

Struktur-basiertes Design, Synthese und Evaluation
von Sondenmolekülen und Wirkstoffkandidaten
zur Adressierung der Proteinkinase Akt

DISSERTATION

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

der Fakultät Chemie und Chemische Biologie
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Niklas Uhlenbrock

aus Wickede (Ruhr)

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
2. Gutachter: Prof. Dr. Paul Czodrowski

Die vorliegende Arbeit entstand in Betreuung von Prof. Dr. Daniel Rauh und wurde im Zeitraum von September 2015 bis April 2019 an der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden bereits in Form von Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften oder im Rahmen der Bachelor- und Masterarbeiten von Laura Depta, Lisa Goebel, Lena Quambusch, Sven Brandherm und Marius Lindemann veröffentlicht und wurden in dieser Dissertation an entsprechender Stelle gekennzeichnet.

Publikationen

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden folgende Publikationen.

Uhlenbrock, N.†; Smith, S.†; Weisner, J.; Landel, I.; Lindemann, M.; Le, T. A.; Hardick, J.; Gontla, R.; Scheinpflug, R.; Czodrowski, P.; Janning, P.; Depta, L.; Quambusch, L.; Müller, M. P.; Engels, B.; Rauh, D., Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase Akt. *Chemical Science* **2019**, 10 (12), 3573-3585.

Weisner, J.†; Landel, I.†; Reintjes, C.†; Uhlenbrock, N.†; Trajkovic-Arsic, M.; Dienstbier, N.; Ladigan, S.; Lindemann, M.; Smith, S.; Quambusch, L.; Scheinpflug, R.; Depta, L.; Gontla, R.; Unger, A.; Müller, H.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Guenther, G.; Maghnouj, A.; Müller, M. P.; Pohl, M.; Teschendorf, C.; Wolters, H.; Viebahn, R.; Tannapfel, A.; Uhl, W.; Hengstler, J.; Hahn, S.; Siveke, J.; Rauh, D., Preclinical Efficacy of Covalent-Allosteric AKT Inhibitor Borussertib in Combination with Trametinib in KRAS-mutant Pancreatic and Colorectal Cancer. *Cancer Research* **2019**, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2861.

Tesch, R.; Becker, C.; Müller, M. P.; Beck, M. E.; Quambusch, L.; Getlik, M.; Lategahn, J.; Uhlenbrock, N.; Costa, F. N.; Poleto, M. D.; Pinheiro, P. S. M.; Rodrigues, D. A.; Sant'Anna, C. M. R.; Ferreira, F. F.; Verli, H.; Fraga, C. A. M.; Rauh, D., An Unusual Intramolecular Halogen Bond Guides Conformational Selection. *Angew Chem Int Ed Engl* **2018**, 57 (31), 9970-9975.

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 (17), 6844-63.

† Diese Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.

Danksagung

Ein großer Dank gilt vor allem meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Rauh, dass er mir in diesem bedeutsamen Projekt Vertrauen geschenkt, mich zu jedem Zeitpunkt individuell gefördert hat sowie jederzeit beratend zur Seite stand. Bei Herrn Prof. Dr. Paul Czodrowski möchte ich mich herzlich sowohl für die Übernahme des Koreferates als auch für die Computerchemischen Hilfestellungen bedanken.

Hinter dem Akt-Projekt stehen inzwischen eine Vielzahl von hervorragenden Wissenschaftlern in der AG Rauh. Für eine stets unkomplizierte und engagierte Zusammenarbeit möchte ich allen voran bei Jörn Weisner und Ina Landel danken, die in allerhand biologischer Fragestellungen wie biochemischen und zellulären Assays oder Strukturbiologie stets zuverlässige Projektpartner waren. Für die Zusammenarbeit in der organischen Synthese möchte ich Dr. Steven Smith, Marius Lindemann, Lena Quambusch, Dr. Rajesh Gontla, Sven Brandherm sowie Laura Depta Dank aussprechen. Zudem möchte ich Julia Hardick für die Durchführung der Metabolismus-Studien danken. Gleichmaßen danke ich Dr. Matthias Müller für Hilfestellungen in strukturbioologischen Fragestellungen. Für das Korrekturlesen dieser Dissertation möchte ich mich bei Dr. Mike Bührmann, Lena Quambusch, Ina Landel und Isabel Prager bedanken.

Gleichmaßen haben zahlreiche Projektpartner maßgeblich zum Erfolg dieses Projektes beigetragen. Im Rahmen des MERCUR-Projekts sind hier die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Jens Siveke vom Universitätsklinikum Essen sowie von Prof. Dr. Stephan Hahn von der Ruhr-Universität Bochum zu nennen, die entscheidend an der *in vivo* Evaluation von Borussertib beteiligt waren. Hier sind insbesondere Dr. Marija Trajkovic-Arsic, Niklas Dienstbier (UK Essen) und Christoph Reintjes (RUB) zu nennen. Ich danke zudem dem Lead Discovery Center Dortmund für eine enge Zusammenarbeit in zahlreichen medizinalchemischen Fragestellungen, insbesondere Dr. Matthias Baumann für die PK-Evaluation sowie Dr. Carsten Schultz-Fademrecht und Dr. Julian Engel für die fruchtbaren Diskussionen und Bereitstellung der Boronsäuren. Der Gruppe um Prof. Dr. Jan Hengstler vom IfADo möchte ich für die Durchführung der *in vivo*-PK-Studien danken. Für die Unterstützung in der Synthese danke ich Dr. Laura Levy und Dr. Thorsten Genski von Taros Chemicals. Darüber hinaus danke ich Dr. Thien Anh Le und Prof. Dr. Bernd Engels von der Julius-Maximilians-Universität Würzburg für die tolle Zusammenarbeit und die vorgenommenen MD-Simulationen. Für Hilfestellungen bei massenspektrometrischen Fragestellungen möchte ich zudem Dr. Petra Janning sowie Jens Warmers vom MPI Dortmund danken. Prof. Dr. Tobias Ritter sowie Jens Rickmeier möchte ich für die belebenden Diskussionen über PET-Sonden meinen Dank aussprechen.

Auf dem HSD11B1-Projekt bin ich Prof. Dr. Michael Hölzel und Daniel Hinze (Universitätsklinikum Bonn) für die interessante Fragestellung und die biologische Evaluation zu Dank verpflichtet. Im Rahmen dieses Projektes danke ich zudem der Gruppe um PD Dr. Iris Helfrich (UK Essen) für die angeregten Diskussionen bedanken.

Ich hatte das große Glück mit einer Vielzahl von engagierten Bachelor- und Masterstudenten zusammenzuarbeiten, deren Abschlussarbeiten ich begleiten durfte. Als Mitglieder der „AG Uhlenbrock“ danke ich daher Laura Depta, Lisa Goebel, Lena Quambusch, Sven Brandherm und Marius Lindemann. Gleichmaßen war es mir eine Freude, die Jahre meiner Promotion in einer guten Arbeitsatmosphäre in einer engen Gemeinschaft verbringen zu dürfen. Neben den bereits genannten Kollegen möchte ich daher Dr. Helena Kaitsiotou, Dr. Jonas Lategahn, Marina Keul, Bianca Wiedemann, Janina Niggenaber, Kirujan Jeyakumar, Dr. Corinna Ottmann, Andreas Arndt, Tobias Grabe, Jonas Warmuth und Patrik Wolle danken. Zudem danke ich Martina Reibner, Petra Alhorn, Maria Sergani und Ulrich Schoppe, ohne deren tadellose Arbeit im Hintergrund wenig laufen würde.

Für die stets zuverlässige Messung von analytischen Daten möchte ich zudem dem NMR-Team um Prof. Dr. Wolf Hiller sowie dem HRMS-Team um Christiane Heitbrink meinen Dank aussprechen. Zudem danke ich der technischen und elektronischen Werkstatt sowie der Glasbläserei der TU Dortmund für die zahlreichen Hilfestellungen.

Einen großen Dank möchte ich letztlich auch meiner Familie und Freunde aussprechen, die mir zu jederzeit ein großer Rückhalt und angenehmer Ausgleich zugleich waren. Allen voran danke ich meinen Eltern, die mir überhaupt erst das Studium ermöglicht und mich auch in schwierigen Zeiten uneingeschränkt unterstützt haben. Für die engagierte Unterstützung möchte ich zudem den Eltern meiner Freundin danken. Den größten Dank möchte ich schließlich meiner Freundin Isabel aussprechen, die jederzeit geduldig war, mich zur rechten Zeit aufgebaut hat und mein bedingungsloser Rückhalt ist, wofür ich sie nicht nur deshalb liebe.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	vii
Danksagung	ix
Inhaltsverzeichnis	xi
Abkürzungsverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1. Präzisionsmedizin in der Krebstherapie.....	1
1.2. Die Proteinkinase Akt.....	3
1.3. Zielgerichtete Adressierung der Proteinkinase Akt	6
1.4. Kovalente und Kovalent-Allosterische Inhibitoren	10
2 Motivation und Zielsetzung	15
3 Ergebnisse und Diskussion	19
3.1. Hochskalierung der Borussertib-Synthese.....	19
3.2. Präklinische Charakterisierung von Borussertib	29
3.2.1. Pharmakokinetische Profilierung von Borussertib.....	29
3.2.2. Evaluierung von Borussertib in PDX-Modellen	32
3.3. SAR-Untersuchungen von CAAs	36
3.3.1. Struktur-basierter Design-Ansatz	36
3.3.2. Struktur-basierte Derivatisierung.....	39
3.3.3. Biochemische Charakterisierung und SAR Analyse	50
3.3.4. Strukturanalyse der CAAs	56
3.3.5. Zelluläre Charakterisierung.....	60
3.3.6. Schlussfolgerungen der SAR-Untersuchungen	62
3.4. Medizinalchemische Optimierung	63
3.4.1. <i>in vitro</i> -PK-Studie von CAAs.....	63
3.4.2. Grundgerüst-Derivatisierung der CAAs.....	66
3.4.3. Struktur-basierte Hybridisierung.....	72
3.5. Entwicklung molekularer Akt-Sonden	75
3.5.1. Isoform-selektive Akt-Sondenmoleküle	80
3.6. HSD11B1-Inhibitoren für die Immunoonkologie	83
3.6.1. Immunoonkologie	83
3.6.2. Zielgerichtete Adressierung der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1	85
3.6.3. Synthese von SKI2852.....	88
3.6.4. <i>in vitro</i> Evaluation von SKI2852.....	91
4 Zusammenfassung und Ausblick	93
5 Kurzfassung	99

6	Abstract	101
7	Experimenteller Teil	103
7.1.	Organische Synthese	103
7.1.1.	Allgemeine Anmerkungen	103
7.1.2.	Allgemeine Synthesevorschriften	104
7.1.3.	Synthese und Analytik	107
7.2.	Methoden	143
7.2.1.	Struktur-basierte Modellierung.....	143
7.2.2.	HTRF-Assay zur IC ₅₀ -Bestimmung und kinetische Charakterisierung	143
7.2.3.	Protein-Massenspektrometrie.....	143
7.2.4.	Kinase-Profilierung	144
7.2.5.	In-Gel-Fluoreszenz	144
7.2.6.	Pharmakophor-basiertes Docking	144
7.2.7.	Datenverfügbarkeit	145
8	Literaturverzeichnis	147
9	Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)	165

Abkürzungsverzeichnis

ABBP	Aktivitäts-basierte Protein-Profilierung
ADME	Absorption, Verteilung, Metabolismus, Exkretion
ALK	Anaplastische Lymphom-Kinase
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl-2-Antagonist of Cell death</i>
BMX	<i>bone marrow kinase on chromosome X</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-Gruppe
CAAI	<i>covalent-allosteric Akt inhibitors</i>
Cbz	Benzyloxycarbonyl-Gruppe
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lyphocyte-associated protein 4</i>
CuAAC	Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition
DBPO	Dibenzoylperoxid
DCM	Dichlormethan
DDQ	2,3-Dichlor-5-6-dicyano-1,4-benzochinon
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMBA	7,12-Dimethylbenzo[a]anthracen
DME	Ethylenglycoldimethylether
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Erk	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GEF	GTP-Austauschfaktor
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>

HSD11B1	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1
HTRF	<i>homogenous time-resolved fluorescence</i>
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
iTRAQ	<i>isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation</i>
LAMTOR1	<i>late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 1</i>
LCMS	Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
MAPK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase
MD	Molekulardynamik
Mek	MAPK/Erk Kinase
MELK	<i>maternal embryonic leucin zipper kinase</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC2	mTOR-Komplex 2
μ w	Mikrowellenstrahlung
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie
NSCLC	nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
ovn	über Nacht
p.o.	peroral
P70S6K	Ribosomale Protein S6 Kinase β -1
PAMPA	<i>parallel artificial membrane permeability-Assay</i>
PASK	<i>PAS domain-containing serine/threonine protein kinase</i>
PD-1	<i>programmed cell death</i> -Protein 1
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PDX	Patientenmaterial-abgeleitete Xenografts
PET	Positronenemissionstomographie
P-GP	<i>permeability glycoprotein</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PHLPP	PH-Domänen- und Leucin-reiche Phosphatasen
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂ /PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat/-triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PP2A	Protein Phosphatase 2

PR	<i>partial response</i>
PROTAC	<i>Von Hippel-Lindau-Recruiting Proteolysis Targeting Chimeras</i>
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
quant.	quantitativ
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
ROCK1/2	Rho-assoziierte Protein Kinase 1/2
rt	Raumtemperatur
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehungen
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TCEP	Tris(carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethylamin
<i>tert</i> -BuLi	<i>tert</i> -Butyllithium
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
THF	Tetrahydrofuran
TLC-MS	Dünnschichtchromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
TP53	Tumor Protein P53
wt	Wildtyp

1 Einleitung

Krebs kommt aufgrund der stetig steigenden Anzahl an Neuerkrankungen und Todesfällen eine immer größer werdende Bedeutung in der Gesellschaft zu.¹ Jeder Zweite wird heutzutage im Laufe seines Lebens mit einer Krebsdiagnose konfrontiert.² In jüngerer Vergangenheit wurde die therapeutische Behandlung dieser Erkrankung durch den vielversprechenden Ansatz der sogenannten Präzisionsmedizin revolutioniert. Die Onkologie erlebt einen Wandel vom Einsatz klassischer unspezifischer Zytostatika hin zu einer Biomarker-adaptierten, zielgerichteten Adressierung onkogener Zielstrukturen.³

1.1. Präzisionsmedizin in der Krebstherapie

Entscheidend für den Erfolg der Präzisionsmedizin in der Krebstherapie ist die Betrachtung von Krebs als Erkrankung des Genoms.⁴ Dabei geht der Tumorgenese die genetische Läsion eines Protoonkogens oder Tumorsuppressorgens voraus.⁵⁻⁶ Sowohl Protoonkogene als auch Tumorsuppressorgene spielen in der Regulation von Zellwachstum, -überleben und -differenzierung eine zentrale Rolle.⁷⁻⁹ Mutationen in Protoonkogenen können die Entstehung eines Onkogens bewirken, dessen kodiertes Onkoprotein durch eine konstitutive Aktivierung oder Überexpression eine gesteigerte, unkontrollierte Zellproliferation zur Folge hat.¹⁰ Gleichmaßen kann durch eine sogenannte *loss-of-function* Mutation in Tumorsuppressorgenen ebenfalls ein Tumorgeschehen hervorgerufen werden.¹¹ Die so entarteten Krebszellen entwickeln zu dem konstitutiv aktiven Signal des Onkogens eine Abhängigkeit bezüglich Zellteilung und Zellüberleben, die WEINSTEIN als *oncogene addiction* postulierte und damit eine Achillesferse des Krebs identifizierte.¹² Diese dient der Präzisionsmedizin als entscheidender Angriffspunkt, indem die gezielte Inhibition eines bestimmten Treibersignals in einem Absterben der Tumorzelle, dem sogenannten *oncogenic shock*, resultiert.¹³

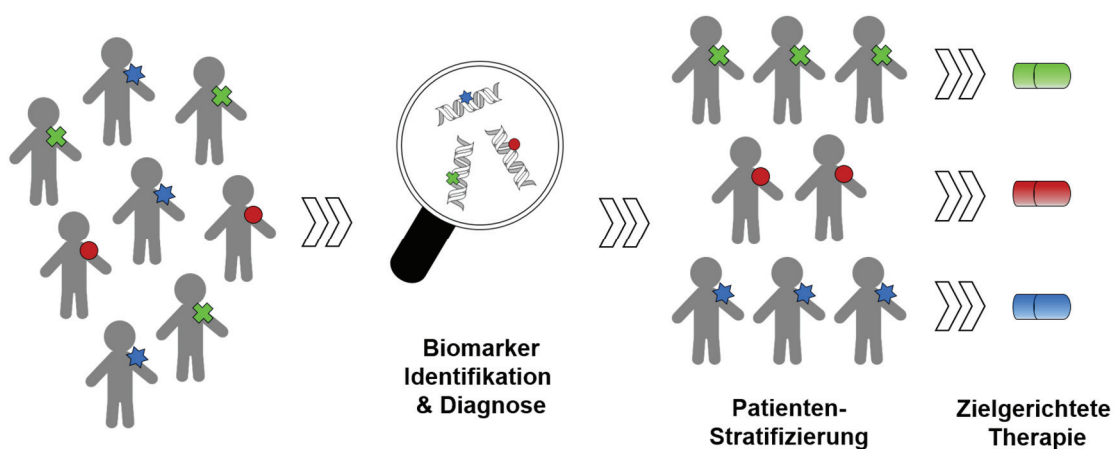


Abbildung 1. Konzept der Präzisionsmedizin in der Krebstherapie. Die Identifizierung von prädiktiven Biomarkern erlaubt die Stratifizierung einer Patientenpopulation und ermöglicht den Einsatz zielgerichteter Therapeutika.

Der Erfolg dieses alternativen Behandlungsansatzes setzt die genaue Kenntnis des onkogenen Treibers voraus, um gezielt das Tumorsignal inhibieren zu können.¹⁴ Entscheidend ist somit die individuelle Identifikation von Biomarkern, die prädiktiv für das Ansprechen des Patienten auf die Therapie sind.¹⁵ In der postgenomischen Ära können durch entsprechende Diagnostik genetische Marker identifiziert werden, mit deren Hilfe eine Patientenpopulation in kleinere Patientengruppen stratifiziert werden kann, für die dann eine maßgeschneiderte Therapie zum Einsatz kommt (Abb. 1).¹⁶⁻¹⁸ Verglichen mit den klassischen Ansätzen der Chemo- oder Strahlentherapie, die einzig vom histologischen Befund bestimmt wird und deren Wirkung allein auf zytostatischen Eigenschaften beruht, führte die Präzisionsmedizin zu deutlich erhöhten Überlebensraten.¹⁹⁻²⁰ Darüber hinaus kommt es aufgrund der selektiveren Wirkungsweise von zielgerichteten Therapeutika zu verringerten Nebenwirkungen und einer damit verbundenen höheren Lebensqualität.²¹⁻²²

Beispielhaft für diesen Erfolg der Präzisionsmedizin steht die Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC), die in der letzten Dekade eine grundlegende Veränderung erfahren hat.²³ Hier konnten Tumor-treibende genetische Läsionen wie aktivierende Mutationen im EGFR (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) oder Genfusionen der ALK (anaplastische Lymphom-Kinase) identifiziert und deren Rolle in der Krebsentstehung charakterisiert werden, sodass diese prädiktive Biomarker für die Behandlung mit entsprechenden Tyrosinkinase-Inhibitoren darstellen.²⁴⁻²⁶ Die mittlere Gesamtüberlebenszeit von NSCLC-Patienten von gerade einmal acht Monaten bei Behandlung mit klassischen chemotherapeutischen Methoden konnte durch den Biomarker-adaptierten Einsatz selektiver EGFR-Inhibitoren wie Erlotinib (Tarceva, Roche), Afatinib (Giotrif, Boehringer Ingelheim) oder Osimertinib (Tagrisso, AstraZeneca) oder ALK-Inhibitoren wie Crizotinib (Xalkori, Pfizer) auf bis zu 30 Monate gesteigert werden.^{21, 27-31} So dramatisch der Effekt der zielgerichteten Therapeutika die Behandlung von NSCLC verbessert, so deutlich werden an diesem Beispiel auch die Herausforderungen, vor denen die Präzisionsmedizin steht. Zum einen können nach Behandlung mit EGFR- oder ALK-Inhibitoren nach wenigen Monaten Resistenzen identifiziert werden.^{26, 32-34} Aufgrund der hohen genetischen Instabilität von Tumoren sowie des durch den Inhibitor ausgeübten Selektionsdrucks ist der Erwerb von Resistenzmutationen unumgänglich.³⁵ Zum anderen basiert der Erfolg der EGFR- und ALK-Inhibitoren auf Vorhandensein solider Biomarker, deren Identifikation und Validierung zentrale Limitationen in der Krebstherapie ausmachen.³⁶ So existiert eine Vielzahl therapeutischer Zielstrukturen, deren komplexes Netzwerk hochverzweigter molekularer Signalwege mit Interaktions- und Rückkopplungsmechanismen verhindert, dass die Diversität eines Tumors mit nur einem Biomarker beschrieben werden kann.³⁷ Auf der anderen Seite existieren Zielstrukturen, deren zentrale Rolle im Tumorgeschehen bekannt ist, aber die medizinalchemisch nur schwer zu adressieren sind.³⁸ In beiden Fällen bedarf es neuer innovativer, hochselektiver Ansätze.

Eine dieser Zielstrukturen, die ein hohes therapeutisches Potential aufweist, für die jedoch robuste Marker fehlen und die darüber hinaus anspruchsvoll in der Adressierung ist, stellt die Proteinkinase Akt dar.³⁹

1.2. Die Proteinkinase Akt

Bei Akt, auch Proteinkinase B (PKB) genannt, handelt es sich um eine Ser/Thr-Proteinkinase, von der drei Isoformen bekannt sind (Akt1, Akt2, Akt3), die sich trotz hoher struktureller Ähnlichkeit in Funktion und gewebespezifischer Expression unterscheiden.⁴⁰ Proteinkinasen sind Transferasen, die den Übertrag des γ -Phosphats von ATP auf die Aminosäure-Seitenketten von Serin, Threonin oder Tyrosin des Substratproteins katalysieren.⁴¹ Sie nehmen damit eine dynamische Rolle in der Signaltransduktion der Zelle ein und sind hochreguliert.⁴² Fehlregulationen von Kinasen sind häufig mit Krankheiten assoziiert und spielen insbesondere in der Tumorentstehung eine bedeutsame Rolle.⁴³ Aus diesem Grund ist die medizinalchemische Modulation der Aktivität von Proteinkinasen von hohem Interesse.⁴⁴ Die Proteinkinase Akt weist eine Kinasedomäne auf, die in Proteinkinasen strukturell konserviert ist (Abb. 2).⁴⁵ Sie wird in eine N-terminale und eine C-terminale Subdomäne unterteilt, die über eine flexible Schleife, die sogenannte Scharnierregion, miteinander verknüpft sind, an welcher sich das katalytisch aktive Zentrum der Kinase befindet.

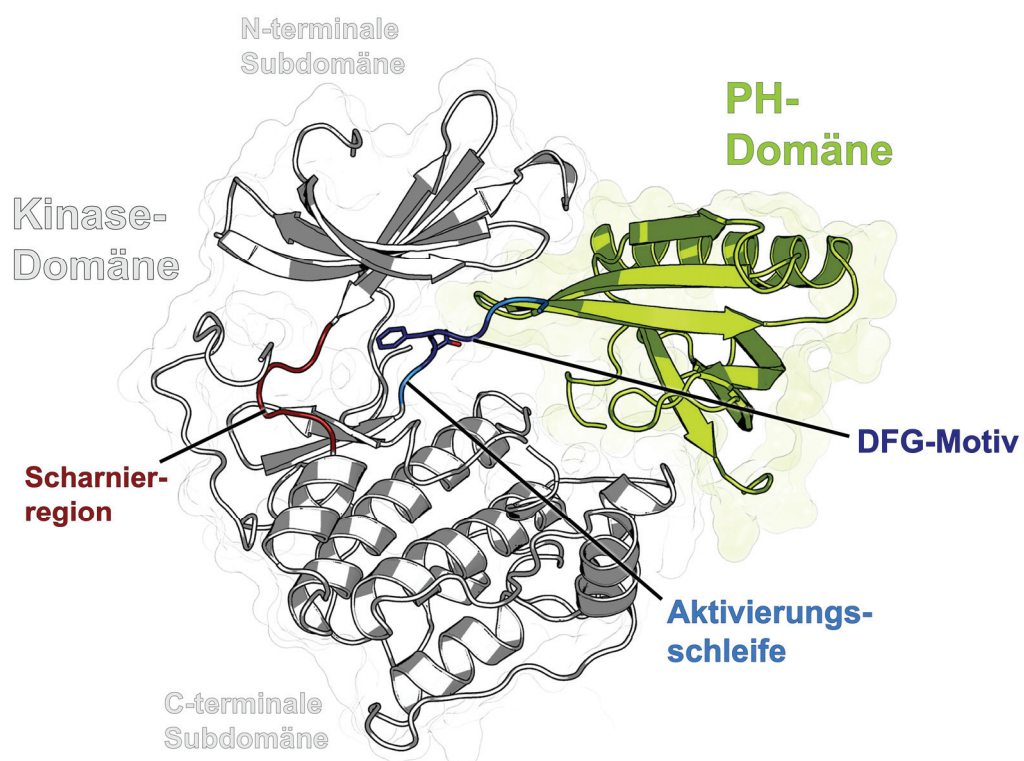


Abbildung 2. Struktureller Aufbau der Proteinkinase Akt. Die Kinasedomäne von Akt (weiß) ist hochkonserviert und setzt sich aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Subdomäne zusammen, die über eine Scharnierregion (rot) miteinander verknüpft sind. Zusätzlich weist Akt eine PH-Domäne (grün) auf, die ähnlich wie Aktivierungsschleife (blau) regulatorische Funktionen übernimmt (PDB: 6HHF).

Darüber hinaus schließt sich N-terminal zu der Kinasedomäne eine sogenannte *pleckstrin homology* (PH)-Domäne an. Diese etwa 120 Aminosäuren große Subdomäne ist in über 100 verschiedenen Proteinen identifiziert worden, die in wichtigen intrazellulären Signalwegen und der cytoskeletalen Organisation beteiligt sind, darunter neben Kinasen auch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), GTP-Austauschfaktoren (GEFs) oder Phospholipasen.⁴⁶⁻⁴⁷ Die PH-Domäne ist Teil eines komplexen Regulationsmechanismus von Akt, indem die relative Orientierung der PH-Domäne zur Kinasedomäne den Aktivitätszustand der Kinase entscheidend beeinflusst. Im Jahr 2010 wurde erstmals eine Kristallstruktur der Proteinkinase Akt in Volllänge veröffentlicht, die das Wechselspiel der PH-Domäne mit der Kinasedomäne im inaktiven Zustand verdeutlicht.⁴⁸ Die PH-Domäne bettet sich zwischen die N- und C-terminale Subdomänen ein, sodass sie das aktive Zentrum der Kinase unzugänglich macht. Dieser sogenannte „PH-in“-Zustand wird durch eine Salzbrücke zwischen Glu17 der PH- und Arg273 der Kinasedomäne, durch polare Interaktionen von Thr81 und Thr82 der PH- und Lys179 und Asp292 der N-terminalen Domäne sowie durch weitere unpolare Wechselwirkungen stabilisiert.⁴⁸ Darüber hinaus verdrängt die PH-Domäne die α -Helix C aus der allosterischen Tasche, sodass das Phe293 des auf der Aktivierungsschleife befindlichen DFG-Motivs die ATP-Bindetasche blockiert und somit die inaktive DFG-out-Konformation einnimmt.⁴¹

Die Aktivierung von Akt kann über eine Vielzahl von Signalwegen erfolgen.⁴⁹ Der prominenteste Signalweg, in dem Akt eine zentrale Rolle einnimmt, ist der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg (Abb. 3).⁵⁰

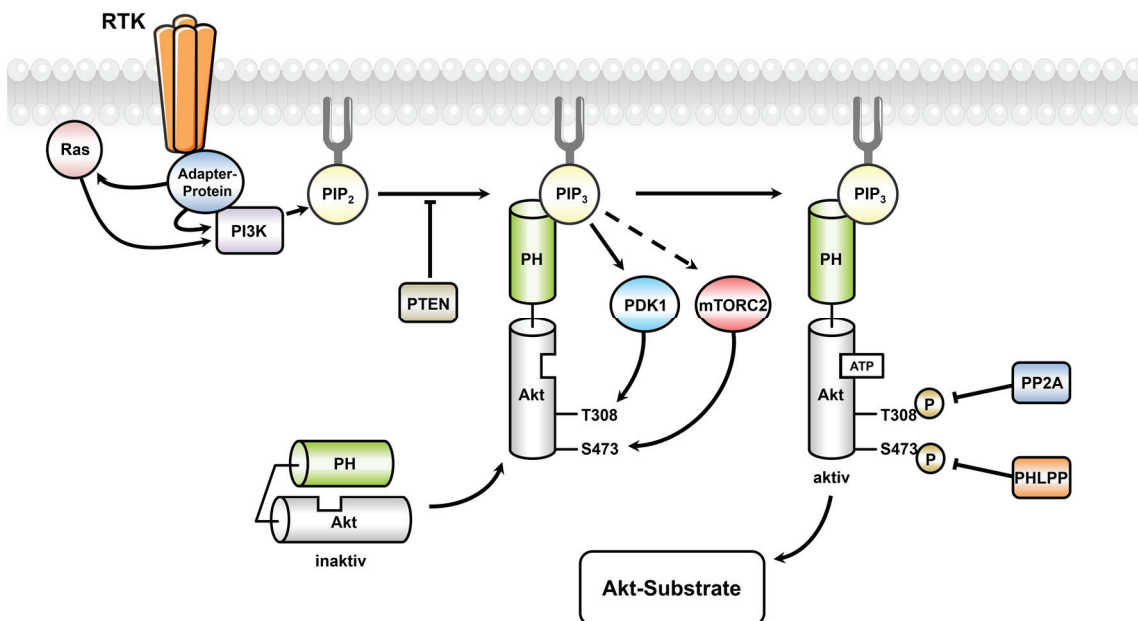


Abbildung 3. Schematischer Ablauf der Akt-Aktivierung über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg. Über extrazelluläre Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) wird PI3K aktiviert, welches PIP₂ zu PIP₃ phosphoryliert. Akt transloziert durch Bindung der PH-Domäne an PIP₃ zur Plasmamembran, wodurch eine konformationelle Änderung zur PH-out-Konformation stattfindet. Die entgültige Aktivierung von Akt erfolgt über Phosphorylierungen von PDK1 und mTORC2.

Durch extrazelluläre Stimulation unterschiedlicher Rezeptoren wie Rezeptortyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kann über verschiedene Mechanismen die Aktivierung der Lipidkinase Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) erfolgen.⁵¹ Diese ist in der Lage, das Phospholipid Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PIP₂) durch Phosphorylierung zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) umzusetzen.⁵² Durch Bindung der PH-Domäne an das als second messenger fungierende PIP₃ wird Akt zur Plasmamembran rekrutiert. Röntgenstrukturanalysen verdeutlichen, dass für die Interaktion von PIP₃ und der PH-Domäne eine Bindetasche verantwortlich ist, die größtenteils von basischen Aminosäuren wie Lysin, Arginin oder Asparagin aufgespannt wird.⁵³ Somit wechselwirken die positiv geladenen Seitenketten von Lys14, Arg23, Arg25 und Asn53 mit dem 3-Phosphat sowie Lys14, Asn53 und Arg86 mit dem 4-Phosphat des PIP₃.⁵⁴ Der aus der Bindung des Phospholipids resultierende veränderte Ladungszustand initiiert drastische konformationelle Änderungen, die eine veränderte relative Ausrichtung von Kinase- und PH-Domäne zueinander bewirken, sodass die Kinase in die offene PH-*out* Konformation wechselt.^{48,55} In diesem Zustand liegt die Aktivierungsschleife exponiert vor, sodass sie für die PIP₃-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) zugänglich ist und an Thr308 phosphoryliert werden kann.⁵⁶ Die veränderte Ladungsdichte in der Aktivierungsschleife destabilisiert die DFG-*out* Konformation, woraufhin die Kinase über Interaktionen des pThr308 mit dem DFG-Motiv und der α -Helix C in den aktiven DFG-*in*-Zustand überführt wird.⁴¹ Eine weitere Phosphorylierung an Ser473 durch *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) *complex 2* (mTORC2) im C-terminal zur Kinasedomäne befindlichen hydrophoben Motiv stabilisiert die pThr308-Modifikation zusätzlich und ist somit für eine maximale Aktivierung der Kinase wichtig.⁵⁷⁻⁵⁸ Das aktive Akt ist in der Lage, zahlreiche bedeutsame Substrate wie das pro-apoptotische Protein *Bcl-2-Antagonist of Cell death* (BAD), die Protein Glykasekinase-3 (GSK3) oder Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie zu phosphorylieren und damit in ihrer Aktivität zu modulieren.⁵⁹⁻⁶¹ Das Akt-Signal kann über verschiedene Phosphatasen terminiert werden.⁴⁹ Die Dephosphorylierung von pThr308 und pSer473 erfolgt über die Protein Phosphatase 2A (PP2A) bzw. über die PH-Domänen- und Leucin-reiche Phosphatasen (PHLPP1/PHLPP2) und bewirkt die Inaktivierung der Proteinkinase Akt.⁶²⁻⁶³ Darüber hinaus nimmt das Phosphatase- und Tensin-Homolog PTEN eine wichtige Rolle in der Akt-Regulierung ein, indem es als Antagonist von PI3K fungiert und PIP₃ zu PIP₂ dephosphoryliert.⁶⁴ Diese komplexe und fein abgestimmte Regulation des Akt-vermittelten Signals ist von entscheidender Bedeutung für wichtige zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, -apoptose, Metabolismus und Angiogenese.⁶⁵ Fehlregulationen der Akt-abhängigen Signaltransduktion werden daher mit der Entwicklung verschiedener Krankheitsbilder wie Typ 2-Diabetes, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen sowie Krebs assoziiert.⁶⁶⁻⁶⁸ Die zielgerichtete Adressierung dieses Signalwegs ist daher von großem Interesse für die Wirkstoffforschung.

1.3. Zielgerichtete Adressierung der Proteinkinase Akt

Die zielgerichtete Adressierung von Akt ist vor allem für die Krebsforschung von besonderer Bedeutung, da genetische Läsionen im Akt-Protoonkogen zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen und somit die Tumorgenese verursachen können.⁶⁹ So führt die somatische Punktmutation E17K in der PH-Domäne von Akt1 zu einer konstitutiven Aktivierung der Proteinkinase, indem der Austausch vom negativ geladenen Glutamat zum positiv geladenen Lysin einerseits die Salzbrücke zu Arg273 verhindert und zum anderen die Ladungsumkehr eine elektrostatische Repulsion zur Folge hat, die das Gleichgewicht zwischen PH-*in*- und PH-*out*-Konformation zugunsten des aktiven PH-*out* Zustands verschiebt.⁷⁰ Diese relativ seltene Mutation ist als treibende Mutation in verschiedenen soliden Tumoren wie Brust- oder Ovarialkarzinomen identifiziert worden und ist ursächlich für eine angeborene Überwucherkrankung, das sogenannte Proteus-Syndrom.⁷¹⁻⁷² Als weitere aktivierende genetische Läsion ist die LAMTOR1-Akt1-Genfusion beschrieben, die ebenfalls einen Verlust der autoinhibitorischen Funktion der PH-Domäne bewirkt und als treibendes Onkogen in einem pädiatrischen Neoplastom identifiziert wurde.⁷³ Zudem sind Amplifikationen von Akt2 in Pankreas-, Brust- und Eierstockkrebs zu finden.⁷⁴⁻⁷⁶ Darüber hinaus stehen Akt-Überexpressionen in Zusammenhang mit Resistenzen gegen einige Chemotherapeutika.⁷⁷ In einer weitaus größeren Anzahl an Tumoren wird eine vom Akt-Signal abhängige Karzinogenese durch genetische Alterationen in übergeordneten Effektoren im Akt-Signalweg hervorgerufen.⁷⁸ Veränderungen wie *loss-of-function* Mutationen im Tumorsuppressor PTEN, aktivierende Mutationen in PI3K oder Ras sowie Überexpressionen in PDK1 treten in bis zu 40 % aller Tumore auf und sind gleichermaßen therapeutisch schwer zu adressierende Zielstrukturen.⁷⁹⁻⁸² Die zentrale Rolle Akt-vermittelter Signalwege in der Krebsentstehung unterstreicht die Bedeutung der Entwicklung zielgerichteter Inhibitoren der Proteinkinase (Abb. 4A).⁸³

Einen klassischen Ansatz zur Adressierung von Proteinkinasen stellen ATP-kompetitive Kinaseinhibitoren dar.⁴⁴ Sogenannte Typ I Inhibitoren adressieren dabei direkt das aktive Zentrum der Kinase, indem sie Interaktionen mit der Scharnierregion eingehen und die Bindung des Kosubstrats ATP verhindern.⁴¹ Einer der ersten entwickelten Akt-Inhibitoren war GSK690693 (GlaxoSmithKline), der das Wachstum von akuten lymphoblastischen Leukämiezellen erfolgreich hemmt, jedoch in der klinischen Entwicklung aufgrund schwerer Nebenwirkungen wie Hyperglykämie gescheitert ist.⁸⁴⁻⁸⁵ Zwei Kandidaten der jüngsten Generation an ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren sind Capivasertib (AstraZeneca) und Ipatasertib (Genentech), die beide in klinischen Studien der Phase II evaluiert werden. In einer großen mehrarmigen Phase II-Studie wurden Patienten mit soliden Tumoren und Lymphomen auf 143 genetische Marker hin untersucht.⁸⁶ Bei Akt1^{E17K}-positiven Patienten konnte hierbei ein stagnierendes bis leicht schrumpfendes Tumorwachstum beobachtet werden.⁸⁷

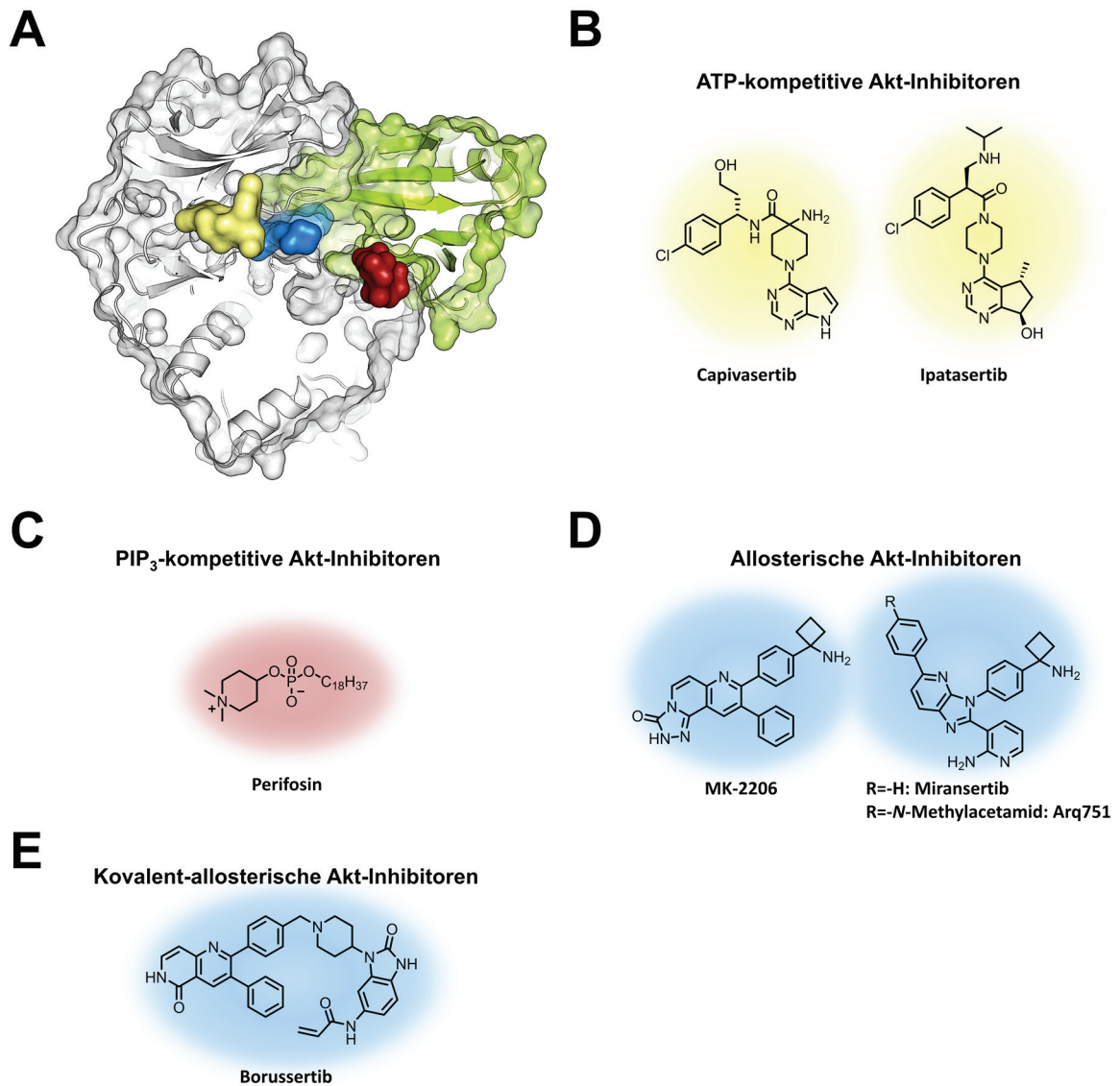


Abbildung 4. Unterschiedliche Angriffspunkte zur Inhibition der Proteinkinase Akt. **A** Übersicht über die Adressierungsmöglichkeiten mit ATP-kompetitiven (gelb), PIP₃-kompetitiven (rot) und (kovalent-)allosterischen (blau) Akt-Inhibitoren (Überlagerung der PDB-Strukturen 5KCV, 4GV1 und 2UVM). **B** Strukturen der ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren Capiwasertib und Ipatasertib. **C** Struktur des PIP₃-kompetitiven Akt-Inhibitors Perifosin. **D** Struktur der allosterischen Akt-Inhibitoren MK-2206 und Miransertib. **E** Struktur des kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors Borussertib.

Ipatasertib wurde ebenfalls in Patienten mit verändertem Akt-Signal untersucht und zeigte in Kombinationstherapie mit Zytostatikum Paclitaxel eine Verlängerung der Überlebensrate.⁸⁸ Die Erfolge dieser beiden ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren unterstreichen die Bedeutung der zielgerichteten Adressierung von Akt, zeigen jedoch einige Limitationen. Ein großes Problem dieser Klasse von Inhibitoren stellt die Selektivität gegenüber anderen Kinasen dar. Die von diesen Wirkstoffen adressierte ATP-Bindetasche von Akt ist strukturell hochkonserviert und weist insbesondere hohe Ähnlichkeit zu verwandten Proteinkinasen der AGC Subfamilie auf.⁸⁹

So inhibierte Capivasertib in einer biochemischen Kinaseprofilierung von 75 Kinasen nicht nur alle drei Isoformen von Akt, sondern auch 15 weitere Proteinkinasen, darunter die Proteinkinase A (PKA), die Ribosomale Protein S6 Kinase β -1 (p70S6K) und die Rho-Kinase 2 (ROCK2) im nanomolaren Bereich.⁹⁰ Diese *off-target* Aktivitäten haben Dosis-limitierende Nebenwirkungen wie Hautausschläge, Diarrhö oder Hyperglykämie zur Folge.⁹¹ Einen alternativen Adressierungsansatz stellen PIP₃-kompetitive Inhibitoren dar.⁶⁵ Diese binden in die PIP₃-Bindetasche in der PH-Domäne von Akt und verhindern so die Rekrutierung der Proteinkinase zur Plasmamembran und damit eine anschließende Aktivierung. Beispielhaft für diese Inhibitor-Klasse steht das Alkylphospholipid Perifosin, welches zwar in präklinischen Studien vielversprechende Ergebnisse lieferte, allerdings in klinischen Studien weitestgehend enttäuschte.⁹² Ein wesentlicher Grund für das Scheitern von Perifosin und anderen analogen Verbindungen ist das schlechte pharmakokinetische Profil, da die hohe Hydrophobizität und der amphiphile Charakter des Inhibitors eine schlechte Löslichkeit sowie Permeabilität zur Folge haben.⁶⁵ Darüber hinaus kann über diesen Wirkmechanismus ebenfalls keine hohe Selektivität erzielt werden, sodass Substanzen dieser Wirkstoffklasse unter anderem auch mit dem Phospholipid-Metabolismus der Zelle interferieren, was schwere gastrointestinale Toxizität mit sich bringt.⁹³ Auf der Suche nach selektiven Akt-Inhibitoren wurden im Jahr 2005 im Rahmen eines Hochdurchsatz-*Screening* Moleküle identifiziert, die allerdings in biochemischen Assays mit Akt-Konstrukten ohne PH-Domäne keine Aktivität aufwiesen.⁹⁴ Die Ursache für diese zufällig entdeckte PH-Domänen-abhängige Aktivität konnte fünf Jahre später über die erstmalig gelöste Kristallstruktur eines solchen Inhibitors in Komplex mit dem Volllängen-Protein geklärt werden.⁴⁸ Es wurde deutlich, dass die Inhibitoren eine in der Interdomänen-Region zwischen Kinase- und PH-Domäne entstehenden Tasche binden, die geschlossene, inaktive PH-*in*-Konformation stabilisieren und somit Akt allosterisch hemmen (Abb. 5). Solch allosterische Modulatoren haben entscheidene Vorteile gegenüber den bisher gezeigten Wirkmechanismen. Während orthosterische Inhibitoren funktionelle Regionen adressieren, die in einer Proteinfamilie zumeist hochkonserviert sind, weist die Adressierung einer weniger konservierten allosterischen Bindetasche einen deutlichen Selektivitätsvorteil auf.⁹⁵ Da allosterische Inhibitoren zudem nicht mit kompetitiven Liganden konkurrieren, erreichen diese eine im Vergleich zu orthosterischen Inhibitoren erhöhte Verweildauer am Protein, die pharmakologisch begünstigt ist.⁹⁶ Der Unterschied zwischen orthosterischen und allosterischen Inhibitoren wird umso deutlicher, wenn beachtet wird, dass Proteinkinasen Funktionen in der Signaltransduktion der Zelle besitzen, die weit über die katalytische Funktion hinaus gehen.⁹⁷ VIVANCO *et al.* verglichen allosterische und ATP-kompetitive Akt-Inhibitoren hinsichtlich ihrer Wirkung auf EBC1-Lungenkrebszellen.⁹⁸

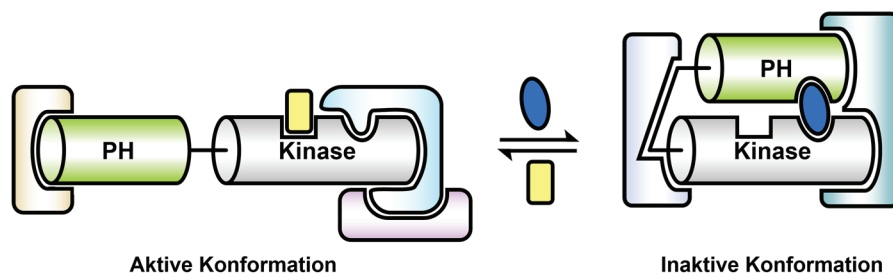


Abbildung 5. Allosterische Interdomänen-Inhibitoren von Akt (blau) stabilisieren die inaktive PH-*in* Konformation der Proteinkinase, während ATP-kompetitive Inhibitoren (gelb) die aktive PH-*out* Konformation binden. Beide Konformationen weisen vermutlich ein unterschiedliches Interaktom auf und rufen somit unterschiedliche Zellantworten hervor. Die Darstellung wurde aus WEISNER und GONTLA *et al.* adaptiert.⁹⁹

Obwohl beide Inhibitorklassen die Phosphorylierung von Akt-Substraten hemmen konnten, wurde lediglich in Anwesenheit eines allosterischen Inhibitors Zelltod induziert. Folglich scheint die ATP-kompetitive Adressierung von Akt ein Kinase-unabhängiges, aber Konformations-abhängiges Überlebenssignal zu induzieren. Allosterische Interdomänen-Inhibitoren stabilisieren die inaktive PH-*in*-Konformation, die ein verändertes Interaktom aufweist und infolgedessen eine veränderte Zellantwort hervorruft.⁹⁸ Aus diesen Eigenschaften allosterischer Akt-Inhibitoren ging ein großes Interesse hervor, das zur Entwicklung verschiedener Wirkstoffe dieser Klasse führte, darunter die klinischen Kandidaten MK-2206 (Merck Sharp & Dome), Miransertib und Arq751 (beide ArQule, Abb. 4C).¹⁰⁰⁻¹⁰¹ Diese Wirkstoffe zeichnen sich durch eine potente Inhibition der drei Akt-Isoformen mit hoher Selektivität gegenüber anderer Proteinkinasen aus. Für MK-2206 sind insgesamt 31 klinische Studien der Phase II sowohl für Mono- als auch für Dualtherapien mit anderen Wirkstoffen beschrieben, wobei die Resultate eher ernüchtert sind.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Zwar zeigte sich eine gute Tolerierbarkeit sowie hohe Effizienz in der Akt-Inhibition, jedoch wurden in der Klinik nur geringe Behandlungserfolge erzielt, da es an der Identifizierung geeigneter prädiktiver Marker mangelt.¹⁰⁶ Gleich zwei allosterische Akt-Inhibitoren des Pharmaunternehmens ArQule befinden sich derzeit in der klinischen Testung der Phase I: Das 3*H*-Imidazo[4,5-*b*]pyridin-Derivat Miransertib sowie die mit einer *N*-Methylacetamid modifizierte Weiterentwicklung Arq751, welche im Vergleich zu Miransertib eine gesteigerte Potenz aufweist.¹⁰⁷ Beide Wirkstoffkandidaten werden zum einen für die Behandlung seltener Überwucherkrankungen, zum anderen für die Therapie solider Tumore evaluiert.¹⁰⁸ Für Überwucherkrankungen wie das Proteus-Syndrom konnte mit der Akt1^{E17K}-Aktivierungsmutation ein geeigneter genetischer Marker ausgemacht werden, sodass in entsprechenden Patientenpopulationen ein vielversprechendes Ansprechen auf eine Miransertib-Monotherapie beobachtet werden kann.¹⁰⁹ Auf der anderen Seite werden Brust-, Eierstock- und Endometriumkarzinome von Patientenpopulationen mit genetischen Alterationen in Akt, aktivierenden Mutationen in PI3K sowie PTEN *loss-of-function* Mutationen klinisch untersucht.¹¹⁰

Während bei einer Monotherapie lediglich eine Ansprechrate von 10 % resultierte, konnte für hormonabhängige Östrogenrezeptor-positive (ER+) Tumore über eine Kombinationstherapie mit Aromatasehemmer Anastrozol die Ansprechrate auf 50 % gesteigert werden.¹⁰⁸ Insgesamt stellen allosterische Interdomänen-Inhibitoren aufgrund ihrer hohen Selektivität und Potenz die vielversprechendste Wirkstoffklasse in der zielgerichteten Adressierung der Proteinkinase Akt dar.⁶⁹ Die bisherigen klinischen Studien zeigen allerdings, dass trotz der wirksamen Inhibition von Akt das therapeutische Potential noch nicht ausgeschöpft werden konnte. Bei Betrachtung der zielgerichteten Akt-Inhibitoren wurde deutlich, dass trotz der unbestritten hohen Relevanz Akt-vermittelter Signalwege im Tumorgeschehen die Adressierung von Akt schwierig ist, da komplexe allosterische Effekte und Feedback-Mechanismen eine Biomarker-gestützte Therapie mit Akt-Inhibitoren erschweren.¹¹¹ Das klassische Konzept einer onkogenen Abhängigkeit in der Präzisionsmedizin stößt in diesem Fall, mit Ausnahme der äußerst seltenen Akt1^{E17K}-Mutation, an seine Grenzen, da Abhängigkeiten vom Akt-Signalweg meist nicht mit nur einem Biomarker beschrieben werden können.¹¹² Die Erfolge der Behandlung Hormon-abhängiger Tumore mit Miransertib und Arq751 zeigen jedoch, dass Kombinationstherapien mit anderen Wirkstoffen durchaus Erfolge zeigt. Um ein genaueres Verständnis der Tumorbiologie Akt-Signal-abhängiger Tumore zu erlangen, Biomarker zu identifizieren und eine Biomarker-gestützte Therapie voranzutreiben, bedarf es noch innovativerer Ansätze in der Adressierung von Akt. Einen solchen Ansatz stellen kovalent-allosterische Akt-Inhibitoren (CAAls) dar.⁹⁹

1.4. Kovalente und Kovalent-Allosterische Inhibitoren

Kovalente Inhibitoren haben bereits eine lange Geschichte in der Wirkstoffentwicklung, ohne dass diese überhaupt bekannt waren (Abbildung 6).¹¹³ Dass bahnbrechende Wirkstoffe der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wie Aspirin oder Penicillin einen kovalenten Wirkmechanismus aufweisen, wurde erst deutlich später in den späten 1970er Jahren entschlüsselt.¹¹⁴⁻¹¹⁵ Während auch für spätere *Blockbuster*-Medikamente wie Omeprazol (Nexium, AstraZeneca) oder Clopidogrel (Plavix, Sanofi-Aventis/Bristol-Myers Squibb) der zugrundeliegende kovalent-irreversible Wirkmechanismus eine Zufallsentdeckung war, kam es im vergangenen Jahrzehnt zu einem Wandel hin zu rational-entworfenen kovalenten Wirkstoffen.¹¹⁶⁻¹¹⁹ Für die Reaktionskinetik kovalenter Liganden kann vereinfacht ein zweistufigerer Verlauf angenommen werden (Abbildung 6). In einem ersten Schritt bildet sich ein nicht-kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex **[E··I]**, dessen Stabilität und geometrische Ausrichtung entscheidenden Einfluss auf die kovalente Bindungsbildung hat. Die reversible Präorganisation des Liganden in der Bindetasche erlaubt im zweiten Schritt die Ausbildung der kovalenten Bindung zum Protein (**E-I**).¹²⁰

Die Reaktionsgeschwindigkeit der kovalenten Bindungsbildung k_{inact} sowie die freie Reaktionsenergie ΔG_{R} sind von den intrinsischen chemischen Eigenschaften der reaktiven Gruppe des Liganden, dem sogenannten *warhead*, abhängig.¹²⁰⁻¹²² Aus diesen unterschiedlichen Bindungseigenschaften kovalenter Inhibitoren ergeben sich im Vergleich zu reversiblen Inhibitoren einige Vorteile. Die veränderte Kinetik bewirkt durch die Irreversibilität der kovalenten Bindung eine Verschiebung des Bindungsgleichgewichtes zur Ligand-gebundenen Seite und resultiert somit in einer höheren Potenz und Ligandeneffizienz.¹²⁰

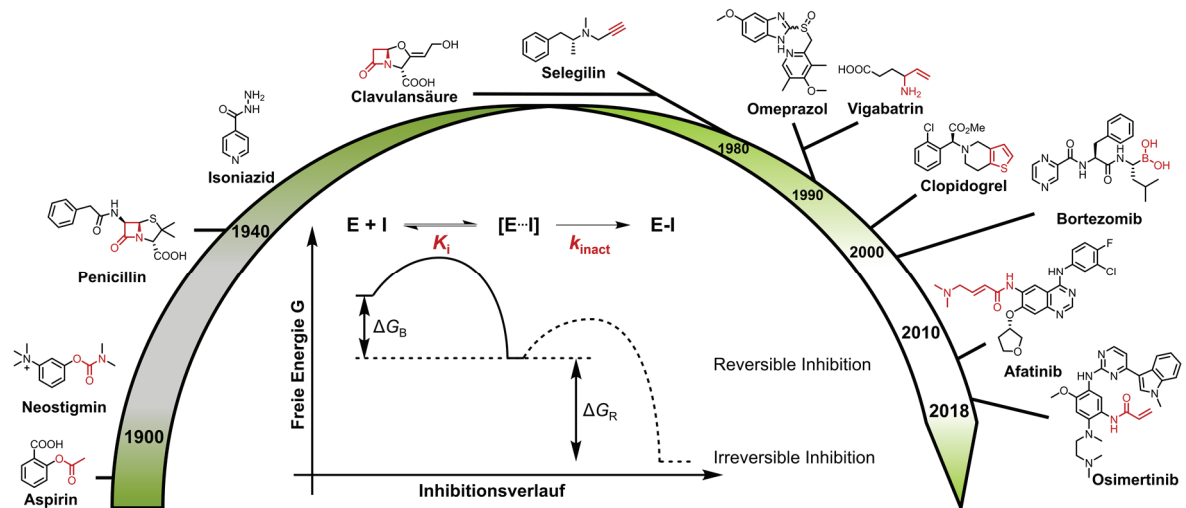


Abbildung 6. Geschichte und Energiediagramm des Inhibitionsmechanismus kovalenter Inhibitoren in der Wirkstoffforschung. Zielprotein (**E**) und Inhibitor (**I**) bilden zunächst einen reversiblen Komplex [**E·I**], woraufhin sich die kovalente Bindung zwischen Zielprotein und Inhibitor ausbildet (**E-I**). Die Abbildung wurde von SCHIRRMUSTER *et al.* adaptiert.¹²⁰

Gleichzeitig maximiert sich dadurch die Verweildauer des Inhibitors an der Zielstruktur, wodurch die Wirkungsdauer verlängert und nur durch die Proteinumsatzrate bestimmt wird.¹²³ Neben der gesteigerten Potenz und verlängerten Wirkungsdauer können kovalente Inhibitoren zudem noch zu einer gesteigerten Selektivität gegenüber verwandter Zielstrukturen beitragen, indem seltene, nicht konservierte nukleophile Seitenketten im Protein adressiert werden.¹¹⁸ Darüber hinaus eröffnen kovalente Inhibitoren die Möglichkeit der zielgerichteten Inhibition relevanter Zielproteine, die mit Hilfe reversibler Ansätze als schwer zu adressierende Strukturen (*undruggable targets*) galten.³⁸ So gelang über irreversible Modifizierung eines mutierten Cysteins in der *Switch II*-Region von KRas^{G12C} mit einem Acrylamid-tragenden Liganden erstmals die zielgerichtete Adressierung des bisher als nicht-therapierbar geltenden Onkogens und zeigte hohe Effizienz in *in vivo*-Studien.¹²⁴⁻¹²⁵ Auf der anderen Seite bestehen bei kovalenten Wirkstoffen einige Risiken, die in der Vergangenheit immer wieder Bedenken gegenüber dieser Wirkstoffklasse hervorgerufen haben.

Eine grundsätzliche Gefahr geht von der Reaktivität des verwendeten Elektrophils aus, da die kovalente Modifikation von unerwünschten Strukturen *off-target*-Effekte zur Folge haben kann. Für den irreversiblen Proteasom-Inhibitor Bortezomib sind beispielsweise einige nicht-proteasomale Strukturen wie die Serinproteasen Cathepsin G und Proteasen der Chymase-Familie bekannt, die über die reaktive Boronsäure-Gruppe kovalent modifiziert werden können und infolgedessen schwere Nebenwirkungen wie periphere Neuropathie verursachen.¹²⁶ Die Verlängerung der Wirkungsdauer kovalenter Inhibitoren kann neben der beschriebenen positiven Folgen ebenfalls eine Toxizität verursachen, da die Modulation funktionell wichtiger Proteine mit geringer Umsatzrate unerwünschte *on-target*-Effekte mit sich bringen kann.¹²⁷

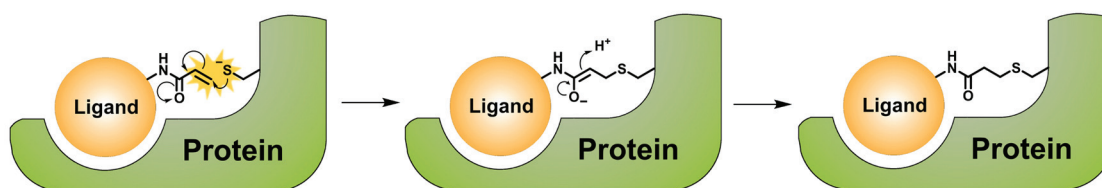


Abbildung 7. Mechanismus der hetero-Michael-Addition eines Liganden mit α,β -ungesättigtem Amid und einer Cystein-Seitenkette. Die reversible Ligandenbindung bringt den Michaelakzeptor und die Thiolseitenkette in räumliche Nähe, sodass die 1,4-Addition erfolgen kann.

Ferner kann die kovalente Bindung eines Inhibitors die Haptenisierung der Zielstruktur bewirken, sodass daraufhin eine Immunantwort erzeugt werden kann. Auf eine solche Immunreaktion werden beispielsweise allergische Reaktionen auf β -Lactam-Antibiotika zurückgeführt.¹²⁸ Bei Abwägung der Vorzüge irreversibler Inhibitoren gegenüber den dargestellten Risiken werden sowohl das enorme Potential als auch die hohen Anforderungen an das Design dieser Wirkstoffklasse deutlich. Geeignete *warheads* müssen so gewählt werden, dass sie auf der einen Seite unreaktiv genug sind um *off-target*-Reaktivitäten zu vermeiden, auf der anderen Seite aber eine effiziente und selektive Modulation nukleophiler Seitenketten des Zielproteins erlauben. Vorallem auf dem Gebiet der kovalenten Kinaseinhibitoren haben sich vorallem α,β -ungesättigte Amide als reaktive Gruppen bewährt.¹²⁹ Diese weisen grundsätzlich eine eher moderate Reaktivität gegenüber biologischen Nukleophilen wie Glutathion auf.¹³⁰ Wird das Elektrophil allerdings im Enzym-Inhibitor-Komplex in räumlicher Nähe zu Cystein-Seitenketten gebracht, erlaubt diese Präorganisation eine irreversible hetero-Michael-Addition an das Thiol (Abbildung 7).¹³¹ Zahlreiche Tyrosinkinase-Inhibitoren mit solchen Michael-Akzeptoren wie Osimertinib oder Crizotinib weisen ein hohes Selektivitätsprofil sowie potente *in vivo* Wirksamkeit bei nur geringen Nebenwirkungen auf.^{31,132} Diese Beispiele belegen eindrucksvoll, dass fein abgestimmte kovalente Wirkstoffe in ihren Risiken kontrollierbar sind und aufgrund der positiven pharmakologischen Eigenschaften einen großen Gewinn für die medizinisch-chemische Forschung darstellen.

Angesichts der anspruchsvollen Adressierbarkeit von Akt sind irreversible Modulatoren der Proteinkinase von großem Interesse. Für die Entwicklung kovalenter Inhibitoren ist das Struktur-basierte Wirkstoffdesign ein unerlässliches Werkzeug.¹²⁷ Bei der Analyse verschiedener Vollängen-Kristallstrukturen von Akt konnten in der unmittelbaren Umgebung kokristallisierter Interdomänen-Inhibitoren zwei nicht-katalytische, auf der Aktivierungsschleife befindliche, redoxensitive Cysteine Cys296 und Cys310 identifiziert werden, die als Angriffspunkte für eine kovalente Adressierung geeignet zu sein schienen.^{48, 133-134} Auf Grundlage dieser strukturellen Information gelang es WEISNER und GONTLA *et al.* Sondenmoleküle zu entwickeln, die über eine Acrylamidgruppe beide Cysteine kovalent modifizieren konnten (Abb. 8).⁹⁹

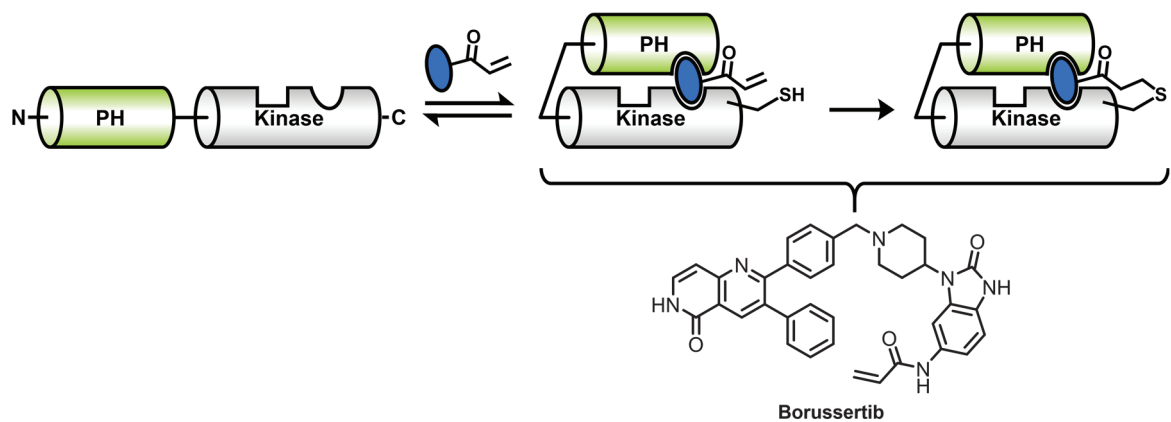


Abbildung 8. Kovalent-allosterische Akt-Inhibitoren wie Borussertib stabilisieren die geschlossene PH-*in*-Konformation über kovalente Modifikation von Cys297 bzw. Cys310.

