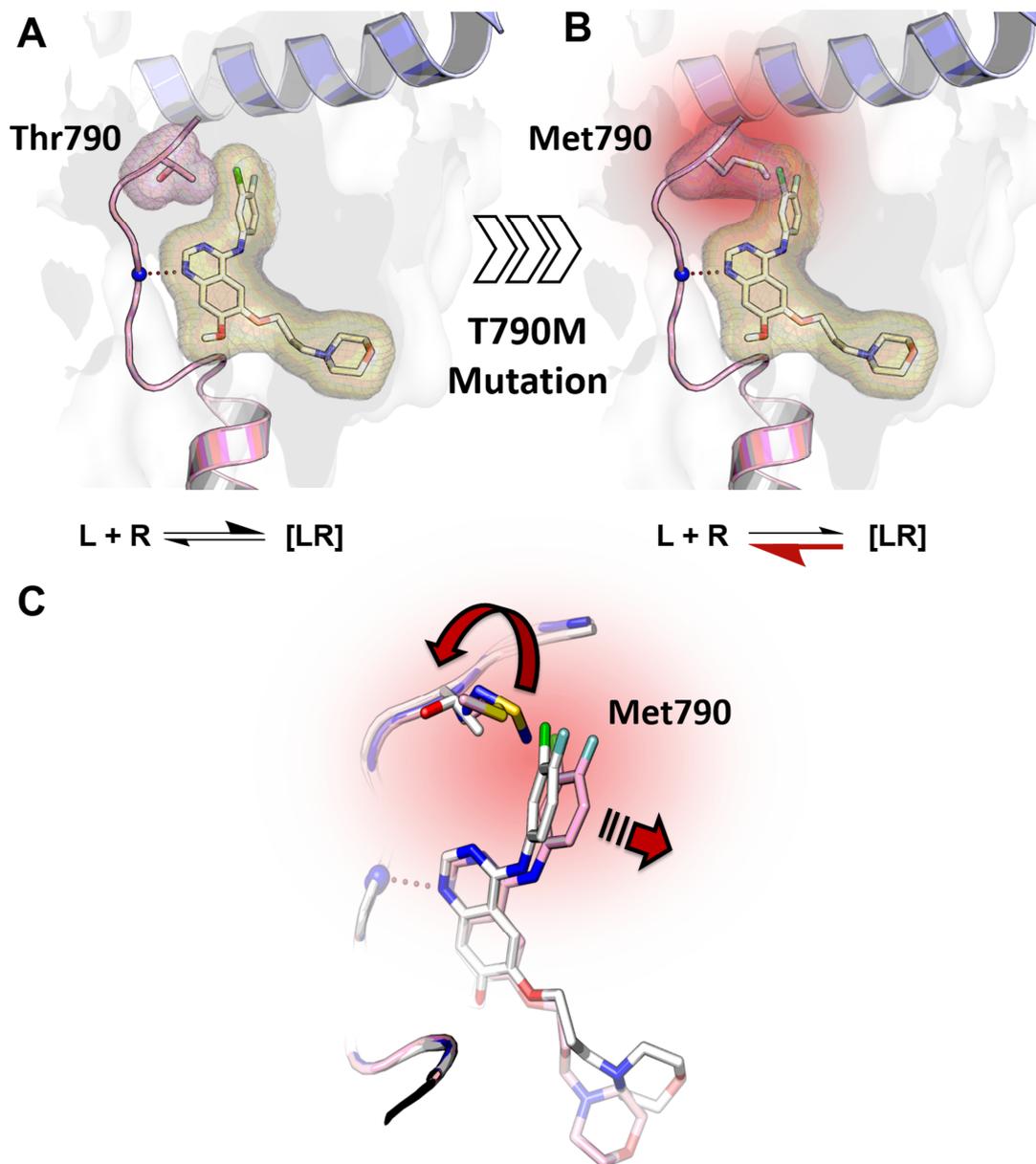


Abbildung 1.6: Strukturelle Grundlage der T790M-Wirkstoffresistenz im EGF-Rezeptor. **A)** Bindungsmodus des reversiblen EGFR-Erstgenerationeninhibitors Gefitinib im EGFR-Wildtyp (PDB-Eintrag: 2ITY). Das Gleichgewicht zwischen ungebundenem Rezeptor (R) mit frei vorliegendem Liganden (L) und dem reversiblen Rezeptor-Ligand-Komplex ([LR]) liegt bedingt durch die hohe Affinität von Gefitinib zur Kinase auf der Seite des [LR]-Komplexes. **B)** Die auftretende Türstehermutation T790M (PDB-Eintrag: 3UG1) verhindert eine optimale Bindung des Inhibitors an die Scharnierregion des EGF-Rezeptors (PDB-Eintrag: 2ITY). Das führt zu einer erhöhten Dissoziation des [LR]-Komplexes und somit zum Verlust der Wirksamkeit. **C)** Illustration der sterischen Abstoßung von Gefitinib durch die T790M-Türstehermutation. Der im Wildtyp von EGFR beobachtete Bindungsmodus von Gefitinib (weiß, PDB-Eintrag: 2ITY) würde zu einer sterischen Hinderung mit der Methioninseitenkette (blau, PDB-Eintrag: 3UG1) und zu einem ungünstigen Bindungsmodus führen (pink, PDB-Eintrag: 3UG2).

Neben der strukturellen Erklärung für die T790M-Wirkstoffresistenz wurde in verschiedenen Studien auch eine Änderung des ATP- K_m -Werts der EGFR-Mutante als zusätzliche Resistenzursache beschrieben. Während die L858R-Aktivierungsmutation zu einer reduzierten ATP-Affinität (höherer ATP- K_m -Wert) führt, stellt die T790M-Sekundärmutation die ursprüngliche Affinität wieder her. Ein unterschiedlicher ATP- K_m hat einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit ATP-kompetitiver Inhibitoren wie Gefitinib und Erlotinib.^{67, 84, 85} Neben der T790M-Mutation konnte eine Überaktivierung des PI3K-Signalweges durch cMet-Amplifikation als weiterer Resistenzmechanismus infolge der TKI-Behandlung aufgeklärt werden.⁸⁶ Wirkstoffresistenzen stellen generell eine große Herausforderung in der Entwicklung zielgerichteter Tumorthérapien dar.⁸⁷⁻⁸⁹ Besonders die Mutation des Türsteherrests zu einer sterisch anspruchsvolleren Aminosäure scheint ein weit verbreitetes Phänomen zu sein, das nicht nur in EGFR, sondern auch in anderen Proteinkinasen wie zum Beispiel in Bcr-Abl (T315I) und KIT (T670I) nach Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren beobachtet wird.^{35, 36, 90}

1.4 Kovalente Inhibitoren zur Umgehung der T790M-Resistenz

Eine zur Adressierung der Aktivierungsmutationen entwickelte zweite Generation an EGFR-Inhibitoren rückte aufgrund vielversprechender *in vitro* sowie *in vivo* Wirkung gegen EGFR mit T790M-Resistenz in den Fokus der Wirkstoffentwicklung.⁹¹⁻⁹⁴ Bei dieser Klasse handelt es sich um kovalente Inhibitoren, die einen Sonderfall der Kinaseinhibitoren darstellen und sich durch einen irreversiblen Bindungsmodus von den vier klassischen Kategorien (Typ I-IV) unterscheiden. Durch ein reaktives Elektrophil, zumeist ein Michaelakzeptor, sind kovalente Inhibitoren in der Lage mit nukleophilen Aminosäureseitenketten des Zielproteins, in der Regel Cystein, aber auch Lysin, eine kovalente Bindung auszubilden und die Kinaseaktivität irreversibel zu inhibieren (Abbildung 1.7).^{32, 95, 96}

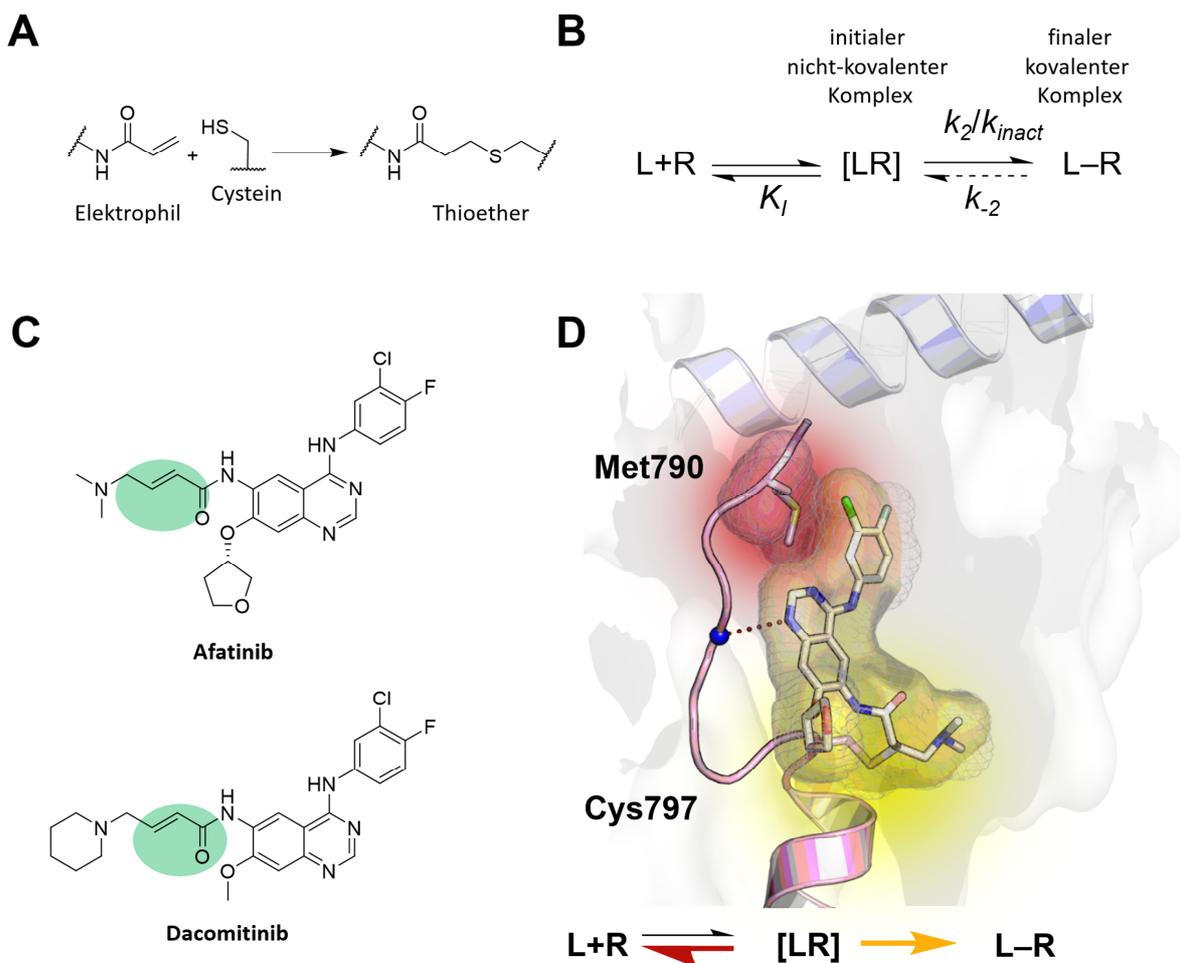


Abbildung 1.7: **A)** Schema der irreversiblen Modifikation eines Cysteins durch einen kovalenten Inhibitor über eine 1,4-Michaeladdition. Ein reaktives Elektrophil (Michaelakzeptor) reagiert mit einer Thiolgruppe eines Cysteins zu einem stabilen Thioether. **B)** Genereller Mechanismus eines zielgerichteten kovalenten Inhibitors. Der erste Schritt ist die Bildung des initialen nicht-kovalenten Rezeptor-Ligand-Komplexes ([LR]) aus dem frei vorliegendem Rezeptor (R) bzw. Liganden (L). Dieser Prozess wird durch den K_i (Inhibitionskonstante) beschrieben. Anschließend wird der finale kovalente Rezeptor-Ligand-Komplex (L-R) gebildet, dessen Bildungsgeschwindigkeit über den k_{inact} bzw. k_2 (Inaktivierungskonstante) ausgedrückt wird. **C)** Kovalente 4-Aminochinazolin-basierte Inhibitoren, die zu den EGFR-Inhibitoren der zweiten Generation gehören. Das reaktive Acrylamid ist grün hervorgehoben. **D)** Bindungsmodus der kovalenten EGFR-Zweitgenerationsinhibitoren am Beispiel von Afatinib. Die T790M-Türstehermutation bewirkt eine sterisch Abstoßung mit den 4-Aminochinazolinen mit der Seitenkette des Methionins und eine Dissoziation des reversiblen Rezeptor-Ligand-Komplexes [LR]. Daher ist die Ausbildung der kovalenten Bindung (Rezeptor-Ligand-Komplex, L-R) mit Cys797 unzureichend für eine effektive *in vivo* Wirkung (PDB-Eintrag: 4G5P).

Das Bindungsverhalten kovalenter Inhibitoren wird durch zwei Schritte charakterisiert (Abbildung 1.7). In einem initialen Schritt erfolgt eine reversible Bindung des Liganden (L) an den Rezeptor (R) zu einem nicht-kovalenten Rezeptor-Ligand-Komplex ([LR]), der wie bei reversiblen Inhibitoren auf der Affinität zum Zielprotein beruht und durch die Inhibitionskonstante (K_I) definiert ist. Ist der reversible Komplex ausreichend stabilisiert und das Elektrophil sowohl in räumlicher Nähe als auch in einer optimalen Orientierung zu einem reaktiven Nukleophil, erfolgt in einem zweiten Schritt die Ausbildung einer kovalenten Bindung zum Rezeptor (L-R), deren Bildungsgeschwindigkeit durch die Inaktivierungskonstante k_{inact} bzw. k_2 beschrieben wird. Durch diesen Prozess wird die Dissoziation des Inhibitors vom Rezeptor und die Kompetition mit ATP verhindert und dadurch die Verweildauer am Zielprotein maximiert. Die inhibierende Wirkung wird erst durch den Abbau und die Neusynthese des Zielproteins aufgehoben.⁹⁷ Die lange Verweildauer kovalenter Inhibitoren reduziert darüber hinaus die für eine effektive Wirksamkeit erforderliche Plasmakonzentration des Wirkstoffs im Patienten, wodurch unerwünschte Nebenwirkungen durch Bindungen an andere Proteine (*off-targets*) verringert werden. Zudem bringt die kovalente Adressierung selten vorkommender reaktiver Cysteine einen hohen Selektivitätsvorteil. Durch diese charakteristischen Eigenschaften kovalenter Inhibitoren repräsentieren diese, besonders im Bereich der Kinaseinhibitoren, eine immer attraktiver werdende Klasse in der Wirkstoffentwicklung.^{95, 98, 99}

Die kovalenten EGFR-Zweitgenerationsinhibitoren sind chemisch wie Gefitinib und Erlotinib von einem 4-Aminochinazolin abgeleitet und verfügen zudem über einen Michaelakzeptor als Elektrophil, der die Ausbildung einer kovalenten Bindung zu einem am C-terminalen Ende der Scharnierregion befindlichen Cystein in der ATP-Bindungstasche des EGF-Rezeptors ermöglicht (Abbildung 1.7).¹⁰⁰ Das Cys797 in EGFR ist ein in Kinasen nur sehr selten vorkommendes Strukturmerkmal (nur 10 von über 500 Kinasen besitzen ein analoges Cystein).^{101, 102} Durch die Lokalisation des Cysteins am Anfang einer α -Helix entsteht eine negative Polarisierung des Thiols, die zu einer Erhöhung dessen Nukleophilie und einer verbesserten Reaktivität hinsichtlich einer 1,4-Michaeladdition führt.¹⁰³

Die kovalenten EGFR-Zweitgenerationsinhibitoren, inklusive Afatinib und Dacomitinib konnten trotz vielversprechender *in vitro* Daten und kovalenter Inhibition der T790M-Mutationsvariante von EGFR jedoch keine ausreichende klinische Wirksamkeit in Patienten mit T790M-Wirkstoffresistenz erzielen (Abbildung 1.7).⁹¹⁻⁹⁴ In den klinischen Studien zeigten sich schwerwiegende Nebenwirkungen wie Hautausschlag und Diarrhö als Reaktion auf die Behandlung mit den EGFR-Zweitgenerationsinhibitoren. Die mit der Inhibition des EGFR-Wildtyps (*on-target*-Toxizität) assoziierten Symptome waren ausschlaggebend dafür, dass eine höhere Dosierung, die für eine effektive Wirkung erforderlich gewesen wäre, nicht verabreicht werden konnte.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Neben einer starken Inhibition des Wildtyps von EGFR war eine unzureichende Potenz gegen die T790M-Mutante entscheidend, was der Tatsache geschuldet war, dass die kovalenten 4-Aminochinazoline ursprünglich zur Inhibition der EGFR-Aktivierungsmutanten mit WT-Türsteher (Thr790) und nicht spezifisch für den Met-Türsteher der T790M-Wirkstoffresistenz entwickelt wurden.⁸⁰

Obwohl kovalente Inhibitoren eine irreversible Bindung zum Protein ausbilden können, ist der initiale reversible Schritt und die Bildung des nicht-kovalenten EGFR-Inhibitor-Komplexes nicht weniger entscheidend für eine effektive Wirksamkeit (Abbildung 1.7). Dessen Destabilisierung infolge einer sterisch anspruchsvollen T790M-Mutation wie im Fall der 4-Aminochinazoline der zweiten Generation an EGFR-Inhibitoren und einer damit assoziierten ungünstigeren Bindung führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung des ungebundenen Inhibitors und damit zu einer geringeren lokalen Konzentration des Michaelakzeptors am Zielprotein. Dadurch kommt es zu einer unzureichenden kovalenten Bindungsbildung, die in einer verminderten *in vivo* Wirksamkeit resultiert.^{80, 107-109} Das Resultat der klinischen Studie demonstrierte eindeutig, dass es nicht ausreichend ist einen schwachen Inhibitor mit einem Elektrophil zu versehen, sondern dass auch ein kovalenter Kinaseinhibitor spezifisch für ein bestimmtes Zielprotein entwickelt werden muss, um die Hürde der initialen Ausbildung des reversiblen Protein-Ligand Komplexes zu überwinden, die auch für die Bindung kovalenter Inhibitoren essentiell erscheint.

Im Jahr 2009 wurde mit dem Inhibitor WZ4002 von Zhou *et al.* aus der Arbeitsgruppe um Nathanael Gray erstmals ein T790M-selektiver kovalenter Kinaseinhibitor beschrieben, der sich in Mausstudien als hochwirksam gegen das EGFR-

T790M-abhängige Tumorwachstum erwies (Abbildung 1.8 A).^{110, 111} Die Verbindung WZ4002 beruht nicht auf einem klassischen 4-Aminochinazolin, sondern auf einem für die Adressierung von EGFR neuartigen Aminopyrimidin. Die Komplexstruktur in EGFR-T790M demonstrierte neben einer kovalenten Bindung zu Cys797 eine direkte Adressierung des Met-Türstehers über lipophile Wechselwirkungen durch einen Chlorsubstituenten (Abbildung 1.8 B).

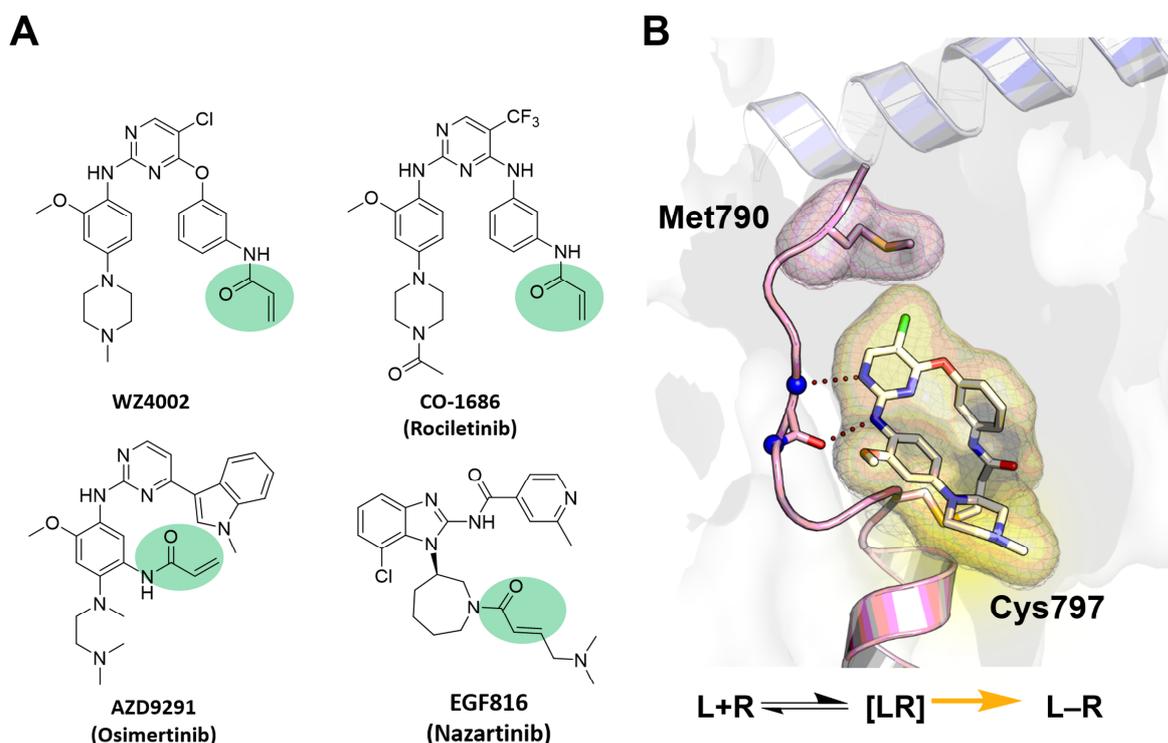


Abbildung 1.8: A) Kovalente Drittgenerationsinhibitoren des EGF-Rezeptors. Das reaktive Acrylamid ist grün hervorgehoben. B) Der Bindungsmodus des Drittgenerationsinhibitors WZ4002 veranschaulicht die Umgehung einer sterischen Abstoßung mit Met790 (PDB-Eintrag: 3IKA). Dadurch wird der reversible Rezeptor-Ligand-Komplex ([LR]) stabilisiert und eine effiziente kovalente Modifikation von Cys797 erreicht. Die damit einhergehende lange Verweildauer am Rezeptor erklärt die hohe und *in vitro* und *in vivo* Wirksamkeit dieser Klasse.

Durch das 5-Chloropyrimidin wird zudem ein sterischer Konflikt mit Met790 verhindert und die Affinität zum polaren Wildtyp-Türsteherrrest (Thr790) abgeschwächt, woraus das T790M-selektive Inhibitionsprofil resultiert.¹¹⁰ Durch den optimalen Bindungsmodus wird der reversible EGFR-Inhibitor-Komplex stabilisiert und eine effiziente kovalente Modifikation von Cys797 erreicht (Abbildung 1.8 B).

Die damit einhergehende lange Verweildauer am Rezeptor erklärt die hohe Wirksamkeit dieser Klasse *in vitro* und *in vivo*. WZ4002 zeigte als erster Inhibitor die wirkungsvolle Umgehung der T790M-Wirkstoffresistenz in EGFR und legte damit den Grundstein für eine dritte Generation an EGFR-Inhibitoren, die sich durch einen kovalenten Bindungsmodus und einer Met790-spezifischen Grundstruktur definiert. Die ersten Drittgenerationsinhibitoren, die in klinischen Studien zur gezielten Therapie von NSCLC-Patienten mit T790M-Wirkstoffresistenz getestet wurden, waren das von der WZ4002-Struktur abgeleitete CO-1686 (Rociletinib) der Firma Clovis Oncology, der Astrazeneca T790M-Inhibitor AZD9291 (Osimertinib) und später der Wirkstoff EGF816 (Nazartinib) von Novartis (Abbildung 1.8 A).¹¹²⁻¹¹⁴

2 Motivation und Zielsetzung

Der Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor, eine Rezeptortyrosinkinase aus der Familie der ErbB-Rezeptoren, spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation zellulärer Prozesse wie Proliferation, Zellüberleben und Apoptose. Eine Fehlregulation des EGF-Rezeptors ist mit der Entstehung diverser Krebserkrankungen, insbesondere Lungenkrebs assoziiert, was ihn zu einem der bedeutendsten Angriffsziele in der Krebstherapie macht. Somatische Aktivierungsmutationen in der Kinasedomäne des EGF-Rezeptors (u. a. L858R-Punktmutation und Exon 19 Deletion) bewirken eine gesteigerte EGFR-Kinaseaktivität und wurden als onkogene Treiber im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) identifiziert. Eine Inhibition der onkogenen EGFR-Mutationsvarianten steht im direkten Zusammenhang mit einer hemmenden Wirkung auf das Tumorstadium und stellt ein Musterbeispiel der zielgerichteten Tumorthherapie dar. NSCLC-Patienten mit diagnostizierter Aktivierungsmutation im EGF-Rezeptor können heutzutage effektiv mit den Erstgenerationeninhibitoren Gefitinib und Erlotinib behandelt werden. Die wirkungsvolle Therapie von Patienten basierend auf einer spezifischen onkogenen Läsion demonstriert das Potential der personalisierten Medizin. Neu erworbene Wirkstoffresistenzen stellen in der Entwicklung zielgerichteter Tumorthapien eine große Herausforderung dar. Ein häufig auftretender Resistenzmechanismus bei Tyrosinkinaseinhibitoren ist die Mutation der Türsteherposition zu einer sterisch anspruchsvolleren Aminosäure. NSCLC-Patienten entwickeln infolge einer TKI-Behandlung mit Gefitinib und Erlotinib in 60 % der Fälle eine Sekundärmutation des Türsteherrests (T790M), die zur vollständigen Wirkstoffresistenz und einem Rückfall der Krebserkrankung führt. Kovalente Kinaseinhibitoren, die durch irreversible Alkylierung des Cys797 über eine lange Verweildauer am EGF-Rezeptor verfügen, haben das Potential gezeigt die T790M-Wirkstoffresistenz zu umgehen. Bisherige T790M-spezifische Inhibitoren haben bewiesen, dass für eine effektive Inhibition von EGFR-T790M ohne *on-target*-Toxizität hervorzurufen, eine neue chemische Grundstruktur erforderlich ist, die nicht auf einem klassischen 4-Aminochinazolin beruht. Die klinischen Erkenntnisse der Erst- und Zweitgenerationeninhibitoren von EGFR zusammen mit strukturbiologischen Daten lieferten wertvolle Informationen für einen rationalen Ansatz zur Entwicklung

T790M-selektiver Kinaseinhibitoren. Das Ziel dieser Arbeit bestand daher in der Identifizierung und strukturbasierten Entwicklung neuer kovalenter T790M-spezifischer EGFR-Inhibitoren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte, ausgehend von der in einem phänotypischen Screen identifizierten Hit-Verbindung, eine Optimierung der kovalenten Bindungsbildung sowie eine spezifische Verbesserung der inhibitorischen Kinaseaktivität gegen die wirkstoffresistente T790M-Variante von EGFR realisiert werden. Dafür sollte zunächst durch rationales Design die Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek erfolgen. Eine biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften sollte Aufschluss über ein T790M-selektives Inhibitionsprofil geben. Dafür sollte die Substanzbibliothek mit einem aktivitätsbasierten Assaysystem auf ihre inhibitorische Kinaseaktivität gegen EGFR-Mutationsvarianten sowie gegen den Wildtyp von EGFR untersucht werden. Ein irreversibler Bindungsmodus der kovalenten Inhibitoren durch Alkylierung des Cys797 im EGF-Rezeptor sollte mittels massenspektrometrischer Experimente mit der isolierten Kinase nachgewiesen werden. Anders als bei reversiblen Inhibitoren, bei denen die Wirksamkeit üblicherweise über die mittlere inhibitorische Konzentration definiert wird, die auf dem Gleichgewicht zwischen ungebundenem Protein und einem reversiblen Protein-Inhibitor-Komplex beruht, unterliegen kovalente Substanzen nur bedingt diesem Gleichgewicht und erfordern zur vollständigen Charakterisierung eine Analyse der Bindungskinetik. Dazu sollten die kovalenten Substanzen hinsichtlich der kinetischen Parameter K_I und k_{inact} untersucht werden. Komplexstrukturen der kovalenten Inhibitoren sollten neben der Bestätigung des Bindungsmodus wertvolle Erkenntnisse über die Struktur-Aktivitäts-Beziehung liefern. Zur Analyse der Selektivität gegenüber anderen Proteinkinasen sollte durch eine Kinomprofilierung ein Selektivitätsprofil erstellt werden. Um zu überprüfen, ob sich die Aktivität in den biochemischen Assaysystemen in einen zellulären Kontext übertragen lässt, was in der Wirkstoffentwicklung häufig eine große Herausforderung darstellt, sollte der inhibitorische Effekt der Substanzen in relevanten NSCLC-Zelllinien untersucht werden. Zusätzlich sollte mit einer Profilierung ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften (ADME/DMPK) evaluiert werden, ob sie für *in vivo* Wirksamkeitsstudien geeignet sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in einem weiteren Projekt ein innovativer Ansatz zur Identifizierung neuer kovalenter Kinaseinhibitoren etabliert werden, der auf dem Prinzip der Zielprotein-kontrollierten Synthese (*target-guided synthesis*) aufbauen sollte. Dabei sollte zunächst eine Methode entworfen werden, die auf einer kovalenten Modifikation eines Zielproteins durch eine irreversibel bindende Sonde beruht. Durch nachfolgendes Screening gegen Fragmente einer Substanzbibliothek mit einer zur Sonde komplementären funktionellen Gruppe sollten neue potente Inhibitoren identifiziert werden. Die Detektion sollte über massenspektrometrische Analysen erfolgen. Für die Proteinkinase MKK7 als Modellsystem sollte basierend auf strukturellen Daten ein geeignetes kovalent bindendes Fragment entworfen und synthetisiert werden. Zur Evaluierung des Fragments als kovalente Sonde in MKK7 sollte eine irreversible Modifikation mittels MS-Experimenten nachgewiesen und ein kovalenter Bindungsmodus durch eine Komplexstruktur in MKK7 demonstriert werden. Zudem sollte eine Fragmentbibliothek hoher Diversität mit zur Sonde komplementärer funktioneller Gruppe erstellt und in einer *proof of concept*-Studie zur Identifizierung neuartiger kovalenter Inhibitoren eingesetzt werden.

3 Strukturbasierte Hit-Optimierung von EGFR-T790M-Inhibitoren

In einem phänotypischen Screen einer Substanzbibliothek mit über 1500 Kinaseinhibitoren gegen 80 genetisch charakterisierte Tumorzelllinien des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zeigte eine Verbindung einen starken Einfluss auf das Wachstum EGFR-abhängiger Zellen.ⁱ Neben der inhibitorischen Wirkung auf TKI-sensitiven Zelllinien (Aktivierungsmutationen in EGFR) konnte ein vergleichbarer Effekt in wirkstoffresistenten H1975-Zellen beobachtet werden, in denen im EGF-Rezeptor zusätzlich zu einer Aktivierungsmutation (L858R) die T790M-Resistenzmutation vorliegt. Bei der identifizierten Verbindung **1a** handelte es sich um einen kovalenten Inhibitor, der auf einem klassischen 4-Aminochinazolin-Grundgerüst basiert (Abbildung 3.1).¹¹⁵ Um aufzuklären, ob die beobachtete Aktivität mit einem möglichen kovalenten Bindungsmodus im Zusammenhang steht, wurde die Hit-Struktur **1a** im Komplex mit einer Variante der Tyrosinkinase cSrc-T338M/S345C (cSrc-DM), einem validierten Modellsystem für EGFR-T790M, kokristallisiert.^{i, 83, 116} Die Komplexstruktur in cSrc-DM zeigte einen für Chinazoline atypischen Bindungsmodus, bei dem der Inhibitor den Kontakt zur Scharnierregion nicht wie üblich über N1, sondern über das Aminopyrazol-Motiv herstellt (Abbildung 3.1). Die Interaktion erfolgt über drei Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat der Aminosäuren Glu339 und Met341. Die Phenylgruppe an C-2 des Chinazolins verhindert durch ihren sterischen Anspruch die klassische Wechselwirkung über N1 und induziert somit diesen untypischen Bindungsmodus. Der Inhibitor nimmt in dieser Konformation einen reversiblen Bindungsmodus ein, bei dem sich der Michaelakzeptor an C-7 des Chinazolins nicht in räumlicher Nähe des reaktiven Cysteins (Cys345) befindet, wodurch die Ausbildung einer kovalenten Bindung verhindert wird. Diese strukturbiochemische Erkenntnis lässt vermuten, dass der beobachtete inhibitorische Effekt gegen die wirkstoffresistente Mutante von EGFR nicht auf eine kovalente Inhibition zurückzuführen ist. Die Komplexkristallstruktur von **1a** zeigte keinen Hinweis auf eine sterische Abstoßung durch den Met-Türsteher

ⁱ Dissertation Matthäus Getlik, 2011, TU Dortmund

(Met790) und lieferte diverse Ansätze für eine Strukturoptimierung zur kovalenten Modifikation des Cysteins und weckte das Interesse an einer strukturbasierten Weiterentwicklung dieser Verbindung.

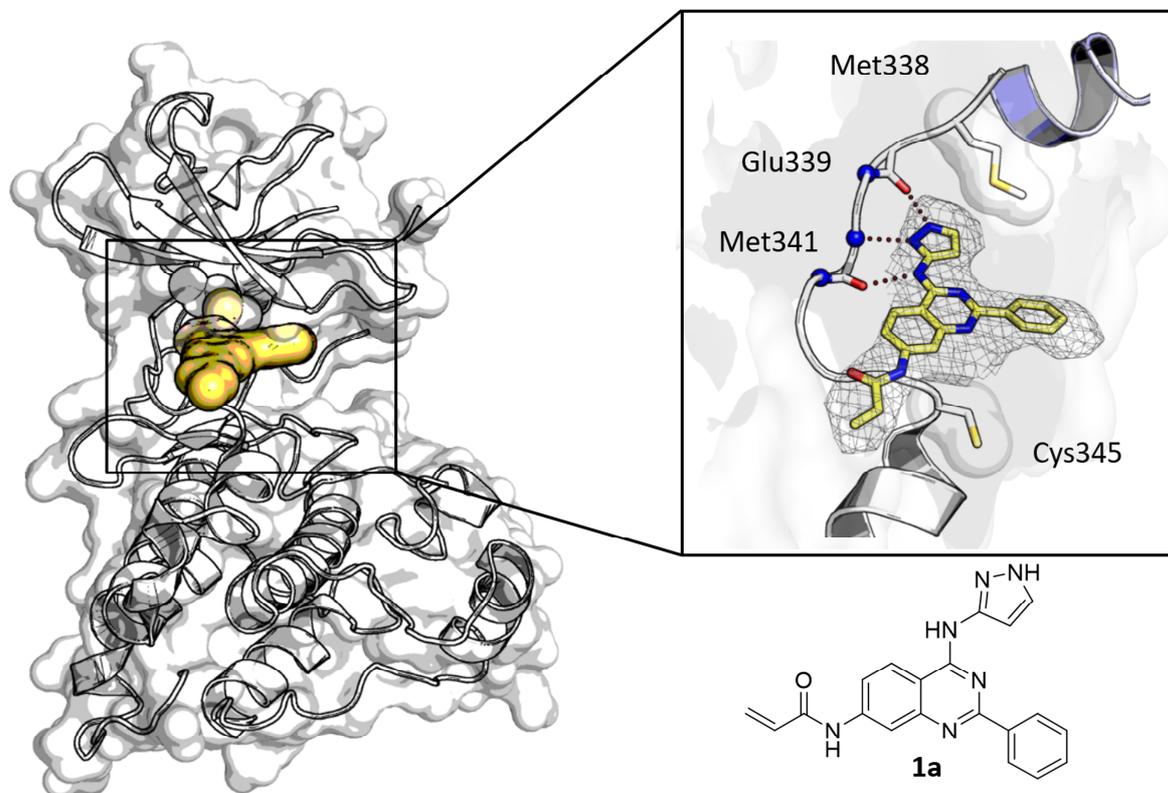


Abbildung 3.1: A) Komplexkristallstruktur der Hitstruktur **1a** aus dem phänotypischen Screen im Komplex mit cSrc-DM (T338M/S345C) (PDB-Eintrag: 5D12). Über ein 4-Aminopyrazol bildet **1a** zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den Carbonylgruppen von Glu339 und Met341 sowie eine zur Rückgrat-NH-Gruppe von Met341 aus. In dem Bindungsmodus ist das Elektrophil der ATP-Bindungstasche abgewandt und lösungsmittlexponiert, womit keine kovalente Modifikation von Cys345 möglich ist.

3.1 Rationales Design zur Hit-Optimierung von EGFR-T790M-Inhibitoren

Der durch die Röntgenkristallstruktur im Komplex mit cSrc-DM aufgedeckte reversible Bindungsmodus der Verbindung **1a** diente als Grundlage umfassender Modellierungsstudien.ⁱⁱ

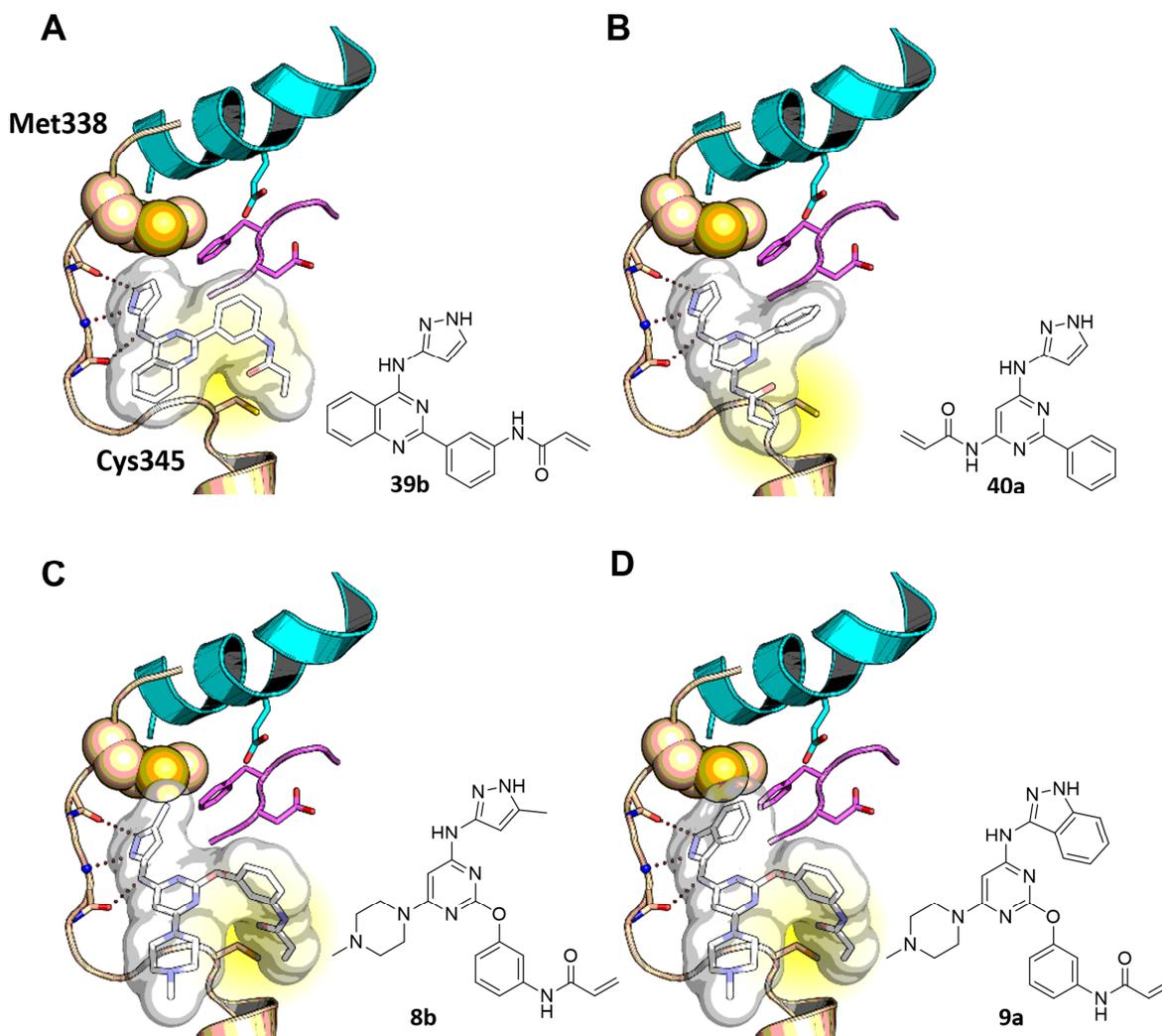


Abbildung 3.2: Modellierungsstudien verschiedener Inhibitor-Strukturen zur Evaluierung optimaler Bindungsgeometrien zwischen Elektrophil und Cys345. **A)** Chinazolin- (**39b**) und **B-D)** Pyrimidin-basierte Strukturen (**40a**, **8b** und **9a**) wurden durch Superposition in die Komplexstruktur von **1a** mit cSrc-DM (PDB-Eintrag: 5D12) modelliert (vgl. Tabelle 3.1, Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3). Interaktionen durch Wasserstoffbrückenbindungen sind durch rote Punkte illustriert.

ⁱⁱ Die Modellierungsstudien der Strukturen **39b** und **40a** wurden von Matthäus Getlik in der AG Rauh durchgeführt (Dissertation Matthäus Getlik, 2011, TU Dortmund).

Hierbei wurden optimale Bindungsgeometrien zwischen dem Elektrophil und dem kovalent zu adressierenden Cystein und mögliche lipophile Interaktionen des Liganden mit der Seitenkette der Met-Türsteheraminosäure evaluiert. Diverse chemische Grundgerüste und Substitutionsmuster wurden basierend auf Verbindung **1a** vorgeschlagen (Abbildung 3.2). Der Phenylrest in 2-Position von **1a** erwies sich laut Modellierung als geeigneter Knüpfungspunkt für das Elektrophil (Abbildung 3.2 A). Als alternatives Grundgerüst wurde ein Pyrimidin aufgrund seiner erhöhten Flexibilität und der damit einhergehenden verbesserten Bindungseigenschaften ausgewählt (Abbildung 3.2 B-D). Für ein Pyrimidin-basiertes Grundgerüst wurden zwei mögliche Verknüpfungspunkte des Michaelakzeptors identifiziert, um verschiedene Geometrien und Orientierungen des Elektrophils zu untersuchen. Das Elektrophil wurde in 4-Position direkt (Abbildung 3.2 B) oder in 2-Position über einen Phenylether (Abbildung 3.2 C, D) an das Pyrimidin geknüpft. Ein besonderes Augenmerk galt außerdem der Optimierung des Pyrazolsubstituenten, der nicht nur den Kontakt zur Scharnierregion herstellt, sondern auch eine mögliche lipophile Interaktion mit dem Met-Türsteherrest eingehen kann. Für verschiedene EGFR-Inhibitoren wurde bereits gezeigt, dass dieser Effekt einen wesentlichen Einfluss auf deren inhibitorische Aktivität und Mutantenselektivität haben kann.^{111, 117} Zur genaueren Untersuchung dieser Wechselwirkung sollte durch Derivatisierung der 4-Position mit Amino-5-Methylpyrazol (Abbildung 3.2 C) und Aminoindazol (Abbildung 3.2 D) der lipophile Charakter des 4-Substituenten (Aminopyrazol) erhöht werden, ohne den Kontakt zur Scharnierregion abzuändern. Modellierungsstudien ließen zudem erkennen, dass beide funktionelle Gruppen einen geeigneten Kompromiss in Bezug auf größtmöglicher lipophiler Wechselwirkung und sterischer Repulsion darstellen (Abbildung 3.2 C, D).

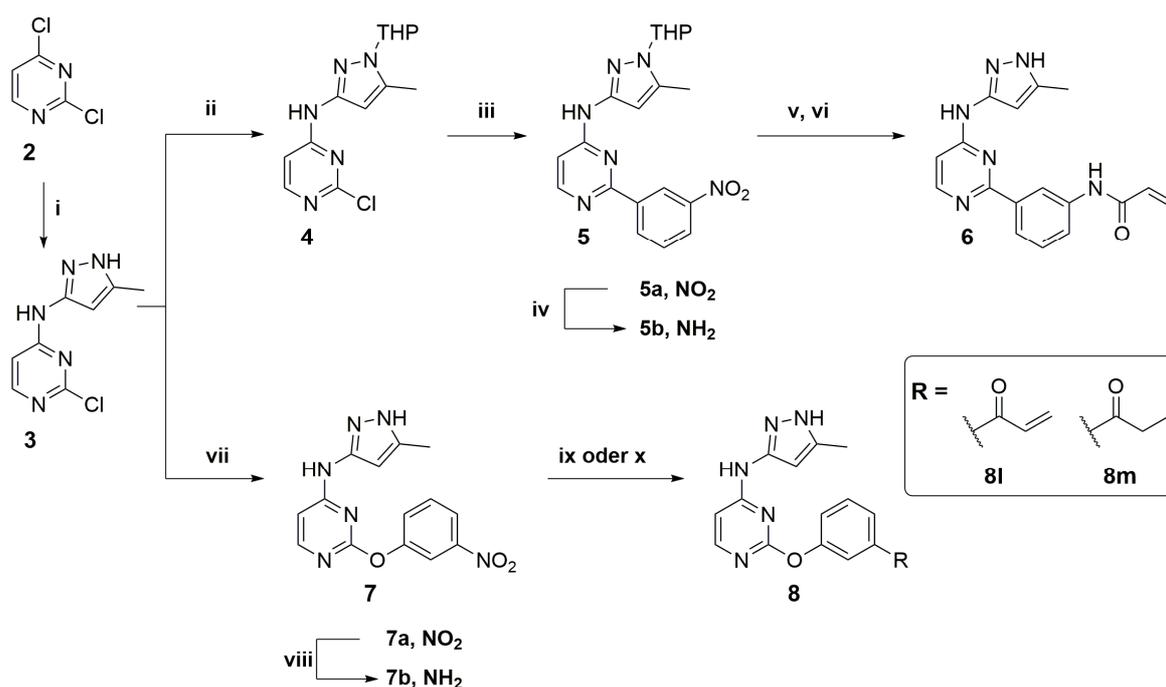
Zu den mit einem Michaelakzeptor versehenen kovalenten Verbindungen wurden zum direkten Vergleich die entsprechenden reversiblen Analoga hergestellt. Als Elektrophil wurde in erster Linie eine Acrylamidgruppe eingesetzt, für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie sich zur Alkylierung des Cys797 in EGFR eignet.¹¹⁰ Die Feinabstimmung der Reaktivität von Michaelakzeptoren spielt für kovalente Inhibitoren eine entscheidende Rolle, weshalb auch Acrylamid-Derivate mit einem zusätzlichen elektronenziehenden Rest (CF₃-Gruppe) zur Erhöhung der Reaktivität

synthetisiert wurden. Die Modifikation des Acrylamids mit einem zusätzlichen Dimethylamin zeigte für einige kovalente EGFR-Inhibitoren ebenfalls Auswirkung auf die Wirksamkeit (z. B. Afatinib). Hierbei soll die positive Wirkung nicht durch einen elektronischen Effekt, sondern durch eine intramolekulare basenkatalysierte 1,4-Michaeladdition hervorgerufen werden.¹¹⁸ Um zu überprüfen, ob sich dieser Einfluss auch auf die Serie der Pyrimidine übertragen lässt, wurden diese Acrylamid-Derivate ebenfalls dargestellt und in die Substanzbibliothek aufgenommen.

3.2 Synthese von Pyrimidin-basierten Kinaseinhibitoren

Zur Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek wurden vier verschiedene Syntheserouten etabliert.

Schema 3.1: Synthese der Pyrimidine **6** und **8l-8m**.

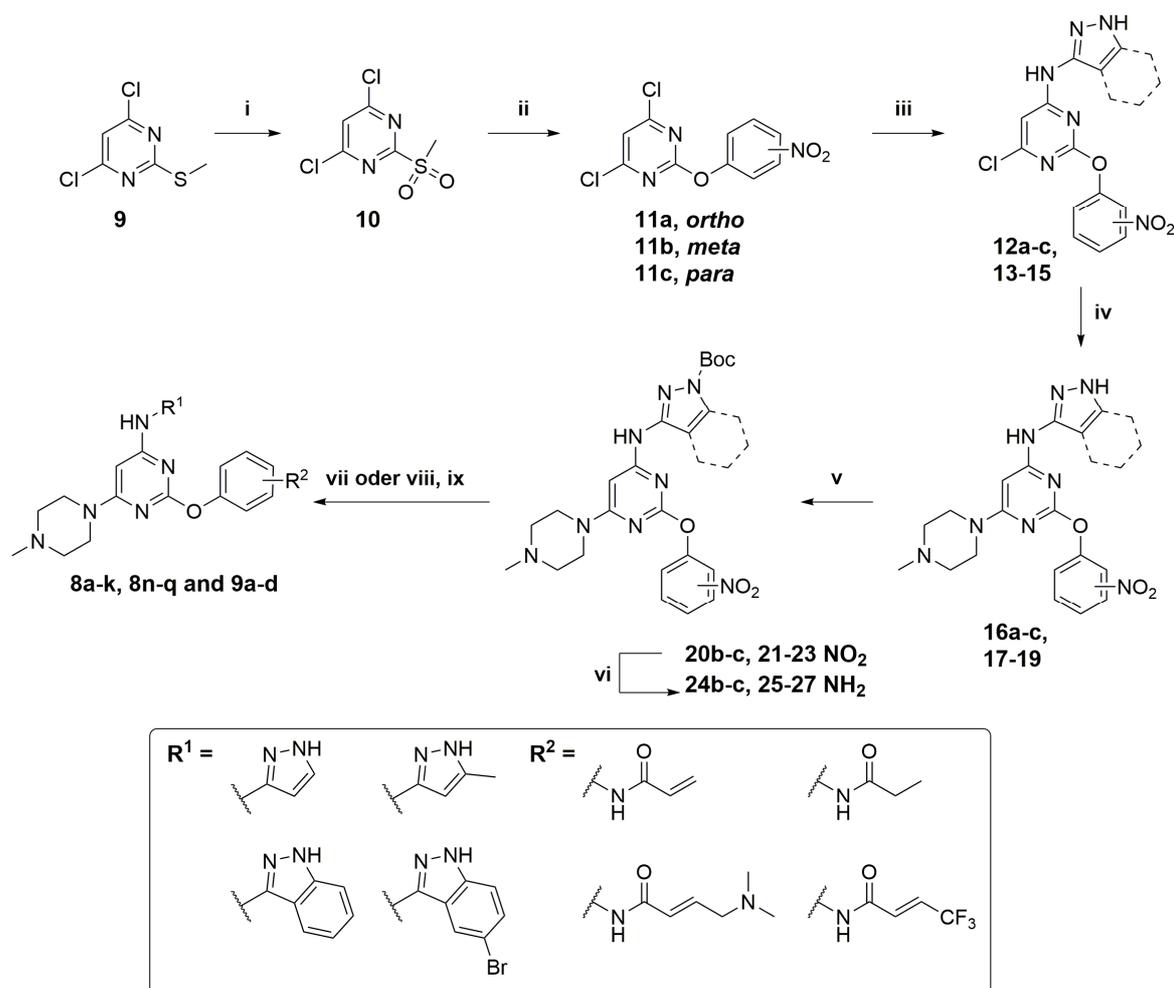


^a Reagenzien und Bedingungen: (i) 5-Methyl-1H-pyrazol-3-amin, DIPEA, DMF, 90 °C, 54 %; (ii) DHP, pTsOH, THF, 90 °C, 64 %; (iii) (3-Nitrobenzol)boronsäure, Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, DME/EtOH (4:1), 150 °C, μ w; 70 %; (iv) Ammoniumformiat, Pd/C, EtOH, 90 °C, quant.; (v) Acryloylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C; (vi) TFA in DCM, RT, 73 % (2 Schritte); (vii) 3-Nitrophenol, K₂CO₃, DMF, 140 °C, 20 %; (viii) Ammoniumformiat, Pd/C, EtOH, 90 °C, 91 %; (ix) Acryloylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C, 26 %; (x) Propionylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C, 27 %.

Die Darstellung der Pyrimidine **6** und **8l-m** erfolgte nach Schema 3.1. Im initialen Schritt wurde 2,4-Dichloropyrimidin (**2**) an 4-Position mit 3-Methyl-1*H*-pyrazol-5-amin dekoriert und somit das Intermediat **3** aufgebaut. Für die weitere Synthese des C-C-verknüpften Pyrimidin-Derivats und die anstehende Kreuzkupplung unter Suzuki-Bedingungen war zunächst eine Schützung des Pyrazolamins erforderlich, bei der sich Tetrahydropyran als eine geeignete Schutzgruppe herausstellte. Anschließend konnte die Dekoration der 2-Position des Pyrimidins mit 3-Nitrobenzol über eine Suzuki-Kupplung erfolgen. Die anschließende palladiumkatalysierte Reduktion der Nitrogruppe zum korrespondierenden Anilin, mit Palladium auf Aktivkohle und Ammoniumformiat, führte zu **5b**. Im letzten Schritt erfolgte die Anbringung des Michaelakzeptors an das Molekül durch Umsetzung von **5b** mit Acryloylchlorid unter basischen Bedingungen zum entsprechenden Acrylamid. Die Entschützung der THP-Schutzgruppe durch sukzessive Behandlung des entstandenen Rohprodukts mit 25 % TFA in DCM lieferte den finalen kovalenten Inhibitor **6**. Die Synthese der Verbindung **8l**, bei der das Elektrophil nicht über eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung, sondern über ein Phenylether mit dem Pyrimidin verbunden ist, erfolgte ebenfalls über das Intermediat **3**. Dessen Umsetzung mit 3-Nitrophenol unter basischen Bedingungen lieferte die Verbindung **7a**. Im Anschluss erfolgte die Reduktion der Nitrogruppe zum korrespondierenden Anilin **7b** unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle. Die Umsetzung des entstandenen Anilins mit den jeweiligen Säurechloriden zum entsprechenden Acrylamid bzw. Propionamid lieferte die kovalente Verbindung (**8l**) und deren reversibles Analogon (**8m**).

Die allgemeine Syntheseroute, illustriert in Schema 3.2, wurde zur Synthese der 2,4,6-substituierten Pyrimidine **8a-k**, **8n-q** und **9a-d** etabliert.ⁱⁱⁱ

ⁱⁱⁱ Die Synthese der Substanzen **8a-k** erfolgte bereits im Zuge der Masterarbeit „Synthese und biochemische Charakterisierung kovalenter Kinaseinhibitoren zur Umgehung der Wirkstoffresistenz T790M in EGFR“ (Julian Engel, 2011, TU Dortmund). Die Verbindungen **9a-e** und **38** wurden arbeitsgruppenintern von Dr. Stefano Tomassi synthetisiert. Weitere Verbindungen wurden von Jasmin Krüll (**8l-m**), Niklas Uhlenbrock (**6**) und Niklas Schaumann (**8n-o**) im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten hergestellt.

Schema 3.2: Synthese der Pyrimidine **8a-k**, **8n-q** und **9a-d**.

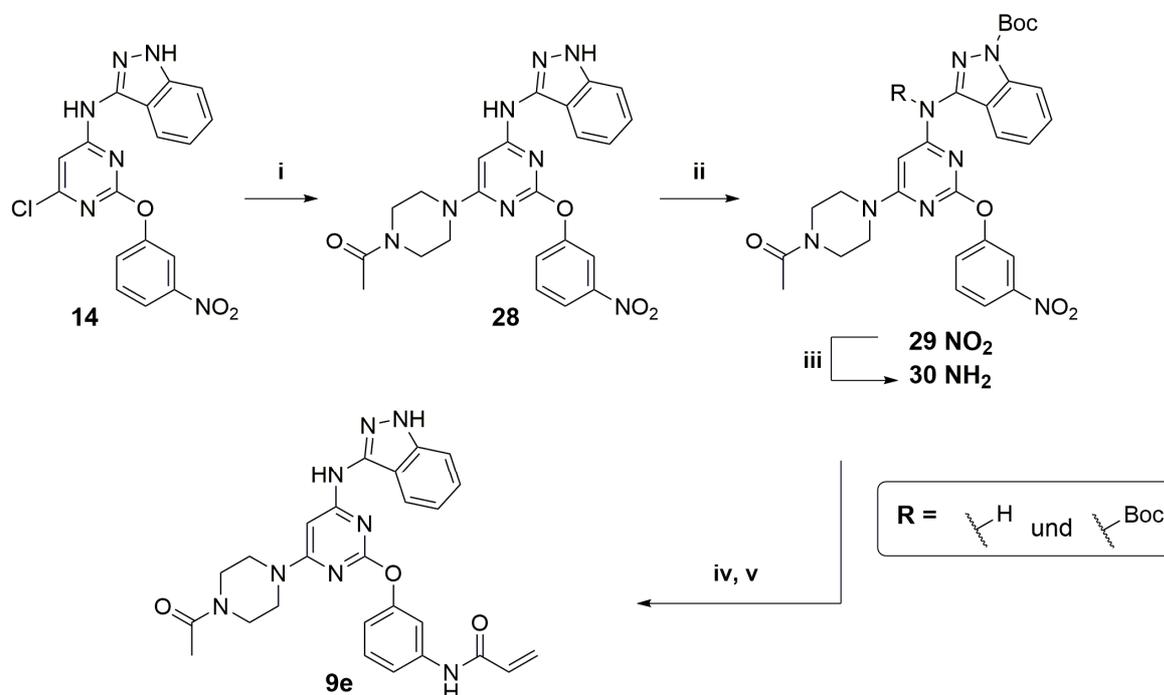
^a Reagenzien und Bedingungen: (i) *m*CPBA, DCM/THF, 0 °C – RT, 86 %; (ii) Nitrophenol, NaH, THF, 0 °C – RT, 29–84 %; (iii) Amin, DIPEA, NaI, DMF, 85–110 °C, 60–82 %; (iv) 1-Methylpiperazin, 110 °C, 62–82 %; (v) Boc₂O, Et₃N, MeOH, RT bzw. Boc₂O, Cs₂CO₃, THF, RT, 56–95 %; (vi) Ammoniumformiat, Pd/C, EtOH bzw. EtOAc, 90 °C, 48–87 %; (vii) Acryloyl bzw. Propionylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C; (viii) (*E*)-4-(Dimethylamino)but-2-ensäure oder (*E*)-4,4,4-Trifluorobut-2-ensäure, EDC, HOBt, DIPEA, DCM, RT bzw. (*E*)-4-(Dimethylamin)but-2-ensäure, Oxalylchlorid, DMF (kat.), THF, RT; (ix) TFA in DCM, RT, 33–95 % (2 Schritte).

Im ersten Schritt wurde 4,6-Dichloro-2-(methylthio)pyrimidin (**9**) unter Verwendung von *m*CPBA zum entsprechenden Sulfon (**10**) oxidiert. Die entstandene Sulfongruppe an 2-Position des Pyrimidins ermöglichte im nachfolgenden Schritt eine selektive nukleophile aromatische Substitution mit *ortho*-, *meta*- oder *para*-substituierten Nitrophenol-Derivaten, die zu den Intermediaten **11a-c** führte.

Die Substitution eines der aromatischen Chloratome mit Aminopyrazol, respektive Aminoindazol, führte zu den Verbindungen **12a-c** und **13-15**, die im nachfolgenden Schritt unter Verwendung von 1-Methylpiperazin an der 6-Position des Pyrimidins weiter zu **16a-c** und **17-19** derivatisiert wurden. Die Dekoration der Pyrazole bzw. Indazole mit einer Boc-Schutzgruppe führte zu **20b-c** und **21-23**. Anschließende Reduktion der aromatischen Nitrogruppe unter Einsatz von Pd/C und Ammoniumformiat führte zu den korrespondierenden Aminen **24b-c** und **25-27**. Im letzten Schritt erfolgte die Dekoration dieser Amine mit Michaelakzeptoren unter Verwendung von Säurechloriden bzw. Carbonsäuren unter Standard-Amidkuppelungsbedingungen (EDC/HOBt) zu **8a-c**, **8n**, **9a** und **9c-e**. Die reversiblen Analoga wurden mit Propionylchlorid zu den entsprechenden Propionamiden (**8d-f**, **8o** und **9b**) umgesetzt.

Zur Darstellung des mit einem acetylierten Piperazin dekorierten Pyrimidins **9e** musste die Syntheseroute modifiziert werden (Schema 3.3).

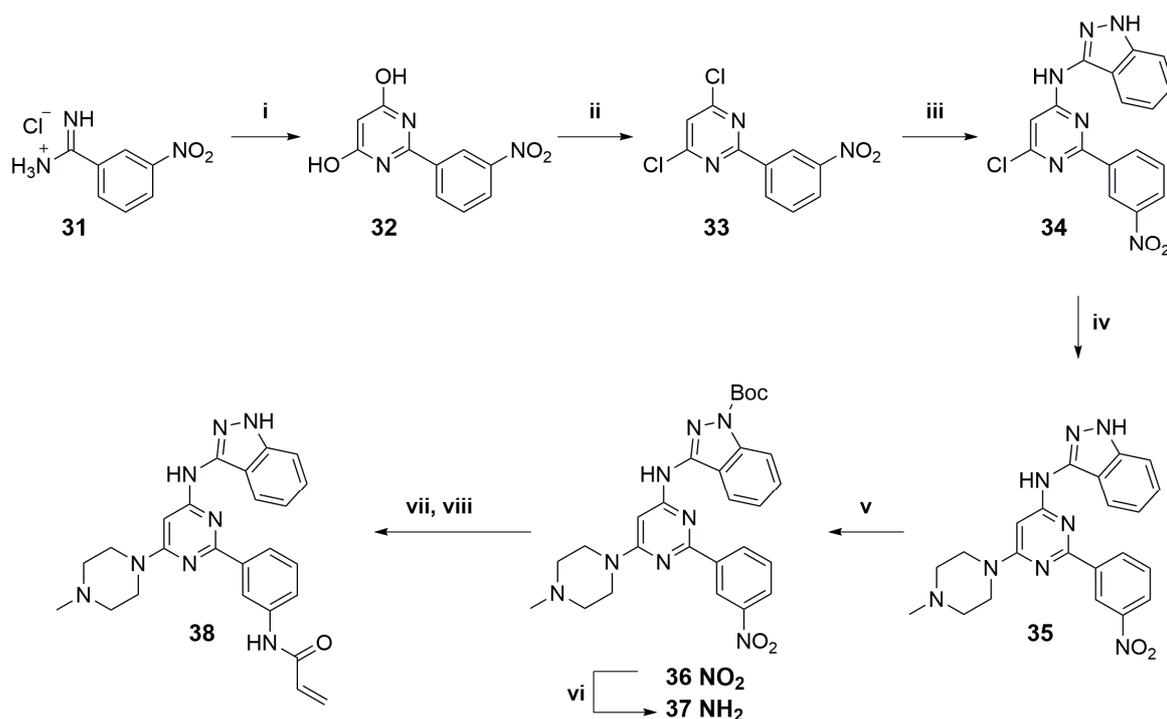
Schema 3.3: Synthese des acetylierten Pyrimidin-Derivats **9e**.



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) 1-(Piperazin-1-yl)ethan-1-on, NaI, DMF, 110 °C, 70 %; (ii) Boc₂O, Cs₂CO₃, THF, RT, 70 %; (iii) Ammoniumformiat, Pd/C, EtOAc, 90 °C, 88 %; (iv) Acryloylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C - RT; (v) TFA in DCM, RT, 75 % (2 Schritte).

Dabei wurde das Schlüsselintermediat **14** nicht mit einem methylierten sondern mit einem acetylierten Piperazin zur Verbindung **28** umgesetzt. Die anschließende Boc-Schätzung lieferte ein Gemisch aus Mono- und Di-Boc-geschütztem Indazol (**29**), was sich jedoch nicht auf die darauffolgende Reduktion mit Pd/C und Ammoniumformiat auswirkte. Die Umsetzung des resultierenden Amins **30** mit Acryloylchlorid zum Acrylamid und die anschließende Boc-Abspaltung mit TFA in DCM lieferte das finale Produkt **9e**. Zur Darstellung des an 2-Position C-C-verknüpften Pyrimidins **38** musste eine neue Syntheseroute etabliert werden, bei der im ersten Schritt das heterocyclische Pyrimidin ausgehend von 3-Nitrobenzimidamid unter Verwendung von Malonsäurediethylester unter stark basischen Bedingungen aufgebaut wurde (Schema 3.4).

Schema 3.4: Synthese des C-C-verknüpften Pyrimidin-Derivats **38**.



^a Reagenzien und Bedingungen: (i) Malonsäurediethylester, DBU, DMF, 90 °C, 90 %; (ii) *N,N*-Diethyl anilin, POCl₃, Reflux, 41 %; (iii) Aminopyrazol, NaI, DIPEA, DMF, 100 °C, 66 %; (iv) 1-Methylpiperazin, 110 °C, 73 %; (v) Boc₂O, Cs₂CO₃, THF/DCM, RT, 95 %; (vi) Ammoniumformiat, Pd/C, EtOAc, 90 °C, 97 %; (vii) Acryloylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C – RT; (viii) TFA in DCM, RT, 60 % (2 Schritte).

Die umgehende Chlorierung des entstandenen Diols (**32**) mit POCl_3 lieferte das Intermediat **33**. Ausgehend von **33** erfolgte die sukzessive Substitution der Chloratome in 4- und 6-Position zunächst mit Aminoindazol und anschließend mit 1-Methylpiperazin. Wie bereits in Schema 3.2 beschrieben musste das Indazol (**35**) ebenfalls mit einer Boc-Schutzgruppe versehen werden, um im letzten Schritt eine selektive Addition des Michaelakzeptors zu gewährleisten. Die aromatische Nitrogruppe der Boc-geschützten Verbindung **36** konnte anschließend palladiumkatalysiert zum entsprechenden Anilin (**37**) reduziert werden. Im finalen Schritt erfolgte die Umsetzung mit Acryloylchlorid zum Acrylamid. Nachfolgende Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure in DCM lieferte das kovalente Derivat **38**. Synthesen zur Herstellung der Chinazoline (**1a-b**, **39a-f**) und der Pyrimidine (**40a-b**) stammen aus Vorarbeiten und wurden von Matthäus Getlik durchgeführt.^{iv} Detaillierte synthetische Vorschriften aller finalen Produkte sowie Zwischenstufen sind im experimentellen Teil (siehe Kapitel 8.1.3) aufgeführt.

