

Konzeptionierung und Etablierung von zwei divergierenden Ansätzen zur Beschleunigung der akademischen und industriellen Wirkstoffentwicklungskaskade

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät Chemie und Chemische Biologie

der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND

vorgelegt von

Jonas Damian Warmuth

geboren 06.05.1992 in Recklinghausen

1. Gutachter: Prof. Dr. DANIEL RAUH

2. Gutachter: Prof. Dr. MICHAEL EDMUND BECK

DISSERTATION

Konzeptionierung und Etablierung von zwei divergierenden Ansätzen zur Beschleunigung der akademischen und industriellen Wirkstoffentwicklungskaskade

Fakultät Chemie und Chemische Biologie
der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND

Dortmund, 2024

Dekan: Prof. Dr. STEFAN KAST

1. Gutachter: Prof. Dr. DANIEL RAUH

2. Gutachter: Prof. Dr. MICHAEL EDMUND BECK

Abgabe: 23.10.2024

Disputation: 29.10.2024, 10:30 Uhr, C2-02-326

Die vorliegende Arbeit entstand unter Betreuung von PROF. DR. DANIEL RAUH und wurde im Zeitraum von März 2019 bis März 2024 an der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden bereits in Form von Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften, als Patent oder im Rahmen der Bachelorarbeit von Herrn ALEXANDER SCHNEIDER (2021) veröffentlicht; entsprechende Stellen wurden in der Dissertation gekennzeichnet.

Publikationen und Patente

Publikationen

Im Rahmen dieser Dissertation entstand die folgenden Publikation, in der bereits Teile dieser Arbeit veröffentlicht wurden:

Bührmann, M.[‡]; Kallepu, S.[‡]; Warmuth, J. D.[‡]; Wiese, J. N.[‡]; Ehrh, C.[‡]; Vatheuer, H.; Hiller, W.; Seitz, C.; Levy, L.; Czodrowski, P.; Sievers, S.; Müller, M. P.; Rauh, D., FRAGOTRY: Pharmacophore-Focused Design, Synthesis, and Evaluation of an sp³-Enriched Fragment Library. *Journal of Medicinal Chemistry* **2023**, *66*(9), 6297-6314.

Patente

Mühlenberg, T.; Warmuth, J. D.; Schulz, T.; Teuber, A.; Lategahn, J.; Sievers, S.; Rauh, D.; Bauer, S. Compounds for Use in the Treatment of Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST). EP23209032, November 10, 2023.

Danksagung

Die Hauptarbeit für diese Dissertation entstand, wie bei zahlreichen anderen meiner ehemaligen Kommilitonen, Kollegen und Mitstreiter, in einer Zeit, in der ein tief einschneidendes Ereignis nicht nur das gesamte gesellschaftliche Leben überschattete, sondern auch die Naturwissenschaften vor eine völlig neue Herausforderung stellte. Am 11. März 2020 wurde die gesamte Weltbevölkerung mit der offiziellen Ausrufung der COVID-19-Pandemie erschüttert. Diese Phase war für die meisten Personen aus meinem Umfeld, aber auch für mich selbst, von großen Unklarheiten, Angst und Unsicherheit geprägt. Doch selbst inmitten dieser scheinbar ausweglosen Situation wurden die Hoffnungen der Menschen durch wissenschaftliche Bemühungen wiederbelebt. Es war die unermüdliche Arbeit von Wissenschaftlern weltweit, die es ermöglichte, in nie dagewesener Geschwindigkeit Impfstoffe für einen breiten Teil der Bevölkerung zur Verfügung zu stellen und damit wieder ein Stück weit Normalität in das Leben der Menschen einkehren zu lassen.

Es ist daher ein Privileg für mich, Teil der wissenschaftlichen Bemühungen sein zu dürfen, die das Ziel haben, unserer Gesellschaft ein besseres und angstfreieres Leben zu ermöglichen. Obgleich die momentanen Ereignisse in unserer Welt häufig Unbeständigkeit, Chaos und Leid implizieren, so bin ich mir sicher, dass auch in Zukunft die kollaborative Zusammenarbeit in den Naturwissenschaften neue Möglichkeiten bereithalten wird, solche Notstände gemeinsam überwinden zu können.

Diesen Worten im Angesicht möchte ich Herrn Prof. Dr. DANIEL RAUH namentlich und dem gesamten Lehrpersonal der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND meinen aufrichtigen Dank dafür aussprechen. Durch ihre inspirierenden Vorlesungsinhalte und ihre einzigartige Art, Wissen zu vermitteln, haben sie maßgeblich dazu beigetragen, meine Begeisterung für die Wissenschaft zu entfachen und zu fördern. Weiterhin danke ich Prof. RAUH für das Vertrauen, das er mir vor sechs Jahren schenkte, als ich als „fachfremder“ Masterand zur Arbeitsgruppe stieß. Dieses Vertrauen war der Anstoß für meine fortwährende Faszination für die Medizinalchemie und mündete schließlich in die Ausformulierung dieser Dissertation.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. MICHAEL EDMUND BECK für die Übernahme des Koreferats bedanken sowie der gesamten AG Rauh für Aufnahme und soziale Inklusion inmitten dieser schwierigen Zeiten. Namentlich seien dabei vor allem Dr. RAJESH GONTLA, TOM SCHULZ und ALINA TEUBER, stellvertretend für das gesamte GIST-Team, sowie Dr. MIKE BÜHRMANN, Dr. CHRISTIANE EHRT, Dr. SHIVAKRISHNA KALLEPU, Dr. THORSTEN GENSKI und Prof. Dr. ANDREAS BRUNSCHWEIGER als Vertreter des FRAGTORY-Konsortiums erwähnt. Die zahlreichen fachlichen Diskussionen konnten dabei meinen Horizont erweitern und haben somit maßgeblich zum Erfolg dieser Dissertation beigetragen.

Weiterhin danke ich auch meinen beiden Kollegen SVEN BRANDHERM und TONIA KIRSCHNER sowie meinem langjährigen Studienkollegen, Herrn JAN GIEROK, für die vielen Gespräche abseits des Laboralltags und die einwandfreie kollegiale Zusammenarbeit bei der Praktikumsbetreuung und anderen Aufgaben.

Ein besonderer Dank richtet sich auch an die zahlreichen betreuten Auszubildenden, namentlich vertreten durch Frau PIA STREY, Herrn MAURICE WESOTY, Frau BIANCA BECK, Herrn LEON-JÜRGEN HAUNERT, Herrn LUCA MACHURA und Frau SIDONIE RÖMER, und meinen Bachelorstudenten Herrn ALEXANDER SCHNEIDER für ihren unermüdlichen Einsatz im Labor und den großen Beitrag, den sie zur Synthese der umfangreichen Substanzbibliothek im GIST-Projekt geleistet haben. Ihre Betreuung und das von ihnen erhaltene Feedback haben meine Leidenschaft für die Vermittlung fachlicher und praktischer Kompetenzen maßgeblich angefach.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern, Frau HEIKE WARMUTH und Herrn ROLAND CURDT-WARMUTH, meiner Schwester, Frau LENA HACKS, meinem Neffen, Herrn JENDRIK HACKS, meiner Nichte, Frau IDA HACKS, meiner Tante, Frau MARTINA FINKE, und meinem Onkel, Herrn HUBERT FINKE. Trotz häufiger emotionaler Ausbrüche meinerseits waren sie stets bemüht, mir ein Umfeld der Entspannung und des Wohlfühlens zu schaffen und somit meine Stimmung zu heben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Partnerin, Frau IONELA TABĂ. Ihre bedingungslose Liebe, Geduld und Fürsorge haben mich durch die herausforderndsten Momente dieser Reise getragen. IONELA hat unermüdlich dafür gesorgt, dass ich trotz der Belastungen und Anforderungen stets Momente der Freude und Erholung finden konnte. Sie hat mich nicht nur motiviert und inspiriert, sondern auch praktische Unterstützung geleistet, indem sie mir den Rücken freigehalten hat, wann immer es nötig war. Ihre unerschütterliche Zuversicht und ihr Glaube an mich haben mir immer wieder neue Kraft gegeben. Es ist schwer in Worte zu fassen, wie viel ihre Unterstützung für mich bedeutet hat, und ich bin ihr zutiefst dankbar für alles, was sie für mich getan hat. Ihr, meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Neffen, meiner Nichte, meiner Tante und meinem Onkel sowie allen weiteren Wegbegleitern widme ich daher diese Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen und Patente	V
Danksagung	VII
Inhaltsverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
Kurzfassung	XVII
Abstract	XXI
1 Einleitung	1
1.1 Entwicklung und Etablierung von Hochdurchsatz-Plattformen als Startpunkt automatisierter Wirkstoffforschung.....	2
1.2 Fragmentbasierte Wirkstoffforschung im Fokus moderner Arzneimittelforschung.....	5
1.3 Möglichkeiten zu Synergien? HTS-geleitete Wirkstoffforschung und FBDD als komplementäre Werkzeuge in der Wirkstoffidentifizierung.....	7
1.3.1 Differenziatoren im Zuge des Designprozesses von HTS- und FBS-Bibliotheken.....	8
1.3.2 Potential für akademische Wirkstoffforschung: FBS ermöglicht höhere Hitraten durch Minimierung des zu durchsuchenden chemischen Raums.....	11
1.3.3 Designprinzipien diktieren die Auswahl des chemischen Raums und molekulare Eigenschaften in Substanzbibliotheken.....	13
1.3.4 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign als synergistisches Bindeglied zwischen FBDD und HTS-gestützter Wirkstoffforschung.....	14
1.4 <i>Drug Repurposing</i> beschleunigt den konventionellen Medikamentenentwicklungsprozesses ...	16
1.5 Analyse der pharmakokinetischen Eigenschaften bildet eine essentielle Grundlage für die Leitstrukturoptimierung bei SBDR.....	20
1.6 SBDR als attraktive Möglichkeit für die Identifizierung von chemischer Materie zur Behandlung von Seltenen Erkrankungen	23
1.7 Gastrointestinale Stromatumore: Ein Paradebeispiel Seltener Erkrankungen.....	24
1.8 Präzisionsmedizinische Ansätze zur Behandlung von GIST: c-KIT und PDGFR α als attraktive Targets für SBDR-Bemühungen.....	26
1.9 Resistenzmutationen erfordern konstante Entwicklung neuer Therapiekonzepte	30
2 Motivation und Zielstellung	33
2.1 Analysen zur Eignung und Implementierung moderner Synthesetechniken im Kontext des Aufbaus sp ³ -reicher Fragmentbibliotheken.....	35
2.2 Identifizierung und Modifizierung eines neuen Chemotyps zur Behandlung resistenzerworbener GIST	38
3 Ergebnisse und Diskussion	43
3.1 Analysen zur Eignung und Implementierung moderner Synthesetechniken im Kontext des Aufbaus sp ³ -reicher Fragmentbibliotheken.....	43
3.1.1 Design und Konstruktion des FRAGTORY-Workflows mittels KNIME	43
3.1.2 2-(Hydroxymethyl)morpholine als molekulare Vertreter idealtypischer Fragmente	47
3.1.3 Etablierung einer literaturbeschriebenen Eintopfreaktion zur Generierung chemisch-diverser 2-(Hydroxymethyl)morpholin-Fragmente	49

3.1.4	Perizyklische Reaktionen als idealtypische Musterreaktionen zur Voraussage des synthetisch-zugänglichen Raums	54
3.1.5	Experimentelle Analysen zu potentiellen Limitationen der oxa-DIELS-ALDER-Reaktion mit normalen Elektronenbedarf	55
3.1.6	Ableitung von empirischen Reaktivitätsregeln und Implementierung in den FRAGTORY-Workflow	59
3.2	Identifizierung und Modifizierung eines neuen Chemotyps zur Behandlung resistenzerworbener GIST	65
3.2.1	Phänotypisches HTS und <i>Counter Screening</i>	65
3.2.2	Treffernominierung durch Treffer-Landschaftsanalyse und Röntgenkristallographie	67
3.2.3	Leitende Fragestellungen für die strukturbasierte Wirkstoffrepositionierung von NDI... ..	70
3.2.4	Etablierung einer modularen, konvergenten Syntheseroute zur schnellen und semi-automatisierten Synthese von NDI-Derivaten	71
3.2.5	Analyse der Struktur-Aktivitätsbeziehungen	73
3.2.5.1	Fluorierungsgrad	74
3.2.5.2	Einfluss von meta-Substitutionen am 3-Fluorbenzol-Ring	79
3.2.5.3	Funktionalisierung der meta- und para-Position des 3-Fluorbenzol-Rings	80
3.2.5.4	Einbau unterschiedlicher Exit-Vektoren im Bereich der Vordertasche	82
3.2.5.5	Variation der Ringgröße des Piperidin-Rings	83
3.2.5.6	Karbonisierung des Piperidin-Rings	86
3.2.5.7	Alternierung der Stickstoff-Position	86
3.2.5.8	Heteroaromatisierung des Piperidin-Rings	88
3.2.6	Struktur-PK-Eigenschaften: Verbesserung der peroralen Bioverfügbarkeit durch Einführung von Fluor	89
4	Zusammenfassung und Ausblick	97
4.1	Analysen zur Eignung und Implementierung moderner Synthesetechniken im Kontext des Aufbaus sp ³ -reicher Fragmentbibliotheken	97
4.2	Identifizierung und Modifizierung eines neuen Chemotyps zur Behandlung resistenzerworbener GIST	100
5	Experimenteller Teil	105
5.1	Computerchemische Verfahren	105
5.1.1	Workflow-Generierung	105
5.1.2	Ausschluss unerwünschter Reaktivitätseigenschaften innerhalb des FRAGTORY-Workflows	105
5.1.3	<i>Docking</i> und Modellierung	105
5.1.4	Sequenzvergleich	106
5.1.5	Generierung eines Interaktionsmodells mit Hilfe von GEOMINE	107
5.1.6	Erstellung von Abbildungen und Bezugsquellen der verwendeten Vektorgrafiken	107
5.2	Organische Synthese	108
5.2.1	Allgemeine Anmerkungen	108
5.2.2	Allgemeine analytische Methoden	108
5.2.3	Allgemeine automatisierte säulenchromatographische Reinigungsverfahren	110
5.2.4	Allgemeine Synthesevorschriften	110
5.2.5	Synthesevorschriften und analytische Charakterisierung	119
	Anhang	173
	Literaturverzeichnis	187

Abkürzungsverzeichnis

.mol2	Tabellenformat, das einzelne oder mehrere chemische Verbindungen darstellt und Atomkoordinaten, Informationen über chemische Bindungen und Metadaten eines Moleküls enthält
.pdb	Multistream-Dateiformat zur Sicherung dreidimensionaler Strukturinformationen
.sdf	engl.: <i>Structured Data File</i>
ABL1	engl.: <i>Abelson Murin Leukemia Viral Oncogene Homolog 1</i>
ACVR1	Activin A-Rezeptor Typ I (engl.: <i>Activin A Receptor, Type I</i> ; auch: <i>Activin Receptor-Like Kinase-2, ALK2</i>)
ADMET	Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion und Toxizität
AGC	Gruppe der Proteinkinasefamilien A, G und C
anhyd. DCM	Trockenes Dichlormethan
app	apparent
äquiv.	Äquivalent
ASAP-MS	<i>Atmospheric Solids Analysis Probe</i> -Massenspektrometrie
ASV	Allgemeine Synthesevorschrift
AT	Automatisierte Trennungsmethode
ATP	Adenosintriphosphat
AuB	Ära der Automatisierung und Biotechnologie
BMP2K	BMP-2-induzierbare Proteinkinase (engl.: <i>BMP-2-Inducible Protein Kinase</i>)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
br	breit
<i>c</i>	Konzentration
CAMK	Gruppe der Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen
CAS	engl.: <i>Chemical Abstracts Service</i>
CHEK1	Checkpoint-Kinase 1 (engl.: <i>Checkpoint kinase 1</i>)
CK1	Gruppe der Zellkinasen 1
c-KIT	Humaner Stammzellfaktor-Rezeptor (engl.: <i>Human Stem Cell Factor Receptor</i>)
CMGC	Gruppe der Cyclin-abhängigen Kinasen

CML	chronisch-myeloische Leukämie (engl.: <i>Chronic Myelogenous Leukemia</i>)
COMAS	engl.: <i>Compound Management And Screening Center</i>
CSNK1D	Caseinkinase I Isoform Delta (engl.: <i>Casein kinase I isoform delta</i>)
CTG	Zellviabilitätsassay (engl.: <i>CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay</i>)
CV	Säulenvolumen (engl.: <i>Column Volumes</i>)
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie (engl.: <i>Thin-Layer Chromatography, TLC</i>)
DC-MS	Dünnschicht-Chromatographie-Massenspektrometrie
dd	Dublett von Dubletten
DDHD	engl.: <i>Drug Discovery Hub Dortmund</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRT	Dosistitration (engl.: <i>Dose-Response Titration</i>)
dt	Dublett von Triplets
DYRK1A	engl.: <i>Dual Specificity Tyrosine-Phosphorylation-Regulated Kinase 1A</i>
EBI	Europäisches Institut für Bioinformatik (engl.: <i>European Bioinformatics Institute</i>)
ECFP4	engl.: <i>Extended Connectivity Fingerprint 4</i>
ELSD	Verdampfungs-Lichtstreuendetektor (engl.: <i>Evaporative Light Scattering Detector</i>)
EMBL	Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie (engl.: <i>European Molecular Biology Laboratory</i>)
ESI	Elektrosprayionisation (engl.: <i>Electrospray Ionisation</i>)
EtOAc	Ethylacetat
FBDD	Fragmentbasierte Wirkstoffforschung (engl.: <i>Fragment-Based Drug Discovery</i>)
FBS	Fragmentbasiertes Screening (engl.: <i>Fragment-Based Screening</i>)
FDA	engl.: <i>U.S. Food And Drug Administration</i>
FPE	FLASHPURE™ EXOFLEX™ Silica-Säule
FPE-C18	FLASHPURE™ EXOFLEX™ C18-modifizierte Silica-Säule

FuE	Forschungs- und Entwicklung (engl.: <i>Research And Development</i> , R&D)
FuR	Ära des Fragment-basierten Wirkstoffdesigns und der Repositionierung
Gew.%	Gewichtsprozent
GIST	Gastrointestinale Stromatumore (engl.: <i>Gastrointestinal Stromal Tumors</i>)
GpiDAPH3	engl.: <i>Graph-P-Donor-Acceptor-Polar-Hydrophobe-Triangle</i>
GR ₅₀	Konzentration des Inhibitors, bei der die Wachstumsrate GR 50% beträgt
h	Stunde
hERG	engl.: <i>human Ether-à-go-go Related Gene</i>
HOMO	höchstbesetztes Grenzorbital (engl.: <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
HSAB	Harte und Weiche Säuren und Basen (engl.: <i>Hard And Soft Acids And Bases</i>)
HTS	Hochdurchsatz-Screening
Hz	Hertz
IC ₅₀	halbmaximale, mittlere inhibitorische Konzentration
K _D	Dissoziationskonstante bzw. Bindungsaffinität
K _I	Inhibitionskonstante
KNIME	engl.: <i>Konstanz Information Miner</i>
LDC	engl.: <i>Lead Discovery Center</i>
LE	Ligandeneffizienz (engl.: <i>Ligand Efficiency</i>)
LUMO	niedrigst unbesetztes Grenzorbital (engl.: <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
m	Multipllett
M	Molarität (mol/L)
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MACCS	engl.: <i>Molecular ACCess System</i>
MERTK	Proto-Onkogen-Tyrosin-Proteinkinase MER (engl.: <i>Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase MER</i>)
min	Minuten

mL	Milliliter
NDI	Platzhaltername für die im HTS identifizierte Verbindung (engl.: <i>New-Dortmund-Inhibitor</i>)
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
<i>n</i> -Pen	<i>n</i> -Pentan
<i>n</i> _{SA}	Anzahl der Schweratome
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (engl.: <i>Non-Small-Cell Lung Cancer</i>)
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (engl.: <i>p38 Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
PAINS	engl.: <i>Pan-Assay Interference Compounds</i>
PAK6	P21-aktivierte Kinase 6 (engl.: <i>P21 (RAC1) Activated Kinase 6</i>)
PAMPA	engl.: <i>Parallel Artificial Membrane Permeation</i>
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl.: <i>Principal Component Analysis</i>)
PD	Pharmakodynamik (engl.: <i>Pharmacodynamics</i>)
PDGFR α	Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor A (engl.: <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha</i>)
PDPK1	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (engl.: <i>Phosphoinositide-Dependent Kinase-1</i>)
PE	Petrolether 40-60 °C
PIM1	Proto-Onkogen-Serin/Threonin-Proteinkinase Pim-1 (engl.: <i>Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase Pim-1</i>)
PK	Pharmakokinetik (engl.: <i>Pharmacokinetics</i>)
PKA	Proteinkinase A (engl.: <i>Protein Kinase A</i>)
PKC	Proteinkinase C (engl.: <i>Protein Kinase C</i>)
p <i>K</i> _s	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PMI	engl.: <i>Principal Moments Of Inertia</i>
ppm	ein Millionstel (engl.: <i>parts per million</i>)
PT	Post-Thalidomid-Ära
PW	Ära der Phänotypischen Wirkstoffforschung
q	Quartett
QED	quantitative Einschätzung der Wirkstoffaffinität (engl.: <i>Quantitative Estimate Of Drug-Likeness</i>)

QSAR	Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (engl.: <i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i>)
quin	Quintett
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RF	Repositionierungsfläche
ROCS	engl.: <i>Rapid Overlay Of Chemical Structures</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>Revolutions Per Minute</i>)
s	Singulett
S	Targetspezifitätsquotient
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung (engl.: <i>Structure-Activity Relationship</i>)
SARS-CoV-2	Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2 (engl.: <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2</i>)
SBDD	Strukturbasiertes Wirkstoffdesign (engl.: <i>Structure-Based Drug Design</i>)
SBDR	Strukturbasierte Repositionierung von Wirkstoffen (engl.: <i>Structure-Based Drug Repurposing</i>)
SBRF	strukturbasierte Repositionierungsfläche
SMARTS	engl.: <i>SMILES Arbitrary Target Specification</i>
SMILES	engl.: <i>Simplified Molecular Input Line Entry System</i>
SMIRKS	Eine Reaktionstransformationssprache (SMILES-Reaktionsspezifikation)
SPR	Struktur-Pharmakokinetik-Beziehungen (engl.: <i>Structure-Pharmacokinetic Relationship</i>)
SRPK1	Serin/Arginin-reiche Spleißfaktor-Proteinkinase-1 (engl.: <i>Serine/Arginine-Rich Splicing Factor Protein Kinase-1</i>)
STE	Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen
STK10	Serin/Threonin-Proteinkinase 10 (engl.: <i>Serine/Threonine-Protein Kinase 10</i>)
STK32A	Serin/Threonin-Proteinkinase 32A (engl.: <i>Serine/Threonine Kinase 32A</i>)
STR	Struktur-Toxizitäts-Beziehungen (engl.: <i>Structure-Toxicity Relationship</i>)
SYK	Milztyrosinkinase (engl.: <i>Spleen Tyrosine Kinase</i>)

t	Triplet
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGD	engl.: <i>Typed-Graph Distances</i>
TGFBR2	engl.: <i>Transforming Growth Factor, Beta-Receptor II</i>
THF	Tetrahydrofuran
TK	Gruppe der Tyrosinkinasen
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor (engl.: <i>Tyrosine Kinase Inhibitor</i>)
TKL	Gruppe der Tyrosinkinase-ähnlichen Kinasen
t_R	Retentionszeit
TTK	Threonin/Tyrosinkinase (engl.: <i>Threonine Tyrosine Kinase</i>)
UHPLC-MS	Ultra-Hochleistungs-Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (engl.: <i>Ultra High-Performance Liquid Chromatography</i>)
UNIPROT	engl.: <i>Universal Protein Database</i>
VRK2	engl.: <i>Vaccinia Related Kinase 2</i>
WTZ	WESTDEUTSCHES TUMORZENTRUM
X-Ray Analyse	Röntgenstrukturanalyse
ZNS	Zentrales Nervensystem (engl.: <i>Central Nervous System, CNS</i>)
ΔG	freie Gibbs-Energie

Kurzfassung

Seit den 1980er Jahren versucht die Pharmaindustrie, den Wirkstoffentwicklungsprozess durch Computer- und Automatisierungstechnologien effizienter zu gestalten. Trotz dieser Bemühungen erweist sich die Medikamentenforschung heute paradoxerweise langwieriger und kostspieliger als vor 40 Jahren. Dieses Phänomen wird als Eroom-Gesetz bezeichnet und erschwert die Entwicklung neuer Therapeutika erheblich. Angesichts der stetig zunehmenden Anzahl neu entdeckter pathologischer Erkrankungsmuster und globaler Gesundheitskrisen, wie Pandemien oder die Verbreitung multiresistenter Keime, ist es dringend erforderlich, den Wirkstoffentwicklungsprozess schneller und risikofreier zu gestalten.

Vor dem Hintergrund dieser Herausforderungen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit in zwei Forschungsprojekten voneinander unabhängige Strategien entwickelt, um die Entwicklungskaskade der Pharmaforschung zu beschleunigen und das Eroom-Gesetz zu durchbrechen.

Als ein wesentliches Hindernis in der Pharmaforschung gilt unter anderem der langsame und mangelnde Einzug innovativer Synthesetechniken in die Medizinalchemie. Dieser Umstand begünstigt neben der limitierten Generierung neuer chemischer Materie auch eine regelrechte Verarmung des chemischen und biodiversen Raums innerhalb von Substanzbibliotheken. Mit der Etablierung des sogenannten FRAGTORY-Workflows konnte sich im Zuge des ersten Forschungsprojekts dieser Problematik jedoch angenommen werden. Neben der computerchemischen Konzeptionierung des quelloffenen, modular-aufgebauten und somit jederzeit erweiterbaren Arbeitsablaufs stand im Fokus der Forschungsbemühungen auch die experimentelle Etablierung zweier Synthesemethoden, die zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit als tendenziell unterrepräsentiert in der Medizinalchemie angesehen werden konnten. Im Gegensatz zu den konventionellen Designstrategien kommerziell-erhältlicher Bibliotheken, fokussiert sich der FRAGTORY-Ansatz auf die Generierung sp^3 -reicher Fragmente vor dem Hintergrund einer rekursiven Pharmakophor-Analyse bereits vorhandener Bibliotheksvertreter. Diese Vorgehensweise ermöglicht den dynamischen Abgleich des bereits abgedeckten Pharmakophor-Raums und bietet damit Möglichkeit, Synthesekandidaten zu nominieren, die die entstehenden Lücken im chemischen Raum effektiv ausfüllen können.

In diesem Kontext konnte zudem auch die experimentelle Einbindung einer Eintopfreaktion zur Darstellung von 2-(Hydroxymethyl)morpholin sowie einer oxa-DIELS-ALDER-Reaktion für die Generierung von α,β -ungesättigten Pyranonen und Dehydrocineolen Restriktionen bezüglich des zuvor definierten Substratumfanges sowie der Tolerierbarkeit gegenüber der Variation von Reaktionsbedingungen aufdecken.

Dies ermöglichte schließlich auch die Ableitung empirischer Reaktivitätsregeln, welche für die spezifische Filterung des zugänglichen synthetischen chemischen Raums genutzt werden konnten. Damit stellt der FRAGTORY-Workflow vor allem für die frühe Phase der Wirkstoffentwicklung ein probates Mittel zur Effizienzsteigerung dar und kann aufgrund seiner Modularität auch problemlos auf anspruchsvolle industrielle Applikationen angewandt werden.

Für die Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung Seltener Krebserkrankungen stellt sich ein klassisches Vorgehen im Sinne einer vorwärtsgerichteten Pharmakologie hingegen aufgrund der häufig undurchsichtigen Datenlage, auftretenden Resistenzmutationen nach Gabe eines wirksamen Inhibitors sowie den geringen Fallzahlen und den damit verbundenen mangelnden finanziellen Anreiz für Pharmaunternehmen als unattraktiv dar. Die Behandlung von Patienten mit resistenzerworbenen gastrointestinalen Stromatumoren stellt ein Paradebeispiel für eine solche medizinische Notlage dar, da bisher etablierte Behandlungsoptionen sich entweder als ineffektiv erweisen oder intolerierbare Nebenwirkungen hervorrufen. Für solche Fälle haben sich insbesondere sogenannte strukturbasierte Repositionierungsansätze als attraktive Möglichkeit bewährt, den Prozess der Wirkstoffentwicklungskaskade zu verkürzen und somit auch im akademischen Umfeld zu ermöglichen.

Im Rahmen des zweiten Forschungsprojekts wurde daher im Zuge eines interdisziplinären Forschungszusammenschlusses mit dem WESTDEUTSCHEN TUMORZENTRUM (WTZ), dem Max-Planck-Institut Dortmund zugehörigen COMPOUND MANAGEMENT AND SCREENING CENTER (COMAS) und dem LEAD DISCOVERY CENTER (LDC) in Dortmund, zunächst ein phänotypisches Hochdurchsatz-Screening (HTS) mit Hilfe von patienten-erschlossenen isogenen Zelllinienmodellen durchgeführt. Dabei wurden mehrere vielversprechende Treffermoleküle identifiziert, von denen eines aufgrund seiner hohen Potenz gegenüber einer Vielzahl von Mutationen der Onkogene c-KIT und PDGFR α einer biochemischen Validierung unterzogen und durch strukturbasierte chemische Modifikation weiter optimiert wurde. Dabei dienten experimentell bestimmte Kristallstrukturen des Inhibitors im Komplex mit mutiertem PDGFR α als Grundlage weiterer rationaler Modifikationen.

Die Synthese einer umfangreichen Substanzbibliothek ermöglichte weiterhin die Herleitung umfangreicher und rational-erklärbarer Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) und Struktur-Pharmakokinetik-Beziehungen (SPR). In einem abschließend durchgeführten Hybridisierungsansatz konnte somit schließlich ein Inhibitor erhalten werden, der im Vergleich zum Ursprungsmolekül verbesserte Selektivitäts- und PK-Eigenschaften aufweist und somit optimale Voraussetzungen für eine Weiterentwicklung zu einem potentiellen klinischen Kandidaten bietet.

Abstract

Since the 1980s, the pharmaceutical industry has sought to make the drug development process more efficient through the implementation of computer and automation technologies. Despite these efforts, drug research has paradoxically become more time-consuming and costly than it was 40 years ago. This phenomenon, known as Eroom's Law, is significantly hampering the development of new therapeutics. Given the increasing number of newly discovered diseases and global health crises such as pandemics and the spread of multi-drug resistant pathogens, it is crucial to make the drug development process faster and less risky.

Against this background, this dissertation aimed to develop independent strategies for accelerating the drug development cascade and overcoming Eroom's law as part of two research projects. A major obstacle in pharmaceutical research is the slow and insufficient integration of innovative synthesis techniques into medicinal chemistry. This situation limits the generation of new chemical entities and leads to an impoverishment of chemical space and biodiversity in compound libraries. The FRAGTORY workflow, developed in the first research project, addresses this issue. Besides the computational design of the open-source, modular, and thus easily expandable workflow, the research efforts also focused on the experimental establishment of two synthesis methods that were underrepresented in medicinal chemistry at the time of writing. Unlike conventional design strategies of commercially available libraries, the FRAGTORY approach focuses on generating sp^3 -rich fragments based on a recursive pharmacophore analysis of existing library representatives. This approach allows for the dynamic alignment of the already covered pharmacophore space, nominating synthesis candidates that can effectively fill the emerging gaps in the chemical space.

In this context, the experimental integration of a one-pot reaction for the production of 2-(hydroxymethyl)morpholines and an oxa-DIELS-ALDER reaction for the generation of α,β -unsaturated pyranones and dehydrocineoles revealed restrictions concerning the previously defined substrate scope and tolerability to reaction condition variations. This ultimately enabled the derivation of empirical reactivity rules, which could be used for the specific filtering of the accessible synthetic chemical space. Thus, the FRAGTORY workflow is particularly effective for the early phase of drug development and can be easily applied to demanding industrial applications due to its modularity.

In the development of drugs for the treatment of rare types of cancer, a classic forward pharmacology approach is unattractive for pharmaceutical companies due to the often unclear data situation, resistance mutations after administration of an effective inhibitor, low case numbers and the associated lack of financial incentives. Treating patients with resistance-acquired gastrointestinal stromal tumors exemplifies such a medical emergency, as established treatment options are either ineffective or cause intolerable side effects. In such cases, structure-based drug repositioning approaches have proven to be an attractive way to shorten the drug development cascade and make it feasible within an academic setting.

Consequently, in the second research project, a phenotypic high-throughput screening was initially conducted using patient-derived isogenic cell line models in the course of an interdisciplinary collaboration with the WESTDEUTSCHE TUMORZENTRUM (WTZ), the COMPOUND MANAGEMENT AND SCREENING CENTER (COMAS), and the LEAD DISCOVERY CENTER in Dortmund. Several promising hits were identified, one of which, due to its high potency against a variety of mutations of the oncogenes c-KIT and PDGFR α , underwent biochemical validation and further optimization through structure-based chemical modification. Experimentally determined crystal structures of the inhibitor in complex with mutated PDGFR α served as the basis for further rational modifications. The synthesis of an extensive compound library further enabled the derivation of comprehensive and rationally explainable structure-activity relationships (SAR) and structure-pharmacokinetic relationships (SPR). Finally, through a hybridization approach, an inhibitor was obtained that showed improved selectivity and pharmacokinetic properties compared to the original molecule, providing optimal conditions for further development into a potential clinical candidate.

1 Einleitung

Die Geschichte der Menschheit ist von einem fortwährenden Streben nach Gesundheit und Wohlbefinden geprägt. Seit dem Aufkommen der modernen Zivilisation hat die Medizin eine zentrale Rolle bei der Bewältigung von Krankheiten und der Verbesserung der Lebensqualität eingenommen.¹⁻³ Von der Antike bis zur Gegenwart haben sich Behandlungsmethoden und medizinisches Wissen kontinuierlich weiterentwickelt, um den ständig wachsenden Herausforderungen im Kampf gegen die Geißel der Menschheit zu begegnen. Die Fortschritte der vergangenen Jahrhunderte haben diesbezüglich das beträchtliche Potenzial kontinuierlicher Forschungsbemühungen offengelegt. Dabei stellen unter anderem die Entwicklung und Implantation künstlicher Herzklappen⁴, die erfolgreiche Ausrottung der Pocken durch umfassende Impfkampagnen in den 1980er Jahren⁵ sowie die kontinuierliche Verbesserung der Detektion, Klassifizierung und zielgerichteten Bekämpfung verschiedener Krebsarten⁶⁻⁸ nur einen kleinen Teil der Meilensteine der jüngeren Medizingeschichte dar.

Trotz oder gerade wegen dieser Errungenschaften sieht sich die Menschheit im 21. Jahrhundert aufgrund der erhöhten Lebenserwartung, zunehmender Exposition mit Umweltgiften sowie der stetig zunehmenden Überbevölkerung neuen gesundheitlichen Bedrohungen ausgesetzt, die ein Umdenken bei der Entwicklung neuartiger Therapeutika erfordern. So führt die seit vielen Jahrzehnten anhaltende Globalisierung beispielsweise dazu, dass sich Erreger häufig nicht nur lokal, sondern auch auf globaler Ebene ausbreiten und damit in kürzester Zeit hohe Fallzahlen für einen breiten Teil der Weltbevölkerung bedingen⁹⁻¹¹. Die moderne Medizinalchemie sieht sich daher zunehmend mit der Herausforderung konfrontiert, den oft langwierigen und kostenintensiven Entwicklungsprozess von Wirk- und Arzneistoffen insoweit zu beschleunigen, dass sie auch auf dynamische Notsituationen innerhalb von Pandemien reagieren kann.

So ließ vor allem auch das Aufkommen und die rasche Verbreitung des Coronavirus im Jahr 2019 die Notwendigkeit erwachsen, Forschungsinitiativen weltweit zu bündeln und somit den Entwicklungsprozess für Inhibitoren der SARS-CoV-2 Hauptprotease deutlich zu beschleunigen.

Dem COVID MOONSHOT CONSORTIUM beispielsweise gelang es im Zuge eines *Open Science*-Ansatzes aus einem fragmentbasierten Screening¹² identifizierte *Hits* in nur 18 Monaten zu dem klinischen Kandidaten DNDI-6510 zu entwickeln.¹³ Die Verbindung zeigte in präklinischen *in vivo*-Testmodellen bereits vielversprechende Wirksamkeit bei insgesamt hoher Bioverfügbarkeit, einem ausgezeichneten Risiko-Nutzen-Profil und zufriedenstellender antiviraler Aktivität.¹⁴ Diese Erfolgsgeschichte betont dabei vor allem die Relevanz fortwährender Innovation im Bereich der Technologisierung und Automatisierung sowie der internationalen Kooperation im Bereich der naturwissenschaftlichen Forschung.

Die anhaltende Bedrohung durch potentiell neu auftretende virale oder bakterielle Erreger wird auch in ferner Zukunft den Einsatz und die Weiterentwicklung strukturbioologischer Hochdurchsatzplattformen unter Einsatz künstlicher Intelligenz und *in silico* basierter Vorhersagemodelle noch bedeutungsvoller und notwendiger werden lassen.¹⁵⁻¹⁷

Aber auch heutzutage finden sich bereits interessante Konzepte in der industriellen und akademischen Forschung wieder. Eine Auswahl dieser soll in den folgenden Abschnitten genauer beleuchtet werden.

1.1 Entwicklung und Etablierung von Hochdurchsatz-Plattformen als Startpunkt automatisierter Wirkstoffforschung

Zweifelsohne hat die Wirkstoffforschung in den letzten beiden Jahrhunderten eine wahrhafte Revolution durchlebt. Von der Entdeckung des Analgetikums Morphins, welches FRIEDRICH WILHELM ADAM SERTÜRNER aus dem getrockneten Milchsaft des Schlafmohns isolierte und dessen Wirkung er zunächst an Ratten und herumstreunenden Hunden testete¹⁸⁻¹⁹, bis hin zu den Anfängen der analytischen Chemie, der Entdeckung von Penicillin²⁰ durch ALEXANDER FLEMING im Jahr 1928, der daraus folgenden Ära der Antibiotikaforschung und später auch der Einzug sich stetig verbessernder computerchemischer Verfahren hat sich die Medizinalchemie von einer alchemistischen Nischenwissenschaft zu einem anerkannten und wertvollen Zweig moderner Naturwissenschaft entwickelt.²¹⁻²²

Während noch bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts die meisten Funde bioaktiver Naturstoffe als Zufallsentdeckungen bezeichnet werden konnten, wandelte sich mit zunehmender Kenntnis über pathophysiologische Ursachen bestimmter Krankheiten sowie technologischen Fortschritten im Bereich der strukturabbildenden Verfahren (z.B. die Röntgenstrukturanalyse (X-Ray Analyse), Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), etc.) die Vorgehensweise bei der Optimierung gefundener Substanzen. Gründe für beobachtbare biologische Aktivitäten konnten so auf Grundlage der chemischen Struktur abgeleitet und anschließend rational verbessert werden („Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen“, engl.: *Quantitative Structure-Activity Relationships*, QSAR).

Die Geburtsstunde des strukturbasierten Wirkstoffdesigns (engl.: *Structure-based Drug Design*, SBDD) in den 1970er und 1980er Jahren führte zur Inklusion angrenzender Teildisziplinen aus anderen naturwissenschaftlichen Zweigen. Computerchemische Berechnungen ermöglichten nun vorteilhafte Modifizierungen im Vorfeld abschätzen oder stabilisierende Interaktionen von destabilisierenden Interaktionen rational unterscheiden zu können.²³ Mit diesem Wissen ergab sich schlussendlich auch die Notwendigkeit chemisch-diverse Substanzbibliotheken hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Liganden zu klassifizieren.

Mit dem Einzug kombinatorischer Parallelsynthesen war es schließlich möglich, innerhalb weniger Monate komplexe und chemisch-diverse Substanzsammlungen im vier- bis fünfstelligen Bereich zu synthetisieren.

Doch die Größe der so erzeugten Bibliotheken erforderte zwangsweise auch einen automatisierten Ablauf bei der Testung der entsprechenden Verbindungen. Die bis zu diesem Zeitpunkt gängigen biochemischen und pharmakologischen Testverfahren benötigten in der Regel Reaktionsvolumina von etwa 1 mL und erforderten die manuelle Einwaage von trockenen Testsubstanzen. Diese Voraussetzungen limitierten den Durchsatz in den meisten Laboratorien auf 20 bis 50 Verbindungen pro Tag bzw. ein bis zweijährige Messungen für eine eher kleine Substanzbibliothek von etwa 3000 Verbindungen.²⁴

Im Zuge eines Projektes von PFIZER GLOBAL RESEARCH AND DEVELOPMENT gelang es der MOLECULAR GENETICS GROUP schließlich durch die Verwendung eines standardisierten Multiplatten-Formates ein robotisiertes Testsystem zu implementieren, das die Vermessung von 10000 Klonen einer rDNA-Bibliothek pro Woche ermöglichte. In den Folgejahren konnte dieses Konzept durch die Einbringung biotechnologischer Fortschritte und fluoreszenzbasierter Auslesemöglichkeiten in eine vollautomatisierte Infrastruktur ausgebaut werden, in deren Implementierung zahlreiche große Pharmaunternehmen investierten.²⁴ Dennoch dauerte es fast zwei Jahrzehnte bis die anfänglichen Kinderkrankheiten vollständig ausgemerzt und das sogenannte Hochdurchsatz-Screening (engl.: *High-Throughput Screening*, HTS) einen breiten Anwenderkreis fand.

Diese Errungenschaft veränderte nachhaltig die Prozesse der Wirkstoffentwicklungskaskade. Wie aus Abbildung 1b hervorgeht, ermöglichte die Automatisierung der pharmazeutischen Infrastruktur die Erschließung eines größeren chemischen Raums, der aufgrund der hohen Amortisierungskosten in der frühen Entwicklungsphase dieser Technologie erst zur Jahrtausendwende auch für kleinere Unternehmen interessant wurde. Im Vergleich zu den bis dato etablierten fokussierten Ansätzen des klassischen SBDD konnten nun große Mengen an Verbindungen im Hochdurchsatz synthetisiert und im Vorfeld bereits auf problematische pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften getestet werden. Infolgedessen stiegen in den folgenden Jahren zwar konstant der Zeit- und Kostenaufwand für die Entwicklung neuer Wirkstoffe (vgl. Abbildung 1b),²⁵⁻²⁶ jedoch verringerten sich aufgrund des daraus resultierenden erhöhten finanziellen Risikos auch die Raten an Diskontinuitätsentscheidungen für gescheiterte Wirkstoffkandidaten (siehe Abbildung 1c).²⁷ Die Etablierung von Hochdurchsatzverfahren ermöglichte somit umfangreiche Einsichten darüber, welche molekularen Eigenschaften zum Erfolg oder Scheitern einer Verbindung in späteren klinischen Phasen führen können und gestaltete damit den Identifizierungs- und Optimierungsprozess im Vergleich zu den zufälligen Entdeckungen der vorherigen Jahrhunderte deutlich planbarer und kalkulierbarer.

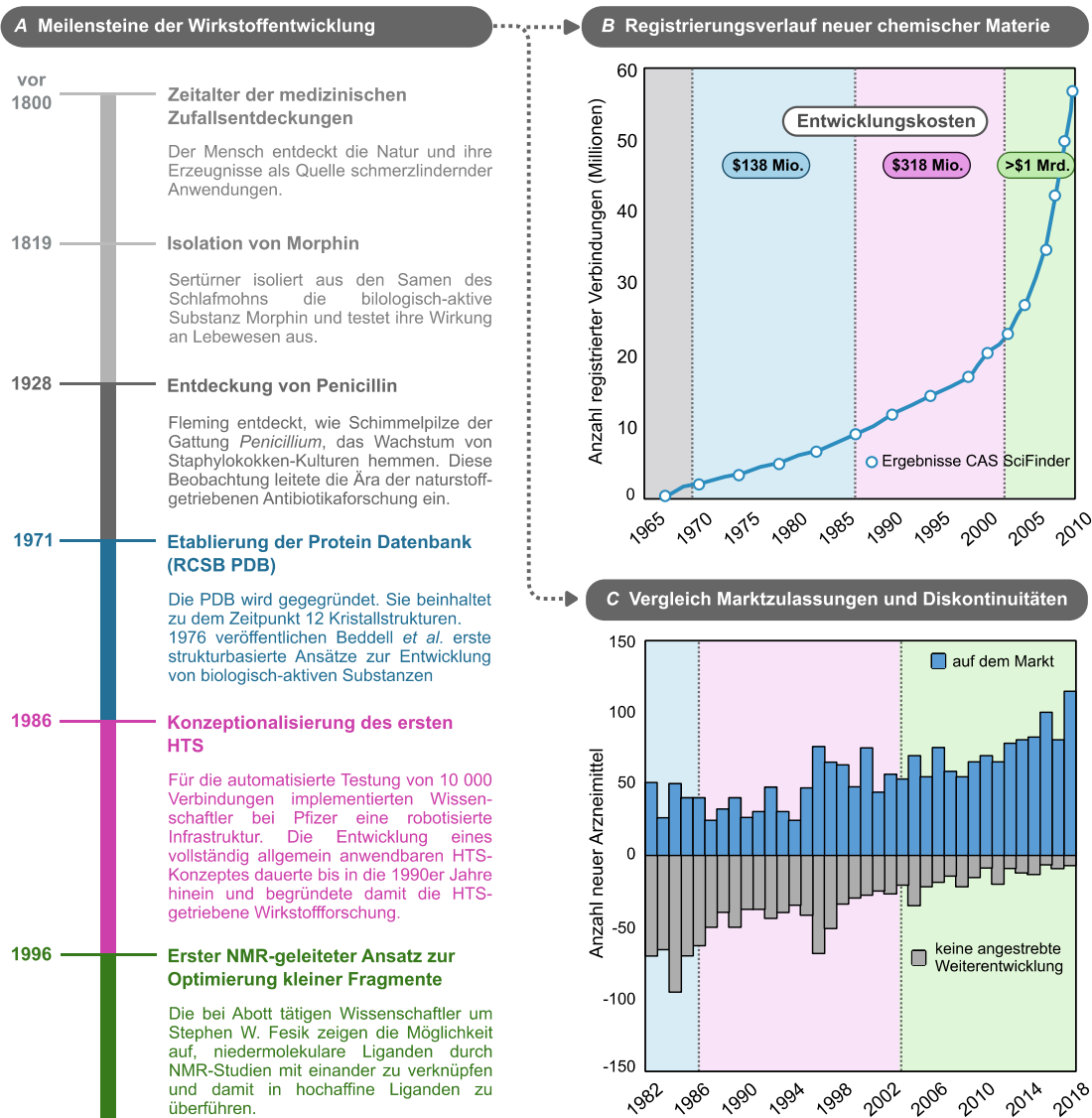


Abbildung 1 | Geschichtlicher Abriss zu den Meilensteinen der Wirkstoffentwicklung. (A) Zeitstrahl zu den historischen Meilensteinen in der Wirkstoffforschung. Während in den Anfängen der pharmazeutischen Forschung keine Wissensgrundlage über die Zusammenhänge von Struktur und Wirkung chemischer Materie auf den Körper vorhanden war, wandelte sich dieser Umstand durch die Bündelung verschiedener naturwissenschaftlicher Disziplinen und Technologien im 20. Jahrhundert und führte zu einem planbaren und kalkulierbaren Prozess. (B) Verlauf der Anzahl an registrierten Verbindungen in der CAS SciFinder-Datenbank von 1965 bis 2010. Das Diagramm zeigt, wie in Abhängigkeit der einzelnen Ären der Wirkstoffforschung (farbliche Codierung) unterschiedlich viele Verbindungen generiert und somit auch für potentielle Zielproteine getestet werden konnten. Die Implementierung automatisierter Verfahren ab den 1990er Jahren führte zu einem Paradigmenwechsel, der mit einem rasanten exponentiellen Wachstum generierter chemischer Materie einherging (pinker und grüner Bereich) (basierend auf WILLIAMS *et al.*)²⁵. (C) Vergleichende Gegeüberstellung von Arzneimitteln, die für den Markt zugelassen wurden und potentiellen Wirkstoffkandidaten, die nicht bis zur Marktreife weiterentwickelt wurden. Der Anteil an nicht-weiterentwickelten Arzneimitteln nimmt seit der Jahrtausendwende stetig ab, da Hochdurchsatz-Verfahren eine frühzeitige Einschätzung von abträglichen Eigenschaften erlauben (basierend auf ZHONG *et al.*)²⁷.

Bis zum heutigen Zeitpunkt stellen Hochdurchsatzplattformen eine zentrale Schlüsseltechnologie für die industrielle Arzneimittelforschung dar. Aufgrund des hohen Kosten- und Zeitaufwandes bei der Unterhaltung der komplexen Infrastruktur gehen zahlreiche Unternehmen jedoch mittlerweile dazu über, ihr Portfolio durch ergänzende Technologien zu erweitern.

Neben der Anwendung DNA-kodierter Substanzbibliotheken²⁸⁻³⁰, finden sich auch immer mehr Fallstudien zu erfolgreich durchgeführten Fragment-basierten Screenings (engl.: *Fragment-Based Screening*, FBS) in der Literatur wieder.³¹⁻³² Diese Methoden haben sich nicht nur als nützliche Ergänzungstechnologien in der industriellen Forschung bewährt, sondern stellen auch aufgrund der niedrigen Laufzeitkosten und der breiten Verfügbarkeit verwendeter Assay-Methoden attraktive Primärscreening-Verfahren für die akademische Forschung dar.

1.2 Fragmentbasierte Wirkstoffforschung im Fokus moderner Arzneimittelforschung

Bis in die späten 1990er Jahre wurde neue chemische Materie vor allem durch konventionelle Hochdurchsatzverfahren identifiziert.³³ Die Optimierung der jeweiligen *Hit*-Strukturen zu neuen Leitstrukturen war häufig jedoch mit hohen Kosten- und Zeitaufwand verbunden oder führte aufgrund von suboptimalen physikochemischen Gegebenheiten nicht selten zum Misserfolg.³⁴ Erst die Demonstration des Konzepts *SAR by NMR*, welches durch eine Forschungsgruppe um STEPHEN W. FESIK bei ABBOTTLABORATORIES ausgearbeitet wurde, legte die Möglichkeit offen, auf Grundlage von NMR-Experimenten kleine, für bestimmte Proteintaschen optimierte Molekülfragmente sequentiell zu hochaffinen Liganden auszubauen und markierte somit den Startpunkt fragmentbasierter Wirkstoffforschung (engl.: *Fragment-Based Drug Discovery*, FBDD) (siehe Abbildung 2a).³⁵

In den Folgejahren wurde dieses Konzept durch die Einführung weiterer biophysikalischer Messmethoden, wie die Massenspektrometrie, die isothermale Titrationskalorimetrie oder auch der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, zwar einem breiteren Anwenderkreis zugänglich gemacht, doch erst mit der stärker betonten Implementierung der Röntgenkristallographie als primäre bzw. in vielen Fällen auch ergänzende Screeningtechnologie, steigerte sich merklich das Interesse in der akademischen und industriellen Forschung. So zeigten ROMASANTA *et al.* in einer 3642 Publikationen umfassenden bibliometrischen Schlagwortanalyse.³⁶ dass die Verwendung des Begriffes „Röntgenkristallographie“ im Kontext von FBDD innerhalb von 20 Jahren mit weniger als 100 Vorkommnissen auf fast 500 Vorkommnisse in den Jahren 2011-2016 eine starke Zunahme erfuhr (siehe Abbildung 2b). Seit dem Jahrtausendwechsel scheint sich die Zahl dieser Vorkommnisse alle 4 Jahre zudem zu verdoppeln.

Interessanterweise zeigt Abbildung 2c auf, dass sich in den selben Zeitraum aber auch eine deutlich stärkere Zuwendung der industriellen Forschung zum Einsatz fragmentbasierter Verfahren abzeichnet.

Während von 1996 bis 2000 lediglich ein großes Pharmaunternehmen mehr als 10 Publikationen zum Thema FBDD veröffentlichte, waren es vier Jahre später bereits sieben Unternehmen.

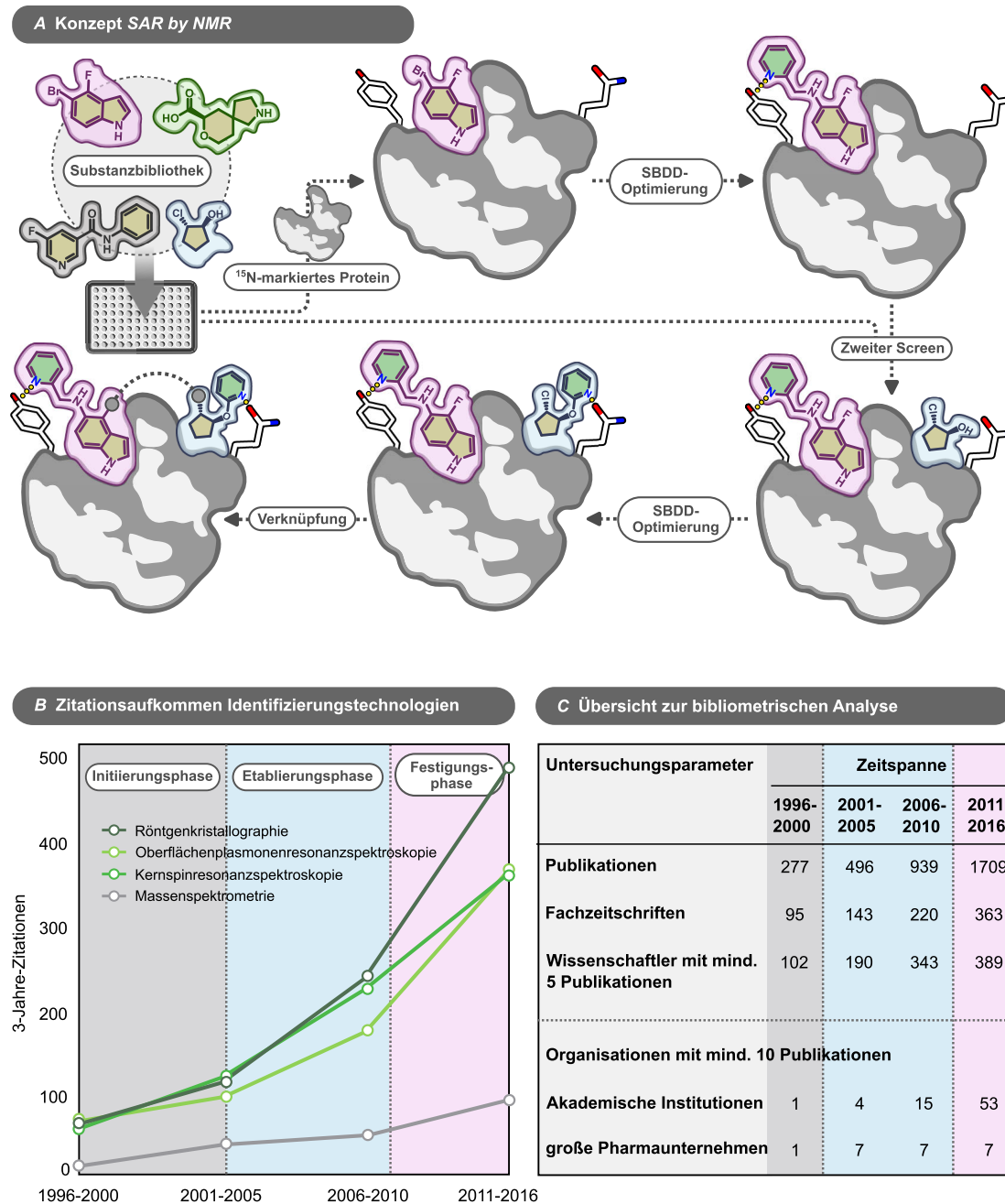


Abbildung 2 | Geschichtlicher Abriss zur Etablierung von FBDD in der modernen Arzneimittelforschung. (A) Visualisierung des bei ABBOTT LABORATORIES entwickelten Konzeptes *SAR by NMR*. Die dazugehörige, aus dem Jahre 1996 stammende Publikation von SHUKER *et al.* legte erstmalig offen, wie kleine, niederaffine Fragmente über wenige Optimierungsschritte hinweg in potente Inhibitoren für verschiedene Proteine ausgebaut werden können.³⁵ Als *Screening*-Technologie fungierte ein Kernspinresonanzspektroskopie-Verfahren, das auf der ¹⁵N-Markierung von Proteinen basiert. Die initial-identifizierten Fragmente wurden per *Fragment Growing* bzw. im letzten Schritt per *Fragment Linking* zu hochaffinen Liganden verknüpft. (B) Übersicht zum Zitationsaufkommen verschiedener Identifizierungstechnologien im Bereich des FBDD von 1996 bis 2016 (basierend auf ROMASANTA *et al.*)³⁶. Das Diagramm zeigt, dass sich ab Mitte der 2000er Jahren die Röntgenstrukturanalyse als die meist-zitierte Screening-Technologie etabliert hat. (C) Die Bibliometrische Analyse nach ROMASANTA *et al.* hebt die starke Fokussierung auf FBDD-Ansätze in den letzten Jahren hervor.³⁶

Mit zunehmender Zahl an berichteten Vorkommnissen von Röntgenkristallographie wandte sich zudem auch das universitäre Umfeld immer stärker diesem Wissenschaftsfeld zu, sodass im Jahre 2016 bereits 53 unterschiedliche akademische Institutionen Forschung in diesem Bereich vorantrieben (siehe Abbildung 2c).

Angesichts dieser Zahlen ist es nicht weiter verwunderlich, dass FBS zusammen mit HTS mittlerweile in 40% aller Arzneimittelentwicklungskampagnen als primäre Screening-Methoden Anwendung finden.³⁷ Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten daher sieben, aus fragmentbasiertem Wirkstoffdesign abgeleitete Wirkstoffe durch die U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) zugelassen werden. Es ist zudem anzunehmen, dass sich dieser Trend durch zunehmende Einbindung automatisierter Verfahren sowie die Einbeziehung künstlicher Intelligenz in den nächsten Jahren weiterhin positiv fortsetzen wird.^{16, 38-39}

1.3 Möglichkeiten zu Synergien? HTS-geleitete Wirkstoffforschung und FBDD als komplementäre Werkzeuge in der Wirkstoffidentifizierung

Insbesondere das Spannungsfeld zwischen FBS- und HTS-geleiteter Wirkstoffforschung hat in den letzten Jahrzehnten regelrechte Grundsatzdiskussionen innerhalb der naturwissenschaftlichen Gemeinschaft ausgelöst. Obgleich sich zahlreiche Beispiele in der Literatur wiederfinden, in denen beide Technologien als konkurrierende Ansätze gegenübergestellt werden⁴⁰⁻⁴², so stellt sich in den letzten Jahren innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft der Konsens ein, dass sich je nach Anwendungsbereich beide Strategien sinnvoll ergänzen können.⁴³⁻⁴⁵ Professor GYÖRGY MIKLÓS KESERŰ äußerte sich diesbezüglich in einem Interview im Jahr 2020 folgendermaßen:

“Although fragment screening was often used as a ‘backup’, for targets without HTS hits, nowadays fragment screening and HTS are applied in parallel. FBDD approaches might help to characterize the druggability of the target and identify structural moieties that are confirmed by HTS. This would contribute to the prioritization and more effective optimization of HTS hits.”⁴²

Der nachfolgende Abschnitt zielt darauf ab, die von Prof. KESERŰ angesprochene synergistische Beziehung beider Verfahrensweisen durch die detaillierte Darstellung ihrer zugrundeliegenden Charakteristika und Differentiatoren in Bezug auf die molekulare Landschaft der jeweilig gescreenten Substanzbibliotheken darzustellen.

1.3.1 Differenziatoren im Zuge des Designprozesses von HTS- und FBS-Bibliotheken

Um die Unterschiede zwischen FBS und HTS genauer zu verstehen, muss zunächst ein Blick auf die Designkonzepte der Substanzbibliotheken der 1990er Jahre geworfen werden. Wie in Abschnitt 1.2 bereits erwähnt, wurden diese in den Anfängen größtenteils durch die Anwendung kombinatorischer Synthesen generiert. Die Folge dieses Vorgehens war, dass nur ein sehr begrenzter chemischer Raum innerhalb dieser Substanzsammlungen abgedeckt wurde und die Moleküle aufgrund des hohen Molekulargewichts sowie des hohen Anteils an Kohlenstoffatomen eher unvorteilhafte physikochemische Eigenschaften für weiterführende Optimierungen boten.⁴⁵⁻⁴⁷

Die Abwesenheit von allgemeingültigen Kriterien, die eine perorale Bioverfügbarkeit bei verschiedenen Substanzklassen abschätzen konnten, nahmen Wissenschaftler wie LIPINSKI⁴⁸, OPREA⁴⁹ oder RISHTON⁵⁰ zum Anlass, empirische Regelwerke zu erstellen, welche molekulare Eigenschaften mit dem Auftreten erwünschter bzw. unerwünschter physikochemischer Eigenschaften korrelierten. Die allgemein hin als *Rule of Five* bekannte Daumenregel wird auch heute noch von vielen Medizinalchemikern als oberstes Credo zur Beurteilung der peroralen Bioverfügbarkeit herangezogen. Allerdings warnen zahlreiche Wissenschaftler auch vor einer Überbewertung der ermittelten Kriterien, da diese lediglich einer Analyse der statistischen Verteilung verschiedener Parameter entstammen und somit nur bedingt repräsentativ sind.⁵¹⁻⁵³ LIPINSKIS Erkenntnisse führten jedoch unter Einbezug von Hochdurchsatz-Toxizitäts- und ADME-Profilierungen in der Folge zur Entwicklung prädiktiver *in silico*-Modelle, die die Vorfiltrierung bestimmter Synthesekandidaten bereits im Zuge des eigentlichen Designprozesses der Bibliothek ermöglichten.

Es lässt sich somit festhalten, dass moderne HTS-Bibliotheken aufgrund der geschichtlichen Entwicklung empirischer Richtwerte, vor allem chemische Materie beinhalten, die dem Ideal Leitstruktur-ähnlicher Verbindungen folgen.^{45, 54-55}

Diesem Umstand geschuldet, weisen identifizierte *Hits* aus solch einer Substanzsammlung zwar durchaus zufriedenstellende Affinitäten gegenüber bestimmten *Targets* auf, stellen jedoch aufgrund ihres relativ hohen Molekulargewichts eine suboptimale Ausgangslage für weiterführende Optimierungsvorhaben dar.³⁴ Zwar mag diese Eigenschaft für sogenannte *Repurposing*-Ansätze als unerheblich erscheinen, jedoch stellt sie sich beispielsweise beim Ausbau eines moderat-affinen *Hits* zu einer hochpotenten Leitstruktur als problematisch dar (siehe Abbildung 3).

Im Gegensatz dazu weisen Fragmente eine derart kleine räumliche Ausdehnung auf, dass sie auch in kleineren Taschen einer Proteinumgebung optimal binden können (vgl. Abbildung 3).

Sie sind im Gegensatz zu typischen Leitstruktur-ähnlichen Verbindungen eher durch kleine Molekulargewichte und damit auch durch moderate bis geringe K_I - oder K_D -Werte im mikro- bis millimolaren Bereich charakterisiert.^{41, 56-58} Letztere Eigenschaft führt zur Notwendigkeit besonders sensibler Messmethoden zur Affinitätsbestimmung.

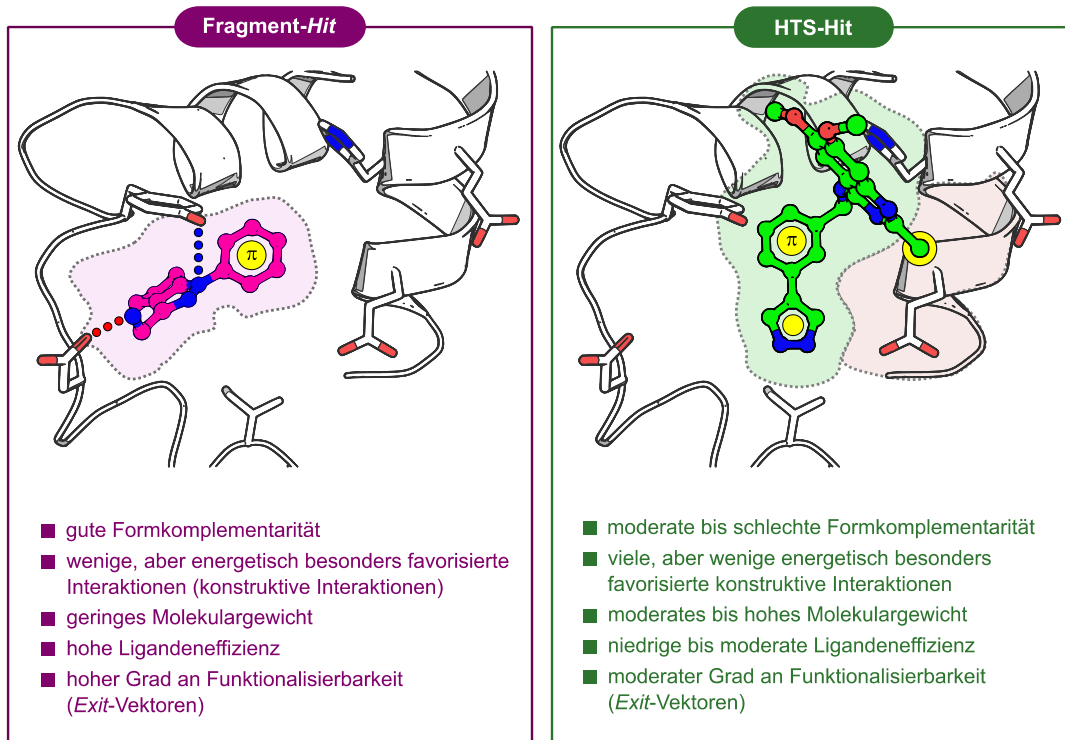


Abbildung 3 | Vergleichende Gegenüberstellung eines idealtypischen Fragment- und HTS-Hits. Die Bindepose des Fragments offenbart eine gute Formkomplementarität (siehe die magenta-gefärbte Fläche), begleitet von hochwertigen Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen (rote Punkte), Salzbrücken (blaue Punkte) oder π - π -Wechselwirkungen (gelber Kreis mit π) mit den Aminosäuren des Proteinrückgrats. Da bei dieser Bindsituation nahezu alle Atome des Fragments effektiv zum Bindungsereignis beitragen, entstehen dabei konservierte Interaktionsmuster. Im Gegensatz dazu binden die meisten HTS-typischen Moleküle unter Bildung weniger attraktiver Wechselwirkungen, wie zum Beispiel hydrophobe Interaktionen (gelber Kreis), und neigen aufgrund ihres deutlich größeren Molekularvolumens zu einer weniger gut ausgeprägten Formkomplementarität (grüne Fläche). Als Resultat ergeben sich daraus Regionen innerhalb des Proteins, die nicht optimal adressiert werden (rote Fläche).

Während beim HTS vorrangig spektrophotometrische oder fluoreszenzbasierte Testsysteme zum Einsatz kommen, benötigen FBS deutlich differenziertere biochemische Messmethoden, wie beispielsweise den *Thermofluor-Assay*, NMR oder Röntgenkristallographie.^{41, 44, 59-62}

Die Gründe für das Auftreten der geringeren Affinitäten bei fragmentbasierten Ansätzen wurden in den letzten Jahren zunehmend kritisch diskutiert.^{32, 41, 56} Zahlreiche Wissenschaftler konstatieren, dass die klassischen Affinitätsparameter, wie K_I , K_D - oder IC_{50} -Werte, die Bindsituation für Fragmente nur unzureichend charakterisieren können. Anstelle der Akkumulation unterschiedlichster Protein-Ligand-Wechselwirkungen über das gesamte Bindetaschenvolumen hinweg, steht bei Fragmenten vor allem die Fähigkeit im Vordergrund, wie effizient diese ihre Atome zur Bindung in kleineren Arealen des Proteins zur Verfügung stellen können.⁵⁶

Ein Parameter, der diese Eigenschaft deutlich besser widerspiegelt, ist die sogenannte Ligandeneffizienz (LE). Diese ist definiert als Quotient zwischen der Bindungsaffinität bzw. freien Gibbs-Energie ΔG sowie der Anzahl an Schweratomen n_{SA} und lässt sich nach Gleichung (1) wie folgt berechnen:

$$LE = \frac{\Delta G}{n_{SA}} \quad (1)$$

Die LE setzt die gemessene Potenz eines Moleküls in Relation zu seiner Größe und liefert deshalb bessere Informationen darüber, wie effizient ein Ligand auch in kleineren Bereichen eines Proteins binden kann. In der Tat weisen die meisten Fragment-*Hits* im Vergleich zu typischen HTS-*Hits* zwar deutlich geringere Affinitäten zu den jeweiligen *Targets* auf, ihre berechnete LE liegt in der Regel jedoch deutlich höher.^{56,63}

Dies liegt unter anderem daran, dass Fragmente vor allem hochwertige Interaktionen eingehen und aufgrund ihrer geringeren Größe weniger Schweratome besitzen, die mit der Proteinoberfläche interagieren können. Diese Eigenschaft ermöglicht zudem die Identifizierung von allosterischen Bindetaschen oder *Hot Spot*-Regionen, die mit konventionellen HTS-Molekülen schwer oder gar nicht zugänglich wären.⁶⁴⁻⁶⁶

In Anbetracht dieser unterschiedlichen Bindsituationen lässt sich als ein wesentlicher Differenziator zwischen beiden Verfahren festhalten, dass beim HTS-basierten Wirkstoffdesign die frühe Phase der Wirkstoffentwicklung primär potenzgetrieben ist, während bei der FBDD eine ideale Anpassung kleiner Liganden an bestimmte Bindetaschen im Vordergrund steht.^{41,45} Erst in späteren Phasen werden bindungsoptimierte Fragmente durch unterschiedliche Verbrückungs- oder Weiterentwicklungsstrategien wie beispielsweise *Fragment Linking*, *Fragment Merging* oder *Fragment Growing* miteinander verknüpft oder aber auf der Grundlage rationaler Designstrategien weiter funktionalisiert, um eine höhere Potenz gegenüber entsprechenden *Targets* zu generieren.⁶⁷⁻⁶⁸ Beim HTS-getriebenen Wirkstoffdesign gleicht die Phase der Leitstruktur-generierung hingegen einem zirkulären iterativen Prozess. Der initiale *Hit* wird durch rationale Ansätze sukzessive in einen maßgeschneiderten Inhibitor überführt (vgl. Abbildung 4).⁶⁹ Dieses Vorgehen ist mit hohem Zeit- und Kostenaufwand verbunden, da eine optimale Einpassung eines Liganden über mehrere Zyklen hinweg erschlossen werden muss und aufgrund suboptimaler physikochemischer Eigenschaften, unvorteilhafter Toxizitätsprofile oder der mangelnden Translation von biochemischer und zellulärer Aktivität in klinische Wirksamkeit in mehr als 90% aller Fälle von Misserfolg geprägt ist.⁷⁰⁻⁷³

Im Vergleich dazu bietet der eher linear verlaufende Prozess des FBDDs gerade für akademische Forschungsgruppen attraktive Möglichkeiten.⁷⁴

So existieren in den meisten Universitäten und Instituten bereits etablierte Infrastrukturen für die Durchführung von NMR-spektroskopischen oder röntgenkristallographischen Experimenten und erfordern daher keine weiteren kostspieligen Investitionen in Gerätschaften. Zudem konnte der lange Zeit als limitierender Faktor geltende Umstand geringer Durchsatzraten bei kristallographischen Untersuchungen in den letzten Jahren durch die Entwicklung innovativer Softwarelösungen wie CRIMS und XCHEMEXPLORER im Wesentlichen ausgeräumt werden.^{40, 75-}
⁷⁶ Im Zusammenhang mit dem mittlerweile auch in kleineren Institutionen voranschreitenden Einzug der Laborautomation⁷⁷⁻⁷⁸ durch die Entwicklung kostengünstiger Pipettierroboter und *Auto Sampler* sowie die Möglichkeit der nahtlosen Integration dieser in Automatisierungssoftwares und *Machine Learning*-Algorithmen konnten in den letzten Jahren hochdurchsatzfähige Röntgenkristallographie-Untersuchungen sowie NMR-*Screenings* wesentlich erleichtert und benutzerfreundlicher gestaltet werden.

1.3.2 Potential für akademische Wirkstoffforschung: FBS ermöglicht höhere Hitraten durch Minimierung des zu durchsuchenden chemischen Raums

HTS-Bibliotheken enthalten aufgrund ihres Anwendungszwecks vor allem Moleküle mit vielen Schweratomen. Eine nicht fokussierte Substanzbibliothek kann bis zu 10^6 Moleküle unterschiedlichster Art enthalten, um einen maximalen Raum biologischer Aktivität abdecken zu können (siehe Abbildung 4). Die Größe der Moleküle korreliert dabei automatisch mit der Anzahl der kombinatorischen Möglichkeiten, Atome untereinander anzuordnen und miteinander zu verknüpfen. HTS-Bibliotheken spannen daher einen extrem großen chemischen Raum auf, der nur durch den Einsatz automatisierter Messverfahren effizient durchsucht werden kann.⁷⁹

Fragmente weisen dagegen mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 150-200 g mol⁻¹ eine geringe Molekülgröße und deutlich weniger atomare Verknüpfungspunkte auf. Da ihr aufgespannter chemischer Raum dadurch ebenfalls begrenzt ist, werden Bibliotheken mit lediglich 10^3 Molekülen für eine effiziente Durchsuchung benötigt. Darüber hinaus ist durch die geringe räumliche Ausdehnung der einzelnen Moleküle die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten sterischer Repulsionen so stark erniedrigt, dass zu einem hohen Maße komplementäre Bindungsereignisse stattfinden können.

Infolgedessen weisen FBS häufig höhere Trefferquoten als konventionelle HTS auf und stellen damit gleichermaßen interessante Voraussetzungen für die akademische wie auch industrielle Wirkstoffforschung bereit.⁸⁰⁻⁸¹

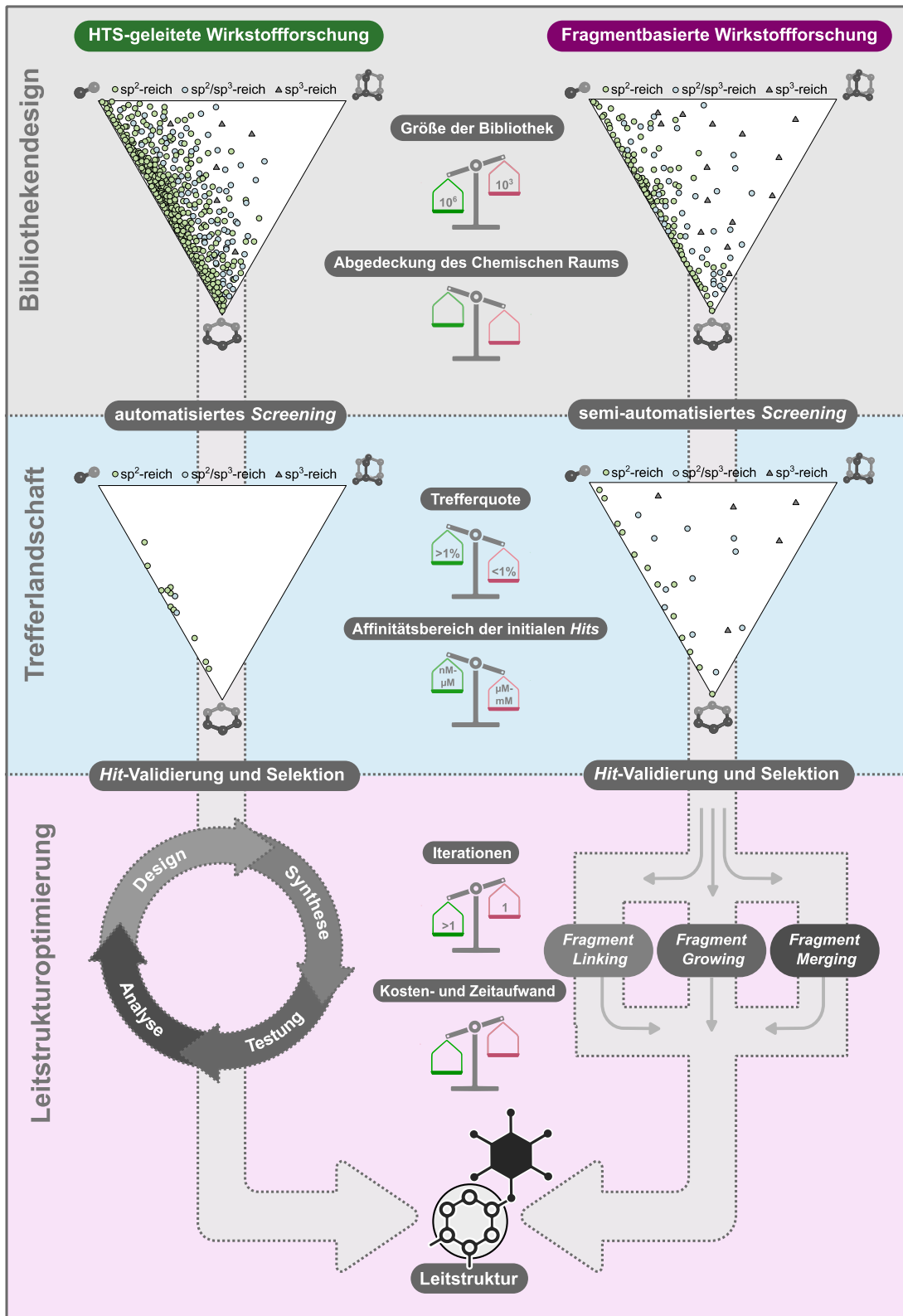


Abbildung 4 | Gegenüberstellung von HTS-geleiteten und fragmentbasiertem Wirkstoffdesign. Die Initialphase beim HTS-getriebenen Wirkstoffdesign ist in der Regel durch ein vollautomatisiertes Screeningverfahren von sehr großen Substanzbibliotheken (bis zu 10^6 Moleküle) geprägt, während beim FBDD kleinere Substanzbibliotheken (bis zu 10^3 Moleküle) durch semi-automatisierte Verfahren wie Röntgenkristallographie oder NMR getestet werden. Die erhaltenen *Hits* werden anschließend entweder in einem iterativen oder aber einem linearen Prozess zu entsprechenden Leitstrukturen ausgebaut.

1.3.3 Designprinzipien diktieren die Auswahl des chemischen Raums und molekulare Eigenschaften in Substanzbibliotheken

Die grundlegenden Unterschiede in Bezug auf die Detektion von HTS- und FBS-Hits bedingen unmittelbar auch die Notwendigkeit, unterschiedliche Anforderungsprofile für die jeweiligen Verbindungen zu definieren. So sind für die Durchführung von spektrophotometrischen oder fluoreszenzbasierten *Assays* weniger stark konzentrierte Stammlösungen im mikromolaren Bereich ausreichend, während kristallographische oder NMR-basierte Screeningverfahren aufgrund der intrinsisch niedrigen Potenz der entsprechenden Fragmente deutlich konzentriertere Stammlösungen im oberen millimolaren Bereich erfordern.⁸²⁻⁸³

Diesbezüglich finden sich in der Literatur auch Berichte darüber, dass ein erhöhter Anteil des für die meisten biochemischen Assays verwendeten Lösemittels Dimethylsulfoxid (DMSO) zum Kollaps von Kristallgittern oder zu einer kompetitiven Bindung mit dem Fragment führen kann. Zur Vermeidung solcher Ereignisse wird daher häufig zur Verwendung wässriger Stammlösungen für Fragmente geraten.⁸²

Neben der hohen Löslichkeit von Fragmenten in solchen polaren Lösemitteln ist unter anderem aber auch eine umfassende Funktionalisierbarkeit der identifizierten Hits von zentraler Bedeutung beim FBDD. Die geringe Potenz der meisten Fragmente erfordert deren Weiterentwicklung in hochaffine Liganden in der Phase der Leitstrukturgenerierung. Dazu sind ausreichend chemisch funktionalisierbare Gruppen erforderlich, die als *Exit*-Vektoren möglichst breit über die gesamte Moleküloberfläche verteilt sein sollten.⁸⁴⁻⁸⁶

Dieses Anforderungsspektrum legt ein idealtypisches Prototypen-Profil fest, das aus medizinisch-chemischer Sicht jedoch nicht gänzlich unproblematisch ist. Die Synthese kleiner, polarer Moleküle mit einem hohen Grad an Heteroatomen und modifizierbaren Funktionalitäten ist aus synthesesetechnischer Sicht nicht trivial. Die meisten veröffentlichten Synthesemethoden sind nur für einen sehr begrenzten Substratbereich ausgelegt und tolerieren nur wenige Änderungen in Bezug auf das Lösungsmittel, das Temperaturprofil und die Wahl der reaktiven Substrate.⁸⁷

Erschwerend kommt hinzu, dass aufgrund des vorherrschenden Publikationsdrucks umfangreiche Analysen bezüglich der Toleranz funktioneller Gruppen häufig nicht durchgeführt und damit häufig nur Möglichkeiten, aber selten Limitationen von Synthesetechniken offengelegt werden. Die Auswahl geeigneter Reaktionen ist somit in zahlreichen Fällen auf bereits etablierte Methoden beschränkt, weshalb zunehmend ein Verarmungsprozess im Bereich der Inklusion neuer innovativer Synthesetechniken feststellbar ist.⁸⁸⁻⁹¹

Weiterhin stellt sich auch die Extraktion und Aufreinigung von kleinen und wasserlöslichen Molekülen als herausfordernd dar.

So müssen häufig alternative Techniken zu den klassischen Verfahren der Flüssig-Flüssig-Extraktion bzw. der klassischen Normalphasen-Chromatographie genutzt werden, die unter anderem spezielle Geräte zur Durchführung oder aber besondere Expertise benötigen.⁸⁸

Das Design von Fragmentbibliotheken gestaltet sich aufgrund dieser speziellen Anforderungen als komplex und profitiert daher auch - wie die meisten HTS-Bibliotheken - von der Einbindung computerchemischer Verfahren für eine zielgerichtete Vorfilterung potenzieller Synthesekandidaten. Neben der Inklusion der *Rule of Three* haben sich diesbezüglich auch der ELI LILLY-Filterkatalog als ein probates Mittel zur Aussortierung unerwünschter molekularer und physikochemischer Eigenschaften erwiesen.^{57, 92}

1.3.4 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign als synergistisches Bindeglied zwischen FBDD und HTS-gestützter Wirkstoffforschung

Trotz zahlreicher Unterschiede im Designkonzept, den Anforderungsprofilen an die molekularen Eigenschaften der jeweiligen Substanzvertreter und den verwendeten biophysikalischen Messmethoden zur Affinitätsbestimmung findet sich in der Literatur eine Vielzahl von Fallstudien, die den Einsatz des strukturbasierten Wirkstoffdesigns als synergetisches Bindeglied zwischen FBDD und HTS-gestützter Wirkstoffforschung hervorheben.^{44, 93} Die Implementierung spektroskopischer Strukturaufklärungsmethoden kann dabei den gesamten Prozess der Wirkstoffentwicklung zeit- und kosteneffizienter gestalten und wichtige Erkenntnisse für die gezielte Hemmung eines bestimmten Targets liefern.

