

DISSERTATION

Etablierung von biochemischen und strukturbasierten Systemen zur Charakterisierung wirkstoffresistenter EGFR-Mutanten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften, Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Technische Universität Dortmund, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

Vorgelegt von: Marina Keul
geb. 09.11.1989 in Dortmund

Dortmund, 2019

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
2. Gutachter: PD. Dr. Leif Dehmelt

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2015 bis März 2019 unter der Leitung von Prof. Dr. Daniel Rauh im Fachbereich für Chemische Biologie und Medizinische Chemie der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh für die interessante Aufgabenstellung, die gute Betreuung sowie die anregenden Diskussionen während meiner Dissertation bedanken. Herrn Dr. Leif Dehmelt möchte ich für die Übernahme des Koreferats herzlich danken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Jonas Lategahn, Dr. Helena Kaitsiotou, Dr. Christian Becker und Tobias Grabe, die gemeinsam mit mir an verschiedenen interdisziplinären Projekten gearbeitet haben und mit anregenden Diskussionen zu so mancher Problemlösung beigetragen haben. Außerdem möchte ich mich bei meiner ehemaligen Masterstudentin Janina Niggenaber für die tolle Zusammenarbeit und die vielen spaßigen Stunden in der Kristallographie bedanken. Zum Stichwort Kristallisation fallen mir natürlich noch weitere Kollegen ein, die mich tatkräftig unterstützt haben und auf so manchen SLS-Trips geradezu später Stunde für Unterhaltung gesorgt haben, an dieser Stelle möchte ich besonders Dr. Matthias Müller und meiner Büropartnerin Ina Landel Dank aussprechen. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Andreas Arndt bedanken, der im Laboralltag eine riesige Unterstützung war und etliche biochemische Daten zu verschiedensten Projekten beigetragen hat. Bei Martina Reibner, Petra Alhorn, Maria Sergani und Ulrich Schoppe möchte ich mich ferner besonders für die Unterstützung in administrativen Bereichen bedanken.

An alle weiteren derzeitigen und ehemaligen Kollegen aus der AG Rauh geht ebenfalls ein großes Dankeschön für die gute Zusammenarbeit und die schönen Stunden abseits des Labors: Jörn, Patrik, Hannah, Steven, André, Julian, Mike, Lena, Lisa, Kiru, Roberta, Svenja, Niklas, Bianca, Rajesh, Julia, Marius, Laura, Jonas und Sven.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der DPF am Max-Planck-Institut Dortmund für die Generierung der vielen Viren für die Proteinexpression in Insektenzellen. Weiterhin möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern bedanken, die in den zahlreichen interdisziplinären Projekten involviert waren und mir gezeigt haben wie wichtig Teamarbeit in der Wissenschaft ist. Dazu zählen Prof. Dr. Martin Sos, Prof. Dr. Roman Thomas, Dr. Jana Fassunke und Fabienne Müller vom Uniklinikum Köln, Julia Ketzer, Thomas Mühlenberg und Prof. Dr. Sebastian Bauer vom Uniklinikum Essen, Bernhard Blank-Landeshammer und Laxmikanth Kollipara vom ISAS, Carsten Schultz-Fademrecht vom LDC und Yannic Alber und Prof. Dr. Stefan Kast von der TU Dortmund.

Zu guter Letzt gilt der größte Dank meinen Eltern Birgitt und Heinz, meiner Tante Ursula und meinem Freund Bastian, die mich während der gesamten Promotion bedingungslos unterstützt haben und ohne die dieses Studium nicht möglich gewesen wäre. Danke euch!

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	13
Publikationen	17
Kurzfassung	21
Abstract	23
1. Einleitung	25
1.1. Zielgerichtete Tumorthherapie	25
1.2. Präzisionsmedizin in NSCLC: Vom heutigen Standard und Zukunftsperspektiven	27
1.2.1. Klinisch-validierte Zielstrukturen in NSCLC	28
1.2.2. Investigative Zielstrukturen in NSCLC	34
2. Motivation und Zielsetzung	37
3. Ergebnisse und Diskussion	39
3.1. Darstellung verschiedener klinisch-relevanter EGFR-Varianten	39
3.1.1. Exkurs: Proteinexpression in Insektenzellen	39
3.1.2. Konstruktdesign	44
3.1.3. Optimierung der Proteinexpression in Insektenzellen	47
3.1.4. Etablierung und Optimierung der Proteinreinigungs-strategie	51
3.1.4.1. Reinigung der Kristallisationskonstrukte	51
3.1.4.2. Reinigung der Assaykonstrukte	59
3.1.5. Etablierung von Kristallisationsbedingungen	61
3.1.6. Zusammenfassung	63
3.2. Einblicke in die Inhibition der EGFR-T790M Variante	64
3.2.1. Exkurs: Kinetische Bindungsstudien mit kovalenten Inhibitoren	65
3.2.2. Pyrimidin-abgeleitete EGFR-Inhibitoren	70
3.2.3. Pyrazolopyrimidin-basierte EGFR-Inhibitoren	73
3.2.4. Pyrrolopyrimidin-basierte EGFR-Inhibitoren	77
3.2.5. Zusammenfassung	85
3.3. Revival von Pozotinib in Exon20-mutiertem NSCLC	87
3.3.1. Hintergrund	87
3.3.2. Biochemische und zelluläre Profilierung	90
3.3.3. Detaillierte kinetische Bindungsstudien	93
3.3.4. Strukturbiologische Untersuchungen in EGFR	96
3.3.5. Zusammenfassung	101
3.4. Screening-Kampagne zur Identifizierung neuer Leitstrukturmotive	102

3.4.1. Hintergrund _____	102
3.4.2. Exkurs: RASPELD – eine akademische Screening-Einheit__	103
3.4.3. HTS zur Identifizierung von EGFR-C797S Inhibitoren_____	108
3.4.4. Zusammenfassung und Ausblick_____	115
3.5. Charakterisierung der wirkstoffresistenten EGFR-G724S Variante	116
3.5.1. Hintergrund _____	116
3.5.2. EGFR-G724S – eine Resistenzmutation _____	119
3.5.3. Durchmusterung einer fokussierten Substanzbibliothek ____	123
3.5.4. Detaillierte kinetische Bindungsstudien _____	125
3.5.5. Weiterführende Zell-basierte Untersuchungen mit Afatinib __	127
3.5.6. Strukturbasierte Untersuchungen _____	129
3.5.7. Zusammenfassung _____	132
4. Material und Methoden _____	135
4.1. Allgemeine Anmerkungen _____	135
4.1.1. Verbrauchsmaterialien_____	135
4.1.2. Verwendete Geräte _____	136
4.1.3. Verwendete Proteine, Reagenzien, Medien und Kits _____	137
4.1.4. Verwendete Bakterienstämme und Insektenzelllinien _____	138
4.1.5. Allgemeine Lösungen und Puffer _____	139
4.2. Molekularbiologische Methoden_____	140
4.2.1. Plasmide _____	140
4.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) _____	141
4.2.3. Restriktionsverdau_____	141
4.2.4. Reinigung von DNA_____	142
4.2.5. Ligation von DNA-Fragmenten _____	142
4.2.6. Mutagenese_____	142
4.2.7. Transformation von chemisch kompetenten Zellen _____	142
4.2.8. Transformation von elektrokompenten Zellen_____	143
4.2.9. Isolierung der Bacmid-DNA_____	143
4.3. Proteinexpression in Insektenzellen_____	143
4.3.1. Transfektion_____	144
4.3.1.1. BacMagic _____	144
4.3.1.2. MultiBac _____	144
4.3.2. Virusamplifikation und Testexpression _____	145
4.3.3. Proteinexpression im präparativen Maßstab _____	146
4.4. Proteinreinigung_____	146
4.4.1. Isolierung der Kristallisationskonstrukte _____	146
4.4.1.1. Zellyse _____	146

4.4.1.2. Erste Affinitätschromatographie und Dialyse	146
4.4.1.3. Zweite Affinitätschromatographie	147
4.4.1.4. Erste Größenausschlusschromatographie	147
4.4.1.5. Anionenaustauschchromatographie	147
4.4.1.6. Zweite Größenausschlusschromatographie	148
4.4.2. Isolierung der EGFR-Assaykonstrukte	148
4.4.2.1. Affinitätschromatographie	148
4.4.2.2. Größenausschlusschromatographie	149
4.5. Strukturbioologische Untersuchungen	149
4.5.1. Kristallisation des EGF-Rezeptors	149
4.5.1.1. <i>Screening</i> -Experimente	150
4.5.1.2. Optimierung der Kristallisationsbedingungen	150
4.5.2. Kristallisationsstudien mit cSrc	150
4.5.3. Datensammlung	151
4.5.4. Datenprozessierung	151
4.6. Biochemische Charakterisierung	151
4.6.1. Etablierung der Assaysysteme	152
4.6.1.1. Untersuchung der Enzymaktivität	153
4.6.1.2. Untersuchung der Enzymkinetik	153
4.6.1.3. Bestimmung des ATP- und Substrat- K_{ms}	154
4.6.1.4. Bestimmung des Fluorophor/Substrat-Verhältnisses	155
4.6.2. Bestimmung der IC_{50} -Werte	156
4.6.3. Kinetische Bindungsstudien	157
4.7. Zellbiologische Methoden	158
4.7.1. Humane Krebszelllinien	158
4.7.2. Zelluläre Charakterisierung	159
5. Anhang	161
5.1. Sequenzen der EGFR Konstrukte	161
5.2. Vergleich der Pufferzusammensetzungen	164
5.3. Überblick Proteinreinigung des Kristallisationskonstrukts EGFR-T790M/E865A/E866A/K867A	165
5.4. Datenstatistiken der cSrc-Komplexstrukturen	167
5.5. Datenstatistiken der EGFR-Komplexstrukturen	168
5.6. Zusatzdaten zum PC9-T790M/C797S Screen	169
5.7. Rohdaten der Screening-Kampagne mit EGFR-del19/G724S	174
6. Literaturverzeichnis	177
7. Eidestättliche Versicherung (Affidativ)	203

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Antikörper, engl. <i>antibody</i>
Abl	Abelson Kinase, engl. <i>Abelson murine leukemia</i>
AcNPV	<i>Autographa californica nuclear polyhedrosis virus</i>
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
AM	Aktivierungsmutation in EGFR entweder L858R oder del19
Amp	Ampicillin
Amp.	Amplifikation
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	engl. <i>American Type Culture Collection</i>
Bcr	engl. <i>Breakpoint cluster region</i>
BEVS	engl. <i>baculovirus expression vector system</i>
BTK	Bruton's Tyrosin-Kinase
CBB	engl. <i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CFA	engl. <i>Colony Formation Assay</i>
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
Cpd	Verbindung, engl. <i>compound</i>
CRISPR/Cas	engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated</i>
cSrc	Zelluläre Sarcoma Kinase, engl. <i>cellular sarcoma</i>
CTG	CellTiter-Glo Assay
Da	Dalton
DEL	engl. <i>DNA-encoded chemical libraries</i>
del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EAI	EGFR allosterischer Inhibitor
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
Em	Emission
EML4	engl. <i>echinoderm microtubule-associated protein-like 4</i>

ErbB	Erythroblastisches Leukemie Viral-homologes Onkogen
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBDD	Fragment-basiertes Wirkstoffdesign, engl. <i>Fragment-based drug design</i>)
FDA	engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
FPLC	Schnelle-Protein-Flüssigkeits-Chromatographie, engl. <i>Fast protein liquid chromatography</i>)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansäure
HER2/3	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2/3
HPLC	hochleistungs-Flüssigchromatographie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HTRF	homogene Zeit-aufgelöste Fluoreszenz, engl. <i>Homogeneous Time-Resolved Fluorescence</i>
HTS	Hochdurchsatz-Screening, engl. <i>High-Throughput-Screening</i>
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IEX	Ionenaustauschchromatographie, engl. <i>ion exchange chromatography</i>
IL-3	Interleukin 3
ins	Insertion
K_i	Gleichgewichtskonstante
k_{inact}	Ratenkonstante der Inaktivierung
K_m	Michaelis-Konstante
KRas	engl. <i>Kirsten rat sarcoma</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MD	Molekulardynamik
MET	mesenchymaler epithelialer Transitionsfaktor
MWCO	engl. <i>molecular weight cut off</i>
n.b.	nicht bestimmt
NGS	Sequenzierung der nächsten Generation, engl. <i>Next-generation sequencing</i>
NSCLC	nicht-kleinzelliger Lungenkrebs, engl. <i>Non-Small Cell Lung cancer</i>
OB	engl. <i>occlusion body</i>

ODV	engl. <i>occlusion-derived virus</i>
ORF	engl. <i>open reading frame</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PD-1/PD-L1	engl. <i>programmed death-1/programmed death ligand-1</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
POI	Zielprotein, engl. <i>protein of interest</i>
RASPELD	<i>Robotics-Assisted Screening Platform for Efficient Ligand Discovery</i>
RET	engl. <i>rearranged during transfection</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S/N	Signal-Rausch, engl. <i>signal-to-noise</i>
SA-XL665	Konjugat aus Streptavidin (SA) und dem Fluorophor Allophycocyanin (XL665)
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung
SBDD	Strukturbasiertes Wirkstoffdesign, engl. <i>structure-based drug design</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie, engl. <i>size exclusion chromatography</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, engl. <i>surface plasmon resonance</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphin
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGFR	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
UV	Ultraviolett
v_0	Produktbildungsgeschwindigkeit
v_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WT	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes Protein, engl. <i>Yellow fluorescent protein</i>

PUBLIKATIONEN

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

⁺Diese Autoren trugen gleichermaßen zur Publikation bei.

- [1] J. Fassunke⁺, F. Müller⁺, **M. Keul**⁺, S. Michels⁺, M.A. Dammert⁺, A. Schmitt⁺, D. Plenker, J. Lategahn, C. Heydt, J. Brägelmann, 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. Püsken, 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. Büttner, M.L. Sos, Overcoming EGFR G724S-Mediated Osimertinib Resistance through Unique Binding Characteristics of Second-Generation EGFR Inhibitors. *Nat. Commun.*, **2018**, 9.
- [2] P. Wolle⁺, J. Weisner⁺, **M. Keul**⁺, I. Landel, J. Lategahn, D. Rauh, RASPELD to Perform High-End Screening in an Academic Environment toward the Development of Cancer Therapeutics. *ChemMedChem*, **2018**, 13,2065-2072.
- [3] J. Lategahn⁺, **M. Keul**⁺, D. Rauh, Lessons To Be Learned: The Molecular Basis of Kinase-Targeted Therapies and Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2018**, 57, 2307–2313.
- [4] H. Kaitsiotou, **M. Keul**, J. Hardick, T. Mühlenberg, J. Ketzer, C. Ehrt, J. Krüll, F. Medda, O. Koch, F. Giordanetto, S. Bauer, D. Rauh, Inhibitors to Overcome Secondary Mutations in the Stem Cell Factor Receptor KIT. *J. Med. Chem.*, **2017**, 60, 8801–8815.

- [5] S. Tomassi⁺, J. Lategahn⁺, J. Engel, **M. Keul**, H.L. Tumbrink, J. Ketzer, T. Mühlenberg, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, S. Bauer, D. Rauh, Indazole-Based Covalent Inhibitors To Target Drug-Resistant Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 2361–2372.
- [6] J. Engel⁺, S. Smith⁺, J. Lategahn, H.L. Tumbrink, L. Goebel, C. Becker, E. Hennes, **M. Keul**, A. Unger, H. Müller, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, G. Günther, J.G. Hengstler, D. Rauh, Structure-Guided Development of Covalent and Mutant-Selective Pyrazolopyrimidines to Target T790M Drug Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 7725–7744.
- [7] S. Smith, **M. Keul**, J. Engel, D. Basu, S. Eppmann, D. Rauh, Characterization of Covalent-Reversible EGFR Inhibitors. *ACS Omega*, **2017**, *2*, 1563–1575.
- [8] M. Günther⁺, J. Lategahn⁺, M. Juchum, E. Döring, **M. Keul**, J. Engel, H.L. Tumbrink, D. Rauh, S. Laufer, Trisubstituted Pyridinylimidazoles as Potent Inhibitors of the Clinically Resistant L858R/T790M/C797S EGFR Mutant: Targeting of Both Hydrophobic Regions and the Phosphate Binding Site. *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 5613–5637.
- [9] D. Plenker, M. Riedel, J. Brägelmann, M.A. Dammert, R. Chauhan, P.P. Knowles, C. Lorenz, **M. Keul**, M. Bührmann, O. Pagel, V. Tischler, A.H. Scheel, D. Schütte, Y. Song, J. Stark, F. Mrugalla, Y. Alber, A. Richters, J. Engel, F. Leenders, J.M. Heuckmann, J. Wolf, J. Diebold, G. Pall, M. Peifer, M. Aerts, K. Gevaert, R.P. Zahedi, R. Buettner, K.M. Shokat, N.Q. McDonald, S.M. Kast, O. Gautschi, R.K. Thomas, M.L. Sos, Drugging the Catalytically Inactive State of RET Kinase in RET-Rearranged Tumors. *Sci. Transl. Med.*, **2017**, *9*, 1–12.

- [10] C. Becker, S. Öcal, H.D. Nguyen, T. Phan, **M. Keul**, J.R. Simard, D. Rauh, Monitoring Conformational Changes in the Receptor Tyrosine Kinase EGFR. *ChemBioChem*, **2016**, *17*, 990–994.
- [11] J. Engel⁺, C. Becker⁺, J. Lategahn, **M. Keul**, J. Ketzer, T. Mühlenberg, L. Kollipara, C. Schultz-Fademrecht, R.P. Zahedi, S. Bauer, D. Rauh, Insight into the Inhibition of Drug-Resistant Mutants of the Receptor Tyrosine Kinase EGFR. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2016**, *55*, 10909–10912.
- [12] J. Engel, A. Richters, M. Getlik, S. Tomassi, **M. Keul**, M. Termathe, J. Lategahn, C. Becker, S. Mayer-Wrangowski, C. Grütter, N. Uhlenbrock, J. Krüll, N. Schaumann, S. Eppmann, P. Kibies, F. Hoffgaard, J. Heil, S. Menninger, S. Ortiz-Cuaran, J.M. Heuckmann, V. Tinnefeld, R.P. Zahedi, M.L. Sos, C. Schultz-Fademrecht, R.K. Thomas, S.M. Kast, D. Rauh, Targeting Drug Resistance in EGFR with Covalent Inhibitors: A Structure-Based Design Approach. *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 6844–6863.

KURZFASSUNG

Die Identifikation von EGFR-Mutationen in Exon19 und Exon21 als prädiktive Biomarker, die mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber EGFR-Inhibitoren der ersten Generation assoziiert werden konnten, leitete einen Paradigmenwechsel in der Behandlung von NSCLC-Patienten ein.^[1-2] In entsprechenden Studien konnte retrospektiv gezeigt werden, dass lediglich Tumore auf die Behandlung mit Gefitinib ansprachen, wenn eine somatische EGFR-Mutation vorlag und im Umkehrschluss Patienten ohne die entsprechende Mutation nicht von der Behandlung mit Gefitinib profitierten, obwohl die Tumore von einer Entität des gleichen Gewebetyps abgeleitet wurden.^[3-4] Anhand dieses Beispiels wurde einerseits das enorme Potential der zielgerichteten Therapie deutlich, aber auch die Tatsache, dass ein tiefgründiges Verständnis der Tumorbiologie eine Voraussetzung für die erfolgreiche zielgerichtete Krebstherapie darstellt.

Mit dem Ziel charakteristische Merkmale der einzelnen EGFR-Mutanten herauszuarbeiten und innerhalb von Optimierungsstudien an neuartigen Inhibitoren SAR-Profile erstellen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene biochemische und strukturelle Systeme für Untersuchungen an wirkstoffresistenten Varianten des EGF-Rezeptors etabliert. Dazu wurde im ersten Schritt die Proteinexpression für einzelne Mutanten des EGFRs in Insektenzellen etabliert und optimiert, um im Anschluss diese durch geeignete Reinigungsstrategien in ausreichender Menge und Reinheit zu erhalten. Auf diesem Weg wurden die EGFR-del19, EGFR-del19/G724S und die EGFR-L858R/T790M/C797S Mutanten für biochemische Assays und die EGFR-T790M/E865A/E866A/K867A sowie die EGFR-T790M/V948R Variante für Kristallisationsstudien erhalten. Ferner konnten entsprechende aktivitätsbasierte Assaysysteme etabliert und Kristallisationssysteme für die EGFR-T790M/V948R Mutante entwickelt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung von neuartigen Inhibitoren zur Adressierung der EGFR-T790M Mutante, wobei die kovalente Adressierung des Cys797 in vorangegangenen Studien als entscheidender Faktor für die effiziente Inhibition der Türstehermutante identifiziert und durch die Einführung von Michael-Akzeptorsystemen in verschiedene Gerüstklassen realisiert wurde. Aufgrund des kovalenten Charakters der Bindungsmechanismus ist eine Beurteilung der Aktivität in biochemischen Systemen anhand des IC_{50} -Werts nur schätzungsweise möglich. Daher wurden detaillierte kinetische Bindungsstudien zur Bestimmung der initialen reversiblen Affinität K_i einer Verbindung zum Enzym und der Rate der Inaktivierung k_{inact} herangezogen und distinkte Profile der einzelnen Gerüstklassen ermittelt. So zeigte sich für Pyrazolopyrimidin-basierte Inhibitoren und Pyrimidin-abgeleitete Inhibitoren eine hohe Abhängigkeit der inhibitorischen Wirksamkeit vom kovalenten Charakter der Bindung, was sich in hohen k_{inact} -Werten manifestierte.

In Korrelation mit diesen Daten, resultierte die Einführung der C797S-Mutation in einem drastischen Verlust der inhibitorischen Aktivität.

Weiterhin wurden Pyrrolopyrimidin-basierte Inhibitoren kinetisch evaluiert, für die eine ausgesprochen hohe reversible Affinität nachgewiesen werden konnte und K_i -Werte der Verbindungen im subnanomolaren Bereich gegenüber der EGFR-L858R/T790M Mutante ermittelt wurden. An dieser Stelle konnte zum ersten Mal eine hohe inhibitorische Potenz gegenüber der EGFR-L858R/T790M/C797S Mutante in biochemischen Assays beobachtet werden, so wurde beispielsweise für den Inhibitor RL2029 ein IC_{50} -Wert von etwa 8 nM festgestellt. Im Folgenden konnte diese Aktivität aber nicht in zelluläre Potenz translatiert werden, welches auf die schlechte Zell-Permeabilität der Verbindungen zurückzuführen sein könnte und einen Ansatzpunkt für weitere Optimierungsstudien darstellt.

In dieser Arbeit wurde außerdem eine Durchmusterung der laborinternen Substanzbibliothek nach aktiven Verbindungen gegenüber der PC9-T790M/C797S Zelllinie mit Hilfe der semi-automatisierten Screening-Einheit RASPELD vorgenommen. Hierbei wurden initial 148 Verbindungen identifiziert, die eine Reduktion der Viabilität der untersuchten Zellen um 70% hervorriefen. In weiterführenden Hitvalidierungsstudien wurden fünf interessante Substanzen identifiziert, die EC_{50} -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich gegenüber EGFR-mutierten Zelllinien zeigten und gleichzeitig keine Aktivität gegenüber EGFR-WT Zelllinien demonstrierten. Jedoch konnte in biochemischen aktivitätsbasierten Assaysystemen keine inhibitorische Aktivität der Hitverbindungen gegenüber den verschiedenen EGFR-Varianten festgestellt werden, sodass Western-Blot Studien angeschlossen werden sollten oder gegebenenfalls andere Zielstrukturen der Verbindungen in Betracht gezogen werden sollten.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit erfolgte innerhalb eines Kooperationsprojektes eine tiefgreifende Charakterisierung der kürzlich identifizierten EGFR-del19/G724S Mutation, die in Patienten eine Wirkstoffresistenz gegenüber des Drittgenerationsinhibitors Osimertinib vermittelt. In biochemischen Assays konnte die klinische Beobachtung verifiziert und nachgestellt werden, sodass das etablierte System als Grundlage für Screening-Experimente genutzt werden konnte. Die Durchmusterung einer fokussierten Substanzbibliothek ergab signifikante Unterschiede in der Potenz der einzelnen Generationen an EGFR-Inhibitoren, sodass abgeleitet werden konnte, dass die del19/G724S-Mutation eine Resistenz gegenüber allen bekannten Drittgenerationsinhibitoren vermittelt. Weiterhin konnten Zweitgenerationsinhibitoren wie Afatinib und Poziotinib als potente Inhibitoren identifiziert werden, für die auch in kinetischen Profilierungen eine hohe Affinität ($K_i < 1$ nM) gegenüber der Osimertinib-resistenten Mutation nachgewiesen werden konnte. Schlussendlich konnte die hohe inhibitorische Wirksamkeit des Afatinibs gegenüber der EGFR-del19/G724S Mutante in zelluläre Potenz und *in vivo* Aktivität gezeigt werden.

ABSTRACT

The identification of EGFR mutations in exon19 and exon21 as predictive biomarkers, which were associated with an increased sensitivity towards first-generation EGFR inhibitors, initiated a paradigm shift in cancer treatment.^[1-2] Retrospective analysis of data from clinical trials, that did not confirm a benefit of gefitinib treatment in NSCLC in the first place, revealed recurrent activating mutations in the kinase domain of EGFR in patients who responded to gefitinib treatment. Moreover, patients, who did not respond to gefitinib treatment, did not exhibit somatic mutations in EGFR.^[3-4] These findings reflected the enormous potential of targeted therapy, but also the fact that a profound understanding of tumor biology is a crucial prerequisite for successful targeted cancer treatment.

Within the scope of this work, various biochemical and crystallization systems were established for investigations on drug-resistant variants of the EGF-receptor, to identify characteristic features of individual EGFR mutants and to be able to generate SAR profiles within optimization studies of novel inhibitors. At first, protein expression systems for EGFR mutant proteins in insect cells were established and optimized in order to obtain sufficient amounts and satisfactory purity through appropriate purification strategies. Thereby, EGFR-del19, EGFR-del19/G724S and EGFR-L858R/T790M/C797S mutants for biochemical assays were obtained, and EGFR-T790M/E865A/E866A/E867A/K867A as well as EGFR-T790M/V948R variants for crystallization studies were acquired. Furthermore, activity-based assay systems have been established and crystallization systems for the EGFR-T790M/V948R mutant were developed.

Another focus of this work was the characterization of novel EGFR-T790M inhibitors, wherein covalent modification of Cys797 was identified as a decisive factor for efficient inhibition of the gatekeeper mutant. This was realized by introducing Michael-acceptor systems into different scaffolds. Due to the covalent nature of the binding mechanism, the rating of inhibitory activities of these compounds by means of IC₅₀-determinations in the biochemical setting is only approximately. Therefore, detailed kinetic binding studies were performed to determine the initial reversible affinity K_i of a compound to the enzyme and the rate of inactivation k_{inact} , wherein distinct profiles of individual scaffold classes were determined. Thereby, a high dependence of the inhibitory efficacy on the covalent character was observed for pyrazolopyrimidine-based inhibitors and pyrimidine-derived inhibitors, which manifested itself in high k_{inact} -values. In correlation with these data, the introduction of the C797S mutation resulted in a dramatic loss of inhibitory activity.

Furthermore, pyrrolopyrimidine-based inhibitors were evaluated kinetically and in general, revealed high reversible affinities towards EGFR mutant proteins, which was demonstrated by K_i -values in the subnanomolar range. Subsequently, a high

inhibitory potency of the pyrrolopyrimidine-based inhibitor, RL2029, against the EGFR-L858R/T790M/C797S mutant was observed in biochemical assays. In the following, however, this activity could not be translated into cellular potency, which could be due to the poor cell permeability of the compounds and represents a starting point for further optimization studies.

Moreover, a screening-campaign was performed to identify novel scaffolds for the inhibition of EGFR-AM/T790M/C797S using the semi-automated screening unit RASPELD. Initially, 148 compounds, which led to a significant reduction of cell viability, were identified and further investigated. Within hit validation studies, five interesting compounds were identified, which showed EC_{50} -values in the low micromolar range in the context of EGFR mutated cell lines and at the same time demonstrated no activity against EGFR-WT cell lines. However, no inhibitory effect of the selected compounds against various EGFR mutants was observed in biochemical activity-based assay systems. Hence, further studies are necessary to elucidate the mode of action of these ligands.

Within a cooperation project, a profound characterization of the recently identified G724S-mutation in EGFR, which mediated drug resistance against the third-generation inhibitor osimertinib in NSCLC-patients with primary del19-mutations, was performed. Initial biochemical assays confirmed the resistance mediating effect of the identified EGFR-del19/G724S mutation against osimertinib and resulted in a 50-fold impaired IC_{50} -value in comparison to the inhibition of EGFR-del19 mutants. Thereby, the established system was validated for the use in further screening experiments. The screening of a focused substance library revealed significant differences in the potency of the individual generations of EGFR inhibitors, which led to the assumption that the del19/G724S mutation mediated resistance against all known first- and third-generation inhibitors. More, second generation inhibitors such as afatinib and poziotinib were identified as potent inhibitors and revealed a high reversible affinity ($K_i < 1$ nM) towards the osimertinib-resistant mutant in kinetic studies. Finally, structural analyses and computer-aided modelling have been carried out suggesting that the G724S-mutation can induce a conformation of the glycine-rich loop that is incompatible with the binding of third-generation TKIs, while the binding of first- and second-generation inhibitors is still possible. Taken into account, that the EGFR-del19/G724S variant exhibited an increased ATP affinity, a covalent mode of action could be mandatory for the effective inhibition of this protein. Lastly, the high inhibitory efficacy of afatinib against the EGFR-del19/G724S mutant could be translated into cellular potency and *in vivo* activity, which suggests treating these patients with the clinically approved second-generation inhibitor afatinib.

1. EINLEITUNG

1.1. Zielgerichtete Tumorthherapie

Enorme Fortschritte im Bereich der Molekulargenetik und der Abschluss des Humangenomprojekts 2003 ließen detaillierte Rückschlüsse auf die molekularen Grundlagen einer Krebserkrankung zu und bestätigten, dass Krebs eine Krankheit des Genoms ist.^[5-8] Dieses Wissen wird zunehmend im Rahmen der Präzisionsmedizin in diagnostische und therapeutische Werkzeuge umgesetzt, sodass ein gezieltes Eingreifen in aberrante Stoffwechselwege oder Wachstumsprozesse erfolgt, anstatt unselektiv schnell teilende Zellen zu adressieren, wie es in der cytotoxischen Chemotherapie der Fall ist.^[9-11]

Die Überlegung krankheitsauslösende Strukturen selektiv zu adressieren, geht auf Paul Ehrlich zurück, der 1913 forderte:^[12-13]

„Wir müssen chemisch zielen lernen!“^[14]

EHRlich verstand es, wie kaum ein anderer in der damaligen Zeit, die Verbindung zwischen Chemie, Biologie und Medizin herzustellen, wobei er im weitesten Sinne davon ausging, dass die biologische Wirkung einer Substanz von deren Molekülstruktur und der Zelle, auf die eine Wirkung ausgeübt wurde, abhängig sei.^[14] In Zusammenarbeit mit Sahachiro Hata gelang es ihm das erste zielgerichtete Therapeutikum eine sog. *magic bullet* gegen Syphilis zu entwickeln und inspirierte Folgegenerationen von Medizinal Chemikern und Biologen die einer Krankheit zugrundeliegenden Mechanismen spezifisch zu adressieren.^[15]

Die Entdeckung der Onkogene gilt als weiteres Schlüsselereignis in der Historie der zielgerichteten Krebstherapie. Grundlagen dafür schafften unter anderem Peyton Rous, Robert Hübner, George Todaro, Harald Elliot Varmus und John Michael Bishop mit der intensiven Forschung an Retroviren. Rous gelang es 1911 erstmals mit einer Injektion eines zellfreien Extrakts aus Hühnertumoren in gesunde Hühner, identische Tumore zu induzieren.^[16-17] Später stellte sich heraus, dass Viren diese Krebserkrankung auslösten, sodass viele Wissenschaftler bis in die 1970er Jahre die Meinung vertraten, dass Krebs durch infektiöse Erreger verursacht wird. Ferner stellten HÜBNER und TODARO 1969 die erste Onkogen-Theorie auf und obwohl sich viele ihrer Hypothesen nicht bewahrheiteten, erkannten sie, dass der Ursprung einer Krebserkrankung ubiquitär in Zellen vorhanden sein muss.^[18-19] Den entscheidenden Zusammenhang stellten schließlich VARMUS und BISHOP her, die 1976 das für eine Tyrosinkinase codierende Proto-Onkogen cSrc als zelleigenes Homolog des ersten bekannten Onkogens vSrc identifizierten.^[20]

In den Folgejahren konnten zahlreiche Krankheitsbilder mit einer fehlregulierten Kinaseaktivität assoziiert werden.

Dennoch dauerte es weitere 20 Jahre bis die erste zielgerichtete niedermolekulare Verbindung, Imatinib, ein Inhibitor des Bcr-Abl Fusionsproteins, als Krebstherapeutikum für die Behandlung von chronischer myeloischer Leukämie (CML) zugelassen wurde. Der Einsatz von Imatinib wurde als Durchbruch in der Behandlung von CML erachtet und demonstrierte das enorme Potential der zielgerichteten Wirkstoffe, da im Vergleich zur traditionellen Behandlung mit Interferon-alpha die Überlebensrate der CML-Patienten nach 18 Monaten von 73% auf 92% erhöht werden konnte.^[21-22] Außerdem konnten eine deutliche Reduktion der Nebenwirkungen in Patienten, die mit Imatinib behandelt wurden, beobachtet werden, sodass nicht nur ein überlegener klinischer Effekt festgestellt wurde, sondern auch die Lebensqualität der Patienten deutlich verbessert werden konnte.^[21, 23] Später zeigte sich, dass Imatinib nicht ausschließlich das Fusionsprotein Bcr-Abl, sondern auch die Tyrosinkinase KIT effektiv inhibiert, die ihrerseits als onkogener Treiber in verschiedenen Krebsarten, wie beispielsweise gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), auftritt.^[24-25] Auch die Behandlung von GIST-Patienten, die Aktivierungsmutationen in KIT trugen, mit Imatinib resultierte in hohen Ansprechraten und einer drastischen Erhöhung des progressionsfreien Überlebens.^[26-28] Gleichzeitig wird die hohe Aktivität von Kinaseinhibitoren gegenüber diversen Zielstrukturen mit *off-target* Effekten assoziiert und stellt eine große Herausforderung in der heutigen Entwicklung von neuartigen Kinaseinhibitoren dar.

Aufgrund von bemerkenswerten Fortschritten in der Sequenziertechnik konnten zehntausende genetische und epigenetische Aberrationen in Tumorzellen identifiziert werden, infolgedessen das Verständnis der Entstehung von Krebs nachhaltig erweitert werden konnte, aber auch die Komplexität der Krankheit offenbart wurde.^[29-30] Beachtlich ist, dass obwohl mehrere genetische Läsionen in einer Tumorzelle aufgefunden werden, die Inaktivierung eines einzelnen onkogenen Treibers ausreicht, um das Wachstum der Krebszellen zu beeinflussen. Dieses Phänomen wird als *oncogene addiction* bezeichnet und bildet die Grundlage für die zielgerichtete Adressierung von onkogenen Treibern. In den wegweisenden Reviews „*Hallmarks of cancer*“ (2000) und „*Hallmarks of cancer: the next generation*“ (2011) fassten HANAHAN und WEINBERG essentielle Alterationen auf zellulärer Ebene zusammen, die gesunde Zellen in Krebszellen transformieren und zur Tumorentwicklung führen, indem sie Zellstoffwechsel und Zellphysiologie beeinflussen.^[31-32] Ferner illustrierten sie, dass das genaue Verständnis der Tumorbiologie eines jeden Tumors entscheidend ist und zeigten neue Ansätze für zielgerichtete Therapien auf.

Letztlich stellt die Verknüpfung einer genetischen Alteration mit einem relevanten prädiktiven Biomarker einen limitierenden Faktor der zielgerichteten Krebstherapie dar, sodass lediglich einem kleinen Teil (<10%) der Krebspatienten klinisch validierte und von der FDA zugelassene Wirkstoffe, die auf den Mutationsstatus abgestimmt wurden, zur Verfügung stehen.^[33] Weiterhin bietet die Krebstherapie

mit zielgerichteten Therapeutika in den meisten Fällen keine dauerhafte Heilung, da infolge der genomischen Instabilität der Krebszellen Wirkstoffresistenzen entstehen, die durch die Behandlung mit zielgerichteten Medikamenten selektiert werden, sodass die Patienten letztendlich Rückfälle erleiden. Die Umgehung dieser Wirkstoffresistenzen und die Identifikation weiterer prädiktiver Biomarker sind zentraler Bestandteil aktueller Forschung.

1.2. Präzisionsmedizin in NSCLC: Vom heutigen Standard und Zukunftsperspektiven

Lungenkrebs ist die häufigste maligne Krebserkrankung und die führende krebsbedingte Todesursache weltweit, wobei nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC) die überwiegende Mehrheit mit 85% aller bösartigen Erkrankungen der Lunge darstellt.^[34-35] In den letzten zehn Jahren führte das zunehmende Verständnis der Tumorbiologie in NSCLC zur vermehrten Ablösung der "one size fits all"-Behandlungsansätze durch differenzierte Behandlungsstrategien, wobei ausgehend von der Identifikation einer genetischen Läsion und deren prädiktiven Eigenschaften eine maßgeschneiderte Präzisionstherapie verabreicht wird.^[36] Hierbei stellen genetische Aberrationen in dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), in der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) und der strukturell ähnlichen Rezeptortyrosinkinase ROS1 klinisch bestätigte prädiktive Biomarker dar, die gezielt mit niedermolekularen Inhibitoren adressiert werden können (siehe Abbildung 1-1).^[37-39]

Durch den Einsatz von Präzisionstherapeutika in diesen genetisch definierten Subgruppen konnte eine signifikante Verbesserung der Überlebensdauer und Lebensqualität der Patienten durch eine Reduktion der Nebenwirkungen beobachtet werden. Während die mittlere Überlebensdauer im Jahr 2000 unter der Behandlung mit Chemotherapeutika bei ungefähr acht Monaten lag, konnte diese auf bis zu 30 Monate im Jahr 2014 gesteigert werden.^[40-41] Jedoch ist die Entstehung von Wirkstoffresistenzen unvermeidlich, die zum Teil durch Mutationen innerhalb der Kinasedomäne, oder durch sog. *bypass*-Mechanismen wie etwa durch Mutationen in HER2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2) vermittelt werden.^[42-43] Ferner werden in NSCLC-Patienten genetische Veränderungen in der Rezeptortyrosinkinase RET (*rearranged during transfection*), dem Mesenchymalen-epithelialen Transitionsfaktor (MET) sowie dem Fibroblast Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR) beobachtet, die zurzeit klinisch evaluiert werden.^[36, 44] Für Patienten in fortgeschrittenen Stadien, die keine der oben aufgeführten Mutationen aufweisen, konnten enorme Erfolge mit Immun-Checkpoint Inhibitoren erzielt werden, die durch die Inhibition der PD-1/PD-L1 Interaktion eine Immunantwort des Körpers gegenüber Krebszellen forcieren.^[45]

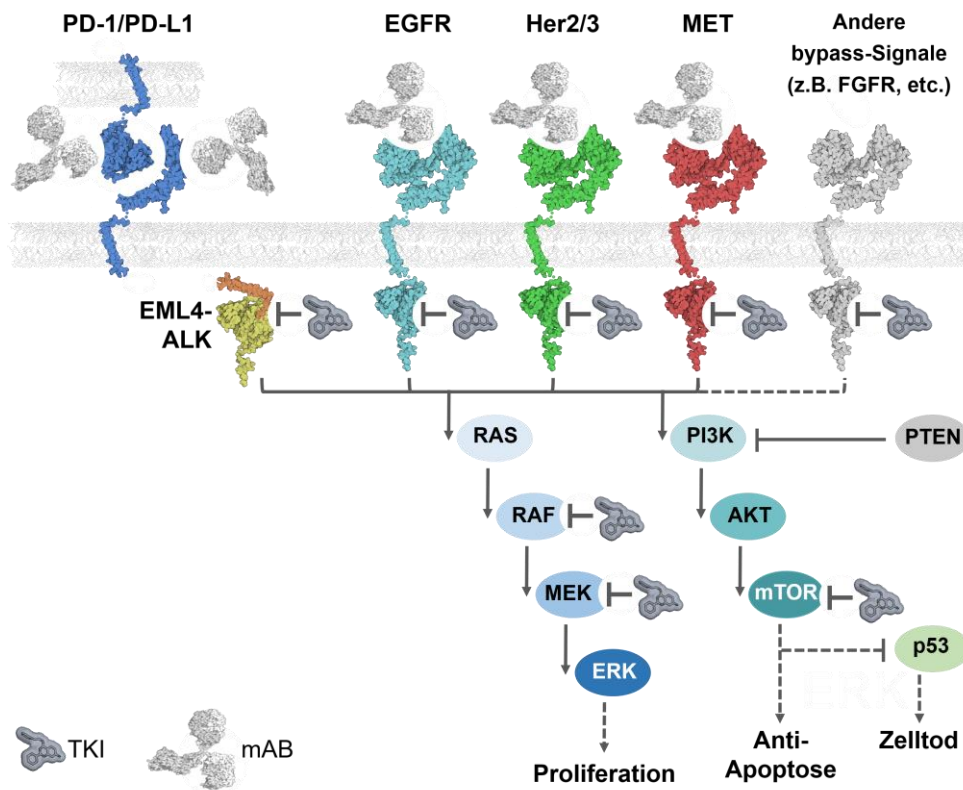


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung beispielhafter Zielproteine und Behandlungsoptionen mit TKIs des NSCLC, sowie die Signalkaskaden, die an der Entstehung von Lungenkrebs maßgeblich beteiligt sind. Die Darstellung wurde von LATEGAHN, KEUL und RAUH adaptiert. ^[1]

Im Folgenden wird auf die Entwicklung der EGFR- und ALK-Inhibitoren eingegangen, beobachtete Resistenzmechanismen und Strategien zur Umgehung dieser aufgeführt und gezeigt, dass die Übertragung von strukturbasierten Ansätzen zur Überwindung von Resistenzmutationen zwischen Proteinkinasen möglich ist und eine schnelle Entwicklung potenter Inhibitoren erlauben könnte. Ferner werden neuartige Zielstrukturen wie MET und FGFR in der Behandlung von NSCLC vorgestellt und der Einsatz von innovativer Immuntherapie thematisiert.

1.2.1. Klinisch-validierte Zielstrukturen in NSCLC

Im Fokus dieser Arbeit stand die Charakterisierung diverser onkogener Varianten des EGF-Rezeptors, der innerhalb des hoch-komplexen zellulären Netzwerks aus Signaltransduktionskaskaden eine Schlüsselposition einnimmt und an der Regulation essentieller zellulärer Prozesse wie der Proliferation, der Differenzierung, Migration oder der Apoptose maßgeblich beteiligt ist (siehe Abbildung 1-1).^[46-47] Aufgrund dessen erscheint es plausibel, dass eine Dysregulation dieser Rezeptortyrosinkinase (RTK) zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen kann und damit einhergehend ein Tumorwachstum auslöst. Tatsächlich wurden in 10-15% der NSCLC-Patienten Aktivierungsmutationen innerhalb der Kinasedomäne von EGFR identifiziert, wobei die Punktmutation L858R in Exon21 und die Deletionsmutation delE746_A750 (del19-Mutation) in

Exon19 circa 80% der onkogenen Treibermutationen abbilden.^[4, 48-49] Strukturbiochemische Untersuchungen und Computer-gestützte Verfahren suggerieren, dass die L858R-Mutation als auch die del19-Mutation das Gleichgewicht zwischen inaktiver und aktiver Konformation der Kinasedomäne in Richtung der aktiven Form verlagern und so eine gesteigerte Kinaseaktivität induzieren. Das in der Aktivierungsschleife lokalisierte Leu858 formt im inaktiven Zustand mit den angrenzenden Aminosäuren in kurzes helikales Segment, das über hydrophobe Interaktionen die regulatorische α C-Helix in einer nach außen rotierten, inaktiven Konformation stabilisiert. Die Substitution des hydrophoben Leu858 durch ein polares Arginin stört die Bildung des Netzwerks aus hydrophoben Interaktionen und destabilisiert auf diese Weise die inaktive Konformation der Kinase. Im Fall der Deletionsmutation in Exon19 wird angenommen, dass durch die verkürzte Schleife zwischen der α C-Helix und dem β 3-Faltblatt, die α C-Helix in der aktiven, zur Bindetasche rotierten Konformation fixiert wird.^[50] In klinischen Studien zeigte sich, dass diese sog. klassischen EGFR-Mutationen eine Sensitivität gegenüber EGFR-Inhibitoren aufweisen und die Behandlung mit TKIs der ersten Generation, wie Erlotinib oder Gefitinib, zu einem deutlichen Rückgang des Tumorgewebes führte.^[4, 37, 48]

Jedoch erleiden alle Patienten, die initial auf die TKI-Behandlung ansprachen, innerhalb eines Jahres nach Beginn der Therapie ein Rezidiv, das in 60% der Fälle auf die sekundäre Punktmutation T790M innerhalb der Kinasedomäne von EGFR zurückzuführen ist (siehe Abbildung 1-2 links).^[51-53] Die Substitution des Thr790 durch ein sterisch anspruchsvolles Methionin resultiert in einem leicht veränderten Bindungsmodus der Erstgenerationsinhibitoren durch Abstoßungen zwischen der Methionin-Seitenkette und dem substituierten Phenylrest des Inhibitors. Weiterhin zeigten YUN *et al.*, dass die ATP-Affinität der Kinasedomäne von den beschriebenen Mutationen beeinflusst wird, sodass für die Aktivierungsmutationen L858R und del19 eine verringerte ATP-Affinität im Vergleich zur WT-Form festgestellt wurde, die für die hohe Sensitivität gegenüber ATP-kompetitiven Inhibitoren verantwortlich ist.^[54] Die sekundäre T790M-Mutation hingegen bewirkt eine Wiederherstellung der ATP-Affinität, die in Kombination mit der sterischen Abstoßung zwischen Met790 und dem Phenyl-Substituenten den Verlust der inhibitorischen Aktivität der TKIs der ersten Generation hervorruft.

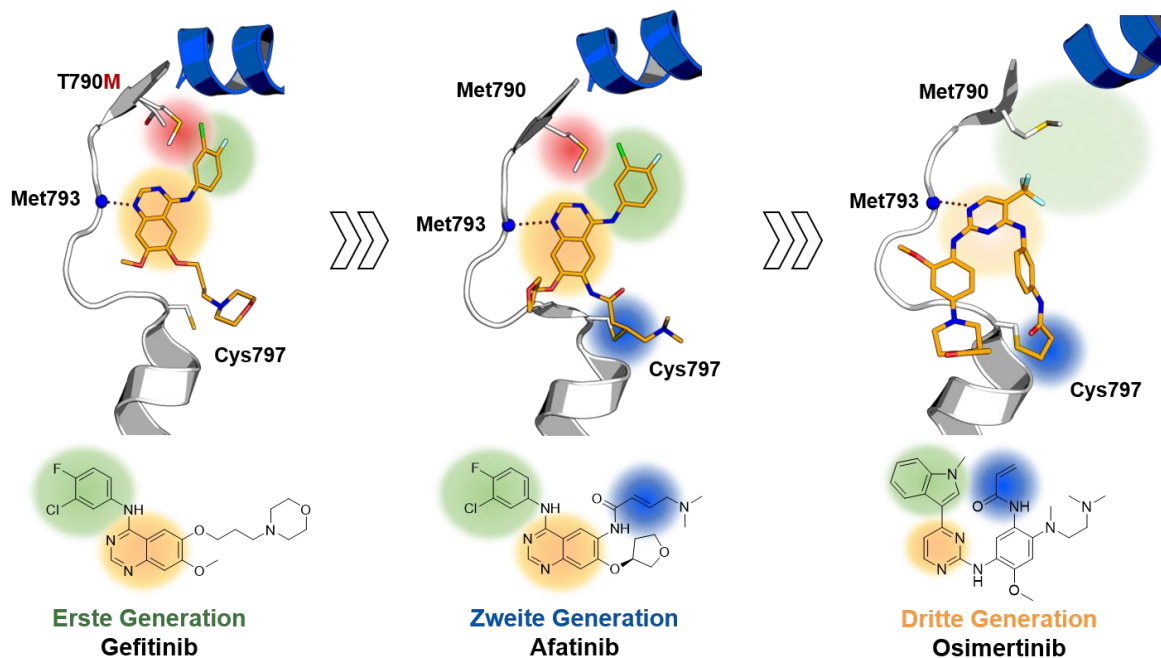


Abbildung 1-2: Vergleich der Bindungsmodi der EGFR-Inhibitoren der ersten, zweiten und dritten Generation. Die Erstgenerationsinhibitoren, wie beispielsweise Gefitinib (links), koordinieren über eine WBB zwischen dem 4-Aminochinazolin Grundgerüst (orange) und dem Peptidrückgrat des Met793 an die Scharnierregion der Kinase. Weiterhin besetzt der substituierte Phenylring (grün) eine hydrophobe Tasche in der Nähe der Türsteheraminosäure. Kommt es nun zur Substitution des Thr790 durch ein sterisch anspruchsvolles Methionin, so entstehen sterische Interferenzen zwischen dem Met790 und dem Phenylsubstituenten (rot) (PDB: 2ITY; Met790: PDB: 4G5P). Der Bindungsmodus eines Zweitgenerationsinhibitors wie Afatinib (zentral; PDB: 4G5P) unterscheidet sich aufgrund des gleichen Grundgerüsts nicht signifikant von dem der Erstgenerationsinhibitoren. Zusätzlich wurden TKIs der zweiten Generation jedoch mit Michael-Akzeptorsystemen ausgestattet, um eine kovalente Adressierung (blau) des Cys797 zu ermöglichen. Drittgenerationsinhibitoren wie Rocicetinib und Osimertinib (rechts) weisen ein Pyrimidin-Grundgerüst (orange) auf und vermeiden die Besetzung der hydrophoben Tasche an Met790 (grün). Genau wie TKIs der zweiten Generation verfügt Osimertinib über ein Michael-Akzeptor (blau), der die kovalente Bindung zum Cys797 bewirkt (PDB: 5UWD). Die Darstellung wurde von LATEGAHN, KEUL und RAUH adaptiert. ^[1]

Vor diesem Hintergrund wurden kovalent irreversible EGFR-Inhibitoren der zweiten Generation wie Afatinib entworfen, die eine erhöhte Verweildauer am Enzym erreichen und die gesteigerte ATP-Affinität der EGFR-T790M Mutante überwinden sollten (siehe Abbildung 1-2 Mitte).^[55-57] Trotz einer guten Wirksamkeit in anfänglichen *in vitro* Studien, führte die hohe Aktivität der Zweitgenerationsinhibitoren gegenüber dem Wildtyp von EGFR, die auf das Chinazolin-Grundgerüst zurückzuführen ist, in *in vivo* Studien zu starken Nebenwirkungen und letztendlich zu Dosisreduktionen, sodass die effektive Konzentration des Wirkstoffs nicht mit dem therapeutischen Behandlungsfenster kongruierte.^[58-59]

Weiterführende Wirkstoffentwicklungen strebten einen mutantenselektiven Charakter der Inhibitoren unter Verwendung eines neuartigen Grundgerüsts und der Beibehaltung des kovalenten Bindungsmodus an. Infolgedessen entstanden, abgeleitet von einem Pyrimidin-Grundgerüst, die Drittgenerationsinhibitoren WZ4002, Rocicetinib und insbesondere Osimertinib, das in klinischen Studien

Ansprechraten von 71% und ein progressionsfreies Überleben von 10.1 Monaten in EGFR-T790M mutierten NSCLC-Patienten erzielte (siehe Abbildung 1-2 rechts).^[60-63] Anhand von Kristallstrukturen konnte der kovalente Bindungsmodus der Drittgenerationsinhibitoren eindeutig bestätigt und hydrophobe Wechselwirkungen zum Met790 identifiziert werden, die auf die Methionin-Türsteheraminosäure beschränkt sind und nicht zur Threonin-Türsteheraminosäure ausgebildet werden, wodurch es zu einer 100-fachen Selektivität gegenüber dem Wildtyp von EGFR kommt.^[64] Wirkstoffresistenzen, die zu einem Fortschreiten der Krankheit führen, werden innerhalb von 11-14 Monaten nach Beginn der Therapie beobachtet und können erneut auf Punktmutationen innerhalb der Kinasedomäne von EGFR, aber auch auf EGFR-unabhängige Resistenzmechanismen zurückgeführt werden.

Die prominentesten tertiären EGFR-Mutationen stellen die C797S, L718Q und die L844V dar, wobei letztere in *in vitro* Studien eine Sensitivität gegenüber Chinazolin-basierten Inhibitoren aufwies.^[65-66] Der Verlust des kovalenten Ankerpunktes durch die Substitution des Cys797 durch ein Serin erschien schwerwiegend und die entsprechende Mutante konnte durch keinen bis dato bekannten EGFR-Inhibitor effektiv inhibiert werden. In vielen Arbeiten wurden Pyrimidin-basierte Inhibitoren mit diversen Substituenten ausgestattet, um zusätzliche Wechselwirkungen zur Kinase aufzubauen und somit die reversible Affinität der Verbindung zum Enzym zu erhöhen. UCHIBORI *et al.* beispielsweise konnten zeigen, dass der ALK-Inhibitor Brigatinib die Osimertinib-resistente EGFR Variante *in vitro* effektiv inhibieren konnte, jedoch in *in vivo* Studien die klinisch relevante Wirkstoffkonzentration nicht erreichen konnte.^[67] Weiterhin gelang mit *ortho*- anstatt mit *meta*-substituierten Amiden die Steigerung der inhibitorischen Aktivität von Aminopyrimidin-basierten Inhibitoren, die auf Interaktionen zwischen den neu eingefügten Resten und dem katalytischen Lys745 zurückzuführen sind.^[68-69] Einen anderen Ansatz verfolgten JIA *et al.*, die einen allosterischen EGFR-Inhibitor entwickelten, der in biochemischen Studien die wirkstoffresistente EGFR-Variante im nanomolaren Bereich inhibierte, in *in vivo* Studien jedoch auf die Zugabe von Cetuximab angewiesen war, um eine effektive Reduktion des Tumorgewebes hervorzurufen.^[70] Kürzlich wurde die Weiterentwicklung des allosterischen EGFR-Inhibitors EAI045, das JBJ-04-125-02, vorgestellt, das in initialen *in vivo* Studien einen hohen inhibitorischen Effekt auf die EGFR-L858R/T790M/C797S ausübte (siehe Abbildung 1-3).^[70-71] Hierbei besetzen die allosterischen Inhibitoren eine Subtasche benachbart zur regulatorischen α C-Helix, die sich im inaktiven Zustand der Kinasedomäne bildet. Im Vergleich zum EAI045 formt das JBJ-04-125-02 zusätzliche Wasserstoff-Brückenbindungen zum Glu749 und Glu865.

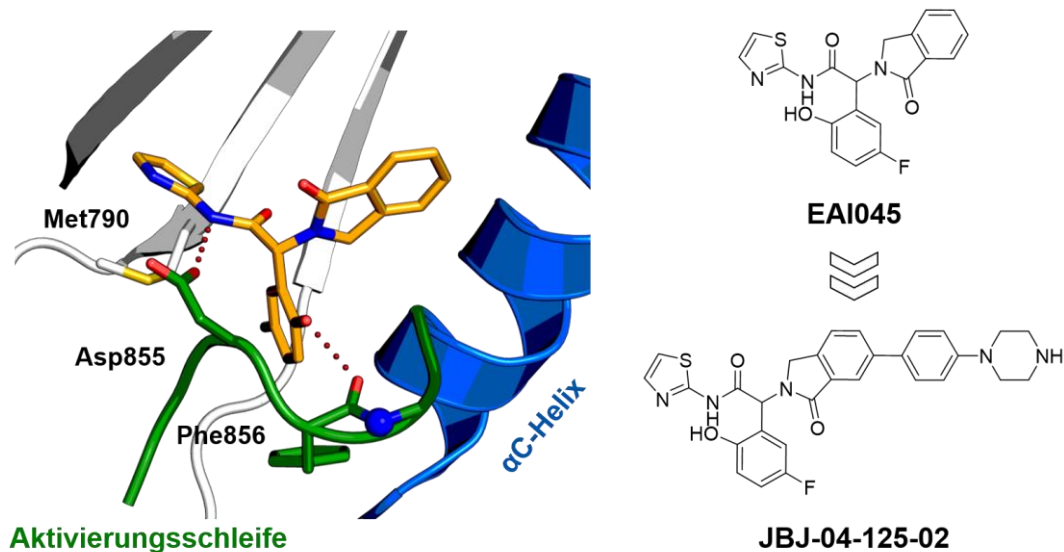


Abbildung 1-3: Molekülstrukturen der allosterischen EGFR-Inhibitoren EAI045 und dessen Weiterentwicklung JBJ-04-125-02, sowie die Darstellung des Bindungsmodus von EAI045 (PDB: 5ZWJ).