3.3 Biochemische Charakterisierung der Chinazoline und Pyrimidine

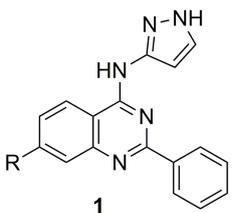
Die gesamte Chinazolin- und Pyrimidin-basierte Substanzkollektion wurde auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber der Wildtypform von EGFR und deren Mutationsvarianten EGFR-L858R und EGFR-L858R/T790M mit Hilfe des aktivitätsbasierten Testsystems KinEASE™ (Cisbio) untersucht (Tabelle 3.1, Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3).^v Die Bestimmung der Aktivität erfolgt hierbei durch Quantifizierung der Phosphorylierung eines artifiziellen Peptidsubstrats durch die zu untersuchende Kinase mittels zeitaufgelösten Förster-Resonanzenergietransfer in An- und Abwesenheit eines Inhibitors (siehe Kapitel 8.2).^{vi}

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

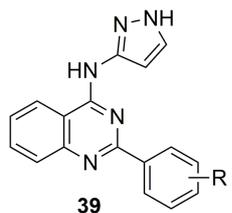
^v Die biochemische Charakterisierung der Chinazoline (**1a-b**, **39a-f**) und der Pyrimidine (**40a-b**) erfolgte bereits im Zuge der Dissertation von Matthäus Getlik an der TU Dortmund. Die Pyrimidine (**8a-k**) wurden im Rahmen der Masterarbeit „Synthese und biochemische Charakterisierung kovalenter Kinaseinhibitoren zur Umgehung der Wirkstoffresistenz T790M in EGFR“ (Julian Engel, 2011, TU Dortmund) durchgeführt.

^{vi} Die IC_{50} -Bestimmungen erfolgten arbeitsgruppenintern von Simone Eppmann und Andreas Arndt.

Tabelle 3.1: IC₅₀-Bestimmungen für die Chinazolin-Derivate gegenüber EGFR.



1



39

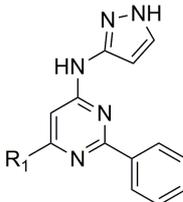
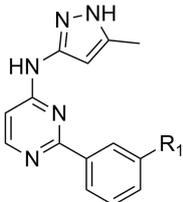
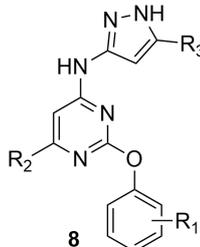
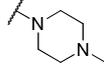
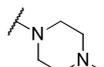
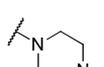
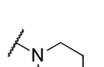
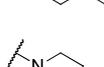
	R	EGFR IC ₅₀ (μM)		
		WT	L858R	L858R/T790M
1a		> 10	1.9 ± 0.3	2.2 ± 0.1
1b		> 10	2.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1
39a	<i>ortho</i> 	> 10	2.7 ± 0.9	1.1 ± 0.1
39b	<i>meta</i> 	1.1 ± 0.2	0.5 ± 0.03	0.1 ± 0.02
39c	<i>para</i> 	> 10	> 10	> 10
39d	<i>ortho</i> 	> 10	> 10	> 10
39e	<i>meta</i> 	3.7 ± 0.2	1.9 ± 2.8	0.4 ± 0.1
39f	<i>para</i> 	> 10	> 10	> 10
Gefitinib		< 0.001	< 0.001	0.1 ± 0.04
WZ4002		0.01 ± 0.07	< 0.001	< 0.001
Rociletinib		0.002 ± 0.0005	0.002 ± 0.0002	0.003 ± 0.0006
Osimertinib		0.002 ± 0.0002	0.001 ± 0.0005	< 0.001

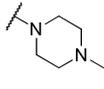
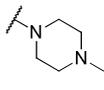
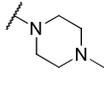
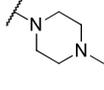
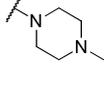
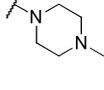
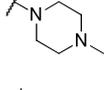
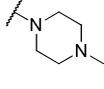
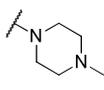
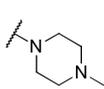
Die Substanzbibliothek umfasste 8 Chinazoline und 25 Pyrimidine. Die mit einem Acrylamid dekorierte Hit-Verbindung **1a** zeigte eine ähnlich potente Wirkung gegen die EGFR-Mutationsvarianten L858R und L858R/T790M wie ihr reversibles Analogon **1b** (IC₅₀ ~ 2.0 μM) und bestätigte somit den in der Komplexkristallstruktur beobachteten reversiblen Bindungsmodus (Tabelle 3.1). Die weiteren kovalenten Chinazoline **39a-c** variieren ausschließlich im Substitutionsmuster des Elektrophils am 2-Phenylrest. Die Substanzen **39d-f** wurden als Kontrollverbindungen hergestellt und repräsentieren deren reversible Analoga. **39b** und **39e** zeigten eine deutlich verbesserte Inhibition der Kinaseaktivität in sämtlichen EGFR-Varianten.

Es wurden IC₅₀-Werte von 1.1 μM (WT), 0.5 μM (L858R) und 0.1 μM (L858R/T790M) für **39b** und 3.7, 1.9 und 0.4 μM für **39e** beobachtet. Die nur geringfügig unterschiedliche Wirkung der beiden Verbindungen deutete auf einen reversiblen

Bindungsmodus hin. Die Verbindungen mit dem jeweiligen Acrylamid/Propionamid in *ortho*- bzw. *para*-Position (**39a/39d** und **39c/39f**) zeigten kaum Aktivität. **39a** präsentierte sich mit einer zumindest moderaten Inhibition von EGFR-L858R (2.8 μM) und EGFR-L858R/T790M (1.1 μM) als Ausnahme. Der Wechsel zum weniger raumgreifenden und flexibleren Pyrimidin-Grundgerüst anstelle eines Chinazolins zeigte vergleichbare IC_{50} -Werte (0.9, 0.8 und 0.3 μM), obwohl das Elektrophil nicht wie bisher an der 2-Position des Phenylrings (**39a-f**), sondern an der 6-Position des Pyrimidins angebracht wurde (**40a**) (Tabelle 3.2). Der reversible Vertreter (**40b**) zeigte jedoch keine signifikante Inhibition von EGFR und lieferte ein erstes Indiz für einen kovalenten Bindungsmodus der Michaelakzeptor dekorierten Derivate

Tabelle 3.2: IC_{50} -Bestimmungen für die Pyrimidin-Derivate gegenüber EGFR.

				EGFR IC_{50} (μM)		
				WT	L858R	L858R/T790M
40a		-	-	0.9 \pm 0.1	0.8 \pm 0.2	0.3 \pm 0.07
40b		-	-	> 10	3.4 \pm 2.5	> 10
6		-	-	> 10	2.8 \pm 0.7	2.5 \pm 0.4
8a	 <i>ortho</i>		CH ₃	0.9 \pm 0.3	0.6 \pm 0.3	2.1 \pm 0.8
8b	 <i>meta</i>		CH ₃	> 10	0.03 \pm 0.08	0.5 \pm 0.3
8c	 <i>para</i>		CH ₃	3.1 \pm 0.8	1.8 \pm 1.10	2.4 \pm 0.9
8d	 <i>ortho</i>		CH ₃	> 10	>10	> 10
8e	 <i>meta</i>		CH ₃	> 10	1.9 \pm 1.2	> 10

8f	 <i>para</i>		CH ₃	> 10	1.9 ± 0.5	0.7 ± 0.1
8g	NO ₂ <i>ortho</i>		CH ₃	> 10	1.9 ± 0.3	1.6 ± 0.3
8h	NO ₂ <i>meta</i>		CH ₃	3.9 ± 0.8	2.3 ± 0.8	0.6 ± 0.2
8i	NO ₂ <i>para</i>		CH ₃	> 10	1.8 ± 0.3	0.9 ± 0.1
8j	NH ₂ <i>meta</i>		CH ₃	> 10	> 10	4.9 ± 1.3
8k	NH ₂ <i>para</i>		CH ₃	> 10	2.1 ± 0.6	1.4 ± 0.4
8l		H	CH ₃	> 10	1.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2
8m		H	CH ₃	> 10	> 10	> 10
8n	 <i>meta</i>		H	> 10	2.0 ± 0.04	1.9 ± 0.6
8o	 <i>meta</i>		H	> 10	> 10	> 10
8p	 <i>para</i>		CH ₃	1.7 ± 0.6	1.8 ± 0.8	> 10
8q	 <i>para</i>		CH ₃	2.0 ± 1.3	2.1 ± 1.0	1.5 ± 0.3
Gefitinib				< 0.001	< 0.001	0.1 ± 0.04
WZ4002				0.01 ± 0.07	< 0.001	< 0.001
Rociletinib				0.002 ± 0.0005	0.002 ± 0.0002	0.003 ± 0.0006
Osimertinib				0.002 ± 0.0002	0.001 ± 0.0005	< 0.001

Auf Grundlage der Modellierungsstudien wurden, zur Optimierung der Ausrichtung des Elektrophils hinsichtlich Cys797, Derivate mit einem Michaelakzeptor in 2-Position des Phenyls hergestellt (**6**).

Zudem sollte eine Methylgruppe an 5-Position des Pyrazols zusätzliche lipophile Interaktionen mit der Met-Türsteheraminosäure (Met790) in der T790M-Mutationsvariante von EGFR induzieren, um eine Selektivität gegenüber der

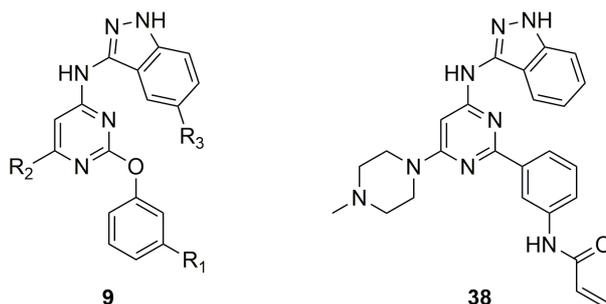
Wildtypform (Thr790) zu erzielen. Die biochemische Evaluierung der Verbindung **6** ließ jedoch keinen verbesserten Effekt gegen die untersuchten EGFR-Varianten erkennen ($IC_{50} > 10 \mu M$ (WT), $2.5 \mu M$ (L858R) und $2.3 \mu M$ (L858R/T790M)).

In einem weiteren Ansatz erfolgte die Verknüpfung des Elektrophils nicht wie bisher über eine C-C-verbundene und damit rotationseingeschränkte Phenylgruppe, sondern über einen flexiblen Phenylether (**8**). Diese chemische Modifikation sollte eine verbesserte Orientierung des Elektrophils zum reaktiven Cystein ermöglichen und somit die Ausbildung einer kovalenten Bindung forcieren. Die Methylgruppe an 5-Position des Pyrazols wurde beibehalten. Für **8l** konnte eine geringe Inhibition von EGFR-L858R ($1.8 \mu M$) sowie von EGFR-L858R/T790M ($0.9 \mu M$) beobachtet werden, wohingegen kein Effekt gegen die Wildtypform von EGFR demonstriert wurde. Das reversible Analogon (**8m**) zeigte gegenüber keiner EGFR-Variante einen inhibierenden Effekt.

Um eine möglicherweise zu hohe strukturelle Flexibilität dieser Verbindungen konformativ einzuschränken, erfolgte zusätzlich die Dekoration des Pyrimidins in 4-Position. Da diese Position laut Modellierungen dem Eingang der ATP-Bindungstasche zugewandt und demnach lösungsmittlexponiert ist, sollte ein eingebautes Methylpiperazin nicht nur die Konformationsmöglichkeiten der Verbindung reduzieren, sondern auch als löslichkeitsvermittelnde Gruppe fungieren. Die Verbindungen **8a-c** wurden generiert, um den Einfluss des Substitutionsmusters des Phenylacrylamids (*ortho*, *meta* oder *para*) und die damit verbundene unterschiedliche Orientierung des Thiol-reaktiven Elektrophils zum Cystein und die Auswirkungen auf die Inhibition zu untersuchen. **8a** (*ortho*) zeigte eine lediglich moderate Inhibition des Wildtyps ($IC_{50} = 0.9 \mu M$), der L858R- ($IC_{50} = 0.6 \mu M$) und der L858R/T790M-Mutante ($IC_{50} = 2.1 \mu M$). Ein ähnliches Verhalten wurde für die entsprechende *para*-substituierte Verbindung (**8c**) ($3.1 \mu M$, WT; $1.8 \mu M$, L858R; $2.4 \mu M$, L858R/T790M) beobachtet. Die Substitution des Acrylamids in *meta*-Position (**8b**) führte hingegen zu einer deutlich verbesserten Inhibition der EGFR-Mutante mit Aktivierungsmutation (L858R) ($IC_{50} = 0.03 \mu M$) und der L858R/T790M-Doppelmutante ($IC_{50} = 0.5 \mu M$). Interessanterweise wies **8b** keinerlei Aktivität gegen EGFR-WT auf. Das mit einem Propionamid versehene reversible Pendant (**8e**) wies im Vergleich zu **8b** eine stark verminderte Inhibition sowohl für die L858R- als auch für

die L858R/T790M-Mutationsvariante von EGFR auf (60-fach und 20-fach). Die signifikant unterschiedliche Potenz deutete stark auf eine kovalente Inhibition von EGFR hin. Die mit einem Pyrazol anstatt eines Methylpyrazols dekorierte Verbindung **8n** zeigte eine weitaus geringere Inhibition von EGFR-L858R und EGFR-L858R/T790M (2.0 bzw. 1.9 μM) und demonstrierte den erheblichen Effekt dieser Methylgruppe auf die inhibitorische Wirksamkeit gegen die EGFR-Mutationsvarianten.

Zur weiteren Untersuchung dieses Effekts wurde der lipophile Charakter des Methylpyrazols durch Substitution mit einem raumgreifenden Indazol weiter verstärkt ohne den Kontakt zur Scharnierregion zu verändern. Die entsprechend derivatisierte Verbindung (**9a**) wies eine stark verbesserte Wirkung gegen die T790M-Mutante von EGFR mit einer inhibitorischen Aktivität im zweistelligen nanomolaren Bereich auf ($\text{IC}_{50} = 0.07 \mu\text{M}$) (Tabelle 3.3). Zudem zeigte **9a** ein exzellentes mutantenselektives Inhibitionsprofil ($\text{IC}_{50} = 0.5 \mu\text{M}$, L858R und 1.7 μM , WT). Das Indazol scheint nicht nur eine verbesserte Protein-Ligand Wechselwirkung zu vermitteln, sondern zeigt auch eine bevorzugte Bindung der Met-Türsteheraminosäure. Das reversible Derivat (**9b**) hatte hingegen keinen inhibierenden Effekt auf die Kinaseaktivität der jeweiligen EGFR-Varianten. Das mit einem sterisch anspruchsvollen 5-Bromoindazol dekorierte Derivat **9d** sollte durch eine erhöhte konformative Einschränkung des Phenylethers das Elektrophil in eine bevorzugte Orientierung bringen. **9d** zeigte einen ähnlichen inhibitorischen Effekt gegen den Wildtyp ($\text{IC}_{50} = 2.9 \mu\text{M}$) sowie der Mutationsvariante EGFR-L858R (0.4 μM), wohingegen die Inhibition der Doppelmutante im Vergleich zu **9a** 4-fach geringer ausfiel (0.3 μM). Die Bromo-Substitution scheint durch seine Sterik die Interaktion mit dem Thioether von Met790 negativ zu beeinflussen.

Tabelle 3.3: IC₅₀-Bestimmungen für die Indazol-Derivate gegenüber EGFR.

	R ¹	R ²	R ³	EGFR IC ₅₀ (μM)		
				WT	L858R	L858R/T790M
9a			H	1.7 ± 0.5	0.5 ± 0.2	0.07 ± 0.04
9b			H	> 10	> 10	8.6 ± 2.3
9c			H	6.7 ± 0.7	3.6 ± 0.5	0.7 ± 0.3
9d			Br	2.9 ± 1.5	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2
9e			H	3.6 ± 0.8	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1
38	-	-	-	> 10	5.0 ± 3.9	4.9 ± 2.5
Gefitinib				< 0.001	< 0.001	0.1 ± 0.04
WZ4002				0.01 ± 0.07	< 0.001	< 0.001
Rociletinib				0.002 ± 0.0005	0.002 ± 0.0002	0.003 ± 0.0006
Osimertinib				0.002 ± 0.0002	0.001 ± 0.0005	< 0.001

Die Modifikation des Acrylamids mit einem Dimethylamin (**9c**) führte zu einem erheblichen Verlust (~10-fach) an inhibitorischer Aktivität gegen alle untersuchten EGFR-Varianten (> 10 μM, WT; 3.6 μM, L858R; 0.7 μM, L858R/T790M) und ließ vermuten, dass ein unsubstituiertes Acrylamid das für diese Pyrimidin-basierten EGFR-Inhibitoren bevorzugte Elektrophil ist. Die moderate Aktivität der Verbindung **38**, bei der das Elektrophil nicht über einen Phenylether, sondern über ein rigides Biarylsystem mit dem Pyrimidin verknüpft ist, macht deutlich, dass es kein optimales Linkersystem für das Elektrophil darstellt.

Die Resultate der biochemischen Evaluierung der Chinazolin- und Pyrimidin-basierten Inhibitoren wiesen für **30a**, **8b** und **9a** eindeutig auf einen kovalenten Bindungsmodus hin.

Diese Verbindungen zeigten eine deutlich stärkere inhibitorische Wirkung als ihre reversiblen Analoga und repräsentierten zudem die potentesten Verbindungen der fokussierten Substanzbibliothek. Das Elektrophil über einen Phenylether mit dem Pyrimidin-Gerüst zu verknüpfen erwies sich als das geeignetste Linkersystem. Neben der Erhöhung der Löslichkeit scheint die löslichkeitsvermittelnde Gruppe sich auch deutlich auf die inhibitorische Aktivität gegenüber des EGF-Rezeptors auszuwirken. Ein unsubstituiertes Acrylamid erwies sich als wirkungsvollster Michaelakzeptor. Die Rolle der Dekoration des Pyrazols wurde in den aktivitätsbasierten Studien ebenfalls deutlich hervorgehoben. Dessen Variation (Pyrazol, Methylpyrazol bzw. Indazol) steigerte nicht nur die inhibitorische Aktivität, sondern führte auch zu einer stark verbesserten Selektivität bezüglich der T790M-Mutante von EGFR.

3.4 MS-basierte Validierung der Alkylierung von Cys797 in EGFR-T790M

Zur Analyse des Bindungsmodus der hergestellten EGFR-Inhibitoren wurden massenspektrometrische Experimente mit der isolierten Kinase (EGFR-T790M) durchgeführt (siehe Kapitel 8.3). Die Überprüfung einer kovalenten Modifikation erfolgte mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) nach Inkubation des Proteins mit den Pyrimidin-basierten Inhibitoren **40a**, **8b** bzw. **9a** (Abbildung 3.3). So sollte neben der Alkylierung des Proteins auch die Effizienz der Reaktion untersucht werden.

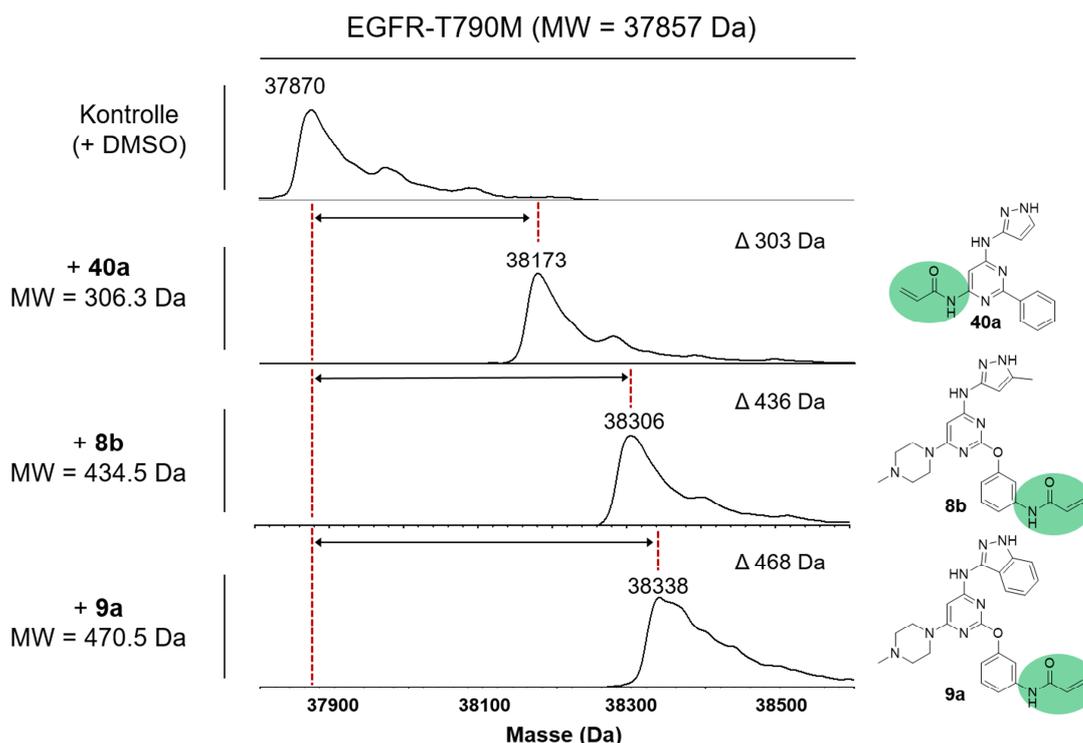


Abbildung 3.3: Übersicht der dekonvolvierten ESI-MS-Spektren zur Analyse der kovalenten Modifikation von EGFR-T790M mit den Inhibitoren **40a**, **8b** und **9a**. Die Massendifferenz in Relation zur DMSO behandelten Kontrolle sind als Δ -Werte dargestellt und zeigen jeweils eine vollständige Modifikation.

Die dekonvolvierten ESI-MS-Spektren zeigen für die getesteten Inhibitoren jeweils einen Peak mit der Massenzunahme des entsprechenden Inhibitors von 303 Da (**40a**), 436 Da (**8b**) und 468 Da (**9a**), im Vergleich mit der DMSO behandelten Kontrolle, und erbrachten den Nachweis einer kovalenten Modifikation von EGFR-T790M. Für alle drei Inhibitoren wurde eine vollständige Alkylierungsreaktion beobachtet, da kein apo-Protein mehr detektiert werden konnte. Eine Mehrfach-Alkylierung an verschiedenen Cystein-Resten scheint trotz eines 3-fachen molaren Überschusses an Inhibitor nicht stattgefunden zu haben, da kein Massenzuwachs eines Vielfachen des Inhibitors beobachtet wurde. Über die jeweilige Massenzunahme konnte eine kovalente Bindung zwischen den Inhibitoren und EGFR-T790M eindeutig nachgewiesen werden.

Um jedoch eine konkrete Aussage über die modifizierte Aminosäure treffen zu können wurden die Verbindungen **8b** und **9a** nach Inkubation mit EGFR-T790M proteolytisch

mit Subtilisin verdaut und anschließend per Tandem-Massenspektrometrie analysiert (siehe Kapitel 8.3).^{vii}

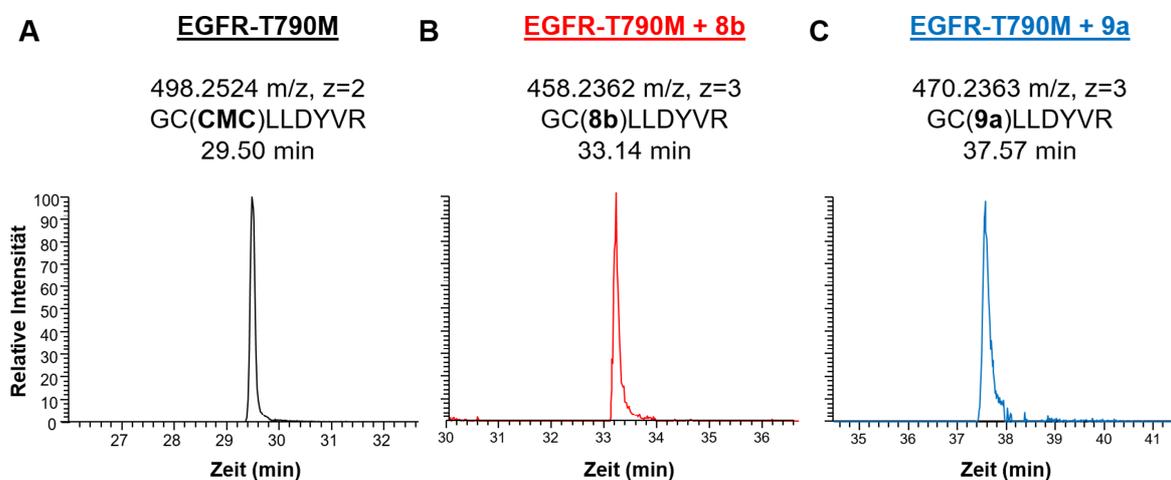


Abbildung 3.4: Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) der drei verschiedenen Isoformen des identifizierten Peptids GCLLDYVR nach Behandlung mit (A) Iodacetamid (Kontrolle), (B) **8b** und (C) **9a**. Das carbamidomethylierte (CMC) Peptid ist nahezu in keiner Probe nach Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor mehr vorhanden, wohingegen das mit dem jeweiligen Inhibitor modifizierte Peptid in den entsprechenden Proben detektiert werden konnte.

Mittels HPLC und gekoppelter MS/MS der aus dem Subtilisin-Verdau erhaltenen Peptide konnte eine Massenzunahme der entsprechenden Inhibitoren **8b** und **9a** in dem Peptid GCLLDYVR identifiziert werden. Das gefundene Fragment entspricht der Aminosäuresequenz aus der Scharnierregion (Gly796-Arg803) und beinhaltet das kovalent zu adressierende Cys797. Die extrahierten Ionenchromatogramme (Abbildung 3.4) zeigen in den Proben nach Behandlung mit den Inhibitoren neben einer unterschiedlichen Retentionszeit eine signifikante Änderung des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) verglichen mit der carbamidomethylierten Kontrollprobe. Das Masse-Ladung-Verhältnis entspricht jeweils dem mit Inhibitor modifizierten Peptid (**8b**; 458.2362 m/z , $z = 3$ und **9a**, 470.2363 m/z , $z = 3$).

^{vii} In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Dr. René Zahedi am Leipzig-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS in Dortmund.

Das nur noch in Spuren zu detektierende carbamidomethylierte Peptid in den Proben nach Inkubation mit den Inhibitoren lässt auf eine nahezu vollständige Modifikation schließen.

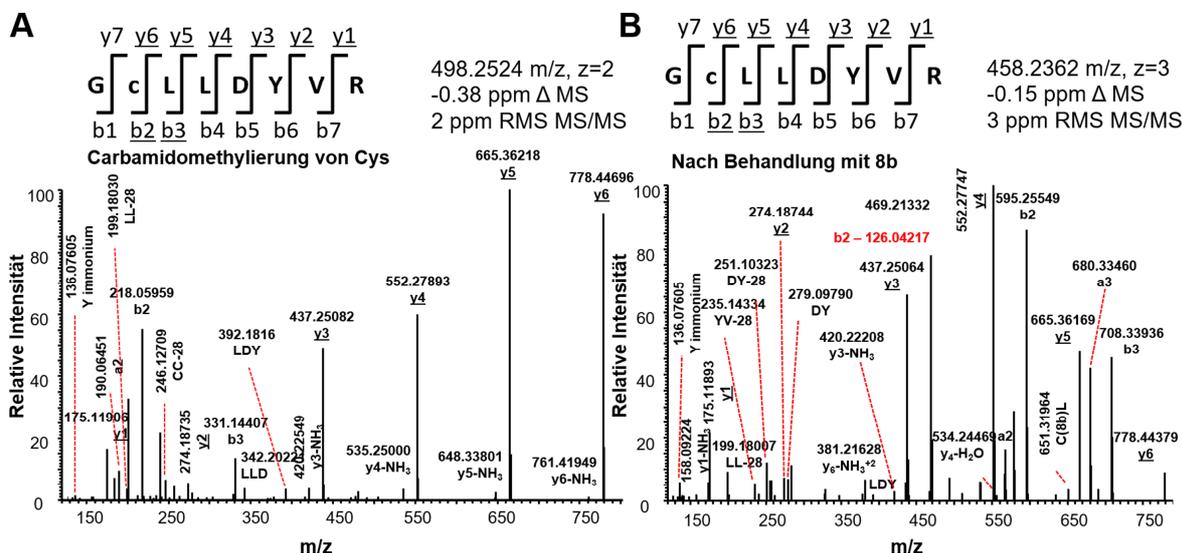


Abbildung 3.5: Fragment-Ion-Spektrum des Peptids GC₇₉₇LLDYVR nach Subtilisin-Verdau von EGFR-T790M nach Inkubation mit **(A)** Iodacetamid und **(B)** **8b**. Die Cys797 beinhaltenden Peptidfragmente (z. B. b2 und b3) zeigen eine Massendifferenz, die dem Inhibitor **8b** entspricht, wohingegen die Fragmente ohne Cys797 (z. B. y5 und y6) die gleiche Masse verglichen mit der Kontrolle aufweisen. Das Fragmentierungsmuster des Peptids GCLLDYVR bestätigt eindeutig die Modifikation des Cys797 mit **8b**.

Das Fragment-Ion-Spektrum für die Probe nach Behandlung mit **8b** zeigt eindeutig eine entsprechende Modifikation des Cys797 (Abbildung 3.5). Für die Peptidfragmente b2 (GC) und b3 (GCL) konnte eine Massendifferenz von jeweils 377.20 m/z verglichen mit den Fragmenten b2 und b3 aus der mit Iodacetamid behandelten Kontrolle beobachtet werden. Für die Fragmente aus dem Peptid, die das Cys797 nicht enthalten, wie zum Beispiel y5 sowie y6, wurde dementsprechend keine Massendifferenz detektiert. Das Fragment-Ion-Spektrum der Probe nach Inkubation mit **9a** zeigt ebenfalls eine eindeutige Modifikation des Cys797 in EGFR-T790M (siehe Anhang, Abbildung 10.2).

Zusammenfassend konnte die massenspektrometrische Analyse für die Inhibitoren **8b** und **9a** eine spezifische Alkylierung des Cysteins797 in EGFR-T790M belegen.

3.5 Komplexstrukturen im T790M-Modellsystem

Zur Untersuchung des Bindungsmodus der Pyrimidine wurden die Verbindungen **8b** und **8c** im Komplex mit der Kinase cSrc-DM, einem EGFR-T790M-Modellsystem, kokristallisiert (Abbildung 3.6).^{viii, 83, 116, 119}

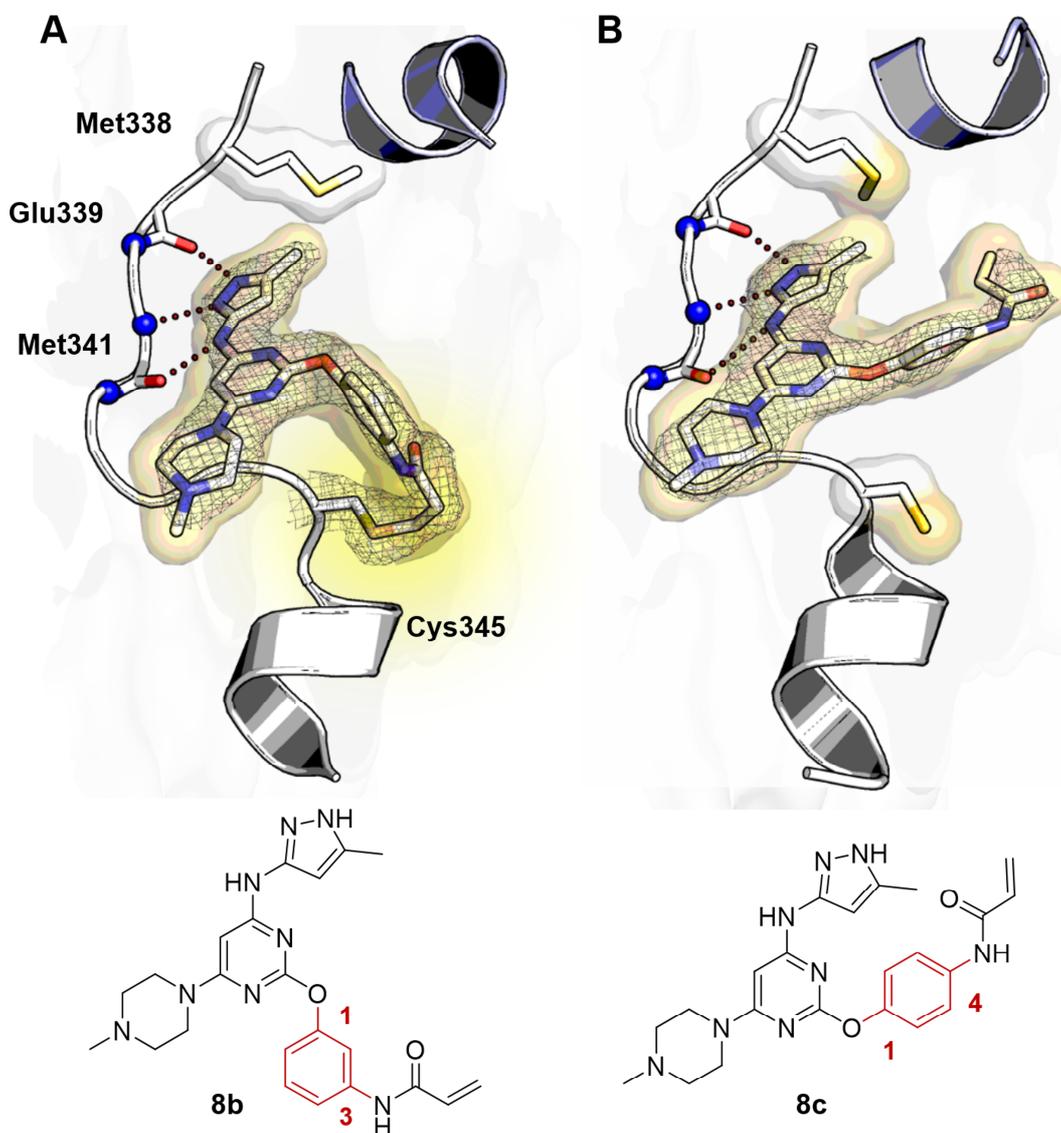


Abbildung 3.6: Pyrimidine im Komplex mit cSrc-T338M/S345C (cSrc-DM). Graphische Darstellung der experimentell ermittelten Elektronendichtekarten von (A) cSrc-DM-**8b** bei einer Auflösung von 2.3 Å (PDB-Eintrag: 5D11) und (B) cSrc-DM-**8c** bei 2.7 Å (PDB-Eintrag: 5D10) ($2Fo - Fc$ -Karte konturiert bei 1σ). Wasserstoffbrückenbindungen der Liganden mit der Scharnierregion (weiß) sind durch rote Punkte illustriert. Das Strukturelement α C Helix ist in blau dargestellt.

^{viii} Die Komplexstrukturen erstanden bereits im Zuge der Masterarbeit „Synthese und biochemische Charakterisierung kovalenter Kinaseinhibitoren zur Umgehung der Wirkstoffresistenz T790M in EGFR“ (Julian Engel, 2011, TU Dortmund).

Das strukturbiologische Interesse galt insbesondere diesen beiden Verbindungen, da sie sich ausschließlich im Substitutionsmuster des Michaelakzeptors differenzieren, aber eine deutlich unterschiedliche biochemische Wirksamkeit gegenüber der T790M-Mutante aufwiesen (**8b**, *meta*, $IC_{50} = 0.5 \mu\text{M}$; **8c**, *para*, $IC_{50} = 2.4 \mu\text{M}$). Die Komplexstrukturen in cSrc-DM konnten mit einer Auflösung von 2.3 Å (**8b**) und 2.7 Å (**8c**) gelöst werden (Abbildung 3.6).

8b adressiert die Scharnierregion im aktiven Zentrum, wie bereits für die Chinazolin-basierte Hit-Verbindung **1a** beobachtet, über die Aminopyrazol-Einheit via drei Wasserstoffbrückenbindungen zu den Carbonylgruppen von Glu339 und Met341 sowie der Amid-NH-Gruppe von Met341. Die Elektronendichte lässt eine deutliche Bindung zwischen dem Liganden und Cys345 erkennen und bestätigt einen kovalenten Bindungsmodus. Der mit einem Acrylamid in *meta*-Position derivatisierte Phenylether nimmt eine rechtwinklige Orientierung zum Pyrimidin-Grundgerüst ein, und bringt das Elektrophil somit in unmittelbare Nähe des reaktiven Cysteins. Das Methylpiperazin erstreckt sich in einen lösungsmittlexponierten Bereich der ATP-Bindungstasche und fungiert über das tertiäre Amin hauptsächlich als Löslichkeitsvermittler. In Übereinstimmung mit den Modellierungsstudien, ist die eingeführte Methylgruppe in 5-Position des Pyrazols in Richtung der Türsteheraminosäure (Met338) orientiert und ermöglicht lipophile Protein-Ligand Wechselwirkungen. Im Gegensatz zu **8b** nimmt **8c** einen reversiblen Bindungsmodus ein, in dem der Phenylether (Acrylamid in *para*-Position) in einer gestreckten Konformation eine hydrophobe Region angrenzend zur Türsteheraminosäure adressiert. In dem Bindungsmodus ist das Elektrophil nicht in räumlicher Nähe zum Cystein lokalisiert und die Ausbildung einer kovalenten Bindung folglich ausgeschlossen.

Die unterschiedlichen Bindungsmodi geben eine valide strukturelle Erklärung für das unterschiedliche inhibitorische Potential beider Verbindungen. Obwohl die für die Komplexkristallstrukturen verwendete Kinase cSrc-DM als Modellsystem für EGFR-T790M validiert wurde, gilt dennoch zu berücksichtigen, dass es sich hierbei um eine künstlich mutierte Variante der cSrc-Kinase und nicht um die Kinasedomäne des EGF-Rezeptors handelt.

3.6 Evaluierung der Pyrimidine in Krebszelllinien

Neben der inhibierenden Wirkung auf die Kinaseaktivität der Mutationsvarianten des EGF-Rezeptors sollte auch der inhibitorische Effekt der Pyrimidine in klinisch-relevanten Krebszelllinien untersucht werden. Die ausgewählten Verbindungen **1a**, **8b**, **8e**, **8h**, **8j**, **9a-e** und **38** wurden auf der wirkstoffresistenten NSCLC-Zelllinie H1975 (EGFR-L858R/T790M) sowie in HCC827 (EGFR-Exon 19 Deletion) und A431- bzw. H661-Zellen (EGFR-Wildtyp) auf ihren Effekt auf die Zellviabilität getestet (Tabelle 3.4). Die entsprechenden Zelllinien wurden jeweils für 96 Stunden mit den entsprechenden Inhibitoren (0-30 μ M) inkubiert und die Viabilität der Zellen mit Hilfe des *Cell Titer-Glo Assays* (Promega GmbH) analysiert (siehe Kapitel 8.4).^{ix,x}

Tabelle 3.4: IC₅₀-Werte der Pyrimidine gegenüber den Zelllinien A431 und H661 (EGFR-Wildtyp-Überexpression) sowie den NSCLC-Zelllinien HCC827 (Exon 19 Deletion) und H1975 (L858R/T790M)^a.

Verbindung	A431 ^c /H661 ^b (WT)	NSCLC-Zelllinien IC ₅₀ (μ M)	
		HCC827 (DelE746_A750)	H1975 (L858R/T790M)
1a	0.7 ^b	1.9 ^d	1.6
8b	5.7 ^b	8.2 \pm 0.7	20 \pm 3.5
8e	8.4 ^b	> 30	> 30
8h	3.5 ^b	8.9 \pm 0.7	6.5 \pm 2.2
8j	20 ^b	> 30	n.i. ^e
9a	8.6 \pm 2.3 ^c	2.5 \pm 0.9	9.8 \pm 2.4
9b	22 \pm 2.2 ^c	> 30	30 \pm 0.4
9c	> 30 ^a	> 30	n.i. ^e
9d	11 \pm 2.3 ^a	8.6 \pm 1.6	18 \pm 3.4
9e	30 ^c	25 \pm 4.0	n.i. ^e
38	12 \pm 1.1 ^c	16 \pm 1.7	11 \pm 0.8
Rociletinib	1.7 \pm 0.1 ^c	0.03 \pm 0.007	0.03 \pm 0.01
Osimertinib	0.6 \pm 0.08 ^c	< 0.01	< 0.01

^aWerte ohne Standardabweichung wurden aus Einzelmessungen in Triplikaten erhalten. ^bH661. ^cA431.

^dPC9del1. ^en.i. kein inhibitorischer Effekt bei Applikation von 30 μ M Testsubstanz.

^{ix} Die Substanz **1a** wurde bereits im Zuge der Dissertation von Matthäus Getlik zellulär charakterisiert.
^x Die Charakterisierung der Substanzen **8b**, **8e**, **8h**, **8j**, **9a-e** und **38** in Krebszelllinien erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Roman Thomas am Max-Planck-Institut für neurologische Forschung in Köln.

Obwohl einige Inhibitoren der fokussierten Substanzbibliothek in den aktivitätsbasierten Studien die Kinaseaktivität der EGFR-Varianten höchst potent inhibieren konnten, zeigten die getesteten Verbindungen nur einen moderaten Effekt auf die Viabilität der NSCLC-Zellen. Im Detail verzeichnete die Ausgangsverbindung **1a** noch die größte inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum der Krebszelllinien ($IC_{50} = 0.7, 1.9$ und $1.6 \mu M$ für H661, HCC827 und H1975). Die in den aktivitätsbasierten Studien beobachtete SAR sowie das Selektivitätsprofil konnten nicht widerspiegelt werden. Die Verbindung **9a** zeigte biochemisch beispielsweise eine starke Inhibition der EGFR-Mutationsvarianten und eine verminderte Aktivität gegenüber des Wildtyps (Tabelle 3.3), wohingegen der Effekt auf die Zelllinien mit mutiertem EGFR ($IC_{50} = 2.5$ und $9.8 \mu M$ für HCC827 und H1975) vergleichbar mit der Wirksamkeit in der EGFR Wildtyp-Zelllinie A431 ($IC_{50} = 8.6 \mu M$) war. Der inhibitorische Effekt in NSCLC-Zellen mit mutiertem EGF Rezeptor war jedoch bei den kovalenten Verbindungen im Vergleich zu deren reversiblen Pendanten deutlich ausgeprägter (HCC827, $IC_{50} = 2.5 \mu M$ und $> 30 \mu M$ für **9a** bzw. **9b**; H1975, $IC_{50} = 9.8 \mu M$ und $30 \mu M$ für **9a** bzw. **9b**). Die mit einer Nitrogruppe versehene reversible Verbindung (**8h**) stellte sich in den zellulären Experimenten als eine der wirksamsten Inhibitoren heraus. Sie konnte das Zellwachstum in den Krebszelllinien mit IC_{50} -Werten von 3.5, 8.9 und $6.5 \mu M$ (H661, HCC827 bzw. H1975) inhibieren.

Interessanterweise zeigte die Mehrheit der Inhibitoren nur einen geringen Verlust an Aktivität in den wirkstoffresistenten NSCLC-Zellen gegenüber der TKI-sensitiven Zelllinie. Allerdings konnte keine Verbindung der Pyrimidin-Substanzbibliothek eine submikromolare Reduktion des Zellwachstums bewirken. Generell konnten die Resultate und die SAR der aktivitätsbasierten Studien in den zellulären Experimenten nicht abgebildet werden.

3.7 ADME-Parameter Löslichkeit und Zellpermeabilität

Zur weiteren Charakterisierung und Untersuchung der moderaten Wirksamkeit der kovalenten Inhibitoren in zellulären Systemen, wurden für **8b** und **9a** die pharmakokinetischen Parameter Löslichkeit und Zellpermeabilität ermittelt

(Abbildung 3.7 und siehe Kapitel 8.6).^{xi} Die Bestimmung der kinetischen Löslichkeit für **8b** und **9a** erfolgte mit Hilfe des SolRank-Assays, einem Hochdurchsatz-Testsystem, das auf der optischen Detektion von Präzipitation der Substanz im wässrigen Medium beruht.¹²⁰

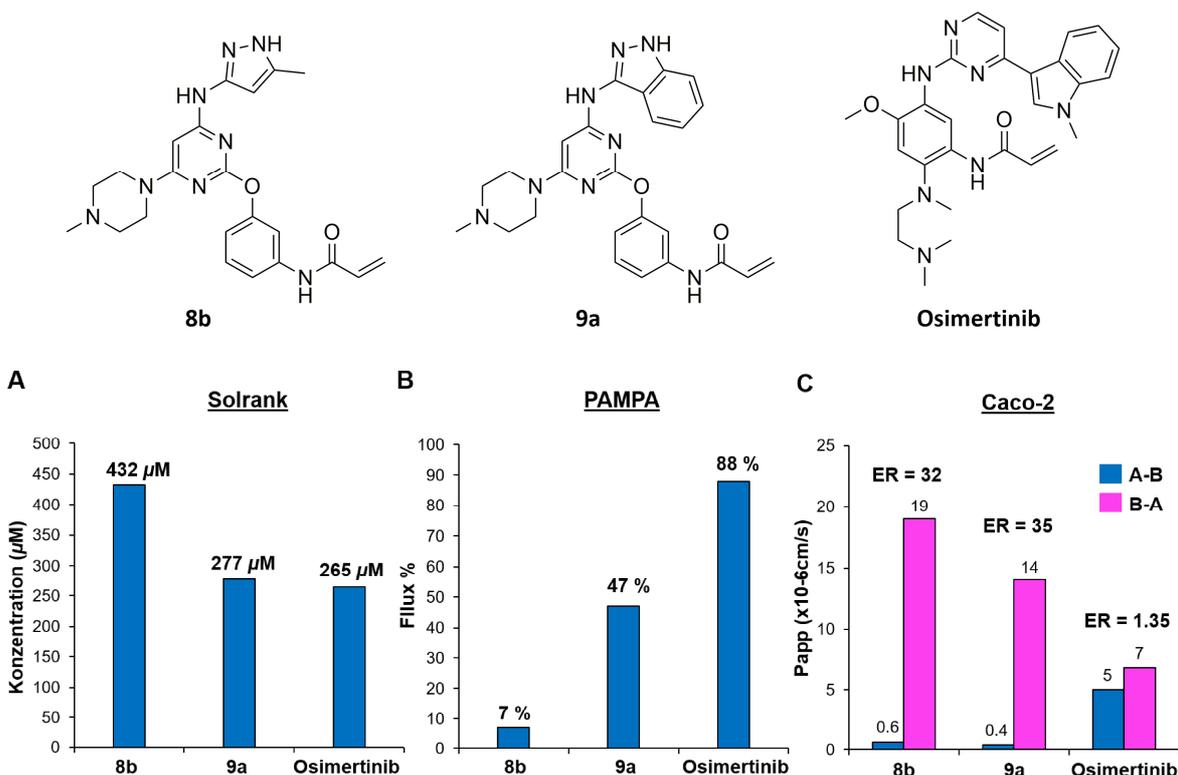


Abbildung 3.7: Graphische Darstellung der pharmakologischen Parameter zur (A) Löslichkeit und (B, C) Zellpermeabilität der Substanzen **8b** und **9a** sowie Osimertinib als Referenzverbindung. Das Verhältnis von B-A zu A-B entspricht dem Efflux-Verhältnis (ER, *efflux ratio*).

Bei dem gemessenen pH-Wert von 7.4 zeigten beide Verbindungen mit 432 μM (**8b**) und 277 μM (**9a**) sehr hohe Löslichkeiten, die keine weitere Optimierung erforderten. Zur Untersuchung der Zellpermeabilität wurden **8b** und **9a** mittels eines in der Medizinalchemie gängigen artifiziellen Membran-Assaysystems (PAMPA, *artificial membrane permeation assay*) analysiert. Dieses gänzlich künstliche Membransystem ohne Membranporen und aktive Transportersysteme dient ausschließlich zur

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

Einschätzung des passiven Transports der Testsubstanzen. Die Verbindungen werden je nach Durchflussmenge (% Flux) durch die Membran in drei Gruppen klassifiziert. Verbindungen mit guter (25-100 %), mittelmäßiger (5-25 %) und geringer Absorption (< 5 %).¹²¹ Gemäß dieser Klassifikation zeigte das Methylpyrazol **8b** mit einem Flux-Wert von 7 % eine mittelmäßig bis geringe Zellpermeabilität, wohingegen für das Indazol **9a** mit einem ca. 7-fach höheren Flux-Wert von 47 % eine ausreichende Zellpermeation ermittelt werden konnte. Neben der Zellgängigkeit in einem artifiziellen System wurde die Zellpermeation auch in Caco-2-Zellen, einem etablierten *in vitro* Modellsystem für die passive Absorption der Darmschleimhaut, untersucht. Hierbei wird der Transport der zu testenden Substanz durch eine ausgebildete Caco-2 Monoschicht von der apikalen zur basolateralen Seite (A-B) sowie von der basolateralen zur apikalen Seite (B-A) gemessen. Das Verhältnis von B-A zu A-B bestimmt dementsprechend das Efflux-Verhältnis. P_{app} (A-B)-Werte von $\leq 1 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$ stehen für eine geringe Absorption wohingegen P_{app} (A-B)-Werte von $\geq 10 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$ Substanzen mit einer hohen Permeation klassifizieren.^{122, 123} Die für die Verbindungen **8b** und **9a** gemessenen A-B-Werte von 0.6 bzw. $0.4 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$ lassen auf eine sehr geringe Zellpermeabilität schließen. Zusammen mit den hohen B-A-Werten von 19 bzw. $14 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$ ergeben sich zudem für beide Substanzen äußerst hohe Effluxraten von 32 (**8b**) und 35 (**9a**).

Die Verbindungen **8b** und **9a** verfügen über eine hohe Löslichkeit, weisen jedoch Anzeichen für eine nicht ausreichende Penetration der Zellmembran und einen aktiven Transport aus dem Cytosol in den Extrazellularraum auf. Diese Faktoren repräsentieren mögliche Ursachen für die geringe Translation der biochemischen Aktivität in eine zelluläre Wirksamkeit.

3.8 Bindungskinetik der Inhibitoren in den Mutationsvarianten von EGFR

Zur weiteren Charakterisierung des kovalenten Bindungsverhaltens und um einen möglichen Zusammenhang mit der moderaten zellulären Wirksamkeit herstellen zu können, wurden die Inhibitoren **8b** und **9a** hinsichtlich ihrer Bindungskinetik untersucht. Dabei galt es die Affinität der initialen reversiblen Bindung zum Rezeptor

und die Geschwindigkeit der Bindungsbildung durch die Parameter K_I und k_{inact} zu bestimmen. Als Maß für die Bindungseffizienz kovalenter Inhibitoren wird in der Regel der Quotient aus k_{inact}/K_I angegeben. Für die Verbindungen **8b** und **9a** sowie für die Referenzinhibitoren (Rociletinib und Osimertinib) wurden die kinetischen Parameter K_I und k_{inact} für die Mutationsvarianten von EGFR-L858R und L858R/T790M mit Hilfe eines aktivitätsbasierten Assaysystems bestimmt (siehe Kapitel 8.2). Die IC_{50} -Werte der entsprechenden Inhibitoren wurden zeitaufgelöst bestimmt und die resultierenden Werte mit der Inkubationszeit von Protein und Inhibitor korreliert. Aus diesen konnten die Parameter K_I und k_{inact} wie in der Literatur beschrieben berechnet werden (Abbildung 3.8 und Tabelle 3.5).^{xii,124}

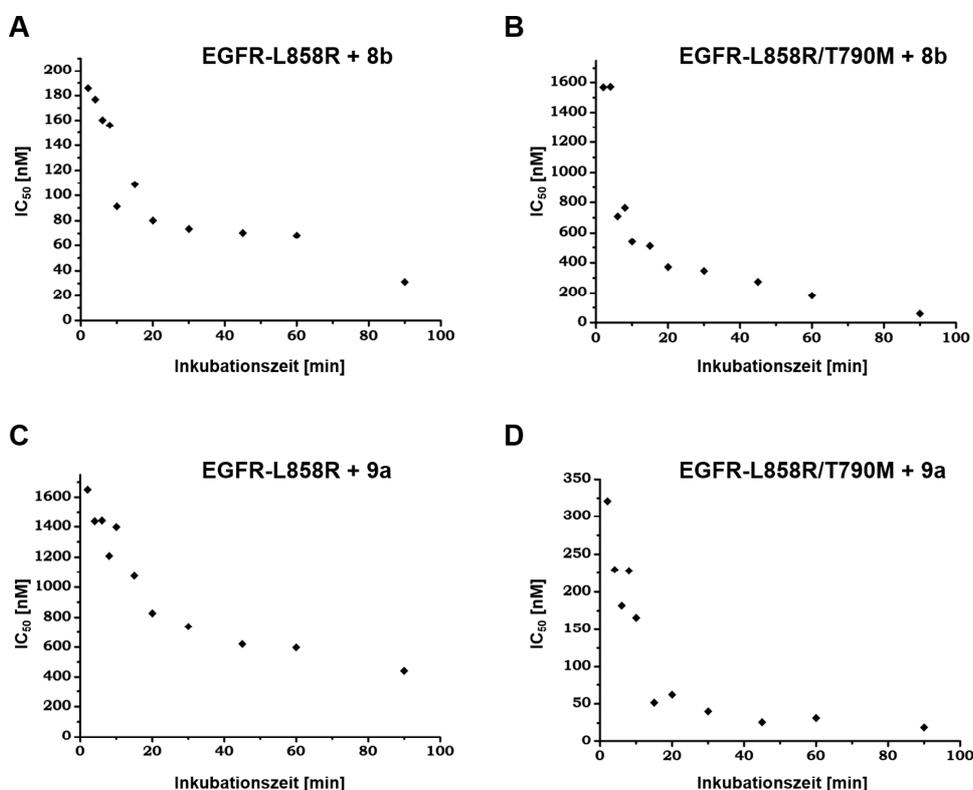
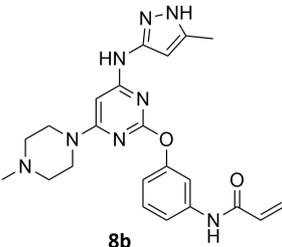
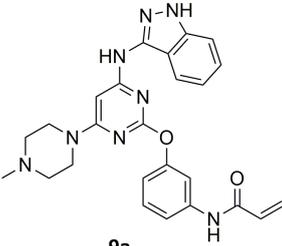


Abbildung 3.8: Kinetische Charakterisierung der Substanzen **8b** und **9a** durch Bestimmung des Parameters k_{inact}/K_I . Die Inhibitoren wurden über verschiedene Zeiträume mit EGFR-L858R (**A**, **C**) oder EGFR-L858R/T790M (**B**, **D**) vorinkubiert. Die Inkubationszeiten für die Enzym- bzw. Stoppreaktion wurden nicht variiert. Zur Bestimmung von k_{inact} und K_I wurde eine Konzentrationsreihe ausgehend von $20 \mu\text{M}$ in einer 6-fach-Verdünnung erstellt, die ermittelten IC_{50} -Werte gegen die Inkubationszeiten aufgetragen und die Kurve wie in der Literatur beschrieben gefittet.¹²⁴ Die dargestellten Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten erhalten.

^{xii} Die Kinetikstudien und die Bestimmung der Parameter wurden arbeitsgruppenintern von Marina Keul durchgeführt.

Tabelle 3.5: Übersicht der kinetischen Parameter (K_I , k_{inact} und k_{inact}/K_I) von **8b**, **9a**, sowie Referenzverbindungen für die Mutationsvarianten EGFR-L858R und L858R/T790M.

Verbindung	EGFR	K_I [nM]	k_{inact} [min^{-1}]	k_{inact}/K_I [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
 8b	L858R	70 ± 8.23	0.02 ± 0.007	0.004 ± 0.001
	L858R/T790M	0.64 ± 0.30	0.12 ± 0.08	2.83 ± 0.96
 9a	L858R	833 ± 429	0.06 ± 0.02	0.001 ± 0.0002
	L858R/T790M	0.32 ± 0.10	0.14 ± 0.09	7.01 ± 4.83
Rociletinib	L858R	1.75 ± 0.19	0.18 ± 0.05	1.67 ± 0.32
	L858R/T790M	1.65 ± 0.07	0.29 ± 0.05	2.95 ± 0.66
Osimertinib	L858R	1.58 ± 0.29	0.30 ± 0.01	3.24 ± 0.46
	L858R/T790M	1.46 ± 0.13	0.33 ± 0.06	3.75 ± 0.39

Die Studie zur Bindungskinetik ergab für die Pyrimidine **8b** und **9a** eine für kovalente Inhibitoren charakteristische zeitabhängige Inhibition beider EGFR-Mutationsvarianten. **8b** und **9a** zeigten gegenüber der T790M-Mutante von EGFR eine hohe Bindungsaffinität im subnanomolaren Bereich ($K_I = 0.64$ und 0.32 nM für **8b** bzw. **9a**), was auf einen äußerst stabilen nicht-kovalenten Rezeptor-Inhibitor-Komplex mit der Met-Türstehervariante schließen lässt. Die Reaktionsgeschwindigkeit der kovalenten Bindungsbildung zu EGFR-L858R/T790M war für beide Verbindungen (**8b**, $k_{inact} = 0.12 \text{ min}^{-1}$ und **9a**, 0.14 min^{-1}) wesentlich geringer als für die Kontrollverbindungen ($k_{inact} = 0.29$ und 0.33 min^{-1} für Rociletinib bzw. Osimertinib). Der Quotient aus k_{inact}/K_I ergab für beide Inhibitoren mit $2.83 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für **8b** und $7.01 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für **9a** ähnliche hohe Werte gegenüber der

T790M-Mutante wie die T790M-Wirkstoffe Rociletinib ($2.95 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und Osimertinib ($3.75 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Die wesentlich geringere Affinität von **8b** und **9a** ($K_I = 70$ bzw. 833 nM) gegenüber der Aktivierungsmutante (EGFR-L858R) kann durch die verminderte Wechselwirkung mit dem Thr790-Türsteher erklärt werden. Die unterschiedlichen Türsteheraminosäuren scheinen jedoch auch einen Effekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit der kovalenten Bindung zu Cys797 zu haben ($k_{inact} = 0.02$ bzw. 0.06 min^{-1}).

Die Kinetikstudien ergaben für **8b** und speziell für **9a** ein hochaffines und kovalentes Bindungsverhalten gegenüber der T790M-Mutationsvariante des EGF-Rezeptors. Es zeigte sich jedoch auch eine langsame Bildungsgeschwindigkeit der kovalenten Modifikation der EGFR-Mutante. Eine ineffiziente irreversible Modifikation kann große Auswirkungen auf die zelluläre Potenz kovalenter Inhibitoren haben.¹⁰⁹ Diese Eigenschaft ist möglicherweise mitverantwortlich für den moderaten zellulären Effekt der Pyrimidin-basierten Inhibitoren.

3.9 Zusammenfassung und rationale Strategien zur Weiterentwicklung

Ausgehend von einer reversibel bindenden Hit-Verbindung wurden Pyrimidin-basierte Kinaseinhibitoren mit einem für EGFR neuartigen Bindungsmotiv generiert. Durch strukturbasierte Optimierung konnten inhibitorische Aktivitäten im niedrigen nanomolaren Bereich gegen die T790M-Resistenzmutante erzielt werden. Neben einem T790M-selektiven Inhibitionsprofil zeigten die Verbindungen einen kovalenten Bindungsmodus, der durch Protein-MS-basierte Analysen und zeitabhängige IC_{50} -Bestimmungen eindeutig belegt wurde. Mittels Subtilisin-Verdau und anschließender MS/MS-Experimente konnte die spezifische kovalente Modifikation des Cys797 in EGFR-T790M nachgewiesen werden. Komplexstrukturen der Pyrimidin-basierten Inhibitoren in einem validierten Modellsystem für EGFR-T790M bestätigten ein kovalentes Bindungsverhalten und lieferten wertvolle Erkenntnisse über die Struktur-Aktivitäts-Beziehung der fokussierten Substanzbibliothek. Die hohe biochemische Potenz und die SAR der Pyrimidinserie konnte allerdings nicht in klinisch relevanten NSCLC-Krebszelllinien (u. a. H1975, HCC827) abgebildet werden.

Mögliche Ursachen scheinen eine unzureichende Zellpermeabilität sowie ein aktiver Transport aus der Zelle heraus zu sein. Ein weiteres Kriterium stellt vermutlich die in den Kinetikstudien beobachtete langsame kovalente Bindungsbildung dar, die möglicherweise nicht effizient genug abläuft, um eine hohe zelluläre Potenz zu erzielen. Auch wenn der in 2-Position des Pyrimidins substituierte Phenylether das Elektrophil in eine optimale Orientierung zu Cys797 bringt, verfügt dieses Element über eine hohe intrinsische Flexibilität und ermöglicht diverse unterschiedliche Konformationszustände.¹¹⁹ Der Wirkstoff Rociletinib ist durch seine Trifluor-Pyrimidin-Struktur konformationell eingeschränkt und verfügt daher über eine präorganisierte Konformation in Lösung, die dem im EGFR-T790M-Komplex angenommenen kovalenten Bindungsmodus entspricht.^{110, 119} Dadurch erhält er unter anderem seine hohe zelluläre Wirksamkeit. Der Vorteil einer präorganisierten Ligandenkonformation ist der geringere Energieverlust durch Bindung des Proteins im Vergleich mit einem Inhibitor, der zur kovalenten Bindung eine energetisch ungünstigere Konformation einnehmen muss.¹¹⁹

Zur Weiterentwicklung der kovalenten T790M-Inhibitoren hinsichtlich einer verbesserten zellulären Wirksamkeit wurden zwei Strategien entworfen, die eine reduzierte Flexibilität und konformationelle Einschränkung des Liganden zur effizienteren kovalenten Bindungsbildung erzielen sollten. Bei einem Konzept lag der Fokus auf der Erhaltung des Aminoindazols als Bindungsmotiv und der Modifizierung des trisubstituierten Pyrimidins als Grundstruktur. Das Design zielte darauf ab den Michaelakzeptor an eine lineare und fixierte Struktur zu knüpfen, um die Anzahl an möglichen Konformationszuständen zu minimieren (Abbildung 3.9). Die Weiterentwicklung dieser Serie wurde arbeitsgruppenintern von Stefano Tomassi realisiert. Für weiterführende Informationen siehe Tomassi *et al.* 2017.¹²⁵ In einer weiteren Strategie sollte eine neue potentielle Substanzklasse identifiziert werden, auf die sich das Konzept der präorganisierten Konformation durch eingeschränkte Flexibilität anwenden lässt.

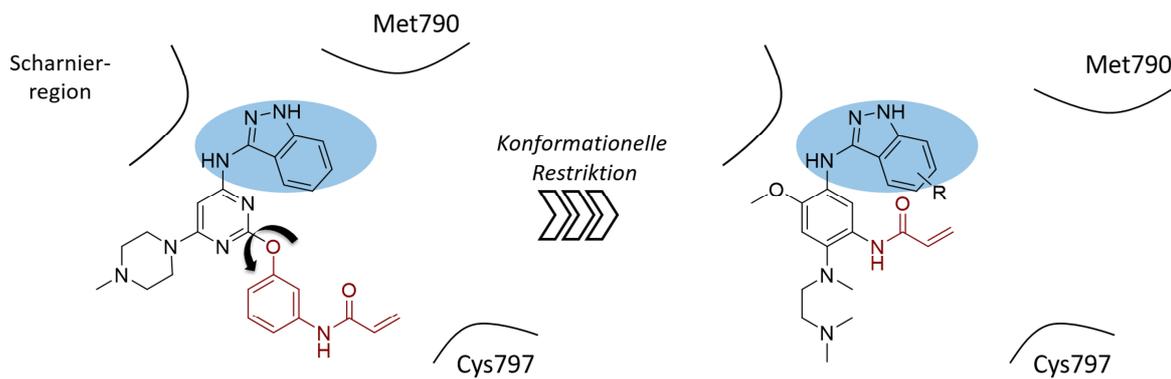


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung des rationalen Designs der Weiterentwicklung der Pyrimidin-basierten T790M-Inhibitoren durch Einschränkung der Konformation. Das Aminoindazol sollte als Strukturmotiv erhalten bleiben (blau hervorgehoben) und der Michaelakzeptor an eine lineare und fixierte Struktur angeknüpft werden (rot markiert), um die Flexibilität des Liganden zu minimieren.

4 Strukturbasiertes *de novo* Design kovalenter EGFR-T790M-Inhibitoren

Neben dem Konzept das Aminoindazol weiterzuentwickeln, wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, bei dem eine neue Serie von T790M-Inhibitoren, ausgehend von einem bekannten Strukturelement zur Bindung der Scharnierregion in Kinasen, entwickelt werden sollte. Basierend auf den aus der strukturbasierten Optimierung der Chinazoline und Pyrimidine gewonnenen Erkenntnissen zusammen mit den klinischen Daten der EGFR-Inhibitoren der ersten und zweiten Generation konnten definierte Kriterien zusammengefasst werden, die zur Entwicklung eines wirksamen Inhibitors der wirkstoffresistenten Türstehermutante T790M erfüllt sein müssen. Das durch *on-target*-Toxizität bedingte Scheitern der EGFR-Zweitgenerationsinhibitoren in den klinischen Studien hat gezeigt wie entscheidend eine mutantenselektive Inhibition der T790M-Mutante ist. Die klassischen 4-Aminochinazoline erwiesen sich bekanntermaßen als ungeeignet zur spezifischen Inhibition der T790M-Türstehermutante, weshalb der Fokus beim strukturbasierten Design auf der Identifizierung einer neuen Substanzklasse lag. Zusätzlich sollte die neue Serie an Inhibitoren einen sterischen Konflikt mit dem Türstehermethionin (Met790) vermeiden und dessen hydrophoben Charakter durch gezielte lipophile Wechselwirkung nutzen, um Affinität und Selektivität der Inhibitoren zu erhöhen. Ein weiteres Merkmal sollte ein reaktives Elektrophil zur kovalenten Modifizierung des Cys797 sein, das sich in allen Studien als essentielles Element zur effektiven Inhibition der wirkstoffresistenten Mutationsvariante von EGFR präsentiert hat. Die bisherigen Arbeiten haben ebenfalls gezeigt, dass nicht die Reaktivität des Elektrophils, sondern die Geometrie und Orientierung zum Cystein ausschlaggebend für die Wirksamkeit eines kovalenten Inhibitors ist.^{80, 110, 119, 126}

Die von dem unselektiven Kinaseinhibitor PP1 abgeleitete Substanzklasse der Aminopyrazolopyrimidine wurde aufgrund ihrer bekannten Bindung an die Scharnierregion von Kinasen über zwei Wasserstoffbrücken zu Gln791 und Met793 als geeigneter Ausgangspunkt zum Design neuer kovalenter T790M-Inhibitoren gewählt (Abbildung 4.1).^{127, 128} Das Pyrazolopyrimidin-Grundgerüst ermöglicht darüber hinaus die effiziente Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek und die

einfache Derivatisierung der beiden Schlüsselemente zur Untersuchung der inhibitorischen Wirkung auf die Kinaseaktivität, des Selektivitätsprofils sowie der Bindungscharakteristiken.

