

STRUKTURBASIERTES DESIGN, SYNTHESE UND
EVALUIERUNG VON INHIBITOREN KREBSRELEVANTER
EGFR-MUTATIONEN

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Fakultät Chemie und Chemische Biologie

der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Tobias Grabe

Dortmund 2021

Erstgutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh

Zweitgutachter: Prof. Dr. Paul Czodrowski

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2017 bis August 2021 unter Leitung von Prof. Dr. Daniel Rauh im Fachbereich für Medizinische Chemie der Fakultät Chemie und Chemische Biologie an der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Im Rahmen dieser Arbeit sind die Masterarbeit von Jonas Warmuth (2018) und die Bachelorarbeit von Tom Schulz (2019) entstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

T. Grabe, J. Lategahn, D. Rauh. C797S Resistance: The Undruggable EGFR Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer? *ACS Med Chem Lett.* **2018**, *9*, 779-782.

J. Lategahn, M. Keul, P. Klövekorn, H. L. Tumbrink, J. Niggenaber, M. P. Müller, L. Hodson, M. Flasshoff, J. Hardick, **T. Grabe**, J. Engel, C. Schultz-Fademrecht, M. Baumann, J. Ketzer, T. Mühlenberg, W. Hiller, G. Günther, A. Unger, H. Müller, A. Heimsoeth, C. Golz, B. Blank-Landeshammer, L. Kollipara, R. P. Zahedi, C. Strohmam, J. G. Hengstler, W. A. L. van Otterlo, S. Bauer, D. Rauh. Inhibition of Osimertinib-Resistant Epidermal Growth Factor Receptor EGFR-T790M/C797S. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10789-10801.

J. Lategahn⁺, J. Hardick⁺, **T. Grabe**⁺, J. Niggenaber⁺, K. Jeyakumar, M. Keul, H. L. Tumbrink, C. Becker, L. Hodson, T. Kirschner, P. Klövekorn, J. Ketzer, M. Baumann, S. Terheyden, A. Unger, J. Weisner, M. P. Müller, W. A. L. van Otterlo, S. Bauer, D. Rauh. Targeting Her2-insYVMA with Covalent Inhibitors - A Focused Compound Screening and Structure-Based Design Approach. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 11725-11755.

J. Niggenaber, L. Heyden, **T. Grabe**, M. P. Müller, J. Lategahn, D. Rauh. Complex Crystal Structures of EGFR with Third-Generation Kinase Inhibitors and Simultaneously Bound Allosteric Ligands. *ACS Med Chem Lett.* **2020**, *11*, 2484-2490.

⁺Diese Autoren trugen gleichermaßen zur Publikation bei.

“All we have to decide is what to do with the time that is given us” – J.R.R. Tolkien

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen Dr. Marina Keul, Kirujan Jeyakumar, Dr. Janina Niggenaber mit denen ich verschiedenste Projekte bearbeiten durfte. Meinen aktuellen und damaligen Kollegen Sven, Jörn, Lena, Mike, Rajesh, Lisa, Marius, Shiva, Laura, Julia, Helena, Niklas, Luke und Steven danke ich für eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Ebenfalls bedanke ich mich bei meinen Bachelor- und Masterstudenten Tom Schulz und Jonas Warmuth für ihr Bemühen und ihre spannenden Ergebnisse während ihrer Abschlussarbeiten. Bedanken möchte ich mich zusätzlich bei Dr. Jörn Weisner und Dr. Matthias Müller für ihren Rat bei jedweder Fragestellung im biologischen Kontext.

Ein besonderer Dank gilt Andreas Arndt für die Generierung eines Großteils der biochemischen Daten und der allgemeinen Unterstützung im Labor. Bei Martina Reibner, Petra Alhorn, Maria Sergani und Ulrich Schoppe möchte ich mich herzlich für ihre administrative Unterstützung bedanken.

Bei Prof. Dr. Paul Czodrowski bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Tonia, Sven und Jörn möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Zusätzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der gemeinsamen Einrichtung, insbesondere der NMR- und der HRMS-Abteilung, bedanken. Ein weiterer Dank gilt meinen frühen Kommilitonen Dennis Vogelsang und Simon Egger und Mark Grobe, die das zähe Bachelor-Studium erträglich gemacht haben.

Bei meinem Bruder Bastian möchte ich mich für den damaligen Rat zum Chemiestudium und die Unterstützung im Bereich der NMR-Analytik und neben der Arbeit bedanken.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie und meiner Freundin Tonia für ihre Unterstützung und Geduld während dieser Promotion.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1. Personalisierte Krebstherapie	9
1.2. Die Rezeptortyrosinkinase EGFR	10
1.3. Entwicklung von EGFR-Inhibitoren	13
1.4. Aktuelle Herausforderungen in der Entwicklung von EGFR-Inhibitoren	20
1.4.1. C797S-Resistenzmutation gegenüber EGFR-Drittgenerations-Inhibitoren	20
1.4.2. Alternative Nukleophile zur kovalenten Adressierung von EGFR	25
1.4.3. EGFR-Exon20-Insertionen als Treibermutationen	28
2. Motivation und Zielsetzung	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Alternative Elektrophile zur Adressierung der C797S-Resistenzmutation	32
3.1.1. Boronsäuren zur kovalenten Adressierung der C797S-Resistenzmutation	32
3.1.2. S(VI)-Fluor-Verbindungen zur kovalenten Adressierung der C797S-Resistenzmutation	38
3.2. Reversible Aminopyrimidine zur Adressierung von C797S-Resistenzmutationen ...	43
3.2.1. Ableitung einer Struktur-Wirkungsbeziehung für die Besetzung der hydrophoben Tasche	47
Biologische Evaluierung der Substanzbibliothek reversibler Aminopyrimidine	51
3.2.2. Optimierung der zellulären Aktivität der reversiblen Aminopyrimidine	55
3.2.3. Reversible 2-Aminopyrimidine als EGFR-Exon20ins-Inhibitoren	64
3.2.4. Zusammenfassung	65
3.3 Hybrid-Inhibitoren basierend auf Nazartinib und BI-4020	67
3.3.1. Hintergrund	67
3.3.2. Synthese einer fokussierten <i>N</i> -Benzimidazol-2-yl-amid Substanzbibliothek	68
3.3.3. Evaluierung der <i>N</i> -Benzimidazol-2-yl-amid Inhibitoren	71
3.3.4. Untersuchung der EGFR-G719S Aktivierungsmutante	76

4. Zusammenfassung & Ausblick	79
5. Summary and Outlook	82
5. Experimenteller Teil	85
5.1. Biochemische Experimente.....	85
5.1.1. HTRF-Assay	85
5.1.2. Aufsetzen des HTRF-Assay für EGFR-G719S.....	86
5.1.3. CTG-Assay	87
5.1.4. Kristallisationsstudien	87
5.2. Synthesevorschriften.....	89
6. Anhang	164
6.1. Literaturverzeichnis	164

Abkürzungsverzeichnis

ALK	Anaplastische Lymphomkinase
ATP	Adenosintriphosphat
CML	Chronisch-myeloische Leukämie
CTG	CellTiter-Glo
Da	Dalton
del	Deletion
DCE	1,2-Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DME	Dimethoxyethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure (engl. DNA - <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. <i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosin-Austauschfaktor (engl. <i>guanosine exchange factor</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
HER	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. <i>human epidermal growth factor receptor</i>)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRTF	homogene Zeit-aufgelöste Fluoreszenz (engl. <i>homogeneous time resolved fluorescence</i>)
HSAB	engl. <i>hard and soft acids and bases</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration

ins	Insertion
LC	Flüssigchromatographie (engl. <i>liquid chromatography</i>)
min	Minute
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
MAPK	Mitogen-aktiviertes Protein Kinase (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MAP2K	Mitogen-aktiviertes Protein Kinase Kinase (engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>)
MAP3K	Mitogen-aktiviertes Protein Kinase Kinase Kinase (engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>)
MS	Massenspektrometrie
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (engl. <i>non-small cell lung carcinoma</i>)
ovn	Über Nacht (engl. <i>over night</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PFS	Progressionsfreies Überleben (engl. <i>progression free survival</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
RR	Ansprechrage (engl. <i>response rate</i>)
Rt	Raumtemperatur
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom (engl. <i>small cell lung carcinoma</i>)
SOS	engl. <i>son of sevenless</i>
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiuntetrafluoroborat
TEA	Triethylamin
TGF- α	Transformierender Wachstumsfaktor (engl. <i>transforming growth factor</i>)
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Heutzutage ist Krebs hinter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt. Im Jahr 2020 stellten Lungen- und Bronchialkarzinome mit 1,8 Millionen Todesfällen weltweit die tödlichste aller Krebserkrankungen dar.^[1-2] Bei Lungenkrebs wird zwischen kleinzelligem (SCLC, *small cell lung carcinoma*) und nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC, *non-small cell lung carcinoma*) unterschieden, wobei der nicht-kleinzellige Lungenkrebs etwa 80% aller Fälle ausmacht.^[3] NSCLC-Patienten zeigen ohne Behandlung eine mittlere Überlebensdauer von vier bis fünf Monaten und eine Ein-Jahr-Überlebensrate von unter 10%. Eine Behandlung mit zytotoxischer Chemotherapie erzielt lediglich eine bescheidene Steigerung der Überlebensdauer der Patienten, geht aber zugleich mit starken Nebenwirkungen einher, welche die Lebensqualität erheblich reduzieren.^[4-6] Die Toxizität der Chemotherapie ist bedingt durch den zugrundeliegenden Wirkmechanismus, also die Inhibition der Zellteilung, welcher jedoch auch gesunde Zellen betrifft. Die Limitationen der Chemotherapie-Behandlung erforderten somit die Entwicklung neuartiger Therapieformen.

1.1. Personalisierte Krebstherapie

Seit der Entdeckung der Struktur der DNS (Desoxyribonukleinsäure) als Träger der Erbinformation durch WATSON und CRICK über die Erschließung des menschlichen Genoms durch Sequenzierungsmethoden bis hin zu modernen, breit verfügbaren Sequenzierungsverfahren vergingen mehrere Jahrzehnte. Diese Entwicklung ermöglichte die Entdeckung und Untersuchung von genetischen Läsionen auf molekularer Ebene. Hierbei konnte festgestellt werden, dass gehäuft Alterationen von Genen auftreten,^[7-8] welche Veränderungen bezüglich Proteinstruktur, -funktion, -aktivität und -expression bewirken, welche letztendlich die Karzinogenese bedingen. Im Falle von Lungenkrebs bestehen die so genannten Treibermutationen hauptsächlich aus Alterationen im *Kirsten Rat Sarcoma* (KRAS) Gen, dem „heiligen Gral“ der Krebsforschung, und aus Läsionen des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) Gens (Abbildung 1).^[8-9]

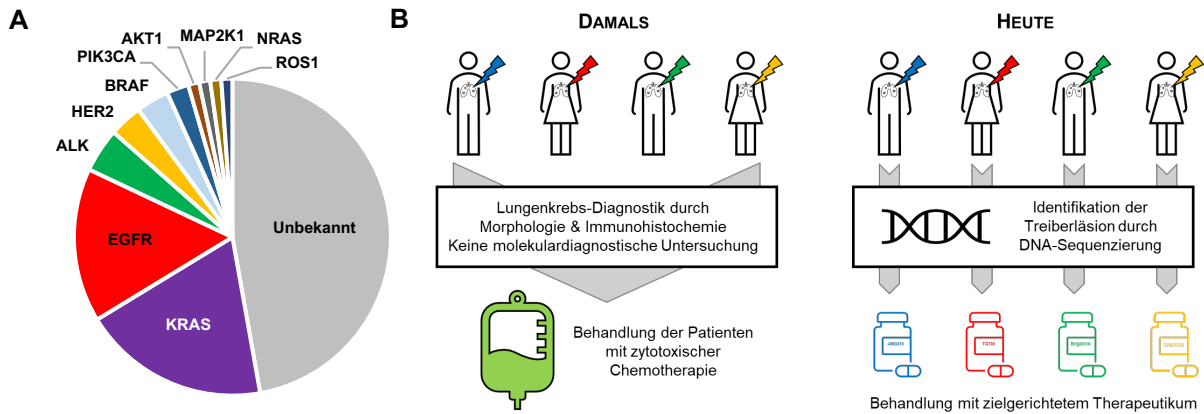


Abbildung 1: A - Onkogene Treiber in nicht-kleinzelligem Lungenkrebs.^[7] B - Gegenüberstellung der klassischen Behandlung mit Chemotherapeutika und der heutzutage angewandten Präzisionsmedizin.

Die Sequenzierung der genetischen Läsionen ist der entscheidende Faktor, um eine zielgerichtete Behandlung auf molekularer Ebene zu verwirklichen. Eine gezielte Ausschaltung des Onkogens und somit des überaktivierten Signalweges spiegelt sich in hohen Ansprechraten auf die Behandlung mit den zielgerichteten Therapeutika wider. Neben hohen Ansprechraten sind verringerte Nebenwirkungen im Vergleich zur zytotoxischen Chemotherapie oder Radiotherapie zu beobachten, welche nicht gezielt die Tumortreibenden Zellkomponenten ausschaltet.^[10-12]

1.2. Die Rezeptortyrosinkinase EGFR

Der *epidermal growth factor receptor* EGFR (Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor) oder ErbB1 ist eine Rezeptortyrosinkinase und Mitglied der ErbB Familie, welche zusätzlich ErbB-2 (*human epidermal growth factor receptor* – HER2), ErbB-3 (HER3) und ErbB-4 (HER4) beinhaltet.^[13] Rezeptortyrosinkinasen spielen bei der Regulierung diverser zellulärer Prozesse eine entscheidende Rolle. Sie bilden die Verbindung zwischen extrazellulären Signalen und den nachgeschalteten Signalwegen im Zellinneren, welche die entsprechende Zellantwort induzieren. Für EGFR sind die extrazellulären Liganden *epidermal growth factor* (EGF) und *transforming growth factor* (TGF- α) bekannt. Für HER2 konnten bislang keine Liganden identifiziert werden, jedoch ist HER2 der favorisierte Bindungspartner der anderen ErbB-Mitglieder bei der Rezeptor-Dimerisierung. Die Liganden-induzierte Dimerisierung ist erforderlich für die Transphosphorylierung und Aktivierung der intrazellulären Kinasedomäne.^[14] Die EGFR-Dimerisierung und folgende Transphosphorylierung bewirkt die Rekrutierung intrazellulärer Interaktionspartner, welche die Signalweiterleitung über verschiedene Signalkaskaden einleitet (Abbildung 2).

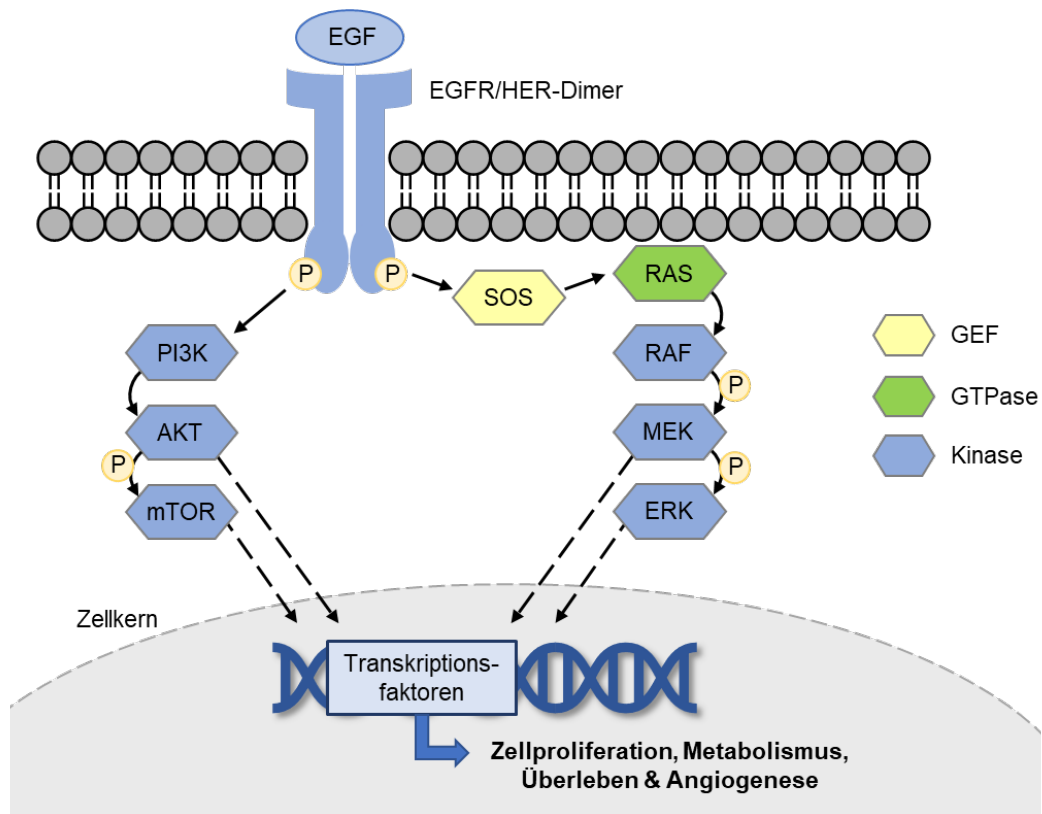


Abbildung 2: Zelluläre Signalkaskaden ausgehend von EGF-induzierter EGFR-Dimerisierung/Aktivierung.

Hierbei ist zum einen die PI3K-AKT-mTOR-Signalkaskade zu nennen. mTOR reguliert insbesondere die Proteinbiosynthese, wohingegen die Ser/Thr-Kinase AKT zusätzlich die Proliferation, den Zellmetabolismus und die Angiogenese vermittelt. Der zweite von EGFR beeinflusste Signalweg ist die Ras-Raf-MEK-ERK-Achse. Hierbei wird das membranständige, inaktive RAS durch die Bindung an den Guanosin-Austauschfaktor (GEF) SOS (*son of sevenless*) aktiviert, indem Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht wird. Hierdurch kann die Proteinkinase RAF (MAP3K, *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) zur Zellmembran rekrutiert werden, welche durch folglich Konformationsänderung das nachgestellte MEK (MAP2K, *mitogen-activated protein kinase kinase*) aktiviert, die wiederum ERK (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) phosphoryliert. Durch die Modulation von Transkriptionsfaktoren wird letztendlich die Genexpression im Zellkern moduliert. Ein Ungleichgewicht in diesen Signalwegen kann folglich zur Karzinogenese und anderen Krankheitsbildern führen. Eine Fehlregulation von EGFR als Startpunkt dieser Signalkaskaden kann zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen.

Neben einer Überexpression oder aktivierenden Mutation von EGFR in NSCLC wird zusätzlich eine Überexpression der Liganden EGF und TGF- α beobachtet.^[15] Dies führt zu einer autokrinen Schleife und konstanter Überaktivierung des Signalwegs.

Prominente Fehlregulationen, welche eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von NSCLC spielen, sind durch Deletions-, Insertions- und Punktmutationen zwischen Exon18 und Exon21 ausgelöst (Abbildung 3).^[16]

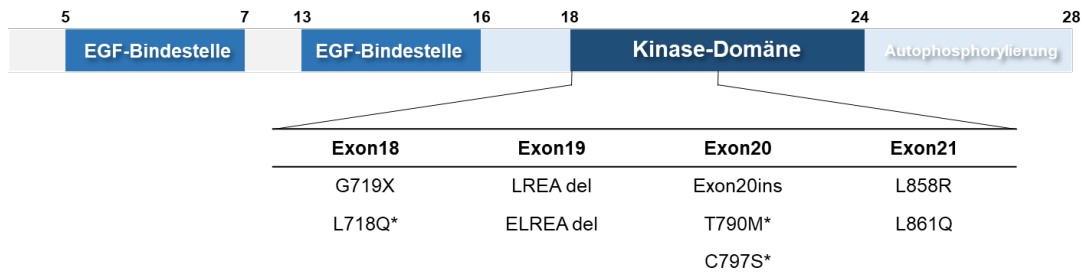


Abbildung 3: Darstellung von ausgewählten NSCLC-relevanten EGFR-Aberrationen in Exon18-21.^[16] * EGFR-Inhibitor Resistenzmutation.

In über 50% aller Lungenkrebsfälle liegt das Onkogen EGFR überexprimiert und in bis zu 30% aller Patienten mutiert vor. Für die Behandlung von EGFR-mutiertem NSCLC sind die Inhibitoren des mutierten EGFR die Behandlungsmethode mit den besten Ansprechraten und Überlebenschancen und werden im folgenden Kapitel detailliert erörtert.

1.3. Entwicklung von EGFR-Inhibitoren

Tyrosin-Kinasen sind bereits seit über 40 Jahren als viral-induzierte Onkogene bekannt.^[17] Aufgrund mangelnder Zusammenhänge zu humanen Tumoren und der Befürchtung keine ausreichende Selektivität in der konservierten Enzym-Familie erzielen zu können, konnten lange keine Erfolge bei der Behandlung Kinase-assoziiierter Krebserkrankungen verzeichnet werden. Die Zulassung von Imatinib, einem Inhibitor des Fusionsproteins BCR-ABL, zur Behandlung von chronisch-myeloischer Leukämie (CML) erfolgte im Jahr 2001. Die erstmals erfolgreiche Behandlung einer Läsion des Kinoms läutete folglich die weitreichende Erforschung von Krankheitsbildern, welche mit aberranter Kinaseaktivität assoziiert werden, und entsprechender Wirkstoffe ein.

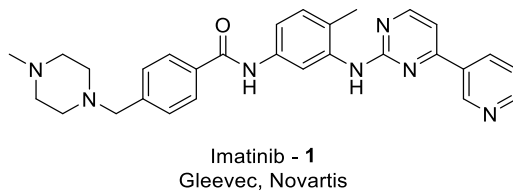


Abbildung 4: Struktur des ersten zugelassenen Kinase-Inhibitors Imatinib.

Der ersten Zulassung eines Kinase-Inhibitors folgten rasch die Zulassung der ersten EGFR-Inhibitoren mit den Aminoquinazolinen Erlotinib (**2**, 2003) und Gefitinib (**3**, 2004). Die Entwicklung dieser Inhibitoren erfolgte ursprünglich zur Untersuchung der Wirksamkeit der Inhibition des EGFR-Wildtyps bei NSCLC.^[18-19] Frühe Befunde zeigten ein ernüchterndes Ergebnis, da die Behandlung mit Erlotinib oder Gefitinib keine hohen Ansprechraten vorweisen konnte.^[20] Spätere Untersuchungen ergaben jedoch, dass in der Patienten-Subpopulation, welche auf Gefitinib ansprach, Mutationen in der EGFR-Kinasedomäne beobachtet werden konnten (Abbildung 6).^[3, 20-21] Die Punktmutation EGFR-L858R und die Deletionsmutation EGFR-Exon19-delELREA wurden hierbei vermehrt vorgefunden.

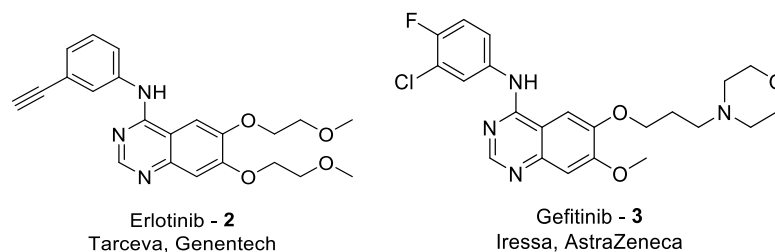


Abbildung 5: Strukturen der Erstgenerations-EGFR-Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib.

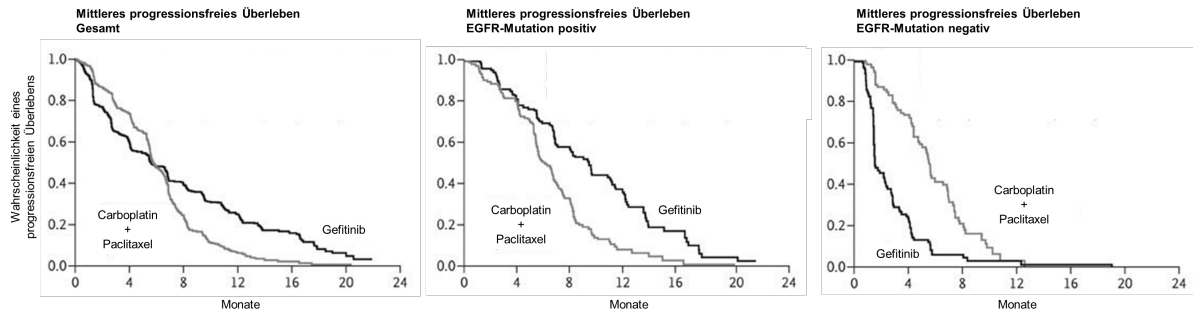


Abbildung 6: Mittleres Progressionsfreies Überleben bei NSCLC Behandlung mit Gefitinib und Carboplatin/Paclitaxel. Ergebnisse der Gesamtpopulation (links), EGFR-Mutations positiver Subpopulation (mitte) und EGFR-Mutations negativer Subpopulation (rechts).^[21]

Die L858R-Punktmutation und die del19-ELREA-Deletionsmutation bedingen Konformationsänderungen in der Kinase-Domäne, welche die Aktivität signifikant steigern. Die L858R-Punktmutation liegt im N-terminalen Bereich der Aktivierungsschleife und bewirkt durch die Einführung der positiv geladenen Arg858-Seitenkette eine Verschiebung der Aktivierungsschleife und der regulierenden α C-Helix, was in einer aktiven Kinase-Konformation resultiert (Abbildung 7). Die del19-ELREA Mutante zieht die α C-Helix durch die Deletion einer vorstehenden flexiblen Schleife ebenfalls in ihre katalytisch kompetente Konformation.^[22]

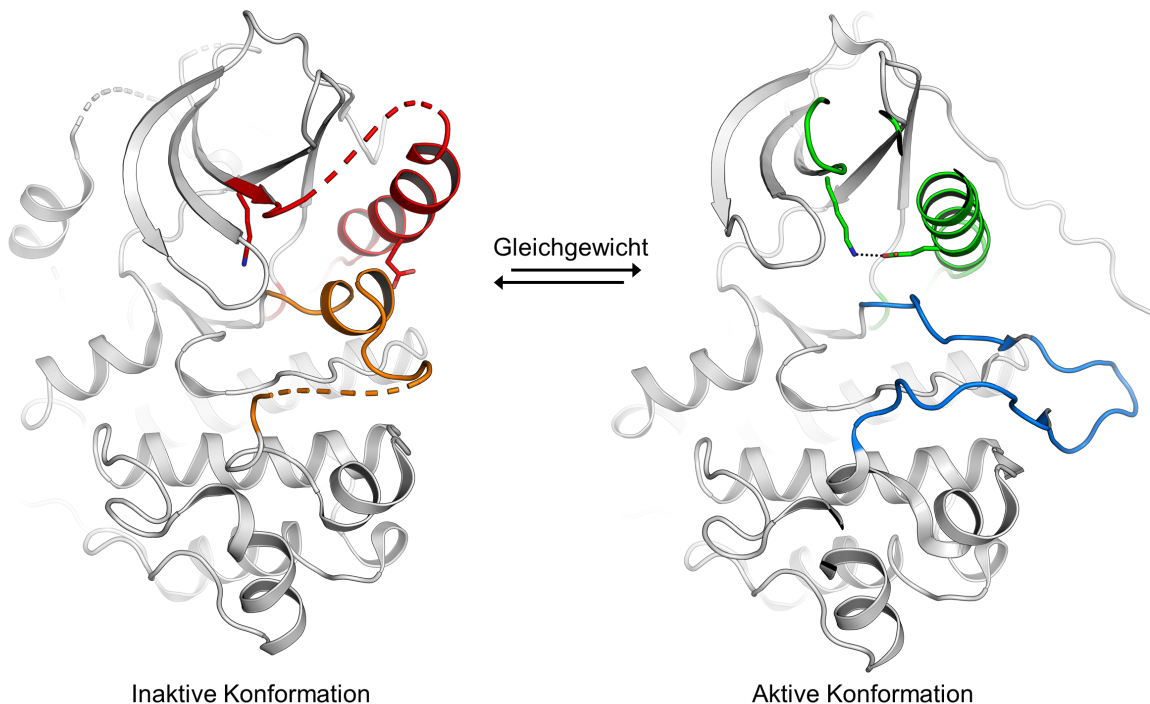
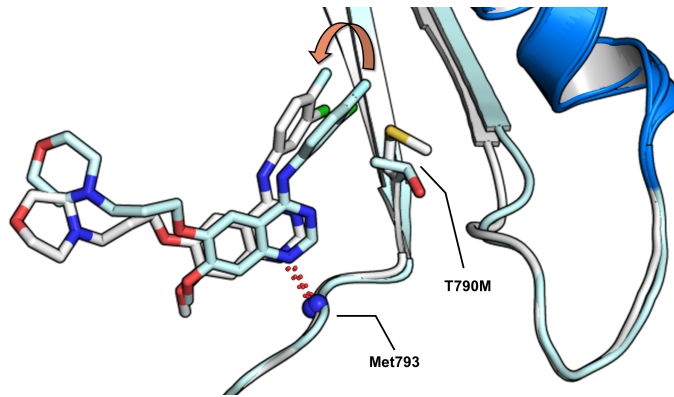


Abbildung 7: A - Gleichgewicht zwischen inaktiver und aktiver Konformation von EGFR. α C-Helix der inaktiven Konformation in Rot, Aktivierungsschleife der inaktiven Konformation in Orange (PDB-Code 1XKK). Nach innen verlagerte α C-Helix der aktiven Konformation in Grün, Aktivierungsschleife der aktiven Kinase-Konformation in Blau (PDB-Code 2ITT). Salzbrücke des katalytischen Lys745 mit Glu762 der α C-Helix gepunktet dargestellt. Abbildung von NIGGENABER et. al.^[22]

Erlotinib und Gefitinib weisen für die genannten Aktivierungsmutanten eine erhöhte Affinität im Vergleich zum EGFR-Wildtyp auf, für den sie ursprünglich entwickelt wurden (vgl. Tabelle 1). Die Wirkung der Quinazolin-Inhibitoren wird begünstigt durch eine verringerte ATP-Affinität der L858R- und del19-ELREA Aktivierungsmutanten (Abbildung 8).^[23] Die resultierende Selektivität der Inhibitoren für die Aktivierungsmutanten über den EGFR-Wildtyp erlaubt eine gezieltere Behandlung als die zytotoxische Chemotherapie, da die Aktivierungsmutanten, im Gegensatz zum ubiquitär vorliegenden Wildtyp, allein im Tumor vorzufinden sind. Dies resultiert in verringerten Nebenwirkungen im Gegensatz zur Chemotherapie. Eine größtmögliche Wildtyp-Selektivität für die zu behandelnde EGFR-Mutation wird folglich in der Entwicklung von EGFR-Inhibitoren angestrebt.

Die Wirkung von Erlotinib und Gefitinib wurde jedoch durch rezidives Tumorwachstum nach durchschnittlich sechs bis zwölf Monaten limitiert.^[23-24] Erneute genetische Untersuchungen fanden im Großteil der Patienten die Punktmutation T790M an der Türsteher-Position in der EGFR-Kinasedomäne. Erstgenerations-Inhibitoren auf Basis des 4-Aminoquinazolin Grundgerüsts weisen in biochemischen Testungen mit der EGFR-L858R/T790M Mutante sowie in zellulären Untersuchungen der entsprechenden H1975-Zelllinie einen drastischen Aktivitätsverlust im Vergleich zur Aktivierungsmutante und dem EGFR-Wildtyp auf (Tabelle 1). Dieser Aktivitäts- und Selektivitätsverlust von Erlotinib und Gefitinib geht einher mit dem Verlust der therapeutischen Wirksamkeit bei EGFR-T790M mutiertem NSCLC. Die Resistenzbildung auf Basis der EGFR-T790M-Punktmutation ist mit 63% der primär beobachtete Resistenzmechanismus bei der Behandlung von NSCLC mit EGFR Erstgenerations-Inhibitoren.^[24]

Die T790M-Resistenzmutation bedingt zwei Faktoren, welche die 4-Aminoquinazolin-Inhibitoren in ihrer Wirksamkeit limitieren. Zum einen ist ein sterischer Konflikt zwischen dem 4-Anilin-Substituenten der Erstgenerations-Inhibitoren und der größeren Methionin Türsteher-Aminosäure in strukturellen Untersuchungen von Ko-Kristallstrukturen erkennbar. Des Weiteren ist eine für die L858R-Mutante gesunkene ATP-Affinität durch die T790M-Punktmutation auf das Niveau des EGFR-Wildtyps wiederhergestellt (vgl. Abbildung 8).^[23] Der um die ATP-Bindetasche konkurrierende Quinazolin-basierte Inhibitor verliert somit seine Wildtyp-Selektivität und letztendlich seine therapeutische Wirksamkeit.



Kinase	ATP-K _m [μM]
EGFR-Wildtyp	5.2 ± 0.2
EGFR-L858R	148 ± 4
EGFR-T790M	5.9 ± 0.1
EGFR-L858R/T790M	8.4 ± 0.3

Abbildung 8: A - Darstellung der sterischen Abstoßung Gefitinibs durch die T790M-Resistenzmutation. Gefitinib gebunden in EGFR-L858R (weiß, PDB-Code 2ITY) und EGFR-L858R/T790M (cyan hell, PDB-Code 3UG2). Sterische Abstoßung des Anilins durch den Met790-Türsteher durch roten Pfeil gekennzeichnet, Wasserstoffbrückenbindung zum Met793 der Scharnierregion rot gepunktet, αC-Helix in blau. **B - Affinitäten der klinisch relevanten EGFR-Varianten zum Substrat ATP.**^[23]

Als Folge dieser Resistenzmutation wurden die kovalenten Zweitgenerations-Inhibitoren, wo vorrangig Afatinib und Neratinib zu nennen sind, entwickelt. Die Entwicklung dieser Inhibitoren folgte der bereits 1997 gemachten Beobachtung einer kovalenten Modifizierung von EGFR-Cys797 durch Thioadenosin. Dies erlaubte eine verlängerte Unterdrückung der EGFR-Aktivität durch einfache Zugabe und erhöhte die inhibitorische Potenz verglichen mit Adenosin, bedingt durch eine erhöhte Verweildauer am Protein.^[25]

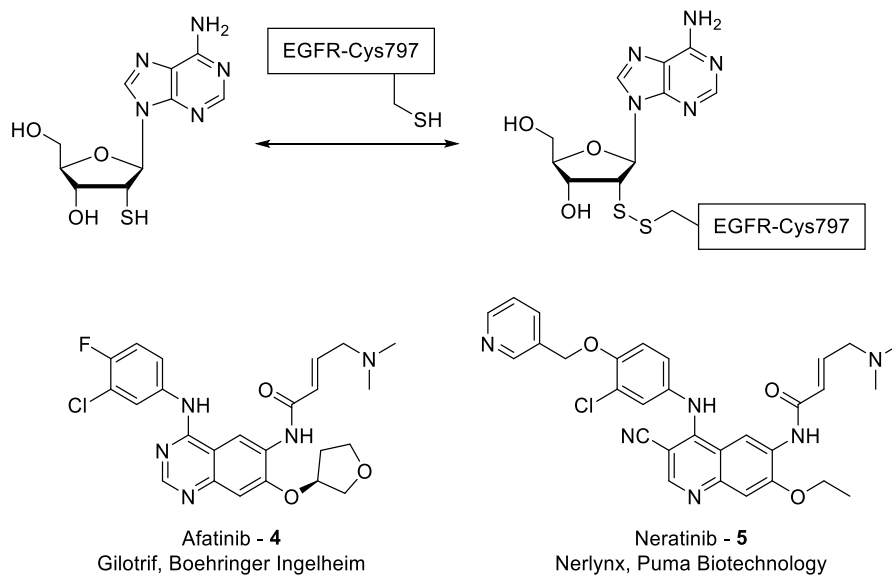
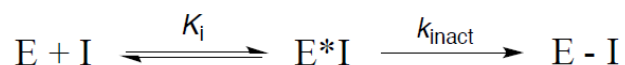


Abbildung 9: Schematische Darstellung der kovalenten Bindung 2'-Thioadenosins an EGFR-Cys797 und Darstellung der Zweigenerations-EGFR-Inhibitoren Afatinib und Neratinib.

Der Vorteil einer kovalenten Modifikation liegt in der Verschiebung des Bindungsgleichgewichts über einen zweistufigen Mechanismus. Nach Ausbildung eines reversiblen Protein-Ligand-Komplex kann der Ligand in einem zweiten Schritt irreversibel an

das Zielprotein binden. Dies gewährt dem Inhibitor eine längere Verweilzeit wodurch das Zielprotein bis zu seinem Abbau inaktiviert wird.^[26]



Für die Entwicklung der Zweitgenerations-Inhibitoren wurde das 4-Aminoquinazolin Grundgerüst von Gefitinib mit einer Acrylamid-Funktionalität bestückt, welche die kovalente, irreversible Modifizierung mittels einer Thiol-En-Reaktion erlaubt. Die irreversible Bindung des Inhibitors soll der wiederhergestellten ATP-Affinität der EGFR-T790M Variante entgegenwirken. Dabei konnte der kovalente Wirkmechanismus die Inhibition gegenüber der T790M-Mutante in biochemischen als auch in zellulären Systemen wiederherstellen (Tabelle 1). Weitere Untersuchungen zu kovalenten Zweitgenerations-Inhibitoren mit T790M-mutiertem EGFR stellten jedoch keine ausreichende Wirksamkeit bei verträglichen Dosen fest. Das therapeutische Fenster, welches Erlotinib und Gefitinib für die Aktivierungsmutanten bedingt durch ihre Wildtyp-Selektivität vorweisen, ist bei den Zweitgenerations-Inhibitoren nicht gegeben, um eine erfolgreiche Behandlung von T790M-positivem NSCLC zu ermöglichen.^[27-29] Ein Blick auf die biochemischen und zellulären Daten (Tabelle 1) gibt wie bei den Erstgenerations-Inhibitoren eine Erklärung für die mangelnde Wirksamkeit der Zweitgenerations-Inhibitoren. Eine wiederhergestellte biochemische Aktivität von Afatinib gegenüber EGFR-L858R/T790M im Vergleich zu Erlotinib wird überschattet von der ebenfalls beobachteten biochemischen und zellulären Aktivitätssteigerung auf dem EGFR-Wildtyp. Das 4-Aminoquinazolin Grundgerüst stellte sich letztendlich als wenig geeignet für die Entwicklung von EGFR-T790M Inhibitoren dar, da eine ausreichende Wildtyp-Selektivität nicht erreicht werden konnte.

Tabelle 1: Biochemische und zelluläre Evaluierung ausgewählter Erst- bis Drittgenerations EGFR-Inhibitor. Daten aus der Arbeitsgruppe Rauh, n.b. = nicht bestimmt. Die Assays wurden durchgeführt von A. Arndt, Dr. M. Keul und K. Jeyakumar.

HTRF / CTG [nM]	EGFR Wildtyp	EGFR L858R	EGFR L858R/T790M	A431	BaF3-EGFR- L858R	H1975
Erlotinib – 1. Gen.	0,031 ± 0,014	0,006 ± 0,002	17 ± 5	2805 ± 338	22 ± 12	7041 ± 925
Gefitinib – 1. Gen.	0,019 ± 0,008	0,007 ± 0,003	21 ± 6	3162 ± 677	35 ± 8	11150 ± 3671
Afatinib – 2. Gen.	0,012 ± 0,004	0,007 ± 0,002	0,24 ± 0,08	743 ± 215	< 14	885 ± 274
Neratinib – 2. Gen.	0,020 ± 0,010	0,020 ± 0,010	0,71 ± 0,24	n.b.	n.b.	n.b.
WZ4002 – 3. Gen.	9,3 ± 6,9	0,37 ± 0,21	0,18 ± 0,11	2304 ± 622	164 ± 23	109 ± 53
Osimertinib – 3. Gen.	0,24 ± 0,10	0,043 ± 0,012	0,024 ± 0,007	830 ± 426	6 ± 3	17 ± 8
Nazartinib – 3. Gen.	2,1 ± 0,8	0,38 ± 0,13	0,12 ± 0,06	6454 ± 1702	86 ± 20	343 ± 92

Als Folge dieser Beobachtungen wurde die Entwicklung von Drittgenerations-Inhibitoren vorangetrieben. Als erster Inhibitor dieser Art ist WZ4002 (**6**) zu nennen.^[30] WZ4002 basiert auf dem 2-Aminopyrimidin Grundgerüst und besitzt wie schon die Zweitgenerations-Inhibitoren eine Acrylamid-Funktionalität zur kovalenten Modifizierung des EGFR-Cys797. Die biochemischen Daten zu WZ4002 zeigen eine hohe Aktivität gegenüber der EGFR-L858R/T790M Mutante, analog zum Zweitgenerations-Inhibitor Afatinib, jedoch mit einer Selektivität gegenüber dem EGFR-Wildtyp. Diese Beobachtung spiegelt sich auch im zellulären System wider. Die EGFR-Wildtyp abhängige Zelllinie A431 wird im Gegensatz zur EGFR-L858R/T790M abhängigen H1975-Zelllinie deutlich geringfügiger inhibiert als bei Afatinib. Die Entdeckung von WZ4002 leitete folglich die weitreichende Erforschung kovalenter 2-Aminopyrimidin basierter Inhibitoren ein. Zusätzlich konnten weitere kovalente Inhibitoren basierend auf Wildtyp-selektiven Grundgerüsten, wie das Benzimidazolamid basierte Nazartinib (**8**) entwickelt werden.^[31]

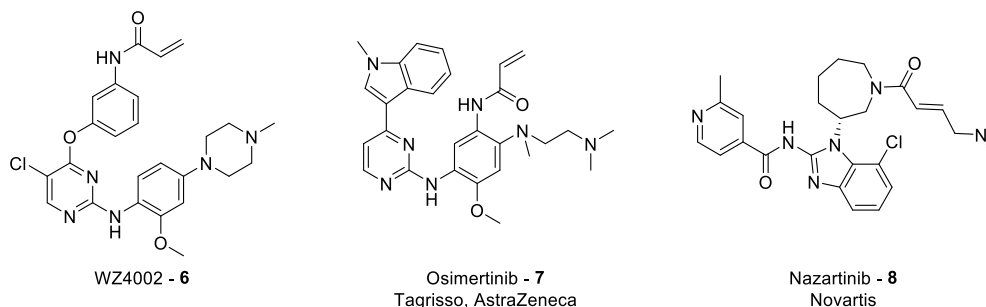


Abbildung 10: Strukturen der EGFR-Drittgenerations-Inhibitoren WZ4002, Osimertinib und Nazartinib.

Die erste Zulassung für die Behandlung von T790M-positivem NSCLC erhielt Osimertinib (**7**) im Jahr 2015,^[32] gefolgt von der Zulassung als Erstlinien-Behandlung bei L858R- und

Exon19-de/ELREA Aktivierungsmutationen im Jahr 2018. Mit einem progressionsfreien Überleben von 18,9 Monaten im Vergleich zu Erstgenerations-Inhibitor-Behandlung von 10,2 Monaten und einer Ansprechrate von 80% stellt Osimertinib heutzutage den Goldstandard bei der Behandlung von EGFR-getriebenem NSCLC dar.^[32-34]

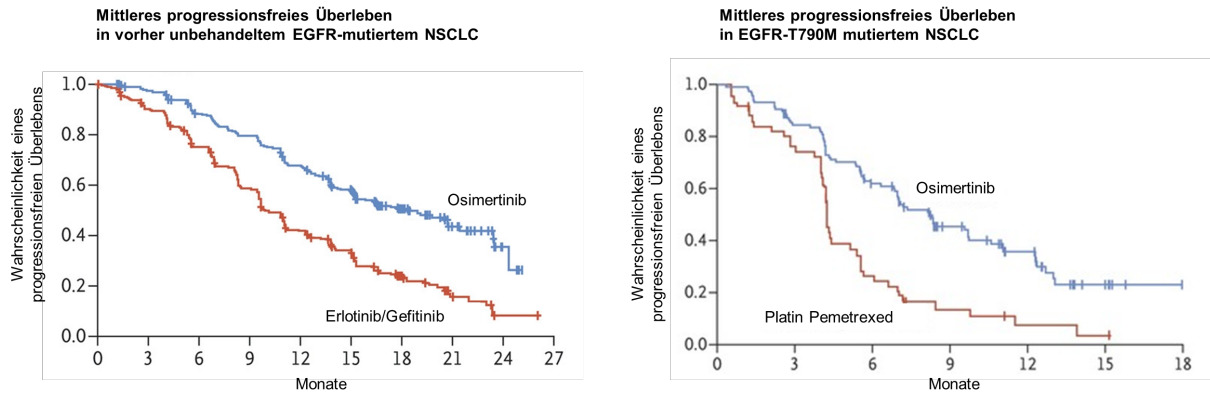


Abbildung 11: Kaplan-Meier Plots von unbehandeltem, EGFR-abhängigem NSCLC mit Osimertinib und Erstgenerations-Inhibitoren Behandlung (links)^[33] und von EGFR-T790M mutiertem NSCLC mit Osimertinib und Platin/Pemetrexed Behandlung (rechts).^[32]

1.4. Aktuelle Herausforderungen in der Entwicklung von EGFR-Inhibitoren

1.4.1. C797S-Resistenzmutation gegenüber EGFR-Drittgenerations-Inhibitoren

Die Wirkstoffresistenz durch Eliminierung des kovalenten Ankerpunkts von Osimertinib durch die Punktmutation EGFR-C797S wurde bereits vor Osimertinibs Erstzulassung im Jahr 2015 beschrieben.^[35] Ein drastischer Aktivitätsabfall durch die C797S-Punktmutation war sowohl biochemisch als auch zellulär zu beobachten (Tabelle 2). Neben Osimertinib weisen auch die Erst- und Zweitgenerations-Inhibitoren eine geringe Aktivität gegenüber der L858R/T790M/C797S-Tripelmutante auf. Lediglich auf der EGFR-L858R/C797S-Resistenzmutation, welche bei Patienten mit Osimertinib *first-line* Behandlung auftritt, weisen Erlotinib und Afatinib, aufgrund der mangelnden T790M-Mutation, noch einen Effekt auf. Hierbei ist Afatinib aufgrund der mangelnden Selektivität über den EGFR-Wildtyp jedoch nicht als Behandlungsmöglichkeit anzusehen.^[36]

Tabelle 2: Biochemische und zelluläre Evaluierung der verschiedenen EGFR-Inhibitor-Generationen auf C797S-mutiertem EGFR. * Einfachmessung, Die Assays wurden durchgeführt von A. Arndt, Dr. M. Keul und K. Jeyakumar.

HTRF / CTG [nM]	EGFR Wildtyp	EGFR LR/CS	EGFR LR/TM/CS	A431	Ba/F3-EGFR LR/CS	PC9-EGFR LR/TM/CS
Erlotinib – 1. Gen.	0,031 ± 0,014	0,059 ± 0,023	228*	2805 ± 338	16 ± 4	7239 ± 2298
Afatinib – 2. Gen.	0,012 ± 0,004	0,18 ± 0,04	25 ± 17	743 ± 215	29 ± 7	4399 ± 540
Osimertinib – 3. Gen.	0,24 ± 0,10	354 ± 129	252 ± 169	830 ± 426	2033 ± 429	3158 ± 661

Seit der Entdeckung der C797S-Resistenzmutation sind eine Vielzahl potentieller Inhibitoren zur Umgehung dieser publiziert worden. Der Erste dieser Viertgenerationsinhibitoren ist EAI045 (**9**), ein allosterischer Ligand, welcher die hydrophobe Tasche hinter der ATP-Bindungsstelle besetzt.^[37] Dieser Inhibitor erhält seine hohe Wildtypselektivität durch die Ausbildung einer allosterischen Tasche, welche durch die L858R-Aktivierungsmutante begünstigt wird. Daher ist dieser Inhibitor-Typ jedoch ungeeignet für weitere Aktivierungsmutanten wie die Exon19-delELREA-Mutation und dessen Resistenzmutationen, bei welchen diese Tasche nicht ausgebildet wird. Ein weiterer Nachteil des Inhibitors EAI045 und dessen optimierten Varianten **10**, **11** und **12** ^[38-39] ist die notwendige Kombination mit einem Anti-EGFR-Dimerisierungs-Antikörper wie Cetuximab, um eine zelluläre Wirkung zu erzielen. Eine erhöhte EGFR-Dimerbildung limitiert die Anwendungsmöglichkeiten dieser Inhibitoren, da die allosterische Tasche nur in einer Untereinheit des EGFR-Dimers ausgebildet wird.^[37-39]

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der allosterischen EGFR-Inhibitoren ist die Kombination mit Drittgenerations-Inhibitoren wie Osimertinib.^[39] In der Arbeitsgruppe RAUH konnten EGFR-Ko-Kristallstrukturen mit verschiedenen Drittgenerations-Inhibitoren zusammen mit den neuartigen allosterischen Inhibitoren gelöst werden.^[40] Hierdurch konnten verschiedene Kombinationen von Dritt- und Viertgenerationsinhibitoren entdeckt werden, welche strukturell betrachtet für eine Behandlung von C797S-mutiertem EGFR im Rahmen der Kombinationstherapie,^[39] sinnvoll erscheinen (Abbildung 12 B).

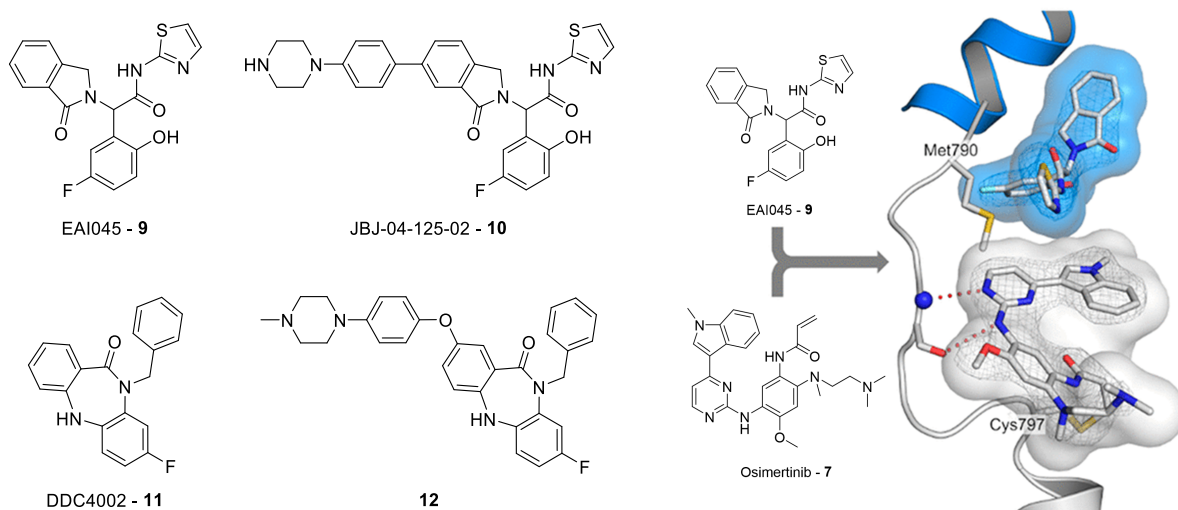


Abbildung 12: A – Strukturen der allosterischen EGFR-Inhibitoren. B – Ko-Kristallstruktur von Osimertinib in der ATP-Bindetasche (weiß) und EAI045 in der allosterischen Tasche (blau) von EGFR-T790M/V948R (PDB-Code 6Z4B) Ko-Kristallstruktur und Abbildung von NIGGENABER et. al.^[40]

Das Konzept der allosterischen Inhibition wurde zusätzlich mit der neuartigen PROTAC-Technologie (engl. *PROteolysis TARgeting Chimera*) vereint.^[41-42] Der Ansatz der PROTAC-Technologie liegt in der Generierung von heterobifunktionalen Molekülen, welche aus einem Binder für das Zielprotein und zusätzlich einem Liganden für die E3-Ubiquitin-Ligase zusammengesetzt sind. Der folglich gebildete tertiäre Zielprotein-Ligand-Ligase-Komplex bewirkt eine Ubiquitinierung des Zielproteins und anschließenden Abbau durch das Proteasom. Der Inhibitor DDC-01-163 (**13**, Abbildung 13) zeigt einen monotherapeutischen Effekt auf Ba/F3-L858R/T790M und Ba/F3-L858R/T790M/C797S-Zellen ohne das EGFR-Wildtyp Ba/F3-Zelllinienwachstum zu beeinflussen. Die effektive Wirkung des Modulators beruht auf dem Abbau von mutiertem EGFR durch den gebildeten EGFR-Ligase Komplex. Die Translation der bisher vielversprechenden PROTAC-Technologie in ein klinisch wirksames Medikament steht jedoch noch aus. Erste klinische Studien versprechen jedoch eine große Zukunft der Technologie auf bisher ungelösten medizinisch-chemischen Problematiken.^[43-45] [NCT04072952, NCT03888612]

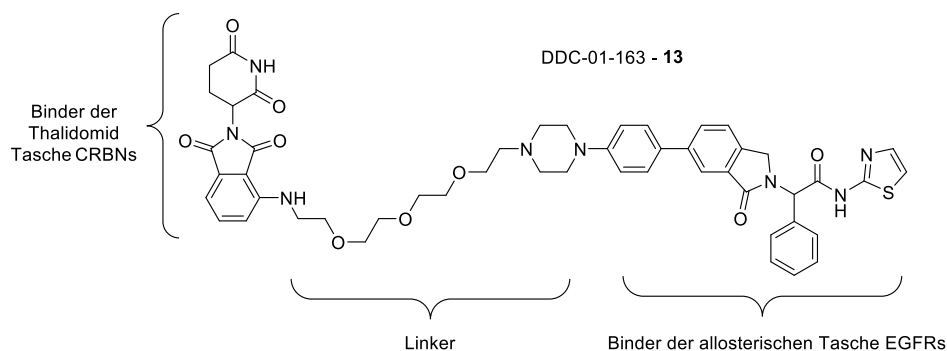


Abbildung 13: Schematische Darstellung des EGFR-PROTACs DDC-01-163. ^[41]

Neben den allosterischen Inhibitoren wurden auch ATP-kompetitive EGFR-Inhibitoren nach dem Konzept der PROTAC-Technologie entwickelt.^[46] Diese wurden jedoch nicht auf EGFR-C797S-mutierten Zelllinien untersucht. Aufgrund der Verwendung des 4-Aminoquinazolin Grundgerüsts ist eine Selektivität gegenüber T790M-mutiertem EGFR zusätzlich als unwahrscheinlich anzusehen.

Neben den allosterischen Inhibitoren und PROTACs wurden auch eine Reihe klassisch ATP-kompetitiver Viertgenerationsinhibitoren entwickelt.^[47-48] In dieser Arbeitsgruppe wurden Inhibitoren mit einem starken reversiblen Bindungscharakter basierend auf dem bizyklischen Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst **14** entwickelt.^[49] Die Cys797-modifizierenden, irreversiblen Inhibitoren verfügen jedoch über einen Selektivitätsfaktor von unter 0,02 (IC_{50} Wildtyp : LR/TM/CS), wodurch ein therapeutischer Nutzen bei C797S-mutiertem NSCLC aufgrund Wildtyp-Inhibition bedingter Toxizität eher unwahrscheinlich scheint. Reversible Varianten der Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren wären, aufgrund ihres starken reversiblen Bindungscharakter, jedoch ein vielversprechender Ansatz zur Adressierung der C797S-Resistenzmutation. Die Verbindungen JND3229^[50] und **16**^[51] sind Inhibitoren, bei denen das Acrylamid gegen ein Acetamid ausgetauscht wurde, um die EGFR-Wildtyp-Inaktivierung auszusparen. Diese Inhibitoren wirken jedoch wie reversible Gegenstücke der kovalenten Acrylamid-Inhibitoren, welche keiner weiteren Optimierung für die C797S-Mutante unterlaufen sind.^[52] Dennoch sticht wie bei **14** der bizyklische Scharnierregion-Binder als möglicher Treiber der reversiblen Potenz hervor.

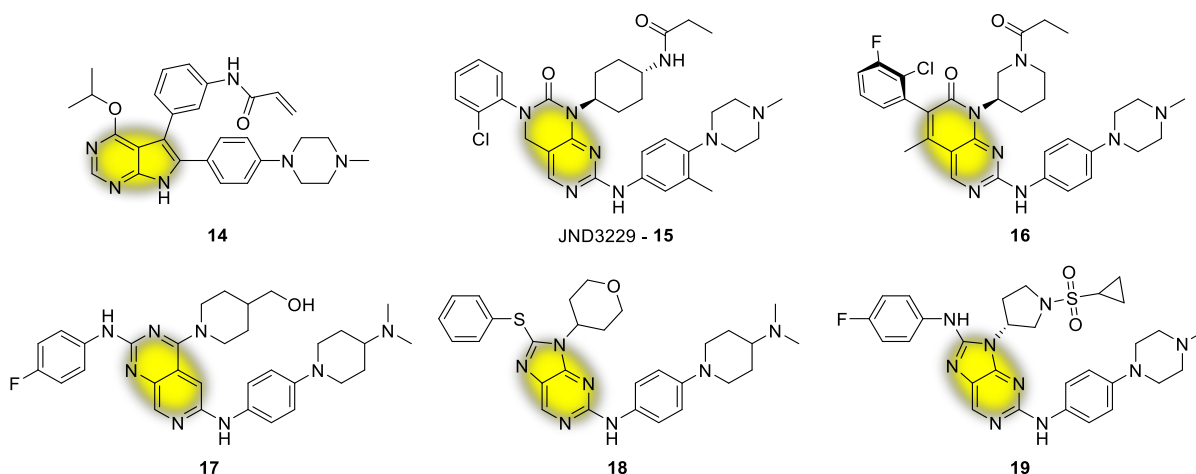


Abbildung 14: Strukturen literaturbekannter Inhibitoren mit starkem reversiblen Bindungscharakter gegenüber C797S-mutiertem EGFR. Bicyclische Scharnierregion-Binder gelb hervorgehoben.

Die hohe reversible Affinität der bicyclischen Grundgerüste konnte auch bei den Inhibitoren **17**^[53], **18**^[54] und **19**^[55] eine entscheidende Rolle in der inhibitorischen Wirkung im Vergleich zu den monozyclischen Scharnierregion-Bindern wie WZ4002, WZ4003 oder Osimertinib einnehmen.

Eine weitere Inhibitorklasse, dessen Wirkung auf T790M/C797S-mutiertem EGFR untersucht wurde, sind ALK-Inhibitoren, welche verstärkt die T790M-mutierten Varianten des EGFR als *off-target* inhibieren.^[56] Eine Vielzahl von zugelassenen oder klinisch untersuchten ALK-Inhibitoren weist Phosphon- oder Sulfongruppen auf, welche die reversible Bindungsstärke durch Wechselwirkung mit dem Kinom-konservierten, katalytischen Lysin erhöhen. Diese ALK-Inhibitoren weisen zusätzlich den aus EGFR-Drittgenerations-Inhibitoren bekannte Aminopyrimidin-Scharnierregion-Binder auf. Der Chlor-Substituent, welcher der Türsteher-Aminosäure zugewandt ist (Abbildung 15), erhöht zusätzlich die *off-target* Inhibition der T790M-mutierten EGFR-Varianten stärker als die des Wildtyps.

Neben bereits bekannten ALK-Inhibitoren wurden neue Strukturwirkungsbeziehungen (SAR) mit Inhibitoren basierend auf dem Grundgerüst des EGFR-Inhibitors WZ4002 generiert.^[57] Hierbei konnten, neben den bekannten Phosphon- und Sulfongruppen, Hydroxyacetamide als Lysin-Binder (**21**) mit starker EGFR-C797S-Inhibition identifiziert werden. Für diese Stoffklasse wurde jedoch keine Wirksamkeit auf C797S-mutierten Zellen untersucht. Basierend auf der festgestellten *off-target* Wirksamkeit von ALK-Inhibitoren gegenüber EGFR, wurden ALK/EGFR-Dual-Inhibitoren (**22**) entwickelt, welche irreversibel mit EGFR-Cys797 reagieren können.^[58] Diese weisen eine hohe Wirksamkeit auf einer Vielzahl von

ALK- und EGFR-abhängigen Zelllinien auf, besitzen jedoch aufgrund der Adressierung des Cys797 keine Selektivität für die C797S-Mutation über den EGFR-Wildtyp.

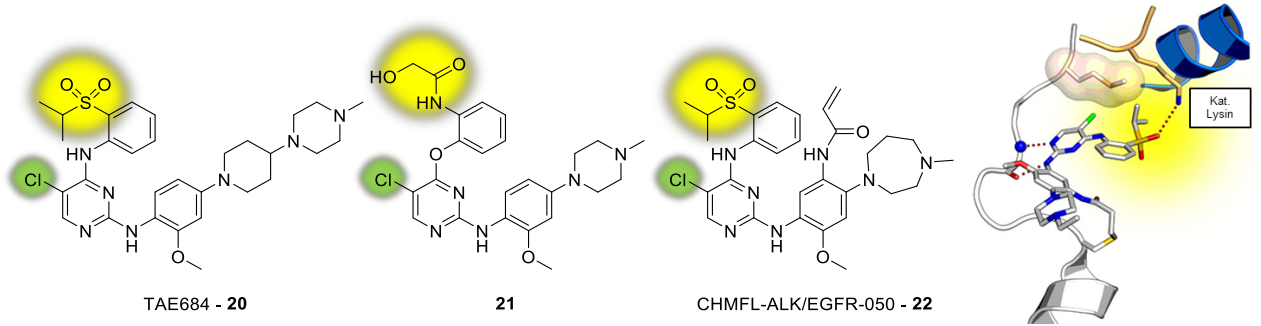


Abbildung 15: ALK- und ALK/EGFR-Dual-Inhibitoren für EGFR-C797S. Aktivitätssteigernde Strukturelemente, die an das katalytische Lysin binden in Gelb hervorgehoben. Ko-Kristallstruktur eines ALK/EGFR-Dual-Inhibitors gebunden in EGFR-T790M (PDB-Code 5GTZ).