Dennoch ist die Wirkung dieser Inhibitoren auf EGFR-L858R Mutanten beschränkt und es wird in den entsprechenden Publikationen eine Kombination mit anderen Therapien vorgeschlagen, um die klinische Wirksamkeit zu steigern, welches mit einer Belastung der Patienten einhergehen kann.^[69]

Aufgrund von präklinischen Daten, die auf eine gute Penetration der Blut-Hirn-Schranke durch Osimertinib und eine hohe Wirksamkeit gegenüber primären EGFR-Mutationen hindeuten, erfolgte die Evaluation von Osimertinib als Erstlinien-Therapeutikum in unbehandeltem EGFR-positiven NSCLC.^[63, 72-75] In der FLAURA Studie konnte ein signifikant höheres progressionsfreies Überleben unter der Osimertinib Behandlung im Vergleich zur Behandlung mit Gefitinib festgestellt werden, sodass Osimertinib nach der FDA-Zulassung für EGFR-T790M mutierten NSCLC in 2015 auch als Erstlinien-Therapeutikum in 2018 zugelassen wurde.^[76-77]

2007 wurden die EML4-ALK Translokationen als Treiber in 4% der NSCLC-Patienten erkannt und deren onkogene Wirkung auf die Kinaseaktivität der Fusionsproteine zurückgeführt, weshalb die Entwicklung von spezifischen Kinaseinhibitoren angestrebt wurde.^[78-79] In klinischen Studien zeigte sich eine hohe Wirksamkeit des Erstgenerationsinhibitors Crizotinib mit Ansprechraten von >70%, wodurch die EML4-ALK Translokationen als prädiktive Zielstrukturen in NSCLC bestätigt wurden (siehe Abbildung 1-4 links).^[80-82] Wirkstoffresistenzen bildeten sich auch an dieser Stelle innerhalb eines Jahres nach Beginn der Therapie und induzierten einen Rückfall der Patienten.^[83-86] In diesem Zusammenhang wurden vermehrt Metastasen im Gehirn beobachtet, welches einen Schwerpunkt auf die Fähigkeit der TKIs der nächsten Generationen die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden legte.^[87-88] Interessanterweise wurden nach der Behandlung mit Crizotinib in ALK Tüersthermutationen analog zu EGFR-Mutationen identifiziert.^[88] Hierbei bewirkte die Substitution des Leu1196 durch ein Methionin gewisse

sterische Abstoßungen, aber vielmehr resultiert die Mutation in einem Verlust der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Crizotinib und dem Leu1196 (siehe Abbildung 1-4).^[89] Zweitgenerationsinhibitoren wie Ceritinib, Alectinib und Brigatinib demonstrierten in klinischen Studien eine überlegene Wirksamkeit sowohl als Erstlinien-Therapeutikum im Vergleich zur Behandlung mit Crizotinib, als auch als Zweitlinien-Behandlung im Vergleich zur Chemotherapie (siehe Abbildung 1-4).^[90-92] Ferner konnte das Auftreten von Hirn-Metastasen reduziert werden. 2018 wurde der Drittgenerationsinhibitor Lorlatinib für die Behandlung von Crizotinib-resistentem NSCLC von der FDA zugelassen und weist in klinischen Studien eine hohe Wirksamkeit gegen nahezu alle Crizotinib-resistenten Varianten auf (siehe Abbildung 1-4 rechts).^[93-94]

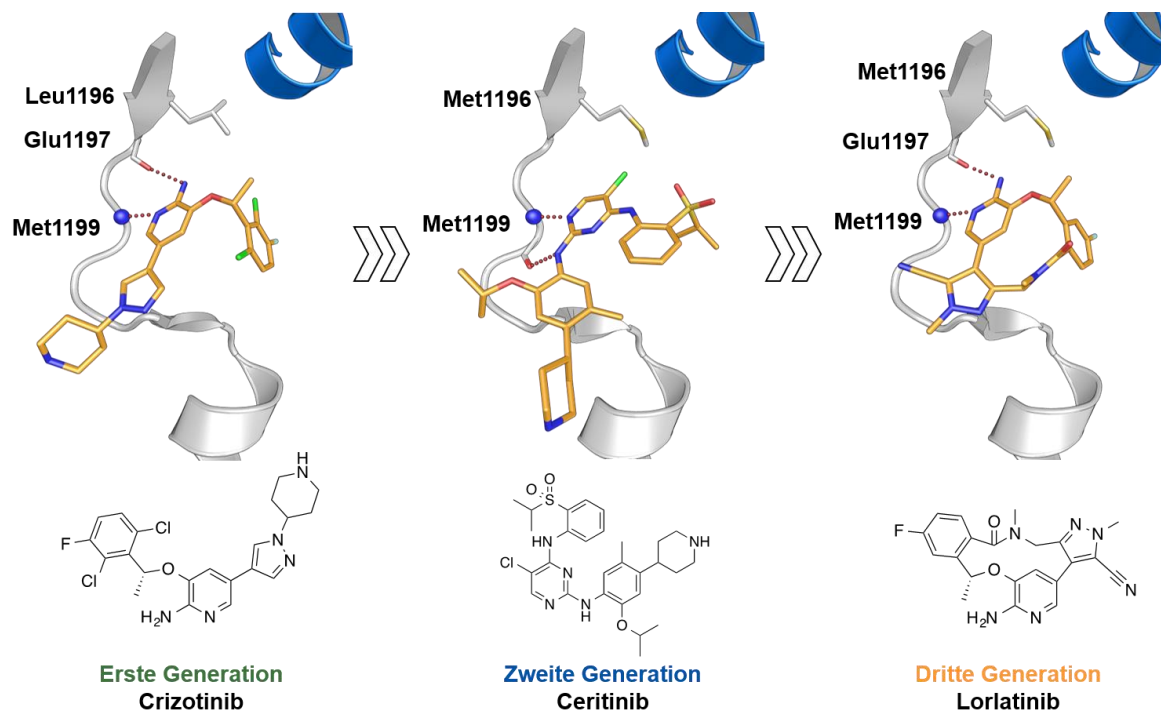


Abbildung 1-4: Vergleich der Bindungsmodi und der Molekülstrukturen der ALK-Inhibitoren der ersten, zweiten und dritten Generation. Links ist der Bindungsmodus des Erstgenerationsinhibitors Crizotinib dargestellt (PDB: 4ANS, Leu1196 PDB: 4MKC). Weiterhin wird der Bindemodus des Pyrimidin-abgeleiteten Zweitgenerationsinhibitors Ceritinib gezeigt (zentral; PDB: PDB: 4MKC, Met1196 PDB: 4ANS). Zuletzt wird die chemische Struktur und der Bindemodus des makrozyklischen Drittgenerationsinhibitors Lorlatinib abgebildet (rechts; PDB: 4CLJ).

1.2.2. Investigative Zielstrukturen in NSCLC

Zurzeit werden verschiedene Zielstrukturen entweder im Kontext von Resistenzentwicklungen nach der Behandlung mit zielgerichteten Therapeutika oder als primäre onkogene Treibermutationen in NSCLC diskutiert. Dazu zählen unter anderem Mutationen, Genfusionen oder Amplifikationen in FGFR, die in *in vitro* Studien mit den Inhibitoren AZD4547 und BGJ398 effektiv adressiert werden konnten.^[95-96] Allerdings konnte in klinischen Studien lediglich eine Ansprechrate von 10% der Patienten beobachtet werden.^[97] Aufgrund der hohen genetischen Heterogenität der Tumore erfolgte eine retrospektive Analyse der Studienergebnisse, infolgedessen ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer FGFR-Mutation in Kombination mit einer Überexpression des Transkriptionsfaktor MYC und dem Ansprechen auf eine Therapie mit dem FGFR-Inhibitor BGJ398 hergestellt werden konnte.^[98] Weiterhin bilden MET Amplifikationen oder Genfusionen einen häufig auftretenden Resistenzmechanismus gegenüber EGFR-Inhibitoren ab.^[99] Diesbezüglich wurde ein Staurosporin-abgeleiteter Kinaseinhibitor, das Tivantinib, in klinischen Studien getestet.

Während es in Phase 1 Studien eine gute Verträglichkeit zeigte, konnte in Phase 3 Studien der primäre Endpunkt auf Grund von schweren Nebenwirkungen nicht erreicht werden.^[100] Wie spätere Untersuchungen zeigten, ging die antineoplastische Wirkung des Tivantinibs auf die Störung der Mikrotubulidynamik zurück und nicht auf die MET-Inhibition.^[101] Dennoch konnte eine erfolgreiche Adressierung der sog. Exon14 *Skipping* Mutationen in MET durch den ALK-Inhibitor Crizotinib erzielt werden und bestätigt auf diese Weise den prädiktiven Charakter einer Subgruppe von MET-Mutationen.^[102]

Wie eingangs erwähnt, wird das Armamentarium der zielgerichteten NSCLC-Therapeutika zunehmend mit Immun-Checkpoint Inhibitoren erweitert, wobei die Wirkung dieser Substanzen auf die Inhibition der PD-1/PD-L1 Interaktion zurückgeht.^[103-104] Nachweislich umgehen viele Krebszellen einer Immunantwort durch die Überexpression des *programmed death ligand 1* (PD-L1), der von den PD1-Rezeptoren auf den Lymphozyten erkannt wird und so einer Immunantwort entgeht. Monoklonale Antikörper wie Pembrolizumab, Nivolumab und Atezolizumab inhibieren die PD-1/PD-L1 Interaktion und ermöglichen eine Immunantwort des Körpers auf die entarteten Krebszellen.^[105-107] In klinischen Studien konnten beachtliche Erfolge erzielt werden, wobei an dieser Stelle ein prädiktiver Biomarker identifiziert werden muss. Bisher wurde anhand der Überexpression des PD-L1 versucht Rückschlüsse auf ein potentielles Ansprechen eines Tumors zu ziehen, welches nicht eindeutig bestätigt werden konnte.^[108-109] Dennoch ist davon auszugehen, dass der Einsatz der Immuntherapie als Monopräparat oder in Kombinationstherapien die Behandlung von Krebs revolutionieren wird, sobald die Tumorbiologie verstanden wurde.^[1]

2. MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Wiederkehrende Resistenzmutationen stellen eine große Herausforderung bei der Behandlung von EGFR-mutiertem NSCLC mit Kinaseinhibitoren dar und erfordern eine stete Entwicklung von neuartigen mutantenselektiven Inhibitoren.^[110] In diesem Zusammenhang ist die Etablierung von biologisch-relevanten aussagekräftigen Systemen zur Profilierung von Inhibitoren von großer Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war es biochemische und strukturelle Systeme zu etablieren, die eine detaillierte Charakterisierung einer Zielverbindung zulassen, um einen Beitrag zum Verständnis einer Wirkstoffresistenz auf molekularer Ebene zu leisten und neue Ansätze zur Optimierung einer Verbindung zu identifizieren. In einem ersten Schritt sollten dazu entsprechende klinisch relevante Mutanten des EGF-Rezeptors in Insektenzellen exprimiert und anschließend gereinigt werden. Weiterhin sollten für strukturelle Untersuchungen geeignete Kristallisationsbedingungen für die Kinasedomäne von EGFR identifiziert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die kovalente Adressierung des Cys797 ein maßgebliches Charakteristikum der Drittgenerationsinhibitoren abbildet, wurden diverse Michael-Akzeptorsysteme beim rationalen Design von EGFR-Inhibitoren zur Umgehung der Türstehermutation berücksichtigt. Zur detaillierten Charakterisierung dieser Substanzklasse sollten kinetische Bindungsstudien gegenüber verschiedenen EGFR-Mutanten durchgeführt werden, die Rückschlüsse auf den Bindungsmechanismus zu lassen und mögliche Ansatzpunkte zur Optimierung hinsichtlich der Ausrichtungen der Michael-Akzeptoren liefern. Unterstützt werden sollten diese Studien durch strukturelle Untersuchungen in EGFR-T790M und dem validierten Modellsystem cSrc, sodass essentielle Interaktionen zwischen den untersuchten Verbindungen und der Bindetasche der Kinase identifiziert und weitere Grundlagen für Optimierungsstudien eruiert werden können.

Ferner sollte mit Hilfe der kürzlich etablierten semi-automatischen Screening-Plattform RASPELD (*Robotics-Assisted Screening Platform for Efficient Ligand Discovery*) eine Durchmusterung der laborinternen Substanzbibliothek erfolgen mit dem Ziel neuartige Leitstrukturelemente zur Adressierung der EGFR-AM/T790M/C797S Mutante zu identifizieren. Im Anschluss sollten im Rahmen von Hitvalidierungen initiale Aktivitäten bestätigt werden und anhand von geeigneten Zelllinien die Toxizität der Substanzen evaluiert werden.

Zuletzt sollte die kürzlich identifizierte EGFR-del19/G724S Mutante innerhalb eines Kooperationsprojekts tiefgreifend charakterisiert werden. Dazu sollten die entsprechenden biochemischen Assaysysteme etabliert werden, um in einem ersten Schritt die resistenzvermittelnde Wirkung der del19/G724S-Doppelmutation *in vitro* zu validieren. Im Anschluss sollte eine Durchmusterung einer fokussierten Substanzbibliothek mit Hilfe der Screening Einheit RASPELD erfolgen.

Zum einen könnten auf diese Weise einzelne potente Verbindungen identifiziert werden oder sogar verschiedene Inhibitorclassen als potente Hemmstoffe der wirkstoffresistenten EGFR-Mutante nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sollten im Folgenden in Computer-gestützten strukturbioologischen Studien evaluiert werden, sodass anhand eines möglichen Bindungsmodus eine Interpretation der Aktivitäts-Profile erfolgen kann.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Darstellung verschiedener klinisch-relevanter EGFR-Varianten

In dieser Arbeit wurde die Proteinexpression in Insektenzellen und die Proteinreinigungsstrategie verschiedener klinisch-relevanter EGFR-Varianten etabliert und optimiert, um schlussendlich in der Lage zu sein, biochemische und strukturelle Analysen durchzuführen. Einen Kernaspekt dabei stellte die Identifikation von Kristallisationssystemen dar, die im letzten Teilabschnitt dieses Kapitels thematisiert wird.*

3.1.1. Exkurs: Proteinexpression in Insektenzellen

Der fortwährende Erkenntnisgewinn und Forschungsprozess im Bereich der Strukturbiologie und mechanistischen Zellbiologie gewährt heutzutage einen überwältigenden Einblick in komplexe zelluläre Prozesse und ermöglicht die Adressierung verschiedenster medizinischer Fragestellungen. Einen Kernaspekt auf diesem Gebiet stellt die Erforschung der Struktur und der Funktion eines Proteins dar und setzt eine Verfügbarkeit des Zielproteins, auch *protein of interest* (POI) genannt, in großen Mengen und hoher Reinheit voraus.^[111-112] Da der Isolation der meisten Zielproteine aus deren endogener Quelle Grenzen gesetzt sind, ist die rekombinante Proteinexpression ein wertvolles Werkzeug in der Biochemie und kam erstmals in der pharmazeutischen Industrie 1982 mit der Expression von humanem Insulin in *Escherichia coli* (*E. coli*) zur Anwendung.^[113-114] Bei der heterologen Proteinexpression wird das für das Zielprotein kodierende Gen in einen Wirtsorganismus eingebracht, um im Anschluss die Proteinbiosynthese kontrolliert zu betreiben. Heutzutage ist eine Vielzahl verschiedener Expressionssysteme in unterschiedlichen Organismen wie Bakterien, Pilzen, Hefen, Insektenzellen und Säugetierzellen verfügbar. Dabei weist jedes dieser Systeme Vor- und Nachteile in Bezug auf Proteinausbeute, Kostenintensität, Zeitaufwand und der Möglichkeit des *Up-Scalings* auf.^[115-116] Die prominenteste Methode ist hierbei die Proteinexpression in Bakterienzellen (*E. coli*), die sich durch das schnelle Wachstum des Organismus bei geringen Kultivierungskosten und gleichzeitig hohen Expressionsraten auszeichnet.^[117-118] Viele klinisch-relevante Proteine sind auf diesem Weg jedoch nicht erschließbar, da sie posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, Acetylierungen, Glykosylierung oder die Ausbildung von Disulfidbrücken verlangen, welche in Bakterien nicht vorgenommen werden.^[119]

* Teile dieses Kapitels entstanden innerhalb der Masterarbeit von J. Niggenaber (AG Rauh, TU Dortmund). Die entsprechenden Abschnitte werden gekennzeichnet.

Um diese für die Struktur und Funktionalität essentiellen Modifikationen möglichst authentisch nachzuahmen, bedient man sich vermehrt eukaryotischer Expressionssysteme unter der Verwendung von Hefen, Insektenzellen oder Säugetierzellen, die in der Lage sind die oben aufgeführten Modifikationen vorzunehmen.^[120-121] Die in dieser Arbeit behandelten EGFR-Mutanten wurden in Insektenzellen nach dem *baculovirus expression vector system* (BEVS) exprimiert. Hierbei werden Insektenzellen als Wirtsorganismen verwendet und mit Baculoviren der Art *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) infiziert.^[122] Ursprünglich spielten Baculoviren eine Schlüsselrolle in der Regulation von Insektenpopulationen und waren daher jahrelang Mittelpunkt der Forschung mit dem Zweck der Schädlingsbekämpfung in der Landwirtschaft. Zumal sie eine hohe Wirtsspezifität aufweisen und aus diesem Grund für Säugetiere ungefährlich sind.^[123] Ein schematischer Replikationszyklus eines Baculovirus ist in Abbildung 3-1 dargestellt und entspricht weitestgehend dem Konzept des BEVS für die heterologe Proteinexpression.^[124] In der Natur erfolgt die Infektion der Insekten über die Aufnahme der Viruspartikel mit der Nahrung. Im Darm der Larven herrscht ein alkalischer pH-Wert, woraufhin sich die *occlusion bodies* (OBs) auflösen und die *occlusion-derived viruses* (ODVs) freigesetzt werden. Diese sind in der Lage die physikalische Barriere des Darms zu überwinden und infizieren dort Zylinderepithelzellen durch direkte Membranfusion. Bei der rekombinanten Proteinexpression werden an dieser Stelle Insektenzellen mit Baculovirus-DNA, die die Gensequenz des Zielproteins trägt, transfiziert. Daraufhin erfolgt eine Freisetzung der Baculovirus-DNA, die in den Nukleus migriert und dort (i) die Replikation der Viren-DNA, (ii) eine Kaskade der Genexpressionen für virale Proteine und (iii) die erneute Produktion von Viruspartikeln induziert. Neue Viruspartikel breiten sich durch Rezeptor-vermittelte Endo- und Exozytose aus und infizieren umliegende Zellen. In der späten Phase der Expressionskaskade wird in einem natürlichen Baculovirus eine große Menge des Hüllproteins Polyhedrin exprimiert und es erfolgt die Formation der OBs, die als robuste Überdauerungsform der Baculoviren außerhalb des Wirtsorganismus dienen. Die OBs beinhalten mehrere Baculoviren eingebettet in Polyhedrin und werden durch die Zellyse in die Umgebung freigesetzt, wo sie bis zur erneuten Infektion eines Wirtsorganismus verharren. Bei der heterologen Proteinexpression im Labor wird der starke Polyhedrin-Promotor meist ausgenutzt, um eine stabile Überexpression des Zielproteins zu erreichen.

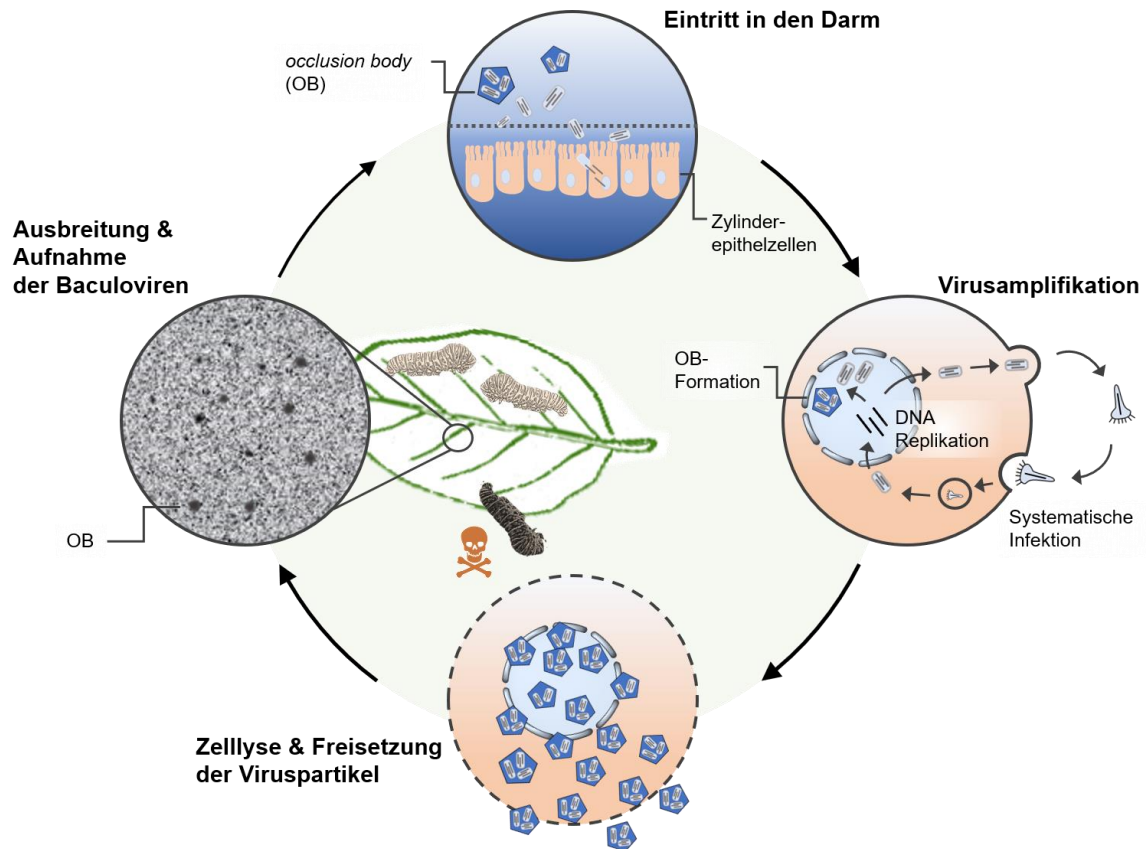


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Baculovirus Replikationszyklus. **Ausbreitung und Aufnahme der Baculoviren:** Die initiale Infektion findet mit der Aufnahme der *occlusion bodies* (OB) über die Nahrung statt. **Eintritt in den Darm:** Die alkalische Umgebung im Darm der Larven sorgt für die Auflösung der OBs und für die Freisetzung der *occlusion-derived viruses* (ODVs), die die physikalische Barriere des Darmepithels überwinden können und dann durch direkte Membranfusion in Zylinderepithelzellen eindringen. Im Anschluss wird das Nucleocapsid im Cytosol freigesetzt. **Virusamplifikation:** Es folgt eine Migration des Nucleocapsids in den Nucleus, wo die Viren-DNA repliziert wird und eine Kaskade an Genexpressionen in Gang gesetzt wird mit dem Ziel der ODV Produktion. Die hergestellten Viruspartikel werden freigesetzt und infizieren umgehend weitere Zellen. Nach ca. 24 h beginnt die Produktion der OBs, diese werden bei Zellyse freigesetzt und können einen neuen Wirtsorganismus infizieren. Die Darstellung wurde von CHAMBERS *et al.* adaptiert.^[124]

SMITH und SUMMERS erkannten das große Potential der Baculovirus-vermittelten Proteinexpression in Insektenzellen und nutzen es erstmals 1983 für die heterologe Expression des humanen β -Interferons.^[125] Durch mehrere technologische Verbesserungen gewann das anfänglich sehr mühsame und ineffiziente System an Popularität, was die steigende Anzahl der PDB-Einträge, bei denen Insektenzellen als Wirtsorganismus verwendet wurde, verdeutlicht.^[126-127] Erhebliche Fortschritte konnten durch den Einsatz von synthetischer Baculovirus-DNA, die lediglich über essentielle Elemente für die Proteinexpression verfügt und hinsichtlich der genetischen Stabilität optimiert wurde, erzielt werden. Inzwischen sind verschiedene Strategien und Plattformen für die effiziente Proteinexpression mithilfe von rekombinanten Baculoviren in Insektenzellen verfügbar.^[128] Im Folgenden werden zwei Systeme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, detailliert vorgestellt und miteinander verglichen.

Grundsätzlich unterscheiden sich die Methoden lediglich in der Generierung der rekombinanten Baculoviren, dem Aufbau der Bacmid-DNA und des Transfervektors. Frühe BEVS nutzten das Prinzip der homologen Rekombination aus und brachten das Zielgen in den Polyhedrin Locus des AcNPV Genoms ein.^[129] Dazu wurden Insektenzellen mit viraler DNA und einem Transfervektor, der das Zielgen beinhaltete, co-transfiziert. Der Prozess der homologen Rekombination stellt jedoch ein komplexes und seltenes Event in der Zelle dar, sodass lediglich 0.1% der Viren das Zielgen enthielten und der Rest die parentale Gensequenz des Polyhedrin aufwies. Daher war eine aufwendige Selektion der rekombinanten Baculoviren anhand des Phänotyps notwendig. Eine Weiterentwicklung dieser Idee stellt das BacMagic-System von Novagen dar.^[130] Das Besondere an diesem System ist der modifizierte ORF1629 (*open reading frame*), der ein Capsid-assoziiertes Protein kodiert und essentiell für die Virusreplikation ist. Auf der BacMagic-DNA liegt dieser Teil mutiert vor, d.h. das Gen des Capsid-assoziierten Proteins wurde deletiert.^[131-132] Auf dem Transfervektor hingegen ist die vollständige Sequenz enthalten und nur durch homologe Rekombination entsteht eine Baculovirus-DNA, die in der Lage ist sich zu replizieren (siehe Abbildung 3-2 A). Dadurch entfällt der aufwendige Selektionsschritt und es können so nahezu 100% rekombinante Baculoviren erhalten werden.^[132] Weitere Modifikationen der Bacmid-DNA stellen die Inaktivierung der Chitinase (*chiA*) und das Einführen einer BAC-Sequenz dar, die eine Vervielfältigung der Bacmid-DNA in *E. coli* ermöglicht.^[133-134]

Neben der homologen Rekombination kann auch das Prinzip der ortsspezifischen Transposition ausgenutzt werden, um rekombinante Baculoviren herzustellen. Das Bac-to-Bac System (Life Technologies) und dessen Weiterentwicklung für die Expression von Multiproteinkomplexen, das MultiBac-System (Geneva Biotech), beruhen etwa auf diesem Prinzip (siehe Abbildung 3-2 B).^[135-139] Der wesentliche Unterschied zu der oben beschriebenen Methode stellt die Generierung der rekombinanten Baculoviren-DNA dar, die in *E. coli* erfolgt und somit den Einsatz von isolierter und hochkonzentrierter DNA bei der Transfektion in Insektenzellen garantiert und das Vorhandensein von parentaler Baculoviren-DNA ausschließt. Dafür wird die MultiBac-DNA mit einem *lacZ*-Gen und einer Tn7 Transpositionsstelle versehen, wohingegen Tn7 Transpositionsstellen auf dem Transfervektor das Zielgen flankieren. Wird der Transfervektor nun in *E. coli*-Zellen eingebracht, die die MultiBac-DNA tragen, so wird das Zielgen in das *lacZ*-Gen inseriert. Basierend auf der Antibiotikaresistenz und einer Blau-Weiß Selektion werden Kolonien identifiziert, die die rekombinante Baculovirus-DNA aufweisen. Durch Lipofektion wird die rekombinante Baculovirus-DNA in Insektenzellen transferiert, in denen nach Virusamplifikation die Expression des Zielproteins stattfindet.

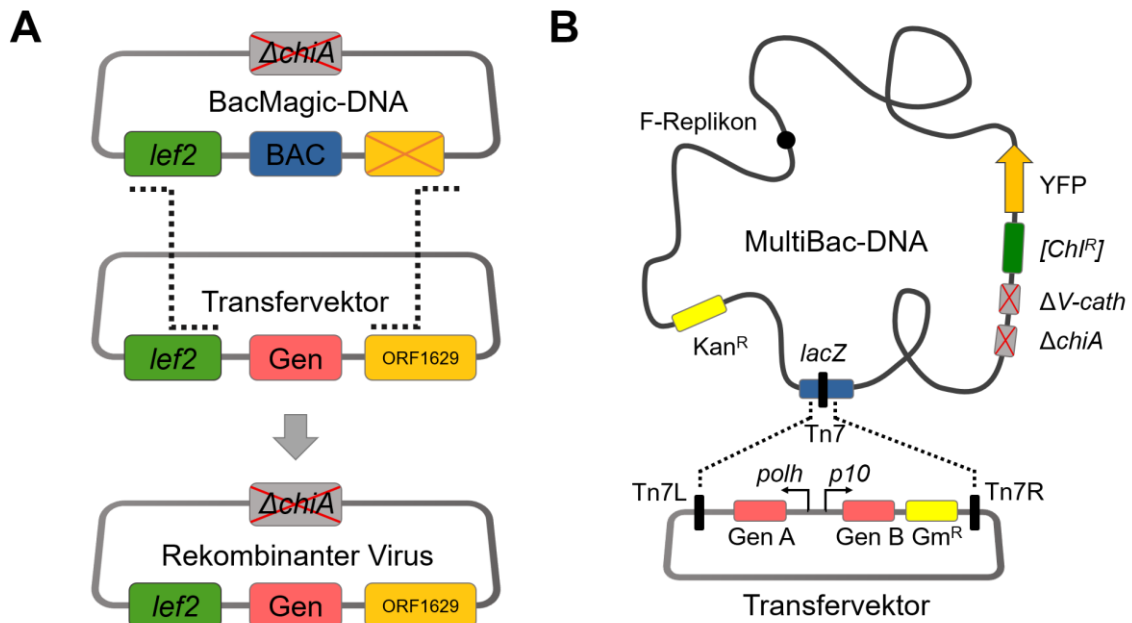


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der verschiedenen Methoden zum Aufbau rekombinanter Baculoviren. **A:** Im Fall des BacMagic-Systems wird durch die homologe Rekombination die rekombinante Baculoviren-DNA erzeugt. Auf einem Transfektor wird die Zielsequenz von Rekombinationsregionen flankiert, die die Gene *lef2* (*late expression factor 2*) und ORF1629 tragen. Die Bacmid-DNA trägt mutierte Rekombinationsregionen, die die Virusreplikation verhindern. Durch die homologe Rekombination mit dem Transfektor wird der Wildtyp Zustand wiederhergestellt und ermöglicht eine Virusreplikation. Durch die BAC-Sequenz ist die Vervielfältigung der Bacmid-DNA in *E. coli* möglich und die Inaktivierung der Chitinase führt zu erhöhten Proteinausbeuten. **B:** Der Aufbau der rekombinanten Baculoviren beruht bei der MultiBac-Methode auf der Tn7 Transposition. Auf dem Transfektor können zwei verschiedene Zielgene, deren Proteinexpression durch die *polh* und *p10* Promotoren initiiert werden, eingebracht werden. Flankiert werden die Zielgene durch Transpositionssequenzen. Die Bacmid-DNA zeichnet sich durch ein *lacZ* Gen mit einer Tn7 Transpositionsstelle, ein F-Replikon, das ein *copy-number* von eins der Bacmid-DNA in *E. coli* gewährleistet, ein Reportergen (YFP), verschiedene Antibiotikaresistenzen (Kan^R: Kanamycin; Chi^R: Chloramphenicol) und deletierte Gensequenzen der Chitinase (*chiA*) und der viralen Cathepsin Protease (*V cath*) aus.^[130, 140]

In dieser Arbeit wurden mithilfe des MultiBac-Systems einzelne Proteine dargestellt, wobei das System grundsätzlich für die Expression von Multiproteinkomplexen etabliert wurde, weswegen es auch den *polh* und den *p10* Promotor auf dem Transfektor aufweist und durch *Cre/loxP*-Rekombinationen den schnellen Aufbau von Multigenen Vektoren ermöglicht.^[140] Weitere grundlegende Eigenschaften des MultiBac-Systems stellen die Deletionen der Chitinase (*chiA*) und der viralen Cathepsin Protease (*V-cath*) auf der Bacmid-DNA dar und führen zu einer erhöhten Ausbeute von sekretorischen und Membranassoziierten Proteinen und verhindern den möglichen Abbau des Zielproteins durch die Protease.^[130, 133] Zusätzlich erlaubt das System die Einführung von Reporterproteinen wie dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP, *Yellow fluorescent protein*), Chaperonen oder anderen Enzymen, die Posttranslationale Modifikationen vornehmen, in die Loci der Chitinase und der viralen Cathepsin Protease.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass durch die enormen technologischen Fortschritte auf diesem Gebiet maßgeschneiderte Expressionssysteme für Proteine

entwickelt werden konnten, die durch herkömmliche Systeme nicht hergestellt werden konnten und heutzutage vielseitig einsetzbare Plattformen für die Proteinexpression verfügbar sind.

3.1.2. Konstruktdesign

Die Konstrukte für die biochemische Charakterisierung unterscheiden sich grundsätzlich von denen, die für die Proteinkristallographie verwendet wurden. Als Ausgangskonstrukt für die Proteinkristallographie diente ein Konstrukt, das von Christian Becker während seiner Promotion hergestellt wurde.^[141] Dieses EGFR-WT Konstrukt kodiert die Aminosäuren 696-1022 (Uniproteintrag P00533) und wurde für die Expression in Insektenzellen codonoptimiert. Dennoch konnte zu Anfang dieser Arbeit keine deutliche Überexpression des Zielproteins in Insektenzellen festgestellt werden, was zu einer schwierigen Reinigung und geringen Proteinausbeuten führte. Die darauffolgende Kristallisation des Proteins im Komplex mit neuartigen Inhibitoren konnte aufgrund der geringen Proteinmengen nur begrenzt vorgenommen werden und zuvor etablierte Kristallisationssysteme führten zu keinem Kristallwachstum. An dieser Stelle wurden zwei Mutagenese-basierte Ansätze verfolgt, um die Proteinkristallisation des Proteins zu ermöglichen.^[142-143] Zum einen wurden drei geladene Aminosäuren (E865, E866 und K867) in der oberflächenexponierten Aktivierungsschleife durch Alanine ersetzt und in einem anderen Konstrukt wurde eine Mutation (V948R) eingefügt, die die Bildung eines asymmetrischen Dimers verhindert (siehe Abbildung 3-3 A). Der Austausch der drei Aminosäuren in der Aktivierungsschleife wurde vorgenommen, um eine Reduktion der Oberflächenentropie zu erzielen. Dieses Konzept beruht auf der Annahme, dass große, flexible und geladene Seitenketten, die über eine hohe konformationelle Entropie verfügen, die Ausbildung von Kristallkontakten stören.^[143-146] Daher sollen flexible und geladene Aminosäurereste wie Lysine, Glutamine und Glutaminsäuren, wenn sie aufeinanderfolgend vorkommen, gegen Alanine ausgetauscht werden, vorausgesetzt diese befinden sich weder an funktional wichtigen Stellen des Proteins, noch in Sekundärstrukturelementen wie einer α -Helix oder einem β -Faltblatt. Die Identifikation von Aminosäuren, die eben diese Merkmale erfüllen, wurde mit Hilfe des SERp-Servers durchgeführt.^[143] In Abbildung 3-3 B sind exemplarisch die Entropiebeiträge der einzelnen Aminosäuren 855-875 des EGFR-WT Konstruktes und des modifizierten Konstruktes gezeigt, wodurch die Reduktion der Oberflächenentropie durch die eingefügten Mutationen deutlich zu erkennen ist.

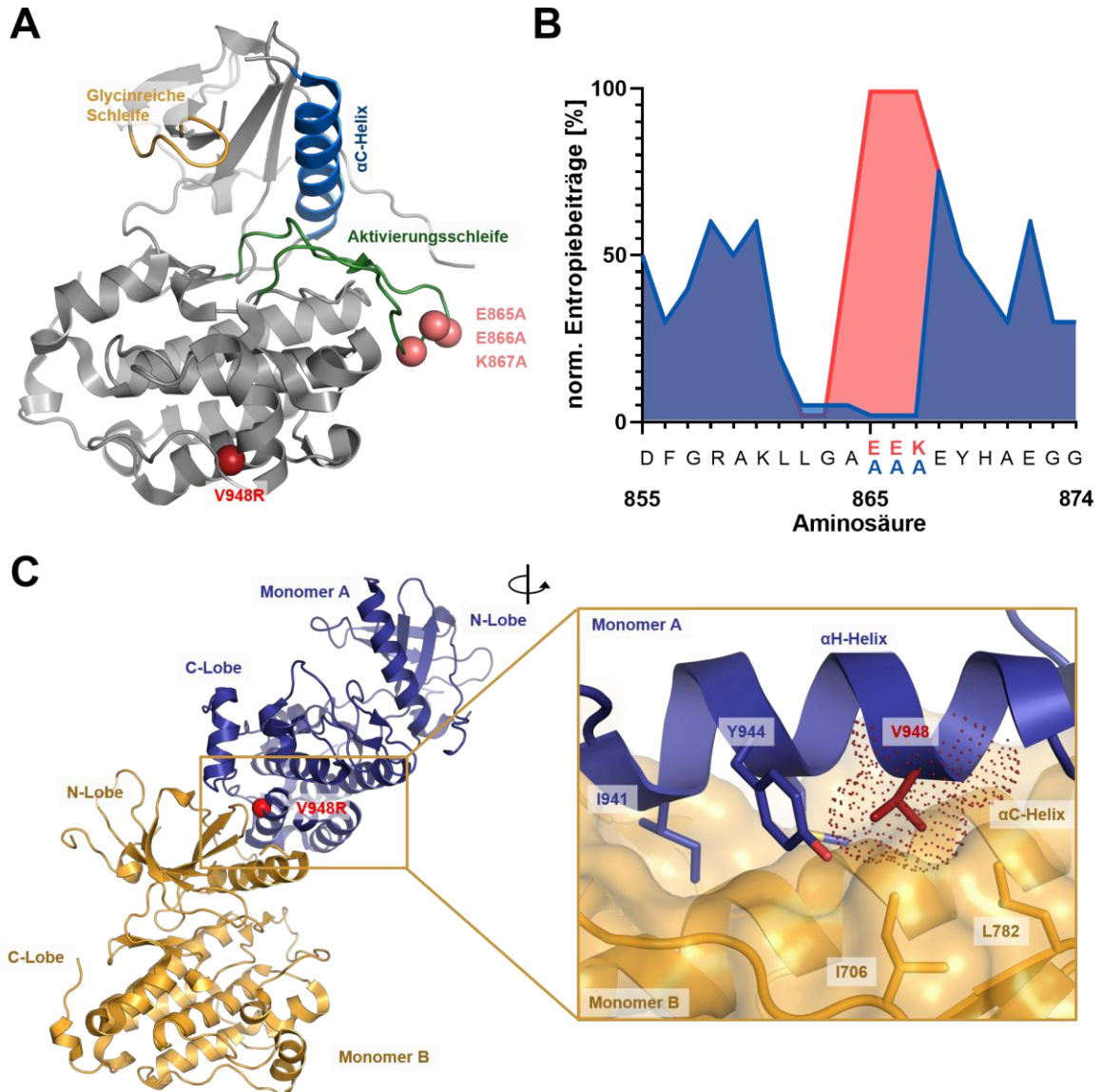


Abbildung 3-3: Konstruktdesign. **A:** Schematische Abbildung einer Kinasedomäne und Markierung der mutierten Aminosäuren. Basierend auf der Annahme, dass eine reduzierte Oberflächenentropie die Proteinkristallisation fördert, wurden in einem Konstrukt drei polare, oberflächenexponierte Aminosäuren gegen Alanine ersetzt (E865A, E866A, K867A in rosa dargestellt). In einem anderen Konstrukt wurde die V948R Mutation eingefügt, die die Bildung eines asymmetrischen Dimers verhindert, sodass vermehrt monomeres EGFR vorliegen sollte. In blau ist die regulatorische αC-Helix gezeigt, in gelb wurden Aminosäuren der glycinreichen Schleife eingefärbt und Aminosäuren der Aktivierungsschleife sind in grün dargestellt. **B:** Vergleich des EGFR-WT Konstrukts und des EGFR E865A/E866A/K867A Kristallisationskonstrukts in Bezug auf die Entropie der einzelnen Aminosäuren. In rot ist das EGFR-WT Konstrukt gezeigt und in blau das EGFR-E865A/E866A/K867A Kristallisationskonstrukt. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des SERp-Servers vorgenommen.^[143] **C:** Darstellung des asymmetrischen Dimers. In blau ist Monomer A eingefärbt und in gelb ist Monomer B gezeigt. In einem vergrößerten Ausschnitt wird die Kontaktfläche der beiden Monomere abgebildet und die Position der Aminosäure V948 hervorgehoben, die hydrophobe Wechselwirkungen zu I706 und L782 ausbildet. PDB: 2GS2.

Wie oben geschrieben, wurde in einem weiteren Konstrukt zusätzlich zu den klinisch relevanten Mutationen auch die V948R Mutation in das EGFR Konstrukt eingefügt, die die Bildung eines asymmetrischen Dimers verhindert.^[142] Das ursprüngliche Val948 ist Teil der α H-Helix, die sich im C-Lobe der Kinasedomäne befindet und Bestandteil der Kontaktfläche im Falle einer Dimerisierung ist (siehe Abbildung 3-3 C). Aus der vergrößerten Darstellung der Kontaktfläche eines asymmetrischen Dimers geht hervor, dass Val948 des sogenannten Aktivators (Monomer A) hydrophobe Wechselwirkungen zu Ile706 und Leu782 des Akzeptors (Monomer B) ausbildet. Wird das Valin nun durch ein Arginin ausgetauscht, führt es zu sterischen Abstoßungen und eine Homo-Dimerisierung wird unterbunden, was in zellulären Assay-Systemen mehrfach gezeigt werden konnte. Im Hinblick auf die Fähigkeit eines Proteins einen Kristall zu bilden, spielt das Vorhandensein von Dimeren ebenfalls eine Rolle und wird tendenziell als störend beschrieben, weswegen eine Unterbindung die Proteinkristallisation begünstigen könnte.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit EGFR Konstrukte generiert, die im Anschluss in biochemische Assays untersucht wurden. Im Gegensatz zu den Kristallisationskonstrukten beinhalteten diese auch die C-terminale Domäne des EGFR, die mehrere Phosphorylierungsstellen enthält und für die katalytische Aktivität der Kinasedomäne essentiell ist. Dabei hat sich herausgestellt, dass sich die Löslichkeit der Proteine durch das Anfügen der C-terminalen Domäne dramatisch verschlechtert. Aus diesem Grund wurden die Konstrukte mit einem GST-Tag versehen, der die Löslichkeit verbessern sollte. Eine Übersicht der relevanten EGFR Konstrukte ist in Tabelle 3-1 dargestellt und die dazugehörigen Sequenzalignments sind in Abschnitt 5.1 zu finden.

Tabelle 3-1: Übersicht der bearbeiteten EGFR Konstrukte dieser Arbeit.

Bezeichnung	Abkürzung	Konstrukt	Mutation
EGFR-T790M/ E865A/E866A/K867A	pMK25	pIEX/Bac3 AS 696-1022	T790M, E865A, E866A, K867A
EGFR-T790M/ V948R	pMK33	pIEX/Bac3 AS 696-1022	T790M, V948R
EGFR-L858R/ T790M/C797S	pMK15	pIEX/Bac5 AS 669-1210	L858R, T790M, C797S
EGFR-del19/G724S	pMK50	pFG AS 669-1210	del19, G724S
EGFR-del19	pMK52	pFG AS 669-1210	del19

3.1.3. Optimierung der Proteinexpression in Insektenzellen

Neben genetischen Ansätzen zur Erhöhung der Ausbeute und der Qualität des Zielproteins, wurde auch die Proteinexpression in Insektenzellen optimiert. Wie in Abschnitt 3.1.1 dargestellt wurde, handelt es sich bei der heterologen Expression in Insektenzellen um ein komplexes System, das an vielen Stellen individuell an das Zielprotein angepasst werden kann. Grundsätzlich ist auffällig, dass der Zeitraum beginnend mit der erfolgreichen Generierung eines Transfervektors bis hin zum exprimierten Protein circa 25 Tage beträgt. Die Proteinexpression in Bakterien dauert hingegen lediglich wenige Tage. Daher sind die Qualität und die Viabilität der Insektenzellen von enormer Bedeutung. Zu Beginn der Arbeit wurden alle Insektenzelllinien in Serum-freiem EX-CELL 405 Medium (Sigma-Aldrich) kultiviert, wobei auffiel, dass die Sf9-Zellen sehr langsam wuchsen. Aus diesem Grund wurde die Kultivierung der Sf9-Zellen in verschiedenen Medien evaluiert und beobachtet, dass die Zellen ein schnelleres Teilungsverhalten und eine verringerte Anfälligkeit für Kontaminationen in Sf-900 III SFM Medium zeigten. Alle darauffolgenden Arbeiten wurden dementsprechend in Sf-900 III SFM Medium vorgenommen. Ebenfalls wurde für jedes EGFR Konstrukt eine sogenannte *time of harvest* (TOH) Analyse durchgeführt und sofern keine Überexpression in Sf9-Zellen festgestellt werden konnte, wurde die Expression in Hi5-Zellen oder TNAO-Zellen untersucht. Beispielhaft sind in Abbildung 3-4 die Ergebnisse der TOH-Analysen der Kristallisationskonstrukte EGFR-T790M/E865A/E866A/K867A (pMK25) und EGFR-T790M/V948R (pMK33) gezeigt.[†] Dazu wurden Testexpressionen in Sf9-Zellen angesetzt und Proben nach 24, 48, 72 und 96 h genommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Im Vergleich zu der Kontrollkultur kann in beiden Fällen erkannt werden, dass eine Proteinbande bei circa 40 kDa nach 24 bzw. 48 h zusätzlich auf dem Gel zu sehen ist, die dem Zielprotein zugeordnet werden kann. Des Weiteren kann der SDS-PAGE entnommen werden, dass sich die Proteinmenge in den Proben nach 72 h und 96 h nicht deutlich unterscheidet, weswegen die Zellernte nach 72 h erfolgte. Die Proteinexpression im großen Maßstab wurde mit diesen Parametern durchgeführt.

[†] Durchführung der Testexpression des pMK25-Konstrukts durch J. Niggenaber (AG Rauh, TU Dortmund).

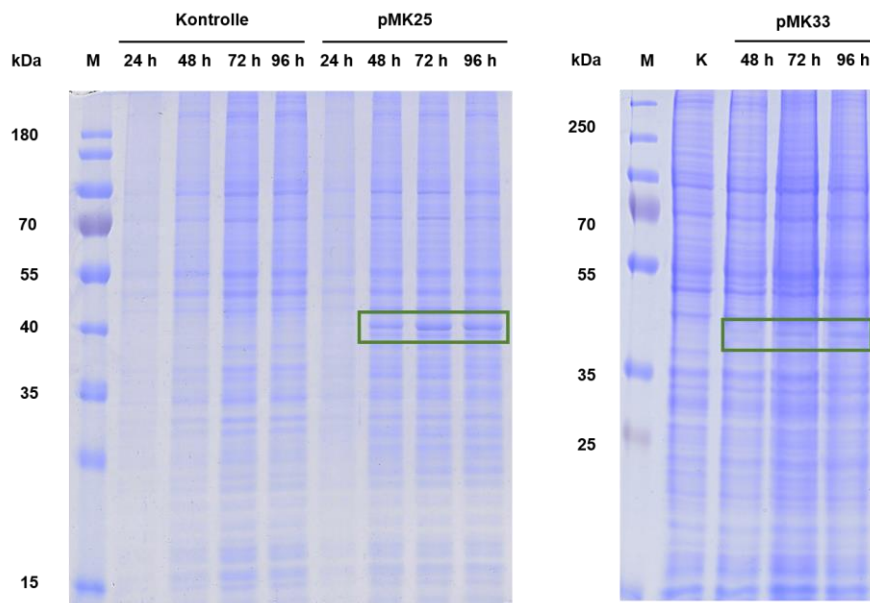


Abbildung 3-4: SDS-PAGE der Testexpressionen der Kristallisationskonstrukte EGFR-T790M/E865A/E866A/K867A (pMK25) und EGFR-T790M/V948R (pMK33) in Sf9-Zellen. Es wurden folgende Proben aufgetragen: M: Marker, Proben einer Sf9-Kontrollkultur nach 24, 48, 72 und 96 h, des Weiteren wurden Proben der Testexpressionen zu den entsprechenden Zeitpunkten aufgetragen. In beiden Testexpressionen werden Banden auf einer Höhe von ungefähr 40 kDa sichtbar, die den Zielproteinen zugeordnet werden können (grüne Kästen).

Für biochemische Assayexperimente musste allerdings auf andere Konstrukte, die die vollständige intrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors kodieren einschließlich des für die katalytische Aktivität essentiellen C-terminalen Schweifs, zurückgegriffen werden. Diese Konstrukte zeichnen sich durch schlechte Löslichkeiten und geringe Expressionslevel aus, die auf die Länge des Konstrukts (541 AS) und auf die mögliche cytotoxische Wirkung aufgrund der katalytischen Aktivität zurückzuführen sind. Daher wurden die Konstrukte zunächst mit einem GST-Tag versehen und die Expressionslevel in Insektenzellen evaluiert. Für das EGFR L858R/T790M/C797S Konstrukt konnte eine zufriedenstellende Expression in Hi5-Zellen beobachtet werden, wohingegen für die EGFR-del19/G724S und EGFR-del19 Mutanten keine Überexpression beobachtet werden konnte. In diesem Zusammenhang wurde das MultiBac-System getestet, das sich durch eine modifizierte Bacmid-DNA auszeichnet, die die Löslichkeit der Zielproteine erhöhen soll. Grundsätzlich wurde das MultiBac-System entwickelt, um die Expression von Multiproteinkomplexen zu ermöglichen, und verfügt daher über mehrere Promotor Regionen auf dem Transfervektor, die zusätzlich zu dem Einbau der Gensequenz des Zielproteins in einem nächsten Schritt auch den Einbau von Chaperonen erlauben. In Abbildung 3-5 sind schematisch die einzelnen Arbeitsschritte dargestellt. Grundsätzlich unterscheidet sich diese Vorgehensweise von dem BacMagic Protokoll bei der Generierung der rekombinanten Bacmid-DNA, die bei dem MultiBac-System auf der Tn7-Transposition beruht und in DH10EMBacY-Zellen durchgeführt wird.

Der Vorteil ist, dass die darauffolgende Transfektion in Insektenzellen mit gereinigter rekombinanter Bacmid-DNA (bekannter Konzentration) vorgenommen werden kann. Wohingegen die Generierung der rekombinanten Bacmid-DNA unter Verwendung des BacMagic-Protokolls erst in den Insektenzellen stattfindet. Die Transfektion sowie die Herstellung der verschiedenen Virusgenerationen unterscheiden sich hingegen kaum.

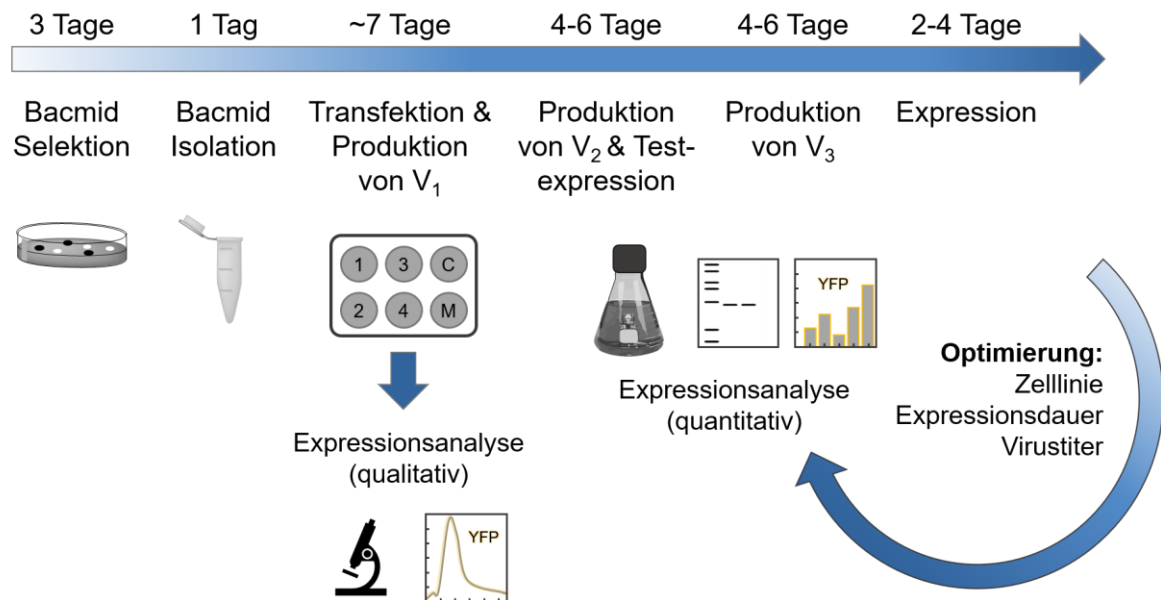


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Proteinexpression in Insektenzellen anhand des MultiBac Protokolls. Nach erfolgreicher Generierung des Transfervektors wird dieser in DH10EMBacY-Zellen eingebracht, wo durch die Tn7-Transposition das Zielgen in die Bacmid-DNA eingefügt wird. In einem nächsten Schritt wird diese isoliert und in Insektenzellen eingebracht. Dort findet die Generierung der ersten Virusgeneration statt, die durch das Reportergen verfolgt werden kann. Im Anschluss wird der Virustiter der Lösung durch wiederholte Infektion von Insektenzellen erhöht bis in Testexpressionen eine Überexpression des Zielproteins beobachtet wird. Danach erfolgt eine Expression im präparativen Maßstab und abhängig von der Proteinausbeute werden die Expressionsdauer, der Virustiter und die für die Expression verwendete Zelllinie variiert.

Ein zusätzlicher Vorteil des MultiBac Systems gegenüber dem BacMagic System ist die gute Nachverfolgung der Transfektionseffizienz und der Proteinexpression durch das Reportergen YFP, wodurch der Zeitpunkt der Ernte der ersten Virusgeneration, aber auch der Zeitpunkt der Zellernte bei der Proteinexpression im präparativen Maßstab individuell angepasst werden kann. Beispielhaft sind in Abbildung 3-6 Mikroskopie-Aufnahmen einer Kontrollkultur und einer infizierten Insektenzellkultur (EGFR del19/G724S) vier Tage nach der Transfektion gezeigt. Dabei handelt es sich um Überlagerungen einer Phasenkontrast-Aufnahme und einer Fluoreszenzaufnahme (Exzitation: 482 nm, Emission: 532 nm), wobei für die Kontrollkultur keine Fluoreszenz detektiert werden konnte. Die mit rekombinanter Bacmid-DNA (EGFR-del19/G724S) infizierten Zellen zeigen hingegen Fluoreszenz, was auf eine YFP-Expression und eine erfolgreiche Transfektion schließen lässt. Weiterhin lässt die Morphologie der infizierten Zellen, die größer und unförmiger als

die Zellen der Kontrollkultur wirken, folgern, dass die Zellen durch die Transfektion gestresst wurden und zum Teil auch abgestorben sind.

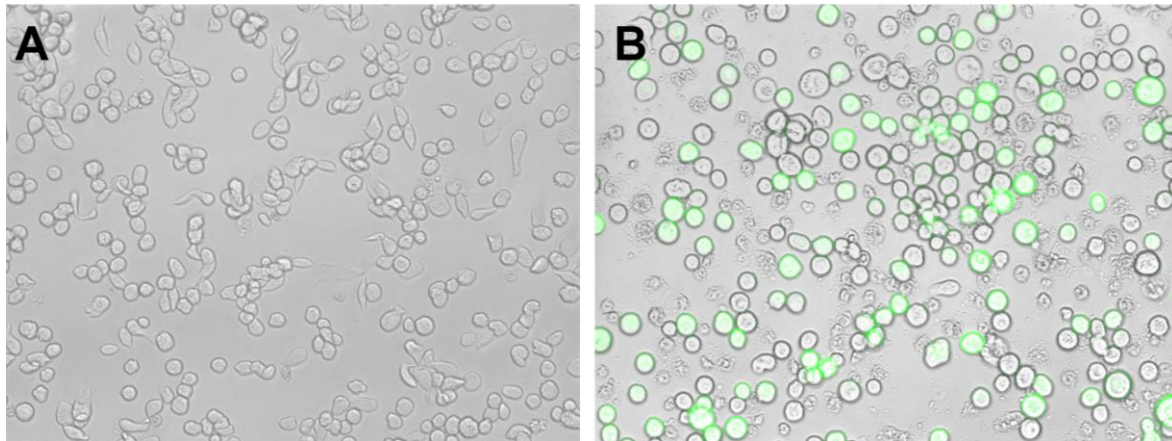


Abbildung 3-6: Verfolgung der Transfektionseffizienz anhand der YFP Produktion in infizierten Insektenzellen. **A:** Mikroskopie-Aufnahme der Kontrollprobe mit Hilfe der FLoid Cell Imaging Station. Dargestellt ist die Überlagerung der Phasenkontrast-Aufnahme und des Fluoreszenzaufnahme im grünen Kanal (Exzitation: 482 nm, Emission: 532 nm), wobei zu erkennen ist, dass die Kontrollprobe keinerlei Fluoreszenz zeigt. **B:** Überlagerung der Phasenkontrast-Aufnahme und der Fluoreszenzaufnahme im grünen Kanal (Exzitation: 482 nm, Emission: 532 nm) der Zellen vier Tage nach der Transfektion mit einer rekombinanten MultiBac-DNA. Es sind deutlich Zellen zu erkennen, die YFP exprimiert haben, was auf eine erfolgreiche Transfektion schließen lässt.

Auch an dieser Stelle erfolgten systematische Untersuchungen verschiedener Kernaspekte wie der Expressionsdauer (*time of harvest*, TOH), die durch die visuelle Beobachtung der YFP-Produktion abgeschätzt werden konnte. Schlussendlich konnten die beiden Assaykonstrukte EGFR-del19/G724S und EGFR-del19 mit dem MultiBac-System exprimiert werden, um im Anschluss gereinigt zu werden und in biochemischen Assaysystemen getestet zu werden.

3.1.4. Etablierung und Optimierung der Proteinreinigungsstrategie

3.1.4.1. Reinigung der Kristallisationskonstrukte

Die Proteinreinigungsstrategie hat neben der Proteinexpression einen großen Einfluss auf die Kristallisation eines Proteins. Nach wiederholten Reinigungen der EGFR-Kinasedomäne anhand eines in unserem Labor etablierten Protokolls, infolgedessen kein Proteinkristallwachstum beobachtet werden konnte, wurde eine von HANAN *et al.* etablierte Reinigungsstrategie getestet.^[147] Beim Vergleich der Abfolge der Reinigungsschritte ist auffällig, dass auf die anfängliche Affinitätschromatographie und Abspaltung des His-Tags innerhalb der in unserem Labor etablierten Methode keine Auftrennung der gespaltenen und ungespaltenen Proteine erfolgte. Außerdem bestand der finale Schritt vor der Proteinkristallisation aus einer Anionenaustauschchromatographie, bei der das Protein mit Hilfe eines Gradienten (75 mM NaCl → 1 M NaCl) von der Säule eluiert wurde. Daher war die Reproduktion der finalen Pufferzusammensetzung enorm schwierig, weil sie unter anderem von der Proteinmenge abhängig war. Eine finale Größenausschlusschromatographie, wie sie von HANAN *et al.* verwendet wurde, umgeht dieses Problem und schafft für die Proteinkristallisation reproduzierbare Ausgangsbedingungen. Die beiden Reinigungsstrategien unterscheiden sich ebenfalls bei der Pufferzusammensetzung. Ein direkter Vergleich der Zusammensetzungen ist in Tabelle 5-2 dargestellt. Ferner verwendet HANAN *et al.* TCEP als Reduktionsmittel, das sich unter anderem durch eine erhöhte Stabilität bei Raumtemperatur im Vergleich zu DTT auszeichnet.

