

**Struktur-basiertes Design, Synthese und  
Charakterisierung von Wirkstoffen zur  
kovalent-allosterischen Adressierung der  
Proteinkinase Akt**

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

Technische Universität Dortmund

**Sven Brandherm**

Geboren am 05.12.1990 in Hamm

Mai 2024

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



*Für meine Eltern*

*"I spend a lot of time in the stacks in libraries, and you're looking at these stacks of unreadable masterpieces that men devoted their lives, standing on the shoulders of geniuses before them. Bertrand Russell, Principia Mathematica, and all these things that – who will read those? How will they change society? How do they really factor into things? And me? I was able to contribute [...]. These are all words and expressions. Things that we created. It's our language but it's also physical. And it helps define us as individuals, how we fit within that framework, and it helps define the community itself. And so, when I look and I think of the contribution of all these geniuses, and the smell and the browning paper of these dusty books that no one will read, I think that I am so rich and what I have done has meaning."*

-John Rodney Mullen



Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Februar 2019 bis Mai 2024 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh im Fachbereich Chemische Biologie und Medizinische Chemie der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden die Bachelorarbeit von Josefa Kremeyer (2021) sowie die Masterarbeit von Tonia Kirschner (2020). Im Rahmen ihrer praktischen Ausbildung wurden die Chemisch-technischen Assistenten Yasmin Wenderoth und Fynn Sörries im Zeitraum von Dezember 2020 bis März 2021 betreut.

Diese Arbeit basiert in Teilen auf internen und vertraulichen Daten der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. D. Rauh, die als Erfindungsmeldungen der Technischen Universität Dortmund eingereicht wurden und deren Publikation vorbereitet ist. Folgende Publikationen und Erfindungen sind Teil dieser Dissertation:

**Publikationen:**

- [1] K.A. Pervanidis, G.D. D`Angelo, J. Weisner, **S. Brandherm**, D. Rauh. Akt Inhibitor Advancements: From Capivasertib Approval to Covalent-Allosteric Promises. *J. Med. Chem.* **2024**, 67, 6052-63.
- [2] **S. Brandherm et al.** Design, Synthesis and Characterization of the Next-Generation of Covalent-Allosteric Akt Inhibitors (CAAI). *Ready to publish*
- [3] **S. Brandherm et al.** Enhancing the Arsenal: The Evolution of the Next-Generation of Covalent-Allosteric Akt Inhibitors (CAAI). *Ready to publish*
- [4] **S. Brandherm et al.** CyPHi: Covalent-Allosteric Inhibition of Akt Beyond the Activation Loop. *Ready to publish*

**Erfindungsmeldungen:**

- TU Dortmund Az- 12/21-03 Rauh
- TU Dortmund Az- 25/23-03 Rauh

## Danksagung

Die Fertigstellung dieser Dissertation markiert den Abschluss einer herausfordernden und zugleich bereichernden Reise, auf der mir viele Menschen zur Seite standen. Die Versuche, meine Dankbarkeit in Worte zu fassen, scheinen kaum der Größe der Unterstützung gerecht zu werden, die ich während meiner Zeit als Doktorand erfahren habe.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh, gilt mein größter Dank für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die spannenden und herausfordernden Fragestellungen, die ich mit kreativer Freiheit bearbeiten durfte, sowie für die Bereitstellung sämtlicher Mittel und den Zugang zu einem überaus privilegierten Laborkomplex. Darüber hinaus bedanke ich mich für die zahlreichen wissenschaftlichen und privaten Diskussionen, die Ratschläge, das entgegengebrachte Vertrauen und die Wertschätzung in jeglicher Hinsicht.

Herrn Prof. Dr. Daniel Summerer, möchte ich meinen herzlichsten Dank für die Übernahme des Koreferats meiner Dissertation aussprechen. Ebenso danke ich ihm für den stets freundlichen und bereichernden Austausch während meines chemisch-biologischen Studiums.

Meinen Mentoren, Herrn Dr. Jörn Weisner und Frau Dr. Lena Quambusch, möchte ich von ganzem Herzen danken. Ich hatte das besondere Privileg, mit euch in einem produktiven Akt-Team zu arbeiten. Eure Geduld und Bereitschaft, meine unzähligen Fragen zu beantworten, die euch nie zu ermüden schienen, haben meine Forschungsarbeit maßgeblich bereichert. Eure Anleitung und Unterstützung waren für mich während meiner gesamten Doktorarbeit von unschätzbarem Wert. Außerdem danke ich euch vielmals für die Durchführung der HTRF- und CTG-Assays sowie für die kritische Durchsicht meiner Dissertation.

Ebenso möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Akt-Teams bedanken, insbesondere bei Dr. Ina Landel, Dr. Laura Depta, Dr. Silke Kleinbölting, Dr. Christiane Ehrt, Dr. Janina Niggenaber und Dr. Matthias Müller, für die zahlreichen Diskussionen, die Durchführung von biologischen Assays, die Strukturaufklärung und die stets reibungslose Arbeitsatmosphäre im Team. Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Tobias Grabe für die unzähligen chemischen und privaten Diskussionen, den anhaltenden Austausch über neuartige Synthesen und Sammelkarten sowie für die Integration von Hans A. in den Arbeitskreis.



Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Rauh für das angenehme Arbeitsklima und die alltäglichen Kleinigkeiten, die es mir jeden Tag ermöglichten, den Arbeitskreis sowohl mit einem Lächeln zu betreten als auch zu verlassen. Besonders hervorheben möchte ich meine (ehemaligen) Büropartner Dr. Mike Bührmann, Dr. Lena Quambusch, Dr. Niklas Uhlenbrock und Dr. Marius Lindemann, sowie meine Bachelor- und Masterstudentinnen Josefa Kremeyer und Tonia Kirschner und meine Auszubildenden Fynn Sörries und Yasmin Wenderoth. Ein ganz besonderer Dank gilt ebenfalls den administrativen und technischen Mitarbeitern der AG Rauh, Martina Reibner, Maria Sergani, Petra Alhorn, Ulrich Schoppe, Andreas Arndt und Alicia Wachholz für ihre stetige Unterstützung und den stets freundlichen Austausch. Dem gesamten Team des NMR-Labors der TU Dortmund, insbesondere Herrn Dr. Bastian Graben, danke ich für die Vielzahl an Sondermessungen und die Archivierung von bereits verloren geglaubten Datensätzen. Weiterhin danke ich Herrn Holger Konopka und seinem Team aus der mechanischen Werkstatt der TU Dortmund für die zahlreichen schnellen Reparaturen und die Wartung unserer Laborgeräte sowie für die Bereitstellung von Sonderanfertigungen jeglicher Art.

Im Rahmen des Drug Discovery Hub Dortmund (DDHD) möchte ich mich bei Frau Dr. Laura Levy von der Taros GmbH für den fachlichen Austausch im Akt-Projekt bedanken, bei Frau Dr. Christina Cadenas, Frau Dr. Rosemarie Marchan und Herrn Simon Schaefers vom IfADo für die durchgeführten Tierstudien sowie bei Herrn Dr. Matthias Baumann, Frau Dr. Anke Unger, Herrn Dr. Julian Engel und der gesamten PK-Abteilung des Lead Discovery Center GmbH Dortmund für die pharmakokinetischen Studien. Dem gesamten DDHD-Konsortium danke ich für den wissenschaftlichen Austausch und die fruchtbaren Diskussionen.

In den Momenten des Zweifels und der Herausforderungen waren es die Gespräche, das Lachen und die Ermutigungen meiner Familie und Freunde, die mich immer wieder auf den richtigen Weg zurückgebracht haben. Jedem von euch gebührt eigentlich ein eigenes Kapitel, das am Ende dennoch nicht ausreichen würde, um meine Dankbarkeit vollständig auszudrücken. Für euch alle gilt jedoch: Ich werde niemals eure Geduld, Ehrlichkeit, Güte, Zuversicht, Ausdauer, Hilfsbereitschaft, Friedfertigkeit und eure Liebe mir gegenüber vergessen. Vom tiefsten Herzen: Danke – Abhi, Alf, Andi, Aure, Basi, Chefkoch, Damian, Dani†, Dave, Ebby, Elke, Emo, Frank, Friedel, Heidi, Hendrik, Jenny, Jessy, Jonas, Jörn, Koni, Krusti, Lari, Lars, Lena, Louisa, Marcel, Markus, Martin, Meluhn, Mirko, Niklas, Onkel, Paul†, Pippo, Pocha, Ralph Simon, Sophie, Thor, Timo, Toni, Winti.

Meinen Eltern, die mich auf jedem Weg meiner Reise mit unerschütterlicher Liebe und Unterstützung begleitet haben, möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Ohne eure Weisheit, eure Ermutigung und die unzähligen Opfer, die ihr gebracht habt, wäre dieser Weg unmöglich gewesen. Ihr habt mir nicht nur die Freiheit gegeben, meinen eigenen Weg zu wählen, sondern standet auch bei jedem Schritt fest an meiner Seite. Für eure unermessliche Unterstützung und euer grenzenloses Vertrauen bin ich euch unendlich dankbar.

Natascha, du begleitest mich seit Jahren, bist mein Refugium, meine Inspiration und mein Anker. Deine unendliche Geduld und Liebe waren mein sicherer Hafen in den stürmischsten Zeiten dieser Forschungsreise. Du hast nicht nur unzählige Nachtschichten mit mir geteilt und meine Sorgen mitgetragen, sondern mir auch die Ruhe und Kraft gegeben, weiterzumachen, wenn die Zweifel überwogen. Für all die kleinen und großen Opfer, die du gebracht hast, für deinen bedingungslosen Rückhalt und für alles, was noch kommen wird, bin ich dir zutiefst dankbar. Ohne dich wäre das alles nicht möglich gewesen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XV</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Krebs	1
1.2 Proteinkinasen	4
1.3 Proteinkinase B / Akt	6
1.3.1 Struktur von Akt	7
1.4 PI3K/Akt/mTOR-Signalweg	10
1.5 Klinische Relevanz von Akt	13
1.5.1 Klinisch-relevante Akt-Inhibitoren	15
1.5.2 ATP-kompetitive Akt-Inhibitoren	16
1.5.3 Allosterische Akt-Inhibitoren	19
1.5.4 Kovalent-Allosterische Akt-Inhibitoren (CAAs)	22
<b>2 Motivation und Zielsetzung</b>	<b>25</b>
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>29</b>
3.1 Struktur-basiertes Design der nächsten Generationen von CAAs	29
3.2 Synthese der 1. Generation neuartiger CAAs	31
3.2.1 Retrosynthetische Aufarbeitung	31
3.2.2 Synthese des östlichen Molekülteils	33
3.2.3 Synthese des westlichen Molekülteils	36
3.2.4 Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek	45
3.3 <i>in vitro</i> Charakterisierung der 1. Generation neuartiger CAAs	49
3.4 Strukturanalyse der 1. Generation neuartiger CAAs	56
3.5 Synthese der 2. Generation neuartiger CAAs	60
3.6 <i>in vitro</i> Charakterisierung der 2. Generation neuartiger CAAs	70
3.7 Strukturanalyse der 2. Generation neuartiger CAAs	79
3.8 Design und Synthese neuartiger CAAs zur Adressierung alternativer Cysteine	82

3.9 <i>in vitro</i> Charakterisierung neuartiger CAAIs zur Adressierung alternativer Cysteine	90
3.10 Strukturanalyse neuartiger CAAIs zur Adressierung alternativer Cysteine	93
3.11 Design und Synthese von chemischen Sonden zur Adressierung von Akt	96
3.12 <i>in vitro</i> Charakterisierung von chemischen Sonden zur Adressierung von Akt	100
<b>4 Kurzfassung</b>	<b>105</b>
<b>5 Abstract</b>	<b>109</b>
<b>6 Experimenteller Teil</b>	<b>113</b>
6.1 Material und Methoden	113
6.2 Synthesevorschriften und Analytik	115
6.3 HTRF-Aktivitätsassay	228
6.4 MS-Analytik zum Nachweis der kovalenten Proteinmodifikation	229
6.5 Proteinexpression und -reinigung	230
6.6 Protein Co-Kristallisation	230
6.7 Western-Blot-Analyse	231
6.8 Antikörper	232
6.9 Glutathion (GSH)-Assay	233
6.10 Zellviabilitäts Assay zur EC <sub>50</sub> -Bestimmung	234
6.11 Bestimmung der <i>in vitro</i> ADME-Parameter	235
6.11.1 SolRank-Assay	235
6.11.2 Caco-2-Assay	235
6.11.3 Assay zur Bestimmung der metabolischen Stabilität (Phase I)	236
6.11.4 Assay zur Bestimmung der metabolischen Stabilität (Phase II)	236
6.11.5 Assay zur Bestimmung der Plasma-Proteinbindung	236
6.11.6 Assay zur Bestimmung der Plasmastabilität	236
<b>7. Quellenverzeichnis</b>	<b>237</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>253</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)</b>	<b>258</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetylierung
AcOH	Essigsäure
ADME	Engl. <i>absorption, distribution, metabolism, excretion</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMP-PNP	ATP-Analogon Adenosin-5-( $\beta$ , $\gamma$ -imido)triphosphat
APLs	Alkylphospholipide
aq.	wässrig
Äq.	Äquivalent(e)
AS	Aminosäuren
AS160	Engl. <i>Akt substrate of 160 kDa</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Engl. <i>area under the curve</i>
Bad	Engl. <i>Bcl-2-Antagonist of Cell Death</i>
BC	Brustkrebs
BCR	B-Zell-Rezeptor
Boc	Boc-Schutzgruppe ( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
C18	Octadecyl-funktionalisiertes Kieselgel
CAAI	Engl. <i>Covalent Allosteric Akt Inhibitor</i>
cLogP	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
CML	chronisch-myeloische Leukämie
CRC	Darmkrebs
CRISPR	Engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CTG	Engl. <i>CellTiter-Glo</i>
CyPHi	Engl. <i>cysteine-alkylating pleckstrin homology domain inhibitors</i>
DCM	Dichlormethan
dDCM	wasserfreies DCM
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O
DIPEA	Diisopropylethylamin
DME	Ethylenglycoldimethylether
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

dTHF	wasserfreies THF
EC <sub>50</sub>	halbmaximale effektive Konzentration
EGFR	Engl. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	Engl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assays</i>
EP	Engl. <i>eastern part</i>
ER	Estrogenrezeptor
ESI	Elektrospray Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
FDA	Engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FoxO1	Engl. <i>Forkhead box protein O1</i>
G6P	Glukose-6-Phosphat
GABA <sub>A</sub> R	$\gamma$ -Aminobuttersäure Typ A Rezeptor
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GEF	GTP-Austauschfaktor
GlcNac	Glykosylierung
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Engl. <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2-	HER2-negativ
HHT	Hereditärer Hämorrhagischer Teleangiektasie
HM	hydrophobes Motiv
HPLC-MS	Hochleistungs-flüssigkeits-chromatographie-Massenspektrometrie
HR+	Hormonrezeptor-positiv
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie
HTRF	Engl. <i>homogeneous time resolved fluorescence</i>
HTS	Hochdurchsatz-Durchmusterung
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
iPrOH	Isopropylalkohol
LSF	Engl. <i>late-stage functionalization</i>
MDM2	Engl. <i>mouse double minute 2 homolog</i>



Me	Methylierung
MS	Engl. <i>mass spectrometry</i>
MSD	Merck Sharp & Dome
mTOR	Engl. <i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	Engl. <i>mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	Engl. <i>mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
n.d.	nicht bestimmt
NCDs	nichtübertragbare Krankheiten
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
NMR	Kernspinresonanz
NTA	Nitrilotriessigsäure
NzS	<i>N</i> -Halogen-succinimid
OC	Eierstockkrebs
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Prostatakrebs
PD	Pharmakodynamik
PDB	Engl. <i>protein data bank</i>
PDK1	Engl. <i>phosphoinositide-dependent-kinase-1</i>
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
PFKFB2	Phosphofrucotokinase-2
PFS	progressionsfreies Überleben
PH	Engl. <i>pleckstrin homology</i>
PHLPP1/2	Engl. <i>PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase 1/2</i>
PI	Phosphoinositol
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIF	PDK-interagierendes Fragment
PIK3CA	Engl. <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
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

PPB	Plasmaproteinbindung
ppm	Engl. <i>parts per million</i>
PR	Progesteronrezeptor
PRAS40	Engl. <i>proline-rich AKT substrate of 40 kDa</i>
PROC	Platin-resistentes Ovarialkarzinom
PROS	Engl. <i>PIK3CA-related overgrowth spectrum</i>
PS	Proteus Syndrom
PTEN	Engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	Rat sarcoma
RIPA	Engl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
ROCK	Engl. <i>Rho-associated protein kinases</i>
rt	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SA	Streptavidin
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung
SBDD	Engl. <i>Structure-Based Drug Design</i>
S <sub>E</sub> Ar	elektrophile aromatische Substitution
SGK	Engl. <i>ribosomal S6 kinase</i>
SiO <sub>2</sub>	Kieselgel
SK	Seborrhoischen Keratose
S <sub>N</sub> Ar	nukleophile aromatische Substitution
SUMO	SUMOylierung
T3P	Propanphosphonsäureanhydrid
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TEA	Triethylamin
TEV	Engl. <i>Tobacco Etch Virus</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TLC	Dünnschicht-Chromatographie
TLC-MS	TLC-Massenspektrometrie

TNBC	Engl. <i>triple-negative breast cancer</i>
TPP	Triphenylphosphin
TPPO	Triphenylphosphinoxid
TRAIL	Engl. <i>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TSC	Engl. <i>tuberous sclerosis complex</i>
UB	Ubiquitinilierung
UDPGA	Engl. <i>Uridine diphosphate glucuronic acid</i>
WB	Western-Blot
WF	Wachstumsfaktor
WP	Engl. <i>western part</i>
wt	Wildtyp
WW	Wechselwirkung

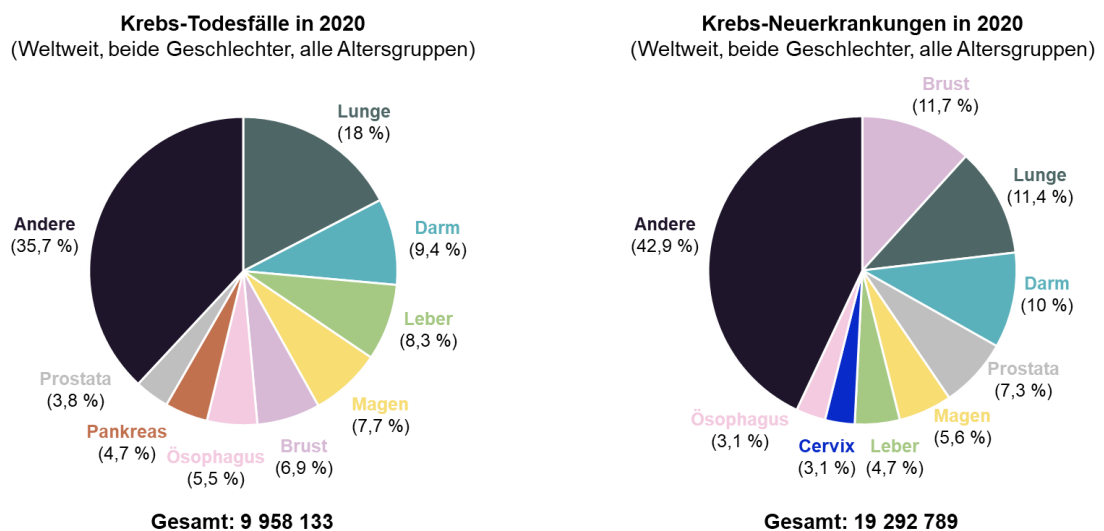
# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs

Krebs beschreibt eine Gruppe von Krankheiten, die durch unkontrolliertes Wachstum und Ausbreitung abnormaler Zellen gekennzeichnet ist. Wenn die Ausbreitung nicht kontrolliert werden kann, führt sie zum Tod.<sup>1</sup> Bei jedem zweiten Mann und jeder dritten Frau wird im Laufe ihres Lebens Krebs diagnostiziert.<sup>2</sup>

Die ältesten Aufzeichnungen, die eine allgemeine Beschreibung von menschlichen Krebserkrankungen beinhalten, wurden Ende des 19. Jahrhunderts in antiken ägyptischen Papyri des EDWIN SMITH und GEORG EBERS entdeckt und werden auf das 16. Jahrhundert v. Chr. datiert.<sup>3</sup> Da es sich bei den entschlüsselten Hieroglyphen um archaische, in dieser Zeit nicht mehr verwendete Schriftzeichen handelt, gehen Experten davon aus, dass es sich um Abschriften handeln muss, die heute über 4500 Jahre alt wären.<sup>4</sup> Schon in dieser Zeit konnten Gelehrte zwischen gut- und bösartigen Neoplasmen unterscheiden und waren in der Lage, verschiedene Behandlungsmethoden wie die chirurgische Exzision und die Kauterisation von Wunden anzuwenden.<sup>5</sup> Mit dem Beginn des 20. Jahrhunderts wurden bedeutende Fortschritte im Verständnis der Strukturen, Funktionen und Chemie lebender Organismen erzielt. Es etablierte sich eine Wissenschaft, welche die Grundlage der heutigen Onkologie darstellt. Die Entdeckung der Anästhesie durch LONG<sup>6</sup> und der Asepsis durch LISTER<sup>7</sup>, zusammen mit Fortschritten in chirurgischen Techniken, der Herstellung von Arsphenamin<sup>8</sup> zusammen mit dem Zufallsfund der Penicilline durch FLEMING<sup>9</sup> brachten die Chirurgie in den Fokus der Frühphasenbehandlung von Krebs und förderten die Rekonvaleszenz. Die Entdeckung von Röntgenstrahlen durch RÖNTGEN, Uran durch BECQUEREL sowie von Radium und Polonium durch Marie und Pierre CURIE, die Hypothesen von EHRLICH zur *Immune Surveillance*<sup>10</sup> und von BOVERI „Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren“<sup>11</sup> markierten den Beginn der modernen diagnostischen und therapeutischen Radiologie und Nuklearmedizin, sodass eine erfolgreiche Behandlung von Krebs in greifbare Nähe rückte.<sup>3</sup> Bemerkenswerterweise leitete die toxische Wirkung des im ersten Weltkrieg verwendeten chemischen Kampfstoffes Senfgas (1-Chlor-2-[(2-chlorethyl)sulfanyl]ethan)<sup>12,13</sup> und dessen Derivate *Nitrogen Mustards* (Substitution des Schwefel- durch ein Stickstoffatom) die Ära der zytotoxischen Chemotherapie ein,<sup>14,15</sup> die wenige Jahre später erstmalig eine vollständige Heilung eines menschlichen, soliden Tumors ermöglichte.<sup>16</sup>

Heute fordern nichtübertragbare Krankheiten (NCDs) jährlich 41 Millionen Todesopfer, was 74 % der globalen Todesfälle entspricht.<sup>17</sup> Krebserkrankungen (10 Mio. Todesfälle in 2020, 19,3 Mio. Neuerkrankungen in 2020)<sup>18</sup> nehmen nach Herz-Kreislaufkrankungen (17,9 Mio. Todesfälle in 2020)<sup>19</sup>, die führende Position unter den NCDs ein. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation ist Krebs in 112 von 183 Ländern die erst- oder zweithäufigste und in weiteren 23 Ländern die dritt- oder vierthäufigste Todesursache unter 70 Jahren.<sup>20</sup> Mit jährlich über 1,8 Mio. weltweiten Todesfällen ist Lungenkrebs die führende Ursache der krebsbedingten Mortalität, gefolgt von Darm-, Leber-, Magen- und Brustkrebs (Abb. 1, links).<sup>21</sup> Mit über 2,3 Mio. neuen Fällen an Brustkrebs (Frauen) wurde Lungenkrebs (2,2 Mio.) im Jahr 2020 als jahrelang am häufigsten diagnostizierte Form der Neoplasmen verdrängt und steht somit vor Darm-, Prostata-, Magen- und Leberkrebs (Abb. 1, rechts).<sup>21</sup>



**Abbildung 1** Zusammenfassung der weltweit häufigsten Arten an Krebs-Todesfällen und Neuerkrankungen im Jahr 2020 (Die Abbildung ist angelehnt an Globocan 2020).<sup>22</sup>

Die Gründe für die seit Jahren steigende Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen sind komplex, spiegeln aber sowohl das Altern, als auch das Wachstum der Bevölkerung, sowie den Rückgang der Sterblichkeitsraten bei Schlaganfällen und koronaren Herzerkrankungen wider,<sup>23</sup> die mit der sozioökonomischen Entwicklung und persönlichen Lebensstiländerungen verbunden sind.<sup>18,24</sup>

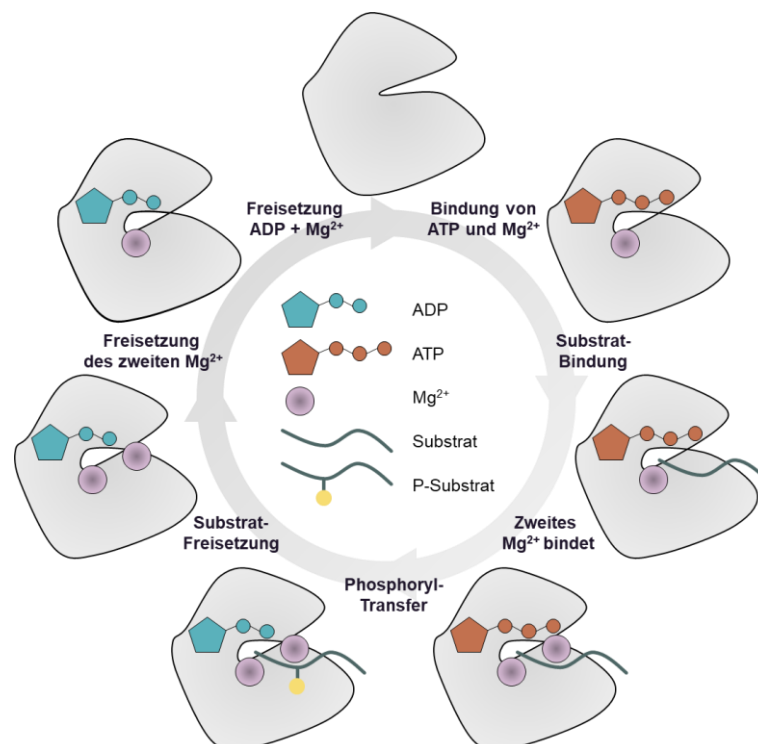
Für das Jahr 2040 wird ein Anstieg der Krebsneuerkrankungen um bis zu 47 % zum Jahr 2020 prognostiziert. Wie bereits für Brust- und Darmkrebs zu beobachten, wird mit steigenden Inzidenzen dieser Krebsarten auch mit einem Anstieg der Sterblichkeitsrate zu rechnen sein, sollten zukünftig nicht genügend Ressourcen für die Forschung und Entwicklung neuartiger Therapien bereitgestellt werden.

In den vergangenen zwei Jahrzehnten hat die Krebsforschung einen umfassenden und komplexen Fundus generiert, der Neoplasmen als Krankheit mit dynamischen Veränderungen im Genom beschreibt. HANAHAN und WEINBERG formulierten Merkmale, die sog. „*hallmarks of cancer*“, ein Organisationsprinzip mit dem die Tumorgenese als Ergebnis einer begrenzten Anzahl von zugrundeliegenden Prinzipien und erworbenen Fähigkeiten verstanden und gezielt adressiert werden kann.<sup>25,26</sup> So wurde kurze Zeit darauf der erste Kinaseinhibitor Imatinib (Gleevec) für die selektive Adressierung des Bcr-Abl Fusionsproteins, das als Ergebnis des Philadelphia-Chromosom-Translokationsereignisses entsteht, für die Behandlung von chronisch-myeloischer Leukämie (CML) durch die *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen.<sup>27</sup> Mit der Vollendung des Humangenom<sup>28</sup> und der Initiierung des ENCODE-Projekts<sup>29,30</sup>, der Entdeckung und Implementierung der CRISPR-Cas9-basierten Genom-Editierung<sup>31-34</sup> sowie den wegweisenden Beschreibungen von CHEN und MELLMAN zur Immunsystem-basierten Erkennung und Neutralisation von Krebszellen<sup>35</sup>, sowie darauf basierende immunologische Therapien<sup>36-39</sup> begann das Zeitalter der molekularen Diagnostik. In dieser Zeit hat sich die konventionelle, breit angewandte zytotoxische Chemotherapie, die einem „*one-size-fits-all*“-Ansatz folgte, zu einer Methodik gewandelt, die individuelle Behandlungsstrategien unter Berücksichtigung von histologischen und molekularbiologischen Subtypen einbezieht.<sup>40,41</sup> Das Ziel dieser Präzisionsmedizin ist es, für jeden Patienten das richtige Medikament in der richtigen Dosierung zum optimalen Zeitpunkt zu finden.<sup>42</sup> Auch wenn so einige Erfolge in der Krebstherapie erzielt werden konnten, ist der „*war on cancer*“<sup>43</sup> noch nicht gewonnen. Aufgrund adaptiver und evasiver Resistenzmechanismen vieler Krebsarten besteht ein dauerhaft steigender Bedarf an neuartigen Wirkstoffen, Technologien und Behandlungsstrategien um diesen Kampf nicht zu verlieren.<sup>44</sup> Im Jahr 2022 erfolgte die Erneuerung der *Cancer Moonshot Initiative* durch den US Präsidenten JOE BIDEN, um Krebs wie wir ihn bisher kennen zu beenden. Die Initiative hat das Ziel durch verbessertes *screening*, neuartige Therapieansätze und gesundheitliche Chancengleichheit die Krebssterblichkeit in den kommenden 25 Jahren um mindestens 50% zu senken und die Erfahrungen von Menschen und ihren Familien, die mit Krebs leben und ihn überleben, zu verbessern.<sup>45</sup>

## 1.2 Proteinkinasen

Ein besonderer Fokus der Präzisionsmedizin liegt auf der zielgerichteten Therapie (*targeted therapy*), welche sich mit der selektiven Adressierung von fehlregulierten Zielproteinen befasst. Aufgrund der Dysregulation der Proteinkinase-Aktivität bei einer Vielzahl von NCDs, darunter auch Krebs, hat sich diese Enzymfamilie zu einem der wichtigsten Ziele für die Entwicklung von Arzneimitteln im 21. Jahrhundert entwickelt.<sup>46,47</sup>

Der Transfer von Phosphorylgruppen stellt eine fundamentale Reaktion in der Biochemie dar. Enzyme, die die  $\gamma$ -Phosphatgruppe des Kofaktors Adenosintriphosphat (ATP) auf einen Akzeptor, die Hydroxylgruppe der Serin-/Threonin- oder Tyrosin-Seitenkette, übertragen, werden als Proteinkinasen bezeichnet und gehören zur Enzymklasse der Transferasen.<sup>48</sup> Die Koordinierung von  $Mg^{2+}$ -Ionen hilft dabei die Bindung von ATP zu stabilisieren und die chemische Reaktion im aktiven Zentrum zu katalysieren. Die Kinaseaktivität umfasst somit die Bindung der Kofaktoren ATP und bivalenten Magnesiumionen sowie dem natürlichen Zielsubstrat, die Induktion der Phosphorylgruppen-Übertragung von ATP auf das Substrat und die abschließende Freisetzung des phosphorylierten Substrats und von Adenosindiphosphat (ADP) (Abb. 2).<sup>49</sup>



**Abbildung 2** Mechanismus der Phosphorylgruppen Übertragung auf ein Substrat am Beispiel der *cyclin-dependent kinase 2* (CDK2). Der Katalysezyklus umfasst die transiente Bindung und Freisetzung von zwei  $Mg^{2+}$  Ionen. (Die Abbildung ist angelehnt an IVANOV 2013).<sup>49</sup>

Solche posttranslationalen Modifikationen (PTMs) in Form von negativ geladenen Phosphatgruppen können die strukturgebende Konformation von Substratproteinen, besonders katalytisch aktiven Enzymen, signifikant verändern, wodurch die direkte katalytische Aktivität oder die Interaktion mit Bindungspartnern moduliert wird. In diesem Kontext kann die Phosphorylierung als ein molekularer Schalter betrachtet werden, der die dynamische Regulation zellulärer Signalwege steuert.<sup>50</sup> Die Aktivität der Kinasen wird auf mehreren strukturellen Organisationsebenen strengt reguliert, um eine Hyperphosphorylierung ihrer Substrate zu vermeiden. So kann die Signaltransduktion durch lokale Interaktionen innerhalb des aktiven Zentrums, durch distale Kontakte zwischen Kinase und Substrat oder durch die Formation von Komplexen mit regulatorischen Faktoren gesteuert werden.<sup>51</sup> Defekte (z.B. durch genetische Mutationen der Kinasen), welche diese regulatorischen Prozesse stören werden häufig mit proliferativen Erkrankungen assoziiert.<sup>52</sup>

Die reversiblen PTMs durch Kinasen können durch Phosphatasen, den Antagonisten der Kinasen, durch Freisetzung von Orthophosphat in einer Hydrolysereaktion aufgehoben werden. Das Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen stellt einen weiteren fein abgestimmten regulatorischen Prozess in einer Vielzahl von zellulären Signaltransduktionswegen dar, so dass Störungen dieser Interaktionen durch genetische Veränderungen, einschließlich Mutationen und Translokationen, sowie Überexpression oder Dysregulation der Proteinkinaseaktivität mit Stoffwechselerkrankungen<sup>53</sup>, chronischen Entzündungsreaktionen<sup>54</sup>, kardialen<sup>55</sup> und neurodegenerativen<sup>56,57</sup> Erkrankungen sowie Neoplasmen<sup>48,57-62</sup> in Verbindung gebracht werden.<sup>46</sup> Von den ca. 20.000 protein-kodierenden Genen des humanen Genoms kodieren ca. 2,5 % für Proteinkinasen.<sup>63</sup> Von den 518 Proteinkinasen sind 244 auf Krebs-assoziierten Amplikons oder anderen Krankheitsloci kartiert.<sup>46,63</sup> Die enorme Relevanz der Kinasen bei NCDs hat zur detaillierten Aufklärung der biologischen Funktionen und enzymatischen Mechanismen vieler Proteinkinasen geführt. Seit der Zulassung von Imatinib im Jahr 2001 wurden bis 2023 insgesamt 72 niedermolekulare Substanzen als Proteinkinase-Inhibitoren von der FDA zugelassen, die jedoch lediglich 10 % der Proteinkinasen adressieren.<sup>46,48,64</sup> Weitere 180 oral-bioverfügbare Kinase-Inhibitoren werden derzeit in klinischen Studien evaluiert und es ist zukünftig mit weiteren therapeutisch validierten Zielen für Proteinkinase-Inhibitoren zu rechnen.<sup>46,48</sup> Mit der Zulassung des ersten Inhibitors der Proteinkinase Akt im November 2023,<sup>65</sup> wurde ein wichtiger Meilenstein in der Entwicklung von Akt-basierten Therapien erreicht, einem Forschungsgebiet, das seit mehr als zwei Jahrzehnten einen Schwerpunkt der medizinisch-chemischen Forschung darstellt. Diese Entwicklung markiert den Beginn eines neuen Kapitels in der zielgerichteten Therapie und unterstreicht die zentrale Rolle der Proteinkinase Akt in der Onkologie.



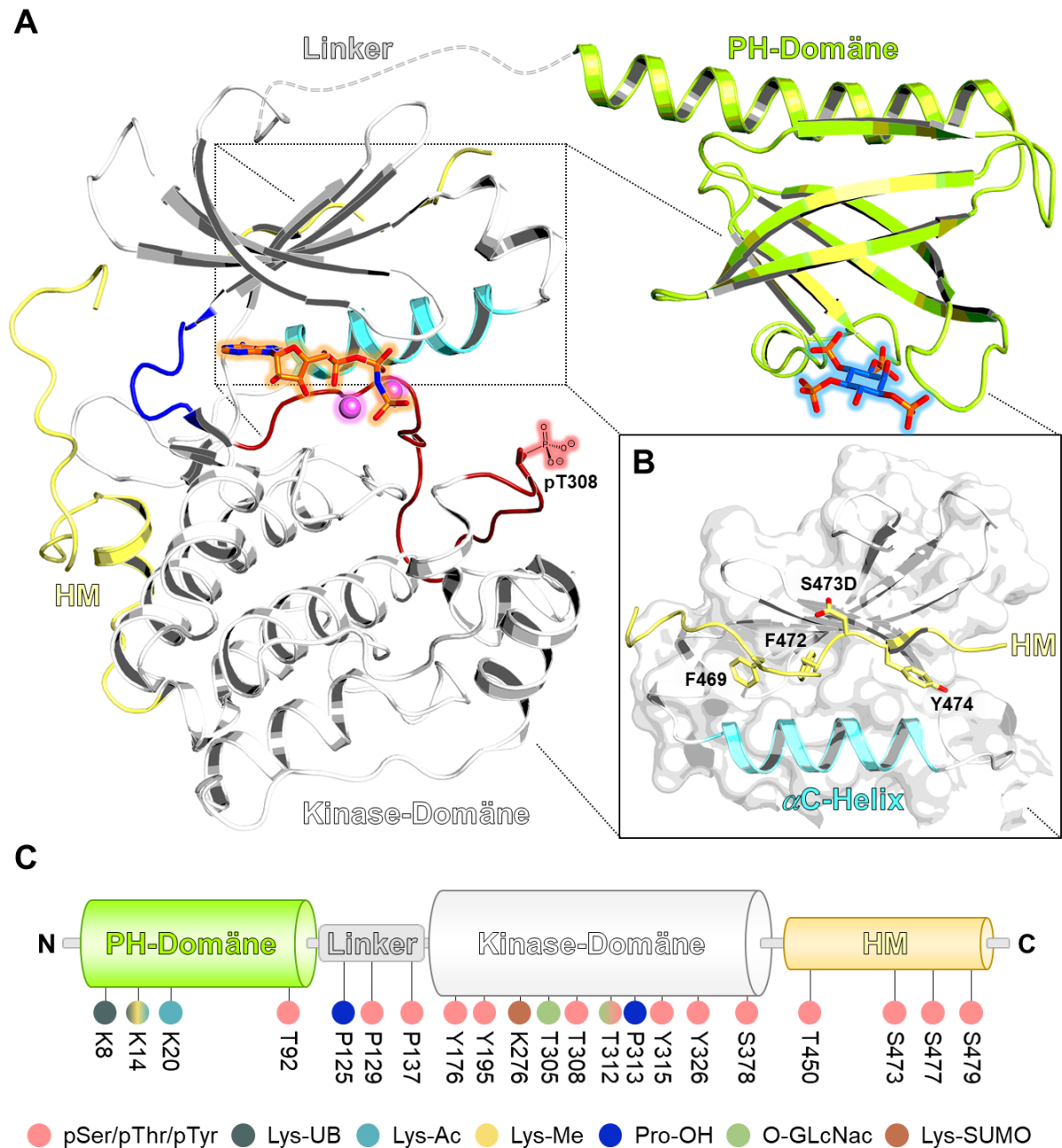
### 1.3 Proteinkinase B / Akt

Die Ser/Thr-spezifische Proteinkinase B (PKB) wurde Ende der 1980er Jahren erstmals als virales Onkogen des transformierenden Retrovirus AKT8 identifiziert, woraufhin sie die Bezeichnung Akt erhielt. Die Klonierung und Charakterisierung des humanen Homologs führte zur Zuordnung der drei im menschlichen Genom konservierten Isozyme, die als Akt1, Akt2 und Akt3 oder alternativ als PKB $\alpha$ , PKB $\beta$  und PKB $\gamma$  bekannt sind.<sup>66</sup> Die drei Akt-Isoformen sind Mitglieder der AGC-Kinase-Superfamilie (benannt nach den Proteinkinasen PKA, PKC und PKG), einer Gruppe von 63 evolutionär verwandten Ser/Thr-spezifischen Proteinkinasen.<sup>67</sup> Diese Superfamilie lässt sich 14 Kinasefamilien und 21 Kinase-Unterfamilien unterteilen zu denen auch PDK1 (*phosphoinositide-dependent-kinase-1*), SGK (*serum and glucocorticoid induced kinases*), S6K (*ribosomal S6 kinase*) und die ROCK (*Rho-associated protein kinases*) Kinasen zählen.<sup>68</sup> Die drei Akt-Isoformen weisen bedingt durch eine Sequenzhomologie von über 80% einen hohen Grad an struktureller Ähnlichkeit auf, unterscheiden sich jedoch in ihrer physiologischen Funktion, ihrem Substratspektrum und ihrer gewebespezifischen Expression.<sup>69</sup> Akt1 konnte hauptsächlich im Zytoplasma und verstärkt an der Plasmamembran nachgewiesen werden, während Akt2 vor allem in den Mitochondrien und im Golgi-Apparat lokalisiert ist und Akt3 als einzige Isoform im Zellkern identifiziert wurde.<sup>70</sup> Gewebespezifische Analysen haben gezeigt, dass Akt1 nahezu ubiquitär exprimiert wird und eine zentrale Rolle spielt, um das Wachstum aller Organe und Blutgefäße (Angiogenese) zu regulieren und die Zellproliferation zu steuern.<sup>71</sup> So wurde für Akt1-*knock-out* Mäuse eine insgesamt kürzere Lebenszeit und eine erhöhte Anfälligkeit für apoptotische-Prozesse beschrieben.<sup>72</sup> Die zweite Isoform wird ähnlich ubiquitär wie Akt1 exprimiert, zeigt ein Expressionsmaximum in Muskel- und Fettgewebe und ist primär für die Regulation der Glukosehomöostase verantwortlich.<sup>73</sup> Akt2-*knock-out* Mäuse zeigten einen diabetischen Phänotyp, der sich durch einen veränderten Blut-Glukosespiegel charakterisieren lässt.<sup>74,75</sup> Akt1/2-doppel-*knock-out* Mäuse zeigten eine verminderte Größe im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Der Phänotyp äußerte sich durch eine extrem dünne und durchscheinende Haut, wobei auch Muskelatrophie und abnormale Knochenentwicklung beobachtet wurden. Die Mäuse starben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt aufgrund von Atemstillstand.<sup>76</sup> Akt3 wird primär mit dem Cortex und dem Hippocampus assoziiert und spielt eine wesentliche Rolle in deren Entwicklung. Untersuchungen an Akt3-*knock-out* Mäusen haben gezeigt, dass eine abgeschwächte mTOR-Signaltransduktion beobachtet wurde, was mit einer reduzierten Hirngröße korreliert.<sup>77,78</sup> Akt1/3-doppel-*knock-out* Mäuse zeigten schwerwiegende Entwicklungsdefekte im Herz- und Nervensystem. Die Mäuse starben bereits während der embryonalen Entwicklung.<sup>79</sup>

Akt2/3-doppel-*knock-out* Mäuse waren als einzige doppel-*knock-out* Variante lebensfähig, wiesen aber Defekte im Glukosestoffwechsel sowie eine verminderte Hirngröße auf.<sup>80</sup> Trotz der spezifischen Defekte die durch transgene Mäuse verdeutlicht werden konnten, verbleibt die Frage nach der funktionellen Redundanz der Akt Isozyme, die bis heute Gegenstand der aktuellen Forschung ist.<sup>81-83</sup> Im Allgemeinen scheint jedoch der Konsens zu überwiegen, dass jede Akt-Isoform eine einzigartige Funktion in der Regulierung des Zellüberlebens einnimmt, wieweil diese Funktion in Abhängigkeit vom genetischen Kontext variieren kann.<sup>69,81,84</sup>

### 1.3.1 Struktur von Akt

Obwohl die drei Akt Isoformen auf unterschiedlichen Genen kodiert sind, weisen sie eine hochkomplexe Struktur auf, die grundsätzlich in drei konservierte Domänen und eine Linkerregion unterteilt werden kann (Abb. 3A und C).<sup>70,85</sup> Dieser Multidomänencharakter und die daraus resultierende dreidimensionale Struktur sind verantwortlich für die einzigartige, fein regulierte Signaltransduktion von Akt. Neben der hoch-konservierten (87-90% Sequenzidentität zwischen den drei Isoformen), katalytisch-aktiven Kinasedomäne (Aminosäuren (AS) in Akt1: 149-408) codieren die AKT-Gene für eine N-terminale, regulatorische, Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne (AS in Akt1: 1-107), sowie für ein C-terminales, hydrophobes Motiv (HM, AS in Akt1: 409-480), welches neben Ser473 auch das konservierte 3-phosphoinositid-abhängige-Proteinkinase 1 (PDK1)-interagierendes Fragment (PIF) beinhaltet.<sup>85,86</sup> Die konservierte Kinasedomäne hat eine homologe Struktur zu allen bekannten Proteinkinasen und ist zu etwa 50 % Sequenzidentisch mit PKC, PKA, SGK und S6K. Die allgemeine Struktur bildet sich aus einer N-terminalen,  $\beta$ -Faltblatt-reichen Subdomäne und einer C-terminalen,  $\alpha$ -Helix-reichen Subdomäne, die über eine flexible Scharnierregion verbunden sind (Abb. 3A). Die Aktivierungsschleife, nahe des aktiven Zentrums enthält das konservierte DFG-Motiv in direkter Nähe zu Thr308, welches durch posttranslationale Phosphorylierung die Aktivierung von Akt initiiert.<sup>87</sup> Die Sekundärstruktur der PH-Domäne setzt sich aus sieben  $\beta$ -Faltblättern sowie zwei  $\alpha$ -Helices zusammen und bildet so ein regulatorisches Strukturelement, welches die Wechselwirkung (WW) mit polaren, mehrfach-phosphorylierten Inositol-Lipidzuckern ermöglicht (Abb. 3A, rechts) und somit die Rekrutierung von Akt zur Plasma- oder anderen Endomembranen begünstigt. PH-Domänen sind unter membran-assoziierten Proteinen wie PDK1, Bruton-Tyrosinkinase (BTK) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) weit verbreitet.<sup>88-90</sup>



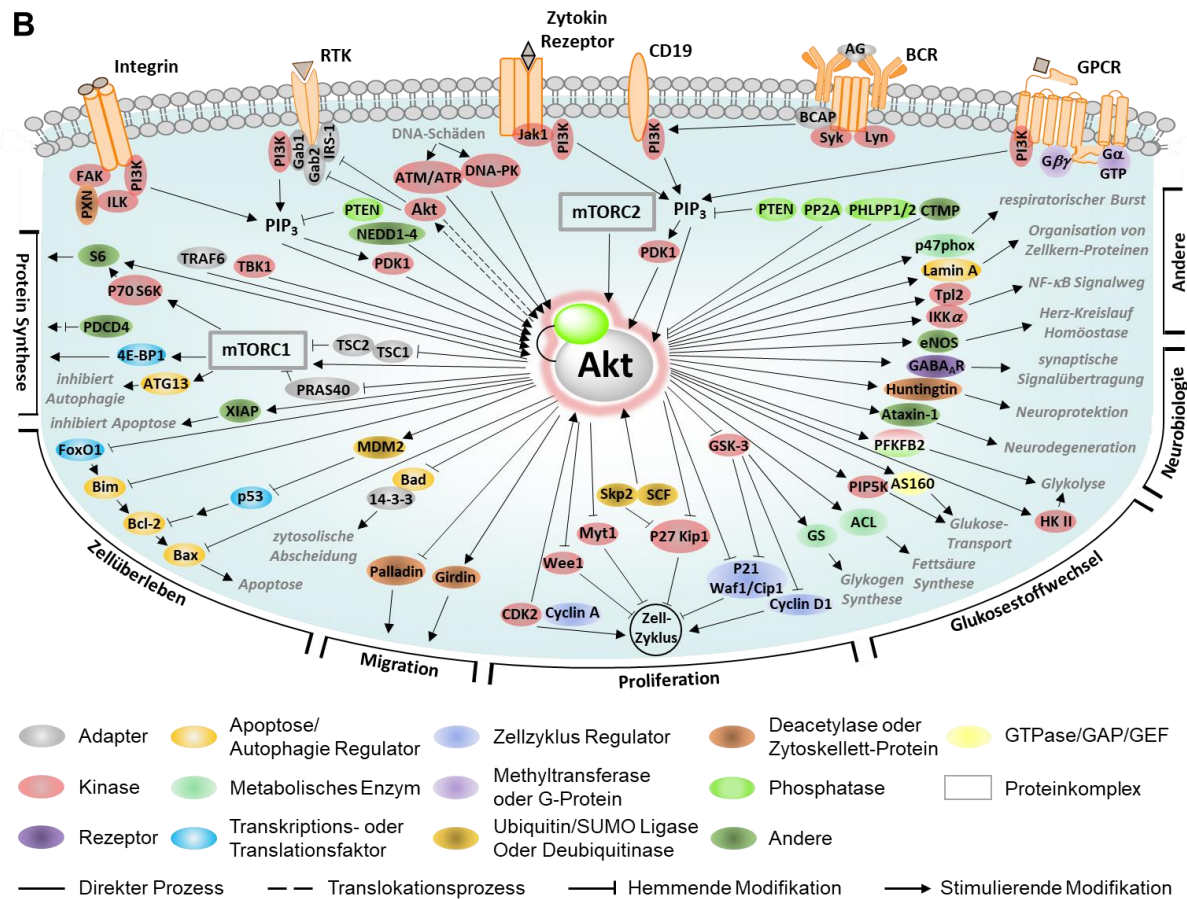
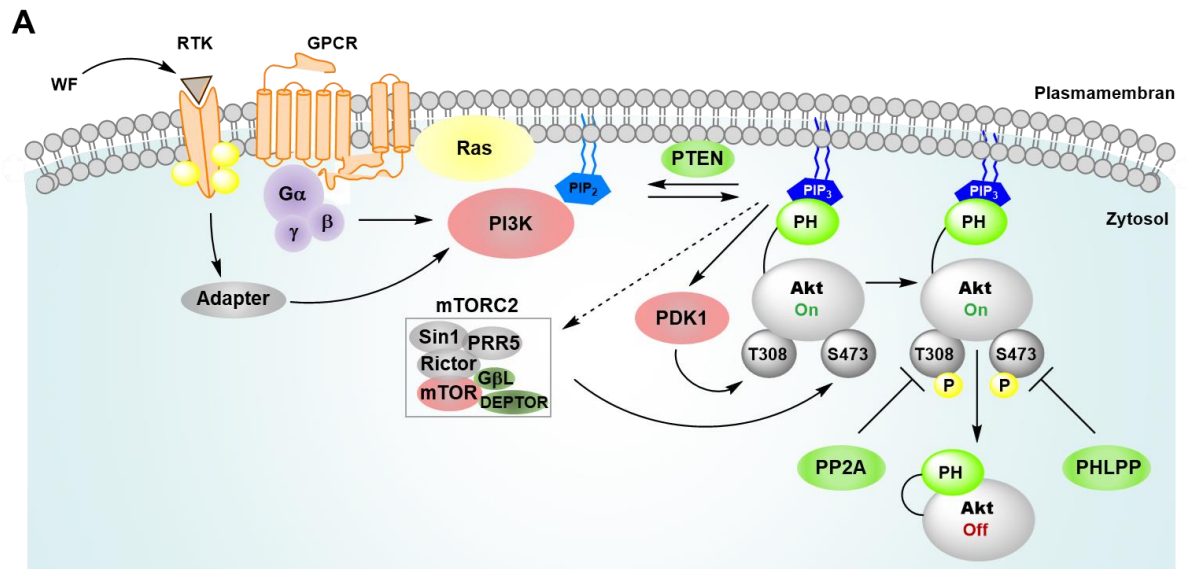
**Abbildung 3** Dreidimensionale- und schematische Darstellung der einzelnen Domänen von Akt. **A** Die Tertiärstruktur von Akt in der PH-out-Konformation setzt sich aus der katalytischen Kinasedomäne (weiß, PDB: 4EKK) sowie der regulatorischen PH-Domäne (grün, PDB: 1UNQ) und dem regulatorischen, hydrophoben Motiv (HM, gelb, PDB: 4EKK) zusammen. Die flexible Linkerregion zwischen Kinase- und PH-Domäne ist nicht aufgelöst und wurde als grau gestrichelte Linie dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden Teile des HM entfernt und die  $\alpha$ C-Helix in Türkis hervorgehoben. Die N-terminale,  $\beta$ -Faltblattreiche Subdomäne der Kinase ist über die Scharnierregion (blau) mit der C-terminalen,  $\alpha$ -Helix-reichen Subdomäne verbunden. Im aktiven Zentrum liegt das ATP-Analogon Adenosin-5-( $\beta$ ,  $\gamma$ -imido)triphosphat (AMP-PNP, orange) mit zwei Mangan(II)-Ionen (violett) nahe der Aktivierungsschleife (rot), welche das konservierte DFG-Motiv und das regulatorische Thr308 (hier phosphoryliert) beinhaltet, reversibel gebunden vor. Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat (IP<sub>4</sub>, blau) liegt als PIP<sub>3</sub>-Analogon reversibel gebunden in der PH-Domäne vor, um die polare Phosphoinositol-Bindetasche zu veranschaulichen. **B** Regulatorische Stabilisierung der PH-out-Konformation von Akt durch hydrophobe Wechselwirkungen (F469, F472, Y474) und H-Brücken (S473D als Phosphomimetikum für pS473)<sup>91</sup> des PIF im HM mit der PIF-pocket in der N-terminalen Subdomäne der Kinase (Die Ansicht stellt eine 180° Drehung der N-terminalen Subdomäne von Abbildung 3A dar). **C** Schematische Darstellung der Domänen von Akt1 mit Positionen von Aminosäuren, die posttranslational modifiziert werden und die vermutlich der Feinregulierung der Akt-Aktivierung und -Inaktivierung, der zellulären Lokalisation oder der Substratspezifität dienen. UB: Ubiquitinierung, Ac: Acetylierung, Me: Methylierung, OH: Hydroxylierung, GlcNac: Glykosylierung, SUMO: SUMOylierung. (Die Abbildung ist angelehnt an MANNING und TOKER 2017).<sup>66</sup>

Zwischen den PH-Domänen dieser Enzyme und den Akt-Isoformen wurde jedoch lediglich eine Sequenzidentität von 30 % beschrieben, während unter den Akt-Isozymen eine Homologie von bis zu 84 % besteht.<sup>85</sup> Die Linkerregion (AS in Akt1: 108-148), welche die PH-Domäne mit der Kinasedomäne verbindet, ist unter den Akt-Isoformen wenig konserviert (17-46% Sequenzidentität zwischen den drei Isoformen).<sup>85</sup> Sie zeigt keine signifikante Homologie zu anderen humanen Proteinen, ermöglicht es aber durch ihre hohe Flexibilität, dass die verknüpften Domänen Konformationsänderungen annehmen können und Akt somit zwischen einem aktiven (PH-*out*) und einem inaktiven (PH-*in*) Zustand alterniert.<sup>92</sup> Die Regulation und Lokalisation von Akt beruht neben dem Gleichgewicht der intramolekularen Interdomäneninteraktion zwischen PH- und Kinasedomäne auch auf der WW des PIF im HM mit einer hydrophoben Kavität der N-terminalen Subdomäne (Abb. 3 B). Diese, innerhalb der AGC-Kinasefamilie konservierte PIF-*pocket*, wird mitunter durch die  $\alpha$ C-Helix gebildet und wird einzig in der aktiven Konformation von Akt ausgebildet und besetzt.<sup>67,93-96</sup> Hydrophobe WW der Aminosäureseitenketten von Phe469, Phe472 und Tyr474 sowie Wasserstoffbrücken (H-Brücken) des phosphorylierten Ser473 im HM mit AS der N-terminalen Subdomäne stabilisieren so durch allosterische Kooperativität das aktive Zentrum der Kinasedomäne.<sup>94</sup> Der katalytisch inaktive Zustand von Akt lässt sich durch eine PH-*in*-Konformation beschreiben, welche durch polare WW zwischen den AS Thr81 und Thr82 der PH-Domäne und Lys179 und Asp292 der N-terminalen Subdomäne, sowie einer Salzbrücke zwischen Arg273 und Glu17 stabilisiert wird.<sup>92,97</sup> Die beschriebenen WW sind hauptverantwortlich für die Blockade des aktiven Zentrums der Kinasedomäne. Durch die Verdrängung der  $\alpha$ C-Helix aus der allosterischen Tasche und die daraus resultierende Stabilisierung der Aktivierungsschleife in der DFG-*out*-Konformation<sup>50</sup> wird die Nukleotid-Bindetasche durch die AS-Seitenkette von Phe293 besetzt und somit die Bindung des Kofaktors ATP verhindert.

Neben den für die Akt-Aktivierung obligatorischen und geschwindigkeitsbestimmenden Phosphorylierungen an Thr308 und Ser473 wurde eine Vielzahl von weiteren Phosphorylierungsereignissen an Akt,<sup>91,98-100</sup> die vor allem mit einer erhöhten Proteinstabilität und der gesteigerten Aktivierung assoziiert werden, sowie zahlreiche weitere PTMs in der Literatur beschrieben, die der Feinjustierung der Aktivierung oder Abschaltung der Akt-Signaltransduktion (Pro125-OH, Pro313-OH, Thr305-GlcNac, Thr312-GlcNac, Lys276-SUMO)<sup>101-103</sup> der zellulären Lokalisation (Lys14-Ac)<sup>104</sup> und möglicherweise auch der Substratspezifität dienen (Abb. 3C).<sup>66</sup>

## 1.4 PI3K/Akt/mTOR-Signalweg

Akt bildet zusammen mit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) das Schlüsselement der Akt-gesteuerten Signalkaskade, die auch bekannt ist als PI3K/Akt/mTOR-Signalweg. Die Aktivierung von Akt wird über die Interaktion von extrazellulären Signalmolekülen (Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren (WF)) mit transmembranständigen Rezeptortyrosinkinasen (RTK), Integrienen, B- und T-Zellrezeptoren, Zytokinrezeptoren, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) oder durch andere Stimuli initiiert (Abb. 4).<sup>105-107</sup> Durch die Rezeptor-medierte Aktivierung erfolgt die direkte oder die Adapterprotein-vermittelte Bindung und Aktivierung von PI3K (Abb. 4A). Auch kleine Guanosintriphosphat-bindende Proteine (G-Proteine) wie Ras können die Aktivierung von PI3K induzieren. Der membrangebundene, sekundäre Botenstoff Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) wird schließlich durch PI3K an der 3'-Position zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) phosphoryliert.<sup>108</sup> Das *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) katalysiert die entsprechende Rückreaktion.<sup>109</sup> Diese Phospholipidzucker dienen PH-Domänen-tragenden Proteinen wie Akt und seiner vorgeschalteten Kinase PDK1 als Ankerstellen an der Plasma- oder an Endomembranen innerhalb des Zytoplasmas. Schließlich führt der Konzentrationsanstieg an zytoplasmatischem PIP<sub>3</sub> von ursprünglich 0,05 µM auf 5-200 µM zur Rekrutierung von Akt an die Plasma- oder Endomembranen wobei die Interaktion der PH-Domäne mit PIP<sub>3</sub> eine Konformationsänderung innerhalb des Multidomänenkomplexes von Akt induziert.<sup>110</sup> Durch die Interaktion zwischen Ligand und Protein kommt es innerhalb der stark positiv geladenen Phosphoinositid-Bindungstasche (Lys14, Arg23, Arg25, Arg 86) zu einer Ladungsinversion und einer damit verbundenen elektrostatischen Repulsion der PH-Domäne von der negativ geladenen Proteinoberfläche der Kinasedomäne (vgl. Abb. 3A).<sup>111</sup> Der Übergang von der auto-inhibierten PH-*in*-Konformation in die Membran-gebundene, PH-*out*-Konformation führt zur Öffnung der ATP-Bindetasche und somit zur Exposition der Aktivierungsschleife und dem dort lokalisierten Thr308, welches schließlich von PDK1 phosphoryliert wird.<sup>112</sup> Die posttranslationale Modifikation führt zu nachweisbarer Kinaseaktivität<sup>113,114</sup> und bereitet das Enzym zusätzlich auf die Phosphorylierung an Ser473 im HM durch den *mechanistic target of rapamycin complex 2* (mTORC2) oder andere PI3K-verwandte Kinasen wie DNA-PK vor.<sup>115,116</sup> Durch die zusätzliche Modifikation wird eine bis zu 1000-fache Steigerung der katalytischen Aktivität erreicht,<sup>117</sup> wobei die alleinige Phosphorylierung von Ser473 für die Aktivierung von Akt nicht ausreichend ist.<sup>118,119</sup>



**Abbildung 4** Schematisch dargestellt sind die molekularen Mechanismen, die einen Einfluss auf die Regulation der Proteinkinase Akt haben, sowie deren Auswirkungen auf das Zellschicksal innerhalb des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges. **A** Die Aktivierung von PI3K erfolgt durch die Stimulation von RTKs oder GPCRs. PI3K katalysiert die Phosphorylierung von PIP<sub>2</sub>, wodurch PIP<sub>3</sub> vermehrt an der Plasmamembran entsteht. Zytosolisch-inaktives Akt wird durch die Wechselwirkung der PH-Domäne mit PIP<sub>3</sub> an die Plasmamembran rekrutiert, wodurch die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife an Thr308 durch PDK1 und an Ser473 des hydrophoben Motivs durch mTORC2 erfolgt, sodass eine vollständige Aktivierung von Akt erzielt wird. Die Dephosphorylierung von Akt durch die Proteinphosphatasen PP2A und PHLPP beendet das Signal (Die Abbildung ist angelehnt an MANNING und TOKER 2017).<sup>66</sup> **B** Akt steht als entscheidender Schalter im Zentrum des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs und phosphoryliert über 100 bekannte, nachgeschaltete Substrate,<sup>66,120</sup> die involviert sind an der Regulation der Proteinbiosynthese, Zell-Proliferation, -Migration und dem -Überleben, des Glukose-Metabolismus und neurobiologischen Prozessen. Dargestellt ist ein Teil der Literaturbeschriebenen Substrate, sowie deren Auswirkung auf das zelluläre System nach der Regulation durch Akt. (Die Abbildung ist angelehnt an Cell Signaling Technology 2020).<sup>121</sup>

Auch nach über 30 Jahren intensiver Akt-Forschung ist die Frage nach der Aktivierung und gezielten Abschaltung von Akt noch nicht vollständig geklärt. In der Literatur werden drei, sich zum Teil ergänzende Modelle postuliert, welche die zellautonomen Kontrollmechanismen von Akt beschreiben.<sup>122</sup> Dem Diffusionsmodell zufolge löst sich Akt nach der Phosphorylierung an Thr308 und Ser473 von der Plasmamembran und diffundiert in der aktiven Konformation durch die Zelle, wobei es Zielsubstrate mit dem konservierten Sequenz-Motiv (Arg-x-Arg-x-x-Ser/Thr-B; x = beliebige AS, B = sperrige, hydrophobe AS) phosphoryliert.<sup>120,122,123</sup> Dieses Modell wird vor allem durch das *phosphatase shielding cage* Modell gestützt, bei dem ein Netzwerk von Interaktionen innerhalb des aktiven Zentrums und des HM von Akt die aktive Form stabilisieren und dadurch vor zytosolischen Phosphatasen schützen.<sup>124-126</sup> Das ATP an/aus Modell beruht auf der Tatsache, dass ATP-kompetitive Akt-Inhibitoren eine Hyperphosphorylierung von Akt in Zellen induzieren,<sup>127,128</sup> ADP-Analoga diesen Effekt jedoch nicht auslösen.<sup>125</sup> Die Hypothese, dass ATP-gebundenes und durch Phosphorylierung aktiviertes Akt frei diffundieren kann, bis es nach einer Substratphosphorylierung durch zytosolische Phosphatasen inaktiviert wird, wurde jedoch in Frage gestellt.<sup>112</sup> In der gleichen Studie wurde postuliert, dass vielmehr die Membrandissoziation der dominante Mechanismus der Akt-Inaktivierung zu sein scheint. Für beide Modelle wird eine ausreichende Stabilität gegenüber spezifischer Phosphatasen vorausgesetzt, um die zytosolische Diffusion zum Substrat zu ermöglichen. Hingegen wird im Modell des allosterischen Lipidschalters die Abhängigkeit der aktiven PH-*out*-Konformation von Akt auf die Zell- oder Endomembranen beschränkt, die mit PIP<sub>3</sub> oder PIP<sub>2</sub> besetzt sind. Hier führt die Dissoziation von der Membran zur Rückfaltung der PH- auf die Kinasedomäne. Durch diese Akt-intrinsische Autoinhibition werden pThr308 und pSer473 exponiert und durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A) bzw. *PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase 1/2* (PHLPP1, PHLPP2) dephosphoryliert.<sup>129-131</sup>

Akt steuert die Funktion von weit über 100 Substraten,<sup>120,132</sup> die an der Regulation der Proteinbiosynthese, Zell-Proliferation, -Migration, dem -Überleben, des Glukose-Metabolismus und neurobiologischer Prozesse beteiligt sind (Abb. 4B).<sup>133</sup> Die Proteinbiosynthese und somit des Zellwachstums wird unter anderem durch die Interaktion mit dem *tuberous sclerosis complex* (TSC)<sup>134</sup> und *proline-rich AKT substrate of 40 kDa* (PRAS40)<sup>135</sup> und somit durch die mTORC1-vermittelte Signalkaskade reguliert.<sup>136</sup>

Akt fungiert als zentraler Regulator des (neuronalen) Zellüberlebens, indem entweder direkt pro-apoptotische Proteine wie *Bcl-2-Antagonist of Cell Death* (Bad),<sup>137</sup> oder die von Transkriptionsfaktoren wie *Forkhead box protein O1* (FoxO1) generierten pro-apoptotischen Signale unterdrückt werden.<sup>138</sup> Akt ist an der Zellmigration und -invasion beteiligt, indem es Aktin-bindende Proteine wie Girdin oder Palladin phosphoryliert.<sup>139,140</sup> Durch die Aktivierung von *Akt substrate of 160 kDa* (AS160 auch TBC1D4) und Phosphofruktokinase-2 (PFKFB2) sowie die Inhibition von Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) ist Akt maßgeblich an der Regulation des Glukosestoffwechsels beteiligt.<sup>66,141,142</sup> Darüber hinaus konnte die Regulation von neuronalen Prozessen, wie die synaptische Signalübertragung durch die Aktivierung von  $\gamma$ -Aminobuttersäure Typ A Rezeptoren (GABA<sub>A</sub>R) nachgewiesen werden.<sup>143</sup>

In Anbetracht der zentralen Bedeutung der Akt-vermittelten Signaltransduktion für die Steuerung des zellulären Schicksals und den mit einer Fehlregulation einhergehenden Konsequenzen, ist Akt ein relevantes Ziel für die therapeutische Intervention.

## 1.5 Klinische Relevanz von Akt

Die Überaktivierung von Akt ist ein molekulares Merkmal, das häufig mit schwerwiegenden humanen Erkrankungen wie Krebs, Diabetes, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert wird.<sup>73,144</sup> Selten kommt es zu klinisch relevanten genetischen Läsionen in AKT selbst.<sup>145</sup> CARPTEN *et al.* identifizierten jedoch eine bei Brust- (BC), Darm- (CRC) und Eierstockkrebs (OC) auftretende, somatische Mutation des Akt1-Gens, welche für eine kontinuierliche Aktivierung der Kinase verantwortlich ist.<sup>146</sup> Durch die beschriebene Akt1<sup>E17K</sup>-Punktmutation wird das negativ geladene Glutamat an Position 17 in der PH-Domäne gegen ein positiv geladenes Lysin ersetzt, wodurch es zu einer Ladungsinversion innerhalb der PI-Bindungstasche und somit zu einem Verlust der Salzbrücke zwischen Glu17 und Arg273 der Kinasedomäne kommt. Als direkte Folge wird die Substrataffinität gegenüber PIP<sub>2</sub> und anderen Inositolzuckern erhöht und somit die PH-*out*-Konformation stabilisiert, sodass die Aktivierung von Akt begünstigt wird.<sup>147</sup> Diese konstitutiv aktive Form von Akt ist neben neoplastischen Transformationen hauptverantwortlich für angeborene Mosaik-Überwucherkrankungen wie das Proteus Syndrom (PS).<sup>148,149</sup> HYMAN *et al.* beschrieben die (Teil-)Remission von 52 Patienten mit Estrogenrezeptor (ER)-positivem BC, gynäkologischen, malignen Neoplasien und anderen Tumorerkrankungen nach einer Akt-inhibitor-basierten Therapie.<sup>145</sup>



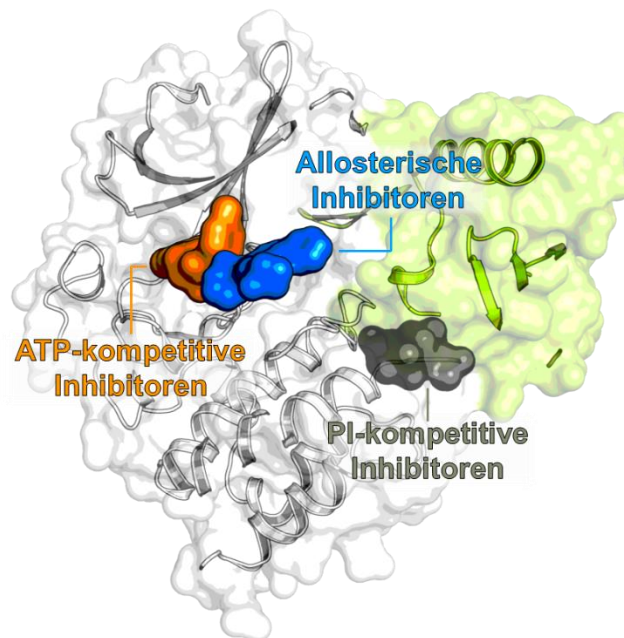
Bei allen Patienten wurde die treibende Akt1<sup>E17K</sup>-Mutation diagnostiziert, sodass sie erstmalig als prädiktiver Biomarker identifiziert und somit zu einem klinisch relevanten Ziel für die Krebstherapie wurde.<sup>145,150</sup>

Häufig wird die unkontrollierte Signaltransduktion-, und somit die Tumorgenese sowie -progression, durch Akt von übergeordneten Protoonkogenen wie RTKs, PI3K oder durch den Verlust von PTEN initiiert. Eine besonders dezisive Rolle spielen dabei die direkten Regulatoren von Akt, die durch *loss-of-function* Mutationen (PTEN, PHLPP) oder *gain-of-function* Läsionen (PI3K) hauptverantwortlich dafür sind, dass Akt in über 50 % aller humanen Krebserkrankungen eine Hyperaktivität aufweist.<sup>66,151-153</sup> Im Gegensatz zur somatischen E17K-Mutation konnte die Hyperaktivierung und -phosphorylierung von Akt im Allgemeinen nicht als prädiktiver Biomarker für therapeutischen Intervention eingestuft werden, auch wenn der Anstieg intrazellulärer pAkt-Level einen prognostischen Indikator für maligne Transformationen darstellen kann.<sup>154-156</sup> Dennoch zeigte eine aktuelle Studie, dass in einer Platin-resistenten Ovarialkarzinom (PROC) Patientensubgruppe mit pAkt-positivem Biomarker ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben (PFS) im Vergleich zur Gruppe mit nicht alteriertem Biomarker festgestellt werden konnte. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Präsenz von pAkt in den Gewebeproben von PROC-Patientinnen mit dem Ansprechen auf die Hemmung von Akt assoziiert ist und somit in dieser Patientenpopulation als prädiktiver Biomarker betrachtet werden kann.<sup>157</sup>

Die pathologische Überexpression von Akt wurde in einer Vielzahl von malignen Neoplasmen, einschließlich Schilddrüsen-, Ovarial-, Lungen-, Prostata- (PC), Pankreaskarzinomen sowie beim Multiplen Myelom beschrieben. Dieses Phänomen korrelieren mit einer gesteigerten Zellproliferation sowie einer erhöhten Überlebensfähigkeit der Tumorzellen.<sup>158-162</sup> Akt-überexprimierende Zellen zeigen Resistenzen gegen proapoptische Signale, wie den *Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand* (TRAIL), *Forkhead box protein O1* (FoxO1), *Bad*, *mouse double minute 2 homolog* (MDM2) (vgl. Abb. 4).<sup>163-166</sup> Die Unterdrückung der Apoptose durch Akt steht auch im Zusammenhang mit einer erworbenen Resistenz gegenüber klassischer Strahlen- und Chemotherapie. Durch Cisplatin-basierte Therapien konnte die Überexpression sowie die dauerhafte Aktivierung von Akt in einer Vielzahl von Krebszellen induziert werden.<sup>167-172</sup> Die Hemmung der Akt-Signaltransduktion in diesen Systemen führte schließlich zur Einleitung der Apoptose und dem Zelltod, was die enorme Relevanz der therapeutischen Intervention gegenüber der Proteinkinase Akt unterstreicht.

### 1.5.1 Klinisch-relevante Akt-Inhibitoren

Die intensiven Bemühungen der vergangenen zwei Jahrzehnte, neue pharmakologisch aktive Inhibitoren von Akt zu identifizieren haben drei funktionell wichtige Regionen von Akt offenbart, die mit niedermolekularen Verbindungen adressiert werden können (Abb. 5).



**Abbildung 5** ATP-kompetitive- (Orange), Allosterische- (Blau) und PI-kompetitive (Anthrazit) Bindungsstellen in Akt. (Die Liganden, sowie die Kinase- (Weiß) und PH-Domäne (Grün) stammen aus den zusammengeführten PDB-Strukturen: 6HHF, 4GV1, 5KCV und 1UNQ)

Neben der ATP-Bindungstasche im aktiven Zentrum der Kinasedomäne und der polaren PI-Bindungstasche innerhalb der PH-Domäne, wurde eine einzigartige allosterische Interdomänen-Bindungstasche identifiziert, die nur in der inaktiven PH-*in*-Konformation von Akt ausgebildet wird. Die Inhibition der PI-Bindetasche verhindert die Membranrekrutierung und damit die Aktivierung von Akt durch PDK1 und mTORC2. In dieser Hinsicht wurden Alkylphospholipide (APLs) wie Perifosin, Edelfosin und Miltefosin als Phosphoinositid-Mimetika und somit als PIP<sub>2</sub>-/PIP<sub>3</sub>-kompetitive Inhibitoren identifiziert und in zahlreichen klinischen Studien der Phase I und II untersucht.<sup>173-176</sup> Die generell ungünstigen Pharmakokinetischen- (PK) Eigenschaften dieser Verbindungen sind hauptsächlich für das Scheitern der klinischen Studien verantwortlich und stehen im Zusammenhang mit zwitterionischen Strukturen und damit verbundenen hohen Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (cLogP), die signifikant über den Richtwerten für eine akzeptable orale Bioverfügbarkeit liegen.<sup>177</sup> Einen vielversprechenderen Ansatz zur gezielten Adressierung von Akt bietet die orthosterische Inhibition der Kinasedomäne mit ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren.

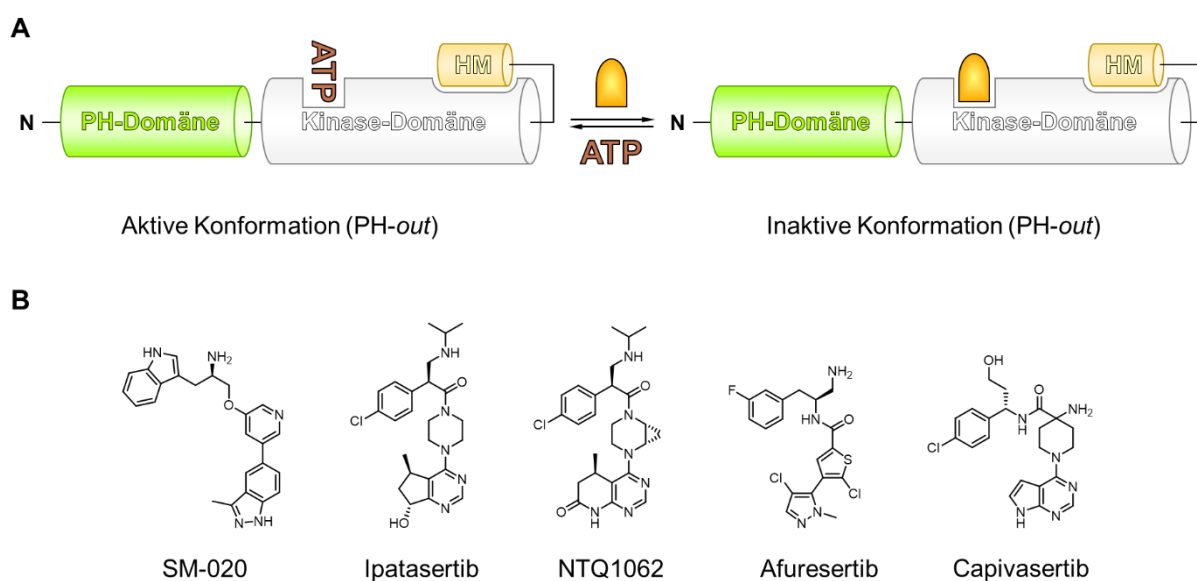
### 1.5.2 ATP-kompetitive Akt-Inhibitoren

Ein traditioneller Ansatz, welcher maßgeblich zur Entwicklung einer Vielzahl orthosterischer Akt-Inhibitoren in den letzten Jahren beigetragen hat, besteht in der gezielten Adressierung des aktiven Zentrums durch ATP-kompetitive Hemmstoffe (Abb. 6 A). Vor dem Hintergrund der strukturellen sowie partiell sequenziellen Homologie der ATP-Bindungstaschen innerhalb des Kinoms, insbesondere zwischen den drei Isoformen von Akt und weiteren Mitgliedern der AGC-Kinasefamilie, besteht die Herausforderung darin, Inhibitoren von hoher Potenz zu entwickeln, die eine selektive Unterdrückung der Akt-vermittelten Signalübertragung ermöglichen. Eine Vielzahl von hochpotenten Inhibitoren wurde in den vergangenen 20 Jahren in klinischen Studien evaluiert. Allerdings mussten viele dieser Entwicklungsprogramme frühzeitig abgebrochen werden, vornehmlich aufgrund toxischer Nebenwirkungen, die häufig durch die Hemmung nicht-zielgerichteter Enzyme (*off-target-Toxizität*) verursacht wurden oder durch einen unzureichenden Wirksamkeitsnachweis.<sup>178-181</sup>

In einer Hochdurchsatz-Durchmusterung (HTS) von Substanzbibliotheken des Pharmaunternehmens Abott Laboratories wurde ein *trans*-3,4'-bispyridinylethylen Grundgerüst identifiziert, das eine moderate Aktivität gegenüber Akt zeigte.<sup>182</sup> Die chemische Optimierung dieser Substanz führte schließlich zur Entwicklung von SM-020 (Abb. 6 B).<sup>183</sup> Die weitere klinische Entwicklung wurde aufgrund des unzureichenden pharmakokinetischen Profils (hohe intrinsische *clearance* unzureichende Bioverfügbarkeit) eingestellt.<sup>184</sup> Neue Formulierungsstudien durch DermBiont führten schließlich zur Konzeptvalidierung in einer neuen Indikation und zu einem positiven Ergebnis in einer Phase II Studie.<sup>185,186</sup> SM-020 ist der erste und einzige topisch-anwendbare Akt-Inhibitor für die Behandlung der Seborrhoischen Keratose (SK) (NCT05136144). In einer laufenden Phase II Studie soll das Dosierungsschema optimiert werden, um Gesichts- und intertriginöse SKs zu behandeln (NCT06099080, NCT06108024).

Ipatasertib (Abb. 6 B) ist ein weiterer ATP-kompetitiver Akt-Inhibitor, welcher von Genentech/Roche entwickelt und im Jahr 2012 erstmals publiziert wurde.<sup>187</sup> Kürzlich wurde eine Phase III Studie abgeschlossen, in der Ipatasertib in Kombination mit Paclitaxel für PIK3CA/Akt1/PTEN-mutierte, Hormonrezeptor-positiven (HR+), HER2-negativen (HER2-) fortgeschrittenen Brustkrebs getestet wurde, wobei für die Kombinationsbehandlung im Vergleich zu jener Gruppe, die Paclitaxel und ein Placebo erhielt, kein Vorteil beobachtet wurde (NCT03337724).<sup>188</sup>

Der Inhibitor wird derzeit in zwei weiteren kombinierten Phase III Studien bei Patienten mit metastasiertem, kastrationsresistentem Prostatakrebs (NCT03072238) und bei lokal fortgeschrittenem, inoperablem oder metastasiertem Brustkrebs (NCT04060862) evaluiert. Gemäß der Entwicklungspipeline von Genentech/Roche wurde die weitere Entwicklung dieser Verbindung eingestellt, vermutlich aufgrund des klinischen Erfolgs des ATP-kompetitiven Inhibitors und Konkurrenten Capiwasertib. Die initial positiven Ergebnisse der Studien mit Ipatasertib führten zur unabhängigen Entwicklung von NTQ1062 (Abb. 6 B; entwickelt von Nanjing Chia-Tai Tianqing Pharmaceutical Co.).<sup>189</sup> NTQ1062 zeichnet sich durch ein neuartiges, Scharnierregion-bindendes Motiv und einen bizyklischen Piperazinlinker aus. Diese chemische Optimierung führte zu einem verbesserten PK-Profil und einer gesteigerten Potenz in *in vitro* und *in vivo* Modellen. Der Wirkstoff wird derzeit in einer Phase I Studie zur Behandlung von fortgeschrittenen soliden Tumoren (NCT06172309) sowie in einer Phase Ib/II Studie in Kombination mit Fulvestrant bei Patientinnen mit fortgeschrittenem HR+/HER2-Brustkrebs (NCT06172322) evaluiert.



**Abbildung 6 A** Schematische Darstellung der ATP-kompetitiven Akt-Inhibition durch orthosterische Liganden. **B** Chemische Strukturen von ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren, die aktuell in klinischen Studien evaluiert werden.

Afuresertib (Abb. 6 B) wurde durch Lead-Optimierungsstudien von GlaxoSmithKline entwickelt, wechselte innerhalb von *Big Pharma* zu Novartis und wurde 2018 an Laekna auslizenziiert.<sup>190,191</sup> In einer Phase I Studie demonstrierte Afuresertib das gewünschte Sicherheitsprofil sowie klinische Wirksamkeit gegenüber malignen hämatologischen Erkrankungen.<sup>192</sup>

Eine aktuell laufende Phase Ib/III Studie evaluiert die Sicherheit und Wirksamkeit von Afuresertib zusammen mit Fulvestrant bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem HR+/HER2- Brustkrebs, die auf Standardtherapien nicht ansprechen (NCT04851613). In einer weiteren Phase II Studie mit PROC-Patientinnen zeigte die Kombinationstherapie von Afuresertib mit Paclitaxel jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe, die Paclitaxel als Monotherapie erhielt (NCT04374630).<sup>157</sup>

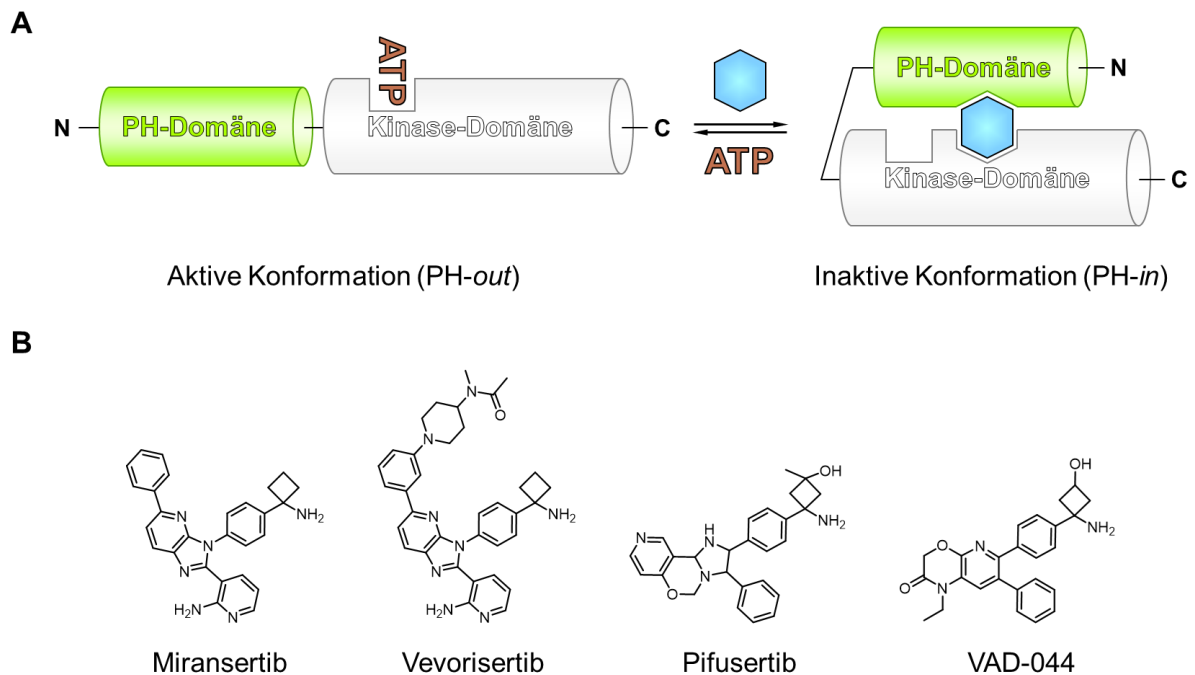
Der am weitesten fortgeschrittene orthosterische Akt-Inhibitor ist Capiwasertib (Abb. 6 B), welcher 2009 in einer Kooperation von AstraZeneca und Astex Pharmaceuticals entwickelt wurde. Der Wirkstoff hat erfolgreich eine Phase III Kombinationsstudie mit Fulvestrant bei Patienten mit HR+/HER2- lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs im Vergleich zu Placebo und Fulvestrant abgeschlossen (NCT04305496).<sup>193</sup> Interessanterweise zeigte diese Studie jedoch keine signifikanten Vorteile für Patienten mit genetischen Läsionen im Akt-Signalweg, was eine anhaltende Herausforderung unterstreicht: Die Abwesenheit von prädiktiven Biomarkern für die Therapie mit Akt-Inhibitoren. Während AstraZeneca im November 2023 die Marktzulassung von der FDA erhielt, wird das Potenzial des Inhibitors auch in weiteren Phase III Studien untersucht, die Brust- und Prostatakrebs betreffen (NCT05348577, NCT04493853, NCT03997123, NCT04862663).