Eine besondere Rolle bei der Erforschung der C797S-Resistenzmutation kommt dem ALK-Inhibitor Brigatinib (**23**) zu. Von den untersuchten ALK-Inhibitoren weist Brigatinib die höchste Wirksamkeit auf den EGFR-Tripelmutanten auf.^[56] Insbesondere in Kombination mit dem Antidimerisierungs-Antikörper Cetuximab können Zelllinien mit L858R/T790M/C797S- bzw. del19/T790M/C797S-Tripelmutanten effektiv inhibiert werden. Die Behandlung von EGFR-del19/T790M/C797S getriebenem NSCLC mit Brigatinib in Kombination mit Cetuximab konnte in präklinischen Untersuchungen und Fallstudien bereits erste Erfolge verzeichnen.^[59-61] Für eine Verwendung als Monotherapie ist die zelluläre Aktivität von Brigatinib jedoch nicht ausreichend. Die hohe biochemische Potenz von Brigatinib auf der EGFR-Tripelmutante stellt jedoch die Entwicklung hochpotenter, selektiver und reversibler Inhibitoren in Aussicht.

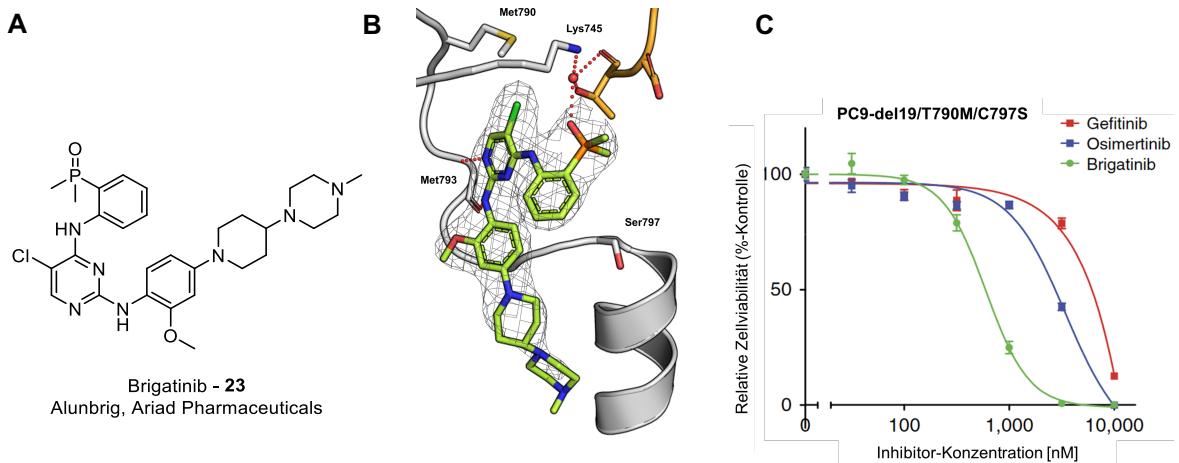


Abbildung 16: A – Struktur des ALK-Inhibitors Brigatinibs. B – Ko-Kristallstruktur von Brigatinib in EGFR-T790M/C797S von Dr. J. Niggenaber. C – Vergleich von Gefitinib, Osimertinib und Brigatinib auf T790M/C797S-modifizierten PC9-Zellen.^[56]

1.4.2. Alternative Nukleophile zur kovalenten Adressierung von EGFR

In den letzten Jahrzehnten erfolgte ein Paradigmenwechsel in der Medizinalchemie bezüglich der Verwendung von elektrophilen Funktionalitäten in Wirkstoffen. Lange wurde eine unselektive, irreversible Modifikation von *off-targets* und eine daraus resultierende Toxizität befürchtet. Zusätzlich wurden unerwünschte Immunreaktionen durch kovalent modifizierte Proteine befürchtet. Jedoch wurde durch die Aufklärung kovalenter Bindungsmodi bereits etablierter Wirkstoffe wie Aspirin^[62], Paracetamol^[63] oder Penicillin^[64] und die Entwicklung erster kovalent bindender Wirkstoffe wie Omeprazol^[65] oder Clopidogrel^[66] die Möglichkeit eines sicheren, irreversibel-bindenden Wirkstoffs klar. Inzwischen stellen kovalente Inhibitoren etwa 30% der zugelassenen Kleinmolekül-Wirkstoffe dar.^[67]

Um einen befürchteten Mangel an Selektivität kovalenter Wirkstoffe gegenüber dem Proteom tiefgehend zu untersuchen, hat sich in den letzten Jahrzehnten die Aktivitätsbasierte Proteinprofilierung (ABPP) oder das *proteomic profiling* als mögliche Technik zur Identifizierung von *off-targets* etabliert.^[68] Hierbei werden kovalente Inhibitoren oder Sondenmoleküle über einen Linker mit verschiedenen Reporter-Funktionalitäten wie Fluorophoren oder Affinitäts-Tag kombiniert. Hierdurch können Zielproteine des kovalenten Modulators ausgelesen, aufgereinigt und identifiziert werden. In der Arbeitsgruppe um CRAVATT konnten für den irreversibel-bindenden EGFR-Drittgenerations Inhibitor Osimertinib bei der Behandlung von H1975-Zelllinien 53 zelluläre *off-targets* per Biotin-basiertem *pull-down* angereichert und identifiziert werden.^[69] Diese bestehen aus teils vorhersehbaren *off-targets* wie Kinasen mit Cysteinen in der Bindetasche, als auch reaktiven Cystein-Proteasen, jedoch auch aus nicht vorhersehbaren *off-targets* wie Membranproteinen.

Die wie im Falle der EGFR-Drittgenerations-Inhibitoren verwendeten Acrylamid-Elektrophile sind im Feld der Kinase-Modulation weit verbreitet.^[26] Durch die C797S-Resistenzmutation ist der kovalente Wirkmechanismus der Acrylamid-basierten Inhibitoren verfallen. ZHAO *et. al.* konnten jedoch bereits eine weitere mögliche kovalente Modifikation von EGFR beschreiben.^[70] Hier konnte das, primär für Serin-Protease-Modifikation bekannte, Arylsulfonylfluorid-Nukleophil kovalent an das katalytische Lys745 in EGFR binden (Abbildung 17, PDB-Code 5U8L). Die Fähigkeit von Sulfonylfluoriden zur irreversiblen Bindung an verschiedene Aminosäuren wie Tyrosin, Lysin, Serin, Threonin, Cystein und Histidin hat eine breite Anwendung dieser Elektrophile in der Entwicklung von Sonden-Moleküle in der chemischen Biologie erlangt.^[71-72] Für den Inhibitor XO44 (**24**), welcher mit

EGFR ko-kristallisiert werden konnte, liegt keine sonderlich hohe Potenz gegenüber EGFR vor. Ebenfalls besitzt der Sulfonylfluorid-basierte Inhibitor keine Selektivität für EGFR über das gesamte Kinom, da das im Kinom hoch konservierte katalytische Lysin modifiziert wird. Im Falle eines ubiquitär vorliegenden Nukleophils muss eine Selektivität über den reversiblen Bindungsteil des Inhibitors erfolgen. Ein Inhibitor, dessen reversible Bindung eine hohe Selektivität für EGFR gegenüber dem Kinom aufweist, könnte sich eine Bindung an das konservierte Lys745 zunutze machen. Das in XO44 vorliegende Aminopyrazol-Motiv scheint in diesem Sinne für die kovalente Inhibition von EGFR-Lys745 eher ungeeignet.

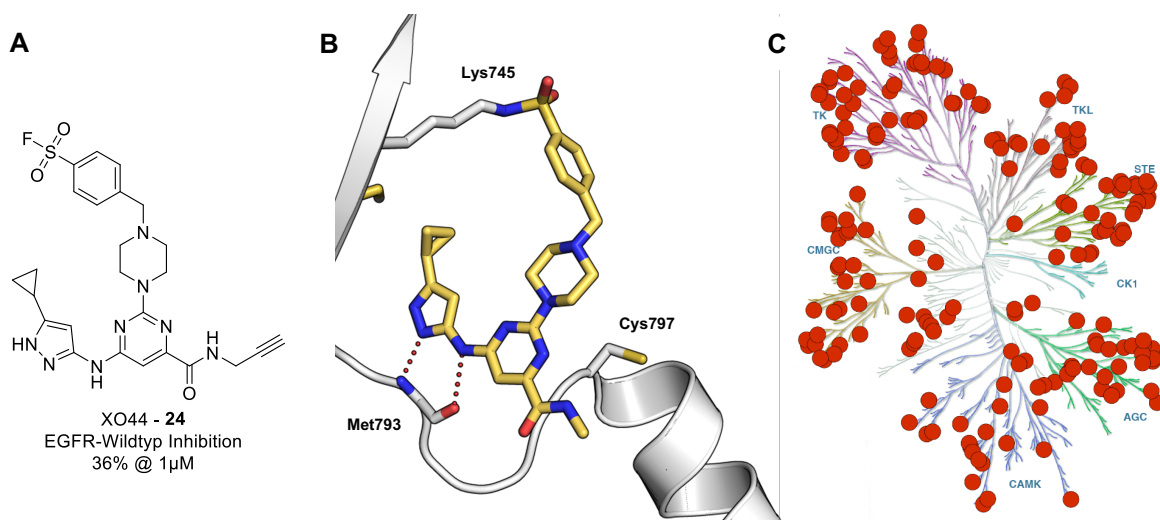


Abbildung 17: A - Struktur des Sulfonylfluorid-basierten Inhibitors XO44. B - XO44 gebunden in EGFR (PDB-Code 5U8L) C - Aktivität des Inhibitors gegenüber des Kinoms.^[70] Kinase-Inhibition über 50% bei einer Konzentration von 1 μ M als roter Punkt dargestellt.

Eine der frühen gezielten Entwicklungen von kovalenten Liganden stellen die Proteasom-Inhibitoren dar. Hierbei wurden Substratpeptid-Analoga, welche das katalytisch aktive Zentrum kovalent modifizieren, als wirksame Inhibitoren ausgemacht. Das aktive Zentrum wird dauerhaft besetzt, wodurch die Substratpeptide nicht mehr binden und gespalten werden können. Neben Aldehyden (MG-132) und Epoxyketonen (Epoxomicin, Carfilzomib und Oprozomib) konnten Boronsäuren als kovalente Modulatoren identifiziert werden, was folglich zur Entwicklung des 20S-Proteasom Inhibitors Bortezomib (**25**) führte.^[73-74] Die erstmals in Proteasom-Inhibitoren zugelassenen Boronsäuren und Boronsäureester (Ixazomib Citrat) zeichneten sich im Vergleich zu den zuvor verwendeten Aldehyden durch eine verbesserte Selektivität zum Threonin des aktiven Zentrums gegenüber Cystein-Proteasen aus.^[75]

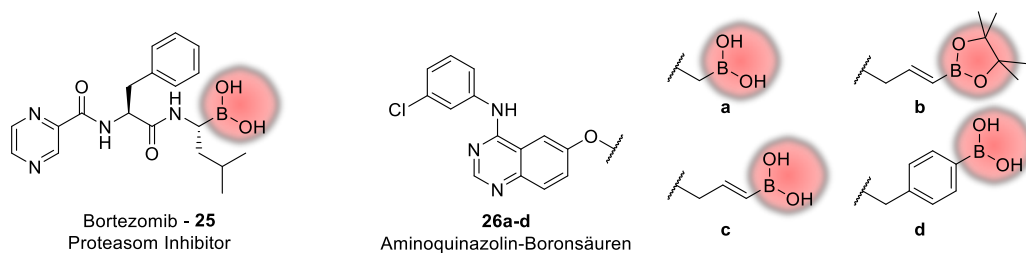


Abbildung 18: Darstellung des Proteasom-Inhibitors Bortezomib und Quinazolin-basierten EGFR-Inhibitoren.^[76] Boronsäure Elektrophile in rot hervorgehoben.

Reversibel-kovalente, Boronsäure-basierte Inhibitoren zur Adressierung von EGFR-Cys797 wurden bereits von BAN *et al.* beschrieben.^[76] Hierfür wurde das aus Erst- und Zweitgenerations-Inhibitoren bekannte 4-Aminoquinazolin Grundgerüst gezielt für eine Komplexierung mittels koordinativer Bindung an das Cys797 und Asp800 mit verschiedenen Boronsäuren ausgestattet. Für den Inhibitor **26d** konnte bei zellulären *washout*-Experimenten mit der EGFR-Wildtyp abhängigen A431-Zelllinie eine verlängerte Autophosphorylierungs-Inhibition festgestellt werden. Eine kovalente Modifizierung des Cys797 scheint nach dem HSAB-Konzept, wobei die Boronsäuren als harte Säuren^[77] und Thiolate als weiche Basen einzustufen sind, jedoch als eher unwahrscheinlich. Zusätzlich ist die beschriebene Selektivität der Boronsäure-Proteasom-Inhibitoren für Threonin- über Cystein-Proteasen wie Cathepsin B beschrieben.^[74] Die Boronsäure-basierten Quinazoline könnten sich aufgrund der Affinität zu harten Nucleophilen möglicherweise geeigneter für die EGFR-C797S-Resistenzmutation herausstellen, bei der das weiche Cystein gegen ein hartes Serin ausgetauscht ist.

1.4.3. EGFR-Exon20-Insertionen als Treibermutationen

Die Erst- und Drittgenerations-EGFR-Inhibitoren zeigen große Erfolge bei der Behandlung von NSCLC, aufgrund der hohen Ansprechraten für die entsprechenden Biomarker, für welche sie entwickelt wurden. Erlotinib und Gefitinib weisen Vorteile im Vergleich zur klassischen Chemotherapie bei Vorliegen der EGFR-L858R oder der EGFR-Exon19-delELREA Mutationen auf. Osimertinib ergänzt dieses Behandlungsspektrum um die EGFR-T790M Aminoquinazolin-Resistenzmutation. Der starke Entwicklungsfokus auf den EGFR-L858R und Exon19-delELREA Aktivierungsmutanten liegt an der statistischen Signifikanz, mit welcher diese in NSCLC auftreten (Abbildung 19 - C).^[78] Dies bedingt neben einer erhöhten Reichweite behandelbarer Patienten auch eine monetäre Komponente bei der Fokussierung auf besagte Treibermutationen.

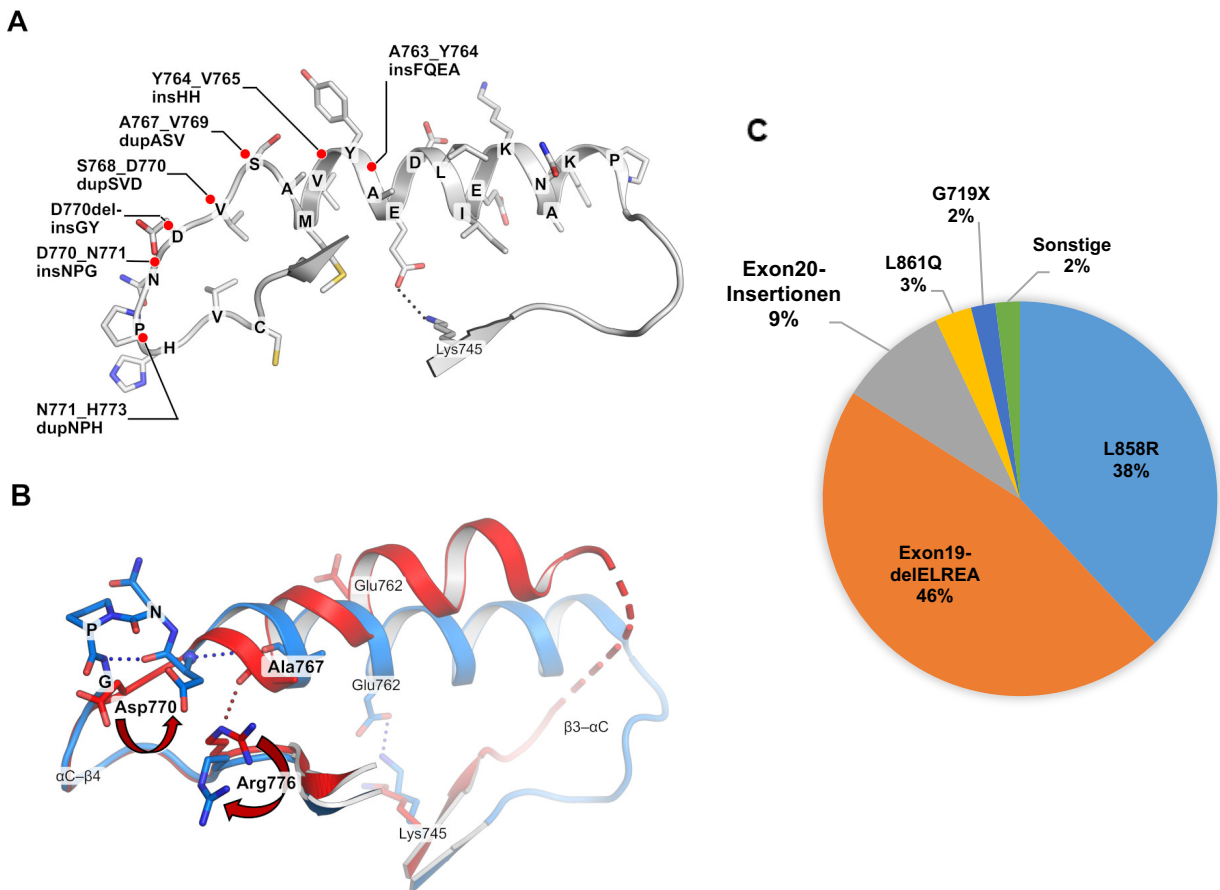


Abbildung 19: A – Strukturelle Darstellung klinisch relevanter Exon20-Insertionsmutation (PDB-Code 1M17); B – Strukturelle Verschiebung der α C-Helix durch die D770_N771insNPG Mutation (blau, PDB-Code 4LRM) im Vergleich zur inaktiven Konformation (rot, PDB-Code 1XKK), Abbildungen aus NIGGENABER et al.^[22] C - Übersicht klinisch relevanter EGFR-Aktivierungsmutationen.^[78]

Die Entwicklung von Inhibitoren für weniger stark auftretende Treiberläsionen wie den Exon20-Insertionsmutationen ist im Gegensatz zu L858R- und Exon19-delELREA-Mutationen eher vernachlässigt worden. (PubMed-Datenbanksuche „EGFR L858R Inhibitor“ 1217 Ergebnisse; „EGFR Exon20 Inhibitor“ 11 Ergebnisse - Stand 01.05.2021).

Weitere EGFR-Treibermutationen in NSCLC, die klinisch nicht weitreichend erforscht wurden, sind die G719X, S768I und L861Q-Punktmutationen.^[79] Diese werden derzeit jedoch in einer Studie mit Osimertinib untersucht.^[NCT03434418] Für die Exon20-Insertionsmutationen sind in den letzten Jahren verschiedene Inhibitoren entwickelt und untersucht worden (Abbildung 20). Die bereits bekannten Erst- bis Drittgenerations-Inhibitoren für die L858R- und del19-ELREA-Mutationen weisen nur eine unzureichende Wirksamkeit auf Exon20ins-Mutationen auf.^[80] Dies lässt sich auch durch ihr geringes Selektivitätsverhältnis über den EGFR-Wildtyp erklären. Vielversprechendere Resultate weisen der hochpotente pan-HER Inhibitor Poziotinib (**27**),^[81-83] Mobocertinib (**28**)^[84-85] oder TAS6417 (**29**) vor.^[86-88]

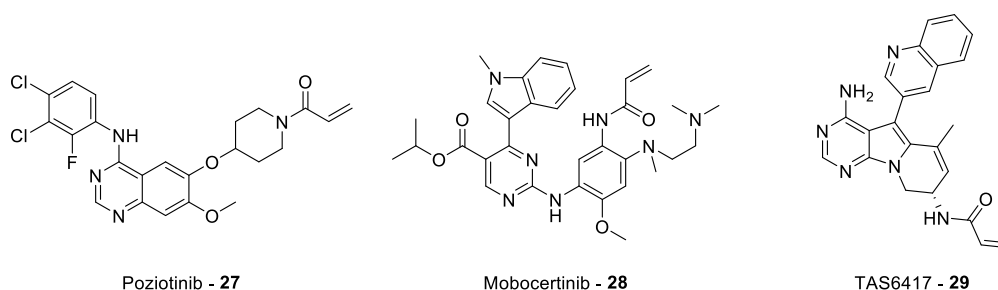


Abbildung 20: Strukturen der klinisch untersuchten EGFR-Exon20-Insertions Inhibitoren Poziotinib, Mobocertinib und TAS6417.

Tabelle 3: Biochemische Analyse verschiedener EGFR-Inhibitoren auf dem EGFR-Wildtyp und der EGFR-Exon20-D770_N771insNPG Mutante und aktuelle klinische Befunde zur Behandlung der Exon20-Insertionsmutationen. PFS = Progressionsfreies Überleben (*progression-free survival*), RR = Ansprechrate (*response rate*). HTRF-Assay durchgeführt von A. Arndt und T. Grabe.

	HTRF [nM]	EGFR Wildtyp	EGFR D770_N771insNPG	Selektivitätsfaktor (Wildtyp:Mutante)	Klinische Erkenntnisse ^[88]
2	Erlotinib	0,031 ± 0,014	5,56 ± 2,50	< 0,01	< 3 Monate PFS, 8-27% RR
4	Afatinib	0,013 ± 0,004	0,360 ± 0,072	0,04	2,7 Monate PFS, 9% RR
5	Neratinib	0,022 ± 0,009	0,290 ± 0,043	0,08	0% RR
7	Osimertinib	0,242 ± 0,095	0,581 ± 0,103	0,42	Laufend
27	Poziotinib	< 0,006	0,011 ± 0,002	< 0,5	Laufend, 64% RR
28	Mobocertinib	0,025 ± 0,006	0,099 ± 0,004	0,25	7,3 Monate PFS, 43% RR
29	TAS6417	0,291 ± 0,088	1,06 ± 0,11	0,27	Laufend

Bei Betrachtung der IC_{50} -Werte der EGFR-Inhibitoren auf dem Wildtyp und der Exon20-D770_N771insNPG-Mutante kann festgestellt werden, dass keiner der untersuchten Inhibitoren eine höhere Potenz auf der Mutante als auf dem Wildtyp vorweisen kann. Die unzureichende klinische Wirksamkeit der Quinazolin-basierten Erst- und Zweitgenerations-Inhibitoren (**2**, **4** und **5**) kann durch eine sehr schlechte Selektivität ($< 0,1$) erklärt werden. Für den Inhibitor Poziotinib konnte kein klares Selektivitätsverhältnis bestimmt werden, da der IC_{50} für den EGFR-Wildtyp nicht exakt aufgelöst werden konnte.

Die Exon20-Insertionsmutationen stellen mit dem dritthöchsten Vorkommen unter den EGFR-Aktivierungsmutationen und nur begrenzt wirksamen Inhibitoren folglich einen Bedarf an der Erforschung neuartiger, selektiver Inhibitoren dar.

2. Motivation und Zielsetzung

Für die bei Osimertinib-Behandlung auftretende C797S-Resistenzmutation wurde bislang kein Inhibitor zugelassen. Basierend auf den Erkenntnissen, welche in zahlreichen Publikationen veröffentlicht wurden und in unserer Arbeitsgruppe zutage gekommen sind, sollen verschiedene Konzepte zur Adressierung der C797S-Resistenzmutation ausgetestet werden. Dabei sollen neuartige kovalente Modifikationen zur Entwicklung biochemisch und zellulär potenter Inhibitoren erforscht werden. Zudem soll ein Fokus auf den potentiell Ser797- und Lys745-bindenden Boronsäuren und Sulfonylfluoriden, die ein EGFR-spezifisches Grundgerüst funktionalisieren sollen, liegen. Zusätzlich sollen bekannte EGFR-Inhibitor-Grundgerüste weiterentwickelt werden, um durch die Optimierung reversibler Binder zellulär potente EGFR-C797S-Inhibitoren zu generieren.

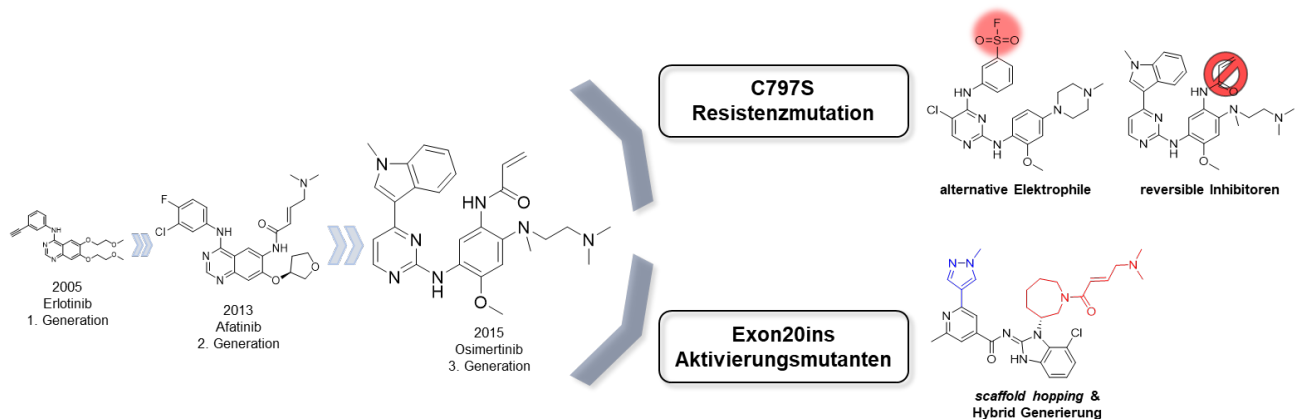


Abbildung 21: Zielsetzung zur Lösung aktueller medizinisch-chemischer Problematiken des Drittgenerations-Inhibitors Osimertinib.

Neben der C797S-Resistenzmutation stellen die Exon20-Insertion-vermittelten Aktivierungsmutationen ein bisher unbeantwortetes Problem bei der Behandlung von NSCLC dar. Für die Insertionsmutationen wurde bislang noch kein Inhibitor zugelassen. Es herrscht ein Mangel an selektiven Inhibitoren, welche ein Wirksamkeitsprofil aufweisen, das Osimertinib für die L858R- oder Exon19-delELREA-Aktivierungsmutanten^[34] sowie die T790M-Resistenzmutation besitzt.^[32] Eine Durchmusterung unserer EGFR-Inhibitor Substanzbibliothek soll Erkenntnisse über die Selektivitätsprofile verschiedener Stoffklassen hervorbringen. Basierend auf den Funden sollen diese Inhibitoren weiterentwickelt werden, um einer erfolgreichen Behandlung von Exon20-Insertionsmutationen einen Schritt näher zu kommen.

3. Ergebnisse

3.1 Alternative Elektrophile zur Adressierung der C797S-Resistenzmutation

Die kovalente Inhibition von EGFR hat sich als sehr erfolgreiche Methode zur Entwicklung von klinisch relevanten EGFR-Inhibitoren herausgestellt.^[47] Die kovalente Modifikation eines onkogenen Treibers bringt vielerlei Vorteile mit sich. Eine längere Verweildauer des Inhibitors am Wirkort kann sich in einer effektiveren zellulären Wirkung widerspiegeln. Die aufwendige Optimierung pharmakokinetischer Parameter wie suboptimale Influx/Efflux-Verhältnisse können durch die veränderte Pharmakodynamik zu einem gewissen Grad umgangen werden, da die kovalent gebundenen Inhibitoren den pharmakokinetischen Gleichgewichten entzogen werden. Eine naheliegende Idee zur Adressierung der C797S-mutierten EGFR-Variante ist somit die abgewandelte kovalente Modifikation mittels Variation des Elektrophils und dessen Angriffspunkt innerhalb des Proteins.

3.1.1. Boronsäuren zur kovalenten Adressierung der C797S-Resistenzmutation

Design und Synthese

Wie in Kapitel 1.4.2. beschrieben, wurden bereits Boronsäuren zur Adressierung von EGFR entwickelt. Diese sollten eine kovalente Bindung zur Thiolat-Seitenkette des Cys797 ausbilden. Aufgrund des harten, elektrophilen Charakters der Boronsäuren war ein kovalenter Bindungsmodus zum härteren Nukleophil Ser797 jedoch aussichtsreicher, wodurch die Boronsäure-Funktionalität ein attraktives Nukleophil zur Adressierung der C797S-Resistenzmutation darstellt. Als Grundgerüst für die Einbringung der Boronsäuren wurde der T790M-selektive EGFR-Drittgenerations-Inhibitor WZ4002 genutzt. Durch die Flexibilität des Linkers kann die Boronsäure-Funktionalität potenziell zusätzlich in Wechselwirkung mit dem katalytischen Lysin treten (Abbildung 22).

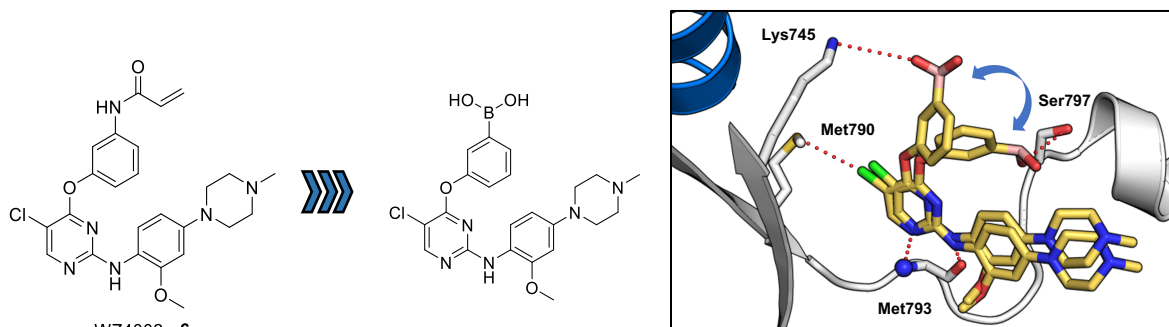
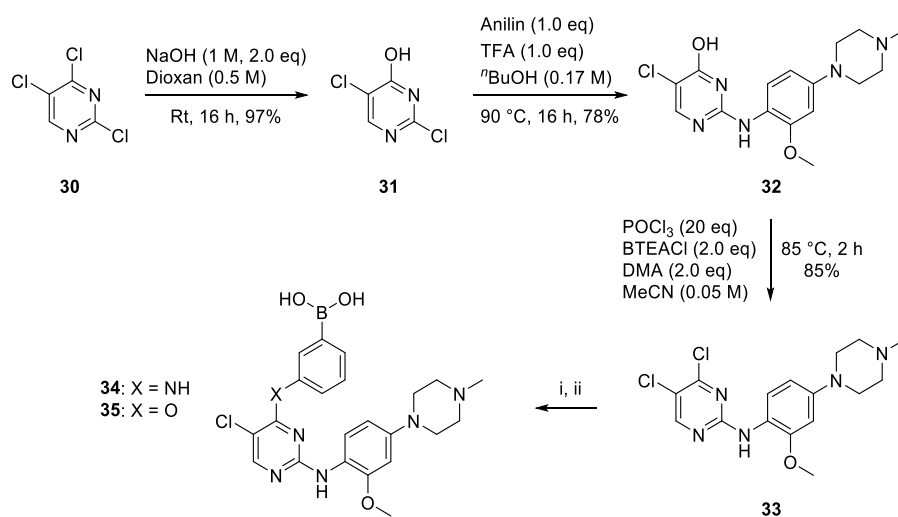


Abbildung 22: Abwandlung des EGFR-Drittgenerations-Inhibitors WZ4002 zum Boronsäure-Derivat. Modellierung reversibler Wechselwirkungen des Boronsäure-Derivats in *LigandScout* ausgehend von reversibel gebundenem WZ4002 in EGFR-T790M/C797S (PDB-Code 7A6L). Flexibilität der Boronsäure (blauer Pfeil) und folglich variiende, nicht-kovalente Wechselwirkungen mit Lys745 und Ser797 (rot gepunktet).

Die Synthese der Boronsäure-Derivate erfolgt ausgehend von einer selektiven Hydrolyse des 2,4,5-Trichloropyrimidins in 4-Position zum Alkohol **31**. Die Löslichkeits-vermittelnde Gruppe wird folgend in 2-Position durch eine nukleophile aromatische Substitution eingefügt, bevor der Alkohol **32** in 4-Position zum Chlorid **33** regeneriert wurde. Die Reaktionsfolge wurde über diesen Umweg gewählt, um eine Derivatisierung in 4-Position als letzten Schritt zu ermöglichen. Als finale Produkte wurden vorerst die *O*- und *N*-verbrückten *meta*-Boronsäuren **34** und **35** synthetisiert. Das *O*-verbrückte Derivat wurde unter basischen Bedingungen unter Erzeugung des Phenolats synthetisiert, wohingegen das *N*-verbrückte Derivat unter säurekatalysierten Bedingungen generiert wurde. Zusätzlich sollte ein Derivat dargestellt werden, welches die Boronsäure in *ortho*-Position trägt. Die entsprechende Reaktion mit der *ortho*-Aminophenylboronsäure zeigte jedoch keine Produktbildung.



Syntheschema 1: Synthese von *O*- und *N*-verbrückten Phenylboronsäure-basierten Inhibitoren. (i) Anilin: TFA, ^tBuOH, 90 °C, 59% (ii) Phenol: K₂CO₃, DMF, 50 °C, 64%.

Biologische Evaluierung

Die Boronsäure-Derivate weisen eine hohe Potenz auf der Aktivierungsmutante EGFR-L858R auf (Tabelle 4), wobei anzumerken ist, dass diese im Vergleich zu Osimertinib und WZ4002 nicht mehr im pikomolaren Bereich liegen. Beide Boronsäure-Inhibitoren weisen mit niedrig nanomolaren IC₅₀-Werten ebenfalls eine gute Toleranz gegenüber der T790M-Resistenzmutation auf. Mit der zusätzlichen C797S-Resistenzmutation fallen die beiden Boronsäure-Derivate ab, weisen jedoch eine höhere Potenz als Osimertinib und WZ4002 vor. Das EGFR-Wildtyp-Selektivitätsverhältnis zur EGFR-L858R/T790M/C797S Mutante liegt bei den Boronsäure-Derivaten in einem akzeptablen Bereich. Bei Betrachtung der PC9-Zelllinie mit EGFR-L858R/T790M/C797S Mutation kann für das Boronsäure-Derivat **35** keine signifikante Aktivitätssteigerung im Vergleich zu Osimertinib und WZ4002 festgestellt

werden. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte durch chemische Optimierung versucht werden die zelluläre Aktivität auf C797S-mutierten Zelllinien zu optimieren.

Tabelle 4: Biochemische und zelluläre Evaluierung der Phenylboronsäure-Derivate von WZ4002. ** Zweifachmessung. Die Assays wurden durchgeführt von A. Arndt und Dr. M. Keul.

HTRF / CTG [nM]		EGFR Wildtyp	EGFR L858R	EGFR L858R/T790M	EGFR LR/TM/CS	PC9-EGFR LR/TM/CS
7	Osimertinib	0,24 ± 0,10	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	212 ± 155	3158 ± 661
6	WZ4002	9,3 ± 6,9	0,37 ± 0,21	0,18 ± 0,11	452 ± 189	3833 ± 766
34	O-verbrückt	234 ± 29	18 ± 3	12 ± 3	51 ± 53 **	5678 ± 702
35	N-verbrückt	30 ± 12	3,6 ± 1,2	3,7 ± 2,7	41 ± 32	2483 ± 566

Optimierung der zellulären Aktivität

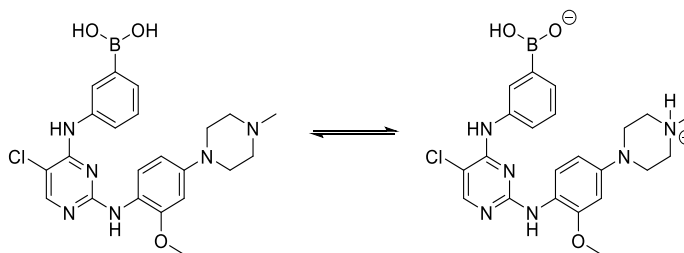
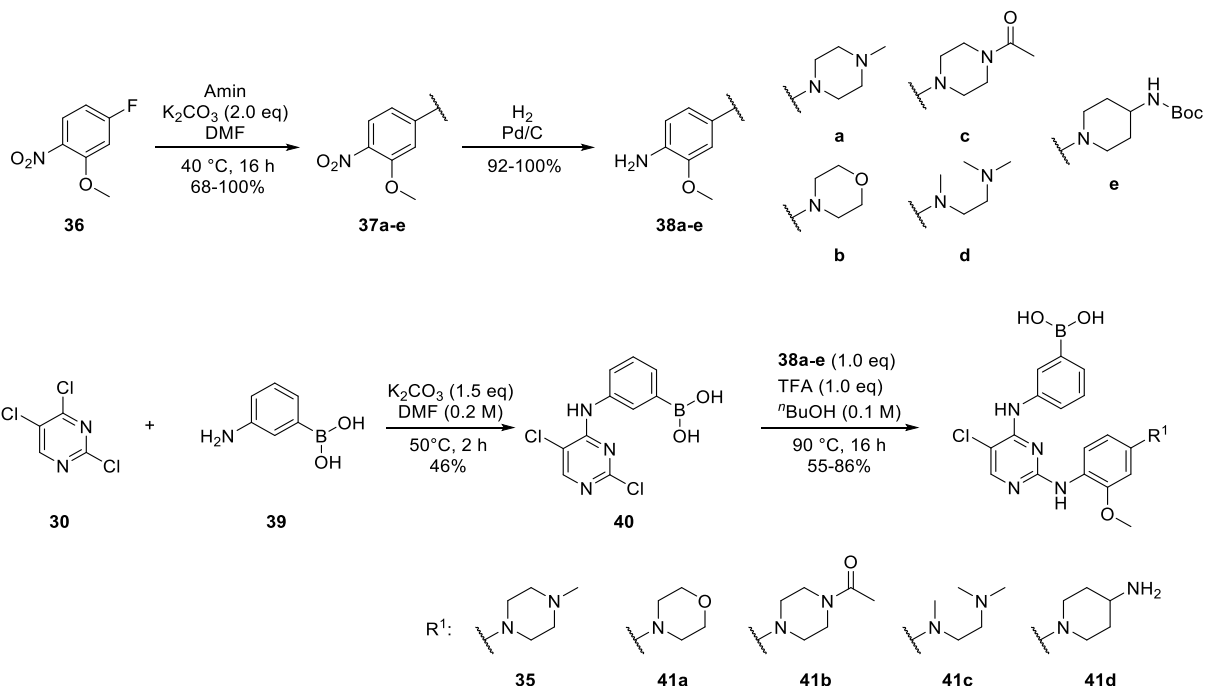


Abbildung 23: Darstellung der ungeladenen (links) und zwitterionischen Struktur (rechts) des Boronsäure-Derivats 35.






Eine mögliche Stellschraube für die Optimierung der zellulären Potenz ist die Derivatisierung der Löslichkeitsgruppe. Die Verbindung **35** kann durch das Vorliegen einer Boronsäure und eines stark basischen, tertiären Amins in einer zwitterionischen Form vorliegen (Abbildung 23). Diese Ladungen könnten die zelluläre Permeabilität vehement beeinflussen. Folglich sollten Löslichkeits-vermittelnde Gruppen eingeführt werden, welche sich in der Basizität des Stickstoffs unterscheiden. Aufgrund der erhöhten Potenz des *N*-verbrückten Derivats **35** gegenüber dem *O*-verbrückten Derivat **34** wird für die folgenden Derivatisierungen mit der 3-Aminophenylboronsäure weitergearbeitet. Die Synthese beginnt hierbei mit der Einbringung der Phenylboronsäure in 4-Position und der Derivatisierung der Löslichkeitsgruppe im letzten Schritt. Die erforderlichen Löslichkeitsgruppen werden durch die S_NAr -Reaktion (nukleophile aromatischen Substitution) von 2-Nitro-5-Fluoranisol mit verschiedenen Aminen und anschließender Reduktion der Nitrogruppe erzeugt.



Syntheschema 2: Synthese einer Boronsäure-Substanzbibliothek mit variierender Löslichkeitsgruppe. Für Inhibitor **41d** erfolgte eine saure Boc-Entschützung.






Die erzeugten Boronsäure-Derivate ähneln sich in ihrem biochemischen Aktivitätsprofil gegenüber den verschiedenen EGFR-Mutanten. Das offenkettige Trimethyl-Ethylendiamin Derivat **41c** zeigt in dieser Serie die geringste Potenz gegenüber dem Wildtyp, der L858R-Aktivierungsmutante und der T790M-Resistenzmutante. Die Inhibitoren mit Morpholin-**41a** und Acetylpiperazin-Gruppe **41b** weisen mit ihrer verringerten Basizität ebenfalls eine geringfügig niedrigere Aktivität als das Methylpiperazin-Derivat **35** auf. Lediglich das 4-Aminopiperidin-Derivat **41d** konnte das Methylpiperazin in seiner biochemischen Potenz geringfügig übertreffen.

Tabelle 5: Biochemische Daten der Boronsäure-Derivate gegenüber dem EGFR-Wildtyp, L858R-, L858R/T790M und L858R/T790M/C797S-Mutante. HTRF-Assay wurde durchgeführt von A. Arndt und Dr. M. Keul.

HTRF [nM]		EGFR Wildtyp	EGFR L858R	EGFR L858R/T790M	EGFR L858R/T790M/C797S
7	Osimertinib	0,24 ± 0,10	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	212 ± 155
6	WZ4002	9,3 ± 6,9	0,37 ± 0,21	0,18 ± 0,11	452 ± 189
35		30 ± 12	3,6 ± 1,2	3,7 ± 2,7	41 ± 32
41a		47 ± 23	7,3 ± 4,4	5,1 ± 0,3	n.b.
41b		49 ± 15	7,1 ± 1,6	5,0 ± 1,8	n.b.
41c		93 ± 17	15,4 ± 0,8	12 ± 2	n.b.
41d		23 ± 5	3,1 ± 0,4	1,8 ± 0,1	n.b.

Bei Betrachtung der zellulären Aktivität gegenüber den verschiedenen EGFR-Mutationen konnte keinerlei Steigerung der Potenz gegenüber dem bisherigen Methylpiperazin-Derivat **35** erzielt werden. Ein Vergleich zwischen den Ba/F3-Zelllinien mit und ohne C797S-Punktmutation zeigt ebenfalls keine signifikanten Aktivitätsunterschiede der Boronsäure-Derivate. Eine positive Wechselwirkung der Boronsäure-Funktionalität mit Ser797 lässt sich aus den zellulären Ergebnissen somit nicht ableiten.

Tabelle 6: Zelluläre Daten der Boronsäure-Derivate gegenüber L858R-, Del19-, T790M- und C797S-mutierten Zelllinien. n.b. nicht bestimmt. CTG-Assay durchgeführt von Dr. M. Keul und K. Jeyakumar.

CTG [µM]		Ba/F3-EGFR-L858R	Ba/F3-EGFR-L858R/C797S	H1975 (L858R/T790M)	PC9-EGFR-Del19/T790M/C797S
7	Osimertinib	< 0,010	2,68 ± 1,12	0,017 ± 0,008	3,16 ± 0,66
6	WZ4002	0,164 ± 0,023	1,57 ± 0,22	0,109 ± 0,053	3,83 ± 0,77
35		2,11 ± 0,27	2,03 ± 0,37	1,33 ± 0,53	2,48 ± 0,57
41a		2,76 ± 0,56	2,96 ± 0,42	3,85 ± 0,90	6,04 ± 1,15
41b		1,94 ± 0,57	2,51 ± 0,49	2,78 ± 1,10	n.b.
41c		4,37 ± 0,02	4,14 ± 0,31	4,28 ± 0,70	6,69 ± 1,57
41d		3,34 ± 0,91	2,58 ± 0,42	8,10 ± 0,95	5,08 ± 1,18

Da es sich bei einer Serin-Boronsäure-Bindung um eine Bindung mit vorwiegend kovalent-reversiblen Charakter handeln würde, wäre eine kinetische Betrachtung der Bindung der Inhibitoren gegenüber der C797S-Mutante notwendig um einen kovalenten

Bindungscharakter zu belegen.^[89-90] Eine kovalente Modifikation per MS-Analyse von EGFR-T790M/C797S konnte für die Boronsäure **35** nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich für die Boronsäure-basierten Liganden eine hohe inhibitorische Potenz im niedrigen nanomolaren Bereich festhalten. Die Übersetzung der biochemischen Ergebnisse konnte nach einer moderaten Aktivität des Inhibitors **35** auf der PC9-L858R/T790M/C797S Zelllinie jedoch nicht weiter verbessert werden. Aufgrund einer zeittechnischen Kosten-Nutzen Abwägung wurde entschieden die synthetischen Arbeiten nicht fortzusetzen und den Fokus zur Adressierung der C797S-Mutante auf alternative Strategien zu legen. Naheliegende Experimente zur Verbesserung der zellulären Potenz dieser Inhibitor-Klasse liegen in der Anwendung des Prodrug-Konzepts. Hierfür könnte die Boronsäure Funktion als Boronsäure-Ester maskiert werden (**42**, Abbildung 24).

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung liegt in der Variation des Grundgerüsts. Im Laufe dieser Arbeit erschienen Boronsäure-Inhibitoren (**43**) auf dem Grundgerüst von Osimertinib. Eine biochemische Evaluierung dieser Inhibitoren ist jedoch nicht verfügbar.^[WO2019079599]

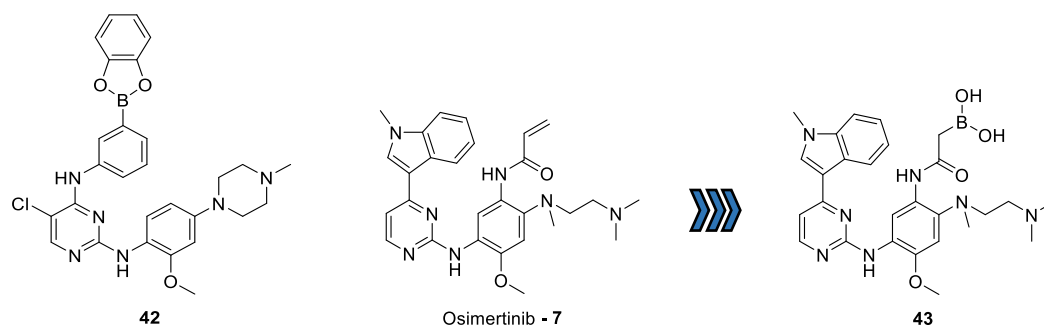


Abbildung 24: Darstellung eines Ester-maskierten Boronsäure Derivats **42** und des Boronsäure Derivats **43** abgewandelt von Osimertinib.^[WO2019079599]

3.1.2. S(VI)-Fluor-Verbindungen zur kovalenten Adressierung der C797S-Resistenzmutation

Design und Synthese

Wie in Kapitel 1.4.2. beschrieben, konnte bereits ein Inhibitor entwickelt werden, welcher in der Lage ist das katalytische Lysin mit einem Sulfonylfluorid-Elektrophil zu modifizieren. Diese kovalente Modifizierung sollte sich bei der irreversiblen Adressierung der EGFR-C797S-Resistenzmutation zunutze gemacht werden. Dabei wurde analog zu den Boronsäure-Derivaten (Kapitel 3.1.1.) das Grundgerüst des EGFR-Drittgenerations-Inhibitors WZ4002 zu den entsprechenden Fluorsulfaten und Sulfonylfluoriden umgewandelt. Durch die Flexibilität des Linkers kann die elektrophile Funktionalität zusätzlich der C797S-Punktmutation zugewandt sein. Eine kovalente Modifikation durch Schwefel(VI)-Fluor Elektrophile, welche primär für das katalytische Serin in Proteasen,^[91-92] jedoch auch für nicht-aktivierte Serine beschrieben ist,^[93] sollte auf das neu entstandene Ser797 übertragen werden.

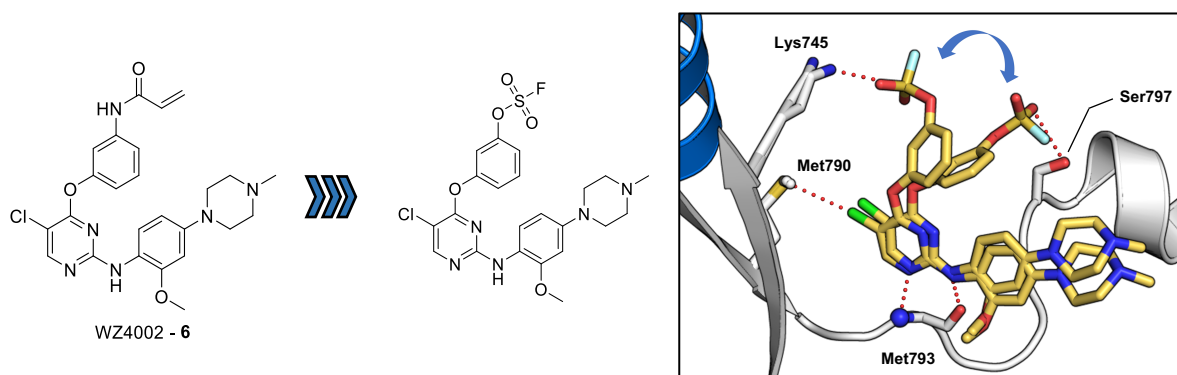
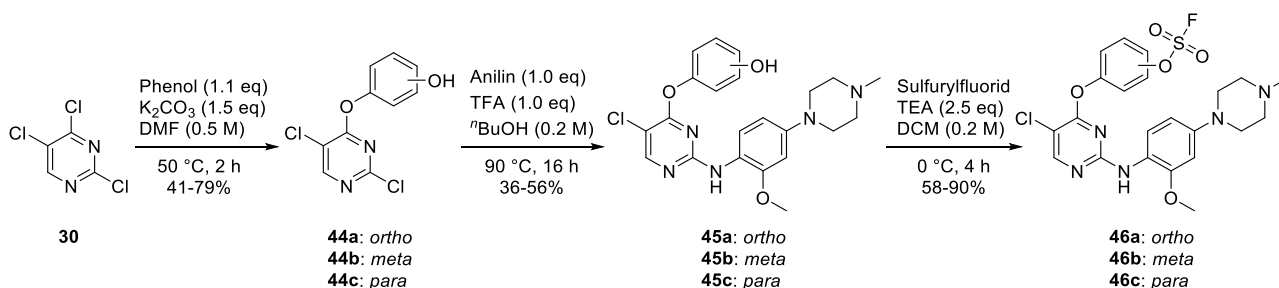


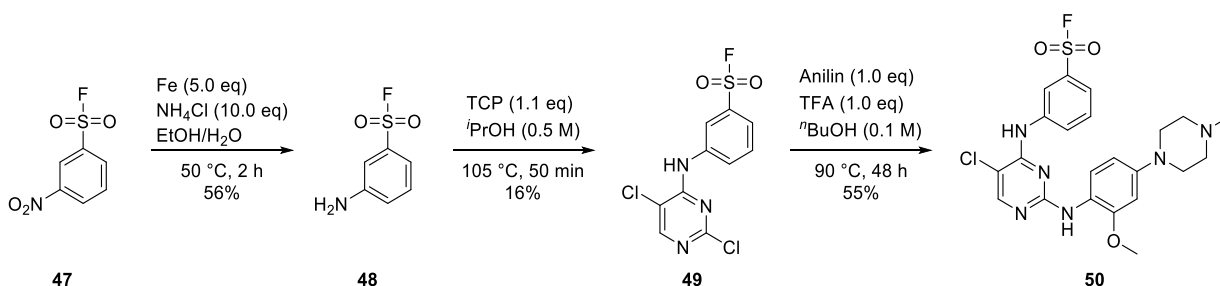
Abbildung 25: Abwandlung des EGFR-Drittgenerations-Inhibitors WZ4002 zum Fluorsulfat-Derivat. Modellierung des Fluorsulfat-Derivats in *LigandScout* ausgehend von reversibel gebundenem WZ4002 in EGFR-T790M/C797S (PDB-Code 7A6L). Flexibilität des Fluorsulfats (blauer Pfeil) und folglich variierende nicht-kovalente Wechselwirkungen mit Lys745 und Ser797 (rot gepunktet).

Durch die Entwicklung von Schwefel(VI)-Fluor Klick-Chemie^[94] in der Arbeitsgruppe von SHARPLESS wurde die *late stage* Funktionalisierung von Wirkstoffen mit Arylfluorsulfat-Nucleophilen ermöglicht.^[95] Dieses Konzept sollte für die Entwicklung von Inhibitoren für die C797S-Resistenzmutation angewendet werden. Hierfür wurde zuerst eine Reihe von WZ4002-analogen Phenolen (**45a-c**) synthetisiert. Diese konnten unter Einsatz des Insektizids SO₂F₂ im letzten der drei Reaktionsschritte effizient zu den Arylfluorsulfaten (**46a-c**) umgesetzt werden.



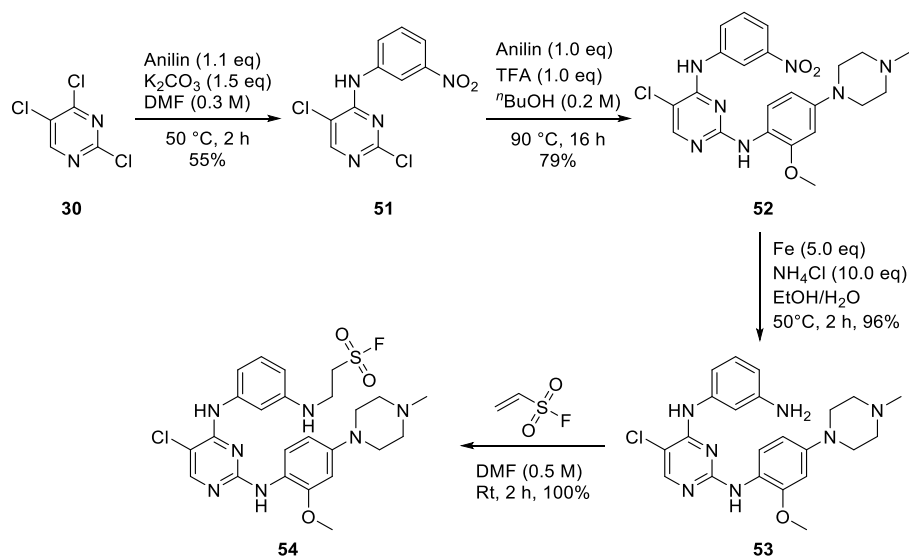
Syntheschema 3: Synthese von Fluorsulfat-basierten Inhibitoren mit Aminopyrimidin-Grundgerüst.

Neben den Fluorsulfaten wurde das *m*-Sulfonylfluorid **50** generiert. Hierfür wurde zuerst das kommerziell erhältliche 3-Nitrobenzolsulfonylfluorid mithilfe von Eisen/Ammoniumchlorid reduziert. Das erhaltene Anilin **48** wurde mittels S_NAr an das 2,4,5-Trichloropyrimidin eingeführt. Zuletzt wurde die Löslichkeitsgruppe durch eine säurekatalysierte S_NAr in 2-Position eingebracht. Eine analoge Synthese des *ortho*-Derivats scheiterte an der selektiven Reduktion des 2-Nitrobenzolsulfonylfluorids.



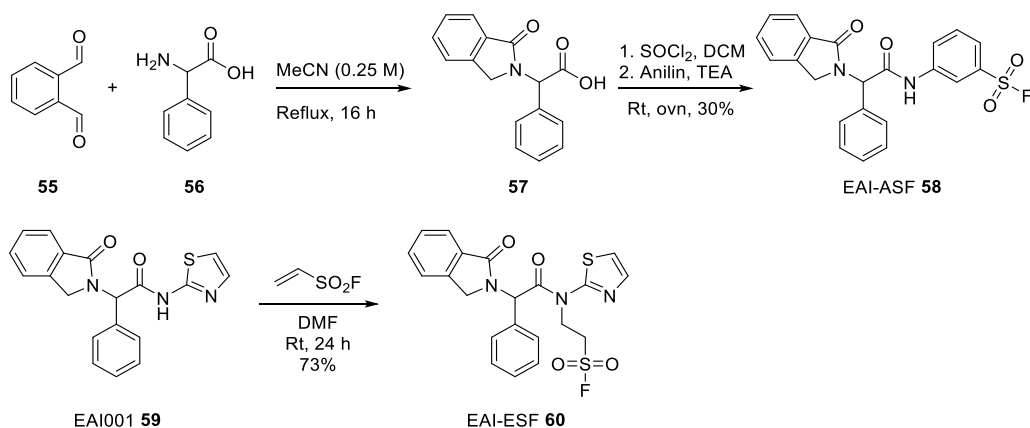
Syntheschema 4: Synthese des Arylsulfonylfluorid-basierten Inhibitors 50.

Zusätzlich sollte das äußerst starke Elektrophil Ethylensulfonylfluorid genutzt werden, um in einer Michael-Addition das Ethan-verbrückte Sulfonylfluorid **54** zu generieren. Hierfür wurde, erneut vom 2,4,5-Trichloropyrimidin ausgehend, das *m*-Nitroanilin eingeführt und in der etablierten S_NAr -Reaktion die Löslichkeitsgruppe eingeführt. Anschließend wurde die Nitroverbindung **52** zum Anilin **53** reduziert, wodurch die Einführung des *warheads* im letzten Schritt erfolgen konnte.



Syntheschema 5: Synthese des Ethansulfonylfluorid-basierten Inhibitors 54.

Neben den ATP-kompetitiven Inhibitoren sollte der allosterische Inhibitor EAI001 als Arylsulfonylfluorid **58** und Ethylensulfonylfluorid **60** modifiziert werden (Syntheschema 6). Inhibitoren dieses Typs besitzen aufgrund der Distanz der allosterischen Bindetasche zum Ser797 keine Möglichkeit der kovalenten Modifikation von C797S. Eine Modifikation des Lys745 erscheint aufgrund der räumlichen Nähe jedoch möglich. Allosterische Inhibitoren mit Acrylamid und Chloracetamid-Nucleophilen wurden bereits von GRAY beschrieben.^[WO2019164948]

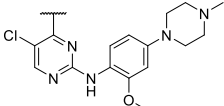


Syntheschema 6: Synthese von Sulfonylfluorid-Inhibitoren basierend auf dem allosterischen Inhibitor EAI001.

Biologische Evaluierung

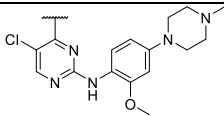
Die generierten Verbindungen zeigen im Vergleich zu den Referenzverbindungen Osimertinib und WZ4002 eine stark verringerte Aktivität. Bei Betrachtung der biochemischen Daten der generierten Inhibitor-Serie ist eine Aktivitätsabnahme zwischen den *meta*- und *para*-Phenol-Vorstufen und den entsprechenden Fluorsulfaten auffällig. Von den Fluorsulfaten konnte keine Verbindung eine höhere Aktivität als Osimertinib auf der L858R/T790M/C797S-Resistenzmutation vorweisen.

Tabelle 7: Biochemische Evaluierung (HTRF-Assay [nM]) der Fluorsulfat- und Sulfonylfluorid-Inhibitoren gegenüber dem EGFR-Wildtyp und klinisch relevanten Mutanten. n.b. nicht bestimmt. HTRF-Assay wurde durchgeführt von A. Arndt und Dr. M. Keul.

		EGFR Wildtyp	EGFR L858R	EGFR L858R/T790M	EGFR L858R/T790M/C797S
7	Osimertinib	0,24 ± 0,10	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	212 ± 155
6	WZ4002	9,3 ± 6,9	0,37 ± 0,21	0,18 ± 0,11	452 ± 189
46a	<i>o</i> -Fluorsulfat	428 *	74 ± 25	33 ± 6	398 ± 264
45b	<i>m</i> -Phenol	246 ± 51	32 ± 2	17 ± 2	451 ± 331
46b	<i>m</i> -Fluorsulfat	n.b.	21 ± 10	46 ± 12	989 ± 252
45c	<i>p</i> -Phenol	611 ± 420	106 ± 72	49 ± 33	972 ± 414
46c	<i>p</i> -Fluorsulfat	n.b.	n.b.	35 ± 3	4039 ± 856
50	<i>m</i> -Sulfonylfluorid	59 ± 10	15 ± 4	9,0 ± 2,8	329 ± 169
54	<i>m</i> -Ethansulfonylfluorid	22 ± 4	3,3 ± 1,0	2,3 ± 0,7	57 ± 35
58	EAI-ASF	n.b.	n.b.	n.b.	> 20000
60	EAI-ESF	n.b.	n.b.	n.b.	> 20000

Die Sulfonylfluoride **50** und **54** stellen die potentesten Verbindungen dieser Serie dar. Besonders das flexible Ethansulfonylfluorid zeigt auf der Tripelmutante die höchste Aktivität, welche die Osimertinibs übertrifft. Ein Aktivitätsgewinn von Doppel- und Tripelmutante durch eine kovalente Modifikation des Ser797 konnte nicht beobachtet werden. Für die allosterischen Sulfonylfluoride **58** und **60** wurde nur die EGFR-L8585R/T790M/C797S-Tripelmutante vermessen. Hierbei konnte jedoch für beide Inhibitoren keine Inhibition (IC₅₀ > 20 µM) festgestellt werden. Weiterhin wurden die Inhibitoren auf ihre zelluläre Potenz untersucht (Tabelle 8).

Tabelle 8: Zelluläre Daten (CTG-Assay [µM]) der Fluorsulfat- und Sulfonylfluorid-Inhibitoren gegenüber EGFR-abhängigen Zelllinien. n.b. nicht bestimmt. CTG-Assay wurde durchgeführt von Dr. M. Keul und K. Jeyakumar.