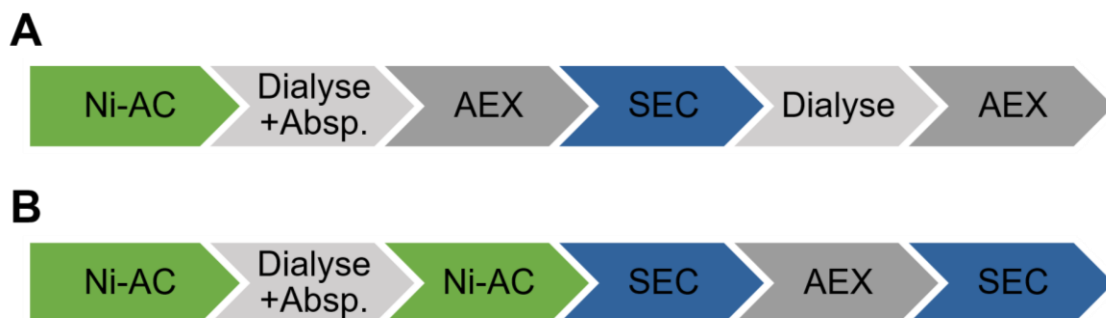


Abbildung 3-7: Vergleich der Reinigungsstrategien **A:** die in unserem Labor etablierte Reinigungsstrategie für die EGFR-Kristallisationskonstrukte, bestehend aus einer anfänglichen Ni²⁺-Affinitätschromatographie (Ni-AC) gefolgt von einer Dialyse über Nacht mit gleichzeitiger Abspaltung des His-Tags. In einem nächsten Schritt wurde eine Anionenaustauschchromatographie (AEX) durchgeführt gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie (SEC), einer Dialyse und einer erneuten Reinigung über einen Anionenaustauscher (AEX). **B:** Darstellung der Reinigung nach HANAN *et al.*, wobei zuerst eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie (Ni-AC) gefolgt von einer Dialyse über Nacht mit gleichzeitiger Abspaltung des His-Tags und erneuter Reinigung über eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie begonnen wird. Gefolgt werden diese Schritte von einer Größenausschlusschromatographie und einer Anionenaustauschchromatographie bevor das isolierte Protein in den finalen Kristallisationspuffer überführt wurde.

Im folgenden Abschnitt wird exemplarisch die Aufreinigung der Kristallisationskonstrukte anhand des EGFR-T790M/V948R (pMK33) Konstrukts erläutert. Alle Reinigungsschritte wurden via FPLC bei 4 °C durchgeführt und anschließend mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung analysiert. Die Chromatogramme sowie die SDS-PAGE der Reinigung des EGFR-T790M/E865A/E866A/K867A (pMK25) Konstrukts sind in Abschnitt 5.3 dargestellt.[‡]

Nach erfolgter Zellyse wurde mit einer Ni²⁺-Affinitätschromatographie begonnen. Durch den N-terminalen His-Tag konnte das Zielprotein an die Säulenmatrix binden und durch einen Imidazol-Gradienten von der Säule eluiert werden. Auf dem dazugehörigen Chromatogramm sind zwei Elutionspeaks zu erkennen, die beide das Zielprotein in unterschiedlicher Reinheit enthielten. Der SDS-PAGE konnte entnommen werden, dass in den Fraktionen des ersten Peaks viele unspezifisch gebundene Proteine und das Zielprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa enthalten waren. In den Fraktionen des zweiten Peaks ist das Verhältnis zwischen unspezifisch gebundenen Proteinen und dem Zielprotein hin zum Zielprotein verschoben, weswegen diese Fraktionen vereinigt wurden und über Nacht gegen einen Puffer mit niedriger Ionenstärke dialysiert wurde, wobei durch die Zugabe von Thrombin der His-Tag abgespalten wurde.

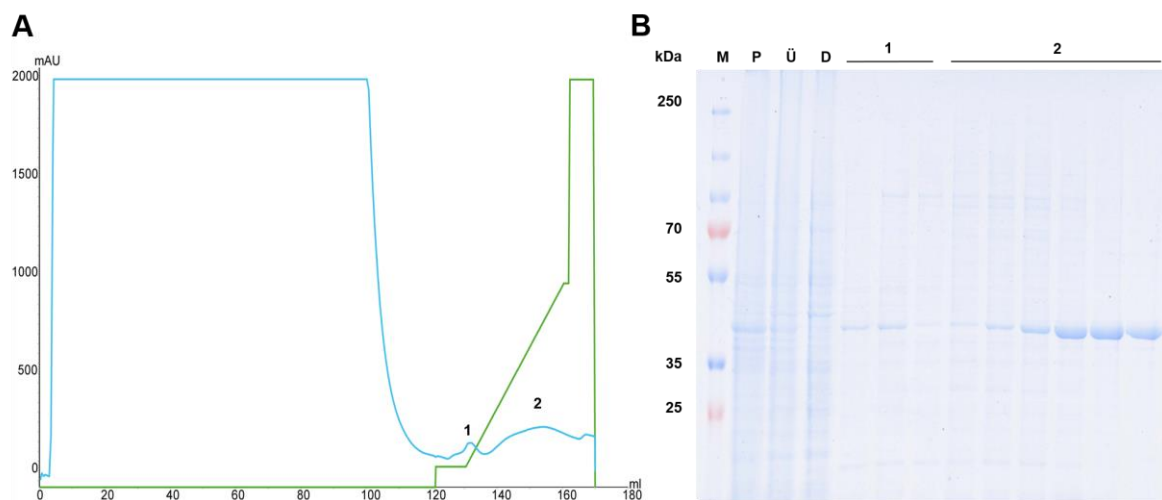


Abbildung 3-8: Erster Reinigungsschritt Affinitätschromatographie. **A:** Chromatogramm der Ni²⁺-Affinitätschromatographie des EGFR-T790M/V948R Konstrukts. Blau: UV-Absorption bei 280 nm; Grün: Anteil Elutionspuffer (250 mM Imidazol). **B:** Coomassie-SDS-Page einzelner Fraktionen aus dem ersten Reinigungsschritt. Aufgetragen wurde eine Probe aus dem Pellet (P) und aus dem Überstand (Ü) nach erfolgtem Zellaufschluss, aus dem Durchfluss der Säule (D), sowie verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks (1) und (2). Hierbei ist eine deutliche Bande auf der Höhe von 40 kDa erkennbar, die dem EGFR T790M/V948R zugeordnet werden kann.

[‡] Durchführung der Proteinreinigung erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von J. Niggenaber (AG Rauh, TU Dortmund)

Anschließend wurde die Affinitätschromatographie wiederholt, um eine Abtrennung des gespaltenen von dem ungespaltenen Protein zu erzielen (siehe Abbildung 3-9). Das gesplattene Protein verfügte zu dem Zeitpunkt nicht mehr über einen His-Tag und konnte infolgedessen nicht an die Säule binden, weshalb es in Fraktionen des Durchflusses zu finden war. Das entsprechende SDS-Gel zeigte weiterhin, dass ein kleiner Teil des Proteins nicht geschnitten wurde und durch den His-tag mit den anderen unspezifisch bindenden Proteinen erst durch Imidazol von der Säule eluiert werden konnte.

Gleichzeitig wird aus dem SDS-Gel deutlich, dass das Protein durch diesen Schritt deutlich an Reinheit gewonnen hat. Die Fraktionen des Durchflusses wurden vereinigt und mittels einer Zentrifugeneinheit auf ein Volumen von ca. 2 mL eingengt.

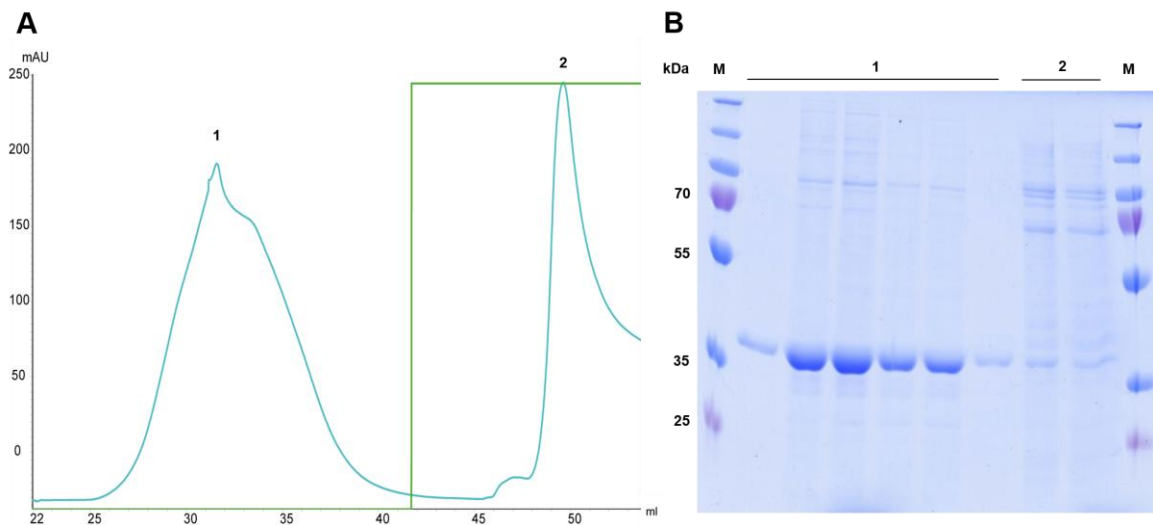


Abbildung 3-9: Zweiter Reinigungsschritt Affinitätschromatographie nach Abspaltung des His-Tags. **A:** Chromatogramm der Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Blau: UV-Absorption bei 280 nm; Grün: Anteil Elutionspuffer (250 mM Imidazol). **B:** Coomassie-SDS-Page einzelner Fraktionen aus dem Durchfluss (1), der durch die Abspaltung des His-Tags das Zielprotein mit einem Molekulargewicht von 38 kDa enthielt und einzelner Fraktionen aus dem Elutionspeak (2).

In dem anschließenden Schritt der Größenausschlusschromatographie wurden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt, mit dem Ziel verbliebene Verunreinigungen zu entfernen und das Protein in monomerer Form zu erhalten (siehe Abbildung 3-10). In dem Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie konnten zwei Peaks erkannt werden. Dabei konnten in den Fraktionen des ersten Peaks einige höher molekulare Verunreinigungen abgetrennt werden. Des Weiteren konnten in den Fraktionen des ersten Peaks auch Proteinbanden auf einer Höhe von ca. 37 kDa identifiziert werden, die vermutlich auf Dimere des Zielproteins zurückzuführen sind. Das SDS-Gel zeigte weiterhin, dass das Zielprotein in den Fraktionen des zweiten Peaks in guter Reinheit erhalten werden konnte. Für die folgende Anionenaustauschchromatographie wurden die Fraktionen des zweiten Peaks vereinigt.

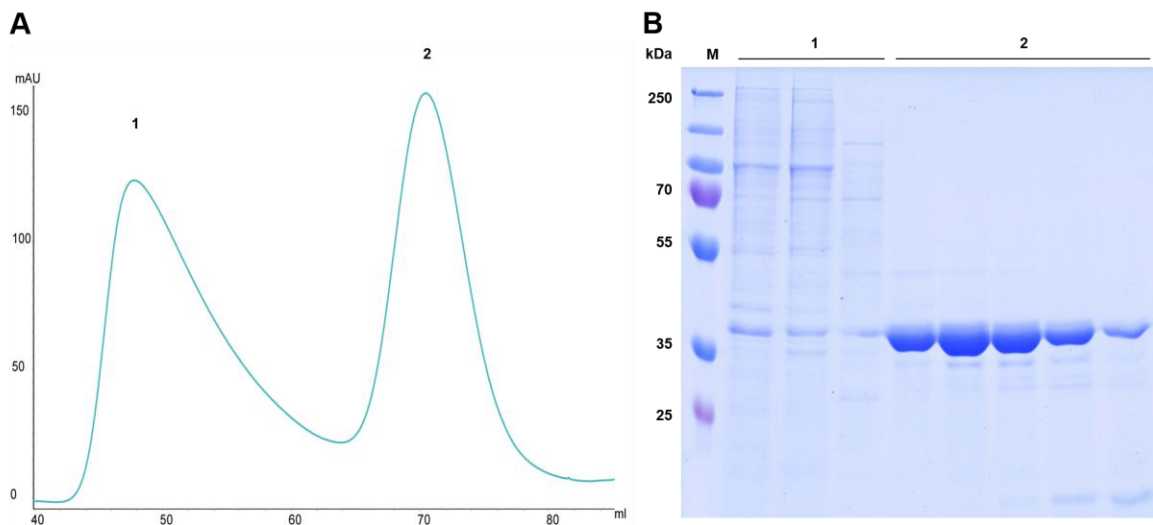


Abbildung 3-10: Dritter Reinigungsschritt Größenausschlusschromatographie. **A:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie. Blau: UV-Absorption bei 280 nm. **B:** Coomassie-SDS-Page einzelner Fraktionen aus dem dritten Reinigungsschritt. Aufgetragen wurden einzelne Proben aus dem ersten und zweiten Elutionspeak. Hier konnten deutliche Banden auf der Höhe von 37 kDa in Proben aus dem zweiten Elutionspeak identifiziert werden, die dem Zielprotein zugeordnet werden konnten.

Durch die Größenausschlusschromatographie konnte das Protein bereits in guter Reinheit erhalten werden, allerdings ist bekannt, dass Kinasen bei der heterologen Expression in Insektenzellen häufig von ihrem Expressionsorganismus posttranslational modifiziert werden, wobei auch die Autophosphorylierung bedingt durch die katalytische Aktivität der Kinasen eine wichtige Rolle spielt. Aufgrund dessen entstehen heterogene Gemische, die unphosphorylierte und phosphorylierte Spezies enthalten und die Ausbildung eines Proteinkristalls stören könnten. Mit Hilfe einer Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung eines starken Säulenmaterials (Mono Q), das eine hohe Affinität gegenüber anionischen Molekülen aufweist und eine höhere Trennleistung als gewöhnliche Anionenaustauscher ermöglicht, sollte die Trennung von Proteinen unterschiedlicher Phosphorylierungsmuster erfolgen.

In dem dazugehörigen Chromatogramm (Abbildung 3-11 A) konnten drei Peaks identifiziert werden, in dessen Fraktionen jeweils das Zielprotein in reiner Form vorliegt, aber vermutlich unterschiedliche Phosphorylierungsmuster aufweist.

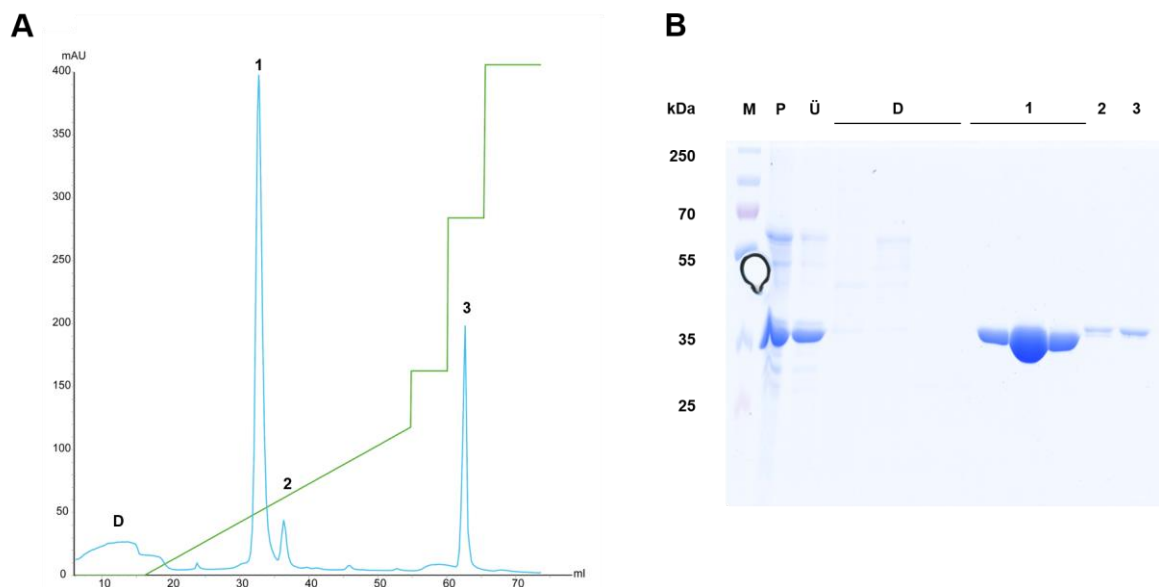


Abbildung 3-11: Vierter Reinigungsschritt Anionenaustauschchromatographie mithilfe einer Mono Q Säule zur Auftrennung von Phosphorylierungsstufen des Zielproteins. **A:** Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie des EGFR-T790M/V948R Konstrukts. Blau: UV-Absorption bei 280 nm; Grün: Anteil Elutionspuffer (1 M NaCl). **B:** Coomassie-SDS-Page, wobei eine Probe des Pellets (P) und des Überstandes (Ü) nach erfolgter Dialyse über Nacht, sowie Proben aus dem Durchfluss und aus den Elutionspeaks 1-3 (1-3) aufgetragen wurden. Das Zielprotein konnten in Fraktionen des ersten Peaks deutlich identifiziert werden und weiterhin scheinen zwei unterschiedliche Phosphospezies in Peak zwei und drei vorhanden zu sein.

Die Analyse der Phosphorylierungsspezies erfolgte mittels ESI-MS, wobei gleichzeitig die Identität und die hohe Reinheit der Proteine bestätigt werden konnte. Wie den Massenspektren entnommen werden kann, wurden in Fraktionen des ersten Peaks lediglich unphosphoryliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 37 910 Da gefunden werden (siehe Abbildung 3-12 B).

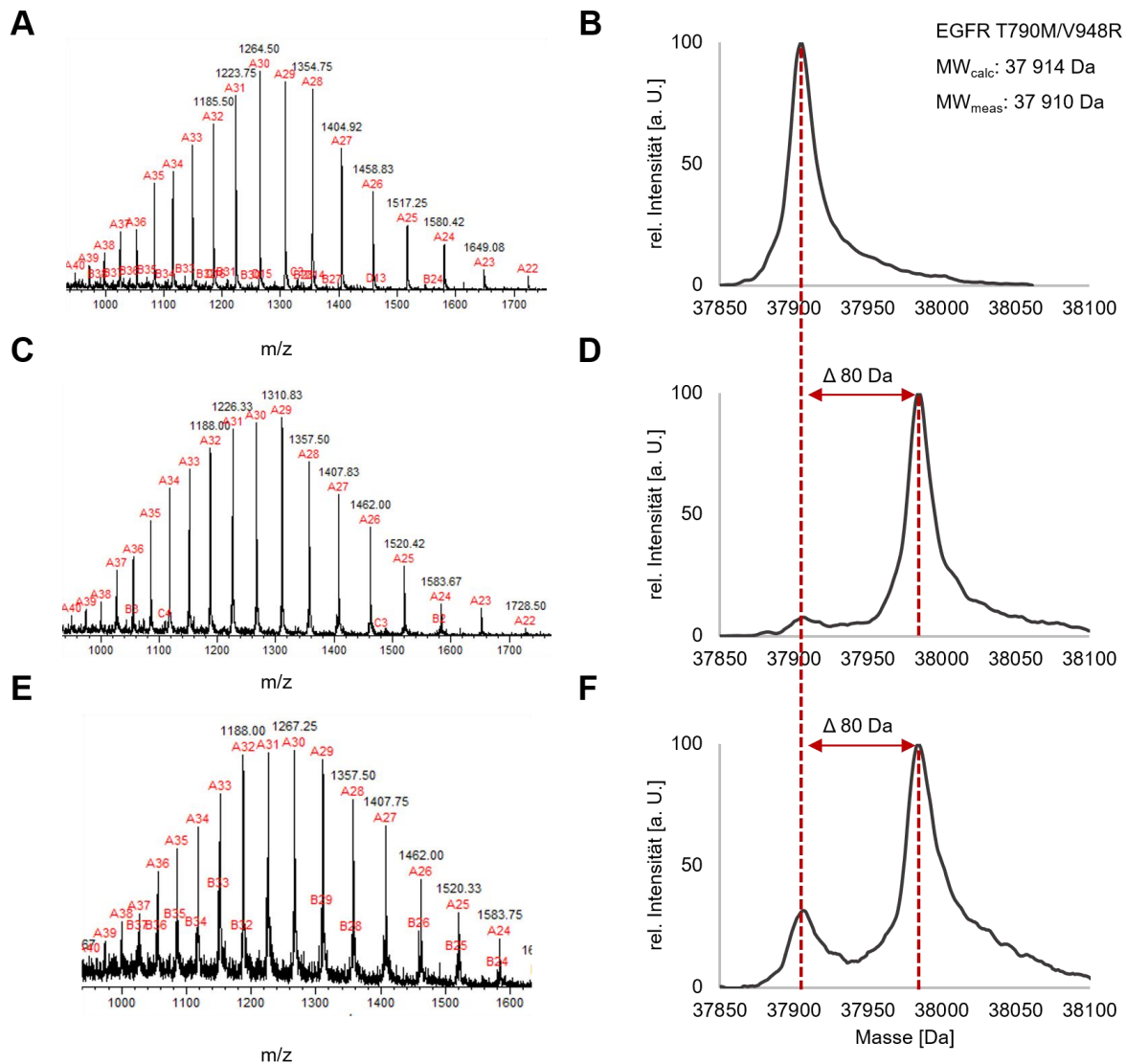


Abbildung 3-12: ESI-MS Analyse mit den entsprechenden dekonvolvierten Massenspektren der Proben aus den Elutionspeaks eins bis drei der Anionenaustauschchromatographie. In **A**, **C**, **E** sind die Rohdaten der ESI-MS Analyse des ersten, zweiten und dritten Elutionspeaks abgebildet. **B**: Dekonvolviertes Massenspektrum der Probe aus dem ersten Elutionspeak. Das berechnete Molekulargewicht der unphosphorylierten EGFR T790M/V948R Mutante liegt bei 37 914 Da und gemessen wurde ein Molekulargewicht von 37 910 Da, was in der Messtoleranz liegt und eindeutig dem Zielprotein zugewiesen werden kann. In **D** und **F** sind die dekonvolvierten Massenspektren des zweiten und dritten Elutionspeaks dargestellt, die beide zusätzlich zu dem unphosphorylierten Protein auch ein einfach phosphoryliertes Protein enthalten.

In den Fraktionen des zweiten und dritten Peaks konnten zusätzlich zu dem unphosphorylierten Protein auch einfach phosphoryliertes Protein identifiziert werden. Allerdings unterschied sich in den beiden Peaks das Verhältnis zwischen unphosphoryliertem und einfach phosphoryliertem Protein. Eine Aufspaltung dieser beiden Spezies kann auch auf Phosphorylierungen an unterschiedlichen Positionen im Protein zurückzuführen sein. Im Anschluss wurde lediglich mit dem unphosphorylierten Protein weitergearbeitet.

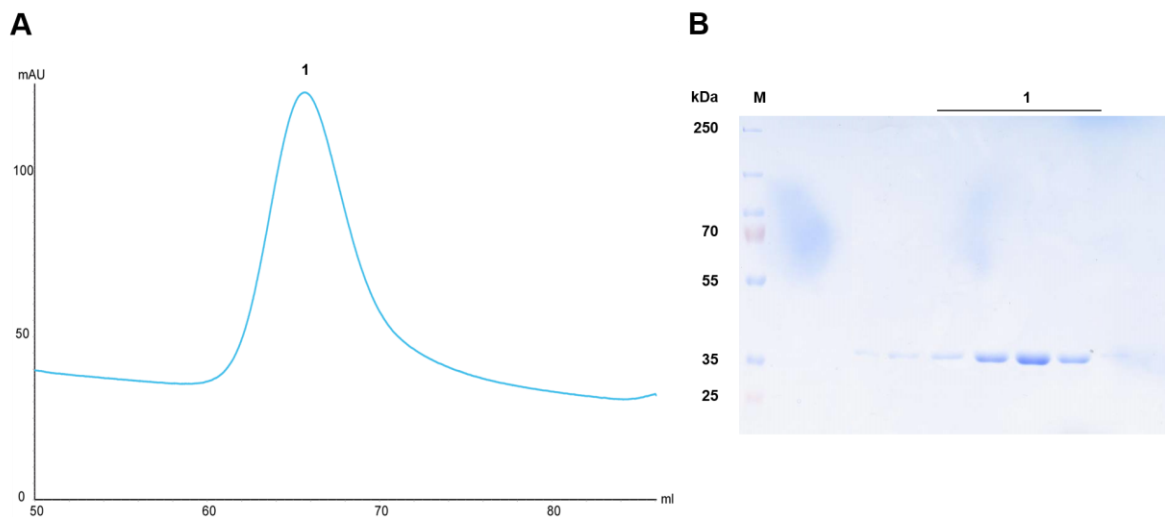


Abbildung 3-13: Letzter Reinigungsschritt des EGFR Kristallisationskonstrukts zur Überführung des Proteins in den Kristallisationspuffer. **A:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie. Blau: UV-Absorption bei 280 nm. **B:** Coomassie-SDS-Page, wobei Proben aus dem Elutionspeak aufgetragen wurden, die das Zielprotein mit einem Molekulargewicht von 37 kDa enthielten.

Im finalen Schritt der Aufreinigung wurde das Protein mittels einer erneuten Größenausschlusschromatographie in den Kristallisationspuffer überführt. Wie das Chromatogramm und das dazugehörige SDS-Gel zeigten, konnte das Zielprotein in ausreichend hoher Reinheit für Kristallisationsstudien isoliert werden. Da die Proteinausbeute mit dieser Reinigungsstrategie durch die vielen Säulen moderat ausfiel, wurden schrittweise Optimierungen vorgenommen. Zuerst wurden alle Phosphospezies nach der Anionenaustauschchromatographie vereinigt und in einem weiteren Schritt wurde die Anionenaustauschchromatographie und die erste Größenausschlusschromatographie ausgelassen. Dadurch konnte die Säulenanzahl von ursprünglich fünf auf drei minimiert werden (siehe Abbildung 3-14 A und B). Daraus resultierte eine deutlich erhöhte Proteinausbeute bei gleichbleibender Reinheit (siehe Abbildung 3-14 C).

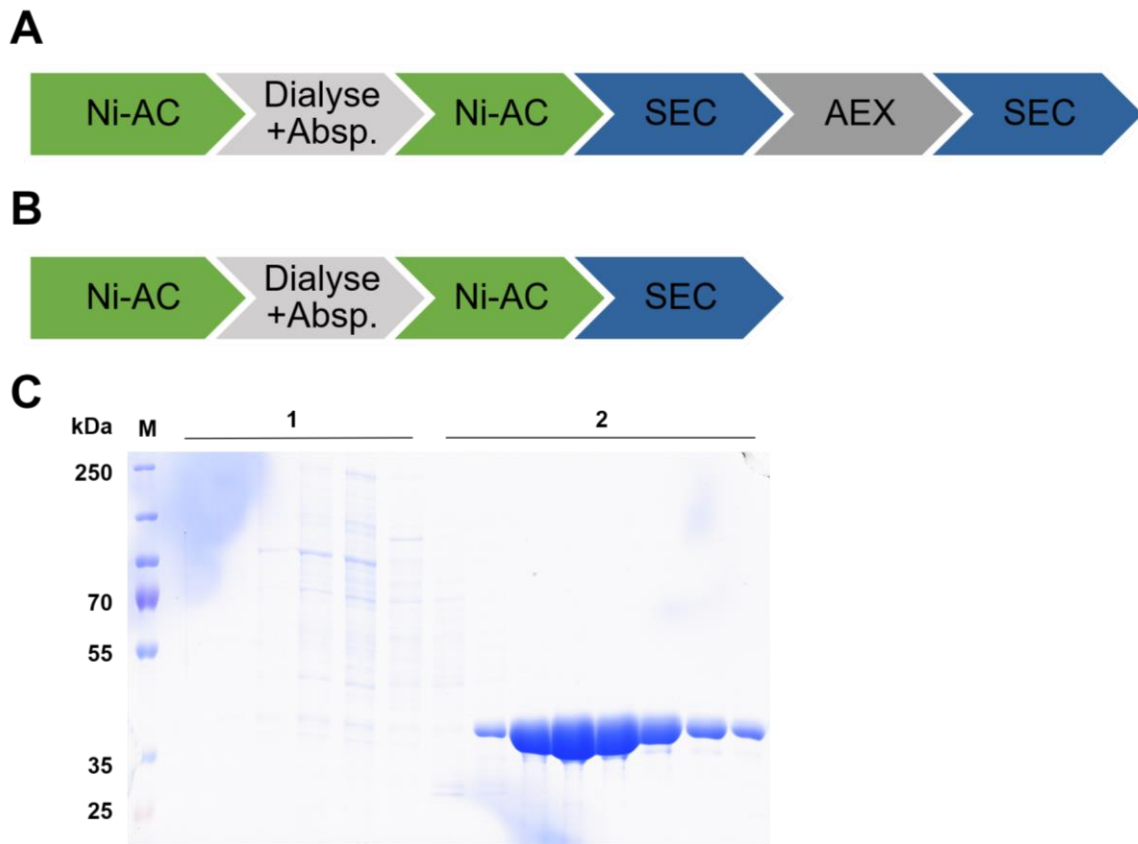


Abbildung 3-14: Schematische Darstellung der Verkürzung der Reinigungsstrategie. **A:** Darstellung der Reinigung nach *Hanan et al.* (vergleiche Abbildung 3-7). **B:** Darstellung der verkürzten Reinigungsstrategie, die nicht mehr fünf, sondern nur noch drei Säulen enthielt. **C:** Exemplarische CBB-SDS-Page einzelner Fraktionen aus dem dritten und finalen Reinigungsschritt. Aufgetragen wurden einzelne Proben aus dem ersten und zweiten Elutionspeak. Hier konnten deutliche Banden auf der Höhe von 37 kDa in Proben aus dem zweiten Elutionspeak identifiziert werden, die dem Zielprotein zugeordnet werden können.

3.1.4.2. Reinigung der Assaykonstrukte

Im Folgenden wird exemplarisch anhand des EGFR-del19/G724S Konstrukts die Reinigung der Assaykonstrukte erläutert. Analog zu der Isolierung der Kristallisationskonstrukte erfolgte die Reinigung via FPLC und wurde bei 4 °C durchgeführt. Die Analyse erfolgte ebenfalls mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung.

Nach erfolgter Zellyse der Insektenzellen mittels Hochdruck, wurde das Lysat langsam auf eine GST-Säule aufgetragen und dann mit Hilfe einer Schlag Elution von der Säule gewaschen (siehe Abbildung 3-15). Das dazugehörige SDS-Gel zeigte, dass auch in der Probe des Durchflusses Proteinbanden auf einer Höhe von 90 kDa zu sehen sind. Dieses deutet daraufhin, dass die Säule entweder zu schnell beladen wurde oder keine Bindestellen für das Protein vorhanden gewesen sind. Dennoch konnte das Zielprotein in hoher Reinheit nach dem ersten Reinigungsschritt erhalten werden und lag in den Fraktionen des Elutionspeaks vor. Des Weiteren konnten Proteinbanden auf der Höhe von ca. 25 kDa erkannt werden, die vermutlich freiem GST zugeordnet werden können.

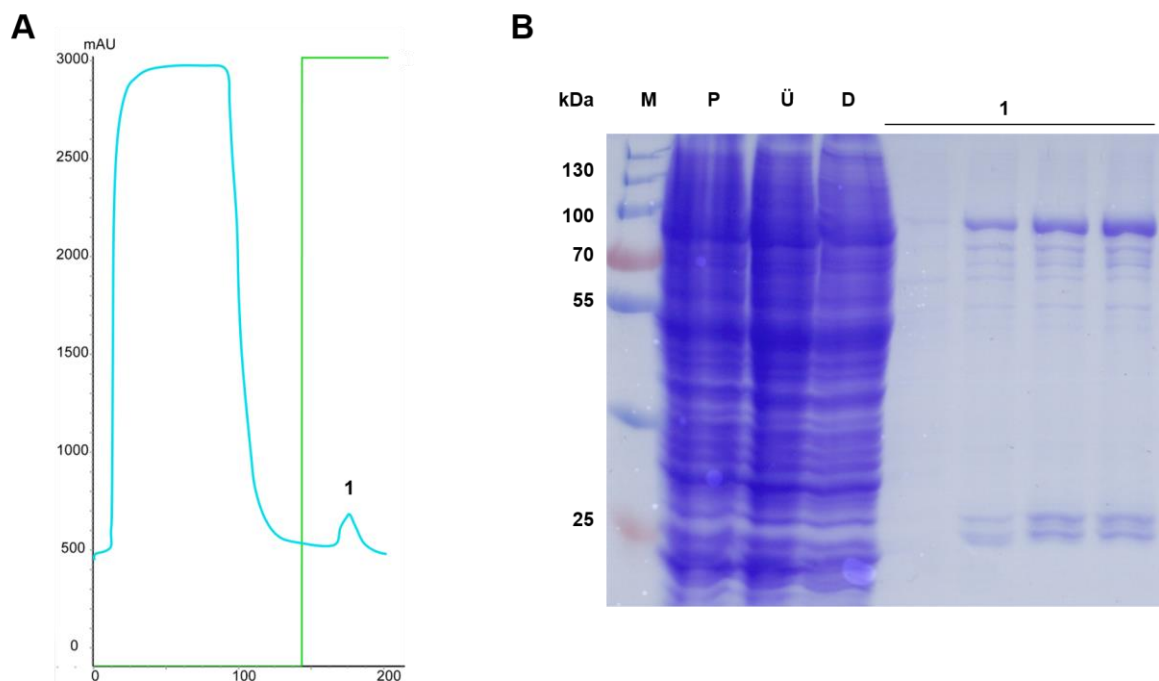


Abbildung 3-15: Erster Reinigungsschritt Affinitätschromatographie. **A:** Chromatogramm der GST-Affinitätschromatographie des EGFR-del19/G724S Konstrukts. Blau: UV-Absorption bei 280 nm; Grün: Anteil Elutionspuffer (25 mM reduziertes Glutathion). **B:** Coomassie-SDS-PAGE einzelner Fraktionen aus dem ersten Reinigungsschritt. Aufgetragen wurde eine Probe aus dem Pellet (P) und aus dem Überstand (Ü) nach erfolgtem Zellaufschluss, aus dem Durchfluss der Säule (D), sowie verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks (1). Wobei hier eine deutliche Bande auf der Höhe von 90 kDa erkennbar ist, die dem EGFR-del19/G724S Konstrukt zugeordnet werden kann.

Für den zweiten Reinigungsschritt wurde die Proteinlösung auf 2 mL eingengt und in einer Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt (siehe Abbildung 3-16). In dem entsprechenden Chromatogramm konnten zwei Peaks beobachtet werden. Durch die SDS-PAGE konnte weiterhin die Abtrennung der niedermolekularen Verunreinigungen festgestellt werden. Das Zielprotein, das ein Molekulargewicht von ca. 89 kDa besaß, konnte in den Fraktionen des ersten Peaks mit leichten Verunreinigungen erkannt werden. Da das Protein für biochemische Untersuchungen verwendet werden sollte, reichte die Reinheit aus. Im Folgenden konnte die katalytische Aktivität in initialen Experimenten bestätigt werden. Darauf hin wurde das Protein bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

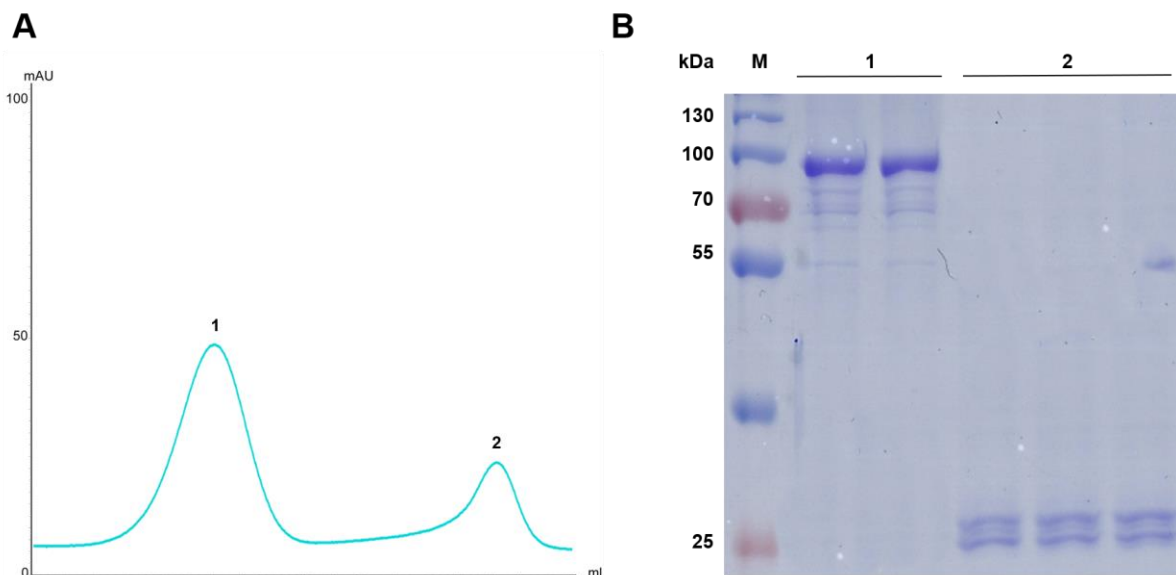


Abbildung 3-16: Zweiter Reinigungsschritt Größenausschlusschromatographie. **A:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie. Blau: UV-Absorption bei 280 nm. **B:** Coomassie-SDS-Page einzelner Fraktionen aus dem zweiten Reinigungsschritt. Aufgetragen wurden einzelne Proben aus dem ersten und zweiten Elutionspeak. Hier konnten deutliche Banden auf der Höhe von 90 kDa in Proben aus dem ersten Elutionspeak identifiziert werden, die dem Zielprotein zugeordnet werden können.

3.1.5. Etablierung von Kristallisationsbedingungen

Strukturbiologische Analysen eines Liganden im Komplex mit dem entsprechenden Zielprotein nehmen eine Schlüsselposition in der heutigen Medizinalchemie ein, die eine rationale Entwicklung und Optimierung eines Liganden ermöglichen. Innerhalb dieser Vorgehensweise stellt die Proteinkristallisation einen schwer kalkulierbaren Schritt dar, der keinem Rational folgt. Daher wurden zur Etablierung eines reproduzierbaren Kristallisationssystems für die beiden EGFR-Mutanten (T790M/V948R und T790M/E865A/E866A/K867A) neben den literaturbekannten Kristallisationsbedingungen auch ca. 600 kommerziell erhältliche Kristallisationsbedingungen in Screening-Experimenten getestet (JCSG Core I-IV Suites, JCSG+ Suite, Classics Suite, Qiagen).^{§ [50, 147-148]} Die initialen Kristallisationsstudien wurden mit der EGFR-T790M/E865A/E866A/K867A Mutante durchgeführt, wobei versucht wurde das Protein im Komplex mit verschiedenen Referenzinhibitoren zu kristallisieren. Unter Verwendung der literaturbekannten Kristallisationsbedingungen konnte kein Kristallwachstum erkannt werden, vielmehr konnten entweder klare Tropfen oder Tropfen mit braunem Niederschlag, der ein denaturiertes Protein indizierte, beobachtet werden. Gleichzeitig konnten kleine Kristalle in zwei Bedingungen aus Screening-Experimenten festgestellt werden, die beide PEG 3350 als Fällungsmittel beinhalteten (siehe Abbildung 3-17 A und B). Die so erhaltenen kubischen Kristalle waren jedoch zu klein, als dass sie die Aufnahme eines Datensatzes ermöglichten. Vor diesem Hintergrund dienten die Bedingungen als Ausgangspunkt für *Fine-Screens*, innerhalb derer systematisch die Proteinkonzentration, die Fällungsmittelkonzentration und die Salzkonzentration verändert wurde. Es zeigte sich, dass sich die Kristalle aus den Screening-Experimenten reproduzieren ließen, die Variation der Proteinkonzentration, der Fällungsmittelkonzentration und der Salzkonzentration, aber keinen positiven Effekt auf die Beschaffenheit der Kristalle zeigte (siehe Abbildung 3-17 C). In weiterführenden Screens wurde der Einfluss verschiedener Additive evaluiert und tatsächlich konnten durch die Zugabe von 3% Ethylenglykol größere Proteinkristalle nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-17 D). Die identifizierte Kristallisationsbedingung wurde im Rahmen dieser Arbeit als Ausgangspunkt innerhalb von Ko-Kristallisationsstudien verwendet und individuell an die Protein-Inhibitor Kombination angepasst.

[§] Die Durchführung der Screening-Experimente erfolgte als Teil der Masterarbeit von J. Niggenaber (AG Rauh, TU Dortmund). Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen geschah in Zusammenarbeit zwischen J. Niggenaber und M. Keul (AG Rauh, TU Dortmund).

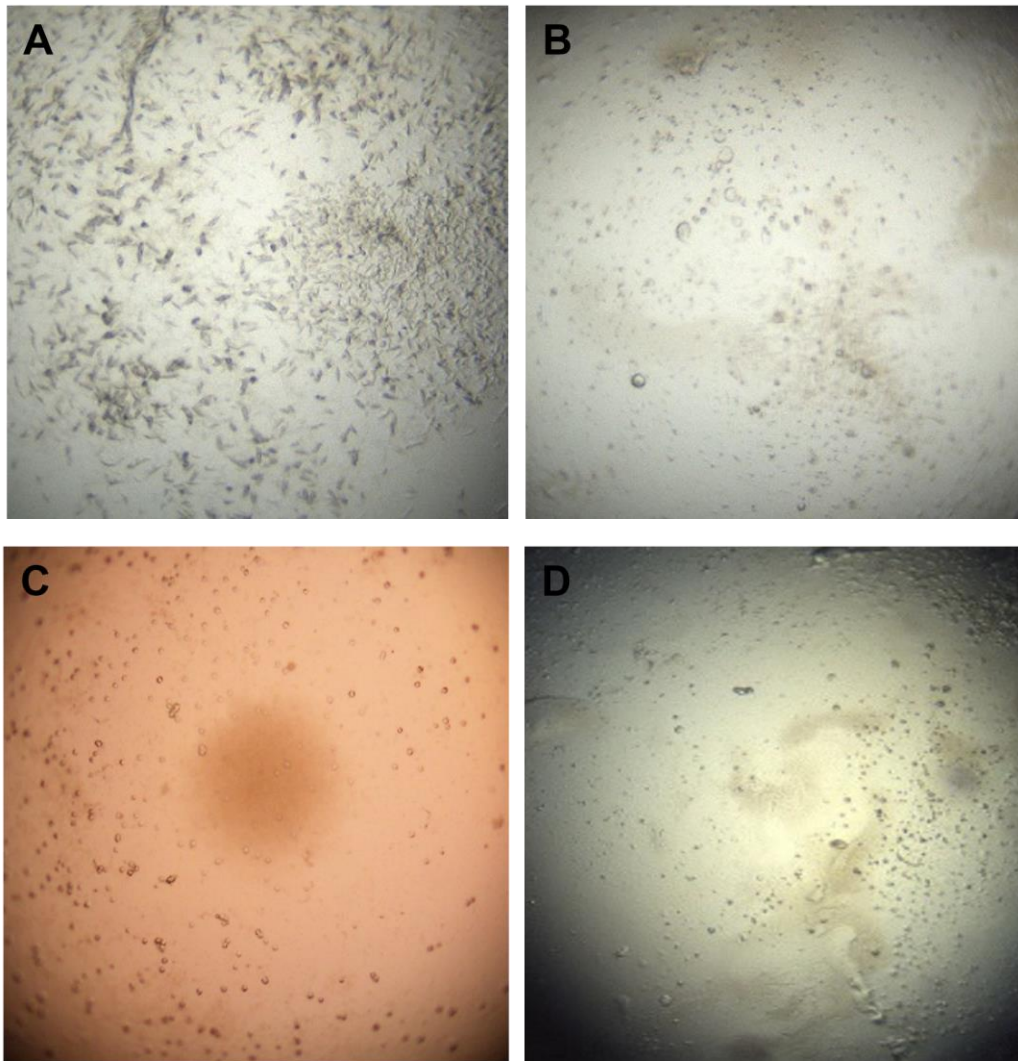


Abbildung 3-17: Beispielhafte Mikroskopie-Aufnahmen von Kristallisationsansätzen. Dabei entstanden **A, B,** und **C** in Kristallisations-Experimenten mit dem EGFR-T790M/E865A/E866A/K867A Konstrukt und **D** in Experimenten mit dem EGFR-T790M/V948R Konstrukt unter der Verwendung nachstehender Bedingungen. **A:** 20% PEG 3350, 200 mM NH₄-Formiat. **B:** 20% PEG 3350, 200 mM MgSO₄. **C:** 22.5% PEG 3350, 100 mM MgSO₄. **D:** 22.5% PEG 3350, 100 mM MgSO₄, 3% Ethylenglykol.

3.1.6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proteinexpression in Insektenzellen für diverse EGFR-Varianten erfolgreich etabliert und optimiert. Zunächst wurde die Expression der Kristallisationskonstrukte durch den Wechsel des Mediums in Kombination mit TOH-Analysen verbessert, sodass eine klare Überexpression der Zielproteine festgestellt werden konnte. Die Expression der gesamten intrazellulären Domäne des EGFR-Rezeptors stellte sich anfangs deutlich schwieriger dar und konnte in zwei Fällen erst unter der Verwendung des MultiBac-Systems realisiert werden. Im Anschluss an die erfolgreiche Überexpression der entsprechenden EGFR-Mutanten konnten für alle Proteine geeignete Reinigungsstrategien entwickelt werden. Speziell für die Kristallisationskonstrukte konnte durch die Veränderung der Pufferzusammensetzungen merkliche Veränderungen im Kristallisationsverhalten beobachtet werden, welches in Kristallwachstum in verschiedenen Ko-Kristallisationsstudien resultierte. Ferner konnte die katalytische Aktivität der Assaykonstrukte nachgewiesen werden, die die funktionelle und damit einhergehend auch die strukturelle Integrität der Proteine bestätigte.

3.2. Einblicke in die Inhibition der EGFR-T790M Variante

Einer der bekanntesten Resistenzmechanismen gegen Tyrosinkinase-Inhibitoren stellt die Mutation der sogenannten Türsteheraminosäure dar, die den Zugang zur ATP-Bindetasche kontrolliert und maßgeblich an der Selektivität gegenüber Liganden beteiligt ist.^[149] Beispielhaft sind an dieser Stelle Mutationen in Kinasen wie BCR-ABL, KIT und EGFR zu nennen, wobei in letzterer die T790M-Mutation eine Wirkstoffresistenz gegenüber Inhibitoren der ersten und zweiten Generation vermittelt und typischerweise innerhalb eines Jahres nach dem Beginn der Therapie mit einem Rezidiv einhergeht.^[51, 150-153] Der Austausch des Threonins durch ein Methionin führt zur sterischen Abstoßung des Inhibitors und zu einer leicht veränderten Bindungsgeometrie der Liganden, die in einem Verlust der inhibitorischen Aktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* resultiert.^[154] Wie eingangs erläutert, wurden die TKIs der dritten Generation, wie beispielsweise Osimertinib, Rociletinib oder Nazartinib (EGF-816) entwickelt, um sterische Interferenzen mit dem Met790 zu vermeiden. Dennoch treten unter Einsatz dieser TKIs Wirkstoffresistenzen auf, die ein Fortschreiten der Krankheit hervorrufen.^[155] Daher besteht ein fortwährender Bedarf an neuartigen EGFR-Inhibitoren, die wirkstoffresistente Varianten des EGFR wirksam inhibieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse Inhibitor-Serien gegenüber wirkstoffresistenten EGFR-Varianten biochemisch, zellulär und strukturbiochemisch mit dem Ziel evaluiert das Verständnis der zugrunde liegenden resistenzvermittelnden Mechanismen zu erweitern und Optimierungsoptionen vorhandener Inhibitoren aufzuzeigen. Ein Schwerpunkt bildete die detaillierte Charakterisierung von kovalenten Inhibitoren, deren theoretischer Hintergrund im folgenden Kapitel thematisiert wird. Im Anschluss werden die so erhaltenen Ergebnisse vorgestellt und diskutiert.

3.2.1. Exkurs: Kinetische Bindungsstudien mit kovalenten Inhibitoren

Trotz anfänglicher Bedenken hinsichtlich einer potentiellen Toxizität rückten kovalente Inhibitoren zunehmend in den Fokus der Wirkstoffforschung und führten in den letzten Jahren zu zahlreichen Erfolgen in der Behandlung von Herz-, Kreislauf- und Krebserkrankungen.^[156] Biochemische Testsysteme mit denen die Wirksamkeit und Inhibitionsstärke von kovalenten Inhibitoren abgebildet werden kann sind daher von besonderem Interesse. In der frühen Wirkstoffentwicklung wird die Aktivität einer Verbindung standardmäßig anhand von biochemischen IC_{50} -Bestimmungen ermittelt.^[157] Dabei entspricht der IC_{50} -Wert der Inhibitorkonzentration, bei der die halbmaximale Inhibition des Enzyms beobachtet wird. Im folgenden Abschnitt erfolgt eine Herleitung des IC_{50} -Werts und es wird erläutert, warum die IC_{50} -Bestimmung nicht die Methodik der Wahl darstellt, wenn es um die Beurteilung von kovalenten Inhibitoren geht. Anschließend wird eine Vorgehensweise vorgestellt, die eine detaillierte Analyse des Bindemechanismus von kovalenten Bindern erlaubt.

Ausgehend von dem vereinfachten Reaktionsmechanismus einer enzymkatalysierten Reaktion, der von Leonor Michaelis und Maud Menten aufgestellt wurde, (vgl. Abbildung 3-18) und unter der Prämisse, dass die Konzentration des aktiven Enzyms und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) konstant bleiben, kann die Produktbildungsgeschwindigkeit (v_0) mit nachstehender Gleichung beschrieben werden:

$$v_0(t) = \frac{d}{dt} P_0(t) = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

mit

$$v_{max} = k_2 \cdot E_{cat} \quad (2)$$

P_0 =Produkt

v_{max} =maximale Reaktionsgeschwindigkeit

S=Substrat

K_m =Michaelis-Konstante

Die Geschwindigkeit der Produktbildung in Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors (v_i) kann durch folgende Gleichung wiedergegeben werden (vgl. Abbildung 3-18):

$$v_i(t) = \frac{d}{dt} P_i(t) = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (3)$$

mit

$$K_i = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad (4)$$

[I]=Inhibitorkonzentration

K_i =Dissoziationskonstante des [EI]-Komplexes

Daraus ergibt sich mit $I=IC_{50}$ und $v_0=2v_i$:^[158]

$$\frac{2v_{\max} \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[IC_{50}]}{K_i}\right) + [S]} = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (5)$$

Durch Umformen ergibt sich die CHENG-PRUSOFF Gleichung für reversible kompetitive Inhibition, die den Bezug zwischen dem IC_{50} -Wert und der Dissoziationskonstante herstellt.^[158-159]

$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) \quad (6)$$

Wie eingangs erwähnt, gelten diese Gleichungen, sofern die Konzentration des aktiven Enzyms und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) konstant bleiben. Im Fall einer reversiblen kompetitiven Inhibition werden diese Voraussetzungen erfüllt. Hingegen zeigen im Gegensatz zu reversiblen Inhibitoren kovalente Inhibitoren eine zeitabhängige Inhibition. Grundsätzlich wird für kovalente Inhibitoren ein zweistufiger Bindemechanismus angenommen, der von einem reversiblen Anteil und einem irreversiblen Anteil geprägt wird (siehe. Abbildung 3-18).

In einem ersten Schritt bindet der Inhibitor reversibel in die Bindetasche des Enzyms und bildet einen Enzym-Inhibitor Komplex, der meist durch Wasserstoff-Brückenbindungen und Van-der-Waals Wechselwirkungen stabilisiert wird. Vorausgesetzt die reaktiven Gruppen des Inhibitors und des Proteins befinden sich in einer ausreichenden Nähe, erfolgt in einem zweiten Schritt die Ausbildung der kovalenten Bindung. Durch die Irreversibilität dieser Reaktion wird das Enzym inaktiviert und dauerhaft dem Fließgleichgewicht entzogen. Daraus resultiert, dass der IC_{50} -Wert nach einer bestimmten Zeit lediglich die verwendete Enzymkonzentration und nicht die inhibitorische Potenz abbildet.^[157] Basierend auf dieser Tatsache lässt sich die inhibitorische Aktivität von kovalenten Inhibitoren nur vage anhand des gemessenen IC_{50} -Werts abschätzen. Eine detaillierte kinetische Charakterisierung der Inhibitoren einschließlich der Bestimmung der Parameter K_i und k_{inact} ist unumgänglich.^[160] Hierbei wird der erste Schritt der Bindungsbildung durch die reversible Affinität K_i des Inhibitors zum Enzym charakterisiert, die mit der Dissoziationskonstante einer reversiblen Inhibition gleichzusetzen ist. Der zweite Schritt der Bindungsbildung wird mit Hilfe der Rate der Inaktivierung k_{inact} beschrieben.^[161] Im Rahmen von Toxizitätsstudien mit den Cytochrom-P₄₅₀ Enzymen wurden schon vielfältige Methoden etabliert, die zum Teil auf die kovalente Inhibition von Kinasen übertragen werden können.^[162-164]

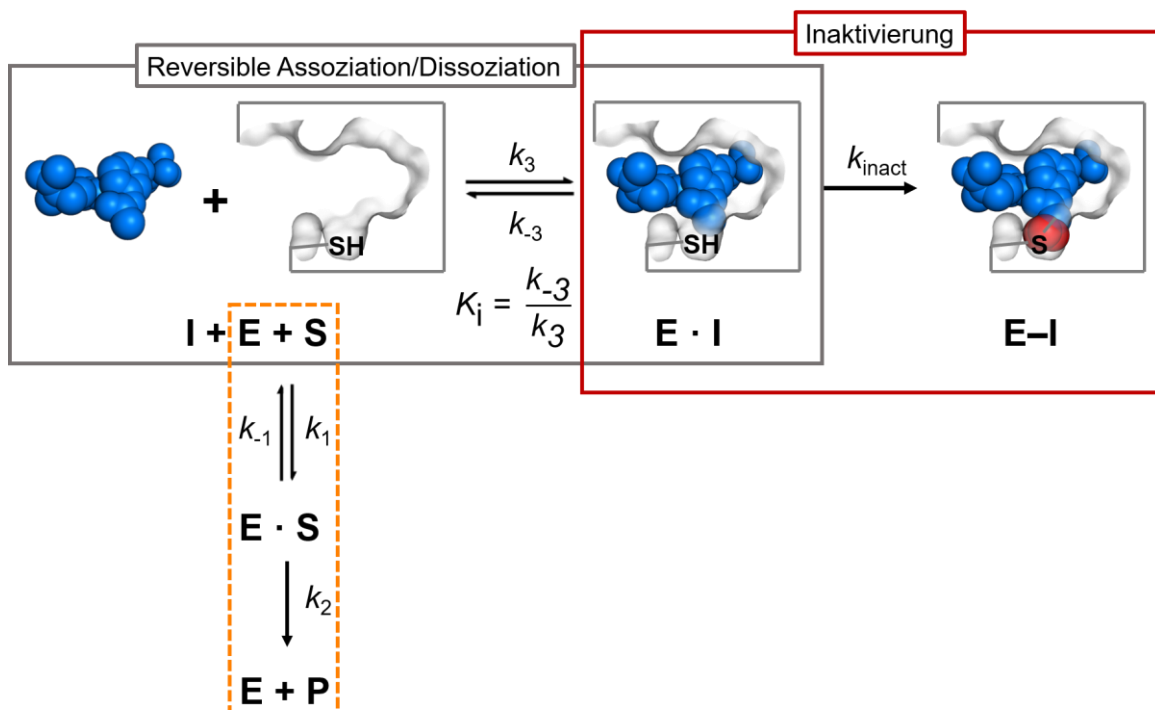


Abbildung 3-18: Schematische Darstellung des Reaktionsschemas einer enzymkatalysierten Reaktion in Anwesenheit eines irreversiblen Inhibitors. Die Produktformation (orange) erfolgt in einem zweistufigen Prozess, wobei sich zuerst das Enzym E und das Substrat S zu einem Komplex ES zusammenlagern, der im anschließenden Schritt zum Enzym E und Produkt P zerfällt. Mit dem Substrat konkurriert der kompetitive Inhibitor I um die Bindetasche des Enzyms. Handelt es sich bei dem Inhibitor I um einen kovalenten Binder, so wird ein zweistufiger Bindemechanismus angenommen. In einem ersten Schritt (grau) kommt es zur Bildung des Enzym-Inhibitor Komplexes EI , der einen reversiblen Charakter aufweist. Anders als bei der Produktformation, erfolgt anschließend eine irreversible Inaktivierung (rot) des Enzyms, wodurch das Enzym und der Inhibitor dauerhaft der Reaktion entzogen werden.

KRIPPENDORFF *et al.* beschreibt eine Methode, mit der kinetische Parameter anhand von zeitabhängigen IC_{50} -Bestimmungen bestimmt werden, unter der Annahme, dass die Substratkonzentration, sowie die Inhibitorkonzentration während der Reaktionszeit konstant bleiben. Ein Fokus liegt auf der Berücksichtigung der Zeitabhängigkeit der Konzentration des aktiven Enzyms und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit.

Daher folgt aus Gleichung (3):

$$v_i(t) = \frac{d}{dt} P_i(t) = \frac{v_{\max}(t) \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (7)$$

mit

$$v_{\max}(t) = k_{\text{inact}} \cdot E_{\text{cat}}(t) \quad (8)$$

t=Inkubationszeit

Daraus leiten KRIPPENDORFF *et al.* die Beziehung zwischen den zeitabhängigen IC_{50} -Bestimmungen ($IC_{50}(t)$) und den Parametern K_i und k_{inact} , wie folgt her:

$$IC_{50}(t) = K_i \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_M}\right) \cdot \left(\frac{2 - 2e^{-\eta_{IC_{50}} \cdot k_{\text{inact}} \cdot t}}{\eta_{IC_{50}} \cdot k_{\text{inact}} \cdot t} - 1\right) \quad (9)$$

mit

$$\eta_{IC_{50}} = \frac{IC_{50}(t)}{K_i \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_M}\right) + IC_{50}(t)} \quad (10)$$

Aus der Gleichung geht hervor, dass für jede spezifische Kurve von IC_{50} -Werten genau eine Kombination der Parameter K_i und k_{inact} existiert. Anzumerken ist, dass die Michaelis-Konstante, die Substratkonzentration und die Inhibitorkonzentration bekannt sind und über die Variation der Präinkubation des Enzyms mit dem Inhibitor (2-90 min) die unbekanntesten zeitabhängigen IC_{50} -Werte aufgenommen werden. Erwartungsgemäß sinken die IC_{50} -Werte mit steigender Präinkubation und ergeben beim Auftragen gegen die Inkubationszeit einen charakteristischen Verlauf (siehe Abbildung 3-19). Aus einer solchen Auftragung können anhand von Gleichung (9) mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate die gesuchten Parameter K_i und k_{inact} determiniert werden. Um eine hohe Genauigkeit der Daten zu erhalten, wurden elf IC_{50} -Werte für jede Verbindung bestimmt, wobei jeder Wert in drei unabhängigen

Experimenten in Duplikaten erhoben wurde. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Untersuchung der Parameter K_i und k_{inact} und somit die Bestimmung der reversiblen und irreversiblen Beiträge zur Potenz eines kovalenten Inhibitors essentiell für das mechanistische Verständnis und die anschließende Optimierung eines irreversiblen Inhibitors sind.