Diese kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren (*covalent-allosteric Akt inhibitors, CAAs*) kombinieren damit die herausragenden Selektivitätseigenschaften allosterischer Inhibitoren mit den vorteilhaften pharmakologischen Eigenschaften eines kovalenten Inhibitors. Aus diesem Design-Ansatz ging die 1,6-Naphthyridinon-basierte Verbindung Borussertib hervor, die in biochemischen Aktivitätsassays im Vergleich zum klinischen Kandidaten MK-2206 eine signifikant gesteigerte Inhibition von Akt bewirkte.⁹⁹ Eine Aktivitätsprofilierung verdeutlichte die selektive Inhibition aller drei Akt-Isoformen gegenüber 100 Kinasen, die auch in zellulären Systemen belegt werden konnte.⁹⁹ Die enorme Potenz und die hohe Selektivität machen CAAs zu vielversprechenden Kandidaten für eine tiefergehende präklinische Untersuchung. In ihrer Funktion als „molekularer Klebstoff“ stabilisieren sie die inaktive Konformation irreversibel stabilisieren und dienen zudem als wichtige molekulare Sonden, um ein tieferes Verständnis in die konformationsabhängigen Signalwege der Proteinkinase gewinnen zu können.

2 Motivation und Zielsetzung

In den vergangenen zwei Jahrzehnten haben sich Wissen und Errungenschaften der Präzisionsmedizin geradezu explosionsartig vermehrt. Onkogene Zielstrukturen wie die Proteinkinase Akt verdeutlichen allerdings, dass diese Therapieform in vielen Fällen noch vor großen Herausforderungen steht. So bedarf es weiterhin innovativer Ansätze wie es die kovalent-allosterische Inhibition von Akt darstellt.

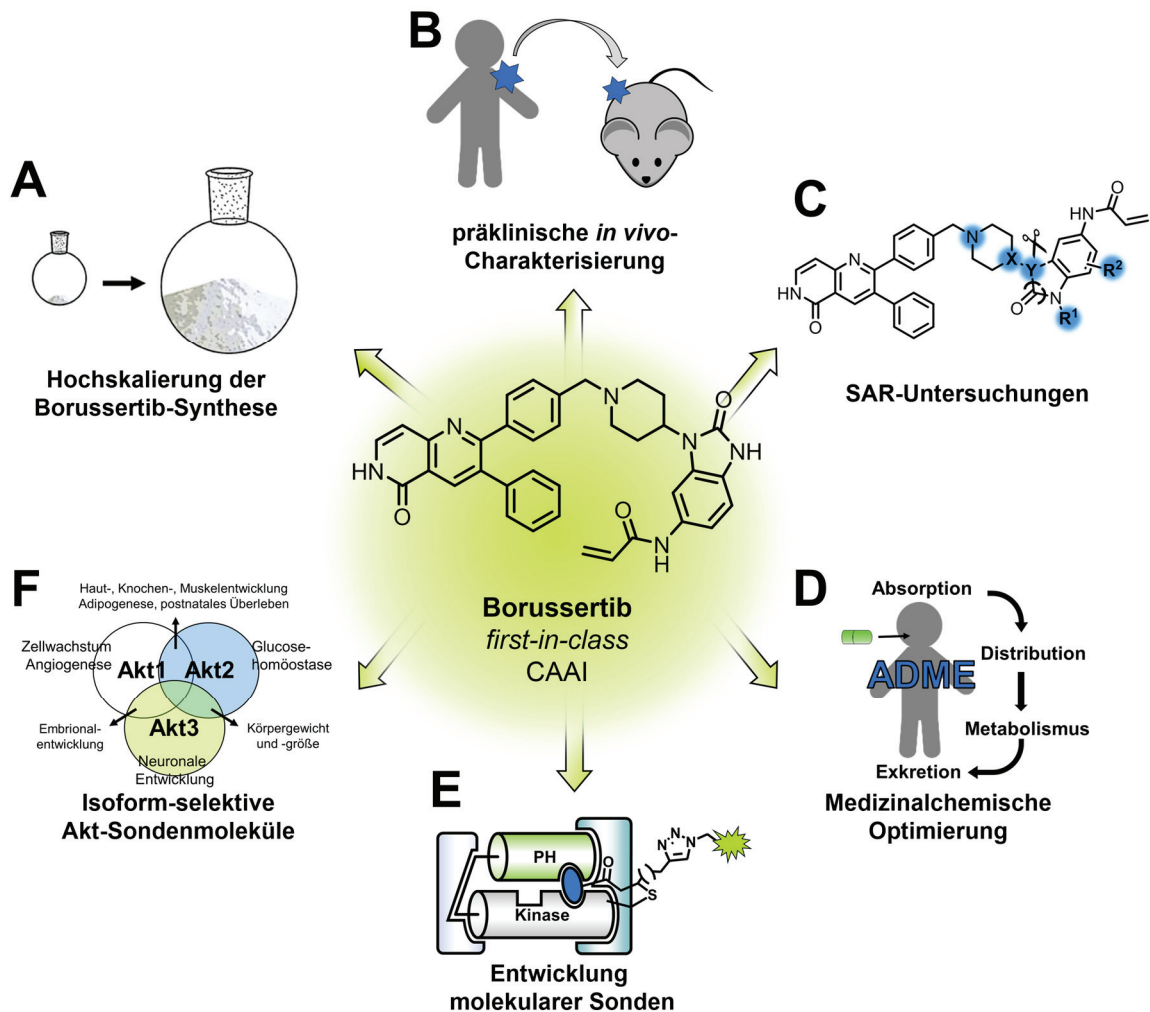


Abbildung 9. Übersicht einiger Interessensfelder für weitere Untersuchungen und Entwicklungen der CAAs. Die in WEISNER und GONTLA *et al.* beschriebene Synthese von Borussertib soll hinsichtlich ihrer Skalierbarkeit im Gramm-Maßstab optimiert werden (A), um eine präklinische Evaluierung in Patientenmaterial-abgeleiteten Xenograft-Modellen (*patient-derived xenografts*, PDX) zu ermöglichen (B).⁹⁹ Darüber hinaus sollten über Derivatisierung und Strukturaufklärung die Struktur-Aktivitätsbeziehung untersucht werden (C). Darauf aufbauend sollte über chemische Derivatisierung sowie pharmakokinetische *in vitro*-Evaluierung eine Optimierung hinsichtlich der PK-Eigenschaften vorangetrieben werden (D). Letztlich ist die Entwicklung molekularer Sonden (E), die eine Interaktionsanalyse erlauben oder über Entwicklung Isoform-selektiver Akt-Inhibitoren zur Aufklärung der nicht-redundanten Isoform-Funktionen beitragen (F), von großem Interesse.

Die von WEISNER und GONTLA *et al.* beschriebene hohe biochemische Potenz von Borussertib versinnbildlicht das enorme Potential von kovalent-allosterischen Inhibitoren hinsichtlich der Adressierung von Akt. Für eine tiefergehende Validierung der Wirksamkeit dieses Wirkstoffkandidaten ist jedoch die Evaluation in komplexeren Modellsystemen wie zellulären Systemen oder Tiermodellen von Nöten. Hierzu bedarf es entsprechend großer Mengen der Zielverbindung, die in einem akademischen Umfeld häufig einen Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt in der Wirkstoffentwicklung darstellen.¹³⁵ Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen dieser Arbeit die literaturbekannte Synthesestrategie für die Darstellung von Borussertib in Kleinstmengen dahingehend optimiert werden, dass diese einen robusten Zugang zu bedeutend größeren Mengen für eine Skalierbarkeit im Gramm-Maßstab erlaubt (Abb. 9A). Borussertib sollte infolgedessen die Untersuchung der pharmakodynamischen sowie pharmakokinetischen Eigenschaften in verschiedenen Patientenmaterial-abgeleiteten Xenograft-Modellen (*patient-derived xenografts*, PDX) für eine *proof-of-concept* Wirksamkeitsstudie von CAAs in Mono- und Kombinationstherapie in unterschiedlichen Krebsarten zu ermöglichen (Abb. 9B). Darüber hinaus sollte auf Grundlage von Röntgenstrukturanalysen von Akt eine Struktur-basierte Derivatisierung von Borussertib erfolgen (Abb. 9C). Mithilfe diverser Variationen im molekularen Grundgerüst sollte der chemische Raum erweitert werden. Über eine biochemische, zelluläre sowie pharmakokinetische Evaluierung der dargestellten Derivate sollten Einblicke in die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) von kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren gewonnen werden. Darauf aufbauend sollte eine weiterführende Optimierung hinsichtlich der pharmakokinetischen Eigenschaften erfolgen, um die Weiterentwicklung von Borussertib hin zu einer oral bioverfügbaren Leitstruktur voranzutreiben (Abb. 9D).

Aufgrund der irreversiblen Stabilisierung des inaktiven PH-*in*-Zustandes eignen sich CAAs ferner zu einer tiefergehenden Untersuchung der Kinase-unabhängigen, jedoch Konformations-abhängigen Eigenschaften von Akt, wie sie in Kapitel 1.3 beschrieben wurden. Daher sollten basierend auf den SAR-Informationen molekulare Sonden entworfen und charakterisiert werden, die eine chemisch-biologische Profilierung des Interaktoms der Proteinkinase erlauben (Abb. 9E). Solche Sondenmoleküle sind darüber hinaus für die Erforschung der nicht-redundanten Funktionen der drei Akt-Isoformen von hoher Bedeutung. Infolgedessen sollten zudem Isoform-selektive kovalent-allosterische Inhibitoren entwickelt werden, um die unterschiedlichen Aufgaben der Isozyme charakterisieren zu können (Abb. 9F).

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte eine mögliche Adressierung Entzündungs-induzierter Resistenzen maligner Melanome genauer untersucht werden. RNA-Sequenzierungen während einer Immunotherapie verdeutlichten hierbei eine Veränderung des Transkriptoms als Reaktion auf die Behandlung. So wurde eine Aktivierung des Glucocorticoid-Stoffwechsels infolge einer erhöhten Expression der 11β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1 (HSD11B1) identifiziert, die somit als möglicher negativer Immun-Checkpoint infrage kommt.[‡] Erste Studien mit dem HSD11B1-hemmenden Glycyrrhizinsäure-Derivat Carbenoxolon zeigte bereits synergistische Effekte mit anti-PD-1-Antikörpern in Xenograft-Modellen, jedoch ist dieser Wirkstoff aufgrund seiner moderaten Potenz und geringen Selektivität für diese Studien nur bedingt geeignet. Um eine Beteiligung von HSD11B1 in der Immunresistenz gezielt validieren zu können, ist die Evaluation von hochpotenten und selektiven HSD11B1-Inhibitoren hinsichtlich synergistischer Effekte wichtig. Daher sollten Literatur-bekannt HSD11B1-Inhibitoren als geeignete Kandidaten identifiziert und in ausreichenden Mengen synthetisiert werden. Nach *in vitro*-Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität sollte schließlich untersucht werden, inwiefern HSD11B1-Inhibitoren in der Lage sind, in einer Kombinationstherapie mit Checkpoint-Inhibitoren eine Immunsensitivität zu regenerieren.

[‡] Prof. Dr. Michael Hölzel (Universitätsklinikum Bonn), unpubliziert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1. Hochskalierung der Borussertib-Synthese

Für die bisherigen biochemischen und zellulären *in vitro*-Studien zu Borussertib waren Inhibitormengen im unteren Milligramm-Bereich ausreichend. Im weiteren Entwicklungsprozess hin zu einem neu-zugelassenen Wirkstoff nehmen nicht nur die Anzahl der Untersuchungen und die Komplexität der Modellsysteme, sondern gleichermaßen die Ansprüche an die synthetische Zugänglichkeit des Kandidaten zu, da die erforderlichen Mengen an Substanz exponentiell ansteigen (Abb. 10).¹³⁶ Es ist daher von großer Bedeutung, bestehende Syntheserouten für den Milligramm-Maßstab in Gramm-Maßstäbe oder höher zu skalieren und hinsichtlich ihrer Effizienz und Robustheit, aber auch ihrer Ökonomie oder Ökologie zu optimieren.

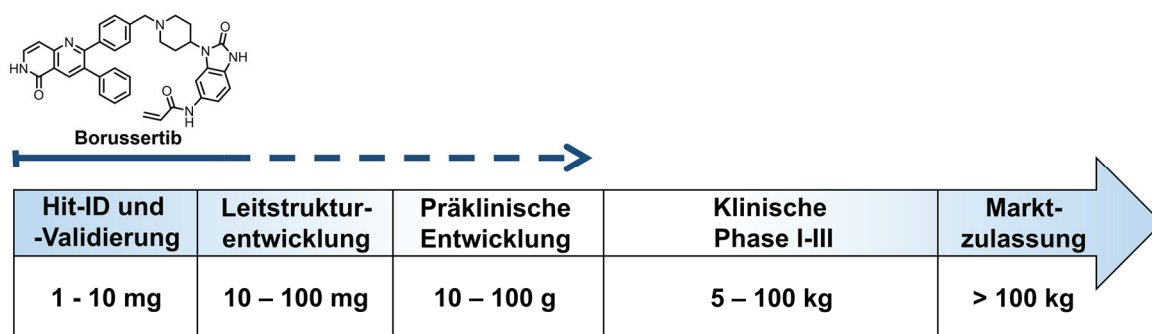
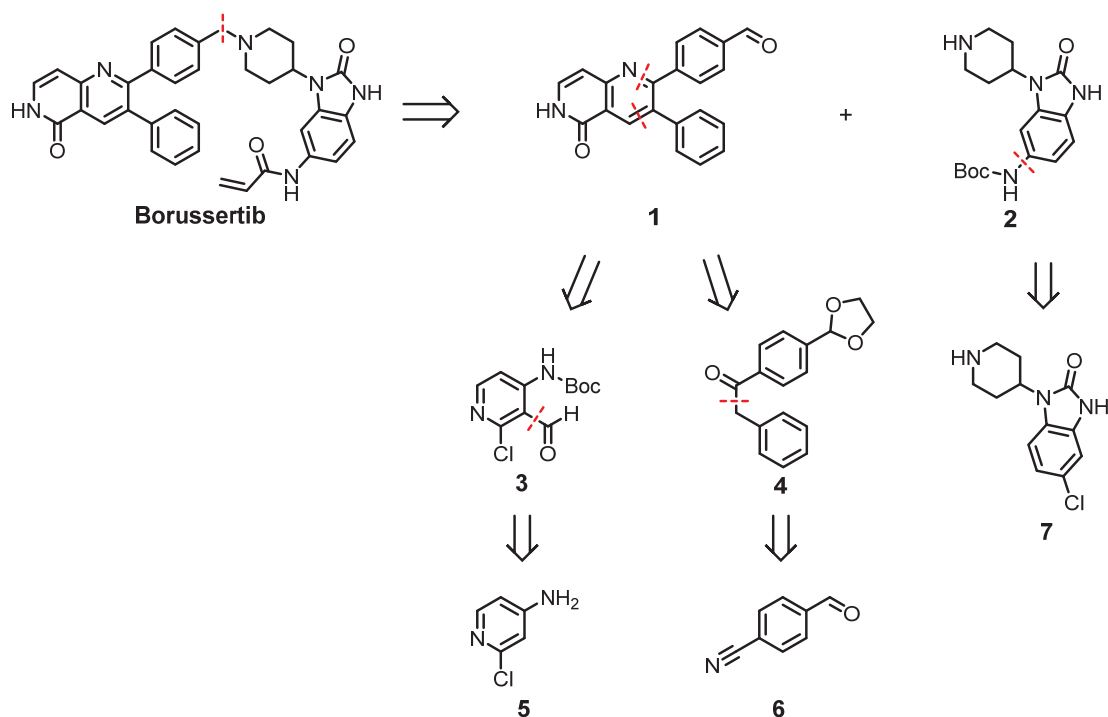


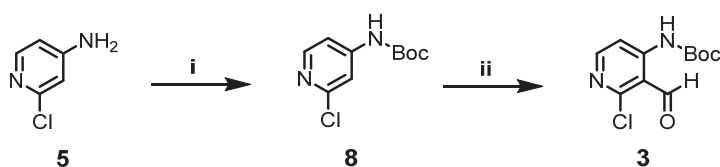
Abbildung 10. Steigerung des Bedarfs an aktiver Substanz im Entwicklungsprozess eines Wirkstoffes. Abbildung angelehnt an SUNJIC und PARNHAM.¹³⁶

Die von WEISNER und GONTLA *et al.* sowie FANG *et al.* beschriebene Synthese zur Darstellung von Borussertib im Kleinstmaßstab diene infolgedessen als Startpunkt für die Entwicklung einer für den Gramm-Maßstab optimierten Synthesestrategie.^{99, 137} Bei Betrachtung der Molekülstruktur lässt sich hierbei die Zielverbindung retrosynthetisch in den 1,6-Naphthyridinon-basierten Aldehyd-Baustein **1** sowie das Benzo[*d*]imidazolon-Derivat **2** unterteilen, die im Rahmen einer konvergenten Synthesestrategie dargestellt werden sollen (Schema 1). Eine solche konvergente Strategie, bei der eine Verzweigung der Syntheseroute und letztliche Zusammenführung der verkürzten Sequenzen erfolgt, weist verglichen mit linearen Synthesestrategien trotz gleicher Anzahl Synthone aufgrund einer Verkürzung der längsten linearen Sequenz eine höhere Effizienz auf.¹³⁸ Infolgedessen sollte Benzaldehyd-Derivat **1** in einer Friedländer-Chinolin-Synthese aus dem Pyridin-Synthon **3** sowie dem Phenon **4** gewonnen werden, welches in einem ebenfalls konvergenten Ansatz aus dem kommerziell verfügbaren Aminopyridin-Baustein **5** sowie 4-Cyanobenzaldehyd (**6**) dargestellt wurde. In einem zweiten, linearen Synthesestrang sollte Synthone **2** ausgehend vom 5-Chlor-substituierten Benzo[*d*]imidazolone **7** synthetisiert werden.



Schema 1. Retrosynthetische Analyse von Borussertib.

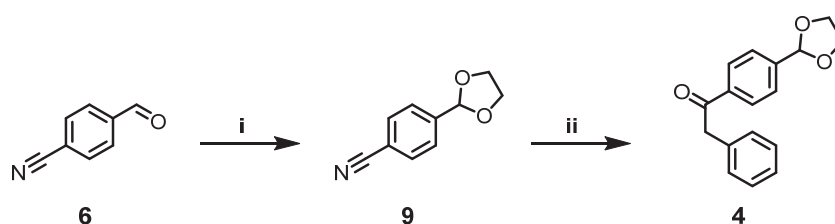
Zur Darstellung des Aldehyds **1** wurde in einem ersten Synthesestrang ausgehend vom Edukt **5** eine *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe am primären Amin in 4-Position eingeführt. Die Schützung erfolgte mit dem Säureanhydrid der Schutzgruppe unter basischen Bedingungen und Zuhilfenahme des nukleophilen Katalysators DMAP.¹³⁹ Trotz unvollständigen Umsatzes konnte eine Ausbeute von 53 % erzielt werden, wobei große Teile des Startmaterials zurückgewonnen wurden. In einem zweiten Schritt wurde das Boc-geschützte Produkt **8** in 3-Position formyliert, indem es in einer Ortho-Metallierung zunächst mit *tert*-Butyllithium an dieser Position lithiiert wurde. Infolgedessen wurde das Organolithium-Intermediat mit DMF als Elektrophil umgesetzt, um das formylierte Produkt **3** zu erhalten. Trotz hoher Sensitivität der Reaktion gegenüber Wasser und Luftsauerstoff konnte unter inerten Bedingungen ein sauberer Reaktionsverlauf beobachtet werden, der in einer Ausbeute von 86 % resultierte.



Schema 2. Darstellung des Pyridin-basierten Intermediats **3**. **i** Boc₂O, DMAP, TEA, DCM, rt, 2 h, 53 %. **ii** *tert*-BuLi, DMF, dTHF, -78 °C – rt, ovn, 86 %.*

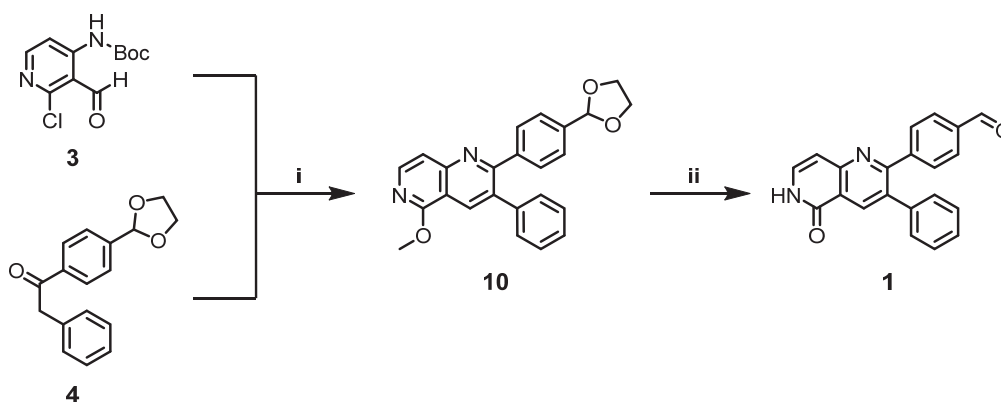
* In Zusammenarbeit mit Dr. Steven Smith (TU Dortmund).¹⁴⁰

In einem zweiten Synthesestrang wurde zunächst ausgehend von 4-Cyanobenzaldehyd **6** die Aldehydfunktion in Form eines zyklischen Acetals geschützt, indem es unter Säurekatalyse mit Ethylenglykol am Wasserabscheider refluxiert wurde, was in einer Ausbeute von 76 % resultierte. Daraufhin wurde **9** in einer Grignardreaktion zum gewünschten Phenon **4** umgesetzt. Dabei wird das Edukt durch Zugabe von Benzylmagnesiumchlorid zunächst in ein entsprechendes Metallalkoxid überführt, welches über Quenching mit einer wässrigsauren NH_4Cl -Lösung in einer Ausbeute von 64 % zu dem gewünschten Produkt hydrolysiert werden konnte.



Schema 3. Darstellung des Phenons **4**. **i** Ethylenglykol, p-TsOH, Toluol, reflux, ovn, 76 %. **ii** BnMgCl , dTHF, 0 °C – rt, 2 h, dann $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{aq}}$, rt, 10 min, 64 %.*

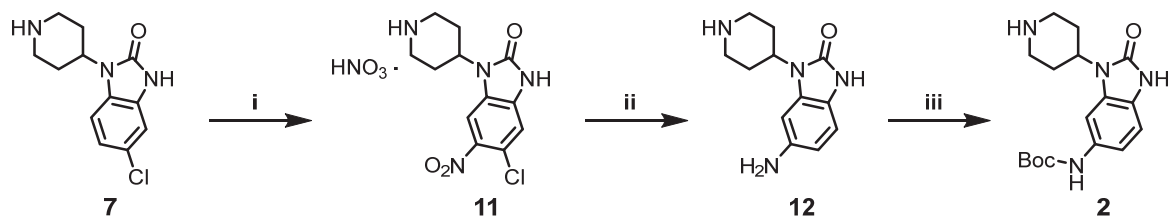
Die beiden Bausteine **3** und **4** wurden daraufhin in einer Friedländer-Chinolin-Synthese umgesetzt, um das 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst zu erhalten (Schema 4). Diese Zyklisierungsreaktion kann sowohl säure- als auch basenkatalysiert ablaufen.¹⁴¹ In der bisher beschriebenen Synthese wurde das Pyridin-Derivat **3** zunächst entschützt und infolgedessen eine basenkatalysierte Zyklisierung durchgeführt.¹³⁷ Diese Zweistufen-Synthese konnte in eine einstufige Synthese zusammengeführt werden, indem die Boc-Schutzgruppe mithilfe von Natriummethanolat als starke Base *in situ* abgespalten und gleichermaßen eine Ringschluss-synthese vorgenommen wurde, was mit einer Ausbeute von 63 % resultierte.¹⁴² Somit konnte das initiale Syntheschema um einen Schritt verkürzt werden, was mit einer Erhöhung der Effizienz sowie Zeitersparnis einherging.



Schema 4. Friedländer-Synthese zur Darstellung des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts. **i** NaOMe (30 % in MeOH), 65 °C, 4 h, 63 %. **ii** 37 % HCl_{aq} , rt, 3 h, 91 %.*

* In Zusammenarbeit mit Dr. Steven Smith (TU Dortmund).¹⁴⁰

Die Darstellung des Benzo[*d*]imidazolons **2** erfolgte in einem parallelen Synthesestrang. Ausgehend vom kommerziell verfügbaren Baustein **7** wurde in einer Nitrierung zunächst Verbindung **11** dargestellt, indem konzentrierte Salpetersäure in der Hitze hinzuge tropft wurde. Der *ortho*-dirigierende Chlor-Substituent bewirkte die literaturbeschriebene Regio-selektivität der Nitrierung in 6-Position.¹⁴³ Die Isolierung von Produkt **11** konnte dahingehend optimiert werden, dass das Rohprodukt in Methanol als Salz der Salpetersäure in quantitativen Ausbeuten gefällt werden konnte.

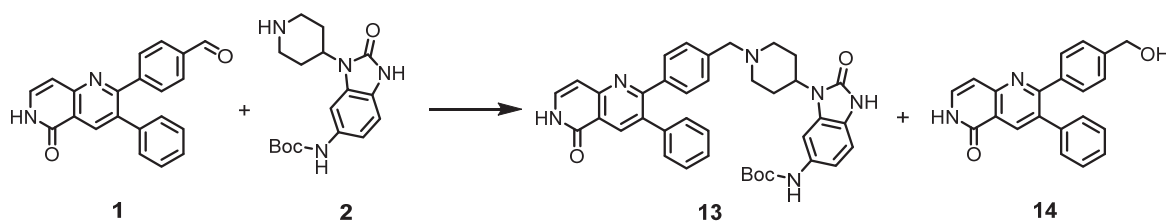


Schema 5. Lineare Syntheseroute zur Darstellung des Benzo[*d*]imidazolon-Baustein **2**. **i** 69 % HNO_3 , *o*-Xylol, 60 °C, 2 h, quant.. **ii** Pd/C, NH_4HCOO , MeOH, reflux, ovn. **iii** Boc_2O , 10 % Essigsäure/ H_2O , 1,4-Dioxan, rt, ovn, 51 % über zwei Schritte.

Nitro-Verbindung **11** konnte in einer Pd-katalysierten Hydrierung zum Amin **12** umgesetzt werden. Hierbei erfolgten die Reduktion der Nitrogruppe zum Amin sowie die reduktive Dehalogenierung in einem Schritt. Im Zuge der Hochskalierung konnte über LCMS festgestellt werden, dass in der von WEISNER und GONTLA *et al.* beschriebenen Reaktionszeit von 30 min die Reduktion der Nitro-Gruppe zwar abgeschlossen, die reduktive Dehalogenierung jedoch unvollständig war.⁹⁹ Über Erhöhung der Katalysatormenge sowie Verlängerung der Reaktionszeit konnte dies hinsichtlich eines vollständigen Umsatzes optimiert werden. Die hohe Polarität von **12** sorgte jedoch für eine extrem anspruchsvolle Reinigung der Zielsubstanz über Extraktion oder Säulenchromatographie. Daher wurde in diesem Schritt auf eine Isolierung verzichtet und **12** ohne weitere Aufarbeitung in einer Boc-Schätzung umgesetzt. Bei diesem Reaktionsschritt musste beachtet werden, dass potentiell zwei nukleophile Amine für die Schätzung vorlagen, wobei jedoch nur das anilinische Amin in Gegenwart des aliphatischen Amin geschützt werden sollte. Dies gelang aufgrund der unterschiedlichen Basizität der Amine in essigsäurem Milieu, indem durch Protonierung des Piperidin-Amins die Nukleophilie herabgesetzt wurde.¹⁴⁴ Über die zwei Schritte der Reduktion sowie Boc-Schätzung konnte eine Ausbeute von insgesamt 51 % erzielt werden. Mit Auslassen der Reinigung nach der Reduktion konnte somit nicht nur ein zeitaufwendiger Schritt vermieden werden, sondern zugleich die Ausbeute im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Angaben (49 % über beide Schritte) leicht erhöht werden.⁹⁹ Wird die Nitrierung mit einbezogen, so konnte die Gesamtausbeute der Darstellung des Benzo[*d*]imidazolons **2** von 30 % auf 51 % gesteigert werden.

Die zwei Synthesestränge sollten daraufhin zusammengeführt werden, indem der Aldehyd-Baustein **1** und der Amin-Baustein **2** in einer reduktiven Aminierung miteinander verknüpft werden. Es wurde zunächst versucht, die für den Kleinstmaßstab beschriebenen Bedingungen auf eine Synthese in größeren Maßstäben zu adaptieren. Die reduktive Aminierung entsprechend der literaturbeschriebenen Bedingung konnte im Gramm-Maßstab nicht reproduziert werden, da über eine LCMS-Analyse lediglich Spuren des gewünschten Produkts festgestellt werden konnten (Tabelle 1, **1.1**).

Tabelle 1. Reduktive Aminierung zur Darstellung des 1,6-Napthyridinon-Derivates **13**.*



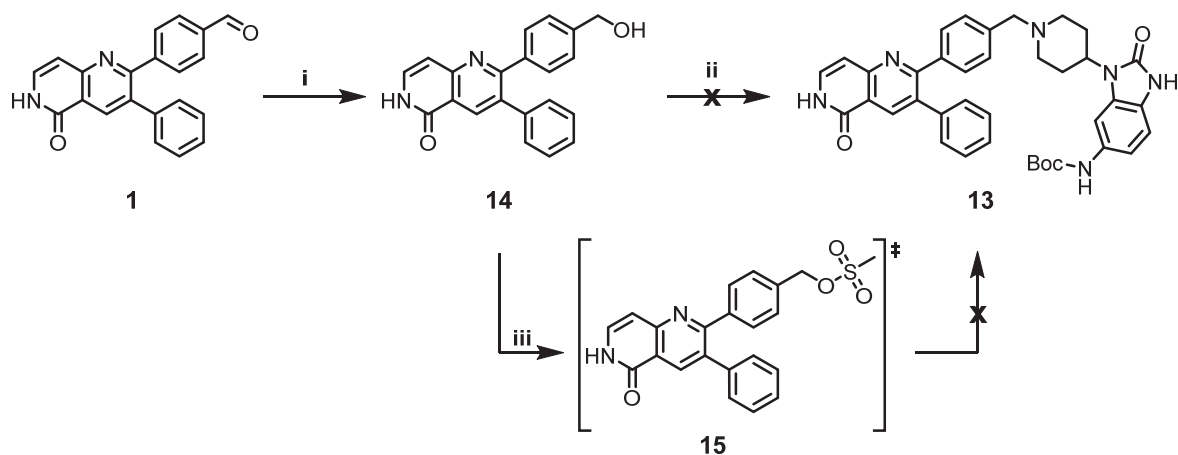
#	Reduktionsmittel	Kat. Säure/Base	Reaktionsbedingung	Ausbeute
1.1	2 Äq. NaCNBH ₃	kat. AcOH/TEA	dMeOH, 75 °C, ovn	Spuren ^a
1.2	2 Äq. NaCNBH ₃	kat. AcOH/TEA	dMeOH, 60 °C – rt, ovn	22 % ^b + Alkohol 14 ^a
1.3	2 Äq. NaCNBH ₃	1 Äq. AcOH/TEA	dMeOH, 60 °C – rt, ovn	Spuren ^a
1.4	2 Äq. NaCNBH ₃	1 Äq. AcOH/TEA	dMeOH, 60 °C – rt, 4 d	33 % ^b
1.5	2 Äq. NaCNBH ₃	kat. AcOH	dTHF, 60 °C – rt, ovn	Spuren ^a + Alkohol 14 ^a
1.6	2 Äq. NaCNBH ₃	kat. AcOH	DMF, 60 °C – rt, ovn	Spuren ^a + Alkohol 14 ^a
1.7	2 Äq. NaCNBH ₃	kat. AcOH	DME/EtOH, 2 h, 130 °C, μ w	Spuren ^a + Alkohol 14 ^a
1.8	2 Äq. NaBH(OAc) ₃	kat. AcOH/TEA	dMeOH, 60 °C – rt, ovn	Spuren ^a
1.9	2 Äq. NaBH(OAc) ₃	1 Äq. AcOH/TEA	dMeOH, 60 °C – rt, ovn	Spuren ^a
1.10	2 Äq. NaBH(OAc) ₃	kat. AcOH	DME/EtOH, rt, on	Spuren ^a
1.11	2 Äq. NaBH(OAc) ₃	kat. AcOH	dMeOH, 60 °C – rt, ovn, Molekularsieb	Spuren ^a

^aüber LCMS-Analyse bestimmt. ^bisolierte Ausbeute.

Reduktive Aminierungen laufen in einem zweistufigen Mechanismus ab. In einem ersten reversiblen Schritt reagiert das Amin mit dem Aldehyd in einer säurekatalysierten Kondensationsreaktion zum Imin, welches in einem zweiten irreversiblen Reaktionsschritt zum entsprechenden Amin reduziert wird. Folglich ergeben sich einige Parameter, die Einfluss auf den Reaktionserfolg haben und somit im Rahmen einer Reaktionsoptimierung variiert wurden (Tabelle 1).

* In Zusammenarbeit mit Dr. Steven Smith (TU Dortmund).¹⁴⁰

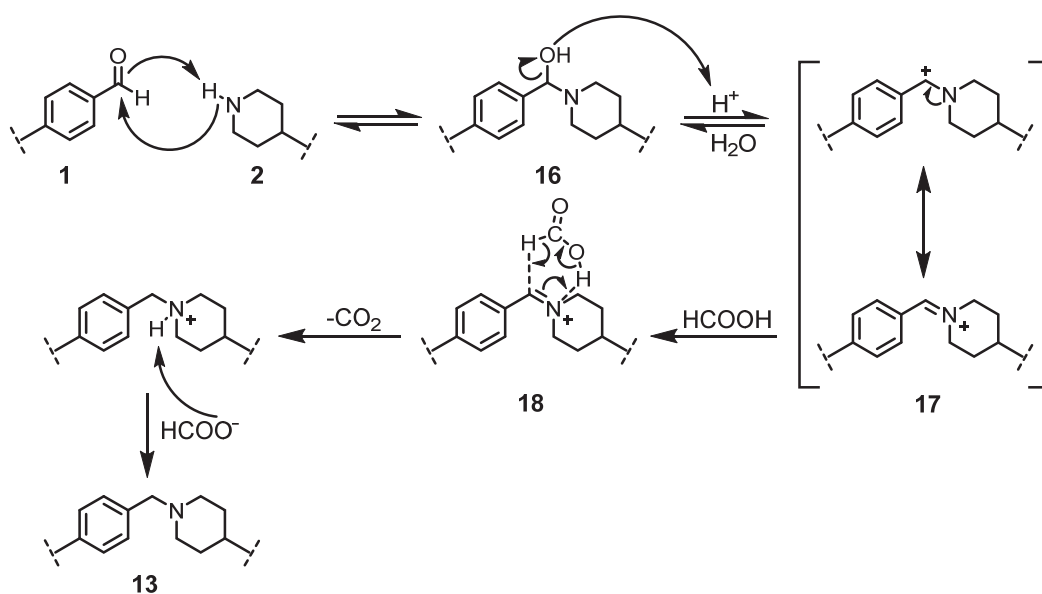
Zunächst wurde über Reduzierung der Temperatur versucht, eine möglicherweise zu schnelle Hydrolyse des Reduktionsmittels Natriumcyanoborhydrid zu vermeiden (**1.2**). Dies führte zwar zu einer Erhöhung der Ausbeute auf 22 %, jedoch wurde eine gesteigerte Nebenproduktbildung von Alkohol **14** beobachtet. Weiterhin wurde die Menge der katalytisch wirkenden Essigsäure bis zu einem Äquivalent erhöht (**1.3**), was bei zusätzlicher Verlängerung der Reaktionszeit auf vier Tage zu einer moderaten Steigerung der Ausbeute auf 33 % führte. Ein weiterer entscheidender Faktor stellt das Lösungsmittel dar, da in den Reaktionsbedingungen **1.1-1.3** eine schlechte Löslichkeit der Edukte festgestellt werden konnte. Jedoch resultierte die Variation von verschiedenen Lösungsmitteln (**1.5**, **1.6**, **1.10**) in keiner Verbesserung des Umsatzes. Auch eine Erhöhung der Wärmezufuhr in einer Mikrowelle führte nicht zu der erhofften Optimierung (**1.7**). Eine entscheidene Limitation scheint die unerwünschte Reduktion des Aldehyds zu sein. Durch Bildung des Alkohols **14** wird hierbei Aldehyd **1** dem Gleichgewicht der Iminbildung irreversibel entzogen. Aus diesem Grund wurde Natriumcyanoborhydrid durch das mildere Natriumtriacetoxyborhydrid ersetzt.¹⁴⁵ Durch diese Veränderung konnte zwar die Bildung des Nebenprodukts **14** verhindert werden, allerdings führte sie lediglich zu minimaler Umsetzung zum gewünschten Produkt. Auch der Einsatz eines Molekularsiebs, welches das in der Iminbildung entstehende Wasser aus der Reaktionsmischung entfernen und so das Gleichgewicht der Reaktion auf Seite des Imins verschieben sollte, verlief erfolglos. Insgesamt konnte über eine klassische reduktive Aminierung keine Bedingung gefunden werden, die für die Synthese im Gramm-Maßstab benötigte Robustheit aufwies. Ein plausibles Hindernis könnte die geringe Reaktivität des hochkonjugierten Aldehyds sowie die mangelhafte Nucleophilie des Amins darstellen, sodass der initiale Schritt der Iminbildung sehr langsam verläuft und das Gleichgewicht der Reaktion auf Seiten der Edukte liegt. Infolgedessen könnten Konkurrenzreaktionen wie die Reduktion des Aldehyds zum Amin auftreten sein. Zusammenfassend stellt diese Form der reduktiven Aminierung keine geeignete Methode für die Aminierung zum gewünschten Produkt **13** dar.



Schema 6. Alternative Möglichkeiten der Aminierung zu Produkt **13**. **i** NaBH₄, EtOH, 90 °C, 1 h, quant. **ii** 2, PPh₃, DDQ, DCM, rt, ovn. **iii** MsCl, TEA, DCM, 0 °C – rt, 2 h, dann **2**, rt ovn.

Als alternativer Ansatz wurde der Aldehyd **1** zunächst gezielt zum Alkohol **14** reduziert (Schema 6). Dies erfolgte über das Hydrierungsreagenz Natriumborhydrid und verlief mit quantitativen Ausbeuten. Ausgehend von **14** konnten zwei verschiedene Bedingungen für eine anschließende Aminierung getestet werden. Zum einen sollte diese über eine Mitsunobu-Reaktion erfolgen, die sich durch besonders milde Reaktionsbedingungen wie dem Einsatz von Triphenylphosphin (PPh₃) auszeichnet.¹⁴⁶ Allerdings zeigte sich kein Umsatz zum gewünschten Produkt, was darin begründet sein könnte, dass in dieser Klasse von Reaktionen saure Pronukleophile als Substrate bevorzugt sind und basische Pronukleophile wie das Piperidin von **2** eine Limitation darstellen könnten.¹⁴⁷ Zum anderen sollte daher der Alkohol durch Mesylierung in eine gute Abgangsgruppe überführt werden, sodass eine nukleophile Substitution durch **2** möglich ist. Auch bei dieser Reaktion konnte nicht das gewünschte Produkt dargestellt werden. Die LCMS-Analyse verdeutlichte, dass bereits die Bildung des Mesylats scheiterte. Somit stellten weder die Mitsunobu-Aminierung noch die nukleophile Substitution des Mesylats eine geeignete Alternative zur reduktiven Aminierung dar.

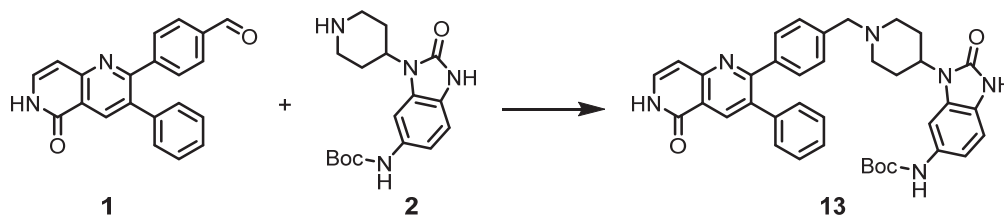
Eine weitere Variante der reduktiven Aminierung ist die sogenannte Leuckart-Wallach-Reaktion. Hierbei wird zur Umsetzung einer Amin- und einer Aldehydspezies Ameisensäure anstelle von Borhydriden als Reduktionsmittel eingesetzt. Mechanistisch wird für diesen Fall angenommen, dass der Piperidin-Stickstoff von **2** das Carbonyl-Kohlenstoffatom nukleophil angreifen kann, sodass Alkohol **16** entsteht (Schema 7). Über saure Wasserabspaltung wird das Carbokation **17** gebildet, welches resonanzstabilisiert ist. In einen sechsgliedriger Übergangszustand wird Ameisensäure so orientiert, dass im Zuge einer Decarboxylierung das benzyliche Amin **13** entsteht. Die irreversible Freisetzung von Kohlendioxid stellt die Triebkraft der Reaktion dar.



Schema 7. Vorgeschlagener Mechanismus der Aminierung nach LEUCKART und WALLACH.¹⁴⁸

Vor diesem Hintergrund wurde die Anwendbarkeit der Leuckart-Wallach-Reaktion auf die vorliegende Aminierung untersucht (Tab. 2). Zusätzlich zu der Verwendung von Ameisensäure als Reduktionsmittel wurde der möglicherweise positive Einfluss von Orthoameisensäuretriethylester als Additiv überprüft, für welches angenommen wird, dass es mit dem in der Kondensationsreaktion freigesetzten Wasser reagiert und es so dem Gleichgewicht entzieht, um eine weitere Triebkraft zu generieren.¹⁴⁹

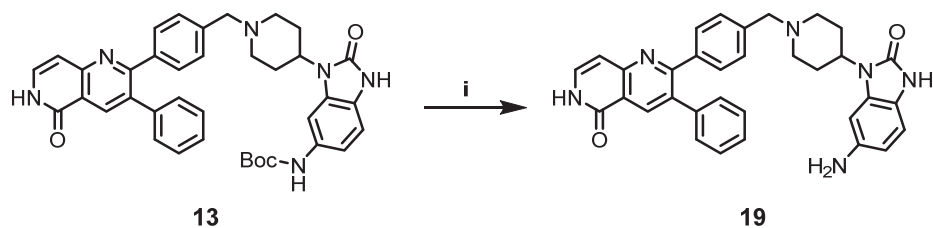
Tabelle 2. Testung verschiedener Reaktionsbedingungen der Leuckart-Wallach-Aminierung von **1** und **2** zum 1,6-Naphthyridinon-Derivat **13**.



#	Reaktionsbedingungen	Additiv	Ausbeute ^a
2.1	MeCN, Ameisensäure, 80 °C, ovn	Orthoameisensäuretriethylester	27 %
2.2	MeCN, Ameisensäure, 80 °C, ovn	/	54 %

^aisolierte Ausbeute.

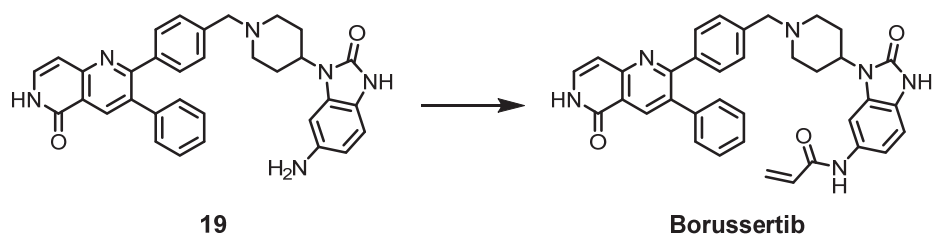
Die Leuckart-Wallach-Reaktion mit Ameisensäure und dem Additiv Orthoameisensäuretriethylester zeigte in der LCMS-Analyse verglichen mit den vorherigen Bedingungen zur reduktiven Aminierung eine deutliche Steigerung des Umsatzes der Edukte, jedoch auch die Bildung eines sehr prominenten unbekanntes Nebenprodukts, sodass lediglich eine Ausbeute von 27 % erzielt werden konnte (Tabelle 2). Ohne Verwendung dieses Additivs konnte die Bildung des Produkts gesteigert und die Entstehung des Nebenprodukts minimiert werden, was eine Erhöhung der Ausbeute auf 54 % zur Folge hatte. Darüber hinaus zeigte sich, dass unter diesen Reaktionsbedingungen eine Skalierbarkeit im Gramm-Maßstab ohne Ausbeuteverluste möglich war, was für eine besonders gute Eignung dieser Reaktion bezüglich der Darstellung großer Mengen spricht. Ein weiterer wichtiger Vorteil im Vergleich zu den alternativen reduktiven Aminierungen ist der saubere Reaktionsverlauf der Reaktion sowie aus ökonomischer und ökologischer Sicht das Aussparen der äußerst toxischen Borhydride.¹⁵⁰ Nach erfolgreicher Optimierung der Aminierung und Darstellung des Zwischenprodukts **13** konnte schließlich über Boc-Entschützung und Acrylamid-Kupplung Borussertib dargestellt werden. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde unter Zugabe einer 4 N Chlorwasserstoff-Lösung in 1,4-Dioxan vorgenommen (Schema 8). Obwohl die Reaktion relativ langsam verlief, konnte nach einer Reaktion über Nacht eine Ausbeute von 75 % erzielt werden.



Schema 8. Saure Abspaltung der Boc-Schutzgruppe zur Darstellung des Amins **19**. **i** 4 N HCl in 1,4-Dioxan, rt, ovn, 75 %.

Die Einführung der Acrylamid-Gruppe erfolgte über eine Additions-Eliminierungsreaktion nach Schotten-Baumann-ähnlichen Bedingungen unter Einsatz von Acryl-Carbonsäurechlorid (Acryloylchlorid). Zur Optimierung dieses Reaktionsschrittes wurden die Äquivalente an Acryloylchlorid sowie Reaktionszeit und Lösungsmittel variiert. Eine äquivalente Verwendung der von WEISNER und GONTLA *et al.* beschriebenen Bedingungen führte bei höherer Skalierung zu moderaten Ausbeuten (Tabelle 3, **3.1**).⁹⁹ Ein Grund hierfür war ein unvollständiger Umsatz der Reaktanden sowie der aufwendigen chromatographischen Trennung von Edukt und Produkt, was signifikante Ausbeuteverluste zur Folge hatte. Um einer möglichen limitierenden Löslichkeit entgegenzuwirken, wurden polarere Lösungsmittel wie DMF (**3.2**) oder 1,4-Dioxan (**3.3**) verwendet, wobei jedoch keine Produktbildung beobachtet werden konnte, was mit den nicht-inerten Eigenschaften der Lösungsmittel und der hohen Reaktivität des Säurechlorids zusammenhängen könnte. Die Wahl einer alternativen Aktivierung der Acrylsäure über Peptid-Kupplungsreagenzien brachte ebenfalls keinen Erfolg (**3.4**).

Tabelle 3. Einführung der Acrylamid-Gruppe zur Darstellung von Borussertib.



#	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
3.1	1.1 Äq. Acryloylchlorid, DIPEA, DCM, 0°C - rt, 2h	16 % ^a
3.2	1.1 Äq. Acryloylchlorid, DIPEA, DMF, rt, 2h	n.d.
3.3	1.1 Äq. Acryloylchlorid, DIPEA, 1,4-Dioxan, rt, 2h	n.d.
3.4	Acrylsäure, HOBt, EDC, DCM, rt, 2h	Spuren ^b
3.5	3x1 Äq. Acryloylchlorid, DIPEA, dTHF, rt, ovn	82 % ^a

n.d. nicht detektierbar. ^aisolierte Ausbeute. ^büber LCMS-Analyse.

Letztlich wurden die initialen Bedingungen von **3.1** insofern optimiert, als dass die Reaktionszeit verlängert und schrittweise zwei weitere Äquivalente des Säurechlorids zugegeben wurden, um überschüssiges Edukt aus der Reaktionsmischung zu titrieren, was über Dünnschichtchromatographie verfolgt werden konnte. Diese Vorgehensweise (**3.5**) resultierte schließlich in einer Ausbeute von 82 %. Insgesamt konnte eine robuste Syntheseroute entwickelt und optimiert werden, die für die Darstellung von Borussertib in großen Mengen geeignet ist. Über eine konvergente Synthesestrategie konnte die Darstellung des zentralen 1,6-Naphthyridinon-Bausteins **1** um einen Schritt verkürzt werden, was mit einer Erhöhung der Effizienz und einer Zeitersparnis einherging. Für den Benzo[*d*]imidazol-Baustein **2** wurde die Synthese dahingehend optimiert, dass über eine Anpassung der Reinigungsmethoden höhere Ausbeuten erzielt werden konnten. Die Zusammenführung der beiden Synthesestränge zu **13** über eine Aminierung stellte sich als kritischer Schritt der Syntheseroute heraus, welcher jedoch über eine Leuckart-Wallach-Reaktion mit guten Ausbeuten bewältigt werden konnte. Nach finaler Entschützung und Acrylamid-Kupplung konnte Borussertib mit einer Gesamtausbeute von 9 % dargestellt werden. Damit konnte die Effizienz der optimierten Syntheseroute im Vergleich zu der publizierten Syntheseroute (Gesamtausbeute: 3 %) verdreifacht werden. Darüber hinaus ist die Verwendung einer Leuckart-Wallach-Reaktion anstelle einer klassischen reduktiven Aminierung in Hinblick auf Ökonomie und Ökologie bei der Synthese großer Mengen an Zielsubstanz von Vorteil. Über diese optimierte Synthesestrategie konnten im Rahmen dieser Arbeit 2 g der angestrebten Verbindung Borussertib dargestellt werden, die somit für eine tiefergehende präklinische Profilierung zur Verfügung standen.[§]

[§] Unter Mithilfe von Dr. Steven Smith und M. Sc. Marius Lindemann.

3.2. Präklinische Charakterisierung von Borussertib

Die hohe Potenz sowie die wirksame Inhibition des Akt-Signals in zellulären Systemen unterstreicht das große Potential von Borussertib als CAAI.⁹⁹ Über die Entwicklung einer robusten Syntheseroute konnten ausreichende Mengen an Inhibitor dargestellt werden, um weiterführende Studien durchführen zu können. Infolgedessen war es im Zuge einer präklinischen Evaluierung von Bedeutung, die Wirksamkeit von CAAs *in vivo* im Rahmen einer *proof-of-concept*-Tiermodellstudie zu untersuchen.

3.2.1. Pharmakokinetische Profilierung von Borussertib

Neben der Pharmakodynamik, die die Wirkung einer Substanz auf den Organismus beschreibt, spielen auch pharmakokinetische Faktoren eine entscheidende Rolle.¹⁵¹ Diese beschreiben die Gesamtheit aller Vorgänge einschließlich der Aufnahme, der Verteilung, des Metabolismus sowie der Ausscheidung des Wirkstoffs und damit die sogenannten ADME-Parameter (von engl. *absorption, distribution, metabolism, excretion*) umfassen. Da limitierende pharmakokinetische Eigenschaften immer noch einen nicht unerheblichen Grund für das Scheitern von Wirkstoffkandidaten in der klinischen Entwicklung darstellt, ist eine Einbeziehung dieser Parameter zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Wirkstoffentwicklung von hoher Bedeutung.¹⁵² Daher wurde für Borussertib zunächst eine *in vitro* Profilierung verschiedener wichtiger pharmakokinetischer Kenngrößen von Borussertib durchgeführt (Tabelle 4). So wurde mithilfe des *SolRank*-Assays eine geringe kinetische Löslichkeit von 14,1 μM ermittelt. Diese liegt wahrscheinlich in der hohen Lipophilie der Verbindung begründet, welche unter Berücksichtigung des hohen berechneten Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten clogP untermauert wird. Neben der Löslichkeit wurde auch die Permeabilität untersucht, indem in einem *parallel artificial membrane permeability*-Assay (PAMPA) die Permeabilität von Borussertib über eine künstliche Doppelmembran evaluiert wurde, die sich mit unter 5 % als sehr gering einstufen ließ. Um komplexere Einblicke in die Möglichkeit einer oralen Absorption zu erlangen, wurde die Permeabilität über ein Dünndarmepithel mithilfe eines Caco-2 Assays analysiert. Die apparente Permeabilität vom apikalen zum basolateralen Kompartiment wies eine äußerst geringe Absorption von Borussertib auf. Um die Mechanismen der Auf- und Abgabe an der Caco-2-Monoschicht genauer untersuchen zu können, wurde zusätzlich die Permeabilität von basolateral nach apikal untersucht und daraufhin der Quotient beider Werte gebildet. Das hohe Verhältnis beider apparenten Permeabilitäten von 105 verdeutlichte, dass ein vielfach höherer Efflux im Vergleich zur Absorption stattfand und somit neben der geringen passiven Permeabilität auch auf einen aktiven Efflux geschlossen werden kann. In weiteren Versuchen wurde fortführend die Stabilität und Verteilung von Borussertib in Blutplasma untersucht.

Tabelle 4. Pharmakokinetische *in vitro* Profilierung von Borussertib. Die Bestimmung der kinetischen Löslichkeit erfolgte über den *SolRank*-Assay. Zur Bestimmung der Permeabilität wurde der *Parallel Artificial Membrane Permeability*-Assay (PAMPA) sowie der Caco-2 Assay durchgeführt. Des Weiteren wurden Plasmastabilität, Plasmaprotein-Bindung und die mikrosomale Phase I-Stabilität untersucht.

PK-Parameter	Borussertib
Löslichkeit	
Kinetische Löslichkeit pH 7.4 [μM] ^a	14,1
cLogP ^b	4,1
Permeabilität	
PAMPA [%] ^a	< 5
Caco-2 (pH 6.5/7.4) P _{app} [10^{-6}cm/s] A \rightarrow B*, ^a	0,04
Caco-2 (pH 6.5/7.4) P _{app} [10^{-6}cm/s] B \rightarrow A*, ^a	4,03
Verhältnis Caco-2 B \rightarrow A/A \rightarrow B ^a	105
Plasmastabilität	
Plasmastabilität [%] murin/human ^a	100/99
Plasmaprotein-Bindung [%] murin/human ^a	98,65/99,90
Mikrosomale Stabilität Phase I	
t _{1/2} [min] murin/human ^c	46/99
Cl _{int} [$\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$] murin/human ^c	30/5

*A: apikal, B: basolateral. ^agemessen von Dr. Matthias Baumann und Anke Unger (Lead Discovery Center, LDC). ^bberechnet mit ChemDraw Professional, Version 15. ^cgemessen von M. Sc. Julia Hardick, TU Dortmund.

Es zeigte sich sowohl in murinen als auch humanen Blutplasma eine hervorragende Stabilität. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass in den Plasmaproben beider untersuchter Spezies eine sehr hohe Plasmaprotein-Bindung beobachtet werden konnte. Um die metabolische Stabilität von Borussertib evaluieren zu können, wurde die Stabilität im Phase I-Metabolismus durch Koinkubation mit murinen und humanen Lebermikrosomen untersucht. Hierbei zeigte sich zwar eine vergleichsweise leicht höhere Stabilität in humanen Mikrosomen, jedoch konnte insgesamt relativ geringe Cl_{int}-Werte ermittelt werden, die somit auf eine gute Stabilität im Phase I Metabolismus hindeuten.

Zusammenfassend ergab die *in vitro*-Profilierung der pharmakokinetischen Eigenschaften von Borussertib, dass der Wirkstoffkandidat hohen Optimierungsbedarf hinsichtlich der Löslichkeits- sowie Permeabilitätseigenschaften aufweist. Sowohl in Blutplasma als auch in Lebermikrosomen konnte hingegen eine ausreichende Stabilität festgestellt werden. Die hohe Plasmaprotein-Bindung wird für kovalente Inhibitoren häufig beobachtet und wurde daher als nicht besonders nachteilig betrachtet.¹⁵³

Vor dem Hintergrund der *in vitro*-Profilierung wurde die Bioverfügbarkeit von Borussertib in Mäusen bei intravenöser (i.v.), intraperitonealer (i.p.) sowie peroraler (p.o.) Applikation untersucht (Abb. 11). Aus den entsprechenden Konzentrations-Zeit-Diagrammen konnte bei intravenöser Verabreichung das erwartete sofortige Anfluten der Wirkstoffkonzentration beobachtet werden, die mit einer Halbwertszeit von 51 min abfiel. Eine intraperitoneale Applikation resultierte in einem langsameren Anfluten, sodass nach 45 min (T_{max}) bei einer Dosis von 20 mg/kg eine maximale Plasmakonzentration von 1,14 μM erreicht werden konnte. Mithilfe der ermittelten Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC_{0-t}) bei intravenöser und intraperitonealer Applikation konnte eine ordentliche Bioverfügbarkeit nach i.p. Verabreichung von 39,6 % berechnet werden.

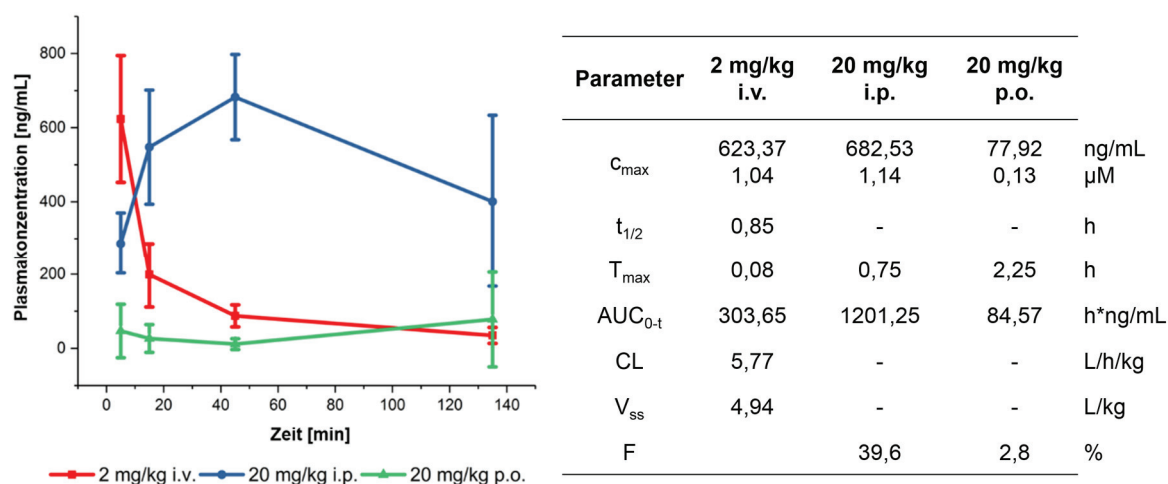


Abbildung 11. Pharmakokinetische *in vivo*-Profilierung von Borussertib bei unterschiedlicher Applikation in RjOrl:SWISS Mäusen. Es wurde die Bioverfügbarkeit bei intravenöser (i.v.), intraperitonealer (i.p.) sowie peroraler (p.o.) Administration untersucht, indem nach 5, 15, 45 und 135 Minuten Blutproben entnommen wurden und die Wirkstoffkonzentration über LCMS/MS-Analyse ermittelt wurde. Aus der Auftragung gegen die Zeit konnte die maximale Plasmakonzentration C_{max} , die Plasmahalbwertszeit $t_{1/2}$, die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve AUC_{0-t} , die apparente Clearance CL, das apparente Verteilungsvolumen V_{ss} sowie die Bioverfügbarkeit F berechnet werden.^ϕ

Für eine perorale Applikation konnte hingegen eine maximale Plasmakonzentration von lediglich 0,13 μM und eine Bioverfügbarkeit von 2,8 % erreicht werden. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den *in vitro* ermittelten Caco-2 Permeabilitätsparametern, die bereits eine schwache Absorption sowie einen aktiven Efflux indizierten. Während folglich die perorale Bioverfügbarkeit streng limitiert ist und weiterer Optimierung bedarf, konnte eine intraperitoneale Bioverfügbarkeit festgestellt werden, die für pharmakodynamische Untersuchungen in Maus-Xenograft-Modellen ausreichend war.

^ϕ Die *in vivo*-PK-Studien wurden von Georgia Günther (Arbeitskreis Prof. Dr. Hengstler, IfADo) durchgeführt. Die LCMS/MS-Analyse erfolgte durch das Lead Discovery Center (LDC).

3.2.2. Evaluierung von Borussertib in PDX-Modellen

Um Erkenntnisse darüber gewinnen zu können, inwiefern sich die überlegenen Eigenschaften der CAAls auch in komplexeren Systemen bestätigen lassen, wurde eine *in vivo-proof-of-concept*-Studie durchgeführt. Die Verwendung konventioneller Krebszelllinien ist hierbei mit einigen Limitationen verbunden, da die entsprechenden Zellen an ein optimales Wachstum unter *in vitro* Bedingungen angepasst sind, nicht die komplexe Tumorerogenität abbilden und infolgedessen eine eingeschränkte prädiktive Aussagekraft für die klinische Entwicklung haben.¹⁵⁴ Um eine möglichst hohe Relevanz der *in vivo* Studie zu erlangen, wurden daher PDX-Modelle verwendet. Diese entstehen durch direkte Implantation von Tumorgewebe eines Patienten in Xenograft-Mäuse.¹⁵⁵ Dadurch behalten die Modelle im hohen Maß die histologischen und genetischen Eigenschaften des Spendertumors und repräsentieren somit dessen charakteristische Heterogenität und anatomische Mikroumgebung.¹⁵⁶

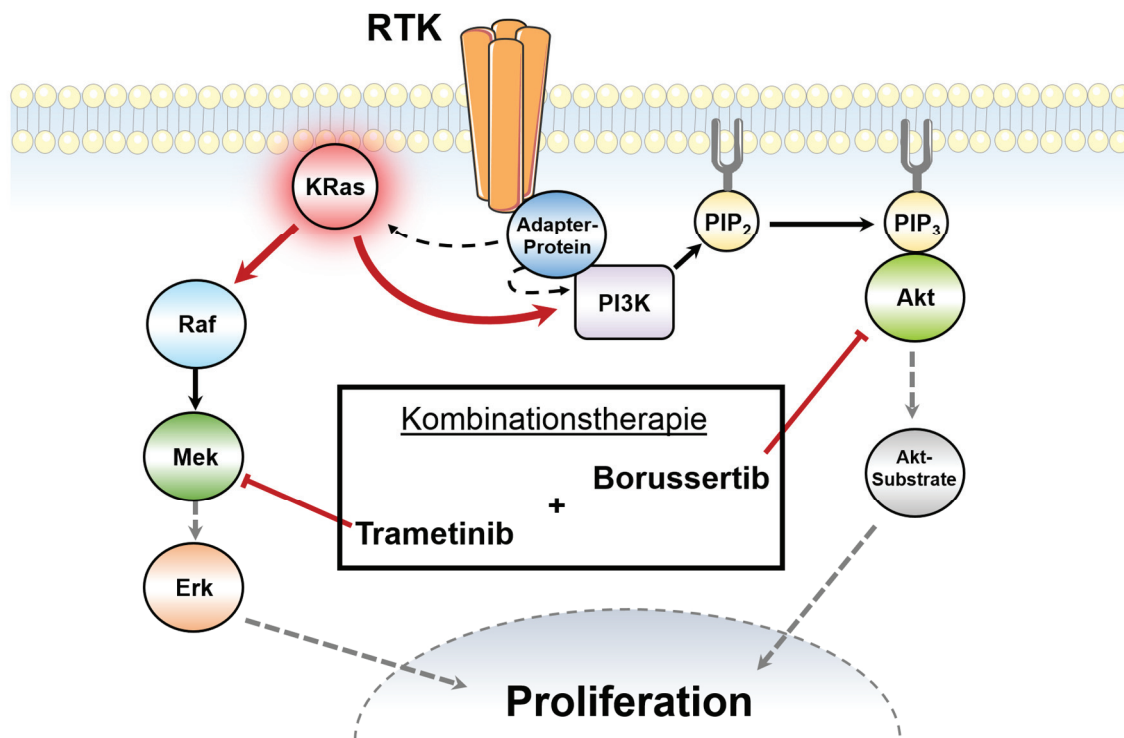
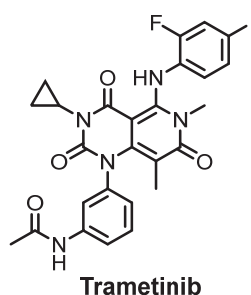


Abbildung 12. Rational der Kombinationstherapie von Borussertib und Trametinib zur Behandlung KRas-abhängiger Tumore. Die Tumore weisen eine konstitutionelle Aktivierung des Onkogens KRas auf, sodass unabhängig von Rezeptorsignalen eine Überaktivierung sowohl des Akt- als auch des MAP-Kinase-Signalwegs erfolgt. Die zielgerichtete Inhibition von Mek und Akt soll beide Signalwege inhibieren und infolgedessen Apoptose auslösen.