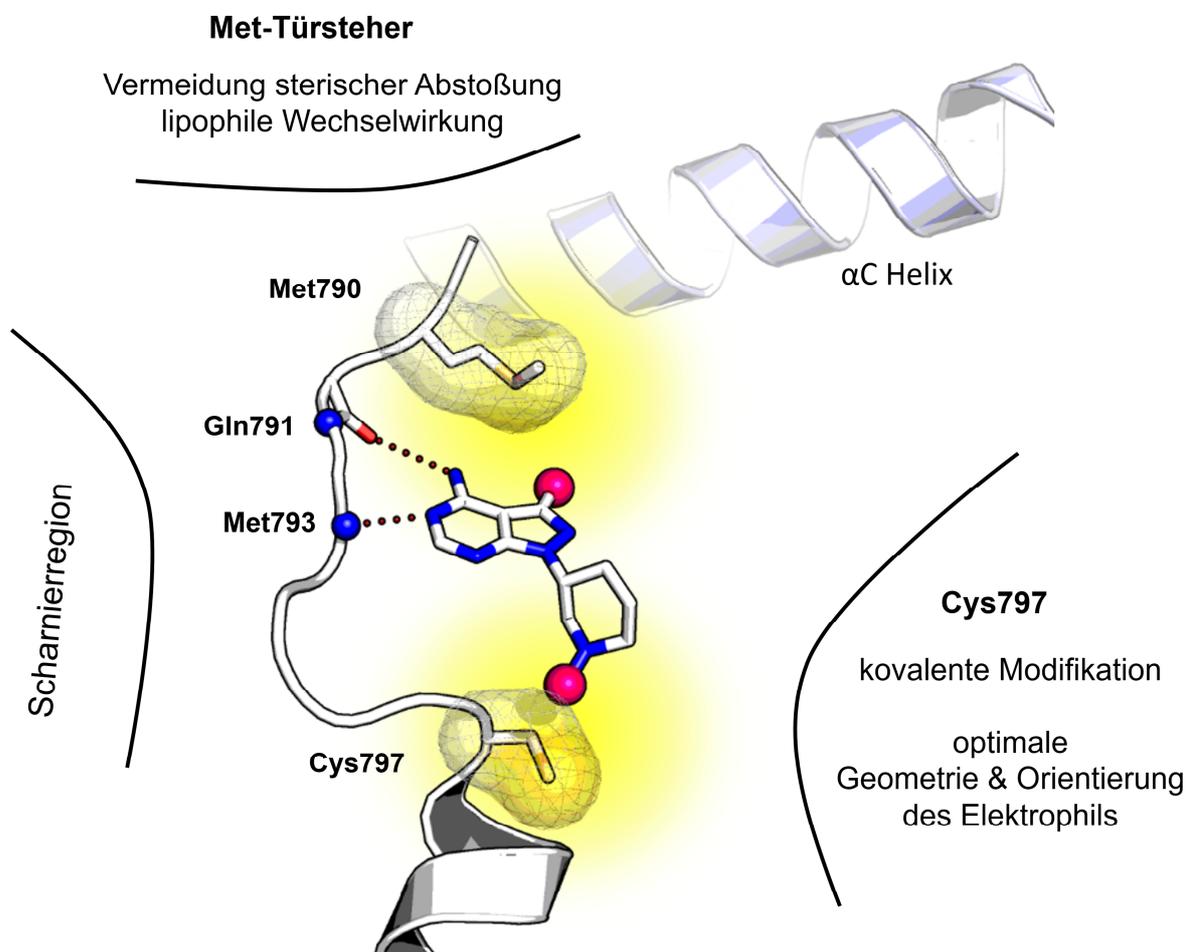


Abbildung 4.1: Schematische Repräsentation des strukturbasierten Ansatzes zur Entwicklung neuer EGFR-Inhibitoren zur Umgehung der T790M-Wirkstoffresistenz. Das Design der neuen Inhibitoren basiert auf einem 4-Aminopyrazolopyrimidin-Grundgerüst und beinhaltet die zielgerichtete Derivatisierung der 3-Position des Pyrazolopyrimidins und der N3-Position des Piperidins (pinke Markierungen). Das 4-Aminopyrazolopyrimidin (PDB-Eintrag: 4HCT) wurde in das aktive Zentrum von EGFR-T790M (PDB-Eintrag: 3IKA) modelliert.

Der Stickstoff N1 des Pyrazolopyrimidins wurde durch seine Orientierung in Richtung des Cys797 als geeigneter Verknüpfungspunkt für ein Michaelakzeptor-System identifiziert. Ein 3-Piperidin als Linker für das Elektrophil zu wählen erwies sich bereits für die Alkylierung eines zu EGFR analogen Cysteins (Cys481 in BTK) als

geeignetes System.^{129, 130} Das Linkersystem bewirkt eine eingeschränkte Flexibilität des Elektrophils und eine Orientierung in Richtung des Cys797, das wie in bisherigen Studien für kovalente EGFR-Inhibitoren und in der Optimierung der Pyrimidine gezeigt werden konnte, einen bedeutenden Einfluss auf die Kinetik der kovalenten Bindungsbildung und damit auf die Wirksamkeit hat.^{131, 132}

Zur Untersuchung der Eigenschaften des optimalen Motivs zur hydrophilen Interaktion mit dem Met-Türsteher erfolgte die Derivatisierung der 3-Position des Pyrazolopyrimidins (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2). Die Substitutionen sollten Aufschluss über einen möglichen Einfluss lipophiler Interaktionen geben und zugleich die räumliche Beschaffenheit und Zugänglichkeit der angrenzenden hydrophoben Tasche evaluieren, um einen Kompromiss zwischen Wechselwirkung und sterischem Anspruch zu finden.

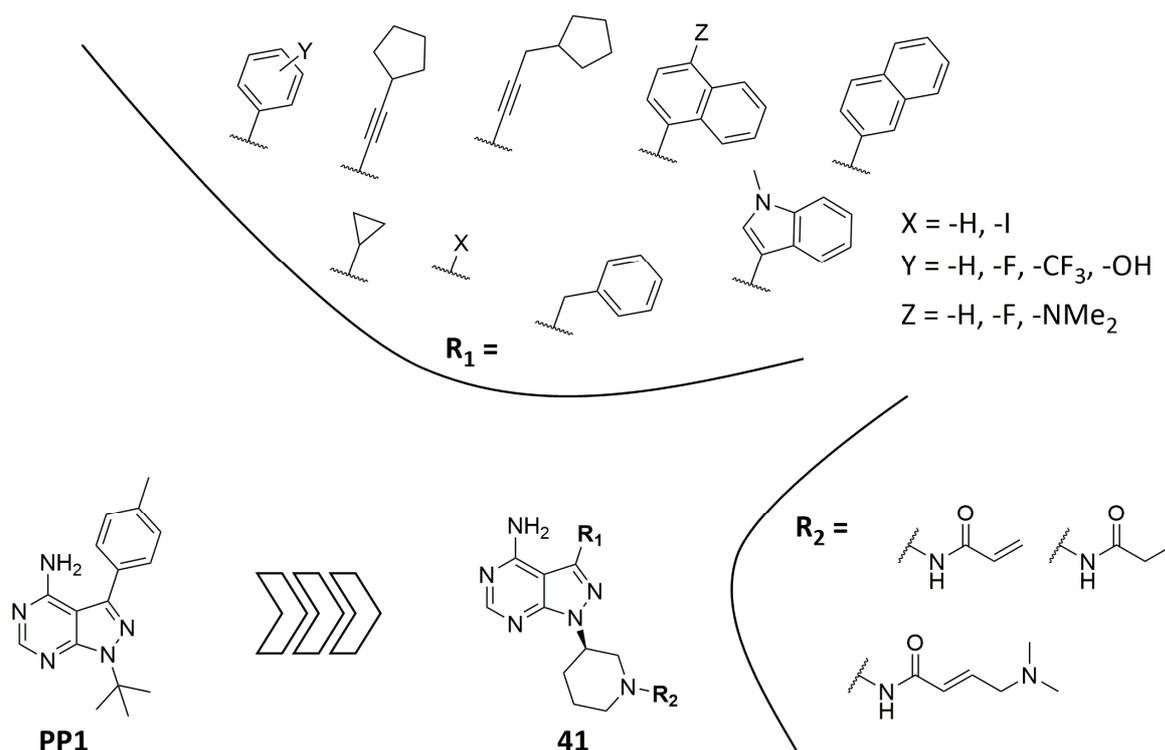


Abbildung 4.2: Rationales Design der Pyrazolopyrimidine zur kovalenten Adressierung der Met-Türstehermutante von EGFR. Schematische Darstellung der vom unselektiven Kinaseinhibitor PP1 abgeleiteten Pyrazolopyrimidin-Grundstruktur und ausgewählte Substituenten für ein tieferes Verständnis der Interaktionseigenschaften zum Met-Türsteher (R₁-Derivatisierung) und der potentiell kovalenten Bindungseigenschaften zu Cys797 (R₂-Derivatisierung).

Neben Derivaten mit wenig raumgreifenden Substituenten und verschiedensten elektronischen Eigenschaften (z. B. Halogen-, Ethin- bzw. Cyclopropyl-Substitution) wurden auch Benzyl und Phenyl-Derivate mit unterschiedlichen Halogenen in *meta*- oder *para*-Position entworfen. Sterisch sehr anspruchsvolle aromatische Bicyclen sollten die maximale Toleranz der lipophilen Extension an C-3 evaluieren.

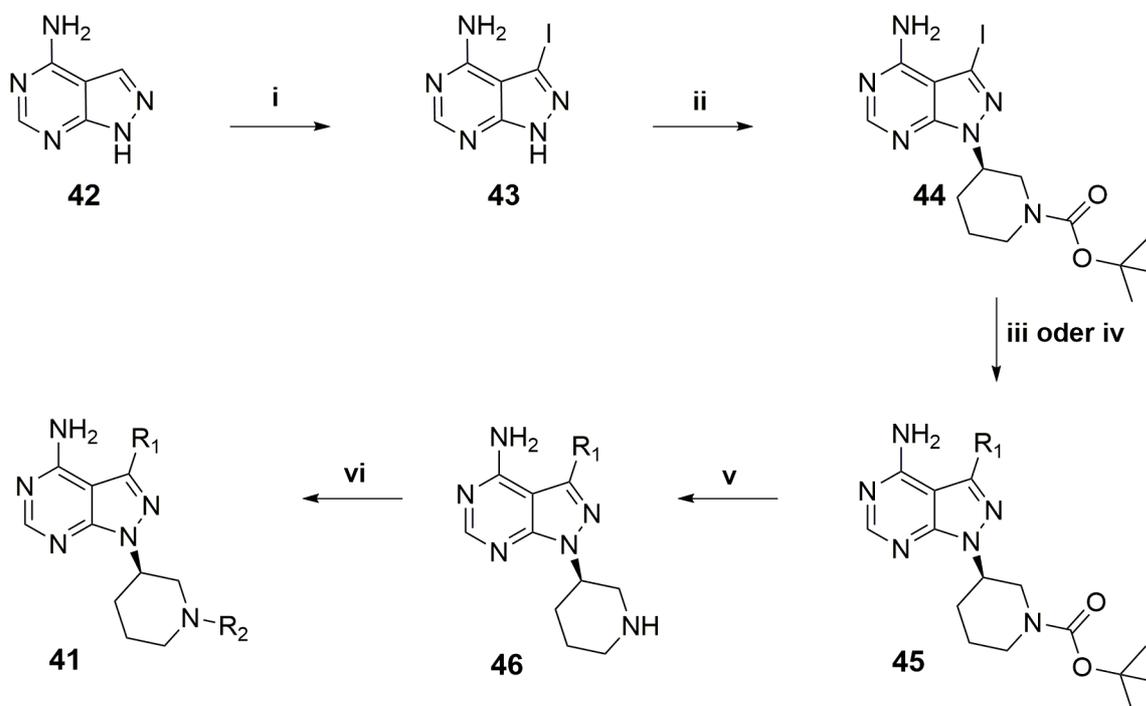
4.1 Synthese von Pyrazolopyrimidin-basierten Kinaseinhibitoren

Zur Synthese der Pyrazolopyrimidin-Bibliothek wurde auf literaturbekannten Vorschriften aufbauend eine neue Syntheseroute etabliert (Schema 4.1).¹³³ Die Iodierung der 3-Position des 1*H*-pyrazolo[3,4*d*]pyrimidin-4-amins (**42**) resultierte in Verbindung **43**, die in einer Mitsunobu-Reaktion mit *N*-Boc-geschütztem (*S*)-3-Hydroxypiperidin unter Inversion des Stereozentrums zu **44** umgesetzt wurde. Ausgehend von diesem entscheidenden Intermediat konnte über palladiumkatalysierte Kreuzkupplung (Suzuki-, Sonogashira-Kupplung) die Derivatisierung und Herstellung einer fokussierten Substanzbibliothek erfolgen. Anschließende Boc-Abspaltung des Kreuzkupplungsprodukts **45** mit TFA lieferte das sekundäre Amin **46**. Das Amin wurde in der Folge mit einem Michaelakzeptor unter Verwendung von Acryloylchlorid (**41d**, **41g**, **41i**, **41k**, **41n** und **41p-z**) oder 4-(Dimethylamino)but-2-ensäure (**41f** und **41m**) versehen. Die reversiblen Derivate (**41e**, **41h**, **41j**, **41l** und **41o**) wurden analog mit Propionylchlorid hergestellt. Zur Darstellung von **41b** erfolgte ausgehend vom Mitsunobu-Produkt (**44**) die Boc-Abspaltung und anschließende Herstellung des finalen Acrylamids. In der Sonogashira-Kreuzkupplung zur Darstellung der Verbindung **44s** konnte das dehalogenierte Mitsunobu-Produkt als Nebenprodukt isoliert und identifiziert werden. Nach Boc-Entschützung und Umsetzung mit Acryloylchlorid gemäß der allgemeinen Syntheseroute (Schema 4.1) wurde **41a** hergestellt und in die Substanzkollektion aufgenommen.^{xiii} Detaillierte synthetische Vorschriften aller

^{xiii} Teile der Pyrazolopyrimidin-basierten Substanzbibliothek (**41j**, **41n** und **41o**) wurden arbeitsgruppenintern von Steven Smith synthetisiert. Weitere Verbindungen wurden von Elisabeth Hennes (**41a**, **41i**, **41q**, **41t**, **41z**) und Lisa Goebel (**41g-h**, **41r-s**, **41y**) im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten hergestellt.

finalen Produkte sowie Zwischenstufen sind im experimentellen Teil (siehe Kapitel 8.1.3) aufgeführt.

Schema 4.1: Synthese der Pyrazolopyrimidine **41a, b, d-z**.



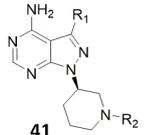
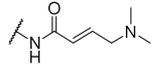
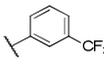
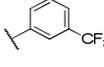
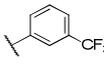
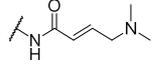
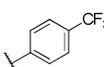
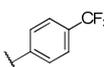
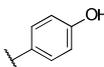
^a Reagenzien und Bedingungen: (i) NIS, DMF, 80 °C, 97 %; (ii) *N*-Boc-(*S*)-3-Hydroxypiperidin, DIAD, PPh₃, THF, RT, 58 %; (iii) Boronsäure /-ester, Pd(PPh₃)₄, ges. Na₂CO₃, DME/EtOH (3:1), 90 °C, 42-97 %; (iv) CuI, Pd(PPh₃)₂Cl₂, TEA, RT, 70 %; (v) TFA in DCM, RT, (vi) Acryloylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C, 19-80 % (2 Schritte).

4.2 Biochemische Charakterisierung der Pyrazolopyrimidine

Die biochemische Charakterisierung der Pyrazolopyrimidine **41a, b, 41d-z** erfolgte mit Hilfe des aktivitätsbasierten Assays KinEASE™ (Cisbio) durch Bestimmung der Kinaseaktivität von EGFR-WT, sowie den Mutationsvarianten EGFR-L858R und EGFR-L858R/T790M (Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 und siehe Kapitel 8.2). Die Substanzkollektion der Pyrazolopyrimidine umfasste 20 kovalente und 5 reversible Verbindungen.^{xiv}

^{xiv} Die IC₅₀-Bestimmungen erfolgten arbeitsgruppenintern von Simone Eppmann und Andreas Arndt.

Tabelle 4.1: IC₅₀-Bestimmungen für die Pyrazolopyrimidine **41a**, **b**, **d-q** gegenüber EGFR.

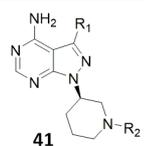
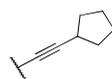
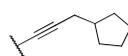
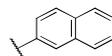
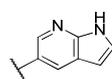
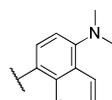
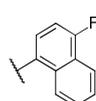
	 41		EGFR IC ₅₀ (nM)		
	R ₁	R ₂	WT	L858R	L858R/T790M
41a			6.9 ± 0.90	2.5 ± 0.17	1.6 ± 0.49
41b			0.28 ± 0.10	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
41d			0.14 ± 0.06	0.01 ± 0.01	0.24 ± 0.04
41e			7.3 ± 3.4	4.7 ± 1.7	> 10
41f			0.67 ± 0.08	0.22 ± 0.02	6.6 ± 1.8
41g			0.13 ± 0.07	0.01 ± 0.01	0.23 ± 0.05
41h			> 10	3.4 ± 2.1	> 10
41i			0.13 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.28 ± 0.10
41j			> 10	5.0 ± 4.6	> 10
41k			0.37 ± 0.09	0.03 ± 0.01	0.22 ± 0.08
41l			> 10	> 10	> 10
41m			3.0 ± 1.5	1.0 ± 0.48	6.1 ± 4.1
41n			0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.27 ± 0.02
41o			6.5 ± 2.8	5.9 ± 2.6	> 10
41p			0.7 ± 0.07	0.11 ± 0.04	0.22 ± 0.08
41q			0.02 ± 0.004	0.003 ± 0.002	0.04 ± 0.04

Gefitinib	-	-	< 0.001	< 0.001	0.19 ± 0.10
WZ4002	-	-	0.01 ± 0.007	< 0.001	< 0.001
Osimertinib	-	-	0.002 ± 0.0002	0.001 ± 0.0005	< 0.001
Rociletinib	-	-	0.002 ± 0.0005	0.002 ± 0.0002	0.003 ± 0.0006

Die Verbindung **41a**, die ausschließlich aus dem Scharnierregion-bindenden Element 4-Aminopyrazolopyrimidin und dem mit Acrylamid dekorierten Piperidin besteht, zeigte bereits einen inhibitorischen Effekt gegen die EGFR-Varianten mit IC₅₀-Werten im einstelligen mikromolaren Bereich (6.9 μM (WT), 2.5 μM (L858R) und 1.6 μM (L858R/T790M)). Die Vergrößerung des lipophilen Charakters durch Einführung eines Halogens (**41b**) resultierte in einer 80-fach erhöhten inhibitorischen Aktivität gegen die Resistenzmutante EGFR-L858R/T790M (IC₅₀ = 0.02 μM) sowie einer verminderten relativen Inhibition des Wildtyps (IC₅₀ = 0.28 μM) und führte zu einer bevorzugten Inhibition der Met790-Türstehervariante von EGFR. Die mit einer Phenylgruppe an C-3 ausgestattete Verbindung **41d** hingegen zeigte ebenfalls einen IC₅₀-Wert im niedrigen zweistelligen nanomolaren Bereich gegen die Aktivierungsmutante EGFR-L858R (0.01 μM), jedoch einen 24-fach verminderten Effekt gegen EGFR-L858R/T790M (0.24 μM). Weitere Phenyl-Derivate mit einem Fluor-Atom oder einer Trifluormethylgruppe in *meta*- oder *para*-Position sowie mit einem Cyclopropyl (Phenyl-Bioisoster) tendierten zu einem ähnlichen Inhibitionsprofil.

Die Einführung eines 4-Phenols an C-3 des Pyrazolopyrimidins führte hingegen zu einer stark verbesserten Inhibition der Mutationsvarianten EGFR-L858R (IC₅₀ = 0.003 μM) und EGFR-L858R/T790M (IC₅₀ = 0.04 μM). Das hydrophile Phenol scheint durch mögliche polare Interaktionen mit dem Protein, vermutlich mit der räumlich angrenzenden Aminosäure Glu762 der αC Helix, einen bedeutenden positiven Einfluss auf die inhibitorische Aktivität zu haben. Dieser Effekt wurde jedoch auch für den Wildtyp von EGFR beobachtet (IC₅₀ = 0.02 μM).

Tabelle 4.2: IC₅₀-Bestimmungen für die Pyrazolopyrimidine **41r-z** gegenüber EGFR.

			EGFR IC ₅₀ (μM)		
	R ₁	R ₂	WT	L858R	L858R/T790M
41r			0.02 ± 0.02	0.003 ± 0.003	0.01 ± 0.01
41s			0.75 ± 0.11	0.06 ± 0.03	1.4 ± 0.68
41t			0.75 ± 0.07	0.12 ± 0.04	0.92 ± 0.33
41u			0.02 ± 0.01	0.001 ± 0.0007	< 0.001
41v			0.01 ± 0.01	0.002 ± 0.001	0.003 ± 0.0004
41w			0.04 ± 0.01	0.002 ± 0.001	0.003 ± 0.001
41x			0.06 ± 0.01	0.001 ± 0.0003	0.002 ± 0.0008
41y			0.81 ± 0.08	0.27 ± 0.01	0.21 ± 0.05
41z			0.07 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Gefitinib	-	-	< 0.001	< 0.001	0.19 ± 0.10
WZ4002	-	-	0.01 ± 0.007	< 0.001	< 0.001
Osimertinib	-	-	0.002 ± 0.0002	0.001 ± 0.0005	< 0.001
Rociletinib	-	-	0.002 ± 0.0005	0.002 ± 0.0002	0.003 ± 0.0006

Zur Untersuchung möglicher lipophiler Wechselwirkungspartner für die hinter der Türsteheraminosäure befindliche hydrophobe Subtasche wurden weitere Verbindungen hergestellt, die ein Alkin verbrücktes Cyclopentan (**41s**) bzw. Ethylcyclopentan (**41t**) aufweisen. Die durch das lineare Alkin eingeführte Rigidität sollte einen sterischen Konflikt des Inhibitors mit Met790 umgehen und zugleich die Cycloalkylgruppen in die hydrophobe Subtasche ausrichten. Der Aktivitätsverlust von **41s** und **41t** gegen die T790M-Mutante (IC₅₀ = 1.4 μM bzw. IC₅₀ = 0.92 μM) verglichen

mit der Thr-Türstehervariante EGFR-L858R ($IC_{50} = 0.06 \mu\text{M}$ und $0.12 \mu\text{M}$) war ein deutliches Indiz für einen negativen Einfluss der raumgreifenden Substitutionen auf die Interaktion mit Met790. Die mit einer lipophilen, aber flexiblen Benzylgruppe versehene Verbindung **41r** wies hingegen einen starken inhibitorischen Effekt auf die Kinaseaktivität der EGFR-Mutationsvarianten L858R ($IC_{50} = 0.003 \mu\text{M}$) und L858R/T790M ($IC_{50} = 0.01 \mu\text{M}$) auf, auch wenn der Wildtyp gleichermaßen inhibiert wurde ($IC_{50} = 0.02 \mu\text{M}$).

Um weitere Erkenntnisse über potenzielle intermolekulare π -Wechselwirkungen mit der Met790-Aminosäureseitenkette zu gewinnen, wurde die 3-Position des Pyrazolopyrimidins mit diversen aromatischen Bicyclen (**41u-z**) derivatisiert. Die mit einer äußerst lipophilen Naphthylgruppe versehenen Verbindungen **41x** (1-Naphthyl) und **41u** (2-Naphthyl) führten zu einer hoch potenten Inhibition der L858R-Aktivierungs- (**41x**, $IC_{50} = 0.001 \mu\text{M}$; **41u**, $IC_{50} = 0.001 \mu\text{M}$) und wirkstoffresistenten Mutante EGFR-L858R/T790M (**41x**, $IC_{50} = 0.002 \mu\text{M}$; **41u**, $IC_{50} < 0.001 \mu\text{M}$). Mit der Einführung eines Azaindols (**41v**) bzw. Methylindols (**41w**) an Stelle der Naphthylgruppe wurden ebenfalls für beide Mutationsvarianten von EGFR mittlere inhibitorische Konzentrationen im einstelligen nanomolaren Bereich beobachtet (**41v**, $IC_{50} = 0.001 \mu\text{M}$ und **41w**, $IC_{50} = 0.001 \mu\text{M}$ bzgl. EGFR-L858R und $IC_{50} = 0.002 \mu\text{M}$ und $IC_{50} < 0.001 \mu\text{M}$ für **41v** bzw. **41w** bzgl. EGFR-L858R/T790M). Neben einer hohen Wirksamkeit zeigten die genannten bicyclischen Verbindungen zudem ein ausgeprägtes mutantenselektives Inhibitionsprofil mit einer bis zu 30-fach geringeren Inhibition des Wildtyps. Das Azaindol-Derivat (**41v**) stellte mit einer 3-fach verminderten Selektivität die einzige Ausnahme dar. Dessen erhöhte WT-Aktivität wird möglicherweise durch eine über N7 des Azaindols vermittelte H-Brücke zur Thr790-Türsteheraminoäure bewirkt. Ein eingeführtes stark elektronenziehendes Fluor-Atom in 4-Position des Naphthyls (**41z**) sorgte für eine bis zu 10-fach verminderte Inhibition aller EGFR-Varianten, während eine Dimethylamin-Substitution an dieser Position (**41y**) mit einem großen Verlust an Aktivität einherging.

Um den Einfluss des Elektrophils auf die Inhibition zu untersuchen, wurde zunächst ein Dimethylamin-modifiziertes Acrylamid eingeführt. Die damit versehenen Verbindungen **41f** und **41m** zeigten verglichen mit ihren Acrylamid-Analoga

(**41d** bzw. **41k**) eine jeweils ca. 30-fach geringere Inhibition der Türsteher-mutierten Resistenzmutante EGFR-L858R/T790M. Ein sterisch anspruchsvolles Dimethylamin kann große Auswirkungen auf die Konformation des Michaelakzeptors haben und die unterschiedliche inhibitorische Aktivität erklären. Das lässt zum einen den Schluss zu, dass ein unsubstituiertes Acrylamid das bevorzugte elektrophile System für die Pyrazolopyrimidinserie darstellt und zum anderen unterstreicht es einmal mehr die Bedeutung einer optimierten Geometrie des Elektrophils in Bezug auf das zu adressierende Cystein. Die reversiblen Analoga (**41e**, **41h**, **41j**, **41l** und **41o**) zeigten keine inhibitorische Wirkung unter 10 μM gegen die T790M-Resistenzmutante von EGFR und demonstrieren die Überlegenheit einer kovalenten Inhibition.

4.3 Profilierungsstudie zur Selektivität im Kinom

Die Selektivität gegenüber anderen Proteinkinasen stellt aufgrund der hochkonservierten Struktur der ATP-Bindungstasche der über 500 Vertreter dieser Proteinklasse die größte Herausforderung an Kinaseinhibitoren dar. Zur Minimierung toxischer Nebenwirkungen, ausgelöst durch *off-Target*-Inhibition, ist die Optimierung der Selektivität ein essentieller Bestandteil in der Entwicklung von Kinaseinhibitoren. Speziell für die hier dargestellten Pyrazolopyrimidine ist eine Kinomprofilierung von großer Bedeutung, da sie strukturell von dem unselektiven Kinaseinhibitor PP1 abgeleitet sind.¹³⁴ Die biochemische Profilierung der Substanz **41w** wurde von der Firma Life Technologies (SelectScreen®, Z'-LYTE™ Technologie) bei einer Substanzkonzentration von 1 μM und dem ATP- $K_{m, app}$ in Duplikaten gegen 100 ausgewählte Kinasen durchgeführt.

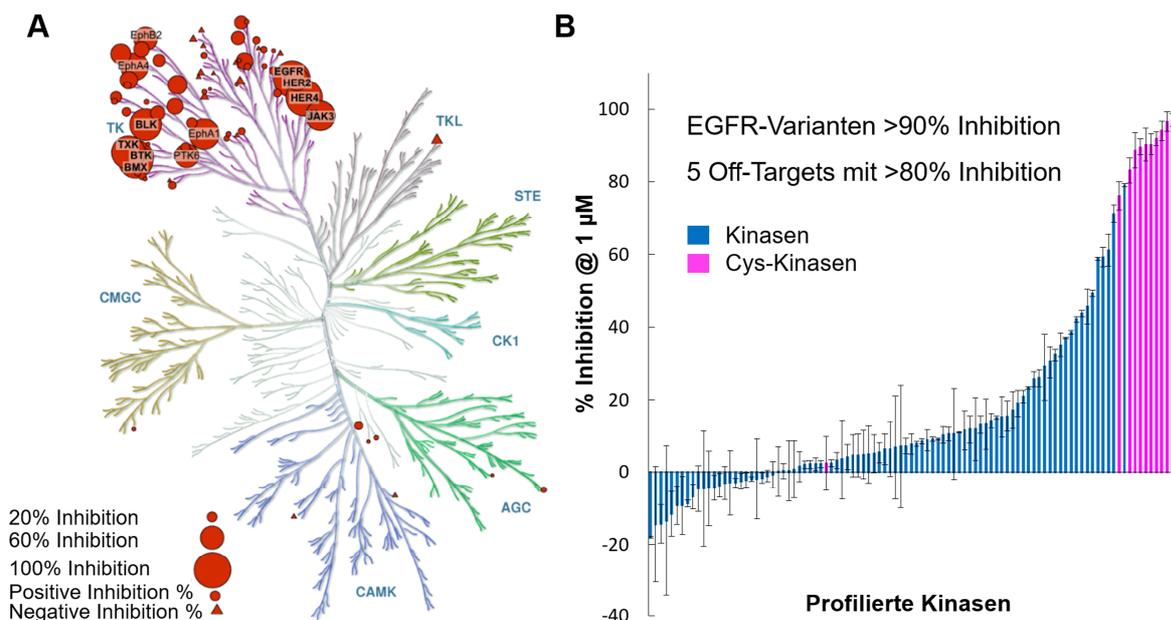


Abbildung 4.3: A) Kinom-Dendrogramm von **41w**. Bei einer Konzentration von 1 µM des Inhibitors **41w** wurde der Wildtyp von EGFR, sowie die Mutationsvarianten EGFR-L861Q, L858R, T790M und L858R/T790M stark inhibiert (> 90 %). Es wurde lediglich eine geringe Anzahl weiterer Kinasen (*off-targets*) mit über 80 % inhibiert (BLK, TXK, BMX, BTK und ErbB-4). Die Profilerung der Kinasen wurde mit dem SelectScreen® Profilerungs-Service der Firma Life Technologies durchgeführt. Das Kinasen-Dendrogramm wurde modifiziert und die finale Darstellung wurde mit der Genehmigung von Cell Signaling Technology, Inc (www.cellsignal.com) generiert.¹³⁵ B) Darstellung der Profilerung von Verbindung **41w** gegenüber 100 Kinasen (inklusive ausgewählter Mutationsvarianten). Die Kinasen, welche ein im aktiven Zentrum befindliches reaktives Cystein (analog zu Cys797 in EGFR) aufweisen sind in pink dargestellt.

41w inhibierte die Kinaseaktivität des Wildtyps von EGFR sowie der EGFR-Mutationsvarianten (L861Q, L858R, T790M und L858R/T790M) mit mehr als 90 % (Abbildung 4.3). Es wurde lediglich eine geringe Anzahl weiterer Kinasen (*off-Targets*) mit über 80 % inhibiert (BLK, TXK, BMX, BTK und ErbB-4), bei denen es sich ebenfalls und ausschließlich um Tyrosinkinase handelt, die ein zu EGFR analoges Cystein in der ATP-Bindungstasche aufweisen. Die Kreuzreaktivität mit den Kinasen BMX, BLK und TXK wurde bereits für andere kovalente EGFR-Inhibitoren beschrieben. Die Kinasen BMX und BLK sind außerdem bekannte *off-Targets* des zu **41w** strukturell ähnlichen BTK-Inhibitors Ibrutinib.^{110, 112, 113, 136, 137} Die Tatsache, dass **41w** die Tyrosinkinase ITK trotz reaktivem Cystein in der ATP-Bindungstasche nicht inhibiert hat (2 % Inhibition), unterstreicht die Bedeutung einer starken initialen reversiblen

Bindung eines kovalenten Inhibitors und bestätigt, dass die milde Reaktivität des Acrylamids es zu einem geeigneten Michaelakzeptor zur kovalenten Modifizierung von Kinasen macht.

Die Profilierungsstudie der Verbindung **41w** lieferte ein exzellentes Selektivitätsprofil innerhalb des untersuchten humanen Kinoms und belegte den Selektivitätsvorteil, den ein kovalenter Kinaseinhibitor mit sich bringen kann. Zudem bestätigte die unterschiedlich starke Inhibition der Kinasen mit analogem Cystein die Möglichkeit zur Differenzierung und gezielten Adressierung einer einzelnen Kinase. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die Profilierung der Substanz nur mit 100 Kinasen durchgeführt wurde und für eine vollständige Evaluierung der Selektivität das gesamte zur Verfügung stehende Kinom untersucht werden müsste.

4.4 MS-basierte Validierung der Alkylierung von Cys797 in EGFR-T790M

Zur Validierung eines kovalenten Bindungsmodus der Inhibitoren **41w** und **41x** mit EGFR-T790M wurden die Verbindungen, nach Inkubation mit der isolierten Kinase massenspektrometrisch (ESI-MS) analysiert (siehe Kapitel 8.3). Die dekonvolutierte ESI-MS-Spektren (Abbildung 4.4) zeigten für die getesteten Substanzen nach Inkubation mit dem Protein eine entsprechende Massenzunahme von 399 Da (**41w**) und 398 Da (**41x**) verglichen mit einer mit DMSO behandelten Kontrolle. Für beide Inhibitoren wurde bei einer 60-minütigen Inkubation mit einem 3-fachen molaren Überschuss des Inhibitors eine vollständige und einfache Modifikation des Proteins beobachtet.

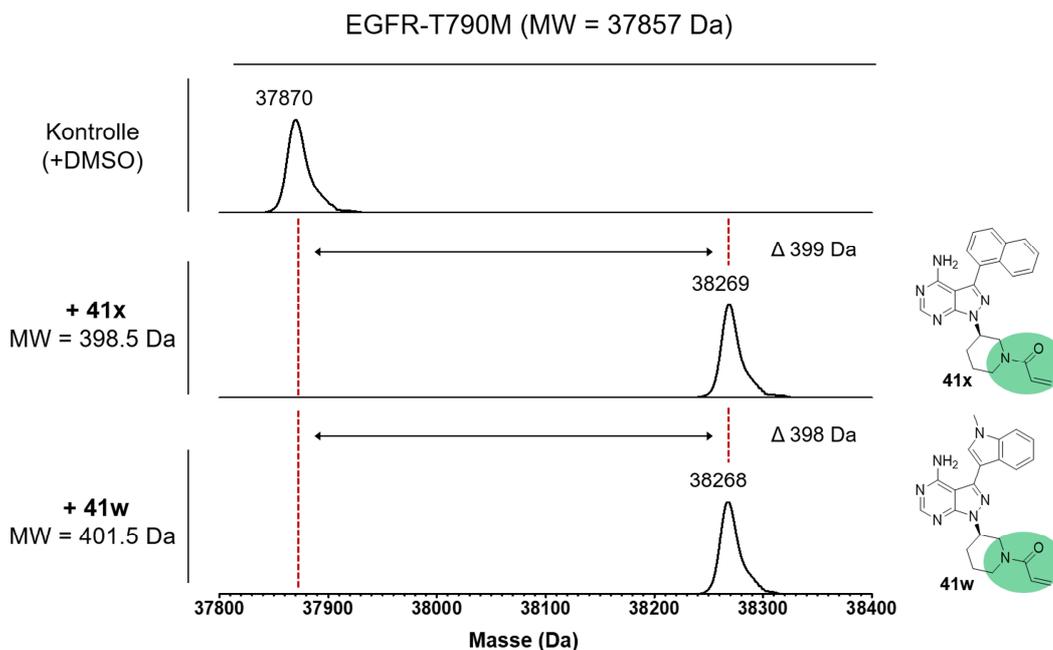


Abbildung 4.4: Übersicht der dekonvolvierten ESI-MS-Spektren zur Analyse der kovalenten Modifikation von EGFR-T790M mit den Inhibitoren **41w** und **41x**. Die Massendifferenz in Relation zur DMSO behandelten Kontrolle sind als Δ -Werte dargestellt und zeigen jeweils eine vollständige Modifikation.

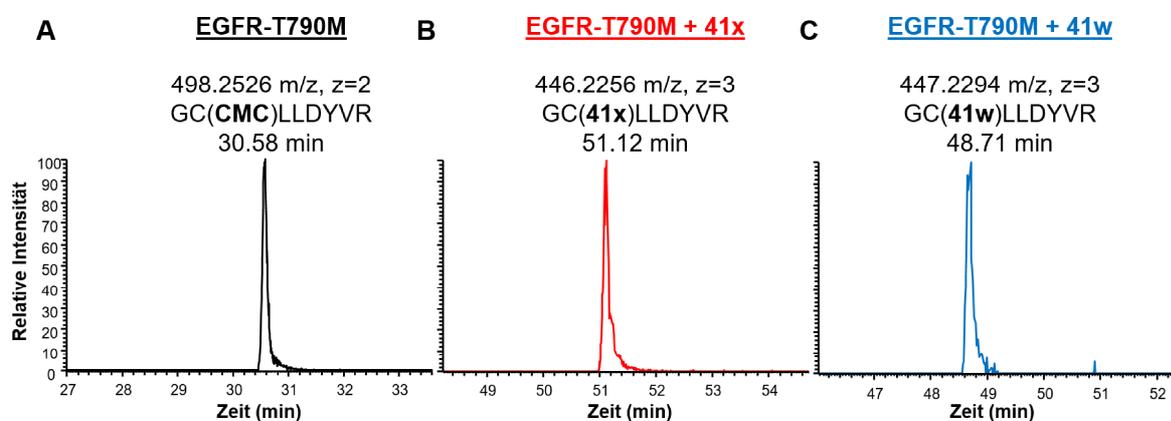


Abbildung 4.5: Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) der drei verschiedenen Isoformen des identifizierten Peptids GCLLDYVR nach Behandlung mit (A) Iodacetamid (Kontrolle), (B) **41x** und (C) **41w**. Das carbamidomethylierte (CMC) Peptid ist nahezu in keiner Probe nach Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor mehr vorhanden, wohingegen das mit dem jeweiligen Inhibitor modifizierte Peptid in den entsprechenden Proben detektiert werden konnte.

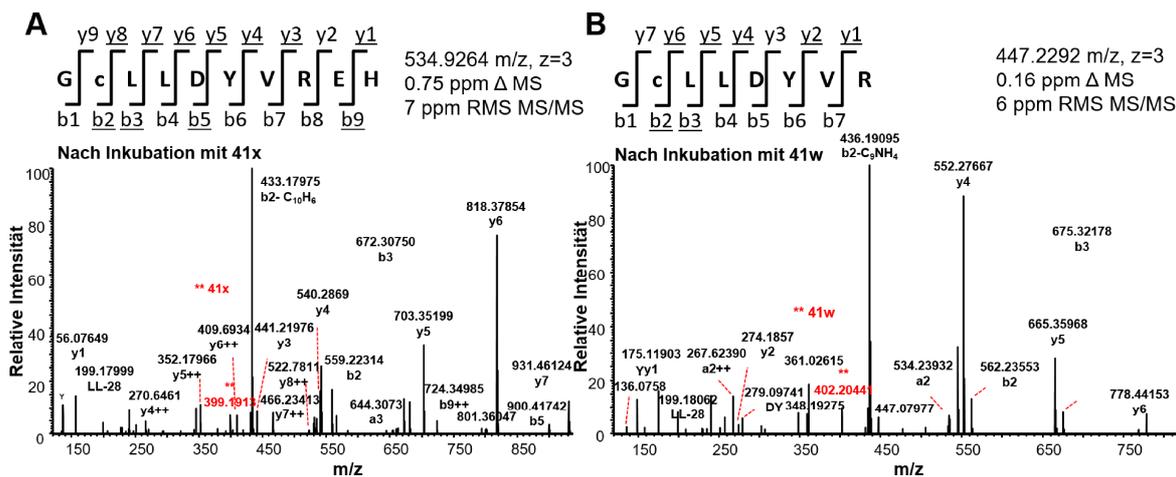


Abbildung 4.6: Fragment-Ion-Spektrum des Peptids GC₇₉₇LLDYVREH bzw. GC₇₉₇LLDYVR nach Subtilisin-Verdau von EGFR-T790M nach Inkubation mit (A) **41w** und (B) **41x**. Die jeweiligen Massen der Cys797 beinhaltenden Peptidfragmente weisen eindeutig eine Modifikation mit dem entsprechenden Inhibitor auf. Die gefundenen Peptidfragmente beweisen eindeutig die Alkylierung der Aminosäure Cys797 in EGFR.

Zur genauen Bestimmung der modifizierten Aminosäure wurden die Verbindungen **41x** und **41w** mit EGFR-T790M nach Inkubation mit der Protease Subtilisin verdaut und die erhaltenen Peptide mit Hilfe von HPLC und gekoppelter MS/MS analysiert.^{xv} Die Analyse ergab eine Massenzunahme der entsprechenden Inhibitoren in dem Peptidfragment GCLLDYVR, das eindeutig dem Cys797 enthaltenden Peptidfragment zugeordnet werden konnte. In den Proben nach Inkubation mit den Inhibitoren konnte neben dem mit dem jeweiligen Inhibitor modifizierten Peptid (**41x**; 446.2256 m/z, $z = 3$ und **41w**, 447.2294 m/z, $z = 3$) das entsprechende carbamidomethylierte Peptid (Negativkontrolle) nur noch marginal detektiert werden und dadurch der Nachweis einer vollständigen Alkylierung eindeutig erbracht werden (Abbildung 4.5). Die Fragment-Ion-Spektren der Proben nach Inkubation mit den Verbindungen **41w** und **41x** sollten Aufschluss über die exakte Modifikation des Peptids erbringen. In der Probe nach Inkubation der Kinase mit **41x** konnten die Peptidfragmente b2, b3, b5 und b9 sowie y1 und y3-y8 eindeutig identifiziert werden (Abbildung 4.6). Neben der exakten Masse von **41x** (399.1913 m/z) konnte anhand

^{xv} In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Dr. René Zahedi am Leipzig-Institut für Analytische Wissenschaften – IAS in Dortmund.

der Massenzunahme der entsprechenden Peptidfragmente die Modifikation des Cys797 verifiziert werden. Für die Probe nach Inkubation mit **41w** wurden die Peptidfragmente b2 und b3 sowie y1, y2 und y4 bis y6 detektiert. In diesem Fall konnte die Masse des Inhibitors **41w** (402.20441 m/z) identifiziert werden. Die gefundene Massenzunahme der entsprechenden Peptidfragmente erbrachte den eindeutigen Nachweis der Alkylierung des gewünschten Cysteins in EGFR-T790M (Cys797).

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse die spezifische Modifikation des Cys797 in EGFR-T790M durch die Inhibitoren **41w** bzw. **41x** eindeutig nachgewiesen werden.

4.5 Komplexstrukturen der Pyrazolopyrimidine in EGFR-T790M

Um ein detailliertes Verständnis über den Bindungsmodus und der SAR der Pyrazolopyrimidine zu erhalten, wurden **41w** und **41x** mit der Kinasedomäne der T790M-Mutante des EGF-Rezeptors kokristallisiert.^{xvi}

^{xvi} Dissertation Christian Becker, 2017, TU Dortmund.

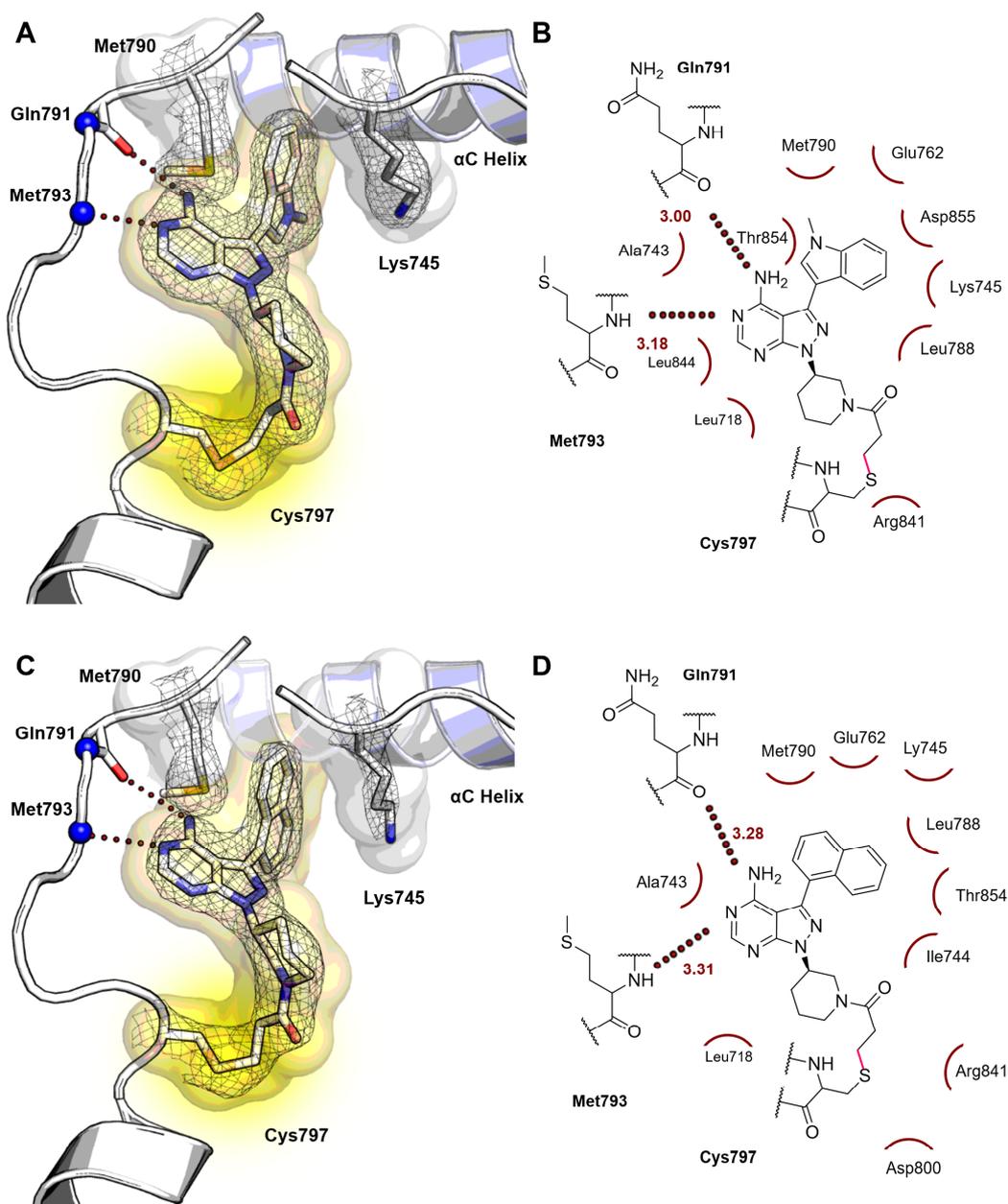


Abbildung 4.7: Kristallstrukturen der Pyrazolopyrimidine im Komplex mit EGFR-T790M. Diagramme der experimentellen Elektronendichte von (A) EGFR-T790M-**41w** bei 2.5 Å (PDB-Eintrag: 5J9Z) und (C) EGFR-T790M-**41x** bei 2.8 Å (PDB-Eintrag: 5J9Y). Elektronendichtekarte $2F_o - F_c$ konturiert bei 1σ . Wasserstoffbrückenbindungen des Inhibitors mit der Scharnierregion (weiß) sind als rot gepunktete Linie dargestellt. Die Strukturelemente der N-terminalen Subdomäne und der α C Helix sind in weiß bzw. blau gezeigt. Das lipophile Methylindol (**41w**) und der 1-Naphthylrest (**41x**) an C-3 des Pyrazolopyrimidins zeigen in Richtung der hydrophoben Tasche und sind zwischen dem Met-Türsteher (Met790) und der Alkylseitenkette von Lys745 eingeschlossen. Der modifizierte *LigPlot*¹³⁸ des Liganden **41w** (B) bzw. **41x** (D) zeigt schematisch die verschiedenen Wechselwirkungen mit den Aminosäuren des Proteins. Wasserstoffbrückenbindungen (Länge in Å) sind als rot gepunktete Linie und lipophile Interaktionen als rote Halbkreise dargestellt. Die neu formierte kovalente Bindung zwischen dem Liganden und dem Protein ist in Pink visualisiert.

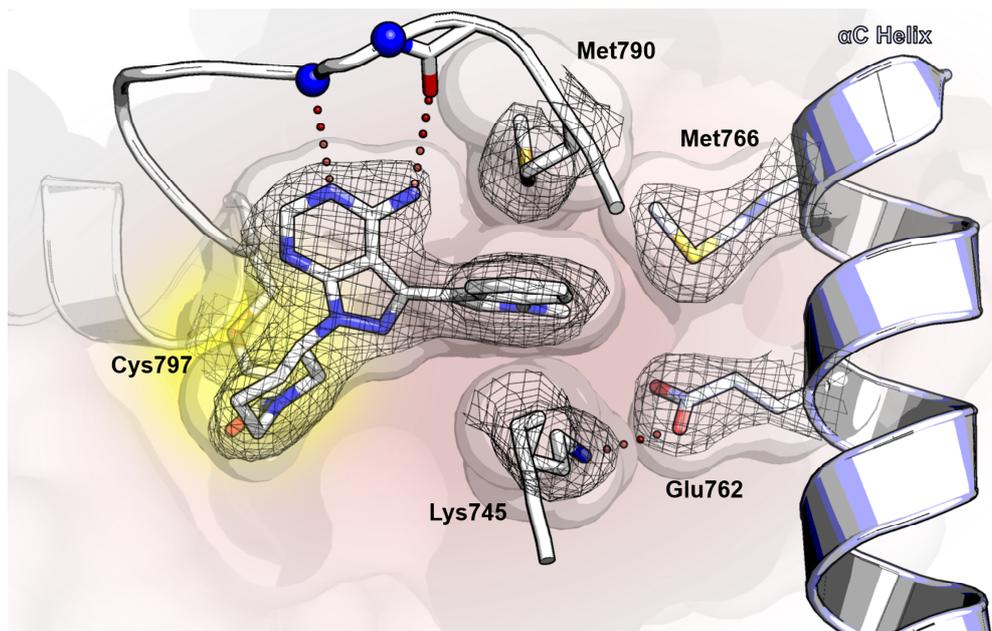


Abbildung 4.8: Das Methylindol von **41w** (PDB-Eintrag: 5J9Z) ist von lipophilen Aminosäureseitenketten umgeben und interagiert mit dem Met-Türsteher (Met790) und der Alkylkette des katalytischen Lys745. Das Amin von Lys745 bildet eine Salzbrücke zu Glu762 aus der α C Helix aus.

Die Komplexstrukturen belegten eindeutig die Alkylierung von Cys797 am Rande der ATP-Bindungstasche durch die Inhibitoren **41w** und **41x** (Abbildung 4.7). Neben zwei direkten Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat der Scharnierregion (Gln791 und Met793) sorgt die 3-Piperidinyl-*N*-Acrylamid-Struktur in **41w** und **41x** für eine optimale Bindungsgeometrie zu Cys797. Die Aminofunktion an 4-Position des Pyrazolopyrimidins bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Carbonyl-Rest im Peptidrückgrat von Gln791 aus. Das Stickstoffatom *N*6 des Pyrazolopyrimidins fungiert als Wasserstoffbrückendonator und stellt den Kontakt zum Peptidrückgrat von Met793 her. Die Komplexstruktur mit **41w** weist eine direkte Wechselwirkung des Methylindols mit der Met-Türsteheramino­säure (Met790) sowie der benachbarten Alkylseitenkette des konservierten Lys745 auf. Die optimale Positionierung des Methylindols inmitten der beiden Aminosäureseitenketten ermöglicht ausgeprägte lipophile Wechselwirkungen. Unterstützt wird dieser Effekt durch die angrenzenden hydrophoben Aminosäuren Met766 und Leu788 (Abbildung 4.8).

Das lipophile Milieu wird durch die Salzbrücke des Amins der Lysinseitenkette (Lys745) und der Glutaminsäure (Glu762) begrenzt. Die Naphthylgruppe von **41x** nimmt eine zu **41w** identische Orientierung bezüglich Met790 und Lys745 ein und liefert dieselben vorteilhaften lipophilen Wechselwirkungen. Diese Schlüsselinteraktion scheint die strukturelle Ursache für die hohe Potenz beider Verbindungen gegen die Met790-Mutante zu sein (**41w**, $IC_{50} = 0.003 \mu\text{M}$; **41x**, $IC_{50} = 0.002 \mu\text{M}$).

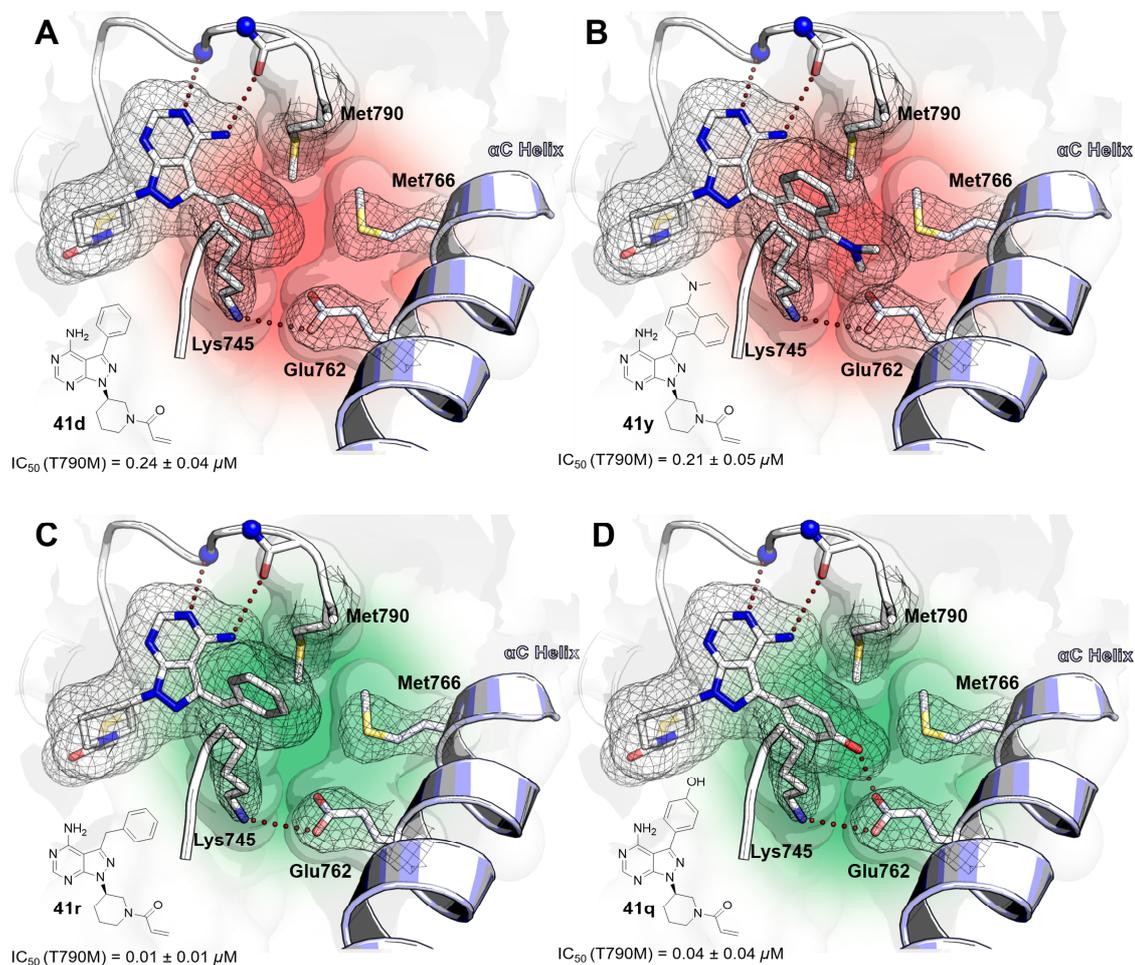


Abbildung 4.9: Modellierung der Substanzen (A) **41d**, (B) **41y**, (C) **41r** und (D) **41q** in die Komplexstruktur von **41w** in EGFR-T790M (PDB-Eintrag: 5J9Z). Die moderate biochemische Potenz der Verbindungen **41d** und **41y** lässt sich durch unzureichende Wechselwirkungen mit der hydrophoben Umgebung (**41d**) und sterischen Konflikten (**41y**) erklären (rot). Die intrinsische Flexibilität der Benzylgruppe (**41r**) ermöglicht eine Positionierung des Aromaten zwischen Met790 und Lys745 wie im Fall der hochaktiven bicyclischen Derivaten und führt zu einer verbesserten Aktivität (grün). Das Phenol-Derivat (**41q**) kann die unzureichenden hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Protein durch eine Wasserstoffbrückenbindung zu Glu762 ausgleichen (grün).

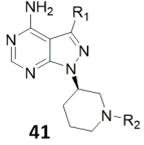
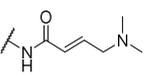
Auf den Komplexstrukturen von **41w** und **41x** aufbauende Modellierungsstudien der Verbindungen **41d**, **41y**, **41r** und **41q** gaben darüber hinaus Aufschluss über die beobachtete SAR der Pyrazolopyrimidine und führten zu einem besseren Verständnis der Wechselwirkungen innerhalb der ATP-Bindungstasche der T790M-Mutante von EGFR (Abbildung 4.9). Die Phenyl-Substitution von **41d** (Abbildung 4.9 A) lässt eine Bindung an die Scharnierregion zu, sorgt aber nicht für ausreichend starke Interaktionen mit der hydrophoben Umgebung im rückwärtigen Teil der ATP-Bindungstasche, die für den Alkylierungsschritt und der effektiven Inhibition von EGFR-T790M erforderlich sind. Das 1-Naphthyl-Derivat **41y** hingegen weist trotz desselben lipophilen Charakters wie das hochpotente **41x** eine 100-fach verminderte inhibitorische Aktivität gegenüber der T790M-EGFR-Variante auf. Die Modellierungsstudien ließen deutlich einen sterischen Konflikt des Dimethylamins mit den Seitenketten der Aminosäuren Met766 sowie Glu762 (Abbildung 4.9 B) erkennen, der die reduzierte Aktivität erklärt. Die Flexibilität der Benzylgruppe von **41r** lässt eine zu den Bicyclen ähnliche Ausrichtung des Aromaten zu, was vermutlich zu einer stärkeren Wechselwirkung und einer 24-fach höheren Potenz gegenüber der Türstehermutante führt, im Vergleich mit dem Phenyl-Derivat (Abbildung 4.9 C). Die Hydroxylgruppe von **41q** scheint die unzureichenden hydrophoben Interaktionen mit dem Protein durch eine Wasserstoffbrückenbindung zu Glu762 auszugleichen (Abbildung 4.9 C).

Zusammenfassend lieferten die Komplexkristallstrukturen von **41w** und **41x** in EGFR-T790M neben dem Nachweis einer kovalenten Modifizierung von Cys797, strukturelle Erkenntnisse über die Bedeutung der lipophilen Substituenten an C-3 der Pyrazolopyrimidine und ließen eine direkte Wechselwirkung zwischen den Inhibitoren und der Met-Türsteheraminosäure und Lys745 erkennen. Der besondere lipophile Kontakt erklärt die hohe Potenz der Pyrazolopyrimidine gegenüber der T790M-Mutante und bestätigte das Konzept einer gezielten Adressierung der hydrophoben Subtasche, einschließlich des Met-Türstehers, zur Steigerung der Affinität und Mutantenselektivität.

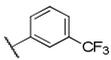
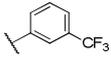
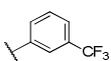
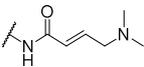
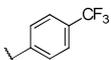
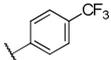
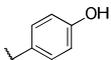
4.6 Evaluierung der Pyrazolopyrimidine in Krebszelllinien

Zur Evaluierung der Pyrazolopyrimidine in klinisch relevanten Zelllinien des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, wurden die Verbindungen **41a**, **b**, **d-z** in HCC827- (Exon 19 Deletion in EGFR) sowie H1975-Zellen (EGFR-L858R/T790M) in Bezug auf ihren Effekt auf die Zellviabilität getestet.^{xvii} Zur Untersuchung der Toxizität, speziell der *on-target*-Toxizität, wurde die Wirkung der Pyrazolopyrimidine auf A431-Zellen (EGFR-Überexpression) getestet (Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4). Die Zellen wurden mit den Inhibitoren **41a**, **b**, **d-z** (0-30 μ M) für 96 Stunden behandelt und die Viabilität mit Hilfe des *Cell Titer-Glo Assays* (Promega GmbH) analysiert (siehe Kapitel 8.4). Gefitinib, WZ4002, Osimertinib sowie Rociletinib dienten dabei als Referenzinhibitoren.

Tabelle 4.3: IC₅₀-Werte der Pyrimidine (**41a,b** und **41d-q**) gegenüber den Zelllinien A431 (EGFR-Überexpression) sowie den NSCLC-Zelllinien HCC827 (Exon 19 Deletion in EGFR) und H1975 (EGFR-L858R/T790M).

	 41		Krebszelllinien IC ₅₀ [μ M]		
			A431	HCC827	H1975
41a			n.i. ^a	9.90 \pm 1.02	n.i.
41b			18.2 \pm 7.06	0.59 \pm 0.13	3.89 \pm 0.94
41d			12.7 \pm 4.37	0.071 \pm 0.02	3.67 \pm 0.10
41e			n.i.	n.i.	n.i.
41f			29.8 \pm 0.39	1.19 \pm 4.48	29.9 \pm 0.26
41g			11.7 \pm 3.81	0.07 \pm 0.35	3.37 \pm 0.85

^{xvii} Die Zelleexperimente wurden arbeitsgruppenintern von Jonas Lategahn durchgeführt.

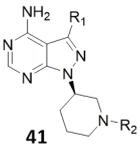
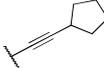
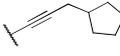
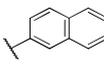
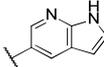
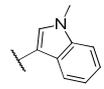
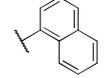
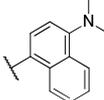
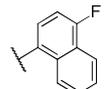
41h			n.i.	22.3 ± 4.85	n.i.
41i			17.0 ± 5.92	0.08 ± 0.03	1.84 ± 0.36
41j			n.i.	25.9 ± 3.58	n.i.
41k			16.0 ± 2.81	0.65 ± 0.13	4.16 ± 0.77
41l			n.i.	n.i.	n.i.
41m			13.7 ± 1.57	6.39 ± 1.62	20.6 ± 2.98
41n			8.87 ± 4.38	0.16 ± 0.08	1.38 ± 0.31
41o			n.i.	23.6 ± 6.96	n.i.
41p			28.1 ± 4.06	0.31 ± 0.12	5.83 ± 1.84
41q			4.17 ± 2.20	0.07 ± 0.02	1.84 ± 0.56
Gefitinib	-	-	1.71 ± 0.79	-	10.7 ± 2.55
WZ4002	-	-	2.21 ± 0.44	-	0.09 ± 0.01
Osimertinib	-	-	0.67 ± 0.23	-	< 0.014
Rociletinib	-	-	1.66 ± 0.12	-	0.10 ± 0.03

^an.i. kein inhibitorischer Effekt bei Applikation von 30 μ M Testsubstanz.

Die an C-3 unsubstituierte kovalente Substanz **41a** zeigte keinen Effekt auf die Viabilität der H1975-Zellen und eine moderate Wirkung auf der HCC827-Zelllinie ($IC_{50} = 9.90 \mu$ M). Die lipophileren Phenyl-Verbindungen (**41d**, **41g**, **41i**, **41k** und **41n**) sowie das Cyclopropyl-Derivat (**41p**) inhibierten das Wachstum der H1975-Zellen im einstelligen mikromolaren Bereich ($IC_{50} = 1.38$ - 5.83μ M), wobei die *para*-substituierten Derivate mit IC_{50} -Werten von 1.84 (Fluor) bzw. 1.38 μ M (CF_3) den stärksten Effekt erzielten. In den HCC827-Zellen wurde für die Phenyl-Derivate eine deutlich stärkere Inhibition des Zellenwachstums beobachtet ($IC_{50} = 0.07$ - 0.65μ M) und der Trend aus den biochemischen Assays bestätigt.

Die starke Inhibition der Kinaseaktivität von EGFR-L858R/T790M durch **41q** (4-Phenolsubstituent an C-3) und **41b** (Iod-Atom an C-3) ließ sich nicht in den zellbasierten Assay übertragen (H1975, $IC_{50} = 1.84 \mu\text{M}$ und $3.89 \mu\text{M}$). Beide Inhibitoren verzeichneten hingegen einen stark inhibierenden Effekt auf die HCC827-Zellen ($IC_{50} = 0.07 \mu\text{M}$ bzw. $0.59 \mu\text{M}$.) ohne größere Wirkung auf das Wachstum der Wildtyp-Zelllinie (A431) ($4.17\text{-}29.6 \mu\text{M}$). In Übereinstimmung mit den Daten aus dem aktivitätsbasierten Assay wurde für die reversiblen Inhibitoren (**41e**, **41h**, **41j**, **41l** und **41o**) im Gegensatz zu deren kovalenten Analoga (**41d**, **41j**, **41i**, **41k** und **41n**) kein signifikanter Effekt auf die Viabilität der Krebszelllinien beobachtet. Die Substanzen mit einem Dimethylamin-substituierten Acrylamid als Michaelakzeptor (**41f** und **41m**) hatten auf beiden NSCLC-Zelllinien einen erheblich geringeren inhibierenden Effekt (5-17-fach).

Tabelle 4.4: IC₅₀-Werte der Pyrimidine (**41r-z**) gegenüber den Zelllinien A431 (EGFR-Wildtyp-Überexpression) sowie den NSCLC-Zelllinien HCC827 (EGFR Exon 19 Deletion) und H1975 (EGFR-L858R/T790M).

		Krebszelllinien IC ₅₀ [μM]			
	R ₁	R ₂	A431	HCC827	H1975
41r			19.9 ± 9.59	0.15 ± 0.02	0.69 ± 0.165
41s			10.9 ± 2.32	1.15 ± 0.14	8.27 ± 0.30
41t			8.77 ± 2.88	3.15 ± 0.55	6.93 ± 1.14
41u			3.60 ± 1.52	< 0.014	0.14 ± 0.05
41v			1.39 ± 0.59	< 0.014	0.28 ± 0.03
41w			6.78 ± 4.45	0.09 ± 0.08	0.23 ± 0.06
41x			29.4 ± 1.67	0.50 ± 0.04	0.49 ± 0.32
41y			24.5 ± 5.76	2.13 ± 0.513	2.67 ± 1.64
41z			12.8 ± 4.63	0.43 ± 0.10	0.36 ± 0.19
Gefitinib	-	-	1.71 ± 0.792	-	10.7 ± 2.55
WZ4002	-	-	2.21 ± 0.44	-	0.09 ± 0.01
Osimertinib	-	-	0.67 ± 0.23	-	< 0.014
Rociletinib	-	-	1.66 ± 0.120	-	0.10 ± 0.03

41s und **41t**, die über ein Alkin mit einem Cyclopentan bzw. Ethylcyclopentan versehen sind, konnten weder in der H1975- noch in der HCC827-Zelllinie starke inhibitorische Effekte hervorrufen (H1975, IC₅₀ = 8.27 bzw. 6.93 μM; HCC827, IC₅₀ = 1.15 bzw. 3.15 μM) (Tabelle 4.4).

