

Synthese, *in vitro* und *in vivo* Evaluierung  
Molekularer Sonden, PROTACs und PET-*Tracern*  
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

**Marius Lindemann**

Dortmund 2021

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh

2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Summerer



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2017 bis Oktober 2021 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh im Fachbereich für Chemische Biologie und Medizinische Chemie 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 Masterarbeit von Mirko Schmidt 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.; Muller, 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.; Muller, H.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Guenther, G.; Maghnouj, A.; Muller, 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**, 79 (9), 2367-2378.

Jörn Weisner, Marius Lindemann, Jens Rickmeier, Nicola Breen, Marija Traikovic-Arsic, Kristina Althoff, Ina Landel, Niklas Uhlenbrock, Sven Brandherm, Rajesh Gontla, Laura Depta, Lena Quambusch, Julian Engel, Matthias Baumann, Cristina Cadenas, Rosemarie Marchan, Georgia Guenther, Matthias P. Müller, Tobais Ritter, Jens T. Siveke, Jan G. Hengstler Daniel Rauh, Design, synthesis and biological evaluation of fluorinated Borussertib targeting AKT, *submitted* **2021**.



## Danksagung

An erster Stelle gilt ein großer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Rauh, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe zu einem sehr spannenden Projekt zu forschen und hierüber meine Promotionsarbeit anzufertigen. Insbesondere bin ich sehr dankbar für die andauernde Unterstützung und Förderung durch neue Impulse während dieser gesamten Zeit. Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Daniel Summerer für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Das Akt-Forschungsprojekt in der AG Rauh macht vor allem die außerordentlich gute Zusammenarbeit mit vielen weiteren Wissenschaftlern aus. So waren der Austausch in Bezug auf (struktur-)biologische und zelluläre Fragestellung, wie u.a. das Durchführen diverser Assays, von Jörn Weisner, Ina Landel und Lena Quambusch unverzichtbar und stets sehr hilfreich. Ein besonderer Dank hierbei gilt vor allem Ina Landel für die Einarbeitung in zellbiologische Arbeiten. Darüber hinaus war die Zusammenarbeit mit Sven Brandherm, Lena Quambusch und Niklas Uhlenbrock im Chemielabor von einer guten Atmosphäre geprägt, in der man bei jeglichen Fragestellungen stets neue Impulse bekam. Ein weiterer besonderer Dank gilt Lisa Goebel für die motivierende Zusammenarbeit während der Corona Zeit und etlichen WB-Analysen. Zusätzlich hierzu war die Arbeit stets von einem guten wissenschaftlichen Miteinander in der AG Rauh geprägt, sodass mein Dank allen weiteren jetzigen und ehemaligen Mitgliedern gilt: meinem Büopartner Mike, Matthias, Steven, Tobias, Kiru, Tonia, Julia, Jonas W., Jonas L., Laura, Rajesh, Shiva, Janina, Patrik, Marina, Alina, Helena und Bianca. Für das Korrekturlesen dieser Dissertation gilt ein außerordentlicher Dank Ina Landel.

Ebenso danke ich meinem Masterstudenten Mirko Schmidt für sein Engagement in einem Teilprojekt dieser Arbeit. Für die Arbeiten im Hintergrund ohne die unsere alltägliche Arbeit nicht ansatzweise möglich gewesen wäre, möchte ich mich bei Martina Reibner, Petra Alhorn, Maria Sergani und Ulrich Schoppe bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei Paul Siebers und Andreas Arndt für die Unterstützung bei den biologischen Arbeiten.

Die Kooperation mit externen Partnern im Rahmen des Akt-Projekts war sehr interessant und lieferte neue hilfreiche Einsichten in diese Arbeit. So bedanke ich mich für diese tolle interdisziplinäre Forschung bei Prof Dr. Jens Sieveke, Dr. Marija Trajkovic-Arsic (UK Essen), Prof. Dr. Stephan Hahn, Dr. Christoph Reintjes (RUB), Prof. Dr. Tobias Ritter, Dr. Jens Rickmeier (MPI Mülheim), Dr. Matthias Baumann, Dr. Julian Engel (LDC) und Dr. Laura Levy (Taros Chemicals).

Für die Durchführung der stets hochqualitativen analytischen Daten möchte ich mich bei dem NMR-Team um Prof. Dr. Wolf Hiller sowie dem HRMS-Team um Christiane Heitbrink bedanken.

An letzter Stelle möchte ich meiner ganzen Familie danken, die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht haben und mich hierbei stets vollends unterstützt haben. Zudem haben sie es, genauso wie meine Freunde, geschafft mich in stressigen Zeiten zu beruhigen, sodass ich mit frischer Energie weitermachen konnte. Ebenso bedanke ich mich für den Zusammenhalt und die Ablenkung bei meinen beiden ehemaligen WG Mitbewohnerinnen Lisa und Alina. An allerletzter Stelle ist meine Freundin Marit zu nennen, die stets hinter mir stand und in den richtigen Momenten für neue Motivation gesorgt hat, vielen Dank!

## Inhaltsverzeichnis

Publikationen .....	V
Danksagung .....	VII
Inhaltsverzeichnis .....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Präzisionsmedizin in der Krebstherapie .....	1
1.2 Relevanz der Proteinkinase Akt in der zielgerichteten Onkologie.....	5
1.2.1 Akt als Schlüsselkomponente in der PI3K/Akt/mTor-Signalkaskade.....	6
1.2.2 Struktur der Proteinkinase Akt .....	8
1.2.3 Medizinalchemische Adressierung der Proteinkinase Akt .....	9
1.3 Positronen-Emissions-Tomographie.....	13
1.3.1 <i>Late Stage Functionalization</i> .....	15
1.4 Wirkstoff-induzierter Proteinabbau .....	16
1.4.1 Adressierung von Akt mittels PROTACs.....	19
1.5 Aktivitätsbasierte Proteinprofilierung.....	20
2 Motivation und Zielsetzung .....	23
3 Ergebnisse und Diskussion .....	26
3.1 Hochskalierung der Borussertib-Synthese zur präklinischen Evaluierung.....	26
3.2 Medizinalchemische Optimierung von Borussertib .....	34
3.2.1 Generierung einer fokussierten Pyridin-basierten Molekülbibliothek.....	35
3.2.2 Biochemische Evaluierung .....	39
3.3 Entwicklung eines Akt-PET-Tracers .....	43
3.3.1 Design und Synthese von <sup>18/19</sup> F-Borussertib.....	43
3.3.2 Biochemische, zelluläre und PK-Profilierung .....	51
3.3.3 <i>in vivo</i> PET-Studien .....	54
3.4 Etablierung molekularer Sonden .....	59

3.4.1 Synthese und Etablierung einer Cy3-basierten chemischen Sonde .....	61
3.4.2 Etablierung einer Cyclooctin-Sonde und der <i>in situ</i> SPAAC .....	66
3.4.3 Synthese und Etablierung von Biotin-Sonden .....	70
3.5 SAR-Untersuchung von Akt-PROTACs.....	74
3.5.1 Design und Synthese von Akt PROTACs.....	74
3.5.2 Biochemische und zelluläre Evaluierung der inhibitorischen Wirkung.....	78
3.5.3 <i>in vitro</i> PD Studien.....	81
3.5.4 Verifizierung des proteasomalen Abbaus .....	90
3.5.5 Zeitabhängige Analyse der Akt1-Degradierung .....	92
4 Zusammenfassung und Ausblick .....	96
5 Kurzfassung.....	103
6 Abstract .....	105
7 Experimenteller Teil.....	107
7.1 Organische Synthese .....	107
7.1.1 Allgemeines.....	107
7.1.2 Generelle Synthesevorschriften.....	108
7.1.3 Synthese und Analytik .....	110
7.2 Methoden.....	159
7.2.1 <i>In silico</i> Modellierung .....	159
7.2.2 HTRF Assay zur IC <sub>50</sub> -Bestimmung und kinetischen Charakterisierung .....	159
7.2.3 Protein-Massenspektrometrie.....	160
7.2.4 <i>in situ</i> CuAAC <i>In-Gel</i> Fluoreszenz .....	160
7.2.5 <i>in situ</i> SPAAC <i>In-Gel</i> Fluoreszenz .....	161
7.2.6 <i>In-Gel</i> Fluoreszenz .....	161
7.2.7 Protein Pull-Down.....	161
7.2.8 WB Analyse des tAkt1- und pAkt <sup>S473</sup> -Levels in Panc1-und ZR-75-1 .....	163
8 Literaturverzeichnis.....	165
Eidesstaatliche Erklärung .....	175

## Abkürzungsverzeichnis

AAP	potentieller allosterischer Akt PROTAC
ABPP	engl. <i>activity based protein profiling</i>
Akt	Proteinkinase B
ALK	anaplastischen Lymphom-Kinasen
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	engl. <i>Bcl-2-antagonist of Cell death</i>
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
Boc	<i>tert</i> -Butyloxybarbonyl
CAAI	kovalent allosterische Akt Inhibitor (eng. Covalent allosteric Akt inhibitor)
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
cIAP	engl. <i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CLIPTAC	engl. <i>in-cell click-formed proteolysis targeting chimeras</i>
COSMIC	engl. <i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
CRBN	Cereblon
CT	engl. <i>charge transfer</i>
CTG	engl. <i>cell titer glow</i>
CuAAC	Kupfer-katalysierten Alkin-Azid Cycloaddition
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DSS	Disuccinimidyl Suberat
EGFR	epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> , EGFR)
FDG	Fluordesoxyglukose
FLT	<sup>18</sup> F-Fluorthymidin
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GTP-Austauschfaktor (engl. <i>guanosine triphosphate exchange factor</i> )
GSK3	Glykasekinase-3
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden

HM	Hydrophobes Motiv
HTRF	engl. <i>homogenous time-resolved fluorescence</i>
HyT	engl. <i>hydrophobic tagging</i>
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
K-Ras	Kirsten-Ras
LCMS	engl. <i>liquid chromatography–mass spectrometry</i>
LSF	engl. <i>late stage functionalization</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MDM2	engl. <i>mouse double minute 2 homologue</i>
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
mTOR	engl. <i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC2	engl. <i>mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
NFSI	N-Fluorbenzolsulfonimid
NMR	magnetische Kernresonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NSCLC	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (engl. <i>non-small-cell lung carcinoma</i> )
N-Ras	Neuroblastoma-Ras
PCA	engl. <i>Protein-fragment Complementation Assay</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>Polymerase chain reaction</i> )
PD	Pharmakodynamik
PDB	Protein Data Bank
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1
PDX	Patientenmaterial-abgeleiteten Xenograft-Modellen (engl. <i>patient-derived xenografts</i> )
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen Emissions Tomographie
PH	engl. <i>pleckstrin homology</i>
PHLPP1/2	PH-Domänen leucin-reiche Protein Phosphatasen 1/2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PK	Pharmakokinetik

PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PRAS40	Prolin-reiches Akt Substrat
PROS	engl. <i>PIK3CA-related overgrowth spectrum</i>
PROTAC	Proteolyse-Targeting-Chimera
PTEN	Phosphatase & Tensin Homolog
PTM	posttranslationale Modifikationen
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
Raf	G-Protein ( <i>rat fibrosarcoma</i> )
Ras	G-Protein ( <i>rat sarcoma</i> )
RCY	engl. <i>radiochemical yield</i>
RIPA	engl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
ROCK	Rho-assoziierten Proteinkinase
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehungen (engl. <i>structure activity relationship</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SET	engl. <i>single electron transfer</i>
SFFV	engl. <i>Spleen Focus Forming Virus</i>
SGK3	eng. <i>serum and glucocorticoid-induced protein kinases 3</i>
SOS	engl. <i>son of sevenless</i>
SPAAC	engl. <i>strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrifuran
ÜS	Überstand
VHL	von Hippel-Lindau
WB	Western Blot
WT	Wildtyp



## 1 Einleitung

Im Jahr 2020 wurde bei 19,3 Millionen Menschen Krebs diagnostiziert und bei 10,0 Millionen Menschen war eine Krebserkrankung die Haupttodesursache.<sup>[1]</sup> Damit sind krebsbedingte Todesfälle nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen, 17,9 Millionen im Jahr 2016, die zweithäufigste Todesursache auf der Welt.<sup>[2]</sup> In den letzten Jahren nahm die Anzahl der diagnostizierten Krebserkrankungen kontinuierlich zu und innerhalb der nächsten zwanzig Jahre wird ein weiterer Anstieg von 47 % auf 28,4 Millionen diagnostizierte Krebserkrankungen pro Jahr erwartet.<sup>[3]</sup> Dieser Anstieg kann zum einen mit der demographischen Entwicklung in vielen Ländern sowie der ansteigenden Weltbevölkerung erklärt werden. Inzwischen hat Brustkrebs mit 2,3 Millionen neuen Diagnosen pro Jahr (11,7 % aller Krebserkrankungen) Lungenkrebs (11,4 %) als am häufigsten diagnostizierte Tumorform abgelöst, gefolgt von kolorektalen Karzinomen (10,0 %), Prostata- (7,3 %) und Magenkrebs (5,6 %). Lungenkrebs ist hierbei die maligne Krebsform mit der größten Mortalität von 1,8 Millionen Todesfällen pro Jahr (18 % aller krebsbedingten Todesfälle), gefolgt von kolorektalen Karzinomen (9,4 %), Leber- (8,3 %), Magen- (7,7 %) und Brustkrebs (6,9 %).<sup>[3]</sup>

Dem entgegen stehen neue und verbesserte Möglichkeiten in der frühen Diagnostik und damit verbundenen besseren Möglichkeiten hinsichtlich erfolgreicher chirurgischer Eingriffe sowie Therapien zur Behandlung der Tumore.<sup>[4]</sup> Ein entscheidender Faktor hierbei ist der Einsatz der sogenannten personalisierten Medizin, durch welche die zielgerichtete Adressierung von onkogenen Biomolekülen möglich ist.<sup>[5]</sup> Diese Präzisionsmedizin führt zu einer deutlichen Erhöhung der Lebenszeit, Überlebenschance und Verbesserung der Lebensqualität der Patienten.

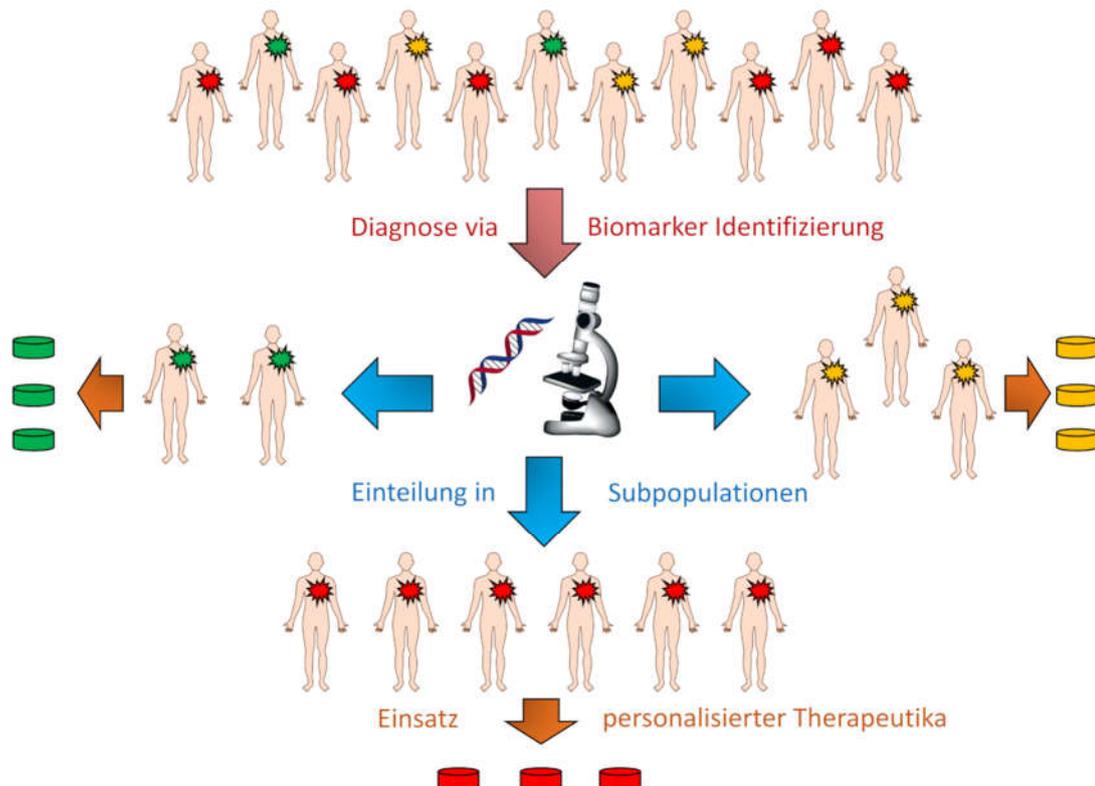
### 1.1 Präzisionsmedizin in der Krebstherapie

Über Jahrzehnte hinweg bis zum Anfang des 21. Jahrhunderts erfolgte die Behandlung von Krebs mittels chirurgischer Eingriffe sowie zytotoxischer Strahlen- und Chemotherapie.<sup>[6]</sup> Mit dem Abschluss des Humangenomprojekts im Jahr 2003 konnte das komplette humane Genom erfolgreich entschlüsselt werden, womit die phänotypische Erkrankung in Korrelation zu der genotypischen Läsion gebracht werden kann.<sup>[7]</sup> Dies ermöglicht somit eine genaue Behandlung des Krankheitsbildes anhand der genotypischen Erkrankung und ermöglicht insbesondere für die Krebstherapie eine

neuartige personalisierte Behandlungsstrategie entsprechend ihrer genetischen Läsionen.<sup>[8]</sup>

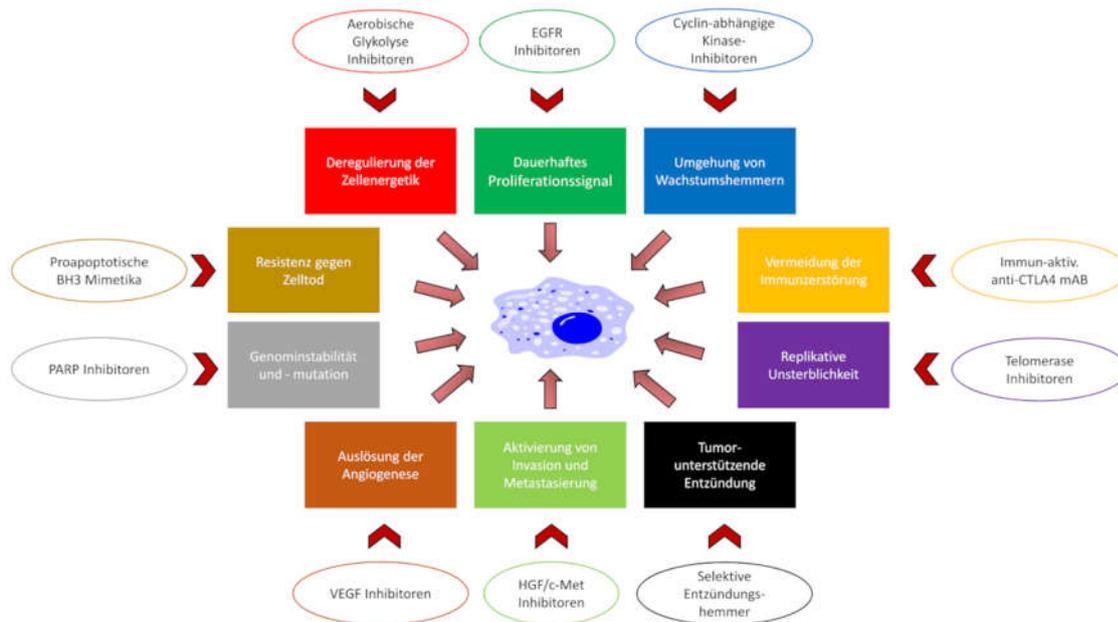
Die Tumorentstehung wird durch eine genetische Läsion eines Tumorsuppressor- oder Protoonkogens ausgelöst.<sup>[9]</sup> Sowohl Protoonkogene als auch Tumorsuppressorgene regulieren zentrale biologische Funktionen wie beispielsweise Zellproliferation, -überleben, -differenzierung und Apoptose.<sup>[10]</sup> Diese zellulären Funktionen können unter anderem durch *loss of function* Mutationen in Tumorsuppressorgenen fehlreguliert werden, was zu einer Tumorgenese führen kann.<sup>[11]</sup> Im Falle genetischer Läsionen in einem Protoonkogen, z. B. Punktmutationen oder Genamplifikationen, kann ein Onkogen entstehen, wodurch eine dauerhafte Aktivierung oder Überexpression des Onkoproteins hervorgerufen wird, die zu einer Entartung der Zelle zur malignen Krebszelle führt.<sup>[12]</sup> Dies führt zu einer Abhängigkeit der Zelle vom onkogenen Signal, der vom WEINSTEIN beschriebenen *oncogene addiction*.<sup>[13]</sup> Diese Abhängigkeit macht sich die zielgerichtete Krebstherapie zu Nutze, indem hierbei das Onkogen gezielt adressiert und inhibiert wird, wodurch die Apoptose induziert wird und die Tumorzelle degeneriert, der sogenannte *oncogenic shock*.<sup>[14]</sup>

Essentiell für den Ansatz der Präzisionsmedizin ist die erfolgreiche Identifikation von Biomarkern, damit die Patienten entsprechend ihrer genetischen Läsion klassifiziert werden können (Abb. 1).<sup>[15]</sup> Diese Biomarker können unter anderem Gene, Proteine oder Metabolite sein, deren Identifikation unverzichtbar ist, um die Entwicklung einer Krankheit und eine gezielte therapeutische Antwort vorhersagen zu können.<sup>[16]</sup> Die Identifikation solcher Biomarker ist mit der Entwicklung von stetig verbesserten, schnelleren Sequenzierung eng verknüpft, da hiermit Patientengruppen sehr effizient stratifiziert werden können.<sup>[17]</sup> Dies bedeutet aber zugleich, dass die Präzisionsmedizin absolut abhängig von solchen Biomarkern ist und die Identifizierung weiterer essentiell für eine verbesserte und großflächigere Krebsbehandlung ist.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Präzisionsmedizin. Eine Patientengruppe mit der phänotypisch gleichen Krebserkrankung wird mittels diagnostischer Biomarker Identifikation in Subpopulationen entsprechend ihrer genotypischen Läsion eingeteilt und dementsprechend mit zielgerichteten Therapeutika behandelt.<sup>[15a]</sup>

Eine wichtige weitere Grundlage für die zielgerichtete Onkologie stellen die *hallmarks of cancer* dar, mit Hilfe derer die relevanten Angriffspunkte von potentiellen Therapeutika beschrieben werden.<sup>[18]</sup> Zu diesen zentralen Eigenschaften einer Tumorzelle wurden zehn elementare Prozesse definiert: Eigenversorgung mit Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumshemmern, Immunevasion, unbegrenzte Replikation, tumorfördernde und entzündliche Mikroumgebung, Aktivierung von Gewebeinvasion und Metastasierung, fortlaufende Angiogenese, Genominstabilität und -mutation, Resistenz gegenüber dem Zelltod und Deregulierung des zellulären Energiestoffwechsels.<sup>[12]</sup> So können beispielsweise Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren, wie Palbociclib und Abemaciclib, genutzt werden, um die Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumshemmern zu adressieren.<sup>[19]</sup>



**Abbildung 2:** Darstellung der *hallmarks of cancer* nach WEINSTEIN.<sup>[12-13]</sup> Die zehn elementaren Prozesse kennzeichnen eine Tumorzelle und stellen mögliche Angriffspunkte für die Präzisionsmedizin dar.

Ein weiterer Angriffspunkt von Tumorzellen, die Eigenversorgung mit Wachstumssignalen, wird beispielsweise zur Behandlung von nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (engl. *non small cell lung cancer*, NSCLC) genutzt.<sup>[20]</sup> Hierbei konnten aktivierende Mutationen im epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) oder Genfusionen in anaplastischen Lymphom-Kinasen (ALK) als entsprechende Biomarker identifiziert werden, die mittels Tyrosinkinase-Inhibitoren behandelt werden können.<sup>[21]</sup> Durch den Einsatz von zielgerichteten Therapeutika wie den EGFR-Inhibitoren Osimertinib (Tagrisso, AstraZeneca), Afatinib (Giotrif, Boehringer Ingelheim) oder dem ALK-Inhibitor Lorlatinib (Lorviqua, Pfizer) konnte die mittlere Überlebenszeit von acht Monaten auf bis zu 30 Monate signifikant gesteigert werden.<sup>[22]</sup> Der Einsatz der Tyrosinkinase-Inhibitoren ist somit von großem Erfolg geprägt, aber wird gleichzeitig durch einen weiteren *hallmark of cancer*, der Genominstabilität und -mutation, limitiert. So treten im EGFR zum Beispiel die T790M oder C797S Resistenzmutationen auf, die durch den Inhibitor-basierten Selektionsdruck entstehen können.<sup>[23]</sup> Solche Resistenzmutationen erfordern die Weiterentwicklung bestehender Therapeutika hin zu ergänzenden Behandlungsstrategien, wie zum Beispiel der Entwicklung kovalenter Modulatoren oder neuen innovativen Methoden wie dem Wirkstoff-induzierten Proteinabbau.<sup>[24]</sup>

Darüber hinaus wird das Anwendungsspektrum für die Präzisionsmedizin immer stärker erweitert, da mit neuen Proteomics-Methoden neue Biomarker identifiziert werden können, die dann durch die Entwicklung gezielter Therapeutika adressiert werden können.<sup>[25]</sup> Die Adressierung dieser Biomarker ist häufig herausfordernd, da diese zum Beispiel Bestandteil des sogenannten *undruggable* Genoms, beispielsweise Protein-Protein-Interaktionen oder unzugängliche Proteinbindetaschen, sein können.<sup>[26]</sup> Eine weitere Herausforderung stellen Zielproteine wie die Serin-/Threoninkinase Akt dar, für die bisher robuste Marker für die Entwicklung eines effizienten therapeutischen Behandlungsansatzes fehlen.<sup>[27]</sup>

## 1.2 Relevanz der Proteinkinase Akt in der zielgerichteten Onkologie

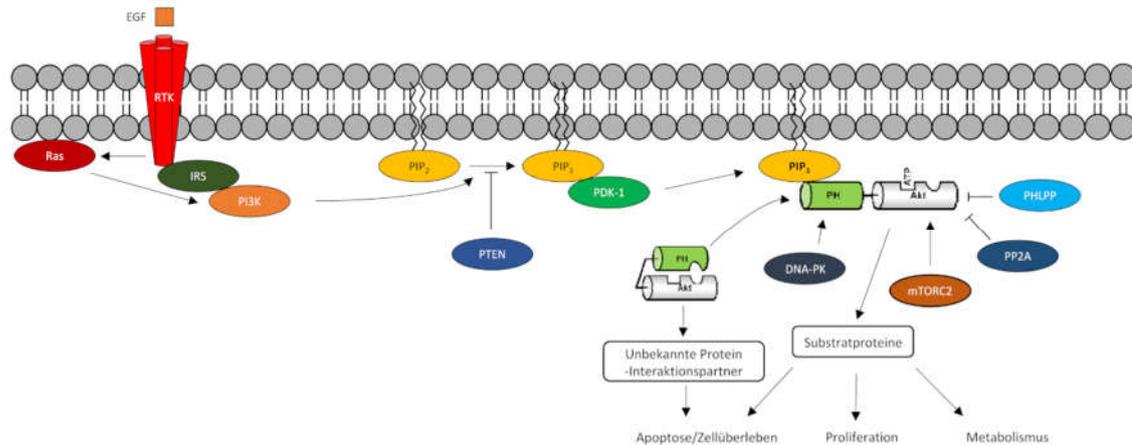
Das humane Kinom umfasst 535 Proteine und steuert die intrazellulären Signalwege durch die Phosphorylierung der entsprechenden Proteinsubstrate.<sup>[28]</sup> Hierbei sind etwa 85 % des Kinoms an mindestens einer Krankheit oder Entwicklungsstörung aufgrund einer Dysregulation beteiligt. Solche Dysregulationen führen zu einer fehlerhaften Funktion der Kinasen, deren Haupteigenschaft die Übertragung von der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des Adenosintriphosphats (ATP) auf Hydroxylgruppen von Substratproteinen ist.<sup>[29]</sup> Dabei unterscheiden sie sich je nach adressierter Aminosäure in Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen. Aufgrund der zentralen Rolle der Kinasen in den Signaltransduktionswegen führt eine Fehlregulation in vielen Fällen zu einem unkontrollierten Zellwachstum, die zur Tumorentstehung führt.<sup>[30]</sup> Dies wiederum führt zu einer hohen Relevanz in Hinsicht auf die chemische Modulation ihrer enzymatischen Aktivität.<sup>[31]</sup>

Die Proteinkinase B (PKB), Akt, mit seiner zentralen Position im PI3K/Akt/mTor-Signalweg und der damit verbundenen hohen Anzahl an Substraten und nachgeschalteten Signaltransduktionswegen, stellt ein vielversprechendes Zielprotein für die medizinalchemische Adressierung dar.<sup>[32]</sup> Akt ist eine Serin/Threonin-Kinase der AGC-Familie (Proteinkinasen A, G und C) mit drei Isoformen, Akt1-3, die sich in Funktion und Lokalisation, trotz der hohen Sequenzhomologie von 73 %, deutlich voneinander unterscheiden.<sup>[33]</sup> Akt mit seiner zentralen Rolle in der PI3K/Akt/mTor-Signalkaskade steuert elementare zelluläre Prozesse wie die Proliferation, Metabolismus und Zellüberleben reguliert werden.<sup>[34]</sup>

Eine abnormale Aktivität einer Komponente des Signalwegs führt zu einer dauerhaften Aktivierung, die eine Entartung der Zelle und die Entstehung von Krebs bedingt.<sup>[35]</sup>

### 1.2.1 Akt als Schlüsselkomponente in der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade

Die Aktivierung von Akt innerhalb des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionswegs erfolgt durch die extrazelluläre Stimulation, ausgelöst von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren (EGF), von Rezeptortyrosinen oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese aktivieren zunächst die Lipidkinase Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zum *second messenger* Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) phosphoryliert.<sup>[36]</sup> Das PIP<sub>3</sub> sorgt für die Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran, indem PIP<sub>3</sub> über basische Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Asparagin an die *pleckstrin homology* (PH) Domäne von Akt bindet.<sup>[37]</sup> Mit Hilfe dieser Bindung wird die PH-out Konformation induziert und durch die ebenfalls PIP<sub>3</sub>-rekrutierte Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) wird Thr308 in der Aktivierungsschleife phosphoryliert.<sup>[38]</sup> Mittels der Phosphorylierung von Ser473 durch den *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) complex 2 (mTORC2) im C-terminalen hydrophoben Motiv wird zum einen die Phosphorylierung von Thr308 durch PDK1 erleichtert und zum anderen Akt vollständig aktiviert.<sup>[39]</sup> Das so aktivierte Akt leitet das Signal durch Phosphorylierungen an die nachstehenden Substrate wie z. B. Glykasekinase-3 (GSK3), Prolin-reiches Akt Substrat (PRAS40) und *Bcl-2-antagonist of Cell death* (BAD) weiter.<sup>[40]</sup> Die Regulation der Akt-Aktivität wird durch verschiedene Phosphatasen kontrolliert, die zu einer Dephosphorylierung von Akt führen und die Akt-initiierte Signalweiterleitung unterbrechen.<sup>[32]</sup> So werden die Aktivierungsmodulationen pThr308 durch die Protein Phosphatase 2A (PP2A) und pSer473 durch die PH-Domänen Leucin-reiche Protein Phosphatasen 1/2 (PHLPP1/2) dephosphoryliert.<sup>[41]</sup> Ebenso reguliert der Tumorsuppressor Phosphatase & Tensin Homolog (PTEN) die Akt-Aktivität durch die Dephosphorylierung von PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub>, sodass die Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran unterbunden wird.<sup>[42]</sup> Neben der Regulation der Akt-Aktivität durch die Kinase-Domäne zeigt Akt eine Kinase-unabhängige Aktivität in Hinsicht auf die Regulation des Zellüberlebens.<sup>[43]</sup> Diese Funktion ist unabhängig von der Bindung zu PDK1 und die Signalweiterleitung erfolgt voraussichtlich über PH-Domänen-vermittelte Protein Interaktionen, wobei diese Interaktionspartner bisher noch nicht vollständig erforscht sind (Abb. 3).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweg.<sup>[44]</sup> Ausgangspunkt ist die extrazelluläre Stimulation von RTKs, durch die PI3K aktiviert wird. PI3K phosphoryliert das membrangebundene PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub>, das Akt durch Bindung zur PH-Domäne an die Membran rekrutiert und in der Enzym-aktiven PH-out Konformation stabilisiert. Hier wird Akt durch PDK1 und mTORC2 phosphoryliert und aktiviert, sodass es durch Phosphorylierung von Substratproteinen eine Signalweiterleitung induziert. Diese steuern wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Metabolismus, Apoptose und das Zellüberleben. Ebenso werden diese Prozesse noch durch die Kinase-unabhängige Aktivität von Akt reguliert, wobei hier die Identifikation der Protein-Interaktionspartner noch nicht abgeschlossen ist.<sup>[32, 43]</sup>

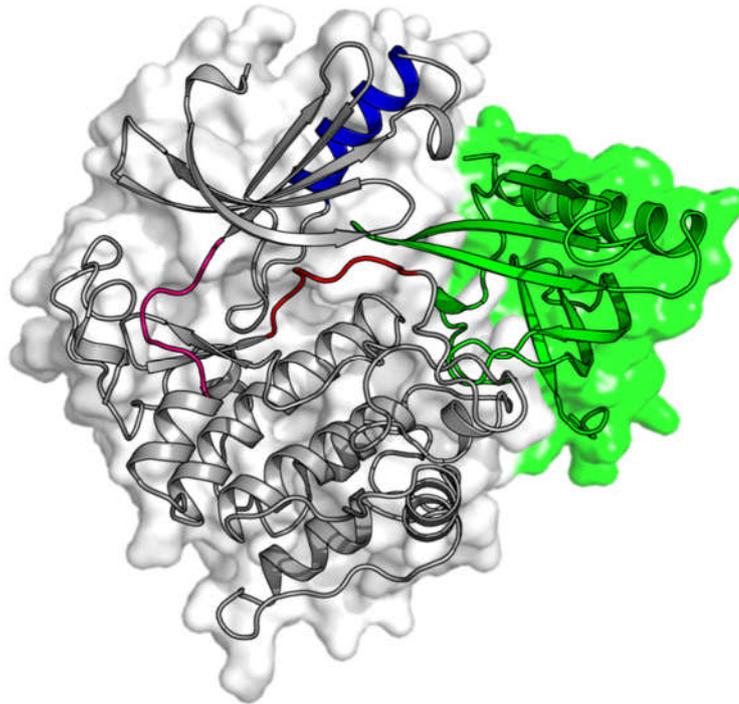
Die PI3K/Akt/mTor-Signalkaskade steuert unter anderem wichtige zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Angiogenese, Zellproliferation und Apoptose.<sup>[44]</sup> Eine abnormale Aktivität innerhalb des Signalwegs ist hierbei mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, wie kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen, Typ 2-Diabetes und einer Vielzahl von Tumorarten (Brust-, Lungenkrebs und Endometriumkarzinomen).<sup>[45]</sup> Dabei sind genetische Läsionen in Akt selbst nur von geringerer Bedeutung, da eine Akt-Überaktivierung meist aufgrund von Fehlregulation weiterer Mitglieder des PI3K/Akt/mTor-Signalweg ausgelöst wird.<sup>[44]</sup> Vor allem aktivierende Mutationen oder Amplifikationen in EGFR oder PI3K, Überexpression von PDK1 oder *loss of function* Mutationen des Tumorsuppressorgens PTEN lösen solche Fehlregulationen aus.<sup>[46]</sup> Trotz der niedrigen Relevanz von Mutationen von Akt selbst treten für die prominenteste E17K-Treibermutation Inzidenzen in Kolorektal-, Lungen-, Eierstockkarzinomen und ER<sup>+</sup>-Brustkrebs auf.<sup>[47]</sup> Eine weitaus höhere Relevanz weist diese Mutation jedoch in einer seltenen Überwucherkrankung, dem Proteus Syndrom, auf und dient hierbei als prädiktiver klinischer Biomarker.<sup>[48]</sup> Durch den Austausch der negativ geladenen Glutaminsäure zur basischen Lysin-Seitenkette entsteht eine elektrostatische Repulsion,

die eine Verschiebung des Gleichgewichts von der inaktiven PH-*in* Konformation zur aktiven PH-*out* Konformation zur Folge hat.<sup>[49]</sup> Dies führt zu einer verstärkten Rekrutierung von Akt zur Plasmamembran und einer konstitutiven Aktivität der Kinase. Die weiteren bekannten Treibermutationen L52R, Q79K und D323H, die eine weitaus geringere Relevanz als die E17K-Mutation haben, schwächen ebenfalls die Interaktion zwischen PH- und Kinasedomäne und haben somit eine Verschiebung des Gleichgewichts zur aktiven PH-*out* Konformation zur Folge.<sup>[50]</sup> Darüber hinaus lassen sich in mehreren Tumorarten Akt2-Genamplifikationen nachweisen und sowohl bei der Strahlen- und Chemotherapie als auch der personalisierten Medizin ist eine Überexpression von Akt als Resistenzmechanismus bekannt.<sup>[51]</sup>

### 1.2.2 Struktur der Proteinkinase Akt

Für die erfolgreiche medizinalchemische Adressierung ist die genaue Identifikation und Analyse der Struktur von Akt essentiell.<sup>[52]</sup> Akt besteht prinzipiell aus drei funktionellen Domänen, der Kinase-, der N-terminalen PH-Domäne und dem C-terminalen hydrophoben Motiv (HM).<sup>[53]</sup> Die hoch konservierte Kinase-Domäne besteht aus einer N-terminalen und C-terminalen Subdomäne, die über die Scharnierregion miteinander verbunden sind.<sup>[54]</sup> An der Scharnierregion befindet sich auch die ATP-Bindungstasche und somit das katalytische Zentrum der Kinase. Außerdem befindet sich das DFG-Motiv, die  $\alpha$ C-Helix und die Phosphorylierungsstelle Thr308 in der Kinasedomäne. Die zweite für die Akt-Aktivität relevante Phosphorylierungsstelle Ser473 befindet sich im C-terminalen HM, welches aus etwa 40 Aminosäuren besteht. Die dritte strukturelle Akt-Domäne stellt die N-terminale PH-Domäne dar, die über einen ca. 30 Aminosäuren langen, flexiblen Linker mit der Kinase verbunden ist und selbst aus etwa 120 Aminosäuren besteht. Die hohe Flexibilität ist entscheidend für die Regulation der Kinaseaktivität, da hierüber das Gleichgewicht zwischen der Kinase-inaktiven PH-*in* Konformation und der aktiven PH-*out* Konformation gesteuert wird.<sup>[55]</sup> Der aktive PH-*out* Zustand wird durch polare Interaktionen zwischen dem *second messenger* PIP<sub>3</sub> und der PH-Domäne induziert. Im Gegensatz dazu legt sich die PH-Domäne bei der PH-*in* Konformation über die Kinase-Domäne und erzeugt somit einen geschlossenen Zustand der Kinase, der durch polare Wechselwirkungen von Glu17 der PH-Domäne mit Arg273 der Kinase-Domäne sowie polarer Interaktionen von Thr81/Thr82 der PH-Domäne und Lys178/Asp292 der Kinasedomäne und weiterer unpolarer Wechselwirkungen stabilisiert wird.<sup>[55]</sup>

Die PH-*in* Konformation führt zu einer Verdrängung der  $\alpha$ C-Helix aus der allosterischen Bindungstasche, der Induktion der DFG-*out* Konformation und zur Blockierung der ATP-Bindetasche durch die Aminosäure Phe293.<sup>[56]</sup> Zugleich entsteht eine allosterische Bindungstasche zwischen Kinase- und PH-Domäne, die von großer Relevanz für die Modulation durch niedermolekulare Verbindungen ist.<sup>[55]</sup>



**Abbildung 4:** Proteinkristallstruktur von Akt (PDB: 6HHJ).<sup>[57]</sup> Akt befindet sich in der Kinase-inaktiven PH-*in* Konformation mit DFG-*out* Zustand und verdrängter  $\alpha$ C-Helix (blau). Die Kinasedomäne (grau) besteht aus einer N-terminalen und C-terminalen Subdomäne, die über die Scharnierregion (pink) miteinander verknüpft sind. Die Aktivierungsschleife (rot) befindet sich in der Kinase-Domäne und die regulatorische PH-Domäne (grün) ist N-terminal mit der Kinase-Domäne verbunden.

### 1.2.3 Medizinalchemische Adressierung der Proteinkinase Akt

Der klassische Ansatz zur Adressierung von Proteinkinasen ist der Einsatz von ATP-kompetitiven niedermolekularen Verbindungen, die das aktive Zentrum der Kinase besetzen und somit die Bindung von ATP inhibieren.<sup>[31,58]</sup> Der Akt-Inhibitor GSK690693 (GlaxoSmithKline), basierend auf einem Aminofurazan Grundgerüst, war einer der ersten Akt-Inhibitoren, der bei akuter lymphoblastischer Leukämie das Zellwachstum, erfolgreich hemmt, aber jedoch zu starken Nebenwirkungen führt, sodass er in der klinischen Entwicklung scheiterte (Abb. 5).<sup>[59]</sup> Weiterführend befinden sich weitere ATP-

kompetitive Akt Inhibitoren, Capivasertib (AstraZeneca) bzw. Ipatasertib (Genentech) mit alternativen chemischen Grundgerüsten, wie z. B. Pyrrolopyrimidin bzw. Cyclopentapyrimidin in verschiedenen Phase I/II-Studien.<sup>[60]</sup> Diese so modifizierten Wirkstoffe zeigen ein verbessertes Selektivitätsprofil und unter anderem für ER<sup>+</sup>-Brustkrebs oder Endometriumkarzinomen mit einer Akt1<sup>E17K</sup> Mutation kann ein stagnierendes bis leicht rückläufiges Tumorwachstum beobachtet werden.<sup>[47c]</sup> Jedoch treten auch für diese beiden Inhibitoren signifikante Nebenwirkungen wie z. B. Diarrhö und Hyperglykämie auf.<sup>[61]</sup> Den stark ausgeprägten Nebenwirkungen liegt der Wirkmechanismus der ATP-kompetitiven Verbindungen zu Grunde, da diese die hoch konservierte ATP-Bindetasche adressieren und im Falle von Akt insbesondere *off target* Effekte bei weiteren Proteinkinasen der AGC Subfamilie, wie PKA oder der Rho-assoziierten Proteinkinase (ROCK), zeigen.<sup>[62]</sup>

Einen weiteren Ansatz zur Akt-Adressierung stellen PIP<sub>3</sub>-Mimetika dar, die kompetitiv zu PIP<sub>3</sub> in die Bindetasche von Akt an die PH-Domäne binden und somit die Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran verhindern.<sup>[63]</sup> Zwei entsprechende Modulatoren sind die beiden Alkylphospholipide Perifosin und Miltefosin.<sup>[64]</sup> In der präklinischen Entwicklung konnten erfolgsversprechende Ergebnisse beobachtet werden, die aber nicht auf die klinischen Studien übertragen werden konnten.<sup>[65]</sup> Aufgrund ihrer chemischen Struktur, der Lipophilie und Amphiphilie, ist nur eine schlechte Löslichkeit und Zellpermeabilität gegeben. Dies führte ebenso wie die geringe Selektivität der PIP<sub>3</sub>-Analoge zu Nebenwirkungen, wie einer hohen gastrointestinalen Toxizität, da die PIP<sub>3</sub>-Bindetasche in der PH-Domäne ein hoch konserviertes Strukturelement, welches in einer Vielzahl weiterer Proteinen vorhanden ist.<sup>[66]</sup>

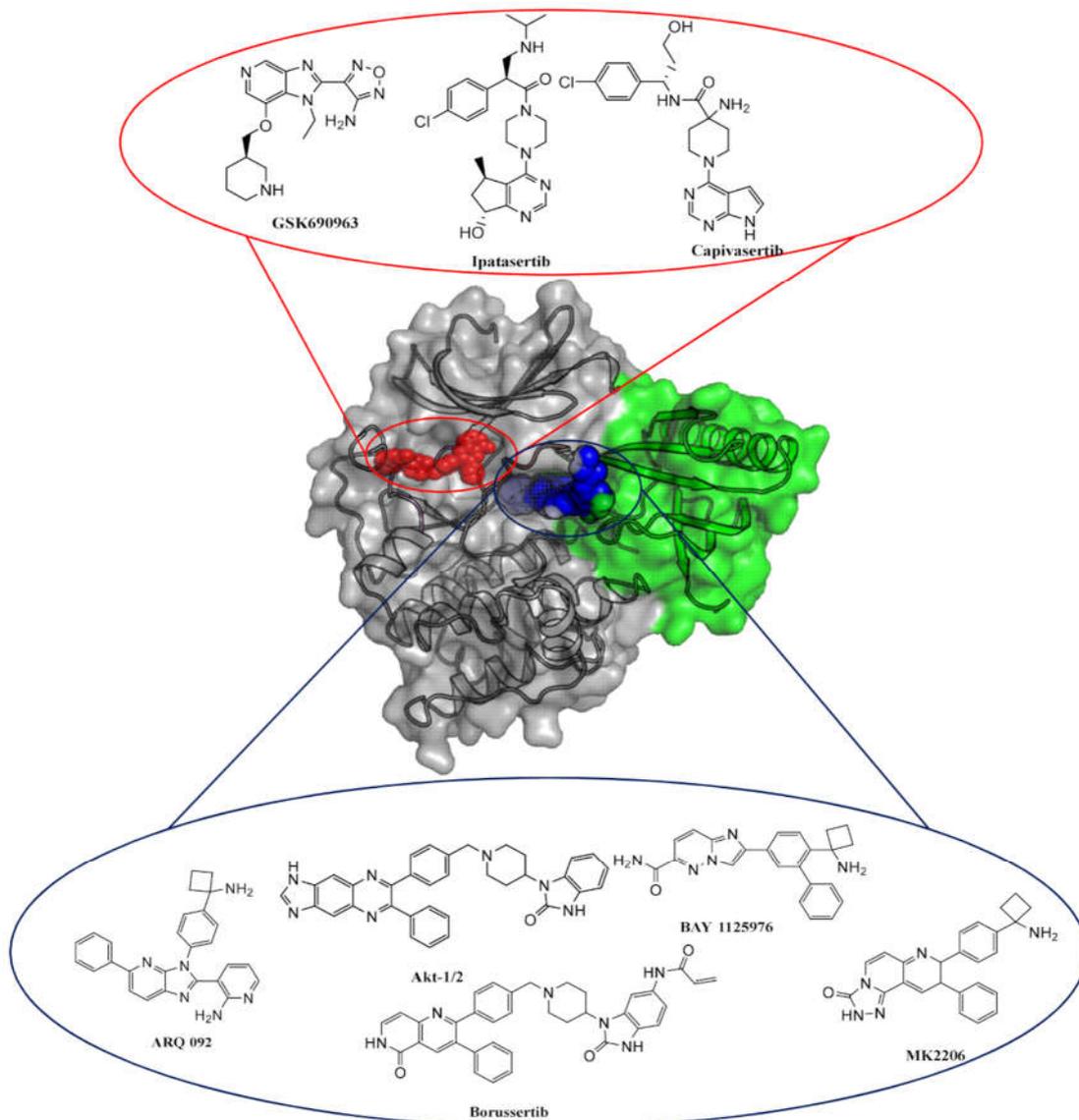
Da die geringe Akt-Selektivität letztendlich bei den kompetitiv-basierten Akt-Modulatoren zu einem Scheitern in klinischen Studien führte, wurde mittels eines Hochdurchsatz-Screenings nach neuen Leitstrukturen gesucht.<sup>[67]</sup> Hierbei konnten erste allosterische Moleküle identifiziert werden, die zu den klinischen Kandidaten Akti-1/2 und MK-2206 führten, die erstmals ein angemessenes Selektivitätsprofil für Akt zeigten.<sup>[68]</sup> 2010 konnte mit der ersten Akt1-Vollängen-Kristallstruktur im Komplex mit Akti-1/2 der postulierte allosterische Bindungsmodus zwischen der PH- und Kinase-Domäne nachgewiesen werden.<sup>[55]</sup> Diese Bindetasche ist deutlich weniger konserviert als die zwei zuvor beschriebenen funktionellen Proteinregionen, sodass eine deutlich bessere Selektivität erreicht werden kann (Abb. 5).<sup>[69]</sup> Zudem müssen allosterische Verbindungen nicht mit natürlichen kompetitiven Liganden konkurrieren, sodass geringere

Konzentrationen eingesetzt werden können und eine höhere Verweildauer der Modulatoren gegeben ist.<sup>[70]</sup>

Durch die Bindung in diese allosterische Tasche wird die inaktive PH-*in* Konformation stabilisiert, wodurch die ATP-Bindetasche blockiert ist.<sup>[55]</sup> Im Vergleich zu den ATP- und PIP<sub>3</sub>-kompetitiven Akt-Inhibitoren weisen die allosterischen Akt-Inhibitoren ein deutlich besseres Sicherheitsprofil, einhergehend mit einer verminderten Hyperglykämie, auf.<sup>[71]</sup> Trotz dieser Optimierung konnten in verschiedenen Phase I/II Studien mit MK-2206 bisher keine effiziente Tumorbehandlung erzielt werden.<sup>[72]</sup> Dies ist jedoch größtenteils auf das Fehlen von hochprädictiven und effizienten Biomarker für Akt-assoziierte Tumorerkrankungen zurückzuführen.<sup>[73]</sup> Auf Grundlage dieser zwei ersten allosterischen Akt-Modulatoren wurden zudem weitere klinische Kandidaten entwickelt. Zum einen das Imidazopyridazin-basierte BAY1125976 (Bayer AG) und die beiden Imidazopyridin-basierten Miransertib und Vevorisertib (ArQule) wurden in verschiedenen Phase I/II-Studien untersucht.<sup>[74]</sup> Trotz erster vielversprechender Ergebnisse und einer guten Wirkstoff-Verträglichkeit konnte insbesondere in Monotherapien kein signifikanter Tumorrückgang beobachtet werden.<sup>[75]</sup> Neben dem Einsatz bei soliden Tumoren wird der Wirkstoff Miransertib noch in Phase I/II-Studien bei Akt1<sup>E17K</sup>-bedingten Überwuchserkrankungen, dem Proteus Syndrom und dem PIK3CA-*related overgrowth spectrum* (PROS), eingesetzt.<sup>[76]</sup> Dabei zeigen erste Studienergebnisse eine Reduktion des Krankheitsbildes nach erfolgter Miransertib Indikation.

Da jedoch mit den allosterischen Inhibitoren bisher auch kein durchschlagender Erfolg erreicht werden konnte, konnten diese mit der Einführung einer elektrophilen Gruppe zu kovalent allosterischen Akt Inhibitoren (CAAI) weiterentwickelt werden.<sup>[77]</sup> Dabei besitzt die meist genutzte reaktive Gruppe in Kinase-Inhibitoren das elektrophile Acrylamid, welches die nukleophile Thiolgruppe der Cystein-Aminosäure modifiziert, das aktuell größte Potential.<sup>[78]</sup> Der Einsatz von kovalenten Kinase-Inhibitoren hat beispielsweise bei der Therapie des NSCLC mit Osimertinib für eine deutlich verbesserte Behandlungsstrategie gesorgt.<sup>[79]</sup> Kovalente Modulatoren haben eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber reversiblen Verbindungen, da die irreversible Bindung z. B. zu einer höheren Potenz, Ligandeneffizienz, Verweildauer und Selektivität führen kann, sodass auch geringe Wirkstoff-Dosen verabreicht werden können.<sup>[80]</sup> Durch die reaktive elektrophile Gruppe können jedoch auch toxische *off target* Effekte auftreten, die durch die richtige Auswahl der Reaktivität des sogenannten *warheads* gesteuert werden können.<sup>[81]</sup> Mit Hilfe der Analyse von Röntgenkristallstrukturen von Akt1 im Komplex

mit allosterischen Modulatoren konnten in der allosterischen Bindungstasche zwischen der PH- und Kinasedomäne zwei redoxensitive Thiolgruppen des Cys296 und Cys310 identifiziert werden.<sup>[55]</sup> Auf Grundlage dieses strukturbasierten Wirkstoffdesigns entstand eine kleine Bibliothek an 1,6-Naphthyridinon-basierten Inhibitoren, die ein Acrylamid als funktionelle Gruppe aufweisen, welches eine Michael-Addition mit Cys296 oder Cys310 eingehen kann.<sup>[77, 82]</sup> Hierbei konnte mit Borussertib eine gesteigerte Potenz im Vergleich zu MK-2206 erzielt werden sowie ein vielversprechendes Selektivitätsprofil gegenüber weiteren 100 Proteinen.<sup>[57]</sup>



**Abbildung 5:** Proteinkristallstruktur von Akt (PDB: 6HHF), inklusive Illustration der ATP-kompetitiven (rot) als auch der allosterischen Bindetasche (blau) zwischen der PH-Domäne (grün) und Kinase-Domäne (grau). Darstellung der ATP-kompetitiven Inhibitoren GSK690963, Ipatasertib und Capivasertib sowie der allosterischen Liganden ARQ092, Akt-1/2, BAY1125976, MK2206 und Borussertib. <sup>[44, 82]</sup>

Die CAAI stellen somit einen interessanten Ansatzpunkt zur erfolgreichen Adressierung von PI3K/Akt/mTor-assoziierten Tumorerkrankungen bzw. Überwuchskrankheiten dar. Zudem können diese Modulatoren als Sondenmoleküle weiterentwickelt werden, um ein tieferes Verständnis der biologischen Funktionalität aller drei Akt-Isoformen zu erreichen. Hierfür ist der Einsatz solcher Moleküle auch zur Identifizierung geeigneter Biomarker von hoher Relevanz, da diese bisher für Akt-assoziierte Dysregulationen fehlen und somit eine Grundvoraussetzung in der Präzisionsmedizin nahezu nicht vorhanden ist.<sup>[73]</sup>

### **1.3 Positronen-Emissions-Tomographie**

Der erfolgreiche Einsatz der vielversprechenden Akt-Inhibitoren scheidet momentan aktuell zumeist in klinischen Phase I/II-Studien, da aufgrund der hohen Komplexität der Akt Regulation und koexistierender Mutationen im Signalweg die Identifizierung entsprechender Biomarker noch nicht erfolgreich abgeschlossen werden konnte.<sup>[47a]</sup> Um eine erfolgreiche Translation in die Klinik zu gewährleisten ist ein detaillierteres Verständnis der Biologie von Akt im Kontext der Tumorentstehung von Nöten. Hierzu stellt die Technologie der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ein entsprechendes starkes Werkzeug, um die Tumorbiologie im Kontext mit Akt-assoziierten Erkrankungen und Inhibitor Verteilung zu untersuchen sowie die Diagnostik zu optimieren, dar.<sup>[83]</sup>

PET ist ein Verfahren der funktionellen Bildgebung, bei dem durch kleine Moleküle, die mit einem Radionuklid versehen sind, sogenannten PET *Tracern*, eine Anreicherung dieser Moleküle in spezifischen Geweben möglich ist.<sup>[84]</sup> PET ist dabei nicht invasiv und sehr sensitiv, sodass kleinste, nicht-pharmakologische Dosen verabreicht werden können, um die Tumorbiologie in der präklinischen Entwicklung sowie in der klinischen Diagnostik untersuchen zu können. Dabei können dreidimensionale Bilder erstellt werden, durch welche die Konzentration und Lokalisation der *Tracer* möglich ist.<sup>[85]</sup> Beim PET-Scan werden hochenergetische Gammastrahlen ( $\gamma$ -Strahlung) detektiert, die durch die Emission eines Positrons ( $\beta$ -Strahlung) aus dem Kern eines radioaktiven Isotops entsteht.<sup>[84]</sup> Das Positron trifft nahezu unverzüglich auf ein Elektron, wodurch die hochenergetische  $\gamma$ -Strahlung (511 keV) in Form zweier Photonen, die in nahezu entgegengesetzter Richtung emittiert werden, entsteht. Geeignete Isotopen für PET-Scans sind unter anderem  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  und  $^{82}\text{Rb}$ , wobei das  $^{18}\text{F}$ -Isotop das Meistgenutzte ist, da die Halbwertszeit mit 110 Minuten den praktikablen klinischen

Einsatz ermöglicht.<sup>[86]</sup> Das  $^{18}\text{F}$ -Isotope wird ebenso wie die  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  Isotope in einem Zyklotron, in dem Ionen durch ein elektrisches Feld (10 bis 500 meV) auf einer spiralähnlichen Bahn beschleunigt werden, hergestellt.<sup>[87]</sup> Ein weiteres Isotop, welches immer mehr an Relevanz in PET *Tracern* gewinnt, ist das  $^{89}\text{Zr}$ , da es aufgrund der längeren Halbwertszeit (3,3 Tage) die Analyse der *in vivo* Distribution von monoklonalen Antikörpern ermöglicht.<sup>[88]</sup> Durch den Einsatz der beschriebenen Isotope in PET *Tracern* kann eine Auflösung von maximal 1-2 mm<sup>3</sup> erreicht werden.<sup>[89]</sup> Das zentrale Element bei der PET ist der *Tracer*, der eine Reihe von unabdingbaren Eigenschaften erfüllen muss.<sup>[90]</sup> Zu allererst muss die chemische Bindung des Radionuklids zu der niedermolekularen Verbindung stabil sein.<sup>[91]</sup>

Zugleich sollte durch die Einführung des Radionuklids keine signifikante Veränderung der biologischen Eigenschaften (z. B. Transport, Affinität zum Zielprotein) der Ausgangsverbindung ausgelöst werden.<sup>[83]</sup> Zudem sollte eine schnelle Verteilung des *Tracers* gewährleistet sein, damit sich das Molekül schnell am Zielprotein anlagert, sodass ein hoher Kontrast zwischen dem Tumor und der Umgebung erzielt werden kann. Damit ist ebenfalls ein hoher Efflux verbunden mittels dem der *Tracer* möglichst kurz bei nicht relevanten Zielstrukturen verweilt. Das Besondere im Vergleich zu vergleichbaren Technologien, wie zum Beispiel der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT), ist, dass nicht nur am Zielort, sondern dauerhaft ein Signal aufgenommen wird.<sup>[92]</sup> Dies ermöglicht eine dynamische Analyse in Hinsicht auf Kinetiken sowie biochemische und physiologische Prozesse.

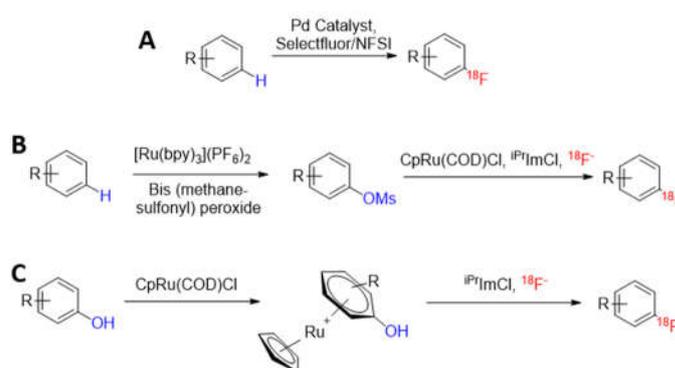
Der aktuell meist genutzte PET *Tracer* ist das Fluordesoxyglukose (FDG), ein Struktur analogon zu D-Glukose, das bereits in den 1980ern Jahren im Kontext mit Hirntumoren verwendet wurde.<sup>[93]</sup> Inzwischen wurde die Anwendung auf eine Vielzahl weiterer Tumorerkrankungen, wie z.B. Lungenkrebs und Brustkrebs, erweitert.<sup>[94]</sup> FDG wird vermehrt in Tumorgewebe angereichert, da Tumorzellen einen gesteigerten Glukose-Metabolismus im Vergleich zu nicht-entarteten Zellen haben.<sup>[95]</sup> Dies stellt jedoch zugleich eine Limitation dieses *Tracers* dar, weil hierdurch ein erhöhter Hintergrund in der Bildgebung gegeben sein kann und zudem konkurriert FDG mit Glukose, sodass in der klinischen Praxis Patienten 4-6 Stunden fasten müssen, um die Kompetition mit Glukose zu minimieren.<sup>[96]</sup> Außerdem ist die Bildgebung von Hirnmetastasen limitiert, da FDG zu einem großen Teil in der Grauen Substanz des Zentralnervensystems akkumuliert wird.<sup>[97]</sup> Aufgrund all dieser Limitationen und dem Bedarf von spezifischen Biomarkern ist die Entwicklung von weiteren PET *Tracern* von

hoher Bedeutung.<sup>[98]</sup> Das  $^{18}\text{F}$ -Fluorthymidin (FLT) stellt hierbei einen weiteren PET *Tracer* dar, der als Biomarker für die Zellproliferation dient, da in Tumorzellen die Anzahl an DNA-Replikationen erhöht und ein größerer Bedarf an Thymidin vorhanden ist.<sup>[99]</sup> Insbesondere aufgrund der besseren Verteilung als FDG im Hirn stellt dieser *Tracer* einen interessanten alternativen Ansatz dar.<sup>[100]</sup> Jedoch weist FLT im Kontext der Spezifität die gleichen Limitationen auf wie FDG.<sup>[83]</sup> Unter anderem aus diesem Grund ist die Entwicklung neuartiger PET *Tracer* auf Grundlage von spezifischen Protein-Modulatoren wie z. B. den CAAIs ein vielversprechender Ansatzpunkt. Hierbei gilt zu beachten, dass diese parentalen Moleküle die oben genannten Eigenschaften, wie beispielsweise einen erhöhten Efflux, besitzen sollten.<sup>[84, 101]</sup> Des Weiteren sollte die Funktionalisierung mit einem Radionuklid im letzten Syntheseschritt, beispielsweise mit der sogenannten *late stage functionalization* (LSF), durchgeführt werden, damit die direkte klinische Applikation möglich ist.<sup>[102]</sup>

### 1.3.1 Late Stage Functionalization

Die LSF kann dazu genutzt werden, um im letzten Syntheseschritt gezielt eine funktionelle Gruppe in das Zielmolekül einzuführen.<sup>[103]</sup> Dies hat insbesondere eine hohe Relevanz für die Funktionalisierung von bioaktiven Molekülen mit Radionukliden, da diese aufgrund ihrer begrenzten Halbwertszeit erst im letzten Syntheseschritt eingeführt werden sollten, damit anschließend unverzüglich die Indikation in den Patienten erfolgen kann. Die Hauptanforderungen an LSF ist die Chemo Selektivität, da im letzten Syntheseschritt bereits zumeist mehrere funktionelle Gruppen im Zielmolekül vorhanden sind, von denen lediglich eine funktionelle Gruppe die Reaktion eingehen soll und die weiteren Gruppen unverändert intakt bleiben sollen.<sup>[104]</sup> Für die Einführung von Radionukliden, wie z.B. dem  $^{18}\text{F}$ , eignet sich insbesondere die Funktionalisierung von aromatischen C-H-Bindungen (Abb. 6).<sup>[105]</sup> Eine direkte Funktionalisierung kann mittels einer Aktivierung der C-H-Bindung durch einen Palladium-Katalysator erzielt werden. Durch diese Aktivierung können mildere Fluorierungsmittel wie Selectfluor oder N-Fluorbenzolsulfonimid (NFSI) verwendet werden, sodass auch hochfunktionalisierte Zielmoleküle fluoriert werden können.<sup>[105a]</sup> Eine alternative indirekte Fluorierung ist die aromatische C-H-Oxygenerierung mittels eines Ruthenium-Komplex über ein Arylmesylat hin zum fluorierten Aromaten.<sup>[105b]</sup> Der Vorteil dieser Methode ist, dass ein breites Spektrum an Substraten, elektronenarme/-reiche Arene, Heteroarene und hochfunktionalisierte Substanzen mit Hilfe von *bis*(Methansulfonyl)peroxid eine

oxidative C-O-Bindungsbildung, gefolgt von einer Fluorierung, eingehen können. Eine weitere Methode zur  $^{18}\text{F}$ -Fluorierung ist die Funktionalisierung von Phenolen mittels einer Ruthenium-katalysierten Komplexierung.<sup>[106]</sup> Durch die Bildung eines  $\pi$ -Komplexes können selbst elektronenreiche Aromaten, wie beispielsweise Aromaten mit basischen Amin-Substituenten, fluoriert werden, wodurch ein breites Substratspektrum abgedeckt werden kann.



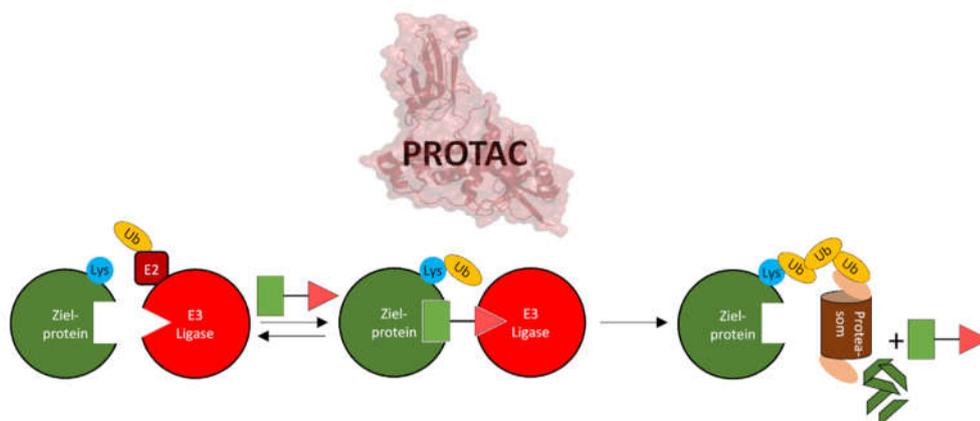
**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der LSF Methoden zur Einführung eines  $^{18}\text{F}$ -Isotops.<sup>[105-106]</sup> **A)** Palladium-katalysierte elektrophile aromatische C-H-Fluorierung: Direkte Fluorierung der C-H-Bindung mittels Pd-Katalysator. **B)** *Late-Stage* aromatische C-H-Oxygenerierung: Fluorierung über ein Arylmesylat-Intermediat. **C)**  $^{18}\text{F}$ -Deoxyfluorierung von Phenolen via Ru- $\pi$ -Komplexen: Fluorierung eines Phenols katalysiert mittels der Ausbildung eines Ru- $\pi$ -Komplexes.

#### 1.4 Wirkstoff-induzierter Proteinabbau

Da die konventionellen medizinisch-chemischen Methoden bisher noch keinen Wirkstoff zur Adressierung von Akt hervorgebracht haben, der alle klinischen Phasen erfolgreich durchlaufen konnte, sind neue innovative Technologien ein vielversprechender weiterer Ansatzpunkt. In den letzten Jahren hat im Bereich der Medizinchemie der gezielte Wirkstoff-induzierte Proteinabbau durch neuartige Strategien an Bedeutung gewonnen. Dabei soll durch niedermolekulare Verbindungen der gezielte Proteinabbau mittels des proteasomalen Systems ausgelöst werden. Dieser Abbau kann mittels zwei verschiedener Ansätze herbeigeführt werden, dem *hydrophobic tagging* (HyT) oder *Proteolyse Targeting Chimera* (PROTAC).<sup>[107]</sup> Beide Technologien basieren auf einem ähnlichen Prinzip mit bifunktionalen chemischen Verbindungen. Dabei wird ein Modulator des zu adressierenden Proteins über einen Linker mit einem Liganden fusioniert, der den gezielten Proteinabbau induziert.

Beim HyT werden mit Adamantyl- oder Boc<sub>3</sub>Arg-Gruppen hauptsächlich zwei Liganden verwendet.<sup>[108]</sup> Diese beiden Liganden können mit einem entsprechenden Modulator, entweder einem natürlichem Substrat oder einem chemischen Liganden, fusioniert werden, der sowohl kovalent als auch nicht-kovalent an das Zielprotein binden kann. Durch die Bindung des HyTs erfolgt die Erkennung des Proteins durch Chaperone, die den proteasomalen Abbau induzieren.<sup>[107]</sup> Der Ansatz des HyT kann ebenfalls dazu genutzt werden, um Proteine des sogenannten *undruggable* Genoms zu adressieren.<sup>[109]</sup> Das erste erfolgreiche Beispiel hierfür war die Adressierung der Pseudokinase HER3.<sup>[110]</sup> Jedoch weist der HyT Ansatz eine starke Limitation in Hinsicht auf die klinische Translation auf, wie unter anderem die hydrophoben Moleküleigenschaften, die mit schlechten PK Eigenschaften einhergehen sowie *off-target* Effekte u. a. durch die Adressierung von mTORC1 durch die hydrophoben Substituenten.<sup>[107, 111]</sup>

Hingegen stellt der PROTAC-Ansatz eine deutlich vielversprechendere Technologie dar, der bereits zu ersten Wirkstoffkandidaten in frühen klinischen Studien führte.<sup>[112]</sup> Ebenso wie beim HyT-Ansatz bestehen PROTACs aus bifunktionalen Molekülen, wobei statt der hydrophoben Gruppe der HyTs ein Ligand einer E3-Ligase über einen Linker mit dem Modulator des Zielproteins verknüpft wird.<sup>[113]</sup> Durch die Bindung des PROTACs an das Zielprotein und der E3-Ligase wird ein ternärer Komplex ausgebildet, mittels welchen das adressierte Protein in direkte räumliche Nähe zu der Ligase gebracht wird (Abb. 7). Hierdurch wird das Zielprotein an Oberflächenlysinen polyubiquitiniert und somit im Proteasom degradiert.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der PROTAC (PDB:4W9H) Technologie zum wirkstoffinduzierten Proteinabbau.<sup>[107]</sup> Der PROTAC bindet an das Zielprotein sowie an eine E3 Ligase und bildet somit einen ternären Komplex mit den beiden Proteinen. Durch die räumliche Nähe zur E3 Ligase kann das Zielprotein polyubiquitiniert, die Polyubiquitinkette durch das Proteasom erkannt und das Zielprotein degradiert werden.