ATP-kompetitive Akt-Inhibitoren blockieren dosisabhängig die Phosphorylierung von nachgeschalteten Substraten. Durch die Stabilisierung der PH-out-Konformation schützen sie jedoch die regulatorischen AS Thr308 und Ser473 vor der inaktivierenden Dephosphorylierung.<sup>125</sup> ATP wird von einer Vielzahl intrazellulärer Proteine (Kinasen, ATPasen, Motorproteine, DNA- und RNA-Polymerasen, Helicasen) metabolisiert, wodurch orthosterische Inhibitoren eine potentielle Quelle für *off-target*-Effekte darstellen. Einen weitaus vielversprechenderen Ansatz zur gezielten und selektiven Akt-Inhibition stellen allosterische Inhibitoren dar, die mit einer einzigartigen Bindungstasche wechselwirken und somit nicht in Konkurrenz mit einem sekundären Botenstoff oder Kofaktor stehen.

### 1.5.3 Allosterische Akt-Inhibitoren

Das grundlegende Prinzip der allosterischen Inhibition basiert auf der Bindung eines Inhibitors an eine Stelle des Enzyms, die eine räumliche Entfernung zum aktiven Zentrum aufweist. Die Wechselwirkung zwischen Enzym und Ligand induziert eine Konformationsänderung innerhalb des Enzyms, wodurch die katalytische Aktivität unterdrückt und die Bindung von Kofaktor und Substrat verhindert wird (Abb. 7 A). In den frühen 2000er Jahren identifizierte Merck Sharp & Dome (MSD) in einem HTS ein 2,3-Diphenylchinoxalin-Grundgerüst, das durch Serendipität als erster PH-Domänen-abhängiger Ligand einer neuartigen allosterischen Tasche von Akt identifiziert wurde.<sup>194</sup> Umfangreiche Entwicklungszyklen führten zu zwei Serien hochpotenter Akt-Inhibitoren, die ein beispielloses Maß an Isoformselektivität aufwiesen und die Grundlage für die Entwicklung aller heute bekannten allosterischen Akt-Inhibitoren lieferten.<sup>195,196</sup>

Die rationalen Design-Studien von ArQule Inc. führten Anfang der 2010er Jahre zu der Entwicklung der Kongenere Miransertib und Vevorisertib (Abb. 7 B).<sup>197,198</sup> Die präklinische Evaluierung der beiden Inhibitoren offenbarte die Selektivität für die Akt-Isoformen gegenüber einem Panel von 303 bzw. 245 getesteten Kinasen sowie eine starke antitumorale Wirkung gegenüber der aktivierenden Akt1<sup>E17K</sup>-Mutante in endometrialen PDX-Modellen.<sup>199</sup> ArQule Inc. wurde 2019 von MSD übernommen, um die Pipeline des Unternehmens im Bereich der Kinase-Inhibitoren zu erweitern. Obwohl Miransertib vielversprechende Ergebnisse in mehreren Phase I Studien im Bereich der Onkologie lieferte (als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie) laufen derzeit keine Folgestudien (NCT01473095, NCT02476955).<sup>200</sup> In nicht-onkologischen Indikationen wird der allosterische Inhibitor derzeit in einer Phase II Studie untersucht, um die Sicherheit und Verträglichkeit bei Patienten mit *PIK3CA-related overgrowth spectrum* (PROS) und Proteus-Syndrom (PS) zu bewerten (NCT04980872). Darüber hinaus zeigte die chronische Behandlung mit Miransertib ein gut verträgliches Langzeit-Nebenwirkungsprofil und die Reduktion der Progression des PS.<sup>201,202</sup>



**Abbildung 7 A** Schematische Darstellung des Konformationsgleichgewichtes von Akt nach Bindung von ATP bzw. einem allosterischen Akt-Inhibitor (blau) (Die Abbildung ist angelehnt an WEISNER und GONTLA *et al.* 2015).<sup>203</sup> Die allosterische Interdomänen-Bindungstasche von Akt wird in der PH-*in*-Konformation an der Grenzfläche zwischen der Kinase- und PH-Domäne ausgebildet. **B** Chemische Strukturen von allosterischen Akt-Inhibitoren, die aktuell in klinischen Studien evaluiert werden.

Die Evaluierung von Vevorisertib erfolgte in einer Phase Ib Studie bei fortgeschrittenen soliden Tumoren mit PIK3CA/Akt/PTEN-Mutation als Monotherapie oder in Kombination mit Paclitaxel oder Fulvestrant (NCT02761694). Die Ergebnisse der Studie zeigten ein adäquates Sicherheitsprofil und eine minimale bis moderate antitumorale Aktivität bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren mit PIK3CA/Akt/PTEN-Mutationen.<sup>204</sup> Aus geschäftlichen Gründen, die vermutlich im Zusammenhang mit der Übernahme durch MSD stehen, wurde die weitere Entwicklung von Vevorisertib eingestellt.

Pifusertib (Abb. 7 B) wurde erstmals Anfang der 2010er Jahre in der Literatur beschrieben.<sup>205</sup> Die Entdeckung und Entwicklung zum klinischen Kandidaten durch Taiho Pharmaceutical Co. wurde jedoch nie offengelegt. In *in vitro*-Studien konnte die dosisabhängige Wachstumshemmung bei verschiedenen Krebszelllinien, darunter Brust-, Lungen- und Eierstockkrebs demonstriert werden. *In vivo*-Mausstudien bestätigten das dosisabhängige Antitumorpotenzial des allosterischen Inhibitors.<sup>206</sup> In einer Phase II Studie mit Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren, die PI3K/AKT-Mutationen aufwiesen, zeigte der allosterische Inhibitor als Monotherapie eine begrenzte antitumorale Aktivität, wies jedoch ein handhabbares Sicherheitsprofil auf.

Insbesondere wurde eine klinische Wirksamkeit bei Patienten mit Ovarialkarzinomen (PIK3CA<sup>E545K</sup>) und Brustkrebs (PIK3CA<sup>H1047R</sup> und Akt1<sup>E17K</sup>) beobachtet (NCT03017521).<sup>206</sup> Derzeit wird Pifusertib in einer Phase II Monotherapie-Studie an Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierten soliden Tumoren, die PTEN-inaktivierende Keimbahnmutationen tragen, untersucht (NCT04770246).<sup>207</sup>

VAD-044 (Abb. 7 B), ursprünglich ALM-301, ist ein allosterischer Akt-Inhibitor, der 2015 von Almac Discovery Ltd. entwickelt wurde.<sup>208,209</sup> Im Jahr 2020 wurde die Verbindung an Vaderis Therapeutics AG auslizenziert, um die weitere Entwicklung und Kommerzialisierung zu ermöglichen.<sup>210</sup> Derzeit wird der Inhibitor in einer randomisierten, doppelblinden und Placebo-kontrollierten Phase 1b Studie untersucht, um die Sicherheit und Wirksamkeit verschiedener Dosierungsregime bei Patienten mit Hereditärer Hämorrhagischer Teleangiektasie (HHT) zu bewerten (NCT05406362).

Allosterische Inhibitoren bieten im Vergleich zu traditionellen orthosterischen Wirkstoffen mehrere bedeutende Vorteile. Dazu gehören eine höhere Selektivität aufgrund weniger homologer Sequenzen an allosterischen Stellen, eine geringere Toxizität durch *off-target*-Effekte und ein niedrigerer Dosisbedarf.<sup>211-214</sup> Kinase-unabhängige bzw. Konformations-abhängige Funktionen von katalytischen Enzymen stellen einen weiteren Vorteil der allosterischen Inhibition dar.<sup>215</sup> VIVANCO *et al.* beschrieben in ihrer Studie, dass katalytisch inaktives Akt (Akt1<sup>G161V</sup>) das Wachstumsfaktor-unabhängige Überleben von primären menschlichen Melanozyten förderte. ATP-kompetitive Akt-Inhibitoren konnten diese Kinase-unabhängige Funktion von AKT nicht blockieren, was ihre Wirksamkeit im Vergleich zu allosterischen AKT-Inhibitoren einschränkt.<sup>216</sup>

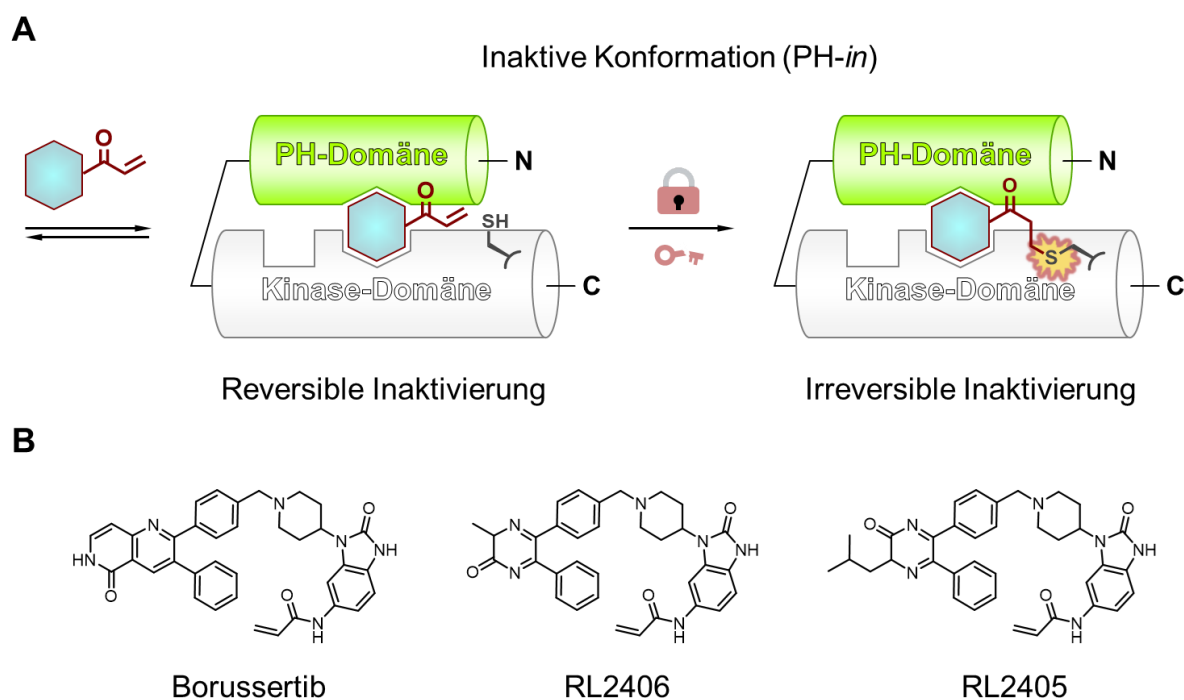


#### 1.5.4 Kovalent-Allosterische Akt-Inhibitoren (CAAIs)

Kovalente Inhibitoren haben eine lange Geschichte in der Arzneimittelforschung, beginnend mit Aspirin Ende des 19. Jahrhunderts bis hin zur jüngsten Zunahme rational entwickelter Inhibitoren wie Carfilzomib, Afatinib, Ibrutinib, Osimertinib und Sotorasib.<sup>217</sup> Der Einfluss von Naturstoffen auf die Entwicklung kovalenter Arzneimittel konnte in einer Studie verdeutlicht werden, in der die physikochemischen Eigenschaften klinisch-relevanter, kovalenter Inhibitoren mit Naturstoffen und bereits zugelassenen nicht-kovalenten Wirkstoffen verglichen wurden. Dabei zeigte sich, dass kovalente Inhibitoren in ihren Eigenschaften den Naturstoffen näher kommen als konventionelle, reversibel-bindende Wirkstoffe.<sup>218</sup> Die Zunahme der Literaturzitate in der „PubMed“-Datenbank (1970: 5 Zitierungen; 2023: 834 Zitierungen)<sup>219</sup> belegen das steigende Interesse an kovalenten Inhibitoren. So wurden im Jahr 2023 drei neue chemische Substanzen (Ritlecitinib, Omaveloxolone, Durlobactam+Sulbactam) mit einem kovalenten Wirkmechanismus von der FDA zugelassen.<sup>220-223</sup> Die anfänglichen Bedenken gegenüber xenobiotisch reaktiven Metaboliten, die schädliche Wirkungen wie Allergien, Gewebeerstörung oder die Karzinogenese hervorrufen, werden durch die Vorteile kovalenter Inhibitoren aufgewogen.<sup>218</sup> Erstens könnte die erhöhte biochemische Effizienz kovalenter Inhibitoren (in Relation zur Molekülgröße) Möglichkeiten bieten, die Dosis eines Medikaments zu reduzieren, was wichtige Implikationen für die Verbesserung des therapeutischen Fensters und die Verringerung des Risikos idiosynkratischer Toxizität hat, die präklinisch schwer vorherzusagen ist.<sup>224</sup> Zweitens könnte die verlängerte Wirkungsdauer eine weniger häufige Medikamenteneinnahme ermöglichen und somit die Compliance der Patienten verbessern.<sup>225</sup> Die kovalente Hemmung kann zudem die Pharmakodynamik (PD) von der Pharmakokinetik (PK) eines Arzneimittels entkoppeln, was eine erwünschte Arzneimittelwirksamkeit für Inhibitoren mit kurzer systemischer Exposition zur Folge haben kann.<sup>218</sup> Es gibt Hinweise darauf, dass das Risiko der Entwicklung von Resistenzen gegen kovalente Arzneimittel geringer ist, welche in Bereichen wie der Onkologie und bei Infektionskrankheiten eine große Herausforderung darstellen.<sup>226</sup>

Um die inhärenten Limitationen der ersten Generation von Akt-Inhibitoren zu eliminieren, haben WEISNER und GONTLA *et al.* eine innovative Strategie zur gezielten Adressierung von Akt durch kovalent-allosterische Akt-Inhibitoren (CAAIs) entwickelt.<sup>203</sup> Diese Klasse von Inhibitoren ist so konzipiert, dass sie die einzigartige allosterische Bindungstasche von Akt ausnutzt und dadurch eine außergewöhnliche Kinom-Selektivität erzielen.

Darüber hinaus alkylieren CAAs die Thiol-Seitenketten der Redox-sensitiven Cysteine 296 und 310 in der Aktivierungsschleife in einer MICHAEL-artigen 1,4-Additionsreaktion, wodurch die Verweildauer am Ziel und damit die Dauer der PD-Effekte maximiert werden (Abb. 8 A). Die relativ langsame Proteinumsatzrate (engl. *turnover*), die typischerweise über 24 Stunden liegt,<sup>227</sup> macht Akt zu einem idealen Ziel für die kovalente Inhibition, da die dauerhafte Bindung von CAAs dieses kinetische Merkmal effektiv ausnutzen kann.



**Abbildung 8 A** Schematische Darstellung der kovalent-allosterischen Inhibition von Akt durch CAAs. Im ersten Schritt erfolgt die reversible Bindung des CAAs (blau) in die Interdomänen-Bindungstasche von Akt. Durch eine anschließende Thia-Michael-Addition der reaktiven Thiol-Seitenkette eines Cysteins in der Aktivierungsschleife mit dem  $\beta$ -Kohlenstoff des Michael-Akzeptors erfolgt die irreversible Bindung. (Die Abbildung ist angelehnt an WEISNER und GONTLA *et al.* 2015).<sup>203</sup>  
**B** Chemische Strukturen des *first-in-class* CAAI Borussertib sowie von Isoform-selektiven CAAs RL2405 und RL2406.<sup>228</sup>

Borussertib (Abb. 8 B) ist der erste Vertreter einer neuen Klasse von kovalent-allosterischen Inhibitoren mit überlegenen PD-Eigenschaften im Vergleich zu reversiblen ATP-kompetitiven und allosterischen Akt-Inhibitoren. Zelluläre Studien haben gezeigt, dass Borussertib mit  $EC_{50}$ -Werten im einstelligen nanomolaren Bereich eine beachtliche antiproliferative Aktivität aufweist, die bis zu 40-mal höher ist als die der klinischen Kandidaten Ipatasertib, Capivasertib und Miransertib.<sup>229</sup> In pharmakokinetischen Studien an Mäusen wurden unterschiedliche Applikationsrouten (2 mg/kg IV, 20 mg/kg PO, 20 mg/kg IP) untersucht, die eine geringe orale Bioverfügbarkeit (< 5 %), jedoch eine erhöhte intraperitoneale Resorption (39,6 %) zeigten.<sup>230</sup>

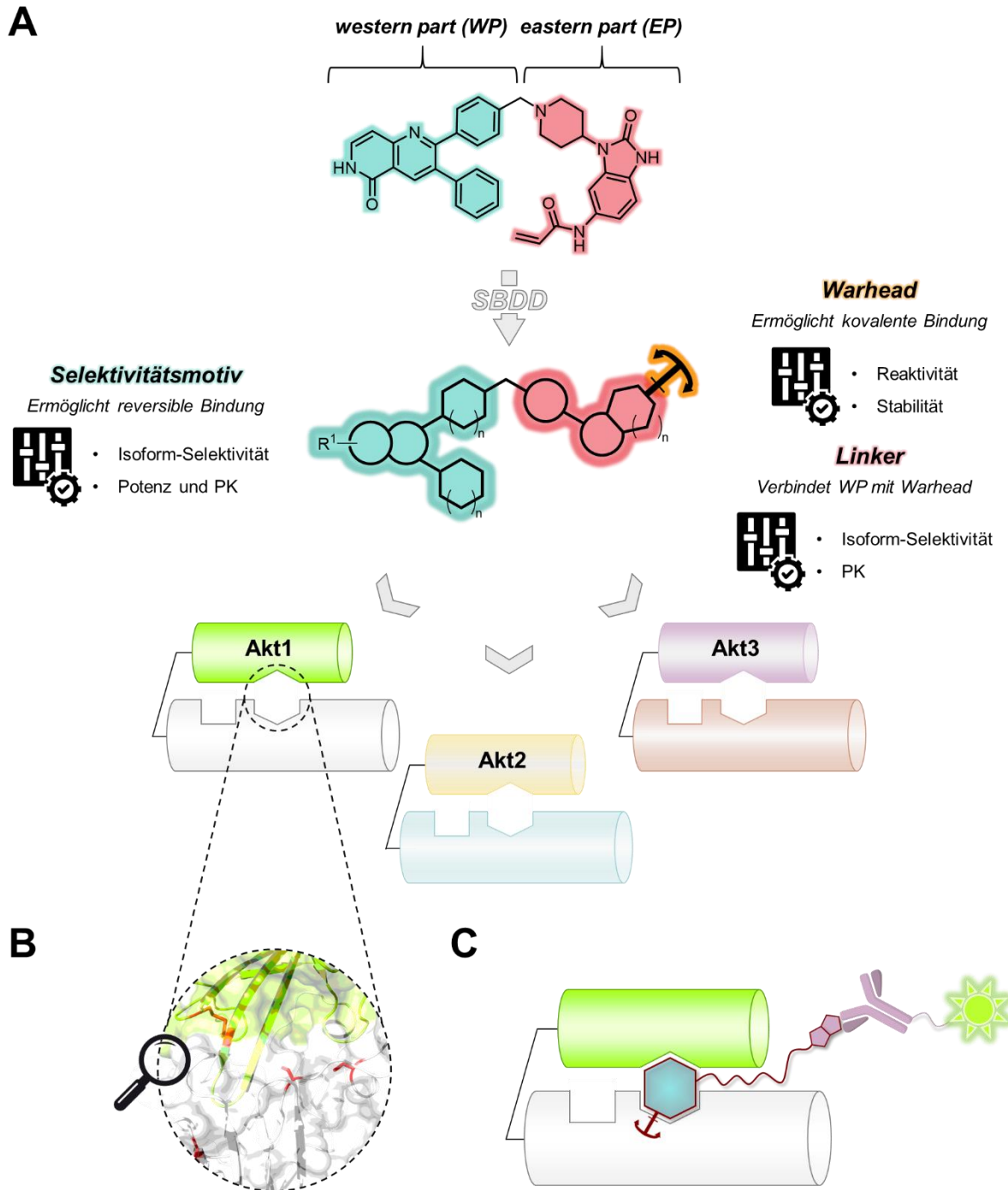
In einem Struktur-basierten Ansatz zur Untersuchung der Präferenz von Isoform-spezifischen Liganden wurden die Pyrazinon-Liganden RL2406, ein Akt1-selektiver Inhibitor, sowie RL2405, ein Akt2-selektiver Inhibitor mit einer 10-fach höheren Affinität gegenüber Akt1 und einer über 100-fachen Affinität gegenüber Akt3 identifiziert.<sup>228</sup> Diese Erkenntnisse bilden den Ausgangspunkt für eine weitergehende strukturbasierte Entwicklung chemischer Sonden, die dazu beitragen können, die Funktionen der Isoformen in Bezug auf Gesundheit und Krankheit in lebenden Organismen zu analysieren.<sup>228,231</sup>

Die vielversprechenden Ergebnisse der kovalent-allosterischen Akt-Inhibition haben den Grundstein für die Entwicklung von PK-optimierten CAAIs der nächsten Generation gelegt. Diese Bemühungen zielen darauf ab, die Herausforderungen der oralen Bioverfügbarkeit zu überwinden und gleichzeitig eine hohe Wirksamkeit und Selektivität beizubehalten, was den Weg für effizientere und patientenfreundlichere Akt-gerichtete Therapien in der Zukunft ebnet wird.

## 2 Motivation und Zielsetzung

Akt ist neben PI3K der zentrale Regulator der PI3K/Akt/mTOR-vermittelten Signaltransduktion. Die Aktivierung dieser Signalkaskade ist für wesentliche physiologische Prozesse wie Zellproliferation, Überleben, Metabolismus und Proteinbiosynthese unabdingbar und spielt zudem eine besonders dezisive Rolle bei einer Vielzahl von humanen Erkrankungen. Veränderungen in Akt-regulierenden Proteinen wie PI3K und PTEN stören das Gleichgewicht, zwischen Aktivierung und Unterdrückung der Signaltransduktion, was zu einer Akt-Hyperaktivität führt und die Pathogenese von NCDs, einschließlich BC, OC, CRC, PC sowie Diabetes, neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen fördert. Nicht selten sind jene malignen Erkrankungen mit einer Überexpression der AKT-Gene oder der konstitutiv aktiven Akt1<sup>E17K</sup>-Mutante assoziiert, die auch die angeborene Überwucherkrankung Proteus-Syndrom auslöst. Die Akt-vermittelte Unterdrückung der Apoptose ist zudem mit einer erworbenen Resistenz gegenüber klassischen strahlen- und chemotherapeutischen Interventionen assoziiert, da diese die Überexpression und anhaltende Aktivierung von Akt in einer Vielzahl von Krebszelltypen induzieren. Diese Zellen werden apoptotisch, wenn die Akt-Signaltransduktion blockiert wird.

Der Einfluss von Akt auf das zelluläre Schicksal, sowie die herausfordernde Adressierung der Regulatoren von Akt, haben die Proteinkinase zu einem lukrativen Ziel der modernen Präzisionsmedizin gemacht. Obwohl die Entwicklung von zielgerichteten Akt-Inhibitoren vor über zwanzig Jahren begann, zeigte erst kürzlich der ATP-kompetitive Akt-Inhibitor Capivasertib positive Ergebnisse in einer Phase III Studie als Ergänzung zur Fulvestrant-basierten Therapie in fortgeschrittenem oder metastatischem Brustkrebs. Capivasertib (Handelsname Truqap) ist der erste Akt-Inhibitor, der im November 2023 eine Zulassung durch die FDA erhalten hat. Um für die Therapie in Frage zu kommen, muss der Status eines Patienten mindestens eine Genveränderung in PI3KCA, Akt1 oder PTEN aufweisen. Die Biomarker-Einschränkung wirft jedoch Fragen auf, da die Kombination (Capivasertib+Fulvestrant) bei einer breiteren Patientenpopulation unabhängig vom Mutationsstatus eine signifikante Verbesserung bei der Verzögerung der Tumorprogression zeigte. Die jahrelange Forschung an der ersten Generation an Akt-Inhibitoren zeigte das die entwickelten Substanzen unter einer begrenzten Wirksamkeit, unzureichender Selektivität und einer damit einhergehenden Toxizität leiden. Die zunächst positiven Ergebnisse der klinischen Studien mit Capivasertib wurden jedoch durch die Einschränkung der Patientenpopulation bei der Zulassung durch die FDA überschattet.



**Abbildung 9** Adressierung von Akt1 und seinen Isoformen mit der nächsten Generation an CAAIs. **A** Medizinal-chemische Optimierung von klassischen CAAIs wie Borussertib im Kontext des Struktur-basierten Wirkstoffdesigns (SBDD). Durch die Optimierung des *western part*, welcher den CAAIs als Selektivitätsmotiv dient und die reversible Bindung ermöglicht, sollte ein neues *scaffold* abgeleitet werden, welches die *late-stage* Derivatisierung erlaubt, um eine fokussierte Substanzbibliothek zur selektiven und potenten Adressierung der Akt-Isoformen zu generieren. In einem zweiten Zyklus der Optimierung sollte der Fokus auf der Derivatisierung des *eastern part* liegen, um den Einfluss des Linkers und des *warhead* auf die Isoformselektivität und Reaktivität der CAAIs zu untersuchen. **B** In einem zweiten Projekt sollten weitere reaktive Cysteine und andere nukleophile Zentren innerhalb der allosterischen Bindungstasche identifiziert und mit einer speziell dafür entworfenen und synthetisierten Serie an neuartigen CAAIs adressiert werden. **C** Auf Grundlage der nächsten Generation an CAAIs sollten in einem dritten Projekt Sondenmoleküle für chemisch-biologische Studien entworfen, synthetisiert und auf zellulärer Ebene evaluiert werden.

Es besteht weiterhin ein hoher klinischer Bedarf an selektiven, hochpotenten und sicheren Akt-Inhibitoren, damit die gesamte Patientenpopulation von der zielgerichteten Therapie profitieren kann. Um die Limitationen der ersten Generation an Akt-Inhibitoren zu überwinden, wurden schließlich CAAs wie Borussertib (Abb. 8 B, 9 A) entwickelt. Diese Form der Akt-Inhibition kombiniert den allosterischen Wirkmechanismus und somit eine hohe Selektivität mit der kovalenten Zieladressierung, wodurch die Dauer der Inhibition maximiert wird. Im Fall von Borussertib konnte durch die verbesserten PD-Eigenschaften der CAAs so erstmals in einer *in vivo*-Mausstudie in Kombination mit dem MEK-Inhibitor Trametinib ein herausragender synergistischer Effekt demonstriert werden.<sup>229</sup> Die Studie offenbarte aber zeitgleich das optimierungsbedürftige PK-Profil der Verbindung, das sich durch eine unzureichende wässrige Löslichkeit, eine geringe intestinale Permeabilität und einen hohen Efflux beschreiben lässt.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit wurde als medizinal-chemische Optimierung von klassischen CAAs wie Borussertib definiert (Abb. 9 A). Dazu sollte in einem ersten Zyklus durch Struktur-basiertes Wirkstoffdesign (SBDD) der westliche Molekülteil (*western part*) von Borussertib dahingehend verändert werden, dass aus dem lipophilen 1,6-Naphthyridinon-Kern ein neues *scaffold* abgeleitet werden kann, das im späteren Teil der Synthese die Derivatisierung erlaubt (*late-stage functionalization* (LSF)), um eine fokussierte Substanzbibliothek an neuartigen kleinen Molekülen zu generieren, die gezielt und selektiv Akt1 und seine Isoformen adressieren. Im Rahmen dieser Bibliothekssynthese, sollten Derivate identifiziert werden, die sich durch eine hohe biochemische- und zelluläre- Potenz, sowie vorteilhafte PK-Eigenschaften auszeichnen. Diese Derivate sollten dann in einen zweiten Zyklus des SBDD einfließen, in dem der östliche Molekülteil (*eastern part*), der als Linker zwischen Selektivitätsmotiv und *warhead* fungiert, den Fokus der chemischen Optimierung darstellt. Während dieser Entwicklungsphase soll zusätzlich durch die Implementierung von neuartigen Elektrophilen die Reaktivität, Stabilität und der Einfluss auf die Isoformselektivität untersucht werden. Am Ende der medizinal-chemischen Optimierungszyklen sollte schließlich eine neue Leitstruktur (engl. *lead*) benannt werden, die durch eine etablierte Synthesestrategie in größerem Maßstab für nachfolgende *in vivo* Experimente bereitgestellt werden kann.

Im weiteren Verlauf der Arbeit, sollte während der Strukturanalyse der Protein-Co-Kristallstrukturen der oben beschriebenen Serien die räumliche Umgebung der allosterischen Interdomänen-Bindungstasche nach weiteren reaktiven Cysteinen und anderen nukleophilen Zentren untersucht werden (Abb. 9 B).

Dazu sollten auch die bereits von der AG Rauh publizierten sowie sämtliche in der PDB hinterlegte Akt-Strukturen analysiert werden. Nach erfolgreicher Identifizierung eines geeigneten Nukleophils, sollte eine neue Serie von CAAIs entworfen und synthetisiert werden, die sich chemisch von der ersten Serie differenziert und das Potential besitzt die Akt-gesteuerte Signaltransduktion durch einen neuen Wirkmechanismus zu inhibieren.

In einem dritten Projekt sollten funktionalisierte Sondenmoleküle basierend auf der nächsten Generation an CAAIs entworfen, synthetisiert und auf zellulärer Ebene evaluiert werden (Abb. 9 C). Diese chemisch-biologischen Werkzeuge bilden die Grundlage für die Entwicklung von essentiellen Assaysystemen, wie *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-basierte *target occupancy* Assays, die unabdinglich in der kovalenten Wirkstoffforschung geworden sind, um beobachtete PD-Effekte mit der erreichten Zielbesetzung zu korrelieren. Neuere Studien weisen darauf hin, dass der lange vernachlässigte Parameter der Verweildauer von Wirkstoffen am Zielort die klassischen Affinitätsparameter ( $K_I$ ,  $K_D$ ,  $IC_{50}$ ,  $EC_{50}$ ) ergänzt und ein besserer Prädiktor für die *in vivo* Wirksamkeit ist.<sup>232,233</sup>

## 3 Ergebnisse und Diskussion

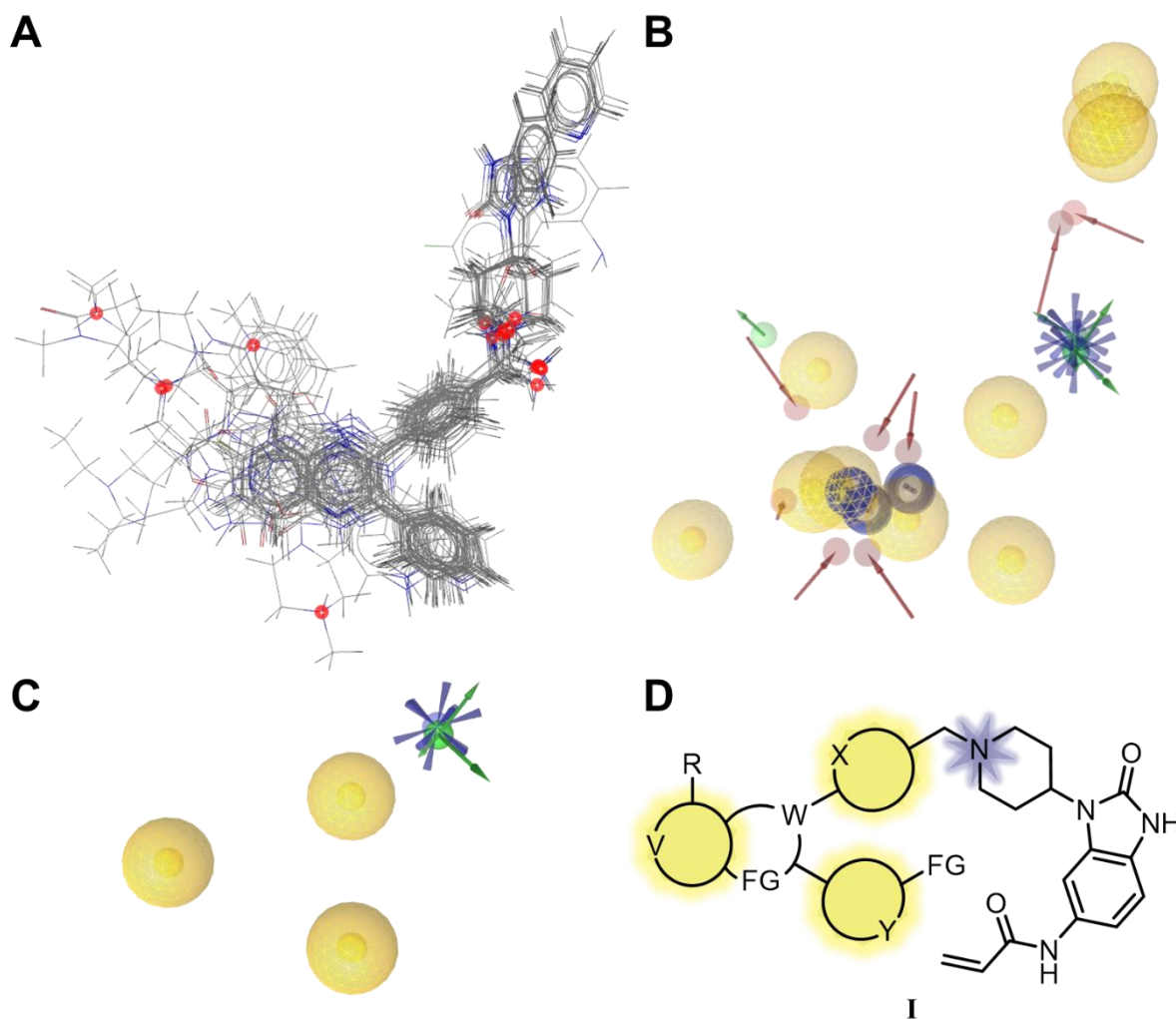
### 3.1 Struktur-basiertes Design der nächsten Generationen von CAAIs

Das Struktur-basierte Wirkstoffdesign (SBDD) ist eine rationale Designstrategie, die das Auffinden, das Design und die Optimierung von niedermolekularen Verbindungen umfasst, die selektiv mit einer makromolekularen Zielstruktur (z.B. Proteinbindungstaschen) wechselwirken. Bei der Entwicklung und Optimierung solcher Wirkstoffe spielen Pharmakophore eine entscheidende Rolle. Ein Pharmakophor ist die abstrakte Darstellung von molekularen Eigenschaften, die für die Struktur eines Wirkstoffes notwendig ist, um mit seinem spezifischen Ziel zu interagieren. Pharmakophore tragen zum Verständnis der molekularen WW zwischen chemischen Liganden und dem biologischen Ziel bei und bilden somit eine rationale Grundlage für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe.<sup>234-236</sup>

In diesem Kontext ergab die Analyse der allosterischen Interdomänen-Bindungstasche von Akt1 im Komplex mit Borussertib (PDB: 6HHF) und weiteren literaturbeschriebenen allosterischen Akt-Inhibitoren (PDB: 3O96, 4EJN) eine Formkomplementarität zwischen dem 1,6-Naphthyridinon-Gerüst von Borussertib und den allosterischen Liganden. Basierend auf dieser Beobachtung wurde eine Substanzbibliothek von 25 in der Literatur beschriebenen allosterischen Akt-Inhibitoren (siehe Anhang Abb. A1) erstellt, um Bindungsmodelle der Liganden in Akt1 zu generieren und somit deren bioaktive Konformation zu bestimmen. Die Rigidität der verwendeten Verbindungen führte zu einer hohen Erfolgsquote bei dem räumlichen Formabgleich, sodass auch hier eine gute Überlagerung mit dem westlichen Molekülteil von Borussertib beobachtet wurde (Abb. 10 A). Für jedes Bindungsmodell wurde anschließend das Pharmakophor des jeweiligen Liganden bestimmt. Die Vereinigung und anschließende Interpolation der Pharmakophore ergab ein fusioniertes Pharmakophormodell (Abb. 10 B), das die gemittelten, kumulativen Eigenschaften der meisten Liganden hervorhebt. Dieses hochkomplexe Modell repräsentiert ein breites Spektrum an Wechselwirkungen, die in die Entwicklung fortgeschrittener Design- und Synthesestrategien integriert werden können. Um explizit die geteilten Eigenschaften aller Liganden zu berücksichtigen, wurde nachfolgend ein *shared feature* Pharmakophormodell generiert, das die essentiellen Anforderungen für die Bindung an Akt erfasst und Liganden-spezifische, nicht aktivitätskritische Eigenschaften ignoriert (Abb. 10 C). Dieses Pharmakophormodell, das lediglich auf den geteilten Eigenschaften aller verwendeten Inhibitoren basiert, identifizierte das für die Aktivität notwendige Kernpharmakophor des westlichen Molekülbausteins.



Die Integration dieser Schlüsseleigenschaften in die nächste Generation von CAAs führte schließlich zur Entwicklung von Verbindung **I** (Abb. 10 D). Das potentiell kovalent-allosterische Vorläufermolekül **I** wurde so konzipiert, dass im späteren Verlauf der Synthese die Derivatisierung mit etablierten Kreuzkupplungsreaktionen erfolgen kann, um so eine fokussierte Substanzbibliothek an neuartigen CAAs zu generieren.



**Abbildung 10** Struktur-basiertes Design der nächsten Generation von CAAs unter Verwendung der Pharmakophore literaturbeschriebener allosterischer Akt-Inhibitoren (Verwendete Software: LigandScout 4.4.8 Expert). **A** Eine fokussierte Substanzbibliothek von 25 literaturbeschriebenen allosterischen Akt-Inhibitoren (siehe auch Anhang Abb. A1)<sup>87,184,195,197,198,203,208,237,238</sup> wurde verwendet, um Bindungsmodelle in Akt1 (PDB: 6HHF, 3O96, 4EJN) zu generieren und somit die bioaktive Konformation der Liganden zu bestimmen. In diesem Kontext konnte durch die Rigidität der kleinen Moleküle eine hohe Erfolgsquote bei dem räumlichen Formabgleich (engl. *shape matching*) erzielt werden. **B** Die Pharmakophore der einzelnen Liganden wurden anschließend vereinigt und interpoliert (engl. *merged and interpolated pharmacophore*). Dieses kombinierte Pharmakophormodell repräsentiert die kumulativen Eigenschaften, die ein Großteil der Liganden gemeinsam haben. **C** Pharmakophormodell der geteilten Eigenschaften (engl. *shared feature pharmacophore*): Der Schwerpunkt dieses Modells liegt auf der Identifizierung und Verwendung von Eigenschaften, die alle Liganden gemeinsam haben. **D** Das Pharmakophor der geteilten Eigenschaften wurde verwendet, um das für die Aktivität notwendige Kern-Pharmakophor zu identifizieren, das schließlich als Grundstein für die Entwicklung neuartiger CAAs wie **I** diene. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; R: Region im Molekül, die eine Derivatisierung im späten Teil der Synthese erlaubt).

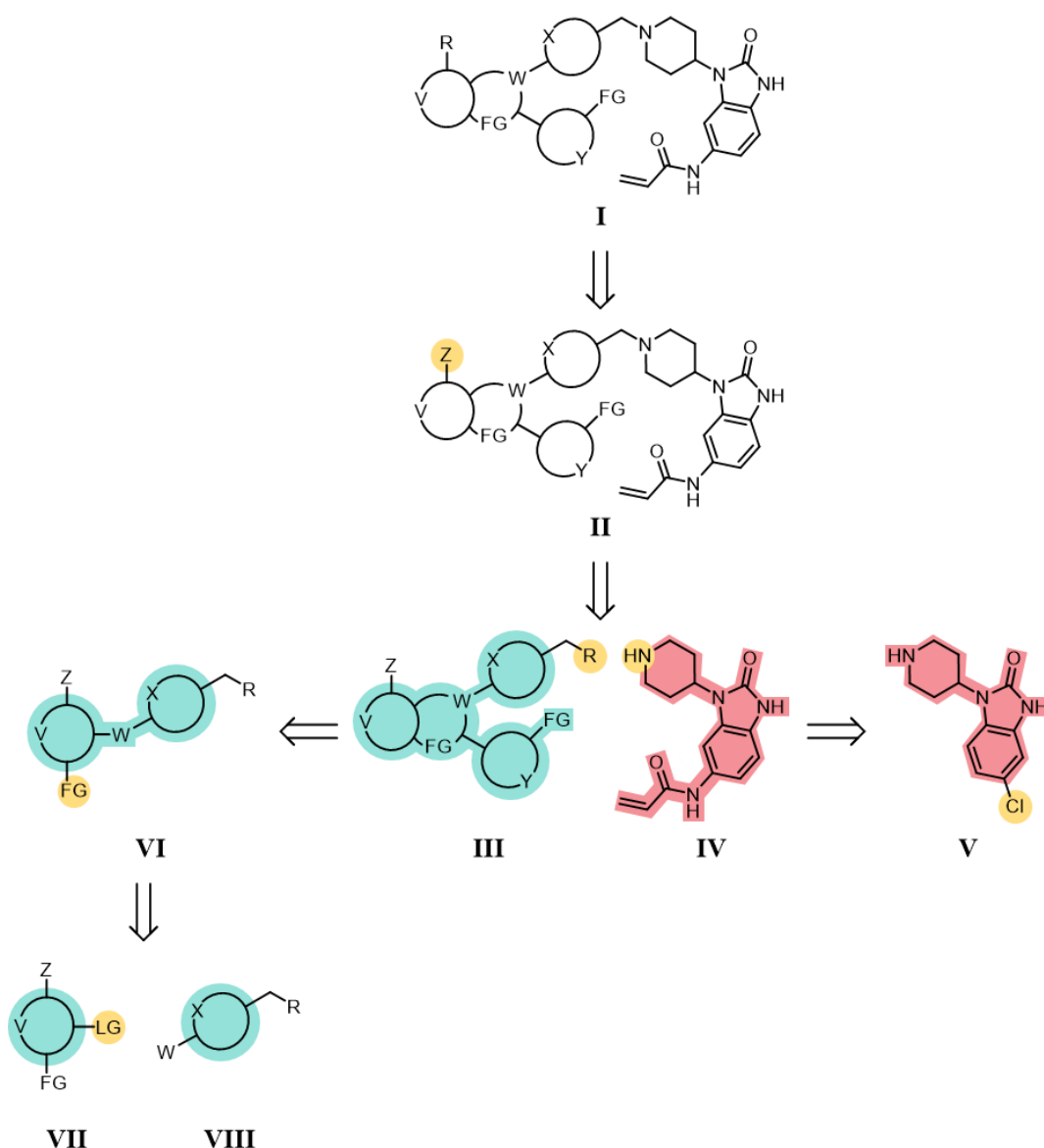
## 3.2 Synthese der 1. Generation neuartiger CAAs

### 3.2.1 Retrosynthetische Aufarbeitung

Das Ziel der retrosynthetischen Aufarbeitung von Zielmolekül **I** bestand darin, die Struktur in einfache Vorläufermoleküle und kommerziell verfügbare Ausgangsstoffe zu überführen. Dies sollte durch eine Abfolge von Rückreaktionen erreicht werden, welche die Struktur des Moleküls aufspalten und somit eine rationale Synthese ermöglichen. Der Bruch einer oder mehrerer Bindungen (engl. *disconnection*) des Zielmoleküls führt zu sogenannten Synthons, konzeptionelle Synthesebausteine die als eigenständige Moleküle nicht existieren müssen. Synthons lassen sich in synthetische Äquivalente (Retrons) überführen, die schließlich für die geplante Synthese genutzt werden. Die Transformation (engl. *transformation*) der Zielstruktur hin zu chemisch zugänglichen Ausgangsmaterialien führt letztendlich zu einem Retrosynthesebaum, der das Fundament der geplanten Syntheseroute darstellt (Abb. 11).

Verbindung **I** stellt als Zielmolekül (engl. *target*) der Retrosynthese eine Substanzbibliothek von Derivaten dar, die sich im westlichen Molekülteil unterscheiden (gekennzeichnet durch "R"). Die Syntheseroute wurde demnach so geplant, dass eine Vorläuferverbindung **II** dargestellt werden muss, die eine Stelle zur Substitution bietet. Molekül **II** wurde so konzipiert das der Substituent "Z" ein Halogen repräsentiert, welches in nachfolgenden Suzuki-Kreuzkupplungsreaktionen mit einer Bibliothek von Boronsäuren oder Boronsäureestern verwendet werden kann. Die Derivatisierung in einem späten Schritt der Synthese ist von großer Bedeutung für die Bibliothekssynthese und setzt voraus, dass die Vorläuferverbindung **II** in ausreichenden Mengen bereitgestellt werden kann. Um dies zu gewährleisten wurde eine konvergente Syntheseroute geplant, die zum einen die Komplexität der Startmaterialien herabsetzt und zum anderen die Parallelsynthese der Derivate ermöglicht. Die Darstellung von Retron **IV** soll demnach über kommerziell verfügbares 5-chloro-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[*d*]imidazol-2-on **V** erfolgen. Die Synthese wurde in der Arbeitsgruppe Rauh bereits teiletabliert<sup>203</sup> und führt über eine regioselektive Nitrierung und Reduktion, Boc-Schutzgruppenstrategie sowie die Amidsynthese und finale Boc-Abspaltung zum gewünschten Baustein **IV**. Für den westlichen Molekülteil **III** wurde eine Synthesestrategie ausgehend von dem Elektrophil **VII** und dem Nukleophil **VIII** geplant. Die Darstellung erfolgt über eine nukleophile aromatische Substitution ( $S_NAr$ ), gefolgt von einer transformierenden Aktivierung hin zum Intermediat **VI**. Eine finale intermolekulare Zyklisierungsreaktion führt dann zu Retron **III**.

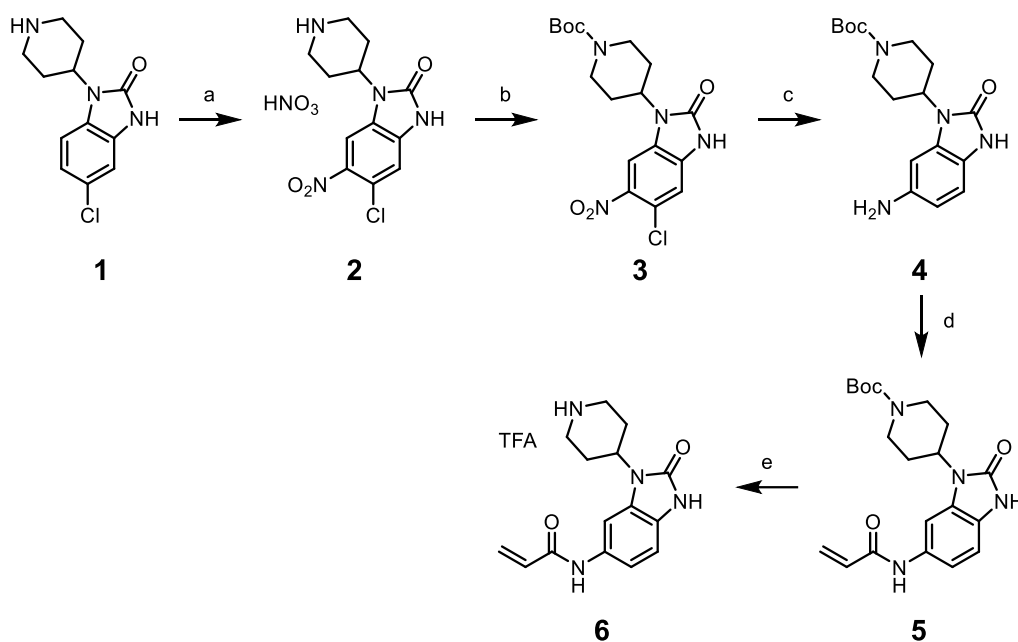
Für die Kupplung des westlichen Molekülbausteins **III** und des östlichen Molekülbausteins **IV** kommen eine Vielzahl von Reaktionen in Frage. Zum einen kann **III** als Aldehyd dargestellt werden, sodass die Kupplung durch eine reduktive Aminierung (Leuckart-Wallach-Reaktion) erfolgen kann. Zum anderen kann die Verbindung der Bausteine durch eine nukleophile Substitution vom Typ  $S_N2$  erfolgen. Hierzu müsste an **III** ein geeignetes Nucleofug generiert werden. Über die Synthese eines benzylichen Alkohols könnten so ein Tosylat oder Mesylat gebildet werden, die besonders geeignete Abgangsgruppen darstellen. Gleichwertig gute Fluchtgruppen stellen Alkylhalogenide wie benzyliche Bromide und Iodide dar. Diese können durch Appel-Reaktionen, die radikalische Bromierung nach Wohl-Ziegler oder durch die Verwendung von Reagenzien wie  $PBr_3$ ,  $PBr_5$  oder  $SOBr_2$  erzeugt werden.



**Abbildung 11** Retrosynthetische Aufarbeitung von Verbindung **I**. Die konvergente Synthesestrategie verläuft über das halogenierte Vorläufermolekül **II** ( $Z = \text{Halogen}$ ), das im größeren Maßstab für Bibliothekssynthese hergestellt werden muss. **II** kann schließlich aus den Retrons **III** und **IV** erzeugt werden, die über eine mehrstufige Syntheseroute aus den kommerziell verfügbaren **VII** und **VIII** bzw. **V** synthetisiert werden können.

### 3.2.2 Synthese des östlichen Molekülteils

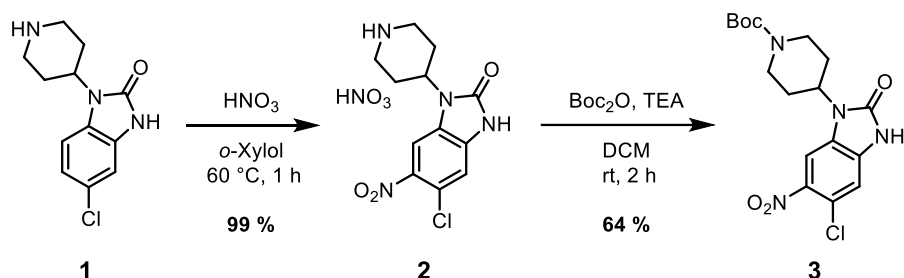
Die Synthese des östlichen Molekülbausteins **6** beginnt mit einer regioselektiven ortho-Nitrierung von handelsüblichem 5-chloro-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[*d*]-imidazol-2-on **1**, um Nitrat **2** zu erhalten. Unter basischen Bedingungen wird der sekundäre Stickstoff des Piperidins mit einer Boc-Schutzgruppe **3** maskiert. Anschließend erfolgt eine Pd-katalysierte Reduktion und Dehalogenierung zur Erzeugung des Intermediates **4**. Schließlich wird der elektrophile *warhead* in Form eines Acrylamids **5** installiert. In einer abschließenden Boc-Entschützungsreaktion wird das TFA-Salz **6** erhalten (Abb. 12).



**Abbildung 12** Allgemeine Darstellung der Synthese des östlichen Molekülbausteins **6**. a) Nitrierung b) Einführen einer Boc-Schutzgruppe c) Reduktion und Dehalogenierung d) Amidsynthese e) Spaltung der Boc-Schutzgruppe.

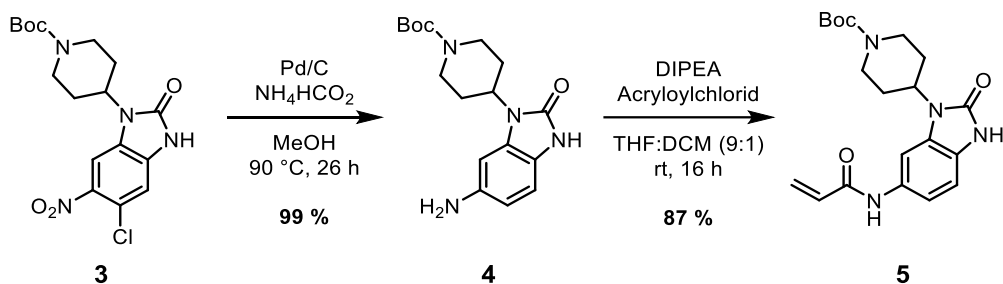
Die regioselektive Nitrierung von **1** erfolgte durch die elektrophile aromatische Substitution ( $S_{EAr}$ ) unter zeitversetzter Zugabe eines Überschusses an Salpetersäure. Die Reaktion verläuft regiospezifisch aufgrund des Chlor-Substituenten in 5-Position, der einen in *ortho*- (und *para*-) Stellung dirigierenden +M-Effekt ausübt, so dass der Angriff eines *in situ* gebildeten Nitronium-Ions an der 6-Position des Aromatischen  $\pi$ -Systems favorisiert wird.<sup>239</sup> Die dabei verloren gegangene Aromatizität des Übergangszustandes wird durch Freisetzung eines Protons wiedergewonnen, so dass **2** ohne säulenchromatographische Aufreinigung als Nitrat in quantitativer Ausbeute erhalten wurde (Abb. 13). Im Anschluss erfolgte die Maskierung des sekundären Stickstoffes des Piperidins von **2**. Die lediglich moderate Ausbeute von 64 % gründet auf der Bildung eines Nebenproduktes, das zusätzlich zum Boc-geschützten Piperidin eine weitere Boc-Gruppe am Urea-Stickstoff aufwies.

Dieses doppelt modifizierte Nebenprodukt kann zukünftig für die nachfolgenden Reaktionen verwendet werden, um die Ausbeute in diesem Schritt zu steigern. Die Kühlung der Reaktion könnte ebenfalls in Erwägung gezogen werden, um die Reaktivität des Urea-Amids herab zu setzen und die Bildung des ungewünschten Nebenproduktes zu unterbinden.



**Abbildung 13** Syntheschema zur Darstellung des Intermediates 3. Die Synthese verläuft über die Nitrierung von 1 und die Boc-Schützung des Nitrats 2.

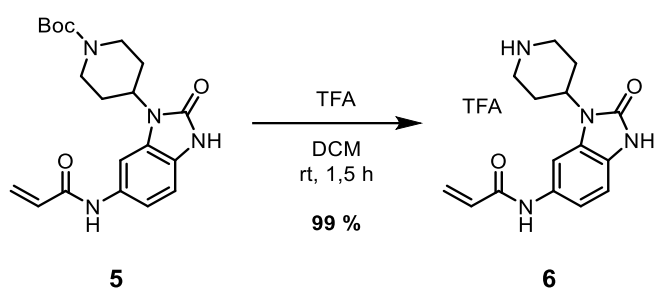
Intermediat 3 wurde im Anschluss in einer heterogen katalysierten Reaktion in das Anilin 4 überführt (Abb. 14). Der auf Kohlenstoff-adsorbierte Palladiumkatalysator dient dabei als Hydridüberträger und Ammoniumformiat als *in situ* Wasserstoffquelle, wobei die Disproportionierung zusätzlich zur Freisetzung von NH<sub>3</sub> und CO<sub>2</sub> führt. Mechanistisch betrachtet entstehen bei der Reaktion nicht-isolierbare Nitroso- und Hydroxylamin-Intermediate, die durch die Freisetzung von H<sub>2</sub>O schließlich das aromatische Anilin bilden. Massenspektrometrische (MS) Analysen ergaben, dass die Hydrierung des Amins innerhalb von wenigen Stunden abgeschlossen war, die vollständige Dehalogenierung jedoch erst am folgenden Tag beobachtet wurde, obwohl diese dem gleichen Reaktionsmechanismus unterliegt. Die Installation des reaktiven *warhead* in Form einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylverbindung erfolgte durch klassische Amidsynthese. Die reaktive Gruppe konnte durch initiale Kühlung direkt über kommerziell verfügbares Acryloylchlorid eingeführt werden, sodass 5 in guten Ausbeuten erhalten wurde.



**Abbildung 14** Syntheschema zur Darstellung des Intermediates 5. Die Synthese verläuft über die Reduktion und Dehalogenierung von 3 und die Amidsynthese des Anilins 4 mit Acryloylchlorid.

Unter TFA-sauren Bedingungen konnte schließlich der östliche Molekülbaustein **6** in quantitativen Ausbeuten als Salz der Trifluoressigsäure isoliert werden (Abb. 15). MS-Analysen nach über drei Jahren der Lagerung bei Raumtemperatur (rt) zeigten keine Spuren des Zerfalls, weshalb sich die Salzform von **6** besonders für die Lagerung über einen längeren Zeitraum eignet.

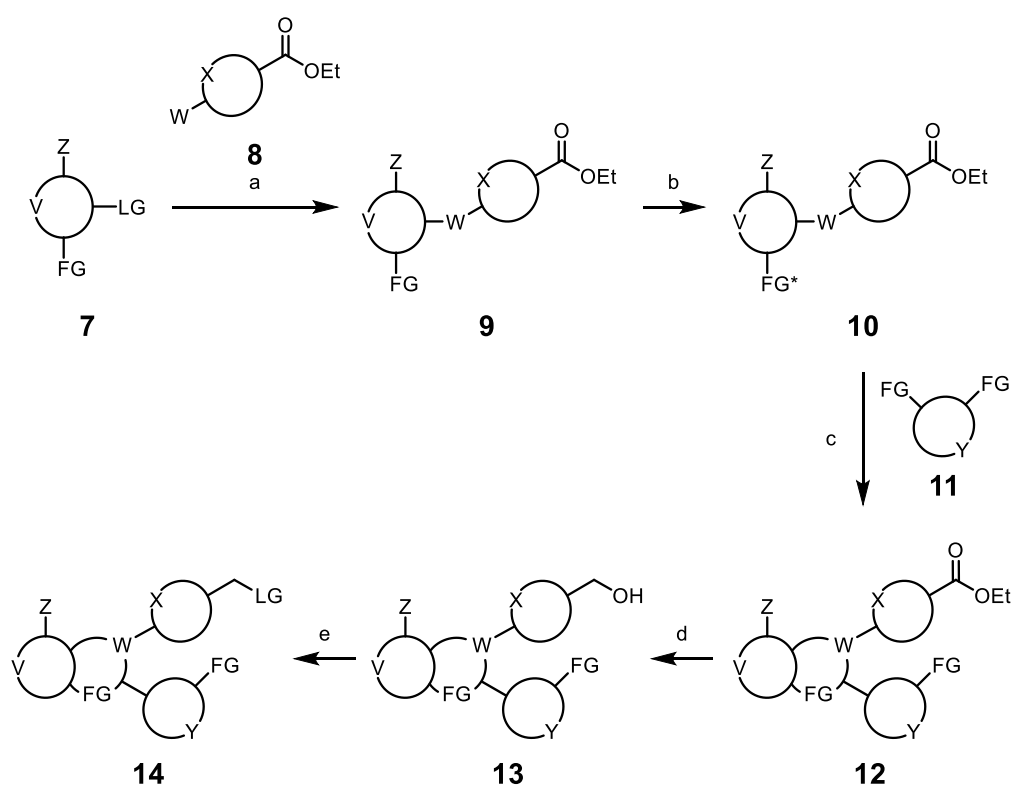
Die Synthese des östlichen Molekülbausteins entwickelte sich im Verlauf des Projekts zu einem iterativen Verfahren. Schließlich wurde für diesen fünfstufigen Syntheseprozess eine Gesamtausbeute von 54 % realisiert, was die Skalierung auf den zweistelligen Gramm-Bereich ermöglichte.



**Abbildung 15** Syntheschema zur Darstellung des westlichen Molekülbausteins **6** durch die TFA-katalysierte Boc-Entschützung von **5**.

### 3.2.3 Synthese des westlichen Molekülteils

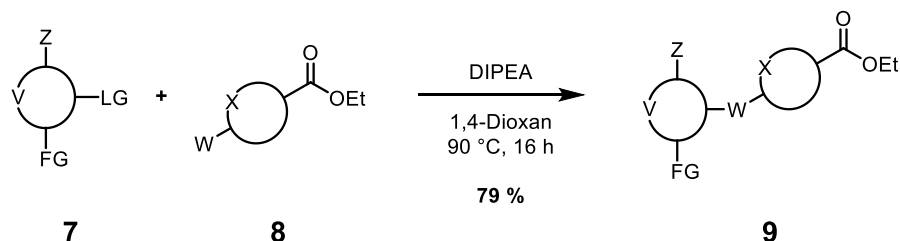
Für den westlichen Molekülbaustein **14** wurde die Synthese so konzipiert, dass zunächst das kommerziell erhältliche Elektrophil **7** in einer konventionellen nukleophilen aromatischen Substitution mit dem Nukleophil **8** zum Intermediat **9** umgesetzt wird. Nach der Transformation der funktionellen Gruppe von **9** erfolgt die mikrowellen-gestützte intermolekulare Zyklisierung zwischen **10** und kommerziell verfügbarem **11**, um den substituierten Kernzyklus **12** zu bilden. Die anschließende Reduktion des Ethylesters führt zum Benzylalkohol **13**, der wiederum durch selektive Funktionalisierung in eine geeignete Abgangsgruppe (-I, -Br, -Cl, -OMs, -OTs, -OTf) überführt werden kann (Abb. 16).



**Abbildung 16** Allgemeine Darstellung der Synthese des westlichen Molekülbausteins **14**. a) Nukleophile aromatische Substitution ( $S_NAr$ ) b) Transformation der funktionellen Gruppe c) Intermolekularer Ringschluss d) Reduktion e) Erzeugung eines Nucleofugs. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalicyklus; FG: Funktionelle Gruppe; FG\*: Transformierte funktionelle Gruppe; LG: Nucleofug; W: Nucleophil; Z: Halogen).

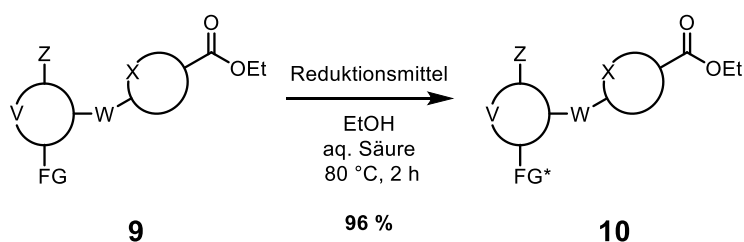
Die Auswahl eines geeigneten Elektrophils **7** stellte die erste Herausforderung bei der Synthese des westlichen Molekülteils dar. Das Elektrophil sollte neben dem Nucleofug “W“ auch ein Halogen “Z“ tragen, das in späteren Kreuzkupplungsreaktionen die Derivatisierung erlauben sollte. Aufgrund der Eigenschaft als potentielle Abgangsgruppe in der  $S_NAr$  war die Entstehung von Nebenprodukten infolge der Substitution des Halogenids zu erwarten. Ebenso musste ein starkes Nucleophil **8** gefunden werden, das seine Eigenschaften nicht durch den elektronischen- oder mesomeren Einfluss von funktionellen Gruppen (FGs) in direkter Nachbarschaft verliert.

Besondere Aufmerksamkeit wurde dem Ausgangsvektor (engl. *exit vector*) der Verbindung gewidmet, der ausreichend inert sein musste, um während der Synthese keine unerwünschten Nebenreaktionen einzugehen. Noch entscheidender war die Prämisse, dass diese FG am Ende der Synthese in eine gute Abgangsgruppe überführt werden kann, um die Kupplung mit dem östlichen Molekülteil zu gewährleisten. Unter Berücksichtigung dieser Voraussetzungen wurden die kommerziell verfügbaren Verbindungen **7** und **8** in einer S<sub>N</sub>Ar verwendet, um das Intermediat **9** zu generieren (Abb. 17).



**Abbildung 17** Syntheschema zur Darstellung des Intermediates **9** durch nukleophile aromatische Substitution des Elektrophils **7** mit dem veresterten Nukleophil **8**. (V, X im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; FG: Funktionelle Gruppe; LG: Nukleofug; W: Nukleophil; Z: Halogen).

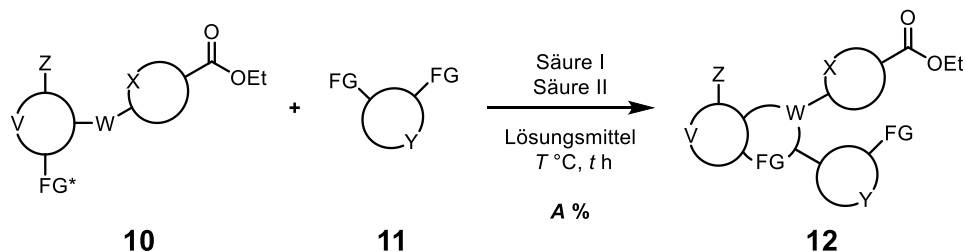
Die Reaktion verläuft gemäß dem klassischen Mechanismus der Addition-Eliminierung, wobei das Nukleophil **8** zunächst an die Position des Nukleofugs im Aromaten **7** addiert. Diese Addition resultiert in der Bildung intermediärer Meisenheimer-Komplexe, in denen die negative Ladung über den gesamten aromatischen Ring delokalisiert wird. Die anschließende Eliminierung der Abgangsgruppe (LG) führt zur Re-Aromatisierung und mündet folglich in der Generierung des Substitutionsprodukts **9**. Trotz der Tatsache, dass bei dieser Reaktion beide Substituenten (Z und LG) des aromatischen Systems **7** die Kriterien als potentielle Abgangsgruppen erfüllen, konnte ausschließlich das antizipierte, kinetische Substitutionsprodukt **9** nachgewiesen werden. Die nachfolgende Reaktion zur Generierung des transformierten Intermediates **10** wurde unter Berücksichtigung des labilen Ethylesters so geplant, dass lediglich die funktionelle Gruppe “FG“ unter den gewählten Bedingungen reduziert wurde (Abb. 18).



**Abbildung 18** Syntheschema zur Darstellung des Intermediates **10** durch Reduktion. (V, X im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; FG: Funktionelle Gruppe; FG\*: Transformierte funktionelle Gruppe; W: Nukleophil; Z: Halogen).



Die quantitative Ausbeute in diesem Reaktionsschritt erforderte keine weitere Optimierung, sodass schließlich die intermolekulare Zyklisierung von **10** mit einem geeigneten aromatischen System **11** erarbeitet werden konnte (Abb. 19, Tabelle 1).



**Abbildung 19** Syntheschema zur Darstellung des Intermediates **12** durch intermolekulare Zyklisierung zwischen **10** und **11**. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

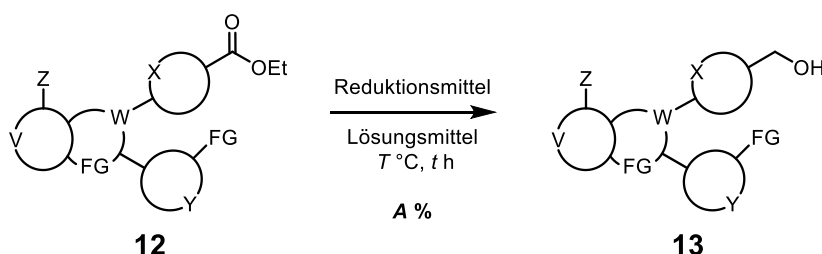
**Tabelle 1** Übersicht der getesteten Reaktionsbedingungen zur Darstellung von **12** (s. Abb. 19).

Eintrag	Säure I [Äq.]	Säure II [Äq.]	Lösungsmittel	Temperatur T [°C]	Zeit t [h]	Umsatz [%]* / Ausbeute A [%]
<b>I</b>	-	-	Säure I : MeOH (9:1)	rt	16	100 <sup>Δ</sup> / 0
<b>II</b>	-	-	Säure I : MeOH (1:9)	rt	16	100 <sup>Δ</sup> / 0
<b>III</b>	1	-	MeOH	rt	16	Spuren / 0
<b>IV</b>	3	-	MeOH	rt	16	Spuren / 0
<b>V</b>	3	-	EtOH	rt	16	Spuren / 0
<b>VI</b>	3	-	DMSO	rt	16	Spuren / 0
<b>VII</b>	3	-	DMF	rt	16	Spuren / 0
<b>VIII</b>	3	-	THF	rt	16	Spuren / 0
<b>IX</b>	3	-	1,4-Dioxan	rt	16	Spuren / 0
<b>X</b>	3	-	MeCN	rt	16	Spuren / 0
<b>XI</b>	3	-	MeCN	50	3	Spuren / 0
<b>XII</b>	3	-	MeCN	70	3	Spuren / 0
<b>XIII</b>	3	-	MeCN	100	3	Spuren / 0
<b>XIV</b>	3	-	MeCN	130 ( $\mu$ w)	0.33	100 <sup>Δ</sup> / < 5
<b>XV</b>	3,5	-	MeCN	130 ( $\mu$ w)	0.33	100 <sup>Δ</sup> / < 5
<b>XVI</b>	3,5	-	MeCN	150 ( $\mu$ w)	0.33	100 <sup>Δ</sup> / ~ 5
<b>XVII</b>	3,5	7	MeCN	150 ( $\mu$ w)	0.33	100 <sup>Δ</sup> / 63
<b>XVIII</b>	3,5	7	MeCN	150 ( $\mu$ w)	0.16	~70 <sup>Δ</sup> / 45
<b>XIX</b>	3,5	7	MeCN	130 ( $\mu$ w)	0.16	~70 <sup>Δ</sup> / 45
<b>XX</b>	3,5	7	MeCN	130 ( $\mu$ w)	0.33	100 <sup>Δ</sup> / 71

\*Bestimmung mittels LC-MS; <sup>Δ</sup>Bildung von Nebenprodukten.

Die anspruchsvolle Zyklisierungsreaktion zur Bildung des Kernintermediates **12** stellte den entscheidenden Schritt in der Synthese des westlichen Molekülteils dar. Um eine möglichst hohe Effizienz in diesem Schritt zu garantieren, mussten chemoselektive Reaktionsbedingungen etabliert werden, die eine reproduzierbare Zyklisierung ermöglichen, ohne dabei die funktionellen Gruppen der Startmaterialien und des sich bildenden Produktes zu transformieren. Stark saure Reaktionsbedingungen über einen längeren Zeitraum hinweg führten zur Bildung von nicht identifizierbaren Nebenprodukten und möglicherweise zum Zerfall der beteiligten Reaktionspartner (Tabelle 1, Eintrag I und II). Die Verwendung stöchiometrischer Mengen an Säure unter Variation der Lösungsmittel führt in Spuren zur Bildung des gewünschten Reaktionsproduktes, das sich aufgrund der Quantität jedoch nicht isolieren lässt (Tabelle 1, Eintrag III-X). Durch die Erhöhung der Temperatur auf bis zu 100 °C konnte die Produktbildung nicht weiter gesteigert werden (Tabelle 1, Eintrag XI-XIII). Mikrowellen-gestützte Reaktionen ermöglichten jedoch die erstmalige Isolation des gewünschten Produktes **12** (Tabelle 1, Eintrag XIV-XVI). Basierend auf den identifizierten Reaktionsparametern ermöglichte die Variation der Temperatur und Zeit, sowie der Zusatz einer weiteren Säure die Steigerung der Effizienz, sodass Ausbeuten von bis zu 71 % für diese entscheidende Zyklisierungsreaktion erzielt werden konnten (Tabelle 1, Eintrag XVII-XX).

Die Kopplung des westlichen mit dem östlichen Molekülbaustein erforderte die Umwandlung des Ethylesters **12** in eine geeignete funktionelle Gruppe zur Bildung der C-N-Bindung. Die Reduktion kann durch starke Kühlung (-78 °C) und den Einsatz äquimolarer Mengen Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) auf der Stufe des Aldehyds gestoppt werden, so dass eine Leuckart-Wallach-Reaktion mit **6** möglich ist. Die geringe Ausbeute der reduktiven Aminierung in früheren Arbeiten führte jedoch zu der Entscheidung, die Kupplung als klassische S<sub>N</sub>2-Reaktion durchzuführen.<sup>203,240</sup> Um ein geeignetes Nucleofug zu generieren, musste **12** zunächst zum benzylicischen Alkohol **13** reduziert werden (Abb. 20).



**Abbildung 20** Syntheschema zur Darstellung des Intermediates **13** durch Reduktion. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

Die selektive Reduktion von Carbonylverbindungen ist in der wissenschaftlichen Literatur umfassend dokumentiert. Allerdings erforderte die spezifische molekulare Struktur von **12** die Optimierung dieser Bedingungen, um die Effizienz zu steigern (Tabelle 2). Vor allem werden wasserfreie, zyklische Ether wie THF als Lösungsmittel für diesen Reaktionstyp genutzt. Aufgrund der mäßigen Löslichkeit von **12** konnten damit nur Spuren der Produktbildung nachgewiesen werden (Tabelle 2, Eintrag II und IV). Das vollständige Lösen des Intermediates in DCM oder polar protischen Lösungsmitteln unter Variation der Reduktionsmittel führte jedoch auch nicht zu dem angestrebten Ergebnis (Tabelle 2, Eintrag I, III, V, VI). Durch die Verwendung eines Überschusses an DIBAL-H konnte erstmals der Alkohol **13** isoliert werden (Tabelle 2, Eintrag VII). Zeitversetzte Dünnschichtchromatographien (DC) bestätigten den vollständigen Umsatz der Reaktion nach 2 h. Allerdings konnte nach der wässrigen Aufarbeitung nur eine geringe Ausbeute erzielt werden. In einem weiteren Ansatz wurde nach 2 h Reaktionszeit eine gesättigte Seignettesalz-Lösung (Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat) hinzugefügt und für weitere 14 h gerührt. Die Komplexierung des entstandenen Aluminiumhydroxid durch den Chelator erleichterte die Aufarbeitung, sodass **13** mit einer Ausbeute von 79 % isoliert werden konnte (Tabelle 2, Eintrag IX).

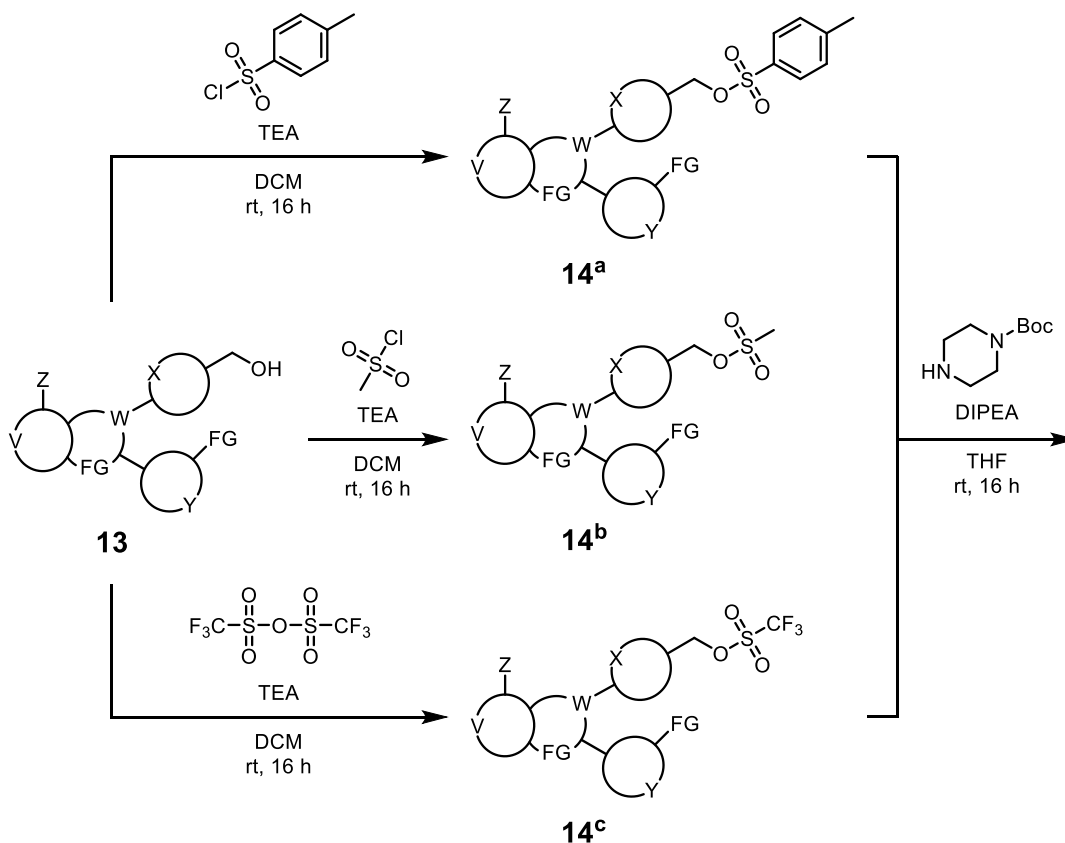
**Tabelle 2** Übersicht der getesteten Reaktionsbedingungen zur Darstellung von **13** (s. Abb. 20).

Eintrag	Reduktionsmittel	Lösungsmittel	Temperatur	Zeit	Ausbeute A [%]
			T [°C]	t [h]	
<b>I</b>	LAH	dDCM	0 – rt	1	Spuren <sup>+</sup>
<b>II</b> <sup>241</sup>	LAH	dTHF	0 – rt	1	Spuren <sup>+</sup>
<b>III</b>	LiBH <sub>4</sub>	dDCM	0	16	Spuren <sup>+</sup>
<b>IV</b> <sup>242</sup>	LiBH <sub>4</sub>	dTHF	0	16	Spuren <sup>+</sup>
<b>V</b>	NaBH <sub>4</sub>	EtOH	rt	2	Spuren <sup>+</sup>
<b>VI</b> <sup>243</sup>	NaBH <sub>4</sub>	MeOH	rt	2	Spuren <sup>+</sup>
<b>VII</b>	DIBAL-H	dDCM	0 – rt	2	35
<b>VIII</b> <sup>*242</sup>	DIBAL-H	dTHF	0 – rt	2	28
<b>IX</b> <sup>*</sup>	DIBAL-H	dDCM	0 – rt	2	79

<sup>\*</sup>Quenchen der Reaktion mit Seignettesalz, <sup>+</sup>Nachweis durch LC-MS

Um ein geeignetes Nukleofug an dem westlichen Molekülteil zu installieren, wurde Intermediat **13** als Tosylat **14a**, Mesylat **14b** und Triflat **14c** verestert (Abb. 21). Der Reaktionsfortschritt wurde mittels DC und LC-MS verfolgt, wobei für alle drei Veresterungsreaktionen ein voller Umsatz am Folgetag erzielt wurde. Bedingt durch die Verwendung hochreaktiver Anhydride und Säurechloride kam es neben der Produktformation zur Bildung von nicht identifizierbaren Nebenprodukten, die den größten Teil des Umsatzes ausmachten.

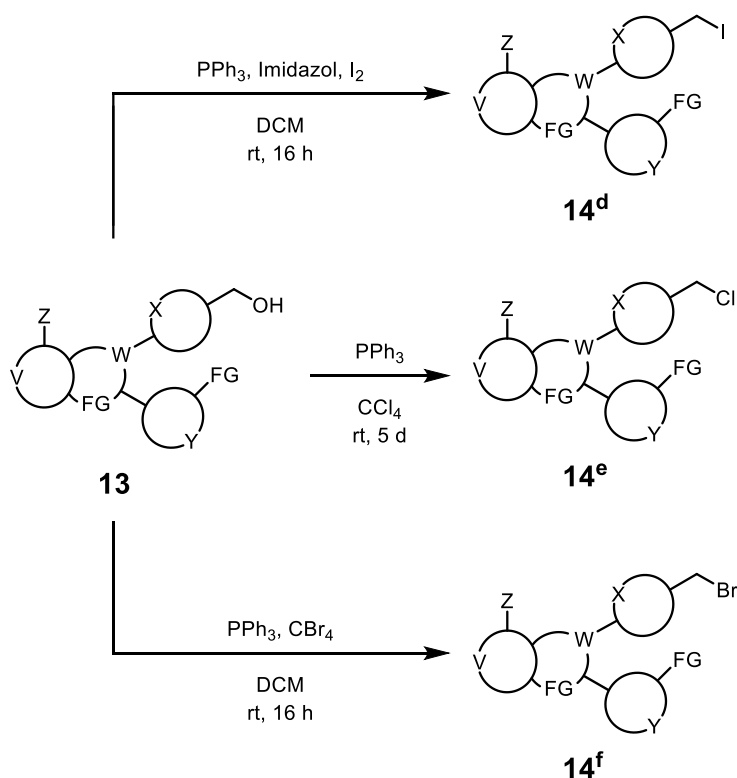
Nach der wässrigen Aufarbeitung wurden die getrockneten Rohprodukte in nukleophilen Substitutionsreaktionen mit 1-Boc-Piperazin verwendet, um ihre Reaktivitäten in der finalen Kopplungsreaktion mit dem östlichen Molekülteil **6** abschätzen zu können. In allen Reaktionen konnte das erwartete Substitutionsprodukt massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Aufgrund der Bildung nicht identifizierbarer Nebenprodukte und damit einhergehenden geringen Ausbeuten wurden weitere Testreaktionen durchgeführt, um die Synthese des Nucleofugs zu optimieren.



**Abbildung 21** Syntheschema zur Darstellung des westlichen Molekülteils **14**. Um eine geeignete Abgangsgruppe an dem westlichen Molekülteil zu erzeugen, wurde Intermediat **13** als Tosylat **14<sup>a</sup>**, Mesylat **14<sup>b</sup>** und Triflat **14<sup>c</sup>** verestert. Anschließend wurde die Funktion als Nucleofug in einer  $S_N2$ -Reaktion mit 1-Boc-piperazin evaluiert. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

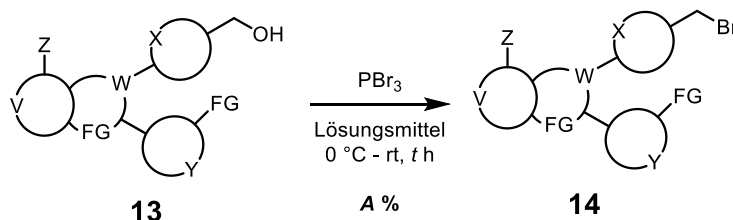
Die Appel-Reaktion ist ein weiteres etabliertes Laborverfahren zur Erzeugung eines geeigneten Nucleofugs. Aufgrund der suboptimalen Atomökonomie der Reaktionen ist die Anwendung dieser Methode jedoch hauptsächlich auf den Forschungsbereich beschränkt. Bei dieser Reaktion werden  $PPh_3$  und ein Halogendonator ( $CCl_4$ ,  $CBr_4$ ,  $I_2$ ) für die Umwandlung eines primären oder sekundären Alkohols in ein Alkylhalogenid verwendet. Die Reaktion verläuft über die Bildung eines Phosphonium-Zwischenprodukts, gefolgt von einer nukleophilen Substitution, die zur Bildung des Alkylhalogenids und von Triphenylphosphinoxid (TPPO) als Nebenprodukt führt.

Die Appel-Reaktion wurde schließlich verwendet, um **13** in das entsprechende Benzylhalogenid **14<sup>d</sup>**, **14<sup>e</sup>** bzw. **14<sup>f</sup>** zu überführen (Abb. 22). Im Allgemeinen wurde für alle drei Ansätze ein milder und sauberer Reaktionsverlauf beobachtet, bei dem TPPO das einzige Nebenprodukt darstellte. Jedoch erwies sich der Einsatz von elementarem Iod als Halogendonator als ungeeignet, da die Reaktion bereits nach 10 Minuten stagnierte und auch am Folgetag kein weiterer Umsatz festgestellt werden konnte. Womöglich führte das Aussalzen von Imidazoliumiodid zum frühzeitigen Reaktionsabbruch. Dieser Reaktionsschritt könnte zukünftig durch die Verwendung von polaren Lösungsmitteln wie THF oder 1,4-Dioxan optimiert werden.<sup>244</sup> Tetrachlormethan wird als gesundheitlich und ökologisch bedenkliches Lösungsmittel eingestuft und führte zu einer schlechten Löslichkeit von **13**. Dadurch konnte ein vollständiger Umsatz erst nach fünf Tagen beobachtet werden. Hingegen wurde in der Bromierungs-Reaktion mit Tetrabrommethan der vollständige Umsatz bereits am Folgetag festgestellt. Die Abtrennung des äquimolar gebildeten TPPO von **14<sup>f</sup>** gelang jedoch weder durch Normalphasen- noch durch Umkehrphasen-Säulenchromatographie, sodass eine weitere Methode der Bromierung, die unabhängig von Triphenylphosphin verläuft, angewandt wurde.



**Abbildung 22** Syntheschema zur Darstellung des westlichen Molekülteils **14**. Um eine geeignete Abgangsgruppe an dem westlichen Molekülteil zu erzeugen, wurde Intermediat **13** in einer Appel-Reaktion verwendet um Benzyljodid **14<sup>d</sup>**, Benzylchlorid **14<sup>e</sup>** und Benzylbromid **14<sup>f</sup>** zu generieren. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

Phosphorhalogenide wie  $\text{PBr}_3$  reagieren mit primären und sekundären Alkoholen in einer  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion, wobei die Hydroxylgruppe durch ein Bromatom substituiert wird. Befindet sich die Hydroxylgruppe an einem chiralen Zentrum, kommt es zur Inversion der Stereoinformation. Die in der Literatur beschriebenen Bedingungen für die selektive Bromierung mit  $\text{PBr}_3$  wurden schließlich adaptiert und auf Intermediat **13** übertragen (Abb. 23, Tabelle 3).