Konventionelle Methoden der Wirkstoffidentifizierung basieren auf dem Konzept der klassischen oder vorwärtsgerichteten Pharmakologie. Dabei werden Substanzbibliotheken in Organismen oder Modellen intakter Zelllinien getestet, um Verbindungen zu identifizieren, die eine Veränderung des Phänotyps begünstigen und damit die gewünschte therapeutische Wirkung erzielen. Die Validierung des eigentlichen *Targets* erfolgt jedoch erst nach der Hit-Identifizierung, z. B. durch chemoproteomische Experimente (vgl. Abbildung 5).⁹⁴

Im Falle der reversen Pharmakologie steht die frühzeitige Identifizierung der krankheitsauslösenden Proteine im Mittelpunkt des Entwicklungsprozesses. Mit der Erschließung potenzieller Targets können die Folgeschritte innerhalb der Wirkstoffentwicklungskaskade, beispielsweise durch die Einbeziehung dreidimensionaler Strukturinformationen, beschleunigt und effizienter gestaltet werden.⁹⁵

Vorab durchgeführte Bindetaschenanalysen liefern wichtige Informationen über die Topologie, Form und Aminosäureumgebung des aktiven Zentrums, aus denen vorteilhafte Interaktionsmuster potenzieller Liganden abgeleitet werden können.

Ein solches Modell kann anschließend dazu genutzt werden, große Substanzbibliotheken auf einen bestimmten pharmakophoren Raum zu fokussieren und damit die Trefferquoten im Screeningverfahren zu verbessern (vgl. Abbildung 5).⁹⁶⁻⁹⁷

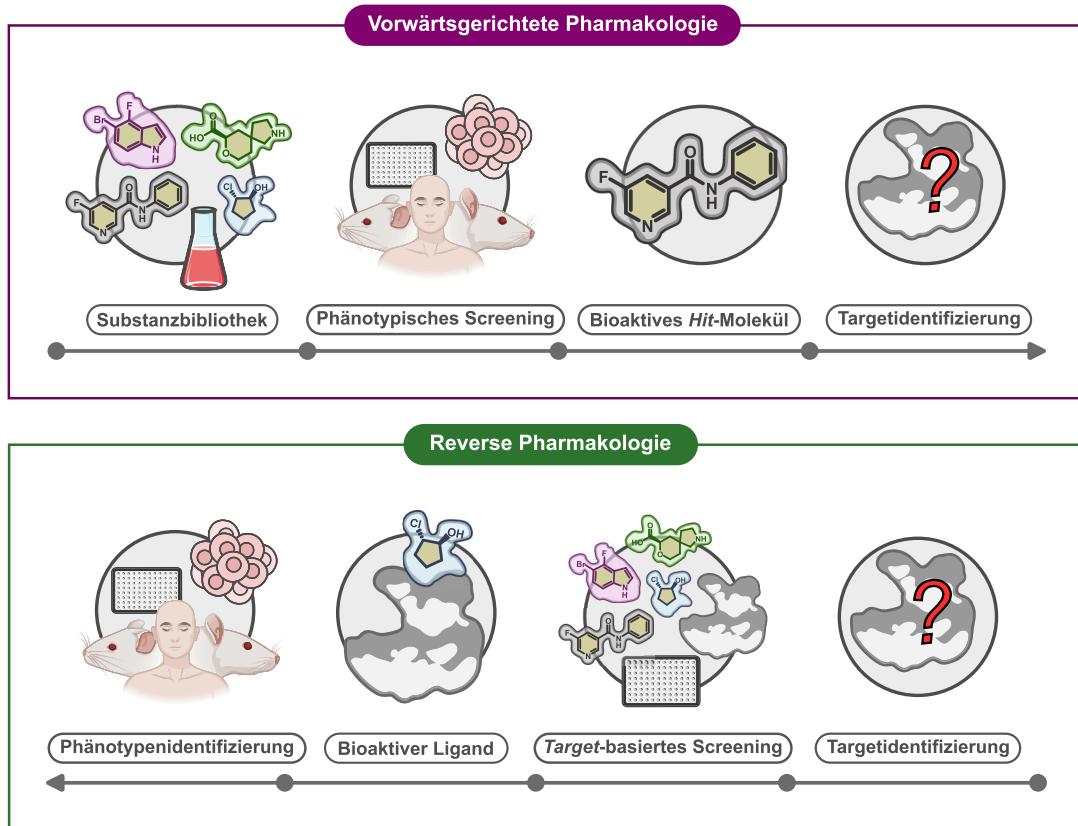


Abbildung 5 | Vergleichende Übersicht zu der klassischen und reversen Pharmakologie. Bis in die 1950er Jahre folgte der Wirkstoffentwicklungsprozess vorrangig dem Ablauf der vorwärtsgerichteten (auch: klassische oder phänotypische) Pharmakologie. Dabei wurden Substanzbibliotheken, bestehend aus Naturstoffen aus Pflanzenextrakten oder ähnliches in funktionellen *Screenings in vivo* getestet. Erst nach der Identifizierung bioaktiver Substanzen wurden nähere Untersuchungen zur Targetidentifizierung durchgeführt. Durch das HUMAN GENOME PROJECT konnten in den 1990er Jahren vermehrt Informationen zu relevanten Zielproteinen gesammelt werden. Diese beeinflussten den Ablauf der Wirkstoffentwicklungskaskade, indem nun vermehrt das Konzept der reversen Pharmakologie angewandt wurde. Bei der reversen (auch: *Target*-basierte) Pharmakologie steht die Targetidentifizierung am Anfang des Entwicklungsprozesses. Erst nach Identifizierung bioaktiver Liganden erfolgt auch eine *in vivo*-Profilierung (basierend auf ZIMMERMANN *et al.*⁹⁸ und ATANASOV *et al.*⁹⁹).

Auch wenn die reverse Pharmakologie in vielen Bereichen des FBDDs und der hochdurchsatzgesteuerten Wirkstoffforschung die klassische Pharmakologie abgelöst hat,⁹⁷ ist es für bestimmte Fragestellungen sinnvoll, eine kombinierte Strategie aus beiden Ansätzen zu verfolgen. Steht eine Erkrankung beispielsweise in Verbindung mit dem Auftreten zahlreicher Mutationsereignisse (z.B. bei verschiedenen Arten von Krebs oder Viruserkrankungen), die eine umfängliche Hemmung der entsprechenden Mutanten („Pan-Inhibitoren“) erfordern,¹⁰⁰⁻¹⁰² kann sich das Screening einer solchen Vielzahl unterschiedlicher *Targets* als unpraktikabel erweisen.¹⁰³⁻¹⁰⁵

Mit phänotypischen *Screenings* lassen sich in solchen Fällen Substanzbibliotheken auf Patienten-erschlossenen Zelllinien testen.

Die daraus erhaltenen *Hits* können anschließend rational für zuvor bereits identifizierte Zielproteine weiterentwickelt werden.¹⁰³⁻¹⁰⁴ Es besteht somit nicht die Notwendigkeit, große Mengen an Protein der jeweiligen Mutanten für das eigentliche *Screening*-Verfahren zu generieren. Zudem können in dem Schritt der nachfolgenden Leitstrukturgenerierung auch *in silico*-Verfahren, wie die Homologiemodellierung oder neuronale Netzwerke zur Strukturvorhersage, genutzt werden, um dreidimensionale Strukturinformationen zu den einzelnen Mutantenformen auch ohne Vorhandensein der Proteine abzuleiten und somit zielgerichtetes Wirkstoffdesign zu ermöglichen.¹⁰⁶

1.4 *Drug Repurposing* beschleunigt den konventionellen Medikamentenentwicklungsprozesses

Neben der Integration von SBDD in der frühen Phase der Wirkstoffidentifizierung besteht auch die Möglichkeit, durch sogenannte Repositionierungsansätze (engl. *Drug Repurposing*) erhebliche Kosten- und Zeiteinsparungen im Vergleich zu den traditionellen Prozessen der Wirkstoffforschung zu erzielen (siehe Abbildung 6). *Drug Repurposing* bezeichnet ein Konzept, bei dem ein bereits zugelassener Wirkstoff oder ein Wirkstoffkandidat aufgrund seiner polypharmakologischen Eigenschaften in der Lage ist, mehrere Proteine gleichzeitig zu hemmen oder aber aufgrund seiner Wechselwirkung mit dem primären *Target* neue assoziierte Indikationen hervorzurufen. Dieser Umstand bedingt, dass gewisse Wirkstoffe multitherapeutischen Nutzen besitzen und somit für verschiedene Erkrankungen zum Einsatz kommen können.¹⁰⁷⁻¹¹⁰

Grundlegend lässt sich die Repositionierung von Wirkstoffen in drei systematische Ansätze unterteilen (siehe Abbildung 7). Den ersten Ansatz bildet der krankheitszentrierte Ansatz, der sich mit pathologischen Anomalien befasst, für die nur begrenzte oder keine Therapiemöglichkeiten vorhanden sind. Diese werden anschließend mit physiologischen Störzuständen korreliert, die eine ähnliche oder identische Pathogenese aufweisen, jedoch durch bekannte biologisch-aktive Verbindungen bereits Behandlungsoptionen vorweisen.¹¹¹ Ein bekanntes Beispiel für diesen Anwendungsfall stellt das Virostatikum REMDESIVIR dar. Es wurde ursprünglich zur Behandlung von Ebola- und Marburgfieber entwickelt, erhielt jedoch im Zuge der Corona-Pandemie von der FDA die Zulassung zur Behandlung von COVID-19.¹¹²

Der *Target*-zentrierte Ansatz stellt eine komplementäre Strategie zum krankheitszentrierten Ansatz dar, indem er das Auftreten einer neuen medizinischen Indikation mit einem bereits bekannten Zielprotein in Beziehung setzt. Ein Beispiel hierfür ist die konstitutiv aktive Tyrosinkinase ABELSON MURINE LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 1 (ABL1).

Obwohl lange Zeit nur aus dem Bereich der Krebsforschung bekannt, zeigen aktuelle Untersuchungen, dass diese Kinase nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der chronisch-myeloischen Leukämie (CML) spielt, sondern auch als potenziell pathogenes Protein bei MORBUS PARKINSON fungiert.

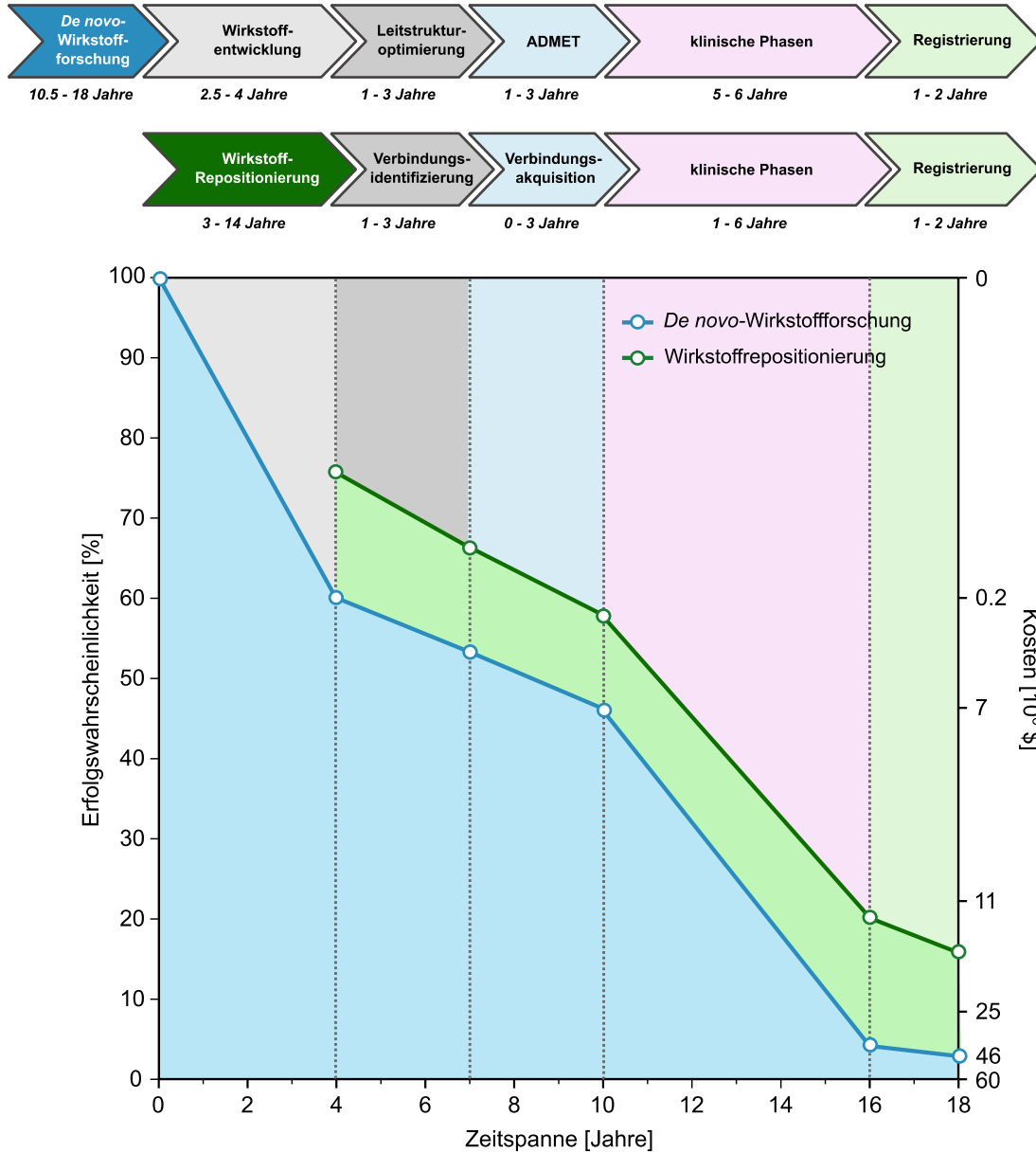


Abbildung 6 | Vergleich zwischen dem konventionellen Ablauf der *De novo*-Wirkstoffforschung und dem verkürzten Entwicklungsprozess beim *Drug Repurposing*. Der herkömmliche Ablauf sieht für die Entwicklung eines marktreifen Medikaments einen fünfstufigen Prozess, bestehend aus der initialen Phase der Wirkstoffentwicklung, der Leitstrukturentwicklung einer präklinischen Phase zur Bestimmung von ADMET-Parametern (Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion und Toxizität), den anschließenden klinischen Phasen und zuletzt der Registrierung des Wirkstoffs, vor. Die Wirkstoffrepositionierung greift hingegen auf bereits zugelassene Wirkstoffe oder gescheiterte Wirkstoffkandidaten zurück, die normalerweise die ersten drei Phasen der konventionellen Entwicklungskaskade bereits durchlaufen haben. Dadurch können die ersten Stadien verkürzt oder ausgelassen werden. Das untere Diagramm zeigt den Zusammenhang zwischen Erfolgswahrscheinlichkeit und Kostenaufwand am Beispiel der Entwicklung von Therapeutika gegen Erkrankungen des zentralen Nervensystems („ZNS-Therapeutika“). Während die allgemeinen Entwicklungskosten für andere Wirkstoffe stark variieren können, ist deren Trendverlauf analog zu dem hier Dargestellten (basierend auf ASHBURN *et al.*¹¹⁴, SPELLICY *et al.*¹¹⁵ und KO¹¹⁶).

Daraus folgt, dass ABL1-Inhibitoren wie NILOTINIB oder IMATINIB wahrscheinlich auch eine Wirksamkeit in Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen aufweisen könnten und damit Möglichkeiten zur Repositionierung bieten.¹¹¹

Im Gegensatz dazu beruht der wirkstoffzentrierte Ansatz auf der Tatsache, dass zahlreiche Wirkstoffe promiskuitiv verschiedene Proteine hemmen können. Vorhersagemodelle deuten darauf hin, dass bis zu 90% aller zugelassenen Medikamente, die nicht als Krebstherapeutika eingesetzt werden, auch für andere Indikationen positive therapeutische Effekte zeigen und damit auch andere Zielproteine adressieren könnten.¹⁰⁷ Die Abschätzung dieser sogenannten potentiellen *Off-Targets* ist somit von höchster Relevanz für die Identifizierung polypharmakologischer chemischer Materie und stellt damit einen zentralen Fokus bei der Etablierung computerchemischer Vorhersagemodelle dar.¹¹³

Da die meisten dieser Ansätze jedoch große Datenmengen generieren, die häufig nur von spezialisierten Chemoinformatikern analysiert und interpretiert werden können, existieren zahlreiche Initiativen zur Konsolidierung solcher Informationen in Datenbanken wie PROMISCIOUS2.0 oder REPURPOSEDB.¹¹⁷⁻¹¹⁸ Die grafisch intuitiv bedienbare Oberfläche bietet dabei auch unerfahrenen Wissenschaftlern die Möglichkeit, Informationen zu Bindetaschenvergleichen oder Sequenzidentitäten schnell und systematisch abzurufen und somit einen Überblick über potenziell repositionierbare Wirkstoffe zu erhalten.

Allen *Drug Repurposing*-Ansätzen liegt stets ein Abwägen zwischen synergistischen Effekten ("vorteilhafte Pharmakologie") und dem Auftreten unerwünschter Nebenwirkungsprofile ("schädliche Pharmakologie") zugrunde.¹¹⁹ Insbesondere bei der Entwicklung von Krebsmedikamenten hat sich der Fokus in den letzten Jahrzehnten jedoch auf die Entwicklung präzisionsmedizinischer Ansätze verschoben, die das Design maßgeschneiderter und selektiver Inhibitoren erfordern.¹²⁰⁻¹²³ Diese Notwendigkeit wird auch durch die inzwischen standardisierte Durchführung von Kinomprofilierungen zur Bewertung des Selektivitätsprofils von Kinaseinhibitoren in den meisten akademischen Wirkstoffprojekten zur Geltung gebracht.¹²⁴⁻¹²⁶

Eine Methodik, die für diesen speziellen Anwendungsbereich attraktive Möglichkeiten bereit hält, ist die strukturbasierte Repositionierung von Wirkstoffen (engl.: *Structure-Based Drug Repurposing*, SBDR). Unter Einbezug der Röntgenkristallographie können im Rahmen des SBDRs rationale Optimierungsstrategien für Wirkstoffe entwickelt werden, die entweder zu einer Erhöhung der Potenz gegenüber dem gewünschten Zielprotein führen oder aber eine Abschwächung der Potenz gegenüber unerwünschten *Off-Targets* begünstigen.

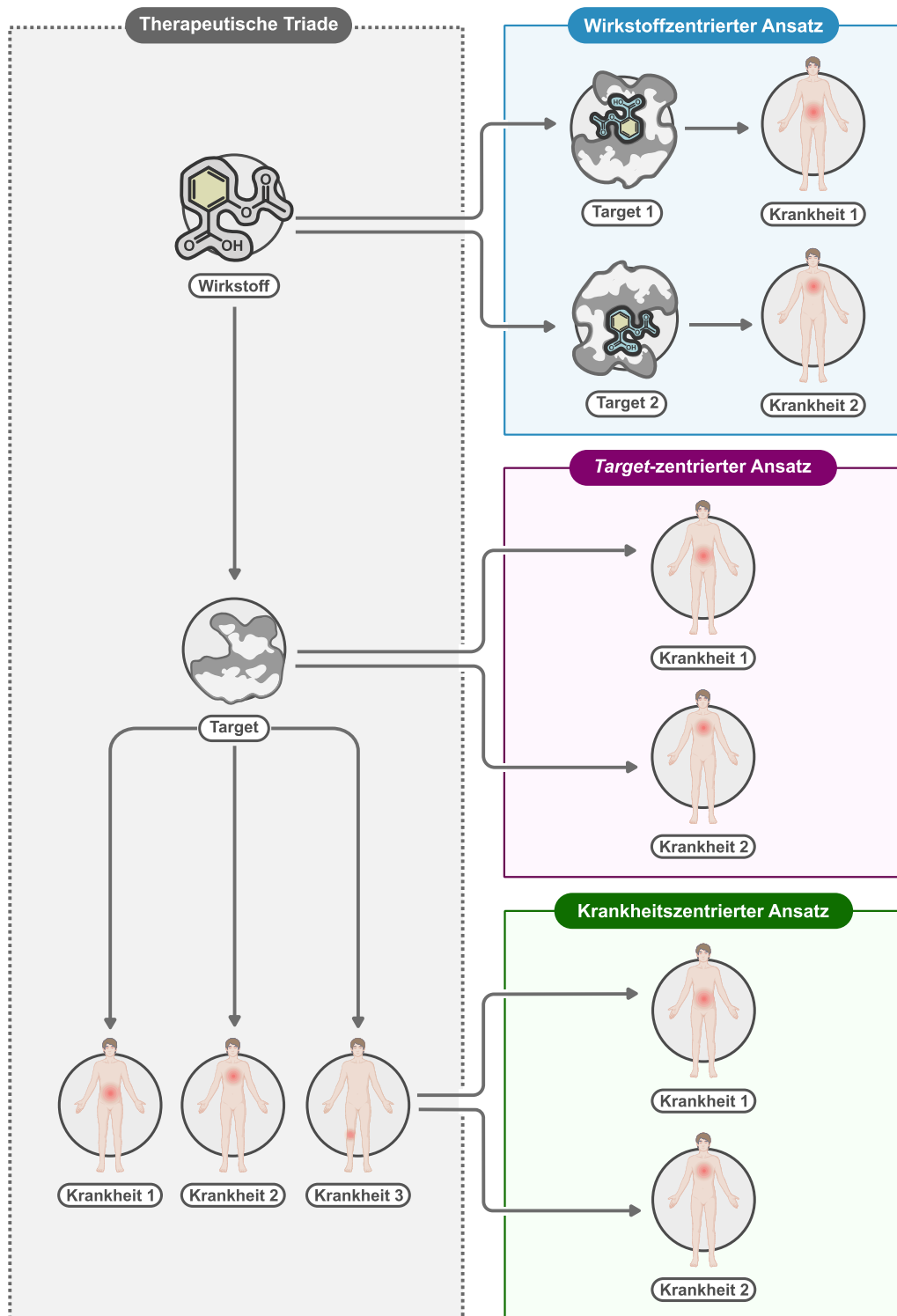


Abbildung 7 | Darstellung der Strategiekonzepte bei der Entwicklung von repositionierten Wirkstoffen. Die Behandlung pathologischer Störungszustände lässt sich im Wesentlichen auf ein einfaches Triaden-Modell zurückführen, in dessen Fokus die Interaktion zwischen einem Wirkstoffmolekül mit einem entsprechenden Zielprotein steht, welches durch eine Überfunktion oder Fehlregulation für die Entstehung verschiedener Krankheiten verantwortlich ist. Die Repositionierung von Wirkstoffen kann daher auf jeder dieser drei Ebenen erfolgen und lässt sich somit in wirkstoffzentrierte, Target-zentrierte und krankheitszentrierte Ansätze unterteilen (basierend auf PARISI *et al.*¹¹¹).

Im Gegensatz zum herkömmlichen zirkulären und iterativen Prozess der Leitstrukturgenerierung beim SBDD steht beim SBDR jedoch nicht die Generierung einer hochpotenten Verbindung durch die Synthese zahlreicher chemisch-diverser Derivate des initialen *Hits* im Vordergrund, sondern vielmehr das Vorhaben, durch Modifizierung vereinzelter Interaktionsmuster grundlegende Eigenschaften wie beispielsweise unerwünschte *Off-Target*-Selektivitäten modulieren zu können.

Der chemische Raum wird dabei durch die repositionierbare Leitstruktur ("repositionierbarer chemischer Raum") vorgegeben und somit deutlich stärker limitiert als bei traditionellen Ansätzen der Wirkstoffidentifizierung.¹²⁷⁻¹²⁹

Aufgrund dieses Umstandes benötigt die Entwicklung einer optimierten SBDR-Leitstruktur in der Regel nur 1-2 Jahre und ist damit fast doppelt so schnell wie bei der klassischen, HTS-getriebenen Wirkstoffforschung.¹³⁰

1.5 Analyse der pharmakokinetischen Eigenschaften bildet eine essentielle Grundlage für die Leitstrukturoptimierung bei SBDR

Statistiken implizieren, dass die Repositionierung von Wirkstoffen von deutlich weniger Ausfallraten bei klinischen Studien geprägt ist. Während Wirkstoffe aus klassischen Identifizierungsverfahren lediglich eine Erfolgsquote von 10% für eine erfolgreiche Marktentwicklung aufweisen, liegt diese Quote bei *Drug Repurposing*-Kampagnen fast dreimal so hoch.¹³¹⁻¹³² Der Grund hierfür lässt sich unter anderem an der Verfügbarkeit klinischer Daten und den bereits optimierten pharmakokinetischen Eigenschaften ableiten, wodurch zahlreiche Risikofaktoren für ein mögliches Scheitern bereits im Vorfeld ausgeschlossen werden können (vgl. Abbildung 6).

Dennoch ergeben sich je nach Art der repositionierbaren Verbindungen verschiedene Schwierigkeiten, die die Effizienz dieser Methodik erheblich limitieren können.¹³³⁻¹³⁴ Grundsätzlich sollte deshalb zunächst einmal zwischen der Repositionierung eines zugelassenen Wirkstoffs und eines in der klinischen Phase gescheiterten Wirkstoffkandidaten unterschieden werden. Je nach Ausgangslage ergeben sich diesbezüglich andere Strategien in der Phase der Leitstrukturoptimierung. Zugelassene Wirkstoffe besitzen in der Regel bereits ideale Eigenschaften bezüglich ihres Pharmakokinetik-Profiles bei gleichzeitig optimalem Risiko-Nutzen-Verhältnis für den Patienten, während gescheiterte Kandidaten in den meisten Fällen der unternehmensinternen Entscheidungspolitik zum Opfer gefallen sind oder ein suboptimales Sicherheitsprofil aufweisen (vgl. Abbildung 8).^{70, 135} Vor allem letzterer Faktor lässt sich häufig auf die Anwesenheit problematischer chemischer Strukturelemente zurückführen und erfordern damit häufig einen Austausch durch beispielsweise bioisostere Gruppen.¹³⁶⁻¹³⁷

In solchen Fällen nimmt die Erschließung umfangreicher Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (engl.: *Structure-Activity Relationship*, SAR) und Struktur-Toxizitäts-Beziehungen (engl.: *Structure-Toxicity Relationship*, STR) einen besonderen Stellenwert bei der Optimierung der entsprechenden Leitstruktur ein.

Von besonderem Interesse ist dabei auch die Abschätzung des Einflusses einzelner Strukturvariationen auf das Pharmakokinetik (PK)- und Pharmakodynamik (PD)-Profil.

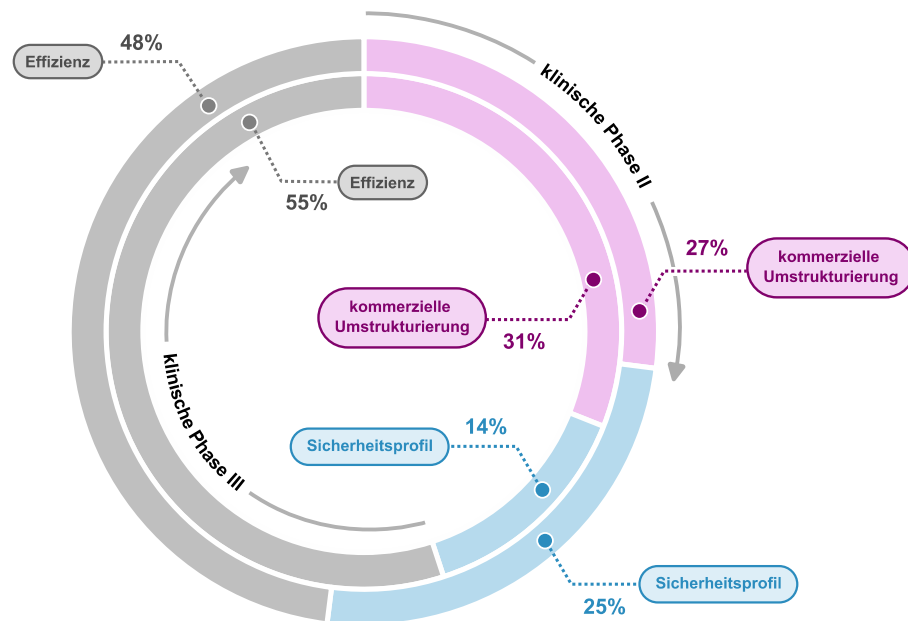


Abbildung 8 | Gründe für das Scheitern von Wirkstoffkandidaten in den klinischen Phasen II und III. Der äußere Kreisring illustriert die relative Häufigkeit der verschiedenen Gründe für das Scheitern von Wirkstoffkandidaten während der klinischen Phase II, während der innere Ring die Verteilung der Gründe für das Scheitern während der Phase III zeigt. In beiden Phasen dominiert mangelnde Effizienz der Verbindungen als Hauptursache für vorzeitige Studienabbrüche. Sicherheitsbedenken sowie strategische oder kommerzielle Umstrukturierungen von Firmen tragen jedoch in der Hälfte aller Fälle ebenfalls zum Scheitern der Marktzulassung bei (basierend auf HARRISON⁷¹).

Waren solche Analysen bis in die 1990er Jahre noch durch Notwendigkeit zur manuellen Durchführung der einzelnen Testmessungen sehr zeitaufwändig, so können in der heutigen Zeit durch die Entwicklung automatisierbarer Testsysteme wie beispielsweise der SOLRANK-*Assay* zur Bestimmung der kinetischen Löslichkeit, der PAMPA-*Assay* zur Beurteilung passiver Transporteigenschaften bei unterschiedlichen pH-Werten oder flüssigchromatographiebasierte Messverfahren zur Bestimmung der chemischen Stabilität und Plasmastabilität eine Vielzahl an Parameterbestimmungen auch im Hochdurchsatzverfahren erfolgen.¹³⁸⁻¹³⁹

Während auf diese Weise problematische physikochemische Eigenschaften (z.B. geringe Löslichkeit in wässrigen Medien, chemische Instabilitäten, schlechte Transporteigenschaften, etc.) zwar relativ verlässlich aufgedeckt werden können, ist die Vorhersage anderer Risikofaktoren jedoch nicht gänzlich unproblematisch.

Insbesondere das Auftreten kardiotoxischer Ereignisse stellt aus Sicht medizinisch-chemischer Bestrebungen ein großes Risiko dar, da solche Nebenwirkungen im Sinne der Nutzen-Risiko-Analyse häufig zur sofortigen Terminierung einer klinischen Studie führen können.¹⁴⁰ Es kommt erschwerend hinzu, dass die genauen Mechanismen zur Entstehung von Wirkstoff-induzierter Kardiotoxizität noch nicht ausreichend verstanden sind, und daher häufig auf eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren, wie beispielsweise eine zu hohe Dosierung des verabreichten Wirkstoffs oder die unerwünschte Hemmung bestimmter Gene in Herzmuskelzellen, zurückgeführt wird.¹⁴¹⁻¹⁴²

Unter den bekanntesten dieser Gene befindet sich auch das Transmembranprotein HUMAN ETHER-À-GO-GO RELATED GENE oder kurz hERG. hERG kodiert die porenbildende Untereinheit des auswärtsgerichteten Kaliumkanals, der aufgrund einer teilweisen Repolarisation durch einen schnellen Kaliumausstrom, das Aktionspotentials des Herzens reguliert und steuert. Bestimmte Pharmaka können jedoch den Ionenstrom durch Bindung an den Kanal blockieren und somit den orchestrierten und koordinierten Ablauf der Hyperpolarisation behindern. Dadurch verlängern sich die QT-Intervalle im Elektrokardiogramm, was lebensbedrohliche Arrhythmien oder sogar den plötzlichen Herzstillstand zur Folge haben kann.¹⁴³⁻¹⁴⁴ Die FDA reagierte bereits im Jahre 2005 auf dieses Erkenntnis mit der Erlassung einer regulatorischen Richtlinie, die die Empfehlung aussprach neue Wirkstoffe auf ihre Inhibitionsfähigkeit bezüglich des hERG-Kanals zu testen. SCHUSTER *et al.* unterstrichen diese Notwendigkeit zudem, indem sie in einer ausführlichen Analyse, das Scheitern klinischer Studien in 90% aller Fälle auf das Auftreten von Hepato- oder Kardiotoxizität zurückführten.¹⁴⁵

Für eine erfolgversprechende Wirkstoffentwicklung ist es daher von zentralem Interesse, bereits in frühen Phasen Testsysteme zur Bestimmung der hERG-Aktivität zu implementieren. Obwohl aufgrund ihres deutlich geringeren Kosten- und Zeitaufwands vorrangig die automatisierbaren fluoreszenzbasierten Polarisationsassays in der Frühphase der Wirkstoffentwicklung Anwendung finden, sind diese als rein prädiktive Testverfahren zu verstehen. Für eine zuverlässige Quantifizierung der hERG-Aktivität ist die Verwendung kostspieliger und aufwändiger *Patch-Clamp*-Technik unerlässlich, da diese die direkte Messung des elektrischen Stromsignals durch den Ionenkanal ermöglicht.¹⁴⁶

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass im Falle einer Repositionierung eines zuvor gescheiterten Wirkstoffkandidaten ein synergistisches Verhältnis zwischen Potenz und Selektivität bei einem insgesamt verbesserten Sicherheitsprofil erzielt werden muss. Damit dieser Kompromiss geschaffen werden kann, müssen durch den Einsatz verschiedener *in vitro*-PK-Verfahren zentrale ADME-Parameter erschlossen und anschließend mit den strukturellen Eigenschaften des Inhibitors korreliert werden.

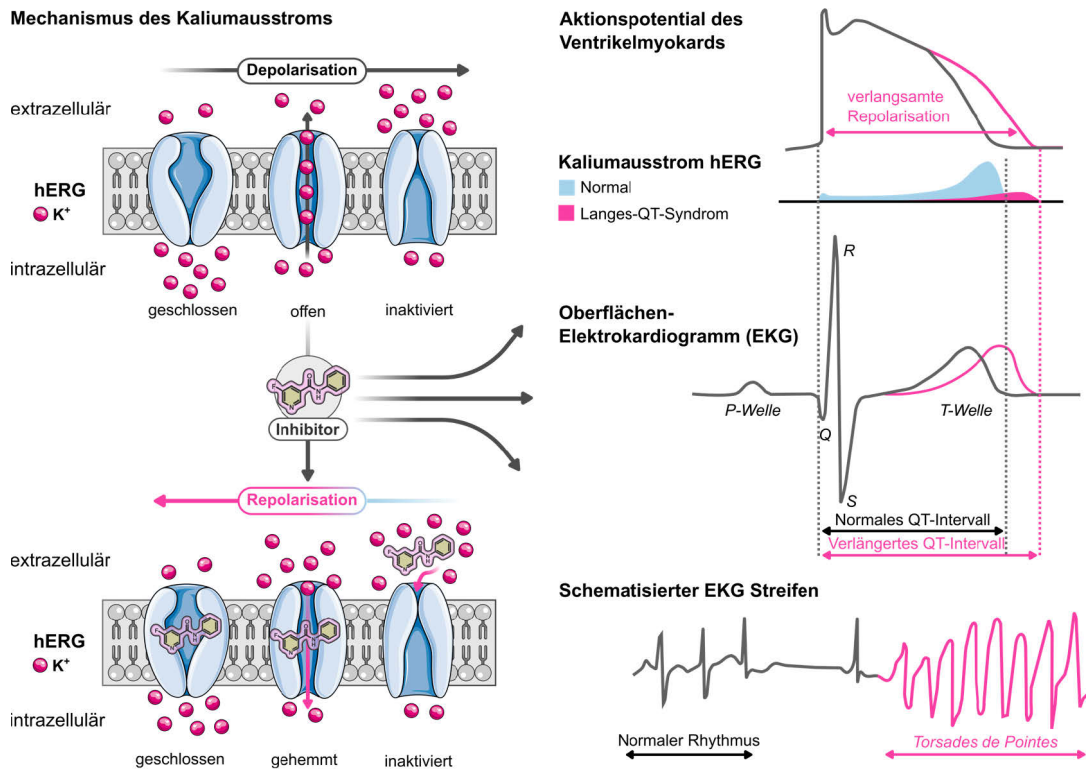


Abbildung 9 | Schematische Darstellung der physiologischen Funktion des hERG-Kanals und Auswirkungen durch eine potentielle Inhibition. Der hERG-Kanal ermöglicht einen orchestrierten Kaliumausstrom, indem er den Überschuss an positiv geladenen Kaliumionen in der Zelle über einen Konzentrationsgradienten in die extrazelluläre Ebene überführt somit für eine Repolarisation (auch Hyperpolarisation genannt) sorgt. Der hERG-Kanal muss für diesen Transport drei unterschiedliche Konformationsänderungen (geschlossen, offen, inaktiviert) eingehen, welche jeweils durch Differenzen bei der auftretenden Transmembranspannung koordiniert werden. Die Depolarisation sorgt für eine Anreicherung positiver Ladungsträger außerhalb der Zelle. Ein potentieller hERG-Inhibitor greift während der Repolarisationsphase ein, indem er den Kanal blockiert und den Kaliumeinstrom verlangsamt. Dies kann dazu führen, dass das QT-Intervall verlängert wird und eine Torsade-Tachykardie auftritt (übernommen aus PARKER *et al.*¹⁴⁷ und angepasst nach SANGUINETTI *et al.*¹⁴⁸).

1.6 SBDR als attraktive Möglichkeit für die Identifizierung von chemischer Materie zur Behandlung von Seltenen Erkrankungen

Seltene Erkrankungen (engl.: *Rare Diseases* oder auch *Orphan Disease*), repräsentieren eine Vielfalt heterogener pathologischer Anomalien, die nur eine geringe Anzahl der Gesamtbevölkerung betrifft. Obwohl jede dieser Störungen individuell betrachtet nur selten vorkommt, leiden weltweit fast 10% der Bevölkerung an mindestens einer der nahezu 8000 seltenen Erkrankungen.^{110, 149} Über zwei Drittel dieser Krankheiten verlaufen chronisch und sind auf genetische Läsionen zurückzuführen. Ihre Verläufe sind daher sehr häufig mit erheblichem Leidensdruck für die Patienten oder einer stark verkürzten Lebenserwartung verbunden.¹¹⁰

Die begrenzte Patientenpopulation und der daraus resultierende Mangel an pathophysiologischen Befunden bedingen gleichzeitig ein hohes finanzielles Risiko bei der Entwicklung wirksamer Therapeutika über die klassischen Methoden der Wirkstoffforschung.

So ist es wenig verwunderlich, dass gerade einmal für 5% aller seltenen Erkrankungen geeignete Wirkstoffe zur Verfügung stehen.¹⁴⁹

In dieser Hinsicht hat sich das SBDR in den letzten Jahren auch für diesen Anwendungsbereich als kosteneffiziente und probate Methode zur Wirkstoffidentifizierung bewährt. Ein herausragendes Beispiel dafür stellt die Repositionierung des Arzneistoffs THALIDOMID dar. Ursprünglich als Schmerz- und Beruhigungsmittel eingeführt, fand THALIDOMID später unter dem Handelsnamen CONTERGAN Anwendung bei der Behandlung von Schwangerschaftsübelkeit – allerdings mit verheerenden Folgen. Aufgrund seiner zunächst unbekanntem teratogenen Wirkung führte die Gabe des Medikaments zu schweren Missbildungen und Beeinträchtigungen in der Wachstumsentwicklung von Föten. Das Bekanntwerden dieses Zusammenhangs führte im November 1961 schließlich zur sofortigen Marktrücknahme und einem langwierigen Prozess gegen das vertreibende deutsche Pharmaunternehmen GRÜNENTHAL.¹⁵⁰

Obwohl dieses Vorkommnis als einer der wahrscheinlich tragischsten Skandale in die jüngere Medizingeschichte einging, wurde der Wirkstoff aufgrund seiner beobachteten antiinflammatorischen, antineoplastischen und antiangiogenetischen Wirksamkeit in den 2000er Jahren als „Arzneimittel für seltene Leiden“ ausgewiesen.¹⁵¹

Im Jahr 2009 erfolgte daraufhin in Deutschland eine Zulassung zur Behandlung des multiplen Myeloms. Neun Jahre später, im Jahr 2018, postulierten SIEVERS *et al.* auf Grundlage eines computergestützten Bindetaschenvergleichs ebenso weitere potenzielle *Targets* von Thalidomid und seinen Derivaten.¹⁵² Unter diesen Zielproteinen befanden sich auch Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Krebs einnehmen und bis zu diesem Zeitpunkt als medikamentös unangreifbar (engl. *undruggable*) galten.

Das Beispiel von Thalidomid legt eindrucksvoll offen, wie polypharmakologische Verbindungen trotz ihres ursprünglich desaströsen Sicherheitsprofils durch kleinere chemische Modifizierungen und Derivatisierung in potentiell sichere Wirkstoffe überführt werden können, die komplett andere Indikationen behandeln. SBDR übernimmt dabei die Aufgabe, gleichermaßen Potenz, Selektivität und PK-Eigenschaften in ein synergistisches Gleichgewicht zu überführen, sodass unerwünschte Nebenwirkungen entweder minimiert oder gänzlich ausgemerzt werden.

1.7 Gastrointestinale Stromatumore: Ein Paradebeispiel Seltener Erkrankungen

Wie kaum eine andere Krankheit stellt Krebs Forschende und Kliniker seit Jahrzehnten vor zentralen Problemen in Bezug auf dessen frühzeitige Erkennung, der Identifizierung seiner molekularen Ursachen sowie die Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze für eine weitgehend nebenwirkungsfreie und minimal-invasive Behandlung.

Zwar konnten sich durch die medizinischen Fortschritte der letzten Jahrzehnte insbesondere die Tumorchirurgie in Kombination mit Strahlen- oder Chemotherapie als probate Behandlungsoptionen etablieren,¹⁵³⁻¹⁵⁴ diese erweisen sich jedoch für die Behandlung hochrezessiver und invasiver Krebsarten häufig als ineffektiv.¹⁵⁵⁻¹⁵⁶

Gastrointestinale Stromatumore (GIST) stellen eine Gruppe von Weichgewebssarkomen dar, die nur geringe Ansprechraten auf konventionelle Behandlungsstrategien zeigen und aufgrund ihrer Seltenheit und Vielfalt höchst individualisierte Therapiekonzepte erfordern. Mit einer geschätzten Prävalenz von ungefähr 10-15 Fällen pro 10⁶ Einwohner weltweit¹⁵⁷ und einem jährlichen Aufkommen von 5000-6000 neuen Fällen in den USA¹⁵⁸ zählen diese Tumoren zu den seltenen Erkrankungen.

Die geringe Dichte und Heterogenität der Patienten erschweren dabei die Erforschung pathophysiologischer Ursachen und erfordern daher die Konsolidierung von Daten, beispielsweise durch internationale Kooperationen von Forschungsinstitutionen.¹⁵⁹

Genomanalysen der letzten Jahre haben gezeigt, dass GIST, unabhängig vom Tumorstadium, eine hohe onkogene Abhängigkeit (engl. *oncogene addiction*) zum Stammzellfaktor-Rezeptor (c-KIT) und dem Rezeptor des PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR A (PDGFR α) aufweisen und dass die Inhibition dieser Tyrosinkinase mit einem signifikant verlangsamten oder gar unterbundenen Tumorwachstum einhergeht.¹⁶⁰⁻¹⁶¹ Aus diesem Grund haben sich insbesondere präzisionsmedizinische Ansätze als effektive Therapieansätze erwiesen, da sie die Möglichkeit bieten, die Behandlung auf die spezifischen genetischen Veränderungen des Tumors auszurichten und somit ein Behandlungssetup möglich machen, das individuell auf die Bedürfnisse des Patienten zugeschnitten ist.¹⁶²

Die derzeitigen Therapieschemata sehen daher den Einsatz des Tyrosinkinase-Inhibitors (TKI) IMATINIB als Erstlinien-Therapeutikum vor. Dennoch entwickelt jeder zehnte Patient innerhalb von 3-6 Monaten nach der Erstgabe Resistenzmutationen, die auf struktureller Ebene zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren führen, was die Bindung des ursprünglichen Liganden erschwert.¹⁶³ Da die Patienten aufgrund dieses Mechanismus eine Insensitivität gegenüber IMATINIB entwickeln, müssen für eine fortlaufende Therapie andere wirksame TKIs verabreicht werden, die dazu in der Lage sind, die aus den Mutationen hervorgehenden strukturellen Änderungen zu umgehen oder sich diesen anzupassen. Da die Entwicklung und Identifizierung solcher Inhibitoren ebenfalls dem Schema der klassischen Wirkstoffentwicklungsprozesse folgt und daher mit einem hohen Kosten- und Zeitaufwand verbunden ist, stehen derzeit nur wenige Zweit- und Drittlinietherapeutika zur Verfügung. Es besteht daher ein regelrechter medizinischer Bedarf, den Entwicklungsprozess für neue TKIs durch innovative Strategien weiter voranzutreiben.

1.8 Präzisionsmedizinische Ansätze zur Behandlung von GIST: c-KIT und PDGFR α als attraktive Targets für SBDR-Bemühungen

Nahezu jeder Aspekt der zellulären Aktivität kann auf die Beteiligung von Proteinkinasen als molekulare Schaltzentren zurückgeführt werden. Als Vertreter der Klasse der Transferasen katalysieren Kinasen den Transfer von Phosphatgruppen von Adenosintriphosphat (ATP) auf Hydroxylseitenketten bestimmter Proteinsubstrate. Dieser biochemische Prozess kann die Aktivität von Enzymen verstärken oder abschwächen und somit maßgeblich zur Aufrechterhaltung grundlegender zellulärer Funktionen beitragen. In ihrer fein abgestimmten Wechselwirkung mit den physiologischen Gegenpartnern, den Phosphatasen, sind Kinasen auch an Prozessen wie Zellerhaltung, Zellteilung und programmiertem Zelltod (Apoptose) beteiligt. Störungen dieses durch sie vermittelten, präzise regulierten physiologischen Gleichgewichts können schwerwiegende pathologische Zustände wie Krebs, Diabetes oder kardiovaskuläre Erkrankungen zur Folge haben.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶

Kinasen stellen aufgrund ihrer zentralen biologischen Funktion daher ein sehr beliebtes *Target* für medizinalchemische Forschung und Präzisionsmedizin dar. Doch bis in die 1990er Jahre galt in der wissenschaftlichen Gemeinschaft das allgegenwärtige Dogma, dass eine medikamentöse Adressierung dieser Zielproteine unmöglich sei.¹⁶⁷ Bemühungen visionärer Wissenschaftler wie JOHN C. LEE und Kollegen bei SMITHKLINE BEECHAM PHARMACEUTICALS¹⁶⁸ oder SACHIYO KAWAMOTO und HIROYOSHI HIDAKA am Universitätsklinikum MIE in Japan¹⁶⁹ offenbarten jedoch die Möglichkeit, chemische Materie auch für die damals hochinteressanten Zielproteine p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) und Isoformen der Proteinkinase C (PKC) zu identifizieren und zu affinen Liganden weiterzuentwickeln. Obwohl diese Arbeiten als bahnbrechende Erkenntnisse in die Geschichte eingingen, schafften es die vorgestellten chemischen Verbindungen nie über den Status von Testsubstanzen (engl. *Tool compounds*) für chemisch-biologische Forschungszwecke hinaus. Erst die eher zufällige synthetische Integration einer einfachen Methylgruppe in ein Diaminopyrimidin-Grundgerüst eines bekannten PKC-Inhibitors verhalf dem Biochemiker NICHOLAS LYNDON zur Entwicklung des relativ spezifischen BCR-ABL-Inhibitors IMATINIB (Handelsname: GLEEVEC) im Jahr 2001. Durch die Bemühungen von BRIAN DRUKER konnte IMATINIB schließlich erfolgreich für die Behandlung von CML eingesetzt werden und verbesserte damit drastisch die Aussicht von Patienten auf ein progressionsfreies Überleben.¹⁷⁰

Diese Erfolgsgeschichte begründete zugleich einen regelrechten Wettlauf in der Geschichte der Medizinalchemie und leitete die Ära der Entwicklung von Kinaseinhibitoren ein. Seitdem konnten zahlreiche strukturblogische Erkenntnisse das Verständnis zur Funktionsweise dieser Proteinklasse aufklären und wichtige Grundlagen für die Entwicklung strukturbasierter Designkonzepte für entsprechende Hemmstoffe bereitstellen.

Die erste Kristallstruktur einer Kinase wurde bereits vor mehr als 30 Jahren von KNIGHTON *et al.* publiziert.¹⁷¹ Durch die strukturelle Analyse der Proteinkinase A (PKA) konnte ein konservierter struktureller Kernbereich, bestehend aus einer N-Terminus-Domäne mit fünf β -Faltblättern und der sogenannten α C-Helix, einer zentralen Kinase-Domäne sowie einer vorwiegend regulatorischen α -helicalen C-Terminus-Domäne, für alle Arten von Kinasen offengelegt werden (vgl. Abbildung 10).

Weiterhin konnte abgeleitet werden, dass die ATP-Bindungsstelle, zusammen mit der sogenannten Aktivierungsschleife, an der Schnittstelle zwischen beiden Termini lokalisiert ist und von deren jeweiligen β -Faltblättern flankiert wird. Dieser Bereich wird allgemein auch als aktives Zentrum bezeichnet. Die Phosphatreste von ATP reichen in eine Subtasche hinein, welche sich unmittelbar unter der Glycin-reichen Schleife befindet und durch die Wechselwirkung mit einem konservierten Lysin des β 3-Faltblatts und einer koordinativen Bindung des C-Terminus mit einem zweiwertigen Magnesiumion charakterisiert ist.¹⁷² Dieser als Ribose-Tasche bezeichnete Bereich bietet insbesondere für die Entwicklung ATP-kompetitiver Kinaseinhibitoren interessante Interaktionsmöglichkeiten, da auf diese Weise beispielsweise Phosphat-mimetische Gruppen in das Inhibitor-design einbezogen werden können.¹⁷³⁻¹⁷⁵

Neben der Adressierung der Ribose-Tasche ist allerdings auch noch die Wechselwirkung mit der sogenannten Scharnierregion (engl. *hinge region*) von essentieller Bedeutung für die Spezifität eines Kinaseinhibitors.¹⁷⁶ Die Scharnierregion verbindet über eine geordnete, kurze Linkersequenz den N- mit dem C-Terminus und ist für die Erkennung der Adenin-Base des ATPs durch zwei Wasserstoffbrücken verantwortlich. Da sich die glycinreiche Schleife in der Nähe der ATP-Bindungsstelle befindet und damit für die Bindung und Einpassung des Substrats verantwortlich ist, muss sie durch ein hohes Maß an Flexibilität und Anpassungsfähigkeit verschiedene Konformationen einnehmen können.¹⁷²

Durch diese Eigenschaft stellt sie die Adressierung dieses Strukturelements in Form eines geeigneten Inhibitor-designs als ein herausforderndes Unterfangen dar, wenngleich auch vereinzelte Ansätze in der Literatur wiederzufinden sind.¹⁸¹ Die aus der Kristallisation von PKA gewonnenen Informationen zur Architektur der Kinasen sowie daraus abgeleitete strukturelle Funktionen einzelner Tertiärstrukturelemente führten in den Folgejahren zur Etablierung allgemein anerkannter Designprinzipien für Kinaseinhibitoren (siehe Abbildung 11).¹⁸²

Diese legten zusammen mit der Durchführung von Genomsequenzierungen den Grundstein für die Entwicklung molekular gesteuerter Präzisionsonkologie.

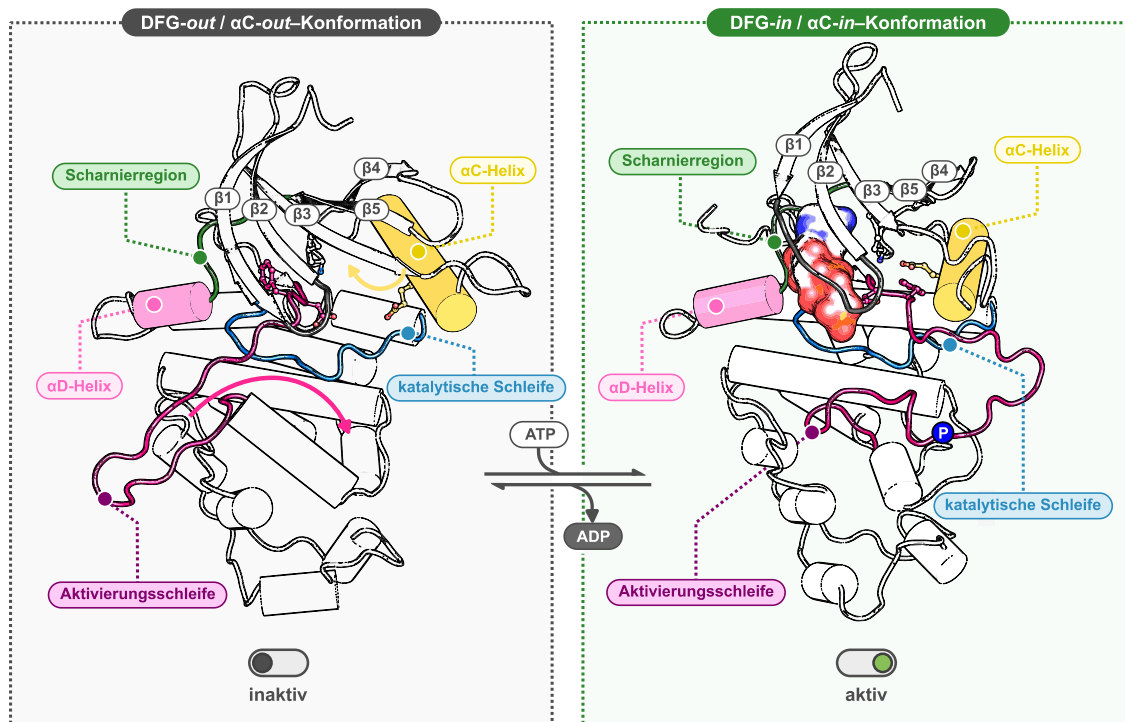


Abbildung 10 | Gegenüberstellung der inaktiven (grau, PDB-ID: 1G3N) und aktiven (grün, PDB-ID: 1FIN) Konformation am Beispiel der CDK-Tyrosinkinase-Familie. Proteinkinasen sind aus einer N-terminalen (oben) und C-terminalen (unten) Untereinheit aufgebaut, zwischen deren Kontaktfläche das aktive Zentrum lokalisiert ist. Im inaktiven Zustand ist das aktive Zentrum aufgrund der topologischen Anordnung der Aktivierungsschleife für das natürliche Substrat ATP unzugänglich. Durch die Bindung eines Liganden in der extrazellulären Domäne (z.B. ein Wachstumsfaktor, Stammzellfaktor etc.) wird das physiologische Gleichgewicht über einen extrazellulären Dimerisierungsmechanismus (z.B. durch die Bindung zweier Monomere durch den Liganden oder eine induzierte konformelle Änderung der extrazellulären Domäne durch Bindung eines Stammzellfaktors) auf die Seite der aktiven Konformation verschoben. Im Zuge dessen nähern sich auch die intrazellulären Domänen an und begünstigen damit eine Transphosphorylierung nucleophiler Aminosäureseitenketten in der Aktivierungsschleife. In Folge dessen orientiert sich das DFG-Motiv von der sogenannten DFG-*out*-Konformation zur DFG-*in*-Konformation um und induziert somit eine 180°-Drehung der Aktivierungsschleife. Gleichzeitig nähert sich die α C-Helix dem katalytischen Lysin des β 3-Faltblatts an (α C-Helix-*in*) und spannt zusammen mit der Aktivierungsschleife die Substratbindestelle für das ATP auf (basierend auf UMEZAWA *et al.*¹⁷⁷, BAYLISS *et al.*¹⁷⁸, HUSE *et al.*¹⁷⁹ und NOLEN *et al.*¹⁸⁰).

Neben der erfolgreichen Behandlung weit verbreiteter Krebsformen wie beispielsweise dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (engl. *Non-Small-Cell Lung Cancer*, NSCLC) durch die zielgerichtete Hemmung des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) durch Inhibitoren wie AFATINIB, GEFITINIB oder ERLOTINIB, revolutionierte die personalisierte Medizin auch die Behandlung seltener Erkrankungen maßgeblich.¹⁸³⁻¹⁸⁴ Zahlreiche Studien zeigen, dass der Einsatz von TKIs bei der Behandlung von GIST entscheidende Vorteile gegenüber den klassischen Methoden der Krebstherapie bietet.

Aufgrund der oft unvorteilhaften Lokalisation und des metastasierenden Charakters dieser Tumore ist die Durchführung einer Bestrahlung in den meisten Fällen nicht möglich, während eine vollständige chirurgische Dissektion nach 5 Jahren bei etwa 30% aller Patienten zur Rezidivierung oder der Bildung neuer Metastasen führt.¹⁸⁵

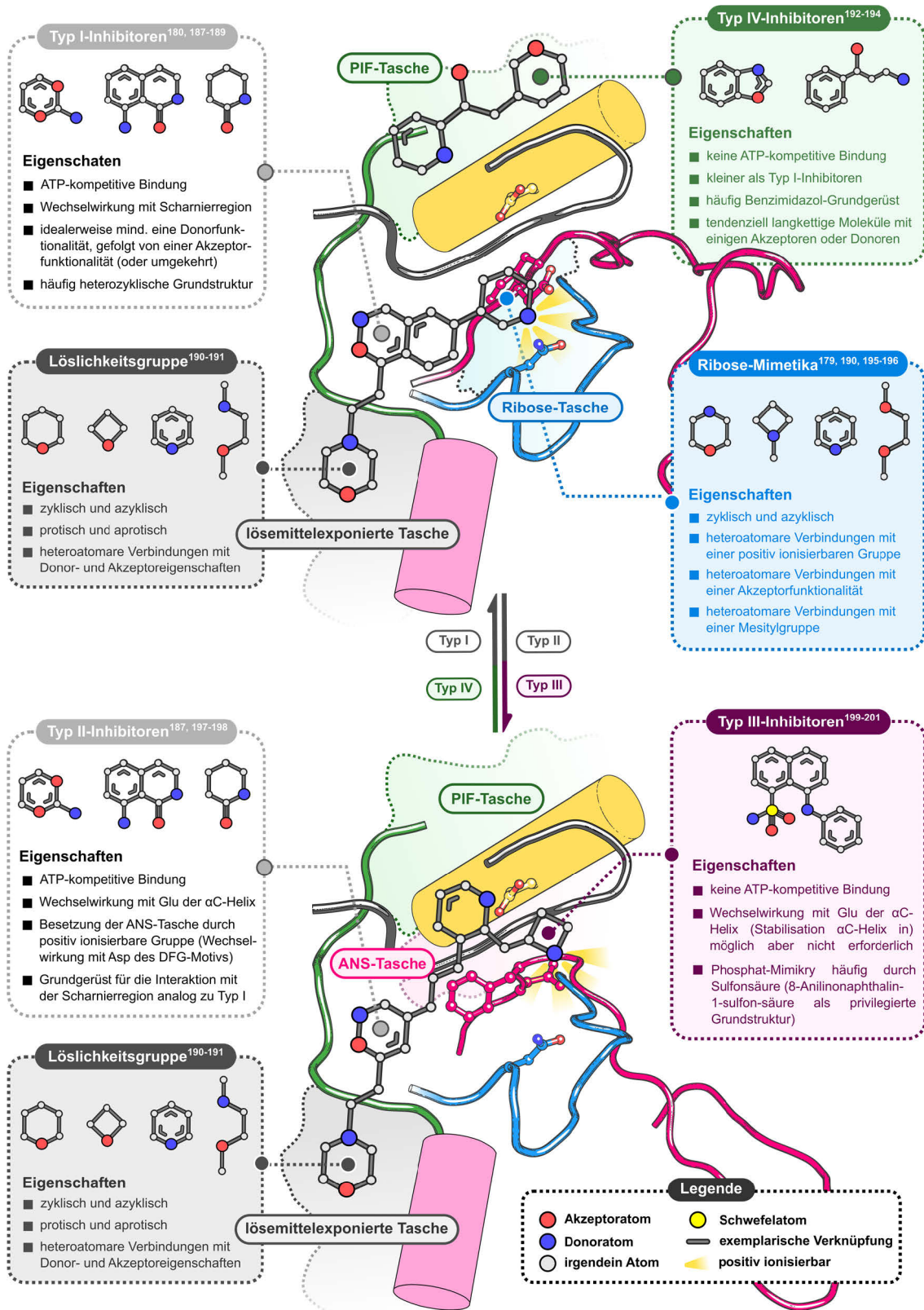


Abbildung 11 | Übersicht zu allgemeinen Designprinzipien bei der Entwicklung von Proteinkinase-Inhibitoren. Während Kinaseinhibitoren des Typs I und II ATP-kompetitiv binden und daher die chemische Natur des Adenin-Grundgerüsts nachahmen müssen, stellen die Typen III und IV Hemmstoffe dar, die nicht mit dem natürlichen Substrat konkurrieren, sondern allosterische Taschen adressieren (basierend auf PALMIERI *et al.*²⁰⁴ und ROSKOSKI²⁰⁵)

Chemotherapeutische Ansätze zeigen zudem nahezu keine Ansprechrate und bereits nach dreimonatiger Behandlungsdauer erneute Tumorprogression.¹⁸⁶

Die Zulassung von IMATINIB als Erstlinientherapeutikum führte nach der Jahrtausendwende schließlich zu einem Paradigmenwechsel bei der Behandlung von GIST. Patienten konnten nun durch die Gabe des Wirkstoffs in Form einer Tablette (400 mg oder 800 mg pro Tag) behandelt werden und wiesen eine durchschnittliche progressionsfreie Überlebensrate zwischen 1.7 und 2 Jahren auf.¹⁸⁷ Dennoch treten bei 85-90% aller Patienten Sekundärmutationen nach Verabreichung des Erstlinientherapeutikums auf, die zu konformationellen Änderungen der Bindetasche führen und somit eine verminderte Affinität von IMATINIB begünstigen.¹⁸⁸ Damit solche Resistenzmutationen auch weiterhin effektiv behandelt werden können, ist die stetige Entwicklung neuer Therapeutika ein zentraler Forschungsschwerpunkt der Präzisionsonkologie.

1.9 Resistenzmutationen erfordern konstante Entwicklung neuer Therapiekonzepte

Das Auftreten von Sekundärmutationen nach Gabe von IMATINIB und die damit einhergehenden verringerten Ansprechraten führte unweigerlich zur Notwendigkeit, neue Therapiekonzepte für die Behandlung von mutierten GIST zu erschließen. Repositionierungsstudien ergaben dabei, dass die Gabe der beiden Multikinasehemmer SUNITINIB und REGORAFENIB als Zweit- und Drittlinientherapeutikum zwar kurzfristig die progressionsfreie Überlebensrate verbesserte, die Wirksamkeit jedoch durch das Auftreten von Sekundärmutationen erneut limitiert wurde. Insbesondere zeigten Patienten mit einer D842V-Mutation im PDGFR α -Gen keine Ansprechbarkeit auf alle bis dato etablierten Behandlungsstrategien.²⁰⁶⁻²⁰⁷

Die Durchführung der NAVIGATOR-Studie offenbarte, dass bezüglich dieses medizinischen Notstands der ursprünglich für die KIT D816H-Mutation rational designte Wirkstoff AVAPRITINIB bei über 90% der betroffenen Patienten Wirksamkeit zeigte.²⁰⁸ In klinischen Anwendungen stellte sich jedoch später heraus, dass der Inhibitor aufgrund seiner Eigenschaft, die Blut-Hirn-Schranke überwinden zu können, schwerwiegende neuro-kognitive Nebenwirkungen in kleineren Patientengruppen hervorruft, die den therapeutischen Nutzen damit maßgeblich limitieren.²⁰⁹⁻²¹⁰

Der aus dieser geschichtlichen Entwicklung hervorgehende konstante und nach wie vor ungedeckte Bedarf an neuen und wirksamen TKIs in Kombination mit dem frequentierten Auftreten von Resistenzmutationen zeigt eindeutig, wie notwendig die Entwicklung innovativer Methoden für die Entwicklung maßgeschneiderter Wirkstoffmoleküle ist.

Das bisherige methodische Vorgehen legt jedoch auch offen, dass die Identifizierung und Verwendung von Multikinaseinhibitoren zur Behandlung resistenzerworbener GIST zwar durchaus kurzfristige therapeutische Wirkung ermöglicht, diese jedoch mit einem rasanten Auftreten neuartiger Mutationen einhergeht. Eine selektive Inhibition einer einzigen, spezifischen Mutante scheint angesichts dieser Ausgangslage daher nur bedingt sinnvoll zu sein.

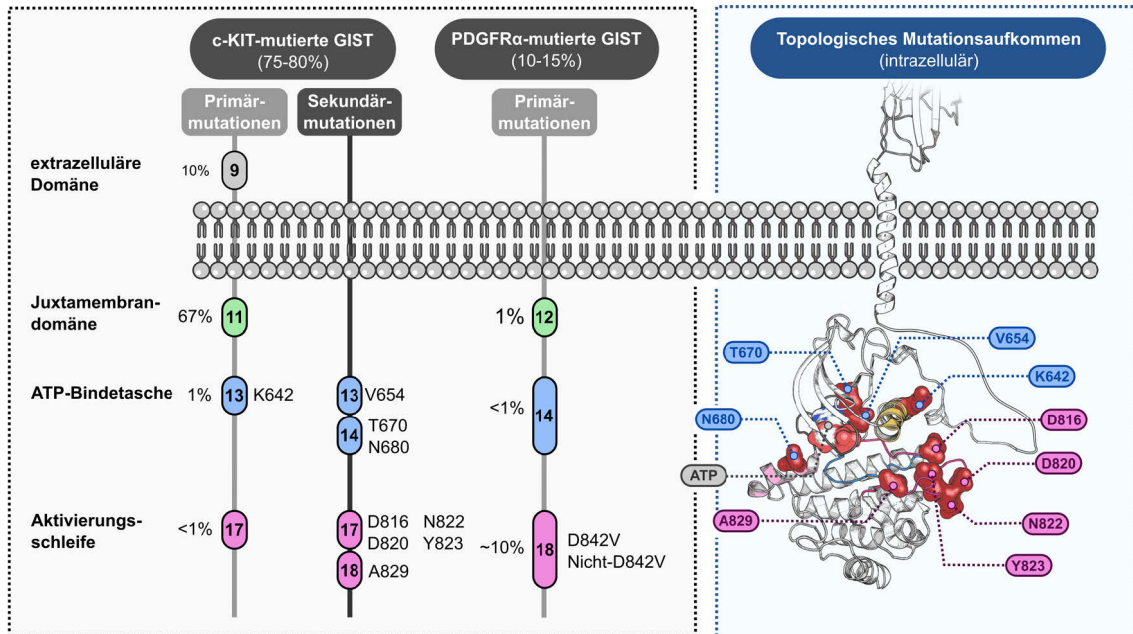


Abbildung 12 | Übersicht zur relativen Häufigkeit auftretender Primär- und Sekundärmutationen bei c-KIT-mutierten und PDGFR α -mutierten GIST und deren topologische Verteilung in der intrazellulären Kinasedomäne. In den meisten Patienten treten mit einer Häufigkeit von 75-80% hauptsächlich Aktivierungs- und Resistenzmutationen in den Exons 13, 14, 17 und 18 des c-KIT-Gens auf. In 10% der Fälle sind jedoch Primärmutationen in PDGFR α zu beobachten, insbesondere in der Aktivierungsschleife (Exon 18). Strukturbioologisch betrachtet führen auftretende Punktmutationen in diesem Bereich hauptsächlich zu Konformationsänderungen der Kinase, da sich die chemischen und elektrostatischen Eigenschaften der mutierten Aminosäuren grundlegend ändern können, was eine Umorientierung des DFG-Motivs begünstigt. Im Vergleich dazu können Mutationen auf topologischer Höhe mit der Türsteher Aminosäure (V654 und T670) vor allem zu einer sterischen Repulsion mit einem Inhibitor des Typs I oder II führen (vgl. räumliche Nähe des ATPs zu den entsprechenden Aminosäuren) (basierend auf SERRANO *et al.*²⁰⁷).

Abbildung 12 zeigt die häufigsten auftretenden Sekundärmutationen bei IMATINIB-resistenten GIST-Patienten in Abhängigkeit ihrer Lokalisation in der intrazellulären Kinasedomäne. Es ist ersichtlich, dass sich wesentliche Mutations-*Hot spots* vor allem in der ATP-Bindungsschnittstelle, den sogenannten Exons 13 und 14, sowie im Bereich der Aktivierungsschleife, also den Exons 17 und 18, befinden.²⁰⁷ Bei c-KIT verorten sich die häufigsten Punktmutationen im Bereich der α C-Helix (K642-Mutationen), auf topologischer Höhe der "Türsteher"-Aminosäure (engl. *gatekeeper*) (T670- und V654-Mutationen) und auf Höhe der Aktivierungsschleife (D816-, D820- und N822-Mutationen).

Mutationsereignisse in diesen spezifischen Positionen können entweder sterische Repulsionen mit bindenden Liganden forcieren oder im Falle von Mutationen in der Aktivierungsschleife zu Konformationsänderungen der Kinase führen, die eine Bindung eines Liganden erschweren.²⁰⁹

Angesichts dieser strukturellen Aspekte ergeben sich spezielle Anforderungen an potenzielle Wirkstoffe, die im Sinne einer Pan-Inhibition ein möglichst breites Spektrum von Mutationen hemmen sollen.

Diese erfordern das Design von Molekülen, die aufgrund ihrer chemischen Strukturmerkmale oder einer besonderen geometrischen Ausrichtung trotz auftretender Konformationsänderungen des Proteins dazu in der Lage sind, hochaffin zu binden. Methoden des SBDDs können diesbezüglich wertvolle Instrumente zur Identifizierung potenzieller Leitstrukturen bereitstellen und die anschließende Optimierung unterstützen.

2 Motivation und Zielstellung

Trotz der bahnbrechenden medizinischen Errungenschaften der letzten Jahrhunderte und dem zunehmenden Einzug innovativer Technologien in die medizinische Forschung steht die wirkstoffentwickelnde Industrie heute vor der zentralen Herausforderung, Kosten- und Zeitökonomie bei der Entwicklung von Wirkstoffen und Arzneimitteln mit den immer strengeren regulatorischen Vorgaben der Arzneimittelbehörden in Einklang zu bringen. Durch die nahezu lawinenartige Anhäufung multiomischer Analysedaten seit der Jahrtausendwende erweitert sich zudem nahezu täglich das Verständnis über die molekularen Ursachen verschiedenster pathologischer Störungszustände. Weiterhin treten durch die anhaltende Globalisierung auch neue Krankheiten in Erscheinung, die sich in rasender Geschwindigkeit über den gesamten Globus verbreiten und eine Vielzahl von Menschen gleichzeitig betreffen.²¹¹⁻²¹²

Der sich daraus abbildende gesteigerte Bedarf an neuen Therapeutika steht jedoch in starkem Kontrast zu den derzeitigen Bedingungen, unter denen die Wirkstoffforschung agiert. So führen die seit mehreren Jahrzehnten stetig anwachsenden Entwicklungskosten, gepaart mit dem Wissen um die hohen Ausfallwahrscheinlichkeiten innerhalb der klinischen Phasen zur Notwendigkeit, dass viele Pharmaunternehmen ausschließlich kommerziell-vielversprechende Wirkstoffkandidaten, mit einem möglichst geringen Risiko zum Scheitern in ihr Portfolio aufnehmen und somit einen regelrechten Innovationsstau begünstigen (siehe Verlauf der nicht-weiterentwickelten Wirkstoffkandidaten in Abbildung 1c).²¹³

SCANNELL *et al.* erkannten diesen Sachverhalt bereits im Jahre 2012 und konstatierten, dass sich trotz des Einzuges moderner Automatisierungstechnologien und bahnbrechenden Innovationen seit den 1980er Jahren die Kosten für die Entwicklung neuer Wirkstoffe alle neun Jahre in etwa verdoppeln.²¹⁴ Dieser paradox-erscheinende Zusammenhang wird allgemein hin als Eroom'sches Gesetz (Anagramm zu Moore'sches-Gesetz) bezeichnet und stellt für den Prozess der Wirkstoffentwicklung aus Sicht der Pharmaunternehmen ein zentrales Problem für die Entwicklung von effizienzsteigernden Strategien dar (siehe Abbildung 13).

Als einer der Hauptursachen für das Auftreten der Eroom'schen Gesetzmäßigkeit wird heutzutage vor allem das sogenannte „Besser als die Beatles“-Problem angesehen. Dieses beschreibt den Umstand, dass sich neu-entwickelte Therapeutika stets an dem aktuellen Stand der Technologie orientieren und daher mit bereits etablierten Therapieoptionen konkurrieren und diese übertreffen müssen. Da dieser Konkurrenzkampf jedoch zu einem immer stärker forcierten Innovationsdruck innerhalb der Pharmaindustrie führen würde, müssen sich die Unternehmen verstärkt auf die Entwicklung von Wirkstoffen für Krankheiten fokussieren, deren Behandlung sich aufgrund der häufig komplett andersartigen Pathogenese als herausfordernder und komplexer darstellt und somit auch mit erhöhten Zeit- und Kostenaufwand einhergeht.²¹⁴⁻²¹⁵

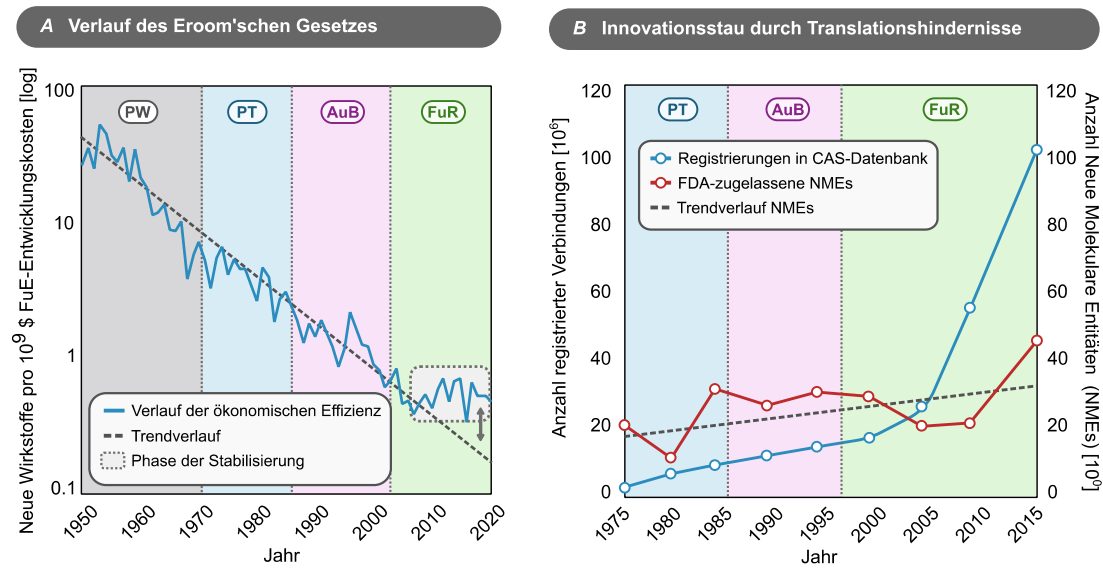


Abbildung 13 | Schematische Darstellung zur Gesetzmäßigkeit des Eroom'schen Zusammenhangs und des sich daraus entwickelnden Innovationsstaus bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe. (A) Verlauf des ökonomischen Effizienz bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe von 1950 bis 2020. Es zeigt sich, dass sich trotz steigenden Kosteneinsatzes die Zahl der neu-entwickelten Wirkstoffe nicht deutlich vergrößert. Als Resultat stellt sich die Entwicklung von Wirkstoffen als immer risikoreicher und finanziell herausfordernder dar. Seit den 2010er Jahren scheint sich der Einfluss des Eroom'schen Gesetzes jedoch abzuschwächen, weshalb die Effizienzkurve langsam in einem Zustand der Stabilisation einfindet. Die Farben deuten jeweils unterschiedlichen Ären in der Wirkstoffforschung an, die sich mit den Historischen Ereignissen aus Abbildung 1 grundlegend decken (PW:= Ära der Phänotypischen Wirkstoffforschung, PT := Post-Thalidomid-Ära, AuB := Ära der Automatisierung und Biotechnologie, FuR := Ära des Fragment-basierten Wirkstoffdesigns und der Repositionierung). **(B)** Vergleich zwischen der Registrierung neuer chemischer Materie in der CAS-Datenbank und den FDA-zugelassenen Neuen Molekularen Entitäten. Während sich seit den 2000er Jahren die Zahl der neuen chemischen Materie durch die Entwicklung neuer und innovativer Synthesetechniken exponentiell vergrößert, übersetzt sich dieser Trend nahezu gar nicht bei der Zulassung von NMEs. Rückführbar ist dies unter anderem auf Translationshindernissen bei der Implementierung neuer Reaktionen in medizinisch-chemische Forschungsbereiche.

Um diesen wissenschaftlichen Engpass entgegenwirken zu können, finden sich in den letzten Jahren vermehrt Bemühungen zur Verkürzung der Abläufe der klassischen Wirkstoffentwicklungskaskade wieder. Als einer der erfolgreichsten Methoden hat sich dabei vor allem die Repositionierung von Wirkstoffen hervor getan. Da diese jedoch nicht in allen Fällen eine valide Entwicklungsstrategie darstellt, steht auch heutzutage noch vor allem die Identifizierung und anschließende Optimierung neuartiger Chemotypen zur Entwicklung neuer selektiver Inhibitoren im Fokus der Forschungsbemühungen.

Die Ursachen für dieses Problem liegen daher nicht im Bereich der Grundlagenforschung, sondern sind viel eher in der Identifizierungsphase neuer chemischer Materie, speziell in der problematischen Gestaltung der meisten HTS- und Fragmentbibliotheken, verortet.

2.1 Analysen zur Eignung und Implementierung moderner Synthesetechniken im Kontext des Aufbaus sp^3 -reicher Fragmentbibliotheken

Trotz zahlreicher innovativer Designansätze bleibt die Landschaft der Substanzbibliotheken, auch 15 Jahre nach dem wissenschaftlichen Appell "*Escape from Flatland*" von LOVERING *et al.*²¹⁶, weiterhin durch einen unverhältnismäßigen Mangel an sp^3 -reichen Molekülstrukturen geprägt.^{89, 217} Rückführbar ist dies unter anderem auf vorherrschende Bedenken hinsichtlich niedriger potentieller Trefferraten beim *Screening* solcher Bibliotheken, aber auch auf die zurückhaltende Verwendung moderner Synthesemethoden im Bereich der Medizinalchemie. Während die Verringerung der *Hit*-Raten aufgrund des deutlich vergrößerten chemischen Raums sp^3 -reicher Strukturen ein inhärentes Problem darstellt, das nur durch den Einsatz kostenintensiver Automatisierungstechnologie gelöst werden kann²¹⁸⁻²²⁰, ist die mangelnde Translation neuer Synthesetechniken in industrielle Applikationen eher auf ein strukturelles Problem innerhalb der fortschrittsorientierten Forschungs- und Entwicklungskultur (FuE) zurückzuführen.

BOSTRÖM *et al.* hoben in ihrer perspektivischen Analyse "*Expanding the medicinal chemistry synthetic toolbox*" aus dem Jahr 2018 diesbezüglich eine Vielzahl von Faktoren hervor, die sich von anthropogenen Gründen wie einer Bevorzugung gegenüber arbeitsfreundlicheren Reaktionsbedingungen (z. B. kurze Reaktionszeiten, Atmosphärendruck, Temperaturen zwischen -80 °C und $+200$ °C, Vermeidung von chiralen Aufreinigungsmethoden etc.) bis hin zur mangelnden Verfügbarkeit komplexer Startmaterialien sowie einem häufig sehr limitierten und spezifischen Substratumfang erstreckten. Die Autoren formulierten diesen Notstand in den folgenden Worten⁸⁸:

“Unfortunately, synthetic chemistry is now often considered a bottleneck in DMTA cycles, which can put considerable pressure on medicinal chemists to deliver molecules in a specific time frame for the planned screening cascades. Reward systems and pressure on delivery have pushed medicinal chemists to meet metric-based goals within a progression-seeking R&D culture. In these circumstances, a numbers-game attitude and a focus on easy-to-make compounds can often divert medicinal chemists from design principles, and the potential impact of more complex and/or challenging synthetic strategies is likely to be lost.”

Doch neben der von den Autoren beschriebenen einseitigen Verwendung von Synthesetechniken begünstigen auch die Auswahl an Designkriterien für die meisten Substanzbibliotheken die Verarmung des chemischen Raums. Im Regelfall folgt der Aufbau einer Substanzsammlung einem linear verlaufenden Prozess, an dessen Anfang das Design potenzieller Synthesekandidaten (z. B. mithilfe virtueller Reaktionen) steht.

Der Umfang dieser generierten Verbindungen wird in Folgeschritten durch die Anwendung verschiedenster Filterkriterien (z. B. durch Diversitätsfilter, Molekulargewichtsfiter oder der Filterung unerwünschter chemischer Eigenschaften) fokussiert, um somit die attraktivsten Kandidaten für nachgeschaltete Synthesen zu identifizieren. Dieses Vorgehen mag zunächst zwar plausibel erscheinen, stellt sich jedoch aus zweierlei Sicht als nicht gänzlich unproblematisch heraus:

- 1) Der chemische Raum wird automatisch durch die Auswahl der vorausgesagten Synthesekandidaten diktiert. Die Größe und der Umfang dieses Raums richten sich entsprechend nach den zuvor definierten Filterkriterien sowie der verwendeten Reaktion zum Aufbau der jeweiligen Verbindung. Da es sich um einen iterativen Prozess handelt, lässt sich der chemische Raum durch die Implementierung verschiedener Synthesetechniken nur schrittweise vergrößern und bedingt damit die Entstehung von Lücken innerhalb der abgedeckten chemischen Landschaft (siehe Abbildung 14).²²¹
- 2) Für das Design von HTS- und Fragment-Bibliotheken haben sich verschiedene molekulare Deskriptoren, wie zum Beispiel zweidimensionale *Fingerprints* (ECFP4, MACCS keys etc.) bzw. dreidimensionale Form- (ROCS, PMI etc.) bzw. Topologie-basierte (GpiDAPH3, TGD etc.) Deskriptoren als probates Mittel zur Institution spezifischer Diversitätsfilter bewährt. Analysen der letzten Jahre zeigen jedoch, dass insbesondere Form-basierte Deskriptoren wie PMI oder ROCS bei direktem Vergleich eine geringe Korrelation aufweisen und daher den bioaktiven Raum nur unzureichend beschreiben können.²²² Um hohe Trefferquoten auch bei biologisch vielfältigen Zielproteinen zu gewährleisten, muss der Designprozess neben maximaler Formvielfalt auch maximale funktionelle Komplementarität der einzelnen Substanzvertreter sicherstellen. Dies kann beispielsweise mithilfe dreidimensionaler pharmakophor-basierter Deskriptoren erfolgen.²²³

Angesichts dieser beiden zentralen Probleme sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit Möglichkeiten erschlossen werden, den linearen und starren Designprozess von Substanzbibliotheken effizienter und dynamischer zu gestalten (siehe Abbildung 14).