		Ba/F3-EGFR- L858R	Ba/F3-EGFR- L858R/C797S	H1975 (L858R/T790M)	PC9-EGFR- Del19/T790M/C797S
7	Osimertinib	< 0,01	2,7 ± 1,1	0,017 ± 0,008	3,2 ± 0,7
6	WZ4002	0,16 ± 0,02	1,6 ± 0,2	0,11 ± 0,05	3,8 ± 0,8
46a	<i>o</i> -Fluorsulfat	5,8 ± 1,9	5,0 ± 1,0	13,7 ± 3,2	5,8 *
46b	<i>m</i> -Fluorsulfat	5,1 ± 0,8	4,2 ± 0,4	15,7 ± 2,4	6,1 *
46c	<i>p</i> -Fluorsulfat	4,7 ± 0,6	4,7 ± 0,6	11,0 ± 0,8	5,5 *
50	<i>m</i> -Sulfonylfluorid	11,9 ± 1,4	13,0 ± 3,0	14,7 ± 2,6	12,3 *
54	<i>m</i> -Ethansulfonylfluorid	9,6 ± 1,7	11,5 ± 3,4	13,8 ± 4,4	19,7 *
58	EAI-ASF	n.b.	n.b.	> 30	> 30
60	EAI-ESF	n.b.	n.b.	> 30	> 30

Bei Betrachtung der zellulären Daten ist festzustellen, dass die teils niedrig nanomolar aktiven Inhibitoren keine Translation der Potenz in den zellulären Kontext erwirken. Alle dargestellten Inhibitoren beeinflussen das Wachstum der verschiedenen EGFR-abhängigen Zelllinien nur im mikromolaren Bereich. Selbst das hochpotente Ethansulfonylfluorid **54** kann keine zufriedenstellende Wirkung vorweisen. Die allosterischen Inhibitoren EAI-ASF **58** und EAI-ESF **60** konnten schon wie bei der biochemischen Untersuchung keinerlei Aktivität vorweisen. Die generierten S(VI)-Fluor-Elektrophile wurden zusätzlich massenspektrometrischen Untersuchungen mit EGFR-T790M/C797S unterzogen (durchgeführt von Dr. J. Niggenaber). Für keinen der Inhibitoren konnte jedoch eine kovalente Modifikation der Kinase festgestellt werden.

Basierend auf der ausbleibenden kovalenten Modifizierung von EGFR-T790/C797S, der Aktivitätsabnahme zwischen Phenol-Vorstufe und Fluorsulfat, der Aktivitätsabnahme von Doppel- zu Tripelmutante und einem Mangel an zellulärer Aktivität, ist ein kovalenter Wirkmechanismus dieser Inhibitor-Klasse gegenüber EGFR auszuschließen. Als erfolgreich ist hierbei lediglich die Synthese mit der erfolgreichen Anwendung des S(VI)-Fluor-Klickchemie-Konzeptes auf das WZ4002-Aminopyrimidin-Grundgerüst zu betrachten.

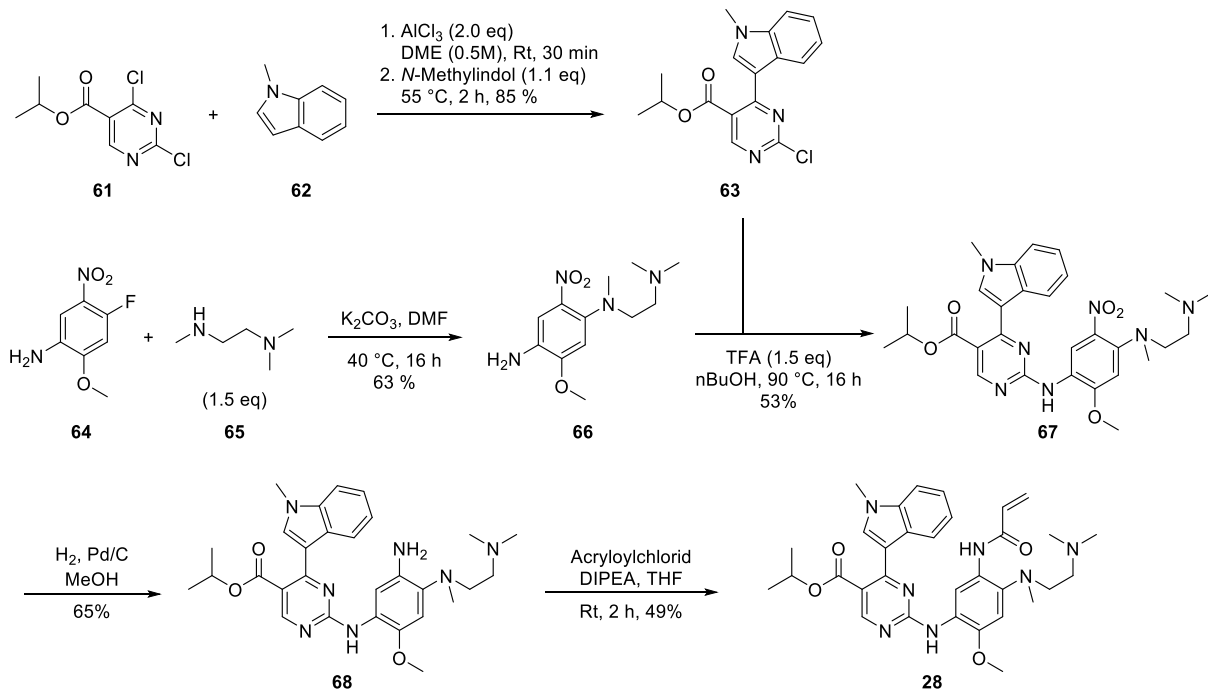
3.2. Reversible Aminopyrimidine zur Adressierung von C797S-Resistenzmutationen

Die Problematik der C797S-Resistenzmutation durch die Behandlung mit kovalenten EGFR-Zweit- und Drittgenerations-Inhibitoren könnte neben einem neu erschlossenen, kovalenten Bindungsmodus auch durch optimierte reversible Inhibitoren gelöst werden.

Die beschriebenen reversiblen EGFR-Inhibitoren (Kapitel 1.4.1.) geben erste Anhaltspunkte für die Möglichkeit einer erfolgreichen Adressierung der C797S-Resistenzmutation. Zusätzlich ergab eine Substanzbibliothek-Durchmusterung der im Arbeitskreis verfügbaren EGFR-Inhibitoren eine bedeutende Erkenntnis in der biochemischen Potenz des Exon20-Inhibitors Mobocertinib gegenüber Osimertinib auf der EGFR-L858R/C797S Resistenzmutation. Die Einbringung des Isopropylesters ergibt eine über zehnfach gesteigerte Potenz Mobocertinibs gegenüber Osimertinib.

Synthese und Evaluierung Mobocertinibs

Die Synthese von Mobocertinib wurde eigenständig durchgeführt, um größere Mengen für Kristallisationsstudien zu generieren, da keine kommerziellen Quellen für den Inhibitor verfügbar waren. Ausgegangen wurde hierbei vom kommerziell verfügbaren Isopropyl-2,4-dichloropyrimidin-5-carboxylat **61**, welches in einer Friedel-Crafts-Arylierung zum substituierten Methylindol **63** transformiert wurde. Aufgrund der bereits durchgeführten Synthese des Anilins **66** in vorangegangenen Projekten wurde die Synthese im Vergleich zum Patent ^[WO2019222093] abgewandelt und die vollständige Löslichkeitsgruppe wurde statt eines *o*-Fluoronitroanilins eingeführt. Anschließend wurde die Nitroverbindung **67** im Wasserstoff-Flussreaktor mithilfe von Palladium auf Aktivkohle reduziert. Im letzten Schritt wurde der Michael-Akzeptor mittels Acryloylchlorid eingeführt. Die Synthese konnte mit moderaten bis guten Ausbeuten durchgeführt werden und es konnten ausreichende Mengen für Kristallisationsstudien generiert werden. Aufgrund teils verbliebenen Startmaterials bei der Generierung von **67** und **28**, könnte die Ausbeute durch Verlängerung der Reaktionszeit oder erneute Zugabe von Reagenzien optimiert werden.



Syntheschema 7: Synthese von Mobocertinib.

Das generierte Mobocertinib wurde für Kristallisationsstudien verwendet. Es konnte eine Ko-Kristallstruktur von Mobocertinib gebunden in EGFR-T790M/V948R erhalten werden (Auflösung = 2.0 Å, PDB-Code 7A6K, Kristallisation durch Dr. J. Niggenaber). Diese zeigt die Besetzung der hydrophoben Tasche, welche von Osimertinib ausgespart wird, durch den Isopropylester. Der Isopropylrest bildet dabei unpolare Wechselwirkungen mit den Met790- und Lys745-Seitenketten. Zusätzlich können polare Wechselwirkungen des Carbonyl-Sauerstoffs mit der Thr854-Seitenkette und ein Wasser-vermittelter Kontakt zur Gln791-Seitenkette ausgemacht werden (Abbildung 26).

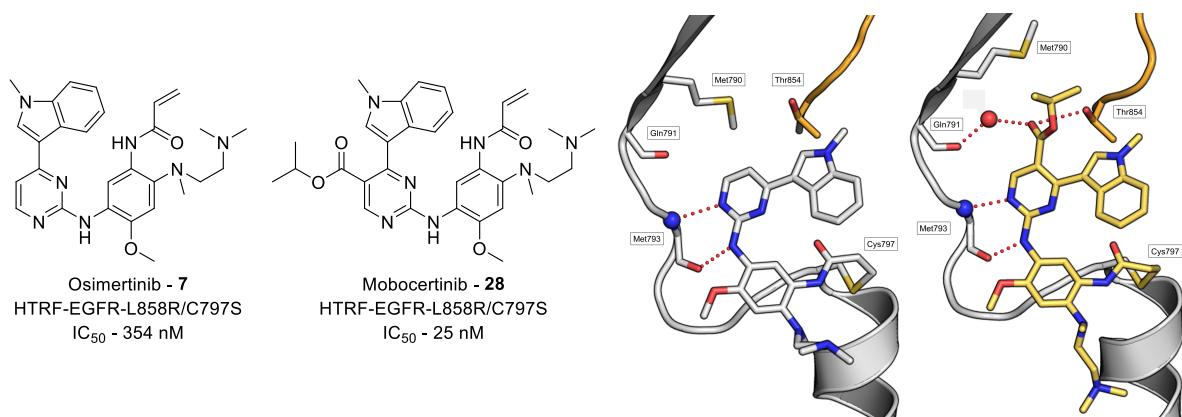


Abbildung 26 – A: Strukturen und IC₅₀-Werte von Osimertinib und Mobocertinib auf EGFR-L858R/C797S; B: Ko-Kristallstruktur von Osimertinib in EGFR-T790M/V948R PDB-Code 6Z4B, Ko-Kristallisation mit EAI045 in der allosterischen Tasche, nicht gezeigt für bessere Übersicht. Wasserstoffbrückenbindung mit Met793 der Scharnierregion rot-gepunktet. C: Ko-Kristallstruktur von Mobocertinib in EGFR-T790M/V948R PDB-Code 7A6K. Wasserstoffbrückenbindung mit Met793 der Scharnierregion und polare Wechselwirkungen in der hydrophoben Tasche rot-gepunktet.

Die biochemische Aktivitätssteigerung zwischen Osimertinib und Mobocertinib war jedoch nicht übertragbar auf das zelluläre Testsystem der EGFR-L858R/C797S abhängigen Ba/F3-Zelllinie (Osimertinib 2.0 μM ; Mobocertinib 2.7 μM). Um weitere Erkenntnisse zu generieren wurden Mobocertinib- und Osimertinib-Derivate ohne Acrylamid-Funktionalität generiert. Neben einer erwarteten Aktivitätssenkung gegenüber dem Cys797-tragendem EGFR-Wildtyp, wurde eine Aktivitätssteigerung für C797S-mutierte EGFR-Varianten erhofft, da in Ko-Kristallstrukturen des Drittgenerations-Inhibitors WZ4002 in EGFR-T790M/C797S eine Abstoßung des Acrylamids vom polaren Ser797 beobachtet werden konnte (Abbildung 27, PDC-Code 7A6L).

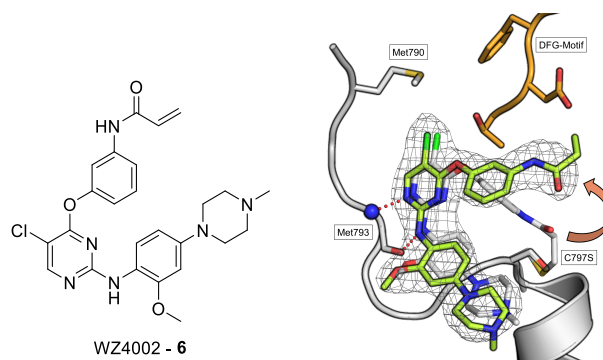
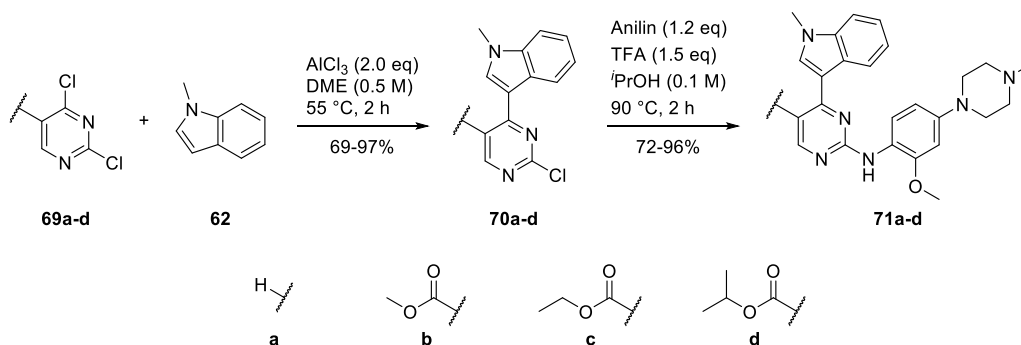


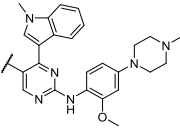




Abbildung 27: Darstellung des Drittgenerations-Inhibitors WZ4002 und Vergleich der Ko-Kristallstrukturen in EGFR-T790M (PDB-Code 4ZAU, weiß, kovalent gebunden an Cys797) und in EGFR-T790M/C797S (gelb, reversibel gebunden). Abstoßung des Acrylamids von Ser797 durch roten Pfeil gekennzeichnet.

Um einen ersten Überblick auf den Einfluss der Estergröße zu erhalten, wurden Derivate ohne Ester (**71a**), mit Methyl- (**71b**), Ethyl- (**71c**), und Isopropylester (**71d**) synthetisiert. Die Synthese erfolgte ausgehend von den kommerziell verfügbaren 2,4-Dichloropyrimidinen mit den entsprechenden Estern in 5-Position. Der erste Reaktionsschritt ist dabei die Einführung des *N*-Methylindols durch eine Friedel-Crafts-artige nukleophile Substitution in 4-Position. Anschließend wird das *Front-Pocket*-Element durch eine säurekatalysierte, nukleophile aromatische Substitution in 2-Position eingeführt:



Syntheschema 8: Synthese einer initialen Serie reversibler Aminopyrimidin-Inhibitoren. Die Intermediate **69d** und **70d** entsprechen **61** und **63**.

Tabelle 9: Biochemische (HTRF-Assay [nM]) und zelluläre (CTG-Assay [µM]) Evaluierung der ersten SAR reversibler Aminopyrimidine gegenüber EGFR-Varianten. Assays wurden durchgeführt von A. Arndt und K. Jeyakumar.

		EGFR Wildtyp	EGFR L858R	EGFR L858R/C797S	Ba/F3-EGFR L858R	Ba/F3-EGFR L858R/C797S
	7 Osimertinib	0,23 ± 0,10	0,043 ± 0,012	354 ± 129	6,0 ± 3,2	2033 ± 429
	28 Mobocertinib	0,025 ± 0,006	0,011 ± 0,001	25 ± 11	1,1 ± 0,3	2711 ± 776
	71a 	34 ± 13	5,4 ± 0,3	125 ± 51	3634 ± 1435	2059 ± 1129
	71b 	23 ± 8	3,4 ± 1,2	73 ± 18	3341 ± 995	3754 ± 283
	71c 	5,2 ± 1,5	0,68 ± 0,10	17 ± 9	1895 ± 602	1884 ± 119
	71d 	1,0 ± 0,2	0,17 ± 0,02	1,6 ± 0,2	605 ± 325	615 ± 216

Die Betrachtung dieser ersten Struktur-Wirkungsbeziehung legt klare Trends für die Entwicklung von EGFR-C797S Inhibitoren dar. Zum einen konnte die unerwünschte Aktivität auf dem EGFR-Wildtyp durch die Entfernung des Acrylamids drastisch reduziert werden. Ein positives Selektivitätsverhältnis zwischen EGFR-Wildtyp und L858R-Aktivierungsmutante konnte für alle generierten Derivate erreicht werden. Das Selektivitätsverhältnis zur L858R-Mutante ist durch das Hinzukommen der C797S-Mutante abgefallen, liegt im Vergleich zu den Acrylamid-tragenden Inhibitoren jedoch in einem annehmbaren Bereich. Dabei ist zu beachten, dass die Michaelis-Menten-Konstante für ATP der beiden Mutanten im betrachteten biochemischen Setup stark variieren. (ATP- K_M : L858R 25 µM, L858R/C797S 75 µM) Die erhöhte ATP-Konzentration der EGFR-L858R/C797S HTRF-Messungen nimmt dabei einen Einfluss auf die gemessene Potenz der ATP-kompetitiven reversiblen Inhibitoren. Eine Beurteilung erhöhter K_i -Werte von Inhibitoren bei C797S-mutiertem EFGR wurde bereits von ZHU *et. al.* vorgenommen, wobei eine Erhöhung der K_i -Werte bei gleichzeitig erhöhtem ATP- K_M der Mutante, aufgrund einer konstanten zellulären ATP-Konzentration, keinen negativen Einfluss auf die zelluläre Aktivität haben sollte.^[96] Bei der Betrachtung der zellulären Daten konnte für die reversiblen Aminopyrimidine in der Tat eine äquipotente Effektivität zwischen den Ba/F3-EGFR-L858R und Ba/F3-L858R/C797S beobachtet werden. Somit kann die abfallende biochemische Potenz zwischen der Aktivierungs- und der L858R/C797S-Resistenzmutante zu einem gewissen Grad vernachlässigt werden.

Der zuvor beobachtbare Aktivitätsgewinn von Osimertinib zu Mobocertinib kann beim Vergleich des Inhibitors **71a** und dem Isopropylester-Derivat **71d** nochmals verstärkt beobachtet werden. Der reversibel bindende Isopropylester **71d** stellt auf der C797S-Resistenzmutante den mit Abstand potentesten Inhibitor dieser Reihe dar. Mit einem IC_{50} von 1,6 nM konnte ein großer Aktivitätssprung gegenüber Osimertinib (354 nM) erzielt werden. Dieser Inhibitor ist zusätzlich der einzige, welcher eine signifikante Aktivitätssteigerung auf der EGFR-L858R/C797S abhängigen Ba/F3-Zelllinie vorweisen konnte. Mit einem erstmals submikromolaren EC_{50} von 615 nM sticht der Inhibitor aus dieser fokussierten Inhibitor-Serie hervor und stellt einen guten Ansatzpunkt für weitere Optimierungszyklen dar.

3.2.1. Ableitung einer Struktur-Wirkungsbeziehung für die Besetzung der hydrophoben Tasche

Um den Einfluss einer Substitution in 5-Position genauer bewerten zu können, wurde eine umfangreiche Substanz-Bibliothek mit verschiedenen pharmakophoren Elementen aufgebaut:

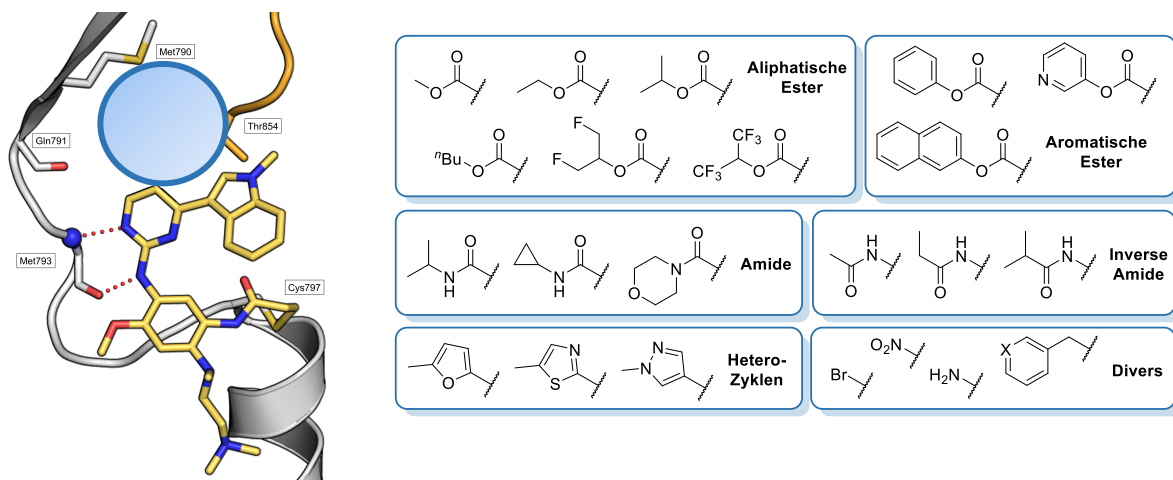
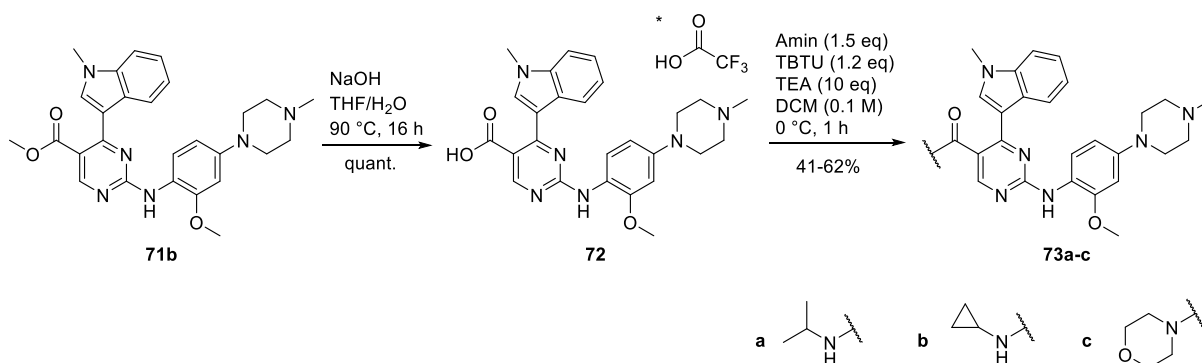


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Substanzbibliothek zur Erforschung der hydrophoben Tasche. Ko-Kristallstruktur von Mobocertinib gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-Code 7A6K) mit entferntem Isopropylester zur Darstellung des besetzbaren Raums (blauer Kreis). 5-Position-Substituenten bestehend aus aliphatischen und aromatischen Estern, Amiden, inversen Amiden, Heterozyklen und weiteren Substituenten (Bibliothek hier nicht vollständig abgebildet).

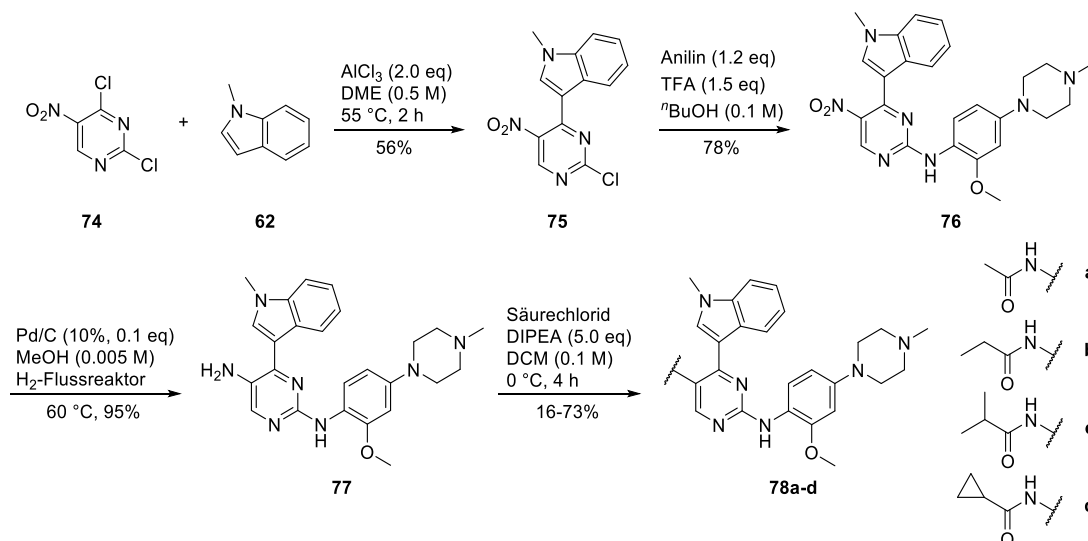
Die Größe des Esters wurde mit den aliphatischen Methyl-, Ethyl- und Isopropylestern bereits untersucht. Analog zu den Estern wurden Amide und inverse Amide synthetisiert, um zu untersuchen, ob polare Amide in der hydrophoben Tasche ebenfalls toleriert werden. Hierbei wurden zusätzlich die freie Carbonsäure, sowie die Amin- und Nitro-Vorstufen auf ihre Bindung in der hydrophoben Tasche untersucht. Für die Amid-Derivate musste der Methylester **71b** zuvor in die entsprechende Carbonsäure überführt werden. Mit verhältnismäßig harschen Hydrolyse-Bedingungen konnte der Methylester erfolgreich in die

Säure **72** überführt werden. Die Notwendigkeit von hohen Reaktionstemperaturen und eines Überschuss Hydroxid-Base zeigt die chemische Stabilität der Pyrimidin-5-carboxylate. Die freie Säure konnte anschließend mit klassischen Amidkupplungs-Bedingungen zum Isopropyl- (**73a**), Cyclopropyl- (**73b**) und Morpholin-Amid (**73c**) transformiert werden.



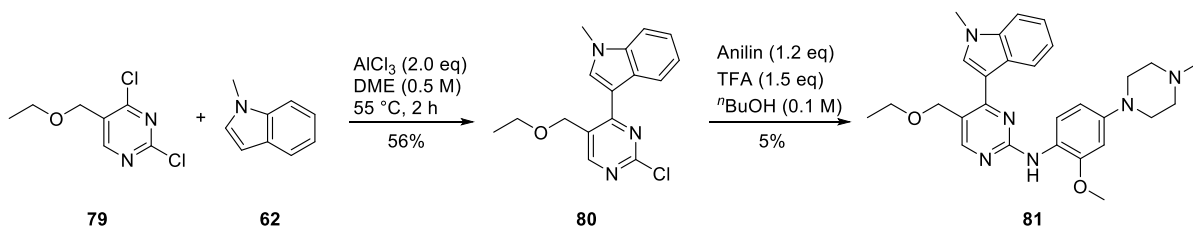
Syntheschema 9: Synthese von Aminopyrimidin-basierten Inhibitoren mit Amid-Funktionalität in 5-Position. * **72** wurde durch C₁₈-Chromatografie als Triflat erhalten.

Für die Synthese der inversen Amide wurde das 5-Nitro-2,4-dichloropyrimidin in einer analogen Synthesefolge wie die bisherigen Ester transformiert. Die erhaltene Nitroverbindung **76** wurde folglich zum Amin **77** reduziert und anschließend mit den entsprechenden Säurechloriden zu den inversen Acet-, Propion-, Isobutyryl- und Cyclobutyryl-Amiden umgesetzt.



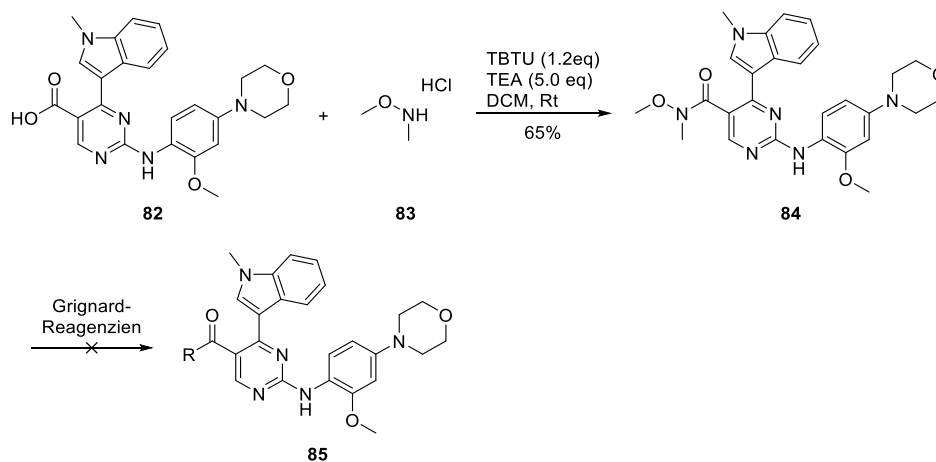
Syntheschema 10: Synthese von Aminopyrimidin-basierten Inhibitoren mit invertiertem Amid in 5-Position.

Eine strukturelle Reduzierung des Esters zum Ether sollte zudem untersucht werden. Für einen Vergleich mit dem Ethylester **71c** wurde der kommerziell verfügbare Ethylether **79** über das Intermediat **80** nach der etablierten Reaktionsfolge zum Inhibitor **81** umgesetzt.



Syntheseschema 11: Synthese des Aminopyrimidin-basierten Inhibitors **81** mit Ethylether-Gruppe in 5-Position.

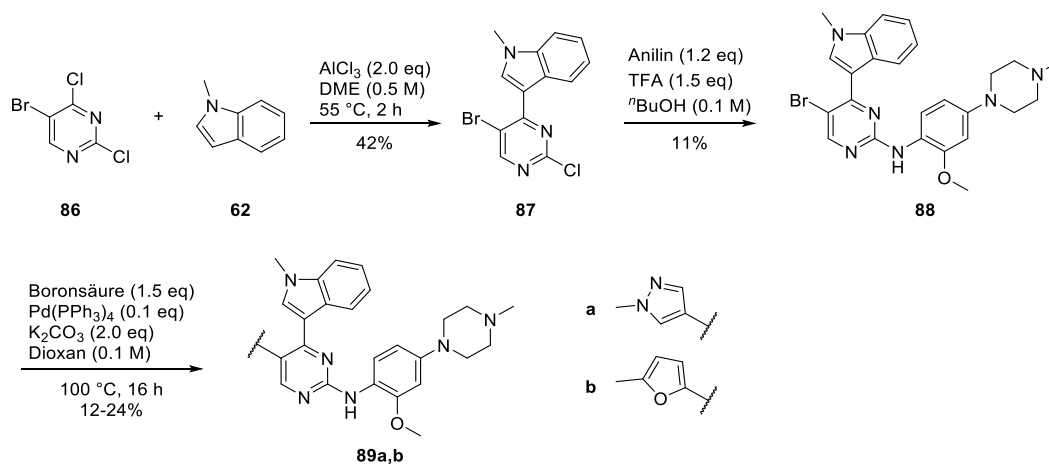
Ebenfalls sollte eine Keto-Funktion als Substituent in der hydrophoben Tasche untersucht werden. Hierfür wurde die freie Carbonsäure **82** zum Weinreb-Amid **84** umgewandelt, um in einer anschließenden Reaktion mit Alkyl-, Alkenyl- und Alkynyl-Grignard-Reagenzien umgesetzt zu werden. Hierbei konnte jedoch für eine Reihe von Grignard-Reagenzien kein Umsatz zum gewünschten Produkt beobachtet werden. Eine Testreaktion mit dem reaktiveren *n*-Butyllithium im Überschuss ergab eine unselektive Produktbildung zum disubstituierten Alkohol. Eine Optimierung der Reaktivität der eingesetzten Reagenzien und der allgemeinen Reaktionsbedingungen ist für die Generierung von Inhibitoren des Typs **85** in Zukunft notwendig.



Syntheseschema 12: Syntheseansatz zur Generierung von Aminopyrimidin-basierten Inhibitoren mit Keto-Gruppe in 5-Position.

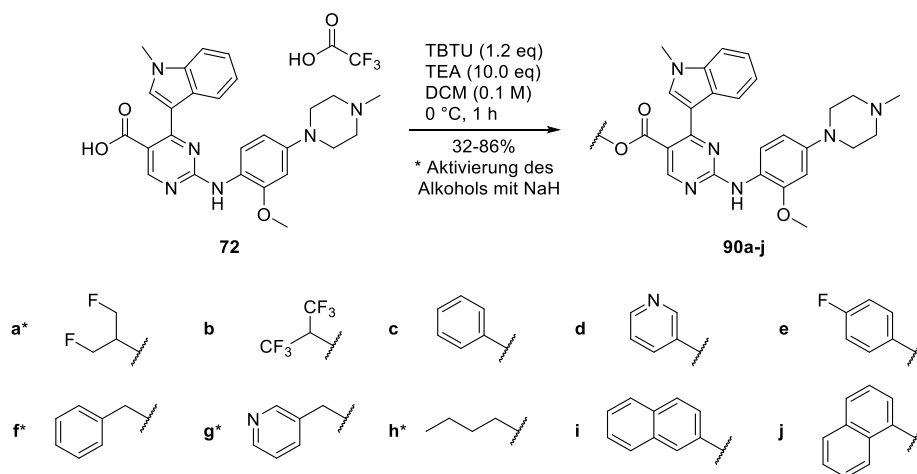
Eine weitverbreitete medizinisch-chemische Methode zur Abwandlung von Pharmakophoren, wie einer Ester-Funktion, stellt die Substitution durch Bioisostere dar.^[97] Diese sollen in einer Bindetasche analoge Wechselwirkungen eingehen können, jedoch abgewandelte chemische oder pharmakokinetische Parameter verfügen. Bei der Untersuchung der hydrophoben Tasche soll der Isopropylester durch kleine Heterozyklen ersetzt werden, welche keine Labilität bezüglich einer Hydrolyse vorweisen sollten. Die Synthese dieser Bioisostere erfolgt ausgehend vom 5-Bromo-2,4-dichloropyrimidin **86**. Die Einführung der Heterozyklen erfolgt, abhängig von der kommerziellen Verfügbarkeit der Organometall-

Verbindungen, in einer finalen Suzuki-Reaktion oder Stille-Kupplung. Die Suzuki-Reaktionen ergaben die Verbindungen **89a** und **89b** in geringen Ausbeuten von 24% bzw. 12%. Bei der Stille-Kupplung mit Tributylstannanen konnte kein Umsatz zu den gewünschten Produkten beobachtet werden. Die geringen Ausbeuten der Suzuki-Reaktion und die ausbleibende Stille-Kupplung legen die Notwendigkeit einer Optimierung der Reaktionsbedingungen nahe.



Syntheschema 13: Generierung von Aminopyrimidin-basierten Inhibitoren mit Heterozyklen in 5-Position.

Neben den kleinen aliphatischen Estern sollten zusätzlich fluorierte aliphatische und größere aromatische Ester untersucht werden. Hierfür wurde erneut die freie Säure **72** mit verschiedenen Alkoholen umgesetzt. Entscheidend für den Erfolg einer Ester-Kupplung war hierbei die Azidität der verwendeten Alkohole. Das Hexafluorisopropanol, (pK_A - 9.4; berechnet mithilfe von Chemdraw 19.0) reagierte beispielsweise unter milden Bedingungen in Anwesenheit von TEA, wohingegen das nur zweifach fluorierte 1,3-Difluoropropanol (pK_A - 12.9) mit Natriumhydrid deprotoniert werden musste, um eine ausreichende Reaktivität zu erreichen. Analog konnten die Phenole, Naphthole und Fluorphenole ($pK_A < 10$) mit TEA umgesetzt werden, wohingegen die benzylichen Alkohole ebenfalls mit Natriumhydrid deprotoniert wurden, um einen vollständigen Umsatz zu erzielen.



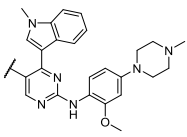















Syntheseschema 14: Synthese von Aminopyrimidin-basierten Inhibitoren mit diversen Estern in 5-Position.

Biologische Evaluierung der Substanzbibliothek reversibler Aminopyrimidine

Der Vergleich der verschiedenen Substituenten in 5-Position ergab klare Trends für die Eignung als EGFR-C797S-Inhibitoren (Tabelle 10). Bei Betrachtung der freien Carbonsäure ist ein starker Abfall der Potenz zu den Estern erkennbar. Die zelluläre Aktivität der Ester auf einen Hydrolyse-bedingten Prodrug-Wirkungsmodus zurückzuführen erscheint somit als höchst unwahrscheinlich. Die Amid-Inhibitoren **73a-c** weisen ebenfalls einen starken Aktivitätsabfall zu den Estern auf. Die inversen Amide **78a-d** bestätigen hierbei die Annahme, dass eine polare Amid-Bindung in der hydrophoben Tasche nicht toleriert wird. Die Nitrovorstufe **76** weist aus dieser Serie die stärkste Inhibition auf. Der Vergleich des Ethylester **71c** mit dem Ethoxymethylether **81** zeigt einen über zehnfachen Aktivitätsverlust des Ethers gegenüber der EGFR-L858R/C797S-Mutante. Die anhand der Kristallstruktur von Mobocertinib ausgemachten Wechselwirkungen des Carbonyl-Sauerstoffs scheinen essenziell für die Inhibition der Resistenzmutante zu sein.

Die Einführung der Heterozyklen **89a** und **89b** als Bioisostere ergab unterschiedliche Ergebnisse. Das Methylpyrazol-Derivat **89a** zeigt eine verringerte Potenz, das Methylfuran-Derivat **89b** ist jedoch annähernd äquipotent zum Isopropylester **71d**. Allerdings erreicht der Inhibitor **89b** nicht die zelluläre Potenz des Isopropylesters (Tabelle 10).

Tabelle 10: Biochemische Evaluierung (HTRF-Assay [nM]) und zelluläre Evaluierung (CTG-Assay [µM]) der Aminopyrimidin-Substanzbibliothek mit Derivatisierung in 5-Position. Die Assays wurden durchgeführt von A. Arndt und K. Jeyakumar.

		EGFR Wildtyp	EGFR L858R	EGFR L858R/T790M	EGFR L858R/C797S	EGFR LR/TM/CS	Ba/F3 EGFR- L858R/C797S
Osimertinib 7		0,24 ± 0,10	0,043 ± 0,012	0,024 ± 0,007	354 ± 129	252 ± 169	3,0 ± 1,2
Mobocertinib 28		0,025 ± 0,006	0,011 ± 0,001	0,030 ± 0,003	25 ± 11	365 ± 139	2,7 ± 0,8
71a		34 ± 13	5,4 ± 0,3	3,8 ± 0,3	125 ± 51	37 ± 19	2,1 ± 1,1
71b		23 ± 8	3,4 ± 1,2	29 ± 17	73 ± 18	265 ± 165	3,8 ± 0,3
71c		5,2 ± 1,5	0,68 ± 0,10	15 ± 5	17 ± 9	156 ± 130	1,9 ± 0,1
71d		1,0 ± 0,2	0,17 ± 0,02	5,0 ± 2,5	1,6 ± 0,2	35 ± 24	0,61 ± 0,22
72		131 ± 15	32 ± 2	2089 ± 208	1336 ± 268	n.b.	> 30
73a		22 ± 6	3,7 ± 1,4	244 ± 78	27 ± 11	1767 ± 650	1,7 ± 0,6
73b		285 ± 100	50 ± 32	942 ± 110	317 ± 175	n.b.	7,2 ± 1,7
73c		60 ± 12	14 ± 12	1887 ± 147	103 ± 23	n.b.	3,6 ± 1,4
76		21 ± 4	3,0 ± 0,3	2,5 ± 0,6	44 ± 12	138 ± 15	4,0 ± 0,5
77		13 ± 5	2,3 ± 0,5	14 ± 3	129 ± 38	470 ± 36	3,1 ± 0,6
78a		452 ± 175	90 ± 66	2037 ± 564	744 ± 143	15834 ± 3702	5,8 ± 0,2
78b		241 ± 193	60 ± 43	8048 ± 4105	178 ± 128	n.b.	4,3 ± 0,7
78c		435 ± 226	137 ± 60	1514 ± 742	1063 ± 360	17921 ± 1956	2,1 ± 0,7
78d		82 ± 70	13 ± 6	306 ± 84	76 ± 11	n.b.	4,5 ± 2,0
81		172 ± 26	29 ± 16	180 ± 44	277 ± 31	2258 ± 800	5,6 ± 1,2

		EGFR Wildtyp	EGFR L858R	EGFR L858R/T790M	EGFR L858R/C797S	EGFR LR/TM/CS	Ba/F3 EGFR- L858R/C797S
88		34 ± 10	3,9 ± 0,6	0,39 ± 0,29	52 ± 6	n.b.	4,4 ± 0,2
89a		9,6 ± 3,4	1,1 ± 0,3	20 ± 4	21 ± 2	141 ± 50	3,5 ± 0,5
89b		0,60 ± 0,18	0,11 ± 0,01	16 ± 3	2,7 ± 0,9	128 ± 26	3,0 ± 0,4
90a		0,95 ± 0,16	0,21 ± 0,12	3,2 ± 0,3	1,2 ± 0,5	38 ± 23	0,29 ± 0,04
90b		15 ± 3	3,0 ± 1,7	3,8 ± 1,0	18 ± 5	32 ± 10	3,0 ± 0,3
90c		0,053 ± 0,015	0,023 ± 0,014	0,69 ± 0,14	0,064 ± 0,029	8,8 ± 2,3	0,10 ± 0,06
90d		6,7 ± 1,0	1,3 ± 0,5	26 ± 3	0,89 ± 0,07	29 ± 11	0,37 ± 0,03
90e		0,28 ± 0,21	0,12 ± 0,05	1,3 ± 1,2	0,15 ± 0,06	6,2 ± 2,3	0,22 ± 0,04
90f		3,2 ± 1,0	0,22 ± 0,06	11 ± 2	2,8 ± 0,5	159 ± 23	1,5 ± 0,6
90g		57 ± 13	4,3 ± 0,2	65 ± 14	57 ± 13	1152 ± 315	1,8 ± 1,0
90h		11 ± 3	2,2 ± 1,7	35 ± 3	11 ± 4	322 ± 178	2,3 ± 0,2
90i		60 ± 24	8,9 ± 0,9	45 ± 11	98 ± 9	111 ± 47	2,4 ± 0,8
90j		19 ± 15	1,0 ± 0,5	89 ± 9	12 ± 2	930 ± 415	2,8 ± 0,01

Der difluorierte Isopropylester **90a** ist das erste Derivat, welches die Aktivität des Isopropylester sowohl biochemisch als auch zellulär übertreffen konnte. Das Hexafluorpropanol-Derivat **90b** hingegen zeigt eine geringe biochemische Potenz und eine moderate zelluläre Aktivität.

Neben den aliphatischen Estern wurde eine Serie aromatischer Ester synthetisiert. Hierbei sticht das Phenol-Derivat **90c** heraus. Mit einem IC₅₀ von 0,064 nM und einer zellulären Potenz von 0,10 µM gegenüber der L858R/C797S-Resistenzmutante stellt es den ersten subnanomolaren Inhibitor im biochemischen Assay dar. Eine Besetzung der hydrophoben Tasche mit Aromaten ist bereits mit einer großen Zahl an Inhibitoren beschrieben worden. Für viele Inhibitoren ist eine *Sandwich*-Konformation des Aromaten zwischen dem katalytischen Lys745 und der T790M-Gatekeeper-Mutation zu erkennen.^[98] Diese würde auch eine Erklärung für die erhöhte Potenz gegenüber der T790M-Resistenzmutation mit einem IC₅₀ von 0,69 nM geben. Zur genauen Klärung des Bindungsmodus des zum Isopropylester stark abweichenden *Backpocket*-Elements sind jedoch weiterführende strukturelle Untersuchungen notwendig. Die weiteren aromatischen Ester **90d** und **90e** stellen ebenfalls hochpotente Verbindungen dar, erreichen jedoch nicht die Potenz des Phenol-Derivats **90c**. Die benzylischen Ester **90f** und **90g** fallen im Vergleich zu ihren Phenyl-Analoga ab.

Die aromatischen Bicyklischen-Ester sollten die Grenzen zur Ausfüllung der hydrophoben Tasche bezüglich ihrer Größe austesten. Hierbei wiesen die Naphthyl-Derivate **90i** und **90j** auch lediglich moderate IC₅₀-Werte für die L858R/C797S-Mutante auf. Auffällig bei den beiden Derivaten ist jedoch der Aktivitäts-Umschwung mit Hinzukommen der T790M-Türsteher-Mutation. Das 1-Naphthyl-Derivat **90j** ist besser in einer hydrophoben Tasche mit Thr790-Türsteher toleriert, wohingegen das 2-Naphthyl-Derivat **90i** eine hydrophobe Tasche mit Met790-Türsteher bevorzugt.

Neben den in Tabelle 10 aufgeführten *Backpocket*-Elementen sollten Derivate untersucht werden, welche die Möglichkeit zur irreversiblen Bindung besitzen. Hierfür wurden analog zum Inhibitor **90c** zwei Fluor-Nitrophenol-Derivate **91** und **92** synthetisiert. Aufgrund des nach dem HSAB-Konzept eher harten Elektrophilie-Charakters der S_NAr-typisierten Fluor-Substitution wäre eine Bindung an das katalytische Lys745 möglich.^[99]

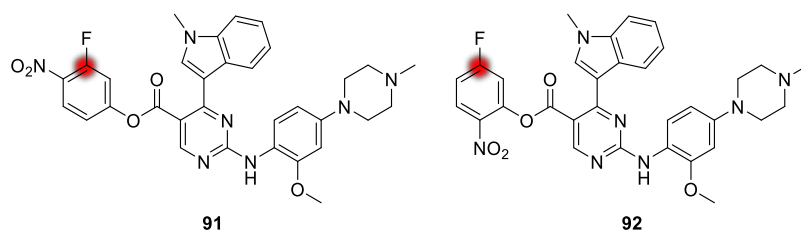

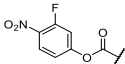



Abbildung 29: Inhibitoren mit elektrophilen *ortho*- und *para*-Fluornitrophenolen zur Adressierung des katalytischen Lysins. Angriffspunkt für nukleophile Substitution in Rot hervorgehoben.

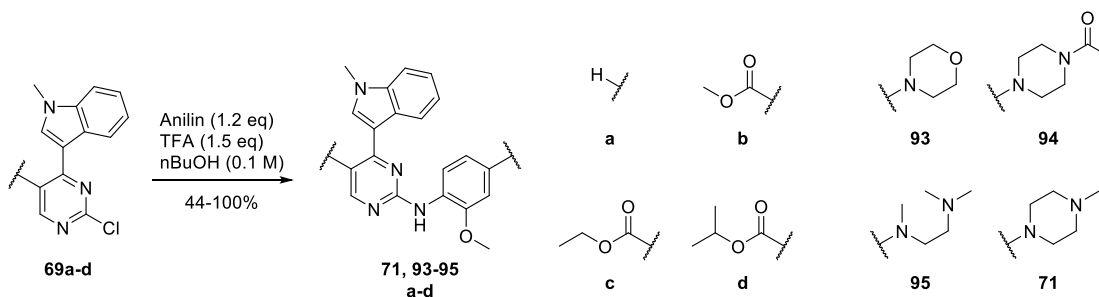
Tabelle 11: Biochemische und zelluläre Evaluierung der Fluornitrophenyl-Derivate gegenüber verschiedenen EGFR-Varianten. Die Assays wurden durchgeführt von A. Arndt und K. Jeyakumar.

HTRF / CTG [nM]	EGFR Wildtyp	EGFR L858R	EGFR L858R/C797S	Ba/F3-EGFR L858R	Ba/F3-EGFR L858R/C797S
90c 	0,053 ± 0,015	0,023 ± 0,014	0,064 ± 0,029	81 ± 21	97 ± 54
91 	16 ± 4	4,8 ± 1,3	62 ± 6	4063 ± 1042	2386 ± 1494
92 	16 ± 8	0,91 ± 0,32	10 ± 1	5976 ± 2269	3292 ± 1346

Der Vergleich der Elektrophile mit der Referenz **90c** zeigt einen drastischen Abfall in biochemischer und zellulärer Potenz. Die massenspektrometrische Untersuchung einer kovalenten Modifikation von C797S-mutiertem EGFR steht aus, jedoch führt ein potentiell kovalenter Wirkmechanismus dieser Inhibitoren nicht zu einer zellulären Aktivitätssteigerung.

3.2.2. Optimierung der zellulären Aktivität der reversiblen Aminopyrimidine

Nachdem die Substitution des Esters in 5-Position der 2-Aminopyrimidine eine klare Struktur-Wirkungsbeziehung im biochemischen Kontext hervorbrachte, sollten die potenten Inhibitoren hinsichtlich ihrer zellulären Aktivität optimiert werden. Dafür wurde von den unsubstituierten sowie den Methyl-, Ethyl und Isopropylesterderivaten eine Substanzbibliothek synthetisiert, welche sich in der *Frontpocket*-Derivatisierung unterscheiden. Analog zu den Boronsäure-Inhibitoren (vgl. Kapitel 3.1.1.) wurden verschiedene Löslichkeitsgruppen mit unterschiedlicher Größe und Basizität verwendet. Diese sind allesamt abgeleitet von den bereits etablierten Aminopyrimidin-basierten EGFR-Inhibitoren WZ4002, Osimertinib, Lazertinib und Rociletinib.

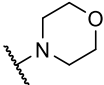
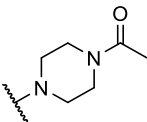
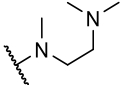
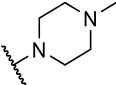


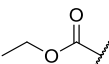
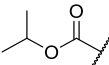


Syntheschema 15: Synthese von Aminopyrimidin-basierten Inhibitoren mit variierenden Löslichkeitsgruppen.

Die Synthese der Substanzbibliothek erfolgte wie bereits bei der Synthese der ersten SAR (vgl. Syntheschema 8) durch Friedel-Crafts-artige Substitution in 4-Position und anschließende nukleophile aromatische Substitution in 2-Position. Die Ausbeuten für die S_NAr -Reaktionen lagen zwischen 44-100% und es konnte zeiteffizient eine Substanzbibliothek von 14 Inhibitoren erzeugt werden.

Der bereits bekannte Trend der Aktivitätssteigerung gegenüber EGFR-L858R/C797S durch Vergrößerung des Esters zog sich durch diese Substanzbibliothek. Zusätzlich konnte auf biochemischer Ebene ein klarer Trend bezüglich der Wahl der Löslichkeitsgruppe beobachtet werden (Tabelle 12).

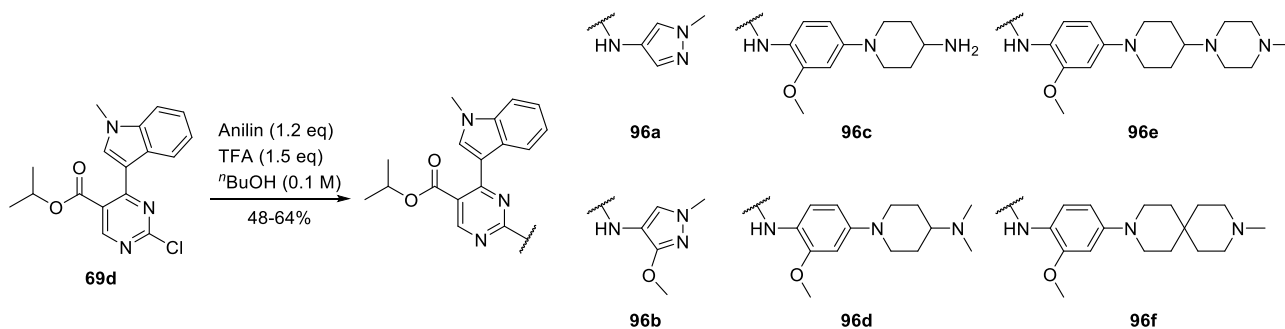
Tabelle 12: Biochemische und zelluläre Evaluierung [nM] der Inhibitoren mit variierender Löslichkeitsgruppe gegenüber EGFR-L858R/C797S. n.s. nicht synthetisiert; * Aufgrund schlechter Löslichkeit nur mit geringfügig konzentrierter Stammlösung gearbeitet. Die Assays wurden durchgeführt von K. Jayakumar.

				
HTRF-EGFR-L858R/C797S				
CTG-Ba/F3-L858R/C797S				
	431 ± 102 13429 ± 1575	383 ± 80 > 3000 *	322 ± 79 3257 ± 214	125 ± 51 2059 ± 1129
	264 ± 109 7817 ± 696	151 ± 42 6159 ± 705	n.s.	73 ± 18 3754 ± 283
	40 ± 12 4838 ± 1219	28 ± 11 2795 ± 544	n.s.	17 ± 9 1884 ± 119
	8,2 ± 1,3 2441 ± 471	4,8 ± 0,5 1014 ± 230	3,8 ± 0,5 2184 ± 664	1,6 ± 0,2 615 ± 216

Die Morpholin-Löslichkeitsgruppe zeigt durchweg die geringsten Aktivitäten, gefolgt von der Acetylpiperazin- und der Trimethylethylendiamin-Gruppe. Innerhalb dieser Substanzbibliothek weist die Methylpiperazin-Löslichkeitsgruppe die besten biochemischen Aktivitäten gegenüber EGFR-L858R/C797S vor. Die Untersuchung der Inhibitoren auf den EGFR-L858R und EGFR-L858R/C797S abhängigen Ba/F3-Zelllinien spiegelt die biochemischen Daten wider. Ausnahme bildet hierbei das Trimethylethylendiamin-Derivat, welches im zellulären Kontext gegenüber dem Acetylpiperazin-Derivat eine geringere Potenz vorweist.

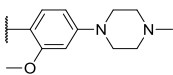


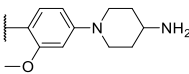
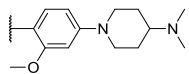
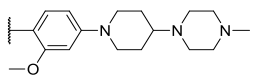
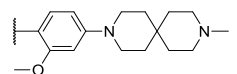
Der signifikante Unterschied zwischen den verschiedenen Isopropylestern zeigt das Potential einer Variation in der Lösungsmittel-exponierten Region. Diese Variation sollte auf weitere Löslichkeitsgruppen ausgeweitet werden. Hierfür wurden die Front-Pocket-Substituenten der EGFR-Inhibitoren Mavelertinib und PF-06459988, sowie der ALK-

Inhibitoren Brigatinib und AZD3463 eingebracht. Zusätzlich wurde der Isopropylester mit der methylierten Variante der AZD3463-Löslichkeitsgruppe **96d** und der Spiroverbindung **96f** generiert.



Syntheseschema 16: Generierung einer Serie von Isopropylestern mit Löslichkeitsgruppen aus bekannten ALK- und EGFR-Inhibitoren.

Tabelle 13: Biochemische und zelluläre Evaluierung der Isopropylester-Derivate mit variierender Löslichkeitsgruppe. Die Assays wurden durchgeführt von K. Jeyakumar.

	HTRF / CTG [nM]	EGFR L858R/C797S	Ba/F3-EGFR L858R	Ba/F3-EGFR L858R/C797S
7	Osimertinib	354 ± 129	6,0 ± 3	2033 ± 429
28	Mobocertinib	25 ± 11	1,0 ± 0,4	2711 ± 776
71d		1,6 ± 0,2	605 ± 325	615 ± 216
96a		12 ± 1	1957 ± 234	1592 ± 301
96b		23 ± 5	2249 ± 440	2073 ± 468
96c		0.56 ± 0.15	412 ± 89	354 ± 119
96d		0.42 ± 0.21	175 ± 28	202 ± 70
96e		0.51 ± 0.14	183 ± 69	246 ± 53
96f		0.94 ± 0.27	428 ± 36	398 ± 137

Die Methylpyrazol-Derivate **96a** und **96b**, mit den Löslichkeitsgruppen von PF-06459988 und Mavelertinib, brachten sowohl biochemisch als auch zellulär keinerlei Verbesserung gegenüber dem Methylpiperazin-Derivat **71d**. Eine Verringerung der biochemischen Potenz konnte bereits bei der Entwicklung der Drittgenerations-Inhibitoren beobachtet werden. Diese wurde jedoch durch ein verbessertes pharmakokinetisches Profil ausgeglichen.^[100-101] Die größeren, basischen Substituenten hingegen brachten die biochemische Potenz gegenüber der EGFR-L858R/C797S-Mutante erstmals auf ein subnanomolares Niveau. Dies spiegelte sich auch in der zellulären Aktivität wider. Die vier Derivate konnten das Methylpiperazin-Derivat **71d** allesamt übertreffen. Der Inhibitor **96d** stellt mit einem EC₅₀ von 0,20 µM gegenüber der EGFR-L858R/C797S abhängigen Ba/F3-Zelllinie den bislang potentesten Isopropylester dar.

Die Gewinnung einer Ko-Kristallstruktur des Inhibitors **96c** in EGFR-T790M/V948R gab die Möglichkeit die bisherigen Inhibitoren durch die Modellierung verschiedener Derivate weiter zu optimieren (Kristallisation von Dr. J. Niggenaber). Eine der in *LigandScout* untersuchten Derivatisierungen war die Einbringung des freien Indols im Gegensatz zu den bisher untersuchten Methylindolen. Durch die Abänderung der Struktur von **96c** zu seinem demethylierten Pendant und anschließender Energieminimierung offenbarte sich eine weitere zusätzliche Wechselwirkung (Abbildung 31). Das Proton des freien Indols kann eine zusätzliche Wasserstoffbrücke mit der Asp855-Seitenkette des DFG-Motifs ausbilden. Zusätzlich konnte eine ionische Wechselwirkung des, unter physiologischen Bedingungen, positiv geladenen Aminopiperidins mit der Asp800-Seitenkette beobachtet werden. Diese bietet eine mögliche Erklärung für die erhöhte Potenz der basischeren Löslichkeitsgruppen. Das freie Indol ist bereits durch den Osimertinib-Metabolit AZ5104^[102] und den ALK-Inhibitor AZD3463^[103] bekannt. Der demethylierte Matabolit besitzt im Vergleich zu Osimertinib eine geringfügig höhere Potenz gegenüber der L858R/C797S-Mutante und der ALK-Inhibitor weist eine Potenz im niedrigen nanomolaren Bereich vor.

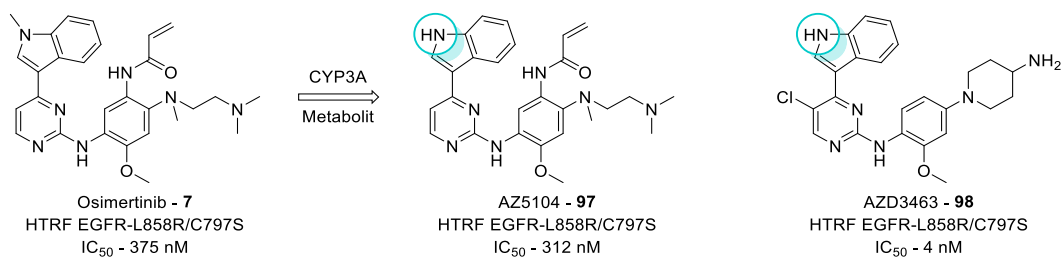


Abbildung 30: Strukturen von Osimertinib, seines Hauptmetabolits AZ5104 und des ALK-Inhibitors AZD3463.

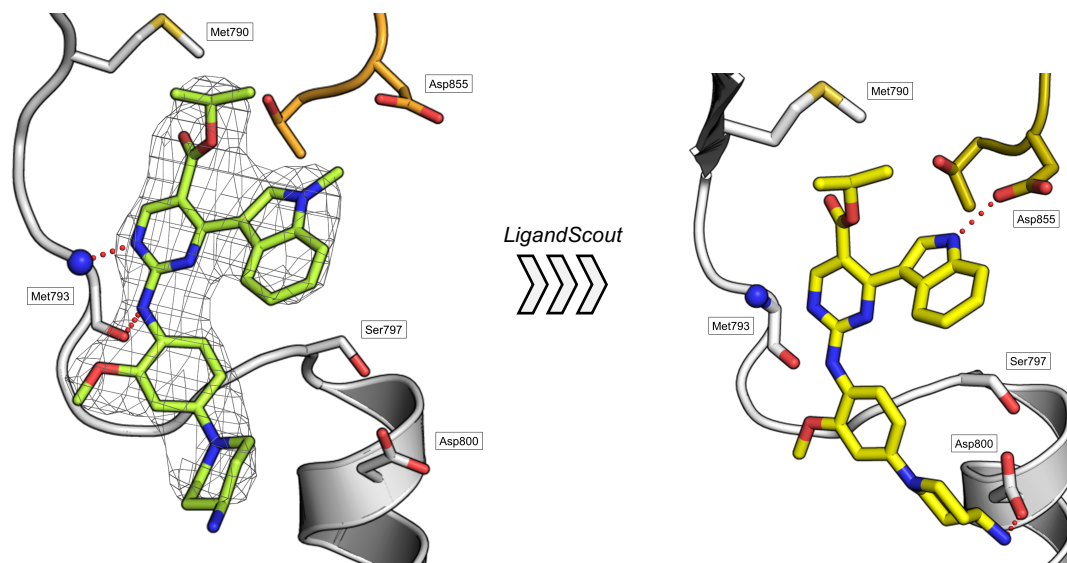
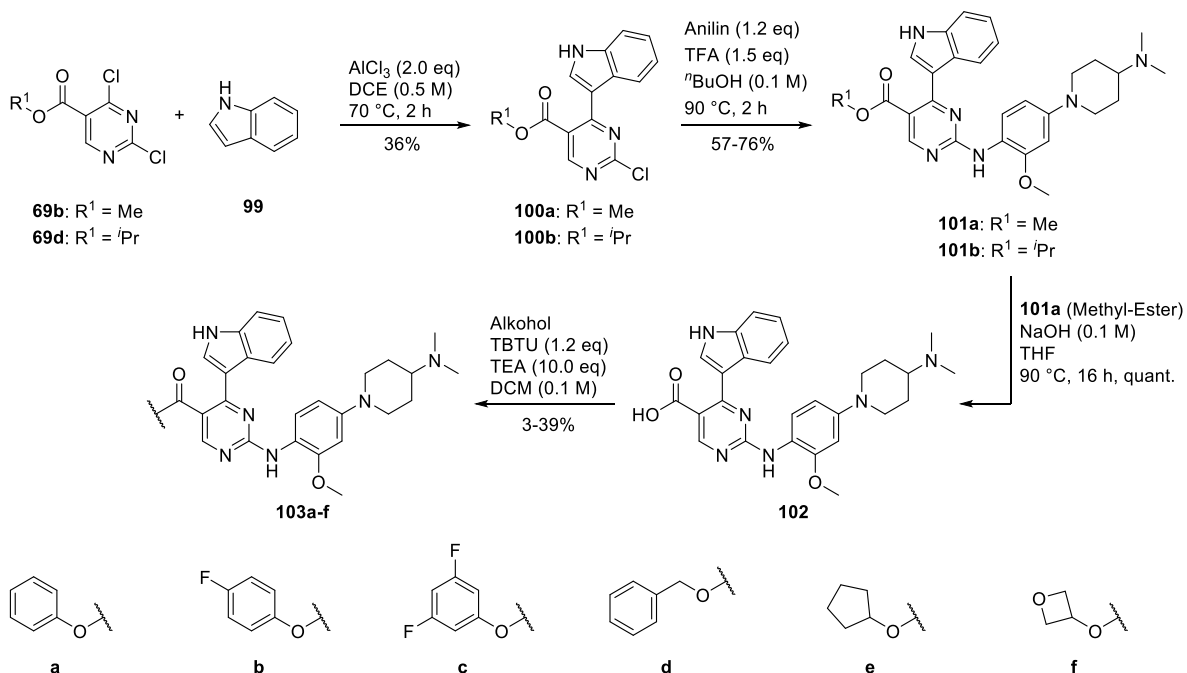


Abbildung 31 – Links: Ko-Kristallstruktur des Inhibitors 96c in EGFR-T790M/C797S. Wasserstoffbrückenbindungen mit Met793 in der Scharnier-Region rot gepunktet. Rechts: Modellierung des freien Indols ausgehend von der Ko-Kristallstruktur von 96c in EGFR-T790M/C797S. Modifizierung von 96c und anschließende MMFF94-Energieminimierung durchgeführt in *LigandScout*. Wasserstoffbrückenbindung des Indol-Protons mit der Asp855-Seitenkette rot gepunktet.