Für die Validierung der *in vivo* Wirksamkeit von CAAls ist neben der Wahl des Tiermodells auch die Wahl einer geeigneten Tumorentität entscheidend. Im Rahmen dieser Arbeit wurden KRas-abhängige Tumormodelle abgeleitet von primären Pankreas- und Darmtumoren verwendet.

Das kleine G-Protein KRas ist einer der bedeutsamsten Schalter der Signaltransduktion. Aktivierende Mutationen in KRas werden in 25 % aller humanen Karzinome identifiziert, sodass das Onkogen eines der attraktivsten Ziele der Krebsforschung darstellt.¹⁵⁷⁻¹⁵⁸ Bis auf wenige Ausnahmen führte die zielgerichtete Adressierung von KRas trotz intensiver Forschung nicht zu bahnbrechenden Erfolgen, sodass das Patienten mit KRas-abhängigen Tumoren lange als nicht-therapierbar galten.¹⁵⁹ KRas ist der Schlüsselspieler in der Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs, über den durch eine Kaskade der MAP-Kinasen Raf, Mek und Erk wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation gesteuert werden (Abb. 12).¹⁶⁰ Allerdings zeigten gezielt gegen die KRas-nachgeschalteten MAP-Kinasen eingesetzte Inhibitoren kein dauerhaftes Ansprechen auf eine Behandlung, was mit einer redundanten Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs zusammenhängt.⁴⁹ Darüber hinaus weist ein signifikanter Anteil KRas-mutierter Tumore weitere aktivierende Mutationen im Akt-Signalweg auf.¹⁶¹ Aus dieser redundanten Verzweigung des MAP-Kinase- und des Akt-Signalwegs ergibt sich das Rational für eine Kombinationstherapie mit MAP-Kinaseinhibitoren und Inhibitoren des Akt-Signalwegs (Abb. 12). Aus diesem Grund wurden die KRas-abhängigen PDX-Modelle hinsichtlich eines Ansprechens auf eine Kombination aus dem CAAI Borussertib und dem Mek-Inhibitor Trametinib (Mekinist, GlaxoSmithKline) untersucht.¹⁶²



Schema 9. Struktur des Mek-Inhibitors Trametinib (Mekinist, GlaxoSmithKline).

Basierend auf den Ergebnissen der PK-Profilierung wurde Borussertib einmal täglich über eine intraperitoneale Applikation von 20 mg/kg verabreicht und sowohl in Monotherapie als auch in Kombinationstherapie mit Trametinib (peroral, 0,5 mg/kg, 5 Tage/Woche) über vier Wochen untersucht. Es wurden insgesamt acht verschiedene KRas-abhängige Pankreas- und Colorektalkarzinome behandelt.⁵ Das relative Tumorwachstum wurde daraufhin gegen die Zeit der Behandlung aufgetragen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Monotherapie mit Borussertib teilweise zu einer Verringerung des Tumorwachstums führte, wie bei der Behandlung des Colorektal-Karzinoms BoC105 besonders deutlich wurde (Abb. 13C).

⁵ Die Durchführung der PDX-Xenograft-Studien erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Hahn (Christoph Reintjes, Ruhr-Universität Bochum).

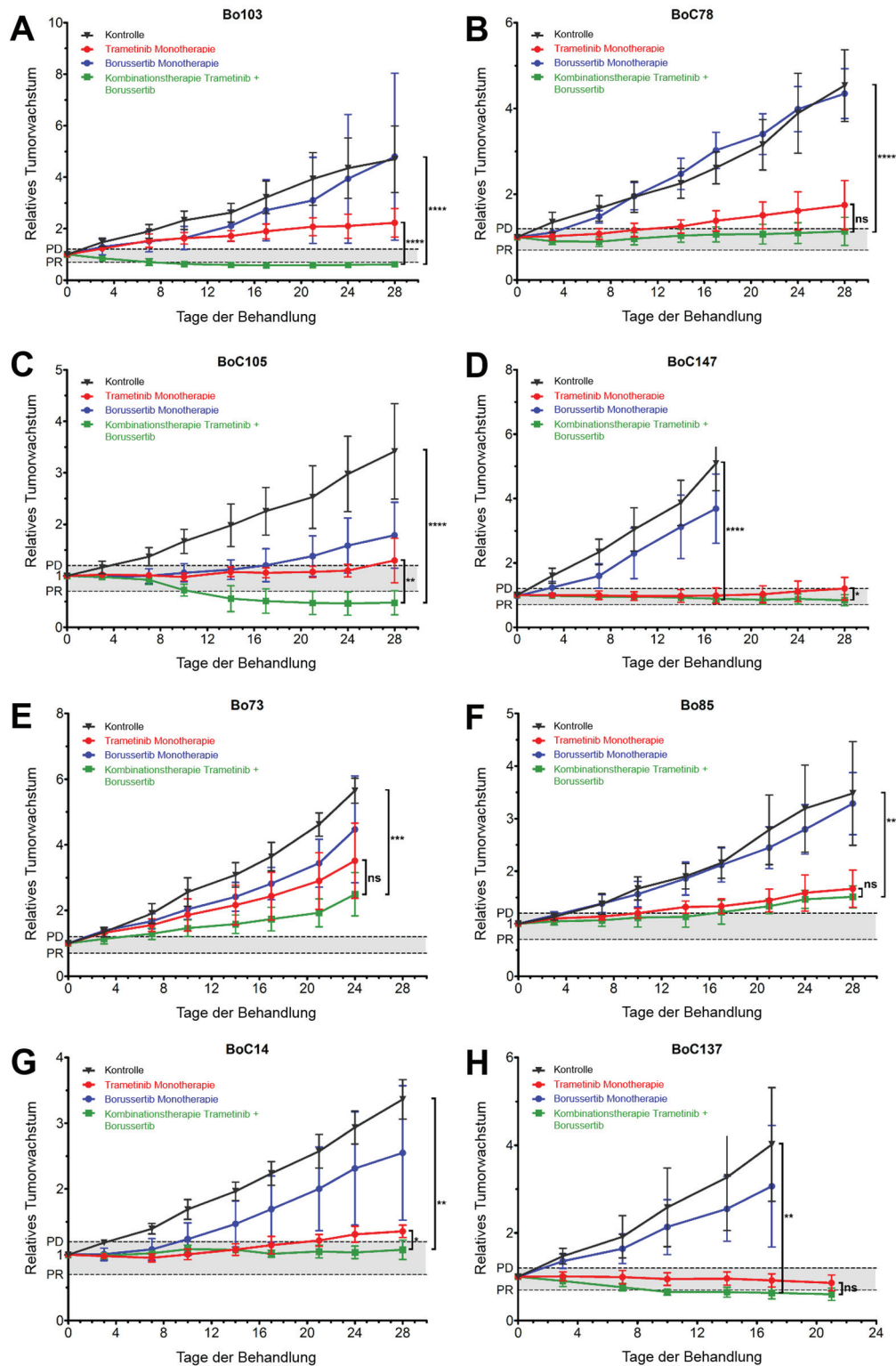


Abbildung 13. *In vivo* Effizienz von Borussertib, Trametinib und der Kombination aus beiden Inhibitoren in KRas-abhängigen Pankreas- (A, E, F) und Kolorektal (B-D, G, H) PDX-Modellen. PD: Progressives Wachstum (+20 % der Basislinie), PR: Partielles Ansprechen (-30 % der Basislinie) nach RECIST 1.1 Kriterien. ns, nicht signifikant. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$, Zweistichproben-t-Test.⁵

⁵ Die Durchführung der PDX-Xenograft-Studien erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Hahn (Christoph Reintjes, Ruhr-Universität Bochum).

Für die Monotherapie mit Trametinib konnte in allen getesteten Pankreas- und Kolorektalkarzinomen eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums festgestellt werden. Allerdings konnte nur in Kombination mit Borussertib und Trametinib eine *partial response* (PR), ein partieller Rückgang des Tumorumfanges von mindestens 30 %, in den colorektalen Tumormodellen BoC105 (Abb. 13C) und BoC137 (Abb. 13H) erzielt werden.¹⁶³ In den vier Tumormodellen Bo103 (Abb. 13A), BoC78 (Abb. 13B), BoC147 (Abb. 13D) und BoC14 (Abb. 13G) konnte eine Stabilisierung des Tumorumfanges erreicht werden. Damit zeigte die Kombinationstherapie mit Borussertib und Trametinib in Summe signifikante Vorteile bezüglich eines Ansprechens der KRas-abhängigen Tumormodelle gegenüber der Monotherapie mit einer der beiden Inhibitoren. Durch Aufzeigen der synergistischen Aktivität von Borussertib in diesen relevanten *in vivo*-Studien konnte somit die *in vivo*-Wirksamkeit der CAAs validiert werden. Das hohe Potential dieser Inhibitor-Klasse wurde umso mehr dadurch unterstrichen, dass dieser Effekt trotz der limitierenden pharmakokinetischen Eigenschaften von Borussertib erzielt wurde. Für tiefere Validierungsstudien und eine perorale Applikation ist es notwendig, diese Eigenschaften zu optimieren. Um dies voranzutreiben, ist es essentiell, ein hohes Verständnis über die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der CAAs zu generieren.

3.3. SAR-Untersuchungen von CAAIs

Unter Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wird die Assoziation spezifischer Aspekte molekularer Strukturen mit einer definierten biologischen Wirkung verstanden.¹⁶⁴ Ein rationaler Ansatz zur Aufklärung dieser Beziehungen sowie zur gezielten Optimierung der CAAIs stellt das Struktur-basierte Wirkstoffdesign dar, im Rahmen dessen gezielte Veränderungen der chemischen Struktur auf Basis struktureller Informationen vorgenommen werden.¹⁶⁵ Als Grundlage hierfür wurde mittels Röntgenstrukturanalyse die Struktur von Borussertib in Komplex mit der Volllängen-Struktur von Akt1 im Komplex mit Borussertib gelöst, die im Folgenden genauer analysiert wird.⁰

3.3.1. Struktur-basierter Design-Ansatz

Mit Hilfe struktureller Informationen, die über eine Röntgenstrukturanalyse generiert werden, können tiefe Einblicke in die Wechselwirkung eines Inhibitors mit der Zielstruktur gewonnen werden, die wichtige Startpunkte für eine weitere Optimierung der inhibitorischen Eigenschaften liefern. Die erste Kristallstruktur eines kovalent-allosterischen Inhibitors in Komplex mit Volllängen-Akt war daher von großer Bedeutung für die weitere Entwicklung.⁰ Es konnte der kovalent-allosterische Bindungsmodus von Borussertib bestätigt werden, wobei der Inhibitor im Interdomänen-Bereich zwischen der Kinase- und PH-Domäne gebunden vorlag und die kovalente Modifikation des Cys296 über den Acrylamid-Michaelakzeptor anhand der Elektronendichte deutlich gezeigt werden konnte (Abb. 14).

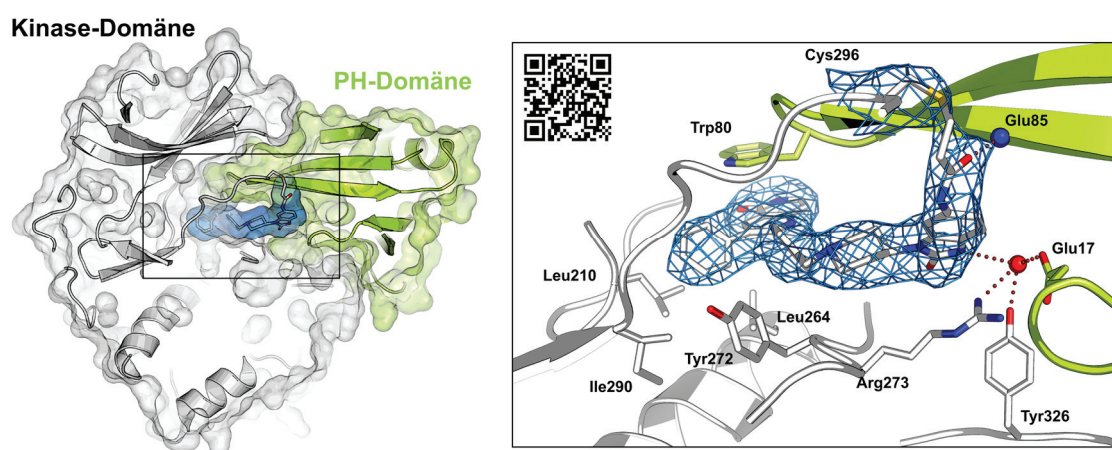


Abbildung 14. Die Kristallstruktur des Volllängen-Konstrukts von Akt im Komplex mit Borussertib (PDB: 6HHF) belegt den kovalent-allosterischen Bindungsmodus in der Interdomänen-Region zwischen der Kinasedomäne (weiß) und der PH-Domäne (grün). Ein detaillierterer Blick auf die Protein-Ligand-Interaktionen zeigt die kovalente Modifikation von Cys296 sowie zahlreiche nicht-kovalente Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken sind als gepunktete Linien dargestellt). Die dargestellte $2F_o - F_c$ -Karte wurde bei 0.8σ konturiert.

⁰ Kristallisation und Verfeinerung der Kristallstruktur wurden von M. Sc. Ina Landel, M. Sc. Rebekka Scheinpflug und Dr. Matthias Müller, TU Dortmund, durchgeführt.

In vorangegangenen qualitativen MS/MS-Studien konnte neben der Modifikation von Cys296 auch eine Adressierung des sich räumlich in der Nähe befindenden Cys310 beobachtet werden.⁹⁹ Die Ursachen für die in der Röntgenstrukturanalyse veranschaulichte klare Präferenz von Cys296 wird in Kapitel 3.3.4 näher diskutiert. Die Ausbildung der kovalenten Bindung wird durch eine Vielzahl nicht-kovalenter Wechselwirkungen des Liganden mit verschiedenen Aminosäuren in der Kinase- und der PH-Domäne stabilisiert. Als zentrale Interaktion, die auch für andere allosterische Akt-Liganden beschrieben ist, bildet das 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst π - π -Stapelwechselwirkungen mit Trp80 in der PH-Domäne aus.^{48, 133, 166} Die Phenylsubstitution in 4-Position wird in einer kleinen hydrophoben Tasche von den Aminosäure-Seitenketten von Leu210, Leu264 und Ile290 flankiert. Darüber hinaus interagieren die Phenylreste in 3- und 4-Position über eine weitere π - π -Stapelinteraktion mit der Seitenkette von Tyr272. Der basische Piperidin-Stickstoff ist hingegen in einer polaren Region der Bindetasche positioniert. Hervorzuheben ist zudem die Ausrichtung des nicht-substituierten N1-Stickstoffs des Benzo[d]imidazolons zu einer engen hydrophoben Tasche, die von einem konservierten Wassermolekül besetzt wird, welches ein Wasserstoffbrücken-Netz zu den Aminosäureseitenketten von Glu17 der PH- und Tyr326 und Arg273 der Kinase-Domäne aufspannt. Die optimale Orientierung des Michael-Akzeptors zur Thiolseitenkette von Cys296 wird zusätzlich durch eine Wasserstoffbrücke des Amid-Carbonyls zum Stickstoff des Amidrückgrats von Glu85 stabilisiert.

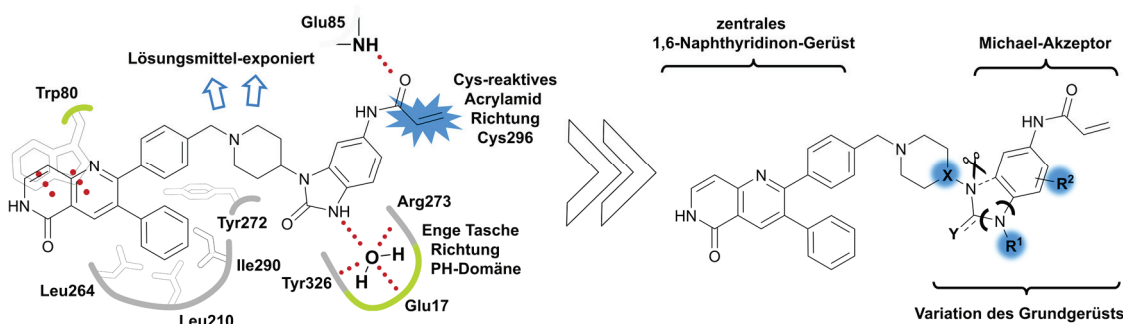


Abbildung 15. Schematische Darstellung der wichtigsten Interaktionen von Borussertib zum Zielprotein Akt1. Die Analyse der Bindetasche inspiriert die Struktur-basierte Entwicklung neuer CAAI-Derivate.

Inspiziert von dieser Analyse der Protein-Ligand-Wechselwirkungen konnten infolgedessen verschiedene, neuartige CAAIs entworfen werden, um Einblicke in die SAR erhalten zu können (Abb. 15). Hierbei sollte das zentrale Naphthyridinon-Grundgerüst zunächst bestehen bleiben, während der Benzo[d]imidazolon-basierte Molekülteil auf Grundlage der Strukturinformationen gezielt derivatisiert wurde.

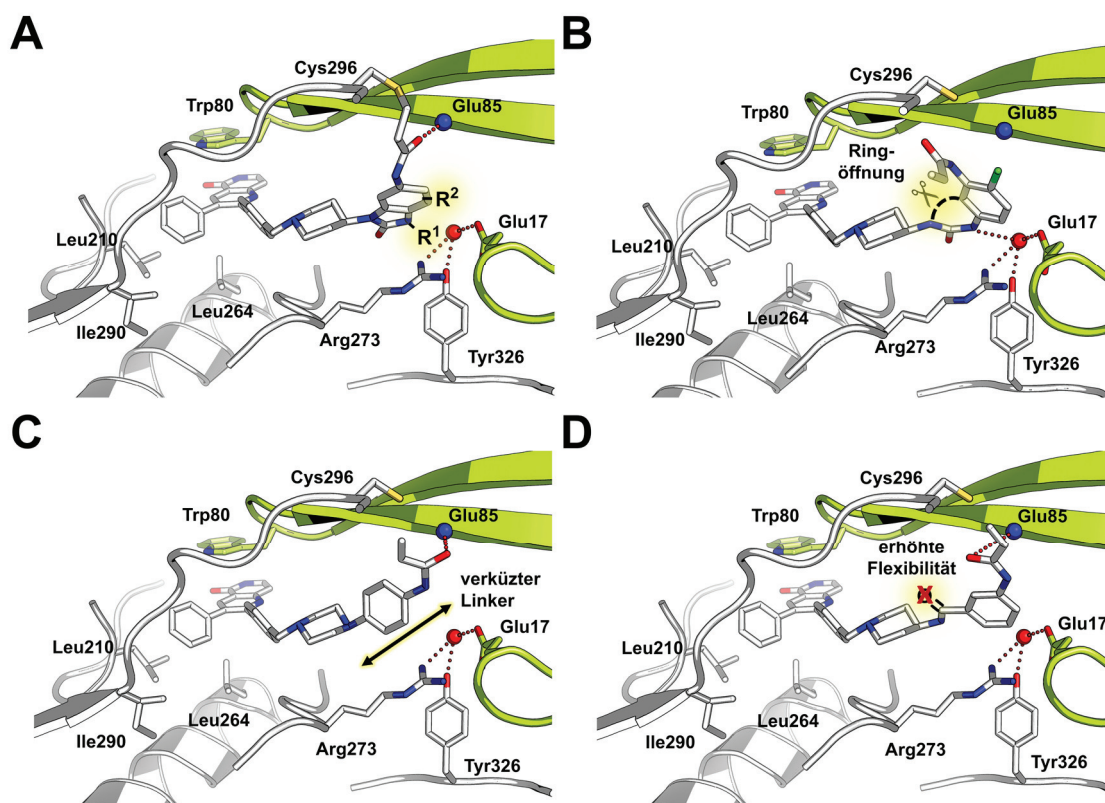


Abbildung 16. Modelle der Zielmoleküle für die Struktur-basierte Derivatisierung der CAAIs (Modellierung erfolgte mit dem Programm Discovery Studio 3.1 Client, Accelrys). **A** Gezielte Derivatisierung des Benzo[*d*]imidazolons-Grundgerüsts. **B** Erhöhte Flexibilität und Linkerlänge durch Öffnung des Imidazolrings zum Phenylharnstoff. **C** Verkürzung des Linkers zum Phenylpiperazin-Grundgerüst. **D** Erhöhung der Flexibilität von Phenylamid-basierten Inhibitoren durch Substitution des Phenylamids durch ein Benzylamin.

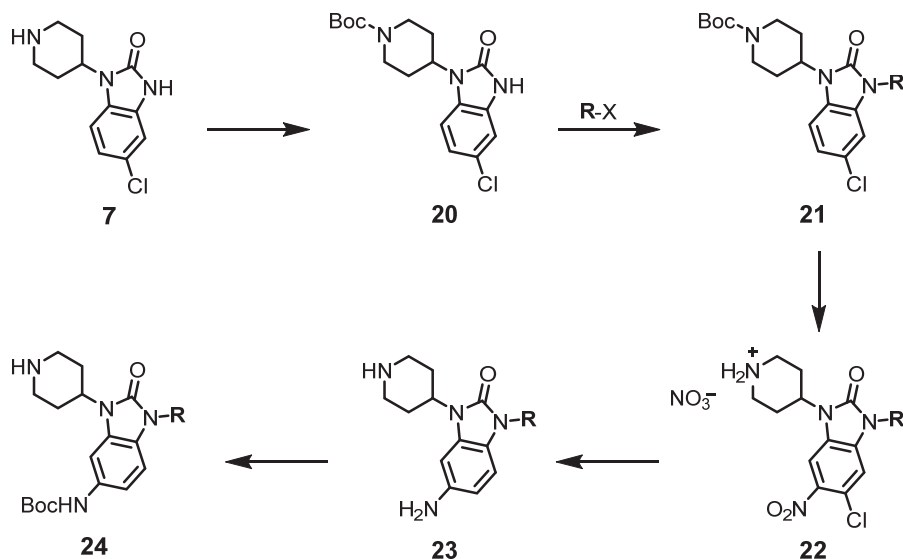
Im Detail wurde das Substitutionsmuster des Benzo[*d*]imidazolons so verändert, dass unter anderem durch Modifikation in N1-Position die Bedeutung der identifizierten Wasser-vermittelten Wasserstoffbrücke genauer untersucht werden konnte (Abb. 16A). Darüber hinaus wurde genauer betrachtet, inwiefern eine Veränderung dieses Bausteins hinsichtlich Länge und Flexibilität sich auf die Präorganisation des Acrylamid-Michaelakzeptors zu den zu adressierenden Cystein-Seitenketten Cys296 und Cys310 auswirkt. Hierzu wurde zum einen der Effekt einer Ringöffnung des Benzo[*d*]imidazolons zu Phenylharnstoff-Derivaten untersucht, welche eine höhere Flexibilität sowie eine gestrecktere, verlängerte Molekülstruktur mit sich bringt (Abb. 16B). Weiterführend wurde der Effekt einer Verkürzung des Harnstoff-basierten Linkerelements hin zu phenylamidischen^o und Phenylpiperazin-basierten Grundgerüsten näher beleuchtet (Abb. 16C). Letztlich wurde die Flexibilität zusätzlich erhöht, indem das Phenylamid durch Benzylamin-Struktur substituiert wurde (Abb. 16D).

^o Darstellung der Phenylamid-basierten Derivate erfolgte von Dr. Steven Smith (Dissertation, 2017, TU Dortmund).

Um diese gezielten Veränderungen vornehmen und eine Serie von neuartigen CAAs darstellen zu können, wurde die bereits etablierte Syntheseroute von Borussertib modifiziert und erweitert.

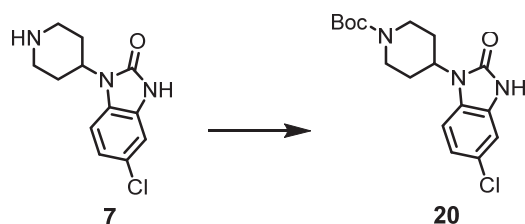
3.3.2. Struktur-basierte Derivatisierung

Basierend auf der in 3.1. beschriebenen optimierten Syntheseroute von Borussertib wurde zunächst das Substitutionsmuster des Benzo[*d*]imidazol-Gerüsts gezielt verändert. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss der Wasserstoffbrücken-Donoreigenschaften des Imidazolons auf die Bindungseigenschaften untersucht, indem in N1-Position substituiert wurde. Dazu sollte die Synthese der Benzo[*d*]imidazolone (Schema 5) insofern modifiziert werden, dass ausgehend vom Chlor-substituierten Derivat **7** zunächst eine Boc-Schutzung des sekundären Amins im Piperidin-Ring vorgenommen werden sollte (Schema 10). Das Boc-geschützte Derivat **20** ermöglichte daraufhin die selektive Modifikation des Imidazolon-Stickstoffs (**21**), welche durch eine nukleophile Substitution mit entsprechenden Alkylhalogeniden (**R-X**) erfolgen sollte. Daraufhin sollte in einem Schritt die Boc-Schutzgruppe abgespalten sowie die Nitrierung in *ortho*-Position zum Chlor-Substituenten durchgeführt werden, woraufhin das Boc-geschützte Anilin **24** analog zur bereits etablierten Route über die Reduktion von **22** und anschließender Boc-Schutzung erhalten werden sollte.



Schema 10. Syntheseroute zur Darstellung verschiedener Derivate der Benzo[*d*]imidazolone-basierten CAAs.

Im Gegensatz zu der Boc-Schutzung des anilinischen Amins in **2** (Schema 5) wurden für die selektive Schutzung von **7** basische Bedingungen verwendet. Es wurde darüber hinaus ein möglicherweise positiver Effekt des nukleophilen Katalysators DMAP auf die Einführung der Boc-Schutzgruppe untersucht (Tabelle 4).¹³⁹

Tabelle 4. Einführung der Boc-Schutzgruppe zur Darstellung von **20**.

#	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
4.1	2 Äq. Boc ₂ O, DIPEA, DCM, rt, 2h	83 % ^a
4.2	2 Äq. Boc ₂ O, 0.3 Äq. DMAP, DIPEA, DCM, rt, 2h	Zweifach-Schätzung ^b

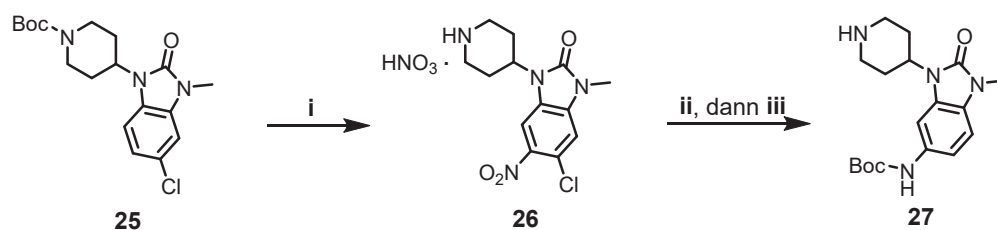
^aisolierte Ausbeute. ^büber ¹H-NMR nachgewiesen.

Es zeigte sich, dass die Zugabe des Katalysators eine unselektive Boc-Schätzung zur Folge hatte, sodass hauptsächlich ein Produkt mit einer Disubstitution sowohl am piperidinischen als auch am N1-Stickstoff des Benzo[*d*]imidazolons erhalten werden konnte. Ohne den Einsatz von DMAP konnte die Substitution am amidischen Stickstoff auf ein Minimum reduziert werden, sodass eine Ausbeute von 83 % erzielt werden konnte. Als Substitution in N1-Position wurde folglich eine Methylierung über eine nukleophile Substitution mit Methyljodid vorgenommen (Schema 11).



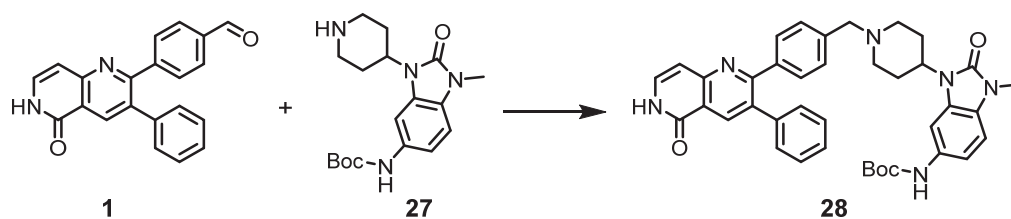
Schema 11. Nukleophile Substitution der N1-Position des Benzo[*d*]imidazolons. Reaktionsbedingungen: MeI, NaH, DMF, 0 °C - rt, 4 h, 85 %.

Aufgrund der Harnstoff-ähnlichen Struktur des Benzo[*d*]imidazolons weist der N1-Stickstoff eine lediglich geringe Nukleophilie auf, sodass mit Natriumhydrid eine starke Base nötig war, um eine nukleophile Substitution zu ermöglichen. Schließlich konnte die Methylierung über Methyljodid mit einer Ausbeute von 85 % erfolgen. Ausgehend von **25** wurde daraufhin die Nitrierung in 5-Position vorgenommen, wobei unter den salpetersauren Bedingungen die Boc-Schutzgruppe parallel abgespalten werden sollte (Schema 12).



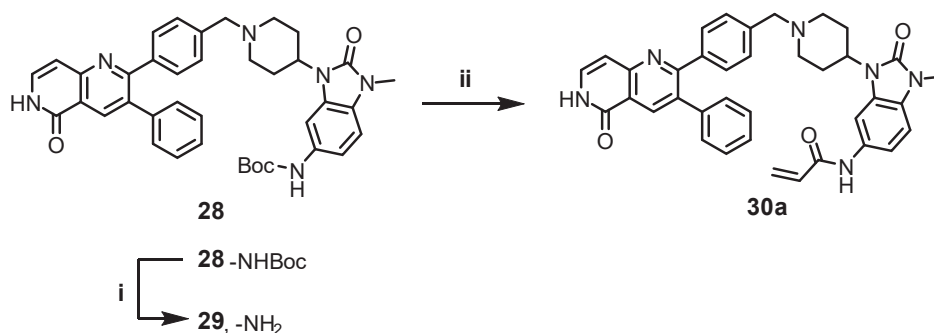
Schema 12. Darstellung des methylierten Benzo[*d*]imidazolone-Derivats **28**. **i** HNO₃, *ortho*-Xylol, 60 °C, 2 h, 90 %. **ii** Pd/C, NH₄HCOO, MeOH, 80 °C, o/vn. **iii** Boc₂O, 10 % AcOH/H₂O, 1,4-Dioxan, rt, o/vn, 44 % über zwei Schritte.

Wie bereits für das unsubstituierte Benzo[*d*]imidazolone beobachtet konnte auch das methylierte Derivat **26** mit Methanol als Reinstoff gefällt werden, womit eine Ausbeute von 90 % erzielt werden konnte. Letztlich konnte die Nitrogruppe analog zur zuvor beschriebenen Syntheseroute bei gleichzeitiger Dehalogenierung reduziert werden, woraufhin erneut eine selektive Boc-Schutzung des anilinischen Amins erfolgte. Somit stand mit **27** ein Baustein zu Verfügung, der mit dem Naphthyridinon-Grundgerüst **1** über eine reduktive Aminierung unter Leuckart-Wallach-Bedingungen umgesetzt werden konnte. In dieser Reaktion konnte eine verglichen mit dem unsubstituierten Derivat verbesserten Ausbeute von 73 % erzielt werden.



Schema 13. Leuckart-Wallach-Reaktion zur Darstellung des Methyl-substituierten Vorläufermoleküls **28**. Reaktionsbedingungen: MeCN, Ameisensäure, 80 °C, o/vn.

Diese höhere Ausbeute könnte zum einen mit einer beobachteten besseren Löslichkeit des methylierten Derivats **27** im Lösungsmittel Acetonitril zusammenhängen, zum anderen aber auch damit begründet werden, dass mögliche störende Einflüsse des Imidazolons in der Reaktion durch den zusätzlichen Substituenten abgeschirmt werden. Das Boc-geschützte Zwischenprodukt **28** konnte schließlich unter HCl-sauren Bedingungen quantitativ entschützt werden, woraufhin analog zur Borussertib-Synthese die Kupplung des Acrylamid-Michael-akzeptors über das entsprechende Säurechlorid vorgenommen wurde, bei der mit einer Ausbeute von 52 % das finale Produkt erzielt werden konnte (Schema 14).



Schema 14. Darstellung des finalen Produkts **30a** durch Boc-Entschützung und Kupplung des Acrylamid-Michaelakzeptors. **i** 4 N HCl in 1,4-Dioxan, rt, 2 h, 98 %. **ii** Acryloylchlorid, DIPEA, THF, rt, 52 %.

Die Darstellung des Methyl-substituierten Derivats **30a** verdeutlichte die Möglichkeit einer Substitution in N1-Position. Neben der aliphatischen Methylgruppe sind vor allem polare Substituenten wie eine Nitrilgruppe von großem Interesse. Diese sollten das konservierte Wasser in der beschriebenen polaren Bindungstasche verdrängen, damit der Inhibitor selbst das Wasserstoffbrückennetzwerk zu Glu17, Arg273 und Tyr326 aufbauen kann und die Bindung des Inhibitors durch Verdrängung des Wassers zusätzlich entropisch begünstigt wird (Abb. 17).

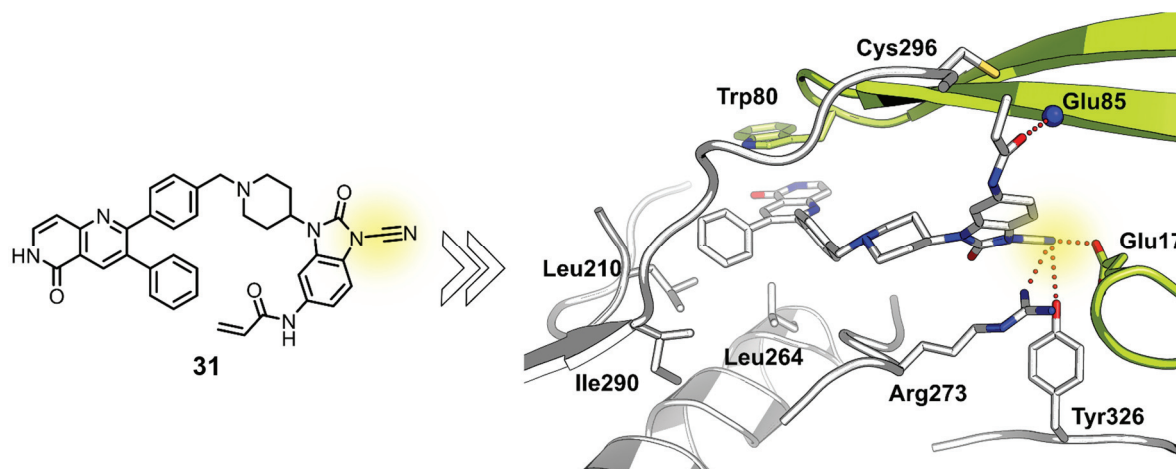


Abbildung 17. Darstellung des möglichen positiven Einflusses polarer Substituenten in N1-Position des Benzo[d]imidazolons, beispielsweise durch eine Nitril-Funktion.

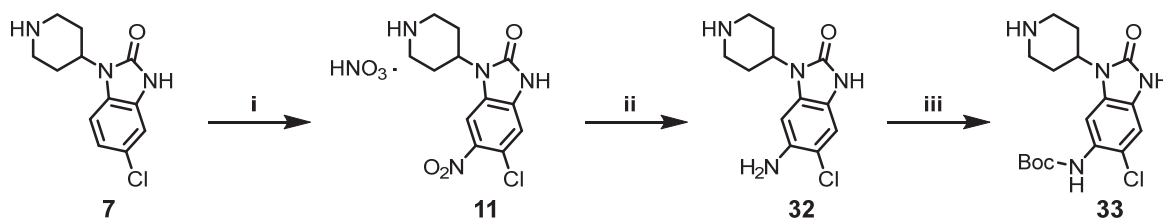
Die Anwendbarkeit der Syntheseroute von **30a** auf weitere in N1-Position substituierte Derivate ist in Tabelle 5 beispielhaft aufgeführt. Es wurde anhand der Substitution mit Methyljodid und Ethyljodid deutlich, dass aliphatische Substitutionen problemlos möglich sind. Allerdings sind aliphatische Gruppen, die die Größe einer Methylgruppe übersteigen, sowohl aus struktureller Sicht für die Adressierung der kleinen polaren Bindetasche als auch aus Löslichkeitsgründen weniger interessant, weshalb diese nicht weiterverfolgt wurden. Die Einführung polarerer Gruppen wie das diskutierte Nitril oder eine Acetylgruppe verliefen hingegen ohne Erfolg. Dies könnte daran liegen, dass harsche Bedingungen notwendig waren, um die notwendige Nucleophilie des Harnstoff-ähnlichen Amids zu erhöhen.

Tabelle 5. Beispielhafte Auswahl möglicher Derivatisierungen in N1-Position des Benzo[d]imidazolons.

#	R-X	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
5.1	MeI	NaH, DMF, 0 °C - rt, 4h	83 % ^a
5.2	EtI	NaH, DMF, 0 °C - rt, 4h	88 % ^a
5.3	CNBr	NaH, DMF, 0 °C - rt, 4h	n.d.
5.4	AcO ₂	Pyridin, rt, ovn	n.d.

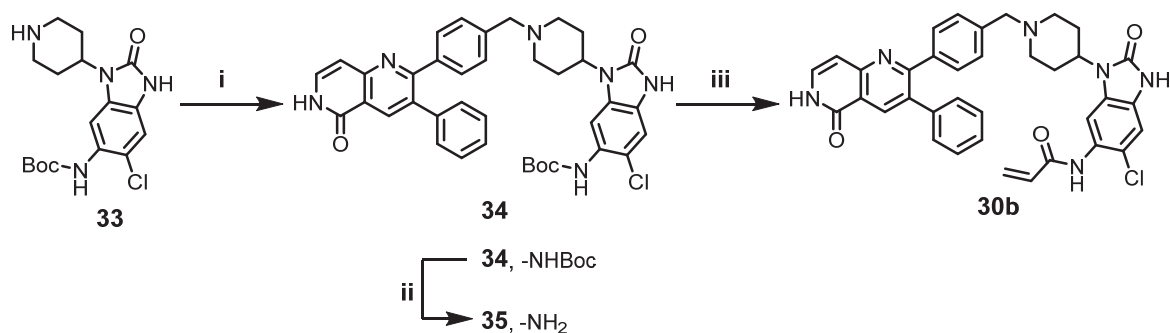
n.d. nicht detektierbar. ^aisolierte Ausbeute.

Unter diesen Bedingungen sind verschiedene Nebenreaktionen wie eine Reduktion des Nitrils denkbar.¹⁶⁷Zum anderen ließ die geringe Nukleophilie des Amins eine Substitution unter milderen Bedingungen wie bei einer Acetylierung über Essigsäureanhydrid nicht zu. Folglich sind Substitutionsmöglichkeiten an dieser Position hinsichtlich ihrer Abdeckung des chemischen Raums sehr beschränkt. Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung der Benzo[d]-imidazolone ergab sich aus dem eingesetzten Edukt **7**, da der Chlor-Substituent in 5-Position als Ausgangspunkt für eine weitere Modifikationen dienen könnte. Da die Substitution in dieser Position im Zuge der Synthese beibehalten werden sollte, mussten die Reduktionsbedingungen angepasst werden, um die reduktive Dehalogenierung zu umgehen (Schema 15). Ausgehend von **11** wurde anstelle einer Palladium-katalysierten Reaktion Eisen als Reduktionsmittel eingesetzt, in dessen Gegenwart es im Gegensatz zu Palladium keine reduktive Dehalogenierung erfolgte.



Schema 15. Alternative Syntheseroute zur Darstellung des Chlor-substituierten Benzo[d]imidazolon-Baustein **33**. **i** 69 % HNO₃, *o*-Xylol, 60 °C, 2 h, quant.. **ii** Fe, NH₄Cl, MeOH/H₂O 5:1, reflux, 2 h, ohne Aufarbeitung weitergearbeitet. **iii** Boc₂O, 10 % Essigsäure/H₂O, 1,4-Dioxan, rt, ovn, 34 % über zwei Schritte.

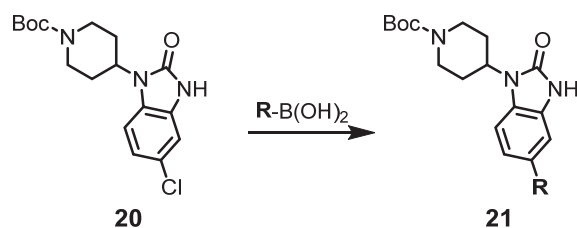
Die anschließende selektive Schützung des anilinschen Amins zeigte zwar verglichen mit der Schützung des dehalogenierten Derivats einen geringeren Umsatz, der mit einer sterischen Hinderung durch das Chlor begründet werden könnte, erbrachte aber über die zwei Schritte der Reduktion und Schützung eine Ausbeute von 34 % des gewünschten Produkts.



Schema 16. Darstellung des finalen Produkts **30b** durch Leuckart-Wallach-Reaktion, Entschützung und Kupplung des Acrylamid-Michaelakzeptors. **i** 1, Ameisensäure, MeCN, 80 °C, o/vn, 54 %. **ii** 4 N HCl in 1,4-Dioxan, rt, 2 h, 78 %. **iii** Acryloylchlorid, DIPEA, THF, rt, 75 %.

Ausgehend von **33** konnte analog das finale Chlor-substituierte Produkt **30b** erhalten werden (Schema 16). Die Leuckart-Wallach-Reaktion mit dem 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst **1** wies eine zur Synthese von Borussertib vergleichbare Ausbeute von 54 % auf. Die finale Entschützung sowie Acrylamid-Kupplung waren ebenfalls erfolgreich, auch wenn geringe Ausbeuteverluste aufgrund der hohen Unlöslichkeit des Amin-Intermediats **35** zu beobachten waren. Um zu testen, inwiefern die Substitution in 5-Position weitergehende Derivatisierungen über Kreuzkupplungen erlaubt, wurden als Testreaktionen zwei Suzuki-Kupplungen ausgehend von **20** durchgeführt (Tabelle 6). In beiden Reaktionen konnte jedoch kein Umsatz zum gewünschten Produkt detektiert werden. Hierfür ursächlich könnte die Eigenschaft des Benzo[*d*]imidazolons als elektronenarmer Aromat sein, da solche Aromaten den Transmetallierungs-Schritt der Suzuki-Kupplung nur sehr langsam durchlaufen können und somit eine sehr geringe Reaktivität aufweisen.¹⁶⁸ Sowohl die Derivatisierungen in N1- als auch in 5-Position verdeutlichten, dass die Benzo[*d*]imidazolon-basierten Sondenmoleküle hinsichtlich ihrer chemischen Modifizierbarkeit gewisse Limitationen aufweisen.

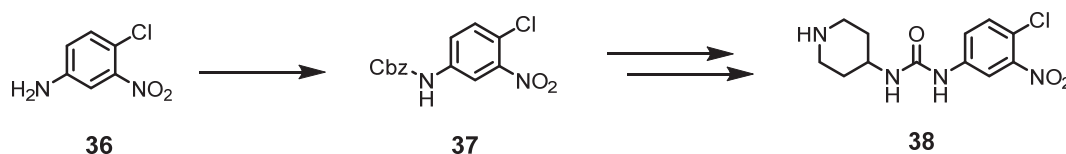
Tabelle 6. Suzuki-Testreaktionen zur Substitution in 5-Position des Benzo[*d*]imidazolons.



#	R-B(OH) ₂	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
6.1	Me-B(OH) ₂	Pd(PPh ₃) ₄ , K ₂ CO ₃ , DME/EtOH 3:1, 150 °C, μw	n.d.
6.2	Cyclopropyl-B(OH) ₂	Pd(PPh ₃) ₄ , K ₂ CO ₃ , DME/EtOH 3:1, 150 °C, μw	n.d.

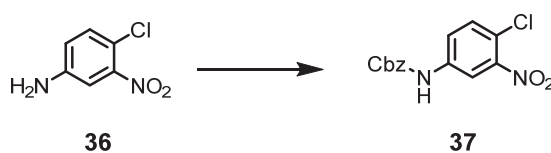
n.d. nicht detektierbar.

Um einen größeren chemischen Raum abdecken zu können, ist es notwendig, die Darstellung alternativer Molekülgerüste zu etablieren, die in Bezug auf eine weiterführende chemische Optimierung geeigneter als die beschriebenen Benzo[d]imidazolone sind. Eine Möglichkeit zur Veränderung dieses Grundgerüsts ergab sich aus der Öffnung des Imidazolone-Rings zu Phenylharnstoff-basierten Derivaten. Diese sollten mittels einer linearen Synthesestrategie dargestellt werden, wobei Nitroanilin **36** zunächst mit einer Carboxybenzyl (Cbz)-Gruppe versehen werden sollte, welche die Umwandlung des Carbamats zum Harnstoff ermöglichte (Schema 17).



Schema 17. Syntheschema zur linearen Synthese des Harnstoff-basierten Bausteins **38**.

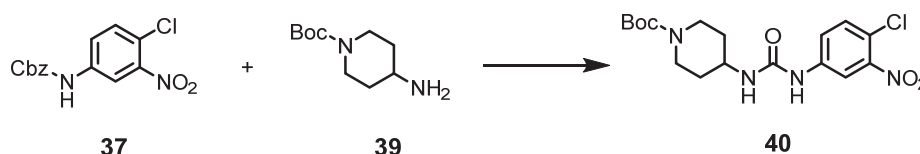
Die Einführung der Cbz-Schutzgruppe erfolgte über Chlorameisensäurebenzylester unter schwach-basischen Bedingungen. Diese Reaktion zeigte aufgrund der geringen Nukleophilie des Nitroanilin-Derivates **36** keinen vollständigen Umsatz, sodass **37** mit einer Ausbeute von 70 % dargestellt werden konnte.



Schema 18. Cbz-Schutzung des Nitroanilin-Derivates **36** zu **37**. Reaktionsbedingungen: Cbz-Cl, NaHCO₃, THF, rt, 4 h, 70 %.

Ausgehend vom Carbamat-geschützten Intermediat **36** erfolgte in einem Schritt die Umwandlung zum unsymmetrischen Harnstoff **40**. Mechanistisch wird hierbei unter basischen Bedingungen aus dem Carbamat *in situ* ein Isocyanat gebildet, welches durch Reaktion mit dem Boc-geschützten 4-Aminopiperidin **39** über eine nukleophile Substitution in den entsprechenden Harnstoff überführt wurde (Tabelle 7).

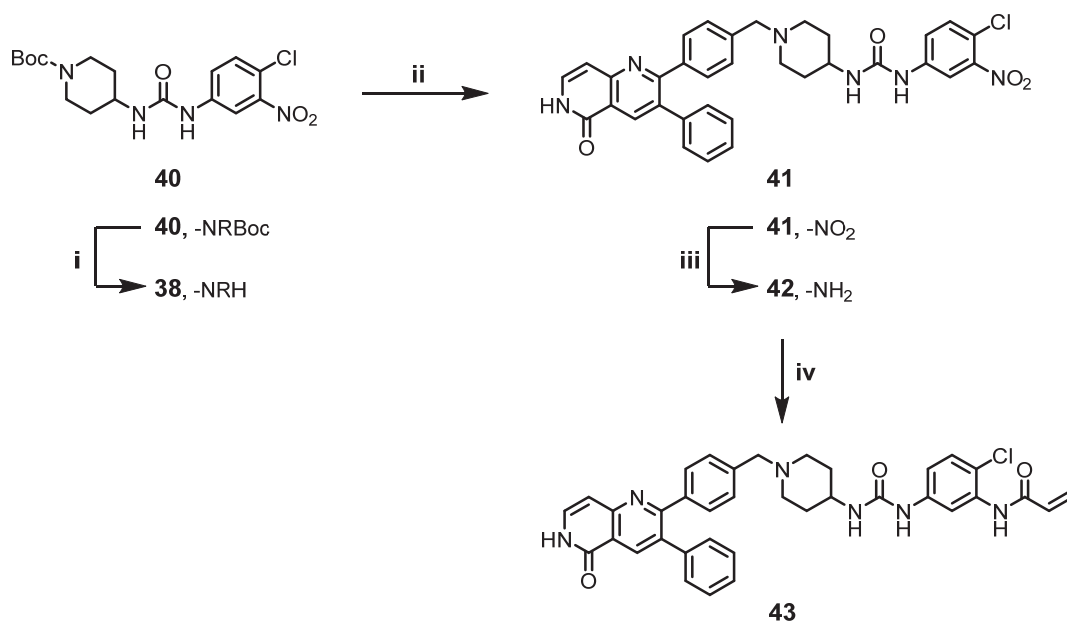
Tabelle 7. Umwandlung des Carbamats zum Harnstoffderivat **40**.



#	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
7.1	K ₂ CO ₃ , DMF, 130 °C, 30 min, μw	34 % ^a
7.2	K ₂ CO ₃ , DMF, 130 °C, 90 min im Autoklavengefäß	30 % ^a

^a isolierte Ausbeute.

Aufgrund der geringen Reaktivität der Carbamat-Gruppe ist hierbei eine hohe Energiezufuhr notwendig, welche sowohl unter Mikrowellen-Bedingungen (7.1, Tab. 7) als auch unter Druck im Autoklavengefäß (7.2) gewährleistet war. Jedoch konnte die Ausbeute nicht höher als 40 % gesteigert werden, sodass hier weiterer Optimierungsraum besteht. Nach saurer Entschützung von **40** wurde Baustein **38** in einer Leuckart-Wallach-Reaktion mit dem 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst **1** verknüpft (Schema 19). Im Gegensatz zu den Benzo[d]imidazolonen konnte in diesem Schritt mit Harnstoff **42** eine Ausbeute von lediglich 17 % erreicht werden. Hierfür könnte vor allem die hohe Unlöslichkeit von **39** eine Ursache sein, wobei auch die Variation zu anderen Lösungsmitteln wie Methanol oder 1,4-Dioxan keine Verbesserung zeigte.



Schema 19. Darstellung des Harnstoff-basierten Derivats **43**. **i** 4N HCl in 1,4-Dioxan, rt, 2 h, 68 %, **ii** **1**, Ameisensäure, MeCN, 80 °C, ovn, 17 %. **iii** Fe, NH₄Cl, MeOH/H₂O 5:1, 80 °C, 2 h, quant.. **iv** Acryloylchlorid, DIPEA, THF, rt, 2 h, 58 %.

Die erhaltene Nitro-Verbindung **41** wurde letztlich zum Amin **42** reduziert, woraufhin analog zu den bisher gezeigten Derivaten die Kupplung mit Acryloylchlorid erfolgte. Somit wurde mit dem Phenylharnstoff-basierten Derivat **43** ein weiteres Sondenmolekül erhalten. Die entwickelte Syntheseroute eröffnete den synthetischen Zugang zu einer neuen Molekülklasse potentieller Akt-Inhibitoren, die aufgrund der hohen kommerziellen Verfügbarkeit anilinischer Edukte wie **36** im Vergleich zu den chemisch stark eingeschränkten Benzo[d]-imidazolonen einen größeren chemischen Raum abdecken können. Verglichen mit Borussertib bewirkt die Ringöffnung zum Phenylharnstoff durch die Veränderung des Linkerbereichs zudem eine vorzugsweise gestrecktere Molekülstruktur. Die aus der Länge und Struktur dieser Linkerregion resultierende Ausrichtung des Michaelakzeptors ist entscheidend für die Ausbildung der kovalenten Bindung. Daher sollten weitere Moleküle unterschiedlicher Linkerstruktur dargestellt werden.

In vorangegangenen Studien wurde bereits der Phenylharnstoff um einen Stickstoff verkürzt, um eine Serie von Phenylamid-basierten Inhibitoren wie **44** zu erhalten. Um den Einfluss der Rigidität der amidischen Grundstruktur zu untersuchen, sollte das Phenylamid-Gerüst zu einem Benzylamin-Gerüst geändert werden. Um diese Molekülklasse darstellen zu können, musste die bisherige Syntheseroute modifiziert werden (Schema 17).*

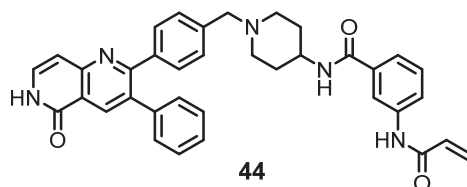
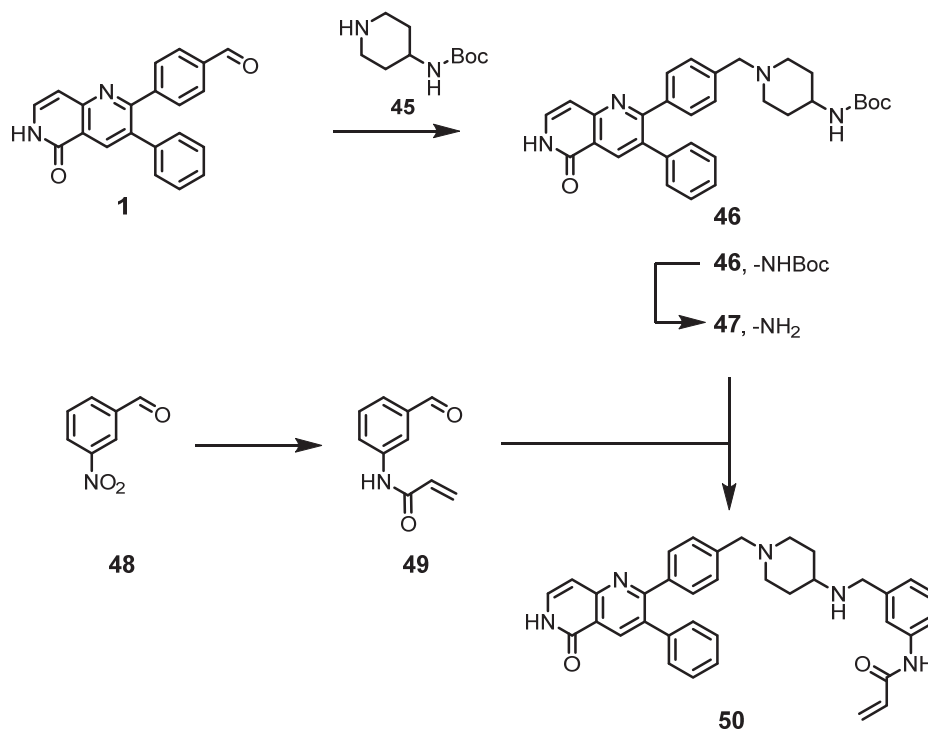


Abbildung 19: Struktur des Phenylamid-verbrückten CAAI **44**.⁶⁹

In einer konvergenten Synthesestrategie sollte der 1,6-Naphthyridinon-Baustein zunächst über eine reduktive Aminierung mit 4-Aminopiperidin **45** umgesetzt werden, um anschließend nach Entschützung das Vorläufermolekül **47** zu erhalten. Parallel sollte Nitrobenzaldehyd in das entsprechende Acrylamid überführt werden, woraufhin der Amin-Baustein **47** und der Benzaldehyd-Baustein **49** erneut in einer reduktiven Aminierung zum finalen Benzylamin **50** umgesetzt werden sollten.

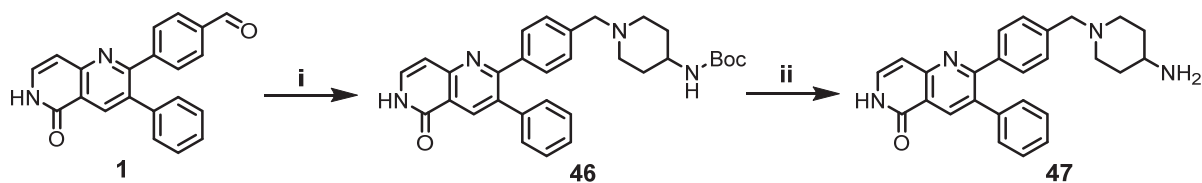


Schema 20. Syntheschema zur Darstellung des Benzylamin-Derivats **50**.

* In Zusammenarbeit mit Dr. Steven Smith (TU Dortmund).¹⁴⁰

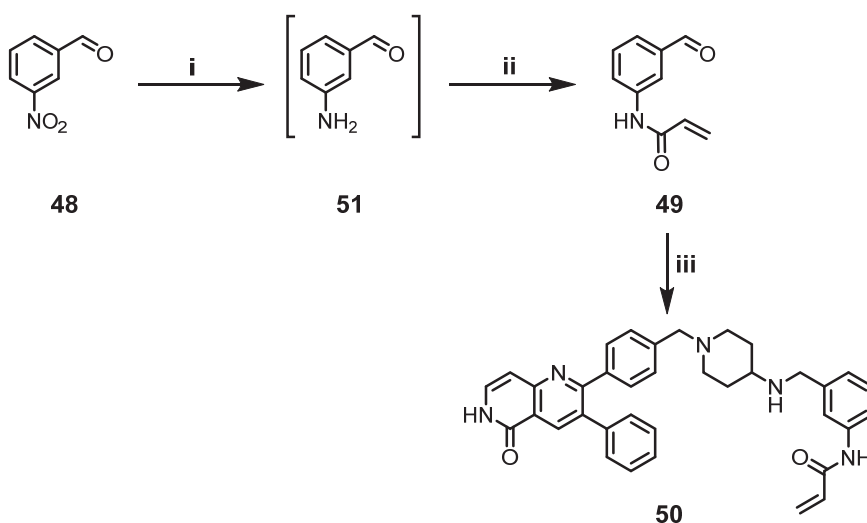
⁶⁹ Darstellung der Phenylamid-basierten Derivate erfolgte von Dr. Steven Smith (Dissertation, 2017, TU Dortmund).

Zur reduktiven Aminierung des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts mit 4-Aminopiperidin **45** wurde die zuvor etablierte Leuckart-Wallach-Reaktion verwendet, die in einer Ausbeute von 42 % resultierte (Schema 18). Anschließend wurde nach HCl-saurer Entschützung das primäre Amin **47** erhalten.



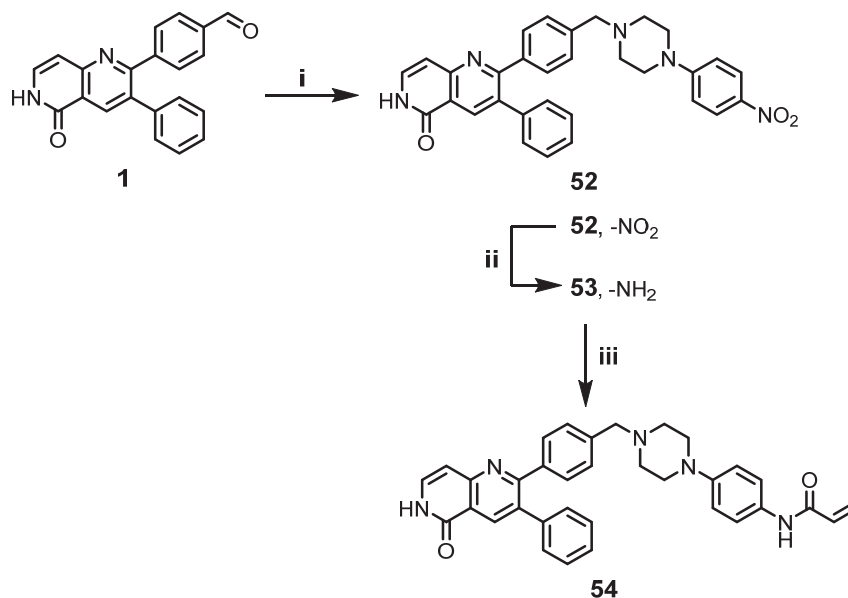
Schema 21. Reduktive Aminierung und Entschützung zur Darstellung des Vorläufermoleküls **47**. **i** **45**, Ameisensäure, MeCN, 80 °C, ovn, 42 %. **ii** 4 N HCl in 1,4-Dioxan, rt, 2h, 92 %.

Zur Darstellung des zweiten Vorläufermoleküls **49** wurde ausgehend von Nitrobenzaldehyd **48** zunächst eine Reduktion der Nitrogruppe zum Amin vorgenommen. Während mit Reduktionsmitteln wie Palladium und Eisen die Reduktion scheiterte, konnte schließlich das gewünschte Amin **51** durch Reduktion mit Zinn(II)chlorid erhalten werden. Nach Aufarbeitung wurde dieses Amin mit Acryloylchlorid versetzt, um das gewünschte Acrylamid-Intermediat **49** mit einer Gesamtausbeute von 87 % über beide Schritte darzustellen. Der Aldehyd-Baustein **49** wurde in einer Leuckart-Wallach-Reaktion mit Amin-Baustein **47** zu dem finalen Produkt **50** umgesetzt. Hierbei konnte eine Ausbeute von lediglich 13 % erreicht werden, wobei ein nur teilweiser Umsatz zum Produkt beobachtet wurde und große Mengen der Edukte reisoliert werden konnten. Dies könnte in der geringen Nukleophilie des primären Amins begründet sein. Auch wenn beim Umsatz der Reaktion Optimierungsbedarf besteht, konnte jedoch positiv vermerkt werden, dass unter den milden Leuckart-Wallach-Bedingungen keine doppelte Substitution am reaktiven benzyliischen sekundären Amin von **50** erfolgte.



Schema 22. Darstellung des Acrylamid-Derivats **49**. **i** Sn(II)Cl₂, MeOH, 1 h, reflux. **ii** Acryloylchlorid, DIPEA, THF, rt, 2 h, 87 %. **iii** **47**, Ameisensäure, MeCN, 80 °C, ovn, 13 %.

Neben den Phenylharnstoff-, Phenylamid- und Benzylamin-basierten Sondenmolekülen sollte der Effekt einer weiteren Verkürzung der Linkerregion untersucht werden. Hierzu wurde eine weitere Verbindung mit einem Phenylpiperazin-Grundgerüst synthetisiert. Basierend auf der entwickelten Route konnte in einer dreistufigen Synthese Derivat **54** dargestellt werden (Schema 23).[§]



Schema 23. Darstellung der Phenylpiperazin-basierten Verbindung **54**. **i** 4-(*para*-Nitrophenyl)piperazin, Ameisensäure, MeCN, 80 °C, o/vn, ohne Aufarbeitung weitergearbeitet. **ii** Fe, NH₄Cl, MeOH/H₂O 5:1, 80 °C, 2 h, 40 % über zwei Schritte. **iii** Acryloylchlorid, DIPEA, THF, rt, 2 h, 42 %.

Dazu wurde zunächst das 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst **1** unter Leuckart-Wallach-Bedingungen mit 4-(*para*-Nitrophenyl)piperazin umgesetzt. Die Reaktion verlief unvollständig, sodass sich infolgedessen die chromatographische Trennung von Edukt **1** und Produkt **52** als sehr anspruchsvoll herausstellte. Daher wurde die Reduktion der Nitro-Gruppe mittels Eisen ohne weitere Aufarbeitung vorgenommen, wodurch das polarere Amin **53** chromatographisch trennen lies. Diese zwei Schritte lieferten zusammen eine Ausbeute von 40 %. Daraufhin konnte der Acrylamid-Michaelakzeptor über das korrespondierende Säurechlorid eingebracht werden. Hierbei wurden einige Nebenprodukte beobachtet, die die chromatographische Isolierung erschwerten und zu Ausbeuteverlusten führten. Dennoch konnte das finale Produkt **54** mit einer Ausbeute von 42 % erhalten werden.

Insgesamt konnten im Rahmen der Struktur-basierten Synthese eine Reihe von chemisch-diversen potenziellen CAAs dargestellt werden. Um den Einfluss der chemischen Änderungen auf die inhibitorische Wirksamkeit zu untersuchen und so einen Einblick in die SAR erlangen zu können, wurden diese Sondenmoleküle biochemisch genauer analysiert.

[§] Erstsynthese von **54** erfolgte über eine alternative Syntheseroute von Dr. Rajesh Gontla, TU Dortmund.

3.3.3. Biochemische Charakterisierung und SAR Analyse

Zur Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität der dargestellten Verbindungen wurde der Aktivitäts-basierte *homogenous time-resolved fluorescence* (HTRF®) KinEASE™ Assay verwendet. Dieser beruht der Phosphorylierung eines biotinylierten Substratpeptids, welches mit der Kinase Akt, ATP und zwei verschiedenen Fluorophoren inkubiert wurde. Der erste Fluorophor ist dabei mit Streptavidin konjugiert wodurch eine Bindung an das biotinylierte Substratpeptid ermöglicht wird. Der zweite Fluorophor ist an einen Antikörper gebunden, der eine Spezifität gegenüber der Phosphorylierung am Substratpeptid aufweist. Aktives Akt kann das Substratpeptid phosphorylieren, woraufhin der Antikörper ebenfalls an das Testsubstrat assoziieren kann. Zwischen den beiden auf diese Weise in räumliche Nähe gebrachten Fluorophoren kann es nun zu einem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Signal kommen, welches mit dem Phosphorylierungslevel des Testsubstrates korreliert und demnach proportional zur Kinaseaktivität ist. Akt-Inhibitoren verhindern die Phosphorylierung des Substratpeptids, wodurch das FRET-Signal unterbunden wird. Über konzentrationsabhängige Messung der Fluoreszenzemission kann folglich die halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} bestimmt werden.