**Abbildung 23** Syntheschema zur Darstellung des westlichen Molekülteils **14** durch selektive Bromierung von **13**. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

**Tabelle 3** Übersicht der getesteten Reaktionsbedingungen zur Darstellung von **14** (s. Abb. 23).

Eintrag	Lösungsmittel	Zeit $t$ [h]	Ausbeute $A$ [%]
<b>I</b> <sup>245</sup>	dDCM	2	41*
<b>II</b> <sup>246</sup>	dTHF	2	46*
<b>III</b>	dDCM:dTHF (1:1)	2	46*
<b>IV</b>	1,4-Dioxan	2	53*
<b>V</b>	1,4-Dioxan	0,016	9 <sup>+</sup>
<b>VI</b>	1,4-Dioxan	0,16	11 <sup>+</sup>
<b>VII</b>	1,4-Dioxan	0,5	16 <sup>+</sup>
<b>VIII</b>	1,4-Dioxan	3	56 <sup>+</sup>
<b>IX</b>	1,4-Dioxan	18	71 <sup>+</sup>
<b>X</b>	1,4-Dioxan	72	79*

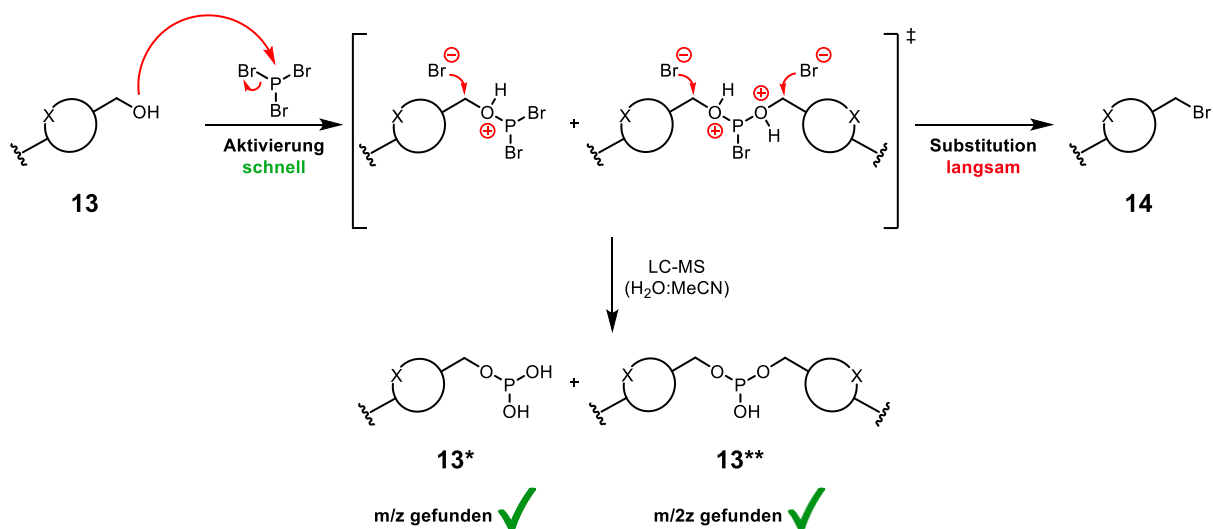
\*Isoliert; <sup>+</sup>Bestimmt mittels LC-MS

Bereits nach zwei Stunden Reaktionszeit konnte der vollständige Umsatz des Startmaterials **13** mittels DC festgestellt werden (Tabelle 3, Eintrag I-IV). Zusätzlich zur Bildung des antizipierten Benzylbromids **14** konnte ein stark polares Nebenprodukt identifiziert werden, welches im Rahmen der wässrigen Aufarbeitung in das Ausgangsmaterial **13** zerfiel (Abb. 24).



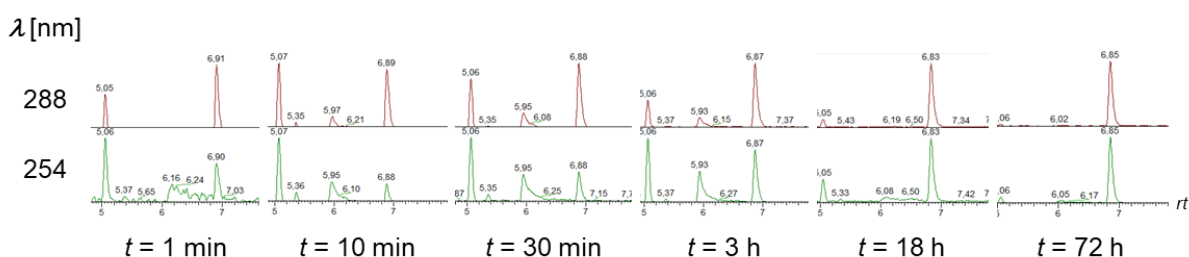
**Abbildung 24** Schematische Darstellung einer Dünnschichtchromatographie (DC) der in Abb. 23 dargestellten Reaktion nach 2 h Reaktionszeit (links) und nach der wässrigen Aufarbeitung (rechts). (E: Edukt **13**, RM: Reaktionsgemisch).

Es wurde die Hypothese formuliert, dass es sich hierbei um isolierbare Phosphonate des Moleküls **13** handeln könnte, deren Präsenz anhand des Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$  bzw.  $m/2z$ ) mittels LC-MS bestätigt werden konnte (Abb. 25). Dementsprechend scheint der Schritt der Aktivierung und somit die Bildung der Phosphorsäureester besonders schnell zu verlaufen, während die Substitutionsreaktion des  $S_N2$ -Typs geschwindigkeitsbestimmend ist.



**Abbildung 25** Mechanismus der Transformation eines primären Alkohols **13** zum Alkylbromid **14** mittels  $PBr_3$ .

Über einen Zeitraum von drei Tagen wurden Proben aus dem Reaktionsgemisch (Abb. 23) entnommen und mittels LC-MS analysiert, um den postulierten Reaktionsverlauf zu validieren (Tabelle 1, Eintrag V-X; Abb. 26). Bereits eine Minute nach Zugabe von  $PBr_3$  konnte die vollständige Transformation von **13** zu **13\*** (Retentionszeit (rt) = 5,0 min), **13\*\*** (rt = 5,93-6,1 min) sowie **14** (rt = 6.83-6.9) beobachtet werden. Nach 72 Stunden war die Reaktion vollständig abgeschlossen, so dass der westliche Molekülteil **14** mit einer Ausbeute von 79 % isoliert wurde.

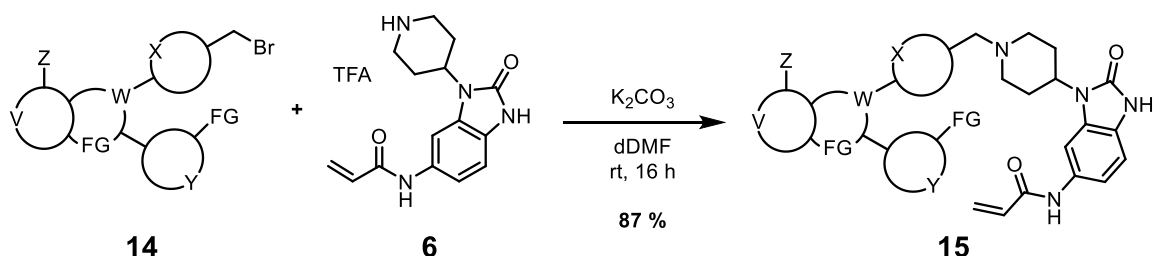


**Abbildung 26** UV-Spektren der selektiven Bromierung von **13** zu angegebenen Zeitpunkten nach der Zugabe von  $PBr_3$ .

Für die Darstellung des westlichen Molekülbausteins wurde eine Syntheseroute bestehend aus fünf Schritten entwickelt, deren Gesamtausbeute sich durch fortlaufende Optimierungsprozesse auf 34 % belief, sodass absolute Ausbeuten im einstelligen Grammbereich erzielt werden konnten.

### 3.2.4 Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek

Die erfolgreiche Synthese der westlichen und östlichen Molekülbausteine in Gramm-Maßstäben ermöglichte schließlich die Kopplung der beiden Verbindungen mittels konventioneller nukleophiler Substitution des  $S_N2$ -Typs. In initialen Kopplungsexperimenten wurde die Reaktion in dTHF als Lösungsmittel mit einem 10-fachen Überschuss der organischen Base DIPEA durchgeführt. Ein vollständiger Umsatz konnte hier allerdings erst nach drei Tagen Reaktionszeit beobachtet werden, wobei die Ausbeute bei 75 % lag. Optimierungen dieses Schrittes führten schließlich zu der Verwendung von dDMF als Lösungsmittel und der anorganischen Base  $K_2CO_3$  in einem 6-fachen Überschuss, wobei bereits nach 16 Stunden Ausbeuten von bis zu 87 % erzielt werden konnten (Abb. 27). Die Neutralisation von Trifluoressigsäure (TFA) mit Carbonatbasen stellt ein gängiges Verfahren in der organischen Synthese dar.<sup>247</sup> Charakteristisch für diesen Prozess ist die Freisetzung von Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ), die als Indikator für den Reaktionsfortschritt dient. Die Reaktionslösung zeigte nach 16 Stunden eine signifikante Trübung. Durch die Verschiebung des Gleichgewichts von der Salzform von **6** hin zum freien Piperidin, erfolgte die nukleophile Substitution am benzylichen Kohlenstoff von **14**. Das freigesetzte Bromidion fällt schließlich als Kaliumbromid aus und stellt somit durch die Trübung der Reaktionslösung einen weiteren Indikator für den Reaktionsfortschritt dar.

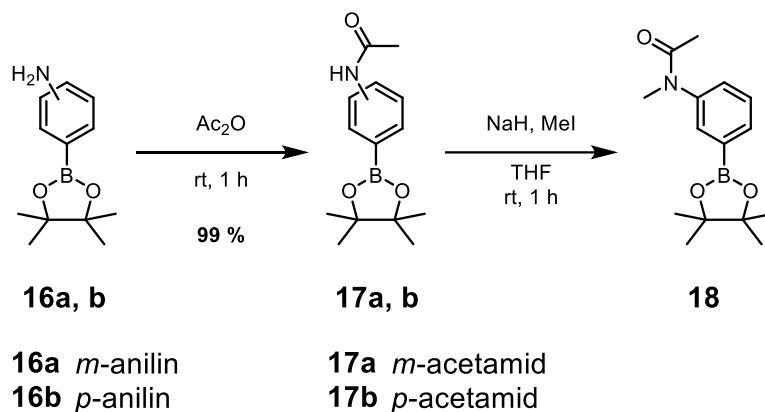


**Abbildung 27** Syntheschema zur Darstellung des Präkursors (engl. *precursor*) **15** durch nukleophile Substitution zwischen dem westlichen (**14**) und dem östlichen (**6**) Molekülbaustein. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

Die Hochskalierung der Reaktion erlaubte es schließlich genügend Ausgangsmaterial für die Synthese einer fokussierten Substanzbibliothek bereit zu stellen. Die Derivatisierung sollte durch Palladium-katalysierte Suzuki-Kreuzkupplungsreaktionen erfolgen. Hierzu nötige Boronssäuren oder entsprechende Pinakolester, die kommerziell nicht verfügbar waren (**17a**, **b** und **18**), konnten durch klassische Acetylierungs- und Methylierungsreaktionen synthetisiert werden (Abb. 28). Kommerziell verfügbare Aniline **16a** und **16b** wurden durch die Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in die entsprechenden acetylierten Derivate **17a** bzw. **17b** transformiert.

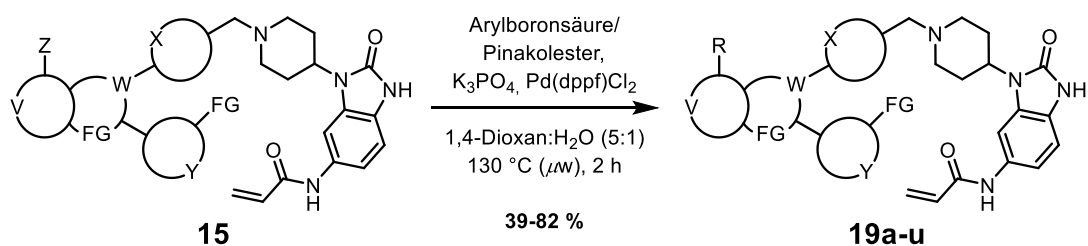


Durch den Einsatz einer Hydridbase konnte **17a** in einer nukleophilen Substitutionsreaktion einer vollständigen N-Methylierung unterzogen werden. Im Zuge der chromatographischen Aufreinigung kam es zur Teilzersetzung des Boronsäureesters in die korrespondierende Boronsäure. Aus diesem Grund wurde das Rohprodukt von **18** in den nachfolgenden Kreuzkupplungsreaktionen eingesetzt.

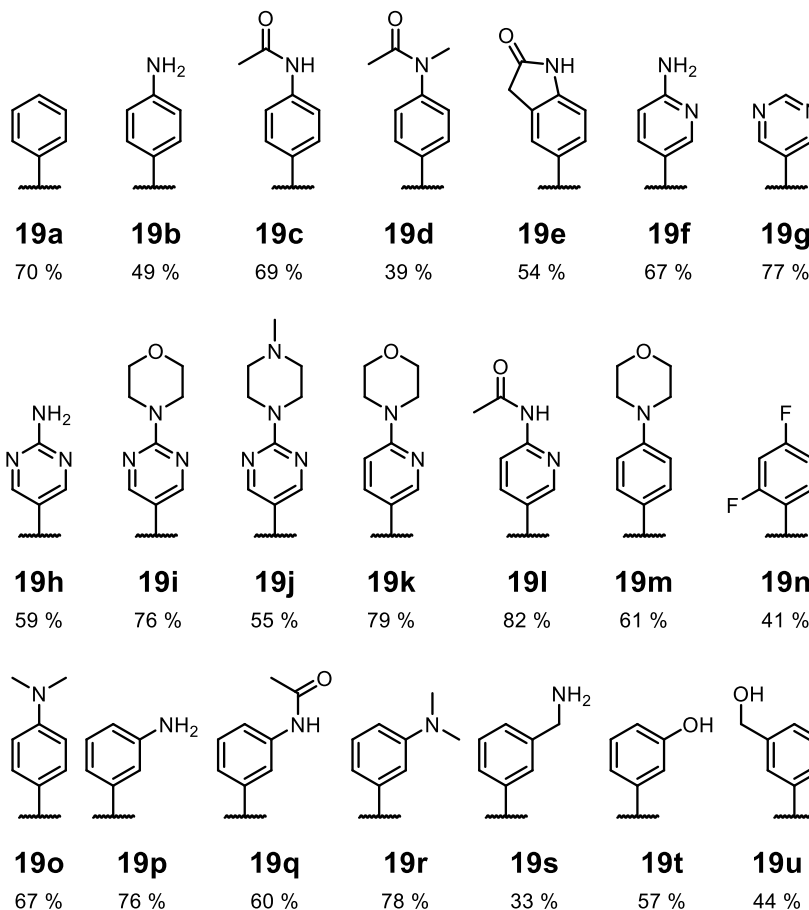


**Abbildung 28** Syntheschema zur Darstellung der Boronsäureester **17a**, **17b** und **18**.

Die Auswahl weiterer Boronsäuren oder Boronsäure-Pinakolester beschränkte sich auf *para*- und *meta*-substituierte aromatische Systeme, die einerseits löslichkeitsfördernde Eigenschaften besitzen und andererseits eine Variation an funktionellen Gruppen aufweisen, die letztlich die Ableitung einer Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) ermöglichen sollte. Für die Synthese der 21 angestrebten Derivate wurden mikrowellen-gestützte Reaktionsbedingungen ausgewählt, die bereits zuvor in der Arbeitsgruppe Rauh validiert werden konnten. Mit diesen Bedingungen erfolgte die Synthese der potentiellen CAAs **19a-u**, wobei Ausbeuten zwischen 39-82 % erzielt werden konnten (Abb. 29). Die Varianz in der Ausbeute innerhalb der einzelnen Reaktionen ist dabei auf die funktionellen Gruppen der verwendeten Boronsäuren zurückzuführen, die einen negativen Einfluss auf den katalytischen Kreislauf haben können. Im initialen Schritt der Suzuki-Kreuzkupplung erfolgt die oxidative Addition des Pd(0)-Katalysators an das Halogen Z der Verbindung **15**, was zur Formation einer Organopalladium(II)-Spezies führt. Die anschließende Wechselwirkung mit K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> führt zur Freisetzung des Halogenids und begünstigt die Entstehung eines intermediären Organopalladium-Phosphats. Dieses Intermediat wird durch Transmetallierung mit einem Boronat, das aus der Reaktion der Boronsäure oder Boronsäure-Pinakolester mit einem zusätzlichen Äquivalent der Base generiert wird, in eine substituierte Organopalladium(II)-Spezies überführt. Die finale reduktive Eliminierung katalysiert die Freisetzung der Zielprodukte **19a-u** sowie die Regeneration des Pd(0)-Katalysators.<sup>248</sup>

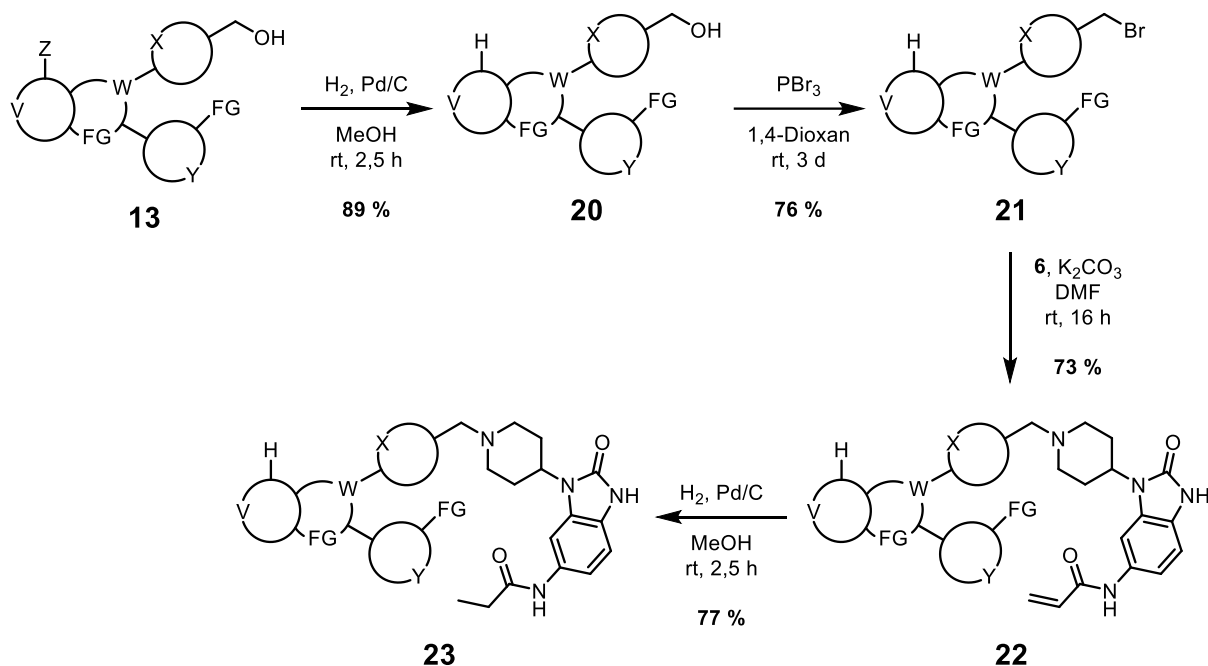


R =



**Abbildung 29** Syntheschema zur Darstellung der ersten Serie an potentiellen CAAIs **19a-u** durch Suzuki-Kreuzkupplungsreaktionen mit den entsprechenden Boronsäuren / Pinakolestern. Die Ausbeuten der einzelnen Reaktionen sind als prozentuale Angaben unter den Derivaten annotiert. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

Im Weiteren sollte ein reversibles Gegenstück **23** zu den synthetisierten CAAIs dargestellt werden, um in der nachfolgenden biologischen Evaluation als Referenzverbindung zu dienen (Abb. 30). Dazu wurde Intermediat **13** in einer Pd-katalysierten reduktiven Dehalogenierungsreaktion verwendet, um die reduzierte Verbindung **20** zu erzeugen. Die bereits etablierten Bedingungen der selektiven Bromierung mittels  $\text{PBr}_3$  führten zum westlichen Molekülteil **21**, das in einer anschließenden nukleophilen Substitution mit dem östlichen Molekülteil **6** zum potentiellen CAAI **22** umgesetzt werden konnte. Die abschließende katalytische Hydrierung des Acrylamids von **22** führte schließlich zum Propionamid **23** und somit zu einem reversiblen Gegenstück zu **22**.



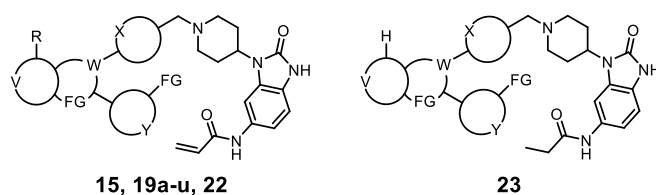
**Abbildung 30** Allgemeine Darstellung der Synthese der reversiblen Verbindung **23**. Die Synthese erfolgt durch die katalytische Dehalogenierung von **13**, die selektive Bromierung von **20** und der nukleophilen Substitution mit dem östlichen Molekülteil **6** zum kovalenten Derivat **22**. Die katalytische Hydrierung von **22** führt schließlich zur reversiblen Verbindung **23**. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

Im Rahmen des ersten Design- und Synthesesyklus wurden 24 neuartige Akt-Inhibitoren konzipiert und dargestellt, darunter ein reversibles Derivat (**15**, **19a-u**, **22**, **23**). Das primäre Ziel der ersten Serie neuer CAAs bestand darin, geeignete Substitutionsmuster zu identifizieren, die sich durch eine herausragende *in vitro* Potenz sowie verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften auszeichnen. Die so gewonnenen Erkenntnisse sollten in den nächsten Zyklus des SBDD einfließen.

### 3.3 *in vitro* Charakterisierung der 1. Generation neuartiger CAAIs

Um die Wirksamkeit der ersten Generation neuartiger CAAIs zu bewerten, wurden IC<sub>50</sub>-Werte gegen die volllängen-Konstrukte der drei Akt-Isoformen in einem aktivitäts-basierten *homogeneous time resolved fluorescence* (HTRF)-Assay bestimmt. Zusätzlich wurde die Wirksamkeit der Inhibitoren in zellbasierten Experimenten durch Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte gegen eine klinisch relevante Brustkrebszelllinie (ZR-75-1, PTEN<sup>L108R</sup>) evaluiert (Tabelle 4). Zum Benchmarking wurden die neu entwickelten CAAIs mit dem *first-in-class* CAAI Borussertib verglichen, der eine subnanomolare Inhibition von Akt1 zeigt, während er eine über 60-fach höhere Selektivität gegenüber Akt2 und eine über 650-fach höhere Selektivität über Akt3 aufweist. Miransertib, ein allosterischer, nicht-kovalenter Akt-Inhibitor, zeigt ein ähnliches Profil, ist aber selektiver für Akt1 und Akt2 als für Akt3. Der bereits zugelassene, ATP-kompetitive Akt-Inhibitor Capivasertib zeigt keine Isoform-Selektivität und kann daher als Pan-Akt-Inhibitor eingestuft werden. Ligand **22**, der mit einem Cystein-reaktiven elektrophil modifiziert wurde, zeigte im Vergleich zu seinem reversiblen Pendant **23** eine signifikante Steigerung der Aktivität um einen Faktor von 20-80 auf den drei Isoformen. Die Einführung von aromatischen Resten in R-Position, die in Richtung der PH-Domäne ausgerichtet sind, fördert in signifikanter Weise die inhibitorische Aktivität gegen alle drei Isoformen (vgl. z.B. **22** und **19a**). Im Allgemeinen scheinen para- und meta-Substitutionen am Phenylring von **19a** gut toleriert zu werden und können zu einer gesteigerten Aktivität bei allen drei Isoformen führen (z.B. **19b**). Mit zunehmender Ligandengröße konnte jedoch keine signifikante Verbesserung der Wirksamkeit erzielt werden. (**19c-e**, **19m-o**). Die Substitution der Phenylgruppe von **19a** in R-Stellung durch heteroaromatische Reste (**19f-l**) führte ebenfalls zu hochwirksamen Verbindungen, wobei insbesondere Inhibitor **19h** durch die zusätzliche para-Aminogruppe eine subnanomolare Potenz gegen Akt1 aufweist. Außerdem übertrifft er **19a** in der Aktivität gegen Akt2 und Akt3 und zeigt ein ähnliches Profil wie **19b**. Vielversprechende Ergebnisse wurden für die meta-substituierten Derivate (**19p-u**) von **19a** erzielt. Eine Ausnahme bildet Benzylamin **19s**, das im Vergleich zum Benzylalkohol **19u** eine bis zu 100-fach geringere Potenz gegen alle Isoformen aufweist. Die initiale Modellierung der potentiellen CAAIs ergab, dass polare Substituenten am Phenylring in R-Position von **19a** zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) mit polaren AS-Seitenketten der PH-Domäne eingehen könnten, die eine hydrophile Tasche nahe der Lösungsmittel exponierten Front bilden und somit zur Aktivitätssteigerung beitragen. Diese Hypothese wird durch die erhöhte Aktivität der Inhibitoren **19p-r** sowie **19t** und **19u** gegenüber allen Isoformen unterstützt.

**Tabelle 4** Biochemische- und zelluläre Evaluation der 1. Generation neuartiger CAAs.

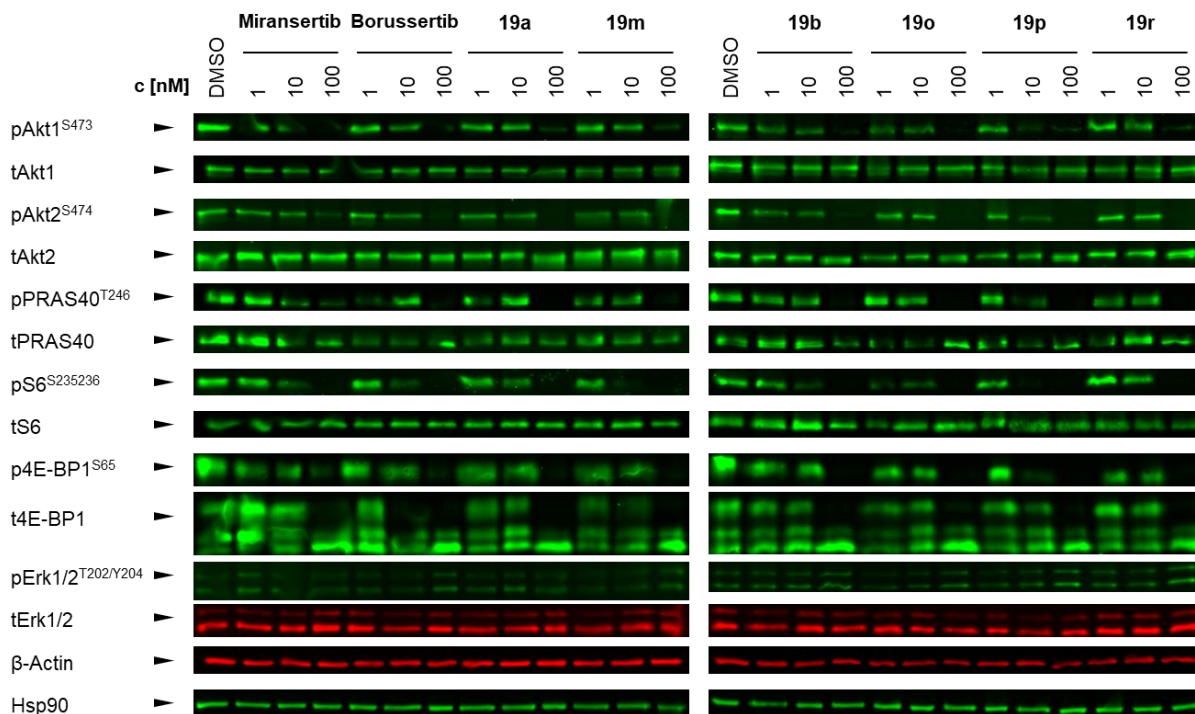


#	R	Akt1 <sup>wt</sup>	Akt2 <sup>wt</sup>	Akt3 <sup>wt</sup>	ZR-75-1
		IC <sub>50</sub> [nM]	IC <sub>50</sub> [nM]	IC <sub>50</sub> [nM]	EC <sub>50</sub> [nM]
<b>Borussertib</b>	-	0,8 ± 0,3	59 ± 16	650 ± 170	5 ± 1
<b>Miransertib</b>	-	1,4 ± 0,2	9,0 ± 1,0	505 ± 120	33 ± 6
<b>Capivasertib</b>	-	1,0 ± 0,1	5,0 ± 0,4	8,0 ± 1,0	191 ± 68
<b>15</b>	chloro	10 ± 2	735 ± 437	5822 ± 1851	18 ± 8
<b>19a</b>	phenyl	1,7 ± 0,5	44 ± 20	106 ± 13	3,4 ± 0,7
<b>19b</b>	4-aminophenyl	1,0 ± 0,2	16 ± 8	69 ± 8	9,6 ± 3,9
<b>19c</b>	4-acetamidophenyl	2,9 ± 0,8	51 ± 19	318 ± 35	42 ± 13
<b>19d</b>	4- <i>N</i> -methylacetamidophenyl	18 ± 6	176 ± 66	1420 ± 763	66 ± 19
<b>19e</b>	2-oxoindolin-5-yl	7,4 ± 2,0	132 ± 74	992 ± 218	193 ± 79
<b>19f</b>	6-aminopyridin-3-yl	1,0 ± 0,2	31 ± 12	140 ± 12	18 ± 5
<b>19g</b>	pyrimidin-5-yl	2,6 ± 0,6	162 ± 41	472 ± 133	21 ± 8
<b>19h</b>	2-aminopyrimidin-5-yl	0,9 ± 0,3	19 ± 6	66 ± 21	16 ± 2
<b>19i</b>	2-morpholinopyrimidin-5-yl	3,8 ± 1,2	42 ± 13	65 ± 11	18 ± 4
<b>19j</b>	2-(methylpiperazin-1-yl)pyrimidin-5-yl	1,8 ± 0,6	32 ± 8	106 ± 6	100 ± 16
<b>19k</b>	6-morpholinopyridin-3-yl	2,0 ± 0,3	16 ± 2	30 ± 7	18 ± 5
<b>19l</b>	6-acetamidopyridin-3-yl	1,7 ± 0,6	23 ± 1	66 ± 6	29 ± 8
<b>19m</b>	4-morpholinophenyl	3,3 ± 0,5	25 ± 5	80 ± 18	16 ± 6
<b>19n</b>	2,4-difluorophenyl	3,1 ± 0,3	54 ± 9	295 ± 66	149 ± 15
<b>19o</b>	4-(dimethylamino)phenyl	3,3 ± 0,7	46 ± 14	181 ± 37	5,7 ± 0,6
<b>19p</b>	3-aminophenyl	0,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1	28 ± 2	5,3 ± 1,0
<b>19q</b>	3-acetamidophenyl	0,6 ± 0,1	2,1 ± 0,2	38 ± 3	8,0 ± 2,1
<b>19r</b>	3-(dimethylamino)phenyl	1,6 ± 0,1	3,8 ± 1,3	57 ± 37	4,1 ± 1,1
<b>19s</b>	3-(aminomethyl)phenyl	57 ± 13	291 ± 17	3633 ± 861	832 ± 342
<b>19t</b>	3-hydroxyphenyl	0,6 ± 0,1	1,8 ± 0,2	23 ± 10	5,6 ± 1,6
<b>19u</b>	3-(hydroxymethyl)phenyl	0,6 ± 0,1	2,4 ± 0,4	38 ± 19	6,5 ± 1,9
<b>22</b>	H	9,8 ± 2,8	381 ± 35	20000	22 ± 7
<b>23</b>	H	837 ± 164	8600 ± 4200	20000	4986 ± 904

HTRF-Assay durchgeführt von Dr. L. Quambusch, Dr. J. Weisner, M. Sc. S. Brandherm; CTG-Assay durchgeführt von: Dr. I. Landel, Dr. J. Weisner.

Um die antiproliferative *in vitro* Aktivität der dargestellten Verbindungen zu untersuchen, wurde die Brustkrebszelllinie ZR-75-1 (PTEN<sup>L108R</sup>) verwendet. Die Sensitivität dieser Zellen gegenüber der Hemmung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs konnte bereits in vorherigen Studien demonstriert werden.<sup>249,250</sup> Die eindeutige Abhängigkeit von der Akt-Signalübertragung wird dadurch verdeutlicht, dass sowohl die drei Referenzsubstanzen als auch alle neu entwickelten CAAs die Zellproliferation unterdrücken können (siehe Tabelle 4). Ein deutlicher Vorteil der kovalenten Inhibition der Akt-Isoformen konnte gezeigt werden, da die mit einem elektrophilen *warhead* versehene Verbindung **22** eine über 200-fach höhere Wirksamkeit im Vergleich zu ihrem reversiblen Gegenstück **23** aufwies. Von den 23 getesteten CAAs zeigten acht eine bemerkenswerte zelluläre Aktivität im einstelligen nanomolaren Bereich (**19a**, **19b**, **19o-r**, **19t**, **19u**) und übertrafen damit die klinisch relevanten Inhibitoren Miransertib und Capivasertib bei dieser speziellen Brustkrebszelllinie.

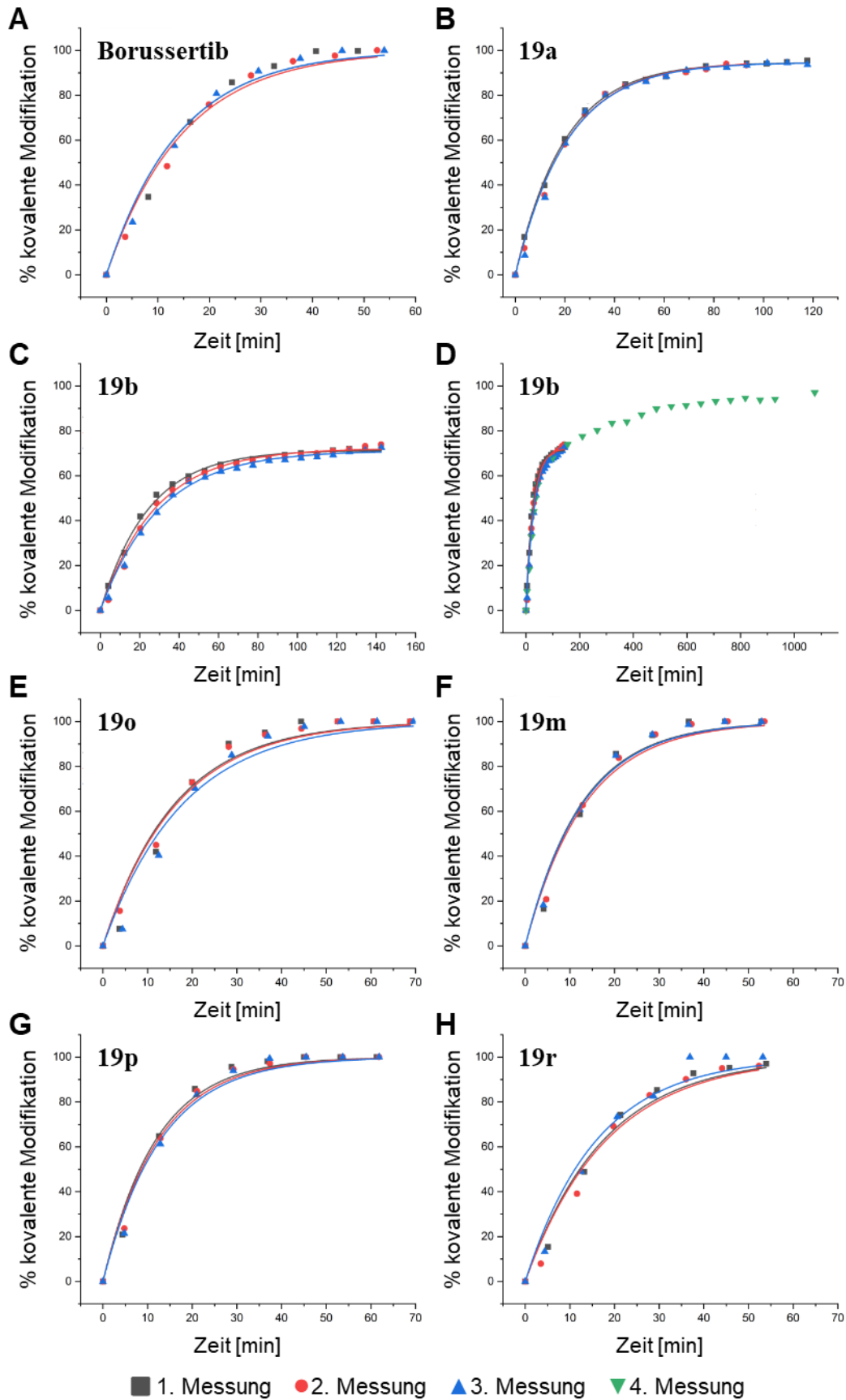
Für eine umfassende und vergleichende Analyse der zellulären Wirksamkeit der neuen CAAs wurde eine ausgewählte Serie neuer Akt-Inhibitoren und Referenzverbindungen, die vielversprechende Ergebnisse während der biochemischen und zellulären Evaluation zeigten, einer *in vitro* Western-Blot-Analyse unterzogen (Abb. 31).



**Abbildung 31** Umfassende und vergleichende PD-Analyse einer ausgewählten Serie an *next-generation* CAAs und Referenzverbindungen. Die Western-Blot-Analyse wurde mit der Brustkrebs-Zelllinie ZR-75-1 durchgeführt, die 2 Stunden lang mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt wurde. Die Analyse ergab eine konzentrationsabhängige Reduktion der Level von pAkt1<sup>S473</sup>, pAkt2<sup>S272</sup> sowie der nachgeschalteten Substrate pPRAS40<sup>T246</sup>, pS6<sup>S235/236</sup> und p4E-BP1<sup>S65</sup>. Diese Ergebnisse korrelieren mit den beobachteten biochemischen IC<sub>50</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werten der Inhibitoren.

Die Studie zeigt eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylierungslevel von pAkt1 und pAkt2 sowie der Akt-nachgeschalteten Substrate pPRAS40<sup>T246</sup>, pS6<sup>S235/236</sup> und p4E-BP1<sup>S65</sup> nach zweistündiger Behandlung und unterstreicht die Wirksamkeit der CAAs in einer komplexen zellulären Umgebung. Verglichen mit dem allosterischen Akt-Inhibitor Miransertib konnten die spezifischen Effekte bereits bei einer 10-fach geringeren Dosis des Inhibitors **19p** erzielt werden. Die zuvor selektierten CAAs wurden daraufhin in zeitabhängigen Akt1-Bindungsexperimenten untersucht, um einen ersten Einblick in ihre Bindungskinetik zu erhalten (Tabelle 5, Abb. 32). Die Daten deuten darauf hin, dass die Geschwindigkeit der kovalenten Bindungsbildung zur Wirksamkeit der Inhibitoren beiträgt, so dass für alle getesteten CAAs vergleichbare maximale Inaktivierungsraten gegenüber Akt1 erzielt wurden. Für **19b** wurde die langsamste Halbwertszeit beobachtet, und eine vollständige Proteinmodifikation konnte erst nach 18 Stunden beobachtet werden (Abb. 32 D). Die biochemische Charakterisierung von kovalent bindenden Liganden ist aufgrund ihres komplexen Bindungsmechanismus von besonderer Bedeutung. Dieser unterscheidet sich deutlich von reversiblen Inhibitoren, bei denen ein klassisches *on/off*-Gleichgewicht die Basis der Interaktion bildet und beinhaltet den zusätzlichen Schritt der irreversiblen, kovalenten Modifikation. Im Falle von **19b** kann ein hoher  $K_i = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  (Dissoziationskonstante) somit auch für die verlangsamte irreversible Modifikation verantwortlich sein. Da der Ligand durch intramolekulare Wechselwirkungen eine präorganisierte Konformation in Lösung einnimmt, kann auch die reversible Bindung durch eine unvorteilhafte Ausrichtung des östlichen Molekülteils dazu führen, dass die kovalente Bindung an die Seitenketten der Cysteine nicht erfolgen kann. Der Ligand müsste somit zunächst aus der Bindungstasche herausdiffundieren, um anschließend in einer für die kovalente Bindungsbildung geeigneteren Konformation erneut zu binden. Um eine fundierte Aussage über die Bindungsbildung treffen zu können sind zukünftig  $K_i$ -Werte zu ermitteln, mit denen sich schließlich zeitabhängige  $IC_{50}$ -Werte definieren lassen.<sup>251</sup>

Die weitere *in vitro*-Charakterisierung der neuen CAAs umfasste die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter (Tabelle 5). Die Reaktivität der neuen CAAs gegenüber Glutathion (GSH) wurde wie die Bestimmung des  $k_{\text{inact}}$  in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass die Halbwertszeit der einzelnen neuen CAAs zwischen 42 (**19s**) und 453 (**19f**) Minuten variiert. Da alle Inhibitoren den gleichen Acrylamid-*warhead* tragen, können die unterschiedlichen Reaktivitäten nur mit intra- oder intermolekularen Wechselwirkungen der einzelnen Liganden erklärt werden.



**Abbildung 32** Zeitabhängige Messungen der kovalenten Modifikation von Akt1 mittels Massenspektrometrie zur Bestimmung der Halbwertszeit  $t_{1/2}$  und  $k_{inact}$ . **A** Borussertib. **B** CAAI 19a. **C** CAAI 19b. **D** CAAI 19b (Messung über 18h). **E** CAAI 19o. **F** CAAI 19m. **G** CAAI 19p. **H** CAAI 19r.



**Tabelle 5** Bestimmung der Akt1-Modifikation ( $t_{1/2}$ ) und PK-Evaluierung der ersten Generation neuartiger CAAs.

#	Akt1- Modifikation $t_{1/2}$ [min]	GSH Stabilität $t_{1/2}$ [min]	SolRank pH 7,4 [ $\mu$ M]	Caco-2 pH 6,5/7,4 [Verhältnis BA/AB]	$Cl_{int}^a$ [mL/min/mg]
<b>Borussertib</b>	9,9 $\pm$ 0,2	185 $\pm$ 61	14	105	30
<b>Miransertib</b>	n.d.	3797 $\pm$ 395	346	1,3	180
<b>15</b>	n.d.	341 $\pm$ 86	38	536	46
<b>19a</b>	14	121 $\pm$ 9	4,4	9,8	4
<b>19b</b>	19 $\pm$ 2	391 $\pm$ 87	13	9,0	8
<b>19c</b>	n.d.	285 $\pm$ 112	12	51	4
<b>19d</b>	n.d.	230 $\pm$ 69	11	31	16
<b>19e</b>	n.d.	244 $\pm$ 119	6,5	12	10
<b>19f</b>	n.d.	453 $\pm$ 219	12	22	6
<b>19g</b>	n.d.	240 $\pm$ 11	45	29	49
<b>19h</b>	n.d.	184 $\pm$ 57	18	129	20
<b>19i</b>	n.d.	141 $\pm$ 0	11	100	17
<b>19j</b>	n.d.	253 $\pm$ 37	22	15	24
<b>19k</b>	n.d.	93 $\pm$ 26	20	125	20
<b>19l</b>	n.d.	132 $\pm$ 8	14	29	25
<b>19m</b>	8,9 $\pm$ 0,2	89 $\pm$ 8	15	4,5	14
<b>19n</b>	n.d.	118 $\pm$ 21	4,9	7,2	32
<b>19o</b>	12 $\pm$ 1	94 $\pm$ 33	11	0,7	6
<b>19p</b>	8,6 $\pm$ 0,3	123 $\pm$ 25	5,3	6,3	31
<b>19q</b>	n.d.	330 $\pm$ 122	7,3	68	39
<b>19r</b>	12 $\pm$ 1	88 $\pm$ 11	30	5,9	60
<b>19s</b>	n.d.	42 $\pm$ 9	n.d.	n.d.	n.d.
<b>19t</b>	n.d.	159 $\pm$ 21	n.d.	n.d.	n.d.
<b>19u</b>	n.d.	250 $\pm$ 120	54	7,3	57
<b>22</b>	n.d.	136 $\pm$ 1	173	1107	63
<b>23</b>	n.d.	3307 $\pm$ 223	345	n.d.	45

<sup>a</sup> murine Lebermikrosomen; n.d.: nicht bestimmt; Bestimmung Akt1-Modifikation durch Dr. J. Weisner, M. Sc. S. Brandherm; GSH-Assay: M. Sc. S. Brandherm; PK-Assays durchgeführt von: Lead Discover Center (LDC) Dortmund.

In Anbetracht der Tatsache, dass 18 der 23 CAAs in Gegenwart von GSH eine Halbwertszeit von über zwei Stunden aufweisen, liegen diese neuen Inhibitoren in einem akzeptablen Bereich für einen kovalenten Wirkstoff und in einem vergleichbaren Reaktivitätsbereich wie der bereits zugelassene kovalente Wirkstoff Osimertinib (GSH  $t_{1/2}$  = 121 min).<sup>252</sup> Als Negativkontrolle wurde neben Miransertib auch Inhibitor **23** untersucht, der als nicht-kovalentes Pendant zu **22** eine 24-fach längere Halbwertszeit aufweist (für **23** wurde keine Adduktbildung beobachtet).

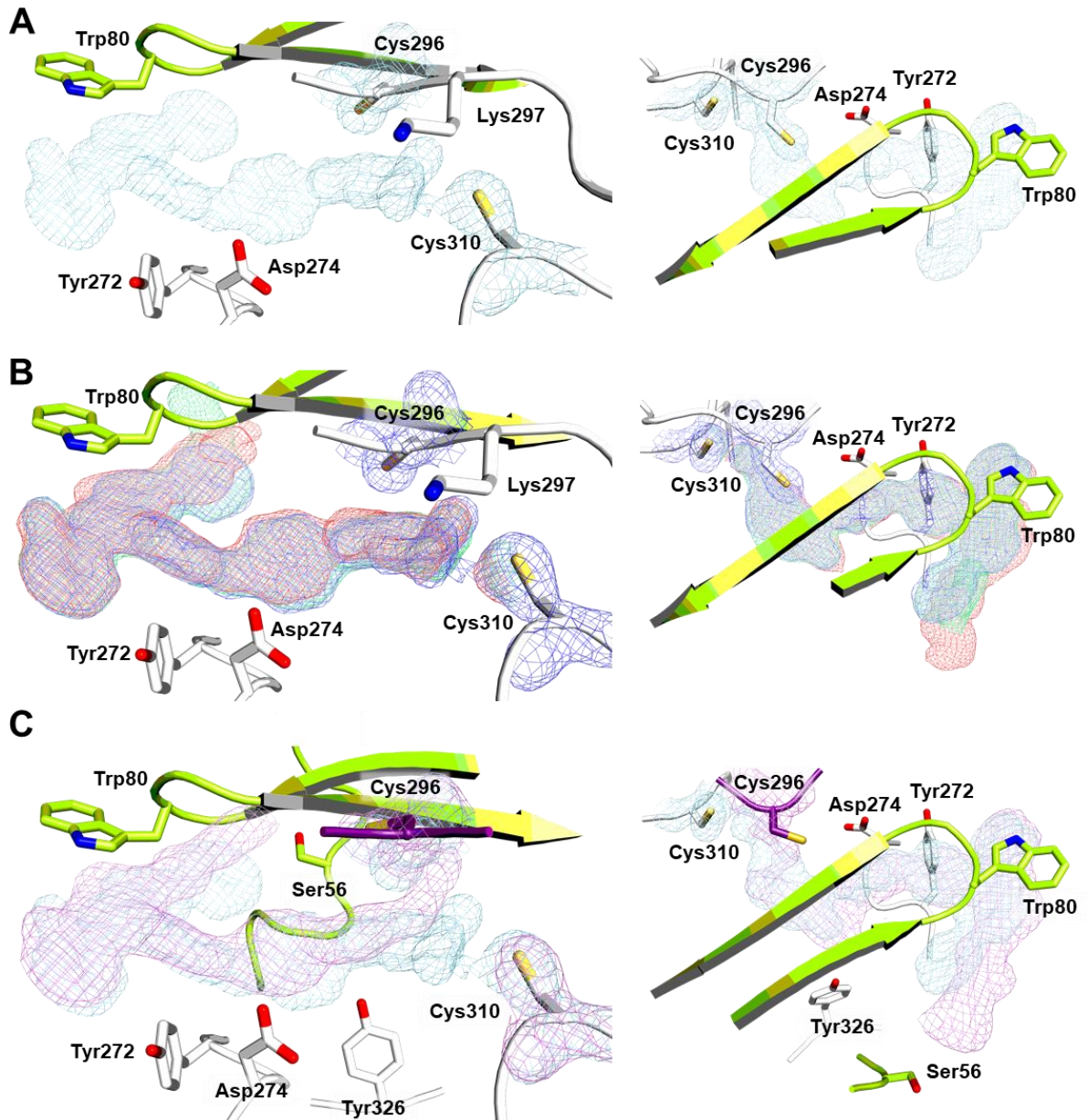
Die kinetische Löslichkeit wurde in HEPES-Puffer bei pH 7,4 bestimmt (Tabelle 5). Aufgrund des hohen Molekulargewichts und der Lipophilie wiesen die meisten CAAs eine schlechte Eigenschaft in diesem Bereich auf. Im Gegensatz dazu wiesen die Inhibitoren **22** und **23**, bei denen die lipophile Substitution an der R-Position fehlt, eine ausgezeichnete Löslichkeit auf. Auch polare Substitutionen an der R-Position, wie zum Beispiel der Benzylalkohol von **19u** oder das Pyrimidin von **19g**, förderten die Löslichkeit. Dennoch ist es notwendig, die Löslichkeit der neuen CAAs im Rahmen zukünftiger Forschungsarbeiten weiter zu optimieren.

Um die potentielle orale Bioverfügbarkeit der neuartigen CAAs zu bewerten, wurde ein Caco-2-Assay durchgeführt (Tabelle 5). Dieser Test diente dazu, die intestinale Permeabilität einer Verbindung vorherzusagen und den Wirkstoff-Efflux zu untersuchen, und basiert auf der Verwendung einer Monolage (engl. *Monolayer*) der Darmkrebszelllinie Caco-2, die eine ähnliche Permeabilität wie das menschliche Darmepithel aufweist.<sup>253</sup> Der CAAI-Prototyp Borussertib zeigte in dieser Studie einen 100-fachen aktiven Efflux. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Wirkstoff für eine orale Administration ungeeignet ist, was in Nachfolgenden *in vivo* PK-Studien bestätigt werden konnte.<sup>229</sup> Im Gegensatz dazu demonstrierte Miransertib, als klinisch optimierte Referenzverbindung, einen um den Faktor 100-geringeren Efflux. Für die Verbindungen **19a**, **19b**, **19m**, **19n**, **19p**, **19r** und **19u** wurden akzeptable Ergebnisse mit einem aktiven Efflux von < 10 erzielt. Der Inhibitor **19o** zeigte einen aktiven Efflux von < 1. Dies lässt vermuten, dass die *para*-Dimethylamino-Substitution möglicherweise nicht von aktiven zellulären Transportern erkannt wird.

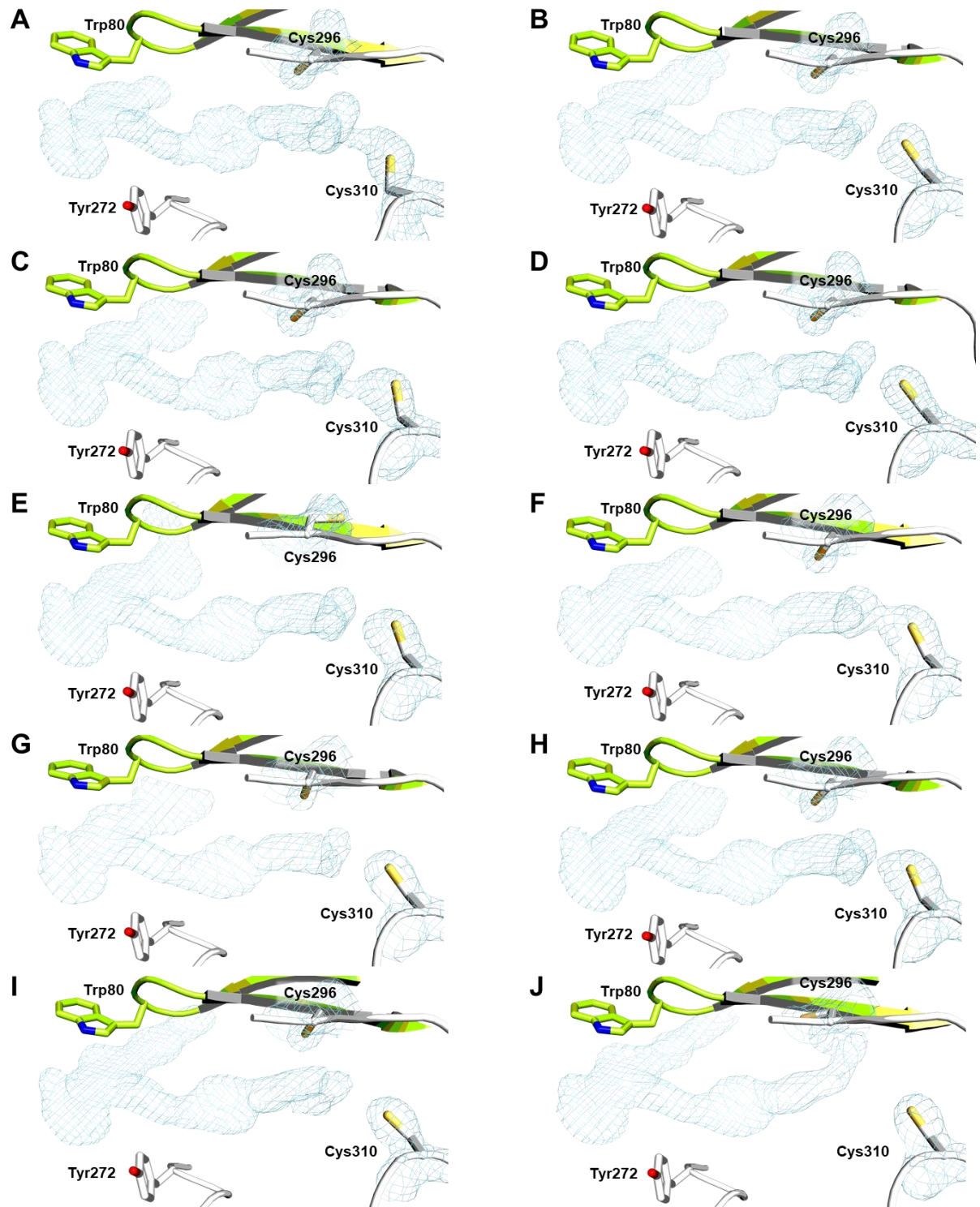
Abschließend wurde ein mikrosomaler Stabilitätsassay mit murinen Lebermikrosomen als Prädiktor für den Phase I Stoffwechsel durchgeführt (Tabelle 5). Für Borussertib konnte eine akzeptable mikrosomale Stabilität während der biotransformierenden Funktionalisierungsphase nachgewiesen werden, während Miransertib eine 6-fach höhere intrinsische *clearance* aufwies. Von den hier gezeigten CAAs wiesen 14, inklusive **19a**, **19b**, **19m**, **19o** und **19p** im Vergleich zu Borussertib entweder eine vergleichbare oder eine bis zu 7-fach höhere mikrosomale Stabilität auf, was diese Inhibitoren zu vielversprechenden Kandidaten für den zweiten medizinisch-chemischen Optimierungszyklus machte.

### 3.4 Strukturanalyse der 1. Generation neuartiger CAAs

Um ein besseres Verständnis des Bindungsmodus der neuartigen Liganden zu erlangen, wurden elf der insgesamt 23 neu entwickelten CAAs zusammen mit Akt1 (Konstrukt ohne HM zur Erleichterung der Kristallisation) co-kristallisiert (Abb. 33, Abb. 34).



**Abbildung 33** Co-Kristallstrukturen von Akt1 (Volllänge ohne HM) im Komplex mit neuartigen CAAs. Die Segmente der PH-Domäne sind in Grün dargestellt. Die Kinase-Domäne ist in Weiß dargestellt. Die  $2F_o - F_c$ -Dichten sind bei  $1\sigma$  konturiert **A** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **19a** (unveröffentlicht). Eine mögliche kovalente Bindung sowohl mit Cys296 als auch mit Cys310 ist durch die Elektronendichte angedeutet. Die bevorzugte Modifikation von Cys310 ist hier dargestellt. **B** Co-Kristallstruktur von **19a** (unveröffentlicht, Elektronendichte in Blau dargestellt), überlagert mit **19c** (unveröffentlicht, Elektronendichte in Rot dargestellt) und **19q** (unveröffentlicht, Elektronendichte in Grün dargestellt). **C** Co-Kristallstruktur von **19a** (unveröffentlicht, Elektronendichte in Hellblau dargestellt) überlagert mit **19m** (unveröffentlicht, Elektronendichte in Lila dargestellt) und Cys296 in lila dargestellt). (Strukturen gelöst von Dr. I. Landel, Dr. L. Depta, Dr. S. Kleinböling, Dr. M. P. Müller).



**Abbildung 34** Co-Kristallstrukturen von Akt1 (Volllänge ohne HM) im Komplex mit neuartigen CAAs. Die  $2F_o - F_c$ -Dichten sind bei  $\text{Sigma} = 1.0$  konturiert. **A** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **15** (unveröffentlicht). **B** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **19c** (unveröffentlicht). **C** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **19b** (unveröffentlicht). **D** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **19f** (unveröffentlicht). **E** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **19q** (unveröffentlicht). **F** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **19g** (unveröffentlicht). **G** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **19n** (unveröffentlicht). **H** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **19h** (unveröffentlicht). **I** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **19i** (unveröffentlicht). **J** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **19m** (unveröffentlicht). (Strukturen gelöst von Dr. I. Landel, Dr. L. Depta, Dr. S. Kleinböling, Dr. M. P. Müller).

In allen Strukturen konnte der erwartete kovalent-allosterische Bindungsmodus innerhalb der Interdomänentasche zwischen der PH- und Kinasedomäne nachgewiesen werden. Alle getesteten Inhibitoren alkylieren bevorzugt, mit Ausnahme von **19m** (Abb. 34J), Cys310 in der Aktivierungsschleife. Die Elektronendichte von Cys296 deutet jedoch ebenfalls auf eine kovalente Bindung hin. Da beide Cysteine in etwa die gleiche Distanz zum  $\beta$ -Kohlenstoff des Acrylamids aufweisen, ist davon auszugehen, dass auch die hier getesteten CAAs beide Thiole gleichermaßen alkylieren können. In früheren Studien der AG Rauh konnte durch Tandem-Massenspektrometrie gezeigt werden, dass ähnliche CAAs beide Cysteine adressieren können, was auf die unterschiedliche Orientierung des elektrophilen Acrylamids oder des Benzo[*d*]imidazol-Linkers zurückgeführt werden konnte.<sup>228,240</sup> Dieser alternative Bindungsmodus offenbart neuartige Interaktionen der Liganden innerhalb der allosterischen Bindungstasche. Der östliche Teil des Moleküls wird durch eine Wechselwirkung in einer energetisch günstigen Position stabilisiert: Der Amidsauerstoff des Michael-Akzeptors wechselwirkt über eine H-Brücke mit dem Amidrückgrat von Lys297 und fördert so die kovalente Bindung mit der Seitenkette von Cys310. Diese Vororientierung wird durch ein konserviertes Wassermolekül begünstigt, das ein Netzwerk von H-Brücken zwischen dem Urea-Sauerstoff und den Seitenketten von Asn54, Gln79 und Tyr326 vermittelt. Der tertiäre Stickstoff des Piperidin bildet eine Salzbrücke mit Asp274, die auch bereits beim Prototypen Borussertib beobachtet werden konnte (PDB: 6HHF). Das Kerngerüst des westlichen Molekülteils wird durch die entscheidenden  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit Trp80 und Tyr272 stabilisiert, die essentiell für den allosterischen Wirkmechanismus der Inhibitoren sind.<sup>254</sup> Im direkten Vergleich der Substitutionsmuster der R-Position wird deutlich, dass *para*-Substitutionen (**19c**) trotz einer geringeren Ligandeneffizienz (**19c** vs. **19a**) gut toleriert werden. Im Gegensatz dazu scheint das gleiche Substitutionsmuster in der *meta*-Position (**19q**) eine energetisch günstigere Position innerhalb der allosterischen Bindungstasche durch eine zusätzliche Wechselwirkung mit dem Rückgrat von Trp80 einzunehmen (Abb. 33B). Für die Acetamid-Substitution von **19c** können keine neuen Wechselwirkungen mit dem Protein beobachtet werden. Die funktionelle Gruppe scheint viel mehr zu einem sterischen Konflikt mit der PH-Domäne zu führen, wodurch sich der westliche Molekülteil in Richtung des lösungsmittel-exponierten Bereichs verschiebt. Bedingt durch diese Verlagerung kommt es zu einem Aktivitätsverlust im Vergleich zu **19a**. Im Gegensatz dazu führt die energetisch begünstigte Positionierung von **19q** zusammen mit der zusätzlichen H-Brücke zum Rückgrat von Trp80 zu einer Steigerung der Aktivität um den Faktor 3 für Akt1.

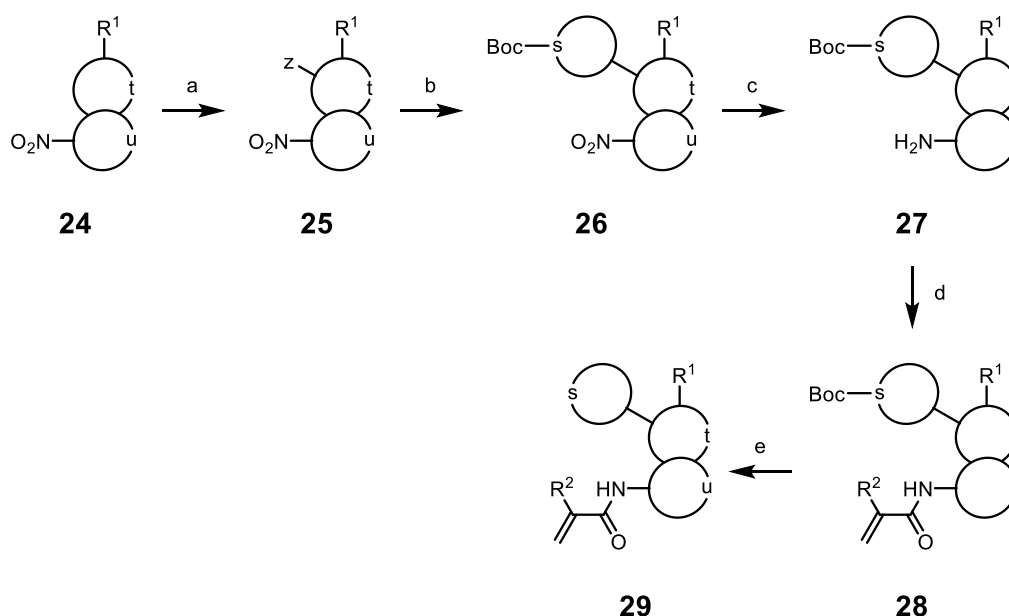
Sterisch anspruchsvolle bizyclische Substituenten in der R-Position (**19i**, **19m**) führen ebenfalls zu einem sterischen Konflikt mit der PH-Domäne, wodurch sich der gesamte westliche Molekülteil in Richtung des lösungsmittlexponierten Bereichs verschiebt (Abb. 33C). Dieser Effekt überträgt sich auf die östliche Molekülregion und begünstigt die Alkylierung von Cys296. Durch diese Verschiebung wird die H-Brücken-Interaktion zwischen dem Morpholin-Substituenten und Ser56 der PH-Domäne begünstigt. Dennoch konnte dadurch keine weitere Aktivitätssteigerung erzielt werden.

Mit der erfolgreichen Strukturanalyse wurde der Grundstein für einen neuen Zyklus des SBDD gelegt. Auf Basis der neuen Kristallstrukturen wurden weitere Derivate konzipiert und synthetisiert. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Erforschung des *meta*-Substitutionsmusters in der R-Position, da dieses im Vergleich zu den *para*-Substituenten die besten Ergebnisse lieferte. Frühere Studien zur östlichen Molekülregion von Borussertib haben gezeigt, dass die Benzo[*d*]imidazol-Kernstruktur eine höhere chemische Variabilität ohne signifikanten Verlust an biochemischer Wirksamkeit ermöglicht. Der Linker zwischen dem Acrylamid-*warhead* und der westlichen Moleküleinheit bot dementsprechend eine geeignete Grundlage für weitere Optimierungen.

### 3.5 Synthese der 2. Generation neuartiger CAAs

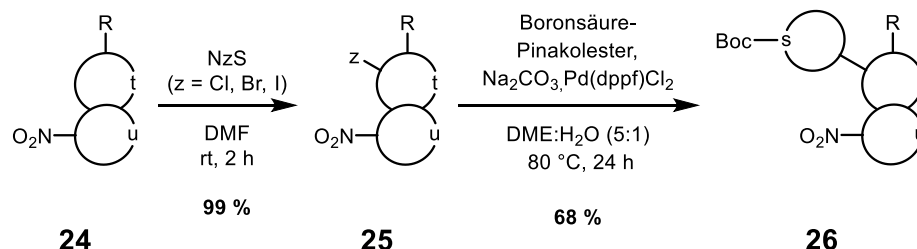
Mit der ersten Generation der neuen CAAs konnte das angestrebte Konzept der kovalent-allosterischen Akt-Inhibition validiert werden. In der nachfolgenden zweiten Generation neuartiger CAAs sollte durch ein ausgewähltes Set an Substitutionsmustern am westlichen Molekülteil, eine möglichst hohe Effizienz erzielt werden. Dabei sollten auch die PK-Eigenschaften durch Variation des Linkers und des *warhead* optimiert werden. In diesem Sinne wurden neue östliche Molekülbausteine konzipiert, die dann mit den bereits dargestellten westlichen Molekülbausteinen durch nukleophile Substitutionsreaktionen gekoppelt werden sollten.

Die Synthese der östlichen Molekülbausteine **29** beginnt mit einer regioselektiven Halogenierung der kommerziell verfügbaren Nitroverbindung **24** (Abb. 35). Die Pd-katalysierte Suzuki-Kreuzkupplung führt zum Boc-geschützten Intermediat **26**, welches in einer anschließenden katalytischen Hydrierungsreaktion in das Amin **27** überführt wird. Durch klassische Amidsynthesen wird ein Acrylamid-*warhead* an **28** installiert, sodass durch eine finale Decarboxylierungsreaktion die östlichen Molekülbausteine **29** erhalten werden.



**Abbildung 35** Allgemeine Darstellung der Synthese des östlichen Molekülbausteins **29**. a) Halogenierung b) Pd-katalysierte Kreuzkupplung c) Reduktion d) Amidsynthese e) Entschützung. (s, t, u im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalzyklus; z: Halogen;  $R^1$ : Organylgruppe  $R^2$ : H oder F).

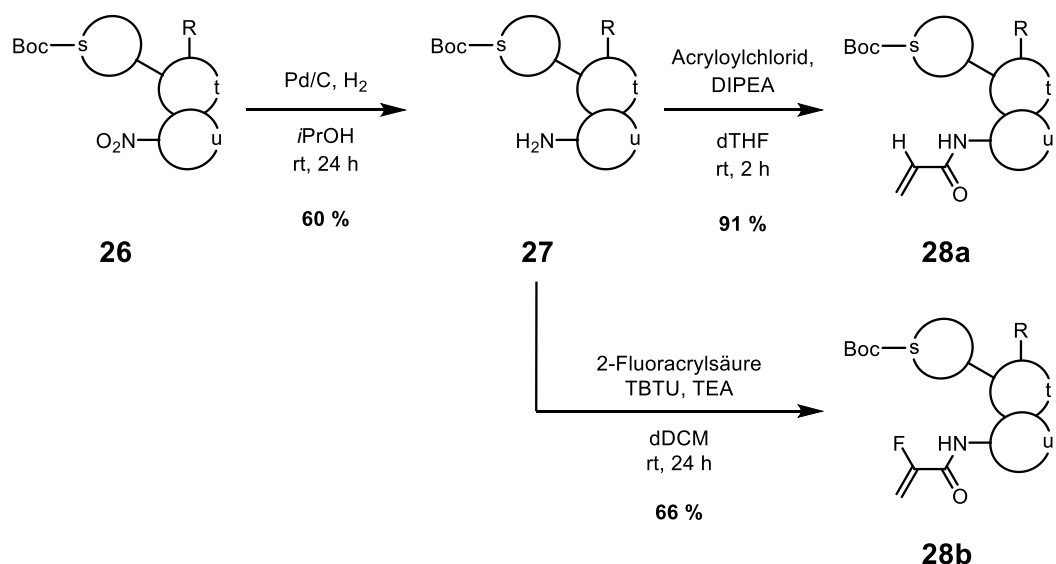
Die retrosynthetische Aufarbeitung von **29** führte zu der kommerziell verfügbaren, bicyklischen Nitroverbindung **24**, welche sich durch die beiden Ringsysteme “t“ und “u“ beschreiben lässt. Da der “t“-Zyklus ladungsreicher als der nitro-substituierte “u“-Zyklus ist, erfolgt die elektrophile aromatische Substitution regiospezifisch am “t“-Zyklus unter Verwendung eines Imids der Bernsteinsäure (Abb. 36).



**Abbildung 36** Syntheschema zur Darstellung des Intermediates **26** durch selektive Halogenierung von **24** und Pd-katalysierte Suzuki-Kreuzkupplung zwischen **25** und einem handelsüblichen Boronsäure-Pinakolester. (s, t, u im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalzyklus; z: Halogen, R: Organylgruppe)

Das halogenierte Intermediat **25** wurde in quantitativer Ausbeute erhalten und konnte somit im einstelligen Gramm-Maßstab für die nachfolgende Suzuki-Kreuzkupplungsreaktion mit einem handelsüblichen Boronsäure-Pinakolester bereitgestellt werden. Um den Linker des östlichen Molekülteils zu vervollständigen, wurde der “s“-Zyklus eingeführt, der später als Nukleophil in der Kopplung zwischen dem östlichen und westlichen Molekülbaustein dienen sollte. Die zuvor etablierten, Mikrowellen-gestützten Bedingungen für die Synthese der Substanzbibliothek der ersten Generation neuartiger CAAs (siehe Abb. 29) führten zu geringen Ausbeuten durch die Zersetzung der Edukte, sodass die Bedingungen für einen milderen Reaktionsverlauf angepasst wurden (Abb. 36). Mit den erarbeiteten Bedingungen konnte das trizyklische Grundgerüst mit einer Ausbeute von 68 % dargestellt werden. Zur Installation des reaktiven *warhead* sollte **26** in das Arylamin **27** überführt werden (Abb. 37). Die klassische Reduktion von Nitroarylen zu den korrespondierenden Aminen mithilfe von elementarem Eisen und Ammoniumchlorid führte im Fall von **26** zur Bildung von nicht identifizierbaren Nebenprodukten.<sup>255</sup> Die Verwendung von Katalysatoren wie Raney-Nickel, Platin(IV)-oxid oder Palladium auf Aktivkohle in einem Strömungsreaktor für die Hydrierung im kontinuierlichen Fluss (H-Cube *Flowreactor*) führte zwar zur Produktbildung, jedoch in nicht isolierbaren Mengen. Erst durch die Verwendung eines Überschusses an Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) unter Wasserstoff-Atmosphäre gelang die katalytische Hydrierung schließlich in akzeptablen Ausbeuten. Die Einführung der reaktiven Gruppen in Form von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylverbindungen erfolgte durch klassische Amidsynthesen (Abb. 37).

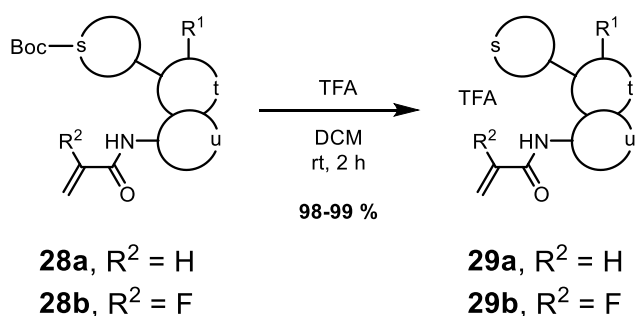




**Abbildung 37** Syntheschema zur Darstellung der Boc-geschützten Intermediate **28a** und **28b**. Die katalytische Hydrierung von **26** führte zum Arylamin **27**, das durch klassische Amidkopplungsreaktionen in die Intermediate **28a** und **28b** überführt werden konnte. (s, t, u im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalzyklus; z: Halogen; R: Organylgruppe)

Acrylamid **28a** konnte durch kommerziell verfügbares Acryloylchlorid in sehr guter Ausbeute innerhalb von zwei Stunden dargestellt werden, während die Synthese des 2-Fluoracrylamids **28b** die Verwendung von Kopplungsreagenzien erforderte und erst nach 24 h abgeschlossen war.

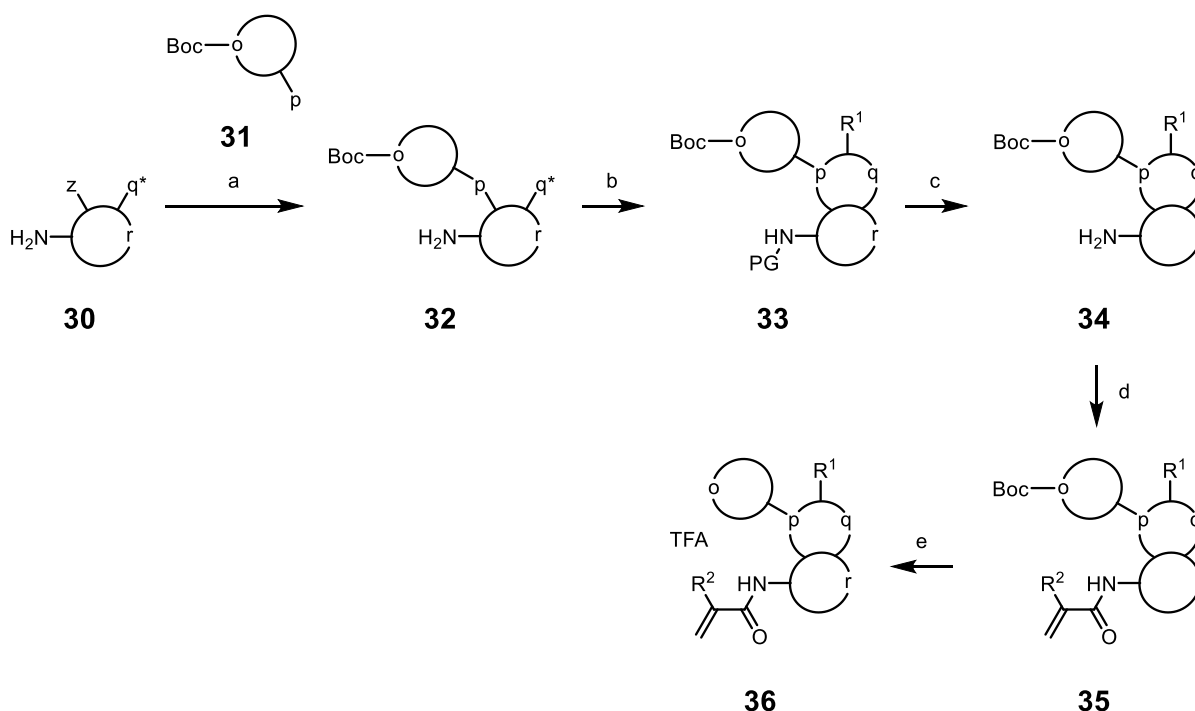
Die abschließende TFA-saure Decarboxylierung von **28a** und **28b** führte schließlich zu den östlichen Molekülbausteinen **29a** und **29b** in quantitativen Ausbeuten (Abb. 38).



**Abbildung 38** Syntheschema zur Darstellung der östlichen Molekülbausteine **29a** und **29b**. (s, t, u im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalzyklus; z: Halogen; R<sup>1</sup>: Organylgruppe)

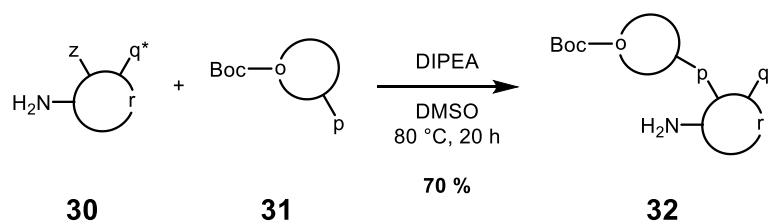
Verbindung **29a** konnte als kristallines Salz in einer Gesamtausbeute von 36 % über fünf Schritte dargestellt werden, während die Syntheseeffizienz des amorphen Feststoffes **29b** lediglich bei 26 % lag. Beide Verbindungen konnten im einstelligen Gramm-Maßstab synthetisiert und für 18 Monate bei Raumtemperatur gelagert werden, ohne dass ein Zerfall der Produkte durch Massenspektrometrie beobachtet werden konnte.

In einem weiteren Ansatz wurden die östlichen Molekülbausteine **36** konzipiert (Abb. 39). Die Synthese beginnt mit einer chemoselektiven nukleophilen aromatischen Substitution zwischen den kommerziell verfügbaren Verbindungen **30** und **31** und führt zu dem bipyklischen Amin **32**. Die sequentielle Mehrkomponentenreaktion von **32** führt zu dem trizyklischen Kerngerüst **33**, welches in einer anschließenden Entschützungsreaktion in das freie Amin **34** transformiert wird. Klassische Amidsynthesen führen zu den Acrylamid-dekorierten Derivaten **35**. Diese können durch eine abschließende Decarboxylierungsreaktion in die östlichen Molekülbausteine **36** umgewandelt werden.



**Abbildung 39** Allgemeine Darstellung der Synthese des östlichen Molekülbausteins **36**. a)  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  b) Schutzgruppenchemie und Zyklisierung c) Reduktion d) Amidsynthese e) Entschützung. (o, p, q, r im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalicyklus; z: Halogen;  $\text{q}^*$ : Transformierte FG; PG: Schutzgruppe;  $\text{R}^1$ : Organylgruppe  $\text{R}^2$ : H oder F).

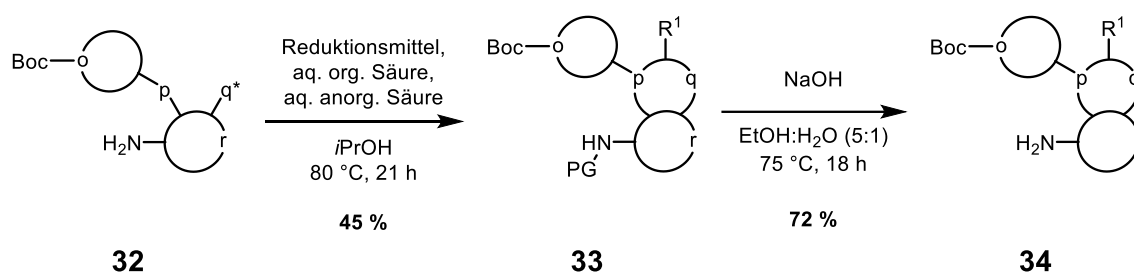
Die retrosynthetische Aufarbeitung von **36** führte zu den kommerziell verfügbaren Verbindungen **30** und **31**, die in einer  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ -Reaktion zum bipyklischen Amin **32** umgesetzt wurden (Abb. 40).



**Abbildung 40** Syntheschema zur Darstellung des Bicyklus **32** durch  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ . (o, r im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalicyklus; z: Halogen;  $\text{q}^*$ : Transformierte FG; p: Nukleophil).

Da **30** neben der Abgangsgruppe “z“ auch eine primäre Aminfunktion besitzt, die nukleophile Eigenschaften aufweist, war bei dieser Reaktion mit der Bildung von Nebenprodukten in Form von Polymeren zu rechnen. Die initial getesteten Reaktionsbedingungen mit äquimolaren Mengen an **30** und **31** und einer starken Verdünnung zeigte jedoch, dass Reaktant **31** eine höhere Nukleophilie als **30** aufwies und die Polymerisierung nicht nachgewiesen werden konnte.

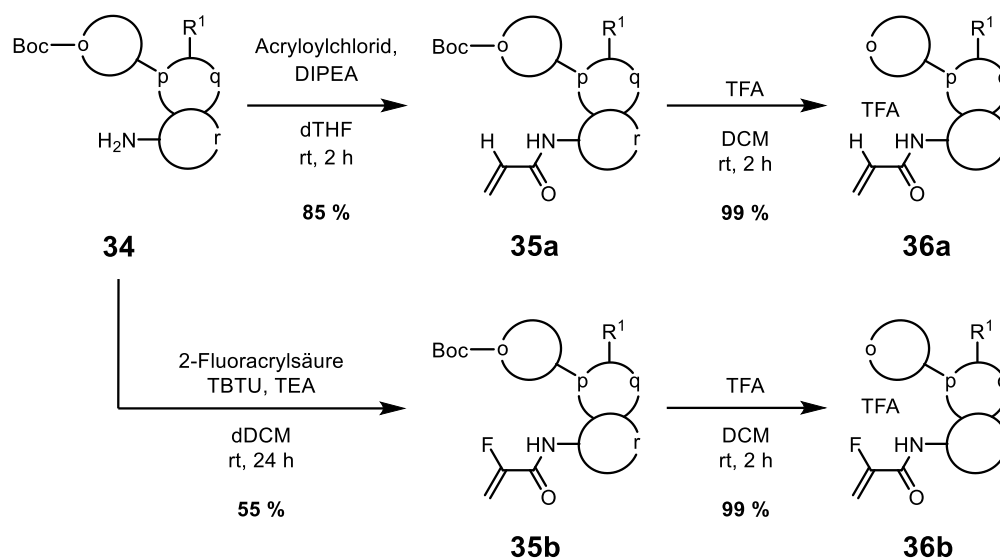
Der Trizyklus **33** konnte in einer Eintopfreaktion von **32** durch die Verwendung von Reduktionsmitteln, organischen und anorganischen Säuren dargestellt werden (Abb. 41).



**Abbildung 41** Syntheschema zur Darstellung des Kerngerüsts **34** durch Eintopfreaktion von **32** und Entschützung von **33**. (o, p, q, r im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalicyclus; q\*: Transformierte FG; PG: Schutzgruppe; R<sup>1</sup>: Organylgruppe).

Die komplexe Mehrkomponentenreaktion stellte eine große Herausforderung bei der Synthese der neuen östlichen Molekülteile dar. Zum einen musste durch die sequentielle Zugabe der Reaktanden sichergestellt werden, dass das primäre Amin von **32** durch Schutzgruppenchemie maskiert wird, um den Reaktionsverlauf nicht zu stören. Zum anderen musste während der Reaktion ein konstanter Druck aufrechterhalten werden, um die Zyklisierung des “p-q-Zyklus“ zu gewährleisten. Die Reaktionsoptimierung beinhaltete unter anderem die Verwendung von druckstabilen Bombenrohren, die es ermöglichten **33** in akzeptablen Ausbeuten zu isolieren. Die zuvor installierte Schutzgruppe “PG“ wurde abschließend unter stark basischen Bedingungen abgespalten, um das freie Amin **34** für die nachfolgende Funktionalisierung mit den zuvor beschriebenen Acrylamiden bereit zu stellen.

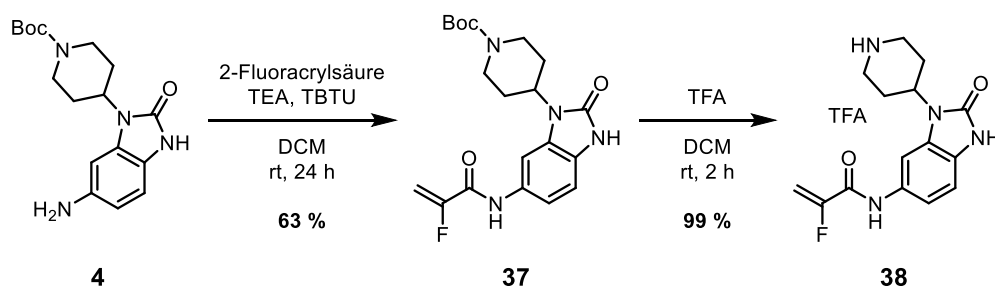
Wie bereits für Acrylamid **28a** beschrieben konnte auch **35a** durch die Amidsynthese mit Acryloylchlorid innerhalb von zwei Stunden in sehr guter Ausbeute dargestellt werden. Die Synthese des 2-Fluoracrylamids **35b** resultierte wie zuvor für **28b** gezeigt, in geringerer Ausbeute. Der finale Schritt des kommerziellen Herstellungsprozesses des kovalenten Ras-inhibitors Adagrasib beinhaltet ebenfalls die Synthese eines 2-Fluoroacrylamids.<sup>256</sup> Die initial geringen Ausbeuten bei der Reaktion konnten durch die Verwendung des Natriumsalzes der 2-Fluoracrylsäure erheblich gesteigert werden, da nicht nur die Acylierungsreaktivität erhöht wurde, sondern auch die Stabilität des Ausgangsmaterials.



**Abbildung 42** Syntheschema zur Darstellung der östlichen Molekülbausteine **36a** und **36b**. Die Amidsynthese von **34** führt zu den Acrylamiden **35a** und **35b**, die durch TFA-saure Decarboxylierungsreaktionen in die östlichen Molekülbausteine **36a** und **36b** überführt werden. (o, p, q, r im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalzyklus; R<sup>1</sup>: Organylgruppe).

Für zukünftige Synthesen sollte daher die Verwendung des Natriumsalzes der 2-Fluoracrylsäure und Kopplungsreagenzien wie Propanphosphonsäureanhydrid (T3P) berücksichtigt werden, um die Effizienz in diesem Syntheseschritt zu steigern.