Zentraler Baustein in den PROTACs sind hierbei die Liganden der E3-Ligasen, wie u.a. *cellular inhibitor of apoptosis protein* (cIAP), *mouse double minute 2 homologue* (MDM2), von Hippel-Lindau (VHL), Cereblon (CRBN).<sup>[114]</sup> Die Auswahl des bestgeeigneten E3-Liganden ist von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Etablierung eines PROTACs, wobei generell CRBN- und VHL-rekrutierende PROTACs das größte Potential zeigen.<sup>[115]</sup>

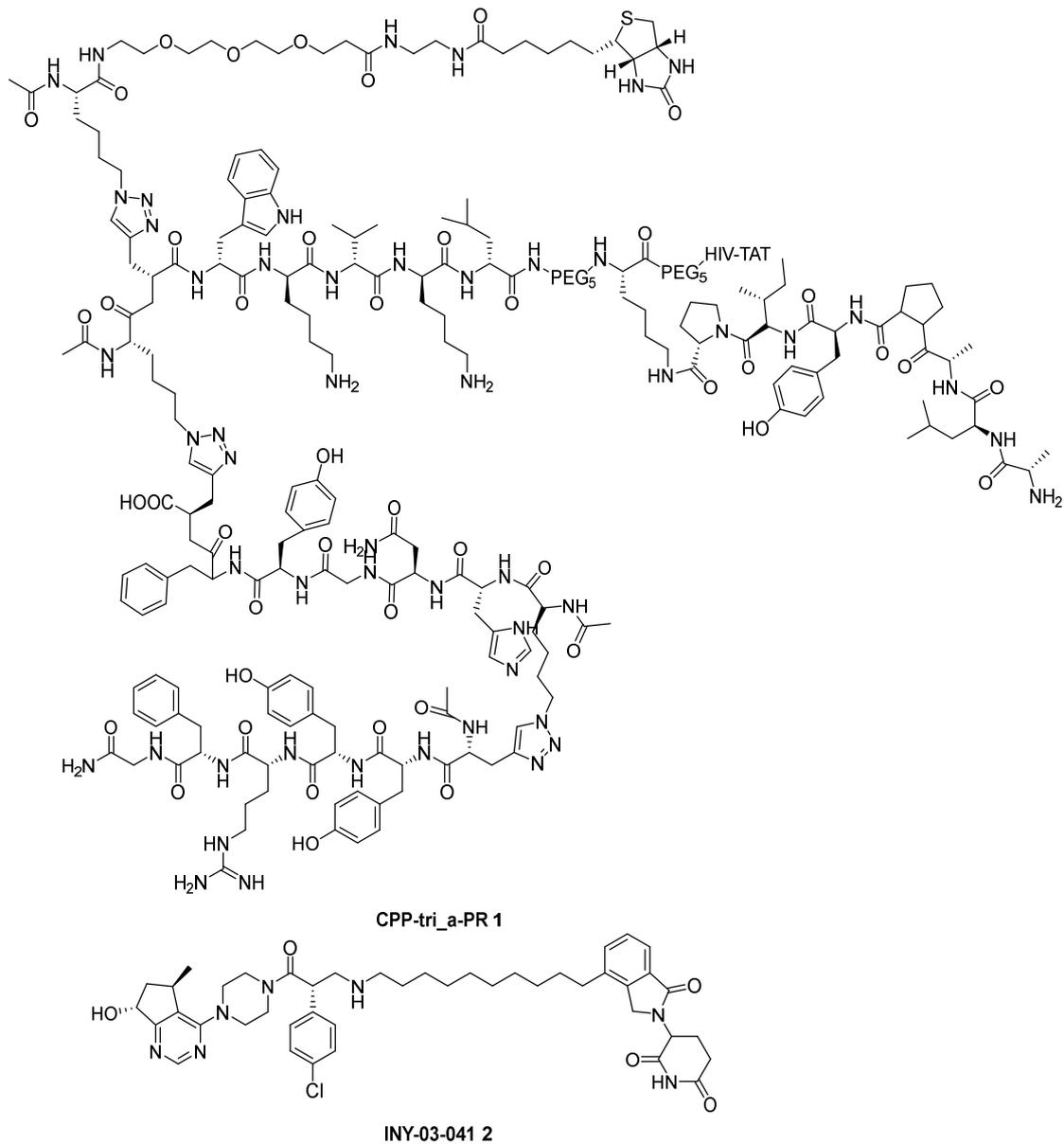
Eine nicht minder essentielle Rolle nimmt der Linker zwischen dem Protein-Modulator und dem E3-Liganden ein, da zur Ausbildung eines stabilen ternären Komplexes die Länge und Flexibilität des Linkers zur optimalen Ausrichtung des PROTACs beitragen.<sup>[116]</sup> So kann ein zu kurzer Linker zu einer ungünstigen Orientierung zwischen Zielprotein und E3-Ligase führen, sodass kein stabiler Komplex geformt werden kann. Ein zu langer oder falsch ausgerichteter Linker wiederum beeinträchtigt die Erreichbarkeit von Oberflächenlysine für die E3-Ligase zur Ubiquitinierung. Somit ist das Zusammenspiel eines geeigneten E3-Liganden und eines optimalen Linkers entscheidend für die Etablierung eines PROTACs. Aufgrund der beiden per Linker verknüpften funktionellen Gruppen, dem Zielprotein-Modulator und dem E3-Liganden, ist das Molekulargewicht der PROTACs im Verhältnis zu klassischen Wirkstoffen relativ hoch, sodass die Zellpermeabilität limitiert sein kann. Einen möglichen alternativen Ansatz stellen *in-cell click-formed proteolysis targeting chimeras* (CLIPTACs) dar, bei denen die beiden funktionellen Gruppen einzeln und mittels *Click*-Chemie erst in der Zelle *in situ* zum aktiven PROTAC werden.<sup>[117]</sup> Hierfür eignen sich kupferfreie Cycloadditionen, wie z. B. mit Tetrazinen und *trans*-Cyclo-Octenen.

Die ersten beiden PROTACs, ARV-110 & ARV-471, die den vollständigen Optimierungsprozess durchlaufen haben, befinden sich aktuell in klinischen Phase II-Studien und haben die ersten Sicherheits- und PK-Analysen bestanden.<sup>[112, 118]</sup> Bis zu 15 weitere PROTACs sollen bis Ende 2021 ebenfalls in klinischen Phase I-Studien evaluiert werden.<sup>[119]</sup> Dabei soll eine große Bandbreite an Proteinen degradiert werden, wie Androgen-/Östrogen-Rezeptoren, BTK, BRD9 und STAT3. Dies unterstreicht das enorme Potential dieser neuen Technologie und stellt einen interessanten Ansatzpunkt zur Adressierung von weiteren Proteinen wie Akt, die bisher noch nicht erfolgreich adressiert werden konnten oder bei denen die Translation in die Klinik anspruchsvoll ist, dar.

### 1.4.1 Adressierung von Akt mittels PROTACs

Akt stellt aufgrund seiner zentralen biologischen Funktion in der PI3K/Akt/mTor-Signalkaskade ein attraktives Target für PROTACs dar, weil bisher mit den klassischen medizinalchemischen Strategien keine erfolgreiche Translation in die Klinik erreicht werden konnte.<sup>[73]</sup> PROTACs sind ein vielversprechender ergänzender Ansatz, insbesondere weil für Akt ein Kinase-unabhängiges Zellüberlebenssignal bekannt ist, welches mit den aktivitätsbasierten Inhibitoren nur unzureichend adressiert werden kann.<sup>[43]</sup> Diese Kinase-unabhängige Aktivität könnte mit Hilfe von PROTACs inhibiert werden, sodass durch eine gezielten Akt-Degradierung eine verbesserte Modulation von Akt-abhängigen Zellsignalen erreicht werden könnte. PROTACs würden es zusätzlich ermöglichen, die biologische Rolle von allen drei Akt-Isoformen tiefergehend zu analysieren, und darüber hinaus könnten PROTACs mit weiterführenden Entwicklungen zu einer alternativen klinischen Behandlungsstrategie werden.

Auf Grundlage dieser Analysen wurden bereits zwei PROTACs zur Adressierung von Akt entwickelt (Abb. 8). Der erste entwickelte PROTAC basiert auf einem Akt2-Aktivator, CPP-tri\_a-PR **1**, und der zuletzt entwickelte auf dem ATP-kompetitiven Inhibitor Ipatasertib, INY-03-141 **2**.<sup>[120]</sup> CPP-tri\_a-PR ist ein *protein catalyzed capture agent* (PCC), der mit einem zelldurchdringenden Peptid konjugiert ist und an das C-terminale hydrophobe Motiv von Akt2 bindet und es aktiviert.<sup>[120a]</sup> Durch die Einführung des VHL-E3-Liganden konnte für diesen PROTAC nach vier Stunden eine 50 %ige Degradierungs-Konzentration (eng. *degradation concentration*, DC<sub>50</sub>) von  $128 \pm 19 \mu\text{M}$  in OVCAR3 Zellen bestimmt werden. Einen weitaus effizienteren Ansatz stellt der PRTOAC INY-03-141 dar, welcher den ATP-kompetitiven Akt-Inhibitor Ipatasertib über eine Polyethylenglykol (PEG) Linker mit dem CRBN-Liganden Lenalidomid verknüpft.<sup>[120b]</sup> INY-03-141 zeigt in verschiedenen zellulären Systemen eine halbmaximale Degradation von Akt zwischen 100 und 250 nM. Bei höheren Konzentrationen, über 500 nM, wurde der bekannte Hook-Effekt beobachtet. Durch den Hook-Effekt werden lediglich binäre Komplexe entweder aus PROTAC mit E3-Ligand oder PROTAC mit Akt aufgebaut, sodass kein ternärer Komplex aus Akt, PROTAC und E3-Ligand gebildet werden kann, sodass keine Ubiquitinierung stattfinden kann.



**Abbildung 9:** Darstellung der chemischen Struktur der beiden publizierten PROTACs, CPP-tri\_a-PR 1 und INY-03-141 2.<sup>[120]</sup>

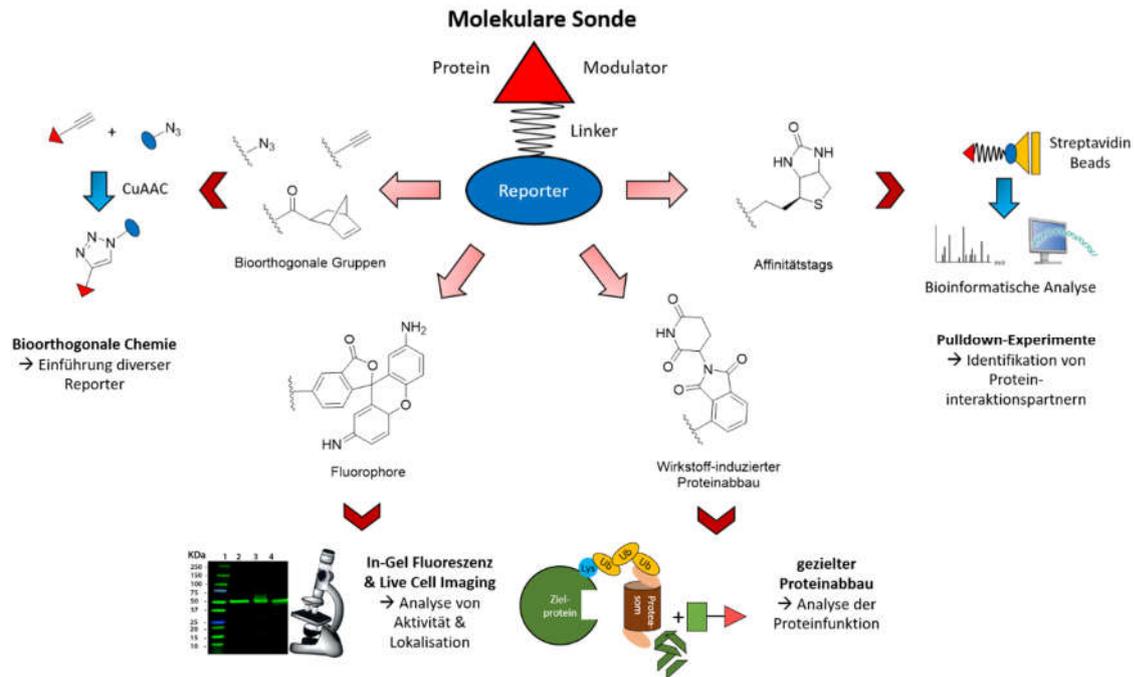
### 1.5 Aktivitätsbasierte Proteinprofilierung

Die klinische Adressierung der Proteinkinase Akt konnte bisher noch nicht erreicht werden. Ein Grund hierfür ist unter anderem das unvollständige Verständnis der biologischen Funktionen von Akt in Hinsicht auf Tumorerkrankungen bis ins letzte Detail.<sup>[73]</sup> Ein wichtiger Baustein hierbei ist die Analyse des Interaktoms von Akt, insbesondere aufgrund der Kinase-unabhängigen Aktivität.<sup>[43]</sup> In diesem Zusammenhang ist die Entschlüsselung der Interaktionen der zwei Aktivitäts-relevanten Konformationen, der Kinase-aktiven PH-out und der Kinase-inaktiven PH-in von hoher Relevanz.

Diese Analyse wird mittels proteomischer Methoden durchgeführt und mit *in vitro* Technologien, wie z. B. dem *Protein-fragment Complementation Assay* (PCA) oder der NMR-Spektroskopie, können die Funktionen, Interaktionen und Expressionslevel von Proteinen untersucht werden.<sup>[121]</sup> Jedoch sind diese Ansätze auf *in vitro* Systeme limitiert, sodass zur *in vivo* Analyse der Proteine und ihres Interaktoms das *activity based protein profiling* (ABPP) sehr vielversprechend ist.<sup>[122]</sup> Aufgrund der natürlichen Zellumgebung beim ABPP können alle wichtigen Parameter wie posttranslationale Modifikationen (PTM), das zelluläre Proteinlevel und das zelluläre Expressionslevel abgebildet werden.<sup>[123]</sup> Jedoch ist es lediglich möglich qualitative und keine quantitativen Analysen durchzuführen und die Detektion von Proteinbindungspartnern mit niedrigen Bindungsaffinitäten kann limitiert sein.

Der zentrale Baustein dieser Technologie sind bifunktionale Sondenmoleküle, die auf der einen Seite eine funktionelle Gruppe zur kovalenten Proteinmodifizierung besitzen, welche über einen Linker mit dem zweiten funktionellen Part der sogenannten Reportergruppe, wie Proteinabbau-induzierende Gruppen, Fluorophore, Affinitätstags oder bioorthogonale Gruppen, verknüpft ist (Abb. 9).<sup>[123]</sup> Wie in Kapitel 1.4 beschrieben können Proteinabbau-induzierende Gruppen dazu genutzt werden, gezielt ein Protein abzubauen. Durch diese gezielte Degradierung eines Proteins oder sogar einer einzelnen Isoform kann die Funktion des Proteins untersucht werden wobei die restliche Zelle komplett intakt bleibt.<sup>[124]</sup> Durch den Einsatz von Fluorophor-Reportern können mittels *In Gel* Fluoreszenz und *live cell imaging* die Funktion und Lokalisation analysiert werden.<sup>[125]</sup> Darüber hinaus können Affinitätstags verwendet werden, mit Hilfe derer *Pulldown*-Experimente durchgeführt werden, durch die Protein-Protein-Interaktionen (PPI) mittels Crosslinker (z. B. Disuccinimidyl Suberat (DSS)) und der Analyse mit Hilfe der Proteomics detektiert werden können.<sup>[126]</sup> Zuletzt stellen bioorthogonale Gruppen die vielseitigste Reportergruppe dar, weil mit Hilfe dieser, größtenteils per Kupfer-katalysierten Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC), die zuvor beschriebenen Reporter auch *in situ* hinzugefügt werden können.<sup>[127]</sup> Der Vorteil der bioorthogonalen Gruppen begrenzt sich nicht nur auf die flexible Einführung von diversen Reportern, sondern auch darauf, dass kleinere Substanzen verwendet werden können, die eine bessere Zellpermeabilität besitzen. Zudem können die sterisch anspruchsvolleren Reportergruppen zu einer stärkeren Herabsetzung der Affinität der Sonden im Vergleich zu den bioorthogonalen Gruppen führen. Auf der anderen Seite jedoch stellt der Einsatz des Kupfer-Katalysators aufgrund der Zelltoxizität eine Limitation für diesen Ansatz dar,

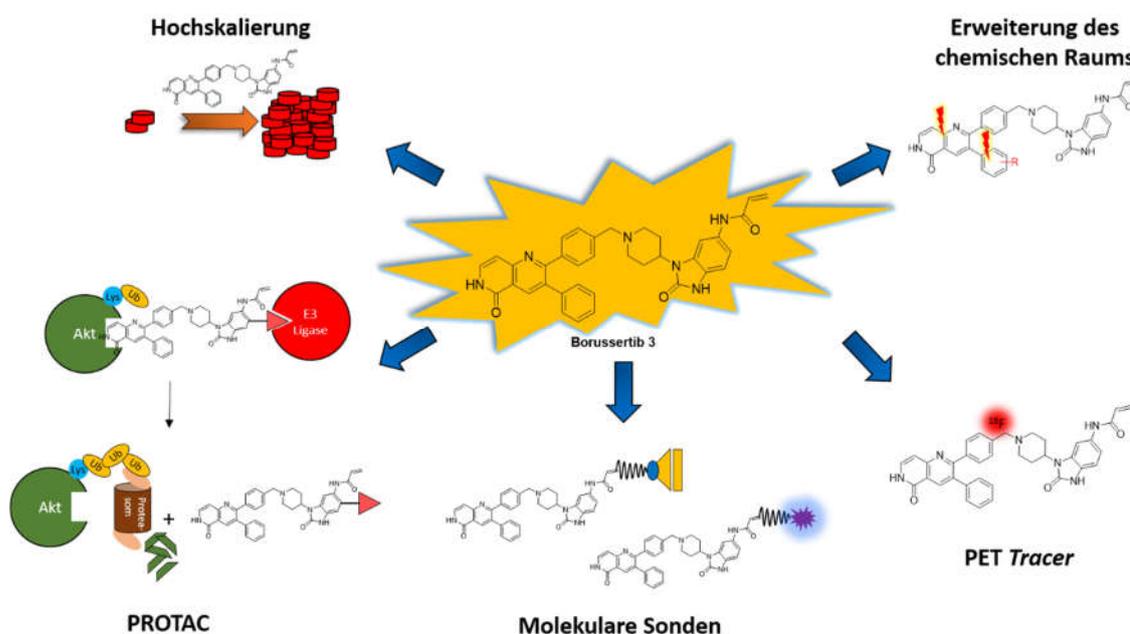
sodass der Einsatz von alternativen bioorthogonalen Gruppen im Fokus steht.<sup>[128]</sup> Ein weiterer Ansatz ist die *strain-promoted azide-alkyne cycloaddition* (SPAAC), bei dem beispielsweise ein Cyclooctin statt eines klassischen Alkins verwendet wird.<sup>[129]</sup> Durch den Bindungswinkel von  $163^\circ$  wird die Ringspannung deutlich erhöht, sodass die Alkin-Azid-Cycloaddition ohne zusätzlichen Katalysator ablaufen kann.



**Abbildung 9:** Schematischer Aufbau von molekularen Sonden, bestehend aus Protein-Modulator und Reporter verknüpft über einen Linker. Darstellung der verschiedenen Reportergruppen mit Fluorophoren, Affinitätstags, Proteinabbau-induzierenden Gruppen und bioorthogonalen Gruppen sowie deren Anwendungsgebiet.

## 2 Motivation und Zielsetzung

Aufgrund der zentralen Rolle der Proteinkinase Akt in einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen, mit denen eine Vielzahl von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen verbunden sind, stellt Akt ein hochrelevantes Zielprotein für die Präzisionsmedizin dar. Trotz der Entwicklung mehrerer ATP-kompetitiver als auch allosterischer Inhibitoren konnte bisher noch keine erfolgreiche Entwicklung bis hin zum Einsatz in der klinischen Behandlung erreicht werden. Durch die Etablierung des Sondenmoleküls Borussertib konnte in biochemischen und zellulären Systemen eine deutlich gesteigerte Potenz erzielt werden. Borussertib zeichnet hierbei der allosterische Bindungsmodus sowie die kovalente irreversible Modifizierung zweier Cysteine in dieser Bindetasche aus, sodass eine erhöhte Verweildauer an Akt und ein verbessertes Selektivitätsprofil erzielt werden kann. Für die erfolgreiche klinische Translation von Akt Inhibitoren müssen bisher noch fehlende prädiktive Biomarker identifiziert werden und die genaue Tumorbilogie im PI3K/Akt/mTor-Signalweg untersucht werden. Dafür stellen die CAAs und insbesondere Borussertib **3** einen vielversprechenden Ausgangspunkt dar (Abb. 10).



**Abbildung 10:** Borussertib **3** als zentraler Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer CAAs und der detaillierten Analyse der Tumorbilogie von Akt: Hochskalierung der Borussertib-Synthese zur präklinischen Evaluierung in Xenograft-Modellen (*patient-derived xenografts* PDX). Strukturbasierte Optimierung von Borussertib, Fokus auf das 1,6-Naphthyridinon-Grüngerüst, zur Erweiterung des chemischen Raums. Design und Synthese von PET *Tracern* zur Identifizierung von neuen prädiktiven

Biomarkern. Etablierung von molekularen Sonden (Biotin-, Fluorophor-basiert) zur detaillierten Analyse von Akt inkl. des Interaktoms der PH-*in* Konformation. Entwicklung von PROTACs zum gezielten Proteinabbau von Akt, mittels derer die Kinase-unabhängige Funktionalität adressiert werden können.

Borussertib zeigt in biochemischen und zellulären Systemen ein vielversprechendes Aktivitäts- und Selektivitätsprofil, welches in Tiermodellen weiter zu evaluieren ist. Hierfür sollte eine Hochskalierung der bereits etablierten Syntheseroute durchgeführt werden, um Borussertib im Multi-Gramm Maßstab zu erhalten. Zugleich konnte bereits in Bezug auf die PK-Eigenschaften von Borussertib festgestellt werden, dass diese großes Optimierungspotential besitzen, um letztendlich einen validen Wirkstoffkandidaten zu erhalten. Daher ist die medizinalchemische Optimierung von Borussertib essentiell für eine mögliche Translation der CAAs in die klinische Anwendung. Hierbei können bereits erhaltene Röntgenkristallstrukturen von Akt im Komplex mit CAAs genutzt werden, um eine neue Generation von CAAs strukturbasiert zu designen und synthetisieren. Von zentraler Bedeutung hierbei ist die Reduktion des Molekulargewichts, das durch die Substitution des Grundgerüsts und Erweiterung des chemischen Raums erreicht werden sollte. Durch diese Substitutionen soll zugleich u.a. die hohe Lipophilie und der hohe Efflux von Borussertib verringert werden. Dies wäre der erste Schritt, um die PK-Eigenschaften dahingehend zu optimieren, dass Borussertib zu neuen oral bioverfügbaren CAAs weiterentwickelt werden kann.

Wie oben beschrieben ist die größte Limitation in Hinsicht auf die Translation von Akt Inhibitoren in die klinische Anwendung die Identifizierung von prädiktiven Biomarkern. Ein möglicher Ansatzpunkt zur Adressierung dieser Problematik stellen Akt-selektive PET *Tracer* dar. Diese ermöglichen eine nicht-invasive Bildgebung von Tumoren mit Wirkstoffdosen weit unterhalb der sonstigen pharmakologisch relevanten Menge. Bei den PET *Tracern* ist unter anderem zudem ein hoher Efflux zielführend, da hierdurch erst ein hoher Kontrast zwischen Zielprotein und der sonstigen Umgebung möglich ist. Diese Eigenschaften sind für Borussertib gegeben, sodass dieses Sondenmolekül eine gute Ausgangsverbindung zur Entwicklung eines Akt-spezifischen PET *Tracers* darstellt. Für das Design eines potentiellen *Tracers* können die Ergebnisse genutzt werden, die durch die strukturbasierte Optimierung von Borussertib erhalten werden. Bei diesen Analysen muss zugleich die Durchführbarkeit der chemischen Synthese mit einbezogen werden. Hierfür eignen sich besonders Methoden der LSF, weil das Radionuklid möglichst im

letzten Syntheseschritt eingeführt werden soll, ohne die bereits vorhandenen funktionellen Gruppen zu modifizieren.

Ein weiterer essentieller Punkt für die zukünftige Entwicklung von neuen Akt-Wirkstoffen, bis hin zum therapeutischen Einsatz dieser, ist das detaillierte Verständnis der Tumorbiologie von Akt. Jedoch sind die allosterischen Wechselwirkungen, die auf Protein-Protein-Interaktion (PPI) beruhen, bisher kaum erforscht. So ist das Interaktom für die Kinase-aktive *PH-out* Konformation nahezu vollständig aufgeschlüsselt, jedoch fehlt für das Interaktom der inaktiven *PH-in* Konformation diese detaillierte Analyse. Diese Analyse ist jedoch von immenser Relevanz für die Behandlung von Akt-assoziierten Tumorerkrankungen, um die Behandlungsstrategie dahingehend anzupassen oder komplett neue Methoden zu entwickeln. Eine geeignete Technologie zur detaillierten Analyse von Akt *in vivo* stellt das ABPP dar mittels kleiner chemischer Sondenmolekülen. Für diese Sondenmoleküle ist Borussertib ein guter Ausgangspunkt, dass durch die Einführung von verschiedenen Reportergruppen, z. B. Biotin als Affinitätstag oder Alkin als bioorthogonale Gruppe, erweitert werden soll.

Im abschließenden Teil dieser Arbeit soll ein weiterer Ansatz zur Adressierung von Akt analysiert werden. Bei den bisher etablierten Akt-Wirkstoffkandidaten handelte es sich ausschließlich um Liganden der Enzym-vermittelten Aktivität. Eine alternative Methode stellt der wirkstoffinduzierte Proteinabbau dar, mit dem Akt über bifunktionale Moleküle durch das Proteasom degradiert werden kann. Hierfür sollen neuartige PROTACs synthetisiert werden, indem Borussertib über einen Linker mit entsprechenden E3-Ligase-Liganden verknüpft wird. Für das Design der PROTACs dienen die bereits vorhandenen Röntgenkristallstrukturen von Akt im Komplex mit den CAAs, da die Ausrichtung und Platzierung des E3-Liganden essentiell für eine erfolgreiche Degradierung ist. Die so dargestellten PROTACs sollen anschließend in einem ersten Schritt biochemisch evaluiert werden und anschließend der Proteinabbau in verschiedenen zellulären Systemen quantifiziert werden.

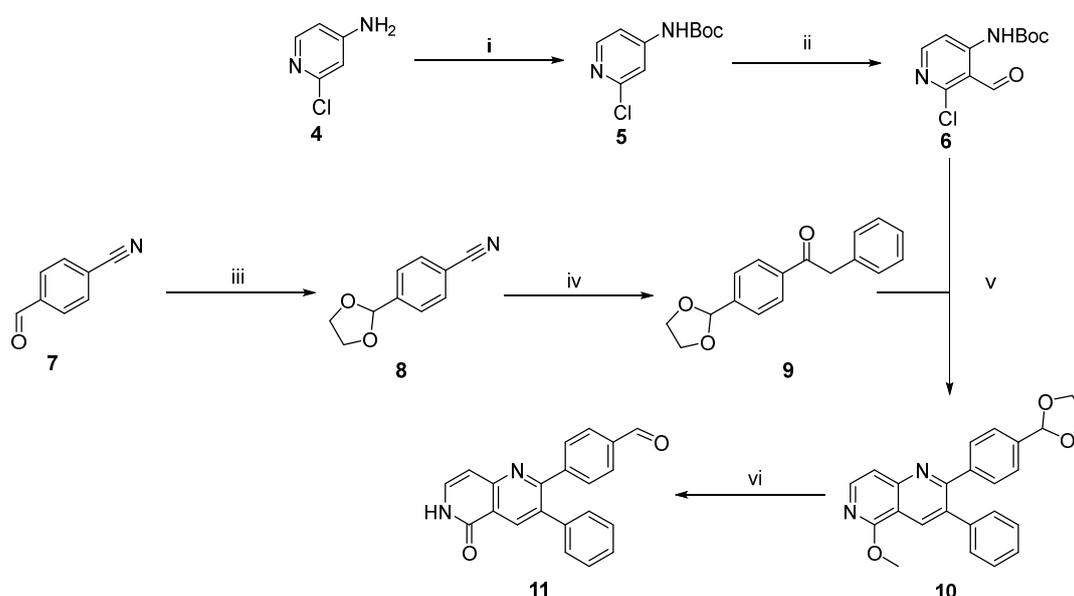
## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Hochskalierung der Borussertib-Synthese zur präklinischen Evaluierung

Für die Evaluierung in biochemischen und zellulären Assay-Systemen des Sondenmoleküls Borussertib waren zunächst nur geringere Mengen im Maßstab von bis zu 100 mg nötig. Diese konnten bereits durch die erstbeschriebene Syntheseroute nach WEISNER und GONTLA *et al.* und FANG *et al.* erzielt werden.<sup>[77, 130]</sup> Die Synthese erfolgte hierbei durch eine konvergente Synthesestrategie des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts und eines Benzo[*d*]imidazolon-Derivates, die über eine reduktive Aminierung miteinander verknüpft und anschließend mit einer Acrylamid-Gruppe modifiziert wurden. Für den Übergang von der Leitstrukturentwicklung hin zu der präklinischen Entwicklung werden jedoch 1000-fache höhere Mengen (10-100 g) des potentiellen Wirkstoffes benötigt.<sup>[131]</sup> Mittels der Optimierungen der Synthesestrategie des 1,6-Naphthyridinon Grundgerüsts, einer optimierten Aufreinigung des Benzo[*d*]imidazolon-Derivates und der Substitution der klassischen reduktiven Aminierung zur Verknüpfung der beiden Bausteine durch eine Leuckart-Wallach Reaktion konnte die Gesamtausbeute der Syntheseroute bereits von 3 % auf 9 % erhöht werden.<sup>[132]</sup> Da die Syntheseroute des 1,6-Naphthyridinons bereits im Vorfeld dieser Arbeit ausreichende Ausbeuten ermöglichte, wurde die Synthese lediglich in einzelnen Syntheseschritten leicht optimiert, sodass auch in höheren Multigramm-Ansätzen keine Verluste oder sogar eine Steigerung der Ausbeuten beobachtet werden konnte.

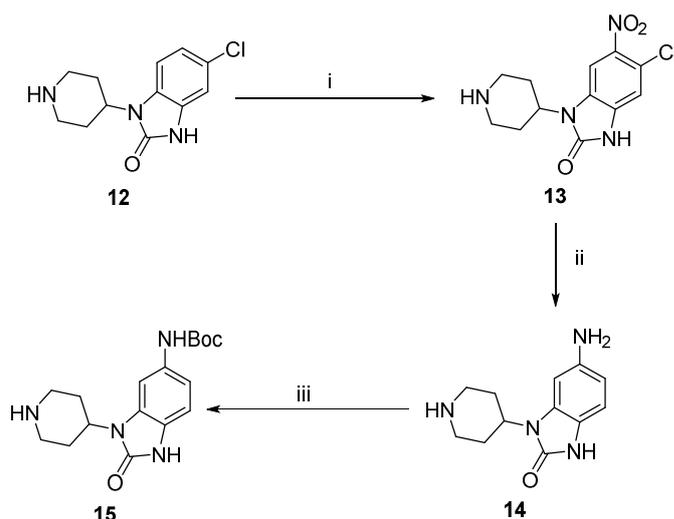
Die Darstellung des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts **11** erfolgte ausgehend vom 4-Amino-2-chlor-pyridin **4**, an dem in 4-Position eine *tert*-Butyloxybarbonyl(Boc)-Schutzgruppe eingeführt wurde (Abb. 11). Als nukleophiler Katalysator wurde DMAP genutzt.<sup>[133]</sup> Durch das schrittweise und langsame Hinzugeben von Boc<sub>2</sub>O konnte eine zweifache Modifizierung des Amins mit der Boc-Schutzgruppe vermieden und die ursprüngliche Produktausbeute von 53 auf 60 % erhöht werden. Das Boc-geschützte Pyridin-Derivat **5** wurde in 3-Position, mittels der Bildung eines Organolithium-Intermediats, durch Verwendung von *tert*-Butyllithium, formyliert. Im konvergenten Synthese Strang wurde der Aldehyd des 4-Cyanobenzaldehyds **7** durch die Bildung eines zyklischen Acetals durch Ethylenglykol geschützt. Im nächsten Syntheseschritt wurde mit Benzylmagnesiumchlorid eine Grignardreaktion durchgeführt, die in dem Phenon **9** Zielmolekül resultierte. Hierbei musste die ursprüngliche Reaktionsdauer angepasst werden, da erst nach 16 Stunden ein voller Eduktumsatz bei größeren Gramm Ansätzen

erzielt werden konnte. Das Pyridin- **6** und Phenon-Derivat **9** konnten durch eine basenkatalysierte Friedländer-Chinolin-Synthese zum 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts **10** umgesetzt werden. Durch die abschließende Entschützung der Acetal Gruppe hin zu der Aldehyd Funktionalität konnte der finale gewünschte 1,6-Naphthyridinon-Baustein **11** erhalten und durch die Erhöhung der Temperatur von Raumtemperatur auf 120 °C eine Verkürzung der Reaktionszeit um zwei Stunden erreicht werden.



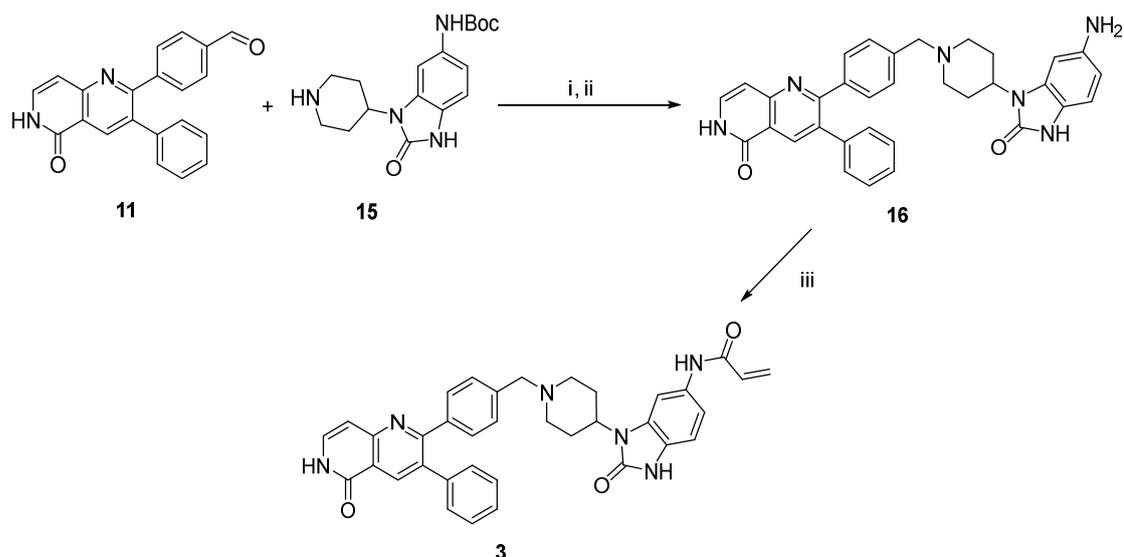
**Abbildung 11:** Synthese des 1,6-Naphthyridinon Grundgerüsts **11**. (i)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , DMAP, TEA, DCM, RT, 16 h, 60 % Ausbeute. (ii) DMF,  $t\text{BuLi}$ , dTHF,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ -rt, 16 h, 86 % Ausbeute. (iii) Ethylenglykol, *p*-TsOH, Toluol, Reflux, 16 h, 86 % Ausbeute. (iv) Benzylmagnesiumbromid, THF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ -RT, 16 h, 65 % Ausbeute. (v) NaOMe, MeOH,  $65\text{ }^\circ\text{C}$ , 4 h, 63 % Ausbeute. (vi) HCl,  $120\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h, 91 % Ausbeute.

Die ursprüngliche lineare Syntheseroute zur Darstellung des Benzo[*d*]imidazolon-Derivates **15** sah im abschließenden Syntheseschritt die Boc-Schützung Amins in 6-Position vor (Abb. 12). Im ersten Syntheseschritt wurde das kommerziell erhältliche 5-Chloro-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[*d*]imidazol-2-on **12** mittels Salpetersäure nitriert, gefolgt von einer Pd-katalysierten Hydrierung zum Amin sowie einer reduktiven Dehalogenierung. Im letzten Syntheseschritt erfolgte durch die Verwendung eines essigsauren Lösungsmittels eine selektive Boc-Schützung des anilinschen Amins gegenüber dem aliphatischen Amin des Piperidins.



**Abbildung 12:** Ursprüngliche Syntheseroute des Benzo[*d*]imidazol-Derivates **15**.<sup>[132]</sup> (i) 69 % HNO<sub>3</sub>, *o*-Xylol, 60 °C, 2 h, quant.. (ii) Pd/C, NH<sub>4</sub>HCOO, MeOH, 80 °C, 16 h. (iii) Boc<sub>2</sub>O, 10 % Essigsäure/H<sub>2</sub>O, 1,4-Dioxan, RT, 16 h, 51 % Ausbeute über zwei Schritte.

Die abschließende Synthese von Borussertib erfolgt mittels drei weiterer Syntheseschritte mit den beiden zuvor dargestellten Bausteinen, dem 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst **11** und dem Benzo[*d*]imidazol-Derivat **15** (Abb. 13). Zunächst werden beide Moleküle über eine Leuckart-Wallach Reaktion, eine reduktive Aminierung mit Ameisensäure, miteinander verknüpft. Hierbei konnte unter anderem als Nebenprodukt das 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst mit Alkohol Funktionalität beobachtet werden, sodass nur eine moderate Ausbeute von 54 % erhalten werden konnte. Im nächsten Schritt erfolgte die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit 4 M Salzsäurelösung in 1,4-Dioxan und im letzten Reaktionsschritt die Einführung der Acrylamid-Gruppe mittels Acryloylchlorid durch eine Additions-Eliminierungsreaktion. Jedoch konnte bei größeren Reaktionsansätzen eine doppelte Addition des Acryloylchlorids beobachtet werden.

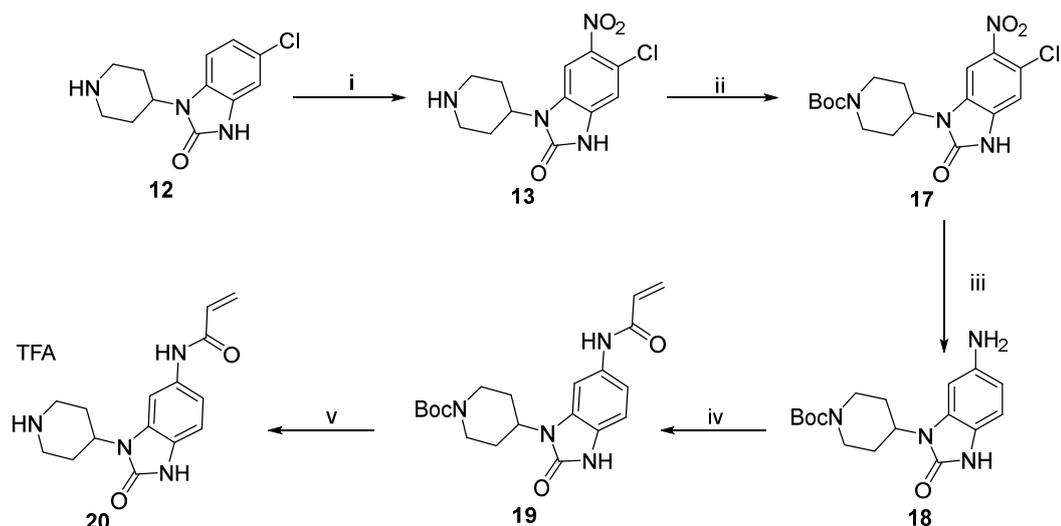


**Abbildung 13:** Ursprüngliche Synthese des CAAs Borussertib per Leuckart-Wallach Reaktion.<sup>[132]</sup> (i) MeCN, Ameisensäure, 80 °C, 16 h, 54 % Ausbeute. (ii) 4 M HCl in 1,4-Dioxan, RT, 16 h, 75 % Ausbeute. (iii) Acryloylchlorid, DIPEA, dTHF, RT, 16 h, 82 % Ausbeute.

Die Syntheseroute des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts ist sehr zeit- und ressourcenintensiv, und limitiert damit die Skalierbarkeit der gesamten Borussertib Synthese. Da die Verknüpfung der beiden Bausteine mit der Leuckart-Wallach Reaktion lediglich eine moderate Ausbeute ergibt und im letzten Syntheseschritt bei größeren Reaktionsansätzen eine doppelte Addition mit der Acrylamid-Gruppe beobachtet werden konnte, wird die Gesamtausbeute der kompletten Syntheseroute deutlich herabgesetzt. Um größere Mengen an Borussertib zu erhalten und eine bessere Skalierbarkeit für die präklinische Entwicklung zu erzielen ist die Optimierung der Syntheseroute dahingehend sinnvoll. Daher sollte die Synthese des Benzo[*d*]imidazolon-Derivates modifiziert werden, sodass dieses bereits die Acrylamid-Gruppe trägt und Borussertib im finalen Schritt mit dem modifizierten Benzo[*d*]imidazolon-Derivat und dem 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst erhalten werden kann. Essentiell hierfür ist die Etablierung einer geeigneten reduktiven Aminierung, die nicht zu Komplikationen mit der Acrylamid Funktionalität führt.

Ebenso wie die ursprüngliche Syntheseroute des Benzo[*d*]imidazolon-Derivates wurde zunächst das Edukt **12** mittels Salpetersäure nitriert (Abb. 14). Hierbei wurde die ortho-dirigierende Eigenschaft des Chlor-Substituenten in 5-Position ausgenutzt, um eine regioselektive Nitrierung in 6-Position **13** zu gewährleisten.<sup>[134]</sup> Im Gegensatz zur ursprünglichen Syntheseroute wurde nun das aliphatische Amin des Piperidins direkt im

basischen Milieu Boc-geschützt und durch die Einführung der Boc-Schutzgruppe die säulenchromatographische Auftrennung, auch für die darauffolgenden Schritte, deutlich verbessert. Im nächsten Schritt erfolgte die Pd-katalysierte Hydrierung der Nitro-Gruppe in 6-Position zum Amin sowie die reduktive Dehalogenierung des Chlor Substituenten in 5-Position. Hierbei musste die Reaktionszeit von 16 auf 26 Stunden erhöht werden, da nach 16 Stunden keine vollständige Dehalogenierung detektiert werden konnte. Anschließend wurde die Acrylamidgruppe mittels einer Additions-Eliminierungsreaktion unter Schotten-Baumann-ähnlichen Bedingungen mittels Acryloylchlorids eingeführt. Dabei konnten die gleichen Reaktionsbedingungen wie in der ursprünglichen Syntheseroute verwendet werden, bis auf eine leichte Modifikation des Lösungsmittels, da sich das Edukt **18** in reinem THF nur unvollständig gelöst hatte. Daher wurde ein Lösungsmittelgemisch aus THF und DCM (9:1) verwendet, sodass eine gute Ausbeute von 73 % erreicht werden konnte. Im abschließenden Syntheseschritt des Benzo[*d*]imidazol-Bausteins **20** sollte die Boc-Schutzgruppe durch den Einsatz eines sauren Milieus entfernt werden. Der Einsatz von wässriger Salzsäurelösung, equivalent zu der ursprünglichen Syntheseroute, führte jedoch aufgrund der schlechten Löslichkeit des Boc-geschützten Edukts **19** zu langen Reaktionszeiten sowie zu einer problematischen Aufreinigung aufgrund der freien Base des Piperidins. Daher wurde die Entfernung der Boc-Schutzgruppe in einem Gemisch aus DCM und TFA (3:1) durchgeführt. Hierdurch konnte per reversen Säulenchromatographie das gewünschte Benzo[*d*]imidazol-Derivat **20** in Form eines TFA-Salzes mit einer sehr guten Ausbeute von 92 % erhalten werden. Durch die Optimierung der Syntheseroute des Benzo[*d*]imidazol-Bausteins hat sich die Syntheseroute dieses Bausteins zwar um zwei Syntheseschritte auf insgesamt fünf erhöht, aber da im Folgenden Borussertib **3** durch eine finale reduktive Aminierung aufgebaut werden kann, bleibt die Anzahl der Syntheseschritte zur Darstellung von Borussertib unverändert. Die einzelnen Syntheseschritte zur Darstellung des neuen Benzo[*d*]imidazol-Bausteins **20** liefern hohe Ausbeuten im Multigramm-Maßstab, sodass diese neue modifizierte Syntheseroute sehr gut geeignet ist für die Skalierbarkeit der Synthese von Borussertib.

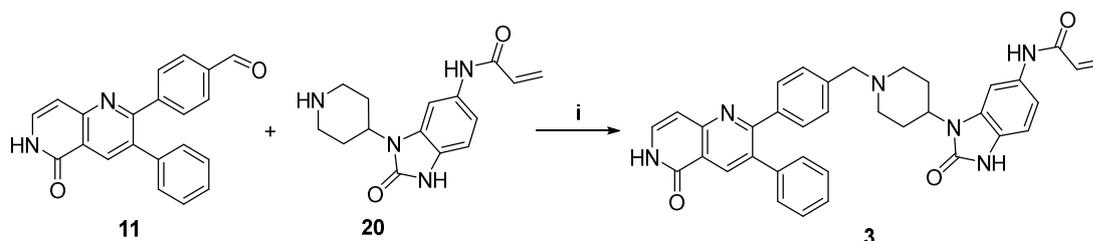


**Abbildung 14:** Optimierte Syntheseroute des Benzo[*d*]imidazolon-Bausteins. (i) 69 % HNO<sub>3</sub>, *o*-Xylol, 60 °C, 2 h, quant.. (ii) Boc<sub>2</sub>O, TEA, DCM, RT, 2 h, 80 % Ausbeute. (iii) Pd/C, NH<sub>4</sub>HCOO, MeOH, 80 °C, 26 h, 93 % Ausbeute. (iv) Acryloylchlorid, DIPEA, dTHF/DCM (9:1), RT, 16 h, 73 % Ausbeute. (v) DCM/TFA (3:1), RT, 2 h, 92 % Ausbeute.

Durch die Änderung der Syntheseroute des Benzo[*d*]imidazolon-Bausteins musste im letzten Syntheseschritt lediglich eine reduktive Aminierung durchgeführt werden. Hierbei bestand die Herausforderung, dass die Acrylamidgruppe des Benzo[*d*]imidazolon-Derivates **20** intakt bleiben muss. Zunächst wurde die Reaktion unter den ursprünglichen Reaktionsbedingungen der Leuckart-Wallach Reaktion durchgeführt (Tab. 1). Unter den sehr milden Reaktionsbedingungen der Leuckart-Wallach Reaktion (**1.1**) konnten lediglich Spuren von Borussertib **3** detektiert werden. Daher wurden zwei alternative Reaktionsbedingungen der reduktiven Aminierung bei verschiedenen Temperaturen getestet. Zum einen wurde der Einsatz von Tetraisopropylorthotitanat getestet, welches als Lewis-Säure Katalysator fungiert und zur Bildung eines Imins führt, das durch Natriumborhydrid zum Produkt reduziert wird.<sup>[135]</sup> Hier wurde zunächst bei Raumtemperatur nur ein unvollständiger Umsatz der Edukte beobachtet, da voraussichtlich die Iminbildung nur unzureichend unter den milden Reduktionsbedingung ablief, sodass per LCMS Analyse lediglich ein Umsatz von 20 % detektiert werden konnte. Durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur konnte ebenfalls keine gesteigerte Reaktivität erzielt werden. Daher wurde mit dem Einsatz von Natriumcyanoborhydrid zur reduktiven Aminierung ein weiterer klassischer Ansatz zur reduktiven Aminierung getestet.<sup>[136]</sup> Bei Raumtemperatur konnte wiederum nur ein schwacher Umsatz der Edukte detektiert werden.

Jedoch konnte durch die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 75 °C ein vollständiger Umsatz der Edukte und eine Ausbeute von 73 % des finalen Borussertibs erhalten werden.

**Tabelle 1:** Testung verschiedener Reaktionsbedingungen zum finalen Syntheseschritt zur Darstellung des CAAs Borussertib mittels reduktiver Aminierung.

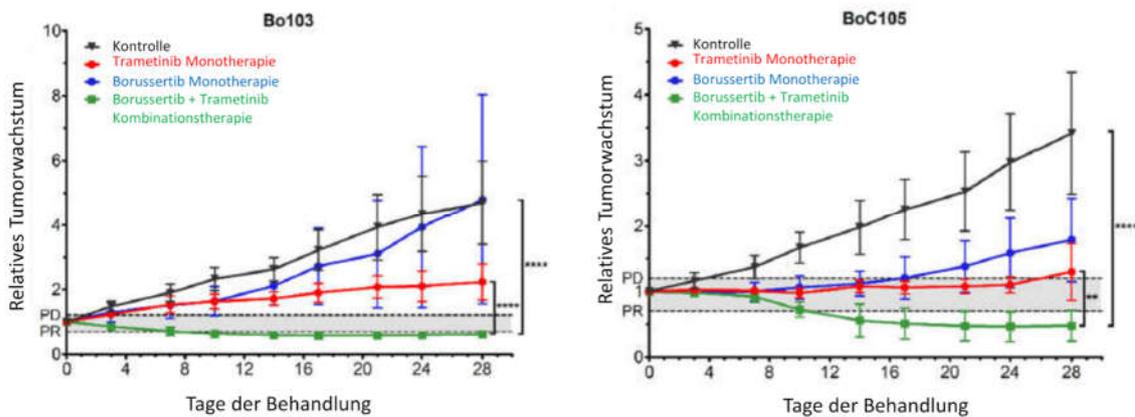


Nr.	Reaktionsbedingungen	Umsatz/Ausbeute
1.1	MeCN, Ameisensäure, 80 °C, 16 h	Spuren <sup>a</sup>
1.2	EtOH, Ti(OiPr) <sub>4</sub> , NaBH <sub>4</sub> , kat. AcOH, RT, 16 h	20 % <sup>a</sup>
1.3	EtOH, Ti(OiPr) <sub>4</sub> , NaBH <sub>4</sub> , kat. AcOH, 75 °C, 16 h	15 % <sup>a</sup>
1.4	MeOH, NaBH <sub>3</sub> CN, kat. AcOH/Et <sub>3</sub> N, RT, 16 h	10 % <sup>a</sup>
1.5	MeOH, NaBH <sub>3</sub> CN, kat. AcOH/Et <sub>3</sub> N, 75 °C, 16 h	73 %

<sup>a</sup> über LCMS Analyse bestimmter Umsatz.

Durch die Modifizierung der Synthese eines neuen Benzo[*d*]imidazolon-Derivates und der Anpassung der reduktiven Aminierung mit dem 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts konnte die Skalierbarkeit der Borussertib-Synthese erhöht werden. Dies ermöglichte die Synthese von weiteren 2,5 g Borussertib, die für weiterführende *in vivo* Studien in Patienten-abgeleiteten Xenograft-Modellen (*patient-derived xenografts*, PDX) benötigt werden.<sup>[137]</sup> Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, sind genetische Läsionen in Akt, die zur Tumorentstehung beitragen, selbst sehr selten, aber aktivierende Mutationen des Onkogens KRas können zu einer fehlerhaften Regulation von Akt führen. Da die Adressierung von KRas sehr herausfordernd ist, sollten nachgeschaltete Proteine wie MEK inhibiert und somit MEK-Inhibitoren verwendet werden, um den nachgeschalteten MAP-Kinase Signalweg zu adressieren.<sup>[138]</sup> Da jedoch eine alleinige Inhibierung dieses Signalweges zu keinem dauerhaften antiproliferativen Effekt auf das Tumolvolumen führte, da der PI3K/Akt/mTor-Signalweg redundant aktiviert wird, ergibt sich das Rational für eine Kombinationstherapie zur Inhibierung beider Signalwege.<sup>[139]</sup> Aus diesem Grund wurden acht KRas-abhängige Pankreas- und Kolorektalkarzinome sowohl

in Monotherapie mit dem MEK-Inhibitor Trametinib (perorale Applikation, 0,5 mg/kg) und Borussertib (i.p. Applikation 20 mg/kg) als auch in Kombinationstherapie behandelt.<sup>ζ[57]</sup> Für die Monotherapie konnte mit der Trametinib-Behandlung in allen Modellen ein signifikant schwächeres Tumorstadium detektiert werden, wobei mit Borussertib nur in einzelnen Modellen eine Abschwächung erreicht werden konnte (Abb. 15). Deutlich stärkere Effekte konnten für die Kombinationstherapie bis hin zu einer *partial response* (partieller Tumorrückgang um 30 %) im kolorektalen Tumormodel Boc103 erzielt werden. Ebenso konnte mit der Kombinationstherapie eine Stabilisierung des Tumorstadiums in dem Pankreas-Tumormodel Bo103 erhalten werden.



**Abbildung 15:** *In vivo* Effizienz von Trametinib, Borussertib und der Kombinationstherapie in KRas-abhängigen pankrealen (**Bo103**) und kolorektalen (**Boc105**) PDX-Modellen. PD: Progressives Wachstum (+20 % der Basislinie), PR: Partielle Regression (-30 % der Basislinie); \*\*p < 0,01; \*\*\*\*p < 0,0001, Zweistichproben-t-Test.<sup>ζ</sup>

Somit kann sowohl für KRas-abhängige kolorektale als auch Pankreas-Karzinome in *in vivo* PDX-Modellen ein signifikanter positiver Effekt für die Kombinationstherapie von einem MEK-Inhibitor mit Borussertib festgehalten werden. Dies zeigt die erfolgreiche Translation von der *in vitro* Aktivität von Borussertib in biochemischen und zellulären Assay-Systemen auf die weitaus komplexeren *in vivo* Modelle.

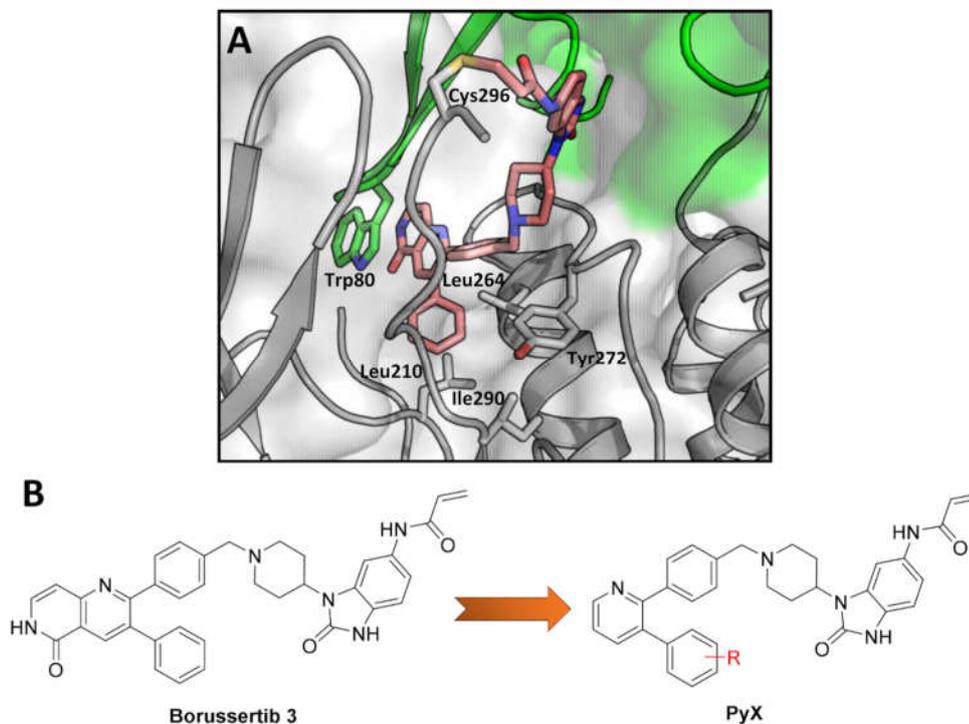
<sup>ζ</sup> Die PDX-Xenograft-Studien wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Hahn getätigt (Christoph Reintjes, Ruhr-Universität Bochum)

### 3.2 Medizinalchemische Optimierung von Borussertib

Die durchgeführten PDX-Model-Studien in Kapitel 3.1 zeigen das enorme Potential von CAAs zur Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere da es sich hierbei um ein Sondenmolekül mit limitierenden PK Eigenschaften handelt.<sup>[132]</sup> Insbesondere die kinetische Löslichkeit (*SolRank*-Assay) ist problematisch, da sich Borussertib nur schlecht im wässrigen physiologischen Milieu löst.<sup>[57]</sup> Die schlechte Löslichkeit hängt mit der hohen Lipophilie des Moleküls zusammen (cLogP 4,1). Neben der schlechten Löslichkeit ist die Permeabilität von Borussertib als kritisch einzustufen, da im künstlichen System (PAMPA) lediglich 5 % der Substanz die Membran passieren können und im Caco-2 Assay sogar ein aktiver Efflux beobachtet werden kann. Unter anderen aus diesen Gründen ist eine medizinalchemische Optimierung des Sondenmoleküls Borussertib von Nöten.

Da die hohe Lipophilie von Borussertib einen negativen Einfluss auf die PK Eigenschaften hat und Borussertib mit 596,7 g/mol ein hohes molekulares Gewicht aufweist, sind die Reduktion von diesem sowie die Erhöhung der Hydrophilie durch die Einführung polarer Gruppen erste Ansatzpunkte. Als erste Arbeiten hierzu haben UHLENBROCK und SMITH *et al.* Struktur-Wirkungsbeziehungen (engl. *structure activity relationship*, SAR) mittels der Substitution des Benzo[*d*]imidazolion-Grundgerüsts durchgeführt.<sup>[82]</sup> Hierbei konnten für Phenylamid- und Phenylurea-Derivate neue potente CAAs dargestellt werden, die jedoch zu keinem signifikant besseren PK-Profil geführt haben. Daher war der nächste Schritt die Substitution des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts, da hier die SAR noch nicht ausreichend untersucht wurde. Das 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst bildet zum Trp80 über  $\pi$ - $\pi$ -stacking eine der elementaren Wechselwirkungen zu Akt aus (Abb. 16 A). Es sollte untersucht werden, ob diese Wechselwirkung ebenfalls mit monozyklischen Aromaten ausgebildet werden kann. Ebenso sollte der Einfluss des Phenylrings in 3-Position tiefergehend analysiert werden, indem weitere polare Gruppen an diesem eingeführt werden (Abb. 16B). Grundlage für die Einführung an dieser Position ist unter anderem der allosterische klinische Kandidat Miransertib, der an dieser Position ein Aminopyridin trägt.<sup>[49]</sup> Hierbei muss beachtet werden, dass lediglich kleine polare Gruppen genutzt werden können, da sich der Phenylring in einer engen hydrophoben Tasche von Akt, ausgebildet von Leu264, Leu210 und Ile290, befindet. Zudem flankieren die beiden Phenylringe in 2- und 3-Position des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts das Tyr272 und bilden somit eine

essentielle Wechselwirkung aus, sodass nur aromatische Substituenten in 3-Position eingeführt werden können.

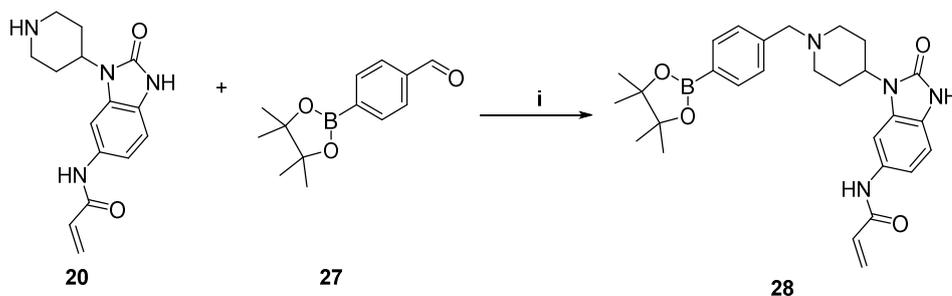


**Abbildung 16:** **A)** Röntgenkristallstruktur von Akt1 im Komplex mit Borussertib **3** (PDB:6 HHF), mit Darstellung von Trp80, das ein  $\pi$ - $\pi$ -stacking mit dem 1,6-Naphthyridinon ausbildet. Die hydrophobe Tasche, in die der 3-Phenylring des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts orientiert ist, wird von den Aminosäuren Leu210, Leu264 und Ile290 gebildet. Die beiden Phenylsubstituenten bilden eine Art Sandwich mit Tyr272 und die kovalente Bindung zu Akt von Borussertib wird an Cys296 geknüpft. **B)** Darstellung von Borussertib **3** und der Modifizierung hinsichtlich einer Pyridin-basierten Molekülbibliothek mit Substitutionen am Phenylring in 3-Position **PyX**.

### 3.2.1 Generierung einer fokussierten Pyridin-basierten Molekülbibliothek

Zur Reduktion des molekularen Gewichts von Borussertib **3** wurde zunächst die Substitution des bicyklischen 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst durch das monozyklische Pyridin getestet werden. Da möglichst effizient eine größere Molekülbibliothek für die Untersuchung des chemischen Raums in 3-Position generiert werden sollte, war eine Modifizierung der Syntheseroute notwendig, um erst im letzten Syntheseschritt verschiedene aromatische Heterozyklen einzuführen. Aus diesem Grunde wurde das in Kapitel **3.1** beschriebene Benzo[*d*]imidazol-Derivat **20** durch eine reduktive

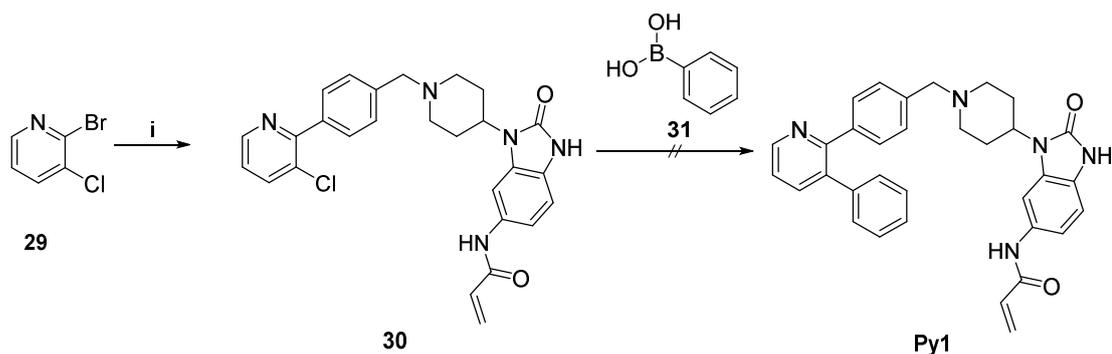
Aminierung um den Phenylring, der sich bei der Borussertib-Synthese an der 2-Position des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst befindet, erweitert (Abb. 17). Für die Zugänglichkeit in der weiteren Synthesestrategie trägt dieser Phenylring einen Boronsäure-Pinacolester **27**.



**Abbildung 17:** Synthese eines modifizierten Benzo[*d*]imidazolons mit einem Boronsäure-Pinacolester **28** per reduktiver Aminierung. (i) MeOH, NaBH<sub>3</sub>CN, cat. AcOH/Et<sub>3</sub>N, 75 °C, 16 h, 85 % Ausbeute.<sup>6</sup>

Für die Synthese des neuen Benzo[*d*]imidazolons Derivates **28** konnten die gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der optimierten Synthese von Borussertib erfolgreich angewendet werden, sodass bei diesem Schritt keine Optimierung nötig war.<sup>6</sup> Dieser Baustein sollte anschließend per Suzuki Reaktion an ein Pyridinring eingeführt werden. Ein geeigneter Baustein hierfür ist das 2-Brom-3-chlorpyridin **29**, da dieser aufgrund seiner zwei Halogensubstituenten im ersten Schritt die Reaktion mit dem Benzo[*d*]imidazolons Derivat **28** und anschließend eine weitere Funktionalisierung per Suzuki-Reaktion ermöglicht. Im ersten Syntheseschritt erfolgte die Suzuki Reaktion an 2-Position, da Brom bei der Palladium-katalysierten Kreuzkupplung gegenüber dem Chlorsubstituenten deutlich reaktiver ist (Abb. 18).<sup>[140]</sup>

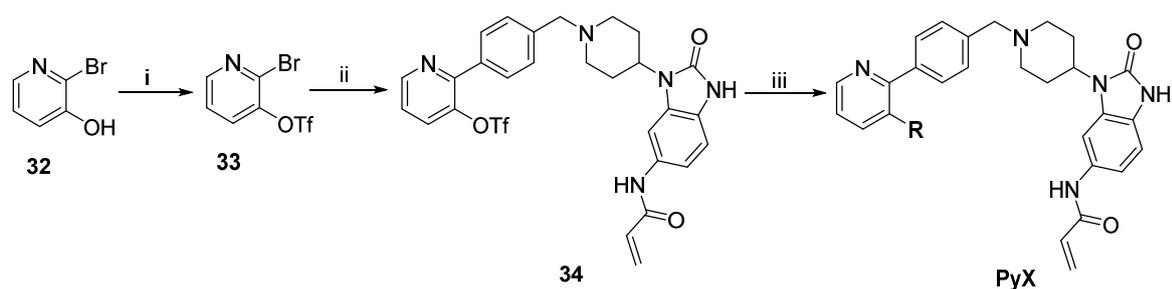
<sup>6</sup> Synthese in Zusammenarbeit mit Dr. Niklas Uhlenbrock, Dr. Lena Quambusch, Dr. Laura Levy (in Kooperation mit Taros)



**Abbildung 18:** Geplante Syntheseroute zur Darstellung neuer CAAs per zweifacher Suzuki Reaktion. Die erste Suzuki Reaktion konnte erfolgreich durchgeführt, beim zweiten anschließenden Syntheseschritt konnte kein Umsatz zum Produkt **Py1** detektiert werden. (i) **28**,  $(C_{17}H_{14}P)_2Fe$   $PdCl_2$ ,  $K_3PO_4$ ,  $H_2O/1,4$ -Dioxan, MW,  $130\text{ }^\circ C$ , 0.5 h, 62 % Ausbeute.

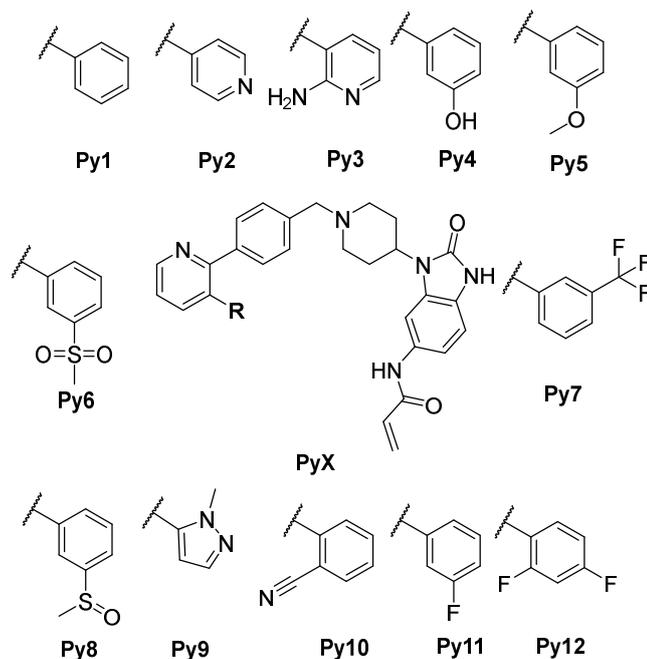
Bei der Suzuki-Kreuzkupplungsreaktion können C-C-Bindungen ausgebildet werden, indem Palladium Katalysatoren verwendet werden. Besonders geeignete Katalysatoren sind [1,1'-Bis(diphenylphosphin)ferrocen]palladium(II)dichlorid, sogenanntes Ferrocen-Palladium, sowie Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0), sogenanntes Tetrakis-Palladium.<sup>[141]</sup> Mit dem Ferrocen-Palladium Katalysator konnte für die erste Suzuki Reaktion des doppelt Halogen-substituierten Pyridinrings ein deutlich höher Umsatz erzielt werden als mit dem Tetrakis-Palladium Liganden. Die Ausbeute von **30** war mit 62 % gut, konnte jedoch nicht durch Variation der Reaktionsbedingungen (längere Reaktionszeit bis zu zwei Stunden, Reaktionstemperatur:  $80\text{ }^\circ C$  und  $150\text{ }^\circ C$ ) erhöht werden. Hervorzuheben ist die kurze Reaktionszeit, durch die innerhalb kürzester Zeit eine hohe Menge des Produktes zur Generierung der Substanzbibliothek erzeugt werden kann. Im zweiten Syntheseschritt sollte die C-C-Bindungsknüpfung in 3-Position des Pyridinrings mit Phenylboronsäure **31** erfolgen. Hierbei wurden wiederum beide beschriebenen Palladium Katalysatoren eingesetzt, sowie die Temperatur, Reaktionszeit und verschiedene Basen (*n*-BuLi,  $K_3PO_4$ , NaOtBu) getestet. Jedoch konnte keinerlei Umsatz der Edukte beobachtet werden. Da der Chlor-Substituent nur eine schwache Abgangsgruppe ist, sollte dieser ersetzt werden, um die ursprünglich geplante Syntheseroute mit den zwei Suzukis beizubehalten.<sup>[142]</sup> Eine mögliche Gruppe, die eine bessere Abgangsgruppe als das Chlor darstellt, sind Triflate, die jedoch zugleich eine geringere Reaktivität als der Brom Substituent besitzen.<sup>[143]</sup> Aus diesem Grund wurde 2-Brom-3-chlorpyridin **29** durch 2-Brom-3-pyridinol **32** ersetzt. In einem ersten Syntheseschritt wurde die Hydroxyl-Gruppe in das erwünschte Triflat **33** mittels

Trifluormethansulfonsäureanhydrid überführt (Abb. 19). **33** konnte mit einer sehr guten Ausbeute von 96 % in ausreichender Menge für die nun zwei folgenden Suzuki-Kreuzkupplungsreaktionen erhalten werden. Die erste der beiden C-C-Bindungsknüpfungen verlief equivalent zu den zuvor beschriebenen Bedingungen. Die Ausbeute von **34** war jedoch mit 44 % etwas geringer als zuvor, da das Triflat in geringer Menge abgespalten wurde. Eine erneute Einführung des Triflats aus diesem Nebenprodukt war jedoch nicht erfolgreich, da keine Triflat Bildung beobachtet werden konnte. Nichtsdestotrotz konnten ausreichende Mengen von **34** erhalten werden, sodass eine Molekülbibliothek mit verschiedenen Aromaten in 3-Position generiert werden kann. Hierfür wurden nahezu analoge Reaktionsbedingungen wie zuvor angewendet, lediglich die Reaktionsdauer musste von einer halben auf anderthalb Stunden verdreifacht werden, da die Kreuzkupplung mit dem Triflat, wie zuvor beschrieben, etwas reaktionsträger ist als mit dem Brom-Substituenten.