Unter Einsatz der textbasierten Software KONSTANZ INFORMATION MINER (KNIME) konnte diesbezüglich in Vorarbeiten zunächst ein automatisierter modularer Arbeitsablauf namens "FRAGTORY" entwickelt werden.²²⁴ Dieser ermöglicht die virtuelle Durchführung verschiedener Reaktionssequenzen und klassifiziert die generierten Verbindungen gemäß Filterkriterien und *Fingerprint*-Berechnungen. Mithilfe einer vergleichenden Hauptkomponentenanalyse (engl.: *Principal Component Analysis, PCA*) werden Produkte ausgewählt, die den am wenigsten ähnlichen Pharmakophoren bereits implementierter Fragmente ähneln.

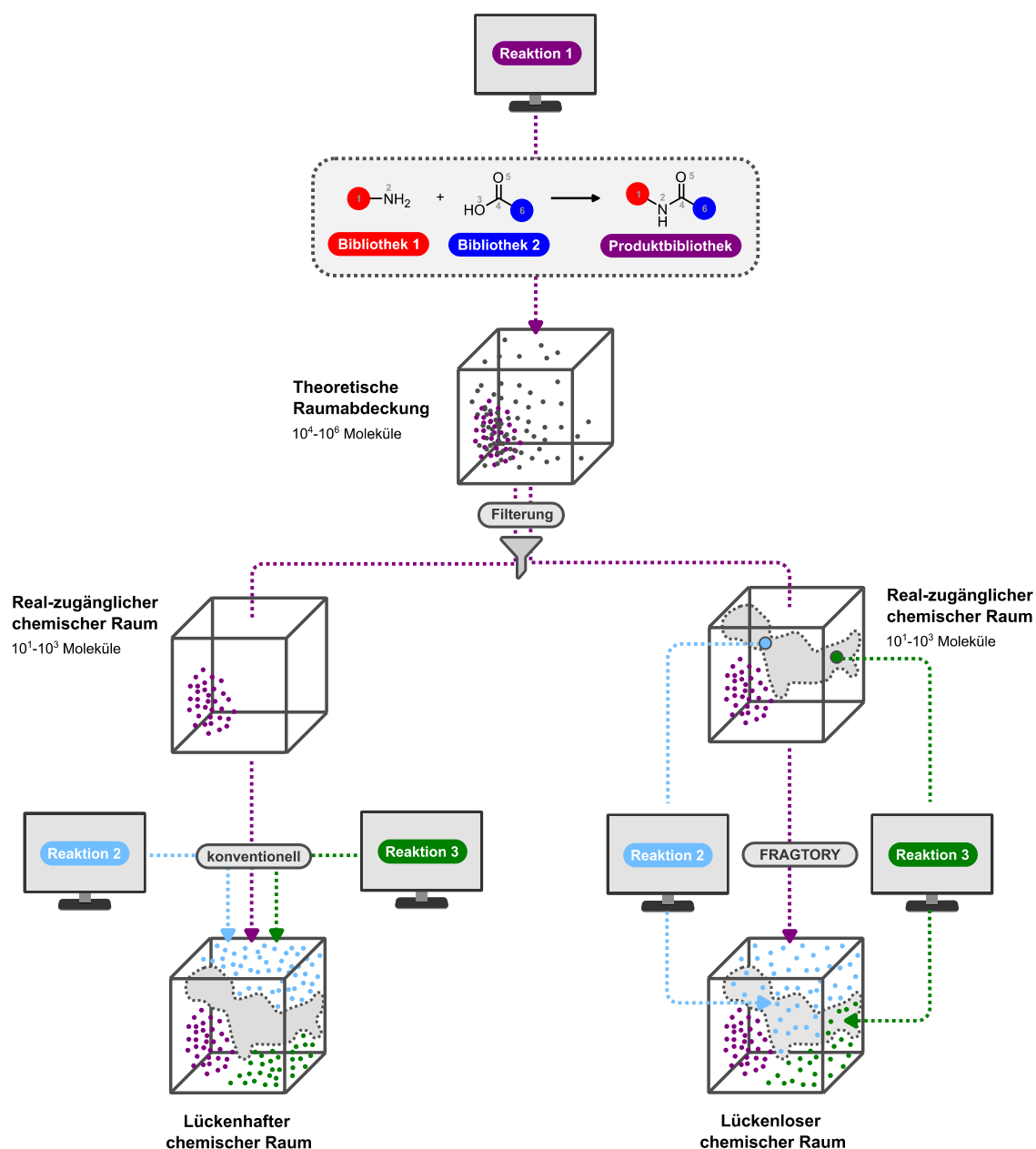


Abbildung 14 | Gegenüberstellung des konventionellen Vorgehens beim Aufbau einer Substanzbibliothek im Vergleich zu dem rekursiven pharmakophorgetriebenen Ansatz der FRAGTORY. Da bei der konventionellen Vorgehensweise eine subsequentielle Einbindung verschiedener Synthesetechniken erfolgt, besteht die Gefahr, dass sich Lücken im chemischen Raum ausbilden. Die FRAGTORY analysiert hingegen den Referenzraum hinsichtlich der Pharmakophor-Diversität und ermöglicht somit zielgerichtet durch eine rekursive Abfrage, Synthesekandidaten zu bestimmen, die einerseits eine maximale Pharmakophordiversität aufweisen, andererseits auch auftretenden Lücken innerhalb des chemischen Raums schließen. Im Zuge dieser Doktorarbeit sollte die experimentelle Etablierung einer Reaktion zum Aufbau diverser niedermolekularer Verbindungen erfolgen. Weiterhin sollte auf Grundlage syntheseswissenschaftlicher Erkenntnisse zu perizyklischen Reaktionen auch Filterkriterien erschlossen werden, die im Vorfeld bereits eine sinnvolle Abschätzung des real-zugänglichen chemischen Raums von Hetero-DIELS-ALDER-Reaktionen ermöglichen.

Dies ermöglicht die Auswahl potenzieller Synthesekandidaten zur Ergänzung der Bibliothek und die iterative Erweiterung der Abdeckung des pharmakophoren Raums. Durch die Implementierung moderner und derzeit in der Medizinalchemie eher marginal vertretener Synthesemethoden sollten nun niedermolekulare Fragment-Verbindungen generiert werden.

Diese sollten aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften, ihres Reichtums an sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatomen sowie der Verteilung an pharmakophoren Eigenschaften einen Bereich des chemischen Raums abdecken, der in den meisten kommerziellen Substanzbibliotheken noch unterrepräsentiert ist.

Spezieller sollte dabei im Fokus der Bemühungen die experimentelle Etablierung einer chemischen Transformation stehen, die kommerziell gut verfügbare Startmaterialien in einem Schritt in mehrere chemisch-konstitutionell isomere Produkte (Konstitutionsisomere) überführt und somit bereits den Zugang zu chemisch diversen Derivaten bietet. Diesbezüglich sollten auch die Eignung dieser Reaktion für eine semi-automatisierbare Reaktionsführung (Parallelisierbarkeit), der Substratumfang sowie die Tolerierbarkeit gegenüber der Änderung bestimmter Reaktionsparameter erschlossen werden, damit anschließend auf computerchemischer Ebene Leit- und Richtlinien bezüglich der Möglichkeiten und Grenzen definiert werden können.

In einem weiteren Versuch sollten ergänzend dazu auch verschiedene Varianten der Diels-Alder-Reaktion genauer untersucht werden, da sie aufgrund ihrer Klassifizierung als Vertreter perizyklischer Reaktionen bereits eine fundierte Grundlage bieten, Vorhersagemodelle bezüglich des Substratumfangs und der Regioselektivität abzuleiten. Diese sollten dazu genutzt werden, die virtuelle Enumeration und damit auch den potentiell zugänglichen chemischen Produktraum im Vorfeld zu limitieren und somit Rechenaufwand einzusparen.

2.2 Identifizierung und Modifizierung eines neuen Chemotyps zur Behandlung resistenzerworbener GIST

Neben dem Einzug des fragmentbasierten Wirkstoffdesigns hat sich auch die Repositionierung von Wirkstoffen als attraktive Möglichkeit aufgetan, Therapien für eine Vielzahl verschiedener Erkrankungen in einem deutlich verkürzten Zeitfenster zu entwickeln. Mehr als ein Drittel aller FDA-Zulassungen lassen sich mittlerweile auf im Vorfeld durchgeführte *Drug-Repurposing*-Studien zurückführen und stellen damit eine Paradedisziplin der modernen Wirkstoffforschung dar.¹³²

Inbesondere die Behandlung seltener Erkrankungen erfuhr in den letzten Jahrzehnten durch die stärker forcierte Repositionierung von Wirkstoffen einen wahren Paradigmenwechsel. So finden sich mittlerweile, trotz anhaltender Ressentiments von Pharmaunternehmen aufgrund des gesteigerten finanziellen Risikos und der Inhomogenität der Patientenschaft, jedoch immer mehr Beispiele akademischer Forschungsbemühungen in der Literatur wieder.

Im November 2020 betonte die Europäische Kommission in ihrer Reform des EU-Arzneimittelrechts zudem die einzigartige Bedeutung der akademischen Forschung sowie gemeinnütziger Akteure für die Förderung und Entwicklung bei der Wiederverwertung von Wirkstoffen für neue therapeutische Zwecke.²²⁵⁻²²⁶ Translationale Forschung in interdisziplinären Forschungsverbänden rückt daher immer stärker in den Fokus wirkstoffforschender Arbeitsgruppen.

Trotz herausragender präzisionsmedizinischer Errungenschaften der letzten Jahre weisen GISTs als Vertreter seltener Erkrankungen derzeit nur begrenzte Behandlungsoptionen auf. So stellte die Zulassung von IMATINIB zur adjuvanten Behandlung von Patienten mit c-KIT-positiven inoperablen und/oder metastasierten malignen GIST aufgrund des deutlich gesteigerten progressionsfreien Überlebens zwar durchaus eine kleine medizinische Revolution dar, das vermehrte Auftreten einer Vielzahl resistenzvermittelnder Sekundärmutationen nach Gabe von Erstlinien-, Zweitlinien- und Drittlinietherapeutika führt jedoch nach wie vor zur Insensitivität gegenüber bisher etablierten TKIs. Für diese Patientengruppen gibt es bisher keinerlei palliative Behandlungsmaßnahmen, weshalb das Auftreten dieser Resistenzmutationen einem Todesurteil gleichkommt.

In Anbetracht dieses fortwährenden medizinischen Notstands stand die Identifizierung und Optimierung eines neuartigen Chemotypen zur Behandlung eines breiten Spektrums klinisch relevanter Resistenzmutationen der treibenden Onkogene c-KIT und PDGFR α im Fokus dieser Doktorarbeit. Zu diesem Zweck sollte im Sinne eines reversen translationalen „*from bed-to-bench*“-Ansatzes zunächst durch ein phänotypisches HTS chemische Materie erschlossen werden, die für eine Vielzahl isogener Zelllinienmodelle eine phänotypische Veränderung begünstigt. Um den gesamten Prozess der Wirkstoffentwicklung dabei möglichst kosteneffizient und zeitlich effektiv zu gestalten, sollte neben dem Screening fokussierter Substanzbibliotheken auch Bibliotheken zugelassener oder in der Klinik gescheiterter Wirkstoffmoleküle berücksichtigt werden, um die Möglichkeit der Repositionierung bekannter Wirkstoffmoleküle zu ermöglichen.

Neben der Identifizierung neuer bioaktiver chemischer Materie sollte jedoch auch die Erschließung spezifischer Struktur-Aktivitäts- und Struktur-Toxizitäts-Beziehungen nach dem klassischen Konzept des SBDDs erfolgen. Dies sollte Gründe für ein vorheriges Scheitern eines Wirkstoffkandidaten aufklären und diese gegebenenfalls ausmerzen oder abschwächen können.

Diesbezüglich sollten weiterhin auch nicht-konservierte Regionen innerhalb der Bindungstasche der beiden treibenden Onkogene c-KIT und PDGFR α erschlossen werden, um mögliche unerwünschte *Off-Target*-Toxizität zu vermeiden und den Inhibitor auf die gewünschten Zielproteine maßzuschneidern.

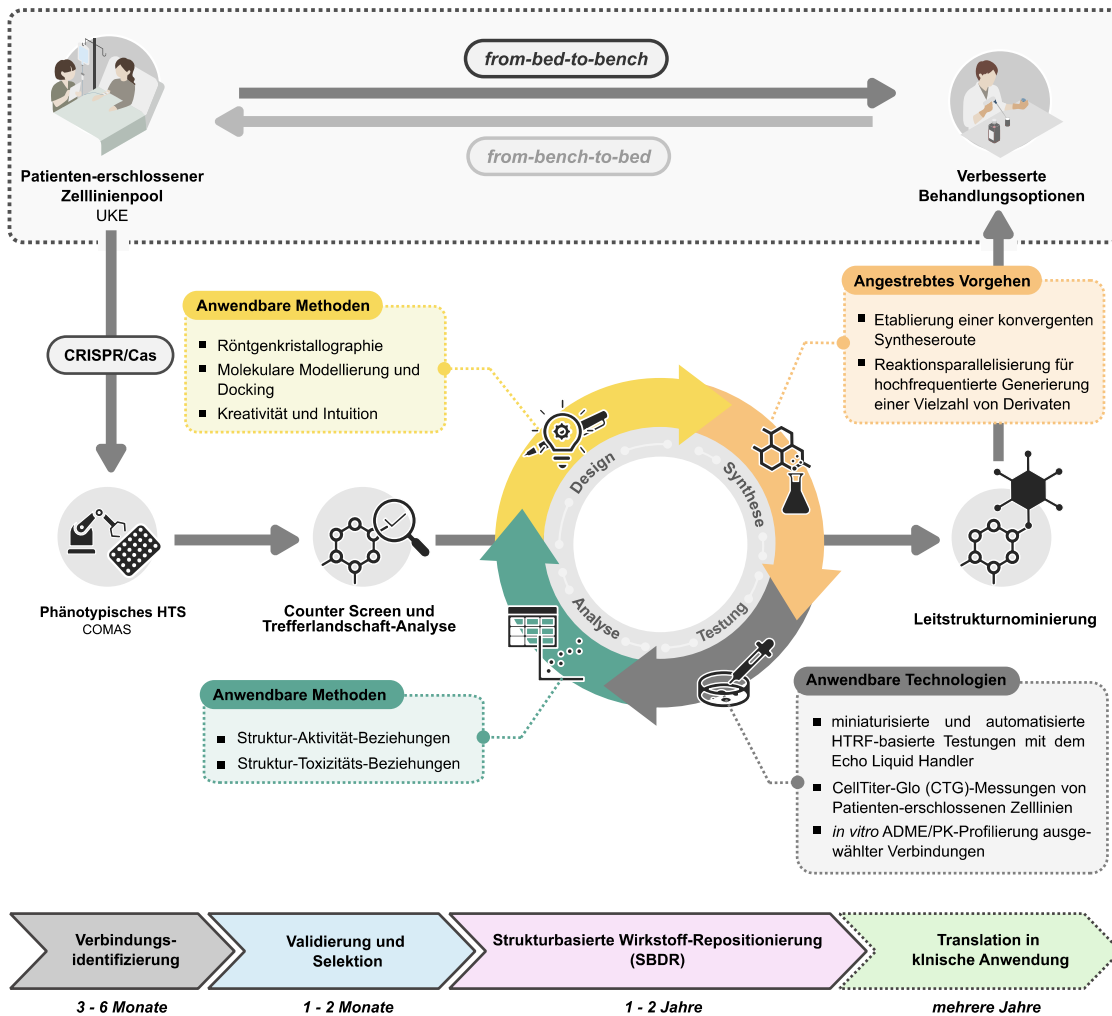


Abbildung 15 | Übersicht zum geplanten reversen translationalen *from-bed-to-bench*-Ansatz zur Identifizierung und Entwicklung neuer chemischer Materie zur Behandlung eines breiten Spektrums klinisch-relevanter Resistenzmutationen der treibenden Onkogene c-KIT und PDGFR α . Ausgehend von einem am WTZ gesammelten Pool an klinisch-relevanten Zelllinien soll mit Hilfe eines phänotypischen HTS ein Chemotyp identifiziert werden, der eine Veränderung auf möglichst vielen Zelllinien bei gleichzeitig geringer Toxizität gegenüber der KIT-negativen Kontrollzelllinie GIST48B bewirkt (*Counter Screen*). Als *Screening*-Bibliotheken sollen dabei unter anderem auch Sammlungen von bereits zugelassenen Inhibitoren herangezogen werden, um den nachfolgenden Optimierungsprozess möglichst zeit- und kosteneffizient zu gestalten

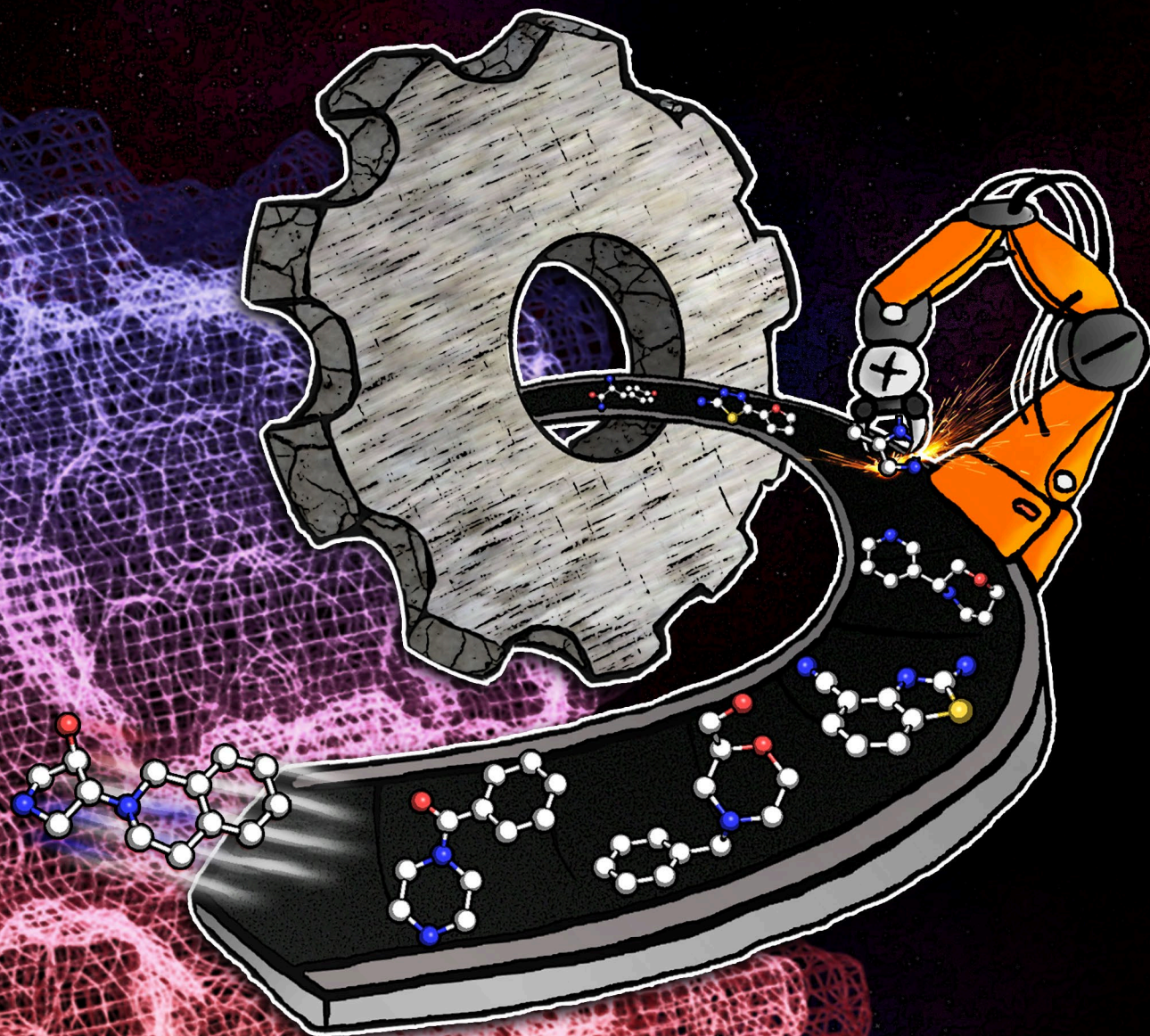
”

Despite over a century of applying organic synthesis to the search for drugs, we are still far from even a cursory examination of the vast number of possible small molecules that could be created.

Indeed, a thorough examination of all ‘chemical space’ is practically impossible.

“

Lipinski, C.; Hopkins, A. Navigating Chemical Space for Biology and Medicine. *Nature* **2004**, *432* (7019), 855–861.



3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Analysen zur Eignung und Implementierung moderner Synthesetechniken im Kontext des Aufbaus sp^3 -reicher Fragmentbibliotheken

3.1.1 Design und Konstruktion des FRAGTORY-Workflows mittels KNIME

Trotz Einzug rasanter Fortschritte im Technologie- und Automatisierungssektor wird die Effizienz bei der Entwicklung neuer Pharmaka nach wie vor maßgeblich durch die Eroom'sche Gesetzmäßigkeit bestimmt. Obgleich HTS und FBS in der Vergangenheit zahlreiche Erfolge bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe verzeichnen konnten, erweisen sich diese Methoden häufig als zu träge und innovationsarm, wenn man sie mit der immer größer werdenden Bedrohung durch globale Pandemieerscheinungen und den nach wie vor anhaltenden Entdeckungen neuer pathologischer Störungszustände konfrontiert.

Als eine Hauptursache für diese Problematik wird unter anderem die Verarmung des chemischen Raums in den meisten verwendeten Substanzbibliotheken diskutiert. Zwar finden sich durchaus vereinzelte Bemühungen auch komplexe, dreidimensionale Moleküle in Bibliotheken zu integrieren, doch stellen derartige Beispiele eher exotische Randerscheinungen in einer primär von sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen geprägten Forschungslandschaft dar. Diese Tatsache ist wenig verwunderlich, da sp^3 -reiche Bibliotheken allgemein mit verringerten Trefferraten und insbesondere einem höheren Maß an Unsicherheit bei der Synthese, Charakterisierung und Reinigung der entsprechenden Vertretermoleküle assoziiert sind.

Diese Gegebenheit erweist sich jedoch als hinderlich für die Entwicklung neuer Medikamente, da die meisten Bibliotheken somit auch durch eine limitierte Pharmakophorvielfalt charakterisiert sind und damit nur einen begrenzten bioaktiven Raum abdecken. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte daher zunächst ein modularer Workflow konzipiert werden, der durch die fortwährende Analyse des bereits abgedeckten pharmakophoren Raums, die Möglichkeit bot, Vertreter zu nominieren, die entstehende Lücken im chemischen Raum effektiv ausfüllen können (engl. *gap filling approach*).

Im Rahmen des im Jahr 2018 initiierten DRUG DISCOVERY HUB DORTMUND (DDHD) wurde zunächst ein Konsortium gebildet, welches sich aus den in Dortmund ansässigen Unternehmen TAROS CHEMICALS GMBH & CO. KG und dem LEAD DISCOVERY CENTER (LDC) sowie der zu der Zeit an der Technischen Universität Dortmund tätigen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. ANDREAS BRUNSCHWEIGER zusammensetzte.

Im Rahmen dieses Konsortiums wurde der Design- und Schaffungsprozess der entsprechenden Substanzbibliothek eingehend diskutiert und zunächst wünschenswerte Eigenschaften idealtypischer Fragmente definiert. Dabei wurde insbesondere das Hauptaugenmerk auf Eigenschaften bereits bestehender Substanzbibliotheken eingegangen und auf Grundlage Unterscheidungskriterien definiert.

Somit ergaben sich als wünschenswerte Parameter eine hohe Löslichkeit in wässrigen Medien, chemische Stabilität unter Normalbedingungen, die Möglichkeit zur chemoselektiven Adressierung von *Exit*-Vektoren, eine möglichst ausgewogene Verteilung pharmakophorer Eigenschaften über die gesamte Oberfläche des Fragments, ein hoher Anteil an sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatomen sowie der einfache synthetische Zugang zu einem entsprechenden Fragment über eine ein- bis maximal drei-Stufensynthese mit kommerziell-verfügbaren Startmaterialien.

Gemäß diesem idealtypischen Anforderungsprofil ergab sich schließlich auch die Notwendigkeit neuartige Synthesemethoden zur Generierung entsprechender Moleküle in Betracht zu ziehen, da konventionell-verbreitete Reaktionen in der Medizinalchemie, wie z.B. Pd-katalysierte Kreuzkupplungen oder nukleophile aromatische Substitutionen, vor allem zum Aufbau planarer, sp^2 -reicher Grundstrukturen herangezogen werden. In einem ersten Schritt wurde daher zunächst eine umfangreiche Literaturrecherche zu potentiellen Synthesetechniken in den Datenbanken REAXYS und SCIFINDER durchgeführt. Die vielversprechendsten Methodiken wurden daraufhin zusammengetragen und durch die Konsortium-Mitglieder einer subjektiven Bewertung unterzogen. Aus diesem Set wurden schließlich drei repräsentative Reaktionen als Grundlage für die Generierung einer virtuellen Bibliothek mit Hilfe der Software KONSTANZ INFORMATION MINER (KNIME) ausgewählt und diese durch die Sprache *Reaction SMILES Arbitrary Target Specification* reaction (*Reaction SMARTS*) in ein computerlesbares Format überführt.

Die Durchführung der *in silico*-Reaktionen erforderte neben der Definition der Transformationsvorschrift jedoch auch noch die Einspeisung einer Datenbank mit entsprechenden Ausgangsmaterialien. Diese wurde zuvor durch die Konkatenation des Chemikalienkatasters der AG RAUH und der frei zugänglichen Datenbank ALDRICH MARKET SELECT¹ der Firma MERCK (ehemals SIGMA ALDRICH) generiert. Zum Zwecke dieses Vorhabens musste ein Workflow entwickelt werden, der die *Chemical Abstracts Service* (CAS)-Registrierungsnummern der jeweiligen Verbindungen aus der entsprechenden Excel-Datei extrahierte und unter Verwendung dieser, strukturelle Informationen mit Hilfe des *Chemical Identifier Resolver* (CIR)-Knoten in KNIME abrief.

¹ <https://www.aldrichmarketselect.com/>

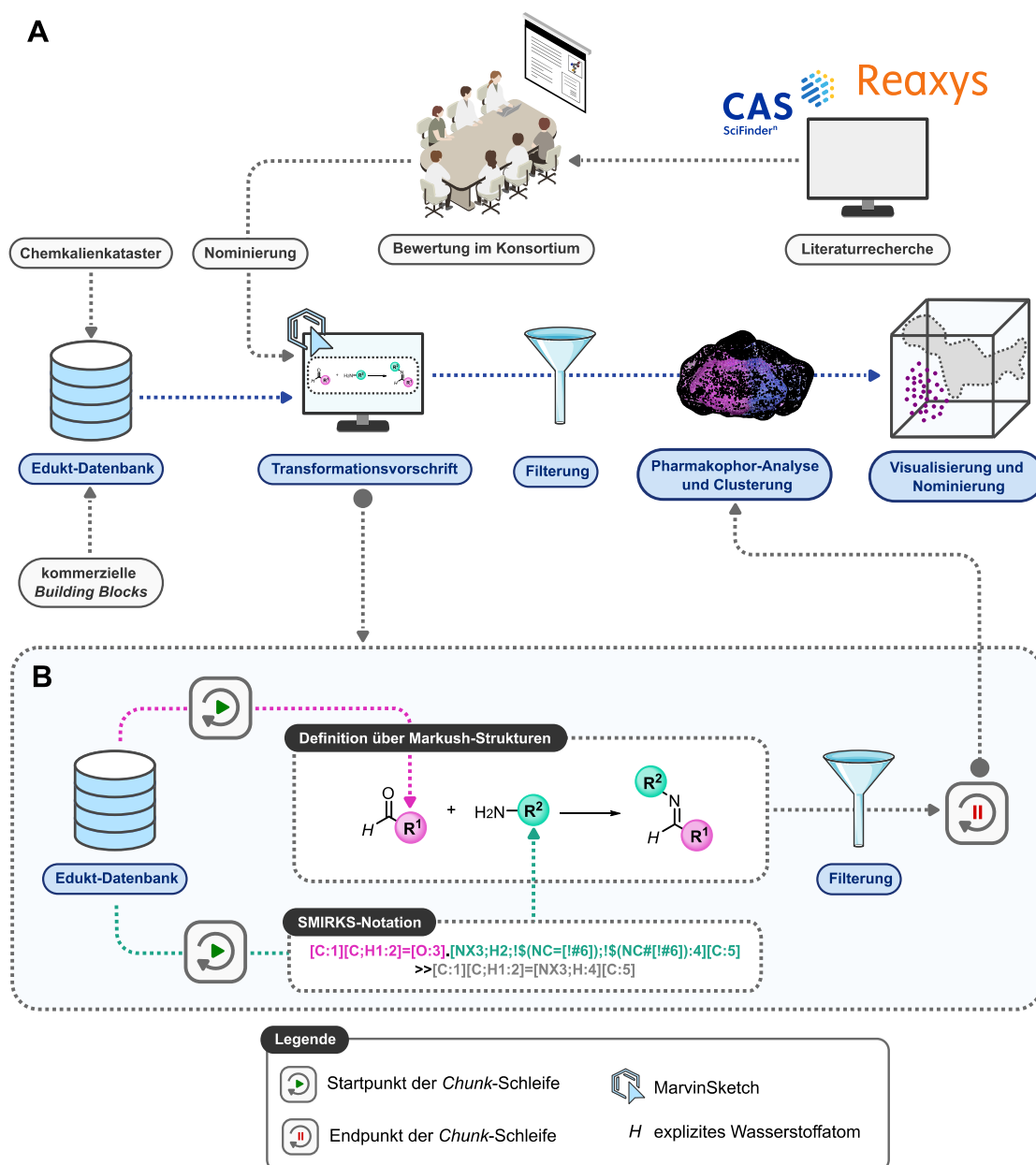


Abbildung 16 | Übersicht zu den notwendigen Schritten zur Implementierung von Reaktionsvorschriften in den FRAGTORY-Workflow. (A) Schematischer Aufbau des FRAGTORY-Workflows zur Generierung sp^3 -reicher Fragmente. In der Anfangsphase des Projekts stand die Literaturrecherche moderner, jedoch in der Medizinalchemie unterrepräsentierter, Reaktionen im Vordergrund. In einer Bewertungseinheit durch die Mitglieder des Konsortiums wurden verschiedene Synthesemethoden nominiert, die anschließend zunächst virtuell durch die Definition einer entsprechenden Transformationsvorschrift in den Workflow eingespeist werden sollten. Eine nachgeschaltete Pharmakophor-Analyse ermöglichte schließlich eine Clusterung der virtuellen Produktbibliothek, sodass aus dem erhaltenen PMI-Plot möglichst biodiverse Vertreter zur Synthese nominiert werden konnten. (B) Exemplarischer Ablauf zur Definition einer Transformationsvorschrift über Markush-Strukturen oder der SMIRKS-Notation am Beispiel der Iminbildung. Die Durchführung einer *in silico*-Reaktion erfordert eine möglichst spezifische Definition möglicher Reaktionspartner. Diese kann entweder mit Hilfe von MARVINSKETCH durch die Verwendung von Markush-Strukturen oder aber durch den Einsatz von SMIRKS-Codes erfolgen. Zur Minimierung der Arbeitsspeicherauslastung wurden die einzelnen Edukte in *Chunk*-Schleifen übergeben, sodass die Daten zu den generierten Produkten auf die Festplatte geschrieben wurden und sich somit nicht in der virtuellen Speicherverwaltung akkumulieren konnten.

Eine nachgeschaltete Kanonisierung der erhaltenen SMILES sowie die Entfernung von Salz-Ionen mittels dem *Salt Stripper* aus dem RDKit resultierte schließlich in einer Zusammenstellung von einsetzbaren Edukten, deren kommerzielle Verfügbarkeit aufgrund der verwendeten Datenbank-Quellen zu jeder Zeit gewährleistet war.

Die erstellte Edukt-Datenbank wurde anschließend für die Durchführung einer ersten virtuellen Testreaktion genutzt. Im Rahmen einer anvisierten Iminbildung sollten testweise 1000 repräsentative Aldehyde mit 1000 repräsentativen Aminen reagieren. Im Zuge dessen fiel auf, dass die Durchführung der *in silico*-Reaktion mehrere Schwachstellen im erstellten Workflow aufdeckte. Neben der Bildung von zahlreichen Produkten, die aus chemischer Sicht als nicht sinnvoll (z.B. da sie durch bestimmte Verknüpfungsmuster eine chemische Instabilität begünstigten etc.) erachtet werden konnten, stellte sich die lange Laufzeit und die massive Arbeitsspeicherauslastung bei Durchführung der Reaktion als limitierender Faktor heraus. Vor allem letztere Problematik führte in einigen Fällen zu einer Betriebsunfähigkeit von KNIME und damit zum Programmstillstand.

In einem nächsten Schritt sollte die Anzahl der reagierenden Edukte weiter erhöht werden, was einen weiteren exponentiellen Anstieg des Rechenaufwands erwarten ließ. Daher war es erforderlich, die Speicherauslastung im Prozess der Produktgenerierung zu minimieren. Zu diesem Zweck wurde eine sogenannte *Chunk*-Schleife eingeführt, bei der die Edukte schrittweise an die Transformationsvorschrift übermittelt werden. Der Vorteil dieser Methode bestand darin, dass nur eine begrenzte Anzahl an Reaktionen gleichzeitig durchgeführt wurde und die entstehenden Datenmengen nicht kumulativ im Arbeitsspeicher gesichert, sondern direkt auf die Festplatte ausgelagert wurden. Zudem ermöglichte die Anwendung von Filterkriterien (z.B. Molekulargewichtsfiler, PAINS etc.) bereits im Vorfeld die Aussortierung unerwünschter Produktstrukturen, wodurch eine Kompromittierung der Produktdatenbank verhindert werden konnte.

Mit Hilfe dieser Methode war es schließlich möglich Produktbibliotheken in einer Größenordnung bis zu 10^8 Molekülen zu generieren und diese tiefgehenden Analysen bezüglich der Verteilung ihrer pharmakophoren Eigenschaften sowie einer Vorhersage von physikochemischen Parametern zu unterziehen. Anschließend erfolgte das *Clustering* dieser Verbindungen auf Basis der unter Zuhilfenahme eines externen Python-Scripts berechneten 3D-Pharmakophor *Fingerprints* sowie der sogenannten „Nächster-Nachbar-Heuristik“ (engl. *k-nearest neighbor algorithm*). Eine Hauptkomponentenanalyse ermöglichte schließlich die Visualisierung dieser Ergebnisse in einem Diagramm und bot somit die Möglichkeit, repräsentative Synthesekandidaten aus divergierenden Arealen des chemischen Raums zu nominieren.

Es sei an dieser Stelle darauf verwiesen, dass ein beträchtlicher Anteil der generierten Produkte zwar theoretisch durch Anwendung der definierten Transformationsvorschrift zugänglich gewesen wäre, ihre synthetische Darstellung jedoch durch bestimmte Gegebenheiten erschwert oder gar unmöglich war. Beispiele hierfür bildeten Reaktionen von Startmaterialien mit multiplen, unmaskierten funktionellen Gruppen, die beispielsweise zu Konkurrenzreaktionen führen könnten (z. B. nukleofuge Gruppen, primäre Alkohole etc.) oder auch die Anwesenheit mehrerer funktioneller Gruppen mit den gleichen chemischen Eigenschaften. (z.B. mehrere Aldehydfunktionalitäten, mehrere Amin-Gruppen etc.). Aus der dargestellten Problematik resultierte die Notwendigkeit, spezifische Reaktivitätsregeln für die jeweiligen Reaktionen zu definieren, um diese als Filterkriterien zur Selektion spezifischer Edukte konsultieren zu können. Somit rückte neben der computerchemischen Definition der Synthesemethoden auch die experimentelle Validierung der Möglichkeiten und Grenzen verschiedener Synthesetechniken in den Fokus des FRAGTORY-*Workflows* und bildete die Grundlage der nachfolgenden Forschungsanstrebungen.

3.1.2 2-(Hydroxymethyl)morpholine als molekulare Vertreter idealtypischer Fragmente

Im Rahmen des im Konsortium durchgeführten Bewertungsprozesses der aus der Literatur herausgesuchten Synthesemethoden rückte vor allem die von BREUNING *et al.* und HENEGAR beschriebene Eintopfreaktion zur Darstellung von 2-(Hydroxymethyl)morpholinen in den Blickpunkt.²²⁷⁻²²⁸ Dieser Umstand ließ sich auf eine Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren zurückführen.

Hinsichtlich der Eigenschaften der durch die Reaktion gebildeten molekularen Klasse der 2-(Hydroxymethyl)morpholine ergab sich ein ideales Wunschprofil für niedermolekulare sp³-reiche Fragmente. So baut sich das Grundgerüst des vollständig gesättigten Heterozyklen-System aus zwei Sauerstoff- und einem Stickstoffatom im Vergleich zu fünf Kohlenstoff-Grundgerüstatomen auf. Dies entspricht einem relativen Anteil von 38% Heteroatomen bei einem insgesamt niedrigen Molekulargewicht von 117.15 g/mol. Aufgrund dieser Parameter bot diese Klasse von Verbindungen einerseits genügend Spielraum zur Einbringung zusätzlicher Modifikationen, andererseits aber auch einen ausreichend hohen polaren Charakter. Die in der Literatur angegebene Retentionszeit von 11.9 min unterstrich zudem den ausreichend hohen wasserlöslichen Charakter der Verbindungsklasse.

Die Verteilung pharmakophorer Eigenschaften ließ erkennen, dass sowohl der Donator als auch die Akzeptoren nahezu über die gesamte Oberfläche des Grundgerüsts verteilt sind. Durch die Funktionalisierung des sekundärenamins könnten zudem weitere Pharmakophore wie beispielsweise hydrophobe Schutzgruppen eingeführt werden, wodurch sich der Bioaktivitätsraum entsprechend vergrößern ließe.

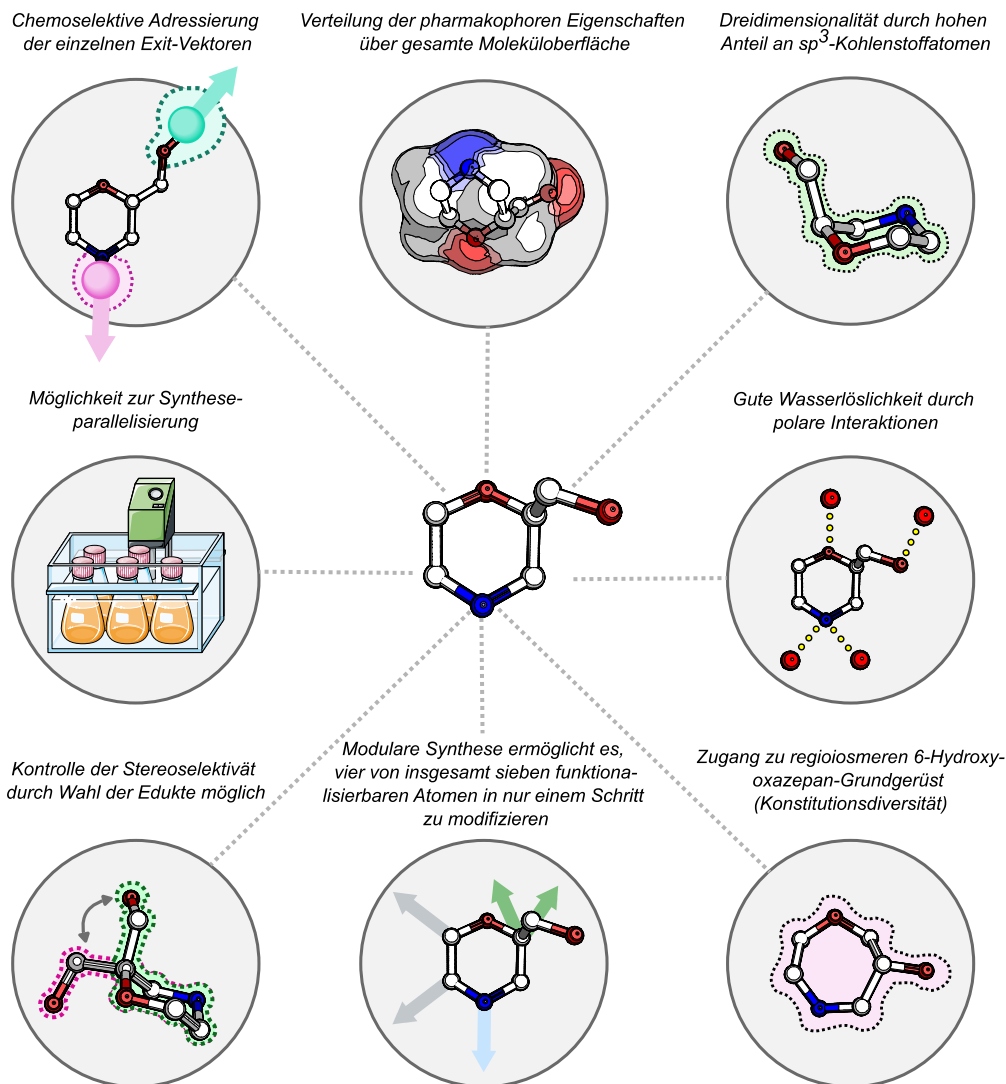


Abbildung 17 | Übersicht zu den wichtigsten Eigenschaften von 2-(Hydroxymethyl)morpholin und deren Eignungsmerkmale als idealtypische sp^3 -reiche Fragmente. Die molekulare Klasse der 2-(Hydroxymethyl)morpholine ist charakterisiert durch ihr geringes Molekulargewicht bei einem gleichzeitig hohen Anteil an sp^3 -reichen Kohlenstoffatomen und der Präsenz von drei Heteroatomen. Diese günstige Konstellation führt zu einer guten Wasserlöslichkeit bei einer insgesamt vorteilhaften Verteilung der pharmakophoren Eigenschaften über die gesamte Moleküloberfläche. Die literaturbeschriebene synthetische Darstellung dieser Verbindungen bietet ebenfalls interessante Möglichkeiten für die Implementierung im Kontext des Aufbaus einer Fragment-Bibliothek. Diese umfassen unter anderem die Kontrolle der Stereoselektivität (sowohl Dia- als auch Enantioselektivität) durch die Wahl der Edukte, der hohe Grad an vermittelter Funktionalisierbarkeit sowie die Möglichkeit der Automation bzw. Parallelisierung der Reaktion.

Neben den optimalen molekularen Eigenschaften der 2-(Hydroxymethyl)morpholine, bot jedoch auch deren synthetische Darstellungsweise attraktive Möglichkeiten im Kontext des Aufbaus von Fragment-Bibliotheken. So legten die Arbeiten von BREUNING *et al.* und HENEGAR bereits einen Teil des möglichen Substratspektrums offen.²²⁷⁻²²⁸ Dabei demonstrierten die Autoren, dass sich ausgehend von der Reaktion von kommerziell erhältlichen β -Aminoalkoholen und Epichlorhydrin eine Reihe von 2-(Hydroxymethyl)morpholin in moderaten bis guten Ausbeuten synthetisieren ließen.

Weiterhin konnte die säulenchromatographische Aufreinigung der erhaltenen Produkte durch einen Destillationsschritt substituiert werden, wodurch sich der Anwendungsbereich für parallelisierte und automatisierte Hochdurchsatzverfahren ergab.

Interessanterweise zeigten die Autoren jedoch auch, dass sich im Zuge der Reaktion ein siebengliedriger 6-Hydroxyoxazepan-Ring als Minder mengenprodukt in einem Verhältnis von 1:9 zum Hauptmengenprodukt bildete. Da sich dieses Positionsisomer in hoher Reinheit von dem Produktgemisch abtrennen ließ, stellte sich dieser Umstand als ideale Grundlage dar, weitere konstitutiv-diverse Moleküle im Zuge der Reaktion isolieren zu können. In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, dass die Reaktion durch den Einsatz von enantiomerenreinen Epichlorhydrin und β -Aminoalkoholen ebenfalls enantio- und diastereoselektiv geführt werden konnte. Da durch die beabsichtigte Kristallisation entsprechender Fragment-*Hits* eine Unterscheidung von Enantiomeren durch die Analyse der Elektronendichte möglich war, stellte es sich somit als ausreichend dar, lediglich eine diastereoselektive Reaktionsführung anzustreben und somit racemische Produkte zu erhalten.

Ferner erwies sich auch die in der Literatur dargestellte synthetische Modularität der Methodik als vorteilhafte Gegebenheit. So war es möglich vier von sieben funktionalisierbaren Positionen innerhalb des 2-(Hydroxymethyl)morpholin-Grundgerüsts nur durch die Variation der jeweiligen β -Aminoalkohole zu modifizieren. Dies bot einerseits Vorteile bei der Generierung chemisch-diverser Vertreter im Rahmen des Aufbaus einer Substanzbibliothek, andererseits konnte auf diese Weise die Funktionalisierbarkeit der Moleküle im Falle einer möglichen Leitstrukturoptimierungsphase gewährleistet werden. Diesbezüglich konnte aufgrund der unterschiedlichen chemischen Natur der im Grundgerüst befindlichen funktionellen Gruppen ebenfalls davon ausgegangen werden, dass eine Adressierung der *Exit*-Vektoren chemoselektiv erfolgen konnte. Die geschilderten Vorteile zeigten deutlich die Relevanz dieser Synthesemethodik zum Aufbau sp^3 -reicher Fragmentbibliotheken auf und begründeten daher auch die Entscheidung diese in das Repertoire des FRAGTORY-Workflows aufzunehmen.

3.1.3 Etablierung einer literaturbeschriebenen Eintopfreaktion zur Generierung chemisch-diverser 2-(Hydroxymethyl)morpholin-Fragmente

Hinsichtlich der in Abschnitt 3.1.2 dargelegten optimalen Grundvoraussetzungen sollte im Fortlauf des Projekts die beschriebene Eintopfreaktion zur Darstellung von 2-(Hydroxymethyl)morpholin in den *Workflow* der FRAGTORY eingebunden werden. Im Rahmen dessen definierte Frau Dr. CHRISTIANE EHRT in Anlehnung zu den beschriebenen Testversuchen des Abschnitts 3.1.1 zunächst eine Transformationsvorschrift, mit Hilfe derer eine 23.536 Moleküle umfassende Produktbibliothek generiert werden konnte. Diese wurde anschließend geclustert und die sechs repräsentativen Moleküle (\pm)-**3a**, (\pm)-**4a**, (\pm)-**3b**, *trans*-(\pm)-**3c**, *trans*-(\pm)-**3d** und *cis*-(\pm)-**3e** zur Synthese nominiert.

Zwecks der intentionierten Darstellung der entsprechenden Synthesekandidaten wurde in einem ersten Schritt auf Grundlage der bereits in der Literatur beschriebenen Synthese von (\pm)-*N*-Benzyl-2-(hydroxymethyl)morpholin ((\pm)-**3a**) zunächst die Durchführung des veröffentlichten Prozessprotokolls erprobt. Dazu wurde eine Lösung von *N*-Benzylethanolamin (**1a**) in zuvor absolutierten Toluol hergestellt und diese anschließend mit racemischen Epichlorhydrin ((\pm)-**2**), der im Hochvakuum getrockneten Lewis-Säure (LS) Lithiumperchlorat und der anorganischen Base Natriummethanolat zur Reaktion gebracht. Nach insgesamt 48 Stunden Laufzeit und anschließender Aufarbeitung konnte durch säulenchromatographische Reinigung sowohl das 2-(Hydroxymethyl)morpholin (\pm)-**3a** wie auch das 6-Hydroxy-1,4-oxazepan (\pm)-**4a** im literaturbeschriebenen Verhältnis von 9:1 und moderaten Ausbeuten erhalten werden.

Angesichts dieser positiven Ergebnisse wurden die Synthesen der weiteren vier Derivate zwecks Reproduzierbarkeit unter den gleichen erprobten Bedingungen durchgeführt. Dabei konnten die beiden 2-(Hydroxymethyl)morpholine *trans*-(\pm)-**3c** und *trans*-(\pm)-**3d** in schlechten bis moderaten Ausbeuten von 19% und 36% erhalten werden. Die Reaktion zu den beiden Verbindungen (\pm)-**3b** und *cis*-(\pm)-**3e** führte hingegen in beiden Fällen unter den literaturbeschriebenen Konditionen zur Entstehung eines komplexen Produktgemischs, welches sich auch nach mehrmaligen säulenchromatographischen Reinigungsversuchen nicht auftrennen ließ.

Mögliche Gründe für das Scheitern dieser Reaktionen ließen sich jedoch anhand einer detaillierten mechanistischen Betrachtung ableiten. Bezugnehmend auf die Parametrisierungsstudien von BREUNING *et al.* konnte dazu zunächst die zentrale Bedeutung einer *N*-Benzyl- bzw. *N*-Methylgruppe für den erfolgreichen Ablauf der Reaktion antizipiert werden.²²⁷ Rückführbar war dies unter anderem auf die notwendige Anwesenheit eines stark nukleophilen, sekundärenamins, da dieses in Gegenwart des konkurrierenden primären Alkohols den Angriff auf das C3-Atom des Epichlorhydrins initiieren muss (siehe Abbildung 20). Nach erfolgter Ringöffnung bildet sich über einen intramolekularen Kaskadenprozess, erneut ein Oxiran-Ring, der nachfolgend durch den Angriff der Hydroxygruppe des Aminoalkohols entweder in einer 6-*exo-tet*- oder einer 7-*endo-tet*-Sequenz geöffnet werden kann.

An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass die verwendete Lewis-Säure im Rahmen dieses Szenarios die Rolle eines Elektrophilie-steigernden Koordinationspartners einnimmt. Dieser gewährleistet die regioselektive Epoxidöffnung gegenüber der nukleophilen Substitution der Chlorgruppe und steuert somit die Dia- und Enantioselektivität der Reaktion. Bei Einsatz von racemischem Epichlorhydrin ((\pm)-**2**) in Gegenwart von enantiomerenreinen β -Aminoalkoholen kann die Verwendung von Lithiumperchlorat prinzipiell als optional angesehen werden, da beide mechanistischen Pfade zu den gleichen Diastereomeren führen würden, die Produkte jedoch als Enantiomergemisch erhalten werden.

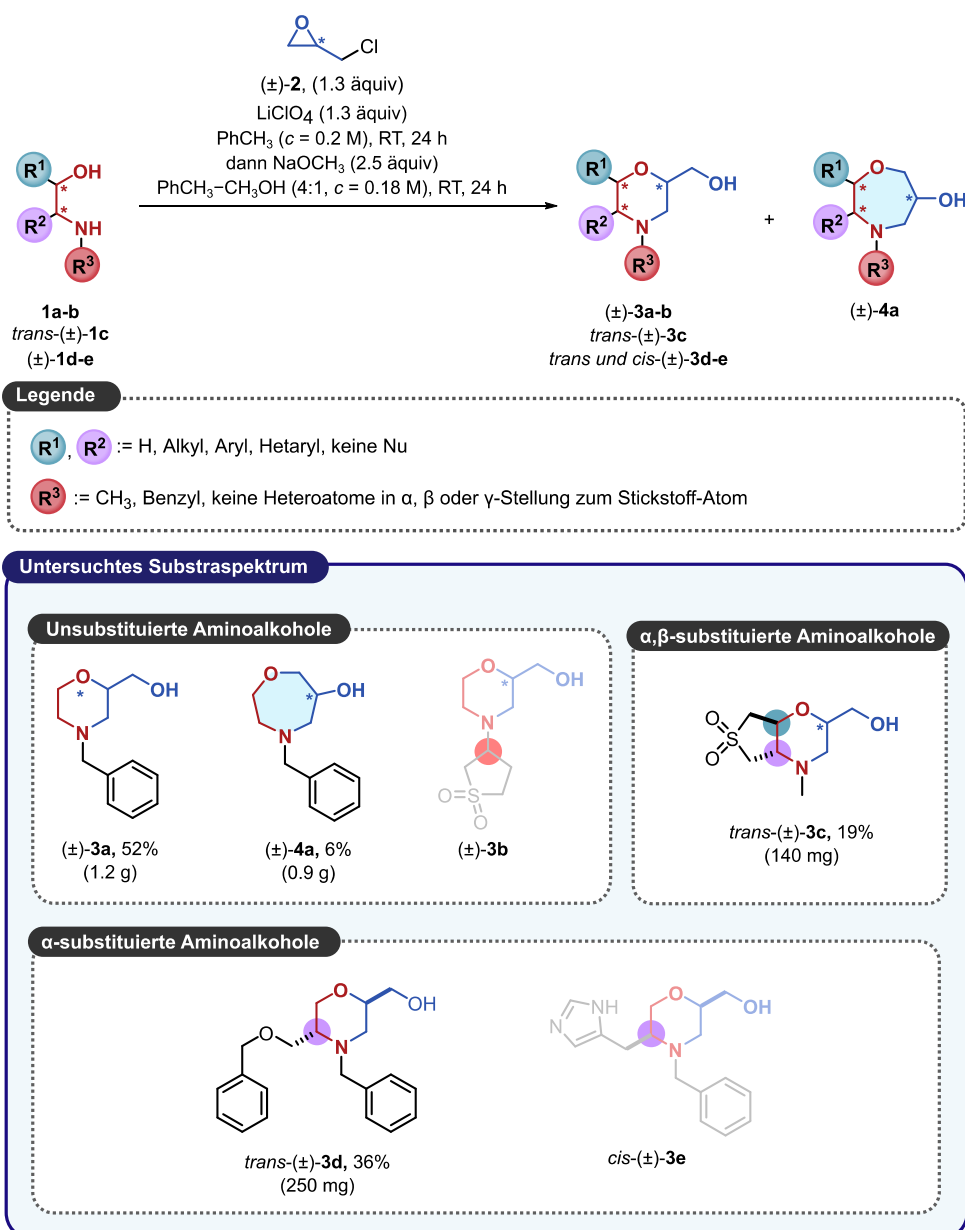


Abbildung 18 | Übersicht zur etablierten Eintopfreaktion für die Darstellung von 2-(Hydroxymethyl)morpholinen und 6-Hydroxyoxazepanen. Die Untersuchung des Substratspektrums offenbarte ein limitiertes Reaktivitätsfenster bezüglich des Einsatzes von bestimmten Aminoalkoholen. Diese Einschränkungen wurden auf das komplexe mechanistische Szenario zurückgeführt, welches eine spezifische Abstimmung einzelner Reaktionsbedingungen erforderte.

Da jedoch eine präferentielle Bildung der 2-(Hydroxymethyl)morpholine über eine 6-*exo-tet*-Zyklisierung angestrebt wurde, sollte durch die Zugabe der Lewis-Säure der mechanistische Seitenpfad der konkurrierenden 7-*endo-tet*-Zyklisierung weitestgehend unterdrückt werden. BREUNING *et al.* erwähnten weiterhin, dass aufgrund des komplexen mechanistischen Ablaufs, die Abstimmung der entsprechenden Reaktionsbedingungen von zentraler Bedeutung sei.

So demonstrierten die Autoren, dass die Reaktion empfindlich auf die Änderung verschiedenster Parameter, wie Lösemittel, Base, Temperatur und Reaktionszeit reagierte.²²⁷

Auch HENEGAR beobachtete einen ähnlichen Trendverlauf und identifizierte lediglich protische Lösungsmittel, wie Methanol und *iso*-Propanol sowie die organische Base Tetraethylammoniumhydroxid als potentielle Substitute für die herkömmlich verwendeten Reagenzien.²²⁸ Interessanterweise zeigte keine der beiden Publikationen tiefergehende Parametrisierungsstudien zu tolerierten Gruppen am Stickstoffatom des β -Aminoalkohols auf, wengleich die Anwesenheit einer *N*-Methyl- oder *N*-Benzylgruppe als Grundvoraussetzung postuliert wurde.

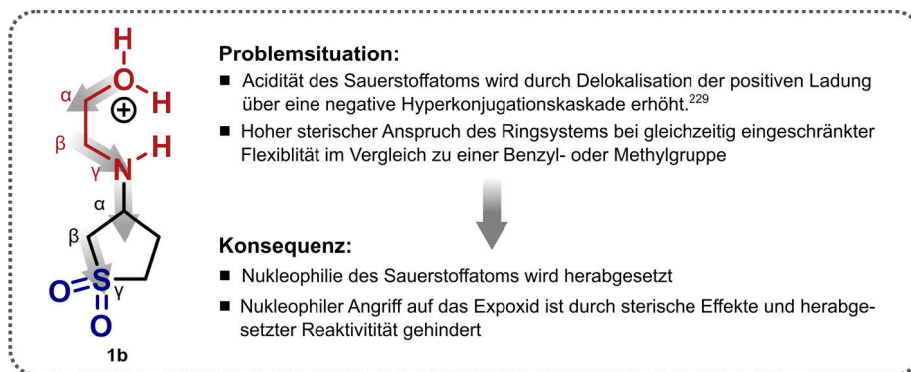


Abbildung 19 | Erklärungsansatz für die limitierte Auswahl geeigneter Funktionalitäten zur Substitution des Stickstoffatoms des β -Aminoalkohols. In den konsultierten Literaturquellen fanden lediglich die Verwendung von *N*-Benzyl- und *N*-Methylgruppen als geeignete Schutzstrategie wieder, jedoch wurden dabei nicht die Gründe für diese Beschränkungen genannt. Hinsichtlich der beobachteten Limitation bei der Synthese der Verbindung (\pm)-**3b** kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sterisch anspruchsvolle Gruppen mit Heteroatomen in α , β oder γ -Stellung zum Stickstoffatom abträglich für die Reaktivität der Alkoholfunktionalität sind. Dieser Erklärungsansatz steht in Einklang mit dem ausgeführten empirischen Regelwerk von MORGENTHALER *et al.*²²⁹

Dieser Umstand ließ die Hypothese zu, dass eine Feinregulierung des pK_s -Wert des Alkohols für einen erfolgreichen Ablauf der Reaktion essentiell war. Da die Hydroxylgruppe über stereoelektronische Effekte in direkter negativer Hyperkonjugation zu der Aminogruppe steht, wird die Basizität der Heteroatome maßgeblich durch die chemische Natur des Substituenten am Stickstoffatom beeinflusst (siehe auch Abschnitt 3.2.6). Im Falle einer *N*-Methyl oder *N*-Benzylgruppe würden lediglich positiv induktive Effekte auf das System einwirken, die nur einen marginalen Einfluss auf den pK_s -Wert des Sauerstoffatoms ausüben. Befinden sich jedoch auch andere heteroatomare Gruppen, wie beispielsweise Sulfone oder Nitrogruppen, in Nachbarschaft zum Stickstoffatom kann über eine σ -Transduktionskaskade Elektronendichte aus dem Sauerstoffatom delokalisiert und somit die Basizität bzw. Nukleophilie herabgesetzt werden. Bezieht man diese Ausführung auf den Aminoalkohol **1b**, so ist ersichtlich, dass aufgrund des herabgesetzten pK_s -Werts der Hydroxylgruppe (siehe Abbildung 19) die zweite intramolekulare Ringöffnung nicht stattfinden kann und somit Konkurrenzreaktionen in den Vordergrund treten (siehe Abbildung 20).

Darüber hinaus stellt die Präsenz unmaskierter nukleophiler Gruppen innerhalb der β -Aminoalkohole eine ebenfalls problematische Ausgangslage für einen störungsfreien Ablauf des mechanistischen Kontinuums dar.

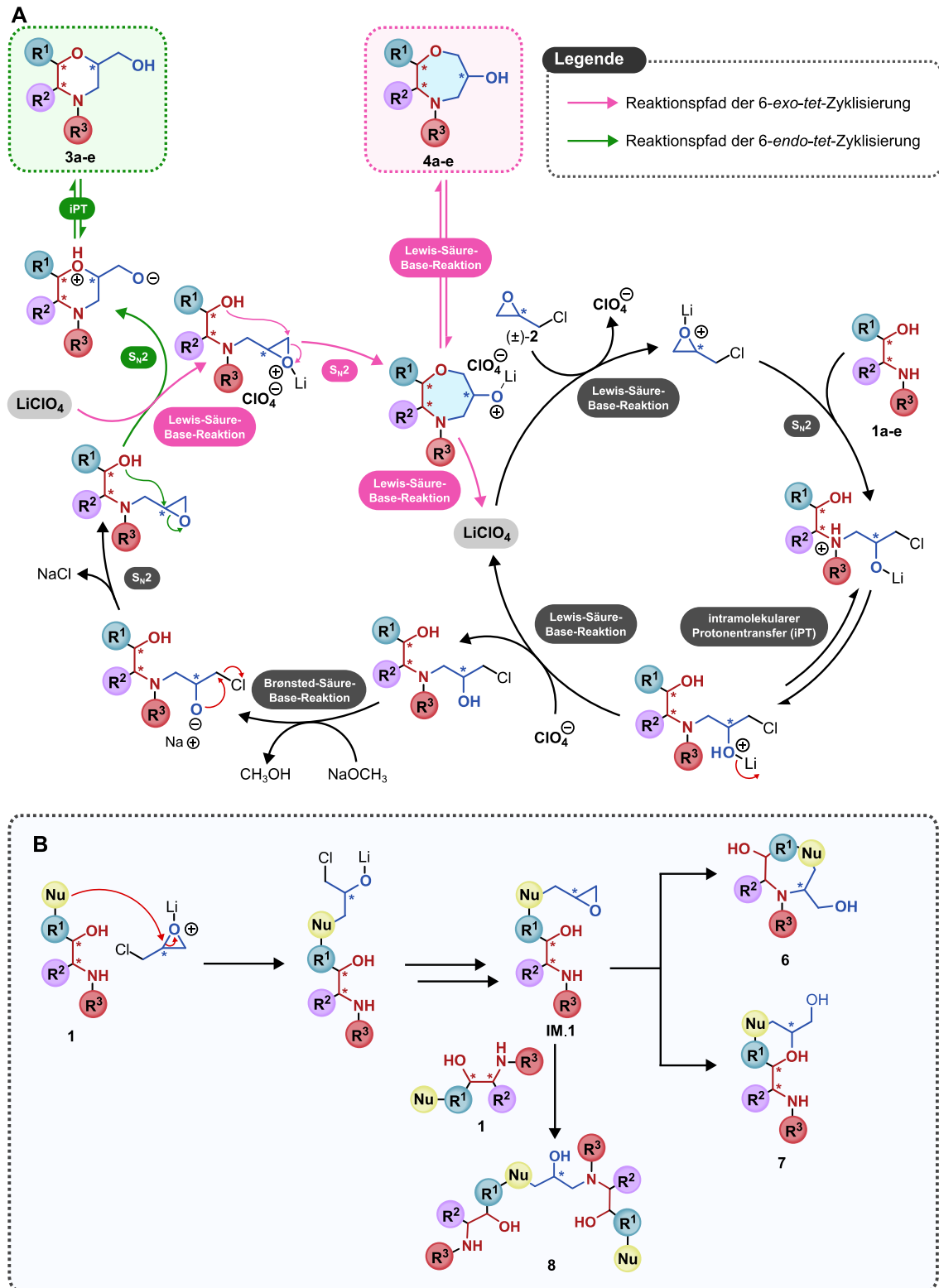


Abbildung 20 | Übersicht zum hypothetischen Katalysezyklus der Eintopfreaktion und daraus abgeleitete mögliche Nebenreaktionen. (A) Der postulierte hypothetische Katalysezyklus der Eintopfreaktion wird durch die experimentelle Daten von BREUNING *et al.* gestützt.²²⁷ (B) Mögliche Nebenreaktionen bei Einsatz eines ungeschützten nukleophilen β -Aminoalkohols. Durch die kompetitive Reaktivität der eingebrachten Gruppe könnte eine Vielzahl ungewollter Substitutionsreaktionen eintreten.

Wie Abbildung 20b zeigt, könnte aufgrund vorherrschender kompetitiver Reaktivitäten ein Konglomerat an unterschiedlichsten Nebenreaktionen auftreten, wie beispielsweise bei der intentionierten Synthese der Verbindung *cis*-(±)-**3e** zu sehen. Daher wäre eine Maskierung der Startmaterialien vor der Generierung solcher Produkte dringend erforderlich.

Angesichts dieser Ergebnisse konnten die Möglichkeiten und Grenzen der Eintopfreaktion zur Erschließung von 2-(Hydroxymethyl)morpholin im Kontext des Aufbaus einer sp^3 -reichen Fragmentbibliothek erfolgreich erschlossen werden. Es konnte festgestellt werden, dass die angewendete Synthesemethode gewisse Einschränkungen hinsichtlich des Austauschs von Lösemittel und Reagenzien aufwies und sich daher nur bedingt für den Aufbau eines breiten chemischen Raums eignete. Dennoch ermöglichten diese Einsichten die Definition von spezifischeren Filterkriterien, um den synthetisch-zugänglichen Raum im Vorfeld besser eingrenzen zu können.

3.1.4 Perizyklische Reaktionen als idealtypische Musterreaktionen zur Voraussage des synthetisch-zugänglichen Raums

Die exemplarische Etablierung der Eintopfreaktion zur Generierung von 2-(Hydroxymethyl)morpholin offenbarte potenzielle Problemstellen bezüglich der Einpflegung von Synthesesequenzen im FRAGTORY-Workflow. Die Strategie, potenzielle Synthesekandidaten nach der Generierung einer Produktbibliothek durch eine im Vorfeld durchgeführte *in silico*-Reaktion zu nominieren, erwies sich hinsichtlich der anschließenden Beurteilung ihrer Synthetisierbarkeit als unvorteilhaft.

In einem nächsten Schritt sollte daher eine Reaktion etabliert werden, die es ermöglichte, basierend auf theoretischen und empirischen Vorhersagemodellen den tatsächlich synthetisch zugänglichen chemischen Raum im Vorfeld vorherzusagen. Im Rahmen dieser Bemühungen sollten zudem die Möglichkeit zur stereospezifischen Reaktionsführung bei gleichzeitig guter Atomeffizienz, ein großer einsetzbarer Substratumfang sowie die Gewährleistung eines außerordentlich hohen Maßes an Chemoselektivität im Vordergrund stehen. Ein Reaktionstypus, der diese Bedingungen erfüllen konnte, fand sich in der Klasse der perizyklischen Reaktionen, da diese aufgrund ihres konzertierten und Grenzorbital-kontrollierten Verlaufs keine ionische oder radikalische Zwischenstufe durchlaufen. Diese Eigenschaft machte sie hinsichtlich der in der Vergangenheit bereits exzessiv durchgeführten Grundlagenforschung zu einem besonders attraktiven Forschungsobjekt für die Entwicklung von computerchemischen Vorhersagemodellen des synthetisch zugänglichen Raums. Des Weiteren ließ der zugrunde liegende Mechanismus eine hohe Toleranz bezüglich weiterer chemischer Funktionalitäten erwarten, da die Generierung der Produkte lediglich über eine Reorganisation von π -Elektronen realisiert wird.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Herrn ALEXANDER SCHNEIDER sollte angesichts dieser ideal erscheinenden Voraussetzungen die Eignung verschiedener Heterovarianten der DIELS-ALDER-Reaktion mit normalen Elektronenbedarf bezüglich des Aufbaus sp^3 -reicher Fragmentbibliotheken genauer untersucht werden. Die daraus resultierenden Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten lediglich in Auszügen präsentiert, da sie bereits Bestandteil der Ausarbeitung der schriftlichen Arbeit von Herrn SCHNEIDER waren.

3.1.5 Experimentelle Analysen zu potentiellen Limitationen der oxa-DIELS-ALDER-Reaktion mit normalen Elektronenbedarf

Als Grundlage zur Etablierung verschiedener Variationen der oxa-DIELS-ALDER-Reaktion diente eine Publikation von BURLAND *et al.* aus dem Jahre 2010. In dieser beschrieben die Autoren den profitablen Einsatz von Mikrowellenstrahlung zur Beschleunigung und Erhöhung der Effizienz der Reaktion und untermauerten ihre Ergebnisse durch die Synthese diverser Pyranon- und Pyridinon-Derivate in sehr guten Ausbeuten.²³⁰ Bemerkenswerterweise wurde im Gegensatz zu den in Druckgefäßen durchgeführten Reaktionen, ein vollständiger Umsatz der Edukte nicht nach 24 Stunden sondern bereits nach 90 Sekunden Laufzeit beobachtet. Der nachfolgende Quenchvorgang mittels Trifluoroessigsäure, die Entfernung des Lösemittels unter verminderten Druck sowie die Möglichkeit zur Durchführung einer säulenchromatographischen Trennung offerierte zudem ein Aufreinigungsprotokoll, das das Potential zur Automatisierung und Parallelisierung bot.

Auf Grundlage dieser Ausführungen erfolgte in einem ersten Schritt die experimentelle Etablierung der mikrowellen-induzierten oxa-DIELS-ALDER-Reaktion zwischen dem schwach aktivierten, elektronenarmen Dienophil 3-Brombenzaldehyd (**10a**) und dem elektronenreichen DANISHEFSKY-Dien (**9**) unter den literaturbekannten Bedingungen. Dabei konnte das erwartete Pyranon (\pm)-**11a** in einer moderaten Ausbeute von 39% erhalten und somit die Plausibilität der erschlossenen Konditionen verifiziert werden.

Aufbauend auf diesem Resultat sollten in einem Folgeschritt zwecks der intentionierten Definition spezifischer Reaktivitätsregeln für den FRAGTORY-Workflow schließlich die Grenzen der Kombinationsmöglichkeiten verschiedener Diene und Hetero-Dienophile genauer erschlossen werden. Im Zuge dessen wurde das elektronenreiche DANISHEFSKY-Dien (**9**) mit dem stark aktivierten, elektronenarmen Dienophil Ethylglyoxylat (**10b**) zur Reaktion gebracht. Letzteres wurde zudem auch mit dem nicht-aktivierten Dien 1,3-Cyclohexadien (**12**) unter den zuvor erprobten Reaktionsbedingungen umgesetzt.

Massenspektrometrische Untersuchungen mittels DC-MS legten dabei offen, dass insbesondere 1,3-Cyclohexadien (**12**) einer starken Polymerisationsreaktion unterlag und daher kein nennenswerter Umsatz zum gewünschten Produkt (\pm)-**13** verzeichnet wurde.

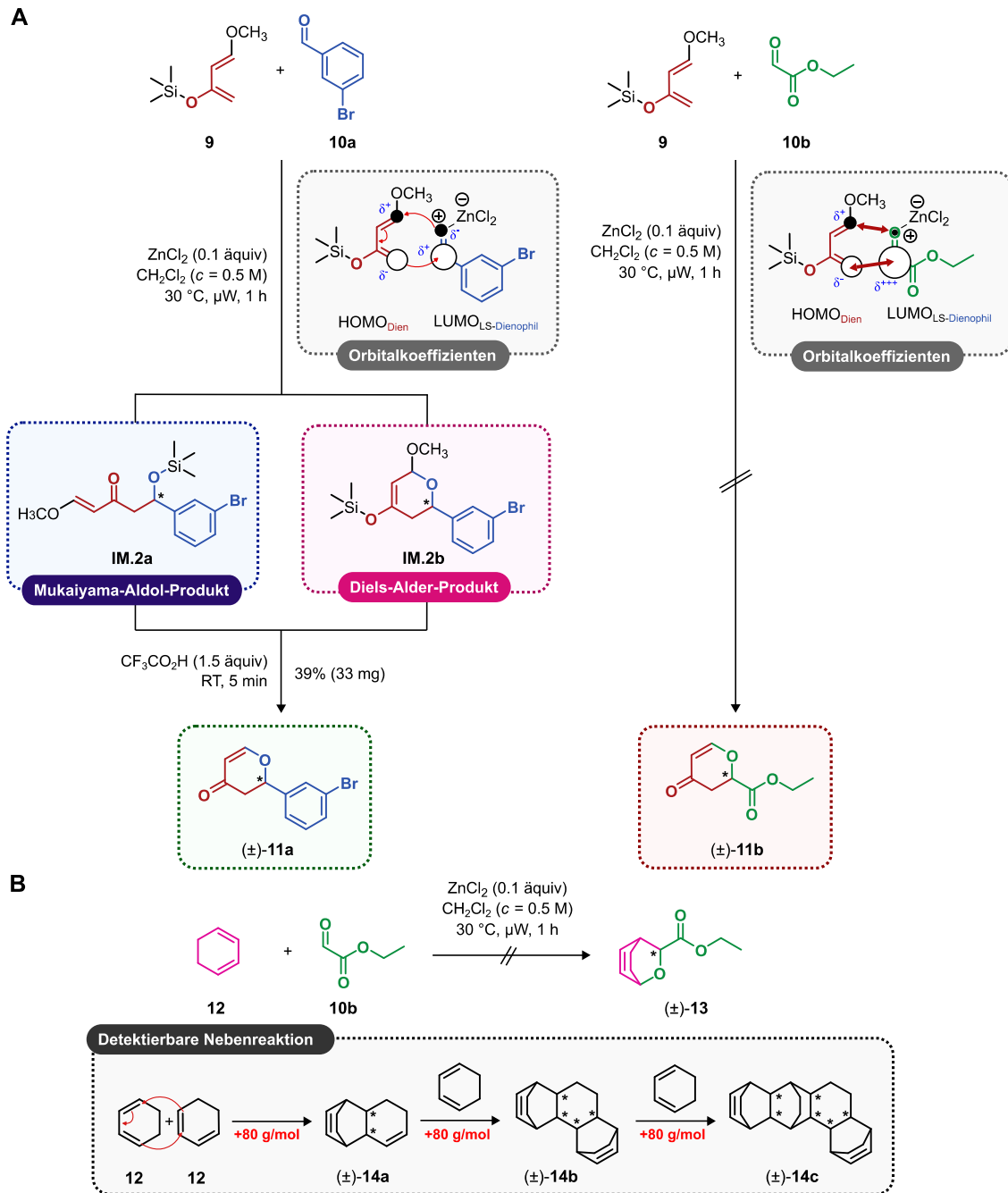


Abbildung 21 | Gegenüberstellung der erfolgreich und nicht-erfolgreich durchgeführten oxa-DIELS-ALDER-Reaktionen unter Lewis-Säure-Katalyse (A) oxa-DIELS-ALDER-Reaktionen zwischen dem elektronenreichen Danishefsky-Dien (**9**) und einem schwach aktivierten, elektronenarmen Dienophil. Die experimentelle Durchführung offenbarte dass unter Einsatz von Zinkchlorid und Mikrowelleneinstrahlung nur die Reaktion zwischen dem Danishefsky-Dien (**9**) und 3-Brombenzaldehyd (**10a**) erfolgreich war. Der Austausch des Dienophils gegen Ethylglyoxal (**10b**) führte trotz idealer Voraussetzungen bezüglich der chemischen Natur beider Reaktionspartner zur unspezifischen Bildung einer Vielzahl von Nebenprodukten. **(B)** oxa-DIELS-ALDER-Reaktion zwischen dem neutralen 1,3-Cyclohexadien (**12**) und Ethylglyoxal (**10b**) unter Lewis-Säure-Katalyse. Auch die Reaktion zwischen einem unaktivierten Dien und einem elektronenreichen Dienophil führte zur ausschließlichen Nebenproduktbildung. Massenspektrometrische Untersuchungen legten einen konkurrierenden Polymerisationsmechanismus nahe.

Entgegen den Erwartungen führte jedoch auch die Reaktion des elektronenreichen DANISHEFSKY-Diens (**9**) mit dem stark-aktivierten elektronenarmen Hetero-Dienophil Ethylglyoxalat (**10b**) nicht zur Bildung des erhofften Produkts (\pm)-**11b**. Da dieses Ergebnis jedoch den grundlegenden Reaktivitätsregeln der oxa-DIELS-ALDER-Reaktion mit normalen Elektronenbedarf widersprach, sollten durch die Variation der Reaktionsbedingungen möglicherweise unvorteilhafte Störfaktoren identifiziert und behoben werden (siehe Tabelle 4 und Tabelle 5).

In der Tat zeigte sich dabei, dass sowohl eine Verlängerung der Reaktionszeit sowie der Austausch des Lösemittels keinen positiven Einfluss auf die gewünschte Produktbildung ausübte. Allerdings führte die Variation der Lewis-Säure sowohl für die Reaktion des 1,3-Cyclohexadiens (**12**) als auch die des DANISHEFSKY-Diens (**9**) zum erfolgreichen Umsatz zu den beiden antizipierten Produkten (\pm)-**11b** und (\pm)-**13**. Erwähnenswert ist dabei die Tatsache, dass das Pyranon (\pm)-**11b** ausschließlich bei Verwendung von Aluminiumtrichlorid erfolgreich synthetisiert werden konnte. Die Generierung des Dehydrocineols (\pm)-**13** gelang hingegen nur unter Einsatz der weniger lewis-aciden Säure Bismuttrichlorid.

Dieser beobachtbare Trend legte die Vermutung nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen der chemischen Natur des eingesetzten Katalysators und den elektronischen Eigenschaften des Dienophils geben musste. Dieser Annahme folgend wurde ein Erklärungsmodell auf Molekülorbital-Basis konzipiert, welches den energetischen Einfluss des dativen Komplexbildungsereignisses mit der Härte bzw. Weichheit der jeweiligen Lewis-Säuren korrelierte (siehe Abbildung 22a).

Auf Grundlage dieses Konzeptes wurde zunächst das Kation Al^{3+} aufgrund der vergleichsweise geringen atomaren Größe und der hohen Ladungsdichte nach dem Konzept der Harten und Weichen Säuren und Basen (engl.: *Hard and Soft Acids and Bases*, HSAB) von PEARSON als harte Säure klassifiziert. Per Definition weisen diese Art von Teilchen schlechte Polarisations-eigenschaften auf und können daher kaum zusätzliche Ladungsdichte, beispielsweise durch die Koordination an ein Heteroatom, delokalisieren. Bezogen auf die Lewis-Säure-Katalyse im Falle der oxa-DIELS-ALDER-Reaktion ließ sich somit schlussfolgern, dass durch Einsatz von Aluminiumtrichlorid nur eine marginale energetische Absenkung des höchstbesetzten (engl.: *Highest Occupied Molecular Orbital*, HOMO)- und des niedrigst unbesetzten (engl.: *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, LUMO)-Grenzorbital des LS-Dienophil-Komplexes erfolgen konnte.

Weichere Kationen wie Bi^{3+} oder Zn^{2+} sind hingegen durch einen größeren atomaren Radius und damit auch durch eine verbesserte Fähigkeit zur Polarisierung ihrer Elektronenhülle charakterisiert. Koordiniert eine solche Lewis-Säure an ein Dienophil, kann diese mehr Ladungsdichte aufnehmen und somit die Elektronenarmut des entstehenden LS-Dienophil-Komplexes deutlich steigern.

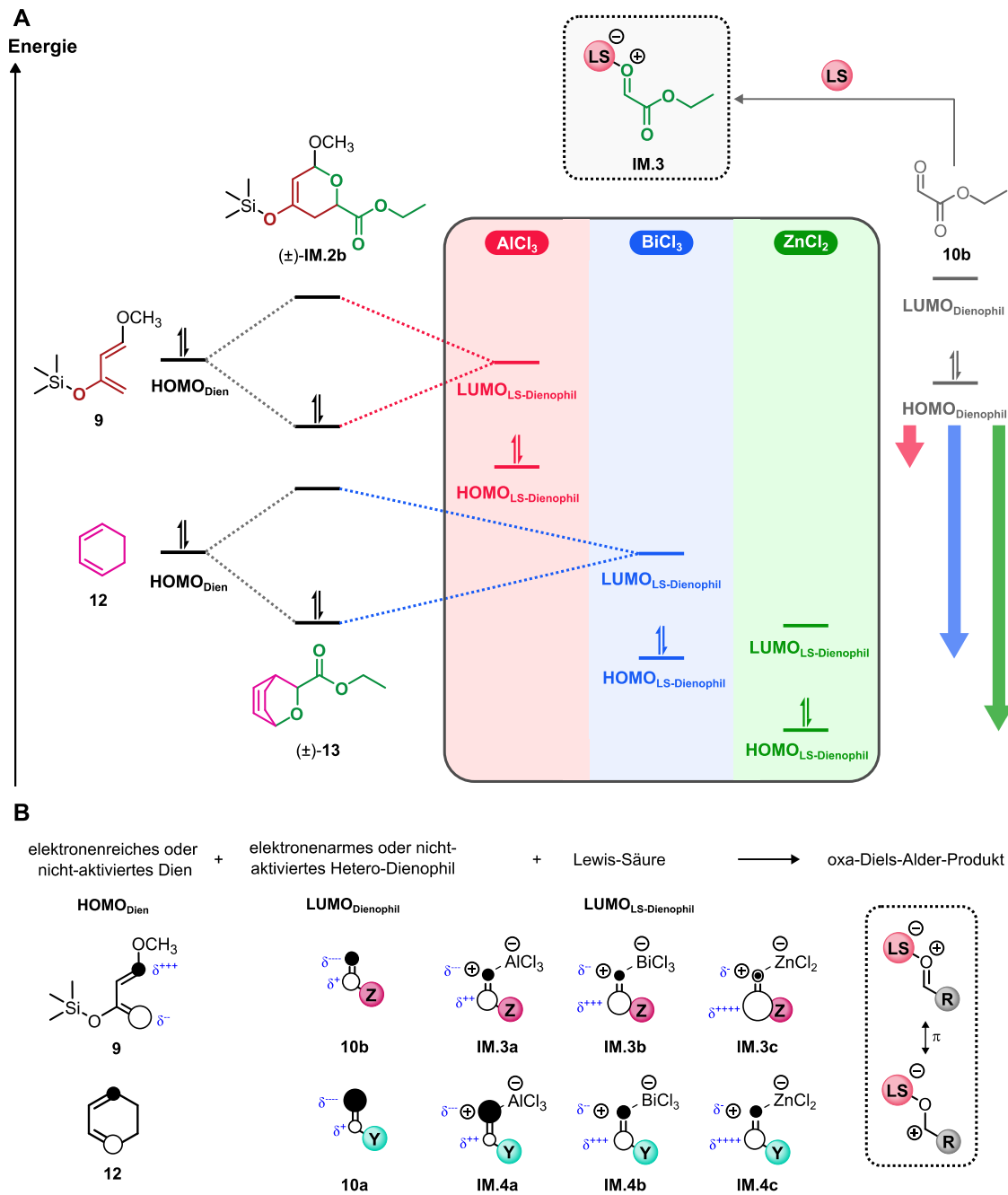


Abbildung 22 | Übersicht zu den Erklärungsmodellen der empirisch-erschlossenen Reaktivitäts-regeln für die oxa-DIELS-ALDER-Reaktion. (A) Energieniveauschema zur Veranschaulichung der energetischen Wirkung von weichen und harten Lewis-Säuren. AlCl_3 bewirkt aufgrund der Eigenschaft als harte Säure nur eine schwache Absenkung der Grenzorbitalenergie, während die Koordination durch weichere Säuren wie ZnCl_2 und BiCl_3 stärkere Absenkungen zur Folge haben. (B) Einfluss der Lewis-Acidität auf die Grenzorbital-Koeffizienten. Die chemische Natur der Lewis-Säuren bewirken unterschiedliche Größenänderungen bei den Orbitalkoeffizienten. Eine Reaktion kann immer nur dann erfolgen, wenn eine kompatible Wechselwirkung zwischen Orbitalkoeffizienten gleicher Größenordnung stattfindet (X = elektronenziehende Gruppe, Y = konjugierte Gruppe).²³¹ Anmerkung: Die dargestellten Partialladungen sowie die Größe der einzelnen Orbitalkoeffizienten sind als qualitativ und nicht quantitativ zu betrachten und dienen lediglich als Erklärungsgrundlage für die beobachteten Reaktivitäten.