Hierbei konnte für Borussertib die hohe Potenz im sub-nanomolaren Bereich (0,8 nM) bestätigt werden, welches somit den klinischen Kandidaten Capiwasertib, Ipatasertib und MK-2206 gegenüber hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität entsprach bzw. überlegen war (Tabelle 8).⁹⁹ Für die dargestellten Derivate konnten unterschiedliche Aktivitätsprofile festgestellt werden, die Aufschluss über die SAR geben konnten. So zeigte sich für das in N1-Position des Benzo[d]imidazolons **30a** ein im Vergleich zu Borussertib dreifach höherer IC_{50} -Wert (3,0 nM). Dieser Verlust an inhibitorischer Aktivität deutete darauf hin, dass die identifizierte Interaktion mit dem konservierten Wassermolekül, die durch bei **30a** durch die Methylierung nicht mehr möglich ist, energetisch vorteilhaft ist, jedoch nicht essentiell zu sein schien, da der Inhibitor dennoch eine niedrig-nanomolare Aktivität aufwies. Derivat **30b** mit einer Chlor-Substitution in 5-Position wies eine nur geringfügig schwächere inhibitorische Potenz auf (1,2 nM). Damit wurde deutlich, dass kleine Substituenten an dieser Position toleriert werden, wenn gleich hydrophobe Substituenten wie Halogenide keinen positiven Effekt erzielten. Neben den Benzo[d]imidazol-basierten Inhibitoren waren Verbindungen mit alternativen Grundgerüsten von besonderem Interesse. Dabei wies Phenylharnstoff-basierte Verbindung **43** zwar einen in Vergleich zu Borussertib eine zehnfach schwächere Aktivität auf (9,1 nM), wobei sich dieses Derivat durch einen einfach nanomolaren IC_{50} -Wert auszeichnete, sodass Phenyl-Harnstoffe ein attraktives neuartiges Grundgerüst für CAAs mit hohem Entwicklungspotential darstellen. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass phenylamidische Strukturen ebenfalls ein vielversprechendes neues Grundgerüst mit hohen Diversifizierungsmöglichkeiten abbilden, wie hier beispielhaft an Verbindung **44** belegt.¹⁴⁰

Tabelle 8. Biochemische Charakterisierung der dargestellten kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren durch Bestimmung der IC₅₀-Werte sowie kinetischer Parameter durch den HTRF® KinEASE™ Assay.^z

#	R	X	Akt1 ^{wt}			
			IC ₅₀ [nM]	K _i [nM]	k _{inact} [min ⁻¹]	k _{inact} /K _i [μM ⁻¹ s ⁻¹]
Borussertib		C	0,8 ± 0,3	2,2 ± 0,3	0,111 ± 0,020	0,853 ± 0,038
30a		C	3,0 ± 0,3	10,7 ± 0,5	0,121 ± 0,016	0,190 ± 0,025
30b		C	1,2 ± 0,3	4,1 ± 0,7	0,110 ± 0,023	0,447 ± 0,074
43		C	9,1 ± 1,5	17,5 ± 3,6	0,081 ± 0,019	0,080 ± 0,008
44 ^o		C	3,6 ± 0,8	6,8 ± 0,3	0,083 ± 0,016	0,202 ± 0,035
50		C	192 ± 45	327 ± 27	0,071 ± 0,004	0,004 ± 0,001
54		N	126 ± 31	67,1 ± 5,5	0,054 ± 0,006	0,013 ± 0,001
Capiwasertib			0,9 ± 0,1	-	-	-
Ipatasertib			3,5 ± 0,6	-	-	-
MK-2206			10,0 ± 2,1	-	-	-

^z Die Messungen der inhibitorischen Aktivität sowie der kinetischen Parameter wurden von M. Sc. Jörn Weisner, TU Dortmund, durchgeführt.

^o Synthese des Phenylamid-Derivats durch Dr. Steven Smith, TU Dortmund.¹⁴⁰

Um die Bedeutung der Rigidität des Amids zu untersuchen, wurde das korrespondierende Benzylamin-Derivat **50** dargestellt, welches im Vergleich zu **44** einen 50-fachen Aktivitätsverlust aufwies (192 nM). Dadurch wurde deutlich, dass die Rigidität von Phenylamid **44** entscheidenden Einfluss auf die Bindung des Inhibitors nimmt, da der Austausch des Amids zum benzyliischen Amin und somit der Verlust der molekularen Integrität einen hohen Potenzverlust verursachte. Dies ließe sich damit begründen, dass das Molekül **50** durch die hinzugewonnenen Freiheitsgrade in Lösung einen deutlich größeren konformationellen Raum einnehmen kann, wodurch die mit der Ligandenbindung verbundene Rigidisierung einen größeren energetisch ungünstigen Entropieverlust zur Folge hat als bei dem rigideren Phenylamid **44**. Somit wäre die Bindung von **50** mit einer größeren entropischen Strafe verbunden. Zur Untersuchung des Einflusses der Länge des Linkerelements wurde neben dem Phenylharnstoff-Derivat **43** und den Phenylamid-Derivaten auch das verkürzte Phenylpiperazin-Derivat **54** analysiert. Für diese Verbindung konnte im Vergleich zu den anderen Grundgerüsten ebenfalls eine deutliche Abnahme der inhibitorischen Potenz beobachtet werden (126 nM), woraus folgte, dass die Verkürzung des Linkerfragments nachteilig für die Bindung des Liganden war. Über zeitabhängige Messung des IC_{50} konnten zudem kinetische Parameter wie die Dissoziationskonstante des reversiblen Protein-Inhibitor-Komplexes K_i sowie die Geschwindigkeitskonstante der kovalenten Bindungsbildung k_{inact} bestimmt werden, die Aufschlüsse über den reversiblen und kovalenten Bindungscharakter geben konnten (vgl. Abb. 6, Kapitel 1.4.). Dass für alle getesteten Verbindungen mit Ausnahme der reversiblen Referenzverbindungen ein k_{inact} messbar war, ließ die Schlussfolgerung zu, dass alle diese Inhibitoren einem kovalenten Inhibitionsmechanismus zugrunde liegen. Für die Benzo[*d*]-imidazol-basierten Derivate zeigte sich eine gleichbleibende Reaktionsgeschwindigkeit k_{inact} , wodurch sich die Unterschiede in der inhibitorischen Aktivität vor allem auf die reversiblen Bindungscharakteristika zurückführen ließen. So indiziert der erhöhte K_i -Wert des N1-methylierten Derivats **31a**, dass der Verlust der Wasserstoffbrücken-Donorfunktion einen durchaus negativen Einfluss auf die Bindungsaffinität hat, wenngleich dieser gering ausfällt. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich beim Vergleich des Phenylamids **44** mit Benzylamin **50**. Auch hier macht der erhöhte K_i -Wert bei gleichbleibenden k_{inact} -Wert deutlich, dass die Ursache für den Aktivitätsverlust in der reversiblen Bindungsbildung liegt, was die Hypothese des entropiebedingten Verlustes der Bindungsaffinität unterstreichen würde. Für das verkürzte Phenylpiperazin-Derivat **54** konnte eine verringerte Reaktionsgeschwindigkeit k_{inact} beobachtet werden, wodurch deutlich wurde, dass die weniger optimale Ausbildung der kovalenten Bindung einen Beitrag zum Aktivitätsverlust leistet. Dies ließ den Schluss zu, dass das verkürzte Phenylpiperazin-Grundgerüst eine schlechtere Präorganisation des Acrylamids zu den reaktiven Cysteinen ermöglichte.

Um einen orthogonalen Nachweis der kovalenten Bindungsbildung zu gewährleisten, wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt, indem die CAAs mit Akt1 inkubiert und über LCMS analysiert wurden (Abb. 18). Obwohl die Auflösung der dekonvolvierten Massenspektren aufgrund der unterschiedlichen Phosphorylierungsspezies von Akt1 gering war, konnte in Gegenwart aller getesteten Inhibitoren eine Verschiebung des Massenspektrums im Vergleich zur Masse des Apo-Proteins beobachtet werden, dessen Massendifferenz einer einfachen Modifikation mit dem jeweiligen Inhibitor entsprach.

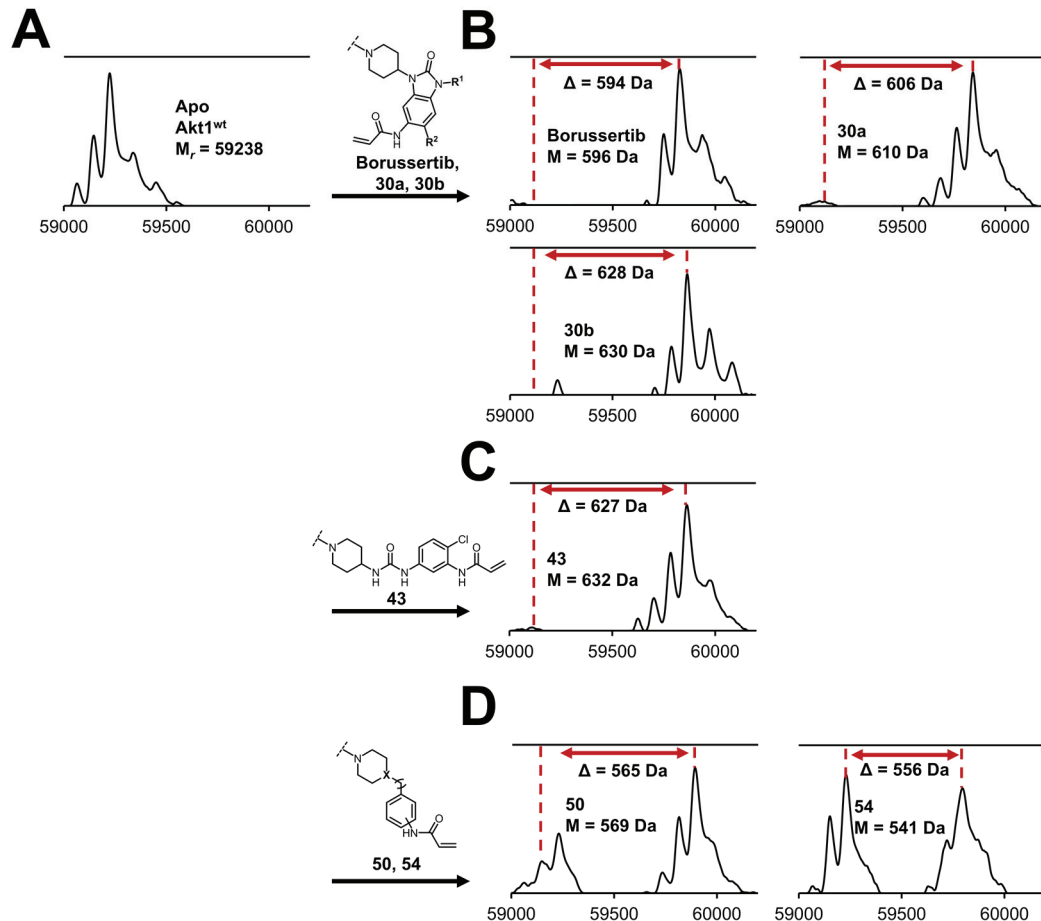


Abbildung 18. Dekonvolvierte Massenspektren von Akt1^{wt} nach Inkubation mit DMSO (Apo, **A**) und einer Serie von CAAs. **B** Massenspektren von Benzo[*d*]imidazol-basierten Inhibitoren. **C** Massenspektrum des Phenylharnstoffs **43**. **D** Massenspektren der Inhibitoren **50** und **54**. Die Massenspektren wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgenommen.[∞]

Ferner konnte festgestellt werden, dass eine gute Korrelation zur inhibitorischen Aktivität bestand, da Inhibitoren mit hoher Potenz wie Borussertib eine vollständige Modifikation aufwiesen, während weniger potente Inhibitoren wie **50** oder **54** nach einer Stunde noch keine vollständige Markierung zeigten. In Summe lieferten die massenspektrometrischen Analysen einen weiteren qualitativen Beleg für eine selektive kovalente Adressierung von Akt.

[∞] Aufnahme und Auswertung der Massenspektren in Zusammenarbeit mit M. Sc. Jörn Weisner und M. Sc. Marius Lindemann, TU Dortmund.

Es sollte weiterführend untersucht werden, inwiefern die vorgenommenen chemischen Änderungen von Borussertib nicht nur auf die inhibitorische Aktivität Einfluss nehmen, sondern auch auf die Selektivität gegenüber anderen Kinasen beeinflussen. Vorangegangene Studien zeigten ein exzellentes Selektivitätsprofil gegenüber anderer Kinasen, indem in einer Profilierungsstudie gegenüber 100 Kinasen ausschließlich die Akt-Isoformen inhibiert wurden.⁹⁹ Um tiefere Einblicke in die Inhibitorselektivität anderer Derivate zu erlangen, wurden das Benzo[*d*]imidazol-Derivat **30a**, das Phenylharnstoff-Derivat **43** sowie das Phenylamid-Derivat **44** in einer Profilierungsstudie untersucht, in der die Inhibitoren auf ihre Aktivität gegenüber 100 ausgewählten Kinasen mit ähnlichen Eigenschaften, darunter Mitglieder der AGC-Kinasefamilie, Kinasen mit PH-Domäne und Kinasen mit analogen Cysteinen auf der Aktivierungsschleife, analysiert wurden (Abb. 19). Bei 1 μ M wiesen alle getesteten Verbindungen eine potente Inhibition der drei Akt-Isoformen auf, wobei eine signifikante Präferenz der Isoformen Akt1 und Akt2 vorlag. Im Allgemeinen zeigten **30a** und **44** ein mit Borussertib vergleichbares Profil bei geringer Inhibition von MELK (48 % mit **30a**, 52 % mit **44**). Für **44** konnte zusätzliche inhibitorische Aktivität gegenüber der AMP-aktivierten Proteinkinase A1/B1/G1 (46 %), und A2/B1/G1 (40 %) sowie der nicht-RTK BMX (44 %) beobachtet werden. Interessanterweise konnten feine Unterschiede im Selektivitätsprofil des Phenylharnstoffs **43** identifiziert werden. So zeigte sich hier eine deutlich höhere Potenz gegenüber MELK (83 %), AMPK A1/B1/G1 (77 %) und A2/B1/G1 (77 %), während eine moderate Inhibition der Kinasen PASK (61 %) und ROCK1 (54 %) festgestellt wurde. Die Tatsache, dass für alle anderen Kinasen eine Inhibition von unter 40 % beobachtet werden konnte, unterstreicht die vielversprechende Kinaseselektivität von CAAs.

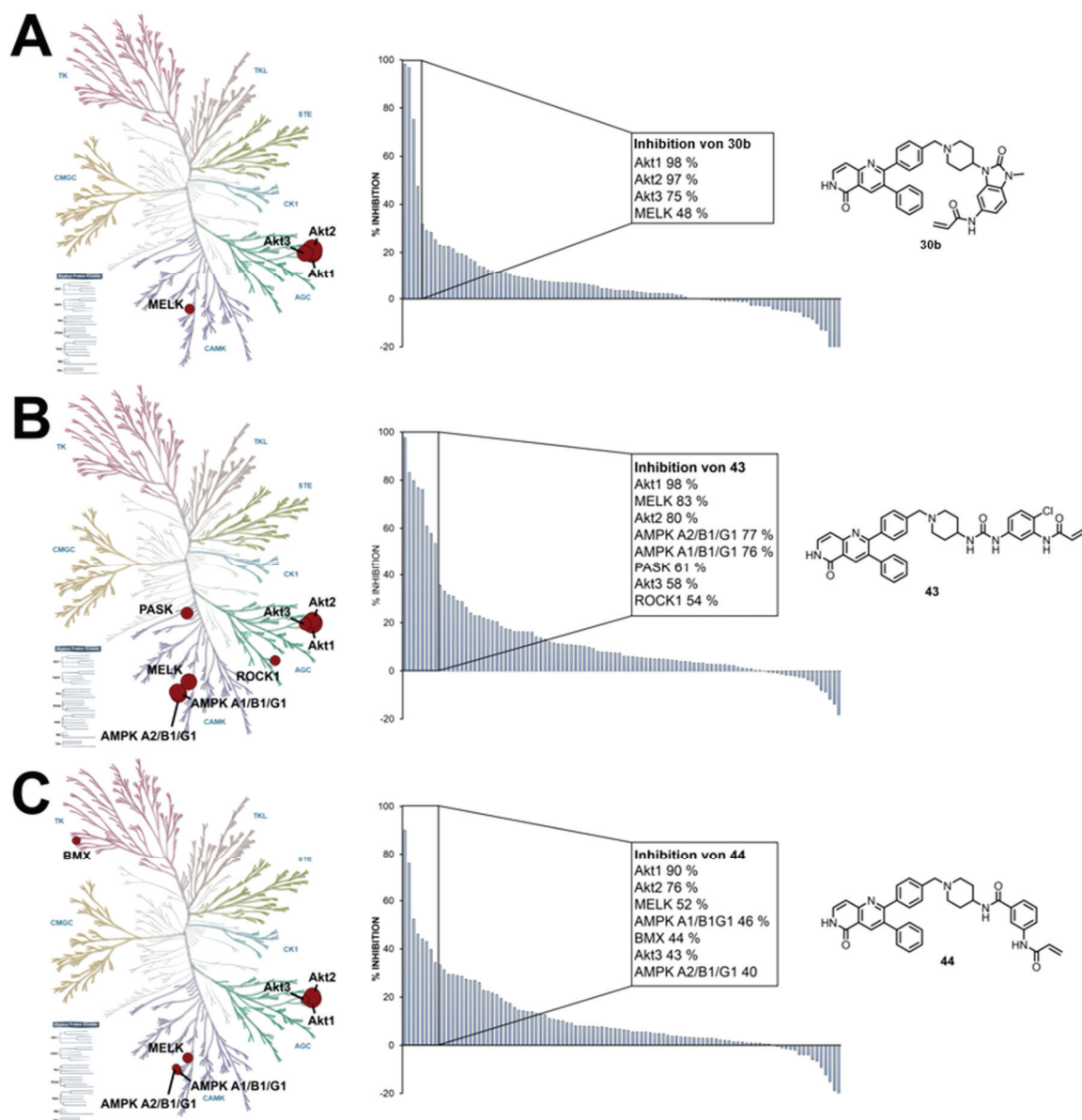


Abbildung 19. Selektivitätsprofil der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren **31a** (A), **43** (B) und **44** (C) über 100 Kinasen bei 1 μ M, dargestellt in einem Kinom-Dendrogramm adaptiert von KinMap.¹⁶⁹ Die Darstellung ist großzügigerweise reproduziert von Cell Signaling Technology, Inc. (<http://www.cell-signal.com>).

3.3.4. Strukturanalyse der CAAs

Die Struktur-basierte Entwicklung, Synthese und biochemische Evaluation einer kleinen fokussierten Bibliothek von CAAs brachte eine Serie von Sondenmolekülen hervor, die Aufschluss über die SAR geliefert und den chemischen Raum für weitere Optimierungen erweitert haben. Um einen tieferen Einblick in die strukturellen Ursachen der unterschiedlichen Aktivitäten zu erhalten, wurde über Röntgenstrukturanalyse die Bindungsmodi einiger vielversprechender Kandidaten untersucht. So konnten die Vollängen-Strukturen von Akt1 in Komplex mit dem Benzo[d]imidazol-Derivat **30a**, dem Phenylharnstoff **43**, dem Benzylamin **50** sowie dem Phenylpiperazin **54** über Kokristallisationsexperimente aufgeklärt werden (Abb. 20).⁹ Alle gelösten Kristallstrukturen zeigten hierbei den erwarteten kovalent-allosterischen Bindungsmodus. Für das Benzo[d]imidazol-Derivat **30a** konnte aufgrund der N1-Methylierung der für Borussertib beobachtete polare Kontakt zu einem konservierten Wasser nicht ausgebaut werden. Überraschenderweise sorgte diese kleine chemische Modifikation für eine drastische Änderung im Interaktionsprofil des Inhibitors (Abb. 20A). So konnte beobachtet werden, dass anstelle des von Borussertib bevorzugtem Cys296 das in räumlicher Nachbarschaft befindliche Cys310 kovalent modifiziert wurde. Dieser alternative Bindungsmodus wurde durch nicht-kovalente Wechselwirkungen wie einer Wasser-vermittelten Wasserstoffbrücke des Imidazol-Carbonyls zu Asn79 und einer Wasserstoffbrücke des Acrylamid-Carbonyls zum Proteinrückgrat von Lys297 stabilisiert. Es hatte den Anschein, dass durch den fehlenden polaren Kontakt, der für Borussertib ausgehend von der N1-Position beschrieben wurde, eine vorzugsweise eine veränderte Konformation des Piperidin-Rings induziert wird, wodurch infolgedessen das alternative Cys310 vorzugsweise modifiziert wird. Dieses divergente Interaktionsprofil konnte erklären, wieso der Verlust der Wechselwirkung mit dem konservierten Wasser keinen drastischen Effekt auf die inhibitorische Aktivität des N-methylierten Inhibitors **30a** zeigte, folglich der Inhibitor ebenfalls eine hohe Potenz im einstellig-nanomolaren Bereich aufwies. Im Falle des Phenylharnstoff-Derivats **43** wurde Borussertib durch Ringöffnung des Imidazolons in eine verlängerte Molekülstruktur überführt. Diese gestreckte Struktur bewirkte eine leichte Verschiebung in der Ligandenkonformation, die ebenfalls eine Adressierung des alternativen Cys310 zur Folge hatte (Abb. 20B). Weiterhin konnte eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Amin des Acrylamids und dem Amid-Rückgrat von Glu17 identifiziert werden. Dass die Länge der Linkerregion des Moleküls eine bedeutsame Rolle für den Bindungsmodus der CAAs spielt, wurde auch durch das um eine Stickstoffeinheit verkürzte Phenylamid-Derivat **44** deutlich, welches einen zu Borussertib analogen Bindungsmodus mit kovalenter Modifikation des Cys296 einnimmt (Abb. 20C).

⁹ Kristallisation und Verfeinerung der Kristallstrukturen wurden von M. Sc. Ina Landel, M. Sc. Rebekka Scheinpflug und Dr. Matthias Müller, TU Dortmund, durchgeführt.

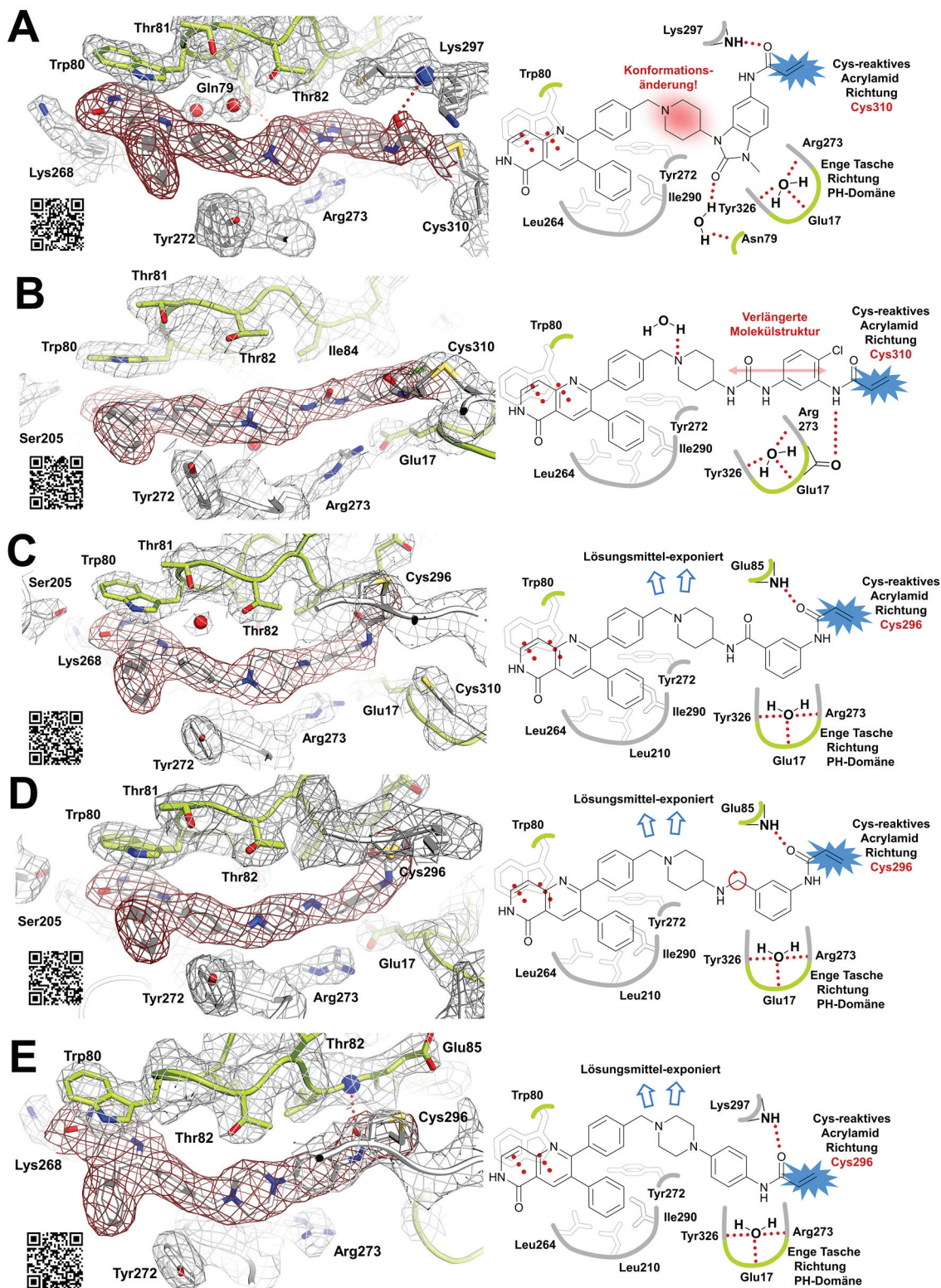


Abbildung 20. Ko-Kristallstruktur von Vollängen-Akt1 im Komplex mit verschiedenen CAAls sowie eine detaillierte Darstellung der Protein-Ligand-Wechselwirkungen. **A** 30a in Komplex mit Akt (PDB: 6HHJ). **B** 43 (PDB: 6HHG) in Komplex mit Akt. **C** 44 in Komplex mit Akt (PDB: 6HHI). **D** 50 in Komplex mit Akt (nicht publiziert).^h **E** 54 in Komplex mit Akt (PDB: 6HHH). Die 2F_o-F_c-Karte wurde bei 0.8 σ konturiert.

^h Die Kristallstruktur wurde von M. Sc. Ina Landel, TU Dortmund, gelöst (unpubliziert).

Das Phenylamin **50** zeigte einen zum Phenylamid-Derivat **44** vergleichbaren Bindungsmodus, indem der Acrylamid-Michaelakzeptor ebenfalls eine Wasserstoffbrücke zum Rückgrat von Glu17 ausbildete (Abb. 20D). Dieser Aspekt bekräftigte die Hypothese, dass die Unterschiede in der Aktivität der beiden Inhibitoren nicht in einem veränderten Interaktom, sondern im Wesentlichen in der entropisch nachteiligen Flexibilität des Inhibitors begründet zu sein scheinen. Eine weitere Verkürzung der Molekülstruktur wie von Phenylpiperazin-Derivat **54** führte ebenfalls zu einer favorisierten Adressierung von Cys296 anstelle von Cys310 (Abb. 20E). Die verkürzte Struktur bewirkte zudem, dass eine Wasserstoffbrücke ausgehend vom Carbonyl-Sauerstoff des Acrylamids nicht, wie für Borussertib und **44** beobachtet, zu Glu85, sondern alternativ zum Proteinerückgrat von Lys297 ausgebildet wurde. Insgesamt zeigte die Kristallstrukturanalyse eine unterschiedliche Priorisierung der kovalenten Adressierung von Cys296 bzw. Cys310 in Abhängigkeit der eingesetzten Inhibitoren. Vorangegangene MS/MS-Studien ließen jedoch sowohl für Borussertib als auch für das Phenylharnstoff-Derivat **43** den Schluss zu, dass für beide Inhibitoren die kovalente Adressierung beider Cysteine möglich ist.⁹⁹

Die Fragestellung, welches Cystein in Abhängigkeit des Grundgerüsts der CAAIs bevorzugt modifiziert wird, ist für eine weitere Struktur-basierte Entwicklung von entscheidender Bedeutung. Daher wurde die Wahrscheinlichkeit, welche der beiden Cysteine bevorzugt von den verschiedenen Inhibitoren modifiziert wird, über Molekulardynamik (MD)-Simulationen untersucht.^{170,♦} Basierend auf den Kristallstrukturen von Borussertib, **30b** und **44** wurden nicht-kovalente Enzym-Inhibitor-Komplexe simuliert und die Distanz des Acrylamid-Elektrophils zu den Schwefelatomen von Cys296 und Cys310 über die Simulationsdauer analysiert.^{120, 171-173} Es konnten für Borussertib über den gesamten Simulationszeitraum deutlich kürzere Distanzen zu Cys296 im Vergleich zu Cys310 beobachtet werden, was somit gut mit den Resultaten der Strukturanalyse sowie der MS/MS-Studien korrelierte. Im Fall von **30b** konnten im Vergleich zur MD-Simulation von Borussertib geringere Distanzen zu Cys310 während der Simulation beobachtet werden, wohingegen die Distanzen von **30b** zu Cys296 im Vergleich zu Borussertib größer waren. Somit bestätigten die MD-Simulationen auch hier die konträre Präferenz von **30b** zu Cys310. Dieser Trend war für das Phenylharnstoff-Derivat **44** bedeutend ausgeprägter. was sich darin widerspiegelte, dass über die Zeitdauer der Simulation zu keinem Zeitpunkt eine Distanz zwischen Acrylamid-Elektrophil und Cys296 detektiert wurde, die eine Reaktion mit der Seitenkette erlaubt.

♦ Die MD-Simulationen wurden von Dr. Thien-Anh Le und Prof. Dr. Bernd Engels, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, durchgeführt.

Auch wenn in MS/MS-Studien eine Cys296-gebundene Spezies identifiziert werden konnte, sind die Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit denen der Kristallstrukturanalyse, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die kovalente Modifikation von Cys310 in Gegenwart von Phenylharnstoff **44** bevorzugt ist.

3.3.5. Zelluläre Charakterisierung

Über die biochemische und strukturbiochemische Analyse der dargestellten CAAs konnte eine Reihe vielversprechender Sondenmoleküle identifiziert werden, die darüber hinaus auch in komplexeren, zellulären Systemen hinsichtlich ihrer antiproliferativen Aktivität auf verschiedenen Krebszelllinien untersucht wurden. Hierzu wurde der Effekt auf die Viabilität der Krebszelllinien AN3CA (Endometrialkarzinom), T47D (Brustkrebs), ZR-75-1 (Brustkrebs), BT-474 (Brustkrebs) und KU-19-19 (Blasenkrebs) in einem Lumineszenz-basierten Zellassay analysiert. Diese Zelllinien weisen genetische Alterationen in den relevanten PI3K/Akt- sowie Ras/MAP-Kinase-Signalwegen auf, darunter aktivierende Deletionen in PIK3R1, *loss-of-function* oder herabregulierende genetische Läsionen in den Tumorsuppressorgenen PTEN oder TP53 sowie aktivierende Punktmutationen in PI3KCA, Akt1 oder NRas.

Tabelle 9. Zelluläre Evaluierung der dargestellten CAAs zur Ermittlung der halbmaximalen effektiven Konzentration (EC₅₀).^o

		Zellviabilitäts-Assay EC ₅₀ [nM]					
		AN3CA	T47D	ZR-75-1	MCF-7	BT-474	KU-19-19
PIK3R1^a	R557_K561>Q						
PIK3CA^a			H1047R		E545K	K111N	R1023Q
PTEN^a	R130fs			L108R			
AKT1^a							E17K/E49K
NRAS^a							Q61R
TP53^a			L194F			E285K	
Capivasertib	869 ± 278	475 ± 92	191 ± 68	2653 ± 555	1605 ± 450	20866 ± 7603	
Ipatasertib	925 ± 457	443 ± 6	219 ± 83	5036 ± 1830	2371 ± 745	24037 ± 9491	
MK-2206	972 ± 322	583 ± 245	63 ± 21	571 ± 111	1682 ± 316	7054 ± 421	
Doxorubicin	30 ± 9	127 ± 40	100 ± 26	153 ± 9	623 ± 134	72 ± 8	
Borussertib	191 ± 90	48 ± 15	5 ± 1	277 ± 90	373 ± 54	7770 ± 641	
30a	230 ± 75	11 ± 2	2 ± 0	32 ± 8	109 ± 16	7157 ± 2112	
30b	159 ± 70	25 ± 7	2 ± 0	138 ± 81	259 ± 68	2313 ± 908	
44	2063 ± 438	336 ± 25	39 ± 3	1111 ± 117	1785 ± 458	1660 ± 46	
45^o	382 ± 31	95 ± 20	11 ± 3	336 ± 113	464 ± 31	14942 ± 5541	
50	3288 ± 298	1897 ± 578	384 ± 62	2196 ± 125	4019 ± 912	6755 ± 1462	
54	3614 ± 1292	832 ± 81	116 ± 16	1218 ± 58	4617 ± 1059	17119 ± 6379	

^a Genetische Alterationen der Krebszelllinien nach COMSIC-Datenbank.

^o Die zelluläre Evaluierung wurde von M. Sc. Ina Landel und M. Sc. Jörn Weinsner, TU Dortmund, vorgenommen.

^o Synthese des Phenylamid-Derivats durch Dr. Steven Smith, TU Dortmund.¹⁴⁰

Die Zelllinien sind literaturbekannt und wurden bereits als sensitiv gegenüber Akt-Inhibition beschrieben.^{166, 174} Diese Sensitivität konnte bestätigt werden, indem sowohl die Referenzverbindungen Capivasertib, Ipatasertib und MK-2206 als auch die CAAs in der Lage waren, die Zellproliferation potent zu inhibieren. Genauer betrachtet wies ein Großteil der CAAs in Vergleich zu den klinischen Kandidaten eine überlegene zelluläre Aktivität auf, was das hohe Potential dieser neuartigen Wirkungsweise zusätzlich unterstreicht. Als besonders sensitiv stellte sich die Brustkrebs-Zelllinie ZR-75-1 heraus, bei der für Borussertib (5 nM) eine zelluläre Inhibition im einstelligen nanomolaren Bereich detektiert werden konnten, welches somit eine zwölffach potentere Inhibition im Vergleich zu dem allosterischen Akt-Inhibitor MK-2206 (63 nM) sowie eine 40-fach höhere Aktivität im Vergleich zu den ATP-kompetitiven Referenzverbindungen Capivasertib (191 nM) und Ipatasertib (219 nM) aufwies. Die zelluläre Aktivität der verschiedenen Derivate zeigt eine gute Korrelation der EC₅₀-Werte zu den zuvor biochemisch ermittelten IC₅₀-Werten. Für die Benzo[*d*]imidazol-basierten Derivate **30a** und **30b** konnte auffälligerweise eine verglichen mit Borussertib zwei- bis fünffach höhere inhibitorische Aktivität festgestellt werden konnte. Angesichts der geringfügig kleineren biochemischen Potenz könnte dies mit einer besseren Zellgängigkeit zusammenhängen. Für das Phenylharnstoff-Derivat **44** bestätigte sich hingegen der Trend aus den biochemischen Analysen, indem analog zur inhibitorischen Aktivität auch eine geringere zelluläre Aktivität zu sehen war. Ebenso konnte die höhere Aktivität des Phenylamids **44** im Vergleich zum Benzylamin **50** bestätigt werden. Darüber hinaus wies das verkürzte Phenylpiperazin-Derivat **54** eine vergleichsweise geringe zelluläre Inhibition auf, was ebenfalls im Einklang mit der biochemischen Charakterisierung ist.

3.3.6. Schlussfolgerungen der SAR-Untersuchungen

Aus der Struktur-basierten Synthese sowie der biochemischen, strukturbioologischen und zellulären Evaluation konnten wichtige Erkenntnisse für eine SAR abgeleitet werden (Abb. 21). Es wurde deutlich, dass unter Beibehaltung des zentralen 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts eine hohe strukturelle Diversität im östlichen Molekülteil erlaubt ist. Dies äußerte sich zum einen darin, dass kleine Substitutionen am Benzo[d]imidazolone-Grundgerüst toleriert werden und eine N1-Methylierung oder Chlor-Substitution in 5-Position positiv auf die zelluläre Wirksamkeit auswirkten. Erstaunlicherweise konnte gezeigt werden, dass die N1-Methylierung von **31a** zudem zu einer drastischen Änderung des Bindungsmodus führte, sodass Cys310 anstelle von Cys296 adressiert wurde. Zum anderen verdeutlichte die Variation verschiedener Grundgerüste die hohe chemische Flexibilität für die Adressierung dieses Bereichs der Bindetasche.

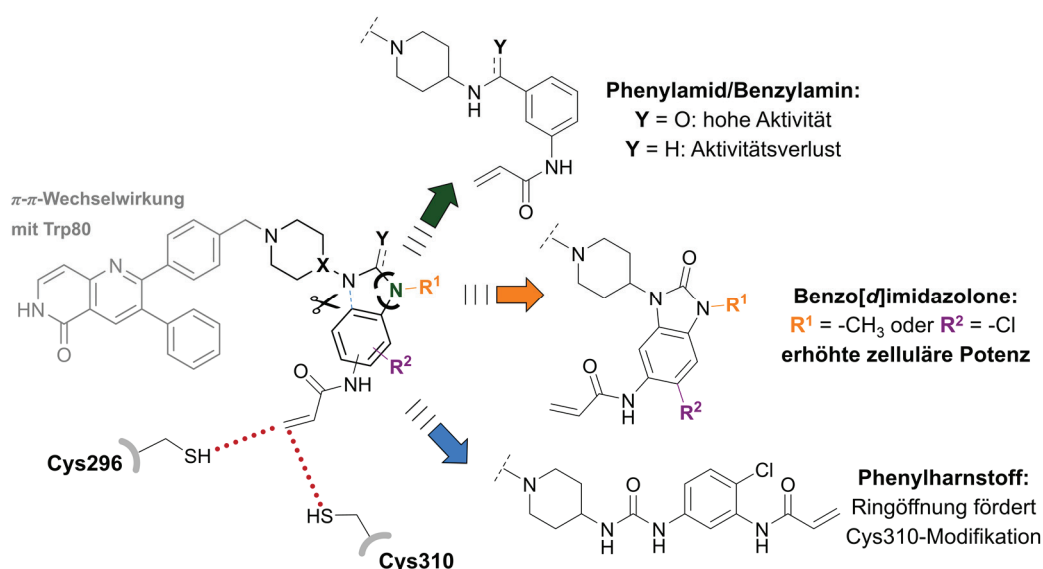


Abbildung 21. Schematische Darstellung der SAR von CAAs.

Durch Öffnung des Benzo[d]imidazolone-Rings ergab sich Phenylharnstoff-Derivat **44** mit hoher biochemischer und zellulärer Potenz. Phenylharnstoffe stellen aufgrund der Möglichkeit, einen großen chemischen Raum abdecken zu können, ein attraktives neues Grundgerüst dar. Es wurde außerdem ersichtlich, dass durch die gestreckte Molekülstruktur eine kovalente Modifikation von Cys310 bevorzugt wird, was Einfluss auf die Protein-Ligand-Interaktionen nimmt. Weiterführende Untersuchungen mit Phenylamid **45** und Benzylamin **50** zeigten zudem, dass sich eine zu hohe Flexibilität offenbar negativ auf die Potenz der CAAs auswirkt. Weiterhin wurde deutlich, dass die Wahl eines Linkerfragments mit geeigneter Länge entscheidend für eine optimale Präorganisation des Michaelakzeptors ist, sodass zu kurze Molekülfragmente eine kinetisch bedingte verringerte biochemische Potenz aufwiesen. Diese Erkenntnisse sind für die weitere Entwicklung von CAAs sowie für eine pharmakokinetische Optimierung dieser Inhibitor-Klasse von essentiellem Wert.


3.4. Medizinalchemische Optimierung

Wie in Kapitel 3.2.1. festgestellt wurde, wies Borussertib aufgrund der hohen Unlöslichkeit sowie geringen Permeabilität einen großen Optimierungsbedarf hinsichtlich der pharmakokinetischen Eigenschaften des Inhibitors auf. Um diesbezüglich einen genaueren Einblick in die Struktur-Eigenschafts-Beziehungen der CAAs zu bekommen, wurden weitere Derivate in einer *in vitro*-PK-Studie untersucht.

3.4.1. *in vitro*-PK-Studie von CAAs

Für eine tiefergehende Analyse der pharmakokinetischen Eigenschaften der CAAs wurden neben Borussertib repräsentativ das Benzo[*d*]imidazol-Derivat **30b**, das Phenylharnstoff-Derivat **44** sowie das Phenylamid-Derivat **45** hinsichtlich ihrer Löslichkeit und Permeabilität untersucht (Tabelle 10). Es wurde deutlich, dass das Benzo[*d*]imidazol **30b** eine vergleichbar schlechte Löslichkeit wie Borussertib aufwies, was mit der hohen strukturellen Ähnlichkeit begründet werden könnte.

Tabelle 10. *in vitro* PK-Studie über Löslichkeit (SolRank-Assay) und Permeabilität (PAMPA- und Caco2-Assay) verschiedener kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren.[†] Über ein Ampel-Farbsystem wurden die Werte auf Grundlage von Erfahrungswerten klassifiziert (rot: schlechte Löslichkeit/Permeabilität, grün: gute Löslichkeit/Permeabilität).

#	SolRank pH 7.4 [μM]	PAMPA pH 7.4 % Flux	Caco-2 pH 6.5/7.4 P_{app} A→B [10^{-6} cm/s]	Caco-2 pH 6.5/7.4 P_{app} A→B [10^{-6} cm/s]	Caco-2 Ratio B→A/A→B
	< 20	< 5	< 2		> 5
	20 – 120	5 – 25	2 – 20		2 - 5
	> 120	> 25	> 20		< 2
Borussertib	14,1	< 5	0,038	4,03	105
30b	20,3	n.a. ^a	0,058	10,7	185
44	77,4	3,6	0,220	12,9	58,6
45^o	109,0	17,5	0,040	9,8	243

^an.a.: nicht auswertbar.

Die Änderung des Grundgerüsts zu Phenylharnstoffen oder Phenylamiden führte zwar zu einer leichten Verbesserung der Löslichkeit, die jedoch mit etwa 100 μM bei pH 7.4 als eher gering einzustufen war. Für **30b** konnte kein Wert im PAMPA-Assay erhalten werden, was vermutlich auf die geringe Löslichkeit zurückzuführen war.

[†] SolRank-, PAMPA- und Caco-2-Messungen wurden von Anke Unger und Dr. Matthias Baumann, LDC Dortmund, durchgeführt.

^o Synthese des Phenylamid-Derivats durch Dr. Steven Smith, TU Dortmund.¹⁴⁰

Phenylharnstoff-Verbindung **44** zeigte ähnlich wie Borussertib eine sehr geringe Permeabilität, während Phenylamid **45** eine geringfügig verbesserte Permeabilität aufwies. Der zellbasierte Caco-2 Assay ist für eine orale Bioverfügbarkeit von hoher Relevanz. Wie zuvor für Borussertib konnte für alle getesteten Verbindungen unabhängig vom Substitutionsmuster oder Grundgerüst eine sehr geringe Absorption der Inhibitoren festgestellt werden. Darüber hinaus ließ das Verhältnis von Influx und Efflux darauf schließen, dass in allen Fällen von einem aktiven Effluxprozess der CAAs ausgegangen werden konnte.

Tabelle 11. Metabolische Stabilitäts-Untersuchungen ausgewählter CAAs in humanen und murinen Lebermikrosomen zur Simulation des Phase I-Metabolismus.[♠]

#	Mikrosomale Stabilität Phase I	
	$t_{1/2}$ [min] (H ^a /M ^b)	Cl _{int} [μL/min/mg] (H ^a /M ^b)
Capivasertib	33/87	14/16
MK-2206	347/693	1/2
Borussertib	99/46	5/30
30a	25/23	19/60
30b	87/41	5/34
44	19/20	24/68
45	58/173	8/8

^aHumane Lebermikrosomen. ^bMurine Lebermikrosomen.

Neben der Löslichkeits- und Permeabilitäts-Eigenschaften ist auch die metabolische Stabilität von großer Bedeutung für die Pharmakokinetik eines Wirkstoffes. Daher wurden ausgewählte Derivate zudem hinsichtlich ihrer metabolischen Phase I-Stabilität in einem Mikrosomenstabilitäts-Assay analysiert (Tabelle 11). Während das Chlor-substituierte Benzo[d]imidazol-Derivate **30b** mit Borussertib vergleichbare hohe Stabilität aufwies, konnte für das N1-methylierte Derivat **30a** eine etwa vierfach schlechtere Stabilität festgestellt werden. Der Methyl-Substituent schien somit ein metabolischer *Hotspot* im Phase I-Metabolismus darzustellen. Auch für Phenylharnstoff für **44** konnte eine verringerte Stabilität bestimmt werden. Folglich ist der offenkettige Phenylharnstoff dem bityklischen Benzo[d]imidazol hinsichtlich der metabolischen Stabilität von Nachteil. Für Phenylamid **45** fiel eine im Vergleich zu Borussertib um Faktor 3 verbesserte Stabilität in murinen Mikrosomen auf. Insgesamt ist für die metabolische Stabilität zu bemerken, dass alle getesteten Kandidaten eine vielversprechende Stabilität zeigten, was vor allem im Vergleich zu den Referenzverbindungen Capivasertib und MK-2206 deutlich wurde.

[♠] Die mikrosomale Mikrosomenstabilität wurde von M. Sc. Julia Hardick untersucht.

Bei Betrachtung der gesamten PK-Profilierung konnten die bisher dargestellten CAAs als Wirkstoffkandidaten charakterisiert werden, die sich durch eine geringe Löslichkeit und Permeabilität sowie eine schlechte Permeabilität auszeichnen, während eine vielversprechende metabolische Stabilität identifiziert werden konnte. Dieses PK-Profil spiegelt damit sehr treffend die limitierte Bioverfügbarkeit wieder, die in den *in vivo*-PK-Studien von Borussertib deutlich wurde. Um diese Eigenschaften gezielt optimieren zu können, wurden die molekularen Eigenschaften der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren untersucht, die ursächlich für die moderaten PK-Eigenschaften zu sein scheinen (Abb. 22).

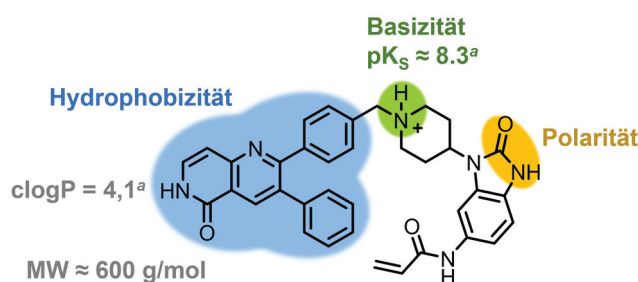


Abbildung 22. Molekulare Analyse der strukturellen Eigenschaften, die Einfluss auf die pharmakokinetischen Eigenschaften zu haben scheinen. Die clogP- und pK_s-Werte wurden mit ChemDraw Professional, Version 15.0, ermittelt.

Einen Anhaltspunkt für Eigenschaften eines Moleküls, die als „*drug-like*“ beschrieben werden können, bieten Lipinskis *rule-of-five*, wonach Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 500 g/mol, einen logP unter 5, maximal fünf Wasserstoffbrücken-Donoren und maximal zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptoren als vielversprechend hinsichtlich einer oralen Bioverfügbarkeit gelten.¹⁷⁵ Unter Berücksichtigung dieser Werte konnte das relativ hohe Molekulargewicht von knapp 600 g/mol als ein Anhaltspunkt für die Unlöslichkeit sowie niedrige Permeabilität festgemacht werden. Darüber hinaus beeinflusst die Hydrophobizität die Löslichkeit einer Verbindung. Mit einem clogP von 4,1 als Maß für Lipophilie lag diese zwar noch an der oberen Grenze der *rule-of-five*, könnte jedoch einen weiteren Faktor für die moderaten Löslichkeitseigenschaften der CAAs darstellen. Bei Betrachtung der Molekülstruktur nahm wahrscheinlich das aromatische 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst den bedeutsamsten Einfluss auf die Hydrophobizität. Als ein weiterer Faktor, der die Permeabilität der Verbindungen negativ beeinflussen könnte, ist die Basizität zu nennen (pK_s ≈ 8.3), die im Wesentlichen auf dem basischen Amin des Piperidins beruht. Dazu fiel eine hohe Polarität ausgehend vom Benzo[*d*]imidazolone-Grundgerüst auf. Basierend auf der Analyse der Molekülstruktur wurde somit deutlich, dass die wesentlichen Limitationen in Löslichkeit und Permeabilität wahrscheinlich auf dem disubstituierten 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst beruhen. Aus diesem Grund sollte infolgedessen im Rahmen einer medizinalchemischen Optimierung eine Variation dieses Strukturelements mit Grundgerüsten verbesserter Eigenschaften erfolgen.

Hierzu sollte der Ansatz des sogenannten *scaffold hopping* auf zwei verschiedene Weisen verwirklicht werden.¹⁷⁶ Einerseits wurde eine neue Syntheseroute entwickelt, die eine schnelle Variation des westlichen Molekülteils ermöglicht. Andererseits wurde basierend auf dem klinischen Kandidaten Miransertib ein Hybridansatz verfolgt.

3.4.2. Grundgerüst-Derivatisierung der CAAs

Die in 3.1. und 3.3.2. beschriebene Syntheseroute eignete sich für eine schnelle Variation des Benzo[*d*]imidazol-Grundgerüsts. Um eine Derivatisierung des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts voranzutreiben, musste allerdings eine alternative Synthesestrategie entwickelt werden. Diese sollte entsprechend dem Konzept der Diversitäts-orientierten Synthese gestaltet werden, indem der Derivatisierungsschritt in einem möglichst späten Schritt der Syntheseroute erfolgen sollte.¹⁷⁷ In einer retrosynthetischen Analyse wurde daher das 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst entfernt und das leicht zu modifizierende Bromphenyl-Derivat **55** als möglicher Startpunkt weiterer Synthesen definiert (Abb. 23).

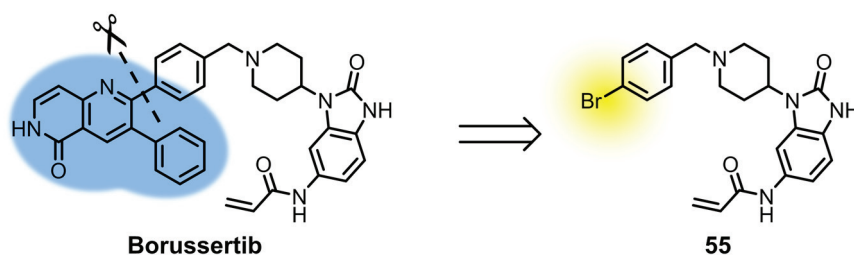
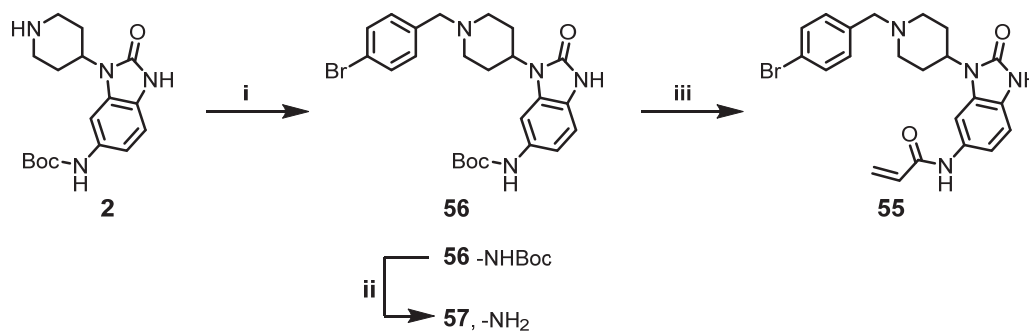


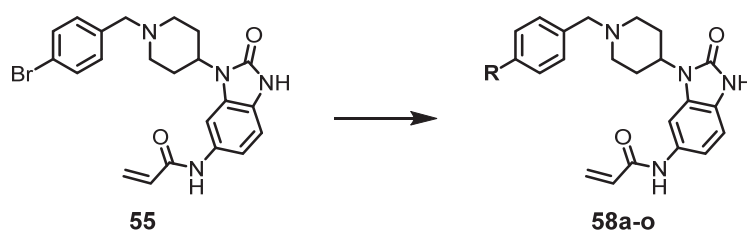
Abbildung 23. Syntheseansatz der Derivatisierung von CAAs. Aus einer retrosynthetischen Analyse wurde Bromphenyl-Derivat **55** als Startpunkt weiterer Synthese definiert.

Ausgehend von diesem zentralen Intermediat sollten in einem letzten Schritt verschiedene Grundgerüste über eine Suzuki-Kreuzkupplungsreaktion eingebracht werden, welche die wichtige π - π -Stapelwechselwirkung mit Trp80 ermöglichen. Die Suzuki-Reaktion eignete sich besonders für eine gezielte Derivatisierung, da einerseits schnell und einfach die gewünschte Aryl-Aryl-Bindung geknüpft werden konnte und andererseits viele interessante Boronsäure-Bausteine kommerziell verfügbar sind.¹⁷⁸ Die Synthese erfolgte ausgehend vom Benzo[*d*]imidazol-Grundgerüst **2** in einer linearen dreischrittigen Syntheseroute, indem **2** zunächst in einer Leuckart-Wallach-Reaktion mit 4-Brombenzaldehyd umgesetzt wurde (Schema 24). Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe von **56** unter sauren Bedingungen abgespalten und der Acrylamid-Michaelakzeptor unter Schotten-Baumann-ähnlichen Bedingungen mit dem korrespondierenden Säurechlorid in **57** eingebracht. Auf diese Weise konnte das zentrale Zwischenprodukt **55** mit einer guten Gesamtausbeute von 36 % dargestellt werden.



Schema 24. Darstellung des zentralen Intermediates **55**. **i** 4-Brombenzaldehyd, Ameisensäure, MeCN, 80 °C, ovn, 56 %. **ii** 4 N HCl in 1,4-Dioxan, rt, 2 h, 75 %. **iii** Acryloylchlorid, DIPEA, THF, rt, 2 h, 86 %.

Zur finalen Derivatisierung wurde **55** in Suzuki-Reaktionen mit einer Vielzahl von Boronsäure-Derivaten umgesetzt. Diese Arylboronsäuren wurden nach verschiedenen Kriterien ausgewählt. Sie sollten entweder kleiner als das bestehende 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst sein, eine geringere Hydrophobizität aufweisen oder aber ein alternatives Grundgerüst darstellen, welches im Gegensatz zum 1,6-Naphthyridinon chemisch leicht modifizierbar ist. Gleichmaßen sollte eine möglichst hohe Diversität geschaffen werden, um Einblicke in die SAR bezüglich dieses Molekülabschnitts gewinnen zu können. Ferner wurde untersucht, inwiefern der Phenyl-Substituent in 3-Position verzichtbar für die Bindung des Inhibitors ist, da ebenfalls Molekulargewicht eingespart und der hydrophobe Charakter herabgesetzt werden könnte. Die Suzuki-Kupplung wurde mit dem Ferrocen-basierten Palladium-Komplex Pd(dppf)Cl₂ als Katalysator im Mikrowellenreaktor durchgeführt und führte in Abhängigkeit von der jeweiligen Boronsäure zu moderaten bis guten Ausbeuten von 24 – 88 %. Im Wesentlichen konnte für elektronenärmere Aromaten eine geringere Ausbeute beobachtet werden, was mit einer verringerten Reaktivität begründet werden konnte.¹⁶⁸ Darüber hinaus besitzen Stickstoff-reiche Derivate wie Indazol **58b** die Fähigkeit, Palladium zu komplexieren und so wohl-möglich zu einer Inaktivierung des Katalysators beizutragen.



Schema 25. Darstellung einer fokussierten Bibliothek potenzieller CAAIs. Reaktionsbedingungen: Boronsäure-Derivat, Pd(dppf)Cl₂, K₃PO₄, 1,4-Dioxan/H₂O 5:1, 130 °C, μ w, 30 min, 24 – 88 %.

Tabelle 12. Biochemische Charakterisierung der dargestellten fokussierten Molekülbibliothek durch Bestimmung der IC₅₀-Werte durch den HTRF® KinEASE™ Assay.^{z,§}

#	R	Akt1 ^{WT} IC ₅₀ [μM]	#	R	Akt1 ^{WT} IC ₅₀ [μM]
Borussertib		0,0008 ± 0,0003	58h		18,5 ± 5,4
55		> 20	58i		> 20
58a		16,5 ± 6,6	58j		9,2 ± 3,8
58b		2,6 ± 0,5	58k		> 20
58c		> 20	58l		> 20
58d		> 20	58m		> 20
58e		> 20	58n		7,0 ± 2,8
58f		19,4 ± 6,9	58o		5,1 ± 1,7
58g		> 20			

^z Die Messungen der inhibitorischen Aktivität wurde von M. Sc. Jörn Weisner, TU Dortmund, durchgeführt.

[§] Die Boronsäure-Derivate wurden freundlicherweise von Dr. Carsten Schultz-Fademrecht, Lead Discovery Center Dortmund, zu Verfügung gestellt.

Über diese Reaktion konnte eine kleine fokussierte Bibliothek von 16 potenziellen CAAs mit diversen Grundgerüsten erstellt werden, die im Folgenden hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität untersucht wurden (Tabelle 12). Bei Betrachtung der biochemischen Evaluation fiel zunächst auf, dass alle hier dargestellten Verbindungen einen starken Aktivitätsverlust gegenüber den 1,6-Naphthyridinon-basierten Inhibitoren wie Borussertib aufwiesen. Dies könnte darin begründet sein, dass eine Phenylsubstitution analog jener in 3-Position des Naphthyridinons bei allen Derivaten fehlt. Somit schien diese Substitution einen sehr großen Beitrag zur Ligandenbindung zu haben. Dies hebt die in der Strukturanalyse detektierte π - π -Stapel-Wechselwirkung mit Tyr272 als eine essentielle Interaktion der allosterischen Akt-Inhibitoren hervor. Dennoch konnten für einige Derivate mikromolare Aktivitäten identifiziert werden, die Rückschlüsse auf die SAR geben und gleichermaßen interessante Startpunkte für eine weitere Entwicklung darstellen. Neben bizyklischen Grundgerüsten wie Indol **58o** oder Indazol **58n** war Benzamid-Derivat **58b** besonders vielversprechend, welches das aktivste Derivat der Serie darstellte. Ein struktureller Vergleich zu den 1,6-Naphthyridinon-basierten Inhibitoren zeigte, dass **58b** ein vergleichbares Pharmakophor aufwies (Abb. 24).

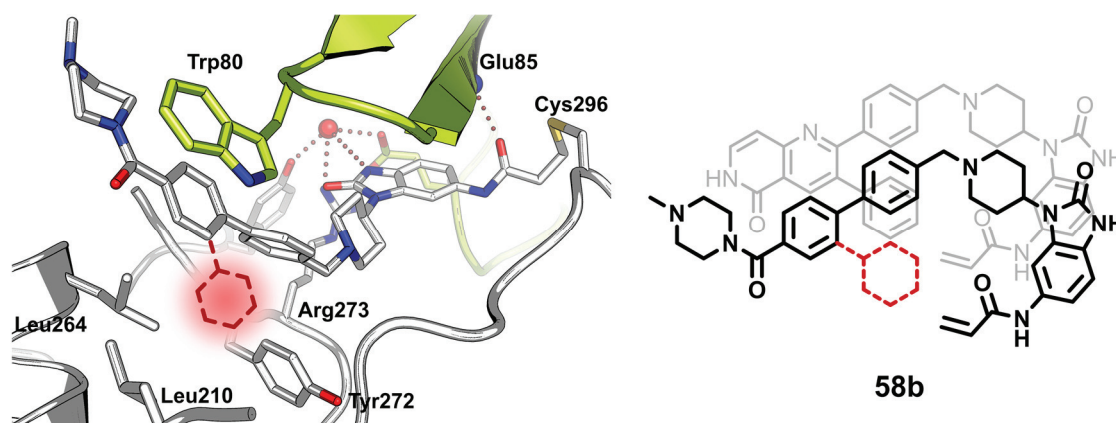
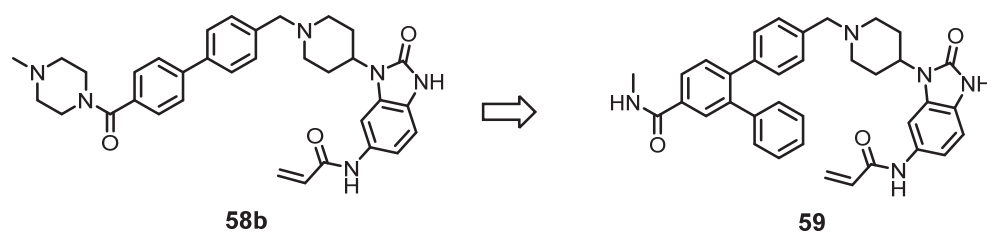


Abbildung 24. Modell des Inhibitors **58b** in der Vollängen-Struktur von Akt (PDB: 6HHF) und Überlagerung dieser Verbindung mit der Kleinmolekül-Struktur von Borussertib. Es konnte ein vergleichbares Pharmakophor zwischen **58b** und Borussertib festgestellt werden, während sich die Verbindungen um eine Phenyl-Substitution in 3-Position unterschieden (rot markiert). Das Modell wurde mit dem Programm Accelrys Discovery Studio 3.1 generiert.

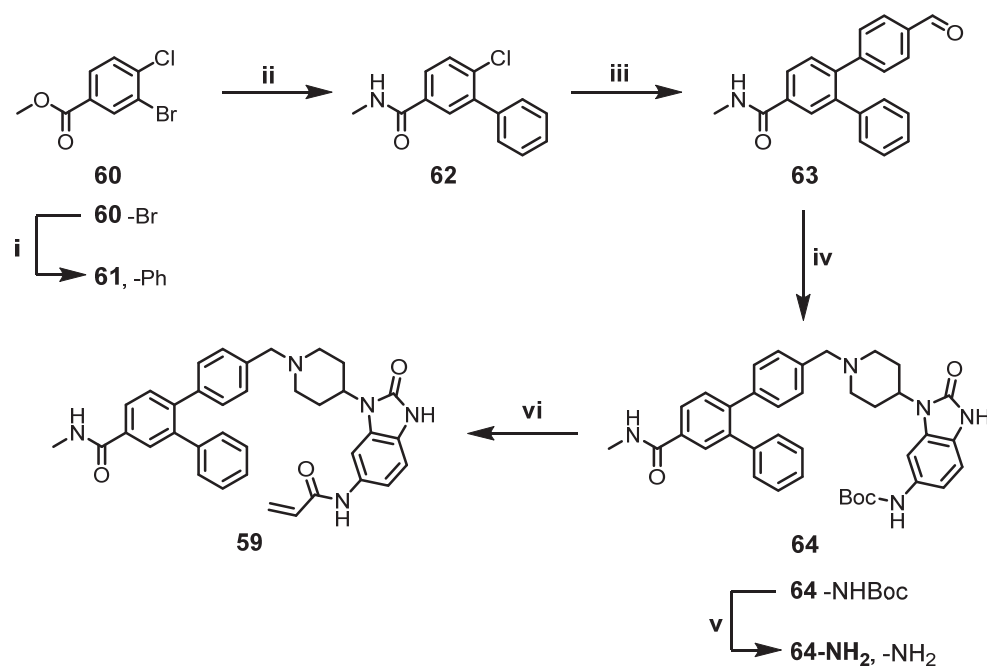
Das Amidgerüst des Benzamids von **58b** korreliert hierbei sehr gut mit der Lactam-Struktur des 1,6-Naphthyridinons, wenngleich das aromatische System um einen Ring verkürzt wurde. Anstelle dessen besitzt **58b** eine Methylpiperazin-Einheit, welche besonders interessant hinsichtlich einer PK-Optimierung war, da dieses Lösungsmittel-exponiert vorlag und somit potenziell Löslichkeit vermittelt. In Bezug auf die Hydrophobizität zeigte sich, dass für **58b** ein clogP von 3,8 bestimmt werden konnte und somit signifikant geringer war als für Borussertib (4,1).^φ

^φ Die clogP-Werte wurden mit ChemDraw Professional, Version 15, bestimmt.