Das lipophile, aber flexiblere Benzyl-Derivat **41r** bestätigte die starke Inhibition der Kinaseaktivität beider onkogenen Mutationsvarianten aus dem aktivitätsbasierten Assay und zeigte einen erheblichen Effekt auf die Viabilität der H1975- ($IC_{50} = 0.69 \mu M$) und HCC827-Zellen ($IC_{50} = 0.15 \mu M$). Das Wachstum der Wildtyp-Zelllinie A431 wurde durch **41r** lediglich schwach inhibiert ($IC_{50} = 19.9 \mu M$).

Die mit bicyclischen Aromaten an der 3-Position des Pyrazolopyrimidins derivatisierten Inhibitoren **41u-x** und **41z**, die sich bereits im aktivitätsbasierten Assay als äußerst potent erwiesen, verzeichneten auch in H1975- ($IC_{50} = 0.14-0.49 \mu M$) sowie in HCC827-Zellen ($IC_{50} = < 0.014-0.50 \mu M$) eine exzellente inhibitorische Wirksamkeit. Eine weitere Besonderheit war der geringe Effekt auf der Wildtyp-Zelllinie A431 ($IC_{50} = 1.39-29.4 \mu M$; 26-60-fache Mutantenselektivität). Das mit einem 2-Naphthyl versehene Derivat **41u** zeigte in den H1975-Zellen die höchste Potenz ($IC_{50} = 0.14 \mu M$), wenngleich die 1-Naphthyl-Substanzen **41x** und **41z** über ein exzellentes mutantenselektives Profil verfügten (60-bzw. 36-fach). Das Azaindol **41v** reduzierte zwar ebenfalls die Viabilität der H1975-Zellen deutlich ($IC_{50} = 0.28 \mu M$), verfügte aber auch, übereinstimmend mit den Daten aus dem *in vitro* Kinase-Assay, über einen Effekt auf das Wachstum der EGFR-Wildtyp Zelllinie A431 ($IC_{50} = 1.39 \mu M$). Mit einem IC_{50} -Wert von $< 0.014 \mu M$ präsentierten sich **41u** und **41v** als die aktivsten Substanzen auf der HCC827-Zelllinie. Der schwache Effekt des Naphthyl-Derivats mit einem zusätzlichen Dimethylamin (**41y**) auf die Viabilität der H1975-Zellen ($IC_{50} = 4.7 \mu M$) entsprach exakt dem in den aktivitätsbasierten Assays beobachteten Trend.

Zusammenfassend konnten die mit aromatischen Bicyklen an C-3 derivatisierten Pyrazolopyrimidine einen starken inhibitorischen Effekt in den NSCLC-Zelllinien und speziell in den wirkstoffresistenten H1975-Zellen hervorrufen. Zudem erwiesen sich diese Verbindungen als äußerst mutantenselektiv und riefen in den Wildtyp-Zelllinien keine bedeutenden Effekte hervor. Der schwache Effekt der reversiblen Inhibitoren in den Krebszelllinien, verglichen mit den irreversiblen Analoga, unterstreicht die große Bedeutung der kovalenten Inhibitoren in der gezielten Therapie der T790M-Wirkstoffresistenz in EGFR.

Zur Untersuchung des Einflusses auf die Autophosphorylierung von EGFR und die Phosphorylierung weiterer Proteine in der nachgeschalteten Signalkaskade wurde mit den Inhibitoren **41u**, **41w** und **41x** sowie den EGFR-Inhibitoren der ersten (Gefitinib) und dritten Generation (WZ4002) als Referenzverbindungen eine Western-Blot-Analyse in den Zelllinien A431 und H1975 durchgeführt (Abbildung 4.10 und siehe Kapitel 8.5).^{xviii} Hierbei wurden der Proteingehalt und die Phosphorylierungszustände von EGFR (pEGFR, Tyr1068/Tyr1045), Akt (p-Akt, Ser473), p44/42 MAPK (pMAPK, Thr202/Tyr204) und von rpS6 (pS6, Ser235/236) untersucht.

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

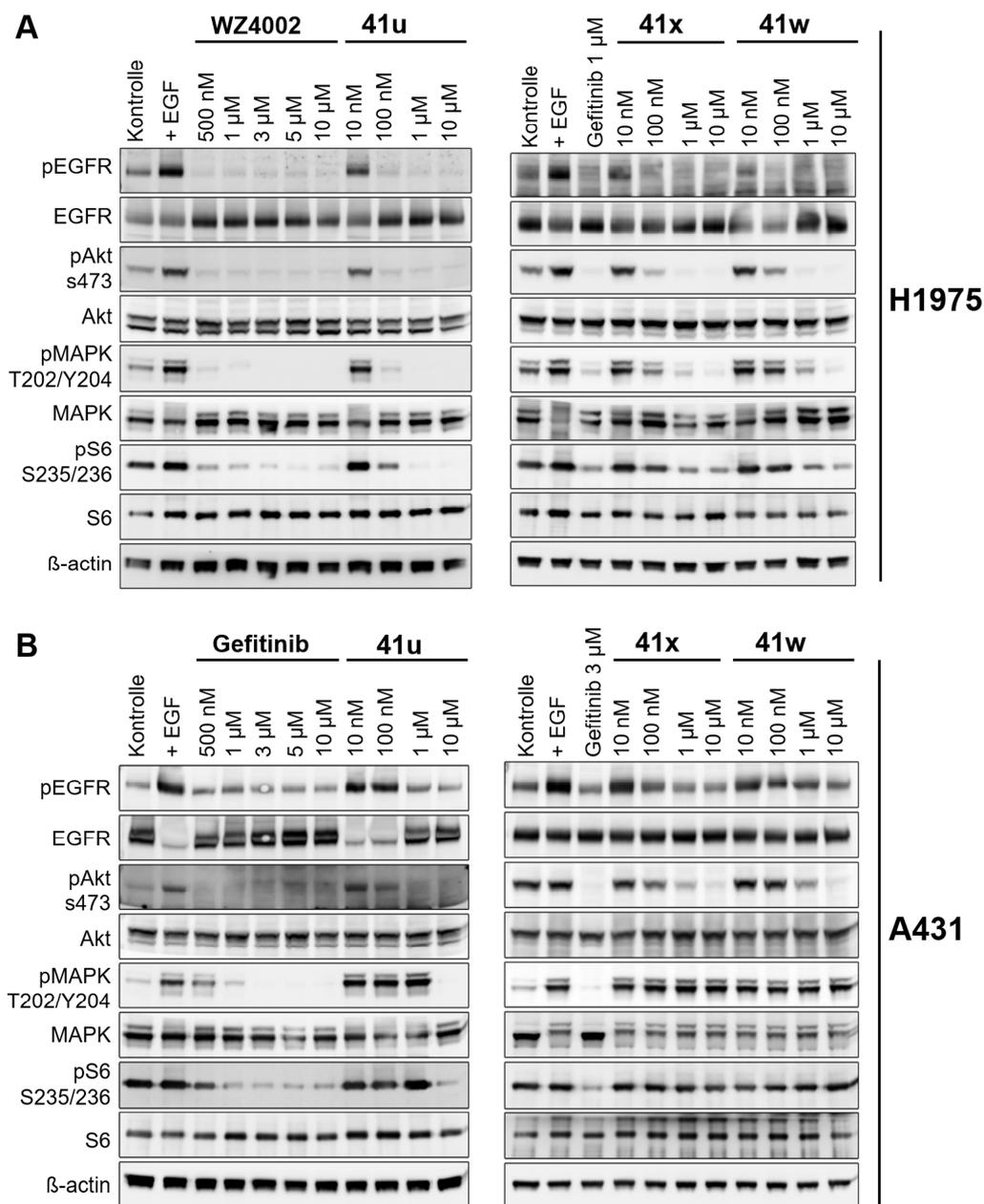


Abbildung 4.10: Immunoblot von **41u**, **41w** und **41x** in den Krebszelllinien (A) H1975 (EGFR-L858R/T790M) und (B) A431 (EGFR-WT). Außer der Kontrolle wurden alle Zellen mit EGF (50 ngmL⁻¹) stimuliert. Die Substanzen **41u**, **41w** und **41x** reduzieren die Autophosphorylierung von EGFR und die Phosphorylierung der nachgeschalteten Proteine Akt, MAPK und S6 der EGFR-Signalkaskade in H1975-Zellen, zeigen aber keinen signifikanten Effekt in A431-Zellen.

Die Behandlung der H1975-Zellen mit den Substanzen **41u**, **41w** und **41x** führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des Proteingehalts an pEGFR, pAkt, pMAPK sowie pS6, bei konstant bleibender Gesamtproteinmenge (Abbildung 4.10 A). Diese Beobachtungen bestätigten, dass die Inhibition der Kinaseaktivität des

EGF-Rezeptors durch die Substanzen **41u**, **41w** und **41x** die Autophosphorylierung von EGFR und die Signalweiterleitung verhindert. Bei einer Konzentration von 100 nM **41u** wurde die Menge an phosphoryliertem EGFR, Akt, MAPK und S6 annähernd vollständig reduziert. Die Substanzen **41x** und **41u** riefen denselben, wenn auch leicht verminderten, Effekt auf den Phospho-Gehalt von EGFR und nachgeschalteter Proteine hervor. Die vergleichbar schwache Wirkung von **41u**, **41w** und **41x** auf den Phosphorylierungsgehalt von EGFR und nachgeschalteter Proteine in der EGFR-Wildtyp-Zelllinie A431 belegte das mutantenselektive Profil aus den bisherigen Studien (Abbildung 4.10 B). **41u** zeigte lediglich bei einer Konzentration von 10 μ M einen signifikanten Effekt auf die Autophosphorylierung von EGFR und den Phospho-Gehalt von Akt, MAPK und S6. Bei **41x** und **41u** waren bei der höchsten Konzentration an Inhibitor (10 μ M) lediglich marginale Auswirkungen auf die Signalweiterleitung zu erkennen. Die Western-Blot-Analyse bestätigte die Wirksamkeit der Substanzen **41u**, **41w** und **41x** auf der wirkstoffresistenten NSCLC-Zelllinie und bestätigte den direkten Einfluss der Inhibitoren auf die Autophosphorylierung von EGFR und die daraus resultierende Herunterregulierung der nachgeschalteten Signalkaskade. Zudem verifizierte die Immunoblot-Untersuchung das mutantenselektive Inhibitionsprofil der Pyrazolopyrimidine und lieferte ein wünschenswertes Toxizitätsfenster bezüglich des Wildtyps von EGFR.

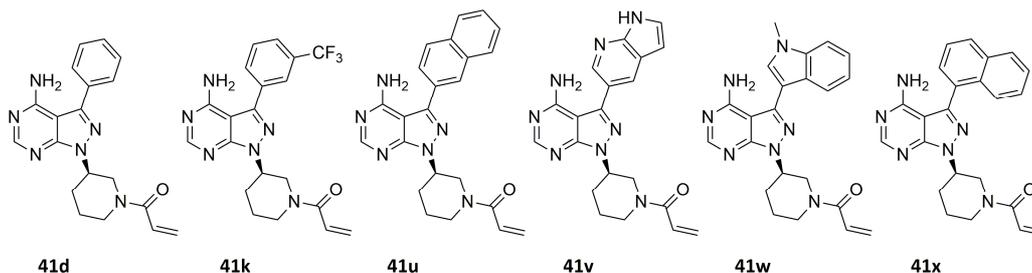
Zusammenfassend konnten die zellulären Untersuchungen zeigen, dass der starke inhibitorische Effekt der kovalenten Pyrazolopyrimidine **41u**, **41w** und **41x** gegen die T790M-Türsthermutante im aktivitätsbasierten Assay in die zellulären Studien übertragen werden konnte und dass diese Substanzen in der Lage sind den EGFR-Signalweg in der wirkstoffresistenten H1975-Krebszelllinie gezielt und potent zu inhibieren.

4.7 ADME/DMPK-Profilierung

Im Zuge der weiteren Profilierung wurden für die biologisch aktiven Pyrazolopyrimidine die ADME/DMPK-Parameter untersucht. Dabei sollte neben dem Aufbau einer SPR (*structure property relationship*) ebenfalls die Evaluierung erfolgen, inwiefern sich die Substanzen für *in vivo* Wirksamkeitsstudien eignen.

Für die ausgewählten Verbindungen **41d**, **41k**, **41u**, **41v**, **41w** und **41x**, wurden die Löslichkeit, die Zellpermeation, die Stabilität im Plasma und in Mikrosomen sowie die Plasmaproteinbindung bestimmt (Tabelle 4.5 und siehe Kapitel 8.6).^{xix}

Tabelle 4.5: *in vitro* Pharmakokinetik einer Auswahl an Pyrazolopyrimidinen (**41d**, **41k**, **41u**, **41v**, **41w** und **41x**) und den Referenzverbindungen Osimertinib und Rociletinib.



	41d	41k	41u	41v	41w	41x	Osimertinib	Rociletinib
clogD (pH 7.4)	2.1	3.0	3.1	1.4	2.5	3.1	3.0	4.1
SolRank (μM)	461	427	248	457	364	38	265	10
PAMPA (% Flux)	59	76	73	27	66	82	112	88
Caco-2 (P_{app} A-B) ($\times 10^{-8}$ cm/s)	-	-	51	-	30	-	8.4	5.0
Caco-2 (P_{app} B-A) ($\times 10^{-8}$ cm/s)	-	-	13	-	29	-	6.0	6.8
Caco-2 (Ratio P_{app} B-A/A-B)	-	-	0.3	-	1.0	-	0.7	1.4
Plasmastabilität Maus (%)	91	99	86	96	100	90	100	75
Plasmastabilität Mensch (%)	97	96	94	98	95	100	100	78
fu₁₀₀ % (Mausplasma)	0.33	0.09	0.02	0.37	0.12	0.15	0.03	0.01
MLM Cl_{int} ($\mu\text{Lmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	924	2773	2311	495	1980	2773	51	81
HLM Cl_{int} ($\mu\text{Lmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	122	578	770	108	462	770	4.1	5.1

Die biologisch aktiven Verbindungen zeigten trotz hoher clogD-Werte exzellente kinetische Löslichkeiten bei pH 7.4 mit Werten von 248-461 μM . Das 1-Naphthyl-Derivat **41x** stellte mit einer kinetischen Löslichkeitskonzentration von 38 μM die einzige Ausnahme dar. Abgesehen von der hydrophilen Azaindol-Verbindung (**1v**) wurde für alle getesteten Substanzen eine hohe Zellgängigkeit beobachtet (PAMPA Flux 59-82 %).

^{xix} In Kooperation mit der Lead Discovery Center GmbH, Dortmund.

41u und **41w** wurden darüber hinaus zur Untersuchung der intestinalen Absorption im Caco-2-Assay vermessen. Die hohe A-B-Permeabilität ($51 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$ und $30 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$ für **41u** bzw. **41w**), die laut Assay-Klassifizierung eine äußerst starke Zellpermeation voraussagt, und die niedrigen Efflux-Raten von 0.3 (**41u**) und 1.0 (**41w**) lieferten eine Erklärung für die hohe zelluläre Wirksamkeit der Substanzklasse und ließen eine gute orale Bioverfügbarkeit vermuten. Alle untersuchten kovalenten Pyrazolopyrimidine erwiesen sich zudem als extrem stabil in Maus- sowie in menschlichem Plasma (> 86 %). Es gab keinerlei Anzeichen für eine hohe Instabilität des Michaelakzeptors. Bei diesem Test wird die Stabilität der Substanz auf mögliche Zersetzung oder Modifikation durch im Blutplasma enthaltenen Enzyme untersucht. Insbesondere bei kovalenten Inhibitoren, die in der Regel über Michaelakzeptoren verfügen, die mit Thiolen im Plasma wie z.B. Glutathion (GSH) reagieren können, spielt die Plasmastabilität eine besondere Rolle.^{109, 139} Die Pyrazolopyrimidine wiesen eine für kovalente Kinaseinhibitoren sehr niedrige Proteinplasmabindung auf.^{140, 141} Es ergaben sich für die untersuchten Verbindungen *free fraction*-Werte ($f_{u100\%}$) von 0.02 (**41u**) bis 0.37 (**41v**). Dieser Parameter beschreibt den Anteil an im Blutplasma freivorliegender Substanz im Verhältnis zur Gesamtmenge. Speziell stark lipophile Wirkstoffe neigen zur unspezifischen Bindung an Plasmaproteinen und können die Verteilung beeinflussen und die Wirksamkeit reduzieren, da theoretisch nur der Anteil an freiem Wirkstoff pharmakologisch aktiv ist.¹⁴² Daher ist die geringe Proteinplasmabindung der lipophilen Pyrazolopyrimidin-Derivate (**41d**, **41v**, **41w** und **41x**), speziell im Vergleich mit Osimertinib ($f_{u100\%} = 0.03$), sehr bemerkenswert. Im Rahmen der ADME/DMPK-Profilierung wurde auch die metabolische Stabilität der Substanzen in Maus- sowie in menschlichen Lebermikrosomen mit Hilfe eines etablierten *in vitro* Assays (*microsomal stability assay*) untersucht. Bei diesem Modellsystem zur Prädiktion hepatischer Metabolisierung wurden die Verbindungen für eine bestimmte Zeit (50 min) in den entsprechenden Mikrosomen inkubiert und die Stabilität mittels LC-MS/MS analysiert. Daraus konnte anschließend die intrinsische Elimination (*clearance*, Cl_{int}) berechnet werden. Der Grad der Metabolisierung wird dabei durch einen hohen (Maus: > 48.0 und Mensch: > 47 $\mu\text{Lmin}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{Protein}$) bzw. niedrigen (Maus: < 8.8 und Mensch: 8.6 $\mu\text{Lmin}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{Protein}$) Cl_{int} -Wert beschrieben.¹⁴³

In den Mikrosomen beider Spezies wurde für alle untersuchten Derivate eine hohe Verstoffwechslung beobachtet (MLM $Cl_{int} = 495\text{-}2773 \mu\text{Lmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ bzw. HLM $Cl_{int} = 108\text{-}770 \mu\text{Lmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$). Die Cl_{int} -Werte korrelieren im Fall der Pyrazolopyrimidine sehr genau mit ihren clogD -Werten. Die Verbindungen mit einem großen hydrophoben Charakter ($\text{clogD} \geq 3$) **41k**, **41u** und **41x** werden am stärksten metabolisiert, während das Azaindol-Derivat (**41v**) mit einem clogD von 1.4 den geringsten Wert aufweist. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass der Metabolisierungsprozess von Wirkstoffen ein Mechanismus des Körpers darstellt, um schwer ausscheidbare Substanzen in hydrophilere Formen zu überführen, welche anschließend problemlos ausgeschieden werden können. Bei der hier untersuchten Phase-I-Metabolisierung steht die Funktionalisierung der Substanz durch Reduktions-, Oxidations- und Hydrolysereaktionen im Vordergrund, die neben einer Erhöhung der Hydrophilie, die Einführung einer funktionellen Gruppe bewirkt. Neben dem hochgradig lipophilen C-3 Substituenten stellt das 3-Piperidinyl-*N*-Acrylamid ein weiteres für die Phase-I-Metabolisierung sehr anfälliges Strukturmotiv dar, was die große Diskrepanz zu dem gleichwertig lipophilen Wirkstoff Osimertinib (MLM $Cl_{int} = 51 \mu\text{Lmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ bzw. HLM $Cl_{int} = 4.1 \mu\text{Lmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$) erklärt. Eine ebenfalls hohe Metabolisierung ist für den strukturell ähnlichen Wirkstoff Ibrutinib (Imbruvica) beschrieben und stimmt mit den hier beobachteten Resultaten überein.¹⁴⁴

Trotz der hohen *in vitro clearance* zeigten die Pyrazolopyrimidine ein vielversprechendes ADME/DMPK-Profil, das eine weitergehende Studie zur *in vivo* Pharmakokinetik stimulierte. Das Methyldol-Derivat **41w** wurde für ein initiales *in vivo* Experiment ausgewählt und Mäusen des Typs CD-1 intravenös (IV, 2 mg/kg), intraperitoneal (IP, 20 mg/kg) und oral (PO, 20 mg/kg) appliziert (Tabelle 4.6 und siehe Kapitel 8.6).^{xx}

^{xx} Die Mausexperimente wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Hengstler am Leibnitz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund durchgeführt. Die Analytik erfolgte in Zusammenarbeit mit der Lead Discovery Center GmbH, Dortmund.

Tabelle 4.6: *in vivo* Pharmakokinetik für **41w**.

IV (2 mg/kg)		IP (20 mg/kg)		PO (20 mg/kg)	
$T_{1/2}$ (h)	0.6	$T_{1/2}$	0.2	$T_{1/2}$	0.6
C_0 (ng/mL)	138	C_{max} (ng/mL)	4539	C_{max} (ng/mL)	38
AUC (hng/mL)	121	AUC (hng/mL)	1888	AUC (hng/mL)	29
Cl (L/h/kg)	16.6	F (%)	156	F (%)	2.4
V _{ss} (L/kg)	12.4	-	-	-	-

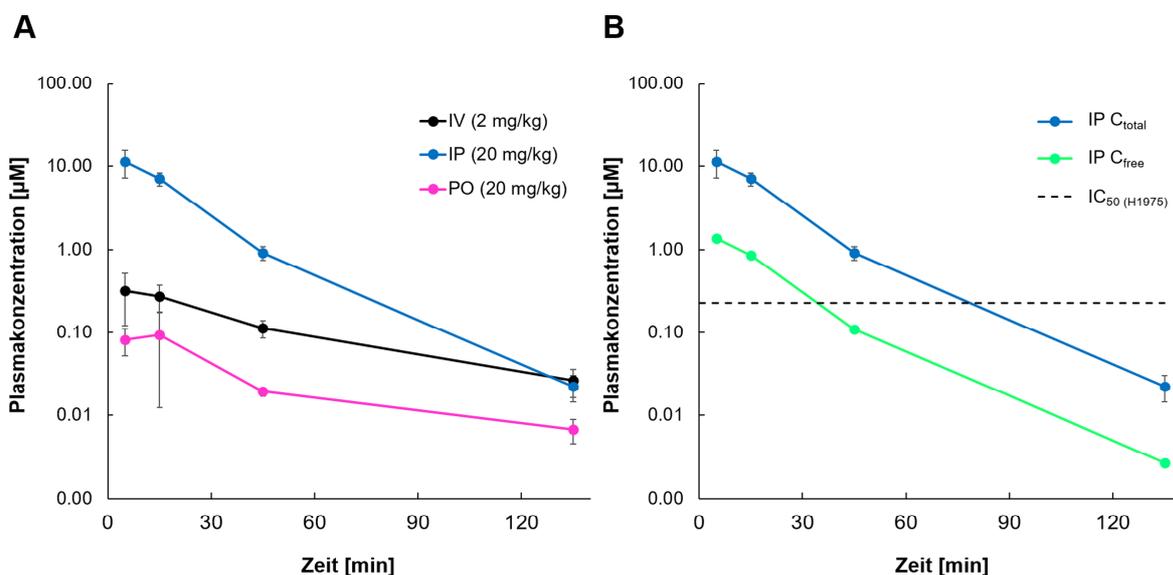


Abbildung 4.11: A) Plasmaspiegel-Zeit-Kurve von **41w** nach intravenöser (IV), intraperitonealer (IP) und oraler (PO) Applikation in Mäusen. **41w** wurde den Mäusen mit verschiedenen Dosierungen und Formulierungen appliziert (2 mg/kg IV: DMSO; 20 mg/kg IP und PO: 10 % DMSO und 90 % einer wässrigen 30 %igen 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-Lösung). Die Blutproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (5, 15, 45 und 135 min) entnommen und die Plasmakonzentration von **41w** mittels LC-MS/MS analysiert. B) Plasmaspiegel-Zeit-Kurve von **41w** nach intraperitonealer Applikation. Neben der Gesamtplasmakonzentration (C_{total}) sind die freie Plasmakonzentration (C_{free}) sowie der zelluläre IC_{50} von **41w** in H1975 Zellen dargestellt.

Die Substanz wurde von den Mäusen bei allen drei Applikationsformen sehr gut vertragen und es konnten keine adversen Effekte beobachtet werden. Bei einer intravenösen Gabe gelangt der Wirkstoff nicht zuerst in die Leber, sondern direkt und unverändert in den Blutkreislauf (Bioverfügbarkeit, % F = 100 %). Dadurch umgeht die Substanz eine erste hepatische Metabolisierung (*first pass*-Effekt) und die intestinale Absorption.

Bei der IV-Dosierung von 2 mg/kg wurde eine sehr geringe Exposition (AUC) von **41w** beobachtet (Abbildung 4.11 A). Dieser Parameter entspricht der Konzentration des Wirkstoffs über die Zeit (Integral der Plasmaspiegel-Zeit-Kurve). Zusammen mit einer hohen clearance (Cl) und einem hohen Verteilungsvolumen (V_{ss}), das auf eine hohe Distribution ins Gewebe schließen lässt, resultiert die geringe Halbwertszeit für **41w** von 0.6 Stunden. Bei der intraperitonealen Applikation von **41w** (20 mg/kg) wurde eine verhältnismäßig hohe Exposition von 1888 hng/mL gemessen, die einer Bioverfügbarkeit von über 100 % (% F = 156 %) entspricht. Eine Substanz, die intraperitoneal in den Bauchraum der Maus appliziert wird, ist wie bei einer oralen Gabe (PO) dem *first pass*-Effekt ausgesetzt, durchläuft aber nicht den Verdauungstrakt. Die höchste im Plasma gemessene Konzentration ($C_{\max, \text{total}}$) von 4539 ng/mL (= 11.32 μM) ist 50-fach höher als der zelluläre IC₅₀ von 0.23 μM in H1975 Zellen, während die höchste freie Plasmakonzentration immer noch einem 6-fach höheren Wert ($C_{\max, \text{free}} = 1.36 \mu\text{M}$) entspricht. Trotz der verhältnismäßig geringen Halbwertszeit von 0.2 Stunden, lag somit die Plasmakonzentration 75 min und die freie Plasmakonzentration 30 Minuten lang über dem IC₅₀-Wert in H1975 Zellen (Abbildung 4.11 B). Diese Konzentrationen könnten für einen Effekt in einer *proof-of-concept in vivo* Wirksamkeitsstudie ausreichend sein. Im Gegensatz dazu wurde bei einer peroralen Applikation (20 mg/kg) eine sehr geringe Exposition von nur 28.6 hng/mL beobachtet, die einer Bioverfügbarkeit von 2.4 % entspricht. Demnach konnten die vielversprechenden *in vitro* Caco-2-Resultate, die eine gute orale Bioverfügbarkeit vermuten ließen, nicht bestätigt werden. Es müsste weiter untersucht werden, ob dies möglicherweise auf einem verstärkten Metabolismus während der intestinalen Absorption oder auf andere Faktoren zurückzuführen ist.

Von den drei verschiedenen Applikationsformen erwies sich die intraperitoneale Dosierung als sehr vielversprechend und würde sich für zukünftige *in vivo* Profilierungsstudien mit **41w** sehr gut eignen. In Anbetracht der Tatsache, dass kovalente Inhibitoren im besten Fall irreversibel an das Zielprotein binden und die Analytik der Pharmakokinetik auf dem LC-MS-basierten Nachweis der Substanz beruht, wären *in vivo* PK/PD-Studien, in denen der zeitaufgelöste biologische Effekt (z. B. Phosphorylierungslevel von EGFR) untersucht wird, ein erforderlicher Schritt.

4.8 C797S-Wirkstoffresistenz in EGFR bei kovalenter TKI-Therapie

Die ersten klinischen Daten eines kovalenten EGFR-Drittgenerationsinhibitors wurden 2013 von der Firma Clovis Oncology auf der ASCO-Konferenz (*American Society of Clinical Oncology*) präsentiert. Mit einer objektiven Ansprechrate (ORR) von 59 % und einem medianen progressionsfreien Überleben (PFS) von 13.1 Monaten bei Patienten mit diagnostizierter T790M-Resistenzmutation in EGFR zeigte der Wirkstoff Rociletinib hervorragende Resultate. Die Firma Astrazeneca stellte nur kurze Zeit später ihren T790M-Inhibitor Osimertinib (AZD9291) mit einer ähnlich beeindruckenden klinischen Wirksamkeit vor (ORR = 61 %; PFS = 9.2 Monate) (Abbildung 4.12 A).^{145, 146}

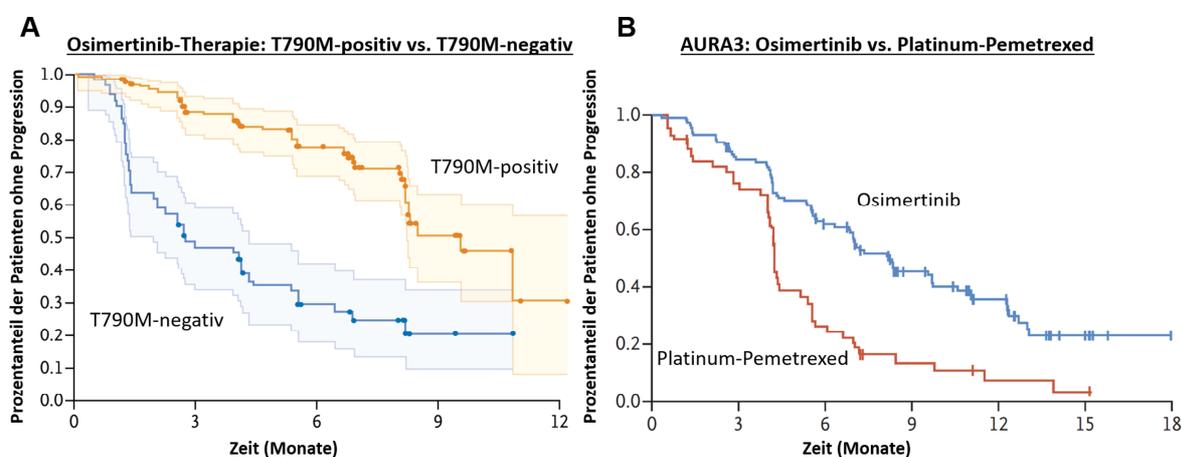


Abbildung 4.12: A) Kaplan-Meier Kurven des progressionsfreien Überlebens von Patienten mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, die mit einer täglichen Dosis von 20 bis 240 mg Osimertinib behandelt wurden. Für die Patientenpopulation mit positiv diagnostizierter EGFR-T790M-Mutation (orange) lag die mediane progressionsfreie Überlebenszeit bei 9.6 Monaten, wohingegen für die Patienten ohne T790M-Mutation (blau) 2.8 Monate ermittelt wurden (adaptiert von Jänne *et al.*)¹⁴⁵ **(B)** Kaplan-Meier Auftragungen des PFS von Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC bei denen sowohl im Tumorgewebe als auch im Plasma die T790M-Mutation in EGFR nachgewiesen wurde. In dieser Phase-III-Studie (AURA3) wurde die Osimertinib-Therapie (blaue Kurve) mit der bisherigen Standardchemotherapie Platinum-Pemetrexed (rote Kurve) verglichen (adaptiert von Mok *et al.*)¹⁴⁷ Die Behandlung mit Osimertinib verlängerte die mediane progressionsfreie Überlebenszeit von 4.4 auf 10.1 Monate.

Beide Wirkstoffe erhielten kurz darauf eine vorläufige Zulassung der FDA (*Breakthrough Therapy*) zur Behandlung von Patienten mit EGFR-T790M-mutiertem NSCLC nach vorausgegangener EGFR-TKI-Therapie.

Die Phase-III-Studie AURA3 belegte für Osimertinib eine deutlich erhöhte Wirksamkeit gegenüber der bisherigen Standardchemotherapie (ORR = 71 % vs. 31 %; PFS = 10.1 vs. 4.4 Monate) (Abbildung 4.12 B).¹⁴⁷ Infolgedessen bekam der Wirkstoff Osimertinib von der FDA im März 2017 die finale Zulassung und wird seitdem unter dem Markennamen Tagrisso® als neuer Behandlungsstandard in der Zweitlinientherapie von Patienten mit metastasiertem EGFR-T790M-mutationspositiven NSCLC eingesetzt. Die Entwicklung von Rociletinib wurde hingegen im Mai 2016 eingestellt. Die zunächst angenommene Wirksamkeit (ORR = 59 %) musste nach wiederholter Überarbeitung der klinischen Daten (TIGER-X-Phase-I/II) auf 45 % korrigiert werden. Zudem führte die erforderliche Dosierung von 625 mg (b.i.d.) aufgrund unerwarteter Metabolite (M502 und M460) zu erheblichen Grad 3/4 Nebenwirkungen (Hyperglykämie und Verlängerung der QT-Zeit).^{148, 149} Die FDA wies den Antrag auf beschleunigte Zulassung aufgrund des ungeklärten Nutzen-Risiko-Profiles zurück, was Clovis Oncology schließlich dazu veranlasste die klinische Entwicklung von Rociletinib nicht weiterzuführen.

Trotz des klinischen Erfolgs von Osimertinib zeigten sich auch hier die Grenzen der zielgerichteten Tumorthherapie. T790M-positive Patienten entwickelten nach erfolgreichem Ansprechen auf eine Osimertinib-Behandlung innerhalb weniger Monate erneute Resistenzen, die zu einer Progression des Tumorwachstums führten. In 40 % der Fälle wurde eine Mutation des Cys797 in EGFR zu einem Serin identifiziert (C797S).^{150, 151} Diese neu erworbene Mutation verhindert einen kovalenten Bindungsmodus der Drittgenerationsinhibitoren, da die Seitenkette des weniger nukleophilen Serins unter physiologischen Bedingungen mit dem Elektrophil keine 1,4-Michaeladdition eingehen kann. Der kovalente Inaktivierungsschritt des Proteins entfällt und die inhibitorische Wirkung des Inhibitors wird ausschließlich auf die reversible Bindung reduziert, die im Fall von Osimertinib nicht ausreicht, um eine klinische Wirksamkeit zu erzielen (Abbildung 4.13).

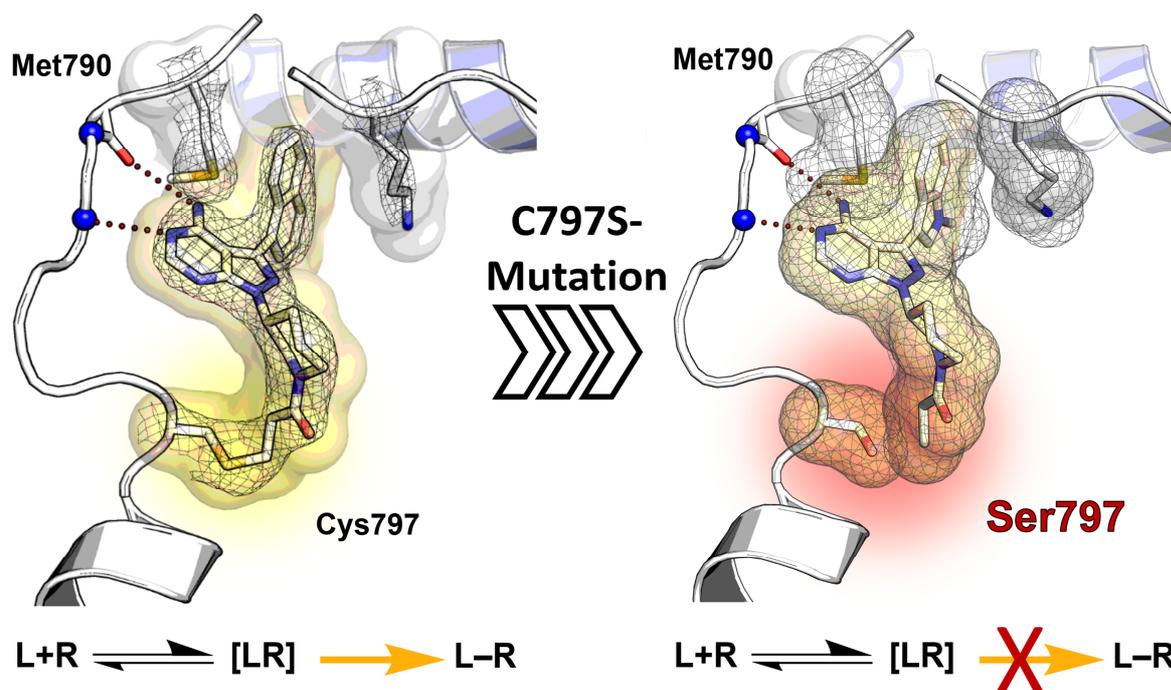
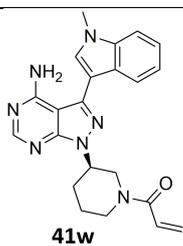
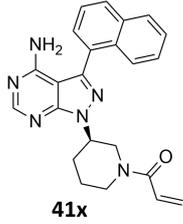
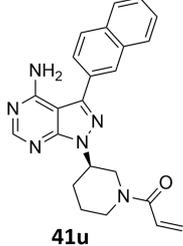


Abbildung 4.13: Darstellung der C797S-Wirkstoffresistenz anhand des Beispiels von **41w**. Bindungsmodus des Pyrazolopyrimidins **41w** in EGFR-T790M (PDB-Eintrag: 5J9Z) und in der modellierten C797S-Resistenzmutante von EGFR. Für beide EGFR-Varianten ist das jeweilige Bindungsgleichgewicht zwischen dem Liganden (L) und dem Rezeptor (R) angegeben. **41w** bindet zunächst reversibel an den Rezeptor [LR] und inaktiviert die Kinase in einem zweiten Schritt durch eine kovalente Bindung zu Cys797. Das Auftreten der C797S-Mutation verhindert den zweiten Schritt der kovalenten Inaktivierung und es kommt nur noch die reversible Bindung zum Tragen, wodurch der Inhibitor seine Wirkung verliert.

Dieser Resistenzmechanismus wurde ebenfalls in anderen Kinasen wie zum Beispiel BTK beobachtet, die ein zu EGFR analoges reaktives Cystein besitzt (C481S). Das spricht dafür, dass die Mutation des Cysteins ein genereller Resistenzmechanismus für kovalente Inhibitoren darstellt. Daher stellt sich die Frage nach der Strategie für die nächste Generation EGFR-Inhibitoren zur Umgehung der C797S-Resistenzmutation. Bedarf es eines weiteren reversiblen Inhibitors, der speziell für die C797S-Mutante entwickelt werden muss und als Folgetherapie seinen Einsatz findet oder besteht auch die Möglichkeit eines Viertgenerationsinhibitors, der beide T790M-Mutanten gleichermaßen inhibiert und eine C797S Resistenz möglicherweise im Ansatz unterdrückt.

Um dieser Fragestellung nachzugehen wurden die potentesten T790M-Inhibitoren **41u**, **41x** und **41w** bezüglich der C797S-Resistenzmutante von EGFR biochemisch charakterisiert.^{xxi}

Tabelle 4.7: Übersicht der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) und der kinetischen Parameter (K_i , k_{inact} und k_{inact}/K_i) der Pyrazolopyrimidine **41u**, **41x** und **41w** sowie der Referenzverbindungen (Osimertinib und Rociletinib) für EGFR-WT und EGFR-Mutationsvarianten (L858R, L858R/T790M und L858R/T790M/C797S).

Inhibitor	EGFR	IC_{50} [nM]	K_i [nM]	k_{inact} [min ⁻¹]	k_{inact}/K_i [$\mu M^{-1}s^{-1}$]
 41w	WT	35 ± 14	25 ± 7.2	0.11 ± 0.03	0.08 ± 0.02
	L858R	3.8 ± 2.8	19 ± 3.1	0.17 ± 0.08	0.14 ± 0.07
	L858R/T790M	2.5 ± 1.4	16 ± 5.2	0.29 ± 0.02	0.36 ± 0.09
	L858R/T790M/C797S	838 ± 85	1008 ± 372	-	-
 41x	WT	58 ± 13	47 ± 5.8	0.13 ± 0.05	0.05 ± 0.04
	L858R	1.0 ± 0.3	44 ± 6.5	0.25 ± 0.06	0.10 ± 0.06
	L858R/T790M	1.9 ± 0.8	58 ± 3.3	0.31 ± 0.04	0.09 ± 0.02
	L858R/T790M/C797S	7900 ± 3700	1068 ± 432	-	-
 41u	WT	16 ± 5.6	15 ± 3.2	0.19 ± 0.12	0.21 ± 0.05
	L858R	1.1 ± 0.6	1.6 ± 0.4	0.14 ± 0.01	1.60 ± 0.53
	L858R/T790M	< 1	1.5 ± 0.8	0.17 ± 0.02	3.42 ± 1.44
	L858R/T790M/C797S	88 ± 16	49 ± 14	-	-
Rociletinib	WT	2 ± 0.5	74 ± 7.1	0.18 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	L858R	2 ± 0.2	1.8 ± 0.2	0.18 ± 0.05	1.67 ± 0.32
	L858R/T790M	3 ± 0.6	1.7 ± 0.1	0.29 ± 0.05	2.95 ± 0.66
	L858R/T790M/C797S	69 ± 13	76 ± 40	-	-
Osimertinib	WT	2 ± 0.2	14 ± 2.3	0.43 ± 0.11	0.52 ± 0.05
	L858R	1 ± 0.5	1.6 ± 0.3	0.30 ± 0.01	3.24 ± 0.46
	L858R/T790M	< 1	1.5 ± 0.1	0.33 ± 0.06	3.75 ± 0.39
	L858R/T790M/C797S	77 ± 22	25 ± 9.6	-	-

^{xxi} Die IC_{50} -Bestimmungen wurden arbeitsgruppenintern von Simone Eppmann und Andreas Arndt sowie die Kinetikexperimente von Marina Keul durchgeführt.

Für die genannten Inhibitoren wurden neben der inhibitorischen Aktivität gegen EGFR-L858R/T790M/C797S auch die kinetischen Parameter K_I und K_{inact} hinsichtlich aller EGFR Varianten bestimmt (Tabelle 4.7 und siehe Kapitel 8.2). Osimertinib und Rociletinib dienten als Referenzinhibitoren.

Die drei getesteten Pyrazolopyrimidine zeigten ein sehr unterschiedliches biochemisches Profil. **41u** inhibierte die C797S-Mutante mit 88 nM sehr stark, wohingegen **41w** und **41x** um ein Vielfaches weniger potent waren ($IC_{50} = 838$ nM bzw. 7900 nM). Die Bindungskinetik der einzelnen Inhibitoren konnte dabei aufschlussreiche Erkenntnisse über die unterschiedlichen Potenzen liefern. Die Verbindungen **41u**, **41w** und **41x** erwiesen sich alle als hoch affin gegenüber der Doppelmutante EGFR-L858R/T790M, wovon **41u** mit 1.5 nM den niedrigsten K_I -Wert aufwies. Die Bildungsrate der kovalenten Bindung zu EGFR-L858R/T790M war bei **41w** und **41x** vergleichbar hoch (0.29 bzw. 0.31 min^{-1}) und der von **41u** überlegen (0.17 min^{-1}). **41u** zeigte auch die mit Abstand höchste Affinität ($K_I = 49$ nM) gegenüber der C797S-Dreifachmutante. Im Vergleich dazu wurden für **41w** und **41x** ca. 20-fach geringere Affinitäten gemessen ($K_I = 1008$ bzw. 1068 nM), die eine Erklärung für die unterschiedlich starke Inhibition der C797S-Mutante liefern. Die für **41w** und **41x** gemessenen hohen Bildungsraten der kovalenten Bindung scheinen die geringe Bindungsaffinität zu kompensieren und eine potente Inhibition der T790M-Doppelmutante zu ermöglichen. Die verschiedenen Drittgenerationsinhibitoren weisen einen ähnlichen Trend auf. Die hohe Affinität von Rociletinib und Osimertinib gegenüber der T790M-Doppelmutante (1.7 bzw. 1.5 nM) überträgt sich auf die C797S-Dreifachmutante (76 bzw. 25 nM) und spiegelt sich in den guten Inhibitionen wider, die aber für eine zelluläre und vor allem klinische Wirksamkeit um den Faktor 10-100 zu gering ist. Die Affinität gegenüber der Met-Türsteheraminosäure zu maximieren scheint ein entscheidendes Kriterium zu sein die neu erworbene C797S-Wirkstoffresistenz in EGFR wirkungsvoll zu umgehen. Diese Erkenntnisse stimulieren die Entwicklung eines kovalenten Viertgenerationsinhibitors, der die Aktivierungs- sowie die T790M-Türstehermutante inhibiert und dazu die Fähigkeit besitzt die tertiäre C797S-Mutante effektiv zu adressieren, um eine Resistenz bzw. die Entstehung zu unterdrücken.

4.9 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen durch rationales Design eine neue Klasse mutantenselektiver und kovalenter EGFR-T790M-Inhibitoren zu entwickeln, die einen starken inhibitorischen Effekt auf das Wachstum wirkstoffresistenter NSCLC-Zelllinien zeigte. Eine Verbindung der Serie konnte als geeigneter Kandidat für *in vivo* Wirksamkeitsstudien identifiziert werden. Basierend auf den Erkenntnissen aus der Hit-Optimierung der Pyrimidin-basierten T790M-Inhibitoren, wurden Kriterien für das Design einer neuen Serie aufgestellt, die zur wirksamen Inhibition der wirkstoffresistenten T790M-Variante des EGF-Rezeptors erfüllt sein müssen. Strukturbasiertes *de novo* Design führte zur Synthese einer fokussierten Pyrazolopyrimidin-Bibliothek bestehend aus 25 Substanzen. Die Serie kovalenter Inhibitoren konnte in einem aktivitätsbasierten Assay hohe inhibitorische Aktivitäten gegen die EGFR-Mutationsvarianten erzielen, wovon die Verbindungen **41u**, **41w** und **41x** die T790M-Resistenzmutante des EGF-Rezeptors am stärksten inhibierten ($IC_{50} = < 1 \text{ nM}$, 3 nM und 2 nM). Die Pyrazolopyrimidine zeigten neben einem T790M-selektiven Inhibitionsprofil auch ein exzellentes Selektivitätsprofil innerhalb des humanen Kinoms. Es konnte mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen nicht nur ein kovalenter Bindungsmodus, sondern auch die spezifische Modifikation des Cys797 in EGFR-T790M nachgewiesen werden. In den Komplexkristallstrukturen von **41w** und **41x** in EGFR-T790M wurde ein kovalenter und einzigartiger Bindungsmodus beobachtet, in dem die Inhibitoren eine direkte Interaktion mit der Met790-Türsteheraminosäure eingehen. Diese Beobachtungen lieferten eine strukturelle Erklärung für die T790M-selektive Potenz der Serie. Die Pyrazolopyrimidine **41u**, **41w** und **41x** konnten zudem das Wachstum der wirkstoffresistenten H1975-Zellen potent inhibieren ($IC_{50} = 0.14 \mu\text{M}$, $0.23 \mu\text{M}$ bzw. $0.49 \mu\text{M}$) ohne *on-target* Toxizität in der Wildtyp-Zelllinie A431 hervorzurufen. Dabei konnte mit Hilfe von Western-Blot-Analysen eine konzentrationsabhängige Reduktion von pEGFR und nachgeschalteter Proteine gezeigt werden, die den direkten Einfluss der kovalenten Inhibitoren auf die Autophosphorylierung von EGFR und die Inhibition der Weiterleitung des EGFR-abhängigen Signals bestätigt. Das ADME/DMPK-Profil von **41w**, das unter anderem eine exzellente Zellpermeabilität und eine sehr gute Stabilität im Plasma zeigte, erlaubte eine erste *in vivo* PK-Studie, in der bei einer

intraperitonealen Applikation (20 mg/kg) eine hohe Exposition erreicht wurde. Die gemessene Plasmakonzentration von **41w** lag für 75 min über dem IC₅₀-Wert in H1975-Zellen und würde eine nachfolgende *proof-of-concept* Wirksamkeitsstudie in einem H1975-Xenograft-Modell ermöglichen. Darüber hinaus konnte das Pyrazolopyrimidin-Derivat **41u** die in Patienten neu entdeckte EGFR-C797S-Resistenzmutante in *in vitro* Studien potent inhibieren (IC₅₀ = 88 nM). Mit Hilfe von Kinetikstudien verschiedener EGFR-Varianten konnte die Affinität zum Met-Türsteher als Schlüsselvoraussetzung zur effektiven Inhibition beider Resistenzmutanten (EGFR-T790M, EGFR-T790M/C797S) identifiziert werden. Diese Erkenntnisse zeigen das Potential der Pyrazolopyrimidine und stimulieren die Entwicklung eines kovalenten Viertgenerationsinhibitors, der die Aktivierungs- sowie die T790M-Türstehermutante inhibiert und dazu die Fähigkeit besitzt die tertiäre C797S-Mutante effektiv zu adressieren.

5 *Covalent in situ Click-Chemie (CovClick)*

Der klinische Erfolg kovalenter Kinaseinhibitoren in der Krebstherapie hat der Medizinalchemie eine neue Dynamik verliehen. Immer mehr strukturbasierte Ansätze zur Entwicklung kovalenter Wirkstoffe finden ihre Anwendung.^{119, 125, 152, 153} Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Strategien für die Entwicklung kovalenter Kinaseinhibitoren zur gezielten Adressierung klinisch relevanter Mutationsvarianten verfolgt. Beide Konzepte führten zur Entwicklung von potenten und kovalent bindenden Inhibitoren. Dafür musste jedoch ein hoher chemischer Aufwand betrieben werden. Der langwierige Prozess der Findung potentieller kovalenter Wirkstoffe und die Optimierung der irreversiblen Bindungseigenschaften stellt in der Wirkstoffentwicklung eine große Herausforderung dar. Das wirft die Frage nach innovativen und zeiteffizienten Ansätzen zur Identifikation neuer kovalenter Inhibitoren auf.

5.1 **CovClick-Prinzip und Design der Sonde**

Die hier entwickelte Methode zur Identifizierung neuer kovalenter Inhibitoren beruht auf dem Konzept der Zielprotein-kontrollierten Synthese (*target-guided synthesis*, TGS), das zum ersten Mal vor über 30 Jahren von Rideout *et al.* beschrieben wurde und seitdem diverse Anwendungen zur Wirkstofffindung hervorgebracht hat. Dabei bringt das Zielprotein durch die individuelle Beschaffenheit der Bindungstasche zwei Fragmente in räumliche Nähe zueinander, die über funktionelle Gruppen miteinander reagieren können.¹⁵⁴⁻¹⁶⁰ Ein Ansatz ist die kinetisch-gesteuerte Zielprotein-kontrollierte Synthese (*kinetically controlled target-guided synthesis*), bei der die Fragmente durch irreversible Reaktionen innerhalb der Bindetasche des Enzyms miteinander verknüpft werden.¹⁶¹⁻¹⁶³ Die dafür erforderlichen hoch reaktiven Reagenzien, die zu unkontrollierten Nebenwirkungen oder Denaturierung des Zielproteins führen können, limitieren die Diversität dieser Anwendung. Der Ansatz der *in situ* Click-Chemie (*in situ click chemistry*) umgeht diese Limitierungen, indem er auf einer bioorthogonalen Reaktion, der [1,3]-dipolaren Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen zu Triazolen, beruht.¹⁶⁴ Das von Huisgen *et al.* entwickelte System

empfehlenswert für die Zielprotein-kontrollierte Synthese, da die reaktiven Gruppen in biologischen Systemen inert sind und keine weiteren Katalysatoren oder externe Reagenzien erfordern. Der entscheidende Faktor ist zudem die extrem langsame Reaktionsgeschwindigkeit der [1,3]-dipolaren Cycloaddition, die durch die räumliche Nähe der Reaktanden innerhalb der Bindetasche und dadurch indirekt durch das Zielprotein, stark beschleunigt werden kann.^{156, 165}

Der hier beschriebene Ansatz vereint das Konzept der *in situ* Click-Chemie mit dem von Erlanson *et al.* publizierten Verfahren *Tethering* bzw. *Extended Tethering*.^{158, 166} Das *Extended Tethering* beschreibt eine Methode, bei der im ersten Schritt ein in der Bindungstasche befindliches Cystein über eine Disulfidbrückenbindung mit einem Fragment, dem *Extender-Molekül*, reagiert. In einem zweiten Schritt wird der *Extender-Fragment-Protein-Komplex* gegen eine Bibliothek aus Disulfidfragmenten gescreent, von denen nur solche mit einer gewissen Affinität zur umgebenden Bindetasche eine Disulfidbrücke zum *Extender-Fragment* ausbilden können. Der Ansatz der kovalenten *in situ* Click-Chemie (*Covalent in situ Click-Chemistry*, CovClick) beruht hingegen auf der kovalenten Modifikation eines in Proteinkinasen natürlich vorkommenden Cysteins durch eine irreversibel bindende Sonde und einer nachfolgenden [1,3]-dipolaren Cycloaddition zwischen einer Alkingruppe des Sondenmoleküls und einem Azidfragment unter Ausbildung eines Triazols (Abbildung 5.1). Die *in situ* synthetisierten neuartigen Inhibitoren sollen mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen detektiert werden.

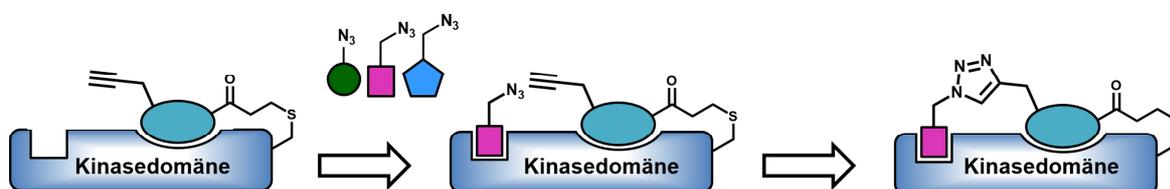


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des CovClick-Prinzips zur Identifizierung neuer kovalenter Kinaseinhibitoren. Zur Vereinfachung wurde nur das *anti*-Triazol dargestellt. Die Bildung des *syn*-Triazols ist in diesem Ansatz gleichermaßen möglich.

Der CovClick-Ansatz besteht aus drei aufeinanderfolgenden Schritten. Zunächst erfolgt die kovalente Bindung des Sondenmoleküls über dessen Michaelakzeptor an ein reaktives Cystein in der Bindungstasche des Zielproteins. Die Sonde trägt als weitere funktionelle Gruppe das für eine [1,3]-dipolare Cycloaddition erforderliche Alkin. In einem zweiten Schritt erfolgt ein Screening gegen eine Azidfragment-Bibliothek. Hierbei kommt es ausschließlich zu einer *in situ* Click-Reaktion zwischen den Reaktanden und somit zur Ausbildung eines stabilen Triazols (Schritt 3), wenn das Azidfragment eine ausreichend hohe Affinität zur spezifischen Bindetasche des Zielproteins aufweist. Eine [1,3]-dipolare Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden kann in einem biologischen System ohne Gebrauch von chemischen Katalysatoren oder hohen Temperaturen in der Regel nur ablaufen, wenn beide Reaktanden aufgrund räumlicher Nähe eine ausreichend hohe lokale Konzentration aufweisen (*proximity-enhanced*).¹⁶⁷ Der Nachweis und die Identifizierung der neugebildeten Inhibitoren erfolgt über eine massenspektrometrische Analyse, bei der die Massenzunahme des Protein-Inhibitor-Komplexes detektiert wird. Verschiedenartige Grundgerüste der Sondenmoleküle und eine große Anzahl an einsetzbaren Azidfragmenten sowie die Möglichkeit der Ausbildung von 1,4 (*anti*)- oder 1,5 (*syn*)-Triazolen in der [1,3]-dipolaren Cycloaddition sorgen für ein hohes Maß an Diversität und Vielfalt an möglichen Inhibitorstrukturen.

Zur Etablierung des CovClick-Systems wurde die Proteinkinase MKK7 (dual-spezifische Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase) als Modellsystem verwendet. MKK7 weist analog zu EGFR ein reaktives Cystein (Cys218) in der ATP-Bindungstasche auf, das sich kovalent adressieren lässt.¹⁶⁸ Für das Design einer geeigneten Sonde wurde auf die Substanzklasse der Aminopyrazolopyrimidine zurückgegriffen. Der von der PP1-Struktur abgeleitete EGFR-T790M-Inhibitor **41w** diente als Grundlage für Modellierungsstudien mit der apo-Kristallstruktur von MKK7 (PDB-Eintrag: 2DYL), in denen die C-3 Position des Pyrazolopyrimidins als geeigneter Verknüpfungspunkt zur Einführung der für die Click-Reaktion erforderlichen Alkingruppe identifiziert wurde (Abbildung 5.2). Die moderate Größe der Verbindung und die Orientierung des Alkins in Richtung der lipophilen Subtasche der ATP-Bindungstasche von MKK7 macht es zu einem geeigneten Sondenmolekül zur Etablierung der CovClick-Methode.

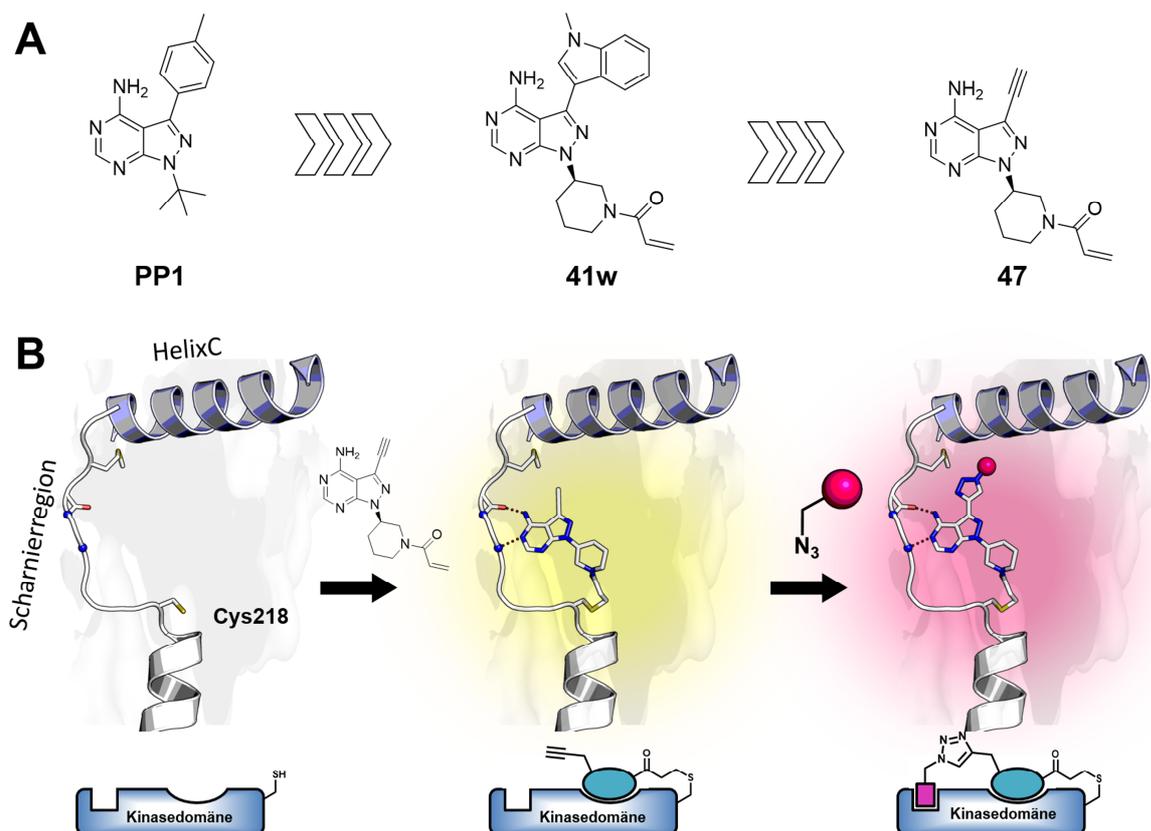
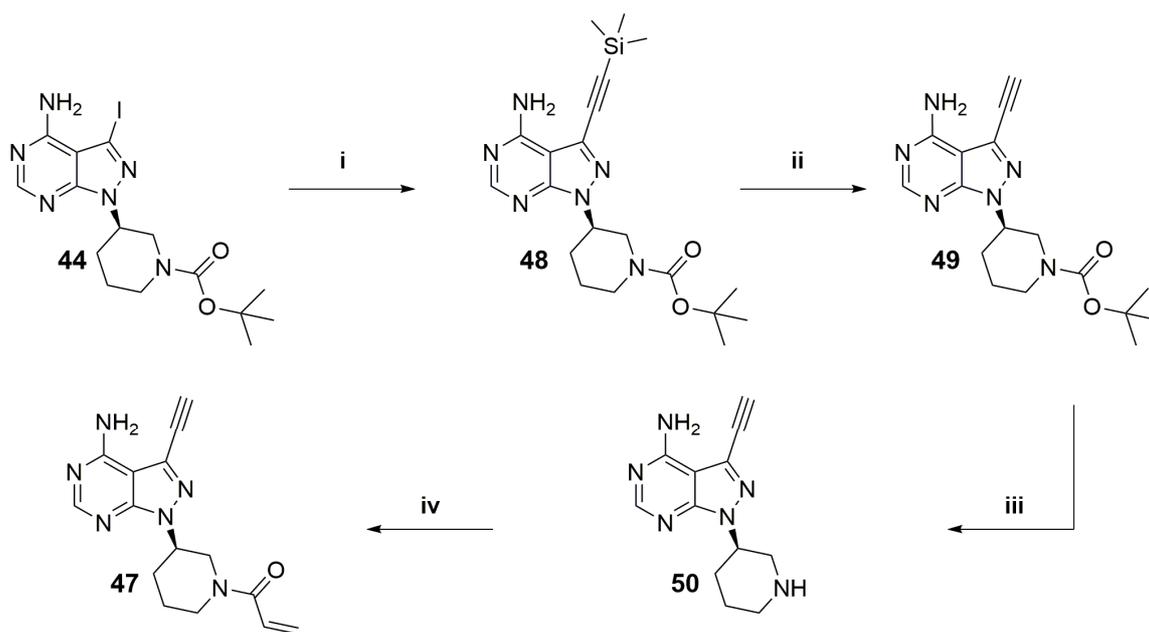


Abbildung 5.2: A) Strukturbasiertes Design der CovClick-Sonde mit B) Modellierungsstudie der Alkylsonde in MKK7 (PDB-Eintrag: 2DYL).

5.2 Synthese der CovClick-Sonde

Für die Synthese des CovClick-Sondenmoleküls (**47**) wurde basierend auf dem in Kapitel 4.1 beschriebenen Schema 4.1 die Syntheseroute modifiziert (Schema 5.1). Ausgehend von dem Intermediat **44** wurde das mit einer Trimethylsilyl-Schutzgruppe versehene Alkin über eine Sonogashira-Reaktion eingebracht (**48**). Anschließend erfolgte die Entschützung der Silyl-Schutzgruppe mit Kaliumcarbonat in Methanol. Die Boc-Schutzgruppe wurde mit TFA in DCM abgespalten und das Amin **50** generiert, welches im folgenden Schritt mit Acryloylchlorid zum finalen Produkt (**47**) umgesetzt wurde. Die detaillierte synthetische Vorschrift des finalen Produkts sowie der Zwischenstufen sind im experimentellen Teil (siehe Kapitel 8.1.3) aufgeführt.

Schema 5.1: Synthese des CovClick-Sondenmoleküls.



Reagenzien und Bedingungen: (i) Trimethylsilylacetylen, Pd(PPh₃)₄, CuI, TEA, DMF, 0 °C-RT; (ii) K₂CO₃, MeOH, RT, 58 % (2 Schritte); (iii) TFA in DCM, RT; (iv) Acryloylchlorid, DIPEA, THF, 0 °C, 43 % (2 Stufen).

5.3 Evaluierung der CovClick-Sonde in MKK7

Eine Grundvoraussetzung für den CovClick-Ansatz stellt die Ausbildung einer kovalenten Bindung der Sonde zur Positionierung der Alkynguppe im aktiven Zentrum des Zielproteins für die finale *in situ* Click-Reaktion dar. Um zu überprüfen, ob die hergestellte CovClick-Sonde (47) das Cys218 in MKK7 kovalent modifiziert, wurde 47 nach Inkubation mit der isolierten Kinasedomäne von MKK7 massenspektrometrisch (ESI-MS) analysiert (siehe Kapitel 8.3).

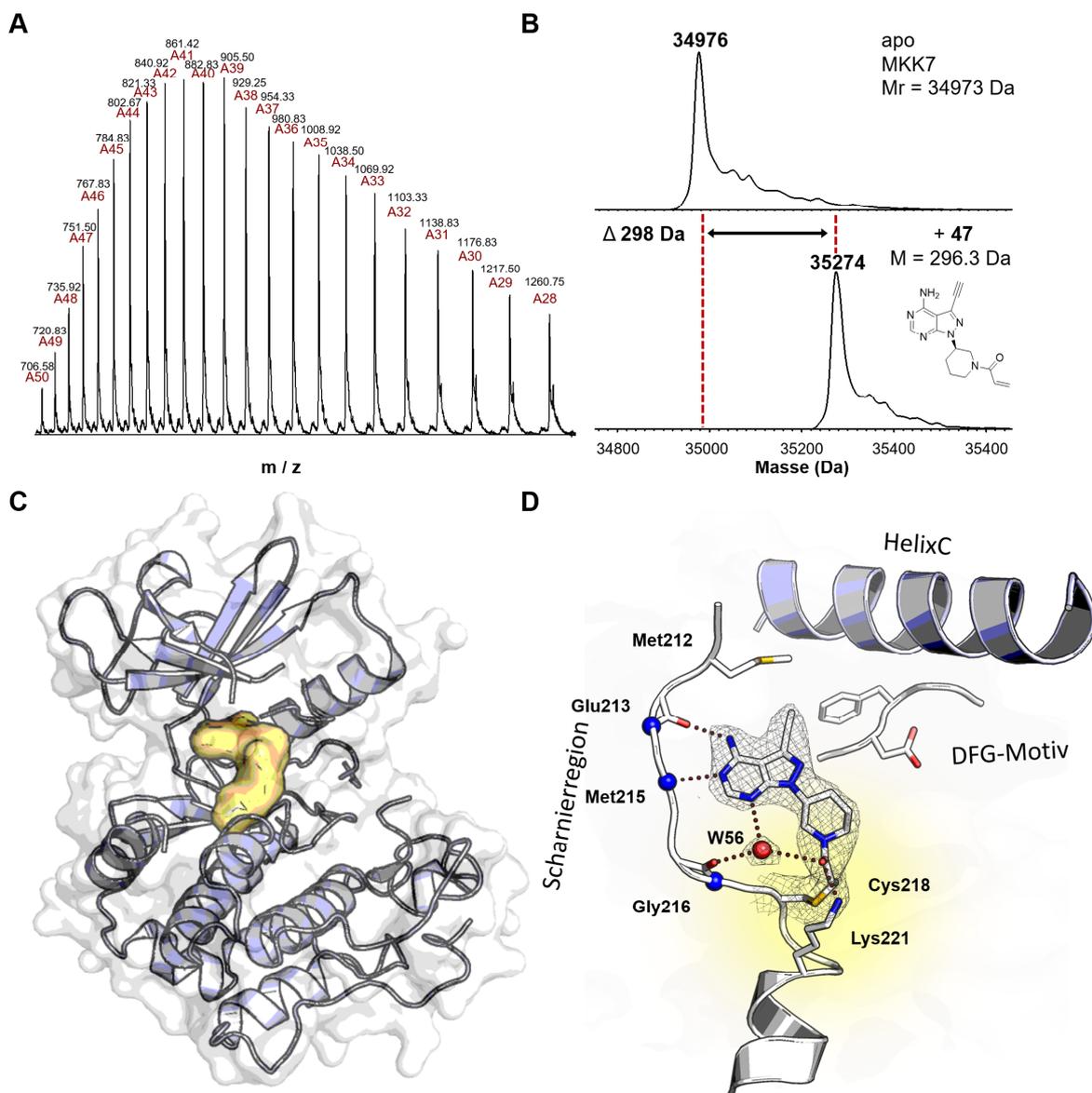


Abbildung 5.3: **A)** ESI-MS-Analyse von MKK7 nach Inkubation mit der CovClick-Sonde **47**. **B)** Vergleich der dekonvolvierten Massenspektren von MKK7 vor und nach Behandlung mit der kovalent bindenden Alkinsonde **47**. Die Massenzunahme von 298 Da beweist die kovalente Modifikation des Proteins durch **47**. **C)** Röntgenkristallstruktur von MKK7 im Komplex mit (**47**). **47** bindet im aktiven Zentrum der Kinase unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zu Cys218. **D)** Detailansicht des Bindungsmodus von **47** in der ATP-Bindungstasche. Die experimentell ermittelte ($2Fo - Fc$) Elektronendichte des Liganden ist bei 1σ konturiert. Neben dem Hauptkontakt des Liganden über zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat der Scharnierregion (Glu213 und Met215) bildet die Carbonylgruppe des Acrylamids eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zur Aminogruppe des Lys221 aus. Zusätzlich koordiniert der Ligand zusammen mit dem Peptidrückgrat von Gly216 ein Wassermolekül (W56).