Um den potenziellen Einfluss der Indol-Substitution zu untersuchen, wurden weitere Derivate nach bekannter Reaktionsabfolge synthetisiert. Die Friedel-Crafts-Reaktion wurde beim freien Indol jedoch in Dichlorethan und bei höheren Temperaturen durchgeführt, um die Reaktivität zu steigern. Die Wahl der Löslichkeitsgruppe fiel aufgrund der stärksten zellulären Aktivität gegenüber der Ba/F3-EGFR-L858R/C797S Zelllinie auf das *N,N*-Dimethyl-4-aminopiperidin-Derivat. Zusätzlich zum Isopropylester sollte das potenteste *Backpocket*-Element aus **90c** eingebracht werden. Hierzu wurde wieder vom Methylester **100a** ausgegangen, welcher nach der Einbringung der Löslichkeitsgruppe zur freien Säure **102** hydrolysiert wurde. In einer finalen Ester-Kupplung mit Phenol und weiteren Alkoholen wurden die Indol-Derivate **103a-f** hergestellt. Die eingesetzten fluorinierten Aromaten sind bereits bekannte *Backpocket*-Elemente aus literatur- und patentbeschriebenen EGFR-Inhibitoren.^{[104],[WO2020190119]}



Syntheschema 17: Synthese der freien Indol-Derivate.

Neben der Synthese der freien Indole war es naheliegend die reaktive Indol-Funktionalität zusätzlich zu acetylieren. Das Acetylindol könnte, analog zu den beschriebenen ALK-EGFR-Dual-Inhibitoren (vgl. Kapitel 1.4.1.) eine Wechselwirkung zum katalytischen Lys745 ausbilden (Abbildung 32).

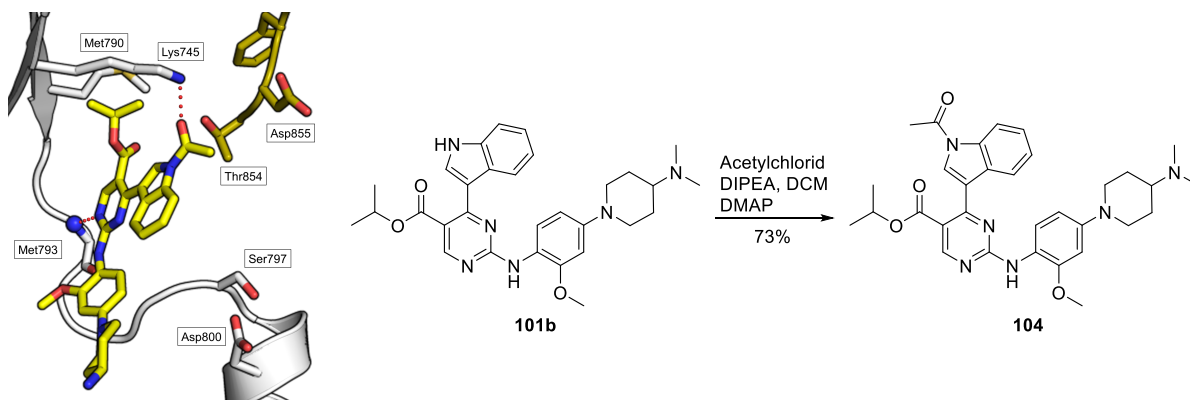



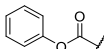
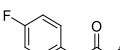
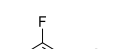
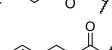




Abbildung 32 – A: Modellierung des Acetyl-Indols 104 ausgehend von der Ko-Kristallstruktur von 96c in EGFR-T790M/C797S. Modifizierung von 96c und anschließende MMFF94-Energieminimierung durchgeführt in *LigandScout*. Wasserstoffbrückenbindung mit Met793 und Acetyl-Wechselwirkung mit Lys745 rot gepunktet; B: Darstellung des Acetyl-Indols 104 aus dem freien Indol 101b.

Die Betrachtung der biochemischen und zellulären Daten (Tabelle 14) zeigt den positiven Einfluss des freien Indols. Weiterhin ist erneut der positive Trend eines sterisch anspruchsvolleren *Backpocket*-Elements vom Methyl- über den Isopropyl- zum Phenylester deutlich zu erkennen. Sowohl für die Methylindol-Derivate (**71b**, **71d** und **90c**) als auch für die optimierten Indol-Derivate (**101a**, **101b** und **103a**) steigt die Potenz gegenüber

EGFR-L858R/C797S drastisch. Das acetylierte Derivat **104** zeigt ebenfalls eine hohe Potenz. Der Vergleich mit dem Methyldol **96d** und dem freien Indol **101b** zeigt jedoch, dass es biochemisch und zellulär die geringste Aktivität der drei Verbindungen vorweist.

Tabelle 14: Biochemische (HTRF-Assay [nM]) und zelluläre (CTG-Assay [nM]) Evaluierung der freien Indol-Derivate. n.b. nicht bestimmt. Die Assays wurden durchgeführt von A. Arndt und K. Jeyakumar.

		EGFR Wildtyp	EGFR L858R	EGFR L858R/T790M	EGFR L858R/C797S	EGFR LR/TM/CS	Ba/F3 EGFR- L858R/C797S
2	Erlotinib	0,031 ± 0,014	< 0,010	17 ± 5	0,059 ± 0,023	228*	16 ± 4
7	Osimertinib	0,24 ± 0,10	0,043 ± 0,012	0,024 ± 0,007	354 ± 129	252 ± 169	2033 ± 429
28	Mobocertinib	0,025 ± 0,006	0,011 ± 0,001	0,030 ± 0,003	25 ± 11	365 ± 139	2389 ± 941
23	Brigatinib	5,6 ± 0,9	1,4 ± 0,6	0,26 ± 0,05	11 ± 6	1,3 ± 0,6	295 ± 2
98	AZD3463	1,5 ± 0,2	0,33 ± 0,09	0,085 ± 0,011	4,0 ± 1,3	1,3 ± 0,9	1262 ± 72
90c	RL3175	0,053 ± 0,015	0,023 ± 0,014	0,69 ± 0,14	0,064 ± 0,029	8,8 ± 2,3	94 ± 54
96d	RL3226	0,40 ± 0,09	0,13 ± 0,10	0,97 ± 0,28	0,42 ± 0,21	19 ± 6	202 ± 70
104		15 ± 3	0,36 ± 0,20	5,2 ± 0,6	3,0 ± 1,1	78 ± 10	220 ± 29
101a		3,7 ± 0,4	0,48 ± 0,21	3,4 ± 1,0	9,3 ± 0,5	81 ± 28	520 ± 76
101b		0,16 ± 0,04	0,097 ± 0,055	0,54 ± 0,15	0,32 ± 0,13	15 ± 6	111 ± 32
103a		0,008 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,033 ± 0,002	0,020 ± 0,005	0,64 ± 0,20	8 ± 2
103b		0,016 ± 0,002	0,011 ± 0,004	0,036 ± 0,005	0,044 ± 0,012	n.b.	11 ± 4
103c		0,097 ± 0,018	0,027 ± 0,003	0,60 ± 0,19	0,30 ± 0,03	n.b.	186 ± 148
103d		3,3 ± 0,9	0,60 ± 0,04	12 ± 2	5,7 ± 0,7	171 ± 37	2319 ± 298
103e		0,84 ± 0,13	0,17 ± 0,02	7,4 ± 2,1	2,1 ± 0,4	89 ± 7	617 ± 379
103f		3,8 ± 0,4	0,64 ± 0,03	12 ± 2	9,8 ± 1,0	187 ± 97	607 ± 103

Die zelluläre Untersuchung ergab eine ebenfalls gesteigerte Aktivität der freien Indole auf den Ba/F3-EGFR-L858R und Ba/F3-EGFR-L858R/C797S Zelllinien. Die Aktivität des Isopropylesters konnte mit dem freien Indol-Derivat **101b** auf 111 nM verbessert werden.

Die Aktivität des bislang aktivsten Inhibitors, dem Phenylester **90c**, wurde mit dem Inhibitor **103a** auf 8 nM gesteigert. Der optimierte Phenylester **103a** überwindet zusätzlich Löslichkeitsprobleme, welche bei der Lagerung des Phenylesters **90c**, in Form von Präzipitation der Stammlösung (10 mM DMSO), beobachtet werden konnten. Mit der Verbindung **103a** konnte ein zellulär aktiver Inhibitor, welcher sich auf dem Niveau der zugelassenen Erstgenerations-Inhibitoren wie Erlotinib und Gefitinib befindet, identifiziert werden. Die bisher moderate Inhibition der EGFR-L858R/T790M und -L858R/T790M/C797S Resistenzmutationen durch die Ester-Derivate wurde mit den optimierten Indol-Derivaten nochmals betrachtet. **103a** ist der erste Inhibitor, welcher mit einer Aktivität von 0,64 nM eine subnanomolare Potenz gegenüber der L8585R/T790M/C797S-Tripelmutante vorweisen kann und hierbei auch die ALK-Inhibitoren Brigatinib und AZD3463 übertrifft. Im Vergleich zum Phenol-Derivat **103a** fällt das *p*-Fluorphenol-Derivat **103b** geringfügig ab, ist mit einer zellulären Aktivität von 11 nM jedoch immer noch aktiver als der Erstgenerations-Inhibitor Erlotinib. Das Difluorderivat **103 c** ist mit subnanomolaren Aktivitäten gegenüber den EGFR-Mutationen immer noch ein sehr potenter Inhibitor, zeigt jedoch eine geringere zelluläre Aktivität als die Phenol- und Monofluorphenol-Derivate. Das Benzyl-Derivat **103d** fällt, wie schon bei der Methylindol-Serie stark ab, wodurch flexiblere *Backpocket*-Elemente eher vernachlässigt werden können. Die Cyclopentyl- und Oxetan-Derivate **103e** und **103f** stellen beim Vergleich zum Isopropylester **101b** und Phenol-Ester **103a** keine relevanten *Backpocket*-Elemente dar.

Für den potentesten reversiblen Aminopyrimidin-Inhibitor **103a** konnte zusätzlich eine Ko-Kristallstruktur im Komplex mit EGFR-T790M/V948R gelöst werden (Kristallisation von Dr. J. Niggenaber). Der Erfolg der gezielten Optimierung der Aminopyrimidin-Inhibitoren spiegelt sich neben den biochemischen und zellulären Daten von **103a** auch in dessen Ko-Kristallstruktur wider. Die Optimierung der Löslichkeitsgruppe zu weiter in die *Frontpocket* ragenden und stark basischen Substituenten erlaubt eine ionische Wechselwirkung des Dimethylaminopiperidins mit Asp800 am Eingang der ATP-Bindetasche. Der Austausch des Methylindols zum freien Indol erlaubt, wie in *LigandScout* vorhergesagt, eine neue Wasserstoffbrückenbindung des Indol-Protons mit Asp855 des DFG-Motifs. Die für die Aktivität entscheidende Einführung des Phenylesters bewirkt eine Stapelung des Aromaten mit den Seitenketten des Met790-Türstehers und des katalytischen Lys745. Eine solche

Wechselwirkung konnte bereits bei verschiedenen EGFR-T790M adressierenden Inhibitoren beobachtet werden.^[98] Durch die Gewinnung der Ko-Kristallstruktur konnte die erfolgreiche Variation an verschiedenen Stellschrauben des Aminopyrimidin-Grundgerüst visualisiert werden (Abbildung 33).

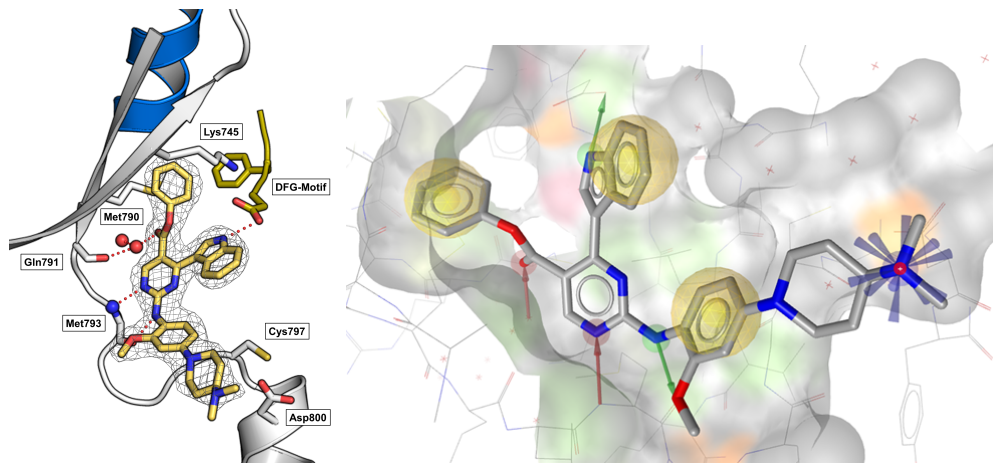


Abbildung 33: Links: Ko-Kristallstruktur des Inhibitor 103a in EGFR-T790M/V948R (Kristallisation von Dr. J. Niggenaber). Rechts: Darstellung der Wechselwirkungen des Inhibitors 103a aus *LigandScout*. Wasserstoffbrückenbindungen als Pfeile, hydrophobe Wechselwirkungen als Kugeln und ionische Wechselwirkungen in Blau hervorgehoben.

3.2.3. Reversible 2-Aminopyrimidine als EGFR-Exon20ins-Inhibitoren

Die Untersuchung der hydrophoben Tasche mittels Variation der 5-Position der 2-Aminopyrimidine beruhte auf der beobachteten Aktivitätssteigerung Mobocertinibs gegenüber Osimertinib auf der EGFR-L858R/C797S-Resistenzmutation. Da Mobocertinib jedoch ursprünglich für die EGFR-Exon20ins-Aktivierungsmutanten entwickelt wurde, lag es nah, die im Rahmen dieser Arbeit generierten Inhibitoren ebenfalls auf dieser Mutante zu untersuchen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Biochemische Evaluierung der reversiblen Aminopyrimidine gegenüber dem EGFR-Wildtyp und den L858R- und D770_N771insNPG-Mutanten. HTRF-Assay wurde durchgeführt von A. Arndt und T. Grabe.

HTRF [nM]	EGFR Wildtyp	EGFR L858R	EGFR D770_N771insNPG	Verhältnis WT : Exon20insNPG
Erlotinib - 2	0,031 ± 0,014	< 0,010	5,56 ± 2,50	0,007
Osimertinib - 7	0,242 ± 0,10	0,043 ± 0,012	0,581 ± 0,103	0,42
Mobocertinib - 28	0,025 ± 0,006	0,011 ± 0,001	0,074 ± 0,036	0,33
71a	34 ± 13	5,4 ± 0,3	195 ± 46	0,17
71b	23 ± 8	3,4 ± 1,2	67 ± 27	0,35
71d	1,0 ± 0,25	0,17 ± 0,02	1,3 ± 0,4	0,78
90c	0,053 ± 0,015	0,023 ± 0,014	0,66 ± 0,17	0,08
96d	0,40 ± 0,09	0,13 ± 0,10	0,43 ± 0,16	0,92
101b	0,16 ± 0,04	0,097 ± 0,055	0,43 ± 0,05	0,37
103a	0,008 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,041 ± 0,009	0,20
103b	0,016 ± 0,002	0,011 ± 0,004	0,078 ± 0,005	0,21
90a	0,95 ± 0,16	0,21 ± 0,12	0,84 ± 0,21	1,1
90d	6,7 ± 1,0	1,3 ± 0,5	4,8 ± 0,5	1,4

Auf der Exon20insNPG-Mutante konnte durch die Vergrößerung des 5-Substituenten, wie bereits auf den L858R-Mutanten, eine drastische Steigerung der Potenz erzielt werden. Ausgehend vom 5-*H*-Derivat **71a** über den Methyl- **71b** und Isopropylester **71d** bis hin zum Phenol-Ester **90c** konnte die Aktivität stetig erhöht werden. Auffällig ist hierbei, dass bis zum Isopropylester **71d** die Wildtyp-Selektivität ebenfalls gesteigert werden konnte. Diese fällt beim Phenolester **90c** jedoch drastisch ab. Das für die zelluläre Aktivität optimierte Isopropylester Derivat **96d** weist eine nochmals gesteigerte Potenz zu seinem Analogon **71d** auf, mit einem ebenfalls guten Selektivitätsprofil für die Mutante. Die Indol-Derivate weisen eine Steigerung der Potenz gegenüber ihren Methylindol-Analoga vor. Mit dem Phenol-Ester **103a** konnte der biochemisch potenteste Inhibitor mit einem IC₅₀ von 41 pM generiert werden. Allerdings weist dieser wie schon der Phenol-Ester **90c** ein suboptimales Wildtyp-

Verhältnis auf. Hier konnten Inhibitoren mit einem Hydroxypyridin- (**90d**) und Difluoropropanol-Ester (**90a**) erstmals ein positives Wildtyp:Mutanten-Verhältnis vorweisen. Eine weitere Derivatisierung der 5-Substituenten mit einem Fokus auf der Wildtyp-Selektivität wäre für zukünftige Arbeiten sinnvoll. Ob sich das gezeigte Wildtyp-Verhältnis in einer Selektivität auf zellulärer Basis widerspiegelt muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Die Untersuchung der Inhibitoren auf EGFR-Exon20ins-abhängigen Zelllinien und der Vergleich mit der Wildtyp-abhängigen A431-Zelllinie sollte ein klareres Bild über das Potential der reversiblen 2-Aminopyrimidine für die Exon20ins-Aktivierungsmutanten liefern. Diese Inhibitoren könnten neben der EGFR-Exon20ins Aktivierungsmutante für dessen C797S-Resistenzmutation^[105] eine besondere Rolle einnehmen, da die bislang klinisch untersuchten Wirkstoffe meist kovalente, Cys797-modifizierende Inhibitoren sind.

3.2.4. Zusammenfassung

Für die Optimierung der reversiblen 2-Aminopyrimidin EGFR-Inhibitoren konnten mehrere effektive Stellschrauben ausgemacht werden. Die Entfernung des kovalenten Ankerpunkts, dem Acrylamid, stellt eine gewisse Selektivität für die C797S-mutierte EGFR-Variante über den Wildtyp wieder her. Die Einführung des Isopropylesters aus Mobocertinib erhöht die biochemische Potenz welche durch die Vergrößerung zum Phenylester nochmals deutlich gesteigert werden kann. Für eine optimierte zelluläre Aktivität konnte der *Frontpocket*-Substituent variiert werden. Zuletzt brachte die Abwandlung von Methylindol-Derivaten zu den freien Indol-Derivaten einen erneuten Aktivitätssprung, welcher in der Entdeckung des Inhibitors **103a** gipfelte. Verglichen mit Osimertinib besitzt das reversible Aminopyrimidin eine über 10000-fach gesteigerte biochemische Potenz gegenüber der EGFR-L858R/C797S-Mutante. Die zelluläre Aktivität auf den EGFR-L858R/C797S Ba/F3-Zellen konnte von 2033 nM bei Osimertinib auf 8 nM von **103a** optimiert werden.

Der nächste Schritt in der Entwicklung der reversiblen Aminopyrimidin-basierten Inhibitoren liegt in der PK-Evaluierung und -Optimierung. Insbesondere die Derivatisierung vom Isopropyl- zum Phenylester könnte, trotz eines Gewinns an biochemischer und zellulärer Potenz, hinsichtlich verschiedener pharmakokinetisch relevanter Parameter, wie der Löslichkeit oder Hydrolyse-Stabilität, einen negativen Einfluss haben. Weiterhin sollte eine Kinom-Profilierung des optimierten Inhibitors **103a** eine Selektivität des Inhibitors für EGFR über das gesamte Kinom beleuchten. Das 2-Aminopyrimidin Grundgerüst ist ein im Feld der Kinase-Inhibitoren weit verbreiteter Scharnierregion-Binder.

Daher sollte untersucht werden, ob die Ausfüllung der hydrophoben Tasche eine ausreichende Selektivität für EGFR gewährleistet.

Mit dem reversiblen Inhibitor **103a** konnte ein neuer Typ von EGFR-Inhibitoren generiert werden. Die Erst- und Zweitgenerations-Inhibitoren sind Quinazolin-basierte Inhibitoren, die reversibel (Erlotinib) oder irreversibel binden (Afatinib). Das durch die kovalenten Aminopyrimidin-basierten Drittgenerations-Inhibitoren (Osimertinib) erweiterte Spektrum konnte durch die Entwicklung hochpotenter, reversibler Aminopyrimidin-Inhibitoren nochmals erweitert werden.

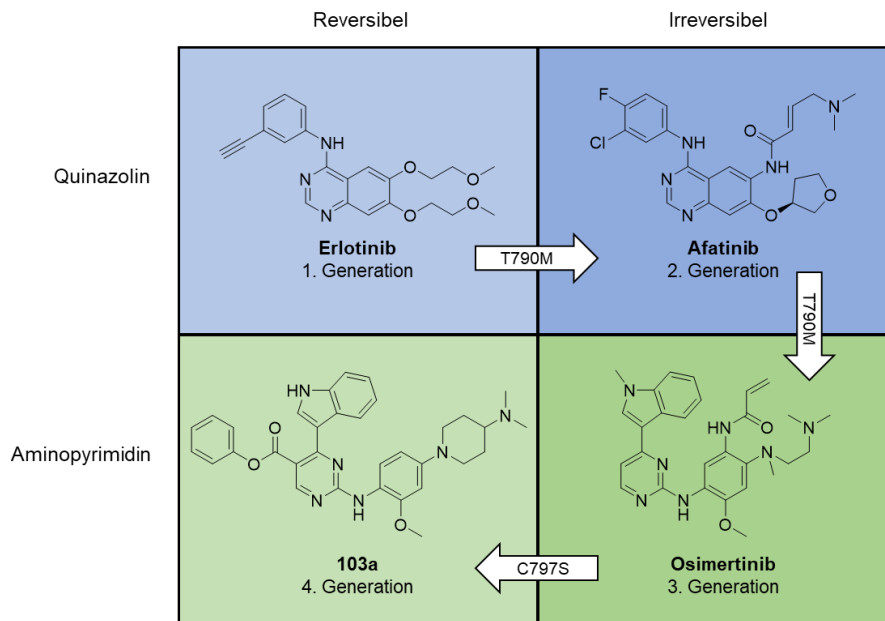


Abbildung 34: Darstellung der verschiedenen Quinazolin- und Aminopyrimidin-basierten EGFR-Inhibitor-Generationen. Resistenzmutationen, welche die Entwicklung des neuen Inhibitor-Typs bewirkte auf Pfeilen gekennzeichnet.

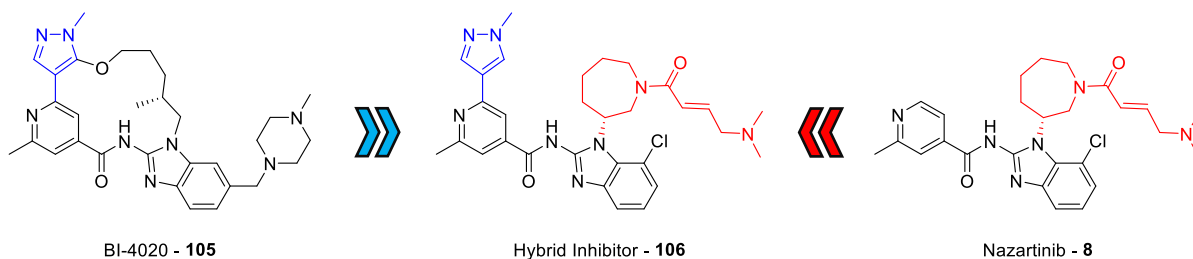


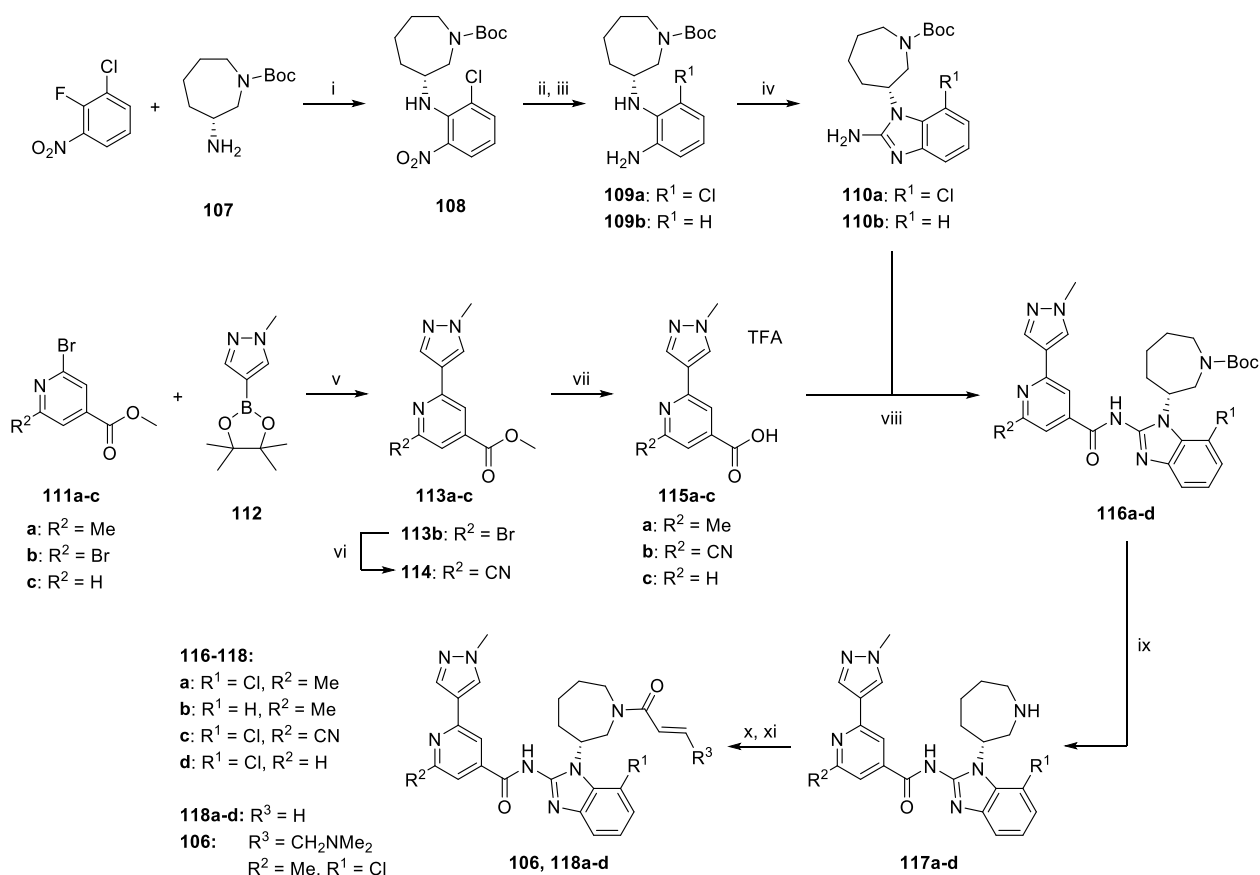
Abbildung 36: Design des Hybrid-Inhibitors 106 ausgehend von BI-4020 und Nazartinib.

Aufgrund des beschriebenen starken Einflusses des Substituenten in *ortho*-Position des Pyridins sollten das unsubstituierte, das Methyl- und das Cyano-substituierte Pyridin untersucht werden. Der Einfluss einer Variation des Nukleophils soll ebenfalls untersucht werden. Dafür wird das Dimethylamino-Acrylamid durch das unsubstituierte Acrylamid ersetzt. Zusätzlich soll der beschriebene positive Einfluss des Chlor-Substituenten am Benzimidazol^[31] mit einem unhalogenierten Derivat verglichen werden.

3.3.2. Synthese einer fokussierten *N*-Benzimidazol-2-yl-amid Substanzbibliothek

Die Synthese des irreversibel bindenden, östlichen Molekülteils geht aus vom kommerziell verfügbaren 2-Fluoro-3-Chloro-Nitrobenzol. Durch eine nukleophile, aromatische Substitution mit dem Boc-geschützten (*R*)-3-Aminoazepan wird das Intermediat **108** erhalten. Zur Derivatisierung des späteren Benzimidazols erfolgt die anschließende Reduktion der Nitrogruppe in zwei verschiedenen Varianten. Zum einen wird die Reduktion unter dehalogenierenden Bedingungen durchgeführt, um eine Abspaltung des Chlors zu erwirken. Zum Erhalt des Chlor-Atoms wurden verschiedene Reaktionsbedingungen ausgetestet, da die Reduktion mittels Palladium/Aktivkohle das chlorierte Derivat nur bei Reaktionen im kleinen Maßstab ergab und nicht reproduzierbar war. Eine Variation verschiedener Metall-Katalysator-Systeme ergab eine erfolgreiche und reproduzierbare Nitro-Reduktion mittels RuO im Wasserstoff-Flussreaktor. Der anschließende Ringschluss zum Aminobenzimidazol erfolgt durch die Substitution und Addition von Bromcyan an die *ortho*-Diaminoderivate **109a** und **109b**.

Ausgangsmaterial für die Synthese des westlichen Molekülteils stellen verschieden substituierte 2-Bromoisonicotinsäuremethylester dar. Die Einbringung des 1-Methylpyrazols mittels einer Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung und die anschließende Methylester-Hydrolyse erzeugen schließlich den westlichen Molekülteil. Ausnahme bildet das 6-Cyano substituierte Derivat. Hierbei wird eine Palladium-katalysierte Substitution des zweiten Bromids **113b** zum Nitril **114** durchgeführt.



Syntheschema 18: Generierung einer fokussierten Substanzbibliothek kovalenter Benzimidazol-Amid basierter Inhibitoren. (i) K₂CO₃, DMF, 50 °C, 95%. (ii) Ru/C, H₂-Flussreaktor, 75 °C, 100%. (iii) Pd/C, H₂-Ballon, Rt, 28%. (iv) Bromcyan, MeCN/MeOH/H₂O, 50 °C, 76-100%. (v) Pd(PPh₃)₄ oder Pd(dppf)Cl₂, K₂CO₃ oder K₃PO₄, Dioxan, 90-120 °C, 32-55%. (vi) Pd(PPh₃)₄, Zn(CN)₂, 100-120 °C, 87%. (vii) LiOH, THF/H₂O, Rt, 100%. (viii) TBTU, DIPEA, DCM, 0-20 °C, 36-100%. (ix) TFA/DCM, 0-20 °C, 85-90%. (x) Acryloylchlorid, DIPEA, DCM, 61-82% oder (xi) Dimethylamino-Crotonsäure, TBTU, DIPEA, DCM 0-20 °C, 61%.

Die freien Carbonsäuren **115a-c** können anschließend durch klassische Amid-Kupplungsbedingungen mit den 2-Aminobenzimidazolen **110a-b** zusammengefügt werden. Die folgende Boc-Entschützung liefert die sekundären Amine **117a-d**, welche zur finalen Einbringung der Elektrophile genutzt werden konnten.

Bei der NMR-Analytik der Hybrid-Inhibitoren waren zuerst unsauber wirkende Spektren zu beobachten. Trotz erneuter Aufreinigungen der Inhibitoren, konnten die per LC-MS rein wirkenden Substanzen keine entsprechende NMR-Analytik hervorbringen. Die Anzahl und Multiplizität der Multipletts stimmte nicht mit den kalkulierten Versionen überein. Eine Erklärung für dies war das Vorliegen mehrerer Spezies durch die Bildung von Tautomeren oder Rotameren. Zur Klärung wurde zuerst eine TFA-saure DMSO-d₆ Lösung verwendet, um das Tautomeren-Gleichgewicht zwischen potentiellen Aminobenzimidazol-Grenzstrukturen zu verschieben (Abbildung 37 - A). Dies brachte jedoch keine Verbesserung der Qualität der NMR-Spektren. Die Klärung der Problematik erfolgte anschließend durch die Messung bei verschiedenen Temperaturen.

Die Messung der Proben zwischen -20 °C und 25 °C in CDCl₃ zeigte eine Verstärkung der Problematik durch eine weitere Auftrennung einzelner Multipletts. Die Hochtemperaturmessungen in DMSO-d₆ bei 80 °C erbrachten zuletzt die gewünschte Anzahl an Multipletts (Abbildung 38). Die Strukturaufklärung durch temperaturabhängige Messung wurde als Indiz genommen, dass die Signalaufspaltung durch das Vorliegen verschiedener Rotamere (Abbildung 37 - **B**) bedingt ist. Zusätzlich konnte ein solcher Effekt in den NMR-Spektren der Referenzverbindung **119** und den entschützten Amin-Vorstufen **117a-d** nicht beobachtet werden.

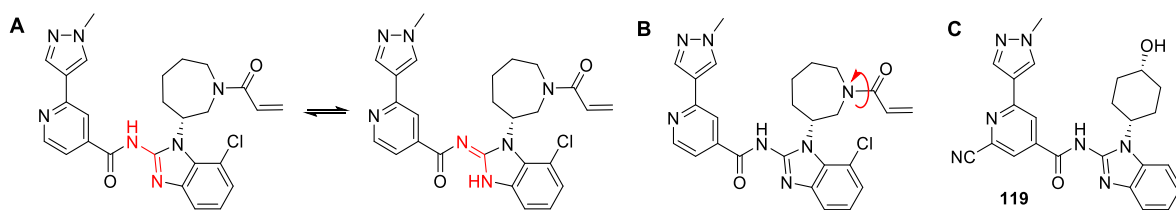


Abbildung 37: A - Mögliche Amino-Benzimidazol Tautomere; B - Potentielle Rotamere des Azepanamids; C - Referenzverbindung 119.

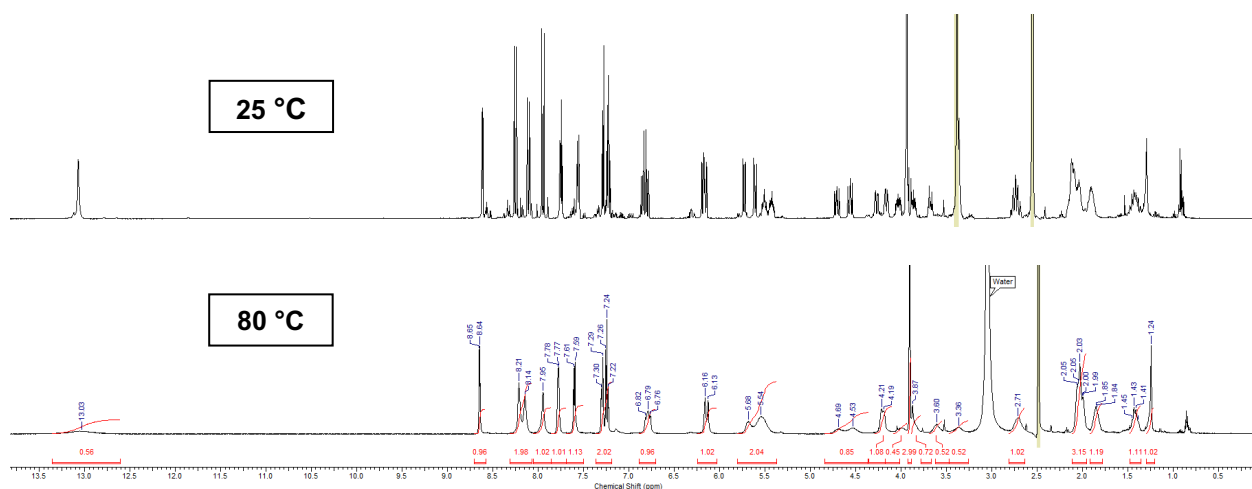


Abbildung 38: ¹H-NMR der Verbindung 118d gemessen bei 25 und 80 °C.

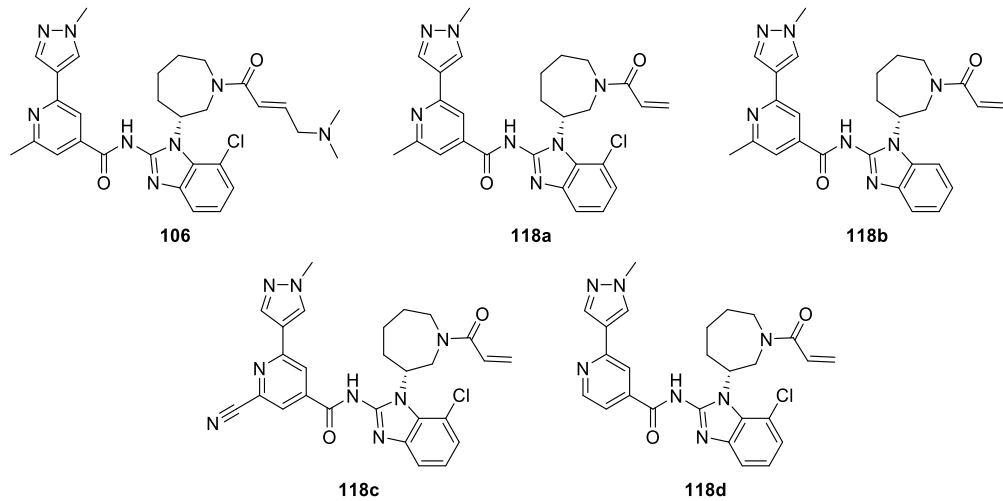


Abbildung 39: Übersicht der generierten Aminobenzimidazolamid-basierten Hybrid-Inhibitoren.

3.3.3. Evaluierung der *N*-Benzimidazol-2-yl-amid Inhibitoren

Zu Beginn sollte überprüft werden, ob die synthetisierten Hybrid-Inhibitoren weiterhin als kovalente Drittgenerations-Inhibitoren fungieren. Dafür wurde die Türsteher-Mutante EGFR-T790M/V948R mit den Inhibitoren inkubiert und anschließend per LC-MS auf eine kovalente Modifizierung untersucht. Diese konnte für alle synthetisierten Inhibitoren erfolgreich nachgewiesen werden, wie beispielhaft für den Inhibitor **106** dargestellt ist (Abbildung 40).

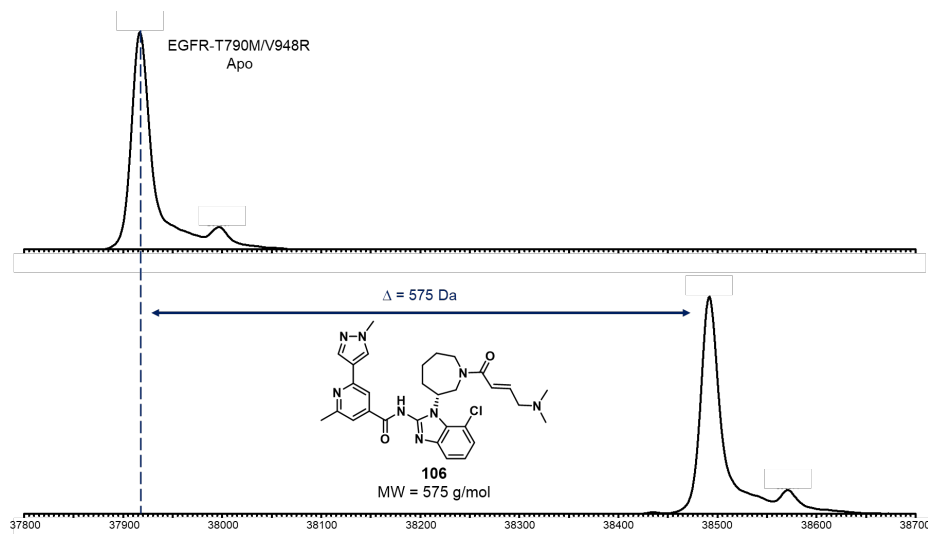


Abbildung 40: Kovalente Modifikation von EGFR-T790M/V948R durch den Hybrid-Inhibitor 106 mit entsprechender Massenverschiebung. Experiment durchgeführt von Dr. J. Niggenaber.

Tabelle 17: Biochemische Evaluierung der Hybrid-Inhibitoren und Referenzverbindungen gegenüber dem EGFR-Wildtyp und den L858R-, L858R/T790M- und D770_N771insNPG-Mutanten. HTRF-Assays durchgeführt von A. Arndt und T. Grabe.

HTRF [pM]	EGFR Wildtyp	EGFR L858R	EGFR L858R/T790M	EGFR D770_N771 insNPG	Selektivitätsfaktor (Wildtyp:insNPG)
2 Erlotinib	31 ± 14	6 ± 2	17375 ± 5376	5560 ± 2500	0,01
4 Afatinib	13 ± 4	9 ± 1	262 ± 80	360 ± 72	0,04
5 Neratinib	22 ± 9	18 ± 1	773 ± 57	290 ± 43	0,08
7 Osimertinib	242 ± 95	43 ± 12	24 ± 7	581 ± 103	0,42
27 Poziotinib	< 6	5 ± 0,3	56 ± 5	11 ± 2	< 0,5
28 Mobocertinib	25 ± 6	11 ± 1	30 ± 3	99 ± 4	0,25
29 TAS6417	291 ± 88	18 ± 1	35 ± 2	1060 ± 110	0,27
8 Nazartinib	2250 ± 828	410 ± 131	135 ± 65	2431 ± 287	0,93
105 BI-4020	96 ± 3	34 ± 20	< 7	121 ± 22	0,79
106	271 ± 36	36 ± 9	7 ± 2	309 ± 39	0,88
118a	216 ± 45	21 ± 7	7 ± 2	178 ± 29	1,21
118b	285 ± 70	28 ± 11	6 ± 2	305 ± 27	0,93
118c	179 ± 75	18 ± 5	11 ± 5	160 ± 22	1,12
118d	38 ± 9	8 ± 2	6 ± 2	43 ± 6	0,88

Die Hybrid-Inhibitoren wurden nach dem erfolgreichen Nachweis der kovalenten Modifikation auf den relevanten Aktivierungs- und Resistenzmutanten untersucht (Tabelle 17). Für die Untersuchung der Exon20-Insertionsmutationen wurde die D770_N771insNPG gewählt, da für diese Mutante als einzige der Exon20ins-Mutationen bereits eine Ko-Kristallstruktur verfügbar ist (PDB-Code 4LRM).

Der irreversible Hybrid-Inhibitor **106** zeigt mit einem IC₅₀ von 309 pM eine hohe Potenz auf der EGFR-Exon20-insNPG Mutation. Der Vergleich der Aktivität gegenüber dem EGFR-Wildtyp zeigt eine erhalten gebliebene Selektivität von 0,88 bei einer gesteigerten biochemischen Potenz gegenüber Nazartinib. Eine Betrachtung der weiteren Derivate bestätigt den Trend einer erhaltenen Wildtyp-Selektivität mit einer verbesserten biochemischen Potenz. Der Hybrid-Inhibitor mit dem unsubstituierten Acrylamid **118a** weist hierbei mit einem Faktor von 1,21 die beste Selektivität gegenüber dem Wildtyp auf. Das Cyano-Pyridin **118c** zeigt mit einem IC₅₀ von 160 pM eine nochmals gesteigerte Aktivität gegenüber dem Methyl-Analoga **118a**. Die dechlorierte Variante **118b** zeigt eine leicht verringerte Aktivität im Vergleich zu seinem Pendant **118a**, was den bereits beschriebenen positiven Einfluss von Substituenten in der 7-Position des Benzimidazols belegt.^[31] Der unmethylierte Hybrid-Inhibitor **118d** ist mit einer biochemischen Potenz von 43 pM der mit Abstand potenteste Inhibitor dieser Serie. Eine Substitution in *ortho*-Position des Isonicotinsäureamids wurde bei der Entwicklung von BI-4020 als Selektivität-treibendes

Element für EGFR-T790M eingeführt.^[106] Das Fehlen eines Substituenten bei Inhibitor **118d** gibt somit eine Erklärung für den Aktivitätssprung auf dem Thr790-tragendem EGFR-Wildtyp und der D770_N771insNPG-Mutante. Im Vergleich zu Nazartinib konnte die biochemische Aktivität auf der D770_N771insNPG-Mutante über 50-fach gesteigert werden. Mit Ausnahme von Poziotinib stellt der Inhibitor **118d** somit den potentesten aller getesteten Wirkstoffe dar, unter Erhalt der Wildtyp-Selektivität der *N*-Benzimidazol-2-yl-amid Inhibitor-Klasse. Die Selektivität der Aminobenzimidazolamide kann sich hierbei von den klinisch untersuchten Exon20ins-Inhibitoren absetzen (Abbildung 41).

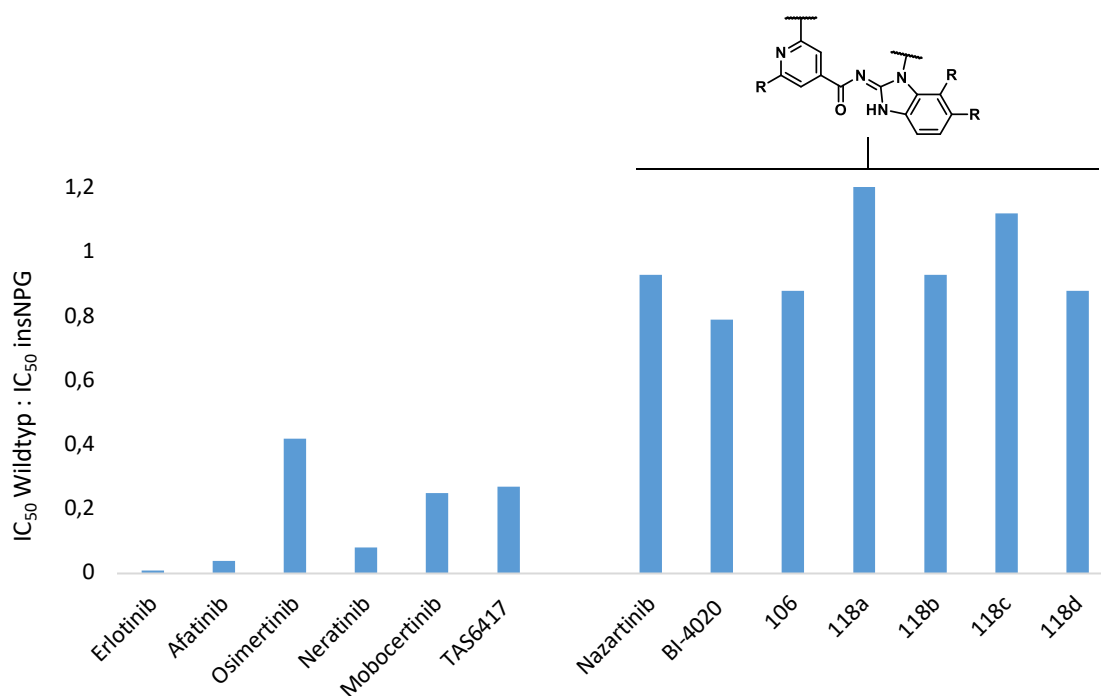


Abbildung 41: Darstellung der Selektivitätsverhältnisse zwischen dem EGFR-Wildtyp und EGFR-D770_N771insNPG.

Die Untersuchung der generierten Aminobenzimidazolamide im Vergleich zu Erst- bis Drittgenerations-Inhibitoren auf der Aktivierungsmutante EGFR-L858R und der Resistenzmutation EGFR-L858R/T790M zeigt ebenfalls ein ausgezeichnetes Profil der Hybrid-Inhibitoren. Analog zu den Drittgenerations-Inhibitoren Osimertinib und Nazartinib weisen die Hybrid-Inhibitoren abnehmende IC₅₀-Werte vom EGFR-Wildtyp über die L858R-Aktivierungsmutante zu der T790M-Resistenzmutante vor (Abbildung 42). Die erwähnte Substitution des Isonicotinsäureamids, welche bei **106** und **118a-c** vorliegt, bewirkt eine erhöhte Aktivität und Selektivität für T790M-mutiertes EGFR. Gegenüber Nazartinib sind die Hybride sowohl auf der Aktivierungs-, als auch der Resistenzmutante, um ein Vielfaches aktiver. Die Selektivität gegenüber dem EGFR-Wildtyp ist bei den Hybrid-Inhibitoren nochmals stärker ausgeprägt als bei Osimertinib.

Somit stellen die generierten Aminobenzimidazolamide, neben der hervorragenden Aktivität und Selektivität für die Exon20-Insertionsmutation, interessante Verbindungen für die von etablierten EGFR-Inhibitoren behandelbaren Aktivierungs- und Resistenzmutationen dar.

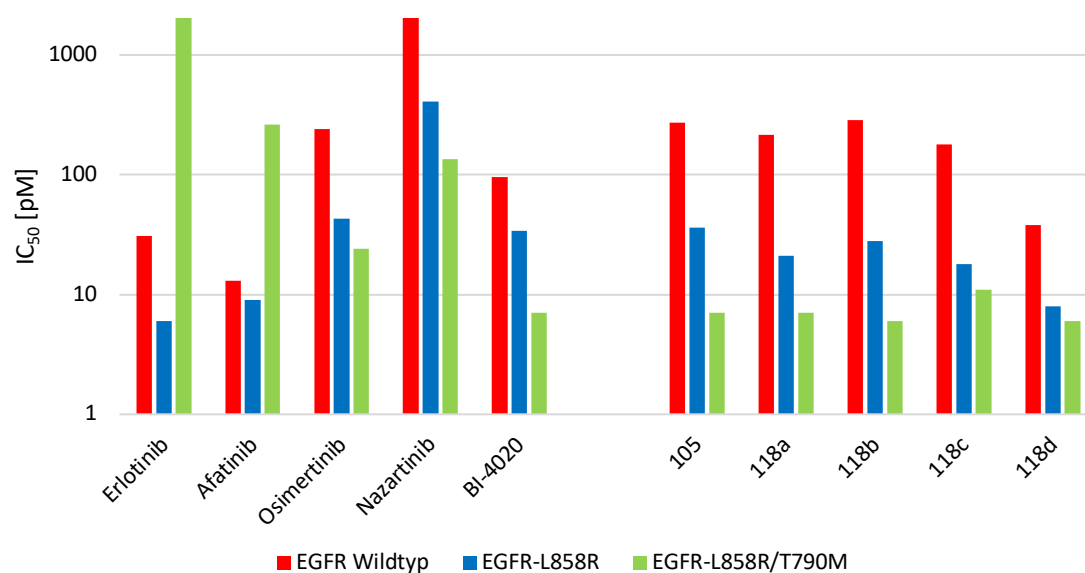


Abbildung 42: IC₅₀-Werte [nM] der Hybrid-Inhibitoren und Referenzverbindungen gegenüber dem EGFR-Wildtyp und den L858R- und L858R/T790M-Mutanten.

Um das Potential dieser Inhibitor-Klasse tiefergehend beurteilen zu können, wurden die Inhibitoren zusätzlich auf entsprechenden EGFR-abhängigen Zelllinien untersucht (Tabelle 18).

Tabelle 18: Zelluläre Evaluierung der Hybrid-Inhibitoren und Referenzverbindungen auf EGFR-abhängigen Zelllinien. Nicht genau definierte Werte von < 1,4 und < 14 basieren auf den kleinsten Werten der angewandten Verdünnungsreihen. CTG-Assay durchgeführt von K. Jeyakumar. * Einfachmessung

CTG [nM]		A431	Ba/F3 EGFR L858R	Ba/F3 EGFR L858R/T790M	H1975
2	Erlotinib	2805 ± 338	22 ± 12	> 3000	7041 ± 925
4	Afatinib	743 ± 215	< 14	185 ± 98	695 ± 93
5	Neratinib	n.b.	n.b.	730 ± 347	n.b.
7	Osimertinib	664 ± 234	6 ± 4	13 ± 3	17 ± 8
27	Pozotinib	318 ± 246	< 14	26 ± 9	96 ± 65
28	Mobocertinib	412**	1,0 ± 0,4	8,6 ± 2,7	35 ± 10
29	TAS6417	> 30000	< 14	5,1 ± 0,7	< 14
8	Nazartinib	6454 ± 1702	96 ± 24	128 ± 31	343 ± 92
105	BI-4020	399 ± 85	18 ± 5	4,0 ± 1,8	266 ± 56
	106	3821 ± 684	3,6 ± 0,6	1,3 ± 0,1	< 14
	118a	1744 ± 406	1,3 ± 0,2	0,88 ± 0,26	< 14
	118b	1345 ± 502	1,2 ± 0,2	0,71 ± 0,10	< 14
	118c	1767 ± 523	1,8 ± 0,4	1,3 ± 0,3	< 14
	118d	940 ± 486	0,7 ± 0,2	0,75 ± 0,14	< 14

Die biochemischen Befunde lassen sich auch in den zellulären Kontext übertragen. Mit EC₅₀-Werten von unter 14 nM auf der EGFR-L858R/T790M abhängigen H1975-Zelllinie sind die Hybrid-Inhibitoren allesamt aktiver als Osimertinib und die Vorläufer Nazartinib und BI-4020. Zusätzlich weisen die Hybrid-Inhibitoren gegenüber der EGFR-Wildtyp-abhängigen A431-Zelllinie Aktivitäten im mikromolaren Bereich auf. Hierbei können sich die Hybride nochmals von Osimertinib und BI-4020 absetzen. Auch für die L858R- und L858R/T790M-abhängigen Ba/F3-Zellen weisen die Inhibitoren hervorragende Aktivitäten auf. Der biochemisch potenteste Inhibitor **118d** stellt auf diesen Zelllinien mit einer subnanomolaren Aktivität ebenfalls den zellulär potentesten Inhibitor.

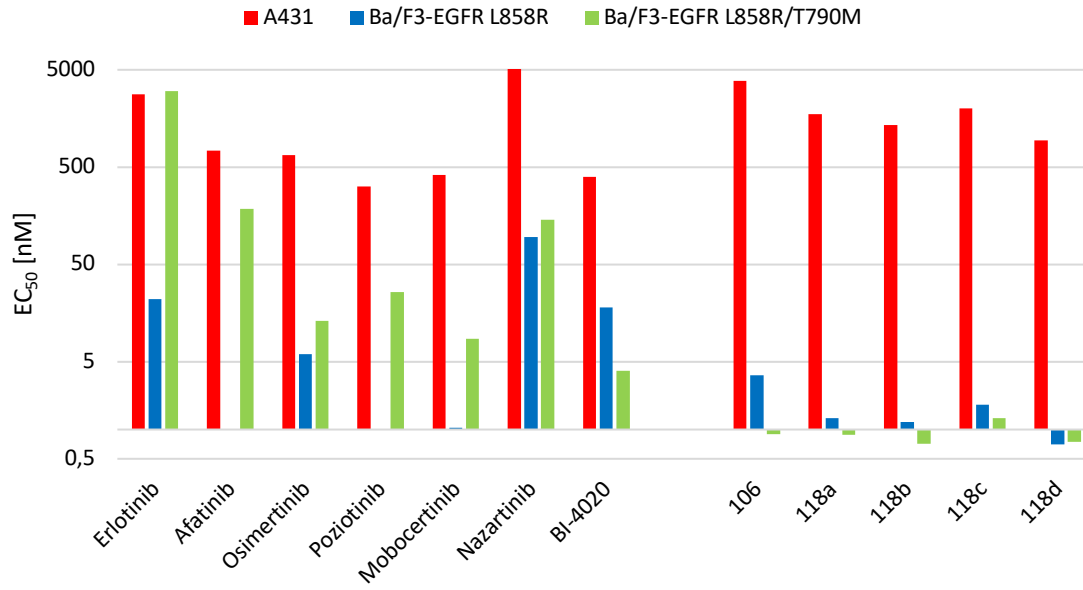


Abbildung 43: Zelluläre Aktivität (CTG-Assay [nM]) der Hybrid-Inhibitoren und Referenzverbindungen auf EGFR-abhängigen Zelllinien.

3.3.4. Untersuchung der EGFR-G719S Aktivierungsmutante

Neben den vielfach untersuchten und adressierten Aktivierungsmutanten EGFR-L858R, EGFR-del19 und bedingt EGFR-Exon20ins, stellen die EGFR-G719X Aktivierungsmutanten einen bisher wenig beachteten onkogenen Treiber in NSCLC dar. Derzeit findet eine erste Studie zur Untersuchung der Effektivität von Osimertinib gegenüber den selteneren Aktivierungsmutationen G719X, S768I und L861Q statt.^[NCT03434418] Eine biochemische und zelluläre Evaluierung der klinisch relevanten EGFR-Inhibitoren gegenüber den G719X Mutanten ist in der Literatur bisher jedoch unterrepräsentiert oder beinhaltet nicht die EGFR-Inhibitoren der späteren Generationen.^[107] Die G719C-Mutante sollte vorerst nicht untersucht werden, da durch die Einführung eines neuen Cysteins in der Bindetasche ein neuer irreversibler Bindungsmodus ermöglicht wird, welcher zur genauen Einordnung der inhibitorischen Wirkung der Elektrophil-tragenden Liganden vertieft untersucht werden müsste. Die Entwicklung von Inhibitoren, welche sich einen solchen neuen Bindungsmodus zunutze machen würden, könnte jedoch einen entscheidenden Selektivitätsvorteil gegenüber dem EGFR-Wildtyp hervorbringen, welcher ein entsprechendes Cystein misst. Das Konzept der Adressierung eines Cystein-enthaltenden Onkogens findet bei der KRas-G12C Mutante mit Sotorasib^[108] und Adagrasib^[109] bereits vielversprechende Anwendung.^[110] Für die kommerziell verfügbare Kinase EGFR-G719S wurden die für den HTRF-Assay benötigten Parameter ermittelt (siehe Anhang 5.1.) bevor dieser durchgeführt werden konnte.

Tabelle 19: Biochemische Evaluierung der Hybrid-Inhibitoren auf dem EGFR Wildtyp und den L858R- und G719S-Aktivierungsmutationen. HTRF-Assays durchgeführt von A. Arndt und T. Grabe.

HTRF [pM]		EGFR Wildtyp	EGFR L858R	EGFR G719S	Selektivitätsfaktor Wildtyp : G719S
2	Erlotinib	31 ± 14	6 ± 2	108 ± 29	0,29
4	Afatinib	13 ± 4	9 ± 1	42 ± 15	0,31
5	Neratinib	22 ± 9	18 ± 1	70 ± 7	0,31
7	Osimertinib	242 ± 95	43 ± 12	2480 ± 191	0,10
27	Poziotinib	6 ± 2	5 ± 0,3	24 ± 13	0,25
28	Mobocertinib	25 ± 6	11 ± 1	312 ± 165	0,08
29	TAS6417	291 ± 88	18 ± 1	901 ± 317	0,32
8	Nazartinib	2250 ± 828	410 ± 131	14010 ± 1870	0,16
105	BI-4020	96 ± 3	34 ± 20	1189 ± 319	0,08
	103a	8 ± 1	7 ± 1	271 ± 18	0,03
	106	271 ± 36	36 ± 9	11090 ± 1500	0,02
	118a	216 ± 45	21 ± 7	3661 ± 710	0,06
	118b	285 ± 70	28 ± 11	18670 ± 1490	0,02
	118c	179 ± 75	18 ± 5	3014 ± 455	0,06
	118d	38 ± 9	8 ± 2	324 ± 31	0,12

Bei der Betrachtung der IC₅₀-Werte der EGFR-G719S-Mutante ist auffällig, dass diese allgemein erhöht sind im Vergleich zum EGFR-Wildtyp und besonders zur EGFR-L858R Aktivierungsmutante. Eine Abschätzung zur Eignung eines Inhibitors gegen die G719S-Mutante erfolgt daher primär durch den Vergleich des Wildtyp:Mutanten-Verhältnis. Die Zweitgenerations-Inhibitoren Afatinib, Neratinib und Poziotinib weisen gegenüber der G719S-Mutante die höchsten Aktivitäten auf und sie besitzen zusätzlich das beste Selektivitätsverhältnis über den Wildtyp. Für klinische Studien könnten daher neben Osimertinib auch die Zweitgenerations-Inhibitoren in Betracht gezogen werden. Überraschenderweise zeigt Osimertinib in dieser Untersuchung eine relativ geringe Aktivität und Selektivität. Das gute Sicherheitsprofil von Osimertinib in klinischen Studien gab möglicherweise den Ausschlag für die klinische Testung Osimertinibs gegen die seltenen Aktivierungsmutanten. Für eine verbesserte Abschätzung der Eignung als Inhibitor der G719X-Aktivierungsmutationen sollten zelluläre Untersuchungen folgen.