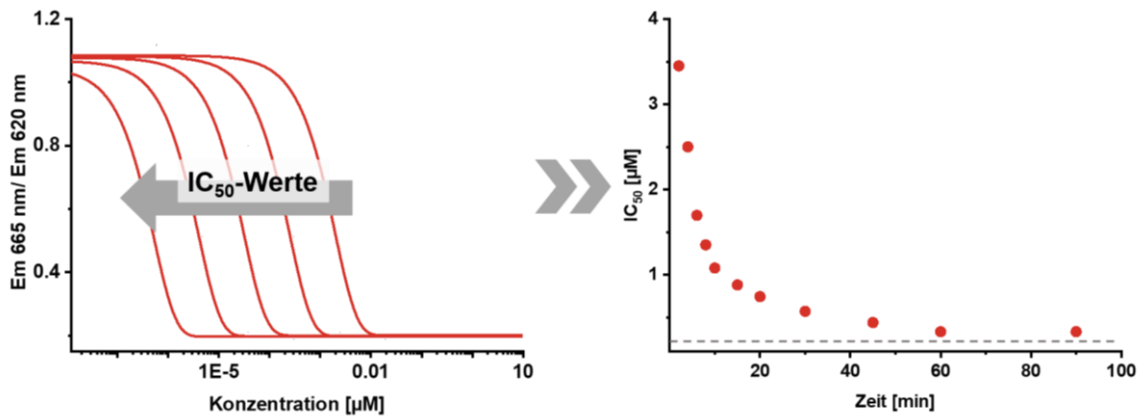


Abbildung 3-19: Schematische Darstellung einer zeitabhängigen IC_{50} -Bestimmung eines kovalenten Inhibitors, wobei mit steigender Präinkubationszeit des Inhibitors mit dem Enzym die IC_{50} -Werte sanken. Anschließend wurden die ermittelten IC_{50} -Werte gegen die Zeit aufgetragen und zeigten den oben dargestellten charakteristischen Verlauf. Nach einer Anfangsphase, in der die IC_{50} -Werte sanken, näherte sich die Kurve asymptotisch einer horizontalen Gerade (grau gestrichelte Linie rechts). Aus dieser Auftragung werden nach KRIPPENDORFF *et al.* die Parameter K_i und k_{inact} determiniert.^[161]

3.2.2. Pyrimidin-abgeleitete EGFR-Inhibitoren

Ausgehend von der vielversprechenden Wirksamkeit der Verbindung RL40 gegenüber NSCLC-Zelllinien, die innerhalb eines phänotypischen Screens festgestellt wurde, erfolgten Kristallisationsstudien in der Modellkinase cSrc, die einen atypischen Bindemodus für den 4-Aminochinazolin basierten Inhibitor ergaben (siehe Abbildung 3-20).^{**[154, 165-167]} Die Komplexstruktur zeigte, dass die Verbindung RL40 über Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen dem Aminopyrazol-Rest und dem Peptidrückgrat der Aminosäuren Glu339 und Met341 und nicht wie üblich über das Chinazolin Grundgerüst an die Scharnierregion der Kinase koordinierte. Die resultierende Orientierung des Liganden verhinderte folglich eine kovalente Bindungsbildung zum Cys341 in cSrc, die potentiell mit einer gesteigerten inhibitorischen Aktivität assoziiert wird.

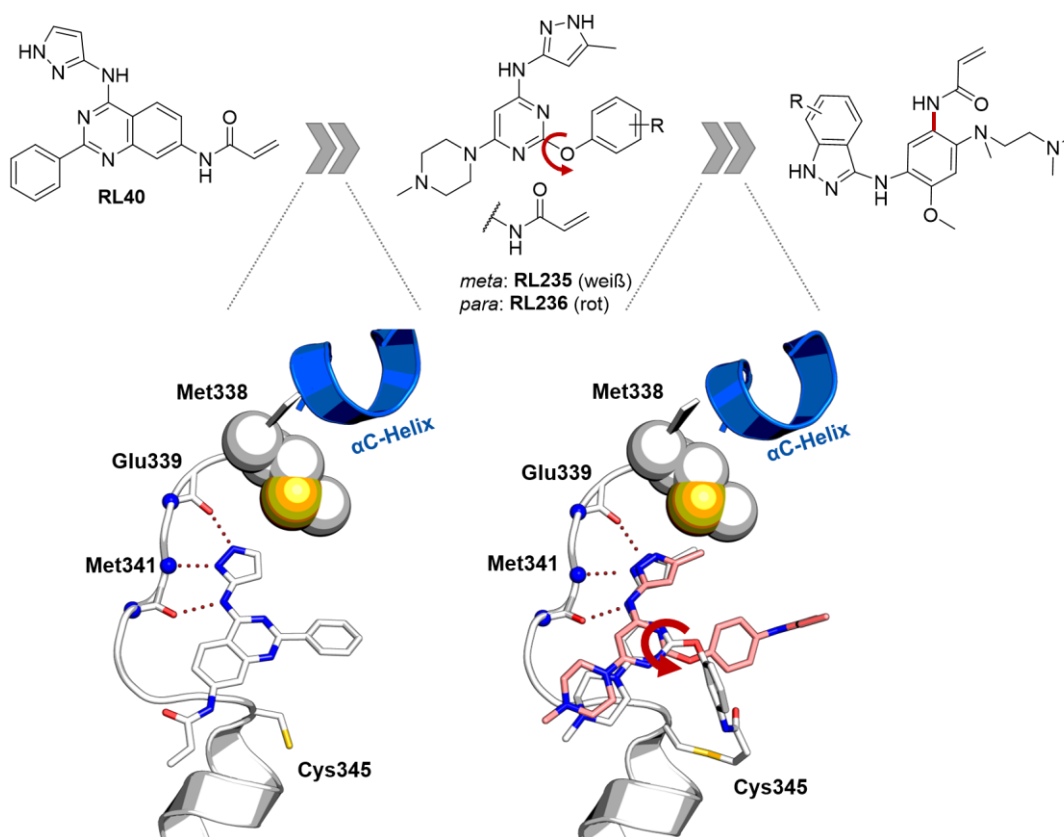


Abbildung 3-20: Schematische Darstellung der Optimierungszyklen ausgehend von der 4-Aminochinazolin-basierten Trefferstruktur RL40, die innerhalb eines phänotypischen Screens identifiziert wurde und wie unten links gezeigt einen atypischen Bindemodus für Aminochinazoline aufwies (PDB: 5D12). Daraufhin wurden unter anderem die Verbindungen RL235 sowie RL236 entworfen, die in strukturellen Untersuchungen eine Flexibilität des Phenylethers demonstrierten (unten rechts; PDB: 5D10 und 5D12). Diese sollte in einem weiteren Optimierungszyklus durch die unmittelbare Verknüpfung des Michael-Akzeptors an das Grundgerüst eingeschränkt werden (oben rechts).

** Der phänotypische Screen und strukturelle Untersuchungen an der Kinasedomäne von cSrc erfolgten durch Dr. M. Getlik innerhalb seiner Dissertation (AG Rau, TU Dortmund).

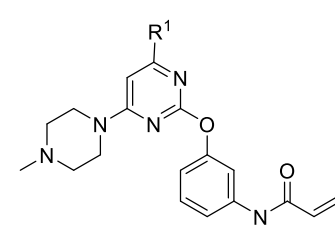
Aufbauend auf dieser Komplexstruktur wurden von ENGEL *et al.* EGFR-Inhibitoren entworfen, die zielgerichtet die EGFR-L858R/T790M Variante inhibieren sollten, wobei ein besonderes Augenmerk auf der Optimierung der Ausrichtung des Michael-Akzeptors lag (siehe Abbildung 3-20).^[165] Darüber hinaus wurde der Einfluss diverser lipophiler Substituenten in 4-Position des Pyrimidin Grundgerüsts auf die Affinität zur EGFR-Türstehermutante eruiert, ohne eine Veränderung der Interaktionen zwischen dem Inhibitor und der Scharnierregion zu verursachen.^{††} Durch strukturbiochemische Untersuchungen und kinetische Bindungsstudien konnte schließlich der kovalente Bindungsmodus einiger Verbindungen bestätigt werden. Insbesondere die Verknüpfung eines *meta*-ständigen Michael-Akzeptors über einen Phenylether in 2-Position erwies sich als vorteilhaft. Daraus konnten die Verbindungen RL235 und RL1131 entwickelt werden, die sich lediglich in der Substitution eines lipophilen Motivs in 4-Position unterschieden und eine gute biochemische Aktivität gegenüber den mutierten EGFR-Varianten zeigten.^{‡‡} Weiterführende detaillierte Bindungsstudien offenbarten eine affine Bindung der beiden Verbindungen an die EGFR-L858R/T790M Doppelmutante, wobei K_i -Werte von einem 1 nM erreicht werden konnten (siehe Tabelle 3-2). Erwähnenswert an dieser Stelle ist die Erhöhung der Affinität, die mit der Einführung der Türstehermutation beobachtet wurde und auf vorteilhafte Interaktionen zwischen dem Met790 und den lipophilen Resten der Liganden in 4-Position hindeutet.^[168] Jedoch ergibt der Vergleich der k_{inact} -Werte der untersuchten Verbindungen mit denen des Referenzinhibitors Osimertinib eine langsame Rate der Bindungsbildung und impliziert eine tendenziell unvorteilhafte Ausrichtung der reaktiven Gruppe zum Cys797. Gestützt wird diese Hypothese durch strukturbiochemische Untersuchungen der Verbindungen RL235 und RL236, die sich lediglich durch die *meta*- bzw. *para*-Substitution des Acrylamids am Phenylether-Rest unterscheiden, in dem Modellsystem cSrc (siehe Abbildung 3-20). Diese zeigten signifikant unterschiedliche Ausrichtungen der Michael-Akzeptoren und demonstrierten eine hohe Flexibilität der Phenylether-Gruppe und des verknüpften Michael-Akzeptors, die eine valide Erklärung für die langsame Rate der kovalenten Bindungsbildung darstellen könnten. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein weiterer Optimierungszyklus vorgenommen, in dem eine fokussierte Substanzbibliothek basierend auf dem Aminoindazol Grundgerüst des RL1131 entstand.^{§§^[169]} Die Beweglichkeit des Michael-Akzeptors sollte durch die unmittelbare Verknüpfung an das Grundgerüst eingeschränkt werden. Initiale biochemische Charakterisierungen anhand von IC_{50} -Bestimmung illustrierten eine deutliche Steigerung der inhibitorischen Aktivität mit IC_{50} -Werten im niedrigen nanomolaren bis subnanomolaren Bereich für die Verbindungen RL1962, RL1964 und RL2087.

^{††} Die Synthese der Pyrimidin-basierten Verbindungen erfolgte durch Dr. J. Engel (AG Rauh, TU Dortmund)

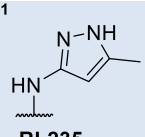
^{‡‡} Die Bestimmung der IC_{50} -Werte der Verbindungen gegenüber verschiedenen EGFR-Varianten erfolgte durch S. Eppmann (AG Rauh, TU Dortmund).

^{§§} Die Synthese der Aminoindazol-basierten Verbindungen wurde von Dr. S. Tomassi durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

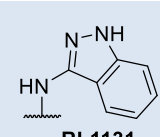
Tabelle 3-2: Übersicht über die Parameter IC_{50} , K_i , k_{inact} und k_{inact}/K_i , die für Pyrimidin-abgeleitete und Aminoindazol-basierte Inhibitoren gegenüber verschiedenen EGFR-Varianten vermessen wurden. Jeder Wert wurde in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten bestimmt, wobei der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben ist.



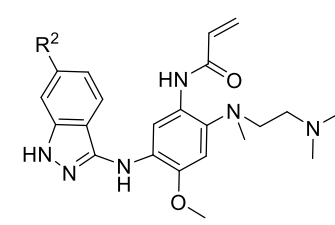
R¹



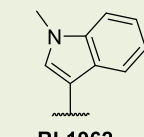
RL235



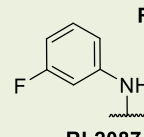
RL1131



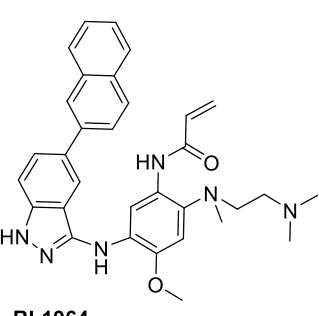
R²



RL1962



RL2087



RL1964

Verbindung	EGFR	HTRF IC_{50} [nM]	K_i [nM]	k_{inact} [min^{-1}]	k_{inact}/K_i [$\mu M^{-1} s^{-1}$]
RL235	WT	>10 000	-	-	-
	L8585R	30 ± 8	70 ± 8.2	0.02 ± 0.007	<0.01
	L858R/T790M	500 ± 300	<1	0.12 ± 0.08	2.83 ± 0.96
RL1131	WT	1700 ± 500	-	-	-
	L8585R	503 ± 206	833 ± 429	0.06 ± 0.02	<0.01
	L858R/T790M	68 ± 34	<1	0.14 ± 0.09	>1.2
RL1962	WT	9.3 ± 1.2	236 ± 89	0.28 ± 0.02	0.02 ± 0.00
	L8585R	1.5 ± 0.4	57 ± 18	0.14 ± 0.02	0.04 ± 0.02
	L858R/T790M	4.8 ± 2.0	149 ± 45	0.37 ± 0.09	0.04 ± 0.03
RL2087	WT	<1	5.1 ± 1.4	0.14 ± 0.08	0.47 ± 0.12
	L8585R	<1	3.9 ± 1.0	0.09 ± 0.05	0.40 ± 0.25
	L858R/T790M	<1	7.4 ± 3.6	0.17 ± 0.12	0.39 ± 0.16
RL1964	WT	8.1 ± 2.1	147 ± 42	0.18 ± 0.09	0.02 ± 0.00
	L8585R	2.2 ± 0.3	105 ± 29	0.14 ± 0.07	0.02 ± 0.02
	L858R/T790M	1.1 ± 0.2	28 ± 4	0.50 ± 0.03	0.30 ± 0.13
Osimer-tinib	WT	1.0 ± 0.6	14 ± 2.3	0.43 ± 0.11	0.52 ± 0.05
	L8585R	<1	1.6 ± 0.3	0.30 ± 0.01	3.24 ± 0.46
	L858R/T790M	<1	1.5 ± 0.1	0.33 ± 0.06	3.75 ± 0.39

Allerdings konnte diese Potenz nicht vollständig in zelluläre Aktivität übersetzt werden. Die vielversprechendste zelluläre Aktivität gegenüber H1975 Zellen wurde für RL2087 mit einem EC_{50} -Wert von 191 nM determiniert.^[169] Eine Erklärung der schlechten Translation der Potenz konnte aus kinetischen Bindungsstudien abgeleitet werden. Diese zeigten, dass die Rate der Bindungsbildung der Aminoindazol-Verbindungen durch die Einschränkung der Flexibilität des Michael-

Akzeptors signifikant erhöht war und k_{inact} -Werte von 0.37 und 0.50 min^{-1} für die Verbindungen RL1962 und RL1964 gegenüber der Türstehermutante erzielt werden konnten (siehe Tabelle 3-2). Andererseits wurden signifikant verminderte reversible Affinitäten der Verbindungen RL1962 und RL1964 gegenüber den EGFR-Varianten festgestellt, die auf Repulsionen zwischen den sterisch-anspruchsvollen lipophilen Resten der Liganden in 5- und 6-Position zurückgehen könnten. Lediglich die Verbindung RL2087, die mit einem Amin-verbrückten Fluorophenyl-Rest in 6-Position ausgestattet ist, wies eine reversible Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich (K_i 5.1±1.4 nM (WT), 3.9±1.0 nM (L858R), 7.4±3.6 nM (L858R/T790M) auf, die mit den Affinitäten der initialen Verbindungen RL235 und RL1131 vergleichbar ist. Aus diesen Studien geht hervor, dass die Inhibition der Aminoindazol-Verbindungen vermehrt auf einen kovalenten Charakter zurückzuführen ist und die reversible Affinität mutmaßlich durch die Einführung der lipophilen Substituenten eingeschränkt wird, sodass bei IC_{50} -Bestimmungen der ausgeprägte kovalente Anteil des Bindemechanismus für eine schnelle Inaktivierung und niedrige IC_{50} -Werte sorgt. In zellulären Systemen hingegen konkurriert der Inhibitor im initialen Schritt des Bindemechanismus mit ATP und die verminderte reversible Affinität ist verantwortlich für eine unzureichende Bildung des Protein-Inhibitor Komplexes, die für eine Ausbildung der kovalenten Bindung essentiell ist.

3.2.3. Pyrazolopyrimidin-basierte EGFR-Inhibitoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls kinetische Bindungsstudien an kovalent-irreversiblen (zuvor allgemein als kovalente Inhibitoren bezeichnet) und kovalent-reversiblen Inhibitoren mit einem Aminopyrazolopyrimidin-Grundgerüst gegenüber verschiedenen EGFR-Varianten durchgeführt. Innerhalb dieses Projekts sollten mutantenselektive Inhibitoren der EGFR-L858R/T790M Doppelmutante entstehen, die basierend auf dem Wissen aus vorangegangenen Studien eine optimale Geometrie des Michael-Akzeptor Systems aufweisen und durch die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen zur Türsteheramino­säure Met790 eine Selektivität gegenüber dem EGFR-WT demonstrieren.^[165] Diese Charakteristika sollten anhand von kinetischen Experimenten eruiert werden und Anstöße für die Optimierung der Strukturen geben. Den Ausgangspunkt für die Arbeiten von ENGEL und SMITH *et al.* bildete seinerzeit der BTK-Inhibitor Ibrutinib, der eine moderate inhibitorische Aktivität gegenüber EGFR zeigte und dessen Grundgerüst eine effiziente Derivatisierung an mehreren Positionen zuließ.^{***†††‡‡‡[148, 170-171]} Wie eingangs beschrieben, wurden innerhalb dieses Projekts zusätzlich zu den kovalenten

*** Die Synthese der kovalent-irreversiblen Inhibitoren wurde von Dr. J. Engel durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

††† Die Synthese der kovalent-reversiblen Inhibitoren wurde von Dr. S. Smith durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

‡‡‡ Die Bestimmung der IC_{50} -Werte der Verbindungen gegenüber verschiedenen EGFR-Varianten erfolgte durch S. Eppmann (AG Rauh, TU Dortmund).

Inhibitoren, die über ein Acrylamid die Bindung zum Protein ausbilden, auch kovalent-reversible Inhibitoren (CRIs) entworfen. Entwickelt wurden kovalent-reversible Inhibitoren vor dem Hintergrund, dass körperfremde kovalente Addukte potentiell eine Immunantwort auslösen können und so einen limitierenden Faktor in der Behandlung mit kovalenten Inhibitoren darstellen könnten.^[171-173] Durch die Verwendung von Michael-Akzeptoren, die mit elektronenziehenden Resten versehen werden, ist der zweite Schritt des postulierten Bindemodus - die dauerhafte Inaktivierung des Enzyms durch einen kovalent-irreversiblen Inhibitor - nicht mehr irreversible und die kovalente Bindung löst sich unter proteolytischen Bedingungen (vgl. Abbildung 3-18).^[173] Ein weiterer Vorteil dieses Prinzips ist, dass der CRI danach erneut in der Lage ist, an ein anderes Protein zu binden und sich durch eine erhöhte Effizienz im Vergleich zu kovalent-reversiblen Inhibitoren auszeichnet.

Die kinetische Charakterisierung der kovalent-irreversiblen Inhibitoren RL1102, RL1103 und RL1105 zeigte eindeutig einen kovalenten Bindungsmodus, wobei der potenteste Ligand RL1102 eine hohe reversible Affinität zu den EGFR-Formen aufwies, die sich in einem K_i -Wert im niedrigen nanomolaren Bereich widerspiegelte (siehe Tabelle 3-3). Darüber hinaus konnte auch eine gute Selektivität der Verbindungen RL1102 und RL1105 anhand der K_i -Wert gegenüber dem EGFR-WT abgeleitet werden, die mit dem Selektivitätsprofil des Drittgenerationsinhibitors Osimertinib vergleichbar ist. Lediglich die Verbindung RL1103 scheint ein schlechteres Selektivitätsprofil aufzuweisen, das vermutlich auf den lipophilen Substituenten zurückzuführen ist.

Die anschließende zeitabhängige Bestimmung der IC_{50} -Werte im Kontext von kovalent-reversiblen Verbindungen stellte sich anfangs problematisch dar, da nach einer kurzen Zeit der Assoziation eine Dissoziation der Verbindungen von dem Protein beobachtet wurde und somit negative k_{inact} -Werte ermittelt wurden. Exemplarisch sind in Abbildung 3-21 die Verläufe der zeitabhängigen IC_{50} -Bestimmungen der kovalent-irreversiblen Verbindung RL1103 und der kovalent-reversiblen Verbindung RL1758 gegenüber der EGFR-L858R/T790M Mutante dargestellt. Erwartungsgemäß wurde für RL1103 zu anfangs eine fallende Kurve beobachtet, die sich asymptotisch einer horizontal verlaufenden Gerade annähert. Hingegen konnte für kovalent-reversible Inhibitoren nach einer Assoziationsphase eine Erhöhung der IC_{50} -Werte festgestellt werden. Wird ausschließlich die erste Phase der Bindung betrachtet, so ist es möglich, einen typischen kovalenten Bindemechanismus zu erkennen, der die Bestimmung der Parameter K_i und k_{inact} zulässt.

Tabelle 3-3: Übersicht über die Parameter IC_{50} , K_i , k_{inact} und k_{inact}/K_i , die für Ibrutinib-abgeleitete kovalent-irreversible und kovalent-reversible Inhibitoren gegenüber verschiedenen EGFR-Varianten ermittelt wurden.

Verbindung	EGFR	HTRF IC_{50} [nM]	K_i [nM]	k_{inact} [min^{-1}]	k_{inact}/K_i [$\mu M^{-1} s^{-1}$]
RL1102	WT	16 ± 6	15 ± 3.2	0.19 ± 0.12	0.21 ± 0.05
	L858R	1.1 ± 0.6	1.6 ± 0.4	0.14 ± 0.01	1.60 ± 0.53
	L858R/T790M	0.6 ± 0.4	1.5 ± 0.8	0.17 ± 0.02	3.42 ± 1.44
RL1105	WT	35 ± 14	25 ± 7.2	0.11 ± 0.03	0.08 ± 0.02
	L858R	3.8 ± 2.8	19 ± 3.1	0.17 ± 0.08	0.14 ± 0.07
	L858R/T790M	2.5 ± 1.4	16 ± 5.2	0.29 ± 0.02	0.36 ± 0.09
RL1103	WT	58 ± 13	47 ± 5.8	0.13 ± 0.05	0.05 ± 0.04
	L858R	1.0 ± 0.3	44 ± 6.5	0.25 ± 0.06	0.10 ± 0.06
	L858R/T790M	1.9 ± 0.8	58 ± 3.3	0.31 ± 0.04	0.09 ± 0.02
RL1122	WT	96 ± 26	265 ± 1.4	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.01
	L858R	10 ± 8	37.5 ± 6.3	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.01
	L858R/T790M	20 ± 13	50.8 ± 2.4	0.17 ± 0.08	0.05 ± 0.02
RL1756	WT	338 ± 69	1674 ± 450	0.17 ± 0.06	0.01 ± 0.01
	L858R	85 ± 34	79.2 ± 9.3	0.12 ± 0.01	0.26 ± 0.07
	L858R/T790M	213 ± 49	83.2 ± 9.8	0.13 ± 0.04	0.36 ± 0.02
RL1758	WT	102 ± 75	64.4 ± 1.9	0.03 ± 0.05	0.01 ± 0.01
	L858R	21 ± 2	14.6 ± 2.5	0.04 ± 0.03	0.68 ± 0.25
	L858R/T790M	80 ± 51	15.4 ± 3.3	0.11 ± 0.01	0.73 ± 0.16
Osimertinib	WT	1.0 ± 0.6	14 ± 2.3	0.43 ± 0.11	0.52 ± 0.05
	L8585R	<1	1.6 ± 0.3	0.30 ± 0.01	>1.2*
	L858R/T790M	<1	1.5 ± 0.1	0.33 ± 0.06	>1.2*
Rociletinib	WT	10 ± 1.2	74 ± 7.1	0.18 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	L8585R	2.0 ± 0.1	1.8 ± 0.2	0.18 ± 0.05	1.67 ± 0.32
	L858R/T790M	<1	1.7 ± 0.1	0.29 ± 0.05	2.95 ± 0.66
EGF-816	WT	1.7 ± 0.8	25 ± 7.8	0.31 ± 0.06	0.23 ± 0.13
	L8585R	<1	10 ± 2.7	0.22 ± 0.02	0.38 ± 0.08
	L858R/T790M	<1	7.7 ± 2.3	0.15 ± 0.04	0.38 ± 0.10

*bestimmt mit $K_i=1$ nM

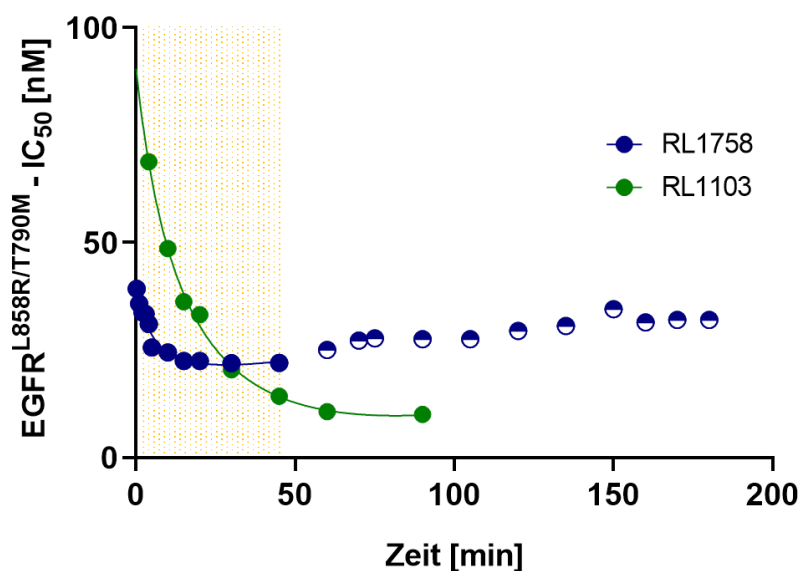


Abbildung 3-21: Zeitabhängige IC₅₀-Werte der kinetischen Charakterisierung des kovalent-irreversiblen Inhibitors RL1103 und des kovalent-reversiblen Inhibitors RL1758 gegenüber der EGFR-L858R/T790M Mutante.

Schlussendlich ergab die kinetische Evaluation der kovalent-reversiblen Inhibitoren eine deutlich verringerte reversible Affinität der Liganden gegenüber den EGFR-Varianten und die kovalente Bindung schien sich im Vergleich zu den kovalent-irreversiblen Inhibitoren deutlich langsamer zu bilden. Der vielversprechendste Inhibitor RL1758 weist K_i -Werte von 64 nM (WT), 15 nM (L858R) und 15 nM (L858R/T790M) auf, die im Vergleich zu dem potentesten kovalent-irreversiblen Liganden RL1102 um den Faktor 10 erhöht sind. Bemerkenswert ist jedoch, dass dennoch eine gute Selektivität der CRIs gegenüber dem EGFR-WT festgestellt werden konnte. Anhand von Kristallstrukturen der Verbindungen RL1103 und 1105 im Komplex mit der EGFR-T790M Mutante, kann auf eine sterische Repulsion zwischen dem Cyclopropyl-Rest und Arg841 geschlossen werden, die möglicherweise generell die Bindung von Liganden mit einem etwaigen Michael-Akzeptor verhindert.

3.2.4. Pyrrolopyrimidin-basierte EGFR-Inhibitoren

Ein weiterer strukturbasierter Ansatz zur Entwicklung von neuartigen mutantenselektiven Inhibitoren der EGFR-L858R/T790M Doppelmutante wurde in Arbeiten von LATEGAHN *et al.*^{§§§} verfolgt, in denen ausgehend von der Gerüstklasse der Pyrrolopyrimidine eine fokussierte Substanzbibliothek entworfen wurde.^{****} Grundsätzlich wurde bereits für Pyrrolopyrimidin-basierte Inhibitoren, wie den EGFR/VEGFR-Dualinhibitor AEE-788, eine inhibitorische Aktivität gegenüber EGFR nachgewiesen, die durch das Auftreten der T790M-Mutation jedoch deutlich eingeschränkt wurde.^[174-176] Aufgrund dessen, wurden im Rahmen dieses Projekts verschiedene Substitutionsmuster des Grundgerüsts, unter dem Gesichtspunkt der Aktivität gegenüber der T790M-Mutante, biochemisch und zellulär eruiert.^{††††^[177]} Weiterhin wurde ein Michael-Akzeptor-System zur kovalenten Adressierung des Cys797 eingefügt, um eine erhöhte Verweildauer des Inhibitors am Enzym zu erreichen, die oftmals mit einer gesteigerten inhibitorischen Wirksamkeit assoziiert wird. Daher galt ein besonderes Interesse der strukturbiochemischen und kinetischen Charakterisierung diverser Verbindungen, um Aktivitäts-relevante Strukturmerkmale herauszuarbeiten und deren Bindemechanismus detailliert zu charakterisieren. Insgesamt wurden aus wiederholten Optimierungszyklen zwei Serien erhalten (*N*-substituierte Pyrrolopyrimidin-4-one und *O*-substituierte Pyrrolopyrimidine), die im biochemischen Kontext äquivalent hohe Aktivitäten zeigten und sich durch unterschiedliche Substitutionen in Richtung der Türsteheraminosäure auszeichneten (siehe Tabelle 3-4).^[177] In beiden Fällen ergab die Einführung einer Löslichkeits-vermittelnden Gruppe in 6-Position und eines Phenyl-verknüpften Acrylamids in 5-Position eine deutliche Steigerung der inhibitorischen Aktivität gegenüber der EGFR-T790M Variante. Aufgrund der Tatsache, dass in initialen Kristallisationsstudien mit Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren und EGFR kein Kristallwachstum beobachtet werden konnte, wurde das bereits validierte Modellsystem cSrc-T338/S345C für strukturbiochemische Untersuchungen herangezogen.^[154, 166] Hierzu wurden bereits publizierte Kristallisationsbedingungen gewählt, die ein reproduzierbares Kristallwachstum in Gegenwart der Verbindungen RL2329 und RL2020 ergaben (siehe Abschnitt 4.5.2.).^[178-179]

§§§ Das Manuskript wurde eingereicht.

**** Die Synthese der Verbindungen RL2022 und RL2029 wurde von Dr. J. Lategahn durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

†††† Die Bestimmung der IC₅₀-Werte der Verbindungen gegenüber verschiedenen EGFR-Varianten erfolgte durch S. Eppmann und A. Arndt (AG Rauh, TU Dortmund).

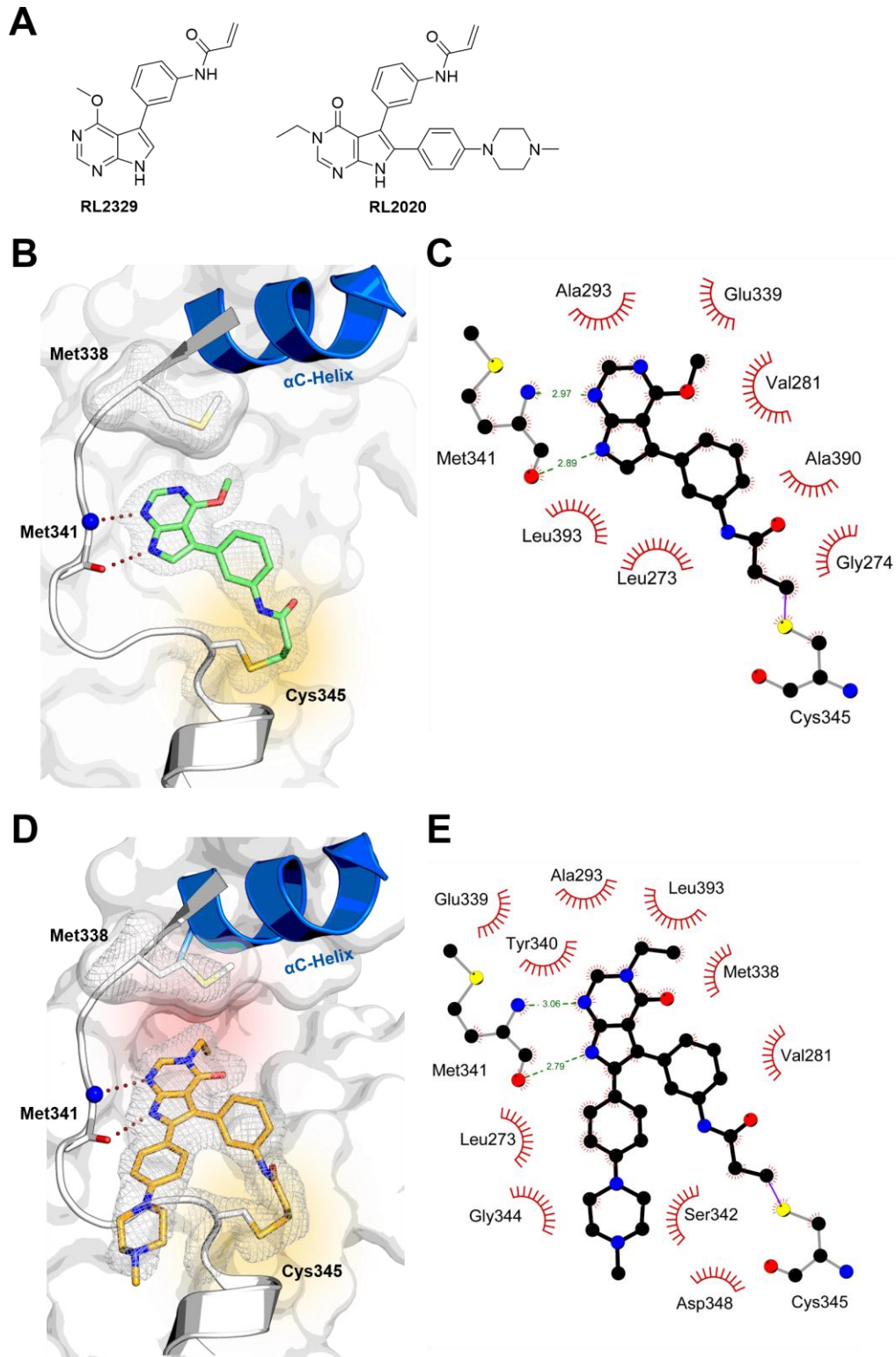


Abbildung 3-22: Strukturbiochemische Untersuchungen der AEE-788-abgeleiteten Inhibitoren in dem bereits validierten Modellsystem cSrc-T338M/S345C. **A:** Molekülstruktur der untersuchten Inhibitoren. **B/D:** Dargestellt ist die Scharnierregion (weiß), die regulatorische α C-Helix (blau) und die Inhibitoren (RL2329: grün und RL2020: orange). Die experimentell ermittelten Elektronendichtekarten sind in grau abgebildet ($2Fo - Fc$ Karte konturiert bei 1σ). Weiterhin werden Wasserstoff-Brückenbindungen durch rote Punkte angedeutet. **C/E:** Darstellung der Wechselwirkungen zwischen den jeweiligen Inhibitoren und der Kinasedomäne von cSrc mit Hilfe des Programms LigPlot.^[180] Die kovalente Bindung ist jeweils lila eingefärbt. Alle Aminosäuren, die hydrophobe Wechselwirkungen zum Inhibitor ausbilden, sind rot dargestellt.

Analog zu den im Vorfeld vorgeschlagenen Bindungsmodi der Pyrrolopyrimidin- und Pyrrolopyrimidin-4-one- Grundgerüste konnten die charakteristischen Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen *N1* und Pyrrol-NH zum Peptidrückgrat des Met341 beobachtet werden (siehe Abbildung 3-22). Weiterhin konnte anhand der gut definierten Elektronendichte im Bereich des Michael-Akzeptorsystems und dem Cys345 in cSrc ein kovalenter Bindungsmodus für beide Inhibitoren verifiziert werden. Beachtlich ist, dass der Pyrrolopyrimidin-basierte Inhibitor RL2329, trotz fehlendem sterisch anspruchsvollem Rest in 6-Position, in dieser Art in die Bindetasche der Kinase koordiniert und nicht wie im Vorfeld vermutet, das Auftreten eines gedrehten Bindemodus vorgefunden wurde. Zusätzlich wurden beide Verbindungen durch hydrophobe Wechselwirkungen zu den in β 1-, β 2- und β 3-Faltblättern befindlichen Aminosäuren Leu273, Ala293 und Leu393 stabilisiert. Außerdem konnten merkliche Unterschiede in der Ausrichtung der Türsteheraminosäure Met341 erkannt werden. Durch den Ethyl-Substituenten in 3-Position des Pyrrolopyrimidin-4-one-Grundgerüsts konnte eine Verdrängung der Seitenkette beobachtet werden, die eine Erklärung für einen starken Aktivitätsverlust der Inhibitoren mit raumgreifendem Substituenten an der Position aufzeigt (vergleiche Abbildung 3-22 B und D).

Neben den strukturbioologischen Untersuchungen wurden ebenfalls kinetische Bindungsstudien mit jeweils einem repräsentativen Inhibitor einer Serie vorgenommen, um den kovalenten Bindemechanismus detailliert beschreiben zu können. Hierzu wurden die Verbindungen RL2022 und RL2029 ausgewählt, für die in biochemischen aktivitätsbasierten Systemen gegenüber allen untersuchten EGFR-Formen IC_{50} -Werte im subnanomolaren Bereich festgestellt wurden (siehe Tabelle 3-4).^{###} Für beide Inhibitoren konnte in zeitabhängigen IC_{50} -Bestimmungen der für kovalente Inhibitoren charakteristische Kurvenverlauf festgestellt werden (siehe beispielhaft Abbildung 3-23). Hierbei konnte eine ausgesprochen hohe reversible Affinität des mit einer *iso*-Butoxy-Gruppe in 4-Position versehenem Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitors RL2029 zu den EGFR-Varianten (WT, L858R, L858R/T790M) nachgewiesen werden, wohingegen der Pyrrolopyrimidin-4-one-basierte Inhibitor RL2022, der in 3-Position mit einer *iso*-Propyl-Gruppe ausgestattet ist, eine 10-fach schwächere reversible Affinität zeigte (siehe Tabelle 3-4). Insoweit konnte die Hypothese, dass sterisch anspruchsvolle Substituenten in 3-Position den inhibitorischen Effekt negativ beeinflussen, aus kinetischen Bindungsstudien abgeleitet werden, aus einzelnen IC_{50} -Messungen jedoch nicht. Weiterhin kann aus den Resultaten geschlussfolgert werden, dass die Inhibition des RL2022 deutlich stärker von der kovalenten Bindungsbildung abhängig ist, was sich in hohen k_{inact} -Werten manifestiert (siehe Tabelle 3-4).

^{###} Die Bestimmung der IC_{50} -Werte der Verbindungen RL2022 und RL2029 gegenüber verschiedenen EGFR-Varianten erfolgte durch S. Eppmann und A. Arndt (AG Rauh, TU Dortmund).

Tabelle 3-4: Übersicht über die Parameter IC_{50} , K_i , k_{inact} und k_{inact}/K_i , die für AEE-788 abgeleitete Inhibitoren gegenüber verschiedenen EGFR-Varianten ermittelt wurden. Jeder Wert wurde in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten bestimmt, wobei der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben ist.

Verbindung	EGFR	HTRF IC_{50} [nM]	K_i [nM]	k_{inact} [min^{-1}]	k_{inact}/K_i [$\mu M^{-1} s^{-1}$]
RL2022	WT	<1	10 ± 1	0.10 ± 0.03	0.16 ± 0.06
	L8585R	<1	10 ± 1	0.19 ± 0.08	0.31 ± 0.11
	L858R/T790M	<1	15 ± 3	0.26 ± 0.09	0.30 ± 0.09
RL2029	WT	<1	<1	0.05 ± 0.01	>1.2*
	L8585R	<1	<1	0.28 ± 0.08	>1.2*
	L858R/T790M	<1	<1	0.17 ± 0.09	>1.2*
Osimertinib	WT	1.0 ± 0.6	14 ± 2.3	0.43 ± 0.11	0.52 ± 0.05
	L8585R	<1	1.6 ± 0.3	0.30 ± 0.01	>1.2*
	L858R/T790M	<1	1.5 ± 0.1	0.33 ± 0.06	>1.2*

*bestimmt mit $K_i=1$ nM

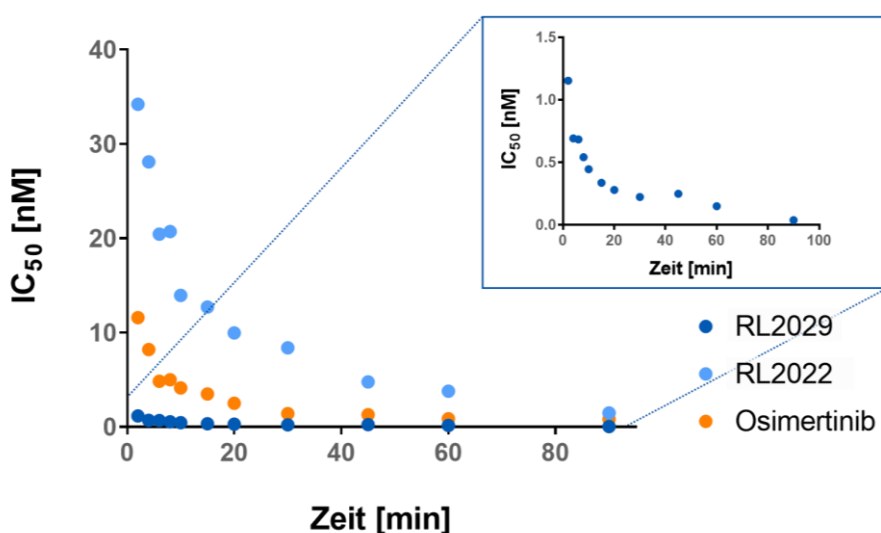


Abbildung 3-23: Ergebnisse der zeitabhängigen IC_{50} -Bestimmungen der Verbindungen RL2022, RL2029 und Osimertinib gegenüber der EGFR-L858R/T790M Mutante.

Bemerkenswert ist, dass bereits anhand der Kurvenverläufe der zeitabhängigen IC_{50} -Messungen der Verbindung Unterschiede erkennbar sind, die insbesondere gegenüber der EGFR-L858R/T790M Mutante signifikant sind (siehe Abbildung 3-23). Des Weiteren scheint RL2029 die Doppelmutante effektiver zu inhibieren als der klinisch-zugelassene Drittgenerationsinhibitor Osimertinib. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass innerhalb des strukturbasierten Ansatzes ausgehend von einem Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst ausgesprochen aktive Verbindungen entwickelt worden sind. Aufgrund des kovalenten Bindungsmodus und der beachtlichen inhibitorischen Wirksamkeit dieser Verbindungen, sind detaillierte kinetische und strukturbiochemische Studien zur Aufklärung der Bindungscharakteristika unerlässlich.

Innerhalb eines Folgeprojektes wurden sterisch anspruchsvolle Motive, die in einem biochemischen Screen gegenüber der HER-insYVMA Mutante als vielversprechende Elemente identifiziert wurden, in 4-Position des Pyrrolopyrimidin-Grundgerüsts eingebracht, mit dem Ziel potente Inhibitoren der HER-insYVMA Mutante zu entwickeln. Hieraus entstand unter anderem die Verbindung RL2741, die über einen 1-Benzyl-1*H*-indazol-5-amino Substituenten in 4-Position und über eine Hydroxy-ethoxy Löslichkeits-vermittelnde Gruppe verfügt (siehe Abbildung 3-25 B). In biochemischen aktivitätsbasierten Untersuchungen konnte eine hohe inhibitorische Aktivität gegenüber den EGFR-Varianten WT und L858R determiniert werden, wohingegen die Aktivität gegenüber der Türstehermutante um den Faktor sechs niedriger war. Erstaunlicherweise wurde jedoch in Ko-Kristallisationsansätzen der Verbindung RL2741 mit der Doppelmutante des EGF-Rezeptors ein Kristallwachstum beobachtet (siehe Abbildung 3-24 B). Auch in massenspektrometrischen Untersuchungen der Kinasedomäne mit RL2741 konnte eine Modifikation des Enzyms festgestellt werden, die in einer Zunahme des Molekulargewichts um 545 Da resultierte (siehe Abbildung 3-24 A). Die erhaltenen Kristalle wurden gefischt und am Synchrotron (SLS, Villingen) vermessen, sodass ein Datensatz mit einer Auflösung von 1.8 Å erzielt werden konnte.^{§§§§}

^{§§§§} Die Durchführung der Proteinkristallisation geschah in Kooperation mit J. Niggenaber (AG Rauh, TU Dortmund).

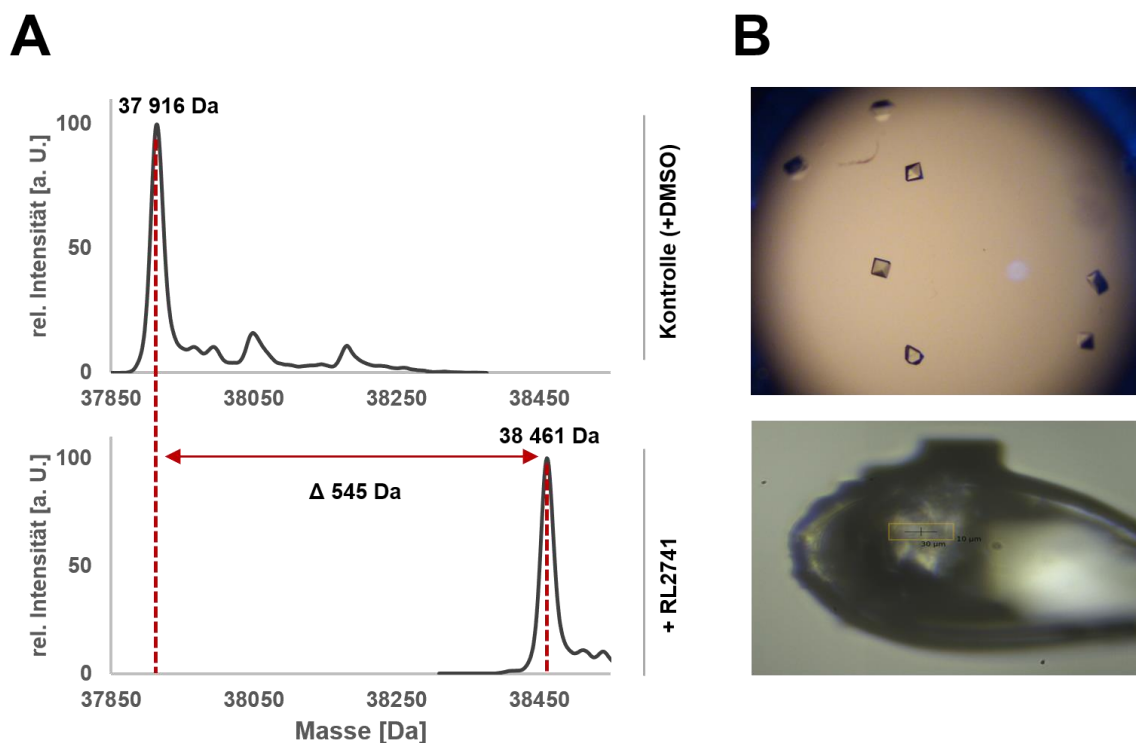


Abbildung 3-24: Massenspektrometrische und strukturbioologische Untersuchungen der Verbindung RL2741 in EGFR. **A:** Dekonvolvierte Massenspektren zur Analyse der kovalenten Modifikation von EGFR durch RL2741. Für die mit DMSO-behandelte Kontrollprobe der EGFR-T790M/V948R Mutante wurde ein Molekulargewicht von 37 916 Da gemessen, das gut mit dem berechneten Molekulargewicht von 37 914 Da übereinstimmt. Die mit RL2741 inkubierte Probe zeigt eine Erhöhung des Molekulargewichts um 545 Da, sodass eine kovalente Modifikation des Proteins durch den Inhibitor nachgewiesen werden konnte. **B:** Mikroskopie-Aufnahmen der erhaltenen Kristalle von EGFR T790M/V948R in Kokristallisationsansätzen mit RL2741 unter der Verwendung folgender Bedingung: 17.5-27.5% PEG3350; 50-200 mM MgSO₄; 2-4% Ethylenglykol (oben). Außerdem ist der vermessene Kristall im Nylonloop dargestellt (unten).

Im Allgemeinen konnte die Erhaltung der charakteristischen Interaktionen der Pyrrolopyrimidin-abgeleiteten Inhibitoren in der Bindetasche des EGF-Rezeptors beobachtet werden, wobei das Grundgerüst über zwei Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen dem N1 und dem Pyrrol-NH zum Peptidrückgrat des Met341 an die Scharnierregion der Kinase koordinierte (siehe Abbildung 3-25 A). Übereinstimmend mit dem rationalen Strukturdesign der Verbindung wurde durch den hydrophoben Substituenten in 4-Position die allosterische Tasche nahe der α C-Helix besetzt, sodass die Kinase in einer inaktiven Konformation stabilisiert wurde und die charakteristische Salzbrücke zwischen dem katalytischen Lys745 und dem Asp855 festgestellt werden konnte. Im Vergleich zu den oben beschriebenen Strukturen, wurden in dieser Komplexstruktur viele zusätzliche hydrophobe Interaktionen ausgebildet (siehe Abbildung 3-25 C). Insbesondere die *edge-to-face* π - π -Stapelwechselwirkung zwischen dem terminalen Benzyl-Substituenten und Phe856, sowie hydrophobe Interaktionen zu dem in der α C-Helix befindlichen Met766 sind bedeutende strukturelle Eigenschaften, die diese Substanzklasse von den ursprünglich beschriebenen Pyrrolopyrimidin-abgeleiteten Inhibitoren differenziert.

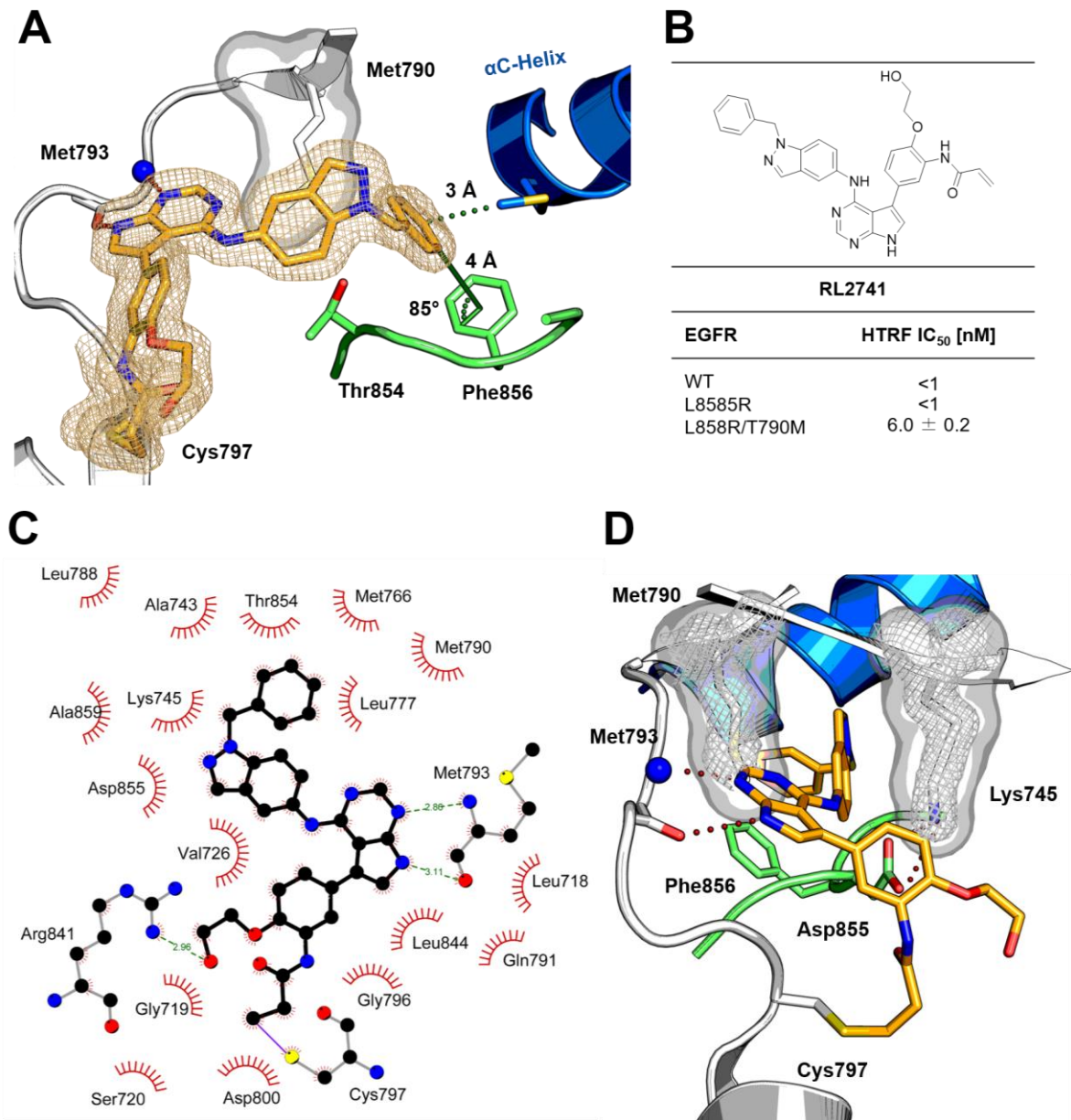


Abbildung 3-25: A/D: Detaillierte strukturelle Analyse des Bindemodus von RL2741 (gelb) innerhalb der Kinasedomäne von EGFR. Dargestellt ist die Scharnierregion (weiß), das β 3-Faltblatt (weiß) und die regulatorische α C-Helix (blau). Die experimentell ermittelten Elektronendichtekarten von RL2741, dem Cys797, dem Met790 und dem Lys745 sind in grau abgebildet ($2Fo-Fc$ Karte konturiert bei 1σ). Die Wasserstoff-Brückenbindung wurden durch rote Punkte angedeutet. Weiterhin wurden hydrophobe Wechselwirkungen durch grüne Punkte illustriert und die *edge-to-face* Wechselwirkung zwischen dem Inhibitor und Phe856 grün eingefärbt. **B:** Gezeigt wird die Molekülstruktur der untersuchten Verbindung mit den entsprechenden biochemischen Daten. **C:** Darstellung der Wechselwirkungen zwischen RL2741 und EGFR mit Hilfe des Programms LigPlot.^[180] Die kovalente Bindung des Inhibitors zu Cys797 ist lila eingefärbt. Alle Aminosäuren, die hydrophobe Wechselwirkungen zum Inhibitor ausbilden sind rot dargestellt.

Ferner wurde deutlich, dass der Indazol-Ring des Liganden von den Aminosäuren Met790 und Lys745 eingerahmt wurde, wodurch zum einen hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet werden, es aber auch zur Einschränkung der konformationellen Freiheit der Seitenkette des Met790 kommt (siehe Abbildung 3-25 D). Diese Beobachtung korreliert mit den biochemischen Daten, die einen leichten Aktivitätsverlust durch die Einföhrung der Türstehermutation zeigten.

Auffällig ist, dass innerhalb des zweiten in der asymmetrischen Einheit befindlichen Monomers zwei Bindungsposen des Liganden erkannt wurden (siehe Abbildung 3-26 A). Dabei konnte die zweite Konformation des Liganden durch die Drehung des Indazol-Rings um 180° erhalten werden und illustriert die Dynamik der Bindung eines Liganden in eine Bindetasche, die niemals so starr ist, wie sie in Kristallstrukturen erscheint. Außerdem wurde innerhalb dieser Bindetasche noch eine zusätzliche Wasserstoff-Brückenbindung zwischen der Alkohol-Funktion der Löslichkeits-vermittelnden Gruppe und dem Arg841 beobachtet. Die resultierende Stabilisation des terminalen Motivs ist vermutlich verantwortlich für die gute Auflösung der Struktur in diesem Bereich.

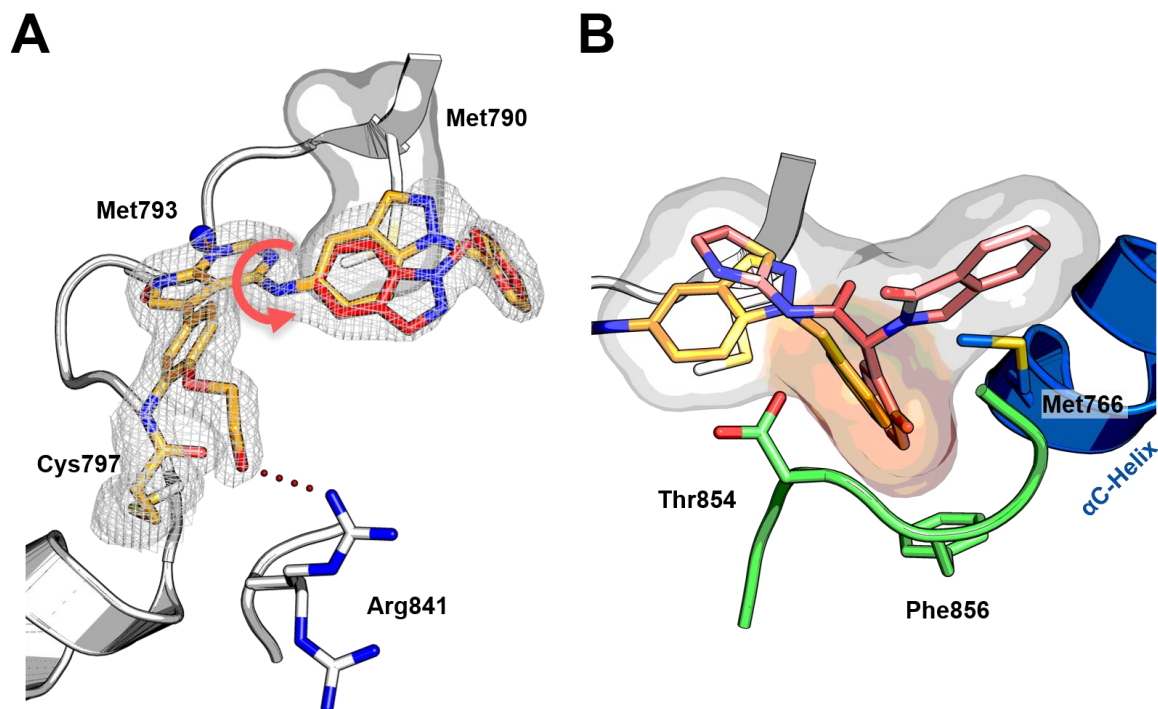


Abbildung 3-26: Darstellung einzelner struktureller Besonderheiten der Kristallstruktur von EGFR-T790M/V948R im Komplex mit RL2741. Dargestellt ist die Scharnierregion (weiß), das β -Faltblatt (weiß) und die regulatorische α C-Helix (blau). Die experimentell ermittelte Elektronendichtekarte des Inhibitors RL2741 ist in grau abgebildet ($2Fo-Fc$ Karte konturiert bei 1σ). Die Wasserstoff-Brückenbindungen werden durch rote Punkte angedeutet. **A:** Darstellung der zwei unterschiedlichen Konformationen des Liganden, die innerhalb der Bindetasche der zweiten Kette beobachtet wurden. **B:** Alignment der Kristallstruktur von RL2741 im Komplex mit EGFR-T790M/V948R mit dem Bindemodus des allosterischen EGFR-Inhibitors EAI-045, der mit dem Fluorophenol-Substituenten in die gleiche Kavität wie der Phenyl-Rest des RL2741 bindet (PDB: 5ZWJ).^[181]

Zuletzt wurde ein Alignment der erhaltenen Struktur mit der Bindungspose des allosterischen EGFR-Inhibitors EAI-045 vorgenommen (siehe Abbildung 3-26 B, PDB: 5ZWJ). Tatsächlich konnte eine gute Überlagerung des terminalen Phenylrings mit dem Fluorophenol-Substituenten beobachtet werden.