Die Analyse mittels ESI-MS zeigte für **47** nach einer 60-minütigen Inkubation mit MKK7 eine entsprechende Massenzunahme von 298 Da verglichen mit einer mit DMSO behandelten Kontrolle und erbrachte den Nachweis einer vollständigen Modifikation des Proteins (Abbildung 5.3 A, B).

Zur Untersuchung des Bindungsmodus von **47**, wurde die Verbindung mit MKK7 kokristallisiert (Abbildung 5.3 C, D).^{xxiii} **47** bindet im aktiven Zentrum der Kinase unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zu Cys218. Neben zwei Wasserstoffbrückenbindungen der Aminopyrazolopyrimidin-Einheit zum Peptidrückgrat der Scharnierregion (Glu213 und Met215) kontaktiert die Carbonylgruppe des Amids die Aminofunktion von Lys221. Ein Wassermolekül (W56) sorgt zusätzlich durch Wechselwirkung mit den Carbonylgruppen des Amids und Gly216 sowie dem Stickstoffatom N7 des Pyrazolopyrimidins für eine Stabilisierung der Konformation des Liganden. Die Alkingruppe in 3-Position des Pyrazolopyrimidins ist in Richtung der α C Helix orientiert und ragt in die lipophile Subtasche hinein. Die Orientierung des Alkins innerhalb der ATP-Bindungstasche ermöglicht die Bindung der für die Click-Reaktion erforderlichen Azidfragmente und demonstriert zusammen mit dem kovalenten Bindungsverhalten das Potenzial der Sonde **47** für den CovClick-Ansatz in MKK7.

5.4 Initialer Screen und Identifizierung neuer kovalenter Verbindung

Zur Etablierung von CovClick in MKK7 wurde eine Substanzbibliothek aus 64 Azidfragmenten mit hoher Diversität zusammengestellt, von denen 57 Azide kommerziell bezogen wurden und sieben weitere aus der internen Substanzkollektion des Arbeitskreises Rauh stammten (Abbildung 10.1). In einem primären Screen wurde das Protein (0.03 mM) zunächst für 2 Stunden auf Eis mit drei Äquivalenten der CovClick-Sonde (0.09 mM) inkubiert und anschließend separat mit den jeweiligen Azidfragmenten (3 mM) für 20 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Die Proteinproben wurden anschließend mittels ESI-MS analysiert (siehe Kapitel 8.7).

^{xxiii} Kristallisationsexperimente wurden arbeitsgruppenintern von Patrik Wolle durchgeführt.

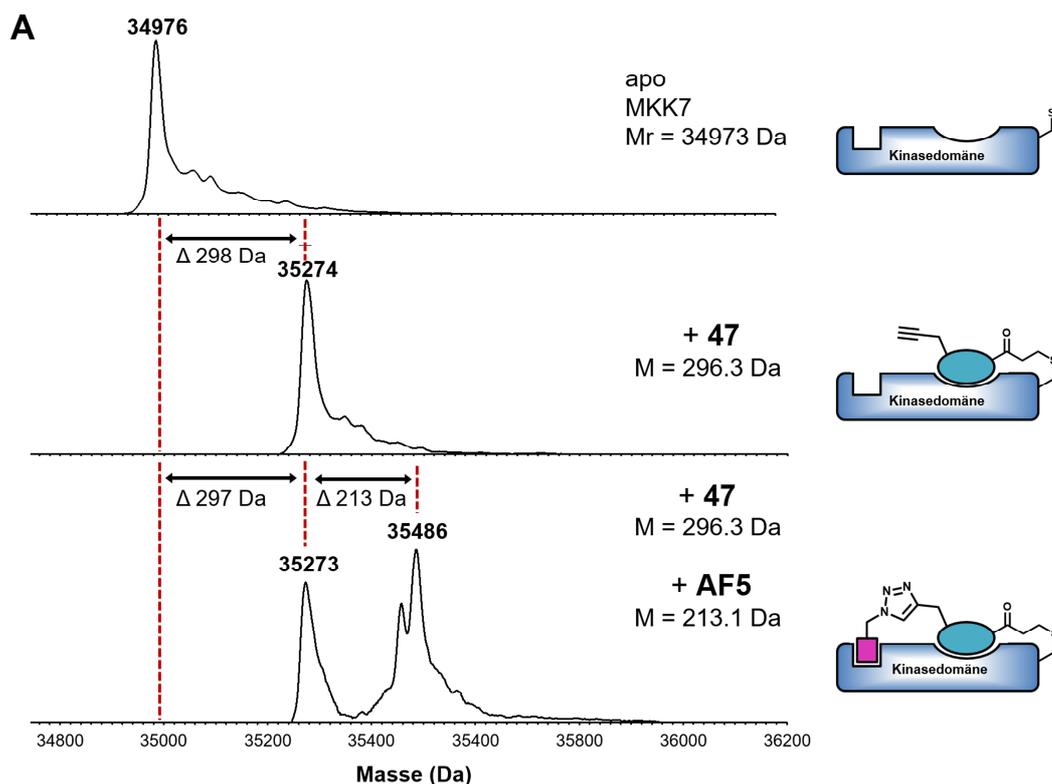
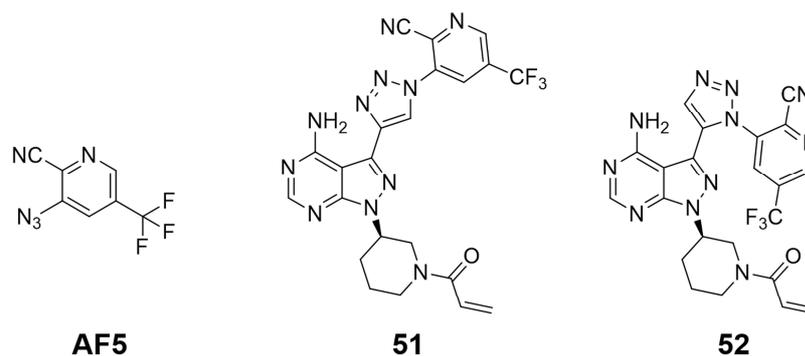
**B**

Abbildung 5.4: **A)** ESI-MS-Analyse des initialen CovClick-Screens. Dekonvolviertes Massenspektrum des MKK7-CovClick-Ansatzes mit dem Azidfragment **AF5** verglichen mit der apo- bzw. **47**-modifizierten Form des Proteins. In dem **AF5**-CovClick-Ansatz ist neben dem Massenpeak der Modifikation des Proteins durch die kovalente Alkinsonde (+ 297 Da) ein weiterer signifikanter Peak mit der Massenzunahme von zusätzlichen 213 Da erkennbar. **B)** Chemische Struktur des CovClick-Hits **AF5** sowie der beiden möglichen durch *in situ* gebildeten CovClick-Regioisomere **51** und **52**.

In dem initialen Screen konnte ein Azid (**AF5**) identifiziert werden, bei dem ein signifikanter Peak mit dem entsprechenden Massenzuwachs aufgetreten ist (Abbildung 5.4 A). Von den 64 getesteten Proben konnten drei aufgrund von zu geringer Intensität im ESI-Massenspektrum durch mögliche Denaturierung des Proteins nicht dekonvolviert und ausgewertet werden.

Bei sieben Proben konnten diverse Massenänderungen beobachtet, aber nicht dem jeweiligen Azid zugeordnet werden. Bei den restlichen 53 Proben war ausschließlich eine Massenzunahme von 298 Da durch die kovalente Sonde zu erkennen. Das dekonvolutierte ESI-MS-Spektrum des CovClick-Ansatzes mit **AF5** zeigte zwei verschiedene Peaks. Neben dem Peak mit der Modifikation der Alkinsonde (+ 297 Da) wurde ein weiterer mit der Massenzunahme von zusätzlichen 213 Da beobachtet, der dem entsprechenden Azid, einem 3-Azido-2-cyano-5(trifluormethyl)pyridin entsprach (Abbildung 5.4 B). Der neu entstandene Massenpeak wurde als erstes Indiz für eine *in situ* Triazol-Bildung gedeutet. Die *in situ* Click-Reaktion im Protein basiert ausschließlich auf einer hohen lokalen Konzentration der Azid- und Alkingruppe und einer optimalen Orientierung zueinander, die eine Bildung des 1,4 (*anti*)-(51) sowie des 1,5 (*syn*)-(52) substituierten CovClick-Produkts der [1,3]-dipolaren Cycloaddition (Abbildung 5.4 B) ermöglicht. Da sich durch eine ESI-MS Analyse keine Aussage über das *in situ* gebildete Regioisomer treffen lässt, wurden mit beiden Varianten Dockingstudien in MKK7 durchgeführt (siehe Kapitel 8.8). Dabei sollte ein potentieller Bindungsmodus untersucht werden. Die Evaluierung der Konformationen erfolgte mit der Docking Software Gold 5.2 (CCDC) und der Standardscorefunktion ChemPLP.^{169, 170} Durch den bekannten Bindungsmodus der CovClick-Sonde **47** in MKK7 wurden der Hauptkontakt des Liganden, die Wasserstoffbrückenbindungen des Aminopyrazolopyrimidins zur Scharnierregion sowie die kovalente Bindung zwischen dem Elektrophil und Cys218 als Bedingungen (*constraints*) für die Dockingstudien festgelegt.

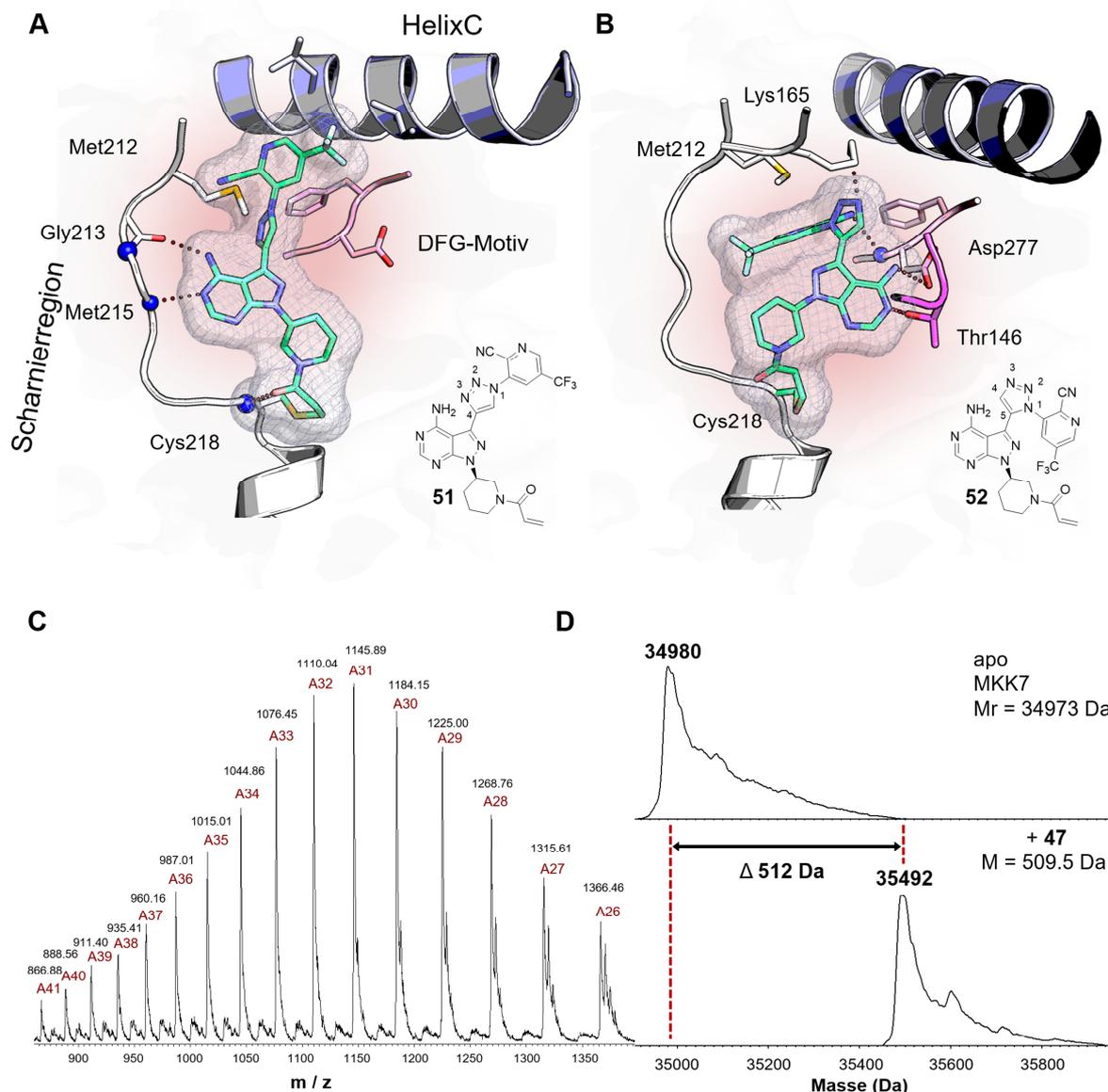
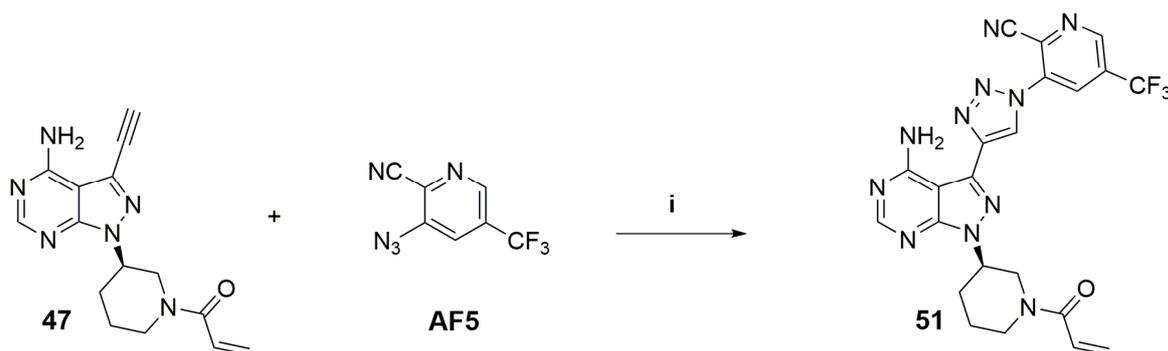


Abbildung 5.5: Dockingstudie der beiden Regioisomere **A) 51** und **B) 52** zur Prädiktion der jeweiligen Bindungsmodi in MKK7. Das kovalente Docking wurde mit der Komplexkristallstruktur von **47** in MKK7 vorgenommen. **C)** ESI-MS-Analyse von MKK7 nach Inkubation mit **51**. **D)** Vergleich der dekonvolvierten Massenspektren von MKK7 vor und nach Behandlung mit der kovalenten Verbindung **51**. Die Massenzunahme von 512 Da erbringt den Nachweis der kovalenten Modifikation des Proteins durch **51**.

Das Docking ergab ausschließlich für das 1,4-CovClick-Produkt (**51**) Konformationen des Liganden, die den vorausgesetzten Bedingungen entsprachen (Abbildung 5.5 A). Der für **51** favorisierte Bindungsmodus zeigt neben der kovalenten Bindung zu Cys218 Wasserstoffbrückenbindungen zu Gly213 und Met215.

Ein weiterer Kontakt wird zwischen der Carbonylgruppe des Liganden und dem Peptidrückgrat von Cys218 angezeigt. Das über die Click-Reaktion eingeführte 2-Cyano-5-(trifluoromethyl)pyridin ist in der lipophilen Subtasche zwischen dem Met-Türsteher (Met212) und der α C Helix eingebettet. Dessen Cyanogruppe ragt tief in Tasche hinein, wohingegen sich das Trifluoromethyl in 5-Position des Pyridins direkt zwischen den hydrophoben Aminosäureseitenketten der α C Helix Ile179 und Leu183 positioniert. Das verbrückende Triazol ist senkrecht zum Pyrazolopyrimidin orientiert und verhindert dadurch einen sterischen Konflikt mit dem Türsteherrest Met212. Die vorgeschlagene Konformation des Aminopyrazolopyrimidingrundgerüsts von **51** aus der Dockingstudie stimmte exakt mit der Komplexstruktur von **47** in MKK7 überein und lieferte einen plausiblen Bindungsmodus für das 1,4-CovClick-Produkt.

Die aus dem Docking hervorgegangenen Konformationen des 1,5-Click Regioisomers **52** erfüllten hingegen nicht die zuvor definierten Kriterien und es wurde trotz festgelegter Bedingung kein Bindungsmodus gefunden, der neben einer kovalenten Bindung zu Cys218 den klassischen Kontakt zur Scharnierregion zulässt. Bei der für **52** vorgeschlagenen Konformation ist der Ligand um etwa 180° gedreht und der Hauptkontakt des Aminopyrazolopyrimidins über Wasserstoffbrückenbindungen wird nicht zur Scharnierregion, sondern zum Asp277 des DFG-Motivs und der Hydroxylgruppe des Thr146 aus der Glycin-reichen Schleife hergestellt (Abbildung 5.5 B). Die Resultate der Dockingstudien unterstützten die *in situ* Bildung des 1,4-substituierten Triazols **51**, weshalb der Fokus zur Synthese zunächst auf dieser Verbindung lag. Deshalb wurde **51** für weiterführende Experimente in einer kupferkatalysierten Reaktion regioselektiv synthetisiert (Schema 5.2 und siehe Kapitel 8.1.3).

Schema 5.2: Regioselektive Synthese von **51**.

^a Reagenzien und Bedingungen: (i) Kupfer(II)sulfat Pentahydrat, Natriumascorbat, H₂O/*tert*-BuOH (1:1), RT, 79 %.

Eine ESI-MS-Analyse von MKK7 nach Behandlung mit der synthetisierten Verbindung **51** zur Überprüfung des Hits aus dem CovClick-Screen, ergab eine vollständige Modifikation des Proteins durch **51** (+ 512 Da) und bestätigte einen kovalenten Bindungsmodus der durch CovClick identifizierten neuen MKK7-Verbindung (Abbildung 5.5 C, D).

Zusammenfassend konnte in einem initialen Screen für MKK7 gezeigt werden, dass der CovClick-Ansatz in der Lage ist, in einer durch die Beschaffenheit der Bindungstasche getriebene *in situ* Reaktion, neue kovalente Verbindungen zu identifizieren. Die primären Resultate demonstrieren das Potential dieser neuen Methode und dienen als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen. Zur weiterführenden Validierung der CovClick-Reaktion sollte die Modifikation des entsprechenden Cysteins durch das CovClick-Produkt in dem *in situ* Ansatz mit Hilfe von MS/MS-Experimenten analysiert werden. Zur Untersuchung, ob die neu identifizierte Verbindung auch mit einer verbesserten Affinität bzw. Aktivität einhergeht, sollten die CovClick-Sonde sowie das CovClick-Produkt in einem Bindungs- bzw. aktivitätsbasierten Assay getestet werden. Die Synthese und die Analyse der 1,5-substituierten Triazolverbindung **52** könnten die Resultate aus den Dockingstudien validieren und die CovClick *in situ* Bildung des 1,4-Produkts untermauern. Zudem wäre eine Komplexstruktur von **51** in MKK7 von großem Interesse, um den in den Dockingstudien vorgeschlagenen Bindungsmodus zu überprüfen. Darüber hinaus sollte eine Optimierung der CovClick-Bedingungen in

Bezug auf die Reaktionsdauer, die Reaktionstemperatur sowie der eingesetzten Konzentrationen von Kinase, CovClick-Sonde und Azid erfolgen, um die Robustheit und die Zuverlässigkeit der Methode detaillierter zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Der Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor gehört zur Familie der ErbB-Rezeptoren und reguliert durch seine Funktion als Rezeptortyrosinkinase grundlegende Prozesse der Zelle wie das Zellwachstum, den Zellzyklus sowie den Zelltod. Eine Fehlregulation des EGF-Rezeptors spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung verschiedener Krebserkrankungen. Bei einer bestimmten Form von Lungenkrebs, dem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom, wurden Mutationen in EGFR als onkogene Treiber identifiziert. Die in der Kinasedomäne auftretenden Mutationen führen zu einer Erhöhung der Tyrosinkinaseaktivität und sind mit unkontrolliertem Zellwachstum und der Entstehung von Tumoren assoziiert. Eine gezielte Inhibition der onkogenen EGFR-Mutationsvarianten steht im direkten Zusammenhang mit einer hemmenden Wirkung auf das Tumorwachstum. NSCLC-Patienten, bei denen Aktivierungsmutationen u. a. eine L858R-Punktmutation oder eine Exon 19 Deletion im EGF-Rezeptor identifiziert wurden, können im Zuge der personalisierten Medizin wirkungsvoll mit spezifischen EGFR-Erstgenerationeninhibitoren wie Gefitinib und Erlotinib behandelt werden. Die Wirksamkeit dieser zielgerichteten Tumorthherapie wird allerdings durch auftretende Wirkstoffresistenzen infolge der TKI-Behandlung stark eingeschränkt. Bei über 60 % der Patienten liegt die Ursache der Tumorprogression in einer auftretenden sekundären Punktmutation der Türsteheraminosäure (T790M). Kovalente EGFR-Inhibitoren, die in der Lage sind das Protein durch irreversible Modifikation eines in der ATP-Bindungstasche befindlichen Cysteins (Cys797) dauerhaft zu inhibieren, konnten das Potential aufzeigen die T790M-Wirkstoffresistenz effektiv zu umgehen.

In der vorliegenden Arbeit wird die strukturbasierte Entwicklung kovalenter T790M-spezifischer EGFR-Inhibitoren beschrieben. Ausgehend von einer reversibel bindenden Hit-Verbindung aus einem phänotypischen Screen konnten mit Hilfe von strukturbasiertem Design Pyrimidin-basierte Inhibitoren mit einem für EGFR neuartigen Bindungsmotiv entworfen und synthetisiert werden, die den EGF-Rezeptor mit T790M-Mutation kovalent inhibieren und über nanomolare inhibitorische Aktivitäten verfügen. Trotz des erstmalig für diese Substanzklasse beschriebenen kovalenten Bindungsmodus und der hohen biochemischen Potenz

konnte die Pyrimidinserie keine hohe Wirksamkeit in NSCLC-Krebszelllinien erzielen. Eine mögliche Erklärung dafür lieferte neben einer unzureichenden Zellpermeabilität und einem aktiven Efflux, eine in den Kinetikstudien beobachtete langsame kovalente Bindungsbildung. Diese Erkenntnisse führten zu strukturbasiertem *de novo* Design einer neuen Serie kovalenter Pyrazolopyrimidin-basierter T790M-Inhibitoren, deren Vertreter über eine zum Teil subnanomolare Inhibition der Kinaseaktivität verfügen und das Wachstum der wirkstoffresistenten H1975-Krebszellen stark inhibieren. Dabei konnte ein direkter inhibitorischer Einfluss auf die Autophosphorylierung von EGFR und die Weiterleitung des EGFR-abhängigen Signals gezeigt werden. Komplexkristallstrukturen in EGFR-T790M lieferten eine strukturelle Erklärung für die hohe Potenz dieser fokussierten Substanzbibliothek. Eine exzellente Selektivität und ein geeignetes *in vitro* ADME/DMPK-Profil ermöglichten eine erste Studie zur *in vivo* Pharmakokinetik, bei der durch intraperitoneale Applikation vielversprechende Plasmakonzentrationen erreicht wurden, die sich für *in vivo* Wirksamkeitsstudien eignen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es außerdem gelungen die Grundlagen für CovClick (*covalent in situ* Click-Chemie), einem Strukturfindungs-System zur Identifizierung neuer kovalenter Kinaseinhibitoren, aufzubauen, das sich das Prinzip der Zielprotein-kontrollierten Synthese zunutze macht. Der Ansatz der kovalenten *in situ* Click-Chemie beruht auf der irreversiblen Modifikation eines in der Bindungstasche des Zielproteins befindlichen Cysteins durch eine kovalent bindende und mit einem Alkin ausgestattete Sonde und einer nachfolgenden *in situ* Click-Reaktion durch Screening gegen Azidfragmente. Mit Hilfe von strukturbasiertem Design konnte für die Modellkinase MKK7 eine kovalente CovClick-Sonde entworfen und synthetisiert werden. MS-Analysen der Pyrazolopyrimidin-basierten Sonde erbrachten den Nachweis eines kovalenten Bindungsmodus in MKK7, der durch eine Komplexkristallstruktur bestätigt werden konnte. In einem primären CovClick-Screen konnte eine Hit-Struktur identifiziert werden, die anschließend zur Validierung synthetisch hergestellt wurde. MS-Experimente belegten eine kovalente Modifizierung von MKK7 durch die mittels CovClick identifizierte Verbindung. Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit die Voraussetzung für weiterführende Optimierungen und Anwendungen dieser Methode zur Identifizierung neuer kovalenter Inhibitoren geschaffen werden.

7 Abstract

The epidermal growth factor receptor (EGFR), a member of the ErbB family, is a receptor tyrosine kinase that represents a key mediator in critical cellular signaling processes such as cell proliferation, cell cycle regulation as well as apoptosis. Therefore, dysregulation of EGFR plays a pivotal role in the onset and progression of cancer. Mutations in the gene encoding the EGF receptor have been discovered as oncogenic drivers in non-small cell lung cancer (NSCLC). These somatic kinase domain mutations accounting for increased tyrosine kinase activity are associated with increased cell proliferation and tumor growth. Specific inhibition of oncogenic EGFR mutant variants results in tumor remission. NSCLC patients harboring activating mutations such as the L858R point mutation or the exon 19 deletion showed a dramatic clinical response to reversible first-generation EGFR inhibitors gefitinib and erlotinib in the course of personalized medicine. However, acquired drug resistances limit the effective treatment with tyrosine kinase inhibitors. In more than 60 % of resistant cases, the relapse of disease is associated with an emerging secondary point mutation at the gatekeeper residue (T790M). However, covalent EGFR inhibitors demonstrated the potential to overcome T790M drug resistance by covalently targeting a unique Cysteine (Cys797) at the lip of the EGFR ATP-binding cleft.

This thesis describes the structure-guided development of covalent T790M-specific EGFR inhibitors. Based on a reversible binding hit identified in a phenotypic screen, structure-based design led to the synthesis of pyrimidine-based inhibitors. They revealed a novel binding mode in EGFR and were demonstrated to covalently target the T790M drug-resistant mutant variant with low nanomolar inhibitory activities. Although the pyrimidine-based inhibitors targeted EGFR in a covalent and irreversible fashion, the strong inhibitory effects in biochemical evaluations could not be translated into cellular potency in cancer cell lines. Their moderate cellular efficacy is likely to result from insufficient cellular permeability and a dramatic efflux rates in conjunction with slow covalent bond formation as observed in kinetic studies. These insights triggered the structure-based *de novo* design of a new focused library of covalent T790M inhibitors of which a subset illustrated subnanomolar kinase inhibition as well as highly potent cellular efficacy in T790M drug-resistant H1975

cells. Moreover, these pyrazolopyrimidine-based inhibitors demonstrated a direct inhibitory effect on EGFR autophosphorylation and its downstream signaling targets in the H1975 cell line. Complex crystal structures with EGFR-T790M revealed a unique binding mode providing a structural explanation for the excellent potency of that series. Excellent selectivity profiles together with a suitable *in vitro* ADME/DMPK profile allowed an investigation of the pharmacokinetics of this compound class *in vivo*. In detail, high exposure by the intraperitoneal route could be achieved providing a promising plasma concentration that encourages further *in vivo* efficacy studies.

This thesis also describes the establishment of the conceptual study CovClick (covalent *in situ* click chemistry) as basis for a novel structure-finding system to identify new covalent kinase inhibitors by target-guided synthesis (TGS). The CovClick approach is based on an irreversible modification of a unique cysteine in the binding site of the target protein by a covalent probe. This probe is equipped with an alkyne moiety and subsequently undergoes an *in situ* click reaction with azide fragments in close proximity. Utilizing structure-based design, a CovClick probe for MKK7 as model kinase was designed and synthesized. Protein-MS-analysis of the covalent probe demonstrated an irreversible binding mode in MKK7 that was confirmed by a complex crystal structure. An initial CovClick-Screen revealed a hit structure that was synthesized for further validation studies. Mass spectrometry experiments confirmed a covalent modification of MKK7 by the identified compound. This research provides the basis for further optimization studies and applications of the CovClick method to identify new covalent inhibitors.

8 Experimenteller Teil

8.1 Organische Synthese

8.1.1 Generelle Anmerkungen

Kommerziell erhältliche Chemikalien und Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders angeführt, von den Firmen ABCR Chemicals, Acros Organics, Activate Scientific, Alfar Aesar, Apollo Scientific, Applichem, Enamine, Maybridge, Merck, Novabiochem, Sigma-Aldrich oder VWR bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Sämtliche hydrolyse- bzw. oxidationsempfindliche Reaktionen wurden nach sorgfältigem Ausheizen der Glasapparaturen unter Argon- bzw. Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

NMR-Spektren wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur auf den Spektrometern Bruker (DRX 400) (400 MHz für ^1H - und 101 MHz für ^{13}C -Spektren), Varian Mercury 400 (400 MHz für ^1H - und 101 MHz für ^{13}C -Spektren), DRX 500 (500 MHz für ^1H - und 125 MHz für ^{13}C -Spektren), sowie DRX 600 (600 MHz für ^1H - und 151 MHz für ^{13}C -Spektren) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden in δ (ppm) angegeben und beziehen sich auf den internen Standard für die Lösungsmittel Deuterodimethylsulfoxid ($\text{DMSO-}d_6$, $\delta = 2.50$ ppm bzw. $\delta = 39.52$ ppm) und Deuteriochloroform (CDCl_3 , $\delta = 7.26$ ppm bzw. $\delta = 77.16$ ppm). Die in den ^1H -Spektren auftretenden Spinmultiplizitäten wurden folgendermaßen bezeichnet: s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett), sowie bs (breites Singulett). Die Kopplungskonstanten (J) wurden jeweils in Hertz (Hz) aufgeführt. NMR-Spektren wurden mit Mestrenova (Mestrelab Research S.L., Version 6.0.3-5604) ausgewertet. Bei einigen Verbindungen kommt es konformationsbedingt zu einer weiteren Aufspaltung der ^1H - sowie der ^{13}C -Signale.

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit dem Spektrometer LTQ Orbitrap der Firma Thermo Fisher Scientific aufgenommen. **Die LC-MS-Spektren** wurden an dem HPLC-System LCQ Advantage Max (1200er Serie) (Agilent) auf einer Eclipse XDB-Säule ($5\ \mu\text{M}$, $150 \times 4.6\ \text{mm}$) (Phenomenex) aufgenommen. Die Auswertung der LC-MS- und HRMS-Spektren erfolgte mit Xcalibur™ (Thermo Fisher Scientific Inc. Version 2.2 SP1).

Analytische Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgel 60 F₂₅₄-beschichteten Aluminiumplatten der Firma Merck. Die Verbindungen wurden mittels Ultraviolettstrahlung ($\lambda = 254 \text{ nm}$ bzw. 366 nm) beziehungsweise den Anfärbereagenzien Ninhydrin, Kaliumpermanganat oder Anisaldehyd visualisiert. Säulenchromatographie erfolgte an Kieselgel der Firma J. T. Baker (Korngröße $40\text{-}60 \mu\text{m}$).

Die Auftrennung von Rohprodukten mittels **präparativer HPLC** erfolgte mit dem Gerät LC-8A der Firma Shimadzu mit Nucleodur C18 Gravity Säule ($5 \mu\text{m}$, Machery Nagel) und VP50/21 Vorsäule (Machery Nagel), sowie einem Agilent HPLC System (1200er Serie) (Agilent) mit VP125/21 Nucleodur C18 Gravity Säule ($5 \mu\text{m}$, Machery Nagel) und VP20/16 Nucleodur C18 Gravity Vorsäule (MacheryNagel).

8.1.2 Verzeichnis der synthetisierten Verbindungen

Detaillierte synthetische Vorschriften der Verbindungen **8a-k**, **10**, **11a-c**, **12a-c**, **16a-c**, **20b-c** und **24b-c** sind in der Masterarbeit „Synthese und biochemische Charakterisierung kovalenter Kinaseinhibitoren zur Umgehung der Wirkstoffresistenz T790M in EGFR“ (Julian Engel, 2011, TU Dortmund) sowie in der Publikation Richters *et al.* 2015 dokumentiert.¹⁷¹

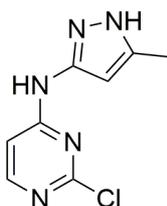
Verbindung 3	S.115
Verbindung 4	S.116
Verbindung 5a	S.117
Verbindung 5b	S.118
Verbindung 6	S.119
Verbindung 7a	S.120
Verbindung 7b	S.121
Verbindung 8l	S.122
Verbindung 8m	S.123
Verbindung 8n	S.128
Verbindung 8o	S.129
Verbindung 8p	S.130
Verbindung 8q	S.131
Verbindung 9a	S.136
Verbindung 9b	S.137
Verbindung 9c	S.138
Verbindung 9d	S.144
Verbindung 9e	S.148
Verbindung 13	S.124
Verbindung 14	S.132
Verbindung 15	S.140
Verbindung 17	S.125
Verbindung 18	S.133
Verbindung 19	S.141
Verbindung 21	S.126
Verbindung 22	S.134
Verbindung 23	S.142
Verbindung 25	S.127
Verbindung 26	S.135
Verbindung 27	S.143
Verbindung 28	S.145
Verbindung 29	S.146
Verbindung 30	S.147
Verbindung 32	S.150
Verbindung 33	S.151
Verbindung 34	S.152
Verbindung 35	S.153

Verbindung 36	S.154
Verbindung 37	S.155
Verbindung 38	S.156
Verbindung 41a	S.176
Verbindung 41b	S.177
Verbindung 41d	S.178
Verbindung 41e	S.179
Verbindung 41f	S.199
Verbindung 41g	S.180
Verbindung 41h	S.181
Verbindung 41i	S.182
Verbindung 41j	S.183
Verbindung 41k	S.184
Verbindung 41l	S.185
Verbindung 41m	S.200
Verbindung 41n	S.186
Verbindung 41o	S.187
Verbindung 41p	S.188
Verbindung 41q	S.189
Verbindung 41r	S.190
Verbindung 41s	S.191
Verbindung 41t	S.192
Verbindung 41u	S.193
Verbindung 41v	S.194
Verbindung 41w	S.195
Verbindung 41x	S.196
Verbindung 41y	S.197
Verbindung 41z	S.198
Verbindung 43	S.157
Verbindung 44	S.158
Verbindung 45a	S.159
Verbindung 45b	S.160
Verbindung 45c	S.161
Verbindung 45d	S.162
Verbindung 45e	S.163
Verbindung 45f	S.164
Verbindung 45g	S.165
Verbindung 45h	S.166
Verbindung 45i	S.167
Verbindung 45j	S.168
Verbindung 45k	S.169
Verbindung 45l	S.170
Verbindung 45m	S.171
Verbindung 45n	S.172
Verbindung 45o	S.173
Verbindung 45p	S.174
Verbindung 45q	S.175
Verbindung 47	S.203

Verbindung 48	S.201
Verbindung 49	S.202
Verbindung 51	S.204

8.1.3 Synthese der Inhibitoren

8.1.3.1 Darstellung von 2-Chloro-*N*-(5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (3)



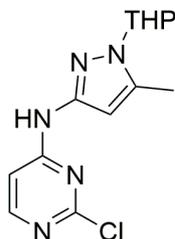
2,4-Dichloropyrimidin (1 g, 6.77 mmol) wurde in DMF (10 mL) gelöst, mit 5-Methyl-1*H*-pyrazol-amin (723 mg, 7.44 mmol) und DIPEA (2.65 mL, 27 mmol) versetzt und bei 90 °C für 6 Stunden gerührt. Zur entstandenen Reaktionsmischung wurde eine ges. Lösung NaHCO₃ hinzugegeben, bevor die wässrige Phase mit 10 % MeOH/DCM (3 x 100 mL) extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (2 % MeOH/DCM) lieferte 770 mg (3.76 mmol, 54 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.11 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.35 (bs, 1H), 6.10 (bs, 1H), 2.22 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.75, 159.34, 157.66, 147.34, 138.83, 105.09, 95.48, 10.60.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 210.05465 für C₈H₉ClN₅ [M+H]⁺. Gefunden: 210.05425.

8.1.3.2 Darstellung von 2-Chloro-*N*-(5-methyl-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (**4**)



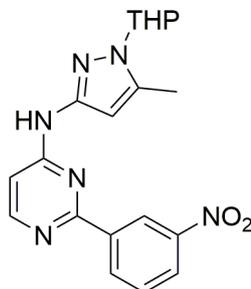
Zu einer Lösung aus **3** (400 mg, 1.91 mmol) und DHP (482 mg, 5.72 mmol) in THF (10 mL) wurde pTsoH (53 μ L, 0.38 mmol) bei 0 °C hinzugegeben. Das entstandene Reaktionsgemisch wurde für 3 Stunden bei 90 °C gerührt und anschließend mit ges. NaHCO₃-Lsg. versetzt. Die Extraktion der wässrigen Phase erfolgte mit DCM (3 x 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel darauffolgend im Vakuum evaporiert. Das entstandene Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (10-50 % EtOAc/PE) aufbereitet und es konnte 356 mg (1.12 mmol, 64 %) des gewünschten Produkts als weißer Feststoff erhalten werden.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.41 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.18 (bs, 1H), 6.09 (bs, 1H), 5.32 (dd, *J* = 9.7, 2.2 Hz, 1H), 3.89 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 3.63 (td, *J* = 11.3, 4.2 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.26-2.19 (m, 1H), 2.05-1.95 (m, 1H), 1.91-1.83 (m, 1H), 1.73-1.60 (m, 1H), 1.57-1.48 (m, 2H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.58, 159.31, 146.15, 139.99, 105.11, 97.74, 83.11, 66.52, 28.84, 24.75, 22.18, 10.37.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 294.11216 für C₁₃H₁₇ClN₅O [M+H]⁺. Gefunden: 294.11194.

8.1.3.3 Darstellung von *N*-(5-Methyl-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-1*H*-pyrazol-3-yl)-2-(3-nitrophenyl)pyrimidin-4-amin (5a)



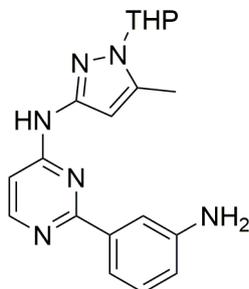
4 (265 mg, 0.90 mmol) und (3-Nitrophenyl)boronsäure (301 mg, 1.8 mmol) wurden in einer Mischung aus DME/EtOH (4:1) (5 mL) gelöst und mit K_2CO_3 (499 mg, 3.61 mmol) versetzt. Nach sorgfältiger Entgasung der Reaktionsmischung wurde der Katalysator Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (104 mg, 0.09 mmol) zugegeben und in einem Mikrowellenreaktor für 90 min auf 150 °C erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die entstandene Reaktionssuspension über Celite filtriert und im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und mit H_2O versetzt. Der anschließenden Phasentrennung folgte die Extraktion mit DCM (2 x 100 mL). Die organischen Phasen wurden vereint, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1 % MeOH/DCM) lieferte 239 mg (0.63 mmol, 70 %) des gewünschten Produkts als gelblichen Feststoff.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 10.15 (s, 1H), 9.13 (t, $J = 1.69$ Hz, 1H), 8.73 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.46 (bs, 1H), 8.34 (dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz, 1H), 7.80 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.20 (bs, 1H), 6.39 (bs, 1H), 5.33 (dd, $J = 9.7, 2.1$ Hz, 1H), 3.90 (d, $J = 11.9$, 1H), 3.69-3.60 (m, 1H), 2.39-2.23 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 2.01 (m, 1H), 1.89 (dd, $J = 13.0, 2.3$ Hz, 1H), 1.75-1.62 (m, 1H), 1.58-1.50 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$) δ 160.63, 159.41, 148.13, 146.82, 139.78, 139.57, 133.49, 130.17, 124.78, 121.96, 105.53, 97.67, 83.14, 66.52, 28.89, 24.79, 22.24, 10.45.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 381.16751 für $C_{19}H_{21}N_6O_3$ $[M+H]^+$. Gefunden: 381.16817.

8.1.3.4 Darstellung von 2-(3-Aminophenyl)-N-(5-methyl-1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (**5b**)



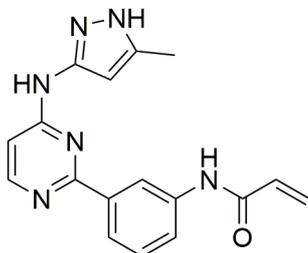
Zu einer Suspension aus **5a** (180 mg, 0.47 mmol) und Ammoniumformiat (179 mg, 2.84 mmol) in Ethanol wurde 5 % Pd/C (1 mg, 0.09 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 45 Minuten auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurde die Suspension über Celite filtriert und im Vakuum eingeeengt. Nach Aufnahme des Rückstands in DCM und Behandlung mit ges. NaHCO₃-Lsg. wurde die wässrige Phase mit DCM (3 x 100 mL) extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Entfernung des Lösungsmittels erfolgte im Vakuum und lieferte 165 mg (0.47 mmol, quant.) des gewünschten Produkts als gelblichen Feststoff. **5b** wurde ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.90 (s, 1H), 8.35 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.62 (bs, 1H), 7.53 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.13 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.13 (bs, 1H), 6.70-6.66 (m, 1H), 6.44 (bs, 1H), 5.31 (dd, *J* = 9.7, 2.2 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.90 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 3.68-3.59 (m, 1H), 2.38-2.22 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 2.0 (m, 1H), 1.87 (dd, *J* = 13.0, 2.3 Hz, 1H), 1.73-1.61 (m, 1H), 1.57-1.49 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.50, 159.24, 155.80, 148.61, 147.15, 139.66, 138.71, 128.70, 116.14, 115.71, 113.32, 104.40, 97.67, 83.09, 66.51, 28.92, 24.81, 22.26, 10.49.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 351.19333 für C₁₉H₂₃N₆ [M+H]⁺. Gefunden: 351.19325.

8.1.3.5 Darstellung von *N*-(3-(4-((5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)phenyl)acrylamid (**6**)



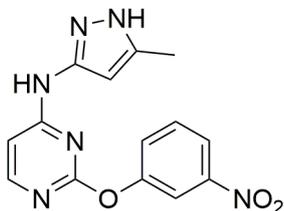
Zu einer Lösung aus **5b** (37 mg, 0.075 mmol) in THF (1 mL) wurde Acryloylchlorid (6.4 μ L, 0.079 mmol) tropfenweise bei 0 ° hinzugegeben und für 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Amins wurde die Reaktionsmischung mit einer Lösung ges. NaHCO₃ und DCM versetzt. Anschließend erfolgte die Extraktion der wässrigen Phase mit DCM (3 x 50 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum konzentriert. Der resultierende hell-gelbe Rückstand wurde in DCM (1 mL) aufgenommen und mit 25 %TFA in DCM (5 mL) für 12 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Nach Alkalisierung der Reaktionsmischung mittels ges. NaHCO₃-Lsg. wurde die wässrige Phase mit 10 % MeOH/DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) lieferte 17.5 mg (0.055 mmol, 73 %) des gewünschten Produkts als weißlich-gelben Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.9 (s, 1H), 10.28 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.35 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.03 (b, 1H), 6.51 (bs, 1H), 6.48 (dd, *J* = 17.0, 10.1 Hz, 1H), 6.30 (dd, *J* = 17.0, 1.8 Hz, 1H), 5.7 (dd, *J* = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.17, 162.64, 159.40, 155.66, 148.21, 139.18, 138.71, 131.95, 128.73, 126.78, 122.73, 121.06, 118.90, 104.72, 95.75, 35.74, 10.72.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 321.14638 für C₁₇H₁₇N₆O [M+H]⁺. Gefunden: 321.14607.

8.1.3.6 Darstellung von *N*-(5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-2-(3-nitrophenoxy)pyrimidin-4-amin (7a)

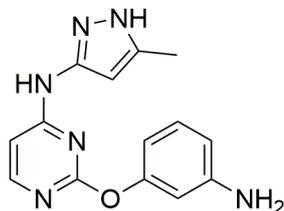


3 (100 mg, 0.48 mmol) wurde in DMF (6 mL) gelöst bevor 3-Nitrophenol (133 mg, 0.95 mmol) und K_2CO_3 (87.9 mg, 1.91 mmol) dazugegeben wurden. Die Reaktionsmischung wurde für 12 Stunden bei 140 °C erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung und Behandlung mit ges. $NaHCO_3$ -Lsg. wurde die wässrige Phase mit 10 % MeOH/DCM (3 x 50 mL) extrahiert und die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde daraufhin im Vakuum entfernt und nachfolgende Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) lieferte 29.5 mg (0.14 mmol, 20 %) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 11.96 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.08 (s, 2H), 7.78-7.69 (m, 2H), 6.74 (bs, 1H), 5.73 (s, 1H), 2.07 (s, 3H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 313.10491 für $C_{14}H_{13}N_6O_3$ $[M+H]^+$. Gefunden: 313.10439.

8.1.3.7 Darstellung von 2-(3-Aminophenoxy)-N-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (7b)



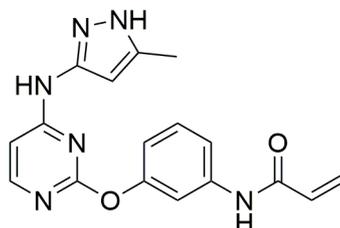
Eine Suspension aus **7a** (136 mg, 0.44 mmol) und Ammoniumformiat (165 mg, 2.61 mmol) in EtOH (7 mL) wurde mit 5 % Pd/C (4.6 mg, 0.044) behandelt und bei 90 °C für 20 Minuten umgesetzt. Die Reaktionssuspension wurde über Celite filtriert und im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wurde anschließend in DCM aufgenommen und mit einer ges. NaHCO₃-Lsg. versetzt. Nachfolgende Extraktion der wässrigen Phase erfolgte mit DCM (3 x 100 mL), die entstandenen organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum eingengt. Säulenchromatographie an Kieselgel (0.5-2 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) erbrachte 113 mg (0.40 mmol, 91 %) des gewünschten Produkts als gelben Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.88 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.03 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.62 (bs, 1H), 6.43 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.32 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 7.9, 1.5, 1H), 5.90 (bs, 1H), 5.17 (s, 2H) 2.12 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.90, 160.98, 157.08, 154.13, 150.10, 147.82, 138.25, 129.43, 110.60, 109.64, 107.23, 101.22, 95.94, 10.60.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 283.13073 für C₁₄H₁₅N₆O [M+H]⁺. Gefunden: 283.13012.

8.1.3.8 Darstellung von *N*-(3-((4-((5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl)acrylamid (**8l**)

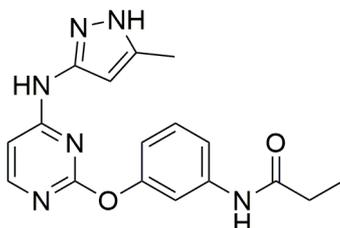


Acryloylchlorid (14.3 μL , 0.20 mmol) wurde zunächst in THF (0.5 mL) verdünnt bevor es tropfenweise bei 0 °C zu einer Lösung aus **7b** (50 mg, 0.18 mmol) und DIPEA (181 μL ; 1.1 mmol) in THF (7 mL) zugegeben wurde. Die entstandene Reaktionsmischung wurde bei 0 °C für 10 Minuten gerührt und im Anschluss mit einer Lösung ges. NaHCO_3 versetzt. Die Extraktion der wässrigen Phase erfolgte mit 10 % MeOH/DCM (3 x 100 mL), woraufhin die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet wurden. Die anschließende Evaporation des Lösungsmittels erfolgte im Vakuum. Säulenchromatographie an Kieselgel (1 % MeOH/DCM) lieferte 15.5 mg (0.046 mmol, 26 %) des gewünschten Produkts als weißen kristallinen Feststoff.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.91 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.56 (s, 2H), 7.37 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.62 (bs, 1H), 6.44 (dd, $J = 15.5, 10.4$ Hz, 1H), 6.25 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H), 5.80 (s, 1H), 5.75 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H), 2.07 (s, 3H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 337.14130 für $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 337.14083.

8.1.3.9 Darstellung von *N*-(3-((4-((5-Methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl)propionamid (**8m**)



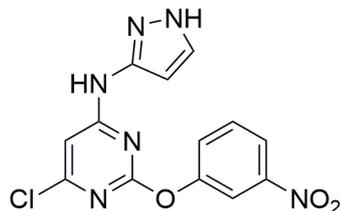
Propionylchlorid (20.2 μL , 0.23 mmol) wurde zunächst in THF (0.5 mL) verdünnt bevor es tropfenweise bei 0 °C zu einer Lösung aus **7b** (59 mg, 0.21 mmol) und DIPEA (213 μL ; 1.25 mmol) in THF (12 mL) gegeben wurde. Die resultierende Reaktionsmischung wurde für 50 Minuten bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe einer ges. NaHCO_3 -Lsg. erfolgte die Extraktion der wässrigen Phase mit 10 % MeOH/DCM (3 x 100 mL). Nachfolgend wurden die organischen Phasen vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließende Säulenchromatographie an Kieselgel (0.5-2 MeOH/DCM) ergab 18.7 mg (0.055 mmol, 27 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.92 (bs, 1H), 9.92 (bs, 2H), 8.05 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.47 (bs, 2H), 7.35-7.31 (m, 1H), 6.79(s 1H), 6.49 (bs, 1H), 5.80(s, 1H), 2.31(q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.08 (s, 3H), 1.07 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 172.42, 164.48, 160.97, 156.26, 153.29, 147.58, 140.73, 138.67, 129.76, 116.62, 115.51, 112.79, 101.73, 96.02, 29.71, 10.66, 9.76.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 339.15695 für $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 339.15646.

8.1.3.10 Darstellung von 6-Chloro-2-(3-nitrophenoxy)-N-(1H-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (13)



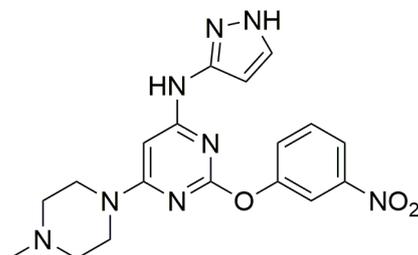
Eine Lösung aus 3-Aminopyrazol (512 mg, 6.16 mmol) und DIPEA (1.14 mL, 6.72 mmol) in DMF (10 mL) wurde für 10 Minuten gerührt, bevor diese mit **11b** (1.6 g, 5.6 mmol) versetzt wurde. Die resultierende Reaktionsmischung wurde für 21 Stunden bei 85 °C erhitzt. Im Anschluss wurde eine Lösung aus ges. NaHCO₃ und DCM hinzugegeben. Der Phasentrennung folgten die Extraktion der wässrigen Phase mit DCM (3 x 100 mL) und die Vereinigung der organischen Phasen. Diese wurden im weiteren Verlauf über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum konzentriert. Aufreinigung des Rohprodukts durch Säulenchromatographie an Kieselgel (50-75 % EtOAc/PE) lieferte 1.1 g (3.43 mmol, 71 %) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.22 (bs, 1H), 10.53 (bs, 1H), 8.15 (bs, 2H), 7.78-7.75 (m, 2H), 7.54 (bs, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.94 (s, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.76, 161.81, 160.52, 158.45, 153.00, 148.61, 146.77, 131.08, 129.17, 120.47, 117.52, 100.26, 96.10.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 333.05029 für C₁₃H₁₀ClN₆O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 333.05009.

8.1.3.11 Darstellung von 6-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2-(3-nitrophenoxy)-*N*-(1*H*-pyrazol-3-yl)pyrimidin-4-amin (17)



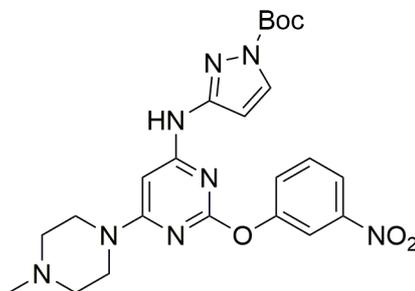
13 (950 mg, 2.8 mmol) wurde in 1-Methylpiperazin (10 mL) gelöst und für 20 Minuten bei 110 °C erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung wurde eine ges. NaHCO₃-Lsg. und EtOAc zur Reaktionsmischung hinzugegeben, bevor die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 100 mL) extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Im Anschluss wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (5 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) erbrachte 729 mg (1.8 mmol, 77 %) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.16 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 8.10 – 8.06 (m, 1H), 8.04 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.73 – 7.65 (m, 2H), 7.47 (s, 1H), 6.39 (bs, 1H), 5.91 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.44-4.41 (m, 4H), 2.37 – 2.31 (m, 4H), 2.19 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.12, 164.14, 163.44, 161.53, 153.66, 148.24, 130.48, 128.70, 119.23, 116.88, 109.09, 95.33, 79.50, 54.02, 45.66, 43.69.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 397.17366 für C₁₈H₂₁N₈O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 397.17290.

8.1.3.12 Darstellung von *tert*-Butyl 3-((6-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-(3-nitrophenoxy)pyrimidin-4-yl)amino)-1*H*-pyrazol-1-carboxylat (**21**)



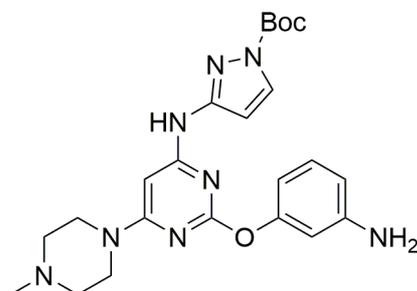
Eine Lösung aus **17** (720 mg, 1.82 mmol), TEA (935 μ L, 7.3 mmol) und DMAP (110 mg, 0.9 mmol) in MeOH (13 mL) wurde mit Boc₂O (1.6 g, 7.3 mmol) versetzt und für 12 Stunden bei RT gerührt. Nach Zugabe einer ges. NaHCO₃-Lösung und DCM zur Reaktionsmischung wurde die wässrige Phase mit DCM (2 x 100 mL) extrahiert und die organischen Phasen vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und anschließend im Vakuum konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (2 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) lieferte 775 mg (1.56 mmol, 86 %) des gewünschten Produkts als gelben Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.99 (s, 1H), 8.11 – 8.07 (m, 1H), 8.06-8.94 (m, 1H), 8.01 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.75 – 7.66 (m, 2H), 6.65 (bs, 1H), 6.23 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 3.50 – 3.44 (m, 4H), 2.37 – 2.32 (m, 4H), 2.20 (s, 1H), 1.55 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.24, 163.45, 160.62, 153.49, 152.23, 148.30, 147.16, 131.12, 130.56, 128.80, 119.48, 116.93, 101.60, 84.00, 81.14, 53.99, 45.63, 43.63, 27.46.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 497.22609 für C₂₃H₂₉N₈O₅ [M+H]⁺. Gefunden: 497.22455.

8.1.3.13 Darstellung von *tert*-Butyl 3-((2-(3-aminophenoxy)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)amino)-1*H*-pyrazol-1-carboxylat (25)



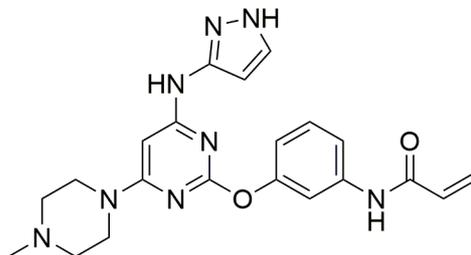
Eine Suspension aus **21** (714 mg, 0.84 mmol) und Ammoniumformiat (318 mg, 5.04 mmol) in EtOH (10 mL) wurde mit 5 % Pd/C (179 mg, 0.084 mmol) behandelt und für 30 Minuten bei 90 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und im Vakuum eingeeengt. Anschließend wurde der Rückstand in DCM aufgenommen und mit einer ges. NaHCO₃-Lsg. versetzt. Die Extraktion erfolgte mit DCM (3 x 100 mL), bevor die organischen Phasen vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt wurden. Säulenchromatographie an Kieselgel (1 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) lieferte 289 mg (0.62 mmol, 74 %) des gewünschten Produkts als gelben Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.90 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.00 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.55 (bs, 1H), 6.41-6.38 (m, 1H), 6.34-6.29 (m, 2H), 6.28-6.21 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.49 – 3.45 (m, 4H), 2.37 – 2.33 (m, 4H), 2.21 (s, 3H), 1.55 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.48, 164.27, 160.66, 154.17, 152.49, 149.90, 147.24, 130.87, 129.26, 110.23, 108.78, 107.01, 101.89, 83.90, 80.44, 54.07, 45.66, 43.57, 27.48.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 467.25191 für C₂₃H₃₁N₈O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 467.25082.

8.1.3.14 Darstellung von *N*-(3-((4-((1*H*-Pyrazol-3-yl)amino)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl)acrylamid (**8n**)



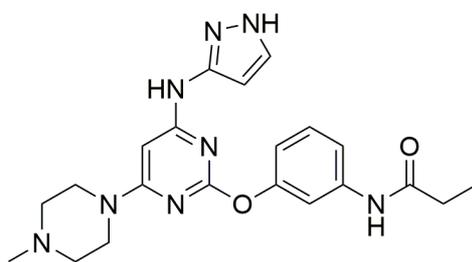
Acryloylchlorid (37.2 μL , 0.46 mmol) wurde in THF (2 mL) verdünnt und tropfenweise bei 0 °C zu einer Lösung aus **25** (106 mg, 0.23 mmol) und DIPEA (78.2 μL ; 0.46 mmol) in THF (10 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1 Stunde bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe einer ges. NaHCO_3 -Lösung wurde die wässrige Phase im Folgenden mit DCM (3 x 100 mL) extrahiert. Im Anschluss wurden die organischen Phasen vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Der so erhaltene Rückstand wurde in DCM (1 mL) aufgenommen, mit 25 %TFA in DCM (5 mL) versetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit einer gesättigten Lösung NaHCO_3 alkalisiert und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die resultierenden organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel (2 % MeOH/DCM + 1 % NH_3) und anschließender HPLC (MeCN/ H_2O + 5 mM NH_4OAc) wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO_3 -Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum lieferte 37.8 mg (0.09 mmol, 39 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.13 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.50 – 7.43 (m, 2H), 7.36-7.30 (m, 1H), 6.85 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.46-6.38 (m, 1H), 6.25 (d, $J = 16.9$ Hz, 2H), 5.95 (s, 1H), 5.78-5.73 (m, 1H), 3.49-3.40 (m, 4H), 2.41-2.34 (m, 4H), 2.21 (s, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 164.45, 164.27, 163.43, 161.72, 153.71, 149.00, 140.04, 131.82, 129.56, 128.71, 127.43, 117.01, 115.43, 112.81, m 79.31, 54.19, 45.78, 43.76.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 421.21005 für $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_8\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 421.20919.

8.1.3.15 Darstellung von *N*-(3-((4-((1*H*-Pyrazol-3-yl)amino)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl)propionamid (8o)



Propionylchlorid (29.7 μL , 0.34 mmol) wurde in THF (2 mL) verdünnt und bei 0 ° zu einer Lösung aus **25** (80 mg, 0.17 mmol) und DIPEA (57.8 μl ; 0.34 mmol) in THF (10 mL) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 Stunde bei 0 °C gerührt und anschließend mit einer ges. NaHCO_3 -Lösung und DCM versetzt. Nach Phasentrennung folgte die Extraktion der wässrigen Phase mit DCM (3 x 100 mL). Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der resultierende Rückstand wurde in DCM (1 mL) aufgenommen, mit 25 %TFA in DCM (5 mL) behandelt und für 1 Stunde bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch mit einer gesättigten Lösung NaHCO_3 neutralisiert und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Der Vereinigung der organischen Phasen folgte die Trocknung über Na_2SO_4 und das Konzentrieren des Lösungsmittels. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel (3 % MeOH/DCM + 1 % NH_3) und anschließender HPLC (MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA) wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO_3 -Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na_2SO_4

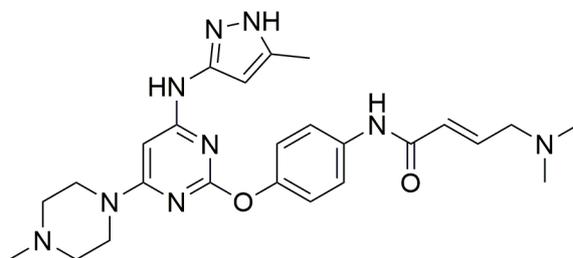
getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum lieferte 28.8 mg (0.06 mmol, 35 %) des gewünschten Produkts als gelben Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.02 (bs, 1H), 9.90 (s, 1H), 9.33 (1s, 1H), 7.44 (bs, 2H), 7.39 (d, *J* = 8.0, 1H), 7.28 (t, 1H), 6.80 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H) 6.33 (bs, 1H), 5.95 (d, 2.2 Hz, 1H), 3.46 – 3.41 (m, 4H), 2.39 – 2.34 (m, 4H), 2.31 (q, *J* = 7.5 Hz, 2), 2.21 (s, 3H), 1.07 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.29, 164.39, 164.19, 161.62, 153.63, 140.33, 129.30, 116.30, 115.03, 112.41, 109.27, 95.47, 79.27, 54.09, 45.65, 43.69, 29.68, 21.18, 9.73.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 423.22570 für C₂₁H₂₇N₈O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 423.22477.

8.1.3.16 Darstellung von 4-(Dimethylamino)-*N*-(4-((4-((5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl)but-2-enamid (8p)



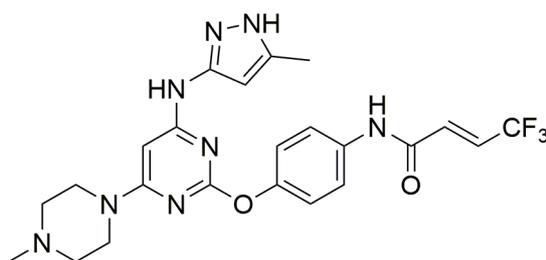
Zu einer Lösung aus 4-(Dimethylamino)but-2-ensäure Hydrochlorid (34.5 mg, 0.21 mmol) und Oxalylchlorid (18 μ L, 0.21 mmol) in THF (1.5 mL) wurden bei 0 °C 150 μ L einer Lösung aus DMF (250 μ L) in 1 mL THF gegeben und für 2 Stunden bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch zu einer Lösung aus **24c** (50 mg, 0.10 mmol) und NMP (0.5 mL) in THF (1 mL) gegeben und für 12 Stunden bei RT umgesetzt. Nach anschließender Zugabe von 1N NaOH wurde die wässrige Phase mit 10 % MeOH/DCM extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Diese wurden im weiteren Verlauf über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum evaporiert. Nach HPLC-Aufreinigung (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA) wurden die erhaltenen

Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum führte zu 11.3 mg (0.02 mmol, 20 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.74 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.10-7.05 (m, 2H), 6.73 (dt, *J* = 15.4, 5.9 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 5.64 (s, 1H), 3.41 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 3.06 (dd, *J* = 5.8, 1.2 Hz, 2H), 2.33 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 2.19 (s, 3H), 2.19 (s, 6H), 2.05 (s, 3H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 492.28355 für C₂₅H₃₄N₉O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 492.28281.

8.1.3.17 Darstellung von 4,4,4-Trifluoro-*N*-(4-((4-((5-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)amino)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl)but-2-enamid (8q)



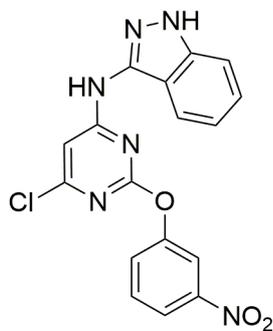
Zu einer Lösung aus 4,4,4-Trifluorobut-2-ensäure (36.5 mg, 0.26 mmol) und Oxalylchlorid (22 μL, 0.26 mmol) in THF (1.5 mL) wurden bei 0 °C 150 μL einer Lösung aus DMF (250 μL) in 1 mL THF gegeben und für 3 Stunden bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit einer Lösung aus **24c** (50 mg, 0.10 mmol) und NMP (0.5 mL) in THF (1 mL) für 12 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung mit 1N NaOH versetzt und die wässrige Phase mit 10 % MeOH/DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden im weiteren Verlauf über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (4 mL) aufgenommen und mit TFA (1 mL) für 12 Stunden behandelt. Nach Zugabe einer ges. NaHCO₃-Lsg. und Extraktion der wässrigen Phase

mit 10 % MeOH/DCM wurden die organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel evaporiert. Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum lieferte 13.3 mg (0,10 mmol, 30 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.76 (s, 1H), 10.64 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.03-6.89 (m, 2H), 6.25 (s, 1H), 5.63 (s, 1H), 3.43 (s, 4H), 2.39 (s, 4H), 2.23 (s, 3H), 2.05 (s, 3H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 503.21308 für C₂₃H₂₆N₈O₂F₃ [M+H]⁺. Gefunden: 423.22477.