Der potenteste Inhibitor der Ester-Serie **103a** (vgl. Kapitel 3.2.) gehört mit einer Aktivität von 0,27 nM zu den potentesten Inhibitoren auf der G719S-Mutante, jedoch ist eine schlechte Wildtyp-Selektivität gegeben. Eine mögliche Erklärung für die drastisch abfallende Potenz geben strukturelle Betrachtungen zur G719S-Mutante. Analog zur G724S-Resistenzmutation wird die Flexibilität der Glycin-reichen Schleife beeinflusst.^[22]

Für diese Resistenzmutation Osimertinibs konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits der Effektivitätsverlust von Aminopyrimidin-basierten Drittgenerations-Inhibitoren beobachtet werden.^[111] Gleichzeitig konnten für die G724S-Mutante jedoch die Quinazolin-basierten EGFR-Zweitgenerations-Inhibitoren als potentielle Behandlungsmöglichkeit ausgemacht werden. Diese Ergebnisse spiegeln sich bereits in ersten Fallstudien wieder.^[112-115] Überträgt man die Erkenntnisse der G724S- auf die G719S-Mutante, sind diese im Einklang mit den gemessenen biochemischen Daten, da hierbei ebenfalls die irreversiblen Zweitgenerations-Inhibitoren hervorstechen. Weitere Untersuchungen wie kinetische Studien und zelluläre Testungen der G719X-Mutanten sollten jedoch erfolgen, um von den bereits verfügbaren EGFR-Inhibitoren den für nachfolgende präklinische Evaluierungen geeignetsten Wirkstoff auszumachen.

4. Zusammenfassung & Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte vielseitige medizinal-chemische Ansätze zur Adressierung krebsrelevanter Aktivierungs- und Resistenzmutationen des EGFRs untersucht werden.

Der Versuch die EGFR-C797S-Resistenzmutationen mittels Variation neuer Elektrophile am etablierten 2-Aminopyrimidin-Grundgerüst zu adressieren konnte letztendlich als nicht erfolgreich beschrieben werden. Die Boronsäure- und Fluorsulfat-Inhibitoren konnten auf biochemischer Ebene eine gute inhibitorische Potenz gegenüber den untersuchten EGFR-Mutanten vorweisen. Die mangelnde Wirksamkeit auf den untersuchten Zelllinien im Vergleich zu den reversibel-bindenden Referenz-Substanzen zeigt jedoch, dass das Konzept einer Effektivitätssteigerung durch einen kovalenten Bindungsmodus ausbleibt.

Ein weitaus vielversprechenderer Ansatz dieser Arbeit war die Optimierung der reversibel-bindenden 2-Aminopyrimidine. Auf Basis der beobachteten Aktivitätssteigerung zwischen Osimertinib (**7**) und Mobocertinib (**28**) auf der EGFR-L858R/C797S Resistenzmutation konnte eine umfangreiche Substanzbibliothek generiert werden, die den Substituenten-Einfluss in der 5-Position untersucht. Eine zusätzliche Variation der weiteren Substituenten mit bekannten Strukturelementen etablierter EGFR-Inhibitoren brachte einen Inhibitor (**103a**) hervor, welcher sowohl im biochemischen als auch im zellulären Kontext eine hohe Potenz gegenüber den C797S-Osimertinib-Resistenzen aufweist.

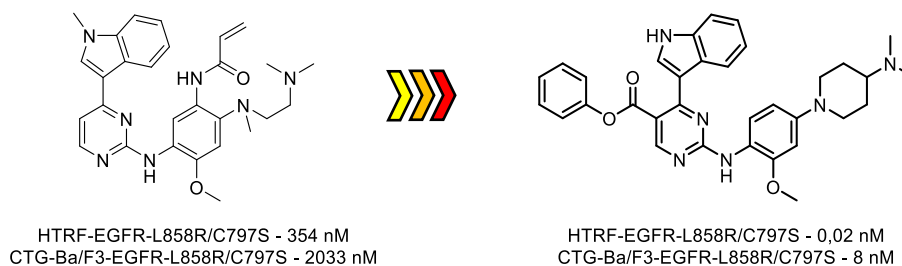


Abbildung 44: Darstellung des optimierten reversiblen Aminopyrimidins 103a ausgehend vom irreversiblen Drittgenerations-Inhibitors Osimertinib.

Für die T790M-Resistenzmutanten konnte eine stark verbesserte Aktivität als für den Quinazolin-basierten Erstgenerations-Inhibitor Erlotinib (**2**) beobachtet werden. Eine weitere Optimierung dieser Inhibitor-Klasse sollte jedoch auf der Tolerierung der T790M-Resistenzmutation liegen. Eine Verlagerung des Esters in 2-Position des Indols könnte den sterischen Konflikt mit der größeren Methionin-Seitenkette möglicherweise reduzieren. Die Ester-Inhibitoren konnten mit **103a** auch für die EGFR-Exon20insNPG- und G719S-Aktivierungsmutanten eine hohe Potenz aufweisen (IC₅₀ Exon20insNPG - 41 pM; G719S - 271 pM).

Das Konzept der Einbringung, des aus BI-4020 bekannten, *N*-Heterozyklus an Nazartinib zur Erhöhung der biochemischen und zellulären Potenz konnte mit den hier präsentierten Hybrid-Inhibitoren erfolgreich demonstriert werden. Es konnten Liganden generiert werden, welche niedrige IC₅₀ auf der EFGR-L858R Aktivierungs- und EGFR-L858R/T790M Resistenzmutation vorweisen, unter Beibehalt einer guten EGFR-Wildtyp-Selektivität. Diese Ergebnisse spiegelten sich auch im zellulären Kontext wider, wo die Hybrid-Inhibitoren geringere EC₅₀ auf der H1975-Zelllinie als Osimertinib vorweisen, bei gleichzeitig höheren EC₅₀-Werten auf der A431-Wildtyp Zelllinie.

Die Hybrid-Verbindungen wurden zudem auf ihre Eignung als Inhibitoren gegen Exon20-Insertionsmutationen untersucht. Für die insNPG-Mutante konnten hochpotente Inhibitoren generiert werden, welche im Vergleich zu den klinisch untersuchten Referenz-Inhibitoren das beste Mutanten:Wildtyp-Verhältnis aufweisen. Zelluläre Untersuchungen auf den verschiedenen Aktivierungs- und Resistenzmutationen zeigten, dass die Hybrid-Inhibitoren, insbesondere Verbindung **118d**, durch eine höhere Potenz als Drittgenerations-Inhibitoren hervorstechen.

Vom synthetischen Standpunkt stellt die Generierung einer Substanzbibliothek mit weiteren Heterozyklen, welche mit dem katalytischen Lys745 wechselwirken, den nächsten Schritt dar. Ein Fokus bei der Generierung einer solchen Substanzbibliothek sollte auf der Bestimmung und Optimierung pharmakokinetischer Parameter liegen. Die Hybrid-Inhibitoren weisen im biochemischen und zellulären Kontext bereits ein Profil auf, welches Osimertinib überlegen ist. Die Weiterentwicklung dieser Inhibitor-Klasse hin zu einem Inhibitor mit einem geeignetem pharmakokinetischen Profil, ist ein bedeutender Schritt um die Entwicklung in ein präklinisches und letztendlich klinisches Feld zu ermöglichen. Ein Blick auf die bereits generierte Substanzbibliothek zeigt, dass die Eliminierung mehrerer Substituenten des ursprünglichen Hybrids **106** sehr gut toleriert wird. Mit dieser Eliminierung und folglichem Molekulargewicht-Reduktion konnte ein Inhibitor (**120**, Abbildung 45) realisiert werden, welcher optimierte Computer-ermittelte Parameter aufweist, welche zur Vorhersage von Eigenschaften wie der oralen Bioverfügbarkeit (LIPINKSI „*Rule of Five*“)^[116] oder der Penetration der Blut-Hirn-Schranke genutzt werden.^[117] Der Erfolg der Optimierung, gestützt durch die Computer-ermittelten Parameter, muss letztendlich durch die pharmakokinetische Profilierung mittels Löslichkeits-, Stabilitäts und Membranpenetrations-Assays (MDCK-II MDR1) verifiziert werden.

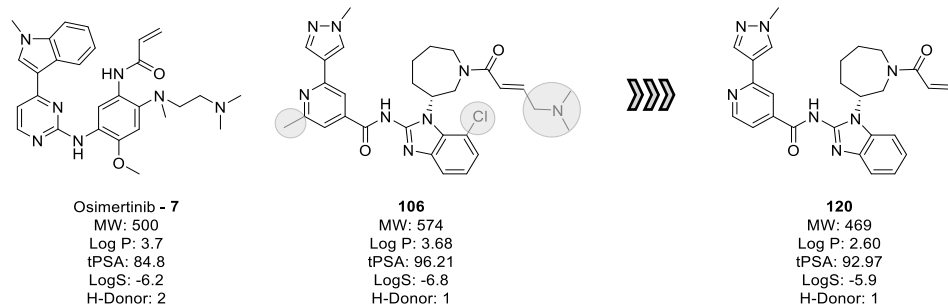


Abbildung 45: Darstellung der Inhibitoren Osimertinib, 106 und 120 mit ihren für die Blut-Hirnschranke-Penetration relevanten Parametern. MW = molecular weight, Log P = Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizient, tPSA = topological polar surface area, LogS = Löslichkeit in mol/l.

Der starke Forschungsfokus auf Aminopyrimidin-basierten EGFR-Inhibitoren, welcher in dem Erfolg Osimertinibs begründet liegt, konnte in dieser Arbeit durch einen Blick auf die Selektivitätsprofile klinisch weniger erfolgreicher Inhibitoren umgangen werden. Eine weitere Möglichkeit die bisherigen Hybrid-Inhibitoren zu optimieren, besteht in der Generierung von kovalenten Makrozyklus-Derivaten, welche dem BI-4020 strukturell noch ähnlicher sind.

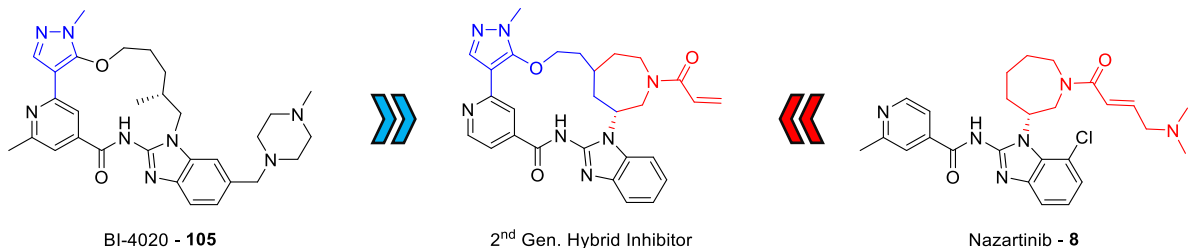


Abbildung 46: Design makrozyklischer Hybrid-Inhibitoren basierend auf BI-4020 und Nazartinib

Neben der Entwicklung potenter Inhibitoren für die C797S-Resistenzmutation und die Exon20ins-Aktivierungsmutation wurden die generierten Inhibitoren mit EGFR-Referenzinhibitoren auf der G719S-Mutante vermessen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die EGFR-Zweitgenerations-Inhibitoren wie Afatinib die vielversprechendste biochemische Inhibition vorweisen.

Das Aminobenzimidazol-Amid Grundgerüst erwies sich zur Adressierung der L858R- und Exon20ins-Aktivierungsmutationen im Vergleich zu den etablierten Erst- bis Drittgenerations-Inhibitoren als überlegen. Eine Übertragung des Aminobenzimidazol-Amid Grundgerüst auf die Problematik der C797S-Resistenzmutation erscheint aufgrund seiner hohen Wildtyp-Selektivität ein sinnvoller Ansatz zur Adressierung dieser Wirkstoffresistenz. Reversible Inhibitoren wie das BI-4020 könnten in Zukunft auch diese Problematik bei der Behandlung von NSCLC überwinden.

5. Summary and Outlook

As part of this work, versatile medicinal-chemical approaches for addressing cancer-relevant activation and resistance mutations of EGFR could be pursued.

The attempt to address the EGFR-C797S resistance mutation by investigating new electrophiles on the established 2-aminopyrimidine scaffold could ultimately be described as unsuccessful. The boronic acid and fluorosulfate based inhibitors demonstrated good inhibitory potency towards the investigated EGFR mutants on the biochemical level. However, the lack of efficacy on the examined cell lines in comparison to reversibly binding reference substances, demonstrates the ineffectiveness of attempting to increase the cellular potency through a covalent binding mode.

A much more promising approach to this work was the optimization of the reversibly binding 2-aminopyrimidines. Based on the observed increase in potency between Osimertinib (**7**) and Mobocertinib (**28**) towards the EGFR-L858R/C797S mutant, an extensive compound library which investigated substitutions at the 5-position was generated. Additional variations of further substituents with known structural elements of established EGFR inhibitors yielded inhibitor **103a**, which displayed a high potency towards the C797S-osimertinib-resistance both in a biochemical and cellular context.

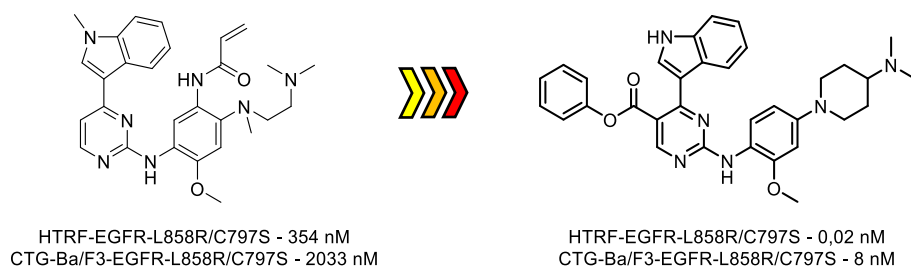


Figure 47: Illustration of the reversible aminopyrimidine **103a** (right) based on the irreversible 3rd-generation EGFR-inhibitor Osimertinib (left).

The activity towards the T790M-resistance mutations was greatly improved in comparison to the quinazoline based first-generation EGFR-inhibitor erlotinib (**2**). Importantly, further optimization of this class of inhibitors should be based on the tolerability of the T790M resistance mutation. Shifting the ester to the 2-position of the indole could possibly reduce the steric conflict with the larger methionine side chain. With **103a**, the ester-based inhibitors could also show a high potency for the EGFR Exon20insNPG (IC₅₀ 41 pM) and G719S activating mutations (IC₅₀ 271 pM).

The concept of introducing the *N*-heterocycle of BI-4020 to Nazartinib to increase its biochemical and cellular potency could be successfully demonstrated with the hybrid inhibitors presented in this work. Ligands with low IC₅₀ on EGFR-L858R activating and EGFR-L858R/T790M resistance mutation with a good wild-type selectivity could be generated. These results were reflected in the cellular setting, where the aminobenzimidazolamide-based inhibitors showed a lower EC₅₀ on the H1975 cell line than Osimertinib, with simultaneously higher EC₅₀ values on the A431 EGFR wild-type bearing cell line.

The inhibitor class was further examined for its suitability against the therapeutically challenging Exon20-insertion activating mutations. Highly potent inhibitors could be generated for the D770_N771insNPG mutant, which possessed an improved and optimal mutant:wild-type ratio in comparison to the clinically investigated reference inhibitors. Cellular studies on the various activation and resistance mutations revealed that the hybrid inhibitors, in particular compound **118d**, were exceptional due to their high potency compared to third-generation inhibitors.

From a synthetic point of view, the generation of a substance library with further heterocycles that interact with the catalytic Lys745 represents the next step forward. When generating such a substance library, a focus should be on the determination and optimization of pharmacokinetic parameters. The hybrid inhibitors already possess an attractive profile that is superior to Osimertinib in a biochemical and cellular setting. The development of this inhibitor class towards an inhibitor with a suitable pharmacokinetic profile will be an important goal to shift its significance into a preclinical and ultimately clinical setting. A look at the already generated substance library reveals that the elimination of several substituents of the initial hybrid **106** is well tolerated. By this elimination, and consequent reduction of its molecular weight, an inhibitor (**120**, Figure 48) could be realized which has optimized computationally-determined parameters used in predicting properties like oral bioavailability (LIPINSKI "Rule of Five")^[116] or penetration of the blood-brain-barrier.^[117] The success of optimizing inhibitors towards these computationally-determined parameters should ultimately be verified by pharmacokinetic evaluation assays with solubility-, stability- and membrane-penetration-assays (MDCK-II MDR1).

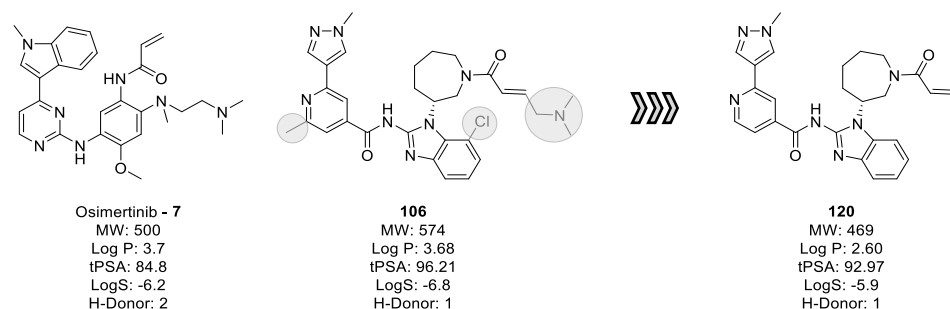


Figure 48: Structures of Osimertinib, 106 und 120 with their predictive parameters regarding oral bioavailability and blood-brain-barrier penetration. MW = molecular weight, Log P = octanol/water partition coefficient, tPSA = topological polar surface area, S = solubility in mol/l.

In this work, the tendency in academic and commercial EGFR-inhibitor research to focus on aminopyrimidines, which is based on the outstanding success of Osimertinib, was overlooked in favour of investigating selectivity profiles of clinically less successful inhibitors. To further improve the Nazartinib inspired inhibitor class, the generation of covalent macrocyclic derivatives, which are further structurally similar to BI-4020, should be investigated (Figure 49).

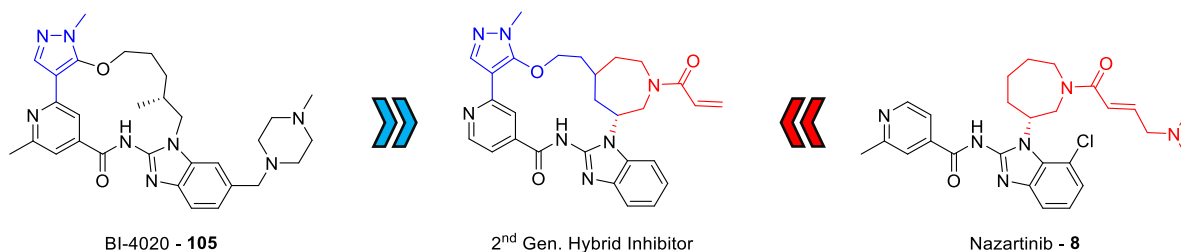


Figure 49: Design of a macrocyclic Hybrid-Inhibitor.

In addition to the development of potent inhibitors for the C797S resistance mutation and the Exon20ins activating mutation, the generated inhibitors and reference compounds were measured against G719X activating mutations. A favourable inhibition of the G719S-mutant could be observed for the hybrid inhibitor **118d**, which was further reflected in the high activity against the EGFR-G719A dependant Ba/F3 cell line. In a biochemical setting, the second-generation EGFR-inhibitor Afatinib showed the most promising profile, which is in line with our observations for the structurally related G724S-mutant.

The aminobenzimidazolamide core scaffold proved to be superior to the established first- to third-generation inhibitors in addressing L858R and Exon20ins activating mutations. A transfer of the aminobenzimidazolamide scaffold to the problematic C797S resistance mutation would be a reasonable approach for addressing drug resistance associated with this mutant due to its high wild-type selectivity. Reversible inhibitors such as BI-4020 could overcome this emerging problem in the treatment of NSCLC.

5. Experimenteller Teil

5.1. Biochemische Experimente

5.1.1. HTRF-Assay

Für die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) wurden mithilfe des ECHO 520 Liquid Handler (LabCyte) die zu untersuchenden Verbindungen in Verdünnungsreihen auf 384-Platten transferiert. Zuvor wurde die Platte mit 2,5 μ L HTRF-Pufferlösung (5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.01% Triton X-100, 5x HTRF KinEASE Reaktionspuffer, ddH₂O) bestückt. Anschließend wurden die im HTRF-Puffer verdünnten Kinasen (5 μ L, für Konzentration siehe Tabelle 20) mittels Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser (Thermo Fisher) auf die Platte transferiert, welche kurz geschüttelt, zentrifugiert und für 30 min in einer Feuchtkammer inkubiert wurde. Anschließend wurden 2,5 μ L der ATP/Substrat-Lösung per Multidrop hinzugeführt. Die Platten wurden erneut geschüttelt, zentrifugiert und für die entsprechende Reaktionszeit (Tabelle 20) in der Feuchtkammer gelagert. Zum Beenden der Reaktion wurde die Stopp-Lösung (Detektionspuffer, pTyr-AB, STV-XL665) per Multidrop hingegeben und für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das FRET-Signal mithilfe des EnVision Multimode Plate Readers (Perkin Elmer) abgelesen. Hierfür wurde die Fluoreszenz bei 620/650 nm 50 μ s nach der Anregung bei 317 nm gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Quattro Research Workflow Software. Die HTRF-Assays wurden durchgeführt von A. Arndt, K. Jeyakumar, Dr. M. Keul und T. Grabe.

Tabelle 20: Parameter für den HTRF-Assay verschiedener EGFR-Varianten. Bis auf die G719S-Variante bereits in der Doktorarbeit von Dr. M. Keul etabliert ^[118]

EGFR-Variante	Kinase/well [ng]	Reaktionszeit [min]	ATP [μ M]	Substrat [μ M]	Fluorophor/ Substrat
Wildtyp	0.6	25	9.5	1	1/8
L858R	0.1	15	25	0.225	1/4
L858R/T790M	0.07	20	20	0.275	1/8
L858R/T790M/C797S	0.8	10	11	0.325	1/8
L858R/C797S	0.05	20	80	1	1/8
D770_N771insNPG	0.02	20	40	1	1/8
G719S	0.27	30	80	1	1/8

5.1.2. Aufsetzen des HTRF-Assay für EGFR-G719S

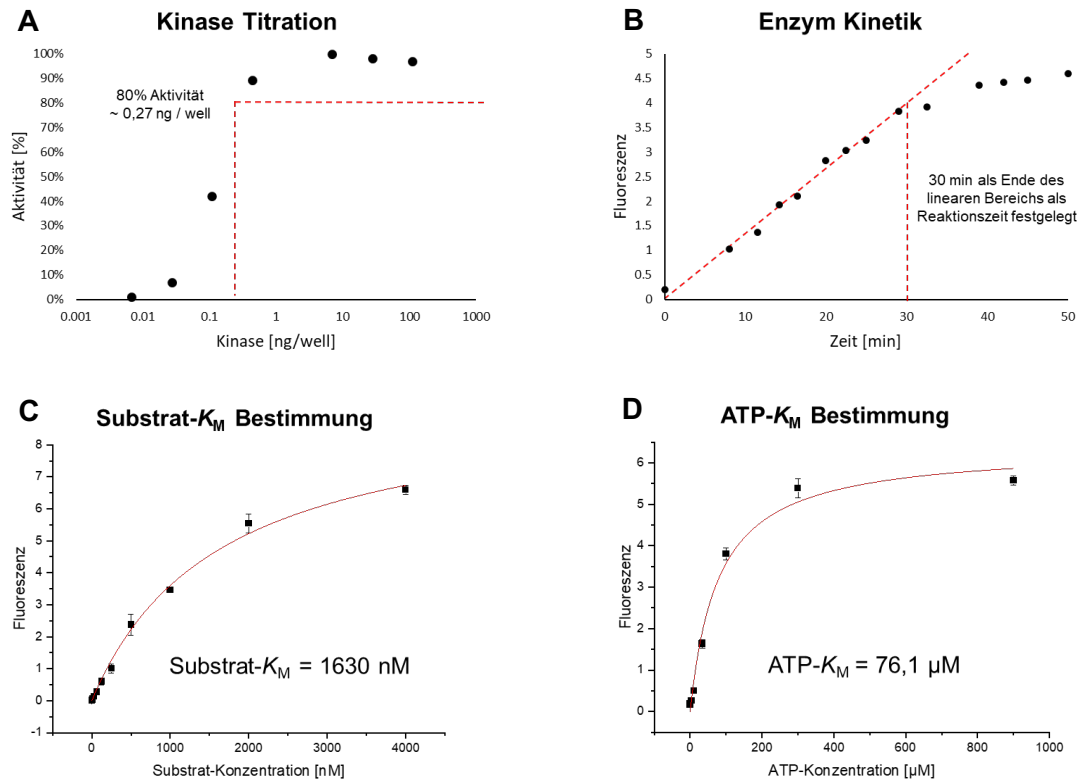


Abbildung 50: Bestimmung der HTRF-Assay Parameter für EGFR-G719S.

Für die Durchführung des HTRF-Assays der EGFR-G719S Mutante wurde das kommerziell verfügbare Protein (ReactionBiology, Produkt# 1035-0000-1, Lot-001) zu Beginn titriert. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe der Kinase mit vierfacher Verdünnung von 111,5 ng/well über sieben Schritte auf 0,007 ng/well angesetzt. Von den Verdünnungen wurden 5 μ L/well auf die Assay-Platte aufgetragen. Der HTRF-Assay wurde analog zu 5.1.1. durchgeführt. Für die HTRF-Start-Lösung (5 μ L/well) wurde eine ATP-Konzentration von 200 μ M und eine Substrat-Konzentration von 2 μ M verwendet. Die Reaktion wurde 30 min durchgeführt und durch Zugabe der HTRF-Stopp-Lösung beendet. Nach einer weiteren Stunde wurde die Fluoreszenz (f_{665}/f_{620}) ermittelt und gegen die Kinase-Konzentration aufgetragen. Für den HTRF-Assay und die nachfolgenden Parameter-Bestimmungen wurde eine Konzentration von 0,274 ng/well mit einer Aktivität von 80% des ermittelten Plateaus ermittelt (Abbildung 50 A). Anschließend folgte die Messung der Enzym-Kinetik. Hierbei wurde die HTRF-Stopp-Lösung in einer Zeit von 0 bis 60 min zugegeben. Eine Stunde nach der letzten Zugabe wurde die Fluoreszenz gemessen und gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Als Reaktionszeit wurde eine Dauer von 30 min, als Ende des linearen Bereichs, für den HTRF-Assay festgelegt (Abbildung 50 B). Anschließend wurde mit der

ermittelten Kinase-Konzentration und Reaktionszeit die Bestimmung des Substrat- K_M durchgeführt. Hierfür wurde für das Substrat eine Konzentrationsreihe über 16 Verdünnungen von 4000 nM bis 0.12 nM angesetzt. Für die Stopp-Lösung wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe des Fluorophors mit einem konstanten Verhältnis von Substrat/Fluorophor von 1/8 angesetzt. Als Substrat- K_M konnte mithilfe des Programms Origin 2020 eine Konzentration von 1630 nM ermittelt werden. Für den HTRF-Assay und die folgende ATP- K_M -Bestimmung wurde, analog zu weiteren EGFR-Varianten (Tabelle 20), mit einer Konzentration von 1 μ M weitergearbeitet um Substrat einzusparen. Zuletzt wurde der ATP- K_M ermittelt. Hierfür wurde eine ATP-Konzentrationsreihe mit 16 Verdünnungen von 900 μ M bis 0.06 nM erstellt. Die mit dem Programm Origin 2020 durchgeführte Auswertung ergab einen ATP- K_M von 76 μ M. Für den HTRF-Assay wurde eine leicht höhere ATP-Konzentration von 80 μ M verwendet.

5.1.3. CTG-Assay

Für die Ermittlung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) wurden die kultivierten Zellen mit dem Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser (Thermo Fisher) kontaktlos mit der entsprechenden Zellzahl auf 384-Well Platten ausgesät. Die Zellen wurden für 24 h bei 37 °C unter 5%iger CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Verbindungen sowie Positiv- und Negativkontrollen (Staurosporin und DMSO) mit dem ECHO 520 Liquid Handler (LabCyte) in Verdünnungsreihen transferiert (für 10 mM DMSO-Stammlösungen von 14 nM bis 30 μ M). Die Zellen wurden anschließend für 3 d erneut bei 37 °C unter 5%iger CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Daraufhin wurde der CTG-Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Das CTG-Reagenz wurde im Verhältnis 1:1 mit dem entsprechendem Kultivierungsmedium gemischt und mithilfe des Multidrop ausplattiert (25 μ L/well). Die 384-Platte wurde für 2 min bei 600 rpm zentrifugiert um die Zellyse einzuleiten. Anschließend wurde zur Stabilisierung des lumineszenten Signals für 20 min im Dunkeln inkubiert. Das Auslesen der Lumineszenz erfolgte mit dem EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) unter Verwendung von 500 ms Integrationszeit. Die Berechnung des EC_{50} -Werts erfolgte mit der Quattro Research Workflow Software. Die CTG-Assays wurden durchgeführt von K. Jeyakumar, Dr. M. Keul und Dr. J. Niggenaber.

5.1.4. Kristallisationsstudien

Ko-Kristallisation von **96c** in EGFR-T790M/C797S: Das aufkonzentrierte Protein EGFR-T790M/C797S (3.5-5.5 mg/mL) wurde mit einem dreifachen Überschuss des Inhibitors **96c** (10 mM DMSO Stammlösung) für 2 h auf Eis inkubiert. Die Kristalle wurden bei 20 °C per *hanging drop vapor diffusion* Methode generiert. Der Protein-Wirkstoff-Komplex wurde im

Verhältnis 1:1 mit der Reservoir Lösung vermischt (1.3-1.7 M K-Na-Tartrat, 100 mM Na-MES pH 5.5-7.5, 0-4 % 1,3-Propanediol). Die Kristalle wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Diffraktionsdaten wurden an der PXII X10SA Strahllinie der *Swiss Light Source* (SLS @ PSI, Villigen, Schweiz) aufgenommen.

Ko-Kristallisation von **103a** in EGFR-T790M/V948R: Das aufkonzentrierte Protein EGFR-T790M/V948R (6.4 mg/mL) wurde mit einem dreifachen Überschuss des Inhibitors **103a** (10 mM DMSO Stammlösung) für 2 h auf Eis inkubiert. Die Kristalle wurden bei 20 °C per *hanging drop vapor diffusion* Methode generiert. Der Protein-Wirkstoff-Komplex wurde im Verhältnis 1:1 mit der Reservoir Lösung vermischt (15-37.5% PEG3350, 100 mM MgSO₄, 0-4% Ethylenglykol). Die erhaltenen Kristalle wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Diffraktionsdaten wurden an der PXII X10SA Strahllinie der *Swiss Light Source* (SLS @ PSI, Villigen, Schweiz) aufgenommen. Die Daten wurden mit XDS prozessiert und mit XSCALE skaliert.^[119] Die Komplexstrukturen wurden mithilfe des molekularen Ersatzes mit PHASER gelöst.^[120] Hierfür wurde als Referenzstruktur PDB-Code 6S8A verwendet. Die Moleküle in der asymmetrischen Einheit wurden manuell in COOT justiert.^[121] Die Verfeinerung wurde durchgeführt mit Phenix.refine 1.17.1.^[122]

Die Kristallisationsstudien wurden durchgeführt von Dr. J. Niggenaber.

5.2. Synthesevorschriften

Die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden bezogen von ABCR, Acros, Activate Scientific, Alfa Aesar, Combi-Blocks, Fisher Scientific, Fluka, Honeywell, Roth, Sigma-Aldrich und VWR. Feuchtigkeits- und Sauerstoff-empfindliche Reaktionen wurden in ausgeheizten Reaktionsgefäßen unter Argon-Atmosphäre durchgeführt. Als Mikrowellenreaktor wurde der Microwave 300 Reaktor von Anton Paar verwendet. Die NMR-Analytik erfolgte mit folgenden Geräten: Bruker Avance III HD NanoBay - 400 MHz, Bruker Avance NEO – 500 MHz, Bruker Avance III HD – 600 MHz und Agilent DD2 – 500 MHz. Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mit der Software ACD/Labs NMR Processor Academic Edition 12.01. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm und die Spinmultiplizitäten wurden mit (s) Singulett, (d) Dublett, (t) Triplett, (dd) Dublett vom Dublett, (dt) Dublett vom Triplet, (spt) Septett angegeben. Die hochauflösenden Massenspektren (HRMS) wurden mit dem Thermo LTQ Orbitrap und dem Accela HPLC-System der Firma Thermo Electron aufgenommen. Die niedrig aufgelösten Massenspektren (LC-MS) wurden mit dem Agilent 1100 HPLC-System und einer CC 125/4 Nucleodur C₁₈ Gravity Säule von Macherey Nagel gekoppelt mit dem Thermo Scientific Finnigan LCQ Advantage Max Massenspektrometer aufgenommen. Die Dünnschichtchromatographie gekoppelte Massenspektrometrie (DC-MS) wurde durchgeführt mit dem Advion CMS Plate Express und den DC Kieselgel 60 F₂₅₄ Aluminiumplatten von Merck. Die Säulenchromatographie wurde durchgeführt mit dem Biotage Isolera One System und Kieselgel-Kartuschen vom Typ Büchi Reveleris. Die Umkehrphasenchromatographie wurde mit den Büchi FlashPure EcoFlex C₁₈-Säulen durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde dabei TFA-saures Wasser (0.2%) und TFA-saures Acetonitril (0.2%) verwendet. Die HPLC-Aufreinigung wurde durchgeführt mit dem Büchi Reveleris Prep System und der VP 250/21 Nucleodur C₁₈ HTec 5 μ m Säule von Macherey Nagel. Die Ausbeute für Reaktionen wurde stets für die aufgereinigte Form angegeben.

Allgemeine Synthesevorschrift für die nukleophile aromatische Substitution von *p*-Fluornitrobenzolen: 2-Nitro-5-fluoroanisole wurde in DMF (0.5 M) gelöst und das sekundäre Amin (1.0 eq) wurde hinzugefügt. Anschließend wurde K₂CO₃ (2.0 eq) zugegeben und für 24 h bei 50 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Wasser und DCM getrennt bevor die organische Phase mit Na₂SO₄ getrocknet und zu einer DMF-Lösung eingeeengt wurde. Das Produkt wurde unter Zugabe von Wasser umkristallisiert. Langsames Abkühlen und anschließende Filtration ergaben das gewünschte Produkt.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Friedel-Crafts-Arylierung: Zu einer Lösung eines 5-substituierten 2,4-Dichloropyrimidin in Dimethoxyethan (0.5 M) wurde bei 0 °C trockenes AlCl_3 (2.0 eq) zugegeben. Nach 15 min wurde *N*-Methylindol (1.1 eq) zugegeben. Die Reaktion wurde langsam auf 55 °C erhitzt und für weitere 2 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei 0 °C mit MeOH gequenchet und zwischen EtOAc und HCl-saurer Lösung (0.1 M) getrennt. Die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (Petrolether:Ethylacetat) aufgereinigt.

Allgemeine Synthesevorschrift zur Reduktion aromatischer Nitroverbindungen: Die Nitroverbindung wurde in MeOH (0.05 M) gelöst und im Wasserstoff-Fluss-Reaktor mit Pd/C (10%) bei 60 °C und 1 atm bei einer Flussrate von 2 mL/min behandelt. Der Durchfluss wurde zum Erhalt des Produkts eingeeengt. Falls nicht anderweitig vermerkt wurde keine weitere Aufreinigung durchgeführt.

Allgemeine Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen: Das 4,5-substituierte 2-Chloropyrimidin und das Anilin (1.0-1.5 eq) wurden in *n*-BuOH oder *i*-PrOH gelöst und mit TFA (1.0-1.5 eq) versetzt. Die Reaktion wird bei 80-110 °C für 2-48 h gerührt bis ausreichend Umsatz zu beobachten war. Die abgekühlte Reaktionslösung wird zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt. Die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert bevor die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet wurden und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt wurde.

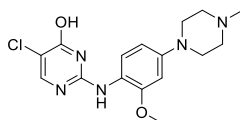
Allgemeine Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung: Die Carbonsäure wurde in DCM (0.1 M) gelöst und mit TEA (2-10 eq) versetzt. Sobald die Carbonsäure gelöst war, wurde bei 0 °C TBTU (1.2 eq) zugegeben und für 15 min gerührt. Anschließend wurde das Amin oder der Alkohol (1.5 - 10.0 eq) zugegeben und bis zum vollständigen Umsatz des Aktivesters bei Rt gerührt.

31 – 2,5-Dichloropyrimidin-4-ol



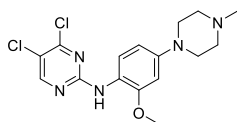
2,4,5-Trichloropyrimidin (10.0 mmol, 1.15 mL) wurde in Dioxan (0.5 M) gelöst und mit Natronlauge (1 M, 20.0 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei Rt gerührt und anschließend zwischen HCl (1M, 20.0 mL) und Ethylacetat getrennt. Die wässrige Phase wurde zweifach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 97% (9.7 mmol, 1.6 g) erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.25 (s, 1 H), 13.01 (br. s., 1 H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 118.86, 151.49, 157.22, 167.09. LC-MS (ESI+) (m/z) berechnet für [C₄H₃Cl₂N₂O]⁺ 164.96, gefunden 165.09.

32 – 5-Chloro-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-ol



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **31** (23.5 mmol, 3.87 g) und 2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilin (24.6 mmol, 5.45 g) in *n*-BuOH (0.2 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 99% (23.3 mmol, 8.15 g) erhalten. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.24 (s, 3 H) 2.47 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.12 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.84 (s, 3 H) 5.76 (s, 1 H) 6.47 (dd, *J*=8.80, 2.20 Hz, 1 H) 6.63 (d, *J*=2.20 Hz, 1 H) 7.78 - 7.93 (m, 2 H) 8.30 (s, 1 H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 45.65, 48.42, 54.56, 54.90, 55.75, 99.81, 106.72, 110.26, 118.61, 122.35, 148.40, 150.44, 152.00, 158.51. LC-MS (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₆H₂₁ClN₅O₂]⁺ 350.14, gefunden 350.15.

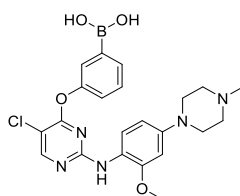
33 – 4,5-Dichloro-N-(2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)pyrimidin-2-amin



32 (5.0 mmol, 1.75 g) wurde in MeCN (0.05 M) gelöst und mit BTEACI (5.0 mmol, 1.14 g) und DMA (5.0 mmol, 631 µL) versetzt. Anschließend wurde POCl₃ (50.0 mmol, 4.67 mL)

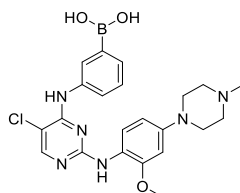
zugegeben und für 2 h bei 90 °C gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde vorsichtig mit K₂CO₃ versetzt und für 15 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen DCM und Bicarbonat-Lösung getrennt. Die wässrige Phase wurde anschließend zweifach mit DCM extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 85% (4.3 mmol, 1.57 g) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.23 (s, 3 H) 2.46 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.14 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.74 (s, 3 H) 6.47 (dd, *J*=8.54, 2.44 Hz, 1 H) 6.60 (d, *J*=2.44 Hz, 1 H) 7.23 (d, *J*=8.54 Hz, 1 H) 8.44 (s, 1 H) 8.94 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 45.74, 48.34, 54.63, 55.53, 100.08, 106.71, 115.00, 118.45, 126.17, 150.03, 153.64, 156.52, 158.27, 159.40. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₆H₂₀Cl₂N₅O]⁺ 368.10, gefunden 368.11.

34 – (3-((5-Chloro-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)oxy)phenyl)boronsäure



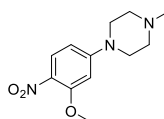
33 (0.10 mmol, 37 mg) und (3-Hydroxyphenyl)boronsäure (0.15 mmol, 21 mg) wurden in DMF (0.1 M) gelöst und mit K₂CO₃ (0.15 mmol, 21 mg) versetzt. Die Reaktion wurde für 24 h bei 90 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen EtOAc und Kochsalzlösung getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrennt und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mittels C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) aufgereinigt, wodurch das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 64% (64 μmol, 30 mg) erhalten wurde. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₂H₂₆BClN₅O₄]⁺ 470.17609, gefunden 470.17567.

35 – (3-((5-chloro-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)boronsäure



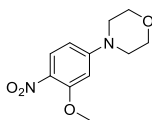
33 (0.20 mmol, 74 mg) und (3-Aminophenyl)boronsäure (0.24 mmol, 33 mg) wurden in *n*-BuOH (0.1 M) gelöst und mit TFA (0.20 mmol, 15 μ L) versetzt. Die Reaktion wurde für 24 h bei 90 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrennt und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mittels C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) aufgereinigt, wodurch das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 59% (0.12 mmol, 56 mg) erhalten wurde. **¹H NMR** (600 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 2.39 (s, 3 H) 2.67 (t, *J*=4.77 Hz, 4 H) 3.15 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.84 (s, 3 H) 6.32 (dd, *J*=8.80, 2.20 Hz, 1 H) 6.60 (d, *J*=2.20 Hz, 1 H) 7.34 (t, *J*=7.70 Hz, 1 H) 7.50 (d, *J*=5.70 Hz, 1 H) 7.54 - 7.62 (m, 1 H) 7.81 (br. s., 1 H) 7.83 (d, *J*=8.80 Hz, 1 H) 7.94 (s, 1 H) **HRMS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₂H₂₇BClN₆O₃]⁺ 469.19207, gefunden 469.19141.

37a – 1-(3-Methoxy-4-nitrophenyl)-4-methylpiperazin



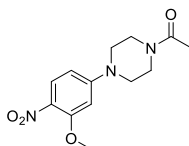
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift für die nukleophile aromatische Substitution von *p*-Fluornitrobenzolen mit 1-Methylpiperazin (50.0 mmol, 5.56 mL) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelbe kristalline Nadeln in quantitativer Ausbeute (49.9 mmol, 12.55 g) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.21 (s, 3 H) 2.36 - 2.47 (m, 4 H) 3.38 - 3.48 (m, 4 H) 3.90 (s, 3 H) 6.51 (d, *J*=2.20 Hz, 1 H) 6.57 (dd, *J*=9.46, 2.20 Hz, 1 H) 7.87 (d, *J*=9.46 Hz, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 30.76, 35.78, 45.64, 46.31, 54.22, 56.25, 96.89, 105.25, 128.01, 128.19, 155.50, 156.02. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₁₂H₁₈N₃O₃]⁺ 252.13, gefunden 252.14.

37b – 4-(3-Methoxy-4-nitrophenyl)morpholin



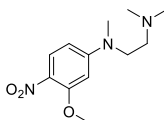
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift für die nukleophile aromatische Substitution von *p*-Fluornitrobenzolen mit Morpholin (150.0 mmol, 13.07 g) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelbe kristalline Nadeln mit einer Ausbeute von 85% (127.2 mmol, 30.30 g) erhalten. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.40 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.73 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.91 (s, 3 H) 6.54 (d, *J*=2.45 Hz, 1 H) 6.59 (dd, *J*=9.29, 2.45 Hz, 1 H) 7.89 (d, *J*=9.29 Hz, 1 H). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 46.57, 56.30, 65.74, 97.03, 105.12, 128.07, 128.50, 155.68, 155.86. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₁₁H₁₅N₂O₄]⁺ 239.10, gefunden 239.02.

37c – 1-(4-(3-Methoxy-4-nitrophenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-on



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift für die nucleophile aromatische Substitution von *p*-Fluornitrobenzolen mit 1-Acetylpiperazin (20.0 mmol, 2.69 g) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelbe kristalline Nadeln mit einer Ausbeute von 67% (13.5 mmol, 3.77 g) erhalten. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.05 (s, 3 H) 3.42 - 3.55 (m, 4 H) 3.55 - 3.63 (m, 4 H) 3.91 (s, 3 H) 6.52 (d, *J*=2.45 Hz, 1 H) 6.58 (dd, *J*=9.29, 2.45 Hz, 1 H) 7.90 (d, *J*=9.29 Hz, 1 H). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 21.21, 44.79, 46.03, 46.25, 56.31, 96.98, 105.18, 128.20, 155.10, 155.95, 168.53. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₁₃H₁₈N₃O₄]⁺ 280.13, gefunden 280.03.

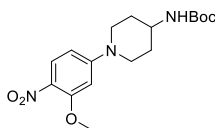
37d – *N*¹-(3-methoxy-4-nitrophenyl)-*N*¹,*N*²,*N*²-trimethylethan-1,2-diamin



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift für die nucleophile aromatische Substitution von *p*-Fluornitrobenzolen mit *N*¹,*N*¹,*N*²-trimethylethan-1,2-diamin (5.00 mmol, 0.86 g) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelbe kristalline Nadeln mit einer

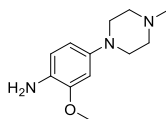
Ausbeute von 87% (4.35 mmol, 1.10 g) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 2.19 (s, 6 H) 2.41 (t, $J=6.85$ Hz, 2 H) 3.06 (s, 3 H) 3.54 (t, $J=6.85$ Hz, 2 H) 3.90 (s, 3 H) 6.23 (d, $J=1.96$ Hz, 1 H) 6.35 (dd, $J=9.78, 1.96$ Hz, 1 H) 7.89 (d, $J=9.78$ Hz, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 38.61, 45.49, 49.72, 55.83, 55.95, 94.43, 103.50, 126.54, 128.48, 154.28, 156.27. LC-MS (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3]^+$ 254.15, gefunden 254.00.

37e – *tert*-Butyl-(1-(3-methoxy-4-nitrophenyl)piperidin-4-yl)carbamat



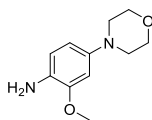
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift für die nucleophile aromatische Substitution von *p*-Fluornitrobenzolen mit *tert*-Butyl-piperidin-4-yl-carbamate (5.0 mmol, 1.00 g) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 93% (4.7 mmol, 1.64 g) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.39 (s, 10 H) 1.74 - 1.88 (m, 2 H) 2.98 - 3.10 (m, 2 H) 3.47 - 3.62 (m, 1 H) 3.90 (s, 3 H) 3.92 - 4.02 (m, 2 H) 6.49 (d, $J=1.96$ Hz, 1 H) 6.57 (dd, $J=9.50, 1.96$ Hz, 1 H) 6.88 (d, $J=7.34$ Hz, 1 H) 7.87 (d, $J=9.50$ Hz, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 28.24, 31.13, 45.73, 47.10, 56.25, 77.62, 96.69, 105.26, 127.50, 128.38, 154.85, 155.03, 156.22. LC-MS (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_5]^+$ 352.19, gefunden 351.92.

38a – 2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilin



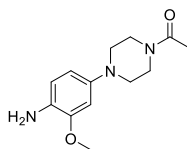
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Reduktion aromatischer Nitroverbindungen durchgeführt. Das Produkt wurde als zähflüssige dunkelviolette Masse in quantitativer Ausbeute (20.0 mmol, 4.42 g) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 2.30 (s, 3 H) 2.57 (br. s., 4 H) 2.99 (br. s., 4 H) 3.74 (s, 3 H) 4.56 (br. s., 1 H) 6.29 (d, $J = 7.74$ Hz, 1 H) 6.49 (s, 1 H) 6.52 (d, $J = 8.39$ Hz, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 45.13, 49.72, 54.51, 55.21, 101.94, 108.61, 114.17, 131.05, 142.97, 146.97. LC-MS (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}]^+$ 222.16, gefunden 222.17.

38b – 2-Methoxy-4-morpholinoanilin



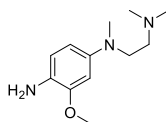
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Reduktion aromatischer Nitroverbindungen durchgeführt. Das Produkt wurde als dunkelgrauer Feststoff in quantitativer Ausbeute (20.0 mmol, 4.17 g) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.92 (t, *J*=4.60 Hz, 5 H) 3.70 (t, *J*=4.60 Hz, 5 H) 6.29 (dd, *J*=8.44, 2.20 Hz, 1 H) 6.50 (d, *J*=2.20 Hz, 1 H) 6.54 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 50.65, 55.23, 66.32, 101.59, 108.28, 114.24, 131.08, 143.28, 147.05. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₁₁H₁₇N₂O₂]⁺ 209.13, gefunden 209.09.

38c – 1-(4-(4-Amino-3-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-on



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Reduktion aromatischer Nitroverbindungen durchgeführt. Das Produkt wurde als hellgrauer Feststoff mit einer Ausbeute von 92% (9.21 mmol, 2.30 g) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.02 (s, 3 H) 2.87 (br. s., 2 H) 2.93 (br. s., 2 H) 3.51 - 3.57 (m, 4 H) 3.74 (s, 3 H) 4.30 (br. s., 2 H) 6.28 - 6.34 (m, 1 H) 6.50 - 6.56 (m, 2 H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 21.19, 40.99, 45.82, 50.71, 51.08, 55.23, 102.64, 109.31, 114.07, 131.57, 142.96, 146.95, 168.13. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₁₃H₂₀N₃O₂]⁺ 250.16, gefunden 250.08.

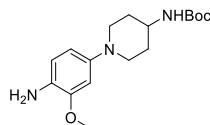
38d – *N*¹-(2-(Dimethylamino)ethyl)-3-methoxy-*N*¹-methylbenzene-1,4-diamin



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Reduktion aromatischer Nitroverbindungen durchgeführt. Das Produkt wurde als dunkelgrauer Feststoff mit einer Ausbeute von 94% (0.74 mmol, 165 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.15 (s, 6 H) 2.32 (t, *J*=7.20 Hz, 2 H) 2.75 (s, 3 H) 3.23 (t, *J*=7.32 Hz, 2 H) 3.43 (br. s., 2 H) 3.73 (s, 3 H) 6.12 (dd, *J*=8.40, 2.52 Hz, 1 H) 6.31 (d, *J*=2.52 Hz, 1 H) 6.52 (d, *J*=8.40 Hz, 1 H).

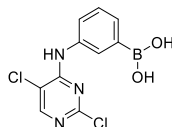
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 45.64, 51.63, 55.13, 55.73, 98.84, 105.95, 115.11, 128.45, 142.26, 147.43. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}]^+$ 224.18, gefunden 224.01.

38e – *tert*-Butyl-(1-(4-amino-3-methoxyphenyl)piperidin-4-yl)carbamate



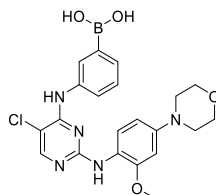
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Reduktion aromatischer Nitroverbindungen durchgeführt. Das Produkt wurde als hell blaugrauer Feststoff in quantitativer Ausbeute (2.0 mmol, 0,65 g) erhalten. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.39 (s, 9 H) 1.50 (m, 2 H) 1.70 - 1.84 (m, 2 H) 2.57 (t, $J=10.64$ Hz, 2 H) 3.24 - 3.42 (m, 5 H) 3.74 (s, 3 H) 4.92 (s, 1 H), 6.26 - 6.37 (m, 1 H) 6.46 - 6.58 (m, 2 H) 6.83 (d, $J=7.70$ Hz, 1 H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 28.27, 31.85, 47.30, 50.21, 55.23, 77.44, 102.60, 109.33, 114.52, 130.24, 143.62, 147.15, 154.86. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3]^+$ 322.21, gefunden 322.01.

40 - (3-((2,5-Dichloropyrimidin-4-yl)amino)phenyl)boronsäure



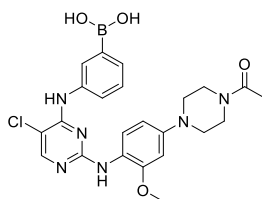
Trichloropyrimidin (0.20 mmol, 37 mg) und 2-Aminobenzylboronsäure (0.22 mmol, 30 mg) wurden in DMF (0.2 M) gelöst und mit K_2CO_3 (0.30 mmol, 42 mg) versetzt. Die Reaktion wurde für 2 h bei 50 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Kochsalzlösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) getrennt und ergab das Produkt als gelben Feststoff mit einer Ausbeute von 46% (0.09 mmol, 26 mg). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.37 (t, $J=7.58$ Hz, 1 H) 7.59 (d, $J=7.83$ Hz, 1 H) 7.64 (d, $J=7.34$ Hz, 1 H) 7.84 (s, 1 H) 8.07 (s, 2 H) 8.35 (s, 1 H) 9.52 (s, 1 H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 113.40, 125.91, 127.63, 129.87, 131.08, 136.51, 155.26, 156.96, 157.44. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BCl}_2\text{N}_3\text{O}_2]^+$ 284.02, gefunden 284.10.

41a – (3-((5-Chloro-2-((2-methoxy-4-morpholinophenyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)boronsäure



40 (0.10 mmol, 28 mg) und **38b** (0.15 mmol, 31 mg) wurden in *n*-BuOH (0.1 M) gelöst und mit TFA (0.10 mmol, 7.7 μ L) versetzt. Die Reaktion wurde für 40 h bei 90 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Silica eingeeengt und säulenchromatographisch mittels C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) getrennt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 86% (86 μ mol, 39 mg) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.06 (t, *J*=4.70 Hz, 4 H) 3.75 (t, *J*=4.70 Hz, 4 H) 3.79 (s, 3 H) 6.34 (d, *J*=8.44 Hz, 1 H) 6.60 (d, *J*=2.20 Hz, 1 H) 7.29 (t, *J*=7.70 Hz, 1 H) 7.56 (d, *J*=7.34 Hz, 1 H) 7.64 (d, *J*=8.80 Hz, 2 H) 7.68 (s, 1 H) 7.90 (s, 1 H) 8.05 (s, 2 H) 8.76 (s, 1 H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 49.22, 55.57, 66.16, 99.72, 103.20, 106.52, 120.85, 122.35, 125.18, 127.36, 129.38, 129.78, 134.47, 137.71, 147.74, 150.44, 154.41, 156.08, 158.06. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₁H₂₄BClN₅O₄]⁺ 456.16, gefunden 456.25.

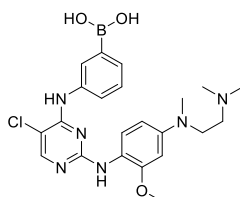
41b – (3-((2-((4-(4-Acetylpiperazin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-5-chloropyrimidin-4-yl)amino)phenyl)boronsäure



40 (0.10 mmol, 28 mg) und **38c** (0.15 mmol, 37 mg) wurden in *n*-BuOH (0.1 M) gelöst und mit TFA (0.10 mmol, 7.7 μ L) versetzt. Die Reaktion wurde für 40 h bei 90 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Silica eingeeengt und säulenchromatographisch mittels C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) getrennt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 82% (82 μ mol, 41 mg) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.05 (s, 3 H) 3.03 (t, *J*=4.80 Hz, 2 H) 3.08 (t, *J*=4.80 Hz, 2 H) 3.57 (dt, *J*=12.29, 5.23 Hz, 4 H) 3.78 (s, 3 H) 6.34 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H) 6.62 (d, *J*=2.20 Hz, 1 H) 7.28 (t, *J*=7.70 Hz, 1 H) 7.55 (d, *J*=7.34 Hz, 1 H) 7.62 (d, *J*=7.70 Hz, 1 H) 7.65 (d, *J*=8.80 Hz, 1 H) 7.66 (br. s., 1 H) 7.90 (s, 1 H) 7.98 - 8.11 (m, 3 H) 8.76 (s, 1 H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 21.20, 40.76, 45.58, 49.26,

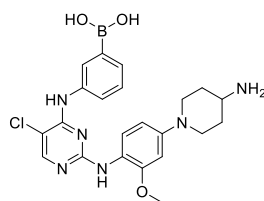
49.58, 55.61, 100.70, 103.26, 107.39, 121.19, 122.17, 125.23, 127.37, 129.44, 129.81, 134.46, 137.69, 147.44, 150.30, 154.45, 156.09, 158.03, 168.20, **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{23}H_{27}BClN_6O_4]^+$ 497.18699, gefunden 497.18667.

41c – **(3-((5-Chloro-2-((4-((2-(dimethylamino)ethyl)(methyl)amino)-2-methoxyphenyl)amino)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)boronsäure**



40 (0.20 mmol, 57 mg) und **38d** (0.30 mmol, 66 mg) wurden in *n*-BuOH (0.1 M) gelöst und mit TFA (0.40 mmol, 31 μ L) versetzt. Die Reaktion wurde für 40 h bei 90 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Silica eingeeengt und säulenchromatographisch mittels C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) getrennt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 76% (0.15 mmol, 72 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 2.46 (s, 6 H) 2.70 (t, *J*=7.32 Hz, 2 H) 2.90 (s, 3 H) 3.46 (t, *J*=7.17 Hz, 2 H) 3.83 (s, 3 H) 6.18 (d, *J*=7.93 Hz, 1 H) 6.40 (d, *J*=2.44 Hz, 1 H) 7.28 (t, *J*=7.80 Hz, 1 H) 7.43 (d, *J*=7.02 Hz, 1 H) 7.58 (d, *J*=7.93 Hz, 1 H) 7.68 (br. s., 1 H) 7.71 (d, *J*=8.85 Hz, 1 H) 7.90 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 39.82, 45.47, 51.46, 56.29, 56.37, 98.67, 104.98, 106.47, 120.93, 123.67, 128.72, 129.62, 131.01, 138.87, 147.55, 152.08, 154.67, 158.25, 159.66. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{22}H_{29}BClN_6O_3]^+$ 471.20772, gefunden 471.20726.

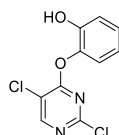
41d – **(3-((2-((4-(4-Aminopiperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-5-chloropyrimidin-4-yl)amino)phenyl)boronsäure**



40 (0.20 mmol, 57 mg) und **38e** (0.30 mmol, 96 mg) wurden in *n*-BuOH (0.1 M) gelöst und mit TFA (0.40 mmol, 31 μ L) versetzt. Die Reaktion wurde für 40 h bei 90 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Silica eingeeengt und säulenchromatographisch mittels C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) getrennt. Anschließend wurde das Zwischenprodukt (0.10 mmol) in DCM (0.25 M) gelöst und mit 4 M HCl-Dioxan-Lösung (8.0 mmol, 2 mL) versetzt. Das Produkt

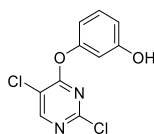
wurde säulenchromatographisch mittels C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) aufgereinigt und als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 55% (55 µmol, 26 mg) erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) d ppm 1.54 - 1.70 (m, 2 H) 1.97 (d, *J*=10.99 Hz, 2 H) 2.76 (t, *J*=11.75 Hz, 2 H) 3.17 (s, 2 H) 3.18 - 3.24 (m, 1 H) 3.70 (d, *J*=12.21 Hz, 2 H) 3.78 (s, 3 H) 6.38 (d, *J*=7.63 Hz, 1 H) 6.64 (br. s., 1 H) 7.31 (t, *J*=7.78 Hz, 1 H) 7.50 (d, *J*=8.54 Hz, 1 H) 7.55 - 7.67 (m, 2 H) 7.87 (s, 1 H) 8.06 (br. s., 2 H) 8.16 (s, 1 H) 8.53 (br. s., 1 H) 9.41 (br. s., 1 H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) d ppm 29.60, 48.07, 49.06, 50.75, 56.11, 101.06, 104.08, 108.01, 116.13, 118.49, 126.34, 127.96, 130.56, 131.26, 135.27, 137.30, 155.77, 157.23, 158.99, 159.25. HRMS (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₂H₂₇BClN₆O₃]⁺ 469.19207, gefunden 469.19159.

44a – 2-((2,5-Dichloropyrimidin-4-yl)oxy)phenol



Catechol (22.0 mmol, 2.4 g) wurde in DMF (0.5 M) gelöst und mit K₂CO₃ (30.0 mmol, 4.1 g) versetzt. Anschließend wurde 2,4,5-Trichloropyrimidin (20.0 mmol, 3.7 g) zugegeben und für 2 h bei 50 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Kochsalzlösung und Ethylacetat getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingedunstet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (Petrolether:Ethylacetat) getrennt und ergab das Produkt als weißen Feststoff mit einer Ausbeute von 41% (8.2 mmol, 2.1 g). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) d ppm 6.88 (td, *J*=7.71, 1.37 Hz, 1 H) 6.99 (dd, *J*=8.09, 1.37 Hz, 1 H) 7.11 - 7.24 (m, 2 H) 8.81 (s, 1 H) 9.91 (s, 1 H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) d ppm 116.33, 117.27, 119.54, 122.66, 127.46, 139.15, 148.60, 156.35, 158.88, 164.89, LC-MS (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₀H₇Cl₂N₂O₂]⁺ 256.99, gefunden 257.07.

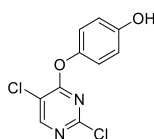
44b – 3-((2,5-Dichloropyrimidin-4-yl)oxy)phenol



Resorcinol (5.0 mmol, 551 mg) wurde in DMF (0.5 M) gelöst und mit K₂CO₃ (5.0 mmol, 691 mg) versetzt. Anschließend wurde 2,4,5-Trichloropyrimidin (3.3 mmol, 605 mg) zugegeben und für 2 h bei 60 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Kochsalzlösung und Ethylacetat getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit

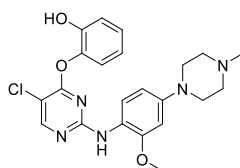
Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (Petrolether:Ethylacetat) getrennt und ergab das Produkt als weißen Feststoff mit einer Ausbeute von 79% (2.6 mmol, 672 mg). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 6.66 (t, *J*=2.20 Hz, 1 H) 6.69 (ddd, *J*=8.01, 2.21, 0.76 Hz, 1 H) 6.74 (ddd, *J*=8.24, 2.29, 0.76 Hz, 1 H) 7.26 (t, *J*=8.09 Hz, 1 H) 8.80 (s, 1 H) 9.88 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 108.65, 111.78, 113.60, 116.70, 130.38, 152.28, 156.26, 158.67, 158.99, 164.89. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₁₀H₇Cl₂N₂O₂]⁺ 256.99, gefunden 257.05.