3.2.5. Zusammenfassung

Im Rahmen der kinetischen und strukturbasierten Charakterisierung verschiedener Gerüstklassen zur Adressierung der EGFR-L858R/T790M Mutante konnten verschiedene SAR-Profile herausgearbeitet werden. Für einen globalen Vergleich der Serien wurde ein repräsentativer Inhibitor jeder Substanzklasse ausgewählt und die entsprechenden K_i - und k_{inact} -Werte gegeneinander aufgetragen (siehe Abbildung 3-27). Als Referenzinhibitoren wurden die beiden Drittgenerationsinhibitoren Rociletinib und Osimertinib und der Zweitgenerationsinhibitor Afatinib herangezogen. Aus der Auftragung geht hervor, dass die inhibitorische Wirksamkeit von Afatinib beispielsweise maßgeblich auf der reversiblen Affinität des Inhibitors zum Enzym beruht. Durch die Einführung der Türstehermutation T790M wird diese jedoch negativ beeinflusst. Im Gegensatz dazu nimmt die Affinität der beiden Drittgenerationsinhibitoren und dem Pyrazolopyrimidin-basierten Inhibitor RL1102 gegenüber mutiertem EGFR zu und die Einführung der T790M-Mutation resultiert in gesteigerten Raten der Inaktivierung.

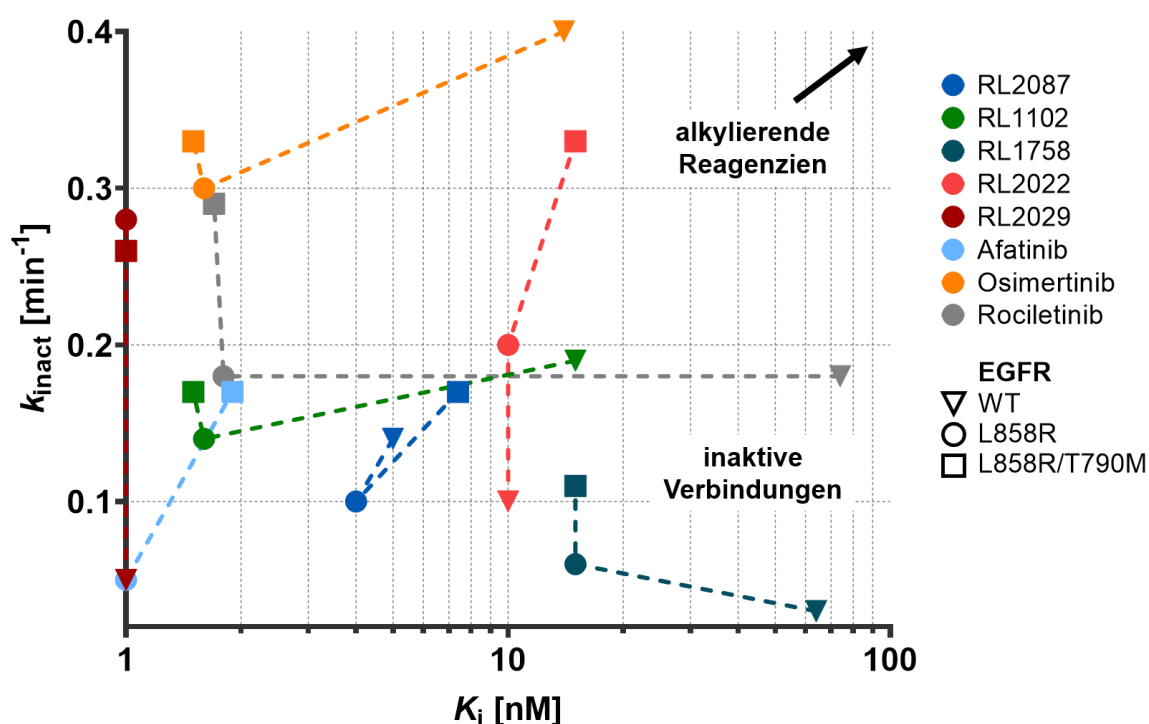


Abbildung 3-27: Auftragung von K_i/k_{inact} Kombinationen repräsentativer Verbindungen.

Ferner wird durch die Auftragung der Unterschied zwischen dem Pyrrolopyrimidin-basiertem Inhibitor RL2029 und dem Pyrrolopyrimidin-4-one-basiertem Inhibitor RL2022 illustriert, wobei die Verbindung RL2029 den potentesten Inhibitor in dem gesamten Set darstellt. In diesem Zusammenhang wurden die Inhibitoren auch gegenüber der wirkstoffresistenten EGFR-L858R/T70M/C797S Mutante getestet, die in Patienten während bzw. nach der Behandlung mit Drittgenerationsinhibitoren beobachtet wird.^[155] Abgeleitet aus den kinetischen Bindungsstudien des Osimertinibs ist dessen inhibitorischer Effekt stark von dem kovalenten Charakter der Bindung abhängig und nimmt daher drastisch mit dem Verlust des kovalenten Ankerpunktes im Protein ab. Aufgrund dessen wurde im Umkehrschluss die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivität der EGFR-T790M Inhibitoren mit einer hohen reversiblen Affinität zum EGF-Rezeptor, nicht so stark von der C797S-Mutation beeinflusst werden sollten. Um diese Annahme zu verifizieren wurden die IC_{50} -Werte der untersuchten Inhibitoren, die im Kontext der EGFR-L858R/T70M/C797S Mutante festgestellt wurden, gegen die K_i -Werte, die für die EGFR-L858R/T790M Mutante aufgenommen wurden, aufgetragen (siehe Abbildung 3-28). Im Allgemeinen konnte die Annahme bestätigt werden, dass mit einer hohen reversiblen Affinität die Aktivität der Verbindungen gegenüber der wirkstoffresistenten Mutante zunimmt, sodass für die Verbindung RL2029 ein IC_{50} -Wert von 8 nM vermessen wurde. Dennoch konnte diese Aktivität nicht in zelluläre Potenz translatiert werden, welches vermutlich auf eine schlechte Löslichkeit und Zellpermeabilität der Verbindungen zurückzuführen ist und Gegenstand von zukünftigen Studien sein könnte.

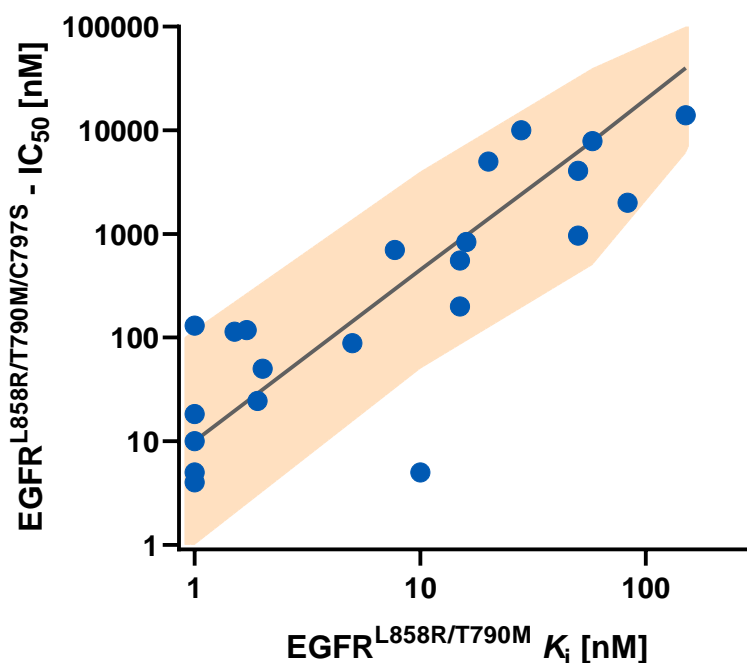


Abbildung 3-28: Auftragung der K_i -Werte, die innerhalb der EGFR-Projekte für diverse Inhibitoren die gegenüber der EGFR-L858R/T790M Doppelmutante determiniert wurden, gegen IC_{50} -Werte der entsprechenden Inhibitoren, die für die EGFR-L858R/T790M/C797 Variante ermittelt wurden.

3.3. Revival von Poziotinib in Exon20-mutiertem NSCLC

3.3.1. Hintergrund

Etwa 10-15% der NSCLC-Patienten tragen Aktivierungsmutationen in der Kinasedomäne von EGFR.^[4, 37, 182] Eine große Mehrheit dieser Patienten, deren Tumore klassisch-aktivierende Mutationen wie beispielsweise Deletionen in Exon19 oder die L858R-Punktmutation aufweisen, profitiert immens von der Behandlung mit TKIs der ersten Generation, wie Gefitinib und Erlotinib, sodass eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und einer verbesserten Lebensqualität der Patienten, im Vergleich zur Behandlung mit Chemotherapeutika, erzielt werden kann.^[183-187] Mittlerweile hat sich jedoch herausgestellt, dass nicht alle aktivierenden EGFR-Mutationen grundsätzlich sensitiv auf die Behandlung mit zielgerichteten Inhibitoren reagieren. In 4-10% der EGFR-mutierten NSCLC-Tumore wurden *in frame* Insertionsmutationen in Exon20 des EGFRs gefunden, die eine *de novo* Resistenz gegen alle heutzutage zugelassenen EGFR-Inhibitoren aufweisen und mit schlechten Überlebensprognosen assoziiert sind.^[188-192] In klinischen Studien und in retrospektiven Analysen dieser konnten lediglich Ansprechraten von 3-8% auf Erst- und Zweitgenerationsinhibitoren und ein progressionsfreies Überleben von weniger als drei Monaten festgestellt werden.^[193-194] Problematisch ist in diesem Zusammenhang, dass die EGFR Exon20 Insertionsmutationen auf molekularer Ebene eine heterogene Mutationsklasse darstellen, die alle Insertionsmutationen oder Duplikationen von bis zu sieben Aminosäuren im C-terminalen Bereich der regulatorischen α C-Helix umfassen, wobei die D770_N771insSVD, V769_D770insASV und H773_V774insNPH die häufigsten Varianten sind (siehe Abbildung 3-29). Ähnlich wie die TKI-sensitiven EGFR-Mutationen (L858R und del19) resultieren die Exon20 Insertionsmutationen in einer gesteigerten Aktivität des Enzyms, welches auf eine Stabilisierung des aktiven Zustandes der Kinase zurückgeführt wird. YASUDA *et al.* konnten 2013 die erste Kristallstruktur einer EGFR-D770_N771insNPG Mutante im Komplex mit einem kovalenten Chinazolin-basierten Inhibitor lösen und zeigten, dass die eingefügten Aminosäuren im C-terminalen Bereich der α C-Helix eine Schleife bilden, die durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff des Asp770 und Amid-Stickstoff des Gly773 stabilisiert wird.^[195] Dieses Motiv erscheint rigide und fixiert so die α C-Helix in einer aktiven, zur Bindetasche rotierten Konformation. Weiterhin wurde für EGFR Exon20 Mutanten eine gesteigerte katalytische Aktivität mit gleichzeitig unveränderter Affinität zum Co-Faktor ATP verglichen mit dem EGFR-WT determiniert. Dadurch geht der entscheidende Faktor, der den EGFR-L858R und EGFR-del19 Mutanten die Sensitivität gegenüber TKIs vermittelt, in Gegenwart von EGFR Exon20 Insertionsmutationen verloren.^[196]

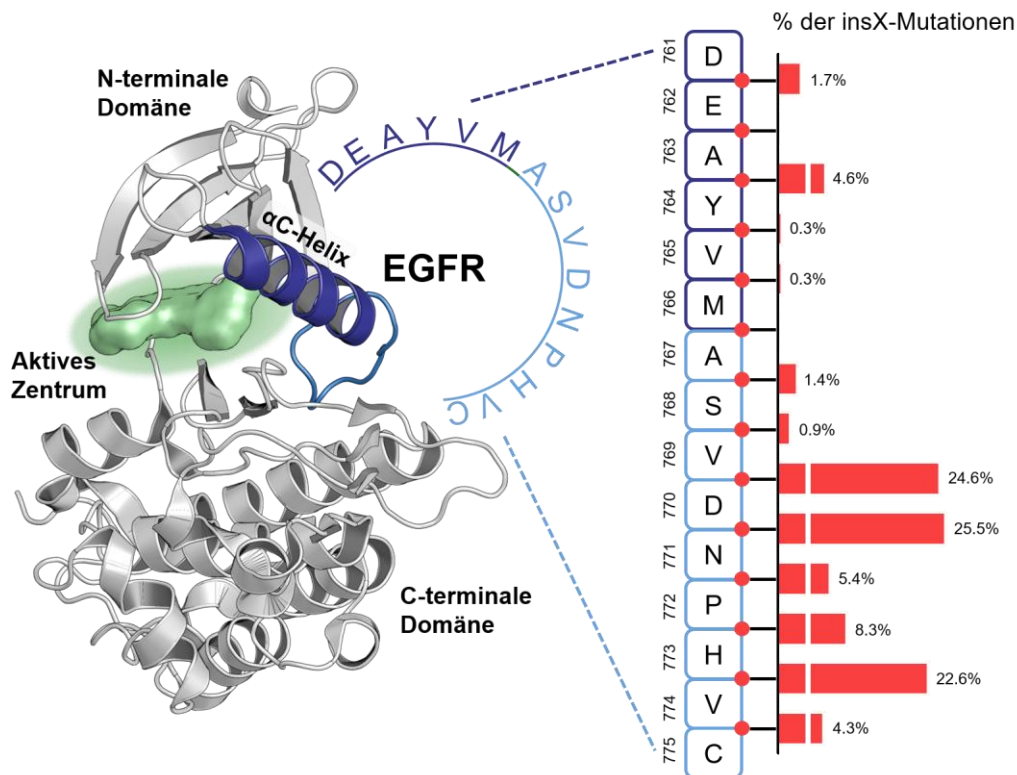


Abbildung 3-29: Schematische Darstellung der Lokalisation und Häufigkeit von Exon20 Insertionsmutationen, die in EGFR-positiven NSCLC-Patienten gefunden wurden (PDB: 1M17). Diese *in frame* Insertionsmutationen in EGFR stellen eine heterogene Subgruppe dar, wobei eine bis sieben Aminosäuren (gekennzeichnet als insX-Mutationen) über einen Bereich von 15 Aminosäuren am C-terminalen Ende der α C-Helix und der anschließenden flexiblen Schleife eingebracht werden. Das Balkendiagramm wurde von VYSE *et al.* adaptiert.^[197]

Interessanterweise wurden in HER2 strukturell analoge Insertionsmutationen im Exon20 gefunden und obwohl HER2-Mutationen mit einer viel niedrigeren Häufigkeit (~2% der NSCLC-Patienten) im Vergleich zu EGFR-Mutationen auftreten, stellen die Insertionsmutationen 90% der Aberrationen in HER2-mutierten NSCLC dar.^[198-199] In diesem Zusammenhang wurden Neratinib und Afatinib in klinischen Phase-II-Studien untersucht, die aber ernüchternde Ergebnisse ergaben, sodass an dieser Stelle ein großer Bedarf an klinisch-aktiven Verbindungen besteht.^[200-201]

Beachtliche Resultate stellten kürzlich ROBICHAUX *et al.* für den Zweitgenerationsinhibitor Pozitotinib (HM781-36B) im Kontext von EGFR Exon20-mutierten NSCLC vor.^[202] Pozitotinib, das ursprünglich für die Überwindung der sekundären T790M-Mutation in EGFR entworfen wurde und dort in klinischen Studien nur geringe Ansprechraten erzielen konnte, zeigte in Phase-II-Studien zuletzt Ansprechraten von 64% (vorläufige Daten) in EGFR Exon20-mutierten NSCLC.^[203-205] Ferner konnte eine hohe Aktivität des Pozitotinibs in verschiedenen *in vitro* Modellen nachgewiesen werden. Durch Computer-gestütztes Modelling wurde des Weiteren argumentiert, dass die Bindetasche der EGFR Exon20 Insertionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp kleiner sei und die Bindung eines Drittgenerationsinhibitors sterisch nicht zulasse.

Die Bindung eines Zweitgenerationsinhibitors, der kompakt und sterisch weniger anspruchsvoll ist, hingegen würde keinen sterischen Konflikt mit der Bindetasche auslösen. Sicherlich lassen sich mit Hilfe dieser Studien die unterschiedlichen Aktivitäten von Zweit- und Drittgenerationsinhibitoren erklären, die offensichtlichen Unterschiede in der Wirksamkeit der Zweitgenerationsinhibitoren bleiben jedoch unaufgelöst. Die enge strukturelle Verwandtschaft der Chinazolin-basierten EGFR-Inhibitoren wird anhand von Abbildung 3-30 deutlich. Alle gezeigten Inhibitoren weisen ein Chinazolin-Grundgerüst auf, das an die Scharnierregion der Kinase über eine Wasserstoff-Brückenbindung koordiniert. Die unterschiedlich substituierten 4-Anilin-Reste besetzen eine hydrophobe Tasche an der Türsteheraminosäure. Zusätzliche sind die TKIs der zweiten Generation mit Michael-Akzeptoren ausgestattet, welche die kovalente Bindung zum Cys797 ermöglichen. Hinsichtlich dieser hohen strukturellen Verwandtschaft, die im Kontrast zu den unterschiedlichen Wirksamkeiten der Verbindungen steht, sollte eine biochemische und zelluläre Profilierung von Poziotinib vorgenommen werden. Darüber hinaus sollten mit Hilfe von Kristallisationsstudien^{*****} distinkte Bindungscharakteristika des Poziotinibs, die es von anderen Chinazolin-basierten Inhibitoren unterscheidet und für die hohe Aktivität verantwortlich ist, herausgearbeitet werden.

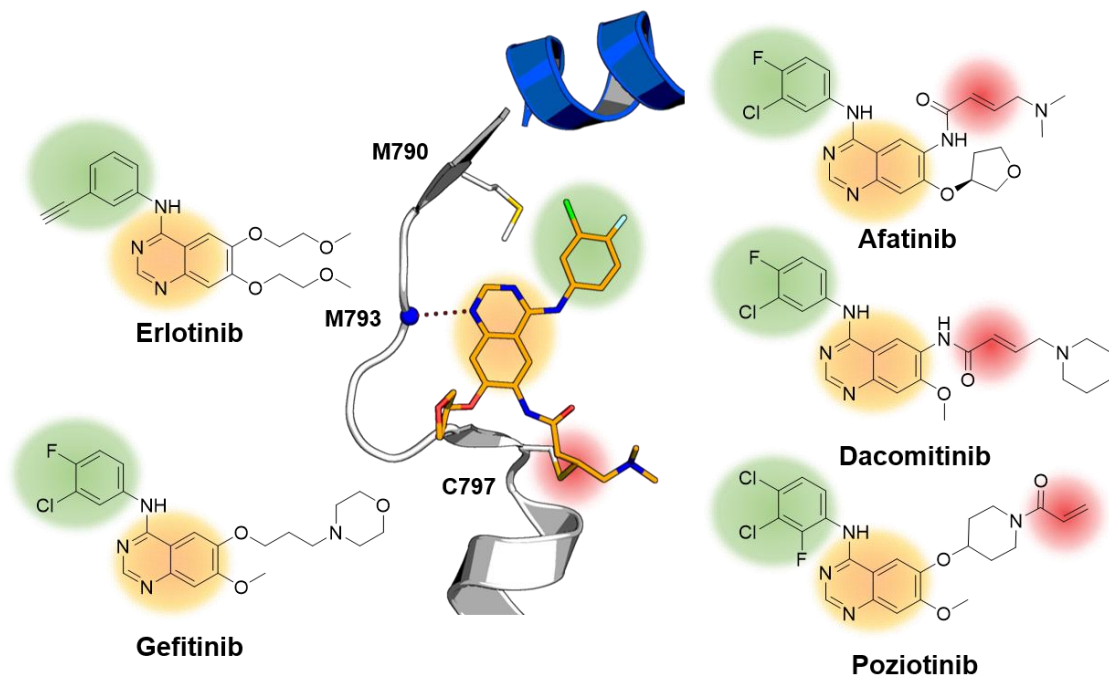


Abbildung 3-30: Darstellung der strukturellen Verwandtschaft verschiedener TKIs der ersten und zweiten Generation. Röntgenkristallstrukturen ergaben ähnliche Bindungsmodi dieser Substanzklasse, wobei das 4-Aminochinazolin (orange) WBB zum Met793 in der Scharnierregion der Kinase ausbildet. Zusätzlich besetzt der substituierte Phenylring (grün) die hydrophobe an der Türsteheraminosäure befindliche Tasche. Weiterhin sind TKIs der zweiten Generation mit einem Michael-Akzeptor (rot) ausgestattet, der eine kovalente Bindung des Inhibitors zum Cys797 ermöglicht (PDB:4G5P).

^{*****} Durchführung der Proteinkristallisation geschah in Kooperation mit J. Niggenaber (AG Rauh, TU Dortmund).

3.3.2. Biochemische und zelluläre Profilierung

Zuerst wurde eine umfassende biochemische Charakterisierung von Poziotinib gegenüber verschiedenen EGFR- und HER2-Varianten vorgenommen und mit klinisch-relevanten EGFR- und HER2-Inhibitoren verglichen. Dazu wurde das aktivitätsbasierte HTRF-Assaysystem genutzt und wie zuvor beschrieben, wurden initial IC₅₀-Bestimmungen^{††††} durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Poziotinib eine ausgesprochen hohe inhibitorische Aktivität gegenüber der Mehrheit der getesteten EGFR- und HER2-Formen im subnanomolaren Bereich besitzt. Kein anderer in diesem Kontext untersuchter Inhibitor war vergleichbar aktiv.

Tabelle 3-5: Biochemische Profilierung von Poziotinib gegen verschiedene klinisch-relevante EGFR- und HER2-Varianten. Dargestellt ist der IC₅₀-Wert, der in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten ermittelt wurde; n.b.= nicht bestimmt.

Mut.		Gefitinib	Erlotinib	Afatinib	Poziotinib	Osimertinib	Rociletinib
EGFR HTRF IC ₅₀ [nM]	WT	<1	<1	<1	<1	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.5
	L858R	<1	<1	<1	<1	<1	2.0 ± 0.2
	L858R/ T790M	190 ± 70	163 ± 8	1.3 ± 0.1	<1	<1	3.3 ± 0.6
	L858R/ T790M/ C797S	250 ± 23	n.b.	25 ± 17	160 ± 23	118 ± 11	527 ± 88
	L858R/ C797S	<1	<1	<1	<1	152 ± 32	n.b.
	del19	2.4 ± 0.6	4.8 ± 1.6	<1	<1	<1	2.3 ± 0.3
	del19/ C797S	2.4 ± 0.6	5.0 ± 0.5	<1	<1	72 ± 5	n.b.
	D770_ N771 insNPG	6.0 ± 1.3	7.1 ± 3.3	1.5 ± 0.8	<1	1.5 ± 0.3	n.b.
HER2 HTRF IC ₅₀ [nM]	WT	96 ± 8.0	n.b.	7.7 ± 4.5	20.8 ± 8.8	4.8 ± 0.1	n.b.
	ins- YVMA	35 ± 5.0	n.b.	<1	<1	3.2 ± 1.1	n.b.

^{††††} Die Bestimmung der IC₅₀-Werte gegenüber den EGFR-WT,-L858R, -L858R/T790M Varianten erfolgte durch S. Eppmann und A. Arndt und entsprechende Werte gegenüber dem HER-WT und der HER2-ins-YVMA Mutante wurden von K. Jeyakumar und M. Keul bestimmt (AG Rauh, TU Dortmund).

Auch fällt in Bezug auf die Untersuchung der Exon20 Insertionsmutanten auf, dass Poziotinib die aktivste Verbindung mit einem IC_{50} -Wert < 1 nM ist. Ferner bewirkt weder die Einführung der T790M-Mutation noch die Einführung der C797S-Mutation in die EGFR-L858R Variante, wobei letztere die kovalente Adressierung des Proteins verhindert, einen Verlust der Aktivität von Poziotinib im biochemischen Kontext. Andere Chinazolin-basierte Inhibitoren wie Afatinib und Gefitinib reagierten deutlich auf die T790M-Mutation und es wurden höhere IC_{50} -Werte im Vergleich zur EGFR-L858R Mutante festgestellt. Erst durch die Kombination der C797S-Mutation mit der T790M-Mutation und der Aktivierungsmutation in EGFR sorgte für eine deutliche Verminderung der inhibitorischen Aktivität, die vergleichbar mit der Osimertinib Aktivität auf dieser Mutante ist. Zu beachten ist allerdings an dieser Stelle, dass Poziotinib, wie auch die anderen Chinazolin-basierten Inhibitoren keine Selektivität gegenüber dem Wildtyp des EGF-Rezeptors zeigten. Aufgrund der Tatsache, dass IC_{50} -Werte im Kontext von kovalenten Inhibitoren keine genaue Beurteilung der Wirksamkeit erlauben, sind weiterführende kinetische Bindungsstudien an dieser Stelle dringend notwendig.

Zunächst erfolgte jedoch die zelluläre Evaluierung der ausgewählten TKIs der ersten, zweiten und dritten Generation im Kontext von EGFR- und HER2-mutierten Zelllinien. ##### Dabei wurde die A431 als EGFR-WT Zelllinie, die durch Überexpression des EGFRs eine Abhängigkeit von dessen Signal zeigt, verwendet, um mögliche Hinweise auf die Toxizität der Verbindungen zu erhalten. Weiterhin wurde die Patienten-abgeleitete H1975-Zelllinie herangezogen, welche die EGFR-L858R/T790M Variante trägt und anhand der Testung der Verbindungen auf der PC9-T790M/C797S Zelllinie, sollte der Einfluss der C797S-Mutation auf die zelluläre Aktivität eruiert werden. Schlussendlich wurden auch noch zwei HER2-mutierte Zelllinien untersucht, die aktivierende Insertionsmutationen aufwiesen (H1781: HER2-G776delinsVC; Ba/F3(insYVMA): HER2-A775_G776insYVMA) mit dem Ziel die klinisch-relevanten Exon20-Mutationen nachzustellen. Unter Verwendung des Viabilitäts-basierten Assaysystems CTG wurden Dosis-Wirkungskurven aufgenommen, wobei acht Inhibitorkonzentration zwischen 30 μ M und 14 nM getestet wurden, die eine EC_{50} -Bestimmung zuließen. Erwartungsgemäß wurden für die reversiblen Inhibitoren der ersten Generation schwache zelluläre Aktivitäten im mikromolaren Bereich auf der A431- und H1975-Zelllinien festgestellt, während der Drittgenerationsinhibitor Osimertinib eine starke inhibitorische Wirkung von 16 nM auf der T790M-mutierten H1975-Zelllinie besaß und auch einen moderaten Einfluss auf die EGFR-WT Zelllinie ausübte.

Ausgehend von der Tatsache, dass Zweitgenerationsinhibitoren analog zu den TKIs der ersten Generation einen 4-Anilin-Substituenten tragen, der mit der sterisch-

Die Bestimmung der EC_{50} -Werte geschah in Kooperation von H. Tumbrink, K. Jeyakumar und M. Keul (AG Rauh, TU Dortmund).

anspruchsvollen Türsteheramino­säure Methionin im T790M-mutierten EGFR interferiert, ist es nicht verwunderlich, dass Afatinib als Vertreter der TKIs der zweiten Generation einen EC₅₀-Wert von 653 nM zeigte. Beachtlich an dieser Stelle ist die zelluläre Aktivität von Poziotinib in T790M-mutierten H1975-Zellen, denn obwohl Poziotinib auch mit dem 4-Anilin-Substituenten ausgestattet ist, wurde eine EC₅₀-Wert von 126 nM determiniert, der mit der Potenz von Rociletinib vergleichbar ist. Ferner konnten die biochemischen Resultate auf der EGFR-L858R/T790M/C797S Mutante durch die zellulären Testungen bestätigt werden und kein Inhibitor zeigte signifikante inhibitorische Aktivität auf den C797S-mutierten Zellen. Darüber hinaus konnte durch die Charakterisierung der Verbindungen auf HER2-Zelllinien eine ausgeprägte Potenz von Poziotinib im Kontext von Exon20 Insertionsmutationen festgestellt werden, die sich sowohl in H1781- als auch in Ba/F3(insYVMA)-Zellen mit EC₅₀-Werten von <14 nM manifestierte. Lediglich Afatinib konnte ähnlich gute Aktivitäten gegenüber den Ba/F3(insYVMA) erreichen, verlor jedoch auf H1781-Zellen um den Faktor 10 an zellulärer Aktivität.

Tabelle 3-6: Zelluläre Profilierung von Poziotinib gegen verschiedene klinisch-relevante EGFR- und HER2-Varianten. Dargestellt ist der EC₅₀-Wert mit Standardabweichung, der in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten ermittelt wurde; n.b.= nicht bestimmt.

Verb.	EGFR CTG	Her2 CTG
	EC ₅₀ [nM]	EC ₅₀ [nM]
	A431 H1975 PC9-T790M/C797S	H1781 Ba/F3(insYVMA)
Erlotinib	2100 ± 980 7400 ± 1400 n.b.	5700 ± 2400 168 ± 58
Gefitinib	1700 ± 790 11000 ± 2600 7300 ± 2800	3400 ± 860 631 ± 412
Afatinib	634 ± 312 653 ± 109 4400 ± 540	174 ± 83 <14
Poziotinib	626 ± 210 126 ± 63 5700 ± 1370	<14 <14
Osimertinib	756 ± 340 16 ± 5 2700 ± 490	461 ± 222 365 ± 329
Rociletinib	1900 ± 470 145 ± 86 4700 ± 2600	1500 ± 480 837 ± 428

Aus den Ergebnissen ließ sich ableiten, dass Poziotinib trotz gleichem Grundgerüst stärkere inhibitorische Aktivitäten gegenüber EGFR-mutierten Zelllinien demonstriert und keinen gravierenden Aktivitätsverlust durch die Einführung der T790M-Mutation im Vergleich zu den anderen Chinazolin-basierten Inhibitoren aufweist. Worauf diese unterschiedlichen Aktivitäten zurückzuführen sind, konnte an dieser Stelle noch nicht erklärt werden. Allerdings unterscheiden sich sowohl die Substitutionsmuster der 4-Anilin-Reste, die in direktem Kontakt mit der Türsteheramino­säure stehen wie auch die Michael-Akzeptorsysteme geringfügig.

3.3.3. Detaillierte kinetische Bindungsstudien

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei Poziotinib um einen irreversiblen Inhibitor handelt, ist die Beurteilung der inhibitorischen Aktivität anhand von IC_{50} -Bestimmungen lediglich schätzungsweise möglich. Wie zuvor beschrieben, können durch kinetische Bindungsstudien, einschließlich der Bestimmung der Parameter K_i und k_{inact} , detaillierte Aussagen über die Affinität K_i des Inhibitors zum Enzym und die Ratenkonstante der Inaktivierung, die mit der Rate der kovalenten Bindungsbildung k_{inact} gleichzusetzen ist, getroffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der Parameter K_i und k_{inact} nach KRIPPENDORF *et al.*^[161] Dazu wurden zeitabhängige IC_{50} -Bestimmung durchgeführt, wobei die Vorinkubation des Inhibitors mit der Kinase variiert wurde (2-90 min). Evaluiert wurden jeweils zwei Vertreter der TKIs der zweiten und dritten Generation auf verschiedenen EGFR-Varianten. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die EGFR-D770_N771insNPG Mutante gelegt. Aus den Ergebnissen der kinetischen Charakterisierung geht hervor, dass Poziotinib ausgesprochen affin an die Kinasedomäne von EGFR bindet (siehe Tabelle 3-7) und gegenüber den meisten EGFR-Formen K_i -Werte im subnanomolaren Bereich festgestellt wurden. Festzuhalten ist, dass die hohe initial durch IC_{50} -Bestimmungen vermutete inhibitorische Aktivität von Poziotinib gegenüber der EGFR-D770_N771insNPG Mutante an dieser Stelle bestätigt werden konnte und ein K_i -Wert von <1 nM determiniert wurde. Im direkten Vergleich der zeitlichen Verläufe der IC_{50} -Werte von Osimertinib und Poziotinib im Kontext der EGFR-Insertionsmutante war ein signifikanter Unterschied zwischen den Plateauphasen erkennbar (siehe Abbildung 3-31 B). Während Osimertinib ein Plateau bei IC_{50} -Werten von ca. 2 nM bildete, inhibierte Poziotinib, schon nach kurzen Inkubationszeiten, das Enzym effektiv mit IC_{50} -Werten von <1 nM. In ähnlicher Weise wurden auch die anderen EGFR-Varianten von Poziotinib adressiert, wobei durch das Einbringen der T790M-Mutation in die EGFR-L858R Mutante ein deutlicher Verlust der hemmenden Wirkung, der mit der Verschiebung des Graphen hin zu höheren IC_{50} -Werten einherging, nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 3-31 A).

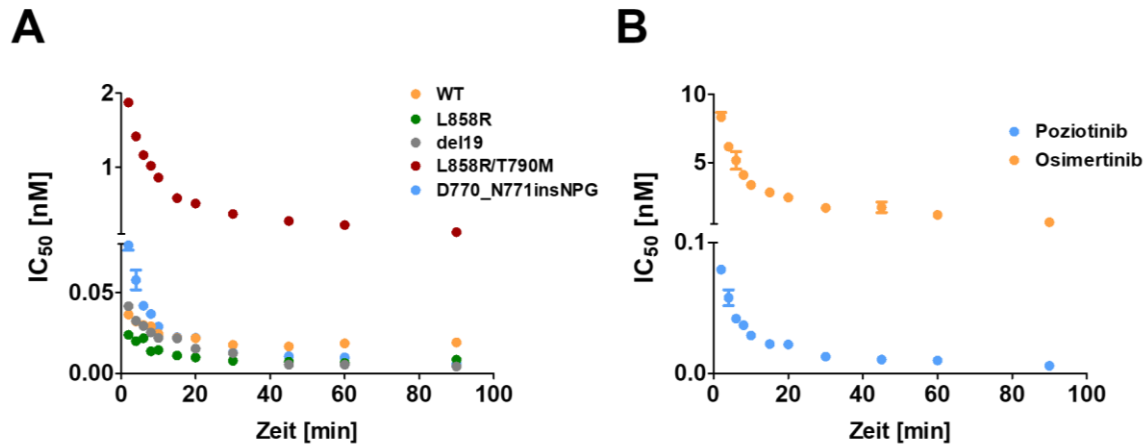


Abbildung 3-31: Zeitabhängige IC₅₀-Werte. **A:** Übersicht über die erhaltenen zeitabhängigen IC₅₀-Werte bei der Evaluierung von Poziotinib gegen verschiedene EGFR-Varianten. **B:** Vergleich der zeitabhängigen IC₅₀-Werte von Osimertinib und Poziotinib auf der EGFR-D770_771insNPG Mutante. Jeder Wert wurde in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten bestimmt, wobei der Mittelwert und die Standardabweichung aufgetragen sind.

Tabelle 3-7: Übersicht über die Parameter K_i , k_{inact} und k_{inact}/K_i , die für Zweit- und Drittgenerationsinhibitoren auf verschiedenen EGFR-Varianten vermessen wurden. Jeder Wert wurde in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten bestimmt, wobei der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben ist.

Verbindung	EGFR	K_i [nM]	k_{inact} [min ⁻¹]	k_{inact}/K_i [μM ⁻¹ s ⁻¹]
Afatinib	WT	<1	0.07 ± 0.01	>1.2*
	L858R	<1	0.04 ± 0.01	>1.2*
	L858R+T790M	1.9 ± 0.1	0.13 ± 0.01	1.07 ± 0.05
	del19	<1	0.05 ± 0.02	>1.2*
Poziotinib	WT	<1	0.05 ± 0.02	>1.2*
	L858R	<1	0.01 ± 0.02	>1.2*
	L858R+T790M	1.1 ± 0.1	0.30 ± 0.03	4.42 ± 0.65
	del19	<1	0.07 ± 0.03	>1.2*
	D770_N771insNPG	<1	0.25 ± 0.05	>3.3*
Osimertinib	WT	14 ± 2.3	0.43 ± 0.11	0.52 ± 0.05
	L858R	1.6 ± 0.3	0.30 ± 0.01	3.24 ± 0.46
	L858R+T790M	1.5 ± 0.1	0.33 ± 0.06	3.75 ± 0.39
	del19	<1	0.14 ± 0.03	>1.2*
	D770_N771insNPG	4.1 ± 0.4	0.22 ± 0.05	0.89 ± 0.10
Rociletinib	WT	74 ± 7.1	0.18 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	L858R	1.8 ± 0.2	0.18 ± 0.05	1.67 ± 0.32
	L858R+T790M	1.7 ± 0.1	0.29 ± 0.05	2.95 ± 0.66
	del19	4.5 ± 0.1	0.12 ± 0.01	0.48 ± 0.05

Aus den initialen IC_{50} -Bestimmungen konnte dieser Trend nicht abgeleitet werden, da immer noch eine hohe Affinität von 1.1 nM festgestellt wurde. Darüber hinaus zeichneten sich die getesteten Zweitgenerationsinhibitoren Afatinib und Poziotinib durch vergleichbar niedrige k_{inact} -Werte aus, die darauf hindeuten, dass die kovalente Bindungsbildung langsam verläuft. Weiterhin kann angenommen werden, dass die Inhibition der TKIs der zweiten Generation auf einen starken reversiblen Charakter zurückzuführen ist und weniger stark von der kovalenten Bindung abhängig ist wie beispielsweise die Inhibition von Osimertinib oder Rociletinib. Diese Annahmen korrelieren gut mit den zuvor bestimmten IC_{50} -Werten der Chinazolin-basierten Inhibitoren gegenüber C797S-mutierten EGFR-Varianten (ausgenommen der EGFR-L858R/T790M/C797S Mutante, siehe Tabelle 3-5), die ebenfalls im niedrigen nanomolaren Bereich lagen. Dagegen zeigte Osimertinib durch den Verlust des kovalenten Bindungscharakters einen deutlichen Aktivitätsverlust.

Obwohl Poziotinib eine sehr hohe inhibitorische Wirksamkeit gegenüber diversen EGFR-Varianten im biochemischen Kontext demonstriert, sollte die hohe Aktivität gegenüber dem EGFR-WT nicht außer Acht gelassen werden, die in der klinischen Anwendung mit toxischen Nebenwirkungen assoziiert wird und nicht selten zu einem Abbruch der Therapie führt. Durch die Auftragung der K_i -Werte von Osimertinib und Poziotinib gegenüber den diversen EGFR-Mutanten werden die unterschiedlichen Profile verdeutlicht (siehe Abbildung 3-32). Während Osimertinib die mutierten Formen des EGFRs um ein 10-faches affiner bindet als den EGFR-WT, zeigt sich bei Poziotinib ein gegensätzliches Bild, sodass keine Selektivität gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden konnte.

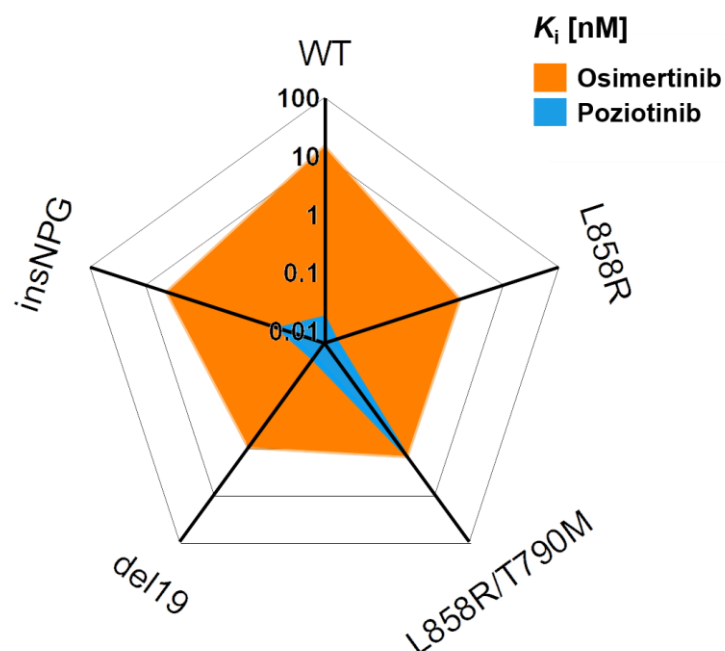


Abbildung 3-32: Visualisierung der Affinitätsprofile von Poziotinib (blau) im Vergleich mit Osimertinib (orange). Radar-Plot, wobei die reversiblen Affinitäten (K_i -Werte [nM]) der Inhibitoren Poziotinib und Osimertinib gegenüber verschiedenen EGFR-Varianten abgebildet sind.

3.3.4. Strukturbiologische Untersuchungen in EGFR

Anhand von Röntgenkristallstrukturanalysen^{§§§§§} sollte zum einen der kovalente Bindungscharakter von Poziotinib gegenüber EGFR nachgewiesen werden und zum anderen eine detaillierte Untersuchung der Bindungseigenschaften erfolgen, die Rückschlüsse auf die Grundlage der ausgesprochen hohen Affinität der Verbindung gegenüber EGFR-Varianten zulassen. In diesem Zusammenhang ist es gelungen Proteinkristalle der EGFR-T790M/V948R Mutante in Kokristallisationsansätzen mit Poziotinib zu erhalten (siehe Abbildung 3-33 B). Die Kristallisationsexperimente wurden, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, durchgeführt. Ferner ergab die massenspektrometrische Untersuchung der für Kristallisationsansätze-vorbereiteten Protein-Inhibitor-Proben eine Modifikation der EGFR-Mutante durch Poziotinib, welches in einer Zunahme der molekularen Masse um 491 Da im Vergleich zur apo-Form resultierte (siehe Abbildung 3-33 A).

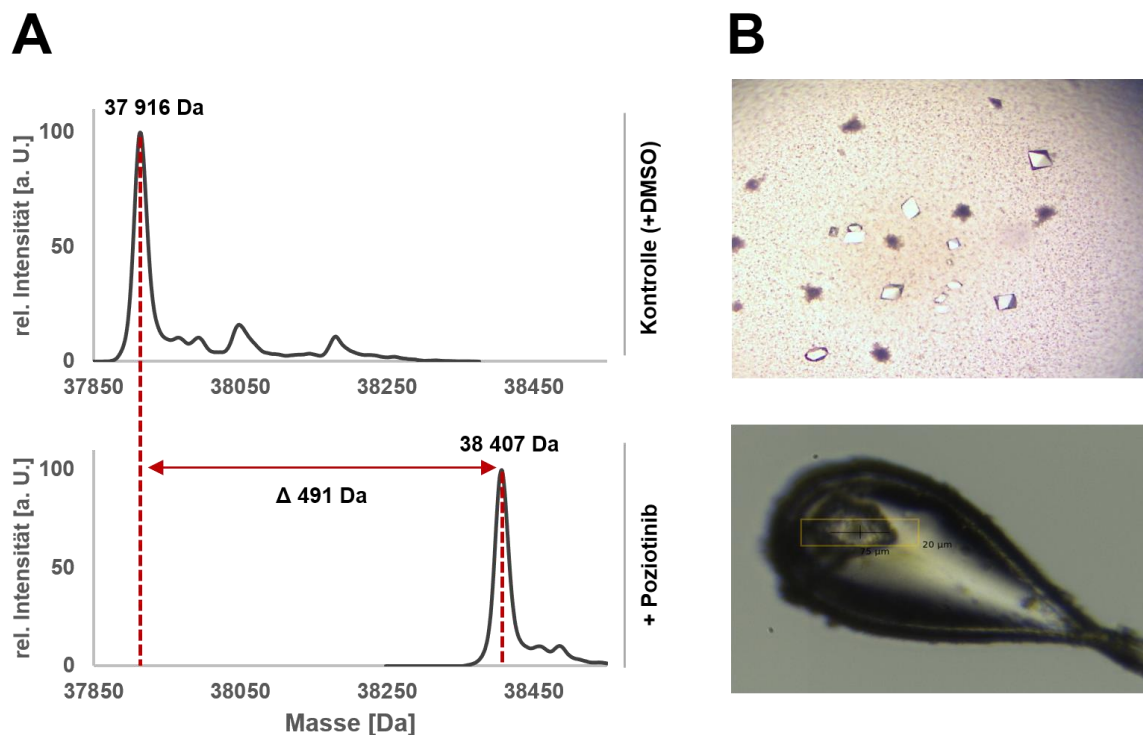


Abbildung 3-33: Massenspektrometrische und strukturbiologische Untersuchungen. **A:** Dekonvolutierte Massenspektren zur Analyse der kovalenten Modifikation von EGFR durch Poziotinib. Für die mit DMSO-behandelte Kontrollprobe der EGFR-T790M/V948R Mutante wurde ein Molekulargewicht von 37 916 Da gemessen, das gut mit dem berechneten Molekulargewicht von 37 914 Da übereinstimmt. Die mit Poziotinib inkubierte Probe zeigt eine Erhöhung des Molekulargewichts um 491 Da, sodass eine kovalente Modifikation des Proteins durch den Inhibitor nachgewiesen werden konnte. **B:** Mikroskopie-Aufnahmen der erhaltenen Kristalle von EGFR-T790M/V948R in Kokristallisationsansätzen mit Poziotinib unter der Verwendung folgender Bedingung: 17.5-27.5% PEG3350; 50-200 mM MgSO₄; 2-4% Ethylenglykol (oben). Außerdem ist der vermessene Kristall im Nylonloop dargestellt (unten).

^{§§§§§} Die Durchführung der Proteinkristallisation geschah in Kooperation mit J. Niggenaber (AG Rauh, TU Dortmund).

Die erhaltenen Kristalle wurden am Synchrotron (SLS, Villingen) vermessen und zeigten eine gute Diffraktion des Röntgenlichts, sodass eine Auflösung von 2.1 Å erreicht werden konnte. Die asymmetrische Einheit enthielt ein EGFR-Dimer, welches über polare Interaktionen zwischen den der Bindetasche-abgewandten Regionen der Kinasedomänen stabilisiert wurde, sodass das aktive Zentrum für Inhibitoren zugänglich war (siehe Abbildung 3-34). Ferner wurde die Bildung eines biologisch-relevanten, asymmetrischen Dimers durch die Einführung der EGFR-V948R Mutation im Vorfeld verhindert. Darüber hinaus konnte der typische Aufbau der Kinasedomäne beobachtet werden, die in diesem Fall eine inaktive Konformation einnahm, bei der die regulatorische α C-Helix in einer von der Bindetasche nach außen rotierten Konformation vorlag.

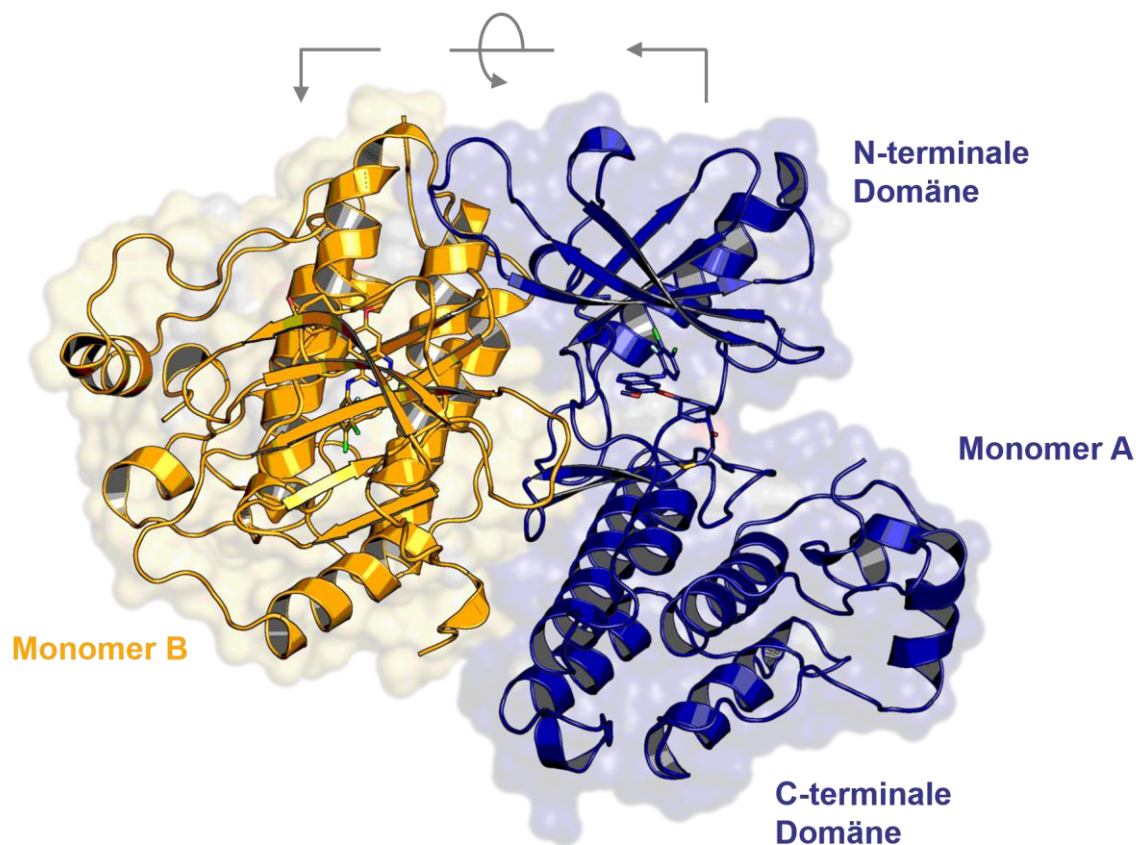


Abbildung 3-34: Röntgenkristallstruktur der EGFR-T790M/V948R Mutante im Komplex mit Poziotinib. Die Struktur konnte mit den oben gezeigten Kristallen gelöst werden und wies eine Auflösung von 2.1 Å auf, wobei in jeder asymmetrischen Einheit ein Dimer gefunden wurde, das hier dargestellt ist. Dabei liegen beide Kinasedomänen in der inaktiven Konformation vor und bilden kein biologisch-relevantes asymmetrisches Dimer. Weiterhin konnte eine Ligandenbindung bestätigt werden.

Insgesamt konnte ein für Chinazoline-typischer Bindungsmodus beobachtet werden, der sich durch eine Wasserstoff-Brückenbindung zwischen dem N1 des Grundgerüsts zum Peptidrückgrat des Met793, sowie durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem 4-Anilin-Substituenten, der tief

in hydrophobe Tasche an der Türsteheraminosäure ragt, auszeichnet (siehe Abbildung 3-35 A und B).

Weiterhin konnte der kovalente Bindungsmodus zwischen Poziotinib und dem Cys797 anhand der Elektronendichtekarte einwandfrei bestätigt werden. Das Interaktionsnetzwerk zwischen dem Liganden und der Bindetasche von EGFR wurde mit Hilfe der LigPlot-Software analysiert und in Abbildung 3-35 B visualisiert.^[180] Auffällig ist die Positionierung der beiden Aminosäuren Met790 und Lys745, die den halogenierten Substituenten einrahmen, dabei bildet das Lys745 eine für den inaktiven Zustand der Kinase charakteristische Salzbrücke zum Asp855 aus. Allerdings geht die Bindung des halogenierten Substituenten in die hydrophobe Tasche auch mit einer Einschränkung der konformationellen Freiheit des Met790 einher, die grundsätzlich energetisch ungünstig ist. Daher stellt sich die Frage, ob durch die starken hydrophoben Wechselwirkungen des Liganden zum Protein diese Barriere überwunden werden kann, zumal der Ring eine optimale Ausrichtung zu haben scheint.

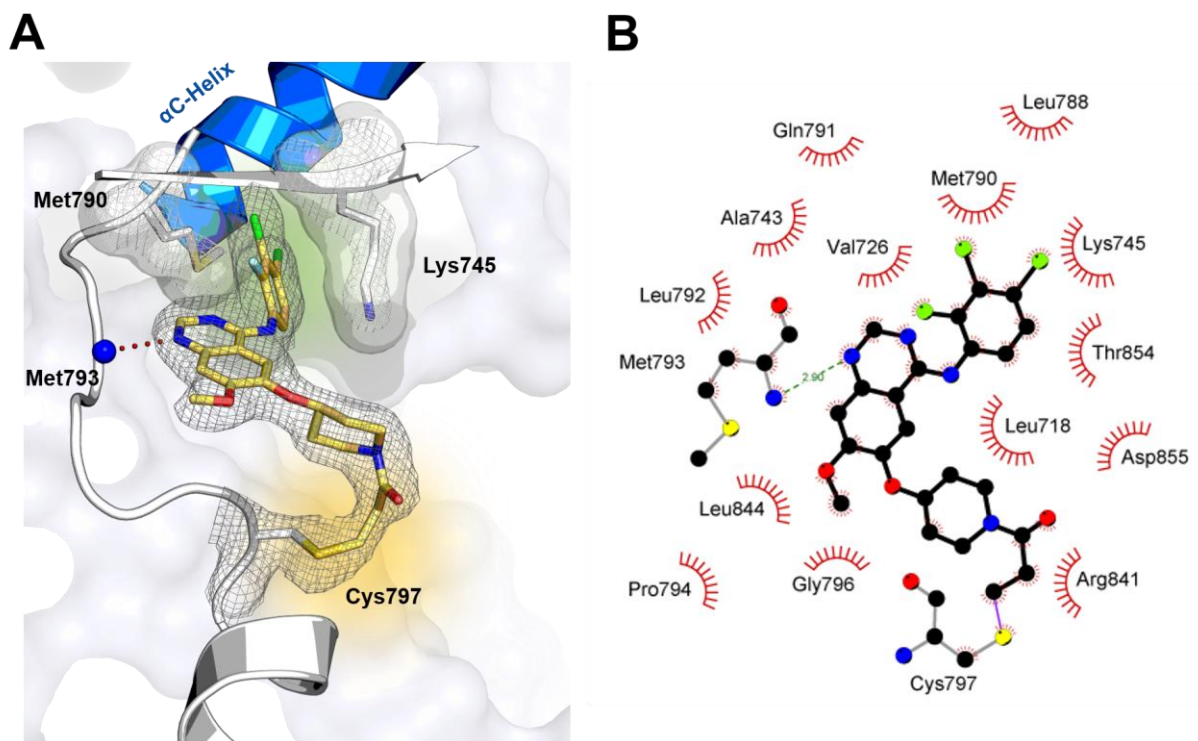


Abbildung 3-35: A: Detailansicht des Bindemodus von Poziotinib (gelb) innerhalb der Kinasedomäne von EGFR. Dargestellt ist die Scharnierregion (weiß), das β 3-Faltblatt (weiß) und die regulatorische α C-Helix (blau). Die experimentell ermittelten Elektronendichtekarten von Poziotinib, dem Cys797, dem Met790 und dem Lys745 sind in grau abgebildet ($2Fo-Fc$ Karte konturiert bei 1σ). Die Wasserstoff-Brückenbindung zwischen dem Amid-Stickstoff des Met793 zum Grundgerüst des Inhibitors wurden durch rote Punkte angedeutet. Weiterhin konnte der kovalente Bindungsmodus eindeutig bestätigt werden. **B:** Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Poziotinib und EGFR mit Hilfe des Programms LigPlot.^[180] Die kovalente Bindung zwischen Poziotinib und Cys797 ist lila eingefärbt. Alle Aminosäuren, die hydrophobe Wechselwirkungen zum Inhibitor ausbilden sind rot dargestellt und die Wasserstoff-Brückenbindung zwischen dem Met793 und Poziotinib ist in grün dargestellt.

Beim Vergleich der Bindungspose von Poziotinib mit anderen 4-Chinazolin-basierten Inhibitoren werden zwei signifikante Unterschiede deutlich (siehe Abbildung 3-35 A und B). Zum einen bewirkt der über ein Piperidin-verknüpfte Michael-Akzeptor eine leichte Verschiebung des Grundgerüsts in Richtung der hydrophoben Tasche und zum anderen können über das in *ortho*-positionierte Fluor am 4-Anilin-Substituenten, das in keinem anderen klinisch-relevanten Chinazolin-basierten Wirkstoff vorhanden ist, zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen zum Val726 und Ala743 ausgebildet werden. Folglich besetzt der halogenierte 4-Anilin-Substituent die hydrophobe Tasche deutlich besser als beispielsweise der analoge Rest in Afatinib oder Dacomitinib (siehe Abbildung 3-35 B). Weiterhin wird vermutet, dass der Fluorsubstituent in *ortho*-Position die Flexibilität des Rings einschränkt und eine Präorganisation der Molekülstruktur hervorruft, welche eine affine Bindung zum Enzym erlaubt.