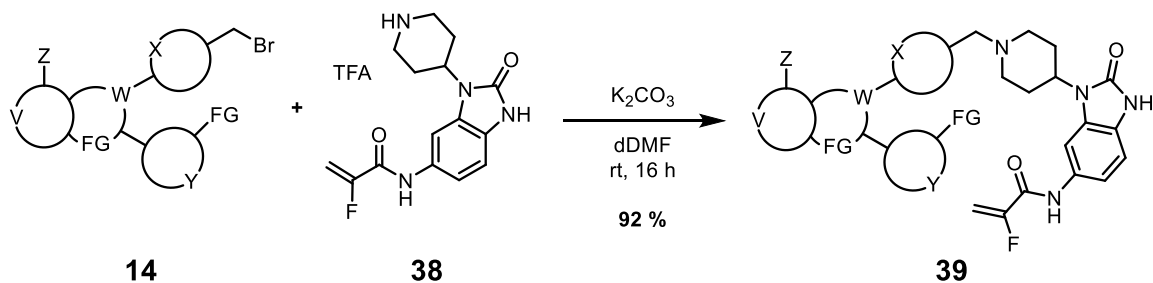
Um das Set der östlichen Molekülbausteine zu vervollständigen, wurde auch das Benzo[*d*]imidazol-2-on Grundgerüst der ersten Serie neuartiger CAAs mit dem fluorierten Elektrophil funktionalisiert (Abb. 43).



**Abbildung 43** Syntheschema zur Darstellung des östlichen Molekülbausteins **38**. Die Amidsynthese von **4** führt zum Acrylamid **37**, das durch eine TFA-saure Decarboxylierungsreaktion in den östlichen Molekülbaustein **38** überführt wird.

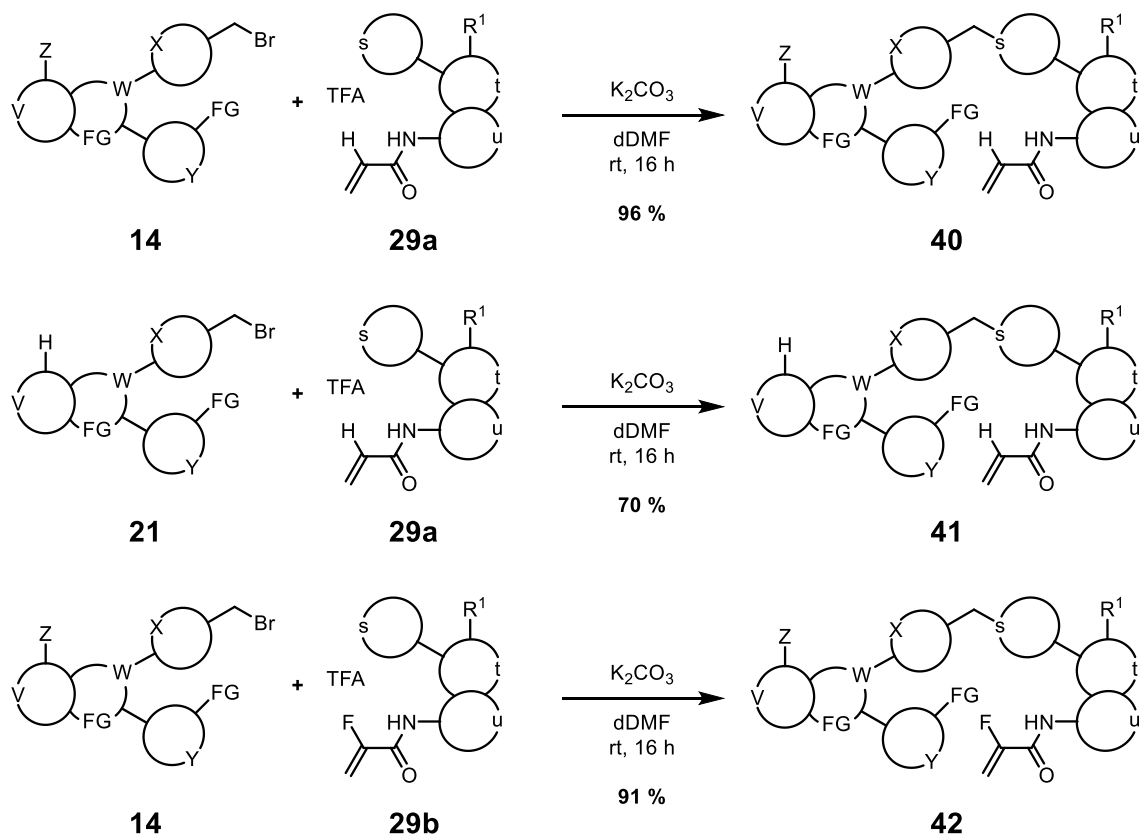
Die Effizienz der fünfstufigen Synthese von **36a**, **36b** und **38** beziffert sich auf 19 %, 12 % und 39 %. Durch iterative Syntheseyklen konnten alle drei Verbindungen in ausreichenden Quantitäten für die nachfolgenden Kopplungsreaktionen mit den westlichen Molekülbausteinen dargestellt werden.

Die Kopplung der östlichen und westlichen Molekülbausteine erfolgte wie bereits zuvor beschrieben (Abb. 27), durch konventionelle nukleophile Substitutionen des S<sub>N</sub>2-Typs (Abb. 44-46).



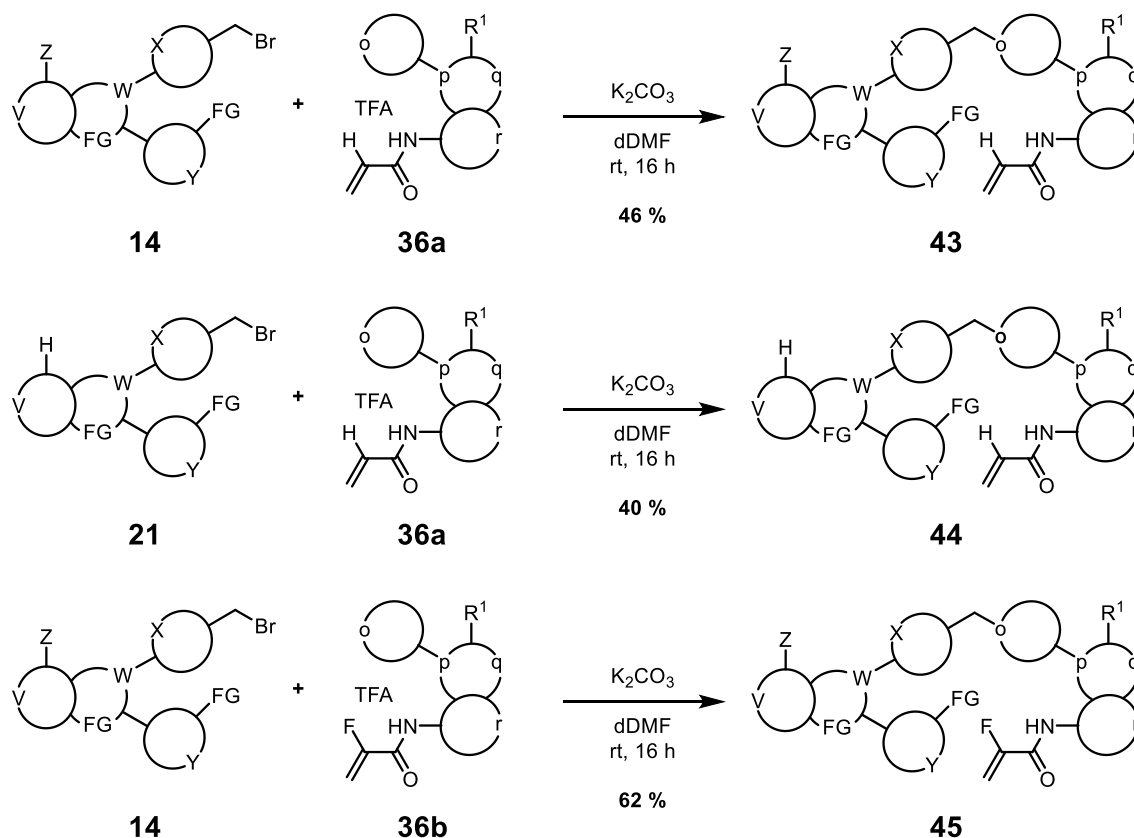
**Abbildung 44** Syntheschema zur Darstellung des CAAI **39** durch nukleophile Substitution zwischen dem westlichen (**14**) und dem östlichen Molekülbaustein **38**. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

Der halogenierte Präkursor **39** stellt das Pendant zu Verbindung **15** dar und unterscheidet sich lediglich durch den fluorierten *warhead* des östlichen Molekülteils. Die Kopplungseffizienz von 92 % ermöglichte die nachfolgende Derivatisierung von **39** durch Suzuki-Kreuzkopplungsreaktionen zur weiteren Erforschung der SAR.



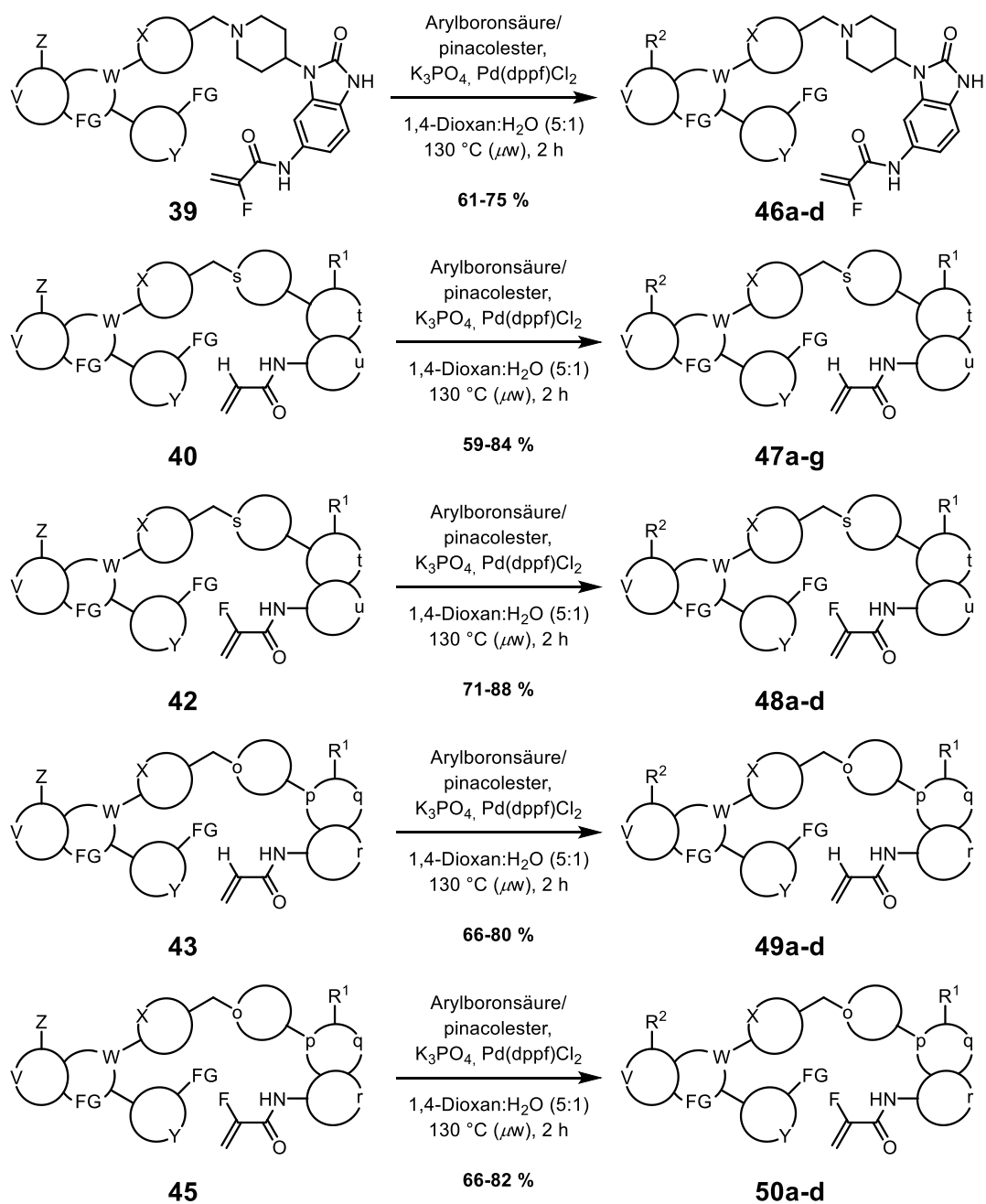
**Abbildung 45** Syntheschema zur Darstellung der CAIs **40-42** durch nukleophile Substitution zwischen den westlichen (**14** und **21**) und den östlichen Molekülbausteinen **29a** und **29b**. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen; s, t, u im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalzyklus; R<sup>1</sup>: Organylgruppe).

Die Verbindungen **40-42** sind die ersten Vertreter der nächsten Generation von CAAIs, die sich durch einen neuartigen östlichen Molekülteil auszeichnen. Zusätzlich dienen die Verbindungen **40** und **42** durch die Halogenierung im westlichen Molekülteil als Vorstufe für die Derivatisierung in einem finalen Syntheseschritt durch Kreuzkupplungsreaktionen zur Erweiterung der CAAI-Substanzbibliothek.

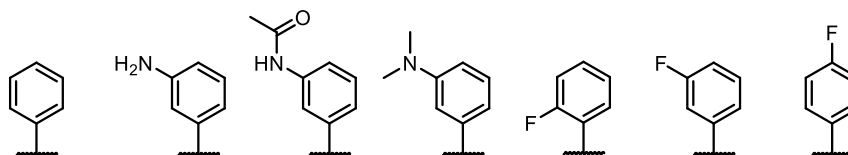


**Abbildung 46** Syntheseschema zur Darstellung der CAAIs **43-45** durch nukleophile Substitution zwischen dem westlichen (**14** und **21**) und den östlichen Molekülbausteinen **36a** und **36b**. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen; o, p, q, r im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalzyklus; R<sup>1</sup>: Organylgruppe).

Mit der abschließenden Synthese der CAAIs **43-45** wurden zwei weitere Verbindungen (**43**, **45**) dargestellt, die in der nachfolgenden Bibliothekssynthese als Präkursor dienen. Die Ausbeuten der  $S_N2$ -Reaktion fielen für alle drei Derivate signifikant geringer aus als für die Derivate **40-42**. Es ist davon auszugehen, dass die nukleophile Substitution mit **36a** und **36b** im Vergleich zu **29a** und **29b** unter den gegebenen Bedingungen deutlich langsamer abläuft, da die Reaktionsbedingungen für die Kupplungen nicht individualisiert wurden. Zukünftig sollte bei der Umsetzung von **36a** und **36b** die Reaktionszeit erhöht werden, um die Ausbeuten in dieser Reaktion zu maximieren. Mit den zuvor validierten Bedingungen zur mikrowellen-gestützten Suzuki-Kreuzkupplung (Abb. 29) erfolgte die Synthese der zweiten Generation von CAAIs **46a-d**, **47a-g**, **48a-d**, **49a-d**, **50a-d** (Abb. 47).



R<sup>2</sup> =



<b>46a</b> 69 %	<b>46b</b> 61 %	<b>46c</b> 77 %	<b>46d</b> 75 %			
<b>47a</b> 84 %	<b>47b</b> 73 %	<b>47c</b> 60 %	<b>47d</b> 73 %	<b>47e</b> 59 %	<b>47f</b> 67 %	<b>47g</b> 61 %
<b>48a</b> 88 %	<b>48b</b> 73 %	<b>48c</b> 71 %	<b>48d</b> 76 %			
<b>49a</b> 75 %	<b>49b</b> 80 %	<b>49c</b> 66 %	<b>49d</b> 79 %			
<b>50a</b> 82 %	<b>50b</b> 66 %	<b>50c</b> 74 %	<b>50d</b> 80 %			

**Abbildung 47** Syntheschema zur Darstellung der zweiten Generation von CAAs **46a-d**, **47a-g**, **48a-d**, **49a-d**, **50a-d** durch Suzuki-Kreuzkupplungsreaktionen mit den entsprechenden Boronsäuren/Pinakolestern. Die Ausbeuten der einzelnen Reaktionen sind als prozentuale Angaben unter den Derivaten annotiert. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen; o, p, q, r, s, t, u im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalzyklus; R<sup>1</sup>: Organylgruppe).

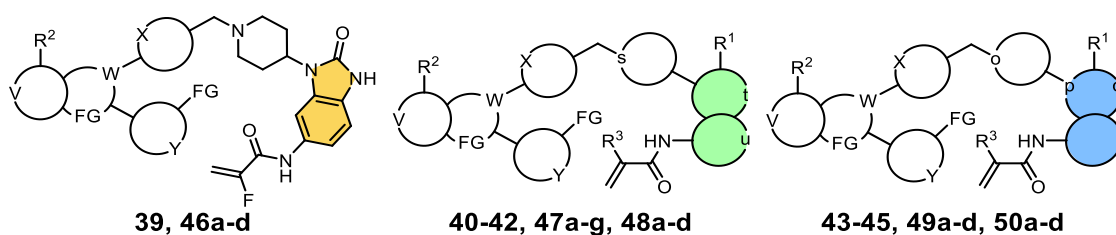
Die 23 neu dargestellten Derivate konnten mit Ausbeuten von 59-84% isoliert werden. Im zweiten Syntheszyklus wurden insgesamt 30 neuartige CAAs konzipiert und synthetisiert. Diese neuen Verbindungen bilden eine weitere fokussierte Substanzbibliothek, die sich durch *meta*-substituierte Phenylreste oder Bioisostere der Phenylsubstitution auszeichnet und Variationen im östlichen Molekülteil inklusive des reaktiven *warhead* aufweist. Das Ziel dieser Serie neuartiger CAAs war die eingehende Analyse der SAR innerhalb der Akt-Interdomänen-Bindungstasche und die Verbesserung der PK-Eigenschaften, die in der nachfolgenden *in vitro* Charakterisierung untersucht wurden.



### 3.6 *in vitro* Charakterisierung der 2. Generation neuartiger CAAIs

Um ein umfassendes Verständnis der Wirksamkeits- und Selektivitätsprofile der verbesserten CAAIs zu erlangen, wurde die inhibitorische Potenz ( $IC_{50}$ -Werte) für die drei Akt-Isoformen mittels HTRF-Assay analysiert. Zudem wurde die Wirksamkeit hinsichtlich der anti-proliferativen Aktivitäten in einem relevanten zellulären Brustkrebsmodell (ZR-75-1, PTEN<sup>L108R</sup>) evaluiert (Tabelle 6). Um eine vergleichende Analyse zu ermöglichen, wurden die verbesserten CAAIs neben dem Prototyp-CAAI Borussertib, einem selektiven Akt1-Inhibitor, sowie den klinischen Kandidaten Miransertib und Capiwasertib positioniert. Miransertib weist eine höhere Selektivität für Akt1 und Akt2 im Vergleich zu Akt3 auf, während Capiwasertib als pan-Akt-Inhibitor beschrieben werden kann. Obwohl die biochemischen Aktivitäten vergleichbar sind, zeigt sich auf zellulärer Ebene besonders deutlich, dass die allosterische Hemmung durch die Stabilisierung der inaktiven Form von Akt zu einer verstärkten Induktion des Zelltods führt.<sup>216</sup> Die kovalente Modifikation reaktiver Cysteine in der allosterischen Interdomänen-Tasche scheint diesen Effekt signifikant zu verstärken.<sup>203,228</sup> Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass orthosterische Akt-Inhibitoren wie Capiwasertib die aktive Konformation von Akt stabilisieren, die als Plattform für eine Kinase-unabhängige Überlebenssignalgebung dienen könnte, wohingegen die durch einen allosterischen Inhibitor induzierte Konformation solche Effekte verhindert.<sup>216,257</sup> Interessanterweise zeigen die neuen CAAIs ohne Substitution in der R<sup>2</sup>-Position (**41**, **42**) im Vergleich zu **22** (Tabelle 4) eine höhere Selektivität für Akt1 im Vergleich zu Akt2 und Akt3. Diese Beobachtung trifft auch auf die chlorierten Derivate **40** und **43** verglichen mit **15** zu (Tabelle 4). **40** und **43** weisen eine ausgeprägte Selektivität für Akt1 auf, die sich in einer über 250-fach höheren Selektivität im Vergleich zu Akt2 und einer über 1000-fach höheren Selektivität im Vergleich zu Akt3 äußert. Aromatische Substitutionen in der R<sup>2</sup>-Position (**47a**, **49a**) führen zu einer erhöhten Aktivität der Verbindungen gegen alle drei Akt-Isoformen im Vergleich zu **19a** (Tabelle 4). Jedoch nimmt, anders als bei den Vorstufen (**40**, **43**), die Selektivität für Akt1 im Vergleich zu Akt2 und Akt3 signifikant ab, was in Akt1/2-selektiven Verbindungen resultiert. Zusätzliche *meta*-orientierte Substitutionsmuster in der R<sup>2</sup>-Position (**47b**, **47c**, **49b**, **49c**) ermöglichen eine subnanomolare Inhibition gegen Akt1, wobei die Selektivität für Akt1 und Akt2 gegenüber Akt3 aufrechterhalten wird. Die Maskierung des anilinischen Stickstoffs bei **47d** und **49d** führt im Vergleich zu den anilinischen Derivaten **47b** und **49b** zu einem bis zu 5-fachen Verlust der Wirksamkeit gegenüber der drei Akt-Isoformen. Im Vergleich zu Derivat **19r** (Tabelle 4) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Isoformselektivität festgestellt werden.

**Tabelle 6** Biochemische und zelluläre Charakterisierung der zweiten Generation neuartiger CAAs

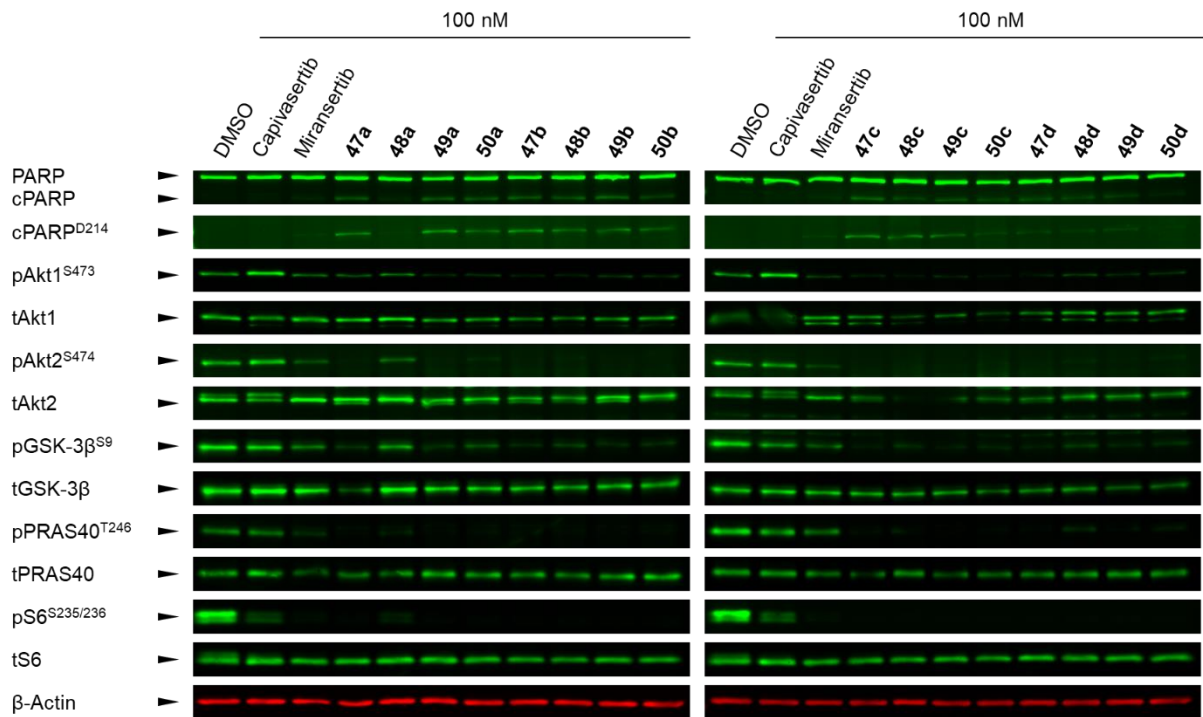


#	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Akt1	Akt2	Akt3	ZR-75-1
			IC <sub>50</sub> [nM]	IC <sub>50</sub> [nM]	IC <sub>50</sub> [nM]	EC <sub>50</sub> [nM]
Borussertib			0,8 ± 0,3	59 ± 16	650 ± 170	5 ± 1
Miransertib			1,4 ± 0,2	9,0 ± 1,0	505 ± 120	33 ± 6
Capivasertib			1,0 ± 0,1	5,0 ± 0,4	8,0 ± 1,0	191 ± 68
<b>39</b>		-	37 ± 3	906 ± 129	10299 ± 444	31 ± 20
<b>40</b>	Cl	H	2,0 ± 0,4	522 ± 39	20000	19 ± 16
<b>42</b>		F	72 ± 12	4010 ± 1647	20000	155 ± 33
<b>43</b>		H	7,8 ± 1,0	2201 ± 991	11400 ± 3862	11 ± 2
<b>45</b>		F	127 ± 15	12227 ± 5650	20000	83 ± 34
<b>41</b>	H	H	5,4 ± 0,5	1165 ± 151	20000	12 ± 4
<b>44</b>		H	15,9 ± 4,1	5216 ± 2290	20000	25 ± 6,0
<b>46a</b>		-	4,5 ± 0,2	226 ± 79	1109 ± 294	7,9 ± 1,6
<b>47a</b>		H	1,0 ± 0,1	4,0 ± 0,5	65 ± 29	1,2 ± 0,3
<b>48a</b>		F	5,3 ± 3,3	304 ± 84	1989 ± 604	11 ± 2
<b>49a</b>		H	0,4 ± 0,1	12 ± 7	108 ± 62	1,5 ± 0,3
<b>50a</b>		F	4,0 ± 1,9	302 ± 153	2802 ± 1105	5,0 ± 0,7
<b>46b</b>		-	0,7 ± 0,4	29 ± 4	130 ± 44	3,4 ± 0,3
<b>47b</b>		H	0,3 ± 0,04	1,3 ± 0,3	16 ± 6	0,6 ± 0,2
<b>48b</b>		F	1,5 ± 0,7	96 ± 52	414 ± 77	2,8 ± 1,1
<b>49b</b>		H	0,5 ± 0,1	18 ± 6	86 ± 55	1,4 ± 0,2
<b>50b</b>		F	2,2 ± 0,5	140 ± 51	924 ± 145	2,1 ± 0,4
<b>46c</b>		-	0,8 ± 0,1	18 ± 3	187 ± 60	7,1 ± 1,5
<b>47c</b>		H	0,4 ± 0,1	7,4 ± 4,1	74 ± 38	0,6 ± 0,2
<b>48c</b>		F	1,5 ± 0,2	90 ± 40	1077 ± 197	3,3 ± 0,7
<b>49c</b>		H	0,4 ± 0	9,2 ± 1,8	92 ± 11	2,1 ± 0,3
<b>50c</b>		F	2,5 ± 0,4	123 ± 73	1602 ± 294	3,6 ± 0,7
<b>46d</b>		-	1,9 ± 0,6	169 ± 74	784 ± 312	5,6 ± 0,3
<b>47d</b>		H	1,5 ± 0,1	5,8 ± 0,6	70 ± 23	2,7 ± 0,9
<b>48d</b>		F	4,1 ± 0,9	111 ± 43	867 ± 95	9,2 ± 1,9
<b>49d</b>		H	1,9 ± 0,1	8,5 ± 0,5	143 ± 37	1,8 ± 0,6
<b>50d</b>		F	6,9 ± 1,7	1297 ± 327	12042 ± 830	5,0 ± 1,6
<b>47e</b>		H	1,2 ± 0,1	20 ± 3,0	103 ± 17	2,9 ± 0,4
<b>47f</b>		H	1,3 ± 0,5	33 ± 2	101 ± 6	3,0 ± 1,2
<b>47g</b>		H	1,9 ± 0,2	47 ± 18	382 ± 115	5,2 ± 2,8

HTRF-Assay durchgeführt von Dr. L. Quambusch, CTG-Assay durchgeführt von Dr. J. Weisner.

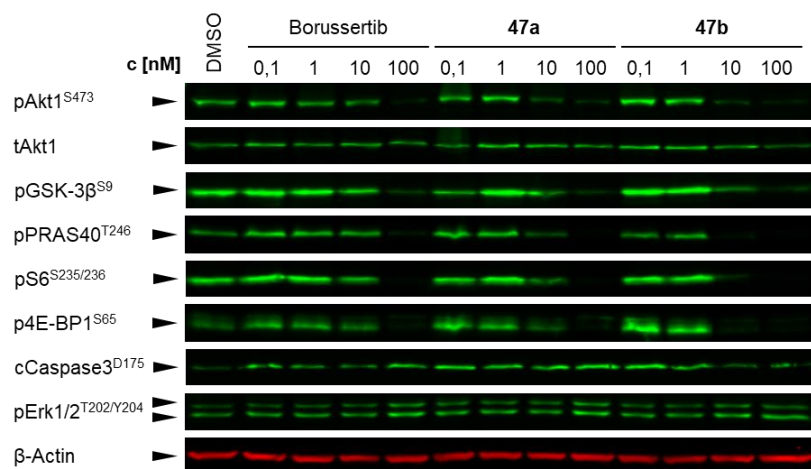
Die fluoriierten Derivate **47e-g** dienen als Bioisostere zu **47a** und wurden entwickelt, um die metabolische Stabilität der CAAs zu erhöhen. Für diese Verbindungen konnten veränderte biochemische Profile beobachtet werden, die sich durch eine bis zu 6-fach geringere Affinität zu Akt2 auszeichnen, während die Affinität der *ortho*-(**47e**) und *meta*-(**47f**) Varianten gegenüber Akt3 keine signifikante Veränderung zeigte. Lediglich die *para*-substituierte Verbindung **47g** äußerte eine im Vergleich zu **47a** 6-fach reduzierte Affinität gegenüber Akt3. Kürzlich wurde in der Literatur ein fluorierter Acrylamid-*warhead* beschrieben, der ein optimiertes Reaktivitätsprofil in Bezug auf die unspezifische Alkylierung von Cysteinen aufwies.<sup>258</sup> Um diesen Ansatz zu überprüfen, wurden analoge Verbindungen entwickelt und synthetisiert, um die metabolische Stabilität der neuartigen CAAs zu verbessern, wohl wissend, dass sowohl die biochemische als auch die zelluläre Aktivität dadurch reduziert werden könnte. Der direkte Vergleich aller am  $\alpha$ -Kohlenstoff fluoriierten Acrylamide mit ihren nicht-fluorierten Gegenstücken zeigt einen signifikanten Verlust an Potenz gegenüber der drei Isoformen. Diese biochemischen Trends lassen sich auch auf das zelluläre ZR-75-1 System übertragen. **47b** und **47c** demonstrierten erstmalig für die Klasse der CAAs eine subnanomolare Inhibition in einem zellulären System. Hingegen wurde für die fluoriierten Gegenstücke **48b** und **48c** ein bis zu fünffacher Wirksamkeitsverlust beobachtet. Darüber hinaus führt der Verlust an Reaktivität aufgrund der fluoriierten Acrylamide jedoch zu einer erhöhten Selektivität für Akt1 gegenüber Akt2 und Akt3. Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt bei **48c**, **50a** und **50d**, die einen Selektivitätsfaktor für Akt1 über Akt2 von 60-180 und für Akt1 über Akt3 von 700-1700 aufweisen.

Um einen tieferen Einblick in die zellulären Wirksamkeitsprofile der neuen CAAs zu gewinnen, wurde eine umfassende und vergleichende *in vitro* Western-Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 48). Für das Gros der CAAs konnte die Reduktion von pAkt1<sup>S473</sup> und pAkt2<sup>S474</sup> sowie der Akt-nachgeschalteten Substrate pGSK-3 $\beta$ <sup>S9</sup>, pPRAS40<sup>T246</sup> und pS6<sup>S235/S236</sup> nach der zweistündigen Behandlung der Brustkrebszelllinie ZR-75-1 demonstriert werden. Verbindung **47a** führt im Vergleich zu seinem fluoriierten Analogon **48a** durch die vollständige Inhibition von pAkt1 und pAkt2 zur Induktion der Apoptose in den Zellen, was durch die Detektion der proapoptischen Marker cPARP/cPARP<sup>D214</sup> verdeutlicht wird. Im Gegensatz dazu konnten für die Referenzverbindungen Capivasertib und Miransertib weder die Hemmung von pAkt1 und pAkt2, sowie deren nachgeschaltete Substrate, noch die Induktion der Apoptose bei der getesteten Konzentration von 100 nM demonstriert werden.



**Abbildung 48** Umfassende und vergleichende Western-Blot-Analyse der zweiten Generation von CAAs **47a-d**, **48a-d**, **49a-d**, **50a-d** und den klinischen Kandidaten Capiwasertib und Miransertib. Die Western-Blot-Analyse wurde mit der Brustkrebs-Zelllinie ZR-75-1 durchgeführt, die für 2 h mit 100 nM der annotierten Akt-Inhibitoren behandelt wurde. Die Analyse offenbarte die Reduktion von pAkt1<sup>S473</sup> und pAkt2<sup>S474</sup> sowie den Akt-nachgeschalteten Substraten pGSK-3β<sup>S9</sup>, pPRAS40<sup>T246</sup> und pS6<sup>S235/S236</sup>. (Western-Blot-Analysen durchgeführt von Dr. J. Weisner).

In einer zusätzlichen Western-Blot-Analyse wurden **47a** und **47b** zusammen mit dem Prototypen Borussertib zur Evaluierung der konzentrationsabhängigen Wirksamkeit der Zelinhibition eingesetzt (Abb. 49). Im Vergleich zu Borussertib konnte der spezifische *downstream*-Effekt bereits bei einer 10-fach geringeren Dosis der zweiten Generation an CAAs beobachtet werden.



**Abbildung 49** Konzentrationsabhängige Western-Blot-Analyse der zweiten Generations CAAs **47a** und **47b** und dem Prototyp CAAI Borussertib. Die Western-Blot-Analyse wurde mit der Brustkrebs-Zelllinie ZR-75-1 durchgeführt, die 2 h mit den angegebenen Inhibitor-Konzentrationen behandelt wurde. Die Analyse ergab eine dosisabhängige Hemmung von pAKT1<sup>S473</sup> sowie der Akt-nachgeschalteten Substrate pGSK-3β<sup>S9</sup>, pPRAS40<sup>T246</sup>, pS6<sup>S235/236</sup> und p4E-BP1<sup>S65</sup>. (Western-Blot-Analyse durchgeführt von Dr. J. Weisner).

Die vielversprechenden Ergebnisse der biochemischen und zellulären Evaluierung haben zu einer detaillierten *in vitro* Charakterisierung der neuartigen CAAs geführt, um die PK-Parameter der Verbindungen zu ermitteln (Tabelle 7).

**Tabelle 7** PK-Parameter der zweiten Generation von CAAs.

#	SolRank pH 7,4 [ $\mu$ M]	Plasma-Stabilität <sup>a</sup> [% verbleibend]	Mikrosomale- Stabilität <sup>a</sup> Phase I Cl <sub>int</sub> [mL/min/mg]	Mikrosomale Stabilität <sup>a</sup> Phase II [% verbleibend]	Plasmaprotein- Bindung <sup>a</sup> [% gebunden]	Caco-2 pH 6,5/7,4 [Verhältnis BA/AB]
Borussertib	14,1	100	35	89	98,7	478
Miransertib	346	96	180	97	96,5	1,3
<b>39</b>	24	92	355	93	99,8	46,7
<b>40</b>	19	90	78	101	98,4	3,6
<b>42</b>	53	98	102	100	99,0	0,5
<b>43</b>	29	102	113	69	98,1	26
<b>45</b>	87	99	231	72	99,3	1,1
<b>41</b>	178	104	80	98	97,5	19,8
<b>44</b>	200	103	62	81	91,2	144
<b>46a</b>	25	131	24	100	99,6	n.d.
<b>47a</b>	4,5	101	16	105	99,9	0,2
<b>48a</b>	38	95	10	111	98,7	0,8
<b>49a</b>	4,2	103	37	99	99,8	1,9
<b>50a</b>	22	111	45	103	99,8	n.d.
<b>46b</b>	5,8	97	64	91	98,0	5,7
<b>47b</b>	7,1	86	35	96	99,1	0,7
<b>48b</b>	16,3	95	22	100	98,7	0,8
<b>49b</b>	6,1	93	89	100	99,2	25,5
<b>50b</b>	15	123	144	85	98,8	n.d.
<b>46c</b>	14	84	47	61	99,7	17,6
<b>47c</b>	5,8	74	43	99	98,9	19
<b>48c</b>	42	117	54	40	100	n.d.
<b>49c</b>	1,8	76	56	56	97,3	33,8
<b>50c</b>	21	83	67	47	94,0	n.d.
<b>46d</b>	9,0	93	87	106	99,0	n.d.
<b>47d</b>	13	90	14	101	98,7	0,4
<b>48d</b>	24	114	16	92	98,1	n.d.
<b>49d</b>	18	90	25	72	98,0	1,1
<b>50d</b>	36	82	33	85	99,0	n.d.

<sup>a</sup>Murin; n.d.: nicht verfügbar; PK-Assays durchgeführt von: Lead Discover Center (LDC) Dortmund,

Im direkten Vergleich zur ersten Serie der neuartigen CAAs (Tabelle 5) konnten bei 13 der 27 getesteten Verbindungen akzeptable kinetische Löslichkeiten von über 20  $\mu$ M festgestellt werden. Die Moleküle **41** und **44**, bei denen die Substitution in der R<sup>2</sup>-Position fehlt, wiesen Löslichkeiten von über 170  $\mu$ M auf. Vergleichbare Werte wurden für den Inhibitor **22** der ersten Generation erzielt (Tabelle 5). Dies bestätigt die Annahme, dass lipophile Substitutionen an dieser Position die Löslichkeit deutlich verringern.

Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass die Inhibitoren mit einer Fluorsubstitution am  $\alpha$ -Kohlenstoff des Acrylamids im Vergleich zu ihren nicht fluorierten Gegenstücken eine höhere Löslichkeit aufweisen. Besonders deutlich wird dies bei dem Paar **49c** und **50c**, die sich in der kinetischen Löslichkeit um einen Faktor von mehr als zehn unterscheiden.

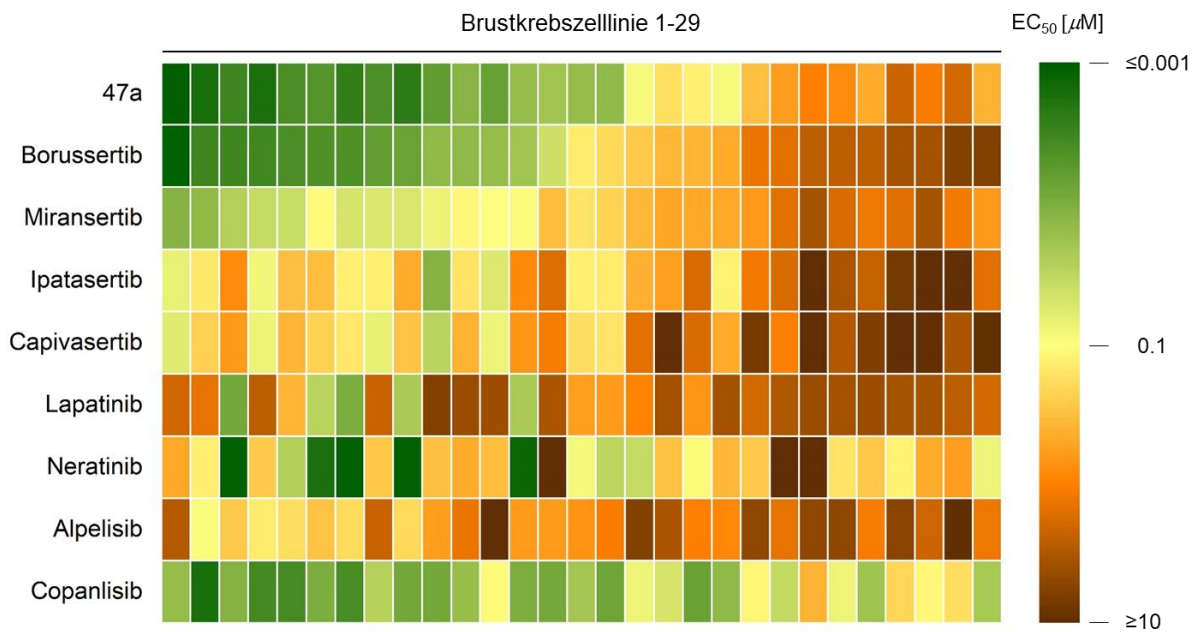
Da alle CAAIs ein funktionelles Acrylamid tragen, wurde die Plasmastabilität der Verbindungen untersucht, um einen schnellen Abbau im Plasma ausschließen zu können, da sich dieser im Allgemeinen nachteilig auf die nachfolgenden *in vivo* PK-Analysen auswirkt. Im Rahmen der Untersuchung zeigte sich, dass die meisten Verbindungen eine ausgezeichnete Plasmastabilität mit einer Rückgewinnung von  $\geq 90$  % nach einem zweistündigen Inkubationsintervall aufwiesen (Tabelle 7). Inhibitoren mit fluorierten Acrylamiden wiesen im Vergleich zu ihren nicht fluorierten Gegenstücken eine erhöhte hydrolytische Stabilität auf. **47c** und **49c** sind neben dem elektrophilen *warhead* mit einem zusätzlichen Amid funktionalisiert und wurden mit 25 % Verlust reisoliert. Es ist anzunehmen, dass die 3-Acetamidophenyl-Substitution der R<sup>2</sup>-Position einen metabolischen Hotspot darstellt. Aus diesem Grund sollten die Inhibitoren **46c-50c** für anstehende *in vivo* Tests nicht weiter berücksichtigt werden.

Um tiefere Einblicke in den Metabolismus der Inhibitoren zu gewinnen, wurden mikrosomale Stabilitätstest in murinen Lebermikrosomen durchgeführt (Tabelle 7). Mit dieser Methode kann die Verfügbarkeit der Verbindungen nach der ersten Leberpassage durch Bestimmung der hepatischen *clearance* und des Prozentsatzes der verbleibenden Substanz vorhergesagt werden. Chlorierte Verbindungen wie **39**, **42**, **43** und **45** weisen eine erhöhte Clearance von  $> 100$  ml/min/mg auf und unterliegen daher theoretisch einer schnellen *in vivo* Elimination, die sich in einer verminderten Wirksamkeit äußert. Eine signifikant höhere *clearance* wurde auch für Miransertib beobachtet. Der allosterische Inhibitor befindet sich seit über fünf Jahren in der Klinik zur chronischen Behandlung von Patienten mit Proteus-Syndrom.<sup>201</sup> Die in murinen Lebermikrosomen erzielten Ergebnisse sollten demnach primär als Indikatoren angesehen werden, die nicht zwangsläufig eine Vorhersage der *in vivo clearance* im humanen System ermöglichen. Im Gegensatz dazu wiesen die Verbindungen **46a**, **47a**, **48a**, **47d** und **48d** verringerte intrinsische *clearance*-Werte von  $< 25$  mL/min/mg auf. Diese Inhibitoren zeigten auch eine außergewöhnliche Resistenz gegenüber konjugierenden Enzymen während der metabolischen Phase II, wobei mehr als 92 % der Substanzen zurückgewonnen wurden. **46c**, **48c**, **49c** und **50c**, die sich durch die 3-Acetamidophenyl-Substitution in der R<sup>2</sup>-Position auszeichnen, scheinen aufgrund ihrer polaren Natur überwiegend durch den konjugierenden Phase-II-Metabolismus eliminiert zu werden.

Der Vergleich der CAAs hinsichtlich ihrer Acrylamidsubstitution zeigt, dass die Fluorierung im Allgemeinen die intrinsische *clearance* fördert. Ausnahmen von diesem Trend sind bei den Paaren **47a** und **48a** sowie **47b** und **48b** zu beobachten. Diese Verbindungen, die sich durch ihre neuartigen östlichen Molekülteile auszeichnen, weisen eine hohe Gesamtstabilität auf und sind daher geeignete Kandidaten für die anstehenden *in vivo* Untersuchungen.

Um ein besseres Verständnis des Verteilungspotentials und somit des Anteils der ungebundenen Fraktion der neuen CAAs zu erhalten, wurde ein Plasmaproteinbindungs-Assay (PPB) durchgeführt (Tabelle 7). Hier wurde für das Gros der getesteten Inhibitoren die Bindung von > 98 % an murine Plasmaproteine beobachtet, die im direkten Zusammenhang mit der hohen Lipophilie der Verbindungen stehen könnte. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Verbindungen mit fluorierten Acrylamiden und ihren Pendants ohne Halogensubstitution konnte in diesem Assay nicht festgestellt werden. Zudem kann keine Aussage darüber getätigt werden ob die getesteten Verbindungen eine irreversible Bindung mit den Plasmaproteinen eingehen. Die kovalente Bindung von Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) an Plasmaproteine wurde kürzlich beschrieben, obwohl in diesen Fällen gezeigt wurde, dass die Alkylierung einen reversiblen Charakter aufweist.<sup>259</sup> Eine hohe Plasmaproteinbindung von kovalenten Wirkstoffen kann jedoch in lebenden Organismen einen besonderen Vorteil bieten. Die gebundene Fraktion dient in diesem Fall als Reservoir, das eine allmähliche Freisetzung des Wirkstoffs ermöglicht, um das Gleichgewicht aufrechtzuerhalten und somit die pharmakologische Wirkung zu verlängern. Diese Theorie beruht auf der Tatsache, dass die gebundene Fraktion weniger anfällig für Metabolisierungsprozesse und die anschließende Elimination ist.<sup>260</sup> Zur Bewertung der potentiellen oralen Bioverfügbarkeit der CAAs wurde ein Caco-2-Assay durchgeführt (Tabelle 7). Dieser diente zur Vorhersage der intestinalen Permeabilität und zur Untersuchung des Wirkstoff-Effluxes. Verbindungen, die durch den zuletzt entwickelten östlichen Molekülbaustein **36a/b** charakterisiert sind (**45**, **49a**, **49d**), zeigen hierbei ein ähnliches Efflux-Verhältnis wie der allosterische Inhibitor Miransertib (~ 1), was darauf hindeutet, dass diese Inhibitoren potentiell oral bioverfügbar sind. Inhibitoren, die mit der östlichen Komponente **29a/b** konjugiert sind (**42**, **47a**, **48a**, **47b**, **47d**), zeigten weitaus vielversprechendere Ergebnisse. Diese Verbindungen wiesen ein effektives Efflux-Verhältnis von < 1 auf, wodurch eine größere Menge der Substanz von der apikalen zur basolateralen Seite transportiert wird als in umgekehrter Richtung. Für alle acetylierten Derivate (**46c**, **47c**, **49c**), wurde ein erhöhtes Effluxverhältnis beobachtet, so dass für diese Substanzklasse von einem aktiven Transport aus den Zellen heraus ausgegangen werden muss.

Die Ergebnisse der biochemischen, zellulären und pharmakokinetischen Untersuchungen führten zu der Entscheidung den *fronrunner* **47a**, in der präklinischen Entwicklung voranzutreiben. In diesem Zusammenhang wurde die Wirksamkeit dieses vielversprechenden Akt-Inhibitors in einem Panel von 29 genetisch annotierten Brustkrebszelllinien evaluiert. Diese Analyse beinhaltete einen vergleichenden Ansatz mit klinisch relevanten Inhibitoren von Akt (Miransertib, Ipatasertib, Capivasertib), PI3K (Alpelisib, Copanlisib), Her2 (Lapatinib, Neratinib) (Abb. 50).



**Abbildung 50** Zell-Panel-Profilierung mit 29 genetisch annotierten Brustkrebszelllinien zur Bewertung der Wirksamkeit des kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors **47a**. Die Studie wurde im direkten Vergleich mit allosterischen (Miransertib) und ATP-kompetitiven (Ipatasertib, Capivasertib) Akt-Inhibitoren sowie weiteren in der Brustkrebstherapie häufig eingesetzten Inhibitoren (Lapatinib und Neratinib: Her2, Alpelisib und Copanlisib: PI3K) durchgeführt. (Die Daten wurden durch Horizon Discovery erhoben).

Die Auswahl der Zelllinien erfolgte auf Grundlage verschiedener Marker, darunter der Her2-Status (positiv oder negativ), der Status von PIK3CA (Wildtyp (wt) oder mutiert) und der Status des Östrogenrezeptors (ER, positiv oder negativ). Um eine umfassende Darstellung zu gewährleisten, wurde mindestens eine Zelllinie mit allen möglichen Kombinationen dieser Marker in die Studie aufgenommen. Im direkten Vergleich der Akt-Inhibitoren erweist sich der Wirkmechanismus der CAAIs als besonders vorteilhaft und übertrifft sowohl orthosterische (Capivasertib, Ipatasertib) als auch reversible allosterische (Miransertib) Akt-Inhibitoren. **47a** demonstriert eine außergewöhnliche antiproliferative Effektivität, mit EC<sub>50</sub>-Werten, die zwischen 1,1 und 28 nM in 16 der 29 evaluierten Zelllinien liegen. Diese herausragende Wirksamkeit lässt sich durch den kovalent-allosterischen Wirkungsmechanismus erklären.



Unspezifische zytotoxische Effekte können ausgeschlossen werden, da für 13 der getesteten Zelllinien EC<sub>50</sub>-Werte im Bereich von 0,1 bis 5,3 µM festgestellt wurden.

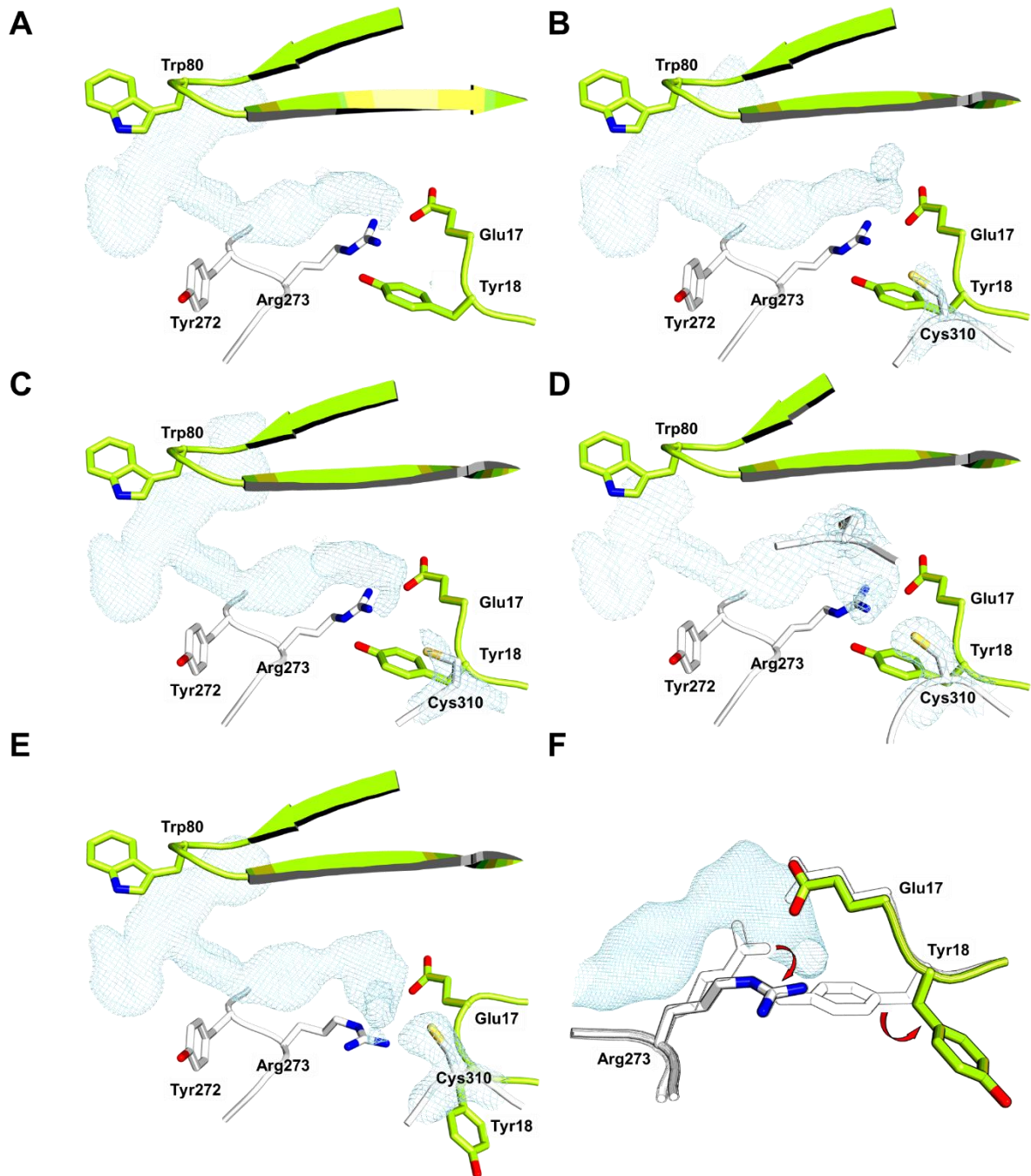
Unter den getesteten Zelllinien befanden sich ebenfalls solche, die als *triple-negative* Brustkrebszellen (TNBC: Her2-negativ (Her2-), Estrogenrezeptor-negativ (ER-), Progesteronrezeptor-negativ (PR-)) charakterisiert sind und im Allgemeinen weniger gut auf Akt-Inhibitoren ansprechen. Dennoch konnten auch bei diesen Subtypen Zelllinien identifiziert werden, die auf die Hemmung von Akt durch **47a** ansprechen. Die *gain-of-function*-Mutationen PIK3CA<sup>H1047R</sup> und PIK3CA<sup>P539R</sup> führen in bestimmten Zelllinien zu einer verstärkten Phosphorylierung von Akt.<sup>261,262</sup> In diesem Fall wurde für **47a** ein EC<sub>50</sub>-Wert von 19 nM erzielt. Noch ausgeprägter ist dieser Effekt in Zellen, in denen neben den *gain-of-function*-Mutationen PIK3CA<sup>H1047R</sup> und PIK3CA<sup>D350N</sup> auch die *loss-of-function* Mutation PTEN<sup>I253N</sup> gefunden wurde.<sup>263</sup> Hier konnte für **47a** ein EC<sub>50</sub>-Wert im einstelligen nanomolaren Bereich bestimmt werden. Bemerkenswert ist hierbei, dass weder für die klinischen Kandidaten und ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren Capivasertib und Ipatasertib noch für den allosterischen Akt-Inhibitor Miransertib ein vergleichbarer Effekt beobachtet werden konnte. Die beiden Her2-Inhibitoren Lapatinib und Neratinib zeigten mit Ausnahme der Her2-positiven Zelllinien vernachlässigbare Effekte. Obwohl mehrere PIK3CA-mutierte Zelllinien in diesem Screening-Panel verwendet wurden, zeigte Alpelisib, ein PI3K $\alpha$ -Inhibitor, der in der Klinik häufig in Kombination mit dem ER-Antagonisten Fulvestrant verwendet wird, eine eingeschränkte Wirksamkeit. Copanlisib hingegen, ein pan-PI3K-Inhibitor, der für seine schwerwiegenden Nebenwirkungen bekannt ist,<sup>264</sup> offenbarte eine unspezifische zytotoxische Wirkung.

Die Ergebnisse der *in vitro* Charakterisierung der neuartigen CAAIs unterstreichen ihren außergewöhnlichen Wirkmechanismus und führten zur Nominierung der *frontrunner*-Verbindung **47a**, einem vielversprechenden Kandidaten für die weitere präklinische Entwicklung. Aufgrund der Überlegenheit der CAAIs gegenüber orthosterischen und allosterischen Inhibitoren stellt **47a** einen möglichen Durchbruch bei der Entwicklung von Akt-Inhibitoren dar. Trotz der Herausforderungen in TNBC-Zellen konnten responsive Subtypen identifiziert werden, die das Potential dieser neuartigen Inhibitorklasse verdeutlichen. Die begrenzte Wirksamkeit etablierter Inhibitoren der ersten Generation verdeutlichen in diesem Zusammenhang die einzigartigen Vorteile der hier dargestellten CAAIs und ebnet den Weg für ihre weitere Erforschung in bevorstehenden *in vivo proof-of-concept* Studien.

### 3.7 Strukturanalyse der 2. Generation neuartiger CAAs

Um ein besseres Verständnis über den Bindungsmodus der neuen CAAs zu erlangen, wurden drei Derivate (**46a**, **46b**, **46d**), mit einem fluorierten Acrylamid am Benzo[*d*]imidazol-EP, ein Derivat (**48a**) mit dem neuartigen östlichen Molekülteil (**29b**), sowie ein Derivat (**44**) mit einem konventionellen Acrylamid am östlichen Molekülteil (**36a**) mit Akt1 erfolgreich cocrystallisiert (Abb. 51). Die Komplexstrukturen veranschaulichen den bereits beschriebenen Bindungsmodus und belegen, dass jeder Ligand Akt1 im inaktiven Zustand (PH-*in*) stabilisiert. Die wichtigsten Interaktionen, die konsistent in sämtlichen neuartigen Komplexstrukturen beobachtet wurden, adressieren das Grundgerüst des westlichen Molekülteils und umfassen insbesondere die signifikanten  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit Trp80 und Tyr272. Überraschenderweise konnte die kovalente Alkylierung weder von Cys296 noch von Cys310 in den Strukturen **46a** (Abb. 51 A) oder **46b** (Abb. 51 B) beobachtet werden und wird nur für **46d** (Abb. 51 C) durch die Elektronendichte des Fluoracrylamid-*warheads* des Liganden und der Seitenkette von Cys310 angedeutet. Der westliche Molekülteil von **46a** überlagert fast vollständig mit seinem Gegenstück **19a**, während im östlichen Molekülteil eine deutliche Verschiebung zu beobachten ist (Abb. A2 A). Die beobachtete Verschiebung ist bei den Verbindungen **46a**, **46b** und **46d** besonders ausgeprägt (Abb. A2 B), was die Hypothese nahelegt, dass auch für diese Serie die bereits in früheren Studien nachgewiesene Alkylierung beider Cysteine (Cys296 und Cys310) möglich ist.<sup>228,240</sup> Es ist anzunehmen, dass aufgrund der reduzierten Reaktivität der fluorierten Acrylamide und der kurzen Inkubationszeit der Liganden mit dem Protein (< 2 Stunden) die vollständige Alkylierung des Proteins mittels kristallographischer Methoden nicht nachgewiesen werden konnte. Eine robuste Methode zum Nachweis der kovalenten Bindung stellt die Protein-Massenspektrometrie zur Bestimmung der Inaktivierungskonstante  $k_{inact}$  dar (vgl. Abb. 32). Die Durchführung war aufgrund zeitlicher Einschränkungen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, ist jedoch für zukünftige Studien vorgesehen.

Die Elektronendichte der Kristallstruktur von **44** (Abb. 51 D) deutet die Alkylierung von Cys310 an. Cys296 in der Aktivierungsschleife ist zwar ebenfalls aufgelöst, die Elektronendichte und damit die Position des Liganden deuten aber nicht auf eine Modifikation dieses Thiols hin. Die Stabilisierung des neuartigen östlichen Molekülteils erfolgt, wie bei allen hier diskutierten Strukturen, durch eine parallel verschobene  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkung mit der Seitenkette von Tyr18. Interessanterweise werden für **48a**, dass sich durch den östlichen Teil **29b** auszeichnet, neue Wechselwirkungen mit Akt1 beobachtet (Abb. 51 E).



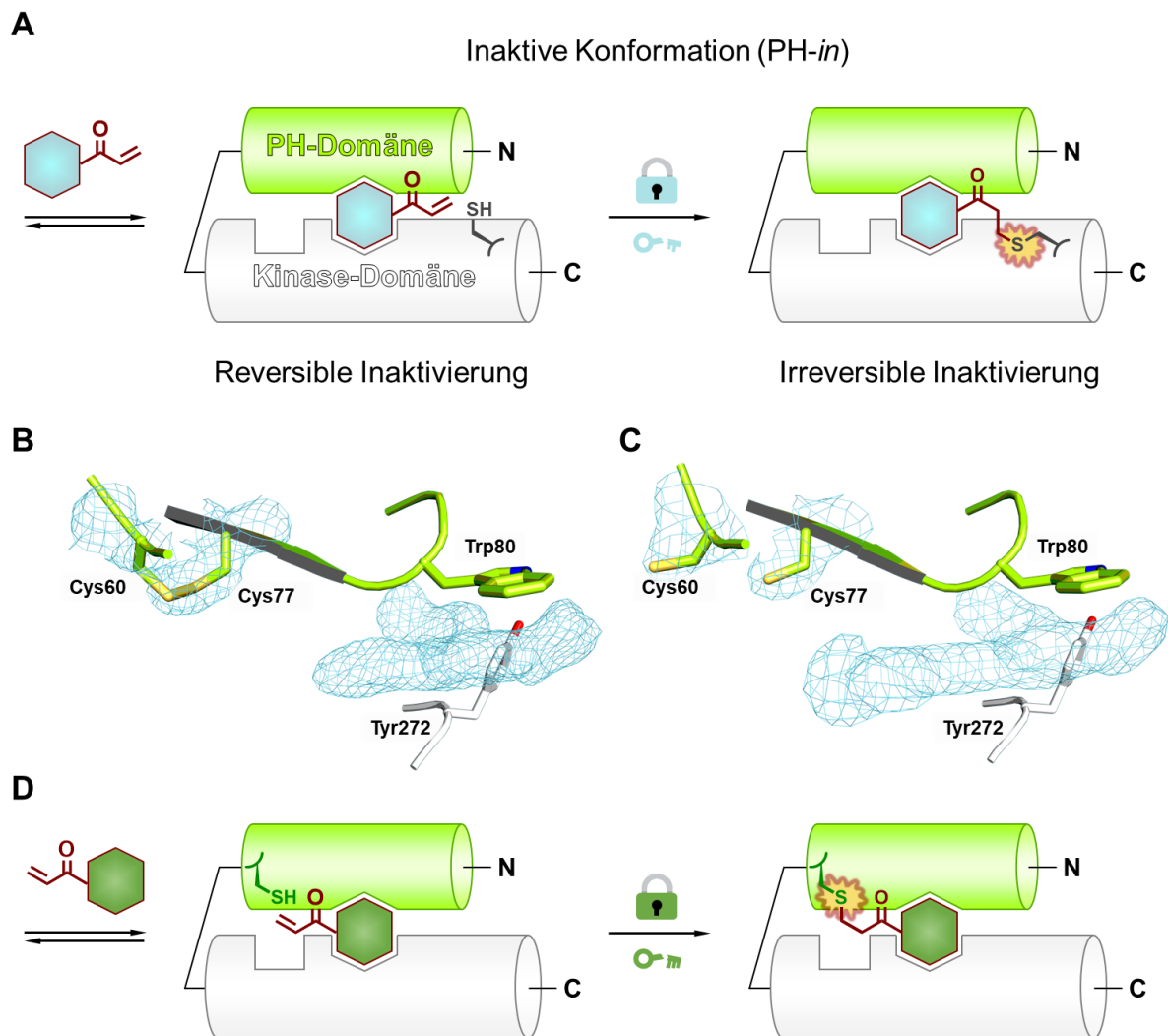
**Abbildung 51** Co-Kristallstrukturen von Akt1 (Volllänge ohne HM) im Komplex mit neuartigen CAAs. Die Sekundärstrukturen und Aminosäuren der PH-Domäne sind grün und die der Kinasedomäne weiß dargestellt. Die  $2F_o-F_c$ -Dichtekarten sind bei  $1\sigma$  konturiert. **A** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **46a** (unveröffentlicht). Die kovalente Bindung mit Cys296 oder Cys310 konnte nicht aufgelöst werden. **B** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **46b** (unveröffentlicht). Die kovalente Bindung zu Cys296 oder Cys310 konnte nicht aufgelöst werden. Die Elektronendichte deutete darauf hin, dass die Alkylierung von beiden Cysteinen möglich ist. **C** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **46d** (unveröffentlicht). Die bevorzugte kovalente Bindung mit Cys310 ist durch die Elektronendichte gekennzeichnet. **D** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **44** (unveröffentlicht). Die bevorzugte kovalente Bindung mit Cys310 ist durch die Elektronendichte gekennzeichnet. **E** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **48a** (unveröffentlicht). Die bevorzugte Bildung einer kovalenten Bindung mit Cys310 wird durch die Elektronendichte angedeutet. **F** Die Alkylierung von Cys310 führt zu einer Verschiebung der Seitenkette von Arg273 und der Bildung einer Kationen- $\pi$ -Wechselwirkung mit dem Liganden, wodurch die  $\pi$ - $\pi$ -Bindung mit Tyr18 aufgehoben wird. (Strukturen gelöst von Dr. L. Depta, Dr. S. Kleinböling, Dr. J. Niggenaber, Dr. M. P. Müller und M.Sc. J. Wiese).

Die Positionierung des neuartigen östlichen Molekülteils führt zur Verschiebung der Seitenkette von Arg273 und somit zu einer Kation- $\pi$ -Wechselwirkung mit dem aromatischen System. Durch den Verlust der Salzbrücke zwischen Glu17 und Arg273 kommt es zu einer Verschiebung der Seitenkette von Tyr18, wodurch die sonst beobachtete  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung aufgehoben wird (Abb. 51 F). Weitere Strukturaufklärungen mit diversen **29a**-modifizierten CAAIs wurden zum Ende dieser Arbeit von Dr. J. Niggenaber und M. Sc. D. D'Angelo durchgeführt, mit denen die neuartigen Interaktionen validiert werden konnten. Angesichts der Unabhängigkeit dieser CAAIs von der Salzbrücke zwischen Glu17 und Arg273 in Akt1 ergibt sich die Möglichkeit, dass diese Verbindungen als potente Inhibitoren der aktivierenden Akt1<sup>E17K</sup>-Mutante fungieren könnten, was in zukünftigen Studien zu verifizieren ist. Darüber hinaus sind Kristallisationsstudien, die Akt2 und Akt3 einschließen, von entscheidender Bedeutung, um das strukturelle Verständnis der allosterischen Bindungstaschen der Akt-Isoformen und der Inhibitorbindung zu erweitern, was für die strukturbasierte Entwicklung Isozym-spezifischer CAAIs unerlässlich ist.

Zukünftig könnten die vielversprechendsten CAAIs der zweiten Generation in *in vivo* Maus-Studien evaluiert werden, um die Pharmakodynamik im lebenden Organismus zu untersuchen und die Absorptions-, Verteilungs-, Metabolismus- und Ausscheidungsprofile (ADME) zu bewerten. Dazu muss in Vorstudien eine geeignete Formulierung für die Verbindungen gefunden werden, bevor diese in einer Dosis-Eskalationsstudie und einer anschließenden *in vivo* PK-Studie evaluiert werden können. Darüber hinaus könnte die Wirksamkeit in einer *proof-of-concept*-Studie an tumortragenden Mäusen untersucht werden. Diese Studien sollen entscheidende Erkenntnisse zum translationalen Potenzial der neuen CAAIs liefern, um sie in die nächste präklinische Entwicklungsphase zu führen.

### 3.8 Design und Synthese neuartiger CAAIs zur Adressierung alternativer Cysteine

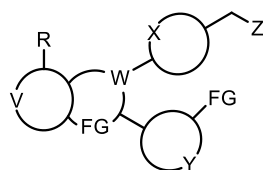
Die Strukturanalyse der nächsten Generation an CAAIs, die gezielt die redox-sensitiven Cystein-Seitenketten von Cys296 und Cys310 der Aktivierungsschleife alkylieren (Abb. 52 A), offenbarten eine hydrophobe Kavität in der PH-Domäne, die von den Seitenketten von Phe55, Val57, Ile75, Ile84 und Leu110 gebildet wird.



**Abbildung 52 A** Schematische Darstellung der kovalenten-allosterischen Inhibition von Akt durch CAAIs. CAAIs (hellblaues Hexagon) stabilisieren die enzymatisch inaktive Konformation (PH-*in*) von Akt durch Bindung in einer einzigartigen allosterischen Interdomänenbindungstasche zwischen der Kinase- und PH-Domäne und unterdrücken dadurch reversibel die Signaltransduktion. Die Alkylierung von Cystein-Seitenketten in der Aktivierungsschleife (Cys296 und Cys310 in Akt1) inaktiviert die Proteinkinase irreversibel, so dass die Signaltransduktion durch Akt erst nach der Resynthese des Proteins möglich ist. **B** Protein Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit einem allosterischen Akt-Inhibitor. Die Struktur veranschaulicht die oxidierte Form der Disulfidbrücke zwischen Cys60 und Cys77 in der PH-Domäne (Elemente der PH-Domäne in grün, Elemente der Kinasedomäne in weiß dargestellt). (Unveröffentlichte Struktur gelöst von Dr. I. Landel). **C** Protein Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit einem allosterischen Akt-Inhibitor. Die Struktur veranschaulicht die reduzierte Form der Seitenketten von Cys60 und Cys77 in der PH-Domäne (Elemente der PH-Domäne in grün, Elemente der Kinasedomäne in weiß dargestellt). (Unveröffentlichte Struktur gelöst von Dr. J. Niggenaber). **D** Konzeptuelle Darstellung von CyPHi: Der Ligand (grünes Hexagon) bindet reversibel in der allosterischen Interdomänenbindungstasche von Akt, bevor er Cys60 oder Cys77 in der PH-Domäne über einen Acrylamid-*warhead* alkyliert und dadurch Akt in der katalytisch inaktiven Konformation stabilisiert.

Innerhalb dieser Tasche wurde eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinseitenketten von Cys60 und Cys77 identifiziert. Die Untersuchung der zuvor diskutierten Protein Co-Kristallstrukturen von Akt1 sowie die Analyse publizierter Kristallstrukturen aus der Protein-Datenbank (PDB) ergab, dass in 21 dieser Strukturen die oxidierte Disulfidbrücke vorhanden ist. In elf Strukturen sind die Cystein-Seitenketten hingegen reduziert und liegen somit als freie Thiole vor (Abb. 52 B, C). Aufgrund der *staple*-Konfiguration ist es anzunehmen, dass diese allosterische Disulfidbrücke (*Cross-Strand Disulfides*) sensitiv auf durch oxidativen Stress ausgelöste Redox-Signale reagiert und dass die Cysteine für die PIP<sub>3</sub>-abhängige Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran erforderlich sind.<sup>265</sup> Die Tatsache, dass es sich bei Cys60 und Cys77 um redox-sensitive Aminosäuren handelt, die für die Aktivierung von Akt essentiell sind, bildete die Grundlage für die Entwicklung eines neuartigen Sets an Liganden auf Basis der zuvor dargestellten westlichen Molekülteile. Auf dieser Grundlage wurde das Konzept von *cysteine-alkylating pleckstrin homology domain inhibitors* (CyPHi) zur gezielten und kovalenten Adressierung von Akt jenseits der Aktivierungsschleife entwickelt (Abb. 52 D).

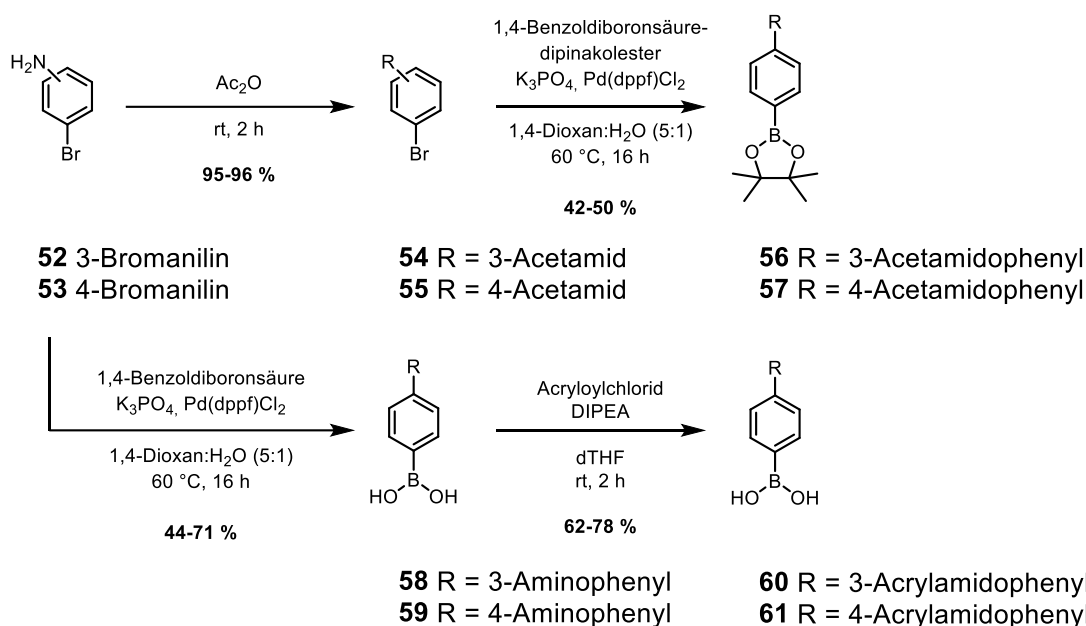
Mit der Adressierung dieser Cysteine werden die östlichen Molekülteile der zuvor beschriebenen Verbindungen obsolet, sodass aus Sicht der Ligandeneffizienz kleinere funktionelle Gruppen in dieser Molekülregion in Betracht gezogen wurden. Kovalente Docking-Studien mit einem ausgewählten Set an konzipierten Verbindungen offenbarten einfache Biaryliche-Substitutionen in der R-Position zusammen mit einem reaktiven Acrylamid am terminalen Aromaten der bityklischen Substitution (Abb. 53).



51

**Abbildung 53** Das kovalente Docking von neu konzipierten Akt-Inhibitoren mit Cys60 und Cys77 (Akt1) führte zu Verbindungen wie **51**. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: polarer Substituent, R: aromatischer Rest mit terminalem Acrylamid).

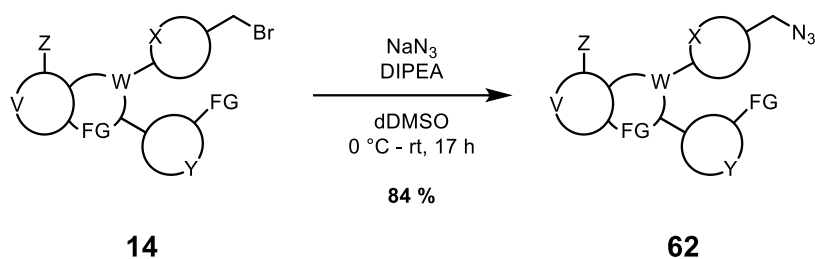
Um das allgemeine Verständnis und die SAR der neuen CyPHi-Verbindungen zu fördern, wurde neben Acrylamid-substituierten Liganden auch ein fokussiertes Set an reversiblen Verbindungen entwickelt, die sich in dem Substitutionsmustern der R-Position unterscheiden. Da in diesem Fall eine lineare Syntheseroute angestrebt wurde, die eine Derivatisierung durch Pd-katalysierte Suzuki-Kreuzkupplungen in der späten Phase der Synthese zulässt, mussten entsprechende Boronsäuren und Pinakolester für die Funktionalisierung bereitgestellt werden (Abb. 54).



**Abbildung 54** Syntheschema zur Darstellung der Boronsäure-Pinakolester **56** und **57** sowie der Boronsäuren **58-61**.

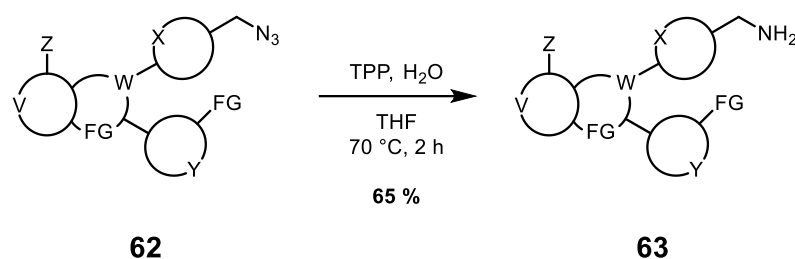
Essigsäureanhydrid wurde in einer konventionellen Acetylierungsreaktion verwendet, um die Aniline **52** und **53** in die entsprechenden Acetamide **54** und **55** zu überführen. Die acetylierten Verbindungen wurden schließlich in einer Pd-katalysierten Suzuki-Kreuzkupplungsreaktion mit 1,4-Benzoldiboronsäure-bispinakolester verwendet, um die Boronsäure-Pinakolester **56** und **57** darzustellen. Die geringen Ausbeuten von unter 50 % in der etablierten Kreuzkupplungsreaktion sind mit der Bildung von Nebenprodukten in Form von *para*-Terphenylverbindungen zu erklären, die massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnten. Ebenso wurde die Bildung von substituierten *p*-Triphenylen bei der Synthese der Biphenylanilin **58** und **59** nachgewiesen. Die Effizienz dieser Reaktionen kann in Zukunft durch die Verwendung eines Überschusses an 1,4-Benzoldiboronsäure bzw. 1,4-Benzoldiboronsäure-dipinakolester gesteigert werden. Schließlich wurden zuvor etablierte Bedingungen zur Installation des Acrylamids mittels Acryloylchlorid verwendet, um die Aniline **58** und **59** in die entsprechenden Acrylamidophenyle **60** und **61** zu überführen.

Das bereits im größeren Maßstab dargestellte Benzylbromid **14** bot die ideale Grundlage für die Synthese der konzipierten Verbindung **51**. Dazu wurde **14** in einem ersten Schritt einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit Natriumazid unterzogen, um das Benzylazid **62** zu formen (Abb. 55). Das Azidion stellt ein exzellentes Nukleophil dar, das in aprotischen Lösemitteln eingesetzt werden kann, um entsprechende Alkyl- oder Arylazide zu bilden, die anschließend zu dem entsprechenden Amin reduziert werden können.



**Abbildung 55** Syntheschema zur Darstellung des Benzylazids **62** durch nukleophile Substitution von **14** mit  $\text{NaN}_3$ . (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

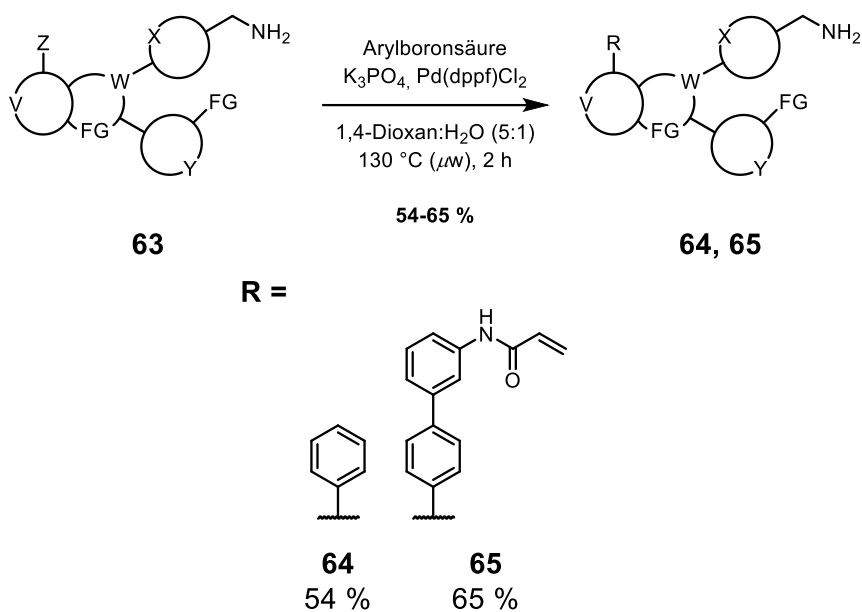
Die Reduktion von **62** mit Palladium unter Wasserstoffatmosphäre führte in diesem Fall jedoch zur Dehalogenierung der Verbindung, wodurch diese unbrauchbar für die nachfolgende Bibliothekssynthese wurde. Eine mildere Alternative zur Synthese von Benzylaminen aus Benzylaziden bot die Staudinger-Reaktion (Abb 56.)



**Abbildung 56** Syntheschema zur Darstellung des Benzylamins **63** durch Staudinger-Reaktion. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

Der Reaktionsverlauf ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt,<sup>266</sup> es wird jedoch folgender Mechanismus angenommen: Im Zentrum des Reaktionsmechanismus steht die Bildung eines Iminophosphorans durch nukleophile Addition von Triphenylphosphin (TPP) an das endständige Stickstoffatom des organischen Azids unter Freisetzung von elementarem Stickstoff. Das Iminophosphoran wird in einem zweiten Schritt durch die Addition eines Wassermoleküls zum Benzylamin **63** und Triphenylphosphinoxid (TPPO) als Nebenprodukt hydrolysiert. Mit einer Ausbeute von 65 % konnte genügend Ausgangsmaterial für die nachfolgende Suzuki-Kreuzkupplungsreaktion mit den zuvor bereitgestellten Boronsäuren erfolgen. Initiale Testreaktionen mit Phenylboronsäure führten in akzeptablen Ausbeuten zu dem Derivat **64** (Abb. 57). Die reversible Verbindung **64** sollte in der nachfolgenden *in vitro* Charakterisierung als direktes Gegenstück zum potentiell kovalent-allosterischen Akt-Inhibitor **65** dienen, der in guten Ausbeuten aus der zuvor dargestellten Boronsäure **60** und dem halogenierten Startmaterial **63** dargestellt werden konnte (Abb. 57).

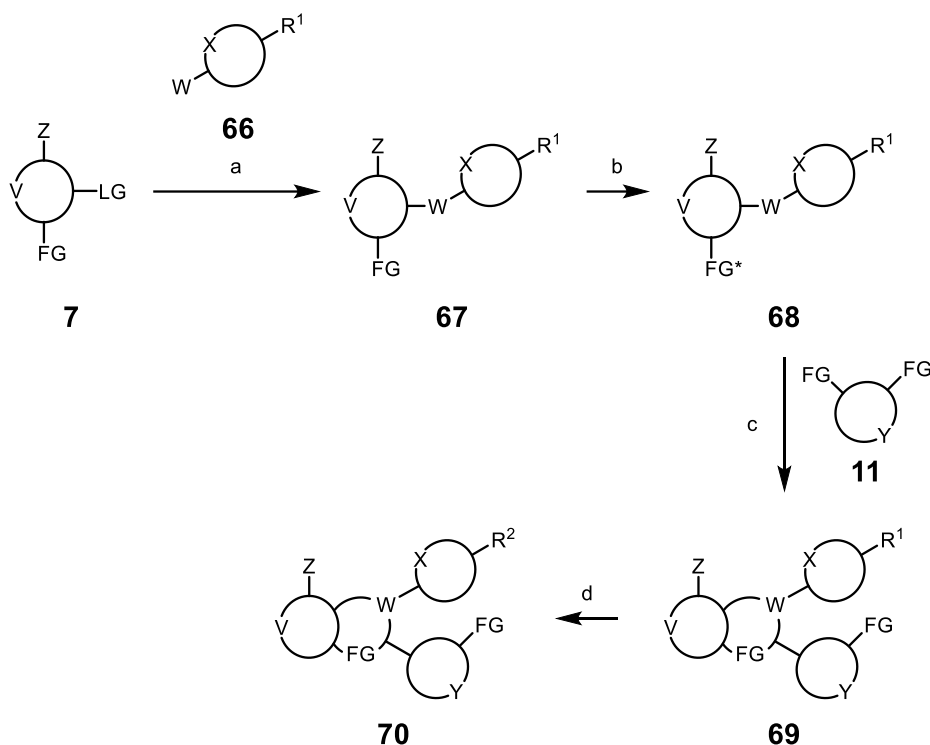




**Abbildung 57** Syntheschema zur Darstellung des potentiell neuartigen CAAs **65** und des reversiblen Vergleichsmoleküls **64** durch Suzuki-Kreuzkupplungsreaktionen mit den entsprechenden Boronsäuren. Die Ausbeuten der einzelnen Reaktionen sind als prozentuale Angaben unter den Derivaten annotiert. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalicyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

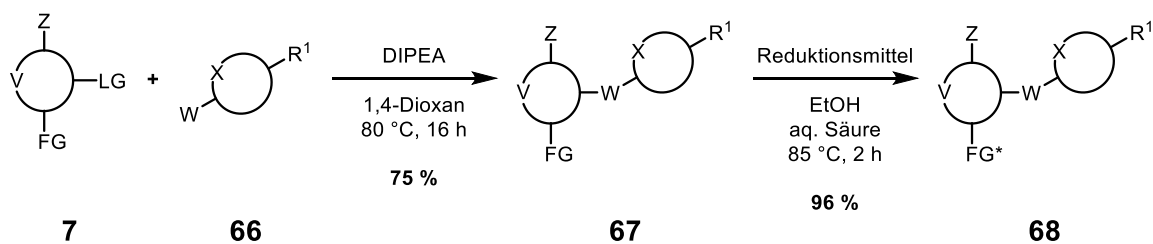
Zum Nachweis der kovalenten Bindung der neuartigen Verbindungen wurde die relative Proteinmassenzunahme von Akt1 nach Inkubation mit **65** massenspektrometrisch untersucht (Abb. A3). Nach einer einstündigen Inkubationszeit konnte keine kovalente Bindung des Liganden an Akt1 beobachtet werden. Erst nach 24 Stunden wurde die kovalente Bindung von **65** an Akt1 zu ca. 40 % nachgewiesen. Diese positiven Ergebnisse veranlassten die Synthese weiterer Derivate, um eine SAR aus der CyPHi-Serie abzuleiten und um den Bindungsmodus schließlich mittels Proteinkristallographie zu validieren. Dazu wurde das Substitutionsmuster des Grundgerüsts leicht verändert, um die Syntheseeffizienz für die Bibliothekssynthese zu steigern (Abb. 58).