In Konsequenz dessen sinkt die Energie der beiden Grenzorbitale in Abhängigkeit der Weichheit der Teilchen ab und ermöglicht somit auch die Reaktion zwischen nicht-aktivierten Dienen und elektronenarmen Dienophilen. Unter Berücksichtigung der Grenzorbital-Theorie konnten diese Überlegungen zudem auch durch eine schematische Visualisierung von Orbitalkoeffizienten modellhaft komplettiert werden.

Dazu wurde angenommen, dass es aufgrund der positiven Partialladung am Carbonyl-Kohlenstoffatom, welche durch das dative Bindungsereignis der Lewis-Säure an das Sauerstoffatom des Aldehyds induziert wird (siehe mesomere Grenzformeln in sb), zu einer Vergrößerung des Grenzorbitalkoeffizienten an dieser Position bei gleichzeitiger Verkleinerung des Orbitalkoeffizienten am Sauerstoffatom kommt. Die Größenordnung dieser Änderung wird dabei maßgeblich durch die Natur der eingesetzten Lewis-Säure bestimmt.

Als weiterer Einflussfaktor muss jedoch auch die Art des jeweiligen Substituenten am Dienophil berücksichtigt werden, da die dirigierenden Eigenschaften verschiedener funktioneller Gruppen bereits wesentlich die Größenverhältnisse der Orbitalkoeffizienten modulieren. Durch die Ausbildung von Lewis-Säure-Komplexen werden diese somit auf unterschiedlichste Weise beeinflusst und bilden damit ein breites Spektrum an differentiellen energetischen Voraussetzungen (siehe Abbildung 22b). Basierend auf der schematischen Visualisierung der entsprechenden Koeffizienten kann schließlich jedoch durch einen Abgleich mit den Koeffizienten des HOMOs der jeweils eingesetzten Diene energetisch kompatible Reaktionspartner identifiziert werden und somit die Wahl einer geeigneten Lewis-Säure im Vorfeld erfolgen.

Basierend auf diesen Modellvorstellungen wurden in einem nächsten Schritt empirische Reaktivitätsregeln abgeleitet und in den FRAGTORY-Workflow eingebunden.

3.1.6 Ableitung von empirischen Reaktivitätsregeln und Implementierung in den FRAGTORY-Workflow

Das entwickelte Erklärungsmodell verdeutlichte deutlich die Notwendigkeit zur Entwicklung eines verständlichen Klassifizierungs- und Einordnungssystems kombinierbarer Diene und Dienophile, um den erfolgreichen Ablauf der Lewis-Säure-katalysierten oxa-DIELS-ALDER-Reaktion gewährleisten zu können. Aus experimenteller Sicht rückte dabei auch die Vorhersage einer kompatiblen Lewis-Säure in den Interessensfokus. Aus diesem Grunde wurden auf Grundlage der in den vorausgegangenen Parameterisierungsversuchen erschlossenen Limitationen zwei wesentliche empirische Reaktivitätsregeln formuliert:

- 1) Die erfolgreiche Durchführung der oxa-DIELS-ALDER-Reaktion mit normalem Elektronenbedarf zwischen einem elektronenreichen Dien und einem stark aktivierten, elektronenarmen Hetero-Dienophil erfordert die Katalyse durch eine harte bzw. besonders Lewis-acide Lewis-Säure (z.B. Aluminiumtrichlorid)

- 2) Die erfolgreiche Durchführung der oxa-DIELS-ALDER-Reaktion zwischen einem elektronenreichen Dien und einem schwach aktivierten elektronenarmen Hetero-Dienophil sowie die Reaktion eines nicht-aktivierten Diens und einem stark-aktivierten, elektronenreichen Hetero-Dienophil erfordert hingegen Lewis-Säuren aus dem Grenzbereich (Bismuttrichlorid, Zinkchlorid etc.) oder tendenziell weichere Lewis-Säuren als Aluminiumtrichlorid.

Die Ausformulierung dieser Zusammenhänge stellte dabei nicht nur nützliche Richtlinien für die experimentelle Arbeit im Labor auf, sondern begründete auch noch das wesentliche Fundament für die Definition von Filterkriterien auf computerchemischer Ebene. So bestand nun die Möglichkeit durch die zielgerichtete Kombination spezifisch-selektionierter Diene und Dienophile, eine virtuelle Produktbibliothek generieren zu lassen, deren Vertreter mit hoher Wahrscheinlichkeit auch problemlos synthetisiert werden konnten.

Zu Beginn dieses visionierten Vorhabens musste sich jedoch zunächst der Herausforderung angenommen werden, einen *Workflow* für die Durchführung der *in silico*-oxa-DIELS-ALDER-Reaktion aufzusetzen. Ausgehend von der bereits vorhandenen Edukt-Datenbank wurde zu diesem Zwecke zunächst durch die Definition von Substruktur-Filtern über eine SMARTS-Notation sowohl potentielle Diene als auch Dienophile selektioniert. Diese wurden anschließend hinsichtlich ihrer elektronischen Eigenschaften in die Unterbibliotheken „elektronenreiche Diene“, „nicht-aktivierte Diene“, „schwach-aktivierte elektronenarme Hetero-Dienophile“ und „stark-aktivierte elektronenarme Hetero-Dienophile“ einsortiert. Diese Klassifizierung sollte zu einem späteren Zeitpunkt die zielgerichtete Kombination von passenden Reaktionspartnern im Sinne der zuvor definierten empirischen Reaktivitätsregeln ermöglichen.

In einem nächsten Schritt konnte schließlich durch die Definition einer allgemeingültigen Transformationsvorschrift die virtuelle Generierung verschiedener oxa-DIELS-ALDER-Produkte initiiert werden. Dabei wurden in Abhängigkeit der plausiblen Kombinationsmöglichkeiten von Dienen und Hetero-Dienophilen (elektronenreiches Dien reagiert mit schwach oder stark aktiviertem elektronenarmem Hetero-Dienophil; nicht-aktiviertes Dien reagiert mit stark aktiviertem, elektronenarmem Hetero-Dienophil) zwei Produktbibliotheken erhalten. An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass auch die Durchführung einer zusätzlichen *in silico*-oxa-DIELS-ALDER-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf möglich gewesen wäre. Aufgrund von Zeitmangel konnten im Rahmen der experimentellen Arbeiten jedoch keine entsprechenden Vorversuche durchgeführt werden, sodass sich die Generierung der virtuellen Produkte auf die Möglichkeit einer oxa-DIELS-ALDER-Reaktion mit normalem Elektronenbedarf beschränkte.

Nach Ausführung der Filterschritte des FRAGTORY-Workflows wurde eine 23224 Moleküle umfassende Bibliothek erhalten, die in zukünftigen Versuchen zur zielgerichteten Nominierung von lückenfüllenden Synthesekandidaten verwendet werden könnte.

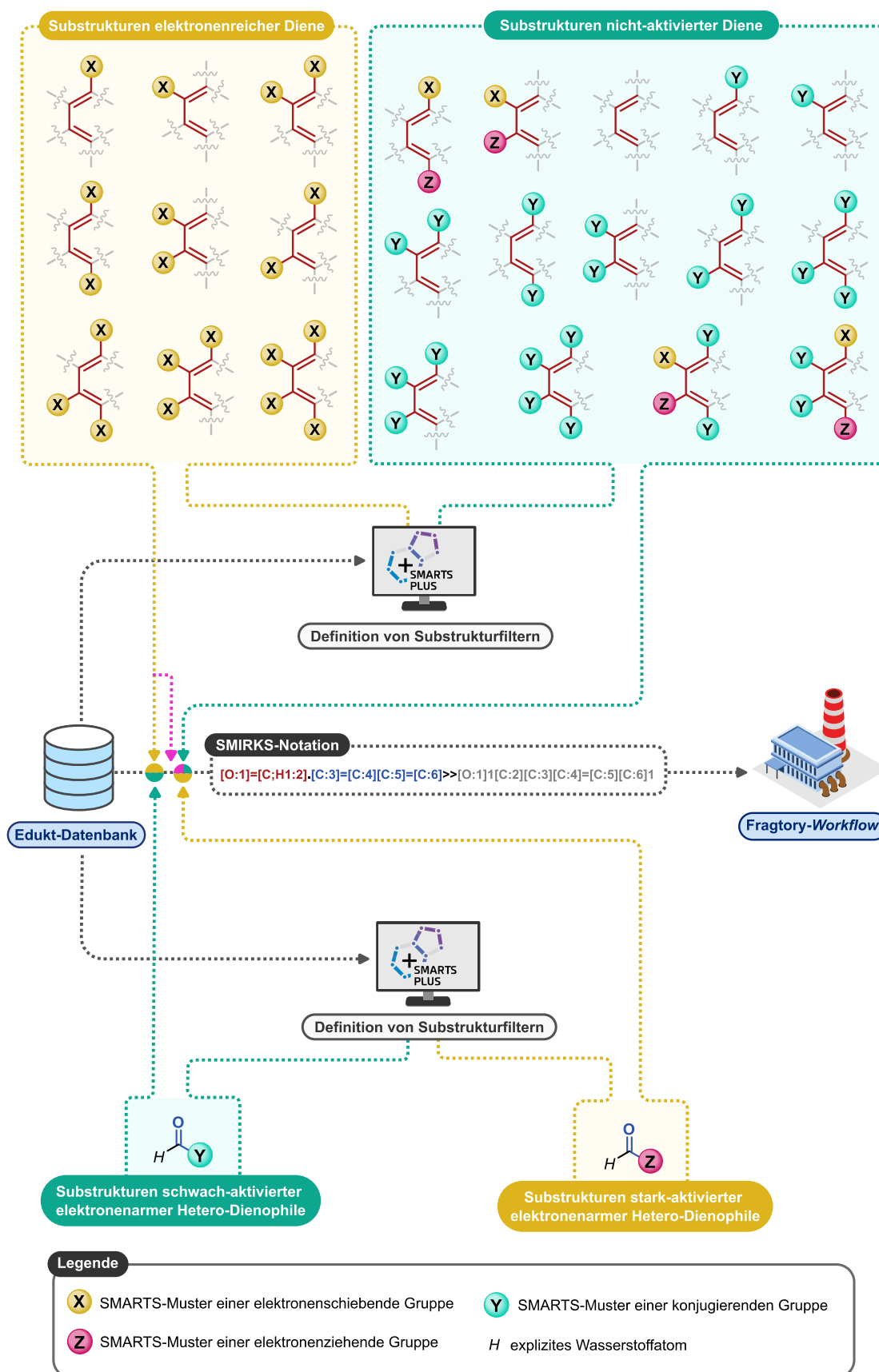


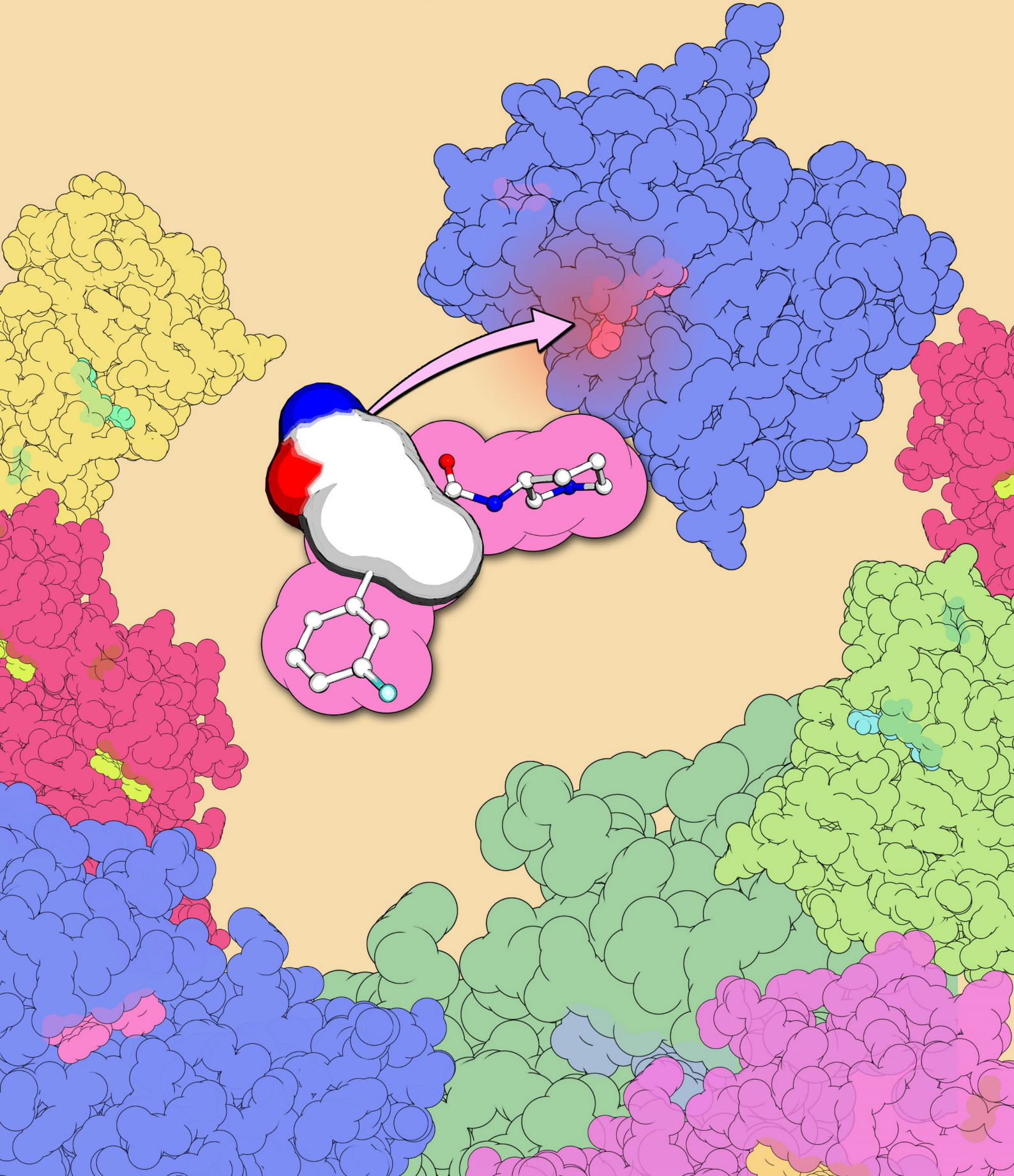
Abbildung 23 | Übersicht zu dem konzipierten Workflow zur Durchführung der *in silico*-oxa-DIELS-ALDER-Reaktion mit normalen Elektronenbedarf. Nach Kombination kompatibler Reaktanden wurde durch die Einbindung in den FRAGTORY-Workflow eine Produktbibliothek von 23224 Molekülen erhalten. Diese könnte in zukünftigen Versuchen dazu verwendet werden, entstandene Lücken im chemischen Raum aufzuspüren und diese durch Nominierung potentieller Synthesekandidaten zu schließen.

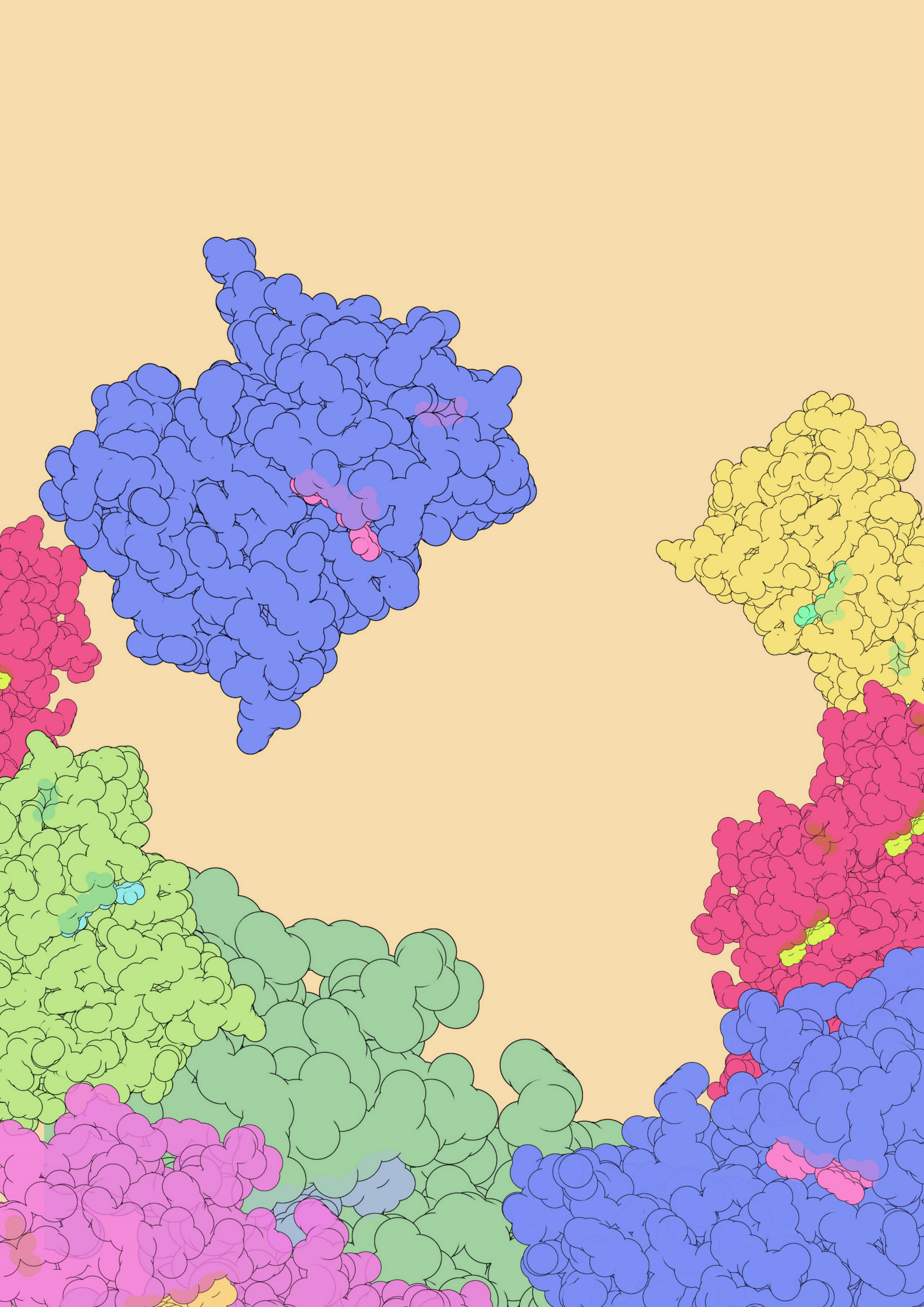
”

Genomics has not only become a crucial clinical tool, but we're at the point of complementing it and addressing patient needs in ways that, 20 years ago, would have been inconceivable. Now, we need to move beyond prolonging life and toward developing cures.

“

Gianrico Farrugia, M.D., Präsident und CEO von Mayo Clinic, Mayo Clinic's 10th Annual Individualizing Medicine Conference, 2021





3.2 Identifizierung und Modifizierung eines neuen Chemotyps zur Behandlung resistenzerworbener GIST

Die nachfolgend diskutierten Ergebnisse sind Bestandteil eines laufenden Patentierungsverfahrens, welches sich derzeit noch in der Anmeldungsphase befindet. Zudem stehen diese Ergebnisse im Kontext einer unmittelbar bevorstehenden, jedoch noch nicht öffentlich-zugänglichen wissenschaftlichen Publikation in einem hochrangigen Wissenschaftsjournal.

3.2.1 Phänotypisches HTS und *Counter Screening*

In den letzten Jahrzehnten haben sich phänotypische HTS als ein effektives Werkzeug zur Entdeckung neuer chemischer Verbindungen in der Medizinalchemie etabliert. Während in den Anfangsjahren noch primär große Unternehmen die notwendigen finanziellen Ressourcen zur Schaffung und Aufrechterhaltung solcher Infrastrukturen besaßen, sind seit den 2000er Jahren auch zahlreiche erfolgreiche Implementierungen im akademischen Bereich zu beobachten.²³²⁻²³³ Dies ist besonders für die Erforschung seltener Krankheiten von essentieller Bedeutung, da somit auch die Durchführung der frühen Wirkstoffentwicklungsprozesse nach dem Prinzip der reversen Pharmakologie bereits im universitären Umfeld erfolgen kann.

Auch am Forschungsstandort Dortmund konnte seit der Gründung des DRUG DISCOVERY HUBS DORTMUND (DDHD) ein interdisziplinäres Kompetenznetzwerk in Zusammenarbeit mit dem WTZ und dem COMAS erschlossen werden, wodurch sich optimale Bedingungen für die Durchführung phänotypischer HTS ergaben. Aufbauend auf der bahnbrechenden Arbeit von BOICHUK *et al.* aus dem Jahr 2014²³⁴, die durch ein unvoreingenommenes *Screening* offenlegte, dass GIST entgegen der historisch-etablierten Auffassung unerwartet sensitiv auf bestimmte Chemotherapeutika reagiert, wurde sich im Rahmen dieser Doktorarbeit der weiterführenden Aufgabe gewidmet, chemische Verbindungen zu identifizieren, die einem komplett neuen Chemotypen entsprechen. Diese sollen als Grundlage für die Entwicklung selektiver und nebenwirkungsarmer TKIs dienen, die auf klinisch relevante Mutationen der Onkogene PDGFR α und c-KIT abzielen.

Für dieses Vorhaben konnte auf einen Pool neuer isogener Zelllinienmodelle von TKI-resistenten GIST zurückgegriffen werden, welcher am Sarkomzentrum des WTZ durch die Entnahme von tumorösen Gewebeproben und nachgeschalteten Zelllinien-*Engineering* mittels CRISPR/Cas9 erschlossen und über mehrere Jahre hinweg stetig vergrößert worden war (siehe Abbildung 24).

Aus dieser umfangreichen Sammlung wurden die klinisch-bedeutsamen Zelllinien PDGFR α -D842V, PDGFR α -T1-674, PDGFR α -T1-680, PDGFR α -T1-5258 als „Phänotypen-von-Interesse“ selektioniert, da Patienten, die unter entsprechenden Läsionen leiden, durch derzeit etablierte Behandlungsoptionen entweder nicht-tolerierbare Nebenwirkungen aufweisen oder aber unter einen nahezu unverändert-voranschreitenden Krankheitsverlauf leiden. Weiterhin wurde auch die KIT-negative GIST48B-Zelllinie als Kontrollzelllinie berücksichtigt, da die Verwendung dieser die Möglichkeit eröffnete, Filterkriterien für Spezifität gegenüber den gewünschten Zielproteinen zu definieren und damit die Grundlage für die Durchführung eines *Counter Screens* bildete.

Vor dem Hintergrund dieser Auswahl erfolgte in Vorarbeiten das HTS ausgewählter Substanzbibliotheken (TOOL COMPOUND LIBRARY der Firma VICHEM,² LDC KINASE LIBRARY³, EDELRIIS KEYMICAL COLLECTION⁴ und COMAS SCREENING LIBRARY⁵), in einer sechstägigen Versuchseinheit durch Frau Dr. SONJA SIEVERS am COMAS. Diese umfasste zunächst die vollautomatisierte Zellaussaat in 96-*well*-Platten am Tag 0, gefolgt von der Behandlung der Zellen mit jeweils 2 μ M und 10 μ M Stammlösungen der jeweiligen Inhibitoren am ersten Tag und dem Auslesen (engl. *Read Out*) der zellulären Aktivität durch einen automatisierten Zellviabilitätsassay (engl.: *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*, PROMEGA CORPORATION, Madison, Wisconsin, USA, CTG) am sechsten Tag.

Die daraus erhaltenen Aktivitätsdaten wurden anschließend einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen, indem die gemessenen Zellviabilitätsdaten zunächst ihrer Größe nach geordnet, kategorisiert und für die einzelnen Zelllinien gegeneinander aufgetragen wurden (siehe schematisch in Abbildung 24). Da die KIT-negative Kontrollzelllinie GIST48B ebenfalls vermessen wurde, konnte in einem weiteren Schritt durch die Berechnung von Relativitätsfaktoren zudem eine Unterscheidung von *Hits* und toxischen *Hits* ermöglicht werden (*Counter Screen*).

Im Zuge dessen konnten insgesamt 183 Treffermoleküle identifiziert werden, die auf der PDGFR α -D842V-Zelllinie mehr als 20% Inhibition und auf der Kontrollzelllinie GIST48B weniger als 20% Inhibition zeigten. 155 Moleküle zeigten hingegen auf PDGFR α -T1-680 ein analoges Verhalten, weshalb durch ein Abgleich beider *Hit*-Sets 87 Inhibitoren identifiziert werden konnten, die aufgrund des herausgefilterten Aktivitätsprofils bereits vorteilhafte Eigenschaften für eine mögliche Weiterentwicklung bereit stellten.

Diese herausgefilterten Treffer wurden in einer nachgeschalteten Dosistitration (engl.: *Dose-Response titration*, DRT) validiert und zelluläre GR₅₀-Werte für relevante Zelllinien ermittelt.

² <http://vichemchemie.com/tool-compound-library-tcl/>

³ <https://www.lead-discovery.de/de/about-us/expertise/#Screening>

⁴ <https://www.edelris.com/solutions-services/compound-collections>

⁵ <https://www.mpi-dortmund.mpg.de/forschung/services/comas/compound-collection>

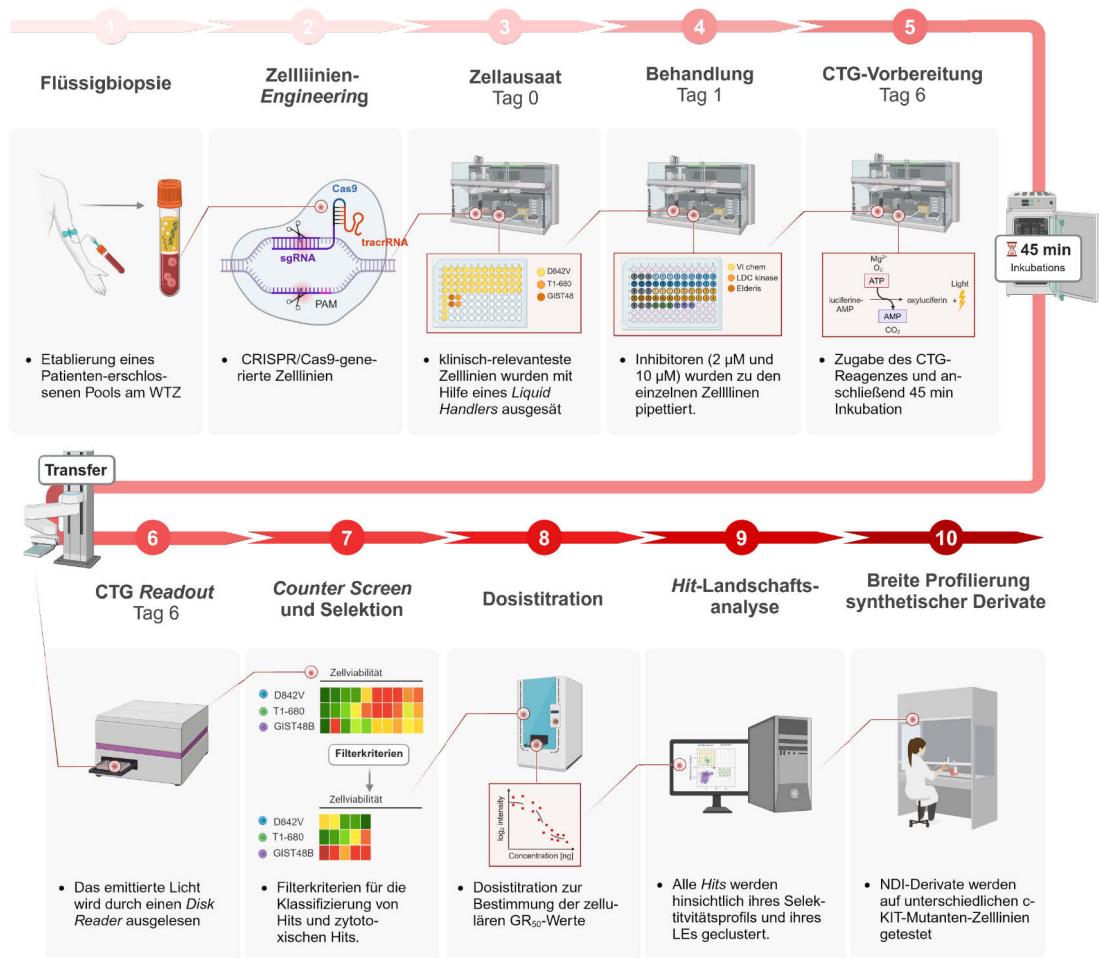


Abbildung 24 | Übersicht zu den durchgeführten und etablierten Arbeitsschritten bei der Identifizierung eines neuen Chemotypen für die Entwicklung eines neuen GIST-Therapeutikums durch einen reversen translationalen *from-bed-to-bench*-Ansatzes. Ausgehend von einem am WTZ gesammelten Pool klinisch relevanter Zelllinien wurden am COMAS ausgewählte Substanzbibliotheken mit Hilfe eines automatisierten phänotypischen HTS-Protokolls an klinisch relevanten Zelllinienmodellen vermessen. Mit Hilfe eines *Counter Screens* konnten anschließend zytotoxische Treffermoleküle herausgefiltert und die übrigen Moleküle einer Dosisstufung zur Bestimmung eines zellulären GR_{50} -Wertes unterzogen werden. Durch eine anschließende Hitlandtschaftsanalyse wurde die Verbindung NDI als Entwicklungskandidat für eine strukturbasierte Wirkstoffrepositionierung ausgewählt und anschließend einer breiten Profilierung an verschiedenen Mutantenzelllinien unterzogen.

3.2.2 Treffernominierung durch Treffer-Landschaftsanalyse und Röntgenkristallographie

Die DRT offenbarte ein stark divergierendes Spektrum chemisch-diverser Verbindungen, das unter anderem auch durch eine breite Verteilung von Größe und Molekulargewicht gekennzeichnet war. Es fiel insbesondere auf, dass eine größere Zahl an identifizierten Treffermolekülen bereits in Zulassungsverfahren für andere Krankheiten involviert waren und sich somit ideal für *Drug Repurposing* Ansätze eigneten. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse war es zunächst erforderlich, ein Ordnungssystem zu konzipieren, um die umfangreiche Trefferlandschaft, hinsichtlich der Ligandeneigenschaften und der Möglichkeit zum Einsatz als GIST-Therapeutikum, einer detaillierten Analyse unterziehen zu können.

Dies schaffte zugleich eine rationale Grundlage, einen geeigneten Weiterentwicklungskandidaten zu nominieren und diesen mit bereits zugelassenen Behandlungsstandards zu vergleichen.

Als Bewertungsreferenz wurde diesbezüglich der TKI AVAPRITINIB herangezogen, da dieser einen selektiven und wirksamen Inhibitor der PDGFR α -D842V Mutation darstellt, jedoch aufgrund seiner kognitiven Nebenwirkungen^{210, 235} und des Aufkommens neuer Resistenzmutationen nach Verabreichung, Schwächen in Bezug auf ein progressionsfreies Überleben der Patienten bietet.²³⁶ Ziel war deshalb die Identifizierung eines neuen Chemotypen mit ähnlichen Eigenschaften hinsichtlich Selektivität und Potenz gegenüber einer Vielzahl unterschiedlichster Mutationen (Pan-Inhibition) bei einem insgesamt vorteilhaften Risiko-Nutzen-Profil. Weiterhin sollte das Grundgerüst (engl. *scaffold*) des *Hit*-Moleküls auch hinreichend Freiraum zur chemischen Funktionalisierbarkeit bieten, um detaillierte SAR- bzw. STR-Studien durchführen zu können. Im Rahmen dieser Überlegungen wurde ersichtlich, dass ein potenzieller Entwicklungskandidat eine hohe intrinsische Potenz gegenüber den beiden Onkogenen PDGFR α und c-KIT bei einem insgesamt eher geringen bis moderaten Molekulargewicht aufweisen müsste.

Als ein sinnvoller Bewertungsparameter wurde daher die LE erachtet, da diese sowohl die Potenz als auch das Molekulargewicht der einzelnen Verbindungen in Bezug zueinander setzt. Wird diese Größe gegen die „Selektivität über Avapritinib“ aufgetragen, kann damit ein Graph erhalten werden, der die einzelnen *Hits* in vier Quadranten um das zentral positionierte AVAPRITINIB (roter Punkt) orientiert (siehe Abbildung 25a).

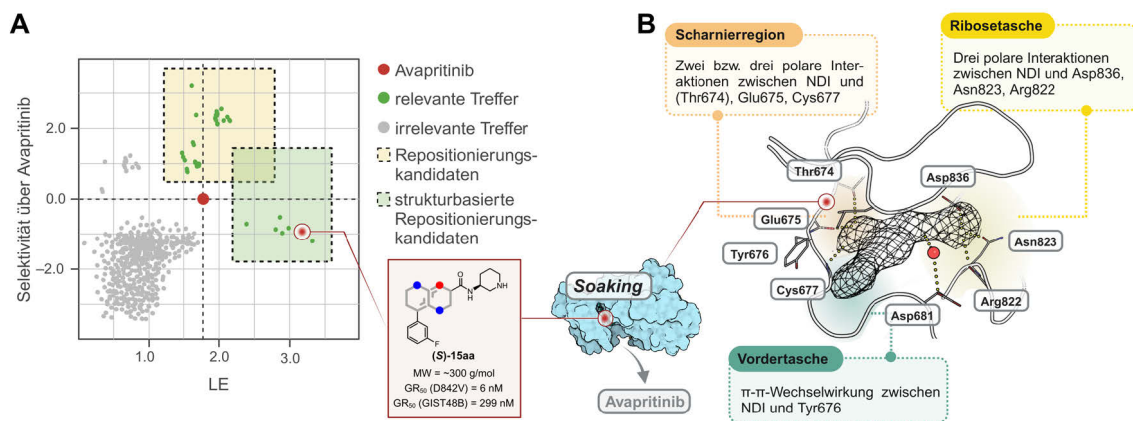


Abbildung 25 | Übersicht zur schematisch-dargestellten Treffer-Landschaftsanalyse, der Nominierung von NDI als Weiterentwicklungskandidat und der anschließenden Kristallisation in der T674I-Mutation des Onkogens PDGFR α . (A) Schematische Treffer-Landschaftsanalyse des durchgeführten phänotypischen HTS. Die entsprechenden Treffermoleküle wurden hinsichtlich des ermittelten LEs sowie der Selektivität über Avapritinib geplottet und anschließend den beiden Arealen der Repositionierungskandidaten und den strukturbasierten Repositionierungskandidaten zugeordnet. Aus dieser Auswahl wurde das NDI ((S)-15aa) aufgrund der bekannten Literaturdaten, dem geringen Molekulargewicht und der intrinsisch-hohen Potenz als attraktiver Entwicklungskandidat ausgewählt. (B) Elektronendichte von NDI ((S)-15aa) in PDGFR α -T674I und Bindungsmodus-Analyse. Die durch *Soaking* erhaltene Kristallstruktur von NDI ((S)-15aa) in PDGFR α -T674I diente als Grundlage für eine durchgeführte Bindungsmodus-Analyse. Anhand dieser wurden die zentralen pharmakophoren Eigenschaften des Liganden erschlossen und verschiedene Fragestellungen für das Projekt formuliert.

Dabei befinden sich sowohl im oberen, wie auch im unteren linken Quadrant Treffer, die weniger selektiv oder aber eine geringere LE als die Bewertungsreferenz selbst aufweisen. Oberhalb und rechts neben AVAPRITINIB befinden sich zwei Flächen, die als Repositionierungsfläche (RF) bzw. strukturbasierte Repositionierungsfläche (SBRF) verstanden werden können. Während sich in der RF vor allem größere Moleküle finden, die eine mit AVAPRITINIB vergleichbare Potenz für die PDGFR α -D842V-Mutation aufweisen, jedoch selektiver sind, befinden sich in der SBRF auch Verbindungen, die zwar ein marginal schlechteres Selektivitätsprofil aufweisen, jedoch aufgrund der höheren LE noch genügend Spielraum für weitere Optimierungen bieten.

Die Tatsache, dass die meisten Treffermoleküle in der SBRF bereits zufriedenstellende *on-target* Potenzen, teilweise im nano- oder sogar subnanomolaren Bereich, aufwiesen, stellte sich als ideale Grundlage für die Durchführung von kristallographischen Experimenten heraus. In vorausgegangenen Arbeiten konnten in der Arbeitsgruppe RAUH bereits Komplexstrukturen von PDGFR α mit AVAPRITINIB erfolgreich kristallisiert werden. Diese stellten die Grundlage für nachfolgende *Soaking*-Experimente mit den aus dem HTS identifizierten hochaffinen Liganden dar, welche durch Frau Dr. ALINA TEUBER durchgeführt wurden. Im Rahmen dieser Bemühungen konnte schließlich auch die Kristallstruktur des *Hit*-Moleküls NDI ((*S*)-**15aa**) in PDGFR α -T674I gelöst und erfolgreich aufgeklärt werden (siehe Abbildung 25).

Diese Begebenheit eröffnete bereits in einem frühen Stadium des Projekts die Möglichkeit, die Bindungssituation des Treffermoleküls genauer zu analysieren und damit auch die Entwicklung vielfältiger Strategien für weiterführende Derivatisierungsvorhaben zu konzipieren. NDI ((*S*)-**15aa**) wies diesbezüglich aufgrund seines moderaten Molekulargewichtes von ungefähr 300 g/mol, sowie der Anwesenheit von lediglich vier Wasserstoffbrücken-Akzeptoren bzw. -Donoren ein interessantes und vielversprechendes Profil auf, welches am ehesten als eine Art Grenzverbindung zwischen einem Fragment (*Rule-of-three*) bzw. einen klassischen HTS-*Hit* (*Rule-of-five*) verstanden werden konnte.

Hinsichtlich des beabsichtigten Vorhabens einer strukturbasierten Wirkstoffrepositionierung stellte sich dieser Umstand als günstige Ausgangslage dar, da das geringe Molekulargewicht des Inhibitors noch ausreichend Freiraum für Substitutionen verschiedener Strukturelemente gewährleistete. Ebenso konnte durch eine tiefere Literaturrecherche offengelegt werden, dass das NDI ((*S*)-**15aa**) bereits in der Vergangenheit einen Evaluationsprozess für eine andere Art von Krankheit durchlaufen hatte.

Trotz der in diesem Zuge beschriebenen vorteilhaften *in vitro* und *in vivo*-Eigenschaften sowie der hohen Löslichkeit entschloss sich das Unternehmen jedoch nach einer vollumfänglichen Risiko-Nutzen-Bilanzierung dazu, die klinische Phase I aufgrund beobachteter toxischer Ereignisse bei höherer Dosisgabe zu terminieren.

Die genauen molekularen Ursachen blieben allerdings unklar und betonen daher die Notwendigkeit weiterer detaillierter Forschungen im Rahmen dieser Doktorarbeit.

3.2.3 Leitende Fragestellungen für die strukturbasierte Wirkstoffrepositionierung von NDI

In Anbetracht des in der Literatur dargelegten und bereits optimierten PK-Profiles sowie der noch ungeklärten Frage nach den molekularen Ursachen der beobachteten Karditoxizität, erwies sich das NDI als ein idealer Kandidat für einen strukturbasierten *Repurposing*-Ansatz. Die einhergehende Analyse des Bindungsmodus (vgl. Abbildung 25) legte dabei offen, dass das Molekül primär drei Regionen bzw. Taschen in PDGFR α bzw. c-KIT besetzt. In einem vorausgegangenen Dekonstruierungsansatz konnte in Vorarbeiten offengelegt werden, dass die Anwesenheit eines flexiblen Scharnierbindungselementes essentiell für die Affinität der Verbindung (*S*)-15aa gegenüber einer Vielzahl von Mutationen der Onkogene PDGFR α und c-KIT ist (vgl. Tabelle 6). Es ließ sich daraus ableiten, dass die Anwesenheit einer Aminosäure mit Akzeptoreigenschaften auf topologischer Höhe der Aminosäure Thr674 in PDGFR α zu der Ausbildung von drei konstruktiven, polaren Interaktionen mit der Scharnierregion führt. Im Falle eines Austauschs einer solchen Aminosäure, beispielsweise durch die Mutation der Türsteher-Aminosäure, können nach wie vor die zwei weiteren polaren Interaktionen mit den Aminosäuren Glu675 und Cys677 zur Affinität des NDIs ((*S*)-15aa) gegenüber den Zielproteinen beitragen und somit die intrinsisch-hohe Potenz dieser Verbindung erklären.

Weiterführende Studien im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten daher nicht mehr die Bedeutung der Scharnierregion-adressierenden Gruppe beleuchten, sondern vor allem die Funktion des Piperidin-Rings im Bereich der Ribosetasche sowie der 3-Fluorbenzol-Gruppe im Bereich der Lösemittel-exponierten Vordertasche (engl. *solvent-exposed front pocket*) erschließen.

Da die Ribosetasche normalerweise als natürliche Substratbindestelle fungiert und somit für die Bindung von ATP verantwortlich ist, sollte durch eine Alternierung des heterozyklischen Systems in diesem Bereich, den Fragen nachgegangen werden, welchen Einfluss die Größe des Ringsystems bzw. welchen Einfluss die Positionierung des basischen Zentrums sowie die absolute Konfiguration des Chiralitätszentrums auf die polare Interaktion mit den drei Aminosäuren Asp386, Asn823, Arg822 ausübt.

Die Analyse der Kristallstruktur von NDI ((*S*)-15aa) in PDGFR α suggerierte dabei, dass im Bereich der *Front pocket* vor allem hydrophobe Wechselwirkungen von zentraler Bedeutung sein könnten. Es schien daher sinnvoll, verschiedene Gruppen in diesem Bereich zu permutieren, um Aufschluss über die Toleranz anderer pharmakophorer Eigenschaften zu erhalten.

Zudem sollte eruiert werden, ob tatsächlich π - π -Wechselwirkungen die Schlüsselinteraktionen in diesem Bereich darstellen und ob durch Variation des Substitutionsgrads Eigenschaften wie Selektivität und/oder Potenz moduliert werden können. Weiterhin stellte die Anwesenheit eines Halogenids in *para*-Position des Benzolrings eine interessante Möglichkeit dar, diesen als synthetischen Vektor zu nutzen, um weiter entfernte Teile dieser Tasche zu erkunden.

Zur Beantwortung all dieser Fragen sollte schließlich, im Sinne der angestrebten strukturbasierenden Wirkstoffrepositionierung, eine Substanzbibliothek synthetisiert und auf Grundlage dieser umfangreiche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen hergeleitet werden.

3.2.4 Etablierung einer modularen, konvergenten Syntheseroute zur schnellen und semi-automatisierten Synthese von NDI-Derivaten

Das Vorhaben der Generierung einer umfangreichen Substanzbibliothek machte das Vorhandensein einer robusten und effizienten Syntheseroute, über die ein möglich großes Spektrum chemisch-diverser Analoga erzeugt werden konnte, unabdingbar. Im Zentrum der Vorplanungen stand daher die Erschließung einer modularen und konvergenten Strategie, die die Umsetzung von zwei separat-hergestellten Synthesebausteinen A und B zu den finalen Produkten in lediglich drei Schritten ermöglichte (siehe Abbildung 26).

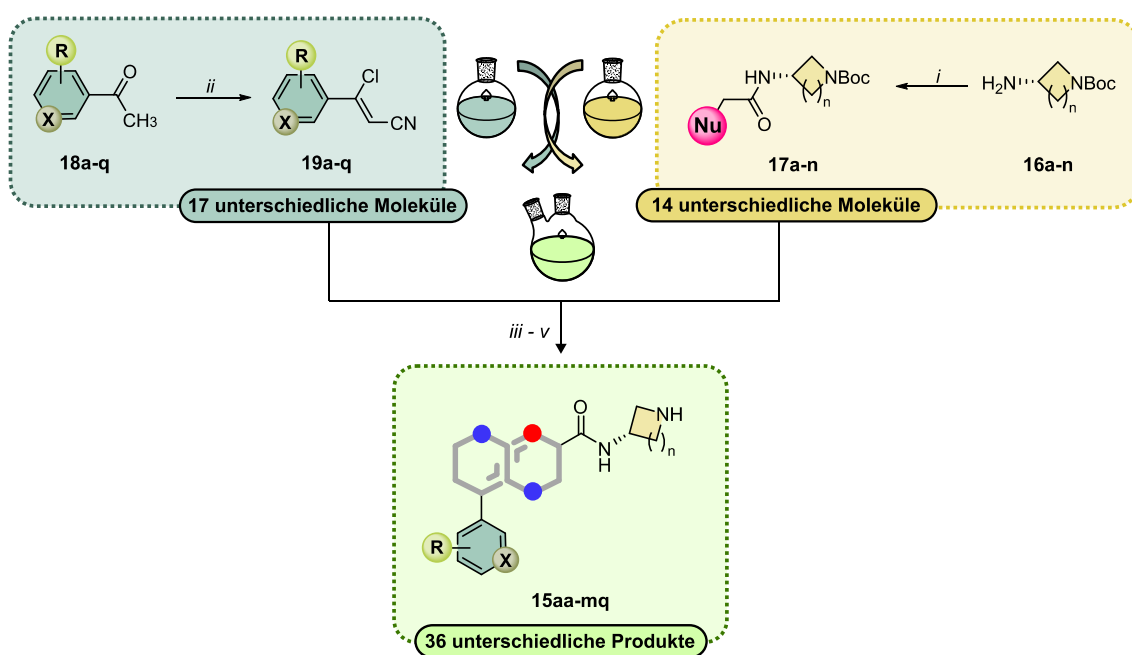
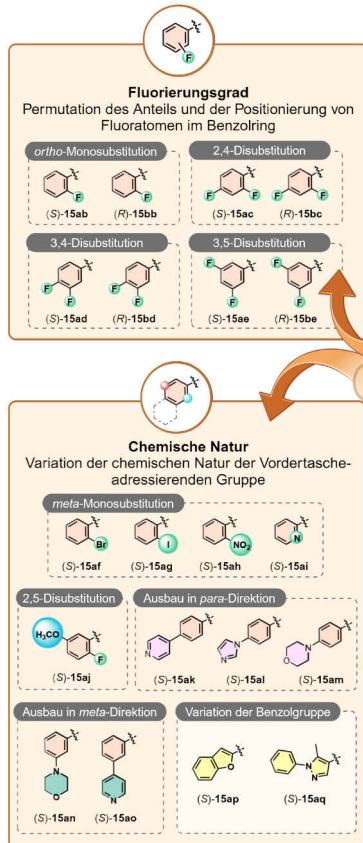


Abbildung 26 | Übersicht zur etablierten, modularen und konvergenten Syntheseroute für die Generierung verschiedener NDI-Derivate. Zur Durchführung der Synthesesequenz mussten zunächst die nukleophilen Acetamide (Synthesebaustein A, gelb) sowie die β -Chlorzimsäurenitrile (Synthesebaustein B, dunkelgrün) separat hergestellt werden. Anschließend konnten diese in einer Eintopfreaktion, gefolgt von der Generierung der Scharnierregion-adressierenden funktionellen Gruppe und einer optionalen Carbamatspaltung in die entsprechenden finalen Produkte (hellgrün) umgesetzt werden. Die Reaktionsbedingungen lauten wie folgt: (i) ClCH_2COCl , Pyridin, THF, 0 °C, 1,5 h, dann NuH, H_2O , RT, 24 h (ii) POCl_3 , $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$, 40 °C, 18 h, dann $\text{NH}_2\text{OH HCl}$, $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$, 45 °C, 0,5 h, 8-71% (iii) NaOCH_3 , THF, RT, 1,5 h (iv) Nuke, THF, RT, 3 h, dann NH_3 in CH_3OH , 0 °C, 30 min (v) HCl in Dioxan ($c = 5 \text{ mol/L}$), CH_3OH , 0 °C, 1 h, 1-58% (über 3 Schritte) bzw. 26-61% (über 2 Schritte).

Zwecks experimenteller Etablierung wurde die Route zunächst für das (*S*)- und (*R*)-Enantiomer des NDIs erprobt und später auch für weitere Derivate erfolgreich angewandt. Im Durchschnitt konnten dabei für nahezu alle Derivate moderate Ausbeuten zwischen 20-60% über drei Schritte erhalten werden. Lediglich die Synthese von besonders polaren Analoga, wie z.B. (*S*)-**15am**, ging in mehreren Fällen mit geringen Ausbeuten zwischen 3-12% einher.

Analyse von Interaktionsmustern innerhalb der Vordertasche

Für die Analyse wurden folgende Parameter-variationen durchgeführt:



Analyse von Interaktionsmustern innerhalb der Ribosetasche

Für die Analyse wurden folgende Parameter-variationen durchgeführt:

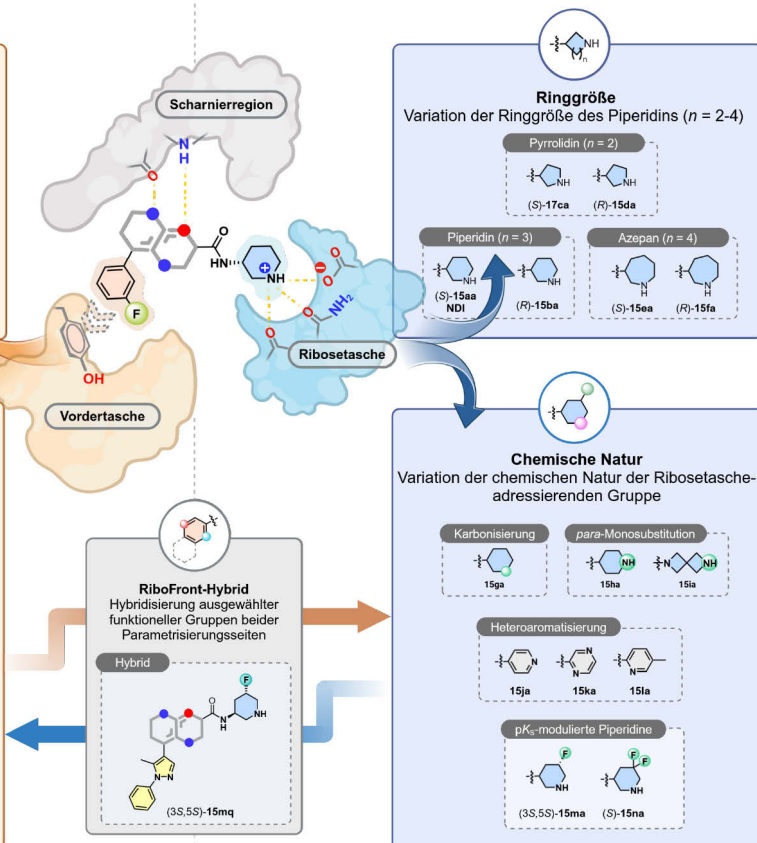


Abbildung 27 | Schematischer 2D-Interaktionsplot von NDI in den beiden Onkogenen c-KIT und PDGFR α sowie die daraus abgeleiteten möglichen Parametervariationen zur Generierung einer fokussierten Substanzbibliothek für eine SAR-Analyse. Auf der linken Seite finden sich die molekularen Ansätze zur Erschließung optimaler und suboptimaler Interaktionsmuster innerhalb der Vordertasche. Auf der rechten Seite hingegen finden sich Designkonzepte für die Ribosetasche. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen der SAR wurden in einer abschließenden Versuchseinheit die optimalsten Strukturelemente beider Parameterseiten zu einer Hybridstruktur verknüpft, um somit möglichst vorteilhafte PK- bei einem gleichbleibend attraktiven Potenz- und Selektivitätsprofil zu generieren.

Während für die Synthese der nukleophilen Acetamide **17a-n** (Synthesebaustein A) im Rahmen der in dieser Doktorarbeit durchgeführten Reaktionen keinerlei Beschränkungen bezüglich des Substratumfanges festgestellt werden konnte, war die Generierung der β -Chlorzimtsäurenitrile **19a-q** ausschließlich bei Einsatz heteroaromatischer und aromatischer Ketone erfolgreich. Die Verwendung aliphatischer Ketone führte indes zu einer konkurrierenden Polymerisationsreaktion, die ausschließlich die Bildung unerwünschter Produkte begünstigte.

Die Generierung der finalen Produkte **15aa-mq** unterlag, insofern die Synthesen der jeweiligen Synthesebausteine A und B erfolgreich waren, keinerlei Limitationen.

Weiterhin konnten aufgrund der Modularität der etablierten Route mehrere Reaktionen parallel durchgeführt und diese anschließend durch standardisierte Reinigungsprotokolle (siehe Abschnitt 5.2.3) mit dem automatisierten Reinigungssystem COMBIFLASH® NEXTGEN 300+ der Firma TELEDYNE ISCO problemlos aufgereinigt werden. Die isolierten Produkte wurden abschließend basisch ausgeschüttelt, um die durch die Reaktions- und Reinigungsbedingungen entstandenen Salzformen in freie Basen zu überführen. Nach der Durchführung einer Sublimationstrocknung über Nacht konnten in den meisten Fällen voluminöse Feststoffe erhalten werden, die sich ohne feststellbare Degradation bei -20 °C oder auch Raumtemperatur lagern ließen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse war es möglich in nur wenigen Monaten eine 36 Verbindungen umfassende Substanzbibliothek zu generieren, die zunächst einer Qualitätsprüfung durch NMR und HPLC-MS unterzogen und anschließend sowohl biochemisch als auch zellulär charakterisiert wurde (siehe Abbildung 27).

3.2.5 Analyse der Struktur-Aktivitätsbeziehungen

Auf Grundlage der durch Frau Dr. ALINA TEUBER und Herrn ANDREAS ARNDT gemessenen biochemischen und zellulären Daten erschlossen sich klar verständliche Struktur-Wirkungsbeziehungen, die wesentliche Erklärungsansätze zu den anfänglich formulierten Fragen (siehe Abschnitt 3.2.3) bereitstellen konnten. Diesbezüglich wurde im Zuge der zellulären Charakterisierung zusätzlich auch die Kit-negative GIST48B-Kontrollzelllinie als Art Toxizitätskontrolle bzw. Selektivitätsmarker vermessen. Aus dem berechneten Verhältnis des ermittelten GR_{50} -Wertes einer Verbindung für die Kontrollzelllinie ($GR_{50}(\text{GIST48B})$) und dem entsprechenden GR_{50} -Wert für die PDGFR α -D842V-Mutation ($GR_{50}(\text{PDGFR}\alpha\text{-D842V})$) konnte anschließend ein Quotient ermittelt werden, der in der nachfolgenden Betrachtung als Target-spezifitätsquotient (S) bezeichnet werden wird (Berechnung siehe Gleichung 2).

$$S = \frac{GR_{50}(\text{GIST48B})}{GR_{50}(\text{PDGFR}\alpha\text{-D842V})} \quad (2)$$

Je größer der Zahlenwert dieses Quotienten, desto spezifischer bindet das entsprechende Derivat an die PDGFR α -D842V-Mutation im Vergleich zum herkömmlichen NDI.

3.2.5.1 Fluorierungsgrad

Im Falle der Variation der 3-Fluorbenzolgruppe zeigte sich, dass sowohl Potenz, wie auch Target-spezifität maßgeblich durch Wahl eines entsprechenden Substituenten moduliert werden konnten. Bereits die Erhöhung des Anteils von Fluoratomen im aromatischen System führte im Falle einer 2,4-Substitution bei (*S*)-**15ac** zu einer nahezu 2.7-fach schwächeren Inhibition der GIST48B Zelllinie bei einer gleichbleibend hohen zellulären Potenz von 8 nM auf der PDGFR α -D842V-Zelllinie im Vergleich zum herkömmlichen NDI (vgl. Abbildung 28 und Tabelle 7).

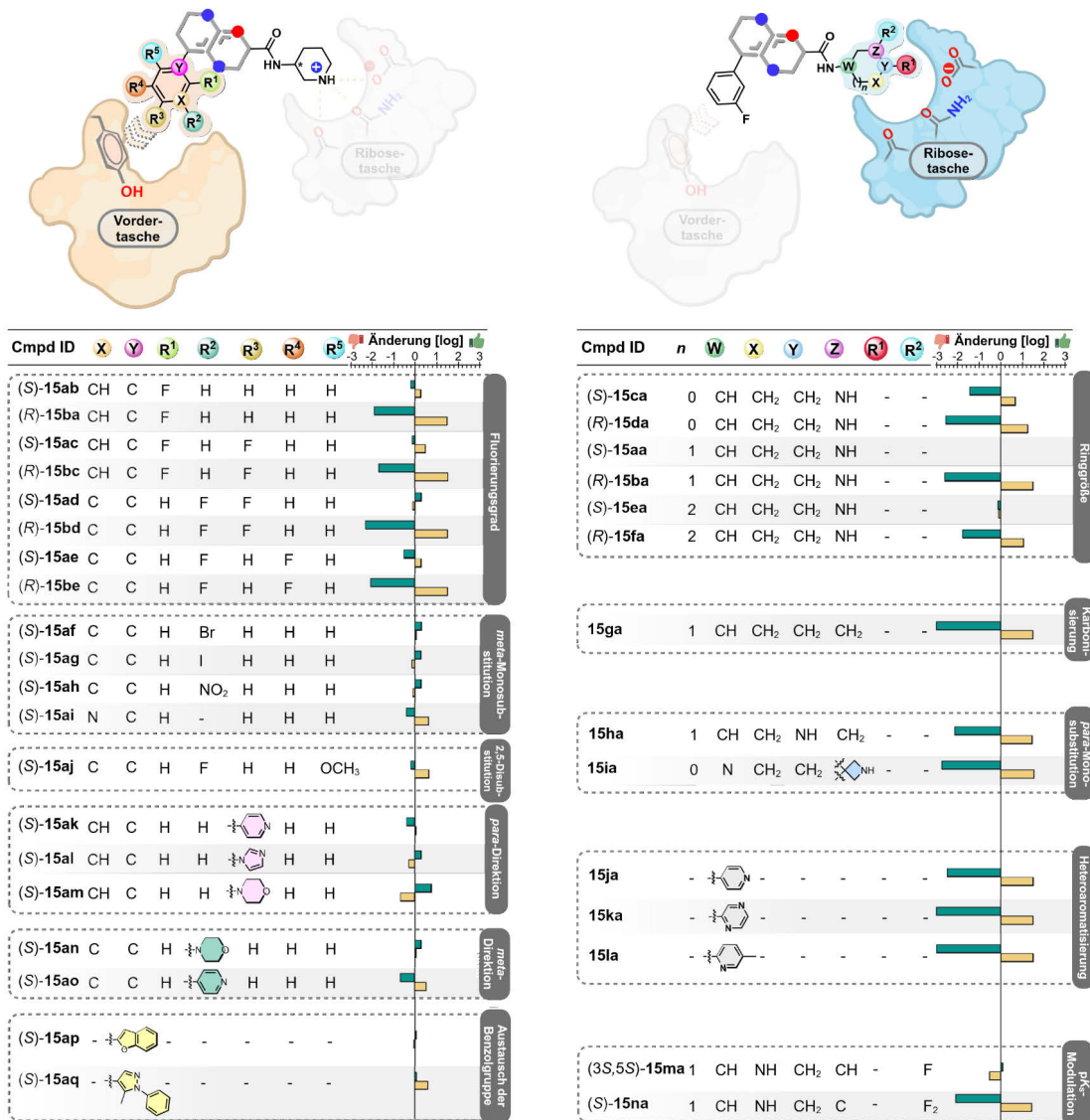


Abbildung 28 | Übersicht über das Struktur-Aktivitäts- und Struktur-Selektivitätsprofil aller synthetisierten NDI Derivate. Das Balkendiagramm visualisiert die logarithmische Änderung der beiden Merkmale Potenz (grün) und Selektivität (gelb) gegenüber der Referenzverbindung NDI ((*S*)-**15aa**). Eine Veränderung im negativen Bereich bedeutet, dass sich das Merkmal im Vergleich zum Ursprungsmerkmal des NDIs verschlechtert, während eine positive Änderung auf eine Verbesserung hindeutet.

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass bereits die Anwesenheit eines mono-Fluor-Substituenten in *ortho*-Position ausreichend ist, um einen verbesserten Targetspezifitätsquotienten von 65 und eine zelluläre Potenz von 9 nM zu erreichen.

Ähnliche Spezifitätseigenschaften zeigen sich auch für die Verbindungen (*S*)-15aj und (*S*)-15aq, die einen 2-Fluor-5-methoxy-substituierten Benzolring bzw. eine 3-Methylpyrazolgruppe aufweisen (siehe Abbildung 28, Tabelle 9 und Tabelle 11). Diese Beobachtung ließ die Annahme aufkommen, dass die Anwesenheit eines hydrophoben Restes mit schwach positiv-mesomeren (+M) oder negativ-induktiven (-I) Eigenschaften in *ortho*-Position des Benzolrings, als ein potentielles Selektivitätsmerkmal definiert werden könnte.

Um jedoch eine Erklärungsgrundlage für diese Hypothese erschließen zu können, war es erforderlich mit Hilfe des webbasierten *Frontends* GEOMINE der Universität Hamburg ein prototypisches Interaktionsmodell für die *meta*- und *ortho*-Fluor-Substitution abzubilden. Dazu wurden zunächst auf Grundlage der vorausgegangenen Bindungsmodusanalyse zentrale pharmakophore Eigenschaften identifiziert und diese anschließend durch die in GEOMINE verfügbaren Definitionen als ein Netzwerk aus zwei Wasserstoff-Donatoren, einem Wasserstoff-Akzeptor, zwei aromatischen Ringzentren und einer hydrophoben Wechselwirkung definiert. Als Unterscheidungskriterium zwischen beiden Suchmodellen wurde der Bindungswinkel zwischen der Einfachbindung des Benzolrings und des Halogens festgelegt. Dieser beträgt für die *ortho*-Konformation 60° und für die *meta*-Konformation entsprechend 120°. Zusätzlich wurden alle Interaktionspunkte mit Distanzen verbunden, um die jeweiligen Bindungslängen des Liganden zu berücksichtigen.

In der Folge identifizierte GEOMINE auf Basis der eingestellten Parameter entsprechende analoge Interaktionsmuster in der PBD und stellte somit eine Übersicht über potenzielle *Off-Targets* bereit. Die Suchabfrage offenbarte, dass für den Fall der *meta*-Substitution zahlreiche Protein-Ligand-Komplexstrukturen von 158 anderen Kinasen identifiziert werden konnten, während das *ortho*-Fluor-Modell lediglich 132 Kinasen aufspürte.

Motiviert durch diese Ergebnisse wurde im nächsten Schritt eine komparative Bindetaschenanalyse aus einem repräsentativen *Set* aus 16 identifizierten *Off-Targets* (je 2 Kinasen pro Kinasengruppe) durchgeführt. Hierbei kamen sowohl ein topologisches Sequenzalignment mittels PYMOL als auch ein multipler Sequenzvergleich durch den Webserver CLUSTALOMEGA zur Anwendung (siehe Abbildung 47). Diese Methoden legten unter anderem offen, dass in allen in der Literatur beschriebenen Kristallstrukturen des *meta*-Fluor-substituierten NDIs eine Bindeposition eingenommen wird, bei der die jeweilige Fluorgruppe vom Tyr676 der Scharnierregion abgewandt ist. Es wurde daraufhin angenommen, dass die vorteilhafte π - π -Wechselwirkung des Tyrosins in Kombination mit der zusätzlich ausgebildeten Wasserstoffbrücke zwischen dem Fluoratom und dem Wassermolekül 59 eine mögliche Erklärungsgrundlage für diese Beobachtung darstellen könnte.

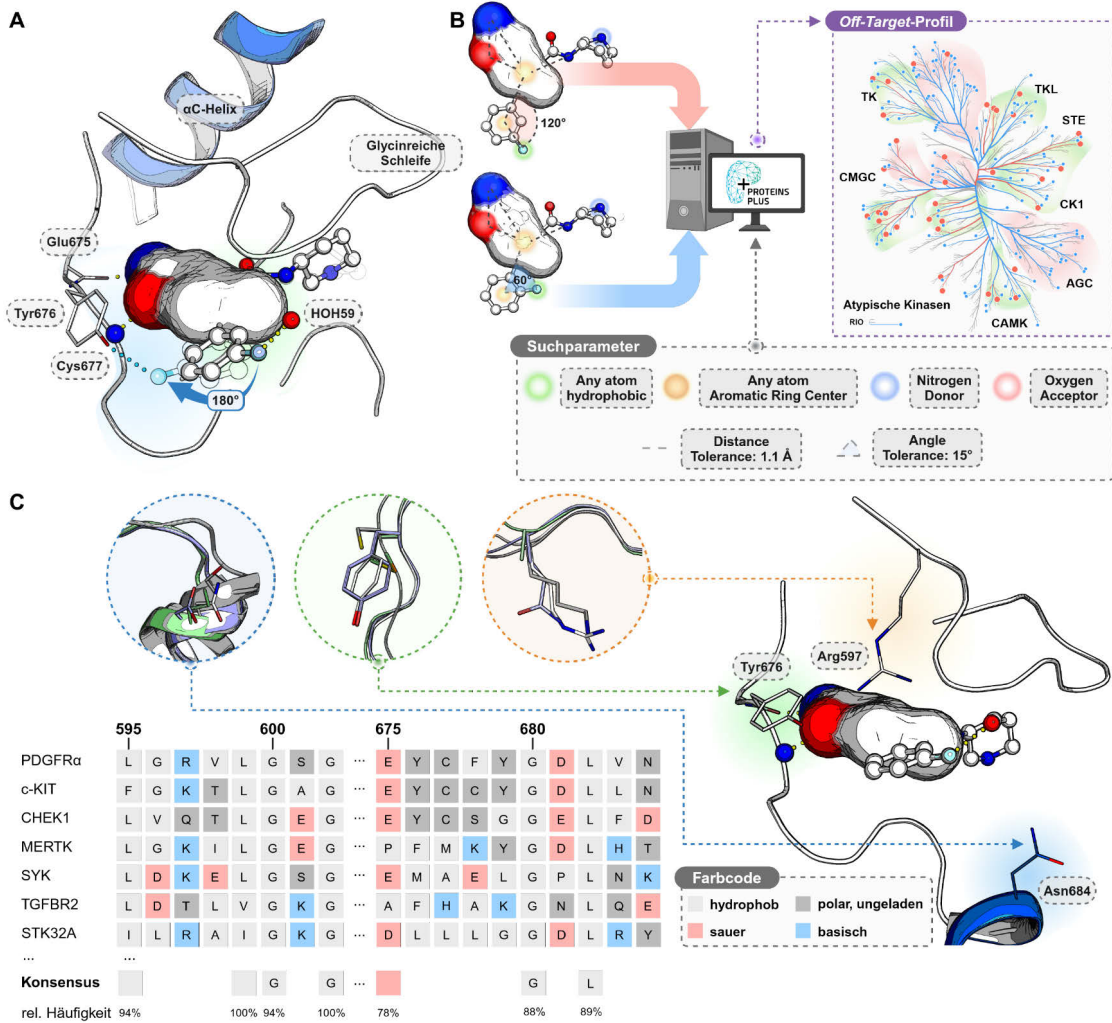


Abbildung 29 | Übersicht über das exemplarische Vorgehen bei der Entwicklung strukturbasierter Erklärungsmodelle für die Variation des Fluorierungsgrades. (A) Überlagerung der Kristallpose von NDI in der PDGFR α -T674I-Mutante mit einer hochpopulierten *Docking*-Pose. Die Analyse suggerierte, dass die Einnahme beider Posen im Falle einer *meta*-Fluorsubstitution des Fluorbenzol-Rings als gleichwahrscheinlich anzusehen ist. (B) Mit Hilfe von GEOMINE erstelltes Interaktionsmodell für die beiden *ortho*- und *meta*-Fluor-substituierten Derivate. Die Suchanfrage für (*S*)-**15aa** (roter Pfad) ergab 156 potentielle *Off-Targets*, während für (*S*)-**15ab** (blauer Pfad) lediglich 132 andere Kinasen gefunden wurden. Der phylogenetische Baum visualisiert das Selektivitätsprofil von NDI gegenüber dem *ortho*-Fluor-Derivat (rote Punkte = Treffer für *meta*-Fluor Derivat (*S*)-**15aa**, blaue Punkte = Treffer für *ortho*-Fluor-Derivat (*S*)-**15ab**, grüne Fläche = verbesserte Selektivität innerhalb einer Kinasefamilie, rote Fläche = keine Veränderung). (C) Exemplarische topologische Sequenzüberlagerung für sieben repräsentative *Off-Targets*. Basierend auf den Kristallstrukturen der Kinasen wurden Bereiche abgesucht, in denen Aminosäuren unterschiedlicher chemischer Natur vorzufinden waren. Eine Aufschlüsselung dieser Ergebnisse findet sich in der unteren, linken Auflistung.

Interessanterweise zeigten im Vorfeld durchgeführte *Docking*-Experimente jedoch, dass in den beiden Kinasen PDGFR α und c-KIT, auch eine um 180° gedrehte Orientierung des *meta*-Fluorbenzolrings mit nahezu identischer Population wie die reproduzierte Kristallpose, generiert werden konnte. Diese Konformation erschien auch aus strukturbiochemischer Sicht als eine sinnvolle Alternativpose, da die Analyse der Dockingpose aufzeigte, dass eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Fluoratom des Benzolrings und der Hydroxylgruppe des Tyr676 ausgebildet wird (siehe Abbildung 29a).

Es konnte daher grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass im Falle einer *meta*-Fluorsubstitution beide Bindungsposen mit gleicher Wahrscheinlichkeit eingenommen werden können und sich das NDI ((*S*)-**15aa**) somit flexibel an unterschiedliche Bindungsumgebungen anpassen kann.

Befindet sich das Fluor jedoch in *ortho*-Position kann eine Wechselwirkung mit dem Wassermolekül 59 aufgrund des größeren Abstands zu diesem nicht mehr erfolgen. Aufgrund dieses Umstandes wäre die Einnahme einer solchen Pose mit keinem konstruktiven Energiegewinn verbunden und somit deutlich unwahrscheinlicher. Im Gegensatz dazu, würde die Umorientierung des Fluoratoms zum Tyr676 zu einer Bindungssituation führen, in der die Dipolmomente der *ortho*-Fluorbenzolgruppe sowie der umgebenden Aminosäure entgegengerichtet und damit energetisch besonders günstig sind.

Bei Anwesenheit eines hydrophoben *ortho*-Substituenten kann daher davon ausgegangen werden, dass sich eine Vorzugsorientierung der Benzolgruppe einstellt und aufgrund der eintretenden Rigidisierung die Interaktion mit Tyr676 in den Vordergrund tritt.

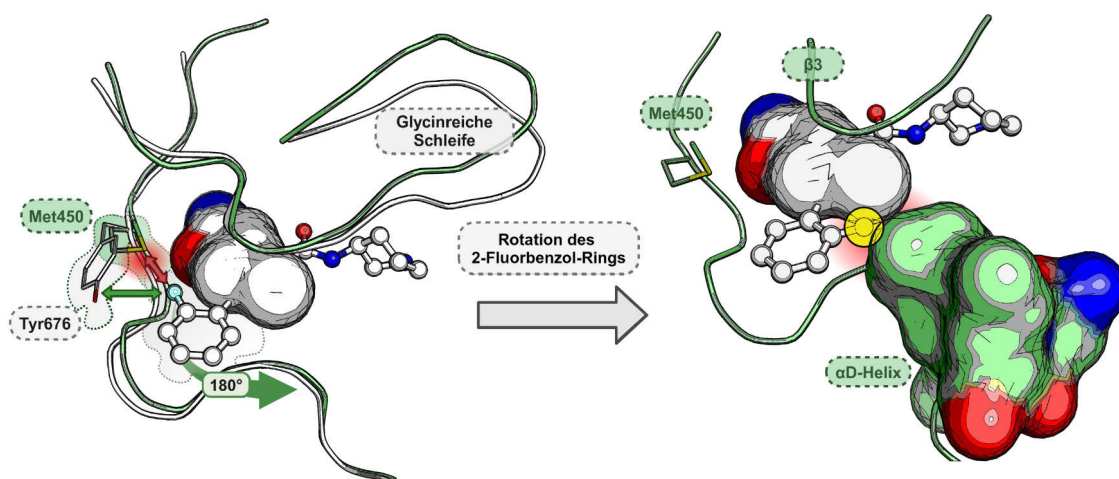


Abbildung 30 | Übersicht zum Erklärungsansatz der gesteigerten Selektivitätseigenschaften des *ortho*-Fluor Derivats (*S*)-15ab.

Die Überlagerung einer exemplarischen *Docking*-Pose von (*S*)-**15ab** im Komplex mit der Kinase SYK (grün, PDB ID: 6ILD) und dem Homologiemodell der PDGFRA-D842V-Mutation (weiß) zeigt, dass der *ortho*-Fluor-Substituent mit dem in der Scharnierregion lokalisierten Met450 der SYK-Kinase sterisch kollidieren würde. Um diese Abstoßung zu umgehen, müsste die 2-Fluorbenzol-Gruppe um 180° rotiert werden. Diese Konformation bietet jedoch beispielsweise in der Kinase SYK wenig Interaktionspotential für das Halogenid, da der obere Bereich der α D-Helix primär durch die Ausbildung einer hydrophoben Region gekennzeichnet ist. Das Tyr676 in PDGFRA hingegen ist von der Scharnierregion abgewandt und ermöglicht somit auch die Einnahme der um 180° gedrehten Pose des 2-Fluorbenzols und damit die Ausbildung einer H-X-Brücke.

Dieser Befund stellte eine zentrale Grundlage für das Verständnis des zuvor beschriebenen Selektivitätsvorteils bei Gegenwart eines hydrophoben *ortho*-Substituenten dar, da die durchgeführte Sequenzüberlagerung ebenfalls manifestierte, dass lediglich 8 (MERTK, CHEK1, BMP2K, ACVR1, TGFBR2, PDPK1, PK6, STK10) der 16 repräsentativen Kinasen (TK: SYK, MERTK; TKL: ACVR1, TGFBR2; CMGC: DYRK1A, SRPK1; CK1: VRK2, CSNK1D; STE: PAK6, STK10; AGC: PDPK1, STK32A; CAMK: CHEK1, PIM1; Sonstige: TTK; BMP2K) aromatische Aminosäuren auf topologischer Höhe des Tyr676 aufweisen.

Lediglich die vier Kinasen CHEK1, BMP2K, ACVR1 und PDPK1 beinhalten dabei ein Tyrosin, welches für eine H-X-Brücke mit einem Halogenid von essentieller Bedeutung wäre (siehe Abbildung 30).

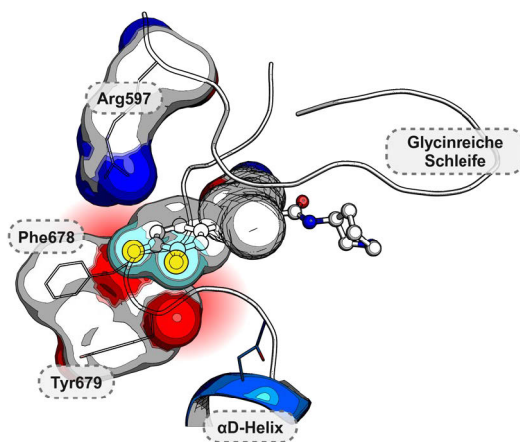


Abbildung 31 | Docking-Pose des 3,4-difluorierten NDI-Derivats (*S*)-15ad im PDGFR α -D842V. Die Analyse des Docking-Experiments legte eine suboptimale Positionierung der Fluoratome in einer polaren Region der Vordertasche offen. Diese Region wird durch die nach innen gerichtete Orientierung der Rückgrat-Carbonylgruppen der beiden aromatischen Aminosäuren Phe678 und Tyr679 aufgespannt und erfordert die Anwesenheit von funktionellen Gruppen mit Donatoreigenschaften in diesem Bereich. Demgegenüber können die beiden in der 3,4-Position befindlichen Fluoratome aufgrund ihrer Eigenschaft als hydrophobe Wasserstoffbrückenakzeptoren keine vorteilhaften Wechselwirkungen eingehen.

Die Kinasen SYK, TTK, STK32A, und PIM1 hingegen weisen entweder hydrophobe aliphatische Aminosäuren, wie Methionin (SYK) oder Leucin (STK32A) auf, die mit einem *ortho*-Fluor-Substituenten sterisch kollidieren würden (siehe Abbildung 30) oder im Falle von TTK und PIM1 polare Aminosäuren wie Cystein oder Arginin, deren Seitenketten für eine potentielle Interaktion zu weit entfernt wären.

Ein analoger Effekt ließ sich auch bei einem 2,5-Substitutionsmuster, wie bei (*S*)-15aj vorzufinden, erkennen. Auch hier scheint bevorzugt eine Interaktion mit dem Tyr676 stattzufinden, welche entweder über das *meta*-ständige Fluor oder aber dem *ortho*-ständigen Methoxyrest erfolgen könnte. Dabei scheint primär eine hydrophobe Wechselwirkung mit Tyr676 in den Vordergrund zu treten, wodurch der Einfluss eines solchen Strukturelements auf den Parameter der Targetspezifität als eher geringfügig einzuschätzen ist.

Im Vergleich dazu zeigte eine 3,4-Substitution, wie beim Inhibitor (*S*)-**15ad**, nur marginale Veränderungen in Bezug auf Spezifität und Aktivität, wohingegen die Anwesenheit von zwei Fluorsubstituenten in 3,5-Position (siehe Verbindung (*S*)-**15ae**) zu einer dreifachen Verschlechterung der Potenz und einem Targetspezifitätsquotienten von 28 führte. Eine Erklärung hierfür konnte wiederum ein Blick auf die umliegenden Aminosäuren in PDGFR α und c-KIT liefern. So spannen die, die *para*-Position umgebenden, Aminosäuren Arg597, Val598 und Leu599 eine eher polare Region auf, welche die Anwesenheit polarer Substituenten mit Akzeptoreigenschaften erfordern würde. Die Anwesenheit einer zweiten Fluorgruppe, wie im Falle einer 3,5-Disubstitution, könnte daher nur zu wenig attraktiven Wechselwirkungen führen, so dass der Beitrag zur Desolvatation dieses Substituenten den Beitrag der konstruktiven Wechselwirkungen überwiegen würde und somit den Potenzverlust in diesem Fall erklären könnte.

3.2.5.2 Einfluss von meta-Substitutionen am 3-Fluorbenzol-Ring

Neben der Variation des Fluoranteils, sollte in einer weiteren Versuchsreihe auch die Kompatibilität anderer Substituenten in *meta*-Position untersucht werden. Dabei fiel auf, dass Integration anderer Halogenide wie Bromid und Iodid, aber auch die Anwesenheit einer Nitrogruppe zu einer leicht gesteigerten Potenz von 3 nM auf der PDGFR α -D842V-Mutation sowie einer marginalen Verbesserung des Targetspezifitätsquotienten führte (siehe Verbindungen (*S*)-**15af-ai** in Tabelle 9 und Abbildung 28). Für den Austausch eines Fluoratoms gegen ein Bromatom verdoppelte sich der Targetspezifitätsquotient bspw. von 50 beim herkömmlichen NDI ((*S*)-**15aa**) auf 101 bei (*S*)-**15af**. Wird das C3-Kohlenstoffatom „X“ gänzlich durch ein basisches Stickstoffatom ausgetauscht (siehe Verbindung (*S*)-**15ai** in Abbildung 28), kann ein ähnlicher Spezifitätsquotient von 92, bei einer insgesamt leichten Verringerung des GR₅₀-Wertes auf 14 nM, erzielt werden (vgl. Tabelle 9).

Die Ursachen für die beschriebenen Trendverläufe ließen sich erneut auf die herbeigeführte Rigidisierung des (hetero-)aromatischen Ringsystems zurückführen. Während der Austausch eines kleinen Fluoratoms mit sterisch anspruchsvolleren Gruppen wie Bromid, Iodid oder einer Nitrogruppe im Sinne des Entropieeffektes beispielsweise zum vollständigen Verdrängen des Wassermoleküls 59 führen könnte, verändert die Einführung eines Pyridinrings die physikochemischen Eigenschaften der Gesamtverbindung. Der so entstehende basische heteroaromatische Teil könnte eine Säure-Base-Reaktion mit der semisauren Aminosäure Tyr676 eingehen und somit die Ausbildung einer Salzbrücke begünstigen.

Da die topologische Sequenzüberlagerung zudem offenbarte, dass andere Kinasen an dieser Stelle beispielsweise ein Phenylalanin, Methionin oder auch ein Leucin und somit keine sauren Aminosäurereste tragen (vgl. Abbildung 29), konnte davon ausgegangen werden, dass der Austausch eines substituierten Benzolrings durch einen basischen Heteroaromaten zu schwächeren Wechselwirkungskräften innerhalb der vorausgesagten *Off-Targets* führen würde

3.2.5.3 Funktionalisierung der meta- und para-Position des 3-Fluorbenzol-Rings

Die zuvor demonstrierte Toleranz größerer Substituenten im Bereich des 3-Fluorbenzol-Rings legte die Möglichkeit offen, die räumliche Ausdehnung der Vordertasche durch Substitutionsversuche genauer zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sollte die Fluorgruppe des Aromaten als eine Art *Exit*-Vektor für weitere Funktionalisierungen des Moleküls fungieren. Auf Grundlage dieses Gedankengangs wurden zwei Molekülserien konzipiert, mit deren Hilfe der chemische Raum der Vordertasche hinsichtlich neuer potentieller Interaktionsmuster und/oder adressierbarer Selektivitätsanker abgesucht werden sollte. Im Rahmen dieses Vorhabens wurden sowohl (hetero-)aromatische als auch gesättigte heterozyklische Ringsysteme in *ortho*- und *para*-Position des Benzolrings installiert. Anschließend wurden die erhaltenen Aktivitätsdaten hinsichtlich ihrer Potenz- und Targetspezifitätstrends analysiert.