Schema 26. Struktur-basierte Weiterentwicklung des Benzamids **58b** zu dem Derivat **59**.

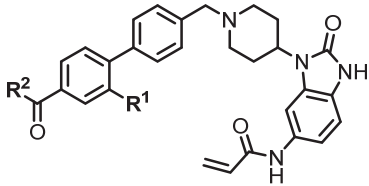

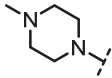


Basierend auf der Modellanalyse wurde **58b** weiter optimiert, indem der zuvor ausgesparte Phenylring in 2'-Position eingeführt wurde, um die Bedeutung der aromatischen Wechselwirkungen zu Tyr272 eingehender zu untersuchen und möglicherweise Aktivität zu gewinnen. Darüber hinaus wurde der Methylpiperazin-Ring durch ein Methylamin-Rest ersetzt, um Molekulargewicht einzusparen und die Wasserstoffbrücken-Donorfunktion der 1,6-Naphthyridinone zurückzugewinnen (Schema 26). Die Darstellung des 2'-Phenyl-substituierten Benzamid-Derivats **59** erfolgte ausgehend von der 3-Brom- sowie 4-Chlor-substituierten Benzoessäuremethylester **60**, welcher über eine Suzuki-Kupplung in 3-Position mit dem Phenylsubstituenten versehen wurde (Schema 27). Die Reaktion verlief mit hoher Chemo-selektivität an der Brom-substituierten Position, sodass eine Ausbeute von 91 % erreicht wurde. Infolgedessen wurde ausgehend von **61** in einem Schritt eine Esterhydrolyse sowie Amidkupplung mit Methylamin durchgeführt, was in nahezu quantitativen Ausbeuten resultierte. Eine zweite Suzuki-Kupplung zur Einbringung des Formylphenyl-Substituenten in 4-Position stellte den kritischen Schritt der Syntheseroute dar.



Schema 27. Darstellung des 2'-Phenyl-substituierten Benzamid-Derivats **59**. **i** Phenylboronsäure, Pd(dppf)Cl₂, K₃PO₄, 1,4-Dioxan/H₂O 5:1, 130 °C, μ w, 30 min, 91 % **ii** LiOH, MeOH/H₂O 1:1, reflux, 1 h, dann MeNH₂, HATU, DIPEA, MeCN, rt, 70 min, 95 % **iii** 4-Formylphenylboronsäure, Pd(dppf)Cl₂, K₃PO₄, 1,4-Dioxan/H₂O 5:1, 130 °C, μ w, 120 min. **iv** Aldehyd **2**, Ameisensäure, MeCN, 80 °C, o/vn, 36 % über zwei Schritte. **v** 4 N HCl in 1,4-Dioxan, rt, 2 h, 73 % **vi** Acryloylchlorid, DIPEA, THF, rt, 2 h, 49 %.

Durch Verlängerung der Reaktionszeit auf zwei Stunden konnte der Umsatz der Suzuki-Kupplung gesteigert werden, wenn auch kein voller Umsatz erzielt werden konnte. Das zurückgebliebene Edukt konnte zudem erst nach der folgenden reduktiven Aminierung unter Leuckart-Wallach-Bedingungen entfernt werden, wodurch sich eine Gesamtausbeute von 36 % über beide Schritte ergab. Schließlich konnte das gewünschte Produkt **59** über saure Entschützung sowie Einbringung des Acrylamid-Michaelakzeptors erhalten werden. Dieses wurde wiederum biochemisch charakterisiert, um den Einfluss der vorgenommenen Modifikationen genauer zu untersuchen.

Tabelle 13. Biochemische Charakterisierung der dargestellten Verbindung **59** durch Bestimmung der IC₅₀-Werte durch den HTRF® KinEASE™-Assay.^z

			
R ¹	R ¹	R ²	Akt1 ^{WT} IC ₅₀ [μM]
58b			2,6 ± 0,5
59			1,6 ± 0,5
Borussertib			0,0008 ± 0,0003

Es wurde deutlich, dass die vorgenommenen Modifikationen zu einer Steigerung der inhibitorischen Aktivität von **59** im Vergleich zu **58b** führten, was den positiven Beitrag des Phenylsubstituenten unterstrich, wenngleich die Potenz verglichen mit anderen CAAs wie Borussertib ebenfalls deutlich geringer war. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich die zweite vorgenommene Modifikation unter Umständen negativ auf die Potenz des Inhibitors ausgewirkt haben könnte. Der Austausch des Methylpiperazins zu dem deutlich kleineren Methylamin könnte deshalb beungünstigt sein, da der kleine Substituent deutlich weniger Wasser verdrängen kann und somit der entropische Anteil der Bindungsenergie im Vergleich zum Methylpiperazin **58b** verringert ist. Dennoch konnte mit der Struktur-basierten Entwicklung von **59** ausgehend von **58b** gezeigt werden, dass die Benzamin-basierten Inhibitoren ein großes Potential für die Entwicklung oral-bioverfügbarer CAAs bieten, da diese ein neuartiges, chemisch leicht modifizierbares Grundgerüst aufweisen, über welches in weiterführenden Entwicklungszyklen potente Inhibitoren mit einem besseren PK-Profil erhalten werden könnten.

^z Die IC₅₀-Messungen wurden von M. Sc. Jörn Weisner, TU Dortmund, durchgeführt.

3.4.3. Struktur-basierte Hybridisierung

Das Konzept des *scaffold hopping* wurde in einem weiteren Ansatz aus der einer Überlagerung der Röntgen-Kristallstrukturen von Miransertib und Borussertib angewendet (Abb. 25A und 25C). Es wurde deutlich, dass das 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst von Borussertib ideal mit dem Imidazopyridin-Grundgerüst von Miransertib überlappte. Davon inspiriert wurden Hybridmoleküle konzipiert, in denen das Imidazopyridin-Grundgerüst von Miransertib mit dem Benzo[d]imidazolon-Grundgerüst von Borussertib verknüpft wurde (Abb. 25B und 25D). Mithilfe dieser Struktur-basierten Hybridisierung sollten die hervorragenden pharmakodynamischen Eigenschaften eines CAAIs mit den guten pharmakokinetischen Eigenschaften des klinischen Kandidaten Miransertib kombiniert werden, um somit Hybridmoleküle mit möglichst bevorzugtem PK- und PD-Profil zu erhalten.

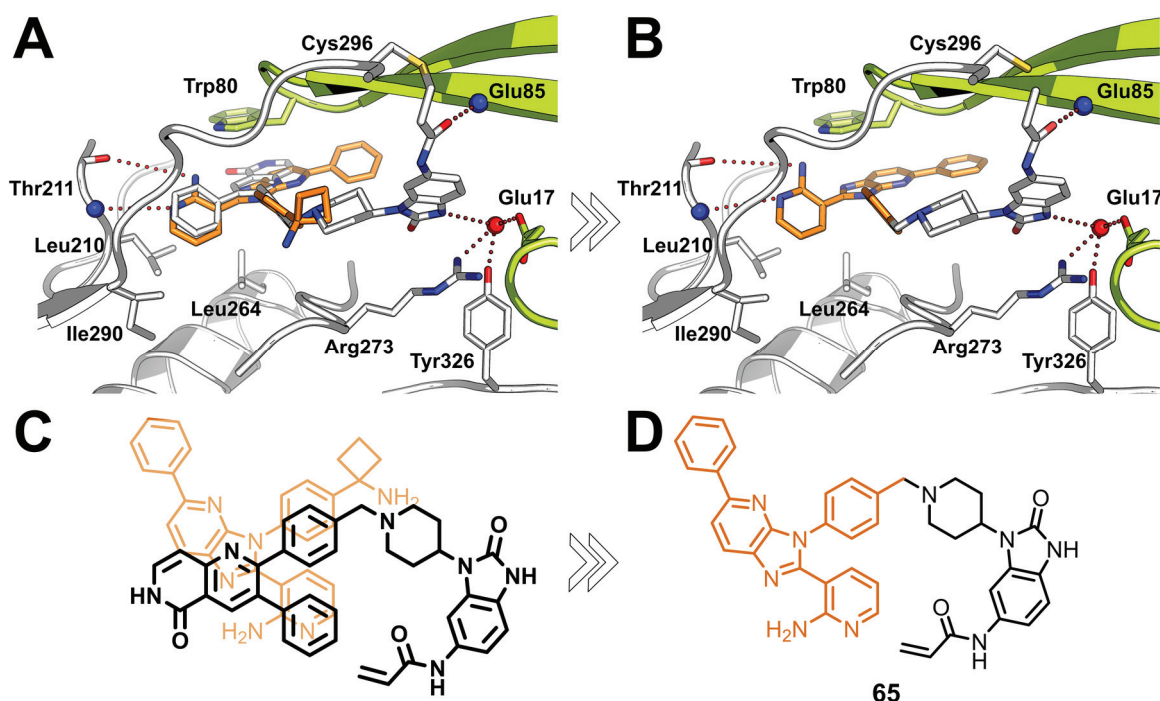


Abbildung 25. Struktur-basiertes Design der Hybridisierung von Borussertib und Miransertib. **A/C** Die Überlagerung der Komplex-Strukturen von Borussertib (PDB: 6HHF) und Miransertib (unpubliziert)[∇] zeigt die Überlappung des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts von Borussertib mit dem Imidazopyridin-Grundgerüst von Miransertib. **B/D** Modell und Struktur des Hybridmoleküls **65**.

Im Rahmen einer Masterarbeit konnte eine Syntheseroute entwickelt werden, mit deren Hilfe die Darstellung einer Serie von Hybridmolekülen mit unterschiedlichem Substitutionsmuster in 5-Position des Imidazopyridins bewerkstelligt werden konnte.^{179,∅} Eine Auswahl der dargestellten Verbindungen und deren Aktivitäten ist in Abbildung 26 dargestellt.

[∇] Kristallisation und Verfeinerung der Kristallstrukturen wurden von M. Sc. Ina Landel und Dr. Matthias Müller, TU Dortmund, durchgeführt.

[∅] Die Synthese und Evaluation der Hybridmoleküle erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von M. Sc. Sven Brandherm, TU Dortmund.¹⁷⁹

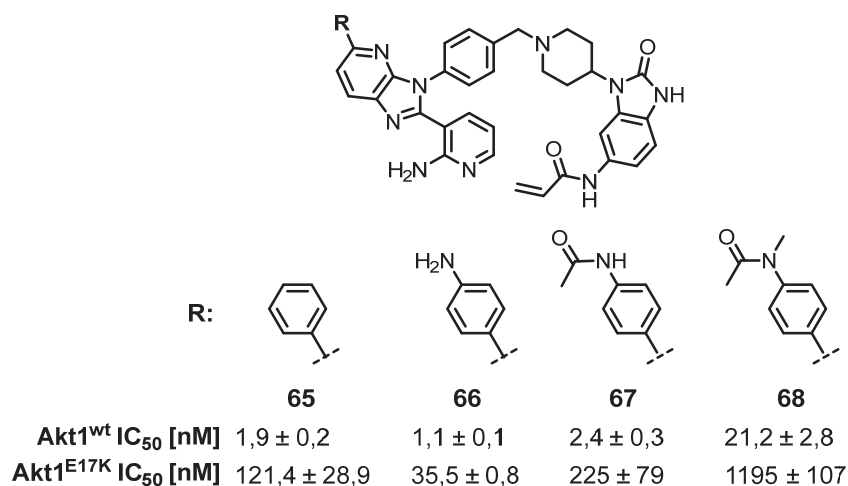


Abbildung 26. Im Rahmen einer Masterarbeit dargestellte Hybridmoleküle basierend auf dem Struktur-basiertem Design der Hybridisierung von Borussertib und Miransertib. Es erfolgte eine biochemische Charakterisierung hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität gegenüber Akt1^{wt} und der Aktivierungsmutante Akt1^{E17K,179},[∅]

Die Hybridmoleküle wurden in einem aktivitätsbasierten Assay hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität überprüft. Hierbei wurde nicht nur die Potenz gegenüber Akt1^{wt}, sondern auch gegenüber der Aktivierungsmutante Akt1^{E17K} untersucht, da Miransertib in Patientengruppen mit dieser relevanten Mutation klinisch evaluiert wird.¹⁰⁸ Die biochemische Charakterisierung des Akt1^{wt} zeigte, dass der Struktur-basierte Hybridisierungsansatz erfolgreich war, da alle dargestellten Verbindungen eine nanomolare Potenz aufwiesen und somit in derselben Größenordnung wie die Referenzverbindungen Borussertib (0,9 nM) und Miransertib (1,3 nM) lagen.¹⁷⁹ Darüber hinaus wurden polare Substituenten in *para*-Position des Aromaten in 5-Position toleriert oder wirkten sich wie bei Anilin-Derivat **66** oder Amino-pyridin-Derivat **67** sogar positiv auf die inhibitorische Aktivität aus. Interessanterweise bewirkte eine Methylierung am Acetamid von **68**, das somit ein Analogon zu dem Zweitgenerations-Inhibitor Arq751 darstellte, einen etwa 10-fachen Aktivitätsverlust. Von enormer Bedeutung ist zudem das Aktivitätsprofil gegenüber der Aktivierungsmutante Akt1^{E17K}. In dieser klinisch relevanten Mutante hat der Austausch der sauren Aminosäure Glutamat zur basischen Aminosäure Lysin eine Ladungsumkehr zur Folge, die eine Ladungsrepulsion zwischen PH- und Kinasedomäne bewirkt, sodass das Gleichgewicht zwischen offener PH-*out*- und geschlossener PH-*in*-Konformation auf die Seite der aktiven PH-*out*-Konformation verschoben wird. Es ist daher offensichtlich, dass für allosterische Liganden, die an die Kinase im inaktiven PH-*in* Zustand binden, ein Aktivitätsverlust zu erwarten war.¹⁸⁰ Bei Betrachtung der CAAs fiel auf, dass durch den irreversiblen Bindungsmodus der Aktivitätsverlust ein Stück weit kompensiert werden konnte, wie insbesondere Verbindung **67** zeigte.

[∅] Die Synthese und Evaluation der Hybridmoleküle erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von M. Sc. Sven Brandherm, TU Dortmund.¹⁷⁹

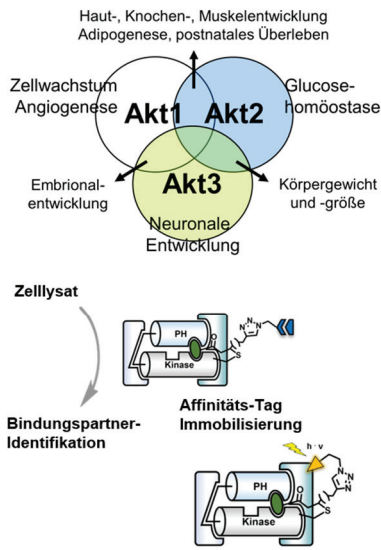
Die Röntgenstrukturanalyse einiger Derivate in Akt1^{wt} zeigte, dass die zusätzliche Besetzung der Bindetasche durch Substituenten in 5-Position ursächlich für die hohe Potenz der Inhibitoren sein könnte und darüber hinaus attraktive Wechselwirkungen der polaren Gruppe in *para*-Position dieses Aryls mit dem Proteinrückgrat bestehen.¹⁷⁹ Inwiefern sich die Änderung des Grundgerüsts auf das pharmakokinetische Profil ausgewirkt hat, wurde zudem analog zu Kapitel 3.4.1. eine *in vitro* PK-Profilierung durchgeführt. Es zeigte sich in Summe trotz bestehender geringer Löslichkeit ein besseres PK-Profil im Vergleich zu den 1,6-Naphthyridinon-basierten CAAIs, da die Imidazopyridin-basierten Hybridmoleküle eine verbesserte Permeabilität aufwiesen und darüber hinaus weniger anfällig gegenüber eines aktiven Effluxes im Caco2-Assay zu sein schienen.¹⁷⁹ Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse, dass die durch Hybridisierung neu erhaltenen Imidazopyridin-basierten CAAIs neuartige Molekülklasse mit großem Potenzial darstellen, die durch gezielte Optimierung sowie Verkleinerung zu oral-bioverfügbaren Akt-Inhibitoren weiterentwickelt werden könnten.

3.5. Entwicklung molekularer Akt-Sonden

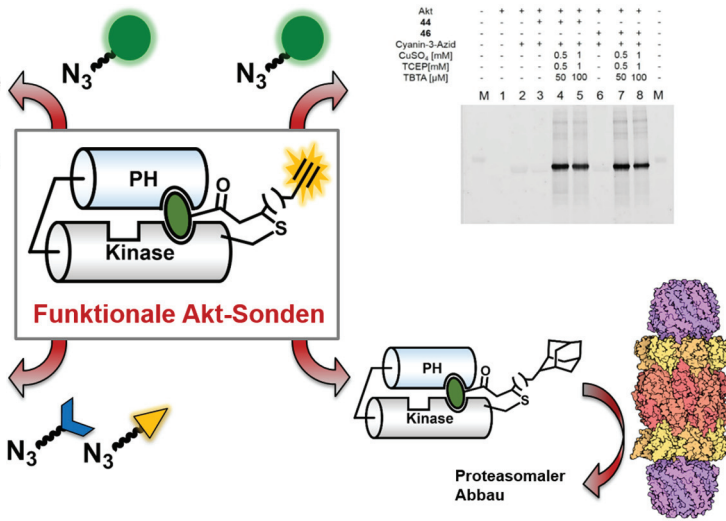
Wie in Kapitel 1.3. beschrieben, übernimmt die Proteinkinase Akt Funktionen in der Signaltransduktion der Zelle, die weit über die Enzymaktivität hinausgehen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass von Akt offenbar Kinase-unabhängige, aber Konformations-abhängige Überlebenssignale ausgehen können. Auch in der in Kapitel 3.3.5. dargestellten zellulären Evaluation konnten signifikante Unterschiede zwischen ATP-kompetitiven und allosterischen Inhibitoren hinsichtlich ihres Einflusses auf die Zellviabilität festgestellt werden, die ein weiteres Indiz für Konformations-abhängige Funktionen darstellen. Um diese tiefergehend untersuchen zu können, sind die kovalent-allosterischen Sondenmoleküle hervorragend geeignet, da sie die inaktive PH-*in*-Konformation irreversibel stabilisieren. Aus diesem Grund sollten die CAAs auf Grundlage von Borussertib zu funktionalen Sondenmolekülen weiterentwickelt werden, um in einer sogenannten Aktivitäts-basierten Protein-Profilierung (ABBP) das Interaktom von Akt studieren zu können.¹⁸¹⁻¹⁸²

Solche Sonden zeichnet neben einer *warhead*-Gruppe zur kovalenten Modifikation Reportergruppen mit funktionalen Eigenschaften wie Fluorophore, Affinitäts-Tags oder Proteasom-rekrutierende Gruppen aus (Abb. 27). Durch Fluorophor-Markierung ist es möglich, In-Gel-Fluoreszenz und Lokalisationsstudien durchzuführen, während mit Affinitäts-Tags sowie photo-induzierbare Gruppen zur molekularen Quervernetzung *pull-down*-Experimente ermöglicht werden, um Bindungs- und Interaktionspartner identifizieren zu können.¹⁸³⁻¹⁸⁵ Verschiedene Reportergruppen erlauben zudem eine Rekrutierung zum Proteasom, um so einen proteolytischen Abbau und damit einen Sonden-induzierten *knock-down* des Proteins zu ermöglichen.¹⁸⁶ Mithilfe solcher Sonden ist es nicht nur interessant, die Konformations-abhängigen Mechanismen von Akt zu untersuchen, sondern auch die unterschiedlichen Funktionalitäten der Akt-Isoformen zu studieren. Um eine molekulare Akt-Sonde möglichst funktional zu gestalten, sollten diese Reportergruppen nicht direkt eingeführt, sondern eine chemisch modifizierbare Alkin-Gruppe eingebracht werden. Diese erlaubt eine flexible *in situ*-Verknüpfung des gewünschten Reporters über eine bioorthogonale, Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC).¹⁸⁷ Bei Einbringung einer solchen funktionellen Gruppe ist es von hoher Bedeutung, dass diese Lösungsmittel-exponiert positioniert wird, um die Modifikation mit den Reporter sterisch zu ermöglichen. Auf Grundlage der gewonnenen Strukturinformationen und Kenntnissen über die SAR der CAAs wurden solche funktionellen Sonden entworfen und synthetisiert.

Isoform-selektive Sonden



Fluorophor-Markierung



Pull-down Analysen and photo-induzierte Quervernetzung

Sonden-induzierter proteasomaler Abbau

Abbildung 27. Funktionale Sonden für die Proteinkinase Akt erlauben verschiedene Möglichkeiten, dessen Interaktom untersuchen zu können. Eine Fluorophor-Markierung erlaubt die Analyse durch In-Gel-Fluoreszenz und Lokalisationsstudien. Gleichermassen können mit Hilfe von Sonden über Affinitätsvermittelnde oder Licht-induzierbare Gruppen *pull-down*-Experimente vorgenommen werden. Weiterhin können Isoform-selektive Funktionen untersucht werden oder über Proteasom-rekrutierende Gruppen ein *knock-down* induziert werden.

Das Design der molekularen Akt-Sonden erfolgte auf Grundlage der Kristallstruktur der Kinase in Komplex mit Borussertib (Abb. 28). Aus der Strukturanalyse gingen zwei mögliche Positionen hervor, die potenziell eine Lösungsmittel-exponierte Einbringung der Alkin-Funktionalität ermöglichen. Zum einen offenbarte sich eine Möglichkeit, in 7-Position des 1,6-Naphthyridinons eine zugängliche Alkin-Gruppe einzufügen. Zum anderen könnte am Benzo[d]-imidazolone der Acrylamid-Michaelakzeptor so modifiziert werden, dass durch Verlängerung des Acrylamids die Alkin-Gruppe Lösungsmittel-exponiert eingebracht wird.

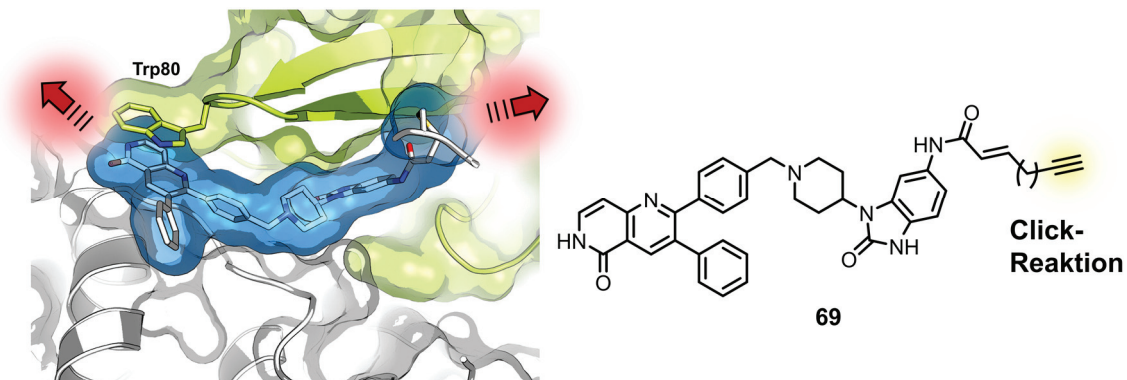


Abbildung 28. Struktur-basiertes Design möglicher der Akt-Sondenmoleküle. Als mögliche Lösungsmittel-exponierte Position kamen die 7-Position des 1,6-Naphthyridinon und eine Verlängerung des Michael-Akzeptors infrage.

Auf Grundlage dieses Design-Ansatzes wurde im Rahmen einer Masterarbeit die für Borussertib bestehende Syntheseroute dahingehend verändert, dass durch Verlängerung des Michael-Akzeptorsystems zwei Alkin-tragende Sondenmoleküle mit unterschiedlicher Linkerlänge dargestellt werden konnten (Abb. 29).^{188,*} Die biochemische Charakterisierung der Sondenmoleküle **69a** (0,7 nM) und **69b** (0,4 nM) machte deutlich, dass diese die Proteinkinase mit IC₅₀-Werten im subnanomolaren Bereich inhibierten und somit eine vergleichbare inhibitorische Potenz zu Borussertib (0,8 nM) aufwiesen. Damit konnte die aus dem strukturellen Design identifizierte Position am Michaelakzeptor insofern als geeignet für eine erweiterte Modifikation mit den Alkin-Reportergruppen angenommen werden, als dass sie genügend sterischen Raum bietet, um die Ligandenbindung nicht negativ zu beeinflussen.

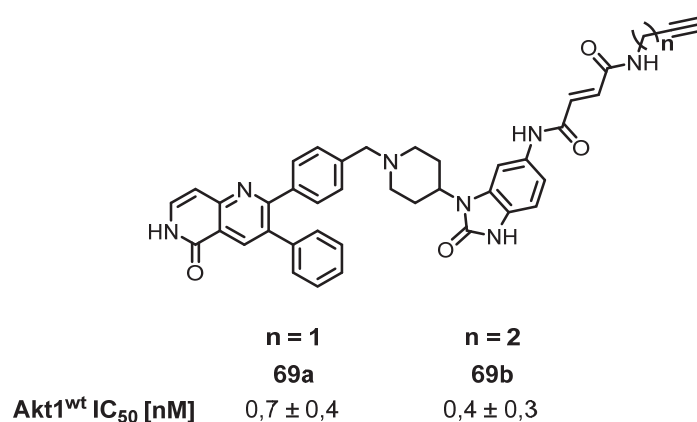


Abbildung 29. Im Rahmen einer Masterarbeit dargestellte Sondenmoleküle **69a** und **69b**. Es erfolgte eine biochemische und kinetische Charakterisierung hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität gegenüber Akt1^{wt}.^{188,*}

Bei Betrachtung des kinetischen Profils der dargestellten Fumaramid-Derivate fiel allerdings auf, dass die kovalente Bindungsbildung zu einem der beiden adressierten Cysteine bedeutsam langsamer verlief, was anhand der kleineren Reaktionsgeschwindigkeit k_{inact} aller dieser Derivate deutlich wurde (**69b**: 0,055 min⁻¹, Borussertib: 0,111 min⁻¹). Ursächlich hierfür könnte sein, dass Elektron-defiziente Olefine wie diese Fumarate bzw Fumaramide zwar als äußerst reaktiv beschrieben sind, jedoch einen kovalent-reversiblen Charakter aufweisen können.¹⁸⁹ Neben der biochemischen Charakterisierung konnte die Reportermodifizierung der Sonden **69a** und **69b** über *in situ*-CuAAC durch Verwendung eines Systems aus Kupfersulfat als Katalysator, Tris(carboxyethyl)phosphin (TCEP) als Reduktionsmittel und Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA) als Redox-Stabilisator etabliert werden.^{188, 190,*} Um die funktionelle Vielfalt der Sonden zu unterstreichen, wurde darauf aufbauend in einem kompetitiven Ansatz die Irreversibilität der CAAs untersucht (Abb. 30).

* Die Synthese der Sondenmoleküle, die biochemische Charakterisierung sowie die Etablierung der *in situ*-CuAAC entstand im Rahmen der Masterarbeit von M. Sc. Marius Lindemann, TU Dortmund.¹⁸⁸

Hierzu wurde Akt zunächst mit Borussertib in verschiedenen Konzentrationen inkubiert, woraufhin in einem zweiten Schritt die Markierung der Kinase mit **69b** erfolgte. Es konnte beobachtet werden, dass auch bei einem maximalen Überschuss von 5 Äq. keine vollständige Modifikation stattgefunden hat, da für alle Proben eine In-Gel-Fluoreszenz auf Höhe der Akt-Bande beobachtet werden konnte. Dennoch war als Trend zu erkennen, dass die steigende Konzentration an Borussertib in einer Abnahme in der Fluoreszenz-Intensität resultierte. Durch den irreversiblen Inhibitionsmechanismus von Borussertib konnte folglich nur solches Protein Fluoreszenz-markiert werden, welches nicht zuvor kovalent von Borussertib modifiziert wurde, sodass die Fluoreszenz-Intensität mit der Effizienz der kovalenten Bindung von Borussertib korrelierte.

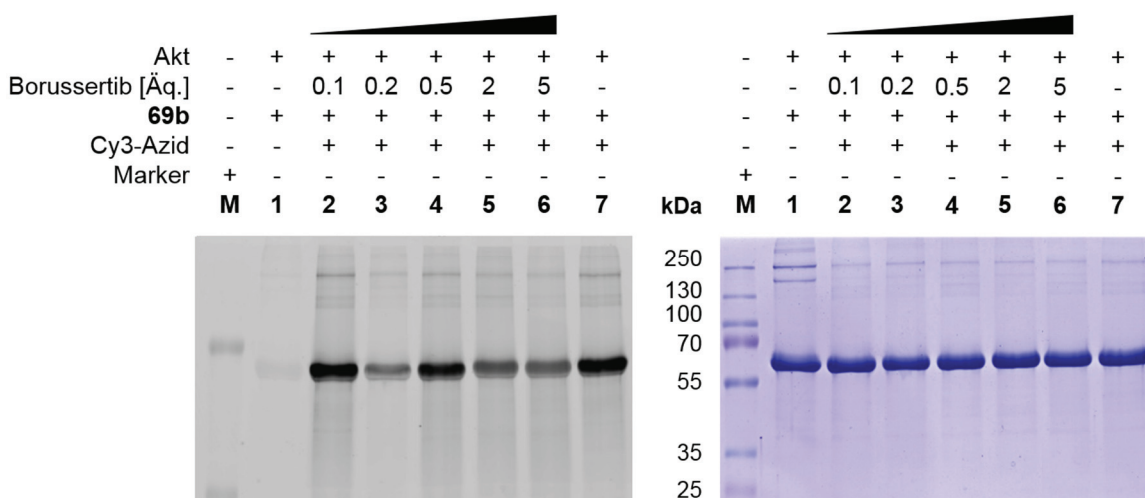


Abbildung 30. Kompetitive Untersuchung der Irreversibilität von Borussertib mithilfe der molekularen Akt-Sonde **69b**. Akt1 (10 μ M) wurde zunächst für eine Stunde bei rt inkubiert, woraufhin schrittweise zunächst **69b** und daraufhin CuSO_4 (0,5 mM), TCEP (0,5 mM) sowie TBTA (50 μ M) hinzugegeben wurden und über ein 12 %-iges SDS-Gel getrennt wurden. Linkes Gel: Fluoreszenz-Aufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 565 nm. Rechtes Gel: Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung. M: Protein-Größenstandard *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* 10-250 kDa von ThermoScientific.

Um diesen Effekt besser quantifizieren zu können, wurde die Fluoreszenz-Intensität über die Intensität der Fluoreszenz ohne Borussertib-Zugabe (Abb. 30, Bahn 7) normiert und gegen die Äquivalente an Borussertib aufgetragen (Abb. 31). Mit Ausnahme der Fluoreszenz-Intensität bei 0.2 Äq., die als Ausreißer zu werten ist, konnte mit steigenden Äquivalenten an Borussertib eine Abnahme der Fluoreszenz-Intensität beobachtet werden. Auch wenn weitere Optimierungen hinsichtlich Reaktionszeit und -bedingungen nötig sind, um eine bessere Sensitivität und Genauigkeit zu erlangen, machte dieses Experiment das enorme Potenzial der dargestellten Sondenmoleküle deutlich, da diese chemoselektiv über eine *in situ*-CuAAC mit Reportergruppen versehen werden können und mit deren Hilfe nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Untersuchungen hinsichtlich der Biologie der Proteinkinase Akt vorgenommen werden können.

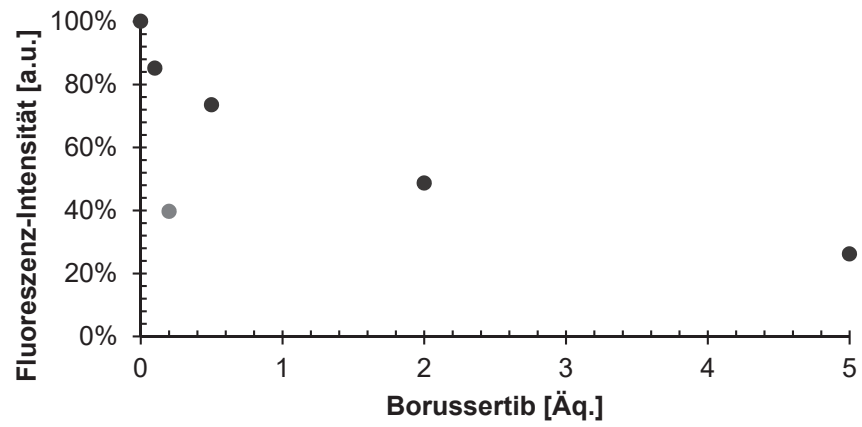


Abbildung 31. Auftragung der mit Image J ermittelten relativen Fluoreszenz-Intensitäten gegen die Äquivalente an Borussertib aus dem kompetitiven In-Gel-Fluoreszenz-Versuch in Akt1.

3.5.1. Isoform-selektive Akt-Sondenmoleküle

Die Sondenmoleküle **69a** und **69b** zeigten neben einer hohen biochemischen Potenz eine breite Funktionalität, da über die bioorthogonale CuAAC verschiedenste Reportergruppen *in situ* eingebracht werden können. Damit stellen diese Sonden ein wertvolles Werkzeug für die weitere Erforschung der Kinase-unabhängigen Mechanismen sowie des Konformations-abhängigen Interaktoms von Akt dar. Gleichzeitig eröffnet sich hiermit der Raum für die Untersuchung weiterer interessanter wissenschaftlicher Fragestellungen. Im Falle von Akt ist hierbei insbesondere die Funktion der drei Isoformen von Bedeutung. Mit Ausnahme der wenig konservierten Linkerregion zwischen PH- und Kinasedomäne weisen diese drei Isoformen eine Sequenzidentität von 80 % und eine hochkonservierte Struktur auf.¹⁹¹ Dennoch konnte in vorangegangenen Studien bereits gezeigt werden, dass diese Isoformen eine Vielzahl nicht-redundanter Funktionen sowie Unterschiede in der Lokalisation aufweisen.⁴⁰ Während Akt1 mit Prozessen der Zellproliferation und -wachstum in Verbindung gebracht wird, wird Akt2 mit der Glukose-Homöostase assoziiert, wohingegen Akt3 die neuronale Entwicklung beeinflusst (Abb. 32).¹⁹²⁻¹⁹⁴

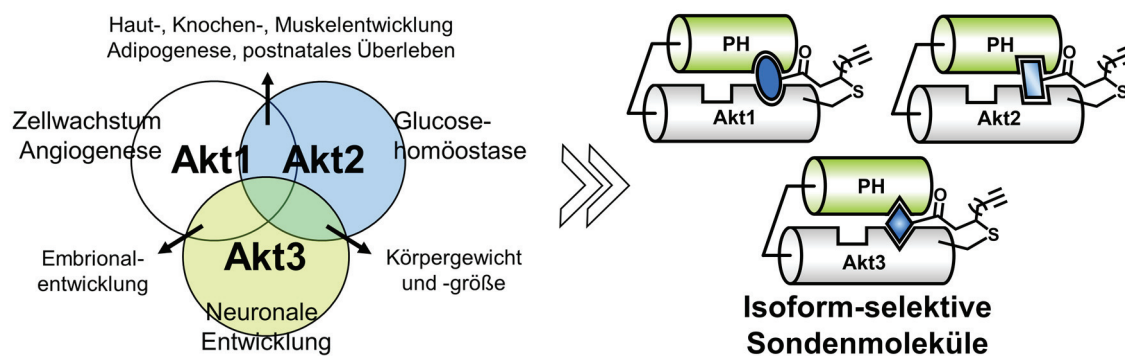


Abbildung 32. Die drei Isoformen der Proteinkinase Akt weisen sowohl redundante als auch nicht-redundante Funktionen auf. Zur Untersuchung dieser Funktionen eignen sich insbesondere Isoform-selektive Akt-Sondenmoleküle (Darstellung angelehnt an GONZALEZ *et al.*).⁴⁰

Zum tiefergehenden Verständnis dieser Funktionen ist die gezielte und selektive Perturbation der Isozyme über molekulare Sonden ein vielversprechendes Mittel. Während für Borussertib eine äquipotente Inhibition aller drei Isoformen aufwies, konnte im Rahmen der Kinaseprofilierung gezeigt werden, dass Änderungen in der chemischen Struktur durchaus auf die Selektivität Einfluss nehmen können, da hier signifikante Unterschiede in der inhibitorischen Potenz gegenüber den Isoformen festgestellt werden konnten (Kapitel 3.3.3.). Diese Tatsache motivierte daher die Entwicklung Isoform-selektiver CAAs. Die Firma Merck Sharp & Dome veröffentlichte verschiedene Derivate mit Pyrazinon- und Chinoxalin-Grundgerüst anstelle des in Borussertib befindlichen 1,6-Naphthyridinon-Elements. Über verschiedene Substitutionsmuster konnten dabei unterschiedliche Selektivitätsprofile erhalten werden.^{94, 195} Eine Sequenzanalyse gab Aufschlüsse über feine Unterschiede in den adressierten Bereich der Bindetasche, die diesen Effekt bewirken könnten (Abb. 33).

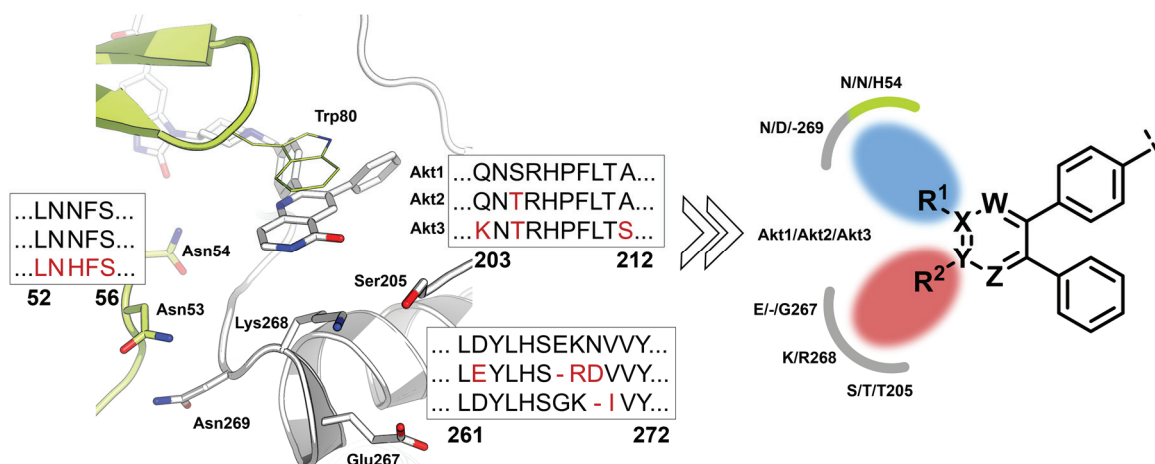


Abbildung 33. Eine Sequenz-Überlagerung der drei Akt-Isoformen offenbarte Unterschiede in Bereichen der allosterischen Bindetasche.^Y Für allosterische Interdomänen-Inhibitoren könnte über die gezielte Adressierung dieser Bereiche Selektivität generiert werden.

Auf dieser Grundlage sollte untersucht werden, inwiefern sich diese interessanten Selektivitätsprofile der von LINDSLEY *et al.* publizierten Sondenmoleküle über einen kovalent-allosterischen Inhibitions-Mechanismus bestätigen oder gar optimieren lassen. Dazu wurde im Rahmen einer Masterarbeit eine neue Syntheseroute entwickelt, die die Darstellung von potenziellen CAAs mit neuartigen Grundgerüsten und Substitutionsmustern erlaubt und eine effiziente Derivatisierung in diesem Molekülteil möglich macht.^{94, 196, Y} Es entstand dabei unter anderem eine Serie von Chinoxalin- und Pyrazinon-Derivaten, bei denen ein variierendes Substitutionsmuster deutliche Unterschiede im Selektionsprofil bewirkten (Abb. 34). So wiesen **70** und **71** eine nanomolare Aktivität gegenüber Akt1 auf, während diese gegenüber der anderen beiden Isoformen eine deutlich geringere Potenz zeigten.

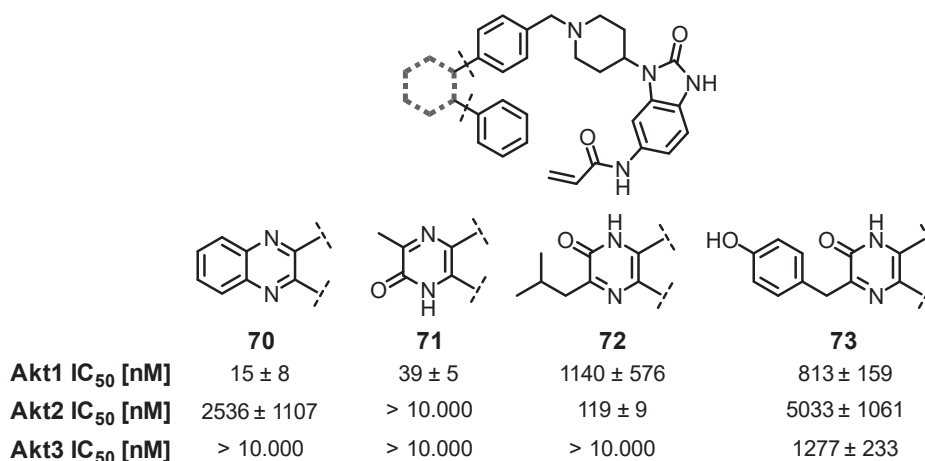


Abbildung 34. Im Rahmen einer Masterarbeit entstandene Chinoxalin- und Pyrazinon-Derivate zeigten signifikante Unterschiede im Selektivitätsprofil gegenüber der Akt-Isoformen.^{196, Y}

^Y Die Sequenz-Analyse sowie die Derivatisierung wurde im Rahmen der Masterarbeit von M. Sc. Lena Quambusch, TU Dortmund, durchgeführt.¹⁹⁶

Eindrucksvolle Unterschiede ergaben sich für Pyrazinon-Derivat **72**, welches eine Selektivität gegenüber der Akt2-Isoform aufwies. Es wurde also deutlich, dass über sterisch anspruchsvolle Substituenten in 3-Position die Selektivität gegenüber der Isoformen maßgeblich beeinflusst werden konnte. Dies wurde auch bei Betrachtung des Hydroxybenzyl-Derivats **73** deutlich, für welches eine mikromolare Aktivität (1277 nM) gegenüber der Akt3-Isoform detektiert wurde. Insgesamt bestätigten diese Ergebnisse der Isoform-Selektivität die von Merck Sharp & Dome dargestellten Trends, wobei der irreversible Inhibitionsmechanismus zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung führte. Somit konnten erstmalig hochpotente kovalent-allosterische Akt1- sowie Akt2-Inhibitoren mit herausragender Selektivität identifiziert werden, die bedeutsame Sondenmoleküle für die Untersuchung der nicht-redundanten Funktionen der beiden Isoformen darstellen.

3.6. HSD11B1-Inhibitoren für die Immunoonkologie

3.6.1. Immunoonkologie

Die bereits beschriebenen Herausforderungen und Limitationen der Therapie mit zielgerichteten Inhibitoren Tumor-treibender Onkogene verdeutlichen die Notwendigkeit der Entwicklung neuer innovativer Behandlungsansätze, wie das Design kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren unterstreicht. Eine weitere innovative Behandlungsstrategie beruht auf Untersuchungen der Mechanismen protektiver Tumormunität. In ihrer Erweiterung der allgemeinen Beschreibung des Tumor-Organisationsprinzips, den sogenannten „*hallmarks of cancer*“, definierten HANAHAN und WEINBERG als zentrales Merkmal von Tumorzellen, sich einer Zerstörung durch das Immunsystem entziehen zu können.¹⁰ Seit Ende des 19. Jahrhunderts gab es daher das Bestreben, das körpereigene Immunsystem so zu stimulieren, dass die Immunresistenz von Krebszellen umgangen werden kann.¹⁹⁷

Für eine zielgerichtete und therapeutisch nutzbare Aktivierung von Immunzellen war jedoch erst das zusammengetragene Verständnis jahrzehntelanger Grundlagenforschung nötig, wie ein Tumor der Immunantwort entkommt.¹⁹⁸ Zum einen schütten Tumorzellen parakrine Mediatoren wie Adenosine, Prostaglanine oder TGF- β aus, die in der Tumor-Mikroumgebung eine Immunsuppression hervorrufen.¹⁹⁹⁻²⁰⁰ Zum anderen wird das bestehende Kommunikationsnetzwerk aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkungen im Zell-Zell-Kontakt von Immunzelle und Krebszelle entscheidend gestört.²⁰¹ So wurde eine Herabregulierung des Expressionslevels vom MHC-Klasse-I-Komplex in einer Reihe von Tumoren beobachtet.¹⁹⁸ Dieser Proteinkomplex dient der Antigen-Präsentation auf der Zelloberfläche und wechselwirkt unter anderem mit zytotoxischen T-Lymphozyten, indem durch Erkennung körperfremder Antigene abberanter Zellen wie Krebszellen die T-Zellen aktiviert werden.²⁰² Die Verringerung der MHC-Klasse-I-Expression induziert somit in Tumorzellen eine fehlerhafte Selbsttoleranz.²⁰³ Auf der anderen Seite kommt es auf der Zelloberfläche von Krebszellen zu einer Überexpression inhibierender T-Zellrezeptor-Liganden, die entscheidend zur Maskierung des Tumors gegenüber des adaptiven Immunsystems beitragen. Diese wechselwirken mit sogenannten Immun-Checkpointrezeptoren wie das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4 (CTLA-4) und das *programmed cell death*-Protein 1 (PD-1), für deren Entdeckung und Charakterisierung ALLISON und HONJO im Jahr 2018 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin zuerkannt wurde.²⁰⁴⁻²⁰⁵

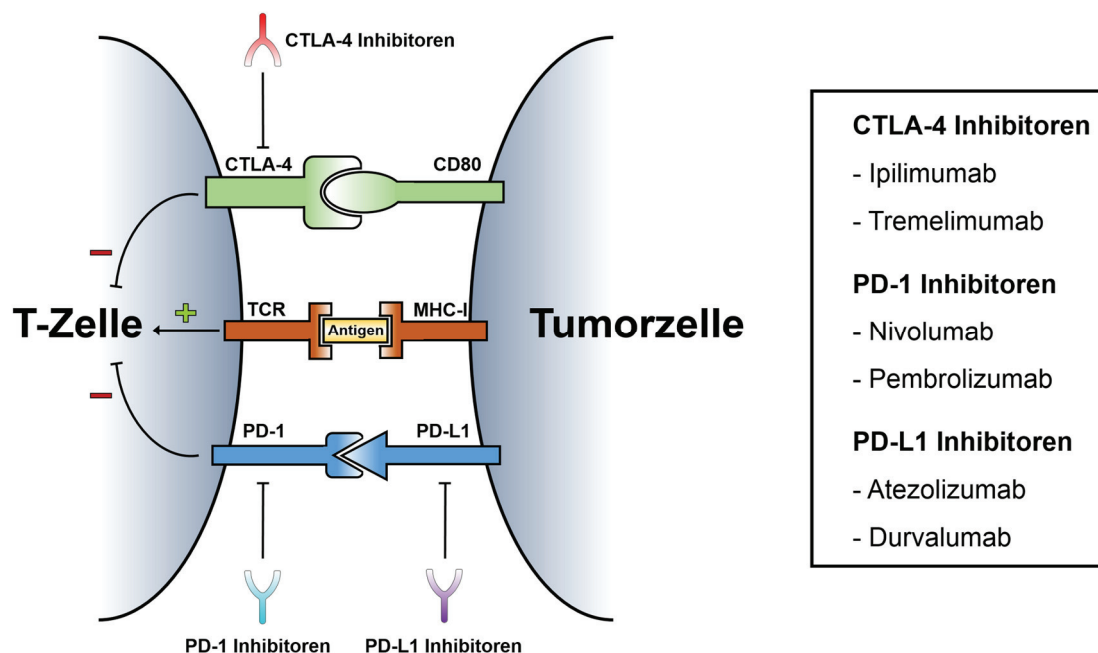


Abbildung 35. Schematische Darstellung der Rezeptor-vermittelten Kommunikation zwischen T-Lymphozyten und Krebszellen. CTLA-4 und PD-1 senden nach Wechselwirkung mit entsprechenden Liganden auf der Tumorzelle ein inhibitorisches Signal aus. Verschiedene Antikörper-basierte CTLA-4-, PD-1- und PD-L1-Inhibitoren sind in der Lage, diese Interaktion zu perturbieren und eine Immunreaktion zu induzieren.

Diese Immun-Checkpoints sind inhibitorische Schlüsselspieler in der Regulation der physiologischen Immunantwort von T-Zellen und von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz körpereigener Zellen.²⁰⁶ Krebszellen bedienen sich dieser regulatorischen Struktur, indem sie Liganden dieser Rezeptoren überexprimieren, ein gesteigertes inhibitorisches Signal in der T-Zelle induzieren und sich so gegenüber einer Immunreaktion maskieren.²⁰⁷ Diese Erkenntnisse waren Grundlage eines neuen Angriffspunkts der Präzisionsmedizin: Sogenannte Checkpoint-Inhibitoren, die die Interaktion zwischen den T-Zellrezeptoren CTLA-4 und PD-1 mit den entsprechenden Oberflächenrezeptoren der Krebszelle unterbinden, sind in der Lage, diese Maskierung der Krebszelle aufzuheben und die T-Lymphozyten-vermittelte Immunantwort gegenüber des Tumors zu reaktivieren (Abb. 35). Auf diesem Prinzip basierend wurden in den vergangenen zwei Jahrzehnten eine Reihe von therapeutischen Antikörpern gegen CTLA-4 (Ipilimumab, Tremelimumab), PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab) und den PD-1-Liganden PD-L1 (Atezolizumab, Durvalumab) entwickelt und in über 2000 klinischen Studien evaluiert.²⁰⁸ Diese zeigten zum Teil bahnbrechende Erfolge in der Behandlung verschiedener Tumore, insbesondere bei malignen Melanomen, NSCLC oder Urothelkarzinomen, und weckten daher große Hoffnungen.²⁰⁹ Allerdings blieben die Ansprechraten mit 15-40 % unter den Erwartungen.²¹⁰

Dies liegt vor allem in der hohen Heterogenität sowie in einem noch ungenügenden Verständnis der molekularen, zellulären und physiologischen Mechanismen der T-Zellaktivierung sowie der Komplexität der Tumormikroumgebung begründet.²⁰⁹ Dies hat zur Folge, dass die Identifizierung robuster Biomarker schwierig ist und eine Reihe von Resistenzmechanismen bestehen.²¹¹ So konnte für maligne Melanome eine phänotypische Plastizität infolge einer T-Zellaktivierung gezeigt werden, die eine Entzündungs-induzierte Dedifferenzierung des Tumors und somit eine Immuntherapie-resistente Rezidivierung zur Folge hatte.²¹²⁻²¹³ Ein tiefergehendes Verständnis dieser Prozesse auf molekularer Ebene wird entscheidend dafür sein, die Ansprechraten auf Immun-Checkpoint-Inhibitoren erhöhen, prädiktive Biomarker identifizieren und über den gezielten Einsatz von Kombinationstherapien Resistenzen umgehen zu können.²¹⁴

3.6.2. Zielgerichtete Adressierung der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1

In Kapitel 3.6.1. wurden die großen Chancen, aber auch die Limitationen der Immun-Checkpoint-Therapie beleuchtet. Ein wichtiger Aspekt diesbezüglich sind rasch auftretende Resistenzen gegen eingesetzte Therapeutika, sodass die Erforschung dieser Resistenzmechanismen von enormen Interesse für die Tumorforschung ist, um Möglichkeiten zu identifizieren, diese umgehen zu können.²¹¹ Ein Mechanismus, der die Resistenz gegen Checkpoint-Inhibitoren zur Folge hat, ist die phänotypische Plastizität, die sich als Reaktion auf die T-Zellaktivierung entwickeln kann und eine Entzündungs-induzierte Dedifferenzierung des Tumors bewirkt und so in einer Immuntherapie-resistenten Rezidivierung resultiert.²¹²⁻²¹³ HÖLZEL *et al.* untersuchte diesen Dedifferenzierungs-Prozess über RNA-Sequenzierung und identifizierte signifikante Veränderungen des Transkriptoms als Reaktion auf eine Behandlung mit Checkpoint-Therapeutika. Hier zeigte sich eine Aktivierung des Glucocorticoid-Stoffwechsels, die sich in einer erhöhten Expression der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1 (HSD11B1) äußerte.* Damit kommt diese Stoffwechsel-Aktivierung als potentieller negativer Immun-Checkpoint infrage. Erste Untersuchungen mit dem Glycyrrhizinsäure-Derivat Carbenoxolon unterstreichen das Rational, die Immun-Checkpoint-Therapie mit der zielgerichteten Inhibition von HSD11B1 zu kombinieren und so synergistische Effekte zu erzielen, indem die Immunsensitivität gegenüber Checkpoint-Inhibitoren regeneriert wird. Um die Möglichkeiten der Kombinationstherapie ausschöpfen zu können, wurden zunächst das Zielprotein sowie vielversprechende Inhibitoren beleuchtet.

* Prof. Dr. Michael Hölzel (Universitätsklinikum Bonn), unpubliziert.

Die HSD11B1 gehört zur Familie der Oxidoreduktasen und ist ein Schlüsselspieler im Glucocorticoid-Haushalt des Menschen, indem es die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-abhängige Reduktion von Corticosteronen in 11-Position katalysiert, wie anhand der Umsetzung des Steroidhormons Cortison zu Cortisol beispielhaft gezeigt (Abb. 36).²¹⁵ HSD11B1 ist damit Teil eines Netzwerks von Enzymen, das dafür sorgt, dass der Gehalt an diesen Glucocorticoiden zwischen niedrig-nanomolaren und mikromolaren Konzentrationen variieren kann.²¹⁶ Diese können über Steroid-Rezeptor-Komplexe die Genregulation von bis zu 2 % des menschlichen Genoms beeinflussen.²¹⁷ Es ist daher nicht überraschend, dass Fehlregulationen im Glucocorticoid-Stoffwechsel mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert sind. So steht eine Überaktivierung von HSD11B1 im Zusammenhang mit dem sogenannten metabolischen Syndrom, welches mit Fettleibigkeit, Insulinresistenz, Typ-2-Diabetes und kardiovaskulären Komplikationen einhergeht.²¹⁸

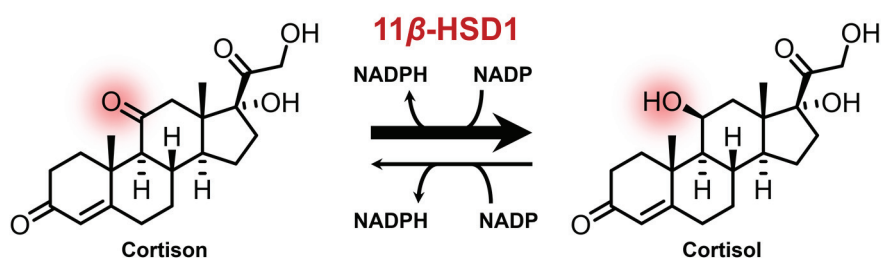


Abbildung 36. Die HSD11B1 katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Cortison zu Cortisol.

Auf dieser Grundlage besteht ein großes Potential in der zielgerichteten Inhibition der Oxidoreduktase, sodass eine Vielzahl von HSD11B1-Inhibitoren entwickelt wurde (Abb. 37). Bereits Ende der 1980er Jahre konnte mit dem Naturstoff-Derivat Carbenoxolon ein Inhibitor der HSD11B1 identifiziert werden, der jedoch eine eher moderate Aktivität sowie geringe Selektivität aufwies. Infolgedessen resultierten zahlreiche Hochdurchsatz-Screenings und Struktur-basierte Entwicklung von Wirkstoffen in einer Reihe niedermolekularer Inhibitoren, darunter die Wirkstoff-Kandidaten BVT-3498 (Biovitrum), PF-915275 (Pfizer), MK-0736 (Merck Sharp & Dome) und AZD4017 (AstraZeneca), die jedoch allesamt aufgrund mangelnder Wirksamkeit in der klinischen Studie zur Behandlung des metabolischen Syndroms oder von Typ-2-Diabetes gescheitert sind.²¹⁹

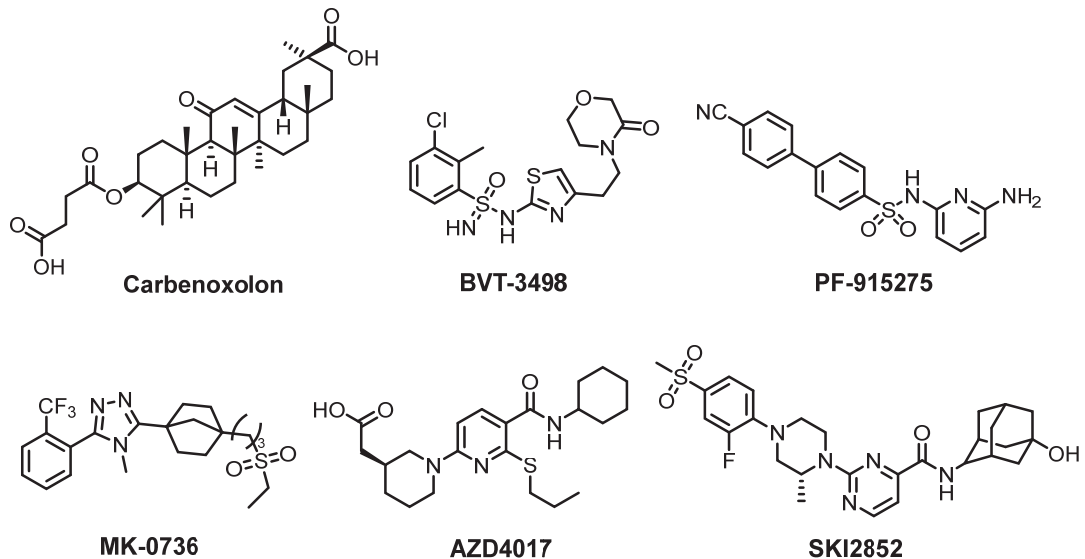


Abbildung 37. Übersicht verschiedener HSD11B1-Inhibitoren.

SKI2852 ist ein HSD1B1-Inhibitor der neuesten Generation, der sich durch eine sehr hohe Potenz sowie ein gutes pharmakokinetisches Profil auszeichnet.²²⁰ Um einen tieferen Einblick in die Wirkungsweise dieses Inhibitors zu erhalten, wurde über ein Pharmakophor-basiertes Docking, das auf der Kristallstruktur eines strukturverwandten Inhibitors in Komplex mit HSD1B1 (PDB: 4BB5) beruht, der Bindungsmodus von SKI2852 untersucht (Abb. 38).²²¹ Es wurde deutlich, dass der Inhibitor einen Cortison-kompetitiven Inhibitionsmechanismus aufweist, indem dieser im aktiven Zentrum des Enzyms in direkter Nähe zum Kofaktor NADPH bindet. Eine zentrale Wechselwirkung konnte über das Amid-Element ausgemacht werden, welches Wasserstoff-Brücken zu Ser170 und Tyr183 der katalytischen Triade (Ser170, Tyr183, Lys187) ausbildet und damit ein Mimetikum zum im Cortison befindlichen Carbonyl-Sauerstoff darstellt. Für das Pyridin-Grundgerüst waren zudem aromatische Wechselwirkungen mit Tyr177 zu beobachten. Darüber hinaus besetzt der Adamantyl-Rest die sogenannte hydrophobe Tasche I, an deren Ende die Hydroxyl-Gruppe am Adamantan eine Wasserstoff-Brücke zum Proteinrückgrat von Thr124 ausbildet. Die strukturelle Analyse gab Anhaltspunkte für die hohe Potenz von SKI2852 als HSD11B1-Inhibitor. Unter Berücksichtigung der zudem vielversprechenden pharmakokinetischen und Selektivitäts-Eigenschaften stellte dieser Inhibitor somit eine spannende Modellverbindung dar, um mögliche Synergismus-Effekte in der Immun-Checkpoint-Therapie zu untersuchen. Hierzu war die Synthese ausreichender Mengen an Wirkstoff von Nöten.

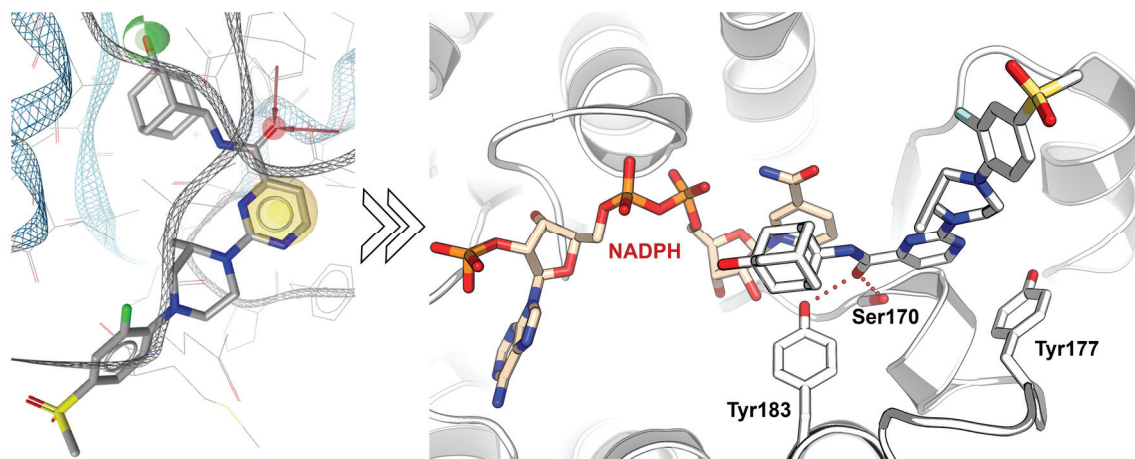
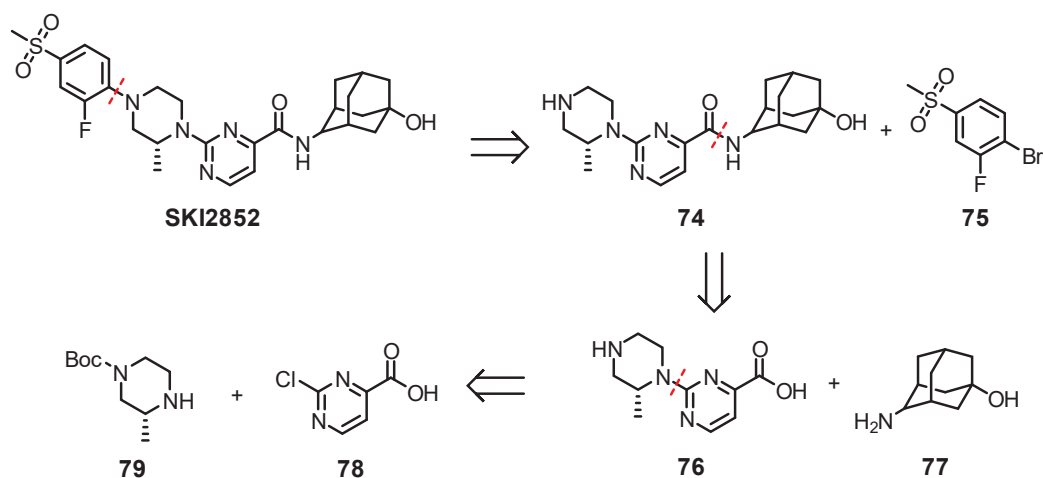


Abbildung 38. Auf der Kristallstruktur eines strukturverwandten HSD11B1-Inhibitors in Komplex mit dem Protein (PDB: 4BB5) beruhendes Pharmakophor-basiertes Docking. Es konnte mit LigandScout 4.3 ein möglicher Bindungsmodus von SKI2852 (weiß) generiert werden, der mittels PyMOL genauer untersucht wurde.²²¹

3.6.3. Synthese von SKI2852

Für den HSD11B1-Inhibitor SKI2852 ist eine Syntheseroute literaturbekannt, die allerdings von Startmaterialien ausgeht, die kommerziell nicht verfügbar waren.²²² Somit musste eine neue Syntheseroute entwickelt werden, deren Grundlage zunächst eine retrosynthetische Analyse des Inhibitors voraussetzte (Schema 28). Darauf aufbauend sollte die 2-Fluoro-4-Methylsulfonylphenyl-Gruppe ausgehend vom korrespondierenden Arylbromid **75** über eine Buchwald-Hartwig-Kupplung in 3-Methylpiperazin-Derivat **74** eingebracht werden. Darüber hinaus sollte das *trans*-4-Aminoadamantol **77** über eine Amidkupplung mit der Carbonsäurefunktion des Pyridin-Derivates **76** dargestellt werden. Letztlich sollte das in 1-Position Boc-geschützte (*R*)-3-Methylpiperazin **79** über eine nukleophile aromatische Substitution mit dem kommerziell erhältlichen Pyrimidin **78** umgesetzt werden.