**Abbildung 19:** Optimierte Syntheseroute zur Erweiterung des chemischen Raums der CAAs per Triflatbildung und anschließender zweifacher Suzuki Reaktion. (i)  $\text{Tf}_2\text{O}$ , TEA, 0 °C-RT, 16 h, 96 % Ausbeute. (ii) **28** ( $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{P}$ ) $_2\text{Fe}$   $\text{PdCl}_2$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}/1,4\text{-Dioxan}$ , MW, 130 °C, 0,5 h, 44 % Ausbeute. (iii) **BPyl-12**, ( $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{P}$ ) $_2\text{Fe}$   $\text{PdCl}_2$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}/1,4\text{-Dioxan}$ , MW, 130 °C, 1,5 h, 22-45 % Ausbeute.

Hierdurch konnten letztendlich zwölf verschiedene Aromaten mit moderaten Ausbeute von 22-45 % erhalten werden (Abb. 20). Diese moderaten Ausbeuten waren ausreichend, da für eine erste SAR nur kleinste Mengen im Milligramm Bereich benötigt werden. Als Referenzverbindung wurde zunächst ein Phenylring, wie er ebenfalls bei Borussertib vorhanden ist, eingeführt. Dem gegenüber sollten Aromaten eingeführt werden, die einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit der neuen Derivate haben sollten. Unter anderem wurden hierfür Pyridin-Amine, Methylsulfonylbenzol und Pyrazole eingeführt. Ebenso wurden kleine elektronenreiche Substituenten wie Fluor genutzt, die ebenfalls positive Einflüsse auf die metabolische Stabilität haben können.



**Abbildung 20:** Darstellung der zwölf Aromaten **Py1-12**, die in 3-Position des Pyridinrings eingeführt wurden, um die SAR zu analysieren.<sup>§</sup>

### 3.2.2 Biochemische Evaluierung

Die Analyse der Effektivität der neuen potentiellen CAAs erfolgte per *homogenous time-resolved fluorescence* (HTRF<sup>®</sup>) KinEASE<sup>™</sup> Assay, mittels der die inhibitorische Aktivität ermittelt werden kann. Durch die Verwendung eines biotinylierten Substratpeptids, das mit ATP, zwei Fluorophoren und Akt koinkubiert wird, kann durch Inhibitor-basierte konzentrationsabhängige Messungen der Fluoreszenzemission die halbmaximale inhibitorische Konzentration IC<sub>50</sub> bestimmt werden. Hierbei wird ein Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Signal detektiert, das in Korrelation zum Phosphorylierungslevels des Substratpeptids und somit auch zur Akt Kinase-Aktivität steht. Akt Inhibitoren sind in der Lage dieses FRET-Signal zu inhibieren, sodass hierüber ihr IC<sub>50</sub> bestimmt werden kann.

Die neue Pyridin-basierte Verbindung mit einem Phenylring **Py1** in 3-Position weist eine Aktivität von  $77 \pm 14$  nM auf (Tab. 2).<sup>§</sup> Dies entspricht etwa einem 80-fachen Verlust der inhibitorischen Aktivität im Vergleich zu Borussertib ( $1 \pm 0,4$  nM).

<sup>§</sup> Synthese in Zusammenarbeit mit Dr. Lena Quambusch

Durch die Reduktion des bizyklischen 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts zum monozyklischen Pyridin könnte es sein, dass die Schlüsselinteraktion zwischen dem Liganden und dem Trp80 von Akt, das ein  $\pi$ - $\pi$ -*stacking* ausbildet, deutlich abgeschwächt wird. Nichtsdestotrotz zeigt sich immer noch eine deutliche Inhibierung der Kinaseaktivität im nanomolaren Bereich. Somit eignet sich **Py1** als gute Referenz zur Generierung einer SAR des Substituenten in 3-Position. Die stärkste inhibitorische Wirkung kann für die beiden Aromaten mit Fluorsubstituenten, zum einen in meta-Position **Py11** und zum anderen in ortho- und para-Position **Py12**, detektiert werden. Mit  $IC_{50}$ -Werten von  $463 \pm 4$  nM und  $472 \pm 49$  nM ist jedoch im Vergleich zu **Py1** ein 6-facher Aktivitätsverlust vorhanden. Gefolgt von diesen beiden Verbindungen zeigt lediglich das 2-Phenol **Py4** noch eine Aktivität im nanomolaren Bereich. Das 3-Pyridin **Py2** besitzt danach bereits mit einer Aktivität  $1713 \pm 120$   $\mu$ M nur noch eine schwache inhibitorische Aktivität. Alle weiteren Verbindungen mit löslichkeitsvermittelnden Gruppen oder das Pyrazol **Py9** haben inhibitorische Aktivitäten von über 10  $\mu$ M bis hin zu einer Aktivität unterhalb der im Assay verwendeten Konzentration von 20  $\mu$ M.

---

<sup>§</sup> Biochemische Charakterisierung durchgeführt von Dr. Lena Quambusch

**Tabelle 2:** Biochemische Charakterisierung der dargestellten Pyridin-basierten Molekülbibliothek **PyX** mittels Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Werte durch HTRF® KinEASE™ Assay.<sup>5</sup> Farbliche Illustration der Aktivität von Rot (stärkste Aktivität) bis hin zu Grün (schwache/keine Aktivität).

Substanz	Substitution	Akt1 IC <sub>50</sub> [nM]
Borussertib	-----	0,8 ± 0,4
Py1		77 ± 14
Py2		1713 ± 120
Py3		12450 ± 2799
Py4		571 ± 280
Py5		8738 ± 3222
Py6		20000 ± 0
Py7		4591 ± 447
Py8		20000 ± 0
Py9		20000 ± 0
Py10		20000 ± 0
Py11		463 ± 4
Py12		472 ± 49

Es konnten lediglich für vier Derivate nanomolare Aktivitäten beobachtet werden. Neben **Py1** waren dies außerdem die beiden Substanzen mit Fluorsubstituenten **Py11** und **Py12** sowie das 2-Phenol **Py4**. Fluor ist lediglich ein kleiner, unpolarer Substituent, sodass der sterische Anspruch dieser Gruppe nur gering ist und polare Abstoßungen eher

unwahrscheinlich sind. Der sterische Anspruch von anderen Substituenten, wie z.B. dem Methylsulfonyl, ist deutlich höher und für all diese Verbindung zeigt sich nur eine minimale bis keine inhibitorische Wirkung. Zudem kann die Polarität der Substituenten zu Repulsionen zwischen dem Liganden und Akt führen. Somit zeigt sich das nur kleinste, unpolare Substituenten wie Fluor toleriert werden. Diese Analyse wird durch **Py4** bestätigt, da diese Gruppe auch nur einen geringen sterischen Anspruch hat. Für kleine Aromaten wie das Pyrazol **Py9** kann auch lediglich eine geringe Aktivität beobachtet werden, da dieser anscheinend zu einer nicht favorisierten Ausrichtung des Liganden führt, wodurch die Wechselwirkungen des Pyrazols und des Phenylrings in 2-Position zum Tyr272 abgeschwächt wird.

Abschließend kann festgehalten werden, dass durch die Reduktion des 1,6-Naphthyrdinon-Grundgerüsts zum Pyridin ein deutlicher Aktivitätsverlust beobachtet werden kann. Ebenfalls führt die Substitution des Phenylrings in 3-Position zu einer deutlichen Minderung der inhibitorischen Aktivität. Die Pyridin-basierte Molekülbibliothek lieferte wertvolle Einblicke in die SAR. So zeigt die SAR das Potential der Einführung von kleinen Substituenten an den Phenylring in 3-Position des 1,6-Naphthyrdinons, welches für die Entwicklung von neuartigen molekularen Sonden genutzt werden kann.

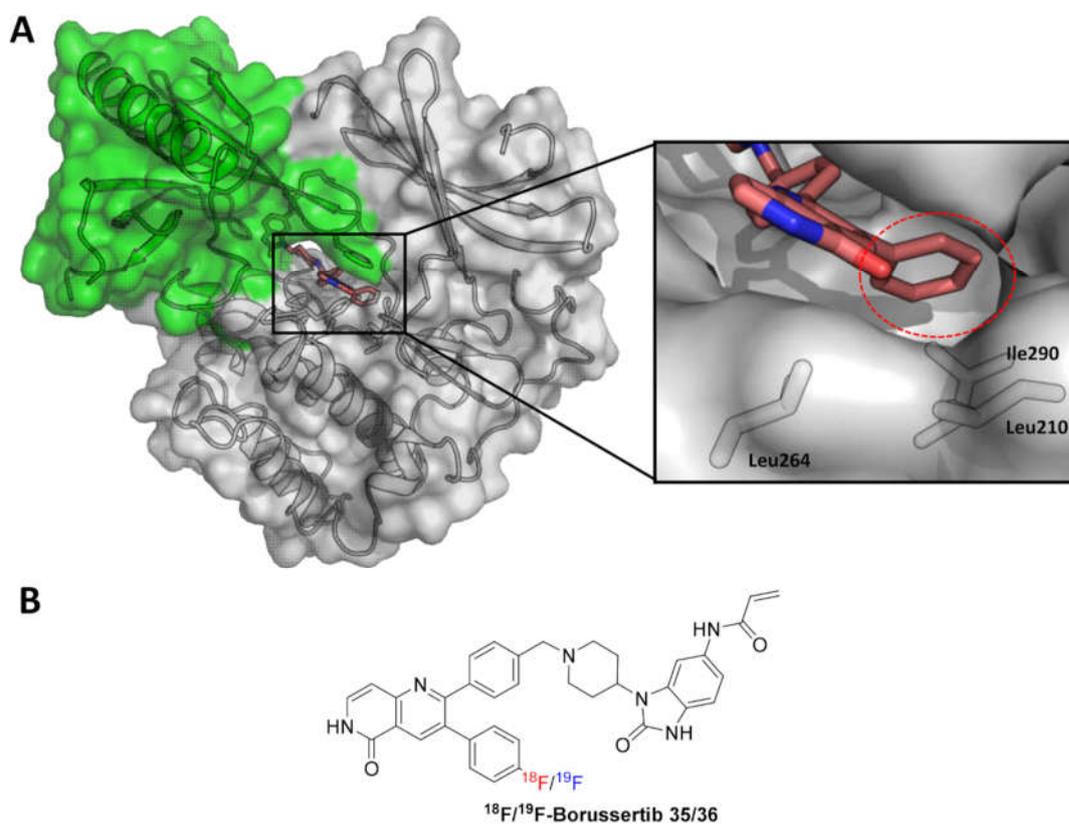
### 3.3 Entwicklung eines Akt-PET-Tracers

Die CAAs, insbesondere Borussertib, vereinen eine sehr gute Selektivität für die drei Akt-Isoformen gegenüber dem restlichem Kinom mit einer herausragenden inhibitorischen Potenz. Neben dem potentiellen therapeutischen Einsatz, u.a. in der Krebstherapie, können diese Inhibitoren ebenfalls als diagnostisches Werkzeug eingesetzt zu werden, um die komplexe Akt-Biologie im Kontext eines Tumorgeschehens chemisch zu adressieren.<sup>[57]</sup> Borussertib weist *in vivo* günstige PK- und pharmakodynamische (PD)-Eigenschaften für die Entwicklung eines *Tracers* auf, wie zum Beispiel unter anderem eine hohe Stabilität im physiologischen System und einen hohen Efflux, der für eine gute Verteilung und eine entsprechende Bildgebung nötig ist. Zudem konnte in ersten Xenograft-Modellen mit Borussertib in Kombination mit dem MEK-Inhibitor Trametinib eine Tumorregression beobachtet werden. Aufbauend auf diesen Eigenschaften sollte ein <sup>18</sup>Fluor-markierter Akt-spezifischer Radioligand entwickelt werden, der für die diagnostische PET-Bildgebung und die Identifizierung von Tumoren mit Überexpression von intrazellulärem Akt geeignet ist. Aufgrund der kovalenten Eigenschaft einer potentiellen CAAI-PET-Sonde sollte diese eine vorteilhafte Tumorretention und gute Biodistributions- und Präzisionsbildgebungseigenschaften im Vergleich zu reversiblen *Tracern* haben.<sup>[144]</sup> Darüber hinaus überwinden niedermolekulare PET-*Tracer* Einschränkungen, die üblicherweise mit fluoreszierenden Sonden verbunden sind, die regelmäßig für *in vitro* Studien verwendet werden, wie z. B. unzureichende PK-Eigenschaften, die eine ausreichende Stabilität, Tumorpenetration und Zellpermeabilität ermöglichen.<sup>[145]</sup> Um die *in vivo* Bildgebung von Tumoren zu ermöglichen, die Akt überexprimieren, ein Merkmal, das gemäß dem *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC) häufig bei Brust-, Endometrium- und Ovarialtumoren beobachtet wird, sollte ein niedermolekularer PET-*Tracer* auf der Basis von Borussertib dargestellt werden.<sup>[146]</sup>

#### 3.3.1 Design und Synthese von <sup>18/19</sup>F-Borussertib

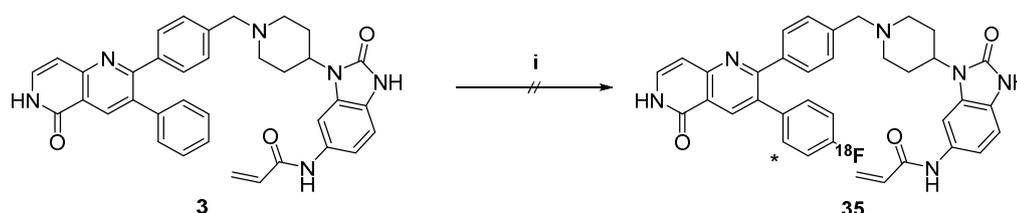
Das meistgenutzte Radionuklid im Bereich der PET-Bildgebung ist das <sup>18</sup>Fluor-Isotop mit einer Halbwertszeit von 110 min. Diese Halbwertszeit ermöglicht die klinische Anwendung, sofern ein robustes Protokoll zur Funktionalisierung im letzten Syntheseschritt erfolgen kann. Hierfür sind insbesondere Synthesemethoden der LSF (s. Kapitel 1.3.1) zur direkten oder indirekten Fluorierung von aromatischen C-H-Bindungen

geeignet. Neben der Möglichkeit der Fluorierung via LSF muss ebenfalls die SAR der CAAs miteinbezogen werden, da der PET *Tracer* möglichst vergleichbare biochemische, zelluläre und PK Eigenschaften zu den bereits etablierten Inhibitoren besitzen sollte. Aufgrund der synthetischen Zugänglichkeit per LSF ist hierfür insbesondere der Phenylring in 3-Position des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts favorisiert (Abb. 21). Wie die SAR in Kapitel 3.2 zeigt, werden hier die Modifizierung des Phenylrings mit kleinen, weniger polaren Substituenten, wie Fluor- oder Hydroxygruppen, toleriert und gehen lediglich mit einem 6-fachen Aktivitätsverlust im biochemischen System einher. Dies wird ebenso von der Analyse der Röntgenkristallstruktur von Akt im Komplex mit Borussertib (PDB: 6HHF) untermauert, da sich der Phenylring in einer engen, hydrophoben Tasche befindet, die durch die Aminosäuren Leu210, Leu264 und Ile290 ausgebildet wird.



**Abbildung 21:** **A)** Röntgenkristallstruktur von Akt1 im Komplex mit Broussertib (PDB: 6HHF). Darstellung der Bindung des Phenylrings des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts von Borussertib in eine hydrophobe Tasche von Akt ausgebildet von Leu210, Leu264 und Ile290. Anhand der SAR eignet sich diese Position zur Einführung eines Fluor-Substituenten. **B)** Chemische Struktur eines potentiellen PET *Tracers*,  $^{18}\text{F}$ -Borussertib **35**, sowie seines nicht radioaktiven Analogons,  $^{19}\text{F}$ -Borussertib **36**.

Basierend auf der chemischen Zugänglichkeit per LSF ist theoretisch eine Einführung des  $^{18}\text{F}$ -Isotops sowohl in der ortho- als auch para-Position des Phenylrings möglich. Daher wurde zunächst das in Kapitel 3.1 synthetisch hochskalierte Borussertib mit einem neuartigen Pd(II)-Katalysator (ligiert mit einem Terpyridin und einem Bidentat), der die direkte aromatische C-H-Fluorierung ermöglicht, umgesetzt (Abb. 22).<sup>6[105a]</sup> Durch den Einsatz des Katalysators ist es möglich, selbst hochfunktionalisierte Moleküle wie Borussertib mit milden Fluorierungsmitteln, wie Selectfluor oder NFSI, zu fluorieren, da ein reaktives Übergangsmetallfluorid-Elektrophil generiert wird. Bei dieser Art der Fluorierung erfolgt zumeist die Synthese von zwei konstituellen Isomeren, dem ortho- und para-Isomer, die jedoch durch geeignete Aufreinigungsprotokolle voneinander getrennt werden können. Im Falle des Borussertibs **3** war als Hauptprodukt **35** aufgrund der sterischen Zugänglichkeit eine Substitution des Phenylrings in 3-Position erwartet worden. Jedoch konnte keine Umsetzung von Borussertib mit den milden Fluorierungsmitteln trotz des Einsatzes des aktivierenden Pd(II)-Katalysators erreicht werden. Dies kann damit begründet werden, dass es sich bei Borussertib um ein hochkomplexes Molekül handelt, sodass die mittels dem Katalysator vermittelte Fluoridgekoppelte Elektronen Transfer Aufgrund zu geringer Elektrophilie des Phenylrings nicht stattfinden kann.



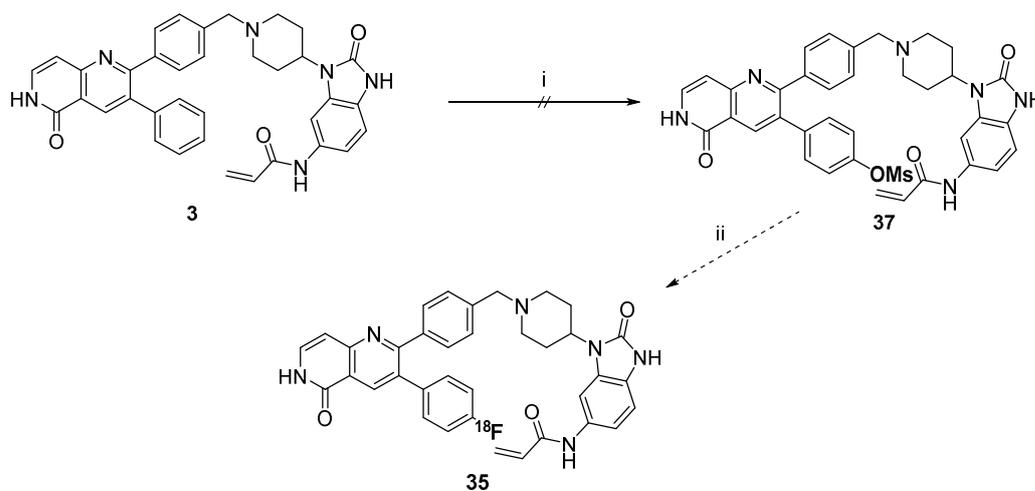
**Abbildung 22:** Die Palladium-katalysierte elektrophile aromatische C-H-Fluorierung zur direkten Einführung des  $^{18}\text{F}$ -Isotops an Borussertib **3** zeigte keinen Umsatz. (i) Pd(II) Katalysator, Selectfluor/NFSI, MeCN, RT, 12-24, kein Reaktionsumsatz.<sup>6</sup>

Neben der direkten Fluorierung von Borussertib, die nicht erfolgreich war, besteht ebenfalls die Möglichkeit der indirekten Fluorierung mittels Bis(methansulfonyl)peroxid.<sup>6[105b]</sup>

ζ Die LSF Reaktionen wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tobias Ritter durchgeführt (Jens Rickmeier, MPI Mülheim)

Hiermit wird über ein *charge transfer* (CT) Komplex die Möglichkeit gegeben selbst an komplexere Molekülen, wie Borussertib, sowohl mit elektronenreichen als auch -armen Heteroaromaten eine C-O-Bindungsknüpfung zu ermöglichen (Abb. 23).

Das Substratspektrum kann hierbei noch durch den Einsatz von  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$ , das als *single electron transfer* (SET) Katalysator agiert, erweitert werden. Hierbei können an einfach-substituierten Aromaten drei konstituelle Isomere entstehen, wobei jedoch eine Präferenz für die Substitution in *para*-Position vorliegt. Durch die C-O-Bindungsknüpfung kann eine Funktionalisierung mit einer Mesylatgruppe durchgeführt werden, die eine gute Fluchtgruppe darstellt, sodass im zweiten Syntheseschritt das  $^{18}\text{F}$ -Isotop mit Hilfe des Ruthenium Komplexes  $\text{CpRu}(\text{COD})\text{Cl}$  eingeführt werden kann. Trotz der Verwendung des Ru-basierten Katalysators, konnte keine erfolgreiche Mesylierung des Phenylrings in 3-Position des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts erzielt werden. Dies hängt mit der Vielzahl an aromatischen Ringen in Borussertib zusammen, wodurch keine selektive C-H-Oxygenerierung möglich ist.



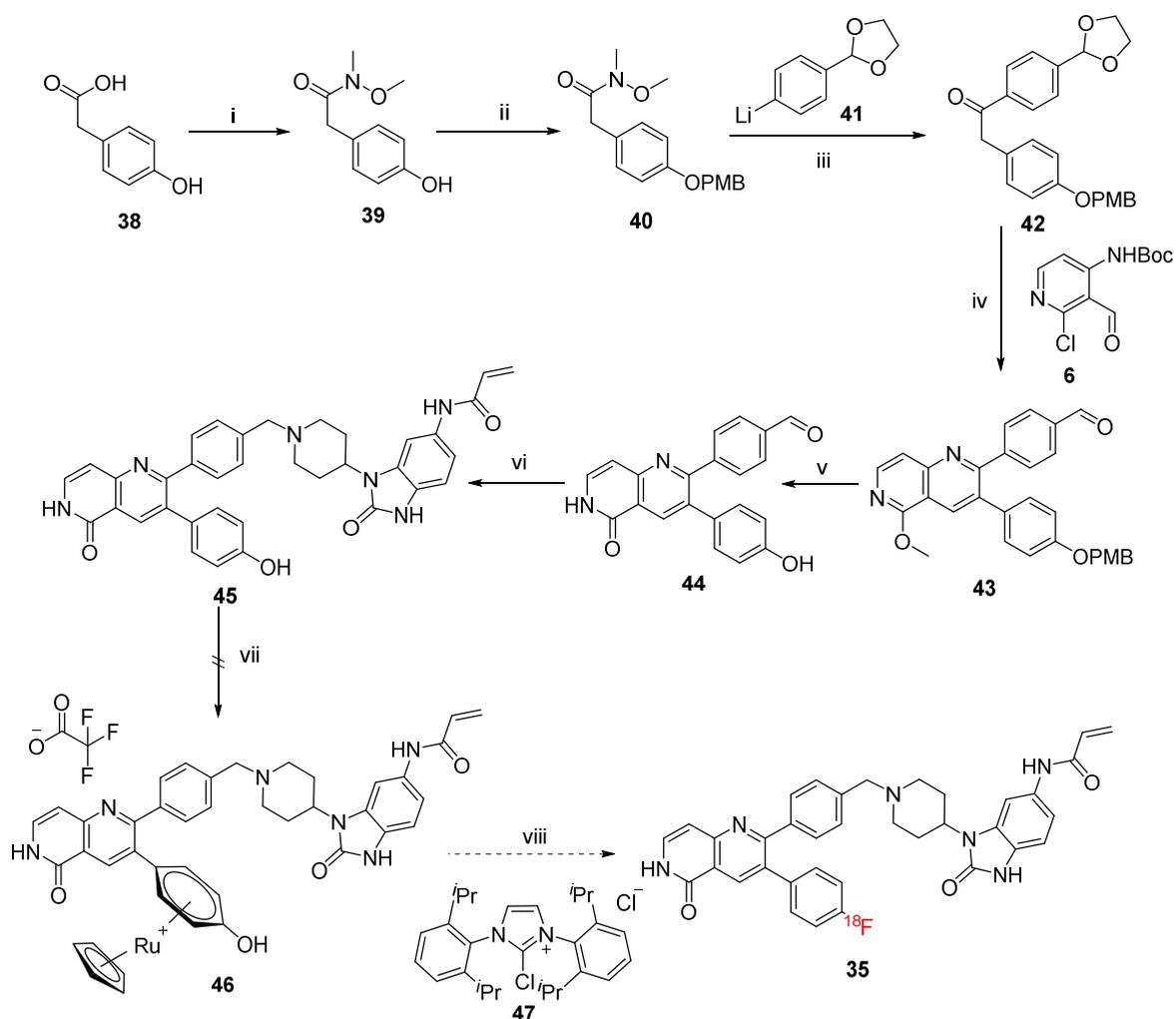
**Abbildung 23:** Die aromatische C-H-Oxygenerierung zur direkten Einführung des  $^{18}\text{F}$ -Isotops an Borussertib zeigte keinen Umsatz. (i) Bis(methansulfonyl)peroxid,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3](\text{PF}_6)_2$ , MeCN, RT, 12-24 h, kein Reaktionsumsatz. (ii)  $\text{CpRu}(\text{COD})\text{Cl}$ ,  $i^{\text{Pr}}\text{ImCl}$ ,  $^{18}\text{F}$ .<sup>6</sup>

Da keine Fluorierung, weder per direkter noch indirekter Methode, des bereits synthetisierten Borussertibs **3** im letzten Syntheseschritt möglich war, sollte eine neue Syntheseroute zur Darstellung von Borussertib mit dem  $^{18}\text{F}$ -Isotop etabliert werden. Eine mögliche alternative Syntheseroute zur Einführung des Fluor-Substituenten besteht über die  $^{18}\text{F}$ -Deoxyfluorierung von Phenolen mittels eines Ru- $\pi$ -Komplexes.<sup>[106]</sup> Durch den

Einsatz des Ru-Komplexes wird ein Meisenheimer-Komplex mit dem Phenolring aufgebaut, sodass die Elektronendichte im Phenol gesenkt wird, wodurch die Reaktionsenergie zur Einführung des Fluorsubstituenten herabgesetzt wird. Aus diesem Grund sollte bei Borussertib in para-Position des 3-Phenylrings des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts eine Hydroxylgruppe eingeführt werden. Basierend auf der etablierten konvergenten Borussertib-Synthese sollte nun eine modifizierte Synthesestrategie entwickelt werden. Der Benzo[*d*]imidazolone Baustein konnte weiterhin analog zur Borussertib Syntheseroute dargestellt werden (s. Kapitel 3.1).

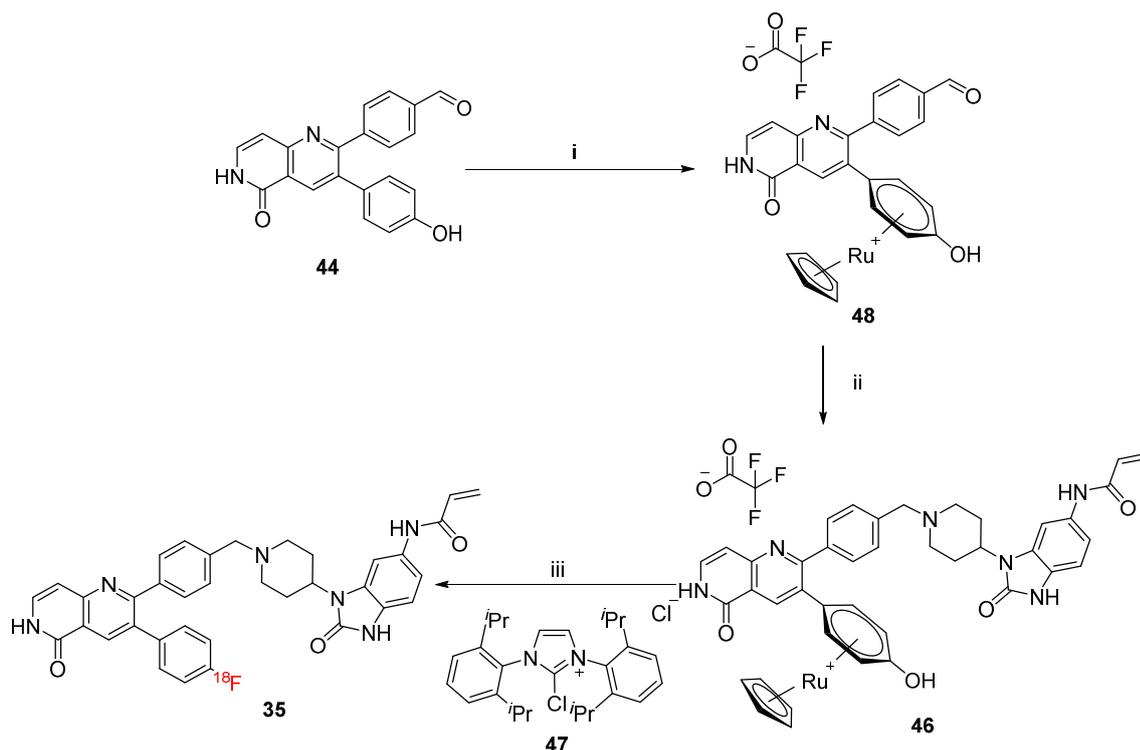
In Zusammenarbeit mit dem MPI Mülheim wurde eine Syntheseroute zur Darstellung des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts mit einem Phenolring in 3-Position entwickelt (Abb. 24). Als Edukt diente hierfür 4-Hydroxyphenylelessigsäure **38**, die mittels *N,O*-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid und Propanphosphonsäureanhydrid zum Weinreb Amid **39** umgesetzt wurde, das ohne säulenchromatographische Auftrennung weiterverarbeitet wurde. Im nächsten Syntheseschritt wurde die Schützung der Phenolgruppe mit *p*-Methoxybenzyl durchgeführt, da die Hydroxygruppe ansonsten in den nächsten Syntheseschritten zu ungewollten Nebenreaktion geführt hätte. Über diese beiden Syntheseschritte konnte eine sehr gute Ausbeute von 68 % erzielt werden. Im nächsten Syntheseschritt wurde das geschützte Weinreb Amid **40** mit (4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)lithium **41** unter Grignard-ähnlichen zu 1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2-(4-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)ethan-1-on **42** umgesetzt. Mittels des Einsatzes des Pyridinderivates **6** aus der Borussertib Synthese wurde das 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst **43** per Friedländer-Chinolin Synthese aufgebaut. Ebenso wie bei der äquivalenten Syntheseroute des Borussertibs konnte **43** mit einer guten Ausbeute von 75 % aufgebaut werden, sodass keinerlei Optimierung des Syntheseschritts nötig war. Im letzten Syntheseschritt zum Aufbau des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst **44** erfolgte die Entschützung des Aldehyds am Phenylring in 2-Position sowie des Phenols in 3-Position des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts. Das Phenol führte zu einer hohen Hydrophilie der Substanz, sodass lediglich eine Aufreinigung per reverser Säulenchromatographie möglich war, die trotz eines vollständigen Reaktionsumsatzes lediglich zu einer Ausbeute von 40 % führte. Diese könnte durch eine Optimierung des Aufreinigungsprotokolls erhöht werden, da jedoch ausreichend Material für die anschließende reduktive Aminierung erhalten wurde, erfolgte die Umsetzung mit dem Benzo[*d*]imidazolone-Derivat **20**. Hierbei konnte das Borussertib-OH **45** mit einer moderaten Ausbeute von 27 % unter den gleichen Synthesebedingungen wie bei der optimierten Borussertib

Syntheseroute erhalten werden. Somit konnte **45** für eine erste biochemische Charakterisierung per HTRF Assay erhalten werden und für die abschließende Komplexierung und Einführung des  $^{18}\text{F}$ -Isotops. Die biochemische Analyse per HTRF Assay zeigte eine inhibitorische Aktivität von  $9 \pm 2$  nM auf Akt1. Dies entspricht der SAR zum Phenylring in 3-Position des 1,6-Naphthyridinons, bei dem die Einführung von kleinen Substituenten zu einem 5-10-fachen Aktivitätsverlust führen (s. Kapitel 3.2). Diese geringe Einbuße in der Aktivität stellt einen ersten Indikator für den erfolgreichen Ansatz zur Einführung des Radionuklids in der para-Position des Phenylrings dar. Der nächste Syntheseschritt zur Darstellung des  $^{18}\text{F}$ -Borussertib ist die Komplexierung mit dem Ru-Liganden. Diese war jedoch nicht erfolgreich, da aufgrund der hohen Anzahl an Aromaten eine Mehrfachkomplexierung des Edukts **45** auftrat. Zudem war die Löslichkeit problematisch, sodass nur ein geringer Anteil von **45** umgesetzt werden konnte und der übrige Teil auch nicht reisoliert werden konnte. Die Hauptproblematik in diesem Syntheseschritt stellt somit die schlechte Löslichkeit der Substanz dar.



**Abbildung 24:** Syntheseroute zur Darstellung des  $^{18}\text{F}$ -Borussertibs via  $^{18}\text{F}$ -Deoxyfluorierung von Phenolen mittels Ru  $\pi$ -Komplexen. (i)  $\text{CH}_3\text{NH}(\text{OMe})\text{HCl}$ , T3P, DIPEA, DCM, RT, 10 min. (ii) PMBBBr,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF,  $70\text{ }^\circ\text{C}$ , 12 h, 68 % Ausbeute über zwei Syntheseschritte. (iii) *n*-BuLi, THF,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h, 70 % Ausbeute, (iv) NaOMe, MeOH,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h, 75 % Ausbeute. (v) HCl,  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , 3 h, 40 % Ausbeute, (vi) **20**,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , AcOH,  $\text{Et}_3\text{N}$ , MeOH,  $75\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h, 27 % Ausbeute. (vii) CpRuNaphtalen OTf, DCE/ACN (9:1),  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h, kein Umsatz. (viii)  $^{18}\text{F}^-$ ,  $130\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 min.<sup>6</sup>

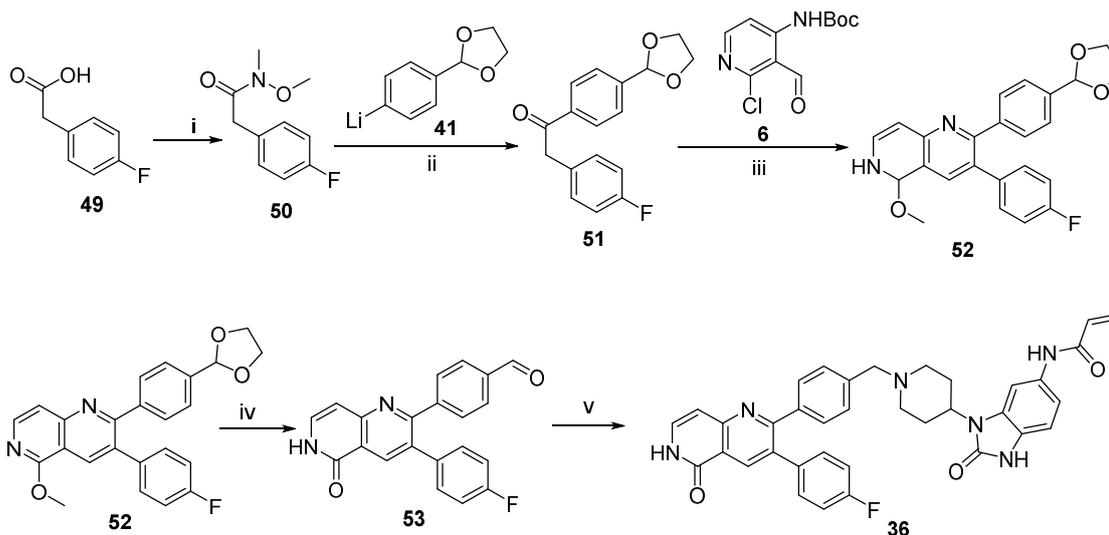
Da die Komplexierung des Borussertib-Ohs **45** nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, sollte bereits das neu synthetisierte **44** komplexiert werden, bevor die reduktive Aminierung mit **20** erfolgt. Durch diese Optimierung der Syntheseroute konnte eine vollständige Umsetzung des Edukts **44** und eine sehr gute Ausbeute von **48** mit 79 % erhalten werden (Abb. 25). Dies hängt mit einer besseren Löslichkeit **44** im Vergleich zu **45** zusammen. Im nächsten Syntheseschritt erfolgte die reduktive Aminierung zu **46** nach dem bekannten Reaktionsprotokoll mit einer sehr guten Ausbeute von 85 %. Mit der so etablierten Syntheseroute konnte somit **46** für die  $^{18}\text{F}$ -Deoxyfluorierung dargestellt und durch den Ru-basierten Meisenheimer Komplex ein sehr guter 75 %iger Umsatz des Edukts zum  $^{18}\text{F}$ -Borussertib **35** detektiert werden. Nach erfolgter Aufreinigung konnte das **35** mit einer sehr guten radiochemischen Ausbeute (eng. *radiochemical yield*, RCY) von 52 % erhalten werden. Das eingeführte  $^{18}\text{F}$ -Isotop wird dabei in einem Zyklotron generiert, sodass dieser letzte Syntheseschritt gut vom Chemielabor in medizinische Einrichtungen transferierbar ist.



**Abbildung 25:** Optimierte Syntheseroute zur Darstellung des  $^{18}\text{F}$ -Borussertibs **35** via  $^{18}\text{F}$ -Deoxyfluorierung von Phenolen mittels Ru  $\pi$ -Komplexen. (i) CpRuNaphtalen OTf, DCE/ACN (9:1), 80 °C, 16 h, 79 % Ausbeute. (ii) **20**,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , AcOH,  $\text{Et}_3\text{N}$ , MeOH, 75 °C, 16 h, 85 % Ausbeute. (iii)  $^{18}\text{F}$ , EtOH/Veratrol/PivCN (1:4:4), 130 °C, 30 min, Elution Effizienz: 90%, DC-Umsatz: 75%, HPLC-Reinheit: 77%, **RCY =52%**.<sup>6</sup>

Vor der Translation in präklinische und klinische Studien ist eine umfassende biochemische, zelluläre und PK-Analyse des Fluor-markierten Borussertibs nötig. Dies ist ebenso von großer Relevanz um den Designansatz zu validieren, sodass zunächst die Synthese des nicht-radioaktiven  $^{19}\text{F}$ -Derivats **36** erfolgen sollte. Die Synthese sollte dabei equivalent zu der bereits etablierten  $^{18}\text{F}$ -Borussertib-Synthese durchgeführt werden. Da keine freie Hydroxygruppe vorliegt, kann das  $^{19}\text{F}$ -1,6-Naphthyridion-Grundgerüst **53** mit nur vier Syntheseschritten aufgebaut werden (Abb. 26). Die Synthese beginnt mit der Umsetzung der 2-(4-Fluorphenyl)essigsäure **49** zum Weinreb-Amid **50**, gefolgt von einer nukleophilen Addition. Mit einer Ausbeute von 90 % bzw. 69 % für den ersten und zweiten Syntheseschritt lag die Ausbeute für die beiden Syntheseschritte im selben Bereich wie für die bereits etablierte Syntheseroute. Im nächsten Schritt konnte das 1,6-Naphthyridion-Grundgerüst **52** durch die Friedländer-Chinolin-Synthese mit einer guten Ausbeute von 68 % aufgebaut werden. Die abschließende Entschützung zum freien Aldehyd lieferte das finale  $^{19}\text{F}$ -1,6-Naphthyridion-Grundgerüst **53** mit einer 77 %igen

Ausbeute. Im Vergleich zu **44** war die Löslichkeit dieses Bausteins deutlich besser, sodass die Aufreinigung deutlich effizienter durchführbar war. Schließlich wurde das  $^{19}\text{F}$ -Borussertib **36** durch reduktive Aminierung analog zu den vorherigen Reaktionsbedingungen erhalten. Die moderate Ausbeute von 45 % lieferte ausreichend Substanz für die geplanten biochemischen, zellulären und PK Analysen.

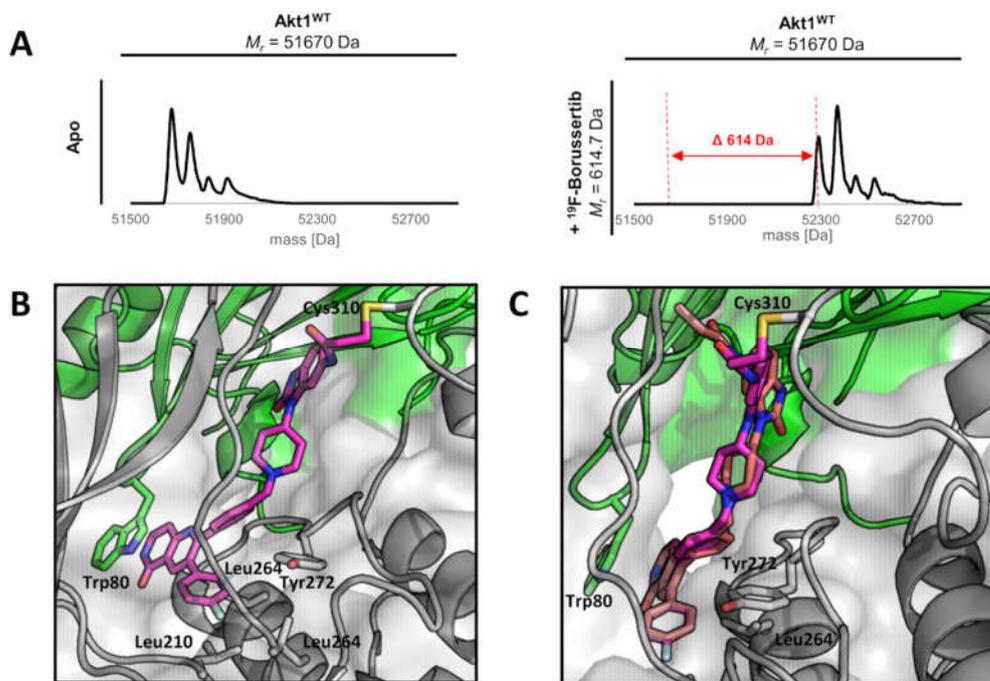


**Abbildung 26:** Syntheseroute zur Darstellung des nicht radioaktiven  $^{19}\text{F}$ -Borussertibs **36**. (i)  $\text{CH}_3\text{NH}(\text{OMe})\text{HCl}$ , T3P, DIPEA, DCM, RT, 1 h, 90 % Ausbeute. (ii) *n*-BuLi, THF,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h, 69 % Ausbeute. (iii) NaOMe, MeOH,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h, 68 % Ausbeute. (iv) HCl,  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , 3 h, 77 % Ausbeute, (v) **20**,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , AcOH,  $\text{Et}_3\text{N}$ , MeOH,  $75\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h, 45 % Ausbeute.

### 3.3.2 Biochemische, zelluläre und PK-Profilierung

Zunächst wurde der kovalente Bindungsmodus von  $^{19}\text{F}$ -Borussertib durch Inkubation in Gegenwart von Akt1 und anschließender Protein-Massenspektrometrie nachgewiesen, die beobachtete Massenverschiebung entspricht der stöchiometrischen, irreversiblen Proteinmarkierung durch **36** (Abb. 27A). Neben dem Nachweis der kovalenten Bindungsknüpfung per Massenspektrometrie konnte der kovalent-allosterische Bindungsmodus durch eine Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit  $^{19}\text{F}$ -Borussertib mit einer Auflösung von  $2,2\text{ \AA}$ , verifiziert werden (Abb. 27B).<sup>5</sup> Demnach zeigte das fluorierte Derivat eine mit Borussertib identische Orientierung des 1,6-diphenylsubstituierten Naphthyridinon-Grundgerüsts, wobei der Fluorsubstituenten in der hydrophoben Bindetasche (Leu210, Leu264, Ile290) keinen Einfluss auf die Proteinkonformation im Vergleich zu Borussertib zeigt (Abb. 27C).

Trotz der identischen Orientierung des 1,6-Naphthyridinons wurde festgestellt, dass Cys310 kovalent modifiziert wurde. Im Gegensatz zu der Röntgenkristallstruktur von Akt in Komplex mit Borussertib (PDB:6HHF), bei der die Modifizierung von Cys296 beobachtet wird. Somit wird auch eine Verschiebung des Piperidins und Benzo[*d*]imidazolons in der Bindetasche in Richtung von Cys310 beobachtet. Jedoch zeigt die Röntgenkristallstruktur nur einen kurzen Ausschnitt der Bindungsdynamik und für weitere CAAs konnte gezeigt werden, dass sowohl Cys296 als auch Cys310 modifiziert werden können. Für eine genaue Differenzierung, welches Cys favorisiert von  $^{19}\text{F}$ -Borussertib modifiziert wird, wäre eine quantitative MS/MS-Analyse nötig.



**Abbildung 27:** Verifizierung des kovalenten Bindungsmodus zu Akt des nicht radioaktiven  $^{19}\text{F}$ -Borussertibs. **A)** Massenspektrometrischer Nachweis des kovalenten Bindungsmodus des nicht radioaktiven  $^{19}\text{F}$ -Borussertibs. **B)** Röntgenkristallstruktur von Akt in Komplex mit  $^{19}\text{F}$ -Borussertibs.<sup>§</sup> **C)** Röntgenkristallstruktur von Akt in Komplex mit  $^{19}\text{F}$ -Borussertibs überlagert mit Borussertib.<sup>§</sup>

<sup>§</sup> Röntgenkristallstrukturanalyse durchgeführt von Dr. Ina Landel

Neben der Analyse der inhibitorischen Aktivität auf Akt1 wurde der HTRF Assay ebenfalls für die zwei weiteren Akt2 und Akt3 Isoformen durchgeführt. Für Akt1 konnte im Vergleich zu Borussertib der schwächste Aktivitätsverlust (5-fach) für  $^{19}\text{F}$ -Borussertib festgestellt werden (Tab. 3).<sup>6</sup> Dem entgegen steht die deutlich geringere Hemmung von Akt2 und Akt3 im Vergleich zu Borussertib von etwa 7- bis 9-fach geringerer Effektivität. Dies führt zu einer Selektivität für Akt1, die für nachfolgende PET-Studien miteinbezogen werden muss. Kinetische Analysen mit aktiviertem Akt1 zeigten Bindungs- und Inaktivierungseigenschaften, die mit denen von Borussertib vergleichbar sind, wie die  $\text{IC}_{50}$ -,  $K_i$ - und  $k_{\text{inact}}$ -Werte zeigen, wobei ein etwa 8-facher Verlust der Bindungsaffinität teilweise durch eine beschleunigte kovalente Bindungsbildung kompensiert wird. In Übereinstimmung mit den biochemischen Daten war die antiproliferative Wirksamkeit von  $^{19}\text{F}$ -Borussertib etwa 5-fach niedriger in den PI3K- und PTEN-mutierten Zelllinien AN3-CA und ZR-75-1 mit  $\text{EC}_{50}$ -Werten von 983 nM bzw. 25 nM, verglichen mit dem parentalen Borussertib, das in diesen Zelllinien halbmaximale effektive Konzentrationen von 190 nM bzw. 5 nM aufweist.<sup>6</sup> Darüber hinaus zeigte die *in vitro* PK-Profilierung von  $^{19}\text{F}$ -Borussertib eine verbesserte wässrige Löslichkeit (SolRank) mit 47  $\mu\text{M}$  gegenüber 14  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu Borussertib.<sup>6</sup> Die moderate Permeabilität über ein künstliches Membransystem (PAMPA) von 22 % zeigt eine leichte Optimierung im Vergleich zu Borussertib. Bemerkenswert ist, dass die orale Bioverfügbarkeit, die, durch das Caco-2-Assay-System vorhergesagt wird, bei oraler Verabreichung eine unbefriedigende Aufnahme zeigte, da im Vergleich zu Borussertib ein 4-facher höherer aktiver Efflux vorliegt. Dieser liegt begründet auf dem aktiven Transport aus der Zelle heraus, wobei die Aufnahme in die Zelle unverändert gering bleibt. Aufgrund des kurzlebigen  $^{18}\text{F}$ -Isotops würde die Anwendung der potenziellen PET-Sonde durch intravenöse oder intraperitoneale Injektion jedoch unabhängig davon einer oralen Verabreichung vorgezogen werden und ein aktiver Efflux ist sogar erwünscht, da der PET-Tracer somit nur eine kurze Zeit im Organismus verbleibt. Die für PET-Tracer höchst relevante Stabilität in murinen Lebermikrosomen ( $\text{CL}_{\text{int}}$  MLM) zeigt eine außerordentlich gute Robustheit, sodass die fluormarkierte Verbindung für die *in vivo* Anwendung geeignet ist.

<sup>6</sup> Biochemische und zelluläre Evaluierung durchgeführt von Dr. Ina Landel und Dr. Lena Quambusch; PK Profilierung durchgeführt vom LDC (Dr. Matthias Baumann)

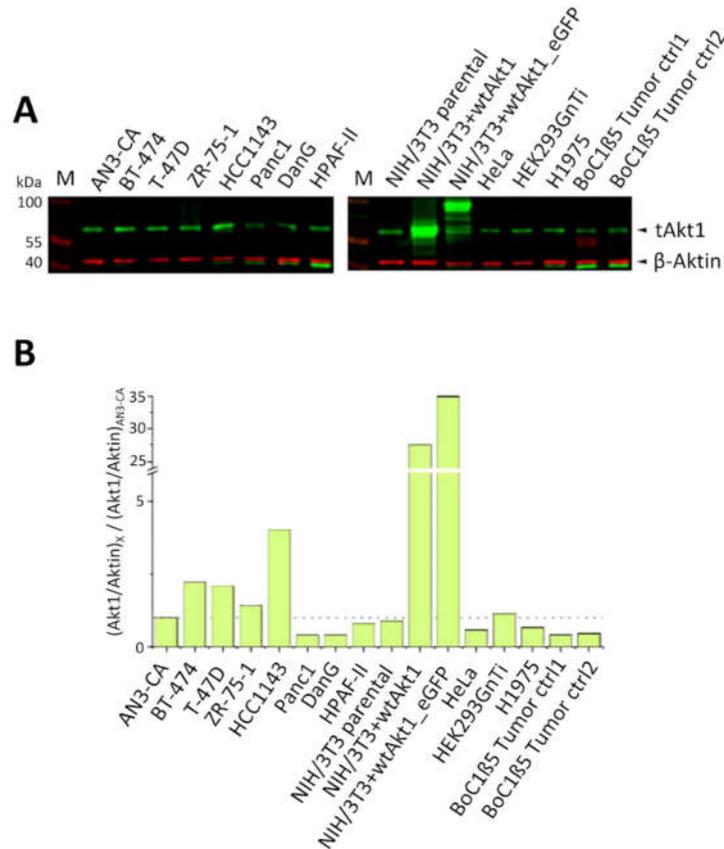
**Tabelle 3:** Biochemische, kinetische, zelluläre und PK Parameter von Borussertib **3** und <sup>19</sup>F-Borussertib **36**. Die Einführung des Fluorsubstituenten bewahrt die relevanten Eigenschaften von Borussertib.<sup>6</sup>

		Borussertib	<sup>19</sup> F-Borussertib
<b>IC<sub>50</sub> /nM</b>	wtAkt1	0,8 ± 0,3	4 ± 1
	wtAkt2	59 ± 16	520 ± 90
	wtAkt3	650 ± 1703	4900 ± 3400
<b>wtAkt1</b>	Ki /nM	2,2 ± 0,3	16 ± 1
	k <sub>inact</sub> /min <sup>-1</sup>	0,111 ± 0,020	0,154 ± 0,055
	k <sub>inact</sub> /Ki /μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	0,853 ± 0,038	0,158 ± 0,050
<b>EC<sub>50</sub> /nM</b>	AN3-CA	190 ± 90	983 ± 430
	ZR-75-1	5 ± 1	25 ± 5
<b>PK</b>	SolRank @ pH 7.4 / μM	14	47
	PAMPA @ pH 7.4 / %flux	<5	22
	Caco-2 (pH 6,5/7,4) Papp [10-6 cm/s] A→B	0,04	0,04
	Caco-2 (pH 6,5/7,4) Papp [10-6 cm/s] A→B	4,0	17,6
	Verhältnis Caco-2 B → A/ B → A	105	405
	Cl <sub>int</sub> [μL/min/mg] murin	31	43

### 3.3.3 *in vivo* PET-Studien

Da die biochemischen Daten eine Selektivität für Akt1 zeigten, wurden verschiedene humane Zelllinien für die Xenograft-Implementierung und die anschließende Validierung des <sup>18</sup>F-Borussertib-PET-Tracers *in vivo* ausgewählt, die hinsichtlich ihrer Akt1-Konzentrationen analysiert wurden.<sup>5</sup> Zur Kontrolle wurde auch die Akt1-Konzentrationen in murinen NIH/3T3-Zellen analysiert, die entweder nicht transduziert oder zur Überexpression von humanem Akt1 transduziert wurden (NIH/3T3+Akt1) (Abb. 28A). Dementsprechend wies die NIH/3T3+Akt1 Zelllinie das höchste Akt1-Level unter allen getesteten Zelllinien. Trotz allgemein geringerer Akt1-Levels in den Tumorproben im Vergleich zu den jeweiligen Zelllysaten, zeigten alle getesteten Tumorphomogenate Akt1-Mengen, die durch WB leicht nachweisbar waren, und qualifizieren sich daher als potentielle Modellsysteme für die Validierung des <sup>18</sup>F-Borussertib (Abb. 28B). Auf Grundlage der bereits etablierten Xenograft-Modelle sollten erste PET-Studien in der humanen Pankreaszelllinie Panc1 und in der murinen NIH/3T3+Akt1 durchgeführt werden.

<sup>5</sup> Zelllinien-Analyse durchgeführt von Dr. Jörn Weisner

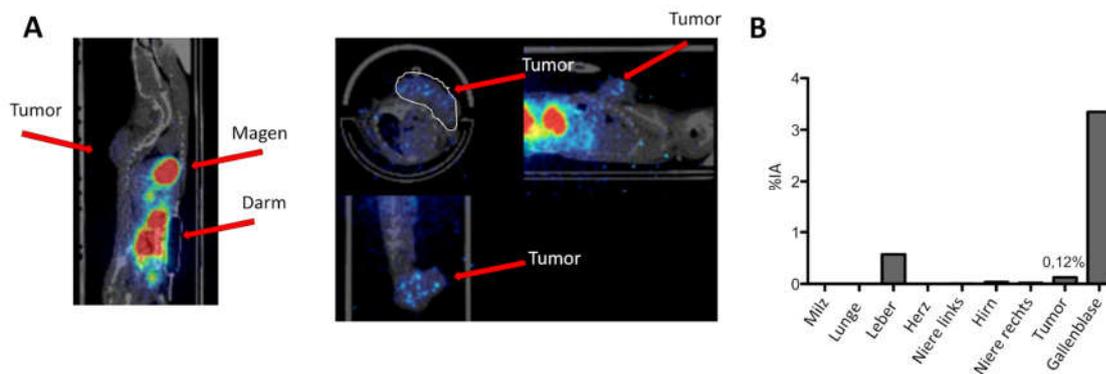


**Abbildung 28:** **A)** WB-Analyse der Akt1-Expressionslevel in verschiedenen humanen und murinen Zelllinien. **B)** Quantifizierung der Akt1-Expressionsniveaus basierend auf den WB. Das höchste Akt1-Level zeigt wie erwartet NIH/3T3 +Akt1. Normalisiert wurde auf die Akt1-Konzentration in AN3-CA.<sup>5</sup>

Zunächst erfolgte die Injektion von  $^{18}\text{F}$ -Borussertib in Panc1-Xenografts.<sup>6</sup> Hierbei werden den Mäusen kleinste nicht pharmakologische Mengen des potentiellen Tracers verabreicht. Die verabreichte Menge wird hierbei in der Einheit der Radioaktivität, Becquerel, angegeben. Es wurden zwei Mäuse mit unterschiedlich ausgeprägten Tumoren behandelt, eine Maus mit einem Tumolvolumen von  $800 \text{ mm}^3$  und eine mit  $200 \text{ mm}^3$ . Die Injektion des Tracers erfolgte intraperitoneal und es wurden 21,5 MBq bzw. 16,3 MBq injiziert. In erster Linie ist festzuhalten, dass  $^{18}\text{F}$ -Borussertib ein radioaktives Signal *in vivo* erzeugt und somit stabil im biologischen System ist. Zudem zeigt sich eine gute Verteilung des Radioliganden, da sowohl nach einer als auch zwei Stunden eine gute Verteilung der Radioaktivität sichtbar ist, ist auch kein freies  $^{18}\text{F}$ Fluor vorhanden.

<sup>6</sup> Die PET Xenografts wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jens Sieveke getätigt (Marija Trajkovic-Arsic, WTZ Essen)

Somit sind prinzipiell die grundlegenden Voraussetzungen zur PET-Bildgebung des Zielproteins Akt gegeben. Der Hauptanteil des  $^{18}\text{F}$ -Borussertibs konnte zwei Stunden nach Injektion in der Leber, Galle, Magen und Darm mittels *in vivo* PET-Scans bei beiden Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 29A). Neben der Anreicherung in diesen Organen konnte für die Maus mit einem größeren Tumor eine leichte Anreicherung der radioaktiven Substanz im Tumor detektiert werden. Nach einer weiteren Stunde erfolgte die *ex vivo*-Untersuchung der Verteilung des  $^{18}\text{F}$ -Borussertibs per Organextraktion und Analyse mittels eines Gamma-Zählers (Abb. 29B). Hierbei konnte der Hauptanteil der injizierten Radioaktivität unter anderem in der Gallenblase und Leber ausgemacht werden. Lediglich 0,12 % der injizierten Radioaktivität pro Gewebegramm (%IA/g) konnten im Tumor lokalisiert werden.

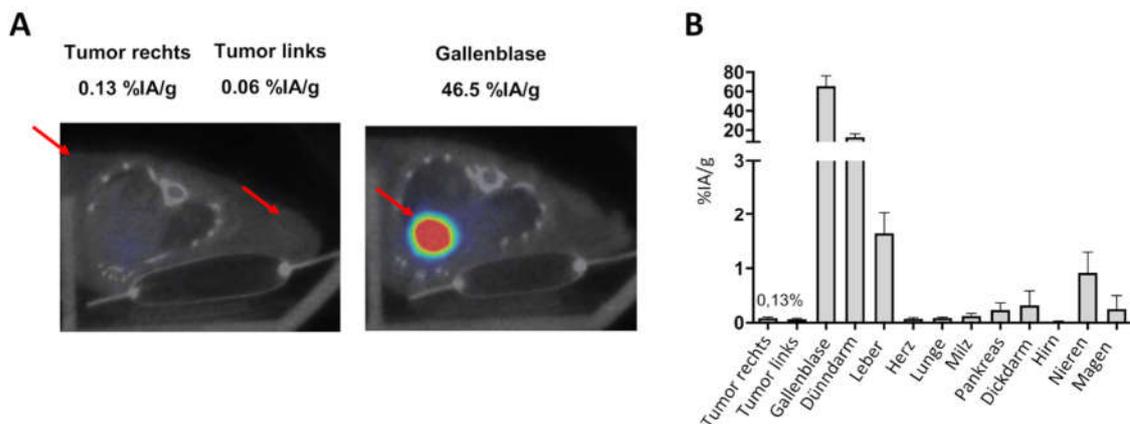


**Abbildung 29:** A) *In vivo* PET-Scans der Panc1-Xenograft-Maus, die einen Tumor mit 800 mm<sup>3</sup> Volumen trägt. Es zeigt sich eine deutliche Anreicherung im Magen/Darm-Trakt und lediglich eine minimale Aufnahme im Tumor. B) *Ex vivo*-Analyse via Gamma-Zähler zur Ermittlung der %IA/g der einzelnen Organe und Gewebe. Der Hauptanteil der Radioaktivität konnte in der Leber und Gallenblase nachgewiesen werden. Lediglich 0,12 %IA/g konnten im Tumor nachgewiesen werden.<sup>6</sup>

Die hohe Anreicherung im Darm kann teilweise mit der intraperitonealen Injektion zusammenhängen. Zum anderen ist Akt unter anderem im Glukose-Metabolismus beteiligt und somit auch vermehrt im Magen-Darm-Trakt lokalisiert.<sup>[147]</sup> Die Aufnahme des Radioliganden in den Tumor mit 0,12 %IA/g ist so gering, dass es als nicht signifikant eingestuft werden muss. Diese geringe Aufnahme kann zum einen mit den moderaten PK-Eigenschaften des  $^{18}\text{F}$ -Borussertibs zusammenhängen (Tab. 3), durch die ein sehr starker Efflux des Moleküls vorliegt, sodass keine ausreichende Bindung an Akt erfolgen kann.

Darüber hinaus kann die Anreicherung in Leber und Niere ein Indiz für einen aktiven Metabolismus der Substanz sein. Eine weitere Limitation stellt das Panc1-Xenograft Modell dar, weil lediglich geringe Mengen an Akt1 mittels WB in Panc1-Zellen detektiert werden konnten (Abb. 28).

Aus diesem Grund wurde eine zweite Xenograft-Studie mit implantierten NIH/3T3+Akt1 Zellen durchgeführt. Die Injektion in diese Xenografts erfolgte auch wie zuvor intraperitoneal, wobei jedoch in dieser Studie bereits die Verabreichung von etwa 3 MBq ausreichend war für eine erfolgreiche PET-Bildgebung. In dieser Xenograft-Studie wurden insgesamt vier Mäuse mit jeweils zwei Tumoren behandelt werden. Jeweils eine und zwei Stunden nach erfolgter Injektion wurden *in vivo* PET-Scans durchgeführt. Innerhalb dieser konnte wie in den Panc1-Xenografts eine Anreicherung in der Gallenblase nachgewiesen werden, wohingegen nur geringste Mengen der Radioaktivität in den Tumoren nachgewiesen werden konnte (Abb. 30A). Drei Stunden nach der Injektion erfolgte wiederum die *ex vivo* Analyse per Gamma-Zähler (Abb. 30B). Diese Auswertung bestätigte die ersten Analysen der *in vivo* PET-Scans nach einer und zwei Stunden, bei denen die größte Radioaktivität in der Gallenblase nachgewiesen werden konnte. In den vier Mäusen mit den zwei Tumoren konnten lediglich kleinste Mengen von Radioaktivität in allen Tumoren detektiert werden (0,06-0,15 %IA/g).



**Abbildung 30:** **A)** *In vivo* PET-Scans einer NIH/3T3+Akt1-Xenograft-Maus, mit zwei implantierten Tumoren. Es zeigt sich eine deutliche Anreicherung in der Gallenblase und lediglich einer minimalen Aufnahme in die Tumore. **B)** *Ex vivo* Analyse via Gamma-Zähler zur Ermittlung der %IA/g der einzelnen Organe und Gewebe. Der Hauptanteil der Radioaktivität konnte in der Leber, Niere und Gallenblase nachgewiesen werden. Lediglich 0,13 %IA/g konnten im Tumor nachgewiesen werden.<sup>6</sup>

Diese Ergebnisse decken sich mit den Analysen der ersten Xenograft-Studie, bei der eine ähnliche Anreicherung von  $^{18}\text{F}$ -Borussertib in Gallenblase, Leber und Magendarmtrakt stattfindet. Dies spricht für einen aktiven Metabolismus bzw. Ausscheidung des Radioliganden. Zum anderen kann die nicht vorhandene Anreicherung im Tumorgewebe auf die intraperitoneale Verabreichung zurückgeführt werden, die zu einer Akkumulation der Substanz im Magendarmtrakt führen. Daher wären weitere Xenograft-Studien mit intravenöser Injektion von Nöten. Da jedoch die PK-Eigenschaften von  $^{18}\text{F}$ -Borussertib sehr limitierend sind für die weitere Applikation bis hin zu einem finalen PET-*Tracer*, sollte eine Optimierung dieses ersten Radioliganden durchgeführt werden.

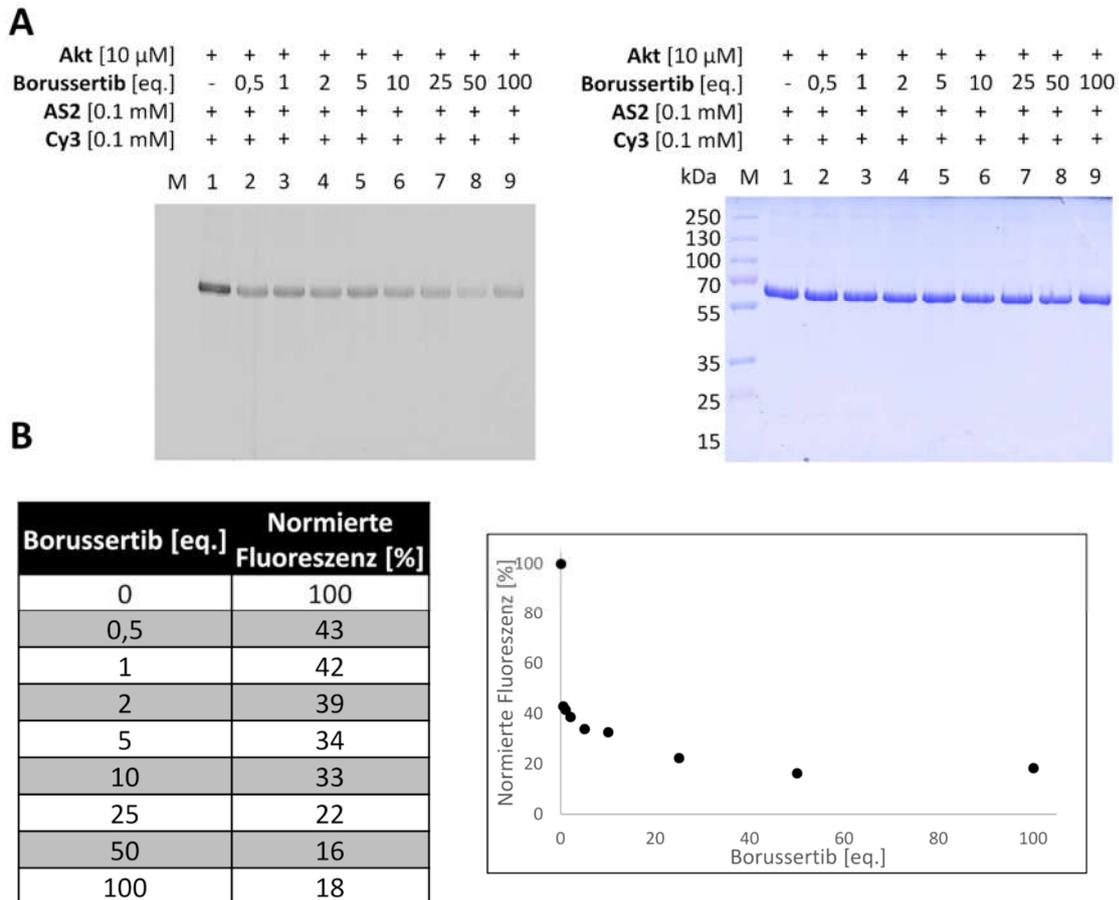
Nichtsdestotrotz stellt das  $^{18}\text{F}$ -Borussertib einen ersten erfolgreichen Ansatz zur Etablierung eines PET-*Tracers* dar. So besitzt das Borussertib-Derivat ein ähnliches biochemisches, zelluläres und PK-Profil, wie mittels des nicht radioaktiven  $^{19}\text{F}$ -Borussertibs nachgewiesen werden konnte, und bindet weiterhin kovalent an Akt, wie per Massenspektrometrie- und Röntgenkristallstruktur-Analyse belegt werden konnte. Darüber hinaus konnte ebenfalls die *in vivo* Stabilität des  $^{18}\text{F}$ -Borussertib in Xenograft-Studien nachgewiesen werden, indem ein radioaktives Signal in PET-Scans sichtbar ist, welches durch den Radioliganden ausgelöst wird.