Im Allgemeinen konnte dabei beobachtet werden, dass die Einführung eines Pyridin-Rings mit einem drei- bis fünffachen Potenzverlust auf der PDGFR α -D842V-Mutation bei einer nahezu konstanten Inhibition der Kontrollzelllinie GIST48B im Falle einer *para*-Substitution bzw. einer dreifach schwächeren Inhibition im Falle der *meta*-Substitution einherging (vgl. Verbindungen (*S*)-**15ak** und (*S*)-**15ao** in Abbildung 28). Die Targetspezifitätsquotienten lagen damit folglich unterhalb des Spezifitätsniveaus des eigentlichen NDIs ((*S*)-**15aa**) (siehe Tabelle 10).

Die Integration eines Imidazol-Rings in *para*-Stellung führte im Falle von (*S*)-**15al** hingegen zu einer leichten Verbesserung des GR₅₀-Wertes auf 3 nM, jedoch auch zu einer doppelt so starken Inhibition der GIST48B-Zelllinie. Der Targetspezifitätsquotient dieser Verbindung liegt damit auf dem gleichen Niveau wie der des ursprünglichen NDIs.

Die Einführung eines ungesättigten heterozyklischen Ringsystems, in Form der beiden Morpholine (*S*)-**15am** und (*S*)-**15an**, führte hingegen zu höheren Potenzen gegenüber der PDGFR α -D842V-Mutation, die jedoch auch im Falle der *para*-Substitution mit einer fünffach stärkeren Inhibition der GIST48B-Kontrollzelllinie einherging. Im Falle der *meta*-Substitution blieb die Inhibitionstendenz für diese Zelllinie auf einem gleichbleibend hohen Niveau von 305 nM. Aufgrund der verbesserten *On-Target*-Potenz weist (*S*)-**15an** damit dennoch einen doppelt so hohen Targetspezifitätsquotienten von 102 auf, während (*S*)-**15am** mit einem Quotienten von 60 geringfügig bessere Selektivitätseigenschaften wie NDI aufweist.

Eine Erklärungsgrundlage für diesen Trendverlauf konnte erneut durch eine strukturbiochemische Analyse der beiden *Docking*-Posen der Morpholine (*S*)-**15am** und (*S*)-**15an** im PDGFR α -D842V-Homologiemodell (siehe Abbildung 32) gewonnen werden. Dabei wurde ersichtlich, dass die Anwesenheit der beiden polaren Aminosäuren Asn684, in der Nähe der *meta*-Position des 3-Fluorbenzol-Rings sowie Arg597 in direkter Nähe zur *para*-Position, die Platzierung eines funktionellen H-Brücken-Akzeptors in dieser Region der Bindetasche notwendig macht.

Insbesondere die Funktionalisierung des *para*-ständigen Kohlenstoffatoms scheint dabei zu einer Ausrichtung des neu eingeführten Restes zu führen, die den hinteren Teil des Liganden außerhalb der eigentlichen Vordertasche positioniert und damit zu einer starken Exposition mit Lösungsmittel-Molekülen führen könnte.

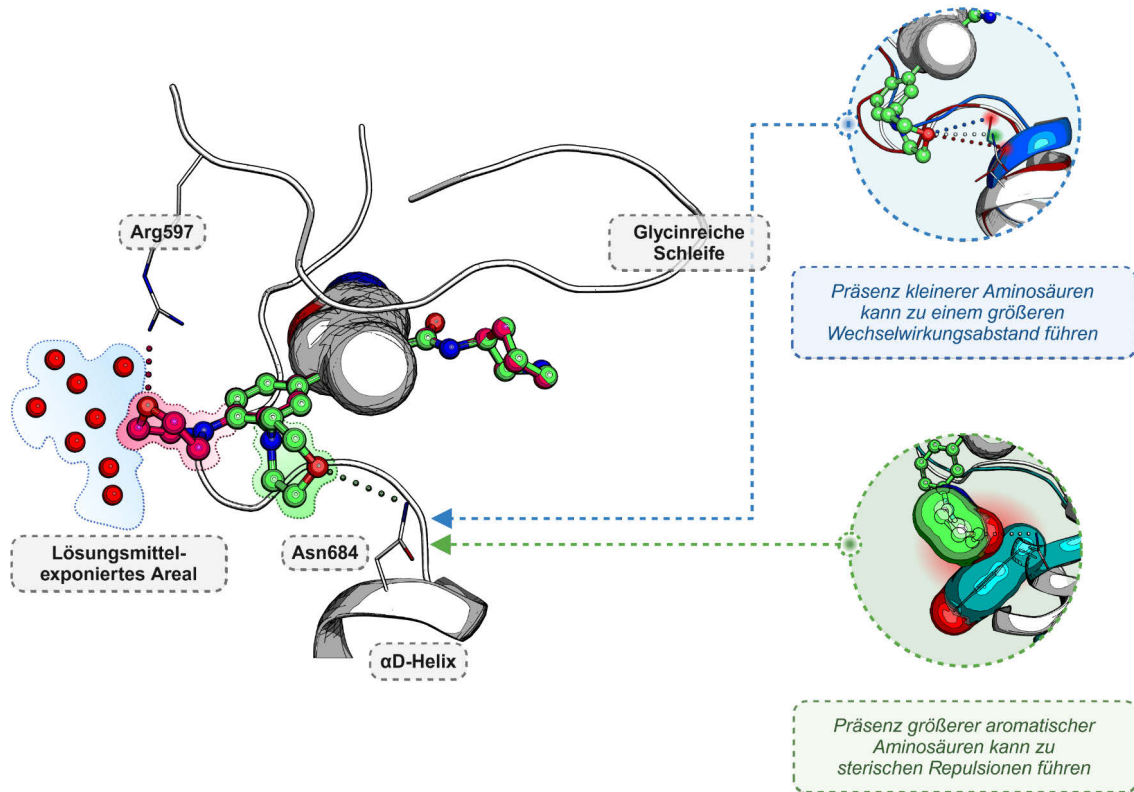


Abbildung 32 | Übersicht zu den strukturellen Erklärungsmodellen zu den *para*- und *meta*-ständigen Morpholin-Derivaten (*S*)-15am und (*S*)-15an. Zur Analyse wurden die beiden erhaltenen *Docking*-Posen von (*S*)-15am (magenta) und (*S*)-15an (grün) im Homologiemodell der PDGFRA-D842V-Mutation (weiß) überlagert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die am C4-substituierte Morpholin-Gruppe bereits im Lösungsmittel-exponierten Areal verortet ist und damit vorrangig mit Wassermolekülen und Arg597 interagiert. Im Falle einer *meta*-Substitution tritt hingegen die Wechselwirkung mit der Aminosäure Asn684 in den Vordergrund. Die potentiellen *Off-Targets* MERTK (rot, PDB ID: 7AB0) und TTK (blau, PDB ID: 4H7Y) weisen mit einem Threonin bzw. Serin kleinere polare Aminosäuren an dieser Position auf, wodurch möglicherweise der Wechselwirkungsabstand zu groß für eine Interaktion mit dem Morpholin-Ring ist. Die Kinase STK32A (cyan, PDB ID: 4FR4) weist hingegen mit Tyrosin einen deutlich größeren Interaktionspartner auf, was wiederum zu sterischen Repulsionen führen könnte. Dieses Modell kann somit den erhöhten Targetspezifitätsquotienten für (*S*)-15an erklären.

Diese Erkenntnis ließ die Vermutung aufkommen, dass für eine solche Art von Derivaten neben einer potenziellen Donor-Akzeptor-Wechselwirkung mit dem Arg597 auch Interaktionen mit Lösungsmittelmolekülen als eine weitere konstruktive Einflussgröße in Betracht gezogen werden sollte. Bemerkenswert ist dennoch die Tatsache, dass alle 16 untersuchten *Off-Targets* eine polare Aminosäure (Lysin in MERTK, SYK, KIT, PDPK1, PK6; Glutamin in CHEK1; Glutaminsäure in JAK2, BMP2K, ACVR1; Asparagin in CDK16; Arginin in TTK, STK32A, Prolin in PIM1, Threonin in TGFBR2) auf topologischer Höhe des Arg597 aufwiesen (vgl. Abbildung 47 und Abbildung 47).

Dies deutet auf eine konservierte Bindungsregion hin, weshalb eine gezielte Adressierung der dortigen Aminosäuren nur eine geringe Selektivität vermitteln könnte. Auch im Falle des Asn684 wurde ersichtlich, dass andere Kinasen ausschließlich polare Aminosäuren mit Donatoreigenschaften in diesem Bereich aufwiesen (vgl. Abbildung 48). Jedoch fanden sich darunter auch kleinere Aminosäuren wie Threonin (MERTK) oder Serin (TTK) bzw. deutlich größere Aminosäuren wie Lysin (SYK) oder Tyrosin (STK32A), die entweder zu einer schwächeren Interaktion mit der Morpholingruppierung führen würden oder sogar eine sterische Repulsion begünstigen könnten (siehe Abbildung 32).

Anhand dieser Ergebnisse ließ sich schlussfolgern, dass der Ausbau von NDI-Derivaten in *meta*- und *para*-Richtung der Vordertasche nur einen marginalen Einfluss auf die Targetspezifität ausübt, jedoch vor allem Potential zur weiteren Verbesserung des Affinitätsprofils bietet.

3.2.5.4 Einbau unterschiedlicher Exit-Vektoren im Bereich der Vordertasche

Getrieben von den vielfältigen Einsichten bei der Funktionalisierung der *meta*- und *para*-Position des 3-Fluorbenzol-Rings, wurde in einer weiteren Versuchsreihe das Vorhaben in Betracht gezogen, durch den Austausch der Benzolgruppe die Kompatibilität anderer chemischer Bausteine in der Umgebung der Vordertasche zu untersuchen. Die beiden synthetisierten Verbindungen (*S*)-**15ap** und (*S*)-**15aq** nahmen diesbezüglich eine Sonderstellung in der Substanzbibliothek ein, da bei diesen Vertretern der ursprüngliche Benzolring durch heteroaromatische Gruppen ersetzt wurde und somit eine andere vektorielle Ausrichtung erreicht werden sollte (vgl. Abbildung 33). Dieser Austausch sollte zudem die Möglichkeit bieten, durch differentielle Funktionalisierungsstrategien eine größere Flexibilität bei der Adressierung verschiedener Aminosäuren zu gewährleisten.

Die initiale Substitution des 3-Fluorbenzol-Rings durch eine Benzofuran-Gruppe zeigte ein nahezu äquivalentes Aktivitäts- und Selektivitätsprofil für die Verbindung (*S*)-**15ap** (siehe Tabelle 9). Dieser Umstand erwies sich jedoch insofern als prädiktiv, als die Verteilung der pharmakophoren Eigenschaften beider Funktionalitäten als nahezu gleichwertig anzusehen war. Für eine weitergehende Analyse wurde daher ein Baustein benötigt, der sowohl eine andere räumliche Ausrichtung der funktionellen Gruppen bot wie auch aufgrund seiner chemischen und pharmakophoren Diversität sich deutlich von der 3-Fluorbenzol-Gruppe differenzierte.

Auf Grundlage dieser Bedingungen wurde 3-Methyl-1-phenylpyrazol als vielversprechendstes Ringsystem nominiert, da sich dieses aufgrund seiner geringen Größe und der differentiellen chemischen Natur sehr stark von dem zuvor untersuchten 2-Benzofuran-Analogen unterschied. In der Tat ergab sich durch Integration dieser Gruppe der Inhibitor (*S*)-**15aq**, der mit einem GR₅₀-Wert von 5 nM und einem Targetspezifitätsquotienten von 238 das bis dahin vielversprechendste Aktivitäts- und Selektivitätsprofil aufwies (siehe Tabelle 9).

Docking-Experimente zu dieser Verbindung suggerierten zudem, dass dieser Ligand einen intermediären Bindungszustand einnehmen konnte, im Zuge dessen sich die Phenylgruppe des 3-Methyl-1-phenylpyrazols in einer Art Zwischenstellung zu den beiden Morpholin-Ringsystemen von (*S*)-**15am** und (*S*)-**15an** verortet. Die hohe Affinität konnte vor allem auf die Kation- π -Wechselwirkung des Benzolrings mit Arg597 zurückgeführt werden und stellte damit in gewisser Weise eine analoge Situation zum vorhergesagten Bindungsmodus des *para*-substituierten Morpholins (*S*)-**15am** dar.

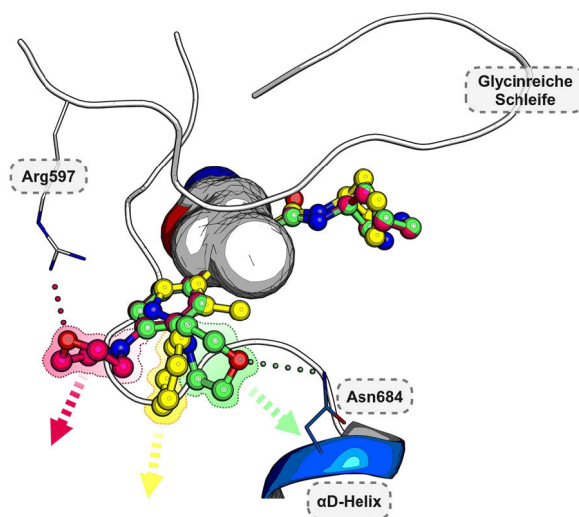


Abbildung 33 | Überlagerung der *Docking*-Posen von (*S*)-15am, (*S*)-15an und (*S*)-15aq im PDGFR α -D842V-Homologiemodell. Durch die Überlagerung werden die unterschiedlichen vektoriellem Ausrichtungen der jeweiligen Substituenten verdeutlicht. Der Austausch des Benzolrings durch einen Pyrazol-Ring ermöglicht die Erschließung eines neuen chemischen Raums innerhalb der Vordertasche.

Darüber hinaus würde die räumliche Nähe zur Aminosäure Asn684 die Installation einer funktionellen Gruppe mit Donorfunktionalität in *meta*- oder *ortho*-Position des Benzolrings erlauben, um beispielsweise die Targetspezifität wie im Fall der Verbindung (*S*)-**15an** weiter zu erhöhen (vgl. Abbildung 33).

3.2.5.5 Variation der Ringgröße des Piperidin-Rings

Neben dem Vordertaschen-adressierenden molekularen Bestandteil von NDI wurde sich in weiteren Molekülserien auch auf die Alternierung des (*S*)-konfigurierten Piperidin-Ringsystems konzentriert. Im Zentrum dieser Bemühungen stand die Motivation, durch Variation verschiedener Strukturelemente, einen Eindruck zu erhalten, welche Modifikationen an dieser Stelle toleriert und welche gänzlich unattraktiv sein könnten. Aufgrund der Tatsache, dass die Piperidin-Gruppe des NDI topologisch gesehen in der Ribosetasche bindet und somit eine Art Mimikry für das natürliche Substrat ATP darstellt, wurde daraus abgeleitet, dass die gezielte Positionierung eines basischen Zentrums, welches die Anwesenheit der Phosphatgruppen simulieren sollte, von essentieller Bedeutung war (siehe Abbildung 34a).

In Bezug auf das Piperidin des NDIs übernahm das sekundäre aminische Stickstoffatom diese Rolle und interagiert dazu in einem polaren Wasserstoffbrückennetzwerk mit den Aminosäuren Arg822, Asn823 und Asp836. Angesichts dieser Tatsachen sollten in einer ersten Teilsreihe zunächst Faktoren identifiziert werden, die die Orientierung und Positionierung des Heteroatoms in der Tasche maßgeblich beeinflussen. Als zwei wesentliche Hauptfaktoren wurden dazu die Ringgröße des entsprechenden Heterozyklus sowie die absolute stereochemische Konfiguration des stereogenen Zentrums am C6-Atom des Piperidins untersucht.

Im Zuge dessen zeigte sich, dass im zellulären Kontext bei allen Derivaten das jeweilige (*R*)-Enantiomer im Durchschnitt 13- bis 400-fach weniger aktiv auf der PDGFR α -D842V-Mutation im Vergleich zum entsprechenden (*S*)-Enantiomer war (vgl. Abbildung 28 und Tabelle 13). Interessanterweise offenbarte sich dieser Trend nicht nur bei der Variation der Ringgröße des Piperidins, sondern konnte auch bereits bei der Variation des Fluorgehalts des Benzolrings (vgl. Abbildung 28, Tabelle 8) beobachtet werden, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass die (*R*)-Konfiguration des C6-Atoms zu einer suboptimalen Ausrichtung des Stickstoffatoms führen muss. Diesbezüglich deuteten *Docking*-Experimente daraufhin, dass sich die Position des Stickstoffatoms im Falle eines (*R*)-Enantiomers durchschnittlich 2.7 Å von der herkömmlichen Position des jeweiligen (*S*)-Enantiomers unterscheidet (vgl. Abbildung 34b) und somit lediglich eine Wechselwirkung mit Asp836, nicht jedoch mit Arg822 und Asn823 möglich ist.

Weiterhin wurde festgestellt, dass eine Wechselwirkung mit den Rückgrat-Carbonylgruppen der Aminosäuren der glycinreichen Schleife nur durch eine Konformationsänderung dieser möglich wäre. Diese Hypothese konnte schließlich durch die von Dr. ALINA TEUBER gelöste Kristallstruktur des (*R*)-konfigurierten Pyrrolidin-Derivats (*R*)-**15da** in c-KIT bestätigt werden. Diese zeigte aufgrund der sterischen Repulsion mit dem Pyrrolidin-Rest eine deutliche Verschiebung der glycinreichen Schleife im Vergleich zur ursprünglichen Konformation der Referenzkristallstruktur des (*S*)-Enantiomers des NDIs in der PDGFR α -T674I-Mutante. Es konnte daher vermutet werden, dass diese Konformationsänderung des Proteins mit einem erhöhten Energieaufwand verbunden ist und somit die Affinität von Inhibitoren mit einer ähnlich ungünstigen Positionierung des Stickstoffatoms vermindern sollte.

In Bezug auf die Variation der Ringgröße fiel ferner auf, dass lediglich die Einführung eines (*S*)-konfigurierten Azepan-Rings ein vergleichbares Potenz- wie auch Selektivitätsprofil im Vergleich zum NDI gewährleistete. Beide Enantiomere des Pyrrolidin-Derivats (*S*)-**15ca** und (*R*)-**15da** wiesen dahingehend deutlich schlechtere Spezifitäts- wie auch Potenzeigenschaften auf (vgl. Tabelle 13). Die Überlagerung der *Docking*-Posen aller Ringderivate manifestierte diesbezüglich, dass das Stickstoffatom in allen Ringvarianten unterschiedlich positioniert war.

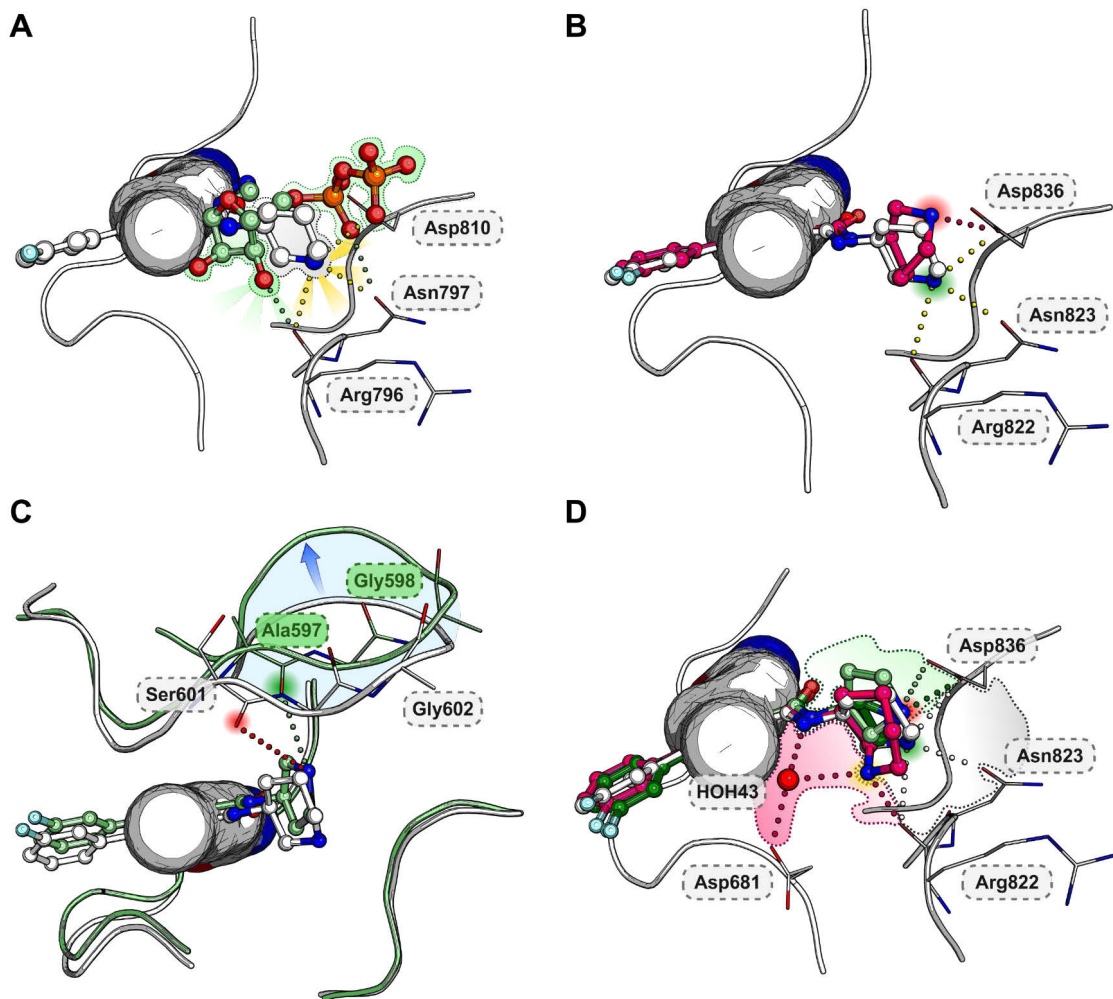


Abbildung 34 | Übersicht zu den strukturellen Erklärungsmodellen bei Variation der Ringgröße des Piperidin-Rings. (A) Überlagerung der Röntgenkristallstruktur von ADP (hellgrün) in der Kinase c-KIT (PDB ID: 1PKG) und der *in-house* Kristallstruktur von NDI (weiß) im Komplex mit dem Wildtypen der Kinase c-KIT. Die Analyse offenbarte ein essentielles polares Interaktionsnetzwerk des Stickstoffatoms mit Arg822, Asn823 und Asp836. Aufgrund der Ionisierbarkeit des Heteroatoms (verblässende Strahlen) und insbesondere der Wechselwirkung mit Asn797 stellt das Piperidin ein Mimikry der Ribose- und Phosphat-Gruppe dar (B) Docking-Pose von (*R*)-15ba (magenta) in Überlagerung mit der tatsächlichen Kristallpose von NDI ((*S*)-15aa) in der PDGFR α -T674I-Mutation. Das Alignment zeigte, dass das Stickstoffatom von (*R*)-15ba ca. 2.7 Å entfernt vom Stickstoffatom des (*S*)-NDI bindet und somit lediglich eine Interaktion (rot) mit Asp810 eingehen kann. (C) Überlagerung der Kristallpose von (*S*)-NDI mit dem Prolin-Derivat (*R*)-15da (hellgrün). Das Bindungsereignis von (*R*)-15da geht mit einer konformellen Verschiebung der glycinreichen Schleife (blau) einher, um Rückgrat-Interaktionen mit dem Stickstoffatom des Prolin-Rings gewährleisten zu können. (D) Überlagerung der Docking-Posen aller Ringgrößen-Variationen. Das Stickstoffatom des Azepan-Rings von (*S*)-15ae (magenta) ist, im Gegensatz zu (*S*)-15ca (grün), in einem Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen HOH43, Asp681 und dem amidischen Stickstoffatom des Inhibitors involviert.

So wurden für die fünfgliedrigen Heterozyklus-Varianten jeweils hohe Populationen von Posen generiert, bei denen das basische Zentrum oberhalb der Ursprungsposition aufzufinden war. Diese Bindungssituation würde jedoch aufgrund des vergrößerten Abstands zu den Aminosäuren Arg822 und Asn822 zu einem Verlust der Wasserstoffbrücken-Interaktion führen und könnte somit den hohen Potenzverlust für diese Verbindung erklären.

Im Falle des Siebenring-Derivats (*S*)-**15ea** wurden hingegen vermehrt Bindungsposen generiert, bei denen sich das Stickstoffatom der Azepan-Gruppe weiter links, in Richtung des Wassermoleküls 43, orientierte. Auf diese Weise wäre das Heteroatom weiterhin in der Lage, mit Arg822 und Asn822 zu interagieren und zugleich den Verlust der Wasserstoffbrücke mit Asp836 durch die Ausbildung eines Interaktionsnetzwerkes mit dem Wassermolekül 43, der umgebenen Aminosäure Asp681 und dem Stickstoffatom der Amidbindung des Inhibitors zu kompensieren.

3.2.5.6 Karbonisierung des Piperidin-Rings

Nachdem der Einfluss der Ringgröße auf die Positionierung des Stickstoffatoms näher untersucht worden war, sollten durch den Austausch des Heteroatoms auch die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Ringsystems grundlegend verändert werden, um die Einflüsse auf Potenz und Selektivität genauer untersuchen zu können. Zu diesem Zweck wurde das Stickstoffatom durch ein Kohlenstoffatom substituiert. Die Verbindung **15ga** zeigte jedoch mit dieser Modifikation keine Aktivität auf der PDGFR α -D842V-Mutation (siehe Abbildung 28 und Tabelle 13).

Dieses Ergebnis unterstützt damit die Hypothese, dass das Vorhandensein eines basischen Stickstoffatoms für die Aufrechterhaltung der Potenz von essentieller Bedeutung ist.

3.2.5.7 Alternierung der Stickstoff-Position

Da die Variation der Ringgröße bereits erste Restriktionen bezüglich der Positionierung des Stickstoffatoms offenlegte, sollte eine komplexere Abwandlung des Ringsystems tiefergehende Einsichten diesbezüglich eröffnen. So wurden sowohl die Position des Stickstoffatoms innerhalb des Sechsrings verändert sowie ein *spiro*-Ringsystem wie im Falle der Verbindung **15ia** integriert.

Die Positionierung des Stickstoffatoms in *para*-Position zum C6-Atom des Piperidin-Rings, repräsentiert durch die Verbindung **15ha**, führte zu einem vollständigen Potenzverlust (siehe Abbildung 28 und Tabelle 14) auf der PDGFR α -D842V-Mutation. *Docking*-Experimente offenbarten diesbezüglich zudem eine hohe Ähnlichkeit der vorausgesagten Bindungspose mit den zuvor generierten Konformationen von (*R*)-**15ba**. Basierend auf diesen Einsichten ließ sich mutmaßen, dass auch in diesem Falle ausschließlich die Interaktion mit der Aminosäure Asp810 in c-KIT bzw. Asp836 in PDGFR α aufgrund der ungünstigen Positionierung des Heteroatoms vermittelt wird und somit die Ausbildung des potenzvermittelnden Interaktionsnetzwerkes mit der umgebenden Aminosäuretriade nicht möglich ist (siehe Abbildung 35a).

Ein vergleichbares Aktivitätsprofil ergab sich jedoch auch für das *spiro*-Ringsystem **15ia**. Auch hier konnte eine Verschlechterung des GR₅₀-Wertes um das 536-fache beobachtet werden. *Docking*-Posen deuteten dabei an, dass aufgrund der Geometrie des neuen Ringsystems eine Bindepose eingenommen werden muss, in der sich das Stickstoffatom versetzt zur Ursprungspose des (*S*)-Enantiomers von NDI ((*S*)-**15aa**) orientiert.

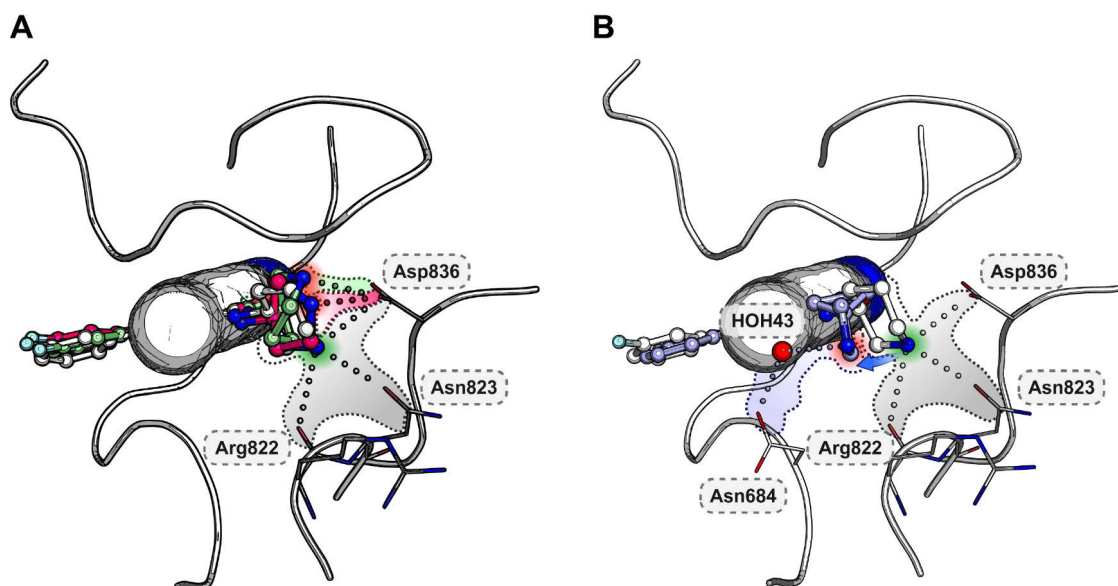


Abbildung 35 | Übersicht zu den strukturellen Erklärungsmodellen bei Alternierung der Stickstoff-Position im Piperidin-Ring. (A) Überlagerung der Docking-Posen von (*R*)-**15ba** (hellgrün) und **15ha** (magenta) mit der Kristallpose von (*S*)-**15aa** (weiß) in der PDGFR α -T674I-Mutation. Das *Alignment* offenbart, dass das Stickstoffatom von **15ha** in nahezu gleicher Position wie die des (*R*)-**15ba** bindet und damit nur Interaktionspotential mit Asp810 in c-KIT bzw. Asp836 in PDGFR α bietet. (B) Vergleich des vorausgesagten Bindemodus von **15ia** (blau) im Vergleich zur Kristallpose von (*S*)-**15aa** (weiß). Die fixierte Geometrie des *spiro*-Ringsystems führt zu einer differentiellen Ausrichtung des Stickstoffatoms in der Ribosetasche. Dieses ist dadurch lediglich in einem Interaktionsnetzwerk mit dem Wassermolekül HOH43 und der Aminosäure Asn684 involviert und zu weit entfernt um die kritischen Wechselwirkungen mit Arg822, Asn823 und Asp836 zu induzieren.

In dieser Konformation könnte lediglich ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk mit dem Wassermolekül 43 ausgebildet werden, während Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Arg822, Asn823 und Asp836 aufgrund der größeren Distanz nicht mehr möglich sind (siehe Abbildung 35b).

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Erkenntnisse lässt sich zudem die Annahme ableiten, dass die Einführung eines Cyclopentylamin- oder eines Cyclopropylamin-Rings zu einer vorteilhafteren Positionierung des Stickstoffatoms führen könnte. Bedauerlicherweise war es im Rahmen dieser Dissertation aus Zeitgründen nicht möglich, dieser Idee weiter nachzugehen. Es sei jedoch angemerkt, dass der Austausch des Piperidin-Rings durch ein symmetrisches Ringsystem mit exozyklischer Amin-Gruppe prinzipiell den Vorteil eröffnet, das NDI in eine achirale Verbindung zu überführen. Zudem ist anzunehmen, dass aufgrund der herabgesetzten Basizität des neu eingeführten Heterozyklus auch PK-Parameter wie die Permeabilität maßgeblich beeinflussbar wären. Für zukünftige Optimierungsstrategien sollte daher über einen solchen Austausch nachgedacht werden.

3.2.5.8 Heteroaromatisierung des Piperidin-Rings

Neben der Integration aliphatischer Systeme sollte auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, den Piperidin-Ring durch Heteroaromaten zu ersetzen. Dieser Idee ging die Überlegung voraus, dass durch Einführung eines solchen Restes zum einen die Verfügbarkeit entsprechender Synthesebausteine verbessert werden könnte, andererseits aber auch ein neuer chemischer Raum für weitere Ringfunktionalisierungen erschlossen werden würde. Es wurde sich daher in einer weiteren Teilserie auf die Einführung stickstoffhaltiger Aromaten beschränkt.

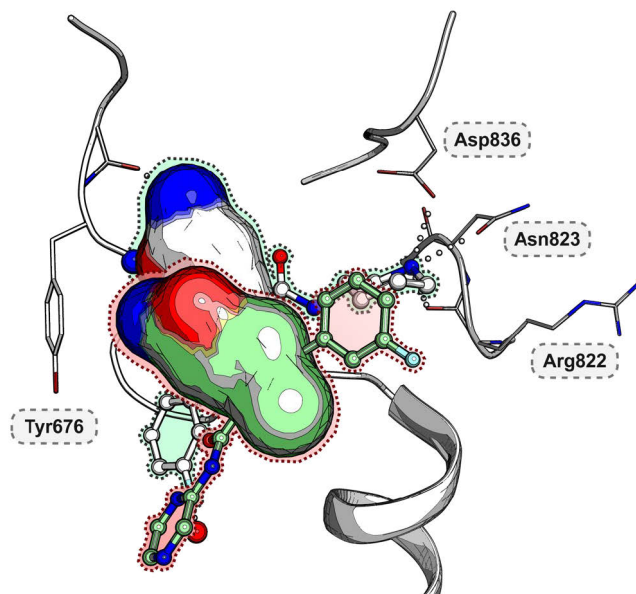


Abbildung 36 | Exemplarische *Docking*-Pose für das Pyrazin-Derivat 15ka. Die Überlagerung zeigte deutlich die Unterschiede des vorausgesagten Bindemodus für das Pyrazin-Derivat **15ka** (hellgrün) im Vergleich zum (*S*)-**15aa** (weiß) auf. Aufgrund der Planarität des eingeführten heteroaromatischen Ringsystems, kann dieses nicht mehr in der Ribosetasche binden und begünstigt somit eine horizontal gespiegelte Orientierung des Liganden.

Die aus den Überlegungen hervorgegangenen Derivate **15ja**, **15ka** und **15la** zeigten jedoch alleamt keine Aktivität auf der PDGFR α -D842V-Mutation. Weiterhin konnten auch nur wenige *Docking*-Posen mit teils drastisch unterschiedlichen Bindungsmodi (siehe Abbildung 36) für diese Art von Verbindungen generiert werden. Es wurde daher angenommen, dass es aufgrund der deutlich ausgeprägteren Planarität dieser Ringsysteme und der damit verbundenen Verringerung der Freiheitsgrade beispielsweise zu sterischen Abstoßungen mit den Aminosäuren der glycinreichen Schleife kommen könnte, wodurch die Einnahme des bisher beobachteten Bindungsmodus entweder deutlich erschwert oder gar unmöglich ist.

3.2.6 Struktur-PK-Eigenschaften: Verbesserung der peroralen Bioverfügbarkeit durch Einführung von Fluor

Die detaillierte Analyse der Struktur-Aktivitätsbeziehungen eröffnete die Möglichkeit, bedeutende Erkenntnisse und damit Designprinzipien für die Generierung potenter und selektiver Inhibitoren für die PDGFR α -D842V-Mutation abzuleiten und somit einen wesentlichen Beitrag zum Repositionierungsvorhaben beizutragen. Im nächsten Schritt sollten deshalb auch tiefergehende Struktur-PK-Beziehungen erschlossen werden, um einen Eindruck vom Sicherheitsprofil des NDIs ((*S*)-**15aa**) zu erlangen.

Aus diesem Grund wurde zusammen mit dem in Dortmund ansässigen LEAD DISCOVERY CENTER durch Frau Dr. MIA-LISA ZISCHINSKY und Frau Dr. ANKE UNGER eine *in vitro*-PK-Profilierung von NDI ((*S*)-**15aa**) durchgeführt. Diese offenbarte, dass die Verbindung mit einer kinetischen Löslichkeit von 414 μM überdurchschnittlich gute Löslichkeitseigenschaften aufwies. Auch die intrinsische Clearance lag mit einem Cl_{int} von 0.9 $\mu\text{L mg min}^{-1}$ in einem optimalen Bereich für eine mögliche perorale Applikation. Die Ergebnisse des artifiziellen PAMPA-Permeabilitätsassays suggerierten jedoch suboptimale Transporteigenschaften und eine schlechte Membrangängigkeit unter physiologischen Bedingungen (vgl. Abbildung 38).

Da eine nachgeschaltete PK-Profilierung des bis zu diesem Zeitpunkt vielversprechendsten Inhibitors (*S*)-**15aq** vergleichbare ADME-Eigenschaften manifestierte und sich dieser strukturell lediglich durch die Substitution der 3-Fluorbenzol-Gruppe vom herkömmlichen (*S*)-**15aa** unterschied, wurden die defizitären Transporteigenschaften auf die Anwesenheit der Piperidin-Gruppe zurückgeführt.

Erschwerenderweise legten die zuvor gewonnenen Erkenntnisse der SAR (siehe Abschnitt 3.2.5.5) die zentrale Bedeutung dieses Strukturmotivs für die Gesamtaffinität der Verbindung gegenüber den Onkogenen c-KIT und PDGFR α offen und verdeutlichten damit eindeutig die Tatsache, dass ein Austausch oder eine Abwandlung der chemischen Natur des heterozyklischen Systems keine valide Option darstellten. Als Konsequenz dieses Umstands, wurde die Überlegung angestellt durch die Integration eines modulierenden Substituenten im Ringsystem die stereoelektronischen Eigenschaften des Stickstoffatoms abzuändern und somit den Parameter der Basizität zu steuern.

Für die Realisierung dieses Vorhabens bot sich die Installation eines elektronenziehenden Substituenten in Nachbarschaft zum Stickstoffatom des Piperidins an. Dieser könnte über eine σ -Transmissionskaskade (Kombination aus hyperkonjugativen *gauche* und anomeren Effekt) die überschüssige Elektronendichte im Heteroatom effektiv verringern und somit die Basizität herabsetzen (siehe Abbildung 38).

Einflussfaktoren für die Stärke dieses Effekts wären unter anderem der Abstand des zur Hyperkonjugation-befähigten Substituenten zum entsprechenden Heteroatom (Basizität nimmt ab in Abhängigkeit vom Abstand: $\alpha > \beta > \gamma$), die Art des Substituenten (z.B. Basizität ist geringer für: $F > CF_3 \gg CH_3$), die topologische Lage des Substituenten (z.B. Basizität ist geringer für: axial > äquatorial) und die Anzahl der entsprechenden Substituenten (Basizität ist geringer für $F_2 > F$).^{229, 237-239}

Basierend auf diesem Gedankengang wurde in einer kleinen Molekülserie die beiden fluorierten Derivate (3*S*,5*S*)-**15ma** und (*S*)-**15na** synthetisiert um somit ein möglichst breit gefächertes Spektrum an p*K*_S-modifizierten Aminen zu erhalten. In Anlehnung an die Untersuchungen von MELNYKOV *et al.*²⁴⁰ aus dem Jahr 2023 wurde diesbezüglich angenommen, dass das Piperidin-Stickstoffatom des NDIs mit einem antizipierten p*K*_S-Wert von 11 als vergleichsweise stark basisch klassifiziert werden könnte und das Protolysegleichgewicht somit vorrangig auf der Seite der geladenen Spezies verschoben ist.

Durch die Einführung eines Fluoratoms, wie im Falle von (3*S*,5*S*)-**15ma**, sollte der p*K*_S-Wert der Piperidin-Gruppe um ca. 2.4 reduziert werden, was zu einem insgesamt leicht basischen Derivat (p*K*_S ~ 8.6) führen sollte. In diesem Fall müsste unter physiologischen Bedingungen zwar immer noch von der vorherrschenden Präsenz einer geladenen Ammoniumspezies ausgegangen werden, jedoch sollte zu einem größeren Anteil auch die neutrale Aminform in Lösung vorliegen. Bei einer zweifachen β-Fluorierung wäre aufgrund des noch stärker forcierten hyperkonjugativen Effekts zu erwarten, dass das ursprünglich basisch-agierende Piperidin leicht saure Eigenschaften (p*K*_S ~ 6.8) aufweist. Im Falle der Verbindung (*S*)-**15na** sollte daher das Protolysegleichgewicht voraussichtlich auf Seite der neutralen Aminspezies liegen.

Da neben den angestrebten veränderten physikochemischen Eigenschaften auch das Potenz- und Selektivitätsprofil der entsprechenden Verbindungen in Betracht gezogen werden sollte, wurde in einem ersten Schritt zunächst eine biochemische und zelluläre Evaluation der erhaltenen Verbindungen durchgeführt. Dies offenbarte, dass das monofluorierte Derivat (3*S*,5*S*)-**15ma** mit einem GR₅₀-Wert von 5 nM zwar eine vergleichbare Potenz im Vergleich zum herkömmlichen NDI aufwies, jedoch um den Faktor 3 stärker die Kontrollzelllinie GIST48B inhibierte (vgl. Abbildung 28 und Tabelle 15). Die Einführung eines zweiten Fluor-Substituenten führte im zellulären Kontext indes zu einer Verringerung der Potenz um das 122-fache bei einem nahezu gleichbleibend schlechten Targetspezifitätsquotienten von 12.

Darüber hinaus zeigten *Docking*-Experimente, dass bereits die Einführung eines Fluorsubstituenten zu einer leichten Störung der Ringgeometrie führen könnte (vgl. Abbildung 37a).

Während dieser Nachteil im Falle einer Monosubstitution durch die Platzierung eines Fluoratoms in Richtung der glycinreichen Schleife weitestgehend abgefedert werden könnte, würde die Integration eines weiteren Fluoratoms zu einer starken sterischen Repulsion führen (siehe Abbildung 37b). Ein Ligand dieser Konstitution könnte daher nur unter starker Verzerrung der Ringgeometrie (Umpositionierung des Stickstoffatoms notwendig) oder aber unter Konformationsänderung der glycinreichen Schleife binden und erklärt daher den starken Potenzverlust der Verbindung (*S*)-**15na**.

Ferner ließ sich auf Grundlage dieser Beobachtung vermuten, dass die Platzierung einer hydrophoben Gruppe in räumlicher Nähe zu den stark konservierten Aminosäuren der glycinreichen Schleife kein einzigartiges Interaktionsmuster innerhalb von Kinasen abbildet und daher nur bedingt dazu geeignet ist, Selektivität zu vermitteln (vgl. Abbildung 37b).

Neben der biochemischen und zellulären Charakterisierung wurden beide Verbindungen schließlich auch einer *in vitro*-PK-Profilierung unterzogen. Diese legte eine Verringerung der mikrosomalen *Clearance*-Werte um den Faktor 21 für das difluorierte Derivat (*S*)-**15na** bzw. um den Faktor 9 für die monofluorierte Verbindung (3*S*,5*S*)-**15ma** offen (vgl. Abbildung 38).

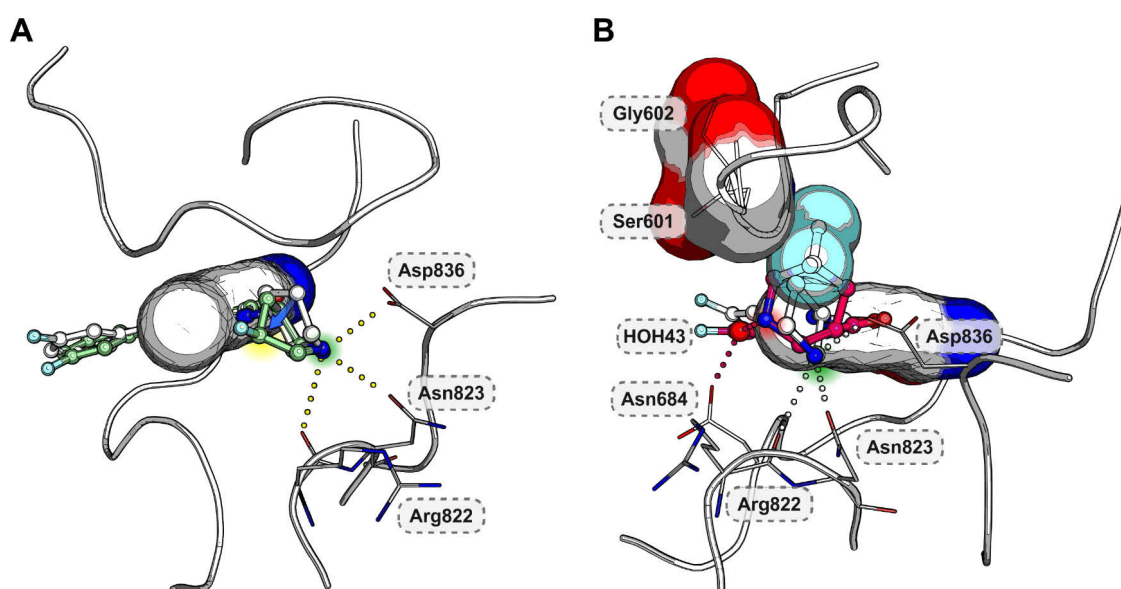


Abbildung 37 | Übersicht zu den strukturbioologischen Erklärungsmodellen bei Integration von p*K*_s-modulierenden Fluorgruppen im Piperidin-Ring. (A) Überlagerung der *Docking*-Pose des mono-Fluorpiperidins (3*S*,5*S*)-**15ma** (hellgrün) mit der Kristallpose von (*S*)-**15aa** (weiß). Der Vergleich offenbart, dass aufgrund der Anwesenheit eines Fluorsubstituenten die Ringgeometrie des Piperidins gestört wird. Diese konformelle Änderung muss eintreten, da der Fluorsubstituent ansonsten mit der glycinreichen Schleife sterisch kollidieren würde. (B) Überlagerung der *Docking*-Pose des Difluorpiperidins (*S*)-**15na** (magenta) mit der Kristallpose von (*S*)-**15aa** (weiß). Da sich die beiden Fluorgruppen des Piperidin-Rings nur in einer ungünstigen Position unterhalb der glycinreichen Schleife anordnen können, führt diese Situation zu einer erheblichen Störung der Ringgeometrie. Als Konsequenz dieser Umorientierung bindet das Stickstoffatom des Piperidins in einer anderen Region der Ribosetasche und kann somit nur noch ein Wasserstoffbrückennetzwerk mit HOH43 und Asn684 ausbilden.

Da die Werte dieser Verbindungen mit $18.9 \mu\text{L mg min}^{-1}$ bzw. $8.4 \mu\text{L mg min}^{-1}$ dennoch in einem optimalen Bereich für perorale Verbindungen lagen, wurden die Hintergründe für diesen Trendverlauf nicht weiter untersucht. Erfreulicherweise konnten für beide Derivate auch deutlich verbesserte Transporteigenschaften festgestellt werden, die durch den Anstieg des ursprünglichen Efflux-Wertes von 7.3% für das herkömmliche NDI ((*S*)-**15aa**) auf 22.6 % für (*S*)-**15na** und 24.1% für (*3*S*,5*S**)-**15ma** angezeigt wurden.

Die Durchführung eines hERG-Polarisationsassays offenbarte zudem, dass die Modulation des pK_s -Wertes nicht nur eine Veränderung der ADME-Parameter bewirkte, sondern auch das Sicherheitsprofil der NDI-Derivate verbesserte. Für die Referenzverbindung (*S*)-**15aa** wurde dabei eine moderate hERG-Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von $26 \mu\text{M}$ nachgewiesen, während für das monofluorierte NDI (*3*S*,5*S**)-**15ma** eine 1.5-fache Verringerung dieses Wertes indiziert werden konnte. Das difluorierte Derivat (*S*)-**15na** wies demgegenüber keinerlei Affinität für den Kanal auf.

Erstaunlicherweise zeigte das bis zu diesem Zeitpunkt vielversprechendste NDI-Analogon (*S*)-**15aq** auch ohne pK_s -modulierende Gruppen am Piperidin-Ring eine deutlich geringere Tendenz zur Inhibition des hERG-Kanals. Diese Ergebnisse motivierten dazu, in einem letzten Schritt durch einen Hybridisierungsansatz die vorteilhaften PK-Eigenschaften des monofluorierten NDI-Derivats (*3*S*,5*S**)-**15ma** mit den vorteilhaften Potenz- und Selektivitätseigenschaften der Verbindung (*S*)-**15aq** zu kombinieren. Die Synthese von (*3*S*,5*S**)-**15mq** resultierte schließlich in einem Inhibitor, der mit einem GR_{50} -Wert von 12 nM zwar leichte Einbußen bezüglich der Affinität für die PDGFR α -D842V-Mutation zu verzeichnen hatte, hinsichtlich seines Targetspezifitätsquotienten von 87 jedoch durchaus attraktive Selektivitätseigenschaften aufwies (vgl. Abbildung 38 und Tabelle 15).

Auch in Bezug auf die entsprechenden PK-Eigenschaften von (*3*S*,5*S**)-**15mq** konnte festgestellt werden, dass in murinem Plasma vollständige Stabilität bei einem gleichzeitig moderaten PAMPA-Efflux von 9.4% gewährleistet war. Zuzüglich zu diesen vorteilhaften ADME-Parametern erwies sich die Verbindung auch mit einem IC_{50} -Wert von $45 \mu\text{M}$ als tendenziell inaktiv auf dem hERG-Kanal. An dieser Stelle sei jedoch darauf hingewiesen, dass der durchgeführte Polarisationsassay lediglich als prädiaktiv zu verstehen ist. Um eine Hemmung des hERG-Kanals gänzlich ausschließen zu können, wäre es empfehlenswert, in zukünftigen Studien auch eine Vermessung mittels *Patch-Clamp*-Technik durchzuführen.

In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse lässt sich zusammenfassend feststellen, dass durch die Auswahl geeigneter Strukturelemente neben den beiden Parametern Aktivität und Selektivität auch die PK-Eigenschaften maßgeblich beeinflusst werden können.

Die Trendverläufe konnten diesbezüglich durch strukturbiologische Modellierungsansätze rational erklärt werden, sodass in zukünftigen Studien Parameter in kürzester Zeit zielgerichtet und kosteneffizient moduliert werden können und somit der Prozess der Wirkstoffentwicklung erheblich beschleunigt wird.

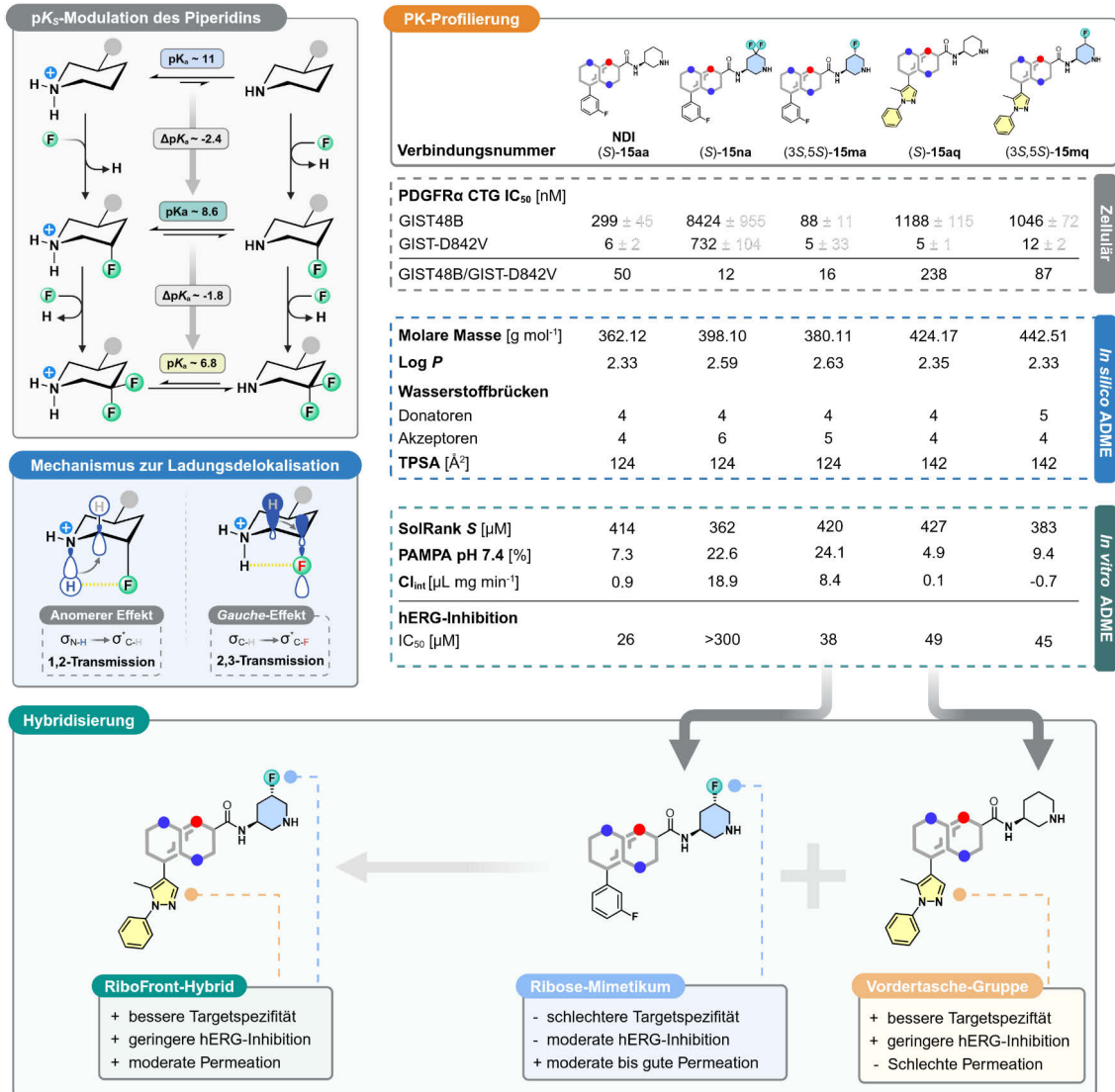


Abbildung 38 | Überblick zu den erschlossenen Struktur-PK-Beziehungen von (S)-15aa und den vier ausgewählten Derivaten (S)-15na, (3S,5S)-15ma, (S)-15aq und (3S,5S)-15mq. Durch die Anwendung des Konzeptes der pK_s-Modulation, welches durch hyperkonjugative Delokalisationseffekte eine Herabsetzung des pK_s-Werts für das Stickstoffatom des Piperidin-Rings bewirkt, konnten auch die entsprechenden PK-Parameter (Permeabilität und hERG-Inhibition) effektiv moduliert werden. Diese Erkenntnisse ebneten den Weg zur Durchführung eines Hybridisierungsansatzes aus dem schließlich der RiboFront-Hybrid (3S,5S)-15mq mit hoher Potenz und deutlich verbesserten PK-Eigenschaften im Vergleich zum ursprünglichen NDI ((S)-15aa) hervorging.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Der flächendeckende Einzug effizienzsteigernder Automatisierungstechnologien im Bereich der wirkstoffentwickelnden Pharmaindustrie seit Mitte der 1980er Jahre erwies sich paradoxerweise als nur bedingt effizienzsteigernd. Auch heutzutage bleibt die Entwicklung neuer Medikamente aufwändig, langwierig und teuer und unterliegt damit maßgeblich der Eroom'schen Gesetzmäßigkeit.

Angesichts der fortwährenden Identifizierung neuer pathologischer Erkrankungen sowie des beträchtlichen Potenzials für globale Gesundheitsnotstände, wie beispielsweise dem Auftreten von Pandemien oder der stetigen Verbreitung multiresistenter Keime in Pflege- und Krankeneinrichtungen, ist die Entwicklung neuer innovativer Ansätze für eine schnelle Wirkstoffentwicklung unabdingbar.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit zwei unterschiedliche Projekte bearbeitet, die wesentliche Strategien für eine Beschleunigung des konventionellen Wirkstoffentwicklungsprozesses bereithalten und somit Grundlagen bieten, das Eroom-Gesetz zu durchbrechen. Beide Projekte bieten zudem auch nach Abschluss dieser Doktorarbeit noch ausreichend Potential für weiterführende Studien und könnten daher auch für zukünftige industrielle Applikationen von gesteigertem Interesse sein.

4.1 Analysen zur Eignung und Implementierung moderner Synthesetechniken im Kontext des Aufbaus sp^3 -reicher Fragmentbibliotheken

Der Einzug moderner Synthesetechniken in die Medizinalchemie findet nur sehr träge und ineffizient statt. Publikations- und Konkurrenzdruck sowie mangelnde Ausstattung für die automatisierte Durchführung verschiedener Parametervariationen führen häufig zu der Bereitstellung einer undurchsichtigen Informationslage bezüglich des möglichen Substratspektrums, der Toleranz verschiedener funktioneller Gruppen und möglicherweise auftretende Problematiken. Für den Aufbau von Substanzbibliotheken stellt sich dieser Umstand als eine suboptimale Ausgangslage dar, da auf diese Weise neuer chemischer Raum nur ineffizient abgedeckt wird.

Im Rahmen des ersten Projektes dieser Arbeit wurde daher der Aufbau einer sp^3 -reichen Fragmentbibliothek angestrebt, die durch Einbindung moderner Synthesemethoden diesem Negativtrend begegnen sollte. Im Zentrum der Konzeptionierung eines solchen modularen *Workflows* stand der Aufbau der Substanzsammlung nach einem iterativen Prinzip, sodass schrittweise durch die Implementierung verschiedenster Synthesetechniken der chemische Raum sukzessive erweitert werden konnte.

Im Gegensatz zu konventionellen Ansätzen des Bibliotheksdesigns ermöglichte der FRAGTORY-Ansatz durch eine rekursive Pharmakophor-Analyse die Identifizierung von Lücken im chemischen und bioaktiven Raum und leitete basierend darauf eine Auswahl an potentiellen Synthesekandidaten ab.

Hinsichtlich dieser Verfahrensweise stand im Hauptfokus der experimentellen Arbeit die virtuelle Durchführung zweier in der Medizinalchemie unterrepräsentierter Reaktionen sowie die nachfolgende Etablierung der entsprechenden Synthesetechniken im Labor. In einem ersten Schritt wurde daher der Versuch unternommen, eine literaturbeschriebene Eintopfreaktion zur Darstellung von 2-(Hydroxymethyl)morpholin in diesen Prozess einzugliedern. Diese molekulare Klasse offenbarte aufgrund einer Vielzahl unterschiedlichster Faktoren ein ideales Wunschprofil und bot aufgrund der Möglichkeit der Semi-Automatisierung des Reaktionsprotokolls optimale Voraussetzungen für die Integration im Zuge eines geplanten Aufbaus einer Fragmentbibliothek.

Während die Einbindung der entsprechenden Transformationsvorschrift und die anschließende Generierung virtueller Produkte weitestgehend problemlos verlief, manifestierten sich im Verlauf der Synthese der sechs nominierten Synthesekandidaten **3a-e** etwaige Limitationen hinsichtlich des Substratumfanges und der Toleranz gegenüber Variationen bestimmter Reaktionsparameter. Dabei konnten lediglich vier der sechs Fragmente erfolgreich über die etablierte Reaktionssequenz dargestellt werden. In Einklang mit den literaturbeschriebenen mechanistischen Ausführungen und den beobachteten Limitationen im Labor konnten schließlich empirische Reaktivitätsregeln aufgestellt werden, die den tatsächlich zugänglichen chemischen Raum begrenzten und damit die Qualität der Voraussage attraktiver Synthesekandidaten erheblich steigerte.

Basierend auf diesen Ergebnissen, erschien es insbesondere hinsichtlich des Bestrebens, maximale Effizienz beim Aufbau der Fragment-Bibliothek zu gewährleisten, als wünschenswert, den tatsächlich zugänglichen chemischen Raum verschiedener Reaktionen bereits im Vorfeld abschätzen zu können. Somit wurde in einem Folgeschritt die Etablierung eines Reaktionstypus beabsichtigt, für den bereits historisch etablierte Vorhersagemodelle durch umfangreiche Grundlagenforschung entwickelt worden waren. Mit der oxa-DIELS-ALDER-Reaktion fand sich eine Synthesetechnik, die aufgrund ihrer Klassifizierung als perizyklische Reaktion diesbezüglich idealtypische Eigenschaften aufwies. Ferner suggerierte die von BURLAND *et al.* beschriebene Vorgehensweise eine optimale Grundlage für eine parallelisierte Durchführung dieser Reaktion.²³⁰

Im Rahmen der experimentellen Etablierung gelang jedoch zunächst ausschließlich die erfolgreiche Synthese des Pyranons (\pm)-**11a**, welches aus der Reaktion des elektronenreichen DANISHEFSKY-Diens und dem schwach-aktivierten elektronenarmen Hetero-Dienophil 3-Brombenzaldehyd hervorging. Unter den gleichen Bedingungen scheiterte die Darstellung der Produkte (\pm)-**11b** und (\pm)-**13** aufgrund konkurrierender Polymerisationsreaktionen. Diese konnten erst durch die Variation des Lewis-Säure-Katalysators unterdrückt und somit die gewünschte Produktbildung ermöglicht werden.

Auf Basis dieser Ergebnisse erfolgte die Konzeptionierung eines theoretischen Reaktivitätsmodell auf Grundlage der Molekülorbitaltheorie, welches Vorhersagen zu kompatiblen Kombinationen entsprechender Reaktionspartner in Abhängigkeit der Stärke der eingesetzten Lewis-Säure ermöglichte. Dieses Modell diente gleichzeitig auch als Grundlage für die zielgerichtete Durchführung der *in-silico*-oxa-DIELS-ALDER-Reaktion bei der nachfolgenden Implementierung in den FRAGTORY-Workflow. Dazu wurden die Diene und Dienophile entsprechend ihrer elektronischen Eigenschaften in Unterbibliotheken einsortiert und diese entsprechend den aufgestellten Reaktivitätsregeln über eine SMIRKS-Vorschrift zur Reaktion gebracht. Die erhaltenen Produktbibliotheken konnte so abschließend in den bestehenden FRAGTORY-Workflow integriert werden, um beispielsweise bestehende Lücken im chemischen Raum durch die Nominierung synthetisch zugänglicher oxa-DIELS-ALDER-Produkte zu schließen.

In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Implementierung des gesamten FRAGTORY-*Workflows* zu einer deutlichen Kostenminimierung in Bezug auf die Konstruktion chemisch diverser Substanzbibliotheken beitragen kann. Dies ist auf den Umstand zurückzuführen, dass der chemische Raum aufgrund der rekursiven Pharmakophoranalyse durch ein Minimum an Bibliotheksvertretern maximal divers abgedeckt werden kann. Die Modularität der einzelnen Bestandteile des *Workflows* ermöglicht eine einfache Anpassung an komplexe industrielle Bedürfnisse und Applikationen und gewährleistet jederzeit eine Erweiterung auch zu späteren Zeitpunkten. Insbesondere die Einbindung diversitätsorientierter Synthesesequenzen könnte sich diesbezüglich großem Interesse darstellen, da sich auf diese Weise gezielt biodiverse Substanzvertreter im Vorfeld nominieren lassen könnten. Die gebündelte Synthese unattraktiver Vertreter mit ähnlichen pharmakophoren Eigenschaften würde somit wegfallen, was zu deutlichen Zeit- und Kosteneinsparungen führen würde.

Im Rahmen von Vorversuchen konnte eine erste Prototypenversion eines solchen Workflows konzipiert werden. Wenngleich sich dieser Ansatz bereits als vielversprechend darstellte, konnte er aus Zeitgründen nicht weiterverfolgt werden. Dennoch zeigt dieser Umstand auf, dass die Umsetzung eines solchen Vorhabens prinzipiell möglich ist.

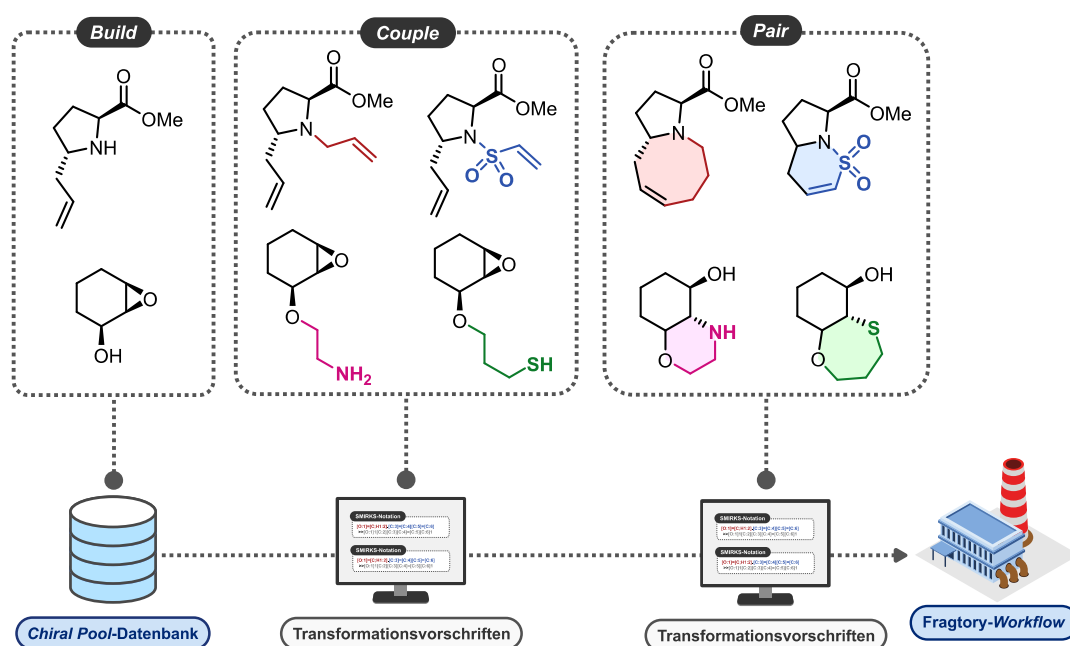


Abbildung 39 | Übersicht zum schematischen Aufbau eines Workflows zur Integration einer diversitätsorientierten Synthesestrategie in den FRAGTORY-Workflow. Ausgehend von einer *Chiral Pool*-Datenbank kann in einem mehrstufigen Verfahren die *Build-Couple-Pair*-Strategie nachempfunden werden. Dafür müssen jeweils eine Reihe unterschiedlicher Transformationsvorschriften definiert und parallel ausgeführt werden. Nach Konkatenation der erhaltenen Produkte kann der nächste Schritt erfolgen.

Angesichts dieses offengelegten beträchtlichen Potentials stellt der *FRAGTORY-Workflow* ein wichtiges Instrument bereit, um die Eroom'sche Gesetzmäßigkeit zu durchbrechen und die Effizienz bei Wirkstoffentwicklungsvorhaben zu steigern.

4.2 Identifizierung und Modifizierung eines neuen Chemotyps zur Behandlung resistenzerworbener GIST

Die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung von resistenzerworbenen GIST stellt aufgrund der Inhomogenität der Patientenschaft sowie den vergleichsweise geringen Fallzahlen ein hohes Risiko für industriell-geführte Wirkstoffentwicklungskampagnen dar. Die konventionellen Verfahren der vorwärtsgerichteten Pharmakologie sind dabei gleichermaßen für große Pharmaunternehmen wie auch akademische Forschungsgruppen aufgrund der benötigten Infrastruktur, der hohen Kosten bei der Durchführung von HTS sowie der anschließenden langwierigen Optimierungsarbeit identifizierter Treffermoleküle hinsichtlich der nicht-anschätzbaren Wahrscheinlichkeit für ein Scheitern in klinischen Phasen als unattraktiv einzuschätzen.

Bezüglich dieses Notstands konnte im Rahmen des zweiten Projektes dieser Arbeit erfolgreich eine Entwicklungsstrategie erarbeitet werden, die im Sinne einer "*from-bed-to-bench*"-Philosophie in Zusammenarbeit mit dem WTZ in Essen und dem COMAS in Dortmund die strukturbasierte Weiterentwicklung eines niedermolekularen phänotypischen HTS-Treffermoleküls in einen hochpotenten Repositionierungskandidaten innerhalb weniger Monate ermöglichte.

Dabei wurde der *Screening*-Prozess unter Verwendung neuer isogener Zelllinienmodelle durchgeführt, die über Jahre hinweg aus einem Patientenpool am WTZ gewonnen und durch den Einsatz der Genschere CRISPR/Cas9 konstruiert worden waren. Als Grundlage für den durchgeführten *Counter Screen* fungierte zudem die c-KIT-negative Zelllinie GIST48B, welche zusätzlich auch als Toxizitätskontrolle Verwendung fand.

In der nachgeschalteten *Hit*-Landschaftsanalyse wurden schließlich eine Reihe potenter Treffermoleküle identifiziert, unter denen das NDI ((*S*)-**15aa**) als besonders vielversprechender Optimierungskandidat hervortrat. Die Sonderstellung dieses Moleküls gründete sich dabei auf dem Vorhandensein bereits durchgeführter Testungen im Rahmen einer gescheiterten klinischen Phase I sowie auf den vorteilhaften molekularen und physikochemischen Eigenschaften und die Verfügbarkeit einer Kristallstruktur des Liganden in der PDGFR α -T674I-Mutante bereits zu Beginn des Projekts. Diese Eigenschaften in Summe klassifizierten NDI zu einem idealen Werkzeug-Molekül für eine strukturbasierte *Drug Repurposing*-Strategie.

Zu diesem Zwecke erfolgte die Synthese einer 36 NDI-Analoga umfassenden Substanzbibliothek, deren biochemische und zelluläre Charakterisierung letztlich klar verständliche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen offenlegte. Die strukturbioologischen Ursachen für die jeweilig beobachtbaren Trendverläufe konnten dabei stets durch *Docking*-Experimente, eine topologische Sequenzüberlagerung und Kristallstrukturanalysen aufgeklärt werden.

Als repräsentative Erklärungsbeispiele sind in diesem Kontext, die beobachtbare Selektivitätssteigerung durch Einführung eines hydrophoben Elements in *ortho*-Position des Benzolrings sowie die Verbesserung der Affinitäts- und Targetspezifitätseigenschaften im Falle der Installation einer Morpholin-Gruppe in *meta*- und *para*-Position des Benzolrings zu nennen (siehe Abschnitt 3.2.5.2). Letzterer Trend ließ sich auf die Wasserstoffbrücken-Interaktion mit der Aminosäure Asn684 in der α D-Helix zurückführen, da einige vorausgesagte *Off-Targets* an dieser Stelle entweder kleinere, polare Aminosäuren, wie Serin oder Threonin bzw. größere polare Aminosäuren wie Tyrosin tragen und somit vermindertes Wechselwirkungspotential bereitstellen.

Zudem erwies sich die zielgenaue Platzierung eines basischen Zentrums inmitten der Ribose-Tasche zwischen den Aminosäuren Arg822, Asn823 und Asp836 als zentraler Faktor für die Aufrechterhaltung der inhibitorischen Potenz des NDIs (siehe Abschnitt 3.2.5.5 und 3.2.5.7).

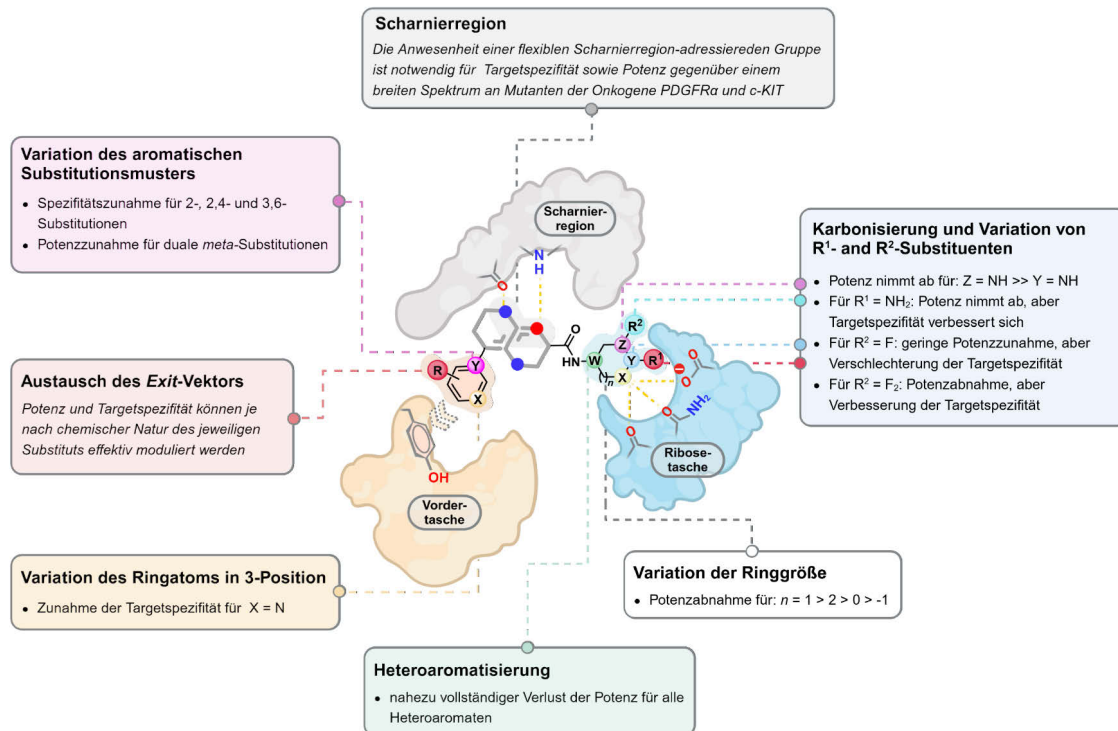


Abbildung 40 | Zusammenfassender Überblick zu den Kernaussagen den Struktur-Aktivitäts- und Struktur-Selektivitätsbeziehungen. Während der Austausch der Scharnierregion-adressierenden Gruppe zum Zwecke des Erhalts der Potenz nicht sinnvoll ist (Typ I-Inhibitor), kann durch die Variation der anderen beiden Funktionalisierungsseiten die beiden Parameter Potenz und Targetspezifität effektiv moduliert werden.

Rückführbar war dies auf die Rolle des Piperidin-Rings als Ribose- und Phosphatmimetikum. Diesbezüglich konnte auch die Notwendigkeit der Präsenz eines sechsgliedrigen stickstoffhaltigen Heterozyklus an dieser Position offengelegt werden, da mit Ausnahme eines Azepan-Derivats (*S*)-15ea, alle vergleichbaren anderen Ringsysteme erhebliche Einbußen hinsichtlich ihres Potenzprofils zeigten.

Darüber hinaus zeigte sich, dass die Konformation des heterozyklischen Ringsystems empfindlich auf die Einführung kleinerer Modifikationen reagierte. *Docking*-Experimente hoben diesbezüglich die Auswirkungen von Fluorsubstituenten auf die Ringgeometrie hervor, wobei der Einbau eines einzelnen β -Fluorsubstituenten bereits zu leichten Verzerrungen und die Anwesenheit von zwei Substituenten zu erheblichen konformationellen Umlagerungen und damit zu einem fast vollständigen Verlust der Potenz führte. In diesem Kontext konnte auch gezeigt werden, dass die Adressierung von Aminosäuren der glycinreichen Schleife aufgrund des hochkonservierten Charakters dieser Region zu einer Verringerung der Targetspezifität führte.

Im Hinblick auf die am LDC durchgeführte pharmakokinetische Profilierung des NDIs stellten sich die defizitären Transporteigenschaften zunächst als optimierungsbedürftig heraus.

Da die Annahme bestand, dass sich dieser Umstand auf die Ionisierbarkeit des Piperidin-Stickstoffatoms zurückführen ließ, wurde durch die Einbringung von β -Fluorsubstituenten der pK_s -Werts des Heteroatoms moduliert. Das aus diesen Überlegungen hervorgegangene Derivat $(3S,5S)$ -**15ma** überzeugte durch eine signifikante Verbesserung der Transporteigenschaften bei einer gleichzeitigen moderaten Verringerung der hERG-Inhibition.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden in einem finalen Hybridisierungsansatz schließlich die vorteilhaften PK-Eigenschaften von $(3S,5S)$ -**15ma** mit dem optimalen Selektivitätsprofil der Verbindung (S) -**15aq** kombiniert. Diese Strategie erbrachte den Inhibitor $(3S,5S)$ -**15mq**, der dem ursprünglichen Treffermolekül NDI ((S) -**15aa**) in Hinsicht auf PK-Eigenschaften in allen evaluierten Parametern überlegen war und zudem bessere Selektivitätseigenschaften bei leicht verminderter Potenz auf der PDGFR α -D842V-Mutation aufwies.

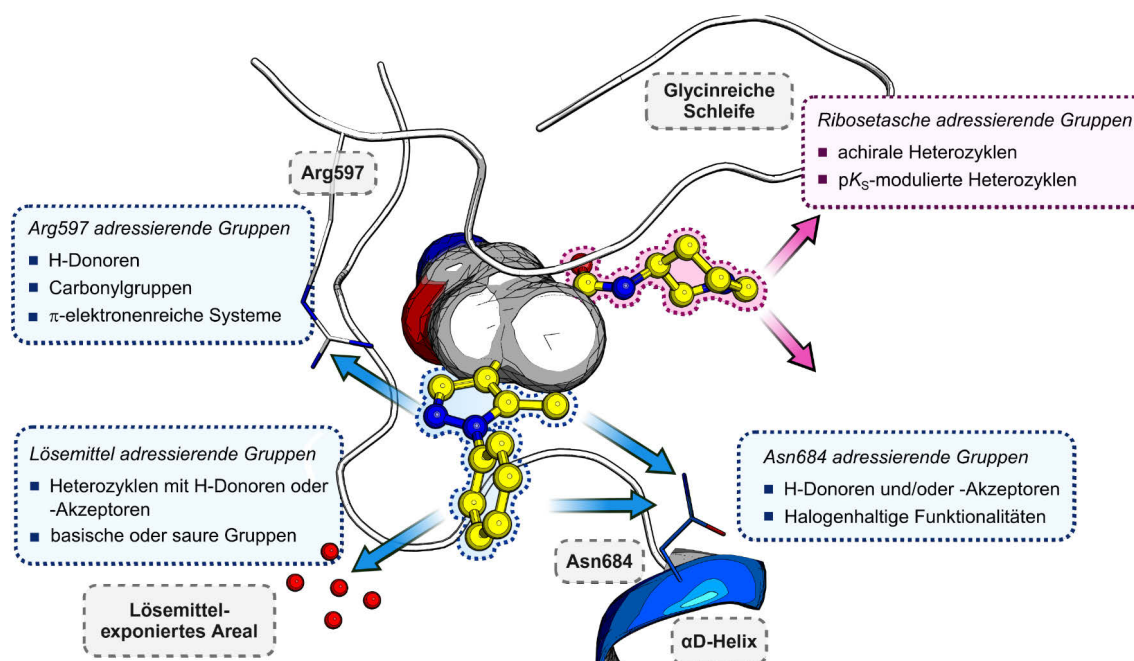


Abbildung 41 | Übersicht zu möglichen weiteren strukturellen Optimierungen der NDI-Derivate. Prinzipiell ließe sich der durch (S) -**15aq** erschlossene vektorielle Raum für weitere strukturelle Modifikationen nutzen. Dabei könnte durch Einbringung einer verschiedenen Strukturmotive beispielsweise eine Wechselwirkung mit der Aminosäure Arg597 (links oben) induziert werden. Ferner könnte auch durch gezielte Substitution einzelner Stellen Interaktionen mit Lösemittelmolekülen (links unten) oder der Aminosäure Asn684 (rechts unten) ermöglicht werden. Letztere könnten die Targetspezifität weiter erhöhen. Der Umpositionierung des Stickstoffatoms des Piperidin-Rings bietet die Möglichkeit die Gesamtbasizität der Verbindung zu verändern und somit auch die PK-Eigenschaften zu modulieren. Durch die Integration einer hochsymmetrischen Gruppe könnte das NDI ((S) -**15aa**) zudem in eine achirale Verbindung überführt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bilden in der Summe eine solide wissenschaftliche Grundlage für die Weiterentwicklung des bisherigen Spitzenreiter-Moleküls $(3S,5S)$ -**15mq** in einen klinischen Kandidaten. Bezug nehmend auf die durchgeführte Repositionsstrategie des NDIs ((S) -**15aa**) lässt sich dabei festhalten, dass in deutlich verkürzter Zeit eine hochpotente Verbindung mit attraktiven PK-Eigenschaften generiert werden konnte.

Für zukünftige Studien müssen noch tiefergehende Untersuchungen bezüglich des Selektivitätsprofils durchgeführt werden, beispielsweise in Form einer Kinom-Profilierung. Erfreulicherweise bietet diesbezüglich der Austausch der ursprünglichen 3-Fluorbenzol-Gruppe gegen die Pyrazol-Gruppe der Verbindung (*S*)-**15a_q** prinzipiell den Vorteil, durch weitere Funktionalisierungen dieses Ringssystems Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der α D-Helix zu forcieren. Auf diese Weise könnten sowohl Selektivitätseigenschaften, wie auch Potenz weiter gesteigert werden.

Auch zentrale PK-Parameter könnten durch die Optimierung der Ribose- und Phosphatmimetischen-Gruppe weiter moduliert und verbessert werden. Der bisher durchsuchte chemische Raum deckt beispielsweise azyklische Substituenten oder Ringsysteme mit Heteroatomen abgestufter Basizität nur bedingt ab. Computerchemische Verfahren wie ein Pharmakophor-Screening oder die Verwendung des *Inspirator*-Modus in dem Programm SEESAR könnten für diesen Zweck zielführend und unterstützend eingesetzt werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Computerchemische Verfahren

5.1.1 Workflow-Generierung

Der computergestützte Workflow zur FRAGTORY wurde mit Hilfe der quelloffenen Software KONSTANZ INFORMATION MINER (KNIME) in den Versionen 3.6.2 und 4.4.1 entwickelt.²⁴¹ Es wurden dabei die frei verfügbaren *Nodes* der KNIME AG (Zürich, Schweiz), die CHEMAXON/INFOCOM *Marvin Extensions Feature* (Infocom Corporation), die *RDKit Nodes Feature* (NOVARTIS INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH (NIBR), Basel), die *Erlwood KNIME Open Source Cheminformatics* (ERLWOOD), die *KNIME-CDK Nodes* (Universität Konstanz und EBI), die *INDIGO KNIME Integration* (EPAM SYSTEMS, Inc.) sowie die *VERNALIS KNIME Nodes* (VERNALIS RESEARCH LTD., Cambridge). Die quantitative Einschätzung der Wirkstoffaffinität (engl.: *quantitative estimate of drug-likeness*, QED)²⁴²⁻²⁴³, die 3D-Pharmakophor-Fingerprints (eigens für RDKit entwickelt)²⁴⁴ sowie die ELI LILLY MedChem-Filterregeln²⁴⁵ wurden als externe Skripte mittels der *External Tool (Labs) Node* in KNIME oder direkt in Python ausgeführt.