Schema 28. Retrosynthetische Analyse des HSD11B1-Inhibitors SKI2852.

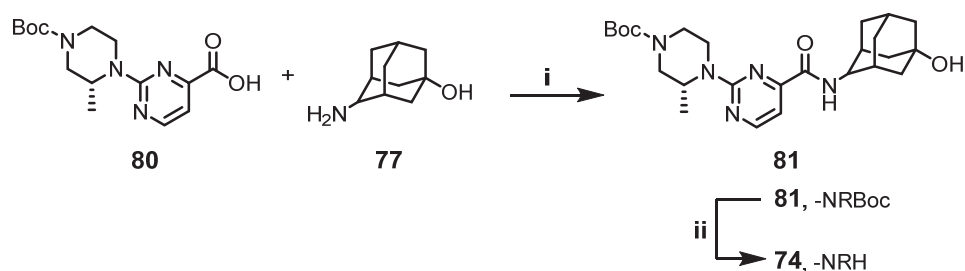
Grundsätzlich ist eine nukleophile aromatische Substitution von Chlor-substituierten Pyrimidinen in 2-, 4- und 6-Position möglich, wobei die 4- und die 6-Position im Vergleich zur 2-Position hinsichtlich ihrer Reaktivität überlegen sind.²²³ Als Nukleophil wurde (*R*)-3-Methylpiperazin **79** verwendet, welches über das ungeschützte sekundäre Amin am Piperazin in 2-Position des Chlorpyrimidin-Derivates nukleophil angreifen konnte. Die moderate Reaktivität des 2-Chlorpyrimidins sowie die geringe Nukleophilie des Piperazins machten neben dem Einsatz einer starken organischen Base auch eine hohe Energiezufuhr notwendig, um einen Substratumsatz zu erzielen. So konnte unter Refluxbedingungen in Acetonitril bei Zugabe von DIPEA als Base nur eine spurenhafte Produktbildung in der LCMS-Analyse beobachtet werden (Tab. 14, **14.1**). Daher wurden harschere Bedingungen in Form einer Mikrowellen-unterstützten Reaktion gewählt (**14.2**), die zu einer deutlichen Steigerung des Umsatzes führten, jedoch in relativ viele Nebenprodukte resultierten.

Tabelle 14. Nukleophile aromatische Substitution zur Darstellung des Pyrimidin-Derivates **103**.

#	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
14.1	DIPEA, MeCN, reflux, o/vn	Spuren ^a
14.2	DIPEA, MeCN, 150 °C, μ w, 90 min	36 % ^b

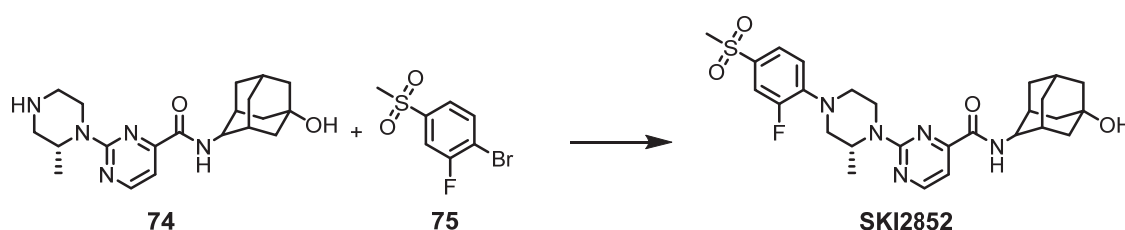
^aüber LCMS ermittelt. ^bisolierte Ausbeute.

Dies erschwerte die chromatographische Isolation des Produkts **80**, was sich in der Ausbeute von 36 % widerspiegelte. Eine weitere Optimierung der Reaktions- und Isolationsbedingungen könnte zu höheren Ausbeuten in der nukleophilen aromatischen Substitution führen. Im darauf folgendem Schritt wurde die freie Carbonsäure von **80** über eine Kupplungsreagenz-vermittelte Amidierung mit *trans*-4-Aminoadamantol **77** verknüpft (Schema 29). Es zeigte sich ein sauberer Reaktionsverlauf, auch wenn kein vollständiger Umsatz erzielt werden konnte.



Schema 29. Amidkupplung und Entschützung zur Darstellung des Pyrimidin-Derivates **101**. **i** HATU, EDC · HCl, DIPEA, DMF, rt, on, 51 %. **ii** 25 % TFA/DCM, rt, 1 h.

Dies könnte darin begründet sein, dass durch die Positionierung der Carbonsäure in 4-Position eines π -Mangelaromaten die Reaktivität der Carbonsäure gegenüber der Aktivierung durch HATU und EDC erschwert und gleichermaßen das nukleophile Amin durch den räumlichen Anspruch des Adamantyl-Restes sterisch gehindert wurde. Dennoch konnte für Produkt **74** eine ordentliche Ausbeute von 51 % erreicht werden. Dieses konnte schließlich unter Verwendung von TFA entschützt werden, sodass das Intermediat **101** erhalten wurde.



Schema 30. Buchwald-Hartwig-Aminierung zur Darstellung des finalen Produkts SKI2852. Reaktionsbedingungen: Pd(AcO)₂, XantPhos, CsCO₃, Toluol, reflux, o/vn, 69 %.

Im finalen Schritt der Synthese wurde die 2-Fluoro-4-Methylsulfonylphenyl-Gruppe als korrespondierendes Bromid eingebracht (Schema 30). Eine geeignete Methode für die Bildung von Arylaminen stellt die Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung dar, die Übergangsmetallkatalysiert die C-N-Verknüpfung von Arylhalogeniden mit Aminen erlaubt.²²⁴ Mithilfe dieser Reaktion wurde ausgehend von Arylbromid **75** und Methylpiperazin **74** das finale Produkt SKI2852 dargestellt.²²⁵ Die Reaktion verlief unter Verwendung von Palladium(II)acetat als Katalysator, dem Liganden XantPhos sowie Caesiumcarbonat als Base mit einem hohen Umsatz und einer guten Ausbeute von 69 %. Insgesamt konnte der HSD11B1-Inhibitor in einer linearen Syntheseroute mit einer Gesamtausbeute von 13% über vier Syntheseschritte erhalten werden. Damit konnten im Vergleich zur literaturbekannten Syntheseroute die Reaktionsschritte von sechs auf vier Stufen verkürzt werden, während für die hier gezeigte Synthese trotz einiger Optimierungsmöglichkeiten die Gesamtausbeute der beschriebenen Synthesestrategie mit 16 % in einem vergleichbaren Rahmen lag.²²² Die neu entwickelte Syntheseroute stellte somit eine neuartige, effiziente Methode für die Darstellung von SKI2852 dar. Um die Wirksamkeit des Inhibitors zu untersuchen, wurde dieser hinsichtlich der inhibitorischen Potenz gegenüber HSD11B1 genauer untersucht.

3.6.4. *in vitro* Evaluation von SKI2852

Zur *in vitro* Evaluation des dargestellten HSD11B1-Inhibitors SKI2852 wurde ein zellbasierter *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt, über welchen die Aktivität der HSD11B1 darüber bestimmt werden konnte, dass die von HSD11B1 katalysierte Konversion von 11-dehydro-Corticosteron zu Corticosteron untersucht wurde. Über diesen Assay wurde die Menge an gebildeten Corticosteron detektiert, wobei HSD11B1-exprimierende Zelllinien in Mikrotiterplatten inkubiert werden, in deren Kavitäten ein anti-Corticosteron-Antikörper immobilisiert wurde, welcher das Produkt der enzymatischen Reaktion spezifisch bindet. Durch Zugabe von biotinyliertem Corticosteron wird eine Konkurrenz von HSD11B1-gebildeten und dem modifizierten Steroid bewirkt. Je weniger Antigen von den untersuchten Zellen produziert wurde, desto mehr des kompetitiven modifizierten Corticosterons wird über Antikörper-Bindung immobilisiert. Daraufhin wird das Streptavidin-gekoppelte Enzym HRP (*horseradish peroxidase*) hinzugegeben, welches wiederum an das biotinylierte Antigen assoziiert. Letztlich kann über eine HRP-katalysierte Farbreaktion der Anteil des biotinylierten Antigens bestimmt werden, welcher umgekehrt proportional zur Menge an produziertem Corticosteron ist. Auf diese Weise kann die Aktivität von HSD11B1 sowie der Effekt von Inhibitoren über Konzentrations-abhängige Messungen in zellulären Systemen untersucht werden. Es wurden die Inhibitoren Carbenoxolon und SKI2852 in zwei verschiedenen relevanten Krebszelllinien untersucht. Hierbei handelte es sich um 7,12-Dimethylbenzanthrazen (DMBA)-induzierte, murine Melanomzelllinien, die unterschiedliche Expressionslevel von HSD11B1 enthalten.²²⁶⁻²²⁷ Während die Primärzelllinie HCmel12 ein hohes Expressionslevel aufwies, zeichnete die Zelllinie CM/MtRet eine relativ geringe Expression des Enzyms aus. Bei der Behandlung beider Zelllinien mit den jeweiligen HSD11B1-Inhibitoren wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme der Corticosteron-Konzentration beobachtet (Abb. 39). Somit konnte bestätigt werden, dass beide Verbindungen in der Lage waren, die Oxidoreduktase zu inhibieren. Darüber hinaus konnte sowohl für die HCmel12- als auch für die CM/MtRet-Zelllinie gezeigt werden, dass SKI2852 dem Glycyrrhizinsäure-Derivat Carbenoxolon hinsichtlich seiner inhibitorischen Potenz gegenüber der HSD11B1 überlegen war. So lag die halbmaximale inhibitorische Konzentration EC_{50} für SKI2852 im einstelligen nanomolaren Bereich für CM/MtRet sowie im dreistelligen nanomolaren Bereich für HCmel12, während für Carbenoxolon eine jeweils etwa zehnfach geringere Wirksamkeit festgestellt werden konnte.

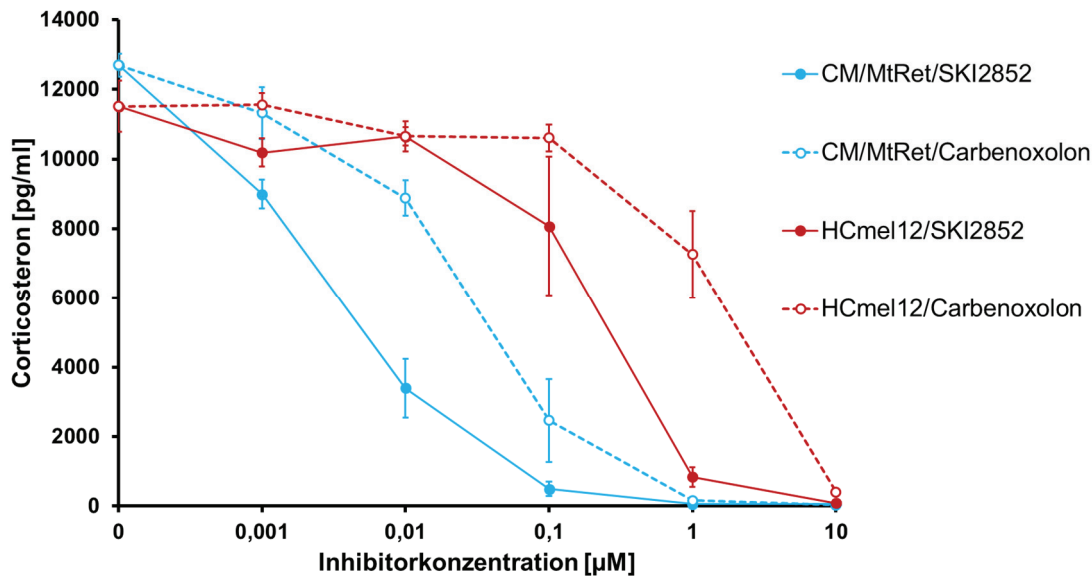


Abbildung 39. *in vitro*-Evaluation der HSD11B1-Inhibitoren Carbenoxolon und SKI2852 in den Melanomzelllinien HCmel12 und CM/MtRet über einen Corticosteron-basierten ELISA-Assay.[♣]

Damit konnte die in der Literatur beschriebene, hervorragende Potenz von SKI2852 über diesen kompetitiven ELISA-Assay validiert werden. Die Unterschiede in der inhibitorischen Aktivität der beiden Zelllinien untereinander ließen sich mit den unterschiedlichen Expressionsleveln an HSD11B1 erklären. So waren für den HSD11B1-hoch-exprimierenden Stamm HCmel12 größere Konzentrationen an Inhibitor für einen inhibitorischen Effekt nötig als für die gering-exprimierende CM/MtRet-Zelllinie. Insgesamt konnte für den HSD11B1-Inhibitor SKI2852 eine effiziente Syntheseroute entwickelt werden, die eine Zugänglichkeit der Verbindung in ausreichend großen Mengen sicherstellt. Die *in vitro*-Evaluierung von SKI2852 in einem zellbasierten, kompetitiven ELISA-Assay konnte die dem Carbenoxolon überlegende Potenz des Inhibitors eindrucksvoll bestätigen. Damit konnte der Grundstein für eine tiefere Untersuchung dieses vielversprechenden Kandidaten in Maus-Xenograft-Modellen hinsichtlich möglicher synergistischer Effekte mit einer Immun-Checkpoint-Therapie gelegt werden, um zu testen, inwiefern die Regeneration der Immunsensitivität, die für Carbenoxolon bereits gezeigt werden konnte, durch eine gezieltere und potentere Inhibition bestätigt oder gar verstärkt werden könnte.

[♣] Der ELISA wurde von Daniel Hinze, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michael Hölzel, Universitätsklinikum Bonn, durchgeführt.

4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Dissertation stand die Proteinkinase Akt, die einen medizinisch relevanten Schlüsselspieler der zellulären Signaltransduktion darstellt, im Fokus zahlreicher Untersuchungen. Basierend auf der Entdeckung des CAAI Borussertib wurde zunächst dessen Synthese dahingehend optimiert, dass diese die Darstellung des Inhibitors im Gramm-Maßstab erlaubte, um Substanz-intensive weiterführende Studien umsetzen zu können. Sowohl die Syntheseroute als auch die Handhabung und Reinigung wurden an eine Durchführung im erweiterten Maßstab angepasst. Der erfolgslimitierende Schritt stellte eine reduktive Aminierung im Rahmen der konvergenten Synthesestrategie dar. Nach intensiver Optimierung konnte eine Leuckart-Wallach-Reaktion als zielführende Bedingung für diesen Reaktionsschritt identifiziert werden, wenn auch weiterer Raum für Verbesserungen offen blieb. Auf Grundlage des im Rahmen der medizinalchemischen Optimierung dargestellten Bausteins **69** könnte weiterführend die reduktive Aminierung in den letzten Schritt der Synthesestrategie verschoben werden. Die deutlich polarerer Eigenschaften von **69** im Vergleich zum Bocgeschützten Analogon **2** würden die Löslichkeitseigenschaften verbessern, was sich positiv auf den Reaktionsumsatz auswirken könnte. Zudem könnte der Einfluss verschiedener Metallsalze wie Indium(III)chlorid auf den Reaktionserfolg untersucht werden, welches über eine *in situ* Bildung von Indiumhydrid die Reduktion der Imin-Zwischenstufe fördern könnte.²²⁸ In Summe konnten 2 g der gewünschten Verbindung über die optimierte Syntheseroute dargestellt werden, die eine präklinische Charakterisierung ermöglichte. In einer pharmakokinetischen Profilierung von Borussertib konnte gezeigt werden, dass trotz einiger limitierender Eigenschaften wie geringer Löslichkeit und Permeabilität sowie aktiven Efflux eine ordentliche Bioverfügbarkeit bei intraperitonealer Applikation vorlag, sodass tiefergehende pharmakodynamische Untersuchungen ermöglicht wurden. In KRas-abhängigen PDX-Modellen wurde daraufhin der Effekt von Borussertib in Kombinationstherapie mit dem Mek-Inhibitor Trametinib evaluiert. In einigen Modellsystemen konnte für die Dualtherapie eine Stabilisierung oder ein teilweiser Rückgang des Tumors beobachtet werden, während Monotherapien keinen Erfolg brachten. Damit konnte die *in vivo* Wirksamkeit des CAAI eindrucksvoll validiert werden, was das hohe Potenzial dieser neuartigen Inhibitor-Klasse unterstreicht. Gleichmaßen qualifizieren diese Ergebnisse Borussertib damit für eine Untersuchung in tiefergehenden *in vivo*-Experimenten. Von besonderem Interesse wäre hierbei die Weiterentwicklung von Borussertib zu einer radioaktiven Sonde, die den Einsatz in der bildgebenden Positronen-Emissions-Tomographie (PET) erlaubt (Abb. 40).²²⁹⁻²³⁰

Nach gezielter Einbringung eines radioaktiven Markers wie ^{18}F ermöglicht eine solche kovalent-allosterische PET-Sonde die Untersuchung unterschiedlicher Aspekte wie biologischer Verteilung, Metastasen-Visualisierung, Metabolismus- oder Biomarker-Studien. So könnten Tumore, in denen eine Akt-Überexpression beobachtet wurde, mit Hilfe solcher Sonden gezielt markiert und visualisiert werden.²³¹⁻²³²

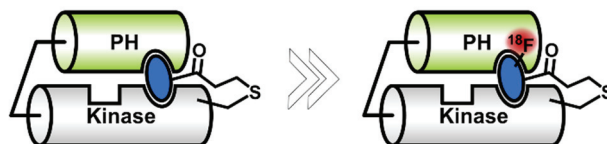


Abbildung 40. Borussertib kann über radioaktive Markierung mit ^{18}F zu einer PET-Sonde entwickelt werden.

Um eine weitere Entwicklung der CAAs zu ermöglichen, wurden tiefere Einblicke in die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gewonnen. Dies gelang durch eine Struktur-basierte Derivatisierung auf Grundlage der Komplexstruktur von Borussertib mit Akt. Es wurden verschiedene Benzo[d]imidazol-Derivate mit hoher inhibitorischer Potenz dargestellt, die allerdings hinsichtlich ihrer chemischen Diversifizierung streng limitiert waren. Daher wurden verschiedene andere Phenylharnstoff-, Phenylamin- und Phenylpiperazin-Grundgerüste synthetisiert und evaluiert, die den chemischen Raum für CAAs erweiterten. Über Strukturanalyse verschiedener Derivate in Komplex mit der Proteinkinase konnten verschiedene Präferenzen für die kovalente Adressierung von Cys296 und Cys310 identifiziert werden, deren mögliche strukturellen Ursachen über MD-Simulationen visualisiert werden konnten. Um eine quantitative Aussage über das Verhältnis der Modifikation dieser Cysteine durch die verschiedenen Inhibitoren treffen zu können, sind detailliertere MS/MS-Experimente notwendig. Eine Möglichkeit wäre hierbei die iTRAQ-Methode (*isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation*), bei der über Isobarenmarkierung und anschließender MS/MS-Analyse eine Quantifizierung der Modifikation von Cys296 oder Cys310 ermöglicht wird.²³³ Eine zelluläre Charakterisierung der dargestellten Verbindungen zeigte für die kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren, dass nahezu alle Derivate hinsichtlich ihrer Potenz gegenüber einer Reihe von relevanten Krebszelllinien den klinischen Kandidaten Capivasertib, Ipatasertib und MK-2206 überlegen waren. Für die Benzo[d]imidazol-Derivate **30a** und **30b** konnte eine im Vergleich zu Borussertib gesteigerte zelluläre Wirksamkeit detektiert werden, somit kleine Substitutionen sich positiv auf die zelluläre Aktivität auswirken können. Als besonders sensitiv gegenüber einer Inhibition der Proteinkinase Akt stellten sich die Brustkrebs-Zelllinien T47D und ZR-75-1 heraus. Diese Zelllinien stellen somit ein attraktives System für eine *in vivo*-Evaluierung in Xenograft-Modellen dar, die vielversprechend hinsichtlich einer Sensitivität gegenüber einer Monotherapie mit CAAs sind.

Diese Modelle sollen im weiteren Verlauf dazu beitragen, robuste Biomarker zu identifizieren, die prädiktiv für ein Ansprechen auf eine Therapie mit CAAls sind. Eine weitere *in vitro*-PK-Studie der dargestellten Derivate zeigte Korrelationen mit den zuvor für Borussertib identifizierten Limitationen hinsichtlich Löslichkeit, Permeabilität und Absorption, dessen Ursachen detaillierter untersucht werden könnten. So könnte der Einfluss prominenter aktiver Transporter wie der *permeability glycoprotein* (P-GP)-Transporter über Durchführung des Caco-2-Assays in Anwesenheit von P-GP-Inhibitoren. Da die Löslichkeits- und Permeabilitätseigenschaften wahrscheinlich maßgeblich vom hydrophoben 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst beeinflusst werden, wurde infolgedessen dieses über *scaffold hopping* in zwei verschiedenen Ansätzen derivatisiert. In einem ersten Ansatz erfolgte ausgehend von dem zentralen Brombenzol-basierten Baustein **55**, der mittels Suzuki-Kupplungen effizient im Rahmen einer Durchmusterung von verschiedenen Boronsäuren zu einer Vielzahl von alternativen Grundgerüsten umgesetzt wurde. Es wurden benzamidische Strukturen (**58b**, **59**) identifiziert, die weiterer Optimierung hinsichtlich ihrer Potenz bedürfen. So könnte der zentrale Phenylbaustein durch ein Pyridin ersetzt werden, um mögliche positive Einflüsse des Heteroaromaten analog zum Pyridin-Element im 1,6-Naphthyridinon zu untersuchen (Abb. 41).

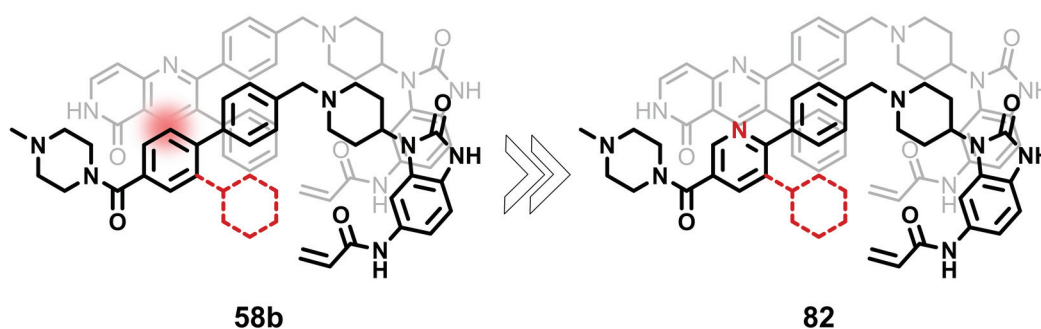
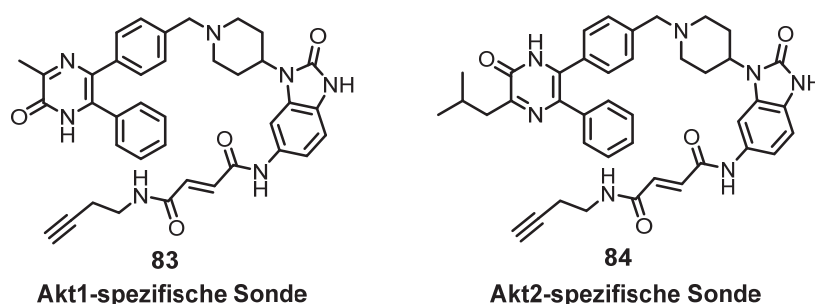


Abbildung 41. Mögliche Weiterentwicklung der aus dem *scaffold hopping* identifizierten Verbindung **58b** zu Pyridin-Derivat **109**.

In einem zweiten Struktur-basierten Ansatz wurde eine Hybridisierung von Borussertib und Miransertib vorgenommen, indem das 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst durch das Imidazopyridin-Grundgerüst ausgetauscht wurde. Hierbei entstanden hochpotente Hybridmoleküle, die zwar eine geringe Löslichkeit aufwiesen, jedoch vielversprechende Resultate im PAMPA und im Caco-2-Assay zeigten. Die Aryl-Substitution in 5-Position bei **55** resultierte in einer deutlichen Reduktion des aktiven Efflux. Diese neuartigen Inhibitoren offenbarten damit ein großes Potenzial, welches perspektivisch in *in vivo*-PK-Studien genauer beleuchtet werden sollte. Weiterhin sollte eine gezielte Optimierung der Löslichkeit, beispielsweise durch Verkleinerung der Molekülstruktur, vorgenommen werden.

Zur Untersuchung der Konformations-abhängigen Funktionen der Proteinkinase Akt wurden darüber hinaus funktionale Sonden in einem Struktur-basierten Ansatz entworfen und synthetisiert. Die Funktionalität dieser Sonden, das endständige Alkin über eine bioorthogonale CuAAC *in situ* mit Reportergruppen versehen zu können, konnte in In-Gel-Fluoreszenz-Experimenten validiert werden. Diese Sondenmoleküle eröffnen den Raum für eine Vielzahl möglicher chemisch-biologischer Untersuchungen der Proteinfunktionen von Akt. So könnte über *Pull-down*-Experimente das Interaktom von Akt in der geschlossenen PH-*in* Konformation genauer analysiert werden, indem über anschließende MS/MS-Experimente potenzielle Bindungspartner von Akt identifiziert werden können. Darüber hinaus ist ein Sonden-induzierter *knockdown* der Proteinkinase durch Vermittlung des proteasomalen Abbaus über hydrophobe Motive wie Adamantan oder andere charakterisierte Gruppen wie PROTACs (*Von Hippel-Lindau-Recruiting Proteolysis Targeting Chimeras*) denkbar.²³⁴ Darüber könnte beispielsweise nach induzierten Abbau die *protein turnover*-Geschwindigkeit der Proteinkinase untersucht werden, die entscheidenden Einfluss auf die Wirkdauer irreversibler Inhibitoren hat.²³⁵ Um weiterhin auch die Isoform-spezifischen Eigenschaften untersuchen zu können, konnten auf Grundlage literaturbekannter Akt-Isoform-selektiver Inhibitoren neuartige CAAs mit einem vielversprechendem Selektivitätsprofil dargestellt werden. Für tiefgehende Analysen der nicht-redundanten Isoformen ist eine Übertragung der Erkenntnisse aus der beschriebenen Sondenentwicklung auf die dargestellten Isoform-selektiven Inhibitoren zukünftig ein attraktiver Anhaltspunkt. So wäre die Darstellung Pyrazinon-basierter Akt1- beziehungsweise Akt2-selektiver Sondenmoleküle denkbar, die eine tiefgehende Profilierung der Isoform-Spezifitäten erlauben würden (Schema 31). Im Rahmen dessen könnten zudem die für die Sondenmoleküle **69a** und **69b** Elektron-defizienten Fumaramide durch alternative Elektronen-reichere Michaelakzeptorsysteme ersetzt werden, beispielsweise durch Einführung der in den Verbindungen **83** und **84** gezeigten Butenamid-Derivate.



Schema 31. Potenzielle Akt1- beziehungsweise Akt2-spezifische Sondenmoleküle basierend auf dem Akt1-selektiven Inhibitor **71** und dem Akt2-selektiven Inhibitor **72**.

Um die Möglichkeiten der Regeneration der Immunsensitivität von Checkpoint-Inhibitor-resistenten Tumoren durch Inhibition der HSD11B1 genauer untersuchen zu können, wurde für den vielversprechenden HSD11B1-Inhibitor SKI2852 eine Syntheseroute entwickelt und eine ausreichende Menge an Wirkstoff für eine Evaluation in einem zellbasierten ELISA-Assay dargestellt. Die hohe Potenz dieses Inhibitors konnte im Vergleich zum Glycyrrhizinsäure-Derivat Carbenoxolon eindrucksvoll belegt werden. Weiterführend ist es nun notwendig, in geeigneten Melanom-Xenograft-Modellen zu untersuchen, inwiefern durch zielgerichtete Inhibition von HSD11B1 die über phänotypische Plastizität vermittelte Resistenz gegenüber der Checkpoint-Immuntherapie umgangen werden kann und somit ein synergistischer Effekt entsteht, der als Rational für eine Kombinationstherapie dient.²³⁶

5 Kurzfassung

Krebs kommt aufgrund der stetig steigenden Anzahl an Neuerkrankungen und Todesfällen eine immer größer werdende Bedeutung in der Gesellschaft zu.¹ In jüngerer Vergangenheit wurde die therapeutische Behandlung dieser Erkrankung durch den vielversprechenden Ansatz der sogenannten Präzisionsmedizin revolutioniert. Die Onkologie erlebt einen Wandel vom Einsatz klassischer unspezifischer Zytostatika hin zu einer Biomarker-adaptierten, zielgerichteten Adressierung onkogener Zielstrukturen.³ Die Proteinkinase Akt stellt eine dieser Zielstrukturen dar, die im Rahmen dieser Dissertation mithilfe kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren (CAAs) adressiert wurde. Basierend auf der Entdeckung des CAA Borussertib wurde zunächst dessen Synthese dahingehend optimiert, dass diese die Darstellung des Inhibitors im Gramm-Maßstab erlaubte, um Substanz-intensive weiterführende Studien umsetzen zu können. Sowohl die Syntheseroute als auch die Handhabung und Reinigung wurden an eine Durchführung im erweiterten Maßstab angepasst. Der erfolgslimitierende Schritt stellte eine reduktive Aminierung im Rahmen der konvergenten Synthesestrategie dar. Nach intensiver Optimierung konnte eine Leuckart-Wallach-Reaktion als zielführende Bedingung für diesen Reaktionsschritt identifiziert werden, wenn auch weiterer Raum für Verbesserungen offen blieb. In Summe konnten 2 g der gewünschten Verbindung über die optimierte Syntheseroute dargestellt werden, die eine präklinische Charakterisierung ermöglichte. In einer pharmakokinetischen Profilierung von Borussertib konnte gezeigt werden, dass trotz einiger limitierender Eigenschaften wie geringer Löslichkeit und Permeabilität sowie aktiven Efflux eine ordentliche Bioverfügbarkeit bei intraperitonealer Applikation vorlag, sodass tiefergehende pharmakodynamische Untersuchungen ermöglicht wurden. In KRas-abhängigen PDX-Modellen wurde daraufhin der Effekt von Borussertib in Kombinationstherapie mit dem Mek-Inhibitor Trametinib evaluiert. In einigen Modellsystemen konnte für die Dualtherapie eine Stabilisierung oder ein teilweiser Rückgang des Tumors beobachtet werden, während Monotherapien keinen Erfolg brachten. Damit konnte die *in vivo* Wirksamkeit des CAA eindrucksvoll validiert werden, was das hohe Potenzial dieser neuartigen Inhibitor-Klasse unterstreicht.

Um eine weitere Entwicklung der CAAs zu ermöglichen, wurden tiefere Einblicke in die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gewonnen. Dies gelang durch eine struktur-basierte Derivatisierung auf Grundlage der Komplexstruktur von Borussertib mit Akt. Es wurden verschiedene Benzo[d]imidazol-Derivate mit hoher inhibitorischer Potenz dargestellt, die allerdings hinsichtlich ihrer chemischen Diversifizierung streng limitiert waren. Daher wurden verschiedene andere Phenylharnstoff-, Phenylamin- und Phenylpiperazin-Grundgerüste synthetisiert und evaluiert, die den chemischen Raum für CAAs erweiterten.

Über Strukturanalyse verschiedener Derivate in Komplex mit der Proteinkinase konnten verschiedene Präferenzen für die kovalente Adressierung von Cys296 und Cys310 identifiziert werden. Darüber hinaus zeigte zelluläre Charakterisierung der dargestellten Verbindungen für die kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren, dass nahezu alle Derivate hinsichtlich ihrer Potenz gegenüber einer Reihe von relevanten Krebszelllinien den klinischen Kandidaten Capivasertib, Ipatasertib und MK-2206 überlegen waren. Für die Benzo[d]imidazol-Derivate **30a** und **30b** konnte eine im Vergleich zu Borussertib gesteigerte zelluläre Wirksamkeit detektiert werden, somit kleine Substitutionen sich positiv auf die zelluläre Aktivität auswirken können. Eine weitere *in vitro*-PK-Studie der dargestellten Derivate zeigte Korrelationen mit den zuvor für Borussertib identifizierten Limitationen hinsichtlich Löslichkeit, Permeabilität und Absorption. Da die Löslichkeits- und Permeabilitätseigenschaften wahrscheinlich maßgeblich vom hydrophoben 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst beeinflusst werden, wurde infolgedessen dieses über *scaffold hopping* in zwei verschiedenen Ansätzen derivatisiert.

Zur Untersuchung der Konformations-abhängigen Funktionen der Proteinkinase Akt wurden darüber hinaus funktionale Sonden in einem Struktur-basierten Ansatz entworfen und synthetisiert. Die Funktionalität dieser Sonden, das endständige Alkin über eine bioorthogonale CuAAC *in situ* mit Reportergruppen versehen zu können, konnte in In-Gel-Fluoreszenz-Experimenten validiert werden. Um weiterhin auch die Isoform-spezifischen Eigenschaften untersuchen zu können, konnten zudem auf Grundlage literaturbekannter Akt-Isoform-selektiver Inhibitoren neuartige CAAs mit einem vielversprechendem Selektivitätsprofil dargestellt werden.

Um die Möglichkeiten der Regeneration der Immunsensitivität von Checkpoint-Inhibitor-resistenten Tumoren durch Inhibition der HSD11B1 genauer untersuchen zu können, wurde für den vielversprechenden HSD11B1-Inhibitor SKI2852 eine Syntheseroute entwickelt und eine ausreichende Menge an Wirkstoff für eine Evaluation in einem zellbasierten ELISA-Assay dargestellt. Die hohe Potenz dieses Inhibitors konnte im Vergleich zum Glycyrrhizinsäure-Derivat Carbenoxolon eindrucksvoll belegt werden. Weiterführend ist es nun notwendig, in geeigneten Melanom-Xenograft-Modellen zu untersuchen, inwiefern durch zielgerichtete Inhibition von HSD11B1 die über phänotypische Plastizität vermittelte Resistenz gegenüber der Checkpoint-Immuntherapie umgangen werden kann und somit ein synergistischer Effekt entsteht, der als Rational für eine Kombinationstherapie dient.²³⁶

6 Abstract

Given the increasing number of new cases and the fact that nowadays one of two Germans will be faced with a diagnosis during lifetime, cancer takes on more and more increasing importance.² However, since two decades of precision medicine revolutionized the treatment of cancer: the therapy undergoes a change from classical therapeutic cytostatic agents to a biomarker-driven treatment of oncogenic target structures.³ Even though, this novel therapeutic options increased survival rates and life quality of patients dramatically, a number of limitations such as resistance mechanisms and a lack of robust predictive biomarkers still restrict the success story of targeted therapy in cancer. Against this background, the development of novel innovative strategies is essential to overcome these limiting factors.

As a key player in the PI3K/Akt/mTOR-pathway, the protein kinase Akt reflects the significance of protein kinases in cellular processes. Alterations and dysregulation in this pathway have been identified as disease drivers in solid tumors and are related to resistance against chemo- and radiotherapy, rendering Akt a prominent drug target. The unique activation mechanism of Akt involves a change of the relative orientation of its N-terminal pleckstrin homology (PH) and the kinase domain and makes this kinase suitable for highly specific allosteric modulation. In view of this, WEISNER and GONTLA *et al.*⁹⁶ recently combined the characteristics of allosteric Akt modulators with the beneficial properties of irreversible inhibitors to result in covalent-allosteric Akt inhibitors (CAAI). The first-in-class CAAI borussertib high selectivity and superior potency against the clinical candidate MK-2206. Based on the high potential of this novel inhibitor class, it was necessary to further validate the efficacy of this type of inhibitors in an *in vivo* proof-of-concept study. This required a robust synthetic strategy suitable for compound scales that go beyond usually used scales in academia. Within this work, the synthesis of borussertib was optimized regarding the suitability of synthesis in bulk scale. A central reductive amination was identified to be the limiting step of the synthetic route but could be dramatically improved by using the Leuckart-Wallach reaction. Although there is still room for improvement, about 2 g of borussertib could be synthesized with the developed synthetic strategy. With this in hand, an initial preclinical evaluation was performed in mouse-xenograft models. Despite limiting characteristics of borussertib with respect to its pharmacokinetic properties, a sufficient bioavailability could be identified by intraperitoneal administration and enabled pharmacodynamics investigations. In KRas-dependent xenograft-models (PDX), the effect of borussertib in combination therapy with Mek inhibitor trametinib was evaluated and showed partial response and stable disease in colorectal and pancreas carcinomas, while monotherapy led to progressive disease. These results validated the *in vivo* efficacy and underlined the high potential of the CAAI borussertib.

For further development of improved CAAs, deeper insights into the structure-activity relationships were gained. Based on the crystal structure of borussertib in complex with Akt, a structure-based design-driven synthesis led to novel inhibitors of high inhibitory potency. Beside benzo[*d*]imidazolones that were restricted regarding chemical modifications, phenylurea-, phenylamine- and phenylpiperazine-based structures could be identified as novel scaffolds opened higher chemical space. The structural analysis of a set of novel inhibitors revealed different preferences for the labeling of Cys296 or Cys310 which were further investigated via MD simulations. A cellular evaluation of the novel inhibitors implied cellular potency and identified the breast cancer cell lines T47D and ZR-75-1 as attractive systems for further xenograft studies. In an *in vitro* PK-study of the synthesized derivatives, the pharmacokinetic limitations regarding solubility, permeability, and absorption were confirmed. Thus, we replaced the hydrophobic 1,6-naphthyridinone scaffold using two different scaffold hopping strategies. To further investigate the conformation-dependent functions of the protein kinase Akt, functional probes on the basis of the gained structural information were developed. These probes were functionalized with an alkyne group making them suitable for the *in situ* introduction of reporter groups via bioorthogonal CuAAC reaction which was validated via In-Gel fluorescence. The probe molecules are a useful chemical biology tool not only for investigating conformation-dependent functions of Akt but also to further analyze the non-redundant roles of the Akt isoforms in cellular processes. For this purpose, based on published isoform-selective inhibitors we developed novel CAAs with an interesting selectivity profile. By combining these isoform-selective inhibitors with the knowledge of Akt probe design, deeper insights into isoform-specific functions could be gained in future work.

An additional novel modern strategy in cancer therapy is based on the treatment with immune checkpoint inhibitors. The promising clinical results were limited by rapidly occurred resistance mechanisms. One of these mechanisms is based on phenotypic plasticity as a reaction to checkpoint inhibitor treatment leading to a loss of immune sensitivity. In order to investigate the possibility of regeneration of the immune sensitivity in checkpoint inhibitor-resistant tumors by inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1, the HSD11B1-inhibitor SKI2852 was synthesized and evaluated in a cell-based ELISA assay. High inhibitory potency with superior characteristics in comparison to glycyrrhizic acid derivative carbenoxolone could be confirmed for this promising compound. Future experiments should be performed in meaningful melanoma xenograft models to analyze if targeted inhibition of HSD11B1 is able to overcome phenotypic plasticity-based resistance in combination therapy with immune checkpoint inhibitors.²³⁶

7 Experimenteller Teil

7.1. Organische Synthese

7.1.1. Allgemeine Anmerkungen

Alle Reagenzien und Lösungsmittel wurden bei Acros, Activate Scientific, Alfa Aesar, Apollo Scientific, Merck, Sigma-Aldrich, TCI Chemicals oder VWR gekauft und ohne weitere Reinigung verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden als wasserfreie Reagenzien von kommerziellen Anbietern bezogen. Hydrolyse- und Redox-sensitive Reaktionen wurden nach Ausheizen der Glasapparaturen unter Argon-Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Für Mikrowellen-unterstützte Reaktionen wurden in einem Microwave 300 Reaktor der Firma Anton Paar verwendet. Lyophilisierungen wurden an einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 D_{plus} der Firma Christ vorgenommen.

¹H und ¹³C NMR-Spektren wurden auf Bruker Avance DRX AV400 (400 MHz and 101 MHz), AV500 (500 MHz and 125 MHz), AV600 (600 MHz and 151 MHz) und AV700 (700 MHz and 176 MHz) Spektrometern aufgenommen. ¹H chemische Verschiebungen sind in δ ppm als singulett (s), dublett (d), dublett vom dublett (dd), triplett (t), quartett (q), multipllett (m) oder breites singulett (b) angegeben und beziehen sich auf den internen Standard für die Lösungsmittel CDCl₃ (7.26), DMSO-*d*₆ (2.50) oder MeOD-*d*₄ (4.78, 3.34). Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte über MestReNova (MestreLab Research, Version 6.0.2-5475).

Für hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) ein Thermo LTQ Orbitrap hochauflösendes Massenspektrometer der Firma Thermo Electron mit einem Accela HPLC-System und einer Hypersil GOLD-Säule (Thermo Electron). LCMS (ESI-MS) Analysen wurden mit einem Agilent HPLC-System (1100er Serie) mit CC 125/4 Nucleodur C18 gravity Säule (3 μ m) von Macherey-Nagel verbunden mit einem Thermo Scientific Finnigan LCQ Advantage Max Ionenfallen-Massenspektrometer mit ESA Corona Detector. Die Auswertung erfolgte über das Programm Xcalibur (Thermo Scientific, Version 2.2). Analytische Dünnschicht-Chromatographie wurde auf Merck 60 F254 Kieselgelplatten (Aluminium) durchgeführt. Dünnschicht-Chromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie erfolgte über ein expression^L CMS-System mit Plate Express der Firma Advion.

Die dargestellten Verbindungen wurden über Säulenchromatographie an Kieselgel von VWR (Partikelgröße: 40-63 μ m) oder über ein Biotage Isolera One System mit Büchi Reveleris Kieselgel-Kartuschen (4 g – 330 g) gereinigt. Die Isolierung über präparative HPLC erfolgte mit einem Agilent HPLC-System (1200er Serie) mit einer VP 125/21 Nucleodur C18 Säule (Macherey-Nagel) mittels UV-Absorption bei 210 nm und 254 nm. Alle finalen Verbindungen wiesen eine Reinheit von > 95 % auf.

7.1.2. Allgemeine Synthesevorschriften

Allgemeine Synthesevorschrift A: Nitrierung von Benzo[d]imidazol-Derivaten

1 Äq. des Benzo[d]imidazolons wurden bei 60 °C in 100 mL *o*-Xylol gerührt. Daraufhin wurden 6 Äq. konzentrierter Salpetersäure (69 %) über einen Tropftrichter hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde für zwei weitere Stunden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde dekantiert und das zurückgebliebene Rohprodukt mit MeOH gewaschen, woraufhin das reine Produkt durch Filtration erhalten wurde.

Allgemeine Synthesevorschrift B: Selektive Boc-Schätzung anilinischer Amine

1 Äq. des Amins wurde in 60 mL 10 %-iger wässriger Essigsäure gelöst. 2 Äq. Boc₂O gelöst in 10 mL 1,4-Dioxan wurden tropfenweise hinzugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mittels 10 M NaOH basifiziert und mit 10 % MeOH in DCM extrahiert. Die organischen Fraktionen wurden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Säulenchromatographische Isolierung (7 – 10 % MeOH in DCM + 1 % NH₃) lieferte das gewünschte Produkt.

Allgemeine Synthesevorschrift C: Reduktion einer Nitro-Gruppe mit Eisen

Zu einer Lösung von 1 Äq. des Nitro-Derivates in MeOH/Wasser (9:1) wurden 6 Äq. Eisenpulver und 9 Äq. NH₄Cl wurden 1 Äq. HATU sowie 3 Äq. DIPEA hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 2 h bei 80 °C gerührt. Die Suspension wurde über Celite gefiltert, das Lösungsmittel verdampft und das Rohprodukt über Säulenchromatographie gereinigt (7 – 10 % MeOH/DCM + 1 % NH₃).

Allgemeine Synthesevorschrift D: Leuckart-Wallach-Reaktion

Zu einer Lösung von 1 Äq. Aldehyd und 1,1 Äq. des sekundären Amins in 10 mL MeCN wurden 4 Äq. Ameisensäure hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 80 °C über Nacht gerührt. Nach Abkühlen wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Produkt über Säulenchromatographie isoliert (1 – 10 % MeOH/DCM + 1 % NH₃).

Allgemeine Synthesevorschrift E: Entschätzung der Boc-Gruppe

1 Äq. des Boc-geschützten Amins wurden in 10 mL HCl in 1,4-Dioxan (4 N) für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde daraufhin mit 10 M NaOH basifiziert und das erhaltene Präzipitat mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel evaporiert. Das gewünschte Produkt wurde über Säulenchromatographie gereinigt (7 – 10 % MeOH/DCM + 1 % NH₃).

Allgemeine Synthesevorschrift F: Acrylamid-Kupplung

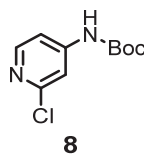
1 Äq. Amin wurden in 4 mL THF und 10 Äq. DIPEA gelöst und 15 min bei 0 °C in einem Eisbad gerührt. Eine Lösung von 1,1 Äq. Acryloylchlorid in 1 mL THF wurde tropfenweise hinzugegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur gerührt, bis ein voller Umsatz detektiert wurde. Daraufhin wurde die Reaktionsmischung mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung gewaschen und mittels Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (7 – 10 % MeOH/DCM + 1 % NH₃).

Allgemeine Synthesevorschrift G: Suzuki-Kupplung

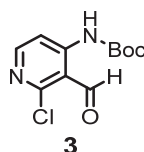
1 Äq. des Halogenids wurden mit 1,3 Äq. Boronsäure und 2 Äq. K₃PO₄ in 3 mL eines 1,4-Dioxan/H₂O-Gemischs (5:1) gelöst und für fünf Minuten über einen Argon-Strom entgast. Daraufhin wurden 0,1 Äq. [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladiumdichlorid und die Reaktionsmischung für zwei Stunden in der Mikrowelle auf 130 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung gewaschen und das Produkt mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das finale Produkt über Säulenchromatographie (1-10 % MeOH/DCM + 1 % NH₃) isoliert.

7.1.3. Synthese und Analytik

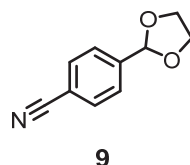
Hochskalierung von Borussertib



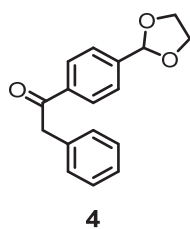
Darstellung von *tert*-Butyl(2-chloropyridin-4-yl)carbamat (8). Zu einer Lösung von 2-Chlorpyridin-4-amin (**5**, 25 g, 0,19 mol), DMAP (7,1 g, 0,06 mol) und Triethylamin (67 mL, 0,49 mol) in 200 mL DCM wurde Boc₂O (44,7 mL, 0,19 mol) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit gesättigter NH₄Cl-Lösung gequenchet. Nach Extraktion mit Ethylacetat wurden die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung ergab 23,7 g (0,10 mol, 53 %) des gewünschten Produkts. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.12 (s, 1H), 8.17 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 5.7 Hz, 1.6 Hz, 1H), 1.48 (s, 9H). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.63, 151.37, 150.55, 149.52, 112.16, 111.69, 81.22, 28.33. **LCMS (*m/z*):** berechnet für C₁₀H₁₃ClN₂O₂ [M+H]⁺, 229,07; gefunden: 228,80.



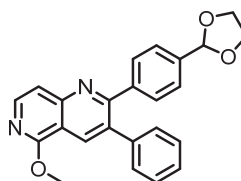
Darstellung von *tert*-Butyl(2-chloro-3-formylpyridin-4-yl)carbamat (3). **8** (4 g, 17,5 mmol) wurde in trockenem THF gelöst und mit Trockeneis auf -78 °C gekühlt. Unter Argonatmosphäre wurde *tert*-Butyllithium (29,8 mL, 50,7 mmol) über einen Zeitraum von einer Stunde hinzuge tropft und das Reaktionsgemisch für zwei Stunden unter Trockeneiskühlung gerührt. Daraufhin wurde DMF (8,1 mL, 105 mmol) hinzuge tropft und über Nacht die Temperatur langsam auf Raumtemperatur erhöht. Die Reaktionsmischung wurde mit einer gesättigten NH₄Cl-Lösung gequenchet und mit einer wässrigen NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die Extraktion erfolgte mit Ethylacetat. Nach Vereinigung und Evaporation der organischen Fraktionen lieferte Säulenchromatographie (25 % EtOAc/PET) das finale Produkt (3,9 g, 15,1 mmol, 86 %). **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.93 (s, 1H), 10.33 (s, 1H), 8.42 (d, *J* = 6 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 6 Hz, 1H), 1.51 (s, 9H). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 194.78, 155.75, 154.43, 151.59, 113.65, 112.35, 82.85, 28.11. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₁₁H₁₃ClN₂O₃ [M+H]⁺, 257,06; gefunden: 256,82.



Darstellung von 4-(1,3-Dioxolan-2-yl)benzonitril (9). Eine Suspension aus **6** (30 g, 0,23 mol), Ethylenglykol (51,6 mL, 0,92 mmol) und p-TsOH (1,3 g, 0,01 mmol) in 300 mL Toluol wurde mit einem Wasserabscheider über Nacht refluxiert. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Aus dem verbliebenen Öl konnte das Rohprodukt bei 4 °C gefällt werden. Durch Waschen mit *n*-Hexan wurde 30,4 g des gewünschten Produkts erhalten (0,17 mol, 76 %). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.85 (s, 1H), 4.13 – 4.02 (m, 4H). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃): δ 143.26, 132.37, 127.32, 118.73, 113.10, 102.61, 65.60. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₁₀H₉NO₂ [M+H]⁺, 176,07; nicht ionisierbar.

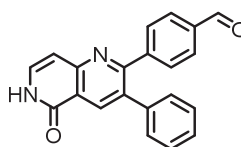


Darstellung von 1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2-phenylethan-1-on (4). Zu einer Lösung von **9** (4,0 g, 22,8 mmol) in trockenem THF wurde unter Kühlung mit einem Eisbad Benzylmagnesiumchlorid (40 mL, 79,9 mmol) hinzugegeben. Nach einstündigem Rühren wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionslösung für vier weitere Stunden gerührt. Diese wurde mit einer gesättigten NH₄Cl-Lösung gequenchet und das präzipitierende Salz abfiltriert. Nach Extraktion mit DCM und Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurden 3,9 g des gewünschten Produkts (14,5 mmol, 64 %) über Säulenchromatographie (30 % EtOAc/Pet) erhalten. **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.07 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.21-7.33 (m, 5H), 5.82 (s, 1H), 4.40 (s, 2H), 4.01-4.07 (m, 2H), 3.95-4.01 (m, 2H). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 197.88, 143.52, 137.34, 135.5, 130.18, 128.86, 127.31, 126.98, 102.52, 65.42, 45.28. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₁₇H₁₆O₃ [M+H]⁺, 269,12; gefunden: 269,05.



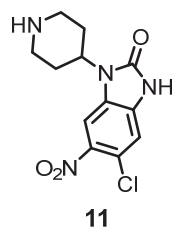
10

Darstellung von 2-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-5-methoxy-3-phenyl-1,6-naphthyridin (10). Zu einer Lösung von **3** (4,0 g, 15,6 mmol) und **4** (4,3 g, 16,1 mmol) in 60 mL trockenem MeOH wurden 4,7 mL Natriummethanolat (30 % in MeOH, 23,4 mmol) tropfenweise hinzugegeben und die Reaktionsmischung für vier Stunden bei 65 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Vakuum entfernt, das Rohprodukt in Ethylacetat aufgenommen und mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung gewaschen. Nach Extraktion mit Ethylacetat wurden die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und 3,8 g des gewünschten Produkts (9,9 mmol, 63 %) mittels Säulenchromatographie (10 % MeOH/DCM) isoliert. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.41 (s, 1H), 8.27 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.51 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.43 – 7.38 (m, 2H), 7.37 – 7.31 (m, 5H), 7.26 (dd, *J* = 6.9 Hz, 2.5 Hz, 2H), 5.71 (s, 1H), 4.10 (s, 3H), 4.04 (dd, *J* = 8.7 Hz, 5.1 Hz, 2H), 3.95 – 3.90 (m, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.72, 161.10, 151.51, 144.42, 140.65, 139.35, 138.77, 135.33, 134.18, 130.22, 129.94, 128.96, 128.11, 126.60, 116.28, 113.53, 102.91, 65.33, 54.60. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₂₄H₂₀N₂O₃ [M+H]⁺, 385,15; gefunden: 385,24.

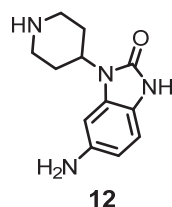


1

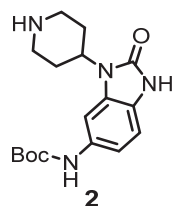
Darstellung von 4-(5-Oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzaldehyd (1). **10** (3,0 g, 7,8 mmol) wurde mit 200 mL Salzsäure (37 %) versetzt und für drei Stunden auf 90 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Reaktionslösung mit 10 M NaOH neutralisiert. Das resultierende Präzipitat wurde abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen, um 2,3 g des gewünschten Produkts (7,1 mmol, 91 %) zu erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.66 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.35 – 7.31 (m, 3H), 7.27 – 7.23 (m, 2H), 6.71 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 192.86, 161.91, 160.11, 152.96, 145.23, 138.43, 137.04, 135.58, 133.93, 133.82, 130.52, 129.48, 128.96, 128.57, 127.69, 120.72, 105.79. **HRMS (*m/z*)** berechnet für C₂₁H₁₄N₂O₂ [M+H]⁺, 327,1128; gefunden: 327,1129.



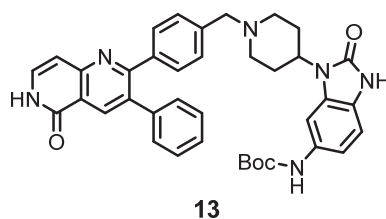
Darstellung von 5-Chlor-6-nitro-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-on (11). **7** (2,5 g, 9,9 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift A umgesetzt und ergab 2,8 g des gewünschten Produkts (9,4 mmol, 95 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.99 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 4.33 (dd, $J = 16.4, 8.2$ Hz, 1H), 3.14 (d, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.68 (t, $J = 11.9$ Hz, 2H), 2.24 (tt, $J = 12.3, 6.2$ Hz, 2H), 1.66 (d, $J = 11.0$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 156.9, 140.2, 137.2, 129.5, 119.6, 111.3, 106.2, 51.0, 46.0, 29.7. **HRMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClN}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 297,0748; gefunden 297,0756.



Darstellung von 6-Amino-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-on (12). **11** (2 g, 6,7 mmol) wurde in 60 mL MeOH resuspendiert und auf 80 °C erhitzt. 5 % Pd/C (0,2 g) und Ammoniumformiat (4,0 g, 67 mmol) wurden in der Hitze hinzugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht refluxiert. Daraufhin wurde das Gemisch über Celite filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung weiter verwendet. **HRMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 233,1396; gefunden 233,1396.



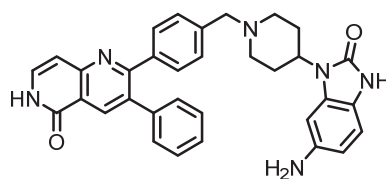
Darstellung von tert-Butyl(2-oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-carbamate (2). **12** (1,5 g, 6,46 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und ergab 1,1 g des gewünschten Produkts (3,3 mmol, 51 % über zwei Schritte). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, MeOD- d_4): δ 7.52 (s, 1H), 7.02 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.39 (tt, $J = 12.4, 4.1$ Hz, 1H), 3.26 (d, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.81 (td, $J = 12.3, 1.7$ Hz, 2H), 2.41 (qd, $J = 12.7, 4.1$ Hz, 2H), 1.82 (dd, $J = 12.1, 1.8$ Hz, 2H), 1.55 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, MeOD- d_4): δ 155.6, 154.7, 133.4, 129.6, 124.3, 109.4, 79.8, 50.8, 45.5, 29.3, 27.4. **HRMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 333,1921; gefunden 333,1923.



13

Darstellung von *tert*-Butyl(2-oxo-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)carbamate (13).

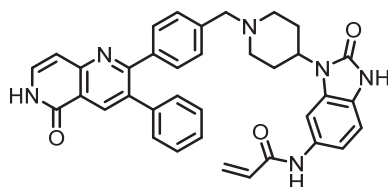
1 (300 mg, 0,9 mmol) und **2** (336 mg, 1,0 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und ergaben 318 mg des gewünschten Produkts (0,5 mmol, 54 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, MeOD- d_4) δ 8.64 (s, 1H), 7.43 – 7.38 (m, 3H), 7.35 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.28 – 7.22 (m, 4H), 7.22 – 7.13 (m, 3H), 6.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.29 (tt, $J = 16.3, 8.5$ Hz, 1H), 3.63 (s, 2H), 3.07 (d, $J = 11.0$ Hz, 2H), 2.46 (dd, $J = 23.3, 10.9$ Hz, 2H), 2.26 (t, $J = 11.0$, 2H), 1.77 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 1.51 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, MeOD- d_4) δ 163.9, 162.7, 155.8, 154.4, 153.5, 139.1, 138.1, 135.5, 132.2, 130.4, 130.3, 129.9, 129.7, 129.66, 129.6, 129.4, 128.6, 127.9, 124.3, 121.1, 109.7, 107.9, 77.7, 62.5, 53.2, 50.6, 28.6. **HRMS** (m/z) berechnet für $\text{C}_{38}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 643,3027; gefunden. 643,3039.



19

Darstellung von 2-(4-((4-(6-Amino-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-3-phenyl-1,6-naphthyridin-5(6H)-on (19).

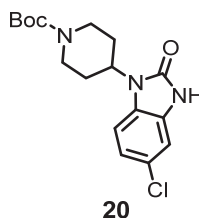
13 (200 mg, 0,3 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und ergab 120 mg des gewünschten Produkts (0,2 mmol, 75 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, MeOD- d_4) δ 8.65 (s, 1H), 7.71 (s, 2H), 7.48 – 7.40 (m, 3H), 7.37 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.32 – 7.27 (m, 3H), 7.26 – 7.19 (m, 2H), 6.89 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.84 (m, 1H), 6.52 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H), 4.42 (br, 2H), 4.32 (dd, $J = 14.5, 10.2$ Hz, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.15 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 2.54 (dt, $J = 21.9, 11.1$ Hz, 2H), 2.37 (t, $J = 11.8$ Hz, 2H), 1.81 (d, $J = 11.5$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, MeOD- d_4) δ 162.8, 161.7, 155.5, 149.8, 145.3, 141.8, 139.3, 139.0, 138.0, 135.5, 132.6, 130.4, 130.3, 129.8, 129.7, 128.6, 127.9, 127.8, 114.2, 112.4, 109.9, 107.4, 66.0, 60.6, 53.1, 28.1. **HRMS** (m/z) berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 543,2503; gefunden 543,2495.



Borussertib

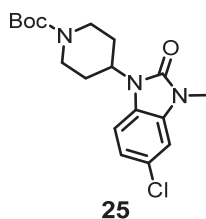
Darstellung von *N*-(2-oxo-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)-benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)acrylamid (Borussertib). 19 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und ergab 45 mg des gewünschten Produkts (0,1 mmol, 82 %). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, MeOD- d_4) δ 8.60 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 26.4, 8.1$ Hz, 4H), 7.31 – 7.28 (m, 3H), 7.25 – 7.20 (m, 3H), 7.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.44 (dd, $J = 16.9, 9.9$ Hz, 1H), 6.37 (dd, $J = 16.9, 1.6$ Hz, 1H), 5.78 (dd, $J = 10.0, 1.6$ Hz, 1H), 4.30 (t, $J = 12.3$ Hz, 1H), 3.72 (s, 2H), 3.13 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 2.56 (dt, $J = 22.1, 11.0$ Hz, 2H), 2.36 (s, 2H), 1.81 (d, $J = 11.3$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, MeOD- d_4) δ 166.05, 164.74, 163.81, 156.58, 154.52, 140.23, 138.69, 136.55, 133.80, 133.74, 132.48, 131.23, 130.81, 130.50, 129.53, 128.79, 127.60, 126.59, 121.93, 115.44, 110.41, 108.15, 103.93, 62.91, 53.93, 51.91, 29.37. **HRMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 597,2608; gefunden, 597,2614.

Struktur-basierte Derivatisierung

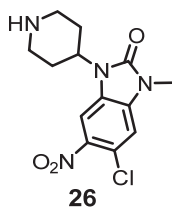


20

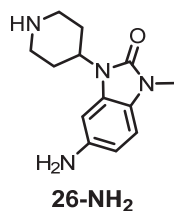
Darstellung von *tert*-Butyl-4-(5-Chlor-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (20). 2,0 g **7** (8,0 mmol) wurden in DCM suspendiert. DIPEA (4,1 g, 31,8 mmol) und Boc_2O (3,5 g, 15,9 mmol) wurden hinzugegeben und die Reaktionsmischung für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit einer gesättigten NH_4Cl -Lösung gewaschen und das Produkt mit DCM extrahiert. Die organischen Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt. Säulenchromatographie (25 % EtOAc/PEt) liefert 2,32 g des gewünschten Produkts (13,2 mmol, 83 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.06 (s, 1H), 7.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.05 – 6.96 (m, 2H), 4.31 (tt, $J = 12.1, 3.7$ Hz, 1H), 4.08 (s, 2H), 2.87 (s, 2H), 2.15 (qd, $J = 12.5, 4.3$ Hz, 2H), 1.67 (d, $J = 10.8$ Hz, 2H), 1.42 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 154.00, 153.83, 129.69, 128.42, 125.04, 120.24, 109.86, 108.86, 79.01, 50.31, 43.57, 42.69, 28.68, 28.29. **LCMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 352,13; nicht ionisierbar.



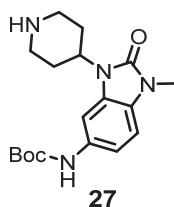
Darstellung von *tert*-Butyl-4-(5-Chlor-3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (25). Eine Lösung von **20** (1,0 g, 2,84 mmol) in 5 mL DMF wurde mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von NaH (136,4 mg, 5,68 mmol) wurde die Suspension für 30 Minuten gerührt. Daraufhin wurde Methyljodid (806,8 mg, 5,68 mmol) zugetropft, das Eisbad entfernt und die Reaktionsmischung für weitere zwei Stunden gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit einer gesättigten NH₄Cl-Lösung gewaschen und das Produkt mit DCM extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wurde *in vacuo* entfernt und 882 mg des gewünschten Produkts (2,4 mmol, 85 %) über Säulenchromatographie (25 % EtOAc/PET) isoliert. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.29 (dd, *J* = 14.5, 5.2 Hz, 1H), 7.06 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 2H), 4.37 (tt, *J* = 12.1, 3.8 Hz, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.35 (s, 2H), 2.86 (d, *J* = 26.5 Hz, 2H), 2.16 (qd, *J* = 12.5, 4.3 Hz, 2H), 1.68 (d, *J* = 10.6 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 153.86, 153.05, 130.93, 126.94, 125.20, 120.35, 109.65, 108.19, 78.87, 50.66, 28.13, 27.04. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₁₈H₂₄ClN₃O₃ [M+H]⁺, 366,15; nicht ionisierbar.



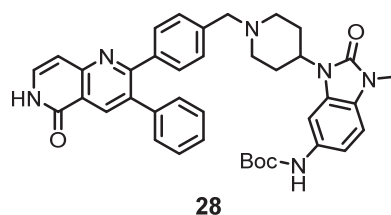
Darstellung von 5-Chlor-3-methyl-6-nitro-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-on (26). **25** (1,0 g, 2,7 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesvorschrift A umgesetzt und ergab 768 mg des gewünschten Produkts (2,4 mmol, 90 %). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.11 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 4.63 (tt, *J* = 12.2, 3.9 Hz, 1H), 3.46 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.08 (q, *J* = 12.3 Hz, 2H), 1.92 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 153.72, 141.13, 134.58, 127.20, 120.01, 110.64, 106.57, 48.64, 43.48, 28.01, 25.74. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₁₃H₁₅ClN₄O₃ [M+H]⁺, 311,08; gefunden, 311,35.



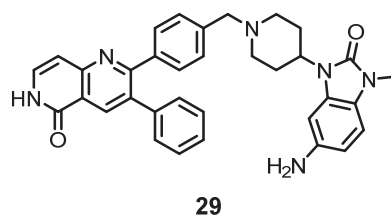
Darstellung von 5-Amino-1-methyl-3-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-on (26-NH₂). **25** (747 mg, 2,4 mmol) wurde in 60 mL MeOH resuspendiert und auf 80 °C erhitzt. 5 % Pd/C (0,1 g) und Ammoniumformiat (1,5 g, 24 mmol) wurden in der Hitze hinzugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht refluxiert. Daraufhin wurde das Gemisch über Celite filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung weiter verwendet. **LCMS (m/z)** berechnet für C₁₃H₁₈N₄O [M+H]⁺, 247,15; gefunden, 247,29.