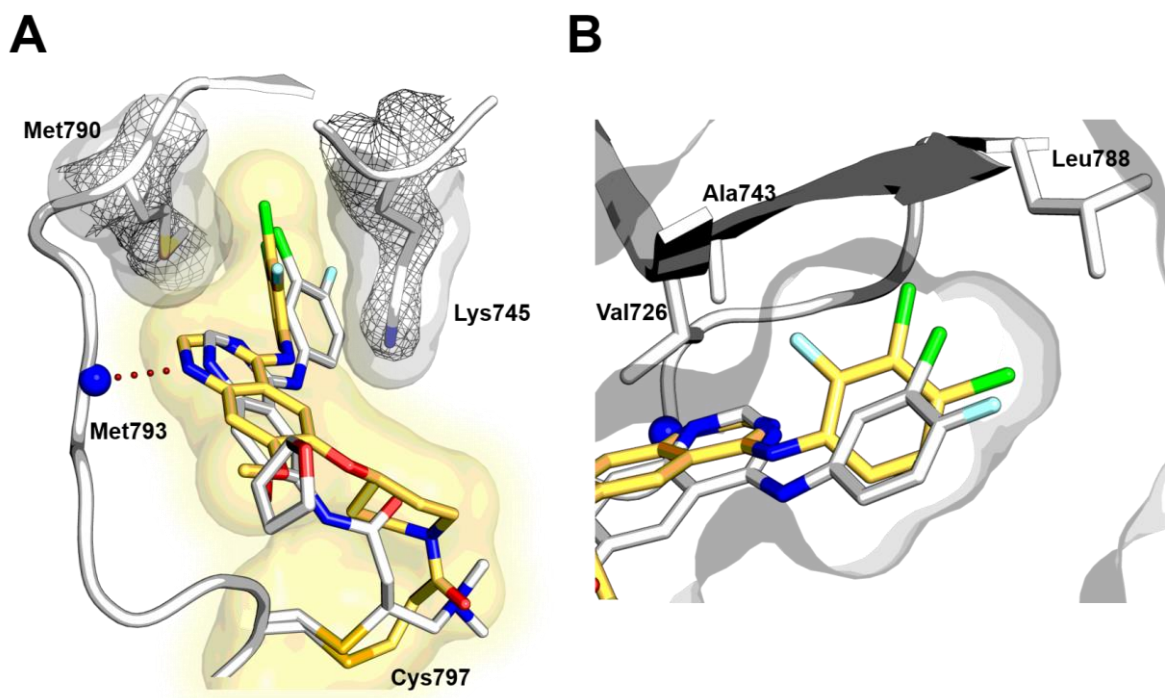


Abbildung 3-36: Vergleich der Bindungsmodi der strukturell eng-verwandten Zweitgenerationsinhibitoren Afatinib (weiß) und Poziotinib (gelb) in T790M-mutiertem EGFR. **A:** Alignment der Afatinib-gebundenen EGFR-Struktur (PDB:4G5P) mit der in dieser Arbeit gelösten EGFR-Struktur im Komplex mit Poziotinib. Gezeigt werden jeweils die Inhibitoren einschließlich des kovalent-gebundenen Cys797. Weiterhin ist die Scharnierregion und das Lys745 der Poziotinib-Struktur dargestellt, wobei die Elektronendichtekarten (*2Fo-Fc* Karte konturiert bei 1σ) des Met790 und des Lys745 abgebildet wurden, um zu unterstreichen, dass diese beiden Aminosäuren den halogenierten Ring des Poziotinibs einrahmen. Im Vergleich mit der Afatinib-Struktur konnten diese Interaktionen nicht festgestellt werden. **B:** Darstellung der hydrophoben Tasche an der Türsteheraminosäure M790. Durch die unterschiedlichen Michael-Akzeptoren und Substitutionsmuster am 4-Anilin-Rest der gezeigten Inhibitoren, ergibt sich ein leicht versetzter Bindungsmodus und eine bessere Besetzung der hydrophoben Tasche durch Poziotinib im Vergleich mit Afatinib.

Durch die Modellierung der experimentell bestimmten Bindungspose des Poziotinib in eine EGFR-Exon20 Struktur wird zusätzlich die Bedeutung des Substitutionsmusters am 4-Anilin-Rest unterstrichen. In der von YASUDA *et al.* gelösten EGFR-D770_N771insNPG Struktur lagen die Kinasen in einer aktiven Konformation mit einer zur Bindetasche rotierten α C-Helix vor.^[195] Dabei könnte der im Vergleich zu Afatinib und Dacomitinib verschobene Bindemodus und die Tatsache, dass Poziotinib in *para*-Position des 4-Anilin-Rests ein Chlor und kein Fluor trägt, in stärkeren hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Met766 in der α C-Helix resultieren und so die stärkere inhibitorische Wirksamkeit des Poziotinibs erklären.

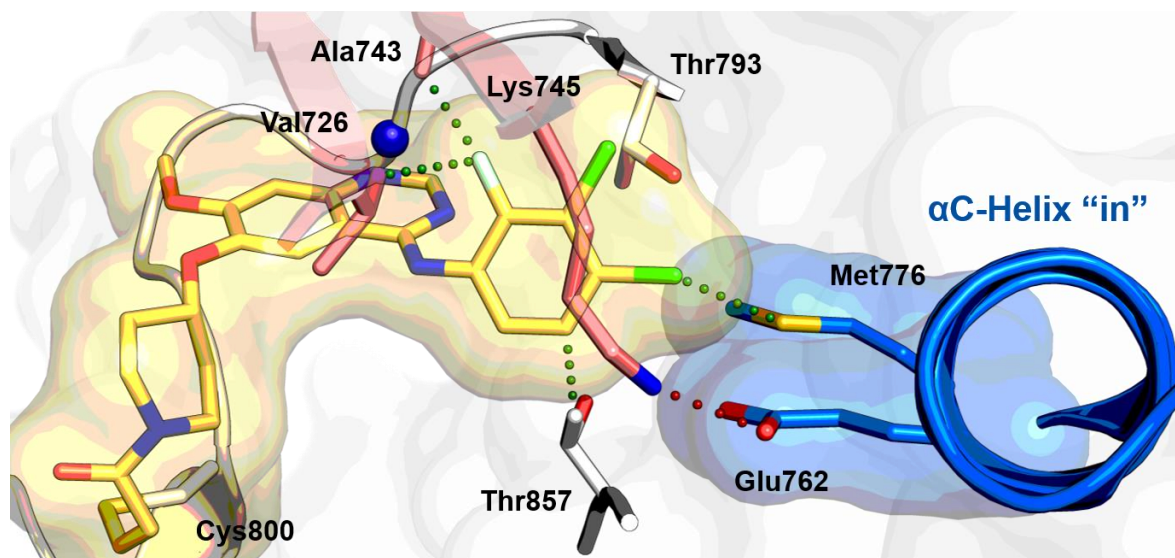


Abbildung 3-37: Modellierung der experimentell-bestimmten Bindungspose von Poziotinib in eine EGFR-Exon20 Insertionsmutante (PDB: 4LRM). Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen dem Lys745 und dem Glu762 sind durch rote Punkte angedeutet. Potentielle hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Poziotinib und den Seitenketten Val726, Ala743, Met776 und Thr857 werden durch grüne Punkte illustriert. Zu beachten ist hier die veränderte Nummerierung der Aminosäuren durch die Insertion D770_N771insNPG.

3.3.5. Zusammenfassung

Basierend auf Studien von ROBICHAUX *et al.*, die eine hohe klinische Wirksamkeit des Zweitgenerationsinhibitors Poziotinib im Kontext von EGFR Exon20 mutierten NSCLC beschrieben,^[202] wurde im Rahmen dieses Projekts eine ausführliche biochemische, zelluläre und strukturelle Profilerung der Verbindung vorgenommen, mit dem Ziel distinkte Bindungscharakteristika des Poziotinibs zu identifizieren, die es von anderen Chinazolin-basierten Inhibitoren unterscheidet. Zunächst konnte in biochemischen und zellulären Assaysystemen eine hohe Inhibitionsstärke des Poziotinibs gegenüber verschiedenen klinisch-relevanten EGFR- und HER2-Mutanten, einschließlich den Exon20-mutierten Varianten, festgestellt werden. Detaillierte kinetische Bindungsstudien zeigten, dass Poziotinib eine ausgesprochen hohe reversible Affinität, welches durch K_i -Werte im subnanomolaren Bereich illustriert wurde, gegenüber EGFR aufwies. In diesem Zusammenhang wurde aber auch eine starke Affinität zum EGFR-WT festgestellt, die grundsätzlich mit starken Nebenwirkungen im Patienten assoziiert wird und daher zu vermeiden ist. Weiterhin konnte der kovalente Bindungscharakter des Poziotinibs mit Hilfe von massenspektroskopischen Untersuchungen bestätigt werden und eine Röntgenkristallstrukturanalyse ergab ein leicht verschobenes Chinazolin-Grundgerüst des Poziotinibs im Vergleich zu Afatinib, sodass Poziotinib tiefer in die Bindetasche von EGFR ragt. Außerdem ermöglicht das Substitutionsmuster des 4-Anilin-Substituenten die Ausbildung von zusätzlichen hydrophoben Wechselwirkungen im Vergleich mit Afatinib und Poziotinib. Abschließend ist festzuhalten, dass Poziotinib sicherlich ein äußerst potenter pan-EGFR Inhibitor ist, der aber eine problematisch hohe Potenz auf dem EGFR-WT zeigt und daher an dieser Stelle weitere Optimierungen der Selektivität der Verbindung von Nöten sind, um dem Patienten eine bestmögliche Therapie bieten zu können.

3.4. Screening-Kampagne zur Identifizierung neuer Leitstrukturmotive

3.4.1. Hintergrund

Ein verbreiteter Resistenzmechanismus gegen kovalente Kinaseinhibitoren stellt die Mutation des adressierten reaktiven Cysteins zu einem weniger reaktiven Serin dar, wodurch die kovalente Bindungsbildung zwischen Inhibitor und dem Protein unterbunden wird und das mit einem signifikanten Verlust der inhibitorischen Wirksamkeit einhergeht.^[69, 206] Entsprechende Mutationen wurden bereits gegen den BTK-Inhibitor Ibrutinib, der zu den ersten beschriebenen kovalenten Kinaseinhibitoren zählt, in CLL beobachtet.^[207-208] Vor vier Jahren folgten dann analoge Beobachtungen in NSCLC-Patienten, die zuvor erfolgreich mit EGFR-TKIs der dritten Generation wie Osimertinib behandelt wurden, letztendlich ein Rezidiv erlitten und die erworbene C797S-Mutation in EGFR aufwiesen.^[155, 209] Seither wurden diverse Ansätze zur Überwindung dieser Wirkstoffresistenz verfolgt, die bisher jedoch nicht zu klinisch-aktiven Verbindungen geführt haben. Unter anderem konnten durch die Optimierung der reversiblen Affinität bekannter Kinaseinhibitoren und die Entwicklung von allosterischen Inhibitoren biochemisch aktive Verbindungen erhalten werden, die jedoch als Monotherapie in Zell-basierten oder in *in vivo* Studien keine ausreichende Wirksamkeit demonstrierten.^[70, 177, 210] Zur Identifizierung neuartiger und zellulär aktiver Verbindungen gegenüber der wirkstoffresistenten EGFR-Variante sollte eine Durchmusterung der laborinternen Substanzbibliothek mit Hilfe der kürzlich etablierten Screening-Einheit RASPELD erfolgen. Im folgenden Kapitel wird die Relevanz des Hochdurchsatz-Screenings in der Wirkstoffforschung thematisiert, Vor- und Nachteile des Ansatzes diskutiert und die Screening-Einheit RASPELD vorgestellt, bevor auf die Ergebnisse der Screening-Kampagne gegenüber der wirkstoffresistenten EGFR-Variante eingegangen wird.

3.4.2. Exkurs: RASPELD – eine akademische Screening-Einheit

Zur Identifikation neuer Leitstrukturelemente in der Arzneimittelforschung wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Strategien, wie das Fragment-basierte Wirkstoffdesign (*Fragment-based drug design* FBDD), das Struktur-basierte Design (*Structure-based drug design* SBDD), das virtuelle Screening und das Hochdurchsatz-Screening (*High-throughput screening* HTS) etabliert und erfolgreich verfolgt.^[211] Jede dieser Herangehensweisen weist Vor- und Nachteile in Bezug auf Anwendbarkeit, Kostenintensität, Zeit- und Arbeitsaufwand auf. Eine Analyse der *hit-to-clinical* Paare, die in den Jahren 2016 und 2017 im *Journal of Medicinal Chemistry* beschrieben wurden, ergab, dass nahezu ein Drittel der klinischen Kandidaten aus HTS-Kampagnen stammten (Abbildung 3-38).^[212] Grundsätzlich steht Screening, Hochdurchsatz-Screening oder heutzutage sogar das Ultra-Hochdurchsatz-Screening für die Durchmusterung einer Substanzbibliothek im Hochdurchsatzformat hinsichtlich einer bestimmten pharmakologischen Eigenschaft. Hierbei nimmt die Erstellung von biologisch relevanten Assaysystemen, die zuverlässige, reproduzierbare und robuste Daten generieren, eine Schlüsselrolle ein. Ein großer Vorteil des Hochdurchsatz-Screenings ist das breite Anwendungsgebiet, zumal kein Vorwissen über die Struktur oder die Beschaffenheit der Bindetasche erforderlich ist, wie etwa beim Struktur-basierten Design oder dem virtuellen Screening.^[213]

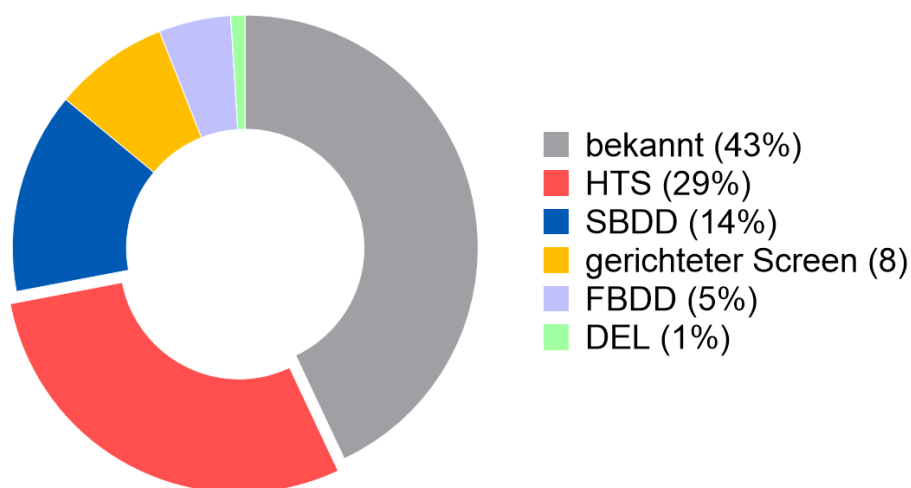


Abbildung 3-38: Verteilung der verwendeten Strategien, die zur Generierung der Leitstrukturen der klinischen Kandidaten, die in den Jahren 2016 und 2017 im *Journal of Medicinal Chemistry* publiziert wurden, geführt haben. Hierbei wurde ein Großteil der klinischen Kandidaten von bekannten Strukturen abgeleitet (bekannt). Neue Leitstrukturen wurden aus dem Hochdurchsatz-Screening (HTS), dem Screening von kleinen Substanzbibliotheken (gerichteter Screen), dem Fragment-basierten Strukturdesign (FBDD), aus *DNA-encoded chemical libraries* (DEL) und dem Struktur-basierten Design (SBDD) erhalten.^[212]

Tatsächlich lässt sich eine Vielzahl zugelassener Wirkstoffe auf Leitstrukturen aus frühen Screening-Kampagnen der 1990er und 2000er Jahre zurückführen, wie beispielsweise die Kinaseinhibitoren Gefitinib, Erlotinib, Sorafenib und Dasatinib.^[214-215]

Die fortschreitende Automatisierung der Prozesse sowie der Einsatz von Robotern in Screening-Einheiten haben in den letzten Jahrzehnten dazu geführt, dass die Datenqualität deutlich verbessert und die Anzahl der getesteten Substanzen bei gleichzeitiger Verringerung des Zeitaufwandes stark erhöht werden konnte. Daher nahm das Screening eine Schlüsselrolle in der frühen Phase der Wirkstoffforschung ein. Aufgrund der Kostenintensität durch die Beschaffung und Instandhaltung des Equipments und der Durchführung der eigentlichen Screening-Kampagnen konnten diese fast ausschließlich im industriellen Umfeld oder in großen gemeinschaftlichen Wissenschaftsprojekten, wie der *European Lead Factory*, durchgeführt werden. Auch im akademischen Bereich ist die Identifikation neuer Leitstrukturmotive und die Generierung qualitativ hochwertiger Daten zur Leitstrukturoptimierung von zentraler Bedeutung. Mit dem Aufbau der semi-automatisierten Screening-Einheit RASPELD (*Robotics-Assisted Screening Platform for Efficient Ligand Discovery*) wird eine Alternative zu komplexen voll-automatisierten Screening-Einheiten vorgestellt, die durch die Implementierung von hochwertigen HTS-Elementen in einen vereinfachten Arbeitsablauf, die Durchführung von Screening-Kampagnen im akademischen Umfeld mit hoher Effizienz innerhalb eines angemessenen Zeitrahmens ermöglicht (siehe Abbildung 3-39 A).^[216] Insgesamt besteht RASPELD aus sechs Kernkomponenten, die nicht nur die Durchführung einer Screening-Kampagne, sondern auch die darauffolgenden zum Teil orthogonalen Hitvalidierungen und Optimierungsstudien einschließen. Ein besonderes Augenmerk bei der Etablierung der Screening-Einheit lag auf der Gewährleistung einer hohen Datenqualität in Verbindung mit einer möglichst einfachen Handhabung. Im Folgenden wird näher auf die sechs Kernkomponenten, (1) die Substanzbibliothek, (2) die Geräte für das Compound-Handling, (3) die Plattform mit verfügbaren Assaytechnologien, (4) die Methoden für orthogonale Folgestudien, (5) die organische Synthese und (6) die integrierte Datenbank eingegangen.

Herzstück einer Screening-Einheit ist die Substanzbibliothek, die mit ihrer Beschaffenheit und Güte den Erfolg einer jeden Screening-Kampagne definiert und limitiert. Die laborinterne Substanzbibliothek umfasst etwa 35 000 Moleküle, die größtenteils kommerziell erworben und durch Substanzen von Kooperationspartnern und der *in-house* Bibliothek erweitert wurden (siehe Abbildung 3-39 B). Die Auswahl der kommerziell erworbenen Moleküle erfolgte unter dem Aspekt der maximalen Diversität mit gleichzeitiger biologischer Relevanz der Substanzen. Hierzu wurde zunächst ein *pan-assay interference compounds* (PAINS) Filter angewendet und in einem nächsten Schritt die Verbindungen hinsichtlich der Lipinski *Rule of five* selektiert. Letztlich wurden die Moleküle ausgewählt, die einen möglichst großen chemischen Raum abdeckten.^[217-218]

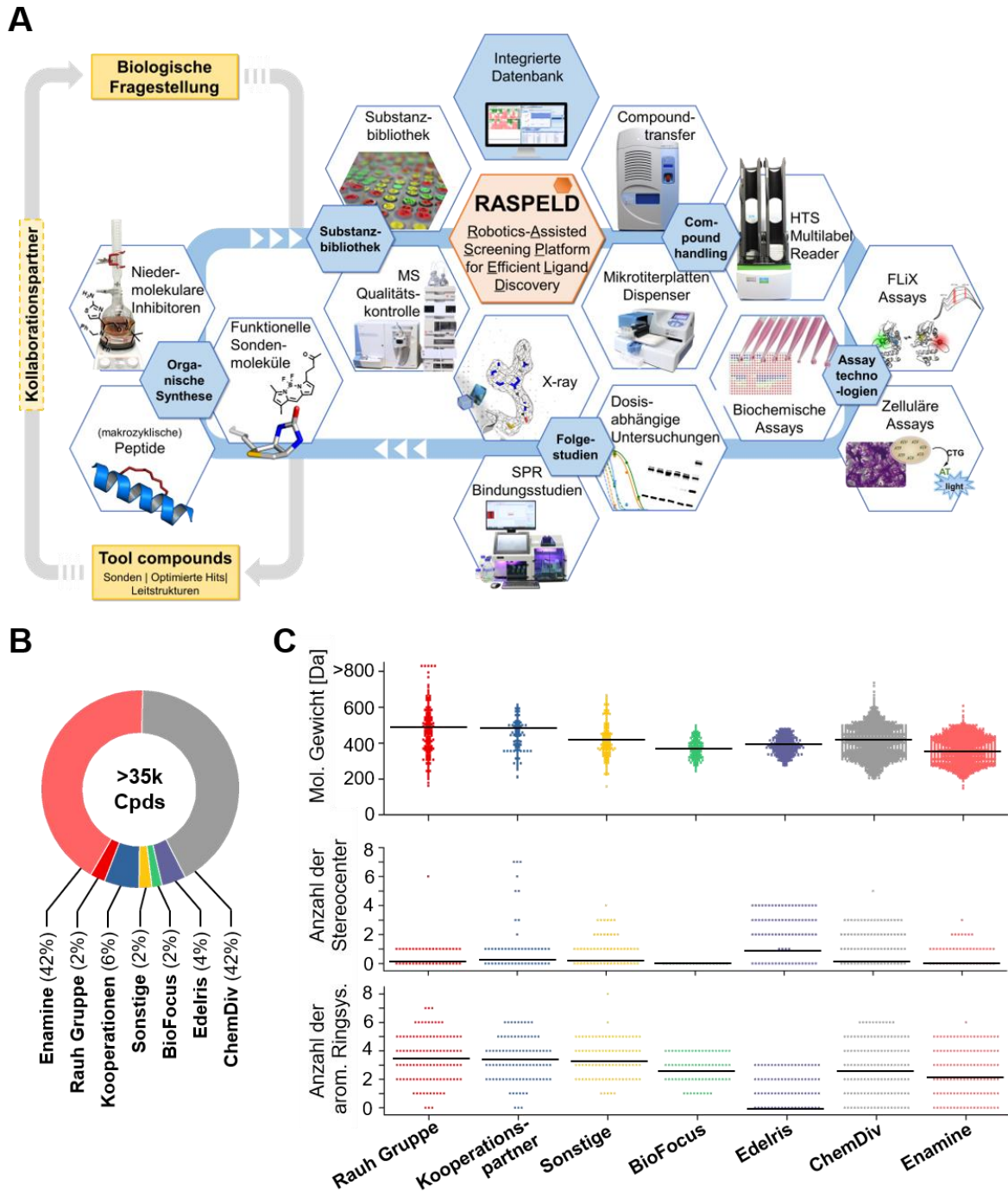


Abbildung 3-39: A: Übersicht über die Kernkomponenten von RASPELD (*Robotics-Assisted Screening Platform for Efficient Ligand Discovery*) und skizzierten Arbeitsablauf einer Screening-Kampagne zur Adressierung von biologischen Fragestellungen im Bereich der Krebsforschung mit den Zielen der Identifikation neuer Leitstrukturmotive, der Leitstrukturoptimierung oder der Generierung von Sondenmolekülen. Die Kernkomponenten stellen die Substanzbibliothek mit über 35 000 Molekülen, die Geräte für das Compound-Handling, die Plattform mit den verfügbaren Assaytechnologien, die Methoden für orthogonale Folgestudien, die organische Synthese und die integrierte Datenbank dar. **B:** Übersicht über die Herkunft der Substanzen, wobei festzuhalten ist, dass der Großteil der Verbindungen kommerziell erworben und durch die *in-house* Bibliothek erweitert wurde. **C:** Vergleich der Verbindungen (aufgeteilt nach Herkunft) in Bezug auf deren Molekulargewicht, die Anzahl der Stereocenter und die Anzahl der aromatischen Ringe. Die Abbildungen wurden nach Wolle *et al.* adaptiert.^[216]

Werden die Substanzen anhand ihrer Herkunft in Gruppen eingeteilt, offenbaren sich distinkte Trends bezüglich des Molekulargewichts, der Anzahl der aromatischen Ringsysteme und der Anzahl der Stereozentren (siehe Abbildung 3-39 C). So weisen beispielsweise die kommerziell erworbenen Verbindungen ein geringeres Molekulargewicht als die Substanzen der *in-house* Bibliothek oder die Substanzen von Kooperationspartnern auf. Dies ist auf die optimierten wirkstoffähnlichen Molekülstrukturen zurückzuführen. Darüber hinaus wird deutlich, dass in einigen Kooperationsprojekten mit Naturstoffen gearbeitet wurde, welches sich in der vergleichsweise hohen Anzahl der Stereozentren widerspiegelt. Um die Diversität der Substanzbibliothek unter dieser Prämisse zu erweitern, wurden *sp*³-reiche Substanzen der Firma Edelris erworben, die vergleichsweise wenige aromatische Ringsysteme beinhalten. Das Compound-Management, angefangen bei der Registrierung der Substanzen, der Vergabe von 2D-Barcodes, dem Erstellen von Stock-Lösungen über die Generierung von Mikrotiterplatten für Assay-Experimente bis hin zur Langzeitlagerung der Substanzen, wurde in Zusammenarbeit mit der COMAS- (*Compound Management and Screening*) Gruppe am MPI Dortmund durchgeführt. Einen zentralen Aspekt nimmt hierbei die Qualitätskontrolle bezüglich der Reinheit und Identität der kommerziell erworbenen Substanzen ein und wird durch LC/MS Analysen regelmäßig überprüft. Die anschließende Lagerung der vorbereiteten Assay-Mikrotiterplatten erfolgt laborintern bei -80 °C.

In dem laboreigenen Screening-Labor erlauben mehrere Mikrotiterplatten Dispenser (Thermo Fisher), der ECHO 520 Liquid Handler (LabCyte) und zwei Plattenlesegeräte (Envision Multimode Plate Reader (PerkinElmer) und der Infinite M1000 Micro Plate Reader (Tecan)) das Screening im Hochdurchsatz-Format. Die Mikrotiterplatten Dispenser ermöglichen den robusten, schnellen Transfer von Protein- und Pufferlösungen sowie Zellsuspensionen im μ L-Maßstab und erlauben so das zeitgleich Arbeiten mit vielen Mikrotiterplatten. Der Compound-Transfer von den vorbereiteten Mikrotiterplatten in die eigentlichen Assay-Platten wird kontaktlos mit dem ECHO 520 Liquid Handler vorgenommen, wobei mithilfe von akustischen Signalen präzise Tropfen im nL-Bereich von der einen in die andere Platte überführt werden. Weiterhin ermöglicht der ECHO 520 Liquid Handler den Gebrauch von verschiedenen Plattenformaten und wird beim Primärscreen, wobei meist einzelne Konzentrationen der Verbindungen transferiert werden und auch innerhalb von Folgestudien zur Generierung von seriellen Verdünnungsreihen der Verbindungen eingesetzt. Die Vorteile eines solchen Systems sind vielzählig, zum einen wird ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit erreicht, zum anderen wird vergleichsweise wenig von der zu untersuchenden Substanz verbraucht und zusätzlich ist der Zeitumfang für die Generierung von beispielsweise 22 seriellen Verdünnungsreihen mit 10 min. sehr gering.

Außerdem bieten die vorhandenen Plattenlesegeräte ein breites Anwendungsspektrum und sind mit diversen Assaytechnologien kompatibel,

sodass das Auslesen von Fluoreszenzintensitäten, der Fluoreszenzpolarisation, zeitaufgelöster Fluoreszenz (TRF) und TR-FRET, Lumineszenz und der Absorption möglich ist. Im Vergleich zu industriellen Screening-Plattformen wurde an dieser Stelle bewusst auf die automatische Roboter-gestützte Vernetzung der einzelnen HTS-Elemente verzichtet, die sich als sehr wartungs- und kostenintensiv darstellt. Die Kernkomponenten, d.h. die Mikrotiterplatten Dispenser, der ECHO 520 Liquid Handler und die zwei Plattenlesegeräte entsprechen dem neusten industriellen Standard. Wie zuvor beschrieben, wurden alle Elemente innerhalb der Screening-Einheit hinsichtlich eines breiten Anwendungsspektrums ausgewählt, sodass diverse Mikrotiterplatten-Formate verwendet werden können und eine Kompatibilität mit verschiedenen Assaytechnologien auf biochemischer und Zell-basierter Ebene geboten wird. Aufgrund der bearbeiteten Fragestellungen in unserem Arbeitskreis, wird häufig auf aktivitätsbasierte Testsysteme wie dem kommerziell erhältlichen HTRF KinEASE Assay (CisBio) oder den ADP-Glo Kinase Assay (Promega) zurückgegriffen. Für Zell-basierte Untersuchungen wird der Viabilitäts-basierte CTG Assay (Promega) herangezogen. Zusätzlich konnten in den letzten Jahren laborintern verschiedene Assaysysteme zur Detektion von Konformationsänderungen, die mit einer Ligandenbindung einhergehen, für verschiedene Proteinklassen wie Kinasen, Phosphatasen und Kernrezeptoren etabliert werden, die auch HTS-fähig sind.^[179, 219-222] Weiterführende nicht HTS-fähige Untersuchungsmethoden wie beispielsweise die Durchführung von Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR), Western-Blot Analysen oder die Proteinkristallographie stehen für detaillierte Validierungsstudien zur Verfügung. Letztendlich können mithilfe der organischen Synthese kleine fokussierte Substanzbibliotheken generiert werden, um initiale Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu erstellen und diese dann in weiteren Optimierungszyklen zu elaborieren. Um die Ergebnisse aus Screening-Experimenten und Leitstrukturoptimierungen zuverlässig, effizient und schnell zu verarbeiten und mit bereits vorhandenen Informationen zu verknüpfen, wurde die Quattro Datenbank (Quattro Research) installiert, die aus verschiedenen Modulen besteht. So werden in einem Modul alle Substanzen erfasst, mit einem anderen werden die Assays verwaltet und in ein weiteres Modul enthält die Analyse-Software. Die Datensicherheit wird durch eine Firewall und ein regelmäßiges Backup der Daten gewährleistet.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit der semi-automatisierten Screening-Einheit RASPELD eine akademische Plattform etabliert wurde, die es ermöglicht effektiv, in einem angemessenen Zeitraum, robuste Screening-Kampagnen durchzuführen.

3.4.3. HTS zur Identifizierung von EGFR-C797S Inhibitoren

Um neuartige Grundgerüste für Inhibitoren zur Überwindung der Osimertinib-resistenten EGFR-AM/T790M/C797S Variante zu identifizieren, wurde die laboreigene Substanzbibliothek (>30 000 Compounds) nach aktiven Verbindungen durchmustert.^{*****} Aufgrund der schlechten Translation von biochemischer Aktivität in zelluläre Potenz, die in vorangegangenen Studien beobachtet wurde, wurde auf ein zelluläres Verfahren zurückgegriffen. Zelluläre Screening-Kampagnen sind deutlich zeitintensiver und komplexer als beispielsweise biochemische Ansätze, allerdings bieten sie den Vorteil, dass die untersuchten Zielproteine unter physiologischen Bedingungen getestet und gleichzeitig auch Daten hinsichtlich der Toxizität und Zellpermeabilität der Substanzen erhoben werden können. Im Rahmen dieses Projekts wurde die PC9-T790M/C797S Zelllinie als Zielstruktur verwendet, die durch CRISPR/Cas9 Genom-Editierung einer PC9-Zelllinie generiert und freundlicherweise von der AG Sos zur Verfügung gestellt wurde.^{†††††} Um den Einfluss der EGFR-C797S Mutation weiter zu eruieren, wurde die PC9-T790M Zelllinie als Referenz ebenfalls im Screening untersucht. Zur Durchmusterung wurde der Viabilitätsassay CTG (Promega) verwendet, der auf der Quantifizierung des Adenosintriphosphat Gehalts basiert, der sich proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen verhält. Die verwendete Infrastruktur wurde im vorherigen Kapitel erläutert, welche die Verwendung von Mikrotiterplatten mit 384 und 1536 Kavitäten erlaubt. Dabei würde die Verwendung von Letzteren mit einer deutlichen Reduktion der benötigten Verbrauchsmaterialien einhergehen. Erste Testreihen in diesem Format im zellulären Kontext führten jedoch zu deutlichen Randeffekten und erlaubten keine adäquate Analyse der Daten, sodass die Screening-Kampagne in Mikrotiterplatten mit 384 Kavitäten durchgeführt wurde. Zusätzlich ergibt sich aus der Tatsache, dass die Verbindungen in Einzelmessungen bei 5 µM evaluiert wurden, eine Anzahl von 82 Mikrotiterplatten pro Zelllinie und somit insgesamt 164 Mikrotiterplatten. Durch den limitierten Platz im Inkubator musste die Durchmusterung auf 8 Etappen aufgeteilt werden. Um die Vergleichbarkeit der Daten und die Aussagekraft eines jeden Assayexperiments nachvollziehen zu können, wurde der sog. Z'-Faktor ermittelt. Dieser ergibt sich durch die Messung von Positiv- und Negativkontrollen aus folgender Formel:

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|} \quad (11)$$

σ = Standardabweichung (p : Positivkontrolle; n : Negativkontrolle)

μ = Mittelwert (p : Positivkontrolle; n : Negativkontrolle)

^{*****} Durchführung des Screens durch H. Tumbrink (AG D. Rauh, TU Dortmund).

^{†††††} Generierung der Zelllinien durch D. Plenker (AG M. Sos, Abteilung für Translationale Genomik, Universitätsklinik Köln)

Im Allgemeinen ist davon auszugehen, dass Z' -Faktoren zwischen 0.5 und 1 verlässliche und stabile Daten indizieren, wobei in diesem Screen lediglich Assayexperimente mit $Z' \geq 0.6$ berücksichtigt wurden.^[223] Tatsächlich wurde ein durchschnittlicher Z' -Faktor von 0.75 erreicht, der den industriellen Standards entspricht (siehe Abbildung 3-40 A).

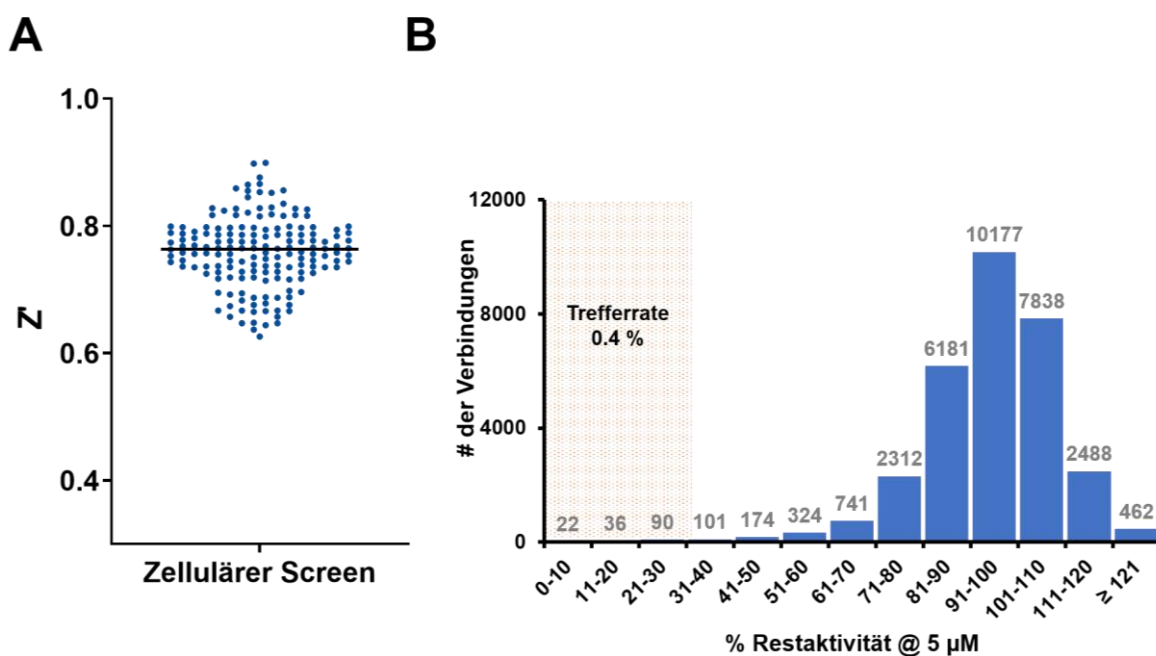


Abbildung 3-40: Beurteilung und Analyse des Primärscreens. **A:** Auftragung der Z' -Faktoren der einzelnen Screening-Experimente, die die Stabilität und Güte der Daten bestätigen (\bar{Z} -Faktor = 0.75). **B:** Verteilung der Aktivitäten der getesteten Substanzen gegenüber der PC9-T790M/C797S Zelllinie. Alle Verbindungen mit Restaktivitäten $\leq 30\%$ wurden als Treffer gewertet.

Alle Verbindungen, die eine Reduktion der Zellviabilität von $\geq 70\%$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bewirkten, wurden als Treffer definiert. Bei dem Screening der PC9-T790M/C797S Zelllinie galt dies für 148 Verbindungen und im Fall der PC9-T790M Zelllinie erreichten 136 Substanzen eine Restaktivität von $\leq 30\%$ (siehe Abbildung 3-41, Abbildung 5-6). Weiterhin erscheint die gewählte Screening-Konzentration von 5 μM sinnvoll zu sein, da viele Verbindungen keinerlei Einfluss auf die Proliferation der Zellen zeigten und eine unselektive Inhibition so minimiert werden konnte.

Unter den Trefferverbindungen wurden Grundgerüste wie Pyrimidine, Pyridine, Harnstoff-Derivate und Pyrazole gefunden, die in klassischen Tyrosinkinase-Inhibitoren ebenfalls vorliegen, dort aber ein anderes Substitutionsmuster aufweisen.^[224-226] Des Weiteren konnten die übrigen Trefferverbindungen anhand ihrer funktionellen Gruppen, wie beispielsweise einer Sulfonamid-Funktion, Amidfunktion oder einer Nitro-Gruppe, verschiedenen Serien zugeordnet werden.

Zur Validierung der primären Screening-Daten und zur Beurteilung der Toxizität der Treffersubstanzen wurden EC_{50} -Werte gegenüber sechs verschiedenen Zelllinien ermittelt.#### Dazu wurde die Potenz gegenüber den EGFR-mutierten Zelllinien (PC9, PC9-T790M und PC9-T790M/C797S) determiniert, wobei die die A431, A549 und die H358 Zelllinien als Toxizitäts-Kontrollen herangezogen wurden. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde eine Clusteranalyse mit Hilfe des Programms SARANEA für jede einzelne Zelllinie vorgenommen, wobei die strukturelle Ähnlichkeit der getesteten Verbindungen anhand von *Fingerprints* berechnet, die Moleküle Clustern zugewiesen und mit der entsprechenden Aktivität, die über einen Farbschema dargestellt wurde, verknüpft wurden.^[227] Darüber hinaus wurde für einen globalen Vergleich der Daten eine Heatmap mit einem Dendrogramm gekoppelt. Dazu wurde anhand der *Fingerprints* eine Distanzmatrix basierend auf dem Tanimoto-Koeffizienten in KNIME generiert und über einen Dendrogramm dargestellt.^[228-229] Durch die Clusteranalyse der PC9-T790M/C797S Daten stellte sich heraus, dass die selektierten Verbindungen eine diverse und inhomogene Gruppe bilden und sich nur wenige Substanzen tatsächlich zu einem Cluster zusammenfügen (siehe Abbildung 3-41). Außerdem ist auffällig, dass eine Vielzahl der Moleküle, die im initialen Screen bei 5 μ M die Viabilität der Zellen deutlich eingeschränkt haben, innerhalb der EC_{50} -Bestimmungen keinerlei Aktivität zeigten und somit ein sog. falsch positives Messergebnis hervorriefen. Darunter befanden sich ein Großteil der Sulfonamide und Verbindungen, die eine Amidfunktion tragen (siehe Abbildung 3-41 und Abbildung 3-42). Durch eine genauere Betrachtung der Treffersubstanzen hinsichtlich reaktiver toxogener Gruppen oder Funktionen, die mit dem Assay Signal interferieren, wurden weitere Verbindungen für Folgeuntersuchungen ausgeschlossen.^[217, 230-231] Hierzu gehören aromatische Nitro-Verbindungen, die für ihre kanzerogene Wirkung bekannt sind und alkylierende Substanzen, die Micheal-Akzeptorsysteme tragen und innerhalb der Hitvalidierung eine erhöhte Potenz gegenüber EGFR-WT Zelllinien zeigten.^[232-235] Als weitere promiskuitive Verbindungen fielen Pyrazole und Thiazole und hier insbesondere 2-Aminothiazole auf, für die EC_{50} -Werte im submikromolaren Bereich sowohl gegenüber den EGFR-mutierten Zelllinien als auch gegenüber den EGFR-WT Zelllinien festgestellt wurden.^[236] Außerdem wurde eine EGFR-WT Aktivität in Verbindung mit Triazolo-Thiadiazinen wie beispielsweise dem RSL8894 beobachtet, die bisher nicht als sog. *frequent hitter* in Erscheinung getreten sind (siehe Abbildung 3-43 und Tabelle 3-8). Jegliche Substanzen, die ein vergleichbares Profil zeigten und keine Selektivität hin zu den EGFR-mutierten Zelllinien aufwiesen, wurden nicht weiterverfolgt.

Durchführung der Validierungsexperimente durch H. Tumbrink und M. Keul (AG D. Rauh, TU Dortmund)

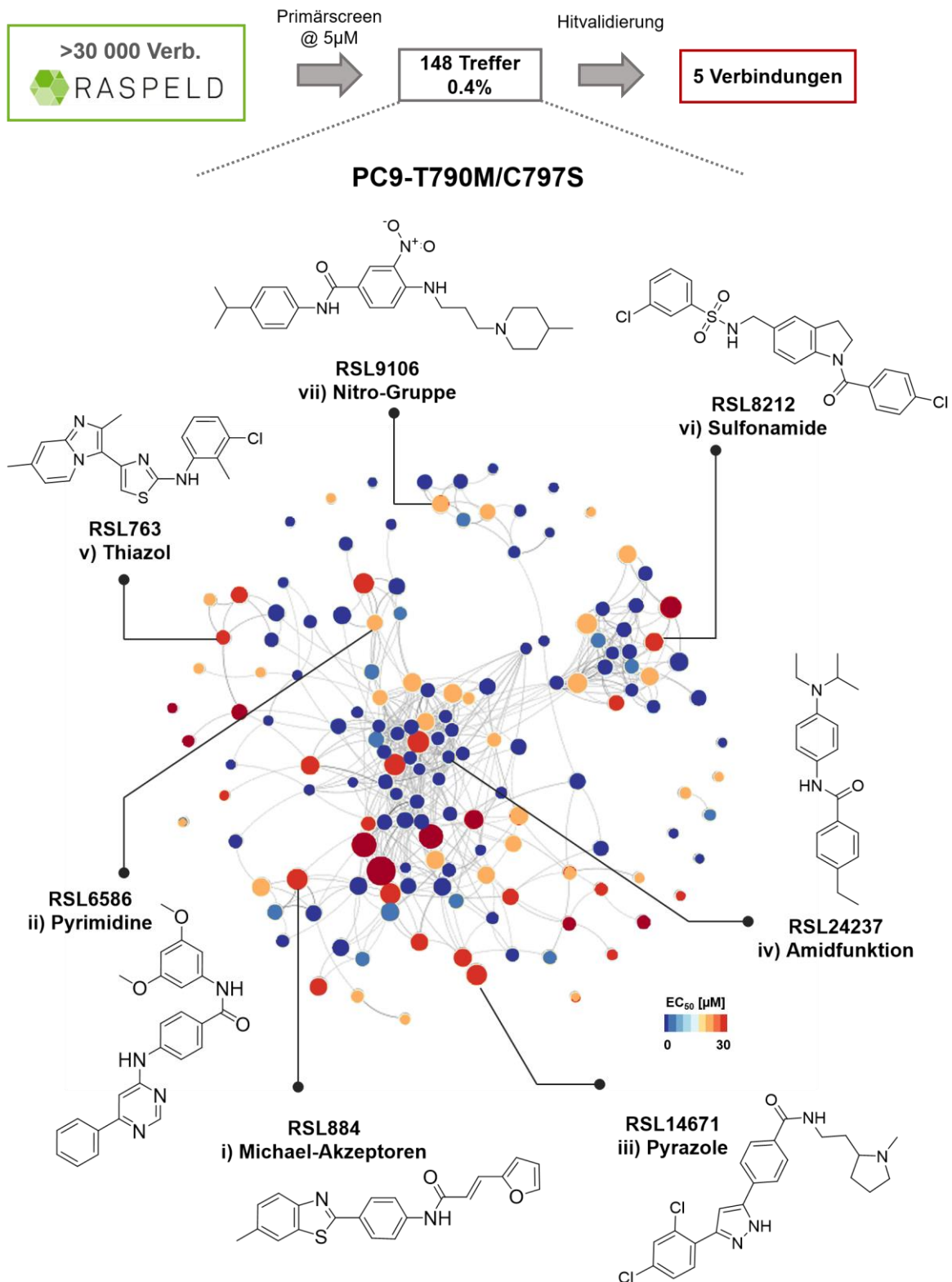


Abbildung 3-41: Übersicht über den Screening-Prozess (oben) und das Clustering der Hitstrukturen (unten). Ursprünglich wurden mehr als 30 000 Substanzen auf der PC9-T790M/C797S Zelllinie bei 5 µM getestet. Die Verbindungen mit einer Restaktivität $\leq 30\%$ wurden als Treffer gewertet und in Validierungsexperimenten untersucht. Das Clustering der Hitverbindungen erfolgte anhand der chemischen Ähnlichkeit mit Hilfe des Programms SARANEA, wobei die zelluläre Aktivität anhand der Farbe illustriert wird.^[227] Die gleichzeitige Testung der Substanzen auf EGFR-WT Zelllinien ermöglichte die Beurteilung der Zytotoxizität der Verbindungen, sodass schlussendlich 5 interessante Strukturen gefunden wurden.

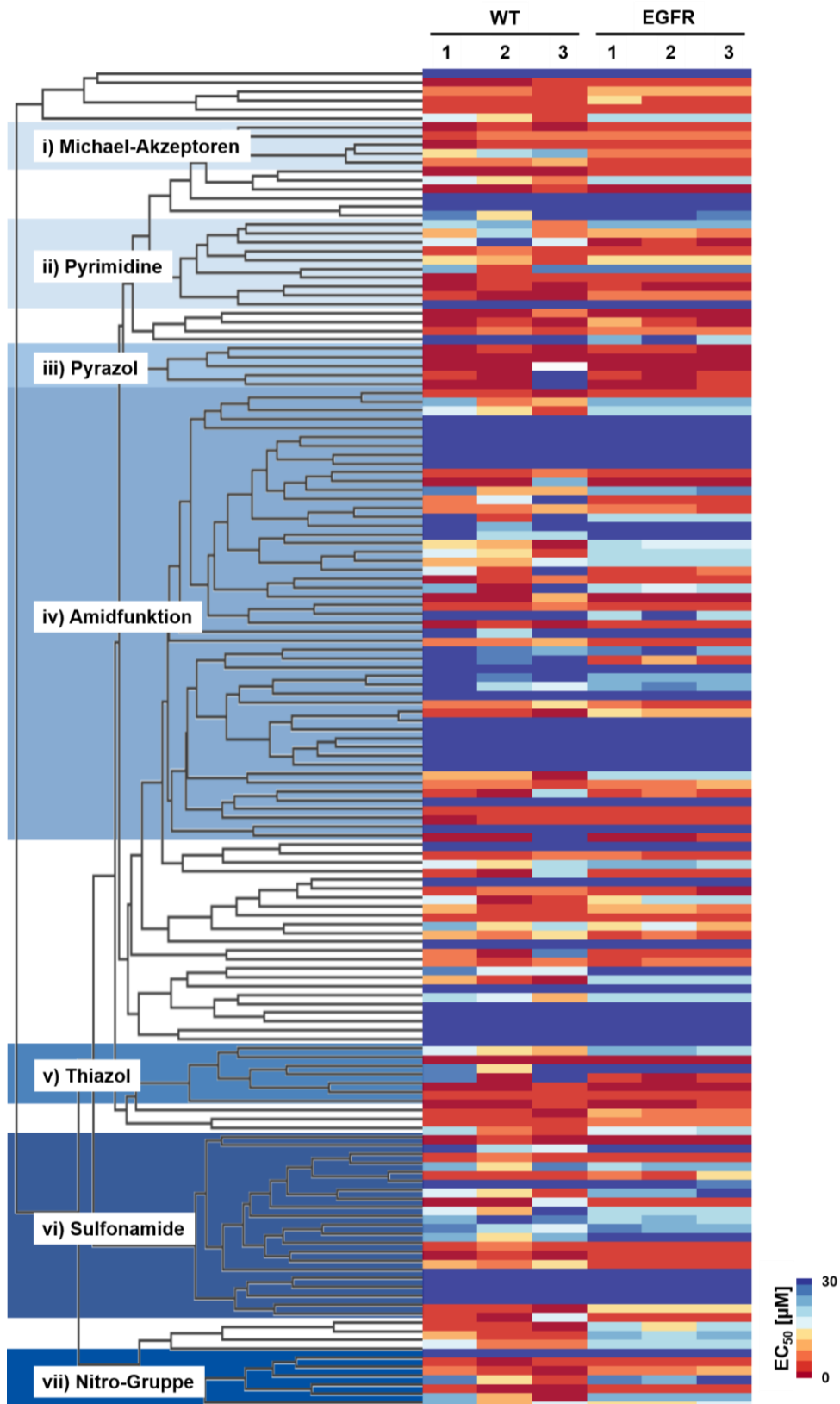


Abbildung 3-42: Dendrogramm mit kombinierter Heatmap zur Visualisierung der Ergebnisse der Hitvalidierung. Alle Substanzen mit einer Restaktivität $\leq 30\%$ wurden auf drei EGFR-WT Zelllinien (1: A431, 2: A549, 3: H358) und drei EGFR-mutierten Zelllinien (1: PC9, 2: PC9-T790M, 3: PC9-T790M/C797S) getestet. Der EC_{50} -Wert wird durch einen Farbcode wiedergegeben, wobei die Rohdaten im Anhang (Tabelle 5-5) hinterlegt sind. Das Dendrogramm wurde mit KNIME generiert, wobei zuerst eine Distanzmatrix anhand der *Fingerprints* erstellt wurde.^[228]

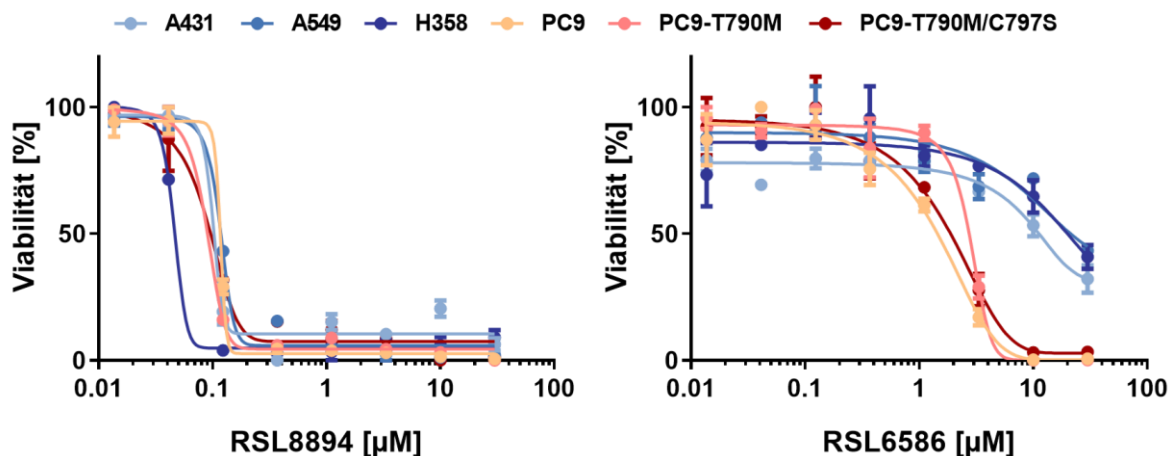
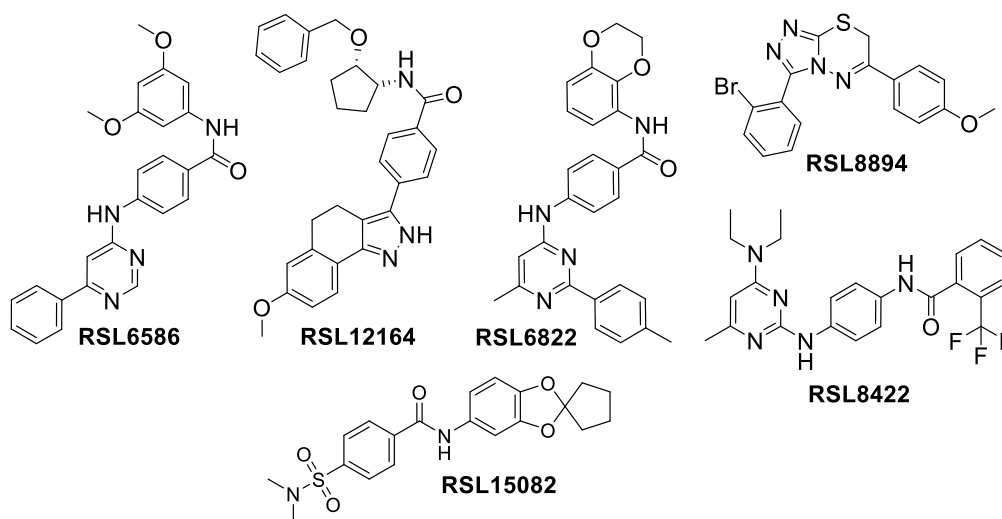


Abbildung 3-43: Repräsentative Dosis-Wirkungskurven, die im Zuge der Hitvalidierung aufgenommen wurden. Es werden Ergebnisse einer unselektiven Verbindung gezeigt (links), die eine sehr hohe zelluläre Potenz gegenüber den evaluierten Zelllinien zeigt und EC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich erzielt. Die schlechte Selektivität führte hier zum Ausschluss von weiteren Evaluierungsstudien. Auf der anderen Seite konnten Verbindungen identifiziert werden, die im moderaten mikromolaren Bereich die EGFR-mutierten Zellen beeinflussten und keine zelluläre Aktivität gegenüber den EGFR-WT Zelllinien demonstrierten.

Insgesamt konnten fünf Verbindungen identifiziert werden, welche die Viabilität der EGFR-mutierten Zelllinien einschränkten, gleichzeitig aber keinerlei Aktivität gegenüber den EGFR-WT Zellen demonstrierten (siehe Abbildung 3-43 und Tabelle 3-8). Darunter befinden sich drei Substanzen mit einem Aminopyrimidin-Grundgerüst, das in bekannten Drittgenerationsinhibitoren das Scharnierregion-bindende Element darstellt. Auch in diesen Fällen ist es wahrscheinlich, dass die Verbindungen über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem *N1/N3*-Stickstoff des Aminopyrimidins und dem Peptidrückgrat des Met793 an die Scharnierregion der Kinase koordinieren. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit der Substanzen mit dem Referenzinhibitor sind diese weniger interessant für weitere Optimierungsstudien. Dennoch ist zu erwähnen, dass RSL6586 eine höhere zelluläre Potenz als Osimertinib gegenüber der PC9-T790M/C797S Zelllinie demonstriert und das obwohl es sich hier um eine initiale Trefferverbindung handelt, die noch nicht optimiert wurde. Interessante Grundgerüste weisen hingegen die beiden moderat aktiven Verbindungen RSL12164 und RSL15082 auf, wobei RSL12164 eine 4,5-Dihydro-1*H*-Benzindazol und RSL15082 eine 1,4-Dioxaspiro[4.4]Nonane Grundstruktur trägt, die als solche noch nicht als EGFR-bindende Elemente beschrieben wurden. Auch die Selektivität gegenüber den EGFR-WT Zelllinien ist vielversprechend. Obwohl die selektierten Verbindungen zelluläre Aktivität zeigten, konnte in anschließenden biochemischen Untersuchungen mit der isolierten Kinasedomäne von EGFR keine inhibitorische Aktivität der Verbindungen beobachtet werden. Ob es sich bei den identifizierten Substanzen tatsächlich um EGFR-Modulatoren handelt, die nicht die Kinaseaktivität, sondern Prozesse wie die Dimerisierung beeinflussen, oder ob die Verbindungen andere Proteine adressieren, gilt es in weiterführenden SPR- oder Western-Blot Studien zu klären.

Tabelle 3-8: Zelluläre Charakterisierung einzelner Verbindungen innerhalb der Hitvalidierung gegen verschiedene EGFR-mutierte und EGFR-WT Zelllinien. Dargestellt ist der EC₅₀-Wert, der in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten ermittelt wurde; n.b.= nicht bestimmt.



Verb.	EGFR WT CTG	EGFR CTG
	EC ₅₀ [nM]	EC ₅₀ [nM]
	A431 A549 H358	PC9 PC9-T790M PC9-T790M/C797S
RSL6586	17490 ± 8630 >30000 18160 ± 16744	1362 ± 703 2983 ± 1370 1225 ± 622
RSL6822	8243 ± 1913 18002 ± 11469 >30000	2345 ± 1053 3929 ± 472 2233 ± 408
RSL8422	9900 ± 1246 6635 ± 931 12273 ± 4239	4158 ± 442 5296 ± 524 4127 ± 808
RSL8894	96 ± 27 156 ± 60 73 ± 22	123 ± 20 97 ± 2 197 ± 42
RSL12164	>30000 >30000 >30000	5077 ± 1513 8437 ± 2501 4697 ± 1094
RSL15082	8740 ± 2120 6140 ± 940 14000 ± 2370	2680 ± 790 4010 ± 790 2590 ± 200
Afatinib	634 ± 312 1490 ± 430 1330 ± 515	<14 427 ± 300 4000 ± 780
Osimertinib	890 ± 430 1830 ± 260 2840 ± 360	32 ± 15 <14 3060 ± 636

3.4.4. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Screening-Plattform RASPELD erfolgreich etabliert wurde und durch die Implementierung von einzelnen hochwertigen HTS-Elementen in einen vereinfachten Arbeitsablauf, die Durchführung von aussagekräftigen Screening-Kampagnen im akademischen Umfeld ermöglicht.^[216] Ein erster zellulärer Screen wurde mit dem Ziel der Identifikation neuer Leitstrukturelemente gegenüber der Osimertinib-resistenten EGFR-AM/T790M/C797S Variante vorgenommen. Die dabei generierten Daten wiesen eine hohe Güte auf, die sich in einem durchschnittlichen Z'-Faktor von 0.75 widerspiegelte. Ebenfalls erscheint eine Trefferrate von 0.4% nachvollziehbar und entspricht publizierten Daten aus der Industrie. Darüber hinaus konnten in Hitvalidierungsstudien fünf Substanzen identifiziert werden, die einen möglichen Ansatz für weitere Untersuchungen darstellen. Weiterhin konnte mit dem RSL6586 eine Verbindung erhalten werden, die keinerlei Aktivität gegenüber EGFR-WT Zellen aufweist und gleichzeitig die Osimertinib-resistente Zelllinie PC9-T790M/C797S effektiver inhibiert als Osimertinib. Problematisch ist jedoch die Tatsache, dass in biochemischen Testungen keine Trefferverbindung eine inhibitorische Aktivität gegenüber diversen EGFR-Formen zeigte. Aus diesem Grund sollten Western-Blot Studien folgen oder gegebenenfalls andere Zielstrukturen der Verbindungen in Betracht gezogen werden.