Die Synthese des Präkursors **70** verläuft analog zu den in Abbildung 16 dargestellten Intermediaten, wobei **7** in einer  $S_NAr$  mit dem Nukleophil **66** zum Intermediat **67** umgesetzt wird. Die Transformation der funktionellen Gruppe von **67** führt zum Intermediat **68**, das in einer intermolekularen Zyklisierungsreaktion mit **11** zum trizyklischen Kerngerüst **69** umgesetzt wird. Die abschließende Entschützungsreaktion resultiert schließlich in der halogenierten Verbindung **70**, die für die nachfolgende Bibliothekssynthese genutzt wird (Abb. 58).



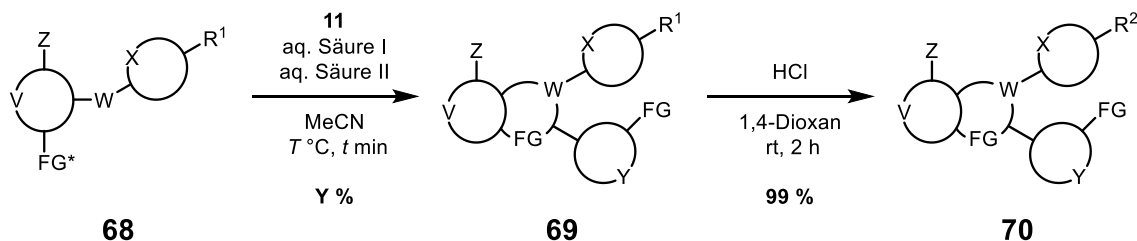
**Abbildung 58** Allgemeine Darstellung der Synthese des Präkursors **70**. a) Nucleophile aromatische Substitution (S<sub>N</sub>Ar) b) Transformation der funktionellen Gruppe c) Intermolekularer Ringschluss d) Entschützung. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; FG\*: Transformierte funktionelle Gruppe; LG: Nucleofug; W: Nucleophil; Z: Halogen; R<sup>1</sup>: Geschützte bifunktionelle Gruppe; R<sup>2</sup>: Bifunktionelle Gruppe).

Im initialen Schritt wurde das kommerziell verfügbare Elektrophil **7** mit dem bifunktionalen Nucleophil **66** in einer nucleophilen aromatischen Substitutionsreaktion zum Intermediat **67** umgesetzt (Abb. 59). Die etablierten Reaktionsbedingungen zur Synthese der westlichen Molekülteile wurden übernommen (siehe Abb. 17) und an die verwendeten Ausgangsmaterialien angepasst, wodurch vergleichbar gute Ausbeuten erzielt werden konnten. Die anschließende Transformation der funktionellen Gruppe durch Reduktion konnte ebenfalls mit adaptierten Bedingungen der zuvor etablierten Synthese dargestellt werden (siehe Abb. 18) und führte in quantitativer Ausbeute zum Intermediat **68** ohne die bifunktionelle Gruppe im östlichen Molekülteil zu beeinträchtigen (Abb. 59).



**Abbildung 59** Syntheschema zur Darstellung des Intermediates **68** durch nucleophile aromatische Substitution des Elektrophils **7** mit dem bifunktionalen Nucleophil **66** und Reduktion von **67**. (V, X im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; FG: Funktionelle Gruppe; LG: Nucleofug; W: Nucleophil; Z: Halogen; FG\*: Transformierte funktionelle Gruppe; R<sup>1</sup>: Geschützte bifunktionelle Gruppe).

Die anspruchsvolle Zyklisierungsreaktion zur Bildung des Kerngerüsts **69** stellte auch bei dieser Synthesepanung den entscheidenden Schritt dar (Abb. 60). Die zuvor erarbeiteten Reaktionsbedingungen zur Synthese des Intermediats **12** (siehe Tabelle 1) führten zur Zersetzung der eingesetzten Ausgangsmaterialien, sodass dieser Syntheseschritt weitere Optimierungen erforderte (Tabelle 8).



**Abbildung 60** Syntheschema zur Darstellung des Präkursors **70** durch intermolekulare Zyklisierung zwischen **68** und **11** sowie Entschützung von **69**. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalicyclus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen; FG\*: Transformierte funktionelle Gruppe; R<sup>1</sup>: Geschützte bifunktionelle Gruppe; R<sup>2</sup>: Bifunktionelle Gruppe).

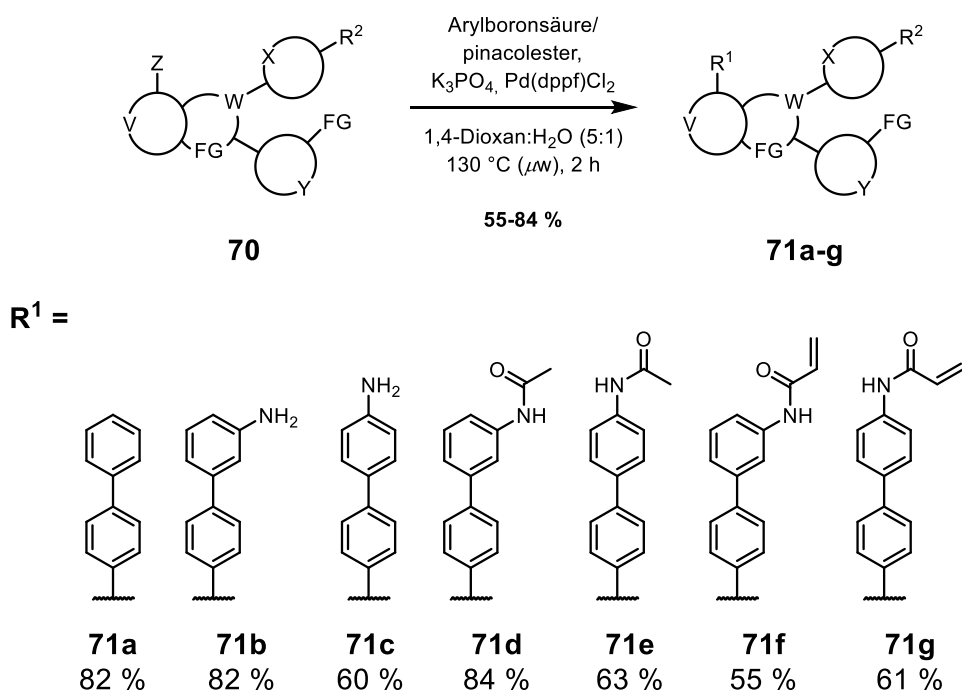
**Tabelle 8** Übersicht der getesteten Reaktionsbedingungen zur Darstellung von **69** (s. Abb. 60).

Eintrag	Temperatur	Zeit	Umsatz [%]* /
	T [°C]	t [min]	Ausbeute Y [%]
I	150 ( $\mu W$ )	20	100 <sup>A</sup> / 6
II	150 ( $\mu W$ )	10	100 <sup>A</sup> / 7
III	150 ( $\mu W$ )	1	15 <sup>A</sup> / 0
IV	140 ( $\mu W$ )	8	100 <sup>A</sup> / 0
V	140 ( $\mu W$ )	5	65 <sup>A</sup> / 0
VI	140 ( $\mu W$ )	3	45 <sup>A</sup> / 0
VII	130 ( $\mu W$ )	10	100 <sup>A,*</sup> / 11
VIII	130 ( $\mu W$ )	8	90 <sup>A,*</sup> / 9
IX	130 ( $\mu W$ )	5	75 <sup>A,*</sup> / 0
X	120 ( $\mu W$ )	8	85 <sup>*</sup> / 8
XI	120 ( $\mu W$ )	5	30 <sup>*</sup> / 0
XII	120 ( $\mu W$ )	3	5 <sup>*</sup> / 0
XIII	110 ( $\mu W$ )	15	95 <sup>*</sup> / 0
XIV	110 ( $\mu W$ )	10	80 <sup>*</sup> / 0
XV	100 ( $\mu W$ )	10	75 <sup>*</sup> / 0
XVI	60	120	< 5 <sup>*</sup> / 0
XVII	60	1440	60 <sup>*</sup> / 42

\*Bestimmung mittels LC-MS; <sup>A</sup>Bildung von Nebenprodukten; \*Intermediatbildung

Die zuvor etablierte, mikrowellen-gestützte Synthese führte in diesem Fall zur Bildung von Nebenprodukten oder stagnierte auf der Stufe eines isolierbaren Intermediates.

Fünf der 15 mikrowellen-gestützten Zyklisierungsreaktionen führten zur Isolierung des gewünschten Produkts mit Ausbeuten zwischen 7 und 11 %. Die Reaktion im Heizblock führte nach 24 h zu einem Reaktionsumsatz von 60 %, so dass eine Ausbeute von 42 % erzielt werden konnte. Da die Reaktion zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig abgeschlossen war, ist davon auszugehen, dass die Ausbeuten durch eine Verlängerung der Reaktionszeit weiter gesteigert werden könnten, da ein großer Teil des Umsatzes als isolierbares Intermediat identifiziert wurde. Nach der abschließenden Entschützungsreaktion wurde **70** nach der Aufreinigung durch Umkehrphasenchromatographie als TFA-Salz in quantitativen Ausbeuten erhalten. Die Synthese des ersten CyPHi-Grundgerüsts **63** erforderte sieben Syntheseschritte und führte zu einer Gesamtausbeute von 18,5 %. Im Gegensatz dazu betrug die Syntheseeffizienz des neu konzipierten Derivats **70** 30 % über vier Schritte. Neben der gesteigerten Ausbeute konnte somit auch eine verkürzte Syntheseroute etabliert werden, die es ermöglichte, ausreichend Ausgangsmaterial für die finalen Suzuki-Kreuzkopplungsreaktionen zur Bibliothekssynthese zu generieren (Abb. 61).



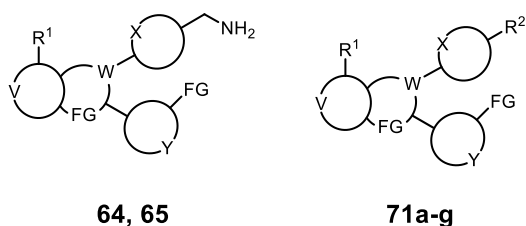
**Abbildung 61** Syntheschema zur Darstellung der CyPHi-Serie **71a-d** durch Suzuki-Kreuzkopplungsreaktionen mit den zuvor dargestellten Boronsäuren und Boronsäure-Pinakolestern. Die Ausbeuten der einzelnen Reaktionen sind als prozentuale Angaben unter den Derivaten annotiert. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen; R<sup>2</sup>: Bifunktionelle Gruppe).

Die sieben Derivate, die sich durch einen Biphenyl-Linker auszeichnen, konnten in Ausbeuten von 55-84 % isoliert werden. Insgesamt wurden für die CyPHi-Serie neun Derivate entworfen und synthetisiert, von denen drei ein Elektrophil in Form eines Acrylamids tragen und somit potentielle CAAs darstellen.

### 3.9 *in vitro* Charakterisierung neuartiger CAAs zur Adressierung alternativer Cysteine

Um einen umfassenden Einblick in die SAR der neuen Inhibitoren zu erhalten, wurden IC<sub>50</sub>-Werte gegen alle drei Akt-Isoformen mittels HTRF-Assay bestimmt. Des Weiteren erfolgte die Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte mittels CTG-Assay mit der zuvor verwendeten Brustkrebszelllinie (ZR-75-1, PTEN<sup>L108R</sup>), um die antiproliferative Wirksamkeit zu evaluieren (Tabelle 9).

**Tabelle 9** Biochemische- und zelluläre Evaluation der CyPHi-Serie.



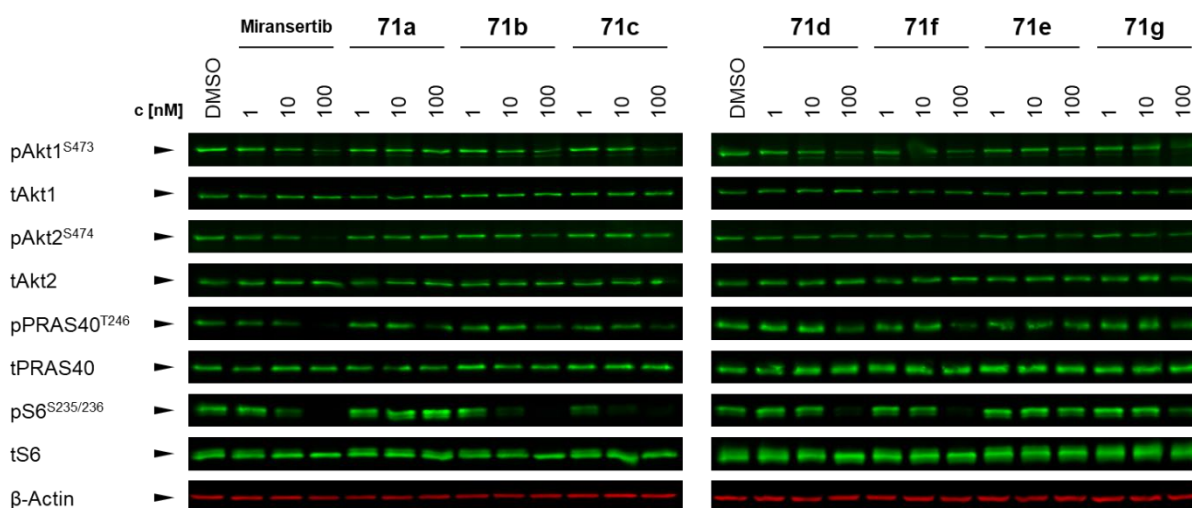
#	R <sup>1</sup>	Akt1	Akt2	Akt3	ZR-75-1	GSH
		IC <sub>50</sub> [nM]	IC <sub>50</sub> [nM]	IC <sub>50</sub> [nM]	EC <sub>50</sub> [nM]	t <sub>1/2</sub> [min]
46a	-	4,5 ± 0,2	226 ± 79	1109 ± 294	7,9 ± 1,6	
47a	-	1,0 ± 0,1	4,0 ± 0,5	65 ± 29	1,2 ± 0,3	
64		9.3 ± 1.7	373 ± 16	> 20000	338 ± 84	n.d.
65		54 ± 16	903 ± 37	6849 ± 409	400 ± 102	110*
71a		11 ± 1	368 ± 9	6324 ± 1255	1918 ± 288	n.d.
71b		1.2 ± 0.2	51 ± 5	606 ± 8	186 ± 24	n.d.
71c		1.8 ± 0.1	46 ± 2	710 ± 7	230 ± 62	n.d.
71d		11 ± 2	64 ± 26	2024 ± 164	166 ± 28	n.d.
71e		89 ± 8	203 ± 99	4893 ± 480	660 ± 40	n.d.
71f		5.0 ± 1.0	20 ± 2	382 ± 179	18 ± 3	179*
71g		20 ± 1	29 ± 4	193 ± 48	24 ± 15	107*

\*Einfachmessung; n.d.: Nicht bestimmt; R<sup>2</sup>: Bifunktionelle Gruppe; HTRF-Assay durchgeführt von Dr. L. Quambusch, CTG-Assay durchgeführt von Dr. J. Weisner

In einer vergleichenden Analyse wurden die neuen Akt-Inhibitoren mit dem CAAI der nächsten Generation **46a**, der eine höhere Selektivität für Akt1 als für Akt2 und Akt3 aufweist, und seinem weiterentwickelten Derivat **47a**, einem hochwirksamen Akt1/2-Inhibitor mit geringer Selektivität für Akt3, verglichen. Der östliche Molekülteil der CAAIs scheint einen besonderen Einfluss auf die korrekte Ausrichtung der Moleküle zu haben und dient durch die Acrylamidsubstitution auch als kovalenter Anker. Die Bestimmung der kinetischen Parameter könnte in Zukunft zur Aufklärung dieser Frage beitragen. Die kovalente Bindung von **46a** und **47a** führt hier zu einer 10- bis 300-fachen Aktivitätssteigerung gegenüber allen Akt-Isoformen im Vergleich zur reversiblen Referenzverbindung **64**. Dieser Trend lässt sich auf das zelluläre ZR-75-1 System übertragen und verdeutlicht ein weiteres Mal die Überlegenheit der kovalenten Inhibition von Akt. Die Biphenylverbindung **71a** zeigt ein ähnliches Profil wie **64** und weist ebenfalls einen signifikanten Wirkungsverlust sowohl auf biochemischer als auch auf zellulärer Ebene im Vergleich zu den CAAIs auf. Durch die Einführung polarer Substituenten in Form der Anilinderivate **71b** und **71c** konnte eine bis zu 10-fache Aktivitätssteigerung auf allen Akt-Isoformen und im zellulären System beobachtet werden im Vergleich zu **71a**. Die Acetylierung der Aniline (**71d** und **71e**) scheint sich sowohl auf biochemischer als auch auf zellulärer Ebene negativ auszuwirken, sodass bis zu 50-fache Aktivitätsverluste beobachtet werden können, wobei der Verlust bei der *para*-substituierten Verbindung **71e** wesentlich stärker ausgeprägt ist. Möglicherweise kommt es auch hier zu sterischen Hinderungen zwischen den Liganden und der PH-Domäne, die bereits während der Strukturanalyse für die *para*-substituierten Moleküle der ersten Generation von CAAIs beschrieben wurden (vgl. Abb. 34). Die acetylierten Derivate dienen als reversible Gegenstücke zu den potentiell kovalenten Akt-Inhibitoren **71f** und **71g**. Der Vergleich zeigt eine signifikante Steigerung der Potenz gegenüber allen Akt-Isoformen, die sich auch auf das zelluläre System überträgt und in EC<sub>50</sub>-Werten im unteren nanomolaren Bereich resultiert. Die bifunktionelle Substitution von **71f** führt zu einer mehr als 20-fachen Steigerung der zellulären Potenz im Vergleich zu seinem Analogon **65**, was mit den IC<sub>50</sub>-Werten für Akt1 korreliert. Die erhöhte Aktivität von **71f** und **71g** im Vergleich zu ihren reversiblen Gegenstücken (**71d** und **71e**) deutet somit auf eine kovalente Bindung an Akt hin. Abschließend wurde die Reaktivität der Acrylamid-tragenden Verbindungen **65**, **71f** und **71g** in Gegenwart von GSH untersucht, um die Halbwertszeiten der Verbindungen zu ermitteln (Tabelle. 9). Für **65** und **71g** wurden Halbwertszeiten von etwa 110 min bestimmt, während **71f** eine um 70 Minuten längere Halbwertszeit aufwies.

Da alle Verbindungen mit einem einheitlichen Acrylamid-*warhead* ausgerüstet sind, lassen sich die Unterschiede in der Reaktivität ausschließlich durch intra- oder intermolekulare Wechselwirkungen erklären, die spezifisch für jeden Liganden sind. Wie bereits zuvor erwähnt, existieren für kovalente Inhibitoren keine in der Literatur beschriebenen Richtwerte. Allerdings werden übermäßig reaktive Elektrophile schnell eliminiert oder bilden unspezifische Addukte. Die Halbwertszeit der untersuchten Verbindungen liegt jedoch im Rahmen für literaturbeschriebene und bereits zugelassene kovalente Inhibitoren und ist daher als wahrscheinlich unbedenklich einzustufen.<sup>252</sup>

Um ein besseres Verständnis der Akt-regulierten Prozesse in ZR-75-1 Zellen nach Behandlung mit den neuen Akt-Inhibitoren zu erhalten, wurde eine vergleichende *in vitro* Western-Blot-Analyse mit einer Auswahl der vielversprechendsten kovalenten Inhibitoren **71f** und **71g**, deren reversiblen Gegenstücke **71d** und **71e**, den Vorläufern **71a-c** und dem allosterischen Akt-Inhibitor Miransertib durchgeführt (Abb. 62).

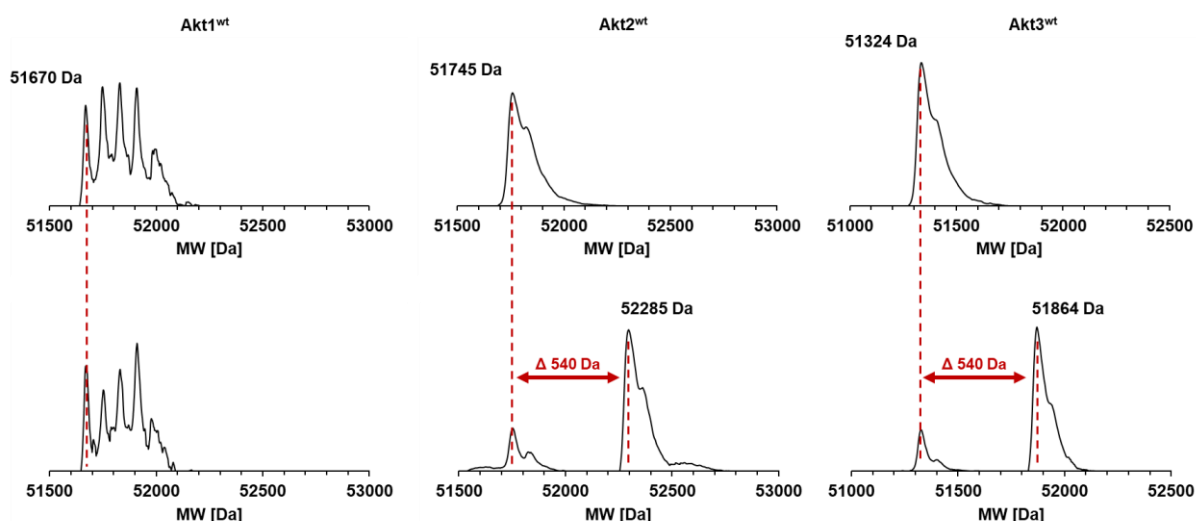


**Abbildung 62** Vergleichende Western-Blot-Analyse der CyPHi-Serie und der allosterischen Referenzverbindung Miransertib. Die Western-Blot-Analyse wurde mit ZR-75-1 Brustkrebszellen durchgeführt, die für 2 h mit den annotierten Konzentrationen der Akt-Inhibitoren behandelt wurden. Die Analyse offenbarte die Reduktion von pAkt1<sup>S473</sup> und pAkt2<sup>S474</sup> sowie den Akt-nachgeschalteten Substraten pPRAS40<sup>T246</sup> und pS6<sup>S235/S236</sup>. (Western-Blot-Analyse durchgeführt von Dr. J. Weisner).

Die Studie zeigte eine Konzentrationsabhängige Reduktion von pAkt1<sup>S473</sup> und pAkt2<sup>S474</sup> nach 2-stündiger Behandlung mit den Inhibitoren, wobei die beobachtete Wirkung bei **71e**, **71g** und der Referenzverbindung am stärksten ausgeprägt war, was mit den entsprechenden biochemischen und zellulären IC<sub>50</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werten korreliert. Neben der Reduktion von pAkt1/2 wird auch die Phosphorylierung der Akt-nachgeschalteten Substrate pPRAS40<sup>T246</sup> und pS6<sup>S235/S236</sup> unterdrückt, was die zelluläre Wirksamkeit der kovalenten Verbindungen der CyPHi-Serie verdeutlicht.

### 3.10 Strukturanalyse neuartiger CAAIs zur Adressierung alternativer Cysteine

Zum Nachweis der kovalenten Bindung wurden weitere Proteinmassenspektrometrische Experimente mit Akt1, Akt2 und Akt3 und dem kovalenten Inhibitor **65** durchgeführt, um die kovalente Modifikation der Isoformen zu verifizieren (Abb. 63).

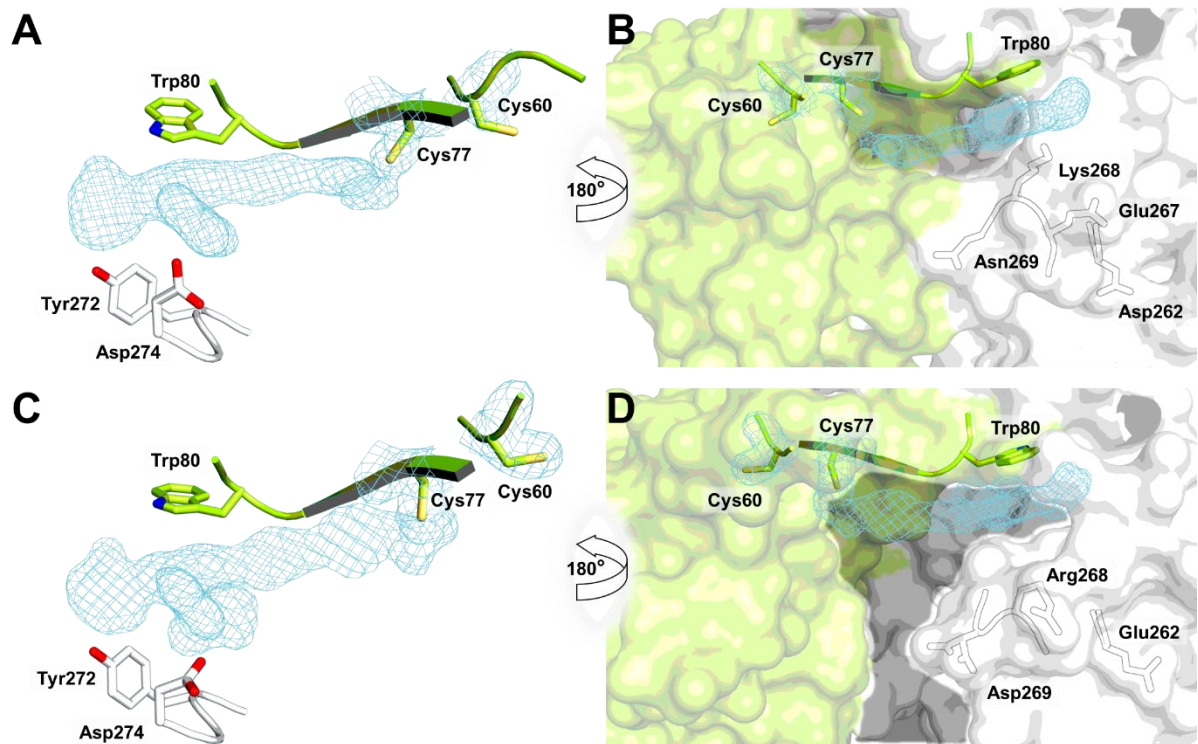


**Abbildung 63** Dekonvolvierte Massenspektren von Akt1<sup>wt</sup>, Akt2<sup>wt</sup> und Akt3<sup>wt</sup> nach einstündiger Inkubation mit **65** bei 4°C zeigen eine Massenverschiebung (dargestellt als  $\Delta$ -Wert der relativen Molekülmasse), die der relativen Molekülmasse des Proteins addiert mit der relativen Masse der getesteten Verbindung entspricht.

Wie zuvor beschrieben konnte nach einstündiger Inkubationszeit keine kovalente Bindung des Liganden an Akt1 beobachtet werden. Erstaunlicherweise zeigte sich für Akt2 und Akt3 bereits nach einer Stunde Inkubationszeit eine nahezu vollständige Alkylierung mit der verwendeten Verbindung. Um den konzipierten Bindungsmodus der neuartigen Inhibitoren sowie die kovalente Modifikation der Cysteine in der PH-Domäne zu evaluieren, wurden co-Kristallisationsexperimente mit Akt1<sup>wt</sup> und einem künstlich erzeugten Konstrukt von Akt1 (Akt1<sup>S205T/D262E/E267del/K268R/N269D</sup>, Konstrukt von Dr. L. Depta)<sup>267</sup>, welches die allosterische Bindungstasche von Akt2 darstellt, durchgeführt (Abb. 64, Abb. A4).

Die Kristallstrukturen der Komplexe zeigen einen Bindungsmodus des substituierten westlichen Kerngerüsts, der mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen für die CAAIs übereinstimmt und bestätigt, dass jeder Ligand Akt in einem inaktiven (PH-*in*) Zustand stabilisiert. In allen drei neuen Komplexstrukturen sind die entscheidenden  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkungen mit der Seitenkette von Trp80 und Tyr272 zu beobachten. Die neuen Inhibitoren **65** (Abb. 64A) und **71g** (Abb. 64C) zeigen eindeutig die kovalente Alkylierung von Cys77 in der PH-Domäne von Akt.





**Abbildung 64** Co-Kristallstrukturen von Akt im Komplex mit neuartigen CyPHi-Liganden. Die Aminosäuren und Sekundärstrukturen der PH-Domäne sind in Grün, die der Kinasedomäne in Weiß dargestellt. Die  $2F_o-F_c$ -Karten sind mit  $\sigma = 1$  konturiert. **A** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **65** (Unveröffentlichte Struktur gelöst von Dr. L. Depta). Die kovalente Bindung an Cys77 ist vollständig aufgelöst, was den antizipierten, kovalent-allosterischen Bindungsmodus bestätigt. **B** Die Visualisierung der Proteinoberfläche von Akt1 zeigt die allosterische Bindungstasche um  $180^\circ$  gedreht im Vergleich zu Abb. 3A und hebt die Lösemittel-exponierte Öffnung hervor. **C** Co-Kristallstruktur des Akt2-Mimikrykonstrukts (Akt1<sup>S205T/D262E/E267del/K268R/N269D</sup>) im Komplex mit **71g** (Unveröffentlichte Struktur gelöst von Dr. J. Niggenaber). Die kovalente Bindung an Cys77 ist vollständig aufgelöst, was den antizipierten, kovalent-allosterischen Bindungsmodus bestätigt. **D** Die Visualisierung der Proteinoberfläche des Akt2-Mimikrykonstrukts (Akt1<sup>S205T/D262E/E267del/K268R/N269D</sup>) zeigt die allosterische Bindungstasche im Vergleich zu Abb. 3C um  $180^\circ$  gedreht, wodurch die lösungsmittel-exponierte Öffnung hervorgehoben wird. Hier bewirkt die Deletion von Glu267 eine Verkürzung der  $\alpha$ E-Helix (aus Übersichtsgründen nicht dargestellt), was zu einer Absenkung des Rückgrats und zu einer Vergrößerung der lösungsmittel-exponierten Öffnung aufgrund der Verschiebung der gesamten PH-Domäne führt.

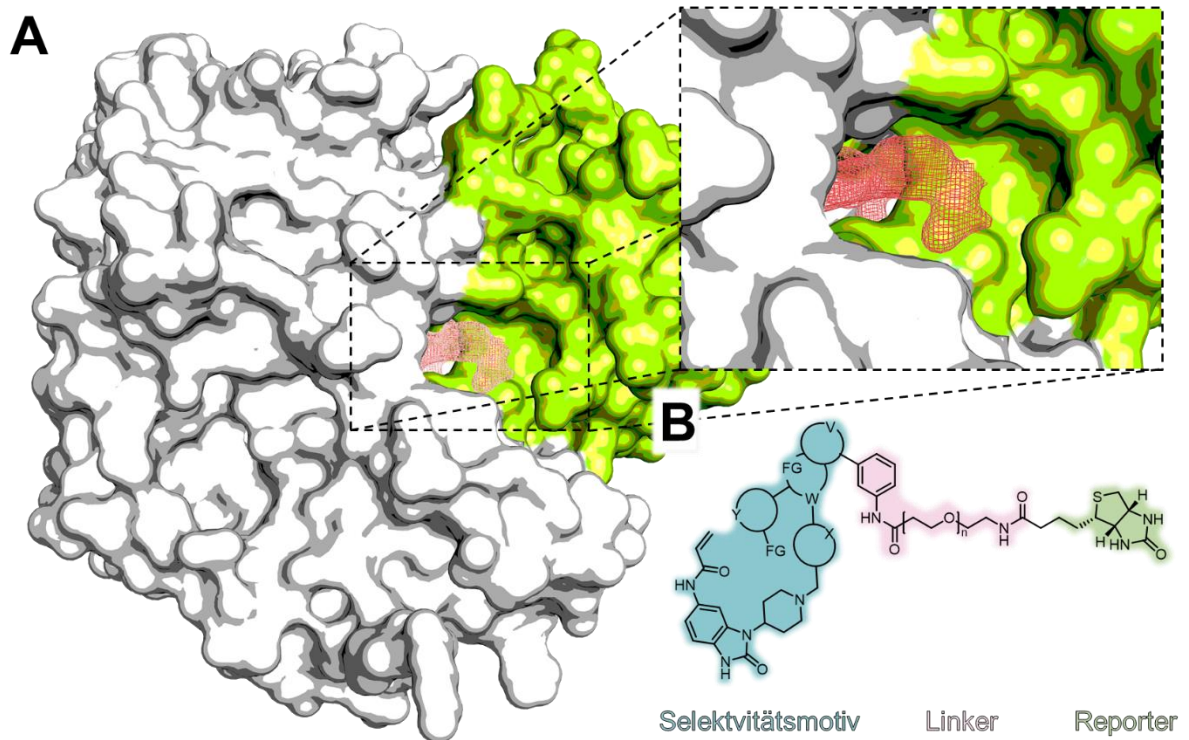
Für Inhibitor **71f** konnte die kovalente Bindung jedoch nicht vollständig aufgelöst werden (Abb. A4). Die Kristallstruktur zeigt eine teilweise oxidierte (geschlossene) und teilweise reduzierte (offene) Form der Disulfidbrücke, die aus der Elektronendichte hervorgeht. Die kurze Inkubationszeit des Liganden mit dem Protein erklärt möglicherweise, warum die Alkylierung des Proteins hier nicht beobachtet werden konnte. Im Vergleich zu **65** zeigten **71f** und **71g**, die eine bifunktionelle Gruppe im östlichen Teil des Moleküls enthalten, eine höhere biochemische Wirksamkeit gegenüber allen Akt-Isoformen. Der apolare Teil der bifunktionellen Gruppe befindet sich in unmittelbarer Nähe von Ile84 und steht somit in hydrophober Wechselwirkung mit der Aminosäureseitenkette, wodurch der polare Teil der bifunktionellen Gruppe auf die Seitenkette von Asp274 ausgerichtet wird und Wasserstoffbrückenbindungen und/oder Salzbrücken bildet.

Darüber hinaus gehen **65** und **71g** über den Carbonylsauerstoff des Acrylamids eine stabilisierende H-Brücke mit der Seitenkette von Gln79 ein, während der *warhead* von **71f** durch WW mit der Seitenkette von Asn53 stabilisiert wird. Erst kürzlich wurde die erste Protein Co-Kristallstruktur von Akt2 veröffentlicht, die ein Derivat des allosterischen Inhibitors VAD-044 zeigt, der an der Schnittstelle zwischen der Kinase und der PH-Domäne bindet.<sup>208</sup> Die erfolgreiche Strukturaufklärung von **71g** in dem Akt2-Mimikrykonstrukt stellt eine attraktive Alternative für die Bewertung der strukturellen Aspekte der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren dar (Abb. 64 C und 64 D). Es zeigte sich, dass die Deletion von Glu267 zu einer Verkürzung der  $\alpha$ E-Helix führt, wodurch das Proteinerückgrat abgesenkt und der Lösungsmittel-exponierte Bereich durch die Verschiebung der PH-Domäne vergrößert wird (vgl. Abb. 64 B und D). Homologiemodelle, die in der AG Rauh angefertigt wurden zeigten dieses Phänomen auch für Akt3. Diese Beobachtungen könnten eine Erklärung dafür sein, warum CyPHi-Verbindungen in massenspektrometrischen Experimenten Akt2 und Akt3 innerhalb von einer Stunde nahezu vollständig alkylieren, während die kovalente Bindung an Akt1 wesentlich länger dauert und somit nicht nachweisbar war. Zukünftig geplante Strukturaufklärungen von Akt2 und Akt3 im Komplex mit diesen Inhibitoren sollen diese Hypothese überprüfen. Die Strukturaufklärung bestätigte den antizipierten Bindungsmodus der neu entwickelten CyPHi-Liganden. Zudem ermöglichte das Akt2-Mimikrykonstrukt einen bisher unbekanntem Einblick in die adaptierte allosterische Interdomänenbindungstasche von Akt2 und vertiefte das Verständnis darüber, wie kovalent-allosterische Liganden an Akt2 binden. Dieses vielversprechende Modell bietet einen enormen Vorteil im SBDD, wenn es darum geht verbesserte und hochselektive CAAIs zu entwickeln, die einen Isoform-spezifischen Charakter aufweisen.

Mit dieser *proof-of-concept*-Studie konnte gezeigt werden, dass die kovalente Adressierung von Akt jenseits der Aktivierungsschleife realisierbar ist. Sie unterstreicht das enorme Potential der kovalenten Adressierung von Akt für die zielgerichtete Therapie und eröffnet neue Wege für therapeutische Interventionen bei Erkrankungen, die mit einer Hyperaktivierung von Akt assoziiert sind. Darüber hinaus bieten sich die neu entwickelten Liganden als chemisch-biologische Werkzeuge an, um die genaue Rolle der Cysteine in der PH-Domäne der Akt-Isoformen zu studieren. Zukünftig könnten dazu neue Verbindungen dargestellt werden, die ausschließlich Cys60 der PH-Domäne adressieren, um subtile Unterschiede in der spezifischen Alkylierung der einzelnen Cysteine in Akt zu analysieren. Diese gezielte Untersuchung könnte wichtige Einblicke in die differenzielle Regulation der Aktivität von Akt durch Redoxmechanismen bieten, die für jede Isoform spezifisch sein könnten.

### 3.11 Design und Synthese von chemischen Sonden zur Adressierung von Akt

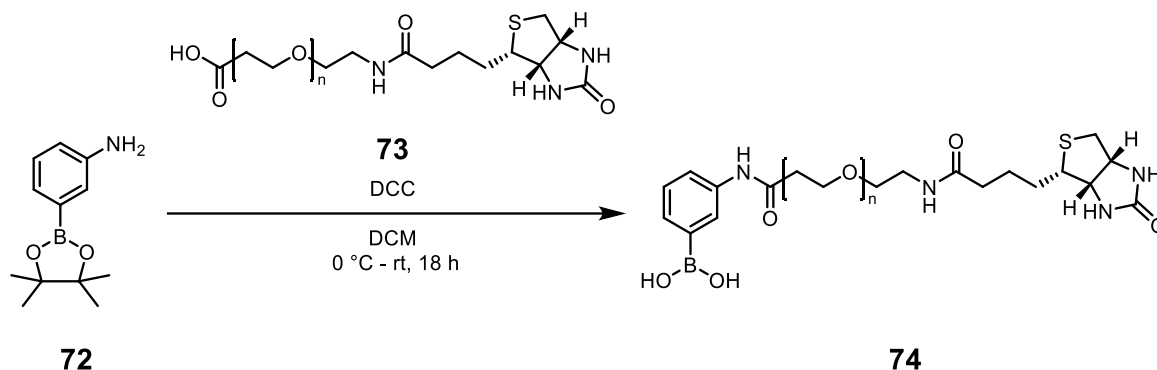
Die Strukturanalyse der ersten und zweiten Generation neuartiger CAAIs offenbarte eine Lösungsmittlexponierte Stelle zwischen der Kinase- und der PH-Domäne, aus der vor allem die *meta*-substituierten Derivate herausragen (Abb. 65 A).



**Abbildung 65** Struktur-basiertes Design chemischer Sonden zur Adressierung von Akt (Kinasedomäne dargestellt in Weiß, PH-Domäne dargestellt in Grün). **A** Die Strukturanalyse der CAAIs der ersten und zweiten Generation offenbarten eine Lösungsmittlexponierte Stelle, aus der die *meta*-substituierten Derivate herausragen (Dargestellt als rotes Gitternetz). **B** Auf dieser Basis wurden Sondenmoleküle entwickelt, die aus einem zuvor dargestellten Selektivitätsmotiv einschließlich des reaktiven *warhead* (blau), einem Linker bestehend aus einer Polyethylenglykolkette (rosa) und einem Reporter in Form von Biotin (grün) bestehen.

Auf dieser Grundlage wurden Sondenmoleküle entworfen, die aus den zuvor dargestellten Selektivitätsmotiven inklusive des reaktiven *warhead*, einem Linker bestehend aus einer Polyethylenglykolkette und einer Reportereinheit in Form von Biotin bestehen (Abb. 65 B). Eine chemische Sonde ist ein selektiver niedermolekularer Modulator der Funktion eines Proteins, der es dem Anwender ermöglicht, mechanistische und phänotypische Fragen zu seinem molekularen Ziel in biochemischen, zellbasierten oder Tier-Studien zu stellen.<sup>268</sup> Mit diesen Sonden sollte die Frage nach der Korrelation zwischen der Zielbesetzung von Akt durch CAAIs und den beobachteten PD-Effekten geklärt werden. Dazu sollten zunächst geeignete biotinylierte Sonden dargestellt und auf zellulärer Ebene mittels Western-Blot-Analysen evaluiert werden.

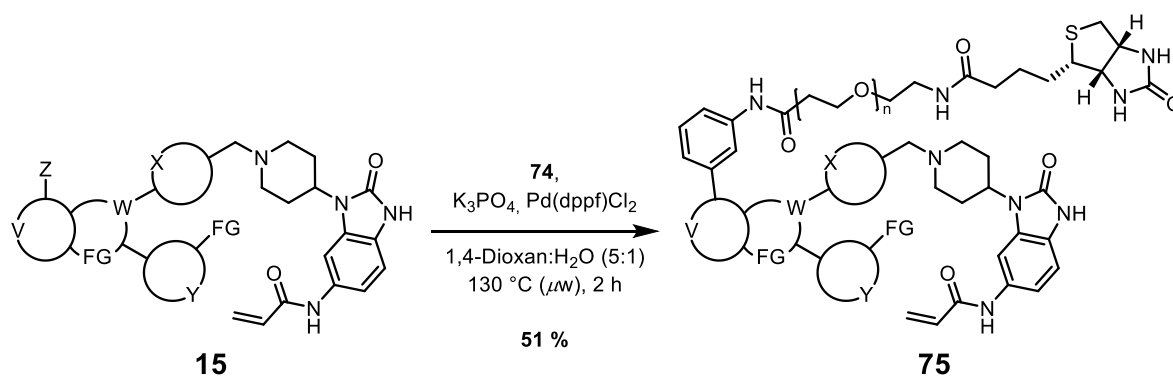
Um das Selektivitätsmotiv mit dem Linker und der Reportergruppe zu verknüpfen, wurde der kommerziell verfügbare Boronsäure-Pinakolester **72** in einer konventionellen Amidsynthese mit dem pegylierten Biotinamid **73** zur Boronsäure **74** umgesetzt (Abb. 66).



**Abbildung 66** Syntheschema zur Darstellung der Boronsäure **74** durch konventionelle Amidsynthese.

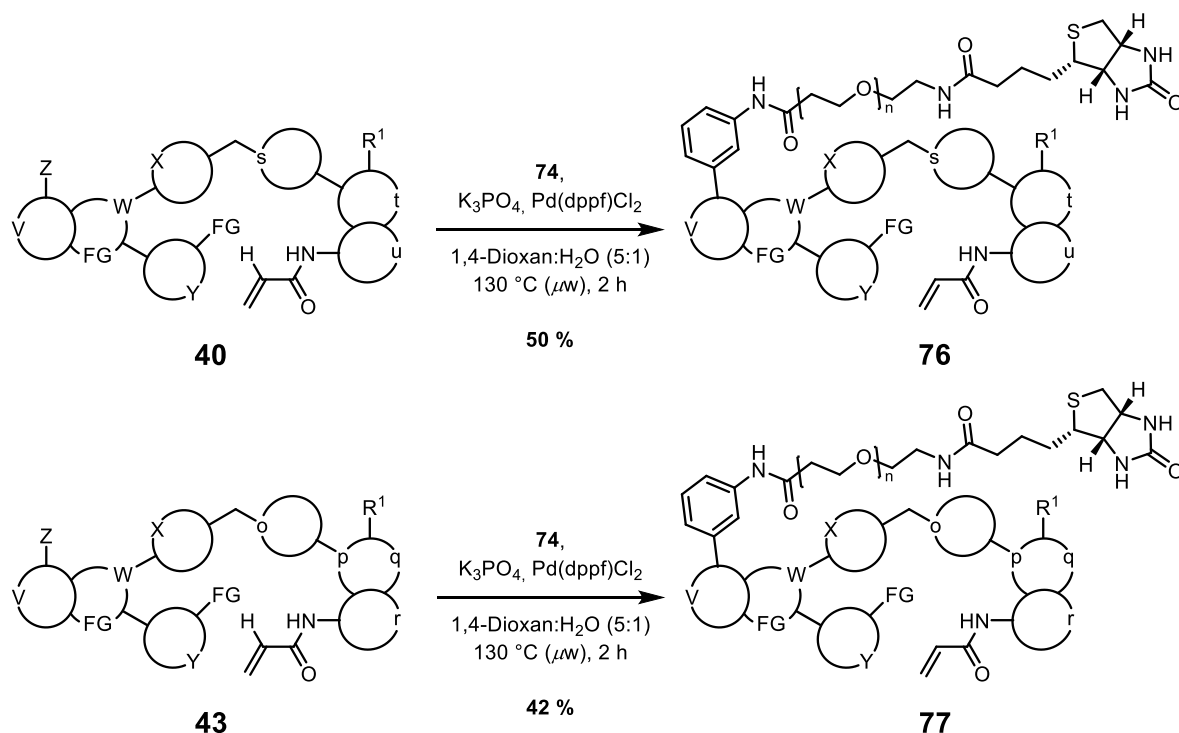
Während der wässrigen Aufarbeitung zersetzte sich der Boronsäure-Pinakolester zur entsprechenden Boronsäure, weshalb auf eine säulenchromatographische Aufreinigung verzichtet wurde. In den nachfolgenden Syntheseschritten wurde ausschließlich das Rohprodukt von **74** verwendet, welches als gelb-kristalliner Feststoff isoliert werden konnte.

Die zuvor etablierten Bedingungen für die Pd-katalysierten Suzuki-Kreuzkupplung wurden ohne weitere Reaktionsoptimierung verwendet, um die neu dargestellte Boronsäure zusammen mit dem Vorläufer-CAAI **15** in die chemische Sonde **75** zu überführen (Abb. 67).



**Abbildung 67** Syntheschema zur Darstellung des Sondenmoleküls **75** durch Pd-katalysierte Suzuki-Kreuzkupplung. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalicyclus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen).

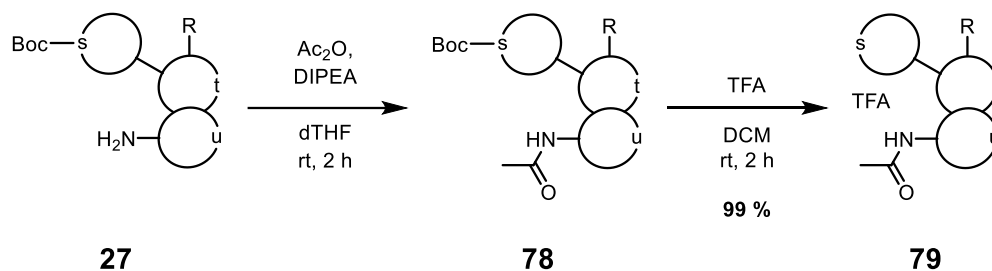
Mit einer akzeptablen Ausbeute von 51 % konnten ausreichende Mengen der chemischen Sonde für die nachfolgende *in vitro* Evaluierung bereitgestellt werden. Zusätzlich wurden auch die Vorläufer CAAs **40** und **43** mit der neu dargestellten Boronsäure **74** gekoppelt (Abb. 68), um ein Set an Sonden zu generieren, die hinsichtlich ihrer zellulären Effektivität verglichen werden sollen.



**Abbildung 68** Syntheschema zur Darstellung der Sondenmoleküle **76** und **77** durch Pd-katalysierte Suzuki-Kreuzkupplung. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen; o, p, q, r, s, t, u im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalzyklus; R<sup>1</sup>: Organylgruppe).

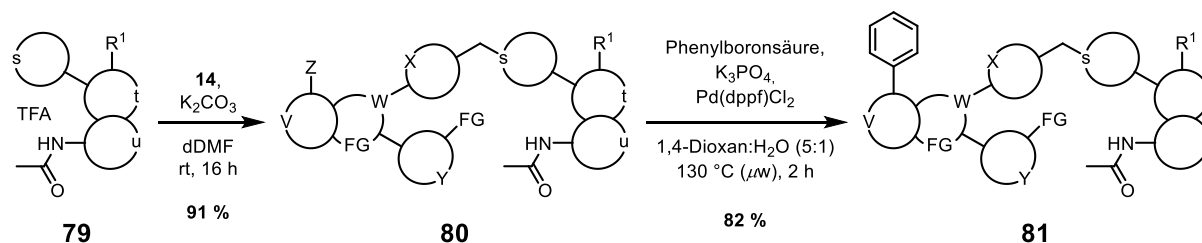
Die Darstellung der Derivate **76** und **77** erfolgte ebenfalls mit lediglich akzeptablen Ausbeuten von 50 % bzw. 42 %, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass die Boronsäure **74** einen geringen Reinheitsgrad aufwies oder die Komplexität der für die Kupplung verwendeten Ausgangsmaterialien die Ausbeuten reduzierte.

Des Weiteren sollte ein reversibles Gegenstück zum *fronrunner* CAAI **47a** dargestellt werden, das eine eindeutige Differenzierung des kovalenten Wirkmechanismus in den anstehenden *target occupancy* Assays ermöglicht. Dazu wurde die Amin-Vorstufe **27** in einer konventionellen Acetylierungsreaktion mit Essigsäureanhydrid zum entsprechenden Acetamid **78** umgesetzt. Die anschließende Boc-Entschützung führte zum östlichen Molekülbaustein **79** in quantitativen Ausbeuten (Abb. 69).



**Abbildung 69** Syntheschema zur Darstellung des östlichen Molekülbausteins **79** durch Acetylierung von **27** und Entschützung von **78**. (s, t, u im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalzyklus; R<sup>1</sup>: Organylgruppe).

Der östliche Molekülbaustein **79** wurde schließlich in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit dem westlichen Molekülbaustein **14** verwendet, um das Intermediat **80** mit einer Ausbeute von 91 % darzustellen (Abb. 70).



**Abbildung 70** Syntheschema zur Darstellung des reversiblen Akt-Inhibitors **81** durch  $S_N2$ -Reaktion zwischen dem östlichen Molekülbaustein **79** und dem westlichen Molekülbaustein **14**, gefolgt von einer Pd-katalysierten Suzuki-Kreuzkupplungsreaktion von **80** mit Phenylboronsäure. (V, X, Y im Zyklus: Aromat / Heteroaromat; W im Zyklus: Heteroaromat / Heteroalzyklus; FG: Funktionelle Gruppe; Z: Halogen; s, t, u im Zyklus: Aromat / Heteroaromat / Heteroalzyklus; R<sup>1</sup>: Organylgruppe).

Die halogenierte Vorstufe **80** wurde schließlich in einer Pd-katalysierten Suzuki-Kreuzkupplungsreaktion mit Phenylboronsäure zum reversiblen Gegenstück **81** umgesetzt.

Insgesamt wurden in diesem Teilprojekt drei potentielle Sondenmoleküle für die Proteinkinase Akt dargestellt, die sich hinsichtlich ihrer östlichen Molekülteile unterscheiden. In der nachfolgenden *in vitro* Charakterisierung sollte zunächst die Funktion der Sonden durch Western-Blot-Analysen validiert werden, bevor sie in *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA)-basierten *target occupancy* Assays eingesetzt werden.

### 3.12 *in vitro* Charakterisierung von chemischen Sonden zur Adressierung von Akt

Zur Bewertung der Wirksamkeit der Sonden wurden die IC<sub>50</sub>-Werte gegen die drei Akt-Isoformen mittels HTRF-Assay bestimmt. Zusätzlich wurde die Effektivität der Sonden in zellbasierten Experimenten durch Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte gegen die Brustkrebszelllinie ZR-75-1 bewertet (Tabelle 10).

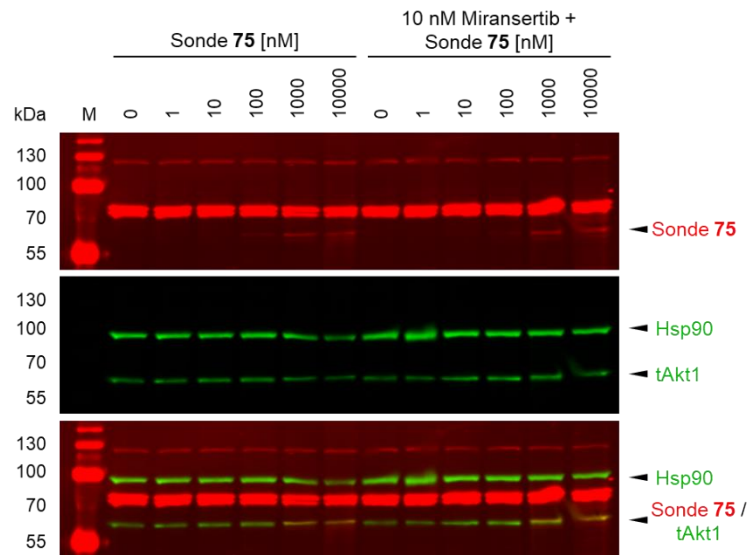
**Tabelle 10** Biochemische- und zelluläre Evaluation der chemischen Sonden zur Adressierung von Akt.

#	Akt1 <sup>wt</sup> IC <sub>50</sub> [nM]	Akt2 <sup>wt</sup> IC <sub>50</sub> [nM]	Akt3 <sup>wt</sup> IC <sub>50</sub> [nM]	ZR-75-1 EC <sub>50</sub> [nM]
<b>75</b>	2,0 ± 0,3	26 ± 12	206 ± 47	140 ± 55
<b>76</b>	1,3 ± 0,4	21 ± 6	119 ± 8	33 ± 18
<b>77</b>	2,2 ± 0,6	29 ± 1	165 ± 10	58 ± 31

HTRF-Assay durchgeführt von Dr. L. Quambusch, CTG-Assay durchgeführt von Dr. J. Weisner.

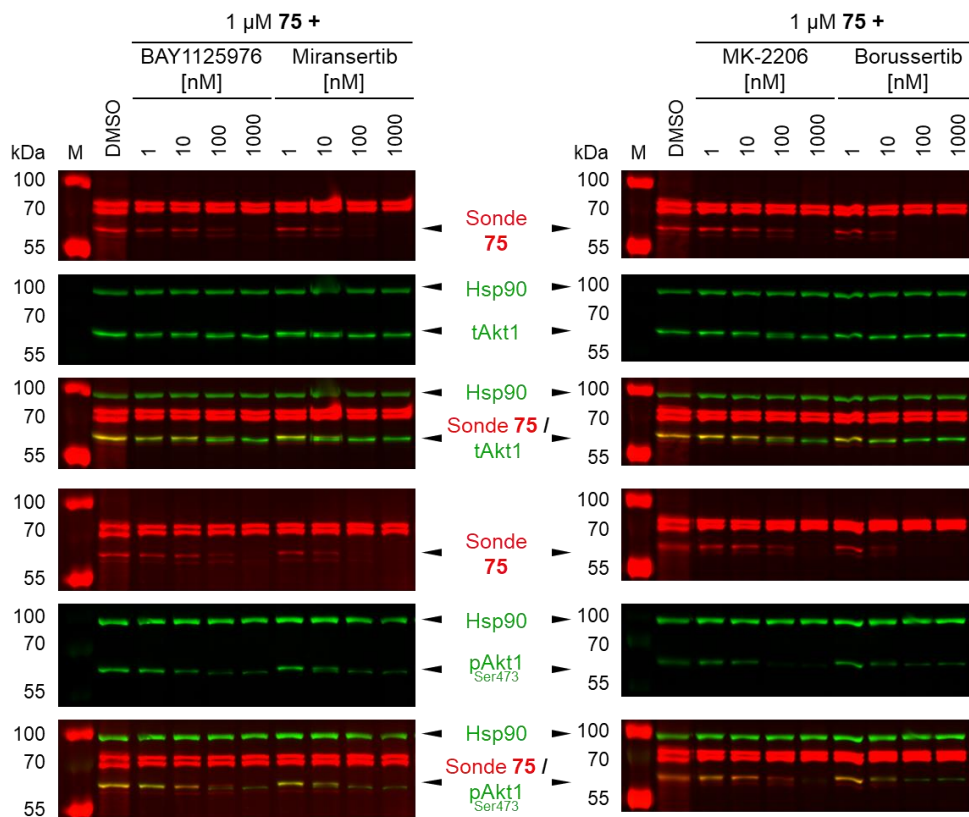
Aus biochemischer Sicht zeigen alle drei Sonden ein ähnliches Profil mit einer etwa 10-fachen Selektivität für Akt1 gegenüber Akt2 und einer etwa 100-fachen Selektivität für Akt1 gegenüber Akt3. Die zelluläre Evaluation zeigt deutlich, dass alle Sonden trotz ihres hohen Molekulargewichts in der Lage sind, die Zellmembran zu durchdringen, um ihr spezifisches Ziel zu erreichen, so dass hier EC<sub>50</sub>-Werte zwischen 33 und 140 nM erzielt wurden. Da diese Werte nicht mit den biochemischen IC<sub>50</sub>-Werten korreliert werden können, sind diese Abweichungen eventuell mit der individuellen Zellpenetration zu erklären.

Zur Validierung der Sondenfunktion wurde **75** in einem initialen Experiment mit ZR-75-1 Zellen in einem Konzentrationsbereich von 0-10 μM für 2 Stunden inkubiert (Abb. 71). In einem parallelen, kompetitiven Experiment wurde der allosterische Akt-Inhibitor Miransertib simultan mit der Sonde eingesetzt, um eine mögliche Verdrängung der Sonde zu untersuchen. Der anschließend mit Streptavidin DyLight™ 650 inkubierte Blot zeigt bei ca. 70 und 130 kDa endogene biotinylierte Proteine der ZR-75-1 Zelllinie, die bei unterschiedlichen Sondenkonzentrationen ein konstantes Signal geben. Ab einer Sondenkonzentration von 100 nM kann eine eindeutige Bande bei ca. 60 kDa beobachtet werden, die dem Akt-Sondenkonjugat entspricht. Das detektierte Signal ist bei einer Konzentration von 1 μM deutlich ausgeprägter, kann aber durch höhere Sondenkonzentrationen nicht weiter verstärkt werden. Die immunologische-Färbung von tAkt1 bestätigte schließlich die selektive Markierung des adressierten Ziels in den ZR-75-1 Zellen durch die Überlagerung des Reporter- und Antikörpersignals.



**Abbildung 71** Western-Blot-Analyse der kovalent-allosterischen Biotin Sonde **75**. Der Immunoblot wurde mit ZR-75-1 Zellen durchgeführt, die zuvor für 2 h mit den annotierten Konzentrationen der Sonde bzw. des Akt-Inhibitors Miransertib behandelt wurden. (Western-Blot durchgeführt zusammen mit Dr. J. Weisner)

Die eingesetzte Konzentration des allosterischen Konkurrenten Miransertib führte in diesem experimentellen Setup zu keiner Verdrängung der Sonde, so dass weitere Verdrängungsexperimente mit allosterischen Akt-Inhibitoren durchgeführt wurden (Abb. 72).

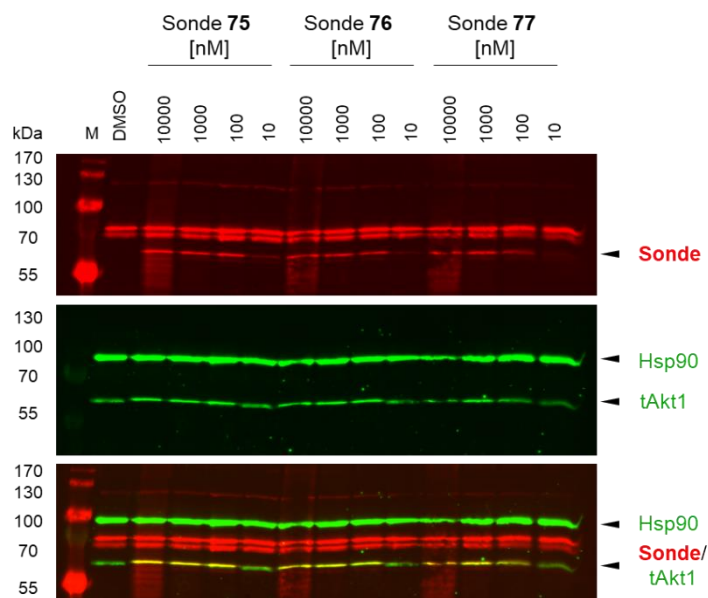


**Abbildung 72** Western-Blot-Analyse der kovalent-allosterischen Biotin Sonde **75**. Der Immunoblot wurde mit ZR-75-1 Zellen durchgeführt, die für 2 h mit den annotierten Konzentrationen der Inhibitoren behandelt wurden. Nach der Zellyse wurden die Lysate für 1 h mit 1  $\mu$ M der Biotinsonde **75** behandelt (Western-Blot durchgeführt von Dr. J. Weisner).



Für eine umfassende und vergleichende Analyse der Affinität von in der Literatur beschriebenen Akt-Inhibitoren wurden die allosterischen Verbindungen BAY1125976, Miransertib und MK-2206 sowie der CAAI-Prototyp Borussertib zwei Stunden lang bei Konzentrationen zwischen 1 und 1000 nM mit ZR-75-1 Zellen inkubiert. Nach der Zelllyse wurden die Lysate für eine weitere Stunde mit 1  $\mu$ M der Biotin-Sonde **75** behandelt. Die Verbindungen BAY1125976 und MK-2206 konnten bei den eingesetzten Konzentrationen von bis zu 100 nM erfolgreich verdrängt werden. Erst der Einsatz von äquimolaren Konzentrationen dieser Inhibitoren führten dazu, dass das Akt-Sondenkonjugat nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Dieser Effekt wird für Miransertib bereits bei einer 10-fach geringeren Konzentration beobachtet und ist für den CAAI-Prototypen Borussertib bereits bei einer Konzentration von 10 nM angedeutet, da durch die kovalente Bindung an das Zielprotein die Verweildauer des CAAI in der allosterischen Bindungstasche maximiert ist. Die Immunofärbung mit pAkt1<sup>S473</sup> zeigt mit steigender Inhibitor-Konzentration eine dosisabhängige Reduktion des pAkt1-Signals und bestätigt somit die Besetzung der allosterischen Tasche durch die eingesetzten Verbindungen.

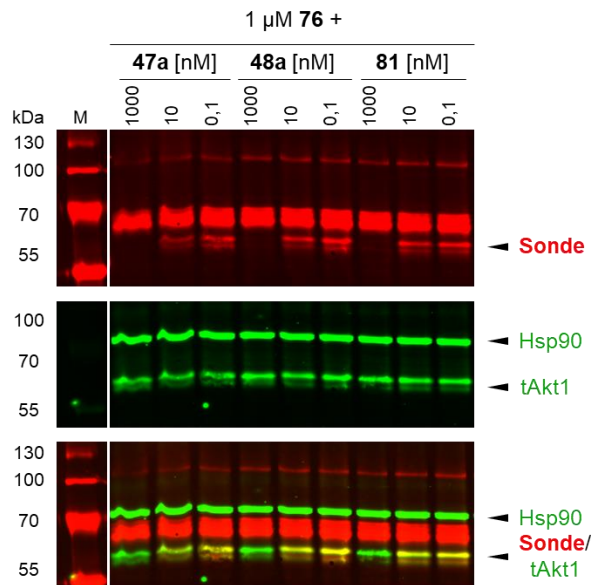
Für eine vergleichende Analyse wurden ZR-75-1-Zelllysate mit den kovalent-allosterischen Biotin-Sonden **75**, **76** und **77** in Konzentrationen zwischen 10 nM und 10  $\mu$ M für zwei Stunden behandelt (Abb. 73).



**Abbildung 73** Western-Blot-Analyse der kovalent-allosterischen Biotin Sonden **75**, **76** und **77**. Der Immunoblot wurde mit ZR-75-1-Zelllysaten durchgeführt, die für 2 h mit den annotierten Konzentrationen der Sonden behandelt wurden.

Bei dieser Analyse konnte für alle drei Sonden die Bildung eines Akt-Sondenkonjugates bereits bei einer Sondenkonzentration von 10 nM nachgewiesen werden.

Auch hier war die maximale Signalintensität bei einer Sondenkonzentration von 100 nM erreicht, wobei durch die immunologische-Färbung von tAkt1 die selektive Alkylierung von Akt durch die Überlagerung des Reporter- und Antikörpersignals bestätigt werden konnte. In einem abschließenden Experiment wurden ZR-75-1-Zytllysate für zwei Stunden mit 1  $\mu$ M der der Biotinsonde **76** und simultan mit den strukturell verwandten Akt-Inhibitoren **47a**, **48a** und **81** in Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 1  $\mu$ M behandelt (Abb. 74).



**Abbildung 74** Western-Blot-Analyse der kovalent-allosterischen Biotin Sonde **76**. Der Immunoblot wurde mit ZR-75-1-Zytllysaten durchgeführt, die für 2 h mit den annotierten Konzentrationen der Inhibitoren und der Sonden behandelt wurden.

Das kompetitive Experiment offenbarte die konzentrationsabhängige Verdrängung der Biotinsonde durch die Akt-Inhibitoren, wobei der Effekt aufgrund der Bandenintensitäten für Verbindung **47a** deutlich stärker ausgeprägt zu sein scheint. Im Gegensatz dazu konnte die reversible Verbindung **81** die kovalente Sonde auch bei äquimolaren Konzentrationen nicht vollständig verdrängen. Zukünftig sollte dieses Experiment in kleineren Abstufungen der Inhibitorkonzentration durchgeführt werden, um signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Verbindungen zu eruieren. Um zukünftig den Unterschied zwischen reversibler Bindung und kovalenter Alkylierung des Zielproteins zu verdeutlichen, sollte, wie in Abb. 72 dargestellt, die Biotinsonde erst nach der zweistündigen Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren zugegeben werden.

Das Konzept der kovalent-allosterischen Biotinsonden zur Adressierung von Akt wurde erfolgreich durch eine Reihe von immunologischen Western-Blot-Analysen validiert. Diese chemisch-biologischen Werkzeuge sind entscheidend für die zukünftige Etablierung robuster Assaysysteme zur Bestimmung der *target occupancy*, um diese mit PD-Effekten zu korrelieren. Sie sollen das Verständnis der Beziehung zwischen der Wirkstoffkonzentration *in vivo* und seiner Wirkung fördern, indem sie aufzeigen, wie viel des Zielproteins zu einem bestimmten Zeitpunkt besetzt ist. Dies ist von besonderer Relevanz für die Bewertung der zeitabhängigen Effekte von Wirkstoffen. Mit den erhobenen Daten können schließlich Dosen bestimmt werden, die erforderlich sind, um eine ausreichende Besetzung des Zielproteins zu erreichen, ohne dabei toxische oder ineffektive Konzentrationen zu überschreiten.

Weitere Studien könnten darauf abzielen, das Repertoire der Sonden zu erweitern, um die drei Isoformen von Akt selektiv zu adressieren. Dies würde das Verständnis der individuellen und kollektiven Rollen dieser Isozyme im zellulären Schicksal vertiefen. Neben Biotin-konjugierten Sonden könnten auch andersweitig funktionalisierte Verbindungen entwickelt werden, die beispielsweise in der Theranostik Anwendung finden könnten. Klinisch-relevante Akt-Mutationen, wie die Akt1<sup>E17K</sup>-Mutation, könnten so durch hochselektive, isotoopenmarkierte Verbindungen nicht nur detektiert, sondern möglicherweise auch gezielt therapiert werden.

## 4 Kurzfassung

Die Ser/Thr-Kinase Akt (Proteinkinase B) ist ein zentraler Regulator im PI3K/Akt/mTOR-Signalnetzwerk, der am häufigsten aktivierten Signalkaskade bei malignen humanen Erkrankungen. Die durch Akt vermittelte Signaltransduktion stellt einen wesentlichen Bestandteil grundlegender physiologischer Prozesse dar, zu denen Zellproliferation, Überleben, Stoffwechsel und Proteinbiosynthese zählen. Veränderungen in den Akt-regulierenden Proteinen wie PI3K und PTEN können zu einer Akt-Hyperaktivität führen und die Genese verschiedene Krankheiten begünstigt, darunter Brust-, Eierstock-, Darm- und Prostatakrebs, Diabetes sowie neurodegenerative Erkrankungen. Ebenso können diese bösartigen Erkrankungen mit der Überexpression der AKT-Gene oder der seltenen Akt1<sup>E17K</sup>-Mutation in assoziiert werden, welche zu einer konstitutiven Aktivierung des Enzyms führt. In diesem Kontext wurde Akt als ein vielversprechendes Ziel für die Präzisionsmedizin identifiziert. Obwohl die Entwicklung von Akt-Inhibitoren mehr als zwei Jahrzehnte andauert, hat lediglich der ATP-kompetitive Inhibitor Capivasertib in einer Phase III Studie als Ergänzung zu einer Fulvestrant-basierten Therapie bei fortgeschrittenem Brustkrebs vielversprechende Ergebnisse gezeigt und ist bislang der einzige Akt-Inhibitor, der eine Zulassung durch die FDA erhielt. Neben orthosterischen Akt-Inhibitoren wurden auch allosterische Liganden entwickelt, die an der Schnittstelle zwischen der regulatorischen PH-Domäne und der katalytischen Kinasedomäne mit einer einzigartig Bindungstasche interagieren und so eine hochselektive Inhibition von Akt ermöglichen. Allerdings sind alle klinischen Studien im onkologischen Kontext mit allosterischen Akt-Inhibitoren bislang gescheitert, hauptsächlich aufgrund unzureichender Wirksamkeit oder dosislimitierender Toxizität. Um die inhärenten Beschränkungen der ersten Generation von Akt-Inhibitoren zu überwinden, hat die AG RAUH eine innovative Strategie für die gezielte Adressierung von Akt durch kovalent-allosterische Akt-Inhibitoren (CAAs) entwickelt. Diese Kategorie von Inhibitoren ist so konzipiert, dass sie die einzigartige allosterische Bindungstasche in Akt adressiert und dadurch eine außergewöhnliche Aktivität und Selektivität gewährleistet. Darüber hinaus alkylieren CAAs Cysteinseitenketten in der Aktivierungsschleife von Akt, wodurch die Verweildauer am Zielprotein maximiert und somit die pharmakodynamische Wirkung verstärkt wird. Die pharmakokinetische Evaluation des Prototypen-CAAs Borussertib ergab jedoch ein optimierungsbedürftiges Profil, das durch eine unzureichende Löslichkeit und Permeabilität und damit eine eingeschränkte Bioverfügbarkeit beschrieben werden kann.

Diese Arbeit beschreibt das Struktur-basierte Design, die Synthese und die umfassende Charakterisierung neuartiger, kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren und Sondenmoleküle.

Die Analyse verfügbarer Co-Kristallstrukturen der in der AG RAUH entwickelten CAAIs sowie von Bindungsmodellen, die auf literaturbekannten allosterischen Akt-Inhibitoren basieren, führte zur Konzeption neuartiger potentiell kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren. Infolgedessen wurde eine konvergente Synthesestrategie entwickelt, die es ermöglichte, potentielle CAAIs auf der Grundlage eines westlichen Molekülbausteins, der von einem Pharmakophor mit gemeinsamen Merkmalen aus literaturbeschriebenen allosterischen Akt-Inhibitoren abgeleitet wurde, und eines östlichen Molekülbausteins, der bereits für den Prototyp Borussertib entwickelt wurde, darzustellen. Die Syntheseroute ermöglichte die Derivatisierung der Verbindungen in einem späten Schritt, was zur erfolgreichen Synthese von insgesamt 24 Derivaten führte. Das Ziel der ersten Serie neuartiger CAAIs bestand darin, geeignete Substitutionsmuster zu identifizieren, die sich durch eine gute *in vitro* Potenz sowie verbesserte PK-Eigenschaften auszeichnen. Alle getesteten Verbindungen zeigten während der biochemischen Charakterisierung ein bemerkenswertes Inhibitionspotential gegenüber den drei Akt-Isoformen, was auf einen kovalenten Bindungsmodus hindeutet, der anschließend durch kinetische und massenspektrometrische Experimente bestätigt werden konnte. Zelluläre Untersuchungen ausgewählter Verbindungen ergaben eine konzentrationsabhängige Herunterregulation von pAkt1 und pAkt2 sowie deren nachgestellten Substraten, die bereits bei geringeren Konzentrationen im Vergleich zu klinischen Kandidaten beobachtet wurden. Im Zuge der pharmakokinetischen Charakterisierung zeigte sich, dass acht der neu entwickelten CAAIs im Caco-2-Assay eine signifikant geringere Effluxrate im Vergleich zum Prototyp Borussertib und somit eine verbesserte intestinale Permeabilität aufwiesen. Für den Großteil der neuen Verbindungen konnte eine exzellente Stabilität in Anwesenheit von murinen Lebermikrosomen sowie eine hinreichend gute Stabilität in Gegenwart von Glutathion nachgewiesen werden. In Anbetracht des überdurchschnittlich hohen Molekulargewichts und der Lipophilie der Verbindungen führten die Analysen der Löslichkeit jedoch lediglich zu moderaten Resultaten. Mit der erfolgreichen Strukturaufklärung wurde der Grundstein für einen zweiten Zyklus des SBDD gelegt. Basierend auf den elf neuen Co-Kristallstrukturen wurden weitere Derivate konzipiert und synthetisiert. Hier führte das Bestreben zum Design einer verbesserten Serie von CAAIs, wobei der Schwerpunkt auf der Optimierung der Pharmakokinetik und der Ligandeneffizienz lag. Insgesamt wurden 30 Derivate synthetisiert, die sich durch ihr *meta*-Substitutionsmuster im westlichen Molekülteil, sowie durch Variationen der östlichen Molekülbausteine und des reaktiven *warhead* unterscheiden.

Die biochemische Evaluation ergab für Verbindungen mit konventionellem Acrylamid-*warhead* eine Präferenz für die Inhibition von Akt1 und Akt2 gegenüber Akt3. Im Gegensatz dazu zeigten Verbindungen mit 2-Fluoracrylamid-Warhead eine höhere Selektivität für Akt1 gegenüber Akt2 und Akt3. In zellulären Untersuchungen erreichten zwei der neuen CAAIs eine subnanomolare Hemmung der Brustkrebszelllinie ZR-75-1, was den ersten Fall einer derart hohen anti-proliferativen Aktivität aller bisher entwickelten CAAIs darstellt. Detaillierte Western-Blot-Analysen einer ausgewählten Serie von Verbindungen zeigten eine konzentrationsabhängige Herunterregulierung von pAkt1, pAkt2 und deren nachgeschalteter Substrate bei geringeren Konzentrationen im Vergleich zu den klinischen Kandidaten Capivasertib und Miransertib. Eine schlüssige *in vitro* PK-Studie offenbarte eine akzeptable kinetische Löslichkeit für 13 der 28 getesteten Derivate, wobei Liganden mit  $\alpha$ -fluorierten Acrylamiden die vielversprechendsten Ergebnisse lieferten. Die Mehrzahl der CAAIs wies eine murine Plasmastabilität von > 90% auf, wobei fünf Inhibitoren eine geringe intrinsische *clearance* und eine außergewöhnliche Resistenz gegenüber konjugierenden Enzymen des Phase II-Metabolismus zeigten. Der abschließende Caco-2-Assay indizierte für neun der getesteten CAAIs eine orale Bioverfügbarkeit. Schließlich wurde der *frontrunner* der neuen Serie einem direkten Vergleich mit klinisch fortgeschrittenen Inhibitoren in einem Brustkrebszellpanel unterzogen, das aus 29 genetisch-annotierten Brustkrebszelllinien bestand. Diese Analyse offenbarte die herausragende Wirksamkeit und Überlegenheit des getesteten CAAI, die auf dem kovalent-allosterischen Wirkmechanismus beruhen. In einer abschließenden Strukturanalyse wurden fünf der neuartigen Inhibitoren mit Akt1 Co-kristallisiert, wobei bisher unbekannte Wechselwirkungen zwischen den Liganden und dem Protein identifiziert werden konnten.

In einem weiteren Projekt wurde während der Strukturaufklärung der neuartigen CAAIs eine weitere Disulfidbrücke in der PH-Domäne von Akt1 identifiziert. Die Tatsache, dass es sich bei diesen Cysteinen um redox-sensitive Aminosäuren handelt, die möglicherweise für die Aktivierung von Akt essentiell sind, bildete die Grundlage für die Entwicklung von neuartigen Liganden auf Basis der zuvor dargestellten westlichen Molekülbausteine. Das rationale Design führte zur Synthese eines fokussierten Sets von neun Verbindungen, von denen drei mit einem reaktiven Acrylamid-*warhead* ausgestattet waren, um die Cysteinseitenketten der PH-Domäne zu adressieren. Die biochemische Charakterisierung dieser potentiell kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren zeigten eine signifikante Steigerung der Potenz gegenüber den drei Akt-Isoformen verglichen mit ihren reversiblen Gegenstücken. Auf zellulärer Ebene resultierte dies in EC<sub>50</sub>-Werten im niedrigen nanomolaren Bereich.

In einer umfassenden Western-Blot-Analyse konnte die konzentrationsabhängige Herunterregulierung von pAkt1 und pAkt2 sowie der Akt-nachgeschalteten Substraten demonstriert werden. Abschließende Strukturaufklärungen bestätigten den antizipierten kovalent-allosterischen Wirkmechanismus und die irreversible Alkylierung einer Cysteinseitenkette in der PH-Domäne von Akt1. Zusätzlich erlaubte die Verwendung eines Akt2-Mimikrykonstrukts einen einzigartigen Einblick in die allosterische Interdomänen-Bindungstasche von Akt2.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden auf Grundlage der zuvor entwickelten CAAIs drei Biotin-konjugierte Sondenmoleküle entworfen und synthetisiert, welche die Grundlage zur Etablierung eines Akt-gerichteten *target occupancy* Assays bilden. In initialen zellulären Studien konnte trotz des hohen Molekulargewichts der Sonden, die Zellgängigkeit demonstriert werden. Zur Validierung der Funktion als selektive Sonden für Akt wurde schließlich eine Reihe von immunologischen Western-Blot-Analysen durchgeführt. Durch Inkubation sowohl von Zelllysaten als auch von lebenden Zellen in Gegenwart dieser Sondenmoleküle konnte die konzentrationsabhängige und selektive Markierung von Akt durch die dargestellten Sondenmoleküle nachgewiesen werden. Ebenso konnte in kompetitiven Ansätzen mit allosterischen und kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren eine konzentrationsabhängige Verdrängung der Referenzverbindungen beobachtet werden.

## 5 Abstract

The Ser/Thr kinase Akt (protein kinase B) is a central regulator in the PI3K/Akt/mTOR signalling network, the most frequently activated signalling cascade in human malignancies. Akt-mediated signalling is an essential component of fundamental physiological processes, including cell proliferation, survival, metabolism and protein biosynthesis. Alterations in Akt-regulating proteins such as PI3K and PTEN can lead to Akt hyperactivity and favour the genesis of various diseases, including breast, ovarian, colon and prostate cancer, diabetes and neurodegenerative diseases. These malignant diseases can also be associated with overexpression of the AKT genes or the rare Akt1<sup>E17K</sup> mutation, which leads to constitutive activation of the enzyme. In this context, Akt has been identified as a promising target for precision medicine. Although the development of Akt inhibitors has been ongoing for more than two decades, only the ATP-competitive inhibitor capivasertib has shown promising results in a phase III trial as an adjunct to fulvestrant-based therapy in advanced breast cancer and is the only Akt inhibitor having received FDA approval to date. In addition to orthosteric Akt inhibitors, allosteric ligands have also been developed that interact with a unique binding pocket at the interface between the regulatory PH domain and the catalytic kinase domain, thus enabling highly selective inhibition of Akt. However, all clinical trials in the oncological context with allosteric Akt inhibitors have so far failed, mainly due to insufficient efficacy or dose-limiting toxicity. To overcome the inherent limitations of the first generation of Akt inhibitors, the RAUH Lab has developed an innovative strategy for the targeting of Akt by covalent-allosteric Akt inhibitors. This category of inhibitors is designed to address the unique allosteric binding pocket in Akt, thereby ensuring exceptional activity and selectivity. In addition, CAAs alkylate cysteine side chains in the activation loop of Akt, maximising drug-target residence time and thus enhancing the pharmacodynamic effect. However, the pharmacokinetic evaluation of the prototype CAAI borussertib revealed a profile in need of optimisation, which can be described by insufficient solubility and permeability and thus limited bioavailability.

This work describes the structure-based design, synthesis and comprehensive characterisation of novel covalent-allosteric Akt inhibitors and probe molecules.



The analysis of available co-crystal structures of CAAs generated in the AG RAUH and of binding models based on allosteric Akt inhibitors known from the literature led to the design of novel covalent-allosteric Akt inhibitors. As a result, a convergent synthesis strategy was developed that allowed potential CAAs to be conceptualised based on a western part derived from a pharmacophore with common features from literature-described allosteric Akt inhibitors and an established eastern part that was already developed for the prototype borussertib. The synthetic route allowed for the late-stage derivatisation of the compounds, leading to the successful synthesis of 24 derivatives in total. The aim of the first series of novel CAAs was to identify suitable substitution patterns characterised by good *in vitro* potency and improved PK properties. All tested compounds showed a remarkable inhibition potential towards the three Akt isoforms during biochemical characterisation, indicating a covalent binding mode, which was subsequently confirmed by kinetic and mass spectrometric experiments. Cellular studies of selected compounds revealed a concentration-dependent downregulation of pAkt1 and pAkt2 as well as their downstream substrates, which was already observed at lower concentrations compared to Akt inhibitors in clinical development. Pharmacokinetic characterisation showed that eight of the newly developed CAAs exhibited a significantly lower efflux rate in the Caco-2 assay compared to the prototype borussertib and thus improved intestinal permeability. Excellent stability in the presence of murine liver microsomes and sufficiently good stability in the presence of glutathione was demonstrated for the majority of the new molecules. However, given the above-average molecular weight and lipophilicity of the compounds, the solubility assessments only led to moderate results. The successful structural elucidation laid the foundation for a second cycle of the SBDD. Based on the eleven new co-crystal structures, additional derivatives were designed and synthesised. This led to the design of an improved series of CAAs, with the focus on optimising pharmacokinetic properties and ligand efficiency. A total of 30 derivatives were synthesised, which differ in their *meta*-substitution pattern in the western part of the molecule, as well as in variations of the eastern part including the reactive warhead. The biochemical evaluation revealed a preference for the inhibition of Akt1 and Akt2 over Akt3 for compounds with a conventional acrylamide warhead. In contrast, compounds with a 2-fluoroacrylamide warhead exhibited higher selectivity for Akt1 over Akt2 and Akt3. In cellular studies, two of the new CAAs achieved subnanomolar inhibition of the breast cancer cell line ZR-75-1, representing the first case of such high potency of any CAA developed to date.

Detailed Western blot analyses of a series of selected compounds showed a concentration-dependent downregulation of pAkt1, pAkt2 and their downstream substrates at lower concentrations compared to the clinical candidates capivasertib and miransertib. A comprehensive *in vitro* PK study revealed acceptable kinetic solubility for 13 of the 28 derivatives tested, with ligands containing  $\alpha$ -fluorinated acrylamides providing the most promising results. The majority of CAAs exhibited a murine plasma stability of > 90%, with five inhibitors showing low intrinsic clearance and exceptional resistance to conjugating enzymes during metabolic phase II studies. The final Caco-2 assay indicated potential oral bioavailability for nine of the CAAs tested. Finally, the frontrunner of the new series was directly compared with clinically advanced inhibitors in a panel consisting of 29 genetically-annotated breast cancer cell lines. This evaluation revealed the outstanding efficacy and superiority of the tested CAA, which is based on the covalent-allosteric mechanism of action. In a final structural analysis, five of the novel inhibitors were co-crystallised with Akt1 revealing previously unknown interactions between the ligands and the protein.

In a second project, an additional disulfide bridge was identified in the PH domain of Akt1 during the structural elucidation of the novel CAAs. The fact that these cysteines are redox-sensitive amino acids, potentially essential for the activation of Akt, formed the basis for the development of novel ligands based on the previously described western parts. The rational design led to the synthesis of a focussed set of nine compounds, three of which were equipped with a reactive acrylamide warhead to address the cysteine side chains in the PH domain. Biochemical characterisation of these potential covalent-allosteric Akt inhibitors showed a significant increase in potency towards the three Akt isoforms compared to their reversible counterparts. At the cellular level, this resulted in EC<sub>50</sub> values in the low nanomolar range. In a comprehensive Western blot analysis, the concentration-dependent downregulation of pAkt1 and pAkt2 as well as the Akt downstream substrates was demonstrated. Final structural elucidations confirmed the anticipated covalent-allosteric mechanism of action and the irreversible alkylation of a cysteine side chain in the PH domain of Akt1. In addition, the use of an Akt2 mimicry construct allowed a unique insight into the allosteric interdomain binding pocket of Akt2.

In the further process of this work, three biotin-conjugated probe molecules were designed and synthesised based on the previously developed CAAs, which set the basis for the establishment of an Akt-directed target occupancy assay.

Despite the high molecular weight of the probes, initial cellular studies demonstrated their cell permeability. To validate the function as selective probes for Akt, a series of immunological Western blot analyses were carried out. Here, the concentration-dependent and selective labelling of Akt by the probe molecules was demonstrated both by incubation with living cells and in cell lysates. Likewise, in competitive approaches with allosteric and covalent-allosteric Akt inhibitors, a concentration-dependent displacement of the reference compounds was observed.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Material und Methoden

Alle Reagenzien, Lösungsmittel sowie trockene Lösungsmittel wurden von *ABCR*, *Acros Organics*, *Activate Scientific*, *Alfa Aesar*, *Apollo Scientific*, *Combi-Blocks*, *Honeywell*, *Maybridge*, *Merck*, *Roth*, *Sigma-Aldrich*, *TCI Chemicals* und *VWR* bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Um hydrolytische Spaltungsreaktionen zu vermeiden, wurden die für die Synthesen verwendeten Glasgeräte zuvor mit einem Heißluftgebläse (Steinel HG 2220 E) ausgeheizt und mit Argon-Schutzgas gespült. Für Mikrowellen-gestützte Synthesen wurden die Mikrowellenreaktoren Monowave 300 und Monowave 400 der Firma Anton Paar verwendet. Die Einwaage der Reagenzien erfolgte mittels einer Sartorius M-pact AX224 Analysewaage. Die Einwaage für die Herstellung von 10 mM Stammlösungen finaler Produkte wurden mit einer Sartorius MSU125P-100-DI Feinwaage vorgenommen.