### 3.4 Etablierung molekularer Sonden

Zur detaillierteren Analyse der komplexen Biologie von Akt zusammen ist der Einsatz von funktionalen Sonden ein vielversprechender Ansatzpunkt.<sup>[122]</sup> Wie VIVANCO *et al.* zeigen konnte geht die Akt-Funktionalität mit einem Kinase-unabhängigen, Konformations-abhängigen Überlebenssignale weit über die klassische Enzymaktivität hinaus.<sup>[43]</sup> Da diese Konformations-abhängigen Überlebenssignale von der Enzym-inaktiven PH-*out* Konformation weitergeleitet werden, eignen sich die CAAs als Grundlage von funktionalen Sondenmolekülen, die im Bereich des ABBPs genutzt werden können. Aus diesem Grund wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit die ersten beiden Alkin-modifizierten Sonden **AS1-2** erfolgreich synthetisiert und per erster *In Gel*-Fluoreszenz-Experimente validiert.<sup>[148]</sup>

In einem weiterführendem *In Gel*-Fluoreszenz-Experiment sollte der allosterische Bindungsmodus von Akt verifiziert und quantifiziert werden, indem ein Kompetitionsexperiment mit Borussertib durchgeführt wird. Hierfür wurde Akt zunächst mit verschiedenen Borussertib-Konzentrationen (0- 100 Equivalente) für zwei Stunden vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 eq. der **AS2** und die Inkubation für 24 Stunden. Anschließend wurde die etablierte *in situ* CuAAC durchgeführt und die Ansätze auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 31 A). Das Cy3-induzierte Fluoreszenzsignal wurde gemessen; anschließend erfolgte die Normalisierung der Fluoreszenzbanden über die Coomassie-gefärbten Banden, um etwaige Ungenauigkeiten bei der Auftragung auf das Gel auszugleichen. So ist anhand des Fluorophor-basierten Gels eine deutliche Reduktion des Fluoreszenzsignals detektierbar. Dies bestätigt den kovalenten allosterischen Bindemodus der Alkin-Sonden, da Borussertib die Bindetasche blockiert, sodass die Sonde nicht kovalent an Akt binden und somit Akt nicht fluoreszierend-modifiziert werden kann. Durch die Quantifizierung der Banden kann bereits mit 0,5 eq. Borussertib nur noch ein Fluoreszenzsignal von 42 % erreicht werden (Abb. 31B). Dieses nimmt mit steigenden Borussertib Konzentration weiter ab, bis lediglich nur noch ein Signal von 16 % bei 50 eq. Borussertib erhalten wird. Bei 100 eq. Borussertib kann mit 18 % keine weitere Verringerung des Fluoreszenzsignals erhalten werden. Dieser Unterschied ist aber im Vergleich zu der Probe mit 50 eq. Borussertib nicht signifikant, sodass von einem Erreichen eines Plateaus bei hohen Konzentrationen ausgegangen werden kann. In der Theorie sollte bei solch hohen Konzentration kein Fluoreszenzsignal zu detektieren sein, da Borussertib Akt bereits bei 3-fachen Überschuss vollständig modifiziert.

Nichtsdestotrotz zeigt dieses Konkurrenzexperiment erfolgreich, dass die Alkin-Sonden in der allosterischen Bindetasche binden und auch eine grundlegende Quantifizierung des kovalenten Bindemodus von CAAI möglich ist.

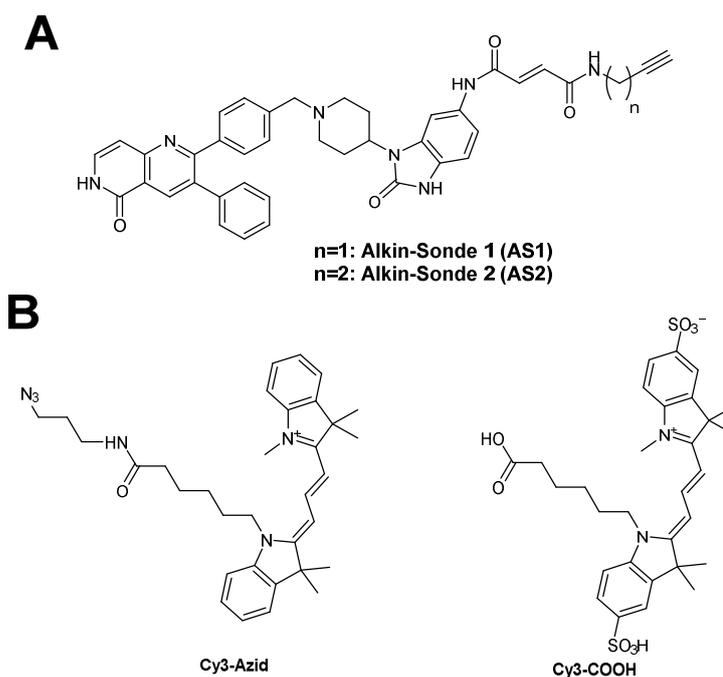


**Abbildung 31:** Konkurrenzexperiment mit Borussertib und einer Alkin-Sonde AS2. Aufsteigend von 0 eq. (Bahn 1) bis 100 eq. (Bahn 9) Borussertib wurde Akt für zwei Stunden bei 4 °C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 eq. der Alkin-Sonde, gefolgt von der etablierten CuAAC. **A)** Linkes Gelbild: Visualisierung des Cy3-Fluorophors per Typhoon. Rechtes Gelbild: Coomassie-Färbung der SDS-PAGE. Im linken Gelbild zeigt sich eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz mit ansteigender Borussertib Konzentration. **B)** Quantifizierung (via *ImageStudio*) des Fluoreszenzsignals normiert auf die Coomassie-Bande und auf 100 % für 0 eq. Borussertib. Die Fluoreszenz wird bis maximal zu 84 % (50 eq. Borussertib) durch die Konkurrenz verringert.

### 3.4.1 Synthese und Etablierung einer Cy3-basierten chemischen Sonde

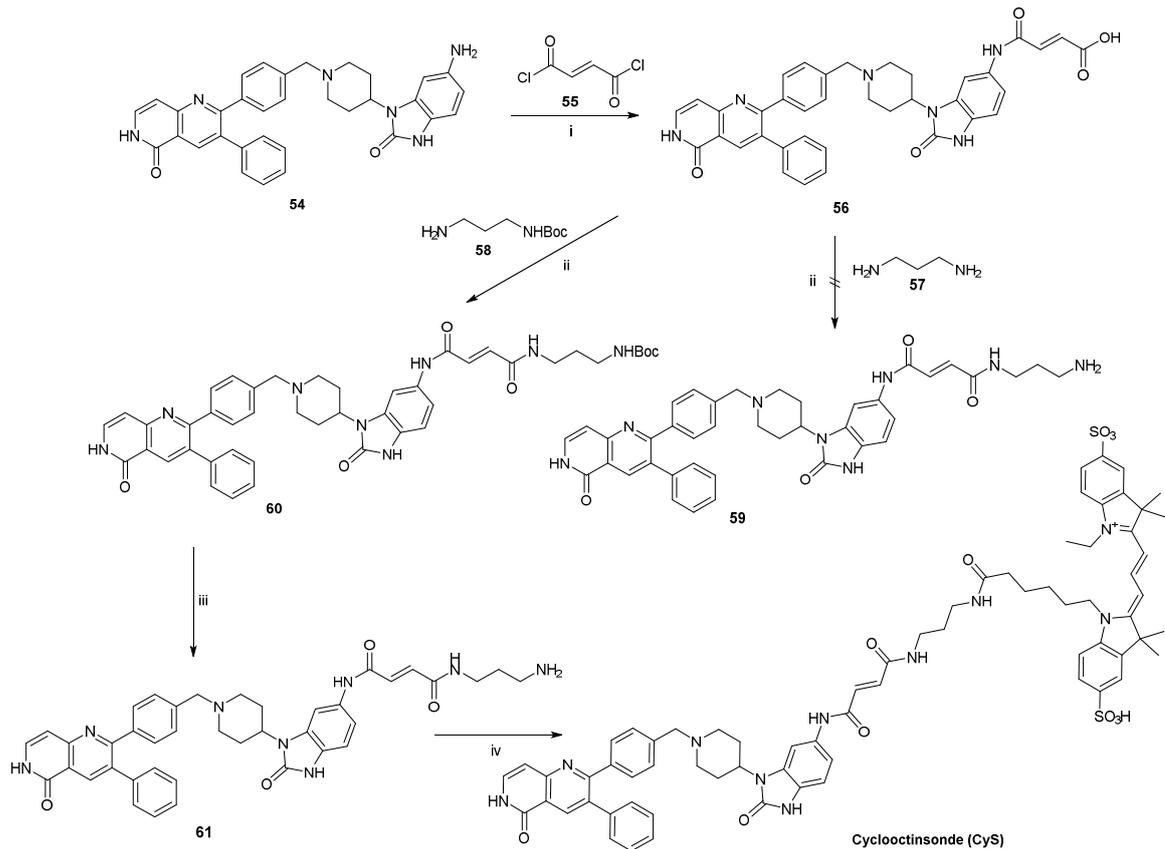
Die Einführung der Reportergruppen konnte zwar mittels *in situ* CuAAC erfolgreich etabliert werden, jedoch stellt das redoxensitive Kupfer eine mögliche Limitation in Hinsicht auf die Translation in komplexere *in vivo* Systeme dar. Aus diesem Grund sollten neben den bereits etablierten Sonden eine direkt mit dem Cy3-gekoppelte Fluorophor-Sonde **CyS** und eine mit einem Cyclooctin-modifizierte Sonde **COS** dargestellt werden.

Bei der Fluorophor-markierten Sonde wird eine deutliche Reduktion der Bindungsaffinität  $K_i$  und kovalenten Bindungsknüpfung  $k_{\text{inact}}$  zu Akt erwartet, da der Fluorophor im Vergleich zu dem kleinen Alkin-Reporter sterisch anspruchsvoller ist und die Orientierung des Michael-Akzeptors stärker beeinflusst (Abb. 32A). Zur Einführung an die bereits etablierte Reporterposition eignen sich insbesondere zwei Cy3-Derivate (Abb. 32B). Zum einen das Cy3-Azid, welches bereits erfolgreich bei der *in situ* CuAAC eingesetzt werden konnte und direkt per CuAAC an die Alkine eingeführt werden könnte. Jedoch werden für die *in situ* CuAAC nur kleinste Mengen, im Nanogramm-Bereich, benötigt, wohingegen für die synthetische Darstellung deutlich größere Substanzmengen, im Milligramm-Bereich, erforderlich sind. Aus diesem Grund sollte das Cy3-Fluorophor mit einem alternativen Cy3-Derivat, dem Cy3-COOH, eingeführt werden. Dieses kann durch die freie Carbonsäure per Amid-Kupplung eingeführt werden und ist zusätzlich sulfoniert, was zu einer verbesserten Wasserlöslichkeit der Sonde beitragen soll.



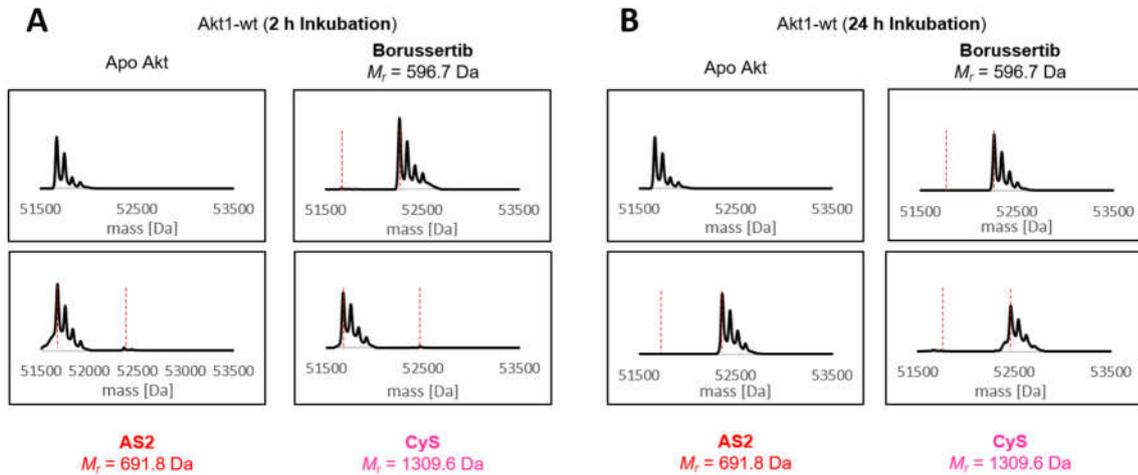
**Abbildung 32:** A) Darstellung der etablierten Alkin Sonden **AS1-2**. B) Zwei Cy3-Derivate, Cy3-Azid und Cy3-COOH, zur Einführung an das Borussertib Grundgerüst zur Darstellung einer Fluorophor-markierten Sonde.

Die Synthese der **CyS** erfolgt analog zu der etablierten Syntheseroute der Alkin-Sonden mit der Funktionalisierung des Borussertib-Grundgerüst **54** mit Fumarylchlorid **55** (Abb. 33). Da damit sowohl der Borussertib-Baustein **56** als auch das Cy3-COOH eine freie Carbonsäure tragen, sollte ein aliphatisches Diamin als Linker eingesetzt werden. Daher wurde das 1,3-Diaminopropan **57** per Amidkupplung an das funktionalisierte Borussertib eingeführt. Aufgrund der zwei freien Amin-Gruppen besteht die Möglichkeit der Bildung eines Dimers, daher wurde ein deutlicher Überschuss des Diamins eingesetzt, um dies zu vermeiden. Trotz des Einsatzes verschiedener Kupplungsreagenzien (HOBt, HATU, EDC, DCC) und anorganischer als auch organischer Basen ( $K_2CO_3$ ,  $CsCO_3$ , DIPEA,  $Et_3N$ ) konnte lediglich das Dimer als Produkt detektiert werden. Daher wurde das *N*-Boc-1,3-Diaminopropan **58** verwendet, bei dem eine der beiden Amingruppen geschützt ist. Hiermit konnte das Diamin erfolgreich eingeführt werden und musste im nächsten Schritt, bevor das Cy3-Fluorophor eingeführt werden konnte, im sauren Milieu entschützt werden. Die Amidkupplung zur finalen Fluorophor-Sonde **CyS** lieferte eine Ausbeute von nur 15 % bei vollständigem Reaktionsumsatz, da bei der Aufreinigung drei säulenchromatographische Auftrennungsschritte nötig waren, um das Produkt von überschüssigem Cy3-COOH und den Kupplungsreagenzien zu isolieren. Da diese Isolierung jedoch ausreichend **CyS** lieferte, wurde auf eine Optimierung der Reaktionsbedingungen (Reduktion des Cy3-COOHs Überschusses/ der Kupplungsreagenzien) und des Aufreinigungsprotokolls verzichtet.



**Abbildung 33:** Synthese einer Cy3-funktionalisierten Akt-Sonde CyS. (i) DIPEA, THF, 0 °C-RT, 16 h, 68 % Ausbeute. (ii) HATU, DIPEA, THF, RT, 16 h, 37 % Ausbeute. (iii) 4 M HCl in 1,4-Dioxan, quant. Ausbeute. (iv) HATU, DIPEA, THF, RT, 16 h, 15 % Ausbeute.

Nach der erfolgreichen synthetischen Darstellung der CyS erfolgte die biochemische und zelluläre Evaluierung per Massenspektrometrie, HTRF- und CTG-Assays (Abb. 34, Tab. 4). Zur Verifizierung der kovalenten Bindung an das Protein wurde die CyS mit einem 10-fachen Überschuss mit Akt1 koinkubiert. Wie schon bei den bereits etablierten AS1-2 konnte keine signifikante kovalente Bindungsbildung nach zwei Stunden, sondern erst nach weiteren 22 Stunden beobachtet werden.



**Abbildung 34:** Koinkubation von Akt1 mit einem 10-fachen Überschuss an Borussertib, AS2 und CyS bei 4 °C. **A)** Massenspektrometrische Analyse nach zwei Stunden von Apo-Akt, Borussertib als Positiv-Kontrolle, AS2 und CyS. Lediglich die Koinkubation mit Borussertib zeigt eine entsprechende Verschiebung der Masse, die mit einer Modifikation mittels Borussertib von Akt einhergeht. **B)** Massenspektrometrische Analyse nach 24 Stunden von Apo-Akt, Borussertib als Positiv-Kontrolle, AS2 und CyS. Für alle drei Substanzen kann eine Verschiebung der Masse beobachtet werden, die mit einer Modifikation mittels Borussertib, AS2 bzw. CyS von Akt einhergeht.

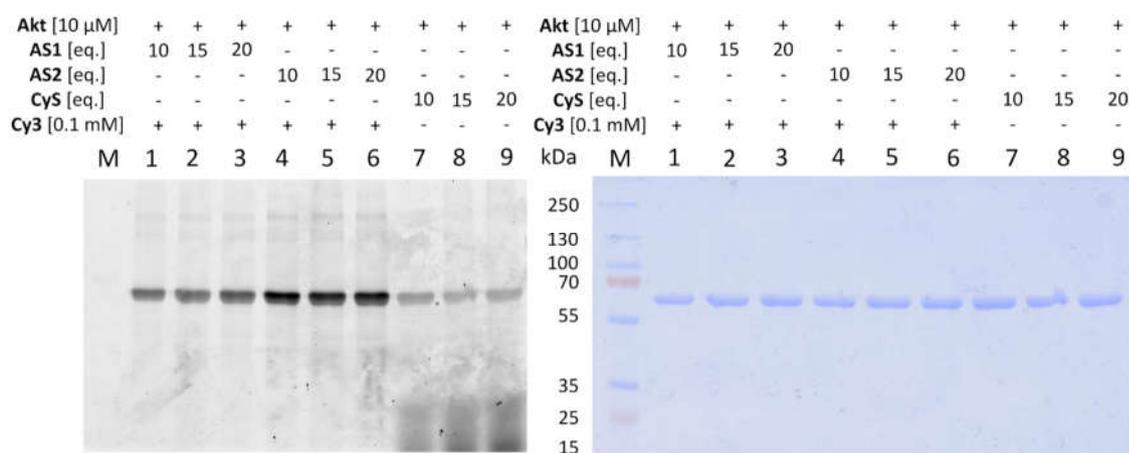
Diese langsamere kovalente Modifizierung korreliert mit den biochemischen Daten, da CyS im biochemischen HTRF Assay eine 20- bzw. 9-fach geringere Aktivität als Borussertib und die AS2 besitzt.<sup>6</sup> Dieser Aktivitätsverlust kann durch die große Reportergruppe und dem damit verbundenen erhöhtem sterischen Anspruch erklärt werden, wodurch zunächst die reversible Bindung und ebenfalls die anschließende kovalente Bindungsknüpfung verlangsamt wird. Zudem wurde die anti-proliferative Aktivität in verschiedenen Zellmodellen bestimmt, da diese auch ebenfalls einen ersten indirekten Anhaltspunkt über die Zellpermeabilität gibt. In AN3-CA, T-47D und ZR-75-1-Zellen können mit 2615, 1122 bzw. 605 nM nur schwache  $EC_{50}$ -Werte nachgewiesen werden, die um einen Faktor von 13-120 schwächer sind als für Borussertib.<sup>6</sup> Dies hängt vermutlich zum einen mit der generellen schwächeren inhibitorischen Aktivität zusammen, aber wahrscheinlich ebenfalls mit einer verminderten Zellpermeabilität, da die CyS unter anderem durch die Erhöhung des Molekulargewichts eine sehr hohe Lipophilie aufweist.

<sup>6</sup> Biochemische und zelluläre Assays durchgeführt von Dr. Ina Landel und Dr. Lena Quambusch

**Tabelle 4:** Biochemische und zelluläre Evaluierung der CyS. Biochemisch (HTRF) ist ein 20- bzw. 9-facher und zellulär (CTG) ein bis 120- bzw. 30-facher Aktivitätsverlust im Vergleich zu Borussertib bzw. der AS2 detektierbar.<sup>6</sup>

	CyS	Borussertib	AS2
IC <sub>50</sub> / nM wtAkt1	17,4 ± 4,0	0,8 ± 0,3	1,9 ± 0,4
EC <sub>50</sub> / nM AN3-CA	2615 ± 91	191 ± 90	760 ± 429
EC <sub>50</sub> / nM T-47D	1122 ± 92	48 ± 15	194 ± 67
EC <sub>50</sub> / nM ZR-75-1	605 ± 146	5 ± 1	19 ± 4

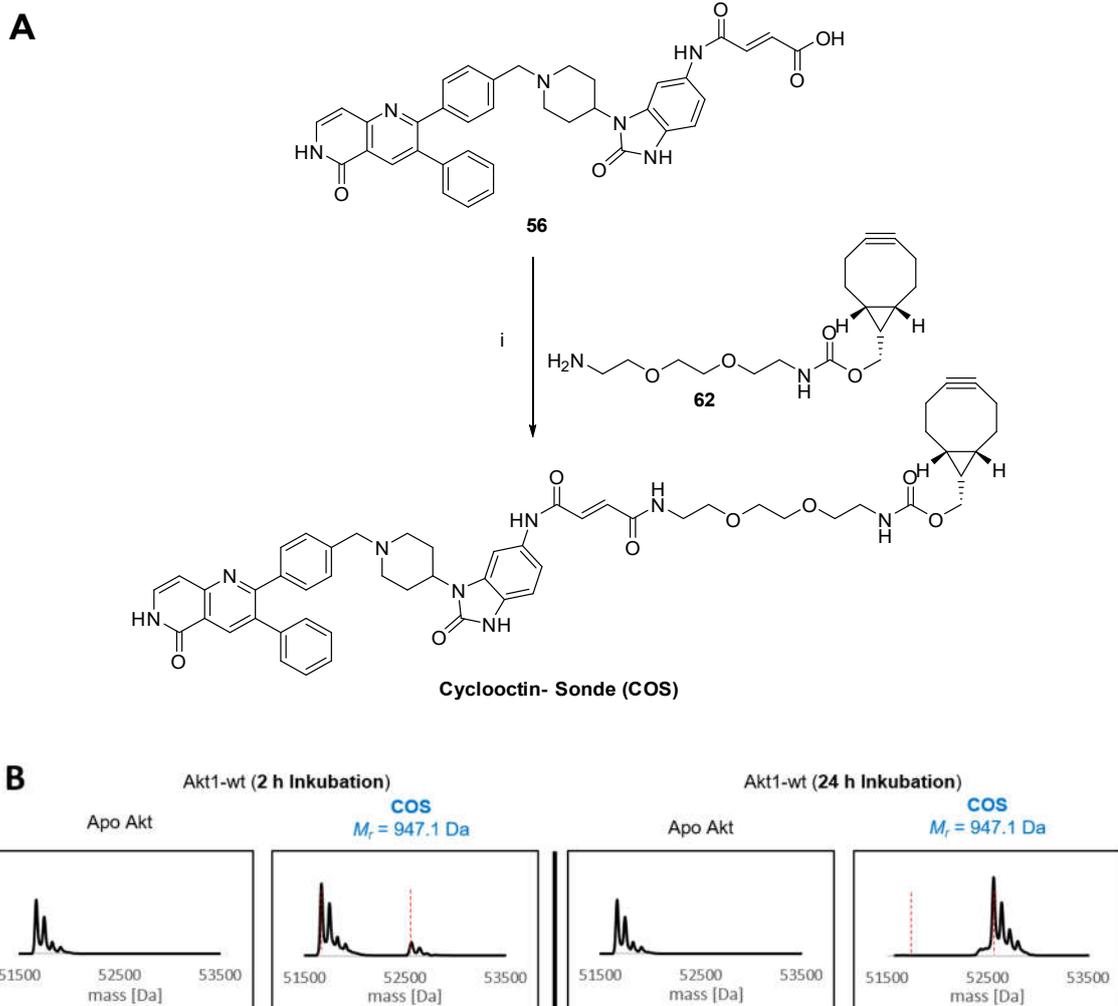
Der letzte Schritt der Etablierung der Cy3-Sonde erfolgte per *In Gel*-Fluoreszenz, indem Akt mit der CyS für 24 Stunden kokubiert und anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen wurde (Abb. 35). Hierbei wurden drei verschiedene Konzentration (100, 150, 200 µM) der Sonde getestet, um zu analysieren, wie viel Überschuss an Sonde nötig ist, um ein möglichst starkes Fluoreszenzsignal zu erhalten. Als Vergleich wurden ebenfalls die beiden AS1-2 aufgetragen, bei denen zusätzlich die *in situ* Click-Reaktion mit Cy3-Azid durchgeführt werden musste. Für alle drei Sonden konnte ein signifikantes Fluoreszenzsignal bei allen drei Konzentrationen detektiert werden. Die Fluoreszenzintensität war für jede Sonde innerhalb des Konzentrationsbereich nahezu identisch (Differenz von ± 10 %), sodass ein 10-facher Überschuss ausreichend ist, um ein stabiles Signal zu erhalten. Die CyS zeigte jedoch im Vergleich zu der Alkin-Sonden AS2 ein deutlich schwächeres Signal mit einer Abnahme der Bandenintensität von 73 ± 4 %. Da die massenspektrometrische Analyse zeigen konnte, dass nach 24 Stunden eine vollständige Besetzung von Akt mittels der CyS erzielt werden kann, wurde ein ebenso starkes Signal wie für die Alkin-Sonden erwartet. Eine mögliche Erklärung für die verringerte Fluoreszenz könnte sein, dass die irreversible Bindung der CyS nicht so stabil ist, wie die der Alkin-Sonden, wodurch im denaturierenden Gel, die kovalente Bindung zu Akt stellenweise verloren geht. Damit einhergehend ist bei den drei Proben mit der CyS auf jeder Bahn im unteren Bereich ein Fluoreszenzsignal sichtbar, welches durch die freie CyS ausgelöst werden könnte. Anhand dieses Gels zeigt sich, dass die Nutzung der Alkin-Sonden für fluorophorbasierte Anwendungen vorteilhaft ist, da diese ein signifikant stärkeres Fluoreszenzsignal erzeugen.



**Abbildung 35:** SDS-Gel zur Etablierung der CyS per *In Gel*-Fluoreszenz im Vergleich zu den beiden AS1-2. Akt [10  $\mu$ M] wurde für 24 Stunden mit den AS1-2 und der CyS [100, 150, 200  $\mu$ M] bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die *in situ* Click-Reaktion für AS1-2 für weitere 24 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die neun Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufs Gel aufgetragen. Die Fluoreszenz wurde (links) ausgelesen gefolgt von der Coomassie-Färbung (rechts) des Gels. Für alle drei Sonden kann ein signifikantes Fluoreszenzsignal erhalten werden, welches unabhängig von der verwendeten Konzentration der Sonde ist. Für die CyS wird das schwächste Fluoreszenzsignal detektiert. Das Coomassie-Gel dient zur Kontrolle der aufgetragenen Akt Menge.

### 3.4.2 Etablierung einer Cyclooctin-Sonde und der *in situ* SPAAC

Neben der bereits etablierten CuAAC gibt es verschiedene weitere bioorthogonale Reaktionen, wie zum Beispiel die inverse Diels-Alder, Staudinger-Reduktion und die SPAAC.<sup>[128]</sup> Der Mechanismus der SPAAC ist vergleichbar mit der CuAAC, allerdings mit dem Unterschied, dass kein Metall-Katalysator benötigt wird. Durch die Verwendung eines Cyclooctin-Rings und die damit verbundene Ringspannung durch einen Bindungswinkel von 163 ° ist ausreichend Energie für eine metallfreie Azid-Alkin-Cycloaddition vorhanden. Die Synthese einer Cyclooctin-Sonde konnte ausgehend von dem Fumarylchlorid-funktionalisiertem Borussertib-Grundgerüst **56** und einem Cyclooctin-Derivat **62** mit einem PEG2-Linker und einem freien Amin in einem Schritt durchgeführt werden (Abb. 36A). Die Amidkupplung lieferte die finale Cyclooctin-Sonde **COS** mit einer moderaten Ausbeute von 30 %. Nach der erfolgreichen Darstellung der neuen Sonde erfolgte die Verifizierung der kovalenten Bindung an das Protein per massenspektrometrischer Analyse (Abb. 36B). Wie schon für die zuvor etablierten Sonden kann nach zwei Stunden nur eine minimale Modifizierung von Akt dargestellt werden. Nach 24 Stunden ist eine vollständige Modifikation detektierbar, sodass die kovalente Bindung auch für die **COS** nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 36:** Darstellung der COS per Amidkupplung, sowie massenspektrometrischer Analyse. **A)** (i) HATU, EDC, THF, RT, 16 h, 30 % Ausbeute. **B)** Koinkubation von Akt mit der COS und massenspektrometrische Analyse nach zwei und 24 Stunden. Nach zwei Stunden ist nur eine minimale Massenverschiebung, die der Modifikation mit der Sonde entspricht, detektierbar. Nach 24 Stunden kann eine vollständige Modifikation von Akt anhand der Massenverschiebung detektiert werden.

Ebenso erfolgte noch die biochemische und zelluläre Evaluierung (Tab. 6). Im biochemischen HTRF Assay kann eine inhibitorische Aktivität von  $4,9 \pm 0,9$  nM nachgewiesen werden, die somit 6-fach im Vergleich zu Borussertib verringert ist. Diese Aktivität liegt im Bereich der **AS1-2**. Für die T-47D und ZR-75-1 wird ein minimal größerer Aktivitätsverlust als bei den **AS1-2** beobachtet, der im Bereich der **CyS** liegt. Bei der AN3-CA Zelllinie wird lediglich eine Aktivität von  $6,8 \pm 0,5$   $\mu$ M detektiert. Diese größeren Aktivitätsverluste der **COS** können auf eine deutlich schlechtere Zellpermeabilität zurückgeführt werden, da durch den PEG-Linker und den Cyclooctin-Ring die Lipophilie stark erhöht wird.

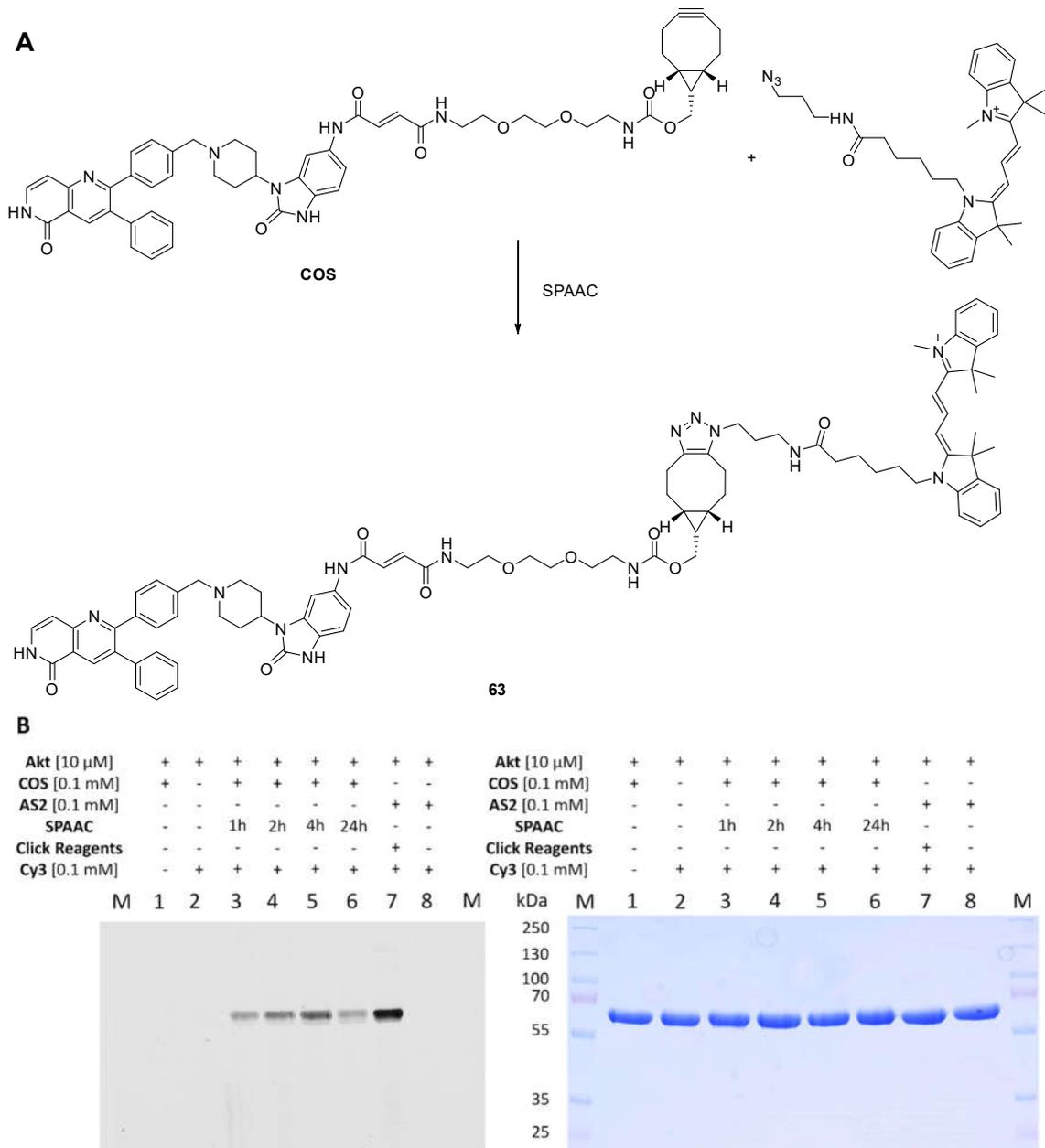
**Tabelle 5:** Biochemische (HTRF) und zelluläre (CTG) Evaluierung der Cyclooctin-Sonde (COS).<sup>6</sup>

	IC <sub>50</sub> / nM	EC <sub>50</sub> / nM	EC <sub>50</sub> / nM	EC <sub>50</sub> / nM
	wtAkt1	AN3-CA	T-47D	ZR-75-1
COS	4,9 ± 0,9	6774 ± 565	1054 ± 863	85 ± 5

Für die Etablierung der COS wurde die Sonde zunächst auf Grundlage der massenspektrometrischen Analyse für 24 Stunden im 10-fachen Überschuss mit Akt inkubiert, um eine vollständige Modifikation von Akt zu erzielen. Erst anschließend wurde das Cy3-Azid hinzugegeben, damit die SPAAC erst am Protein und nicht schon an der freien COS erfolgt (Abb. 37A). Hierdurch würde die Bindung zum Protein deutlich verschlechtert werden. Da die SPAAC langsamer als die CuAAC verläuft, wurden Proben nach einer, zwei, vier und 24 Stunden (Bahn 3-6) auf ein Gel aufgetragen (Abb. 37B). Als Positiv-Kontrolle wurde eine Alkin-Sonde mit den etablierten *in situ* CuAAC-Bedingungen aufgetragen (Bahn 7) sowie die AS2 lediglich mit dem Cy3-Azid ohne Click-Reagenzien wie bei den SPAAC-Bedingungen. Bereits nach einer Stunde (Bahn 3) kann schon ein schwaches Fluoreszenzsignal (86 % schwächer als das Fluoreszenzsignal der AS2 Probe) detektiert werden. Dieses nimmt über zwei Stunden (72 % schwächer) bis hin zu vier Stunden (55 % schwächer) weiter zu. Nach 24 Stunden (Bahn 6) ist das Signal nur noch vergleichbar zu dem Signal nach einer Stunde. Dies könnte durch eine gewisse Proteininstabilität sowie des Cy3-Azids im wässrigen Medium ausgelöst werden, da die Probe nach 24 Stunden insgesamt durch die Sonden-Inkubation für 48 Stunden bei 4 °C aufbewahrt wurde. Auf Bahn 7 ist die stärkste Fluoreszenzsignalbande des Gels für die klassische CuAAC als Positiv-Kontrolle zu sehen. Als Negativ-Kontrolle auf Bahn 8 ist kein Fluoreszenzsignal sichtbar, sodass hiermit gezeigt werden kann, dass die Azid-Alkin-Cycloaddition nicht mit dem hier verwendeten Alkin, sondern lediglich mit einem Cyclooctin möglich ist. Das Signal nach vier Stunden ist zwar im Vergleich zu der CuAAC nicht ganz so stark, aber trotzdem signifikant. Dies zeigt, dass der Umsatz der SPAAC geringer ist wie der der CuAAC. Eine Erhöhung dieses Fluoreszenzsignals wäre möglicherweise durch einen höheren Überschuss des Cy3-Azids möglich oder eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von 4 °C auf Raumtemperatur, wobei hierbei möglicherweise die Stabilität des Proteins limitierend ist.

<sup>6</sup> Biochemische und zelluläre Assays durchgeführt von Dr. Ina Landel und Dr. Lena Quambusch

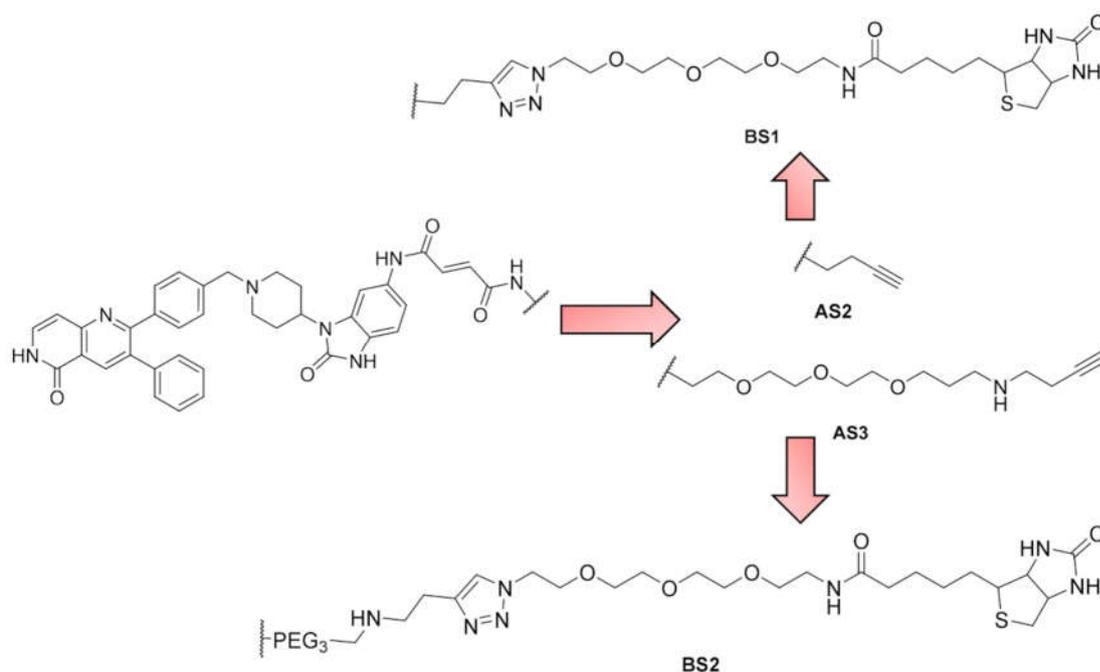
Ein weiterer Optimierungsansatz wäre eine Verlängerung des Linkers, durch den die Cyclooctin-Einheit weiter aus der Bindungstasche heraussticht und hierdurch eine bessere Zugänglichkeit und schnellere Addition für das Cy3-Azid gegeben ist.



**Abbildung 37:** SDS-Gel zur Etablierung der **COS** und der *in situ* SPAAC per *In Gel*-Fluoreszenz im Vergleich zu **AS2**. Akt [10  $\mu$ M] wurde für 24 Stunden mit der **COS** [0.1 mM] bei 4 °C inkubiert und anschließend die SPAAC für weitere ein, zwei, vier und 24 Stunden (Bahn 3-6) durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurde mit **AS2** die etablierte CuAAC (Bahn 7) durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle wurde die **AS2** lediglich mit Cy3-Azid ohne die *Click*-Reagenzien inkubiert (Bahn 8). Anschließend wurden die acht Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufs Gel aufgetragen. Die Fluoreszenz wurde (links) ausgelesen, gefolgt von der Coomassie-Färbung (rechts) des Gels. Für alle vier Zeitpunkte bei der SPAAC kann ein signifikantes Fluoreszenzsignal erhalten werden, wobei nach vier Stunden das stärkste Signal detektiert wird. Dieses Signal ist jedoch etwas schwächer als das Fluoreszenzsignal der CuAAC.

### 3.4.3 Synthese und Etablierung von Biotin-Sonden

Neben der Fluorophor-basierten Sonden sollten ebenfalls Affinitäts-basierte Sonden ausgehend von Borussertib etabliert werden. Auf Grundlage der bisherigen Vorarbeiten sollten Biotin-basierte Sonden im Rahmen einer Masterarbeit dargestellt werden.<sup>§</sup> Durch ein computerbasiertes Docking konnte festgestellt werden, dass die bereits etablierten Alkin-Sonden dazu führen könnten, dass Biotin, welches direkt ohne Linker eingeführt wird, zu einem sterischen Konflikt zwischen Akt und Avidin führen könnte. Aus diesem Grund wurde noch eine zusätzliche Alkin-Sonde **AS3** mit einem PEG3-Linker dargestellt (Abb. 38). Ebenso wurde das Biotin mit einem PEG3-Linker an eine der beiden bereits etablierten Alkin-Sonden **BS1** sowie der neuen Alkin-Sonde **BS2** per *Click-Chemie* eingeführt.

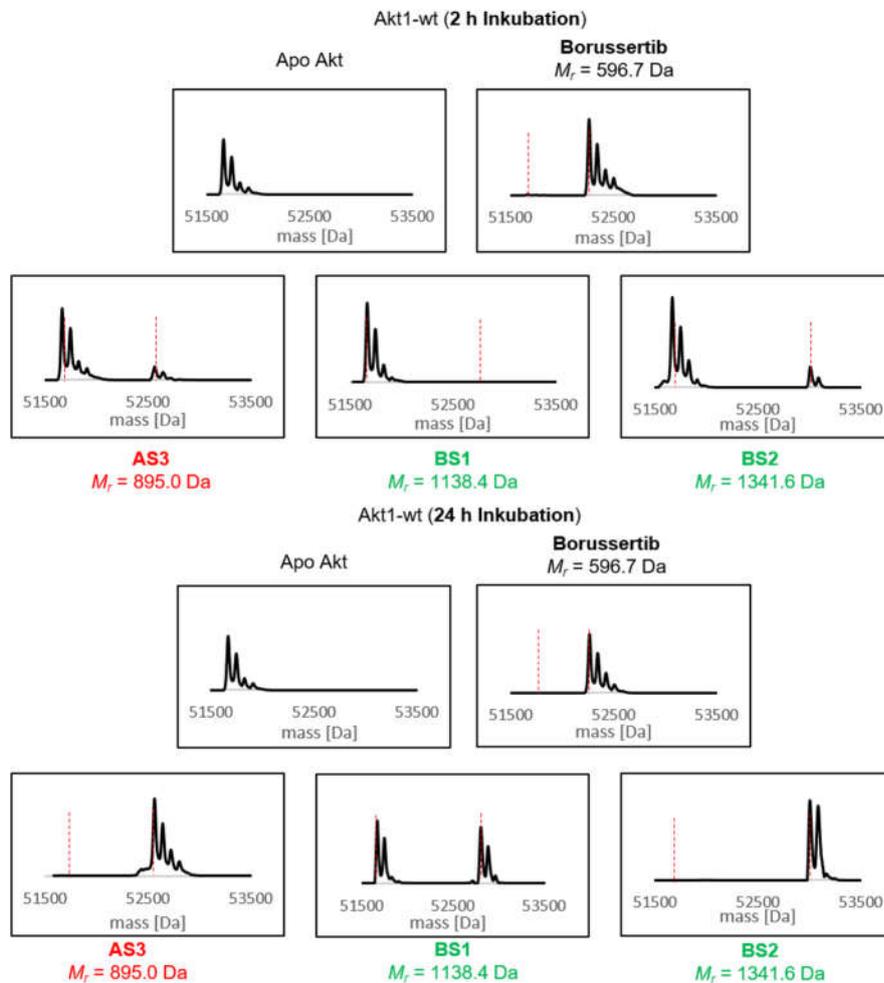


**Abbildung 38:** Darstellung der Biotin-Sonden **BS1/2** sowie deren **AS2/3**-Vorläufern und dem Borussertib-Grundgerüst.<sup>§</sup>

Im ersten Schritt erfolgte wiederum die biochemische, zelluläre und massenspektrometrische Evaluierung (Abb. 39).

<sup>§</sup> Synthese und erste Etablierung der Biotin-Sonden durchgeführt im Rahmen der Masterarbeit von M. Sc. Mirko Schmidt

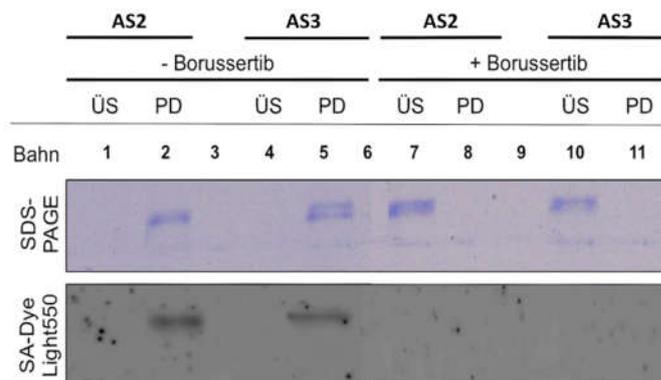
Diese bestätigten eine kovalente Modifizierung von Akt, wobei **BS1** nach 24 Stunden lediglich zu einer unvollständigen Modifikation von Akt führte, wohingegen **BS2** eine vollständige Modifikation zeigte.



**Abbildung 39:** Koinkubation von Akt mit **AS3** sowie den Biotin-Sonden **BS1/2** und massenspektrometrische Analyse nach zwei und 24 Stunden. Nach zwei Stunden ist nur eine minimale Massenverschiebung für **AS3** und **BS2** detektierbar. Nach 24 Stunden kann eine vollständige Modifikation von Akt für **AS3** und **BS2** anhand der Massenverschiebung detektiert werden, wohingegen bei **BS1** nur eine unvollständige Modifikation erfolgt.

Damit sind grundlegend alle dargestellten Alkin- und Biotin-Sondenmoleküle für nachfolgende *Pulldown*-Experimente geeignet, wobei für die Biotin-Sonde **BS1** mit verkürztem Linker kein vollständiger Pulldown zu erwarten ist.

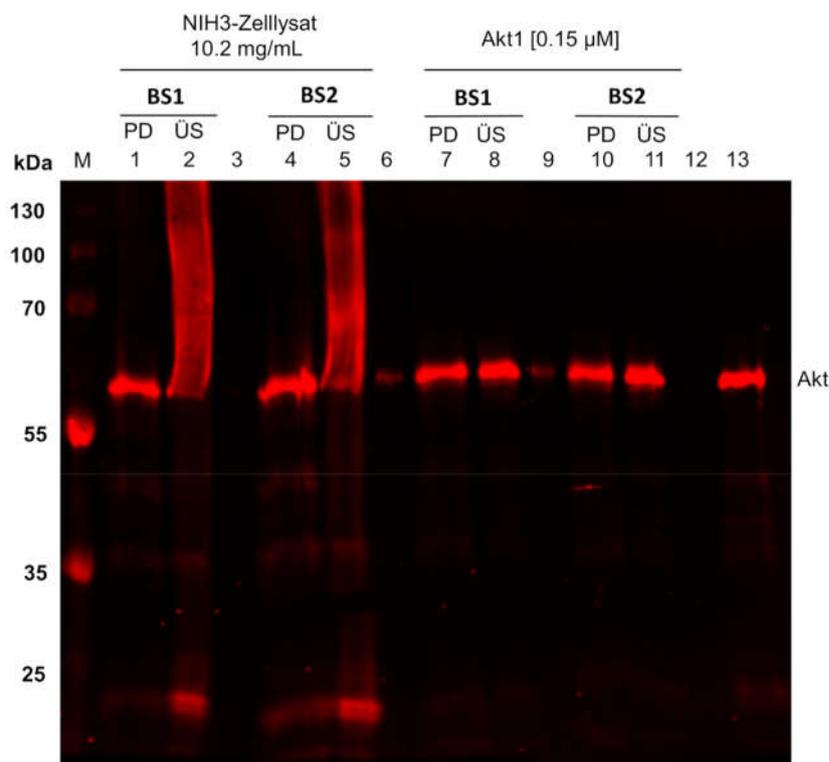
Zunächst konnte der erfolgreiche *in situ-Pulldown* mit **AS2** und **AS3** für aufgereinigtes, isoliertes Akt etabliert werden (Abb. 40).<sup>5</sup> Dabei konnte eine vollständige Anreicherung von Akt in der Pulldownfraktion (PD) per magnetischer Streptavidin-(SA)-Beads gegenüber dem Überstand (ÜS) erzielt werden. Als Kontrolle für eine spezifische Bindung der Sonden in der allosterischen Bindetasche erfolgte ebenso ein Konkurrenzexperiment mit Borussertib, das zunächst mit Akt vorinkubiert wurde. Hierbei war keinerlei Modifikation von Akt mittels der Sonden zu detektieren, sodass der allosterische Bindemodus verifiziert werden konnte.



**Abbildung 40:** Akt-Pulldown mit **AS2** und **AS3**. Oberes Gelbild: SDS-Gel mit Coomassie-Anfärbung; Unteres Gelbild: Visualisierung über SA-DyeLight550-Konjugat. Bei den Proben ohne Borussertib-Vorinkubation (Bahn 1, 2, 4, 5) zeigt sich ein vollständiger Übertrag von Akt [10 µM] aus dem Überstand (ÜS) in die Pulldownfraktion (PD) mit **AS2-3** [0.1 mM]. Bei den Proben mit Borussertib-Vorinkubation (Bahn 7, 8, 10, 11) kann nur Akt im Coomassie-Gel im Überstand detektiert werden, sodass dies keinerlei Modifikation von Akt mit den Sonden verifiziert, da die allosterische Bindetasche mittels Borussertib blockiert ist.<sup>5</sup>

Im nächsten Schritt sollte der Pulldown auf komplexere Systeme wie Zelllysate ausgedehnt werden (Abb. 41).<sup>5</sup> Da in Vorarbeiten zu dieser Translation gezeigt werden konnte, dass ein Pulldown mit den Alkin-Sonden aufgrund der Zytotoxizität des Kupfers problematisch ist, wurde lediglich die Etablierung mit den Biotin-Sonden **BS1-2** durchgeführt. Zur Kontrolle wurden neben den Proben mit Zelllysate (Bahn 1, 2, 4, 5) noch weitere Proben mit den **BS1-2**, inkubiert mit aufgereinigtem Akt (Bahn 7, 8, 10, 11), aufgetragen. Die Visualisierung der Akt-Bande erfolgte mittels eines primären Antikörpers (anti-tAkt, Maus) und eines sekundären fluoreszenten Antikörpers (anti-Maus, DyeLight680, Ziege). Als Kontrolle wurde auf Bahn 13 aufgereinigtes Protein

ohne jegliche Inkubation aufgetragen. Bei den Proben im Zelllysatsatz kann für beide Biotin-Sonden ein signifikanter Akt-Pulldown festgestellt werden, da auf Höhe der erwarteten Akt-Bande ein deutliches Fluoreszenzsignal in den PD-Fractionen detektiert werden konnte. Hingegen ist in den ÜS-Fractionen nur noch ein schwächeres Signal zu vorhanden. Für die Proben mit dem aufgereinigtem Protein kann hingegen nur ein unvollständiger Pulldown erzielt werden, da die korrespondierenden Akt-Banden in der PD- und ÜS-Fraktion nahezu identisch sind. Dies kann entweder durch einen Anteil des Proteins verursacht worden sein, der nicht mit den Sonden modifiziert wurde oder der nicht an die *SA-Beads* binden konnte, da deren Bindekapazität überschritten wurde. Zudem zeigte sich im vorangegangenen massenspektrometischen Experiment, dass **BS1** nur zu einer unvollständigen Modifizierung von Akt führt. Nichtsdestotrotz konnte ein erster erfolgreicher Pulldown von Akt aus einem NIH3-Zelllysatsatz erzielt werden, was das Potential der Biotin-Sonden für weiterführende Affinitäts-basierte Experimente zeigt.



**Abbildung 41:** Akt-Pulldown aus NIH/3T3-Zelllysatsatz. Auf Bahn 1, 2, 4 und 5 wurden die Proben mit Biotin-Sonde **BS1-2**, inkubiert mit Zelllysatsatz, aufgetragen. Zur Kontrolle wurden ebenso Proben der Biotin-Sonden, inkubiert mit dem aufgereinigtem Protein, auf Bahn 7, 8, 10 und 11 aufgetragen. Die Visualisierung der Akt-Bande erfolgte mittels eines primären Antikörpers (anti-tAkt, Maus) und eines sekundären fluoreszenten Antikörpers (anti-Maus, DyeLight680, Ziege). Als Kontrolle wurde auf Bahn 13 aufgereinigtes Protein ohne jegliche Inkubation aufgetragen. Für beide Biotin-Sonden konnte ein erfolgreicher Akt-Pulldown im Zelllysatsatz und teilweise für die Proben mit aufgereinigtem Protein erzielt werden.<sup>5</sup>

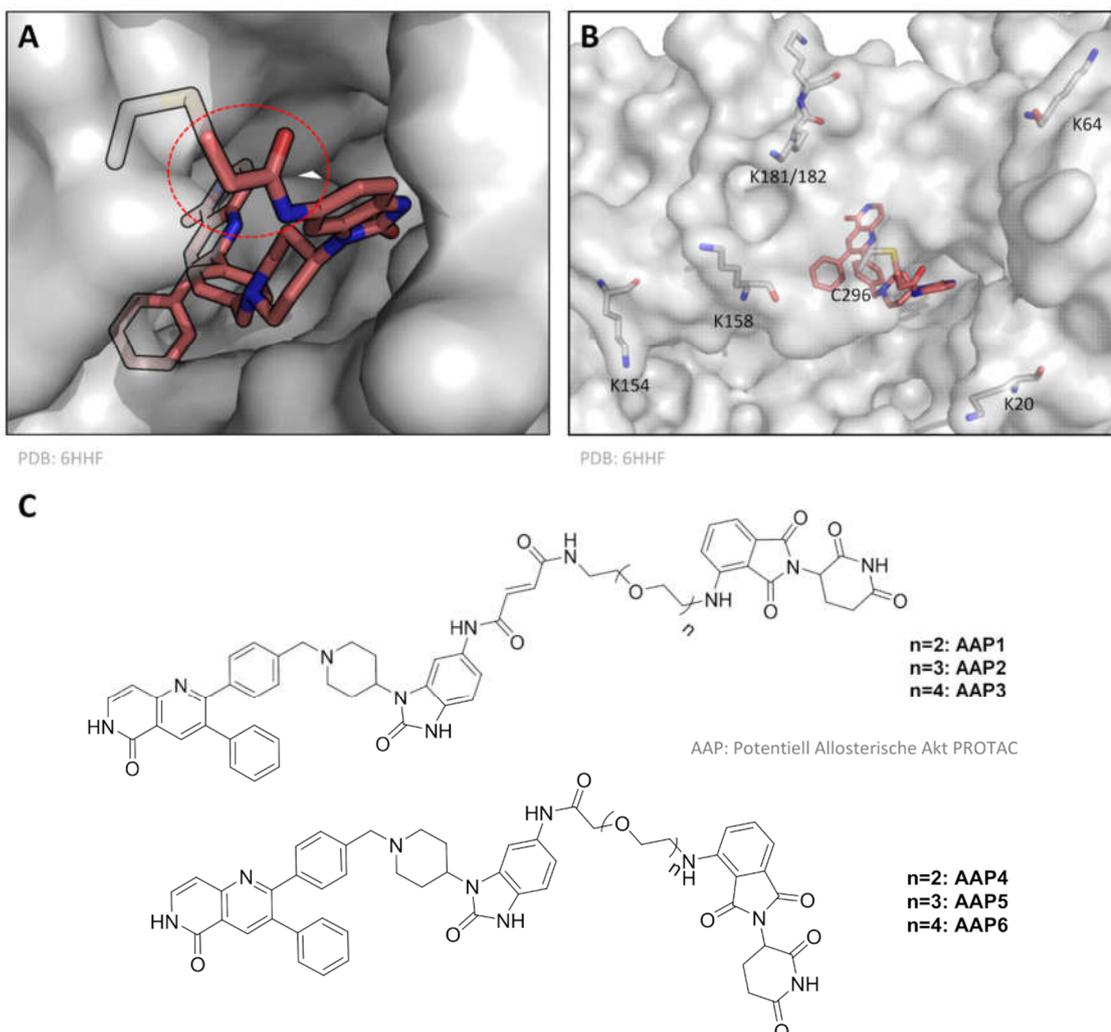
### 3.5 SAR-Untersuchung von Akt-PROTACs

Wie bereits in Kapitel 1.4.1 beschreiben, ist die Adressierung von Proteinen mit PROTACs ein neuer innovativer Ansatz, der eine gute Ergänzung zu der konventionellen Adressierung von Kinasen darstellt. Dies gilt insbesondere für Akt aufgrund seiner Kinase-unabhängigen Aktivität, da diese nicht mit den klassischen Kinaseinhibitoren ausreichend unterdrückt werden kann.<sup>[43]</sup> Der vielversprechendste bisher etablierte Akt-PROTAC ist INY-03-141, der mit Ipatasertib auf einen ATP-kompetitiven Inhibitor basiert.<sup>[120b]</sup> INY-03-141 zeigt zwar eine hochpotente Degradierung von Akt, aber dieser Ligand konkurriert durch seinen Bindemodus mit ATP und zudem ist die Selektivität aufgrund der hochkonservierten ATP-Bindetasche limitiert. Aus diesem Grund sollten weitere PROTACs etabliert werden, die auf einen anderen Bindungsmodus basieren, wie er zum Beispiel von den CAAs dargestellt wird. Auf Grundlage dieser ist es möglich sowohl kovalente als auch nicht-kovalente allosterische PROTACs zu synthetisieren. Diese würden zunächst die Kinase-inaktive PH-*in* Konformation stabilisieren, die anschließend abgebaut werden würde. Somit wäre mit den Akt-PROTACs auch die Inhibierung von den bisher weitgehend unbekanntem PPI möglich. Durch die Verwendung von bereits etablierten Akt-Isoform-selektiven Inhibitoren und der PROTAC-Technologie könnte zudem in weiterführenden *Knock-Out* Experimenten eine detaillierte Analyse der biologischen Funktion der einzelnen Isoformen erreicht werden.<sup>[33b]</sup> So gibt es bereits erste Beispiele für die gezielte Adressierung von einzelnen Isoformen für andere Kinasen, wie der *serum and glucocorticoid-induced protein kinases 3* (SGK3).<sup>[116b]</sup>

#### 3.5.1 Design und Synthese von Akt PROTACs

Aus den zuvor genannten Gründen ist Borussertib der Ausgangspunkt für das Design von neuen kovalenten allosterischen PROTAC-Modulatoren. Anhand der Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit Borussertib (PDB: 6HHF) konnte die  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Carbonylgruppe, der Michael-Akzeptor, als geeigneter Ankerpunkt für die Einführung des E3-Liganden bestimmt werden (Abb. 42A). Diese Position ist aus zwei Gründen geeignet: Zum einen ist der Michael-Akzeptor mit seiner kovalenten Bindung an das Cystein lösungsmittel-exponiert, sodass ein E3-Ligand an dieser Position eingeführt werden kann. Dies konnte bereits erfolgreich für die aktivitätsbasierten Sonden mit Biotin oder verschiedenen Fluorophoren in Kapitel 3.4 gezeigt werden.

Zum anderen befinden sich sechs oberflächenzugängliche Lysine (K20, K64, K154, K158, K181, K182) in unmittelbarer Nähe der Bindungstasche, die durch Verwendung von PROTACs mit variierender Linkerlänge ubiquitiniert werden könnten (Abb. 42B). Das CRBN wurde als E3-Ligase-Ziel gewählt, da es bereits durch den publizierten PROTAC INY-03-141 zu einer hohen Degradierungsrate von Akt führte. Der so ausgewählte CRBN-Ligand Lenalidomid soll mit unterschiedlichen PEG-Einheiten ( $n=2-4$ ) an das Borussertib-Kerngerüst gebunden werden, da die Linkerlänge entscheidend für die Orientierung des PROTACs und zum Aufbau des ternären Komplexes ist. Aus diesem Grund sollten je drei Moleküle mit  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten und  $\alpha$ ,  $\beta$ -gesättigten Carbonylgruppen auf Basis von Borussertib dargestellt werden, die im Folgenden als potentielle allosterische Akt PROTACs 1-6 (AAP1-6) bezeichnet werden (Abb. 42C).

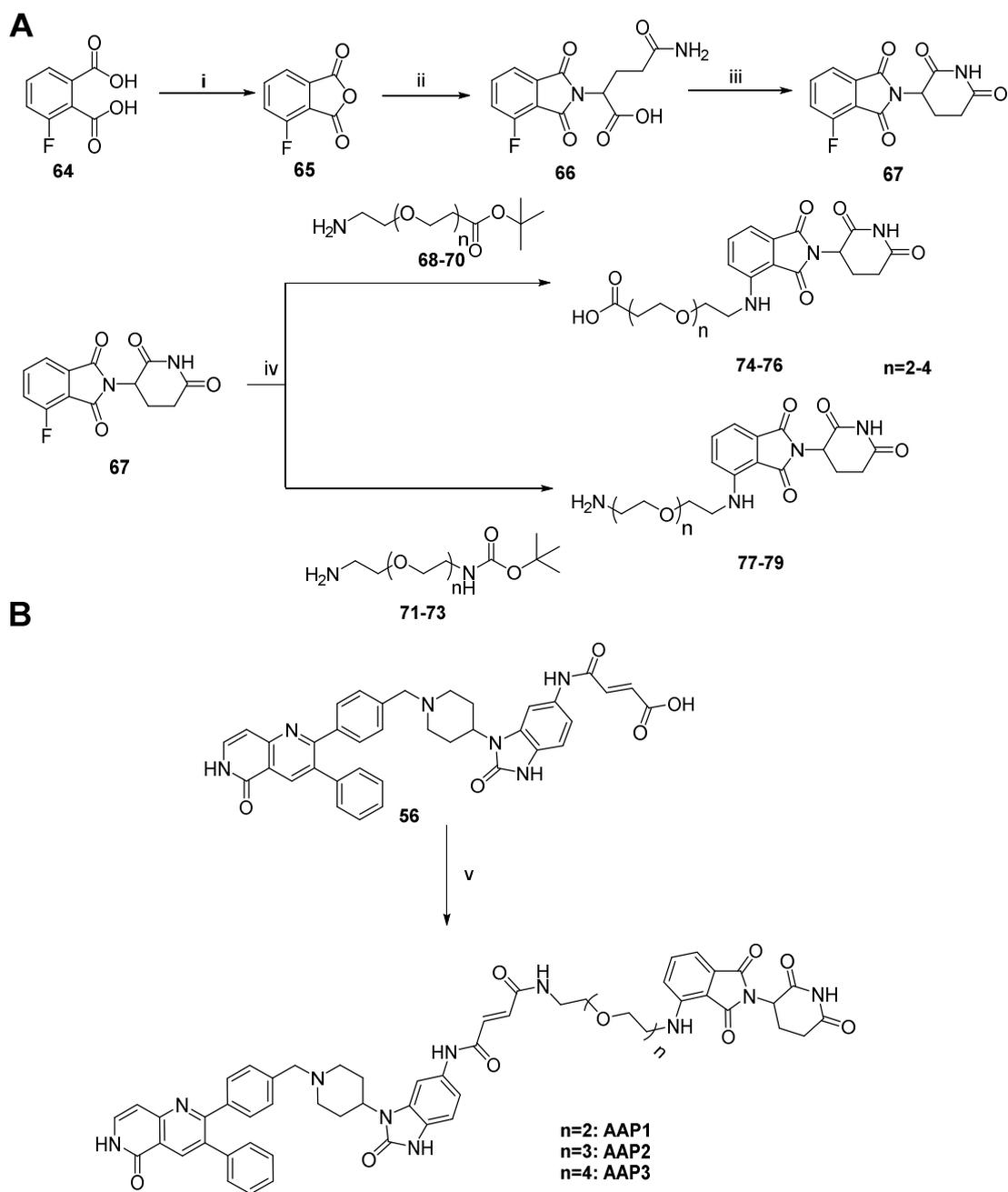


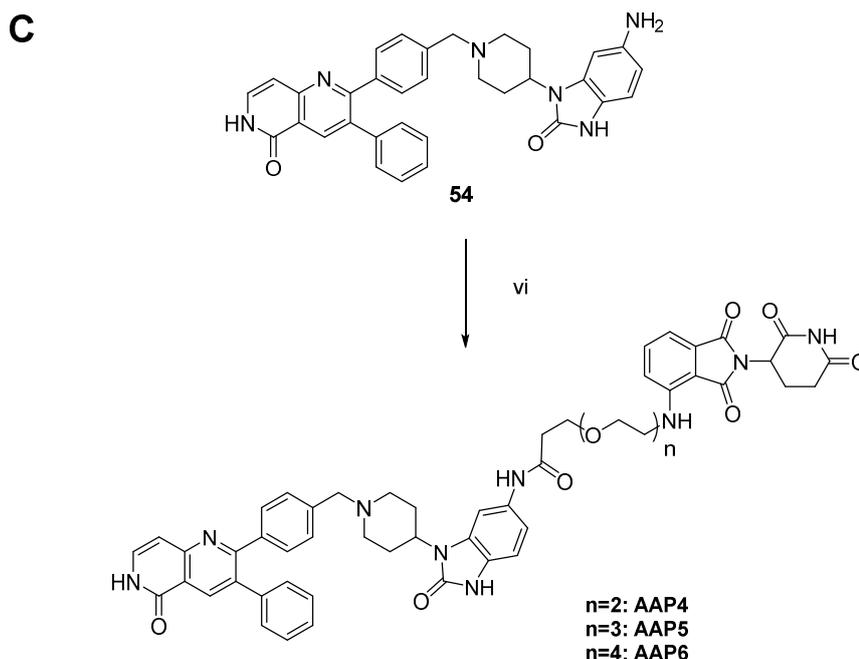
**Abbildung 42:** Design von allosterischen Akt-PROTACs (AAP). **A)** Röntgenkristallstruktur von Akt1 im Komplex mit Borussertib (PDB: 6 HHF).

Hervorhebung des lösungsmittel-exponierten Michael-Akzeptors für die Einführung des E3-Liganden. **B)** Röntgenkristallstruktur von Akt1 im Komplex mit Borussertib (PDB: 6 HHF) mit Hervorhebung der Oberflächenlysine (K20, K64, K154, K158, K181, K182), die in der Nähe der Bindungstasche und des Ankerpunkts des E3-Liganden zugänglich sind. **C)** Chemische Struktur des **AAP1-6** mit und ohne  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Carbonylgruppe (n=2-4 PEG-Einheiten).

Die Synthese der neu synthetisierten potentiellen PROTACs erfolgte analog zur Borussertib-Synthese. Für die Modulatoren ohne Michael-Akzeptor **AAP4-6** erfolgte die Synthese bis hin zum Borussertib-Grundgerüst **54**. Für die Modulatoren mit Michael-Akzeptor wurde hingegen noch im letzten Syntheseschritt die bereits etablierte Funktionalisierung mit Fumarylchlorid **55** durchgeführt. Zugleich erfolgte die Synthese von 2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-4-fluorisoindolin-1,3-dion, Lenalidomid **67**, ausgehend von 3-Fluorphthalsäure **64** (Abb. 43A).<sup>[114d]</sup> Mittels Essigsäureanhydrid wurde hiervon ausgehend das 3-Fluorophthalanhydrid **65** gebildet, das per Rekristallisation ohne Aufarbeitung erhalten werden konnte. Anschließend erfolgte die Umsetzung des Anhydrids unter sauren Bedingungen mit L-Glutamin, bis das Produkt **66** als weißer kristalliner Niederschlag ausfiel, der mittels Filtration erhalten werden konnte. Dieser wurde anschließend mit den Kupplungsreagenzien CDI und DMAP umgesetzt, sodass das gewünschte Lenalidomid-Grundgerüst **67** dargestellt und per säulenchromatographischer Auftrennung als gelblicher Feststoff erhalten werden konnte. Die Ausbeute mit 20 % über drei Reaktionsschritte ist moderat und könnte durch eine Aufreinigung der vorherigen beiden Syntheseschritte erhöht werden. Da jedoch durch die Einsparung der Aufreinigung die Synthese sehr zeitsparend ist, wurde auf eben diese Aufreinigung verzichtet, insbesondere da bei der Synthese selbst im Multigramm-Maßstab keine weiteren Einbußen in der Ausbeute auftraten. Anschließend wurden sechs verschiedene Linker **68-73** mit zwei bis vier PEG-Einheiten über ein freies Amin mittels nukleophiler Substitution eingeführt. Die zweite funktionelle Gruppe des Linkers war im Falle der Carbonsäure mit einer *tert*-Butyl-Gruppe maskiert und im anderen Fall desamins mit einer Boc-Gruppe geschützt. Anschließend erfolgte die Entschützung, zur freien Carbonsäure **74-76** oder zum freien Amin **77-79**, sodass das Lenalidomid an das Borussertib-Grundgerüst eingeführt werden kann. Der letzte Schritt lieferte **AAP1-3** durch eine Amidkupplung von **56** und **77-79** (Abb. 43B). Die  $\alpha$ ,  $\beta$ -gesättigten Gegenstücke wurden über **54** und den Carbonsäure-modifizierten Lenalidomid **74-76** gekoppelt. Aufgrund des elektronenarmen Amins von **54** konnte mit konventionellen Amid-Kupplungen keine erfolgreiche Reaktion erzielt werden. Mit Hilfe des Einsatzes

von BTFFH erfolgte eine *in situ*-Bildung zum Acylfluorid, wodurch die Aktivität ausreichend gesteigert wird, sodass eine erfolgreiche Kupplung zwischen der Carbonsäure und dem anilinischem Amin ermöglicht wird. Hiermit war es möglich die  $\alpha$ ,  $\beta$ -gesättigten AAP4-6 zu erhalten (Abb. 43C).





**Abbildung 43:** Synthese der AAP1-6. **A)** Synthese der Lenalidomidderivate. (i)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Reflux, 2h. (ii) L-Glutamin, DMF, 4 M HCl/1,4-Dioxan, 90 °C, 8 h. (iii) CDI, DMAP, ACN, Reflux, 5 h, 20 % Ausbeute über 3 Schritte. (iv) **9-14**, DIPEA, DMF, 90 °C, 16 h, 2) 4 M HCl/1,4-Dioxan, 2 h, 20-40 % Ausbeute. **B)** Synthese von **AAP1-3** mit  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigter Einheit im Linker. (v) **77-79**, HATU, DIPEA, THF, RT, 16 h, 34-60 % Ausbeute. **C)** Synthesis von **AAP4-6** mit  $\alpha$ ,  $\beta$ -gesättigter Einheit im Linker (vi) **74-76**, BTFFH, DIPEA, DCM, 80 °C, 16 h, 27-49 % Ausbeute.