44c – 4-((2,5-Dichloropyrimidin-4-yl)oxy)phenol



Hydrochinon (22.0 mmol, 2.4 g) wurde in DMF (0.5 M) gelöst und mit K₂CO₃ (30.0 mmol, 4.1 g) versetzt. Anschließend wurde 2,4,5-Trichloropyrimidin (20.0 mmol, 3.7 g) zugegeben und für 2 h bei 50 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Kochsalzlösung und Ethylacetat getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (Petrolether:Ethylacetat) getrennt und ergab das Produkt als weißen Feststoff mit einer Ausbeute von 72% (14.5 mmol, 3.72 g). **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 6.78 - 6.86 (m, 2 H) 7.05 - 7.10 (m, 2 H) 8.78 (s, 1 H) 9.62 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 115.99, 116.57, 122.31, 143.49, 155.58, 156.29, 158.78, 165.33. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₁₀H₇Cl₂N₂O₂]⁺ 256.99, gefunden 257.06.

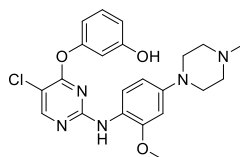
45a – 2-((5-Chloro-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)oxy)phenol



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesvorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **44a** (2.5 mmol, 642 mg) und **38a** (3.0 mmol, 664 mg) in *n*-BuOH (0.1 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als weißer

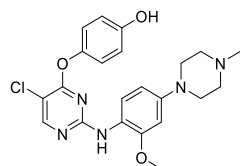
Feststoff mit einer Ausbeute von 50% (1.26 mmol, 555 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.23 (s, 3 H) 2.46 (br. t, *J*=4.70, 4.70 Hz, 4 H) 3.05 (br. t, *J*=4.70, 4.70 Hz, 4 H) 3.75 (s, 3 H) 6.15 (br. s., 1 H) 6.53 (d, *J*=2.44 Hz, 1 H) 6.81 - 6.92 (m, 1 H) 6.99 (dd, *J*=7.93, 1.22 Hz, 1 H) 7.11 - 7.18 (m, 2 H) 7.24 (d, *J*=8.54 Hz, 1 H) 7.95 (s, 1 H) 8.31 (s, 1 H) 9.74 (s, 1 H). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₂H₂₅ClN₅O₃]⁺ 442.16, gefunden 442.19.

45b – 3-((5-Chloro-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)oxy)phenol



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **44b** (1.0 mmol, 257 mg) und **38a** (1.0 mmol, 221 mg) in *n*-BuOH (0.1 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 56% (0.56 mmol, 248 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.21 (s, 3 H) 2.44 (t, *J*=4.70 Hz, 4 H) 3.06 (t, *J*=4.70 Hz, 4 H) 3.74 (s, 3 H) 6.24 (br. s., 1 H) 6.54 (d, *J*=2.44 Hz, 1 H) 6.60 (t, *J*=2.14 Hz, 1 H) 6.65 (dd, *J*=8.24, 1.53 Hz, 1 H) 6.69 - 6.73 (m, 1 H) 7.24 (t, *J*=8.09 Hz, 1 H) 7.27 (d, *J*=8.85 Hz, 1 H) 8.10 (s, 1 H) 8.32 (s, 1 H) 9.77 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 45.80, 48.65, 54.67, 55.51, 99.89, 104.03, 106.50, 108.98, 112.20, 112.80, 119.59, 130.06, 152.94, 157.83, 158.39, 158.57, 163.70. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₂H₂₅ClN₅O₃]⁺ 442.16, gefunden 442.20.

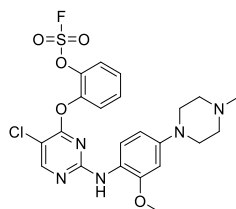
45c – 4-((5-Chloro-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)oxy)phenol



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **44c** (0.50 mmol, 129 mg) und **38a** (0.5 mmol, 111 mg) in *n*-BuOH (0.1 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 36% (0.18 mmol, 80 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.22 (s, 3 H) 2.38 - 2.48 (m, 4 H) 3.01 - 3.12 (m, 4 H) 3.74 (s, 3 H) 6.22

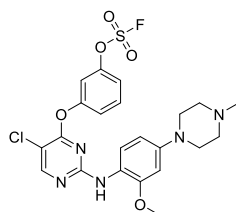
(br. s., 1 H) 6.54 (d, $J=2.44$ Hz, 1 H) 6.76 - 6.86 (m, 2 H) 6.97 - 7.08 (m, 2 H) 7.25 (d, $J=8.54$ Hz, 1 H) 8.02 (s, 1 H) 8.29 (s, 1 H) 9.50 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) d ppm 45.80, 48.66, 54.68, 55.51, 99.89, 106.47, 115.74, 119.67, 122.73, 144.02, 155.09, 157.58, 164.13. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{ClN}_5\text{O}_3]^+$ 442.16, gefunden 442.17.

46a – 2-((5-Chloro-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)oxy)phenyl sulfurofluoridat



45a (57 μmol , 25 mg) wurde in DCM (0.05 M) gelöst und mit TEA (141 μmol , 20 μL) versetzt. Anschließend wurde ein mit SO_2F_2 gefüllter Ballon angeschlossen und stark gerührt. Die Reaktion wurde für 30 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Rohprodukt auf Silica eingengt und säulenchromatographisch mittels C_{18} -Säule ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 58% (33 μmol , 17 mg) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) d ppm 2.25 (s, 3 H) 2.48 (t, $J=4.70$ Hz, 4 H) 3.08 (t, $J=4.70$ Hz, 4 H) 3.71 (s, 3 H) 6.21 (br. s., 1 H) 6.52 (d, $J=2.20$ Hz, 1 H) 7.08 (br. s., 1 H) 7.49 - 7.54 (m, 1 H) 7.58 - 7.63 (m, 1 H) 7.63 - 7.67 (m, 1 H) 7.76 - 7.85 (m, 1 H) 8.31 (s, 1 H) 8.40 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) d ppm 40.73, 45.57, 48.40, 54.51, 55.43, 99.84, 103.22, 106.39, 119.10, 122.93, 125.36, 127.74, 130.33, 141.00, 142.85, 148.79, 158.40, 158.56, 162.56. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{ClFN}_5\text{O}_5\text{S}]^+$ 524.12, gefunden 524.13.

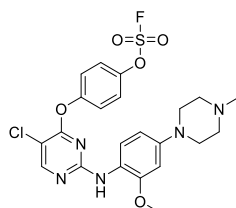
46b – 3-((5-Chloro-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)oxy)phenyl sulfurofluoridat



45b (0.20 mmol, 88 mg) wurde in DCM (0.05 M) gelöst und mit TEA (0.50 mmol, 70 μL) versetzt. Anschließend wurde ein mit SO_2F_2 gefüllter Ballon angeschlossen und stark gerührt. Die Reaktion wurde für 3 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Rohprodukt auf Silica eingengt und säulenchromatographisch mittels C_{18} -Säule ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$) aufgereinigt.

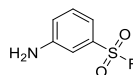
Das Produkt wurde als hellbeiger Feststoff mit einer Ausbeute von 90% (0.18 mmol, 95 mg) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.23 (s, 3 H) 2.45 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.06 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.73 (s, 3 H) 6.20 (br. s., 1 H) 6.44 - 6.60 (m, 1 H) 7.15 (br. s., 1 H) 7.46 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H) 7.56 (dd, *J*=8.25, 1.65 Hz, 1 H) 7.67 (t, *J*=8.44 Hz, 1 H) 7.70 (br. s., 1 H) 8.24 (s, 1 H) 8.37 (s, 1 H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 45.66, 48.48, 54.57, 55.46, 99.87, 103.76, 106.34, 115.74, 118.41, 119.31, 123.09, 131.38, 148.65, 149.61, 151.54, 152.89, 158.25, 158.33, 163.22. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₂H₂₄ClFN₅O₅S]⁺ 524.12, gefunden 524.15.

46c – 4-((5-Chloro-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)oxy)phenyl sulfurofluoridat



45c (57 μmol, 25 mg) wurde in DCM (0.05 M) gelöst und mit TEA (141 μmol, 20 μL) versetzt. Anschließend wurde ein mit SO₂F₂ gefüllter Ballon angeschlossen und stark gerührt. Die Reaktion wurde für 2 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Rohprodukt auf Silica eingeeengt und säulenchromatographisch mittels C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 67% (38 μmol, 20 mg) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.23 (s, 3 H) 2.46 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.06 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.73 (s, 3 H) 6.21 (br. s., 1 H) 6.53 (d, *J*=2.57 Hz, 1 H) 7.14 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H) 7.46 - 7.56 (m, 2 H) 7.68 - 7.76 (m, 2 H) 8.24 (s, 1 H) 8.37 (s, 1 H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 45.63, 48.45, 54.56, 55.49, 99.92, 103.68, 106.28, 119.31, 122.53, 124.31, 146.72, 151.81, 158.22, 163.33. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₂H₂₄ClFN₅O₅S]⁺ 524.12, gefunden 524.14.

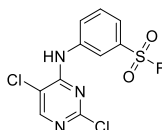
48 – 3-Aminobenzolsulfonylfluorid



3-Nitrobenzoylfluorid (3.0 mmol, 615 mg) wurde in EtOH:H₂O (1:1; 0.2 M) gelöst und mit NH₄Cl (30.0 mmol, 1.6 g) und Eisenpulver (15.0 mmol, 838 mg) versetzt. Die Reaktion wurde für 2 h bei 60°C unter Argon-Atmosphäre im Ultraschallbad behandelt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Wasser und DCM getrennt und die wässrige Phase

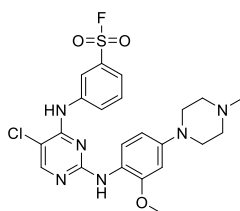
wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (Petrolether:Ethylacetat) getrennt und ergab das Produkt als weißen Feststoff mit einer Ausbeute von 50% (1.5 mmol, 261 mg). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₆H₇FNO₂S]⁺ 176.02, gefunden 176.09.

49 – 3-((2,5-Dichloropyrimidin-4-yl)amino)benzolsulfonylfluorid



48 (1.0 mmol, 175 mg) und 2,4,5-Trichloropyrimidin (2.0 mmol, 366 mg) wurden in *i*-PrOH (0.5 M) gelöst und für 20 min bei 100 °C in der Mikrowelle behandelt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde zwischen H₂O und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mittels C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) getrennt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 16% (0.16 mmol, 53 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7.81 (t, *J*=8.07 Hz, 1 H) 7.90 (d, *J*=7.83 Hz, 1 H) 8.24 (d, *J*=8.31 Hz, 1 H) 8.46 - 8.54 (m, 2 H) 9.94 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 114.22, 121.59, 123.71, 129.97, 130.73, 131.59, 131.77, 139.40, 156.26, 156.89, **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₀H₇Cl₂FN₃O₂S]⁺ 321.96, gefunden 322.17.

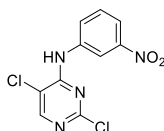
50 – 3-((5-Chloro-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)benzoylfluorid



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **49** (0.10 mmol, 32 mg) und **38a** (0.11 mmol, 23 mg) in *n*-BuOH (0.1 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 55% (55 μmol, 28 mg) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.30 (s, 3 H) 2.57 (br. s., 4 H) 3.15 (br. s., 4 H) 3.75 (s, 3 H) 6.42 (dd, *J*=8.62, 2.02

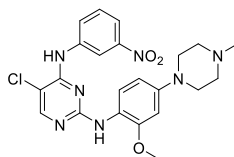
Hz, 1 H) 6.62 (d, $J=2.20$ Hz, 1 H) 7.39 (d, $J=7.70$ Hz, 1 H) 7.54 - 7.63 (m, 1 H) 7.74 (d, $J=8.07$ Hz, 1 H) 8.07 (br. s., 1 H) 8.13 (s, 1 H) 8.35 (br. s., 1 H) 8.40 (br. s., 1 H) 9.23 (s, 1 H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) d ppm 45.32, 48.33, 54.40, 55.49, 100.15, 106.75, 120.00, 120.42, 121.92, 124.60, 128.83, 130.32, 131.43, 131.58, 140.77, 148.72, 152.22, 155.25, 155.57, 158.70. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{ClFN}_6\text{O}_3\text{S}]^+$ 507.14, gefunden 507.20.

51 – 2,5-Dichloro-*N*-(3-nitrophenyl)pyrimidin-4-amin



3-Nitroanilin (7.5 mmol, 1036 mg) und 2,4,5-Trichloropyrimidin (5.0 mmol, 917 mg) wurden in DMF (0.5 M) gelöst und für 24 h bei 50 °C gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde zwischen Kochsalzlösung und Ethylacetat getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeignet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mittels C_{18} -Säule ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$) getrennt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 55% (2.75 mmol, 783 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{10}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2]^+$ 284.99, gefunden 285.05.

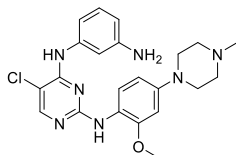
52 – 5-Chloro-*N*²-(2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-*N*⁴-(3-nitrophenyl)pyrimidine-2,4-diamin



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesvorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **51** (0.86 mmol, 245 mg) und **38a** (0.86 mmol, 190 mg) in *n*-BuOH (0.2 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 79% (0.68 mmol, 320 mg) erhalten. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) d ppm 2.23 (s, 3 H) 2.46 (t, $J=4.80$ Hz, 4 H) 3.10 (t, $J=4.80$ Hz, 4 H) 3.75 (s, 3 H) 6.34 (dd, $J=8.62, 2.02$ Hz, 1 H) 6.59 (d, $J=2.57$ Hz, 1 H) 7.37 (d, $J=8.44$ Hz, 1 H) 7.48 (t, $J=8.07$ Hz, 1 H) 7.83 - 7.91 (m, 1 H) 8.03 (s, 1 H) 8.11 (s, 1 H) 8.16 - 8.25 (m, 1 H) 8.48 (br. s., 1 H) 9.17 (s, 1 H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) d ppm 45.79, 48.62, 54.69, 55.44, 100.01, 106.51, 116.25, 117.36, 119.84, 124.65, 127.84, 129.40, 140.22, 147.72,

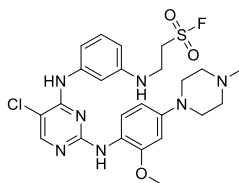
148.88, 152.20, 155.32, 155.44, 158.71. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{22}H_{25}ClN_7O_3]^+$ 470.17, gefunden 470.36.

53 – N⁴-(3-Aminophenyl)-5-chloro-N²-(2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)pyrimidin-2,4-diamin



52 (0.63 mmol, 300 mg) wurde in EtOH:H₂O (1:1; 0.02 M) gelöst und mit NH₄Cl (6.4 mmol, 342 mg) und Eisenpulver (3.2 mmol, 178 mg) versetzt. Die Reaktion wurde für 2 h bei 60°C unter Argon-Atmosphäre im Ultraschallbad behandelt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Wasser und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) getrennt und ergab das Produkt in 96% Ausbeute (0.60 mmol, 265 mg). **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.25 (s, 3 H) 2.49 (t, *J*=4.70 Hz, 4 H) 3.11 (t, *J*=4.70 Hz, 4 H) 3.79 (s, 3 H) 4.93 (br. s., 2 H) 6.29 - 6.36 (m, 1 H) 6.42 (dd, *J*=8.62, 2.38 Hz, 1 H) 6.61 (d, *J*=2.57 Hz, 1 H) 6.74 - 6.79 (m, 1 H) 6.93 (s, 2 H) 7.65 (d, *J*=8.80 Hz, 1 H) 7.68 (s, 1 H) 8.01 (s, 1 H) 8.38 (s, 1 H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 45.66, 48.66, 54.63, 55.51, 99.95, 103.25, 106.80, 108.18, 109.68, 110.49, 120.58, 123.12, 128.52, 139.25, 147.94, 148.68, 150.96, 154.30, 155.75, 158.38. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{22}H_{27}ClN_7O]^+$ 440.20, gefunden 440.26.

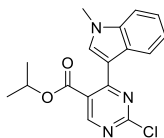
54 – 2-((3-((5-Chloro-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)amino)ethan-1-sulfonylfluorid



53 (0.10 mmol, 44 mg) wurde in DMF (0.5 M) gelöst und mit Ethansulfonylfluorid (0.11 mmol, 9.1 µL) versetzt. Die Reaktion wurde für 3 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Wasser und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in*

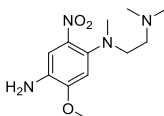
vacuo eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) getrennt und ergab das Produkt in quantitativer Ausbeute (0.10 mmol, 56 mg). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₄H₃₀ClFN₇O₃S]⁺ 550.18, gefunden 550.24.

63 – Isopropyl-2-chloro-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



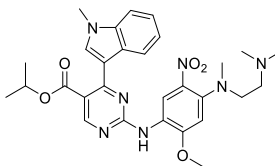
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift der Friedel-Crafts-Arylierung mit Isopropyl-2,4-dichloropyrimidin-5-carboxylat (5.00 mmol, 1.18 g) durchgeführt. Das Produkt wurde als blassgelber Feststoff mit einer Ausbeute von 85% (4.24 mmol, 1.40 g) erhalten. **¹H-NMR** (700 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.26 (d, *J* = 6.24 Hz, 6 H) 3.88 (s, 3 H) 5.21 (spt, *J* = 6.27 Hz, 1 H) 7.28 - 7.36 (m, 2 H) 7.37 - 7.40 (m, 1 H) 7.96 (s, 1 H) 8.17 - 8.21 (m, 1 H) 8.79 (s, 1 H). **¹³C-NMR** (176 MHz, CDCl₃) δ ppm 21.57, 33.57, 69.97, 109.87, 111.63, 120.96, 121.86, 122.08, 123.19, 126.75, 134.66, 137.36, 160.37, 161.97, 162.48, 165.85. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₇H₁₇ClN₃O₂]⁺ 330.10, gefunden 330.02.

66 – N¹-(2-(Dimethylamino)ethyl)-5-methoxy-N¹-methyl-2-nitrobenzol-1,4-diamin



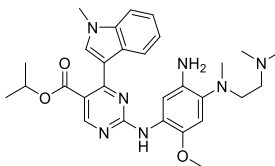
4-Fluoro-2-methoxy-5-nitroanilin (5.0 mmol, 931 mg) wurde in DMF (1 M) gelöst und mit N¹,N¹,N²-trimethylethan-1,2-diamin (6.0 mmol, 681 µL) versetzt. Anschließend wurde K₂CO₃ (10.0 mmol, 1.38 g) zugefügt und für 16 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Kochsalzlösung und Ethylacetat getrennt. Die wässrige Phase wurde zweifach mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mittels C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) aufgereinigt wodurch das Produkt als blutrotes Öl mit einer Ausbeute von 63% (3.15 mmol, 845 mg) erhalten wurde. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.10 (s, 6 H) 2.32 (t, *J*=7.00 Hz, 2 H) 2.70 (s, 3 H) 3.02 (t, *J*=7.00 Hz, 2 H) 3.86 (s, 3 H) 4.90 (s, 2 H) 6.74 (s, 1 H) 7.11 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 41.99, 45.45, 54.02, 55.84, 56.88, 103.97, 108.31, 132.97, 136.28, 138.40, 150.75. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₂H₂₁N₄O₃]⁺ 269.16, gefunden 268.98.

67 – Isopropyl-2-((4-((2-(dimethylamino)ethyl)(methyl)amino)-2-methoxy-5-nitrophenyl)-amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **63** (2.0 mmol, 660 mg) und **66** (2.4 mmol, 644 mg) in *i*-PrOH (0.2 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 53% (1.05 mmol, 590 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.12 (d, *J*=6.30 Hz, 6 H) 2.27 (s, 6 H) 2.57 (t, *J*=7.10 Hz, 2 H) 2.89 (s, 3 H) 3.29 (t, *J*=7.10 Hz, 2 H) 3.93 (s, 3 H) 3.97 (s, 3 H) 5.07 (spt, *J*=6.26 Hz, 1 H) 7.16 - 7.23 (m, 1 H) 7.25 - 7.29 (m, 1 H) 7.37 (d, *J*=7.93 Hz, 1 H) 7.73 (br. s., 1 H) 7.76 (s, 1 H) 8.04 (br. s., 1 H) 8.88 (s, 1 H) 9.42 (br. s., 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 21.54, 33.36, 41.00, 45.81, 53.88, 56.07, 56.87, 68.73, 101.42, 103.68, 109.84, 114.74, 117.22, 120.75, 120.91, 121.69, 122.28, 126.55, 129.21, 133.47, 133.59, 137.27, 143.54, 152.47, 159.18, 160.85, 166.38. **DC-MS** (APCI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₉H₃₆N₇O₅]⁺ 562.3, gefunden 526.6.

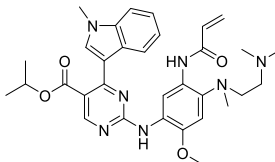
68 – Isopropyl-2-((5-amino-4-((2-(dimethylamino)ethyl)(methyl)amino)-2-methoxyphenyl)-amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Reduktion aromatischer Nitroverbindungen mit **67** (0.90 mmol, 508 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 65% (0.59 mmol, 314 mg) gewonnen. **¹H NMR** (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.23 (d, *J*=6.41 Hz, 6 H) 2.32 (s, 6 H) 2.48 (t, *J*=6.71 Hz, 2 H) 2.67 (s, 3 H) 3.00 (t, *J*=6.71 Hz, 2 H) 3.80 (br. s., 1 H) 3.84 (s, 3 H) 3.87 (s, 3 H) 5.13 (spt, *J*=6.26 Hz, 1 H) 6.70 (s, 1 H) 7.22 - 7.26 (m, 1 H) 7.27 - 7.31 (m, 1 H) 7.37 (d, *J*=7.93 Hz, 1 H) 7.81 (s, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 8.19 (br. s., 2 H) 8.87 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 21.68, 29.66, 33.30, 42.50, 45.56, 54.35, 56.68, 57.44, 68.32, 104.77, 107.09, 109.61, 113.03, 120.85, 121.84, 122.41, 125.73, 127.10, 133.01, 133.42, 136.57, 137.15, 141.05,

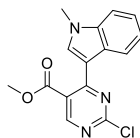
159.67, 160.88, 162.21, 166.22. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{29}H_{38}N_7O_3]^+$ 532.30, gefunden 532.29.

28 – Isopropyl-2-((5-acrylamido-4-((2-(dimethylamino)ethyl)(methyl)amino)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat – Mobocertinib



68 (0.10 mmol, 53 mg) wurde in THF (0.1 M) gelöst und mit DIPEA (0.50 mmol, 87 μ L) versetzt. Bei 0 °C wurde Acryloylchlorid (0.11 mmol, 8.9 μ L) zugegeben und für 1 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrennt und *in vacuo* eingeeignet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) und anschließend mittels präparativer HPLC (C_{18} -Säule, $H_2O:MeCN$) aufgereinigt. Das Produkt konnte als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 49% (49 μ mmol, 29 mg) gewonnen werden. **1H NMR** (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 1.12 (d, $J=6.26$ Hz, 6 H) 2.21 (s, 6 H) 2.33 (br. s., 2 H) 2.72 (s, 3 H) 2.89 (t, $J=5.65$ Hz, 2 H) 3.81 (s, 3 H) 3.87 (s, 3 H) 4.99 (spt, $J=6.26$ Hz, 1 H) 5.77 (dd, $J=10.22$, 1.98 Hz, 1 H) 6.27 (dd, $J=16.94$, 1.98 Hz, 1 H) 6.43 (dd, $J=16.94$, 10.22 Hz, 1 H) 6.99 - 7.09 (m, 2 H) 7.18 (t, $J=7.32$ Hz, 1 H) 7.48 (d, $J=8.24$ Hz, 1 H) 7.72 (br. s., 1 H) 8.17 (br. s., 1 H) 8.65 (s, 1 H) 8.67 (s, 1 H) 8.82 (br. s., 1 H) 10.16 (br. s., 1 H). **^{13}C NMR** (126 MHz, $CHLOROFORM-d$) δ ppm 21.44, 29.66, 33.09, 43.57, 45.32, 56.01, 57.16, 68.52, 104.54, 109.64, 110.86, 114.36, 120.32, 120.41, 121.68, 125.57, 126.21, 126.81, 129.44, 132.66, 135.89, 137.36, 144.66, 159.41, 160.85, 162.07, 162.88, 166.72. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{32}H_{40}N_7O_4]^+$ 586.3136, gefunden 586.3134.

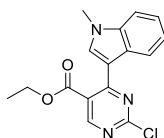
70b – Methyl-2-chloro-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift der Friedel-Crafts-Arylierung mit Methyl-2,4-dichloropyrimidin-5-carboxylat (5.27 mmol, 1.10 g) durchgeführt. Das Produkt

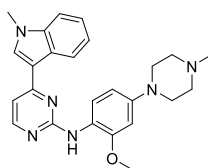
wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 97% (5.10 mmol, 1.54 g) erhalten. **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.87 (s, 3 H) 3.88 (s, 3 H) 7.29 - 7.36 (m, 2 H) 7.37 - 7.40 (m, 1 H) 7.98 (s, 1 H) 8.18 (dt, *J* = 8.25, 0.83 Hz, 1 H) 8.83 (s, 1 H). **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ ppm 33.62, 52.84, 109.94, 111.50, 119.98, 121.76, 122.21, 123.22, 126.66, 134.96, 137.40, 160.61, 162.19, 162.64, 166.70. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₁₅H₁₃ClN₃O₂]⁺ 302.07, gefunden 302.17.

70c – Ethyl-2-chloro-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift der Friedel-Crafts-Arylierung mit Ethyl-2,4-dichloropyrimidin-5-carboxylat (1.0 mmol, 221 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 69% (0.69 mmol, 218 mg) erhalten. **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.25 (t, *J* = 7.15 Hz, 3 H) 3.89 (s, 3 H) 4.34 (q, *J* = 7.21 Hz, 2 H) 7.28 - 7.36 (m, 2 H) 7.37 - 7.40 (m, 1 H) 7.97 (s, 1 H) 8.18 (d, *J* = 8.07 Hz, 1 H) 8.83 (s, 1 H). **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.92, 33.60, 62.08, 109.90, 111.60, 120.43, 121.81, 122.13, 123.20, 126.73, 134.82, 137.38, 160.57, 162.13, 162.59, 166.30. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₁₆H₁₅ClN₃O₂]⁺ 316.08, gefunden 316.14.

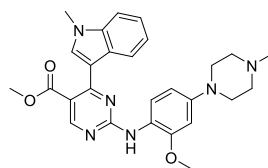
71a – *N*-(2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-amin



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit 3-(2-Chloropyrimidin-4-yl)-1-methyl-1*H*-indol (0.20 mmol, 49 mg) und **38a** (0.24 mmol, 53 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 72% (0.14 mmol, 62 mg) erhalten. **¹H NMR** (700 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 2.40 (s, 3 H) 2.65 (t, *J* = 4.80 Hz, 4 H) 3.22 (t, *J* = 4.80 Hz, 4 H) 3.87 (s, 3 H) 3.91 (s, 3 H) 6.60 (d, *J* = 2.58 Hz, 1 H) 6.63 (dd, *J* = 8.82, 2.58 Hz, 1 H) 7.01 (d, *J* = 5.16 Hz, 1 H) 7.25 - 7.29 (m, 1 H) 7.32 (td, *J* = 7.53, 1.08 Hz, 1 H) 7.38 (d, *J* = 8.17 Hz, 1 H) 7.44 (s, 1 H) 7.80 (s, 1 H) 8.33 (d,

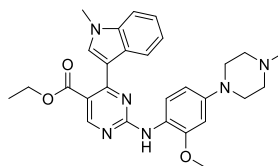
$J = 5.38$ Hz, 1 H) 8.39 (d, $J = 8.82$ Hz, 1 H) 8.40 (d, $J = 7.74$ Hz, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 33.27, 46.01, 50.25, 55.16, 55.65, 100.83, 107.57, 108.35, 109.70, 114.19, 120.29, 121.11, 121.87, 122.46, 123.03, 125.96, 131.13, 137.87, 146.87, 149.23, 157.22, 160.32, 162.20. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}]^+$ 429.2397, gefunden 429.2392.

71b – Methyl-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **70b** (3.0 mmol, 0.91 g) und **38a** (3.6 mmol, 0.80 g) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 95% (2.85 mmol, 1.39 g) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.25 (s, 3 H) 2.49 (t, $J = 4.90$ Hz, 4 H) 3.17 (t, $J = 4.90$ Hz, 4 H) 3.74 (s, 3 H) 3.78 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 6.51 (dd, $J = 8.70, 2.59$ Hz, 1 H) 6.67 (d, $J = 2.44$ Hz, 1 H) 7.04 (br. s., 1 H) 7.21 (t, $J = 7.48$ Hz, 1 H) 7.47 (d, $J = 8.54$ Hz, 2 H) 7.92 (s, 1 H) 7.95 (br. s., 1 H) 8.62 (s, 1 H) 8.67 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 32.97, 45.79, 48.58, 51.83, 54.69, 55.48, 100.02, 106.72, 110.12, 111.31, 119.27, 120.62, 121.96, 122.12, 126.15, 126.52, 134.42, 136.71, 149.72, 153.34, 160.17, 161.24, 161.28, 167.26. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_3]^+$ 487.2452, gefunden 487.2446.

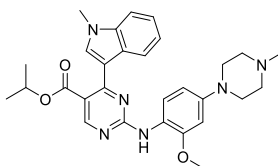
71c – Ethyl-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **70c** (0.10 mmol, 32 mg) und **38a** (0.12 mmol, 27 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 96% (96 μmol , 48 mg) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-

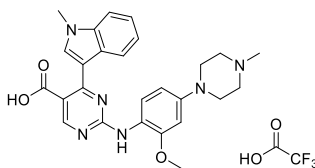
d_6) δ ppm 1.15 (t, $J = 7.17$ Hz, 3 H) 2.23 (s, 3 H) 2.47 (t, $J = 4.90$ Hz, 4 H) 3.16 (t, $J = 4.90$ Hz, 4 H) 3.77 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 4.20 (q, $J = 7.02$ Hz, 2 H) 6.50 (dd, $J = 8.70, 2.59$ Hz, 1 H) 6.66 (d, $J = 2.44$ Hz, 1 H) 7.03 (br. s., 1 H) 7.20 (t, $J = 7.63$ Hz, 1 H) 7.44 - 7.51 (m, 2 H) 7.91 (s, 1 H) 7.93 (br. s., 1 H) 8.62 (s, 1 H) 8.64 (s, 1 H) $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 13.86, 32.94, 45.81, 48.60, 54.70, 55.49, 60.45, 100.01, 106.71, 110.11, 111.39, 119.31, 120.57, 121.93, 122.04, 126.00, 126.55, 134.36, 136.69, 149.68, 153.24, 160.22, 161.21, 161.23, 166.80. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_3]^+$ 501.2609, gefunden 501.2604.

71d – Isopropyl-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



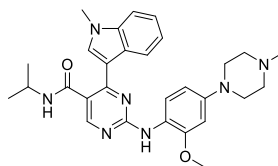
Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chlorpyrimidinen mit **63** (0.10 mmol, 33 mg) und **38a** (0.12 mmol, 27 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 87% (87 μmol , 45 mg) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 1.20 (d, $J = 6.24$ Hz, 6 H) 2.39 (s, 3 H) 2.63 (t, $J = 4.80$ Hz, 4 H) 3.21 (t, $J = 4.80$ Hz, 4 H) 3.87 (s, 3 H) 3.90 (s, 3 H) 5.10 (spt, $J = 6.24$ Hz, 1 H) 6.52 - 6.60 (m, 2 H) 7.17 - 7.23 (m, 1 H) 7.25 - 7.31 (m, 1 H) 7.36 (d, $J = 8.44$ Hz, 1 H) 7.74 (s, 1 H) 7.81 (s, 1 H) 8.04 (d, $J = 8.07$ Hz, 1 H) 8.38 (d, $J = 8.44$ Hz, 1 H) 8.86 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 21.65, 33.26, 46.00, 49.94, 55.08, 55.62, 68.25, 100.38, 108.18, 109.51, 113.24, 113.84, 120.74, 120.81, 121.71, 122.29, 127.05, 133.09, 137.06, 147.58, 149.41, 160.02, 160.93, 162.22, 166.30. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_3]^+$ 515.2765, gefunden 515.2760.

72 – 2-((2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carbonsäure Ditriflat



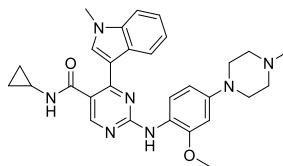
Der Methylester Methyl-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat **71b** (2.80 mmol, 1.36 g) wurde in THF/MeOH gelöst (4:1, 0.1 M) und mit wässriger KOH-Lösung versetzt (1 M, 5.6 mL). Die Reaktion wurde für 16 h bei 80 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde *in vacuo* eingeeengt, in Wasser gelöst (50 mL) und mit TFA auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Um den Überschuss KOH abzutrennen wurde die Lösung mithilfe einer C₁₈-Umkehrphasensäule aufgereinigt. Das Produkt wurde als orangenes, kristallines TFA-Salz in einer quantitativen Ausbeute (2.80 mmol, 1.96 g, entspricht zweifachem Triflat) erhalten. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.88 (s, 3 H) 2.99 (t, *J*=12.20 Hz, 2 H) 3.11 - 3.27 (m, 2 H) 3.55 (d, *J*=11.74 Hz, 2 H) 3.80 (s, 3 H) 3.85 (s, 4 H) 3.98 (br. s., Wasser/TFA) 6.58 (dd, *J*=8.80, 2.45 Hz, 1 H) 6.75 (d, *J*=2.45 Hz, 1 H) 7.05 (t, *J*=7.58 Hz, 1 H) 7.17 - 7.26 (m, 1 H) 7.48 (d, *J*=8.31 Hz, 1 H) 7.58 (d, *J*=8.80 Hz, 1 H) 7.99 (br. s., 1 H) 8.00 (s, 1 H) 8.64 (s, 1 H) 8.70 (s, 1 H) 10.00 (br. s., 1 H). **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₆H₂₉N₆O₃]⁺ 473.23, gefunden 473.46.

73a – N-Isopropyl-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxamid



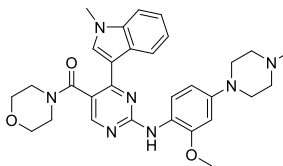
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 μmol, 70 mg), Isopropylamin (150 μmol, 13 μL), TEA (1.0 mmol, 139 μL) und TBTU (120 μmol, 39 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 41% (41 μmol, 21 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.11 (d, *J*=6.71 Hz, 6 H) 2.24 (s, 3 H) 2.48 (br. s., 4 H, mixed with DMSO signal) 3.16 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.78 (s, 3 H) 3.82 (s, 3 H) 3.99 - 4.10 (m, 1 H) 6.51 (dd, *J*=8.70, 2.59 Hz, 1 H) 6.67 (d, *J*=2.60 Hz, 1 H) 7.03 (t, *J*=7.48 Hz, 1 H) 7.18 - 7.24 (m, 1 H) 7.47 (d, *J*=8.24 Hz, 1 H) 7.56 (d, *J*=8.85 Hz, 1 H) 7.82 (s, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 8.20 (br. s., 1 H) 8.21 (s, 1 H) 8.30 (d, *J*=7.93 Hz, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 22.06, 33.02, 40.85, 45.79, 48.73, 54.72, 55.51, 100.17, 106.76, 109.98, 111.42, 118.91, 120.21, 120.48, 122.08, 122.96, 125.32, 126.50, 132.98, 136.78, 149.11, 156.45, 158.51, 160.56, 167.10. **HRMS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₉H₃₆N₇O₂]⁺ 514.2925, gefunden 514.2916.

73b – N-Cyclopropyl-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxamid



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 μ mol, 70 mg), Cyclopropylamin (150 μ mol, 9 mg), TEA (1.0 mmol, 139 μ L) und TBTU (120 μ mol, 39 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 49% (49 μ mol, 25 mg) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.43 - 0.51 (m, 2 H) 0.64 - 0.72 (m, 2 H) 2.28 (s, 3 H) 2.53 (br. s., 5 H) 2.84 (tq, *J*=7.43, 3.97 Hz, 1 H) 3.18 (t, *J*=4.70 Hz, 4 H) 3.78 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 6.51 (dd, *J*=8.80, 2.57 Hz, 1 H) 6.68 (d, *J*=2.57 Hz, 1 H) 7.04 (t, *J*=7.34 Hz, 1 H) 7.18 - 7.26 (m, 1 H) 7.48 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H) 7.55 (d, *J*=8.80 Hz, 1 H) 7.80 (s, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.20 (br. s., 1 H) 8.22 (s, 1 H) 8.47 (d, *J*=4.40 Hz, 1 H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 5.49, 22.85, 33.04, 45.62, 48.62, 54.61, 55.50, 100.19, 106.77, 109.95, 111.35, 118.47, 120.19, 120.49, 122.07, 122.94, 125.37, 126.47, 132.98, 136.77, 149.07, 152.85, 156.37, 158.58, 160.60, 169.25. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₉H₃₄N₇O₂]⁺ 512.27685, gefunden 512.27609.

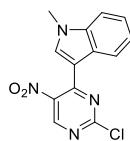
73c – (2-((2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-yl)(morpholino)methanon



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 μ mol, 70 mg), Morpholin (150 μ mol, 13 mg), TEA (1.0 mmol, 139 μ L) und TBTU (120 μ mol, 39 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 62% (62 μ mol, 33 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.26 (s, 3 H) 2.46 - 2.51 (m, 4 H) 2.88 - 3.02 (m, 2 H) 3.17 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.35 (dt, *J*=7.32, 3.36 Hz, 4 H) 3.43 - 3.53 (m, 2 H) 3.55 - 3.70 (m, 4 H) 3.79 (s, 3 H) 3.88 (s, 3 H) 6.52 (dd, *J*=8.70, 2.59 Hz, 1 H) 6.68 (d, *J*=2.44 Hz, 1 H) 7.06 (t, *J*=7.17 Hz, 1 H) 7.21 - 7.28 (m, 1 H) 7.50 (d, *J*=8.24 Hz, 1 H) 7.57 (d, *J*=8.85 Hz, 1 H) 7.64 (s, 1 H) 8.18 (s, 1 H) 8.24 (br. s., 1 H) 8.31 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 33.07, 41.69, 45.76, 46.77, 48.69, 51.61, 54.69, 55.49,

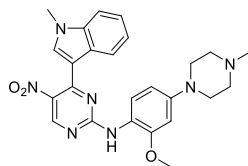
65.62, 65.70, 66.18, 100.13, 106.74, 110.15, 111.18, 116.14, 120.03, 120.72, 122.36, 122.83, 125.49, 126.16, 132.33, 136.91, 149.17, 156.29, 157.90, 160.69, 167.67. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{30}H_{36}N_7O_3]^+$ 542.29, gefunden 542.33.

75 – 3-(2-Chloro-5-nitropyrimidin-4-yl)-1-methyl-1H-indol



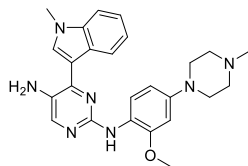
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift der Friedel-Crafts-Arylierung mit 2,4-Dichloro-5-nitropyrimidin (15.00 mmol, 2.91 g) durchgeführt. Das Produkt wurde als roter Feststoff mit einer Ausbeute von 56% (8.47 mmol, 2.45 g) erhalten. **¹H-NMR** (600 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 3.90 (s, 3 H) 7.35 - 7.46 (m, 3 H) 7.86 (s, 1 H) 8.23 (m, 1 H) 8.83 (s, 1 H). **¹³C-NMR** (151 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 33.92, 108.35, 110.26, 122.44, 123.18, 123.98, 126.33, 135.42, 137.53, 140.18, 154.65, 156.05, 161.67. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{13}H_{10}ClN_4O_2]^+$ 289.05, gefunden 289.15.

76 – N-(2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-5-nitropyrimidin-2-amin



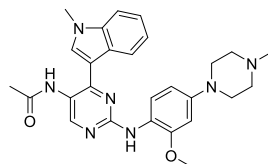
Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **75** (4.25 mmol, 1.23 g) und **38a** (4.25 mmol, 0.94 g) in *n*-BuOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als kristalliner roter Feststoff mit einer Ausbeute von 78% (3.31 mmol, 1.57 g) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.58 (br. s., 3 H) 2.96 (br. s., 4 H) 3.33 (br. s., 4 H) 3.77 (s, 3 H) 3.86 (br. s., 3 H) 6.57 (dd, *J*=8.70, 2.29 Hz, 1 H) 6.72 (br. s., 1 H) 6.97 (br. s., 1 H) 7.23 (br. s., 1 H) 7.36 (d, *J*=8.54 Hz, 1 H) 7.50 (br. s., 1 H) 7.62 (br. s., 1 H) 7.97 (br. s., 1 H) 8.89 (br. s., 1 H) 9.38 (s, 1 H). Durch den starken mesomeren Effekt der Nitro-Gruppe sind einige Peaks zusätzlich aufgespalten oder verbreitert. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{25}H_{28}N_7O_3]^+$ 474.22, gefunden 474.33.

77 – N²-(2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-2,5-diamin



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Reduktion aromatischer Nitroverbindungen mit **76** (3.00 mmol, 1.42 g) durchgeführt. Das Produkt wurde als blassgrüner kristalliner Feststoff mit einer Ausbeute von 95% (2.86 mmol, 1.27 g) erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.23 (s, 3 H) 2.47 (t, *J* = 4.80 Hz, 4 H) 3.09 (t, *J* = 4.80 Hz, 4 H) 3.83 (s, 3 H) 3.87 (s, 3 H) 4.56 (s, 2 H) 6.44 (dd, *J* = 8.70, 2.59 Hz, 1 H) 6.65 (d, *J* = 2.44 Hz, 1 H) 7.10 (t, *J* = 7.50 Hz, 1 H) 7.21 - 7.28 (m, 2 H) 7.50 (d, *J* = 7.93 Hz, 1 H) 7.96 (dd, *J* = 8.70, 1.37 Hz, 1 H) 8.00 - 8.05 (m, 1 H) 8.18 (s, 1 H) 8.43 (d, *J* = 7.93 Hz, 1 H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 32.91, 45.82, 49.18, 54.80, 55.61, 100.35, 106.94, 109.79, 110.86, 120.15, 120.41, 122.12, 122.74, 123.01, 126.61, 130.88, 132.58, 136.60, 145.62, 146.62, 148.36, 149.60, 154.00. HRMS (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₅H₃₀N₇O]⁺ 444.2506, gefunden 444.2496.

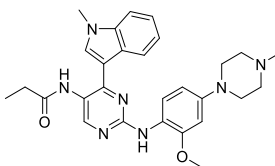
78a – N-(2-((2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-yl)acetamid



77 (150 μmol, 67 mg) wurde in DCM/THF (50:50, 0.05 M) gelöst und mit DIPEA (0.75 mmol, 131 μL) versetzt. Bei 0 °C wurde Acetylchloride (0.23 mmol, 16 μL) hinzugefügt und für 2 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarb-Lösung und DCM getrennt und zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) und anschließender C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) aufgereinigt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 16% (23.7 μmol, 11.5 mg) erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.11 (s, 3 H) 2.24 (s, 3 H) 3.16 (t, *J* = 5.00 Hz, 4 H) 3.79 (s, 3 H) 3.87 (s, 3 H) 6.50 (dd, *J* = 8.54, 2.44 Hz, 1 H) 6.67 (d, *J* = 2.44 Hz, 1 H) 7.04 (t, *J* = 7.48 Hz, 1 H) 7.22 (t, *J* = 7.48 Hz, 1 H) 7.48 (d, *J* = 8.24 Hz, 1 H) 7.59 (d, *J* = 8.54 Hz, 1

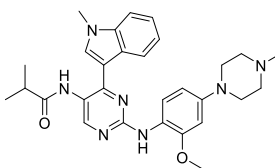
H) 7.99 (s, 1 H) 8.01 (s, 1 H) 8.09 (s, 1 H) 8.29 (d, $J = 7.32$ Hz, 1 H) 9.43 (s, 1 H). Einer der Piperazin Signale (t, 4 H) mit DMSO-Signal vermischt. $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 23.16, 33.06, 45.81, 48.81, 54.74, 55.49, 100.19, 106.78, 109.88, 110.15, 118.73, 120.49, 120.74, 122.16, 123.25, 124.91, 126.63, 133.03, 136.54, 148.82, 152.53, 157.68, 157.81, 159.17, 169.61. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_7\text{O}_2]^+$ 486.2612, gefunden 486.2602.

77b – N-(2-((2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-yl)propionamid



77 (0.15 mmol, 67 mg) wurde in DCM/THF (50:50, 0.05 M) gelöst und mit DIPEA (0.75 mmol, 131 μL) versetzt. Bei 0 °C wurde Propionylchloride (0.15 mmol, 13 μL) hinzugefügt und für 2 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarb-Lösung und DCM getrennt und zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) und anschließender C_{18} -Säule ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$) aufgereinigt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 72% (0.11 mmol, 54 mg) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.12 (t, $J=7.52$ Hz, 3 H) 2.24 (s, 3 H) 2.41 (q, $J=7.46$ Hz, 2 H) 2.47 (t, $J=4.70$ Hz, 6 H) 3.15 (t, $J=4.70$ Hz, 4 H) 3.79 (s, 3 H) 3.86 (s, 3 H) 6.50 (dd, $J=8.62, 2.38$ Hz, 1 H) 6.67 (d, $J=2.57$ Hz, 1 H) 7.04 (t, $J=7.52$ Hz, 1 H) 7.21 - 7.27 (m, 2 H) 7.48 (d, $J=8.44$ Hz, 1 H) 7.62 (d, $J=8.44$ Hz, 1 H) 7.96 (s, 1 H) 7.99 (s, 1 H) 8.10 (s, 1 H) 8.28 (d, $J=7.34$ Hz, 1 H) 9.35 (s, 1 H). **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_2]^+$ 500.2769, gefunden 500.2765.

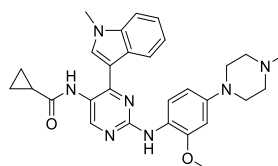
77c – N-(2-((2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-yl)isobutyramid



77 (150 μmol , 67 mg) wurde in DCM/THF (50:50, 0.05 M) gelöst und mit DIPEA (0.75 mmol, 131 μL) versetzt. Bei 0 °C wurde Isobutyrylchloride (0.15 mmol, 13 μL) hinzugefügt und für

2 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarb-Lösung und DCM getrennt und zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) und anschließender C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) aufgereinigt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 49% (74 µmol, 38 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.15 (d, *J*=6.71 Hz, 6 H) 2.26 (s, 3 H) 2.69 (spt, *J*=6.70 Hz, 1 H) 3.17 (t, *J*=4.70 Hz, 4 H) 3.80 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 6.51 (dd, *J*=8.54, 2.44 Hz, 1 H) 6.68 (d, *J*=2.44 Hz, 1 H) 7.05 (t, *J*=7.48 Hz, 1 H) 7.23 (t, *J*=7.63 Hz, 1 H) 7.49 (d, *J*=7.93 Hz, 1 H) 7.62 (d, *J*=8.54 Hz, 1 H) 7.95 (s, 1 H) 8.03 (s, 1 H) 8.08 (s, 1 H) 8.27 (d, *J*=7.63 Hz, 1 H) 9.36 (s, 1 H). Einer der Piperazin Signale (t, 4 H) mit DMSO-Signal vermischt. **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 19.40, 33.05, 34.19, 45.77, 48.79, 54.72, 55.50, 100.20, 106.78, 109.91, 110.30, 118.82, 120.46, 120.77, 122.17, 123.10, 124.72, 126.57, 132.87, 136.51, 148.75, 152.42, 157.79, 158.06, 159.18, 176.23. **HRMS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₉H₃₆N₇O₂]⁺ 514.2925, gefunden 514.2911.

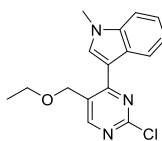
78d – N-(2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-yl)cyclopropanecarboxamid



77 (150 µmol, 67 mg) wurde in DCM/THF (50:50, 0.05 M) gelöst und mit DIPEA (0.75 mmol, 131 µL) versetzt. Bei 0 °C wurde Cyclopropanecarbonylchlorid (0.23 mmol, 20 µL) hinzugefügt und für 2 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarb-Lösung und DCM getrennt und zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) und anschließender C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) aufgereinigt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 73% (109 µmol, 56 mg) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.77 - 0.86 (m, 4 H) 1.85 - 1.94 (m, 1 H) 2.25 (s, 3 H) 2.49 (t, *J*=4.80 Hz, 3 H) 3.16 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.80 (s, 3 H) 3.87 (s, 3 H) 6.51 (dd, *J*=8.44, 2.57 Hz, 1 H) 6.68 (d, *J*=2.57 Hz, 1 H) 7.05 (t, *J*=7.52 Hz, 1 H) 7.20 - 7.28 (m, 1 H) 7.50 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H) 7.61 (d, *J*=8.80 Hz, 1 H) 7.95 (s, 1 H) 8.01 (s, 1 H) 8.10 (s, 1 H) 8.28 (d, *J*=7.34 Hz, 1 H) 9.68 (s, 1 H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 6.65, 13.95, 33.13, 45.79, 48.80, 54.72, 55.48, 100.18, 106.78, 109.87, 110.28,

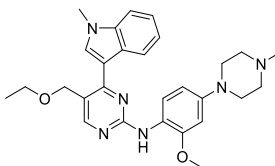
118.75, 120.46, 120.72, 122.16, 123.20, 124.78, 126.59, 132.87, 136.47, 148.77, 152.45, 157.56, 157.86, 159.13, 172.88. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₉H₃₄N₇O₂]⁺ 512.27685, gefunden 512.27591.

80 – 3-(2-Chloro-5-(ethoxymethyl)pyrimidin-4-yl)-1-methyl-1*H*-indol



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift der Friedel-Crafts-Arylierung mit 2,4-Dichloro-5-(ethoxymethyl)pyrimidin (1.0 mmol, 207 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als brauner Feststoff mit einer Ausbeute von 56% (0.57 mmol, 171 g) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.32 (t, *J*=7.02 Hz, 3 H) 3.64 (q, *J*=7.02 Hz, 2 H) 3.91 (s, 3 H) 4.55 (s, 2 H) 7.31 - 7.42 (m, 3 H) 7.93 (s, 1 H) 8.50 (s, 1 H) 8.53 - 8.58 (m, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 15.22, 33.64, 65.59, 68.30, 109.49, 111.30, 122.07, 122.65, 123.31, 124.04, 126.94, 134.20, 137.41, 160.09, 160.32, 164.28. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₆H₁₇ClN₃O]⁺ 302.1, gefunden 301.4.

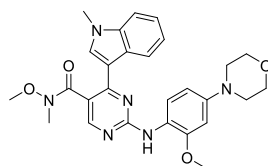
81 – 5-(Ethoxymethyl)-*N*-(2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-amin



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **80** (0.20 mmol, 60 mg) und **38a** (0.24 mmol, 53 mg) in *n*-BuOH (0.2 M) bei 100 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 5% (9.3 μmol, 4.5 mg) erhalten. **¹H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.26 (br. s., 3 H) 3.15 (br. s., 4 H) 3.59 (q, *J*=7.10 Hz, 2 H) 3.80 (s, 3 H) 3.88 (s, 3 H) 4.42 (s, 2 H) 6.47 (dd, *J*=8.60, 2.58 Hz, 1 H) 6.67 (d, *J*=2.58 Hz, 1 H) 7.06 (t, *J*=7.42 Hz, 1 H) 7.23 (td, *J*=7.58, 1.18 Hz, 1 H) 7.50 (d, *J*=8.17 Hz, 1 H) 7.71 (d, *J*=8.60 Hz, 1 H) 7.96 (s, 2 H) 8.28 (d, *J*=6.88 Hz, 1 H) 8.30 (br. s., 1 H), Piperazin (4 H) überdeckt von DMSO. **¹³C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 15.13, 33.09, 45.62, 48.70, 54.61, 55.53, 64.30, 68.12, 100.19, 106.78, 109.86, 111.50, 116.22, 120.37, 120.79, 122.15, 122.76,

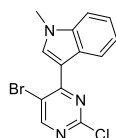
124.10, 126.69, 133.35, 136.94, 148.43, 151.94, 159.72, 160.46, 161.66. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{28}H_{35}N_6O_2]^+$ 487.28, gefunden 487.34.

84 – N-Methoxy-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-N-methyl-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxamid



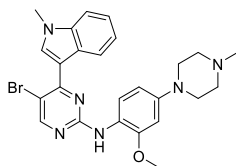
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit 2-((2-Methoxy-4-morpholinophenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carbonsäure (250 μ mol, 115 mg), Weinreb-Amin Hydrochlorid (380 μ mol, 37 mg), TEA (1.25 mmol, 220 μ L) und TBTU (310 μ mol, 100 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 65% (163 μ mol, 82 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{27}H_{31}N_6O_4]^+$ 503.24, gefunden 503.19.

87 – 3-(5-Bromo-2-chloropyrimidin-4-yl)-1-methyl-1H-indol



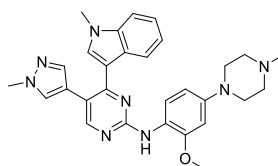
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift der Friedel-Crafts-Arylierung mit 5-Bromo-2,4-dichloropyrimidin (5.00 mmol, 1.14 g) durchgeführt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 42% (2.09 mmol, 0.67 g) erhalten. **¹H-NMR** (600 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 3.91 (s, 3 H) 7.34 - 7.42 (m, 3 H) 8.52 (s, 1 H) 8.60 (s, 1 H) 8.63 - 8.67 (m, 1 H). **¹³C-NMR** (151 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 33.76, 109.64, 110.88, 113.86, 122.45, 123.39, 123.56, 127.07, 134.91, 136.99, 158.95, 161.16, 161.46. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{13}H_{10}BrClN_3]^+$ 321.97, gefunden 322.16.

88 – 5-Bromo-N-(2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-2-amin



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **87** (2.5 mmol, 0.81 g) und **38a** (2.75 mmol, 0.61 g) in *n*-BuOH (0.1 M) bei 110 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 11% (0.26 mmol, 134 mg) erhalten. **¹H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.38 (br. s., 3 H) 2.68 (br. s., 4 H) 3.22 (br. s., 4 H) 3.76 (s, 3 H) 3.89 (s, 3 H) 6.50 (dd, *J*=8.60, 2.15 Hz, 1 H) 6.68 (d, *J*=2.20 Hz, 1 H) 7.02 (br. t, *J*=7.60, 7.60 Hz, 1 H) 7.23 (t, *J*=7.64 Hz, 1 H) 7.45 (d, *J*=8.60 Hz, 1 H) 7.49 (d, *J*=8.17 Hz, 1 H) 8.19 (br. s., 1 H) 8.29 (s, 1 H) 8.41 (s, 1 H) 8.56 (s, 1 H). **¹³C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 33.57, 45.44, 48.64, 54.69, 55.97, 100.82, 103.38, 107.37, 110.47, 111.30, 120.74, 121.17, 122.83, 123.82, 126.53, 127.20, 134.74, 137.01, 149.60, 153.85, 159.09, 160.27, 160.46. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₅H₂₈BrN₆O]⁺ 507.15, gefunden 507.32.

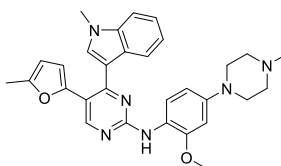
89a – N-(2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)pyrimidin-2-amin



5-Bromo-*N*-(2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-2-amin **88** (50.0 μmol, 25 mg) und 1-Methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1H-pyrazol (75.0 μmol, 16 mg) wurden in Dioxan gelöst (0.05 M) und 15 min im Ar-Strom entgast. K₂CO₃ (100.0 μmol, 14 mg) und Pd(PPh₃)₄ (5.0 μmol, 6 mg) wurden hinzugefügt und die Reaktion wurde 16 h bei 100 °C gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) und anschließender C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) aufgereinigt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 24% (11.8 μmol, 6 mg) erhalten. **¹H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.25 (s, 3 H) 2.49 (t, *J* = 4.60 Hz, 3 H) 3.14 (t, *J* = 4.60 Hz, 4 H) 3.64 (s, 3 H) 3.83 (s, 3 H) 3.94 (s, 3 H) 6.44 - 6.49 (m, 2 H) 6.67 (d, *J* = 2.37 Hz, 1 H) 7.11 (t, *J* = 7.53 Hz, 1 H) 7.25 (t, *J* = 7.50 Hz, 1 H) 7.54 (d, *J* = 8.17 Hz, 1 H) 7.63 (s, 1 H) 7.69 (d, *J* = 8.82 Hz, 1 H) 7.83 (s, 1 H) 8.06 (s, 1 H) 8.11 (d, *J* = 5.38 Hz, 1 H) 8.22 (d, *J* = 7.53 Hz, 1 H). **¹³C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 30.52, 38.73, 45.74, 48.82, 54.69, 55.57, 100.12, 106.79, 109.22, 110.06, 110.55, 111.71, 120.63, 120.90, 121.40, 122.20, 123.31, 125.94,

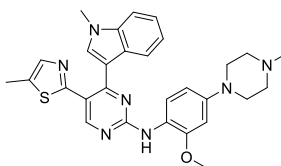
131.94, 133.83, 136.90, 139.61, 148.08, 151.29, 156.67, 160.74, 162.43. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{29}H_{33}N_8O]^+$ 509.2772, gefunden 509.2764.

89b – N-(2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-5-(5-methylfuran-2-yl)pyrimidin-2-amin



5-Bromo-N-(2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-2-amin **88** (50.0 μ mol, 25 mg) und 4,4,5,5-Tetramethyl-2-(5-methylfuran-2-yl)-1,3,2-dioxaborolan (75.0 μ mol, 16 mg) wurden in Dioxan gelöst (0.05 M) und 15 min im Ar-Strom entgast. K_2CO_3 (100.0 μ mol, 14 mg) und $Pd(PPh_3)_4$ (5.0 μ mol, 6 mg) wurden hinzugefügt und die Reaktion wurde 16 h bei 100 °C gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) und anschließender C_{18} -Säule (H_2O :MeCN) aufgereinigt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 20% (9.8 μ mol, 5 mg) erhalten. **1H NMR** (600 MHz, METHANOL- d_4) δ ppm 2.35 (s, 3 H) 3.01 (s, 3 H) 3.14 (br. s., 2 H) 3.66 (br. s., 2 H) 3.77 (s, 3 H) 3.89 (s, 3 H) 3.96 (br. s., 2 H) 6.25 - 6.29 (m, 1 H) 6.46 - 6.50 (m, 1 H) 6.73 (dd, $J=8.62, 2.38$ Hz, 1 H) 6.74 - 6.78 (m, 1 H) 6.84 - 6.85 (m, 1 H) 7.13 (t, $J=7.34$ Hz, 1 H) 7.29 (t, $J=7.70$ Hz, 1 H) 7.46 (d, $J=8.07$ Hz, 1 H) 7.59 - 7.67 (m, 1 H) 8.04 (br. s., 1 H) 8.26 (br. s., 1 H). **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{30}H_{33}N_6O_2]^+$ 509.2660, gefunden 509.2652.

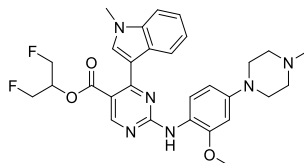
N-(2-Methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-5-(5-methylthiazol-2-yl)pyrimidin-2-amin



Das Arylbromid **88** (0.10 mmol, 50,7 mg) wird in DMF (0.1 M) gelöst und mit 5-Methyl-2-(tributylstannyl)thiazol (0.12 mmol, 46.6 mg) und Pd-Tetrakis (0.01 mmol, 11.6 mg) versetzt. Das Gemisch wird für 15min mit Argon entgast und anschließend über eine Stunde von 80-

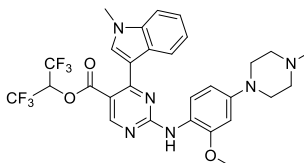
110°C in der Mikrowelle erhitzt. Per LC-MS Analyse konnte keine Produktbildung beobachtet werden.

90a – 1,3-Difluoropropan-2-yl 2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 µmol, 70 mg), 1,3-Difluoropropanol (150 µmol, 14 mg), TEA (1.0 mmol, 139 µL) und TBTU (120 µmol, 39 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 32% (32 µmol, 18 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.25 (s, 3 H) 3.18 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.77 (s, 3 H) 3.82 (s, 3 H) 4.57 - 4.81 (m, 4 H) 5.34 - 5.50 (m, 1 H) 6.51 (dd, *J*=8.70, 2.59 Hz, 1 H) 6.67 (d, *J*=2.44 Hz, 1 H) 7.02 (br. s., 1 H) 7.20 (t, *J*=7.48 Hz, 1 H) 7.40 - 7.45 (m, 1 H) 7.47 (d, *J*=8.54 Hz, 1 H) 7.90 (br. s., 1 H) 7.93 (s, 1 H) 8.66 (s, 1 H) 8.79 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 32.94, 45.73, 48.52, 54.64, 55.49, 70.78 (t, *J*=19.50 Hz, 1 C) 81.09 (dd, *J*=168.00, 8.00 Hz, 2 C) 100.02, 106.70, 110.12, 111.02, 119.11, 120.62, 122.00, 122.24, 126.51, 134.75, 136.72, 149.89, 160.66, 161.47, 161.57, 165.92. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₉H₃₃F₂N₆O₃]⁺ 551.26, gefunden 551.32.

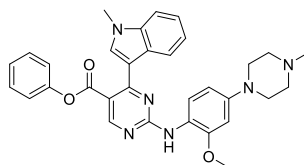
90b – 1,1,1,3,3,3-Hexafluoropropan-2-yl 2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 µmol, 70 mg), 1,1,1,3,3,3-Hexafluoropropan-2-ol (500 µmol, 53 µL), TEA (1.0 mmol, 139 µL) und TBTU (120 µmol, 39 mg) durchgeführt. Zusätzlich wurden katalytische Mengen DMAP (10 µmol, 1.2 mg) zugesetzt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 75% (75 µmol, 47 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.24 (s, 3 H) 2.48 (t, *J*=4.80 Hz, 3 H) 3.19 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.77 (s, 3 H) 3.83 (br. s., 3 H) 6.51 (dd, *J*=8.85, 2.44 Hz, 1 H) 6.68 (br. s., 1 H) 6.88 - 7.08 (m, 2 H) 7.22 (br. s.,

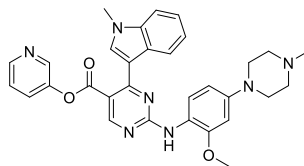
1 H) 7.38 (d, $J=8.85$ Hz, 1 H) 7.49 (br. s., 1 H) 7.73 (br. s., 1 H) 7.92 (s, 1 H) 8.77 (br. s., 1 H) 9.19 (s, 1 H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) d ppm 33.06, 45.79, 48.47, 54.67, 55.47, 65.60, 65.87, 66.14, 99.92, 106.68, 110.24, 110.95, 118.43, 120.83, 122.18, 126.45, 136.73, 161.52, 161.86, 162.43. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_3]^+$ 623.22, gefunden 623.29.