Der Reaktionsverlauf wurde mittels analytischer Dünnschichtchromatographie (TLC) verfolgt. Verwendet wurden aluminiumbeschichtete Kieselgelplatten (Merck DC Kieselgel 60 F254), die unter UV-Licht bei den Wellenlängen  $\lambda = 254$  nm bzw. 366 nm ausgewertet wurden. Amine konnten nachträglich mit einer Ninhydrinlösung (1,5 g Ninhydrin, 100 mL n-BuOH, 3 mL AcOH) sichtbar gemacht werden. Die TLC-gekoppelte Massenspektrometrie (TLC-MS) wurde auf einem expression<sup>L</sup>-CMS-System mit angeschlossenem Plate Express der Firma Advion durchgeführt.

Die synthetisierten, niedermolekularen Verbindungen wurden mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (Partikelgröße 40–63  $\mu\text{m}$ ) der Firma VWR gereinigt. Alternativ wurden die dargestellten Verbindungen über ein Biotage Isolera One System mit Büchi Reveleris 12 g, 24 g, 40 g Kieselgel- (40  $\mu\text{m}$ ) oder 4 g, 12 g, 24 g, 40 g Octadecylsilan- (C18, 40  $\mu\text{m}$ ) Kartuschen gereinigt.

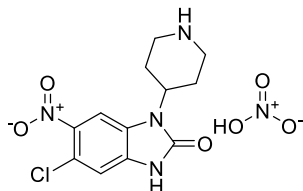
Zur Evaporation der Lösungsmittel wurde ein Rotationsverdampfer (Rotavapor R-210) der Firma Büchi verwendet. Synthetisierte Feststoffe wurden entweder mittels der Schlenktechnik mit angeschlossenem Hochvakuum (Vacuubrand Drehschieberpumpe RZ 6) oder an einem Gefriertrockner (Christ Alpha 2-4 LD plus) getrocknet.

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) aller Verbindungen erfolgte auf Bruker Avance DRX AV400 (400 MHz für  $^1\text{H}$ - und 101 MHz für  $^{13}\text{C}$ -NMR), AV500 (500 MHz  $^1\text{H}$ - und 125 MHz für  $^{13}\text{C}$ -NMR), AV600 (600 MHz  $^1\text{H}$ -, 151 MHz für  $^{13}\text{C}$ -, und 565 MHz für  $^{19}\text{F}$ -NMR) und AV700 (700 MHz  $^1\text{H}$ - und 176 MHz für  $^{13}\text{C}$ -NMR) Spektrometern. Die chemische Verschiebung der NMR-Spektren ist in *parts per million* (ppm) angegeben und bezieht sich auf das interne Standardsignal von DMSO- $d_6$  ( $\delta = 2.50$  ppm für  $^1\text{H}$ - und 39.51 ppm für  $^{13}\text{C}$ -NMR). Die Abkürzungen der Signalmultiplizitäten ergeben sich aus den folgenden Abkürzungen: s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett vom Dublett), t (Triplet), tt (Triplet vom Triplet), q (Quartett), qd (Quartett vom Dublett), quint (Quintett), m (Multiplet), hept (Heptett), bs (breites Singulett). Der Reinheitsgrad aller finalen Verbindungen belief sich auf  $> 95\%$  und wurde mittels HPLC bestimmt.

HPLC-MS-Analytik (ESI-MS) wurde mit dem Agilent 1100 oder 1260 Series HPLC-System unter Verwendung einer EC 125/4 Nucleodur C18 Gravity-Säule ( $3\ \mu\text{m}$ ) von Macherey-Nagel durchgeführt, welche mit einem Thermo Scientific Finnigan LCQ Advantage Max Ionenfallen-Massenspektrometer mit nachgeschaltetem ESA Corona Detektor oder einem Agilent MSD-iQ Massenspektrometer gekoppelt war. Zusätzlich wurde ein Thermo Scientific LCQ Fleet System der Firma Thermo Scientific mit einer EC 50/2 Nucleodur C18 Gravity-Säule ( $1,8\ \mu\text{m}$ ) von Macherey-Nagel verwendet. Die hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) wurde an einem LTQ Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Electron) mit einem Accela HPLC-System unter Verwendung einer Hypersil Gold-Säule (Thermo Electron) durchgeführt.

## 6.2 Synthesevorschriften und Analytik

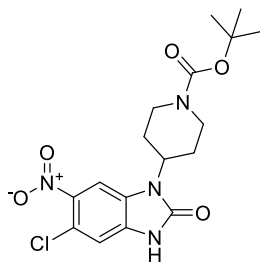
### Synthetische Darstellung von 5-Chloro-6-nitro-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-on nitrat (2)



5-Chloro-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-on **1** (5,0 g, 19,9 mmol, 1 äq.) wurde in 60 mL *o*-Xylol suspendiert und auf 60 °C erhitzt. Konzentrierte Salpetersäure (15,8 mL, 238,4 mmol, 12 Äq.) wurde langsam mit einem Tropftrichter zur Reaktionslösung hinzugesetzt und das Gemisch wurde für eine Stunde bei 60 °C unter Rühren erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das überschüssige Lösungsmittel dekantiert. Der verbleibende Feststoff wurde eine Stunde lang bei 70 °C in MeOH (100 mL) erhitzt und präzipitierte beim Abkühlen auf Raumtemperatur. Das überschüssige Lösungsmittel wurde abfiltriert und der verbleibende Feststoff im Vakuum getrocknet. Nitrat **2** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (7,1 g, Ausbeute: 99 %).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 11.76 (s, 1H), 8.49 (d,  $J = 88.6$  Hz, 2H), 8.06 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 4.58 (tt,  $J = 12.2, 3.9$  Hz, 1H), 3.46 (d,  $J = 12.2$  Hz, 2H), 3.35 (s, 2H), 3.08 (q,  $J = 11.5$  Hz, 2H), 1.93 (d,  $J = 11.9$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 154.02, 140.87, 133.28, 128.35, 119.54, 110.81, 106.29, 47.90, 43.27, 25.42. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet.: 297,07 für  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3\text{Cl}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 297,12.

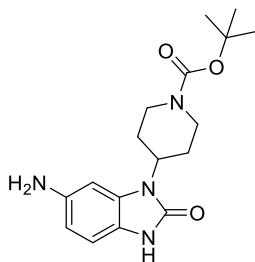
**Synthetische Darstellung von *tert*-Butyl 4-(5-chloro-6-nitro-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**3**)**



5-Chloro-6-nitro-1-(piperidin-4-yl)-1,3-dihydro-2*H*-benzo[*d*]imidazol-2-on nitrat **2** (6 g, 16,7 mmol, 1 Äq.) wurde in DCM (100 mL) suspendiert und mit TEA (6,87 mL, 50,3 mmol, 3 Äq.) versetzt bevor die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur gerührt wurde. Di-*tert*-butylpyrocarbonat (3,91 mL, 18,3 mmol, 1,1 Äq.) wurde in DCM (20 mL) gelöst und zur Reaktionslösung hinzugegeben. Nach zwei Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 100/1 → 33/1) Verbindung **3** wurde als gelber Feststoff erhalten (4,22 g, Ausbeute: 64 %)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 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 ppm 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 für C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 397,65.

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

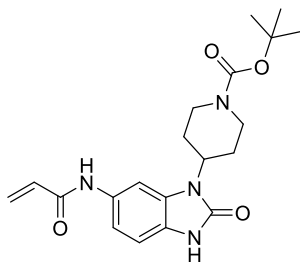


*tert*-Butyl 4-(5-chloro-6-nitro-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat **3** (4,2 g, 10,6 mmol, 1 Äq.) wurde in MeOH (80 mL) gelöst und Palladium auf Aktivkohle (5 % Pd, 0,34 g, 3,2 mmol, 0,3 Äq.) wurde hinzugefügt. Die Suspension wurde auf 90 °C erhitzt und dann mit Ammoniumformiat (2,6 g, 42,4 mmol, 4 Äq.) versetzt und für weitere 26 h unter Rückfluss gerührt. Der Pd-Katalysator wurde im Anschluss über Celite® abfiltriert und das überschüssige Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> suspendiert und mit DCM (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 100/1 → 25/1). Verbindung **4** wurde als hellgelber Feststoff (3,5 g, Ausbeute: 99 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 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).  
<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 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 für C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 333,88.



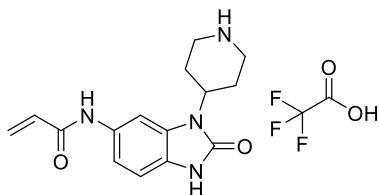
**Synthetische Darstellung von *tert*-Butyl 4-(6-acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (5)**



*tert*-Butyl 4-(6-amino-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat **4** (3,5 g, 10,6 mmol, 1 Äq.) wurde in einer Mischung aus dTHF (45 mL) und DCM (5 mL) gelöst, zu der DIPEA (3,6 mL, 21,2 mmol, 2 Äq.) zugegeben wurde. Acryloylchlorid (0,94 mL, 11,6 mmol, 1,1 Äq.) wurde in dTHF (5 mL) gelöst und über einen Zeitraum von 5 min tropfenweise zu der Lösung unter Kühlung mit einem Eisbad gegeben. Nach 16 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 100/1 → 25/1). Verbindung **5** wurde als hellgelber Feststoff (3,56 g, Ausbeute: 87 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 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). <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 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 für C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 387,58.

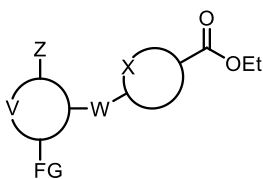
**Synthetische Darstellung von *N*-(2-oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid--2,2,2-trifluoroacetat (6)**



*tert*-butyl 4-(6-acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidine-1-carboxylat **5** (3,2 g, 8,3 mmol, 1 Äq.) wurde in einer Mischung aus DCM (30 mL) und TFA (10 mL) gelöst und 90 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssiges TFA wurden unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in H<sub>2</sub>O (50 mL) resuspendiert und anschließend lyophilisiert. Verbindung **6** wurde als weißes Salz erhalten (3,3 g, Ausbeute: 99 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 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). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 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. <sup>19</sup>F NMR (565 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm -74.76. HPLC-MS (*m/z*): Berechnet: 287,14 für C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 287,16.

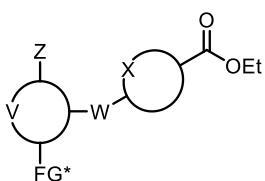
## Synthetische Darstellung von Verbindung 9



Elektrophil **7** (7,2 g, 1,2 Äq.) wurde in 1,4-Dioxan (150 mL) gelöst, bevor Nukleophil **8** (5,1 g, 1 Äq.) und DIPEA (10,6 mL, 2 Äq.) zugegeben wurden. Das Gemisch wurde für 16 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde das überschüssige Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der verbleibende rote ölige Rückstand wurde in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 50/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **9** wurde als oranger Feststoff erhalten (7,8 g, Ausbeute: 79 %).

<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.25 (s, 1H), 8.57 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.79 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.12 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.31 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.33 (t, J = 7.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 165.71, 154.16, 148.74, 142.73, 139.37, 130.39, 129.45, 125.72, 122.19, 115.64, 61.04, 14.67. HPLC-MS (m/z): Nicht gefunden.

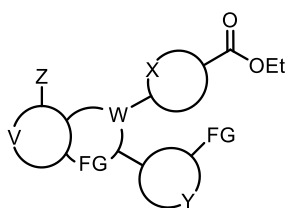
## Synthetische Darstellung von Verbindung 10



Verbindung **9** (2,3 g, 1 Äq.) und das Reduktionsmittel (2,4 g, 6 Äq.) wurden in EtOH (90 mL) gelöst, bevor die zuvor in 10 mL H<sub>2</sub>O gelöste Säure (3,4 g, 9 Äq.) hinzugegeben wurde. Die Reaktionslösung wurde unter Argon-Schutzgasatmosphäre für zwei Stunden bei 80 °C gerührt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lösung wurde über Celite® filtriert und das überschüssige Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit einer gesättigten wässrigen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aufgenommen und mit DCM (3x 100 mL) extrahiert. Die organischen Fraktionen wurden vereinigt und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Reinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 33/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **10** wurde als gelb-brauner Feststoff isoliert (2,0 g, Ausbeute: 96 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.44 (s, 1H), 7.88 – 7.84 (m, 2H), 7.70 – 7.66 (m, 2H), 7.00 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.35 (s, 2H), 4.26 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 166.02, 146.49, 141.76, 133.46, 132.53, 130.68, 123.65, 121.56, 117.22, 116.56, 60.54, 14.76. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 292,74 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 292,10.

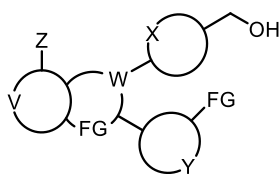
## Synthetische Darstellung von Verbindung 12



Zu einer Lösung von Verbindung **10** (500 mg, 1 Äq.) und Verbindung **11** (209,3 mg, 1 Äq.) in MeCN (6 mL) wurden Säure II (367  $\mu$ L, 7 Äq.) und Säure I (182,3  $\mu$ L, 3,5 Äq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 20 min bei 130 °C in einem Mikrowellenreaktor erhitzt. Nach abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 50 mL) extrahiert. Die organischen Fraktionen wurden vereinigt und mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 33/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **12** wurde als gelber Feststoff isoliert (0,48 g, Ausbeute: 71 %).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.28 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.12 – 8.07 (m, 2H), 8.01 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 1H), 7.63 – 7.57 (m, 2H), 7.48 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.24 (dd, J = 7.6, 1.8 Hz, 1H), 6.80 (s, 2H), 6.45 (dd, J = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 4.35 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 3H).  
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  165.46, 158.15, 152.35, 150.83, 148.27, 144.94, 139.25, 139.21, 134.11, 130.75, 130.54, 130.47, 128.48, 119.79, 111.73, 106.52, 61.57, 14.61. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 394,83 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 394,16.

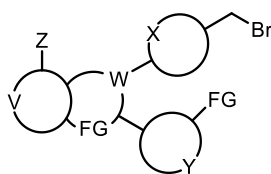
## Synthetische Darstellung von Verbindung 13



Zu einer Lösung von Verbindung **12** (2,3 g, 1 Äq.) in dDCM (50 mL) wurde eine Lösung von DIBAL-H (20,7 mL, 3,5 Äq.) in 20 mL dDCM über einen Zeitraum von 1,5 h bei 4 °C zugegeben. Die Lösung wurde anschließend für 30 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor 70 mL einer gesättigten Lösung von Natriumkaliumtartrat zugegeben wurden. Die zweiphasige Lösung wurde für weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit DCM (3x 100 mL) und anschließend mit Ethylacetat (3x 100 mL) extrahiert. Die organischen Fraktionen wurden vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **13** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (1,7 g, Ausbeute: 79 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.26 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 1H), 7.48 – 7.44 (m, 3H), 7.41 – 7.37 (m, 2H), 7.23 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 6.92 (s, 2H), 6.41 (dd, J = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 5.36 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 5.7 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 158.31, 152.47, 150.59, 148.65, 144.86, 144.02, 138.89, 133.81, 133.66, 130.26, 128.00, 127.78, 119.50, 111.57, 106.63, 62.81. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 352,80 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 352,19.

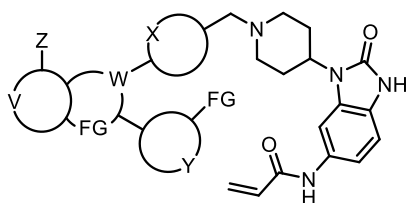
## Synthetische Darstellung von Verbindung 14



Zu einer im Eisbad gekühlten Lösung von Verbindung **13** (1,0 g, 1 Äq.) in wasserfreiem 1,4-Dioxan (20 mL) wurde Phosphortribromid (1,3 mL, 5 Äq.) in trockenem 1,4-Dioxan (10 mL) über einen Zeitraum von 30 min unter Argon-Schutzgasatmosphäre zugegeben. Um die Produktbildung zu maximieren, wurde die Lösung 72 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gequenchet und mit DCM (3x 50 mL) extrahiert. Die organischen Fraktionen wurden vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **14** wurde als gelber Feststoff isoliert (0,91 g, Ausbeute: 79 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.27 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.45 (dd, J = 15.2, 8.2 Hz, 3H), 7.24 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 6.88 (s, 2H), 6.43 (dd, J = 7.2, 5.0 Hz, 1H), 4.78 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 158.07, 152.30, 150.40, 148.47, 144.91, 139.29, 139.26, 134.93, 133.94, 130.90, 130.40, 128.47, 119.63, 111.61, 106.81, 33.93. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 415,69 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 415,96.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 15

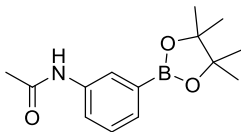


Verbindung **14** (25 mg, 1 Äq.) und *N*-(2-Oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid-2,2,2 trifluoacetat **6** (48,3 mg, 2 Äq.) wurden in dDMF (4 mL) gelöst. Nach der Zugabe von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mg, 6 Äq.) wurde die Suspension 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde überschüssiges DMF im Luftstrom entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Reinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) / MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **15** wurde als hellgelber Feststoff (32,6 mg, Ausbeute: 87 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 10.81 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.44 (dd, *J* = 19.2, 8.3 Hz, 3H), 7.32 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 7.18 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 3H), 6.44 – 6.36 (m, 2H), 6.24 (dd, *J* = 17.0, 1.8 Hz, 1H), 5.77 – 5.69 (m, 1H), 4.15 (tt, *J* = 12.4, 4.0 Hz, 1H), 3.63 (s, 2H), 3.01 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.34 (qd, *J* = 12.7, 3.9 Hz, 2H), 2.16 (t, *J* = 11.2 Hz, 2H), 1.69 (d, *J* = 10.0 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 162.77, 157.86, 154.01, 152.04, 150.19, 148.06, 144.42, 139.46, 138.41, 133.52, 133.36, 132.65, 132.05, 129.85, 128.98, 127.65, 126.33, 124.50, 119.07, 112.14, 111.05, 108.64, 106.05, 100.95, 61.30, 54.92, 52.74, 50.10, 28.70. HPLC-MS (*m/z*): Berechnet: 620,11 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 620,08.



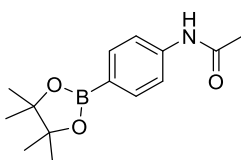
**Synthetische Darstellung von *N*-(3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetamid (17a)**



3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)anilin **16a** (419,5 mg, 1,91 mmol, 1 Äq.) wurde in Essigsäureanhydrid (50 mL, 527 mmol, 275 Äq.) gelöst und für 1 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Das überschüssige Essigsäureanhydrid wurde unter reduziertem Druck entfernt. Verbindung **17a** wurde als weißer Feststoff (493 mg, Ausbeute: 99 %) erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.92 (s, 1H), 7.89 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 7.73 (dt,  $J = 7.5, 1.9$  Hz, 1H), 7.35 – 7.26 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.29 (s, 12H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168.74, 139.38, 129.41, 128.74, 125.41, 122.39, 84.11, 25.15, 24.44. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 262,13 für  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{BNO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 262,34.

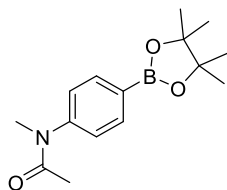
**Synthetische Darstellung von *N*-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetamid (17b)**



4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3-dioxolan-2-yl)anilin **16b** (300 mg, 1,37 mmol, 1 Äq.) wurde in Essigsäureanhydrid (25 mL, 264 mmol, 194 Äq.) gelöst und für 1 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Das überschüssige Essigsäureanhydrid wurde unter reduziertem Druck entfernt. Verbindung **17b** wurde als weißer Feststoff (350 mg, Ausbeute: 99 %) isoliert.

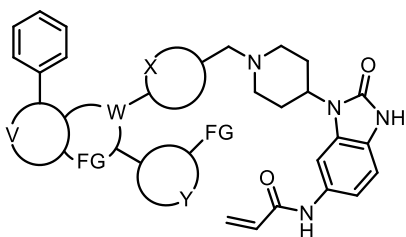
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 10.04 (s, 1H), 7.59 (s, 4H), 2.05 (s, 3H), 1.27 (s, 12H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 168.57, 142.15, 135.27, 122.52, 117.93, 83.41, 24.69, 24.13. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 262,13 für  $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{BNO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 262,16.

**Synthetische Darstellung von *N*-methyl-*N*-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetamid (**18**)**



*N*-(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetamid **17b** (300 mg, 1,15 mmol, 1 Äq.) wurde in wasserfreiem THF (10 mL) gelöst. 60 % NaH in Mineralöl (82,8 mg, 3,45 mmol, 3 Äq.) wurde langsam zugegeben und die Suspension für 15 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor Methyljodid (86 µL, 1,38 mmol, 1,2 Äq.) tropfenweise zugesetzt wurde. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der verbleibende Feststoff in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Das Rohprodukt von **18** wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

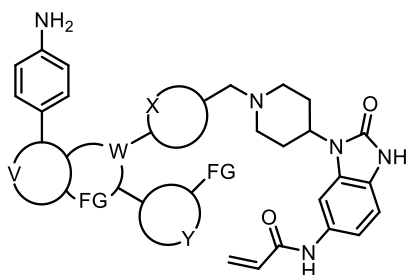
## Synthetische Darstellung von Verbindung 19a



Zu einer Lösung von Verbindung **15** (40 mg, 1 Äq.) in einer 5:1-Mischung aus 1,4-Dioxan:H<sub>2</sub>O wurde Phenylboronsäure (11,8 mg, 1,5 Äq.) zugegeben. Nach 20-minütiger Entgasung der Lösung mit Argon wurden K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (29,6 mg, 2 Äq.) und Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5,2 mg, 0,1 Äq.) zugegeben und die Suspension wurde für 2 h bei 130 °C in einem Mikrowellenreaktor erhitzt. Anschließend wurde die Suspension mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Reinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **19a** wurde als hellgelber Feststoff (29,7 mg, Ausbeute: 70 %) isoliert.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 10.83 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.27 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.01 (ddd, J = 10.9, 8.4, 3.7 Hz, 4H), 7.70 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.47 (dd, J = 15.3, 8.0 Hz, 4H), 7.38 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 7.18 (dd, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.03 (s, 2H), 6.90 (dd, J = 21.4, 8.4 Hz, 1H), 6.40 (ddd, J = 10.2, 9.7, 3.9 Hz, 2H), 6.23 (dd, J = 17.0, 2.0 Hz, 1H), 5.72 (dd, J = 10.1, 2.0 Hz, 1H), 4.16 (tt, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.02 (d, J = 10.9 Hz, 2H), 2.40 – 2.30 (m, 2H), 2.17 (t, J = 11.3 Hz, 2H), 1.70 (d, J = 9.3 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 163.23, 158.41, 154.48, 152.21, 151.82, 150.43, 149.14, 139.35, 139.26, 138.85, 134.59, 133.92, 133.12, 132.50, 130.21, 129.44, 129.25, 129.17, 128.10, 127.94, 127.12, 126.83, 124.96, 116.74, 112.60, 111.53, 109.12, 106.80, 101.41, 61.78, 53.21, 50.57, 29.17. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 662,77 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 662,50.

## Synthetische Darstellung von Verbindung **19b**

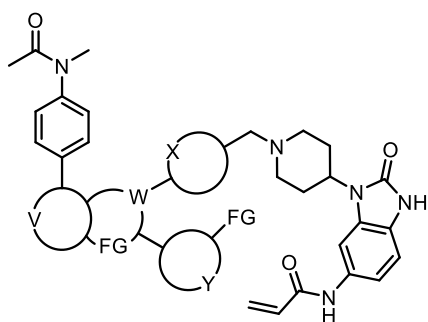


Verbindung **19b** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (30 mg, 1 Äq.) und 4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)anilin (15,8 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19b** wurde als hellgelber Feststoff (16,0 mg, Ausbeute: 49 %) erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 10.80 (d,  $J = 31.1$  Hz, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.13 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.97 (dd,  $J = 4.8, 1.7$  Hz, 1H), 7.82 – 7.60 (m, 4H), 7.58 – 7.42 (m, 4H), 7.39 – 7.16 (m, 2H), 7.13 (dd,  $J = 7.7, 1.6$  Hz, 1H), 7.05 (s, 2H), 6.91 (dd,  $J = 21.3, 8.4$  Hz, 1H), 6.60 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.45 – 6.32 (m, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.77 – 5.66 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.25 – 4.07 (m,  $J = 20.0, 13.3$  Hz, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.02 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 2.35 (d,  $J = 10.9$  Hz, 2H), 2.18 (d,  $J = 12.1$  Hz, 2H), 1.69 (d, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 171.56, 162.82, 157.95, 154.05, 152.55, 150.43, 149.75, 149.67, 148.50, 138.17, 134.39, 132.69, 132.05, 129.75, 129.01, 127.68, 127.23, 126.44, 126.15, 125.37, 124.53, 114.71, 114.22, 113.72, 112.19, 111.07, 108.70, 106.50, 100.99, 61.39, 52.76, 50.13, 28.73. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 677,30  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 677,27.



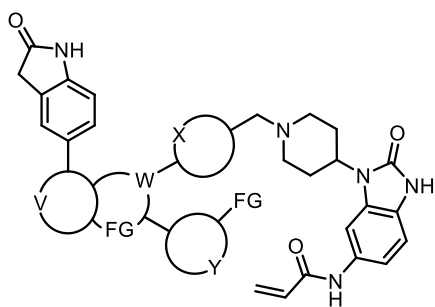
## Synthetische Darstellung von Verbindung 19d



Verbindung **19d** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (35 mg, 1 Äq.) und *N*-methyl-*N*-(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetamid **18** (23,3 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19d** wurde als gelber Feststoff erhalten (16 mg, Ausbeute: 39 %).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 10.80 (d,  $J = 31.2$  Hz, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.28 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.12 – 7.95 (m, 4H), 7.71 (s, 1H), 7.51 (dd,  $J = 29.6, 8.0$  Hz, 4H), 7.41 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.30 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 7.04 (s, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.39 (dt,  $J = 10.6, 7.3$  Hz, 2H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.71 (dd,  $J = 10.1, 1.9$  Hz, 1H), 4.24 – 4.08 (m, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.16 (s, 3H), 3.02 (d,  $J = 9.6$  Hz, 2H), 2.35 (d, 2H), 2.17 (dd,  $J = 14.2, 8.8$  Hz, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.70 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 171.54, 162.80, 157.98, 154.05, 151.92, 150.54, 150.03, 148.73, 144.66, 138.94, 138.43, 134.12, 133.58, 132.69, 132.05, 129.79, 129.00, 128.31, 127.66, 127.57, 126.38, 124.52, 124.02, 116.41, 114.71, 112.15, 111.10, 108.70, 106.32, 100.95, 61.35, 52.78, 51.20, 33.28, 28.70, 22.13. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 733,32  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 733,36.

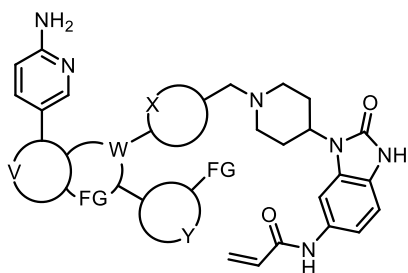
## Synthetische Darstellung von Verbindung 19e



Verbindung **19e** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (40 mg, 1 Äq.) und 5-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)indolin-2-on (25 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19e** wurde als gelber Feststoff erhalten (25,1 mg, Ausbeute: 54 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 10.75 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 10.49 (s, 1H), 8.23 – 8.19 (m, 1H), 8.02 – 7.96 (m, 1H), 7.91 – 7.86 (m, 3H), 7.54 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.51 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 7.47 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.24 – 7.16 (m, 1H), 7.15 – 7.10 (m, 1H), 7.02 (s, 2H), 6.95 – 6.84 (m, 3H), 6.77 (s, 1H), 6.47 – 6.41 (m, 1H), 6.40 – 6.35 (m, 1H), 4.15 (s, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.53 (s, 2H), 3.02 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 2.28 (dd, J = 15.1, 7.5 Hz, 2H), 2.17 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 1.69 (d, J = 8.4 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 179.97, 177.00, 172.00, 170.75, 158.41, 154.50, 152.25, 151.71, 150.29, 149.06, 144.91, 138.71, 134.68, 133.34, 132.63, 131.28, 130.24, 129.40, 128.18, 127.89, 127.17, 126.88, 126.83, 124.48, 123.21, 116.04, 111.50, 109.69, 109.00, 106.87, 102.36, 101.24, 61.78, 53.20, 36.30, 29.97, 29.17. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 717,29 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 717,51.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 19f

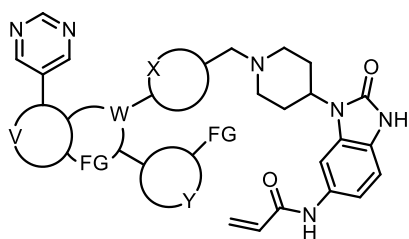


Verbindung **19f** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (40 mg, 1 Äq.) und 5-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyridin-2-amin (21,3 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19f** wurde als gelber Feststoff erhalten (29,3 mg, Ausbeute: 67 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 10.82 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.62 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 8.17 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.03 – 7.96 (m, 2H), 7.82 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.53 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.46 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.32 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H), 7.04 (s, 2H), 6.90 (dd,  $J = 25.5, 8.4$  Hz, 1H), 6.49 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.44 – 6.34 (m, 2H), 6.27 – 6.19 (m, 3H), 5.72 (dd,  $J = 10.1, 1.9$  Hz, 1H), 4.20 – 4.11 (m, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.02 (d,  $J = 9.4$  Hz, 2H), 2.41 – 2.31 (m, 2H), 2.17 (t,  $J = 10.0$  Hz, 2H), 1.70 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 171.52, 162.79, 159.98, 157.93, 154.03, 150.75, 150.56, 149.75, 148.52, 146.81, 138.21, 135.25, 132.66, 132.46, 132.04, 129.70, 129.00, 127.62, 127.40, 126.36, 124.51, 124.01, 122.83, 114.62, 112.17, 111.05, 108.65, 107.65, 106.40, 100.95, 61.33, 52.74, 50.12, 28.70. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 678,29  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 678,33.



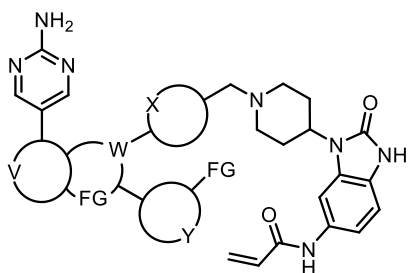
## Synthetische Darstellung von Verbindung 19g



Verbindung **19g** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (30 mg, 1 Äq.) und Pyrimidin-5-boronsäure (8.9 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19g** wurde als gelber Feststoff erhalten (24,6 mg, Ausbeute: 77 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.81 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 9.40 (s, 2H), 9.20 (s, 1H), 8.37 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.16 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.02 (dd,  $J = 4.7, 1.7$  Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.53 (dd,  $J = 28.3, 8.3$  Hz, 4H), 7.30 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.21 (dd,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H), 7.04 (s, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.43 – 6.36 (m, 2H), 6.26 – 6.20 (m, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.8$  Hz, 1H), 4.15 (t,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.02 (d,  $J = 10.7$  Hz, 2H), 2.40 – 2.30 (m, 2H), 2.17 (t,  $J = 11.3$  Hz, 2H), 1.69 (d,  $J = 10.3$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.24, 158.48, 158.43, 155.26, 154.48, 153.09, 150.71, 149.35, 146.45, 139.51, 139.00, 134.95, 134.34, 133.12, 132.51, 132.46, 130.22, 129.46, 128.30, 127.97, 126.81, 124.97, 117.22, 112.61, 111.58, 109.12, 106.55, 101.41, 61.78, 53.22, 50.59, 29.17. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 664,74  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 664,14.

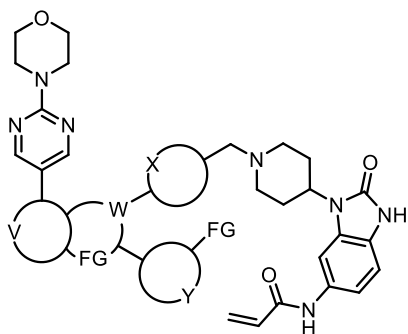
## Synthetische Darstellung von Verbindung 19h



Verbindung **19h** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (30 mg, 1 Äq.) und 2-Aminopyrimidin-5-boronsäure (10,1 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19h** wurde als gelber Feststoff erhalten (19,3 mg, Ausbeute: 59 %).

$^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.81 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.87 (s, 2H), 8.22 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J = 4.7, 1.7$  Hz, 1H), 7.88 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.54 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.46 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.32 (dd,  $J = 8.4, 1.5$  Hz, 1H), 7.16 (dd,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H), 7.03 (s, 2H), 6.96 – 6.90 (m, 3H), 6.43 – 6.37 (m, 2H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.8$  Hz, 1H), 5.71 (dd,  $J = 10.2, 1.8$  Hz, 1H), 4.15 (tt,  $J = 12.4, 4.0$  Hz, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.02 (d,  $J = 11.1$  Hz, 2H), 2.35 (tt,  $J = 12.2, 6.1$  Hz, 2H), 2.17 (t,  $J = 11.3$  Hz, 2H), 1.70 (d,  $J = 10.2$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.83, 163.26, 158.41, 156.91, 154.49, 151.60, 150.35, 149.01, 148.69, 139.35, 138.75, 134.58, 133.41, 133.14, 132.52, 130.18, 129.47, 128.08, 128.04, 126.80, 124.98, 121.54, 115.01, 112.63, 111.55, 109.11, 106.76, 101.40, 61.81, 53.20, 50.61, 29.17. HPLC-MS (m/z): Calc.: 679,76  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 679,33.

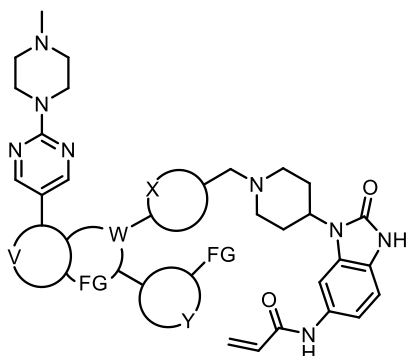
## Synthetische Darstellung von Verbindung 19i



Verbindung **19i** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (30 mg, 1 Äq.) und 4-(5-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyrimidin-2-yl)morpholin (21,1 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19i** wurde als gelber Feststoff erhalten (27,6 mg, Ausbeute: 76 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.81 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 9.01 (s, 2H), 8.24 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 8.00 (dd,  $J$  = 4.8, 1.8 Hz, 1H), 7.92 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.70 (d,  $J$  = 1.1 Hz, 1H), 7.54 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.47 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.31 (dd,  $J$  = 8.4, 1.7 Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J$  = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.04 (s, 2H), 6.92 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.43 – 6.37 (m, 2H), 6.23 (dd,  $J$  = 17.0, 1.9 Hz, 1H), 5.71 (dd,  $J$  = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 4.18 – 4.12 (m, 1H), 3.76 – 3.72 (m, 4H), 3.66 – 3.62 (m, 6H), 3.02 (d,  $J$  = 11.1 Hz, 2H), 2.39 – 2.31 (m, 2H), 2.17 (t,  $J$  = 11.2 Hz, 2H), 1.70 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.23, 161.34, 158.40, 156.63, 154.48, 151.77, 150.42, 149.03, 148.16, 139.30, 138.79, 134.55, 133.61, 133.13, 132.51, 130.18, 129.46, 128.11, 127.95, 126.78, 124.97, 121.70, 115.27, 112.60, 111.56, 109.11, 106.71, 101.39, 66.38, 61.81, 53.22, 50.60, 44.46, 29.18. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 749,85  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 749,24.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 19j

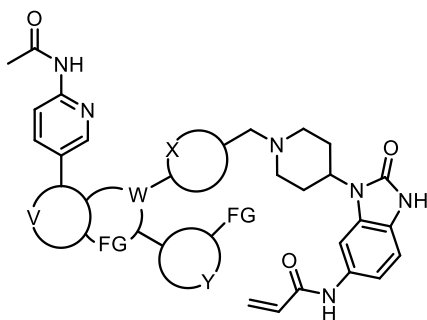


Verbindung **19j** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (30 mg, 1 Äq.) und 2-(4-Methylpiperazin-1-yl)-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyrimidin (22,1 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19j** wurde als gelber Feststoff erhalten (20,4 mg, Ausbeute: 55 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.88 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 9.05 (s, 2H), 8.30 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.06 (dd,  $J = 4.7, 1.6$  Hz, 1H), 7.97 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.60 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.53 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.38 (dd,  $J = 8.4, 1.5$  Hz, 1H), 7.25 (dd,  $J = 7.7, 1.6$  Hz, 1H), 7.10 (s, 2H), 6.98 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.49 – 6.44 (m, 2H), 6.29 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.77 (dd,  $J = 10.2, 1.8$  Hz, 1H), 4.26 – 4.17 (m, 1H), 3.87 – 3.76 (m, 4H), 3.71 (s, 2H), 3.08 (d,  $J = 11.0$  Hz, 2H), 2.43 – 2.37 (m, 6H), 2.28 – 2.19 (m, 5H), 1.76 (d,  $J = 10.1$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.23, 161.25, 158.40, 156.64, 154.48, 151.70, 150.40, 149.02, 148.27, 139.30, 138.78, 134.56, 133.54, 133.14, 132.53, 130.16, 129.45, 128.09, 127.95, 126.75, 124.97, 121.32, 115.20, 112.60, 111.56, 109.11, 106.73, 101.39, 61.81, 54.78, 53.23, 50.61, 46.25, 43.89, 29.19. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 762,89  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 762,34.



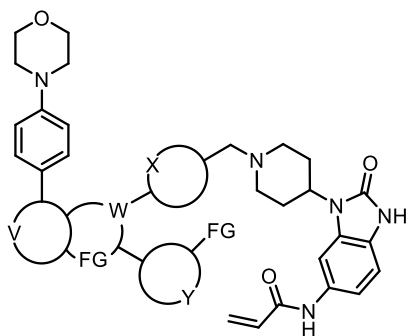
## Synthetische Darstellung von Verbindung 191



Verbindung **191** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (30 mg, 1 Äq.) und *N*-(5-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyridin-2-yl)acetamid (19 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **191** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (28,6 mg, Ausbeute: 82 %).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.82 (s, 1H), 10.60 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.96 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 8.38 (dd,  $J = 8.8, 2.4$  Hz, 1H), 8.29 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.16 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 8.03 – 7.99 (m, 2H), 7.71 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 7.55 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.49 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.32 (dd,  $J = 8.4, 1.6$  Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H), 7.03 (s, 2H), 6.93 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.40 (dt,  $J = 9.9, 7.4$  Hz, 2H), 6.26 – 6.21 (m, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.1, 1.9$  Hz, 1H), 4.20 – 4.13 (m, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.03 (d,  $J = 11.1$  Hz, 2H), 2.40 – 2.31 (m, 2H), 2.18 (t,  $J = 11.2$  Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 1.71 (d,  $J = 10.0$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz, DMSO)  $\delta$  169.84, 163.25, 158.42, 154.49, 152.67, 152.26, 150.47, 149.35, 149.16, 146.71, 139.40, 138.85, 136.54, 134.52, 133.99, 133.13, 132.51, 130.25, 130.20, 129.47, 128.07, 126.80, 124.97, 116.41, 113.39, 112.62, 111.54, 109.12, 106.74, 101.40, 61.81, 53.20, 50.60, 29.18, 24.43, 22.96. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 720,81  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 720,14.

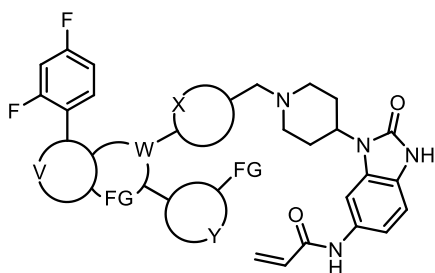
## Synthetische Darstellung von Verbindung 19m



Verbindung **19m** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (30 mg, 1 Äq.) und 4-Morpholinophenyl-boronsäure (15 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19m** wurde als gelber Feststoff erhalten (22 mg, Ausbeute: 61 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.81 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.18 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.98 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.92 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 7.88 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.71 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.46 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.31 (dd,  $J = 8.4, 1.6$  Hz, 2H), 7.16 (dd,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 1H), 7.04 (s, 2H), 6.99 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.43 – 6.36 (m, 2H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.71 (dd,  $J = 10.1, 1.9$  Hz, 1H), 4.16 (tt,  $J = 12.4, 4.1$  Hz, 1H), 3.74 – 3.70 (m, 4H), 3.66 (s, 2H), 3.16 – 3.12 (m, 4H), 3.02 (d,  $J = 11.0$  Hz, 2H), 2.36 (ddd,  $J = 20.9, 7.8, 5.2$  Hz, 2H), 2.17 (t,  $J = 11.3$  Hz, 2H), 1.70 (d,  $J = 9.7$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  163.24, 158.41, 154.48, 152.11, 151.81, 151.39, 150.24, 149.06, 139.25, 138.67, 134.76, 133.14, 133.04, 132.51, 130.21, 129.72, 129.46, 128.11, 127.88, 127.77, 126.80, 124.97, 115.69, 115.15, 112.60, 111.52, 109.12, 106.88, 101.40, 66.44, 61.80, 53.20, 50.60, 48.30, 29.19. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 747,87  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 747,24.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 19n

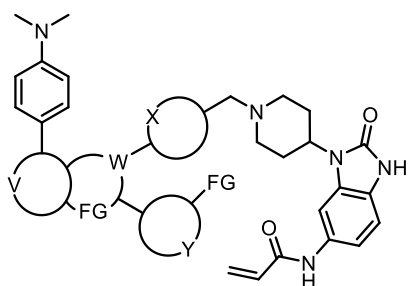


Verbindung **19n** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (30 mg, 1 Äq.) und 2,4-Difluorphenyl-boronsäure (11,5 mg, 1.5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19n** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (13,8 mg, Ausbeute: 41 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.81 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 8.30 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.00 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.86 (td,  $J = 8.9, 6.9$  Hz, 1H), 7.77 (dd,  $J = 8.3, 2.0$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 7.49 (dd,  $J = 27.2, 8.4$  Hz, 4H), 7.38 (ddd,  $J = 11.6, 9.3, 2.5$  Hz, 1H), 7.30 (dd,  $J = 8.4, 1.6$  Hz, 1H), 7.23 – 7.16 (m, 2H), 6.99 (s, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.40 (dt,  $J = 10.3, 7.4$  Hz, 2H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.1, 1.9$  Hz, 1H), 4.15 (tt,  $J = 12.4, 4.0$  Hz, 1H), 3.64 (s, 2H), 3.01 (d,  $J = 11.1$  Hz, 2H), 2.38 – 2.28 (m, 2H), 2.16 (t,  $J = 11.4$  Hz, 2H), 1.69 (d,  $J = 10.1$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  163.24, 162.76 (dd,  $J = 248.4, 12.4$  Hz), 160.25 (dd,  $J = 250.8, 12.4$  Hz), 158.42, 154.48, 152.70, 150.55, 149.21, 147.11, 139.46, 138.92, 134.44, 133.92, 133.12, 133.01 – 132.68 (m), 132.51, 130.21, 129.45, 128.11, 127.65, 126.78, 124.97, 124.47 (dd,  $J = 12.0, 3.5$  Hz), 120.14 (d,  $J = 8.2$  Hz), 112.64 (dd,  $J = 21.1, 3.5$  Hz), 112.60, 111.53, 109.11, 106.76, 105.14 (t,  $J = 20.5$  Hz), 101.41, 61.76, 53.21, 50.58, 29.17.  $^{19}\text{F}$  NMR (565 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -109.63 (dt,  $J = 16.8, 8.4$  Hz), -112.59 (dd,  $J = 18.9, 9.6$  Hz). HPLC-MS (m/z): Berechnet: 698,75  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 698,13.



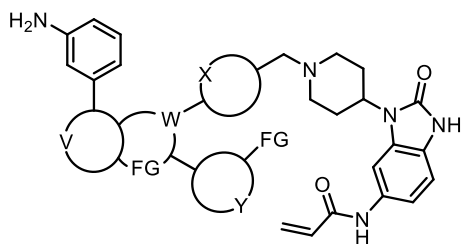
## Synthetische Darstellung von Verbindung 19o



Verbindung **19o** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (30 mg, 0.048 mmol, 1 Äq.) und *N,N*-Dimethyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)anilin (17,9 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19o** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (23,0 mg, Ausbeute: 67 %).

$^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.87 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 8.21 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.04 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.95 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.90 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.60 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.53 – 7.51 (m, 2H), 7.38 (dd,  $J = 8.4, 1.6$  Hz, 1H), 7.21 (dd,  $J = 7.6, 1.8$  Hz, 1H), 7.10 (s, 2H), 6.98 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.82 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.48 – 6.43 (m, 2H), 6.29 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.77 (dd,  $J = 10.1, 1.9$  Hz, 1H), 4.25 – 4.19 (m, 1H), 3.72 (s, 2H), 3.09 (d,  $J = 11.2$  Hz, 2H), 2.99 (s, 6H), 2.42 (qd,  $J = 12.3, 3.5$  Hz, 2H), 2.24 (t,  $J = 11.3$  Hz, 2H), 1.76 (d,  $J = 10.4$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.24, 158.40, 154.49, 152.60, 151.17, 151.03, 150.15, 149.01, 139.19, 138.62, 134.80, 133.14, 132.69, 132.52, 130.16, 129.47, 128.08, 127.92, 127.70, 126.78, 124.98, 115.33, 112.61, 112.53, 111.98, 111.53, 109.11, 106.95, 101.41, 61.80, 53.22, 50.62, 29.19, 0.63. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 705,84  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 705,21.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 19p

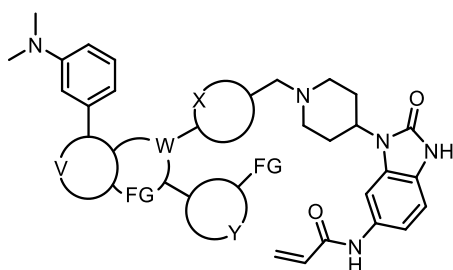


Verbindung **19p** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (35 mg, 1 Äq.) und 3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)anilin (18,5 mg, 1.5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19p** wurde als gelber Feststoff isoliert (29,0 mg, Ausbeute: 76 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.82 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.22 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J = 4.8, 1.7$  Hz, 1H), 7.80 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.53 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.47 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.31 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.16 – 7.12 (m, 2H), 7.09 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.98 (s, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.58 (dd,  $J = 7.8, 1.1$  Hz, 1H), 6.43 – 6.36 (m, 2H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 10.2, 1.8$  Hz, 1H), 5.15 (s, 2H), 4.15 (dt,  $J = 15.9, 6.0$  Hz, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.03 (d,  $J = 10.6$  Hz, 2H), 2.36 (dt,  $J = 21.5, 6.9$  Hz, 2H), 2.17 (t,  $J = 11.3$  Hz, 2H), 1.70 (d,  $J = 10.4$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.26, 158.40, 154.49, 153.03, 151.92, 150.32, 149.38, 149.01, 140.09, 139.32, 138.82, 134.64, 133.65, 133.12, 132.51, 130.28, 130.17, 129.65, 129.46, 128.14, 127.72, 126.81, 124.98, 116.72, 115.14, 114.90, 112.64, 111.52, 109.12, 106.97, 101.43, 61.81, 53.23, 50.60, 29.17. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 677,78  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 677,11.



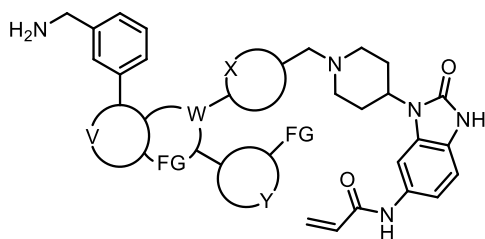
## Synthetische Darstellung von Verbindung 19r



Verbindung **19r** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (30 mg, 1 Äq.) und 3-(*N,N*-Dimethylamino)phenylboronsäure (11,9 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19r** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (26,5 mg, Ausbeute: 78 %).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.84 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.23 (dd,  $J = 8.3, 3.1$  Hz, 1H), 8.00 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.96 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.71 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 7.53 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.50 – 7.47 (m, 2H), 7.43 – 7.40 (m, 1H), 7.31 (dd,  $J = 11.6, 4.8$  Hz, 2H), 7.22 (ddd,  $J = 12.4, 11.2, 6.3$  Hz, 2H), 7.06 (s, 2H), 6.93 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.74 (dd,  $J = 8.2, 2.2$  Hz, 1H), 6.40 (ddd,  $J = 14.0, 9.0, 5.8$  Hz, 2H), 6.26 – 6.20 (m, 1H), 5.71 (dd,  $J = 10.1, 2.0$  Hz, 1H), 4.20 – 4.11 (m, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.01 (d,  $J = 11.6$  Hz, 2H), 2.89 (s, 6H), 2.34 (dt,  $J = 12.2, 8.7$  Hz, 2H), 2.15 (t,  $J = 11.1$  Hz, 2H), 1.69 (d,  $J = 9.7$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.23, 158.41, 154.48, 152.44, 151.88, 151.14, 150.40, 148.92, 139.70, 139.15, 138.82, 134.67, 133.72, 133.13, 132.48, 130.19, 129.73, 129.43, 128.03, 127.71, 126.84, 124.96, 116.70, 115.22, 113.42, 112.59, 111.57, 110.93, 109.14, 109.12, 106.78, 101.39, 61.83, 53.10, 50.55, 49.18, 29.17. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 705,84  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 705,24.

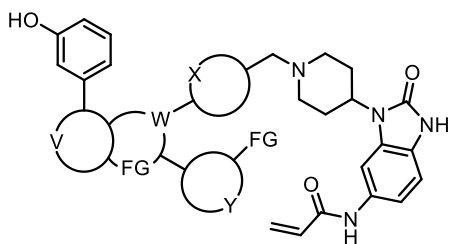
## Synthetische Darstellung von Verbindung 19s



Verbindung **19s** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (50 mg, 1 Äq.) und 3-(Aminomethyl)phenyl)-boronsäure (22,7 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19s** wurde als gelber Feststoff erhalten (18,3 mg, Ausbeute: 33 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.75 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.27 (dd,  $J = 8.3, 3.9$  Hz, 1H), 8.04 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H), 8.01 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.85 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.76 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.55 – 7.48 (m, 5H), 7.44 (dt,  $J = 15.0, 7.6$  Hz, 2H), 7.20 (dd,  $J = 7.6, 1.8$  Hz, 1H), 6.89 – 6.85 (m, 3H), 6.81 – 6.76 (m, 1H), 6.45 (dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz, 1H), 4.28 – 4.18 (m, 1H), 3.79 (s, 2H), 3.51 (s, 2H), 3.07 (d,  $J = 10.7$  Hz, 2H), 2.92 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2H), 2.52 (dd,  $J = 7.1, 4.2$  Hz, 2H), 2.24 (dt,  $J = 12.3, 9.1$  Hz, 2H), 2.16 (t,  $J = 11.2$  Hz, 2H), 1.59 (d,  $J = 9.6$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  170.67, 158.31, 154.43, 153.05, 152.30, 150.40, 148.93, 139.90, 139.28, 138.79, 134.66, 134.02, 133.28, 131.43, 129.47, 129.07, 128.84, 128.05, 127.64, 127.35, 126.24, 124.44, 117.88, 111.96, 111.78, 109.05, 107.18, 102.38, 62.08, 55.39, 54.51, 53.43, 49.81, 45.84, 36.73, 29.19. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 691,81  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 691,26.

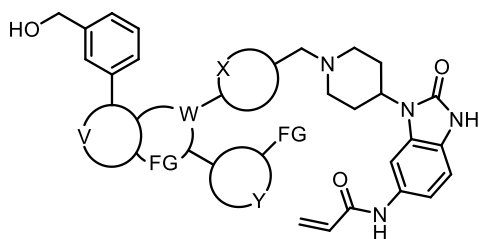
## Synthetische Darstellung von Verbindung 19t



Verbindung **19t** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (10 mg, 1 Äq.) und 3-Hydroxyphenyl-boronsäure (3,3 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **19t** wurde als gelber Feststoff isoliert (6,2 mg, Ausbeute: 57 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.98 (s, 1H), 9.24 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.41 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.16 (dd,  $J = 4.7, 1.6$  Hz, 1H), 7.06 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.71 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 6.67 – 6.63 (m, 2H), 6.62 – 6.57 (m, 2H), 6.48 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.42 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.35 – 6.32 (m, 1H), 6.17 (s, 2H), 6.09 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 5.94 (dt,  $J = 7.8, 3.9$  Hz, 1H), 5.60 – 5.53 (m, 2H), 5.43 – 5.37 (m, 1H), 4.88 (dd,  $J = 10.0, 8.4$  Hz, 1H), 3.33 (s, 1H), 2.83 (s, 2H), 2.20 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 1.56 – 1.48 (m, 2H), 1.35 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 0.87 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H).  
 $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.25, 158.40, 158.13, 154.48, 152.15, 151.99, 150.38, 149.07, 140.69, 139.37, 138.82, 134.60, 133.88, 133.11, 132.49, 130.20, 130.15, 129.46, 128.14, 127.83, 126.81, 124.97, 117.99, 116.74, 116.22, 113.96, 112.60, 111.51, 109.11, 106.86, 101.40, 61.79, 53.23, 50.60, 29.17. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 678,77  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 678,20.

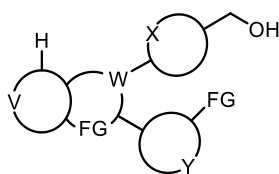
## Synthetische Darstellung von Verbindung 19u



Verbindung **19u** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (50 mg, 1 Äq.) und 3-(Hydroxymethyl)phenylborsäure (18,4 mg, 1,5 Äq.). Verbindung **19u** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (23,3 mg, Ausbeute: 42 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.82 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 8.27 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.96 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.89 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.69 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.48 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.41 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.34 – 7.30 (m, 2H), 7.18 (dd,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 1H), 7.02 (s, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.39 (dt,  $J = 10.0, 7.4$  Hz, 2H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 2.0$  Hz, 1H), 5.71 (dt,  $J = 8.5, 4.2$  Hz, 1H), 5.22 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.54 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2H), 4.16 (tt,  $J = 12.4, 4.1$  Hz, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.02 (t,  $J = 11.5$  Hz, 2H), 2.40 – 2.30 (m, 2H), 2.16 (dd,  $J = 21.8, 10.0$  Hz, 2H), 1.70 (d,  $J = 10.0$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.25, 158.42, 154.49, 152.17, 150.41, 149.17, 143.47, 139.37, 139.12, 138.82, 134.61, 133.87, 133.12, 132.50, 130.22, 129.46, 129.02, 128.15, 127.92, 127.34, 126.81, 125.62, 125.18, 124.98, 116.77, 112.63, 111.53, 109.12, 106.84, 101.43, 70.26, 63.37, 61.80, 53.19, 50.60, 29.17. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 692,79  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 692.21.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 20

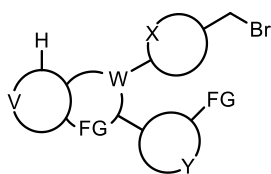


Verbindung **13** (100 mg, 1 Äq.) wurde in MeOH (5 mL) gelöst. Nach der Zugabe von 10 % Palladium auf Aktivkohle (45,4 mg, 1,5 Äq.) wurde die Suspension für 2,5 h unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Katalysator über Celite<sup>®</sup> abfiltriert und das überschüssige Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit 50 mL einer gesättigten wässrigen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aufgenommen und mit DCM (3x 50 mL) extrahiert. Die organischen Fraktionen wurden vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **20** wurde als hellgelber Feststoff (80,3 mg, Ausbeute: 89 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.32 (dd, J = 4.7, 1.5 Hz, 1H), 8.20 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.40 – 7.36 (m, 3H), 7.22 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.40 (dd, J = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 5.36 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 5.8 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 158.41, 151.72, 150.36, 149.34, 144.69, 143.59, 138.85, 134.51, 134.25, 128.07, 127.65, 127.19, 119.60, 111.59, 106.86, 62.81. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 318,35 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 318,13.



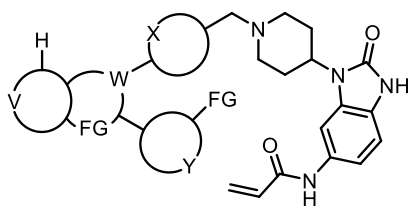
## Synthetische Darstellung von Verbindung 21



Zu einer im Eisbad gekühlten Lösung von Verbindung **20** (60 mg, 1 Äq.) in wasserfreiem 1,4-Dioxan (4 mL) wurde Phosphortribromid (36  $\mu$ L, 2 Äq.) in trockenem 1,4-Dioxan (1 mL) über einen Zeitraum von 30 min unter Argon-Schutzgasatmosphäre zugegeben. Um die Produktbildung zu maximieren, wurde die Lösung 72 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gequenchet und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die organischen Fraktionen wurden vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0  $\rightarrow$  9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1  $\rightarrow$  0/1). Verbindung **21** wurde als gelber Feststoff isoliert (54,5 mg, Ausbeute: 76 %).

<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.33 (dd, J = 4.7, 1.4 Hz, 1H), 8.21 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 8.00 (dd, J = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.43 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 2H), 7.40 (dd, J = 8.0, 4.7 Hz, 1H), 7.25 – 7.23 (m, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.43 (dd, J = 7.5, 4.9 Hz, 1H), 4.78 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, DMSO)  $\delta$  158.10, 151.49, 149.97, 149.19, 144.77, 139.30, 138.91, 135.55, 134.64, 130.78, 128.58, 127.34, 119.73, 111.64, 107.15, 34.03. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 381,25 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 381,03.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 22

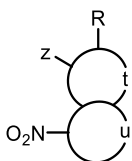


Verbindung **21** (25 mg, 1 Äq.) und *N*-(2-Oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid-2,2,2 trifluoacetat **6** (52,6 mg, 2 Äq) wurden in dDMF (4 mL) gelöst. Nach der Zugabe von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (54,5 mg, 6 Äq.) wurde die Suspension 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde überschüssiges DMF im Luftstrom entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Reinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **22** wurde als hellgelber Feststoff (28 mg, Ausbeute: 73 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.81 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 8.33 (dd, *J* = 4.7, 1.4 Hz, 1H), 8.21 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 4.8, 1.8 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.44 – 7.36 (m, 3H), 7.31 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.01 (s, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.44 – 6.36 (m, 2H), 6.24 (dd, *J* = 17.0, 1.9 Hz, 1H), 5.72 (dd, *J* = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 4.18 – 4.10 (m, 1H), 3.63 (s, 2H), 3.00 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 2.38 – 2.28 (m, 2H), 2.15 (t, *J* = 11.4 Hz, 2H), 1.69 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.24, 158.43, 154.48, 151.73, 150.42, 149.26, 144.73, 139.47, 138.84, 134.60, 134.51, 133.13, 132.51, 130.28, 129.44, 128.22, 127.20, 126.81, 124.97, 119.63, 112.61, 111.54, 109.12, 106.74, 101.41, 61.80, 53.15, 50.57, 29.17. HPLC-MS (*m/z*): Berechnet: 586,67 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 586,02.



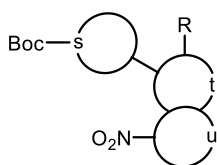
## Synthetische Darstellung von Verbindung 25



Verbindung **24** (1,75 g, 1 Äq.) wurde in DMF (30 mL) suspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur gerührt. *N*-Iodsuccinimid (2,35 g, 1,05 Äq.) wurde hinzugefügt und die Suspension wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, bevor überschüssiges DMF unter im Luftstrom entfernt wurde. Der Rückstand wurde mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Verbindung **25** wurde als brauner Feststoff erhalten (2,98 g, Ausbeute: 99 %)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.15 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 9.1, 2.3 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 141.86, 140.22, 138.09, 129.84, 117.80, 117.43, 111.76, 58.16, 33.82. HPLC-MS (*m/z*): Nicht gefunden.

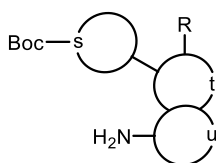
## Synthetische Darstellung von Verbindung 26



Verbindung **25** (2 g, 1 Äq.) und der Boronsäure-Pinakolester (3,0 g, 1,5 Äq.) wurden in 110 mL einer 5:1-Mischung aus DME und H<sub>2</sub>O gelöst. Nach 15-minütiger Entgasung der Lösung mit Argon wurden Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,75 g, 2,5 Äq.) und Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (48 mg, 0,01 Äq.) zugegeben und die Suspension wurde für 24 Stunden bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde die Suspension mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **26** wurde als orangefarbener Feststoff isoliert (1,6 g, Ausbeute: 68 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.70 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 9.1, 2.2 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.66 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 6.20 (s, 1H), 4.07 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.58 (t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.32 (s, 2H), 1.44 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 154.43, 141.50, 140.50, 131.43, 129.01, 125.16, 124.41, 118.02, 117.42, 117.29, 111.24, 79.29, 40.53, 33.51, 28.59, 25.08, 24.95. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 358,41 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 358,92.

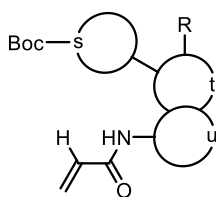
## Synthetische Darstellung von Verbindung 27



Verbindung **26** (3,55 g, 1 Äq.) wurde in *i*PrOH (100 mL) gelöst und mit 10 % Palladium auf Aktivkohle (1,05 g, 1 Äq.) versetzt. Die Suspension wurde für 24 Stunden unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Der verbleibende Pd-Katalysator wurde mit Celite® abfiltriert, und das überschüssige Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einer gesättigten, wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> suspendiert und mit DCM (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 100/1 → 25/1). Verbindung **27** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (1,98 g, Ausbeute: 60 %).

<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.06 – 7.03 (m, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.71 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.52 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.04 (s, 2H), 3.60 (s, 3H), 2.96 – 2.81 (m, 2H), 2.78 (tt, J = 11.7, 3.4 Hz, 1H), 1.88 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 1.47 (td, J = 12.6, 4.0 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H).  
<sup>13</sup>C NMR (176 MHz, DMSO) δ 154.41, 141.15, 131.38, 127.78, 125.35, 117.13, 112.21, 110.21, 102.54, 78.95, 40.50, 33.56, 32.97, 32.69, 28.61. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 330,44 [M+H]<sup>+</sup>, found: 329,87.

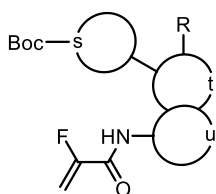
## Synthetische Darstellung von Verbindung 28a



Verbindung **27** (0,6 g, 1 Äq.) wurde in dTHF (20 mL) gelöst und mit DIPEA (0,62 mL, 2 Äq.) versetzt. Acryloylchlorid (0,16 mL, 1,1 Äq.) wurde in dTHF (1 mL) gelöst und über einen Zeitraum von fünf Minuten bei 4 °C tropfenweise zugegeben. Nach 2 h Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 100/1 → 25/1). Verbindung **28a** wurde als weißer Feststoff (0,63 g, Ausbeute: 91 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.99 (s, 1H), 8.00 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 7.34 (dt, J = 15.6, 5.2 Hz, 2H), 7.09 (s, 1H), 6.45 (dd, J = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.23 (dd, J = 17.0, 2.0 Hz, 1H), 5.70 (dd, J = 10.1, 2.0 Hz, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.96 – 2.82 (m, 3H), 1.91 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 1.54 – 1.46 (m, 2H), 1.42 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.09, 154.40, 134.21, 132.79, 131.17, 126.63, 126.58, 126.26, 118.79, 115.20, 110.10, 109.94, 79.00, 40.53, 33.41, 33.03, 32.82, 28.60. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 384,49 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 383,89.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 28b

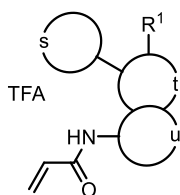


2-Fluoracrylsäure (87,5 mg, 1 Äq.) wurde in 10 mL DCM bei 0 °C gelöst und TEA (0,16 mL, 1,2 Äq.) sowie TBTU (0,37 g, 1,2 Äq.) wurden zugesetzt. Die Lösung wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor Verbindung **27** (0,32 g, 1 Äq.) zugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 100/1 → 25/1). Verbindung **28b** wurde als roter Feststoff (0,26 g, Ausbeute: 66 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.15 (s, 1H), 7.96 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 8.8, 1.9 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 5.68 (dd, J = 47.7, 3.5 Hz, 1H), 5.37 (dd, J = 15.6, 3.5 Hz, 1H), 4.05 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.97 – 2.78 (m, 3H), 1.91 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 1.50 (qd, J = 12.2, 3.7 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 157.54 (d, J = 31.4 Hz), 157.09 (d, J = 270.2 Hz), 154.41, 134.69, 129.61, 126.72, 126.49, 118.93, 116.46, 111.83, 109.96, 99.51 (d, J = 14.9 Hz), 79.00, 40.52, 33.43, 33.00, 32.83, 28.60. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 402,48 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 401,81.



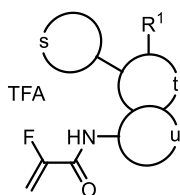
## Synthetische Darstellung von Verbindung 29a



Verbindung **28a** (0,64 g, 1 Äq.) wurde in einem Gemisch aus DCM (30 mL) und TFA (10 mL) gelöst und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssige TFA wurden unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in H<sub>2</sub>O (50 mL) resuspendiert und anschließend lyophilisiert. Verbindung **29a** wurde als weißes Salz (0,65 g, Ausbeute: 99 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.02 (s, 1H), 8.57 (dd, J = 138.7, 9.3 Hz, 2H), 8.10 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.24 (dd, J = 8.7, 1.8 Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.46 (dd, J = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.23 (dd, J = 17.0, 2.0 Hz, 1H), 5.71 (dd, J = 10.1, 2.0 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.39 (d, J = 12.4 Hz, 2H), 3.16 – 3.01 (m, 3H), 2.10 (d, J = 13.3 Hz, 2H), 1.80 (qd, J = 13.9, 3.7 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.17, 158.56 (q, J = 32.6 Hz), 134.27, 132.75, 131.17, 126.52, 126.43, 126.30, 117.68, 117.23 (q, J = 297.8 Hz), 115.64, 110.27, 44.06, 40.52, 32.85, 31.17, 29.75. <sup>19</sup>F NMR (565 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -73.94. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 284,37 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 284,08.

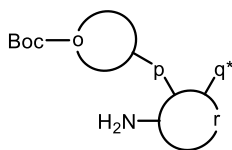
## Synthetische Darstellung von Verbindung 29b



Verbindung **28b** (0,25 g, 1 Äq.) wurde in einem Gemisch aus DCM (30 mL) und TFA (10 mL) gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssige TFA wurden unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in H<sub>2</sub>O (50 mL) resuspendiert und anschließend lyophilisiert. Verbindung **29b** wurde als weißes Salz erhalten (0,25 g, Ausbeute: 98 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.17 (s, 1H), 8.62 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 8.40 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 7.35 (dt, J = 8.8, 5.2 Hz, 2H), 7.14 (s, 1H), 5.73 – 5.61 (m, 1H), 5.39 (dd, J = 15.6, 3.5 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.38 (d, J = 12.5 Hz, 2H), 3.13 – 3.01 (m, 3H), 2.09 (d, J = 13.3 Hz, 2H), 1.80 (qd, J = 13.9, 3.8 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ 158.68 (q, J = 35.5 Hz), 157.68 (d, J = 31.4 Hz), 157.07 (d, J = 270.0 Hz), 134.80, 129.57, 126.69, 126.27, 117.78, 117.05, 116.36 (q, J = 292.9 Hz), 112.23, 110.16, 44.08, 32.88, 31.19, 29.70. <sup>19</sup>F NMR (565 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -116.45 (dd, J = 47.8, 15.6 Hz), -74.58. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 302,36 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 302,18.

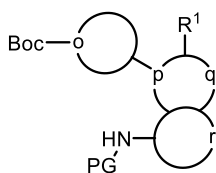
## Synthetische Darstellung von Verbindung 32



Das Nucleophil **31** (1,28 g, 1 Äq.) wurde in 30 mL DMSO unter Argon-Schutzgasatmosphäre gelöst. DIPEA (5,4 mL, 5 Äq.) und Elektrophil **30** (1,0 g, 1 Äq.) wurden zugegeben und die Lösung für 20 Stunden bei 80 °C erhitzt. Anschließend wurde das überschüssige Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der verbleibende ölige Rückstand wurde in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 50/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) / MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **32** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (1,5 g, Ausbeute: 70 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.35 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 6.61 (s, 2H), 6.01 (dd, J = 9.4, 2.2 Hz, 1H), 5.93 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.86 (d, J = 12.8 Hz, 2H), 3.60 – 3.52 (m, 1H), 2.98 (s, 2H), 1.96 (d, J = 10.4 Hz, 2H), 1.43 – 1.34 (m, 11H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 156.95, 154.29, 147.33, 129.41, 122.50, 106.77, 92.26, 79.26, 55.40, 48.95, 31.55, 28.54. HPLC-MS (m/z): Nicht gefunden.

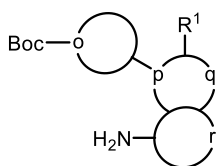
### Synthetische Darstellung von Verbindung 33



Verbindung **32** (0,5 g, 1 Äq.) und die aq. organische Säure (8 mL) wurden in 24 mL *i*PrOH gelöst und für 20 Minuten unter Argon-Schutzgasatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend in ein verschlossenes Druckgefäß überführt in dem die anorganische Säure (0,79 g, 10 Äq.) und das Reduktionsmittel (0,83 g, 10 Äq.) vorgelegt wurden. Das Gemisch wurde für 21 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde das überschüssige Reduktionsmittel über Celite® abfiltriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> suspendiert und mit DCM (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **33** wurde als gelber Feststoff isoliert (0,46 g, Ausbeute: 45 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.26 (s, 1H), 8.32 – 8.28 (m, 2H), 8.10 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.60 – 7.56 (m, 1H), 7.20 (dd, J = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 4.49 (dt, J = 15.8, 11.8, 3.8 Hz, 1H), 4.13 (s, 2H), 2.96 (s, 2H), 2.01 (d, J = 9.8 Hz, 2H), 1.96 – 1.85 (m, 2H), 1.43 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163.55, 159.88, 154.20, 142.35, 140.36, 133.87, 133.50, 120.15, 114.93, 101.56, 79.41, 52.90, 31.99, 28.57. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 345,41 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 344,95.

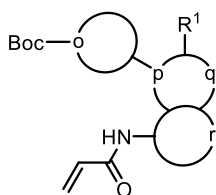
## Synthetische Darstellung von Verbindung 34



Verbindung **33** (0,1 g, 1 Äq.) wurde in 10 mL einer 5:1-Mischung aus EtOH und H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Zugabe von NaOH (23,2 mg, 2 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 18 Stunden bei 75 °C erhitzt. Das überschüssige Lösungsmittel wurde anschließend unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> suspendiert und mit DCM (3 x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 100/1 → 33/1) und Umkehrphasenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **34** wurde als gelber Feststoff (66 mg, Ausbeute: 72 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.96 (s, 1H), 7.28 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.52 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 4.94 (s, 2H), 4.31 (tt, J = 11.9, 3.8 Hz, 1H), 4.12 (s, 2H), 2.93 (s, 2H), 1.98 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 1.87 (qd, J = 12.4, 4.4 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 154.23, 145.30, 139.20, 136.08, 134.82, 120.08, 111.79, 93.97, 79.38, 52.69, 42.83, 31.89, 28.58. HPLC-MS (m/z): Nicht gefunden.

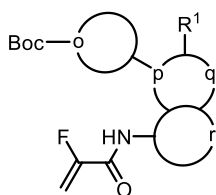
## Synthetische Darstellung von Verbindung 35a



Verbindung **34** (0,35 g, 1 Äq.) wurde in dTHF (10 mL) gelöst und mit DIPEA (0,37 mL, 2 Äq.) versetzt. Acryloylchlorid (0,1 mL, 1,1 Äq.) wurde in dTHF (1 mL) gelöst und über einen Zeitraum von 5 min bei 4 °C tropfenweise zugegeben. Nach 2 h wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 100/1 → 25/1) und Umkehrphasenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **35a** wurde als hellgelber Feststoff (0,35 g, Ausbeute: 85 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.23 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.21 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.27 (dd, J = 8.6, 1.8 Hz, 1H), 6.47 (dd, J = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.27 (dd, J = 17.0, 1.9 Hz, 1H), 5.77 – 5.74 (m, 1H), 4.47 (tt, J = 11.8, 3.9 Hz, 1H), 4.14 (s, 2H), 2.98 (s, 2H), 2.03 (d, J = 10.3 Hz, 2H), 1.93 (qd, J = 12.3, 4.3 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.46, 154.23, 142.30, 140.42, 134.61, 133.55, 132.45, 127.01, 120.02, 115.28, 101.79, 79.43, 53.01, 42.67, 32.01, 28.57. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 370,45 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 370,91.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 35b



2-Fluoracrylsäure (18,2 mg, 1 Äq.) wurde in 4 mL DCM bei 4 °C gelöst. TEA (34 µL, 1,2 Äq.) und TBTU (78 mg, 1,2 Äq.) wurden zugesetzt und die Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor Verbindung **34** (76,8 mg, 1,2 Äq.) zugegeben und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 100/1 → 25/1). Verbindung **35b** wurde als weißer Feststoff (43 mg, Ausbeute: 55 %) erhalten.

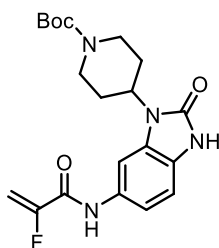
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.38 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.11 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 8.7, 1.9 Hz, 1H), 5.72 (dd, J = 47.3, 3.9 Hz, 1H), 5.43 (dd, J = 15.6, 3.6 Hz, 1H), 4.49 (tt, J = 11.8, 3.9 Hz, 1H), 4.14 (s, 2H), 2.97 (s, 2H), 2.02 (d, J = 10.1 Hz, 2H), 1.94 (qd, J = 12.3, 4.3 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 158.06 – 157.49 (m), 155.69, 154.22, 142.74, 141.06, 133.33, 133.12, 119.83, 116.63, 103.64, 100.12 (d, J = 14.8 Hz), 79.44, 53.11, 31.95, 28.56, 22.97. <sup>19</sup>F NMR (471 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -116.76 (dd, J = 47.1, 16.1 Hz). HPLC-MS (m/z): Berechnet: 389,44 for [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 389,01.







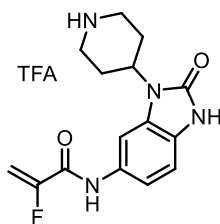
## Synthetische Darstellung von Verbindung 37



2-Fluoracrylsäure (0,12 g, 1 Äq.) wurde in 15 mL DCM bei 4 °C gelöst und mit TEA (208,5  $\mu$ L, 1,2 Äq.) und TBTU (0,48 g, 1,2 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde 20 Minuten bei 4 °C gerührt, bevor *tert*-Butyl-4-(6-amino-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat **4** (0,5 g, 1 Äq.) zugegeben und weitere 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 100/1 → 25/1). Verbindung **37** wurde als weißer Feststoff (0,32 g, Ausbeute: 63 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.87 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.67 (dd, *J* = 47.7, 3.5 Hz, 1H), 5.39 (dd, *J* = 15.6, 3.5 Hz, 1H), 4.30 (tt, *J* = 12.4, 4.0 Hz, 1H), 4.11 (s, 2H), 2.88 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.14 (qd, *J* = 12.6, 4.5 Hz, 2H), 1.69 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  157.71, 157.67, 157.46, 155.92, 154.43, 154.38, 131.58, 129.29, 125.71, 114.28, 108.95, 102.87, 99.95, 99.85, 79.40, 50.29, 29.07, 28.56. HPLC-MS (*m/z*): Berechnet: 405,44 [M+H]<sup>+</sup>, found.: 404,98.

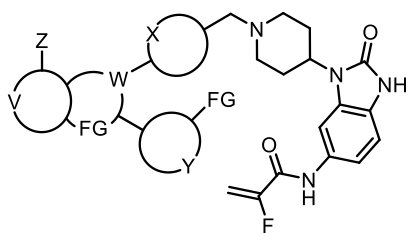
## Synthetische Darstellung von Verbindung 38



*tert*-Butyl-4-(6-(2-fluoracrylamido)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat **37** (0,32 g, 1 Äq.) wurde in einer Mischung aus DCM (30 mL) und TFA (10 mL) gelöst und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssiges TFA wurden unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in H<sub>2</sub>O (50 mL) resuspendiert und anschließend lyophilisiert. Verbindung **38** wurde als weißer Feststoff (0,33 g, Ausbeute: 99 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.94 (s, 1H), 10.26 (s, 1H), 8.74 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 8.52 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.68 (dd, *J* = 47.7, 3.6 Hz, 1H), 5.41 (dd, *J* = 15.6, 3.6 Hz, 1H), 4.45 (tt, *J* = 12.3, 4.0 Hz, 1H), 3.43 (d, *J* = 12.4 Hz, 2H), 3.11 (q, *J* = 12.6 Hz, 2H), 2.59 – 2.50 (m, 2H), 1.88 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 158.71 (q, *J* = 34.7 Hz), 157.86 (d, *J* = 31.8 Hz), 156.81 (d, *J* = 269.6 Hz), 154.40, 131.15, 129.29, 126.07, 116.63 (q, *J* = 294.3 Hz), 115.75, 109.14, 103.85, 99.97 (d, *J* = 14.8 Hz), 47.87, 43.51, 26.05. <sup>19</sup>F NMR (565 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -74.41, -116.74 (dd, *J* = 48.0, 16.0 Hz). HPLC-MS (*m/z*): Berechnet: 305,13 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 305,12.

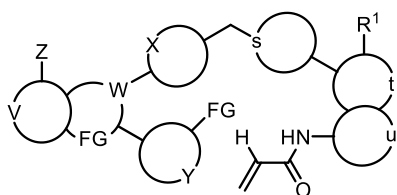
## Synthetische Darstellung von Verbindung 39



Verbindung **14** (0,12, 1 Äq.) und 2-Fluor-*N*-(2-oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid--2,2,2 trifluoacetat **38** (48,3 mg, 2 Äq.) wurden in wasserfreiem DMF (10 mL) gelöst.  $K_2CO_3$  (0,24 g, 6 Äq.) wurde zugegeben und die Suspension für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde überschüssiges DMF im Luftstrom entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von  $NaHCO_3$  aufgenommen und mit DCM (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über  $Na_2SO_4$  getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- ( $SiO_2$ , DCM/MeOH = 1/0  $\rightarrow$  9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18,  $H_2O$  (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1  $\rightarrow$  0/1). Verbindung **39** wurde als gelber Feststoff (170 mg, Ausbeute: 92 %) erhalten.

$^1H$  NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  10.86 (s, 1H), 10.24 (s, 1H), 8.26 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.67 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.48 – 7.45 (m, 2H), 7.42 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.18 (dd,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 1H), 6.95 – 6.90 (m, 3H), 6.39 (dd,  $J = 7.7, 4.8$  Hz, 1H), 5.68 (dd,  $J = 47.8, 3.6$  Hz, 1H), 5.39 (dd,  $J = 15.6, 3.6$  Hz, 1H), 4.16 (tt,  $J = 12.4, 4.1$  Hz, 1H), 3.62 (s, 2H), 3.01 (d,  $J = 11.4$  Hz, 2H), 2.34 (qd,  $J = 12.3, 3.6$  Hz, 2H), 2.16 (t,  $J = 11.1$  Hz, 2H), 1.68 (d,  $J = 10.0$  Hz, 2H).  $^{13}C$  NMR (151 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  158.33, 157.58 (d,  $J = 43.9$  Hz), 156.79 (d,  $J = 257.7$  Hz), 154.49, 152.51, 150.66, 148.54, 144.88, 139.90, 138.88, 134.00, 133.83, 131.67, 130.39, 130.29, 129.32, 128.12, 125.68, 119.54, 113.98, 111.51, 108.86, 106.53, 102.91, 99.91 (d,  $J = 14.8$  Hz). 61.83, 53.27, 50.58, 29.19.  $^{19}F$  NMR (565 MHz,  $DMSO$ )  $\delta$  -116.81 (dd,  $J = 47.8, 15.6$  Hz). HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 638,21  $[M+H]^+$ , gefunden: 638,13.

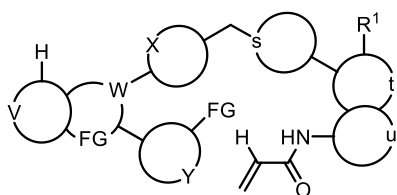
## Synthetische Darstellung von Verbindung 40



Verbindung **14** (0,68 g, 1 Äq.) und Verbindung **29a** (0,66 g, 1 Äq.) wurden in wasserfreiem DMF (15 mL) gelöst. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,24 g, 6 Äq.) wurde zugegeben und die Suspension für 16 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde überschüssiges DMF im Luftstrom entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **39** wurde als gelber Feststoff isoliert (0,98 g, Ausbeute: 96 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.99 (s, 1H), 8.27 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.01 – 7.97 (m, 2H), 7.50 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 12.9, 9.2 Hz, 3H), 7.34 – 7.29 (m, 1H), 7.17 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.94 (s, 2H), 6.45 (dd, J = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.38 (dd, J = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 6.23 (dd, J = 17.0, 1.9 Hz, 1H), 5.70 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.61 (s, 2H), 2.96 (d, J = 10.5 Hz, 2H), 2.71 (t, J = 11.6 Hz, 1H), 2.16 (t, J = 11.1 Hz, 2H), 1.93 (d, J = 11.8 Hz, 2H), 1.73 (q, J = 11.8 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163.08, 158.35, 152.51, 150.66, 148.53, 144.89, 140.28, 138.85, 134.26, 133.88, 133.81, 132.82, 131.14, 130.27, 128.07, 126.78, 126.48, 126.23, 119.54, 119.23, 115.10, 111.49, 110.03, 106.49, 62.36, 54.28, 33.64, 33.24, 32.81. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 617,24 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 617,24.

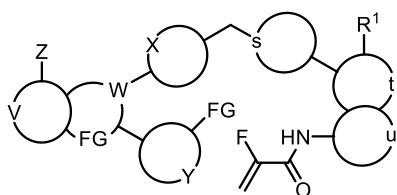
## Synthetische Darstellung von Verbindung 41



Verbindung **21** (38 mg, 1 Äq.) und Verbindung **29a** (79,4 mg, 2 Äq.) wurden in wasserfreiem DMF (5 mL) gelöst. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (82,9 mg, 6 Äq.) wurde hinzugefügt und die Suspension für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde überschüssiges DMF im Luftstrom entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **41** wurde als gelber Feststoff (41 mg, Ausbeute: 70 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.99 (s, 1H), 8.33 (dd, J = 4.7, 1.4 Hz, 1H), 8.21 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 8.00 – 7.97 (m, 2H), 7.49 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.39 (ddd, J = 9.1, 5.8, 2.0 Hz, 4H), 7.31 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.18 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.02 (s, 2H), 6.45 (dd, J = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.38 (dd, J = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 6.25 – 6.20 (m, 1H), 5.72 – 5.68 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.61 (s, 2H), 2.96 (d, J = 10.8 Hz, 2H), 2.75 – 2.68 (m, 1H), 2.17 (dd, J = 17.6, 6.6 Hz, 2H), 1.93 (d, J = 11.4 Hz, 2H), 1.72 (qd, J = 12.4, 3.1 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 160.97, 156.31, 149.60, 148.29, 147.13, 142.59, 137.68, 136.69, 132.37, 132.13, 130.69, 129.00, 128.05, 126.04, 125.07, 124.65, 124.35, 124.12, 117.50, 117.10, 116.43, 112.97, 109.38, 107.91, 107.87, 104.59, 60.26, 52.11, 31.52, 31.10, 30.68. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 583,28 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 583,17.