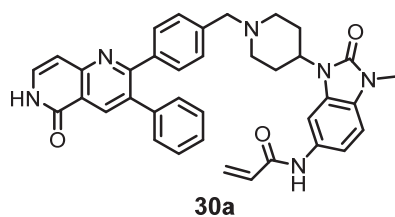
Darstellung von tert-Butyl(1-methyl-2-oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)carbamate (27). **26-NH₂** (591 mg, 2,4 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und ergab 363 mg des gewünschten Produkts (1,1 mmol, 44 % über zwei Schritte). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.23 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 7.02 – 6.97 (m, J = 8.4 Hz, 1H), 4.20 – 4.11 (m, 1H), 3.38 (b, 1H), 3.26 (s, 3H), 3.06 (d, J = 11.9 Hz, 2H), 2.57 (t, J = 11.5 Hz, 2H), 2.14 (qd, J = 12.2, 3.8 Hz, 2H), 1.59 (d, J = 9.5 Hz, 2H), 1.47 (s, 9H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.41, 158.18, 138.67, 133.02, 130.20, 116.34, 112.78, 105.29, 83.94, 56.36, 51.05, 35.29, 33.41, 32.02. **LCMS (m/z)** berechnet für C₁₈H₂₆N₄O₃ [M+H]⁺, 347,20; gefunden, 347,23.



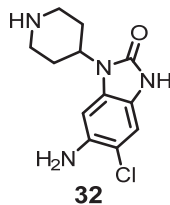
Darstellung von *tert*-Butyl(1-methyl-2-oxo-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-carbammat (28). **1** (152 mg, 0,5 mmol) und **27** (178 mg, 0,5 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und ergaben 223 mg des gewünschten Produkts (0,3 mmol, 73 %). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.21 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.54 – 7.46 (m, 2H), 7.37 – 7.30 (m, 6H), 7.29 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 7.27 – 7.22 (m, 3H), 7.11 (s, 1H), 7.00 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.21 – 4.08 (m, 1H), 3.54 (s, 2H), 3.26 (s, 3H), 2.92 (d, $J = 11.0$ Hz, 2H), 2.31 (td, $J = 12.1, 9.4$ Hz, 2H), 2.10 (t, $J = 11.3$ Hz, 2H), 1.63 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 1.47 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 161.99, 161.16, 153.22, 152.93, 139.03, 138.85, 138.16, 136.79, 133.70, 133.47, 129.66, 129.36, 128.41, 128.16, 127.76, 127.45, 124.99, 120.24, 107.56, 105.91, 78.75, 61.23, 52.45, 50.56, 28.47, 28.19. **LCMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{39}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 657,31; gefunden, 654,34.



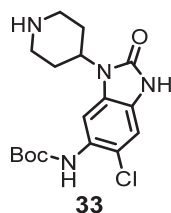
Darstellung von 2-(4-((4-(6-Amino-3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-3-phenyl-1,6-naphthyridin-5(6H)-on (29). **28** (220 mg, 0,3 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und ergab 182 mg (0,3 mmol, 98 %) des gewünschten Produkts. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.38 (s, 1H), 7.53 – 7.46 (m, 1H), 7.36 – 7.28 (m, 6H), 7.25 (t, $J = 7.7$ Hz, 4H), 6.78 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.29 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.87 (b, 2H), 4.09 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H), 3.51 (s, 2H), 3.20 (s, 3H), 2.91 (d, $J = 10.6$ Hz, 2H), 2.29 (dd, $J = 21.5, 11.9$ Hz, 2H), 2.06 (t, $J = 11.3$ Hz, 2H), 1.60 (d, $J = 10.4$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 167.22, 166.39, 158.30, 158.13, 148.87, 144.24, 144.00, 143.39, 141.98, 138.92, 138.77, 134.88, 134.60, 133.83, 133.65, 133.48, 132.69, 126.04, 125.46, 113.34, 111.87, 111.14, 101.06, 66.70, 57.85, 55.59, 33.88, 31.92. **LCMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{39}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 557,26; gefunden, 557,32.



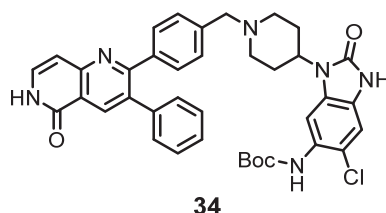
Darstellung von *N*-(1-Methyl-2-oxo-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)-benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)acrylamid (30a**).** **29** (40 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und ergab 23 mg des gewünschten Produkts (0,04 mol, 52 %). **¹H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.58 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 10.12 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.49 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.42 – 7.30 (m, 6H), 7.31 – 7.23 (m, 4H), 7.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.41 (dt, *J* = 24.2, 12.1 Hz, 1H), 6.25 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H), 5.74 (t, *J* = 10.5 Hz, 1H), 4.14 (q, *J* = 12.3 Hz, 1H), 3.54 (s, 2H), 3.29 (s, 3H), 2.94 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H), 2.31 (dd, *J* = 22.0, 11.2 Hz, 2H), 2.10 (t, *J* = 11.3 Hz, 2H), 1.66 (d, *J* = 10.6 Hz, 2H). **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.82, 161.99, 161.19, 153.26, 152.92, 139.02, 138.70, 138.20, 136.79, 133.73, 133.50, 133.03, 132.00, 129.67, 129.38, 128.43, 128.33, 127.71, 127.48, 126.44, 126.00, 120.25, 112.09, 107.69, 105.92, 100.91, 61.45, 52.53, 50.76, 28.70, 26.87. **HRMS (*m/z*)** berechnet für C₃₇H₃₅N₆O₃ [M+H]⁺, 611,2765; gefunden, 611,2759.



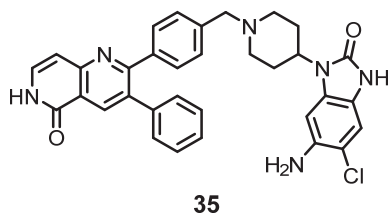
Darstellung von 6-Amino-5-chlor-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2*H*-benzo[*d*]imidazol-2-on (32**).** **11** (1,5 g, 5,06 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift C umgesetzt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung weiterverarbeitet. **HRMS (*m/z*)** berechnet für C₁₂H₁₆N₄OCl [M+H]⁺, 267,1007; gefunden 267,1009.



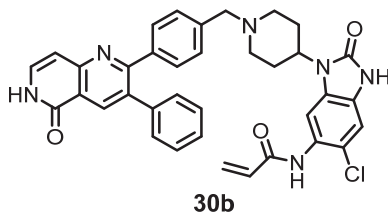
Darstellung von *tert*-Butyl(6-chlor-2-oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]-imidazol-5-yl)carbamat (33). **32** (899 mg, 3,37 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und ergab 415 mg des gewünschten Produkts (1,1 mmol, 34 % über zwei Schritte). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.54 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 4.22 – 4.15 (m, 1H), 3.04 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 2.56 (t, $J = 11.8$ Hz, 1H), 2.13 (qt, $J = 12.1, 5.8$ Hz, 1H), 1.57 (t, $J = 11.0$ Hz, 1H), 1.44 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 153.86, 129.58, 128.23, 128.10, 127.87, 126.89, 121.43, 108.85, 78.88, 50.57, 45.69, 29.98, 28.14. **LCMS (*m/z*)** berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{ClN}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 367,15; gefunden, 367,08.



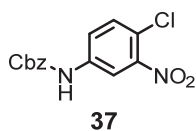
Darstellung von *tert*-Butyl(6-Chlor-2-oxo-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)-carbamate (34). **1** (89 mg, 0,3 mmol) und **33** (110 mg, 0,3 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und ergaben 99 mg des gewünschten Produkts (0,1 mmol, 54 %). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.58 (s, 1H), 10.97 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.49 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.36 – 7.29 (m, 6H), 7.28 – 7.21 (m, 4H), 7.00 (s, 1H), 6.68 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.16 – 4.08 (m, 1H), 3.51 (s, 2H), 2.89 (d, $J = 11.0$ Hz, 2H), 2.30 (td, $J = 12.0, 8.7$ Hz, 2H), 2.09 (t, $J = 11.2$ Hz, 2H), 1.63 (d, $J = 10.1$ Hz, 2H), 1.44 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 162.47, 161.64, 154.36, 154.04, 153.39, 139.51, 139.44, 138.60, 137.27, 134.17, 133.94, 130.13, 130.01, 129.84, 128.87, 128.73, 128.64, 128.56, 128.46, 127.91, 127.09, 125.21, 121.19, 120.71, 109.35, 108.06, 106.39, 79.51, 61.79, 52.83, 50.65, 49.07, 28.95, 28.58. **LC-MS (*m/z*)** berechnet für $\text{C}_{38}\text{H}_{37}\text{ClN}_6\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 677,26; gefunden 677,28.



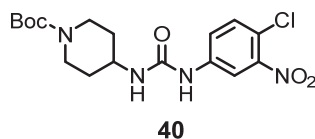
Darstellung von 2-(4-((4-(6-Amino-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-3-phenyl-1,6-naphthyridin-5(6H)-on (35). **34** (200 mg, 0,3 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und ergab 120 mg des gewünschten Produkts (0,2 mmol, 75 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, MeOD- d_4) δ 8.65 (s, 1H), 7.71 (s, 2H), 7.48 – 7.40 (m, 3H), 7.37 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.32 – 7.27 (m, 3H), 7.26 – 7.19 (m, 2H), 6.89 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.84 (m, 1H), 6.52 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 4.42 (br, 2H), 4.32 (dd, J = 14.5, 10.2 Hz, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.15 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 2.54 (dt, J = 21.9, 11.1 Hz, 2H), 2.37 (t, J = 11.8 Hz, 2H), 1.81 (d, J = 11.5 Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, MeOD- d_4) δ 162.8, 161.7, 155.5, 149.8, 145.3, 141.8, 139.3, 139.0, 138.0, 135.5, 132.6, 130.4, 130.3, 129.8, 129.7, 128.6, 127.9, 127.8, 114.2, 112.4, 109.9, 107.4, 66.0, 60.6, 53.1, 28.1. **HRMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 543,2503; gefunden 543,2495.



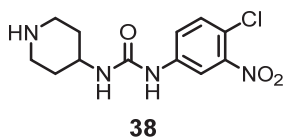
Darstellung von N-(6-Chlor-2-oxo-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)-benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)acrylamid (30b). **35** (40 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und ergab 33 mg des gewünschten Produkts (0,1 mmol, 82 %). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.58 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 11.02 (s, 1H), 9.68 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.49 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 7.36 – 7.29 (m, 5H), 7.27 – 7.22 (m, 4H), 7.06 (s, 1H), 6.68 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 17.0, 10.3 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 17.0 Hz, 1H), 5.77 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 4.11 (t, J = 12.1 Hz, 1H), 3.51 (s, 2H), 2.90 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 2.29 (dd, J = 21.3, 11.8 Hz, 2H), 2.07 (t, J = 11.6 Hz, 2H), 1.64 (d, J = 10.2 Hz, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ 163.62, 162.00, 161.20, 153.91, 152.92, 139.03, 138.77, 138.15, 136.78, 133.72, 133.47, 131.50, 129.66, 129.38, 129.12, 128.41, 128.27, 127.45, 127.35, 127.01, 126.94, 120.24, 120.02, 119.74, 109.76, 108.91, 107.44, 105.94, 61.46, 52.43, 50.41, 28.57. **HRMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_3\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 631,2218; gefunden, 631,2218.



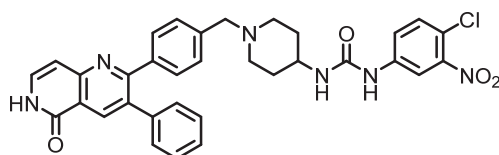
Darstellung von Benzyl(4-chlor-3-nitrophenyl)carbamate (37). 2,0 g **36** (11,5 mmol) und 1,0 g NaHCO_3 (12,7 mmol) wurden in 20 mL THF gelöst. 1,8 mL Chlorameisensäurebenzylester (12,7 mmol) wurden hinzugegeben und die Reaktionsmischung für fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Reaktionslösung mit einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung gewaschen und das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurden 2,5 g des gewünschten Produkts (8,0 mmol, 70 %) über Säulenchromatographie erhalten (20 % EtOAc/Pet). **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.4 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.71-7.65 (m, 2H), 7.29-7.46 (m, 6H), 5.19 (s, 1H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 153.7, 147.86, 139.71, 136.54, 132.56, 129.32, 129.05, 128.76, 128.5, 126.87, 123.48. **LCMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 347,20; nicht ionisierbar.



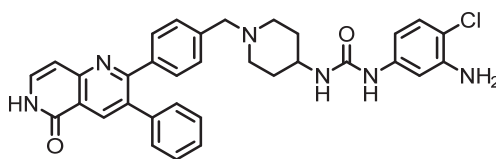
Darstellung von tert-Butyl-4-(3-(4-chlor-3-nitrophenyl)ureido)piperidin-1-carboxylat (40). 1,4 g **37**, 1,1 g 1-Boc-4-aminopiperidin (5,5 mmol), 943 mg K_2CO_3 (6,8 mmol) wurden in 15 mL DMF suspendiert und für 90 min bei 130 °C in einem Autoklavengefäß erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser und gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen und das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, im Vakuum eingedunstet und über Säulenchromatographie (1 % MeOH/DCM) gereinigt. Es wurden 737 mg des gewünschten Produkts (1,8 mmol, 40 %) erhalten. **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.95 (s, 1H), 8.25 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.6 - 7.56 (m, 1H), 7.56 - 7.52 (m, 1H), 6.44 (s, 1H), 3.82 (d, $J = 13.2$, 2H), 3.69-3.59 (m, 1H), 3.32 (s, 2H), 1.78 (dd, $J = 12.7$ Hz, 3.3 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.28 (dd, $J = 14.8$ Hz, 12.3 Hz, 2H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 154.40, 147.93, 141.04, 132.13, 122.95, 116.25, 114.07, 79.12, 55.38, 46.83, 32.16, 28.55. **HRMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 399,1428; gefunden, 399,1429.



Darstellung von 1-(4-Chlor-3-Nitrophenyl)-3-piperidin-4-yl)harnstoff (38). 1,2 g **40** wurden mit 15 mL HCl in 1,4-Dioxan (4 N) versetzt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung gewaschen und das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. 595 mg des gewünschten Produkts (2,0 mmol, 68 %) wurden ohne weitere Reinigung erhalten. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.93 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 3.78-3.37 (m, 2H), 3.23-3.15 (m, 2H), 2.91 (dd, *J* = 17.1, 6.6 Hz, 2H), 1.96- 1.87 (m, 2H), 1.85 (s, 1H), 1.61-1.51 (m, 2H). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154.84, 147.9, 141.37, 132.1, 122.74, 115.94, 113.75, 44.58, 42.6, 29.65. **HRMS (m/z)** berechnet für C₁₂H₁₆N₄O₃Cl [M+H]⁺, 299,0909; gefunden, 299,0905.

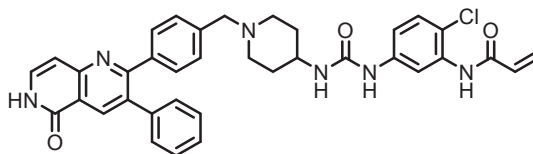


Darstellung von 1-(4-Chlor-3-nitrophenyl)-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)harnstoff (41). **1** (300 mg, 0,9 mmol) und **38** (348 mg, 1,2 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und ergaben 95 mg des gewünschten Produkts (0,2 mmol, 17 %). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.60 (d, 1H, *J* = 4.3 Hz), 8.96 (s, 1H), 8.37 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz), 8.25 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz), 7.58 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz), 7.54-7.47 (m, 2H), 7.36-7.27 (m, 5H), 7.26-7.18 (m, 4H), 6.68 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 6.39 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 3.51-3.41 (m, 3H), 2.68 (d, 2H, *J* = 9.9 Hz), 2.04 (t, 2H, *J* = 10.2 Hz), 1.78 (d, 2H, *J* = 10.1 Hz), 1.46-1.35 (m, 2H). **¹³C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.66, 154.49, 147.92, 141.06, 139.39, 138.56, 137.27, 133.98, 132.12, 130.10, 129.84, 128.89, 128.67, 127.92, 122.85, 116.16, 113.96, 106.37, 62.18, 52.16, 49.07, 32.28. **HRMS (m/z)** berechnet für C₃₃H₃₀N₆O₄Cl [M+H]⁺, 609,2011; gefunden, 609,2026.



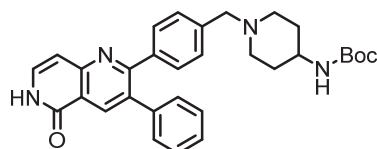
42

Darstellung von 1-(3-Amino-4-Chlorphenyl)-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)harnstoff (42). **41** (93 mg, 0,2 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift C umgesetzt und ergab 88 mg des gewünschten Produkts (0,2 mmol, quantitativ). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.61 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.53-7.47 (m, 1H), 7.36-7.28 (m, 6H), 7.28-7.20 (m, 4H), 6.97 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.9 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 6.68 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 6.55 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H), 6.15 (s, 1H), 5.21 (s, 2H), 3.56 (s, 1H), 3.46 (m, 2H), 2.75 (s, 2H), 1.81 (d, $J = 10.1$ Hz, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.24 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 162.46, 154.85, 153.42, 145.09, 140.47, 139.44, 138.01, 138.43, 137.35, 134.19, 134.04, 130.17, 129.89, 129.23, 128.9, 128.31, 120.7, 110.09, 107.42, 106.45, 104.82, 74, 70.04, 64.38, 25.67. **HRMS** (m/z) berechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{ClN}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 579.22698; gefunden: 579,22680.



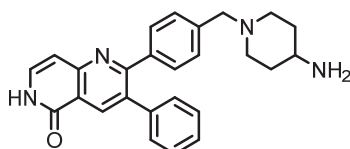
43

Darstellung von N-(2-chlor-5-(3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)ureido)phenyl)acrylamid (43). **42** (75 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und ergab 48 mg des gewünschten Produkts (0,1 mol, 58 %). $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.57 (s, 1H), 9.59 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.51 – 7.48 (m, 1H), 7.34 – 7.29 (m, 8H), 7.26 – 7.20 (m, 4H), 6.68 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.59 (dt, $J = 17.2, 8.7$ Hz, 1H), 6.26 (dd, $J = 17.0, 1.9$ Hz, 1H), 3.45 (b, 3H), 2.65 (dd, $J = 17.1, 9.9$ Hz, 2H), 2.09 – 2.00 (b, 2H), 1.77 (d, $J = 20.7$ Hz, 2H), 1.42 – 1.35 (b, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (176 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.37, 161.99, 161.20, 154.27, 152.92, 139.69, 139.02, 138.12, 136.79, 134.62, 133.72, 133.51, 131.45, 129.65, 129.38, 129.26, 128.42, 128.21, 127.46, 127.31, 120.26, 117.98, 115.54, 114.90, 105.90, 61.72, 51.67, 46.16, 32.06. **HRMS** (m/z) berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{34}\text{ClN}_6\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 633,2375; gefunden, 633,2375.



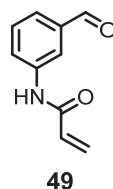
46

Darstellung von tert-Butyl(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)carbamate (46). **1** (413 mg, 1,3 mmol) und **45** (329 mg, 1,6 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und ergaben 277 mg des gewünschten Produkts (0,5 mmol, 43 %). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.62 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.50 (dt, *J* = 14.3, 7.2 Hz, 1H), 7.37 – 7.29 (m, 5H), 7.29 – 7.20 (m, 4H), 6.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.65 (b, 1H), 3.39 – 3.26 (m, 4H), 2.85 (b, 2H), 1.73 – 1.69 (m, 2H), 1.44 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H), 1.37 (s, 9H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.67, 162.46, 161.64, 155.29, 153.37, 139.47, 138.62, 137.26, 134.16, 133.98, 130.10, 129.84, 128.88, 128.72, 127.92, 120.70, 106.37, 77.90, 62.04, 52.51, 47.84, 32.18, 28.73. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₃₁H₃₄N₄O₃ [M+H]⁺, 511,26; gefunden, 511,17.

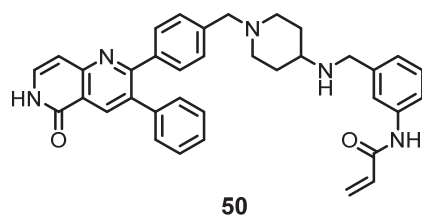


47

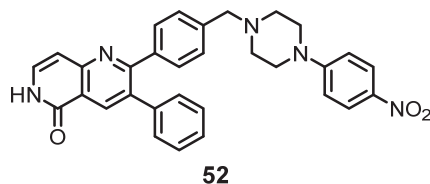
Darstellung von 2-(4-((4-Aminopiperidin-1-yl)methyl)phenyl)-3-phenyl-1,6-naphthyridin-5(6H)-on (46). **46** (313 mg, 0,6 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und ergab 231 mg des gewünschten Produkts (0,6 mmol, 92 %). **¹H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.75 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.55 – 7.53 (m, 1H), 7.42 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.35 – 7.32 (m, 3H), 7.26 – 7.23 (m, 2H), 6.75 – 6.71 (m, 1H), 6.13 (b, 2H), 4.25 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.31 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H), 3.26 – 3.20 (m, 1H), 3.00 (dd, *J* = 22.8, 10.7 Hz, 2H), 2.12 (d, *J* = 11.9 Hz, 2H), 2.05 – 1.97 (m, 2H). **¹³C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.85, 160.32, 152.58, 140.06, 138.54, 137.59, 134.30, 134.00, 131.12, 130.62, 130.36, 130.17, 130.13, 129.59, 128.62, 127.79, 120.76, 105.28, 66.47, 49.55, 45.38, 26.83. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₂₆H₂₆N₄O [M+H]⁺, 511,21; gefunden, 411,20.



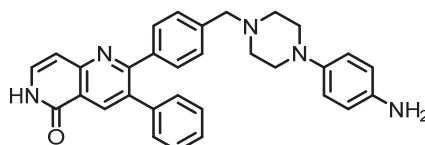
Darstellung von *N*-(3-formylphenyl)acrylamid (49). 300 mg 3-Nitrobenzaldehyd (**48**, 2,0 mmol) wurde in 20 mL MeOH gelöst und Zinn(II)chlorid (1,5 g, 7,9 mmol) hinzugegeben. Daraufhin wurde die Reaktionsmischung für eine Stunde refluxiert. Nach Abkühlen wurde die Reaktionsmischung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung neutralisiert, das Präzipitat abgefiltert und das Produkt mit DCM aus dem Filtrat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von etwa 20 mL eingengt. DIPEA (1,0 mL, 6,0 mmol) und Acryloylchlorid (178 µL, 2,3 mmol) wurden hinzugegeben und das Gemisch für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Waschen mit NH₄Cl-Lösung und Extraktion mit DCM wurde das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen entfernt und das gewünschte Produkt (302 mg, 1,7 mmol, 87 %) über Säulenchromatographie erhalten (1-10 % MeOH/DCM + 1 % NH₃). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.44 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.57 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.45 (dd, *J* = 17.0, 10.1 Hz, 1H), 6.30 (dd, *J* = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.80 (dd, *J* = 10.1, 1.7 Hz, 1H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 193.11, 163.50, 139.83, 136.79, 131.58, 129.80, 127.60, 125.27, 125.07, 119.11. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₁₀H₉NO₂ [M+H]⁺, 176,06; gefunden, 176,02.



Darstellung von *N*-(3-(((1-(4-(5-Oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)-piperidin-4-yl)amino)methyl)phenyl)acrylamid (50). **46** (200 mg, 0,5 mmol) und **49** (97 mg, 0,5 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und ergaben 37 mg des gewünschten Produkts (0,06 mmol, 13 %). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.60 (b, 1H), 10.10 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.61 – 7.56 (m, 2H), 7.49 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.33 – 7.27 (m, 5H), 7.26 – 7.16 (m, 6H), 7.02 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.44 (dd, *J* = 17.0, 10.1 Hz, 1H), 6.24 (dd, *J* = 17.0, 1.8 Hz, 1H), 5.73 (dd, *J* = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.29 (b, 2H), 2.71 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.38 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H), 1.90 (t, *J* = 10.7 Hz, 2H), 1.79 (d, *J* = 10.6 Hz, 2H), 1.28 (dd, *J* = 20.5, 10.2 Hz, 2H). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.04, 161.99, 161.20, 152.91, 141.85, 139.11, 139.03, 138.87, 138.00, 136.77, 133.69, 133.48, 131.96, 129.57, 129.36, 128.39, 128.14, 127.43, 126.68, 123.08, 120.22, 118.82, 117.58, 105.90, 61.77, 53.75, 51.85, 49.82, 32.02. **HRMS (*m/z*)** berechnet für C₃₆H₃₅N₅O₂ [M+H]⁺, 570,2864; gefunden, 570,2861.

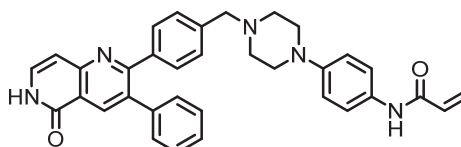


Darstellung von 2-(4-((4-(4-Nitrophenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenyl)-3-phenyl-1,6-naphthyridin-5(6H)-on (52). **1** (100 mg, 0,3 mmol) und 1-(4-Nitrophenyl)piperazin (96 mg, 0,4 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung weiter verwendet. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₃₂H₂₉N₄O₃ [M+H]⁺, 518,21; gefunden, 518,12.



53

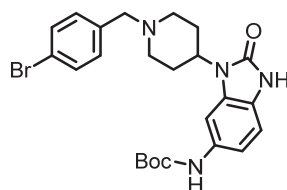
Darstellung von 2-(4-((4-(4-Aminophenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenyl)-3-phenyl-1,6-naphthyridin-5(6H)-on (53). 52 (147 mg, 0,3 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift C umgesetzt und ergab 60 mg des gewünschten Produkts (0,1 mmol, 40 % über zwei Schritte). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 8.64 (s, 1H), 7.39 (dd, $J = 9.6, 7.8\text{Hz}$, 4H), 7.28 (dt, $J = 12.8, 8.5\text{Hz}$, 5H), 7.21 (dd, $J = 6.4, 2.8\text{Hz}$, 2H), 6.89 (d, $J = 7.4\text{Hz}$, 1H), 6.84 (d, $J = 7.9\text{Hz}$, 2H), 6.72 (d, $J = 7.9\text{Hz}$, 2H), 4.64 (s, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.06 (s, 4H), 2.64 (s, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) 163.90, 162.85, 153.52, 139.12, 138.94, 138.07, 137.96, 135.58, 132.45, 130.24, 129.89, 129.56, 128.63, 127.87, 121.15, 119.16, 117.12, 107.66, 62.75, 53.23, 51.12. **HRMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 488,2444; gefunden, 488,2446.



54

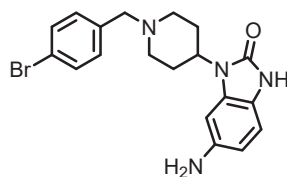
Darstellung von N-(4-(4-(4-(5-Oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperazin-1-yl)phenyl)acrylamid (54). 53 (45 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und ergab 21 mg des gewünschten Produkts (0,04 mmol, 42 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{MeOD-}d_4$) δ 8.62 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.49 (d, $J = 9.0\text{Hz}$, 2H), 7.42 (d, $J = 7.4\text{Hz}$, 1H), 7.37 (d, $J = 8.1\text{Hz}$, 2H), 7.32 - 7.24 (m, 5H), 7.23 - 7.18 (m, 2H), 6.92 (d, $J = 9.1\text{Hz}$, 2H), 6.86 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 1H), 6.37 (dd, $J = 17.0, 9.7\text{Hz}$, 1H), 6.31 (dd, $J = 16.9, 2.1\text{Hz}$, 1H), 5.70 (dd, $J = 9.7, 2.1\text{Hz}$, 1H), 3.59 (s, 2H), 3.16 (s, 4H), 2.62 (s, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{MeOD-}d_4$, CDCl_3) δ 164.95, 163.92, 153.54, 140.32, 139.17, 138.94, 137.96, 135.60, 132.64, 132.59, 131.56, 130.19, 129.86, 129.47, 128.59, 127.84, 127.09, 126.49, 121.67, 121.10, 116.89, 107.45, 62.66, 53.89, 49.58. **HRMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 542,2550; gefunden, 542,2551.

Grundgerüst-Derivatisierung



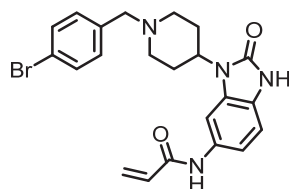
56

Darstellung von *tert*-Butyl(3-(1-(4-brombenzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)carbamat (56). **2** (1,0 g, 3,0 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und ergab 850 mg des gewünschten Produkts (1,7 mmol, 56 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.68 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 8.16 – 8.05 (m, 1H), 7.53 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.32 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.06 – 7.00 (m, 1H), 6.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.14 – 4.06 (m, 1H), 3.85 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 3.53 (s, $J = 11.3$ Hz, 2H), 3.17 (s, 1H), 2.94 (d, $J = 11.3$ Hz, 2H), 2.32 (qd, $J = 12.3, 3.5$ Hz, 2H), 2.13 (t, $J = 11.2$ Hz, 2H), 1.63 (d, $J = 9.8$ Hz, 2H), 1.48 (s, 8H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 163.05, 160.75, 153.98, 152.95, 133.07, 131.06, 130.93, 129.04, 123.43, 119.97, 108.52, 78.68, 60.79, 54.89, 49.89, 28.45, 28.20. **LCMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_3\text{Br}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 501,09; gefunden, 501,14.



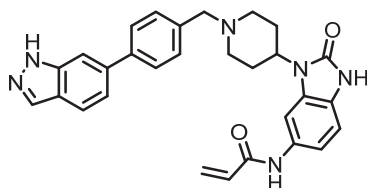
57

Darstellung von 6-Amino-1-(1-(4-brombenzyl)piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-on (57). **56** (850 mg, 1,7 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und ergab 510 mg des gewünschten Produkts (1,3 mmol, 75 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.31 (s, 1H), 7.54 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.63 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.54 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 6.21 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 1H), 4.74 (b, 2H), 4.09 – 4.01 (m, 1H), 3.49 (s, 2H), 2.92 (d, $J = 11.3$ Hz, 2H), 2.28 (qt, $J = 16.0, 7.9$ Hz, 2H), 2.06 (t, $J = 11.4$ Hz, 2H), 1.59 (d, $J = 9.7$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 153.97, 143.16, 138.01, 131.12, 130.99, 129.92, 119.97, 119.08, 109.15, 106.78, 95.85, 61.11, 54.97, 52.69, 49.77, 28.66. **LCMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{OBr}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 401,09; gefunden, 401,15.



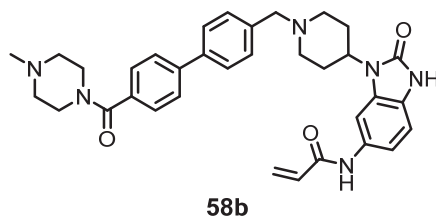
58b

Darstellung von *N*-(3-(1-(4-Brombenzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid (55). 57 (500 mg, 1,2 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und ergab 498 mg des gewünschten Produkts (1,1 mmol, 88 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.86 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.54 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.47 (dd, $J = 16.9, 10.1$ Hz, 1H), 6.25 (dd, $J = 17.0, 1.8$ Hz, 1H), 5.73 (dd, $J = 10.2, 1.8$ Hz, 1H), 4.11 (t, $J = 12.2$ Hz, 1H), 3.51 (s, 2H), 2.94 (d, $J = 10.2$ Hz, 2H), 2.31 (dd, $J = 21.9, 11.4$ Hz, 2H), 2.10 (t, $J = 11.0$ Hz, 2H), 1.65 (d, $J = 10.7$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 162.84, 154.02, 137.90, 132.73, 132.13, 131.14, 131.08, 128.98, 126.30, 124.49, 120.00, 112.18, 108.69, 100.93, 61.06, 53.28, 52.58, 50.12, 28.68. **LCMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_2\text{Br}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 455,10; gefunden, 455,17.

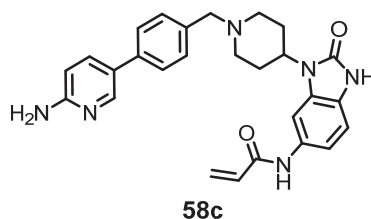


58a

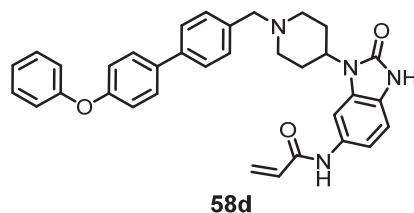
Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(1H-Indazol-6-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid (58a). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 13 mg des gewünschten Produkts (0,03 mmol, 24 %). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.14 (s, 1H), 10.82 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 8.10 (s, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.77 – 7.71 (m, 4H), 7.53 – 7.41 (m, 3H), 6.93 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.43 (dd, $J = 16.9, 10.1$ Hz, 1H), 6.26 (dd, $J = 17.0, 1.9$ Hz, 1H), 5.74 (dd, $J = 10.1, 1.9$ Hz, 1H), 4.16 (b, 1H), 3.67 – 3.56 (m, 2H), 3.04 (b, 2H), 2.31 (b, 2H), 2.12 (b, 2H), 1.66 (b, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.26, 154.48, 141.04, 133.86, 133.10, 132.51, 130.12, 129.47, 127.54, 126.83, 124.98, 122.63, 121.43, 120.53, 112.66, 109.14, 107.99, 101.44, 62.04, 59.53, 52.02, 29.15. **LCMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 493,23; gefunden, 493,11.



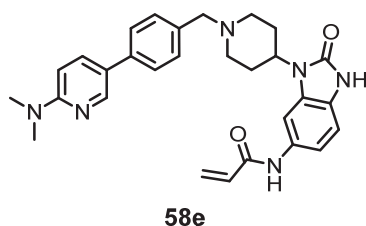
Darstellung von *N*-(3-(1-((4'-(4-Methylpiperazin-1-carbonyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58b). 55 (30 mg, 0,07 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 21 mg des gewünschten Produkts (0,04 mmol, 55 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.83 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 7.76 – 7.72 (m, 3H), 7.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.49 – 7.44 (m, 4H), 7.27 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.42 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J* = 17.0, 1.8 Hz, 1H), 5.74 (dd, *J* = 10.2, 1.7 Hz, 1H), 4.14 (ddd, *J* = 16.2, 12.2, 3.8 Hz, 1H), 3.59 (s, 2H), 3.35 (s, 4H), 3.00 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H), 2.40 – 2.25 (m, 6H), 2.19 (s, 3H), 2.12 (t, *J* = 11.3 Hz, 2H), 1.67 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.77, 162.80, 154.03, 141.09, 138.20, 138.05, 134.73, 132.68, 132.06, 129.61, 129.00, 127.71, 126.70, 126.60, 126.44, 124.51, 112.14, 108.71, 100.95, 61.61, 52.74, 50.16, 45.67, 41.53, 28.75. HRMS (*m/z*) berechnet für C₃₄H₃₉N₆O₃ [M+H]⁺, 579,3078; gefunden, 579,3075.



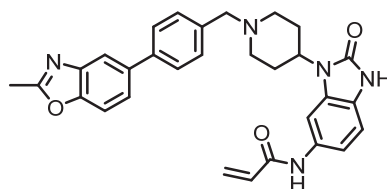
Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(6-Aminopyridin-3-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58c). 55 (30 mg, 0,07 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 21 mg des gewünschten Produkts (0,04 mmol, 68 %). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.80 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.69 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 7.58 – 7.52 (m, 3H), 7.38 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.91 (dd, *J* = 8.8, 5.6 Hz, 1H), 6.42 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 6.03 (s, 2H), 5.73 (dd, *J* = 10.2, 1.7 Hz, 1H), 4.12 (b, 1H), 3.57 (s, 2H), 3.00 (b, 2H), 2.36 – 2.26 (m, 2H), 2.13 (b, 2H), 1.67 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.63, 158.98, 153.85, 145.43, 135.15, 134.36, 132.48, 131.89, 129.45, 128.82, 126.19, 125.53, 125.05, 124.34, 112.02, 108.50, 107.84, 100.81, 61.39, 61.21, 52.42, 28.42. LCMS (*m/z*) berechnet für C₂₇H₂₉N₆O₂ [M+H]⁺, 469,23; gefunden, 469,17.



Darstellung von *N*-(2-Oxo-3-(1-((4'-phenoxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58d). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 29 mg des gewünschten Produkts (0,05 mmol, 48 %). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.81 (s, *J* = 47.0 Hz, 1H), 10.11 (s, *J* = 14.8 Hz, 1H), 7.70 – 7.65 (m, 2H), 7.63 – 7.58 (m, 2H), 7.44 – 7.37 (m, 5H), 7.16 (dd, *J* = 14.2, 7.1 Hz, 1H), 7.09 – 7.02 (m, 5H), 6.43 (dd, *J* = 17.0, 10.1 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J* = 17.0, 1.8 Hz, 1H), 5.73 (dd, *J* = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 4.17 – 4.09 (m, 1H), 3.57 (s, *J* = 8.5 Hz, 2H), 2.99 (t, *J* = 11.9 Hz, 2H), 2.36 – 2.27 (m, 2H), 2.11 (t, *J* = 11.5 Hz, 2H), 1.66 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.92, 156.61, 156.42, 154.15, 138.33, 137.44, 136.28, 135.34, 132.79, 132.19, 130.23, 130.20, 129.64, 129.59, 129.12, 128.32, 126.46, 126.43, 124.63, 123.82, 123.77, 119.19, 118.99, 118.96, 117.26, 112.27, 108.79, 101.08, 61.72, 52.81, 50.30, 28.84. LCMS (*m/z*) berechnet für C₃₄H₃₃N₄O₃ [M+H]⁺, 545,25; gefunden, 545,18

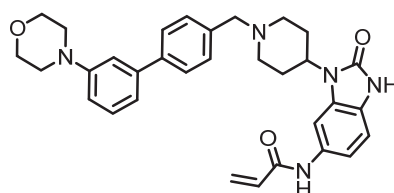


Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(6-(Dimethylamino)pyridin-3-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58e). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 33 mg des gewünschten Produkts (0,07 mmol, 61 %). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.82 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 8.43 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.60 – 7.53 (m, 2H), 7.41 – 7.34 (m, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.43 (dd, *J* = 16.8, 10.2 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 5.74 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 4.18 – 4.10 (m, 1H), 3.55 (s, 2H), 3.06 (s, 6H), 2.99 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.32 (dd, *J* = 19.6, 10.2 Hz, 2H), 2.10 (t, *J* = 13.1 Hz, 2H), 1.66 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.79, 158.30, 154.02, 145.40, 136.60, 136.44, 135.32, 132.66, 132.05, 129.54, 129.49, 128.98, 126.34, 125.29, 124.50, 123.21, 112.13, 108.65, 105.75, 100.95, 61.65, 52.64, 50.17, 37.70, 28.72. LCMS (*m/z*) berechnet für C₂₉H₃₃N₆O₂ [M+H]⁺, 497,26; gefunden, 497,17.



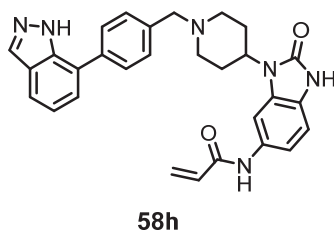
58f

Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(2-Methylbenzo[*d*]oxazol-5-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58f). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 33 mg des gewünschten Produkts (0,07 mmol, 56 %). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.83 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.92 (s, $J = 1.0$ Hz, 1H), 7.76 – 7.66 (m, 4H), 7.63 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 6.42 (dd, $J = 16.9, 10.1$ Hz, 1H), 6.26 (dd, $J = 17.0, 1.7$ Hz, 1H), 5.74 (dd, $J = 10.2, 1.6$ Hz, 1H), 4.18 – 4.10 (m, 1H), 3.58 (s, 2H), 3.01 (d, $J = 10.9$ Hz, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.32 (dt, $J = 12.2, 9.4$ Hz, 2H), 2.12 (t, $J = 11.3$ Hz, 2H), 1.67 (d, $J = 10.4$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.63, 163.64, 162.82, 154.05, 151.92, 149.98, 141.96, 140.81, 138.86, 137.48, 136.85, 132.70, 132.07, 130.69, 129.58, 129.00, 126.97, 126.44, 124.93, 124.52, 123.62, 117.04, 112.16, 110.63, 109.45, 108.71, 100.98, 61.64, 52.73, 50.18, 28.76, 14.24, 14.14. **LCMS (*m/z*)** berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 508,23; gefunden, 508,15.

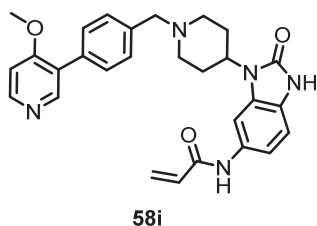


58g

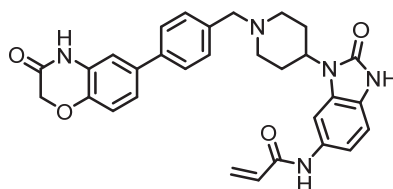
Darstellung von *N*-(3-(1-((3'-Morpholino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58g). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 33 mg des gewünschten Produkts (0,07 mmol, 61 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.84 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 7.63 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.41 (dd, $J = 11.9, 4.5$ Hz, 2H), 7.32 – 7.23 (m, 3H), 7.18 (dd, $J = 14.1, 6.6$ Hz, 2H), 6.99 – 6.91 (m, 2H), 6.43 (dd, $J = 16.9, 10.1$ Hz, 1H), 6.26 (d, $J = 17.0$ Hz, 1H), 5.74 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.14 (b, 1H), 3.57 (s, 2H), 3.37 (s, 4H), 3.21 – 3.15 (m, 4H), 3.00 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.37 – 2.27 (m, 2H), 2.11 (b, 2H), 1.67 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 162.83, 154.05, 151.64, 150.37, 140.96, 132.70, 132.07, 129.53, 129.00, 128.06, 126.74, 126.44, 125.36, 124.53, 120.98, 117.71, 117.15, 114.28, 113.45, 112.18, 108.73, 66.21, 61.64, 52.67, 48.78, 48.51, 28.72. **LCMS (*m/z*)** berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 538,27; gefunden, 538,19.



Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(1*H*-Indazol-7-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58h). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 14 mg des gewünschten Produkts (0,03 mmol, 26 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.23 (s, 1H), 10.88 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.86 – 7.73 (m, 4H), 7.59 (b, 2H), 7.48 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.33 – 7.24 (m, 2H), 6.99 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.49 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.31 (dd, *J* = 16.9, 1.8 Hz, 1H), 5.80 (dd, *J* = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 4.27 (b, 1H), 3.69 (s, 2H), 3.13 (b, 2H), 2.28 – 2.20 (m, 2H), 2.05 (b, 2H), 1.75 (b, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.60, 153.81, 140.28, 137.79, 131.82, 129.42, 129.37, 128.79, 127.95, 127.81, 126.18, 124.32, 124.22, 120.78, 120.74, 119.18, 111.72, 110.20, 106.40, 62.07, 57.97, 52.51, 28.71. LCMS (*m/z*) berechnet für C₂₉H₂₉N₆O₂ [M+H]⁺, 493,32; gefunden, 493,20.

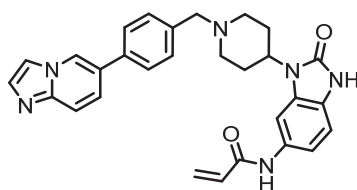


Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(4-Methoxyppyridin-3-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58i). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 25 mg des gewünschten Produkts (0,05 mmol, 47 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.81 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.45 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.28 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.42 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 16.9, 2.0 Hz, 1H), 5.74 (dd, *J* = 10.0, 2.0 Hz, 1H), 4.19 – 4.10 (m, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.58 (s, 2H), 3.02 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.36 – 2.28 (m, 2H), 2.13 (t, *J* = 11.2 Hz, 2H), 1.68 (d, *J* = 10.0 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.56, 161.85, 153.79, 150.25, 149.82, 137.57, 133.06, 132.43, 131.83, 128.94, 128.60, 126.13, 125.20, 124.28, 111.91, 108.44, 107.09, 100.73, 61.49, 55.40, 52.52, 49.94, 28.50. LCMS (*m/z*) berechnet für C₂₈H₃₀N₅O₃ [M+H]⁺, 484,23; gefunden, 484,15.



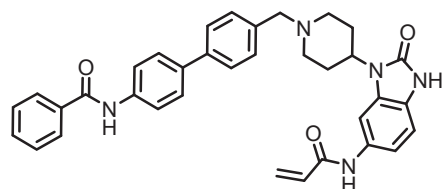
58j

Darstellung von *N*-(2-Oxo-3-(1-(4-(3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-6-yl)-benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58j). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 36 mg des gewünschten Produkts (0,07 mmol, 63 %). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.84 (s, *J* = 7.5 Hz, 1H), 10.81 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 7.75 (b, 1H), 7.61 (b, 2H), 7.48 – 7.36 (m, 2H), 7.28 (b, 3H), 6.95 (dd, *J* = 23.6, 8.1 Hz, 2H), 6.43 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.74 (dd, *J* = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.21 (b, 1H), 3.54 (b, 2H), 3.00 (b, 2H), 2.31 (b, 2H), 2.09 (b, 2H), 1.67 (b, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.82, 162.82, 154.02, 143.70, 142.66, 132.04, 129.53, 129.00, 126.45, 126.24, 124.55, 120.69, 120.67, 119.03, 116.27, 114.21, 66.81, 61.70, 57.89, 52.71, 29.09. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₃₀H₃₀N₅O₄ [M+H]⁺, 524,22; gefunden, 524,14.



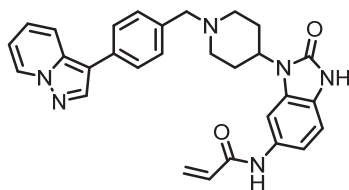
58k

Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(Imidazo[1,2-*a*]pyridin-6-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58k). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 32 mg des gewünschten Produkts (0,07 mmol, 59 %). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.85 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.72 – 7.64 (m, 2H), 7.62 – 7.57 (m, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.27 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.43 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.27 (dd, *J* = 17.0, 1.9 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J* = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 4.18 – 4.11 (m, 1H), 3.59 (s, 1H), 3.01 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 2.33 (dt, *J* = 12.2, 9.1 Hz, 1H), 2.13 (t, *J* = 11.4 Hz, 1H), 1.67 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.83, 154.05, 143.84, 137.94, 135.46, 133.70, 132.70, 132.07, 129.71, 129.01, 126.42, 124.89, 124.53, 124.47, 124.10, 116.93, 113.64, 112.16, 108.73, 100.98, 61.58, 52.70, 50.17, 28.74. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₂₉H₂₉N₆O₂ [M+H]⁺, 493,23; gefunden, 493,26.



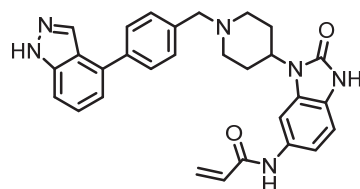
58l

Darstellung von *N*-(4'-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)benzamid (58l). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 44 mg des gewünschten Produkts (0,08 mmol, 70 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.89 (s, 1H), 10.40 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 8.01 – 7.95 (m, 3H), 7.92 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.85 – 7.71 (m, 5H), 7.59 (dt, J = 14.9, 7.2 Hz, 5H), 6.95 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.45 (dd, J = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.25 (dd, J = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.75 (dd, J = 10.2, 1.8 Hz, 1H), 4.39 (b, 2H), 3.60 – 3.52 (m, 1H), 3.24 (b, 2H), 2.62 (b, 2H), 1.95 (b, 2H), 1.24 (b, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165.66, 162.93, 162.87, 154.01, 134.92, 131.97, 131.72, 129.05, 128.57, 128.48, 127.88, 127.74, 126.99, 126.64, 126.52, 124.67, 120.67, 120.65, 108.85, 61.71, 58.28, 54.43, 25.82. **LCMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 572,26; gefunden, 572,15.



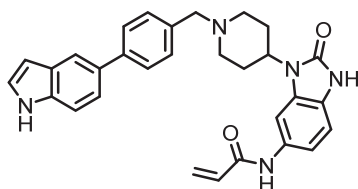
58m

Darstellung von *N*-(2-Oxo-3-(1-(4-(pyrazolo[1,5-*a*]pyridin-3-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58m). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 31 mg des gewünschten Produkts (0,06 mmol, 57 %). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.83 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 8.73 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.99 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.74 (s, J = 12.3 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.43 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.34 – 7.24 (m, 2H), 6.97 – 6.90 (m, 2H), 6.42 (dd, J = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.25 (dd, J = 17.0, 1.9 Hz, 1H), 5.74 (dd, J = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 4.14 (t, J = 12.2 Hz, 1H), 3.57 (s, 2H), 3.02 (d, J = 10.4 Hz, 2H), 2.37 – 2.27 (m, 2H), 2.12 (t, J = 11.2 Hz, 2H), 1.67 (d, J = 10.6 Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 162.81, 154.04, 140.34, 136.05, 132.68, 132.06, 131.50, 129.73, 129.42, 129.00, 126.44, 126.28, 124.74, 124.52, 117.42, 112.52, 112.16, 111.52, 108.71, 100.98, 61.76, 52.69, 50.18, 28.74. **LCMS (m/z)** berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 493,23; gefunden, 493,16.



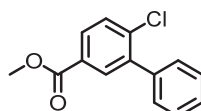
58n

Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(1*H*-indazol-4-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58n). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 22 mg des gewünschten Produkts (0,04 mmol, 41 %). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.17 (s, 1H), 10.82 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.75 – 7.65 (m, 2H), 7.57 – 7.49 (m, 2H), 7.42 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.27 – 7.20 (m, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.43 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 16.9, 1.8 Hz, 1H), 5.74 (dd, *J* = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 4.24 – 4.12 (m, 1H), 3.64 (s, 2H), 3.07 (s, 2H), 2.37 (b, 2H), 2.22 – 2.13 (m, 2H), 1.70 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.29, 154.49, 138.47, 132.50, 130.10, 129.48, 128.64, 128.49, 126.88, 125.86, 125.71, 125.00, 124.43, 122.46, 121.42, 119.86, 116.53, 112.57, 112.40, 62.73, 59.79, 53.24, 29.49. **HRMS** (*m/z*) berechnet für C₂₉H₂₉N₆O₂ [M+H]⁺, 493,2347; gefunden, 493,2341.



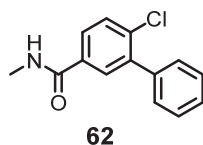
58o

Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(1*H*-indol-5-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid (58o). 55 (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt. Das entstandene Toluolsulfonamid-Intermediat wurde ohne weitere Aufreinigung mit 157 mg TBAF (0,6 mmol) in 5 mL THF versetzt und für eine Stunde refluxiert.²³⁷ Die Reaktionsmischung wurde mit einer gesättigten Na₂SO₄-Lösung gewaschen und das Produkt mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, im Vakuum eingeeengt und über HPLC (C18, 10-100 % MeCN/H₂O) 14 mg des finalen Produkts isoliert (0,03 mmol, 28 %). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.45 (s, 1H), 10.86 (s, 1H), 10.31 (b, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 9.6 Hz, 3H), 7.76 (s, 1H), 7.58 (s, 2H), 7.47 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.17 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.12 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.46 (dt, *J* = 21.9, 10.9 Hz, 1H), 6.22 (t, *J* = 15.6 Hz, 1H), 5.71 (dd, *J* = 12.8, 11.5 Hz, 1H), 4.44 (s, 1H), 4.34 (s, 2H), 3.52 (b, 2H), 3.23 (s, 2H), 2.65 (b, *J* = 21.7 Hz, 2H), 1.93 (b, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.99, 154.05, 137.43, 137.11, 132.86, 132.20, 131.97, 128.95, 126.64, 126.37, 125.60, 124.96, 124.69, 124.25, 121.71, 119.96, 119.15, 114.95, 113.04, 112.23, 108.93, 101.38, 59.26, 52.50, 51.01, 29.15. HRMS (*m/z*) berechnet für C₃₀H₃₀N₅O₂ [M+H]⁺, 492,2394; gefunden, 492,2388.

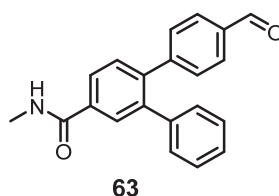


61

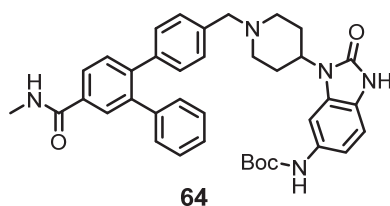
Darstellung von Methyl-6-chlor-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylat (61). 60 (325 mg, 1,3 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt und ergab 292 mg des gewünschten Produkts (1,2 mmol, 91 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.95 (dd, *J* = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.52 – 7.43 (m, 5H), 3.87 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.35, 140.24, 137.77, 136.51, 131.84, 130.60, 129.63, 129.18, 128.85, 128.47, 128.29, 52.50. LCMS (*m/z*) berechnet für C₁₄H₁₁O₂Cl [M+H]⁺, 247,04; nicht ionisierbar.



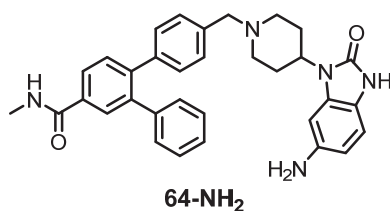
Darstellung von 6-Chlor-N-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-carboxamid (62). 370 mg **61** (1,5 mmol) wurden in einem MeOH/H₂O-Gemisch (1:1) resuspendiert und mit 216 mg LiOH (9,0 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde refluxiert, daraufhin mit 2 N wässriger HCl-Lösung angesäuert und das Produkt mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Zwischenprodukt wurde in DMF aufgenommen, mit 856 mg HATU (2,3 mmol) und 1,1 mL DIPEA (6,0 mmol) versetzt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurden 0,7 mL einer 2 M Methylamin-Lösung in MeOH hinzugegeben und die Reaktionsmischung für eine weitere Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer gesättigten NH₄Cl-Lösung gewaschen und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Über Säulenchromatographie (1-10 % MeOH/DCM) konnten 350 mg des gewünschten Produkts (1,4 mmol, 95 %) erhalten werden. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.60 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.84 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.52 – 7.43 (m, 5H), 2.78 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.37, 139.64, 138.24, 134.02, 133.54, 130.00, 129.31, 128.35, 128.07, 127.90, 26.32. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₁₄H₁₂NOCl [M+H]⁺, 246,06; gefunden, 246,06.



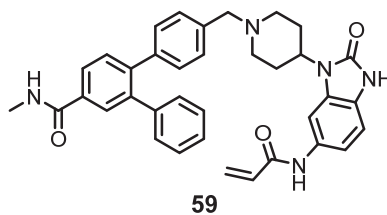
Darstellung von 4-Formyl-N-methyl-[1,1':2',1''-terphenyl]-4'-carboxamid (63). **62** (200 mg, 0,8 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift G umgesetzt. Es wurde ein Edukt-Produkt-Gemisch erhalten, das ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt wurde. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₂₁H₁₈NO₂ [M+H]⁺, 316,13; gefunden, 316,08.



Darstellung von *tert*-Butyl(3-(1-((4'-(methylcarbamoyl)-[1,1':2',1''-terphenyl]-4-yl)-methyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)carbamat (64). 63 (252 mg, 0,8 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und ergab 182 mg des gewünschten Produkts (0,3 mmol, 36 % über 2 Schritte). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.70 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.58 (q, *J* = 4.6 Hz, 1H), 8.07 (s, 2H), 7.91 – 7.87 (m, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.38 (s, 2H), 7.25 (t, *J* = 8.6 Hz, 3H), 7.15 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.06 – 7.00 (m, 2H), 6.86 – 6.83 (m, 2H), 4.09 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H), 3.51 (s, 1H), 2.92 (d, *J* = 10.8 Hz, 2H), 2.81 (d, *J* = 4.4 Hz, 3H), 2.29 (dd, *J* = 21.6, 12.2 Hz, 2H), 1.80 – 1.70 (m, 2H), 1.62 (d, *J* = 9.7 Hz, 2H), 1.46 (s, *J* = 1.8 Hz, 9H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.15, 160.82, 153.94, 152.97, 142.32, 139.88, 133.57, 133.17, 130.55, 129.59, 129.33, 129.14, 129.05, 128.54, 128.09, 126.92, 126.46, 123.45, 111.34, 108.65, 78.74, 61.33, 52.56, 49.74, 29.47, 28.21, 26.33. LCMS (*m/z*) berechnet für C₃₈H₄₂N₅O₄ [M+H]⁺, 632,32; gefunden, 632,19.

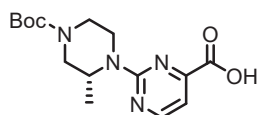


Darstellung von 4-((4-(6-amino-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)-*N*-methyl-[1,1':2',1''-terphenyl]-4'-carboxamid (64-NH₂). 64 (170 mg, 0,3 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und ergab 104 mg des gewünschten Produkts (0,2 mmol, 73 %). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.32 (s, 1H), 8.59 (q, *J* = 4.5 Hz, 1H), 8.05 (s, 2H), 7.93 – 7.86 (m, 1H), 7.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.27 – 7.22 (m, 4H), 7.13 (dd, *J* = 20.4, 6.9 Hz, 4H), 6.66 – 6.63 (m, 2H), 6.55 (s, 1H), 4.75 (b, 2H), 4.07 (b, 1H), 3.51 (b, 2H), 2.94 (b, 2H), 2.81 (d, *J* = 4.4 Hz, 3H), 2.29 (d, *J* = 10.4 Hz, 2H), 1.72 (t, *J* = 14.3 Hz, 2H), 1.60 (d, *J* = 9.7 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.15, 160.84, 153.87, 143.18, 140.62, 139.89, 133.60, 130.56, 129.89, 129.83, 129.60, 129.36, 129.16, 128.11, 126.95, 126.47, 119.07, 109.24, 106.91, 61.39, 57.97, 52.65, 49.49, 29.47, 28.20. LCMS (*m/z*) berechnet für C₃₃H₃₄N₅O₂ [M+H]⁺, 532,26; gefunden, 532,16.



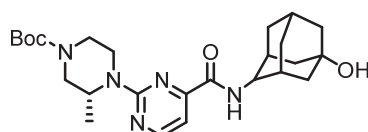
Darstellung von 4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)-N-methyl-[1,1':2',1''-terphenyl]-4'-carboxamid (59). **64** (50 mg, 0,1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und ergab 27 mg des gewünschten Produkts (0,05 mmol, 49 %). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.82 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.57 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.93 – 7.88 (m, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.30 – 7.20 (m, 6H), 7.15 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H), 6.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.42 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.25 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 5.74 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 4.19 (b, 1H), 3.70 (b, 2H), 3.04 (b, 2H), 2.82 (d, *J* = 4.3 Hz, 3H), 2.37 (b, 2H), 1.73 (b, 2H), 1.23 (b, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.98, 162.67, 153.86, 141.99, 140.40, 139.76, 133.54, 132.46, 131.89, 130.35, 129.44, 129.32, 128.97, 128.85, 128.80, 128.59, 127.93, 127.89, 126.80, 126.30, 126.22, 124.40, 120.43, 112.25, 108.57, 64.23, 57.10, 52.07, 28.06, 26.15. **HRMS (*m/z*)** berechnet für C₃₆H₃₆N₅O₃ [M+H]⁺, 586,2813; gefunden, 586,2809.

HSD11B1-Inhibitor SKI2852



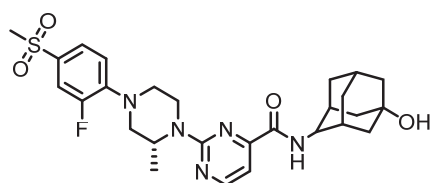
80

Darstellung von (R)-2-(4-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-4-carbonsäure (80). 1 g **78** (6,3 mmol) und 1,4 g **79** (6,9 mmol) wurden in 20 mL MeCN gelöst, 6,79 mL DIPEA (37,8 mmol) und 314 mg KI (1,9 mmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung unter Rühren über Nacht auf 80 °C erhitzt. Daraufhin wurde mit einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gewaschen und das Produkt mit DCM extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und 723 mg des gewünschten Produkts (2,2 mmol, 36 %) über Säulenchromatographie (1-10 % MeOH/DCM) isoliert. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.47 (b, 1H), 8.60 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.45 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 3.81 (b, 2H), 3.12 (d, *J* = 14.6 Hz, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.41 (s, 3H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.88, 161.06, 160.46, 156.52, 154.48, 109.01, 79.08, 49.09, 48.08, 46.27, 43.03, 28.19, 28.13. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₁₅H₂₃N₄O₄ [M+H]⁺, 323,16; gefunden, 323,90.



81

Darstellung von (R)-2-((4-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-N-((1*R*,2*S*,3*S*,5*S*,7*S*)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidin-4-carboxamid (81). 600 mg **80** (1,9 mmol) wurden in 5 mL DMF gelöst und 1,1 g HATU (2,8 mmol), 535 mg EDC · HCl (2,8 mmol) sowie 1,9 mL DIPEA (11,2 mmol) dazugegeben. Nach zehnmütigen Rühren bei Raumtemperatur wurde **x** (311 mg, 1,9 mmol) hinzugegeben und für weitere vier Stunden gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gewaschen und das Produkt mit 10 % MeOH/DCM extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet, im Vakuum eingeeengt und über Säulenchromatographie (1-10 % MeOH/DCM) aufgereinigt. Es wurden 298 mg des gewünschten Produkts (0,6 mmol, 34 %) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.62 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.78 (s, 1H), 4.49 (s, 1H), 4.37 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.96 – 3.92 (m, 1H), 3.83 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 3.19 (b, 2H), 2.08 (s, 3H), 1.73 (s, 4H), 1.66 (d, *J* = 12.6 Hz, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.24 (dd, *J* = 14.1, 6.7 Hz, 2H), 1.11 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.98, 160.56, 160.00, 157.09, 154.19, 106.33, 78.83, 65.22, 52.09, 45.02, 44.09, 44.05, 37.94, 33.05, 30.27, 30.20, 28.90, 27.91, 19.05. **LCMS (*m/z*)** berechnet für C₂₅H₃₈N₅O₄ [M+H]⁺, 472,28; gefunden, 472,08.



SKI2852

Darstellung von 2-((R)-4-(2-Fluor-4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-N-((1R,2S,3S,5S,7S)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidin-4-carboxamid (SKI2852).

280 mg **81** (0,6 mmol) wurden mit einer 25 %-igen TFA-Lösung in DCM versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, die Reaktionsmischung mit einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gewaschen und mit 10 % MeOH/DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel erneut evaporiert. Das Intermediat wurde in 5 mL Toluol aufgenommen, in ein Schlenkgefäß überführt, 457 mg CsCO₃ (2,4 mmol) sowie 103 mg XantPhos (0,2 mmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung für zehn Minuten mit Argon geflutet. Nach Zugabe von 13 mg Pd(AcO)₂ (0,1 mmol) wurde die Reaktionsmischung über Nacht bei 100 °C gerührt. Die Suspension wurde über Celite filtriert, mit einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gewaschen und das Produkt mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden *in vacuo* evaporiert und 222 mg des gewünschten Produkts (0,4 mmol, 69 %) nach Säulenchromatographie (1-6 % MeOH/DCM) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.65 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.71 – 7.64 (m, 2H), 7.26 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.91 (s, 1H), 4.55 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 4.52 (s, 1H), 3.97 – 3.93 (m, 1H), 3.66 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 3.58 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 3.39 (td, *J* = 13.5, 3.3 Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.12 (dd, *J* = 12.0, 2.7 Hz, 1H), 2.99 (td, *J* = 11.7, 3.2 Hz, 1H), 2.09 (b, 3H), 1.79 – 1.72 (m, 4H), 1.66 (d, *J* = 12.5 Hz, 4H), 1.47 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 1.29 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.19, 160.80, 160.07, 157.31, 152.16, 144.37 (d, *J* = 7.7 Hz), 132.59 (d, *J* = 6.5 Hz), 124.38, 119.01, 115.06 (d, *J* = 24.3 Hz), 106.57, 65.40, 54.06, 52.26, 48.92, 46.69, 45.19, 44.26, 44.22, 43.73, 38.48, 33.22, 30.46, 30.39, 29.08, 14.17. **HRMS (*m/z*)** berechnet für C₂₇H₃₅N₅O₄FS [M+H]⁺, 544,2388; gefunden, 544,2386.

7.2. Methoden

7.2.1. Struktur-basierte Modellierung

Für die Modellierung von Zielverbindungen im Rahmen eines Struktur-basierten Design-Ansatzes wurde zunächst eine gegebene Kokristallstruktur über PyMOL (Version 2.0.6) geöffnet und die Koordinaten des gebundenen Liganden als pdb-Datei extrahiert. Diese Datei wurde infolgedessen über Accelrys Discovery Studio 3.1 bearbeitet, in dem chemische Modifikationen vorgenommen wurden und anschließend mit der neu generierten Molekülstruktur eine Energieminimierung durchgeführt wurde. Die energieminimierte Struktur wurde erneut als pdb-Datei gespeichert, in PyMOL in die zuvor bearbeitete Kokristallstruktur eingeladen und visualisiert.