3.5. Charakterisierung der wirkstoffresistenten EGFR-G724S Variante

3.5.1. Hintergrund

Eine große Herausforderung bei der Behandlung von NSCLC-Patienten mit zielgerichteten Kinaseinhibitoren bleibt der Umgang mit wiederkehrenden Resistenzmutationen. Obgleich in verschiedenen Phase-III-Studien Ansprechraten von 70% in NSCLC-Patienten mit Aktivierungsmutationen in EGFR auf die Erstgenerationsinhibitoren Gefitinib und Erlotinib, aber auch auf den Zweitgenerationsinhibitor Afatinib beobachtet werden konnten, erleiden nahezu alle Patienten ein Rezidiv, das in 60% der Fälle auf die Entwicklung einer sekundären Punktmutation (T790M) innerhalb der Kinasedomäne von EGFR zurückzuführen ist.^[42, 184, 186, 237-238] Drittgenerationsinhibitoren, wie beispielsweise Osimertinib, wurden für die Adressierung dieser EGFR-T790M Mutante entworfen und konnten in klinischen Studien Ansprechraten von bis zu 71% im Kontext der T790M-Mutation erreichen.^[63, 239] Aufgrund der guten Verträglichkeit und hohen Wirksamkeit wurde Osimertinib kürzlich auch als Erstlinientherapeutikum in EGFR-mutiertem NSCLC ohne T790M-Mutation zugelassen,^[77] aber auch hier treten Resistenzmutationen auf, die einen Rückfall verursachen. Der häufigste Resistenzmechanismus ist die Substitution des reaktiven Cysteins (Cys797) zu einem Serin, wodurch die kovalente Modifikation des Proteins durch den Inhibitor nicht möglich ist und der Inhibitor an Wirksamkeit verliert (siehe Abbildung 3-44 D).^[155, 240] Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Universitätsklinik Köln wurde eine weitere neuartige Mutation innerhalb der Kinasedomäne von EGFR nach der Behandlung von NSCLC-Patienten mit Osimertinib identifiziert, deren zugrunde liegender resistenzvermittelnder Mechanismus noch nicht bekannt war. Dabei handelte es sich um die Substitution des Glycins an Position 724 durch ein Serin, das in vier Patienten nach dem Fortschreiten der Tumorerkrankung unter Osimertinib-Behandlung nachgewiesen wurde. Bis heute wurde das Auftreten dieser Mutation in drei weiteren Fallberichten beschrieben, die im Kontext der Progression unter Osimertinib-Behandlung in NSCLC-Patienten auftraten.^[241-243] Unsere Studie basiert auf vier Patienten, die initial mit Aktivierungsmutationen in EGFR diagnostiziert wurden und eine Behandlung mit Erstgenerationsinhibitoren oder Chemotherapien bis zum Fortschreiten des Tumorwachstums und der Identifikation der sekundären Mutation T790M in EGFR erhielten. Drei Patienten wurden daraufhin unmittelbar innerhalb der AURA Studie mit Osimertinib behandelt und ein Patient wurde zunächst mit EGF816, nach erneutem Rezidiv aber auch mit Osimertinib therapiert. Durch NGS (*Next-generation sequencing*) des entnommenen Tumorgewebes der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose, sowie vor und nach der Behandlung mit Osimertinib konnte der Mutationsstatus der Patienten genau verfolgt werden (siehe Abbildung 3-44 A und B).

Interessanterweise konnten in zwei Patienten schon vor Beginn der Therapie mit Osimertinib niedrige Level der EGFR-G724S Mutation nachgewiesen werden, wohingegen in den anderen beiden Patienten die EGFR-G724S Mutation erst nach der Gabe von Osimertinib beobachtet wurde. Festzuhalten ist, dass in allen vier Fällen nach der Behandlung mit Osimertinib ein hoher bzw. gesteigerter Level der G724S-Mutation festgestellt werden konnte, der mit einem Verlust der sekundären EGFR-T790M Mutation einherging (siehe Abbildung 3-44 A). Eine übergreifende Analyse der Biopsie Ergebnisse von insgesamt 30 Patienten, die innerhalb von klinischen Studien mit Drittgenerationsinhibitoren wie Osimertinib, Rociletinib und EGF816 an der Universitätsklinik Köln therapiert wurden, ergab eine Prävalenz der G724S-Mutation von 12.5%, die damit noch häufiger auftrat als die zuvor beschriebene C797S-Mutation mit einer Prävalenz von 10% (siehe Abbildung 3-44 C). Weiterhin ist das Gly724 ein Bestandteil der Glycin-reichen Schleife, die ein hochkonserviertes Strukturmotiv innerhalb der Familie der Kinasen darstellt und die variable Region zwischen dem β 1- und β 2-Faltblatt der Kinase bildet (siehe Abbildung 3-44 D).^[244-245] Zusammen mit der α C-Helix und der Aktivierungsschleife ist die Glycin-reiche Schleife entscheidend an der Regulation der Kinaseaktivität beteiligt.^[245] Durch das Vorhandensein der drei Glycine zeichnet sich die Glycin-reiche Schleife durch eine hohe Flexibilität aus und ist in der Lage sich nach der Bindung des Co-faktors ATP über diesen zu falten und die Bindung zu stabilisieren. Mutationen innerhalb dieses essentiellen Sekundärstrukturelements wurden bereits in ABL identifiziert und sind dort mit einer Stabilisierung der Kinase in einer Konformation assoziiert, die keine Bindung des Wirkstoffs Imatinib zulässt.^[246-247] Bemerkenswert ist, dass die G724S-Mutation lediglich im Kontext mit aktivierenden Deletionsmutationen in Exon19 und nicht mit der Punktmutation L858R identifiziert wurde, wobei die Aktivierungsmutationen (del19 und L858R) in etwa die gleiche Prävalenz aufweisen.^[4, 182] Insbesondere ist das aufgrund der räumlichen Nähe der initialen Aktivierungsmutation EGFR-del19 und der erworbenen Mutation EGFR-G724S interessant und lässt die Vermutung zu, dass die sekundäre Mutation G724S-Mutation explizit einen Einfluss auf das Interaktionsnetzwerk der EGFR-del19 Mutante, aber nicht auf das Interaktionsnetzwerk der EGFR-L858R Mutante ausübt (siehe Abbildung 3-44 D).

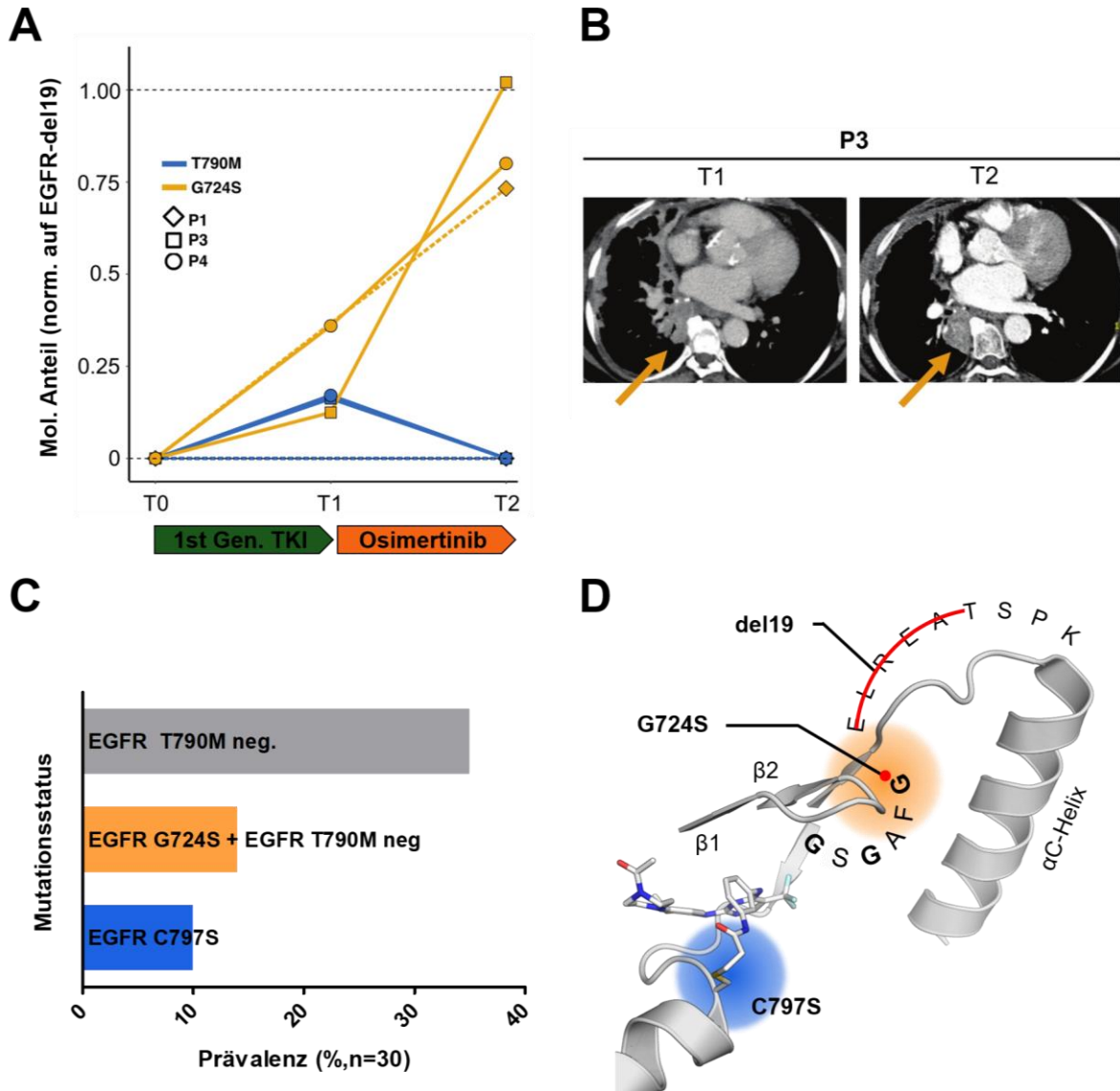


Abbildung 3-44: Auftreten der G724S-Mutation in NSCLC-Patienten nach der Behandlung mit dem Drittgenerationsinhibitor Osimertinib. **A:** Graphische Auftragung der Molekularen Fraktionen von EGFR-T790M und EGFR-G724S (normalisiert auf EGFR-del19) zum Zeitpunkt der Diagnose (T0), vor (T1) und nach der Behandlung (T2) mit Osimertinib, die in Patient P1, P3 und P4 beobachtet wurden. **B:** CT-Scans des Patienten 3, die vor der Behandlung (T1) und nach der Behandlung (T2) mit Osimertinib aufgenommen wurden. Die gelben Pfeile markieren Position, an denen die Biopsien entnommen wurden. **C:** Säulendiagramm, das die Anteile der aufgetretenen EGFR-Resistenzmutationen (C797S; G724S) im Vergleich zu EGFR-T790M neg. Resistenzmutationen zeigt (n=30). **D:** Darstellung der Positionen der Resistenzmutationen (EGFR-C797S; EGFR-G724S) und der ursprünglichen Aktivierungsmutation (del19) innerhalb der Bindetasche von EGFR (PDB:5UWD).

Im Rahmen der Zusammenarbeit von Fassunke, Müller, Keul, Michels, Dammert und Schmitt *et al.*^[248] sollte eine umfassende Charakterisierung der erworbenen G724S-Mutation innerhalb der Kinasedomäne von EGFR vorgenommen werden.

Ausgehend von den NGS-Ergebnissen §§§§§§ , wurden systematische Untersuchungen zur Bestätigung der resistenzvermittelnden Wirkung der Mutation *in vitro* und *in vivo* durchgeführt. Die Durchmusterung einer fokussierten Substanzbibliothek sollte weiterhin Einblicke und mögliche Ansatzpunkte zur Adressierung dieser EGFR-Variante ergeben. Darüber hinaus erfolgten detaillierte Bindungsstudien, weiterführende Zell-basierte Untersuchungen ***** , Computergestützte Analysen ††††††† und *in vivo* Studien ‡‡‡‡‡‡‡ zur Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus. Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse vorgestellt und diskutiert.

3.5.2. EGFR-G724S – eine Resistenzmutation

Um die Relevanz der identifizierten EGFR-Mutation zu testen, wurden zunächst verschiedene Kombinationen der EGFR-Mutationen (del19 und G724S) in NIH-3T3 Zellen überexprimiert, für 24 h mit Osimertinib inkubiert und mittels Western-Blot analysiert.***** Obwohl in den Patienten diverse Deletionsmutationen identifiziert wurden, wurde in allen folgenden Experimenten die del746_750 Mutation als repräsentative del19-Mutation verwendet. Die Behandlung der EGFR-del19 Zellen mit Osimertinib resultierte in einem starken Rückgang des pEGFR-Levels bei einer Inhibitor-Konzentration von 0.3 µM (siehe Abbildung 3-45 A). Die hohe klinische Wirksamkeit von Osimertinib gegenüber EGFR-Aktivierungsmutanten konnte somit in diesem System abgebildet werden. Dahingegen führte die Einführung der G724S-Mutation in EGFR, alleine oder in Kombination mit der del19-Mutation, zu einem erheblichen Aktivitätsverlust des Drittgenerationsinhibitors. In einem orthogonalen Zell-basierten Assaysystem sollten diese Ergebnisse untermauert werden. Hierzu wurden Ba/F3-Zelllinien generiert, die ebenfalls EGFR-del19 und EGFR-del19/G724S überexprimierten. Das Überleben dieser murinen Zellen ist ursprünglich IL-3 abhängig, kann aber durch das Einbringen von onkogenen Treiberproteinen wie EGFR IL-3 unabhängig werden.^[249] Wie erwartet, konnte die Transformation durch die Insertion der EGFR-Formen beobachtet werden. Die Ergebnisse des Viabilitäts-basierten Assaysystems korrelierten gut mit den oben beschriebenen Untersuchungen und untermauern die Hypothese, dass es sich bei der EGFR-del19/G724S Variante um eine Osimertinib-resistente Form des EGFR handelt (siehe Abbildung 3-45 B).

§§§§§§ Analysen der Biopsien, Sequenzierungen sowie statistische Auswertungen wurden von J. Fassunke (Abteilung R. Büttner, Institut für Pathologie, Universitätsklinik Köln) und S. Michels (Abteilung J. Wolf, Klinik I für Innere Medizin, Universitätsklinik Köln) vorgenommen.

***** Zelluläre Charakterisierungen wurden von F. Müller und H.L. Tumbrink (AG M. Sos, Abteilung für Translationale Genomik, Universitätsklinik Köln) durchgeführt.

††††††† MD-Simulationen durch Y. Albers (AG S. Kast, TU Dortmund) und strukturbasierte Analysen durch J. Lategahn und M. Keul (AG D. Rauh, TU Dortmund).

‡‡‡‡‡‡‡ *in vivo* Studien durch A. Schmitt (AG C. Reinhardt, Universität Köln).

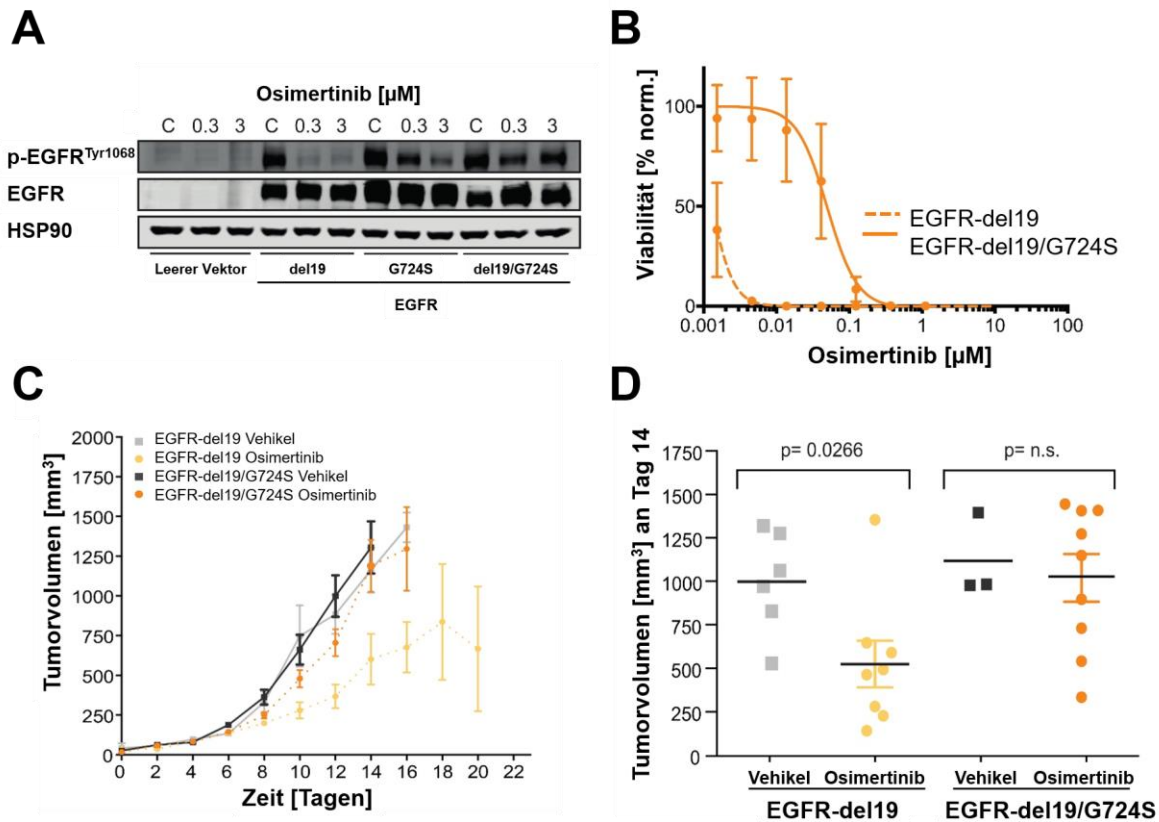


Abbildung 3-45: Die EGFR-G724S Form ist resistent gegenüber dem Drittgenerationsinhibitor Osimertinib. **A:** Western-Blot Analysen der NIH-3T3 Zellen (leerer Vektor, EGFR-del19, EGFR-G724S und EGFR-del19/G724S) unter Osimertinib-Behandlung (nach 24 h), wobei das pEGFR und EGFR (total) Level betrachtet und HSP90 als Kontrolle eingesetzt wurde. **B:** Dosis-Wirkungskurven von Osimertinib im Kontext von Ba/F3 Zellen, die EGFR-del oder EGFR del19/G724S abhängig sind. **C/D:** Ergebnisse der *in vivo*-Studien mit Mäusen, die subkutan NIH-3T3 EGFR-del19 oder EGFR-del19/G724S injiziert bekamen. Es wurden vier Kohorten gebildet (EGFR-del19, Vehikel, n=7 Mäuse; EGFR-del19, Osimertinib, n= 8 Mäuse; EGFR-del19/G724S, Vehikel; n=7; EGFR-del19/G724S, Osimertinib, n=10). **C:** Auftragung des Tumorzvolumens [mm³] gegen die Zeit (20 Tage). **D:** Auftragung des Tumorzvolumens [mm³] an Tag 14, wobei jeder Punkt einem Tumor in der Maus entspricht. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student-t-Test berechnet, n.s.: nicht signifikant.

Mit weiterführenden *in vivo* Studien sollte die Wirksamkeit von Osimertinib gegenüber den relevanten EGFR-Varianten eruiert werden.^{§§§§§§§§} Zu diesem Zweck wurden Xenograft-Modelle herangezogen, wobei eine subkutane Injektion mit genetisch veränderten NIH-3T3 Zellen (EGFR-del19 oder EGFR-del19/G724S) in Nacktmäuse erfolgte. Nachdem eine Tumorformation beobachtet wurde, fand eine Behandlung mit Osimertinib (5 mg/kg täglich) oder Vehikeln über 20 Tage statt. Die Wirksamkeit der Behandlung wurde vom Tumorzvolumen [mm³] abgeleitet, dessen Verlauf in Abbildung 3-45 C und D dargestellt wird. Die Ergebnisse illustrieren deutlich die Wirksamkeit von Osimertinib im Kontext von EGFR-Deletionsmutationen, da im Vergleich zu der Vehikel-Behandlung das Tumorzvolumen signifikant verlangsamt wurde (p=0.027). Bei der Behandlung von

^{§§§§§§§§} *in vivo* Studien durch A. Schmitt (AG C. Reinhardt, Universität Köln).

Tumoren der EGFR-del19/G724S NIH-3T3 Zellen mit Osimertinib ist nahezu kein Effekt im Vergleich zur Vehikel-Behandlung erkennbar.

Biochemische Studien, bei denen der Einfluss der Inhibitoren auf die isolierte katalytische Domäne des EGFRs betrachtet wird, sollten Aufschluss darüber geben, ob die zu untersuchende Mutante einen direkten Einfluss auf die Bindung der Drittgenerationsinhibitoren an die Kinase hat. Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, wurden dazu zunächst Assaykonstrukte entworfen, die die Aminosäuren 686-1210 des EGFRs kodieren. Durch ortsspezifische Mutagenese konnten die zu untersuchenden Mutationen inseriert werden, bevor die Proteine in Insektenzellen exprimiert wurden und schlussendlich nach einigen Optimierungszyklen der Reinigungsstrategie in ausreichender Menge und Reinheit erhalten werden konnten (siehe Abschnitt 3.1.4.2). Daraufhin wurden aktivitätsbasierte Testsysteme (HTRF KinEASE, Cisbio) für die beiden EGFR-Mutanten (del19 und del19/G724S) etabliert und die ermittelten Protein-spezifischen Parameter können Tabelle 4-9 entnommen werden. Durch die gemessene Kinaseaktivität konnte weiterhin die funktionelle und damit einhergehend auch die strukturelle Integrität der Proteine bestätigt werden. Interessanterweise ergaben sich merkbliche Unterschiede im ATP- K_m der EGFR-Varianten (siehe Abbildung 3-46). Die Aktivierungsmutante EGFR-del19 weist einen ATP- K_m von 60 μM auf, der im Vergleich zur Wildtyp-Form deutlich erhöht ist. Dahingegen sorgt die sekundäre, unter Osimertinib aufkommende G724S-Mutation für eine Wiederherstellung der hohen Affinität zu ATP, die mit dem Wildtyp vergleichbar ist. Ähnliche Beobachtungen machte YUN *et al.* bei der Untersuchung der EGFR-L858R/T790M Mutante und postulierte, dass die erhöhte Affinität zu ATP und die damit verbundene gesteigerte Konkurrenz zwischen dem Co-Faktor ATP und dem Inhibitor um die Bindetasche für die Resistenzentwicklung verantwortlich sein kann.^[250]

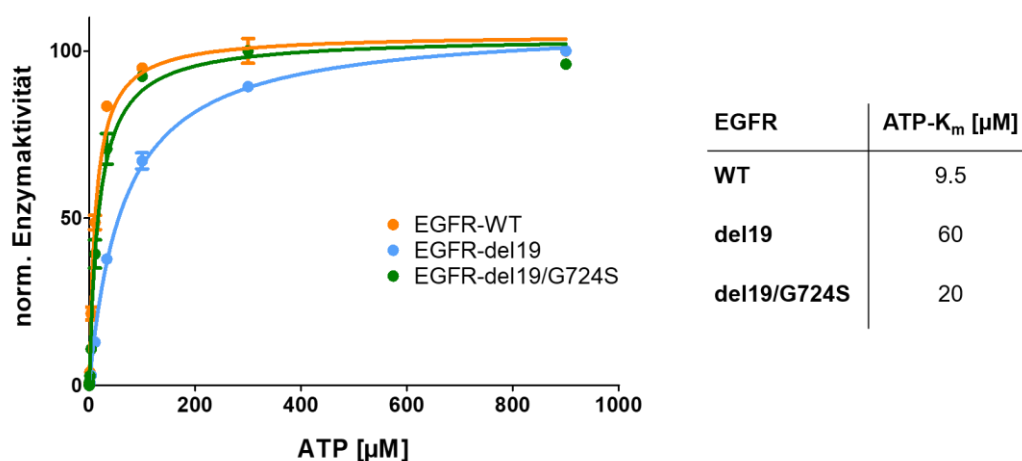


Abbildung 3-46: Bestimmung des ATP- K_m s der EGFR-Varianten: WT, del19 und del19/G724S.

Für erste IC_{50} -Bestimmungen wurde jeweils ein Vertreter der Erst-, Zweit- und Drittgenerationsinhibitoren ausgewählt und auf EGFR-del19 und EGFR-del19/G724S getestet (vergleiche Abbildung 3-47 A). Die Resultate zeigten, dass

der Drittgenerationsinhibitor Osimertinib eine ausgezeichnete inhibitorische Aktivität im Kontext der EGFR-del19 Mutante aufweist mit einem IC_{50} -Wert von <1 nM (siehe Abbildung 3-47 B und C). Auch in Bezug auf die EGFR-del19/G724S-Variante konnte ein inhibitorischer Effekt der Verbindung beobachtet werden, allerdings lag der IC_{50} -Wert hier bei nur 34 nM und damit mindestens 30-fach höher als bei der EGFR-del19 Mutante. Ein ähnlicher Trend lieferte die Inhibition mit dem Erstgenerationsinhibitor Erlotinib, der auch eine 40-fach erniedrigte Aktivität gegenüber der Doppelmutante im Vergleich zur EGFR-del19 Mutante zeigte. Der mit Erlotinib strukturell-verwandte Zweitgenerationsinhibitor Afatinib hingegen war in der Lage die EGFR-del19/G724S Variante im niedrigen nanomolaren Bereich zu inhibieren und stellt einen interessanten Ansatzpunkt zur Adressierung der wirkstoffresistenten G724S-Mutante dar. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse verschiedener *in vivo* und *in vitro* Studien den Schluss zu, dass die Punktmutation G724S in Kombination mit der Deletionsmutation in EGFR eine Wirkstoffresistenz gegenüber Osimertinib bewirkt. Weiterhin wurde hier ein biochemisches Assaysystem etabliert, das in der Lage ist die im Patienten gefundene Wirkstoffresistenz abzubilden und künftig als Grundlage für weitere Studien zur Überwindung der EGFR-del19/G724S Mutante verwendet werden kann.

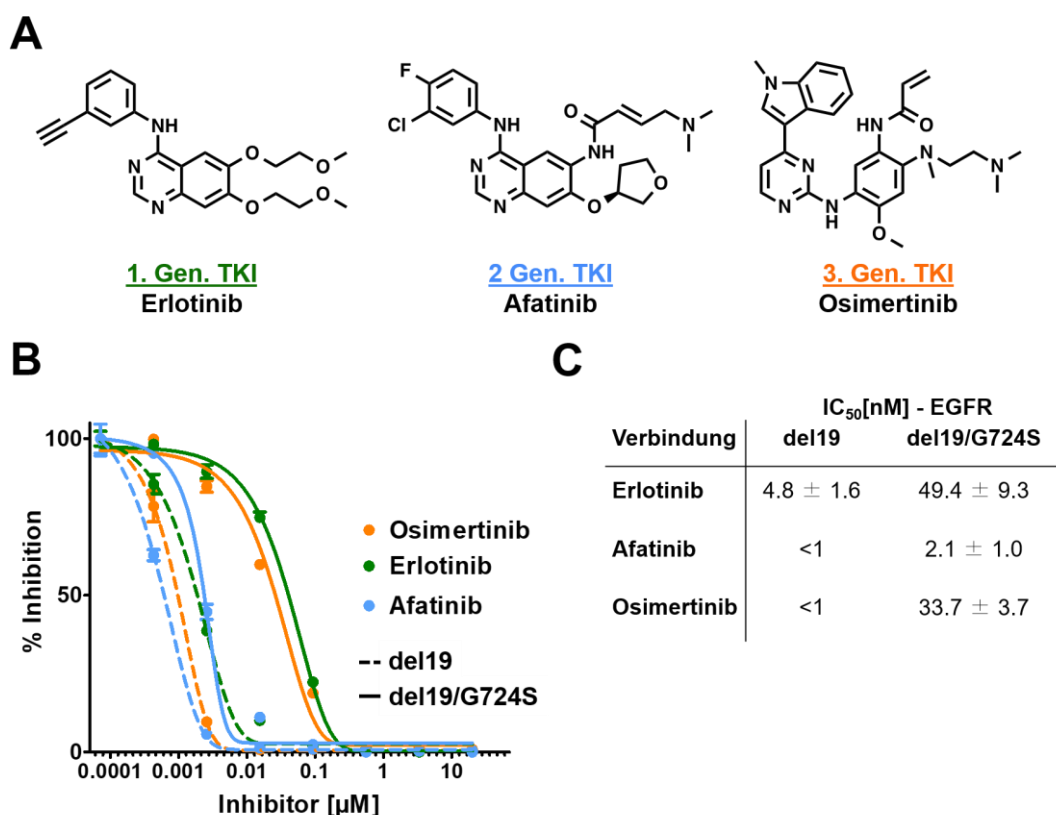


Abbildung 3-47: Biochemische Profilierung der EGFR-del19/G724S Mutante. **A:** Darstellung der chemischen Strukturen von repräsentativen Erst-, Zweit- und Drittgenerationsinhibitoren. **B:** Dosis-Wirkungskurven repräsentativer Erst-, Zweit- und Drittgenerationsinhibitoren auf EGFR-del19 und EGFR-del19/G724S. **C:** Übersicht über IC_{50} -Werte repräsentativer Erst-, Zweit- und Drittgenerationsinhibitoren auf EGFR-del19 und EGFR-del19/G724S. Jeder Wert wurde in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten bestimmt, wobei der Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung gezeigt werden.

3.5.3. Durchmusterung einer fokussierten Substanzbibliothek

Mit Hilfe des zuvor etablierten aktivitätsbasierten Assaysystems sollte im Folgenden eine Durchmusterung einer fokussierten Substanzbibliothek erfolgen, um mögliche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu eruieren und neue Ansatzpunkte für die Überwindung der Wirkstoffresistenz zu identifizieren. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde der IC₅₀-Wert für 120 Verbindungen bestimmt, von denen 80 proprietär sind und daher im Weiteren nicht erörtert werden. Die verbleibenden 40 ausgewählten Inhibitoren besaßen ein distinktes EGFR Profil und umfassen alle klinisch-relevanten Erst-, Zweit- und Drittgenerationsinhibitoren des EGFRs, sowie allosterische, EAI-045-verwandte Inhibitoren.^[177] Die Resultate der IC₅₀-Bestimmungen zeigten interessante Profile der unterschiedlichen Inhibitor-Serien (siehe Abbildung 3-48 und Tabelle 5-6). Zum einen führte das Einbringen der G724S-Mutation in die EGFR-del19 Mutante zur Resistenz gegenüber nahezu allen Erst- und Drittgenerationsinhibitoren und auch allosterische Inhibitoren wiesen keine inhibitorische Hemmung der Doppelmutante auf. Dagegen konnten für Zweitgenerationsinhibitoren wie Afatinib, Poziotinib und Dacomitinib IC₅₀-Werte im unteren nanomolaren Bereich im Kontext der Doppelmutante beobachtet werden. Initiale Rückschlüsse auf die SAR lässt der Vergleich der inhibitorischen Aktivität der Erst- und Zweitgenerationsinhibitoren zu, denn obwohl die beiden Inhibitor-Klassen das gleiche 4-Aminoquinazolin Grundgerüst tragen, zeigten sie signifikant unterschiedliche inhibitorische Hemmungen der EGFR-del19/G724S Variante. Der Michael-Akzeptor ist ein besonderes Merkmal der TKIs der zweiten Generation, das die irreversible Bindung des Inhibitors an das Protein über eine Alkylierung des Cys797 ermöglicht und sie von Inhibitoren der ersten Generation unterscheidet. Infolgedessen könnte der kovalente Bindungsmodus ein Charakteristikum sein, das für eine erfolgreiche Adressierung der wirkstoffresistenten Form des EGFR notwendig ist.

Interessanterweise konnte auch ein laborinterner Inhibitor auf Aminoindazol-Basis, der für die Adressierung der Türstehermutante des EGFRs entworfen wurde und daher als Drittgenerationsinhibitor klassifiziert wird, mit geringer nanomolarer Aktivität gegen die Doppelmutanten-Kinase identifiziert werden.^[169] Allerdings unterscheidet sich diese Verbindung strukturell von den klassischen Drittgenerationsinhibitoren und damit einhergehend ist der Bindemodus auch ein anderer. In Abschnitt 3.5.5 wird auf Grundlage von Strukturmodellen eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung vorgestellt. Diese Gerüstklasse wurde jedoch im Rahmen dieses Projekts nicht weiterverfolgt.

Vielmehr wurde der Fokus auf die Charakterisierung der äußerst potenten Zweitgenerationsinhibitoren, wie beispielsweise Afatinib und Poziotinib, gelegt. Obwohl diese Inhibitor-Klasse eine starke inhibitorische Aktivität gegenüber EGFR-WT besitzt, wodurch Nebenwirkungen wie Durchfall oder Hautausschlag verursacht werden, ist Afatinib ein von der FDA zugelassener Wirkstoff zur

Erstlinienbehandlung von EGFR-mutiertem NSCLC und würde potentiell eine direkte Umsetzung der hier gewonnenen Ergebnisse in die klinische Praxis für Osimertinib-resistente Patienten mit Lungenkrebs ermöglichen.

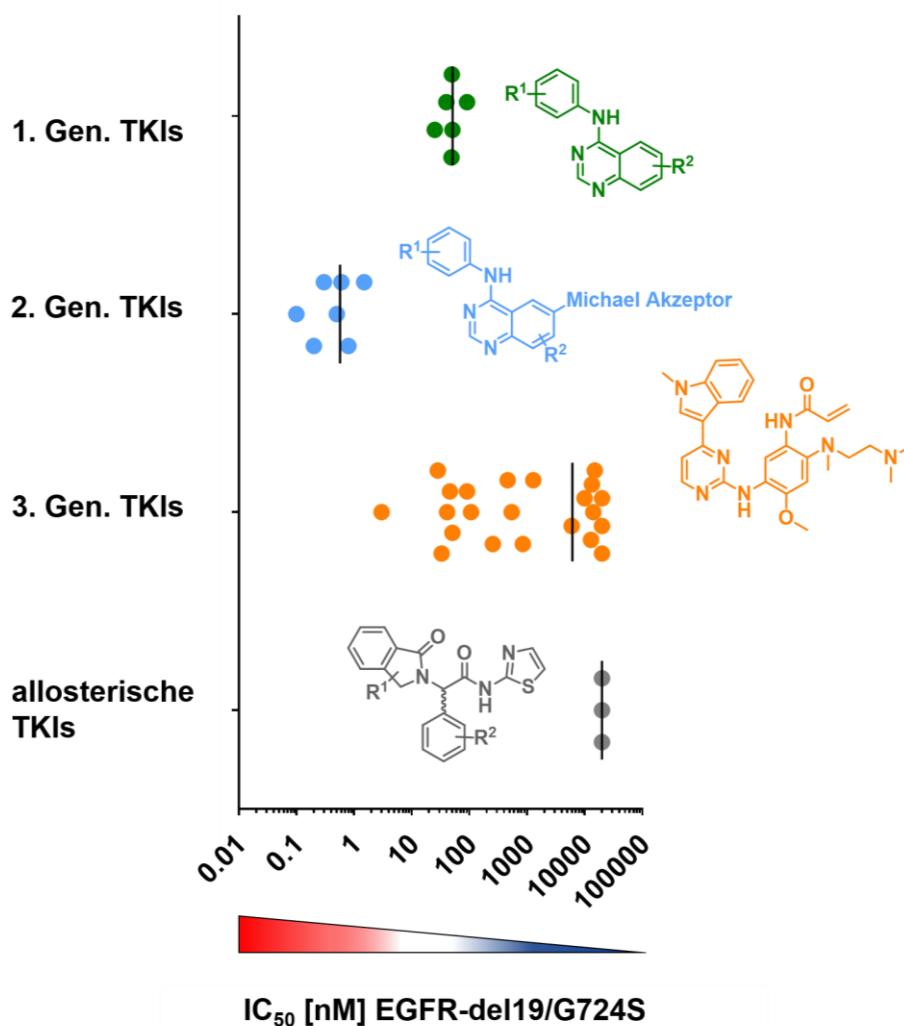


Abbildung 3-48: Durchmusterung einer EGFR-fokussierten Substanzbibliothek. Graphische Darstellung der IC_{50} -Werte der untersuchten EGFR-Inhibitoren gegenüber der EGFR-del19/G724S Mutante. Die untersuchten Inhibitoren wurden anhand ihrer Struktur in Klassen eingeteilt (Erst-(grün), Zweit-(blau) und Drittgenerationsinhibitoren (orange) und allosterische EGFR-Inhibitoren (grau). Jeder Wert wurde in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten bestimmt, wobei jeweils der Mittelwert gezeigt ist.

3.5.4. Detaillierte kinetische Bindungsstudien

Wie zuvor beschrieben, ist die Beurteilung der Inhibitionsstärke von kovalenten Inhibitoren anhand von IC_{50} -Messungen nur begrenzt möglich. Aufgrund der irreversiblen Komplexbildung des Inhibitors mit dem Protein wird Letzteres dem Fließgleichgewicht der Reaktion permanent entzogen und erlaubt daher keinen Vergleich anhand der IC_{50} -Bestimmung. Um die TKIs der zweiten und dritten Generation im Kontext der EGFR-del19/G724S Mutante näher zu untersuchen, war es unerlässlich detaillierte kinetische Bindungsstudien, einschließlich der Bestimmung der Parameter K_i und k_{inact} , durchzuführen. Dazu erfolgte die K_i/k_{inact} -Bestimmung nach KRIPPENDORF *et al.* über zeitabhängige IC_{50} -Messungen, unter der Annahme, dass die irreversible Bindung in einem zweistufigen Mechanismus erfolgt.^[161] Der erste Schritt, in dem sich der Inhibitor reversibel an die Kinase lagert, spiegelt die Affinität K_i des Inhibitors zum Protein wieder. In einem zweiten Schritt wird die kovalente Bindung gebildet, die mit der Ratenkonstante der Inaktivierung k_{inact} spezifiziert werden kann. In diesen Studien konnten schon anhand der zeitlichen Verläufe der IC_{50} -Werte repräsentativer Zweit- (Afatinib) und Drittgenerationsinhibitoren (Osimertinib) markante Unterschiede in den Bindungseigenschaften gegenüber den EGFR-Mutationen del19 und del19/G724S erkannt werden (siehe Abbildung 3-49). Es ist nicht nur der Fall, dass unterschiedliche Steigungen im Anfangsbereich der Graphen ermittelt wurden, sondern auch signifikant unterschiedliche Plateauphasen abgebildet wurden.

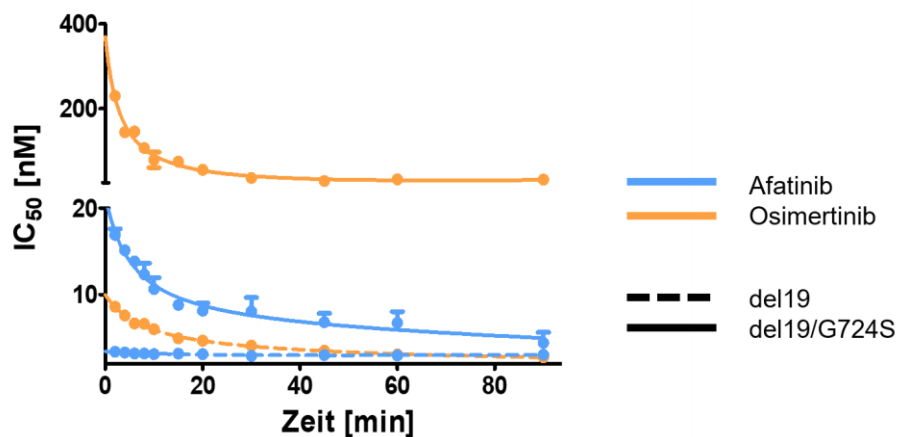


Abbildung 3-49: Zeitabhängige IC_{50} -Bestimmung der beiden kovalenten Inhibitoren Afatinib und Osimertinib im Kontext der EGFR-del19 und EGFR-del19/G724S Mutante. Jeder Wert wurde in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten bestimmt, wobei der Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt wurde.

Für Untersuchungen der kinetischen Parameter wurden Afatinib und Poziotinib als repräsentative Zweitgenerationsinhibitoren und Osimertinib und Rociletinib als Vertreter der TKIs der dritten Generation ausgewählt und die Parameter IC_{50} , K_i und k_{inact} für verschiedene EGFR-Mutanten bestimmt (siehe Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9: Übersicht über IC₅₀-Werte und die kinetischen Parameter K_i , k_{inact} und k_{inact}/K_i , die für Zweit- und Drittgenerationsinhibitoren für verschiedene EGFR-Varianten ermittelt wurden. Jeder Wert wurde in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten bestimmt, wobei der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben ist.

Verbindung	EGFR	IC ₅₀ [nM]	K_i [nM]	k_{inact} [min ⁻¹]	k_{inact}/K_i [μM ⁻¹ s ⁻¹]
Afatinib	WT	<1	<1	0.07 ± 0.01	>1.2*
	L858R	<1	<1	0.04 ± 0.01	>1.2*
	L858R/T790M	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0.13 ± 0.01	1.07 ± 0.05
	del19	<1	<1	0.05 ± 0.02	>1.2*
	del19/G724S	2.1 ± 1.0	<1	0.03 ± 0.01	>1.2*
Poziotinib	WT	<1	<1	0.05 ± 0.02	>1.2*
	L858R	<1	<1	0.01 ± 0.02	>1.2*
	L858R/T790M	<1	1.1 ± 0.1	0.30 ± 0.03	4.42 ± 0.65
	del19	<1	<1	0.07 ± 0.03	>1.2*
	del19/G724S	<1	<1	0.02 ± 0.01	>1.2*
Osimertinib	WT	2.3 ± 0.2	14 ± 2.3	0.43 ± 0.11	0.52 ± 0.05
	L858R	<1	1.6 ± 0.3	0.30 ± 0.01	3.24 ± 0.46
	L858R/T790M	<1	1.5 ± 0.1	0.33 ± 0.06	3.75 ± 0.39
	del19	<1	<1	0.14 ± 0.03	>1.2*
	del19/G724S	33.7 ± 3.7	80.4 ± 35.7	0.19 ± 0.08	0.04 ± 0.00
Rociletinib	WT	2.2 ± 0.5	74 ± 7.1	0.18 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	L858R	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.2	0.18 ± 0.05	1.67 ± 0.32
	L858R/T790M	3.3 ± 0.6	1.7 ± 0.1	0.29 ± 0.05	2.95 ± 0.66
	del19	2.3 ± 0.3	4.5 ± 0.1	0.12 ± 0.01	0.48 ± 0.05
	del19/G724S	41.0 ± 9.5	164.3 ± 37.3	0.25 ± 0.07	0.03 ± 0.00

Die Resultate der kinetischen Bindungsstudien ergaben wichtige Einblicke in den G724S-vermittelten Resistenzmechanismus, so schienen beispielsweise die k_{inact} -Werte von Osimertinib und Rociletinib gegenüber allen EGFR-Mutanten konstant zu sein und lassen somit den Rückschluss zu, dass die Rate der Bindungsbildung der Inhibitoren zum Cys797 nicht negativ durch die Einführung der EGFR-G724S Mutation beeinflusst wurde. Die Daten deuten außerdem darauf hin, dass die EGFR-G724S Mutation einen starken Einfluss auf die Bildung des initialen reversiblen Protein-Liganden-Komplexes im Kontext der TKIs der dritten Generation ausübt, die sich als weniger affin bindend erwiesen und erhöhte K_i -Werte (Osimertinib EGFR-del19 K_i <1 nM; EGFR-del19/G724S K_i =80 nM) zeigten. Für den Zweitgenerationsinhibitor Afatinib und den strukturell verwandten Inhibitor Poziotinib wurden hingegen vergleichbar gute Affinitäten und Ratenkonstanten der Bindungsbildung für EGFR-WT, EGFR-del19 und EGFR-del19/G724S Varianten bestimmt. Herauszustellen sind die K_i -Werte im subnanomolaren Bereich, die auf eine starke Affinität der Inhibitoren zum Protein hindeuten. Abschließend ist festzuhalten, dass der beobachtete Verlust der inhibitorischen Wirksamkeit der

Drittgenerationsinhibitoren, der bei der Einführung der G724S-Mutation in die EGFR-del19 Variante beobachtet wurde, auf eine signifikant verringerte reversible Affinität der Inhibitoren zum Protein zurückzuführen ist und in erhöhten IC₅₀-Werten resultiert. Dabei erfolgt die kovalente Bindungsbildung im Kontext der Doppelmutante mit analoger Geschwindigkeit wie im Fall der EGFR-del19 Mutante. Interessanterweise vermittelt die C797S-Mutation auf gegensätzliche Art und Weise eine Wirkstoffresistenz gegen Osimertinib, indem sie die kovalente Bindung des Inhibitors zum Protein verhindert. Ferner bestätigen die kinetischen Bindungsstudien die zuvor vermutete hohe Potenz der Zweitgenerationsinhibitoren gegenüber der Resistenzmutante und dies sollte im Folgenden in zellulären und in *in vivo* Studien untersucht werden.

3.5.5. Weiterführende Zell-basierte Untersuchungen mit Afatinib

Um zu testen, ob die beobachtete hohe Affinität der TKIs der zweiten Generation gegenüber der Osimertinib-Resistenzmutation in zelluläre Aktivität übertragen werden kann, wurde die Wirksamkeit von Afatinib auf NIH-3T3-Zellen, die entweder EGFR-del19 oder EGFR-del19/G724S überexprimierten, in CF- (*Colony* Formation) Assays determiniert. ***** Dazu wurden die Zellen 20 Tage mit Afatinib oder Osimertinib behandelt. Übereinstimmend mit den vorherigen *in vivo*-Ergebnissen war Osimertinib nur gegen die Bildung der Kolonien der EGFR-del19-mutierten Kolonien in submikromolaren Konzentrationen wirksam, nicht aber gegen die Bildung der EGFR-del19/G724S-mutierte Zellen (siehe Abbildung 3-50 A und B). Afatinib verhinderte jedoch weitgehend die Bildung sowohl von EGFR-del19- als auch von EGFR-del19/G724S-mutierten Kolonien in submikromolaren Konzentrationen. So war der wachstumshemmende Effekt von Afatinib im Vergleich zu Osimertinib in EGFR-del19/G724S-mutierten Zellen signifikant höher ($p=0,01$).

***** Zelluläre Charakterisierungen wurden von F. Müller (AG M. Sos, Abteilung für Translationale Genomik, Universitätsklinik Köln) durchgeführt.

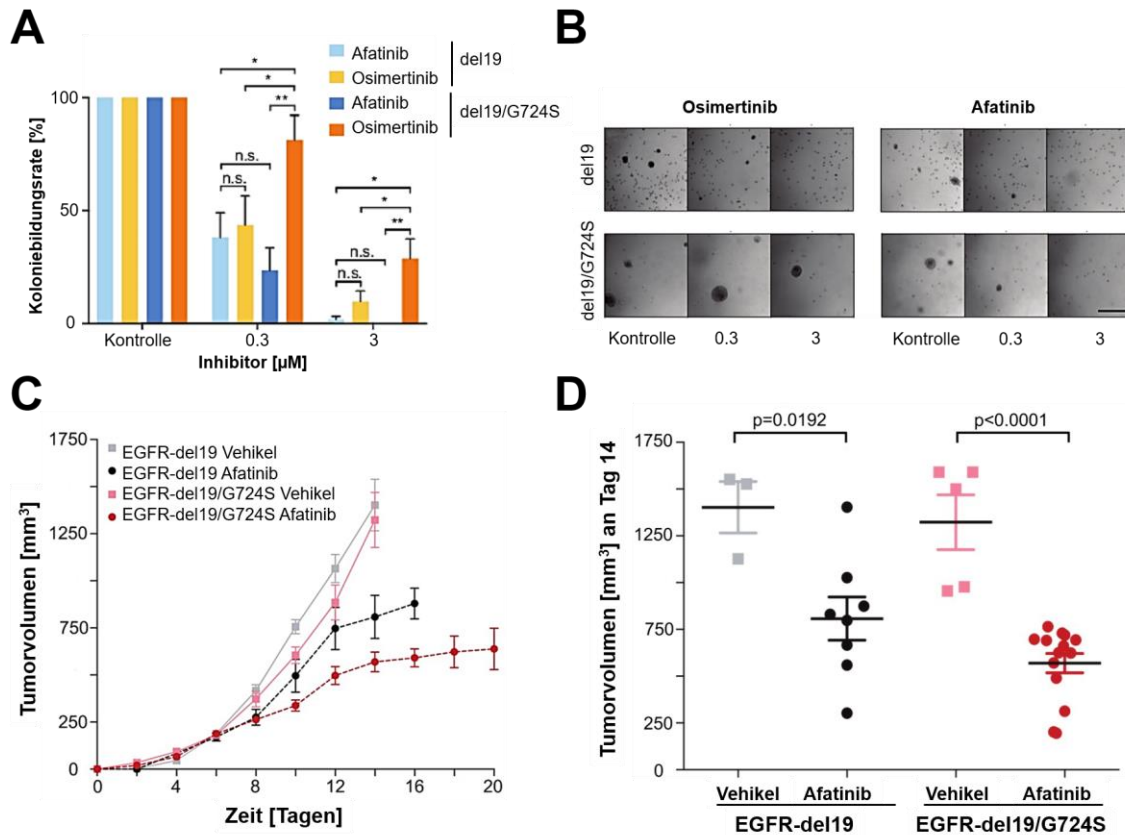


Abbildung 3-50: Sensitivität der EGFR-del19/G724S Mutation gegenüber TKIs der zweiten Generation *in vitro* und *in vivo*. **A:** Ergebnisse des CF-(*Colony Formation*) Assays auf Soft-Agar, dazu wurden NIH-3T3 EGFR-del19 oder EGFR-del19/G724S Zellen mit Afatinib oder Osimertinib behandelt und 16 Tage nach der Behandlung wurde die Koloniebildungsrate ermittelt. n.s.: nicht signifikant, $*=p<0.05$, $**=p<0.01$. **B:** Repräsentative Bilder einiger Kolonien unter Behandlung mit den Inhibitoren. Maßstab zeigt 50 µm an. **C** und **D:** Ergebnisse der *in vivo*-Studien mit Nacktmäusen, denen subkutan NIH-3T3 EGFR-del19 oder EGFR-del19/G724S Zellen injiziert wurden und 20 Tage mit Afatinib (20 mg/kg täglich) oder Vehikeln behandelt wurden. **C:** Auftragung des Tumorzvolumens, das über 20 Tage jeden zweiten Tag nach Behandlungsbeginn ermittelt wurde, gegen die Zeit. **D:** Auftragung des Tumorzvolumens, die an Tag 14 ermittelt wurden; Volumenänderungen in der Afatinib-Behandlungsgruppe (dunkelgrau und rot) wurden mit der behandelten Kontrollgruppe (hellgrau und hellrot) verglichen. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student-t-Test berechnet. n.s.: nicht signifikant, $*=p<0.05$, $**=p<0.01$.

Nachdem die biochemisch beobachtete inhibitorische Aktivität des Zweitgenerationsinhibitors Afatinib in zellulären Assaysystemen bestätigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob diese auch in *in vivo* Studien translatiert werden kann.^{††††††††} Dazu wurden murine Xenograft-Modelle herangezogen, denen, wie oben beschrieben, EGFR-del19 oder EGFR-del19/G724S NIH-3T3 Zellen injiziert wurden. Auch hier bildeten sowohl EGFR-del19- als auch die EGFR-del19/G724S-mutierten NIH-3T3 Zellen sehr schnell wachsende Tumore in Nacktmäusen (siehe Abbildung 3-50 C). Wie erwartet, verlangsamte die Afatinib-Behandlung (20 mg/kg täglich) das Tumorwachstum sowohl in EGFR-del19 ($p=0,0192$) als auch in EGFR-del19/G724S ($p<0,0001$) Tumoren im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tumoren signifikant (siehe Abbildung 3-50 C und D).

^{††††††††} *in vivo* Studien durch A. Schmitt (AG C. Reinhardt, Universität Köln).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die sekundäre unter Osimertinib aufkommende EGFR-G724S Mutation die Wirksamkeit von Inhibitoren der dritten Generation stark reduziert, jedoch die Sensitivität gegenüber EGFR-Inhibitoren der zweiten Generation wie Afatinib beibehält. Die bestehende FDA-Zulassung für Afatinib könnte die Umsetzung der hier erhaltenen Ergebnisse in die klinische Anwendung erleichtern.

3.5.6. Strukturbasierte Untersuchungen

Zuletzt erfolgten Strukturanalysen und MD-Simulationen, um den strukturellen Einfluss der G724S-Mutation auf die Kinasedomäne von EGFR zu eruieren und Ansätze zum Verständnis der Wirkstoffresistenz gegenüber Erst- und Drittgenerationsinhibitoren bei gleichzeitiger Sensitivität gegenüber Zweitgenerationsinhibitoren zu entwickeln.##### Wie zuvor beschrieben, ist die Glycin-reiche Schleife ein hochkonserviertes Sekundärstrukturelement innerhalb der Familie der Kinasen, das eine intrinsische Flexibilität besitzt und eine wichtige Rolle bei der Bindung von Liganden spielt.^[244-245] Darüber hinaus steht das Glycin, das in diesem Fall zu einem Serin mutiert wurde, in direktem Kontakt mit dem benachbarten ELREA-Motiv, das wiederum in den betroffenen Patienten einer Deletionsmutation unterliegt. Die ELREA-Sequenz an sich stellt ein Schlüsselement bei der Ausrichtung der regulatorischen α C-Helix dar, welche entscheidend am Übergang zwischen der aktiven und inaktiven Konformation der Kinase beteiligt ist. Daher ist es denkbar, dass eine Störung innerhalb dieses komplexen und engverbundenen regulatorischen Netzwerks auch Veränderungen in der Bindetasche der Kinase hervorrufen kann. In MD-Simulationen, ausgehend von einer EGFR-WT Struktur im Komplex mit Osimertinib (PDB:4ZAU), führte das Einbringen der G724S-Mutation zu einer deutlichen Verschiebung des ELREA-Motivs verglichen mit der simulierten Wildtyp-Form der Kinasedomäne. In der Tat induzierte die G724S-Mutation eine erhöhte dynamische Flexibilität nicht nur im ELREA-Motiv, sondern auch in der Glycin-reichen Schleife und in der α C-Helix im Vergleich mit der simulierten Wildtyp-Struktur (siehe Abbildung 3-51 A). Vorrangig stellt sich im Kontext der identifizierten Wirkstoffresistenz aber die Frage nach der Auswirkung der G724S-Mutation auf die EGFR-del19 Variante. In Arbeiten von SHAN *et al.* wurde gezeigt, dass die EGFR-del19 Mutation auch einen erheblichen Einfluss auf die Dynamik der Glycin-reichen Schleife und der α C-Helix hat und nicht mit der Wildtyp-Form vergleichbar ist. Daher wurden ferner die entsprechenden Systeme EGFR-del19 und EGFR-del19/G724S simuliert (siehe Abbildung 3-51 B). Herauszustellen ist, dass trotz der erheblichen Störung des Systems durch das Entfernen der ELREA-Sequenz auch für die EGFR-del19/G724S Form im Vergleich zur EGFR-del19 Variante eine erhöhte Flexibilität insbesondere innerhalb der

MD-Simulationen durch Y. Albers (AG S. Kast, TU Dortmund) und strukturbasierte Analysen durch J. Lategahn und M. Keul (AG D. Rauh, TU Dortmund).

Glycin-reichen Schleife erkennbar ist. Es deutet sich an, dass die mutierte Ser724-Seitenkette in dem regulatorischen Netzwerk, bestehend aus der α C-Helix, der Glycin-reichen Schleife und dem Übergang zwischen dem β 3-Faltblatt und der α C-Helix, eine erhöhte Flexibilität sowie eine veränderte Konformation der Glycin-reichen Schleife induziert.

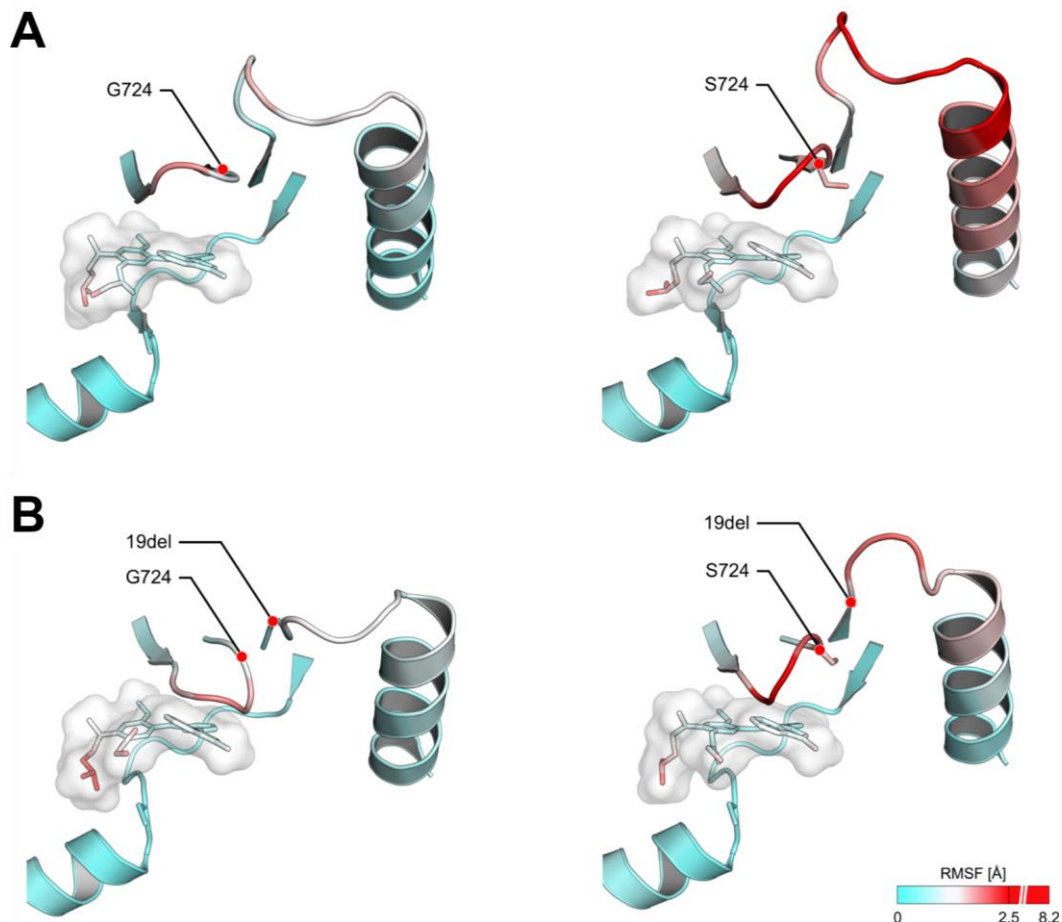


Abbildung 3-51: MD-Simulation der G724S-Mutation. **A:** Vergleich der MD-Simulationen von Osimertinib-gebundenem EGFR-WT (links) und EGFR-G724S (rechts) (basierend auf PDB: 4ZAU). **B:** Vergleich der MD-Simulationen von Osimertinib-gebundenem EGFR-del19 (links) und EGFR-del19/G724S (rechts) (basierend auf PDB: 4ZAU).