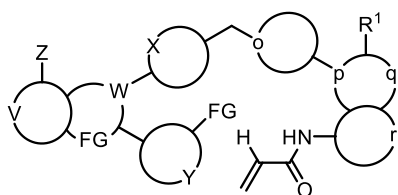
## Synthetische Darstellung von Verbindung 42



Verbindung **14** (136 mg, 1 Äq.) und Verbindung **29b** (190,7 mg, 1,4 Äq.) wurden in wasserfreiem DMF (10 mL) gelöst. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (272 mg, 6 Äq.) wurde zugegeben und die Suspension für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde überschüssiges DMF im Luftstrom entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **42** wurde als gelber Feststoff (190 mg, Ausbeute: 91 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.15 (s, 1H), 8.26 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.48 – 7.44 (m, 2H), 7.40 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.17 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.94 (s, 2H), 6.38 (dd, J = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 5.68 (dd, J = 47.7, 3.5 Hz, 1H), 5.37 (dd, J = 15.6, 3.5 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.61 (s, 2H), 2.96 (d, J = 10.9 Hz, 2H), 2.75 – 2.69 (m, 1H), 2.16 (t, J = 11.0 Hz, 2H), 1.93 (d, J = 11.6 Hz, 2H), 1.73 (qd, J = 12.5, 3.3 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 158.35, 157.52 (d, J = 31.3 Hz), 157.11 (d, J = 270.1 Hz), 152.51, 150.66, 148.53, 144.89, 140.26, 138.85, 134.72, 133.89, 133.81, 130.28, 130.25, 129.59, 128.07, 126.64, 126.63, 119.54, 119.37, 116.32, 111.87, 111.48, 109.89, 106.49, 99.50 (d, J = 15.0 Hz) 62.36, 54.27, 33.64, 33.21, 32.83. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 635,23 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 635,11.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 43

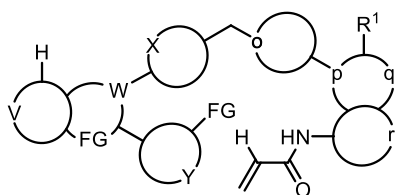


Verbindung **14** (200 mg, 1 Äq.) und Verbindung **36a** (241 mg, 1,3 Äq.) wurden in wasserfreiem DMF (10 mL) gelöst. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (400 mg, 6 Äq.) wurde zugegeben und die Suspension 16 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde überschüssiges DMF im Luftstrom entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter vredeuziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **43** wurde als gelber Feststoff erhalten (135 mg, Ausbeute: 46 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.23 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.27 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.20 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.32 (dd, J = 8.7, 1.8 Hz, 1H), 7.18 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 6.93 (s, 2H), 6.47 (dd, J = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.40 (dd, J = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 6.27 (dd, J = 17.0, 1.9 Hz, 1H), 5.76 (dd, J = 10.1, 1.9 Hz, 1H), 4.30 (tt, J = 11.8, 4.0 Hz, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.02 (d, J = 11.6 Hz, 2H), 2.27 (t, J = 11.0 Hz, 2H), 2.14 (qd, J = 12.2, 3.5 Hz, 2H), 2.04 (d, J = 10.1 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163.47, 158.34, 152.52, 150.67, 148.53, 144.88, 142.37, 140.53, 139.93, 138.87, 134.59, 134.01, 133.83, 133.60, 132.49, 130.32, 130.29, 128.12, 127.01, 120.00, 119.55, 115.15, 111.52, 106.51, 101.85, 61.65, 53.50, 52.70, 32.01. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 604,2 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 604,00.



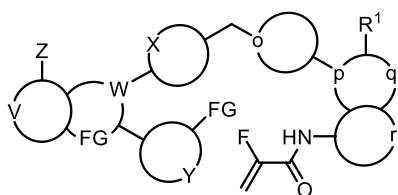
## Synthetische Darstellung von Verbindung 44



Verbindung **21** (38 mg, 1 Äq) und Verbindung **36a** (53,8 mg, 1,4 Äq.) wurden in wasserfreiem DMF (5 mL) gelöst. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (82,9 mg, 6 Äq.) wurde hinzugefügt und die Suspension für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde überschüssiges DMF im Luftstrom entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **44** wurde als gelber Feststoff (22,8 mg, Ausbeute: 40 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.25 (s, 1H), 8.35 – 8.29 (m, 2H), 8.21 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.99 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.40 (dd, J = 12.3, 6.4 Hz, 3H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.18 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.02 (s, 2H), 6.47 (dd, J = 16.9, 10.1 Hz, 1H), 6.39 (dd, J = 7.4, 4.9 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 5.76 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 4.30 (t, J = 11.2 Hz, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.02 (d, J = 10.5 Hz, 2H), 2.26 (t, J = 11.0 Hz, 2H), 2.13 (dd, J = 21.6, 10.7 Hz, 2H), 2.04 (d, J = 9.8 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163.47, 158.43, 151.73, 150.50, 150.43, 149.23, 144.72, 142.38, 140.51, 139.46, 138.84, 134.59, 134.50, 133.57, 132.46, 130.25, 128.22, 127.21, 127.05, 120.00, 119.64, 115.14, 111.53, 106.72, 101.82, 61.69, 53.52, 52.66, 31.98. HPLC-MS (m/z): Berechnung: 570,26 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 570,06.

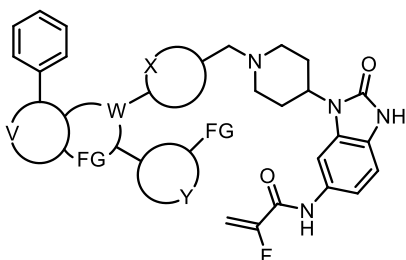
## Synthetische Darstellung von Verbindung 45



Verbindung **14** (150 mg, 1 Äq.) und Verbindung **36b** (291,1 mg, 2 Äq.) wurden in wasserfreiem DMF (10 mL) gelöst. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (300 mg, 6 Äq.) wurde zugegeben und die Suspension für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde überschüssiges DMF im Luftstrom entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **45** wurde als gelber Feststoff isoliert (140 mg, Ausbeute: 62 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.36 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.28 – 8.25 (m, 1H), 8.11 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 7.48 – 7.39 (m, 4H), 7.18 (dd, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 6.93 (s, 2H), 6.41 – 6.37 (m, 1H), 5.78 – 5.66 (m, 1H), 5.43 (dd, J = 15.6, 3.6 Hz, 1H), 4.32 (tt, J = 11.8, 3.9 Hz, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.02 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 2.27 (t, J = 11.2 Hz, 2H), 2.15 (qd, J = 12.1, 3.3 Hz, 2H), 2.04 (d, J = 10.3 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 158.33, 157.83 (d, J = 31.6 Hz), 156.79 (d, J = 269.8 Hz), 152.51, 150.67, 148.52, 144.89, 142.82, 141.18, 139.90, 138.88, 134.01, 133.83, 133.38, 133.13, 130.34, 128.11, 127.79, 119.79, 119.55, 116.46, 111.52, 106.52, 103.71, 100.09 (d, J = 14.8 Hz), 61.65, 53.63, 52.70, 31.96. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 622,21 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 622,16.

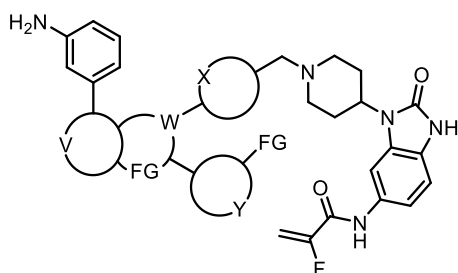
## Synthetische Darstellung von Verbindung 46a



Verbindung **46a** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **39** (30 mg, 1 Äq.) und Penylboronsäure (8,6 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **46a** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (21,1 mg, Ausbeute: 69 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.87 (s, 1H), 10.24 (s, 1H), 8.28 (dd,  $J = 8.3, 3.4$  Hz, 1H), 8.06 – 7.98 (m, 3H), 7.68 (dd,  $J = 5.5, 1.4$  Hz, 1H), 7.58 – 7.37 (m, 8H), 7.19 (dt,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H), 7.03 (s, 2H), 6.96 – 6.90 (m, 2H), 6.40 (ddd,  $J = 7.5, 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 5.69 (dt,  $J = 47.7, 3.6$  Hz, 1H), 5.40 (dt,  $J = 15.6, 3.4$  Hz, 1H), 4.18 (s, 1H), 3.65 (d,  $J = 16.8$  Hz, 2H), 3.03 (s, 2H), 2.35 (s, 2H), 2.18 (s, 2H), 1.70 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158.42, 157.55 (d,  $J = 31.5$  Hz), 156.83 (d,  $J = 270.1$  Hz), 154.50, 152.51, 152.22, 151.86, 150.66, 150.43, 149.16, 148.54, 144.88, 139.29, 138.90, 133.93, 131.66, 129.25, 128.14, 127.13, 125.69, 119.55, 116.76, 114.00, 111.53, 108.88, 106.83, 106.54, 102.92, 99.92 (d,  $J = 14.8$  Hz), 61.83, 53.26, 50.61, 29.18.  $^{19}\text{F}$  NMR (565 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -116.80 (ddd,  $J = 47.7, 15.3, 11.7$  Hz). HPLC-MS (m/z): Berechnung: 680,28  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 680,15.

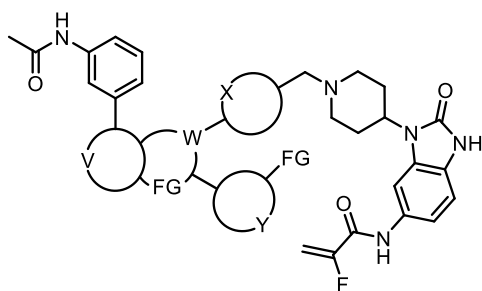
## Synthetische Darstellung von Verbindung 46b



Verbindung **46b** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **39** (30 mg, 1 Äq.) und 3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)anilin (15,4 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **46b** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (19,9 mg, Ausbeute: 61 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.87 (s, 1H), 10.24 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 8.23 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.81 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.49 – 7.46 (m, 3H), 7.20 (t,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 7.17 – 7.13 (m, 2H), 7.10 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.94 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.59 (ddd,  $J = 7.8, 2.1, 0.9$  Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz, 1H), 5.74 – 5.63 (m, 1H), 5.39 (dd,  $J = 15.6, 3.6$  Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.18 (tt,  $J = 12.4, 4.0$  Hz, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.04 (d,  $J = 11.3$  Hz, 2H), 2.40 – 2.31 (m, 2H), 2.17 (t,  $J = 11.2$  Hz, 2H), 1.70 (d,  $J = 10.1$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158.40, 157.56 (d,  $J = 31.5$  Hz), 156.83 (d,  $J = 270.1$  Hz), 154.50, 153.04, 151.92, 150.32, 149.38, 149.03, 140.10, 139.28, 138.81, 134.65, 133.65, 131.67, 130.23, 129.65, 129.34, 128.14, 127.73, 125.69, 116.73, 115.14, 114.90, 114.00, 112.65, 111.51, 108.87, 106.99, 102.90, 99.92 (d,  $J = 14.9$  Hz), 61.88, 53.29, 50.62, 29.20.  $^{19}\text{F}$  NMR (565 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -116.78 (dd,  $J = 47.7, 15.6$  Hz). HPLC-MS (m/z): Berechnet: 695,29  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 695,07.

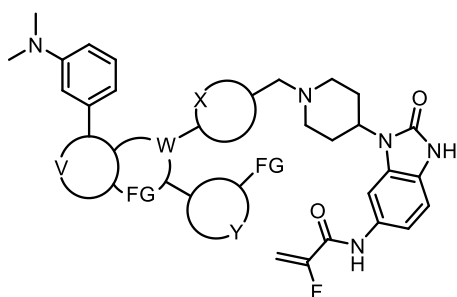
## Synthetische Darstellung von Verbindung 46c



Verbindung **46c** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **39** (30 mg, 1 Äq.) und *N*-(3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetamid **17a** (18,4 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **46c** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (26,8 mg, Ausbeute: 77 %).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  10.88 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 8.28 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.99 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.86 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.69 – 7.63 (m, 3H), 7.53 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.50 – 7.45 (m, 3H), 7.37 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.17 (dd,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.94 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J = 7.7, 4.8$  Hz, 1H), 5.68 (dd,  $J = 47.8, 3.5$  Hz, 1H), 5.39 (dd,  $J = 15.6, 3.5$  Hz, 1H), 4.18 (td,  $J = 12.5, 6.3$  Hz, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.03 (d,  $J = 10.5$  Hz, 2H), 2.35 (td,  $J = 11.8, 9.5$  Hz, 2H), 2.16 (t,  $J = 11.4$  Hz, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.69 (d,  $J = 10.1$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$  167.68, 157.25, 156.39 (d,  $J = 31.5$  Hz), 155.67 (d,  $J = 270.1$  Hz), 153.34, 151.13, 150.83, 149.25, 148.00, 139.05, 138.79, 138.17, 137.70, 133.41, 132.82, 130.51, 129.12, 128.40, 128.18, 126.97, 126.82, 124.52, 120.90, 118.68, 116.65, 115.68, 112.83, 110.35, 107.71, 105.75, 101.73, 98.75 (d,  $J = 15.0$  Hz), 60.71, 52.10, 49.48, 28.05, 23.30.  $^{19}\text{F NMR}$  (471 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  -116.82 (dd,  $J = 47.8, 15.7$  Hz). HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 736,30  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 735,94.

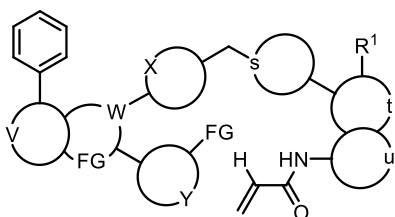
## Synthetische Darstellung von Verbindung 46d



Verbindung **46d** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **39** (30 mg, 1 Äq.) und 3-(Dimethylamino)phenyl-boronsäure (11,6 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **46d** wurde als gelber Feststoff isoliert (25,4 mg, Ausbeute: 75 %).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.89 (s, 1H), 10.26 (s, 1H), 8.23 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.00 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.96 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.69 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 7.50 (dt,  $J = 14.5, 7.3$  Hz, 5H), 7.42 – 7.40 (m, 1H), 7.32 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.27 – 7.20 (m, 2H), 7.06 (s, 2H), 6.94 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.75 (dd,  $J = 8.1, 2.3$  Hz, 1H), 6.41 (dd,  $J = 7.7, 4.8$  Hz, 1H), 5.68 (dd,  $J = 47.8, 3.5$  Hz, 1H), 5.39 (dd,  $J = 15.6, 3.5$  Hz, 1H), 4.16 (t,  $J = 12.2$  Hz, 1H), 3.64 (s, 2H), 3.02 (d,  $J = 11.4$  Hz, 2H), 2.89 (s, 6H), 2.35 (dt,  $J = 24.2, 6.9$  Hz, 2H), 2.15 (t,  $J = 11.4$  Hz, 2H), 1.68 (d,  $J = 10.2$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158.42, 157.55 (d,  $J = 31.5$  Hz), 156.83 (d,  $J = 270.1$  Hz), 154.50, 152.49, 151.89, 151.16, 150.39, 148.95, 139.74, 139.13, 138.80, 134.69, 133.73, 131.68, 130.23, 129.72, 129.33, 128.03, 127.71, 125.68, 116.72, 115.24, 113.97, 113.42, 111.57, 110.96, 108.88, 106.81, 102.86, 99.92 (d,  $J = 14.8$  Hz), 61.88, 53.15, 50.60, 40.48, 29.19.  $^{19}\text{F}$  NMR (471 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -116.84 (dd,  $J = 47.8, 15.7$  Hz). HPLC-MS (m/z): Berechnet: 723,32  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 723,35.

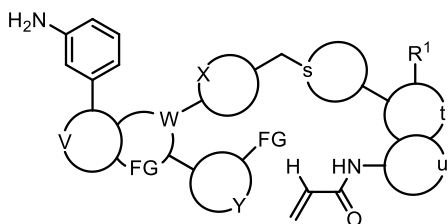
## Synthetische Darstellung von Verbindung 47a



Zu einer Lösung von Verbindung **40** (30 mg, 1 Äq.) in einer 5:1-Mischung aus 1,4-Dioxan und H<sub>2</sub>O wurde Phenylboronsäure (8,9 mg, 1,5 Äq.) zugegeben. Nach 15-minütiger Entgasung der Lösung mit Argon wurden K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (22,4 mg, 2 Äq.) und Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3,4 mg, 0,1 Äq.) zugegeben und die Suspension für zwei Stunden bei 130 °C in einem Mikrowellenreaktor erhitzt. Anschließend wurde die Suspension mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 20/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **47a** wurde als hellgelber Feststoff (26,8 mg, Ausbeute: 84 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.99 (s, 1H), 8.29 – 8.26 (m, 1H), 8.03 (dd, J = 8.3, 1.1 Hz, 2H), 8.01 – 7.97 (m, 3H), 7.53 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.46 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 7.40 – 7.35 (m, 2H), 7.32 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.17 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.04 (s, 2H), 6.45 (dd, J = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.38 (dd, J = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 6.23 (dd, J = 17.0, 2.0 Hz, 1H), 5.70 (dd, J = 10.1, 2.0 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 2.97 (s, 2H), 2.72 (s, 1H), 2.18 (s, 2H), 1.94 (d, J = 11.2 Hz, 2H), 1.74 (q, J = 11.0 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163.10, 158.44, 152.21, 151.84, 150.42, 149.14, 139.65, 139.28, 138.81, 134.54, 134.26, 133.91, 132.83, 131.14, 130.18, 129.24, 129.16, 128.05, 127.93, 127.12, 126.78, 126.49, 126.23, 119.21, 116.74, 115.11, 111.50, 110.04, 110.02, 106.79, 62.35, 54.25, 33.64, 33.20, 32.81. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 659,31 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 659,28.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 47b

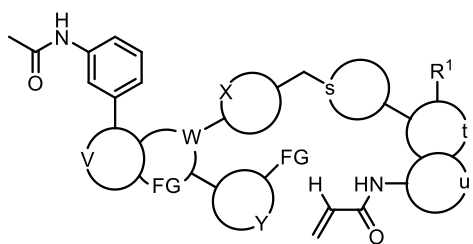


Verbindung **47b** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **40** (30 mg, 1 Äq.) und 3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)anilin (16 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **47b** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (24,1 mg, Ausbeute: 73 %).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  9.99 (s, 1H), 8.22 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J = 4.7, 1.7$  Hz, 2H), 7.80 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.51 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.45 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.38 (dd,  $J = 8.7, 1.4$  Hz, 1H), 7.32 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.19 (t,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J = 7.7, 1.5$  Hz, 2H), 7.11 – 7.07 (m, 2H), 7.00 (s, 2H), 6.60 – 6.57 (m, 1H), 6.45 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.37 (dd,  $J = 7.7, 4.8$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 2.0$  Hz, 1H), 5.70 (dd,  $J = 10.1, 2.0$  Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 2.98 (d,  $J = 9.6$  Hz, 2H), 2.72 (t,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 2.18 (s, 2H), 1.94 (d,  $J = 11.7$  Hz, 2H), 1.74 (q,  $J = 11.8$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  163.09, 158.42, 153.02, 151.91, 150.32, 149.39, 149.01, 140.09, 139.66, 138.79, 134.54, 134.26, 133.64, 132.82, 131.13, 130.12, 129.65, 128.09, 127.72, 126.78, 126.50, 126.24, 119.23, 116.72, 115.13, 115.10, 114.90, 112.64, 111.48, 110.04, 110.01, 106.94, 62.41, 54.30, 33.65, 33.24, 32.81. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 674,32  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 674,23.



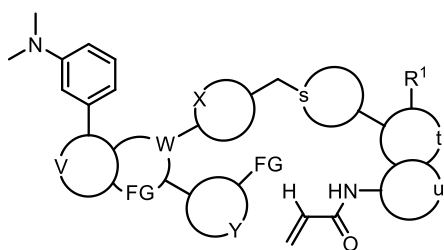
## Synthetische Darstellung von Verbindung 47c



Verbindung **47c** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **40** (30 mg, 1 Äq.) und *N*-(3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetamid **17a** (19 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **47c** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (21,1 mg, Ausbeute: 60 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.04 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 8.28 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.00 (dd,  $J = 4.6, 1.8$  Hz, 2H), 7.86 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.66 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.52 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 7.46 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.38 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 7.32 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J = 7.6, 1.7$  Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.45 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.38 (dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 2.0$  Hz, 1H), 5.70 (dd,  $J = 10.1, 1.9$  Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 2.99 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.73 (s, 1H), 2.18 (s, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.94 (d,  $J = 11.5$  Hz, 2H), 1.74 (q,  $J = 11.4$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168.85, 163.09, 158.42, 152.29, 151.99, 150.42, 149.14, 140.22, 139.95, 139.72, 138.85, 134.47, 134.26, 133.97, 132.82, 131.14, 130.17, 129.57, 128.08, 127.97, 126.78, 126.48, 126.24, 122.06, 119.85, 119.25, 117.80, 116.83, 115.11, 111.49, 110.04, 110.01, 106.87, 62.39, 54.27, 33.65, 33.23, 32.81, 24.49. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 716,33  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 716,25.

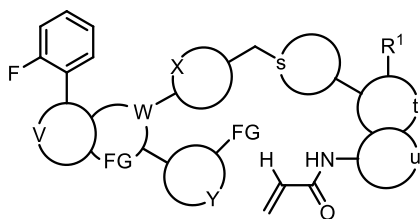
## Synthetische Darstellung von Verbindung 47d



Verbindung **47d** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **40** (30 mg, 1 Äq.) und 3-(Dimethylamino)phenyl-boronsäure (12 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **47d** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (25,2 mg, Ausbeute: 73 %).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.99 (s, 1H), 8.25 – 8.21 (m, 1H), 8.01 (dd,  $J = 4.5, 1.9$  Hz, 2H), 7.96 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.51 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.46 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.42 – 7.40 (m, 1H), 7.37 (dd,  $J = 8.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.32 (dd,  $J = 8.2, 4.1$  Hz, 2H), 7.25 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.21 (dd,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 3H), 7.08 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H), 6.75 (dd,  $J = 8.2, 2.2$  Hz, 1H), 6.45 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.40 (dd,  $J = 7.7, 4.8$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 2.0$  Hz, 1H), 5.70 (dd,  $J = 10.1, 2.0$  Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 2.96 (d,  $J = 11.0$  Hz, 2H), 2.90 (s, 6H), 2.70 (dt,  $J = 9.4, 8.5$  Hz, 1H), 2.17 (t,  $J = 11.0$  Hz, 2H), 1.93 (d,  $J = 11.2$  Hz, 2H), 1.73 (qd,  $J = 12.5, 3.1$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.09, 158.43, 152.49, 151.89, 151.16, 150.39, 148.96, 139.75, 139.51, 138.77, 134.57, 134.26, 133.71, 132.82, 131.14, 130.11, 129.72, 127.99, 127.70, 126.77, 126.49, 126.24, 119.21, 116.72, 115.26, 115.08, 113.44, 111.55, 110.96, 110.05, 110.01, 106.77, 62.41, 54.17, 40.51, 33.68, 33.22, 32.81. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 702,35  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , found.: 702,28.

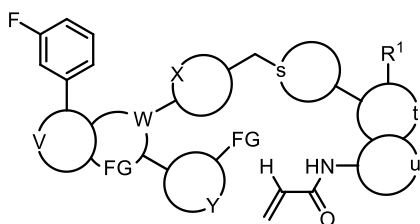
## Synthetische Darstellung von Verbindung 47e



Verbindung **47e** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **40** (30 mg, 1 Äq.) und 2-Fluorphenyl-boronsäure (10,2 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **47e** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (19,5 mg, Ausbeute: 59 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.99 (s, 1H), 8.30 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.01 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.83 – 7.77 (m, 2H), 7.53 – 7.42 (m, 5H), 7.39 – 7.28 (m, 4H), 7.17 (dd,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.45 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 2.0$  Hz, 1H), 5.70 (dd,  $J = 10.1, 2.0$  Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.61 (s, 2H), 2.96 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 2.71 (s, 1H), 2.16 (s, 2H), 1.93 (d,  $J = 10.6$  Hz, 2H), 1.72 (d,  $J = 11.2$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.09, 160.17 (d,  $J = 248.0$  Hz), 158.44, 152.63, 150.53, 149.21, 147.94, 139.80, 138.90, 134.37, 134.26, 133.89, 132.82, 131.54, 131.13, 131.02 (d,  $J = 8.5$  Hz), 130.14, 128.08, 127.75 (d,  $J = 11.7$  Hz), 127.54, 126.77, 126.49, 126.24, 125.27 (d,  $J = 3.3$  Hz), 120.38 (d,  $J = 8.2$  Hz), 119.24, 116.78 (d,  $J = 22.8$  Hz), 115.11, 111.50, 110.04, 110.01, 106.78, 62.37, 54.27, 33.64, 33.22, 32.81. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 677,30  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 677,23.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 47f

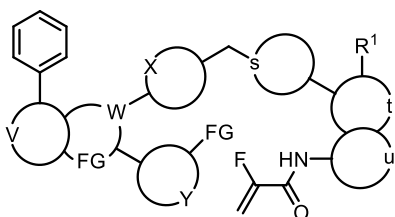


Verbindung **47f** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **40** (30 mg, 1 Äq.) und 3-Fluorphenyl-boronsäure (10,2 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **47f** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (22,1 mg, Ausbeute: 67 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.99 (s, 1H), 8.29 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.05 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.02 – 7.98 (m, 2H), 7.91 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.84 – 7.81 (m, 1H), 7.54 – 7.45 (m, 5H), 7.37 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.32 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.22 (td,  $J = 8.3, 2.2$  Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.05 (s, 2H), 6.48 – 6.42 (m, 1H), 6.39 (dd,  $J = 7.7, 4.8$  Hz, 1H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 2.0$  Hz, 1H), 5.70 (dd,  $J = 10.1, 2.0$  Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 2.98 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.72 (s, 1H), 2.18 (s, 2H), 1.94 (d,  $J = 11.6$  Hz, 2H), 1.74 (q,  $J = 11.3$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.13 (d,  $J = 242.8$  Hz), 163.09, 158.44, 152.64, 150.54, 150.15 (d,  $J = 2.9$  Hz), 149.10, 141.78 (d,  $J = 7.8$  Hz), 139.75, 138.85, 134.38, 134.26, 132.82, 131.27 (d,  $J = 8.6$  Hz), 131.13, 130.16, 128.03, 127.99, 126.77, 126.49, 126.23, 123.08, 123.06, 119.20, 116.96, 115.87 (d,  $J = 21.3$  Hz), 115.10, 113.54 (d,  $J = 22.8$  Hz), 111.51, 110.04, 110.00, 106.66, 62.38, 54.27, 33.64, 33.23, 32.81. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 677,30  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , found.: 677,24.



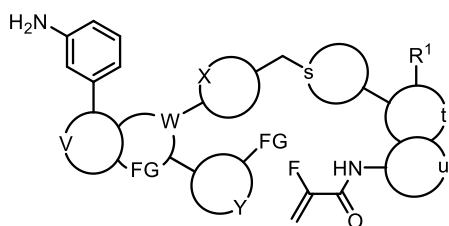
## Synthetische Darstellung von Verbindung 48a



Verbindung **48a** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **42** (30 mg, 1 Äq.) und Phenylboronsäure (8,6 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **48a** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (28,1 mg, Ausbeute: 88 %).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.15 (s, 1H), 8.28 – 8.26 (m, 1H), 8.05 – 8.02 (m, 2H), 7.99 (ddd,  $J = 14.4, 5.4, 1.7$  Hz, 3H), 7.53 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.46 (dd,  $J = 10.0, 5.2$  Hz, 5H), 7.38 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.34 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.17 (dd,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.04 (s, 2H), 6.38 (dd,  $J = 7.7, 4.8$  Hz, 1H), 5.73 – 5.63 (m, 1H), 5.37 (dd,  $J = 15.6, 3.5$  Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.63 (s, 1H), 2.97 (s, 2H), 2.73 (s, 1H), 2.18 (s, 2H), 1.94 (d,  $J = 11.7$  Hz, 2H), 1.74 (q,  $J = 11.5$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158.44, 157.53 (d,  $J = 31.3$  Hz), 157.12 (d,  $J = 270.1$  Hz), 152.21, 151.84, 150.42, 149.15, 139.67, 139.28, 138.81, 134.72, 134.55, 134.53, 133.91, 130.20, 129.60, 129.24, 129.17, 128.06, 127.93, 127.12, 126.64, 119.36, 116.74, 116.34, 111.88, 111.50, 109.90, 106.79, 99.50 (d,  $J = 15.0$  Hz), 62.35, 54.25, 33.64, 33.20, 32.83. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 677,30  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 677,21.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 48b



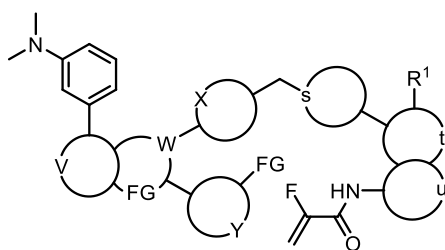
Verbindung **48b** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **42** (30 mg, 1 Äq.) und 3-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)anilin (15,5 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **48b** wurde als gelber Feststoff erhalten (23,7 mg, Ausbeute: 73 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.16 (s, 1H), 8.23 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.02 – 7.96 (m, 2H), 7.81 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.49 (dd,  $J = 26.5, 9.3$  Hz, 5H), 7.35 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.20 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 7.12 (dt,  $J = 20.3, 7.7$  Hz, 4H), 7.01 (s, 2H), 6.60 (dd,  $J = 7.8, 1.1$  Hz, 1H), 6.41 – 6.35 (m, 1H), 5.69 (dd,  $J = 47.7, 3.5$  Hz, 1H), 5.38 (dd,  $J = 15.6, 3.5$  Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 2.99 (s, 2H), 2.74 (s, 1H), 2.18 (s, 2H), 1.94 (s, 2H), 1.75 (d,  $J = 10.7$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158.42, 157.54 (d,  $J = 31.3$  Hz), 157.11 (d,  $J = 270.1$  Hz), 153.03, 151.91, 150.32, 149.39, 149.00, 140.09, 139.65, 138.81, 134.73, 134.56, 134.51, 133.64, 130.15, 129.65, 129.59, 128.11, 127.73, 126.64, 119.39, 116.73, 116.36, 115.14, 114.91, 112.65, 111.89, 111.48, 109.91, 106.95, 99.51 (d,  $J = 14.9$  Hz), 62.39, 54.29, 33.67, 33.21, 32.84. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 692,31  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 692,10.





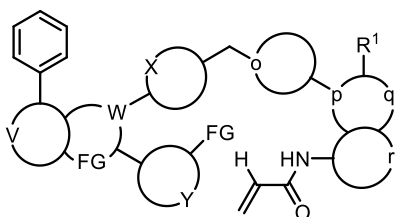
## Synthetische Darstellung von Verbindung 48d



Verbindung **48d** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **42** (30 mg, 1 Äq.) und 3-(Dimethylamino)phenyl-Boronsäure (11,7 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **48d** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (26 mg, Ausbeute: 76 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.15 (s, 1H), 8.23 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.01 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.97 (dd,  $J = 12.1, 5.0$  Hz, 2H), 7.52 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.48 – 7.45 (m, 3H), 7.42 – 7.40 (m, 1H), 7.35 – 7.31 (m, 2H), 7.24 (dd,  $J = 13.9, 6.1$  Hz, 1H), 7.20 (dt,  $J = 5.5, 2.8$  Hz, 1H), 7.10 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 7.07 (s, 2H), 6.75 (dd,  $J = 8.2, 2.4$  Hz, 1H), 6.40 (dd,  $J = 7.7, 4.8$  Hz, 1H), 5.68 (dd,  $J = 47.7, 3.5$  Hz, 1H), 5.37 (dd,  $J = 15.6, 3.5$  Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 2.97 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 2.90 (s, 6H), 2.72 (t,  $J = 11.2$  Hz, 1H), 2.18 (s, 2H), 1.94 (d,  $J = 11.7$  Hz, 2H), 1.74 (dd,  $J = 22.0, 11.7$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168.85, 158.42, 157.53 (d,  $J = 31.3$  Hz), 157.11 (d,  $J = 270.1$  Hz), 152.29, 151.99, 150.41, 149.14, 140.21, 139.95, 138.84, 134.72, 134.50, 133.97, 130.22, 129.59, 129.57, 128.73, 128.08, 127.97, 126.64, 126.62, 122.06, 119.85, 119.36, 117.81, 116.84, 116.34, 111.87, 111.48, 109.90, 106.88, 99.50 (d,  $J = 15.0$  Hz), 62.35, 54.24, 33.62, 33.17, 32.83, 24.49. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 720,34  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 720,21.

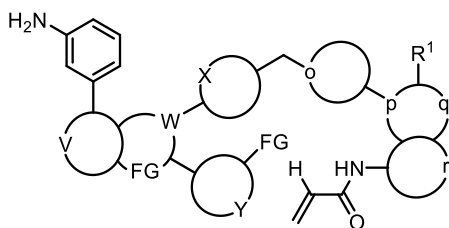
## Synthetische Darstellung von Verbindung 49a



Verbindung **49a** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **43** (25 mg, 1 Äq.) und Phenylboronsäure (7,5 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **49a** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (20,1 mg, Ausbeute: 75 %).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.25 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.27 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.21 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 8.04 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.01 – 7.97 (m, 2H), 7.59 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.50 – 7.44 (m, 4H), 7.39 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.31 (dd,  $J = 8.7$ , 1.8 Hz, 1H), 7.17 (dd,  $J = 7.7$ , 1.8 Hz, 1H), 7.04 (s, 2H), 6.47 (dd,  $J = 16.9$ , 10.1 Hz, 1H), 6.40 (dd,  $J = 7.7$ , 4.8 Hz, 1H), 6.27 (dd,  $J = 17.0$ , 2.0 Hz, 1H), 5.76 (dd,  $J = 10.1$ , 2.0 Hz, 1H), 4.30 (ddd,  $J = 15.2$ , 11.4, 3.6 Hz, 1H), 3.68 (s, 2H), 3.04 (d,  $J = 11.1$  Hz, 2H), 2.28 (t,  $J = 11.2$  Hz, 2H), 2.14 (dt,  $J = 11.7$ , 8.8 Hz, 2H), 2.05 (d,  $J = 10.0$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.47, 158.42, 152.22, 151.83, 150.44, 149.12, 142.38, 140.50, 139.35, 139.27, 138.84, 134.61, 134.59, 133.92, 133.59, 132.47, 130.23, 129.26, 129.18, 128.09, 127.95, 127.12, 127.04, 120.00, 116.76, 115.14, 111.54, 106.79, 101.82, 61.68, 53.51, 52.72, 31.99. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 646,29  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 646,18.

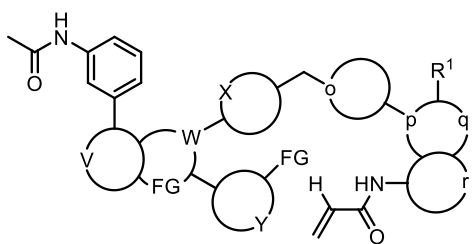
## Synthetische Darstellung von Verbindung 49b



Verbindung **49b** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **43** (25 mg, 1 Äq.) und 3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)anilin (13,6 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **49b** wurde als gelber Feststoff isoliert (21,8 mg, Ausbeute: 80 %).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.25 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.22 (dd,  $J = 9.6, 5.0$  Hz, 2H), 7.99 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.80 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.53 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.47 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.32 (dd,  $J = 8.6, 1.8$  Hz, 1H), 7.20 – 7.18 (m, 1H), 7.16 – 7.12 (m, 2H), 7.09 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.58 (ddd,  $J = 7.8, 2.2, 1.1$  Hz, 1H), 6.47 (dd,  $J = 16.9, 10.1$  Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J = 7.7, 4.8$  Hz, 1H), 6.30 – 6.24 (m, 1H), 5.76 (dd,  $J = 10.1, 2.0$  Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 4.31 (ddd,  $J = 15.4, 11.6, 3.8$  Hz, 1H), 3.67 (s, 2H), 3.04 (d,  $J = 11.1$  Hz, 2H), 2.28 (t,  $J = 11.1$  Hz, 2H), 2.19 – 2.10 (m, 2H), 2.05 (d,  $J = 9.9$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.47, 158.40, 153.00, 151.91, 150.34, 149.40, 148.99, 142.37, 140.50, 140.08, 138.82, 134.65, 134.59, 133.64, 133.59, 132.46, 130.20, 129.66, 128.78, 128.12, 127.73, 127.05, 120.00, 116.74, 115.15, 115.11, 114.89, 112.62, 111.52, 106.94, 101.82, 61.74, 53.52, 52.74, 31.99. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 661,30  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 661,15.

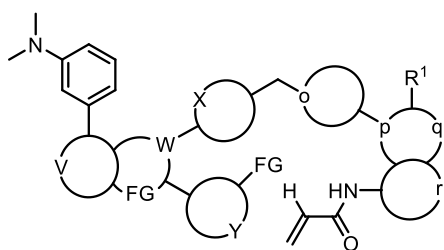
## Synthetische Darstellung von Verbindung 49c



Verbindung **49c** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **43** (25 mg, 1 Äq.) und *N*-(3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetamid **17a** (16,2 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **49c** wurde als gelber Feststoff isoliert (19,3 mg, Ausbeute: 66 %).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.24 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 8.33 – 8.26 (m, 2H), 8.21 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 8.16 (t,  $J = 1.6$  Hz, 1H), 8.00 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.87 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.69 – 7.63 (m, 2H), 7.59 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.48 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.38 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.31 (dd,  $J = 8.7, 1.8$  Hz, 1H), 7.16 (dd,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.47 (dd,  $J = 16.9, 10.1$  Hz, 1H), 6.40 (dd,  $J = 7.7, 4.8$  Hz, 1H), 6.27 (dd,  $J = 17.0, 2.0$  Hz, 1H), 5.76 (dd,  $J = 10.1, 2.0$  Hz, 1H), 4.31 (ddd,  $J = 15.7, 11.7, 4.0$  Hz, 1H), 3.68 (s, 2H), 3.05 (d,  $J = 11.4$  Hz, 2H), 2.28 (t,  $J = 10.9$  Hz, 2H), 2.15 (qd,  $J = 12.1, 3.3$  Hz, 2H), 2.05 (d,  $J = 10.1$  Hz, 2H), 2.01 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168.84, 163.46, 158.40, 152.29, 151.97, 150.43, 149.13, 142.36, 140.50, 140.21, 139.94, 139.35, 138.86, 134.59, 134.56, 133.98, 133.59, 132.46, 130.24, 129.58, 128.12, 127.98, 127.04, 122.06, 120.00, 119.83, 117.77, 116.84, 115.13, 111.52, 106.87, 101.80, 61.71, 53.52, 52.72, 32.03, 24.48. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 703,31  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 703,19.

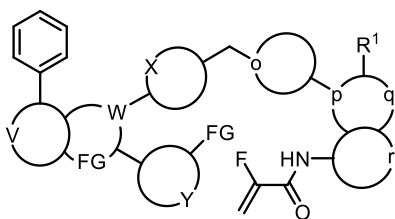
## Synthetische Darstellung von Verbindung 49d



Verbindung **49d** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **43** (25 mg, 1 Äq.) und 3-(Dimethylamino)phenyl-boronsäure (16,2 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **49d** wurde als gelber Feststoff isoliert (22,6 mg, Ausbeute: 79 %).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.22 (d,  $J = 17.1$  Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.25 – 8.20 (m, 2H), 8.01 (dd,  $J = 4.8, 1.7$  Hz, 1H), 7.96 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.53 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.48 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.33 – 7.30 (m, 2H), 7.24 (dd,  $J = 13.4, 5.5$  Hz, 1H), 7.21 (dd,  $J = 7.7, 1.6$  Hz, 1H), 7.05 (s, 2H), 6.75 (dd,  $J = 8.2, 2.0$  Hz, 1H), 6.47 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.41 (dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz, 1H), 6.27 (dd,  $J = 17.0, 1.8$  Hz, 1H), 5.75 (dd,  $J = 10.2, 1.7$  Hz, 1H), 4.30 (td,  $J = 11.7, 5.8$  Hz, 1H), 3.67 (s, 2H), 3.02 (d,  $J = 11.5$  Hz, 2H), 2.90 (s, 6H), 2.27 (t,  $J = 11.1$  Hz, 2H), 2.18 – 2.10 (m, 2H), 2.04 (d,  $J = 9.8$  Hz, 2H).  
 $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.49, 158.42, 152.54, 151.90, 151.17, 150.41, 148.94, 142.40, 140.53, 139.77, 139.21, 138.81, 134.70, 134.60, 133.73, 133.58, 132.48, 130.17, 129.73, 128.04, 127.72, 127.02, 120.01, 116.75, 115.27, 115.15, 113.42, 111.58, 110.98, 106.79, 101.86, 61.72, 53.55, 52.63, 40.51, 31.98. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 689,33  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 689,25.

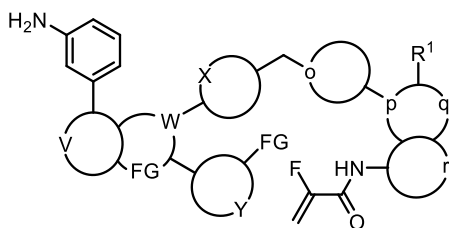
## Synthetische Darstellung von Verbindung 50a



Verbindung **50a** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **45** (30 mg, 1 Äq.) und Phenylboronsäure (11,8 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **50a** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (26,3 mg, Ausbeute: 82 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.37 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.27 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 8.05 – 8.02 (m, 2H), 8.01 – 7.97 (m, 2H), 7.61 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.56 – 7.50 (m, 3H), 7.47 (dd, J = 15.7, 8.1 Hz, 4H), 7.39 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.17 (dd, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.03 (s, 2H), 6.40 (dd, J = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 5.72 (dd, J = 47.7, 3.6 Hz, 1H), 5.43 (dd, J = 15.6, 3.6 Hz, 1H), 4.35 – 4.29 (m, 1H), 3.68 (s, 2H), 3.04 (d, J = 11.3 Hz, 2H), 2.28 (t, J = 11.2 Hz, 2H), 2.16 (qd, J = 12.0, 3.2 Hz, 2H), 2.04 (d, J = 10.3 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 158.43, 157.83 (d, J = 31.7 Hz), 156.79 (d, J = 269.8 Hz), 152.22, 151.85, 150.43, 149.14, 142.82, 141.18, 139.35, 139.29, 138.83, 134.63, 133.92, 133.40, 133.13, 130.24, 129.25, 129.17, 128.09, 127.94, 127.13, 119.80, 116.76, 116.46, 111.54, 106.81, 103.69, 100.74 – 99.65 (m), 61.70, 53.64, 52.73, 31.97. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 664,28 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 664,35.

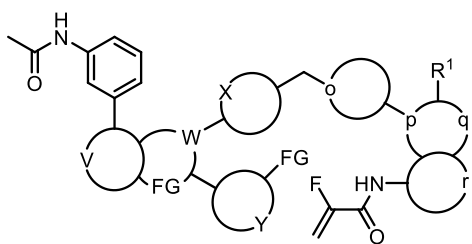
## Synthetische Darstellung von Verbindung 50b



Verbindung **50b** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **45** (30 mg, 1 Äq.) und 3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)anilin (21,1 mg, 2 Äq.) synthetisiert. Verbindung **50b** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (21,6 mg, Ausbeute: 66 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.37 (s, 1H), 8.34 (s,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 8.23 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.12 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 7.99 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.80 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.61 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.52 (dd,  $J = 12.8, 8.4$  Hz, 3H), 7.47 (dd,  $J = 8.1, 5.1$  Hz, 2H), 7.19 (t,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 7.16 – 7.13 (m, 2H), 7.09 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.59 (ddd,  $J = 7.8, 2.1, 1.0$  Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 47.7, 3.6$  Hz, 1H), 5.43 (dd,  $J = 15.6, 3.6$  Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.33 (s, 1H), 3.68 (s, 2H), 3.05 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 2.28 (s, 2H), 2.21 – 2.11 (m, 2H), 2.05 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158.40, 157.83 (d,  $J = 31.7$  Hz), 156.79 (d,  $J = 269.8$  Hz), 153.03, 151.91, 150.33, 149.39, 149.00, 142.81, 141.18, 140.10, 139.30, 138.82, 134.69, 133.65, 133.39, 133.13, 130.23, 129.65, 128.14, 127.74, 119.80, 116.74, 116.48, 115.14, 114.91, 112.66, 111.52, 100.10 (d,  $J = 14.8$  Hz), 106.96, 103.71, 61.71, 53.63, 52.73, 31.96. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 679,29  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 679,33.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 50c

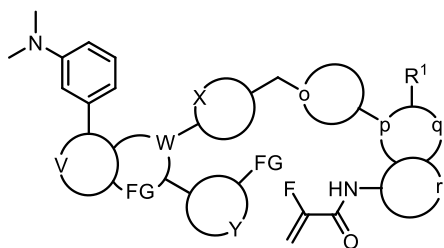


Verbindung **50c** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **45** (30 mg, 1 Äq.) und *N*-(3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)acetamid **17a** (25,2 mg, 2 Äq.) synthetisiert. Verbindung **50c** wurde als gelber Feststoff isoliert (25,8 mg, Ausbeute: 74 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.36 (s, 1H), 10.03 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.28 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.12 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 8.00 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.86 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.68 – 7.60 (m, 3H), 7.55 – 7.50 (m, 3H), 7.48 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.38 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.16 (dd,  $J = 7.7, 1.8$  Hz, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.39 (dd,  $J = 7.7, 4.8$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 47.6, 3.6$  Hz, 1H), 5.43 (dd,  $J = 15.6, 3.6$  Hz, 1H), 4.32 (tt,  $J = 11.8, 4.0$  Hz, 1H), 3.67 (s, 2H), 3.05 (d,  $J = 11.5$  Hz, 2H), 2.27 (t,  $J = 11.1$  Hz, 2H), 2.16 (qd,  $J = 12.0, 3.3$  Hz, 2H), 2.05 (d,  $J = 10.4$  Hz, 2H), 2.01 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168.83, 158.41, 157.82 (d,  $J = 31.7$  Hz), 156.79 (d,  $J = 269.8$  Hz), 152.29, 152.00, 150.42, 149.14, 142.80, 141.18, 140.22, 139.95, 139.35, 138.86, 134.58, 133.98, 133.40, 133.13, 130.25, 129.57, 128.12, 127.98, 122.06, 119.84, 119.80, 117.81, 116.85, 116.45, 111.52, 106.89, 103.67, 100.08 (d,  $J = 14.8$  Hz), 61.72, 53.66, 52.72, 31.99, 24.47. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 720,30 for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , found.: 720,13.



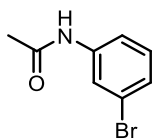
## Synthetische Darstellung von Verbindung 50d



Verbindung **50d** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **45** (30 mg, 1 Äq.) und 3-(Dimethylamino)phenyl-boronsäure (18,9 mg, 2 Äq.) synthetisiert. Verbindung **50d** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (26,9 mg, Ausbeute: 80 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.37 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.23 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.13 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 8.01 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.96 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.61 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.54 – 7.50 (m, 3H), 7.48 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.41 (dd,  $J = 4.7, 2.7$  Hz, 1H), 7.32 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.27 – 7.20 (m, 2H), 7.06 (s, 2H), 6.75 (dd,  $J = 8.2, 2.2$  Hz, 1H), 6.41 (dd,  $J = 7.7, 4.8$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 47.7, 3.6$  Hz, 1H), 5.43 (dd,  $J = 15.6, 3.6$  Hz, 1H), 4.32 (ddd,  $J = 15.6, 11.7, 3.8$  Hz, 1H), 3.67 (s, 2H), 3.03 (d,  $J = 11.4$  Hz, 2H), 2.90 (s, 6H), 2.26 (t,  $J = 11.3$  Hz, 2H), 2.15 (qd,  $J = 12.1, 3.2$  Hz, 2H), 2.04 (d,  $J = 10.2$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158.42, 157.82 (d,  $J = 31.7$  Hz), 156.79 (d,  $J = 269.8$  Hz), 152.54, 151.89, 151.17, 150.40, 148.94, 142.84, 141.19, 139.77, 139.18, 138.80, 134.70, 133.73, 133.38, 133.14, 130.18, 129.72, 128.03, 127.72, 119.81, 116.76, 116.44, 115.28, 113.42, 111.57, 110.99, 106.79, 103.68, 100.09 (d,  $J = 14.8$  Hz), 61.73, 53.66, 52.64, 31.95, 22.96. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 707,32  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 707,35.

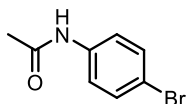
### ***N*-(3-bromophenyl)acetamid (54)**



3-Bromanilin **52** (0,64 g, 3,7 mmol, 1 Äq.) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in Essigsäureanhydrid (2,8 mL, 37,2 mmol, 10 Äq.) gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) gequench und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Verbindung **54** wurde als weißer Feststoff (0,77 g, Ausbeute: 96 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.09 (s, 1H), 7.94 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 7.46 (ddd, J = 8.1, 1.8, 1.1 Hz, 1H), 7.24 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.20 (ddd, J = 8.0, 1.8, 1.1 Hz, 1H), 2.05 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ 169.13, 141.36, 131.13, 126.03, 121.99, 121.71, 118.13, 24.51. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 213,97 für C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>BrNO [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 214,12.

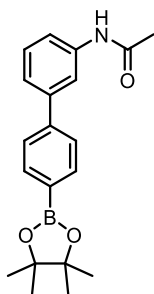
### ***N*-(4-bromophenyl)acetamid (55)**



4-Bromanilin **53** (0,3 g, 1,7 mmol, 1 Äq.) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in Essigsäureanhydrid (1,6 mL, 17,4 mmol, 10 Äq.) gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) gequench und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Verbindung **55** wurde als weißer Feststoff (0,36 g, Ausbeute 95 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.05 (s, 1H), 7.56 – 7.53 (m, 2H), 7.47 – 7.44 (m, 2H), 2.04 (s, J = 4.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 168.93, 139.15, 131.94, 121.32, 114.94, 24.49. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 213,97 für C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>BrNO [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 214,41.

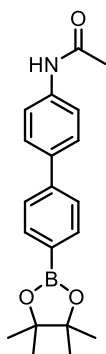
***N*-(4'-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)acetamid (56)**



Zu einer Lösung von *N*-(3-Bromphenyl)acetamid **54** (0,25 g, 1,2 mmol, 1 Äq.) in einer 5:1-Mischung aus 1,4-Dioxan und H<sub>2</sub>O wurde 1,4-Bis(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzol (0,96 g, 2,9 mmol, 2,5 Äq.) zugegeben. Nach 20-minütigem Entgasen der Suspension mit Argon wurden K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0,35 g, 1,5 mmol, 1,3 Äq.) und Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (85,3 mg, 0,11 mmol, 0,1 Äq.) zugegeben und das Gemisch für 16 Stunden bei 60 °C erhitzt. Anschließend wurde die Suspension mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **56** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (167 mg, Ausbeute: 42 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.05 (s, 1H), 7.92 – 7.90 (m, 1H), 7.77 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.62 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.61 – 7.58 (m, 1H), 7.37 (ddd, J = 18.8, 7.8, 5.2 Hz, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.31 (s, J = 5.9 Hz, 12H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 168.92, 143.38, 140.70, 140.43, 135.60, 135.27, 129.86, 126.50, 126.05, 121.90, 118.91, 117.72, 84.18, 25.17, 24.54. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 338,18 für C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>BNO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 338,63.

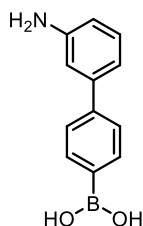
***N*-(4'-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetamid (**57**)**



Zu einer Lösung von *N*-(4-Bromphenyl)acetamid **55** (0,25 g, 1,2 mmol, 1 Äq.) in einer 5:1-Mischung aus 1,4-Dioxan und H<sub>2</sub>O wurde 1,4-Bis(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzol (0,96 g, 2,9 mmol, 2,5 Äq.) zugegeben. Nach 20-minütigem Entgasen der Suspension mit Argon wurden K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0,35 g, 1,5 mmol, 1,3 Äq.) und Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (85,3 mg, 0,11 mmol, 0,1 Äq.) zugegeben und das Gemisch für 16 Stunden bei 60 °C erhitzt. Anschließend wurde die Suspension mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **57** wurde als hellgelber Feststoff erhalten (197 mg, Ausbeute: 50 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.05 (s, J = 12.2 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.65 (tt, J = 5.4, 4.1 Hz, 6H), 2.06 (s, J = 4.4 Hz, 3H), 1.30 (s, J = 6.3 Hz, 12H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 168.86, 142.95, 139.71, 135.54, 135.24, 134.56, 127.47, 126.04, 125.60, 119.77, 84.11, 25.16, 24.54. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 338,18 für C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>BNO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 338,32.

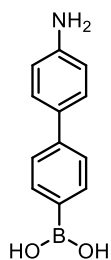
### (3'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-Boronsäure (58)



Zu einer Lösung von 3-Bromanilin (0,12 g, 0,67 mmol, 1 Äq.) in einer 5:1-Mischung aus 1,4-Dioxan und H<sub>2</sub>O wurde 1,4-Phenylendiboronsäure (0,17 g, 1 mmol, 1,5 Äq.) zugegeben. Nach 20-minütigem Entgasen der Lösung mit Argon wurden K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0,31 g, 1,4 mmol, 2 Äq.) und Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (49,5 mg, 0,067 mmol, 0,1 Äq.) zugegeben und die Suspension für 16 Stunden bei 60 °C erhitzt. Anschließend wurde die Suspension mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **58** wurde als hellgelber Feststoff (64,1 mg, Ausbeute: 44 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.03 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.16 – 7.08 (m, 1H), 6.95 – 6.80 (m, 2H), 6.65 – 6.55 (m, 1H), 5.38 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ 149.20, 142.93, 141.31, 135.10, 134.44, 129.86, 125.89, 115.11, 113.99, 112.84. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 214,09 für C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>BNO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 214,20.

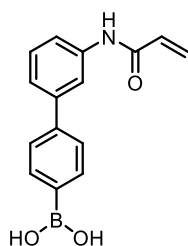
### (4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-Boronsäure (59)



Zu einer Lösung von 4-Bromanilin (0,12 g, 0,67 mmol, 1 Äq.) in einer 5:1-Mischung aus 1,4-Dioxan und H<sub>2</sub>O wurde 1,4-Phenylendiboronsäure (0,17 g, 1 mmol, 1,5 Äq.) zugegeben. Nach 20-minütigem Entgasen der Lösung mit Argon wurden K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0,31 g, 1,4 mmol, 2 Äq.) und Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (49,5 mg, 0,067 mmol, 0,1 Äq.) zugegeben und die Suspension für 16 Stunden bei 60 °C erhitzt. Anschließend wurde die Suspension mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **59** wurde als gelber Feststoff (102 mg, Ausbeute: 71 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.95 (s, 2H), 7.78 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.50 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.40 – 7.37 (m, 2H), 6.66 – 6.61 (m, 2H), 5.24 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 149.02, 142.60, 135.16, 127.67, 124.67, 114.64, 56.49, 19.04. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 214,09 für C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>BNO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 214,11.

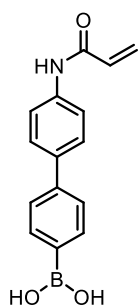
### (3'-acrylamido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-Boronsäure (60)



(3'-Amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-Boronsäure **58** (70 mg, 0,37 mmol, 1 Äq.) wurde in dTHF (10 mL) gelöst und mit DIPEA (0,12 mL, 0,74 mmol, 2 Äq.) versetzt. Acryloylchlorid (0,033 mL, 0,41 mmol, 1,1 Äq.) wurde in dTHF (1 mL) gelöst und über einen Zeitraum von 5 min tropfenweise zu der Lösung bei 4 °C zugegeben. Nach 2 h wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 100/1 → 25/1). Verbindung **60** wurde als weißer Feststoff (68,3 mg, Ausbeute: 78 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.24 (s, 1H), 8.09 (s, 2H), 8.02 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.66 (dd, J = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.44 – 7.38 (m, 2H), 6.50 – 6.42 (m, 1H), 6.31 – 6.25 (m, 1H), 5.78 (dt, J = 8.1, 4.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163.74, 141.95, 141.21, 140.06, 135.29, 132.34, 129.89, 127.50, 126.27, 126.07, 122.41, 118.97, 118.08. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 268,10 für C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>BNO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 268,11.

**(4'-acrylamido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-Boronsäure (61)**



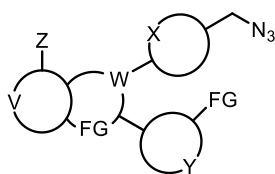
(4'-Amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-Boronsäure **59** (70 mg, 0,37 mmol, 1 Äq.) wurde in dTHF (10 mL) gelöst und mit DIPEA (0,12 mL, 0,74 mmol, 2 Äq.) versetzt. Acryloylchlorid (0,033 mL, 0,41 mmol, 1,1 Äq.) wurde in dTHF (1 mL) gelöst und über einen Zeitraum von 5 min tropfenweise zu der Lösung bei 4 °C zugegeben. Nach 2 h wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 100/1 → 25/1).

Verbindung **61** wurde als weißer Feststoff (54,9 mg, Ausbeute: 62 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.24 (s, 1H), 8.05 (s, 2H), 7.86 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.49 – 6.43 (m, 1H), 6.30 – 6.26 (m, 1H), 5.77 (dd, J = 10.1, 1.8 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163.64, 141.51, 139.09, 135.52, 135.25, 132.31, 127.49, 126.64, 125.66, 120.14, 116.15. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 268,10 für C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>BNO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 268,02.



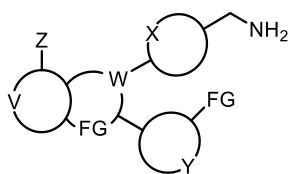
## Synthetische Darstellung von Verbindung 62



Verbindung **14** (30 mg, 1 Äq.) und Natriumazid (11,8 mg, 2,5 Äq.) wurden in wasserfreiem DMSO (15 mL) bei 4 °C gelöst. Die Lösung wurde für 30 Minuten bei 0°C gerührt, bevor das Eisbad entfernt und für weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde. Anschließend wurde überschüssiges DMSO im Luftstrom entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit EtOAc (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **62** wurde als gelber Feststoff (23 mg, Ausbeute: 84 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.27 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.49 – 7.45 (m, 3H), 7.18 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 6.89 (s, 2H), 6.39 (dd, J = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 4.58 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 158.30, 152.44, 150.68, 148.51, 144.90, 138.91, 137.08, 134.94, 133.88, 130.33, 129.91, 128.58, 119.59, 111.56, 106.51, 53.44. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 377,09 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 377,00.

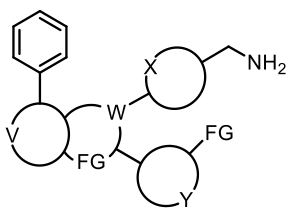
## Synthetische Darstellung von Verbindung 63



Verbindung **62** (45 mg, 1 Äq.) wurde in THF (4 mL) gelöst und mit Triphenylphosphin (78,3 mg, 2,5 Äq.) und H<sub>2</sub>O (43 µL, 20 Äq.) versetzt. Das Gemisch wurde für zwei Stunden bei 70 °C gerührt, bevor das überschüssige Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt wurde. Der Rückstand wurde mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **63** wurde als gelber Feststoff isoliert (36 mg, Ausbeute: 65 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.32 (t, J = 9.6 Hz, 4H), 8.07 (dd, J = 5.5, 1.7 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 7.59 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 7.57 – 7.54 (m, 2H), 7.53 – 7.49 (m, 1H), 6.64 (dd, J = 7.5, 5.6 Hz, 1H), 4.14 (q, J = 5.6 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 158.87 (q, J = 33.2 Hz), 155.94, 150.47, 148.48, 145.60, 145.36, 142.46, 135.51, 134.80, 133.96, 130.86, 130.55, 128.39, 119.87, 117.06 (q, J = 296.6 Hz), 111.84, 109.81, 42.28. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 351,10 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 351,04.

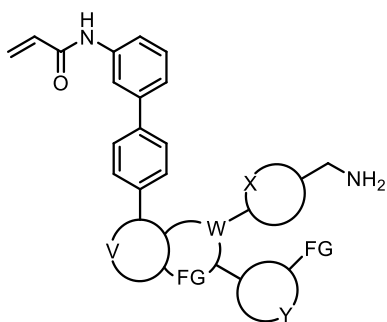
## Synthetische Darstellung von Verbindung 64



Zu einer Lösung von Verbindung **63** (20 mg, 0,043 mmol, 1 Äq.) in einer 5:1-Mischung aus 1,4-Dioxan und H<sub>2</sub>O wurde Phenylboronsäure (7,8 mg, 1,5 Äq.) zugegeben. Nach 20-minütiger Entgasung der Suspension mit Argon wurden K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (29,6 mg, 3 Äq.) und Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3,1 mg, 0,1 Äq.) zugegeben und das Gemisch für zwei Stunden bei 130 °C in einem Mikrowellenreaktor erhitzt. Anschließend wurde die Suspension mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **64** wurde als hellgelber Feststoff (9,1 mg, Ausbeute: 54 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.26 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.05 – 7.96 (m, 5H), 7.51 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.49 – 7.37 (m, 6H), 7.21 (dd, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 6.98 (s, 2H), 6.41 (dd, J = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 3.84 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 158.41, 152.23, 151.76, 150.34, 149.23, 144.85, 139.29, 138.84, 133.94, 133.88, 129.22, 129.16, 128.33, 127.90, 127.88, 127.08, 116.66, 111.63, 107.02, 45.47. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 393,17 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 393,06.

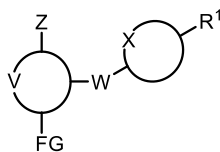
## Synthetische Darstellung von Verbindung 65



Zu einer Lösung von Verbindung **63** (40 mg, 1 Äq.) in einer 5:1-Mischung aus 1,4-Dioxan und H<sub>2</sub>O wurde (3'-Acrylamido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-Boronsäure **60** (34,4 mg, 1,5 Äq.) zugegeben. Nach 20-minütigem Entgasen der Lösung mit Argon wurden K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (59,4 mg, 3 Äq.) und Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6,2 mg, 0,1 Äquivalente) zugegeben und die Suspension für zwei Stunden bei 130 °C in einem Mikrowellenreaktor erhitzt. Anschließend wurde die Suspension mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 20/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **65** wurde als hellgelber Feststoff (30,3 mg, Ausbeute: 65 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.27 (s, 1H), 8.30 – 8.27 (m, 1H), 8.14 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.07 – 7.99 (m, 4H), 7.72 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.46 – 7.40 (m, 5H), 7.22 (dd, J = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.47 (dd, J = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.42 (dd, J = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 6.29 (dd, J = 17.0, 1.8 Hz, 1H), 5.78 (dd, J = 10.1, 1.8 Hz, 1H), 3.84 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163.77, 158.42, 152.30, 151.26, 150.36, 149.30, 145.07, 140.68, 140.63, 140.12, 138.85, 138.49, 134.04, 133.84, 132.34, 129.96, 128.47, 128.32, 128.02, 127.93, 127.88, 127.67, 127.53, 127.45, 122.34, 119.10, 117.99, 116.70, 111.63, 107.02, 45.58. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 538,22 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 538,15.

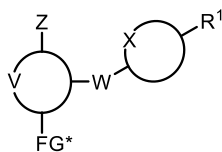
## Synthetische Darstellung von Verbindung 67



Elektrophil **7** (0,32 g, 1,1 Äq.) wurde in 1,4-Dioxan (30 mL) gelöst bevor das Nukleophil **66** (0,4 g, 1 Äq.) und DIPEA (0,5 mL, 2 Äq.) hinzugefügt wurde. Die Lösung wurde für 16 Stunden auf 80 °C erhitzt. Das überschüssige Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der ölige Rückstand in einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 50/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **67** wurde als oranger Feststoff isoliert (478 mg, Ausbeute: 75 %).

<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.11 (d, J = 18.7 Hz, 1H), 8.54 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.52 (t, J = 11.4 Hz, 2H), 7.44 – 7.36 (m, 2H), 6.99 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 2.46 – 2.30 (m, 4H), 1.98 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 1.79 (s, 1H), 1.34 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 154.71, 154.53, 149.66, 144.19, 139.31, 135.90, 128.31, 126.03, 123.05, 114.29, 77.97, 58.52, 34.21, 28.74, 15.66. HPLC-MS (m/z): Nicht gefunden.

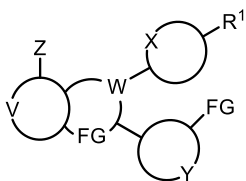
## Synthetische Darstellung von Verbindung 68



Verbindung **67** (2 g, 1 Äq.) und das Reduktionsmittel (1,6 g, 6 Äq.) wurden in EtOH (90 mL) gelöst, bevor die zuvor in 10 mL H<sub>2</sub>O gelöste Säure (2,2 g, 9 Äq.) hinzugegeben wurde. Die Reaktionslösung wurde unter Argon-Schutzgasatmosphäre für zwei Stunden bei 85 °C gerührt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lösung wurde über Celite® filtriert und das überschüssige Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit einer gesättigten wässrigen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aufgenommen und mit DCM (3x 80 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Reinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 33/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **68** wurde als brauner Feststoff isoliert (1,8 g, Ausbeute: 96 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.91 (s, 1H), 7.52 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.48 (s, 1H), 7.29 – 7.24 (m, 2H), 6.92 – 6.87 (m, 1H), 6.62 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.20 (s, 2H), 2.42 – 2.32 (m, 4H), 1.95 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 1.76 (s, 1H), 1.34 (s, J = 15.4 Hz, 9H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 154.47, 143.52, 139.99, 139.62, 133.75, 131.14, 125.89, 122.45, 118.45, 114.29, 77.80, 58.46, 34.26, 31.16, 28.75. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 388,16 [M+H]<sup>+</sup>, found : 388,87.

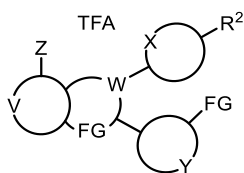
## Synthetische Darstellung von Verbindung 69



Zu einer Lösung von Verbindung **68** (500 mg, 1 Äq.) und Verbindung **11** (460 mg, 1 Äq.) in MeCN (15 mL) wurden Säure II (800  $\mu$ L, 7 Äq.) und Säure I (400  $\mu$ L, 3,5 Äq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 24 Stunden bei 60 °C erhitzt. Nach abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 100 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 33/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **69** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (0,79 g, Ausbeute: 42 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.26 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.98 (dd, J = 4.8, 1.8 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.53 – 7.50 (m, 2H), 7.45 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.39 (s, 2H), 7.26 – 7.09 (m, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.30 (dd, J = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 2.46 – 2.38 (m, 4H), 2.01 (s, 1H), 1.82 (s, 1H), 1.35 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  158.42, 154.61, 152.43, 150.55, 148.58, 148.28, 144.89, 138.65, 133.73, 133.12, 130.25, 127.69, 126.93, 119.54, 111.39, 106.38, 78.14, 58.64, 34.01, 28.72, 15.70. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 490,18 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden : 490,89.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 70

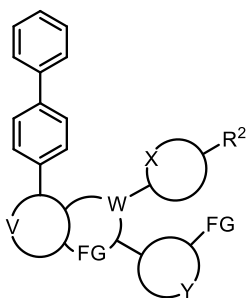


Verbindung **69** (0,51 g, 1 Äq.) wurde in 15 mL einer 4 M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan gelöst. Nach 2 h bei Raumtemperatur wurde das überschüssige Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgte durch Umkehrphasen-Chromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **70** wurde als hellgelber Feststoff (0,52 g, Ausbeute: 99 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.56 (s, 3H), 8.26 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.01 (dd, J = 5.6, 1.7 Hz, 1H), 7.66 – 7.50 (m, 5H), 7.44 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.62 (dd, J = 7.5, 5.7 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 2.65 – 2.54 (m, 2H), 2.51 – 2.45 (m, 2H), 2.17 – 2.05 (m, 1H), 1.84 – 1.71 (m, 1H).  
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 158.92, 155.47, 150.08, 148.44, 145.45, 143.19, 141.86, 134.55, 133.99, 130.98, 128.29, 128.01, 119.94, 115.42, 115.37, 111.93, 58.51, 32.61, 14.05.  
HPLC-MS (m/z): Berechnet: 390,87 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 390,83.



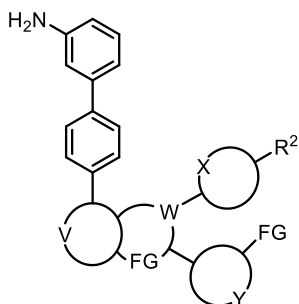
## Synthetische Darstellung von Verbindung 71a



Zu einer Lösung von Verbindung **70** (60 mg, 1 Äq.) in einem 5:1-Gemisch aus 1,4-Dioxan und H<sub>2</sub>O wurde Biphenyl-4-Boronsäure (35,3 mg, 1,5 Äq.) zugegeben. Nach 20-minütigem Entgasen der Lösung mit Argon wurden K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (54,6 mg, 2 Äq.) und Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8,7 mg, 0,1 Äq.) zugegeben und die Suspension für zwei Stunden bei 130 °C in einem Mikrowellenreaktor erhitzt. Anschließend wurde die Suspension mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> versetzt und mit DCM (3x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Aufreinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **71** wurde als hellgelber Feststoff (49,5 mg, Ausbeute: 82 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.28 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.04 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.01 (dd, J = 4.7, 1.6 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.64 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.48 (dd, J = 13.8, 7.9 Hz, 4H), 7.38 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.20 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.41 (dd, J = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 2.74 (s, 2H), 2.48 – 2.41 (m, 2H), 2.20 – 2.11 (m, 2H), 2.10 – 2.00 (m, 1H), 1.78 – 1.67 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 158.41, 152.29, 151.32, 150.38, 150.10, 149.23, 140.73, 139.97, 138.90, 138.30, 134.04, 133.64, 129.48, 128.16, 127.95, 127.70, 127.65, 127.50, 127.09, 126.64, 116.71, 111.62, 107.03, 58.98, 37.38, 14.34. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 508,23 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 508,64.

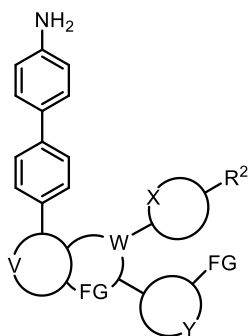
## Synthetische Darstellung von Verbindung 71b



Verbindung **71b** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **71a** aus der Vorstufe **70** (60 mg, 1 Äq.) und 3'-Amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-boronsäure **58** (37,9 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **71b** wurde als gelber Feststoff isoliert (49,5 mg, Ausbeute: 82 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.28 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.10 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 8.02 (dd,  $J = 7.2, 5.0$  Hz, 2H), 7.65 (dd,  $J = 8.2, 7.0$  Hz, 4H), 7.46 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.21 (dd,  $J = 7.6, 1.5$  Hz, 1H), 7.12 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.89 (s, 1H), 6.83 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.59 (dd,  $J = 7.9, 1.3$  Hz, 1H), 6.42 (dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz, 1H), 5.18 (s,  $J = 12.1$  Hz, 2H), 2.47 – 2.31 (m, 4H), 2.17 – 2.11 (m, 2H), 2.08 – 2.00 (m, 1H), 1.73 (qt,  $J = 9.1, 5.9$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  156.29, 150.09, 149.40, 148.29, 148.22, 147.50, 147.10, 139.57, 138.57, 136.74, 135.88, 131.82, 131.47, 127.80, 125.79, 125.57, 125.39, 125.10, 124.47, 114.54, 112.62, 111.75, 110.30, 109.50, 104.92, 56.87, 35.41, 12.21. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 524,24  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 524,44.

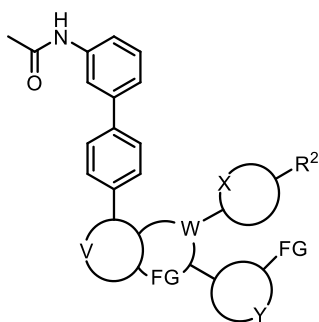
## Synthetische Darstellung von Verbindung 71c



Verbindung **71c** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **71a** aus der Vorstufe **70** (60 mg, 1 Äq.) und (4'-Amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-boronsäure **59** (37,9 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **71c** wurde als gelber Feststoff isoliert (37,4 mg, Ausbeute: 60 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.24 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.03 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 8.01 – 7.96 (m, 2H), 7.64 (d, J = 7.2 Hz, 4H), 7.44 (dd, J = 14.6, 8.5 Hz, 4H), 7.19 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.65 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.41 (dd, J = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 5.28 (s, J = 11.7 Hz, 2H), 2.48 – 2.41 (m, 4H), 2.13 (ddd, J = 11.2, 9.1, 6.1 Hz, 2H), 2.09 – 2.01 (m, 1H), 1.72 (qt, J = 9.1, 5.9 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 156.29, 149.88, 149.59, 148.22, 148.18, 147.06, 139.23, 136.70, 134.32, 131.62, 131.51, 125.73, 125.56, 125.49, 125.35, 124.87, 124.46, 123.79, 114.29, 112.54, 109.50, 104.94, 104.91, 56.87, 35.39, 12.21. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 524,24 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden : 524,48.

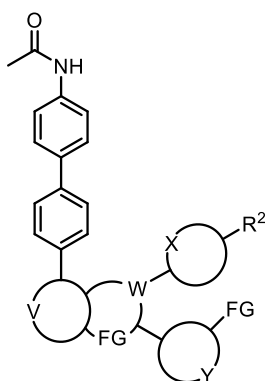
## Synthetische Darstellung von Verbindung 71d



Verbindung **71d** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **71a** aus der Vorstufe **70** (45 mg, 1 Äq.) und *N*-(4'-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)acetamid **56** (30 mg, 1 Äq.) synthetisiert. Verbindung **71d** wurde als gelber Feststoff isoliert (42,4 mg, Ausbeute: 84 %).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.05 (s, 1H), 8.30 – 8.27 (m, 1H), 8.14 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 8.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.01 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.70 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.66 – 7.63 (m, 2H), 7.57 (dd,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, 1H), 7.48 – 7.45 (m, 2H), 7.41 – 7.35 (m, 2H), 7.20 (dd,  $J = 7.6, 1.8$  Hz, 1H), 6.98 (s, 2H), 6.42 (dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz, 1H), 2.49 – 2.41 (m, 4H), 2.16 – 2.11 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.06 – 2.01 (m, 1H), 1.72 (qdd,  $J = 10.9, 8.9, 5.9$  Hz, 1H).  
 $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168.92, 158.42, 152.31, 151.34, 150.38, 150.30, 149.25, 140.78, 140.52, 140.42, 138.89, 138.45, 134.05, 133.61, 129.84, 127.95, 127.71, 127.70, 127.43, 126.62, 121.83, 118.76, 117.61, 116.76, 111.63, 107.04, 58.99, 37.46, 24.56, 14.34.  
HPLC-MS (m/z): Berechnet: 565,25  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden : 565,58.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 71e

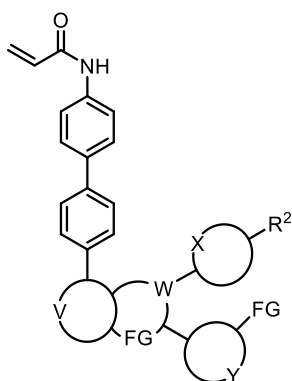


Verbindung **71e** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **71a** aus der Vorstufe **70** (30 mg, 1 Äq.) und *N*-(4'-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetamid **57** (30 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **71e** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (21,3 mg, Ausbeute: 63 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.08 (s, 1H), 8.65 (s, 3H), 8.34 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.16 – 8.07 (m, 2H), 7.78 – 7.66 (m, 11H), 7.54 (t,  $J = 10.4$  Hz, 1H), 6.68 – 6.62 (m, 1H), 2.70 (ddd,  $J = 13.1, 9.2, 6.7$  Hz, 2H), 2.57 (ddd,  $J = 12.8, 9.3, 6.6$  Hz, 2H), 2.26 – 2.16 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.89 (dq,  $J = 11.4, 9.2, 6.8$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168.87, 160.01, 158.77, 158.55, 153.59, 151.91, 149.02, 141.30, 140.56, 139.61, 137.63, 136.83, 135.28, 134.28, 134.10, 128.52, 128.19, 127.74, 127.67, 127.34, 126.96, 119.83, 117.01, 111.89, 58.61, 32.75, 24.53, 14.09. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 565,25  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 564,98.



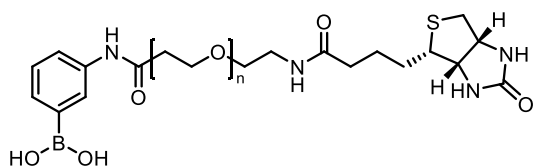
## Synthetische Darstellung von Verbindung 71g



Verbindung **71g** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **71a** aus der Vorstufe **70** (40 mg, 1 Äq.) und (3'-Acrylamido-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-boronsäure **60** (31,7 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **71g** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (28,5 mg, Ausbeute: 62 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.28 (s, 1H), 8.27 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.12 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 8.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.01 (dd,  $J = 4.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.78 (dd,  $J = 12.9, 8.6$  Hz, 4H), 7.72 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.65 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.48 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.21 (dd,  $J = 7.6, 1.8$  Hz, 1H), 6.98 (s, 2H), 6.47 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.42 (dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz, 1H), 6.28 (dd,  $J = 17.0, 1.8$  Hz, 1H), 5.78 (dd,  $J = 10.1, 1.8$  Hz, 1H), 2.47 (ddd,  $J = 11.9, 5.9, 2.8$  Hz, 4H), 2.17 (ddd,  $J = 11.6, 9.0, 6.1$  Hz, 2H), 2.11 – 2.02 (m, 1H), 1.78 – 1.70 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163.66, 158.41, 152.23, 151.39, 150.38, 149.50, 149.22, 140.23, 139.20, 138.89, 137.90, 134.87, 134.00, 133.80, 132.30, 131.76, 129.87, 127.94, 127.75, 127.62, 127.51, 127.41, 127.00, 126.70, 120.19, 116.66, 111.63, 107.05, 58.97, 37.08, 14.32. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 578,25  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 578,00.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 74

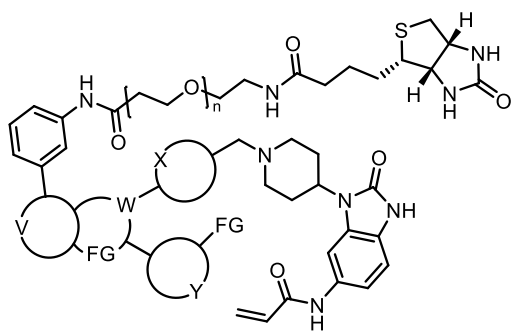


Verbindung **73** (161 mg, 1 Äq.) wurde in DCM gelöst und mit 3-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)anilin **72** (71,7 mg, 1 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde für 10 min bei 4 °C gerührt, bevor DCC (81 mg, 1,2 Äq.) zugegeben wurde. Nach 18 h wurde die Suspension mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Verbindung **74** wurde als Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung verwendet.

HPLC-MS (m/z): Nicht gefunden



## Synthetische Darstellung von Verbindung 75

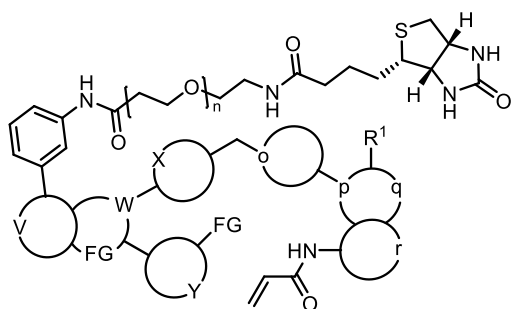


Verbindung **75** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **19a** aus der Vorstufe **15** (30 mg, 1 Äq.) und Verbindung **74** (32,5 mg, 1,1 Äq.) synthetisiert. Verbindung **75** wurde als gelber Feststoff erhalten (28,3 mg, Ausbeute: 51 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.91 (s, 1H), 10.11 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 8.35 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.08 (dd,  $J = 5.6, 1.6$  Hz, 1H), 7.93 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.82 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 7.76 – 7.67 (m, 6H), 7.63 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.59 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 7.39 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.96 (s, 2H), 6.71 – 6.68 (m, 1H), 6.44 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 2H), 6.23 (dd,  $J = 17.0, 1.8$  Hz, 1H), 5.74 (dd,  $J = 10.2, 1.7$  Hz, 1H), 4.45 (s, 2H), 4.29 (dd,  $J = 7.6, 5.0$  Hz, 1H), 4.11 (dd,  $J = 7.7, 4.4$  Hz, 1H), 3.67 – 3.63 (m, 2H), 3.56 (d,  $J = 10.9$  Hz, 2H), 3.45 (d,  $J = 7.2$  Hz, 16H), 3.35 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 3.31 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 3.15 (q,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 3.09 – 3.04 (m, 1H), 2.80 (dd,  $J = 12.4, 5.1$  Hz, 1H), 2.67 (q,  $J = 12.3$  Hz, 2H), 2.56 (d,  $J = 12.4$  Hz, 1H), 2.52 (dd,  $J = 10.7, 4.5$  Hz, 2H), 2.04 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.01 (d,  $J = 12.4$  Hz, 2H), 1.59 (tt,  $J = 15.9, 6.0$  Hz, 1H), 1.52 – 1.41 (m, 3H), 1.32 – 1.24 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  172.62, 169.86, 163.34, 163.19, 159.09, 158.87, 158.65, 158.42, 154.45, 152.56, 148.85, 140.17, 139.70, 136.37, 134.06, 133.00, 132.92, 132.36, 130.64, 129.65, 129.49, 128.66, 128.52, 126.92, 125.12, 122.16, 119.98, 117.95, 117.83, 117.22, 115.99, 113.71, 111.96, 109.38, 101.81, 70.20, 70.19, 70.14, 70.11, 70.09, 69.98, 69.59, 67.05, 61.50, 59.66, 59.20, 55.88, 51.77, 48.07, 38.88, 37.69, 35.55, 28.65, 28.50, 26.47, 25.72. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 1150,52  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 1150,51.



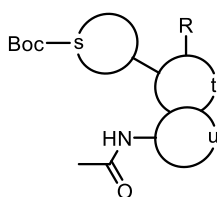
## Synthetische Darstellung von Verbindung 77



Verbindung **77** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **43** (30 mg, 1 Äq.) und Verbindung **74** (33,3 mg, 1,1 Äq.) synthetisiert. Verbindung **77** wurde als hellgelber Feststoff isoliert (23,7 mg, Ausbeute: 42 %).

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.49 (s, 1H), 10.25 (s, J = 25.9 Hz, 1H), 10.08 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.56 (d, J = 23.5 Hz, 1H), 8.37 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.94 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.75 (dd, J = 50.5, 18.8 Hz, 7H), 7.63 (dd, J = 27.7, 6.1 Hz, 2H), 7.42 – 7.35 (m, 2H), 6.71 (s, 1H), 6.51 (dd, J = 16.3, 10.5 Hz, 1H), 6.35 (dd, J = 51.5, 23.5 Hz, 3H), 5.81 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.51 (s, 3H), 4.30 (s, 2H), 4.12 (s, 2H), 3.65 (s, 4H), 3.46 (d, J = 6.6 Hz, 12H), 3.36 (s, 4H), 3.16 (d, J = 3.7 Hz, 2H), 3.08 (s, 1H), 2.81 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 2.60 – 2.55 (m, 1H), 2.40 (d, J = 13.6 Hz, 4H), 2.05 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 1.59 (s, 1H), 1.49 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.28 (d, J = 4.5 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 172.61, 169.87, 163.80, 163.19, 159.24, 159.02, 158.80, 158.57, 155.46, 152.58, 149.85, 148.84, 143.14, 141.19, 140.19, 139.70, 136.37, 134.07, 133.00, 132.47, 132.17, 129.69, 129.64, 128.94, 128.68, 128.53, 128.25, 127.60, 122.16, 119.98, 118.01, 117.83, 117.22, 116.05, 111.97, 102.76, 70.20, 70.14, 70.10, 70.09, 69.98, 69.59, 67.05, 61.51, 59.67, 59.14, 55.88, 51.18, 38.88, 37.68, 35.55, 29.03, 28.65, 28.50, 27.94, 25.72. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 1134,52 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 1134,63.

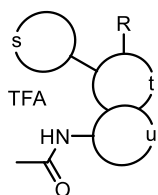
## Synthetische Darstellung von Verbindung 78



Verbindung **27** (50 mg, 1 Äq.) wurde in dTHF (5 mL) gelöst und mit Essigsäureanhydrid (16,1  $\mu$ L, 1,1 Äq) versetzt. Die Lösung wurde für zwei Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine gesättigte wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) zugegeben und mit DCM (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Verbindung **78** wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

HPLC-MS (m/z): Berechnet: 372,48 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 372,36.

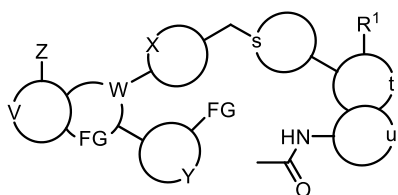
## Synthetische Darstellung von Verbindung 79



Verbindung **78** (56 mg, 1 Äq.) wurde in einer Mischung aus DCM (3 mL) und TFA (1 mL) gelöst und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssiges TFA wurden unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in H<sub>2</sub>O (5 mL) resuspendiert und anschließend lyophilisiert. Verbindung **79** wurde als weißer Feststoff (58 mg, Ausbeute: 99 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  9.76 (s, 1H), 8.66 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 8.7, 1.9 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.38 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H), 3.13 – 3.01 (m, 3H), 2.09 (d, *J* = 13.4 Hz, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.79 (qd, *J* = 14.0, 3.8 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  168.12, 158.53 (q, *J* = 33.3 Hz), 134.10, 131.50, 126.39, 126.33, 117.56, 117.05 (q, *J* = 296.6 Hz) 115.76, 110.11, 110.08, 44.06, 32.84, 31.12, 29.76, 24.32. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 272,48 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 272,22.

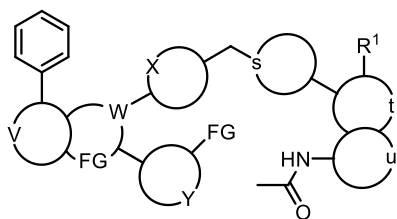
## Synthetische Darstellung von Verbindung 80



Verbindung **14** (45 mg, 1 Äq.) und Verbindung **79** (50 mg, 1,2 Äq.) wurden in dDMF (5 mL) gelöst. Nach der Zugabe von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (89,7 mg, 6 Äq.) wurde die Suspension 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde überschüssiges DMF im Luftstrom entfernt und der Rückstand mit einer gesättigten wässrigen Lösung von NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen und mit DCM (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Reinigung erfolgte durch Normalphasen- (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH = 1/0 → 9/1) und Umkehrphasen-Säulenchromatographie (C18, H<sub>2</sub>O (0,2 % TFA) /MeCN (0,2 % TFA) = 9/1 → 0/1). Verbindung **80** wurde als hellgelber Feststoff (59,5 mg, Ausbeute: 91 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.73 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 4.8, 1.8 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.46 (dd, *J* = 8.3, 4.3 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.30 – 7.25 (m, 2H), 7.17 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.94 (s, 2H), 6.38 (dd, *J* = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.60 (s, 2H), 2.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 2.70 (s, 1H), 2.14 (d, *J* = 20.5 Hz, 2H), 1.92 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H), 1.72 (q, *J* = 11.7 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 168.03, 158.35, 152.51, 150.66, 148.53, 144.89, 140.31, 138.85, 134.06, 133.89, 133.81, 131.46, 130.28, 130.22, 128.08, 126.72, 126.31, 119.55, 119.09, 115.17, 111.49, 109.85, 109.79, 106.49, 62.35, 54.28, 33.62, 33.23, 32.79, 24.39. HPLC-MS (m/z): Berechnet: 606,14 [M+H]<sup>+</sup>, gefunden: 605,89.