### 3.5.2 Biochemische und zelluläre Evaluierung der inhibitorischen Wirkung

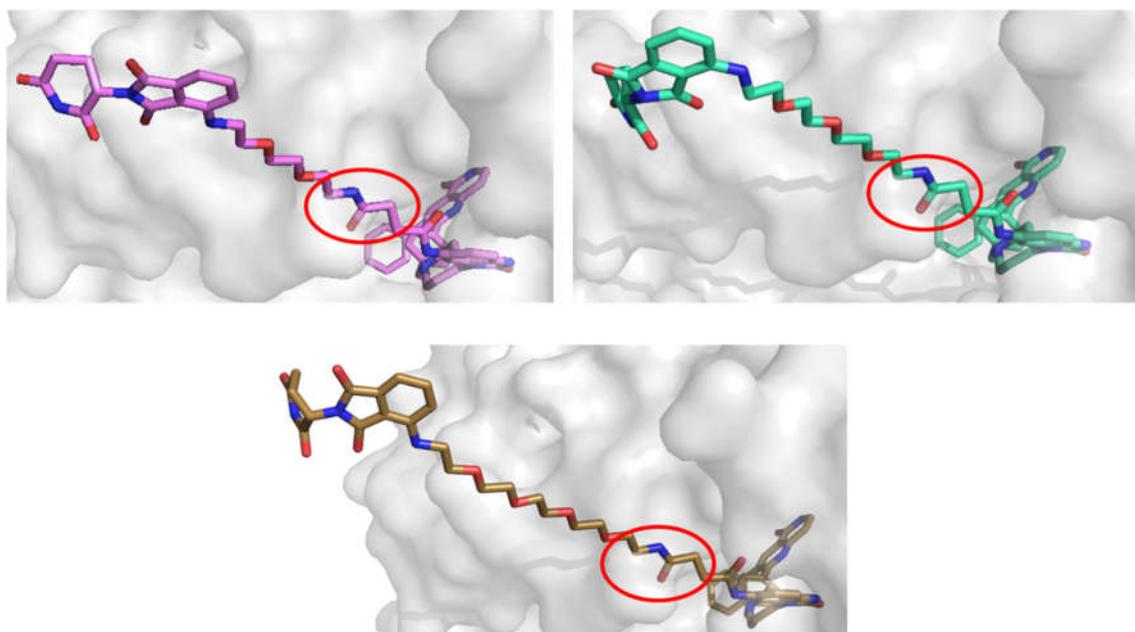
Zunächst wurden die dargestellten **AAP1-6** hinsichtlich ihrer biochemischen und zellulären Aktivität mit dem parentalen Inhibitor Borussertib verglichen. Die biochemischen Daten aus dem kommerziellen HTRF-Assay dienen hierbei dem Nachweis der Bindung an Akt und dessen Effekt auf die Proteinaktivität, da der degradierende Effekt hiermit nicht miteinbezogen wird. Ebenso wurden die **AAPs** hinsichtlich ihrer antiproliferativen Aktivität auf der PTEN-alterierten Brustkrebs-Zelllinie ZR-75-1 evaluiert.<sup>6</sup> In der Bestimmung der biochemischen  $\text{IC}_{50}$ -Werte zeigt sich ein signifikanter 10-30-facher Abfall der Aktivität für die **AAP1-3** mit der Michael Akzeptor (Tab. 6).<sup>6</sup> Dies lässt sich durch die Lenalidomid-Einheit teilweise erklären und war ebenso für die Aktivitäts-basierten Sonden zu beobachten. Dies führt aufgrund einer eingeschränkten Flexibilität zu einer geringeren Affinität und langsameren Bindung an Akt. Trotz der  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Einheit und einer Vielzahl von Optimierungsansätzen der massenspektrometrischen Analysen konnte für **AAP1-3** wider Erwarten keine kovalente Modifizierung von Akt sondern lediglich Apo-Protein detektiert werden.

Dies kann die Aktivitätsabnahme gegenüber dem kovalenten Inhibitor Borussertib zusätzlich erklären. Einen möglichen Ansatz für die fehlende kovalente Bindung der drei PROTACs mit Michael Akzeptor zu Akt bietet die Analyse und die Modellierung mittels der Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit Borussertib (PDB: 6HHF) hinsichtlich potentieller Bindemodi. Generell gilt für den PEG-Linker, dass eine hohe Flexibilität vorhanden ist, sodass eine Vielzahl von möglichen Bindungsmodi auftreten können, wobei bei dieser Modellierung die kovalente Bindung zu Cys296 als fester Bestandteil verankert wurde., um die potentiellen kovalenten Bindungsmodus zu analysieren. Hierdurch wurde für die drei **AAP1-3** deutlich, dass es zu sterischen Konflikten mit Akt, direkt an der Bindung in Richtung des Lenalidomids, kommt (Abb. 44). Diese Modellierung stellt zwar lediglich eine starre Konformation von Akt dar, sodass keine dynamischen Prozesse der Bindungsknüpfung miteinbezogen werden können. Jedoch gibt diese die Modellierung einen ersten Ansatzpunkt dafür, dass die kovalente Modifizierung durch die **AAP1-3** nicht ohne sterische Überschneidungen mit Akt ablaufen kann, sodass die kovalente Bindungsknüpfung sehr unwahrscheinlich ist. Damit führen diese sterischen Konflikte dazu, dass die gewünschte kovalente Bindung zu Akt ausbleibt. Da die Vielzahl der publizierten PROTACs nicht-kovalente Moleküle sind und der postulierte Degradierungsmechanismus (siehe Kapitel 1.4) nicht-kovalente Molekül vorteilhaft darstellt, könnte das Ausbleiben der kovalenten Bindung für die Degradierung von Akt jedoch vorteilhaft sein.<sup>[113]</sup> Für die  $\alpha$ ,  $\beta$ -gesättigten Verbindungen **AAP4-6** wird eine deutlich stärkere Aktivitätsabnahme, bis zu 360-fach, beobachtet. Ein ähnlicher Trend zeigt sich bei den EC<sub>50</sub>-Werten in der humanen Brustzelllinie ZR-75-1, wobei die **AAP1-3** entsprechend der biochemischen Daten einen Verlust um das 12-20-fache gegenüber Borussertib aufweisen und dennoch eine hohe zelluläre Aktivität im niedrigen nanomolaren Bereich besitzen. Im Vergleich dazu sind **AAP4-6** bis zu 60-fach weniger aktiv. Dies kann zum einen an der bereits im biochemischen Assay gezeigten verringerten biochemischen Aktivität und damit limitierten Ligandenbindung liegen, zum anderen wiederum auch an einer deutlich herabgesetzten zellulären Permeabilität.

<sup>6</sup> Biochemische und zelluläre Charakterisierung durchgeführt von Dr. Ina Landel und Dr. Lena Quambusch

**Tabelle 7:** Biochemische IC<sub>50</sub>-Werte der PROTACs AAP1-6 im Vergleich zu Borussertib gegen Akt1<sup>wt</sup> und zelluläre CTG EC<sub>50</sub>-Werte auf ZR-75-1.<sup>6</sup>

	HTRF IC <sub>50</sub>	CTG EC <sub>50</sub> [nM]
	[nM]	ZR-75-1
<b>Borussertib</b>	0.8 ± 0.3	5 ± 1
<b>AAP1</b>	15.1 ± 0	70 ± 20
<b>AAP2</b>	10.6 ± 1.6	70 ± 18
<b>AAP3</b>	23.8 ± 0	85 ± 22
<b>AAP4</b>	19.6 ± 1.9	640 ± 230
<b>AAP5</b>	177.2 ± 4.0	4439 ± 112
<b>AAP6</b>	289.8 ± 4.2	3831 ± 31

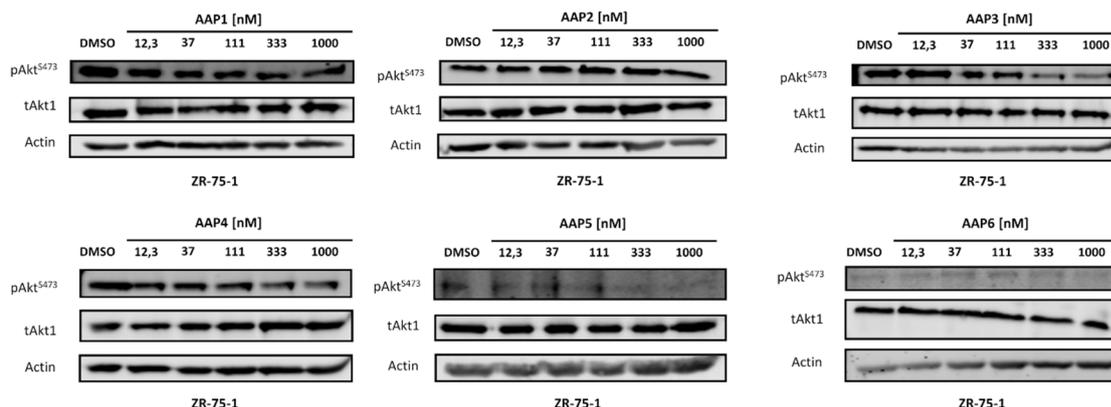


**Abbildung 44:** Modellierung und Illustration von jeweils einem möglichen kovalenten Bindungsmodus von den AAP1-3 mit zwei (links oben), drei (rechts oben) und vier (unten) PEG-Einheiten mittels der Röntgenkristallstruktur von Akt in Komplex mit Borussertib (PDB: 6 HHF). In rot ist der kritische Bereich des sterischen Konflikts der Liganden mit Borussertib markiert.

### 3.5.3 *in vitro* PD Studien

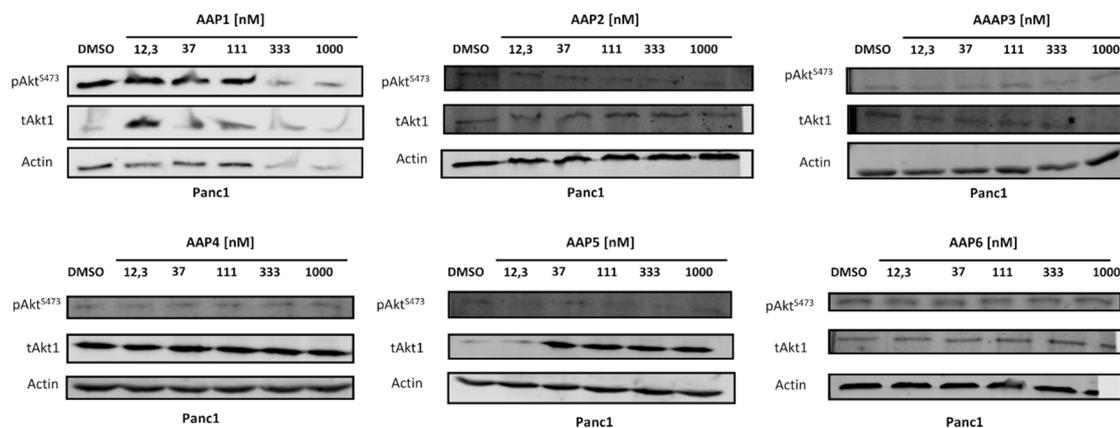
Im nächsten Schritt sollte die Fähigkeit der neu dargestellten Substanzen analysiert werden, inwiefern sie zu einer Degradierung von Akt im zellulären System führen. Diese Analyse erfolgte per WB, mittels derer eine genaue Quantifizierung der Akt-Level möglich ist. Die Analyse hierfür sollte innerhalb zwei verschiedener Zelllinien, Panc1 und ZR-75-1, erfolgen. Beide Zelllinien exprimieren Akt1 in quantifizierbaren Mengen (s. Kapitel 3.3.2) und weisen eine für die *in vitro* PD Studien praktikable Verdopplungszeit auf. Dabei sollten verschiedene Inkubationszeiten mit den potentiellen PROTACs sowie Konzentrations-abhängige Effekte untersucht werden. Akt hat eine Reproduktionszeit von 36 Stunden in MCF-7-Zellen, die als erste Orientierung dienen kann, da sich die Reproduktionszeiten in unterschiedlichen Zelllinien deutlich voneinander unterscheiden können.<sup>[149]</sup> Zusätzlich besitzt INY-03-141 eine maximale Degradierungsrate von Akt im Zeitraum von vier bis 24 Stunden, daher sollten zunächst die Inkubationszeitpunkte vier und 24 Stunden untersucht werden.<sup>[120b]</sup> Ebenso entscheidend wie die Inkubationsdauer ist der richtige Konzentrationsbereich, da eine zu geringe Konzentration keinen Effekt auslöst, weil in diesem Falle nicht genügend ternäre Komplexe entstehen. Auf der anderen Seite führt eine zu hohe PROTAC-Konzentration zu dem in Kapitel 1.4.1 beschriebenen Hook-Effekt.

Anhand der biochemischen Daten sollte im ersten Schritt ein Konzentrationsbereich von 12,3-1000 nM abgedeckt werden. Zunächst wurden die Panc1 Zellen mit den entsprechenden Konzentrationen der sechs AAPs für 24 Stunden inkubiert sowie einer Negativ-Kontrolle mit DMSO und per WB analysiert (Abb. 45) Hierbei konnte keine Abnahme bei allen sechs AAPs der Akt Konzentration beobachtet werden, wobei jedoch die Intensität und Schärfe der Banden gering sind, sodass die limitierte Qualität der WB-Daten eine genauere Analyse erschweren. Etwaige Schwankungen in der Bandenintensität wurden durch die Normalisierung über Aktin untersucht und konnten nicht als signifikant bestätigt werden. Wohingegen ab einer Konzentration von 333 nM der AAPs teilweise ein leichter Rückgang des pAkt<sup>S473</sup>-Levels detektiert werden kann. Dieser ist zwar deutlich geringer als in vorangegangenen WB-Studien mit Borussertib, aber er zeigt zumindest, dass die AAPs zellgängig sind, an Akt binden und dieses inhibieren.<sup>[57]</sup>



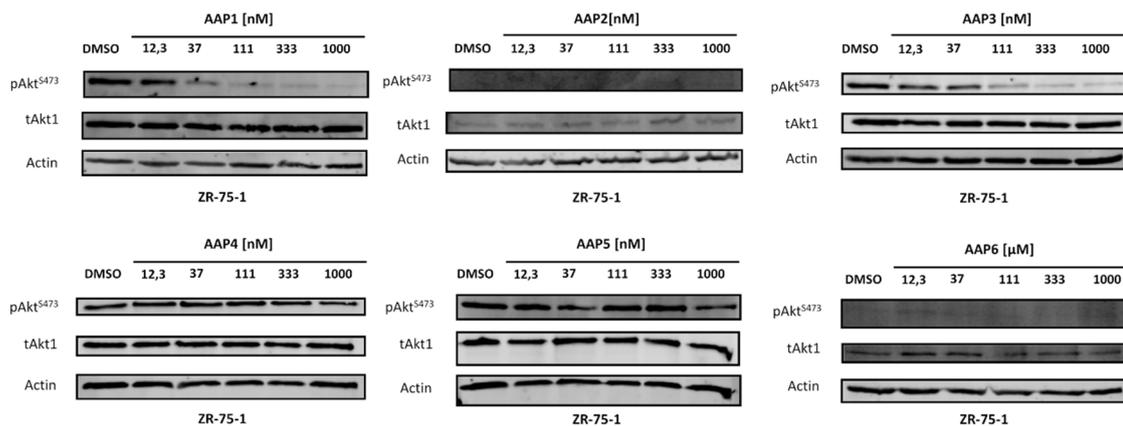
**Abbildung 45:** WBs von ZR-75-1-Zelllysaten, die 24 Stunden lang mit einer Konzentration von 12,3-1000 nM AAP1-6 bei 37 °C behandelt wurden. Es kann keinerlei Abnahme des tAkt1-Niveaus beobachtet werden. Das pAkt<sup>S473</sup> Levels wird bei ab einer Konzentration von 333 nM herunterreguliert.

Analog zum vorangegangenen Experiment wurden auch Panc1-Zellen mit den sechs AAPs behandelt (Abb. 46). Hierbei konnte wiederum keine Degradierung von Akt bei allen sechs AAPs beobachtet werden. Da die Panc1-Zellen nicht sonderlich sensitiv für Akt-Inhibitoren sind, kann zudem nur eine minimale Verringerung des pAkt<sup>S473</sup>-Signals bei 1000 nM für die sechs AAPs beobachtet werden. Da die Inkubationszeit mit den AAPs mit 24 Stunden relativ lang ist könnte es sein, dass keine Degradierung detektiert werden kann, da die Neusynthese von Akt den Effekt der Degradierung überdeckt. Zudem ist für Borussertib ein aktiver Efflux bekannt, der auch ebenfalls für die AAPs vorliegen kann, wodurch nur ein kurzzeitiger Effekt auf das tAkt1 als auch pAkt<sup>S473</sup>-Level erkennbar sein könnte.



**Abbildung 46:** WBs von Panc1-Zellysaten, die 24 Stunden lang mit einer Konzentration von 12,3-1000 nM **AAP1-6** bei 37 °C behandelt wurden. Es kann keinerlei Abnahme des tAkt1- und nur eine minimale Abnahme des pAkt<sup>S473</sup> Levels bei 1000 nM detektiert werden.

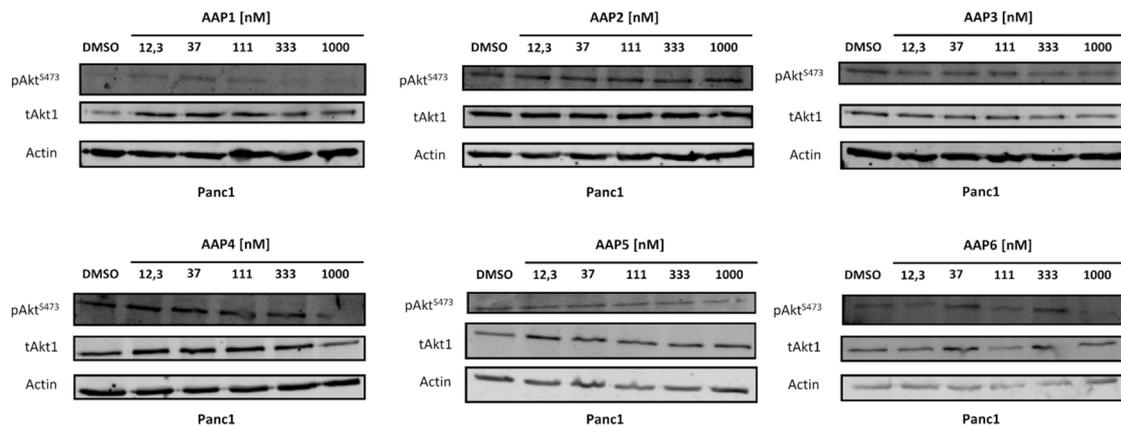
Daher wurde die Inkubationszeit der **AAPs** auf vier Stunden reduziert und der Effekt auf das tAkt1- und pAkt<sup>S473</sup>-Level in den ZR-75-1-Zellen untersucht (Abb. 47). Hierbei konnte für **AAP1-3** ein deutlicher Effekt auf das pAkt<sup>S473</sup> oberhalb von 111 nM bis hin zu einer fast vollständigen Abnahme bei 1000 nM beobachtet werden. Für die **AAP4-6** konnte lediglich bei einer Konzentration von 1000 nM eine Abnahme des pAkt<sup>S473</sup>-Signals beobachten werden, dies korreliert mit den zuvor gezeigten zellulären Daten (Tab. 6), bei denen erst im höheren µM-Bereich ein Effekt für **AAP4-6** vorhanden war. Jedoch konnte für keinen der **AAPs** eine Abnahme des tAkt1-Levels registriert werden.



**Abbildung 47:** WBs von ZR-75-1-Zellysaten, die vier Stunden lang mit einer Konzentration von 12,3-1000 nM **AAP1-6** bei 37 °C behandelt wurden. Es kann keinerlei Abnahme des tAkt1-Levels beobachtet werden. Das pAkt<sup>S473</sup> Levels wird ab einer Konzentration von 111 nM deutlich reduziert und bei einer Konzentration von 1000 nM kann für die **AAP1-3** nahezu kein pAkt<sup>S473</sup> detektiert werden.

Analog zu den ZR-75-1-Zellen wurden ebenfalls Panc1-Zellen mit **AAP1-6** für vier Stunden inkubiert (Abb. 48). Hierbei konnte für das pAkt<sup>S473</sup>-Signal eine schwächere Abnahme als in den ZR-75-1-Zellen beobachtet werden. Dies war zu erwarten, da die Panc1-Zellen nicht abhängig vom Akt-Signalweg sind. Für die beiden **AAP1/3** können minimale Abnahmen des tAkt1-Levels ab einer Konzentration von 333 nM detektiert werden, die jedoch in wiederholenden WB validiert werden müssten.

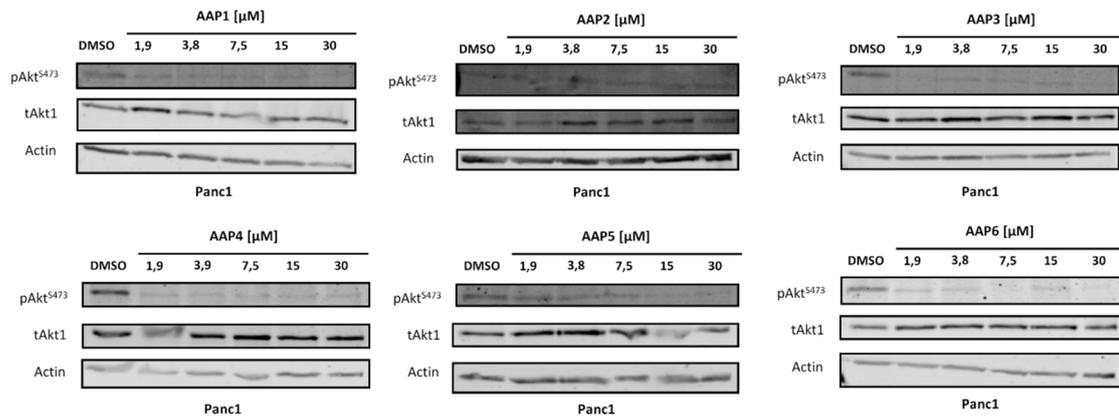
Für die übrigen **AAPs** war keine signifikante Abnahme erkennbar. Da die Abnahmen des tAkt1-Levels für die beiden **AAP1/3** am oberen Ende des Konzentrationsbereichs detektiert werden konnten, könnte eine durchaus stärkere Degradierungsrate für höhere **AAP**-Konzentration erhalten werden. Daher wurde auf eine Replikation dieser WBs verzichtet und der Konzentrationsbereich zunächst angepasst.



**Abbildung 48:** WBs von Panc1-Zelllysaten, die vier Stunden lang mit einer Konzentration von 12,3-1000 nM **AAP1-6** bei 37 °C behandelt wurden. Es können für die **AAP1/3** minimal Abnahmen des tAkt1 Levels ab einer Konzentration von 333 nM beobachtet werden. Die weiteren **AAP** zeigen keine Runterregulierung von tAkt1. Das pAkt<sup>S473</sup> Levels wird teilweise bei Konzentrationen oberhalb von 333 nM runterreguliert.

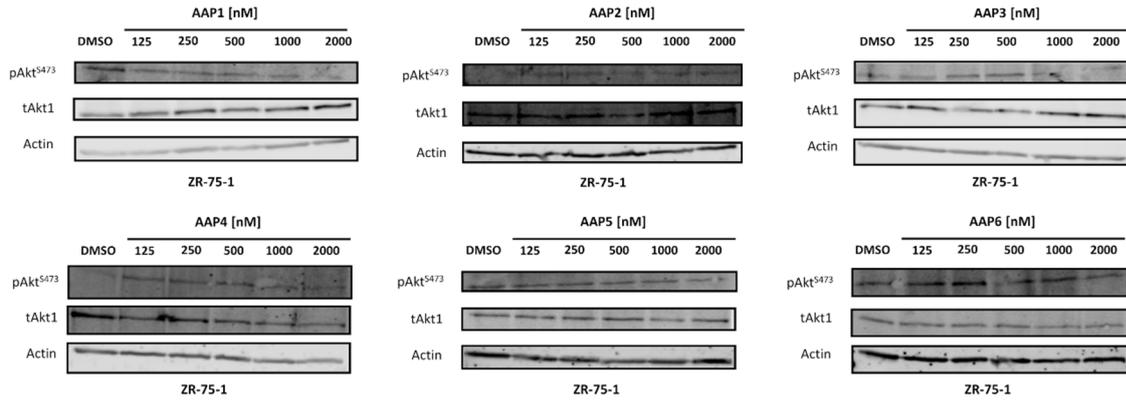
Aus diesem Grund wurde der Konzentrationsbereich auf 1,9-30  $\mu$ M der **AAP1-6** angepasst. Da der Ressourcenbedarf an **AAPs** bei diesen hohen Konzentrationen sehr hoch ist wurden lediglich Panc1-Zellen für vier Stunden behandelt (Abb. 49). Aufgrund der hohen **AAP**-Konzentrationen konnte in den Panc1-Zellen eine deutliche Reduktion des pAkt<sup>S473</sup>-Levels erreicht werden. Lediglich bei 1,9  $\mu$ M war noch ein minimales Signal detektierbar, oberhalb dieser Konzentration wurde die Serin-Phosphorylierung komplett inhibiert. Jedoch konnten lediglich für die zwei **AAP2/3** schwache Reduktionen des tAkt1-Levels bei 1,9  $\mu$ M beobachtet werden, oberhalb dieser Konzentration blieb das tAkt1-Level auf dem Niveau der Negativ-Kontrolle mit DMSO. Die weiteren **AAPs** zeigten bei keiner Konzentration einen Effekt hinsichtlich des tAkt1-Levels. Da im vorherigen Experiment ab einer Konzentration von 333 nM und in diesem Experiment zumindest noch ein Effekt bei 1,9  $\mu$ M für zwei **AAPs** zu detektieren war, ist davon auszugehen, dass die hier gewählten Konzentrationen zu hoch sind. Durch diese hohen

**AAP**-Konzentrationen können sich potentiell rasch binäre Komplexe aus E3-Ligand und **AAP** sowie Akt und **AAP** bilden, die somit die Bildung des ternären Komplex aus E3-Ligand, **AAP** und Akt blockieren. Wie bereits beschrieben, ist dieser Hook-Effekt ein typisches Charakteristikum von PROTACs.



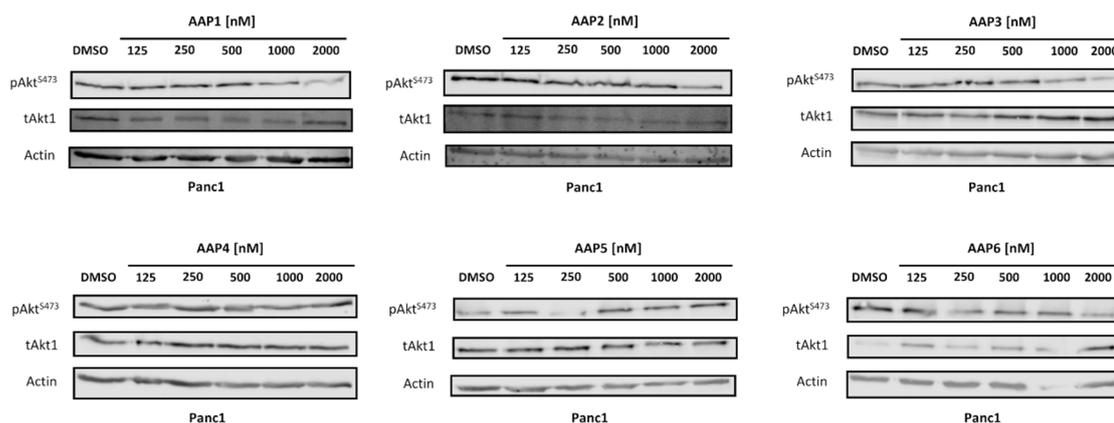
**Abbildung 49:** WBs von Panc1-Zelllysaten, die vier Stunden lang mit einer Konzentration von 1,9-30  $\mu\text{M}$  **AAP1-6** bei 37 °C behandelt wurden. Es kann keinerlei Abnahme des tAkt1 Levels beobachtet werden. Das pAkt<sup>S473</sup> Level wird für alle Konzentrationen signifikant gesenkt; bei 1,9  $\mu\text{M}$  ist noch eine schwache Bande zu detektieren, die bei 30  $\mu\text{M}$  nicht mehr zu detektieren ist. Lediglich für **AAP2/3** kann eine leichte Abschwächung der Bandenintensität für die Konzentration von 1,9  $\mu\text{M}$  detektiert werden.

Aus diesem Grund wurde die **AAP** Konzentration auf 125-2000 nM verringert, sodass ebenfalls wieder die Charakterisierung auf den ZR-75-1 Zellen möglich war (Abb. 50). Für ansteigende Konzentrationen der **AAPs** kann für das pAkt<sup>S473</sup>-Signal eine kontinuierliche Abnahme beobachtet werden, die in Korrelation zu den zellulären CTG-Daten steht. Für die tAkt1-Bande kann in den WBs stellenweise eine minimale Abnahme in der Intensität beobachtet werden. Jedoch muss diese Abnahme auf die Intensität der Aktin-Bande normalisiert werden und da diese auch in eben diesen Proben deutlich schwächer ausfallen, liegt keine signifikante Degradierung von tAkt1 vor. Diese Schwankungen in der Bandenintensität können auf variierende Auftragung der Probenmenge oder auch eine minimale Abweichung in der Bestimmung der Proteinkonzentration zurückgeführt werden.



**Abbildung 50:** WBs von ZR-75-1-Zelllysaten, die vier Stunden lang mit einer Konzentration von 125-2000 nM AAP1-6 bei 37 °C behandelt wurden. Es kann keinerlei Abnahme des tAkt1-Levels beobachtet werden. Für die AAP1-3 ist bereits ab 125 nM eine konzentrationsabhängige Runterregulierung des pAkt<sup>S473</sup>-Levels sichtbar; für die AAP4-6 tritt dies erst ab 1000 nM auf. Das tAkt1 bleibt für alle AAPs unverändert.

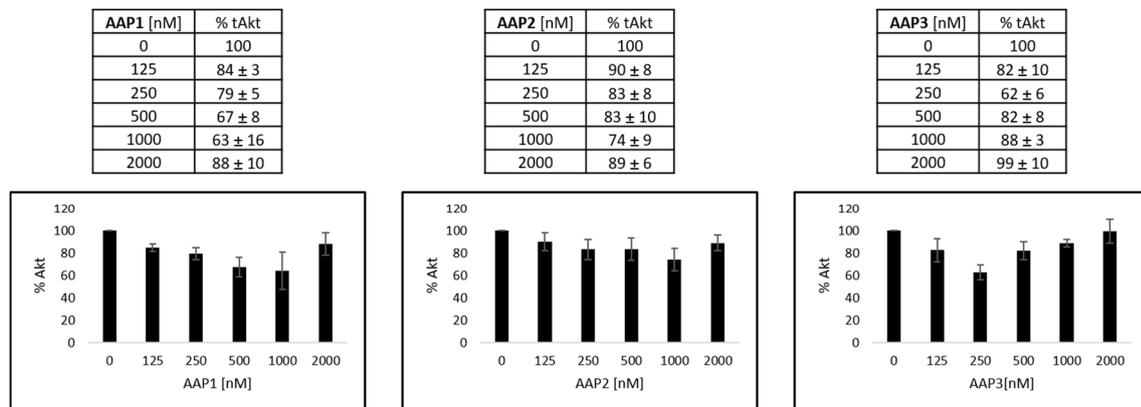
Analog hierzu wurden ebenfalls Panc1-Zellen mit den sechs AAPs inkubiert und per WB analysiert (Abb. 51). Hierbei kann lediglich für die drei AAP1-3 mit Michael-Akzeptor eine Abnahme des pAkt<sup>S473</sup> oberhalb von 1000 nM detektiert werden. Die weiteren drei AAP4-6 zeigen keinerlei Veränderung des Phosphorylierungslevels, ebenso wie die tAkt1-Konzentration unverändert bleibt. Hingegen können für die drei AAP1-3 eine minimale Abnahme der Bandenintensität des tAkt1-Levels ab 125 nM detektiert werden. Eine maximale Verringerung der tAkt1-Konzentration kann für die beiden AAP1/2 mit kürzerem Linker bei 1 µM beobachtet werden, wobei die stärkste Runterregulierung von Akt bei AAP3 bei 250 nM auftritt. Aufgrund der deutlich geringeren biochemischen Aktivität von AAP4-6 im Vergleich zu AAP1-3, die bis zu 20-fach höher ist, könnte die Affinität für Akt zu gering sein, um einen erfolgreichen ternären Komplex zu bilden; damit ist es nicht möglich, einen Abbau von Akt zu induzieren.



**Abbildung 51:** WBs von Panc1-Zelllysaten, die vier Stunden lang mit einer Konzentration von 125-2000 nM AAP1-6 bei 37 °C behandelt wurden. Es kann keinerlei Abnahme des tAkt1-Levels beobachtet werden. Das pAkt<sup>S473</sup> Level wird bei Konzentrationen ab 1000 nM bzw. bei 2000 nM für AAP1-3 oder AAP4-6 signifikant verringert. Für AAP1-3 kann im Konzentrationsbereich zwischen 125 nM und 1000 nM eine schwache Abnahme der tAkt1 Bandenintensität detektiert werden. Bei den AAP4-6 kann keine signifikante Veränderung der Bandenintensität für tAkt1 detektiert werden.

Um die Signifikanz dieser WBs zu bestätigen, wurden jeweils zwei Proben von den drei AAP1-3 von zwei verschiedenen Panc1-Zelllysaten-Ansätzen untersucht und anschließend quantifiziert (Abb. 52). Die Quantifizierung der insgesamt vier Proben bestätigte für AAP1-3 eine leichte Verringerung des Akt1-Levels. Eine maximale Reduktion des tAkt1-Levels um 38 % wurde für AAP3 bei einer Konzentration von 250 nM beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte für AAP1/2 eine maximale Degradierungsrate bei einer Konzentration von 1 µM mit 37 % bzw. 26 % festgestellt werden. Für die AAP1-3 wurde oberhalb dieser Konzentration ein Anstieg des tAkt1-Spiegels beobachtet, der durch den Hook-Effekt erklärt werden kann. Die stärkste Degradierung von Akt1 wird durch AAP3 ausgelöst, das mit drei PEG-Einheiten den längsten Linker besitzt. Aufgrund der kürzeren Linker von AAP1 und AAP2 könnte es zu sterischen Konflikten zwischen der rekrutierten E3-Ligase und Akt kommen oder die Zugänglichkeit zu Oberflächenlysinen problematisch sein. Dies korrespondiert mit früheren Studien, in denen gezeigt wurde, dass die Linkerlänge von zentraler Bedeutung für die erfolgreiche Bildung des ternären Komplexes aus Zielmolekül, E3-Ligase und PROTAC und den damit verbundenen Abbau des Zielproteins ist.<sup>[116a]</sup> Auch AAP3 mit der größten Degradation von tAkt1 bei 250 nM zeigt einen ähnlichen Konzentrationsbereich wie INY-03-141, wobei der Hook-Effekt auch bei höheren Konzentrationen auftritt.<sup>[120b]</sup>

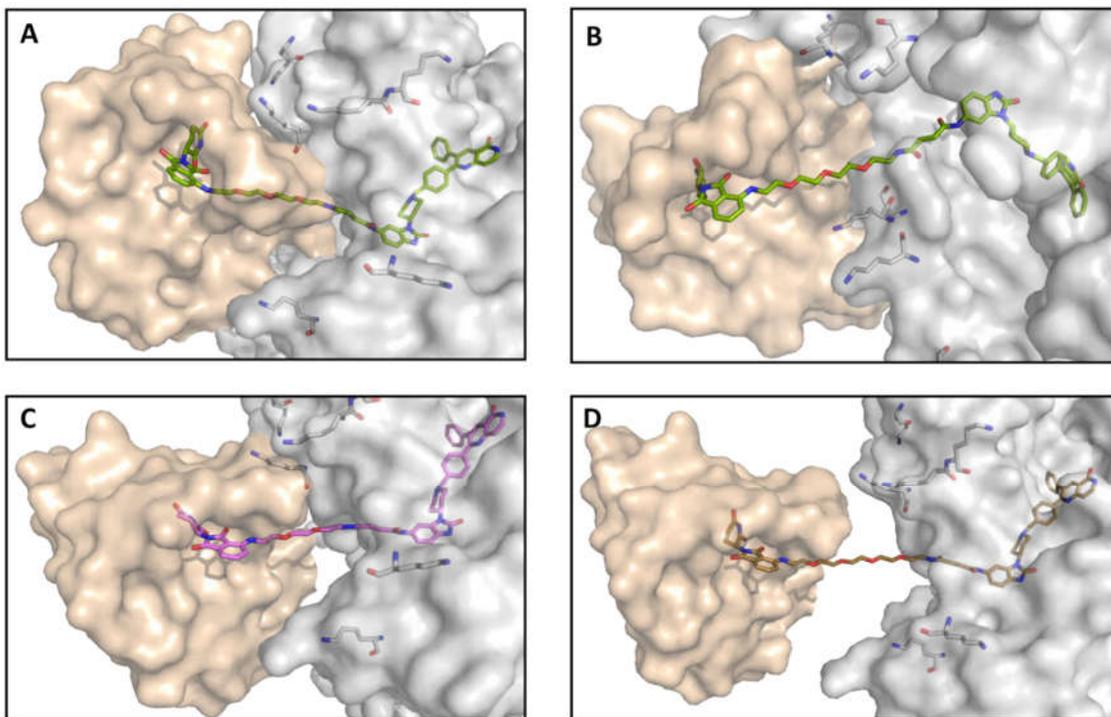
Im Gegensatz dazu liegen die beiden anderen PROTACs **AAP1** & **AAP2** deutlich höher hinsichtlich ihrer maximalen Degradierungskonzentration bei 1  $\mu\text{M}$ , bei der die größte Abnahme von tAkt1 zu beobachten ist. Dies entspricht jedoch der Vermutung, dass die Bindung der beiden Verbindungen **AAP1** & **AAP2** an Akt deutlich langsamer verläuft, wodurch der für den Abbau von Akt1 notwendige ternäre Komplex erst bei höheren Konzentrationen entsteht. Folglich wird auch der Hook-Effekt erst bei höheren Konzentrationen wie 2  $\mu\text{M}$  beobachtet.



**Abbildung 52:** Quantifizierung des tAkt1/ $\beta$ -Aktin-Spiegels [%] (n=4), normalisiert auf die DMSO-Kontrolle. Balkendiagramm der tAkt1-Entwicklung über den abgedeckten Konzentrationsbereich, die den tAkt1-Abbau und den bekannten Hook-Effekt verdeutlichen.

Um diese Annahmen zu untermauern, wurde eine Modellierung des ternären Komplex mittels der Röntgenkristallstruktur von Akt1 im Komplex mit Borussertib (PDB: 6HHF) durchgeführt. Diese Modellierung kann jedoch nur ein sehr artifizielles Modell abbilden und dient somit nur als eine erste Analyse. Hierfür wurden die drei **AAPs** in *Discovery Studios* ausgehend von Borussertib erweitert und anschließend energieminiert in die allosterische Akt Bindetasche eingefügt. Anschließend wurde dann die Röntgenkristallstruktur der Cereblon Isoform 4 in Komplex mit Pomalidomid (PDB: 4V2Z) hinzugefügt und per *Pair Fit* entsprechend an das Lenalidomid der PROTACs orientiert (Abb. 53). Hierbei ist die Ausrichtung des Linkers und die damit verbundene Orientierung des Lenalidomids entscheidend. Für **AAP2** sind hier zwei verschiedene Bindemodi dargestellt (Abb. 53A/B). Zum einen ist, wie schon in Abb. 44 beschrieben, ein sterischer Konflikt zwischen der Linkerregion des PROTACs und Akt vorhanden. Zudem kann für beide Konformationen ein starker sterischer Konflikt der E3-Ligase und

Akt verdeutlicht werden. Durch diese Hinderungen wird der Aufbau des benötigten ternären Komplexes für die Degradierung von Akt deutlich erschwert. Die gleiche Problematik kann hier ebenfalls für eine Bindungspose von **AAP1** gezeigt werden (Abb. 53C). Lediglich mit dem **AAP3**, der den längsten Linker mit vier PEG-Einheiten besitzt, kann der sterische Konflikt von Akt und E3 Ligand erfolgreich vermieden werden (Abb. 53D). Durch den längeren Linker ist eine ausreichende Distanz zwischen den beiden Proteinen gegeben, sodass es zu keiner Überschneidung der beiden Proteinoberflächen kommt und die Bildung des ternären Komplexes hierdurch nicht beeinträchtigt werden sollte. Die Analyse der Bildung des ternären Komplexes per *PyMOL* unterstützt somit die Hypothese, dass die Linker von **AAP1** und **AAP2** zu kurz sind, sodass es zu einem sterischen Konflikt der beiden Proteine kommt. Erst der längere Linker von **AAP3** liefert keinen sterischen Konflikt und ermöglicht somit eine stabilere und schnellere Bildung des ternären Komplexes.

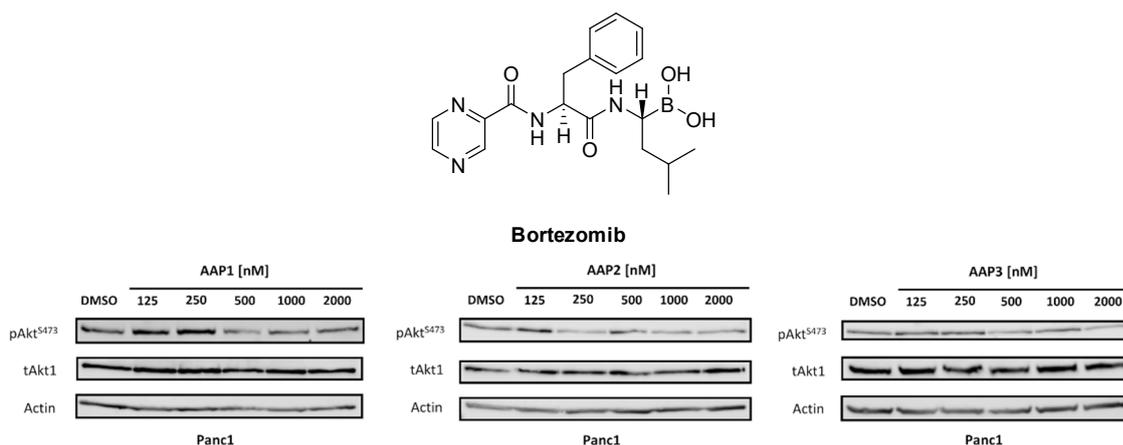


**Abbildung 53:** Modellierung des ternären Komplexes aus den drei **AAP1-3** mittels der Röntgenkristallstrukturen von Akt1 mit Borussertib (grau, PDB: 6HHF) und der Cereblon Isoform 4 in Komplex mit Pomalidomid (braun, PDB: 4V2Z). Visualisierung per *PyMOL*. **A/B)** Darstellung des ternären Komplexes aus E3-Ligand, **AAP2** (grün) und Akt mit zwei verschiedenen Orientierungen/Konformationen des Lenalidomids. In beiden Fällen kommt es zu einem sterischen Konflikt zwischen Cereblon und Akt. **C)** Darstellung des ternären Komplexes aus E3-Ligand, **AAP1** (lila) und Akt.

Es tritt ein sterischer Konflikt zwischen Cereblon und Akt auf. **D)** Darstellung des ternären Komplexes aus E3-Ligand, **AAP3** (braun) und Akt. Durch den längeren Linker von **AAP3** ist ein ausreichender Abstand zwischen den beiden Proteinen vorhanden, sodass kein sterischer Konflikt vorliegt.

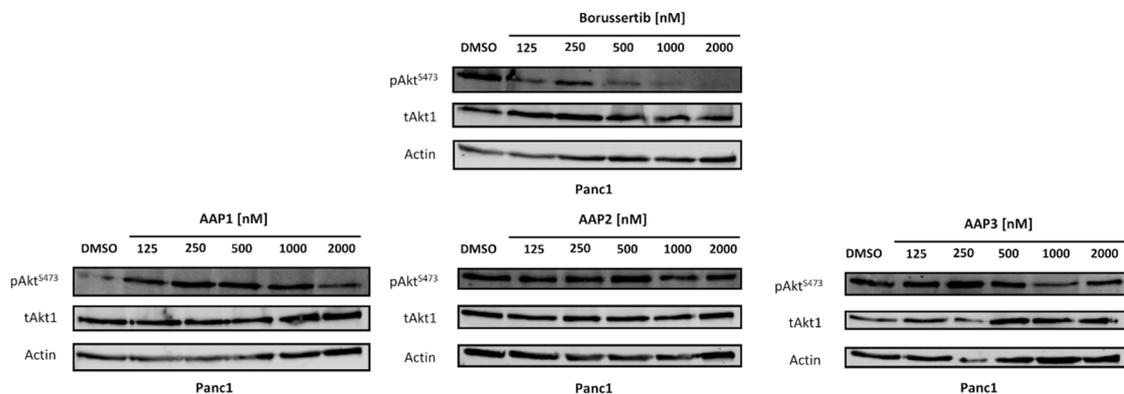
### 3.5.4 Verifizierung des proteasomalen Abbaus

Die Verifizierung der Degradierung durch Bindung der **AAPs** in die allosterische Bindetasche von Akt, CRBN und mittels des proteasomalen Systems sollte durch die Ko-Inkubation mit entsprechenden Modulatoren der einzelnen Bausteine erfolgen. Zunächst wurde diesbezüglich Bortezomib eingesetzt, der das Proteasom adressiert und den Proteinabbau somit inhibiert.<sup>[120b]</sup> Hierfür wurden die Panc1-Zellen zusätzlich zu den **AAP1-3** mit einer konstanten Menge von Bortezomib [0,5  $\mu$ M] behandelt (Abb. 54). Durch Quantifizierung der tAkt1-Bandenintensität und Normalisierung über Aktin können lediglich nicht signifikante Schwankungen von unter  $\pm 5\%$  (normalisiert auf die DMSO-Kontrolle) detektiert werden. Somit wird durch die Ko-Inkubation mit Bortezomib der Abbau von Akt unterdrückt, sodass dies die Annahme der proteasomal-induzierten Akt1-Degradation belegt. Zusätzlich zum tAkt1-Signal wurde auch wiederum das Phosphorylierungslevel analysiert. Hierbei kann eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung ab 500 nM beobachtet werden, sodass die Bindung der **AAP1-3** weiterhin gegeben ist und das Ausbleiben der Degradierung lediglich auf die Inhibition des proteasomalen Systems zurückgeführt werden kann.



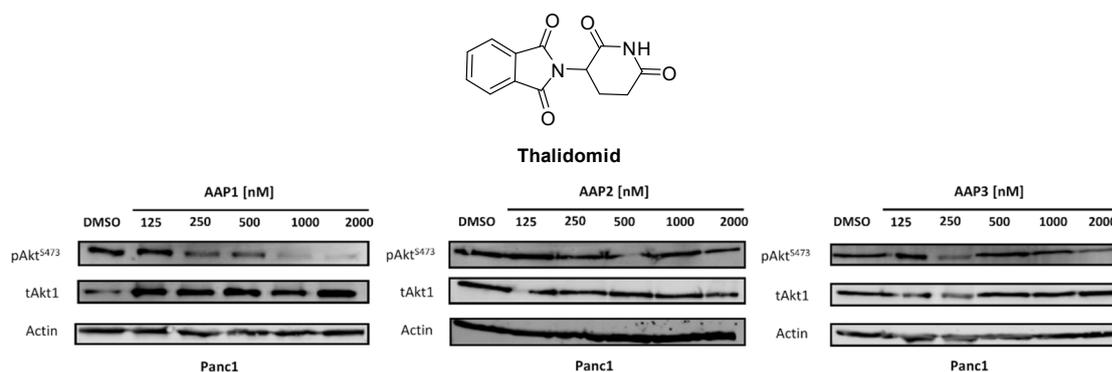
**Abbildung 54:** Darstellung der chemischen Struktur des Proteasom-Inhibitors Bortezomib. WB-Analyse von **AAP1-3** in Panc1-Zellen mit Bortezomib-Ko-Inkubation. Behandlung der Panc1-Zellen mit konstanter Bortezomib-Konzentration [0,5  $\mu$ M] und **AAP1-3** für vier Stunden mit 125-2000 nM zeigten keine Abnahme des tAkt1-Spiegels, lediglich des pAkt<sup>S473</sup>-Levels, sodass die Degradierung von Akt1 auf das proteasomale System zurückgeführt werden kann.

Im nächsten Schritt erfolgte die Vorinkubation mit Borussertib [ $1 \mu\text{M}$ ], um den proteasomalen Abbau durch Bindung in die allosterische Bindetasche zu verifizieren (Abb. 55). Hierfür wurden die Panc1-Zellen zunächst eine Stunde mit Borussertib inkubiert, sodass die allosterische Bindungstasche besetzt und für die AAPs blockiert ist. Dies führte für alle drei AAPs zu einem konstant unveränderten tAkt1-Level, sodass die allosterische Bindung zu Akt essentiell für den proteasomalen Abbau ist. Ebenso wurde zur Kontrolle ein WB, durchgeführt mit Borussertib-behandelten Panc1-Zellen, bei dem sich auch keine Veränderung des tAkt1-Levels zeigt. Somit ist die Einführung des Lenalidomids an das Borussertib-Grundgerüst entscheidend für den proteasomalen Abbau.



**Abbildung 55:** WB-Analyse von AAPI-3 in Panc1-Zellen mit Vorinkubation des CAAIs Borussertib. Behandlung der Panc1-Zellen mit konstanter Borussertib-Konzentration [ $1 \mu\text{M}$ ] und AAPI-3 für vier Stunden mit 125-2000 nM zeigten keine Abnahme des tAkt1-Spiegels, lediglich des pAkt<sup>S473</sup>-Levels, sodass die Degradierung von Akt1 auf die Bindung in die allosterische Akt-Bindetasche zurückgeführt werden kann. Ebenso wurden die Panc1-Zellen für vier Stunden mit 125-2000 nM behandelt, wobei ebenfalls ein konstantes tAkt1-Signal detektiert werden konnte.

Analog dazu wurden Panc1-Zellen mit dem CRBN-Liganden Thalidomid [ $10 \mu\text{M}$ ] vorinkubiert, sodass die Bindetasche der E3-Ligase für die drei AAPI-3 blockiert ist (Abb. 56). Ebenso wie für die beiden vorherigen Experimente kann keine Abnahme des tAkt1-Levels beobachtet werden. Durch die Vorinkubation mit Thalidomid ist die Bindetasche des E3-Liganden blockiert, sodass dieser nicht in räumliche Nähe zu Akt gebracht werden kann; somit bleibt die für den Proteinabbau nötige Ubiquitinierung von Akt aus.



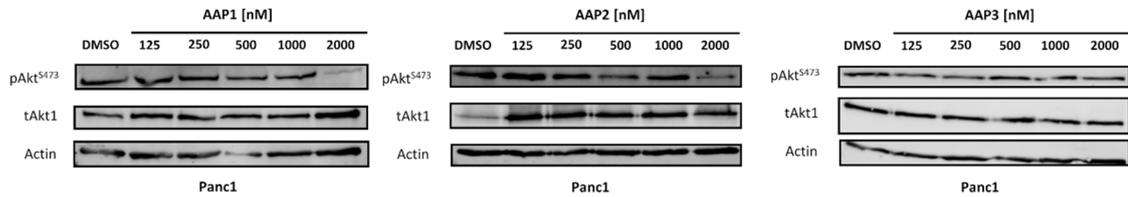
**Abbildung 56:** Darstellung der chemischen Struktur des CRBN-Liganden Thalidomid. WB-Analyse von **AAP1-3** in Panc1-Zellen mit Thalidomid-Vorinkubation. Behandlung der Panc1-Zellen mit konstanter Thalidomid-Konzentration [10  $\mu$ M] und **AAP1-3** für vier Stunden mit 125-2000 nM zeigten keine Abnahme des tAkt1-Spiegels, lediglich des pAkt<sup>S473</sup>-Levels, sodass die Degradierung von Akt1 auf die Bindung zu CRBN zurückgeführt werden kann.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Akt-Degradierung durch die Bindung an die E3-Ligase CRBN, das Zielprotein Akt sowie der Funktion des proteasomalen Systems induziert wird. Wird jedoch eine dieser Bindungstaschen durch den entsprechenden Liganden blockiert, ist ein erfolgreicher Abbau von Akt1 nicht mehr möglich. Dieses Ergebnis zeigt, dass die erfolgreiche Bildung des ternären Komplexes für die Akt1-Degradierung essentiell ist und dieser anschließend im proteasomalen System abgebaut wird. Somit bestätigen diese Experimente die Annahme, dass **AAP1-3** als PROTACs fungieren können.

### 3.5.5 Zeitabhängige Analyse der Akt1-Degradierung

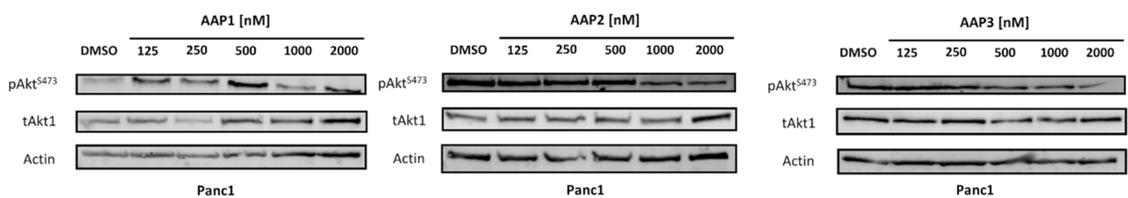
Anschließend wurde noch der zeitabhängige Abbau von Akt1 über sechs Zeitpunkte von einer bis 24 Stunden für **AAP1-3** untersucht, um eine detailliertere Analyse des Akt1-Abbaus durch allosterische Modulatoren durchzuführen. Nach einer Stunde liegt keine Runterregulierung des tAkt1-Levels vor (Abb. 57). Dies könnte unter anderem damit zusammenhängen, dass die PROTACs aufgrund ihrer begrenzten PK-Eigenschaften nur langsam die Zellmembran passieren. Außerdem ist die Bindung der Substanzen an Akt im Vergleich zu Borussertib schwächer (Tab. 6), was ebenfalls bedeutet, dass die Bildung des ternären Komplexes eine längere Zeitspanne benötigt. Es kann auch lediglich eine Abnahme des pAkt<sup>S473</sup> für die höchste **AAP**-Konzentration mit 2  $\mu$ M detektiert werden,

was auch mit der Annahme der langsameren Zellpermeabilität und der abgeschwächten Akt-Bindung korrelieren würde.



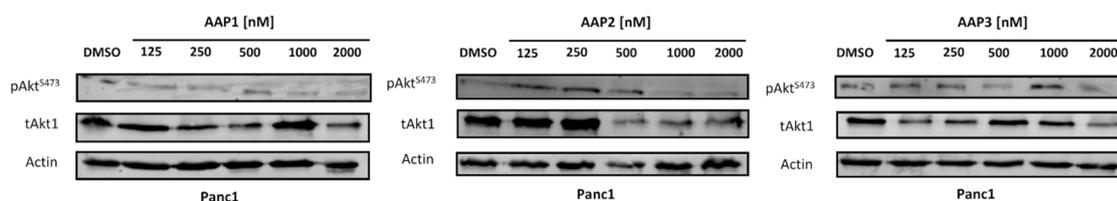
**Abbildung 57:** WB-Analysen von **AAP1-3** in Panc1-Zellen nach einer Stunde Inkubation mit Konzentrationen in Höhe von 125-2000 nM. Es kann keine Abnahme des tAkt1-Levels detektiert werden; auch nimmt die Akt-Phosphorylierung lediglich bei 2  $\mu$ M ab.

Diese Annahmen können durch die Analyse der WBs der Panc1-Zellen, die zwei Stunden mit den **AAPs** inkubiert wurden, bestätigt werden, da hier bereits eine erste Degradierung von Akt1 zu beobachten ist (Abb. 58). Diese ist jedoch geringer als nach vier Stunden (Abb. 52), sodass davon auszugehen ist, dass nach zwei Stunden noch nicht eine vergleichbare Menge an ternären Komplexen aufgebaut werden konnte. So kann für **AAP1** bzw. **AAP2** bei 1000 nM eine Runterregulierung von tAkt1 um etwa 20 % und 10 % und für **AAP3** bei 500 nM von 15 % beobachtet werden. Damit ist die Abnahme etwa nur halb so stark wie nach vier Stunden, wobei die Quantifizierung sehr ungenau ist, da lediglich jeweils nur ein WB zu diesem Zeitpunkt analysiert wurde. Daher ist lediglich eine qualitative Aussage hinsichtlich des Akt Proteinabbaus über die verschiedenen Zeitpunkte möglich.



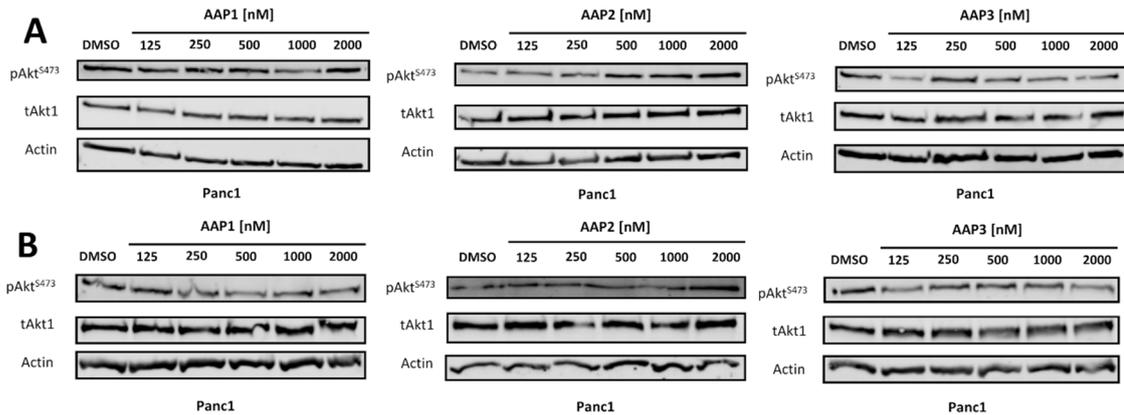
**Abbildung 58:** WB-Analysen von **AAP1-3** in Panc1-Zellen nach zwei Stunden Inkubation mit Konzentrationen in Höhe von 125-2000 nM. Es kann eine minimale Abnahme des tAkt1-Levels detektiert werden, die jedoch schwächer ausfällt als die Akt1-Degradierung nach vier Stunden.

Der nächste analysierte Zeitpunkt erfolgt nach achtstündiger Inkubation mit den **AAPs** (Abb. 59). Hierbei ist weiterhin eine Reduktion des Akt1-Levels zu detektieren, allerdings ist diese bereits schwächer als der Proteinabbau nach vier Stunden und liegt quantitativ auf einem vergleichbaren Niveau wie nach zwei Stunden. Dies kann zum einen damit zusammenhängen, dass der Abbau von Akt in Konkurrenz mit der Neusynthese von Akt steht. Da der Effekt der **AAPs** zwar signifikant ist, aber mit maximaler 38 %iger Proteinabnahme nicht allzu stark ist, kann der Proteinabbau schnell ausgeglichen werden, sobald die Degradierung von Akt durch eine Verringerung der Wirkstoff-induzierten Ubiquitinierung abnimmt. Dies kann damit zusammenhängen, dass **AAP1-3**, wie bereits für Borussertib beobachtet, einem aktiven Efflux ausgesetzt sind und somit nicht dauerhaft in der Zelle verweilen.



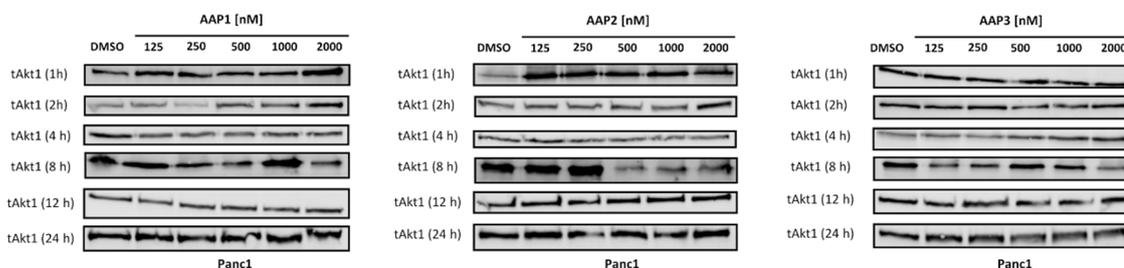
**Abbildung 59:** WB-Analysen von **AAP1-3** in Panc1-Zellen nach acht Stunden Inkubation mit Konzentrationen in Höhe von 125-2000 nM. Es kann eine deutliche Abnahme des tAkt1-Levels detektiert werden, die jedoch schwächer ausfällt als die Akt1-Degradierung nach vier Stunden.

Die letzten beiden untersuchten Inkubationszeitpunkte sind nach zwölf und 24 Stunden (Abb. 60). Diese beiden Zeitpunkte bestätigen den Trend der bereits nach acht Stunden Inkubation sichtbar war. So kann für diese beiden Zeitpunkte keine Degradierung von Akt1 detektiert werden, was ebenfalls die oben beschriebenen Effekte untermauern würde. Auch das pAkt<sup>S473</sup>-Signal bestätigt diese Hypothese, da für diese beiden Zeitpunkte auch kein Effekt auf das Phosphorylierungslevel zu detektieren ist.



**Abbildung 60:** WB-Analysen von **AAP1-3** in Panc1-Zellen nach 12 (**A**) und 24 (**B**) Stunden Inkubation mit Konzentrationen in Höhe von 125-2000 nM. Es kann keine Abnahme des tAkt1- sowie des pAkt<sup>S473</sup>-Levels detektiert werden.

Insgesamt wurden somit sechs verschiedene Zeitpunkte für die drei PROTACs analysiert (Abb. 61). Dabei konnten für kurze Behandlungszeiten keine bis hin zu einer minimalen (nach ein- bzw. zweistündiger Behandlung) Abnahme der Akt-Konzentration beobachtet werden. Für zwei Stunden war hierbei die Degradierung bei etwa 15-20 % und damit halb so stark wie nach vier Stunden. Hier konnte auch der maximale Degradierungseffekt nachgewiesen, der für 1  $\mu$ M **AAP1** bzw. **AAP2** bei einer Reduktion des Akt-Levels um 37 bzw. 26 % lag. Im Vergleich dazu zeigte **AAP3** die höchste Abnahme von tAkt1 um 38 % bei einer 4-fach niedrigeren Konzentration von 250 nM. Die Verdopplung der Inkubationszeit auf acht Stunden hatte wiederum etwa eine Halbierung des Akt-Abbaus zur Folge, bis hin zu einem nicht mehr detektierbarem Akt1-Abbau für die Inkubationszeiträume von zwölf und 24 Stunden.



**Abbildung 61:** WB-Analysen von **AAP1-3** in Panc1-Zellen nach einer, zwei, vier, acht, zwölf und 24 Stunden Behandlung mit Konzentrationen in Höhe von 125-2000 nM. Ein signifikanter Proteinabbau kann lediglich für die drei Zeitpunkte nach zwei, vier und acht Stunden detektiert werden. Der stärkste Degradierungseffekt kann hierbei nach vier Stunden beobachtet werden.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

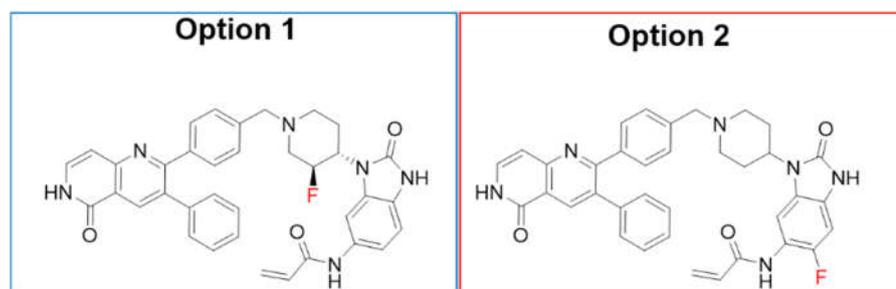
Im Fokus dieser Dissertation stand die Proteinkinase Akt, die aufgrund ihrer zentralen Rolle in der PI3K/Akt/mTor-Signalkaskade ein vielversprechendes Zielprotein für die zielgerichtete Onkologie ist, da viele der vorgeschalteten Proteine Tumorsuppressoren oder Protoonkogene sind. Da bisher jedoch kein klinischer Kandidat, weder ATP-kompetitive noch allosterische Inhibitoren, alle klinischen Studien erfolgreich durchlaufen konnte, stellt der CAAI Borussertib einen vielversprechenden weiteren Ansatz dar. Hierfür sind zunächst *in vivo* PDX-Modelle nötig, um die Effizienz sowie Verträglichkeit in komplexeren biologischen Systemen analysieren zu können und die Entwicklung von einer Leitstruktur hin zu einem klinischen Kandidaten voranzutreiben. Für diese Untersuchungen werden größere Gramm-Mengen des Inhibitors Borussertib benötigt, sodass die Hochskalierung der Syntheseroute nötig war. Hierbei war insbesondere die Synthese des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts limitierend. Daher wurde die Syntheseroute dahingehend umgestellt, dass die reduktive Aminierung zur Fusion des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts und des Benzo[*d*]imidazol-Bausteins erst im letzten Syntheseschritt erfolgte. Hierfür wurde die Syntheseroute des Benzo[*d*]imidazol-Bausteins dahingehend modifiziert, dass bereits das Acrylamid eingeführt ist. Durch die Etablierung der reduktiven Aminierung mit Natriumcyanoborhydrid als abschließenden Syntheseschritt konnten 2,5 g Borussertib synthetisiert werden. Hiermit konnte in KRas-abhängigen PDX-Modellen eindrucksvoll die *in vivo* Wirksamkeit der CAAs in einer Kombinationstherapie mit Trametinib zeigen konnten.

Für weiterführende Studien ist die Weiterentwicklung des Sondenmoleküls Borussertib mittels einer medizinalchemischen Optimierung nötig. Da sich bereits im Vorfeld auf dieser Arbeit hauptsächlich auf den Benzo[*d*]imidazol-Bausteins fokussiert wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts und des Substituenten in 3-Position untersucht und somit der chemische Raum der CAAs erweitert. Durch die Substitution des bicyklischen 1,6-Naphthyridinon hin zum monozyklischen Pyridin konnte das Molekulargewicht der CAAs signifikant vermindert werden. Da die Aktivität weiterhin im niedrignanomolaren Bereich lag, konnten auf Grundlage dieses neuen Inhibitors die Untersuchung einer kleinen in 3-Position derivatisierten Substanzbibliothek durchgeführt werden. Dabei zeigte sich jedoch das lediglich minimalste polare Gruppen wie das Hydroxyl toleriert werden und deutlich polarere und größere Gruppen, wie zum Beispiel das Methylsulfonyl, zu einer deutlich erhöhten inhibitorischen Aktivität im  $\mu\text{M}$ -Bereich führen.

Zusätzlich konnte auch für kleine Substituenten wie Fluor gezeigt werden, dass diese toleriert werden. Letztendlich ermöglichten all die hier durchgeführten Substitutionen eine aufschlussreiche SAR hinsichtlich des Phenylrings in 3-Position, mit dem Ergebnis, dass der Phenylring das Optimum hinsichtlich der Aktivität der CAAs darstellt. Eine Derivatisierung des Phenylrings mit polaren Gruppen führt zu einer deutlichen Aktivitätsabnahme, sodass hierauf für die weitere Optimierung von Borussertib verzichtet werden kann. Die Einführung der Fluorsubstituenten zeigt zwar eine geringe Abnahme in der Aktivität, aber durchaus eine gute Toleranz, sodass dies für weiterführende Optimierungen auch hinsichtlich der metabolischen Stabilität durchaus nutzbar ist.

Diese Analyse der Substituenten in 3-Position führte zwar nicht zu einer Weiterentwicklung von Borussertib zu einem neuen optimierten CAAI, lieferte aber wichtige Informationen für die Etablierung eines radioaktiven Liganden für die Bildgebung per PET. Hierfür stellt der CAAI Borussertib aufgrund seiner PK-Eigenschaften und hohen Selektivität für Akt einen guten Startpunkt dar. Durch die hier gezeigte SAR konnte ebenso eine geeignete Position zur Einführung des radioaktiven  $^{18}\text{F}$ -Isotops identifiziert werden, die ebenfalls den Anforderungen der Zugänglichkeit per LSF entspricht. Dabei wurde zunächst eine direkte Fluorierung von Borussertib präferiert, jedoch konnte keine erfolgreiche Darstellung von Borussertib inklusive des Radionuklids erhalten werden. Daher wurde die Syntheseroute von Borussertib dahingehend optimiert, das im letzten Syntheseschritt eine Ruthenium-katalysierte Deoxyfluorierung durchgeführt werden konnte. Hiermit wurde das radioaktive  $^{18}\text{F}$ -Borussertib erfolgreich synthetisch dargestellt. Bevor eine erste *in vivo* Studie durchgeführt werden konnte, erfolgte die Synthese des  $^{19}\text{F}$ -Borussertibs, damit die biochemischen und zellulären Eigenschaften evaluiert werden konnten. Dabei wurde eine Abnahme der Aktivität hinsichtlich Akt1 im 4-fachen Bereich erhalten, die ebenso auf die zellulären Assaysysteme übertragen werden konnte. Jedoch zeigte  $^{19}\text{F}$ -Borussertib eine deutliche Abnahme der Aktivität gegenüber Akt2 und Akt3, sodass es sich bei  $^{18}\text{F}$ -Borussertib lediglich um einen Akt1-spezifischen PET-*Tracer* handeln könnte. Im nächsten Schritt wurden erste *in vivo* Xenograft-Modellen per PET-Bildgebung analysiert. Hierbei konnte keine signifikante Anreicherung des *Tracers* in den Tumoren detektiert werden, sondern lediglich unter anderem in der Gallenblase, Leber und im Magen-Darm-Trakt. Jedoch zeigten diese Ergebnisse zumindest eine gute Verteilung von  $^{18}\text{F}$ -Borussertib und ebenfalls eine gute metabolische Stabilität, da ein radioaktives Signal detektiert werden konnte.