8.1.3.18 Darstellung von *N*-(6-Chloro-2-(3-nitrophenoxy)pyrimidin-4-yl)-1*H*-indazol-3-amin (**14**)



Zu einer Lösung aus **11b** (950 mg, 3.32 mmol), Natriumiodid (498 mg, 3.32 mmol) und 1*H*-Indazol-3-amin (531 mg, 3.99 mmol) in DMF (12 mL) wurde DIPEA (0.87 mL, 4.98 mmol) gegeben und das Reaktionsgemisch für 2 Stunden bei 110 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktionsmischung auf RT abgekühlt und tropfenweise mit 6 mL H₂O versetzt. Der entstandene hell-gelbe Feststoff wurde filtriert, mit H₂O gewaschen und die flüchtigen Bestandteile mit EtOH im Vakuum co-

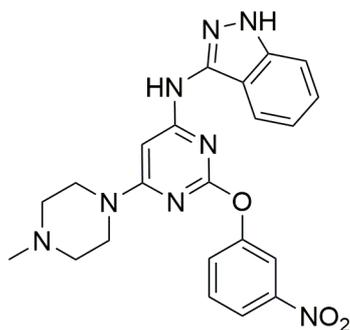
evaporiert. Säulenchromatographie an Kieselgel (2 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) lieferte 1175 mg (2.16 mmol, 65 %) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.66 (s, 1H), 10.70 (bs, 1H), 8.11-8.05 (m, 2H), 7.87 (bs, 1H), 7.75-7.69 (m, 3H), 7.44 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.34 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.01 (bs, 1H).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.15, 163.62, 153.75, 153.71, 149.33, 141.49, 141.32, 131.71, 131.67, 129.65, 127.76, 121.09, 120.51, 117.93, 111.17, 110.93, 100.99.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 383.07 für C₁₇H₁₂ClN₆O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 383.11.

8.1.3.19 Darstellung von *N*-(6-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2-(3-nitrophenoxy)pyrimidin-4-yl)-1*H*-indazol-3-amin (18)



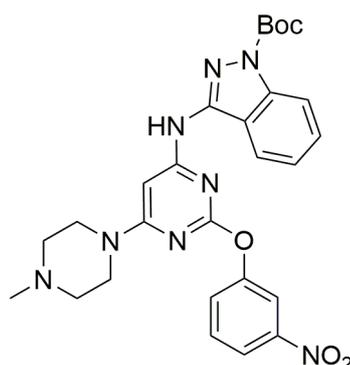
14 (815 mg, 2.13 mmol) wurde in *N*-Methylpiperazin (8 mL) suspendiert und für 1 Stunde bei 110 °C erhitzt. Darauf folgend wurde das Reaktionsgemisch mit H₂O und EtOAc versetzt, die wässrige Phase mit EtOAc (3 x 70 mL) extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Diese wurden zunächst mit einer NaHCO₃-Lsg. (2 x 50 mL) und anschließend mit einer ges. NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde daraufhin über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographie an Kieselgel (5 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) lieferte 584 mg (1.32 mmol, 62 %) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.44 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 8.08 - 8.03 (m, 2H), 7.97 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.68 - 7.66 (m, 2H), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.36 - 7.30 (m, 1H), 7.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.93 (bs, 1H), 3.50 - 3.42 (m, 4H), 2.38 - 2.30 (m, 4H), 2.19 (s, 3H).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.35, 164.06, 162.78, 154.58, 149.11, 143.03, 141.36, 131.30, 129.26, 127.59, 121.41, 120.00, 119.90, 117.42, 115.92, 110.58, 55.72, 54.88, 46.50, 44.63.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 447.19 für C₂₂H₂₃N₈O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 447.21.

8.1.3.20 Darstellung von *tert*-Butyl 3-((6-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-(3-nitrophenoxy)pyrimidin-4-yl)amino)-1*H*-indazol-1-carboxylat (**22**)



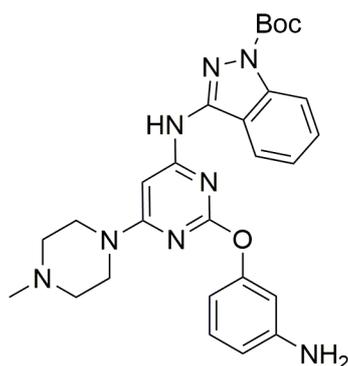
Zu einer Lösung aus **18** (605 mg, 1.36 mmol) und Di-*tert*-Butyl dicarbonat (0.33 mL, 1.42 mmol) in THF (14 mL) wurde bei 0 °C sukzessive Cs₂CO₃ (464 mg, 1.42 mmol) gegeben und für 14 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit einer ges. NaHCO₃-Lsg. (50 mL) versetzt, die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit NaHCO₃ (50 mL) und einer ges. NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Trocknung über Na₂SO₄ und die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (3 % MeOH/DCM) erbrachte (703 mg, 1.29 mmol, 95 %) des gewünschten Produkts als weißgrauen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.44 (s, 1H), 8.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.14 – 8.06 (m, 3H), 7.71 (m, 2H), 7.64 – 7.57 (m, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.58 – 3.47 (m, 4H), 2.41 – 2.29 (m, 4H), 2.21 (s, 3H), 1.64 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.56, 163.96, 161.31, 154.48, 149.72, 149.17, 147.28, 140.08, 131.39, 130.65, 129.28, 124.05, 122.11, 120.17, 119.67, 117.44, 114.69, 84.20, 84.14, 54.83, 46.47, 44.55, 28.58.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 547.24 für C₂₇H₃₁N₈O₅ [M+H]⁺. Gefunden: 547.06.

8.1.3.21 Darstellung von *tert*-Butyl 3-((2-(3-aminophenoxy)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)amino)-1*H*-indazol-1-carboxylat (26)



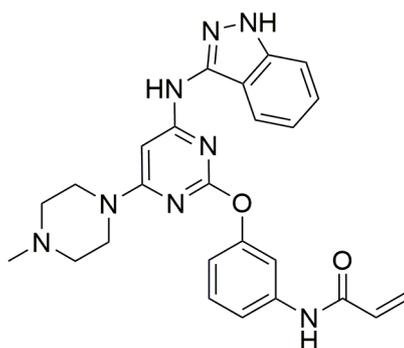
Eine Suspension aus **22** (716 mg, 1.311 mmol) und Pd/C 10 % w/w (72 mg) in EtOAc (12 mL) wurde auf 80 °C erhitzt, bevor Ammoniumformiat (331 mg, 13.1 mmol) dazugegeben und das Reaktionsgemisch für 1 Stunde bei 80 °C gerührt wurde. Nach Ablauf der Reaktion wurde das entstandene weißgraue Präzipitat in THF gelöst und über Celite filtriert. Im Anschluss wurde die resultierende Reaktionslösung mit EtOAc (100 mL) verdünnt und mit einer ges. NaHCO₃- (2 x 30 mL) und NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (5 % MeOH/DCM) lieferte 596 mg (1.15 mmol, 88 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.56 - 7.52 (m, 3H), 7.25 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.16 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.59 - 6.51 (m, 2H), 3.85 (bs, 2H), 3.75 (m, 4H), 2.50 (m, 4H), 2.36 (s, 3H), 1.72 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 165.99, 164.91, 159.90, 154.76, 149.86, 148.12, 146.49, 130.20, 130.12, 123.68, 119.17, 119.03, 115.25, 112.72, 112.35, 109.63, 84.02, 83.50, 55.14, 46.53, 44.57, 30.08, 28.62.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 517.27 für C₂₇H₃₃N₈O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 517.08.

8.1.3.22 Darstellung von *N*-(3-((4-((1*H*-Indazol-3-yl)amino)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl) acrylamid (9a)



Acryloylchlorid (25 μL, 0.31 mmol) wurde in THF (1 mL) verdünnt, bei 0 °C tropfenweise zu einer Lösung aus **26** (150 mg, 0.29 mmol) und DIPEA (0.15 mL, 0.87 mmol) gegeben und für 1 Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit EtOAc (80 mL) versetzt und die organische Phase mit H₂O (50 mL), einer ges. NaHCO₃- (50 mL) und NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der resultierende Rückstand wurde in DCM (2 mL) aufgenommen, tropfenweise bei 0 °C mit 50 % TFA in DCM (3 mL) versetzt und für 1 Stunde bei RT gerührt. Darauf folgend wurde das Reaktionsgemisch mit einer gesättigten NaHCO₃-Lsg. (30 mL) versetzt und die wässrige Phase mit DCM (60 mL) extrahiert. Nach Vereinigung der organischen Phasen wurden diese über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im

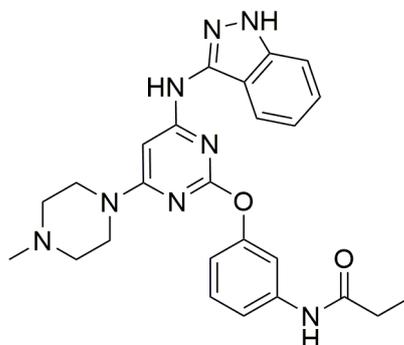
Vakuum eingengt. Säulenchromatographie an Kieselgel (8 % MeOH/DCM) lieferte 121 mg (0.26 mmol, 88 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.40 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.36 – 7.28 (m, 2H), 7.01 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.43 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (d, *J* = 17.0 Hz, 1H), 5.76 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 3.45 (m, 4H), 2.34 (m, 4H), 2.19 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.56, 164.64, 164.07, 162.78, 154.68, 143.23, 141.33, 140.76, 132.65, 130.15, 127.87, 127.61, 121.46, 119.87, 117.25, 115.93, 115.84, 113.09, 110.51, 81.09, 54.90, 46.50, 44.56.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 471.22570 für C₂₅H₂₇N₈O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 471.22515.

8.1.3.23 Darstellung von *N*-(3-((4-((1*H*-Indazol-3-yl)amino)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl) propionamid (**9b**)



Propionylchlorid (18 μ L, 0.20 mmol) wurde in THF (1 mL) verdünnt, bei 0 °C tropfenweise zu einer Lösung aus **26** (100 mg, 0.19 mmol) und DIPEA (101 μ L, 0.58 mmol) gegeben und für 1 Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in EtOAc (50 mL) verdünnt und mit H₂O (40 mL), einer ges. NaHCO₃-(40 mL) und NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wurde in DCM (2 mL) aufgenommen, tropfenweise bei 0 °C mit 50 % TFA in DCM (3 mL)

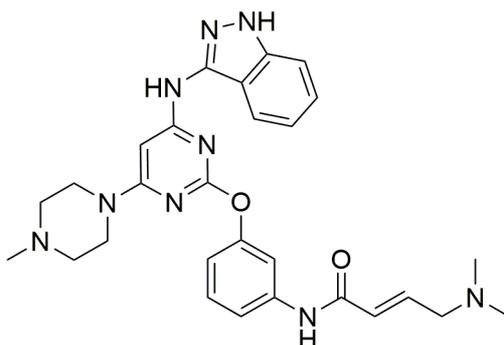
versetzt und für 1 Stunde bei RT gerührt. Nach Zugabe einer gesättigten NaHCO₃-Lösung (30 mL) folgte die Extraktion der wässrigen Phase mit DCM (60 mL). Anschließend wurden die organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (8.5 % MeOH/DCM) lieferte 86 mg (0.18 mmol, 95 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.40 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.43 - 7.21 (m, 4H), 7.01 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.82 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.44 (bs, 4H), 2.31 (m, 6H), 2.19 (s, 3H), 1.08 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.93, 165.56, 164.67, 162.78, 154.64, 143.25, 141.34, 141.13, 129.99, 127.61, 121.47, 119.87, 116.65, 115.88, 115.58, 112.76, 110.52, 81.06, 54.93, 46.53, 44.58, 30.43, 10.48.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 473.24135 für C₂₅H₂₉N₈O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 473.24113.

8.1.3.24 Darstellung von *N*-(3-((4-((1*H*-Indazol-3-yl)amino)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl)-4-(dimethylamino)but-2-enamid (9c)



Zu einer Suspension aus 4-(Dimethylamino)but-2-ensäure Hydrochlorid (26 mg, 0.16 mmol) in THF (1.2 mL) wurden bei 0 °C 100 μ L einer Mischung aus DMF/THF (1:1) und Oxalyldichlorid (13 μ L, 0.16 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 15 Minuten auf RT abgekühlt, bevor eine Lösung aus **26** (20 mg, 0.04 mmol) und

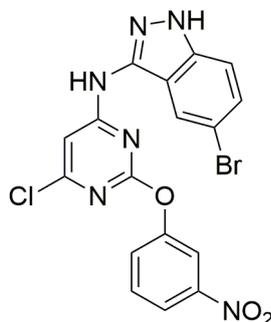
DIPEA (0.027 mL, 0.155 mmol) in THF/NMP (2:1, 0.75 mL) bei 0 °C tropfenweise zugegeben wurde. Nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden bei RT wurde das Reaktionsgemisch mit EtOAc und einer ges. NaHCO₃-Lsg. versetzt und die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 50 mL) extrahiert. Anschließend wurden die organischen Phasen aufeinander folgend mit einer ges. NaHCO₃-Lsg. (50 mL) und einer ges. NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde im Anschluss über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (4 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) lieferte 24 mg (0.037 mmol) des gewünschten Boc-geschützten Produkt als weißen Feststoff. Im Anschluss wurde der erhaltene Feststoff in DCM (1 mL) aufgenommen, tropfenweise bei 0 °C mit 50 % TFA in DCM versetzt und für 2 Stunden bei RT umgesetzt. Nach Zugabe einer ges. NaHCO₃-Lsg. und DCM wurde die wässrige Phase mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen zunächst mit einer ges. Lösung NaHCO₃ (30 mL) und anschließend mit einer ges. NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Nach Vereinigung der organischen Phasen wurden diese über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (8 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) ergab 19 mg (0.04 mmol, 95 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.39 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.34 – 7.28 (m, 2H), 7.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.73 (dt, *J* = 15.4 Hz, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.26 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 3.44 (m, 4H), 3.07 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.34 (m, 4H), 2.18 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.54, 164.65, 164.08, 162.77, 154.61, 143.21, 141.34, 140.92, 139.49, 130.10, 127.62, 127.58, 126.85, 121.44, 119.89, 117.09, 115.84, 113.01, 110.53, 81.05, 60.48, 54.91, 46.51, 45.90, 44.57.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 528.28355 für C₂₈H₃₄N₉O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 528.28230.
Berechnet: 550.26549 für C₂₈H₃₃N₉O₂Na [M+Na]⁺. Gefunden: 550.26336.

8.1.3.25 Darstellung von 5-Bromo-*N*-(6-chloro-2-(3-nitrophenoxy)pyrimidin-4-yl)-1*H*-indazol-3-amin (15)



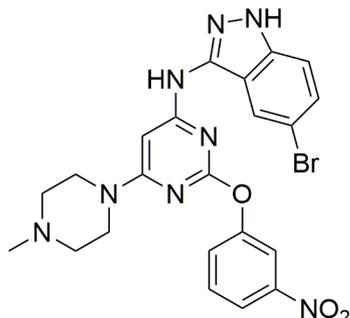
Eine Lösung aus **18b** (850 mg, 2.97 mmol), NaI (223 mg, 1.49 mmol) und 5-Bromo-1*H*-indazol-3-amin (756 mg, 3.57 mmol) in DMF (8 mL) und DIPEA (621 μ L, 3.57 mmol) wurde für 1 Stunde auf 110 °C erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch zunächst auf RT abgekühlt und anschließend tropfenweise mit H₂O (8 mL) behandelt. Infolgedessen bildete sich ein hell-gelber Feststoff, der filtriert und mit H₂O gewaschen wurde. Abschließend wurde das restliche Lösungsmittel mit EtOH im Vakuum co-evaporiert. Säulenchromatographie an Kieselgel (1 % MeOH/DCM + 0.5 % NH₃) lieferte 823 mg (1.78 mmol, 60 %) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.84 (s, 1H), 10.69 (bs, 1H), 8.17 - 8.05 (m, 3H), 7.75 - 7.65 (m, 3H), 7.44 - 7.40 (s, 2H).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.21, 163.11, 154.50, 153.63, 150.58, 145.62, 142.67, 133.28, 132.08, 129.73, 128.19, 120.89, 120.65, 115.38, 112.21, 111.92, 102.25.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 460.98 für C₁₇H₁₁BrClN₆O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 461.04.

8.1.3.26 Darstellung von 5-Bromo-*N*-(6-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-(3-nitrophenoxy)pyrimidin-4-yl)-1*H*-indazol-3-amin (19)



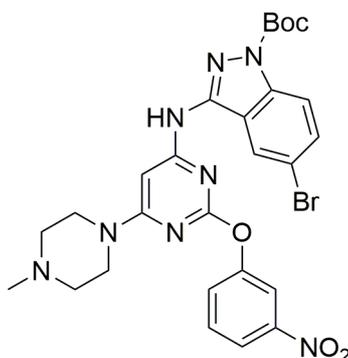
15 (170 mg, 0.37 mmol) wurde in *N*-Methylpiperazin (2 mL) suspendiert und für 1 Stunde bei 110 °C umgesetzt. Nach Zugabe von H₂O und EtOAc wurde die wässrige Phase (50 mL) mit EtOAc (3 x 80 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen aufeinanderfolgend mit einer ges. NaHCO₃-Lsg. (2 x 50 mL) und einer ges. NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde schließlich über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (2 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) ergab 125 mg (0,24 mmol, 65 %) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.62 (s, 1H), 9.84 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.09 – 8.01 (m, 2H), 7.72 – 7.64 (m, 2H), 7.41 (m, 2H), 6.95 (bs, 1H), 3.50 - 3.44 (m, 4H), 2.39 – 2.31 (m, 4H), 2.20 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.41, 164.04, 162.40, 154.50, 149.09, 142.55, 140.00, 131.28, 130.30, 129.28, 123.92, 120.04, 117.42, 117.27, 112.70, 111.93, 81.50, 54.89, 46.52, 44.66.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 525.10 für C₂₂H₂₂BrN₈O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 525.12.

8.1.3.27 Darstellung von *tert*-Butyl 5-bromo-3-((6-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-(3-nitrophenoxy)pyrimidin-4-yl)amino)-1*H*-indazol-1-carboxylat (23)



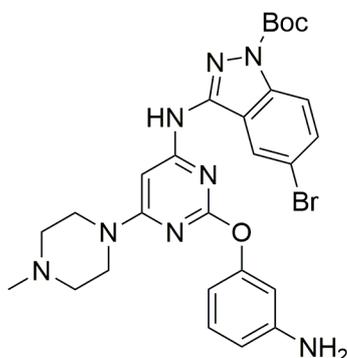
Zu einer Lösung aus **19** (354 mg, 0.67 mmol) und Di-*tert*-Butyldicarbonat (170 μ L, 0.74 mmol) in THF (8.4 mL) wurde sukzessive Cs₂CO₃ (242 mg, 0.741 mmol) bei 0 °C gegeben und das entstandene Reaktionsgemisch für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Zugabe einer ges. NaHCO₃-Lsg. (50 mL) folgte die Extraktion der wässrigen Phase mit EtOAc (2 x 60 mL) und die Vereinigung der organischen Phasen. Darauf folgend wurde die organische Phase zunächst mit einer ges. NaHCO₃-Lösung (50 mL) und anschließend mit einer ges. NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen, worauf die Trocknung über Na₂SO₄ folgte. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (2 % MeOH/DCM) lieferte 703 mg (0.64 mmol, 95 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.08 (m, 2H), 8.03 (dt, $J = 6.9$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.68 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.62 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.50 – 7.43 (m, 3H), 3.68 (m, 4H), 2.51 – 2.42 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 1.69 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 165.20, 163.46, 159.45, 153.50, 149.06, 148.71, 144.82, 138.75, 132.87, 129.50, 128.18, 121.50, 120.17, 119.52, 117.53, 116.33, 116.29, 84.26, 83.56, 54.61, 46.13, 44.26, 28.16.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 625.15 für C₂₇H₃₀BrN₈O₅ [M+H]⁺. Gefunden: 624.97.

8.1.3.28 Darstellung von *tert*-Butyl 3-((2-(3-aminophenoxy)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)amino)-5-bromo-1*H*-indazol-1-carboxylat (27)



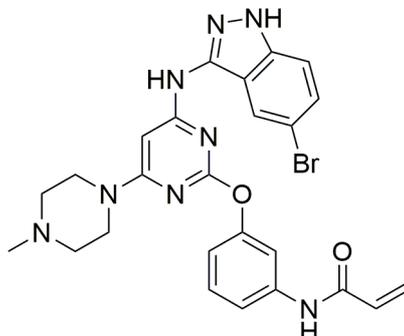
Eine Suspension aus **23** (262 mg, 0.42 mmol) und Pd/C 10 % w/w (26 mg) in EtOAc/MeOH (7:1, 8 mL) wurde zunächst auf 80 °C erhitzt ehe der Redaktionsmischung Ammoniumformiat (106 mg, 1.68 mmol) zugegeben wurde. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 Stunde bei 80 °C erhitzt. Anschließend wurde das entstandene Präzipitat in THF gelöst und über Celite filtriert. Die resultierende Reaktionslösung wurde mit EtOAc (100 mL) verdünnt und mit einer ges. NaHCO₃- (2 x 30 mL) und NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde in der Folge über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographie an Kieselgel (2 % MeOH/DCM + 0.5 % NH₃) lieferte 120 mg (0.20 mmol, 48 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.01 – 7.95 (m, 3H), 7.81 (s, 1H), 7.56 – 7.53 (m, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.23 – 7.19 (m, 2H), 3.65 – 3.62 (m, 6H), 2.48 – 2.45 (m, 4H), 2.33 (s, 3H), 1.67 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 164.43, 163.60, 157.02, 152.82, 148.85, 147.16, 141.54, 137.21, 133.30, 126.12, 127.55, 120.86, 128.93, 117.22, 116.81, 113.17, 114.02, 84.37, 82.25, 52.71, 45.90, 42.20, 27.88.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 595.18 für C₂₇H₃₂BrN₈O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 594.92.

8.1.3.29 Darstellung von *N*-(3-((4-((5-Bromo-1*H*-indazol-3-yl)amino)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl)acrylamid (9d)



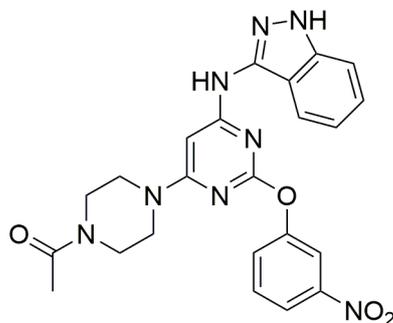
27 (45 mg, 0.08 mmol) und DIPEA (053 μ L, 0.30 mmol) wurden in THF (1.5 mL) gelöst und für 10 Minuten bei 0 °C gerührt. Eine Lösung aus Acryloylchlorid (6 μ L, 0.08 mmol) in THF (0.5 mL) wurde dem Reaktionsgemisch tropfenweise hinzugefügt und für 1 Stunde bei RT gerührt. Nach Zugabe einer Mischung aus DCM/MeOH (9:1, 60 mL) wurde die organische Phase stufenweise mit H₂O (30 mL), einer gesättigten NaHCO₃-Lsg. (30 mL) und einer ges. NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen. Die organische wurde daraufhin über Na₂SO₄ getrocknet und die restlichen flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der erhaltene weißgraue Rückstand wurde in DCM (1 mL) aufgenommen, tropfenweise bei 0 °C mit TFA 50 % in DCM (2 mL) versetzt und für 1 Stunde bei RT gerührt. Nach Behandlung der Reaktionslösung mit DCM wurde eine ges. Lösung NaHCO₃ (25 mL) hinzugeben und die organische Phase mit einer Mischung aus DCM/MeOH (60 mL, 9:1) extrahiert. Diese wurde darauf folgend mit einer ges. NaHCO₃- (25 mL) und NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (3 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) lieferte 36 mg (0.07 mmol, 87 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.69 (bs, 1H), 10.30 (s, 1H), 9.93 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.46 - 7.41 (m, 3H), 7.33 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.89 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 6.45 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.27 (dd, *J* = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.77 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.25 (bs, 2H), 3.23 (bs, 2H), 3.08 (bs, 2H), 2.82 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165.20, 164.61, 164.19, 163.00, 154.36, 142.35, 140.82, 140.12, 132.63, 130.37, 130.20, 127.94, 123.87, 117.31, 117.23, 116.54, 116.21, 113.24, 112.83, 112.07, 81.70, 55.72, 52.62, 43.05, 41.93.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 549.13621 für $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{BrN}_8\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 549.13550. Berechnet: 551.13416 für $\text{C}_{25}\text{H}_{26}^{81}\text{BrN}_8\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 551.13345.

8.1.3.30 Darstellung von 1-(4-(6-((1*H*-Indazol-3-yl)amino)-2-(3-nitrophenoxy)pyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl)ethan-1-on (28)



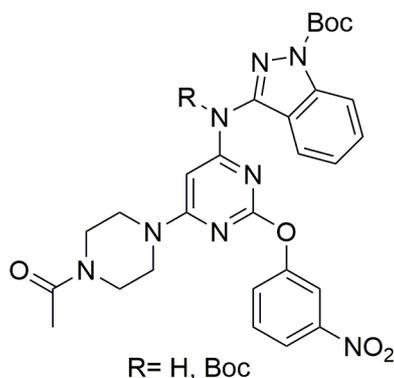
14 (290 mg, 0.76 mmol), NaI (114 mg, 0.76 mmol) und DIPEA (486 mg, 3.79 mmol) wurden in DMF (3 mL) gelöst und für 2 Stunden bei 110 °C erhitzt. Nach Zugabe von H_2O (50 mL) und EtOAc (50 mL) erfolgte die Extraktion der wässrigen Phase mit EtOAc (2 x 50 mL). Die organischen Phasen wurden vereinigt, sukzessive mit H_2O (2 x 50 mL) und einer ges. NaCl-Lsg. (20 mL) gewaschen und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Die restlichen flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (3 % MeOH/DCM + 1 % NH_3) lieferte 252 mg (0.53 mmol, 70 %) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.45 (s, 1H), 9.83 (s, 1H), 8.06 (m, 2H), 7.96 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.69 - 7.68 (m, 2H), 7.41 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.01 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.90 (bs, 1H), 3.52 (bs, 6H), 3.47 (bs, 2H), 2.03 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 169.43, 165.50, 164.74, 162.96, 153.24, 147.02, 142.94, 141.40, 131.33, 129.29, 127.59, 121.41, 120.08, 119.94, 117.47, 115.96, 110.66, 81.31, 45.73, 44.57, 44.39, 22.07.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 475.18 für $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_8\text{O}_4$ [M+ H]. Gefunden: 475.07.

8.1.3.31 Darstellung von *tert*-Butyl 3-((6-(4-Acetylpiperazin-1-yl)-2-(3-nitrophenoxy)pyrimidin-4-yl)(*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1*H*-indazol-1-carboxylat (**29**)



Zu einer Lösung aus **28** (90 mg, 0.19 mmol) und Di-*tert*-Butyldicarbonat (48 μL , 0.21 mmol) in THF (2.5 mL) wurde sukzessive Cs_2CO_3 (68 mg, 0.21 mmol) bei 0 °C gegeben und das entstandene Reaktionsgemisch für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Zugabe einer ges. NaHCO_3 -Lsg. (50 mL) folgte die Extraktion der wässrigen Phase mit EtOAc (2 x 60 mL). Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit einer gesättigten NaHCO_3 - (50 mL) und NaCl -Lsg. (10 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel (1 % MeOH/DCM) lieferte 77 mg (0.13 mmol, 70 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (m, 2H), 8.07 – 8.05 (m, 1H), 7.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.72 – 7.65 (m, 1H), 7.61 - 7.48 (m, 6H), 7.41 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.31 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.13 (m, 2H), 7.01 (m, 2H), 3.79 - 3.69

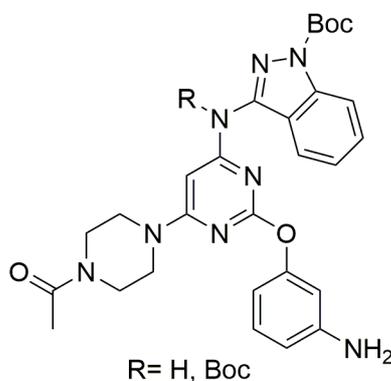
(m, 10H), 3.67 – 3.51 (m, 6H), 2.15 (m, 3H), 2.13 (m, 3H), 1.74 (s, 9H), 1.71 (s, 9H), 1.31 (s, 9H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 169.63, 165.70, 161.65, 160.19, 153.98, 152.15, 149.20, 148.21, 130.35, 130.05, 129.12, 128.90, 128.60, 128.50, 128.48, 123.98, 123.81, 123.27, 119.99, 119.72, 119.65, 117.90, 115.43, 115.04, 88.54, 85.62, 84.05, 84.01, 28.64, 28.60, 28.22, 21.76.

LC-MS (ESI-MS): Boc-Derivat: Berechnet: 575.24 für $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_8\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 574.97.

LC-MS (ESI-MS): Di-Boc-Derivat: Berechnet: 675.29 für $\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{N}_8\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 674.94.

8.1.3.32 Darstellung von *tert*-Butyl 3-((6-(4-acetylpiperazin-1-yl)-2-(3-aminophenoxy)pyrimidin-4-yl)(*tert*-butoxycarbonyl)amino)-1*H*-indazol-1-carboxylat (30)



Eine Suspension aus **29** (89 mg, 0.16 mmol) und Pd/C 10 % w/w (9 mg) in EtOAc (3 mL) wurde auf 80 °C erhitzt, mit Ammoniumformiat (98 mg, 1.55 mmol) versetzt und für 1 Stunde gerührt. Im Anschluss wurde das entstandene Präzipitat in THF gelöst, über Celite filtriert und mit EtOAc (100 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde darauffolgend mit einer ges. NaHCO_3 - (2 x 30 mL) und NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Säulenchromatographie an Kieselgel (2 %

MeOH/DCM) lieferte 69 mg (0.14 mmol, 88 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

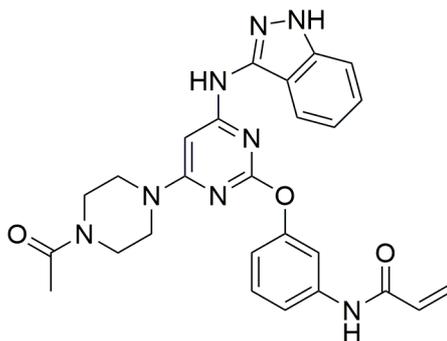
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.97 (m, 2H), 7.82 - 7.79 (m, 1H), 7.44 - 7.39 (m, 2H), 7.27 - 7.20 (m, 5H), 7.17 (m, 1H), 7.03 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.91 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.76 - 6.70 (m, 2H), 6.61 (m, 2H), 6.35 (m, 2H), 3.86 (bs, 4H), 3.73 - 3.67 (m, 10H), 3.62 - 3.47 (m, 6H), 2.11 (m, 3H), 2.08 (m, 3H), 1.72 (s, 9H), 1.70 (s, 9H), 1.29 (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 168.12, 166.02, 161.35, 160.81, 154.10, 151.87, 147.94, 145.32, 135.31, 128.86, 127.41, 126.77, 126.58, 126.03, 124.31, 123.70, 122.98, 120.80, 119.30, 118.53, 115.75, 115.30, 113.11, 112.49, 86.00, 84.60, 83.55, 27.15, 25.77, 24.85, 20.89.

LC-MS (ESI-MS): Boc-Derivat: Berechnet: 545.26 für $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_8\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 545.04.

LC-MS (ESI-MS): Di-Boc-Derivat: Berechnet: 645.31 für $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_8\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 644.98.

8.1.3.33 Darstellung von *N*-(3-((4-((1*H*-Indazol-3-yl)amino)-6-(4-acetylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)oxy)phenyl)acrylamid (9e)



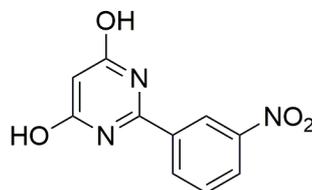
30 (52 mg, 0.1 mmol) und DIPEA (66 μL , 0.38 mmol) wurden in THF (2 mL) gelöst und für 10 Minuten bei 0 °C gerührt. Nach tropfenweiser Zugabe einer Lösung aus Acryloylchlorid (0.09 mL, 0.12 mmol) in THF (0.5 mL) wurde das Reaktionsgemisch für 2 Stunden bei RT gerührt ehe es mit EtOAc (50 mL) verdünnt wurde. Im Anschluss

wurde die organische Phase stufenweise mit H₂O (30 mL), einer ges. NaHCO₃- (30 mL) und NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Konzentration des Lösungsmittels im Vakuum ergab einen weißgrauen Feststoff, welcher anschließend in DCM (2 mL) aufgenommen, tropfenweise mit 50 % TFA in DCM (2 mL) bei 0 °C versetzt und für 3 Stunden bei RT gerührt wurde. Nach vollständiger Umsetzung und Zugabe von EtOAc wurde das Reaktionsgemisch mit einer ges. NaHCO₃-Lsg. (30 mL) versetzt und die wässrige Phase mit EtOAc (60 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde im Anschluss mit einer ges. Lösung NaHCO₃ (30 mL) und NaCl (10 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (3 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) lieferte 36 mg (0.07 mmol, 75 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.39 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.28 (m, 2H), 6.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.39 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.22 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 5.72 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 3.47 (s, 6H), 3.42 (s, 2H), 1.97 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.37, 165.37, 164.59, 164.08, 162.76, 154.57, 143.14, 141.31, 140.76, 132.59, 130.23, 128.01, 127.65, 121.45, 119.91, 117.32, 115.97, 115.79, 113.11, 110.54, 81.07, 45.77, 44.55, 44.34, 22.12.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 499.22061 für C₂₆H₂₇N₈O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 499.22028.
Berechnet: 521.20256 für C₂₆H₂₆N₈O₃Na [M+Na]⁺. Gefunden: 521.20139.

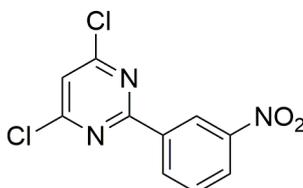
8.1.3.34 Darstellung von 2-(3-Nitrophenyl)pyrimidin-4,6-diol (32)

3-Nitrobenzimidamid Hydrochlorid (1000 mg, 4.71 mmol) und DBU (1.41 mL, 9.42 mmol) wurden in DMF (10 mL) gelöst, bei 0 °C mit Diethylmalonat (0.79 mL, 5.18 mmol) versetzt und für 8 Stunden bei 90 °C erhitzt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C abgekühlt und tropfenweise mit 1N HCl behandelt. Das gebildete weiße Präzipitat wurde filtriert und sukzessive mit 0.01 N HCl und EtOH gewaschen. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum lieferte 990 mg (4.24 mmol, 90 %) des gewünschten Produkts als orangefarbenen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.97 (bs, 2H), 8.96 (s, 1H), 8.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.79 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.54 (s, 1H), 1.88 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.83, 169.69, 148.89, 134.64, 131.13, 126.56, 123.40, 110.02, 89.45.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 234.05148 für C₁₀H₈N₃O₄ [M+H]⁺. Gefunden: 234.05217.

8.1.3.35 Darstellung von 4,6-Dichloro-2-(3-nitrophenyl)pyrimidin (33)

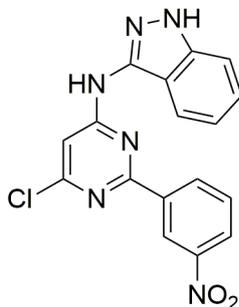
32 (933 mg, 4.00 mmol) und Diethylanilin (642 μ L, 4.003 mmol) wurden mit Phosphorylchlorid (10 mL) gelöst und für 4 Stunden bei 110 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde im Anschluss auf 0 °C abgekühlt, portionsweise mit Eis versetzt und für 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Nach Bildung eines Präzipitats ergab anschließende Filtration 440 mg (1.64 mmol, 41 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.88 – 8.87 (m, 1H), 8.61 (ddd, $J = 8.1, 2.3, 1.0$ Hz, 1H), 8.41 (ddd, $J = 8.2, 2.3, 1.0$ Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.83 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163.11, 162.70, 149.07, 136.76, 134.92, 131.70, 127.48, 123.22, 121.58.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 269.98 für $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: Keine Detektion, da nicht ionisierbar.

8.1.3.36 Darstellung von *N*-(6-Chloro-2-(3-nitrophenyl)pyrimidin-4-yl)-1*H*-indazol-3-amin (34)



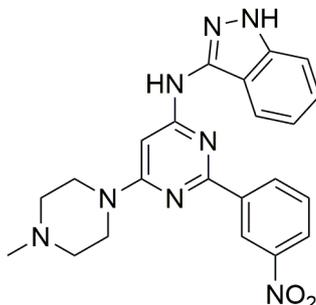
Eine Lösung aus **33** (400 mg, 1.48 mmol), NaI (166 mg, 1.11 mmol), 1*H*-Indazol-3-amin (217 mg, 1.63 mmol) und DIPEA (0.28 mL, 1.63 mmol) in DMF (5.3 mL) wurde für 12 Stunden bei 110 °C erhitzt. Nach Zugabe von EtOAc und H₂O (80 mL) folgte die Extraktion der wässrigen Phase mit EtOAc (2 x 80 mL). Die organischen Phasen wurden vereinigt, sukzessive mit H₂O (2 x 80 mL) und ges. NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nachfolgend wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingengt. Säulenchromatographie an Kieselgel (3 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) lieferte 358 mg (0.98 mmol, 66 %) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.68 (s, 1H), 10.85 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.64 – 8.61 (m, 1H), 8.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.76 - 7.72 (m, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.14, 161.92, 154.31, 149.00, 141.78, 141.45, 138.74, 134.71, 131.20, 130.50, 127.91, 126.51, 123.16, 120.54, 110.97, 104.29.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 367.07 für C₁₇H₁₂ClN₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 367.14.

8.1.3.37 Darstellung von *N*-(6-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2-(3-nitrophenyl)pyrimidin-4-yl)-1*H*-indazol-3-amin (35)



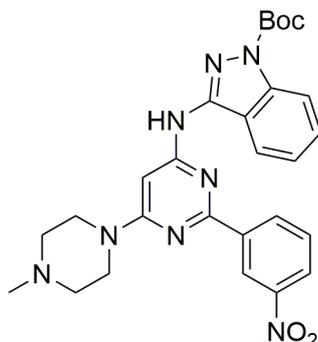
34 (333 mg, 0.91 mmol) wurde in *N*-Methylpiperazin (4 mL) suspendiert und für 45 Minuten bei 110 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend abgekühlt und mit H₂O (60 mL) und DCM versetzt. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase (60 mL) mit einer Mischung aus DCM/MeOH 9:1 (2 x 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaHCO₃-Lsg. (2 x 50 mL) und einer gesättigten NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (3 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) führte zu 285 mg (0.66 mmol, 73 %) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.41 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.69 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.69 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.58 (s, 4H), 2.36 (s, 4H), 2.15 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.20, 161.24, 160.52, 148.88, 143.40, 141.34, 140.96, 134.69, 130.70, 127.71, 125.45, 122.89, 121.59, 119.91, 115.83, 110.59, 84.60, 55.06, 46.62, 44.49.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 431.19 für C₂₂H₂₃N₈O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 431.17.

8.1.3.38 Darstellung von *tert*-Butyl 3-((6-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-(3-nitrophenyl)pyrimidin-4-yl)amino)-1*H*-indazol-1-carboxylat (**36**)



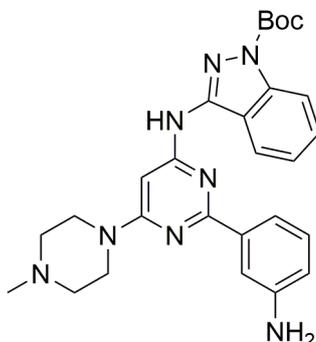
Einer Lösung aus **35** (255 mg, 0.59 mmol) und Di-*tert*-Butyldicarbonat (0.15 mL, 0.65 mmol) in THF/DCM (1:1,11 mL) wurde bei 0 °C Cs₂CO₃ (212 mg, 0.65 mmol) portionsweise zugegeben. Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde für 16 Stunden bei RT gerührt, bevor es mit einer ges. NaHCO₃ (60 mL) versetzt wurde. Nach Phasentrennung und nachfolgender Extraktion mit EtOAc (2 x 60 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen mit einer ges. NaHCO₃- (60 mL) und NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeeengt und das Rohprodukt anschließend mit Säulenchromatographie an Kieselgel (3 % MeOH/DCM) aufgereinigt, wodurch 300 mg (0.56 mmol, 95 %) des gewünschten Produkts als weißgrauer Feststoff hergestellt wurden.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.29 – 9.20 (m, 1H), 8.72 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.29 – 8.26 (m, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.77 – 7.67 (m, 2H), 7.59 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.87 (bs, 4H), 2.64 – 2.50 (m, 4H), 2.39 (s, 3H), 1.72 (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 164.34, 161.08, 158.87, 150.15, 149.82, 148.85, 146.32, 140.63, 140.24, 134.19, 130.34, 129.46, 125.00, 123.81, 123.47, 119.08, 118.81, 115.43, 87.00, 55.17, 46.61, 44.44, 28.63.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 531.25 für C₂₇H₃₁N₈O₄ [M+H]⁺. Gefunden: 531.04.

8.1.3.39 Darstellung von *tert*-Butyl 3-((2-(3-aminophenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-yl)amino)-1*H*-indazol-1-carboxylat (**37**)



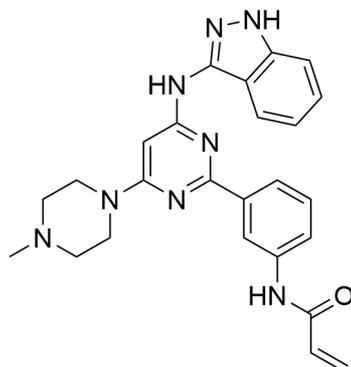
Eine Suspension aus **36** (270 mg, 0.51 mmol) und Pd/C 10 % w/w (27 mg) in EtOAc (18 mL) wurde zunächst auf 80 °C erhitzt und schließlich mit Ammoniumformiat (321 mg, 5.09 mmol) für 30 Minuten umgesetzt. Nach Abkühlung der Reaktionsmischung wurde das erhaltene Präzipitat mit THF aufgenommen, über Celite filtriert und mit EtOAc (100 mL) verdünnt. Anschließend wurde die organische Phase mit einer ges. NaHCO₃- (2 x 30 mL) und NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (5 % MeOH/DCM) lieferte 247 mg (0.49 mmol, 97 %) des gewünschten Produkts als weißgrauen Feststoff.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 9.2 Hz, 3H), 7.56 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.27 – 7.21 (m, 1H), 6.78 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 3.86 (s, 6H), 2.66 – 2.47 (m, 4H), 2.37 (s, 3H), 1.71 (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 163.71, 162.95, 158.18, 149.29, 146.21, 146.05, 139.64, 139.23, 129.62, 129.03, 123.12, 118.56, 118.32, 116.92, 114.74, 114.42, 85.77, 83.64, 54.63, 46.03, 43.79, 28.03.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 501.27 für C₂₇H₃₃N₈O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 501.06.

8.1.3.40 Darstellung von *N*-(3-(4-((1*H*-Indazol-3-yl)amino)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-2-yl)phenyl)acrylamid (38)



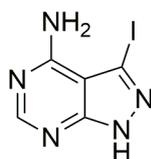
37 (100 mg, 0.20 mmol) und DIPEA (0.35 mL, 2.00 mmol) wurden in THF (4 mL) gelöst, für 10 Minuten bei 0 °C gerührt und mit einer Lösung aus Acryloylchlorid (0.02 mL, 0.21 mmol) in THF (0.4 mL) für 3 Stunden bei RT umgesetzt. Nach Zugabe einer Mischung aus DCM/MeOH (9:1, 50 mL) wurde die organische Phase mit H₂O (30 mL), einer ges. a NaHCO₃- (30 mL) und NaCl-Lsg. (10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nachfolgend wurde das Lösungsmittel im Vakuum konzentriert. Der erhaltene hell-gelbe Rückstand wurde in DCM (4 mL) aufgenommen, tropfenweise bei 0 °C mit 50 % TFA in DCM (4 mL) versetzt und für 4 Stunden bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch mit DCM und einer ges. Lösung NaHCO₃ (50 mL) behandelt und die wässrige Phase mit einem Gemisch aus DCM/MeOH (9:1, 100 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde aufeinanderfolgend mit einer ges. NaHCO₃- (50 mL) und NaCl-Lsg. (20 mL) gewaschen über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (3 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) lieferte 55 mg (0.10 mmol, 60 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.43 (s, 1H), 10.26 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.45 – 7.38 (m, 2H), 7.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.50 (dd, *J* = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.29 (dd, *J* = 17.0, 1.6 Hz, 1H), 5.78 (dd, *J* = 10.2, 1.6 Hz, 1H), 3.66 (s, 4H), 2.47 – 2.39 (m, 4H), 2.24 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.29, 164.05, 162.55, 161.35, 143.56, 141.39, 140.03, 139.72, 134.75, 132.82, 129.26, 127.67, 124.05, 122.02, 121.61, 119.97, 119.83, 115.93, 110.56, 84.13, 55.13, 46.65, 44.52.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 455.23078 für $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_8\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 455.23042.

8.1.3.41 Darstellung von 3-Iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-amin (43)



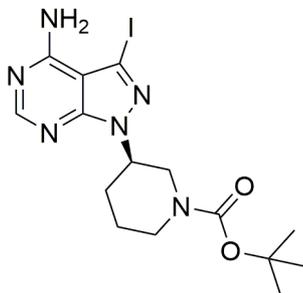
3-Iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-amin (5 g, 37 mmol) wurde in 20 mL DMF suspendiert und mit *N*-Iodosuccinimid (12.5 g, 55.5 mmol) für 12 Stunden bei 85 °C umgesetzt. Das entstandene Präzipitat wurde filtriert, mit gekühltem EtOH mehrmals gewaschen und die restlichen flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt, woraus sich 9.4 g (36 mmol, 97 %) des gewünschten Produkts als weißgrauen Feststoff ergaben.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 13.78 (s, 1 H), 8.17 (s, 1 H), 7.09 (bs, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 157.53, 156.00, 102.47, 89.62.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 261.96 für $\text{C}_5\text{H}_5\text{IN}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 262.14.

8.1.3.42 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**44**)



Eine Suspension aus **43** (500 mg, 1.92 mmol) in THF (15 mL) wurde mit Triphenylphosphin (996 mg, 3.8 mmol) und *tert*-Butyl (*S*)-3-hydroxypiperidin-1-carboxylat (764 mg, 3.8 mmol) versetzt und für 10 Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde tropfenweise DIAD (864 μ L, 3.8 mmol) hinzugegeben und für 20 Stunden bei RT umgesetzt. Nach Zugabe von DCM und H₂O wurde die wässrige Phase mit 10 % MeOH in DCM (3 x 100 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-3 % MeOH/DCM) lieferte 496 mg (1.12 mmol, 58 %) des gewünschten Produkts als weißgrauen Feststoff.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.21 (s, 1H), 7.74 (bs, 1H), 6.63 (bs, 1H), 4.63 – 4.54 (m, 1H), 4.11 – 3.68 (m, 2H), 3.52 – 3.36 (m, 0.5H), 3.15 – 3.05 (m, 0.5H), 3.04 – 2.86 (m, 1H), 3.04 – 2.86 (m, 1H), 2.07 – 1.98 (m, 1H), 1.95 – 1.79 (m, 1H), 1.57 – 1.48 (m, 1H), 1.30 (s, 9),

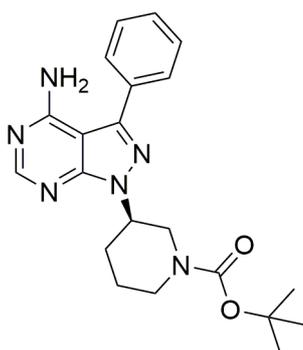
¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157.68, 155.84, 153.69, 153.14, 103.17, 88.92, 78.86, 52.60, 48.02, 47.24, 44.02, 43.02, 29.06, 27.94, 23.79, 23.01.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 445.08 für C₁₅H₂₂IN₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 445.00.

8.1.3.43 Allgemeine Arbeitsanweisung A zur Darstellung von 3-substituierten Pyrazolopyrimidinen in einer Palladium-katalysierten Kreuzkupplung

Eine Lösung aus **44**, ges. Na₂CO₃-Lsg. (0.25 mL) in einem Gemisch aus EtOH/DME (1:3, 2 mL) wurde mit der entsprechenden Boronsäure bzw. dem entsprechenden Boronsäurepinakolester versetzt und für 30 Minuten entgast. Im letzten Schritt wurde Tetrakis(triphenylphosphin)palladium als Katalysator hinzugegeben, das Reaktionsgemisch 12 Stunden bei 90 °C erhitzt (bzw. für 20 Minuten bei 130 °C in einem Mikrowellenreaktor) und anschließend über Celite filtriert. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt. Der resultierende Rückstand wurde in DCM und H₂O aufgenommen und die wässrige Phase mit 10 % MeOH/DCM (bzw. Ethylacetat) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum konzentriert. Säulenchromatographie an Kieselgel lieferte das gewünschte Produkt.

8.1.3.44 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**45a**)



Die Herstellung von **45a** erfolgte gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** und unter Verwendung von **44** (392 mg, 0.88 mmol), Phenylboronsäure (150 mg, 1.23 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (101 mg, 0.09 mmol).

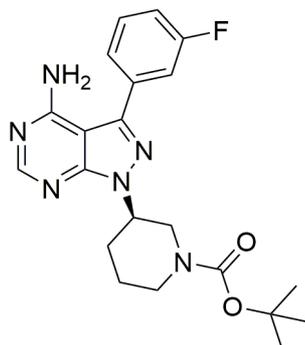
Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) lieferte 341 mg (0.86 mmol, 97 %) des gewünschten Produkts als weißgrauen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.27 (s, 1H), 7.70 – 7.64 (m, 2H), 7.58 – 7.51 (m, 2H), 7.51 – 7.45 (m, 1H), 6.89 (bs, 2H), 4.75 – 4.65 (m, 1H), 4.22 – 3.65 (m, 3H), 3.09 – 2.92 (m, 1H), 2.28 – 2.16 (m, 1H), 2.13 – 2.04 (m, 1H), 2.03 – 1.79 (m, 1H), 1.61 – 1.49 (m, 1H), 1.32 (bs, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.07, 155.49, 153.95, 153.72, 143.50, 132.89, 129.02, 128.55, 128.18, 97.43, 78.78, 52.05, 47.48, 43.23, 28.98, 27.89, 23.67.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 395.22 für C₂₁H₂₇N₆O₂ [M+H⁺]. Gefunden: 395.11.

8.1.3.45 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(3-fluorophenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat n (**45b**)

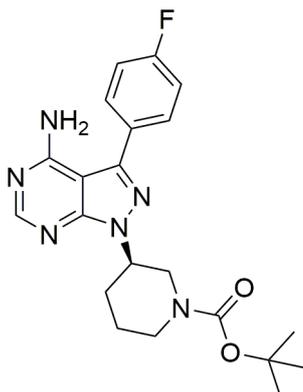


Analog der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** und unter Verwendung von **44** (105 mg, 0.23 mmol), (3-Fluorophenyl)Boronsäure (47 mg, 0.34 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (27 mg, 0.02 mmol) lieferte Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) 59 mg (0.14 mmol, 61 %) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.40 (s, 1H), 7.56 – 7.40 (m, 3H), 7.24 – 7.14 (m, 1H), 5.68 (bs, 2H), 4.90 – 4.80 (m, 1H), 4.46 – 3.99 (m, 2H), 3.57 – 3.27 (m, 1H), 2.92 – 2.79 (m, 1H), 2.31 – 2.18 (m, 1H), 1.97 – 1.85 (m, 1H), 1.83 – 1.66 (m, 2H), 1.44 (bs, 9H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 413.21013 für $C_{21}H_{26}O_2N_6F$ $[M+H]^+$. Gefunden: 413.20993.

8.1.3.46 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(4-fluorophenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (45c)



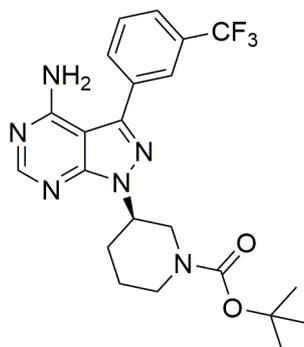
Analog der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** und unter Verwendung von **44** (105 mg, 0.23 mmol), (4-Fluorophenyl)Boronsäure (48.2 mg, 0.35 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (27 mg, 0.02 mmol) lieferte Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) 78.0 mg (0.19 mmol, 83 %) des gewünschten Produkts.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.40 (s, 1H), 7.74 – 7.66 (m, 2H), 7.29 – 7.23 (m, 2H), 5.59 (bs, 2H), 4.92 – 4.77 (m, 1H), 4.49 – 4.03 (m, 2H), 3.62 – 3.26 (m, 1H), 2.95 – 2.81 (m, 1H), 2.35 – 2.22 (m, 1H), 2.00 – 1.88 (m, 1H), 1.81 – 1.66 (m, 2H), 1.46 (bs, 9H).

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

HRMS Berechnet: 413.20 für $C_{21}H_{26}FN_6O_2$ $[M+H]^+$. Gefunden: 413.21.

8.1.3.47 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**45d**)



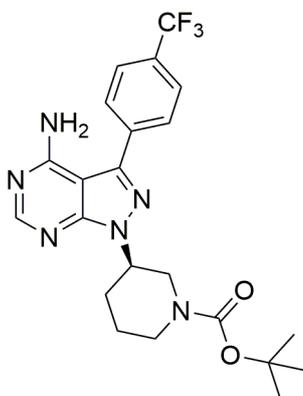
Die Herstellung von **45d** erfolgte gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** und unter Verwendung von **44** (450 mg, 1.00 mmol), (3-(Trifluoromethyl)phenyl)boronsäure (266 mg, 1.4 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (116 mg, 0.10 mmol). Säulenchromatographie an Kieselgel (0.25-2 % MeOH/DCM) führte zu 439 mg (0.95 mmol, 95 %) des gewünschten Produkts als weißgrauen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.28 (s, 1H), 7.99 – 7.93 (m, 2H), 7.86 – 7.81 (m, 1H), 7.80 – 7.74 (m, 1H), 7.02 (bs, 2H), 4.81 – 4.63 (m, 1H), 4.38 – 3.50 (m, 3H), 3.11 – 2.93 (m, 1H), 2.30 – 2.17 (m, 1H), 2.14 – 2.06 (m, 1H), 2.04 – 1.85 (m, 1H), 1.63 – 1.53 (m, 1H), 1.32 (bs, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.19, 155.61, 154.17, 153.72, 142.10, 133.79, 132.17, 130.11, 129.73, 129.48, 125.16, 125.02, 124.60, 122.97, 97.49, 78.79, 55.96, 52.14, 46.88, 43.22, 29.09, 27.88, 23.28.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 463.21 für C₂₂H₂₆F₃N₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 463.09.

8.1.3.48 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**45e**)

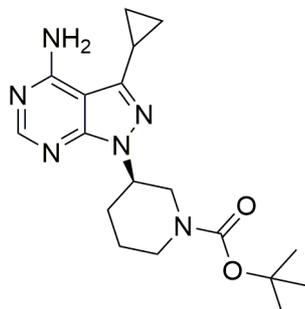


Die Herstellung von **45e** erfolgte gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** und unter Verwendung von **44** (556 mg, 1.10 mmol), (4-(Trifluoromethyl)phenyl)boronsäure (343 mg, 1.70 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (131 mg, 0.10 mmol). Säulenchromatographie an Kieselgel (0.25-2 % MeOH/DCM) führte zu 432 mg (0.93 mmol, 85 %) des gewünschten Produkts als weißgrauen Feststoff.

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

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.2, 155.7, 154.2, 154.1–153.6, 136.8, 133.1, 132.4, 32.0, 131.5, 131.4, 129.0, 128.8, 128.7, 128.5, 126.0, 125.2, 123.4, 97.5, 52.1, 29.0, 27.9, 2.2–22.0.

8.1.3.49 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-cyclopropyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (45f)



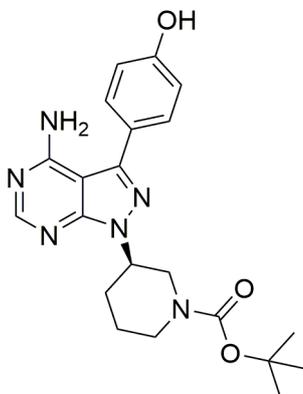
44 (100 mg, 0.23 mmol) wurde in einem Gemisch aus Dioxan/H₂O (3:1, 2.5 mL) gelöst, mit Cs₂CO₃ (220 mg, 0.68 mmol) und Cyclopropylboronsäurepinakolester (58 μ L, 0.32 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 30 Minuten entgast. Anschließend wurde [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]dichloropalladium(II) (im Komplex mit DCM) zur Reaktionslösung gegeben und diese für 12 Stunden bei 100 °C erhitzt. Nach Filtration über Celite und Zugabe von DCM und H₂O erfolgte die Extraktion der wässrigen Phase mit 10 % MeOH/DCM (3 x 50 mL). Nachfolgend wurden die organischen Phasen vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (0.5-2 % MeOH/DCM) lieferte 57 mg (0.16 mmol, 70 %) des gewünschten Produkts als weißgrauen Feststoff.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.12 (s, 1H), 7.34 (bs, 2H), 4.52 – 4.41 (m, 1H), 4.02 – 3.91 (m, 0.5H), 3.89 – 3.66 (m, 1H), 3.14 – 3.02 (m, 0.5H), 2.98 – 2.81 (m, 1H), 2.42 – 2.34 (m, 1H), 2.12 – 2.01 (m, 1H), 1.98 – 1.90 (m, 1H), 1.90 – 1.75 (m, 1H), 1.53 – 1.44 (m, 1H), 1.42 – 1.22 (m, 9H), 1.21 – 1.18 (m, 1H), 0.96 – 0.89 (m, 2H), 0.88 – 0.81 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.22, 155.40, 153.72, 153.58, 145.46, 99.10, 78.79, 51.84, 47.58, 43.37, 28.94, 27.92, 23.68, 8.49, 7.53.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 359.22 für C₁₈H₂₇N₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 359.08.

8.1.3.50 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**45g**)



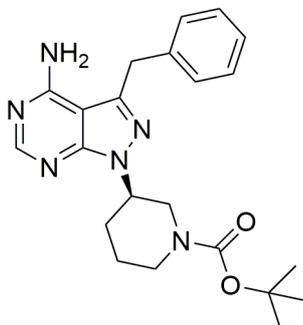
Gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** und unter Verwendung von **44** (100 mg, 0.23 mmol), (4-Hydroxyphenyl)Boronsäurepinakolester (74.2 mg, 0.34 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (27 mg, 0.02 mmol) wurde **45g** hergestellt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-6 % MeOH/DCM) führte zu 88 mg (0.21 mmol, 91 %) des gewünschten Produkts als weißgrauen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.76 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.73 (bs, 2H), 4.70 – 4.61 (m, 1H), 4.19 – 3.66 (m, 2H), 3.60 – 3.16 (m, 1H), 3.09 – 2.90 (m, 1H), 2.27 – 2.14 (m, 1H), 2.11 – 2.03 (m, 1H), 2.01 – 1.84 (m, 1H), 1.60 – 1.49 (m, 1H), 1.32 (bs, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.14, 157.95, 155.44, 153.80, 143.73, 129.58, 123.59, 115.89, 97.35, 78.86, 51.97, 47.27, 43.09, 29.09, 27.94, 23.74.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 411.21 für C₂₁H₂₇N₆O₃ [M+H]⁺. Gefunden: 411.21.

8.1.3.51 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-benzyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (45h)

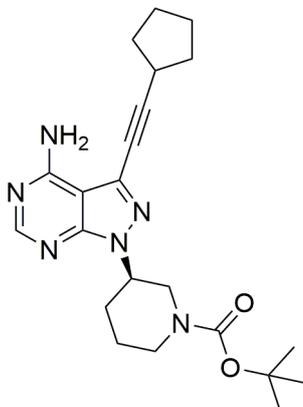


Abweichend zur Arbeitsanweisung **A** wurde **44** (100 mg, 0.23 mmol) in einem Gemisch aus Dioxan/H₂O (3:1, 2.5 mL) gelöst, mit Cs₂CO₃ (220 mg, 0.68 mmol) und Benzylboronsäurepinakolester (75 μ L, 0.34 mmol) versetzt und die Reaktionsmischung für 30 Minuten entgast. Anschließend wurde [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]dichloropalladium(II) (im Komplex mit DCM) (16.5 mg, 0.02 mmol) zur Reaktionslösung gegeben und diese für 20 Stunden bei 145 °C in einem Mikrowellenreaktor erhitzt. Nach Filtration über Celite und Zugabe von EtOAc und H₂O erfolgte die Extraktion der wässrigen Phase mit EtOAc (3 x 50 mL). Nachfolgend wurden die organischen Phasen vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) lieferte 58 mg (0.14 mmol, 63 %) des gewünschten Produkts als braunen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.34 (s, 1H), 7.34–7.23 (m, 4H), 7.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 5.76 (s, 2H), 4.62 (s, 1H), 4.45–4.36 (m, 2H), 3.85 (m, 3H), 2.93 (m, 1H), 2.22–2.09 (m, *J* = 20.4, 11.4 Hz, 1H), 2.09–1.99 (m, 1H), 1.92–1.80 (m, 1H), 1.53 (dt, *J* = 32.9, 16.3 Hz, 1H), 1.27 (d, *J* = 50.6, 39.0 Hz, 9H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 409.23520 für C₂₂H₂₉O₂N₆ [M+H]⁺. Gefunden: 409.23448.

8.1.3.52 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(cyclopentylethynyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (45i)



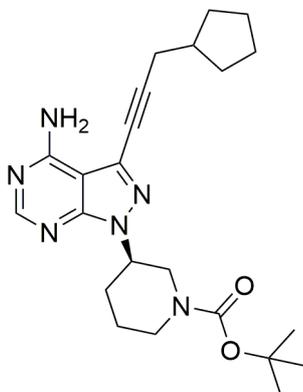
Abweichend zur Arbeitsanweisung **A** wurden **44** (100 mg, 0.23 mmol) und Cyclopentylacetylen (32 mg, 0.25 mmol) in THF (800 μ L) gelöst und mit Triethylamin (1.20 mL, 13.6 mmol), Triphenylphosphin (1.2 mg, 0.005 mmol), PdCl₂(PPh₃)₂ (1.6 mg, 0.003 mmol) und Kupferiodid (0.90 mg, 0.006 mmol) versetzt. Die entstandene Reaktionsmischung wurde für 1 Stunde bei 60 °C erhitzt. Anschließend wurde wie in der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** verfahren. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) ergab 125 mg (0.30 mmol) des gewünschten Produkts als harzartigen Feststoff.

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

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

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 411.25085 für C₂₂H₃₁O₂N₆ [M+H]⁺. Gefunden: 411.25017.

8.1.3.53 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(3-cyclopentylprop-1-yn-1-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (45j)



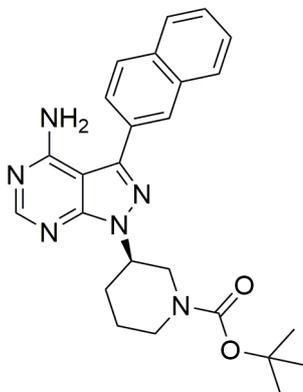
Abweichend zur Arbeitsanweisung **A** wurde **44** (100 mg, 0.23 mmol) in 2 mL THF gelöst und mit Prop-2-yn-1-ylcyclopentan (41.2 μ L, 0.31 mmol), Kupferiodid (2.14 mg, 0.01 mmol), $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ (7.93 mg, 0.01 mmol) und Triethylamin (157 μ L, 1.13 mmol) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 12 Stunden bei RT gerührt und anschließend über Celite filtriert und mit EtOAc und ges. Na_2CO_3 -Lsg. versetzt. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (0.5-5 % MeOH/DCM) lieferte 66.3 mg (0.16 mmol, 70 %) des gewünschten Produkts.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.21 (s, 1H), 4.56 (d, $J = 41.1$ Hz, 1H), 4.11–3.63 (m, 1H), 3.22–2.83 (m, 1H), 2.54 (t, $J = 10.0$ Hz, 2H), 2.19–2.07 (m, 2H), 2.02 (dt, $J = 21.0, 8.2$ Hz, 1H), 1.88 (dd, $J = 17.9, 11.0$ Hz, 1H), 1.79 (td, $J = 11.8, 7.0$ Hz, 2H), 1.68–1.58 (m, 2H), 1.57–1.48 (m, 3H), 1.46–1.19 (m, 13H).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 158.3, 156.8, 154.3–154.1, 153.1, 132.5, 132.0, 131.9, 129.3, 129.2, 126.7–126.5, 101.1, 96.1, 79.5–79.3, 72.8, 52.8, 38.7, 32.1, 28.4, 25.22–25.18, 25.1.

LC-MS: Berechnet: 425.27 für $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 425.27.

8.1.3.54 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(naphthalen-2-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (45k)



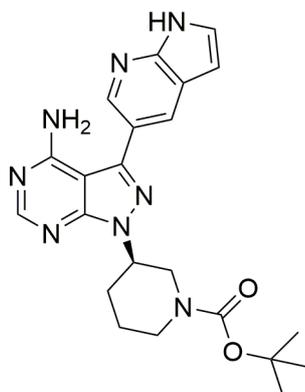
Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** wurde **44** (50 mg, 0.11 mmol) mit Naphthalen-2-ylboronsäure (39 mg, 0.23 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (12 mg, 0.01 mmol) umgesetzt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) ergab 37 mg (0.08 mmol, 73 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.30 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.04 (dd, *J* = 6.0, 3.4 Hz, 1H), 8.00 (dd, *J* = 6.0, 3.4 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H), 7.61 – 7.56 (m, 2H), 6.80 (bs, 2H), 4.77 – 4.69 (m, 1H), 4.24 – 3.53 (m, 3H), 3.10 – 2.91 (m, 1H), 2.30 – 2.21 (m, 1H), 2.15 – 2.08 (m, 1H), 2.05 – 1.83 (m, 1H), 1.64 – 1.54 (m, 1H), 1.31 (bs, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.20, 155.55, 154.08, 153.81, 143.75, 133.04, 132.79, 130.33, 128.68, 128.40, 127.72, 127.55, 126.69, 126.65, 126.03, 97.62, 79.08, 52.16, 48.11, 47.17, 43.93, 42.97, 29.41, 28.81, 27.97, 24.14, 23.40.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 445.24 für C₂₅H₂₉N₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 445.21.

8.1.3.55 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-5-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (45l)



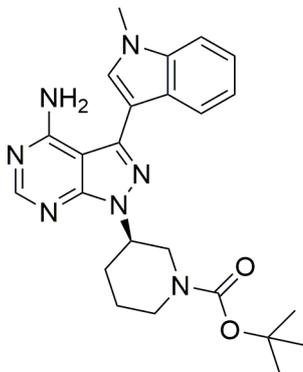
Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** und unter Verwendung von **44** (118 mg, 0.27 mmol), 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-5-yl)Boronsäurepinakolester (162 mg, 0.67 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (31 mg, 0.03 mmol). Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) lieferte 91.8 mg (0.21 mmol, 78 %) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.84 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.03 (bs, 2H), 6.57 (s, 1H), 4.74 – 4.64 (m, 1H), 4.20 – 3.50 (m, 3H), 3.01 (s, 1H), 2.31 – 2.16 (m, 1H), 2.15 – 2.06 (m, 1H), 2.04 – 1.83 (m, 1H), 1.66 – 1.50 (m, 1H), 1.31 (s, 9H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.28, 155.51, 153.86, 153.65, 148.39, 142.39, 127.84, 127.11, 120.82, 119.49, 100.45, 97.73, 78.87, 52.05, 47.43, 43.01, 28.86, 27.94, 23.78.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 435.23 für C₂₂H₂₇N₈O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 435.12.