## Synthetische Darstellung von Verbindung 81



Verbindung **81** wurde nach dem Standardverfahren zur Herstellung von Verbindung **47a** aus der Vorstufe **80** (42 mg, 1 Äq.) und Phenylboronsäure (12,4 mg, 1,5 Äq.) synthetisiert. Verbindung **81** wurde als gelber Feststoff isoliert (37 mg, Ausbeute: 82 %).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.73 (s, 1H), 8.27 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.00 (ddd,  $J = 15.9, 14.2, 7.9$  Hz, 4H), 7.84 (s, 1H), 7.51 (t,  $J = 11.2$  Hz, 2H), 7.46 (dd,  $J = 10.2, 4.7$  Hz, 4H), 7.42 – 7.36 (m, 1H), 7.31 – 7.24 (m, 2H), 7.16 (dd,  $J = 7.7, 1.6$  Hz, 1H), 7.05 (d,  $J = 15.4$  Hz, 3H), 6.38 (dd,  $J = 7.6, 4.8$  Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 2.97 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 2.70 (s, 1H), 2.17 (s,  $J = 25.4$  Hz, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.92 (d,  $J = 12.5$  Hz, 2H), 1.73 (dd,  $J = 22.2, 11.6$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168.04, 158.44, 152.21, 151.84, 150.42, 149.14, 139.28, 138.80, 134.07, 133.91, 131.47, 130.12, 129.24, 129.16, 128.05, 127.93, 127.12, 126.73, 126.31, 119.08, 119.05, 116.74, 115.18, 111.50, 109.85, 109.81, 106.79, 62.36, 54.27, 33.59, 33.23, 32.79, 24.39, 22.96. HPLC-MS ( $m/z$ ): Berechnet: 647,8  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gefunden: 647,92.

### 6.3 HTRF-Aktivitätsassay

Die biochemischen halbmaximalen Hemmkonzentrationen ( $IC_{50}$ ) wurden mit dem HTRF KinEASE-Assay (Cisbio) bestimmt.<sup>113</sup> Zur biochemischen Charakterisierung wurden jeweils 2,5  $\mu$ L des 1X Kinase-Puffers (50 mM HEPES (pH 7,0), 0,02 % NaN<sub>3</sub>, 0,01 % BSA) in jede Kavität einer 384-Loch-Platte mittels eines MultiDrop Combi (Thermo Scientific) transferiert. Im Anschluss wurden die zu untersuchenden Verbindungen als serielle Verdünnung (acht Konzentrationen, sechs-fache Verdünnung, 20  $\mu$ M höchste Konzentration, 200 nL Gesamtvolumen) mit einem Echo 520 Liquid Handler (Labcyte) auf die 384-Loch-Platte transferiert. Im Anschluss wurden je 5  $\mu$ L Kinase-Lösung (1X Kinase-Puffer + 260 pM wtAkt) in jede Kavität der Platte gegeben und diese für 20 s bei 1.200 U/min geschüttelt und für eine Stunde bei RT in einer befeuchteten Dunkelkammer inkubiert, bevor je 2,5  $\mu$ L der Startlösung (1X Kinase Puffer + 1  $\mu$ M STK Substrat 3, 320  $\mu$ M ATP) in jede Kavität pipettiert (Multidrop Combi) wurde. Im Anschluss wurde die Platte erneut für 20 s bei 1200 U/min durchmischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer befeuchteten Dunkelkammer inkubiert. Nach der Zugabe (MultiDrop Combi) von je 10  $\mu$ L der Stopp/Detektionslösung (50 mM HEPES (pH 7.0), 0.1 % BSA, 800 mM KF, 20 mM EDTA, 31.25 nM SA-XL665, 1X STK Antikörper-Kryptat) in jede Kavität der Platte erfolgte eine finale Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur in einer befeuchteten Dunkelkammer. Die Auswertung der 384-Loch-Platte erfolgte unter Zuhilfenahme des Multimode Plate Reader EnVision 2104 (PerkinElmer) durch Anregung des Eu<sup>3+</sup>-Kryptats bei einer Wellenlänge von 337 nm. Die Emission erfolgte bei 620 nm (Eu<sup>3+</sup>-Kryptat) und 665 nm (XL665, Phycobilliprotein Pigment), 60  $\mu$ s nach der Anregung. Die Akzeptor-Donor-Verhältnisse ( $Em_{665}/Em_{620}$ ) wurden berechnet, auf eine Positivkontrolle (20  $\mu$ M Staurosporin) und eine Negativkontrolle (DMSO) normiert und gegen die Konzentrationen der eingesetzten Verbindungen halblogarithmisch aufgetragen (Quattro Software Suite). Die erhaltenen Inhibitionskurven erlaubten die Ableitung von  $IC_{50}$ -Werten. Insgesamt wurden pro finale Verbindung mindestens drei unabhängige Messungen durchgeführt und die daraus resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Der HTRF-Assay wurde von Dr. Lena Quambusch und Dr. Jörn Weisner durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

## 6.4 MS-Analytik zum Nachweis der kovalenten Proteinmodifikation

Die Proteinlösung des verwendeten Akt-Wildtyps wurde durch Verdünnung mit einem Gelfiltrationspuffer (50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 10 % Glycerol, pH 7,3; für die Bestimmung von  $k_{inact}$ : 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 2 % Glycerol, pH 7,3, 1 mM DTT, 1 mM ATP) auf eine Endkonzentration von 10  $\mu$ M (für die Bestimmung von  $k_{inact}$ : 2  $\mu$ M Protein) eingestellt. Im Anschluss wurden der Proteinlösung jeweils fünf Äquivalente einer niedermolekularen Verbindung (oder äquivalente Mengen an DMSO als Negativkontrolle; für die Bestimmung von  $k_{inact}$ : 50 Äq. Inhibitor) zugesetzt, bevor die Proben für eine Stunde bei 4 °C inkubiert wurden. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 21000 x g und 4 °C erfolgte die Vermessung der Proben an einem Velos Pro Ionenfallen-Massenspektrometer (Thermo Scientific) mit einer AdvanceBio Desalting-RP-Kartusche (Agilent Technologies). Im Rahmen der Untersuchung wurde ein Gradient aus H<sub>2</sub>O/MeCN (0,1 % Ameisensäure) = 9/1  $\rightarrow$  1/4 bei einer Flussrate von 400  $\mu$ L/min über einen Zeitraum von sechs Minuten eingestellt und ein Massenbereich zwischen 700 und 2000 Da untersucht. Die generierten Rohdaten wurden im Anschluss mit der Software ProMass (Thermo Scientific) dekonvolutiert. Zeitabhängige Messungen erlaubten die Auftragung der prozentualen Modifikation von Akt gegen die Zeit und somit die Bestimmung der Rate der kovalenten Inaktivierung  $k_{inact}$  (verwendete Software: OriginPro 2023b). Die Halbwertszeit, bei der 50 % des eingesetzten Proteins alkyliert vorliegt, wurde mit der Formel  $t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k_{inact}}$  berechnet.



## 6.5 Proteinexpression und -reinigung

Die Proteinexpression und -reinigung der Akt-Isoformen und des Akt2-Mimikrykonstrukts wurde von Dr. Ina Landel,<sup>269</sup> Dr. Laura Depta,<sup>267</sup> Dr. Jörn Weisner<sup>270</sup> und Dr. Janina Niggenaber durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund) und ist ausführlich in den referenzierten Dissertationen beschrieben.

## 6.6 Protein Co-Kristallisation

Die Konzentration des verwendeten Akt1-Wildtyp (2-446) und des Akt2-Mimikrykonstrukts (Akt1 2-446, S205T/D262E/E267del/K268R/N269D) wurde nach abgeschlossener Gelfiltration auf eine Endkonzentration von 3 mg/mL durch die Verdünnung mit dem Gelfiltration-Puffer (25 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 7,5) eingestellt. Im Anschluss wurde das Protein mit einem dreifachen molaren Überschuss des Inhibitors (10 mM in DMSO) für 60 min in einem Eisbad inkubiert. Die Proben wurden 10 min bei 20000 x g (Eppendorf Centrifuge 5804 R) zentrifugiert, bevor hängende Tropfen an den Deckeln der 15-*well*-Kristallisationsplatten (EasyXtal Tool, Quiagen), durch die Vereinigung von 1  $\mu$ L Protein-Ligand-Komplex (Überstand) mit 1  $\mu$ L Reservoirlösung bei 20 °C Umgebungstemperatur vorbereitet wurden. Die Nukleation wurde in einigen Fällen bereits am ersten Tag beobachtet. Co-Kristalle für die Röntgendiffraktion wuchsen innerhalb von vier Tagen und wurden mit Nylonschlaufen isoliert, in einer 20 % Ethylenglykol-Lösung kryokonserviert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Röntgenbeugungsdaten wurden an dem SLS (Paul Scherrer Institut, Villingen, Schweiz) an der PXII-X10SA *beamline* (Wellenlänge nahe 1.0 Å), sowie an einem D8 Venture Diffraktometer mit I $\mu$ S 3.0 Röntgenquelle und Photon II Detektor der Firma Bruker aufgenommen.

Die Protein-Co-Kristallisation und Strukturaufklärung wurde von Dr. Ina Landel, Dr. Laura Depta, Dr. Janina Niggenaber, Dr. Silke Barbara Kleinbölting, Dr. Matthias Müller und M. Sc. Jan Wiese durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

## 6.7 Western-Blot-Analyse

ZR-75-1 Zellen wurden in Sechs-Loch-Gewebekulturplatten (Sarstedt) ausgesät, um nach einer Inkubation über Nacht eine Konfluenz von 70-90 % zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen von Inhibitoren oder DMSO behandelt und bei 37 °C für weitere 24 Stunden (zwei Stunden bei Sondenexperimenten) inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Um die Zellyse einzuleiten, wurden pro Vertiefung 100 µl RIPA-Puffer (Cell Signaling Technology) mit Phosphatase- und Proteaseinhibitor-Cocktails (Roche) zugegeben. Die Mischung wurde dann für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden durch Abschaben geerntet und in vorgekühlte Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Zelllysate wurden durch Zentrifugation bei 14 000 x g und 4 °C für 10 Minuten geklärt, und der Überstand wurde in frische, vorgekühlte Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Pierce BCA-Protein-Assay (Thermo) gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Zelllysate von unbehandelten Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen und auf eine Konzentration von 1 mg/mL in einem Volumen von 100 µL eingestellt. Die Lysate wurden dann mit Inhibitoren und/oder Sonden in den angegebenen Konzentrationen behandelt, durch Schütteln gemischt und zwei Stunden lang bei 20 °C inkubiert. Gleiche Proteinmengen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Pierce™ 1-Step-Transferpuffer (Thermo) und dem Pierce™ Power Blotter (Thermo) auf Immobilon-FL PVDF-Membranen (Merck Millipore) übertragen. Die Membranen wurden für 5 Minuten mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Odyssey® Blocking Buffer TBS (Li-Cor) blockiert. Mit Biotin markierte Proben wurden mit Streptavidin Protein-DyLight™ 650 (Thermo, 84547, 1:5000) in Intercept® Blocking Buffer TBS eine weitere Stunde bei rt inkubiert und dann dreimal mit TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,4) für 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit in Odyssey® Blocking Buffer TBS verdünnten Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,4) gewaschen und anschließend für eine Stunde mit in Odyssey® Blocking Buffer TBS verdünnten sekundären Antikörpern bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Schließlich wurden die Membranen dreimal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und dann mit einem Odyssey® CLx-Bildgebungssystem (Li-Cor) gescannt.

Die Western-Blot-Analysen wurden zusammen mit Dr. Jörn Weisner durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

## 6.8 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Quelle</b>	<b>Kennung</b>
p4E-BP1 <sup>S65</sup>	Cell Signaling Technology	#13443
4E-BP1	Cell Signaling Technology	#9644
β-Actin	Sigma Aldrich	A5441
pAkt1 <sup>S473</sup>	Cell Signaling Technology	#9018
Akt1	Cell Signaling Technology	#2938
pAkt2 <sup>S474</sup>	Cell Signaling Technology	#8599
Akt2	Cell Signaling Technology	#3063
Hsp90	Cell Signaling Technology	#4874
pErk1/2 <sup>T202/Y204</sup>	Cell Signaling Technology	#4370
Erk1/2	Cell Signaling Technology	#4696
pPRAS40 <sup>T246</sup>	Cell Signaling Technology	#2997
PRAS40	Cell Signaling Technology	#2691
pS6 <sup>S235/236</sup>	Cell Signaling Technology	#4858
S6	Cell Signaling Technology	#2217

## 6.9 Glutathion (GSH)-Assay

Für den Reaktivitäts-/Stabilitätstest wurde eine 50  $\mu\text{M}$ -Lösung des Inhibitors (in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7,4 mit 7 % MeCN) mit einer 50  $\mu\text{M}$ -Lösung von Sulindac als internem Standard mit 4,6 mM Glutathion (GSH) oder ohne ( $t_0$ -Probe) inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde mittels HPLC-MS nach 0, 12, 70, 128, 186 und 244 Minuten bei 37 °C analysiert. Die AUC-Werte (Fläche unter der Kurve) wurden durch Integration der HPLC-Chromatogramme bestimmt und anschließend mit dem internen Standard korrigiert. Die AUC-Werte der Inhibitoren wurden einer linearen Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate (OLS) unterzogen, und zur Berechnung der Parameter (kinetische Geschwindigkeitskonstante und Halbwertszeit) wurde ein OriginPro 2023b Dokument verwendet. Die Daten sind als Mittelwerte von Dreifachbestimmungen angegeben. Die kinetische Geschwindigkeitskonstante für den Abbau wurde wie folgt berechnet: Die Reaktionshalbwertszeit für Reaktionen pseudoerster Ordnung ( $t_{1/2}$ ) ist  $\ln(2)/k$ , wobei  $k$  die Reaktionsgeschwindigkeit ist. Schließlich wird die Halbwertszeit der Inhibitoren in Gegenwart von GSH anhand der Gleichung  $t_{\frac{1}{2}} = \frac{-\ln 2}{k}$  bestimmt.

## 6.10 Zellviabilitäts Assay zur EC<sub>50</sub>-Bestimmung

Am Tag 0 wurden ZR-75-1-Brustkrebszellen in weiße Zellkulturplatten mit 384 Vertiefungen (Greiner Bio-One) unter Verwendung eines Multidrop™-Reagenzienverteilers (Thermo) mit 400 Zellen pro Vertiefung plattiert, um eine lineare und optimale Lumineszenzsignalintensität sicherzustellen. Nach einer 24-stündigen Inkubation in einer befeuchteten Atmosphäre bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit Inhibitoren in seriellen Verdünnungen von 30 μM bis zu 0,1 nM unter Verwendung eines Echo 520 *Acoustic Liquid Handlers* (Labcyte Inc.) behandelt. Die Zellviabilität der Zellen wurde an Tag 5 mit dem CellTiter-Glo®-Assay (Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers analysiert. Die Lumineszenz wurde mit einem EnVision *Multilabel 2104 Plate Reader* (PerkinElmer) bei einer Integrationszeit von 500 ms aufgezeichnet. Die erhaltenen Daten wurden auf die Positivkontrolle (30 μM Staurosporin) und die Negativkontrolle (DMSO) normiert und anschließend mit der *Quattro Software Suite* (Quattro Research) unter Verwendung eines logistischen Modells mit vier Parametern analysiert und angepasst. Als Qualitätskontrolle wurde der Z-Faktor aus 16 positiven und negativen Kontrollwerten berechnet. Nur Testergebnisse mit einem Z-Faktor  $\geq 0,5$  wurden für die weitere Analyse verwendet. Alle Versuchspunkte wurden für jede Platte doppelt gemessen und auf mindestens drei Platten repliziert.<sup>229</sup>

Der Zellviabilitätsassay wurde von Dr. Jörn Weisner und Dr. Ina Landel durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

## 6.11 Bestimmung der *in vitro* ADME-Parameter

Alle nachfolgenden ADME-Assays wurden am Lead Discovery Center (LDC) Dortmund in der PK-Abteilung unter der Leitung von Dr. Matthias Baumann und Dr. Anke Unger durchgeführt und sind ausführlich in der Literatur durch WEISNER *et al.*<sup>229</sup> und LATEGHAN *et al.*<sup>271</sup> beschrieben.

### 6.11.1 SolRank-Assay

Zur Bestimmung der kinetischen Löslichkeit wurden die getesteten Verbindungen von einer 10 mM Stammlösung in DMSO auf eine Endkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  in 50 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) verdünnt. Nach einer Inkubation von 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler wurde die wässrige Verdünnung durch einen 0,2-mm-PVDF-Filter filtriert und die optische Dichte zwischen 250 und 500 nm in Abständen von 10 nm gemessen. Die kinetische Löslichkeit wurde aus der AUC zwischen 250 und 500 nm berechnet und auf die Absorption einer Verdünnung der Verbindung in Acetonitril normiert.<sup>229</sup>

### 6.11.2 Caco-2-Assay

Zur Messung der Zellpermeabilität wurden die getesteten Verbindungen in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in HBSS entweder auf die apikale (A) oder die basolaterale (B) Seite einer auf 96-Transwell©-Platten kultivierten Caco-2-Zellschicht (ATCC) aufgetragen und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Konzentrationen der getesteten Verbindungen auf jeder Seite der Monoschicht wurden mittels LC/MS bestimmt, und die apparente Permeabilität ( $P_{\text{app}}$ ) wurde für die Richtungen von apikal nach basolateral (A→B) und von basolateral nach apikal (B→A) nach der folgenden Gleichung berechnet:  $P_{\text{app}} = 1/(A \times C_0) \times (dQ/dt)$ , wobei  $A$  die Membranoberfläche,  $C_0$  die Donor-Wirkstoffkonzentration bei  $t = 0$  und  $dQ/dt$  die innerhalb eines bestimmten Zeitraums transportierte Wirkstoffmenge ist.<sup>271</sup>

### 6.11.3 Assay zur Bestimmung der metabolischen Stabilität (Phase I)

Die mikrosomale metabolische Stabilität ( $CL_{int}$ ) der getesteten Verbindungen unter oxidativen Bedingungen wurde bei einer Endkonzentration von  $1 \mu\text{M}$  durch Inkubation mit murinen Lebermikrosomen (XenoTech, tebu-bio, Deutschland) bestimmt, die mit NADP, Glukose-6-Phosphat (G6P) und G6P-Dihydrogenase supplementiert wurden. Der Abbau der Substanz wurde im Laufe der Zeit mittels LC-MS/MS gemessen, um die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  der Substanz zu berechnen. Die Umrechnung in die intrinsische *in vitro clearance*  $CL_{int}$ , angegeben in  $[\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}]$ , erfolgte anhand der folgenden Gleichung:  $CL_{int}[\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}] = (0,693/t_{1/2}[\text{min}]) \times (\text{Reaktionsvolumen} [\mu\text{L}]/\text{mikrosomales Protein} [\text{mg}])$ .<sup>271</sup>

### 6.11.4 Assay zur Bestimmung der metabolischen Stabilität (Phase II)

Die mikrosomale metabolische Stabilität der getesteten Verbindungen unter konjugativen Bedingungen (Phase II) wurde im Glucuronidierungs-Assay durch LC/MS-basierte Bestimmung des prozentualen Rückstands der Prüfsubstanzen bei einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  nach Inkubation mit Lebermikrosomen, die mit *Uridine diphosphate glucuronic acid* (UDPGA) supplementiert waren, für 1 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  gemessen.<sup>271</sup>

### 6.11.5 Assay zur Bestimmung der Plasma-Proteinbindung

Die Plasmaproteinbindung wurde durch Gleichgewichtsdialyse von  $5 \mu\text{M}$  der getesteten Verbindung in 50 % Plasma von Mäusen gegen PBS gemessen. Nach 6 Stunden Inkubation bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  wurden die Konzentrationen der Verbindung auf beiden Seiten der Membran mittels LC/MS gemessen. Die Plasmaproteinbindung, ausgedrückt als [% gebunden], wurde anhand der folgenden Gleichung berechnet:  $\% \text{ gebunden} = (C_{\text{Plasma}} - C_{\text{PBS}}) / C_{\text{Plasma}} \times 100 \%$ .<sup>271</sup>

### 6.11.6 Assay zur Bestimmung der Plasmastabilität

Die Plasmastabilität wurde durch LC-MS/MS-basierte Quantifizierung der Wirkstoffkonzentrationen nach einstündiger Inkubation von  $5 \mu\text{M}$  der getesteten Verbindung bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  mit Plasma von Mäusen bestimmt. Die Plasmastabilität wurde als [% Restwert] nach Normalisierung auf die Ausgangskonzentration ausgedrückt.<sup>271</sup>

## 7. Quellenverzeichnis

- 1 *What Is Cancer?*, <<https://training.seer.cancer.gov/disease/cancer/>> (2024).
- 2 *Understanding Cancer*, <<https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer.html>> (2024).
- 3 Faguet, G. B. A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database. *Int J Cancer* **136**, 2022-2036, doi:10.1002/ijc.29134 (2015).
- 4 van Middendorp, J. J., Sanchez, G. M. & BurrIDGE, A. L. The Edwin Smith papyrus: a clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries. *Eur Spine J* **19**, 1815-1823, doi:10.1007/s00586-010-1523-6 (2010).
- 5 *Cancer: A Historic Perspective*, <<https://training.seer.cancer.gov/disease/history/>> (2024).
- 6 Long, C. W. An account of the first use of sulphuric ether. *Southern Med Surg J* **5**, 705-713 (1849).
- 7 Lister, J. On the antiseptic principle in the practice of surgery. *Lancet* **90**, 353-356 (1867).
- 8 Ehrlich, P. Die Behandlung der Syphilis mit dem Ehrlichschen Präparat. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 1893-1896 (1910).
- 9 Flemming, A. ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B. INFLUENZAE. *Br J Exp Pathol* **10**, 226-236 (1929).
- 10 Ehrlich, P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd* **5**, 273-290 (1909).
- 11 Hansford, S. & Huntsman, D. G. Boveri at 100: Theodor Boveri and genetic predisposition to cancer. *J Pathol* **234**, 142-145, doi:10.1002/path.4414 (2014).
- 12 Smith, S. L. War! What is it good for? Mustard gas medicine. *CMAJ* **189**, E321-E322, doi:10.1503/cmaj.161032 (2017).
- 13 Goodman, L. S. *et al.* Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J Am Med Assoc* **132**, 126-132, doi:10.1001/jama.1946.02870380008004 (1946).
- 14 Hirsch, J. An Anniversary for Cancer Chemotherapy. *JAMA* **296**, 1518-1520 (2006).
- 15 Chabner, B. A. & Roberts, T. G., Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* **5**, 65-72, doi:10.1038/nrc1529 (2005).
- 16 Oransky, I. Roy Hertz. *The Lancet* **360**, doi:10.1016/s0140-6736(02)11781-8 (2002).
- 17 Organization, W. H. *Noncommunicable diseases*, <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>> (2023).
- 18 Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209-249, doi:10.3322/caac.21660 (2021).
- 19 Roth, G. A. *et al.* Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol* **76**, 2982-3021, doi:10.1016/j.jacc.2020.11.010 (2020).
- 20 Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E. & Soerjomataram, I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer* **127**, 3029-3030, doi:10.1002/cncr.33587 (2021).
- 21 *Cancer Today - Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020*, <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>> (2020).
- 22 *Global Cancer Observatory*, <<https://gco.iarc.fr/today/home>> (2020).



- 23 *Global Burden of Disease Results*, <<https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>> (2020).
- 24 Omran, A. R. The epidemiologic transition: a theory of the epidemiology of  
population change. 1971. *Milbank Q* **83**, 731-757, doi:10.1111/j.1468-  
0009.2005.00398.x (2005).
- 25 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70,  
doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9 (2000).
- 26 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**,  
646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 27 Druker, B. J. *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine  
kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **344**, 1031-1037,  
doi:10.1056/NEJM200104053441401 (2001).
- 28 Hood, L. & Rowen, L. The Human Genome Project: big science transforms biology  
and medicine. *Genome Med* **5**, 79, doi:10.1186/gm483 (2013).
- 29 Consortium, E. P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human  
genome. *Nature* **489**, 57-74, doi:10.1038/nature11247 (2012).
- 30 Skipper, M., Dhand, R. & Campbell, P. Presenting ENCODE. *Nature* **489**, 45,  
doi:10.1038/489045a (2012).
- 31 Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive  
bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821, doi:10.1126/science.1225829 (2012).
- 32 Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA  
ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in  
bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2579-2586, doi:10.1073/pnas.1208507109  
(2012).
- 33 Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*  
**339**, 819-823, doi:10.1126/science.1231143 (2013).
- 34 Stadtmauer, E. A. *et al.* CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer.  
*Science* **367**, doi:10.1126/science.aba7365 (2020).
- 35 Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle.  
*Immunity* **39**, 1-10, doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012 (2013).
- 36 Przepiorcka, D. *et al.* FDA Approval: Blinatumomab. *Clin Cancer Res* **21**, 4035-4039,  
doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0612 (2015).
- 37 Inman, B. A., Longo, T. A., Ramalingam, S. & Harrison, M. R. Atezolizumab: A PD-  
L1-Blocking Antibody for Bladder Cancer. *Clin Cancer Res* **23**, 1886-1890,  
doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1417 (2017).
- 38 Pai-Scherf, L. *et al.* FDA Approval Summary: Pembrolizumab for Treatment of  
Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: First-Line Therapy and Beyond. *Oncologist*  
**22**, 1392-1399, doi:10.1634/theoncologist.2017-0078 (2017).
- 39 Akinboro, O. *et al.* FDA Approval Summary: Pembrolizumab, Atezolizumab, and  
Cemiplimab-rwlc as Single Agents for First-Line Treatment of Advanced/Metastatic  
PD-L1-High NSCLC. *Clin Cancer Res* **28**, 2221-2228, doi:10.1158/1078-0432.CCR-  
21-3844 (2022).
- 40 Dolly, S. O., Collins, D. C., Sundar, R., Popat, S. & Yap, T. A. Advances in the  
Development of Molecularly Targeted Agents in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Drugs*  
**77**, 813-827, doi:10.1007/s40265-017-0732-2 (2017).
- 41 Barot, S., Patel, H., Yadav, A. & Ban, I. Recent advancement in targeted therapy and  
role of emerging technologies to treat cancer. *Med Oncol* **40**, 324,  
doi:10.1007/s12032-023-02184-6 (2023).
- 42 Xue, Y. & Wilcox, W. R. Changing paradigm of cancer therapy: precision medicine  
by next-generation sequencing. *Cancer Biol Med* **13**, 12-18, doi:10.28092/j.issn.2095-  
3941.2016.0003 (2016).

- 43 *National Cancer Act of 1971*, <<https://www.cancer.gov/about-nci/overview/history/national-cancer-act-1971>> (2021).
- 44 Hanahan, D. Rethinking the war on cancer. *Lancet* **383**, 558-563, doi:10.1016/S0140-6736(13)62226-6 (2014).
- 45 Singer, D. S. A new phase of the Cancer Moonshot to end cancer as we know it. *Nature Medicine* **28**, 1345-1347 (2022).
- 46 Roskoski, R., Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2023 update. *Pharmacol Res* **187**, 106552, doi:10.1016/j.phrs.2022.106552 (2023).
- 47 Cohen, P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* **1**, 309-315, doi:10.1038/nrd773 (2002).
- 48 Cohen, P., Cross, D. & Janne, P. A. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 551-569, doi:10.1038/s41573-021-00195-4 (2021).
- 49 Ivanov, I. Enzyme cofactors: double-edged sword for catalysis. *Nat Chem* **5**, 6-7, doi:10.1038/nchem.1529 (2013).
- 50 Rabiller, M. *et al.* Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases. *Arch Pharm (Weinheim)* **343**, 193-206, doi:10.1002/ardp.201000028 (2010).
- 51 Ubersax, J. A. & Ferrell, J. E., Jr. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 530-541, doi:10.1038/nrm2203 (2007).
- 52 Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* **9**, 153-166, doi:10.1038/nrc2602 (2009).
- 53 Jahani, V., Kavousi, A., Mehri, S. & Karimi, G. Rho kinase, a potential target in the treatment of metabolic syndrome. *Biomed Pharmacother* **106**, 1024-1030, doi:10.1016/j.biopha.2018.07.060 (2018).
- 54 Clark, J. D., Flanagan, M. E. & Telliez, J. B. Discovery and development of Janus kinase (JAK) inhibitors for inflammatory diseases. *J Med Chem* **57**, 5023-5038, doi:10.1021/jm401490p (2014).
- 55 Satoh, K., Fukumoto, Y. & Shimokawa, H. Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H287-296, doi:10.1152/ajpheart.00327.2011 (2011).
- 56 Chen, J. *et al.* Protein kinases in cardiovascular diseases. *Chin Med J (Engl)* **135**, 557-570, doi:10.1097/CM9.0000000000001870 (2022).
- 57 Silnitsky, S., Rubin, S. J. S., Zerihun, M. & Qvit, N. An Update on Protein Kinases as Therapeutic Targets-Part I: Protein Kinase C Activation and Its Role in Cancer and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci* **24**, doi:10.3390/ijms242417600 (2023).
- 58 Cicenias, J. & Raciene, A. Anti-Cancer Drugs Targeting Protein Kinases Approved by FDA in 2020. *Cancers (Basel)* **13**, doi:10.3390/cancers13050947 (2021).
- 59 Thompson, H. J. & Lutsiv, T. Natural Products in Precision Oncology: Plant-Based Small Molecule Inhibitors of Protein Kinases for Cancer Chemoprevention. *Nutrients* **15**, doi:10.3390/nu15051192 (2023).
- 60 Zhang, Z., Bu, L., Luo, J. & Guo, J. Targeting protein kinases benefits cancer immunotherapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1877**, 188738, doi:10.1016/j.bbcan.2022.188738 (2022).
- 61 Spinello, Z. *et al.* Targeting Protein Kinases in Blood Cancer: Focusing on CK1alpha and CK2. *Int J Mol Sci* **22**, doi:10.3390/ijms22073716 (2021).
- 62 Chu, C. N. & Lee, T. K. W. Targeting protein kinases in cancer stem cells. *Essays Biochem* **66**, 399-412, doi:10.1042/EBC20220002 (2022).
- 63 Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-1934, doi:10.1126/science.1075762 (2002).

- 64 Carles, F., Bourg, S., Meyer, C. & Bonnet, P. PKIDB: A Curated, Annotated and Updated Database of Protein Kinase Inhibitors in Clinical Trials. *Molecules* **23**, doi:10.3390/molecules23040908 (2018).
- 65 FDA approves capivasertib with fulvestrant for breast cancer, <<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-capivasertib-fulvestrant-breast-cancer>> (2023).
- 66 Manning, B. D. & Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **169**, 381-405, doi:10.1016/j.cell.2017.04.001 (2017).
- 67 Leroux, A. E., Schulze, J. O. & Biondi, R. M. AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development. *Semin Cancer Biol* **48**, 1-17, doi:10.1016/j.semcancer.2017.05.011 (2018).
- 68 Pearce, L. R., Komander, D. & Alessi, D. R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 9-22, doi:10.1038/nrm2822 (2010).
- 69 Gonzalez, E. & McGraw, T. E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **8**, 2502-2508, doi:10.4161/cc.8.16.9335 (2009).
- 70 Santi, S. A. & Lee, H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C580-591, doi:10.1152/ajpcell.00375.2009 (2010).
- 71 Chang, Z. *et al.* Deletion of Akt1 causes heart defects and abnormal cardiomyocyte proliferation. *Dev Biol* **347**, 384-391, doi:10.1016/j.ydbio.2010.08.033 (2010).
- 72 Chen, W. S. *et al.* Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* **15**, 2203-2208, doi:10.1101/gad.913901 (2001).
- 73 Hers, I., Vincent, E. E. & Tavaré, J. M. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* **23**, 1515-1527, doi:10.1016/j.cellsig.2011.05.004 (2011).
- 74 Cho, H. *et al.* Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* **292**, 1728-1731, doi:10.1126/science.292.5522.1728 (2001).
- 75 Garofalo, R. S. *et al.* Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* **112**, 197-208, doi:10.1172/JCI16885 (2003).
- 76 Peng, X. D. *et al.* Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev* **17**, 1352-1365, doi:10.1101/gad.1089403 (2003).
- 77 Easton, R. M. *et al.* Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol* **25**, 1869-1878, doi:10.1128/MCB.25.5.1869-1878.2005 (2005).
- 78 Tschopp, O. *et al.* Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132**, 2943-2954, doi:10.1242/dev.01864 (2005).
- 79 Yang, Z. Z. *et al.* Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Mol Cell Biol* **25**, 10407-10418, doi:10.1128/MCB.25.23.10407-10418.2005 (2005).
- 80 Dummler, B. *et al.* Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol Cell Biol* **26**, 8042-8051, doi:10.1128/MCB.00722-06 (2006).
- 81 Santi, S. A., Douglas, A. C. & Lee, H. The Akt isoforms, their unique functions and potential as anticancer therapeutic targets. *Biomol Concepts* **1**, 389-401, doi:10.1515/bmc.2010.035 (2010).

- 82 Hinz, N. & Jucker, M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Commun Signal* **17**, 154, doi:10.1186/s12964-019-0450-3 (2019).
- 83 Sharma, M. & Dey, C. S. Role of Akt isoforms in neuronal insulin signaling and resistance. *Cell Mol Life Sci* **78**, 7873-7898, doi:10.1007/s00018-021-03993-6 (2021).
- 84 Dillon, R. L. & Muller, W. J. Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res* **70**, 4260-4264, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0266 (2010).
- 85 Kumar, C. C. & Madison, V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* **24**, 7493-7501, doi:10.1038/sj.onc.1209087 (2005).
- 86 Song, G., Ouyang, G. & Bao, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* **9**, 59-71, doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x (2005).
- 87 Nitulescu, G. M. *et al.* Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int J Oncol* **48**, 869-885, doi:10.3892/ijo.2015.3306 (2016).
- 88 Lemmon, M. A. Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem Soc Symp*, 81-93, doi:10.1042/BSS0740081 (2007).
- 89 Currie, R. A. *et al.* Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem J* **337** ( Pt 3), 575-583 (1999).
- 90 Riehle, R. D., Cornea, S. & Degtarev, A. Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in cell signaling. *Adv Exp Med Biol* **991**, 105-139, doi:10.1007/978-94-007-6331-9\_7 (2013).
- 91 Alessi, D. R. *et al.* Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* **15**, 6541-6551 (1996).
- 92 Calleja, V., Laguerre, M., Parker, P. J. & Larijani, B. Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS Biol* **7**, e17, doi:10.1371/journal.pbio.1000017 (2009).
- 93 Biondi, R. M. *et al.* Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA. *EMBO J* **19**, 979-988, doi:10.1093/emboj/19.5.979 (2000).
- 94 Yang, J. *et al.* Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol* **9**, 940-944, doi:10.1038/nsb870 (2002).
- 95 Hanada, M., Feng, J. & Hemmings, B. A. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* **1697**, 3-16, doi:10.1016/j.bbapap.2003.11.009 (2004).
- 96 Kannan, N., Haste, N., Taylor, S. S. & Neuwald, A. F. The hallmark of AGC kinase functional divergence is its C-terminal tail, a cis-acting regulatory module. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1272-1277, doi:10.1073/pnas.0610251104 (2007).
- 97 Wu, W. I. *et al.* Crystal structure of human AKT1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition. *PLoS One* **5**, e12913, doi:10.1371/journal.pone.0012913 (2010).
- 98 Alessi, D. R. & Cohen, P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 55-62, doi:10.1016/s0959-437x(98)80062-2 (1998).
- 99 Guo, H. *et al.* Coordinate phosphorylation of multiple residues on single AKT1 and AKT2 molecules. *Oncogene* **33**, 3463-3472, doi:10.1038/onc.2013.301 (2014).
- 100 Liu, P. *et al.* Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. *Nature* **508**, 541-545, doi:10.1038/nature13079 (2014).

- 101 Guo, J. *et al.* pVHL suppresses kinase activity of Akt in a proline-hydroxylation-  
dependent manner. *Science* **353**, 929-932, doi:10.1126/science.aad5755 (2016).
- 102 Wang, S. *et al.* Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation  
regulates Akt signaling. *PLoS One* **7**, e37427, doi:10.1371/journal.pone.0037427  
(2012).
- 103 Li, R. *et al.* Akt SUMOylation regulates cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer  
Res* **73**, 5742-5753, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0538 (2013).
- 104 Sundaresan, N. R. *et al.* The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and  
activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. *Sci Signal*  
**4**, ra46, doi:10.1126/scisignal.2001465 (2011).
- 105 Xu, L. *et al.* Single-cell RNA sequencing reveals the mechanism of PI3K/AKT/mTOR  
signaling pathway activation in lung adenocarcinoma by KRAS mutation. *J Gene Med*  
**26**, e3658, doi:10.1002/jgm.3658 (2024).
- 106 Pozuelo-Rubio, M., Leslie, N. R., Murphy, J. & Mackintosh, C. Mechanism of  
activation of PKB/Akt by the protein phosphatase inhibitor Calyculin A. *Cell Biochem  
Biophys* **58**, 147-156, doi:10.1007/s12013-010-9101-4 (2010).
- 107 Okano, J., Gaslightwala, I., Birnbaum, M. J., Rustgi, A. K. & Nakagawa, H.  
Akt/protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor  
stimulation. *J Biol Chem* **275**, 30934-30942, doi:10.1074/jbc.M004112200 (2000).
- 108 Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. & Bilanges, B. The  
emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**,  
329-341, doi:10.1038/nrm2882 (2010).
- 109 Hager, M. *et al.* Recapitulation of anti-aging phenotypes by global overexpression of  
PTEN in mice. *Geroscience* **46**, 2653-2670, doi:10.1007/s11357-023-01025-8 (2024).
- 110 Insall, R. H. & Weiner, O. D. PIP3, PIP2, and cell movement--similar messages,  
different meanings? *Dev Cell* **1**, 743-747, doi:10.1016/s1534-5807(01)00086-7 (2001).
- 111 Calleja, V., Laguerre, M. & Larijani, B. 3-D structure and dynamics of protein kinase  
B-new mechanism for the allosteric regulation of an AGC kinase. *J Chem Biol* **2**, 11-  
25, doi:10.1007/s12154-009-0016-8 (2009).
- 112 Ebner, M., Lucic, I., Leonard, T. A. & Yudushkin, I. PI(3,4,5)P(3) Engagement  
Restricts Akt Activity to Cellular Membranes. *Mol Cell* **65**, 416-431 e416,  
doi:10.1016/j.molcel.2016.12.028 (2017).
- 113 Fang, Z. *et al.* Discovery of inter-domain stabilizers-a novel assay system for allosteric  
akt inhibitors. *ACS Chem Biol* **10**, 279-288, doi:10.1021/cb500355c (2015).
- 114 Alessi, D. R. *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase  
which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* **7**, 261-269,  
doi:10.1016/s0960-9822(06)00122-9 (1997).
- 115 Carnero, A. & Paramio, J. M. The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, Cancer Mouse  
Models. *Front Oncol* **4**, 252, doi:10.3389/fonc.2014.00252 (2014).
- 116 Legate, K. R., Montanez, E., Kudlacek, O. & Fassler, R. ILK, PINCH and parvin: the  
tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 20-31, doi:10.1038/nrm1789  
(2006).
- 117 Yang, J. *et al.* Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by  
hydrophobic motif phosphorylation. *Mol Cell* **9**, 1227-1240, doi:10.1016/s1097-  
2765(02)00550-6 (2002).
- 118 Vincent, E. E. *et al.* Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with  
Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* **104**,  
1755-1761, doi:10.1038/bjc.2011.132 (2011).
- 119 Kondapaka, S. B., Zarnowski, M., Yver, D. R., Sausville, E. A. & Cushman, S. W. 7-  
hydroxystaurosporine (UCN-01) inhibition of Akt Thr308 but not Ser473

- phosphorylation: a basis for decreased insulin-stimulated glucose transport. *Clin Cancer Res* **10**, 7192-7198, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0772 (2004).
- 120 Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274, doi:10.1016/j.cell.2007.06.009 (2007).
- 121 *PI3K / Akt Signaling*, <<https://www.cellsignal.com/pathways/pathways-akt-signaling>> (2020).
- 122 Yudushkin, I. Getting the Akt Together: Guiding Intracellular Akt Activity by PI3K. *Biomolecules* **9**, doi:10.3390/biom9020067 (2019).
- 123 Alessi, D. R., Caudwell, F. B., Andjelkovic, M., Hemmings, B. A. & Cohen, P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* **399**, 333-338, doi:10.1016/s0014-5793(96)01370-1 (1996).
- 124 Chan, T. O. *et al.* Resistance of Akt kinases to dephosphorylation through ATP-dependent conformational plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E1120-1127, doi:10.1073/pnas.1109879108 (2011).
- 125 Lin, K. *et al.* An ATP-site on-off switch that restricts phosphatase accessibility of Akt. *Sci Signal* **5**, ra37, doi:10.1126/scisignal.2002618 (2012).
- 126 Chan, T. O. *et al.* Akt kinase C-terminal modifications control activation loop dephosphorylation and enhance insulin response. *Biochem J* **471**, 37-51, doi:10.1042/BJ20150325 (2015).
- 127 Han, E. K. *et al.* Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition. *Oncogene* **26**, 5655-5661, doi:10.1038/sj.onc.1210343 (2007).
- 128 Okuzumi, T. *et al.* Inhibitor hijacking of Akt activation. *Nat Chem Biol* **5**, 484-493, doi:10.1038/nchembio.183 (2009).
- 129 Andjelkovic, M. *et al.* Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5699-5704, doi:10.1073/pnas.93.12.5699 (1996).
- 130 Newton, A. C. & Trotman, L. C. Turning off AKT: PHLPP as a drug target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **54**, 537-558, doi:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140338 (2014).
- 131 Brognard, J., Sieracki, E., Gao, T. & Newton, A. C. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell* **25**, 917-931, doi:10.1016/j.molcel.2007.02.017 (2007).
- 132 Humphrey, S. J. *et al.* Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2. *Cell Metab* **17**, 1009-1020, doi:10.1016/j.cmet.2013.04.010 (2013).
- 133 Fresno Vara, J. A. *et al.* PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* **30**, 193-204, doi:10.1016/j.ctrv.2003.07.007 (2004).
- 134 Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K. L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* **4**, 648-657, doi:10.1038/ncb839 (2002).
- 135 Sancak, Y. *et al.* PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* **25**, 903-915, doi:10.1016/j.molcel.2007.03.003 (2007).
- 136 Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960-976, doi:10.1016/j.cell.2017.02.004 (2017).
- 137 Datta, S. R. *et al.* 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* **6**, 41-51 (2000).

- 138 Brunet, A. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868, doi:10.1016/s0092-8674(00)80595-4 (1999).
- 139 Chin, Y. R. & Toker, A. The actin-bundling protein palladin is an Akt1-specific substrate that regulates breast cancer cell migration. *Mol Cell* **38**, 333-344, doi:10.1016/j.molcel.2010.02.031 (2010).
- 140 Enomoto, A. *et al.* Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell* **9**, 389-402, doi:10.1016/j.devcel.2005.08.001 (2005).
- 141 Chavez, J. A., Roach, W. G., Keller, S. R., Lane, W. S. & Lienhard, G. E. Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **283**, 9187-9195, doi:10.1074/jbc.M708934200 (2008).
- 142 Novellasdemunt, L. *et al.* Akt-dependent activation of the heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB2) isoenzyme by amino acids. *J Biol Chem* **288**, 10640-10651, doi:10.1074/jbc.M113.455998 (2013).
- 143 Chang, C. Y., Chen, Y. W., Wang, T. W. & Lai, W. S. Akting up in the GABA hypothesis of schizophrenia: Akt1 deficiency modulates GABAergic functions and hippocampus-dependent functions. *Sci Rep* **6**, 33095, doi:10.1038/srep33095 (2016).
- 144 Shaw, R. J. & Cantley, L. C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424-430, doi:10.1038/nature04869 (2006).
- 145 Hyman, D. M. *et al.* AKT Inhibition in Solid Tumors With AKT1 Mutations. *J Clin Oncol* **35**, 2251-2259, doi:10.1200/JCO.2017.73.0143 (2017).
- 146 Carpten, J. D. *et al.* A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448**, 439-444, doi:10.1038/nature05933 (2007).
- 147 Landgraf, K. E., Pilling, C. & Falke, J. J. Molecular mechanism of an oncogenic mutation that alters membrane targeting: Glu17Lys modifies the PIP lipid specificity of the AKT1 PH domain. *Biochemistry* **47**, 12260-12269, doi:10.1021/bi801683k (2008).
- 148 Lindhurst, M. J. *et al.* A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome. *N Engl J Med* **365**, 611-619, doi:10.1056/NEJMoa1104017 (2011).
- 149 Lindhurst, M. J. *et al.* Repression of AKT signaling by ARQ 092 in cells and tissues from patients with Proteus syndrome. *Sci Rep* **5**, 17162, doi:10.1038/srep17162 (2015).
- 150 Coleman, N., Moyers, J. T., Harbery, A., Vivanco, I. & Yap, T. A. Clinical Development of AKT Inhibitors and Associated Predictive Biomarkers to Guide Patient Treatment in Cancer Medicine. *Pharmgenomics Pers Med* **14**, 1517-1535, doi:10.2147/PGPM.S305068 (2021).
- 151 Alvarez-Garcia, V., Tawil, Y., Wise, H. M. & Leslie, N. R. Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity. *Semin Cancer Biol* **59**, 66-79, doi:10.1016/j.semcancer.2019.02.001 (2019).
- 152 Varkaris, A. *et al.* Discovery and Clinical Proof-of-Concept of RLY-2608, a First-in-Class Mutant-Selective Allosteric PI3K $\alpha$  Inhibitor That Decouples Antitumor Activity from Hyperinsulinemia. *Cancer Discov* **14**, 240-257, doi:10.1158/2159-8290.CD-23-0944 (2024).
- 153 Chen, M. *et al.* Identification of PHLPP1 as a tumor suppressor reveals the role of feedback activation in PTEN-mutant prostate cancer progression. *Cancer Cell* **20**, 173-186, doi:10.1016/j.ccr.2011.07.013 (2011).
- 154 Woenckhaus, J. *et al.* Prognostic value of PIK3CA and phosphorylated AKT expression in ovarian cancer. *Virchows Arch* **450**, 387-395, doi:10.1007/s00428-006-0358-3 (2007).

- 155 Qiao, M., Iglehart, J. D. & Pardee, A. B. Metastatic potential of 21T human breast cancer cells depends on Akt/protein kinase B activation. *Cancer Res* **67**, 5293-5299, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0877 (2007).
- 156 Lim, J. *et al.* Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* **58**, 1199-1205, doi:10.1136/jcp.2004.024786 (2005).
- 157 *After GSK and Novartis handoffs, Laekna's drug fails ovarian cancer trial*, <<https://www.fiercebiotech.com/biotech/fierce-biotech-layoff-tracker-2024>> (2024).
- 158 Song, M., Bode, A. M., Dong, Z. & Lee, M. H. AKT as a Therapeutic Target for Cancer. *Cancer Res* **79**, 1019-1031, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2738 (2019).
- 159 Nakatani, K. *et al.* Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem* **274**, 21528-21532, doi:10.1074/jbc.274.31.21528 (1999).
- 160 Cheng, J. Q. *et al.* Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3636-3641, doi:10.1073/pnas.93.8.3636 (1996).
- 161 Staal, S. P. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5034-5037, doi:10.1073/pnas.84.14.5034 (1987).
- 162 Jin, Y. *et al.* Phosphorylated-Akt overexpression is associated with a higher risk of brain metastasis in patients with non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res* **18**, 100625, doi:10.1016/j.bbrep.2019.100625 (2019).
- 163 Goswami, R., Kilkus, J., Dawson, S. A. & Dawson, G. Overexpression of Akt (protein kinase B) confers protection against apoptosis and prevents formation of ceramide in response to pro-apoptotic stimuli. *J Neurosci Res* **57**, 884-893 (1999).
- 164 Xu, J., Zhou, J. Y., Wei, W. Z. & Wu, G. S. Activation of the Akt survival pathway contributes to TRAIL resistance in cancer cells. *PLoS One* **5**, e10226, doi:10.1371/journal.pone.0010226 (2010).
- 165 Arcaro, A. & Guerreiro, A. S. The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. *Curr Genomics* **8**, 271-306, doi:10.2174/138920207782446160 (2007).
- 166 Wang, Z., Cui, X., Hao, G. & He, J. Aberrant expression of PI3K/AKT signaling is involved in apoptosis resistance of hepatocellular carcinoma. *Open Life Sci* **16**, 1037-1044, doi:10.1515/biol-2021-0101 (2021).
- 167 West, K. A., Castillo, S. S. & Dennis, P. A. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* **5**, 234-248, doi:10.1016/s1368-7646(02)00120-6 (2002).
- 168 Lu, D., Shi, H. C., Wang, Z. X., Gu, X. W. & Zeng, Y. J. Multidrug resistance-associated biomarkers PGP, GST-pi, Topo-II and LRP as prognostic factors in primary ovarian carcinoma. *Br J Biomed Sci* **68**, 69-74, doi:10.1080/09674845.2011.11730326 (2011).
- 169 Lu, C. & Shervington, A. Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem* **312**, 71-80, doi:10.1007/s11010-008-9722-8 (2008).
- 170 Asselin, E., Mills, G. B. & Tsang, B. K. XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* **61**, 1862-1868 (2001).
- 171 Yang, H., He, L., Kruk, P., Nicosia, S. V. & Cheng, J. Q. Aurora-A induces cell survival and chemoresistance by activation of Akt through a p53-dependent manner in ovarian cancer cells. *Int J Cancer* **119**, 2304-2312, doi:10.1002/ijc.22154 (2006).
- 172 Winograd-Katz, S. E. & Levitzki, A. Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38(MAPK) phosphorylation of the EGF receptor. *Oncogene* **25**, 7381-7390, doi:10.1038/sj.onc.1209737 (2006).



- 173 Brown, J. S. & Banerji, U. Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacol Ther* **172**, 101-115, doi:10.1016/j.pharmthera.2016.12.001 (2017).
- 174 Gajate, C. & Mollinedo, F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* **109**, 711-719, doi:10.1182/blood-2006-04-016824 (2007).
- 175 Leonard, R. *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer. *J Clin Oncol* **19**, 4150-4159, doi:10.1200/JCO.2001.19.21.4150 (2001).
- 176 Gills, J. J. & Dennis, P. A. Perifosine: update on a novel Akt inhibitor. *Curr Oncol Rep* **11**, 102-110, doi:10.1007/s11912-009-0016-4 (2009).
- 177 Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **46**, 3-26, doi:10.1016/s0169-409x(00)00129-0 (2001).
- 178 Crouthamel, M. C. *et al.* Mechanism and management of AKT inhibitor-induced hyperglycemia. *Clin Cancer Res* **15**, 217-225, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1253 (2009).
- 179 Tolcher, A. W. *et al.* Phase I dose-escalation trial of the oral AKT inhibitor uprosertib in combination with the oral MEK1/MEK2 inhibitor trametinib in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* **85**, 673-683, doi:10.1007/s00280-020-04038-8 (2020).
- 180 Stanciu, S. *et al.* Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Pancreatic Cancer: From Molecular to Clinical Aspects. *Int J Mol Sci* **23**, doi:10.3390/ijms231710132 (2022).
- 181 Azaro, A. *et al.* A first-in-human phase I trial of LY2780301, a dual p70 S6 kinase and Akt Inhibitor, in patients with advanced or metastatic cancer. *Invest New Drugs* **33**, 710-719, doi:10.1007/s10637-015-0241-7 (2015).
- 182 Li, Q. *et al.* Discovery of trans-3,4'-bispyridinylethylenes as potent and novel inhibitors of protein kinase B (PKB/Akt) for the treatment of cancer: Synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 1679-1685, doi:10.1016/j.bmcl.2005.12.017 (2006).
- 183 Davies, T. G. *et al.* A structural comparison of inhibitor binding to PKB, PKA and PKA-PKB chimera. *J Mol Biol* **367**, 882-894, doi:10.1016/j.jmb.2007.01.004 (2007).
- 184 Lindsley, C. W., Barnett, S. F., Yaroschak, M., Bilodeau, M. T. & Layton, M. E. Recent progress in the development of ATP-competitive and allosteric Akt kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem* **7**, 1349-1363, doi:10.2174/156802607781696864 (2007).
- 185 COMPOSITIONS AND FORMULATIONS FOR TOPICAL USE OF AN AKT INHIBITOR FOR THE PREVENTION, TREATMENT, AND IMPROVEMENT OF SKIN DISEASES, CONDITIONS, AND DISORDERS. WO2023044351A1.
- 186 DermBiont Announces Positive Phase 2 Clinical Trial Data Treating Seborrheic Keratosis with SM-020, the First and Only Targeted Topical Treatment for these Common Benign Tumors, <<https://www.dermbiont.com/in-the-news/2022/06/23/dermbiont-announces-positive-phase-2-clinical-trial-data-treating-seborrheic-keratosis-with-sm-020-the-first-and-only-targeted-topical-treatment-for-these-common-benign-tumors>> (2022).
- 187 Blake, J. F. *et al.* Discovery and preclinical pharmacology of a selective ATP-competitive Akt inhibitor (GDC-0068) for the treatment of human tumors. *J Med Chem* **55**, 8110-8127, doi:10.1021/jm301024w (2012).

- 188 Turner, N. *et al.* Ipatasertib plus paclitaxel for PIK3CA/AKT1/PTEN-altered hormone receptor-positive HER2-negative advanced breast cancer: primary results from cohort B of the IPATunity130 randomized phase 3 trial. *Breast Cancer Res Treat* **191**, 565-576, doi:10.1007/s10549-021-06450-x (2022).
- 189 Ma, C. *et al.* Discovery of Clinical Candidate NTQ1062 as a Potent and Bioavailable Akt Inhibitor for the Treatment of Human Tumors. *J Med Chem* **65**, 8144-8168, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00527 (2022).
- 190 Lin, X. *et al.* Discovery of 2-pyrimidyl-5-amidothiophenes as potent inhibitors for AKT: synthesis and SAR studies. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 4163-4168, doi:10.1016/j.bmcl.2006.05.092 (2006).
- 191 Adams, B. *Novartis licenses out unwanted GlaxoSmithKline cancer drugs to Chinese biotech*, <<https://www.fiercebiotech.com/biotech/novartis-licenses-out-unwanted-gsk-cancer-meds-to-chinese-biotech>> (2018).
- 192 Spencer, A. *et al.* The novel AKT inhibitor afuresertib shows favorable safety, pharmacokinetics, and clinical activity in multiple myeloma. *Blood* **124**, 2190-2195, doi:10.1182/blood-2014-03-559963 (2014).
- 193 Turner, N. C. *et al.* Capivasertib in Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* **388**, 2058-2070, doi:10.1056/NEJMoa2214131 (2023).
- 194 Barnett, S. F. *et al.* Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. *Biochem J* **385**, 399-408, doi:10.1042/BJ20041140 (2005).
- 195 Lindsley, C. W. *et al.* Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 761-764, doi:10.1016/j.bmcl.2004.11.011 (2005).
- 196 Cherrin, C. *et al.* An allosteric Akt inhibitor effectively blocks Akt signaling and tumor growth with only transient effects on glucose and insulin levels in vivo. *Cancer Biol Ther* **9**, 493-503, doi:10.4161/cbt.9.7.11100 (2010).
- 197 Ashwell, M. A. *et al.* Discovery and optimization of a series of 3-(3-phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amines: orally bioavailable, selective, and potent ATP-independent Akt inhibitors. *J Med Chem* **55**, 5291-5310, doi:10.1021/jm300276x (2012).
- 198 Lapierre, J. M. *et al.* Discovery of 3-(3-(4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl)-5-phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amine (ARQ 092): An Orally Bioavailable, Selective, and Potent Allosteric AKT Inhibitor. *J Med Chem* **59**, 6455-6469, doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00619 (2016).
- 199 Yu, Y. *et al.* Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT Pathway with an Allosteric AKT Inhibitor, ARQ 092. *PLoS One* **10**, e0140479, doi:10.1371/journal.pone.0140479 (2015).
- 200 Shariati, M. & Meric-Bernstam, F. Targeting AKT for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* **28**, 977-988, doi:10.1080/13543784.2019.1676726 (2019).
- 201 Ours, C. A., Sapp, J. C., Hodges, M. B., de Moya, A. J. & Biesecker, L. G. Case report: five-year experience of AKT inhibition with miransertib (MK-7075) in an individual with Proteus syndrome. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* **7**, doi:10.1101/mcs.a006134 (2021).
- 202 Biesecker, L. G. *et al.* Clinical report: one year of treatment of Proteus syndrome with miransertib (ARQ 092). *Cold Spring Harb Mol Case Stud* **6**, doi:10.1101/mcs.a004549 (2020).
- 203 Weisner, J. *et al.* Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**, 10313-10316, doi:10.1002/anie.201502142 (2015).

- 204 Pant, S. *et al.* Phase 1b study of pan-AKT inhibitor vevorisertib alone or with paclitaxel or fulvestrant in PIK3CA/AKT/PTEN-mutated advanced solid tumors. *Cancer* **129**, 1919-1929, doi:10.1002/cncr.34733 (2023).
- 205 Utsugi, T. New challenges and inspired answers for anticancer drug discovery and development. *Jpn J Clin Oncol* **43**, 945-953, doi:10.1093/jjco/hyt131 (2013).
- 206 Lee, J. B. *et al.* Phase 2 study of TAS-117, an allosteric akt inhibitor in advanced solid tumors harboring phosphatidylinositol 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog gene mutations. *Invest New Drugs* **39**, 1366-1374, doi:10.1007/s10637-021-01085-7 (2021).
- 207 Rodon, J. *et al.* A phase II study of TAS-117 in patients with advanced solid tumors harboring germline PTEN-inactivating mutations. *Future Oncol* **18**, 3377-3387, doi:10.2217/fon-2022-0305 (2022).
- 208 Page, N. *et al.* Identification and development of a subtype-selective allosteric AKT inhibitor suitable for clinical development. *Sci Rep* **12**, 15715, doi:10.1038/s41598-022-20208-5 (2022).
- 209 Inhibitors of AKT activity. US9221838B2 (2015).
- 210 Almac Discovered Molecule Progresses into Clinical Development with its strategic licensee Vadderis Therapeutics AG, <<https://www.almacgroup.com/news/almac-discovered-molecule-progresses-into-clinical-development-with-its-strategic-licensee-vadderis-therapeutics-ag/>> (2022).
- 211 Palmieri, L. & Rastelli, G. alphaC helix displacement as a general approach for allosteric modulation of protein kinases. *Drug Discov Today* **18**, 407-414, doi:10.1016/j.drudis.2012.11.009 (2013).
- 212 Nussinov, R. & Tsai, C. J. Unraveling structural mechanisms of allosteric drug action. *Trends Pharmacol Sci* **35**, 256-264, doi:10.1016/j.tips.2014.03.006 (2014).
- 213 Berezovsky, I. N. Thermodynamics of allostery paves a way to allosteric drugs. *Biochim Biophys Acta* **1834**, 830-835, doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.024 (2013).
- 214 Lu, S. *et al.* Emergence of allosteric drug-resistance mutations: new challenges for allosteric drug discovery. *Drug Discov Today* **25**, 177-184, doi:10.1016/j.drudis.2019.10.006 (2020).
- 215 Rauch, J., Volinsky, N., Romano, D. & Kolch, W. The secret life of kinases: functions beyond catalysis. *Cell Commun Signal* **9**, 23, doi:10.1186/1478-811X-9-23 (2011).
- 216 Vivanco, I. *et al.* A kinase-independent function of AKT promotes cancer cell survival. *Elife* **3**, doi:10.7554/eLife.03751 (2014).
- 217 Boike, L., Henning, N. J. & Nomura, D. K. Advances in covalent drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **21**, 881-898, doi:10.1038/s41573-022-00542-z (2022).
- 218 Bauer, R. A. Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov Today* **20**, 1061-1073, doi:10.1016/j.drudis.2015.05.005 (2015).
- 219 PubMed "covalent inhibitor", <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=covalent+inhibitor&filter=years.1967-2023&sort=pubdate>> (2024).
- 220 Telliez, J. B. *et al.* Discovery of a JAK3-Selective Inhibitor: Functional Differentiation of JAK3-Selective Inhibition over pan-JAK or JAK1-Selective Inhibition. *ACS Chem Biol* **11**, 3442-3451, doi:10.1021/acscchembio.6b00677 (2016).
- 221 Shapiro, A. B., Moussa, S. H., McLeod, S. M., Durand-Reville, T. & Miller, A. A. Durlobactam, a New Diazabicyclooctane beta-Lactamase Inhibitor for the Treatment of Acinetobacter Infections in Combination With Sulbactam. *Front Microbiol* **12**, 709974, doi:10.3389/fmicb.2021.709974 (2021).

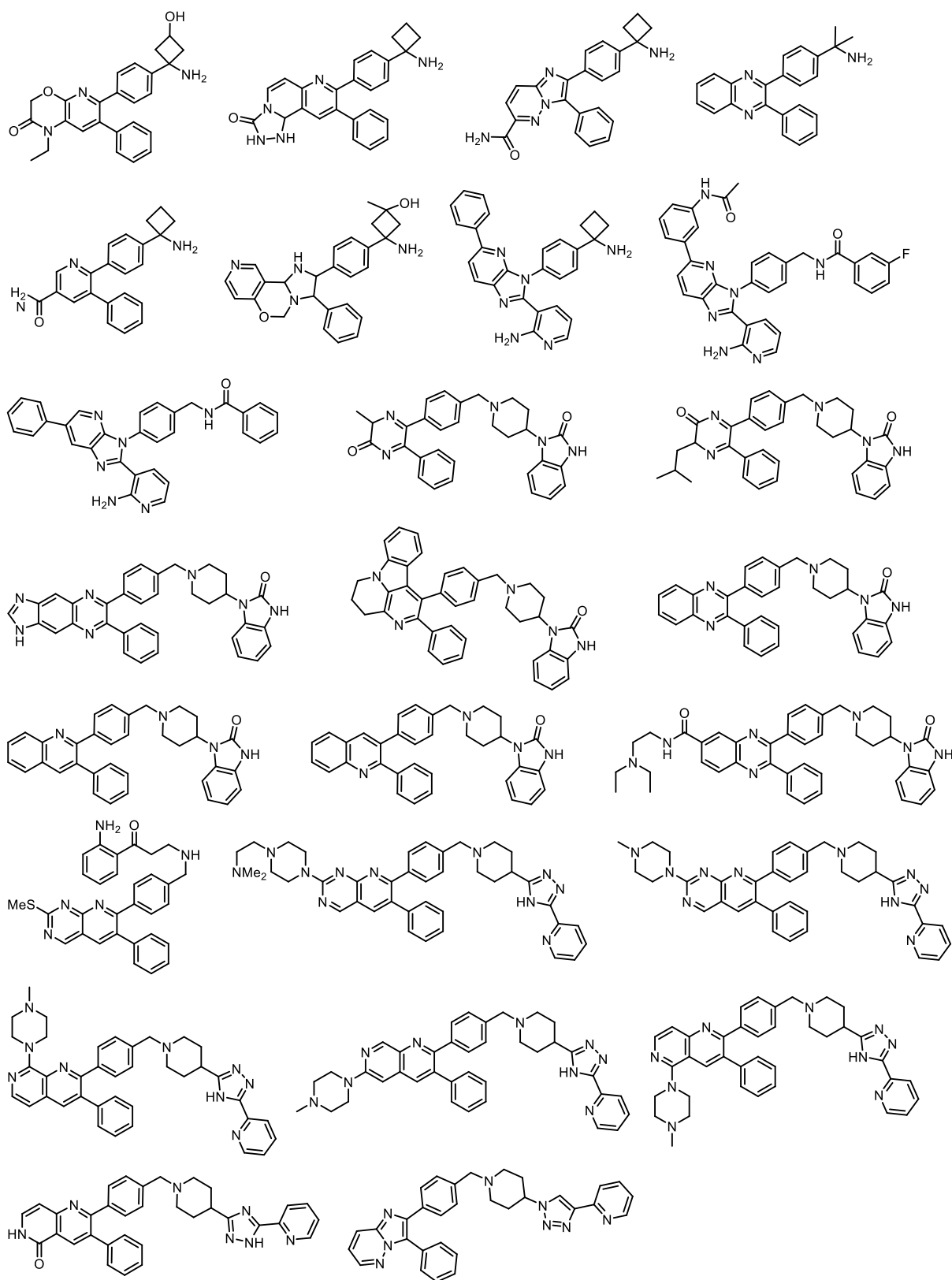
- 222 FDA approves first treatment for Friedreich's ataxia,  
<<https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-first-treatment-friedreichs-ataxia>> (
- 223 2023 Novel Small Molecule FDA Drug Approvals,  
<<https://drughunter.com/articles/2023-novel-small-molecule-fda-drug-approvals/>>  
(2024).
- 224 Nakayama, S. *et al.* A zone classification system for risk assessment of idiosyncratic drug toxicity using daily dose and covalent binding. *Drug Metab Dispos* **37**, 1970-1977, doi:10.1124/dmd.109.027797 (2009).
- 225 Claxton, A. J., Cramer, J. & Pierce, C. A systematic review of the associations between dose regimens and medication compliance. *Clin Ther* **23**, 1296-1310, doi:10.1016/s0149-2918(01)80109-0 (2001).
- 226 Singh, J., Petter, R. C., Baillie, T. A. & Whitty, A. The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 307-317, doi:10.1038/nrd3410 (2011).
- 227 Basso, A. D. *et al.* Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* **277**, 39858-39866, doi:10.1074/jbc.M206322200 (2002).
- 228 Quambusch, L. *et al.* Covalent-Allosteric Inhibitors to Achieve Akt Isoform-Selectivity. *Angew Chem Int Ed Engl* **58**, 18823-18829, doi:10.1002/anie.201909857 (2019).
- 229 Weisner, J. *et al.* Preclinical Efficacy of Covalent-Allosteric AKT Inhibitor Borussertib in Combination with Trametinib in KRAS-Mutant Pancreatic and Colorectal Cancer. *Cancer Res* **79**, 2367-2378, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2861 (2019).
- 230 van der Westhuizen, L. *et al.* Covalent Allosteric Inhibitors of Akt Generated Using a Click Fragment Approach. *ChemMedChem* **17**, e202100776, doi:10.1002/cmde.202100776 (2022).
- 231 Quambusch, L. *et al.* Cellular model system to dissect the isoform-selectivity of Akt inhibitors. *Nat Commun* **12**, 5297, doi:10.1038/s41467-021-25512-8 (2021).
- 232 Lee, K. S. S. *et al.* Drug-Target Residence Time Affects in Vivo Target Occupancy through Multiple Pathways. *ACS Cent Sci* **5**, 1614-1624, doi:10.1021/acscentsci.9b00770 (2019).
- 233 Barf, T. *et al.* Acalabrutinib (ACP-196): A Covalent Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor with a Differentiated Selectivity and In Vivo Potency Profile. *J Pharmacol Exp Ther* **363**, 240-252, doi:10.1124/jpet.117.242909 (2017).
- 234 Giordano, D., Biancaniello, C., Argenio, M. A. & Facchiano, A. Drug Design by Pharmacophore and Virtual Screening Approach. *Pharmaceuticals (Basel)* **15**, doi:10.3390/ph15050646 (2022).
- 235 Seidel, T., Wieder, O., Garon, A. & Langer, T. Applications of the Pharmacophore Concept in Natural Product inspired Drug Design. *Mol Inform* **39**, e2000059, doi:10.1002/minf.202000059 (2020).
- 236 Seidel, T., Schuetz, D. A., Garon, A. & Langer, T. The Pharmacophore Concept and Its Applications in Computer-Aided Drug Design. *Prog Chem Org Nat Prod* **110**, 99-141, doi:10.1007/978-3-030-14632-0\_4 (2019).
- 237 Siu, T. *et al.* Discovery of potent and cell-active allosteric dual Akt 1 and 2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 4186-4190, doi:10.1016/j.bmcl.2008.05.085 (2008).
- 238 Guo, K., Tang, W., Zhuo, H. & Zhao, G. Recent Advance of Akt Inhibitors in Clinical Trials. *ChemistrySelect* **4**, 9040-9044, doi:10.1002/slct.201901293 (2019).
- 239 Bruckner, R. *Organic Mechanisms - Reactions, Stereochemistry and Synthesis*. (2010).

- 240 Uhlenbrock, N. *et al.* Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase Akt. *Chem Sci* **10**, 3573-3585, doi:10.1039/c8sc05212c (2019).
- 241 GPR120 RECEPTOR AGONISTS AND USES THEREOF. WO 2011/159297 A1 (2011).
- 242 HETEROCYCLIC CARBOXYLIC ACIDS AS ACTIVATORS OF SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE. WO 2016/014463 A1 (2016).
- 243 IRAK4 INHIBITING AGENTS. WO 2016/011390 A1 (2016).
- 244 THIENO[3,2-d]PYRIMIDINE, FURO[3,2-d]PYRIMIDINE, AND PYRROLO[3,2-d]PYRIMIDINES USEFUL FOR TREATING RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTIONS. WO 2016/018697 A1 (2016).
- 245 NEW PYRIDONE DERIVATIVES WITH MCH ANTAGONISTIC ACTIVITY AND MEDICAMENTS COMPRISING THESE COMPOUNDS. WO 2008/022979 A1 (2008).
- 246 Wang, J. *et al.* Utilization of a photoactivatable antigen system to examine B-cell probing termination and the B-cell receptor sorting mechanisms during B-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E558-567, doi:10.1073/pnas.1517612113 (2016).
- 247 SYNTHESIS OF N-(HETROARYL)\_PYRROLO[3,2-D]PYRIMIDIN-2-AMINES. WO 2018/005865 A1 (2018).
- 248 Amatore, C., Jutand, A. & Le Duc, G. Kinetic data for the transmetalation/reductive elimination in palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura reactions: unexpected triple role of hydroxide ions used as base. *Chemistry* **17**, 2492-2503, doi:10.1002/chem.201001911 (2011).
- 249 Politz, O. *et al.* BAY 1125976, a selective allosteric AKT1/2 inhibitor, exhibits high efficacy on AKT signaling-dependent tumor growth in mouse models. *Int J Cancer* **140**, 449-459, doi:10.1002/ijc.30457 (2017).
- 250 Odintsov, I. *et al.* Novel Preclinical Patient-Derived Lung Cancer Models Reveal Inhibition of HER3 and MTOR Signaling as Therapeutic Strategies for NRG1 Fusion-Positive Cancers. *J Thorac Oncol* **16**, 1149-1165, doi:10.1016/j.jtho.2021.03.013 (2021).
- 251 Krippendorff, B. F., Neuhaus, R., Lienau, P., Reichel, A. & Huisinga, W. Mechanism-based inhibition: deriving K(I) and k(inact) directly from time-dependent IC(50) values. *J Biomol Screen* **14**, 913-923, doi:10.1177/1087057109336751 (2009).
- 252 McAulay, K. *et al.* Alkynyl Benzoxazines and Dihydroquinazolines as Cysteine Targeting Covalent Warheads and Their Application in Identification of Selective Irreversible Kinase Inhibitors. *J Am Chem Soc* **142**, 10358-10372, doi:10.1021/jacs.9b13391 (2020).
- 253 in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* (eds K. Verhoeckx *et al.*) (2015).
- 254 Shrestha Bhattarai, T. *et al.* AKT mutant allele-specific activation dictates pharmacologic sensitivities. *Nat Commun* **13**, 2111, doi:10.1038/s41467-022-29638-1 (2022).
- 255 Ramadas, K. & Srinivasan, N. Iron-Ammonium Chloride - A Convenient and Inexpensive Reductant. *Synthetic Communications* **22**, 3189-3195, doi:10.1080/00397919208021132 (2006).
- 256 Chen, C. Y. *et al.* Synthesis of Adagrasib (MRTX849), a Covalent KRAS(G12C) Inhibitor Drug for the Treatment of Cancer. *Org Lett* **25**, 944-949, doi:10.1021/acs.orglett.2c04266 (2023).

- 257 Kostaras, E. *et al.* A systematic molecular and pharmacologic evaluation of AKT inhibitors reveals new insight into their biological activity. *Br J Cancer* **123**, 542-555, doi:10.1038/s41416-020-0889-4 (2020).
- 258 Fell, J. B. *et al.* Identification of the Clinical Development Candidate MRTX849, a Covalent KRAS(G12C) Inhibitor for the Treatment of Cancer. *J Med Chem* **63**, 6679-6693, doi:10.1021/acs.jmedchem.9b02052 (2020).
- 259 Liu, X., Feng, D., Zheng, M., Cui, Y. & Zhong, D. Characterization of covalent binding of tyrosine kinase inhibitors to plasma proteins. *Drug Metab Pharmacokinet* **35**, 456-465, doi:10.1016/j.dmpk.2020.07.002 (2020).
- 260 Smith, D. A., Di, L. & Kerns, E. H. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 929-939, doi:10.1038/nrd3287 (2010).
- 261 Ng, P. K. *et al.* Systematic Functional Annotation of Somatic Mutations in Cancer. *Cancer Cell* **33**, 450-462 e410, doi:10.1016/j.ccell.2018.01.021 (2018).
- 262 Mankoo, P. K., Sukumar, S. & Karchin, R. PIK3CA somatic mutations in breast cancer: Mechanistic insights from Langevin dynamics simulations. *Proteins* **75**, 499-508, doi:10.1002/prot.22265 (2009).
- 263 Mighell, T. L., Evans-Dutson, S. & O'Roak, B. J. A Saturation Mutagenesis Approach to Understanding PTEN Lipid Phosphatase Activity and Genotype-Phenotype Relationships. *Am J Hum Genet* **102**, 943-955, doi:10.1016/j.ajhg.2018.03.018 (2018).
- 264 FDA grants accelerated approval to copanlisib for relapsed follicular lymphoma, <<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-copanlisib-relapsed-follicular-lymphoma>> (2017).
- 265 Su, Z. *et al.* Global redox proteome and phosphoproteome analysis reveals redox switch in Akt. *Nat Commun* **10**, 5486, doi:10.1038/s41467-019-13114-4 (2019).
- 266 Lin, F. L., Hoyt, H. M., van Halbeek, H., Bergman, R. G. & Bertozzi, C. R. Mechanistic investigation of the staudinger ligation. *J Am Chem Soc* **127**, 2686-2695, doi:10.1021/ja044461m (2005).
- 267 Depta, L. *Strukturbiologische und zelluläre Charakterisierung Isoform-selektiver kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren*, TU Dortmund, (2022).
- 268 Arrowsmith, C. H. *et al.* The promise and peril of chemical probes. *Nat Chem Biol* **11**, 536-541, doi:10.1038/nchembio.1867 (2015).
- 269 Landel, I. *Strukturbiologische Untersuchung und Zelluläre Charakterisierung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren*, TU Dortmund, (2020).
- 270 Weisner, J. *Biochemische, kinetische und zelluläre Charakterisierung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren*, TU Dortmund, (2020).
- 271 Lategahn, J. *et al.* Insight into Targeting Exon20 Insertion Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor with Wild Type-Sparing Inhibitors. *J Med Chem* **65**, 6643-6655, doi:10.1021/acs.jmedchem.1c02080 (2022).

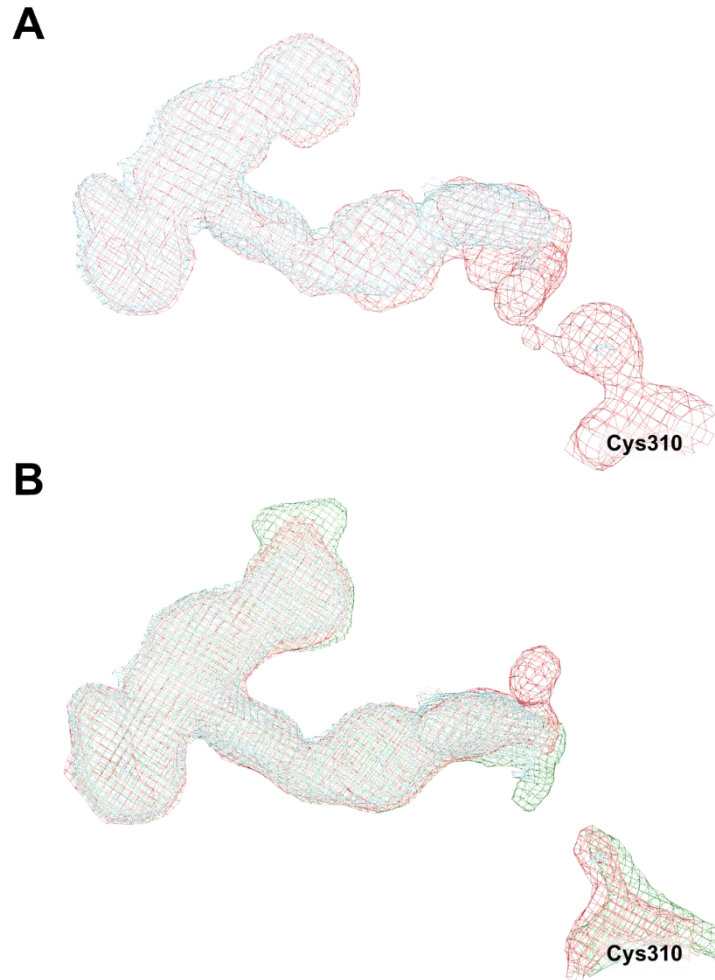


## 8. Anhang



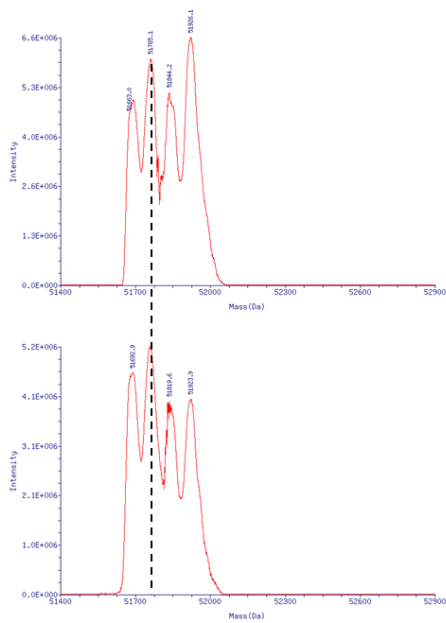
**Abbildung A1** Auswahl an literaturbeschriebenen allosterischen Akt-Inhibitoren.<sup>87,184,195,197,198,203,208,237,238</sup> Das gemeinsame Pharmakophor der Verbindungen wurde zum SBDD der nächsten Generation an CAAs verwendet.



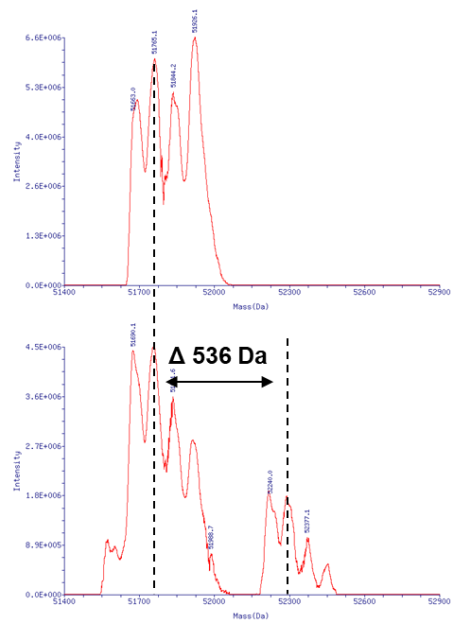


**Abbildung A2** Co-Kristallstrukturen von Akt1 (Volllänge ohne HM) im Komplex mit neuartigen CAIs. Die  $2F_o-F_c$ -Dichten sind bei  $1\sigma$  konturiert **A** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit **19a**, kovalent gebunden an Cys310 (unveröffentlicht,  $2F_o-F_c$ -Dichtekarte dargestellt in rot) überlagert mit **46a** (unveröffentlicht,  $2F_o-F_c$ -Dichtekarte dargestellt in hellblau). **B** Die Überlagerung von **46a** (unveröffentlicht,  $2F_o-F_c$ -Dichtekarte dargestellt in hellblau), **46b** (unveröffentlicht,  $2F_o-F_c$ -Dichtekarte dargestellt in rot) und **46d** (unveröffentlicht,  $2F_o-F_c$ -Dichtekarte dargestellt in grün) offenbart die unterschiedliche Orientierung der östlichen Molekülteile, die auf die Alkylierung von Cys296 und Cys310 zurückzuführen ist.

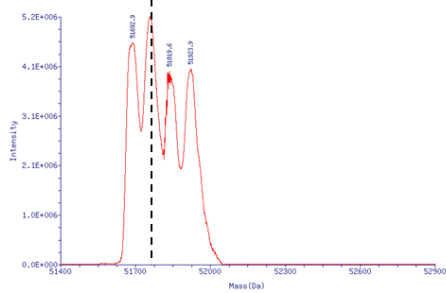
Akt1 (DMSO) - 1 h



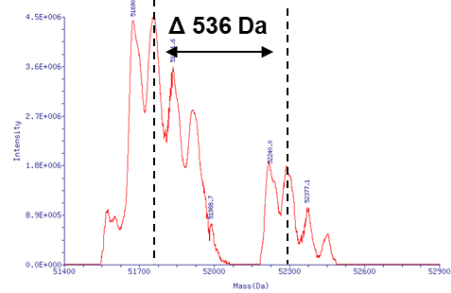
Akt1 (DMSO) - 24 h



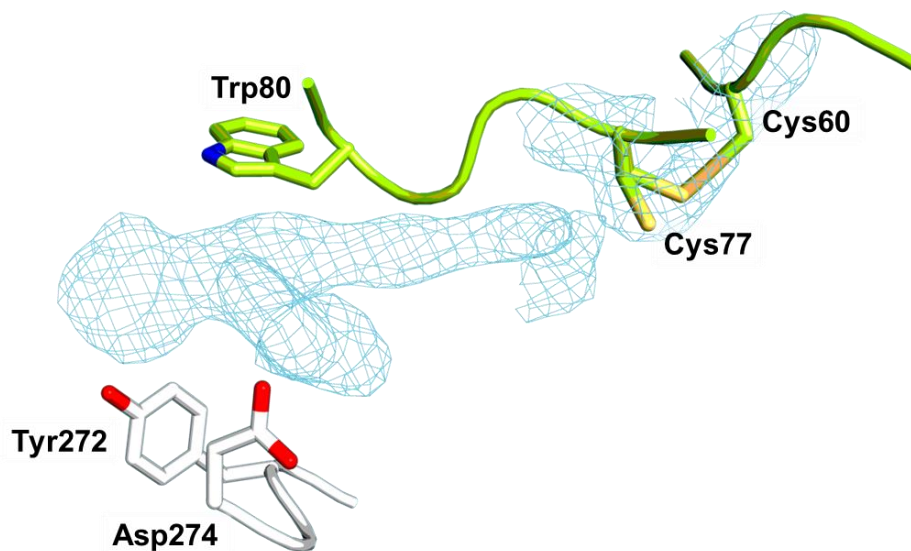
Akt1 (65) - 1 h



Akt1 (65) - 24 h



**Abbildung A3** Dekonvolvierte Massenspektren von Akt1<sup>wt</sup> nach 1 h und 24 h Inkubation mit **65** bei 4°C zeigen eine Massenverschiebung (dargestellt als  $\Delta$ -Wert der relativen Molekülmasse), die der relativen Molekülmasse des Proteins addiert mit der relativen Masse der getesteten Verbindung entspricht.



**Abbildung A4** Co-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit CyPHi **71f** (Unveröffentlichte Struktur gelöst von Dr. J. Niggenaber). Die Aminosäuren und Sekundärstrukturen der PH-Domäne sind in Grün dargestellt, die der Kinasedomäne in Weiß. Die  $2F_o-F_c$ -Karte ist bei  $\sigma = 1$  konturiert. Die Elektronendichte zeigt eine teilweise oxidierte (geschlossen) und reduzierte (offen) Form der Disulfidbindung zwischen Cys60 und Cys77. Daher war es nicht möglich, die kovalente Bindung zu Cys77 aufzulösen.

*“This is the luxury of having spent my life doing what I love. The cost of that? It sucks. I’m not blind. I’m not numb to the pain. I would argue I’m more conscious of it than anybody else. But I’m also more conscious of what that gives me. And when I’m done with this, that will be what it is, and I’ll find a way. But there’s something inside of me, propelling, that I’m not going to give up until the wheels fall off. That’s what I’m made of. And I wish — I see all the arguments against it — but I wish I could relate the intangibles to you. My guess, is that we’re all built the same. None of us are completely stupid. A little deranged, I think there’s a strong argument there. I do. But ultimately, we also know what we have. And to go and lay down in that sense of it, that’s like, embracing what we’ve done with our lives.”*

-John Rodney Mullen

# Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname  
(Surname, first name)

\_\_\_\_\_  
Matrikel-Nr.  
(Enrolment number)

**Belehrung:**

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

**Official notification:**

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum  
(Place, date)

\_\_\_\_\_  
Unterschrift  
(Signature)

\_\_\_\_\_  
Titel der Dissertation:  
(Title of the thesis):

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.\*

**\*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.**

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum  
(Place, date)

\_\_\_\_\_  
Unterschrift  
(Signature)