5.1.2 Ausschluss unerwünschter Reaktivitätseigenschaften innerhalb des FRAGTORY-Workflows

Für die Filterung unerwünschter Funktionalitätskonstellationen innerhalb der *Building Block*-Bibliotheken des FRAGTORY-Workflows wurden substrukturelle Muster über die Sprache SMARTS definiert. Die jeweiligen Ausdrücke wurden mit Hilfe des SMARTS.plus-Webservers der Universität Hamburg konzipiert und visualisiert.²⁴⁶ Unerwünschte, unvorteilhafte oder unmögliche chemische Transformationsszenarien konnten durch die Definition sogenannter *Reaction SMARTS* oder *SMIRKS* ausgeschlossen werden. Die Visualisierung dieser Ausdrücke konnte ebenfalls durch den SMARTS.plus-Webserver erfolgen.

5.1.3 Docking und Modellierung

Die Generierung relevanter *Docking*-Posen erfolgte über den Algorithmus FlexX, der in dem Programmpaket SEESAR (Version: 13.0.5, Midas) der Firma BIOSOLVEIT (Sankt Augustin, Deutschland) eingebettet ist.²⁴⁷ Die Bewertung der generierten Posen erfolgte nach einem Konsensusmodell, im Zuge dessen eine erste Einordnung relevanter Posen, basierend auf den vorhergesagten Affinitäten durch den in SEESAR integrierten HYDE-Algorithmus²⁴⁸, getroffen werden.

Die vielversprechendsten Posen wurden anschließend hinsichtlich ihrer Bindungsgeometrie, ihrer Populationsgröße, der Torsionswinkelqualität und ihrer Befähigung konstruktive Interaktionen mit dem jeweiligen *Target* ausüben zu können, analysiert und entsprechend daraus exemplarische Konformationen herausgesucht.

Für das *Docking* wurde im Vorfeld mit Hilfe des SWISS-MODEL-Webservers der Universität Basel ein Homologiemodell der PDGFR α -D842V-Mutation unter Verwendung eines *Target-Template Alignments* generiert.²⁴⁹⁻²⁵³ Als Templat diente dazu eine, in der Arbeitsgruppe RAUH durch Frau Dr. ALINA TEUBER gelöste, Kristallstruktur eines Protein-Ligand-Komplexes der PDGFR α -T674I Mutation mit dem NDI ((S)-**15aa**). In das generierte Modell wurde mit Hilfe eines topologischen Sequenzalignments über das Programm PYMOL (Version 2.6) der Firma SCHRÖDINGER (New York, USA)²⁵⁴ die kristallographisch-beobachtbare Referenzpose des Liganden eingeladen und der vorbereitete Protein-Ligand-Komplex anschließend als .pdb-Datei abgespeichert.

Die für das Docking verwendeten Liganden wurden in dem Programm CHEMDRAW (Version 21.0.0) der Firma REVVITY SIGNALS (Waltham, USA) zunächst gezeichnet und in einer gemeinsamen .sdf-Datei gespeichert. Unter Verwendung des Befehlszeilen-Programms UNICON (Version: 1.4.2) der Universität Hamburg konnten die dreidimensionalen Koordinaten für die einzelnen Liganden generiert und einer Energieminimierung unterzogen werden.²⁵⁵⁻²⁵⁷ Ferner wurden dabei lediglich das energetisch-günstigste Konformer und Tautomer generiert und als .mol2-Datei abgespeichert. Vor Verwendung in den Docking-Experimenten wurden die berechneten Protonierungszustände der generierten Liganden-Bibliothek noch einmal untersucht, ggfs. korrigiert und erneut energieminimiert.

Die Bindetaschendefinition erfolgte durch das Einladen der vorbereiteten Proteindatei in das Programmpaket SEESAR und die im Hintergrund durchgeführte automatische Bindetaschendetektion. Diese wurde ohne weitere Veränderungen für die nachfolgenden Docking-Experimente genutzt.

Anschließend konnte die Liganden-Bibliothek eingeladen werden und ein *Standard-Docking* unter Generierung von 50 Konformeren erfolgen.

5.1.4 Sequenzvergleich

Das Sequenzalignment der selektierten *Off-Targets* des NDIs ((S)-**15aa**) wurde mit dem CLUSTAL OMEGA-Webserver (EMBL-EBI) unter Verwendung der in der UNIPROT-Datenbank hinterlegten Sequenzen verschiedener Kinasen durchgeführt.²⁵⁸ Die verwendeten Identifizierungsnummern sowie die dazugehörigen Aminosäuresequenzen sind der Abbildung 47 zu entnehmen.

Für den Vergleich wurde sich lediglich auf den Bereich der automatisch-detektierten Binde-tasche der Kinase PDGFR α beschränkt. Diese umfasst die Aminosäuren 595-609, 623-627, 658-661 sowie 674-685 und 816-837.

5.1.5 Generierung eines Interaktionsmodells mit Hilfe von GEOMINE

Für die Vorhersage potentieller unerwünschter *Off-Targets* wurde das kostenlose webbasierte *Frontend* GEOMINE²⁵⁹ der Universität Hamburg verwendet. Basierend auf der Bindungsanalyse der beobachtbaren Kristallpose des NDIs im Komplex mit PDGFR α -T674I wurden zentrale pharmakophore Eigenschaften zunächst identifiziert und diese anschließend als Punktinterkati-onen mit Hilfe von GEOMINE nachgebaut. Die gesetzten Suchparameter, die Gewichtung dieser sowie Analyse der entsprechenden Treffermoleküle sind der Abbildung 29b zu entnehmen.

5.1.6 Erstellung von Abbildungen und Bezugsquellen der verwendeten Vektorgrafiken

Die Abbildungen in dieser Dissertation wurden unter Verwendung des *Open Source* Vektor-zeichenprogramms INKSCAPE (Version 1.3.2) und der Online-Plattform BIORENDER erstellt. Die verwendeten Vektorgrafiken stammen aus verschiedenen *Open-Source*-Datenbanken und wurden gemäß den jeweiligen Lizenzbedingungen verwendet. Die primären Quellen umfassen die OPEN CLIPART LIBRARY^f, WIKIMEDIA COMMONS^g und BIOICONS^h. Ferner wurden dabei die von dem DATABASE CENTER FOR LIFE SCIENCEⁱ, dem Unternehmen SERVIER^j zur Verfügung ge-stellten Vektorgrafiken verwendet und für illustrative Zwecke abgewandelt. Für die Erstellung von Abbildungen in BIORENDER wurden die integrierten Vorlagen und Symbole der Plattform verwendet, die für akademische Zwecke zur Verfügung stehen.

^f <https://openclipart.org/>

^g <https://commons.wikimedia.org/>

^h <https://bioicons.com/>

ⁱ <https://togotv.dbcls.jp/en/pics.html>

^j <https://smart.servier.com/>

5.2 Organische Synthese

5.2.1 Allgemeine Anmerkungen

Die verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden von den Anbietern BLDPHARM, COMBI BLOCKS INC, ABCR, ACTIVATE SCIENTIFIC, ALFA AESAR, SIGMA ALDRICH, APOLLO SCIENTIFIC, THERMO FISHER SCIENTIFIC und VWR INTERNATIONAL kommerziell erworben und, sofern nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung verwendet.

Trockenes Dichlormethan (anhyd. DCM), Methanol und Tetrahydrofuran (THF) wurden von ACROS ORGANICS bezogen. Wasser wurde mithilfe eines ELGA LABWATER PURELAB FLEX 2-Wasseraufbereitungssystems gereinigt.

Luft- und/oder feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden in zuvor ausgeheizten Glasapparaturen unter Inertgas, entweder in einer Argon- oder wahlweise Stickstoffatmosphäre, durchgeführt. Organische Lösungsmittel wurden dabei unter reduziertem Druck in einem BÜCHI-Rotationsverdampfer (Modell: ROTAVAPOR R-210 ADVANCED), angeschlossen an einer VACUUBRAND-Diaphragmavakuumpumpe (Modell: MZ 2C NT +2AK), und in einem temperaturgesteuerten Wasserbad bei einer Wassertemperatur von 45 °C, verdampft.

Wässrige Lösungen wurden hingegen durch eine Sublimationstrocknung mit der Gefriertrocknungsanlage APHA 2-4 DPLUS der Firma CHRIST über Nacht eingengt und das Lyophilisat anschließend für mehrere Stunden an einem Hochvakuum (VACUUBRAND Drehschieberpumpe RZ 6) feingetrocknet.

Mikrowellen-unterstützte Reaktionen wurden mit Hilfe eines MONOWAVE 300-Reaktors der Firma ANTON PAAR durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Reaktionsmischungen dabei mit einer Rührgeschwindigkeit von 600 rpm durchmischt und der Modus „*Heat as fast as possible*“, der die Leistung der Mikrowelle in Abhängigkeit von der eingestellten Reaktionstemperatur dynamisch adjustiert, ausgewählt. Als Reaktionsgefäße dienten die Standard-Reaktionsgefäße (G30 (30 mL) und G10 (10 mL)) aus Borsilikatglas der Firma ANTON PAAR

5.2.2 Allgemeine analytische Methoden

Der Fortschritt einer Reaktionen wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC), *Atmospheric Solids Analysis Probe*-Massenspektrometrie (ASAP-MS) und Ultra-Hochleistungs-Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (UHPLC-MS) überwacht. Die analytische DC wurde auf Merck 60 F254 aluminiumbeschichteten Kieselgelplatten durchgeführt und unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$ bzw. 366 nm) sowie durch Färbung mit Ninhydrin- oder Anisaldehydlösung visualisiert.

Für ASAP-MS-Messungen wurde eine 1:10-Verdünnung der Reaktionslösung in DCM hergestellt und unter Verwendung des ADVION EXPRESSION-L COMPACT Massenspektrometers (CMS) mit typischen und/oder niedrigen Fragmentierungseinstellungen massenspektrometrisch analysiert. Die Spektren wurden mit der ADVION DATA EXPRESS-Software (ADVION INC., Version 6.9.43.1) ausgewertet.

Die Reinigung aller Endverbindungen erfolgte stets bis zu einem Reinheitsgrad von $\geq 95\%$. Die Validierung erfolgte unter Verwendung eines AGILENT UHPLC-Systems (1260 INFINITY II-Serie) mit einer CC 125/4 NUCLEODUR C18 GRAVITY COLUMN (3 μm) von MACHEREY NAGEL, gekoppelt an einen THERMO SCIENTIFIC FINNIGAN LCQ ADVANTAGE MAXIONTRAP- und ESA Corona-Detektor mit UV-Detektion bei $\lambda = 210 \text{ nm}$. Die Spektren wurden mit der XCALIBUR-Software (THERMO FISHER, Version 2.2) ausgewertet. Die zur Reinheitsanalyse verwendeten Konditionen für die UHPLC sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 | Übersicht zu den Bedingungen für die Reinheitsanalyse mittels UHPLC. Die Beurteilung der Reinheit erfolgte per Quantifizierung des entsprechenden Produktpeaks im Verhältnis zu beobachtbaren Fremdverbindungen. Beschrieben sind die Bedingungen für die Standard UHPLC-Methode **UHPLC.A**.

Parameter	Wert
Eluent A	0.1% Trifluoressigsäure (TFA)/Wasser
Eluent B	0.1% Trifluoressigsäure (TFA)/CH ₃ CN
Säule	NUCLEODUR™ C18 GRAVITY, 3 μm , 125 x 4 mm analytische Säule (MACHEREY-NAGEL)
Elutionsbedingungen	Elution für 9.5 min bei Variation des Anteils des Eluenten B von 10% bis 100% bei einer Fließgeschwindigkeit von 1.0 mL/min.

Die Kernresonanzspektren (NMR) wurden entweder auf einem BRUKER AVANCE DRX AV400 (400 MHz und 101 MHz), AV 500 AVANCE HDX-III (500 MHz und 125 MHz), AV 500 AVANCE NEO (500 MHz und 125 MHz), AV 600 AVANCE HD-III (600 MHz und 151 MHz) oder AV 700 AVANCE HDX-III (700 MHz und 176 MHz) aufgezeichnet. Chemische Verschiebungen (δ) werden in *parts per million* (ppm) angegeben und auf das Lösemittelsignal DMSO-d₆ (2.50 ppm oder 39.52 ppm) oder CDCl₃ (7.26 ppm oder 77.00 ppm) bezogen. Die Spinmultiplizität der ¹H-NMR-Spektren wird auf etablierte Weise dargestellt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, m = Multipllett, dd = Dublett von Dubletten, dt = Dublett von Triplets..., br = breit, appt = apparentes Triplett, ... etc.). Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte unter Verwendung des ACD/NMR PROCESSOR (ACDLABS 12.0).

5.2.3 Allgemeine automatisierte säulenchromatographische Reinigungsverfahren

Die chromatographische Reinigung der Produkte erfolgte an einem automatisierten TELEDYNE ISCO COMBIFLASH® NEXTGEN 300+-System unter Verwendung verschiedener Trennsäulen und UV-Detektion ($\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 366 \text{ nm}$, $\lambda_3 = 200\text{-}400 \text{ nm}$). Zum Einsatz kamen dabei unterschiedliche Größen von FLASHPURE™ EXOFLEX™ Silica-Säulen (40 μm unregelmäßig, 60 Å Porengröße) (FPE) der Firma BÜCHI, FLASHPURE™ EXOFLEX™ C18-modifizierte Silica-Säulen (50 μm sphärisch, 100 Å Porengröße) (FPE-C18) der Firma BÜCHI sowie folgende Eluenten in HPLC-Reinheitsgrad: Petrolether 40-60 °C (PE), *n*-Pentan (*n*-Pen), Dichlormethan (DCM, CH_2Cl_2), Diethylether (Et_2O), Ethylacetat (EtOAc), Methanol (CH_3OH), Acetonitril (CH_3CN), Wasser (H_2O).

Bei sehr polaren und basischen Verbindungen wurden den Eluenten wahlweise 1% bis maximal 2% Triethylamin (TEA) oder Ammoniakwasser (NH_4OH) hinzugefügt. Im Falle einer Umkehrphasen-Chromatographie wurden den Eluenten CH_3CN und H_2O standardmäßig 0.1% Trifluoressigsäure (TFA) beigesetzt.

UV-inaktive Verbindungen wurden zudem über den angeschlossenen Verdampfungs-Lichtstreuungsdetektor (engl.: *evaporative light scattering detector*, ELSD) und dem Massenspektrometer PURION der Firma ADVION INTERCHIM SCIENTIFIC simultan und in Echtzeit detektiert.

Die Probenvorbereitung beinhaltete zunächst die Konzentration des aufzureinigenden Stoffgemischs unter verminderten Druck und eine anschließende Aufnahme in einer Minimalmenge Lösemittel. Anschließend wurde portionsweise so viel Silica zur Lösung hinzugefügt, bis sämtliche Flüssigkeit adsorbiert vorlag (ca. 20 Gew.%). Nach erneuter Verdampfung des entsprechenden Lösemittels wurde der Rückstand in Kartuschen gefüllt und anschließend eine der automatisierten Trennungsmethoden (AT) aus Tabelle 2 und Tabelle 3 durchgeführt.

5.2.4 Allgemeine Synthesevorschriften

Da im Zuge dieser Arbeit unter anderem auch die Implementierung neuer Synthesetechniken zur Beschleunigung der konventionellen Prozesse der Wirkstoffentwicklungskaskade im Fokus der Forschungsbemühungen stand, wurde zwecks Wahrung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, der potentiellen Etablierung zukünftiger industrieller Anwendungen sowie aus Gründen der Zeit- und Kosteneffizienz allgemeiner Synthesevorschriften (ASV) erarbeitet, die einen semi-automatisierten und parallelisierten Ablauf der einzelnen Reaktionen ermöglichen. Eine Übersicht zu den jeweiligen ASVs findet sich im folgenden Abschnitt.

Tabelle 2 | Übersicht zu den Konditionen der Reinigungsprotokolle für die automatisierte Säulenchromatographie. Aufgelistet sind sowohl die verwendeten Eluenten, ggfs. verwendete Co-Eluenten, die Säulen und die Einstellungen für den Gradienten.

Methode	Eluent		Additiv	Säule	Gradient	
	A	B			A → B	
AT.A2	PE	EtOAc	-	FPE 24 g	3 CV	0% → 0%
					5 CV	0% → 60%
					5 CV	60% → 60%
					1 CV	25% → 100%
					2 CV	100% → 100%
					Flussrate: 32 mL/min	
AT.A3	PE	EtOAc	-	FPE 24 g	3 CV	0% → 0%
					5 CV	0% → 80%
					5 CV	80% → 80%
					1 CV	25% → 100%
					2 CV	100% → 100%
					Flussrate: 32 mL/min	
AT.C1	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	-	FPE 40 g	3 CV	0% → 0%
					3 CV	0% → 30%
					5 CV	30% → 30%
					3 CV	30% → 100%
					2 CV	100% → 100%
					Flussrate: 40 mL/min	
AT.C2	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	-	FPE 40 g	3 CV	0% → 0%
					5 CV	0% → 50%
					6 CV	50% → 50%
					4 CV	50% → 100%
					2 CV	100% → 100%
					Flussrate: 40 mL/min	
AT.C3	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	1% TEA	FPE 24 g	3 CV	0% → 0%
					5 CV	0% → 40%
					6 CV	40% → 40%
					4 CV	40% → 100%
					2 CV	100% → 100%
					Flussrate: 32 mL/min	

Tabelle 3 | Übersicht zu den Konditionen der Reinigungsprotokolle für die automatisierte Säulenchromatographie. Aufgelistet sind sowohl die verwendeten Eluenten, ggfs. verwendete Co-Eluenten, die Säulen und die Einstellungen für den Gradienten.

Methode	Eluent		Additiv	Säule	Gradient	
	A	B			A → B	
AT.D1	CH ₂ Cl ₂	CH ₃ OH	-	FPE 24 g	Flussrate: 32 mL/min	
					3 CV	0% → 0%
					5 CV	0% → 20%
					1 CV	20% → 20%
					3 CV	20% → 100%
					3 CV	100% → 100%
AT.D2	CH ₂ Cl ₂	CH ₃ OH	-	FPE 24 g	Flussrate: 32 mL/min	
					3 CV	0% → 0%
					5 CV	0% → 10%
					2 CV	10% → 10%
					2 CV	10% → 100%
					3 CV	100% → 100%
AT.E	H ₂ O	CH ₃ CN	0.1% TFA	FPE-C18 20 g	Flussrate: 32 mL/min	
					3 CV	10% → 10%
					4 CV	10% → 55%
					3 CV	55% → 55%
					1 CV	55% → 100%
					2 CV	100% → 100%
					Flussrate: 40 mL/min	

Allgemeine Synthesevorschrift A (ASV.A): Synthese der substituierten nukleophilen Acetamide 17a-n

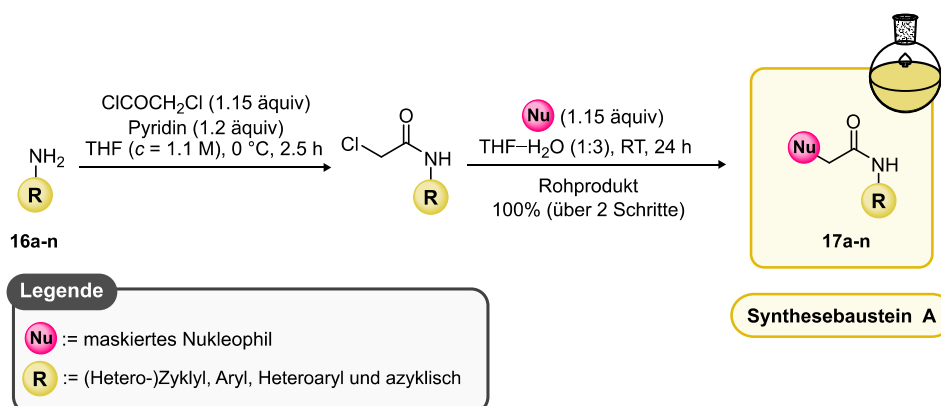


Abbildung 42 | Allgemeines Syntheschema zur Darstellung der substituierten nukleophilen Acetamide 17a-n. Als Edukte lassen sich prim\u00e4re und sekund\u00e4re Amine aller Art einsetzen. Zus\u00e4tzliche nukleophile oder basische Funktionalit\u00e4ten m\u00fcssen aufgrund potentiell-aufretender Nebenreaktionen jedoch gesch\u00fctzt werden.

Schritt 1: Darstellung der Chloracetamide

In einem ausgeheizten Zweihals-Rundkolben, ausgestattet mit einem Tropftrichter, wurde unter Argonstrom ein Amin oder Anilin (**16a-n**, 1 \u00e4quiv.) in trockenen Tetrahydrofuran (THF, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$, $c = 1.1 \text{ mol/L}$, 22.5 mL) bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ gel\u00f6st. Anschließend wurden zun\u00e4chst Pyridin ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 79.10 g/mol, 0.98 g/mL, 1.2 \u00e4quiv.) und nachfolgend tr\u00f6pfchenweise Chloroacetylchlorid ($\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_2\text{O}$, 112.94 g/mol, 1.42 g/mL, 1.15 \u00e4quiv.) \u00fcber einen Zeitraum von 20 Minuten \u00fcber den Tropftrichter hinzugef\u00fcgt, gefolgt von einem Durchsp\u00fclen des Tropftrichters mit Tetrahydrofuran (2 mL). Die Reaktion wurde f\u00fcr 2.5 Stunden bei Raumtemperatur ger\u00fchrt und der Fortschritt mittels D\u00fcnnschichtchromatographie (DC) \u00fcberwacht. Nach vollst\u00e4ndigem Umsatz (DC-Kontrolle) wurde eine 16%ige (w/w) w\u00e4ssrige Natriumchloridl\u00f6sung hinzugef\u00fcgt und die Mischung f\u00fcr weitere 30 Minuten lang ger\u00fchrt. Die w\u00e4ssrige Phase wurde anschlie\u00dfend abgetrennt und die organische Phase ohne weitere Reinigung direkt f\u00fcr den n\u00e4chsten Syntheseschritt verwendet.

Schritt 2: Darstellung der substituierten nukleophilen Acetamide 17a-n

Zu der organischen Phase aus Schritt 1 wurde in einem Einhalskolben eine filtrierte L\u00f6sung eines nukleophilen Reagenzes (114.21 g/mol, 1.5 \u00e4quiv.) in Wasser (H_2O , $c = 4.3 \text{ mol/L}$, 8.6 mL) hinzugef\u00fcgt und das entstehende Zwei-Phasen-Gemisch \u00fcber Nacht bei Raumtemperatur stark ger\u00fchrt. Nach vergangener Reaktionszeit wurde die organische Phase mittels DC auf vollst\u00e4ndige Umsetzung \u00fcberpr\u00fcft. Die w\u00e4ssrige Phase wurde daraufhin mit Ethylacetat (3x) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen \u00fcber Natriumsulfat (Na_2SO_4) getrocknet, bevor das L\u00f6sungsmittel unter vermindertem Druck verdampft wurde. Das Produkt (**17a-n**, 100% (Rohprodukt, \u00fcber 2 Schritte), 1 \u00e4quiv.) wurde ohne weitere Reinigung als Baustein f\u00fcr das weiter unten beschriebene Pr\u00e4parationsverfahren ASV.C verwendet.

Allgemeine Synthesevorschrift B (ASV.B): Synthese der β -Chlorzimtsäurenitrile **19a-q** über eine modifizierte VILSMEIER-HAACK-ARNOLD-Reaktion

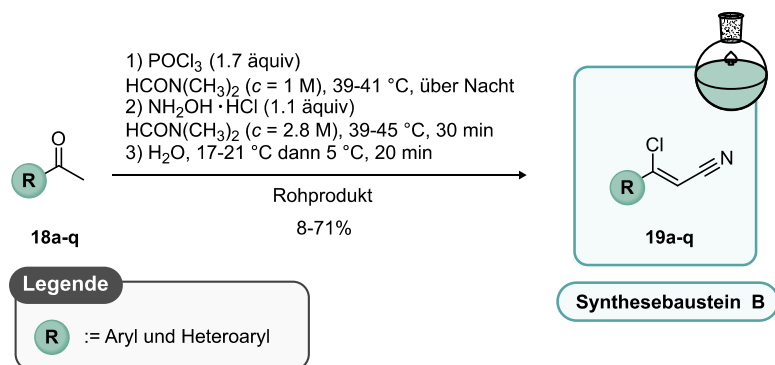


Abbildung 43: | Allgemeines Syntheschema zur Darstellung der β -Chlorzimts\u00e4urenitrile **19a-q**. Als Ausgangsmaterialien k\u00f6nnen hier Arylketone und Arylaldehyde eingesetzt werden. Der Einsatz aliphatischer Carbonylverbindungen f\u00fchrte unter den entsprechenden Reaktionsbedingungen nicht zur gew\u00fcnschten Produktbildung

Die Synthese der β -Chlorzimts\u00e4urenitrile **19a-q** erfolgte nach einem angepassten Prozedere von LIEBSCHER *et al.*²⁴² aus dem Jahre 1983. Dazu wurde in einem ausgeheizten Dreihals-Rundkolben, ausgestattet mit einem Tropftrichter mit Druckausgleich, einem F\u00c4NDENSER und einer Thermosonde zur Messung der internen Reaktionstemperatur, ein Arylketon (**18a-q**, 1 \u00e4quiv.) in trockenen Dimethylformamid (DMF, $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$, $c = 1 \text{ mol/L}$) unter Argonstrom bei 40°C gel\u00f6st und anschlie\u00dfend Phosphoroxychlorid (POCl_3 , 153.33 g/mol , 1.65 g/mL , 1.7 \u00e4quiv.) tropfenweise hinzugef\u00fcgt. W\u00e4hrend der Zugabe wurde darauf geachtet, die interne Reaktionstemperatur in einem Bereich zwischen 39 und 41°C zu halten. Das Reaktionsgemisch wurde anschlie\u00dfend \u00fcber Nacht bei 40°C ger\u00fchrt.

Nachdem durch DC der vollst\u00e4ndige Verbrauch der Ausgangsmaterialien indiziert wurde, erfolgte die tropfenweise Zuf\u00fchrung einer L\u00f6sung von Hydroxylaminhydrochlorid (NH_4OCl , 69.49 g/mol , 1.1 \u00e4quiv.) in DMF ($c = 2. \text{ M}$), wobei stets ein Temperaturbereich zwischen 39 und 45°C eingehalten wurde. Die L\u00f6sung wurde dann 30 min bei 40°C ger\u00fchrt, bevor sie auf 15 - 20°C abgek\u00fchlt wurde. Es erfolgte die tropfenweise Zugabe von Wasser (H_2O -DMF 1:12, $c = 0.63 \text{ mol/L}$) unter Konstanthaltung der internen Temperatur in einem Bereich zwischen 17 und 21°C . Die resultierende Suspension wurde auf 5°C abgek\u00fchlt und weitere 20 Minuten ger\u00fchrt. Das Pr\u00e4zipitat wurde abfiltriert, mit Wasser (2x20 w/w %) gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Die Produkte **19a-q** konnten in Ausbeuten von 50 bis 65% und ausreichender Reinheit f\u00fcr die n\u00e4chsten Schritte erhalten werden.

Allgemeine Synthesevorschrift C (ASV.C): Synthese der NDI-Derivate 15aa-mq

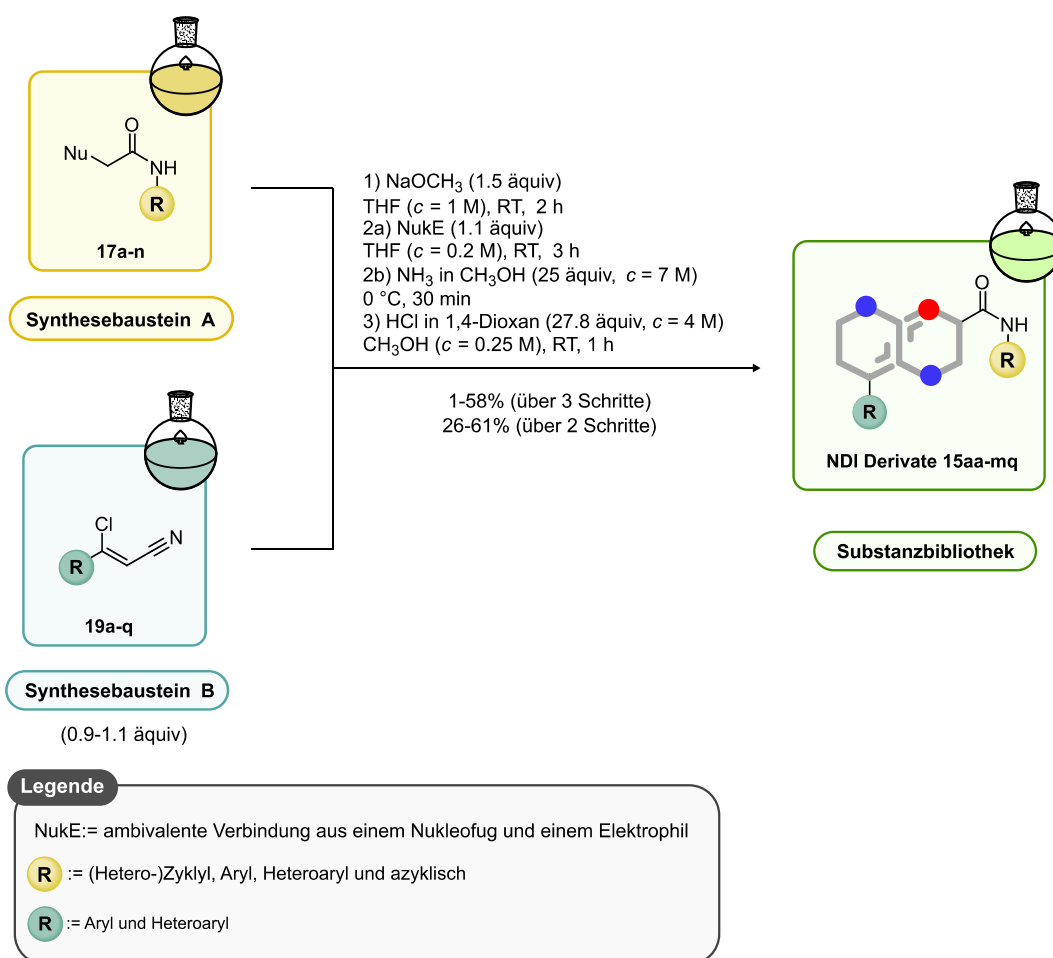


Abbildung 44 | Allgemeines Syntheschema zur Darstellung der NDI-Derivate 15aa-mq. Als Ausgangsmaterialien werden hier die zuvor synthetisierten Synthesebausteine A und B verwendet. Die Intermediate und finalen Produkte wurden semi-automatisiert mit den entsprechenden Reinigungsprotokollen gereinigt.

Schritt 1: Heterozyklisierung der beiden Synthesebausteine A und B zu bifunktionellen Intermediaten

In einem ausgeheizten Einhalskolben wurde bei Raumtemperatur unter Argon-Gegenstrom eine Lösung der substituierten nukleophilen Acetamide (17a-n, **Synthesebaustein A**, 1 äquiv.) in Tetrahydrofuran (THF, C₄H₈O, c = 1 mol/L) gelöst und danach die jeweiligen β-Chlorzimtsäurenitrile (19a-q, **Synthesebaustein B**, 0.9-1.1 äquiv.) in einer Portion zugegeben. Es folgte die tropfenweise Zugabe einer Natriummethoxid-Lösung (NaOCH₃, 54.02 g/mol, 30 Gew.% in CH₃OH, 0.97 g/mL, 1.5 äquiv.) über einen Zeitraum von ca. 5-10 min. Nach ungefähr 20 minütigen Rühren bei Raumtemperatur färbte sich die Reaktionslösung dunkelrot und wurde anschließend noch weitere 2 Stunden lang gerührt. Durch eine DC-Kontrolle wurde der vollständige Verbrauch aller Ausgangsmaterialien angezeigt, das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels einer spezifischen Reinigungsbedingung unter Verwendung des TELEDYNE ISCO COMBIFLASH NEXTGEN 300+-Systems gereinigt.

Die erhaltenen bifunktionelle Intermediate wurden in den meisten Fällen mit guter Ausbeute und ausreichender Reinheit für den nächsten Schritt isoliert.

Schritt 2a: Generierung des Scharnierregion-bindenden Strukturelements innerhalb der bifunktionellen Intermediate

In einen ausgeheizten Einhalskolben wurde eine Lösung des zuvor synthetisierten bifunktionellen Intermediates (1 äquiv.) in Tetrahydrofuran (THF, C₄H₈O, $c = 0.2$ M, 5.5 mL) gelöst und ein Reagenz mit ambivalenten nukleofugen und elektrophilen Charakter (1.1 äquiv.) tropfenweise zugegeben. Dabei wurde stets ein Temperaturbereich zwischen 20 °C und 30 °C eingehalten. Nach 20 minütigen Rühren fiel in den meisten Fällen ein Niederschlag aus und die entstehende Suspension wurde für eine weitere Stunde und 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Schritt 2b: Nach vollständigem Verbrauch des Ausgangsmaterials (DC-Kontrolle) wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und der resultierende Niederschlag auf 0 °C gekühlt, bevor er erneut in eine methanolische Ammoniaklösung (NH₃, 17.03 g/mol, $c = 7$ mol/L in CH₃OH, 469 mg, 5.5 mL, 27.6 mmol, 25 äquiv.) aufgenommen wurde. Die resultierende Lösung wurde 30 Minuten lang gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels einer spezifischen Reinigungsbedingung unter Verwendung des TELEDYNE ISCO COMBIFLASH NEXTGEN 300+-Systems gereinigt, sodass die Produkte in hohen Ausbeuten über zwei Schritte hinweg erhalten werden konnten. Insofern die Verbindungen noch Boc-Schutzgruppen beinhalteten, wurden diese der optionalen Carbamatspaltung aus Schritt 3 zugeführt, um die gewünschten finalen Produkte **15aa-mq** zu erhalten.

Schritt 3: Optionale Carbamatspaltung von *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-tragenden bifunktionellen Intermediaten

In einem ausgeheizten Rundkolben wurde bei 0 °C eine Lösung der aus Schritt 2b hergestellten Intermediate (1 äquiv.) in wasserfreiem Methanol (CH₃OH, $c = 0.25$ mol/L) gelöst und mit einer Lösung von Salzsäure in 1,4-Dioxan (HCl, 36.46 g/mol, $c = 4$ mol/L, 27.8 äquiv.) tropfenweise versetzt. Dabei wurde die interne Temperatur zwischen 0 °C und 5 °C gehalten. Die Lösung wurde anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung der Edukte (DC-Kontrolle) gerührt.

Es folgte die Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck. Der verbleibende Rückstand wurde mittels der spezifischen Reinigungsbedingung **AT.E** unter Verwendung des TELEDYNE ISCO COMBIFLASH NEXTGEN 300+-Systems gereinigt und anschließend basisch ausgeschüttelt (pH-Teststreifen), um die freien Basen der Produkte **15aa-mq** in geringer bis moderater Ausbeute (über 2 Schritte) und hoher Reinheit zu erhalten.

Allgemeine Synthesevorschrift D (ASV.D): Synthese der sauerstoffhaltigen Heterozyklen-Fragmente (\pm)-11a-b und (\pm)-13 über eine Oxa-DIELS-ALDER-Reaktion

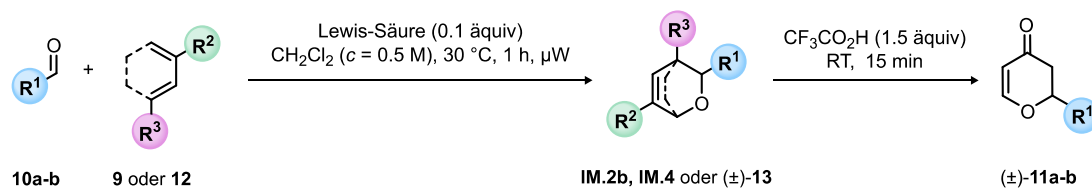


Abbildung 45 | Allgemeines Syntheschema zur Durchführung der oxa-DIELS-ALDER-Reaktion unter Lewis-Säure-Katalyse. Als Ausgangsmaterialien können beispielsweise die schwach oder stark-aktivierten Aldehyde **10a-b** und das nicht-aktivierte oder das elektronenreiche Dien **9** oder **12** eingesetzt werden. Die erfolgreiche Durchführung der Reaktion erfordert eine präzise Abstimmung des Lewis-Säure-Katalysators je nach eingesetzten Reaktionspartnern. Bei Anwesenheit eines Silylether-geschützten Alkohols, kann eine nachgeschaltete TFA-vermittelte Konversion des Grundgerüst zu den entsprechenden Pyranonen (\pm)-**11a-b** erfolgen.

In einem Mikrowellengefäß wurden der entsprechende Aldehyd (**10a-b**, 1 äquiv.) sowie die jeweilige Lewis-Säure (0.1 äquiv) in Dichlormethan (DCM, $c = 0.5$ mol/L) suspendiert und mehrere Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde das jeweilige Dien (**9** oder **12**, 1.3 äquiv.) hinzugegeben, das Reaktionsgemisch mit Argon überschichtet und für 1h bei 30 °C unter Mikrowelleneinstrahlung gerührt.

Im Falle des DANISHEFSKY-Diens wurde nach vergangener Reaktionszeit, zum Zwecke einer Silyletherspaltung, Trifluoressigsäure (TFA, CF₃CO₂H, 114.02 g/mol, 1.48 g/mL, 1 äquiv.) zur Reaktionsmischung hinzuge tropft und die Lösung für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und der verbleibende Rückstand mittels der spezifischen Reinigungsbedingung **AT.A3** unter Verwendung des TELEDYNE ISCO COMBIFLASH NEXTGEN 300+-Systems gereinigt. Die isolierten Produkte (\pm)-**13** und (\pm)-**11a-b** konnten in moderaten Ausbeuten und zufriedenstellender Reinheit erhalten werden.

Allgemeine Synthesevorschrift E (ASVE): Synthese der 2-(Hydroxy-methyl)morpholin-Fragmente (\pm)-3a-e und des 3-Hydroxyoxazepan-Fragments (\pm)-4a

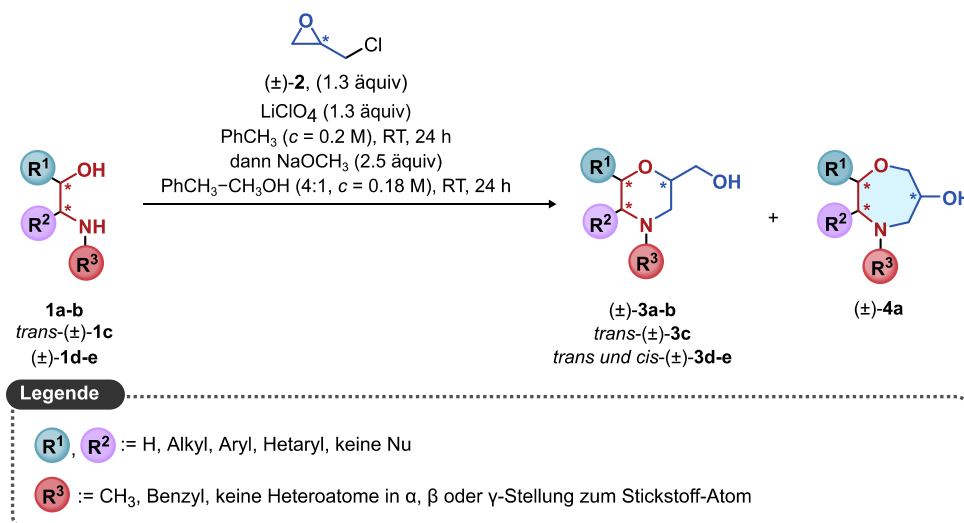
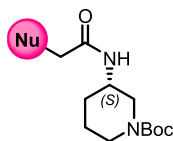


Abbildung 46 | Allgemeines Syntheschema zur Durchführung der Eintopfreaktion zur Darstellung der 2-(Hydroxy-methyl)morpholine (\pm)-3a-e. Als Ausgangsmaterialien dienen α,β -substituierte Aminoalkohole und racemisches Epichlorhydrin ((\pm)-2). Die Durchführung der Reaktion ermöglicht sowohl den Zugang zu den entsprechenden 2-(Hydroxy-methyl)morpholinen wie auch zu den jeweiligen 3-Hydroxyoxazepanen.

Die Synthese der beiden Fragmentklassen erfolgte nach einem angepassten Prozedere von BREUNING *et al.*²²⁷ aus dem Jahre 2007. Dazu wurde in einem ausgeheizten Einhalskolben zu einer Lösung eines Aminoalkohols (1 äquiv.) in trockenen Toluol (C_7H_8 , $c = 0.2 \text{ mol/L}$) (\pm)-Epichlorhydrin ((\pm)-2, $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$, 92.52 g/mol, 1.18 g/mL, 1.3 äquiv.) und zuvor am Hochvakuum getrocknetes Lithiumperchlorat (LiClO_4 , 106.39 g/mol, 2.3 g, 21.5 mmol, 1.30 äquiv.) hinzugegeben und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur 14-48 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz der Edukte (DC-Kontrolle) wurde eine Lösung von Natriummethanolat (NaOCH_3 , 30 Gew.% in CH_3OH , 2.5 äquiv.) zur Reaktionsmischung zugetropft und weitere 14-72 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde anschließend durch Zugabe von wässriger Ammoniumchlorid-Lösung verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc (3x) extrahiert. In Folge dessen wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter verminderten Druck entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels der Reinigungsbedingung **AT.D2** unter Verwendung des TELEDYNE ISCO COMBIFLASH NEXTGEN 300+-Systems gereinigt. Dabei konnten sowohl die 2-(Hydroxy-methyl)morpholin-Fragmente (\pm)-3a-e als auch das 3-Hydroxyoxazepan-Fragment (\pm)-4a in einem Verhältnis von 9:1 in moderaten Ausbeuten isoliert werden.

5.2.5 Synthesevorschriften und analytische Charakterisierung

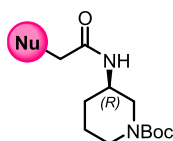
Darstellung des nukleophilen Acetamids (*S*)-17a



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift **ASV.A** erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 *tert*-Butyl (*S*)-3-aminopiperidin-1-carboxylat ((*S*)-**16a**, C₁₀H₂₀N₂O₂, 200.28 g/mol, 5000 mg, 25 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (2.4 g, 2.4 mL, 30 mmol) und Chloracetylchlorid (3.2 g, 2.3 mL, 28.7 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (4.3 g, 37.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt (*S*)-**17a** (316.42 g/mol, 7.9 g, 25 mmol) wurde als orangegelbes, hochviskoses Öl erhalten.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 5.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 316.15 für [M+H⁺], *m/z* gefunden: 339.2 [M+H⁺+Na⁺] und 317.1 [M+H⁺].

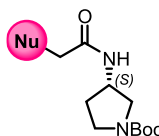
Darstellung des nukleophilen Acetamids (*R*)-17b



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift **ASV.A** erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 *tert*-Butyl (*R*)-3-aminopiperidin-1-carboxylat ((*R*)-**16b**, C₁₀H₂₀N₂O₂, 200.28 g/mol, 5000 mg, 25 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (2.4 g, 2.4 mL, 30 mmol) und Chloracetylchlorid (3.2 g, 2.3 mL, 28.7 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (4.3 g, 37.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt (*R*)-**17b** (316.42 g/mol, 7.9 g, 25 mmol) wurde als orangebraunes, hochviskoses Öl erhalten.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 5.5 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 316.15 für [M+H⁺], *m/z* gefunden: 339.2 [M+H⁺+Na⁺].

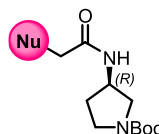
Darstellung des nukleophilen Acetamids (*S*)-17c



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 *tert*-Butyl (*S*)-3-aminopyrrolidin-1-carboxylat ((*S*)-**16c**, C₉H₁₈N₂O₂, 186.25 g/mol, 2000 mg, 10.7 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (1 g, 1 mL, 12.8 mmol) und Chloracetylchlorid (1.4 g, 1 mL, 12.3 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (1.8 g, 16.1 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt (*S*)-**17c** (302.39 g/mol, 3.2 g, 10.7 mmol) wurde als gelbes Öl erhalten.

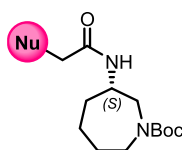
HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 5.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 302.13 für [M+H⁺], *m/z* gefunden: 325.1 [M+H⁺+Na⁺].

Darstellung des nukleophilen Acetamids (*R*)-17d



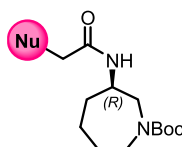
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 *tert*-Butyl (*R*)-3-aminopyrrolidin-1-carboxylat ((*R*)-**16d**, C₉H₁₈N₂O₂, 186.25 g/mol, 2000 mg, 10.7 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (1 g, 1 mL, 12.8 mmol) und Chloracetylchlorid (1.4 g, 1 mL, 28.7 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (1.8 g, 16.1 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt (*R*)-**17d** (302.39 g/mol, 3.2 g, 10.7 mmol) wurde als dunkelgelbes Öl erhalten.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 5.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 302.13 für [M+H⁺], *m/z* gefunden: 325.1 [M+H⁺+Na⁺].

Darstellung des nukleophilen Acetamids (*S*)-17e

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 *tert*-Butyl (*S*)-3-aminoazepan-1-carboxylat ((*S*)-**16e**, C₁₁H₂₂N₂O₂, 214.31 g/mol, 1000 mg, 4.7 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (443 mg, 452 μ L, 5.6 mmol) und Chloracetylchlorid (606 mg, 427 μ L, 5.4 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (799 mg, 7 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt (*S*)-**17e** (330.44 g/mol, 1540 mg, 4.7 mmol) wurde als rote Flüssigkeit erhalten.

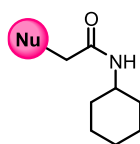
HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 6.3 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 330.16 für [M+H⁺], m/z gefunden: 231.1 [M+H⁺-Boc].

Darstellung des nukleophilen Acetamids (*R*)-17f

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 *tert*-Butyl (*R*)-3-aminoazepan-1-carboxylat ((*R*)-**16f**, C₁₁H₂₂N₂O₂, 214.31 g/mol, 1.02 g/mL, 600 mg, 588 μ L, 2.8 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (266 mg, 271 μ L, 3.4 mmol) und Chloracetylchlorid (364 mg, 256 μ L, 3.2 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (480 mg, 4.2 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt (*R*)-**17f** (330.44 g/mol, 925 mg, 2.8 mmol) wurde als dunkelrote Flüssigkeit erhalten.

HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 6.5 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 330.16 für [M+H⁺], m/z gefunden: 231.1 [M+H⁺-Boc].

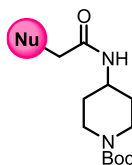
Darstellung des nukleophilen Acetamids 17g



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 Cyclohexylamin (**16g**, C₆H₁₃N, 99.18 g/mol, 0.86 g/mL, 3500 mg, 4.1 mL, 35.3 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (3.4 g, 3.4 mL, 42.4 mmol) und Chloracetylchlorid (4.6 g, 3.2 mL, 40.6 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (6.1 g, 52.9 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt **17g** (215.31 g/mol, 7.6 g, 35.3 mmol) wurde als gelbe Flüssigkeit erhalten.

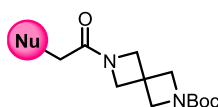
HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 8.1 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 215.10 für [M+H⁺], *m/z* gefunden: 216.0 [M+H⁺].

Darstellung des nukleophilen Acetamids 17h



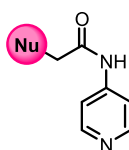
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 *tert*-Butyl 4-aminopiperidin-1-carboxylat (**16h**, C₁₀H₂₀N₂O₂, 200.28 g/mol, 1500 mg, 7.5 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (711 mg, 725 µL, 9 mmol) und Chloracetylchlorid (973 mg, 685 µL, 8.6 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (1280 mg, 11.2 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt **17h** (316.42 g/mol, 2.4 g, 7.5 mmol) wurde als orangebrauner Feststoff erhalten.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 5.5 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 316.15 für [M+H⁺], *m/z* gefunden: 339.2 [M+H⁺+Na⁺] und 219.1 [M+H⁺-Boc].

Darstellung des nukleophilen Acetamids 17i

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 *tert*-Butyl 2,6-diazaspiro[3.3]heptan-2-carboxylat-Oxalat (2:1) (**16i**, C₂₂H₃₈N₄O₈, 486.57 g/mol, 1000 mg, 2.1 mmol) mit der zweifachen Menge an Pyridin (390 mg, 398 μ L, 4.9 mmol, 2.4 äquiv) und Chloracetylchlorid (267 mg, 188 μ L, 2.4 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (352 mg, 3.1 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt **17i** (314.4 g/mol, 646 mg, 2.1 mmol) wurde als rote Flüssigkeit erhalten.

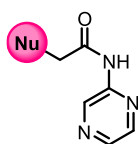
HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 5.2 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 314.13 für [M+H⁺], m/z gefunden: 337.2 [M+H⁺+Na⁺] und 215.2 [M+H⁺-Boc].

Darstellung des nukleophilen Acetamids 17j

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 4-Aminopyridin (**16j**, Fampridin, C₅H₆N₂, 94.12 g/mol, 3500 mg, 37.2 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (3.5 g, 3.6 mL, 44.6 mmol) und Chloracetylchlorid (4.8 g, 3.4 mL, 42.8 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (6.4 g, 55.8 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt **17j** (210.25 g/mol, 7.8 g, 37.2 mmol) wurde als schwarzer Feststoff erhalten.

HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 2.1 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 210.05 für [M+H⁺], m/z gefunden: 232.1 [M+H⁺+Na⁺].

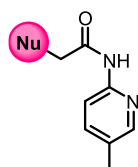
Darstellung des nukleophilen Acetamids 17k



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 2-Aminopyrazin (**16l**, C₄H₅N₃, 95.10 g/mol, 532.6 mg, 5.6 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (532 mg, 542 µL, 6.7 mmol) und Chloracetylchlorid (727 mg, 512 µL, 6.4 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (959 mg, 8.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt **17k** (211.24 g/mol, 1.3 g, 5.6 mmol) wurde als orangebrauner Feststoff erhalten.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 1.9 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 211.04 für [M+H⁺], *m/z* gefunden: 212.0 [M+H⁺].

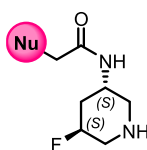
Darstellung des nukleophilen Acetamids 17l



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 2-Amino-5-methylpyridin (**16l**, C₆H₈N₂, 108.14 g/mol, 605.6 mg, 5.6 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (532 mg, 542 µL, 6.7 mmol) und Chloracetylchlorid (727 mg, 512 µL, 6.4 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (959 mg, 8.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt **17l** (224.28 g/mol, 1.3 g, 5.6 mmol) wurde als schwarze Flüssigkeit erhalten.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 1.9 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 224.06 für [M+H⁺], *m/z* gefunden: 246.1 [M+H⁺+Na⁺].

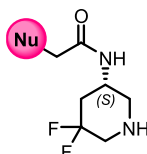
Darstellung des nukleophilen Acetamids (3*S*,5*S*)-17m



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 *tert*-Butyl (3*S*,5*S*)-3-amino-5-fluorpiperidin-1-carboxylat ((3*S*,5*S*)-**16m**, C₁₀H₁₉FN₂O₂, 218.27 g/mol, 804.9 mg, 3.7 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (350 mg, 357 μL, 4.4 mmol) und Chloracetylchlorid (479 mg, 337 μL, 4.2 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (632 mg, 5.5 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt (3*S*,5*S*)-**17m** (334.41 g/mol, 1.2 g, 3.7 mmol) wurde als hochviskoses oranges Öl erhalten.

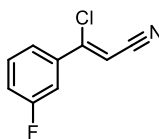
HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 5.1 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 334.14 für [M+H⁺], *m/z* gefunden: 357.1 [M+H⁺+Na⁺] und 219.0 [M+H⁺-Boc].

Darstellung des nukleophilen Acetamids (*S*)-17n



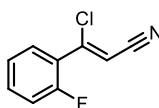
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 *tert*-Butyl (3*S*)-5-amino-3,3-difluorpiperidin-1-carboxylat ((*S*)-**17n**, C₁₀H₁₈F₂N₂O₂, 236.26 g/mol, 871.2 mg, 3.7 mmol) mit der entsprechenden Menge an Pyridin (350 mg, 357 μL, 4.4 mmol) und Chloracetylchlorid (479 mg, 337 μL, 4.2 mmol) und darauf folgend in Schritt 2 mit der stöchiometrisch-äquivalenten Menge des nukleophilen Reagenzes (632 mg, 5.5 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt (*S*)-**17n** (352.40 g/mol, 1.3 g, 3.7 mmol) wurde als hochviskoses gelbes Öl erhalten.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 5.5 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 352.13 für [M+H⁺], *m/z* gefunden: 375.2 [M+H⁺+Na⁺].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils 19a

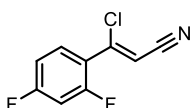
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 3'-Fluoracetophenon (**18a**, C₈H₇FO, 138.14 g/mol, 1.13 g/mL, 8 g, 7.1 mL, 57.9 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (15.1 g, 9.2 mL, 98.4 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (4.4 g, 63.7 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(3-fluorphenyl)prop-2-enitril (**19a**, C₉H₅ClFN, 181.60 g/mol, 7 g, 38.8 mmol, 67%) wurde als brauner Feststoff in moderater Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 7.3 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 181.01 für C₉H₅ClFN [M+H⁺], *m/z* gefunden: 182.0 [M+H⁺].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils 19b

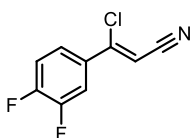
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 2'-Fluoracetophenon (**18b**, C₈H₇FO, 138.14 g/mol, 1.14 g/mL, 4000 mg, 3.5 mL, 29.0 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (7.6 g, 4.6 mL, 49.2 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (2.2 g, 31.9 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(2-fluorphenyl)prop-2-enitril (**19b**, C₉H₅ClFN, 181.59 g/mol, 2945 mg, 16.2 mmol, 56%) wurde als gelbes Öl in moderater Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 7.3 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 181.0 für C₉H₅ClFN [M+H⁺], *m/z* gefunden: 182.0 [M+H⁺].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils 19c

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 2',4'-Difluoracetophenon (**18c**, C₈H₆F₂O, 145.13 g/mol, 1.23 g/mL, 4000 mg, 3.2 mL, 25.6 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (6.7 g, 4.1 mL, 43.6 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (2.0 g, 28.2 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(2,4-difluorphenyl)prop-2-enitril (**19c**, C₉H₄ClF₂N, 199.58 g/mol, 2454 mg, 12.3 mmol, 48%) wurde als kristallines braunes Pulver in moderater Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

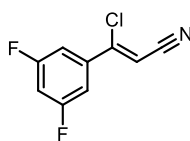
HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 7.2 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 199.00 für C₉H₄ClF₂N [M+H⁺], *m/z* gefunden: 200.0 [M+H⁺].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils 19d

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 3',4'-Difluoracetophenon (**18d**, C₈H₆F₂O, 145.13 g/mol, 1.25 g/mL, 4000 mg, 3.2 mL, 25.6 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (6.7 g, 4.1 mL, 43.6 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (2.0 g, 28.2 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(3,4-difluorphenyl)prop-2-enitril (**19d**, C₉H₄ClF₂N, 199.58 g/mol, 3477 mg, 17.4 mmol, 68%) wurde als gelbbrauner Feststoff in moderater Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 7.4 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 199.00 für C₉H₄ClF₂N [M+H⁺], *m/z* gefunden: 200.0 [M+H⁺].

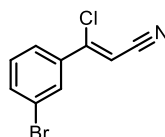
Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils **19e**



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 3',5'-Difluoracetophenon (**18e**, C₈H₆F₂O, 145.13 g/mol, 1.23 g/mL, 4000 mg, 3.2 mL, 25.6 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (6.7 g, 4.1 mL, 43.6 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (2.0 g, 28.2 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(2-fluorphenyl)prop-2-enitril (**19e**, C₉H₄ClF₂N, 199.58 g/mol, 2913 mg, 14.6 mmol, 57%) wurde als weißer Feststoff in moderater Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

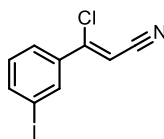
HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 7.6 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 199.00 für C₉H₄ClF₂N [M+H⁺], *m/z* gefunden: 200.0 [M+H⁺].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils **19f**



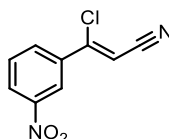
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 3'-Bromacetophenon (**18f**, C₈H₇BrO, 199.05 g/mol, 1.49 g/mL, 10.0 g, 6.7 mL, 50.2 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (13.1 g, 7.9 mL, 85.4 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (3.8 g, 55.3 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-(3-Bromphenyl)-3-chlorprop-2-enitril (**19f**, C₉H₅ClBrN, 242.50 g/mol, 8.6 g, 35.6 mmol, 71%) wurde als gelber Feststoff in moderater Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 7.1 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 240.93 für C₉H₅ClBrN [M+H⁺], *m/z* gefunden: 241.9 [M+H⁺].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils 19g

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 3'-Iodacetophenon (**18g**, C_8H_7IO , 246.05 g/mol, 1.19 g/mL, 5000 mg, 4.2 mL, 25.1 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (6.5 g, 4.0 mL, 42.7 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (1.9 g, 27.6 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(3-iodphenyl)prop-2-ennitril (**19g**, C_9H_5IFN , 289.50 g/mol, 4589 mg, 15.9 mmol, 63%) wurde als kristallines gelbes Pulver in moderater Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

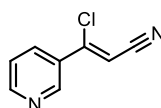
HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 8.2 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 288.92 für C_9H_5IFN [$M+H^+$], m/z gefunden: 289.9 [$M+H^+$].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils 19h

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 3'-Nitroacetophenon (**18h**, $C_8H_7NO_3$, 165.15 g/mol, 1.19 g/mL, 4145 mg, 3.5 mL, 25.1 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (6.5 g, 4.0 mL, 42.7 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (1.9 g, 27.6 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(3-nitrophenyl)prop-2-ennitril (**19h**, $C_9H_5ClN_2O_2$, 208.60 g/mol, 3246 mg, 15.6 mmol, 62%) wurde als gelber Feststoff in moderater Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 7.9 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 208.00 für $C_9H_5ClN_2O_2$ [$M+H^+$], m/z gefunden: 209.0 [$M+H^+$].

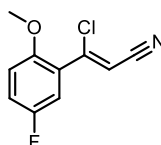
Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils **19i**



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 3-Acetylpyridin (**18i**, C_7H_7NO , 121.14 g/mol, 1.10 g/mL, 2423 mg, 2.2 mL, 20 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxchlorid (5.2 g, 3.2 mL, 34 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (1.4 g, 22 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(pyridin-3-yl)prop-2-enitril (**19i**, $C_8H_5ClN_2$, 164.59 g/mol, 395 mg, 2.4 mmol, 12%) wurde als grauer Feststoff in geringer Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

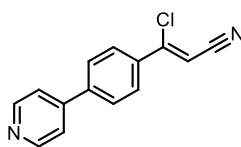
HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 5.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 164.01 für $C_8H_5ClN_2$ [$M+H^+$], m/z gefunden: 188.1 [$M+Na^+$].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils **19j**



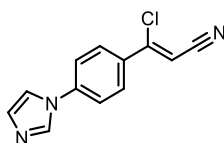
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 5'-Fluor-2'-Methoxyacetophenon (**18j**, $C_9H_9FO_2$, 168.17 g/mol, 1.12 g/mL, 3414 mg, 3.1 mL, 20.3 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxchlorid (5.3 g, 3.2 mL, 34.5 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (1.6 g, 22.3 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(5-fluor-2-methoxyphenyl)prop-2-enitril (**19j**, $C_{10}H_7ClFNO$, 211.62 g/mol, 3007 mg, 14.2 mmol, 70%) wurde als rotbraunes Pulver in moderater Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 7.1 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 211.02 für $C_{10}H_7ClFNO$ [$M+H^+$], m/z gefunden: 212.0 [$M+H^+$].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils 19k

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 3'-(Pyridin-4-yl)acetophenon (**18k**, $C_{13}H_{11}NO$, 197.24 g/mol, 0.99 g/mL, 986 mg, 1 mL, 5 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (1 g, 0.8 mL, 8.5 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (382 mg, 5.5 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(4-(pyridin-4-yl)phenyl)prop-2-enitril (**19k**, $C_{14}H_9ClN_2$, 240.69 g/mol, 157 mg, 0.7 mmol, 13%) wurde als grauer Feststoff in geringer Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

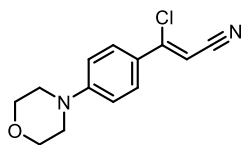
HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 4.3 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 240.05 für $C_{14}H_9ClN_2$ [$M+H^+$], m/z gefunden: 241.0 [$M+H^+$].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils 19l

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 4'-(Imidazol-1-yl)acetophenon (**18l**, $C_{11}H_{10}N_2O$, 186.21 g/mol, 2384 mg, 12.8 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (3.3 g, 2 mL, 21.8 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (978 mg, 14.1 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(3-(pyridin-4-yl)phenyl)prop-2-enitril (**19l**, $C_{12}H_8ClN_3$, 229.61 g/mol, 382 mg, 1.7 mmol, 13%) wurde als gelborangener Feststoff in geringer Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 4.5 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 229.04 für $C_{12}H_8ClN_3$ [$M+H^+$], m/z gefunden: 230.0 [$M+H^+$].

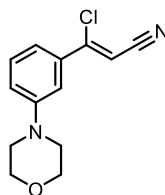
Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils **19m**



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 4'-Morpholinacetophenon (**18m**, $C_{12}H_{15}NO_2$, 205.26 g/mol, 4105 mg, 20 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (5.2 g, 3.2 mL, 34 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (1.4 g, 22 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(4-morpholinophenyl)prop-2-enitril (**19m**, $C_{13}H_{13}ClN_2O$, 248.71 g/mol, 398 mg, 1.6 mmol, 8%) wurde als dunkelgrüner Feststoff in geringer Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

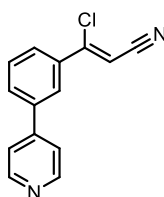
HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 7.1 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 248.07 für $C_{13}H_{13}ClN_2O$ [$M+H^+$], m/z gefunden: 249.0 [$M+H^+$].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils **19n**



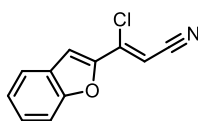
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 3'-Morpholinacetophenon (**18n**, $C_{12}H_{15}NO_2$, 205.26 g/mol, 1000 mg, 4.9 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (1.3 g, 0.8 mL, 8.3 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (372 mg, 5.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(3-morpholinophenyl)prop-2-enitril (**19n**, $C_{13}H_{13}ClN_2O$, 248.71 g/mol, 230 mg, 0.9 mmol, 19%) wurde als hochviskoses, gelbes Öl in geringer Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 7.0 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 248.07 für $C_{13}H_{13}ClN_2O$ [$M+H^+$], m/z gefunden: 249.0 [$M+H^+$].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils 19o

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 3'-(Pyridin-4-yl)-acetophenon (**18o**, C₁₃H₁₁NO, 197.24 g/mol, 0.99 g/mL, 986 mg, 1 mL, 5 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (1 g, 0.8 mL, 8.5 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (382 mg, 5.5 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(3-(pyridin-4-yl)phenyl)prop-2-enitril (**19o**, C₁₄H₉ClN₂, 240.69 g/mol, 132 mg, 0.6 mmol, 11%) wurde als violetter Feststoff in geringer Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

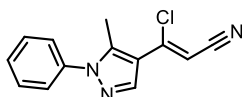
HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 4.5 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 240.05 für C₁₄H₉ClN₂ [M+H⁺], *m/z* gefunden: 241.0 [M+H⁺].

Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils 19p

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 2-Acetylbenzofuran (**18p**, C₁₀H₈O₂, 160.17 g/mol, 4004 mg, 25 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxychlorid (6.5 g, 4 mL, 42.5 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (1.9 g, 27.5 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(benzofuran-2-yl)prop-2-enitril (**19p**, C₁₁H₆ClNO, 203.62 g/mol, 1935 mg, 9.5 mmol, 38%) wurde als orangebrauner Feststoff in moderater Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 8.1 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 203.01 für C₁₁H₆ClNO [M+H⁺], *m/z* gefunden: 204.0 [M+H⁺].

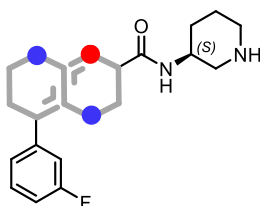
Darstellung des β -Chlorzimtsäurenitrils **19q**



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 4-Acetyl-5-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazol (**18q**, C₁₂H₁₂N₂O, 200.24 g/mol, 1000 mg, 5 mmol) mit der entsprechenden Menge an Phosphoroxchlorid (1 g, 0.8 mL, 8.5 mmol) und Hydroxylaminhydrochlorid (382 mg, 5.5 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das Produkt 3-Chlor-3-(5-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl)prop-2-enitril (**19q**, C₁₃H₁₀ClN₃, 243.69 g/mol, 499 mg, 2.1 mmol, 41%) wurde als brauner Feststoff in moderater Ausbeute erhalten und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet.

HPLC-MS (ESI-MS): [*t_R*] = 6.4 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 243.06 für C₁₃H₁₀ClN₃ [M+H⁺], *m/z* gefunden: 244.0 [M+H⁺].

Darstellung von NDI ((*S*)-**15aa**)

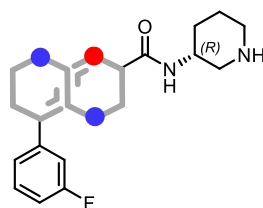


Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-**17a** (316.42 g/mol, 800 mg, 2.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19a** (C₉H₅ClFN, 181.60 g/mol, 413 mg, 2.3 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (683 mg, 0.7 mL, 3.8 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (419.52 g/mol, 465 mg, 1.1 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (230 mg, 191 μ L, 1.2 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (469 mg, 4 mL, 27.6 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (462.54 g/mol, 320 mg, 0.7 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.7 g, 4.8 mL, 19.2 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt.

Die freie Base des NDIs ((*S*)-**15aa**, 362.42 g/mol, 250 mg, 0.7 mmol, 27% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als kristallines gelblich-weißes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.00 (br. s., 1H), 8.28 (s, 1H), 7.95 (d, J = 7.77 Hz, 1H), 7.41 - 7.54 (m, 3H), 7.24 (appt, J = 8.20 Hz, 1H), 6.66 (br. s., 2H), 3.88 - 4.00 (m, 1H), 3.06 (dd, J = 2.88, 11.65 Hz, 1H), 2.93 (appd, J = 12.44 Hz, 1H), 2.62 (t, J = 10.81 Hz, 1H), 2.56 (appt, J = 10.33 Hz, 1H), 1.84 (appd, J = 9.81 Hz, 1H), 1.71 (dd, J = 3.56, 9.47 Hz, 1H), 1.46 - 1.61 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ = 163.4, 162.9, 161.8, 154.9, 145.1, 141.8, 135.3, 131.5, 121.7, 119.3, 115.6, 112.1, 109.4, 49.1, 45.5, 44.6, 29.6, 23.5. **HPLC-MS (ESI-MS):** [t_R] = 4.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 362.12 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 363.2 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats (*R*)-15ba

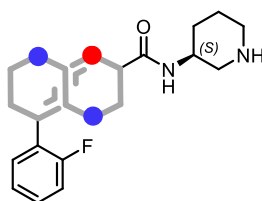


Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*R*)-17b (316.42 g/mol, 120 mg, 0.38 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19a ($\text{C}_9\text{H}_5\text{ClFN}$, 181.60 g/mol, 62 mg, 0.3 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (102 mg, 0.1 mL, 0.6 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (419.52 g/mol, 45 mg, 0.11 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (22 mg, 19 μL , 0.1 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (46 mg, 0.4 mL, 2.7 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (462.54 g/mol, 30 mg, 0.06 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (65 mg, 0.5 mL, 1.8 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt.

Die freie Base des NDI-Derivats (*R*)-15ba (362.42 g/mol, 20.3 mg, 0.06 mmol, 15% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als flockiges, gelbes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.00 (br. s., 1H), 8.28 (s, 1H), 7.95 (d, J = 7.77 Hz, 1H), 7.41 - 7.54 (m, 3H), 7.24 (appt, J = 8.20 Hz, 1H), 6.66 (br. s., 2H), 3.88 - 4.00 (m, 1H), 3.06 (dd, J = 2.88, 11.65 Hz, 1H), 2.93 (appd, J = 12.44 Hz, 1H), 2.62 (t, J = 10.81 Hz, 1H), 2.56 (appt, J = 10.33 Hz, 1H), 1.84 (appd, J = 9.81 Hz, 1H), 1.71 (dd, J = 3.56, 9.47 Hz, 1H), 1.46 - 1.61 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ = 163.4, 162.9, 161.8, 154.9, 145.1, 141.8, 135.3, 131.5, 121.7, 119.3, 115.6, 112.1, 109.4, 49.1, 45.5, 44.6, 29.6, 23.5. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 4.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 362.12 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 363.2 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15ab



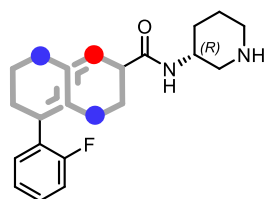
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 750 mg, 2.4 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19b ($\text{C}_9\text{H}_5\text{ClFN}$, 181.60 g/mol, 430 mg, 2.4 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (711 mg, 0.7 mL, 4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (419. g/mol, 700 mg, 1.7 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.A2 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (346 mg, 288 μL , 1.8 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (710 mg, 6 mL, 41.7 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (462.54 g/mol, 400 mg, 0.9 mmol) konvertiert.

Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.9 g, 6 mL, 24 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt.

Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15ab (362.42 g/mol, 311 mg, 0.9 mmol, 36% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als feines kristallines, gelbliches Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.98 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.74 (appd, J = 7.95 Hz, 1H), 7.66 (dt, J = 1.65, 7.92 Hz, 1H), 7.22 - 7.42 (m, 3H), 6.55 (br. s., 2H), 3.72 (apptq, J = 4.40, 8.40 Hz, 1H), 2.86 (dd, J = 3.24, 11.68 Hz, 1H), 2.71 (td, J = 4.00, 12.20 Hz, 1H), 2.35 (dquin, J = 2.20, 11.00 Hz, 2H), 1.74 (td, J = 3.20, 8.90 Hz, 1H), 1.54 (td, J = 3.50, 12.80 Hz, 1H), 1.44 (dq, J = 4.10, 11.00 Hz, 1H), 1.33 (tt, J = 4.10, 11.10 Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 162.9, 154.9, 144.4, 128.4, 125.4, 120.9, 120.9, 120.5, 116.8, 116.5, 109.9, 109.8, 51.0, 46.9, 45.6, 30.3, 25.2. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 4.6 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 362.12 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 363.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats (*R*)-15bb



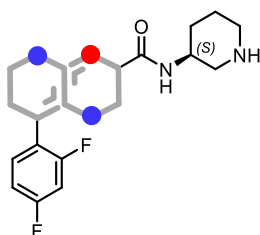
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*R*)-17b (316.42 g/mol, 1000 mg, 3.2 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19b ($\text{C}_9\text{H}_5\text{ClFN}$, 181.60 g/mol, 631 mg, 3.5 mmol, 1.1 äquiv.) und Natriummethoxid (854 mg, 0.9 mL, 4.7 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (419.52 g/mol, 960 mg, 2.3 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.A2 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (474 mg, 395 μL , 2.5 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (974 mg, 8.2 mL, 57.2 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (462.54 g/mol, 629 mg, 1.4 mmol) konvertiert.

Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (1.4 g, 9.5 mL, 37.8 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt.

Die freie Base des NDI-Derivats (*R*)-15bb (362.42 g/mol, 424 mg, 1.2 mmol, 37% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als klumpiges, gelbes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.98 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.74 (appd, J = 7.95 Hz, 1H), 7.66 (dt, J = 1.65, 7.92 Hz, 1H), 7.22 - 7.42 (m, 3H), 6.55 (br. s., 2H), 3.72 (apptq, J = 4.40, 8.40 Hz, 1H), 2.86 (dd, J = 3.24, 11.68 Hz, 1H), 2.71 (td, J = 4.00, 12.20 Hz, 1H), 2.35 (dquin, J = 2.20, 11.00 Hz, 2H), 1.74 (td, J = 3.20, 8.90 Hz, 1H), 1.54 (td, J = 3.50, 12.80 Hz, 1H), 1.44 (dq, J = 4.10, 11.00 Hz, 1H), 1.33 (tt, J = 4.10, 11.10 Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 162.9, 154.9, 144.4, 128.4, 125.4, 120.9, 120.9, 120.5, 116.8, 116.5, 109.9, 109.8, 51.0, 46.9, 45.6, 30.3, 25.2. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 4.6 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 362.12 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 363.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15ac

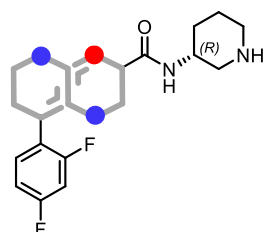


Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 750 mg, 2.4 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19c ($\text{C}_9\text{H}_5\text{ClF}_2\text{N}$, 199.59 g/mol, 473 mg, 2.4 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (711 mg, 0.7 mL, 4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (437.51 g/mol, 740 mg, 1.7 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (351 mg, 292 μL , 1.9 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (720 mg, 6 mL, 42.3 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (480.54 g/mol, 415 mg, 0.9 mmol) konvertiert.

Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.8 g, 6 mL, 24 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15ac (380.41 g/mol, 323 mg, 0.9 mmol, 36% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als kristallines gelbes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.04 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.74 - 7.87 (m, 2H), 7.45 (appddd, J = 2.69, 9.14, 11.77 Hz, 1H), 7.22 (appddt, J = 0.70, 2.70, 8.50 Hz, 1H), 6.63 (br. s., 2H), 3.80 (apptq, J = 4.40, 8.90 Hz, 1H), 2.94 (dd, J = 3.24, 11.68 Hz, 1H), 2.79 (td, J = 4.00, 12.20 Hz, 1H), 2.43 (dquin, J = 1.90, 11.00 Hz, 2H), 1.81 (td, J = 3.20, 8.90 Hz, 1H), 1.61 (td, J = 4.10, 12.80 Hz, 1H), 1.51 (dq, J = 4.10, 11.00 Hz, 1H), 1.40 (tt, J = 4.00, 11.10 Hz, 1H). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 162.8, 154.9, 144.5, 135.1, 130.0, 120.8, 112.9, 112.6, 105.4, 105.1, 59.6, 50.9, 46.9, 45.6, 30.4, 25.4, 21.0, 13.9. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 0.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 380.11 für [M+H⁺], m/z gefunden: 381.2 [M+H⁺].

Darstellung des NDI-Derivats (*R*)-15bc

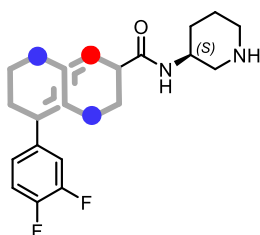


Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*R*)-17b (316.42 g/mol, 1000 mg, 3.2 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19c (C₉H₅ClF₂N, 199.59 g/mol, 568 mg, 2.8 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (854 mg, 0.9 mL, 4.7 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (437.51 g/mol, 1174 mg, 2.7 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (556 mg, 463 μ L, 3 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (1.1 g, 9.6 mL, 67.1 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (480.54 g/mol, 171 mg, 0.4 mmol) konvertiert.

Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.4 g, 2.5 mL, 9.9 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*R*)-15bc (380.41 g/mol, 133 mg, 0.4 mmol, 11% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer geringen Ausbeute als gelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.04 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.74 - 7.87 (m, 2H), 7.45 (appddd, J = 2.69, 9.14, 11.77 Hz, 1H), 7.22 (appddt, J = 0.70, 2.70, 8.50 Hz, 1H), 6.63 (br. s., 2H), 3.80 (apptq, J = 4.40, 8.90 Hz, 1H), 2.94 (dd, J = 3.24, 11.68 Hz, 1H), 2.79 (td, J = 4.00, 12.20 Hz, 1H), 2.43 (dq, J = 1.90, 11.00 Hz, 2H), 1.81 (td, J = 3.20, 8.90 Hz, 1H), 1.61 (td, J = 4.10, 12.80 Hz, 1H), 1.51 (dq, J = 4.10, 11.00 Hz, 1H), 1.40 (tt, J = 4.00, 11.10 Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 162.8, 154.9, 144.5, 135.1, 130.0, 120.8, 112.9, 112.6, 105.4, 105.1, 59.6, 50.9, 46.9, 45.6, 30.4, 25.4, 21.0, 13.9. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 4.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 380.11 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 381.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15ad

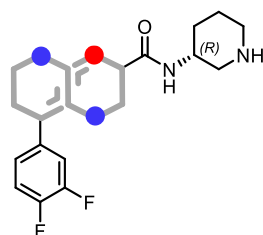


Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 750 mg, 2.4 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19d ($\text{C}_9\text{H}_5\text{ClF}_2\text{N}$, 199.59 g/mol, 473 mg, 2.4 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (711 mg, 0.7 mL, 4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (437.51 g/mol, 800 mg, 1.7 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (379 mg, 316 μL , 2 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (779 mg, 6.5 mL, 45.7 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (480.54 g/mol, 665 mg, 1.4 mmol) konvertiert.

Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (1.4 g, 9.6 mL, 38.5 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15ad (380.41 g/mol, 524 mg, 1.4 mmol, 58% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als gelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.01 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.79 (d, J = 7.95 Hz, 1H), 7.71 (appddd, J = 2.14, 7.64, 11.62 Hz, 1H), 7.44 - 7.58 (m, 2H), 6.64 (br. s., 2H), 3.80 (apptq, J = 4.40, 8.40 Hz, 1H), 2.94 (dd, J = 3.06, 11.62 Hz, 1H), 2.79 (td, J = 4.00, 12.23 Hz, 1H), 2.38 - 2.48 (m, 2H), 1.81 (td, J = 3.20, 8.90 Hz, 1H), 1.63 (td, J = 4.10, 12.80 Hz, 1H), 1.51 (dq, J = 4.10, 11.00 Hz, 1H), 1.35 - 1.46 (m, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 162.8, 154.9, 145.3, 141.0, 122.7, 119.5, 118.7, 118.5, 114.9, 114.6, 109.5, 50.8, 49.6, 49.3, 46.7, 45.5, 30.4, 25.1. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 4.9 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 380.11 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 381.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats (*R*)-15bd

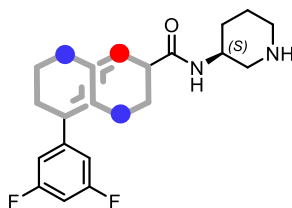


Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*R*)-17b (316.42 g/mol, 750 mg, 2.4 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19d ($\text{C}_9\text{H}_5\text{ClF}_2\text{N}$, 199.59 g/mol, 473 mg, 2.4 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (711 mg, 0.7 mL, 4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (437.51 g/mol, 500 mg, 1.1 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (237 mg, 197 μL , 1.3 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (487 mg, 4.1 mL, 28.6 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (462.54 g/mol, 661 mg, 1.4 mmol) konvertiert.

Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (1.4 g, 9.6 mL, 38.2 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15bd (380.41 g/mol, 521 mg, 1.4 mmol, 58% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als gelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.01 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.79 (d, J = 7.95 Hz, 1H), 7.71 (appddd, J = 2.14, 7.64, 11.62 Hz, 1H), 7.44 - 7.58 (m, 2H), 6.64 (br. s., 2H), 3.80 (apptq, J = 4.40, 8.40 Hz, 1H), 2.94 (dd, J = 3.06, 11.62 Hz, 1H), 2.79 (td, J = 4.00, 12.23 Hz, 1H), 2.38 - 2.48 (m, 2H), 1.81 (td, J = 3.20, 8.90 Hz, 1H), 1.63 (td, J = 4.10, 12.80 Hz, 1H), 1.51 (dq, J = 4.10, 11.00 Hz, 1H), 1.35 - 1.46 (m, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 162.8, 154.9, 145.3, 141.0, 122.7, 119.5, 118.7, 118.5, 114.9, 114.6, 109.5, 50.8, 49.6, 49.3, 46.7, 45.5, 30.4, 25.1. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 4.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 362.12 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 363.2 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15ae

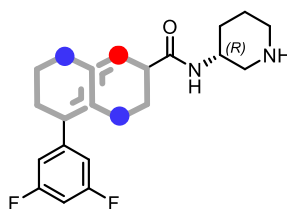


Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 159 mg, 0.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19e ($\text{C}_9\text{H}_5\text{ClF}_2\text{N}$, 199.59 g/mol, 100 mg, 0.5 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (135 mg, 0.1 mL, 0.8 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (437.51 g/mol, 160 mg, 0.4 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (76 mg, 63 μL , 0.4 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (156 mg, 1.3 mL, 9.1 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (480.54 g/mol, 115 mg, 0.2 mmol) konvertiert.

Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.2 g, 1.7 mL, 6.7 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15ae (380.41 g/mol, 59 mg, 0.2 mmol, 49 % (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als feines, kristallines, gelbliches Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.99 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 7.78 Hz, 1H), 7.27 - 7.41 (m, 3H), 6.63 (br. s., 2H), 3.83 (apptq, *J* = 4.40, 8.40 Hz, 1H), 2.97 (dd, *J* = 3.20, 11.60 Hz, 1H), 2.83 (appd, *J* = 12.05 Hz, 1H), 2.38 - 2.48 (m, 2H), 1.82 (appd, *J* = 10.50 Hz, 1H), 1.65 (td, *J* = 3.40, 12.21 Hz, 1H), 1.51 (dq, *J* = 4.10, 11.70 Hz, 1H), 1.43 (appt, *J* = 11.60 Hz, 1H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 162.7, 154.8, 120.2, 110.4, 109.0, 99.7, 59.7, 50.3, 46.6, 45.5, 30.3, 24.8, 20.8, 14.0. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [*t*_R] = 0.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 380.11 für [M+H⁺], *m/z* gefunden: 381.1 [M+H⁺].

Darstellung des NDI-Derivats (*R*)-15be

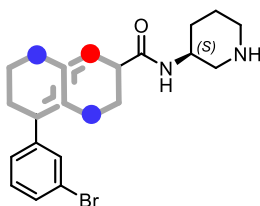


Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*R*)-17b (316.42 g/mol, 165.6 mg, 0.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β-Chlorzimtsäurenitrils 19e (C₉H₅ClF₂N, 199.59 g/mol, 94 mg, 0.5 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (141 mg, 0.1 mL, 0.8 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (437.51 g/mol, 174 mg, 0.4 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (82 mg, 69 μL, 0.4 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (169 mg, 1.4 mL, 9.9 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (480.54 g/mol, 106 mg, 0.2 mmol) konvertiert.

Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.2 g, 1.5 mL, 6.1 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*R*)-15be (380.41 g/mol, 83 mg, 0.2 mmol, 42% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als weißgelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.99 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 7.78 Hz, 1H), 7.27 - 7.41 (m, 3H), 6.63 (br. s., 2H), 3.83 (apptq, *J* = 4.40, 8.40 Hz, 1H), 2.97 (dd, *J* = 3.20, 11.60 Hz, 1H), 2.83 (appd, *J* = 12.05 Hz, 1H), 2.38 - 2.48 (m, 2H), 1.82 (appd, *J* = 10.50 Hz, 1H), 1.65 (td, *J* = 3.40, 12.21 Hz, 1H), 1.51 (dq, *J* = 4.10, 11.70 Hz, 1H), 1.43 (appt, *J* = 11.60 Hz, 1H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 162.7, 154.8, 120.2, 110.4, 109.0, 99.7, 59.7, 50.3, 46.6, 45.5, 30.3, 24.8, 20.8, 14.0. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [*t*_R] = 4.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 380.11 für [M+H⁺], *m/z* gefunden: 381.1 [M+H⁺].

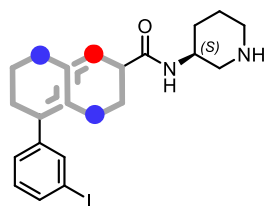
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15af



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 6.5 g, 20.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19f** (C_9H_5BrClN , 242.50 g/mol, 4468 mg, 18.4 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (5.5 g, 5.7 mL, 30.7 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (480.42 g/mol, 1500 mg, 3.1 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (647 mg, 539 μ L, 3.4 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (1.3 g, 11.2 mL, 78.1 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (480.42 g/mol, 1171 mg, 2.43 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (2.3 g, 15.6 mL, 62.2 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt.

Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15af (423.33 g/mol, 724 mg, 1.7 mmol, 8% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer geringen Ausbeute als weißer Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.03 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.77 - 7.83 (m, 2H), 7.64 (td, J = 0.80, 7.80 Hz, 1H), 7.59 (ddd, J = 0.76, 1.83, 8.10 Hz, 1H), 7.43 (appt, J = 7.90 Hz, 1H), 6.67 (br. s., 2H), 3.80 (apptq, J = 4.40, 8.40 Hz, 1H), 2.94 (dd, J = 3.20, 11.60 Hz, 1H), 2.79 (td, J = 3.20, 12.05 Hz, 1H), 2.43 (dquin, J = 1.50, 11.00 Hz, 2H), 1.81 (td, J = 3.20, 8.85 Hz, 1H), 1.62 (td, J = 4.10, 12.80 Hz, 1H), 1.50 (dq, J = 4.10, 11.00 Hz, 1H), 1.41 (tt, J = 4.00, 11.10 Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 162.8, 154.9, 145.1, 141.2, 135.2, 131.6, 131.4, 127.8, 124.5, 122.6, 119.2, 109.5, 50.8, 46.8, 45.5, 30.4, 25.1. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 0.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 422.04 für $[M+H^+]$, m/z gefunden: 425.1 [$^{81}Br-M+H^+$] und 423.1 [$^{79}Br-M+H^+$].

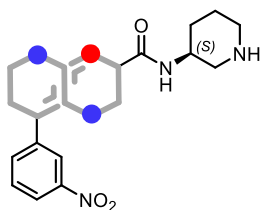
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15ag

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 791 mg, 2.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19g** (C₉H₅ClIN, 289.50 g/mol, 651 mg, 2.3 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (675 mg, 0.7 mL, 3.8 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (527.42 g/mol, 698 mg, 1.3 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.A2 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (274 mg, 229 μ L, 1.5 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (563 mg, 4.7 mL, 33.1 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (570.45 g/mol, 720 mg, 1.3 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (1.3 g, 8.8 mL, 35.1 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15ag (470.33 g/mol, 593 mg, 1.3 mmol, 50% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als flockiges, cremefarbenes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.00 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.95 (t, J = 1.66 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 7.77 Hz, 1H), 7.76 (appd, J = 7.86 Hz, 1H), 7.65 (ddd, J = 0.80, 2.00, 8.20 Hz, 1H), 7.27 (t, J = 7.86 Hz, 1H), 6.66 (br. s., 2H), 3.87 - 3.95 (m, 1H), 3.06 (appdd, J = 3.38, 11.74 Hz, 1H), 2.93 (td, J = 3.70, 12.49 Hz, 1H), 2.52 - 2.64 (m, 2H), 1.81 - 1.87 (m, 1H), 1.68 - 1.75 (m, 1H), 1.42 - 1.59 (m, 2H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-d₆) δ = 163.2, 154.9, 145.5, 141.6, 137.4, 135.2, 133.6, 131.4, 124.8, 119.0, 109.1, 95.7, 49.5, 45.6, 44.6, 29.6, 23.8. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 5.2 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 470.03 für [M+H⁺], m/z gefunden: 471.1 [M+H⁺].

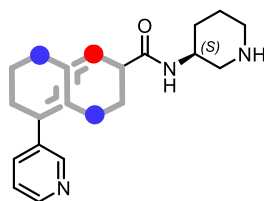
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15ah



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 790 mg, 2.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19h** ($C_9H_5ClN_2O_2$, 208.60 g/mol, 469 mg, 2.3 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (675 mg, 0.7 mL, 3.8 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (446.53 g/mol, 500 mg, 1.1 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (232 mg, 193 μ L, 1.2 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (477 mg, 4 mL, 28 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (489.55 g/mol, 356 mg, 0.7 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.7 g, 5.1 mL, 20.2 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15ah (389.43 g/mol, 280 mg, 0.7 mmol, 29% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als flockiges, gelbes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

1H NMR (700 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.01 (br. s., 1H), 8.42 (s, 1H), 8.35 (t, J = 2.04 Hz, 1H), 8.23 (ddd, J = 0.65, 2.30, 8.20 Hz, 1H), 8.11 (ddd, J = 0.80, 1.60, 7.74 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 7.74 Hz, 1H), 7.77 (t, J = 8.07 Hz, 1H), 6.71 (br. s., 2H), 3.93 - 4.00 (m, 2H), 3.12 (appdd, J = 3.55, 11.94 Hz, 1H), 2.99 (td, J = 3.20, 12.69 Hz, 1H), 2.66 (dd, J = 10.33, 11.62 Hz, 1H), 2.61 (appt, J = 11.20 Hz, 1H), 1.83 - 1.91 (m, 1H), 1.71 - 1.78 (m, 1H), 1.49 - 1.61 (m, 2H). ^{13}C NMR (176 MHz, DMSO- d_6) δ = 162.8, 154.9, 148.4, 145.3, 140.6, 134.4, 131.6, 131.1, 123.2, 119.7, 109.8, 62.1, 48.7, 45.3, 44.4, 29.4, 25.5. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 4.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 389.12 für $[M+H]^+$, m/z gefunden: 390.1 $[M+H]^+$.

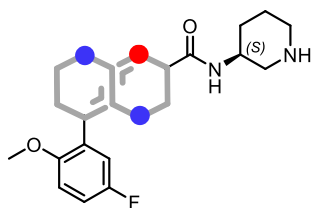
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15ai

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 584 mg, 1.9 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19i** (C₈H₅ClN₂, 164.59 g/mol, 304 mg, 1.9 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (499 mg, 0.5 mL, 2.8 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (402.52 g/mol, 486 mg, 1.2 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (250 mg, 209 μ L, 1.3 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (514 mg, 4.3 mL, 30.2 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (445.54 g/mol, 513 mg, 1.2 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.D2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (1.2 g, 8 mL, 32 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15ai (345.42 g/mol, 388 mg, 1.1 mmol, 55% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als klumpiges, gelbes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.96 (s, 1H), 9.57 (app br. s., 2H), 9.09 (app br. s., 1H), 8.79 (d, J = 3.22 Hz, 1H), 8.51 (appd, J = 7.81 Hz, 1H), 8.41 - 8.47 (m, 2H), 7.92 (t, J = 6.20 Hz, 1H), 6.43 - 6.93 (m, 1H), 4.20 - 4.30 (m, 1H), 3.24 (appd, J = 9.99 Hz, 1H), 3.14 (appd, J = 11.63 Hz, 1H), 2.87 - 2.96 (m, 1H), 2.79 (app br. s., 1H), 1.88 (appd, J = 9.58 Hz, 2H), 1.71 - 1.82 (m, 1H), 1.65 (appq, J = 10.01 Hz, 1H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-d₆) δ = 162.8, 154.8, 145.3, 143.7, 141.2, 139.0, 137.4, 131.2, 126.9, 121.3, 111.4, 45.9, 43.3, 42.6, 28.0, 20.5. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 3.1 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 345.13 für [M+H⁺], m/z gefunden: 346.2 [M+H⁺].

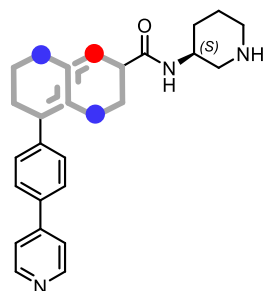
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15aj



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 712 mg, 2.3 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19j ($C_{10}H_7ClFNO$, 211.62 g/mol, 476 mg, 2.3 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (608 mg, 0.6 mL, 3.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (449.55 g/mol, 539 mg, 1.1 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (249 mg, 207 μ L, 1.3 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (511 mg, 4.3 mL, 30 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (492.57 g/mol, 474 mg, 1 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (1 g, 6.7 mL, 26.8 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15aj (392.45 g/mol, 374 mg, 1 mmol, 38% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als flockiges, cremefarbenes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

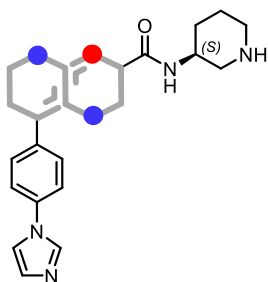
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.96 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.90 (d, J = 7.95 Hz, 1H), 7.47 (appdd, J = 2.10, 9.50 Hz, 1H), 7.17 - 7.27 (m, 2H), 6.60 (br. s., 2H), 3.95 - 4.01 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.10 (appdd, J = 3.36, 11.80 Hz, 1H), 2.99 (td, J = 3.20, 12.70 Hz, 1H), 2.67 (dd, J = 10.27, 11.74 Hz, 1H), 2.59 (appt, J = 11.10 Hz, 1H), 1.82 - 1.91 (m, 1H), 1.74 (dd, J = 3.55, 9.54 Hz, 1H), 1.46 - 1.64 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 163.3, 155.1, 152.1, 144.0, 137.4, 122.6, 120.2, 115.7, 114.1, 113.8, 113.6, 110.4, 56.5, 48.7, 45.2, 44.4, 29.4, 23.3. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 4.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 392.13 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 393.2 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15ak

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 713 mg, 2.3 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19k (C₁₄H₉ClN₂, 240.69 g/mol, 542 mg, 2.3 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (608 mg, 0.6 mL, 3.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (478.62 g/mol, 124 mg, 0.3 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (54 mg, 45 μ L, 0.3 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (110 mg, 1 mL, 6.5 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (521.64 g/mol, 30 mg, 0.1 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C3 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.1 g, 0.4 mL, 1.6 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15ak (421.52 g/mol, 22 mg, 0.1 mmol, 2% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer geringen Ausbeute als cremefarbenes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.98 (s, 1H), 8.66 (dd, J = 1.53, 4.80 Hz, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.15 (appt, J = 7.00 Hz, 1H), 7.90 - 7.99 (m, 2H), 7.75 - 7.81 (m, 4H), 6.72 (br. s, 2H), 4.09 - 4.24 (m, 1H), 3.21 (appd, J = 12.36 Hz, 1H), 2.89 (appt, J = 11.29 Hz, 1H), 2.82 (appt, J = 10.76 Hz, 1H), 2.63 (appt, J = 1.80 Hz, 1H), 2.53 - 2.62 (m, 2H), 1.88 - 1.92 (m, 1H), 1.66 (appquin, J = 12.00 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 163.2, 158.1, 157.8, 155.1, 150.5, 145.9, 145.6, 137.3, 133.5, 128.0, 126.2, 120.9, 118.6, 116.1, 114.0, 108.6, 28.2, 21.2. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 3.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 421.16 für [M+H⁺], m/z gefunden: 422.2 [M+H⁺].

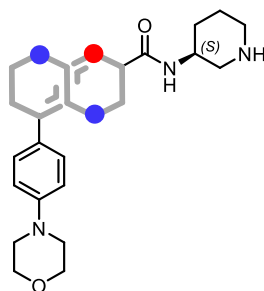
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15al



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-**17a** (316.42 g/mol, 712 mg, 2.3 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19l** (C₁₂H₈ClN₃, 229.67 g/mol, 517 mg, 2.3 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (608 mg, 0.6 mL, 3.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (467.59 g/mol, 267 mg, 0.6 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (118 mg, 99 μ L, 0.6 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (243 mg, 2 mL, 14.3 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (510.62 g/mol, 41 mg, 0.1 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C3 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.1 g, 0.6 mL, 2.2 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-**15al** (410.50 g/mol, 30 mg, 0.1 mmol, 3% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer geringen Ausbeute als cremefarbenes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.08 (br. s., 1H), 8.33 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.81 (appt, J = 1.14 Hz, 1H), 7.74 - 7.79 (m, 5H), 7.13 (apps, 1H), 6.65 (br. s, 2H), 3.74 - 3.83 (m, 1H), 2.93 (dd, J = 3.40, 11.80 Hz, 1H), 2.77 (td, J = 3.70, 12.05 Hz, 1H), 2.38 - 2.48 (m, 2H), 1.76 - 1.86 (m, 1H), 1.61 (td, J = 4.20, 12.80 Hz, 1H), 1.46 - 1.56 (m, 1H), 1.34 - 1.44 (m, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 158.6, 158.2, 155.5, 142.4, 137.4, 135.9, 131.8, 130.6, 127.6, 121.4, 119.0, 118.1, 116.6, 51.6, 47.4, 46.0, 31.1, 26.1. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 4.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 410.15 für [M+H⁺], m/z gefunden: 411.2 [M+H⁺].

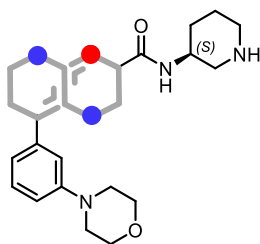
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15am

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 712 mg, 2.3 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19m** (C₁₃H₁₃ClN₂O, 248.71 g/mol, 560 mg, 2.3 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (608 mg, 0.6 mL, 3.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (486.64 g/mol, 104 mg, 0.2 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (44 mg, 37 μ L, 0.2 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (91 mg, 0.8 mL, 5.3 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (529.66 g/mol, 46 mg, 0.1 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.1 g, 0.6 mL, 2.4 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15am (429.54 g/mol, 16 mg, 0.03 mmol, 1% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer geringen Ausbeute als gelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.06 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.69 (d, J = 7.90 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 8.80 Hz, 2H), 7.01 (d, J = 8.93 Hz, 2H), 6.60 (br. s, 2H), 3.81 - 3.92 (m, 1H), 3.74 (t, J = 4.40 Hz, 4H), 3.50 (s, 1H), 3.18 (t, J = 4.80 Hz, 4H), 3.00 (appd, J = 11.13 Hz, 1H), 2.87 (appd, J = 11.37 Hz, 1H), 2.52 - 2.59 (m, 2H), 1.77 - 1.86 (m, 1H), 1.63 - 1.71 (m, 1H), 1.49 (appspt, J = 10.80 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ = 163.3, 154.9, 151.3, 145.5, 144.5, 126.3, 123.5, 116.3, 115.0, 106.8, 65.9, 47.6, 29.9, 24.4. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 4.3 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 429.18 für [M+H⁺], m/z gefunden: 430.2 [M+H⁺].

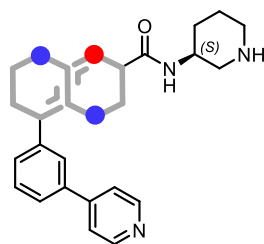
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15an



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 712 mg, 2.3 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19n (C₁₃H₁₃ClN₂O, 248.71 g/mol, 560 mg, 2.3 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (608 mg, 0.6 mL, 3.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (486.64 g/mol, 129 mg, 0.3 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (55 mg, 46 μ L, 0.3 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (113 mg, 1 mL, 6.6 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (529.66 g/mol, 99 mg, 0.2 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.2 g, 1.3 mL, 5.2 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15an (429.54 g/mol, 72 mg, 0.2 mmol, 7% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer geringen Ausbeute als gelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.05 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.78 (d, J = 7.93 Hz, 1H), 7.32 (appt, J = 7.86 Hz, 1H), 7.05 - 7.13 (m, 2H), 7.00 (dd, J = 1.98, 8.39 Hz, 1H), 6.62 (br. s., 2H), 3.81 - 3.89 (m, 1H), 3.76 (t, J = 4.60 Hz, 4H), 3.17 (t, J = 4.90 Hz, 4H), 2.99 (dd, J = 2.90, 11.60 Hz, 1H), 2.85 (td, J = 3.20, 12.21 Hz, 1H), 2.44 - 2.49 (m, 1H), 1.82 (appd, J = 8.54 Hz, 1H), 1.66 (td, J = 4.00, 12.82 Hz, 1H), 1.37 - 1.58 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ = 163.5, 155.4, 152.1, 145.6, 144.6, 134.2, 130.5, 118.6, 116.8, 116.2, 112.0, 108.9, 66.5, 50.7, 48.7, 46.7, 45.7, 30.6, 25.1. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 4.2 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 429.18 für [M+H⁺], m/z gefunden: 430.2 [M+H⁺].

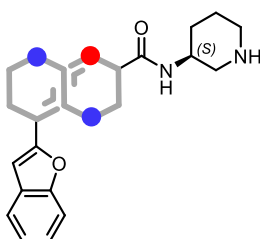
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15ao

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 713 mg, 2.3 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19o ($C_{14}H_9ClN_2$, 240.69 g/mol, 542 mg, 2.3 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (608 mg, 0.6 mL, 3.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (478.62 g/mol, 93 mg, 0.2 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (40 mg, 34 μ L, 0.2 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (83 mg, 0.7 mL, 4.9 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (521.64 g/mol, 40 mg, 0.1 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C3 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.1 g, 0.5 mL, 2.1 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15ao (421.52 g/mol, 31 mg, 0.1 mmol, 3% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer geringen Ausbeute als cremefarbenes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.03 (s, 1H), 8.68 (dd, J = 1.60, 4.80 Hz, 2H), 8.35 (s, 1H), 7.96 (t, J = 1.60 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 7.78 Hz, 1H), 7.82 (td, J = 0.90, 7.63 Hz, 1H), 7.78 (dd, J = 1.68, 4.80 Hz, 1H), 7.75 (td, J = 1.10, 7.80 Hz, 1H), 7.63 (t, J = 7.80 Hz, 1H), 6.67 (br. s, 2H), 3.89 - 4.00 (m, 1H), 3.08 (dd, J = 3.28, 11.83 Hz, 1H), 2.94 (td, J = 3.40, 12.36 Hz, 1H), 2.54 - 2.66 (m, 2H), 1.82 - 1.89 (m, 1H), 1.69 - 1.76 (m, 1H), 1.46 - 1.62 (m, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 163.1, 155.1, 150.3, 146.6, 145.3, 142.8, 138.7, 134.0, 130.4, 127.6, 126.2, 123.7, 121.4, 119.0, 118.6, 109.1, 49.1, 45.4, 29.6, 23.4. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 4.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 421.16 für $[M+H^+]$, m/z gefunden: 422.2 $[M+H^+]$ und 322.0 $[M-C_5H_{11}N_2+H^+]$.

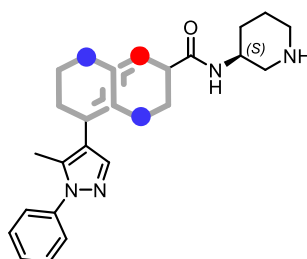
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15ap



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 712 mg, 2.3 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19p ($C_{11}H_6ClNO$, 203.63 g/mol, 458 mg, 2.3 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (608 mg, 0.6 mL, 3.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (441.55 g/mol, 485 mg, 1.1 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (228 mg, 190 μ L, 1.2 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (468 mg, 3.9 mL, 27.5 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (484.58 g/mol, 516 mg, 1.1 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (1.1 g, 7.4 mL, 29.6 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15ap (384.45 g/mol, 367 mg, 1 mmol, 38% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als cremefarbenes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.06 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.87 (d, J = 7.82 Hz, 1H), 7.55 - 7.73 (m, 2H), 7.32 - 7.40 (m, 2H), 7.29 (ddd, J = 0.73, 7.00, 8.00 Hz, 1H), 6.69 (br. s., 2H), 3.74 - 3.88 (m, 1H), 2.90 - 3.03 (m, 1H), 2.81 (td, J = 3.20, 12.23 Hz, 1H), 2.38 - 2.49 (m, 2H), 1.77 - 1.89 (m, 1H), 1.64 (td, J = 4.00, 12.70 Hz, 1H), 1.36 - 1.58 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 162.8, 154.9, 154.1, 149.8, 144.8, 131.9, 128.5, 125.4, 123.7, 121.5, 119.0, 111.1, 109.3, 103.3, 50.6, 46.7, 45.4, 30.3, 25.0. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 5.0 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 384.13 für $[M+H]^+$, m/z gefunden: 385.2 $[M+H]^+$.

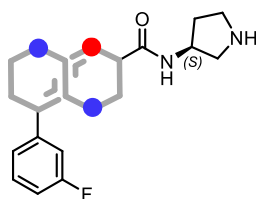
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15aq

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17a (316.42 g/mol, 712 mg, 2.3 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19q (C₁₃H₁₀ClN₃, 243.69 g/mol, 548 mg, 2.3 mmol, 1 äquiv.) und Natriummethoxid (608 mg, 0.6 mL, 3.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (481.62 g/mol, 675 mg, 1.4 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (290 mg, 242 μ L, 1.5 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (597 mg, 5 mL, 35 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (524.64 g/mol, 502 mg, 1 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (1 g, 6.7 mL, 26.6 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15aq (424.52 g/mol, 400 mg, 0.9 mmol, 38% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als cremefarbenes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.13 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.71 (d, J = 7.82 Hz, 1H), 7.54 - 7.62 (m, 4H), 7.46 - 7.54 (m, 1H), 6.61 (br. s., 2H), 3.79 - 3.89 (m, 1H), 3.62 (br. s., 1H), 2.98 (dd, J = 3.06, 11.62 Hz, 1H), 2.84 (td, J = 2.50, 12.23 Hz, 1H), 2.50 (br. s., 3H), 2.38 - 2.49 (m, 2H), 1.78 - 1.88 (m, 1H), 1.66 (td, J = 3.90, 12.72 Hz, 1H), 1.37 - 1.59 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ = 163.1, 154.9, 145.1, 138.9, 138.3, 136.0, 135.7, 129.3, 128.2, 125.1, 117.9, 114.7, 107.0, 50.5, 46.4, 45.3, 30.3, 24.8, 11.9. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 0.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 424.17 für [M+H⁺], m/z gefunden: 425.2 [M+H⁺].

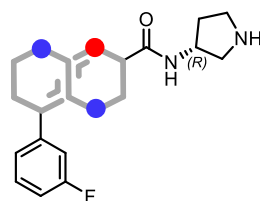
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15ca



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17c (302.39 g/mol, 750 mg, 2.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19a** (C₉H₅ClFN, 181.60 g/mol, 405 mg, 2.2 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (670 mg, 0.7 mL, 3.7 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (405.49 g/mol, 800 mg, 2 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (409 mg, 341 μ L, 2.2 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (840 mg, 7.1 mL, 49.3 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (448.52 g/mol, 388 mg, 0.9 mmol) konvertiert.

Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.9 g, 6 mL, 24.1 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15ca (348.40 g/mol, 293 mg, 0.8 mmol, 34% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als klumpiger, gelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.00 (d, J = 13.85 Hz, 1H), 8.24 - 8.34 (m, 2H), 7.51 (appq, J = 7.20 Hz, 1H), 7.45 - 7.48 (m, 1H), 7.43 (appd, J = 9.95 Hz, 1H), 7.24 (dt, J = 2.23, 8.20 Hz, 1H), 6.67 (br. s., 2H), 4.42 - 4.48 (m, 1H), 4.37 (br. s., 1H), 3.14 - 3.25 (m, 2H), 2.96 - 3.08 (m, 2H), 2.10 (appsxt, J = 7.40 Hz, 1H), 1.85 - 1.93 (m, 1H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ = 163.4, 161.8, 154.9, 145.3, 142.1, 135.3, 131.5, 121.7, 119.2, 115.6, 112.1, 109.2, 50.6, 49.5, 44.4, 31.0. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 4.6 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 348.11 für [M+H⁺], m/z gefunden: 349.1 [M+H⁺].

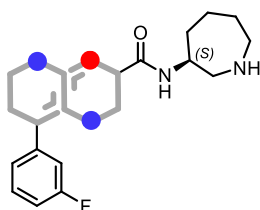
Darstellung des NDI-Derivats (*R*)-15da

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*R*)-17d (302.39 g/mol, 750 mg, 2.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19a** (C₉H₅ClFN, 181.60 g/mol, 405 mg, 2.2 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (670 mg, 0.7 mL, 3.7 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (405.49 g/mol, 789 mg, 2 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (403 mg, 336 μ L, 2.1 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (828 mg, 7 mL, 48.7 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (448.52 g/mol, 378 mg, 0.8 mmol) konvertiert.

Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.9 g, 5.9 mL, 23.4 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*R*)-15da (348.40 g/mol, 291 mg, 0.8 mmol, 34% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als klumpiger, gelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.00 (d, J = 13.85 Hz, 1H), 8.24 - 8.34 (m, 2H), 7.51 (appq, J = 7.20 Hz, 1H), 7.45 - 7.48 (m, 1H), 7.43 (appd, J = 9.95 Hz, 1H), 7.24 (dt, J = 2.23, 8.20 Hz, 1H), 6.67 (br. s., 2H), 4.42 - 4.48 (m, 1H), 4.37 (br. s., 1H), 3.14 - 3.25 (m, 2H), 2.96 - 3.08 (m, 2H), 2.10 (appsxt, J = 7.40 Hz, 1H), 1.85 - 1.93 (m, 1H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ = 163.4, 161.8, 154.9, 145.3, 142.1, 135.3, 131.5, 121.7, 119.2, 115.6, 112.1, 109.2, 50.6, 49.5, 44.4, 31.0. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 4.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 362.12 für [M+H⁺], m/z gefunden: 363.2 [M+H⁺].

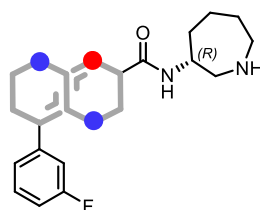
Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15ea



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-**17e** (330.45 g/mol, 800 mg, 2.4 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19a** (C₉H₅ClFN, 181.60 g/mol, 396 mg, 2.2 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (654 mg, 0.7 mL, 3.6 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (433.55 g/mol, 193 mg, 0.4 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (92 mg, 77 μ L, 0.5 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (190 mg, 1.6 mL, 11.1 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (476.57 g/mol, 165 mg, 0.4 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.4 g, 2.4 mL, 9.6 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-**15ea** (376.45 g/mol, 126 mg, 0.3 mmol, 14% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer geringen Ausbeute als klumpiger, weißgelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.03 (br. s., 1H), 8.28 (s, 1H), 7.78 (d, J = 7.58 Hz, 1H), 7.38 - 7.59 (m, 3H), 7.23 (ddt, J = 1.50, 2.10, 8.10 Hz, 1H), 6.64 (br. s., 2H), 3.85 - 4.09 (m, 1H), 2.92 (dd, J = 4.28, 13.57 Hz, 1H), 2.62 - 2.83 (m, 3H), 1.74 - 1.85 (m, 1H), 1.42 - 1.73 (m, 5H).
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ = 163.8, 162.5, 154.9, 144.9, 141.5, 135.2, 131.5, 121.7, 119.3, 115.5, 112.1, 109.7, 52.9, 51.0, 48.7, 33.3, 30.4, 22.4. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 4.9 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 376.14 für [M+H⁺], m/z gefunden: 377.2 [M+H⁺].

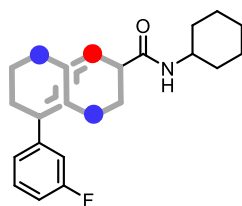
Darstellung des NDI-Derivats (*R*)-15fa

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*R*)-17f (330.45 g/mol, 750 mg, 2.3 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils 19a (C₉H₅ClFN, 181.60 g/mol, 371 mg, 2 mmol, 0.9 äquiv) und Natriummethoxid (613 mg, 0.6 mL, 3.4 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (433.55 g/mol, 600 mg, 1.4 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (287 mg, 239 μ L, 1.5 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (589 mg, 4.9 mL, 34.6 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (476.57 g/mol, 412 mg, 0.9 mmol) konvertiert.

Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.9 g, 6 mL, 24 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*R*)-15fa (376.45 g/mol, 324 mg, 0.9 mmol, 38% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als weißgelber, klumpiger Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.03 (br. s., 1H), 8.28 (s, 1H), 7.78 (d, J = 7.58 Hz, 1H), 7.38 - 7.59 (m, 3H), 7.23 (ddt, J = 1.50, 2.10, 8.10 Hz, 1H), 6.64 (br. s., 2H), 3.85 - 4.09 (m, 1H), 2.92 (dd, J = 4.28, 13.57 Hz, 1H), 2.62 - 2.83 (m, 3H), 1.74 - 1.85 (m, 1H), 1.42 - 1.73 (m, 5H).
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ = 163.8, 162.5, 154.9, 144.9, 141.5, 135.2, 131.5, 121.7, 119.3, 115.5, 112.1, 109.7, 52.9, 51.0, 48.7, 33.3, 30.4, 22.4. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 4.9 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 376.14 für [M+H⁺], m/z gefunden: 377.1 [M+H⁺].

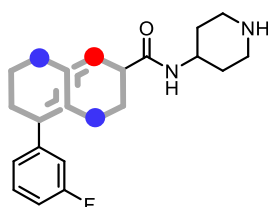
Darstellung des NDI-Derivats 15ga



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid **17g** (215.32 g/mol, 1500 mg, 7 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19a** (C_9H_5ClFN , 181.60 g/mol, 1139 mg, 6.3 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (1.9 g, 1.9 mL, 10.5 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (318.41 g/mol, 1362 mg, 4.3 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.A2 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (886 mg, 738 μ L, 4.7 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (1.8 g, 15.3 mL, 106.9 mmol) zum NDI-Derivat **15ga** konvertiert. Nach erfolgter Aufreinigung mittels der Reinigungsmethode AT.C1 und nachfolgender Sublimationstrocknung konnte das finale Produkt **15ga** (361.44 g/mol, 1536 mg, 4.3 mmol, 61% (über 2 Schritte)) in einer moderaten Ausbeute als weißer Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.09 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.91 (appd, J = 7.83 Hz, 1H), 7.39 - 7.58 (m, 3H), 7.23 (dt, J = 1.50, 8.00 Hz, 1H), 6.63 (br. s., 2H), 3.72 (tq, J = 4.40, 8.50 Hz, 1H), 1.77 (appdd, J = 12.47, 24.60 Hz, 3H), 1.60 (appd, J = 12.59 Hz, 1H), 1.31 (appspt, J = 12.00 Hz, 4H), 1.04 - 1.18 (m, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ = 164.2, 163.1, 161.8, 155.4, 145.5, 142.0, 135.8, 131.9, 122.1, 119.7, 115.9, 112.6, 110.1, 49.0, 32.7, 25.6. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 4.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 361.13 für $[M+H^+]$, m/z gefunden: 362.0 $[M+H^+]$ und 384.0 $[M+Na^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats 15ha

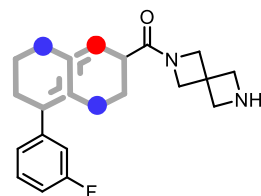


Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid **17h** (316.42 g/mol, 800 mg, 2.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19a** (C_9H_5ClFN , 181.60 g/mol, 413 mg, 2.3 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (683 mg, 0.7 mL, 3.8 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (419.52 g/mol, 426 mg, 1 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (210 mg, 175 μ L, 1.1 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (432 mg, 3.6 mL, 25.4 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (462.54 g/mol, 365 mg, 0.8 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.8 g, 5.5 mL, 21.9 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats **17ha** (362.42 g/mol, 281 mg, 0.8 mmol, 31% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als gelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.04 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.09 (d, J = 7.48 Hz, 1H), 7.39 - 7.56 (m, 4H), 7.24 (dt, J = 1.80, 8.20 Hz, 1H), 6.64 (br. s., 2H), 3.83 - 3.95 (m, 1H), 3.54 (br. s., 1H), 3.14 (appd, J = 12.36 Hz, 2H), 2.72 (t, J = 11.60 Hz, 2H), 1.82 (appd, J = 10.99 Hz, 2H), 1.61 (appq, J = 11.50 Hz, 2H). **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 163.0, 161.6, 154.9, 145.5, 141.8, 135.2, 131.5, 121.9, 119.2, 115.6, 112.1, 109.4, 46.2, 43.9, 30.5. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 4.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 362.12 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 363.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$ und 385.2 $[\text{M}+\text{Na}^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats **15ia**



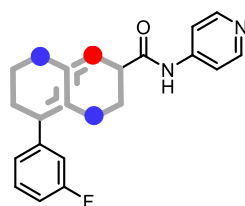
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid **17i** (314.41 g/mol, 600 mg, 1.9 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19a** ($\text{C}_9\text{H}_5\text{ClFN}$, 181.60 g/mol, 312 mg, 1.7 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (515 mg, 0.5 mL, 2.3 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (417.50 g/mol, 65 mg, 0.2 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (32 mg, 27 μ L, 0.2 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (66 mg, 0.6 mL, 3.9 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (460.53 g/mol, 28 mg, 0.1 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.1 g, 0.4 mL, 1.7 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt.

Die freie Base des NDI-Derivats **15ia** (360.41 g/mol, 16.2 mg, 0.04 mmol, 2% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer geringen Ausbeute als gelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

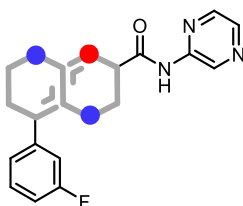
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.07 (br. s., 1H), 8.27 (s, 1H), 7.96 (appd, J = 7.70 Hz, 1H), 7.38 - 7.57 (m, 3H), 7.24 (ddt, J = 1.40, 2.20, 8.30 Hz, 3H), 6.63 (br. s., 2H), 3.71 (s, 4H), 3.22 (s, 4H). **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 4.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 362.12 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 363.2 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats **15ja**



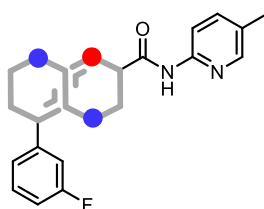
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid **17j** (210.26 g/mol, 1390 mg, 6.6 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19a** ($\text{C}_9\text{H}_5\text{ClFN}$, 181.60 g/mol, 1080 mg, 6 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (1.8 g, 1.8 mL, 9.9 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (419.52 g/mol, 553 mg, 1.3 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.D1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (366 mg, 305 μL , 1.9 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (0.8 g, 6.3 mL, 44.1 mmol) zum NDI-Derivat **15ja** konvertiert. Nach erfolgter Aufreinigung mittels der Reinigungsmethode AT.E, basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und nachfolgender Sublimationstrocknung konnte das finale Produkt **15ja** (356.38 g/mol, 602 mg, 1.7 mmol, 26% (über 2 Schritte)) in einer moderaten Ausbeute als gelborangener Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.25 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 8.47 (appd, J = 6.10 Hz, 2H), 8.38 (s, 1H), 7.74 (dd, J = 1.40, 5.30 Hz, 1H), 7.48 - 7.56 (m, 3H), 7.24 - 7.32 (m, 1H), 6.79 (br. s., 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ = 163.4, 162.9, 161.8, 154.8, 150.2, 146.8, 145.6, 143.7, 135.0, 131.6, 121.9, 119.4, 116.0, 114.5, 112.4, 108.8. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 4.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 356.07 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 357.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats **15ka**

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid **17k** (211.24 g/mol, 528 mg, 2.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19a** (C_9H_5ClFN , 181.60 g/mol, 409 mg, 2.3 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (0.7 g, 0.7 mL, 3.8 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (313.34 g/mol, 286 mg, 0.9 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (189 mg, 157 μ L, 1 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (0.4 g, 3.3 mL, 22.8 mmol) zum NDI-Derivat **15ka** konvertiert. Nach erfolgter Aufreinigung mittels der Reinigungsmethode AT.E, basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und nachfolgender Sublimationstrocknung konnte das finale Produkt **15ka** (357.36 g/mol, 319 mg, 0.9 mmol, 36% (über 2 Schritte)) in einer moderaten Ausbeute als klumpiger, gelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.72 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 9.26 (d, J = 1.38 Hz, 1H), 8.47 (dd, J = 1.54, 2.45 Hz, 1H), 8.40 (d, J = 2.52 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.44 - 7.63 (m, 4H), 7.28 (ddt, J = 1.40, 2.40, 8.40 Hz, 1H), 6.76 (br. s., 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ = 163.4, 162.7, 161.7, 154.8, 148.7, 146.8, 144.3, 142.6, 139.9, 138.0, 135.0, 131.6, 121.9, 119.3, 116.0, 112.4, 108.9. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 4.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 357.07 für $[M+H^+]$, m/z gefunden: 358.1 $[M+H^+]$ und 380.1 $[M+Na^+]$.

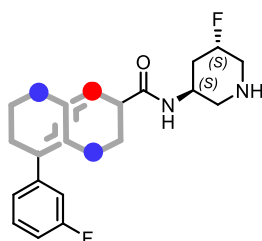
Darstellung des NDI-Derivats **15la**

Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid **17l** (224.28 g/mol, 550 mg, 2.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19a** (C_9H_5ClFN , 181.60 g/mol, 401 mg, 2.2 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (0.7 g, 0.7 mL, 3.7 mmol) zur Reaktion gebracht wurde.

Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (327.38 g/mol, 413 mg, 1.3 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.A2 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (261 mg, 218 μ L, 1.4 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (0.5 g, 4.5 mL, 31.5 mmol) zum NDI-Derivat **15la** konvertiert. Nach erfolgter Aufreinigung mittels der Reinigungsmethode AT.C2 und nachfolgender Sublimationstrocknung konnte das finale Produkt **15la** (370.40 g/mol, 463 mg, 1.3 mmol, 51% (über 2 Schritte)) in einer moderaten Ausbeute als gelber Feststoff mit hoher Reinheit isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.17 (s, 1H), 9.83 (app br. s., 1H), 8.31 (s, 1H), 8.22 (app br. s., 1H), 7.92 (d, J = 8.39 Hz, 1H), 7.66 (dd, J = 1.98, 8.54 Hz, 2H), 7.46 - 7.55 (m, 3H), 7.27 (ddt, J = 1.00, 2.60, 8.20 Hz, 1H), 6.60 - 6.86 (m, 2H), 2.28 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 164.1, 162.1, 155.7, 149.7, 148.3, 143.9, 138.9, 135.6, 132.3, 129.4, 124.5, 122.6, 120.0, 116.2, 115.3, 112.9, 30.7, 17.9. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 5.2 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 370.09 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 371.0 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

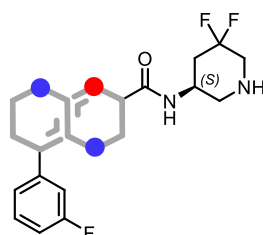
Darstellung des NDI-Derivats (3*S*,5*S*)-15ma



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (3*S*,5*S*)-**17m** (334.41 g/mol, 836 mg, 2.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19a** ($\text{C}_9\text{H}_5\text{ClFN}$, 181.60 g/mol, 409 mg, 2.3 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (675 mg, 0.7 mL, 3.8 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (437.51 g/mol, 222 mg, 0.5 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C3 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (105 mg, 88 μ L, 0.6 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (216 mg, 1.8 mL, 12.7 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (480.54 g/mol, 154 mg, 0.3 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.3 g, 2.2 mL, 8.9 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (3*S*,5*S*)-**15ma** (380.41 g/mol, 119 mg, 0.3 mmol, 13% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als cremefarbenes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.03 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.89 (d, J = 7.93 Hz, 1H), 7.40 - 7.58 (m, 1H), 7.25 (appdt, J = 1.70, 8.20 Hz, 1H), 6.67 (br. s, 2H), 4.79 (d, J = 48.22 Hz, 1H), 4.01 - 4.21 (m, 1H), 2.87 - 3.00 (m, 2H), 2.63 (appdd, J = 14.04, 37.38 Hz, 1H), 2.45 - 2.50 (m, 1H), 2.10 (appt, J = 11.90 Hz, 1H), 1.75 - 1.93 (m, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 163.7, 163.0, 161.6, 154.9, 145.1, 141.9, 135.2, 131.5, 121.7, 119.2, 115.7, 112.2, 109.3, 88.4, 86.9, 49.6, 48.7, 43.4, 34.9. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_R] = 0.8 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 380.11 für $[\text{M}+\text{H}^+]$, m/z gefunden: 381.1 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Darstellung des NDI-Derivats (*S*)-15na

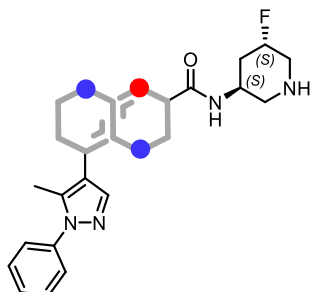


Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (*S*)-17n (352.40 g/mol, 881 mg, 2.5 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19a** ($\text{C}_9\text{H}_5\text{ClFN}$, 181.60 g/mol, 409 mg, 2.3 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (675 mg, 0.7 mL, 3.8 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (455.50 g/mol, 235 mg, 0.5 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.C1 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (107 mg, 89 μL , 0.6 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (220 mg, 1.8 mL, 12.9 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (498.53 g/mol, 254 mg, 0.5 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.5 g, 3.5 mL, 14.2 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (*S*)-15na (398.40 g/mol, 201 mg, 0.5 mmol, 20% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als cremefarbenes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.00 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.99 (d, J = 7.93 Hz, 1H), 7.39 - 7.59 (m, 3H), 7.25 (ddt, J = 0.70, 2.10, 8.50 Hz, 1H), 6.68 (br. s, 2H), 3.99 - 4.14 (m, 1H), 3.33 (br. s, 1H), 2.97 - 3.08 (m, 1H), 2.94 (apptd, J = 3.40, 12.66 Hz, 1H), 2.74 (dd, J = 13.00, 30.00 Hz, 1H), 2.43 - 2.50 (m, 1H), 2.31 (dd, J = 10.99, 21.51 Hz, 1H), 2.04 (appdtd, J = 5.50, 15.70, 26.10 Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 164.1, 163.5, 162.2, 155.3, 145.8, 142.5, 135.9, 132.0, 122.2, 119.7, 116.2, 112.7, 109.5, 50.8, 48.9, 46.1, 38.1.

HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 4.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 398.10 für $[M+H^+]$, m/z gefunden: 399.1 $[M+H^+]$ und 421.1 $[M+Na^+]$.

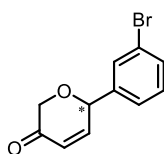
Darstellung des NDI-Derivats (3*S*,5*S*)-15mq



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem in Schritt 1 das substituierte nukleophile Acetamid (3*S*,5*S*)-**17m** (334.41 g/mol, 265 mg, 0.8 mmol) mit der entsprechenden Menge des β -Chlorzimtsäurenitrils **19q** ($C_{13}H_{10}ClN_3$, 243.69 g/mol, 174 mg, 0.7 mmol, 0.9 äquiv.) und Natriummethoxid (214 mg, 0.2 mL, 1.2 mmol) zur Reaktion gebracht wurde. Das erhaltene bifunktionelle Intermediat (499.61 g/mol, 221 mg, 0.4 mmol) aus Schritt 1 wurde über das Reinigungsprotokoll AT.A2 aufgereinigt und in Schritt 2 mit dem ambivalenten Reagenz (92 mg, 58 μ L, 0.5 mmol) und methanolischer Ammoniaklösung (190 mg, 2.2 mL, 11.1 mmol) zum Scharnierregion-adressierenden Intermediat (542.63 g/mol, 157 mg, 0.3 mmol) konvertiert. Dieses wurde unter Anwendung der Reinigungsmethode AT.C2 aufgereinigt und in Schritt 3 mit Hilfe von salzsaurer 1,4-Dioxan-Lösung (0.3 g, 2 mL, 8 mmol) zum finalen Produkt umgesetzt. Die freie Base des NDI-Derivats (3*S*,5*S*)-**15mq** (442.52 g/mol, 68 mg, 0.2 mmol, 19% (über 3 Schritte)) konnte nach Durchführung der Reinigungsmethode AT.E, anschließender basischer Extraktion (pH-Indikator) mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließender Sublimationstrocknung in einer moderaten Ausbeute als cremefarbenes Pulver mit hoher Reinheit isoliert werden.

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.12 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.75 (d, J = 8.04 Hz, 1H), 7.54 - 7.60 (m, 4H), 7.46 - 7.51 (m, 1H), 6.60 (br. s, 2H), 4.78 (appd, J = 48.32 Hz, 1H), 4.05 - 4.15 (m, 1H), 3.32 (br. s., 2H), 2.92 (appdd, J = 2.38, 12.10 Hz, 2H), 2.62 (appdd, J = 13.35, 37.10 Hz, 1H), 2.45 - 2.48 (m, 1H), 2.32 - 2.43 (m, 1H), 2.03 - 2.14 (m, 1H), 1.83 (dtd, J = 2.09, 12.40, 41.33 Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ = 163.8, 155.4, 145.7, 139.4, 138.8, 136.5, 136.2, 129.8, 128.7, 125.6, 118.4, 115.2, 107.3, 88.8, 87.7, 50.2, 49.2, 49.0, 43.7, 35.7, 35.3, 12.4. **HPLC-MS (ESI-MS):** [t_R] = 0.6 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 442.16 für $[M+H^+]$, m/z gefunden: 443.2 $[M+H^+]$.

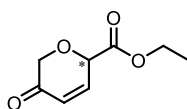
Darstellung des α , β -ungesättigten Pyranons 6-(3-Bromphenyl)-2*H*-pyran-3-on ((\pm)-11a)



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem das Dienophil 3-Benzaldehyd (**10a**, C₇H₅BrO, 185.02 g/mol, 1.59 g/mL, 87 mg, 0.05 mL, 0.5 mmol), die Lewis-Säure Zinkchlorid (ZnCl₂, 136.30 g/mol, 6 mg, 0.05 mmol), das DANISHEFSKY-Dien (**9**, C₈H₁₆O₂Si, 172.30 g/mol, 0.89 g/mL, 106 mg, 0.12 mL, 0,07 mmol) und Trifluoressigsäure (54 mg, 36 μ L, 0.5 mmol,) zur Reaktion gebracht wurden. Das isolierte α , β -ungesättigte Pyranon 6-(3-Bromphenyl)-2*H*-pyran-3-on ((\pm)-**11a**, C₁₁H₉BrO₂, 253.09 g/mol, 33 mg, 0.13 mmol, 39%) konnte in moderater Ausbeute und zufriedenstellender Reinheit als gelber Feststoff erhalten werden.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.24 (d, J = 4 Hz, 1H), 7.23-7.18 (m, 1H), 5.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.33 (dd, J = 4.0, 8.0 Hz, 1H), 2.79 (dd, J = 4.0, 16.0 Hz, 1H), 2.59 (dd, J = 4.0, 12.0 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 91.42, 163.83, 140.13, 131.96, 130.41, 129.21, 124.56, 122.93, 107.62, 80.15, 43.43. HPLC-MS (ESI-MS): [t_R] = 8.6 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 251.98 für C₁₁H₉BrO₂ [M+H⁺], m/z gefunden: 252.8 [M+H⁺].

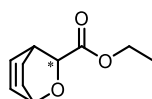
Darstellung des α , β -ungesättigten Pyranons Ethyl 4-oxo-3,4-dihydro-2*H*-pyran-2-carbonsäureester ((\pm)-11b)



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem das Dienophil Ethylglyoxalat (**10b**, C₄H₆O₃, 102.09 g/mol, 1.0 g/mL, 46 mg, 0.09 mL, 0.4 mmol), die Lewis-Säure Aluminiumtrichlorid (AlCl₃, 133.34 g/mol, 6 mg, 0.04 mmol), das DANISHEFSKY-Dien (**9**, C₈H₁₆O₂Si, 172.30 g/mol, 0.89 g/mL, 106 mg, 0.12 mL, 0,07 mmol) und Trifluoressigsäure (54 mg, 36 μ L, 0.5 mmol,) zur Reaktion gebracht wurden. Das isolierte α , β -ungesättigte Pyranon Ethyl 4-oxo-3,4-dihydro-2*H*-pyran-2-carbonsäureester ((\pm)-**11b**, C₈H₁₀O₄, 170.16 g/mol, 33 mg, 0.19 mmol, 41%) konnte in moderater Ausbeute und zufriedenstellender Reinheit als gelber Feststoff erhalten werden.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.4 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.48 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.01 (t, J = 4.0 Hz, 1H), 4.28 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 2.86 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 1.31 (t, J = 8.0 Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 189.41, 167.86, 161.71, 107.94, 76.13, 62.17, 38.37, 13.95. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_{R}] = 8.1 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 170.60 für $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}^+$], m/z gefunden: 171.7 [$\text{M}+\text{H}^+$].

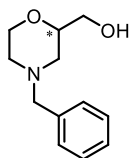
Darstellung des Dehydrocineols Ethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-carboxylat ((±)-13)



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem das Dienophil Ethylglyoxalat (**10b**, $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$, 102.09 g/mol, 1.0 g/mL, 46 mg, 0.09 mL, 0.4 mmol), die Lewis-Säure Bismuttrichlorid (BiCl_3 , 315.34 g/mol, 6 mg, 0.04 mmol) und 1,3-Cyclohexadien (**12**, C_6H_8 , 80.13 g/mol, 0.85 g/mL, 47 mg, 55 μL , 0.6 mmol) zur Reaktion gebracht wurden. Das isolierte Dehydrocineol Ethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-carboxylat ((±)-**13**, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3$, 182.22 g/mol, 45 mg, 0.25 mmol, 40%) konnte in moderater Ausbeute und zufriedenstellender Reinheit als gelber Feststoff erhalten werden.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 6.46 (t, J = 4.0 Hz, 1H), 6.21 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 4.54-4.50 (m, 1H), 4.24 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 4.08 (q, J = 4.0 Hz, 2H), 3.06-3.00 (m, 1H), 2.05-1.96 (m, 1H), 1.37-1.21 (m, 1H), 1.18 (t, J = 8.0 Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 172.23, 134.68, 130.57, 74.14, 66.54, 60.80, 33.30, 25.70, 20.98, 14.21. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [t_{R}] = 8.9 min (HPLC-Methode UHPLC.A), m/z berechnet: 182.09 für $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3$ [$\text{M}+\text{H}^+$], m/z gefunden: 183.2 [$\text{M}+\text{H}^+$].

Darstellung des 2-(Hydroxymethyl)morpholins *N*-Benzyl-2-(hydroxymethyl)morpholin ((±)-3a)

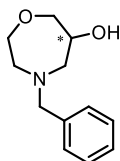


Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem 2-Benzylaminoethanol (**1a**, $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}$, 151.21 g/mol, 1.06 g/mL, 1000 mg, 0.9 mL, 6.6 mmol), (±)-Epichlorhydrin ((±)-**2**, 795 mg, 0.7 mL, 8.6 mmol), die Lewis-Säure Lithiumperchlorat (915 mg, 8.6 mmol) und Natriummethoxid (893 mg, 2.3 mL, 16.5 mmol) zur Reaktion gebracht wurden.

Das isolierte 2-(Hydroxymethyl)morpholin *N*-Benzyl-2-(hydroxymethyl)morpholin ((±)-**3a**, C₁₂H₁₇NO₂, 207.27 g/mol, 712 mg, 3.4 mmol, 52%) konnte, neben dem 6-Hydroxy-1,4-oxazepan 4-Benzyl-1,4-oxazepan-6-ol ((±)-**4a**, C₁₂H₁₇NO₂, 207.27 g/mol, 0.4 mmol, 78 mg, 6%), in moderater Ausbeute und zufriedenstellender Reinheit als hellgelbes Öl erhalten werden.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ = 7.22 - 7.27 (m, 4H), 7.16 - 7.22 (m, 1H), 3.82 (ddd, *J* = 1.80, 3.10, 11.70 Hz, 1H), 3.63 (dt, *J* = 2.80, 11.20 Hz, 1H), 3.56 - 3.60 (m, 1H), 3.53 (dd, *J* = 3.50, 11.40 Hz, 1H), 3.47 (dd, *J* = 6.40, 11.40 Hz, 1H), 3.43 (d, *J* = 9.77 Hz, 2H), 2.61 (ddt, *J* = 2.00, 4.00, 10.70 Hz, 2H), 2.37 (br. s., 1H), 2.12 (dt, *J* = 3.36, 11.52 Hz, 1H), 1.93 (appt, *J* = 10.70 Hz, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 137.5, 129.2, 128.4, 127.2, 75.9, 66.6, 64.3, 63.3, 54.5, 53.0. HPLC-MS (ESI-MS): [*t*_R] = 5.7 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 207.13 für C₁₂H₁₇NO₂ [M+H⁺], *m/z* gefunden: 208.2 [M+H⁺].

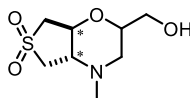
Darstellung des 2-(Hydroxymethyl)morpholins (4-Benzylmorpholin-2-yl)methanol ((±)-**4a**)



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden und wurde im Zuge der zuvor dargelegten Synthesevorschrift „Darstellung des 2-(Hydroxymethyl)morpholins (4-Benzylmorpholin-2-yl)methanol ((±)-**3a**)“ als Nebenprodukt isoliert. Das 6-Hydroxy-1,4-oxazepan 4-Benzyl-1,4-oxazepan-6-ol ((±)-**4a**, C₁₂H₁₇NO₂, 207.27 g/mol, 0.4 mmol, 78 mg, 6%) konnte dabei in geringer Ausbeute und zufriedenstellender Reinheit als dunkelgelbes Öl isoliert werden

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ = 7.25 - 7.30 (m, 3H), 7.20 - 7.25 (m, 2H), 3.79 (dd, *J* = 1.83, 3.67 Hz, 1H), 3.73 - 3.76 (m, 2H), 3.65 - 3.70 (m, 4H), 2.92 (ddd, *J* = 1.40, 5.50, 12.84 Hz, 1H), 2.74 - 2.82 (m, 2H), 2.46 (ddd, *J* = 4.40, 7.61, 12.56 Hz, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 138.3, 129.0, 128.5, 127.4, 76.2, 69.9, 68.8, 63.3, 57.4, 57.0. HPLC-MS (ESI-MS): [*t*_R] = 5.9 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 207.13 für C₁₂H₁₇NO₂ [M+H⁺], *m/z* gefunden: 208.2 [M+H⁺].

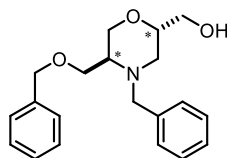
Darstellung des 2-(Hydroxymethyl)morpholins *trans*-(4*aS*,7*aS*)-2-(hydroxymethyl)-4-methylhexahydro-2*H*-thieno[3,4-*b*][1,4]oxazine 6,6-dioxids (*trans*-(±)-3c)



Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem *trans*-4-(Methylamino)tetrahydrothiophen-3-ol 1,1-dioxide (*trans*-(±)-**1d**, C₅H₁₁NO₃S, 165.21 g/mol, 500 mg, 3 mmol), (±)-Epichlorhydrin ((±)-**2**, 364 mg, 0.3 ml, 3.9 mmol), die Lewis-Säure Lithiumperchlorat (419 mg, 3.9 mmol) und Natriummethoxid (409 mg, 1.8 mL, 7.6 mmol) zur Reaktion gebracht wurden. Das isolierte 2-(Hydroxymethyl)morpholin *trans*-(4*aS*,7*aS*)-2-(hydroxymethyl)-4-methylhexahydro-2*H*-thieno[3,4-*b*][1,4]oxazine 6,6-dioxid (*trans*-(±)-**3c**) (221.28, 207.27 g/mol, 712 mg, 3.4 mmol, 52%) konnte in moderater Ausbeute und zufriedenstellender Reinheit als hellgelbes Öl erhalten werden.

¹H NMR (700 MHz, CDCl₃) δ = 4.44 (q, *J* = 2.72 Hz, 1H), 3.73 - 3.79 (m, 1H), 3.70 (dd, *J* = 3.23, 12.00 Hz, 1H), 3.59 - 3.67 (m, 2H), 3.40 (appt, *J* = 12.50 Hz, 1H), 3.36 (appd, *J* = 2.80 Hz, 2H), 3.05 (dd, *J* = 6.99, 12.37 Hz, 1H), 2.54 (dd, *J* = 2.69, 12.15 Hz, 1H), 2.42 (appt, *J* = 12.00 Hz, 1H), 2.40 (s, 3H). ¹³C NMR (176 MHz, CDCl₃) δ 76.6, 74.6, 63.4, 59.4, 59.2, 47.2, 43.8, 43.6. HPLC-MS (ESI-MS): [*t*_R] = 4.9 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 221.07 für C₁₂H₁₇NO₂ [M+H⁺], *m/z* gefunden: 222.2 [M+H⁺].

Darstellung des 2-(Hydroxymethyl)morpholins (*S*)-4-Benzyl-5-(benzyloxymethyl)-2-(hydroxymethyl)morpholin (*trans*-(±)-3d)



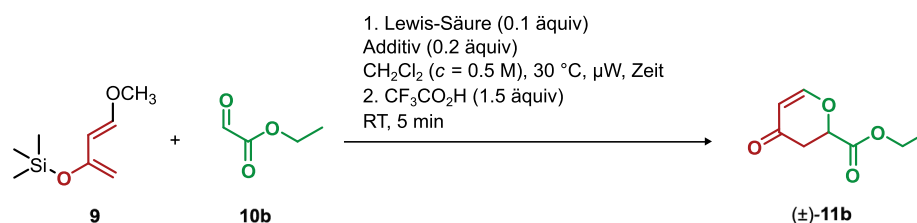
Die Zielverbindung konnte durch Anwendung des dargelegten Verfahrens der allgemeinen Synthesevorschrift ASV.A erfolgreich synthetisch dargestellt werden, indem (*S*)-(-)-2-Amino-3-benzyloxy-1-propanol ((*S*)-**1d**, C₁₇H₂₁NO₂, 271.36 g/mol, 600 mg, 2.2 mmol), (±)-Epichlorhydrin ((±)-**2**, 266 mg, 0.2 ml, 2.9 mmol), die Lewis-Säure Lithiumperchlorat (306 mg, 2.9 mmol) und Natriummethoxid (299 mg, 1.3 mL, 5.5 mmol) zur Reaktion gebracht wurden. Das isolierte 2-(Hydroxymethyl)morpholin *trans*-4-Benzyl-5-(benzyloxymethyl)-2-(hydroxymethyl)morpholin (*trans*-(±)-**3d**, C₂₀H₂₅NO₃, 327.42 g/mol, 261 mg, 0.8 mmol, 36%) konnte in moderater Ausbeute und zufriedenstellender Reinheit als hellgelbes Öl erhalten werden.

¹H NMR (700 MHz, CDCl₃) δ = 7.32 - 7.40 (m, 8H), 7.24 - 7.28 (m, 2H), 4.54 (d, *J* = 12.91 Hz, 2H), 4.07 (dd, *J* = 2.15, 11.19 Hz, 1H), 3.76 - 3.84 (m, 4H), 3.66 - 3.71 (m, 2H), 3.60 (dd, *J* = 3.44, 11.00 Hz, 1H), 3.55 (dd, *J* = 6.02, 11.19 Hz, 1H), 2.90 (appdt, *J* = 2.37, 4.95 Hz, 1H), 2.50 (appt, *J* = 11.60 Hz, 1H), 2.41 (dd, *J* = 2.80, 11.83 Hz, 1H), 2.06 (br. s, 1H). **¹³C NMR** (176 MHz, CDCl₃) δ 138.3, 128.9, 128.7, 128.4, 128.3, 127.6, 127.1, 75.6, 73.4, 67.8, 64.7, 64.2, 59.3, 56.9, 48.1. **HPLC-MS (ESI-MS)**: [*t_R*] = 6.1 min (HPLC-Methode UHPLC.A), *m/z* berechnet: 327.18 für C₂₀H₂₅NO₃ [M+H⁺], *m/z* gefunden: 328.1 [M+H⁺].

Anhang

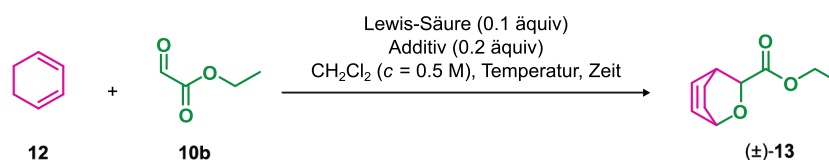
Parametrisierungsversuche zur oxa-DIELS-ALDER-Reaktion von Ethylglyoxalaten

Tabelle 4 | Übersicht zu den durchgeführten Parametervariationen für die Synthese des Pyranons (±)-11b. Weder die Erhöhung der Reaktionslaufzeit noch der Zusatz eines Radikalfängers führten zur gewünschten Produktbildung. Erst die Variation der Lewis-Säure führte zum gewünschten Erfolg.



Eintrag	LS	Additiv	Zeit	Ausbeute	Kommentar
1	ZnCl ₂	-	2 h	-	Keine Produktbildung
2	ZnCl ₂	Hydrochinon	1 h	-	Keine Produktbildung
3	AlCl ₃	-	1 h	41% (33 mg)	Produktbildung

Tabelle 5 | Übersicht zu den durchgeführten Parametervariationen für die Synthese des Dehydrocineols (±)-13. Weder die Erhöhung der Reaktionslaufzeit noch der Zusatz eines Radikalfängers führten zur gewünschten Produktbildung. Erst die Variation der Lewis-Säure führte zum gewünschten Erfolg.



Eintrag	LS	Additiv	Temperatur	Zeit	Ausbeute	Kommentar
1	ZnCl ₂	-	30 °C (μW)	2 h	-	Polymerisation Dien
2	ZnCl ₂	Hydrochinon	30 °C (μW)	2 h	-	Polymerisation Dien
3	AlCl ₃	-	30 °C (μW)	1 h		Polymerisation Dien
			150 °C	1 h		Dimerisierung Dien
	BiCl ₃	-	30 °C (μW)	1 h	40% (45 mg)	Produktbildung

Sequenzvergleich

Kinase	ID	Sequenz	Position
PDGFR α	P16234	Y-----DSRWEFPRDGLVLRVVLGSGAFGKVVVEGTAYGL	615
c-KIT	P10721	Y-----DHKWEFPRNRLSFGKTLGAGAFGKVVVEATAYGL	611
TGF β R2	P37173	-----INHNT-ELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQN	266
ACVR1	Q04771	F-----LVQRT-VARQITLLEC VGKGRYGEVWRGSWQ--	228
MERTK	Q12866	K-----LEDVVIDRNLLILGKILGEGEFGSVMEGNLKQE	609
SYK	Q15046	YPHKFHVDISLTDFIQKYSHLQPGDHLTDITLKVAGRIH--AKRASGGK---LIFYDLR-	148
VRK2	Q86Y07	-PEG-----KVLDDMEGNQWVLGKKIGSGGFLIYLAFPTNK	51
CSNK1D	P48730	-----MELRVGNRYRLGRKIGSGSFGDIYLGTDIAA	31
SRPK1	Q96SB4	CKGGYHL-----VKIGDLFNGRYHVIRKLGWGHFSTVWLSWDIQQ	102
DYRK1A	Q13627	YD--YI-----VKNGEKWMDRYEIDSLIGKGSFGQVVKAYDRVE	181
TTK	P33981	-----NECISVKGRIYSILKQIGSGGSKVQVQLNEK-	546
BMP2K	Q9NSY1	-----VGRHQVTLEESLAEGGFSTVFLVVRTHG-	72
PAK6	Q9NQUS	FKAALRM-----VVDQGDPRLLLSYVKIGEGSGTIVCLAREKHS	429
STK10	Q94804	-----VRRDLDPNEVWEIVGELGDGAFGKVKYKAKNKET	58
ST32A	Q8WU08	-----ENED-VNFDHFELLRALGKGSFGKVCIVQKNDD	45
PDPK1	O15530	-----PRK-KRPEDFKFGKILGEGSFSSTVVLARELAT	104
CHEK1	O14757	-----MAVPFVEDWDLVQTLGEGAYGEVQLAVNRVT	31
PIM1	P11309	-----GKEKEPLESQYQVGPLLGSGGFGSVYSGIRVSD	6
PDGFR α	P16234	SRSQPVMKVAVKMLKPTAR-SSE----K-----QALMSEL	645
c-KIT	P10721	IKSDAAMTVAVKMLKPSAH-LTE----R-----EALMSEL	641
TGF β R2	P37173	T-SEQFETVAVKIFPYEEYA-----SWKTEK	291
ACVR1	Q04771	-----GENVAVKIFSSRDEK-----SWFRET	249
MERTK	Q12866	--DGTSLKVAVKTMKLDNSSQRE----I-----EEFLSEA	638
SYK	Q15046	-----GEGVKLQVMANSRNYKSEEEFIHINNKLRRGDIIGVQGNPGKTKKGELSIPYEI	203
VRK2	Q86Y07	-----PEKDARHVVKVEYQEN-GPLFSEL-----74	74
CSNK1D	P48730	-----GEEVAIKLECVKT-KH-PQLHIES-----53	53
SRPK1	Q96SB4	-----KKFVAMKVVKSAEHYT-ETALDEI-----125	125
DYRK1A	Q13627	-----QEWVAIKIKNKKAFI-NQAQIEV-----RLL	207
TTK	P33981	-----KQIYAIKYVNLEEADN-QT----L-----DSYRNEI	572
BMP2K	Q9NSY1	-----GIRCALKRMYVN-----NMPDL-----NVCKREI	96
PAK6	Q9NQUS	-----GRQVAVKMMDLRKQQR-RELL-----FNEV	453
STK10	Q94804	-----GALAAAKVIETK---S-EEELEDY-----IVEI	82
ST32A	Q8WU08	-----KKMYAMKYMNKQKCV-E-RNEVRNV-----FKEL	72
PDPK1	O15530	-----SREYAIKILEKRHIK-ENKVPYV-----TRER	131
CHEK1	O14757	-----EEAVAVKIVDMKRAVD-CPENIK-----KEI	56
PIM1	P11309	-----NLPVAIKHVEKDRISD-WGELPNG-----TRVPMEV	90
PDGFR α	P16234	KIMTH-L-----GPHLNIVNLLGACTKSGP-	669
c-KIT	P10721	KVLSY-L-----GNHMNIVNLLGACTIGGP-	665
TGF β R2	P37173	DIFSDIN-----LKHENILQFLTAERKTE-	316
ACVR1	Q04771	DIFSDIN-----LKHENILQFLTAERKTE-	274
MERTK	Q12866	ACMKD-F-----SHPNVIRLLGVCIEMSSQ	662
SYK	Q15046	TLLSPCLHMLPHLHFLGDKKETRYRQRYLDLILNDFVRQKFIIRSKIITYIRSFLDELG-	262
VRK2	Q86Y07	KFYQRVAKKD-----CIKKWIERKQLDYLGIPLFYGSGL-TEFA	112
CSNK1D	P48730	KIYKM-----MQGGVGIPTIRWCG----A	73
SRPK1	Q96SB4	RLLKSVRNSD-----P-----NDPNREMVVQLLDDFK-ISGV	156
DYRK1A	Q13627	ELMNK-----HSTEMKYIIVHLKRHF-	229
TTK	P33981	AYLNKLQ-----QHSDKIIRLYDYEI-----593	593
BMP2K	Q9NSY1	TIMKEL-----SGHKNIVGYLDCAVNSISD	121
PAK6	Q9NQUS	VIMRD-----YQHFNVVEMYKSYL----V	473
STK10	Q94804	EILAT-----CDHPYIVKLLGAYY----H	102
ST32A	Q8WU08	QIMQG-----LEHPFLVNLWYSFQ----D	92
PDPK1	O15530	DVMSR-----LDHPPFFVKLYFTFQ----D	151
CHEK1	O14757	CINKML-----NHENVVKFYGH-R----R	75
PIM1	P11309	VLLKKVS-----SGFSGVIRLLDWFE----R	112

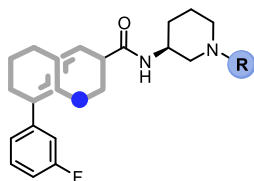
Abbildung 47 | Sequenzvergleich für ausgewählte Off-Targets des NDIs ((S)-(15aa)). Der Vergleich wurde mit dem CLUSTAL OMEGA-Webserver durchgeführt und anschließend mit den Sekundärstrukturelementen der Kinase PDGFR α abgeglichen.

Kinase	ID	Sequenz	Position
			
PDGFRα	P16234	----IYIITEYCFYGDVNLVHKNRDSFLSHHPEKPKKELDIFGLNPADESTRSYVILSF	725
c-KIT	P10721	----TLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEAAALYKNLLHSKES-----SCS	715
TGFβR2	P37173	LGKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHV-----	341
ACVR1	Q04771	SSTQLWLITHYHEMGSLYDYQLQTT-----	299
MERTK	Q12866	GIPKPMVILPFMKYGDVLTLYLSR-----	687
SYK	Q15046	FLEIETPMNIIIPGGAVAKPFI-T-----	285
VRK2	Q86Y07	GRSYRFVMVER-LGIDLQKISG-Q-----	134
CSNK1D	P48730	EGDYNVMVMEL-LGPSLEDLDFN-F-----	95
SRPK1	Q96SB4	NGTHICMVFV-LGHLLKWI IKS-----	179
DYRK1A	Q13627	FRNHLCLVFEM-LSYNYDLLRNT-----	252
TTK	P33981	TDQYIYMVME-CGNIDLNSWLKK-----	615
BMP2K	Q9NSY1	NVWEVLILMEYCRAGQVVNQMNKK-----	145
PAK6	Q9NQU5	GEE-LWVLMFELQGGALTDIVS-Q-----	495
STK10	Q94804	DGK-LWIMIEFCPGGAVDAIML-E-----	124
ST32A	Q8WU08	EED-MFMVVDLLGGDLRYHLQ-Q-----	114
PDPK1	O15530	DEK-LYFGLSYAKNGELLYIR-K-----	173
CHEK1	O14757	EGNIQYLFLEYCSGGELFDRIE-P-----	98
PIM1	P11309	PDSFVLILERPEPVQDLDFDIT-E-----	135
			
PDGFRα	P16234	NSEGLTLLDLSFTYQVARGMEFLASK-----NCVHRDLAARNVLLAQ--GKIVK	833
c-KIT	P10721	DELALDLEDLLSFSYQVAKGMAFLASK-----NCIHRDLAARNILLTH--GRITK	807
TGFβR2	P37173	----ISWEDLRKLGSSSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKN--DLTCC	394
ACVR1	Q04771	----LDTVSLRIVLSIASGLAHLHIEIFG-TQGKPAIAHRDLKSKNILVKK--NGQCC	351
MERTK	Q12866	GPKHIPLOTLKFMVDIALGMEYLSNR-----NFLHRDLAARNCLMRD--DMTVC	738
SYK	Q15046	YHNELDMNLYMRIAPELYHKMLVVGGI-----DRVYEIGRQFRNEGIDLTH--NP---	333
VRK2	Q86Y07	-NGTFKKSTVLQLGIRMLDVLEYIHEN-----EYVHGDIKAANLLGLYKN-PDQVY	183
CSNK1D	P48730	CSRKFSLKTVLLADQMSRIEYIHSK-----NFIHRDVKPDNFMGLGKGNLVY	146
SRPK1	Q96SB4	NYQGLPLPCVKKI IQQVLQGLDYLHTK-----CRIIHTDIKPENILLSVNE-QYIRR	230
DYRK1A	Q13627	NFRGVSLNLRKFAQQMCTALLFLATP-----ELSIHCDLKPENILLCNPK-RSAIK	304
TTK	P33981	-KKSIDPWERKSYWKNMLEAVHTIHQH-----GIVHSDLKPANFLIVD--GMLK	661
BMP2K	Q9NSY1	LQTGFTEPEVLQIFCDTCEAVARLHQ-----KTPIIHRDLKVENILLND--GGNVV	195
PAK6	Q9NQU5	--VRLNEEQIATVCEAVLQALAYLHAQ-----GVIHRDIKSDSILLTL--DGRVK	541
STK10	Q94804	LDRGLTEPQIQVVCQRMLEALNLFHSK-----RIIHRDLKAGNVLMTL--EGDIR	172
ST32A	Q8WU08	-NVHFKEETVKLFI CELVMALDYLQNG-----RIIHRDMKPDNILLDE--HGHHV	161
PDPK1	O15530	-IGSFDETCRFRYTAELVSALEYLHGK-----GI IHRDLKPENILLNE--DMHIQ	220
CHEK1	O14757	-DIGMPEPDAQRFHFHQLMAGVVYLHGI-----GITHRDIKPENILLDE--RDNLK	145
PIM1	P11309	-RGALQEEELARSFFWQVLEAVRHCHNC-----GVLHRDIKDENILLIDL-N-RGELK	183
			
PDGFRα	P16234	ICDFGLARDIMHDSNYV---SKGS--TFLPVKWMAPESIFDNLY-----	872
c-KIT	P10721	ICDFGLARDIKNDSNYV---VKGN--ARLPVKWMAPESIFNVCVY-----	846
TGFβR2	P37173	LCDFGLSLRLDPTLSVD---DLANSQVGTARYMAPEVLESRMNLEN-----	438
ACVR1	Q04771	IADLGLAVMHSQSTNQL---DVGNNPRVGTARYMAPEVLDETIQVDC-----	395
MERTK	Q12866	VADFGLSKKIYSGDYR---QGRI--AKMPVKWIAIESLADRVY-----	777
SYK	Q15046	-----EFTTCEFYMAYADYHDLMEITEKMSVGMVKHITG	367
VRK2	Q86Y07	LADYGLSYRYCPNGNHKQYQE-NPRKGNHTIEFTSLD-----AHKG-----	224
CSNK1D	P48730	IIDFGLAKKYRDARTHQHIPY-RENKNLTGTARYASIN-----THLG-----	187
SRPK1	Q96SB4	LAAEATEWQRSGAP-----PPSGSAVSTAPQ-----P-----	257
DYRK1A	Q13627	IVDFGSSCQLGQ-----RIYQYIQSRFYRSPE-----VLLGM-----	336
TTK	P33981	LIDFGIANQMPTTTSV-----VKDSQVGTVNYMPPE-----AIKDMSSSREN	704
BMP2K	Q9NSY1	LCDFGSATNKFLNPQKDGVNVEEIEIKYTTLSYRAPE-----MINL-----	237
PAK6	Q9NQU5	LSDFGFAQISKD--VP-----KRKSLVGTTPYWMAPE-----VISRS-----	576
STK10	Q94804	LADFGVSAKNLKT--LQ-----KRDSFIGTPYWMAPE-----VVMCET-----	208
ST32A	Q8WU08	ITDFNIAAMLPRET-----QITTMAGTKPYMAPE-----MFSS-----	194
PDPK1	O15530	ITDFGTAKVLSPEKQA-----RANSFVGTAYVVSPE-----LLTE-----	256
CHEK1	O14757	ISDFGLATVFRYNNRER-----LLNKMCGTLPYVAPE-----LLKRRE-----	183
PIM1	P11309	LIDFGSGALLK---DT-----VYTDVFDGTRVYSPPE-----WIRYHR-----	217

Abbildung 48 (Fortsetzung) | Sequenzvergleich für ausgewählte *Off-Targets* des NDIs ((S)-(15aa)). Der Vergleich wurde mit dem CLUSTAL OMEGA-Webserver durchgeführt und anschließend mit den Sekundärstrukturelementen der Kinase PDGFRα abgeglichen

Profilierung der NDI-Derivate

Tabelle 6 | Übersicht zu der biochemischen Profilierung der dekonstruierten NDI-Derivate ohne Scharnierregion-adressierende Gruppe. Zusammenstellung der Daten für das Boc-geschützte sowie das ungeschützte (*S*)- und (*R*)-Enantiomer.



Verbindungsnummer	R =		H	
	COOC(CH ₃) ₃ (<i>R</i>)-20a	(<i>S</i>)-20b	(<i>R</i>)-21a	(<i>S</i>)-21b
HTRF IC₅₀ [nM]				
c-KIT WT	> 20000	> 20000	> 20000	> 20000
PDGFR α WT	> 20000	652 \pm 78	> 20000	> 20000
PDGFR α G680R	> 20000	> 20000	> 20000	> 20000
PDGFR α -D842V	563 \pm 44	> 20000	> 20000	> 20000
PDGFRα CTG GR₅₀ [nM]				
GIST48B	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000
GIST-D842V	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000
GIST-T1-680	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000
GIST-T1-5258	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000
c-KIT CTG GR₅₀ [nM]				
GIST-T1	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000
GIST-T1-D816E	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000
GIST-T1-V654A	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000

Tabelle 7 | Übersicht zu der biochemischen und zellulären Profilierung für verschiedene NDI-Derivate. Zusammenstellung der Daten für die Variation des Fluorierungsgrads ((*S*)-Enantiomere).

Verbindungsnummer	(<i>S</i>)-15a	(<i>S</i>)-15b	(<i>S</i>)-15c	(<i>S</i>)-15d	(<i>S</i>)-15ae
Absolute Konfiguration	(<i>S</i>)	(<i>S</i>)	(<i>S</i>)	(<i>S</i>)	(<i>S</i>)
HTRFIC₅₀ [nM]					
PDGFR α -D842V	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.6	0.5 ± 0.7	<0.1	2.6 ± 1.7
c-KIT-D816H	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.2
PDGFR α WT	<0.1	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.0	1.6 ± 0.3
c-KIT WT	0.9 ± 0.9	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.9 ± 0.4
PDGFRα CTG GR₅₀ [nM]					
GIST48B	299 ± 45	588 ± 157	827 ± 76	230 ± 13	565 ± 106
GIST-D842V	6 ± 2	9 ± 3	8 ± 2	3 ± 1	20 ± 6
GIST-T1-680	315 ± 62	720 ± 102	1067 ± 52	292 ± 8	625 ± 89
GIST-T1-5258	44 ± 4	65 ± 15	64 ± 6	21 ± 2	133 ± 23
GIST48B/GIST-D842V	50	65	105	77	28
c-KIT CTG GR₅₀ [nM]					
GIST-T1	17 ± 0	12 ± 4	14 ± 4	8 ± 3	23 ± 7
GIST-T1-D816E	17 ± 2	12 ± 0	11 ± 3	7 ± 3	32 ± 13
GIST-T1-V654A	45 ± 2	16 ± 6	19 ± 8	11 ± 3	28 ± 10

Tabelle 8 | Übersicht zu der biochemischen und zellulären Profilierung für verschiedene NDI-Derivate. Zusammenstellung der Daten für die Variation des Fluorierungsgrads ((*R*)-Enantiomere).

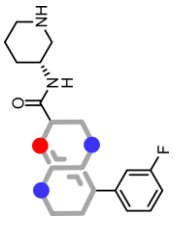
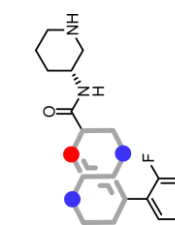
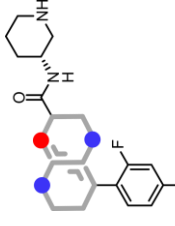
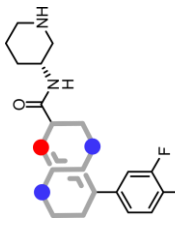
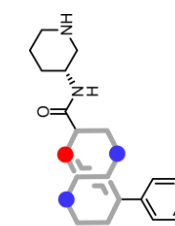
					
Verbindungsnummer	(<i>R</i>)-15ba	(<i>R</i>)-15bb	(<i>R</i>)-15bc	(<i>R</i>)-15bd	(<i>R</i>)-15be
Absolute Konfiguration	(<i>R</i>)	(<i>R</i>)	(<i>R</i>)	(<i>R</i>)	(<i>R</i>)
HTRF IC₅₀ [nM]					
PDGFR α -D842V	356 ± 245	17 ± 10	11 ± 7	63 ± 10	50 ± 30
c-KIT-D816H	24 ± 11	-	-	-	-
PDGFR α WT	88 ± 21	-	-	-	-
c-KIT WT	533 ± 446	-	-	-	-
PDGFRα CTG GR₅₀ [nM]					
GIST48B	>10000	>10000	>10000	9642 ± 349	9910 ± 221
GIST-D842V	2400 ± 100	471 ± 91	293 ± 46	1221 ± 474	673 ± 119
GIST-T1-680	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
GIST-T1-5258	>10000	3647 ± 383	2124 ± 370	4935 ± 556	3730 ± 680
GIST48B/GIST-D842V	4	21	34	8	15
c-KIT CTG GR₅₀ [nM]					
GIST-T1	2278 ± 988	504 ± 38	346 ± 59	1043 ± 390	446 ± 59
GIST-T1-D816E	1616 ± 1409	935 ± 303	592 ± 246	938 ± 860	968 ± 577
GIST-T1-V654A	4427 ± 2187	994 ± 417	637 ± 261	2171 ± 865	799 ± 333

Tabelle 9 | Übersicht zu der biochemischen und zellulären Profilierung für verschiedene NDI-Derivate. Zusammenstellung der Daten für die Variation der *meta*-Substitution am 3-Fluorbenzol-Ring.

Verbindungsnummer	(S)-15af	(S)-15ag	(S)-15ah	(S)-15ai	(S)-15aj
Absolute Konfiguration	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)
HTRF IC₅₀ [nM]					
PDGFR α -D842V	0.1 \pm 0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.8 \pm 0.4
c-KIT-D816H	0.3 \pm 0.2	<0.1	0.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
PDGFR α WT	<0.1	-	-	-	-
c-KIT WT	0.1 \pm 0.0	-	-	-	-
PDGFRα CTG GR₅₀ [nM]					
GIST48B	304 \pm 33	213 \pm 6	252 \pm 21	1288 \pm 173	1276 \pm 45
GIST-D842V	3 \pm 2	3 \pm 0	3 \pm 0	14 \pm 3	10 \pm 3
GIST-T1-680	301 \pm 48	213 \pm 6	289 \pm 25	2654 \pm 541	3392 \pm 244
GIST-T1-5258	24 \pm 7	28 \pm 2	27 \pm 5	98 \pm 32	77 \pm 2
GIST48B/GIST-D842V	101	71	84	92	128
c-KIT CTG GR₅₀ [nM]					
GIST-T1	-	16 \pm 2	15 \pm 3	49 \pm 10	32 \pm 2
GIST-T1-D816E	-	13 \pm 2	12 \pm 3	20 \pm 1	25 \pm 5
GIST-T1-V654A	-	33 \pm 7	36 \pm 18	82 \pm 15	60 \pm 12

Tabelle 10 | Übersicht zu der biochemischen und zellulären Profilierung für verschiedene NDI-Derivate. Zusammenstellung der Daten für die Funktionalisierung der *meta*- und *para*-Position.