8.1.3.56 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (45m)



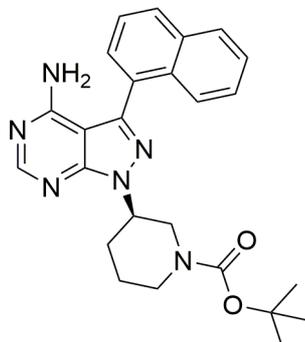
Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** und unter Verwendung von **44** (500 mg, 1.13 mmol), (1-Methyl-1*H*-indol-3-yl)boronsäurepinakolester (412 mg, 1.6 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (31 mg, 0.03 mmol). Säulenchromatographie an Kieselgel (1-3 % MeOH/DCM) lieferte 418 mg (0.93 mmol, 82 %) des gewünschten Produkts als hell-grünen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.24 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.93 (bs, 2H), 4.75 – 4.64 (m, 1H), 4.21 – 3.42 (m, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.11 – 2.86 (m, 1H), 2.32 – 2.19 (m, 1H), 2.17 – 2.09 (m, 1H), 2.08 – 1.88 (m, 1H), 1.65 – 1.52 (m, 1H), 1.31 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.27, 155.38, 153.76, 153.42, 136.81, 129.55, 126.13, 122.04, 120.42, 119.86, 109.95, 106.71, 97.85, 78.77, 51.89, 32.70, 27.91.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 448.25 für C₂₄H₃₁N₇O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 448.15.

8.1.3.57 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(naphthalen-1-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (45n)



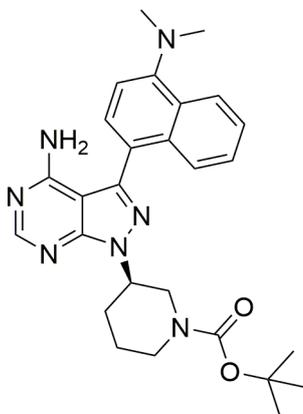
Analog der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** und unter Verwendung von **44** (382 mg, 0.86 mmol), Naphthalen-1-ylboronsäure (206 mg, 0.23 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (99 mg, 0.1 mmol) führte Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) zu 331 mg (0.74 mmol, 86 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

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

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157.85, 155.69, 153.76, 153.55, 141.74, 133.53, 131.26, 129.84, 129.20, 128.29, 128.21, 126.79, 126.21, 125.55, 125.39, 99.24, 78.80, 52.21, 47.62, 43.20, 28.94, 27.91, 23.64.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 445.24 für C₂₅H₂₉N₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 445.13.

8.1.3.58 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(4-(dimethylamino)naphthalen-1-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (45o)

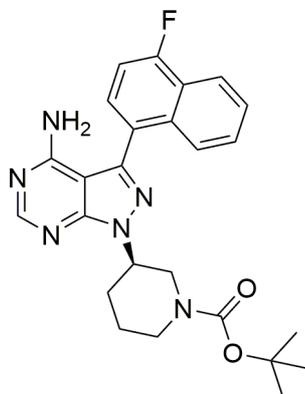


Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** wurde **44** (286 mg, 0.64 mmol) mit (4-(Dimethylamino)naphthalen-1-yl)Boronsäurepinakolester (287 mg, 0.97 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (74 mg, 0.06 mmol) umgesetzt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) ergab 130 mg (0.27 mmol, 42 %) des gewünschten Produkts als braunen Feststoff.

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

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

8.1.3.59 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-(4-fluoronaphthalen-1-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**45p**)

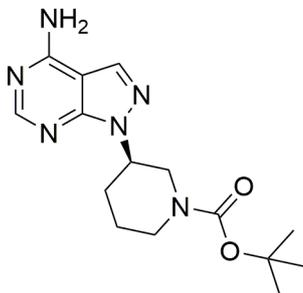


Die Herstellung von **45p** erfolgte gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **A** und unter Verwendung von **44** (150 mg, 0.34 mmol), (4-Fluoronaphthalen-1-yl)Boronsäure (98.1 mg, 0.02 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (39.3 mg, 0.02 mmol). Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) lieferte 121 mg (0.26 mmol, 76 %) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (s, 1H), 8.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.71–7.53 (m, 4H), 7.48 (td, *J* = 7.5, 2.9 Hz, 1H), 7.33–7.28 (m, 1H), 5.61–5.01 (m, 2H), 5.01–4.78 (m, 1H), 4.41 (d, *J* = 80.5 Hz, 1H), 4.14 (s, 1H), 2.86 (td, *J* = 13.1, 2.6 Hz, 1H), 2.37–2.20 (m, 2H), 1.80–1.67 (m, 1H), 1.52–1.43 (m, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 158.7, 157.8, 156.1, 154.8, 154.0, 142.0, 132.3, 132.2, 128.7, 128.6, 128.4, 127.2, 127.1, 126.3, 125.6, 124.4, 124.3, 121.2, 109.6, 109.4, 80.1, 53.1, 30.4, 28.6.

8.1.3.60 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**45q**)



45q wurde als Nebenprodukt bei der Sonogashira-Kreuzkupplung zur Darstellung der Verbindung **44s** identifiziert und isoliert. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) lieferte 49.7 mg des dehalogenierten Produkts als weißen Feststoff.

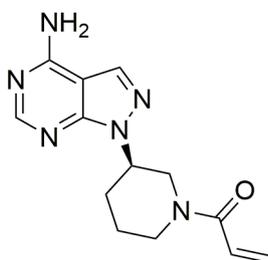
¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.17 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.71 (bs, 2H), 4.61-4.53 (m, 1H), 4.15-3.71 (m, 2H), 3.52-3.39 (m, 0.5H), 3.22-3.05 (m, 0.5H), 3.01-2.81 (m, 1H), 2.20-2.09 (m, 1H), 2.06-1.99 (m, 1H), 1.95-1.80 (m, 1H), 1.60-1.49 (m, 1H), 1.38 (bs, 9H).

8.1.3.61 Allgemeine Arbeitsanweisung B zur Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-onen bzw. propan-1-onen

Die am Piperidin mit einer Boc-Schutzgruppe versehenen Verbindungen wurden in DCM (1-2 mL) gelöst, bei 0 °C mit 25 % TFA in DCM versetzt und für 1 Stunde bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch mit DCM verdünnt und mit einer ges. NaHCO₃-Lsg. neutralisiert. Nach Phasentrennung erfolgten die Extraktion der wässrigen Phase mit 10 % MeOH/DCM (5 x 50 mL), die Trocknung mit Na₂SO₄ und die Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung weiterverwendet. Das Produkt wurde in THF (5 mL) gelöst, mit DIPEA behandelt und für 15 Minuten bei 0 °C gerührt. Acryloylchlorid bzw. Propionylchlorid

wurde in THF (1 mL) verdünnt und tropfenweise zur Reaktionslösung hinzugegeben und für 15-30 Minuten umgesetzt. Nach Zugabe von DCM und H₂O erfolgte die Extraktion der wässrigen Phase mit 10 % MeOH/DCM (3 x 20 mL). Im Anschluss wurden die organischen Phasen vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt. Säulenchromatographie bzw. HPLC-Aufreinigung lieferte das gewünschte Produkt.

8.1.3.62 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41a)

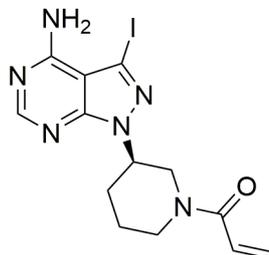


Gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45q** (50 mg, 0.18 mmol) DIPEA (269 μ L, 1.60 mmol) und Acryloylchlorid (14 μ L, 0.20 mmol) umgesetzt wurde. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) lieferte 15 mg (0.10 mmol, 38 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts.

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

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 273.15 für C₁₃H₁₇N₆O [M+H]⁺. Gefunden: 273.15.

8.1.3.63 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41b)



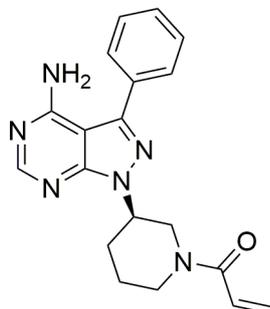
Gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **44** (80 mg, 0.18 mmol) ergab sich zunächst 83 mg (0.24 mmol) Rohprodukt, welches mit DIPEA (204 μ L, 1.20 mmol) und Acryloylchlorid (28 μ L, 0.34 mmol) umgesetzt wurde. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) lieferte 12 mg (0.03 mmol, 17 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als gelblichen Feststoff.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.21 (s, 1H), 7.90 (bs, 1H), 6.89 – 6.69 (m, 1H), 6.63 (bs, 1H), 6.15 – 6.05 (m, 1H), 5.73 – 5.59 (m, 1H), 4.65 – 4.54 (m, 1H), 4.54 – 4.48 (m, 0.5H), 4.30 – 4.24 (m, 0.5H), 4.20 – 4.14 (m, 0.5H), 4.09 – 4.03 (m, 0.5H), 3.62 – 3.56 (m, 0.5H), 3.19 – 3.07 (m, 1H), 2.92 – 2.86 (m, 0.5H), 2.22 – 2.15 (m, 1H), 2.08 – 2.02 (m, 1H), 1.91 – 1.83 (m, 1H), 1.61 – 1.47 (m, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.04, 164.93, 158.19, 156.45, 153.68, 153.58, 128.79, 128.65, 128.04, 127.92, 103.68, 103.62, 89.82, 89.67, 53.93, 53.05, 49.62, 46.17, 45.53, 41.93, 30.05, 29.95, 25.37, 23.90.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 399.04303 für C₁₃H₁₆IN₆O [M+H]⁺. Gefunden: 399.04248.

8.1.3.64 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41d)



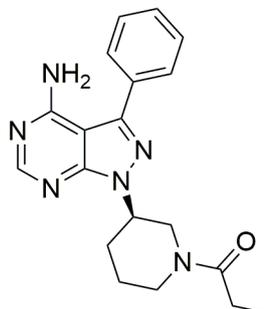
Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45a** (286 mg, 0.73 mmol) wurden zunächst 210 mg (0.71 mmol) Rohprodukt erhalten und davon 100 mg (0.34 mmol) mit DIPEA (340 μ L, 2 mmol) und Acryloylchlorid (30 μ L, 0.37 mmol) umgesetzt. Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) und nachfolgender HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum lieferte 18 mg (0.05 mmol, 15 %) lieferte 18 mg (0.05 mmol, 15 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.31 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.59 – 7.53 (m, 2H), 7.52 – 7.47 (m, 1H), 7.04 (bs, 2H), 6.94 – 6.63 (m, 1H), 6.23 – 6.02 (m, 1H), 5.73 – 5.56 (m, 1H), 4.81 – 4.66 (m, 1H), 4.56 (d, *J* = 10.9 Hz, 0.5H), 4.20 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.07 (d, *J* = 12.3 Hz, 0.5H), 3.77 – 3.67 (m, 0.5H), 3.29 – 3.16 (m, 1H), 3.07 – 2.99 (m, 0.5H), 2.34 – 2.22 (m, 1H), 2.17 – 2.10 (m, 1H), 1.98 – 1.90 (m, 1H), 1.67 – 1.52 (m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.35, 158.41, 154.62, 155.34, 144.65, 133.55, 129.99, 129.62, 129.25, 129.13, 128.26, 128.03, 98.24, 53.62, 52.86, 49.80, 46.50, 46.96, 42.48, 30.15, 30.49, 25.66, 24.02.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 349.17768 für C₁₉H₂₁N₆O [M+H]⁺. Gefunden: 349.17714.

8.1.3.65 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)propan-1-on (**41e**)



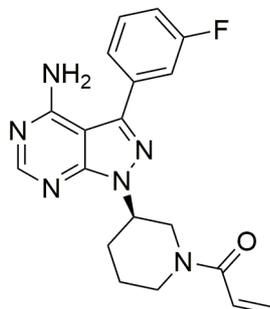
Gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45a** (286 mg, 0.73 mmol) wurde das Rohprodukt hergestellt, von dem 70 mg (0.24 mmol) im folgenden Schritt mit DIPEA (243 μ L, 1.43 mmol) und Propionylchlorid (23 μ L, 0.26 mmol) umgesetzt wurden. Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) und nachfolgender HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum ergab 43 mg (0.12 mmol, 50 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.27 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.55 (dd, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.52 – 7.47 (m, 1H), 8.85 (bs, 2H), 4.79 – 4.60 (m, 1H), 4.57 – 4.51 (m, 0.5H) 4.22 (d, *J* = 13.0 Hz, 0.5H), 4.06 – 4.00 (m, 0.5H), 3.87 (d, *J* = 13.3 Hz, 0.5H), 3.62 – 3.55 (m, 0.5H), 3.16 – 3.07 (m, 1H), 2.90 – 2.82 (m, 0.5H), 2.42 – 2.19 (m, 3H), 2.16 – 2.07 (m, 1H), 1.94 – 1.84 (m, 1H), 1.69 – 1.47 (m, 1H), 1.04 – 0.94 (m, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.44, 171.29, 158.06, 155.57, 155.50, 154.00, 153.86, 143.68, 143.60, 132.85, 129.04, 128.59, 128.19, 97.44, 97.37, 52.67, 52.12, 49.07, 45.30, 44.77, 41.07, 29.56, 29.29, 25.55, 24.57, 23.40, 9.37.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 351.19333 für C₁₉H₂₃N₆O [M+H]⁺. Gefunden: 351.19279.

8.1.3.66 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(3-fluorophenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41g)

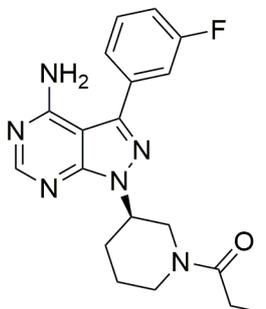


Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45b** (239 mg, 0.58 mmol) wurden zunächst 224 mg (0.72 mmol) Rohprodukt erhalten, wovon 44.7 mg (0.14 mmol) mit DIPEA (246 μ L, 1.43 mmol) und Acryloylchlorid (13.0 μ L, 0.16 mmol) umgesetzt wurden. Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) und nachfolgender HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum lieferte 15.0 mg (0.04 mmol, 29 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.29 (s, 1H), 7.60–7.41 (m, 3H), 7.36–7.27 (m, 1H), 6.90–6.61 (m, 1H), 6.09 (dd, *J* = 35.8, 16.9 Hz, 1H), 5.74–5.53 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 4.17 (s, 1H), 3.77–3.66 (m, 1H), 3.24 (dd, *J* = 11.7 Hz, 1H), 2.04–1.88 (m, 2H), 1.59 (s, 1H), 1.32–1.19 (m, 2H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 367.16826 für C₁₉H₂₀ON₆F [M+H]⁺. Gefunden: 367.16812.

8.1.3.67 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(3-fluorophenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)propan-1-on (41h)



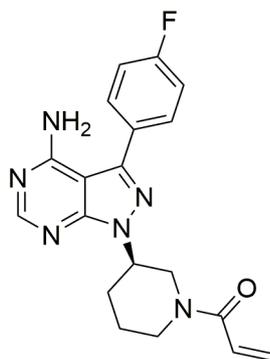
Die Verwendung von **45b** (239 mg, 0.58 mmol) gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** lieferte zunächst das Rohprodukt (224 mg, 0.55 mmol). Abweichend von der Arbeitsanweisung **B** erfolgte keine wässrige Aufarbeitung, wodurch das Rohprodukt als TFA-Salz erhalten wurde. Hiervon wurden 181 mg (0.44 mmol) mit DIPEA (1 μ L, 1.43 mmol) und Propionylchlorid (56 μ L, 0.64 mmol) behandelt. Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) und nachfolgender HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum lieferte 35.5 mg (0.1 mmol, 23 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

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

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.38, 163.48, 161.52, 157.63, 155.09, 153.79, 142.69, 134.85, 131.09, 124.38, 115.57, 115.41, 97.34, 52.77, 52.27, 49.01, 45.27, 44.74, 41.08, 29.53, 29.33, 25.59, 24.51, 23.49, 9.40.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 369.18391 für C₁₉H₂₂ON₆F [M+H]⁺. Gefunden: 369.18390

8.1.3.68 Darstellung von (R)-1-(3-(4-Amino-3-(4-fluorophenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41i)

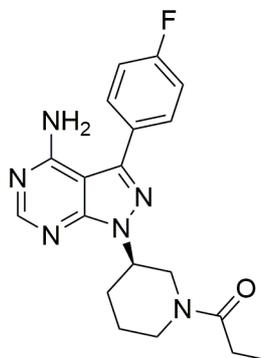


Gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45c** (78.0 mg, 0.19 mmol) wurden zunächst 60.0 mg (0.19 mmol) Rohprodukt erhalten und mit DIPEA (326 μ L, 1.89 mmol) und Acryloylchlorid (16.8 μ L, 0.21 mmol) umgesetzt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-3 % MeOH/DCM) führte zu 44.3 mg (0.12 mmol, 63 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.39 (s, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.23 (t, 2H), 6.58 (m, 1H), 6.29 (d, 1H), 5.68 (d, 1H), 5.40 (s, 2H), 2.36 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.74 (m, 1H), 1.27 (m, 5H).

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 369.17 für C₁₉H₂₀FN₆O [M+H]⁺. Gefunden: 369.17

8.1.3.69 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(4-fluorophenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)propan-1-on (41j)



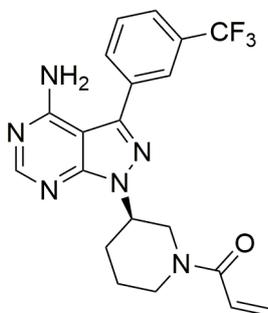
Gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45c** (389 mg, 0.90 mmol), DIPEA (1.87 mL, 11 mmol) und Propionylchlorid (101 μ L, 1.20 mmol) umgesetzt. Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (1-3 % MeOH/DCM) und nachfolgender HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum führte zu 111 mg (0.3 mmol, 29 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.25 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.69 (ddd, *J* = 7.9, 5.3, 2.2 Hz, 2H), 7.37 (td, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 2H), 4.80–4.58 (m, 1H), 4.57–4.19 (m, 1H), 3.97 (ddd, *J* = 67.3, 27.7, 10.3 Hz, 1H), 3.54 (dt, *J* = 26.0, 13.0 Hz, 1H), 3.16–3.05 (m, 1H), 2.83 (t, *J* = 10.9 Hz, 1H), 2.41–2.19 (m, 2H), 2.13–2.03 (m, 1H), 1.94–1.82 (m, 1H), 1.57 (dddd, *J* = 27.9, 14.8, 11.1, 3.4 Hz, 1H), 0.98 (dt, *J* = 21.5, 7.4 Hz, 3H).

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

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

8.1.3.70 Darstellung von (R)-1-(3-(4-Amino-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41k)



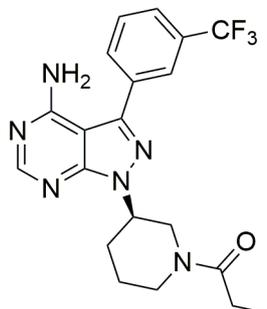
Analog der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45d** (415 mg, 0.90 mmol) wurde zunächst das Rohprodukt erhalten und im Anschluss 100 mg (0.28 mmol) mit DIPEA (289 μ L, 1.7 mmol) und Acryloylchlorid (25 μ L, 0.30 mmol) umgesetzt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) führte zu 46 mg (0.11 mmol, 39 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.29 (s, 1H), 7.98 – 7.93 (m, 2H), 7.86 – 7.74 (m, 2H), 7.03 (bs, 2H), 6.91 – 6.66 (m, 1H), 6.18 – 6.02 (m, 1H), 5.75 – 5.54 (m, 1H), 4.83 – 4.68 (m, 1H), 4.53 (d, *J* = 11.2 Hz, 0.5H), 4.24 – 4.12 (m, 1H), 4.05 (d, *J* = 12.4 Hz, 0.5H), 3.81 – 3.71 (m, 0.5H), 3.41 – 3.17 (m, 1H), 3.14 – 3.03 (m, 0.5H), 2.33 – 2.23 (m, 1H), 2.18 – 2.09 (m, 1H), 1.99 – 1.87 (m, 1H), 1.67 – 1.53 (m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.52, 158.20, 155.66, 154.04, 142.36, 133.76, 132.18, 130.12, 129.74, 129.48, 128.32, 127.29, 127.07, 125.15, 125.01, 124.61, 122.98, 97.46, 52.81, 52.09, 48.95, 45.64, 45.09, 41.53, 29.46, 29.17, 24.68, 23.10.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 417.16507 für C₂₀H₂₀F₃N₆O [M+H]⁺. Gefunden: 417.16452.

8.1.3.71 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-amino-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)propan-1-on (41l)



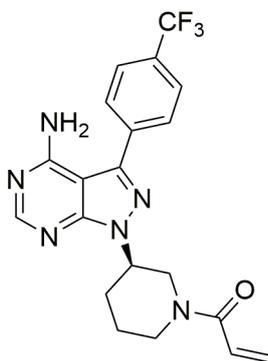
Gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45d** (415 mg, 0.90 mmol) wurde das Rohprodukt hergestellt, von dem 75 mg (0.21 mmol) im folgenden Schritt mit DIPEA (211 μ L, 0.76 mmol) und Propionylchlorid (20 μ L, 0.23 mmol) umgesetzt wurden. Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) und nachfolgender HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum lieferte 61 mg (0.15 mmol, 71 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.29 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 7.99 – 7.94 (m, 2H), 7.85 – 7.75 (m, 2H), 7.03 (bs, 2H), 4.81 – 4.62 (m, 1H), 4.55 – 4.47 (m, 0.5H), 4.20 (d, *J* = 12.3 Hz, 0.5H), 4.05 – 4.00 (m, 0.5H), 3.86 (d, *J* = 13.3 Hz, 0.5H), 3.64 – 3.57 (m, 0.5H), 3.20 – 3.11 (m, 1H), 2.92 – 2.84 (m, 0.5H), 2.42 – 2.19 (m, 3H), 2.17 – 2.08 (m, 1H), 1.96 – 1.82 (m, 1H), 1.69 – 1.48 (m, 1H), 1.03 – 0.94 (m, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.44, 171.30, 158.20, 155.69, 155.62, 154.25, 154.11, 142.30, 142.24, 133.99, 133.78, 132.19, 130.13, 129.89, 129.75, 129.49, 127.25, 125.15, 125.03, 124.60, 122.98, 97.55, 97.44, 52.78, 52.18, 48.99, 45.26, 44.75, 41.03, 29.47, 29.26, 25.56, 24.35, 23.34, 9.34.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 419.18072 für C₂₀H₂₂F₃N₆O [M+H]⁺. Gefunden: 419.18017.

8.1.3.72 Darstellung von (R)-1-(3-(4-Amino-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41n)



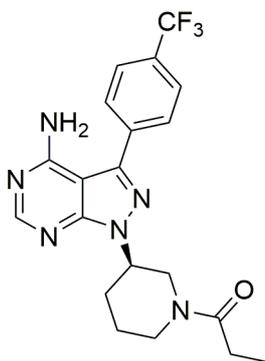
Analog der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45e** (439 mg, 1.0 mmol), DIPEA (1.7 mL, 10.0 mmol) und Acryloylchlorid (89.8 μ L, 1.1 mmol) umgesetzt. Aufreinigung erfolgte mittels RP-Säulenchromatographie an C18-Kieselgel (MeCN/H₂O + 0.2 %TFA) und nachfolgender HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum führte zu 123 mg (0.30 mmol, 31 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts.

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

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

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 417.16507 für $C_{20}H_{20}F_3N_6O$ $[M+H]^+$ und 439.14701 für $C_{20}H_{19}N_6OF_3Na$ $[M+Na]^+$. Gefunden: 417.16392 und 439.14578.

8.1.3.73 Darstellung von (R)-1-(3-(4-Amino-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)propan-1-on (41o)

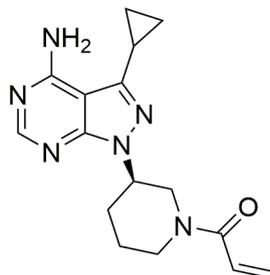


Gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45e** (246 mg, 0.50 mmol) wurde das Rohprodukt hergestellt, von dem 102 mg (0.30 mmol) im folgenden Schritt mit DIPEA (483 μ L, 2.80 mmol) und Propionylchlorid (27 μ L, 0.30 mmol) umgesetzt wurden. Säulenchromatographie an Kieselgel (5 % EtOAc/DCM + 1 % Ammoniak) lieferte 46 mg (0.10 mmol, 39 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts.

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

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 419.18072 für $C_{20}H_{22}F_3N_6O$ $[M+H]^+$ und 441.16266 für $C_{20}H_{21}F_3N_6ONa$ $[M+Na]^+$. Gefunden: 419.17997 und 441.16178.

8.1.3.74 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-cyclopropyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41p)



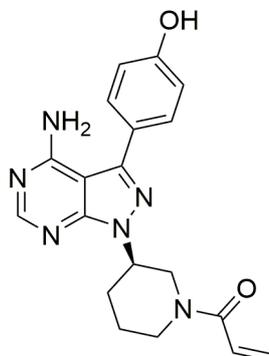
Die Verwendung von **45f** (236 mg, 0.67 mmol) gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** lieferte zunächst 158 mg (0.61 mmol) eines harzartigen Rohprodukts, wovon 50 mg (0.19 mmol) mit DIPEA (194 μ L, 1.14 mmol) und Acryloylchlorid (17 μ L, 0.21 mmol) behandelt wurden. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM, 100 % EtOAc + 1 % NH₃ und nachfolgender HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum führte zu 17 mg (0.05 mmol, 26 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.13 (bs, 1H), 7.28 (bs, 2H), 6.91 – 6.60 (m, 1H), 6.14 – 6.01 (m, 1H), 5.73 – 5.54 (m, 1H), 4.58 – 4.44 (m, 1H), 4.40 (d, *J* = 11.9 Hz, 0.5H), 4.17 – 4.09 (m, 0.5H), 4.08 – 4.00 (m, 1H), 3.64 – 3.56 (m, 0.5H), 3.21 – 3.05 (m, 1H), 3.04 – 2.96 (m, 0.5H), 2.45 – 2.38 (m, 1H), 2.19 – 2.10 (m, 1H), 2.02 – 1.96 (m, 1H), 1.91 – 1.82 (m, 1H), 1.58 – 1.45 (m, 1H), 0.93 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 0.86 (bs, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.48, 164.43, 158.28, 155.56, 153.65, 153.57, 145.70, 145.61, 128.37, 128.25, 127.46, 127.22, 99.10, 99.06, 52.31, 51.78, 49.20, 45.66, 45.13, 41.57, 29.51, 29.30, 24.89, 23.23, 8.57, 7.66.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 313.17768 für C₁₆H₂₁N₆O [M+H]⁺. Gefunden: 313.17714.

8.1.3.75 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41q)

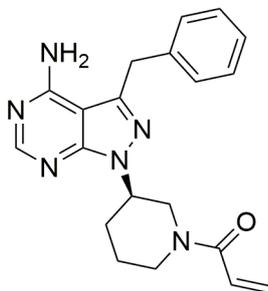


Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45g** (88.0 mg, 0.22 mmol) wurden zunächst 92.3 mg (0.30 mmol) Rohprodukt erhalten und mit DIPEA (371 μ L, 2.15 mmol) und Acryloylchlorid (19.3 μ L, 0.24 mmol) umgesetzt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) führte zu 50.8 mg (0.14 mmol, 64 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts.

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

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 365.17 für C₁₉H₂₁N₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 313.17.

8.1.3.76 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-benzyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**41r**)

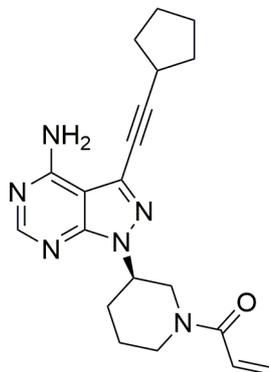


Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45h** (58.0 mg, 0.14 mmol) wurden zunächst 39.7 mg (0.13 mmol) Rohprodukt erhalten und mit DIPEA (223 μ L, 1.29 mmol) und Acryloylchlorid (12 μ L, 0.14 mmol) umgesetzt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) führte zu 26.9 mg (0.07 mmol, 50 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

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

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 363.19333 für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ON}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ und 385.17528 für $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{ON}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$. Gefunden: 363.19288 und 385.17471.

8.1.3.77 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(cyclopentylethynyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41s)



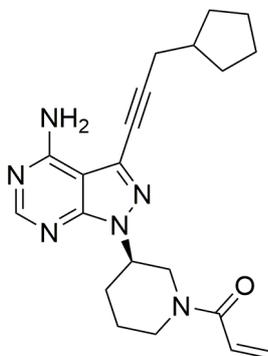
Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45i** (125 mg, 0.31 mmol) wurden zunächst 109 mg (0.31 mmol) Rohprodukt erhalten und mit DIPEA (604 μ L, 3.50 mmol) und Acryloylchlorid (31 μ L, 0.39 mmol) umgesetzt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-3 % MeOH/DCM) lieferte 22.3 mg (0.06 mmol, 19 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

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

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.86, 156.53, 154.60, 152.19, 128.28, 127.21, 100.33, 71.37, 52.56, 48.87, 44.92, 41.03, 33.05, 30.18, 29.14, 24.48, 22.86.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 365.20898 für C₂₀H₂₅ON₆ [M+H]⁺ und 387.19093 für C₂₀H₂₄ON₆Na [M+Na]⁺. Gefunden: 365.20857 und 387.19038.

8.1.3.78 Darstellung von (R)-1-(3-(4-Amino-3-(3-cyclopentylprop-1-yn-1-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41t)



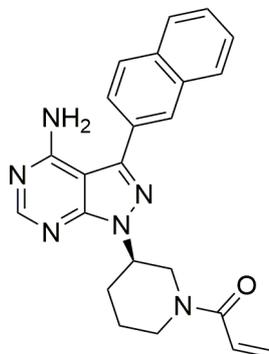
Die Verwendung von **45j** (66.4 mg, 0.16 mmol) gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** lieferte zunächst das Rohprodukt (50.6 mg, 0.16 mmol) und wurde umgehend mit DIPEA (270 μ L, 1.56 mmol) und Acryloylchlorid (15 μ L, 0.18 mmol) behandelt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) lieferte 38.0 mg (0.10 mmol, 63 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

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

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

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

8.1.3.79 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(naphthalen-2-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**41u**)

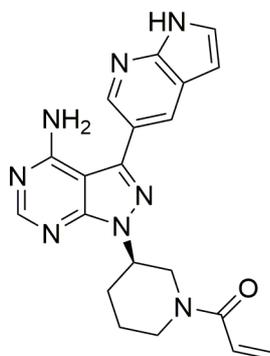


Die Verwendung von **45k** (37 mg, 0.08 mmol) gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** lieferte zunächst 30 mg (0.09 mmol) Rohprodukt, welche mit DIPEA (85 μ L, 0.5 mmol) und Acryloylchlorid (7.4 μ L, 0.09 mmol) behandelt wurden. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) und nachfolgender HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum lieferte 9 mg (0.02 mmol, 22 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.29 (bs, 1H), 8.20 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.06 – 7.99 (m, 2H), 7.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.61 – 7.57 (m, 2H), 6.93 – 6.71 (m, 1H), 6.18 – 6.06 (m, 1H), 5.74 – 5.59 (m, 1H), 4.80 – 4.70 (m, 1H), 4.58 (d, *J* = 12.5 Hz, 0.5H), 4.27 – 4.22 (m, 1H), 4.13 – 4.07 (m, 0.5H), 3.78 – 3.72 (m, 0.5H), 3.28 – 3.19 (m, 1H), 3.05 – 2.99 (m, 0.5H), 2.35 – 2.26 (m, 1H), 2.19 – 2.15 (m, 1H), 2.00 – 1.95 (m, 1H), 1.66 – 1.55 (m, 1H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 399.19333 für C₂₃H₂₃N₆O [M+H]⁺. Gefunden: 399.19279.

8.1.3.80 Darstellung von (R)-1-(3-(4-Amino-3-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-5-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41v)



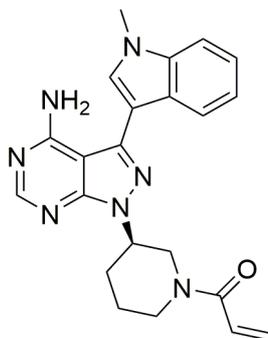
Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45I** (23.7 mg, 0.05 mmol) wurden zunächst 18 mg (0.05 mmol) Rohprodukt erhalten und mit DIPEA (28 μ L, 0.16 mmol) und Acryloylchlorid (4.85 μ L, 0.06 mmol) umgesetzt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) lieferte 16.8 mg (0.04 mmol, 80 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.82 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.57 – 7.56 (m, 1H), 6.94 (bs, 2H), 6.91 – 6.68 (m, 2H), 6.59 – 6.53 (m, 1H), 6.18 – 6.02 (m, 1H), 5.73 – 5.55 (m, 1H), 4.81 – 4.65 (m, 1H), 4.57 (d, J = 10.8 Hz, 0.5H), 4.26 – 4.15 (m, 1H), 4.07 (d, J = 12.5 Hz, 0.5H), 3.79 – 3.68 (m, 0.5H), 3.28 – 3.18 (m, 1H), 3.08 – 2.97 (m, 0.5H), 2.37 – 2.24 (m, 1H), 2.20 – 2.08 (m, 1H), 2.00 – 1.87 (m, 1H), 1.68 – 1.49 (m, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.56, 158.28, 155.58, 154.00, 148.38, 142.35, 128.29, 127.80, 127.33, 127.10, 120.77, 119.46, 100.41, 97.70, 52.82, 52.01, 49.30, 45.72, 45.10, 41.48, 29.71, 29.35, 24.79, 23.21.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 389.18383 für $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_8\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 389.18328.

8.1.3.81 Darstellung von (R)-1-(3-(4-Amino-3-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41w)



Die Verwendung von **45m** (85.4 mg, 0.19 mmol) gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** lieferte zunächst das Rohprodukt, welches im weiteren Verlauf mit DIPEA (196 μ L, 1.2 mmol) und Acryloylchlorid (17 μ L, 0.21 mmol) behandelt wurden. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) lieferte 48 mg (0.12 mmol, 63 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als hell-gelben Feststoff.

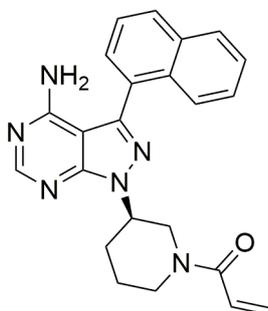
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, bei 24 °C) δ 8.24 (d, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.26 (dd, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.15 (dd, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.98 (bs, 2H), 6.91 – 6.70 (m, 1H), 6.17 – 6.04 (m, 1H), 5.73 – 5.57 (m, 1H), 4.75 – 4.65 (m, 1H), 4.57 (d, *J* = 11.1 Hz, 0.5H), 4.31 – 4.20 (m, 1H), 4.08 (d, *J* = 13.4 Hz, 0.5H), 3.88 (s, 3H), 3.74 – 3.68 (m, 0.5H), 3.29 – 3.18 (m, 1H), 3.01 – 2.94 (m, 0.5H), 2.34 – 2.25 (m, 1H), 2.18 – 2.11 (m, 1H), 1.98 – 1.91 (m, 1H), 1.66 – 1.55 (m, 1H).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, bei 100 °C) δ 8.24 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.27 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.15 (dd, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 16.8, 10.6 Hz, 1H), 6.57 (s, 2H), 6.06 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 5.62 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 4.78 – 4.71 (m, 1H), 4.42 (bs, 1H), 4.17 – 4.07 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.55 (bs, 1H), 3.21 – 3.13 (m, 1H), 2.40 – 2.30 (m, 1H), 2.24 – 2.17 (m, 1H), 2.03 – 1.97 (m, 1H), 1.69 – 1.60 (m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.59, 164.53, 158.36, 155.58, 153.60, 153.51, 138.68, 138.57, 136.87, 129.76, 128.40, 128.26, 127.56, 127.37, 126.18, 122.14, 120.52, 119.98, 110.09, 106.71, 97.91, 97.81, 52.65, 51.84, 49.44, 45.85, 45.19, 41.64, 32.82, 29.73, 29.49, 24.98, 23.51.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 402.20423 für $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 402.20368.

8.1.3.82 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(naphthalen-1-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41x)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45n** (67.8 mg, 0.15 mmol) wurden zunächst 53 mg (0.15 mmol) Rohprodukt erhalten und mit DIPEA (153 μL , 0.9 mmol) und Acryloylchlorid (14 μL , 0.17 mmol) umgesetzt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) führte zu 44.2 mg (0.11 mmol, 73 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

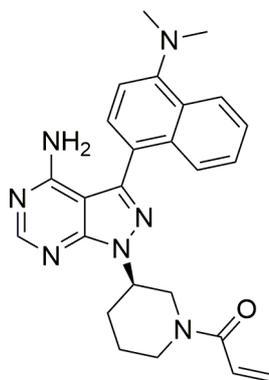
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.30 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 15.3, 8.0 Hz, 2H), 7.91 – 7.85 (m, 1H), 7.69 – 7.49 (m, 4H), 6.93 – 6.71 (m, 1H), 6.18 – 6.04 (m, 1H), 5.74 – 5.58 (m, 1H), 5.39 (bs, 2), 4.84 – 4.72 (m, 1H), 4.59 (d, J = 11.7 Hz, 0.5H), 4.32 – 4.16 (m, 1H), 4.06 (d, J = 13.6 Hz, 0.5H), 3.79 – 3.70 (m, 0.5H), 3.32 – 3.18 (m, 1H), 3.05 – 2.96 (m, 0.5H), 2.33 – 2.23 (m, 1H), 2.22 – 2.16 (m, 1H), 1.98 – 1.91 (m, 1H), 1.67 – 1.53 (m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.60, 164.45, 157.96, 155.93, 153.63, 153.54, 142.10, 141.98, 133.62, 131.37, 129.89, 129.36, 128.44, 128.39, 128.35, 128.18,

127.67, 127.49, 126.98, 126.94, 126.35, 125.71, 125.48, 99.22, 52.87, 52.09, 49.40, 45.90, 45.18, 41.66, 29.70, 29.47, 24.95, 23.41.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 399.19333 für C₂₃H₂₃N₆O [M+H]⁺. Gefunden: 399.19279.

8.1.3.83 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(4-(dimethylamino)naphthalen-1-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41y)



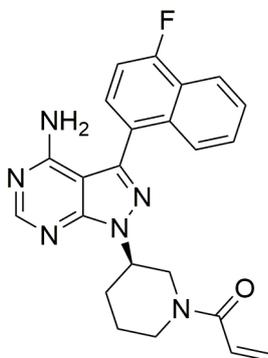
Die Verwendung von **45o** (100 mg, 0.21 mmol) gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** lieferte zunächst das Rohprodukt (79 mg, 0.20 mmol), welches im weiteren Verlauf mit DIPEA (354 μ L, 2.05 mmol) und Acryloylchlorid (19 μ L, 0.23 mmol) behandelt wurde. Anschließende Säulenchromatographie an Kieselgel (1-4 % MeOH/DCM) lieferte 22 mg (0.05 mmol, 24 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

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

^{13}C NMR (176 MHz, DMSO- d_6) δ 165.1, 158.4, 156.3, 154.1–153.8, 152.0, 143.32, 133.1, 132.4–131.6, 128.9, 128.8 (d, $J = 14.4$ Hz), 128.2–127.6, 127.1, 126.4, 125.8, 124.9, 124.4, 114.0, 99.9–99.2, 56.0, 53.8–53.0, 52.4, 49.8, 45.5, 45.1, 30.3–29.9, 25.6–25.1, 24.0–23.6.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 442.23553 für $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{ON}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 442.23528.

8.1.3.84 Darstellung von (*R*)-1-(3-(4-Amino-3-(4-fluoronaphthalen-1-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41z)

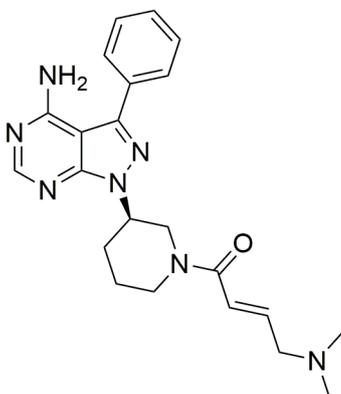


Die Verwendung von **45p** (121 mg, 0.26 mmol) gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** lieferte zunächst das Rohprodukt (95 mg, 0.26 mmol), welches im weiteren Verlauf mit DIPEA (452 μL , 2.62 mmol) und Acryloylchlorid (23.3 μL , 0.34 mmol) behandelt wurde. Anschließende Säulenchromatographie an Kieselgel (1–4 % MeOH/DCM) lieferte 39 mg (0.10 mmol, 36 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts.

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

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 417.18391 für $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ON}_6\text{F}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ und 439.16586 für $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ON}_6\text{FNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Gefunden: 417.18300 und 439.16488.

8.1.3.85 Darstellung von (*R,E*)-1-(3-(4-Amino-3-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)-4-(dimethylamino)but-2-en-1-on (41f)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45a** (286 mg, 0.73 mmol) wurde die Boc-Schutzgruppe entschützt. Das resultierende sekundäre Amin (50 mg, 0.17 mmol) wurde in DCM (2 mL) gelöst und in einer Kupplungsreaktion mit 4-(Dimethylamino)-2-butensäure Hydrochlorid (42 mg, 0.26 mmol), EDC Hydrochlorid (49 mg, 0.26 mmol), HOBt (34 mg, 0.26 mmol) und DIPEA (173 μ L, 1.02 mmol) für 12 Stunden bei RT umgesetzt. Nach Zugabe von DCM und H₂O erfolgte die Extraktion der wässrigen Phase mit 10 % MeOH/DCM (4 x 30 mL). Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (2-10 % MeOH/DCM) und nachfolgender HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum ergab 19 mg (0.05 mmol, 29 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als gelblichen Feststoff.

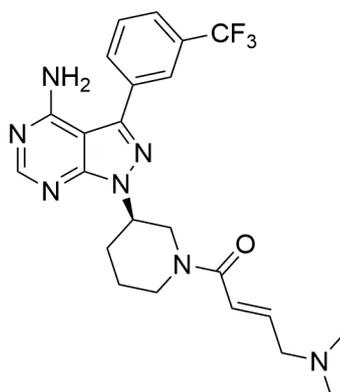
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.27 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.70 – 7.64 (m, 2H), 7.62 (bs, 2H), 7.58 – 7.53 (m, 2H), 7.52 – 7.48 (m, 1H), 7.05 – 6.85 (m, 1H), 6.71 – 6.58 (m, 1H), 4.79 – 4.67 (m, 1H), 4.54 (d, *J* = 12.0 Hz, 0.5H), 4.28 – 4.17 (m, 1H), 4.08 (d, *J* = 13.4 Hz,

0.5H), 3.87 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.74 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.77 – 3.70 (m, $J = 8.9$ Hz, 0.5H), 3.28 – 3.20 (m, 1H), 3.03 – 2.96 (m, 0.5), 2.72 (s, 3H), 2.65 (s, 3H), 2.31 – 2.21 (m, 1H), 2.16 – 2.09 (m, 1H), 1.98 – 1.87 (m, 1H), 1.69 – 1.53 (m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163.47, 158.21, 155.77, 155.74, 154.07, 153.96, 143.90, 143.81, 132.89, 132.85, 132.43, 132.08, 129.22, 129.19, 128.97, 128.77, 128.33, 128.27, 97.41, 56.74, 52.75, 52.00, 49.37, 45.93, 45.32, 41.75, 41.64, 29.66, 29.56, 24.92, 23.35

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 406.23553 für $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Gefunden: 406.23499.

8.1.3.86 Darstellung von (*R,E*)-1-(3-(4-amino-3-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)-4-(dimethylamino)but-2-en-1-on (41m)



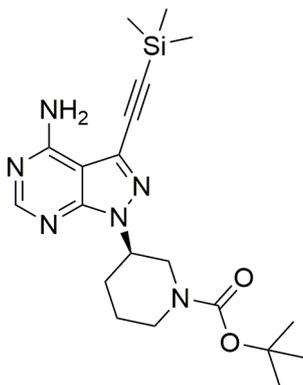
Gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **45d** (415 mg, 0.90 mmol) erfolgte die Entschützung der Boc-Schutzgruppe. Das erhaltene Amin (50 mg, 0.14 mmol) wurde anschließend in DCM (2 mL) gelöst und in einer Kupplungsreaktion mit 4-(Dimethylamino)-2-butensäure Hydrochlorid (35.0 mg, 0.21 mmol), EDC Hydrochlorid (40.3 mg, 0.21 mmol), HOBt (28.4 mg, 0.21 mmol) und DIPEA (141 μL , 0.83 mmol) für 12 Stunden bei RT umgesetzt. Nach Zugabe von DCM und H_2O wurde die wässrige Phase mit 10 % MeOH/DCM (3 x 40 mL) extrahiert. Es folgte die Vereinigung der organischen Phasen und die Trocknung über Na_2SO_4 . Zuletzt wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung

erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (2-10 % MeOH/DCM) und nachfolgender HPLC (MeCN/H₂O + 0.1 % TFA). Anschließend wurden die erhaltenen Fraktionen mit DCM und einer ges. NaHCO₃-Lösung versetzt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Evaporation der flüchtigen Bestandteile im Vakuum lieferte 23.2 mg (0.05 mmol, 36 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als gelblichen Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.28 (s, 1H), 7.98 – 7.93 (m, 2H), 7.87 – 7.74 (m, 2H), 7.21 (s, 2H), 6.72 – 6.42 (m, 2H), 4.83 – 4.65 (m, 2H), 4.55 – 4.49 (m, 0.5H), 4.17 – 4.11 (m, 0.5H), 4.09 – 4.02 (m, 1H), 4.09 – 4.02 (m, 0.5H), 3.27 – 3.19 (m, 1H), 3.17 – 3.11 (m, 0.5H), 3.05 (d, *J* = 5.2 Hz, 0.5H), 2.88 (d, *J* = 4.9 Hz, 0.5H), 2.32 – 2.21 (m, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.18 – 2.07 (m, 1H), 2.05 (s, 3H), 2.01 – 1.88 (m, 1H), 1.67 – 1.52 (m, 1H).

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 474.22292 für C₂₃H₂₇F₃N₇O [M+H⁺]. Gefunden: 474.22237.

8.1.3.87 Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-((trimethylsilyl)ethynyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (48)

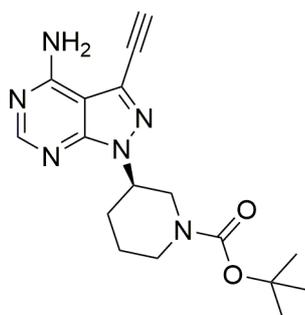


44 (284 mg, 0.64 mmol) wurden in DMF (5 mL) gelöst und mit Triethylamin (355 μ L, 2.56 mmol) und Kupferiodid (24.0 mg, 0.13 mmol) versetzt. Nach tropfenweiser Zugabe von Trimethylsilylacetylen (1.8 mL, 12.8 mmol) bei 0 °C wurde Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (74 mg, 0.06 mmol) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 2 Stunden bei RT gerührt. Der Filtration über Celite folgte die

Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen, mit H₂O versetzt und die wässrige Phase mit 10 % MeOH/DCM extrahiert (3 x 50 mL). Die organischen Phasen wurden umgehend vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) ergab 283 mg (0.68 mmol) des gewünschten Produkts als gelbes Harz.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 415.23 für C₂₀H₃₁N₆O₂Si [M+H]⁺. Gefunden: 415.13.

8.1.3.88 Darstellung von *tert*-Bbutyl (*R*)-3-(4-amino-3-ethynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**49**)



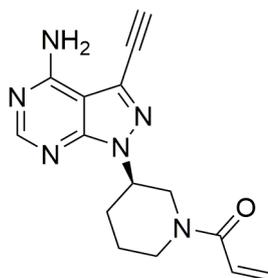
Zu einer Lösung aus **48** (283 mg, 0.68 mmol) in MeOH (5 mL) wurde K₂CO₃ (23.0 mg, 0.17 mmol) gegeben und das Reaktionsgemisch für 1 Stunde bei RT gerührt. Nach Zugabe von DCM und H₂O wurde die wässrige Phase mit 10 % MeOH/DCM extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde umgehend im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographie an Kieselgel (30-70 % EtOAc/DCM) lieferte 126 mg (0.37 mmol, 58 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als gelben Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.24 (s, 1H), 8.04 (bs, 1H), 6.69 (bs, 1H), 4.65 (s, 1H), 4.64 – 4.60 (m, 1H), 4.14 – 3.58 (m, 3H), 3.19 – 2.88 (m, 1H), 2.20 – 2.08 (m, 1H), 2.08 – 2.00 (m, 1H), 1.99 – 1.81 (m, 1H), 1.57 – 1.49 (m, 1H), 1.45 – 1.23 (m, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157.70, 156.42, 153.73, 152.76, 124.92, 100.97, 86.11, 79.00, 75.27, 52.48, 47.88, 47.00, 43.99, 42.95, 28.92, 27.93, 23.95, 23.16.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 343.19 für C₁₇H₂₃N₆O₂ [M+H]⁺. Gefunden: 343.09.

8.1.3.89 Darstellung von (R)-1-(3-(4-Amino-3-ethynyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (47)



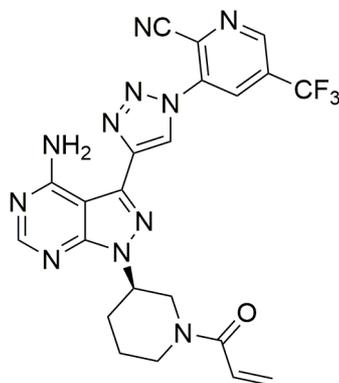
Gemäß der allgemeinen Arbeitsanweisung **B** und unter Verwendung von **49** (400 mg, 1.17 mmol) wurde das Rohprodukt hergestellt und im folgenden Schritt mit DIPEA (995 μ L, 5.85 mmol) und Acryloylchlorid (129 μ L, 1.6 mmol) umgesetzt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-3 % MeOH/DCM) lieferte 147 mg (0.50 mmol, 43 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als gelben Feststoff.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.24 (s, 1H), 8.05 (bs, 1H), 6.88 – 6.68 (m, 1H), 6.54 (bs, 1H), 6.54 (bs, 1H), 6.15 – 6.05 (m, 1H), 4.66 (s, 1H), 4.65 – 4.59 (m, 1H), 4.51 (d, J = 11.3 Hz, 0.5H), 4.29 – 4.16 (m, 1H), 4.07 (d, J = 13.4 Hz, 0.5H), 3.64 – 3.58 (m, 0.5H), 3.19 – 3.09 (m, 1H), 2.95 – 2.89 (m, 0.5H), 2.22 – 2.15 (m, 1H), 2.10 – 2.05 (m, 1H), 1.93 – 1.85 (m, 1H), 1.60 – 1.52 (m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.59, 164.45, 157.71, 156.51, 152.83, 152.73, 128.34, 128.15, 127.61, 127.46, 125.13, 124.96, 100.97, 100.92, 86.21, 75.22, 53.39, 52.51, 49.09, 45.62, 45.10, 41.51, 29.51, 29.36, 24.88, 23.36.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 297.14638 für C₁₅H₁₇N₆O [M+H]⁺. Gefunden: 297.14584.

8.1.3.90 Darstellung von (*R*)-3-(4-(1-(1-Acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)picolinonitril (51)



Zu einer Suspension aus **47** (40 mg, 0.14 mmol) in H₂O/*tert*-Butanol (1:1, 1 mL) wurde Natriumascorbat (2.80 mg, 0.01 mmol), Kupfer(II)sulfat Pentahydrat (0.35 mg, 0.001 mmol) und 3-Azido-5-(trifluoromethyl)picolinonitril (32.0 mg, 0.15 mmol) gegeben und das Reaktionsgemisch für 3 Stunden bei RT gerührt. Nach Zugabe von DCM und einer ges. Na₂CO₃-Lsg. erfolgte die Extraktion der wässrigen Phase mit 10 % MeOH/DCM (2 x 50 mL) und im Anschluss Vereinigung der organischen Phasen. Diese wurden daraufhin über Na₂SO₄ getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM) lieferte 54 mg (0.11 mmol, 79 % über zwei Schritte) des gewünschten Produkts als weißen Feststoff.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.51 (s, 1H), 9.42 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.79 (bs, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.25 (bs, 1H), 6.91 – 6.70 (m, 1H), 6.17 – 6.06 (m, 1H), 5.74 – 5.60 (m, 1H), 4.80 – 4.68 (m, 1H), 4.63 (d, *J* = 11.5 Hz, 0.5H), 4.35 – 4.23 (m, 1H), 4.13 (d, *J* = 13.3 Hz, 0.5H), 3.72 – 3.63 (m, 0.5H), 3.20 – 3.08 (m, 1H), 2.97 – 2.88 (m, 0.5H), 2.33 – 2.24 (m, 1H), 2.21 – 2.15 (m, 1H), 2.00 – 1.93 (m, 1H), 1.69 – 1.56 (m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.66, 164.53, 158.18, 156.53, 154.02, 153.90, 148.11, 142.29, 135.71, 134.18, 132.07, 130.39, 128.94, 128.67, 128.12, 127.82, 127.68, 124.21, 123.34, 121.17, 114.80, 97.84, 97.79, 53.21, 52.46, 49.25, 45.80, 45.28, 41.71, 29.65, 29.44, 24.92, 23.41.

HRMS (ESI-MS): Berechnet: 510.17261 für $C_{22}H_{19}F_3N_{11}O$ $[M+H]^+$. Gefunden: 510.17207.

8.2 IC₅₀-Bestimmungen und Kinetikmessungen

Die IC₅₀-Bestimmungen für den EGF-Rezeptor und dessen Mutationsvarianten (Carna Biosciences lot13CBS-0005K für EGFR-WT; Invitrogen, lot279551C für EGFR-L858R und Invitrogen, lot350247C für EGFR-L858R/T790M) wurden mit Hilfe des HTRF KinEASE-TK Assaysystems von Cisbio entsprechend der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Es wurden für die Reaktion folgende Mengen an Protein pro Kavität eingesetzt: 0.6 ng EGFR-WT (0.67 nM), 0.1 ng EGFR-L858R (0.11 nM), 0.07 ng EGFR-L858R/T790M (0.08 nM) oder 0.1 ng EGFR-L858R/T790M/C797S (0.08 nM). Dabei erfolgt die Phosphorylierung eines artifiziellen Substratpeptids (TK-Substrat von Cisbio) durch die Kinase. Die Reaktion (Reaktionszeit: 25 min für WT, 15 min für L858R, 20 min für L858R/T790M und 10 min für L858R/T790M/C797S) wird durch Zugabe eines EDTA-haltigem Puffer mit pTyr-spezifischem Antikörper mit terminal verknüpftem Eu³⁺-Kryptat (FRET-Donor) und einem Streptavidin-gebundenen Fluorophor XL665 (FRET-Akzeptor) gestoppt. Nach einer einstündigen Inkubation wird der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen Eu³⁺-Kryptat und XL665 gemessen und die Phosphorylierung des Substratpeptids quantifiziert. Die ATP-Konzentration entsprach dem jeweiligen *K_M*-Wert (9.5 μM für EGFR-WT, 9 μM für EGFR-L858R, 4 μM für EGFR-L858R/T790M und 9.5 μM für EGFR-L858R/T790M/C797S) bei einer Substratkonzentration von 1 μM, 225 nM, 200 nM bzw. 225 nM. Die Kinase und der entsprechende Inhibitor wurden für 30 min auf Eis vorinkubiert bevor die Reaktion durch Zugabe von ATP und Substratpeptid gestartet wurde. Ein Mikrotiterplatten-Lesegerät (EnVision, Perkin Elmer) wurde verwendet, um die Fluoreszenz der Proben bei 620 nm (Eu³⁺-markierter Antikörper) und 665 nm (XL655-markiertes Streptavidin) 50 μs nach Anregung bei 320 nm zu messen. Durch Quotientenbildung der Emissionswerte ($EM_{665\text{ nm}}/EM_{620\text{ nm}}$) bei acht verschiedenen Inhibitorkonzentrationen und graphischer Auftragung gegen die Inhibitorkonzentrationen in logarithmischem Maßstab erfolgte mit Hilfe von XLfit

(IDBS) die Bestimmung der IC₅₀-Werte. Jede Ermittlung eines IC₅₀-Werts wurde in mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen in Duplikaten durchgeführt. Zur Bestimmung der Kinetikparameter K_I und k_{inact} wurden die entsprechenden Verbindungen mit EGFR-WT, -L858R oder -L858R/T790M über verschiedene Zeiten (2-90 min) inkubiert, bei konstanter enzymatischer bzw. Stoppreaktion. Es wurde eine sechs-fach Verdünnungsreihe (acht Datenpunkte pro IC₅₀-Kurve) mit 20 μ M als Startkonzentration (finale Inhibitorkonzentration) angewendet. Die Verdünnungsreihen wurden mittels eines akustischen Pippettiersystems "ECHO 520 Liquid Handler" von der Firma Labcyte und der dazugehörigen Dosis-Wirkungs-Software "Echo Dose-Response v1.5.4" erstellt. Die berechneten IC₅₀-Werte wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen und wie in der Literatur beschrieben zur Bestimmung von k_{inact} und K_I gefittet.¹²⁴ Die Bestimmung des K_I -Werts der Inhibitoren gegenüber EGFR-L858R/T790M/C797S basiert auf dem Modell der kompetitiven Enzyminhibition. Dafür wurde der ATP- $K_{m,app}$ -Wert in der Gegenwart von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (20 μ M-0.6 x 10⁻⁴ μ M) bestimmt und die K_I -Werte mit Hilfe der Software Prism (Version 7, GraphPad Software, Inc.) unter Verwendung des nonlinearen Fits der kompetitiven Inhibition ermittelt.

8.3 Massenspektrometrie^{xxiii}

Für die massenspektrometrischen Experimente wurde das Protein (52 μ M) mit dem entsprechenden Inhibitor (100 μ M) in einem Puffersystem (25 mM TRIS, 250 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 mM TCEP, pH 8) für 1 h auf Eis inkubiert. Die massenspektrometrische Analyse der Aliquote erfolgte mit einem 1100 HPLC-System (Agilent), gekoppelt an ein Massenspektrometer (ThermoFinnigan LTQ Linear Ion Trap, Thermo Fisher Scientific) mit einer Elektrospray-Ionenquelle. Dafür wurden 5 μ L der Probe injiziert und mit einer Vydac 214TP C4 5 μ m Säule (150 mm x 2.1 mm) bei 30 °C mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.21 mL/min über 25 min aufgetrennt. Die Proteinlösung wurde mit 80 % Lösungsmittel A (0.1 % TFA in Wasser) und 20 %

^{xxiii} Die Nano-LC-MS/MS-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Dr. René Zahedi am Leipzig-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS in Dortmund (siehe Engel *et al.* 2015 und Engel *et al.* 2016).^{119, 152}

Lösungsmittel B (0.1 % TFA in Acetonitril) über 5 min auf die Säule geladen und anschließend mit einem linearen Gradienten auf 30 % A über 10 min aufgetrennt. Die Säule wurde mit 10 % A (linearer Gradient über 2 min, anschließend 2 min konstant) gewaschen und wieder auf die Startbedingung äquilibriert (linearer Gradient auf 80 % A/20 % B über 1 min, anschließend für 5 min konstant). Für die MS-Experimente wurde während des gesamten Gradienten der m/z-Massenbereich von 700–2000 gescannt. Die Auswertung und Dekonvolutierung der Massenspektren wurde mit Xcalibur 2.0.7 und MagTran 1.02¹⁷² durchgeführt.

Für die Nano-LC-MS/MS-Messungen wurden die Proben mit 10 mM Iodacetamid für 30 min bei RT unter Ausschluss von Licht inkubiert, um alle freien Cysteinseitenketten zu carbamidomethylieren. Anschließend wurde 1 µg jeder Probe mit der breitspezifischen Protease Subtilisin (Sigma Aldrich) verdaut, um eine hohe Sequenzabdeckung zu gewährleisten. Dazu wurden die Proben mit Subtilisin in einem 1:10 Verhältnis (Protease:Protein) für 20 min bei 5 °C verdaut. Der Verdau wurde durch Zugabe von 1 % TFA gestoppt und 2 pmol der Probe mittels Nano-LC-MS/MS (Q Exactive Massenspektrometer, online-gekoppelt an ein Ultimate 3000 Nano RSLC System (Beide Thermo Scientific) analysiert.

Die Peptide wurden für 5-10 min auf einer 75 µm x 2 cm C18 Trap Säule bei 0.1 % TFA (v/v) und einer Flussgeschwindigkeit von 20 µL/min aufkonzentriert und mit einer 75 µm x 50 cm C18 Säule (beide Pepmap, Thermo Scientific) mit einem 60-minütigen LC-Gradienten von 3-43 % B (84 % Acetonitril in 0.1 % Ameisensäure) bei einer Flussgeschwindigkeit von 250 nL/min. Die MS-Scans wurden von 300 bis 1500 m/z bei einer Auflösung von 60000-120000 mittels Polysiloxan bei 371.1012 m/z bzw. 445.12003 m/z als *lock mass* aufgenommen. Die intensivsten Ionen mit einer Ladung ≥ 2 wurden mit einem 1.6 Da Fenster für Fragmentierung mittels *higher-energy collisional dissociation* (HCD) mit normalisierter Kollisionsenergie von 27 isoliert. Die MS/MS-Spektren wurden mit einer Auflösung von 15000 aufgenommen. Die Rohdaten wurden mit Hilfe der Software Proteowizard 2.2¹⁷³ in ein mgf-Format umgewandelt und mit einer *in-house*-generierten Datenbank, welche die Sequenz von EGFR-T790M (in Hefe exprimiert) (SGD Datenbank, 6879 Zielsequenzen) enthält, mit Mascot 2.4¹⁷⁴ und den folgenden Parametern verglichen: 'none' für die Protease (undefiniert), MS und MS/MS Toleranz von 5 ppm und 0.02 Da, Carbamidomethylierung des Cys

(+57.0214 Da), **41x** an Cys (+398.1855 Da), **41w** an Cys (401.2178 Da), **8b** an Cys (+434.2178 Da) und **9a** an Cys (470.2178 Da) als variable Modifikationen.

8.4 Zellkultur und Viabilitätsassay^{xxiv}

A431-, H661-, HCC827- und H1975-Zellen wurden von der Firma American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. A431-Zellen wurden in DMEM *high glucose* Medium (Life Technologies) und H661-, HCC827- und H1975-Zellen in RPMI Medium (Life Technologies) mit L-Glutamin und 10 % FBS (PAN-Biotech) und 1 % PenStrep (Life Technologies) in einem Feuchtigkeitsinkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden am ersten Tag ausgesät (100-300 Zellen/Kavität, 25 µL). Nach Zellaufzucht für 24 h in serum- und antibiotikahaltigem Medium in einem Feuchtigkeitsinkubator bei 37 °C und 5 % CO₂, wurden die Zellen für 96 h mit den Inhibitoren (14 nM bis 30 µM) und mit DMSO und Staurosporin als Referenzen inkubiert. Die Verdünnungsreihen wurden mittels eines akustischen Pippettiersystems "ECHO 520 Liquid Handler" von der Firma Labcyte und der dazugehörigen Dosis-Wirkungs-Software "Echo Dose-Response v1.5.4" erstellt. Viabilitätsstudien wurden am fünften Tag mit Hilfe des CellTiterGlo Assays (Promega), einer Methode zur Bestimmung der Lebendzellzahl in Kultur, bestimmt. Dieses System basiert auf der Quantifizierung von ATP als Indikation für metabolisch aktive Zellen. Für diese Studien wurde das CellTiterGlo Reagenz entsprechend der Vorschrift des Herstellers hergestellt und 1:1 mit dem entsprechenden Medium verdünnt. Anschließend wurden das Reagenz und die Assayplatten bei RT für 20 min äquilibriert. 25 µL des Reagenzes wurden in jede Kavität gegeben und die Platten für 2 min auf einem Orbitalschüttler zur Lyse der Zellen geschüttelt. Die Mikrotiterplatten wurden für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lumineszenz mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (EnVision, Perkin Elmer) mit 500 ms Integrationszeit visualisiert. Die Daten wurden mit der Quattro Software Suite¹⁷⁵ zur IC₅₀-Bestimmung analysiert. Als Qualitätskontrolle wurde der Z'-Faktor von 16

^{xxiv} Die Experimente zur Charakterisierung der Substanzen **8b**, **8e**, **8h**, **8j**, **9a-e** und **38** in Krebszelllinien erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Roman Thomas am Max-Planck-Institut für neurologische Forschung in Köln (siehe Engel *et al.* 2015).¹¹⁹

Positiv- und Negativkontrollen berechnet. Es wurden ausschließlich die Assaydaten mit einem Z'-Faktor ≥ 0.5 für weitere Analysen verwendet. Alle Datenpunkte wurden für jede Platte in Duplikaten bestimmt und mindestens in zwei Platten repliziert.

8.5 Western-Blot-Analyse^{xxv}

Die Zellen wurden am ersten Tag in einer 6er Mikrotiterplatte ausplattiert (H1975, 400000 Zellen/Kavität und A431, 500000 Zellen/Kavität) und bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Feuchtigkeitsinkubator inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Zellen über Nacht mit 0.5 % FBS-haltigem Medium ausgehungert, bevor diese am dritten Tag mit den Inhibitoren für 1 h inkubiert und anschließend für 30 min mit EGF (50 ng/mL) stimuliert wurden. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit DPBS (1x) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 100 μ L Lysepuffer pro Kavität von der Mikrotiterplatte abgelöst, daraufhin abgeschabt und anschließend für 1 h bei 4 °C rotiert (Stuart Scientific).