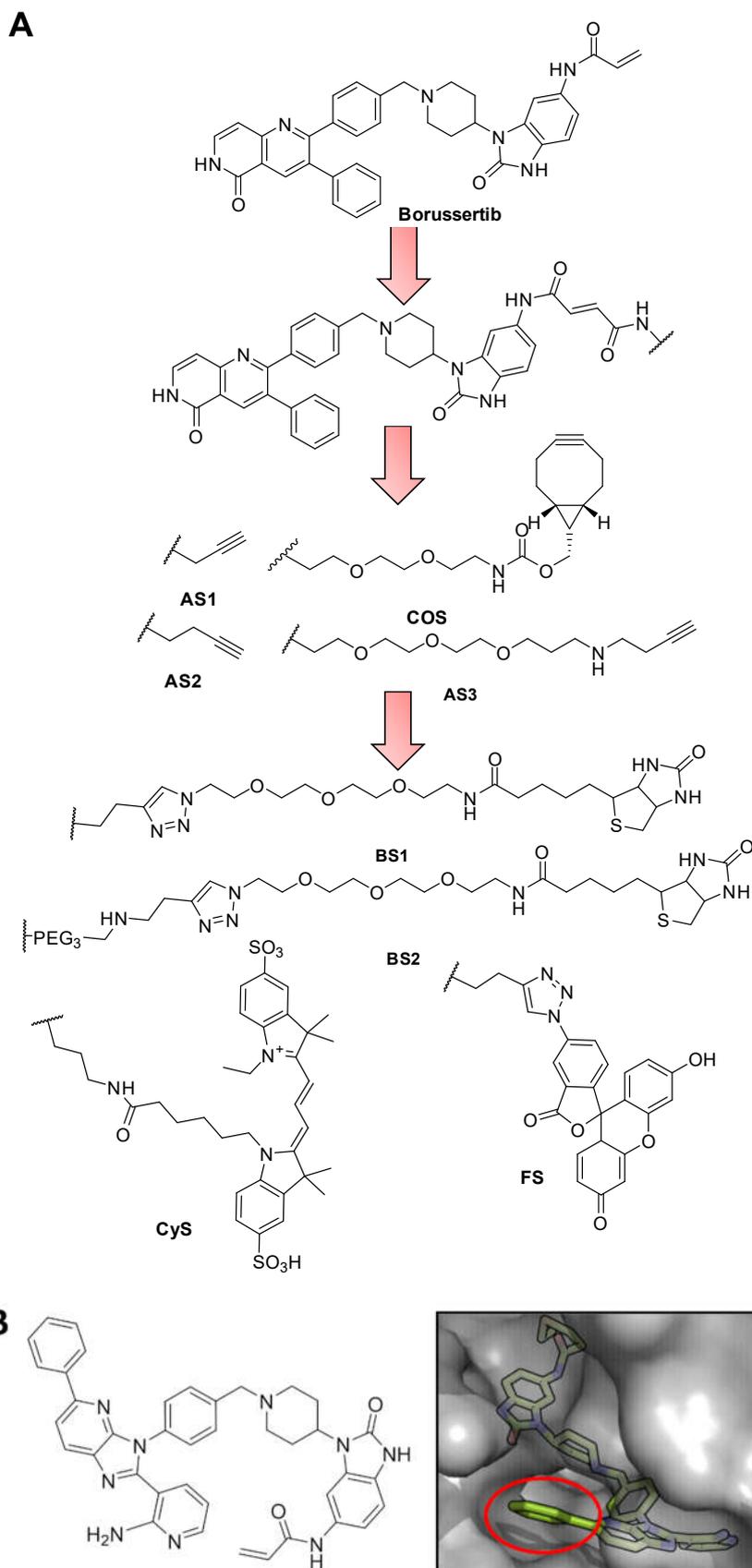
Diese nicht vorhandene Anreicherung im Tumorgewebe kann zum einen damit begründet werden, dass die verwendeten Modellsysteme nicht für  $^{18}\text{F}$ -Borussertib als *Tracer* geeignet sind, da zum Beispiel im Falle der Panc1-Zellen das Akt1-Level zu gering ist. Zum anderen kann der *Tracer* aufgrund seines PK-Profiles und seiner geringeren Aktivität im Vergleich zu Borussertib limitiert sein, da er nicht dazu fähig ist Akt in ausreichendem Maßstab für die PET-Bildgebung zu modifizieren. Aus diesem Grund wäre ein erster Schritt zu einer erfolgreichen PET-Bildgebung die Optimierung des radioaktiven Liganden, zum Beispiel durch die Einführung des Radionuklids in einer alternativen Position (Abb. 62). Hierfür eignen sich zwei weitere Positionen: Zum einen die 3-Position des Piperidin Rings (Option 1), da hier die Bindetasche von Akt ausreichend Platz liefert. Diese Position ist jedoch sehr herausfordernd, da die in Kapitel 1.3.1 beschriebenen LSF-Methoden auf aromatische Systeme beschränkt sind. Daher wäre die Option 2 mit der Einführung des  $^{18}\text{F}$ -Isotops in 5-Position des Benzo[*d*]imidazolons chemisch besser darstellbar, da hierfür ebenso die Ruthenium-katalysierte Deoxyfluorierung genutzt werden könnte. Zudem konnte für einen Chlor-Substituenten in derselben Position für das Benzo[*d*]imidazolons-Grundgerüst eine ähnliche biochemische und zelluläre Profilierung wie für Borussertib erhalten werden.<sup>[82]</sup>



**Abbildung 62:** Darstellung der zwei Optionen für einen optimierten PET-*Tracer*. Option 1 zeigt Borussertib mit dem Fluorsubstituenten in 3-Position des Piperidins. Option 2 zeigt Borussertib mit dem Fluorsubstituenten in 5-Position des Benzo[*d*]imidazolons.

Zusätzlich zu den PET-*Tracern* stellen chemische Sonden ein weiteres niedermolekulares Werkzeug zur detaillierteren Untersuchung der biologischen Funktion von Proteinen dar. Zusätzlich zu den bereits etablierten Alkin-Sonden konnten im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Alkin-Sonde mit verlängertem PEG-Linker, eine Cyclooctin-, zwei Biotin-Sonde und eine Cy3-Sonde erfolgreich etabliert werden. Somit konnte die Auswahl an Akt-Sonden von drei auf acht Substanzen erweitert werden (Abb. 63A). Die vier Alkin-basierten Sonden bieten den Vorteil, dass sie aufgrund der kleineren chemischen Gruppe

für die bioorthogonale Reaktion die biologische und zelluläre Aktivität der Sonde nur geringfügig im Vergleich zu den etablierten CAAs beeinflussen. Die bioorthogonale Alkin-Gruppe bietet zudem den Vorteil, dass unterschiedlichste Reporter per CuAAC oder SPAAC eingeführt werden können. Hierfür konnten auch die entsprechenden *in situ* Reaktionsbedingungen zur Modifizierung mit Fluorophoren und Affinitätstags etabliert werden und zusätzlich zwei Fluorophor-basierte Sonden dargestellt werden, die für weiterführende *Live Cell Imaging*-Experimente genutzt werden können. Mittels der *Live Cell Imaging*-Experimente ist es möglich, die Lokalisation und Expressionslevel der drei Akt-Isoformen zu untersuchen und somit die Aktivität der drei Proteine detaillierter zu betrachten. Ebenso konnten zwei Biotin-Sonden erfolgreich in ersten *Pull-down*-Experimenten etabliert werden, bei denen zunächst aufgereinigtes Akt1 per magnetischer Partikel erfolgreich gebunden werden konnte. In einem zweiten Schritt war es möglich Akt1, ebenfalls aus Akt-überexprimierenden NIH/3T3 Zelllysaten zu isolieren. Nachfolgende Experimente wären die Translation in klinisch relevantere Zelllinien, wie die ZR-75-1, sowie der anschließende Einsatz von *Cross Linkern*, um allosterische Bindepartner von der inaktiven PH-*in* Akt-Konformation identifizieren zu können. Eine weitere Anwendung der Biotin-Sonden wäre im Bereich der Proteinbesetzung.<sup>[150]</sup> Dabei können Tumorproben, die zuvor mit einem CAAI behandelt wurden, hinsichtlich ihres Besetzungsgrad von Akt untersucht werden und die Fragestellung geklärt werden, wie hoch dieser sein muss, um eine ausreichende Runterregulierung der Akt-Signalweiterleitung zu erreichen, die eine Tumorrogression induziert. Darüber hinaus wäre die Entwicklung von weiteren Sondenmolekülen von hoher Relevanz, da die etablierten Sonden aufgrund der Einführung an der Michael-Akzeptor-Position eine deutliche langsamere kovalente Bindungsknüpfung als Borussertib eingehen. Zudem können keine Proteininteraktionspartner im Bereich des Biotins detektiert werden, da dieser durch die Bindung zum Avidin blockiert ist. Eine alternative Position zur Einführung von Reportergruppen kann auf Grundlage der etablierten Hybrids-substanzen von Arq092 und Borussertib identifiziert werden (Abb. 63B).<sup>[151]</sup> Dabei ist das 1,6-Naphthyridinon-Grüngerüst durch ein Imidazopyridin ersetzt, an dem sich in 5-Position ein weiterer Phenylring befindet. Wie die Analyse der Röntgenkristallstruktur in Komplex mit einer der neuen Hybrids-substanzen, zeigt ist der Phenylring lösungsmittlexponiert. Hierbei bilden insbesondere die ortho- als auch meta-Position geeignete Ausgangsvektoren zur Einführung entsprechender Reportergruppen.

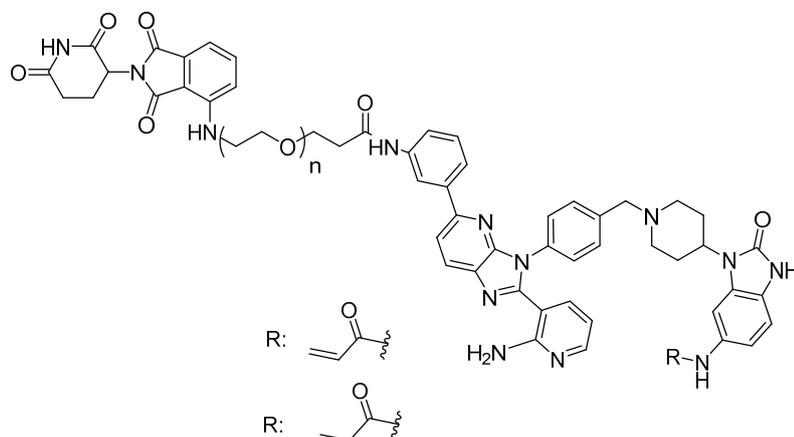


**Abbildung 63:** A) Darstellung aller etablierten Sondenmoleküle basierend auf dem CAAI Borussertib. Insgesamt konnten acht Sonden, vier Alkin-, zwei Fluorophor- und zwei Biotin-Sonden, etabliert werden, die für unterschiedlichste Anwendung wie *Live Cell Imaging* oder *Pulldown*-Experimente werden können.

**B)** Darstellung der chemischen Struktur der Hybridsubstanz aus Arq092 und Borussertib sowie die Röntgenkristallstruktur von Akt mit Markierung der lösungsmittel-exponierten Position zur Einführung von Reportergruppen.

Da bisher mit den klassischen Wirkstoffen noch keine geeignete Behandlungsstrategie in die Klinik translatiert werden konnte und die biologische Aktivität von Akt über den Kinase-abhängigen Mechanismus hinausgeht, sind alternative Therapieansätze von hoher Relevanz. Aufgrund der Kinase-unabhängigen Funktion von Akt stellen PROTACs einen vielversprechenden Ansatz für die Adressierung dar, weil somit nicht nur die Weiterleitung des Phosphorylierungssignals unterbunden wird, sondern ebenfalls allosterische PPI durch die gezielte Akt-Degradierung inhibiert werden. Auf der Grundlage von Borussertib konnten sechs verschiedene AAPs synthetisch dargestellt werden. Dabei zeigten die AAP1-3 eine schwache, jedoch signifikante Degradierung von Akt in Panc1-Zellen mit einem maximalen Proteinabbau von 38 %. Durch Ko/Vor-Inkubation mit dem CRBN-Liganden Thalidomid, dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib und dem CAAI Borussertib konnte die Bildung des ternären Komplexes und die anschließende proteasomale Degradierung verifiziert werden. Ebenso erfolgte noch eine zeitabhängige Evaluierung der drei AAPs. Der stärkste Degradierungseffekt trat nach vier Stunden Inkubation auf. Neben der Analyse des tAkt1-Levels per WB erfolgten weitere biochemische und zelluläre Evaluierungen. Hierbei konnte eine deutliche Abnahme der inhibitorischen Aktivität beobachtet werden, die zu der Hypothese führen das eine hohe Bindungsaffinität essentiell für den erfolgreichen Akt-Abbau ist. Da die Degradierung von Akt bisher nur für Panc1-Zellen mit den AAP1-3 gezeigt werden konnte und in ZR-75-1-Zellen ausblieb, ist die Optimierung der AAPs nötig. Durch die Einführung des Lenalidomids per PEG-Linker direkt an den Michael-Akzeptor geht die kovalente Modifizierung von Akt verloren, sodass eine andere Position zur Einführung des E3-Liganden von Nöten ist. Eine geeignete Position bietet hierbei, wie schon für die chemischen Sonden, der Phenylring der Hybridsubstanz aus Arq092 und Borussertib (Abb. 64). Wie bereits bei den dargestellten AAPs sollten sowohl Substanzen mit als auch ohne der  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Einheit dargestellt werden, um den Effekt der kovalenten Modifizierung hinsichtlich der Akt-Degradierung untersuchen zu können. Ein weiterer alternativer Ansatz wäre die Verwendung von verschiedenen E3-Liganden, wie zum Beispiel VHL-Liganden.

Durch den stetigen Zuwachs an Relevanz der PROTACs nimmt hier die Verfügbarkeit kommerziell verfügbarer Bausteine stetig zu, sodass sehr zeiteffizient eine kleine Bibliothek an potentiellen PROTACs aufgebaut werden kann.



**Abbildung 64:** Darstellung der chemischen Struktur von optimierten AAPs. Die Einführung des E3-Liganden erfolgt am Phenylring in 5-Position des Imidazopyridins. Das Lenalidomid wird über einen PEG-Linker an den Akt-Binder eingeführt, sodass eine optimale Ausrichtung von Akt und CRBN erfolgen kann. Zur Untersuchung des Einflusses einer kovalenten Modifizierung von Akt auf die Degradierung sollen sowohl AAPs mit als auch ohne Michael-Akzeptor synthetisch dargestellt werden.

## 5 Kurzfassung

Tumorerkrankungen stellen weltweit die zweithäufigste Todesursache dar und aufgrund der demographischen Entwicklung nimmt die Anzahl der Neuerkrankungen und Todesfälle stetig zu.<sup>[3]</sup> Dementgegen wirkt zum einen eine verbesserte Diagnostik und neue chirurgische Behandlungsmöglichkeiten sowie zum anderen der Ansatz der zielgerichteten Präzisionsmedizin.<sup>[4]</sup> Hierbei erfolgt die Behandlung nicht mehr auf Grundlage der phänotypischen Erkrankung, sondern auf Basis der zielgerichteten Adressierung genotypischer Läsionen.<sup>[5]</sup> Ein relevantes Zielprotein ist die Proteinkinase Akt, für das bisher noch kein Wirkstoff die klinischen Phasen durchlaufen konnte und auch die Identifizierung prädiktiver Biomarker von Nöten ist. Aufgrund des exzellenten biochemischen und zellulären Aktivitätsprofil des CAAIs Borussertib, stellt dieser Inhibitor für weiterführende Untersuchungen einen vielversprechenden Ansatzpunkt dar. Durch die Hochskalierung der Synthese konnten 2,5 g Borussertib mittels der Modifizierung der Synthese des Benzo[*d*]imidazol-Bausteins und der reduktiven Aminierung als letzten Reaktionsschritt dargestellt werden. Hiermit konnte in KRas-abhängigen PDX-Modellen, in Kombination mit dem MEK-Inhibitor Trametinib, eine Stabilisierung des Tumolvolumens bis hin zu einer partiellen Tumorregression erzielt werden. Somit konnte die gute biochemische und zelluläre Aktivität ebenfalls in *in vivo* Modelle transferiert und das enorme Potential der CAAIs bestätigt werden.

Jedoch besitzt Borussertib eine Reihe von limitierenden PK-Eigenschaften wie einen aktiven Efflux, schlechte Zellpermeabilität und geringe Löslichkeit. Daher sollte das Molekulargewicht reduziert werden und die Einführung löslichkeitsvermittelnder polarer Gruppen in 3-Position des 1,6-Naphthyridinons-Grundgerüsts untersucht werden. Die kleine fokussierte Substanzbibliothek auf Basis eines monozyklischen Pyridins lieferte neue Einblicke in die SAR der CAAIs. So wurde eine deutliche Aktivitätsabnahme für das Pyridin im Vergleich zum 1,6-Naphthyridinons beobachtet, die noch weiter durch die Einführung polarer Gruppen an den Phenylring in 3-Position verstärkt wurde. Lediglich kleine Substituenten wie Hydroxylgruppen oder auch Fluor wurden toleriert. Somit konnte lediglich der chemische Raum der CAAIs erweitert, jedoch keine erfolgreiche Optimierung von Borussertib erzielt werden.

Nichtsdestotrotz lieferte die SAR-Untersuchung des Phenylrings in 3-Position des 1,6-Naphthyridinons-Grundgerüsts wertvolle Erkenntnisse, die für die Entwicklung eines radioaktiven PET-*Tracers* genutzt werden konnten.

Bislang fehlen geeignete Biomarker für Akt-assoziierte Läsionen, sodass die Entwicklung eines Akt-spezifischen PET-*Tracers* diese Fragestellung adressieren kann. Borussertib stellt aufgrund seines biochemischen, zellulären und PK-Profiles einen guten Ansatzpunkt dar und mit Hilfe der LSF und der vorherigen SAR-Analyse war die erfolgreiche Etablierung von  $^{18}\text{F}$ -Borussertib möglich. Nach erfolgter biochemischer und zellulärer Validierung des nicht radioaktiven Gegenstücks,  $^{19}\text{F}$ -Borussertib, wurden erste *in vivo* Tiermodelle durchgeführt. Die PET-Bildgebung konnte erfolgreich das radioaktive Signal des  $^{18}\text{F}$ -Borussertibs detektieren, jedoch ohne eine signifikante Anreicherung des  $^{18}\text{F}$ -Borussertib in den Tumoren nachweisen zu können.

Da die Tumorbiologie von Akt noch nicht vollständig aufgeschlüsselt ist, werden noch weitere chemische Werkzeuge wie beispielsweise funktionelle Sonden benötigt. Insgesamt konnten acht verschiedene molekulare Sonden durch Erweiterung von Borussertib mit verschiedenen Reportergruppen synthetisiert werden und in biologischen Systemen etabliert werden. Einerseits wurden Alkin-basierte Sonden erfolgreich dargestellt, für die die entsprechende *in situ* CuAAC und SPAAC zur Einführung verschiedener Reporter etabliert wurde. Andererseits erfolgte die erfolgreiche Synthese von Fluorophor- und Affinitäts-basierten Sonden, die per *In Gel*-Fluoreszenz und *Pulldown*-Experimente validiert werden konnten.

Aufgrund der fehlenden Akt-Inhibitoren, die die klinische Translation erfolgreich durchlaufen konnten, ist die Entwicklung von alternativen Behandlungsansätzen von Nöten. Diese Herausforderung kann mit PROTACs adressiert werden, da diese nicht nur die Kinaseaktivität inhibieren, sondern durch den gezielten Proteinabbau ebenfalls allosterische PPI ausschalten. Auf der Grundlage von Borussertib war es möglich sechs AAPs mit unterschiedlicher Linkerlänge und sowohl mit als auch ohne Michael Akzeptor darzustellen. Die Evaluierung in biologischen und zellulären Systemen zeigte eine Abnahme in der inhibitorischen Aktivität im Vergleich zu Borussertib. Für die drei potenteren AAP1-3 konnte jedoch per WB-Analyse eine minimale Akt1-Degradierung in Panc1-Zellen nach vier Stunden detektiert werden. Durch Ko/Vor-Inkubation mit einem Proteasom-, CRBN- und einem Akt-Liganden konnte die erfolgreiche Bildung eines ternären Komplexes sowie die proteasomale Degradierung verifiziert werden. Ebenso wurde die zeitabhängige Degradierung untersucht, bei der die maximale Degradierung nach vier Stunden bestätigt werden konnte.

## 6 Abstract

Cancer is the second most common cause of death worldwide and, due to demographic developments, the number of new cases and deaths is constantly increasing.<sup>[3]</sup> This is counteracted on the one hand by improved diagnostics and new surgical treatment options, and on the other hand by the approach of targeted precision medicine.<sup>[4]</sup> Here, treatment is no longer based on the phenotypic disease but on targeting genotypic lesions.<sup>[5]</sup> A potential new therapeutic target is the protein kinase Akt, where no corresponding agent has yet been able to progress through clinical phases. So there is also a need for valid biomarkers. A key starting point for this need is the CAAI borussertib with an excellent biochemical and cellular activity profile. By upscaling the synthesis, 2.5 g of borussertib, via modification of the synthesis of the benzo[*d*]imidazolone building block and reductive amination as the final reaction step, could be obtained. With this, in KRas-dependent PDX models, combined with the Mek inhibitor trametinib, stabilization of tumour volume up to a slight tumour regression could be achieved. Thus, the good biochemical and cellular activity could also be transferred to *in vivo* models, confirming the enormous potential of CAAs.

However, borussertib possesses several properties such as active efflux, poor cell permeability and low solubility. Therefore, the molecular weight should be reduced, and the introduction of solubility-mediating polar groups in 3-position of the 1,6-naphthyridinone scaffold should be investigated. The small focused compound library based on a monocyclic pyridine provided new insights into the SAR of CAAs. Thus, a significant decrease in activity was observed for the pyridine compared to the 1,6-naphthyridinone, which was further enhanced by introducing polar groups to the phenyl ring in the 3-position. Only small substituents such as hydroxyl groups or even fluorine were tolerated. Thus, only the chemical space of CAAs could be extended, but could achieve no successful optimization of borussertib.

Nevertheless, SAR investigation of the phenyl ring in 3-position of the 1,6-naphthyridinone scaffold provided valuable insights that could be used to develop of a radioactive PET tracer. To date, suitable biomarkers for Akt-associated lesions are lacking, so the development of an Akt-specific PET tracer may address this issue. Borussertib represents a good starting point due to its biochemical and PK profile, and with the help of LSF and the preliminary SAR analysis, the successful establishment of <sup>18</sup>F-borussertib was possible.

After biochemical and cellular validation of the non-radioactive counterpart,  $^{19}\text{F}$ -borussertib, the first in vivo animal models were performed. PET imaging successfully detected the radioactive signal of  $^{18}\text{F}$ -borussertib, but without detecting a significant accumulation of  $^{18}\text{F}$ -borussertib in the tumours.

Since the tumour biology of Akt has not yet been thoroughly dissected, additional chemical tools such as functional probes are still needed. In total, eight different molecular probes could be synthesized by extending borussertib with varying groups of reporter and established in biological systems. On the one hand, alkyne-based probes were successfully presented, for which the corresponding *in situ* CuAAC and SPAAC were established to introduce different reporters. On the other hand, fluorophore- and affinity-based probes were validated via in-gel fluorescence and pulldown experiments.

Due to the lack of Akt inhibitors that could successfully undergo clinical translation, the treatment approaches are needed. This challenge can be addressed by PROTACs, which not only inhibit kinase activity but also switch off allosteric PPI by small molecule induced protein degradation. Based on borussertib, it was possible to display six AAPs with different linker lengths and both with and without  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated moiety. Evaluation in biological and cellular systems showed a decrease in inhibitory activity in comparison to borussertib. However, for the three more potent AAP1-3 significant Akt1 degradation was detected in Panc1 cells after four hours by WB analysis. Furthermore, co/pre-incubation with a proteasome, CRBN, and Akt inhibitor verified the successful formation of a ternary complex and proteasomal degradation. Similarly, time-dependent degradation was investigated, where maximal degradation was confirmed after four hours.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Organische Synthese

#### 7.1.1 Allgemeines

Die für die Synthese verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen *Acros*, *Activate Scientific*, *Alfar Aesar*, *Bionet*, *Combi Blocks*, *Fluka*, *Fluorchem*, *Lumiprobe*, *Maybridge*, *Merck*, *Novabiochem*, *Roth*, *Sigma-Aldrich*, *TCI Chemicals* und *VWR* bezogen und ohne weitere Aufarbeitung verwendet. Die Durchführung Redox- und Hydrolyse-sensitiver Reaktionen erfolgte nach Ausheizen der Reaktionsgefäße und unter Argon-Atmosphäre. Die Lyophilisierung wurde mittels der Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 D<sub>plus</sub> der Firma *Christ* durchgeführt. Reaktionen unter Einsatz von Mikrowellen Strahlung wurden mit dem Mikrowellensystem *Microwave 300* Reaktor der Firma *Anton Paar* vorgenommen.

Die Dünnschichtchromatographie wurde mittels Aluminium-Kieselgel-Platten der Firma *Merck* (Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator F254) durchgeführt und deren Auswertung erfolgte mit Hilfe einer UV-Kammer mit den Wellenlängen 254 nm und 366 nm. Eine Nynhidrin-Lösung wurde zur Aminanfärbung, eine Kaliumpermanganat-Lösung zur Anfärbung von ungesättigten Kohlenwasserstoffverbindung und eine Bromkresolgrün-Lösung zur Carbonsäureanfärbung verwendet. Das *expression LCMS*-System mit Plate Express der Firma *Advion* diente zur Dünnschichtchromatographisch-gekoppelten Massenspektrometrie.

Zur säulenchromatographischen Auftrennung wurde Kieselgel der Firma *VWR* (Partikelgröße: 40-63 µm) eingesetzt. Darüber hinaus wurden die automatisierten Säulenchromatographie-Systeme *Isolera<sup>TM</sup> Prime* der Firma *Biotage* sowie *Flash Prep* System von *Büchi* zur Aufreinigung verwendet. Die präparative HPLC wurde mittels des präparativen Modus des Flash Prep System von *Büchi* mit VP125/21 Nucleodur C18 Gravity Säule (5 µm, *Macherey Nagel*).

Die LC-MS-Analytik erfolgte mit dem *Agilent* HPLC-System (1100er Serie) mit CC 125/4 Nucleodur C18 gravity Saule (3 µm) von *Macherey-Nagel* verknüpft mit einem *Thermo Scientific* Finnigan LCQ Advantage Max Ionenfallen- Massenspektrometer mit *ESA Corona Detector*

Die hochaufgelöste Massenspektrometrie (HRMS) erfolgte mit dem Spektrometer *LTQ Orbitrap* der Firma *Thermo Electron Corporation* mit einem *Accela* HPLC-System und einer Hypersil GOLD-Säule (*Thermo Electron*).

Für die  $^1\text{H}$ -NMR und  $^{13}\text{C}$ -NMR wurden die Avance III HD (CryoProbe)-Spektrometer AV400 (400 MHz für  $^1\text{H}$ - und 101 MHz für  $^{13}\text{C}$ -NMR), AV500 (500 MHz und 125 MHz), AV600 (600 MHz und 151 MHz) und AV700 (700 MHz und 176 MHz) der Firma *Bruker* eingesetzt. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm wiedergegeben. Der interne Standard wurde auf das Lösungsmittel Deuterodimethylsulfoxid (DMSO-*d*<sub>6</sub>  $\delta = 2.50$  ppm bzw. 39.51 ppm) bezogen. Die Multiplizitäten der Signale sind mit Hilfe folgender Abkürzungen beschrieben: s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett vom Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett), b (breites Singulett). Die finalen Moleküle wiesen eine Reinheit von > 95 % auf.

### 7.1.2 Generelle Synthesevorschriften

#### Allgemeine Synthesevorschrift A: Amid-Kupplung

1 eq. des Carbonsäure-Derivates wurde in THF gelöst und 3 eq. DIPEA und 1,5 eq. HATU hinzugegeben. Anschließend wurde das Amin-Derivat (1 eq.) bei Raumtemperatur langsam hinzugegeben. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei Raumtemperatur und anschließend wurden die Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Nach erfolgter säulenchromatographischer Auftrennung (0-20 % MeOH/DCM) konnte das Reinprodukt erhalten werden.

#### Allgemeine Synthesevorschrift B: Nukleophile Substitution

Ein Gemisch aus 2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-4-fluorisoindolin-1,3-dion (1 eq.) und PEG-Linkern (1,1 eq.) in DMF wurde 16 h lang bei 90 °C gerührt. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, in Wasser (20 mL) gegossen und mit Ethylacetat (35 mL x 2) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (30 mL) und einer gesättigten NaCl Lösung (30 mL) gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert. Anschließend wurde eine säulenchromatographische Trennung (Petrolether/Ethylacetat) durchgeführt. Der resultierende gelbliche Feststoff wurde direkt weiterverwendet und 2 h bei RT in 30 mL

HCl gerührt. Dann wurde eine weitere reverse säulenchromatographische Trennung durchgeführt (H<sub>2</sub>O/ACN + 0,1% TFA) und die erwarteten Produkte wurden erhalten.

#### **Allgemeine Synthesevorschrift C: Amid-Kupplung PROTACs**

Zu einer Lösung von 1,2 eq. Carbonsäurederivaten in THF (0,2 M) werden 1 eq. HATU und 4 eq. DIPEA zugegeben. Anschließend wurde 1 eq. 2-(4-((4-(6-Amino-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-3-phenyl-1,6-naphthyridin-5(6*H*)-on zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt, das Lösungsmittel *in vacuo* eingedampft und durch säulenchromatographische Auftrennung das gewünschte Produkt erhalten (H<sub>2</sub>O/ACN+0,1% TFA).

#### **Allgemeine Synthesevorschrift D: *in situ* Aktivierung mit BTFFH**

Die Carbonsäure (1,2 eq.), BTFFH (1,5 eq.) DIPEA (4,5 eq.) wurden in trockenem Dichlormethan 30 min unter Argon gerührt. Anschließend wurde das Amin (1 eq.) zugegeben und 16 h bei 80 °C erhitzt. Die Reaktionslösungsmittel wurde im Vakuum reduziert und das Rohprodukt durch Kieselgelsäulenchromatographie erhalten.<sup>[152]</sup>

#### **Allgemeine Synthesevorschrift E: Reduktive Aminierung mit Natriumcyanoborhydrid**

Das Aldehyd (1 eq.) und das sekundäre Amin (1,1 eq.) wurden in dMeOH (2 mL/mmol) gelöst, 2 Tropfen TEA und AcOH wurden zugegeben. Das Gemisch wurde 4 Stunden lang bei 75 °C gerührt. Dann wurde NaCNBH<sub>3</sub> (zugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 16 Stunden lang bei 75 °C gerührt. Anschließend erfolgte die Einengung des Reaktionsgemisches *in vacuo*, gefolgt von der Extraktion des Rückstandes zwischen DCM und einer ges. Bicarbonat-Lösung. Anschließend wurden die organischen Phasen mit einer ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum reduziert und anschließend konnte per säulenchromatographischer Auftrennung (0-20 % MeOH/DCM) das Rohprodukt erhalten werden.

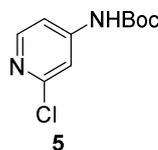
### Allgemeine Synthesevorschrift F: Suzuki-Kreuzkupplungsreaktion

In einem Mikrowellengefäß wurden unter Argonatmosphäre 1-3 eq. der Halogen/Triflat-Substanz und 1 eq. der Boronsäure/Pinacolester in 1,4-Dioxan und Wasser (5:1, 2 mL/mmol) gelöst. Das Gemisch wurde 10 min entgast und anschließend wurden 2,0 eq. der Base  $K_3PO_4$  sowie 0,1 eq. [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)-dichlorid zugegeben. Anschließend wurde die Suspension unter Mikrowellenbestrahlung 0,5 bis 1 Stunde lang bei 130 °C gerührt. Die resultierende Suspension wurde über Celite filtriert und mit DCM extrahiert, die vereinigten organischen Fraktionen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und im Vakuum eingedampft. Kieselgelsäulenchromatographie (0 - 10 % MeOH/DCM) ergab das gewünschte Produkt.

#### 7.1.3 Synthese und Analytik

##### Hochskalierung von Borussertib

##### Darstellung von *tert*-Butyl (2-chloropyridin-4-yl)carbamat **5**



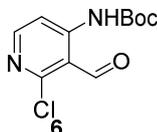
5 g 2-Chloropyridin-4-amin (38,9 mmol, 1 eq.) **4** und 1 g DMAP (7,8 mmol, 0.2 eq.) sowie 13.5 mL Triethylamin (97,2 mmol, 2,5 eq.) wurden in 70 mL DCM gelöst. Anschließend wurden bei 0 °C 10,7 mL Di-*tert*-butyldicarbonat (46,7 mmol, 1,2 eq.) zu der Reaktionslösung hinzugegeben. Die Reaktionslösung rührte über Nacht bei Raumtemperatur unter Argon-Atmosphäre. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Ammoniumchlorid neutralisiert und mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Durch eine chromatographische Auftrennung (0-50 % Ethylacetat/Petrolether) konnten 4,9 g (23,3 mmol., 60 %) des Endprodukts **5** erhalten werden.

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 10.10 (s, 1H), 8.17 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 7.55 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H), 7.36 (dd,  $J$  = 5.7, 1.9 Hz, 1H), 3.32 (s, 1H), 1.48 (s, 9H).

$^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 152.16, 150.90, 150.0, 149.05, 111.70, 111.24, 80.75, 27.87 (3).

**LC-MS:** Berechnet: 229.68 für  $C_{10}H_{13}ClN_2O_2$   $[M+H]^+$ , gefunden: 228.85.

### Darstellung von *tert*-Butyl (2-chloro-3-formylpyridin-4-yl)carbamat **6**



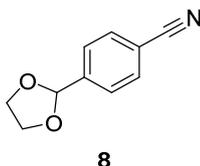
4 g *tert*-Butyl (2-Chloropyridin-4-yl)carbamat **5** (17,5 mmol, 1 eq.) wurden in THF gelöst und bei  $-78$  °C wurden 29,4 mL *tert*-Butyllithium-Lösung (50 mmol, 2,86 eq.) unter Argonatmosphäre langsam zugetropft. Nach zweistündigem Rühren wurden 10.8 ml DMF (139,9 mmol, 8 eq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht auf Raumtemperatur aufgewärmt und anschließend mit Methanol neutralisiert. Im Anschluss wurde mit DCM/Methanol extrahiert und mit Wasser/Bicarbonat gewaschen. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Endprodukt **6** (2,5 g, 9,7 mmol, 56 %) wurde durch eine säulenchromatographische Auftrennung (0-50 % Ethylacetat/Petrolether) erhalten.

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$  = 10.94 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 8.42 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 8.24 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 1.50 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 9H).

$^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 206.23, 167.17, 165.86, 163.01, 161.61, 125.04, 123.75, 94.27, 39.52 (3).

**LC-MS:** Berechnet: 257.69 für  $C_{11}H_{13}ClN_2O_3$   $[M+H]^+$ , gefunden: 256.87.

### Darstellung von 4-(1,3-Dioxolan-2-yl)benzonnitril **8**



10 g 4-Formylbenzonnitril **7** (76,3 mmol, 1 Eq.), 3,94 g *p*-TsOH (22,9 mmol, 0,3 eq.) und 17,2 mL Ethylenglycol (305 mmol, 4 eq.) wurden in Toluol gelöst. Die Reaktionslösung wurde unter Reflux über Nacht erhitzt und das entstandene Wasser mittels eines Wasserabscheiders abgetrennt. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat extrahiert und

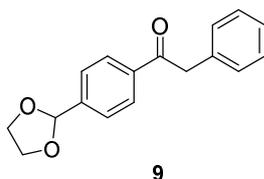
Wasser/Bicarbonat und einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die vereinigten organischen Fraktionen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der übrige flüssige Rückstand wurde gekühlt bis das Produkt kristallisierte. Das reine Produkt **8** (11.5 g, 65.6 mmol, 86 %) wurde durch eine Rekristallisation mit *n*-Hexan erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 7.88 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.63 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 5.83 (s, 1H), 4.09 – 3.92 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 143.41, 132.42 (2), 127.51 (2), 118.63, 111.86, 101.67, 65.06 (2).

**LC-MS:** Berechnet: 176.19 für  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 176.10.

#### Darstellung von 1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2-phenylethan-1-on **9**



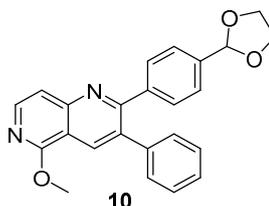
4 g 4-(1,3-Dioxolan-2-yl)benzonnitril **8** (22,8 mmol, 1 eq.) wurden in THF gelöst und bei 0 °C unter Argonatmosphäre wurden 40 mL Benzylmagnesiumchlorid-Lösung (79,9 mmol, 3,5 eq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei RT über Nacht gerührt und anschließend mit Ammoniumchlorid neutralisiert. Das Salz wurde abfiltriert und mit DCM gewaschen. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt und anschließend erfolgte eine Extraktion mit DCM. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Rohprodukt **9** (3,2 g, 13,2 mmol, 52 %) wurde durch eine säulenchromatographische Auftrennung (0-50 % Ethylacetat/Petrolether) erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 8.07 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.58 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.36 – 7.12 (m, 5H), 5.82 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 4.40 (s, 2H), 4.10 – 3.90 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 197.41, 143.04, 136.86, 135.02, 129.70 (2), 128.45 (2), 128.31, 126.84 (2), 126.50 (2), 102.04, 64.94 (2), 44.80.

**LC-MS:** Berechnet: 269.31 für  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 269.18.

**Darstellung von 2-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-5-methoxy-3-phenyl-1,6-naphthyridin 10**



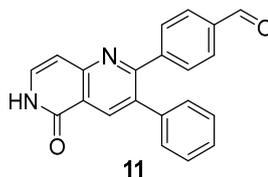
4 g *tert*-Butyl (2-chloro-3-formylpyridin-4-yl)carbamat **6** (15,6 mmol, 1 Eq.) und 4.3 g 1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2-phenylethan-1-on **9** (15,6 mmol, 1 Eq.) wurden in Methanol unter Argonatmosphäre gelöst. Anschließend wurden 35,8 mL Natriummethanolat-Lösung (35,8 mmol, 2.3 Eq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für vier Stunden bei 65 °C gerührt. Danach wurde das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt **10** (3,7 g, 9,7 mmol, 62 %) wurde durch eine chromatographische Auftrennung (0-20 % MeOH/DCM) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ = 8.42 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.45 – 7.20 (m, 9H), 5.71 (s, 1H), 4.14 – 3.81 (m, 7H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO) δ = 161.26, 160.64, 151.05, 143.94, 140.19, 138.89, 138.31, 134.87, 133.70, 129.73 (2), 129.47, 128.47 (2), 127.63, 126.11, 115.81 (2), 113.07, 102.44, 64.86 (2), 54.12.

LC-MS: Berechnet: 385.43 für C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 385.42.

**Darstellung von 4-(5-Oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzaldehyd 11**



3,7 g 2-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-5-methoxy-3-phenyl-1,6-naphthyridin **10** (9,6 mmol, 1 eq.) wurden in 60 mL konzentrierter Salzsäure gelöst und bei 90 °C für drei Stunden gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt und 40 %-ige Natriumhydroxid-Lösung bis zu einem pH > 7 hinzugegeben. Anschließend wurde der

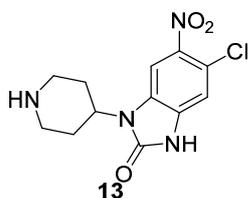
ausgefallene Feststoff abfiltriert und in DCM und Methanol aufgenommen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach dem Trocknen am Hochvakuum konnten 2,2 g des reinen Produktes **11** (6,8 mmol, 71 %) erhalten werden.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 10.02 (d,  $J$  = 19.5 Hz, 1H), 8.47 – 8.22 (m, 1H), 8.09 – 7.84 (m, 1H), 7.84 – 7.78 (m, 2H), 7.62 (t,  $J$  = 12.1 Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J$  = 22.7, 17.5 Hz, 2H), 7.38 – 7.09 (m, 5H), 6.66 (t,  $J$  = 8.5 Hz, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 192.48, 163.73, 158.93, 152.84, 145.28, 138.51 (2), 136.74, 135.09, 132.72, 130.15 (2), 129.12, 128.57 (2), 128.15, 127.90, 127.08 (2), 119.88, 104.61.

**LC-MS:** Berechnet: 327.35 für  $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 327.39.

### Darstellung von **5-Chlor-6-nitro-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-on 13**



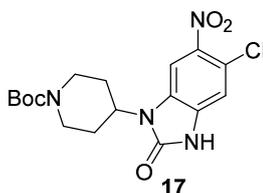
5 g 5-Chloro-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-on **12** (19,9 mmol, 1 eq.) wurden in 150 mL *p*-Cymol gelöst und auf 60 °C erhitzt. Anschließend wurden 15,8 mL konzentrierte Salpetersäure (238,4 mmol, 12 Eq.) durch einen Tropftrichter hinzugegeben und die Reaktionslösung für eine weitere Stunde gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und 7,1 g des Produktes **13** (23,9 mmol, 115 %) wurden durch die Rekristallisation in Methanol erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.76 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.33 – 7.18 (m, 1H), 4.68 – 4.46 (m, 1H), 3.19 – 2.97 (m, 4H), 1.90 (dd,  $J$  = 28.3, 12.6 Hz, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 153.87, 140.72, 133.13, 128.21, 119.38, 110.66, 106.14, 47.78, 43.14 (2), 25.29 (2).

**LC-MS:** Berechnet: 297.71 für  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 297.26.

**Darstellung von *tert*-Butyl 4-(5-chlor-6-nitro-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat **17****



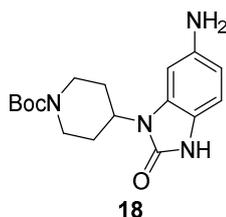
5-Chlor-6-nitro-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2*H*-benzo[*d*]imidazol-2-on **13** (6 g, 16,7 mmol, 1 eq.) wurde in DCM (80 mL) gelöst und TEA (6,87 mL, 18,3 mmol, 1,1 eq.) zugegeben und 10 min bei RT gerührt. Boc<sub>2</sub>O (3,91 mL, 18,3 mmol, 1,1 eq.) in 20 mL DCM zugegeben und die resultierende Lösung 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum reduziert und das resultierende Öl mit DCM und satter Bicarbonatlösung extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, eingedampft und über Kieselgelsäulenchromatographie (0-3 % MeOH/DCM) gereinigt. Das Produkt **17** wurde als gelber Feststoff erhalten (5,32 g, 13,4 mmol, 80 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ) 11.68 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 4.41 (tt, *J* = 12.2, 3.9 Hz, 1H), 4.08 (s, 2H), 2.86 (s, 2H), 2.18 (qd, *J* = 12.5, 4.4 Hz, 2H), 1.71 (dd, *J* = 11.9, 2.0 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ) 153.92, 153.85, 140.89, 132.74, 128.50, 118.80, 110.24, 106.09, 78.87, 50.73, 43.06, 28.26, 28.11.

HPLC-MS (*m/z*): Berechnet: 397.12 for C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 397.65.

**Darstellung von *tert*-Butyl 4-(6-amino-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat **18****



*tert*-Butyl-4-(5-chlor-6-nitro-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat **17** (4,2 g, 10,6 mmol, 1 eq.), 5 % Pd/C (0,34 g) und Ammoniumformiat (15,5 g, 245,8 mmol, 10 eq.) wurden in Methanol (60 mL) gelöst und über Nacht bei 80 °C

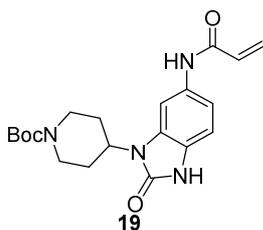
gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert, eingedampft und durch säulenchromatographische Auftrennung (0-5 % MeOH/DCM) gereinigt. Das Produkt **18** wurde als weißgelber Feststoff erhalten (3,3 g, 10,0 mmol, 93 %).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) 10.31 (s, 1H), 6.64 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.48 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 6.22 (dd,  $J = 8.2, 2.0$  Hz, 1H), 4.69 (s, 2H), 4.21 (tt,  $J = 12.3, 4.0$  Hz, 1H), 4.10 (s, 2H), 2.84 (s, 2H), 2.13 (qd,  $J = 12.6, 4.5$  Hz, 2H), 1.64 (d,  $J = 10.3$  Hz, 2H), 1.43 (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) 153.91, 153.83, 143.13, 129.92, 119.08, 109.16, 106.88, 95.60, 78.84, 49.62, 40.06, 28.62, 28.12.

**HPLC-MS (m/z):** Berechnet: 333.18 for  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 333.88.

#### Darstellung von *tert*-Butyl 4-(6-acrylamid-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat **19**



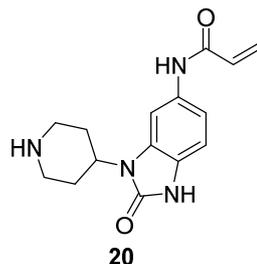
Zu *tert*-Butyl-4-(6-amino-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat **18** (3,5 g, 10,6 mmol, 1 eq.) in 50 mL dTHF/DCM (9:1) wurde DIPEA (3,6 mL, 21,2 mmol, 2 eq.) zugegeben und unter Eiskühlung gerührt. Acryloylchlorid (0,94 mL, 11,6 mmol, 1,1 eq.) in THF (5 mL) wurde langsam zugegeben und die Reaktion über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum reduziert, mit DCM und gesättigter Hydrogencarbonatlösung extrahiert, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, eingedampft und durch Kieselgelsäulenchromatographie (0-5 % MeOH/DCM) gereinigt. Das Produkt **19** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (3,0 g, 7,7 mmol, 73 %).

$^1\text{H NMR}$  (700 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) 10.81 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 7.71 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, 1H), 6.92 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.40 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.22 (dd,  $J = 16.9, 2.0$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.1, 2.0$  Hz, 1H), 4.28 (tt,  $J = 12.3, 4.0$  Hz, 1H), 4.11 (s, 2H), 2.88 (s,  $J = 76.4$  Hz, 2H), 2.15 (qd,  $J = 12.6, 4.5$  Hz, 2H), 1.70 (d,  $J = 10.3$  Hz, 2H), 1.44 (s, 9H).

$^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) 163.23, 154.43, 154.36, 133.07, 132.47, 129.44, 126.78, 124.97, 112.81, 109.18, 101.39, 79.40, 50.34, 40.50, 29.10, 28.57.

HPLC-MS (m/z): Berechnet: 387.20 for  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 387.58

**Darstellung von N-(2-Oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid 20**



tert-Butyl-4-(6-acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat **19** (3,2 g, 8,3 mmol, 1 eq.) wurde für anderthalb Stunden bei RT in 40 mL DCM/TFA (4:1) gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel und TFA im Vakuum reduziert und durch C18-Silikagel-Säulenchromatographie (10-30 % ACN/ H<sub>2</sub>O) gereinigt. Das resultierende Produkt **20** wurde lyophilisiert und kristallisierte als weißes TFA-Salz (3,1 g, 7,7 mmol, 92 %).

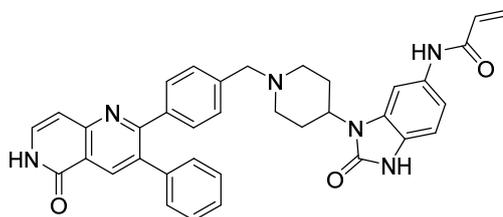
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) 10.89 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 8.79 – 8.49 (m, 2H), 7.85(d,  $J$  = 1.4 Hz, 1H), 7.00 (dd,  $J$  = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 6.95 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.45 (dd,  $J$  = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.25 (dd,  $J$  = 17.0, 2.0 Hz, 1H), 5.74 (dd,  $J$  = 10.1, 2.0 Hz, 1H), 4.43 (tt,  $J$  = 12.2, 3.9 Hz, 1H), 3.44 (d,  $J$  = 12.4 Hz, 2H), 3.13 (q,  $J$  = 12.7 Hz, 2H), 2.60 – 2.52 (m, 2H), 1.89 (d,  $J$  = 12.5 Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 162.87, 158.36, 153.97, 132.38, 131.96, 129.01, 126.38, 124.74, 115.72, 113.35, 108.85, 101.67, 47.53, 43.06, 25.66.  $^{19}\text{F}$  NMR (565 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -74.76.

HPLC-MS (m/z): Berechnet: 287.14 für  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 287.16.

**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-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid/**

**Borussertib 3**



**11** (500 mg, 1 mmol) und **20** (384 mg, 1 mmol) wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und ergab 450 mg des gewünschten Produkts **3** (1 mmol, 82 %).

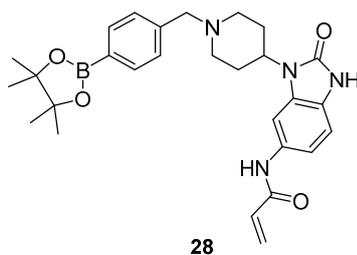
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOD-*d*4)  $\delta$  8.60 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.48 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.39 (dd,  $J = 26.4, 8.1$  Hz, 4H), 7.31–7.28 (m, 3H), 7.25 – 7.20 (m, 3H), 7.02 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 6.44 (dd,  $J = 16.9, 9.9$  Hz, 1H), 6.37 (dd,  $J = 16.9, 1.6$  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).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, MeOD-*d*4)  $\delta$  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: 597,2608 für C<sub>36</sub>H<sub>33</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>; gefunden, 597,2614.

**Derivatisierung von CAAI**

**Darstellung N-(2-oxo-3-(1-(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid 28**



1,0 g N-(2-Oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid **19** (3,5 mmol, 1,0 eq.) und 625 mg 4-Formylphenylboronsäure **27** (4,2 mmol, 1,2 eq.)

wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und es konnten 980 mg des reinen Produkts **28** erhalten werden (2.3 mmol, 66 %).

<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.94 (d, *J* = 12.80 Hz, 2H) 2.63 (d, *J* = 12.80 Hz, 2H) 3.22 (d, *J* = 11.40 Hz, 2H) 3.50 (d, *J* = 11.19 Hz, 2H) 4.34 (d, *J* = 3.98 Hz, 2H) 4.41 - 4.47 (m, 1H) 5.71 - 5.76 (m, 1H) 6.24 (dd, *J* = 17.05, 1.88 Hz, 1H) 6.44 (dd, *J* = 16.94, 10.16 Hz, 1H) 6.91 - 7.02 (m, 2H) 7.22 - 7.29 (m, 2H) 7.49 (d, *J* = 7.96 Hz, 1H) 7.70 - 7.78 (m, 2H) 7.89 (d, *J* = 7.96 Hz, 2H) 10.10 (s, 1H) 10.89 (s, 1H).

<sup>13</sup>C-NMR (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 26.23, 47.52, 51.08, 59.29, 62.92, 101.22, 108.58, 113.34, 124.69, 125.37, 128.89, 130.32, 131.13, 132.29, 133.97, 134.50, 140.08, 144.39, 153.81, 162.87.

**HPLC-MS (ESI):** Berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>BN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+H<sup>+</sup>]: 421,28; gefunden: 421,27.

### Darstellung von 2-Brompyridin-3-yltrifluormethansulfonat **33**



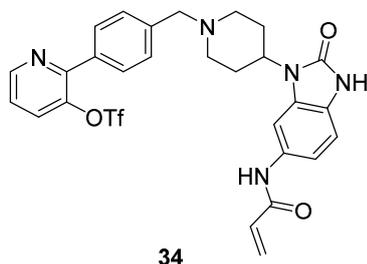
1 g 2-Bromo-3-Pyridinol **32** (5,7 mmol, 1 eq.) wurde in 20 mL dDCM gelöst und unter Argonatmosphäre bei 0 °C wurden 890 µL TEA (6,3 mmol, 1,1 eq.) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von 1,2 mL Triflatanhydrid (6,9 mmol, 1,2 eq.). Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionsmischung für 16 Stunden bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der leicht gelbliche Feststoff **33** (1,7 g, 5,5 mmol, 96 % Ausbeute) konnte per säulenchromatographischer Auftrennung erhalten werden (0-20 % PE/EtOAc).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 7.90 (s, 1 H) 8.60 (s, 1 H) 8.89 (s, 1 H).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 119.75, 126.38, 142.90, 148.72, 153.47, 163.36.

**HPLC-MS (ESI):** berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>BrF<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>S [M+H<sup>+</sup>]:307,05; gefunden: 307,03.

**Darstellung von 2-(4-((4-(6-Acrylamid-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)pyridin-3-yltrifluormethansulfonat**



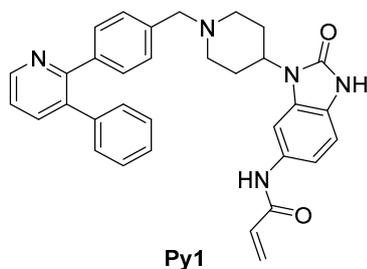
913 mg 2-Bromopyridin-3-yltrifluormethansulfonat **33** (1.0 mmol, 3 eq.) und 500 mg N-(2-oxo-3-(1-(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid **28** (1,0 mmol, 1,0 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F verwendet und ergaben die finale Substanz als Feststoff **34** (263 mg, 0,4 mmol, 44 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (700 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 1.77 (d, 2 H), 2.25 (t, 2 H), 2.53 - 2.62 (m, 2 H), 3.12 (d, 2 H), 3.57 (s, 2 H), 4.28 (s, 1 H), 5.83 (dd, 1 H), 6.33 - 6.37 (m, 1 H), 6.45 - 6.53 (m, 1 H), 7.23 (dd, 2 H), 7.29 - 7.36 (m, 4 H), 7.54 (dd, 1 H), 7.77 (d, 1 H), 7.92 (dd, 1 H), 8.65 (dd, 1 H), 8.93 (s, 1 H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (176 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 29.82, 52.40, 54.17, 63.35, 104.24, 110.53, 115.66, 117.56, 124.13, 129.55, 130.44, 130.68, 130.85, 131.15, 132.63, 133.84, 138.47, 140.52, 140.66, 140.95, 148.95, 156.78, 158.45, 166.24.

**HRMS (ESI):** berechnet für C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S [M+H<sup>+</sup>]: 601,60; gefunden: 601,55.

**Darstellung von N-(2-oxo-3-(1-(4-(3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid Py1**



25 mg Phenylboronsäure (0,07 mmol, 1,0 eq.) und 29,4 mg (2-(4-((4-(6-Acrylamid-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)pyridin-3-

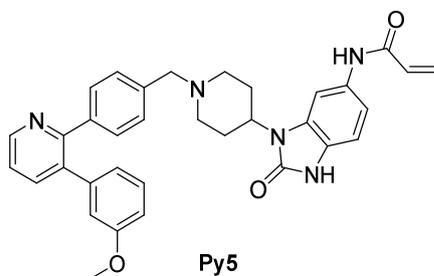
yltrifluormethansulfonat **34** (0,07 mmol, 1,0 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F verwendet und ergaben die finale Substanz Py1 als Feststoff (17,0 mg, 0,03 mmol, 45 %).

<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 1.79 (d, *J* = 10.00 Hz, 2 H) 2.26 (t, *J* = 11.45 Hz, 2 H) 2.50 - 2.59 (m, 2 H) 3.09 (d, *J* = 11.83 Hz, 2 H) 3.64 (s, 2 H) 4.30 (s, 1 H) 5.80 (dd, *J* = 10.00, 1.72 Hz, 1 H) 6.35 - 6.41 (m, 1 H) 6.43 - 6.50 (m, 1 H) 7.04 (d, *J* = 8.39 Hz, 1 H) 7.19 (dd, *J* = 6.67, 2.90 Hz, 2 H) 7.25 - 7.37 (m, 8 H) 7.52 (dd, *J* = 7.74, 4.95 Hz, 1 H) 7.74 (d, *J* = 1.72 Hz, 1 H) 7.90 (dd, *J* = 7.74, 1.72 Hz, 1 H) 8.62 (dd, *J* = 4.89, 1.67 Hz, 1 H).

<sup>13</sup>C-NMR (176 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 29.82, 52.40, 54.17, 63.35, 104.24, 110.53, 115.66, 124.13, 126.78, 127.71, 128.67, 129.55, 130.44, 130.68, 130.85, 131.15, 132.63, 133.84, 138.47, 140.52, 140.66, 140.95, 148.95, 156.78, 158.45, 166.24.

HRMS (ESI): berechnet für C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 530.2550; gefunden: 530.2557.

#### Darstellung von N-(3-(1-(4-(3-(3-methoxyphenyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid Py5



11 mg 3-Methoxybenzolboronsäure (0,1 mmol, 1,0 eq.) und 30 mg (2-(4-((4-(6-Acrylamid-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)pyridin-3-yltrifluormethansulfonat **34** (0,1 mmol, 1,0 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F verwendet und ergaben die finale Substanz **Py5** als Feststoff (10 mg, 0,1 mmol, 40 %).

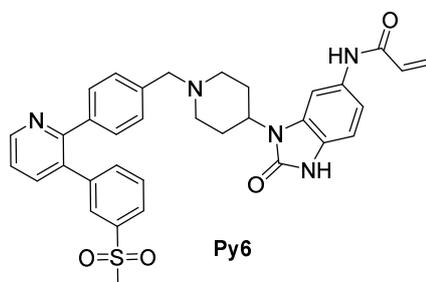
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ 10.79 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H), 10.06 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H), 8.65 (dt, *J* = 16.0, 8.0 Hz, 1H), 7.83 (dt, *J* = 24.8, 12.4 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.45 (dt, *J* = 14.8, 7.4 Hz, 1H), 7.32 – 7.19 (m, 7H), 6.90 (t, *J* = 10.3 Hz, 1H), 6.86 – 6.82 (m, 1H), 6.76 (dd, *J* = 10.2, 8.8 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J* = 7.1, 4.9 Hz, 1H), 6.40 (dt, *J* = 19.2, 9.6 Hz, 1H), 6.27 – 6.22 (m, 1H), 5.73 (dt, *J* = 18.0, 9.0 Hz, 1H), 3.59 (d, *J* = 4.7 Hz, 3H), 3.53

(s, 2H), 2.94 (d,  $J = 10.8$  Hz, 2H), 2.33 – 2.25 (m, 2H), 2.08 (dd,  $J = 13.3, 9.4$  Hz, 2H), 1.63 (t,  $J = 18.1$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  162.77, 158.99, 156.20, 154.00, 148.29, 140.83, 138.82, 138.31, 137.76, 135.25, 132.59, 132.01, 129.41, 128.99, 128.32, 126.35, 124.55, 122.37, 121.57, 114.92, 113.08, 112.12, 108.57, 100.95, 61.56, 54.84, 52.57, 50.14, 28.68.

LCMS: berechnet für  $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_3$  ( $[\text{M}+\text{H}^+]$ ), 560.67; gefunden: 560.68.

**Darstellung von N-(3-(1-(4-(3-(3-(methylsulfonyl)phenyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid Py6**



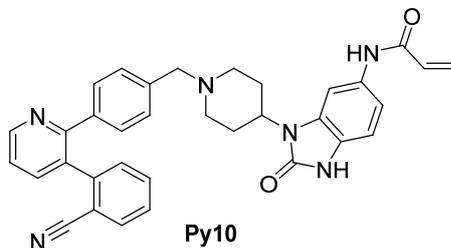
15 mg 3-(Methylsulfonyl)phenylboronsäure (0,1 mmol, 1,0 eq.) und 30 mg (2-(4-((4-(6-Acrylamid-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)pyridin-3-yl)trifluormethansulfonat **34** (0,1 mmol, 1,0 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F verwendet und ergaben die finale Substanz **Py6** als Feststoff (13 mg, 0,1 mmol, 40 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.80 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.77 – 8.68 (m, 1H), 7.95 (dt,  $J = 16.0, 8.0$  Hz, 1H), 7.82 (tt,  $J = 17.2, 8.8$  Hz, 1H), 7.71 – 7.66 (m, 1H), 7.65 – 7.59 (m, 3H), 7.56 – 7.50 (m, 1H), 7.32 – 7.19 (m, 6H), 6.92 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.40 (dt,  $J = 25.2, 12.6$  Hz, 1H), 6.27 – 6.19 (m, 1H), 5.72 (dt,  $J = 37.6, 18.8$  Hz, 1H), 3.51 (s, 2H), 3.04 (d,  $J = 9.5$  Hz, 3H), 2.94 (d,  $J = 11.0$  Hz, 2H), 2.33 – 2.25 (m, 2H), 2.06 (t,  $J = 11.3$  Hz, 2H), 1.64 (d,  $J = 10.2$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  163.25, 156.94, 154.47, 149.55, 141.25, 141.01, 139.06, 138.71, 134.85, 134.23, 133.03, 132.50, 130.15, 129.47, 128.95, 128.40, 126.83, 126.14, 124.92, 123.13, 112.60, 109.11, 101.38, 62.03, 53.08, 50.62, 43.84, 29.15, 25.13.

LCMS: berechnet für  $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$  ( $[\text{M}+\text{H}^+]$ ), 608.73; gefunden: 608.75.

**Darstellung von N-(3-(1-(4-(3-(2-cyanophenyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid Py10**



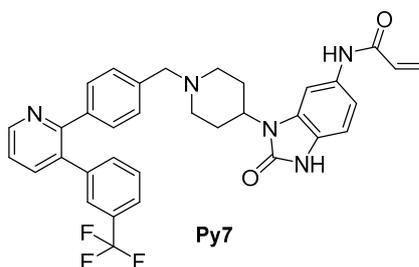
23 mg 2-Cyanophenylboronsäure (0,1 mmol, 2,0 eq.) und 30 mg (2-(4-((4-(6-Acrylamid-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)pyridin-3-yl)trifluormethansulfonat **34** (0,1 mmol, 1,0 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F verwendet und ergaben die finale Substanz **Py10** als Feststoff (9 mg, 0,1 mmol, 33 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.85 – 10.75 (m, 1H), 10.13 – 10.04 (m, 1H), 8.78 (dt,  $J = 17.4, 8.7$  Hz, 1H), 7.89 (ddd,  $J = 17.5, 7.8, 1.6$  Hz, 1H), 7.85 – 7.78 (m, 1H), 7.75 – 7.66 (m, 2H), 7.58 – 7.51 (m, 2H), 7.48 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.41 – 7.17 (m, 6H), 6.95 – 6.89 (m, 1H), 6.47 – 6.38 (m, 1H), 6.28 – 6.20 (m, 1H), 5.74 (dt,  $J = 22.6, 11.2$  Hz, 1H), 3.63 – 3.49 (m, 2H), 2.97 (dd,  $J = 56.0, 10.1$  Hz, 2H), 2.31 (dd,  $J = 24.9, 12.3$  Hz, 2H), 2.07 (t,  $J = 11.7$  Hz, 2H), 1.65 (d,  $J = 10.9$  Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  163.24, 157.07, 154.53, 150.19, 149.96, 143.80, 139.36, 138.70, 138.41, 137.68, 133.67, 133.52, 133.11, 132.68, 132.51, 131.68, 129.93, 129.46, 128.98, 128.66, 126.83, 124.92, 122.68, 120.58, 118.19, 112.59, 112.29, 109.11, 101.37, 61.88, 53.07, 50.58, 29.13.

**LCMS:** berechnet für  $C_{34}H_{30}N_6O_2$  ( $[M+H]^+$ ), 555.65; gefunden: 555.62.

**Darstellung von N-(3-(1-(4-(3-(2-cyanophenyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid Py7**



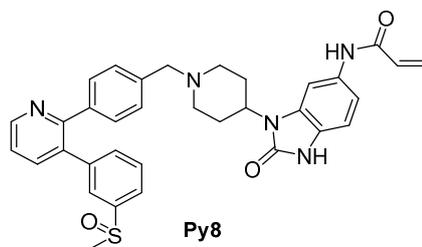
14 mg 3-(Trifluormethyl)phenylboronsäure (0,1 mmol, 2,0 eq.) und 30 mg (2-(4-((4-(6-Acrylamid-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)-phenyl)pyridin-3-yltrifluormethansulfonat **34** (0,1 mmol, 1,0 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F verwendet und ergaben die finale Substanz **Py7** als Feststoff (14 mg, 0,1 mmol, 49 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ 10.98 – 10.85 (m, 1H), 10.08 (d, 1H), 9.74 (d, 1H), 8.74 (t, 1H), 7.95 (dd, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.64 (d, 1H), 7.62 – 7.47 (m, 4H), 7.39 (dt, 5H), 6.93 (d, 2H), 6.43 (dt, 1H), 6.23 (t, 1H), 5.73 (t, 1H), 4.34 (s, 3H), 3.21 (d, 2H), 2.63 (d, 2H), 1.95 (d, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ 163.33, 158.47, 156.35, 154.43, 149.47, 141.48, 140.68, 139.18, 134.61, 134.04, 132.89, 132.38, 131.34, 130.60, 130.11, 129.47, 126.92, 125.12, 123.55, 113.78, 109.35, 101.83, 59.31, 51.49, 48.02, 26.32.

LCMS: berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 598.64; gefunden: 598.64.

**Darstellung von N-(3-(1-(4-(3-(3-(methylsulfinyl)phenyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid Py8**



14 mg 3-Methylsulfinylphenylboronsäure (0,1 mmol, 2,0 eq.) und 30 mg (2-(4-((4-(6-Acrylamid-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)-phenyl)pyridin-3-yltrifluormethansulfonat **34** (0,1 mmol, 1,0 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F verwendet und ergaben die finale Substanz **Py8** als Feststoff (13 mg, 0,1 mmol, 43 %).

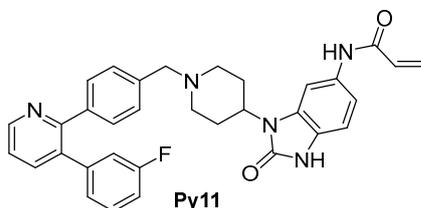
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ 10.81 (s, 1H), 10.13 – 10.04 (m, 1H), 8.69 (dd, 1H), 8.15 (t, 1H), 8.04 – 7.91 (m, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.54 (d, 4H), 7.37 – 7.22 (m, 5H), 6.93 (d, 1H), 6.47 – 6.38 (m, 1H), 6.30 – 6.21 (m, 1H), 5.78 – 5.71 (m, 1H), 4.06 (d, 1H), 3.55 (d, 3H),

3.08 – 2.87 (m, 2H), 2.69 – 2.55 (m, 3H), 2.44 – 2.00 (m, 2H), 1.61 (d, 2H), 1.30 – 1.12 (m, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  163.26, 156.86, 154.47, 149.24, 146.98, 138.95, 133.08, 132.48, 131.95, 129.95, 129.46, 126.83, 125.03, 112.60, 109.04, 101.34, 62.01, 53.16, 50.59, 43.65, 29.15.

LCMS: berechnet für  $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$  ( $[\text{M}+\text{H}^+]$ ), 592.73; gefunden: 592.70.

**Darstellung von N-(3-(1-(4-(3-(3-Fluorphenyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid Py11**



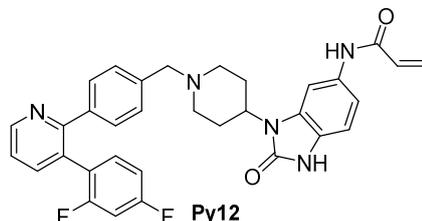
11 mg 3-Fluorophenylboronsäure (0,1 mmol, 2,0 eq.) und 30 mg (2-(4-((4-(6-Acrylamid-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)-phenyl)pyridin-3-yl)trifluormethansulfonat **34** (0,1 mmol, 1,0 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F verwendet und ergaben die finale Substanz **Py11** als Feststoff (14 mg, 0,1 mmol, 47 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.81 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.68 (dt,  $J = 30.7, 15.3$  Hz, 1H), 7.87 (dd,  $J = 11.2, 4.5$  Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.58 – 7.52 (m, 1H), 7.52 – 7.46 (m, 2H), 7.39 – 7.34 (m, 1H), 7.28 (d,  $J = 7.9$  Hz, 4H), 7.13 (tt,  $J = 11.9, 5.9$  Hz, 1H), 7.02 (t,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.41 (dt,  $J = 21.0, 10.5$  Hz, 1H), 6.30 – 6.21 (m, 1H), 5.73 (dt,  $J = 21.7, 10.8$  Hz, 1H), 3.61 – 3.46 (m, 2H), 2.92 (t,  $J = 23.9$  Hz, 2H), 2.31 (d,  $J = 11.1$  Hz, 2H), 2.07 (t,  $J = 23.5$  Hz, 2H), 1.65 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  163.32, 161.54, 156.71, 154.47, 149.14, 142.45, 138.99, 134.65, 133.11, 132.51, 131.10, 130.78, 130.00, 129.45, 128.82, 126.80, 126.02, 124.96, 122.91, 116.67, 114.54, 112.58, 108.93, 101.36, 62.00, 53.07, 50.61, 29.13.

LCMS: berechnet für  $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{FN}_5\text{O}_2$  ( $[\text{M}+\text{H}^+]$ ), 548.63; gefunden: 548.61.

**Darstellung von N-(3-(1-(4-(3-(2,4-Difluorphenyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid Py12**



12 mg 2,4-Difluorphenylboronsäure (0,1 mmol, 2,0 eq.) und 30 mg (2-(4-((4-(6-Acrylamid-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)-phenyl)pyridin-3-yltrifluormethansulfonat **34** (0,1 mmol, 1,0 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F verwendet und ergaben die finale Substanz **Py12** als Feststoff (14 mg, 0,1 mmol, 49 %).