Verbindungsnummer	<i>(S)</i> -15ak		<i>(S)</i> -15al		<i>(S)</i> -15am		<i>(S)</i> -15an		<i>(S)</i> -15ao	
	<i>(S)</i>	<i>(S)</i>	<i>(S)</i>	<i>(S)</i>	<i>(S)</i>	<i>(S)</i>	<i>(S)</i>	<i>(S)</i>	<i>(S)</i>	<i>(S)</i>
Absolute Konfiguration										
HTRF IC₅₀ [nM]										
PDGFR α -D842V	0.9 ± 0.1		0.1 ± 0		0.2 ± 0.1		0.1 ± 0		0.1 ± 0	
c-KIT-D816H	3.2 ± 0.3		0.5 ± 0.1		0.1 ± 0		0.3 ± 0.1		0.5 ± 0.1	
PDGFR α WT	0.5 ± 0.1		0.1 ± 0		-		0.1 ± 0		0.1 ± 0	
c-KIT WT	5.1 ± 0.8		0.8 ± 0.2		-		1.1 ± 0.3		0.9 ± 0.3	
PDGFRα CTG GR₅₀ [nM]										
GIST48B	300 ± 54		152 ± 35		60 ± 17		305 ± 125		1031 ± 17	
GIST-D842V	16 ± 4		3 ± 0		1 ± 0		3 ± 0		30 ± 4	
GIST-T1-680	349 ± 24		2176 ± 38		63 ± 19		247 ± 6		2176 ± 38	
GIST-T1-5258	120 ± 40		247 ± 53		10 ± 1		23 ± 4		257 ± 53	
GIST48B/GIST-D842V	19		51		60		102		34	
c-KIT CTG GR₅₀ [nM]										
GIST-T1	78 ± 11		31 ± 2		8 ± 1		24 ± 2		131 ± 16	
GIST-T1-D816E	74 ± 11		22 ± 3		10 ± 2		20 ± 4		66 ± 3	
GIST-T1-V654A	160 ± 33		52 ± 8		23 ± 5		57 ± 4		133 ± 30	

Tabelle 11 | Übersicht zu der biochemischen und zellulären Profilierung für verschiedene NDI-Derivate. Zusammenstellung der Daten für die Integration neuer *Exit*-Vektoren im Austausch des 3-Fluorbenzol-Rings.

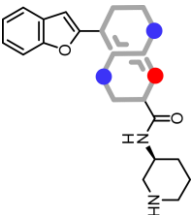
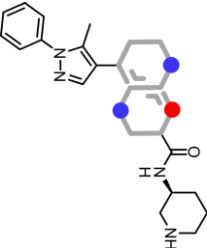
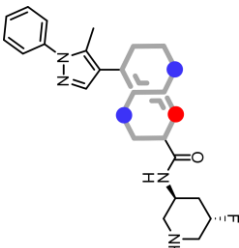
Verbindungsnummer	(S)-15ap	(S)-15aq	(3S,5S)-15mq
			
			
			
Absolute Konfiguration	(S)	(S)	(S)
HTRF IC₅₀ [nM]			
PDGFR α -D842V	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0	0.4 ± 0.1
c-KIT-D816H	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.4 ± 0.1
PDGFR α WT	-	-	-
c-KIT WT	-	-	-
PDGFRα CTG GR₅₀ [nM]			
GIST48B	275 ± 25	1188 ± 115	1046 ± 72
GIST-D842V	5 ± 1	5 ± 1	12 ± 2
GIST-T1-680	249 ± 16	539 ± 51	1113 ± 108
GIST-T1-5258	38 ± 3	37 ± 4	160 ± 46
GIST48B/GIST-D842V	55	238	87
c-KIT CTG GR₅₀ [nM]			
GIST-T1	17 ± 3	32 ± 6	-
GIST-T1-D816E	14 ± 1	28 ± 2	-
GIST-T1-V654A	42 ± 8	62 ± 19	-

Tabelle 12 | Übersicht zu der biochemischen und zellulären Profilierung für verschiedene NDI-Derivate. Zusammenstellung der Daten für die Variation der Ringgröße des Piperidin-Rings ((*S*)-Enantiomere).

Verbindungsnummer	<i>(S)</i> -15ca		<i>(S)</i> -15aa		<i>(S)</i> -15ea	
	<i>(S)</i>		<i>(S)</i>		<i>(S)</i>	
Absolute Konfiguration						
HTRF IC₅₀ [nM]						
PDGFR α -D842V	8.5 \pm 5.0	0.2 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2			
c-KIT-D816H	1.2 \pm 0.4	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1			
PDGFR α WT	5.1 \pm 3.3	<0.1	-			
c-KIT WT	15 \pm 13	0.9 \pm 0.9	-			
PDGFRα CTG GR₅₀ [nM]						
GIST48B	1317 \pm 75	299 \pm 45	246 \pm 58			
GIST-D842V	175 \pm 58	6 \pm 2	9 \pm 2			
GIST-T1-680	3233 \pm 266	315 \pm 62	256 \pm 19			
GIST-T1-5258	1108 \pm 199	44 \pm 4	78 \pm 31			
GIST48B/GIST-D842V	8	50	28			
c-KIT CTG GR₅₀ [nM]						
GIST-T1	227 \pm 81	17 \pm 0	-			
GIST-T1-D816E	144 \pm 114	17 \pm 2	-			
GIST-T1-Y654A	288 \pm 129	45 \pm 2	-			

Tabelle 13 | Übersicht zu der biochemischen und zellulären Profilierung für verschiedene NDI-Derivate. Zusammenstellung der Daten für die Variation der Ringgröße des Piperidin-Rings ((*R*)-Enantiomere).

Verbindungsnummer	(<i>R</i>)-15da	(<i>R</i>)-15ba	(<i>R</i>)-15fa
Absolute Konfiguration	(<i>R</i>)	(<i>R</i>)	(<i>R</i>)
HTRF IC₅₀ [nM]			
PDGFR α -D842V	61 \pm 31	356 \pm 245	12 \pm 8
c-KIT-D816H	7.0 \pm 1.9	24 \pm 11	2.8 \pm 0.5
PDGFR α WT	44 \pm 8	88 \pm 21	8.7 \pm 0.2
c-KIT WT	564 \pm 353	533 \pm 446	178 \pm 77
PDGFRα CTG GR₅₀ [nM]			
GIST48B	5300 \pm 559	>10000	3550 \pm 423
GIST-D842V	2217 \pm 523	2400 \pm 100	358 \pm 114
GIST-T1-680	>10000	>10000	6400 \pm 1826
GIST-T1-5258	9733 \pm 653	>10000	1917 \pm 325
GIST48B/GIST-D842V	2	4	10
c-KIT CTG GR₅₀ [nM]			
GIST-T1	1593 \pm 495	2278 \pm 988	291 \pm 100
GIST-T1-D816E	1744 \pm 720	1616 \pm 1409	339 \pm 153
GIST-T1-V654A	3693 \pm 1536	4427 \pm 2187	495 \pm 185

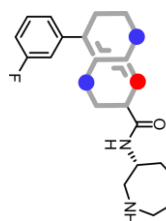
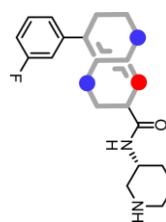
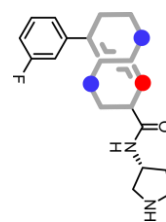


Tabelle 14 | Übersicht zu der biochemischen und zellulären Profilierung für verschiedene NDI-Derivate. Zusammenstellung der Daten für die Karbonisierung und Variation der Stickstoffpositionierung innerhalb des Piperidin-Rings.

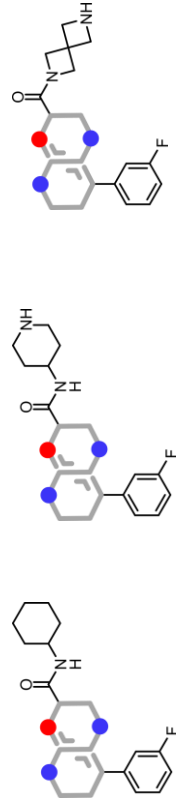
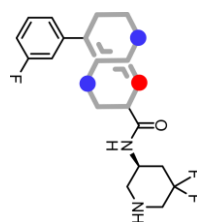
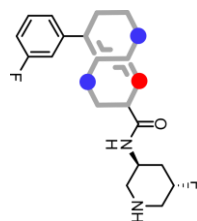
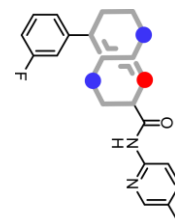
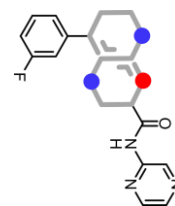
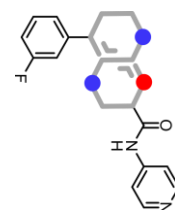
Verbindungsnummer	15gf	15ha	15ia
			
Absolute Konfiguration	-	-	-
HTRF IC₅₀ [nM]			
PDGFR α -D842V	298 ± 129	31 ± 16	33 ± 19
c-KIT-D816H	69 ± 28	4.0 ± 2.2	3.4 ± 1.3
PDGFR α WT	110 ± 9	-	-
c-KIT WT	1770 ± 1126	-	-
PDGFRα CTG GR₅₀ [nM]			
GIST48B	>10000	8229 ± 1375	>10000
GIST-D842V	9367 ± 551	825 ± 135	3216 ± 725
GIST-T1-680	>10000	>10000	9758 ± 297
GIST-T1-5258	>10000	4725 ± 1282	8721 ± 1783
GIST48B/GIST-D842V	1	10	3
c-KIT CTG GR₅₀ [nM]			
GIST-T1	>10000	688 ± 109	3232 ± 336
GIST-T1-D816E	>10000	664 ± 173	2864 ± 316
GIST-T1-Y654A	>10000	2672 ± 187	6599 ± 383

Tabelle 15 | Übersicht zu der biochemischen und zellulären Profilierung für verschiedene NDI-Derivate. Zusammenstellung der Daten für Heteroaromatisierung und pK_s-Modulation des Piperidins.

Verbindungsnummer	15ja	15ka	1a	(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-15na	(<i>S</i>)-15na
Absolute Konfiguration	-	-	-	(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	(<i>S</i>)
HTRF IC₅₀ [nM]					
PDGFR α -D842V	500 \pm 281	46 \pm 6	3739 \pm 1934	0.3 \pm 0.1	19.8 \pm 3.2
c-KIT-D816H	46 \pm 23	47 \pm 19	627 \pm 458	0.4 \pm 0.1	4.8 \pm 2.1
PDGFR α WT	168 \pm 12	65 \pm 22	-	0.5 \pm 0.1	16.3 \pm 2.5
c-KIT WT	917 \pm 230	7300 \pm 4551	-	2.2 \pm 0.6	186 \pm 47.4
PDGFRα CTG GR₅₀ [nM]					
GIST48B	>10000	>10000	>10000	88 \pm 11	8424 \pm 955
GIST-D842V	1800 \pm 100	>10000	>10000	5 \pm 33	732 \pm 104
GIST-T1-680	>10000	>10000	>10000	194 \pm 13	>10000
GIST-T1-5258	7967 \pm 451	>10000	>10000	58 \pm 15	4019 \pm 200
GIST48B/GIST-D842V	6	1	1	16	12
c-KIT CTG GR₅₀ [nM]					
GIST-T1	2942 \pm 441	-	>10000	-	-
GIST-T1-D816E	4535 \pm 1476	-	>10000	-	-
GIST-T1-V654A	4814 \pm 1164	-	>10000	-	-



Literaturverzeichnis

1. Haraldstad, K.; Wahl, A.; Andenæs, R.; Andersen, J. R.; Andersen, M. H.; Beisland, E.; Borge, C. R.; Engebretsen, E.; Eisemann, M.; Halvorsrud, L.; Hanssen, T. A.; Haugstvedt, A.; Haugland, T.; Johansen, V. A.; Larsen, M. H.; Løvereide, L.; Løyland, B.; Kvarme, L. G.; Moons, P.; Norekvål, T. M.; Ribu, L.; Rohde, G. E.; Urstad, K. H.; Helseth, S., A systematic review of quality of life research in medicine and health sciences. *Quality of life research : an international journal of quality of life aspects of treatment, care and rehabilitation* **2019**, *28* (10), 2641–2650.
2. Kaplan, R. M., The significance of quality of life in health care. *Quality of life research : an international journal of quality of life aspects of treatment, care and rehabilitation* **2003**, *12* Suppl 1, 3–16.
3. Olsson, I. N.; Runnamo, R.; Engfeldt, P., Medication quality and quality of life in the elderly, a cohort study. *Health and quality of life outcomes* **2011**, *9*, 95.
4. Kumar, T.; Singh, A.; Thakre, S.; Acharya, S.; Shukla, S.; Kumar, S., Scientific Evolution of Artificial Heart Valves: A Narrative Review. *Cureus* **2023**, *15* (7), e42131.
5. Belongia, E. A.; Naleway, A. L., Smallpox vaccine: the good, the bad, and the ugly. *Clinical medicine & research* **2003**, *1* (2), 87–92.
6. Arthur, C.; Carlson, L.-M.; Svoboda, J.; Sandvik, U.; Jylhä, C.; Nordenskjöld, M.; Holm, S.; Tham, E., Liquid biopsy guides successful molecular targeted therapy of an inoperable pediatric brainstem neoplasm. *NPJ precision oncology* **2024**, *8* (1), 44.
7. Murciano-Goroff, Y. R.; Suehnholz, S. P.; Drilon, A.; Chakravarty, D., Precision Oncology: 2023 in Review. *Cancer discovery* **2023**, *13* (12), 2525–2531.
8. Gray, H. J.; Chatterjee, P.; Rosati, R.; Appleyard, L. R.; Durenberger, G. J.; Diaz, R. L.; Swan, H. A.; Peretti, D.; Pollastro, M.; Ainge, T.; Kapeli, K.; Pereira, S.; Margossian, A. L.; Banda, K.; Goff, B. A.; Swisher, E. M.; Bernard, B.; Kemp, C. J.; Grandori, C., Extraordinary clinical response to ibrutinib in low-grade ovarian cancer guided by organoid drug testing. *NPJ precision oncology* **2023**, *7* (1), 45.
9. Antràs, P.; Redding, S. J.; Rossi-Hansberg, E., Globalization and Pandemics. *American Economic Review* **2023**, *113* (4), 939–981.
10. Williams, B. A.; Jones, C. H.; Welch, V.; True, J. M., Outlook of pandemic preparedness in a post-COVID-19 world. *NPJ vaccines* **2023**, *8* (1), 178.
11. Anderson, A. S., A lightspeed approach to pandemic drug development. *Nature medicine* **2022**, *28* (8), 1538.
12. Douangamath, A.; Fearon, D.; Gehrtz, P.; Krojer, T.; Lukacik, P.; Owen, C. D.; Resnick, E.; Strain-Damerell, C.; Aimon, A.; Ábrányi-Balogh, P.; Brandão-Neto, J.; Carbery, A.; Davison, G.; Dias, A.; Downes, T. D.; Dunnett, L.; Fairhead, M.; Firth, J. D.; Jones, S. P.; Keeley, A.; Keserü, G. M.; Klein, H. F.; Martin, M. P.; Noble, M. E. M.; O'Brien, P.; Powell, A.; Reddi, R. N.; Skyner, R.; Snee, M.; Waring, M. J.; Wild, C.; London, N.; Delft, F. v.; Walsh, M. A., Crystallographic and electrophilic fragment screening of the SARS-CoV-2 main protease. *Nature communications* **2020**, *11* (1), 5047.
13. Martin, M. P.; Endicott, J. A.; Noble, M. E. M.; Tatum, N. J., Crystallographic fragment screening in academic cancer drug discovery. *Methods in enzymology* **2023**, *690*, 211–234.
14. Bobby, M. L.; Fearon, D.; Ferla, M.; Filep, M.; Koekemoer, L.; Robinson, M. C.; Chodera, J. D.; Lee, A. A.; London, N.; Delft, A. v.; Delft, F. v.; Achdout, H.; Aimon, A.; Alonzi, D. S.; Arbon, R.; Aschenbrenner, J. C.; Balcomb, B. H.; Bar-David, E.; Barr, H.; Ben-Shmuel, A.; Bennett, J.; Bilenko, V. A.; Borden, B.; Boulet, P.; Bowman, G. R.; Brewitz, L.; Brun, J.; Bvnbs, S.; Calmiano, M.; Carbery, A.; Carney, D. W.; Cattermole, E.; Chang, E.;

- Chernyshenko, E.; Clyde, A.; Coffland, J. E.; Cohen, G.; Cole, J. C.; Contini, A.; Cox, L.; Croll, T. I.; Cvitkovic, M.; Jonghe, S. d.; Dias, A.; Donckers, K.; Dotson, D. L.; Douangamath, A.; Duberstein, S.; Dudgeon, T.; Dunnett, L. E.; Eastman, P.; Erez, N.; Eyermann, C. J.; Fairhead, M.; Fate, G.; Fedorov, O.; Fernandes, R. S.; Ferrins, L.; Foster, R.; Foster, H.; Fraisse, L.; Gabizon, R.; García-Sastre, A.; Gawriljuk, V. O.; Gehrtz, P.; Gileadi, C.; Giroud, C.; Glass, W. G.; Glen, R. C.; Glinert, I.; Godoy, A. S.; Gorichko, M.; Gorrie-Stone, T.; Griffen, E. J.; Haneef, A.; Hassell Hart, S.; Heer, J.; Henry, M.; Hill, M.; Horrell, S.; Huang, Q. Y. J.; Huliak, V. D.; Hurley, M. F. D.; Israely, T.; Jajack, A.; Jansen, J.; Jnoff, E.; Jochmans, D.; John, T.; Kaminow, B.; Kang, L.; Kantsadi, A. L.; Kenny, P. W.; Kiappes, J. L.; Kinakh, S. O.; Kovar, B.; Krojer, T.; van La, N. T.; Laghnimi-Hahn, S.; Lefker, B. A.; Levy, H.; Lithgo, R. M.; Logvinenko, I. G.; Lukacik, P.; Macdonald, H. B.; MacLean, E. M.; Makower, L. L.; Malla, T. R.; Marples, P. G.; Matviuk, T.; McCorkindale, W.; McGovern, B. L.; Melamed, S.; Melnykov, K. P.; Michurin, O.; Miesen, P.; Mikolajek, H.; Milne, B. F.; Minh, D.; Morris, A.; Morris, G. M.; Morwitzer, M. J.; Moustakas, D.; Mowbray, C. E.; Nakamura, A. M.; Neto, J. B.; Neyts, J.; Nguyen, L.; Noske, G. D.; Oleinikovas, V.; Oliva, G.; Overheul, G. J.; Owen, C. D.; Pai, R.; Pan, J.; Paran, N.; Payne, A. M.; Perry, B.; Pingle, M.; Pinjari, J.; Politi, B.; Powell, A.; Pšenák, V.; Pulido, I.; Puni, R.; Rangel, V. L.; Reddi, R. N.; Rees, P.; Reid, S. P.; Reid, L.; Resnick, E.; Ripka, E. G.; Robinson, R. P.; Rodriguez-Guerra, J.; Rosales, R.; Rufa, D. A.; Saar, K.; Saikatendu, K. S.; Salah, E.; Schaller, D.; Scheen, J.; Schiffer, C. A.; Schofield, C. J.; Shafeev, M.; Shaikh, A.; Shaqra, A. M.; Shi, J.; Shurrush, K.; Singh, S.; Sittner, A.; Sjö, P.; Skyner, R.; Smalley, A.; Smeets, B.; Smilova, M. D.; Solmesky, L. J.; Spencer, J.; Strain-Damerell, C.; Swamy, V.; Tamir, H.; Taylor, J. C.; Tennant, R. E.; Thompson, W.; Thompson, A.; Tomásio, S.; Tomlinson, C. W. E.; Tsurupa, I. S.; Tumber, A.; Vakonakis, I.; van Rij, R. P.; Vangeel, L.; Varghese, F. S.; Vaschetto, M.; Vitner, E. B.; Voelz, V.; Volkamer, A.; Walsh, M. A.; Ward, W.; Weatherall, C.; Weiss, S.; White, K. M.; Wild, C. F.; Witt, K. D.; Wittmann, M.; Wright, N.; Yahalom-Ronen, Y.; Yilmaz, N. K.; Zaidmann, D.; Zhang, I.; Zidane, H.; Zitzmann, N.; Zvornicanin, S. N., Open science discovery of potent noncovalent SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *Science (New York, N.Y.)* **2023**, 382 (6671), eabo7201.
15. Gallego, V.; Naveiro, R.; Roca, C.; Ríos Insua, D.; Campillo, N. E., AI in drug development: a multidisciplinary perspective. *Molecular diversity* **2021**, 25 (3), 1461–1479.
 16. Paul, D.; Sanap, G.; Shenoy, S.; Kalyane, D.; Kalia, K.; Tekade, R. K., Artificial intelligence in drug discovery and development. *Drug discovery today* **2021**, 26 (1), 80–93.
 17. Shah, P.; Kendall, F.; Khozin, S.; Goosen, R.; Hu, J.; Laramie, J.; Ringel, M.; Schork, N., Artificial intelligence and machine learning in clinical development: a translational perspective. *NPJ digital medicine* **2019**, 2, 69.
 18. Krishnamurti, C.; Rao, S. C., The isolation of morphine by Serturmer. *Indian journal of anaesthesia* **2016**, 60 (11), 861–862.
 19. Schmitz, R., Friedrich Wilhelm Sertürner and the Discovery of Morphine. *Pharmacy in History* **1985**, 27 (2), 61–74.
 20. Ligon, B. L., Penicillin: its discovery and early development. *Seminars in pediatric infectious diseases* **2004**, 15 (1), 52–57.
 21. Doytchinova, I., Drug Design-Past, Present, Future. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2022**, 27 (5).
 22. Pina, A. S.; Hussain, A.; Roque, A. C. A., An historical overview of drug discovery. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2009**, 572, 3–12.
 23. Robertus, J., Structure-based drug design ten years on. *Nature structural biology* **1994**, 1 (6), 352–354.

24. Pereira, D. A.; Williams, J. A., Origin and evolution of high throughput screening. *British journal of pharmacology* **2007**, *152* (1), 53–61.
25. Williams, A. J.; Tkachenko, V.; Lipinski, C. A.; Tropsha, A.; Ekins, S., Free online resources enabling crowd-sourced drug discovery. *Drug Discovery World* **2009**, Winter 2009/2010, 33–39.
26. Morgan, S.; Grootendorst, P.; Lexchin, J.; Cunningham, C.; Greyson, D., The cost of drug development: a systematic review. *Health policy (Amsterdam, Netherlands)* **2011**, *100* (1), 4–17.
27. Zhong, H.; Chan, G.; Hu, Y.; Hu, H.; Ouyang, D., A Comprehensive Map of FDA-Approved Pharmaceutical Products. *Pharmaceutics* **2018**, *10* (4).
28. Gironde-Martínez, A.; Donckele, E. J.; Samain, F.; Neri, D., DNA-Encoded Chemical Libraries: A Comprehensive Review with Successful Stories and Future Challenges. *ACS pharmacology & translational science* **2021**, *4* (4), 1265–1279.
29. Peterson, A. A.; Liu, D. R., Small-molecule discovery through DNA-encoded libraries. *Nature reviews. Drug discovery* **2023**, *22* (9), 699–722.
30. Satz, A. L.; Brunschweiler, A.; Flanagan, M. E.; Gloger, A.; Hansen, N. J. V.; Kuai, L.; Kunig, V. B. K.; Lu, X.; Madsen, D.; Marcaurelle, L. A.; Mulrooney, C.; O'Donovan, G.; Sakata, S.; Scheuermann, J., DNA-encoded chemical libraries. *Nature Reviews Methods Primers* **2022**, *2* (1).
31. Esch, I. J. P. d.; Erlanson, D. A.; Jahnke, W.; Johnson, C. N.; Walsh, L., Fragment-to-Lead Medicinal Chemistry Publications in 2020. *Journal of medicinal chemistry* **2022**, *65* (1), 84–99.
32. Li, Q., Application of Fragment-Based Drug Discovery to Versatile Targets. *Frontiers in molecular biosciences* **2020**, *7*, 180.
33. Archer, J. R., History, evolution, and trends in compound management for high throughput screening. *Assay and drug development technologies* **2004**, *2* (6), 675–681.
34. Keseru, G. M.; Makara, G. M., Hit discovery and hit-to-lead approaches. *Drug discovery today* **2006**, *11* (15-16), 741–748.
35. Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W., Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science (New York, N.Y.)* **1996**, *274* (5292), 1531–1534.
36. Romasanta, A. K. S.; van der Sijde, P.; Hellsten, I.; Hubbard, R. E.; Keseru, G. M.; van Muijlwijk-Koezen, J.; Esch, I. J. P. d., When fragments link: a bibliometric perspective on the development of fragment-based drug discovery. *Drug discovery today* **2018**, *23* (9), 1596–1609.
37. Brown, D. G., An Analysis of Successful Hit-to-Clinical Candidate Pairs. *Journal of medicinal chemistry* **2023**, *66* (11), 7101–7139.
38. Schneider, G., Automating drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **2018**, *17* (2), 97–113.
39. Bilslund, A. E.; Pugliese, A.; Bower, J., Implementation of an AI-assisted fragment-generator in an open-source platform. *RSC medicinal chemistry* **2022**, *13* (10), 1205–1211.
40. Kaminski, J. W.; Vera, L.; Stegmann, D. P.; Vering, J.; Eris, D.; Smith, K. M. L.; Huang, C. Y.; Meier, N.; Steuber, J.; Wang, M.; Fritz, G.; Wojdyla, J. A.; Sharpe, M. E., Fast fragment-and compound-screening pipeline at the Swiss Light Source. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology* **2022**, *78* (Pt 3), 328–336.
41. Kirsch, P.; Hartman, A. M.; Hirsch, A. K. H.; Empting, M., Concepts and Core Principles of Fragment-Based Drug Design. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2019**, *24* (23).
42. Lansdowne, L. E.; Networks, T., Advances in Fragment-Based Drug Discovery.

43. Konteatis, Z., What makes a good fragment in fragment-based drug discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery* **2021**, *16* (7), 723–726.
44. Bon, M.; Bilslund, A.; Bower, J.; McAulay, K., Fragment-based drug discovery-the importance of high-quality molecule libraries. *Molecular oncology* **2022**, *16* (21), 3761–3777.
45. Barker, J.; Hestekamp, T.; Whittaker, M., Integrating HTS and fragment-based drug discovery. *Drug Discovery World* **2008**.
46. Dahlin, J. L.; Walters, M. A., The essential roles of chemistry in high-throughput screening triage. *Future medicinal chemistry* **2014**, *6* (11), 1265–1290.
47. Davis, A. M.; Leeson, P. D., Physicochemical Properties. In *The handbook of medicinal chemistry*, 2nd edition ed.; Ward, S. E.; Davis, A.; Davis, A. M., Eds. Royal Society of Chemistry: London, 2023; pp 1–39.
48. 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. *Advanced drug delivery reviews* **2001**, *46* (1-3), 3–26.
49. Oprea, T. I., Property distribution of drug-related chemical databases. *Journal of computer-aided molecular design* **2000**, *14* (3), 251–264.
50. Rishton, G. M., Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening. *Drug discovery today* **2003**, *8* (2), 86–96.
51. Benet, L. Z.; Hosey, C. M.; Ursu, O.; Oprea, T. I., BDDCS, the Rule of 5 and drugability. *Advanced drug delivery reviews* **2016**, *101*, 89–98.
52. Petit, J.; Meurice, N.; Kaiser, C.; Maggiora, G., Softening the Rule of Five--where to draw the line? *Bioorganic & medicinal chemistry* **2012**, *20* (18), 5343–5351.
53. Shultz, M. D., Two Decades under the Influence of the Rule of Five and the Changing Properties of Approved Oral Drugs. *Journal of medicinal chemistry* **2019**, *62* (4), 1701–1714.
54. Ashenden, S. K., Screening Library Design. *Methods in enzymology* **2018**, *610*, 73–96.
55. Villar, H. O.; Hansen, M. R., Design of chemical libraries for screening. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2009**, *4* (12), 1215–1220.
56. Schultes, S.; Graaf, C. d.; Haaksma, E. E. J.; Esch, I. J. P. d.; Leurs, R.; Krämer, O., Ligand efficiency as a guide in fragment hit selection and optimization. *Drug discovery today. Technologies* **2010**, *7* (3), e157-e162.
57. Jhoti, H.; Williams, G.; Rees, D. C.; Murray, C. W., The 'rule of three' for fragment-based drug discovery: where are we now? *Nature reviews. Drug discovery* **2013**, *12* (8), 644–645.
58. Oprea, T. I., Current trends in lead discovery: are we looking for the appropriate properties? *Journal of computer-aided molecular design* **2002**, *16* (5-6), 325–334.
59. Coyle, J.; Walser, R., Applied Biophysical Methods in Fragment-Based Drug Discovery. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D* **2020**, *25* (5), 471–490.
60. McMahon, R. M.; Scanlon, M. J.; Martin, J. L., Interrogating Fragments Using a Protein Thermal Shift Assay. *Australian Journal of Chemistry* **2013**, *66* (12), 1502.
61. Chilingaryan, Z.; Yin, Z.; Oakley, A. J., Fragment-based screening by protein crystallography: successes and pitfalls. *International journal of molecular sciences* **2012**, *13* (10), 12857–12879.
62. Harner, M. J.; Frank, A. O.; Fesik, S. W., Fragment-based drug discovery using NMR spectroscopy. *Journal of biomolecular NMR* **2013**, *56* (2), 65–75.
63. Bembenek, S. D.; Tounge, B. A.; Reynolds, C. H., Ligand efficiency and fragment-based drug discovery. *Drug discovery today* **2009**, *14* (5-6), 278–283.

64. Hall, D. R.; Kozakov, D.; Whitty, A.; Vajda, S., Lessons from Hot Spot Analysis for Fragment-Based Drug Discovery. *Trends in pharmacological sciences* **2015**, *36* (11), 724–736.
65. Turnbull, A.; Boyd, S.; Walse, B., Fragment-based drug discovery and protein-protein interactions. *Research and Reports in Biochemistry* **2014**, *4*, 13–26.
66. Coyne, A. G.; Scott, D. E.; Abell, C., Drugging challenging targets using fragment-based approaches. *Current opinion in chemical biology* **2010**, *14* (3), 299–307.
67. Bancet, A.; Raingeval, C.; Lomberget, T.; Le Borgne, M.; Guichou, J.-F.; Krimm, I., Fragment Linking Strategies for Structure-Based Drug Design. *Journal of medicinal chemistry* **2020**, *63* (20), 11420–11435.
68. Lamoree, B.; Hubbard, R. E., Current perspectives in fragment-based lead discovery (FBLD). *Essays in biochemistry* **2017**, *61* (5), 453–464.
69. Duffy, B. C.; Zhu, L.; Decornez, H.; Kitchen, D. B., Early phase drug discovery: cheminformatics and computational techniques in identifying lead series. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2012**, *20* (18), 5324–5342.
70. Sun, D.; Gao, W.; Hu, H.; Zhou, S., Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta pharmaceutica Sinica. B* **2022**, *12* (7), 3049–3062.
71. Harrison, R. K., Phase II and phase III failures: 2013–2015. *Nature reviews. Drug discovery* **2016**, *15* (12), 817–818.
72. Dowden, H.; Munro, J., Trends in clinical success rates and therapeutic focus. *Nature reviews. Drug discovery* **2019**, *18* (7), 495–496.
73. Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L., Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology* **2011**, *162* (6), 1239–1249.
74. Bulfer, S. L.; Jean-Francois, F. L.; Arkin, M. R., Making FBDD Work in Academia. In *Fragment-based Drug Discovery Lessons and Outlook*, Erlanson, D. A.; Jahnke, W., Eds. Wiley: 2016; pp 223–246.
75. Cornaciu, I.; Bourgeas, R.; Hoffmann, G.; Dupeux, F.; Humm, A.-S.; Mariaule, V.; Pica, A.; Clavel, D.; Seroul, G.; Murphy, P.; Márquez, J. A., The Automated Crystallography Pipelines at the EMBL HTX Facility in Grenoble. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2021**, (172).
76. Krojer, T.; Talon, R.; Pearce, N.; Collins, P.; Douangamath, A.; Brandao-Neto, J.; Dias, A.; Marsden, B.; Delft, F. v., The XChemExplorer graphical workflow tool for routine or large-scale protein-ligand structure determination. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology* **2017**, *73* (Pt 3), 267–278.
77. Christopher, P., Automating Academic Laboratories: Promoting Reliability, Productivity, and Safety. *ACS Energy Letters* **2020**, *5* (8), 2737–2738.
78. Holland, I.; Davies, J. A., Automation in the Life Science Research Laboratory. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **2020**, *8*, 571777.
79. Volochnyuk, D. M.; Ryabukhin, S. V.; Moroz, Y. S.; Savych, O.; Chuprina, A.; Horvath, D.; Zabolotna, Y.; Varnek, A.; Judd, D. B., Evolution of commercially available compounds for HTS. *Drug discovery today* **2019**, *24* (2), 390–402.
80. Carbery, A.; Skyner, R.; Delft, F. v.; Deane, C. M., Fragment Libraries Designed to Be Functionally Diverse Recover Protein Binding Information More Efficiently Than Standard Structurally Diverse Libraries. *Journal of medicinal chemistry* **2022**, *65* (16), 11404–11413.
81. Shi, Y.; Itzstein, M. v., How Size Matters: Diversity for Fragment Library Design. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2019**, *24* (15).

82. Patel, D.; Bauman, J. D.; Arnold, E., Advantages of crystallographic fragment screening: functional and mechanistic insights from a powerful platform for efficient drug discovery. *Progress in biophysics and molecular biology* **2014**, *116* (2-3), 92–100.
83. Baybekov, S.; Marcou, G.; Ramos, P.; Saurel, O.; Galzi, J.-L.; Varnek, A., DMSO Solubility Assessment for Fragment-Based Screening. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2021**, *26* (13).
84. Murray, C. W.; Rees, D. C., Opportunity Knocks: Organic Chemistry for Fragment-Based Drug Discovery (FBDD). *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2016**, *55* (2), 488–492.
85. Keserü, G. M.; Erlanson, D. A.; Ferenczy, G. G.; Hann, M. M.; Murray, C. W.; Pickett, S. D., Design Principles for Fragment Libraries: Maximizing the Value of Learnings from Pharma Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) Programs for Use in Academia. *Journal of medicinal chemistry* **2016**, *59* (18), 8189–8206.
86. St Denis, J. D.; Hall, R. J.; Murray, C. W.; Heightman, T. D.; Rees, D. C., Fragment-based drug discovery: opportunities for organic synthesis. *RSC medicinal chemistry* **2020**, *12* (3), 321–329.
87. Blakemore, D. C.; Castro, L.; Churcher, I.; Rees, D. C.; Thomas, A. W.; Wilson, D. M.; Wood, A., Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. *Nature chemistry* **2018**, *10* (4), 383–394.
88. Boström, J.; Brown, D. G.; Young, R. J.; Keserü, G. M., Expanding the medicinal chemistry synthetic toolbox. *Nature reviews. Drug discovery* **2018**, *17* (10), 709–727.
89. Morley, A. D.; Pugliese, A.; Birchall, K.; Bower, J.; Brennan, P.; Brown, N.; Chapman, T.; Drysdale, M.; Gilbert, I. H.; Hoelder, S.; Jordan, A.; Ley, S. V.; Merritt, A.; Miller, D.; Swarbrick, M. E.; Wyatt, P. G., Fragment-based hit identification: thinking in 3D. *Drug discovery today* **2013**, *18* (23-24), 1221–1227.
90. Brown, D. G.; Boström, J., Analysis of Past and Present Synthetic Methodologies on Medicinal Chemistry: Where Have All the New Reactions Gone? *Journal of medicinal chemistry* **2016**, *59* (10), 4443–4458.
91. Taylor, C. J.; Pomberger, A.; Felton, K. C.; Grainger, R.; Barecka, M.; Chamberlain, T. W.; Bourne, R. A.; Johnson, C. N.; Lapkin, A. A., A Brief Introduction to Chemical Reaction Optimization. *Chemical reviews* **2023**, *123* (6), 3089–3126.
92. Zhu, T.; Cao, S.; Su, P.-C.; Patel, R.; Shah, D.; Chokshi, H. B.; Szukala, R.; Johnson, M. E.; Hevener, K. E., Hit identification and optimization in virtual screening: practical recommendations based on a critical literature analysis. *Journal of medicinal chemistry* **2013**, *56* (17), 6560–6572.
93. Leveridge, M.; Chung, C.-W.; Gross, J. W.; Phelps, C. B.; Green, D., Integration of Lead Discovery Tactics and the Evolution of the Lead Discovery Toolbox. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D* **2018**, *23* (9), 881–897.
94. Takenaka, T., Classical vs reverse pharmacology in drug discovery. *BJU international* **2001**, *88 Suppl 2*, 7-10; discussion 49-50.
95. Suba, V., Reverse Pharmacology: A Tool for Drug Discovery from Traditional Medicine. In *EVIDENCE BASED VALIDATION OF TRADITIONAL MEDICINES A COMPREHENSIVE*, Mandal, S. C.; Chakraborty, R.; Sen, S., Eds. SPRINGER: [S.l.], 2020; pp 299–310.
96. Batool, M.; Ahmad, B.; Choi, S., A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *International journal of molecular sciences* **2019**, *20* (11).
97. Swinney, D. C.; Anthony, J., How were new medicines discovered? *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, *10* (7), 507–519.

98. Zimmermann, A.; Hofer, S.; Pendl, T.; Kainz, K.; Madeo, F.; Carmona-Gutierrez, D., Yeast as a tool to identify anti-aging compounds. *FEMS yeast research* **2018**, *18* (6).
99. Atanasov, A. G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.-M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, E. H.; Rollinger, J. M.; Schuster, D.; Breuss, J. M.; Bochkov, V.; Mihovilovic, M. D.; Kopp, B.; Bauer, R.; Dirsch, V. M.; Stuppner, H., Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances* **2015**, *33* (8), 1582–1614.
100. Coley, A. B.; Ward, A.; Keeton, A. B.; Chen, X.; Maxuitenko, Y.; Prakash, A.; Li, F.; Foote, J. B.; Buchsbaum, D. J.; Piazza, G. A., Pan-RAS inhibitors: Hitting multiple RAS isozymes with one stone. *Advances in cancer research* **2022**, *153*, 131–168.
101. Kim, D.; Herdeis, L.; Rudolph, D.; Zhao, Y.; Böttcher, J.; Vides, A.; Ayala-Santos, C. I.; Pourfarjam, Y.; Cuevas-Navarro, A.; Xue, J. Y.; Mantoulidis, A.; Bröker, J.; Wunberg, T.; Schaaf, O.; Popow, J.; Wolkerstorfer, B.; Kropatsch, K. G.; Qu, R.; Stanchina, E. d.; Sang, B.; Li, C.; McConnell, D. B.; Kraut, N.; Lito, P., Pan-KRAS inhibitor disables oncogenic signalling and tumour growth. *Nature* **2023**, *619* (7968), 160–166.
102. Corcoran, R. B., A single inhibitor for all KRAS mutations. *Nature cancer* **2023**, *4* (8), 1060–1062.
103. Blay, V.; Tolani, B.; Ho, S. P.; Arkin, M. R., High-Throughput Screening: today's biochemical and cell-based approaches. *Drug discovery today* **2020**, *25* (10), 1807–1821.
104. Medina-Franco, J. L.; Giulianotti, M. A.; Welmaker, G. S.; Houghten, R. A., Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug discovery today* **2013**, *18* (9–10), 495–501.
105. Ramsay, R. R.; Popovic-Nikolic, M. R.; Nikolic, K.; Uliassi, E.; Bolognesi, M. L., A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clinical and translational medicine* **2018**, *7* (1), 3.
106. Chang, Y.; Hawkins, B. A.; Du, J. J.; Groundwater, P. W.; Hibbs, D. E.; Lai, F., A Guide to In Silico Drug Design. *Pharmaceutics* **2022**, *15* (1).
107. Ajmeera, D.; Ajmeera, R., Drug repurposing: A novel strategy to target cancer stem cells and therapeutic resistance. *Genes & diseases* **2024**, *11* (1), 148–175.
108. Hua, Y.; Dai, X.; Xu, Y.; Xing, G.; Liu, H.; Lu, T.; Chen, Y.; Zhang, Y., Drug repositioning: Progress and challenges in drug discovery for various diseases. *European journal of medicinal chemistry* **2022**, *234*, 114239.
109. Kulkarni, V. S.; Alagarsamy, V.; Solomon, V. R.; Jose, P. A.; Murugesan, S., Drug Repurposing: An Effective Tool in Modern Drug Discovery. *Russian journal of bioorganic chemistry* **2023**, *49* (2), 157–166.
110. Roessler, H. I.; Knoers, N. V. A. M.; van Haelst, M. M.; van Haften, G., Drug Repurposing for Rare Diseases. *Trends in pharmacological sciences* **2021**, *42* (4), 255–267.
111. Parisi, D.; Adasme, M. F.; Sveshnikova, A.; Bolz, S. N.; Moreau, Y.; Schroeder, M., Drug repositioning or target repositioning: A structural perspective of drug-target-indication relationship for available repurposed drugs. *Computational and structural biotechnology journal* **2020**, *18*, 1043–1055.
112. Ng, Y. L.; Salim, C. K.; Chu, J. J. H., Drug repurposing for COVID-19: Approaches, challenges and promising candidates. *Pharmacology & therapeutics* **2021**, *228*, 107930.
113. Ashburn, T. T.; Thor, K. B., Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews. Drug discovery* **2004**, *3* (8), 673–683.
114. Spellacy, S. E.; Hess, D. C., Recycled Translation: Repurposing Drugs for Stroke. *Translational stroke research* **2022**, *13* (6), 866–880.

115. Ko, Y., Computational Drug Repositioning: Current Progress and Challenges. *Applied Sciences* **2020**, *10* (15), 5076.
116. Palve, V.; Liao, Y.; Remsing Rix, L. L.; Rix, U., Turning liabilities into opportunities: Off-target based drug repurposing in cancer. *Seminars in cancer biology* **2021**, *68*, 209–229.
117. Shameer, K.; Glicksberg, B. S.; Hodos, R.; Johnson, K. W.; Badgeley, M. A.; Readhead, B.; Tomlinson, M. S.; O'Connor, T.; Miotto, R.; Kidd, B. A.; Chen, R.; Ma'ayan, A.; Dudley, J. T., Systematic analyses of drugs and disease indications in RepurposeDB reveal pharmacological, biological and epidemiological factors influencing drug repositioning. *Briefings in bioinformatics* **2018**, *19* (4), 656–678.
118. Gallo, K.; Goede, A.; Eckert, A.; Moahamed, B.; Preissner, R.; Gohlke, B.-O., PROMISCUOUS 2.0: a resource for drug-repositioning. *Nucleic acids research* **2021**, *49* (D1), D1373-D1380.
119. Pinzi, L.; Rastelli, G., Identification of Target Associations for Polypharmacology from Analysis of Crystallographic Ligands of the Protein Data Bank. *Journal of chemical information and modeling* **2020**, *60* (1), 372–390.
120. Schipper, L. J.; Zeverijn, L. J.; Garnett, M. J.; Voest, E. E., Can Drug Repurposing Accelerate Precision Oncology? *Cancer discovery* **2022**, *12* (7), 1634–1641.
121. Li, Y. Y.; Jones, S. J., Drug repositioning for personalized medicine. *Genome medicine* **2012**, *4* (3), 27.
122. Abdelsayed, M.; Kort, E. J.; Jovinge, S.; Mercola, M., Repurposing drugs to treat cardiovascular disease in the era of precision medicine. *Nature reviews. Cardiology* **2022**, *19* (11), 751–764.
123. K W To, K.; Cho, W. C. S., Drug Repurposing for Cancer Therapy in the Era of Precision Medicine. *Current molecular pharmacology* **2022**, *15* (7), 895–903.
124. Fabro, F.; Kannegieter, N. M.; Graaf, E. L. d.; Queiroz, K.; Lamfers, M. L. M.; Ressa, A.; Leenstra, S., Novel kinome profiling technology reveals drug treatment is patient and 2D/3D model dependent in glioblastoma. *Frontiers in oncology* **2022**, *12*, 1012236.
125. Knight, J. D. R.; Pawson, T.; Gingras, A.-C., Profiling the kinome: current capabilities and future challenges. *Journal of proteomics* **2013**, *81*, 43–55.
126. Radu, M.; Chernoff, J., Recent advances in methods to assess the activity of the kinome. *F1000Research* **2017**, *6*, 1004.
127. Choudhury, C.; Arul Murugan, N.; Priyakumar, U. D., Structure-based drug repurposing: Traditional and advanced AI/ML-aided methods. *Drug discovery today* **2022**, *27* (7), 1847–1861.
128. Saez-Ayala, M.; Hoffer, L.; Abel, S.; Ben Yaala, K.; Sicard, B.; Andrieu, G. P.; Latiri, M.; Davison, E. K.; Ciufolini, M. A.; Brémond, P.; Rebuffet, E.; Roche, P.; Derviaux, C.; Voisset, E.; Montersino, C.; Castellano, R.; Collette, Y.; Asnafi, V.; Betzi, S.; Dubreuil, P.; Combes, S.; Morelli, X., From a drug repositioning to a structure-based drug design approach to tackle acute lymphoblastic leukemia. *Nature communications* **2023**, *14* (1), 3079.
129. Adasme, M. F.; Parisi, D.; Sveshnikova, A.; Schroeder, M., Structure-based drug repositioning: Potential and limits. *Seminars in cancer biology* **2021**, *68*, 192–198.
130. Xue, H.; Li, J.; Xie, H.; Wang, Y., Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *International journal of biological sciences* **2018**, *14* (10), 1232–1244.
131. Pillaiyar, T.; Meenakshisundaram, S.; Manickam, M.; Sankaranarayanan, M., A medicinal chemistry perspective of drug repositioning: Recent advances and challenges in drug discovery. *European journal of medicinal chemistry* **2020**, *195*, 112275.

132. Krishnamurthy, N.; Grimshaw, A. A.; Axson, S. A.; Choe, S. H.; Miller, J. E., Drug repurposing: a systematic review on root causes, barriers and facilitators. *BMC health services research* **2022**, *22* (1), 970.
133. Hernandez, J. J.; Pryszyk, M.; Smith, L.; Yanchus, C.; Kurji, N.; Shahani, V. M.; Molinski, S. V., Giving Drugs a Second Chance: Overcoming Regulatory and Financial Hurdles in Repurposing Approved Drugs As Cancer Therapeutics. *Frontiers in oncology* **2017**, *7*, 273.
134. Weth, F. R.; Hoggarth, G. B.; Weth, A. F.; Paterson, E.; White, M. P. J.; Tan, S. T.; Peng, L.; Gray, C., Unlocking hidden potential: advancements, approaches, and obstacles in repurposing drugs for cancer therapy. *British journal of cancer* **2024**, *130* (5), 703–715.
135. Waring, M. J.; Arrowsmith, J.; Leach, A. R.; Leeson, P. D.; Mandrell, S.; Owen, R. M.; Pairaudeau, G.; Pennie, W. D.; Pickett, S. D.; Wang, J.; Wallace, O.; Weir, A., An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nature reviews. Drug discovery* **2015**, *14* (7), 475–486.
136. Wu, T.; Chen, Y.; Yang, C.; Lu, M.; Geng, F.; Guo, J.; Pi, Y.; Ling, Y.; Xu, J.; Cai, T.; Lu, L.; Zhou, Y., Systematical Evaluation of the Structure-Cardiotoxicity Relationship of 7-Azaindazole-based PI3K Inhibitors Designed by Bioisosteric Approach. *Cardiovascular toxicology* **2023**, *23* (11-12), 364–376.
137. Chamikara, M. A. P.; Chen, Y.-P. P., MedFused: A framework to discover the relationships between drug chemical functional group impacts and side effects. *Computers in Biology and Medicine* **2021**, *133*, 104361.
138. Saunders, K. C., Automation and robotics in ADME screening. *Drug discovery today. Technologies* **2004**, *1* (4), 373–380.
139. Wan, H.; Holmén, A. G., High throughput screening of physicochemical properties and in vitro ADME profiling in drug discovery. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **2009**, *12* (3), 315–329.
140. Ferdinandy, P.; Baczkó, I.; Bencsik, P.; Giricz, Z.; Görbe, A.; Pacher, P.; Varga, Z. V.; Varró, A.; Schulz, R., Definition of hidden drug cardiotoxicity: paradigm change in cardiac safety testing and its clinical implications. *European heart journal* **2019**, *40* (22), 1771–1777.
141. Kelleni, M. T.; Abdelbasset, M., Drug Induced Cardiotoxicity: Mechanism, Prevention and Management. In *Cardiotoxicity*, Tan, W., Ed. IntechOpen: [Erscheinungsort nicht ermittelbar], 2018.
142. Varga, Z. V.; Ferdinandy, P.; Liaudet, L.; Pacher, P., Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2015**, *309* (9), H1453-67.
143. Creanza, T. M.; Delre, P.; Ancona, N.; Lentini, G.; Saviano, M.; Mangiardi, G. F., Structure-Based Prediction of hERG-Related Cardiotoxicity: A Benchmark Study. *Journal of chemical information and modeling* **2021**, *61* (9), 4758–4770.
144. Lamothe, S. M.; Guo, J.; Li, W.; Yang, T.; Zhang, S., The Human Ether-a-go-go-related Gene (hERG) Potassium Channel Represents an Unusual Target for Protease-mediated Damage. *The Journal of biological chemistry* **2016**, *291* (39), 20387–20401.
145. Schuster, D.; Laggner, C.; Langer, T., Why Drugs Fail - A Study on Side Effects in New Chemical Entities. *Current pharmaceutical design* **2005**, *11* (27), 3545–3559.
146. Piper, D. R.; Duff, S. R.; Eliason, H. C.; Frazee, W. J.; Frey, E. A.; Fuerstenau-Sharp, M.; Jachec, C.; Marks, B. D.; Pollok, B. A.; Shekhani, M. S.; Thompson, D. V.; Whitney, P.; Vogel, K. W.; Hess, S. D., Development of the predictor HERG fluorescence polarization assay using a membrane protein enrichment approach. *Assay and drug development technologies* **2008**, *6* (2), 213–223.

147. Parker, J. A.; Fung, E. S.; Trejo-Martin, A.; Liang, L.; Gibbs, K.; Bandara, S.; Chen, S.; Sandhu, R.; Bercu, J.; Maier, A., The utility of hERG channel inhibition data in the derivation of occupational exposure limits. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* **2022**, *134*, 105224.
148. Sanguinetti, M. C.; Tristani-Firouzi, M., hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* **2006**, *440* (7083), 463–469.
149. Sardana, D.; Zhu, C.; Zhang, M.; Gudivada, R. C.; Yang, L.; Jegga, A. G., Drug repositioning for orphan diseases. *Briefings in bioinformatics* **2011**, *12* (4), 346–356.
150. Rehman, W.; Arfons, L. M.; Lazarus, H. M., The rise, fall and subsequent triumph of thalidomide: lessons learned in drug development. *Therapeutic advances in hematology* **2011**, *2* (5), 291–308.
151. Thalidomide approved. *Positively aware : the monthly journal of the Test Positive Aware Network* **1998**, *9* (5), 16.
152. Sievers, Q. L.; Petzold, G.; Bunker, R. D.; Renneville, A.; Słabicki, M.; Liddicoat, B. J.; Abdulrahman, W.; Mikkelsen, T.; Ebert, B. L.; Thomä, N. H., Defining the human C2H2 zinc finger degrome targeted by thalidomide analogs through CRBN. *Science (New York, N.Y.)* **2018**, *362* (6414).
153. Debela, D. T.; Muzazu, S. G.; Heraro, K. D.; Ndalama, M. T.; Mesele, B. W.; Haile, D. C.; Kitui, S. K.; Manyazewal, T., New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine* **2021**, *9*, 20503121211034366.
154. Mee, T.; Kirkby, N. F.; Defourny, N. N.; Kirkby, K. J.; Burnet, N. G., The use of radiotherapy, surgery and chemotherapy in the curative treatment of cancer: results from the FORTY (Favourable Outcomes from RadioTherapY) project. *The British journal of radiology* **2023**, *96* (1152), 20230334.
155. Schwartzberg, L.; Kim, E. S.; Liu, D.; Schrag, D., Precision Oncology: Who, How, What, When, and When Not? *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting* **2017**, *37*, 160–169.
156. Choi, Y. Y.; Noh, S. H.; Cheong, J.-H., Evolution of Gastric Cancer Treatment: From the Golden Age of Surgery to an Era of Precision Medicine. *Yonsei medical journal* **2015**, *56* (5), 1177–1185.
157. Khan, J.; Ullah, A.; Waheed, A.; Karki, N. R.; Adhikari, N.; Vemavarapu, L.; Belakhlef, S.; Bendjemil, S. M.; Mehdizadeh Seraj, S.; Sidhwa, F.; Ghleilib, I.; Foroutan, S.; Blakely, A. M.; Del Rivero, J.; Karim, N. A.; Vail, E.; Heneidi, S.; Mesa, H., Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST): A Population-Based Study Using the SEER Database, including Management and Recent Advances in Targeted Therapy. *Cancers* **2022**, *14* (15).
158. Demetri, G. D.; Mehren, M. v.; Antonescu, C. R.; DeMatteo, R. P.; Ganjoo, K. N.; Maki, R. G.; Pisters, P. W. T.; Raut, C. P.; Riedel, R. F.; Schuetze, S.; Sundar, H. M.; Trent, J. C.; Wayne, J. D., NCCN Task Force report: update on the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* **2010**, *8 Suppl 2* (0 2), S1-41; quiz S42-4.
159. Ness, J. Human Sarcoma Model Initiative.
160. Joensuu, H.; Wardelmann, E.; Eriksson, M.; Reichardt, A.; Hall, K. S.; Schütte, J.; Cameron, S.; Hohenberger, P.; Sihto, H.; Jost, P. J.; Lindner, L. H.; Bauer, S.; Nilsson, B.; Kallio, R.; Pesonen, T.; Reichardt, P., KIT and PDGFRA Mutations and Survival of Gastrointestinal Stromal Tumor Patients Treated with Adjuvant Imatinib in a Randomized Trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2023**, *29* (17), 3313–3319.

161. Lasota, J.; Miettinen, M., KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Seminars in diagnostic pathology* **2006**, *23* (2), 91–102.
162. Mei, L.; Smith, S. C.; Faber, A. C.; Trent, J.; Grossman, S. R.; Stratakis, C. A.; Boikos, S. A., Gastrointestinal Stromal Tumors: The GIST of Precision Medicine. *Trends in cancer* **2018**, *4* (1), 74–91.
163. Reid, T., Reintroduction of imatinib in GIST. *Journal of gastrointestinal cancer* **2013**, *44* (4), 385–392.
164. Cohen, P.; Cross, D.; Jänne, P. A., Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nature reviews. Drug discovery* **2021**, *20* (7), 551–569.
165. Roskoski, R., A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological research* **2015**, *100*, 1–23.
166. Sridhar, R.; Hanson-Painton, O.; Cooper, D. R., Protein kinases as therapeutic targets. *Pharmaceutical research* **2000**, *17* (11), 1345–1353.
167. Front Matter. In *Fragment-based Drug Discovery Lessons and Outlook*, Erlanson, D. A.; Jahnke, W., Eds. Wiley: 2016.
168. Lee, J. C.; Laydon, J. T.; McDonnell, P. C.; Gallagher, T. F.; Kumar, S.; Green, D.; McNulty, D.; Blumenthal, M. J.; Heys, J. R.; Landvatter, S. W.; Strickler, J. E.; McLaughlin, M. M.; Siemens, I. R.; Fisher, S. M.; Livi, G. P.; White, J. R.; Adams, J. L.; Young, P. R., A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **1994**, *372* (6508), 739–746.
169. Kawamoto, S.; Hidaka, H., 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochemical and biophysical research communications* **1984**, *125* (1), 258–264.
170. Iqbal, N.; Iqbal, N., Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemotherapy research and practice* **2014**, *2014*, 357027.
171. Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; Eyck, L. F. t.; Ashford, V. A.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M., Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science (New York, N.Y.)* **1991**, *253* (5018), 407–414.
172. Arter, C.; Trask, L.; Ward, S.; Yeoh, S.; Bayliss, R., Structural features of the protein kinase domain and targeted binding by small-molecule inhibitors. *The Journal of biological chemistry* **2022**, *298* (8), 102247.
173. Ballard, P.; Bradbury, R. H.; Harris, C. S.; Hennequin, L. F. A.; Hickinson, M.; Johnson, P. D.; Kettle, J. G.; Klinowska, T.; Leach, A. G.; Morgentin, R.; Pass, M.; Ogilvie, D. J.; Olivier, A.; Warin, N.; Williams, E. J., Inhibitors of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase: Novel C-5 substituted anilinoquinazolines designed to target the ribose pocket. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2006**, *16* (6), 1633–1637.
174. Becker, R.; Pederick, J. L.; Dawes, E. G.; Bruning, J. B.; Abell, A. D., Structure-guided design and synthesis of ATP-competitive N-acyl-substituted sulfamide d-alanine-d-alanine ligase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2023**, *96*, 117509.
175. Boutard, N.; Białas, A.; Sabiniarz, A.; Guzik, P.; Banaszak, K.; Biela, A.; Bień, M.; Buda, A.; Bugaj, B.; Cieluch, E.; Cierpich, A.; Dudek, Ł.; Eggenweiler, H.-M.; Fogt, J.; Gaik, M.; Gondela, A.; Jakubiec, K.; Jurzak, M.; Kitlińska, A.; Kowalczyk, P.; Kujawa, M.; Kwecińska, K.; Leś, M.; Lindemann, R.; Maciuszek, M.; Mikulski, M.; Niedziejko, P.; Obara, A.; Pawlik, H.; Rzymyski, T.; Sieprawska-Lupa, M.; Sowińska, M.; Szeremeta-Spisak, J.; Stachowicz, A.; Tomczyk, M. M.; Wiklik, K.; Włoszczak, Ł.; Ziemiańska, S.; Zarębski, A.; Brzózka, K.; Nowak, M.; Fabritius, C.-H., Discovery and Structure-Activity

- Relationships of N-Aryl 6-Aminoquinoxalines as Potent PFKFB3 Kinase Inhibitors. *ChemMedChem* **2019**, *14* (1), 169–181.
176. Sharma, V.; Gupta, M., Designing of kinase hinge binders: A medicinal chemistry perspective. *Chemical biology & drug design* **2022**, *100* (6), 968–980.
177. Lauber, B. S.; Hardegger, L. A.; Alam, K. A.; Lund, B. A.; Dumele, O.; Harder, M.; Kuhn, B.; Engh, R. A.; Diederich, F., Addressing the Glycine-Rich Loop of Protein Kinases by a Multi-Faceted Interaction Network: Inhibition of PKA and a PKB Mimic. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2016**, *22* (1), 211–221.
178. Traxler, P.; Furet, P., Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors. *Pharmacology & therapeutics* **1999**, *82* (2-3), 195–206.
179. Umezawa, K.; Kii, I., Druggable Transient Pockets in Protein Kinases. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2021**, *26* (3).
180. Bayliss, R.; Fry, A.; Haq, T.; Yeoh, S., On the molecular mechanisms of mitotic kinase activation. *Open biology* **2012**, *2* (11), 120136.
181. Huse, M.; Kuriyan, J., The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **2002**, *109* (3), 275–282.
182. Nolen, B.; Taylor, S.; Ghosh, G., Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Molecular cell* **2004**, *15* (5), 661–675.
183. Michelotti, A.; Scordilli, M. d.; Bertoli, E.; Carlo, E. d.; Del Conte, A.; Bearz, A., NSCLC as the Paradigm of Precision Medicine at Its Finest: The Rise of New Druggable Molecular Targets for Advanced Disease. *International journal of molecular sciences* **2022**, *23* (12).
184. Maria Marchiano, R. d.; Di Sante, G.; Piro, G.; Carbone, C.; Tortora, G.; Boldrini, L.; Pietragalla, A.; Daniele, G.; Tredicine, M.; Cesario, A.; Valentini, V.; Gallo, D.; Babini, G.; D'Oria, M.; Scambia, G., Translational Research in the Era of Precision Medicine: Where We Are and Where We Will Go. *Journal of personalized medicine* **2021**, *11* (3).
185. Mohammadi, M.; IJzerman, N. S.; Hollander, D. d.; Bleckman, R. F.; Oosten, A. W.; Desar, I. M. E.; Reyners, A. K. L.; Steeghs, N.; Gelderblom, H., Improved Efficacy of First-Line Imatinib in Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST): The Dutch GIST Registry Data. *Targeted oncology* **2023**, *18* (3), 415–423.
186. Zhao, Z.; Bourne, P. E., Overview of Current Type I/II Kinase Inhibitors. In *Next Generation Kinase Inhibitors*, Shapiro, Ed. Springer International Publishing: Cham, 2020; pp 13–28.
187. Xing, L.; Klug-Mcleod, J.; Rai, B.; Lunney, E. A., Kinase hinge binding scaffolds and their hydrogen bond patterns. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2015**, *23* (19), 6520–6527.
188. Rachman, M.; Bajusz, D.; Hetényi, A.; Scarpino, A.; Merő, B.; Egyed, A.; Buday, L.; Barril, X.; Keserű, G. M., Discovery of a novel kinase hinge binder fragment by dynamic undocking. *RSC medicinal chemistry* **2020**, *11* (5), 552–558.
189. Najjar, A.; Platzer, C.; Luft, A.; Aßmann, C. A.; Elghazawy, N. H.; Erdmann, F.; Sippl, W.; Schmidt, M., Computer-aided design, synthesis and biological characterization of novel inhibitors for PKMYT1. *European journal of medicinal chemistry* **2019**, *161*, 479–492.
190. Lei, H.; Jia, F.; Cao, M.; Wang, J.; Guo, M.; Zhu, M.; Zuo, D.; Zhai, X., An exploration of solvent-front region high affinity moiety leading to novel potent ALK & ROS1 dual inhibitors with mutant-combating effects. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2019**, *27* (20), 115051.
191. Arencibia, J. M.; Fröhner, W.; Krupa, M.; Pastor-Flores, D.; Merker, P.; Oellerich, T.; Neimanis, S.; Schmithals, C.; Köberle, V.; Süß, E.; Zeuzem, S.; Stark, H.; Piiper, A.; Odadzic, D.; Schulze, J. O.; Biondi, R. M., An Allosteric Inhibitor Scaffold Targeting the

- PIF-Pocket of Atypical Protein Kinase C Isoforms. *ACS chemical biology* **2017**, *12* (2), 564–573.
192. Liu, W.; Li, P.; Mei, Y., Discovery of SBF1 as an allosteric inhibitor targeting the PIF-pocket of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Journal of molecular modeling* **2019**, *25* (7), 187.
193. Busschots, K.; Lopez-Garcia, L. A.; Lammi, C.; Stroba, A.; Zeuzem, S.; Piiper, A.; Alzari, P. M.; Neimanis, S.; Arencibia, J. M.; Engel, M.; Schulze, J. O.; Biondi, R. M., Substrate-selective inhibition of protein kinase PDK1 by small compounds that bind to the PIF-pocket allosteric docking site. *Chemistry & biology* **2012**, *19* (9), 1152–1163.
194. Chen, Y.; Zhang, L.; Yang, C.; Han, J.; Wang, C.; Zheng, C.; Zhou, Y.; Lv, J.; Song, Y.; Zhu, J., Discovery of benzenesulfonamide derivatives as potent PI3K/mTOR dual inhibitors with in vivo efficacies against hepatocellular carcinoma. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2016**, *24* (5), 957–966.
195. Gandin, V.; Ferrarese, A.; Dalla Via, M.; Marzano, C.; Chilin, A.; Marzaro, G., Targeting kinases with anilinopyrimidines: discovery of N-phenyl-N'-4-(pyrimidin-4-ylamino)phenylurea derivatives as selective inhibitors of class III receptor tyrosine kinase subfamily. *Scientific reports* **2015**, *5*, 16750.
196. Bethke, E.; Pinchuk, B.; Renn, C.; Witt, L.; Schlosser, J.; Peifer, C., From Type I to Type II: Design, Synthesis, and Characterization of Potent Pyrazin-2-ones as DFG-Out Inhibitors of PDGFR β . *ChemMedChem* **2016**, *11* (24), 2664–2674.
197. Kufareva, I.; Abagyan, R., Type-II kinase inhibitor docking, screening, and profiling using modified structures of active kinase states. *Journal of medicinal chemistry* **2008**, *51* (24), 7921–7932.
198. Betzi, S.; Alam, R.; Martin, M.; Lubbers, D. J.; Han, H.; Jakkaraj, S. R.; Georg, G. I.; Schönbrunn, E., Discovery of a potential allosteric ligand binding site in CDK2. *ACS chemical biology* **2011**, *6* (5), 492–501.
199. Goodwin, N. C.; Cianchetta, G.; Burgoon, H. A.; Healy, J.; Mabon, R.; Strobel, E. D.; Allen, J.; Wang, S.; Hamman, B. D.; Rawlins, D. B., Discovery of a Type III Inhibitor of LIM Kinase 2 That Binds in a DFG-Out Conformation. *ACS medicinal chemistry letters* **2015**, *6* (1), 53–57.
200. Fasano, M.; Della Corte, C. M.; Califano, R.; Capuano, A.; Troiani, T.; Martinelli, E.; Ciardiello, F.; Morgillo, F., Type III or allosteric kinase inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert opinion on investigational drugs* **2014**, *23* (6), 809–821.
201. Palmieri, L.; Rastelli, G., α C helix displacement as a general approach for allosteric modulation of protein kinases. *Drug discovery today* **2013**, *18* (7-8), 407–414.
202. Roskoski, R., Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacological research* **2016**, *103*, 26–48.
203. Verweij, J.; Casali, P. G.; Zalcberg, J.; LeCesne, A.; Reichardt, P.; Blay, J.-Y.; Issels, R.; van Oosterom, A.; Hogendoorn, P. C. W.; van Glabbeke, M.; Bertulli, R.; Judson, I., Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet (London, England)* **2004**, *364* (9440), 1127–1134.
204. Casali, P. G.; Zalcberg, J.; Le Cesne, A.; Reichardt, P.; Blay, J.-Y.; Lindner, L. H.; Judson, I. R.; Schöffski, P.; Leyvraz, S.; Italiano, A.; Grünwald, V.; Pousa, A. L.; Kotasek, D.; Sleijfer, S.; Kerst, J. M.; Rutkowski, P.; Fumagalli, E.; Hogendoorn, P.; Litière, S.; Marreaud, S.; van der Graaf, W.; Gronchi, A.; Verweij, J., Ten-Year Progression-Free and Overall Survival in Patients With Unresectable or Metastatic GI Stromal Tumors: Long-Term Analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Italian Sarcoma Group, and Australasian Gastrointestinal Trials Group Intergroup Phase III Randomized Trial on

- Imatinib at Two Dose Levels. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2017**, 35 (15), 1713–1720.
205. Thirasastr, P.; Somaiah, N., Emerging Data on the Safety and Efficacy of Ripretinib for the Treatment of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clinical and experimental gastroenterology* **2023**, 16, 11–19.
206. Xu, Z.; Huo, X.; Tang, C.; Ye, H.; Nandakumar, V.; Lou, F.; Zhang, D.; Jiang, S.; Sun, H.; Dong, H.; Zhang, G.; Liu, Z.; Dong, Z.; Guo, B.; Yan, H.; Yan, C.; Wang, L.; Su, Z.; Li, Y.; Gu, D.; Zhang, X.; Wu, X.; Wei, X.; Hong, L.; Zhang, Y.; Yang, J.; Gong, Y.; Tang, C.; Jones, L.; Huang, X. F.; Chen, S.-Y.; Chen, J., Frequent KIT mutations in human gastrointestinal stromal tumors. *Scientific reports* **2014**, 4, 5907.
207. Serrano, C.; Martín-Broto, J.; Asencio-Pascual, J. M.; López-Guerrero, J. A.; Rubió-Casadevall, J.; Bagué, S.; García-Del-Muro, X.; Fernández-Hernández, J. Á.; Herrero, L.; López-Pousa, A.; Poveda, A.; Martínez-Marín, V., 2023 GEIS Guidelines for gastrointestinal stromal tumors. *Therapeutic advances in medical oncology* **2023**, 15, 17588359231192388.
208. Heinrich, M. C.; Jones, R. L.; Mehren, M. v.; Schöffski, P.; Serrano, C.; Kang, Y.-K.; Cassier, P. A.; Mir, O.; Eskens, F.; Tap, W. D.; Rutkowski, P.; Chawla, S. P.; Trent, J.; Tugnait, M.; Evans, E. K.; Lauz, T.; Zhou, T.; Roche, M.; Wolf, B. B.; Bauer, S.; George, S., Avapritinib in advanced PDGFRA D842V-mutant gastrointestinal stromal tumour (NAVIGATOR): a multicentre, open-label, phase 1 trial. *The Lancet. Oncology* **2020**, 21 (7), 935–946.
209. Teuber, A.; Schulz, T.; Fletcher, B. S.; Gontla, R.; Mühlenberg, T.; Zischinsky, M.-L.; Niggenaber, J.; Weisner, J.; Kleinbölting, S. B.; Lategahn, J.; Sievers, S.; Müller, M. P.; Bauer, S.; Rauh, D., Avapritinib-based SAR studies unveil a binding pocket in KIT and PDGFRA. *Nature communications* **2024**, 15 (1), 63.
210. Jones, R. L.; Serrano, C.; Mehren, M. v.; George, S.; Heinrich, M. C.; Kang, Y.-K.; Schöffski, P.; Cassier, P. A.; Mir, O.; Chawla, S. P.; Eskens, F. A. L. M.; Rutkowski, P.; Tap, W. D.; Zhou, T.; Roche, M.; Bauer, S., Avapritinib in unresectable or metastatic PDGFRA D842V-mutant gastrointestinal stromal tumours: Long-term efficacy and safety data from the NAVIGATOR phase I trial. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **2021**, 145, 132–142.
211. Bano, I.; Butt, U. D.; Mohsan, S. A. H., New challenges in drug discovery. In *Novel Platforms for Drug Delivery Applications*, Elsevier: 2023; pp 619–643.
212. Prasad, S.; Srivastava, A.; Singh, N.; Singh, H.; Saluja, R.; Kumar, A.; Yadav, N.; Qidwai, T., Present and future challenges in therapeutic designing using computational approaches. In *Computational Approaches for Novel Therapeutic and Diagnostic Designing to Mitigate SARS-CoV-2 Infection*, Elsevier: 2022; pp 489–505.
213. Scannell, J. W., *Eroom's Law and the decline in the productivity of biopharmaceutical R&D*. 2023.
214. Scannell, J. W.; Blanckley, A.; Boldon, H.; Warrington, B., Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nature reviews. Drug discovery* **2012**, 11 (3), 191–200.
215. van Norman, G. A., Overcoming the Declining Trends in Innovation and Investment in Cardiovascular Therapeutics: Beyond EROOM's Law. *JACC. Basic to translational science* **2017**, 2 (5), 613–625.
216. Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C., Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, 52 (21), 6752–6756.

217. Erlanson, D. A.; Fesik, S. W.; Hubbard, R. E.; Jahnke, W.; Jhoti, H., Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **2016**, *15* (9), 605–619.
218. Hann, M. M.; Leach, A. R.; Harper, G., Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery. *Journal of chemical information and computer sciences* **2001**, *41* (3), 856–864.
219. Hall, R. J.; Mortenson, P. N.; Murray, C. W., Efficient exploration of chemical space by fragment-based screening. *Progress in biophysics and molecular biology* **2014**, *116* (2-3), 82–91.
220. Hamilton, D. J.; Dekker, T.; Klein, H. F.; Janssen, G. V.; Wijtmans, M.; O'Brien, P.; Esch, I. J. P. d., Escape from planarity in fragment-based drug discovery: A physicochemical and 3D property analysis of synthetic 3D fragment libraries. *Drug discovery today. Technologies* **2020**, *38*, 77–90.
221. McGrady, M. Y.; Colby, S. M.; Nuñez, J. R.; Renslow, R. S.; Metz, T. O., AI for Chemical Space Gap Filling and Novel Compound Generation. 2022.
222. Koutsoukas, A.; Paricharak, S.; Galloway, W. R. J. D.; Spring, D. R.; Ijzerman, A. P.; Glen, R. C.; Marcus, D.; Bender, A., How diverse are diversity assessment methods? A comparative analysis and benchmarking of molecular descriptor space. *Journal of chemical information and modeling* **2014**, *54* (1), 230–242.
223. Makara, G. M., Measuring molecular similarity and diversity: total pharmacophore diversity. *Journal of medicinal chemistry* **2001**, *44* (22), 3563–3571.
224. Bührmann, M.; Kallepu, S.; Warmuth, J. D.; Wiese, J. N.; Ehrst, C.; Vatheuer, H.; Hiller, W.; Seitz, C.; Levy, L.; Czodrowski, P.; Sievers, S.; Müller, M. P.; Rauh, D., Fractory: Pharmacophore-Focused Design, Synthesis, and Evaluation of an sp³-Enriched Fragment Library. *Journal of medicinal chemistry* **2023**, *66* (9), 6297–6314.
225. Kommission, E., Mitteilung der Kommission an das Europäisch Parlament, den Rat, den Europäischen Wirtschafts- und Sozialausschuss und den Ausschuss der Regionen: Eine Arzneimittelstrategie für Europa. Europäische Kommission: Brüssel, 2020.
226. van den Berg, S.; Visser, S. d.; Leufkens, H. G. M.; Hollak, C. E. M., Drug Repurposing for Rare Diseases: A Role for Academia. *Frontiers in pharmacology* **2021**, *12*, 746987.
227. Breuning, M.; Winnacker, M.; Steiner, M., Efficient One-Pot Synthesis of Enantiomerically Pure 2-(Hydroxymethyl)morpholines. *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, *2007* (13), 2100–2106.
228. Henegar, K. E., Concise synthesis of (S)-N-BOC-2-hydroxymethylmorpholine and (S)-N-BOC-morpholine-2-carboxylic acid. *The Journal of organic chemistry* **2008**, *73* (9), 3662–3665.
229. Morgenthaler, M.; Schweizer, E.; Hoffmann-Röder, A.; Benini, F.; Martin, R. E.; Jaeschke, G.; Wagner, B.; Fischer, H.; Bendels, S.; Zimmerli, D.; Schneider, J.; Diederich, F.; Kansy, M.; Müller, K., Predicting and tuning physicochemical properties in lead optimization: amine basicities. *ChemMedChem* **2007**, *2* (8), 1100–1115.
230. Burland, P. A.; Coisson, D.; Osborn, H. M. I., Rapid synthesis of carbohydrate derivatives, including mimetics of C-linked disaccharides and C-linked aza disaccharides, using the hetero-Diels-Alder reaction. *The Journal of organic chemistry* **2010**, *75* (21), 7210–7218.
231. Düfert, A., Pericyclische Reaktionen. In *Organische Synthesemethoden*, Düfert, A., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2023; pp 481–614.
232. Frearson, J. A.; Collie, I. T., HTS and hit finding in academia--from chemical genomics to drug discovery. *Drug discovery today* **2009**, *14* (23-24), 1150–1158.

233. Nelson, S. L., Academic HTS: diverse portraits. *Drug discovery today. Technologies* **2008**, *5* (1), e1-e34.
234. Boichuk, S.; Lee, D. J.; Mehalek, K. R.; Makielski, K. R.; Wozniak, A.; Seneviratne, D. S.; Korzeniewski, N.; Cuevas, R.; Parry, J. A.; Brown, M. F.; Zewe, J.; Taguchi, T.; Kuan, S.-F.; Schöffski, P.; Debiec-Rychter, M.; Duensing, A., Unbiased compound screening identifies unexpected drug sensitivities and novel treatment options for gastrointestinal stromal tumors. *Cancer research* **2014**, *74* (4), 1200–1213.
235. Serrano, C.; George, S., Gastrointestinal Stromal Tumor: Challenges and Opportunities for a New Decade. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2020**, *26* (19), 5078–5085.
236. Grunewald, S.; Klug, L. R.; Mühlenberg, T.; Lategahn, J.; Falkenhorst, J.; Town, A.; Ehrst, C.; Wardelmann, E.; Hartmann, W.; Schildhaus, H.-U.; Treckmann, J.; Fletcher, J. A.; Jung, S.; Czodrowski, P.; Miller, S.; Schmidt-Kittler, O.; Rauh, D.; Heinrich, M. C.; Bauer, S., Resistance to Avapritinib in PDGFRA-Driven GIST Is Caused by Secondary Mutations in the PDGFRA Kinase Domain. *Cancer discovery* **2021**, *11* (1), 108–125.
237. Lankin, D. C.; Chandrakumar, N. S.; Rao, S. N.; Spangler, D. P.; Snyder, J. P., Protonated 3-fluoropiperidines: an unusual fluoro directing effect and a test for quantitative theories of solvation. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115* (8), 3356–3357.
238. Schnider, P.; Dolente, C.; Stalder, H.; Martin, R. E.; Reinmüller, V.; Marty, R.; Wyss Gramberg, C.; Wagner, B.; Fischer, H.; Alker, A. M.; Müller, K., Modulation of Pharmacologically Relevant Properties of Piperidine Derivatives by Functional Groups in an Equatorial or Axial β -Position to the Amino Group. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2020**, *21* (1-2), 212–234.
239. Thiehoff, C.; Rey, Y. P.; Gilmour, R., The Fluorine Gauche Effect: A Brief History. *Israel Journal of Chemistry* **2017**, *57* (1-2), 92–100.
240. Melnykov, K. P.; Nazar, K.; Smyrnov, O.; Skreminskyi, A.; Pavlenko, S.; Klymenko-Ulianov, O.; Shishkina, S.; Volochnyuk, D. M.; Grygorenko, O. O., Mono- and Difluorinated Saturated Heterocyclic Amines for Drug Discovery: Systematic Study of Their Physicochemical Properties. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2023**, *29* (47), e202301383.
241. Berthold, M. R.; Cebon, N.; Dill, F.; Gabriel, T. R.; Kötter, T.; Meinl, T.; Ohl, P.; Sieb, C.; Thiel, K.; Wiswedel, B., KNIME: The Konstanz Information Miner. In *Data Analysis, Machine Learning and Applications: Proceedings of the 31st Annual Conference of the Gesellschaft Für Klassifikation E.V., Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, March 7-9, 2007 (Studies in classification, data analysis, and knowledge organization)*, 1 ed.; Christine, P., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; pp 319–326.
242. Chemistry, U.-U. o. A. M. *UAMCAntwerpen/qed: Release 1.0.2*, Zenodo: 2020.
243. Bickerton, G. R.; Paolini, G. V.; Besnard, J.; Muresan, S.; Hopkins, A. L., Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nature chemistry* **2012**, *4* (2), 90–98.
244. Landrum, G. *RDKit: Open-source cheminformatics*, rdkit/rdkit: 2021_03_3 (Q1 2021) Release; Zenodo: 2021.
245. Bruns, R. F.; Watson, I. A., Rules for identifying potentially reactive or promiscuous compounds. *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55* (22), 9763–9772.
246. Ehrst, C.; Krause, B.; Schmidt, R.; Ehmki, E. S. R.; Rarey, M., SMARTS.plus - A Toolbox for Chemical Pattern Design. *Molecular informatics* **2020**, *39* (12), e2000216.
247. *SeeSAR*, 13.0.5 (Midas); BioSolveIT GmbH: Sankt Augustin, Germany, 2024.
248. Schneider, N.; Lange, G.; Hindle, S.; Klein, R.; Rarey, M., A consistent description of Hydrogen bond and DEhydration energies in protein-ligand complexes: methods behind

- the HYDE scoring function. *Journal of computer-aided molecular design* **2013**, *27* (1), 15–29.
249. Guex, N.; Peitsch, M. C.; Schwede, T., Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis* **2009**, *30 Suppl 1*, S162-73.
250. Bienert, S.; Waterhouse, A.; Beer, T. A. P. d.; Tauriello, G.; Studer, G.; Bordoli, L.; Schwede, T., The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic acids research* **2017**, *45* (D1), D313-D319.
251. Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; Beer, T. A. P. d.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R.; Schwede, T., SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research* **2018**, *46* (W1), W296-W303.
252. Studer, G.; Rempfer, C.; Waterhouse, A. M.; Gumienny, R.; Haas, J.; Schwede, T., QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics (Oxford, England)* **2020**, *36* (6), 1765–1771.
253. Bertoni, M.; Kiefer, F.; Biasini, M.; Bordoli, L.; Schwede, T., Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific reports* **2017**, *7* (1), 10480.
254. Schrodinger, LLC, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. 2015.
255. Sommer, K.; Friedrich, N.-O.; Bietz, S.; Hilbig, M.; Inhester, T.; Rarey, M., UNICON: A Powerful and Easy-to-Use Compound Library Converter. *Journal of chemical information and modeling* **2016**, *56* (6), 1105–1111.
256. Urbaczek, S.; Kolodzik, A.; Fischer, J. R.; Lippert, T.; Heuser, S.; Groth, I.; Schulz-Gasch, T.; Rarey, M., NAOMI: on the almost trivial task of reading molecules from different file formats. *Journal of chemical information and modeling* **2011**, *51* (12), 3199–3207.
257. Urbaczek, S.; Kolodzik, A.; Rarey, M., The valence state combination model: a generic framework for handling tautomers and protonation states. *Journal of chemical information and modeling* **2014**, *54* (3), 756–766.
258. Madeira, F.; Madhusoodanan, N.; Lee, J.; Eusebi, A.; Niewielska, A.; Tivey, A. R. N.; Lopez, R.; Butcher, S., The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic acids research* **2024**, *52* (W1), W521-W525.
259. Graef, J.; Ehrt, C.; Diedrich, K.; Poppinga, M.; Ritter, N.; Rarey, M., Searching Geometric Patterns in Protein Binding Sites and Their Application to Data Mining in Protein Kinase Structures. *Journal of medicinal chemistry* **2022**, *65* (2), 1384–1395.
260. Liebscher, J.; Neumann, B.; Hartmann, H., Eine einfache Synthese von β -Chlorzimtsäurenitrilen nach einer modifizierten Vilsmeier-Haack-Arnold-Reaktion. *Journal für Praktische Chemie* **1983**, *325* (6), 915–918.

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Warmuth, Jonas Damian

172380

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):

Konzeptionierung und Etablierung von zwei divergierenden Ansätzen zur Beschleunigung der akademischen und industriellen Wirkstoffentwicklungskaskade

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)