7.2.2. HTRF-Assay zur IC₅₀-Bestimmung und kinetische Charakterisierung

Die biochemische inhibitorische Aktivität (IC₅₀) wurde mit dem HTRF® KinEASE™ Assay von Cisbio bestimmt.¹³⁷ Alle Reagenzien für den Assay wurden von Cisbio Bioassays, Frankreich, bezogen. Die Messungen wurden mit dem Quattro Software-Paket zur IC₅₀-Bestimmung ausgewertet. Die kinetischen Parameter wurden über zeitabhängige IC₅₀-Messungen zu zwölf Zeitpunkten und anschließende Auftragung gegen die Zeit ermittelt, indem eine Auswertung gemäß KRIPPENDORF *et al.* erfolgte.²³⁸

7.2.3. Protein-Massenspektrometrie

Für Protein-Massenspektrometrie wurde Akt1 verwendet. 10 µM des Proteins und 100 µM des zu untersuchenden Inhibitors wurden in einem Puffer für eine Stunde inkubiert. Die Proben wurden daraufhin zentrifugiert und über LCMS mittels eines Thermo Fisher Ultimate 3000 HPLC-Systems gekoppelt an ein Thermo Fisher Velos Pro 2D-Ionenfallen-Massenspektrometer untersucht. Die chromatographische Auftrennung erfolgte über eine Vydac 214TP C4 5µm Säule (150 mm x 2,1 mm) über einen Gradienten von anfänglich 20 % MeCN/0,1 % Ameisensäure in Wasser für fünf Minuten, gefolgt von einem linearen Gradienten über 14 min bis zu 90 % MeCN/Ameisensäure in Wasser. Es wurde ein Massenbereich von 700-2000 m/z gescannt. Die Rohdaten wurden über das Programm ProMass dekonvolviert. Die dekonvolvierten Massenspektren wurden mithilfe der Software mMass (Version 5.5.0) auf einen relativen Massenbereich von 59.000-60.300 m/z gekürzt und geglättet.²³⁹

7.2.4. Kinase-Profilierung

Die ausgewählten Akt-Inhibitoren wurden in einer Kinase-Profilierungsstudie gegen 100 ausgewählte Kinasen bei einer Konzentration von 1 μM getestet. Die Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt und beim entsprechenden apparenten ATP K_M jeder individuellen Kinase der Aktivitäts-basierte Z'LYTE[®] Kinase-Assay vom SelectScreen[®] Profiling Service (ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mithilfe von KinMap in einem Kinom-Dendrogramm visualisiert.¹⁶⁹ Die Darstellung ist großzügigerweise reproduziert von Cell Signaling Technology, Inc. (<http://www.cell-signal.com>).

7.2.5. In-Gel-Fluoreszenz

Für die In-Gel-Fluoreszenz-Messungen wurden zunächst 10 μM Akt und ein 10-facher Überschuss der entsprechenden Sonde bei 4 °C für eine Stunde inkubiert. Nach Zugabe von TBTA (2 mM Stammlösung in DMSO/*tert*-BuOH 1:4), TCEP (20 mM Stammlösung in H₂O) Cy3-Azid (100 μM) und CuSO₄ (20 mM Stammlösung in H₂O) wurde schließlich für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden 7,5 μL der Probe mit 2,5 μL 4xSDS-Probenpuffer (100 mM Tris (pH 6,8), 200 mM DTT, 1M β -Mercaptoethanol, 4 % (w/v) SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerol) versetzt und die Proben über SDS-Gelelektrophorese (40 mA, 40 min) mittels 12 %ige Gele aufgetrennt (Laufpuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3). Als Größenstandard wurde 3 μL *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* 10-250 kDa von ThermoScientific verwendet. Die Detektion der In-Gel-Fluoreszenz erfolgte über einen Typhoon Trio Plus der Firma *GE Healthcare*. Im Anschluss wurde zur Kontrolle eine Färbung über Coomassie-Brilliantblau durchgeführt.

7.2.6. Pharmakophor-basiertes Docking

Zur Generierung eines möglichen Bindungsmodus von SKI2852 wurde ein Pharmakophor-basiertes Docking mit LigandScout 3.0 durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Kristallstruktur eines Struktur-verwandten Inhibitors in LigandScout untersucht (PDB: 4BB5). Auf Basis dieser Kokristallstruktur wurde daraufhin ein Ligand-basiertes Pharmakophor-Modell erstellt. Parallel wurde eine Struktur von SKI2852 über Accelrys Discovery Studio 3.1 erstellt, energie-minimiert und als lib-Datei gespeichert. Diese Datei wurde in der *Screening-Oberfläche* von LigandScout eingeladen und ein Pharmakophor-basiertes Docking durchgeführt. Die erhaltene Struktur wurde daraufhin als pdb-Datei exportiert und der Bindungsmodus über PyMOL (Version 2.0.6.) visualisiert.

7.2.7. Datenverfügbarkeit

Die Strukturen von Akt1 in Komplex mit Borussertib (6HHF), **31a** (6HHJ), **43** (6HHG) und **44** (6HHI) sind in der Proteindatenbank (PDB) hinterlegt. Zusätzlich sind Strukturmodelle für Augment über QR-Codes in den entsprechenden Abbildungen verfügbar.²⁴⁰

8 Literaturverzeichnis

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **2018**.
2. Krebs in Deutschland für 2013/2014, 11. Ausgabe, Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidermologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin. **2017**.
3. Schilsky, R. L., Personalized medicine in oncology: the future is now. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, 9 (5), 363-6.
4. Vogelstein, B.; Kinzler, K. W., Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **2004**, 10 (8), 789-99.
5. Tabin, C. J.; Bradley, S. M.; Bargmann, C. I.; Weinberg, R. A.; Papageorge, A. G.; Scolnick, E. M.; Dhar, R.; Lowy, D. R.; Chang, E. H., Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* **1982**, 300 (5888), 143-9.
6. Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C. C., p53 mutations in human cancers. *Science* **1991**, 253 (5015), 49-53.
7. Adamson, E. D., Oncogenes in development. *Development* **1987**, 99 (4), 449-71.
8. Weinberg, R. A., Tumor suppressor genes. *Science* **1991**, 254 (5035), 1138-46.
9. Finlay, C. A.; Hinds, P. W.; Levine, A. J., The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **1989**, 57 (7), 1083-93.
10. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, 144 (5), 646-74.
11. Levine, A. J., The p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* **1992**, 326 (20), 1350-2.
12. Weinstein, I. B., Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* **2002**, 297 (5578), 63-4.
13. Sharma, S. V.; Fischbach, M. A.; Haber, D. A.; Settleman, J., "Oncogenic shock": explaining oncogene addiction through differential signal attenuation. *Clin Cancer Res* **2006**, 12 (14 Pt 2), 4392s-4395s.
14. Eifert, C.; Powers, R. S., From cancer genomes to oncogenic drivers, tumour dependencies and therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* **2012**, 12 (8), 572-8.
15. Nalejska, E.; Maczynska, E.; Lewandowska, M. A., Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology. *Mol Diagn Ther* **2014**, 18 (3), 273-84.
16. Ashley, E. A., Towards precision medicine. *Nat Rev Genet* **2016**, 17 (9), 507-22.
17. Shaw, E. C.; Johnson, P. W., Stratified medicine for cancer therapy. *Drug Discov Today* **2012**, 17 (5-6), 261-8.
18. Adams, D. R.; Eng, C. M., Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders. *N Engl J Med* **2018**, 379 (14), 1353-1362.

19. Schwaederle, M.; Zhao, M.; Lee, J. J.; Eggermont, A. M.; Schilsky, R. L.; Mendelsohn, J.; Lazar, V.; Kurzrock, R., Impact of Precision Medicine in Diverse Cancers: A Meta-Analysis of Phase II Clinical Trials. *J Clin Oncol* **2015**, *33* (32), 3817-25.
20. Coates, A.; Abraham, S.; Kaye, S. B.; Sowerbutts, T.; Frewin, C.; Fox, R. M.; Tattersall, M. H., On the receiving end--patient perception of the side-effects of cancer chemotherapy. *Eur J Cancer Clin Oncol* **1983**, *19* (2), 203-8.
21. Schiller, J. H.; Harrington, D.; Belani, C. P.; Langer, C.; Sandler, A.; Krook, J.; Zhu, J.; Johnson, D. H.; Eastern Cooperative Oncology, G., Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **2002**, *346* (2), 92-8.
22. Mathur, S.; Sutton, J., Personalized medicine could transform healthcare. *Biomedical reports* **2017**, *7* (1), 3-5.
23. Lategahn, J.; Keul, M.; Rauh, D., Lessons To Be Learned: The Molecular Basis of Kinase-Targeted Therapies and Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Angewandte Chemie* **2018**, *57* (9), 2307-2313.
24. Paez, J. G.; Janne, 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* (5676), 1497-500.
25. Soda, M.; Choi, Y. L.; Enomoto, M.; Takada, S.; Yamashita, Y.; Ishikawa, S.; Fujiwara, S.; Watanabe, H.; Kurashina, K.; Hatanaka, H.; Bando, M.; Ohno, S.; Ishikawa, Y.; Aburatani, H.; Niki, T.; Sohara, Y.; Sugiyama, Y.; Mano, H., Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **2007**, *448* (7153), 561-6.
26. Sharma, S. V.; Bell, D. W.; Settleman, J.; Haber, D. A., Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7* (3), 169-81.
27. Clinical Lung Cancer Genome, P.; Network Genomic, M., A genomics-based classification of human lung tumors. *Sci Transl Med* **2013**, *5* (209), 209ra153.
28. 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* (2), 123-32.
29. Janjigian, Y. Y.; Smit, E. F.; Groen, H. J.; Horn, L.; Gettinger, S.; Camidge, D. R.; Riely, G. J.; Wang, B.; Fu, Y.; Chand, V. K.; Miller, V. A.; Pao, W., Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. *Cancer Discov* **2014**, *4* (9), 1036-45.
30. 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* (7), 629-640.

31. Shaw, A. T.; Kim, D. W.; Nakagawa, K.; Seto, T.; Crino, L.; Ahn, M. J.; De Pas, T.; Besse, B.; Solomon, B. J.; Blackhall, F.; Wu, Y. L.; Thomas, M.; O'Byrne, K. J.; Moro-Sibilot, D.; Camidge, D. R.; Mok, T.; Hirsh, V.; Riely, G. J.; Iyer, S.; Tassell, V.; Polli, A.; Wilner, K. D.; Janne, P. A., Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* **2013**, *368* (25), 2385-94.
32. Engel, J.; Smith, S.; Lategahn, J.; Tumbrink, H. L.; Goebel, L.; Becker, C.; Hennes, E.; Keul, M.; Unger, A.; Müller, H.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Günther, G.; Hengstler, J. G.; Rauh, D., Structure-Guided Development of Covalent and Mutant-Selective Pyrazolopyrimidines to Target T790M Drug Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor. *J Med Chem* **2017**, *60* (18), 7725-7744.
33. 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.; Janne, 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* (6), 560-2.
34. 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* (120), 120ra17.
35. Negrini, S.; Gorgoulis, V. G.; Halazonetis, T. D., Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11* (3), 220-8.
36. Diamandis, E. P., The failure of protein cancer biomarkers to reach the clinic: why, and what can be done to address the problem? *BMC Med* **2012**, *10*, 87.
37. de Gramont, A.; Watson, S.; Ellis, L. M.; Rodon, J.; Tabernero, J.; de Gramont, A.; Hamilton, S. R., Pragmatic issues in biomarker evaluation for targeted therapies in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2015**, *12* (4), 197-212.
38. Dang, C. V.; Reddy, E. P.; Shokat, K. M.; Soucek, L., Drugging the 'undruggable' cancer targets. *Nat Rev Cancer* **2017**, *17* (8), 502-508.
39. Wang, Q.; Chen, X.; Hay, N., Akt as a target for cancer therapy: more is not always better (lessons from studies in mice). *British Journal Of Cancer* **2017**, *117*, 159.
40. Gonzalez, E.; McGraw, T. E., The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **2009**, *8* (16), 2502-8.
41. 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* (4), 193-206.
42. Ochoa, D.; Jonikas, M.; Lawrence, R. T.; El Debs, B.; Selkrig, J.; Typas, A.; Villen, J.; Santos, S. D.; Beltrao, P., An atlas of human kinase regulation. *Mol Syst Biol* **2016**, *12* (12), 888.
43. Blume-Jensen, P.; Hunter, T., Oncogenic kinase signalling. *Nature* **2001**, *411* (6835), 355-65.
44. Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S., Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9* (1), 28-39.

45. Hanks, S. K.; Quinn, A. M.; Hunter, T., The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **1988**, *241* (4861), 42-52.
46. Haslam, R. J.; Koide, H. B.; Hemmings, B. A., Pleckstrin domain homology. *Nature* **1993**, *363* (6427), 309-10.
47. van Rossum, D. B.; Patterson, R. L.; Sharma, S.; Barrow, R. K.; Kornberg, M.; Gill, D. L.; Snyder, S. H., Phospholipase Cgamma1 controls surface expression of TRPC3 through an intermolecular PH domain. *Nature* **2005**, *434* (7029), 99-104.
48. Wu, W.-I.; Voegtli, W. C.; Sturgis, H. L.; Dizon, F. P.; Vigers, G. P. A.; Brandhuber, B. J., Crystal Structure of Human AKT1 with an Allosteric Inhibitor Reveals a New Mode of Kinase Inhibition. *PLoS ONE* **2010**, *5* (9), e12913.
49. Manning, B. D.; Toker, A., AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **2017**, *169* (3), 381-405.
50. Hemmings, B. A.; Restuccia, D. F., PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2012**, *4* (9), a011189.
51. Vanhaesebroeck, B.; Guillermet-Guibert, J.; Graupera, M.; Bilanges, B., The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11* (5), 329-41.
52. Rameh, L. E.; Cantley, L. C., The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* **1999**, *274* (13), 8347-50.
53. Calleja, V.; Laguerre, M.; Larijani, B., 3-D structure and dynamics of protein kinase B-new mechanism for the allosteric regulation of an AGC kinase. *J Chem Biol* **2009**, *2* (1), 11-25.
54. Milburn, C. C.; Deak, M.; Kelly, S. M.; Price, N. C.; Alessi, D. R.; Van Aalten, D. M., Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem J* **2003**, *375* (Pt 3), 531-8.
55. Calleja, V.; Alcor, D.; Laguerre, M.; Park, J.; Vojnovic, B.; Hemmings, B. A.; Downward, J.; Parker, P. J.; Larijani, B., Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol* **2007**, *5* (4), e95.
56. Alessi, D. R.; James, S. R.; Downes, C. P.; Holmes, A. B.; Gaffney, P. R.; Reese, C. B.; Cohen, P., Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* **1997**, *7* (4), 261-9.
57. Yang, J.; Cron, P.; Thompson, V.; Good, V. M.; Hess, D.; Hemmings, B. A.; Barford, D., Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol Cell* **2002**, *9* (6), 1227-40.
58. Sarbassov, D. D.; Guertin, D. A.; Ali, S. M.; Sabatini, D. M., Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **2005**, *307* (5712), 1098-101.
59. Datta, S. R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y.; Greenberg, M. E., Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **1997**, *91* (2), 231-41.
60. Cross, D. A.; Alessi, D. R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M.; Hemmings, B. A., Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **1995**, *378* (6559), 785-9.

61. Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmond, M. J.; Lin, M. Z.; Juo, P.; Hu, L. S.; Anderson, M. J.; Arden, K. C.; Blenis, J.; Greenberg, M. E., Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **1999**, *96* (6), 857-68.
62. Kuo, Y. C.; Huang, K. Y.; Yang, C. H.; Yang, Y. S.; Lee, W. Y.; Chiang, C. W., Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem* **2008**, *283* (4), 1882-92.
63. Gao, T.; Furnari, F.; Newton, A. C., PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* **2005**, *18* (1), 13-24.
64. Lee, J. O.; Yang, H.; Georgescu, M. M.; Di Cristofano, A.; Maehama, T.; Shi, Y.; Dixon, J. E.; Pandolfi, P.; Pavletich, N. P., Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* **1999**, *99* (3), 323-34.
65. Hers, I.; Vincent, E. E.; Tavaré, J. M., Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* **2011**, *23* (10), 1515-27.
66. Huang, X.; Liu, G.; Guo, J.; Su, Z., The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int J Biol Sci* **2018**, *14* (11), 1483-1496.
67. Rickle, A.; Bogdanovic, N.; Volkman, I.; Winblad, B.; Ravid, R.; Cowburn, R. F., Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neuroreport* **2004**, *15* (6), 955-9.
68. Abeyrathna, P.; Su, Y., The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascul Pharmacol* **2015**, *74*, 38-48.
69. Nitulescu, G. M.; Van De Venter, M.; Nitulescu, G.; Ungurianu, A.; Juzenas, P.; Peng, Q.; Olaru, O. T.; Gradinaru, D.; Tsatsakis, A.; Tsoukalas, D.; Spandidos, D. A.; Margina, D., The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review). *Int J Oncol* **2018**, *53* (6), 2319-2331.
70. Carpten, J. D.; Faber, A. L.; Horn, C.; Donoho, G. P.; Briggs, S. L.; Robbins, C. M.; Hostetter, G.; Boguslawski, S.; Moses, T. Y.; Savage, S.; Uhlik, M.; Lin, A.; Du, J.; Qian, Y. W.; Zeckner, D. J.; Tucker-Kellogg, G.; Touchman, J.; Patel, K.; Mousses, S.; Bittner, M.; Schevitz, R.; Lai, M. H.; Blanchard, K. L.; Thomas, J. E., A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **2007**, *448* (7152), 439-44.
71. Hyman, D. M.; Smyth, L. M.; Donoghue, M. T. A.; Westin, S. N.; Bedard, P. L.; Dean, E. J.; Bando, H.; El-Khoueiry, A. B.; Perez-Fidalgo, J. A.; Mita, A.; Schellens, J. H. M.; Chang, M. T.; Reichel, J. B.; Bouvier, N.; Selcuklu, S. D.; Soumerai, T. E.; Torrisi, J.; Erinjeri, J. P.; Ambrose, H.; Barrett, J. C.; Dougherty, B.; Foxley, A.; Lindemann, J. P. O.; McEwen, R.; Pass, M.; Schiavon, G.; Berger, M. F.; Chandarlapaty, S.; Solit, D. B.; Banerji, U.; Baselga, J.; Taylor, B. S., AKT Inhibition in Solid Tumors With AKT1 Mutations. *J Clin Oncol* **2017**, *35* (20), 2251-2259.
72. Lindhurst, M. J.; Sapp, J. C.; Teer, J. K.; Johnston, J. J.; Finn, E. M.; Peters, K.; Turner, J.; Cannons, J. L.; Bick, D.; Blakemore, L.; Blumhorst, C.; Brockmann, K.; Calder, P.; Cherman, N.; Deardorff, M. A.; Everman, D. B.; Golas, G.; Greenstein, R. M.; Kato, B. M.; Keppler-Noreuil, K. M.; Kuznetsov, S. A.; Miyamoto, R. T.; Newman, K.; Ng, D.; O'Brien, K.; Rothenberg, S.; Schwartzentruber, D. J.; Singhal, V.; Tirabosco, R.; Upton, J.; Wientroub, S.; Zackai, E. H.; Hoag, K.; Whitewood-Neal, T.; Robey, P. G.; Schwartzberg, P. L.; Darling,

- T. N.; Tosi, L. L.; Mullikin, J. C.; Biesecker, L. G., A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome. *N Engl J Med* **2011**, *365* (7), 611-9.
73. Slotkin, E. K.; Diolaiti, D.; Shukla, N. N.; Dela Cruz, F. S.; Clark, J. J.; Gundem, G.; Yellapantula, V. D.; Levine, M. F.; You, D.; Ma, P.; Pachhal, S.; Ibanez Sanchez, G.; Benayed, R.; Jungbluth, A. A.; Smyth, L. M.; Mauguen, A.; Gushterova, I.; Ding, H.; Spraggon, L.; Darnell, R.; Califano, A.; Ladanyi, M.; Papaemmanuil, E.; Kung, A. L.; Hyman, D. M.; Roberts, S. S., Patient-driven Discovery, Therapeutic Targeting, and Post-Clinical Validation of a Novel AKT1 Fusion-driven Cancer. *Cancer Discov* **2019**.
74. Ruggeri, B. A.; Huang, L.; Wood, M.; Cheng, J. Q.; Testa, J. R., Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol Carcinog* **1998**, *21* (2), 81-6.
75. Cheng, J. Q.; Ruggeri, B.; Klein, W. M.; Sonoda, G.; Altomare, D. A.; Watson, D. K.; Testa, J. R., Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93* (8), 3636-41.
76. Bellacosa, A.; de Feo, D.; Godwin, A. K.; Bell, D. W.; Cheng, J. Q.; Altomare, D. A.; Wan, M.; Dubeau, L.; Scambia, G.; Masciullo, V.; Ferrandina, G.; Benedetti Panici, P.; Mancuso, S.; Neri, G.; Testa, J. R., Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* **1995**, *64* (4), 280-5.
77. West, K. A.; Castillo, S. S.; Dennis, P. A., Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* **2002**, *5* (6), 234-48.
78. Vivanco, I.; Sawyers, C. L., The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2* (7), 489-501.
79. Keniry, M.; Parsons, R., The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene* **2008**, *27* (41), 5477-85.
80. Thorpe, L. M.; Yuzugullu, H.; Zhao, J. J., PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* **2015**, *15* (1), 7-24.
81. Downward, J., Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3* (1), 11-22.
82. Maurer, M.; Su, T.; Saal, L. H.; Koujak, S.; Hopkins, B. D.; Barkley, C. R.; Wu, J.; Nandula, S.; Dutta, B.; Xie, Y.; Chin, Y. R.; Kim, D. I.; Ferris, J. S.; Gruvberger-Saal, S. K.; Laakso, M.; Wang, X.; Memeo, L.; Rojzman, A.; Matos, T.; Yu, J. S.; Cordon-Cardo, C.; Isola, J.; Terry, M. B.; Toker, A.; Mills, G. B.; Zhao, J. J.; Murty, V. V.; Hibshoosh, H.; Parsons, R., 3-Phosphoinositide-dependent kinase 1 potentiates upstream lesions on the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in breast carcinoma. *Cancer Res* **2009**, *69* (15), 6299-306.
83. Nitulescu, G. M.; Margina, D.; Juzenas, P.; Peng, Q.; Olaru, O. T.; Saloustros, E.; Fenga, C.; Spandidos, D.; Libra, M.; Tsatsakis, A. M., Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int J Oncol* **2016**, *48* (3), 869-85.
84. Levy, D. S.; Kahana, J. A.; Kumar, R., AKT inhibitor, GSK690693, induces growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* **2009**, *113* (8), 1723-9.
85. Crouthamel, M. C.; Kahana, J. A.; Korenchuk, S.; Zhang, S. Y.; Sundaresan, G.; Eberwein, D. J.; Brown, K. K.; Kumar, R., Mechanism and management of AKT inhibitor-induced hyperglycemia. *Clin Cancer Res* **2009**, *15* (1), 217-25.

86. Conley, B. A.; Chen, A. P.; O'Dwyer, P. J.; Arteaga, C. L.; Hamilton, S. R.; Williams, P. M.; Little, R. F.; Takebe, N.; Patton, D.; Sazali, K.; Zhang, J.; Zwiebel, J. A.; Mitchell, E. P.; Gray, R. J.; McShane, L.; Li, S.; Rubinstein, L.; Flaherty, K.; team, N. M., NCI-MATCH (Molecular Analysis for Therapy Choice) – a national signal finding trial. *Journal of Clinical Oncology* **2016**, *34* (15_suppl), TPS2606-TPS2606.
87. Capivasertib Active against AKT1-Mutated Cancers. *Cancer Discov* **2018**, doi: 10.1158/2159-8290.CD-NB2018-153.
88. de Bono, J. S.; De Giorgi, U.; Rodrigues, D. N.; Massard, C.; Bracarda, S.; Font, A.; Arranz Arijia, J. A.; Shih, K. C.; Radavoi, G. D.; Xu, N.; Chan, W. Y.; Ma, H.; Gendreau, S.; Riisnaes, R.; Patel, P. H.; Maslyar, D. J.; Jinga, V., Randomized Phase II Study Evaluating Akt Blockade with Ipatasertib, in Combination with Abiraterone, in Patients with Metastatic Prostate Cancer with and without PTEN Loss. *Clin Cancer Res* **2018**.
89. Pearce, L. R.; Komander, D.; Alessi, D. R., The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11* (1), 9-22.
90. Davies, B. R.; Greenwood, H.; Dudley, P.; Crafter, C.; Yu, D. H.; Zhang, J.; Li, J.; Gao, B.; Ji, Q.; Maynard, J.; Ricketts, S. A.; Cross, D.; Cosulich, S.; Chresta, C. C.; Page, K.; Yates, J.; Lane, C.; Watson, R.; Luke, R.; Ogilvie, D.; Pass, M., Preclinical pharmacology of AZD5363, an inhibitor of AKT: pharmacodynamics, antitumor activity, and correlation of monotherapy activity with genetic background. *Mol Cancer Ther* **2012**, *11* (4), 873-87.
91. Banerji, U.; Dean, E. J.; Perez-Fidalgo, J. A.; Batist, G.; Bedard, P. L.; You, B.; Westin, S. N.; Kabos, P.; Garrett, M. D.; Tall, M.; Ambrose, H.; Barrett, J. C.; Carr, T. H.; Cheung, S. Y. A.; Corcoran, C.; Cullberg, M.; Davies, B. R.; de Bruin, E. C.; Elvin, P.; Foxley, A.; Lawrence, P.; Lindemann, J. P. O.; Maudsley, R.; Pass, M.; Rowlands, V.; Rugman, P.; Schiavon, G.; Yates, J.; Schellens, J. H. M., A Phase I Open-Label Study to Identify a Dosing Regimen of the Pan-AKT Inhibitor AZD5363 for Evaluation in Solid Tumors and in PIK3CA-Mutated Breast and Gynecologic Cancers. *Clin Cancer Res* **2018**, *24* (9), 2050-2059.
92. Gills, J. J.; Dennis, P. A., Perifosine: update on a novel Akt inhibitor. *Curr Oncol Rep* **2009**, *11* (2), 102-10.
93. Vink, S. R.; Schellens, J. H.; van Blitterswijk, W. J.; Verheij, M., Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anti-cancer alkylphospholipid. *Invest New Drugs* **2005**, *23* (4), 279-86.
94. Lindsley, C. W.; Zhao, Z.; Leister, W. H.; Robinson, R. G.; Barnett, S. F.; Defeo-Jones, D.; Jones, R. E.; Hartman, G. D.; Huff, J. R.; Huber, H. E.; Duggan, M. E., Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15* (3), 761-764.
95. Nussinov, R.; Tsai, C. J., Allostery in disease and in drug discovery. *Cell* **2013**, *153* (2), 293-305.
96. Fang, Z.; Grütter, C.; Rauh, D., Strategies for the selective regulation of kinases with allosteric modulators: exploiting exclusive structural features. *ACS Chem Biol* **2013**, *8* (1), 58-70.
97. Rauch, J.; Volinsky, N.; Romano, D.; Kolch, W., The secret life of kinases: functions beyond catalysis. *Cell Commun Signal* **2011**, *9* (1), 23.

98. Vivanco, I.; Chen, Z. C.; Tanos, B.; Oldrini, B.; Hsieh, W. Y.; Yannuzzi, N.; Campos, C.; Mellingerhoff, I. K., A kinase-independent function of AKT promotes cancer cell survival. *Elife* **2014**, *3*, DOI: 10.7554/eLife.03751.
99. Weisner, J.; Gontla, R.; van der Westhuizen, L.; Oeck, S.; Ketzer, J.; Janning, P.; Richters, A.; Mühlenberg, T.; Fang, Z.; Taher, A.; Jendrossek, V.; Pelly, S. C.; Bauer, S.; van Otterlo, W. A.; Rauh, D., Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors. *Angewandte Chemie* **2015**, *54* (35), 10313-6.
100. Hirai, H.; Sootome, H.; Nakatsuru, Y.; Miyama, K.; Taguchi, S.; Tsujioka, K.; Ueno, Y.; Hatch, H.; Majumder, P. K.; Pan, B. S.; Kotani, H., MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **2010**, *9* (7), 1956-67.
101. Ashwell, M. A.; Lapierre, J.-M.; Brassard, C.; Bresciano, K.; Bull, C.; Cornell-Kennon, S.; Eathiraj, S.; France, D. S.; Hall, T.; Hill, J.; Kelleher, E.; Khanapurkar, S.; Kizer, D.; Koerner, S.; Link, J.; Liu, Y.; Makhija, S.; Moussa, M.; Namdev, N.; Nguyen, K.; Nicewonger, R.; Palma, R.; Szwaya, J.; Tandon, M.; Uppalapati, U.; Vensel, D.; Volak, L. P.; Volckova, E.; Westlund, N.; Wu, H.; Yang, R.-Y.; Chan, T. C. K., Discovery and Optimization of a Series of 3-(3-Phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amines: Orally Bioavailable, Selective, and Potent ATP-Independent Akt Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55* (11), 5291-5310.
102. Ma, C. X.; Suman, V.; Goetz, M. P.; Northfelt, D.; Burkard, M. E.; Ademuyiwa, F.; Naughton, M.; Margenthaler, J.; Aft, R.; Gray, R.; Tevaarwerk, A.; Wilke, L.; Haddad, T.; Moynihan, T.; Loprinzi, C.; Hieken, T.; Barnell, E. K.; Skidmore, Z. L.; Feng, Y. Y.; Krysiak, K.; Hoog, J.; Guo, Z.; Nehring, L.; Wisinski, K. B.; Mardis, E.; Hagemann, I. S.; Vij, K.; Sanati, S.; Al-Kateb, H.; Griffith, O. L.; Griffith, M.; Doyle, L.; Erlichman, C.; Ellis, M. J., A Phase II Trial of Neoadjuvant MK-2206, an AKT Inhibitor, with Anastrozole in Clinical Stage II or III PIK3CA-Mutant ER-Positive and HER2-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **2017**, *23* (22), 6823-6832.
103. Chung, V.; McDonough, S.; Philip, P. A.; Cardin, D.; Wang-Gillam, A.; Hui, L.; Tejani, M. A.; Seery, T. E.; Dy, I. A.; Al Baghdadi, T.; Hendifar, A. E.; Doyle, L. A.; Lowy, A. M.; Guthrie, K. A.; Blanke, C. D.; Hochster, H. S., Effect of Selumetinib and MK-2206 vs Oxaliplatin and Fluorouracil in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer After Prior Therapy: SWOG S1115 Study Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* **2017**, *3* (4), 516-522.
104. Jonasch, E.; Hasanov, E.; Corn, P. G.; Moss, T.; Shaw, K. R.; Stovall, S.; Marcott, V.; Gan, B.; Bird, S.; Wang, X.; Do, K. A.; Altamirano, P. F.; Zurita, A. J.; Doyle, L. A.; Lara, P. N., Jr.; Tannir, N. M., A randomized phase 2 study of MK-2206 versus everolimus in refractory renal cell carcinoma. *Ann Oncol* **2017**, *28* (4), 804-808.
105. ClinicalTrials.gov, https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=mk-2206&age_v=&gndr=&type=&rslt=&phase=1&Search=Apply. **05.12.2018**.
106. Al-Saffar, N. M. S.; Troy, H.; Wong Te Fong, A. C.; Paravati, R.; Jackson, L. E.; Gowan, S.; Boulton, J. K. R.; Robinson, S. P.; Eccles, S. A.; Yap, T. A.; Leach, M. O.; Chung, Y. L., Metabolic biomarkers of response to the AKT inhibitor MK-2206 in pre-clinical models of human colorectal and prostate carcinoma. *Br J Cancer* **2018**, *119* (9), 1118-1128.
107. Yu, Y.; Savage, E.; Eathiraj, S.; Hall, T.; Schwartz, B.; Abbadessa, G., In Vitro and In Vivo Anti-tumor Activity of ARQ 751, a Potent and Selective AKT Inhibitor. *AACR Annual Meeting* **2018**, 374.

108. ArQule Corporate Presentation, Pursuing treatments for biomarker-driven cancers and rare diseases. **November 2018**.
109. Lindhurst, M. J.; Yourick, M. R.; Yu, Y.; Savage, R. E.; Ferrari, D.; Biesecker, L. G., Repression of AKT signaling by ARQ 092 in cells and tissues from patients with Proteus syndrome. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 17162.
110. Pant, S.; Subbiah, V.; Rodon, J.; Janku, F.; Hong, D.; Karp, D.; Piha-Paul, S.; Tsimberidou, A. M.; Naing, A.; Fu, S.; Savage, R. E.; Chai, F.; Yu, Y.; Tith, K.; Alfattal, R.; Schwartz, B.; Meric-Bernstam, F.; Eathiraj, S.; Yap, T., A Phase 1 Dose Escalation Study of ARQ 751 in Adult Patients with Advanced Solid Tumors with AKT1, 2, 3 Genetic Alterations, Activating PI3K Mutations, PTEN-null, or Other Known Actionable PTEN Mutations *30th EORTC-NCI-AACR Symposium, Dublin* **November 2018**, 395.
111. Jansen, V. M.; Mayer, I. A.; Arteaga, C. L., Is There a Future for AKT Inhibitors in the Treatment of Cancer? *Clin Cancer Res* **2016**, *22* (11), 2599-601.
112. Costa, C.; Bosch, A., The Strategy of PIKing a Target: What Is AKTually Most Effective? *Clin Cancer Res* **2018**, *24* (9), 2029-2031.
113. Bauer, R. A., Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov Today* **2015**, *20* (9), 1061-73.
114. Roth, G. J.; Majerus, P. W., The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* **1975**, *56* (3), 624-32.
115. Yocum, R. R.; Waxman, D. J.; Rasmussen, J. R.; Strominger, J. L., Mechanism of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**, *76* (6), 2730-4.
116. Shin, J. M.; Cho, Y. M.; Sachs, G., Chemistry of covalent inhibition of the gastric (H⁺, K⁺)-ATPase by proton pump inhibitors. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (25), 7800-11.
117. Savi, P.; Nurden, P.; Nurden, A. T.; Levy-Toledano, S.; Herbert, J. M., Clopidogrel: a review of its mechanism of action. *Platelets* **1998**, *9* (3-4), 251-5.
118. Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A., The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10* (4), 307-17.
119. Liu, W.; Ghosh, A. K.; Samanta, I.; Mondal, A., Covalent Inhibition in Drug Discovery. *ChemMedChem* **2019**.
120. Schirmeister, T.; Kesselring, J.; Jung, S.; Schneider, T. H.; Weickert, A.; Becker, J.; Lee, W.; Bamberger, D.; Wich, P. R.; Distler, U.; Tenzer, S.; Johe, P.; Hellmich, U. A.; Engels, B., Quantum Chemical-Based Protocol for the Rational Design of Covalent Inhibitors. *J Am Chem Soc* **2016**, *138* (27), 8332-5.
121. Lonsdale, R.; Burgess, J.; Colclough, N.; Davies, N. L.; Lenz, E. M.; Orton, A. L.; Ward, R. A., Expanding the Armory: Predicting and Tuning Covalent Warhead Reactivity. *J Chem Inf Model* **2017**, *57* (12), 3124-3137.
122. 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* (2), 146-59.
123. 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* (9), 730-9.

124. Patricelli, M. P.; Janes, M. R.; Li, L. S.; Hansen, R.; Peters, U.; Kessler, L. V.; Chen, Y.; Kucharski, J. M.; Feng, J.; Ely, T.; Chen, J. H.; Firdaus, S. J.; Babbar, A.; Ren, P.; Liu, Y., Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State. *Cancer Discov* **2016**, *6* (3), 316-29.
125. Janes, M. R.; Zhang, J.; Li, L. S.; Hansen, R.; Peters, U.; Guo, X.; Chen, Y.; Babbar, A.; Firdaus, S. J.; Darjania, L.; Feng, J.; Chen, J. H.; Li, S.; Li, S.; Long, Y. O.; Thach, C.; Liu, Y.; Zariéh, A.; Ely, T.; Kucharski, J. M.; Kessler, L. V.; Wu, T.; Yu, K.; Wang, Y.; Yao, Y.; Deng, X.; Zarrinkar, P. P.; Brehmer, D.; Dhanak, D.; Lorenzi, M. V.; Hu-Lowe, D.; Patricelli, M. P.; Ren, P.; Liu, Y., Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell* **2018**, *172* (3), 578-589 e17.
126. Arastu-Kapur, S.; Anderl, J. L.; Kraus, M.; Parlati, F.; Shenk, K. D.; Lee, S. J.; Muchamuel, T.; Bennett, M. K.; Driessen, C.; Ball, A. J.; Kirk, C. J., Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clin Cancer Res* **2011**, *17* (9), 2734-43.
127. Lonsdale, R.; Ward, R. A., Structure-based design of targeted covalent inhibitors. *Chem Soc Rev* **2018**, *47* (11), 3816-3830.
128. Ariza, A.; Collado, D.; Vida, Y.; Montanez, M. I.; Perez-Inestrosa, E.; Blanca, M.; Torres, M. J.; Canada, F. J.; Perez-Sala, D., Study of protein haptentation by amoxicillin through the use of a biotinylated antibiotic. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e90891.
129. 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* (1), 2-5.
130. Jackson, P. A.; Widen, J. C.; Harki, D. A.; Brummond, K. M., Covalent Modifiers: A Chemical Perspective on the Reactivity of alpha,beta-Unsaturated Carbonyls with Thiols via Hetero-Michael Addition Reactions. *J Med Chem* **2017**, *60* (3), 839-885.
131. Krishnan, S.; Miller, R. M.; Tian, B.; Mullins, R. D.; Jacobson, M. P.; Taunton, J., Design of reversible, cysteine-targeted Michael acceptors guided by kinetic and computational analysis. *J Am Chem Soc* **2014**, *136* (36), 12624-30.
132. Soria, J. C.; Ohe, Y.; Vansteenkiste, J.; Reungwetwattana, T.; Chewaskulyong, B.; Lee, K. H.; Dechaphunkul, A.; Imamura, F.; Nogami, N.; Kurata, T.; Okamoto, I.; Zhou, C.; Cho, B. C.; Cheng, Y.; Cho, E. K.; Voon, P. J.; Planchard, D.; Su, W. C.; Gray, J. E.; Lee, S. M.; Hodge, R.; Marotti, M.; Rukazenzov, Y.; Ramalingam, S. S.; Investigators, F., Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **2018**, *378* (2), 113-125.
133. Ashwell, M. A.; Lapierre, J. M.; Brassard, C.; Bresciano, K.; Bull, C.; Cornell-Kennon, S.; Eathiraj, S.; France, D. S.; Hall, T.; Hill, J.; Kelleher, E.; Khanapurkar, S.; Kizer, D.; Koerner, S.; Link, J.; Liu, Y.; Makhija, S.; Moussa, M.; Namdev, N.; Nguyen, K.; Nicewonger, R.; Palma, R.; Szwaya, J.; Tandon, M.; Uppalapati, U.; Vensel, D.; Volak, L. P.; Volckova, E.; Westlund, N.; Wu, H.; Yang, R. Y.; Chan, T. C., Discovery and optimization of a series of 3-(3-phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amines: orally bioavailable, selective, and potent ATP-independent Akt inhibitors. *J Med Chem* **2012**, *55* (11), 5291-310.
134. Ahmad, F.; Nidadavolu, P.; Durgadoss, L.; Ravindranath, V., Critical cysteines in Akt1 regulate its activity and proteasomal degradation: implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* **2014**, *74*, 118-28.

135. Blakemore, D. C.; Castro, L.; Churcher, I.; Rees, D. C.; Thomas, A. W.; Wilson, D. M.; Wood, A., Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. *Nat Chem* **2018**, *10* (4), 383-394.
136. Sunjic, V.; Parnham, M. J., Signposts to Chiral Drugs. *Chapter 1 - Organic Synthesis in Drug Discovery and Development* **2011**, Springer Basel AG.
137. Fang, Z.; Simard, J. R.; Plenker, D.; Nguyen, H. D.; Phan, T.; Wolle, P.; Baumeister, S.; Rauh, D., Discovery of inter-domain stabilizers-a novel assay system for allosteric akt inhibitors. *ACS Chem Biol* **2015**, *10* (1), 279-88.
138. Hendrickson, J. B., Systematic synthesis design. 6. Yield analysis and convergency. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99* (16), 5439-5450.
139. Steglich, W.; Höfle, G., N,N-Dimethyl-4-pyridinamine, a Very Effective Acylation Catalyst. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1969**, *8* (12), 981-981.
140. Dissertation Dr. Steven Smith, TU Dortmund. **2017**.
141. Bose, D. S.; Idrees, M.; Jakka, N. M.; Rao, J. V., Diversity-Oriented Synthesis of Quinolines via Friedländer Annulation Reaction under Mild Catalytic Conditions. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2010**, *12* (1), 100-110.
142. Chen, C.; Eastman, B. W.; Hu, E., H. Inhibitors of Akt activity. 2006.
143. James, A. T.; Turner, E. E., 314. Structure and antimalarial activity. Part IV. Benzimidazoles and mercaptodihydroglyoxalines. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1950**, (0), 1515-1519.
144. Perron, V.; Abbott, S.; Moreau, N.; Lee, D.; Penney, C.; Zacharie, B., A Method for the Selective Protection of Aromatic Amines in the Presence of Aliphatic Amines. *Synthesis* **2009**, *2009* (02), 283-289.
145. Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D., Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures¹. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61* (11), 3849-3862.
146. Swamy, K. C.; Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Kumar, K. V., Mitsunobu and related reactions: advances and applications. *Chem Rev* **2009**, *109* (6), 2551-651.
147. Huang, H.; Kang, J. Y., Mitsunobu Reaction Using Basic Amines as Pronucleophiles. *The Journal of Organic Chemistry* **2017**, *82* (13), 6604-6614.
148. Pollard, C. B.; Young, D. C., The Mechanism of the Leuckart Reaction. *The Journal of Organic Chemistry* **1951**, *16* (5), 661-672.
149. Frederick, M. O.; Kjell, D. P., A synthesis of abemaciclib utilizing a Leuckart-Wallach reaction. *Tetrahedron Letters* **2015**, *56* (7), 949-951.
150. Sigma-Aldrich, Sicherheitsdatenblatt Natriumcyanoborhydrid. **2018**.
151. Klebe, G., *Wirkstoffdesign*. Spektrum Verlag: 2009; Vol. 2. Auflage.

152. Waring, M. J.; Arrowsmith, J.; Leach, A. R.; Leeson, P. D.; Mandrell, S.; Owen, R. M.; Pairaudeau, G.; Pennie, W. D.; Pickett, S. D.; Wang, J.; Wallace, O.; Weir, A., An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14* (7), 475-86.
153. Bose, P.; Gandhi, V. V.; Keating, M. J., Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of ibrutinib for the treatment of chronic lymphocytic leukemia: rationale for lower doses. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **2016**, 1-12.
154. Johnson, J. I.; Decker, S.; Zaharevitz, D.; Rubinstein, L. V.; Venditti, J. M.; Schepartz, S.; Kalyandrug, S.; Christian, M.; Arbuck, S.; Hollingshead, M.; Sausville, E. A., Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *British Journal Of Cancer* **2001**, *84*, 1424.
155. Tentler, J. J.; Tan, A. C.; Weekes, C. D.; Jimeno, A.; Leong, S.; Pitts, T. M.; Arcaroli, J. J.; Messersmith, W. A.; Eckhardt, S. G., Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nature Reviews Clinical Oncology* **2012**, *9*, 338.
156. Hidalgo, M.; Amant, F.; Biankin, A. V.; Budinska, E.; Byrne, A. T.; Caldas, C.; Clarke, R. B.; de Jong, S.; Jonkers, J.; Maelandsmo, G. M.; Roman-Roman, S.; Seoane, J.; Trusolino, L.; Villanueva, A., Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* **2014**, *4* (9), 998-1013.
157. Hobbs, G. A.; Der, C. J.; Rossman, K. L., RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of cell science* **2016**, *129* (7), 1287-1292.
158. Cox, A. D.; Fesik, S. W.; Kimmelman, A. C.; Luo, J.; Der, C. J., Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov* **2014**, *13* (11), 828-51.
159. Ostrem, J. M.; Shokat, K. M., Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to mechanism-based design. *Nat Rev Drug Discov* **2016**, *15* (11), 771-785.
160. Lippman, S. M.; El-Naggar, A. K., Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy AU - Santarpià, Libero. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2012**, *16* (1), 103-119.
161. De Roock, W.; Claes, B.; Bernasconi, D.; De Schutter, J.; Biesmans, B.; Fountzilias, G.; Kalogerias, K. T.; Kotoula, V.; Papamichael, D.; Laurent-Puig, P.; Penault-Llorca, F.; Rougier, P.; Vincenzi, B.; Santini, D.; Tonini, G.; Cappuzzo, F.; Frattini, M.; Molinari, F.; Saletti, P.; De Dosso, S.; Martini, M.; Bardelli, A.; Siena, S.; Sartore-Bianchi, A.; Tabernero, J.; Macarulla, T.; Di Fiore, F.; Gangloff, A. O.; Ciardiello, F.; Pfeiffer, P.; Qvortrup, C.; Hansen, T. P.; Van Cutsem, E.; Piessevaux, H.; Lambrechts, D.; Delorenzi, M.; Tejpar, S., Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* **2010**, *11* (8), 753-62.
162. Gilmartin, A. G.; Bleam, M. R.; Groy, A.; Moss, K. G.; Minthorn, E. A.; Kulkarni, S. G.; Rominger, C. M.; Erskine, S.; Fisher, K. E.; Yang, J.; Zappacosta, F.; Annan, R.; Sutton, D.; Laquerre, S. G., GSK1120212 (JTP-74057) Is an Inhibitor of MEK Activity and Activation with Favorable Pharmacokinetic Properties for Sustained & In Vivo Pathway Inhibition. *Clinical Cancer Research* **2011**, *17* (5), 989.
163. Eisenhauer, E. A.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L. H.; Sargent, D.; Ford, R.; Dancey, J.; Arbuck, S.; Gwyther, S.; Mooney, M.; Rubinstein, L.; Shankar, L.; Dodd, L.; Kaplan, R.; Lacombe, D.; Verweij, J., New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer* **2009**, *45* (2), 228-247.

164. McNaught, A. D.; Wilkinson, A., IUPAC Compendium of Chemical Terminology. *Blackwell Scientific Publications* **2006**, 2nd, <https://doi.org/10.1351/goldbook.ST06845>.
165. Blundell, T. L., Structure-based drug design. *Nature* **1996**, *384* (6604 Suppl), 23-6.
166. Lapierre, J. M.; Eathiraj, S.; Vensel, D.; Liu, Y.; Bull, C. O.; Cornell-Kennon, S.; Iimura, S.; Kelleher, E. W.; Kizer, D. E.; Koerner, S.; Makhija, S.; Matsuda, A.; Moussa, M.; Namdev, N.; Savage, R. E.; Szwaya, J.; Volckova, E.; Westlund, N.; Wu, H.; Schwartz, B., Discovery of 3-(3-(4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl)-5-phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amine (ARQ 092): An Orally Bioavailable, Selective, and Potent Allosteric AKT Inhibitor. *J Med Chem* **2016**, *59* (13), 6455-69.
167. Too, P. C.; Chan, G. H.; Tnay, Y. L.; Hirao, H.; Chiba, S., Hydride Reduction by a Sodium Hydride-Iodide Composite. *Angewandte Chemie* **2016**, *55* (11), 3719-23.
168. Barder, T. E.; Walker, S. D.; Martinelli, J. R.; Buchwald, S. L., Catalysts for Suzuki-Miyaura coupling processes: scope and studies of the effect of ligand structure. *J Am Chem Soc* **2005**, *127* (13), 4685-96.
169. Eid, S.; Turk, S.; Volkamer, A.; Rippmann, F.; Fulle, S., KinMap: a web-based tool for interactive navigation through human kinome data. *BMC Bioinformatics* **2017**, *18* (1), 16.
170. Uhlenbrock, N.; Smith, S.; Weisner, J.; Landel, I.; Lindemann, M.; Le, T. A.; Hardick, J.; Gontla, R.; Scheinpflug, R.; Czodrowski, P.; Janning, P.; Depta, L.; Quambusch, L.; Müller, M. P.; Engels, B.; Rauh, D., Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase Akt. *Chemical Science* **2019**, *10* (12), 3573-3585.
171. Mladenovic, M.; Junold, K.; Fink, R. F.; Thiel, W.; Schirmeister, T.; Engels, B., Atomistic insights into the inhibition of cysteine proteases: first QM/MM calculations clarifying the regiospecificity and the inhibition potency of epoxide- and aziridine-based inhibitors. *J Phys Chem B* **2008**, *112* (17), 5458-69.
172. Mladenovic, M.; Schirmeister, T.; Thiel, S.; Thiel, W.; Engels, B., The importance of the active site histidine for the activity of epoxide- or aziridine-based inhibitors of cysteine proteases. *ChemMedChem* **2007**, *2* (1), 120-8.
173. Schmidt, T. C.; Welker, A.; Rieger, M.; Sahu, P. K.; Sotriffer, C. A.; Schirmeister, T.; Engels, B., Protocol for rational design of covalently interacting inhibitors. *Chemphyschem* **2014**, *15* (15), 3226-35.
174. Politz, O.; Siegel, F.; Barfacker, L.; Bomer, U.; Hagebarth, A.; Scott, W. J.; Michels, M.; Ince, S.; Neuhaus, R.; Meyer, K.; Fernandez-Montalvan, A. E.; Liu, N.; von Nussbaum, F.; Mumberg, D.; Ziegelbauer, K., BAY 1125976, a selective allosteric AKT1/2 inhibitor, exhibits high efficacy on AKT signaling-dependent tumor growth in mouse models. *Int J Cancer* **2017**, *140* (2), 449-459.
175. Lipinski, C. A., Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol* **2004**, *1* (4), 337-41.
176. Zhao, H., Scaffold selection and scaffold hopping in lead generation: a medicinal chemistry perspective. *Drug Discov Today* **2007**, *12* (3-4), 149-55.
177. Schreiber, S. L., Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science* **2000**, *287* (5460), 1964-9.

178. Kappe, C. O.; Dallinger, D., The impact of microwave synthesis on drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5* (1), 51-63.
179. Sven Brandherm, Medizinal-chemische Optimierung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren, Masterarbeit, TU Dortmund. **2019**.
180. Yu, Y.; Savage, R. E.; Eathiraj, S.; Meade, J.; Wick, M. J.; Hall, T.; Abbadessa, G.; Schwartz, B., Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT Pathway with an Allosteric AKT Inhibitor, ARQ 092. *PLoS One* **2015**, *10* (10), e0140479.
181. Cravatt, B. F.; Wright, A. T.; Kozarich, J. W., Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annu Rev Biochem* **2008**, *77*, 383-414.
182. Rix, U.; Superti-Furga, G., Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat Chem Biol* **2009**, *5* (9), 616-24.
183. Edgington-Mitchell, L. E.; Bogyo, M., Detection of Active Caspases During Apoptosis Using Fluorescent Activity-Based Probes. *Methods Mol Biol* **2016**, *1419*, 27-39.
184. Wu, Y.; Olsen, L. B.; Lau, Y. H.; Jensen, C. H.; Rossmann, M.; Baker, Y. R.; Sore, H. F.; Collins, S.; Spring, D. R., Development of a Multifunctional Benzophenone Linker for Peptide Stapling and Photoaffinity Labelling. *Chembiochem* **2016**, *17* (8), 689-92.
185. Segal, E.; Prestwood, T. R.; van der Linden, W. A.; Carmi, Y.; Bhattacharya, N.; Withana, N.; Verdoes, M.; Habtezion, A.; Engleman, E. G.; Bogyo, M., Detection of intestinal cancer by local, topical application of a quenched fluorescence probe for cysteine cathepsins. *Chem Biol* **2015**, *22* (1), 148-58.
186. Salami, J.; Crews, C. M., Waste disposal-An attractive strategy for cancer therapy. *Science* **2017**, *355* (6330), 1163-1167.
187. Speers, A. E.; Adam, G. C.; Cravatt, B. F., Activity-based protein profiling in vivo using a copper(i)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (16), 4686-7.
188. Marius Lindemann, Synthese von kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren als molekulare Sonden zur Untersuchung der Proteinkinase Akt, TU Dortmund. **2017**.
189. Serafimova, I. M.; Pufall, M. A.; Krishnan, S.; Duda, K.; Cohen, M. S.; Maglathlin, R. L.; McFarland, J. M.; Miller, R. M.; Frodin, M.; Taunton, J., Reversible targeting of noncatalytic cysteines with chemically tuned electrophiles. *Nat Chem Biol* **2012**, *8* (5), 471-6.
190. Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G., Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (11), 3192-3.
191. Kumar, C. C.; Madison, V., AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* **2005**, *24* (50), 7493-501.
192. Heron-Milhavet, L.; Franckhauser, C.; Rana, V.; Berthenet, C.; Fisher, D.; Hemmings, B. A.; Fernandez, A.; Lamb, N. J., Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Mol Cell Biol* **2006**, *26* (22), 8267-80.
193. Hussain, K.; Challis, B.; Rocha, N.; Payne, F.; Minic, M.; Thompson, A.; Daly, A.; Scott, C.; Harris, J.; Smillie, B. J.; Savage, D. B.; Ramaswami, U.; De Lonlay, P.; O'Rahilly, S.; Barroso,

- I.; Semple, R. K., An activating mutation of AKT2 and human hypoglycemia. *Science* **2011**, 334 (6055), 474.
194. Zhang, T.; Shi, Z.; Wang, Y.; Wang, L.; Zhang, B.; Chen, G.; Wan, Q.; Chen, L., Akt3 deletion in mice impairs spatial cognition and hippocampal CA1 long long-term potentiation through downregulation of mTOR. *Acta Physiol (Oxf)* **2019**, 225 (1), e13167.
195. Zhao, Z.; Leister, W. H.; Robinson, R. G.; Barnett, S. F.; Defeo-Jones, D.; Jones, R. E.; Hartman, G. D.; Huff, J. R.; Huber, H. E.; Duggan, M. E.; Lindsley, C. W., Discovery of 2,3,5-trisubstituted pyridine derivatives as potent Akt1 and Akt2 dual inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, 15 (4), 905-9.
196. Lena Quambusch, Design und Synthese kovalent-allosterischer Liganden zur isoform-selektiven Adressierung der Proteinkinase Akt, TU Dortmund. **2017**.
197. Coley, W. B., II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* **1891**, 14 (3), 199-220.
198. Mellman, I.; Coukos, G.; Dranoff, G., Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **2011**, 480 (7378), 480-9.
199. Mandapathil, M.; Szczepanski, M. J.; Szajnik, M.; Ren, J.; Jackson, E. K.; Johnson, J. T.; Gorelik, E.; Lang, S.; Whiteside, T. L., Adenosine and prostaglandin E2 cooperate in the suppression of immune responses mediated by adaptive regulatory T cells. *J Biol Chem* **2010**, 285 (36), 27571-80.
200. Oh, S. A.; Li, M. O., TGF-beta: guardian of T cell function. *J Immunol* **2013**, 191 (8), 3973-9.
201. Hennecke, J.; Wiley, D. C., T cell receptor-MHC interactions up close. *Cell* **2001**, 104 (1), 1-4.
202. Townsend, A.; Bodmer, H., Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **1989**, 7, 601-24.
203. Garcia-Lora, A.; Algarra, I.; Garrido, F., MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* **2003**, 195 (3), 346-55.
204. Leach, D. R.; Krummel, M. F.; Allison, J. P., Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **1996**, 271 (5256), 1734-6.
205. Ishida, Y.; Agata, Y.; Shibahara, K.; Honjo, T., Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* **1992**, 11 (11), 3887-95.
206. Pardoll, D. M., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **2012**, 12 (4), 252-64.
207. Iwai, Y.; Ishida, M.; Tanaka, Y.; Okazaki, T.; Honjo, T.; Minato, N., Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99 (19), 12293-7.
208. Tang, J.; Yu, J. X.; Hubbard-Lucey, V. M.; Neftelinov, S. T.; Hodge, J. P.; Lin, Y., Trial watch: The clinical trial landscape for PD1/PDL1 immune checkpoint inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, 17 (12), 854-855.

209. Wei, S. C.; Duffy, C. R.; Allison, J. P., Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov* **2018**, *8* (9), 1069-1086.
210. Onyshchenko, M., The Puzzle of Predicting Response to Immune Checkpoint Blockade. *EBioMedicine* **2018**, *33*, 18-19.
211. Sharma, P.; Hu-Lieskovan, S.; Wargo, J. A.; Ribas, A., Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* **2017**, *168* (4), 707-723.
212. Landsberg, J.; Kohlmeyer, J.; Renn, M.; Bald, T.; Rogava, M.; Cron, M.; Fatho, M.; Lennerz, V.; Wölfel, T.; Hölzel, M.; Tüting, T., Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* **2012**, *490* (7420), 412-6.
213. Hölzel, M.; Tüting, T., Inflammation-Induced Plasticity in Melanoma Therapy and Metastasis. *Trends Immunol* **2016**, *37* (6), 364-374.
214. Patel, S. A.; Minn, A. J., Combination Cancer Therapy with Immune Checkpoint Blockade: Mechanisms and Strategies. *Immunity* **2018**, *48* (3), 417-433.
215. Chapman, K.; Holmes, M.; Seckl, J., 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol Rev* **2013**, *93* (3), 1139-206.
216. Abraham, I. M.; Meerlo, P.; Luiten, P. G., Concentration dependent actions of glucocorticoids on neuronal viability and survival. *Dose Response* **2006**, *4* (1), 38-54.
217. Reddy, T. E.; Pauli, F.; Sprouse, R. O.; Neff, N. F.; Newberry, K. M.; Garabedian, M. J.; Myers, R. M., Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Res* **2009**, *19* (12), 2163-71.
218. Saiah, E., The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in metabolic disease and therapeutic potential of 11beta-hsd1 inhibitors. *Curr Med Chem* **2008**, *15* (7), 642-9.
219. Scott, J. S.; Goldberg, F. W.; Turnbull, A. V., Medicinal chemistry of inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11beta-HSD1). *J Med Chem* **2014**, *57* (11), 4466-86.
220. Oh, H.; Jeong, K. H.; Han, H. Y.; Son, H. J.; Kim, S. S.; Lee, H. J.; Kim, S.; Sa, J. H.; Jun, H. S.; Ryu, J. H.; Choi, C. S., A potent and selective 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, SKI2852, ameliorates metabolic syndrome in diabetic mice models. *Eur J Pharmacol* **2015**, *768*, 139-48.
221. Goldberg, F. W.; Leach, A. G.; Scott, J. S.; Snelson, W. L.; Groombridge, S. D.; Donald, C. S.; Bennett, S. N.; Bodin, C.; Gutierrez, P. M.; Gyte, A. C., Free-Wilson and structural approaches to co-optimizing human and rodent isoform potency for 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11beta-HSD1) inhibitors. *J Med Chem* **2012**, *55* (23), 10652-61.
222. Ryu, J. H.; Lee, J. A.; Kim, S.; Shin, Y. A.; Yang, J.; Han, H. Y.; Son, H. J.; Kim, Y. H.; Sa, J. H.; Kim, J. S.; Lee, J.; Lee, J.; Park, H. G., Discovery of 2-((R)-4-(2-Fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-methylpiperazin-1-yl)-N-((1R,2s,3S,5S,7S)-5-hydroxyadamantan-2-yl)pyrimidine-4-carboxamide (SKI2852): A Highly Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (11beta-HSD1). *J Med Chem* **2016**, *59* (22), 10176-10189.

223. Bruening, F.; Lovelle, L. E., Highly Regioselective Organocatalytic SNAr Amination of 2,4-Dichloropyrimidine and Related Heteroaryl Chlorides. *European Journal of Organic Chemistry* **2017**, 2017 (22), 3222-3228.
224. Paul, F.; Patt, J.; Hartwig, J. F., Palladium-catalyzed formation of carbon-nitrogen bonds. Reaction intermediates and catalyst improvements in the hetero cross-coupling of aryl halides and tin amides. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116 (13), 5969-5970.
225. Tomassi, S.; Lategahn, J.; Engel, J.; Keul, M.; Tumbrink, H. L.; Ketzer, J.; Mühlenberg, T.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Bauer, S.; Rauh, D., Indazole-Based Covalent Inhibitors To Target Drug-Resistant Epidermal Growth Factor Receptor. *J Med Chem* **2017**, 60 (6), 2361-2372.
226. Gelboin, H. V.; Wiebel, F.; Diamond, L., Dimethylbenzanthracene tumorigenesis and aryl hydrocarbon hydroxylase in mouse skin: inhibition by 7,8-benzoflavone. *Science* **1970**, 170 (3954), 169-71.
227. Bald, T.; Quast, T.; Landsberg, J.; Rogava, M.; Glodde, N.; Lopez-Ramos, D.; Kohlmeyer, J.; Riesenberger, S.; van den Boorn-Konijnenberg, D.; Homig-Holzel, C.; Reuten, R.; Schadow, B.; Weighardt, H.; Wenzel, D.; Helfrich, I.; Schadendorf, D.; Bloch, W.; Bianchi, M. E.; Lugassy, C.; Barnhill, R. L.; Koch, M.; Fleischmann, B. K.; Forster, I.; Kastenmuller, W.; Kolanus, W.; Holzel, M.; Gaffal, E.; Tuting, T., Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature* **2014**, 507 (7490), 109-13.
228. Lee, O. Y.; Law, K. L.; Ho, C. Y.; Yang, D., Highly chemoselective reductive amination of carbonyl compounds promoted by InCl₃/Et₃SiH/MeOH system. *J Org Chem* **2008**, 73 (22), 8829-37.
229. Weber, W. A., Positron emission tomography as an imaging biomarker. *J Clin Oncol* **2006**, 24 (20), 3282-92.
230. Pantel, A. R.; Mankoff, D. A., Molecular imaging to guide systemic cancer therapy: Illustrative examples of PET imaging cancer biomarkers. *Cancer Lett* **2017**, 387, 25-31.
231. Yamamoto, K.; Li, J.; Garber, J. A. O.; Rolfes, J. D.; Boursalian, G. B.; Borghs, J. C.; Genicot, C.; Jacq, J.; van Gastel, M.; Neese, F.; Ritter, T., Palladium-catalysed electrophilic aromatic C-H fluorination. *Nature* **2018**, 554, 511.
232. Beyzavi, M. H.; Mandal, D.; Strebl, M. G.; Neumann, C. N.; D'Amato, E. M.; Chen, J.; Hooker, J. M.; Ritter, T., (18)F-Deoxyfluorination of Phenols via Ru pi-Complexes. *ACS Cent Sci* **2017**, 3 (9), 944-948.
233. Wiese, S.; Reidegeld, K. A.; Meyer, H. E.; Warscheid, B., Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* **2007**, 7 (3), 340-50.
234. Crew, A. P.; Raina, K.; Dong, H.; Qian, Y.; Wang, J.; Vigil, D.; Serebrenik, Y. V.; Hamman, B. D.; Morgan, A.; Ferraro, C.; Siu, K.; Neklesa, T. K.; Winkler, J. D.; Coleman, K. G.; Crews, C. M., Identification and Characterization of Von Hippel-Lindau-Recruiting Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) of TANK-Binding Kinase 1. *J Med Chem* **2018**, 61 (2), 583-598.
235. Baillie, T. A., Targeted Covalent Inhibitors for Drug Design. *Angewandte Chemie* **2016**, 55 (43), 13408-13421.

236. Gaffal, E.; Landsberg, J.; Bald, T.; Sporleder, A.; Kohlmeyer, J.; Tüting, T., Neonatal UVB exposure accelerates melanoma growth and enhances distant metastases in Hgf-Cdk4R24C C57BL/6 mice. *International Journal of Cancer* **2011**, *129* (2), 285-294.
237. Yasuhara, A.; Sakamoto, T., Deprotection of N-sulfonyl nitrogen-heteroaromatics with tetrabutylammonium fluoride. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (7), 595-596.
238. 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* (8), 913-23.
239. Strohalm, M.; Hassman, M.; Kosata, B.; Kodicek, M., mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2008**, *22* (6), 905-8.
240. Wolle, P.; Müller, M. P.; Rauh, D., Augmented Reality in Scientific Publications-Taking the Visualization of 3D Structures to the Next Level. *ACS Chem Biol* **2018**, *13* (3), 496-499.

9 Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Uhlenbrock, Niklas

Name, Vorname
(Surname, first name)

133998

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.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Struktur-basiertes Design, Synthese und Evaluation

von Sondenmolekülen und Wirkstoffkandidaten

zur Adressierung der Proteinkinase Akt

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.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)