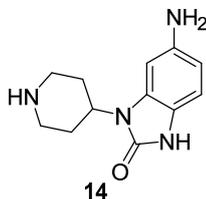
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ 10.80 (s, 1H), 10.06 (d, *J* = 25.5 Hz, 1H), 8.72 (dt, *J* = 18.7, 9.3 Hz, 1H), 7.87 – 7.80 (m, 1H), 7.72 – 7.67 (m, 1H), 7.52 – 7.46 (m, 1H), 7.41 (td, *J* = 8.6, 6.8 Hz, 1H), 7.31 – 7.24 (m, 6H), 7.22 – 7.18 (m, 1H), 7.13 (tt, *J* = 8.8, 4.3 Hz, 1H), 6.91 (t, *J* = 13.7 Hz, 1H), 6.41 (dt, *J* = 36.2, 18.1 Hz, 1H), 6.28 – 6.21 (m, 1H), 5.73 (dt, *J* = 20.6, 10.3 Hz, 1H), 3.53 (d, *J* = 10.4 Hz, 2H), 2.93 (t, *J* = 15.4 Hz, 2H), 2.35 – 2.25 (m, 2H), 2.09 (t, *J* = 11.3 Hz, 2H), 1.65 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ 163.22, 157.43, 154.43, 149.73, 139.72, 138.97, 138.61, 133.12, 132.59, 129.45, 129.19, 128.97, 128.74, 126.81, 124.95, 122.69, 112.58, 109.10, 104.59, 101.37, 61.95, 53.11, 50.60, 29.13.

**LCMS:** berechnet für C<sub>33</sub>H<sub>29</sub>F<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 565.62; gefunden: 565.60.

## Synthese der molekularen Sonden

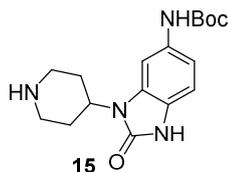
### Darstellung von 6-Amino-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-on **14**



5.9 g 5-Chlor-6-nitro-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo-[d]imidazol-2-on **13** (19,9 mmol, 1 eq.) wurden in 100 mL Methanol gelöst und 0,4 g Palladium auf Aktivkohle hinzugegeben. Nach Erhitzen der Reaktionslösung auf 80 °C wurden 12,5 g Ammoniumformiat (198,8 mmol, 10 Eq.) hinzugegeben. Nach Rühren über Nacht bei 80 °C wurde die Reaktionslösung abgekühlt und mit Celite filtriert. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt **14** wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

LC-MS: Berechnet: 233.29 für C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 233.26.

### Darstellung von *tert*-Butyl (2-oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)carbamat **15**



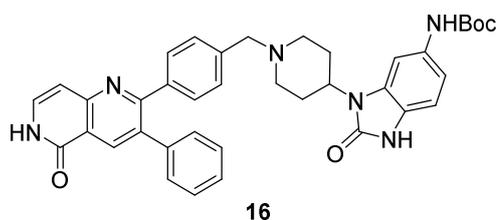
4,6 g 6-Amino-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-on **14** (19,8 mmol, 1 Eq.) wurden in 80 mL 10 %iger Essigsäure gelöst und 6,5 g Di-*tert*-butyldicarbonat (29,7 mmol, 1,5 Eq.), gelöst in 20 mL Dioxan, wurden bei 0°C langsam hinzugegeben. Die Reaktionslösung rührte bei RT über Nacht und anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und 5 M Natriumhydroxid-Lösung hinzugegeben bis der pH-Wert > 7 war. Die Lösung wurde anschließend mit Ethylacetat und DCM extrahiert und die vereinigten organischen Fraktionen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach dem Entfernen der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und einer säulenchromatographischen Auftrennung (0-20 % MeOH/DCM), konnten 5,2 g des Produktes **15** (10,5 mmol, 78 % über zwei Reaktionsschritte) erhalten werden.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 10.60 (d,  $J$  = 116.7 Hz, 1H), 9.07 (d,  $J$  = 79.1 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 6.99 – 6.93 (m, 1H), 6.84 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 5.76 (s, 2H), 3.21 – 2.99 (m, 2H), 2.61 (dd,  $J$  = 12.0, 10.7 Hz, 2H), 2.25 – 2.10 (m, 2H), 1.59 (t,  $J$  = 11.3 Hz, 19H), 1.48 – 1.43 (m, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 153.98, 153.01, 133.13, 133.00, 129.12, 123.50, 108.52, 78.64, 54.92, 50.31, 45.65 (2), 29.73 (2), 28.21 (3).

**LC-MS:** Berechnet: 333.40 für C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 333.13.

**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-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)carbamat 16**



1,4 g 4-(5-Oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzaldehyd (4,3 mmol, 1 Eq.) und 1,4 g *tert*-Butyl (2-oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo-*[d]*imidazol-5-yl)carbamate (4,7 mmol, 1.1 Eq.) wurden in 40 mL Acetonitril gelöst und 647  $\mu$ L Methansäure (17,2 mmol, 4 Eq.) zu der Reaktionslösung hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und 1,5 g des Produktes (1,9 mmol, 53 %) durch eine säulenchromatographische Auftrennung (0-20 % MeOH/DCM) erhalten.

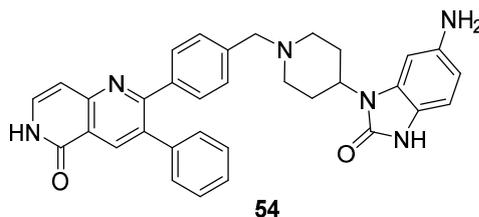
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.57 (t,  $J$  = 19.4 Hz, 1H), 10.69 (s, 1H), 9.10 (d,  $J$  = 95.6 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.54 – 7.42 (m, 1H), 7.33 (dt,  $J$  = 13.0, 7.8 Hz, 5H), 7.30 – 7.21 (m, 4H), 7.09 – 6.95 (m, 1H), 6.84 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.69 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 4.17 – 4.03 (m, 1H), 3.55 (s, 2H), 3.24 – 3.10 (m, 1H), 2.89 (t,  $J$  = 35.8 Hz, 2H), 2.38 – 2.23 (m, 2H), 2.10 (t,  $J$  = 11.3 Hz, 2H), 1.61 (t,  $J$  = 15.6 Hz, 2H), 1.47 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 171.43, 162.00, 161.19, 154.00, 152.96, 152.93, 138.99, 138.15, 136.80, 133.72, 133.50, 133.10, 129.67, 129.38 (4), 129.03, 128.43,

128.16 (2), 127.47 (2), 123.43, 120.24, 108.54, 105.93, 78.70, 61.27, 52.53 (2), 49.26, 48.12, 28.20 (2), 22.51 (3).

**LC-MS:** Berechnet: 643.76 für  $C_{38}H_{38}N_6O_4$   $[M+H]^+$ , gefunden: 643.29.

**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 **54****



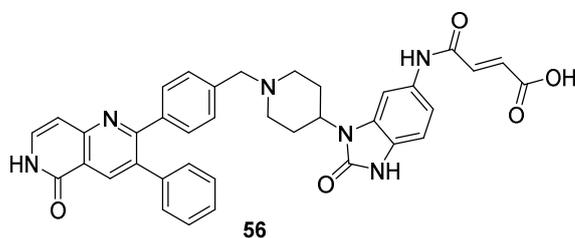
600 mg *tert*-Butyl (2-oxo-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)carbamat **16** (0,8 mmol) wurden in 10 mL einer 4 M Salzsäure-Lösung in Dioxan gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit Bicarbonat und DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über  $Na_2SO_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Durch eine säulenchromatographische Auftrennung (0-20 % MeOH/DCM+1 %  $NH_3$ ) konnten 420 mg (0,7 mmol, 83 %) des Produktes **54** erhalten werden.

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.54 (t,  $J$  = 40.0 Hz, 1H), 10.30 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.56 – 7.42 (m, 1H), 7.31 (dd,  $J$  = 18.3, 11.6, 9.1 Hz, 5H), 7.28 – 7.20 (m, 4H), 6.69 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 6.63 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 6.55 (d,  $J$  = 1.3 Hz, 1H), 6.21 (dt,  $J$  = 30.5, 15.2 Hz, 1H), 4.74 (s, 2H), 4.16 – 3.92 (m, 1H), 3.52 (s, 2H), 2.92 (d,  $J$  = 11.2 Hz, 2H), 2.29 (qt,  $J$  = 19.9, 10.0 Hz, 2H), 2.06 (t,  $J$  = 11.3 Hz, 2H), 1.60 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 2H).

$^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 162.00, 161.19, 153.95, 152.92, 143.12, 139.04, 138.17, 136.81, 133.72, 133.50, 129.89, 129.66, 129.38 (4), 128.43, 128.24 (2), 127.48 (2), 120.24, 119.07, 109.10, 106.74, 105.92, 95.85, 61.53, 52.71 (2), 49.78, 28.65 (2).

**LC-MS:** Berechnet: 543.64 für  $C_{33}H_{30}N_6O_2$   $[M+H]^+$ , gefunden: 543.50.

**Darstellung von (E)-4-oxo-4-((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)amino)but-2-enolsäure **56****



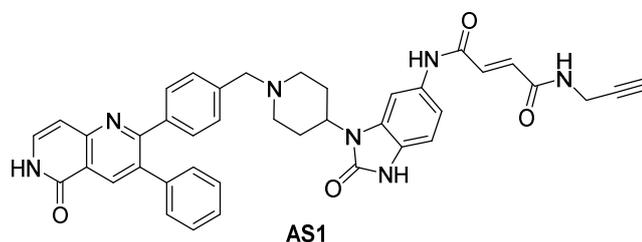
250 mg 2-(4-((4-(6-Amino-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-3-phenyl-1,6-naphthyridin-5(6H)-on **54** (0,5 mmol, 1 Eq.) wurden in 4 mL THF gelöst und anschließend 241  $\mu$ L DIPEA (1,4 mmol, 3 Eq.) unter Argonatmosphäre hinzugegeben. Bei 0 °C wurden 52  $\mu$ L Fumarylchlorid (0,5 mmol, 1 Eq.) gelöst in 1 mL THF langsam zu der Reaktionslösung zugetropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und danach Methanol hinzugegeben. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt und durch eine säulenchromatographische Auftrennung (0-100% ACN/H<sub>2</sub>O) konnten 201 mg (0,34 mmol, 68 %) des Produktes **56** erhalten werden.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.63 (t,  $J$  = 19.4 Hz, 1H), 11.05 – 10.87 (m, 1H), 10.46 (d,  $J$  = 29.4 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.52 (dd,  $J$  = 13.5, 6.7 Hz, 1H), 7.50 – 7.45 (m, 4H), 7.34 (dd,  $J$  = 5.0, 1.5 Hz, 3H), 7.29 – 7.25 (m, 2H), 7.17 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.97 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 1H), 6.70 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 6.65 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H), 4.37 (dd,  $J$  = 26.0, 8.1 Hz, 3H), 3.97 (s, 1H), 3.47 (d,  $J$  = 10.7 Hz, 2H), 2.69 – 2.58 (m, 2H), 2.03 – 1.91 (m, 2H), 1.36 – 1.11 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 166.64, 162.23, 161.51, 160.79, 158.30, 153.17, 141.08, 138.92, 137.53, 137.23, 134.10, 134.00, 132.29, 131.19, 130.62, 130.46, 129.73 (4), 128.74, 127.75 (2), 125.13 (2), 120.76, 117.12, 115.23, 109.12, 106.08, 101.29, 58.96, 51.35 (2), 47.77, 26.10 (2).

**HRMS:** Berechnet: 641.2434 für C<sub>37</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 641.2521.

**Darstellung von  $N^1$ -(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)- $N^4$ -(prop-2-yn-1-yl)fumaramid AS1**



100 mg (*E*)-4-oxo-4-((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)amino)but-2-enolsäure **56** (0,2 mmol, 1 Eq.) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift A mit 14  $\mu$ L 1-Amino-2-propyne umgesetzt. Abweichend hierzu wurden sechs statt drei Äquivalente von DIPEA verwendet. Die chromatographische Aufreinigung führte zu 35 mg (0,1 mmol, 33 %) der finalen Verbindung **AS1**.

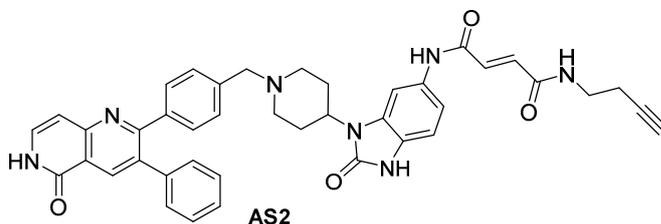
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.64 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 1H), 10.92 (s, 1H), 10.42 (s, 1H), 9.76 (d,  $J$  = 28.1 Hz, 1H), 8.98 – 8.92 (m, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.52 (t,  $J$  = 10.5, 5.3 Hz, 1H), 7.49 – 7.45 (m, 4H), 7.35 – 7.31 (m, 3H), 7.26 (dd,  $J$  = 7.1, 2.2 Hz, 2H), 7.09 (d,  $J$  = 15.1 Hz, 1H), 6.96 (dd,  $J$  = 16.2, 7.9 Hz, 2H), 6.69 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 4.40 – 4.35 (m, 1H), 4.34 (d,  $J$  = 3.2 Hz, 2H), 4.01 (dd,  $J$  = 5.3, 2.4 Hz, 2H), 3.46 (d,  $J$  = 10.7 Hz, 2H), 3.21 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 1H), 3.19 (dd,  $J$  = 11.3, 8.9 Hz, 2H), 2.69 – 2.58 (m, 2H), 1.98 (t,  $J$  = 16.6 Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 163.33, 161.95, 161.74, 160.58, 153.97, 152.93, 140.86, 138.67, 136.94, 133.82, 133.75, 132.63, 132.21, 130.91, 130.17 (4), 129.71, 129.48, 129.14 (2), 128.50 (2), 127.63, 124.93, 120.54, 113.34, 108.94, 105.80, 101.14, 80.58, 73.52, 58.90 (2), 51.08, 47.65, 28.14 (2), 25.91.

**LC-MS:** Berechnet: 678.28 für  $\text{C}_{40}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 678.44.

**HRMS:** Berechnet: 678.2751 für  $\text{C}_{40}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 678.2839.

**Darstellung von *N*<sup>1</sup>-(but-3-yn-1-yl)-*N*<sup>4</sup>-(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)fumaramid AS2**



100 mg (*E*)-4-oxo-4-((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)amino)but-2-enolsäure **56** (0,2 mmol, 1 Eq.) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift A mit 14  $\mu$ L 1-Amino-3-butyne (0,2 mmol, 1 Eq.) umgesetzt. Abweichend hierzu wurden sechs statt drei Äquivalente von DIPEA verwendet. Die chromatographische Aufreinigung führte zu 39 mg (0,1 mmol, 37 %) des finalen Produktes **AS2**.

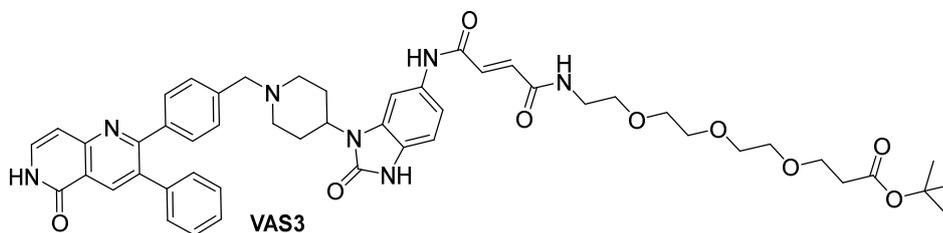
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.60 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 10.87 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H), 10.41 (s, 1H), 8.70 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.53 – 7.47 (m, 1H), 7.33 (m, 5H), 7.29 – 7.21 (m, 4H), 7.06 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.93 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.11 (dd, *J* = 14.2, 10.2 Hz, 1H), 3.54 (s, 2H), 3.30 (dd, *J* = 13.0, 6.6 Hz, 2H), 2.92 (t, *J* = 15.0 Hz, 2H), 2.87 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 2.36 (m, 2H), 2.29 (dd, *J* = 21.5, 11.9 Hz, 2H), 2.08 (t, *J* = 11.3 Hz, 2H), 1.65 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 163.75, 162.04, 161.78, 161.25, 154.01, 152.96, 139.05, 138.81, 138.25, 136.85, 133.76, 133.57, 133.40, 133.06, 132.52, 129.72 (4), 129.43, 129.02, 128.49 (2), 128.37 (2), 127.54, 124.78, 120.28, 112.11, 105.96, 100.79, 82.17, 72.34, 61.53, 52.64 (2), 50.16, 38.08, 28.69 (2), 18.61.

**LC-MS:** Berechnet: 692.29 für C<sub>41</sub>H<sub>37</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 692.53.

**HRMS:** Berechnet: 692.2907 für C<sub>41</sub>H<sub>37</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 692.2995.

**Darstellung von tert-butyl (E)-14,17-dioxo-17-((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)amino)-4,7,10-trioxa-13-azaheptadec-15-enoate VAS3**



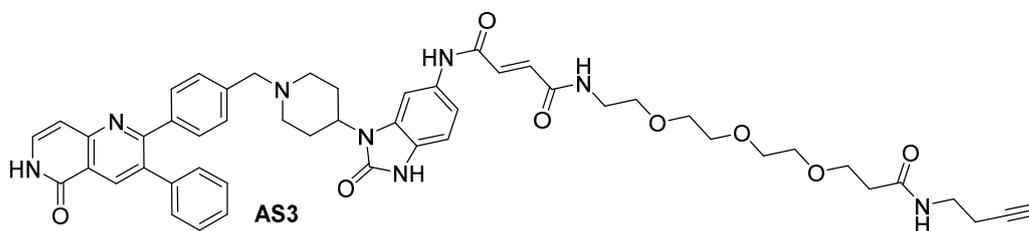
(E)-4-oxo-4-((2-oxo-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]-imidazol-5-yl)amino)but-2-enolsäure **56** (100 mg, 0.16 mmol, 1 eq.) wurden mit HATU (77 mg, 0.2 mmol, 1.3Eq.) und EDC HCl (45 mg, 0.2 mmol, 1.5 eq.) in 3mL eines THF/DMF-Gemisches (2:1 (v/v)) gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von DIPEA (55  $\mu$ L, 0.3 mmol, 2Eq.). tert-butyl 3-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (52 mg, 0.2 mmol, 1.2 eq.) wurde in 2mL THF gelöst und der Reaktionslösung zugetropft. Anschließend wurde für vier Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in einer Bicarbonat-Lösung aufgenommen. Es erfolgte die Extraktion mit DCM + 10% MeOH. Daraufhin wurden die organischen Phasen vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Durch eine säulenchromatographische Aufreinigung (0-20% MeOH/DCM + 1% NH<sub>3</sub>) konnte das Produkt (128 mg, 0.1 mmol, 91 %) als gelblicher Feststoff erhalten werden.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.62 (s, 1H), 10.90 (d, J = 35.4 Hz, 1H), 10.42 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.51 (s, 3H), 7.42 – 7.20 (m, 8H), 6.99 (t, J = 20.7 Hz, 3H), 3.73 – 3.54 (m, 5H), 3.50 (d, J = 15.7 Hz, 10H), 3.20 – 3.05 (m, 2H), 2.40 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.02 (d, J = 65.6 Hz, 2H), 1.66 (s, 5H), 1.37 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 187.68, 170.45, 128.53, 123.68, 120.24, 107.18, 79.74, 69.75, 68.94, 66.25, 53.38, 39.52, 27.76, 18.01, 16.73.

**LC-MS:** Berechnet: 900.42 für C<sub>50</sub>H<sub>57</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 900.38.

**Darstellung von N1-(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)-N4-(12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azaheptadec-16-yn-1-yl)fumaramide AS3**



tert-butyl (E)-14,17-dioxo-17-((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)4,7,10-trioxa-13-azaheptadec-15-enoat (120 mg, 0.1 mmol, 1 eq.) wurden in 5mL eines HCl/Dioxan-Gemisches (4 M) gelöst. Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der verbliebene Rückstand (120 mg, 0.14 mmol, 1 eq.) wurde mit EDC · HCl (41mg 0.2 mmol, 1.5 eq.) sowie HATU (70 mg, 0.2 mmol, 1.3 eq.) in 6mL eines THF/DMF-Gemisches (2:1(v/v)) umgesetzt. Nachdem die Feststoffe vollständig gelöst waren erfolgte die Zugabe von DIPEA (149 µL, 0.9 mmol, 6Eq.). 1-Amino-3-Butyn (14 µL, 0.2 mmol, 1.2Eq.) in 100 µL THF gelöst und dem Reaktionsansatz langsam zugetropft. Die Lösung wurde für vier Stunden bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel durch einleiten eines Luftstroms über Nacht verdampft. Nachdem der Rückstand in einer gesättigten Bicarbonat-Lösung resuspendiert wurde, erfolgte die Extraktion mit DCM (3x). Daraufhin wurden die organischen Phasen vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Durch eine säulenchromatographische Aufreinigung (0-20% MeOH/DCM + 1% NH<sub>3</sub>) konnte das Produkt **AS3** (20 mg, 22 µmol, 16% (über zwei Reaktionsschritte)) als gelblicher Feststoff gewonnen werden.

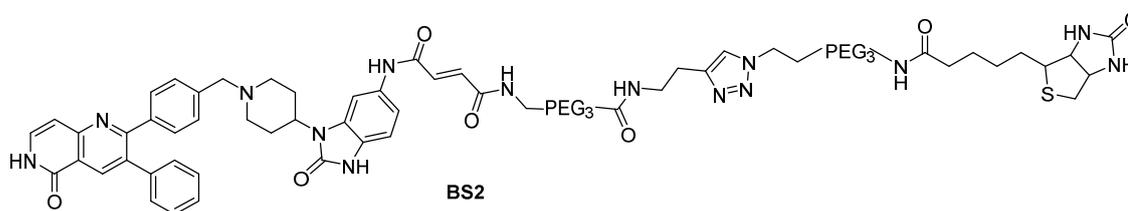
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) = 11.58 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 10.83 (s, 1H), 10.39 (s, 1H), 8.58 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.00 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.54 – 7.45 (m, 1H), 7.39 – 7.20 (m, 10H), 6.97 (dt, J = 12.5, 11.7 Hz, 3H), 3.65 – 3.42 (m, 18H), 3.14 (dd, J = 12.9, 7.0 Hz, 2H), 2.94 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 2.80 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 2.38 – 2.18 (m, 7H), 1.66 (d, J = 8.6 Hz, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) = 170.16, 163.73, 161.99, 161.83, 156.40, 153.99, 152.92, 136.80, 133.74, 133.51, 133.25, 132.50, 129.39, 128.43, 127.50, 124.75, 120.29, 105.92, 82.26, 72.03, 69.72, 69.68, 69.63, 69.53, 68.91, 66.73, 37.71, 36.04, 18.73.

**LC-MS:** berechnet: 895.41 für  $C_{50}H_{54}N_8O_8$   $[M+H]^+$ , gefunden: 895.28.

**LC-HRMS:** berechnet: 896.4137 für  $C_{50}H_{54}N_8O_8$   $[M+H]^+$ , gefunden: 895.4144.

**Darstellung von N1-(12-oxo-15-(1-(13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-13-azapentadecyl)-N4-(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)fumaramide BS2**



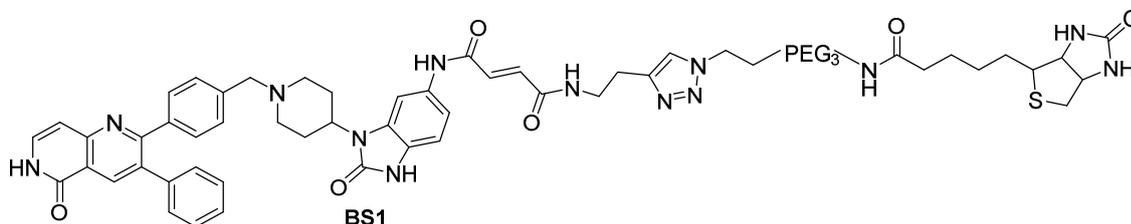
N1-(2-oxo-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-N4-(12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azaheptadec-16-yn-1-yl)fumaramid **56** (12 mg, 13  $\mu$ mol, 1 eq.) wurde mit N-[2[2[2(2-Azidoethoxy)ethoxy]-ethoxy]ethyl]hexahydro-2-oxo(3a*S*,4*S*,6a*R*)1H-thieno[3,4-d]imidazole-4-pentanamide (6.6 mg, 15  $\mu$ mol, 1.1 eq.) in 5 mL eines  $H_2O/DMF$ -Gemisches (3:2 (v/v)) gelöst. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  (6.7 mg, 27  $\mu$ mol, 2 Eq.) und Natriumascorbat (8 mg, 40  $\mu$ mol, 3 Eq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 30 °C erwärmt und für 20 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck eingeengt. Das Produkt **BS2** (16 mg, 12  $\mu$ mol, 89 %) wurde durch säulenchromatographische Aufreinigung (RP, 10-100% Acetonitril/ $H_2O$ ) als gelblicher Feststoff erhalten.

**$^1H$ -NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.64 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 10.92 (s, 1H), 10.39 (s, 1H), 9.79 (s, 1H), 8.61 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.96 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 7.83 (d,  $J$  = 11.1 Hz, 3H), 7.56 – 7.42 (m, 7H), 7.28 (dt,  $J$  = 6.6, 4.2 Hz, 7H), 6.97 (dd,  $J$  = 15.9, 9.9 Hz, 3H), 4.46 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 3H), 3.57 – 3.40 (m, 37H), 3.29 (dd,  $J$  = 13.3, 7.2 Hz, 3H), 2.85 – 2.70 (m, 3H), 2.67 – 2.54 (m, 3H), 2.30 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 2.05 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H), 1.97 (d,  $J$  = 11.2 Hz, 2H), 1.65 – 1.55 (m, 1H), 1.35 – 1.23 (m, 2H).

**LC-MS:** berechnet: 1339.62 für  $C_{68}H_{86}N_{14}O_{13}S$   $[M+H]^+$ , gefunden: 1340.47.

**LC-HRMS:** berechnet: 1340.6292 für  $C_{68}H_{86}N_{14}O_{13}S$   $[M+H]^+$ , gefunden: 1339.6320.

**Darstellung von N1-(2-(1-(13-oxo-17-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)-N4-(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)fumaramide BS1**



N1-(but-3-yn-1-yl)-N4-(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)fumaramid (20 mg, 29  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurden mit Kupfersulfatpentahydrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) (0.1 mg, 0.6  $\mu\text{mol}$ , 0.02Eq.), Natriumascorbat (0.6 mg, 3  $\mu\text{mol}$ , 0.1 Eq.) und Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin) (TBTA) (1.5 mg, 3  $\mu\text{mol}$ , 0.1 Eq.) in 2mL eines Gemisches aus Butanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1 (v/v) gelöst. Weiterhin wurde N-[2-[2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethyl]hexahydro-2-oxo-(3aS,4S,6aR)-1H-thieno[3,4-d]imidazole-4-pentanamide (14.1 mg, 32  $\mu\text{mol}$ , 1.1Eq.) in 1mL des BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$ -Gemisches gelöst und dem Reaktionsansatz zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde für 20 Stunden bei 40 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung (RP, 10-100% Acetonitril/ $\text{H}_2\text{O}$ ) konnte das Produkt **BS1** (6 mg, 5.5  $\mu\text{mol}$ , 18 %) als hellbräunlicher Feststoff erhalten werden.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, MeOD)  $\delta$  = 11.51 (s, 1H), 10.80 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.88 (d,  $J$  = 35.4 Hz, 2H), 7.51 (dd,  $J$  = 19.7, 7.6 Hz, 4H), 7.23 (dd,  $J$  = 16.0, 12.7 Hz, 5H), 7.00 (dt,  $J$  = 14.8, 10.3 Hz, 3H), 4.55–4.49 (m, 2H), 4.35 (d,  $J$  = 13.1 Hz, 2H), 3.67–3.50 (m, 15H), 3.27 (s, 17H), 2.88 (ddd,  $J$  = 19.6, 18.1, 13.2 Hz, 3H), 2.68–2.60 (m, 2H), 2.14 (ddd,  $J$  = 32.4, 19.9, 10.4 Hz, 4H), 1.60 (qdd,  $J$  = 28.8, 17.7, 5.9 Hz, 6H).

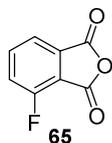
$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, MeOD)  $\delta$  = 162.77, 151.03, 144.19, 139.93, 139.09, 136.55, 134.24, 132.19, 132.16, 132.05, 130.89, 129.69, 128.99, 115.55, 112.31, 110.78, 107.92, 103.16, 71.65, 71.62, 71.50, 71.26, 71.14, 70.58, 70.55, 70.38, 63.37, 63.35, 61.63, 57.02, 51.76, 41.05, 40.36, 40.33, 36.72, 29.76, 29.75, 29.49, 26.86.

**LC-MS:** berechnet: 1136.51 für  $\text{C}_{59}\text{H}_{69}\text{N}_{13}\text{O}_9\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 1136.38.

**LC-HRMS:** berechnet: 1137.5134 für  $\text{C}_{59}\text{H}_{69}\text{N}_{13}\text{O}_9\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 1136.5152.

## Synthese von PROTACs

### Darstellung von 4-Fluorisobenzofuran-1,3-dion **65**



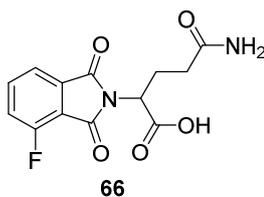
Eine Mischung von 4 g 3-Fluorphthalsäure **64** (21,7 mmol, 1,0 eq.) in 32 mL Essigsäureanhydrid wurde 2 h lang refluxiert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand wurde in Essigsäureanhydrid kristallisiert, um das Produkt **65** als braunen Feststoff zu erhalten.<sup>[114d]</sup>

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO):  $\delta$  7.85 (t, 1H), 7,94 (d, 1H), 8,02-8,08 (m, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO):  $\delta$  158,69, 156,07, 139,34, 133,60, 123,71, 123,52, 121,86, 118,20.

LC-MS: berechnet: 167.11 für C<sub>8</sub>H<sub>3</sub>FO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 167.22.

### Darstellung von 5-Amino-2-(4-fluor-1,3-dioxoisindolin-2-yl)-5-oxopentanoic acid **66**



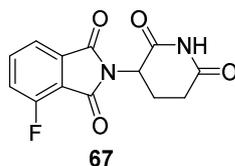
Ein Gemisch aus 3,6 g 4-Fluor-1,3-dihydro-2-benzofuran-1,3-dion **65** (21,7 mmol, 1,0 eq.) und 3,2 g L-Glutamin (21,7 mmol, 1,0 eq.) in trockenem DMF (18 mL) wurde bei 90 °C für 8 h. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 4 M HCl (200 mL) gelöst und rührte für weitere 8 h. Der so entstandene Niederschlag wurde filtriert, mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet, um das Produkt als leicht weißen Feststoff zu erhalten.<sup>[114d]</sup>

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  2.13-2.20 (t, 2H), 2.21-2.36 (m, 2H), 4.74-4.78 (m, 1H), 6.73 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.73 (t, 1H), 7.78 (m, 1H), 8.95 (m, 1H), 13.30 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO):  $\delta$  173, 15, 170,27, 164,20, 157,55, 156,06, 137,96, 133,50, 122,96, 119,98, 51,46, 31,34, 23,87.

**LC-MS:** berechnet 295,24 für C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 295,32.

### Darstellung von 2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-4-fluoroisindolin-1,3-dion **67**



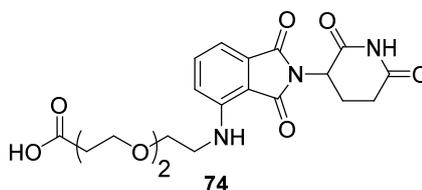
Ein Gemisch aus 4 g 5-Amino-2-(4-fluor-1,3-dioxoisindolin-2-yl)-5-oxopentanoic acid **66** (13,6 mmol, 1 eq.), 2,6 g 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) (16,3 mmol, 1,2 eq.) und 166 mg 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) (1,4 mmol, 0,1 eq.) in 10 mL Acetonitril wurde 5 h refluxiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt. Der resultierende Feststoff wurde durch Filtration gesammelt und mit Acetonitril (100 mL) gewaschen, um das Rohprodukt **67**, das durch Kieselgelchromatographie mit 1-10% MeOH in DCM als Eluent gereinigt wurde, und als hellgelber Feststoff (1,2 g, 4,3 mmol, 30 %) erhalten wurde.<sup>[114d]</sup>

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO):  $\delta$  2.04-2.09 (m, 1H), 2.54 (dd, 1H), 2,62 (dt, 1H), 2.87-2.92 (m, 1H), 5.14-5.18 (m, 1H), 7.73 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.95 (m, 1H), 11.15 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (125 MHz, DMSO):  $\delta$  172,17, 166,09, 163,95, 157,54, 156,05, 138,06, 133,44, 122,93, 120,03, 117,14, 49,08, 30,89, 21,83.

**LC-MS:** berechnet 277,22 für C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 277,31.

### Darstellung von 3-((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy-ethoxy)propanoic acid **74**



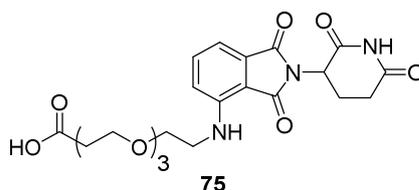
200 mg 2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-4-fluorisoindolin-1,3-dion **67** (0,7 mmol, 1,0 eq) und 169 mg tert-Butyl-3-(2-aminoethoxy-ethoxy-ethoxy)propanoat **68** (0,7 mmol, 1,0 eq) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B verwendet und ergab das Produkt **74** als blassgelben Feststoff (81 mg, 0,2 mmol, 26 %).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO):  $\delta$  12.24 (s, 1H), 7.75 (t, 1H), 7.58 (d, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.02 (t, 1H), 6.97 (t, 1H), 5.67 – 5.55 (m, 1H), 3.91 – 3.80 (m, 7H), 3.76 (t, 2H), 3.37 – 3.25 (m, 3H), 2.99 – 2.87 (m, 1H), 2.81 (s, 1H), 2.75 – 2.66 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, DMSO):  $\delta$  196,22, 180,77, 174,35, 171,13, 168,08, 167,11, 155,89, 147,73, 136,03, 131,66, 118,48, 111,52, 108,93, 77,56, 69,88, 49,16, 42,15, 28,98.

LC-MS: berechnet 434,42 für  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 434,45.

**Darstellung von 3-(2-((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy-ethoxy-ethoxy)propanoicssäure **75****



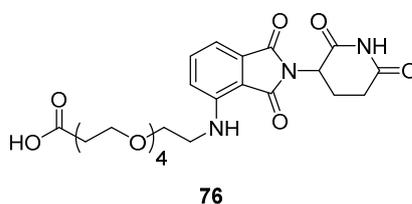
50 mg 2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-4-fluorisoindolin-1,3-dion **67** (0,2 mmol, 1,0 eq) und 50 mg tert-Butyl-3-(2-aminoethoxy-ethoxy-ethoxy-ethoxy)propanoat **69** (0,2 mmol, 1,0 eq) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B verwendet und ergab das Produkt **75** als blassgelben Feststoff (21 mg, 0,1 mmol, 35 %).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO):  $\delta$  12.30 (s, 1H), 7.87 (t, 1H), 7.63 (d, 1H), 7.41 (d, 1H), 7.13 (t, 1H), 7.02 (t, 1H), 5.77 – 5.69 (m, 1H), 4.02 – 3.95 (m, 11H), 3.79 (t, 2H), 3.51 – 3.37 (m, 3H), 3.01 – 2.93 (m, 1H), 2.87 (s, 1H), 2.81 – 2.74 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, DMSO):  $\delta$  195,89, 181,22, 174,15, 171,21, 167,96, 166,98, 155,63, 147,56, 135,87, 131,73, 118,52, 111,34, 108,73, 77,48, 69,71, 49,02, 41,96, 29,22.

LC-MS: berechnet 478,47 für  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_9$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 478,43.

**Darstellung von 3-(2-((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy-ethoxy-ethoxy)propanoicssäure **76****



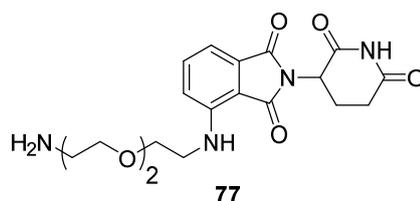
150 mg 2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-4-fluorisoindolin-1,3-dion **67** (0,5 mmol, 1,0 eq) und 175 mg tert-Butyl-3-(2-aminoethoxy-ethoxy-ethoxy-ethoxy-ethoxy)propanoat **70** (0,5 mmol, 1,0 eq) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B verwendet und ergab das Produkt **76** als blaugelben Feststoff (90 mg, 0,2 mmol, 29 %).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO):  $\delta$  12.03 (s, 1H), 7.68 (t, 1H), 7.42 (d, 1H), 7.29 (d, 1H), 6.97 (t, 1H), 6.78 (t, 1H), 5.63 – 5.54 (m, 1H), 3.93 – 3.79 (m, 15H), 3.68 (t, 2H), 3.42 – 3.32 (m, 3H), 2.96 – 2.89 (m, 1H), 2.75 (s, 1H), 2.69 – 2.57 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, DMSO):  $\delta$  195,37, 180,89, 174,32, 170,92, 168,24, 166,79, 155,32, 147,26, 135,64, 131,58, 118,17, 110,68, 108,85, 77,08, 69,55, 48,99, 42,13, 29,34.

LC-MS: berechnet 522,52 für  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_{10}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 522,50.

### Darstellung von 4-((2-(2-Aminoethoxy-ethoxy)ethyl)amino)-2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)isoindolin-1,3-dion **77**



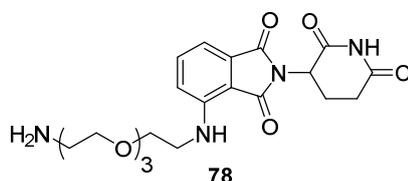
200 mg 2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-4-fluorisoindolin-1,3-dion **67** (0,7 mmol, 1,0 eq) und 180 mg tert-Butyl-(2-(2-aminoethoxy-ethoxy)-ethyl)-carbammat **71** (0,7 mmol, 1,0 eq) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B und lieferte das Produkt **77** als hellgelben Feststoff (78 mg, 0,2 mmol, 27 %).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO):  $\delta$  11.24 (d, 1H), 7.45 (dt, 1H), 7.06 (d, 1H), 6.97 (d, 1H), 6.69 (t, 1H), 6.59 (t, 1H), 5.08 – 4.95 (m, 1H), 3.53 – 3.33 (m, 8H), 3.25 (t, 2H), 3.03 – 2.94 (m, 3H), 2.83 – 2.76 (m, 1H), 2.58 – 2.51 (m, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, DMSO):  $\delta$  197,94, 173,27, 170,45, 169,24, 167,89, 156,15, 146,54, 137,01, 132,46, 118,08, 111,00, 109,56, 77,97, 70,06, 48,96, 41,95, 29,01.

LC-MS: berechnet 405,42 für  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 405,39.

### Darstellung von 4-((2-(2-Aminoethoxy-ethoxy-ethoxy)ethyl)amino)-2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)isoindolin-1,3-dion **78**



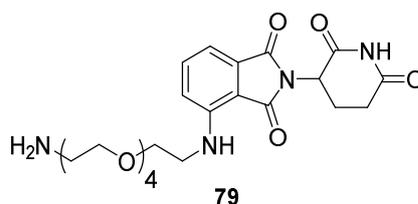
61 mg 2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-4-fluorisoindolin-1,3-dion **67** (0,2 mmol, 1,0 eq) und 65 mg tert-Butyl-(2-(2-aminoethoxy-ethoxy-ethoxy)-ethyl)-carbamate **72** (0,2 mmol, 1,0 eq) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B und lieferte das Produkt **78** als hellgelben Feststoff (30 mg, 0,1 mmol, 32 %).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO):  $\delta$  11.13 (d, 1H), 7.58 (dt, 1H), 7.15 (d, 1H), 7.04 (d, 1H), 6.75 (t, 1H), 6.61 (t, 1H), 5.18 – 5.03 (m, 1H), 3.64 – 3.41 (m, 12H), 3.35 (t, 2H), 3.07 – 3.01 (m, 3H), 2.93 – 2.84 (m, 1H), 2.66 – 2.51 (m, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, DMSO):  $\delta$  198,13, 173,30, 170,65, 169,43, 167,77, 156,04, 146,85, 136,71, 132,56, 117,94, 111,14, 109,72, 78,05, 70,33, 69,96, 49,06, 42,08, 28,69.

LC-MS: berechnet 449,48 für  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 449,52.

#### Darstellung von 4-((2-(2-Aminoethoxy-ethoxy-ethoxy-ethoxy)ethyl)amino)-2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)isoindolin-1,3-dion **79**



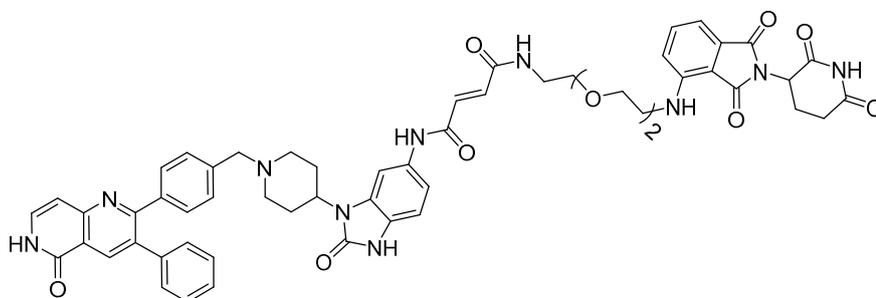
150 mg 2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-4-fluorisoindolin-1,3-dion **67** (0,5 mmol, 1,0 eq) und 183 mg tert-Butyl-(2-(2-aminoethoxy-ethoxy-ethoxy-ethoxy)-ethyl)-carbamate **73** (0,5 mmol, 1,0 eq) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B und lieferte das Produkt **79** als hellgelben Feststoff (82 mg, 0,2 mmol, 31 %).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO):  $\delta$  10.88 (d, 1H), 7.27 (t, 1H), 6.99 (d, 1H), 6.84 (d, 1H), 6.76 (t, 1H), 6.49 (t, 1H), 5.09 – 4.99 (m, 1H), 3.59 – 3.42 (m, 16H), 3.27 (t, 2H), 2.98 – 2.91 (m, 3H), 2.88 – 2.79 (m, 1H), 2.54 – 2.41 (m, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz, DMSO):  $\delta$  197,13, 172,88, 169,79, 168,73, 167,12, 155,84, 146,38, 136,44, 132,09, 117,58, 110,85, 109,53, 77,76, 70,02, 69,58, 48,81, 41,75, 28,69.

LC-MS: berechnet 493,53 für  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 493,49.

**Darstellung von N1-(2-(2-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy-ethoxy)ethyl)-N4-(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)fumaramid AAP1**



**AAP1**

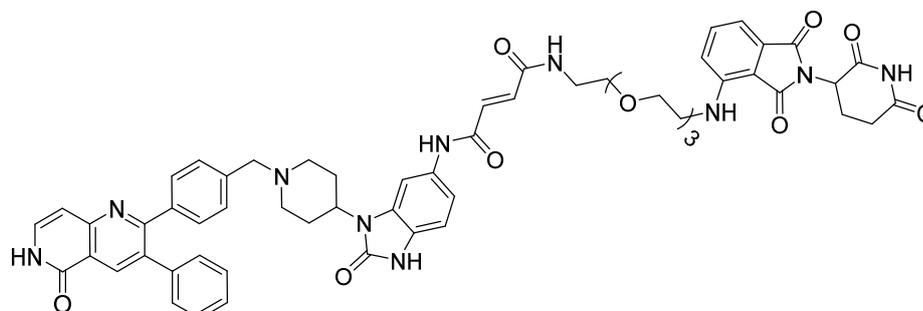
38 mg (E)-4-Oxo-4-((2-oxo-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)amino)but-2-enoic-säure **56** (0,06 mmol, 1 eq.) und 24 mg 4-((2-(2-Aminoethoxy-ethoxy)ethyl)amino)-2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)isoindolin-1,3-dion **77** (0,06 mmol, 1 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift C verwendet und ergab das Produkt **AAP1** als blassgelben Feststoff (36 mg, 0,04 mmol, 60 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.22 – 11.15 (m, 1H), 10.36 (d, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.49 – 7.41 (m, 6H), 7.31 (dd, 3H), 7.25 – 7.21 (m, 2H), 7.16 (m, 2H), 7.03 (m, 3H), 6.68 (m, 3H), 6.57 (t, 1H), 5.03 – 4.92 (m, 1H), 4.32 (m, 3H), 3.77 (s, 1H), 3.57 – 3.32 (m, 10H), 3.18 (t, 2H), 3.04 – 2.98 (m, 3H), 2.65 – 2.57 (m, 4H), 1.99 – 1.87 (m, 2H), 1.16 – 1.08 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 197,84, 173,15, 170,11, 169,35, 168,02, 166,66, 162,15, 161,41, 160,89, 158,40, 156,15, 153,20, 146,57, 141,01, 138,99, 137,57, 137,35, 134,09, 134,02, 132,25, 131,11, 130,62, 130,11, 129,73, 128,64, 127,75, 125,13, 120,56, 118,08, 117,12, 115,23, 111,00, 109,12, 106,08, 101,29, 77,97, 70,06, 58,96, 51,35, 48,96, 47,77, 41,95, 29,01, 26,10.

**LCMS:** Berechnet: 1028.11 für C<sub>56</sub>H<sub>54</sub>N<sub>10</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 1028.08.

**Darstellung von N1-(2-(2-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy-ethoxy-ethoxy)ethyl)-N4-(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)fumaramid AAP2**



**AAP2**

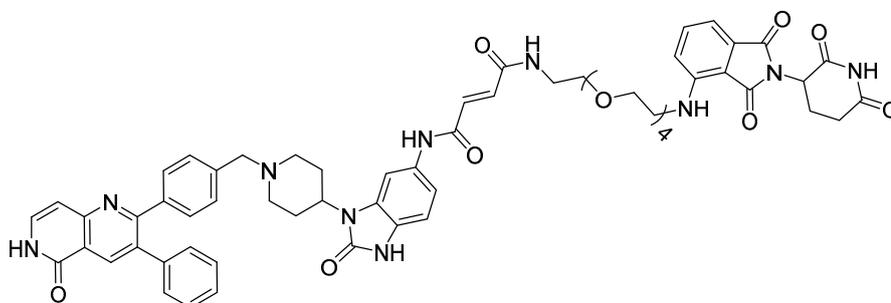
20 mg (E)-4-Oxo-4-((2-oxo-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)amino)but-2-enoisäure **56** (0.03 mmol, 1 eq.) und 14 mg 4-((2-(2-Aminoethoxy-ethoxy-ethoxy)ethyl)amino)-2-(2, 6-Dioxopiperidin-3-yl)isindolin-1,3-dion **78** (0.03 mmol, 1 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift C verwendet und ergab das Produkt **AAP2** als blassgelben Feststoff (15 mg, 0,02 mmol, 46 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.18 – 11.11 (m, 1H), 10.28 (d, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.47 – 7.39 (m, 6H), 7.29 (dd, 3H), 7.23 – 7.15 (m, 2H), 7.10 (m, 5H), 6.64 (m, 3H), 6.53 (t, 1H), 5.07 – 4.98 (m, 1H), 4.25 (m, 3H), 3.67 (s, 1H), 3.53 – 3.29 (m, 14H), 3.15 (t, 2H), 3.06 – 3.00 (m, 3H), 2.67 – 2.55 (m, 4H), 1.97 – 1.89 (m, 2H), 1.13 – 1.06 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 198,02, 173,55, 170,42, 169,64, 168,34, 166,75, 162,08, 161,21, 160,98, 158,30, 155,25, 153,20, 148,57, 142,05, 139,88, 137,45, 137,22, 134,05, 132,17, 131,61, 130,93, 130,56, 129,85, 128,66, 127,45, 126,88, 125,73, 120,43, 119,07, 116,79, 115,23, 112,22, 108,84, 106,23, 101,17, 78,57, 69,04, 58,76, 52,35, 49,87, 48,54, 47,54, 42,06, 29,21, 26,76.

**LCMS:** Berechnet: 1072.16 für C<sub>58</sub>H<sub>58</sub>N<sub>10</sub>O<sub>11</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 1072.10.

**Darstellung von N1-(2-(2-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy-ethoxy-ethoxy-ethoxy)ethyl)-N4-(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)fumaramid AAP3**



AAP3

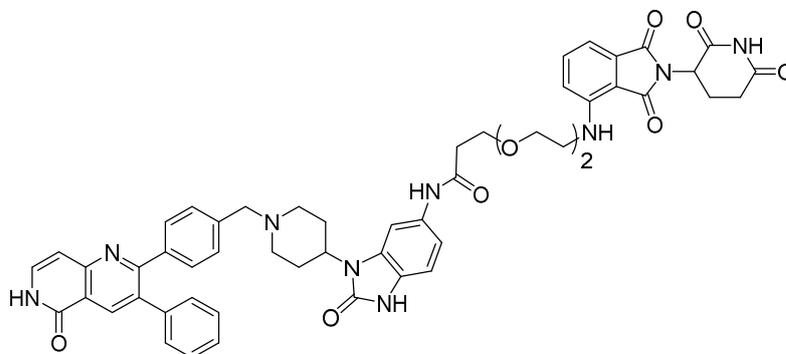
38 mg (E)-4-Oxo-4-((2-oxo-3-(1-(4-(5-oxo-3-phenyl-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)amino)but-2-enoic acid **56** (0,6 mmol, 1 eq.) und 29 mg 4-((2-(2-Aminoethoxy-ethoxy-ethoxy-ethoxy)ethyl)amino)-2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)isoindolin-1,3-dione **79** (0,6 mmol, 1 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesvorschrift C verwendet und ergab das Produkt **AAP3** als blassgelben Feststoff (22 mg, 0,2 mmol, 34 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.25 – 11.18 (m, 1H), 10.39 (d, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.51 – 7.44 (m, 6H), 7.33 (dd, 3H), 7.27 – 7.22 (m, 2H), 7.15 (m, 2H), 7.04 (m, 3H), 6.78 (m, 3H), 6.55 (t, 1H), 5.11 – 4.99 (m, 1H), 4.45 (m, 3H), 3.89 (s, 1H), 3.59 – 3.30 (m, 18H), 3.25 (t, 2H), 3.06 – 3.01 (m, 3H), 2.66 – 2.55 (m, 4H), 2.05 – 1.93 (m, 2H), 1.18 – 1.10 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  = 197,48, 173,51, 170,17, 169,45, 168,06, 167,62, 162,05, 161,31, 160,53, 158,92, 155,79, 153,14, 146,38, 141,21, 138,99, 137,85, 137,25, 135,25, 134,29, 134,27, 132,28, 131,15, 130,09, 130,01, 129,53, 128,44, 127,55, 125,03, 120,26, 118,18, 117,00, 115,15, 111,27, 109,54, 106,61, 101,23, 77,78, 70,46, 58,75, 51,37, 49,33, 48,69, 47,43, 42,43, 30,21, 27,25.

**LCMS:** Berechnet: 1116.21 für C<sub>60</sub>H<sub>62</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 1116.23.

**Darstellung von 3-(2-((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy-ethoxy)-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-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)propanamid AAP4**



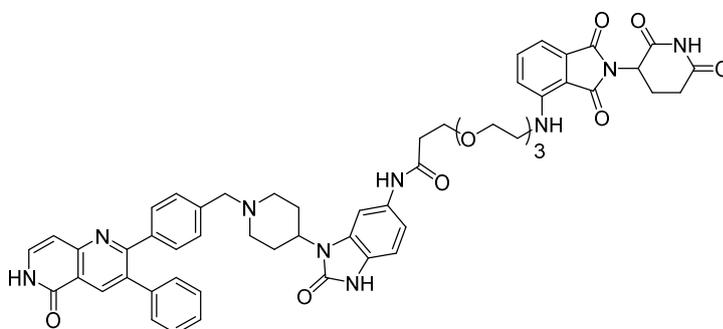
**AAP4**

15 mg 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 **54** (0,03 mmol, 1 eq.) und 16 mg 3-(2-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-Dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy-ethoxy)propansäure **74** (0,03 mmol, 1 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das Produkt **AAP4** als hellgelben Feststoff (10 mg, 0,01 mmol, 40 %).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.47 (t, 1H), 10.32 (s, 1H), 7.78 (t, 1H), 7.58 – 7.46 (m, 2H), 7.35 (m, 5H), 7.28 – 7.21 (m, 5H), 7.05 (m, 2H), 6.96 (d, 1H), 6.67 (d, 1H), 6.53 (d, 1H), 6.23 (dt, 1H), 5.62 – 5.58 (m, 1H), 4.70 (s, 2H), 3.98 – 3.81 (m, 8H), 3.68 (t, 2H), 3.47 (s, 2H), 3.39 – 3.28 (m, 4H), 3.03 – 2.92 (m, 3H), 2.86 (s, 1H), 2.79 – 2.71 (m, 2H), 2.49 (t, 3H), 2.31 (t, 2H), 1.72 (d, 2H).

**LC-MS:** Berechnet: 958.04 für C<sub>53</sub>H<sub>51</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 958.03.

**Darstellung von 3-(2-((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy-ethoxy-ethoxy)-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-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)propanamid AAP5**



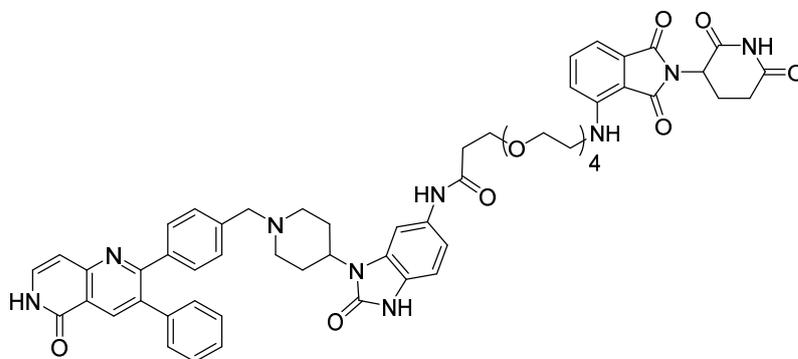
AAP5

15 mg 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 **54** (0,03 mmol, 1 eq.) und 17 mg 3-(2-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1, 3-Dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy-ethoxy-ethoxy)propansäure **75** (0,03 mmol, 1 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das Produkt **AAP5** als hellgelben Feststoff (9 mg, 0,1 mmol, 35 %).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.54 (t, 1H), 10.34 (s, 1H), 7.79 (t, 1H), 7.55 – 7.41 (m, 2H), 7.31 (m, 5H), 7.25 – 7.18 (m, 5H), 7.00 (m, 3H), 6.78 (d, 1H), 6.63 (d, 1H), 6.18 (dt, 1H), 5.65 (m, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.04 – 3.82 (m, 12H), 3.75 (t, 2H), 3.52 (s, 2H), 3.43 – 3.35 (m, 4H), 3.04 – 2.96 (m, 3H), 2.89 (s, 1H), 2.83 – 2.77 (m, 2H), 2.43 (t, 3H), 2.32 (t, 2H), 1.83 (d, 2H).

**LC-MS:** Berechnet: 1003.10 für  $\text{C}_{55}\text{H}_{55}\text{N}_9\text{O}_{10}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 1003.13.

**Darstellung von 3-(2-((2-(2,6-Dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy-ethoxy-ethoxy-ethoxy)-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-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)propanamid AAP6**



AAP6

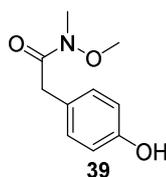
15 mg 2-(4-((4-(6-amino-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)-phenyl)-3-phenyl-1,6-naphthyridin-5(6H)-on **54** (0,03 mmol, 1 eq.) und 19 mg 3-(2-((2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1, 3-Dioxoisindolin-4-yl)amino)ethoxy-ethoxy-ethoxy-ethoxy)propansäure **76** (0,03 mmol, 1 eq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das Produkt **AAP6** als hellgelben Feststoff (7 mg, 0,1 mmol, 27 %).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  = 11.25 (t, 1H), 10.27 (s, 1H), 7.88 (t, 1H), 7.61 – 7.45 (m, 2H), 7.33 (m, 5H), 7.27 – 7.20 (m, 5H), 6.98 (m, 3H), 6.74 (d, 1H), 6.61 (d, 1H), 6.20 (dt, 1H), 5.71 (m, 1H), 4.70 (s, 2H), 3.98 – 3.77 (m, 18H), 3.54 (s, 2H), 3.41 – 3.32 (m, 4H), 3.03 – 2.94 (m, 3H), 2.84 – 2.76 (m, 3H), 2.54 (t, 3H), 2.37 (t, 2H), 1.86 (d, 2H).

**LC-MS:** Berechnet: 1047.15 für  $\text{C}_{57}\text{H}_{59}\text{N}_9\text{O}_{11}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 1047.11.

### Synthese von PET Tracern

**Darstellung von 2-(4-Hydroxyphenyl)-N-methoxy-N-methylacetamid **39****



10 g 2-(4-Hydroxyphenyl)essigsäure **38** (66 mmol, 1 eq.), 7,1 g  $\text{MeNH}(\text{OMe})\text{-HCl}$  (72 mmol, 1,1 eq.) und 34 mL  $\text{DIPEA}$  (199 mmol, 3 eq.) wurden in 20 mL Dichlormethan

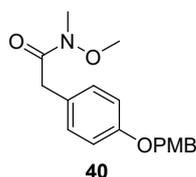
gelöst. Zu der Lösung wurde 50 %ige Propylphosphonsäureanhydrid in MeCN (57 mL, 99 mmol, 1,5 eq.) tropfenweise hinzugegeben. Die Lösung wurde 12 Stunden lang bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM (20 mL) verdünnt und mit 10%iger wässriger HCl, gesättigtem wässrigem Natriumbicarbonat und Salzlösung gewaschen. Die organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt, und mit 10 mL Isopropanol rekristallisiert, sodass 2-(4-Hydroxyphenyl)-N-methoxy-N-methylacetamid **39** als farbloser Feststoff (10 g, 18 mmol, 76 % Ausbeute) erhalten werden konnte.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.10–7.05 (m, 2H), 6.70–6.65 (m, 2H), 3.70 (s, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.21 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.2, 155.0, 130.4, 126.1, 115.6, 77.3, 77.0, 76.75, 61.3, 38.2, 32.3.

HRMS (m/z) berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M]<sup>+</sup>, 195.0890; gefunden: 195.0892.

#### Darstellung von N-Methoxy-2-(4-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)-N-methylacetamid **40**



Zunächst wurde nacheinander 6,9 mL 4-Methoxybenzylalkohol (56 mmol, 1 eq.), 200 mL Diethylether und 100 mL Bromwasserstoffsäure (48% in Wasser, 0,84 mol, 15 eq.) zusammengegeben. Das Gemisch wurde eine Minute lang geschüttelt, anschließend wurde die wässrige Schicht verworfen und die organische Schicht mit gesättigter Natriumbromidlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert, um 4-Methoxybenzylbromid als farbloses Öl (7,53 mL, 10,5 g) zu erhalten. 12,5 g Kaliumcarbonat (89,1 mmol, 2 eq.) in 250 mL Aceton gelöst. Zu der Suspension wurden nacheinander 8,7 g 2-(4-Hydroxyphenyl)-N-methoxy-N-methylacetamid **39** (44,6 mmol, 1 eq.) und 7,9 mL 4-Methoxybenzylbromid (52 mmol, 1,2 eq.) gegeben. Die resultierende Suspension wurde 12 Stunden lang am bei 70 °C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat verdünnt und filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum konzentriert und ergab ein gelbes Öl. Das Öl wurde durch

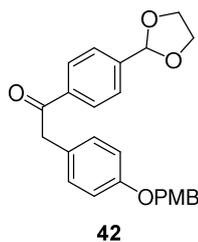
Chromatographie auf Kieselgel mit einem 20-40%igen Gradienten von Ethylacetat und Hexan gereinigt, um das Produkt **40** als farblosen Feststoff zu erhalten (12,1 g, 38,4 mmol, 86% Ausbeute).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.36–7.33 (m, 2H), 7.22–7.19 (m, 2H), 6.92 (dd,  $J = 4.4$ , 2.0 Hz, 2H), 6.91 (d,  $J = 4.3$  Hz, 2H), 4.97 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.71 (s, 2H), 3.61 (s, 3H), 3.19 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 159.5, 157.9, 130.4, 129.3, 129.2, 115.0, 114.1, 69.9, 61.4, 55.4.

**HRMS** ( $m/z$ ) berechnet für  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NONa}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  338.1358; gefunden: 338.1363.

**Darstellung** von **1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2-(4-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)ethan-1-on 42**



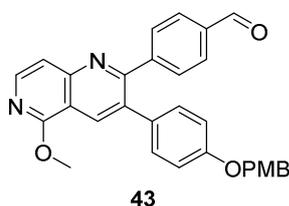
4,6 g 2-(4-Bromphenyl)-1,3-dioxolan **40** (20 mmol, 1,1 eq.) wurden in 20 mL dTHF gelöst. Die klare Lösung wurde auf  $-78$  °C abgekühlt und 9,7 mL *n*-Butyllithium (2,0 M in Hexan, 19 mmol, 1,1 eq.) wurde dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Nach 30 Minuten wurde eine Lösung von 5,8 g *N*-Methoxy-2-(4-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)-*N*-methylacetamid (18 mmol, 1,0 eq.) in 20 mL dTHF tropfenweise zu der Suspension des Aryllithiums gegeben. Die resultierende orangefarbene Suspension wurde auf Raumtemperatur erwärmt und die resultierende orangefarbene Lösung wurde durch Zugabe von gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung gequencht. Dann wurden Wasser und Dichlormethan hinzugegeben. Die organische Schicht wurde abgetrennt und die wässrige Schicht mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Schichten wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert, um einen orangefarbenen Feststoff zu erhalten. Der Feststoff wurde durch Chromatographie auf Kieselgel mit einem 30-40%igen Gradienten aus Ethylacetat und Hexan gereinigt, um das Produkt als farblosen Feststoff zu erhalten (5,5 g, 14 mmol, 70% Ausbeute).

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 8.04–8.00 (m, 2H), 7.59–7.55 (m, 2H), 7.37–7.33 (m, 2H), 7.20–7.16 (m, 2H), 6.95–6.90 (m, 4H), 5.85 (s, 1H), 4.96 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 4.13–4.02 (m, 4H), 3.81 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 197.6, 159.5, 158.0, 143.0, 137.2, 130.5, 129.3, 129.1, 128.8, 126.8, 126.7, 115.2, 114.1, 103.0, 69.9, 65.5, 55.4, 44.9.

**HRMS(m/z)** berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>Na<sub>1</sub> [M+Na]<sup>+</sup>, 427.1516; gefunden: 427.1515.

### Darstellung von 4-(5-Methoxy-3-(4-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzaldehyd **43**



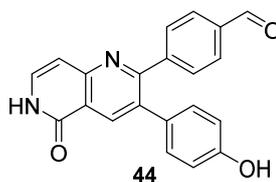
Zu einer Lösung von tert-Butyl-(2-chlor-3-formylpyridin-4-yl)carbamate **6** (533 mg, 2,1 mmol, 1 eq.) und 1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2-(4-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)ethan-1-on **42** (840 mg, 2,1 mmol, 1 Eq.) in 15 mL dMeOH Natriummethoxid (1,3 mL, 30 % in MeOH, 2,5 Eq.) wurde tropfenweise zugegeben. Die Reaktion wurde für 24 Stunden bei 80 °C gerührt und anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft. Der resultierende Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum reduziert und säulenchromatographische Auftrennung (10 % MeOH/DCM) ergab 605 mg (1,0 mmol, 56 %) des gewünschten Produkts **43**.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 8.51–8.49 (m, 1H), 8.21 (d, *J* = 6.1, 1H), 7.56–7.47 (m, 3H), 7.45–7.33 (m, 4H), 7.17–7.11 (m, 2H), 6.96–6.86 (m, 4H), 5.82 (s, 1H), 4.98 (s, 2H), 4.15 (s, 3H), 4.14–3.99 (m, 4H), 3.82 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 161.9, 161.3, 159.6, 158.5, 151.6, 143.6, 141.0, 138.3, 135.0, 134.2, 131.9, 131.0, 130.1, 129.4, 128.9, 126.4, 116.4, 115.0, 114.3, 114.1, 103.6, 69.9, 65.3, 55.4, 54.2.

**HRMS-ESI (m/z)** berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M]<sup>+</sup>, 521.2072; gefunden, 521.2071.

**Darstellung von 4-(3-(4-Hydroxyphenyl)-5-oxo-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzaldehyd 44**



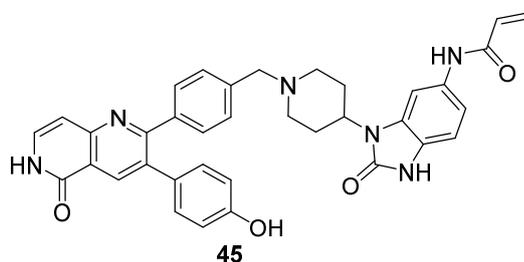
1,6 g 4-(5-Methoxy-3-(4-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzaldehyd **43** (3,1 mmol, 1 eq.) in 110 mL wässriger HCl (37 %) wurden für drei Stunden auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 10 M NaOH-Lösung auf pH = 7 eingestellt. Der entstandene gelbliche Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und per säulenchromatographischer Auftrennung (0-10 % DCM/MeOH) das isolierte Produkt **44** erhalten. Es wurden 420 mg des weißen Produkts (1,2 mmol, 40 % Ausbeute) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.99 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.85 – 7.79 (m, 2H), 7.61 – 7.50 (m, 3H), 7.32 (qd, *J* = 4.5, 1.5 Hz, 3H), 7.24 (dt, *J* = 6.9, 2.2 Hz, 2H), 6.70 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 192.8, 161.9, 160.0, 152.9, 145.2, 138.4, 137.0, 135.5, 133.9, 133.8, 130.5, 129.4, 128.9, 128.54, 127.6, 120.7, 105.7.

HRMS (*m/z*) berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup>, 343.1078; gefunden: 343.1077.

**Darstellung von N-(3-(1-(4-(3-(4-hydroxyphenyl)-5-oxo-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid 45**



4-(3-(4-Hydroxyphenyl)-5-oxo-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzaldehyd **44** (40 mg, 0,1 mmol, 1 eq. ) und N-(2-Oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid **20** (51 mg, 0,2 mmol, 1,1 eq.) wurden in dMeOH gelöst, 3 Tropfen TEA und AcOH wurden zugegeben. Die Mischung wurde 4 Stunden lang bei 75 °C gerührt. Anschließend wurde Natriumcyanoborhydrid (58 mg, 0,9 mmol,

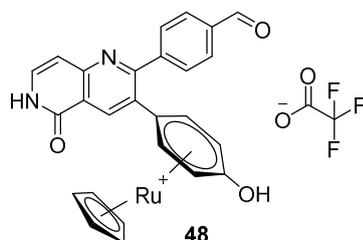
4 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung weitere 16 Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde eingedampft und das Reaktionsgemisch mit DCM und sätt. Bicarbonatlösung extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, eingedampft und über Kieselgelsäulenchromatographie (5-10 % MeOH/DCM) wurden 64 mg (0,1 mmol, 45 %) des weißen Produkts **45** erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ): 11.83 (s, 1H), 11.21 (s, 1H), 10.74 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.54 (d, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.34 (m, 4H), 7.21 (t, 2H), 6.95 (d, 1H), 6.73 (d, 1H), 6.45 (m, 1H), 6,28 (d, 1H), 5.76 (d, 1H), 4.13 (s, 1H), 3.59 (s, 1H), 2.13 (t, 1H), 1.95 (s, 2H), 1.70 (d, 2H), 1,11 (t, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ): 171.82, 162.54, 161,53, 153.45, 152.70, 138.26, 137.54, 135.58, 134.89, 133.00, 132.32, 131.79, 131.26, 129.43, 128.72, 128.14, 126.07, 124.37, 119.97, 115.17, 115.13, 111.86, 108.38, 105.70, 100.71, 62.51, 61.22, 52.36, 59.85, 46.82, 28.39, 22.91, 12.76.

HPLC-MS (m/z) berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>32</sub>F<sub>1</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 613.90 ; gefunden: 613.77

### Darstellung von Ru-komplexiertem 4-(3-(4-Hydroxyphenyl)-5-oxo-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzaldehyd **48**



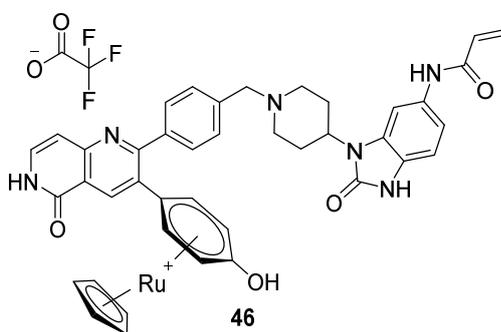
180 mg 4-(3-(4-Hydroxyphenyl)-5-oxo-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzaldehyd **44** (0,5 mmol, 1,0 eq.) und 270 mg [CpRu(Naphthalin)]OTf (0,6 mmol, 1,2 eq.) wurden in 6 mL DCE), 0, 6 mL MeCN und 0,6 mL MeOH gelöst und 16 Stunden lang bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und per reverser Säulenchromatographie gereinigt, um das Produkt **48** als orangefarbenes Pulver zu erhalten (0,22 g, 0,43 mmol, 85 % Ausbeute).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, δ): 11.80 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 10.06 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.60 (dd, *J* = 7.4, 5.9 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 6.17 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 5.35 (s, 5H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C,  $\delta$ ): 192.9, 161.6, 160.3, 153.9, 143.6, 139.7, 136.1, 135.0, 133.1, 130.9, 129.3, 127.6, 120.4, 105.6, 100.5, 87.1, 80.9, 74.0.

HRMS ( $m/z$ ) berechnet für  $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3\text{Ru}$   $[\text{M}-\text{CF}_3\text{CO}_2]^+$ , 509.0434; gefunden, 509.0442.