Lysepuffer: 1 % (v/v) NP-40, 50 mM (v/v) TRIS-HCl pH 8.0, 100 mM (m/v) Natriumfluorid, 30 mM (m/v) Natriumpyrophosphat, 2 mM (m/v) Natriummolybdat, 5 mM (v/v) EDTA und 2 mM (m/v) Natriumvanadat; 1 % 10 mg/mL Aprotinin und Leupeptin sowie 10 % 100 mM PMSF und 200 mM Natriumvanadat wurden kurz vor Gebrauch hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 4 °C für 30 min und 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß transferiert und die Proteinkonzentration mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) bestimmt. Der Ladepuffer mit 0.5 M (v/v) TRIS-HCl pH 6.7, 10 % (v/v) SDS, (w/v) DTT, (v/v) Glycerol und 0.05 % (w/v) Bromphenolblau wurde hinzugefügt und die Lysate für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf NC-Membranen (GE Healthcare/Amersham-Biosciences) mit X Cell II Blot module entsprechend der Vorschrift des Herstellers (Thermo Fisher Scientific) geblottet. Nach Blocken mit 1x Net-G Puffer (10x Puffer mit 1.5 M (w/v) NaCl, 50 mM (w/v) EDTA, 500 mM (w/v) TRIS 0.5 % (v/v) Tween 20 und 0.4 % (w/v) Gelatin) wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C mit den entsprechenden primären Antikörpern

^{xxv}Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Sebastian Bauer am Universitätsklinikum in Essen durchgeführt (siehe Engel *et al.* 2016).¹⁵²

inkubiert (1:5000 für β -Aktin, 1:1000 für die anderen Antikörper). Nach dem Waschschrift wurden die Membranen für 2 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (anti-IgG-HRP 1:2000, CST) inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Veränderungen in Proteinexpressions- und Phosphorylierungsleveln wurden durch Chemilumineszenz mit Hilfe des FUJI LAS3000 Systems und der Science Lab 2001 ImageGauge 2.0 Software (Fujifilm Medial Systems) visualisiert und quantifiziert. Die verwendeten Antikörper gegen pEGFR (Tyr1068 und Tyr1045), EGFR, Akt, pAkt (Ser473), p42/44 MAPK, phospho-p42/44 MAPK (Thr202/Tyr204), rpS6, phospho-rpS6 (Ser235/236) stammten von der Firma Cell Signaling.

8.6 Bestimmung der ADME/DMPK Parameter^{xxvi,xxvii}

Zur Bestimmung der kinetischen Löslichkeit wurde die jeweilige Substanz aus einer 10 mM Stammlösung in DMSO auf eine Konzentration von 500 μ M in 50 mM HEPES-Puffer, pH 7.4 verdünnt. Nach anschließender 90-minütiger Inkubation bei RT auf einem Schüttler wurde die wässrige Lösung durch einen 0.2 μ m PVDF-Filter gefiltert und die optische Dichte zwischen 250 und 500 nm in einem Intervall von 10 nm gemessen. Die kinetische Löslichkeit wurde über die Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) ermittelt und mit Bezug auf die Absorption der in Acetonitril verdünnten Substanz normalisiert.

Die Zellgängigkeit der Substanzen wurde mit Hilfe des artifiziellen Membran-Assaysystems (*artificial membrane permeation assay* (PAMPA) und Caco-2-Zellen untersucht. Für die PAMPA-Messung wurde eine 10 mM Stammlösung der jeweiligen Verbindung in DMSO mit einem 50 mM HEPES-Puffer pH 7.4 auf eine Konzentration von 500 μ M verdünnt und auf eine Transwell-Membran transferiert, die mit einer membranbildenden Lösung aus 10 % 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (Sigma-Aldrich) und 0.5 % (w/v) Cholesterol (Sigma-Aldrich) in Dodecan beschichtet wurde. Nach 20-stündiger Inkubation bei RT in einer Feuchtekammer wurde die optische

^{xxvi} Die *in vitro* ADME/DMPK-Experimente sowie die Analytik der *in vivo* Studie wurden in Kooperation mit der Lead Discovery Center GmbH, Dortmund durchgeführt (siehe Engel *et al.* 2015, Engel *et al.* 2016 und Engel *et al.* 2017).^{119, 152, 153}

^{xxvii} Die Mausexperimente erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Hengstler am Leibnitz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund (siehe Engel *et al.* 2017).¹⁵²

Dichte der Lösung in der *receiver*-Kavität zwischen 250 und 500 nm mit einem Intervall von 10 nm bestimmt. Die Durchflussmenge (% Flux) wurde über die AUC zwischen 250 und 500 nm ermittelt und mit Bezug auf die Absorption der Verbindung nach 20-stündiger Inkubation bei RT in einem parallelen Transwell mit einer mit 50 % Methanol in 50 mM HEPES-Puffer pH 7.4 übergezogenen Membran normalisiert.

Für die Caco-2-Kultur wurde eine 10 mM Stammlösung der jeweiligen Verbindung in DMSO mit einem HBSS-Puffer pH 7.4 auf eine Konzentration von 5 μ M verdünnt und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ auf einer Caco-2-Monoschicht (ATCC) inkubiert, die für 21 Tage auf einer Transwell-Membran (Millipore) gewachsen sind. Die Konzentration der Substanz wurde sowohl in der *receiver*-Kavität, als auch in der Donor-Kavität gemessen. Die scheinbare Konzentration (P_{app}) der apikalen zur basolateralen Seite (A-B) bzw. der basolateralen zur apikalen Seite (B-A) wurde über die Gleichung $P_{app} = 1/AC_0 (dQ/dt)$ bestimmt, wobei A die Membranfläche, C_0 die Donor-Substanzkonzentration bei $t = 0$ und dQ/dt die Menge an transportierter Substanz innerhalb der 2 Stunden ist.

Die Plasmastabilität wurde mittels LC-MS gemessen. Dabei wurde die jeweilige Verbindung bei einer Konzentration von 5 μ M mit 100 % Plasma verschiedener Spezies für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die noch vorhandene Substanz (in %) per LC-MS bestimmt.

Die Plasmaproteinbindung wurde mittels Gleichgewichtsdialyse durch Inkubation der Substanz bei einer Konzentration von 5 μ M für 6 h bei 37 °C in 50 % Plasma in Puffer (v/v) und anschließender Konzentrationsbestimmung der Substanz durch LC-MS ermittelt. Die resultierenden *free fraction*-Werte bei 50 % Plasma ($f_{u50\%}$) wurden zur Ermittlung von 100 % Plasma ($f_{u100\%}$) mittels der Gleichung $f_{u100\%} = f_{u50\%} / (2 - f_{u50\%})$ extrapoliert.

Die metabolische Stabilität unter oxidativen Bedingungen wurde in Lebermikrosomen verschiedener Spezies mit Hilfe von LC-MS ermittelt. Dabei wurde der Abbau der Substanz bei einer Konzentration von 3 μ M über einen Zeitraum von 50 min bei 37 °C gemessen. Anhand der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) der Substanz wurde die intrinsische Elimination (*clearance*, Cl_{int}) bestimmt.

Zur Bestimmung der Pharmakokinetik von **41w** wurden insgesamt 24 männliche RjOrl:SWISS (CD1) Mäuse im Alter von 8-10 Wochen und einem Körpergewicht (*bodyweight*, *bw*) zwischen 29 und 31 g von der Firma Janvier Labs. verwendet. Die Mäuse wurden ad libitum mit Alleinfutter für Ratten-/Mäusehaltung von der Firma Sniff Spezialdiäten ernährt. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser und wurden in einem 12 h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Alle Experimente wurden mit einer Genehmigung der örtlichen Behörden durchgeführt. Die Pharmakokinetik der Substanz **41w** wurde für die orale (PO), die intraperitoneale (IP) und die intravenöse (IV) Applikation untersucht. Für die orale und intraperitoneale Gabe wurde eine Stammlösung von **41w** aus 8 mg in 4 mL einer Lösung aus 10 % DMSO und 90 % einer wässrigen Lösung aus 30 % 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin hergestellt. Um eine Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht zu erreichen wurden 300 μ L pro 30 g Körpergewicht der Maus appliziert. Für die intravenöse Applikation wurde eine 2 mg/mL DMSO-Lösung hergestellt und 30 μ L appliziert, um eine Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht zu erzielen. Die Mäuse wurden nach 5, 15, 45 und 135 min nach Applikation der Substanz euthanasiert und es wurde ca. 100 μ L Blut aus der linken Herzkammer entnommen. Es wurden drei Mäuse pro Zeitpunkt und Darreichungsform (PO, IP und IV) analysiert. Nach der Blutentnahme wurden die Blutproben bei 16200 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und das Plasma bei - 80 °C bis zur LC-MS-Analyse gelagert. Der LC-MS-Analyse vorausgehend, wurden die Plasmaproteine mit Acetonitril (inklusive eines internen Standards) präzipitiert und die Proben gefiltert. Eine Kalibrationskurve wurde durch angereicherte Leerproben des Plasmas erstellt. **41w** wurde mit einem Shimadzu UPLC System, gekoppelt mit einem QTrap 4000 Hybrid Triple Quadrupole/linear Ion Trap Massenspektrometer (AB Sciex) vermessen. Zur Berechnung der Plasmakonzentrationen wurde die Regressionsgleichung der Kalibrationskurve verwendet. Die pharmakokinetischen Parameter wurden mit Hilfe der PKSolver Software²¹⁷⁶ ermittelt.

8.7 CovClick-Screen

Für den primären CovClick-Screen wurde das Protein MKK7 (1 mg/mL, 0.03 mM) zunächst für 2 Stunden mit drei Äquivalenten der CovClick-Sonde **47** (0.09 mM) in Puffer (25 mM TRIS, 150 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, pH 7.0) auf Eis inkubiert und

anschließend separat mit dem jeweiligen Azidfragment (3 mM) für 20 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurden die Proben bei 16000 g für 10 min zentrifugiert. Die Proteinproben wurden anschließend wie in Kapitel 8.3 beschrieben mittels ESI-MS analysiert.

8.8 Dockingstudien

Die dreidimensionale Struktur der Verbindungen **51** und **52** wurde mit Hilfe von Spartan 14 (Wavefunction Inc.) unter Verwendung der semi-empirischen Methode PM6¹⁷⁷ erstellt und energieminiert. Die energieminierten Strukturen wurden für das semi-flexible kovalente Docking mit MKK7 (in-house Kristallstruktur) mit Hilfe der Software GOLD 5.2 (CCDC)¹⁷⁰ als mol2-Dateien eingeladen. Als Bindungstasche wurden alle Aminosäuren innerhalb von 12 Å ausgehend von Leu266 berücksichtigt. Zur Bewertung der generierten Konformationen wurde die Standardoption für Ligandenflexibilität und die Standardcorefunktion ChemPLP¹⁶⁹ ausgewählt. Durch den bekannten Bindungsmodus der CovClick-Sonde **47** in MKK7 wurden der Hauptkontakt des Liganden, die Wasserstoffbrückenbindungen des Aminopyrazolopyrimidins zur Scharnierregion sowie die kovalente Bindung zwischen dem Elektrophil und Cys218 als Kriterien (*constraints*) für die Dockingstudien festgelegt. Die Sucheffizienz des Algorithmus wurde auf 100 % gesetzt. Die Bewertung der 10 *best-ranked* Bindungsmodi für die entsprechende Verbindung erfolgte durch visuelle Analyse der Interaktionen zwischen Protein und Liganden.

9 Literaturverzeichnis

- [1] Ullrich, A.; Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **1990**, 61, 203-212.
- [2] Blume-Jensen, P.; Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **2001**, 411, 355-365.
- [3] Pawson, T. Protein modules and signalling networks. *Nature* **1995**, 373, 573-580.
- [4] Levi-Montalcini, R. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann N Y Acad Sci* **1952**, 55, 330-344.
- [5] Cohen, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* **1962**, 237, 1555-1562.
- [6] Cohen, S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol* **1965**, 12, 394-407.
- [7] Carpenter, G.; King, L., Jr.; Cohen, S. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* **1978**, 276, 409-410.
- [8] Ushiro, H.; Cohen, S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem* **1980**, 255, 8363-8365.
- [9] Eckhart, W.; Hutchinson, M. A.; Hunter, T. An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell* **1979**, 18, 925-933.
- [10] Robinson, D. R.; Wu, Y. M.; Lin, S. F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **2000**, 19, 5548-5557.
- [11] Yano, S.; Kondo, K.; Yamaguchi, M.; Richmond, G.; Hutchison, M.; Wakeling, A.; Averbuch, S.; Wadsworth, P. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. *Anticancer Res* **2003**, 23, 3639-3650.
- [12] Leahy, D. J. Structure and function of the epidermal growth factor (EGF/ErbB) family of receptors. *Adv Protein Chem* **2004**, 68, 1-27.
- [13] Kovacs, E.; Zorn, J. A.; Huang, Y.; Barros, T.; Kuriyan, J. A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. *Annu Rev Biochem* **2015**, 84, 739-764.
- [14] Burgess, A. W.; Cho, H. S.; Eigenbrot, C.; Ferguson, K. M.; Garrett, T. P.; Leahy, D. J.; Lemmon, M. A.; Sliwkowski, M. X.; Ward, C. W.; Yokoyama, S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* **2003**, 12, 541-552.

- [15] Ferguson, K. M.; Berger, M. B.; Mendrola, J. M.; Cho, H. S.; Leahy, D. J.; Lemmon, M. A. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* **2003**, 11, 507-517.
- [16] Ogiso, H.; Ishitani, R.; Nureki, O.; Fukai, S.; Yamanaka, M.; Kim, J. H.; Saito, K.; Sakamoto, A.; Inoue, M.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* **2002**, 110, 775-787.
- [17] Singh, B.; Carpenter, G.; Coffey, R. J. EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Res* **2016**, 5.
- [18] Mineev, K. S.; Bocharov, E. V.; Pustovalova, Y. E.; Bocharova, O. V.; Chupin, V. V.; Arseniev, A. S. Spatial structure of the transmembrane domain heterodimer of ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases. *J Mol Biol* **2010**, 400, 231-243.
- [19] Escher, C.; Cymer, F.; Schneider, D. Two GxxxG-like motifs facilitate promiscuous interactions of the human ErbB transmembrane domains. *J Mol Biol* **2009**, 389, 10-16.
- [20] Lemmon, M. A.; Treutlein, H. R.; Adams, P. D.; Brünger, A. T.; Engelman, D. M. A dimerization motif for transmembrane alpha-helices. *Nat Struct Biol* **1994**, 1, 157-163.
- [21] Endres, N. F.; Das, R.; Smith, A. W.; Arkhipov, A.; Kovacs, E.; Huang, Y.; Pelton, J. G.; Shan, Y.; Shaw, D. E.; Wemmer, D. E.; Groves, J. T.; Kuriyan, J. Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell* **2013**, 152, 543-556.
- [22] Thiel, K. W.; Carpenter, G. Epidermal growth factor receptor juxtamembrane region regulates allosteric tyrosine kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104, 19238-19243.
- [23] Zhang, X.; Gureasko, J.; Shen, K.; Cole, P. A.; Kuriyan, J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **2006**, 125, 1137-1149.
- [24] Jura, N.; Zhang, X.; Endres, N. F.; Seeliger, M. A.; Schindler, T.; Kuriyan, J. Catalytic control in the EGF receptor and its connection to general kinase regulatory mechanisms. *Mol Cell* **2011**, 42, 9-22.
- [25] Pawson, T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **2004**, 116, 191-203.
- [26] Russell, R. B.; Breed, J.; Barton, G. J. Conservation analysis and structure prediction of the SH2 family of phosphotyrosine binding domains. *FEBS Lett* **1992**, 304, 15-20.
- [27] Yarden, Y.; Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, 2, 127-137.
- [28] Oda, K.; Matsuoka, Y.; Funahashi, A.; Kitano, H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* **2005**, 1, 2005 0010.

- [29] Yarden, Y.; Pines, G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* **2012**, 12, 553-563.
- [30] Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, 298, 1912-1934.
- [31] Schwartz, P. A.; Murray, B. W. Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg Chem* **2011**, 39, 192-210.
- [32] Rabiller, M.; Getlik, M.; Klüter, S.; Richters, A.; Tückmantel, S.; Simard, J. R.; Rauh, D. Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases. *Arch Pharm (Weinheim)* **2010**, 343, 193-206.
- [33] Kobayashi, S.; Boggon, T. J.; Dayaram, T.; Jänne, P. A.; Kocher, O.; Meyerson, M.; Johnson, B. E.; Eck, M. J.; Tenen, D. G.; Halmos, B. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **2005**, 352, 786-792.
- [34] Liu, Y.; Shah, K.; Yang, F.; Witucki, L.; Shokat, K. M. A molecular gate which controls unnatural ATP analogue recognition by the tyrosine kinase v-Src. *Bioorg Med Chem* **1998**, 6, 1219-1226.
- [35] Gibbons, D. L.; Prich, S.; Kantarjian, H.; Cortes, J.; Quintás-Cardama, A. The rise and fall of gatekeeper mutations? The BCR-ABL1 T315I paradigm. *Cancer* **2012**, 118, 293-299.
- [36] Katayama, R.; Shaw, A. T.; Khan, T. M.; Mino-Kenudson, M.; Solomon, B. J.; Halmos, B.; Jessop, N. A.; Wain, J. C.; Yeo, A. T.; Benes, C.; Drew, L.; Saeh, J. C.; Crosby, K.; Sequist, L. V.; Iafrate, A. J.; Engelman, J. A. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med* **2012**, 4, 120ra117.
- [37] Huse, M.; Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **2002**, 109, 275-282.
- [38] Zheng, J.; Trafny, E. A.; Knighton, D. R.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Ten Eyck, L. F.; Sowadski, J. M. 2.2 A refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1993**, 49, 362-365.
- [39] Adams, J. A. Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model? *Biochemistry* **2003**, 42, 601-607.
- [40] Jeffrey, P. D.; Russo, A. A.; Polyak, K.; Gibbs, E.; Hurwitz, J.; Massagué, J.; Pavletich, N. P. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **1995**, 376, 313-320.
- [41] Gotoh, N.; Tojo, A.; Hino, M.; Yazaki, Y.; Shibuya, M. A highly conserved tyrosine residue at codon 845 within the kinase domain is not required for the transforming activity of human epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, 186, 768-774.
- [42] Cline, M. J.; Battifora, H. Abnormalities of protooncogenes in non-small cell lung cancer. Correlations with tumor type and clinical characteristics. *Cancer* **1987**, 60, 2669-2674.

- [43] Chan, B. A.; Hughes, B. G. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl Lung Cancer Res* **2015**, *4*, 36-54.
- [44] Rimawi, M. F.; Shetty, P. B.; Weiss, H. L.; Schiff, R.; Osborne, C. K.; Chamness, G. C.; Elledge, R. M. Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. *Cancer* **2010**, *116*, 1234-1242.
- [45] Siwak, D. R.; Carey, M.; Hennessy, B. T.; Nguyen, C. T.; McGahren Murray, M. J.; Nolden, L.; Mills, G. B. Targeting the epidermal growth factor receptor in epithelial ovarian cancer: current knowledge and future challenges. *J Oncol* **2010**, *2010*, 568938.
- [46] Herbst, R. S.; Heymach, J. V.; Lippman, S. M. Lung cancer. *N Engl J Med* **2008**, *359*, 1367-1380.
- [47] Sharma, S. V.; Bell, D. W.; Settleman, J.; Haber, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7*, 169-181.
- [48] Singh, M.; Jadhav, H. R. Targeting non-small cell lung cancer with small-molecule EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Drug Discov Today* **2017**.
- [49] Noonberg, S. B.; Benz, C. C. Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs* **2000**, *59*, 753-767.
- [50] Raymond, E.; Faivre, S.; Armand, J. P. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs* **2000**, *60* Suppl 1, 15-23; discussion 41-12.
- [51] Solignac, M. [New targets in the treatment of lung cancer. Role of EGF-R tyrosine kinase inhibitors]. *Rev Pneumol Clin* **2000**, Suppl 3, 34-36.
- [52] Arteaga, C. L.; Engelman, J. A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 282-303.
- [53] Mendelsohn, J. EGF receptors as a target for cancer therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **2004**, *115*, 249-253; discussion 253-244.
- [54] Barker, A. J.; Gibson, K. H.; Grundy, W.; Godfrey, A. A.; Barlow, J. J.; Healy, M. P.; Woodburn, J. R.; Ashton, S. E.; Curry, B. J.; Scarlett, L.; Henthorn, L.; Richards, L. Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem Lett* **2001**, *11*, 1911-1914.
- [55] Ciardiello, F.; Caputo, R.; Bianco, R.; Damiano, V.; Pomatice, G.; De Placido, S.; Bianco, A. R.; Tortora, G. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* **2000**, *6*, 2053-2063.

- [56] Cohen, M. H.; Williams, G. A.; Sridhara, R.; Chen, G.; Pazdur, R. FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets. *Oncologist* **2003**, *8*, 303-306.
- [57] Cohen, M. H.; Johnson, J. R.; Chen, Y. F.; Sridhara, R.; Pazdur, R. FDA drug approval summary: erlotinib (Tarceva) tablets. *Oncologist* **2005**, *10*, 461-466.
- [58] Kris, M. G.; Natale, R. B.; Herbst, R. S.; Lynch, T. J., Jr.; Prager, D.; Belani, C. P.; Schiller, J. H.; Kelly, K.; Spiridonidis, H.; Sandler, A.; Albain, K. S.; Cella, D.; Wolf, M. K.; Averbuch, S. D.; Ochs, J. J.; Kay, A. C. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* **2003**, *290*, 2149-2158.
- [59] Fukuoka, M.; Yano, S.; Giaccone, G.; Tamura, T.; Nakagawa, K.; Douillard, J. Y.; Nishiwaki, Y.; Vansteenkiste, J.; Kudoh, S.; Rischin, D.; Eek, R.; Horai, T.; Noda, K.; Takata, I.; Smit, E.; Averbuch, S.; Macleod, A.; Feyereislova, A.; Dong, R. P.; Baselga, J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol* **2003**, *21*, 2237-2246.
- [60] Shepherd, F. A.; Rodrigues Pereira, J.; Ciuleanu, T.; Tan, E. H.; Hirsh, V.; Thongprasert, S.; Campos, D.; Maoleekoonpiroj, S.; Smylie, M.; Martins, R.; van Kooten, M.; Dediu, M.; Findlay, B.; Tu, D.; Johnston, D.; Bezjak, A.; Clark, G.; Santabarbara, P.; Seymour, L.; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **2005**, *353*, 123-132.
- [61] Lynch, T. J.; Bell, D. W.; Sordella, R.; Gurubhagavatula, S.; Okimoto, R. A.; Brannigan, B. W.; Harris, P. L.; Haserlat, S. M.; Supko, J. G.; Haluska, F. G.; Louis, D. N.; Christiani, D. C.; Settleman, J.; Haber, D. A. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **2004**, *350*, 2129-2139.
- [62] Paez, J. G.; Jänne, P. A.; Lee, J. C.; Tracy, S.; Greulich, H.; Gabriel, S.; Herman, P.; Kaye, F. J.; Lindeman, N.; Boggon, T. J.; Naoki, K.; Sasaki, H.; Fujii, Y.; Eck, M. J.; Sellers, W. R.; Johnson, B. E.; Meyerson, M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **2004**, *304*, 1497-1500.
- [63] Pao, W.; Miller, V.; Zakowski, M.; Doherty, J.; Politi, K.; Sarkaria, I.; Singh, B.; Heelan, R.; Rusch, V.; Fulton, L.; Mardis, E.; Kupfer, D.; Wilson, R.; Kris, M.; Varmus, H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 13306-13311.
- [64] Gazdar, A. F. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* **2009**, *28* Suppl 1, S24-31.
- [65] Yun, C. H.; Boggon, T. J.; Li, Y.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Meyerson, M.; Eck, M. J. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes:

- mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* **2007**, 11, 217-227.
- [66] Sordella, R.; Bell, D. W.; Haber, D. A.; Settleman, J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* **2004**, 305, 1163-1167.
- [67] Carey, K. D.; Garton, A. J.; Romero, M. S.; Kahler, J.; Thomson, S.; Ross, S.; Park, F.; Haley, J. D.; Gibson, N.; Sliwkowski, M. X. Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Res* **2006**, 66, 8163-8171.
- [68] Rosell, R.; Carcereny, E.; Gervais, R.; Vergnenegre, A.; Massuti, B.; Felip, E.; Palmero, R.; Garcia-Gomez, R.; Pallares, C.; Sanchez, J. M.; Porta, R.; Cobo, M.; Garrido, P.; Longo, F.; Moran, T.; Insa, A.; De Marinis, F.; Corre, R.; Bover, I.; Illiano, A.; Dansin, E.; de Castro, J.; Milella, M.; Reguart, N.; Altavilla, G.; Jimenez, U.; Provencio, M.; Moreno, M. A.; Terrasa, J.; Muñoz-Langa, J.; Valdivia, J.; Isla, D.; Domine, M.; Molinier, O.; Mazieres, J.; Baize, N.; Garcia-Campelo, R.; Robinet, G.; Rodriguez-Abreu, D.; Lopez-Vivanco, G.; Gebbia, V.; Ferrera-Delgado, L.; Bombaron, P.; Bernabe, R.; Bearz, A.; Artal, A.; Cortesi, E.; Rolfo, C.; Sanchez-Ronco, M.; Drozdowskyj, A.; Queralt, C.; de Aguirre, I.; Ramirez, J. L.; Sanchez, J. J.; Molina, M. A.; Taron, M.; Paz-Ares, L.; Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Français de, P.-C.; Associazione Italiana Oncologia, T. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **2012**, 13, 239-246.
- [69] Mok, T. S.; Wu, Y. L.; Thongprasert, S.; Yang, C. H.; Chu, D. T.; Saijo, N.; Sunpaweravong, P.; Han, B.; Margono, B.; Ichinose, Y.; Nishiwaki, Y.; Ohe, Y.; Yang, J. J.; Chewaskulyong, B.; Jiang, H.; Duffield, E. L.; Watkins, C. L.; Armour, A. A.; Fukuoka, M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* **2009**, 361, 947-957.
- [70] Mitsudomi, T.; Morita, S.; Yatabe, Y.; Negoro, S.; Okamoto, I.; Tsurutani, J.; Seto, T.; Satouchi, M.; Tada, H.; Hirashima, T.; Asami, K.; Katakami, N.; Takada, M.; Yoshioka, H.; Shibata, K.; Kudoh, S.; Shimizu, E.; Saito, H.; Toyooka, S.; Nakagawa, K.; Fukuoka, M.; West Japan Oncology, G. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **2010**, 11, 121-128.
- [71] Douillard, J. Y.; Ostoros, G.; Cobo, M.; Ciuleanu, T.; McCormack, R.; Webster, A.; Milenkova, T. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* **2014**, 110, 55-62.
- [72] Torti, D.; Trusolino, L. Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils. *EMBO Mol Med* **2011**, 3, 623-636.

- [73] Weinstein, I. B. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* **2002**, 297, 63-64.
- [74] Weinstein, I. B. Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* **2000**, 21, 857-864.
- [75] Okimoto, R. A.; Bivona, T. G. Recent advances in personalized lung cancer medicine. *Per Med* **2014**, 11, 309-321.
- [76] Kazandjian, D.; Blumenthal, G. M.; Yuan, W.; He, K.; Keegan, P.; Pazdur, R. FDA Approval of Gefitinib for the Treatment of Patients with Metastatic EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **2016**, 22, 1307-1312.
- [77] Khozin, S.; Blumenthal, G. M.; Jiang, X.; He, K.; Boyd, K.; Murgo, A.; Justice, R.; Keegan, P.; Pazdur, R. U.S. Food and Drug Administration approval summary: Erlotinib for the first-line treatment of metastatic non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 19 deletions or exon 21 (L858R) substitution mutations. *Oncologist* **2014**, 19, 774-779.
- [78] Pao, W.; Miller, V. A.; Politi, K. A.; Riely, G. J.; Somwar, R.; Zakowski, M. F.; Kris, M. G.; Varmus, H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* **2005**, 2, e73.
- [79] Sequist, L. V.; Waltman, B. A.; Dias-Santagata, D.; Digumarthy, S.; Turke, A. B.; Fidias, P.; Bergethon, K.; Shaw, A. T.; Gettinger, S.; Cosper, A. K.; Akhavanfard, S.; Heist, R. S.; Temel, J.; Christensen, J. G.; Wain, J. C.; Lynch, T. J.; Vernovsky, K.; Mark, E. J.; Lanuti, M.; Iafrate, A. J.; Mino-Kenudson, M.; Engelman, J. A. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* **2011**, 3, 75ra26.
- [80] Engel, J.; Lategahn, J.; Rauh, D. Hope and Disappointment: Covalent Inhibitors to Overcome Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *ACS Med Chem Lett* **2016**, 7, 2-5.
- [81] Klüter, S.; Simard, J. R.; Rode, H. B.; Grütter, C.; Pawar, V.; Raaijmakers, H. C.; Barf, T. A.; Rabiller, M.; van Otterlo, W. A.; Rauh, D. Characterization of irreversible kinase inhibitors by directly detecting covalent bond formation: a tool for dissecting kinase drug resistance. *ChemBiochem* **2010**, 11, 2557-2566.
- [82] Sos, M. L.; Rode, H. B.; Heynck, S.; Peifer, M.; Fischer, F.; Klüter, S.; Pawar, V. G.; Reuter, C.; Heuckmann, J. M.; Weiss, J.; Ruddigkeit, L.; Rabiller, M.; Koker, M.; Simard, J. R.; Getlik, M.; Yuza, Y.; Chen, T. H.; Greulich, H.; Thomas, R. K.; Rauh, D. Chemogenomic profiling provides insights into the limited activity of irreversible EGFR Inhibitors in tumor cells expressing the T790M EGFR resistance mutation. *Cancer Res* **2010**, 70, 868-874.
- [83] Michalczyk, A.; Klüter, S.; Rode, H. B.; Simard, J. R.; Grütter, C.; Rabiller, M.; Rauh, D. Structural insights into how irreversible inhibitors can overcome drug resistance in EGFR. *Bioorg Med Chem* **2008**, 16, 3482-3488.
- [84] Mulloy, R.; Ferrand, A.; Kim, Y.; Sordella, R.; Bell, D. W.; Haber, D. A.; Anderson, K. S.; Settleman, J. Epidermal growth factor receptor mutants from human lung

- cancers exhibit enhanced catalytic activity and increased sensitivity to gefitinib. *Cancer Res* **2007**, 67, 2325-2330.
- [85] Yun, C. H.; Mengwasser, K. E.; Toms, A. V.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Wong, K. K.; Meyerson, M.; Eck, M. J. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, 105, 2070-2075.
- [86] Engelman, J. A.; Zejnullahu, K.; Mitsudomi, T.; Song, Y.; Hyland, C.; Park, J. O.; Lindeman, N.; Gale, C. M.; Zhao, X.; Christensen, J.; Kosaka, T.; Holmes, A. J.; Rogers, A. M.; Cappuzzo, F.; Mok, T.; Lee, C.; Johnson, B. E.; Cantley, L. C.; Jänne, P. A. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* **2007**, 316, 1039-1043.
- [87] Lackner, M. R.; Wilson, T. R.; Settleman, J. Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies. *Future Oncol* **2012**, 8, 999-1014.
- [88] Groenendijk, F. H.; Bernards, R. Drug resistance to targeted therapies: déjà vu all over again. *Mol Oncol* **2014**, 8, 1067-1083.
- [89] Barouch-Bentov, R.; Sauer, K. Mechanisms of drug resistance in kinases. *Expert Opin Investig Drugs* **2011**, 20, 153-208.
- [90] Wang, W. L.; Conley, A.; Reynoso, D.; Nolden, L.; Lazar, A. J.; George, S.; Trent, J. C. Mechanisms of resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* **2011**, 67 Suppl 1, S15-24.
- [91] Engelman, J. A.; Zejnullahu, K.; Gale, C. M.; Lifshits, E.; Gonzales, A. J.; Shimamura, T.; Zhao, F.; Vincent, P. W.; Naumov, G. N.; Bradner, J. E.; Althaus, I. W.; Gandhi, L.; Shapiro, G. I.; Nelson, J. M.; Heymach, J. V.; Meyerson, M.; Wong, K. K.; Jänne, P. A. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer Res* **2007**, 67, 11924-11932.
- [92] Kwak, E. L.; Sordella, R.; Bell, D. W.; Godin-Heymann, N.; Okimoto, R. A.; Brannigan, B. W.; Harris, P. L.; Driscoll, D. R.; Fidias, P.; Lynch, T. J.; Rabindran, S. K.; McGinnis, J. P.; Wissner, A.; Sharma, S. V.; Isselbacher, K. J.; Settleman, J.; Haber, D. A. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, 7665-7670.
- [93] Gonzales, A. J.; Hook, K. E.; Althaus, I. W.; Ellis, P. A.; Trachet, E.; Delaney, A. M.; Harvey, P. J.; Ellis, T. A.; Amato, D. M.; Nelson, J. M.; Fry, D. W.; Zhu, T.; Loi, C. M.; Fakhoury, S. A.; Schlosser, K. M.; Sexton, K. E.; Winters, R. T.; Reed, J. E.; Bridges, A. J.; Lettiere, D. J.; Baker, D. A.; Yang, J.; Lee, H. T.; Tecle, H.; Vincent, P. W. Antitumor activity and pharmacokinetic properties of PF-00299804, a second-generation irreversible pan-erbB receptor tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther* **2008**, 7, 1880-1889.
- [94] Li, D.; Ambrogio, L.; Shimamura, T.; Kubo, S.; Takahashi, M.; Chirieac, L. R.; Padera, R. F.; Shapiro, G. I.; Baum, A.; Himmelsbach, F.; Rettig, W. J.; Meyerson, M.; Solca, F.; Greulich, H.; Wong, K. K. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* **2008**, 27, 4702-4711.

- [95] Barf, T.; Kaptein, A. Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks. *J Med Chem* **2012**, *55*, 6243-6262.
- [96] Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 307-317.
- [97] Lewandowicz, A.; Tyler, P. C.; Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Schramm, V. L. Achieving the ultimate physiological goal in transition state analogue inhibitors for purine nucleoside phosphorylase. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 31465-31468.
- [98] Tummino, P. J.; Copeland, R. A. Residence time of receptor-ligand complexes and its effect on biological function. *Biochemistry* **2008**, *47*, 5481-5492.
- [99] Smith, A. J.; Zhang, X.; Leach, A. G.; Houk, K. N. Beyond picomolar affinities: quantitative aspects of noncovalent and covalent binding of drugs to proteins. *J Med Chem* **2009**, *52*, 225-233.
- [100] Singh, J.; Dobrusin, E. M.; Fry, D. W.; Haske, T.; Whitty, A.; McNamara, D. J. Structure-based design of a potent, selective, and irreversible inhibitor of the catalytic domain of the erbB receptor subfamily of protein tyrosine kinases. *J Med Chem* **1997**, *40*, 1130-1135.
- [101] Wu, S.; Luo Howard, H.; Wang, H.; Zhao, W.; Hu, Q.; Yang, Y. Cysteinome: The first comprehensive database for proteins with targetable cysteine and their covalent inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **2016**, *478*, 1268-1273.
- [102] Liu, Q.; Sabnis, Y.; Zhao, Z.; Zhang, T.; Buhrlage, S. J.; Jones, L. H.; Gray, N. S. Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome. *Chem Biol* **2013**, *20*, 146-159.
- [103] Kortemme, T.; Creighton, T. E. Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family. *J Mol Biol* **1995**, *253*, 799-812.
- [104] Katakami, N.; Atagi, S.; Goto, K.; Hida, T.; Horai, T.; Inoue, A.; Ichinose, Y.; Koboyashi, K.; Takeda, K.; Kiura, K.; Nishio, K.; Seki, Y.; Ebisawa, R.; Shahidi, M.; Yamamoto, N. LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J Clin Oncol* **2013**, *31*, 3335-3341.
- [105] Miller, V. A.; Hirsh, V.; Cadranel, J.; Chen, Y. M.; Park, K.; Kim, S. W.; Zhou, C.; Su, W. C.; Wang, M.; Sun, Y.; Heo, D. S.; Crino, L.; Tan, E. H.; Chao, T. Y.; Shahidi, M.; Cong, X. J.; Lorence, R. M.; Yang, J. C. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol* **2012**, *13*, 528-538.
- [106] Sequist, L. V.; Besse, B.; Lynch, T. J.; Miller, V. A.; Wong, K. K.; Gitlitz, B.; Eaton, K.; Zacharchuk, C.; Freyman, A.; Powell, C.; Ananthakrishnan, R.; Quinn, S.; Soria, J. C. Neratinib, an irreversible pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor: results of a phase II trial in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **2010**, *28*, 3076-3083.

- [107] Heuckmann, J. M.; Rauh, D.; Thomas, R. K. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling and covalent EGFR inhibition in lung cancer. *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 3417-3420.
- [108] Copeland, R. A.; Pompliano, D. L.; Meek, T. D. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 730-739.
- [109] Schwartz, P. A.; Kuzmic, P.; Solowiej, J.; Bergqvist, S.; Bolanos, B.; Almaden, C.; Nagata, A.; Ryan, K.; Feng, J.; Dalvie, D.; Kath, J. C.; Xu, M.; Wani, R.; Murray, B. W. Covalent EGFR inhibitor analysis reveals importance of reversible interactions to potency and mechanisms of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 173-178.
- [110] Zhou, W.; Ercan, D.; Chen, L.; Yun, C. H.; Li, D.; Capelletti, M.; Cortot, A. B.; Chirieac, L.; Jacob, R. E.; Padera, R.; Engen, J. R.; Wong, K. K.; Eck, M. J.; Gray, N. S.; Jänne, P. A. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature* **2009**, *462*, 1070-1074.
- [111] Zhou, W.; Ercan, D.; Jänne, P. A.; Gray, N. S. Discovery of selective irreversible inhibitors for EGFR-T790M. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, *21*, 638-643.
- [112] Cross, D. A.; Ashton, S. E.; Ghiorghiu, S.; Eberlein, C.; Nebhan, C. A.; Spitzler, P. J.; Orme, J. P.; Finlay, M. R.; Ward, R. A.; Mellor, M. J.; Hughes, G.; Rahi, A.; Jacobs, V. N.; Red Brewer, M.; Ichihara, E.; Sun, J.; Jin, H.; Ballard, P.; Al-Kadhimi, K.; Rowlinson, R.; Klinowska, T.; Richmond, G. H.; Cantarini, M.; Kim, D. W.; Ranson, M. R.; Pao, W. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* **2014**, *4*, 1046-1061.
- [113] Walter, A. O.; Sjin, R. T.; Haringsma, H. J.; Ohashi, K.; Sun, J.; Lee, K.; Dubrovskiy, A.; Labenski, M.; Zhu, Z.; Wang, Z.; Sheets, M.; St Martin, T.; Karp, R.; van Kalken, D.; Chaturvedi, P.; Niu, D.; Nacht, M.; Petter, R. C.; Westlin, W.; Lin, K.; Jaw-Tsai, S.; Raponi, M.; Van Dyke, T.; Etter, J.; Weaver, Z.; Pao, W.; Singh, J.; Simmons, A. D.; Harding, T. C.; Allen, A. Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC. *Cancer Discov* **2013**, *3*, 1404-1415.
- [114] Lelais, G.; Epple, R.; Marsilje, T. H.; Long, Y. O.; McNeill, M.; Chen, B.; Lu, W.; Anumolu, J.; Badiger, S.; Bursulaya, B.; DiDonato, M.; Fong, R.; Juarez, J.; Li, J.; Manuia, M.; Mason, D. E.; Gordon, P.; Groessel, T.; Johnson, K.; Jia, Y.; Kasibhatla, S.; Li, C.; Isbell, J.; Spraggon, G.; Bender, S.; Michellys, P. Y. Discovery of (R,E)-N-(7-Chloro-1-(1-[4-(dimethylamino)but-2-enoyl]azepan-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methylisonicotinamide (EGF816), a Novel, Potent, and WT Sparing Covalent Inhibitor of Oncogenic (L858R, ex19del) and Resistant (T790M) EGFR Mutants for the Treatment of EGFR Mutant Non-Small-Cell Lung Cancers. *J Med Chem* **2016**, *59*, 6671-6689.
- [115] Pierce, A. C.; ter Haar, E.; Binch, H. M.; Kay, D. P.; Patel, S. R.; Li, P. CH...O and CH...N hydrogen bonds in ligand design: a novel quinazolin-4-ylthiazol-2-ylamine protein kinase inhibitor. *J Med Chem* **2005**, *48*, 1278-1281.
- [116] Blair, J. A.; Rauh, D.; Kung, C.; Yun, C. H.; Fan, Q. W.; Rode, H.; Zhang, C.; Eck, M. J.; Weiss, W. A.; Shokat, K. M. Structure-guided development of affinity probes for tyrosine kinases using chemical genetics. *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 229-238.

- [117] Ward, R. A.; Anderton, M. J.; Ashton, S.; Bethel, P. A.; Box, M.; Butterworth, S.; Colclough, N.; Chorley, C. G.; Chuaqui, C.; Cross, D. A.; Dakin, L. A.; Debreczeni, J. É.; Eberlein, C.; Finlay, M. R.; Hill, G. B.; Grist, M.; Klinowska, T. C.; Lane, C.; Martin, S.; Orme, J. P.; Smith, P.; Wang, F.; Waring, M. J. Structure- and reactivity-based development of covalent inhibitors of the activating and gatekeeper mutant forms of the epidermal growth factor receptor (EGFR). *J Med Chem* **2013**, *56*, 7025-7048.
- [118] Wissner, A.; Mansour, T. S. The development of HKI-272 and related compounds for the treatment of cancer. *Arch Pharm (Weinheim)* **2008**, *341*, 465-477.
- [119] Engel, J.; Richters, A.; Getlik, M.; Tomassi, S.; Keul, M.; Termathe, M.; Lategahn, J.; Becker, C.; Mayer-Wrangowski, S.; Grütter, C.; Uhlenbrock, N.; Krüll, J.; Schaumann, N.; Eppmann, S.; Kibies, P.; Hoffgaard, F.; Heil, J.; Menninger, S.; Ortiz-Cuaran, S.; Heuckmann, J. M.; Tinnefeld, V.; Zahedi, R. P.; Sos, M. L.; Schultz-Fademrecht, C.; Thomas, R. K.; Kast, S. M.; Rauh, D. Targeting Drug Resistance in EGFR with Covalent Inhibitors: A Structure-Based Design Approach. *J Med Chem* **2015**, *58*, 6844-6863.
- [120] Alsenz, J.; Kansy, M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv Drug Deliv Rev* **2007**, *59*, 546-567.
- [121] Teksin, Z. S.; Seo, P. R.; Polli, J. E. Comparison of drug permeabilities and BCS classification: three lipid-component PAMPA system method versus Caco-2 monolayers. *AAPS J* **2010**, *12*, 238-241.
- [122] Artursson, P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* **1990**, *79*, 476-482.
- [123] Artursson, P.; Karlsson, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, *175*, 880-885.
- [124] Krippendorff, B. F.; Neuhaus, R.; Lienau, P.; Reichel, A.; Huisinga, W. Mechanism-based inhibition: deriving K(I) and k(inact) directly from time-dependent IC(50) values. *J Biomol Screen* **2009**, *14*, 913-923.
- [125] Tomassi, S.; Lategahn, J.; Engel, J.; Keul, M.; Tumbrink, H. L.; Ketzer, J.; Mühlenberg, T.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Bauer, S.; Rauh, D. Indazole-Based Covalent Inhibitors To Target Drug-Resistant Epidermal Growth Factor Receptor. *J Med Chem* **2017**, *60*, 2361-2372.
- [126] Finlay, M. R.; Anderton, M.; Ashton, S.; Ballard, P.; Bethel, P. A.; Box, M. R.; Bradbury, R. H.; Brown, S. J.; Butterworth, S.; Campbell, A.; Chorley, C.; Colclough, N.; Cross, D. A.; Currie, G. S.; Grist, M.; Hassall, L.; Hill, G. B.; James, D.; James, M.; Kemmitt, P.; Klinowska, T.; Lamont, G.; Lamont, S. G.; Martin, N.; McFarland, H. L.; Mellor, M. J.; Orme, J. P.; Perkins, D.; Perkins, P.; Richmond, G.; Smith, P.; Ward, R. A.; Waring, M. J.; Whittaker, D.; Wells, S.; Wrigley, G. L. Discovery of a potent and selective EGFR inhibitor (AZD9291) of both sensitizing and T790M resistance mutations that spares the wild type form of the receptor. *J Med Chem* **2014**, *57*, 8249-8267.

- [127] Hanke, J. H.; Gardner, J. P.; Dow, R. L.; Changelian, P. S.; Brissette, W. H.; Weringer, E. J.; Pollok, B. A.; Connelly, P. A. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* **1996**, 271, 695-701.
- [128] Schindler, T.; Sicheri, F.; Pico, A.; Gazit, A.; Levitzki, A.; Kuriyan, J. Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cell* **1999**, 3, 639-648.
- [129] Byrd, J. C.; Furman, R. R.; Coutre, S. E.; Flinn, I. W.; Burger, J. A.; Blum, K. A.; Grant, B.; Sharman, J. P.; Coleman, M.; Wierda, W. G.; Jones, J. A.; Zhao, W.; Heerema, N. A.; Johnson, A. J.; Sukbuntherng, J.; Chang, B. Y.; Clow, F.; Hedrick, E.; Buggy, J. J.; James, D. F.; O'Brien, S. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **2013**, 369, 32-42.
- [130] Wang, M. L.; Rule, S.; Martin, P.; Goy, A.; Auer, R.; Kahl, B. S.; Jurczak, W.; Advani, R. H.; Romaguera, J. E.; Williams, M. E.; Barrientos, J. C.; Chmielowska, E.; Radford, J.; Stilgenbauer, S.; Dreyling, M.; Jdrzejczak, W. W.; Johnson, P.; Spurgeon, S. E.; Li, L.; Zhang, L.; Newberry, K.; Ou, Z.; Cheng, N.; Fang, B.; McGreivy, J.; Clow, F.; Buggy, J. J.; Chang, B. Y.; Beaupre, D. M.; Kunkel, L. A.; Blum, K. A. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med* **2013**, 369, 507-516.
- [131] Xu, T.; Zhang, L.; Xu, S.; Yang, C. Y.; Luo, J.; Ding, F.; Lu, X.; Liu, Y.; Tu, Z.; Li, S.; Pei, D.; Cai, Q.; Li, H.; Ren, X.; Wang, S.; Ding, K. Pyrimido[4,5-d]pyrimidin-4(1H)-one derivatives as selective inhibitors of EGFR threonine790 to methionine790 (T790M) mutants. *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, 52, 8387-8390.
- [132] Chang, S.; Zhang, L.; Xu, S.; Luo, J.; Lu, X.; Zhang, Z.; Xu, T.; Liu, Y.; Tu, Z.; Xu, Y.; Ren, X.; Geng, M.; Ding, J.; Pei, D.; Ding, K. Design, synthesis, and biological evaluation of novel conformationally constrained inhibitors targeting epidermal growth factor receptor threonine(7)(9)(0) --> methionine(7)(9)(0) mutant. *J Med Chem* **2012**, 55, 2711-2723.
- [133] Zapf, C. W.; Gerstenberger, B. S.; Xing, L.; Limburg, D. C.; Anderson, D. R.; Caspers, N.; Han, S.; Aulabaugh, A.; Kurumbail, R.; Shakya, S.; Li, X.; Spaulding, V.; Czerwinski, R. M.; Seth, N.; Medley, Q. G. Covalent inhibitors of interleukin-2 inducible T cell kinase (itk) with nanomolar potency in a whole-blood assay. *J Med Chem* **2012**, 55, 10047-10063.
- [134] Tatton, L.; Morley, G. M.; Chopra, R.; Khwaja, A. The Src-selective kinase inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases. *J Biol Chem* **2003**, 278, 4847-4853.
- [135] Chartier, M.; Chenard, T.; Barker, J.; Najmanovich, R. Kinome Render: a stand-alone and web-accessible tool to annotate the human protein kinome tree. *PeerJ* **2013**, 1, e126.
- [136] Honigberg, L. A.; Smith, A. M.; Sirisawad, M.; Verner, E.; Loury, D.; Chang, B.; Li, S.; Pan, Z.; Thamm, D. H.; Miller, R. A.; Buggy, J. J. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, 13075-13080.

- [137] Hur, W.; Velentza, A.; Kim, S.; Flatauer, L.; Jiang, X.; Valente, D.; Mason, D. E.; Suzuki, M.; Larson, B.; Zhang, J.; Zagorska, A.; Didonato, M.; Nagle, A.; Warmuth, M.; Balk, S. P.; Peters, E. C.; Gray, N. S. Clinical stage EGFR inhibitors irreversibly alkylate Bmx kinase. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, 18, 5916-5919.
- [138] Wallace, A. C.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* **1995**, 8, 127-134.
- [139] Shibata, Y.; Chiba, M. The role of extrahepatic metabolism in the pharmacokinetics of the targeted covalent inhibitors afatinib, ibrutinib, and neratinib. *Drug Metab Dispos* **2015**, 43, 375-384.
- [140] Dickinson, P. A.; Cantarini, M. V.; Collier, J.; Frewer, P.; Martin, S.; Pickup, K.; Ballard, P. Metabolic Disposition of Osimertinib in Rats, Dogs, and Humans: Insights into a Drug Designed to Bind Covalently to a Cysteine Residue of Epidermal Growth Factor Receptor. *Drug Metab Dispos* **2016**, 44, 1201-1212.
- [141] Food and Drug Administration, F. Ibrutinib, Pharmacology Review(s). In 2013.
- [142] Heuberger, J.; Schmidt, S.; Derendorf, H. When is protein binding important? *J Pharm Sci* **2013**, 102, 3458-3467.
- [143] Melvin Reichman, H. G. Automated Drug Screening for ADMET Properties. In *Drug Metabolism Handbook: Concepts and Applications*, Nassar, A. F., Ed. Wiley: 2009; p 150.
- [144] Cameron, F.; Sanford, M. Ibrutinib: first global approval. *Drugs* **2014**, 74, 263-271.
- [145] Jänne, P. A.; Yang, J. C.; Kim, D. W.; Planchard, D.; Ohe, Y.; Ramalingam, S. S.; Ahn, M. J.; Kim, S. W.; Su, W. C.; Horn, L.; Haggstrom, D.; Felip, E.; Kim, J. H.; Frewer, P.; Cantarini, M.; Brown, K. H.; Dickinson, P. A.; Ghiorghiu, S.; Ranson, M. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **2015**, 372, 1689-1699.
- [146] Sequist, L. V.; Soria, J. C.; Goldman, J. W.; Wakelee, H. A.; Gadgeel, S. M.; Varga, A.; Papadimitrakopoulou, V.; Solomon, B. J.; Oxnard, G. R.; Dziadziuszko, R.; Aisner, D. L.; Doebele, R. C.; Galasso, C.; Garon, E. B.; Heist, R. S.; Logan, J.; Neal, J. W.; Mendenhall, M. A.; Nichols, S.; Piotrowska, Z.; Wozniak, A. J.; Raponi, M.; Karlovich, C. A.; Jaw-Tsai, S.; Isaacson, J.; Despaigne, D.; Matheny, S. L.; Rolfe, L.; Allen, A. R.; Camidge, D. R. Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **2015**, 372, 1700-1709.
- [147] Mok, T. S.; Wu, Y. L.; Ahn, M. J.; Garassino, M. C.; Kim, H. R.; Ramalingam, S. S.; Shepherd, F. A.; He, Y.; Akamatsu, H.; Theelen, W. S.; Lee, C. K.; Sebastian, M.; Templeton, A.; Mann, H.; Marotti, M.; Ghiorghiu, S.; Papadimitrakopoulou, V. A.; Investigators, A. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* **2017**, 376, 629-640.
- [148] Sequist, L. V.; Soria, J. C.; Camidge, D. R. Update to Rociletinib Data with the RECIST Confirmed Response Rate. *N Engl J Med* **2016**, 374, 2296-2297.
- [149] Dhingra, K. Rociletinib: has the TIGER lost a few of its stripes? *Ann Oncol* **2016**, 27, 1161-1164.

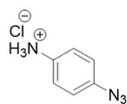
- [150] Niederst, M. J.; Hu, H.; Mulvey, H. E.; Lockerman, E. L.; Garcia, A. R.; Piotrowska, Z.; Sequist, L. V.; Engelman, J. A. The Allelic Context of the C797S Mutation Acquired upon Treatment with Third-Generation EGFR Inhibitors Impacts Sensitivity to Subsequent Treatment Strategies. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 3924-3933.
- [151] Thress, K. S.; Paweletz, C. P.; Felip, E.; Cho, B. C.; Stetson, D.; Dougherty, B.; Lai, Z.; Markovets, A.; Vivancos, A.; Kuang, Y.; Ercan, D.; Matthews, S. E.; Cantarini, M.; Barrett, J. C.; Jänne, P. A.; Oxnard, G. R. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med* **2015**, *21*, 560-562.
- [152] Engel, J.; Smith, S.; Lategahn, J.; Tumberink, H. L.; Goebel, L.; Becker, C.; Hennes, E.; Keul, M.; Unger, A.; Müller, H.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Günther, G.; Hengstler, J. G.; Rauh, D. Structure-Guided Development of Covalent and Mutant-Selective Pyrazolopyrimidines to Target T790M Drug Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor. *J Med Chem* **2017**, *60*, 7725-7744.
- [153] Engel, J.; Becker, C.; Lategahn, J.; Keul, M.; Ketzer, J.; Mühlenberg, T.; Kollipara, L.; Schultz-Fademrecht, C.; Zahedi, R. P.; Bauer, S.; Rauh, D. Insight into the Inhibition of Drug-Resistant Mutants of the Receptor Tyrosine Kinase EGFR. *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55*, 10909-10912.
- [154] Rideout, D. Self-assembling cytotoxins. *Science* **1986**, *233*, 561-563.
- [155] Rideout, D.; Calogeropoulou, T.; Jaworski, J.; McCarthy, M. Synergism through direct covalent bonding between agents: a strategy for rational design of chemotherapeutic combinations. *Biopolymers* **1990**, *29*, 247-262.
- [156] Mocharla, V. P.; Colasson, B.; Lee, L. V.; Röper, S.; Sharpless, K. B.; Wong, C. H.; Kolb, H. C. In situ click chemistry: enzyme-generated inhibitors of carbonic anhydrase II. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *44*, 116-120.
- [157] Lehn, J. M.; Eliseev, A. V. Dynamic combinatorial chemistry. *Science* **2001**, *291*, 2331-2332.
- [158] Erlanson, D. A.; Braisted, A. C.; Raphael, D. R.; Randal, M.; Stroud, R. M.; Gordon, E. M.; Wells, J. A. Site-directed ligand discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 9367-9372.
- [159] Kehoe, J. W.; Maly, D. J.; Verdugo, D. E.; Armstrong, J. I.; Cook, B. N.; Ouyang, Y. B.; Moore, K. L.; Ellman, J. A.; Bertozzi, C. R. Tyrosylprotein sulfotransferase inhibitors generated by combinatorial target-guided ligand assembly. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12*, 329-332.
- [160] Maly, D. J.; Choong, I. C.; Ellman, J. A. Combinatorial target-guided ligand assembly: identification of potent subtype-selective c-Src inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 2419-2424.
- [161] Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radić, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, *41*, 1053-1057.

- [162] Nguyen, R.; Huc, I. Using an Enzyme's Active Site To Template Inhibitors This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and by the Ecole Polytechnique (predoctoral fellowship to R.N.). We thank Prof. Jean-Marie Lehn for stimulating discussions. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*, 1774-1776.
- [163] Nonoo, R. H.; Armstrong, A.; Mann, D. J. Kinetic template-guided tethering of fragments. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 2082-2086.
- [164] Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions – Introduction, Survey, Mechanism. In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Wiley, Ed. A. Padwa: New York, 1984; pp 1-176.
- [165] Manetsch, R.; Krasiński, A.; Radić, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. In situ click chemistry: enzyme inhibitors made to their own specifications. *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 12809-12818.
- [166] Erlanson, D. A.; Lam, J. W.; Wiesmann, C.; Luong, T. N.; Simmons, R. L.; DeLano, W. L.; Choong, I. C.; Burdett, M. T.; Flanagan, W. M.; Lee, D.; Gordon, E. M.; O'Brien, T. In situ assembly of enzyme inhibitors using extended tethering. *Nat Biotechnol* **2003**, *21*, 308-314.
- [167] Long, M. J.; Poganik, J. R.; Aye, Y. On-Demand Targeting: Investigating Biology with Proximity-Directed Chemistry. *J Am Chem Soc* **2016**, *138*, 3610-3622.
- [168] Zhao, Z.; Liu, Q.; Bliven, S.; Xie, L.; Bourne, P. E. Determining Cysteines Available for Covalent Inhibition Across the Human Kinome. *J Med Chem* **2017**, *60*, 2879-2889.
- [169] Korb, O.; Stützel, T.; Exner, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J Chem Inf Model* **2009**, *49*, 84-96.
- [170] Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* **1997**, *267*, 727-748.
- [171] Richters, A.; Basu, D.; Engel, J.; Ercanoglu, M. S.; Balke-Want, H.; Tesch, R.; Thomas, R. K.; Rauh, D. Identification and further development of potent TBK1 inhibitors. *ACS Chem Biol* **2015**, *10*, 289-298.
- [172] Zhang, Z.; Marshall, A. G. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J Am Soc Mass Spectrom* **1998**, *9*, 225-233.
- [173] Kessner, D.; Chambers, M.; Burke, R.; Agus, D.; Mallick, P. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics* **2008**, *24*, 2534-2536.
- [174] Koenig, T.; Menze, B. H.; Kirchner, M.; Monigatti, F.; Parker, K. C.; Patterson, T.; Steen, J. J.; Hamprecht, F. A.; Steen, H. Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. *J Proteome Res* **2008**, *7*, 3708-3717.
- [175] <http://www.quattro-research.de/>.

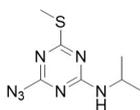
- [176] Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Xie, S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed* **2010**, *99*, 306-314.
- [177] Stewart, J. J. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J Mol Model* **2007**, *13*, 1173-1213.

10 Anhang

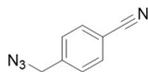
10.1 Azidbibliothek



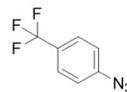
AF1



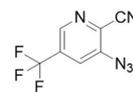
AF2



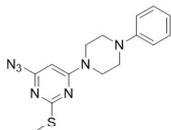
AF3



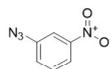
AF4



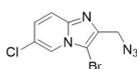
AF5



AF6



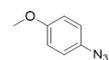
AF7



AF8



AF9



AF10



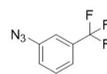
AF11



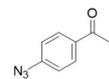
AF12



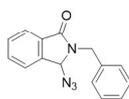
AF13



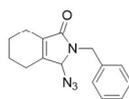
AF14



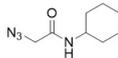
AF15



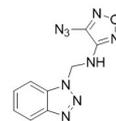
AF16



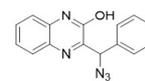
AF17



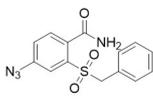
AF18



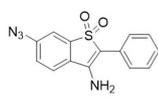
AF19



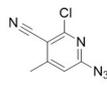
AF20



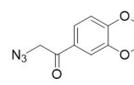
AF21



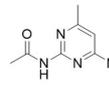
AF22



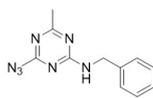
AF23



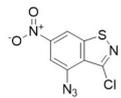
AF24



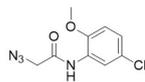
AF25



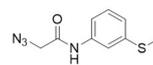
AF26



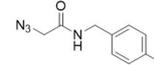
AF27



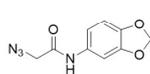
AF28



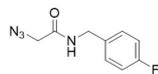
AF29



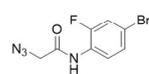
AF30



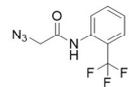
AF32



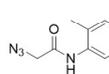
AF33



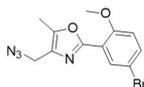
AF34



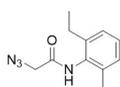
AF35



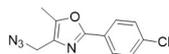
AF36



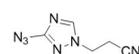
AF37



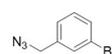
AF38



AF39



AF40



AF42

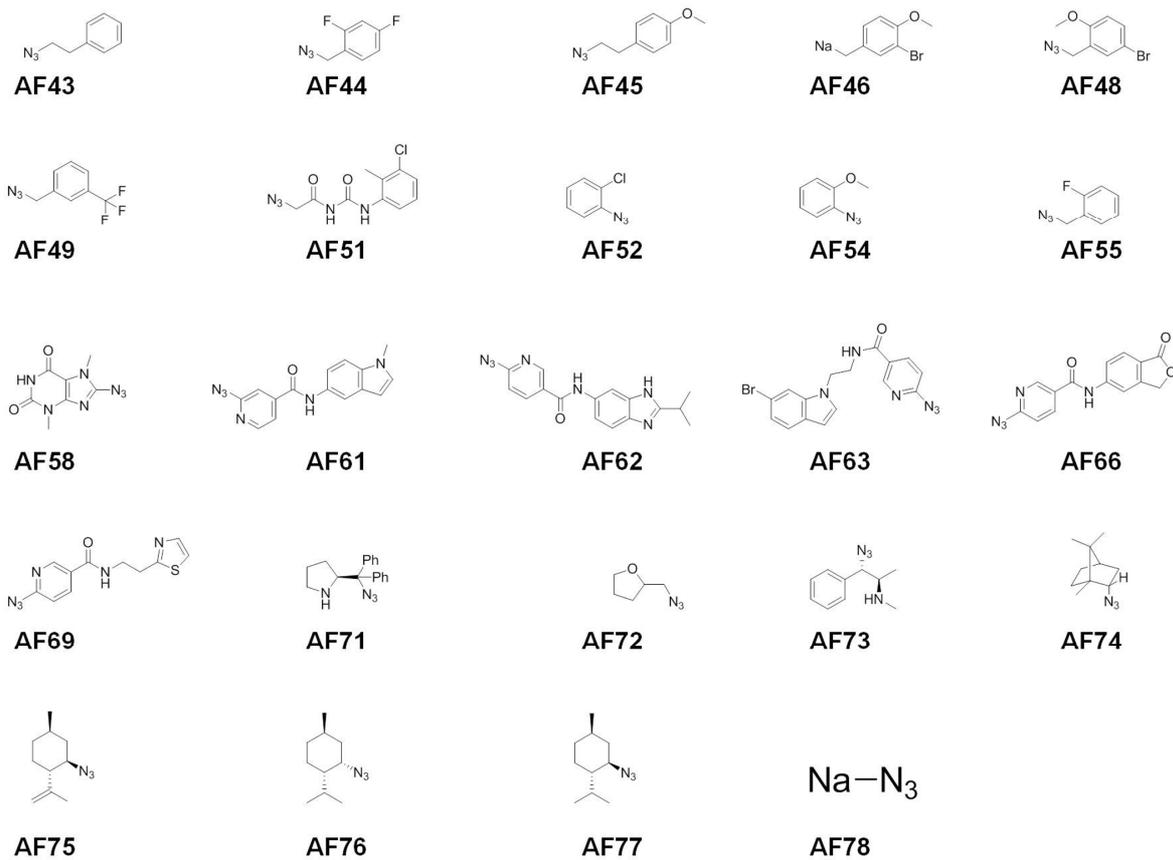


Abbildung 10.1: Azidbibliothek bestehend aus 64 Azidfragmenten. **AF1** und **AF2** wurden von der Firma VWR, **AF3**, **AF4** und **AF78** von Sigma-Aldrich, **AF5** und **AF6** von Key Organics, **AF7-AF15** von Enamine, **AF16-AF30**, **AF32-AF40**, **AF42-AF46**, **AF48**, **AF49**, **AF51**, **AF52**, **AF54**, **AF55**, **AF58**, **AF61-AF63**, **AF66** und **AF69** von Vitas-M Laboratory bezogen. Die Azide **AF71-AF77** stammten aus der internen AK Rau Substanzbibliothek.

10.2 Massenspektrometrie

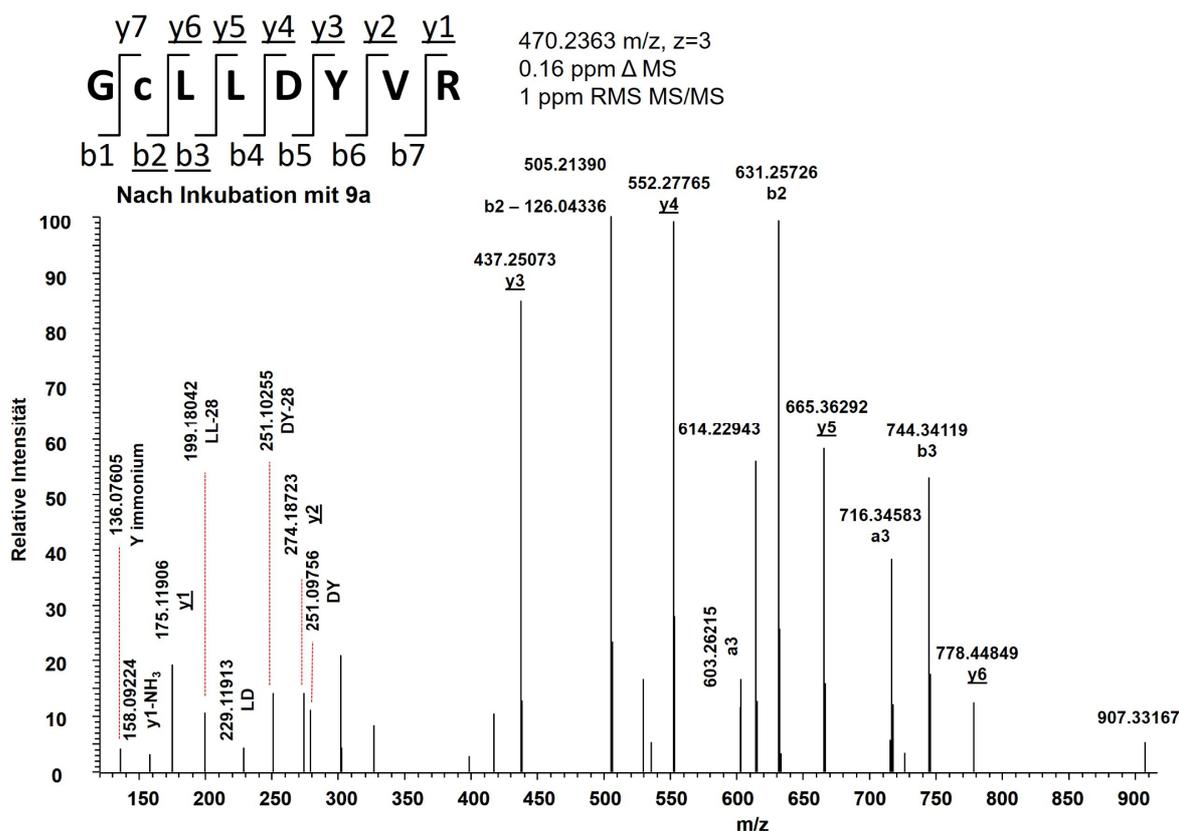


Abbildung 10.2: Fragment-Ion-Spektrum des Peptids GC₇₉₇LLDYVR nach Subtilisin-Verdau von EGFR-T790M nach Inkubation mit **9a**. Die Cys₇₉₇ beinhaltenen Peptidfragmente (z. B. b₃) zeigen eine Massendifferenz, die dem Inhibitor **9a** entspricht, wohingegen die Fragmente ohne Cys₇₉₇ (z. B. y₅ und y₆) die gleiche Masse verglichen mit der carbamidomethylierten Kontrolle aufweisen. Das Fragmentierungsmuster des Peptids GCLLDYVR bestätigt eindeutig die Modifikation des Cys₇₉₇ mit **9a**.

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Engel, Julian

Name, Vorname
(Surname, first name)

113688

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

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:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Dortmund, den

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Strukturbasiertes Design und Entwicklung kovalenter Kinaseinhibitoren

zur Umgehung der durch EGFR-T790M vermittelten Wirkstoffresistenz

im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom

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.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.

Dortmund, den

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)