90c - Phenyl 2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 μmol , 70 mg), Phenol (150 μmol , 14 mg), TEA (1.0 mmol, 139 μL) und TBTU (120 μmol , 39 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 56% (56 μmol , 31 mg) erhalten. ^1H NMR (600 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) d ppm 2.42 (s, 3 H) 2.67 (t, $J=4.80$ Hz, 4 H) 3.24 (t, $J=4.80$ Hz, 4 H) 3.85 (s, 3 H) 3.92 (s, 3 H) 6.56 (d, $J=8.44$ Hz, 1 H) 6.58 (d, $J=2.57$ Hz, 1 H) 7.04 (d, $J=7.70$ Hz, 2 H) 7.21 - 7.26 (m, 2 H) 7.29 - 7.32 (m, 1 H) 7.35 - 7.40 (m, 3 H) 7.83 (s, 1 H) 7.95 (s, 1 H) 8.18 (d, $J=8.07$ Hz, 1 H) 8.34 - 8.48 (m, 1 H) 9.14 (s, 1 H). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) d ppm 33.35, 46.00, 49.82, 55.10, 55.68, 100.34, 108.25, 109.63, 111.88, 112.86, 121.06, 121.13, 121.44, 121.72, 121.98, 122.48, 125.74, 127.21, 129.37, 134.03, 137.10, 147.79, 149.57, 150.75, 160.25, 162.01, 163.34, 164.98. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_3]^+$ 549.26087, gefunden 549.26014.

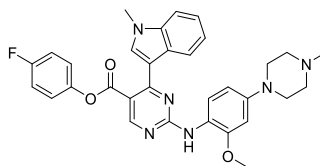
90d – Pyridin-3-yl 2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 μmol , 70 mg), 3-Hydroxypyridin (150 μmol , 14 mg), TEA (1.0 mmol, 139 μL) und TBTU (120 μmol , 39 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 54% (54 μmol , 30 mg) erhalten. ^1H NMR (700 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) d ppm

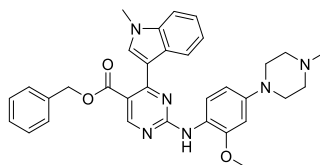
2.40 (s, 3 H) 2.64 (t, $J=4.80$ Hz, 4 H) 3.23 (t, $J=4.80$ Hz, 4 H) 3.87 (s, 3 H) 3.92 (s, 3 H) 6.57 (d, $J=7.31$ Hz, 1 H) 6.58 (d, $J=2.58$ Hz, 1 H) 7.23 (t, $J=7.42$ Hz, 1 H) 7.28 - 7.34 (m, 2 H) 7.39 (d, $J=8.17$ Hz, 2 H) 7.86 (s, 1 H) 7.90 (s, 1 H) 8.08 (d, $J=7.96$ Hz, 1 H) 8.28 (br. d, $J=2.20$ Hz, 1 H) 8.39 (br. s., 1 H) 8.46 (dd, $J=4.73, 1.29$ Hz, 1 H) 9.14 (br. s., 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 33.39, 46.05, 49.84, 55.10, 55.69, 100.26, 108.14, 109.80, 121.14, 121.25, 122.62, 123.76, 127.07, 129.40, 133.65, 137.14, 143.59, 146.77, 147.43, 148.06, 149.66, 160.34, 162.17, 163.50, 164.47. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_7\text{O}_3]^+$ 550.26, gefunden 550.21.

90e – 4-Fluorophenyl 2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 μmol , 70 mg), 4-Fluorophenol (150 μmol , 14 mg), TEA (1.0 mmol, 139 μL) und TBTU (120 μmol , 39 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 86% (86 μmol , 49 mg) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.26 (s, 3 H) 2.51 (br. s., 4 H) 3.19 (br. s., 4 H) 3.79 (s, 3 H) 3.84 (s, 3 H) 6.52 (d, $J=8.60$ Hz, 1 H) 6.68 (br. s., 1 H) 7.04 (br. s., 1 H) 7.21 (br. s., 1 H) 7.26 (d, $J=6.67$ Hz, 4 H) 7.44 - 7.51 (m, 2 H) 7.92 (br. s., 1 H) 8.09 (s, 1 H) 8.85 (s, 1 H) 8.91 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 32.95, 45.65, 48.46, 54.59, 55.51, 100.02, 106.72, 110.16, 111.38, 115.89, 116.02, 119.04, 120.67, 121.99, 123.77, 123.82, 126.24, 126.54, 134.78, 136.70, 146.60, 146.62, 149.82, 153.45, 158.88, 160.26, 161.41, 161.49, 162.21, 165.00. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{FN}_6\text{O}_3]^+$ 567.25, gefunden 567.27.

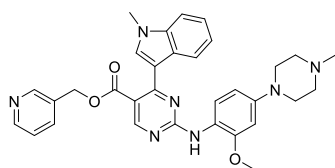
90f – Benzyl-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 μmol , 70 mg), Benzylalkohol (150 μmol , 16 mg), TEA (1.0 mmol, 139 μL) und

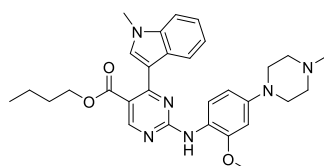
TBTU (120 μ mol, 39 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 42% (42 μ mol, 23 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 2.41 (s, 3 H) 2.66 (t, $J=4.70$ Hz, 4 H) 3.23 (t, $J=4.70$ Hz, 4 H) 3.76 (s, 3 H) 3.89 (s, 3 H) 5.20 (s, 2 H) 6.51 - 6.60 (m, 2 H) 7.15 - 7.24 (m, 3 H) 7.27 - 7.39 (m, 5 H) 7.67 (s, 1 H) 7.75 (s, 1 H) 8.05 (d, $J=7.93$ Hz, 1 H) 8.37 (d, $J=8.24$ Hz, 1 H) 8.92 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 33.20, 45.88, 49.80, 54.98, 55.61, 66.58, 100.38, 108.23, 109.56, 113.02, 120.82, 120.97, 121.62, 122.34, 126.91, 126.94, 128.10, 128.25, 128.40, 133.27, 135.69, 137.06, 147.55, 149.43, 160.05, 161.16, 162.47, 166.62. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₃₃H₃₅N₆O₃]⁺ 563.28, gefunden 563.25.

90g – Pyridin-3-ylmethyl 2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



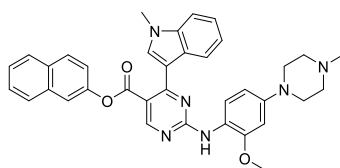
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 μ mol, 70 mg), *m*-Pyridinmethanol (150 μ mol, 16 mg), TEA (1.0 mmol, 139 μ L) und TBTU (120 μ mol, 39 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 55% (55 μ mol, 31 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 2.40 (s, 3 H) 2.66 (t, $J=4.80$ Hz, 4 H) 3.22 (t, $J=4.80$ Hz, 4 H) 3.80 (s, 3 H) 3.89 (s, 3 H) 5.15 (s, 2 H) 6.52 - 6.58 (m, 2 H) 7.14 - 7.22 (m, 2 H) 7.24 - 7.31 (m, 1 H) 7.32 - 7.36 (m, 1 H) 7.36 - 7.41 (m, 1 H) 7.67 (s, 1 H) 7.78 (s, 1 H) 7.92 (d, $J=7.93$ Hz, 1 H) 8.31 - 8.40 (m, 2 H) 8.53 (dd, $J=4.88, 1.53$ Hz, 1 H) 8.91 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 33.25, 45.87, 49.75, 54.97, 55.61, 64.04, 100.34, 108.19, 109.70, 113.40, 120.79, 120.98, 121.17, 121.48, 122.39, 123.26, 126.84, 131.23, 132.84, 134.67, 136.02, 137.05, 147.63, 148.85, 149.44, 149.62, 160.10, 161.26, 162.53, 166.47. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₃₂H₃₄N₇O₃]⁺ 564.27, gefunden 564.23.

90h - Butyl 2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



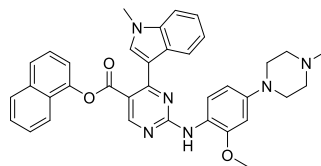
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 μmol , 70 mg), *n*-BuOH (0.5 mL), TEA (1.0 mmol, 139 μL) und TBTU (120 μmol , 39 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 59% (59 μmol , 31 mg) erhalten. **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.82 (t, $J=7.30$ Hz, 3 H) 1.11 - 1.26 (m, 3 H) 1.40 - 1.54 (m, 2 H) 2.25 (s, 3 H) 2.49 (t, $J=5.00$ Hz, 4 H) 3.17 (t, $J=5.00$ Hz, 4 H) 3.79 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 4.14 (t, $J=6.60$ Hz, 2 H) 6.51 (dd, $J=8.80, 2.45$ Hz, 1 H) 6.67 (d, $J=2.45$ Hz, 1 H) 7.05 (t, $J=6.36$ Hz, 1 H) 7.21 (t, $J=7.34$ Hz, 1 H) 7.48 (d, $J=8.31$ Hz, 1 H) 7.51 (d, $J=8.80$ Hz, 1 H) 7.91 (s, 1 H) 7.92 (br. s., 1 H) 8.62 (s, 1 H) 8.62 (s, 1 H). **$^{13}\text{C NMR}$** (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 13.54, 18.58, 29.90, 32.90, 45.76, 48.57, 54.66, 55.49, 64.15, 100.02, 106.71, 110.06, 111.58, 119.32, 120.51, 121.82, 121.90, 125.83, 126.51, 134.09, 136.70, 149.59, 153.14, 160.12, 161.18, 161.22, 166.83. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_3]^+$ 529.29, gefunden 529.34.

90i – Naphthalen-2-yl 2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



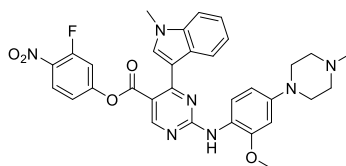
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 μmol , 70 mg), 2-Naphthol (1.0 mmol, 144 mg), TEA (1.0 mmol, 139 μL) und TBTU (120 μmol , 39 mg) durchgeführt. Zusätzlich wurde DMAP in katalytischen Mengen zugegeben. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 74% (74 μmol , 44 mg) erhalten. **$^1\text{H NMR}$** (500 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 2.43 (s, 3 H) 2.69 (t, $J=4.80$ Hz, 4 H) 3.25 (t, $J=4.80$ Hz, 4 H) 3.84 (s, 3 H) 3.92 (s, 3 H) 6.57 (d, $J=9.46$ Hz, 1 H) 6.58 - 6.61 (m, 1 H) 7.19 (dd, $J=8.85, 2.14$ Hz, 1 H) 7.22 - 7.27 (m, 1 H) 7.30 - 7.36 (m, 1 H) 7.36 - 7.41 (m, 1 H) 7.42 - 7.52 (m, 3 H) 7.74 - 7.79 (m, 1 H) 7.84 (d, $J=8.55$ Hz, 2 H) 7.88 (s, 1 H) 7.97 (s, 1 H) 8.20 (d, $J=7.93$ Hz, 1 H) 8.43 (d, $J=7.63$ Hz, 1 H) 9.20 (s, 1 H). **$^{13}\text{C NMR}$** (126 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 33.33, 45.84, 49.68, 54.97, 55.65, 100.32, 108.25, 109.67, 118.67, 121.01, 121.16, 121.22, 121.45, 122.47, 125.62, 126.45, 127.19, 127.59, 127.69, 129.24, 131.34, 133.66, 134.01, 137.07, 147.68, 148.31, 149.53, 160.22, 162.04, 163.33, 165.16. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_3]^+$ 599.28, gefunden 599.24.

90j – Naphthalen-1-yl 2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **72** (100 μ mol, 70 mg), 1-Naphthol (1.0 mmol, 144 mg), TEA (1.0 mmol, 139 μ L) und TBTU (120 μ mol, 39 mg) durchgeführt. Zusätzlich wurde DMAP in katalytischen Mengen zugegeben. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 69% (69 μ mol, 41 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 2.44 (s, 3 H) 2.70 (t, $J=4.80$ Hz, 4 H) 3.27 (t, $J=4.80$ Hz, 4 H) 3.78 (s, 3 H) 3.93 (s, 3 H) 6.57 (d, $J=7.93$ Hz, 1 H) 6.60 (d, $J=2.44$ Hz, 1 H) 7.22 - 7.27 (m, 1 H) 7.27 - 7.33 (m, 2 H) 7.33 - 7.37 (m, 1 H) 7.44 - 7.53 (m, 3 H) 7.76 (d, $J=8.54$ Hz, 1 H) 7.82 - 7.86 (m, 1 H) 7.86 - 7.91 (m, 2 H) 8.00 (s, 1 H) 8.26 - 8.33 (m, 1 H) 8.44 (d, $J=7.02$ Hz, 1 H) 9.37 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 33.31, 45.79, 49.66, 54.93, 55.68, 100.35, 108.34, 109.59, 118.17, 121.14, 121.18, 121.27, 121.43, 122.49, 125.40, 125.92, 126.40, 126.99, 127.25, 127.98, 134.61, 137.06, 146.69, 147.73, 149.60, 160.30, 162.11, 163.73, 164.80. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₃₆H₃₅N₆O₃]⁺ 599.28, gefunden 599.23.

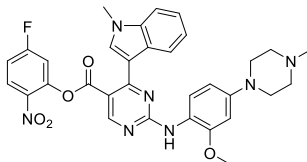
91 – 3-Fluoro-4-nitrophenyl-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach dem allgemeinen Syntheschema zur Amid- und Ester-Kupplung durchgeführt. **72** (100 μ mol, 70 mg) wurde in DCM (0.1 M) gelöst und mit TEA (1.00 mmol, 140 μ L) versetzt. Anschließend wurde TBTU (120 μ mol, 39 mg) zugegeben und für 10 min gerührt. Anschließend wurde 3-Fluoro-4-nitrophenol (0.50 mmol, 79 mg) zugegeben und für 2 h bei Rt gerührt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 69% (69 μ mol, 42 mg) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.25 (s, 3 H) 2.49 (t, $J=4.70$ Hz, 5 H) 3.19 (t, $J=4.70$ Hz, 4 H) 3.78 (s, 3 H) 3.84 (s, 3 H) 6.52 (dd, $J=8.80, 2.57$ Hz, 1 H) 6.62 - 6.73 (m, 1 H) 7.21 (br. s., 1 H) 7.39 (d, $J=8.44$ Hz, 1 H) 7.43 (d, $J=8.80$ Hz, 1 H) 7.47

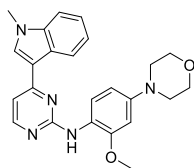
(d, $J=6.97$ Hz, 1 H) 7.67 (d, $J=10.64$ Hz, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.27 (t, $J=8.80$ Hz, 1 H) 8.96 (s, 1 H) 9.00 (s, 1 H). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{32}H_{31}FN_7O_5]^+$ 612.24, gefunden 612.08.

92 – 5-Fluoro-2-nitrophenyl-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach dem allgemeinen Syntheschema zur Amid- und Ester-Kupplung durchgeführt. **72** (100 μ mol, 70 mg) wurde in DCM (0.1 M) gelöst und mit TEA (1.00 mmol, 140 μ L) versetzt. Anschließend wurde TBTU (120 μ mol, 39 mg) zugegeben und für 10 min gerührt. Anschließend wurde 2-Nitro-3-fluorphenol (0.50 mmol, 79 mg) zugegeben und für 2 h bei Rt gerührt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 65% (65 μ mol, 40 mg) erhalten. **1H NMR** (600 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.25 (s, 3 H) 2.49 (t, $J=4.70$ Hz, 4 H) 3.19 (t, $J=4.70$ Hz, 4 H) 3.78 (s, 3 H) 3.82 (br. s., 3 H) 6.53 (dd, $J=8.44, 2.57$ Hz, 1 H) 6.69 (br. s., 1 H) 7.21 (br. s., 1 H) 7.39 (d, $J=8.44$ Hz, 1 H) 7.47 (ddd, $J=9.17, 7.70, 2.57$ Hz, 2 H) 7.68 (br. s., 1 H) 8.08 (s, 1 H) 8.31 (dd, $J=9.17, 5.87$ Hz, 1 H) 8.99 (br. s., 1 H) 9.10 (s, 1 H). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{32}H_{31}FN_7O_5]^+$ 612.24, gefunden 612.14.

93a – N-(2-Methoxy-4-morpholinophenyl)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-amin

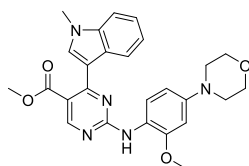


Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit 3-(2-Chloropyrimidin-4-yl)-1-methyl-1*H*-indol (0.20 mmol, 49 mg) und **38b** (0.24 mmol, 50 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 44% (87 μ mol, 36 mg) erhalten. **1H NMR** (400 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 3.12 - 3.21 (m, 4 H) 3.86 - 3.96 (m, 11 H) 6.55 - 6.66 (m, 2 H) 7.02 (d, $J=5.38$ Hz, 1 H) 7.23 - 7.42 (m, 4 H) 7.57 (br. s., 1 H) 7.83 (s, 1 H) 8.32 (d, $J=5.38$ Hz, 1 H) 8.35 - 8.43 (m, 2 H). **^{13}C NMR** (101 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 33.32, 50.59, 55.67, 67.01, 100.37, 107.50, 107.92, 109.76,

114.06, 120.55, 121.22, 121.91, 122.56, 122.99, 125.95, 131.36, 137.90, 147.08, 149.46.

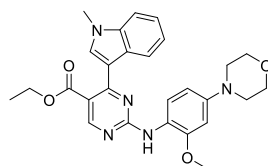
HRMS (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{24}H_{26}N_5O_2]^+$ 416.20810, gefunden 416.20743.

93b – Methyl-2-((2-methoxy-4-morpholinophenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **70b** (1.0 mmol, 302 mg) und **38b** (1.2 mmol, 250 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 80% (0.8 mmol, 380 mg) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.14 (t, *J*=4.70 Hz, 4 H) 3.74 (s, 3 H) 3.77 (t, *J*=4.70 Hz, 4 H) 3.78 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 6.51 (dd, *J*=8.80, 2.57 Hz, 1 H) 6.68 (d, *J*=2.20 Hz, 1 H) 7.04 (br. s., 1 H) 7.21 (t, *J*=7.52 Hz, 1 H) 7.47 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H) 7.51 (d, *J*=8.44 Hz, 1 H) 7.91 (s, 1 H) 7.95 (br. s., 1 H) 8.62 (s, 1 H) 8.65 (s, 1 H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 32.93, 48.99, 51.80, 55.50, 66.15, 99.84, 106.47, 110.09, 111.30, 111.65, 119.64, 120.61, 121.95, 122.06, 125.99, 126.49, 134.37, 136.69, 149.69, 153.27, 160.13, 161.20, 167.21. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{26}H_{28}N_5O_4]^+$ 474.21358, gefunden 474.21290.

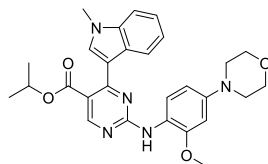
93c – Ethyl-2-((2-methoxy-4-morpholinophenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **70c** (1.75 mmol, 553 mg) und **38b** (1.93 mmol, 401 mg) in *n*-BuOH (0.1 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 83% (1.45 mmol, 705 mg) erhalten. **¹H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.16 (t, *J*=7.10 Hz, 3 H) 3.12 - 3.18 (m, 4 H) 3.76 - 3.78 (m, 4 H) 3.79 (s, 3 H) 3.86 (s, 3 H) 4.21 (q, *J*=7.10 Hz, 2 H) 6.52 (dd, *J*=8.60, 2.58 Hz, 1 H) 6.69 (d, *J*=2.58 Hz, 1 H) 7.05 (br. s., 1 H) 7.22 (t, *J*=7.53 Hz, 1 H) 7.48 (d, *J*=8.17 Hz, 1 H) 7.53 (d, *J*=8.60 Hz, 1 H) 7.92 (s, 1 H) 7.94 (br. s., 1 H) 8.63 (d, *J*=4.09 Hz, 2 H). **¹³C NMR**

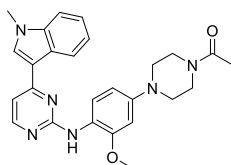
(176 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 13.81, 32.91, 49.00, 55.52, 60.42, 66.14, 99.85, 106.47, 110.08, 111.39, 119.68, 120.53, 121.91, 126.51, 134.28, 136.67, 149.63, 160.15, 161.17, 166.74. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₇H₃₀N₅O₄]⁺ 488.23, gefunden 488.21.

93d – Isopropyl-2-((2-methoxy-4-morpholinophenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **63** (0.10 mmol, 33 mg) und **38b** (0.12 mmol, 25 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 69% (69 μ mol, 35 mg) erhalten. **¹H NMR** (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.21 (d, *J*=6.36 Hz, 6 H) 3.15 (t, *J*=4.80 Hz, 4 H) 3.86 - 3.92 (m, 10 H) 5.11 (spt, *J*=6.28 Hz, 1 H) 6.50 - 6.59 (m, 2 H) 7.20 (t, *J*=7.09 Hz, 1 H) 7.25 - 7.32 (m, 1 H) 7.34 - 7.39 (m, 1 H) 7.78 (s, 1 H) 7.82 (s, 1 H) 8.05 (d, *J*=8.31 Hz, 1 H) 8.40 (d, *J*=8.31 Hz, 1 H) 8.86 (s, 1 H). **¹³C NMR** (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 21.66, 33.29, 50.34, 55.66, 66.92, 68.31, 100.03, 107.86, 109.53, 113.20, 113.90, 120.81, 120.84, 121.78, 121.98, 122.33, 127.06, 133.19, 137.08, 147.56, 149.49, 159.93, 160.81, 162.25, 166.25. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₈H₃₂N₅O₄]⁺ 502.24488, gefunden 502.24417.

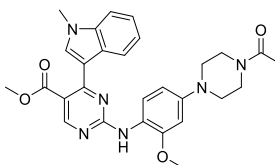
94a – 1-(4-(3-Methoxy-4-((4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)phenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-on



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit 3-(2-Chloropyrimidin-4-yl)-1-methyl-1*H*-indol (0.20 mmol, 49 mg) und **38c** (0.22 mmol, 55 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 65% (0.13 μ mol, 59 mg) erhalten. **¹H NMR** (700 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 2.16 (s, 3 H) 3.15 (dt, *J*=19.20, 5.14 Hz, 4 H) 3.64 - 3.67 (m, 2 H) 3.79 - 3.83 (m, 2 H) 3.89 (s, 3 H) 3.92 (s, 3 H) 6.57 - 6.64 (m, 2 H) 7.03 (d, *J*=5.38 Hz, 1 H) 7.24 - 7.30 (m, 2 H) 7.33 (td, *J*=7.58, 0.97

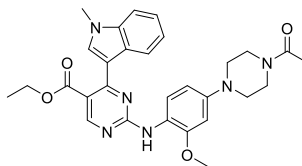
Hz, 1 H) 7.39 (d, $J=8.17$ Hz, 1 H) 7.63 (br. s., 1 H) 7.84 (br. s., 1 H) 8.31 (d, $J=5.38$ Hz, 1 H) 8.36 - 8.41 (m, 2 H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, CHLOROFORM- d) d ppm 21.35, 33.36, 41.49, 46.38, 50.66, 50.98, 55.71, 101.42, 107.55, 108.89, 109.80, 114.00, 120.45, 121.28, 121.89, 122.63, 123.48, 125.94, 131.47, 137.92, 146.71, 149.45, 156.61, 159.79, 162.42, 168.97. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_2]^+$ 457.23465, gefunden 457.23396.

94b – Methyl-2-((4-(4-acetylpiperazin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **70b** (0.20 mmol, 60 mg) und **38c** (0.22 mmol, 55 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff in quantitativer Ausbeute (0.20 mmol, 103 mg) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, DMSO- d_6) d ppm 2.05 (s, 3 H) 3.07 - 3.21 (m, 4 H) 3.54 - 3.65 (m, 4 H) 3.74 (s, 3 H) 3.79 (s, 3 H) 3.84 (s, 3 H) 6.52 (dd, $J=8.71, 2.26$ Hz, 1 H) 6.67 - 6.76 (m, 1 H) 7.05 (br. s., 1 H) 7.21 (t, $J=7.42$ Hz, 1 H) 7.47 (d, $J=8.17$ Hz, 1 H) 7.54 (d, $J=8.60$ Hz, 1 H) 7.91 (s, 1 H) 7.97 (br. s., 1 H) 8.63 (s, 1 H) 8.64 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, DMSO- d_6) d ppm 21.19, 32.93, 40.74, 45.52, 48.97, 49.28, 51.80, 55.55, 100.73, 107.29, 110.11, 111.34, 111.73, 119.93, 120.61, 121.97, 122.01, 125.79, 126.49, 134.38, 136.71, 149.36, 153.11, 160.14, 161.13, 161.24, 167.20, 168.27. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_4]^+$ 515.24013, gefunden 515.23929.

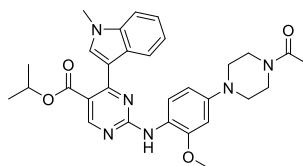
94c – Ethyl-2-((4-(4-acetylpiperazin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **70c** (0.50 mmol, 158 mg) und **38c** (0.55 mmol, 137 mg) in *n*-BuOH (0.1 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 67% (0.33 mmol, 177 mg) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (700

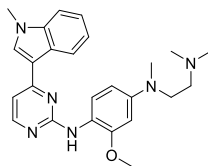
MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.15 (t, *J*=7.10 Hz, 3 H) 2.06 (s, 3 H) 3.09 - 3.14 (m, 2 H) 3.15 - 3.21 (m, 2 H) 3.57 - 3.63 (m, 4 H) 3.79 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 4.20 (q, *J*=7.10 Hz, 2 H) 6.53 (dd, *J*=8.60, 2.58 Hz, 1 H) 6.71 (d, *J*=2.37 Hz, 1 H) 7.04 (br. s., 1 H) 7.21 (t, *J*=7.53 Hz, 1 H) 7.48 (d, *J*=8.17 Hz, 1 H) 7.54 (d, *J*=8.60 Hz, 1 H) 7.91 (s, 1 H) 7.94 (br. s., 1 H) 8.62 (d, *J*=3.44 Hz, 2 H). ¹³C NMR (176 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 14.31, 21.70, 33.41, 41.22, 46.01, 49.46, 49.78, 56.05, 60.92, 101.24, 107.77, 110.59, 111.88, 120.34, 120.43, 121.03, 122.41, 126.24, 126.99, 134.78, 137.17, 149.83, 153.60, 160.65, 161.60, 161.67, 167.23, 168.74. **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₉H₃₃N₆O₄]⁺ 529.26, gefunden 529.30.

94d – Isopropyl-2-((4-(4-acetylpiperazin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



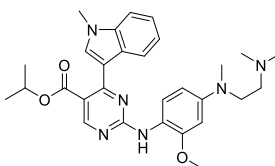
Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chlorpyrimidinen mit **63** (0.10 mmol, 33 mg) und **38c** (0.12 mmol, 30 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 78% (78 μmol, 42 mg) erhalten. ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.20 (d, *J*=6.36 Hz, 6 H) 2.15 (s, 3 H) 3.13 (dt, *J*=11.13, 5.44 Hz, 4 H) 3.59 - 3.67 (m, 2 H) 3.75 - 3.83 (m, 2 H) 3.87 (s, 3 H) 3.90 (s, 3 H) 5.11 (spt, *J*=6.28 Hz, 1 H) 6.54 (dd, *J*=8.56, 2.20 Hz, 1 H) 6.57 (d, *J*=2.45 Hz, 1 H) 7.16 - 7.24 (m, 1 H) 7.24 - 7.33 (m, 1 H) 7.34 - 7.39 (m, 1 H) 7.79 (s, 1 H) 7.82 (s, 1 H) 8.05 (d, *J*=8.31 Hz, 1 H) 8.41 (d, *J*=8.80 Hz, 1 H) 8.86 (s, 1 H). ¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 21.30, 21.64, 33.28, 41.39, 46.27, 50.41, 50.70, 55.67, 68.34, 101.05, 108.79, 109.55, 113.14, 113.99, 120.65, 120.84, 121.72, 122.34, 122.51, 127.03, 133.21, 137.07, 147.15, 149.38, 159.86, 160.76, 162.24, 166.21, 168.93. **HRMS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₃₀H₃₅N₆O₄]⁺ 543.27143, gefunden 543.27078.

95a – N⁴-(2-(Dimethylamino)ethyl)-2-methoxy-N⁴-methyl-N¹-(4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-2-yl)benzol-1,4-diamin



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit 3-(2-Chloropyrimidin-4-yl)-1-methyl-1H-indol (0.20 mmol, 49 mg) und **38d** (0.24 mmol, 54 mg) in *n*-BuOH (0.1 M) bei 100 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 51% (0.10 mmol, 44 mg) erhalten. **¹H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.20 (s, 6 H) 2.42 (t, *J*=7.15 Hz, 2 H) 2.94 (s, 3 H) 3.44 (t, *J*=7.15 Hz, 2 H) 3.79 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 6.32 (dd, *J*=8.60, 2.37 Hz, 1 H) 6.40 (d, *J*=2.37 Hz, 1 H) 7.05 (d, *J*=5.38 Hz, 1 H) 7.10 (t, *J*=7.31 Hz, 1 H) 7.22 (t, *J*=7.64 Hz, 1 H) 7.48 (d, *J*=8.39 Hz, 1 H) 7.62 (d, *J*=8.60 Hz, 1 H) 7.81 (s, 1 H) 8.20 (d, *J*=5.16 Hz, 1 H) 8.22 (s, 1 H) 8.40 (br. s., 1 H). **¹³C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 32.93, 38.56, 45.60, 50.43, 55.28, 55.63, 96.39, 103.48, 105.99, 110.14, 112.62, 117.91, 120.53, 122.01, 122.60, 125.23, 125.65, 132.40, 137.51, 146.74, 152.47, 156.86, 161.21, 162.03. **HRMS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₅H₃₁N₆O]⁺ 431.2554, gefunden 431.2550.

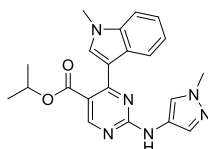
95d – Isopropyl-2-((4-((2-(dimethylamino)ethyl)(methyl)amino)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **63** (100 µmol, 33 mg) und **38d** (120 µmol, 27 mg) in *n*-BuOH (0.1 M) bei 80 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 49% (49 µmol, 25 mg) erhalten. **¹H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.17 (d, *J* = 6.02 Hz, 6 H) 2.20 (s, 6 H) 2.41 (t, *J* = 7.10 Hz, 2 H) 2.95 (s, 3 H) 3.44 (t, *J* = 7.10 Hz, 2 H) 3.76 (s, 3 H) 3.84 (s, 3 H) 5.05 (spt, *J* = 6.20, 1 H) 6.27 (dd, *J* = 8.60, 2.58 Hz, 1 H) 6.38 (s, 1 H) 7.01 (br. s., 1 H) 7.19 (t, *J* = 6.78 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J* = 8.60 Hz, 1 H) 7.46 (d, *J* = 7.96 Hz, 1 H) 7.90 (br. s, 2 H) 8.57 (d, *J* = 6.02 Hz, 2 H). **¹³C NMR** (176 MHz,

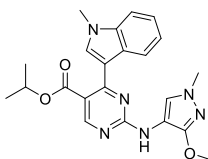
DMSO-*d*₆) δ ppm 21.89, 33.37, 39.02, 46.09, 50.75, 55.75, 56.13, 68.25, 96.71, 103.89, 110.50, 112.01, 116.86, 120.89, 122.31, 122.55, 127.07, 127.45, 134.62, 137.13, 148.38, 154.39, 160.62, 161.58, 161.96, 166.82. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₉H₃₇N₆O₃]⁺ 517.2922, gefunden 517.2912.

96a – Isopropyl-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-2-((1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **63** (150 μ mol, 49 mg) und 1-Methyl-1H-pyrazol-4-amin (150 μ mol, 13 μ L) in *n*-BuOH (0.1 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 63% (95 μ mol, 37 mg) erhalten. **¹H NMR** (700 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.22 (d, *J*=6.20 Hz, 7 H) 3.82 (br. s., 3 H) 3.85 (br. s., 3 H) 5.12 (spt, *J*=6.20 Hz, 1 H) 7.20 (t, *J*=7.58 Hz, 1 H) 7.29 (t, *J*=7.58 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=7.96 Hz, 1 H) 7.49 (s, 1 H) 7.80 (br. s., 1 H) 7.83 (s, 1 H) 7.88 (br. s., 1 H) 8.03 (d, *J*=7.96 Hz, 1 H) 8.86 (br. s., 1 H). **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₁H₂₂N₆O₂]⁺ 391.1877, gefunden 391.1885.

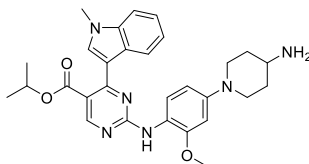
96b – Isopropyl-2-((3-methoxy-1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **63** (150 μ mol, 49 mg) und 3-Methoxy-1-methyl-1H-pyrazol-4-amin Hydrochlorid (150 μ mol, 25 mg) in *n*-BuOH (0.1 M) bei 90 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als hellgrauer Feststoff mit einer Ausbeute von 65% (97 μ mol, 41 mg) erhalten. **¹H NMR** (700 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.23 (br. s., 6 H) 3.69 (br. s., 3 H) 3.87 (s, 3 H) 3.98 (s, 3 H) 5.13 (br. s., 1 H) 7.21 (t, *J*=7.10 Hz, 1 H) 7.29 (t, *J*=7.53 Hz, 1 H) 7.37 (d, *J*=7.96 Hz, 1 H) 7.44 (br. s., 1 H) 7.84 (br. s., 2 H) 8.09 (br. s., 1 H) 8.86 (br. s., 1 H). **¹³C NMR** (176 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 21.70, 33.31, 39.02, 56.40,

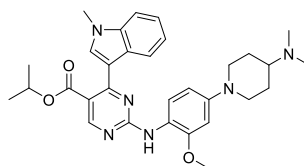
68.32, 106.40, 109.61, 112.98, 120.77, 122.20, 122.46, 124.25, 127.13, 133.14, 133.85, 137.11, 154.30, 160.61, 161.34, 166.12. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₂H₂₅N₆O₃]⁺ 421.1983, gefunden 421.1978.

96c – Isopropyl-2-((4-(4-aminopiperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chlorpyrimidinen mit **63** (0.10 mmol, 33 mg) und **38e** (0.12 mmol, 39 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Die Entschützung der Boc-Gruppe erfolgte in einem Gemisch aus DCM (1.0 mL) und TFA (1.0 mL) bei Rt für 60 min. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 55% (55 µmol, 28 mg) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.16 (d, *J*=6.24 Hz, 6 H) 1.33 - 1.42 (m, 2 H) 1.78 - 1.84 (m, 2 H) 2.70 - 2.77 (m, 3 H) 3.64 (d, *J*=12.84 Hz, 2 H) 3.77 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 5.04 (spt, *J*=6.20 Hz, 1 H) 6.50 (dd, *J*=8.80, 2.57 Hz, 1 H) 6.65 (d, *J*=2.57 Hz, 1 H) 7.04 (br. s., 1 H) 7.20 (t, *J*=7.52 Hz, 1 H) 7.44 - 7.50 (m, 2 H) 7.89 (s, 1 H) 7.92 (br. s., 1 H) 8.58 (s, 1 H) 8.59 (s, 1 H). **¹³C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 21.39, 32.91, 34.68, 48.05, 48.16, 55.47, 67.84, 100.38, 107.13, 110.09, 111.52, 112.43, 118.95, 120.48, 121.90, 125.74, 126.50, 134.11, 136.67, 149.70, 153.08, 160.10, 161.08, 161.13, 166.31. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₉H₃₅N₆O₃]⁺ 515.2765, gefunden 515.2757.

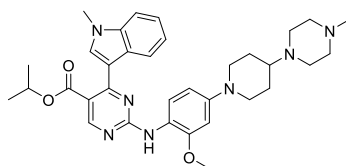
96d – Isopropyl-2-((4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chlorpyrimidinen mit **63** (0.20 mmol, 66 mg) und 1-(4-Amino-3-methoxyphenyl)-*N,N*-dimethylpiperidin-4-amin (0.20 mmol, 50 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 64% (0.13 mmol, 70 mg) erhalten. **¹H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.79

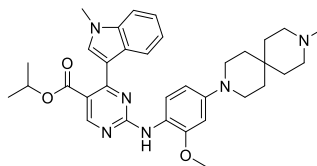
- 0.89 (m, 1 H) 1.17 (d, $J=6.24$ Hz, 6 H) 1.51 (qd, $J=12.00, 3.76$ Hz, 2 H) 1.85 (d, $J=12.00$ Hz, 2 H) 2.21 (m, 7 H) 2.69 (td, $J=12.00, 2.15$ Hz, 2 H) 3.73 (d, $J=12.48$ Hz, 2 H) 3.78 (s, 3 H) 3.86 (s, 3 H) 5.05 (spt, $J=6.2$ Hz, 1 H) 6.51 (dd, $J=8.60, 2.58$ Hz, 1 H) 6.66 (d, $J=2.37$ Hz, 1 H) 7.05 (br. s., 1 H) 7.21 (t, $J=7.53$ Hz, 1 H) 7.46 - 7.53 (m, 2 H) 7.90 (s, 1 H) 7.93 (br. s., 1 H) 8.56 - 8.62 (m, 2 H). $^{13}\text{C NMR}$ (176 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 21.38, 27.89, 32.89, 41.51, 48.57, 55.47, 61.39, 67.82, 100.46, 107.15, 110.06, 111.50, 119.02, 119.11, 120.46, 121.88, 126.49, 134.10, 136.66, 149.60, 153.06, 160.08, 161.00, 161.06, 161.12, 166.27, 166.28. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_3]^+$ 543.31, gefunden 543.29.

96e – Isopropyl-2-((2-methoxy-4-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



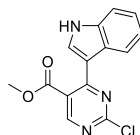
Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chlorpyrimidinen mit **63** (0.20 mmol, 66 mg) und 2-Methoxy-4-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl)anilin (0.20 mmol, 61 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 48% (0.10 mmol, 57 mg) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, METHANOL- d_4) δ ppm 2.72 (d, $J=6.24$ Hz, 6 H) 3.21 (qd, $J=12.10, 4.03$ Hz, 2 H) 3.56 (d, $J=12.47$ Hz, 2 H) 3.85 (s, 3 H) 3.92 (tt, $J=11.55, 3.67$ Hz, 1 H) 3.95 - 4.45 (m, 8 H) 5.28 (d, $J=12.47$ Hz, 2 H) 5.43 (s, 3 H) 5.44 (s, 3 H) 6.62 (spt, $J=6.24$ Hz, 1 H) 8.12 (dd, $J=8.80, 2.57$ Hz, 1 H) 8.25 (d, $J=2.57$ Hz, 1 H) 8.67 (t, $J=7.52$ Hz, 1 H) 8.77 - 8.83 (m, 1 H) 8.99 (d, $J=8.07$ Hz, 1 H) 9.38 (s, 1 H) 9.44 (d, $J=8.07$ Hz, 1 H) 9.56 (d, $J=8.80$ Hz, 1 H) 10.24 (s, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, METHANOL- d_4) δ ppm 22.01, 29.39, 33.53, 46.10, 49.96, 51.40, 56.00, 56.45, 63.22, 70.08, 102.49, 109.90, 110.98, 114.28, 114.91, 122.02, 122.29, 122.74, 123.52, 124.31, 128.44, 134.94, 138.85, 150.47, 152.78, 161.59, 161.96, 163.90, 168.42. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_3]^+$ 598.35, gefunden 598.28.

96f – Isopropyl 2-((2-methoxy-4-(9-methyl-3,9-diazaspiro[5.5]undecan-3-yl)phenyl)amino)-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **63** (0.20 mmol, 66 mg) und 2-Methoxy-4-(9-methyl-3,9-diazaspiro[5.5]undecan-3-yl)anilin (0.20 mmol, 58 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 37% (0.07 mmol, 43 mg) erhalten. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.16 (d, *J*=6.20 Hz, 6 H) 1.47 (t, *J*=5.34 Hz, 4 H) 1.54 (t, *J*=5.50 Hz, 4 H) 2.16 (s, 3 H) 2.29 (br. s., 4 H) 3.14 (t, *J*=5.30 Hz, 4 H) 3.77 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 5.04 (spt, *J*=6.21 Hz, 1 H) 6.49 (dd, *J*=8.54, 2.44 Hz, 1 H) 6.64 (d, *J*=2.14 Hz, 1 H) 7.04 (br. s., 1 H) 7.20 (t, *J*=7.63 Hz, 1 H) 7.43 - 7.54 (m, 2 H) 7.89 (s, 1 H) 7.92 (br. s., 1 H) 8.59 (d, *J*=2.75 Hz, 2 H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 21.41, 28.29, 32.93, 35.12, 44.57, 46.16, 50.73, 55.46, 67.86, 73.83, 100.04, 106.96, 110.13, 111.55, 118.92, 120.50, 121.90, 125.71, 126.53, 134.16, 136.69, 149.92, 153.04, 160.15, 161.12, 161.14, 166.33. LC-MS (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₃₄H₄₃N₆O₃]⁺ 583.34, gefunden 583.33.

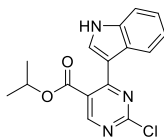
100a – Methyl-2-chloro-4-(1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Methyl-2,4-dichloropyrimidin-5-carboxylat (2.0 mmol, 414 mg) wurde in Dichlorethan (0.2 M) gelöst und bei 70 °C für 20 min mit AlCl₃ (2.4 mmol, 320 mg) vorgerührt. Anschließend wurde Indol (2.0 mmol, 234 mg) zugegeben und für weitere 20 min bei 70 °C gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde zwischen 0.1 M Salzsäure und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrennt und *in vacuo* eingedunstet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (Petrolether:Ethylacetat) aufgereinigt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 36% (0.72 mmol, 206 mg) gewonnen. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.87 (s, 3 H) 7.20 - 7.28 (m, 2 H) 7.47 - 7.56 (m, 1 H) 8.07 (s, 1 H) 8.17 - 8.27 (m, 1 H) 8.84 (s, 1 H) 12.11 (br. s., 1 H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-

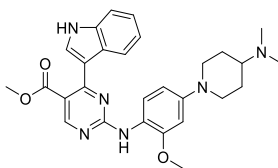
d_6) δ ppm 53.06, 110.40, 112.50, 120.55, 121.29, 121.62, 122.88, 125.56, 132.42, 136.59, 160.09, 160.82, 162.03, 166.58. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{14}H_{11}ClN_3O_2]^+$ 288.05, gefunden 288.10.

100b – Isopropyl-2-chloro-4-(1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Isopropyl-2,4-dichloropyrimidin-5-carboxylat (0.2 mmol, 47 mg) wurde in Dichlorethan (0.2 M) gelöst und bei 70 °C für 20 min mit $AlCl_3$ (0.22 mmol, 29 mg) vorgerührt. Anschließend wurde Indol (0.2 mmol, 23 mg) zugegeben und für weitere 20 min bei 70 °C gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde zwischen 0.1 M Salzsäure und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrennt und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (Petrolether:Ethylacetat) aufgereinigt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff gewonnen. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{16}H_{15}ClN_3O_2]^+$ 316.08, Produkt ionisiert nicht.

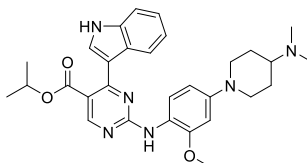
101a – Methyl-2-((4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **100a** (0.50 mmol, 144 mg) und 1-(4-Amino-3-methoxyphenyl)-*N,N*-dimethylpiperidin-4-amin (0.60 mmol, 150 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 57% erhalten (0.28 mmol, 142 mg). **1H NMR** (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 1.50 (qd, $J=12.00$, 4.03 Hz, 2 H) 1.85 (d, $J=12.00$ Hz, 2 H) 2.17 - 2.24 (m, 8 H) 2.65 - 2.73 (m, 2 H) 3.72 (m, 4 H) 3.77 (s, 3 H) 6.50 (dd, $J=8.80$, 2.57 Hz, 1 H) 6.66 (d, $J=2.57$ Hz, 1 H) 6.99 (br. s., 1 H) 7.13 (t, $J=7.34$ Hz, 1 H) 7.42 (d, $J=8.07$ Hz, 1 H) 7.46 (d, $J=8.80$ Hz, 1 H) 7.89 (d, $J=2.57$ Hz, 1 H) 8.61 (d, $J=3.67$ Hz, 2 H) 11.66 (br. s., 1 H). **^{13}C NMR** (151 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 27.90, 41.54, 48.58, 51.76, 54.91, 55.45, 61.42, 100.46, 107.14, 111.73, 112.31,

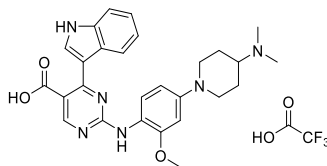
119.04, 120.28, 121.83, 126.07, 130.54, 136.13, 149.72, 153.26, 160.07, 161.23, 161.66, 167.27. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{28}H_{33}N_6O_3]^+$ 501.26, gefunden 501.22.

101b – Isopropyl-2-((4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift zur nukleophilen aromatischen Substitution von 2-Chloropyrimidinen mit **100b** (35 μ mol, 11 mg) und 1-(4-Amino-3-methoxyphenyl)-*N,N*-dimethylpiperidin-4-amin (53 μ mol, 13 mg) in *i*-PrOH (0.1 M) bei 85 °C durchgeführt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 76% (27 μ mol, 14 mg) erhalten. **1H NMR** (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.16 (d, $J=6.10$ Hz, 6 H) 1.54 (qd, $J=11.90, 3.66$ Hz, 2 H) 1.89 (d, $J=12.21$ Hz, 2 H) 2.30 (s, 6 H) 2.40 (br. s., 1 H) 2.69 (td, $J=12.13, 1.98$ Hz, 2 H) 3.76 (d, $J=12.51$ Hz, 2 H) 3.79 (s, 3 H) 5.02 (spt, $J=6.26$ Hz, 1 H) 6.51 (dd, $J=8.54, 2.44$ Hz, 1 H) 6.67 (d, $J=2.44$ Hz, 1 H) 7.00 (br. s., 1 H) 7.13 (t, $J=7.48$ Hz, 1 H) 7.43 (d, $J=7.93$ Hz, 1 H) 7.50 (d, $J=8.85$ Hz, 1 H) 7.87 (d, $J=3.05$ Hz, 1 H) 7.90 (br. s., 1 H) 8.59 (s, 1 H) 8.61 (s, 1 H) 11.61 - 11.75 (m, 1 H). **^{13}C NMR** (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 21.44, 27.52, 41.16, 48.50, 55.50, 61.62, 67.87, 100.54, 107.20, 111.78, 112.51, 119.26, 120.21, 121.68, 121.83, 126.09, 130.32, 136.15, 149.52, 153.20, 160.01, 161.17, 161.50, 166.45. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{30}H_{37}N_6O_3]^+$ 529.29, gefunden 529.26.

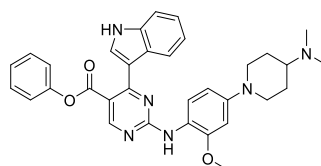
102 - 2-((4-(4-(Dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carbonsäure triflat



101a (0.43 mmol, 216 mg) wurde in THF (0.1 M) gelöst und mit 1 M Natronlauge (4.3 mmol) und LiOH (4.3 mmol, 103 mg) versetzt. Die Reaktion wurde für 16 h bei 90 °C gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde *in vacuo* eingeeengt und in TFA-saurem Wasser aufgenommen. Der pH-Wert wurde mit TFA auf pH 2 eingestellt und das Gemisch wurde säulenchromatographisch mittels C_{18} -Säule ($H_2O:MeCN$) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Entfernung des Lösungsmittels im Luftstrom als orangenes TFA-Salz in quantitativer

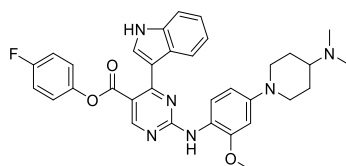
Ausbeute (0.43 mmol, 454 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{27}H_{31}N_6O_3]^+$ 487.25, gefunden 487.21.

103a – Phenyl-2-((4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach dem allgemeinen Syntheschema zur Amid- und Ester-Kupplung durchgeführt. **102** (0.10 mmol, 105mg) wurde in DCM (0.025 M) gelöst und mit DIPEA (2.00 mmol, 348 μ L) versetzt. Anschließend wurde TBTU (0.12 mmol, 39 mg) zugegeben und für 5 min gerührt. Anschließend wurde Phenol (1.00 mmol, 94 mg) zugegeben. Nach einer halben Stunde wurde erneut Phenol (1.00 mmol, 94 mg) zugegeben, welches mit NaH (1.00 mmol) in THF vorgerührt wurde. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 39% (38.5 μ mol, 21.7 mg) erhalten. **1H NMR** (600 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.55 (qd, $J=11.86$, 3.67 Hz, 2 H) 1.89 (d, $J=11.74$ Hz, 2 H) 2.29 (br. s., 6 H) 2.33 - 2.44 (m, 1 H) 2.71 (td, $J=12.20$, 2.02 Hz, 2 H) 3.77 (d, $J=12.47$ Hz, 2 H) 3.80 (s, 3 H) 6.53 (dd, $J=8.80$, 2.57 Hz, 1 H) 6.68 (d, $J=2.57$ Hz, 1 H) 7.02 (br. s., 1 H) 7.14 (t, $J=7.15$ Hz, 1 H) 7.20 (d, $J=7.70$ Hz, 2 H) 7.27 (t, $J=7.34$ Hz, 1 H) 7.41 - 7.45 (m, 3 H) 7.48 (d, $J=8.44$ Hz, 1 H) 7.94 (br. s., 1 H) 8.05 (d, $J=2.93$ Hz, 1 H) 8.83 (s, 1 H) 8.90 (s, 1 H) 11.71 (br. s., 1 H). **^{13}C NMR** (151 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 27.69, 41.34, 48.56, 55.64, 61.72, 100.62, 107.31, 111.94, 112.53, 119.03, 120.49, 121.87, 122.03, 122.11, 122.14, 125.89, 126.26, 126.42, 129.51, 131.12, 136.26, 149.92, 150.69, 153.59, 161.35, 161.63, 162.69, 165.29. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{33}H_{35}N_6O_3]^+$ 563.28, gefunden 563.23.

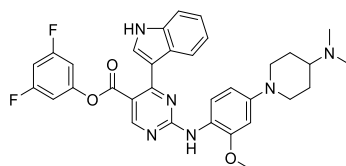
103b – 4-Fluorophenyl-2-((4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach dem allgemeinen Syntheschema zur Amid- und Ester-Kupplung durchgeführt. **102** (60 μ mol, 63 mg) wurde in DCM (0.02 M) gelöst und mit DIPEA (1.20 mmol, 209 μ L) versetzt. Anschließend wurde TBTU (72 μ mol, 23 mg) zugegeben und

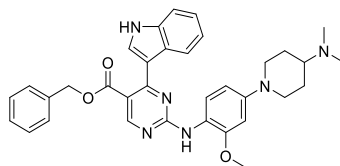
für 10 min gerührt. Anschließend wurde 4-Fluorophenol (0.60 mmol, 67 mg) zugegeben. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 39% (24 μ mol, 13.7 mg) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.75 - 1.84 (m, 3 H) 2.08 (d, *J*=8.80 Hz, 2 H) 2.50 (br. s., 6 H) 2.71 - 2.79 (m, 2 H) 3.71 (d, *J*=12.47 Hz, 2 H) 3.92 (s, 3 H) 6.55 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H) 6.58 (d, *J*=2.57 Hz, 1 H) 6.91 - 6.96 (m, 2 H) 7.01 - 7.05 (m, 2 H) 7.23 (t, *J*=7.34 Hz, 1 H) 7.27 - 7.30 (m, 1 H) 7.45 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H) 7.88 (s, 1 H) 8.00 (d, *J*=2.57 Hz, 1 H) 8.09 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H) 8.41 (br. s., 1 H) 8.61 (br. s., 1 H) 9.12 (s, 1 H). **¹³C NMR** (151 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.01, 27.41, 40.78, 49.94, 55.71, 62.60, 101.01, 108.74, 111.51, 115.89, 116.05, 120.86, 121.35, 122.94, 123.03, 123.09, 126.41, 129.06, 136.01, 146.45, 146.47, 147.77, 149.50, 159.35, 160.27, 160.97, 161.94, 163.48, 164.95. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₃₃H₃₄FN₆O₃]⁺ 581.27, gefunden 581.27.

103c – 3,5-Difluorphenyl-2-((4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)-amino)-4-(1*H*-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



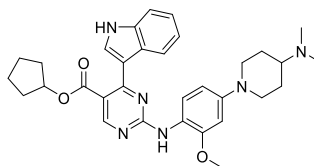
Die Reaktion wurde nach dem allgemeinen Syntheschema zur Amid- und Ester-Kupplung durchgeführt. **102** (60 μ mol, 63 mg) wurde in DCM (0.02 M) gelöst und mit DIPEA (1.20 mmol, 209 μ L) versetzt. Anschließend wurde TBTU (72 μ mol, 23 mg) zugegeben und für 10 min gerührt. Anschließend wurde 3,5-Difluorophenol (0.60 mmol, 78 mg) zugegeben. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 35% (21 μ mol, 12.5 mg) erhalten. **¹H NMR** (600 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.75 - 1.85 (m, 2 H) 2.01 - 2.16 (m, 2 H) 2.50 (br. s., 6 H) 2.56 (br. s., 1 H) 2.71 - 2.79 (m, 2 H) 3.72 (d, *J*=12.47 Hz, 2 H) 3.92 (s, 3 H) 6.50 - 6.57 (m, 3 H) 6.58 (d, *J*=2.20 Hz, 1 H) 6.68 (tt, *J*=8.94, 2.25 Hz, 1 H) 7.21 - 7.26 (m, 1 H) 7.27 - 7.31 (m, 1 H) 7.47 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H) 7.90 (s, 1 H) 7.97 (d, *J*=2.93 Hz, 1 H) 8.05 (d, *J*=8.07 Hz, 1 H) 8.39 (br. s., 1 H) 8.63 (br. s., 1 H) 9.10 (br. s., 1 H). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₃₃H₃₃F₂N₆O₃]⁺ 599.26, gefunden 599.20.

103d – Benzyl-2-((4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



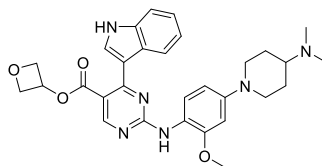
Die Reaktion wurde nach dem allgemeinen Syntheschema zur Amid- und Ester-Kupplung durchgeführt. **102** (50 μmol , 53 mg) wurde in DCM (0.025 M) gelöst und mit TEA (1.00 mmol, 139 μL) versetzt. Anschließend wurde TBTU (60 μmol , 19 mg) zugegeben und für 5 min gerührt. Anschließend wurde Benzylalkohol (2.50 mmol, 0.26 mL) zugegeben. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 4% (1.9 μmol , 1.1 mg) erhalten.

103e – Cyclopentyl-2-((4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



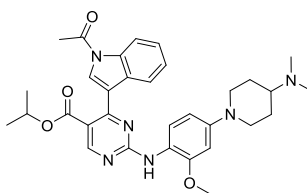
Die Reaktion wurde nach dem allgemeinen Syntheschema zur Amid- und Ester-Kupplung durchgeführt. **102** (100 μmol , 106 mg) wurde in DCM (0.025 M) gelöst und mit DIPEA (2.00 mmol, 348 μL) versetzt. Anschließend wurde TBTU (120 μmol , 39 mg) zugegeben und für 10 min gerührt. Anschließend wurde Cyclopentanol (2.00 mmol, 172 mg) zugegeben. Nach einer halben Stunde wurde erneut Cyclopentanol (1.00 mmol, 86 mg) zugegeben, welches mit NaH (1.00 mmol) in THF vorgerührt wurde. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 4% (4.3 μmol , 2.4 mg) erhalten. **$^1\text{H NMR}$** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.44 - 1.53 (m, 6 H) 1.53 - 1.61 (m, 2 H) 1.76 (dq, $J=13.75$, 6.79 Hz, 2 H) 1.85 (d, $J=12.47$ Hz, 2 H) 2.17 - 2.27 (m, 7 H) 2.68 (td, $J=12.20$, 2.02 Hz, 2 H) 3.73 (d, $J=12.47$ Hz, 2 H) 3.78 (s, 3 H) 5.15 - 5.22 (m, 1 H) 6.50 (dd, $J=8.80$, 2.57 Hz, 1 H) 6.65 (d, $J=2.57$ Hz, 1 H) 6.99 (br. s., 1 H) 7.13 (t, $J=7.52$ Hz, 1 H) 7.42 (d, $J=8.07$ Hz, 1 H) 7.48 (d, $J=8.44$ Hz, 1 H) 7.85 (d, $J=2.93$ Hz, 1 H) 7.88 (br. s., 1 H) 8.58 (d, $J=4.77$ Hz, 2 H) 11.65 (br. d, $J=2.00$ Hz, 1 H). **$^{13}\text{C NMR}$** (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 23.18, 27.85, 31.99, 41.49, 48.58, 55.48, 61.43, 77.04, 100.47, 107.16, 111.73, 112.66, 119.14, 120.17, 121.55, 121.80, 125.81, 126.08, 130.12, 136.12, 149.62, 153.13, 160.13, 161.15, 161.60, 166.55. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_3]^+$ 555.31, gefunden 555.22.

103f – Oxetan-3-yl 2-((4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)-4-(1H-indol-3-yl)pyrimidin-5-carboxylat



Die Reaktion wurde nach dem allgemeinen Syntheschema zur Amid- und Ester-Kupplung durchgeführt. **102** (100 μmol , 106 mg) wurde in DCM (0.025 M) gelöst und mit DIPEA (2.00 mmol, 348 μL) versetzt. Anschließend wurde TBTU (120 μmol , 39 mg) zugegeben und für 10 min gerührt. Anschließend wurde Oxetan-2-ol (2.00 mmol, 132 μL) zugegeben. Nach einer halben Stunde wurde erneut Oxetan-2-ol (1.00 mmol, 66 μL) zugegeben, welches mit NaH (1.00 mmol) in THF vorgerührt wurde. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 3% (3.1 μmol , 1.7 mg) erhalten. **$^1\text{H NMR}$** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.51 (qd, $J=11.80$, 3.85 Hz, 2 H) 1.85 (d, $J=12.47$ Hz, 2 H) 2.18 - 2.28 (m, 7 H) 2.69 (td, $J=12.01$, 2.02 Hz, 2 H) 3.74 (d, $J=12.47$ Hz, 2 H) 3.77 (s, 3 H) 4.51 (t, $J=5.87$ Hz, 2 H) 4.77 (t, $J=6.97$ Hz, 2 H) 5.49 - 5.56 (m, 1 H) 6.51 (dd, $J=8.80$, 2.57 Hz, 1 H) 6.66 (d, $J=2.57$ Hz, 1 H) 6.99 (br. s., 1 H) 7.12 (t, $J=7.15$ Hz, 1 H) 7.41 (d, $J=8.07$ Hz, 1 H) 7.45 (d, $J=8.80$ Hz, 1 H) 7.88 (br. s., 1 H) 7.95 (d, $J=2.93$ Hz, 1 H) 8.72 (s, 1 H) 8.75 (s, 1 H) 11.66 (br. s., 1 H). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_4]^+$ 543.27, gefunden 543.21.

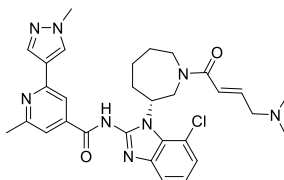
104 – Isopropyl-4-(1-acetyl-1H-indol-3-yl)-2-((4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)pyrimidin-5-carboxylat



Das Indol **101b** (20 μmol , 10.6 mg) wurde in THF (0.02 M) gelöst und mit DIPEA (0.10 mmol, 18 μL) und DMAP (20 μmol , 2.4 mg) versetzt. Anschließend wurde bei 0 °C Acetylchlorid (30 μmol , 2.4 mg) zugetropft und für 4 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 73% (15 μmol , 8.3 mg) gewonnen. **$^1\text{H NMR}$** (700 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.02 (br. s., 6 H)

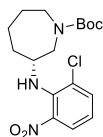
1.45 - 1.57 (m, 2 H) 1.86 (d, $J=11.62$ Hz, 2 H) 2.27 (br. s, 6 H) 2.31 - 2.43 (m, 1 H) 2.64 - 2.73 (m, 5 H) 3.73 (d, $J=12.26$ Hz, 2 H) 3.79 (s, 3 H) 4.89 (br. s., 1 H) 6.49 (d, $J=8.17$ Hz, 1 H) 6.64 (d, $J=2.20$ Hz, 1 H) 7.25 (br. s., 1 H) 7.36 (t, $J=7.64$ Hz, 1 H) 7.45 (d, $J=8.60$ Hz, 1 H) 7.63 (d, $J=7.96$ Hz, 1 H) 8.22 (s, 1 H) 8.36 (d, $J=8.17$ Hz, 1 H) 8.78 (s, 1 H) 8.91 (s, 1 H). **^{13}C NMR** (176 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 21.20, 23.80, 27.53, 28.99, 41.20, 48.33, 55.53, 61.53, 68.01, 100.43, 107.14, 115.84, 118.65, 123.65, 124.96, 125.76, 128.65, 134.77, 149.71, 153.20, 160.52, 160.85, 161.35, 165.04, 169.65. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_4]^+$ 571.30, gefunden 571.23

106 – (R,E)-N-(7-Chloro-1-(1-(4-(dimethylamino)but-2-enoyl)azepan-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methyl-6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinamid



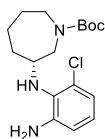
4-Dimethylaminocrotonsäure Hydrochlorid (60 μmol , 10 mg) wurde in DCM (0.1 M) gelöst und mit DIPEA (250 μL , 44 μL) versetzt. Bei 0 °C wurde TBTU (75 μmol , 24 mg) zugegeben und für 15 min gerührt. Anschließend wurde das sekundäre Amin **117a** (50 μmol , 23 mg) zugegeben und für 1 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 61% (30 μmol , 17.5 mg) erhalten. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{ClN}_8\text{O}_2]^+$ 575.26443, gefunden 575.26409.