**Darstellung von Ru-komplexiertem N-(3-(1-(4-(3-(4-Hydroxyphenyl)-5-oxo-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid **46****



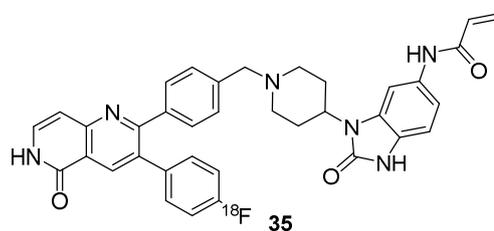
70 mg Ru-komplexiertes 4-(3-(4-Hydroxyphenyl)-5-oxo-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzaldehyde **48** (0,1 mmol, 1 eq. ) und 82 mg N-(2-Oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamide **20** (0,1 mmol, 1 eq.) wurden in 5 mL dMeOH gelöst, 2 Tropfen TEA und AcOH wurden hinzugefügt. Die Mischung wurde 4 Stunden lang bei 75 °C gerührt. Anschließend wurde 26 mg Natriumcyanoborhydrid (0,9 mmol, 4 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung weitere 16 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde eingedampft und das Reaktionsgemisch mit DCM und sat. Bicarbonatlösung extrahiert, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, eingedampft und über säulenchromatographische Auftrennung (5-10 % MeOH/DCM) 78 mg (0,1 mmol, 85 %) des weißen Produkts **46** erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ,  $\delta$ ): 9.95 (br, 1H), 9.83 (br, 1H), 9.18 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.55–7.48 (m, 4H), 7.42 (dd,  $J = 15.4, 7.9$  Hz, 2H), 6.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.70 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 6.41 (dd,  $J = 17.0, 10.2$  Hz, 1H), 6.28 (dd,  $J = 16.9, 1.8$  Hz, 1H), 6.14 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 6.00 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 5.73 (dd,  $J = 10.2, 1.8$  Hz, 1H), 5.21 (s, 5H), 4.52–4.42 (m, 1H), 4.32 (s, 2H), 3.55 (d,  $J = 12.2$  Hz, 2H), 3.10 (t,  $J = 12.9$  Hz, 2H), 2.86–2.74 (m, 2H), 2.01 (d,  $J = 13.8$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.9, 161.6, 160.8, 158.0 (q,  $J = 31.5$  Hz), 153.9, 153.86, 139.5, 139.4, 134.9, 133.3, 132.4, 131.9, 131.2, 130.5, 130.5, 129.1, 127.5, 126.4, 124.6, 120.2, 117.1 (q,  $J = 297.3$  Hz), 113.2, 108.9, 105.6, 101.3, 100.6, 87.1, 80.8, 73.9, 58.8, 51.1, 47.6, 25.9.

HRMS( $m/z$ ) berechnet für  $\text{C}_{41}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{N}_6\text{Ru}$   $[\text{M}-2(\text{CF}_3\text{CO}_2)]^{2+}$ , 390.0994; gefunden, 390.0997.

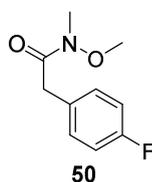
**Darstellung von N-(3-(1-(4-(3-(4-(Fluoro- $^{18}\text{F}$ ))phenyl)-5-oxo-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid **35**<sup>6</sup>**



Die Reaktionen wurden auf einem automatisierten Kassetten-basierten radiochemischen Synthesizer ELIXYS FLEX/CHEM durchgeführt, der mit einer PURE/FORM-Reinigungs- und Formulierungseinheit (Sofie Biosciences) verbunden war. Wässriges  $^{18}\text{F}$  (0,34 GBq, 9,1 mCi),  $t = 0$ ) wurde auf einer Waters-QMA-Anionenaustauscherkartusche aufgefangen, die nach dem allgemeinen Verfahren vorkonditioniert wurde. Das  $^{18}\text{F}$  wurde von der Kartusche mit einer Lösung von 2,8 mg Ru-komplexiertem N-(3-(1-(4-(3-(4-Hydroxyphenyl)-5-oxo-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid **46** (2,5  $\mu\text{mol}$ , 1,0 Equiv.) und Imidazoliumchlorid (4,5 mg, 10  $\mu\text{mol}$ , 4,0 Equiv.) in Methanol (0,50 mL) in ein 3 mL V-Fläschchen eluiert. Das Lösungsmittel wurde drei Minuten lang unter vermindertem Druck bei 100 °C eingedampft. In das Fläschchen wurde eine Mischung aus DMSO:MeCN:EtOH (0,20 mL:0,20 mL:25 $\mu\text{L}$ ) gegeben und das Fläschchen mit einer Teflonfolie verschlossen. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten lang bei erhöhter Temperatur (Sollwert 150 °C) gerührt und anschließend auf 50 °C abgekühlt. Das Lösungsmittel wurde bei 110 °C unter vermindertem Druck für 3 Minuten eingedampft. Zu der verbleibenden Lösung wurde eine Mischung aus Wasser:MeOH (2,0 mL:1,0 mL) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde vom ELIXYS FLEX/CHEM-System in das PURE/FORM-System überführt und durch HPLC mit einer Hypersil-Gold-Säule

(250×10 mm, 5 µm, Durchflussrate = 4 mL · min<sup>-1</sup>) mit einer isokratischen Mischung aus 15:85 (MeCN:Wasser, 0,10 % TFA, v:v) für 2 Minuten gereinigt, gefolgt von einem linearen Gradienten zu 85:15 (MeCN:Wasser, 0,10 % TFA, v:v) innerhalb von 25 Minuten. Das Produkt wurde von 22 min bis 23 min gesammelt. Die Aktivität der produkthaltigen Fraktion wurde mit Wasser (40 mL) verdünnt und auf eine C-18 light SepPak-Kartusche geladen. Die C-18-Kartusche wurde mit Wasser (3,0 mL) gewaschen, und das Produkt wurde nacheinander mit Ethanol (0,30 mL) und Wasser (1,7 mL) eluiert. Die ethanolische Kochsalzlösung enthielt 55 MBq (1,5 mCi, t = 120 min).

### Darstellung von 2-(4-Fluorphenyl)-N-methoxy-N-methylacetamid **50**



2-(4-Fluorphenyl)essigsäure **49** (1,11 g, 7,2 mmol, 1 eq.), MeNH(OMe)-HCl (773 mg, 7,92 mmol, 1,1 eq.) und DIPEA (3,76 mL, 21,6 mmol, 3 eq.) wurden in Dichlormethan (20 mL) gelöst. Zu der Lösung wurde Propylphosphonsäureanhydrid in MeCN (6,87 g, 10,8 mmol, 1,5 eq.) tropfenweise zugegeben. Die Lösung wurde 1 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM (20 mL) verdünnt und mit 10%iger wässriger HCl, gesättigtem wässrigen Natriumbicarbonat und Salzlösung gewaschen. Die organische Schicht wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert, um 2-(4-Fluorphenyl)-N-methoxy-N-methylacetamid als farbloses Öl **50** zu erhalten (1,28 g, 6,49 mmol, 90 % Ausbeute).

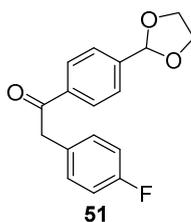
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 7.24–7.19 (m, 2H), 6.98–6.92 (m, 2H), 3.70 (s, 2H), 3.59 (s, 3H), 3.14 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 172.1, 161.7, 130., 130.7, 115.7, 103.0, 65.6, 44.8.

HRMS (m/z) berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>1</sub>O<sub>2</sub>F<sub>1</sub>[M]<sup>+</sup>, 197.084657; gefunden, 197.084640.

---

ζ Die Darstellung von **35** wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tobias Ritter durchgeführt (Jens Rickmeier, MPI Mühlheim)

**Darstellung von 1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2-(4-fluorphenyl)ethan-1-on **51****

(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)lithium (1,45 g, 6,34 mmol, 1 Equiv.) wurde in dTHF (6 mL) gelöst. Die klare Lösung wurde auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und anschließend wurde n-Butyllithium (2.0 M in Hexan, 3.0 mL, 6.02 mmol, 0.95 Eq.) zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Nach 30 min wurde eine Lösung des Weinreb-Amids 2-(4-Fluorphenyl)-N-methoxy-N-methylacetamid **50** (1.25 g, 6.34 mmol, 1 Eq.) in dTHF (6 mL) zu der Suspension des Aryllithiums getropft. Die resultierende orangefarbene Suspension wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung gequenchet und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Schicht wurde abgetrennt und die wässrige Schicht wurde mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert, um einen orangefarbenen Feststoff zu erhalten. Der Feststoff wurde durch Kieselgelsäulenchromatographie mit einem 20-40%igen Gradienten aus Ethylacetat und Petrolether aufgetrennt, um das Keton 1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2-(4-fluorphenyl)ethan-1-on als farblosen Feststoff **51** zu erhalten (1,25 g, 6,33 mmol, 69% Ausbeute).

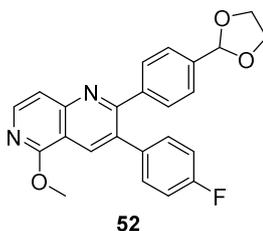
**$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\delta$ ): 8.03–7.99 (m, 2H), 7.60–7.56 (m, 2H), 7.24–7.19 (m, 2H), 7.05–6.98 (m, 2H), 5.86 (s, 1H), 4.26 (s, 2H) 4.14–4.04 (m, 4H).

**$^{13}\text{C NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 197.2, 162.0, 143.3, 137.1, 131.2, 130.1, 128.8, 126.9, 115.7, 103.0, 65.6, 44.8.

**$^{19}\text{F NMR}$**  (471 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): -116.0.

**HRMS** ( $m/z$ ) berechnet für  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_1\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 287.107799; gefunden, 287.107480.

**Darstellung von 2-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-3-(4-fluorphenyl)-5-methoxy-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin 52**



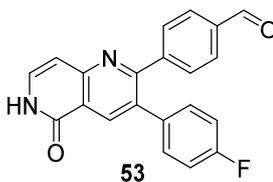
Zu einer Lösung von tert-Butyl-(2-chlor-3-formylpyridin-4-yl)carbamate **6** (493 mg, 1,9 mmol, 1 eq.) und 1-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-2-(4-fluorphenyl)ethan-1-on **51** (550 mg, 1,9 mmol, 1 eq.) in 10 mL dMeOH wurde Natriummethoxid (1,2 mL, 30 % in MeOH, 2,5 eq.) tropfenweise zugegeben. Die Reaktion wurde für 4 h bei 80 °C gerührt und anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingedampft. Der resultierende Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und mit sat. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Wasser und sat. NaCl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingedampft und durch Kieselgelsäulenchromatographie (10 % MeOH/DCM) wurden 525 mg (1,3 mmol, 68 %) des gewünschten Produkts **52** erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 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, 4H), 7.26 (dd, *J* = 6.9 Hz, 2.5 Hz, 2H), 5.71 (s, 1H), 4.10 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H), 4.04 (dd, *J* = 8.7 Hz, 5.1 Hz, 2H), 3.95 – 3.90 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ): 161.26, 160.64, 151.05, 143.94, 140.19, 138.89, 138.31, 134.87, 133.70, 129.73, 129.47, 128.47, 127.63, 126.11, 115.81, 113.07, 102.44, 64.86, 54.12.

**HPLC-MS (m/z)** berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>F<sub>1</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 402.43; gefunden: 402.40.

**Darstellung von 4-(3-(4-Fluorophenyl)-5-oxo-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzaldehyd 53**



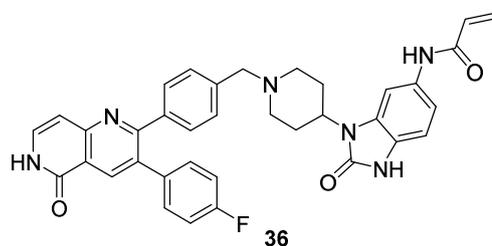
500 mg 2-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenyl)-3-(4-fluorphenyl)-5-methoxy-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin **52** (1.2, 1 eq.) wurden in 15 mL wässriger HCl (37 %) für 3 h auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 10 M NaOH-Lösung auf pH > 7 neutralisiert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Es wurden 328 mg weißes Produkt **53** (0,9 mmol, 77 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 25 °C, δ): 10.00 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.95 (m, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.35 – 7.31 (d, 1H), 7.33 – 7.27 (m, 3H), 7.20 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 25 °C, δ): 192.48, 163.73, 158.93, 152.84, 145.28, 136.74, 135.09, 130.15, 129.12, 128.57, 128.15, 127.08, 119.88, 109.19, 104.61.

HPLC-MS (*m/z*) berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>13</sub>F<sub>1</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 344.35; gefunden: 344.29.

**Darstellung von N-(3-(1-(4-(3-(4-Fluorphenyl)-5-oxo-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**



4-(3-(4-Fluorphenyl)-5-oxo-5,6-dihydro-1,6-naphthyridin-2-yl)benzaldehyde **53** (80 mg, 0,2 mmol, 1 eq. ) und N-(2-Oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid **20** (102 mg, 0,3 mmol, 1,1 eq.) wurden in dMeOH gelöst, 3 Tropfen TEA und AcOH wurden zugegeben. Die Mischung wurde 4 Stunden lang bei 75 °C gerührt. Anschließend wurde Natriumcyanoborhydrid (58 mg, 0,9 mmol, 4 Eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung weitere 16 Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde eingedampft und das Reaktionsgemisch mit DCM und sätt. Bicarbonatlösung extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, eingedampft und über Kieselgelsäulenchromatographie (5-10 % MeOH/DCM) wurden 64 mg (0,1 mmol, 45 %) des weißen Produkts **36** erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ): 11.63 (s, 1H), 10.84 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.54 (d, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.34 (m, 4H), 7.21 (t, 2H), 6.95 (d, 1H), 6.73 (d, 1H), 6.45 (m, 1H), 6.28 (d, 1H), 5.76 (d, 1H), 4.13 (s, 1H), 3.59 (s, 1H), 2.13 (t, 1H), 1.95 (s, 2H), 1.70 (d, 2H), 1.11 (t, 4H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ): 171.80, 162.64, 161.73, 153.75, 152.80, 138.58, 137.78, 136.58, 135.17, 133.33, 132.47, 131.79, 131.26, 129.43, 128.72, 128.14, 126.07, 124.37, 119.97, 115.17, 115.13, 111.86, 108.38, 105.70, 100.71, 62.51, 61.22, 52.36, 49.85, 45.42, 28.39, 20.81, 9.76.

**HRMS-ESI (m/z)** berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>31</sub>F<sub>1</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 614.6814 ; gefunden: 614.6812

## 7.2 Methoden

### 7.2.1 *In silico* Modellierung

Die Modellierung von neuen Zielverbindungen wurde im Rahmen eines Struktur-basierten Designs mittels Röntgenkristallstrukturen aus der PDB Datenbank oder aus der AG Rauh Bibliothek gestartet. Hierbei wurden die Koordinaten des gebundenen Liganden als pdb-Datei aus *PyMOL* (Version 2.2.3) extrahiert. Diese pdb-Datei wurde dann mittels *Accelrys Discovery Studio 3.1* entsprechend der chemischen Modifikation erweitert und energieminiert. Dieser so neu erzeugte Ligand wurde wieder in *PyMOL* importiert und visualisiert.

### 7.2.2 HTRF Assay zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung und kinetischen Charakterisierung

Der IC<sub>50</sub> wurde mittels des HTRF<sup>®</sup> KinEASE<sup>™</sup> Assay von *Cisbio* bestimmt.<sup>[130]</sup> Die Reagenzien für den Assay wurden von *Cisbio Bioassays*, Frankreich, verwendet. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit dem *Quattro* Software-Paket zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung. Die kinetischen Parameter wurden mittels zeitabhängiger IC<sub>50</sub>-Messungen zu zwölf Zeitpunkten und anschließender Auftragung gegen die Zeit erhalten, indem die Auswertung gemäß KRIPPENDORF *et al.* durchgeführt wurde.<sup>[153]</sup>

### 7.2.3 Protein-Massenspektrometrie

Die kovalente Proteinmodifikation wurde validiert, indem 10  $\mu\text{M}$  Volllängen-Akt1 mit 30-100  $\mu\text{M}$  des potentiell kovalenten Liganden für eine bis zu 24 Stunden inkubiert wurde. Nach erfolgter Zentrifugation für 10 min bei 20000 g und 4 °C wurden die Proben in die entsprechenden Messgefäße überführt und die Validierung des kovalenten Bindungsmodus erfolgte mit Hilfe der *Thermo Fisher* Ultimate 3000 HPLC-Systems gekoppelt an ein *Thermo Fisher* Velos Pro 2D-Ionenfallen-Massenspektrometer (Protonierungsmittel: 0,1 %ige Ameisensäure). Die chromatographische Auftrennung erfolgte über eine Vydac 214TP C4 5 $\mu\text{m}$  Saule (150 mm x 2,1 mm) mit einem Gradienten von 10 % MeCN in H<sub>2</sub>O für fünf Minuten, gefolgt von einem linearen Gradienten über 14 min bis zu 100 % MeCN in H<sub>2</sub>O. Es wurde ein Massenbereich von 700-2000 m/z gescannt. Die Rohdaten wurden mittels des Programm MagTran dekonvolviert.

**Proteinpuffer:** 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, pH 7,3.

### 7.2.4 *in situ* CuAAC In-Gel Fluoreszenz

Die *In-Gel* Fluoreszenz wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt. Die Proben wurden zunächst für 24 Stunden mit 10  $\mu\text{M}$  Akt und mit 100  $\mu\text{M}$  der entsprechenden Alkin-Sonden bei 4 °C inkubiert. Nach der Zugabe des Cy3-Azides (100  $\mu\text{M}$ ), TBTA (50  $\mu\text{M}$  in DMSO/*tert*-BuOH 1:4), TCEP (500  $\mu\text{M}$  in H<sub>2</sub>O) und CuSO<sub>4</sub> (500  $\mu\text{M}$  in H<sub>2</sub>O) erfolgte eine weitere 24-stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 7,5  $\mu\text{L}$  der einzelnen Proben mit 2,5  $\mu\text{L}$  4xSDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse erfolgte über 12 %ige Gele mit 10  $\mu\text{L}$  Probenlösung und 3  $\mu\text{L}$  des Größenstandards (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa, *Thermo Scientific*) und einer Auftrennung von 40 min bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA. Im Anschluss wurden die Gele zunächst mit einem *Typhoon Trio Plus* von der Firma *GE Healthcare* analysiert und anschließend mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt und analysiert.

**SDS-Probenpuffer (4x):** 100 mM Tris (pH 6,8), 200 mM DTT, 1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 4 % (w/v) SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerol.

**Laufpuffer:** 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3.

**Coomassie-Färbelösung:** 0,3 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250 und R-250, 10 % Essigsäure, 50 % Ethanol.

**Entfärbelösung:** 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Ethanol.

### 7.2.5 *in situ* SPAAC *In-Gel* Fluoreszenz

Die *In-Gel* Fluoreszenz wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt. Die Proben wurden zunächst für 24 Stunden mit 10  $\mu\text{M}$  Akt und mit 100  $\mu\text{M}$  der Cyclooctin-Sonde bei 4 °C inkubiert. Nach der Zugabe des Cy3-Azides (100  $\mu\text{M}$ ) erfolgte eine 1-24-stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 7,5  $\mu\text{L}$  der einzelnen Proben mit 2,5  $\mu\text{L}$  4xSDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse erfolgte über 12 %ige Gele mit 10  $\mu\text{L}$  Probenlösung und 3  $\mu\text{L}$  des Größenstandards (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa, *Thermo Scientific*) und einer Auftrennung von 40 min bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA. Im Anschluss wurden die Gele zunächst mit einem *Typhoon Trio Plus* von der Firma *GE Healthcare* analysiert und anschließend mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt und analysiert.

### 7.2.6 *In-Gel* Fluoreszenz

Die *In-Gel* Fluoreszenz wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt. Die Proben wurden zunächst für 24 Stunden mit 10  $\mu\text{M}$  Akt und mit 100  $\mu\text{M}$  der Cy3-Sonde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 7,5  $\mu\text{L}$  der einzelnen Proben mit 2,5  $\mu\text{L}$  4xSDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse erfolgte über 12 %ige Gele mit 10  $\mu\text{L}$  Probenlösung und 3  $\mu\text{L}$  des Größenstandards (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa, *Thermo Scientific*) und einer Auftrennung von 40 min bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA. Im Anschluss wurden die Gele zunächst mit einem *Typhoon Trio Plus* von der Firma *GE Healthcare* analysiert und anschließend mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt und analysiert.

### 7.2.7 Protein Pull-Down

Es wurden Streptavidin Magentische Partikel (*Sigma Aldrich*, Hamburg, Deutschland) sowie Dynabead M-280 Streptavidin (*Invitrogen*, Carlsbad, USA) verwendet. Aufgereinigtes Vollängen-Akt1 oder Zelllysat (lysiert mit RIPA-Puffer, Phosphatase- und Protease Inhibitor Cocktail) mit einem 10-fachem Überschuss der Biotin-Sonden (10 mM Stammlösung in DMSO) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die Alkin-Sonden erfolgte zusätzlich die Zugabe von den CuAAC-Reagenzien sowie des Biotin-PEG3-Azids (1.1 eq., 2.5mM Stammlösung in H<sub>2</sub>O). Jede der Proben wurde geschüttelt und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden per Zentrifugation (5900 g, 5 Minuten, 4 °C) abgetrennt und der Überstand entfernt. Das Proteinpellet wurde

in 20  $\mu\text{L}$  einer SDS-Lösung (0.5% (w/v)) resuspendiert. Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 15  $\mu\text{L}$ . 50  $\mu\text{L}$  der magnetischen Partikel wurden abgenommen und mit 1 mL HEPES-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Partikel mit der vorinkubierten Proteinlösung resuspendiert. Es folgte eine weitere Inkubationsperiode über Nacht bei 4 °C. Die magnetischen Partikel wurden über ein Magnetfeld (*GE Healthcare*, Chicago, USA) von der restlichen Lösung separiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Probenvorbereitung auf Eis gelagert. Die magnetischen Partikel wurden mit je 1 mL HEPES-Puffer gewaschen (Waschfraktionen) und anschließend in 20  $\mu\text{L}$  SDS-Probenpuffer (4x) resuspendiert (PD). Der Überstand und die Waschfraktionen wurden ebenfalls mit 5  $\mu\text{L}$  SDS-Probenpuffer (4x) versetzt. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Die PVDF-Membran (*Roth*, Karlsruhe, Deutschland) wurde für fünf Minuten mit MeOH bei RT aktiviert. Die aktivierte Membran, sowie das SDS-Gel wurden für fünf weitere Minuten in Transfer-Puffer bei RT inkubiert. Der Proteintransfer erfolgte mit einer Powerstation (*Pierce PowerStation*, ThermoScientific, Waltham, USA) (Maximale Spannung: 25 V, konstante Stromstärke: 1.5 A, Transferdauer: 7 Minuten). Anschließend wurde die Membran mit 5 mL TBS-Puffer gewaschen. Nachdem die Membran für eine Stunde bei RT mit einem Blockierungspuffer (*Intercept Blocking Buffer*, *Li-Cor*, 5 %-ige BSA-Lösung (v/w)) behandelt wurde, erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C mit 5 mL des primären Antikörpers (1:1000 verd. Anti-His6) oder 5 mL des Streptavidin-Dye550-Konjugats (1:1000 verd.). Anschließend wurde die Membran mit TBS-T-Puffer (3 x 5 mL) gewaschen. Die Membran wurde für eine Stunde bei RT mit einem zweiten Antikörper inkubiert (Anti-IgG-AP, nur bei vorheriger Inkubation mit Anti-His6-Antikörper). Nach erneutem Waschen mit TBS-T-Puffer (3 x 5 mL) wurden die Proteine über eine chemilumineszente Reaktion detektiert und an einem Fluoreszenzscanner *Odyssey* (*Li-Cor*, Bad Homburg, Deutschland) visualisiert. Die Membranen (Inkubation mit Streptavidin-Dye550- Konjugat) wurden mit dem Fluoreszenzscanner Typhoon (*GE-Healthcare*, Chicago, USA) ausgelesen.

**RIPA-Puffer:** 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, 0,1 % Triton X-100, pH 8,0.

**Transfer-Puffer:** 336 mM Tris, 260 mM Glycin, 140 mM Tricin, 2,5 mM EDTA.

**10 x TBS/TBS-T-Puffer:** 200mM Tris, 1.5 M NaCl, (1% Tween-20 (nur bei TBS-T)), pH 7.5.

**Blocking-Puffer:** 10% (v/v) 10 x TBS-T-Puffer, 5% (w/v) BSA, 85% ddH<sub>2</sub>O.

### 7.2.8 WB Analyse des tAkt1- und pAkt<sup>S473</sup>-Levels in Panc1- und ZR-75-1

Für die Panc1- (DMEM-Medium, 10 % FBS Good, 1 % Penicilin-Streptomycin) und ZR-75-1-Zellen (RPMI-1640-GlutaMax-Medium, 10 % FBS Good Forte, 1 % Penicilin-Streptomycin) wurden nach dem Trypsinieren die Zellzahl bestimmt. Für die Panc1-Zelllinie wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro *Well* und für die ZR-75-1-Zelllinie wurden  $8 \times 10^5$  Zellen pro *Well* in einer 6-well TC-Platte (*Sarstedt*) in einem Volumen von 2,5 mL ausplattiert. Nach dem Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden AAP-Konzentrationen (10 mM Stammlösung in DMSO) für vier und 24 Stunden bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Zur Minimierung der Protease- und Phosphatase-Aktivität wurden die folgenden Schritte zur Zelllyse auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen zwei Mal mit kaltem DPBS-Puffer (2 mL) gewaschen und die Zellen mit 100 µL RIPA-Puffer (inkl. Protease- und Phosphatase Inhibitor Cocktail) lysiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Zellrasen mittels eines Zellschabers gelöst und in ein vorgekühltes 1,5 mL-Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde die Lösung 10 Minuten bei 14000 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues vorgekühltes 1,5 mL-Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden die Proteinkonzentration von den Zelllysaten mittels des BCA Protein Assay Kits (*Pierce, Thermo Fisher Scientific*) bestimmt und die Proteinkonzentration auf 1 mg/mL durch die entsprechende Zugabe von autoklaviertem Wasser und 4 x SDS-Probenpuffer eingestellt. Die Proteine wurden bei 95 °C über fünf Minuten denaturiert und anschließend weitere fünf Minuten bei 21000 g runterzentrifugiert. Die Taschen des SDS-Gels wurden mit 10-15 µL der Proteinlösung beladen und die Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel aufgetrennt. Der Transfer auf die PVDF-Membran erfolgte wie in Kapitel 7.2.7 beschreiben. Anschließend erfolgte die Zugabe der drei primären Antikörper-Lösungen, tAkt1 (Cell Signaling Technology, #2938, Hase-AK, 1:1000), pAkt<sup>S473</sup> (Cell Signaling Technology, #4060, Hase-AK, 1:1000) und β-Actin (Sigma-Aldrich, A5441, Maus-AK, 1:5000), und die Inkubation über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Membranen mit TBS-T-Puffer (3 x 5 mL) gewaschen und für eine Stunde bei RT mit den sekundären Antikörper-Lösungen, Anti-Maus IgG, DyLight-680 Konjugate (Cell Signaling Technology, #5470, Ziege-AK, 1:10000) und Anti-Hase IgG, DyLight-800 4X PEG Konjugate (Cell Signaling Technology, #5151, Ziege-AK, 1:10000), behandelt. Danach

wurden die Membranen wiederum mit TBS-T-Puffer (3 x 5 mL) gewaschen und abschließend mittels eines Fluoreszenzlesers (*Odyssey CLx, Imaging System, Li-Cor Biosciences*) analysiert. Für die Quantifizierung der WB wurde die Software Image Studio (*Li-Cor Biosciences*) genutzt. Die Intensität der tAkt1-Bande wurde auf das *housekeeping*-Protein  $\beta$ -Actin der entsprechenden Bahn normalisiert.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] WHO Cancer Today, **Stand: 01.06.2020.**
- [2] [https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1), **Stand: 04.06.2021.**
- [3] H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2021**, *71*, 209-249.
- [4] D. Nguyen, C. D. Gocke, *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **2017**, *471*, 175-194.
- [5] A. A. Seyhan, C. Carini, *Journal of Translational Medicine* **2019**, *17*, 114.
- [6] J. Zugazagoitia, C. Guedes, S. Ponce, I. Ferrer, S. Molina-Pinelo, L. Paz-Ares, *Clinical therapeutics* **2016**, *38*, 1551-1566.
- [7] a) E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.-F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, et al., *Nature* **2001**, *409*, 860-921; b) S. G. Gregory, K. F. Barlow, K. E. McLay, R. Kaul, D. Swarbreck, A. Dunham, C. E. Scott, K. L. Howe, K. Woodfine, C. C. A. Spencer, M. C. Jones, C. Gillson, S. Searle, Y. Zhou, F. Kokocinski, L. McDonald, R. Evans, K. Phillips, A. Atkinson, R. Cooper, C. Jones, R. E. Hall, T. D. Andrews, C. Lloyd, R. Ainscough, J. P. Almeida, K. D. Ambrose, F. Anderson, R. W. Andrew, R. I. S. Ashwell, K. Aubin, A. K. Babbage, C. L. Bagguley, J. Bailey, H. Beasley, G. Bethel, C. P. Bird, S. Bray-Allen, J. Y. Brown, A. J. Brown, D. Buckley, J. Burton, J. Bye, C. Carder, J. C. Chapman, S. Y. Clark, G. Clarke, C. Clee, V. Copley, R. E. Collier, N. Corby, G. J. Coville, J. Davies, R. Deadman, M. Dunn, M. Earthrowl, A. G. Ellington, H. Errington, A. Frankish, J. Frankland, L. French, P. Garner, J. Garnett, L. Gay, M. R. J. Ghori, R. Gibson, L. M. Gilby, W. Gillett, R. J. Glithero, D. V. Grafham, C. Griffiths, S. Griffiths-Jones, R. Grocock, S. Hammond, E. S. I. Harrison, E. Hart, E. Haugen, P. D. Heath, S. Holmes, K. Holt, P. J. Howden, A. R. Hunt, S. E. Hunt, G. Hunter, J. Isherwood, R. James, C. Johnson, D. Johnson, A. Joy, M. Kay, J. K. Kershaw, M. Kibukawa, A. M. Kimberley, A. King, A. J. Knights, H. Lad, G. Laird, S. Lawlor, D. A. Leongamornlert, D. M. Lloyd, et al., *Nature* **2006**, *441*, 315-321.
- [8] a) B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Nature medicine* **2004**, *10*, 789-799; b) R. L. Schilsky, *Nature reviews. Drug discovery* **2010**, *9*, 363-366.
- [9] C. J. Tabin, S. M. Bradley, C. I. Bargmann, R. A. Weinberg, A. G. Papageorge, E. M. Scolnick, R. Dhar, D. R. Lowy, E. H. Chang, *Nature* **1982**, *300*, 143-149.
- [10] a) E. D. Adamson, *Development (Cambridge, England)* **1987**, *99*, 449-471; b) R. A. Weinberg, *Science (New York, N.Y.)* **1991**, *254*, 1138-1146.
- [11] A. J. Levine, *New England Journal of Medicine* **1992**, *326*, 1350-1352.

- [12] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
- [13] I. B. Weinstein, *Science (New York, N.Y.)* **2002**, *297*, 63-64.
- [14] S. V. Sharma, M. A. Fischbach, D. A. Haber, J. Settleman, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2006**, *12*, 4392s-4395s.
- [15] a) G. S. Ginsburg, K. A. Phillips, *Health affairs (Project Hope)* **2018**, *37*, 694-701; b) E. Nalejska, E. Mączyńska, M. A. Lewandowska, *Molecular diagnosis & therapy* **2014**, *18*, 273-284.
- [16] D. F. Ransohoff, *Science (New York, N.Y.)* **2003**, *299*, 1679.
- [17] D. R. Adams, C. M. Eng, *The New England journal of medicine* **2018**, *379*, 1353-1362.
- [18] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- [19] a) A. S. Clark, T. B. Karasic, A. DeMichele, D. J. Vaughn, M. O'Hara, R. Perini, P. Zhang, P. Lal, M. Feldman, M. Gallagher, P. J. O'Dwyer, *JAMA oncology* **2016**, *2*, 253-260; b) C. L. Braal, E. M. Jongbloed, S. M. Wilting, R. H. J. Mathijssen, S. L. W. Koolen, A. Jager, *Drugs* **2021**, *81*, 317-331.
- [20] J. Lategahn, M. Keul, D. Rauh, **2018**, *57*, 2307-2313.
- [21] a) S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, D. A. Haber, *Nature reviews. Cancer* **2007**, *7*, 169-181; b) M. Soda, Y. L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara, H. Watanabe, K. Kurashina, H. Hatanaka, M. Bando, S. Ohno, Y. Ishikawa, H. Aburatani, T. Niki, Y. Sohara, Y. Sugiyama, H. Mano, *Nature* **2007**, *448*, 561-566.
- [22] a) J. G. Paez, P. A. Jänne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson, M. Meyerson, *Science (New York, N.Y.)* **2004**, *304*, 1497; b) Y. Y. Syed, *Drugs* **2019**, *79*, 93-98; c) Y. Y. Janjigian, E. F. Smit, H. J. Groen, L. Horn, S. Gettinger, D. R. Camidge, G. J. Riely, B. Wang, Y. Fu, V. K. Chand, V. A. Miller, W. Pao, *Cancer discovery* **2014**, *4*, 1036-1045; d) T. S. Mok, Y.-L. Wu, M.-J. Ahn, M. C. Garassino, H. R. Kim, S. S. Ramalingam, F. A. Shepherd, Y. He, H. Akamatsu, W. S. M. E. Theelen, C. K. Lee, M. Sebastian, A. Templeton, H. Mann, M. Marotti, S. Ghiorghiu, V. A. Papadimitrakopoulou, *New England Journal of Medicine* **2016**, *376*, 629-640; e) A. T. Shaw, D. W. Kim, K. Nakagawa, T. Seto, L. Crinó, M. J. Ahn, T. De Pas, B. Besse, B. J. Solomon, F. Blackhall, Y. L. Wu, M. Thomas, K. J. O'Byrne, D. Moro-Sibilot, D. R. Camidge, T. Mok, V. Hirsh, G. J. Riely, S. Iyer, V. Tassell, A. Polli, K. D. Wilner, P. A. Jänne, *The New England journal of medicine* **2013**, *368*, 2385-2394.
- [23] a) J. Engel, S. Smith, J. Lategahn, H. L. Tumbrink, L. Goebel, C. Becker, E. Hennes, M. Keul, A. Unger, H. Müller, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, G. Günther, J. G. Hengstler, D. Rauh, **2017**, *60*, 7725-7744; b) K. S. Thress, C. P. Paweletz, E. Felip, B. C. Cho, D. Stetson, B. Dougherty, Z. Lai, A. Markovets, A. Vivancos, Y. Kuang, D. Ercan, S. E. Matthews, M. Cantarini, J. C. Barrett, P. A. Jänne, G. R. Oxnard, *Nature medicine* **2015**, *21*, 560-562.
- [24] J. Jang, C. To, D. J. H. De Clercq, E. Park, C. M. Ponthier, B. H. Shin, M. Mushajiang, R. P. Nowak, E. S. Fischer, M. J. Eck, P. A. Jänne, N. S. Gray, **2020**, *59*, 14481-14489.
- [25] Z. Z. Hu, H. Huang, C. H. Wu, M. Jung, A. Dritschilo, A. T. Riegel, A. Wellstein, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2011**, *719*, 547-571.
- [26] C. V. Dang, E. P. Reddy, K. M. Shokat, L. Soucek, *Nature reviews. Cancer* **2017**, *17*, 502-508.
- [27] Q. Wang, X. Chen, N. Hay, *British Journal of Cancer* **2017**, *117*, 159-163.

- [28] L. J. Wilson, A. Linley, D. E. Hammond, F. E. Hood, J. M. Coulson, D. J. MacEwan, S. J. Ross, J. R. Slupsky, P. D. Smith, P. A. Eyers, I. A. Prior, *Cancer research* **2018**, *78*, 15-29.
- [29] M. Rabiller, M. Getlik, S. Kluter, A. Richters, S. Tuckmantel, J. R. Simard, D. Rauh, *Archiv der Pharmazie* **2010**, *343*, 193-206.
- [30] P. Blume-Jensen, T. Hunter, *Nature* **2001**, *411*, 355-365.
- [31] J. Zhang, P. L. Yang, N. S. Gray, *Nature reviews. Cancer* **2009**, *9*, 28-39.
- [32] B. D. Manning, A. Toker, *Cell* **2017**, *169*, 381-405.
- [33] a) E. Gonzalez, T. E. McGraw, *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **2009**, *8*, 2502-2508; b) L. Quambusch, I. Landel, L. Depta, J. Weisner, N. Uhlenbrock, M. P. Müller, F. Glanemann, K. Althoff, J. T. Siveke, D. Rauh, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2019**, *58*, 18823-18829.
- [34] I. Vivanco, C. L. Sawyers, *Nature reviews. Cancer* **2002**, *2*, 489-501.
- [35] G. M. Nitulescu, D. Margina, P. Juzenas, Q. Peng, O. T. Oлару, E. Saloustros, C. Fenga, D. Spandidos, M. Libra, A. M. Tsatsakis, *International journal of oncology* **2016**, *48*, 869-885.
- [36] B. D. Manning, L. C. Cantley, *Cell* **2007**, *129*, 1261-1274.
- [37] V. Calleja, M. Laguerre, B. Larijani, *Journal of chemical biology* **2009**, *2*, 11-25.
- [38] C. C. Milburn, M. Deak, S. M. Kelly, N. C. Price, D. R. Alessi, D. M. Van Aalten, *The Biochemical journal* **2003**, *375*, 531-538.
- [39] D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali, D. M. Sabatini, *Science (New York, N.Y.)* **2005**, *307*, 1098-1101.
- [40] a) D. A. Cross, D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, B. A. Hemmings, *Nature* **1995**, *378*, 785-789; b) S. R. Datta, H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, M. E. Greenberg, *Cell* **1997**, *91*, 231-241; c) D. Lv, L. Guo, T. Zhang, L. Huang, *Oncotarget* **2017**, *8*, 69076-69085.
- [41] a) T. Gao, F. Furnari, A. C. Newton, *Molecular cell* **2005**, *18*, 13-24; b) Y. C. Kuo, K. Y. Huang, C. H. Yang, Y. S. Yang, W. Y. Lee, C. W. Chiang, *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283*, 1882-1892.
- [42] J. O. Lee, H. Yang, M. M. Georgescu, A. Di Cristofano, T. Maehama, Y. Shi, J. E. Dixon, P. Pandolfi, N. P. Pavletich, *Cell* **1999**, *99*, 323-334.
- [43] I. Vivanco, Z. C. Chen, B. Tanos, B. Oldrini, W. Y. Hsieh, N. Yannuzzi, C. Campos, I. K. Mellingerhoff, *eLife* **2014**, *3*.
- [44] I. Hers, E. E. Vincent, J. M. Tavaré, *Cellular signalling* **2011**, *23*, 1515-1527.
- [45] a) X. Huang, G. Liu, J. Guo, Z. Su, *International journal of biological sciences* **2018**, *14*, 1483-1496; b) A. Rickle, N. Bogdanovic, I. Volkman, B. Winblad, R. Ravid, R. F. Cowburn, *Neuroreport* **2004**, *15*, 955-959; c) P. Abeyrathna, Y. Su, *Vascular Pharmacology* **2015**, *74*, 38-48; d) N. Jiang, Q. Dai, X. Su, J. Peng, J. Fu, X. Feng, *Molecular biology reports* **2020**, *47*, 4587-4629.
- [46] a) G. Lazaro, E. Kostaras, I. Vivanco, *Biochemical Society transactions* **2020**, *48*, 933-943; b) M. Keniry, R. Parsons, *Oncogene* **2008**, *27*, 5477-5485; c) L. M. Thorpe, H. Yuzugullu, J. J. Zhao, *Nature reviews. Cancer* **2015**, *15*, 7-24; d) J. Downward, *Nature reviews. Cancer* **2003**, *3*, 11-22; e) M. Maurer, T. Su, L. H. Saal, S. Koujak, B. D. Hopkins, C. R. Barkley, J. Wu, S. Nandula, B. Dutta, Y. Xie, Y. R. Chin, D. I. Kim, J. S. Ferris, S. K. Gruberger-Saal, M. Laakso, X. Wang, L. Memeo, A. Rojzman, T. Matos, J. S. Yu, C. Cordon-Cardo, J. Isola, M. B. Terry, A. Toker, G. B. Mills, J. J. Zhao, V. V. Murty, H. Hibshoosh, R. Parsons, *Cancer research* **2009**, *69*, 6299-6306.
- [47] a) J. D. Carpten, A. L. Faber, C. Horn, G. P. Donoho, S. L. Briggs, C. M. Robbins, G. Hostetter, S. Boguslawski, T. Y. Moses, S. Savage, M. Uhlik, A. Lin, J. Du, Y. W. Qian, D. J. Zeckner, G. Tucker-Kellogg, J. Touchman, K. Patel, S.

- Mousses, M. Bittner, R. Schevitz, M. H. Lai, K. L. Blanchard, J. E. Thomas, *Nature* **2007**, *448*, 439-444; b) M. S. Kim, E. G. Jeong, N. J. Yoo, S. H. Lee, *British journal of cancer* **2008**, *98*, 1533-1535; c) D. M. Hyman, L. M. Smyth, M. T. A. Donoghue, S. N. Westin, P. L. Bedard, E. J. Dean, H. Bando, A. B. El-Khoueiry, J. A. Pérez-Fidalgo, A. Mita, J. H. M. Schellens, M. T. Chang, J. B. Reichel, N. Bouvier, S. D. Selcuklu, T. E. Soumerai, J. Torrissi, J. P. Erinjeri, H. Ambrose, J. C. Barrett, B. Dougherty, A. Foxley, J. P. O. Lindemann, R. McEwen, M. Pass, G. Schiavon, M. F. Berger, S. Chandarlapaty, D. B. Solit, U. Banerji, J. Baselga, B. S. Taylor, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2017**, *35*, 2251-2259.
- [48] M. J. Lindhurst, J. C. Sapp, J. K. Teer, J. J. Johnston, E. M. Finn, K. Peters, J. Turner, J. L. Cannons, D. Bick, L. Blakemore, C. Blumhorst, K. Brockmann, P. Calder, N. Cherman, M. A. Deardorff, D. B. Everman, G. Golas, R. M. Greenstein, B. M. Kato, K. M. Keppler-Noreuil, S. A. Kuznetsov, R. T. Miyamoto, K. Newman, D. Ng, K. O'Brien, S. Rothenberg, D. J. Schwartzenuber, V. Singhal, R. Tirabosco, J. Upton, S. Wientroub, E. H. Zackai, K. Hoag, T. Whitewood-Neal, P. G. Robey, P. L. Schwartzberg, T. N. Darling, L. L. Tosi, J. C. Mullikin, L. G. Biesecker, *The New England journal of medicine* **2011**, *365*, 611-619.
- [49] Y. Yu, R. E. Savage, S. Eathiraj, J. Meade, M. J. Wick, T. Hall, G. Abbadessa, B. Schwartz, *PloS one* **2015**, *10*, e0140479.
- [50] K. H. Yi, J. Lauring, *Oncotarget* **2016**, *7*, 4241-4251.
- [51] a) B. A. Ruggeri, L. Huang, M. Wood, J. Q. Cheng, J. R. Testa, *Molecular carcinogenesis* **1998**, *21*, 81-86; b) Z. Wang, Y. Huang, J. Zhang, *Cellular & molecular biology letters* **2014**, *19*, 233-242.
- [52] P. S. Mundi, J. Sachdev, C. McCourt, K. Kalinsky, *Br J Clin Pharmacol* **2016**, *82*, 943-956.
- [53] G. Song, G. Ouyang, S. Bao, *Journal of cellular and molecular medicine* **2005**, *9*, 59-71.
- [54] M. Hanada, J. Feng, B. A. Hemmings, *Biochimica et biophysica acta* **2004**, *1697*, 3-16.
- [55] W. I. Wu, W. C. Voegtli, H. L. Sturgis, F. P. Dizon, G. P. Vigers, B. J. Brandhuber, *PloS one* **2010**, *5*, e12913.
- [56] a) S. S. Taylor, A. P. Kornev, *Trends in biochemical sciences* **2011**, *36*, 65-77; b) M. Rabiller, M. Getlik, S. Klüter, A. Richters, S. Tückmantel, J. R. Simard, D. Rauh, *Archiv der Pharmazie* **2010**, *343*, 193-206.
- [57] J. Weisner, I. Landel, C. Reintjes, N. Uhlenbrock, M. Trajkovic-Arsic, N. Dienstbier, J. Hardick, S. Ladigan, M. Lindemann, S. Smith, L. Quambusch, R. Scheinpflug, L. Depta, R. Gontla, A. Unger, H. Müller, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, G. Günther, A. Maghnoij, M. P. Müller, M. Pohl, C. Teschendorf, H. Wolters, R. Viebahn, A. Tannapfel, W. Uhl, J. G. Hengstler, S. A. Hahn, J. T. Siveke, D. Rauh, *Cancer research* **2019**, *79*, 2367.
- [58] K. S. Bhullar, N. O. Lagarón, E. M. McGowan, I. Parmar, A. Jha, B. P. Hubbard, H. P. V. Rupasinghe, *Molecular cancer* **2018**, *17*, 48.
- [59] a) D. A. Heerding, N. Rhodes, J. D. Leber, T. J. Clark, R. M. Keenan, L. V. Lafrance, M. Li, I. G. Safonov, D. T. Takata, J. W. Venslavsky, D. S. Yamashita, A. E. Choudhry, R. A. Copeland, Z. Lai, M. D. Schaber, P. J. Tummino, S. L. Strum, E. R. Wood, D. R. Duckett, D. Eberwein, V. B. Knick, T. J. Lansing, R. T. McConnell, S. Zhang, E. A. Minthorn, N. O. Concha, G. L. Warren, R. Kumar, *Journal of medicinal chemistry* **2008**, *51*, 5663-5679; b) M.-C. Crouthamel, J. A.

- Kahana, S. Korenchuk, S.-Y. Zhang, G. Sundaresan, D. J. Eberwein, K. K. Brown, R. Kumar, *Clinical Cancer Research* **2009**, *15*, 217.
- [60] a) J. F. Blake, R. Xu, J. R. Bencsik, D. Xiao, N. C. Kallan, S. Schlachter, I. S. Mitchell, K. L. Spencer, A. L. Banka, E. M. Wallace, S. L. Gloor, M. Martinson, R. D. Woessner, G. P. Vigers, B. J. Brandhuber, J. Liang, B. S. Safina, J. Li, B. Zhang, C. Chabot, S. Do, L. Lee, J. Oeh, D. Sampath, B. B. Lee, K. Lin, B. M. Liederer, N. J. Skelton, *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55*, 8110-8127; b) M. Addie, P. Ballard, D. Buttar, C. Crafter, G. Currie, B. R. Davies, J. Debreczeni, H. Dry, P. Dudley, R. Greenwood, P. D. Johnson, J. G. Kettle, C. Lane, G. Lamont, A. Leach, R. W. A. Luke, J. Morris, D. Ogilvie, K. Page, M. Pass, S. Pearson, L. Ruston, *Journal of medicinal chemistry* **2013**, *56*, 2059-2073; c) <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=AZD5363&cntry=&state=&city=&dist=>, **Stand: 29.06.2021**; d) <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=gdc-0068&cntry=&state=&city=&dist=>. **Stand: 29.06.2021**.
- [61] a) U. Banerji, E. J. Dean, J. A. Pérez-Fidalgo, G. Batist, P. L. Bedard, B. You, S. N. Westin, P. Kabos, M. D. Garrett, M. Tall, H. Ambrose, J. C. Barrett, T. H. Carr, S. Y. A. Cheung, C. Corcoran, M. Cullberg, B. R. Davies, E. C. de Bruin, P. Elvin, A. Foxley, P. Lawrence, J. P. O. Lindemann, R. Maudsley, M. Pass, V. Rowlands, P. Rugman, G. Schiavon, J. Yates, J. H. M. Schellens, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2018**, *24*, 2050-2059; b) J. S. de Bono, U. De Giorgi, K. C. Shih, G. D. Radavoi, N. Xu, W. Y. Chan, H. Ma, S. Gendreau, R. Riisnaes, P. H. Patel, D. J. Maslyar, V. Jinga, D. N. Rodrigues, C. Massard, S. Bracarda, A. Font, J. A. Arranz Arija, **2019**, *25*, 928-936.
- [62] B. R. Davies, H. Greenwood, P. Dudley, C. Crafter, D. H. Yu, J. Zhang, J. Li, B. Gao, Q. Ji, J. Maynard, S. A. Ricketts, D. Cross, S. Cosulich, C. C. Chresta, K. Page, J. Yates, C. Lane, R. Watson, R. Luke, D. Ogilvie, M. Pass, *Molecular cancer therapeutics* **2012**, *11*, 873-887.
- [63] E. J. Meuillet, *Current medicinal chemistry* **2011**, *18*, 2727-2742.
- [64] a) J. Verweij, K. Krzemieniecki, T. Kok, A. Poveda, C. van Pottelsberghe, M. van Glabbeke, H. Mouridsen, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **1993**, *29a*, 208-209; b) J. J. Gills, P. A. Dennis, *Current oncology reports* **2009**, *11*, 102-110.
- [65] B. J. Giantonio, C. Derry, C. McAleer, J. J. McPhillips, P. J. O'Dwyer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2004**, *10*, 1282-1288.
- [66] P. Ríos-Marco, C. Marco, X. Gálvez, J. M. Jiménez-López, M. P. Carrasco, *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* **2017**, *1859*, 1657-1667.
- [67] C. W. Lindsley, Z. Zhao, W. H. Leister, R. G. Robinson, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, R. E. Jones, G. D. Hartman, J. R. Huff, H. E. Huber, M. E. Duggan, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2005**, *15*, 761-764.
- [68] a) Z. Zhao, R. G. Robinson, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, R. E. Jones, G. D. Hartman, H. E. Huber, M. E. Duggan, C. W. Lindsley, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2008**, *18*, 49-53; b) M. T. Bilodeau, A. E. Balitza, J. M. Hoffman, P. J. Manley, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, K. Haskell, R. E. Jones, K. Leander, R. G. Robinson, A. M. Smith, H. E. Huber, G. D. Hartman, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2008**, *18*, 3178-3182; c) Y. Li, J. Liang, T. Siu, E. Hu, M. A. Rossi, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, R. E. Jones, R. G. Robinson, K. Leander, H. E. Huber, S. Mittal, N. Cosford, P. Prasit, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2009**, *19*, 834-836.

- [69] R. Nussinov, C. J. Tsai, *Cell* **2013**, *153*, 293-305.
- [70] Z. Fang, C. Grutter, D. Rauh, *ACS chemical biology* **2013**, *8*, 58-70.
- [71] a) T. A. Yap, L. Yan, A. Patnaik, I. Fearen, D. Olmos, K. Papadopoulos, R. D. Baird, L. Delgado, A. Taylor, L. Lupinacci, R. Riisnaes, L. L. Pope, S. P. Heaton, G. Thomas, M. D. Garrett, D. M. Sullivan, J. S. de Bono, A. W. Tolcher, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2011**, *29*, 4688-4695; b) L. R. Molife, L. Yan, J. Vitfell-Rasmussen, A. M. Zernhelt, D. M. Sullivan, P. A. Cassier, E. Chen, A. Biondo, E. Tetteh, L. L. Siu, A. Patnaik, K. P. Papadopoulos, J. S. de Bono, A. W. Tolcher, S. Minton, *Journal of hematology & oncology* **2014**, *7*, 1; c) Y. Zhang, H. Yan, Z. Xu, B. Yang, P. Luo, Q. He, *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **2019**, *15*, 767-774.
- [72] <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=MK-2206&cntry=&state=&city=&dist=>. **Stand: 30.06.2021.**
- [73] I. Landel, L. Quambusch, L. Depta, D. Rauh, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2020**, *11*, 225-227.
- [74] a) J.-M. Lapierre, S. Eathiraj, D. Vensel, Y. Liu, C. O. Bull, S. Cornell-Kennon, S. Iimura, E. W. Kelleher, D. E. Kizer, S. Koerner, S. Makhija, A. Matsuda, M. Moussa, N. Namdev, R. E. Savage, J. Szwaya, E. Volckova, N. Westlund, H. Wu, B. Schwartz, *Journal of medicinal chemistry* **2016**, *59*, 6455-6469; b) O. Politz, F. Siegel, L. Bäracker, U. Bömer, A. Hägebarth, W. J. Scott, M. Michels, S. Ince, R. Neuhaus, K. Meyer, A. E. Fernández-Montalván, N. Liu, F. von Nussbaum, D. Mumberg, K. Ziegelbauer, *International journal of cancer* **2017**, *140*, 449-459; c) ArQule Corporate Presentation, a. R. Diseases., **November, 2018**; d) <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=BAY+1125976&cntry=&state=&city=&dist=>. **Stand: 30.06.2021;** e) <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Arq+092&cntry=&state=&city=&dist=>. **Stand: 30.06.2021;** f) <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=arq+751&cntry=&state=&city=&dist=>. **Stand: 30.06.2021.**
- [75] a) ArQule Corporate Presentation, a. R. Diseases., **August, 2019**; b) M. Saleh, Papadpoulo, K., Arabnia, A., Patnaik, A., Stein, R.M., Chai, F., Lamar, M., Savage, R., Abbadessa, G., Tolcher, A., *Poster, 26th EORTC – NCI – AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics November 2014*; c) A. Schneeweiss, D. Hess, M. Joerger, G. Wilkinson, A. Varga, S. Moulder, A. M. Tsimberidou, C. Ma, S. A. Hurvitz, C. Rentzsch, M. Rudolph, S. Thiele, O. Boix, E. Lagkadinou, M. Ocker, *Cancers* **2019**, *11*.
- [76] a) L. G. Biesecker, M. Edwards, S. O'Donnell, P. Doherty, T. MacDougall, K. Tith, J. Kazakin, B. Schwartz, *Cold Spring Harbor molecular case studies* **2020**, *6*; b) ArQule Corporate Presentation, a Portfolio in a Product., **März, 2019.**
- [77] J. Weisner, R. Gontla, L. van der Westhuizen, S. Oeck, J. Ketzer, P. Janning, A. Richters, T. Muhlenberg, Z. Fang, A. Taher, V. Jendrossek, S. C. Pelly, S. Bauer, W. A. van Otterlo, D. Rauh, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2015**, *54*, 10313-10316.
- [78] A. Abdeldayem, Y. S. Raouf, S. N. Constantinescu, R. Moriggl, P. T. Gunning, *Chemical Society reviews* **2020**, *49*, 2617-2687.
- [79] T. S. Mok, Y. L. Wu, M. J. Ahn, M. C. Garassino, H. R. Kim, S. S. Ramalingam, F. A. Shepherd, Y. He, H. Akamatsu, W. S. Theelen, C. K. Lee, M. Sebastian, A. Templeton, H. Mann, M. Marotti, S. Ghiorghiu, V. A. Papadimitrakopoulou, *The New England journal of medicine* **2017**, *376*, 629-640.

- [80] a) R. A. Copeland, D. L. Pompliano, T. D. Meek, *Nature reviews. Drug discovery* **2006**, *5*, 730-739; b) J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, *10*, 307-317; c) T. Schirmeister, J. Kesselring, S. Jung, T. H. Schneider, A. Weickert, J. Becker, W. Lee, D. Bamberger, P. R. Wich, U. Distler, S. Tenzer, P. Johé, U. A. Hellmich, B. Engels, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 8332-8335.
- [81] R. Lonsdale, R. A. Ward, *Chemical Society reviews* **2018**, *47*, 3816-3830.
- [82] N. Uhlenbrock, S. Smith, J. Weisner, **2019**, *10*, 3573-3585.
- [83] S. S. Gambhir, *Nature Reviews Cancer* **2002**, *2*, 683-693.
- [84] K. Lameka, M. D. Farwell, M. Ichise, in *Handbook of Clinical Neurology, Vol. 135* (Eds.: J. C. Masdeu, R. G. González), Elsevier, **2016**, pp. 209-227.
- [85] A. Rahmim, H. Zaidi, *Nuclear Medicine Communications* **2008**, *29*, 193-207.
- [86] H. Herzog, *Radiation Physics and Chemistry* **2007**, *76*, 337-342.
- [87] A. Esser, in *Media in the Enlarged Europe: Politics, Policy and Industry*, **2009**, pp. 23-36.
- [88] J. K. Yoon, B. N. Park, E. K. Ryu, Y. S. An, S. J. Lee, *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*.
- [89] D. W. Townsend, *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **2001**, *42*, 533-534.
- [90] S. R. Cherry, S. S. Gambhir, *ILAR journal* **2001**, *42*, 219-232.
- [91] A. F. Chatziioannou, *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2002**, *29*, 98-114.
- [92] R. Weissleder, *Nature Reviews Cancer* **2002**, *2*, 11-18.
- [93] G. Di Chiro, *Investigative radiology* **1987**, *22*, 360-371.
- [94] S. S. Gambhir, J. Czernin, J. Schwimmer, D. H. Silverman, R. E. Coleman, M. E. Phelps, *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **2001**, *42*, 1s-93s.
- [95] T. A. Smith, *Nucl Med Commun* **1998**, *19*, 97-105.
- [96] T. A. Smith, *Nuclear medicine and biology* **2001**, *28*, 1-4.
- [97] M. Lapela, A. Eigtved, S. Jyrkkiö, R. Grénman, T. Kurki, P. Lindholm, J. Nuutinen, E. Sutinen, O. Solin, I. Bjornskov, P. Bretlau, L. Friberg, S. Holm, M. Jensen, H. Sand Hansen, H. Minn, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **2000**, *36*, 858-867.
- [98] T. Akhurst, R. J. Downey, M. S. Ginsberg, M. Gonen, M. Bains, R. Korst, R. J. Ginsberg, V. W. Rusch, S. M. Larson, *The Annals of thoracic surgery* **2002**, *73*, 259-264; discussion 264-256.
- [99] K. A. Krohn, D. A. Mankoff, J. F. Eary, *J Clin Pharmacol* **2001**, *41*, 96S-103S.
- [100] a) A. F. Shields, J. R. Grierson, B. M. Dohmen, H. J. Machulla, J. C. Stayanoff, J. M. Lawhorn-Crews, J. E. Obradovich, O. Muzik, T. J. Mangner, *Nature medicine* **1998**, *4*, 1334-1336; b) L. Zanoni, A. K. Buck, K. Herrmann, in *Oncological PET/CT with Histological Confirmation* (Eds.: J. Cerci, S. Fanti, D. Delbeke), Springer International Publishing, Cham, **2016**, pp. 65-76.
- [101] K. Hermann, O. E. Neiweg, S. P. Povoski, *Springer International Publishing* **2016**.
- [102] M. E. Phelps, *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **2000**, *41*, 661-681.
- [103] J. Börgel, T. Ritter, *Chem* **2020**, *6*, 1877-1887.
- [104] P. Muller, *Pure and Applied Chemistry* **1994**, *66*, 1077-1184.
- [105] a) K. Yamamoto, J. Li, J. A. O. Garber, J. D. Rolfes, G. B. Boursalian, J. C. Borghs, C. Genicot, J. Jacq, M. van Gastel, F. Neese, T. Ritter, *Nature* **2018**, *554*,

- 511-514; b) J. Börgel, L. Tanwar, F. Berger, T. Ritter, *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 16026-16031.
- [106] D. M. M. Hassan Beyzavi, Martin G. Strebl, Constanze N. Neumann, Erica M. D'Amato, Junting Chen, Jacob M. Hooker, and Tobias Ritter, *ACS Cent Sci.* **2017**, *3*(9), 944–948.
- [107] A. C. Lai, C. M. Crews, *Nature Reviews Drug Discovery* **2017**, *16*, 101-114.
- [108] a) H. S. Tae, T. B. Sundberg, T. K. Neklesa, D. J. Noblin, J. L. Gustafson, A. G. Roth, K. Raina, C. M. Crews, *Chembiochem* **2012**, *13*, 538-541; b) T. K. Neklesa, C. M. Crews, *Nature* **2012**, *487*, 308-309.
- [109] T. Xie, S. M. Lim, K. D. Westover, M. E. Dodge, D. Ercan, S. B. Ficarro, D. Udayakumar, D. Gurbani, H. S. Tae, S. M. Riddle, T. Sim, J. A. Marto, P. A. Jänne, C. M. Crews, N. S. Gray, *Nature chemical biology* **2014**, *10*, 1006-1012.
- [110] S. M. Lim, T. Xie, K. D. Westover, S. B. Ficarro, H. S. Tae, D. Gurbani, T. Sim, J. A. Marto, P. A. Jänne, C. M. Crews, N. S. Gray, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2015**, *25*, 3382-3389.
- [111] Marcus J. C. Long, Deviprasad R. Gollapalli, L. Hedstrom, *Chemistry & biology* **2012**, *19*, 629-637.
- [112] A. Mullard, *Nature Reviews Drug Discovery* **2019**, *18*, 895.
- [113] K. M. Sakamoto, K. B. Kim, A. Kumagai, F. Mercurio, C. M. Crews, R. J. Deshaies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 8554-8559.
- [114] a) Y. Itoh, M. Ishikawa, M. Naito, Y. Hashimoto, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 5820-5826; b) A. R. Schneekloth, M. Pucheault, H. S. Tae, C. M. Crews, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2008**, *18*, 5904-5908; c) D. P. Bondeson, A. Mares, I. E. D. Smith, E. Ko, S. Campos, A. H. Miah, K. E. Mulholland, N. Routly, D. L. Buckley, J. L. Gustafson, N. Zinn, P. Grandi, S. Shimamura, G. Bergamini, M. Faelth-Savitski, M. Bantscheff, C. Cox, D. A. Gordon, R. R. Willard, J. J. Flanagan, L. N. Casillas, B. J. Votta, W. den Besten, K. Famm, L. Kruidenier, P. S. Carter, J. D. Harling, I. Churcher, C. M. Crews, *Nature chemical biology* **2015**, *11*, 611-617; d) J. Lu, Y. Qian, M. Altieri, H. Dong, J. Wang, K. Raina, J. Hines, James D. Winkler, Andrew P. Crew, K. Coleman, Craig M. Crews, *Chemistry & biology* **2015**, *22*, 755-763.
- [115] D. P. Bondeson, B. E. Smith, G. M. Burslem, A. D. Buhimschi, J. Hines, S. Jaime-Figueroa, J. Wang, B. D. Hamman, A. Ishchenko, C. M. Crews, *Cell chemical biology* **2018**, *25*, 78-87.e75.
- [116] a) A. P. Crew, K. Raina, H. Dong, Y. Qian, J. Wang, D. Vigil, Y. V. Serebrenik, B. D. Hamman, A. Morgan, C. Ferraro, K. Siu, T. K. Neklesa, J. D. Winkler, K. G. Coleman, C. M. Crews, *Journal of medicinal chemistry* **2018**, *61*, 583-598; b) H. Tovell, A. Testa, H. Zhou, N. Shpiro, C. Crafter, A. Ciulli, D. R. Alessi, *ACS chemical biology* **2019**, *14*, 2024-2034.
- [117] H. Lebraud, D. J. Wright, C. N. Johnson, T. D. Heightman, *ACS central science* **2016**, *2*, 927-934.
- [118] a) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04072952?term=ARV-471&draw=2&rank=1>, **Stand: 09.07.2021**; b) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03888612?term=ARV-110&draw=2&rank=1>, **Stand: 09.07.2021**.
- [119] A. Mullard, *Nature reviews. Drug discovery* **2021**, *20*, 247-250.
- [120] a) R. K. Henning, J. O. Varghese, S. Das, A. Nag, G. Tang, K. Tang, A. M. Sutherland, J. R. Heath, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2016**, *22*, 196-200; b) I. You, E. C. Erickson, K. A.

- Donovan, N. A. Eleuteri, E. S. Fischer, N. S. Gray, A. Toker, *Cell chemical biology* **2020**, *27*, 66-73.e67.
- [121] V. S. Rao, K. Srinivas, G. N. Sujini, G. N. Kumar, *International journal of proteomics* **2014**, *2014*, 147648.
- [122] B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annual review of biochemistry* **2008**, *77*, 383-414.
- [123] U. Rix, G. Superti-Furga, *Nature chemical biology* **2009**, *5*, 616-624.
- [124] J. Salami, C. M. Crews, *Science (New York, N.Y.)* **2017**, *355*, 1163-1167.
- [125] a) L. E. Edgington-Mitchell, M. Bogyo, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2016**, *1419*, 27-39; b) L. Wang, M. S. Frei, A. Salim, K. Johnsson, *Journal of the American Chemical Society* **2019**, *141*, 2770-2781.
- [126] a) U. Kaur, H. Meng, F. Lui, R. Ma, R. N. Ogburn, J. H. R. Johnson, M. C. Fitzgerald, L. M. Jones, *Journal of proteome research* **2018**, *17*, 3614-3627; b) E. V. Petrotchenko, C. H. Borchers, *Mass Spectrometry Reviews* **2010**, *29*, 862-876.
- [127] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 4686-4687.
- [128] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS chemical biology* **2014**, *9*, 592-605.
- [129] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [130] Z. Fang, J. R. Simard, D. Plenker, H. D. Nguyen, T. Phan, P. Wolle, S. Baumeister, D. Rauh, *ACS chemical biology* **2015**, *10*, 279-288.
- [131] V. Sunjic, M. J. Parnham, *Organic Synthesis in Drug Discovery and Development* **2011**.
- [132] Dissertation N. Uhlenbrock, Dortmund, **2019**.
- [133] W. Steglich, G. Höfle, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1969**, *8*, 981-981.
- [134] A. T. James, E. E. Turner, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1950**, 1515-1519.
- [135] S. Bhattacharyya, *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 2401-2404.
- [136] C. F. Lane, *Synthesis* **1975**, *1975*, 135-146.
- [137] M. Hidalgo, F. Amant, A. V. Biankin, E. Budinská, A. T. Byrne, C. Caldas, R. B. Clarke, S. de Jong, J. Jonkers, G. M. Mælandsmo, S. Roman-Roman, J. Seoane, L. Trusolino, A. Villanueva, *Cancer discovery* **2014**, *4*, 998-1013.
- [138] L. Santarpia, S. M. Lippman, A. K. El-Naggar, *Expert opinion on therapeutic targets* **2012**, *16*, 103-119.
- [139] W. De Roock, B. Claes, D. Bernasconi, J. De Schutter, B. Biesmans, G. Fountzilias, K. T. Kalogeras, V. Kotoula, D. Papamichael, P. Laurent-Puig, F. Penault-Llorca, P. Rougier, B. Vincenzi, D. Santini, G. Tonini, F. Cappuzzo, M. Frattini, F. Molinari, P. Saletti, S. De Dosso, M. Martini, A. Bardelli, S. Siena, A. Sartore-Bianchi, J. Tabernero, T. Macarulla, F. Di Fiore, A. O. Gangloff, F. Ciardiello, P. Pfeiffer, C. Qvortrup, T. P. Hansen, E. Van Cutsem, H. Piessevaux, D. Lambrechts, M. Delorenzi, S. Tejpar, *The Lancet. Oncology* **2010**, *11*, 753-762.
- [140] A. Suzuki, *Journal of Organometallic Chemistry* **1999**, *576*, 147-168.
- [141] T. E. Barder, S. D. Walker, J. R. Martinelli, S. L. Buchwald, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 4685-4696.
- [142] J. M. Schomaker, T. J. Delia, *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 7125-7128.
- [143] G. Espino, A. Kurbangalieva, J. M. Brown, *Chemical Communications* **2007**, 1742-1744.

- [144] J. W. Chang, M. Bhuiyan, H. M. Tsai, H. J. Zhang, G. Li, S. Fathi, D. C. McCutcheon, L. Leoni, R. Freifelder, C. T. Chen, R. E. Moellering, **2020**, *59*, 15161-15165.
- [145] a) H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chemical reviews* **2010**, *110*, 2620-2640; b) K. O. Vasquez, C. Casavant, J. D. Peterson, *PloS one* **2011**, *6*, e20594.
- [146] J. G. Tate, S. Bamford, H. C. Jubb, Z. Sondka, D. M. Beare, N. Bindal, H. Boutselakis, C. G. Cole, C. Creatore, E. Dawson, P. Fish, B. Harsha, C. Hathaway, S. C. Jupe, C. Y. Kok, K. Noble, L. Ponting, C. C. Ramshaw, C. E. Rye, H. E. Speedy, R. Stefanicsik, S. L. Thompson, S. Wang, S. Ward, P. J. Campbell, S. A. Forbes, *Nucleic Acids Research* **2019**, *47*, D941-D947.
- [147] S. A. Santi, H. Lee, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2009**, *298*, C580-C591.
- [148] Masterarbeit M. Lindemann, Dortmund **2017**.
- [149] A. D. Basso, D. B. Solit, G. Chiosis, B. Giri, P. Tsihchlis, N. Rosen, *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, 39858-39866.
- [150] T. Barf, T. Covey, R. Izumi, B. van de Kar, M. Gulrajani, B. van Lith, M. van Hoek, E. de Zwart, D. Mittag, D. Demont, S. Verkaik, F. Krantz, P. G. Pearson, R. Ulrich, A. Kaptein, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2017**, *363*, 240-252.
- [151] Masterarbeit S. Brandherm, Dortmund, **2018**.
- [152] M. E. Due-Hansen, S. K. Pandey, E. Christiansen, R. Andersen, S. V. F. Hansen, T. Ulven, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, *14*, 430-433.
- [153] B. F. Krippendorff, R. Neuhaus, P. Lienau, A. Reichel, W. Huisinga, *Journal of biomolecular screening* **2009**, *14*, 913-923.

**Eidesstaatliche Erklärung****Lindemann, Marius**Name, Vorname  
(Surname, first name)**149579**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 obenstehende 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.

Unna, 08.11.21

Ort, Datum  
(Place, date)Unterschrift  
(Signature)Titel der Dissertation:  
(Title of the thesis):

Synthese, *in vitro* und *in vivo* Evaluierung Molekularer Sonden, PROTACs und PET-Tracern 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.

Unna, 08.11.21

Ort, Datum  
(Place, date)Unterschrift  
(Signature)