108 – tert-Butyl-(R)-3-((2-chloro-6-nitrophenyl)amino)azepan-1-carboxylat



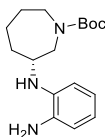
1-Chloro-2-fluoro-3-nitrobenzol (4.5 mmol, 790 mg) wurde in DMF (0.2 M) gelöst und mit *tert*-Butyl-(*R*)-3-aminoazepan-1-carboxylat (4.5 mmol, 964 mg) versetzt. Anschließend wurde K_2CO_3 (13.5 mmol, 1866 mg) zugegeben und für 2 h bei 50 °C gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Der DMF-Rückstand wurde zusätzlich im Luftstrom getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (Petrolether:Ethylacetat) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 95% (4.27 mmol, 1.578 g) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{ClN}_3\text{O}_4]^+$ 370.15, gefunden 369.71.

109a – *tert*-Butyl-(*R*)-3-((2-amino-6-chlorophenyl)amino)azepan-1-carboxylat



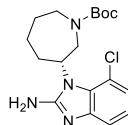
Die Nitroverbindung **108** (1.56 mmol, 577 mg) wurde in MeOH (0.005 M) gelöst und im H₂-Flussreaktor bei 75 °C, 70 bar, 7% H₂-Produktion und einer Flussrate von 1 mL/min mithilfe eines Ru/C-Katalysators (5%) reduziert. Der Durchfluss wurde *in vacuo* eingengt und das Produkt konnte ohne weitere Aufreinigung als klare Flüssigkeit in einer quantitativen Ausbeute (1.56 mmol, 530 mg) erhalten werden. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₇H₂₇ClN₃O₂]⁺ 340.18, gefunden 339.96.

109b – *tert*-Butyl-(*R*)-3-((2-aminophenyl)amino)azepan-1-carboxylat



Die Nitroverbindung **108** (1.00 mmol, 370 mg) wurde in MeOH (0.05 M) gelöst und mit Pd/C (10%) versetzt. Die Reaktion wurde für 8 h bei Rt °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Kieselgur filtriert und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mittels C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) aufgereinigt. Das Produkt wurde als klare Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 28% (0.28 mmol, 85 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₇H₂₈N₃O₂]⁺ 306.22, gefunden 306.00.

110a – *tert*-Butyl-(*R*)-3-(2-amino-7-chloro-1*H*-benzo[d]imidazol-1-yl)azepan-1-carboxylat

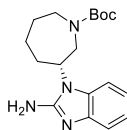


Das Anilin **109a** (0.82 mmol, 279 mg) wird in MeOH (0.1 M) gelöst und zu einer Lösung aus Bromcyan (1.64 mmol, 174 mg) in MeOH:MeCN (3:1, 0.25 M) getropft. Die Reaktion wurde für 2 h bei 50 °C gerührt bevor bei 0 °C mit Bicarbonat-Lösung gequencht wurde. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über

Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt.

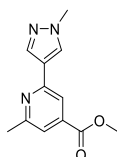
Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 76% (0.63 mmol, 228 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₈H₂₆ClN₄O₂]⁺ 365.17, gefunden 365.04.

110b – *tert*-Butyl-(*R*)-3-(2-amino-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)azepan-1-carboxylat



Das Anilin **109b** (0.28 mmol, 86 mg) wird in MeOH (0.1 M) gelöst und zu einer Lösung aus Bromcyan (0.54 mmol, 57 mg) in MeOH:MeCN (3:1, 0.25 M) getropft. Die Reaktion wurde für 2 h bei 50 °C gerührt bevor bei 0 °C mit Bicarbonat-Lösung gequenchet wurde. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit quantitativer Ausbeute (0.29 mmol, 96 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₈H₂₇N₄O₂]⁺ 331.21, gefunden 331.07.

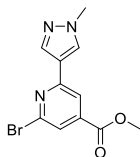
113a – Methyl-2-methyl-6-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)isonicotinat



Methyl-2-bromo-6-methylisonicotinate (2.0 mmol, 460 mg) und 1-Methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol (3.0 mmol, 624 mg) wurden in Dioxan (0.2 M) gelöst und für 15 min im Argonstrom entgast. Anschließend wurden K₂CO₃ (4.0 mmol, 553 mg) und Pd(PPh₃)₄ (0.2 mmol, 231 mg) zugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h bei 120 °C in der Mikrowelle gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 32% erhalten (0.64 mmol, 148 mg). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 2.62 (s, 3

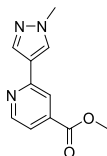
H) 3.96 (s, 6 H) 7.50 (s, 1 H) 7.79 (s, 1 H) 8.00 (s, 2 H). ^{13}C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) d ppm 24.54, 39.16, 52.60, 115.78, 119.60, 123.17, 129.17, 137.71, 138.17, 152.31, 159.37, 166.00. **DC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2]^+$ 232.1, gefunden 231.4.

113b – Methyl-2-bromo-6-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)isonicotinat



Methyl-2,6-dibromoisonicotinat (1.75 mmol, 516 mg) und 1-Methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol (1.93 mmol, 401 mg) wurden in Dioxan (0.1 M) gelöst und für 30 min im Argonstrom entgast. Anschließend wurden K_3PO_4 (3.50 mmol, 743 mg) und $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (0.175 mmol, 128 mg) zugegeben. Die Reaktion wurde für 10 h bei 90 °C gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 55% (0.96 mmol, 285 mg) erhalten. ^1H NMR (700 MHz, CHLOROFORM-*d*) d ppm 3.97 (s, 3 H) 3.98 (s, 3 H) 7.80 (d, $J=1.08$ Hz, 1 H) 7.91 (d, $J=1.29$ Hz, 1 H) 8.00 (d, $J=0.86$ Hz, 1 H) 8.01 (s, 1 H). ^{13}C NMR (176 MHz, CHLOROFORM-*d*) d ppm 39.26, 52.97, 117.33, 121.88, 124.24, 129.78, 137.85, 140.19, 142.46, 154.00, 164.44. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BrN}_3\text{O}_2]^+$ 296.00, gefunden 296.09.

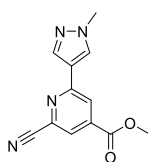
113c – Methyl-2-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)isonicotinat



Methyl-2-bromoisonicotinat (2.0 mmol, 432 mg) und 1-Methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-pyrazol (3.0 mmol, 624 mg) wurden in Dioxan (0.2 M) gelöst und für 15 min im Argonstrom entgast. Anschließend wurden K_2CO_3 (4.0 mmol, 553 mg) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.2 mmol, 231 mg) zugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h bei 120 °C in der Mikrowelle gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die

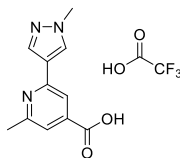
vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 48% (0.96 mmol, 208 mg) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 3.97 (s, 3 H) 3.98 (s, 3 H) 7.63 (dd, $J=5.04, 1.37$ Hz, 1 H) 7.98 - 8.02 (m, 2 H) 8.02 (s, 1 H) 8.68 (dd, $J=5.19, 0.61$ Hz, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 39.24, 52.73, 118.69, 119.95, 122.91, 129.18, 137.70, 138.00, 150.19, 152.91, 165.69. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2]^+$ 218.09, gefunden 218.12.

114 – Methyl-2-cyano-6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinat



Das Bromid **113b** (0.50 mmol, 148 mg) wurde in DMF (0.25 M) gelöst und mit ZnCN_2 (0.30 mmol, 35 mg) versetzt. Die Lösung wurde für 30 min im Argonstrom entgast bevor $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.05 mmol, 58 mg) zugegeben wurde. Die Reaktion wurde über 2 h in der Mikrowelle von 100 °C auf 120 °C aufgeheizt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (Petrolether:Ethylacetat) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 87% (0.44 mmol, 106 mg) erhalten. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 4.00 (s, 3 H) 4.02 (s, 3 H) 7.98 (d, $J=1.47$ Hz, 1 H) 8.04 (s, 1 H) 8.06 (s, 1 H) 8.15 (d, $J=1.47$ Hz, 1 H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 39.39, 53.25, 116.87, 121.55, 121.78, 124.27, 130.09, 134.43, 137.97, 139.16, 154.85, 163.96. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_2]^+$ 243.09, gefunden 243.11.

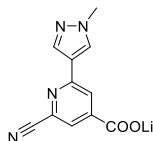
115a – 2-Methyl-6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinsäure triflat



Der Methylester **113a** (0.64 mmol, 148 mg) wurde in THF:H₂O (3:1, 0.1 M) gelöst und mit LiOH (1.32 mmol, 32 mg) versetzt. Nach 4 h Reaktionszeit wurde die Lösung im Luftstrom

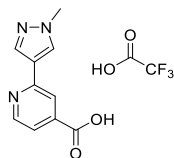
getrocknet. Das Rohprodukt wurde in TFA-saurer Lösung aufgenommen und säulenchromatographisch über eine C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in quantitativer Ausbeute als Triflat (231 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₁H₁₂N₃O₂]⁺ 218.09, gefunden 218.14.

115b – Lithium-2-Cyano-6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinat



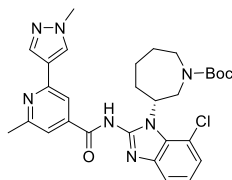
Der Methylester **114** (0.5 mmol, 121 mg) wurde in THF (0.1 M) gelöst und mit LiOH (0.6 mmol, 0.1 M wässrige Lösung) versetzt. Nach 10 min Reaktionszeit wurde die Lösung im Luftstrom getrocknet. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in quantitativer Ausbeute als Lithiumsalz (0.5 mmol, 66 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₁H₉N₄O₂]⁺ 229.07, gefunden 229.12. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₂₈H₃₃ClN₇O₃]⁺ 550.23, gefunden 550.12.

115c – 2-(1-Methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinsäure triflat



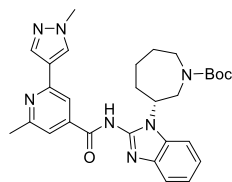
Der Methylester **113c** (0.90 mmol, 196 mg) wurde in THF:H₂O (3:1, 0.1 M) gelöst und mit LiOH (2.70 mmol, 65 mg) versetzt. Nach 4 h Reaktionszeit wurde die Lösung im Luftstrom getrocknet. Das Rohprodukt wurde in TFA-saurer Lösung aufgenommen und säulenchromatographisch über eine C₁₈-Säule (H₂O:MeCN) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff als Triflat in quantitativer Ausbeute (0.90 mmol, 286 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für [C₁₀H₁₀N₃O₂]⁺ 204.08, gefunden 204.14.

116a – *tert*-Butyl-(*R*)-3-(7-chloro-2-(2-methyl-6-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)isonicotinamido)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)azepan-1-carboxylat



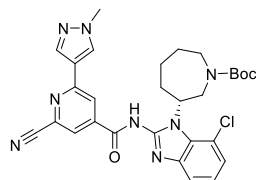
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **115a** (0.20 mmol, 66 mg) und **110a** (0.20 mmol, 73 mg), DIPEA (1.00 mmol, 174 μ L) und TBTU (0.30 mmol, 96 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in quantitativer Ausbeute (0.20 mmol, 115 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{ClN}_7\text{O}_3]^+$ 564.25, gefunden 564.17.

116b – *tert*-Butyl-(*R*)-3-(2-(2-methyl-6-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)isonicotinamido)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)azepan-1-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **115a** (0.10 mmol, 33 mg) und **110b** (0.10 mmol, 33 mg), DIPEA (0.50 mmol, 87 μ L) und TBTU (0.15 mmol, 48 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 96% (96 μ mol, 51 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_3]^+$ 530.29, gefunden 530.21.

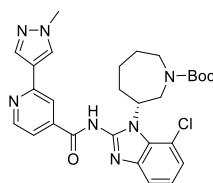
116c – *tert*-Butyl-(*R*)-3-(7-chloro-2-(2-cyano-6-(1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)isonicotinamido)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)azepan-1-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **115b** (120 μ mol, 27 mg) und **110a** (140 μ mol, 53 mg), TEA (140 μ mol, 20 μ L) und TBTU (140 μ mol, 45 mg) durchgeführt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute

von 36% (43 μ mol, 25 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_3]^+$ 575.23, gefunden 574.86.

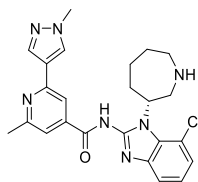
116d – tert-Butyl-(R)-3-(7-chloro-2-(2-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinamido)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)azepan-1-carboxylat



Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Amid- und Ester-Kupplung mit **115c** (0.20 mmol, 64 mg) und **110a** (0.20 mmol, 73 mg), DIPEA (1.00 mmol, 174 μ L) und TBTU (0.30 mmol, 96 mg) durchgeführt.

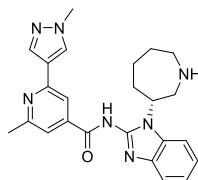
Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 79% (0.16 mmol, 87 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{ClN}_7\text{O}_3]^+$ 550.23, gefunden 550.17.

117a – (R)-N-(1-(Azepan-3-yl)-7-chloro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methyl-6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinamid



Die Verbindung **116a** (200 μ mol, 113 mg) wurde in DCM (2 mL) gelöst und bei 0 °C mit TFA (2 mL) versetzt. Die Reaktion wurde für 2 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt. Die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 89% (177 μ mol, 82 mg) erhalten. **$^1\text{H NMR}$** (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.43 - 1.62 (m, 2 H) 1.74 - 1.87 (m, 2 H) 2.05 - 2.18 (m, 1 H) 2.57 (s, 3 H) 2.71 (br. s., 1 H) 2.86 - 2.95 (m, 1 H) 3.16 (dd, $J=14.12$, 4.95 Hz, 1 H) 3.66 - 3.79 (m, 1 H) 3.90 (s, 3 H) 5.61 (br. s., 1 H) 7.20 (t, $J=8.07$ Hz, 1 H) 7.26 (d, $J=7.70$ Hz, 1 H) 7.56 (d, $J=7.34$ Hz, 1 H) 7.61 (s, 1 H) 7.95 (br. s., 1 H) 8.01 (s, 1 H) 8.31 (s, 1 H). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{ClN}_7\text{O}]^+$ 464.20, gefunden 464.07.

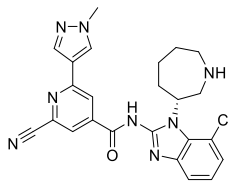
117b – (R)-N-(1-(Azepan-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methyl-6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinamid



Die Verbindung **116b** (100 μmol , 53 mg) wurde in DCM (1.0 mL) gelöst und bei 0 °C mit TFA (1.0 mL) versetzt. Die Reaktion wurde für 4 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt. Die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt.

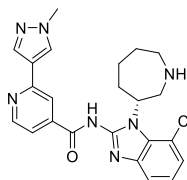
Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 87% (87 μmol , 37 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}]^+$ 430.24, gefunden 430.14.

117c – (R)-N-(1-(Azepan-3-yl)-7-chloro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-cyano-6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinamid



Die Verbindung **116c** (43 μmol , 25 mg) wurde in DCM (3 mL) gelöst und bei 0 °C mit TFA (3 mL) versetzt. Die Reaktion wurde für 4 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt. Die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 85% (37 μmol , 18 mg) erhalten. **$^1\text{H NMR}$** (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.56 - 1.71 (m, 2 H) 1.80 - 1.92 (m, 2 H) 2.02 - 2.12 (m, 1 H) 2.55 - 2.67 (m, 1 H) 2.80 - 2.91 (m, 1 H) 2.92 - 3.01 (m, 1 H) 3.25 (dd, $J=13.89$, 4.73 Hz, 1 H) 3.82 (dd, $J=13.73$, 7.63 Hz, 1 H) 3.92 (s, 3 H) 5.54 - 5.63 (m, 1 H) 7.24 (t, $J=7.93$ Hz, 1 H) 7.31 (d, $J=7.93$ Hz, 1 H) 7.59 (d, $J=7.93$ Hz, 1 H) 8.11 (s, 1 H) 8.23 (s, 1 H) 8.43 (s, 1 H) 8.48 (s, 1 H). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{ClN}_8\text{O}]^+$ 475.18, gefunden 475.08.

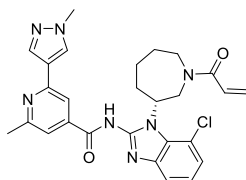
117d – (R)-N-(1-(Azepan-3-yl)-7-chloro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinamid



Die Verbindung **116d** (160 μmol , 88 mg) wurde in DCM (1.6 mL) gelöst und bei 0 °C mit TFA (1.6 mL) versetzt. Die Reaktion wurde für 2 h bei Rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt. Die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt.

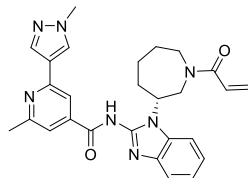
Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 90% (144 μmol , 65 mg) erhalten. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClN}_7\text{O}]^+$ 450.18, gefunden 450.09.

118a – (R)-N-(1-(1-Acryloylazepan-3-yl)-7-chloro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methyl-6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinamid



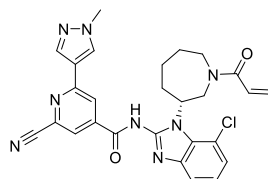
Das sekundäre Amin **117a** (50 μmol , 23 mg) wurde in DCM:THF (50:50, 0.05 M) gelöst und mit DIPEA (250 μmol , 44 μL) versetzt. Bei 0 °C wurde Acryloylchlorid (75 μmol , 6 μL in 0.5 mL THF) zugegeben und anschließend für 4 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 61% (30 μmol , 18 mg) erhalten. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{ClN}_7\text{O}_2]^+$ 518.20658, gefunden 518.20600.

118b – (R)-N-(1-(1-Acryloylazepan-3-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methyl-6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinamid



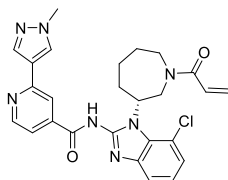
Das sekundäre Amin **117b** (40 μmol , 17 mg) wurde in DCM:THF (50:50, 0.05 M) gelöst und mit DIPEA (200 μmol , 35 μL) versetzt. Bei 0 °C wurde Acryloylchlorid (60 μmol , 5 μL in 0.5 mL THF) zugegeben und anschließend für 4 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 68% (27 μmol , 13 mg) erhalten. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}_2]^+$ 484.24555, gefunden 484.24439.

118c – (R)-N-(1-(1-Acryloylazepan-3-yl)-7-chloro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-cyano-6-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinamid



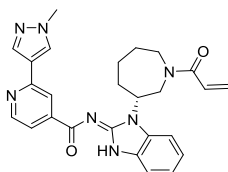
Das sekundäre Amin **117c** (25 μmol , 12 mg) wurde in THF (0.025 M) gelöst und mit DIPEA (125 μmol , 22 μL) versetzt. Bei 0 °C wurde Acryloylchlorid (38 μmol , 3 μL in 0.25 mL THF) zugegeben und anschließend für 4 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 70% (17 μmol , 9.2 mg) erhalten. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{ClN}_8\text{O}_2]^+$ 529.18618, gefunden 529.18565.

118d – (R)-N-(1-(1-Acryloylazepan-3-yl)-7-chloro-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinamid



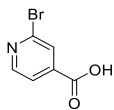
Das sekundäre Amin **117d** (50 μmol , 23 mg) wurde in DCM (0.05 M) gelöst und mit DIPEA (250 μmol , 44 μL) versetzt. Bei 0 °C wurde Acryloylchlorid (75 μmol , 6 μL in 0.5 mL THF) zugegeben und anschließend für 4 h bei Rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen Bicarbonat-Lösung und DCM getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 82% (41 μmol , 21 mg) erhalten. **HRMS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{ClN}_7\text{O}_2]^+$ 504.19093, gefunden 504.19034.

120 - (R,E)-N-(1-(1-Acryloylazepan-3-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-yliden)-2-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)isonicotinamid



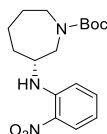
127 (50 μmol , 23 mg) und 1-Methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3-dioxolan-2-yl)-1H-pyrazol (75 μmol , 16 mg) wurden in Dioxan:Wasser (5:1, 0.1 M) gelöst und für 15 min mit Argon entgast. Anschließend wurden K_3PO_4 -Monohydrat (150 μmol , 35 mg) und $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (20 Mol-%, 7 mg) zugegeben. Die Reaktion wurde für 60 min in der Mikrowelle bei 120 °C gerührt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde zwischen DCM und Bicarbonat-Lösung getrennt. Die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 35% gewonnen (17 μmol , 8.2 mg). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_2]^+$ 470.23, gefunden 470.17.

121 - 2-Bromoisonicotinsäure



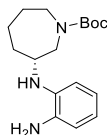
Methyl-2-bromoisonicotinat (4.0 mmol) wurde in THF (1.0 M) gelöst und mit 2 M wässriger Lithiumhydroxid-Lösung (8.0 mmol) versetzt. Die Reaktion wurde für 30 min bei Rt gerührt. Die Lösung wurde eingengt und in TFA-saurem Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde zusätzlich mit TFA (8.0 mmol) angesäuert und das entstandene Präzipitat wurde abfiltriert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in quantitativer Ausbeute als Triflat gewonnen. **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_6H_5BrNO_2]^+$ 201.95, gefunden 202.02.

122 - tert-Butyl-(R)-3-((2-nitrophenyl)amino)azepan-1-carboxylat



2-Fluornitrobenzol (10.0 mmol, 1.41 g) wurde in DMF (0.2 M) gelöst und mit *Tert*-butyl-(*R*)-3-aminoazepan-1-carboxylat (10.0 mmol, 2.14 g) versetzt. Anschließend wird K_2CO_3 (30.0 mmol, 4.15 g) zugegeben und für 4 h bei 55 °C gerührt. Die abgekühlte Suspension wurde zwischen Ethylacetat und Bicarbonat-Lösung getrennt und die organische Phase wurde zweifach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (Petrolether:Ethylacetat) aufgereinigt. Das Produkt wurde als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 79% erhalten (7.9 mmol, 2.65 g). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{17}H_{26}N_3O_4]^+$ 336.19, gefunden 335.79.

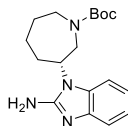
123 - tert-Butyl-(R)-3-((2-aminophenyl)amino)azepan-1-carboxylat



Die Nitroverbindung **122** (7.87 mmol, 2.64 g) wurde in EtOH (0.1 M) gelöst und mit Pd/Aktivkohle (5 %ig, 5mol%, 730 mg) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 90 min bei 40 °C gerührt bevor es über eine Nutsche abfiltriert und *in vacuo* eingengt wurde. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (Petrolether:EtOAc) aufgereinigt.

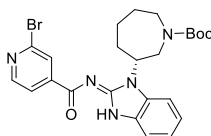
Das Produkt wurde als klares, zähflüssiges Öl mit einer Ausbeute von 92% erhalten (7.26 mmol, 2.22 g). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{17}H_{28}N_3O_2]^+$ 306.22, gefunden 305.92.

124 - *tert*-Butyl (*R*)-3-(2-amino-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)azepan-1-carboxylat



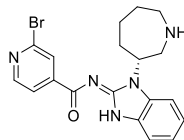
Das Diamin **123** (4.0 mmol, 1.22 g) wurde in MeCN (0.5 M) gelöst und zu einer Lösung aus Bromyan (4.0 mmol, 424 mg) in MeOH/MeCN (3:1, 0.5 M) getropft. Die Lösung wurde für 2 h bei 50 °C gerührt und anschließend unter Eiskühlung mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung gequenchet. Das Gemisch wurde zwischen DCM und Wasser getrennt und die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH/ NH_3) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 96% gewonnen (3.8 mmol, 1.26 g). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{18}H_{27}N_4O_2]^+$ 331.21, gefunden 331.00.

125 - *tert*-Butyl-(*R,E*)-3-(2-((2-bromoisonicotinoyl)imino)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)azepan-1-carboxylat



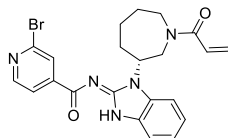
2-Bromoisonicotinsäure Triflat (**121**, 1.50 mmol, 474 mg) wurde in DCM (0.1 M) gelöst und mit DIPEA (7.50 mmol, 1.31 mL) versetzt. Bei 0 °C wurde TBTU (1.65 mmol, 530 mg) zugegeben und für 10 min gerührt bevor *tert*-butyl (*R*)-3-(2-Amino-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)azepan-1-carboxylat (**124**, 1.65 mmol, 545 mg) zugegeben wurde. Die Reaktion wurde für 30 min gerührt und anschließend zwischen Bicarbonat und DCM getrennt. Die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 92% gewonnen (1.38 mmol, 711 mg). **LC-MS** (ESI+) (m/z) berechnet für $[C_{24}H_{29}BrN_5O_3]^+$ 514.14, gefunden 513.91.

126 - (R,E)-N-(1-(Azepan-3-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-ylidene)-2-bromoisonicotinamid



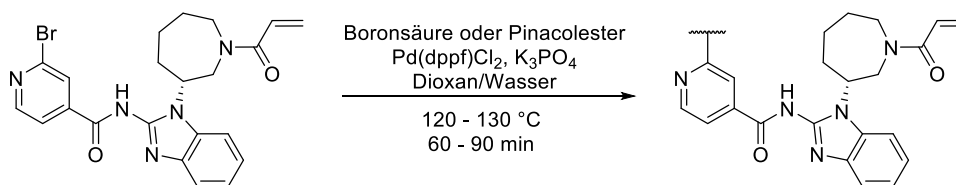
125 (1.00 mmol, 514 mg) wurde in DCM (0.1 M) gelöst und mit TFA (0.1 M) versetzt. Die Reaktion wurde für 1 h bei Rt gerührt und anschließend im Luftstrom eingeeengt. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und mit Bicarbonat-Lösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH/NH₃) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 92% gewonnen (0.92 mmol, 380 mg). ¹H NMR (700 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.56 - 1.71 (m, 2 H) 1.78 - 1.93 (m, 3 H) 2.32 - 2.42 (m, 1 H) 2.67 - 2.76 (m, 1 H) 3.02 - 3.15 (m, 2 H) 3.38 (dd, *J*=14.20, 6.02 Hz, 1 H) 5.08 (br. s., 1 H) 7.22 - 7.31 (m, 2 H) 7.57 - 7.61 (m, 1 H) 7.94 (d, *J*=7.31 Hz, 1 H) 8.09 (dd, *J*=4.95, 1.29 Hz, 1 H) 8.17 - 8.21 (m, 1 H) 8.55 (dd, *J*=4.95, 0.65 Hz, 1 H). **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₁₉H₂₁BrN₅O]⁺ 414.09, gefunden 413.96.

127 - (R,E)-N-(1-(1-Acryloylazepan-3-yl)-1,3-dihydro-2H-benzo[d]imidazol-2-ylidene)-2-bromoisonicotinamid



126 (0.94 mmol, 390 mg) wurde in DCM:THF (50:50, 0.05 M) gelöst und mit DIPEA (9.40 mmol, 1.6 mL) versetzt. Bei 0 °C wurde in THF vorgelöstes Acryloylchlorid (1.03 mmol, 84 µL) zugegeben und für 30 min bei Rt gerührt. Die Reaktion wurde zwischen DCM und Bicarbonat-Lösung getrennt. Die wässrige Phase wurde zweifach mit DCM extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Silica (DCM:MeOH) aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in quantitativer Ausbeute gewonnen (0.95 mmol, 446 mg). **LC-MS** (ESI+) (*m/z*) berechnet für [C₂₂H₂₃BrN₅O₂]⁺ 468.10, gefunden 468.03.

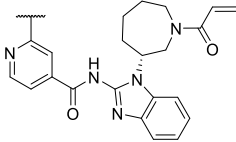
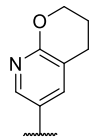
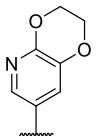
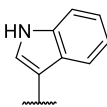
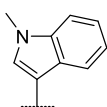
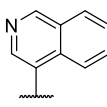
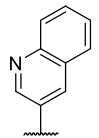
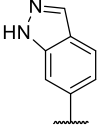
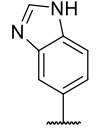
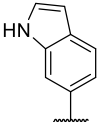
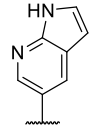
Generierung einer Substanzbibliothek mit Derivatisierung des Isonicotinamids:



Evaluation der generierten Substanzbibliothek:

	HTRF EGFR Wildtyp [nM]	HTRF EGFR D770_N771insNPG [nM]	CTG A431 [nM]	CTG Ba/F3-EGFR H773_V774insNPH [nM]
	0,033 ± 0,011	0,042 ± 0,006	4473 ± 1601	13 ± 2
	0,034 ± 0,006	0,124 ± 0,016	13972 ± 8428	99 ± 24
	0,029 ± 0,010	0,037 ± 0,010	4156 ± 746	13 ± 3
	0,035 ± 0,009	0,040 ± 0,002	923 ± 344	16 ± 1
	0,040 ± 0,009	0,087 ± 0,012	6541 ± 2293	103 ± 28
	0,033 ± 0,011	0,072 ± 0,009	2135 ± 599	27 ± 6
	0,042 ± 0,002	0,059 ± 0,012	1273 ± 333	24 ± 6
	0,081 ± 0,036	0,162 *	2846 ± 700	97 ± 16
	0,056 ± 0,016	0,136 *	2298 ± 460	50 ± 9

* Einfachmessung

	HTRF EGFR Wildtyp [nM]	HTRF EGFR D770_N771insNPG [nM]	CTG A431 [nM]	CTG Ba/F3-EGFR H773_V774insNPH [nM]
	0,037 ± 0,006	0,034 ± 0,006	802 ± 180	20 ± 5
	0,040 ± 0,003	0,047 ± 0,006	2377 ± 646	21 ± 5
	0,173 ± 0,013	0,950 ± 0,131	7322 ± 2522	484 ± 327
	0,084 ± 0,017	0,516 ± 0,091	9991 ± 2741	828 ± 103
	0,028 ± 0,011	0,023 ± 0,008	585 ± 152	14 ± 3
	0,060 ± 0,016	0,101 ± 0,011	6215 ± 1431	179 ± 59
	0,040 ± 0,004	0,113 ± 0,012	10566 ± 5321	84 ± 16
	0,063 ± 0,018	0,224 ± 0,017	4093 ± 2012	187 ± 61
	0,091 ± 0,027	0,674 ± 0,011	18135 ± 5368	332 ± 71
	0,017 ± 0,005	0,030 ± 0,005	1567 ± 374	23 ± 3

6. Anhang

6.1. Literaturverzeichnis

- [1] <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/286584/umfrage/zahl-der-krebstodesfaelle-nach-krebsart-weltweit>, Stand 12.05.2021.
- [2] <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>, Stand 12.05.2021.
- [3] S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, D. A. Haber, *Nat Rev Cancer* **2007**, 7, 169-181.
- [4] E. Rapp, J. L. Pater, A. Willan, Y. Cormier, N. Murray, W. K. Evans, D. I. Hodson, D. A. Clark, R. Feld, A. M. Arnold, J. I. Ayoub, K. S. Wilson, J. Latreille, R. F. Wierzbicki, D. P. Hill, *J Clin Oncol* **1988**, 6, 633-641.
- [5] D. H. Joan H. Schiller, Chandra P. Belani, Corey Langer, Alan Sandler, James Krook, Junming Zhu, David H. Johnson, *N Engl J Med* **2002**, 346, 92-98.
- [6] G. V. Scagliotti, F. De Marinis, M. Rinaldi, L. Crino, C. Gridelli, S. Ricci, E. Matano, C. Boni, M. Marangolo, G. Failla, G. Altavilla, V. Adamo, A. Ceribelli, M. Clerici, F. Di Costanzo, L. Frontini, M. Tonato, P. Italian Lung Cancer, *J Clin Oncol* **2002**, 20, 4285-4291.
- [7] W. Pao, K. E. Hutchinson, *Nat Med* **2012**, 18, 349-351.
- [8] W. Pao, N. Girard, *The Lancet Oncology* **2011**, 12, 175-180.
- [9] A. F. Gazdar, *N Engl J Med* **2009**, 361, 1018-1020.
- [10] A. Potti, R. L. Schilsky, J. R. Nevins, *Sci. Transl. Med.* **2010**, 2, 1-3.
- [11] M. Kalia, *Metabolism* **2013**, 62 Suppl 1, S11-14.
- [12] J. Mendelsohn, *J Clin Oncol* **2013**, 31, 1904-1911.
- [13] R. Roskoski, Jr., *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, 319, 1-11.
- [14] N. F. Endres, K. Engel, R. Das, E. Kovacs, J. Kuriyan, *Curr Opin Struct Biol* **2011**, 21, 777-784.
- [15] G. J. Todaro, J. E. DeLarco, C. Fryling, P. A. Johnson, M. B. Sporn, *Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry* **1981**, 15, 287-301.
- [16] E. L. Stewart, S. Z. Tan, G. Liu, M. S. Tsao, *Transl Lung Cancer Res* **2015**, 4, 67-81.
- [17] J. L. Marx, *Science* **1981**, 211, 1336-1338.
- [18] J. B. John Mendelsohn, *Oncogene* **2000**, 19, 6550-6565.
- [19] G. T. Fortunato Ciardiello, *Clin Cancer Res* **2001**, 7, 2958-2970.
- [20] T. J. Lynch, D. W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R. A. Okimoto, B. W. Brannigan, P. L. Harris, S. M. Haserlat, J. G. Supko, F. G. Haluska, D. N. Louis, D. C. Christiani, J. Settleman, D. A. Haber, *N Engl J Med* **2004**, 350, 2129-2139.

- [21] T. S. Mok, Y.-L. Wu, S. Thongprasert, C.-H. Yang, D.-T. Chu, N. Saijo, P. Sunpaweravong, B. Han, B. Margono, Y. Ichinose, Y. Nishiwaki, Y. Ohe, J.-J. Yang, B. Chewaskulyong, H. Jiang, E. L. Duffield, C. L. Watkins, A. A. Armour, M. Fukuoka, *N Engl J Med* **2009**, *361*, 947-957.
- [22] J. Niggenaber, J. Hardick, J. Lategahn, D. Rauh, *J Med Chem* **2020**, *63*, 40-51.
- [23] C. H. Yun, K. E. Mengwasser, A. V. Toms, M. S. Woo, H. Greulich, K. K. Wong, M. Meyerson, M. J. Eck, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 2070-2075.
- [24] H. A. Yu, M. E. Arcila, N. Rekhtman, C. S. Sima, M. F. Zakowski, W. Pao, M. G. Kris, V. A. Miller, M. Ladanyi, G. J. Riely, *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 2240-2247.
- [25] J. Singh, E. M. Dobrusin, D. W. Fry, T. Haske, A. Whitty, D. J. McNamara, *J Med Chem* **1997**, *40*, 1130-1135.
- [26] T. A. Baillie, *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55*, 13408-13421.
- [27] M. L. Sos, H. B. Rode, S. Heynck, M. Peifer, F. Fischer, S. Kluter, V. G. Pawar, C. Reuter, J. M. Heuckmann, J. Weiss, L. Ruddigkeit, M. Rabiller, M. Koker, J. R. Simard, M. Getlik, Y. Yuza, T. H. Chen, H. Greulich, R. K. Thomas, D. Rauh, *Cancer Res* **2010**, *70*, 868-874.
- [28] F. A. Eskens, C. H. Mom, A. S. Planting, J. A. Gietema, A. Amelsberg, H. Huisman, L. van Doorn, H. Burger, P. Stopfer, J. Verweij, E. G. de Vries, *Br J Cancer* **2008**, *98*, 80-85.
- [29] N. Godin-Heymann, L. Ulkus, B. W. Brannigan, U. McDermott, J. Lamb, S. Maheswaran, J. Settleman, D. A. Haber, *Mol Cancer Ther* **2008**, *7*, 874-879.
- [30] W. Zhou, D. Ercan, L. Chen, C. H. Yun, D. Li, M. Capelletti, A. B. Cortot, L. Chirieac, R. E. Iacob, R. Padera, J. R. Engen, K. K. Wong, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Janne, *Nature* **2009**, *462*, 1070-1074.
- [31] G. Lelais, R. Epple, T. H. Marsilje, Y. O. Long, M. McNeill, B. Chen, W. Lu, J. Anumolu, S. Badiger, B. Bursulaya, M. DiDonato, R. Fong, J. Juarez, J. Li, M. Manuia, D. E. Mason, P. Gordon, T. Groessl, K. Johnson, Y. Jia, S. Kasibhatla, C. Li, J. Isbell, G. Spraggon, S. Bender, P. Y. Michellys, *J Med Chem* **2016**, *59*, 6671-6689.
- [32] T. S. Mok, Y. L. Wu, M. J. Ahn, M. C. Garassino, H. R. Kim, S. S. Ramalingam, F. A. Shepherd, Y. He, H. Akamatsu, W. S. Theelen, C. K. Lee, M. Sebastian, A. Templeton, H. Mann, M. Marotti, S. Ghiorghiu, V. A. Papadimitrakopoulou, A. Investigators, *N Engl J Med* **2017**, *376*, 629-640.
- [33] J. C. Soria, Y. Ohe, J. Vansteenkiste, T. Reungwetwattana, B. Chewaskulyong, K. H. Lee, A. Dechaphunkul, F. Imamura, N. Nogami, T. Kurata, I. Okamoto, C. Zhou, B.

- C. Cho, Y. Cheng, E. K. Cho, P. J. Voon, D. Planchard, W. C. Su, J. E. Gray, S. M. Lee, R. Hodge, M. Marotti, Y. Rukazenzov, S. S. Ramalingam, F. Investigators, *N Engl J Med* **2018**, *378*, 113-125.
- [34] S. S. Ramalingam, J. Vansteenkiste, D. Planchard, B. C. Cho, J. E. Gray, Y. Ohe, C. Zhou, T. Reungwetwattana, Y. Cheng, B. Chewaskulyong, R. Shah, M. Cobo, K. H. Lee, P. Cheema, M. Tiseo, T. John, M. C. Lin, F. Imamura, T. Kurata, A. Todd, R. Hodge, M. Saggese, Y. Rukazenzov, J. C. Soria, F. Investigators, *N Engl J Med* **2020**, *382*, 41-50.
- [35] K. S. Thress, C. P. Paweletz, E. Felip, B. C. Cho, D. Stetson, B. Dougherty, Z. Lai, A. Markovets, A. Vivancos, Y. Kuang, D. Ercan, S. E. Matthews, M. Cantarini, J. C. Barrett, P. A. Janne, G. R. Oxnard, *Nat Med* **2015**, *21*, 560-562.
- [36] T. Nakamura, C. Nakashima, K. Komiya, K. Kitera, M. Hirai, S. Kimura, N. Aragane, *PLoS One* **2018**, *13*, e0209384.
- [37] Y. Jia, C. H. Yun, E. Park, D. Ercan, M. Manuia, J. Juarez, C. Xu, K. Rhee, T. Chen, H. Zhang, S. Palakurthi, J. Jang, G. Lelais, M. DiDonato, B. Bursulaya, P. Y. Michellys, R. Epple, T. H. Marsilje, M. McNeill, W. Lu, J. Harris, S. Bender, K. K. Wong, P. A. Janne, M. J. Eck, *Nature* **2016**, *534*, 129-132.
- [38] D. J. H. De Clercq, D. E. Heppner, C. To, J. Jang, E. Park, C. H. Yun, M. Mushajiang, B. H. Shin, T. W. Gero, D. A. Scott, P. A. Janne, M. J. Eck, N. S. Gray, *ACS Med Chem Lett* **2019**, *10*, 1549-1553.
- [39] C. To, J. Jang, T. Chen, E. Park, M. Mushajiang, D. J. H. De Clercq, M. Xu, S. Wang, M. D. Cameron, D. E. Heppner, B. H. Shin, T. W. Gero, A. Yang, S. E. Dahlberg, K. K. Wong, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Janne, *Cancer Discov* **2019**, *9*, 926-943.
- [40] J. Niggenaber, L. Heyden, T. Grabe, M. P. Muller, J. Lategahn, D. Rauh, *ACS Med Chem Lett* **2020**, *11*, 2484-2490.
- [41] J. Jang, C. To, D. J. H. De Clercq, E. Park, C. M. Ponthier, B. H. Shin, M. Mushajiang, R. P. Nowak, E. S. Fischer, M. J. Eck, P. A. Janne, N. S. Gray, *Angew Chem Int Ed Engl* **2020**, *59*, 14481-14489.
- [42] R. B. Kargbo, *ACS Med Chem Lett* **2019**, *10*, 1098-1099.
- [43] Y. Zou, D. Ma, Y. Wang, *Cell Biochem Funct* **2019**, *37*, 21-30.
- [44] S. Zeng, W. Huang, X. Zheng, C. Liyan, Z. Zhang, J. Wang, Z. Shen, *Eur J Med Chem* **2021**, *210*, 112981.
- [45] S. L. Paiva, C. M. Crews, *Curr Opin Chem Biol* **2019**, *50*, 111-119.

- [46] M. Cheng, X. Yu, K. Lu, L. Xie, L. Wang, F. Meng, X. Han, X. Chen, J. Liu, Y. Xiong, J. Jin, *J Med Chem* **2020**, *63*, 1216-1232.
- [47] X. Lu, L. Yu, Z. Zhang, X. Ren, J. B. Smail, K. Ding, *Med Res Rev* **2018**, *38*, 1550-1581.
- [48] L. Chen, W. Fu, L. Zheng, Z. Liu, G. Liang, *J Med Chem* **2018**, *61*, 4290-4300.
- [49] J. Lategahn, M. Keul, P. Klovekorn, H. L. Tumbrink, J. Niggenaber, M. P. Muller, L. Hodson, M. Flasshoff, J. Hardick, T. Grabe, J. Engel, C. Schultz-Fademrecht, M. Baumann, J. Ketzer, T. Muhlenberg, W. Hiller, G. Gunther, A. Unger, H. Muller, A. Heimsoeth, C. Golz, B. Blank-Landeshammer, L. Kollipara, R. P. Zahedi, C. Strohmam, J. G. Hengstler, W. A. L. van Otterlo, S. Bauer, D. Rauh, *Chem Sci* **2019**, *10*, 10789-10801.
- [50] X. Lu, T. Zhang, S. J. Zhu, Q. Xun, L. Tong, X. Hu, Y. Li, S. Chan, Y. Su, Y. Sun, Y. Chen, J. Ding, C. H. Yun, H. Xie, K. Ding, *ACS Med Chem Lett* **2018**, *9*, 1123-1127.
- [51] J. Shen, T. Zhang, S. J. Zhu, M. Sun, L. Tong, M. Lai, R. Zhang, W. Xu, R. Wu, J. Ding, C. H. Yun, H. Xie, X. Lu, K. Ding, *J Med Chem* **2019**, *62*, 7302-7308.
- [52] L. Yu, M. Huang, T. Xu, L. Tong, X. E. Yan, Z. Zhang, Y. Xu, C. Yun, H. Xie, K. Ding, X. Lu, *Eur J Med Chem* **2017**, *126*, 1107-1117.
- [53] H. Zhang, J. Wang, Y. Shen, H. Y. Wang, W. M. Duan, H. Y. Zhao, Y. Y. Hei, M. Xin, Y. X. Cao, S. Q. Zhang, *Eur J Med Chem* **2018**, *148*, 221-237.
- [54] Y. Y. Hei, Y. Shen, J. Wang, H. Zhang, H. Y. Zhao, M. Xin, Y. X. Cao, Y. Li, S. Q. Zhang, *Bioorg Med Chem* **2018**, *26*, 2173-2185.
- [55] H. Lei, S. Fan, H. Zhang, Y. J. Liu, Y. Y. Hei, J. J. Zhang, A. Q. Zheng, M. Xin, S. Q. Zhang, *Eur J Med Chem* **2020**, *186*, 111888.
- [56] K. Uchibori, N. Inase, M. Araki, M. Kamada, S. Sato, Y. Okuno, N. Fujita, R. Katayama, *Nat Commun* **2017**, *8*, 14768.
- [57] A. A. Romu, Z. Lei, B. Zhou, Z. S. Chen, V. Korlipara, *Bioorg Med Chem Lett* **2017**, *27*, 4832-4837.
- [58] Y. Chen, J. Wu, A. Wang, Z. Qi, T. Jiang, C. Chen, F. Zou, C. Hu, W. Wang, H. Wu, Z. Hu, W. Wang, B. Wang, L. Wang, T. Ren, S. Zhang, Q. Liu, J. Liu, *Eur J Med Chem* **2017**, *139*, 674-697.
- [59] X. Wang, L. Zhou, J. C. Yin, X. Wu, Y. W. Shao, B. Gao, *J Thorac Oncol* **2019**, *14*, 85-88.
- [60] Y. Wang, N. Yang, Y. Zhang, L. Li, R. Han, M. Zhu, M. Feng, H. Chen, A. Lizaso, T. Qin, X. Liu, Y. He, *J Thorac Oncol* **2020**, *15*, 1369-1375.

- [61] J. Zhao, M. Zou, J. Lv, Y. Han, G. Wang, G. Wang, *Onco Targets Ther* **2018**, *11*, 5545-5550.
- [62] G. J. Roth, P. W. Majerus, *J Clin Invest*. **1975**, *56*, 624-632.
- [63] J. L. Devalia, A. E. McLean, *Biochemical Pharmacology* **1983**, *32*, 2602-2603.
- [64] R. R. Yogum, D. J. Waxman, J. R. Rasmussen, J. L. Strominger, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**, *76*, 2730-2734.
- [65] E. Fellenius, T. Berglinde, G. Sachs, L. Olbe, B. Elander, E.-E. Sjöstrand, B. Wallmark, *Nature* **1981**, *290*, 159-161.
- [66] R. Féliste, D. Delebassée, M. F. Simon, H. Chap, G. Defreyn, E. Vallée, L. Douste-Blazy, J. P. Maffrand, *Thrombosis Research* **1987**, *48*, 403-415.
- [67] F. Sutanto, M. Konstantinidou, A. Domling, *RSC Med Chem* **2020**, *11*, 876-884.
- [68] H. J. Bennis, C. J. Wincott, E. W. Tate, M. A. Child, *Curr Opin Chem Biol* **2021**, *60*, 20-29.
- [69] S. Niessen, M. M. Dix, S. Barbas, Z. E. Potter, S. Lu, O. Brodsky, S. Planken, D. Behenna, C. Almaden, K. S. Gajiwala, K. Ryan, R. Ferre, M. R. Lazear, M. M. Hayward, J. C. Kath, B. F. Cravatt, *Cell Chem Biol* **2017**, *24*, 1388-1400 e1387.
- [70] Q. Zhao, X. Ouyang, X. Wan, K. S. Gajiwala, J. C. Kath, L. H. Jones, A. L. Burlingame, J. Taunton, *J Am Chem Soc* **2017**, *139*, 680-685.
- [71] L. H. Jones, *ACS Med Chem Lett* **2018**, *9*, 584-586.
- [72] A. Narayanan, L. H. Jones, *Chem Sci* **2015**, *6*, 2650-2659.
- [73] J. Adams, R. Stein, *Annual Reports in Medicinal Chemistry* **1996**, *31*, 279-288.
- [74] J. Adams, M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y.-T. Ma, L. Plamondon, R. L. Stein, *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8*, 333-338.
- [75] J. Adams, V. J. Palombella, E. A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D. D. Lazarus, J. Maas, C. S. Pien, S. Prakash, P. J. Elliott, *Cancer Res* **1999**, *59*, 2615-2622.
- [76] H. S. Ban, T. Usui, W. Nabeyama, H. Morita, K. Fukuzawa, H. Nakamura, *Org Biomol Chem* **2009**, *7*, 4415-4427.
- [77] J. A. Dean, in *Lange's Handbook of Chemistry*, 13 ed. (Ed.: M. Hill), McGraw Hill, New York, **1985**, pp. 3-128.
- [78] M. E. Arcila, K. Nafa, J. E. Chaff, N. Rekhman, C. Lau, B. A. Reva, M. F. Zakowski, M. G. Kris, M. Ladanyi, *Mol Cancer Ther* **2013**, *12*, 220-229.
- [79] C. H. Chiu, C. T. Yang, J. Y. Shih, M. S. Huang, W. C. Su, R. S. Lai, C. C. Wang, S. H. Hsiao, Y. C. Lin, C. L. Ho, T. C. Hsia, M. F. Wu, C. L. Lai, K. Y. Lee, C. B. Lin, D.

- Yu-Wung Yeh, C. Y. Chuang, F. K. Chang, C. M. Tsai, R. P. Perng, J. Chih-Hsin Yang, *J Thorac Oncol* **2015**, *10*, 793-799.
- [80] M. Yang, X. Xu, J. Cai, J. Ning, J. P. Wery, Q. X. Li, *Int J Cancer* **2016**, *139*, 171-176.
- [81] H. J. Nam, H. P. Kim, Y. K. Yoon, H. S. Hur, S. H. Song, M. S. Kim, G. S. Lee, S. W. Han, S. A. Im, T. Y. Kim, D. Y. Oh, Y. J. Bang, *Cancer Lett* **2011**, *302*, 155-165.
- [82] T. Koga, Y. Kobayashi, K. Tomizawa, K. Suda, T. Kosaka, Y. Sesumi, T. Fujino, M. Nishino, S. Ohara, M. Chiba, M. Shimoji, T. Takemoto, M. Suzuki, P. A. Janne, T. Mitsudomi, *Lung Cancer* **2018**, *126*, 72-79.
- [83] J. P. Robichaux, Y. Y. Elamin, Z. Tan, B. W. Carter, S. Zhang, S. Liu, S. Li, T. Chen, A. Poteete, A. Estrada-Bernal, A. T. Le, A. Truini, M. B. Nilsson, H. Sun, E. Roarty, S. B. Goldberg, J. R. Brahmer, M. Altan, C. Lu, V. Papadimitrakopoulou, K. Politi, R. C. Doebele, K. K. Wong, J. V. Heymach, *Nat Med* **2018**, *24*, 638-646.
- [84] G. J. Riely, J. W. Neal, D. R. Camidge, A. I. Spira, Z. Piotrowska, D. B. Costa, A. S. Tsao, J. D. Patel, S. M. Gadgeel, L. Bazhenova, V. W. Zhu, H. L. West, T. Mekhail, R. D. Gentzler, D. Nguyen, S. Vincent, S. Zhang, J. Lin, V. Bunn, S. Jin, S. Li, P. A. Janne, *Cancer Discov* **2021**.
- [85] F. Gonzalez, S. Vincent, T. E. Baker, A. E. Gould, S. Li, S. D. Wardwell, S. Nadworny, Y. Ning, S. Zhang, W. S. Huang, Y. Hu, F. Li, M. T. Greenfield, S. G. Zech, B. Das, N. I. Narasimhan, T. Clackson, D. Dalgarno, W. C. Shakespeare, M. Fitzgerald, J. Chouitar, R. J. Griffin, S. Liu, K. K. Wong, X. Zhu, V. M. Rivera, *Cancer Discov* **2021**.
- [86] S. Hasako, M. Terasaka, N. Abe, T. Uno, H. Ohsawa, A. Hashimoto, R. Fujita, K. Tanaka, T. Okayama, R. Wadhwa, K. Miyadera, Y. Aoyagi, K. Yonekura, K. Matsuo, *Mol Cancer Ther* **2018**, *17*, 1648-1658.
- [87] H. Udagawa, S. Hasako, A. Ohashi, R. Fujioka, Y. Hakozaki, M. Shibuya, N. Abe, T. Komori, T. Haruma, M. Terasaka, R. Fujita, A. Hashimoto, K. Funabashi, H. Yasuda, K. Miyadera, K. Goto, D. B. Costa, S. S. Kobayashi, *Mol Cancer Res* **2019**, *17*, 2233-2243.
- [88] S. Vyse, P. H. Huang, *Signal Transduct Target Ther* **2019**, *4*, 5.
- [89] J. M. Strelow, *SLAS Discov* **2017**, *22*, 3-20.
- [90] S. Smith, M. Keul, J. Engel, D. Basu, S. Eppmann, D. Rauh, *ACS Omega* **2017**, *2*, 1563-1575.
- [91] A. J. Brouwer, T. Ceylan, A. M. Jonker, T. van der Linden, R. M. Liskamp, *Bioorg Med Chem* **2011**, *19*, 2397-2406.

- [92] A. J. Brouwer, A. Jonker, P. Werkhoven, E. Kuo, N. Li, N. Gallastegui, J. Kemmink, B. I. Florea, M. Groll, H. S. Overkleeft, R. M. J. Liskamp, *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 10995-11003.
- [93] O. O. Fadeyi, L. R. Hoth, C. Choi, X. Feng, A. Gopalsamy, E. C. Hett, R. E. Kyne, Jr., R. P. Robinson, L. H. Jones, *ACS Chem Biol* **2017**, *12*, 2015-2020.
- [94] J. Dong, L. Krasnova, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, *53*, 9430-9448.
- [95] Z. Liu, J. Li, S. Li, G. Li, K. B. Sharpless, P. Wu, *J Am Chem Soc* **2018**, *140*, 2919-2925.
- [96] S.-J. Zhu, P. Zhao, J. Yang, R. Ma, X.-E. Yan, S.-Y. Yang, J.-W. Yang, C.-H. Yun, *Oncotarget* **2018**, *9*, 13652-13665.
- [97] C. G. Wermuth, *The Practice of Medicinal Chemistry*, 2 ed., Elsevier, London, **2003**.
- [98] J. Engel, S. Smith, J. Lategahn, H. L. Tumbrink, L. Goebel, C. Becker, E. Hennes, M. Keul, A. Unger, H. Muller, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, G. Gunther, J. G. Hengstler, D. Rauh, *J Med Chem* **2017**, *60*, 7725-7744.
- [99] D. A. Shannon, R. Banerjee, E. R. Webster, D. W. Bak, C. Wang, E. Weerapana, *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 3330-3333.
- [100] S. Planken, D. C. Behenna, S. K. Nair, T. O. Johnson, A. Nagata, C. Almaden, S. Bailey, T. E. Ballard, L. Bernier, H. Cheng, S. Cho-Schultz, D. Dalvie, J. G. Deal, D. M. Dinh, M. P. Edwards, R. A. Ferre, K. S. Gajiwala, M. Hemkens, R. S. Kania, J. C. Kath, J. Matthews, B. W. Murray, S. Niessen, S. T. Orr, M. Pairish, N. W. Sach, H. Shen, M. Shi, J. Solowiej, K. Tran, E. Tseng, P. Vicini, Y. Wang, S. L. Weinrich, R. Zhou, M. Zientek, L. Liu, Y. Luo, S. Xin, C. Zhang, J. Lafontaine, *J Med Chem* **2017**, *60*, 3002-3019.
- [101] H. Cheng, S. K. Nair, B. W. Murray, C. Almaden, S. Bailey, S. Baxi, D. Behenna, S. Cho-Schultz, D. Dalvie, D. M. Dinh, M. P. Edwards, J. L. Feng, R. A. Ferre, K. S. Gajiwala, M. D. Hemkens, A. Jackson-Fisher, M. Jalaie, T. O. Johnson, R. S. Kania, S. Kephart, J. Lafontaine, B. Lunney, K. K. Liu, Z. Liu, J. Matthews, A. Nagata, S. Niessen, M. A. Ornelas, S. T. Orr, M. Pairish, S. Planken, S. Ren, D. Richter, K. Ryan, N. Sach, H. Shen, T. Smeal, J. Solowiej, S. Sutton, K. Tran, E. Tseng, W. Vernier, M. Walls, S. Wang, S. L. Weinrich, S. Xin, H. Xu, M. J. Yin, M. Zientek, R. Zhou, J. C. Kath, *J Med Chem* **2016**, *59*, 2005-2024.
- [102] P. A. Dickinson, M. V. Cantarini, J. Collier, P. Frewer, S. Martin, K. Pickup, P. Ballard, *Drug Metab Dispos* **2016**, *44*, 1201-1212.

- [103] Y. Wang, L. Wang, S. Guan, W. Cao, H. Wang, Z. Chen, Y. Zhao, Y. Yu, H. Zhang, J. C. Pang, S. L. Huang, Y. Akiyama, Y. Yang, W. Sun, X. Xu, Y. Shi, H. Zhang, E. S. Kim, J. A. Muscal, F. Lu, J. Yang, *Sci Rep* **2016**, *6*, 19423.
- [104] M. Gunther, J. Lategahn, M. Juchum, E. Doring, M. Keul, J. Engel, H. L. Tumbrink, D. Rauh, S. Laufer, *J Med Chem* **2017**, *60*, 5613-5637.
- [105] M. Nishino, K. Suda, T. Koga, S. Ohara, T. Fujino, J. Soh, V. Tirunagaru, A. Vellanki, R. C. Doebele, T. Mitsudomi, *Thorac Cancer* **2021**.
- [106] H. Engelhardt, D. Bose, M. Petronczki, D. Scharn, G. Bader, A. Baum, A. Bergner, E. Chong, S. Dobel, G. Egger, C. Engelhardt, P. Ettmayer, J. E. Fuchs, T. Gerstberger, N. Gonnella, A. Grimm, E. Grondal, N. Haddad, B. Hopfgartner, R. Kousek, M. Krawiec, M. Kriz, L. Lamarre, J. Leung, M. Mayer, N. D. Patel, B. P. Simov, J. T. Reeves, R. Schnitzer, A. Schrenk, B. Sharps, F. Solca, H. Stadtmuller, Z. Tan, T. Wunberg, A. Zoephel, D. B. McConnell, *J Med Chem* **2019**, *62*, 10272-10293.
- [107] C. H. Yun, T. J. Boggon, Y. Li, M. S. Woo, H. Greulich, M. Meyerson, M. J. Eck, *Cancer Cell* **2007**, *11*, 217-227.
- [108] B. A. Lanman, J. R. Allen, J. G. Allen, A. K. Amegadzie, K. S. Ashton, S. K. Booker, J. J. Chen, N. Chen, M. J. Frohn, G. Goodman, D. J. Kopecky, L. Liu, P. Lopez, J. D. Low, V. Ma, A. E. Minatti, T. T. Nguyen, N. Nishimura, A. J. Pickrell, A. B. Reed, Y. Shin, A. C. Siegmund, N. A. Tamayo, C. M. Tegley, M. C. Walton, H. L. Wang, R. P. Wurz, M. Xue, K. C. Yang, P. Achanta, M. D. Bartberger, J. Canon, L. S. Hollis, J. D. McCarter, C. Mohr, K. Rex, A. Y. Saiki, T. San Miguel, L. P. Volak, K. H. Wang, D. A. Whittington, S. G. Zech, J. R. Lipford, V. J. Cee, *J Med Chem* **2020**, *63*, 52-65.
- [109] J. B. Fell, J. P. Fischer, B. R. Baer, J. F. Blake, K. Bouhana, D. M. Briere, K. D. Brown, L. E. Burgess, A. C. Burns, M. R. Burkard, H. Chiang, M. J. Chicarelli, A. W. Cook, J. J. Gaudino, J. Hallin, L. Hanson, D. P. Hartley, E. J. Hicken, G. P. Hingorani, R. J. Hinklin, M. J. Mejia, P. Olson, J. N. Otten, S. P. Rhodes, M. E. Rodriguez, P. Savechenkov, D. J. Smith, N. Sudhakar, F. X. Sullivan, T. P. Tang, G. P. Vigers, L. Wollenberg, J. G. Christensen, M. A. Marx, *J Med Chem* **2020**, *63*, 6679-6693.
- [110] L. Goebel, M. P. Muller, R. S. Goody, D. Rauh, *RSC Med Chem* **2020**, *11*, 760-770.
- [111] J. Fassunke, F. Muller, M. Keul, S. Michels, M. A. Dammert, A. Schmitt, D. Plenker, J. Lategahn, C. Heydt, J. Bragelmann, H. L. Tumbrink, Y. Alber, S. Klein, A. Heimsoeth, I. Dahmen, R. N. Fischer, M. Scheffler, M. A. Ihle, V. Priesner, A. H. Scheel, S. Wagener, A. Kron, K. Frank, K. Garbert, T. Persigehl, M. Pusken, S.

- Haneder, B. Schaaf, E. Rodermann, W. Engel-Riedel, E. Felip, E. F. Smit, S. Merkelbach-Bruse, H. C. Reinhardt, S. M. Kast, J. Wolf, D. Rauh, R. Buttner, M. L. Sos, *Nat Commun* **2018**, 9, 4655.
- [112] W. Fang, Y. Huang, J. Gan, Q. Zheng, L. Zhang, *J Thorac Oncol* **2020**, 15, e36-e37.
- [113] Y. Li, Y. Lin, J. Wu, F. Ye, *Transl Lung Cancer Res* **2020**, 9, 2188-2190.
- [114] S.-Y. He, Q.-F. Lin, J. Chen, G.-P. Yu, J.-L. Zhang, D. Shen, *World J Clin Cases* **2021**, 26, 1329-1335.
- [115] R. Minari, A. Leonetti, L. Gnetti, T. Zielli, L. Ventura, L. Bottarelli, C. Lagrasta, S. LaMonica, P. G. Petronini, R. Alfieri, M. Tiseo, *Anti-Cancer Drugs* **2021**.
- [116] F. L. Christopher A. Lipinski, Beryl W. Dominy, Paul F. Freaney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, 23, 3-25.
- [117] T. T. Wager, X. Hou, P. R. Verhoest, A. Villalobos, *ACS Chem Neurosci* **2016**, 7, 767-775.
- [118] M. Keul, TU Dortmund (Dortmund), **2019**.
- [119] W. Kabsch, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, 66, 125-132.
- [120] R. J. Read, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2001**, 57, 1373-1382.
- [121] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, 60, 2126-2132.
- [122] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, P. H. Zwart, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, 66, 213-221.