Mit dem Ziel, die Resistenzmutation auf molekularer Ebene weiter zu veranschaulichen, wurde ein Alignment eines an EGFR-gebundenen TKIs der dritten Generation (Rociletinib, PDB: 5UWD, siehe Abbildung 3-52 A) mit einer Kristallstruktur einer Exon20-mutierten Form des EGFR (PDB: 4LRM) durchgeführt.^[195, 251] Die röntgenkristallographischen Studien an der Exon20-Mutante weisen ebenfalls ein gestörtes Netzwerk der Wechselwirkungen zwischen der regulatorisch wichtigen α C-Helix, des angrenzenden ELREA-Motivs und der Glycin-reichen Schleife auf und zeigen so eine Analogie zu der untersuchten G724S-Mutante.^[195] Der strukturelle Vergleich deutet darauf hin, dass die Glycin-reiche Schleife in einer Konformation existieren kann, die mit der Inhibitorbindung der dritten Generation nicht kompatibel ist. In dem Modell zeigt sich ein sterischer Konflikt zwischen dem Acrylamid-Linker von Rociletinib oder dem

Methylindol-Rest von Osimertinib mit den β 1- und β 2-Faltblättern angrenzend an die Glycin-reiche Schleife (siehe Abbildung 3-52 B). Gleichzeitig zeigt das Strukturmodell keine Hinweise auf vergleichbare sterische Konflikte der Bindung von TKIs der zweiten Generation sowie des Aminoindazol-basierten Inhibitors (siehe Abbildung 3-52 C und D). Somit sind die Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den biochemischen Studien (vergleiche Abschnitt 3.5.3), die eine potente Inhibition durch diese Inhibitoren zeigten.

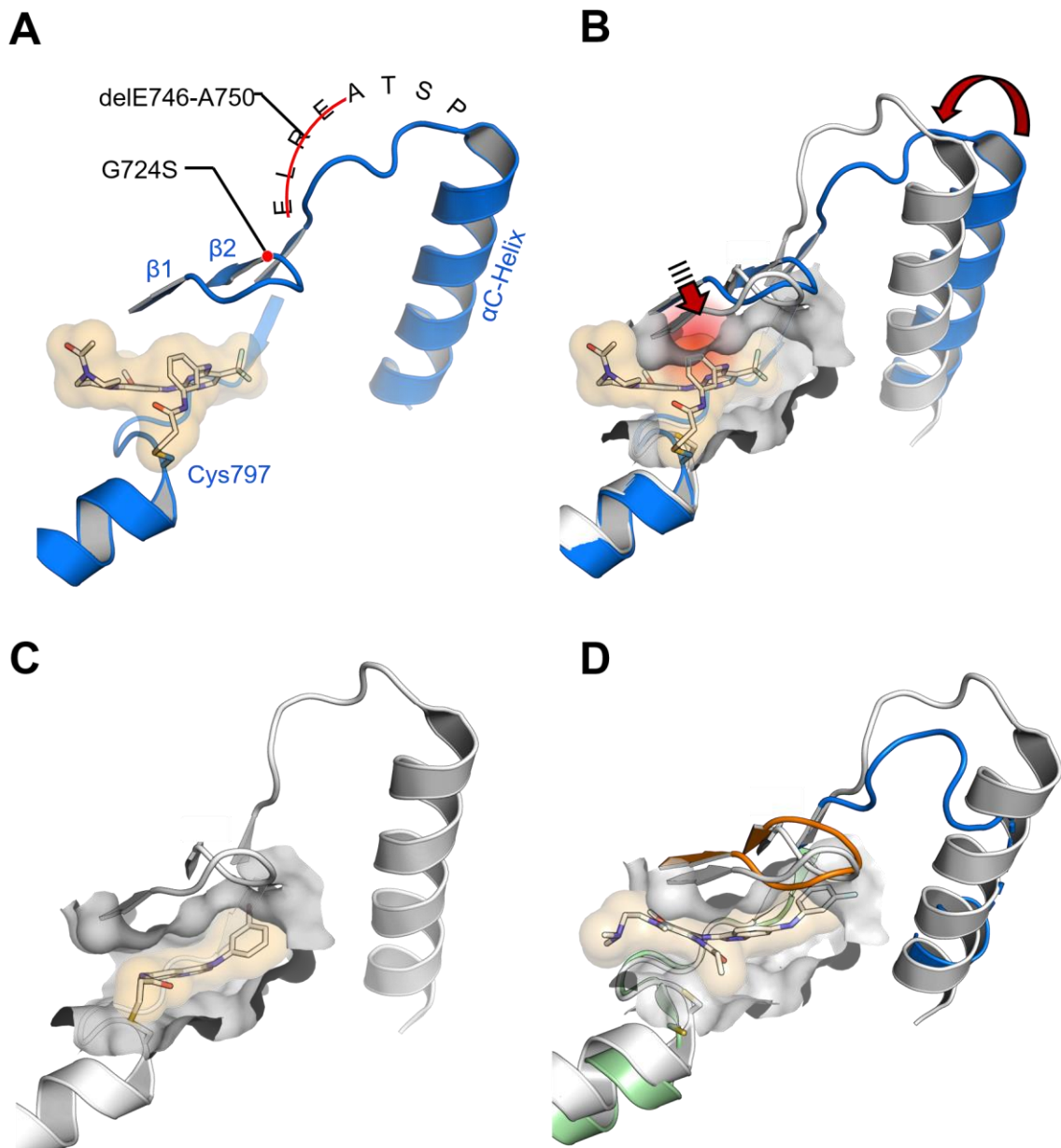


Abbildung 3-52: Strukturbasierte Modelle zum Verständnis der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Zweit- und Drittgenerationsinhibitoren. **A:** Darstellung der Bindetasche von EGFR im Komplex mit Rociletinib (PDB: 5UWD). **B:** Überlagerung der beiden Komplexstrukturen für den Vergleich der Bindetaschen (5UWD in blau und 4LRM in weiß), wodurch mögliche sterische Hinderungen bei der Bindung eines Drittgenerationsinhibitors zur mutierten EGFR-Variante sichtbar werden. **C:** Struktur einer Exon20-Mutante des EGFRs im Komplex mit einem 4-Aminoquinazolin-basierten TKI (PD168393, PDB:4LRM). **D:** Alignment des Aminoindazol-basierten Inhibitors (aus einem cSrc-Modell basierend auf PDB: 5D11, farbige Linien) mit der Bindetasche der EGFR Exon20 Mutante (weiß, PDB: 4LRM), die eine tolerierte Bindung von Aminoindazol-basierten TKIs offenbart.

Gestützt wird das Strukturmodell und die Hypothese, dass die G724S-Mutation besonders in Kombination mit der EGFR-del19 einen distinkten Einfluss auf die Struktur der Kinasedomäne ausübt durch:

- A. die Tatsache, dass die G724S-Mutation in keinen *in vitro*-Screening Experimenten zur Identifikation von unter Osimertinib-aufkommenden Mutationen gefunden wurde. Denn in diesen Experimenten wurde die Punktmutation L858R als initiale Aktivierungsmutation in EGFR verwendet und eben nicht die EGFR-del19 Mutation.^[66]
- B. Arbeiten von BROWN *et al.*, die zeigen konnten, dass die L858R/G724S-Mutante sensitiv auf die Inhibition von Osimertinib reagiert, sodass die hier untersuchte Wirkstoffresistenz nachweislich auf dem Zusammenspiel der G724S-Mutation mit der EGFR-del19 Mutation beruht.^[252]

3.5.7. Zusammenfassung

In den letzten Jahren konnten immense Fortschritte durch die Entwicklung von zunehmend hochpotenten und selektiven Inhibitoren von mutierten Treiber-Onkogenen erzielt werden. Ein Paradebeispiel dafür ist der klinische Erfolg des EGFR-L858R/T790M-selektiven Drittgenerationsinhibitors Osimertinib. Trotz dieser Fortschritte stellt die Entstehung von Wirkstoffresistenzen gegen Präzisionstherapeutika nach wie vor eine große klinische Herausforderung im Kontext der Behandlung von NSCLC dar. Im Rahmen dieses Projektes wurde in einer Gruppe von NSCLC-Patienten, die zunächst auf die Behandlung mit Osimertinib ansprachen, nach einer Zeit aber einen Rückfall erlitten, eine Selektion von EGFR-T790M-negativen, aber EGFR-del19/G724S-positiven Subklonen beobachtet. In orthogonalen zellbasierten *in vitro*- aber auch *in vivo*- Studien konnte die Wirkstoffresistenz bestätigt werden. Weiterhin konnten für biochemische Untersuchungen entsprechende EGFR-del19 und EGFR-del19/G724S Varianten in Insektenzellen exprimiert und isoliert werden. Auch auf der biochemischen Ebene konnte die Wirkstoffresistenz der EGFR-del19/G724S Mutante gegenüber Osimertinib abgebildet werden, sodass das etablierte Assaysystem im Folgenden als Grundlage für Screening-Experimente genutzt werden konnte. Die Durchmusterung einer fokussierten Substanzbibliothek ergab eine Resistenz der EGFR-del19/G724S Form gegenüber nahezu allen Erst- und Drittgenerationsinhibitoren, die durch die Einführung der G724S-Mutation eine um den Faktor 30 verminderte inhibitorische Aktivität zeigten. Weiterhin konnten Zweitgenerationsinhibitoren wie Afatinib und Poziotinib als potente Verbindungen identifiziert werden, für die in kinetischen Profilierungen eine hohe Affinität ($K_i < 1$ nM) gegenüber den klinisch-relevanten EGFR-del19 und EGFR-del19/G724S Varianten determiniert wurde. Im Gegensatz dazu wurde für Osimertinib ein deutlicher Verlust der Affinität durch die Einbringung der G724S-Mutation in EGFR-del19 festgestellt. Aufgrund der Tatsache, dass konstante Ratenkonstanten der

Inaktivierung (k_{inact} -Wert) bestimmt wurden und somit kein negativer Einfluss der G724S-Mutation auf die Ausbildung der kovalenten Bindung ermittelt werden konnte, wurde angenommen, dass konformationelle Veränderungen innerhalb der Bindetasche für die Wirkstoffresistenz gegenüber Osimertinib verantwortlich sind. In weiterführenden *in vitro*- und *in vivo*-Systemen konnte eine signifikante Reduzierung der Koloniebildung und des Tumorwachstums von EGFR-del19/G724S-mutierten NIH-3T3 Zellen durch Afatinib-Behandlung erzielt werden. Zuletzt wurden Strukturanalysen und Computer-gestützte Modellierungen vorgenommen, die vermuten lassen, dass die G724S-Mutation eine Konformation der Glycin-reichen Schleife induzieren kann, die mit der Bindung von TKIs der dritten Generation nicht kompatibel ist, während die Bindung der Zweitgenerationsinhibitoren weiterhin möglich ist. Ausgehend von diesem Modell dürfte die G724S-Mutation keine Resistenz gegenüber den Erstgenerationsinhibitoren Erlotinib und Gefitinib vermitteln, die strukturell eng mit Zweitgenerationsinhibitoren verwandt sind. Wird allerdings die erhöhte ATP-Affinität der EGFR-del19/G724S Variante berücksichtigt, ist es denkbar, dass die Bindung eines TKIs der ersten Generation zwar toleriert wird, aber eine effektive Besetzung der Bindetasche erst durch kovalente Inhibitoren erreicht werden kann. Ferner scheint es ein distinktes Zusammenspiel der G724S-Mutation mit der del19-Mutation zu geben, die einen Einfluss auf die Kinasedomäne ausübt. Arbeiten von BROWN *et al.* zeigten, dass die EGFR-Doppelmutante L858R/G724S keine Resistenz gegenüber Osimertinib vermittelt.^[252] In diesem Kontext wäre die Lösung einer Kristallstruktur der EGFR-del19/G724S Variante äußerst interessant, um die oben gezeigten Analysen zu bestätigen. Angesichts der steigenden Zahl an NSCLC-Patienten, die mit Osimertinib behandelt werden, sind die hier vorgestellten Daten von hoher klinischer Relevanz und legen eine Therapie der EGFR-del19/G724S-mutierten Tumore mit dem zugelassenen Inhibitor Afatinib nahe.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Allgemeine Anmerkungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Anbietern im analytischen Reinheitsgrad bezogen: Sigma-Aldrich, Alfa-Aesar, Acros Organics, Carl-Roth, Life Technologies, Merck und VWR.

4.1.1. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4-1: Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Artikel- und Herstellerangaben
24-Well Kristallisationsplatten	EasyXtal 24-Well Tool X-Seal, Qiagen
96-Well Kristallisationsplatten	TTP Laptech, 96-Well sitting drop iQ plate
Dialyseschlauch	Spectra/Por MWCO 12–14 kDa, Spectrumlabs
Entsalzungssäulen	Polyacrylamide Spin Desalting Columns, ThermoFisher
FPLC-Säulen	Ni-NTA Superflow Cartridge, Qiagen Glutathione HiCap Cartridge, Qiagen HiLoad 16/60 Superdex 75, GE Healthcare Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare Mono Q Säule 5/50 GL, GE Healthcare
HPLC-Säule	AdvancedBio Desalting-RP, Agilent Technologies
Mikrotiterplatten	MICROPLATTE, 384-Well, med. binding, small volume, weiß, Greiner BIO-ONE MICROPLATTE, 384-Well, med. binding, big volume, weiß, Greiner BIO-ONE MICROPLATTE, 384-Well, med. binding, small volume, weiß, Greiner BIO-ONE ZELLKULTUR MICROPLATTE, 384-Well, F-Boden, weiß, Abdeckplatte, steril, Greiner BIO-ONE
Objektträger	Countess cell counting chamber slides, ThermoFisher
Pipettenspitzen	Verschieden Größen, Starlab
Serologische Pipetten	Sarstedt
Sterilfilter	Filtropur S, 0.2 µm, Sarstedt Filtropur S, 0.45 µm, Sarstedt
Zellkulturflaschen	TC-Flasche T-25, Sarstedt TC-Flasche T-75, Sarstedt

Zentrifugenfiltereinheit Amicon Ultra-4/-15, 10 kDa MWCO, Merck Millipore

4.1.2. Verwendete Geräte

Tabelle 4-2: Übersicht über verwendete Geräte.

Bezeichnung	Artikel- und Herstellerangaben
Dispergierer	T18 basic Ultra-Turrax, IKA,
FPLC System	ÄKTA pure, GE Healthcare
Gelelektrophoresesystem	Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, Hercules
Hochdruckhomogenisator	M-110L Microfluidizer Materials Processor, Microfluidics,
Inkubatoren	Incubator Shaker Series I26, New Brunswick Scientific Temperier-Lagerschrank IPS750, Memmert Inkubator wtb, Binder
Kristallplatten-Imager	Rock Imager 1000, Formulatrix
LC-MS Systeme	Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US; Nanospray Flex Ion Source, Thermo Fisher Scientific 1100 HPLC-System, Agilent, Santa Clara, CA, USA mit Finnigan LCQ Advantage Max, Thermo Fisher Scientific, oder LTQ XL™ Linear Ion Trap Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific
Liquid-Handler	ECHO 520 Liquid Handler, LabCyte
Mikroskop	FLoid Imaging Cell Station, Thermo Fisher
Mikrotiterplatten Dispenser	Multidrop Combi Reagent Dispenser; Thermo Fisher
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Envision Multimode Plate Reader, PerkinElmer
Pipettierroboter	LCP-Mosquito, TTP-Laptech
Plattenschüttler	MixMate, Eppendorf
Spektralphotometer	NanoDrop 2000, Thermo Scientific
Sterilbank	Sterilbank Herasafe, Thermo Scientific
Thermocycler	Mastercycler Pro, Eppendorf
Thermoschüttler	Thermomixer comfort, Eppendorf

Vakuumkonzentrator	Concentrator plus, Eppendorf
Zentrifugen und Rotoren	Zentrifuge 5804R, Eppendorf Zentrifuge 5415R, Eppendorf
Zentrifugen und Rotoren	Sorvall Evolutions RC, Thermo Fisher Scientific SA-600 Fixed Angle Rotor, Thermo Fisher Scientific FiberLite F8-6x1000y, Thermo Fisher Scientific
Zellzähler	Zellzähler Countess II, Life Technologies

4.1.3. Verwendete Proteine, Reagenzien, Medien und Kits

Tabelle 4-3: Übersicht über verwendete Proteine, Reagenzien, Medien und Kits.

Reagenz	Hersteller
0,25 % Trypsin/EDTA	Gibco, Life Technologies
Benzonase Nuclease	Sigma-Aldrich
Alkalische Phosphatase aus dem Rinderdarm	Sigma-Aldrich
Cellfectin II Reagent	Invitrogen
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega
cOmplete ULTRA Tablets, Protease Inhibitor	Roche
DMEM Medium, high glucose, GlutaMAX	Gibco, Life Technologies
DPBS	Gibco, Life Technologies
EX-CELL 405 Serum-Free Medium	Sigma-Aldrich
FBS Good (Lot: P150605)	PAN-Biotech
FBS Good Forte (Lot: P131102)	PAN-Biotech
<i>DpnI</i> , <i>Bsu36I</i> , <i>NcoI</i> , <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i>	New England BioLabs
HTRF KinEASE Assay	CisBio
Insect GeneJuice Transfection Reagent	Merck, Millipore
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Penicillin/ Streptomycin	Gibco, Life Technologies
PfuUltra II Fusion HS	Agilent Technologies
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

RedTaq DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX	Gibco, Life Technologies
Sf-900 III SFM Insektenzellmedium	Gibco, Life Technologies
Thrombin	Sigma-Aldrich
Trypan Blue stain 0,4 %	Life Technologies

4.1.4. Verwendete Bakterienstämme und Insektenzelllinien

Tabelle 4-4: Übersicht über verwendete Bakterienstämme und Insektenzelllinien.

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> XL10 Gold	endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)]	Stratagene
<i>E. coli</i> DH10EmBacY	str. K-12 F- Δ(ara-leu)7697[Δ(rapA'-cra')] Δ(lac)X74[Δ('yahH-mhpE)] duplication(514341-627601)[nmpC-gltI] galK16 galE15 e14-(icdWT mcrA) φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 Tn10.10 nupG rpsL150(StrR) rph+ spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ- Missense(dnaA glmS glyQ lpxK mreC murA) Nonsense(chiA gatZ fhuA? yigA ygcG) Frameshift(flhC mglA fruB)	Geneva Biotech
<i>E. coli</i> Top10 F'	F'[lacIq Tn10(tetR)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 λ-	Thermo Fisher
High Five Cells (BTI-TN-5B1-4) aus <i>Trichoplusia ni</i>		Thermo Fisher
<i>Spodoptera frugiperda</i>		Thermo Fisher

4.1.5. Allgemeine Lösungen und Puffer

Tabelle 4-5: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen; Sofern nicht anders angegeben, wurden die Lösungen mit ddH₂O angesetzt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
DNA-Ladepuffer (6-fach)	30% Glycerin 0.25% Bromphenolblau
PBS-Puffer (10-fach)	1.4 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4 mit HCl
Färbelösung für SDS-PAGE	44% (v/v) Ethanol 12% (v/v) Essigsäure 0.15% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM TRIS 190 mM Glycin 0.1% (w/v) SDS
Probenpuffer für SDS (4-fach)	200 mM TRIS pH 6.8 8% (w/v) SDS 40% (v/v) Glycerol 0.4% Bromphenolblau 10% (v/v) β-Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer für SDS-PAGE	0.5 M TRIS pH 6.8 0.4% (w/v) SDS
Trenngelpuffer für SDS-PAGE	1.5 M TRIS pH 8.8 0.4% (w/v) SDS
TAE-Puffer (50-fach)	1 M TRIS pH 8.0 2 M Essigsäure 0.5 M EDTA
5x HTRF KinEASE Reaktions-Puffer	50 mM HEPES 5 mM MgCl ₂ 0.1 mM Na ₃ VO ₄ 0.02% (w/v) NaN ₃ 0.01% (w/v) BSA 1 mM DTT 0.01% (v/v) Triton X-100 pH 7.0 bei 4 °C

HTRF KinEASE Detektionspuffer	50 mM HEPES
	0.1% (w/v) BSA
	800 mM KF
	20 mM EDTA
	pH 7.0 bei 4 °C

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1. Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene EGFR-Konstrukte für Kristallisationsstudien und biochemische Assays entworfen und kloniert. Alle Konstrukte wurden für die Expression in *Spodoptera frugiperda* Codon-optimiert und die Gene wurden bei GeneArt (Thermo Fisher) oder MWG (Eurofins) synthetisiert. Die EGFR-Kristallisationskonstrukte basieren auf dem Uniprot-Eintrag P00533 und umfassen die Aminosäuren 696 bis 1022. Für die Expression in Insektenzellen wurde das Gen in den pLEX/Bac3 Transfervektor kloniert und für eine effektive Aufreinigung wurde das Konstrukt zusätzlich mit einem N-terminalen Hexahistidin-Tag modifiziert. Im Anschluss wurden die klinisch-relevanten Mutationen T790M und L858R in Kombination oder durch zielgerichtete Mutagenese eingefügt. Zusätzlich wurden die in Abschnitt 3.1 aufgeführten Mutationen, die das Proteinkristallwachstum begünstigen (V948R und E865A/E866A/K867A), in die einzelnen Konstrukte eingebracht.

Die EGFR-Assaykonstrukte beruhen ebenfalls auf dem Uniprot-Eintrag P00533 beinhalten aber zusätzlich zur Kinasedomäne noch die C-terminale Domäne, die für die katalytische Aktivität der Kinase von Bedeutung ist (Aminosäuren 669 bis 1210). Das entsprechende Gen wurde in den pLEX/Bac5 Transfervektor kloniert, sodass das Protein N-terminal mit einem GST-Tag ausgestattet war, um die Löslichkeit zu erhöhen. Zum Schluss wurden die klinisch-relevanten Mutationen L858R, T790M und C797S durch Mutagenese eingeführt. In dem letzten Projekt sollten die klinisch-relevanten EGFR del19 und EGFR del19/G724 dargestellt werden. Diese konnten nicht unter der Verwendung der bis dahin genutzten Systeme (*flashBac*-Systeme, Oxford Technologies) erhalten werden, weshalb auf das MultiBac-System (Geneva Biotech) umgestellt wurde. Dafür wurden die Gene in den pFG-Transfervektor kloniert. Ein Sequenzalignment der verwendeten Konstrukte ist im Anhang zu finden (Abschnitt 5.1).

4.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *Polymerase chain reaction*) wurde zur Vervielfältigung von DNA im Rahmen der Überprüfung einer Ligationsreaktion, der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten und bei Mutagenesen, verwendet. Dazu wurden verschiedene Zusammensetzungen und Reaktionsprogramme verwendet, die im Folgenden aufgelistet werden.

Tabelle 4-6: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten und zur Einführung von gezielten Mutationen mit dem dazugehörigen Reaktionsprogramm.

Zusammensetzung	Reaktionsprogramm				
20 ng DNA Templat	1	Denaturierung	95 °C	5 min	30 Zyklen
1x Pfu Ultra II Puffer	2	Denaturierung	95 °C	30 s	
10 µM Primer I	3	Annealing	57 °C	30 s	
10 µM Primer II	4	Elongation	72 °C	120 sec	
0.5 mM dNTP-Mix	5	Elongation	72 °C	10 min	
0.2 µL Pfu Ultra II DNA-Polymerase	6	Pause	4 °C		

Tabelle 4-7: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur Überprüfung einer gelungenen Ligation mit dazugehörigem Reaktionsprogramm.

Zusammensetzung	Reaktionsprogramm				
Bakterienlysat ¹	1	Denaturierung	95 °C	5 min	30 Zyklen
1x RedTaq Puffer	2	Denaturierung	95 °C	30 s	
10 µM Primer I	3	Annealing	50 °C	30 s	
10 µM Primer II	4	Elongation	72 °C	120 sec	
0.5 mM dNTP-Mix	5	Elongation	72 °C	5 min	
0.5 µL RedTaq DNA-Polymerase	6	Pause	4 °C		

¹Material einer Kolonie wurde mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt.

4.2.3. Restriktionsverdau

Im Zuge von Klonierungsarbeiten wurde die spezifische Spaltung von DNA mit *High-Fidelity* Restriktionsenzymen der Firma NEB nach Herstellerangaben durchgeführt. In den meisten Fällen wurden dazu 0.1-3 µg DNA mit Puffer und Restriktionsenzymen für 2 h bei 37 °C mit anschließender Hitzeaktivierung inkubiert. Sollte danach eine Ligation erfolgen, wurde dem Restriktionsansatz eine Einheit alkalische Phosphatase aus dem Rinderdarm (Sigma-Aldrich) zugefügt, um eine Religation des Vektors zu verhindern.

4.2.4. Reinigung von DNA

Zur Plasmid-Isolierung wurde das QIAspin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Nach Restriktionsansätzen oder PCR-Experimenten wurden die DNA-Fragmente mithilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde die Größe überprüft. Für die Bacmid-Isolierung aus *E. coli* DH10EmBacY Zellen wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Im Anschluss an eine DNA-Isolierung, wurde eine Konzentrationsbestimmung über eine Messung der Absorption bei 260 nm durchgeführt.

4.2.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten, das heißt eines linearisierten und dephosphorylierten Vektors und eines kleineren DNA-Fragmentes, wurde mithilfe der T4 DNA Ligase (Fermentas) nach Herstellerangaben vorgenommen. Dazu wurden 50 ng des linearisierten Vektors mit einem 3 bis 7 - fachen Überschuss des einzuführenden DNA-Fragmentes mit 1-fach Ligasepuffer entweder für 3 h bei RT oder für 16 h bei 4 °C inkubiert.

4.2.6. Mutagenese

Um einzelne Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen innerhalb einer Proteinsequenz einzuführen, wurden mithilfe des QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) ortsgerichtet Basenpaare in den Konstrukten verändert. Dazu wurde zunächst eine Mutagenese-PCR, wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, durchgeführt. Dann folgte ein Verdau der parentalen Vektor-DNA mit 1 U *DpnI* nach Herstellerangaben für mindestens 3 h bei 37 °C. Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli* XL10 Gold Zellen mit der DNA transformiert. Die Plasmid-DNA wurde wie zuvor beschrieben isoliert. Letztlich wurde mithilfe einer Sequenzierung überprüft, ob die gewünschte Mutation vorhanden war.

4.2.7. Transformation von chemisch kompetenten Zellen

Im Rahmen von Klonierungsarbeiten, Mutagenesen oder zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde eine Transformation von kompetenten *E. coli* XL10/ *E. coli* Top10 F'-Zellen mittels Hitzeschocks durchgeführt. Dazu wurden 50 µl der chemisch-kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µL Plasmid-DNA versetzt. Die Suspension wurde für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Nachdem erneut 5 min auf Eis inkubiert wurde, wurden 200 µL auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde nun 60 min bei 37 °C und 250 rpm im Thermoschüttler inkubiert.

Anschließend wurden 100 μL der Zellsuspension auf LB-Agar mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

4.2.8. Transformation von elektrokompetenten Zellen

Zuerst wurden 10-20 ng Plasmid-DNA zusammen mit 50 μL der elektrokompetenten *E. coli* DH10EmBacY-Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Anschließend wurden die Zellen einem kurzen Puls hoher Spannung ausgesetzt (Spannung 1.8 kV, Widerstand 200 Ω , Kapazität 25 μF) und sofort mit 900 μL LB-Medium versetzt. Danach erfolgte eine Inkubation von mindestens 6 h bei 37 °C und 200 rpm in einem Thermoschüttler ohne den Einsatz von Antibiotika. Zuletzt erfolgte eine Blau-Weiß Selektion. Dazu wurden die Zellen auf LB-Agarplatten (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gentamycin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tetracyclin, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ x-Gal, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IPTG) ausplattiert und mindestens 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgreicher Transposition des Zielgens in die Bacmid-DNA, was eine Inaktivierung der β -Galactosidase bewirkt, sollten die Bakterien-Kolonien weiß bleiben. Mit diesen Kolonien wurde dann, wie in Abschnitt 4.2.9 beschrieben, weitergearbeitet.

4.2.9. Isolierung der Bacmid-DNA

Hierzu wurden 250 mL LB-Kulturen (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gentamycin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin) angesetzt und mit einer weißen Kolonie der LB-Agarplatten aus Kapitel 4.2.8 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C unter Schütteln für 24 h. Durch Zentrifugation bei 4500 g und 4 °C für 15 min wurden die Zellen geerntet. Danach wurde die Bacmid-DNA nach Herstellerangaben mithilfe des Plasmid-Maxi-Kits (Qiagen) isoliert. Die Konzentration der isolierten Bacmid-DNA wurde mit einem NanoDrop 2000 Photometer bestimmt.

4.3. Proteinexpression in Insektenzellen

Alle Arbeiten mit Insektenzellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank mit laminarer Verdrängungsströmung durchgeführt. Die Insektenzellen wurden, sofern nicht anders beschrieben, in Schüttelkulturen bei 37 °C und 110 rpm kultiviert. Grundsätzlich wurde darauf geachtet, dass die Passagennummer der Zellen nach dem Auftauen nicht zu hoch wurde, um eine optimale Proteinexpression zu gewährleisten. Zur Proteinexpression wurden in dieser Arbeit zwei Insektenzelllinien (High Five und Sf9) verwendet. Die Sf9- und die TNAO38-Zellen wurden in Sf-900 III SFM Insektenzellmedium und die High five-Zellen wurden in EX-CELL 405 Medium kultiviert. Im Abstand von drei bis vier Tagen wurde die Zelldichte und die Zellviabilität mittels einer Trypanblau-Färbung überprüft. Dazu wurden 10 μL der Zellsuspension mit 10 μL einer Trypanblau-Lösung gemischt und

auf einen Objektträger überführt. Die Auswertung wurde mit dem Countess II Zellzählers vorgenommen, wobei ausschließlich mit Zellenpassagen weitergearbeitet wurde, die eine Viabilität von mindestens 90% aufwiesen. In dieser Arbeit wurden verschiedene Protokolle zur Generierung rekombinanter Baculoviren verwendet. Das EGFR Assaykonstrukt (pMK15) und das EGFR Kristallisationskonstrukt (pMK33) wurden von der Dortmund Protein Facility (DPF, MPI-Dortmund) nach dem *flashBac* Protokoll (Oxford Technologies) transfiziert und bis zur zweiten Generation des Baculovirus prozessiert. Die Virusamplifikation, die *time of harvest* (TOH) Analysen, sowie die Expression im präparativen Maßstab wurden dann in unserem Labor durchgeführt. Das EGFR-Kristallisationskonstrukt (pMK25) wurde nach dem BacMagic Protokoll (Novagen) transfiziert und wird im Folgenden näher erläutert. Zuletzt wurden die EGFR-Assaykonstrukte (pMK50/pMK52) entsprechend des MultiBac Protokolls transfiziert. Die Transfektionen wurden ausschließlich in Sf9-Zellen durchgeführt.

4.3.1. Transfektion

4.3.1.1. BacMagic

Zunächst wurde die Bacmid-DNA, die freundlicherweise von Dr. Yaowen Wu (seinerzeit CGC) zur Verfügung gestellt wurde, mit *Bsu36I* Restriktionsendonuklease nach Herstellerangaben (New England Biolabs) linearisiert. Das auf diese Art vorbereitete Bacmid wurde dann bei 4 °C nicht länger als 24 h gelagert. Für die Transfektion wurden 2.5×10^6 Sf9-Zellen in einer T-25 Kulturflasche ausgesät und eine Stunde bei 27 °C inkubiert, sodass die Zellen an der Oberfläche anwachsen und eine konfluente Zellschicht (*Monolayer*) ausbilden konnten. In dieser Zeit wurde der Transfektions-Mix, bestehend aus 2000 ng Transfervektor, 1000 ng Bacmid-DNA, 16 µL Insect GeneJuice Transfection Reagent (Merck) und 2.5 mL Sf-900 III SFM Medium, hergestellt und mindestens 15 min, aber nicht mehr als 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium in den Kulturflaschen durch den Transfektions-Mix ersetzt und für mindestens 8 h mit den Zellen bei 27 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden 2.5 mL frisches Medium zu den Zellen gegeben und weitere fünf bis sieben Tage inkubiert. Zum Schluss wurde der Überstand vorsichtig von den Zellen abgenommen und steril filtriert. Er enthielt nun die P1-Virusgeneration und wurde umgehend für die Virusamplifikation verwendet.

4.3.1.2. MultiBac

Zur Generierung der ersten Virusgeneration wurden zunächst 400 µL einer Sf9-Zellsuspension mit einer Zelldichte von 0.8×10^6 Zellen/mL in einer Zellkulturplatte (24 Kavitäten) ausgesät und 1 h bei 27 °C in einer Feuchtekammer

inkubiert. Die Zellen konnten in der Zeit an der Oberfläche der Zellkulturplatte anwachsen. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und durch 202 μL des Transfektions-Mix (200 μL Sf-900 III SFM Medium, 2 μL Cellfectin II Reagent (Invitrogen) und 1-3 μg der isolierten rekombinanten Bacmid-DNA) ersetzt. Nach einer weiteren Inkubation in einer Feuchtekammer bei 27 °C (5 h) wurde der Transfektions-Mix entfernt und durch 400 μL Sf-900 III SFM Medium ausgetauscht. Da die transfizierte Bacmid-DNA zusätzlich zu dem Zielprotein auch die Gensequenz des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP) enthielt, konnten anhand der YFP-Expression Schlussfolgerungen bezüglich der Transfektionseffizienz und des Zeitpunkt der Virusernte gemacht werden. Für die Beobachtung der Viabilität und der Fluoreszenzzunahme durch die YFP-Expression wurde die FLoId Cell Imaging Station (Thermo Fisher) genutzt, wobei die Fluoreszenz mit dem grünen Filter (Exzitation: 482 nm, Emission: 532 nm) beobachtet wurde. Sobald die YFP-Expression in der Mehrzahl der Zellen erkannt wurde (nach 5-7 Tage) wurde der Überstand, der nun die erste Virusgeneration enthielt, abgenommen, steril filtriert und umgehend für die Virusamplifikation eingesetzt.

4.3.2. Virusamplifikation und Testexpression

Zur Erhöhung der Viruskonzentration (Virustiter) wurden die Viren zunächst weiter amplifiziert. Für die Herstellung der P2-Virusgeneration wurden ausschließlich Sf9-Zellen verwendet, auch wenn die anschließende Proteinexpression in High five- oder TNAO38-Zellen durchgeführt werden sollte. Für die Herstellung der P2-Virus Lösung wurden 10 mL Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/mL angesetzt und mit 300 μL Viruslösung (P1) versetzt. Nach viertägiger Inkubation bei 27 °C und 110 rpm, wurden die Zellen abzentrifugiert (3 000 g, 4 °C, 15 min) und der Überstand, der die P2-Virusgeneration enthielt, wurde sterilfiltriert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Viruslösung lichtgeschützt bei 4 °C, oder für eine langfristige Lagerung bei -20 °C und einer Zugabe von 5% FBS, gelagert. Mit der P2-Virusgeneration wurde zusätzlich eine Testexpression im 10 mL Maßstab durchgeführt. Dazu wurden 10 mL Zellsuspension mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/mL angesetzt und mit 300 μL Viruslösung (P2) versetzt. Nach drei Tagen wurden die Zellen abzentrifugiert, aufgeschlossen und mit einer 1 mL Säule (Ni-NTA) wurde das Protein gereinigt. Die Proben wurden anschließend mithilfe der SDS-PAGE analysiert. Nach positiver Überexpression des Zielproteins wurde der P2-Virus weiter zur dritten und letzten Virusgeneration amplifiziert. An dieser Stelle wurden die Viren in den Zellen amplifiziert, in denen auch im Anschluss die Proteinexpression vorgenommen werden sollte. Dazu wurden 100 mL Zellsuspension mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/mL angesetzt und diese mit 20 μL P2-Virus-Lösung versetzt. Die Virusernte erfolgte sobald die Zellen eine Viabilität von 60-80% erreicht hatten. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (3 000 g, 4 °C, 15 min), der Überstand sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

4.3.3. Proteinexpression im präparativen Maßstab

Die Proteinexpression im großen Maßstab wurde in 5 L Erlenmeyerkolben durchgeführt. Um eine gute Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten, wurden lediglich 700 mL einer Zellsuspension mit einer Dichte von 3×10^6 Zellen/mL (Sf9 Zellen), 1.5×10^6 Zellen/mL (High five- und TNAO38-Zellen) in einem Kolben kultiviert. Die Überexpression wurde durch die Zugabe von 21 mL der P3-Viruslösung induziert. Nach dreitägiger Inkubation bei 27 °C und 110 rpm, wurden die Zellen abzentrifugiert (3 000 g, 4 °C, 15 min) und zwei Mal mit PBS-Puffer gewaschen, um Reste des Nährmediums zu entfernen. Das erhaltene Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.4. Proteinreinigung

4.4.1. Isolierung der Kristallisationskonstrukte

4.4.1.1. Zellyse

Das Zellpellet wurde im drei bis vierfachen Volumen des Lysepuffers resuspendiert und mit Benzonase (Millipore) und einer Tablette des Protease-Inhibitorcocktails (Pierce, Thermo) versetzt. Das Pellet wurde bis zur vollständigen Resuspension bei 4 °C für mindestens 45 min gerührt. Danach erfolgte der Zellaufschluss mit Hilfe des Hochdruckhomogenisators in acht bis zehn Zyklen. Das Zellysate wurde daraufhin mit CHAPS (1g/150 mL Zellysate), einem zwitterionischen Detergens, für 1 h bei 4 °C gerührt, um die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen. Mittels Zentrifugation bei 40 000 g bei 4 °C für 60 min wurden die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt und der lösliche Überstand wurde abgenommen und filtriert (Porengröße 0.45 µm).

Lysepuffer: 600 mM NaCl, 50 mM TRIS, 1mM TECEP, 15 % (v/v) Glycerol, pH 7.5 bei 4 °C

4.4.1.2. Erste Affinitätschromatographie und Dialyse

Zuerst wurde die Ni²⁺-Affinitätssäule (Qiagen) nach Herstellerangaben gewaschen und mit Waschpuffer äquilibriert. Bei einer Flussrate von 1-2 mL/min wurde das filtrierte Zellysate auf die Säule aufgetragen. Die unspezifisch gebundenen Proteine wurden durch Waschen der Säule mit 2% Elutionspuffer entfernt. Sobald sich das UV-Signal stabilisiert hatte, wurde die Elution durch einen linearen Gradienten zu 50% Elutionspuffer in 45 min erreicht. Im Anschluss wurden die proteinhaltigen Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert und die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, vereinigt. Zur Abspaltung des His-Tags wurde zu der Proteinlösung Thrombin hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C gegen Dialysepuffer ohne Imidazol dialysiert.

Waschpuffer: 500 mM NaCl, 25 mM TRIS, 1mM TECEP, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4 °C

Elutionspuffer: 500 mM NaCl, 25 mM TRIS, 250 mM Imidazol, 1mM TECEP, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8.0 bei 4 °C

Dialysepuffer: 250 mM NaCl, 50 mM TRIS, 1mM TECEP, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8.0 bei 4 °C

4.4.1.3. Zweite Affinitätschromatographie

Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung 15 min bei 4 000 g zentrifugiert und im Anschluss wurde der Überstand filtriert (Porengröße 0.22 µM), um denaturiertes Protein sowie Schwebepartikel abzutrennen. Die Puffer sowie die Säulenvorbereitung entsprachen den Angaben aus Abschnitt 4.4.1.2. Die Proteinlösung wurde mit einem Fluss von 1 mL/min auf die Säule aufgetragen. Durch die Abspaltung des Affinitätsankers im vorherigen Schritt, sollte das Zielprotein nicht mehr an die Säule binden können und im Durchfluss der Säule zu finden sein. Ungespaltene Protein und unspezifisch-bindende Proteine wurden so aus der Proteinlösung entfernt. Der fraktionierte Durchfluss wurde zuletzt mittels SDS-PAGE analysiert und die Fraktionen, die das Zielprotein beinhalten, wurden vereinigt und mit einer Zentrifugeneinheit (MWCO 10 kDa) aufkonzentriert.

4.4.1.4. Erste Größenausschlusschromatographie

Die zuvor aufkonzentrierte Proteinlösung wurde auf eine nach den Herstellerangaben gewaschene und mit SEC-Puffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 75 µg, GE Healthcare) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einem Fluss von 1 mL/min. Durch die Verfolgung des UV-Signals bei 280 nm, konnten die proteinhaltigen Fraktionen identifiziert werden und mittels SDS-PAGE analysiert werden. Zur Vorbereitung auf die anschließende Anionenaustauschchromatographie wurde eine erneute Dialyse über Nacht bei 4 °C wie in Abschnitt 4.4.1.2 beschrieben (ohne den Zusatz der Protease) vorgenommen.

SEC-Puffer: 500 mM NaCl, 50 mM TRIS, 1mM TECEP, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8.0 bei 4 °C

4.4.1.5. Anionenaustauschchromatographie

Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung filtriert (Porengröße 0.22 µM) und auf eine gewaschene und mit Waschpuffer äquilibrierte Mono Q Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Sobald sich das UV-Signal stabilisiert hatte, wurde die Elution durch einen linearen Gradienten zu 30% Elutionspuffer in 45 min erreicht. Mittels SDS-

PAGE wurden die proteinhaltigen Fraktionen analysiert und durch LC/MS-Experimente auf unterschiedliche Phosphorylierungszustände überprüft.

Waschpuffer: 50 mM TRIS, 1mM TECEP, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4 °C

Elutionspuffer: 1 M NaCl, 50 mM TRIS, 1mM TECEP, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8.0 bei 4 °C

4.4.1.6. Zweite Größenausschlusschromatographie

Im letzten Schritt wurde ein für die Kristallisation essentieller Pufferwechsel vorgenommen. Hierzu wurde eine Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) Gelfiltrationssäule mit dem SEC2-Puffer äquilibriert. Die Probe wurde mit einem Fluss von 0.5 mL/min auf die Säule aufgetragen und die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert, aufkonzentriert und für Kristallisationsansätze verwendet.

SEC2-Puffer: 100 mM NaCl, 25 mM TRIS, 2mM TECEP, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8.0 bei 4 °C

4.4.2. Isolierung der EGFR-Assaykonstrukte

Die in dieser Arbeit generierten EGFR-Assaykonstrukte wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen GST-Tag in Insektenzellen exprimiert, um deren Löslichkeit zu verbessern. Die Zellyse wurde, wie in Abschnitt 4.4.1.1 beschrieben, vorgenommen. Der einzige Unterschied bestand im verwendeten Lysepuffer (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 1% (v/v) NP-40, pH 7.4).

4.4.2.1. Affinitätschromatographie

Das filtrierte Lysat wurde auf eine äquilibrierte Glutathion HiCap Säulenmatrix aufgetragen. Der Fluss der Probe wurde zwischen 0.2-0.4 mL/min eingestellt, um eine Bindung des Fusionsproteins an die Säulenmatrix zu erleichtern. Nach dem Waschen der Säule und der Stabilisation des UV-Signals, wurde eine Elution des Zielproteins durch den Elutionspuffer, der reduziertes Glutathion beinhaltet, eingeleitet. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden anschließend mit einer SDS-PAGE analysiert. Zuletzt wurden die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, mithilfe einer Zentrifugenfiltereinheit (MWCO 35 kDa) aufkonzentriert und gleichzeitig wurden kleine Proteine (MW <35 kDa) abgetrennt.

Waschpuffer: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4 bei 4 °C

Elutionspuffer: 400 mM NaCl, 50 mM TRIS, 25 mM reduziertes Glutathion, pH 8.0 bei 4 °C

4.4.2.2. Größenausschlusschromatographie

Die aufkonzentrierte Proteinlösung wurde auf eine zuvor äquilibrierte Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 75 µg, GE Healthcare) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einem Fluss von 1 mL/min. Durch die Verfolgung des UV-Signals bei 280 nm, konnten die proteinhaltigen Fraktionen identifiziert und mittels SDS-PAGE analysiert werden. Die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und erneut mit Hilfe einer Zentrifugeneinheit (MWCO 35 kDa) aufkonzentriert, bis eine Proteinkonzentration von 1 mg/mL erreicht wurde. Das gereinigte Protein wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

SEC-Puffer: 500 mM NaCl, 50 mM TRIS, 1mM TECEP, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8.0 bei 4 °C

4.5. Strukturbiologische Untersuchungen

4.5.1. Kristallisation des EGF-Rezeptors

Ein Ziel dieser Arbeit war es Strukturen neuartiger Liganden im Komplex mit der Kinasedomäne von EGFR zu lösen. Ein essentieller und unberechenbarer Faktor dabei ist die Proteinkristallisation, das heißt die Identifikation einer Bedingung, bei der sich die Löslichkeit des Proteins langsam herabsetzt und es zu einer spontanen Kristallisation kommt. Für diese Experimente wurde grundsätzlich bevorzugt das isolierte Protein nach dem finalen Reinigungsschritt verwendet. Sofern das Protein zuvor bei -80 °C gelagert wurde, so wurde zunächst eine Größenausschlusschromatographie zur Abtrennung oligomerer Spezies durchgeführt. Dabei wurde eine Superdex 10/30 GL 75 µg (GE Healthcare) verwendet und das Protein in den Kristallisationspuffer (siehe Abschnitt 4.4.1.6) überführt. In initialen Kristallisationsexperimenten wurde nach Kristallisationsbedingungen gescreent (siehe Abschnitt 4.5.1.1), um dann in einem nächsten Schritt die gefundenen Bedingungen zu optimieren (siehe Abschnitt 4.5.1.2). Sämtliche verwendeten Puffer und Kristallisationslösungen wurden vor der Verwendung steril filtriert (0.22 µm Porengröße). Das Protein wurde auf eine Konzentration von 3-5 mg/mL mittels einer Zentrifugeneinheit aufkonzentriert und für Ko-Kristallisationsansätze mit dreifachem molarem Überschuss des Inhibitors für 1 h bei 4 h inkubiert. Zur Abtrennung des möglicherweise entstandenen Präzipitats wurde die Proteinlösung bei 16 000xg für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und in Kristallisationsexperimenten eingesetzt.

4.5.1.1. **Screening-Experimente**

Um initiale Kristallisationsbedingungen für die EGFR-Kristallisationskonstrukte zu finden, wurde auf kommerziell erhältliche Protein Kristallisations Kits (JCSG Core I-IV Suites, JCSG+ Suite, Classics Suite, Qiagen) zurückgegriffen. Dabei wurden Kristallisationsplatten mit 96 Kavitäten (IQ Plates, TTP Labtech) eingesetzt. Zunächst wurden 70 µL der jeweiligen Reservoir-Lösungen in die Kavitäten der Kristallisationsplatte vorgelegt und im Anschluss wurden mit Hilfe des Pipettierroboters Mosquito Crystal (TTP Labtech) 100 nL der vorbereiteten Proteinlösung und 100 nL Reservoir-Lösung in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Zum Schluss wurden die Platten versiegelt und jeweils ein Ansatz bei 4 °C und ein Ansatz bei 20 °C inkubiert. Die Beobachtung der Tropfen erfolgte mit Hilfe des Kristallisationsplatten-Imagers (Rock-Maker, Formulatrix).

4.5.1.2. **Optimierung der Kristallisationsbedingungen**

Für die Optimierung der in den *Screening*-Experimenten gefundenen initialen Kristallisationsbedingungen (**A:** 20% PEG 3350, 200 mM NH₄-Formiat; **B:** 20% PEG 3350, 200 mM MgSO₄, jeweils bei 20 °C Inkubationstemperatur) wurden die puffernden Substanzen, der pH-Wert und die Salzkonzentrationen variiert. Des Weiteren wurden kommerziell erhältliche Additive in weiteren Screening-Experimenten getestet. Als Kristallisationsmethode wurde anschließend die Dampfdiffusion im hängenden Tropfen in Kristallisationsplatten mit 15 Kavitäten (Easy Xtal Platten, Qiagen) bei 20 °C angewendet, wobei jeweils 1 µL der Reservoir-Lösung mit 1 µL der Proteinlösung gemischt wurde. Für das EGFR-T790M/V948R Konstrukt konnte in Ko-Kristallisationsansätzen mit verschiedenen Inhibitoren ein Kristallwachstum unter folgenden Bedingungen (17.5-27.5% PEG 3350; 50-200 mM MgSO₄; 2-4% Ethylenglykol) nach 3-10 Tagen beobachtet werden. Die Kristalle wurden abschließend gefischt und ohne weiteren Cryo-Schutz in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.5.2. **Kristallisationsstudien mit cSrc**

Für verschiedene Liganden, mit denen keine Kristalle im Komplex mit EGFR erhalten werden konnten, wurden Kristallisationsstudien mit cSrc-T338M/S345C durchgeführt. Die grundsätzliche Vorgehensweise kann Abschnitt 4.5.1.2 entnommen werden. Das Protein wurde unter folgenden Bedingungen bei Raumtemperatur ko-kristallisiert: 10% Ethylenglykol, 10 mM NaCl, pH 7.0.^[178]

4.5.3. Datensammlung

Die Kristalle wurden zunächst an der Röntgenquelle (MICROSTAR Röntgenquelle, Bruker AXS Inc., Mar345 Image Plate Detektor, Marresearch GmbH) am Max-Planck-Institut auf ihr Streuverhalten getestet. Wurde ein für Proteine typisches Streuverhalten beobachtet bzw. ein Salzkristall ausgeschlossen, erfolgte die weitere Analyse der Kristalle an der Röntgenquelle X10SA der *Swiss Light Source* (SLS) am Paul-Scherrer-Institut in Villingen und gegebenenfalls die Aufnahme eines Datensatzes.

4.5.4. Datenprozessierung

Die Prozessierung der erhaltenen Datensätze erfolgte im ersten Schritt mittels XDS, wodurch die gemessenen Reflexe indexiert, integriert und skaliert wurden.^[253] Die EGFR- sowie die cSrc-Komplexstrukturen wurden mit Hilfe des molekularen Ersatzes mit PHASER gelöst.^[254] Für die cSrc-Strukturen wurde eine in unserem Arbeitskreis entstandene Referenzstruktur (PDB: 3D5G) verwendet und für die EGFR-Strukturen diente eine hochaufgelöste Struktur (PDB: 5HG8) als Modell. Durch alternierende Zyklen des manuellen Modellbaus in WINCOOT und Verfeinerungen mittels PHENIX wurden die Komplexstrukturen gelöst.^[255-257] Die Generierung der Topologien der Liganden für den korrekten Einbaus des Liganden erfolgte mit Hilfe des Dundee PRODRG-Servers.^[258] Die verfeinerten Strukturen wurden im Anschluss mit dem PDB-Server validiert.^[259] Zur Visualisierung und zur Strukturanalyse, sowie für die Erstellung von Abbildungen wurde in dieser Arbeit die Software PYMOL verwendet.^[260]

4.6. Biochemische Charakterisierung

Einen weiteren wesentlichen Aspekt dieser Arbeit stellte die biochemische Charakterisierung von Molekülen, im Hinblick auf deren inhibitorischen Effekt gegenüber Kinasen, dar. Hierzu wurde auf das kommerziell erhältliche Assaysystem KinEASE der Firma Cisbio zurückgegriffen, das auf der HTRF (*Homogeneous Time-Resolved Fluorescence*) Technologie beruht. Mit Hilfe dieses Aktivitäts-basierten Systems sollten zum einen IC₅₀-Werte ermittelt werden, aber auch detaillierte kinetische Studien zur Bestimmung der Bindungsaffinität K_i und der Rate der Inaktivierung k_{inact} einiger ausgewählter Verbindungen durchgeführt werden. Prinzipiell beruht die Methode auf der Messung des γ -Phosphatgruppentransfers von ATP auf ein artifizielles Substratpeptid (siehe Abbildung 4-1). Dafür wurde zuerst ein Inhibitor mit der Kinase präinkubiert, dann wurde die Reaktion durch die Zugabe des Substratpeptids und ATP gestartet. Nach einer bestimmten Zeit wurde die Reaktion durch die Zugabe einer Stopp-Lösung beendet. Die Stopp-Lösung enthielt unter anderem EDTA, welches das für die Kinase-Reaktion essentielle Mg^{2+} komplexiert, aber auch einen pTyr- oder

pSer/pThr-spezifischen Antikörper, der an ein Eu^{3+} -Kryptat (FRET-Donor) gekoppelt wurde. Des Weiteren beinhaltete die Stopp-Lösung einen Streptavidin-gebundenen XL665-Fluorophor (STV-XL665; FRET-Akzeptor), der in der Lage war an das biotinylierte Substratpeptid zu binden. Sobald das Substratpeptid von der Kinase phosphoryliert wurde, befanden sich die beiden Fluorophore in ausreichend räumlicher Nähe (90 Å) und die Exzitation des Donor-Fluorophors (Eu^{3+} -Kryptat) bei 317 nm führte zu einer Emission des Akzeptor-Fluorophors (XL665) bei 665 nm.

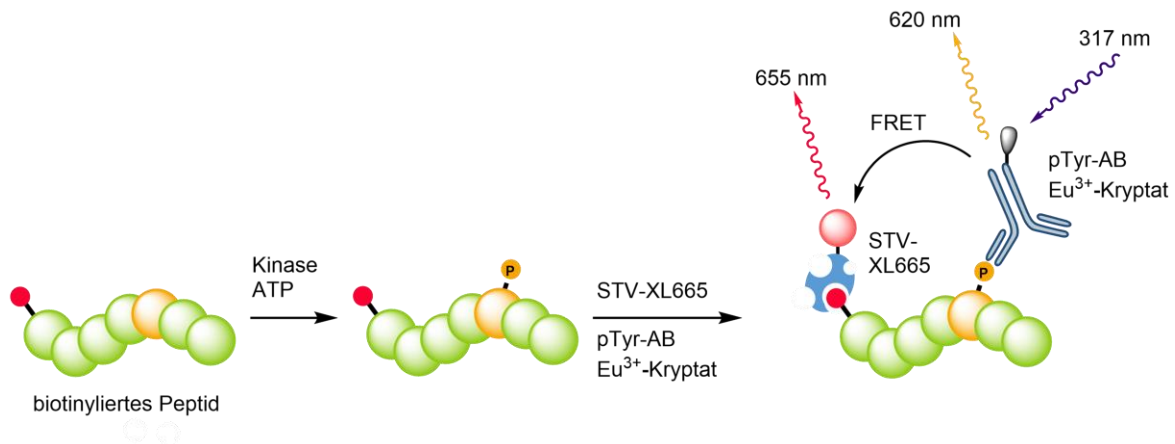


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des Assay-Prinzips. Zuerst katalysierte die Kinase den γ -Phosphatgruppentransfer von dem Cofaktor ATP auf ein artifizielles biotinyliertes Substratpeptid. Danach wurde die Reaktion durch die Zugabe von EDTA, das Mg^{2+} komplexiert, gestoppt. Außerdem wurde für die Verfolgung des Phosphattransfers ein pTyr-spezifischer Antikörper, der an ein Eu^{3+} -Kryptat gekoppelt wurde (pTyr-AB Eu^{3+} -Kryptat) und ein Streptavidin-gebundener XL665-Fluorophor (STV-XL665) hinzugegeben. Die schlussendliche Detektion des Phosphatgruppentransfers erfolgte durch die Messung des FRET-Signals, das erst durch die räumliche Nähe der beiden Fluorophore ermöglicht wurde.

Um die relative Menge des phosphorylierten Substrats zu bestimmen, wurden die zeitaufgelösten Emission bei einer Wellenlänge von 665 nm bzw. 620 nm gemessen, wobei der Quotient den Anteil des phosphorylierten Substrats abbildete, der der Kinaseaktivität entspricht. Die genaue Vorgehensweise und Bestimmung der einzelnen Parameter werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.6.1. Etablierung der Assaysysteme

Im Vorfeld der umfangreichen biochemischen Untersuchungen und IC_{50} -Bestimmungen, wurden Protein-spezifische Parameter einer jeden Kinase bestimmt und Assay-Bedingungen optimiert, sodass robuste und reproduzierbare Primärdaten generiert werden konnten und gleichzeitig wenig Protein verbraucht wurde. Dazu wurde die Enzymaktivität, die Enzymkinetik sowie der ATP- K_m und der Substrat- K_m der Kinase untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, die in Tabelle 4-8 gezeigten Kinasen untersucht, die zum Teil intern hergestellt oder kommerziell erworben wurden.

Tabelle 4-8: Übersicht über die untersuchten Kinasen, entweder intern hergestellt oder kommerziell erworben wurden.

Protein	Hersteller	Bestellnummer/Lot
EGFR-WT	Carna Biosciences	13CBS-0005K
EGFR-L858R	Carna Biosciences	13CBS-0537B
EGFR-L858R/T790M	Carna Biosciences	12CBS-0765B
EGFR-L858R/T790M/C797S	intern	
EGFR-L858R/C797S	SignalChem	E10-122ZG-10/2219-3
EGFR-del19/C797S	SignalChem	E10-122TG-10/2259-7
EGFR-del19	intern	
EGFR-del19/G724S	intern	
EGFR-D770insNPG	Carna Biosciences	17CBS-0041B
HER2-WT	intern (A. Arndt)	
HER2-insYVMA	ProQinase	1525-0000-1/003

4.6.1.1. Untersuchung der Enzymaktivität

In einem ersten Schritt der Assay-Etablierung wurde die Kinaseaktivität ermittelt, um daraus die optimale Proteinmenge pro Well abzuleiten. Dazu wurde eine serielle Verdünnungsreihe mit zwölf Datenpunkten des Proteins, ausgehend von 50 ng/Well bis hin zu 0.01 ng/Well, angefertigt. Die Kinase-Reaktion wurde für 30 min unter saturierenden Konzentrationen an ATP (100 μ M) und Substrat (1 μ M) durchgeführt, bevor sie durch Zugabe der Stopp-Lösung (Fluorophor/Substrat = 1/8) beendet wurde. Nach einstündiger Inkubation wurden die Daten ausgelesen. Durch die Auftragung des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten bei 665 nm und 620 nm gegen die logarithmische Proteinmenge, konnte eine sigmoidale Kurve erhalten werden. Im Idealfall konnten zwei Plateaus erkannt werden, ansonsten wurde die Enzymaktivitätsbestimmung mit angepassten Proteinmengen wiederholt. Die optimale Proteinkonzentration entsprach dann dem Wert, bei dem ca. 80% Kinaseaktivität beobachtet werden konnten. Diese ermittelte Proteinmenge wurde für alle weiteren Experimente verwendet.

4.6.1.2. Untersuchung der Enzymkinetik

Der zweite Schritt der Etablierung eines Assaysystems bildet die Untersuchung der Enzymkinetik ab, mit dem Ziel die optimale Reaktionszeit der Kinase zu ermitteln. Wie im ersten Schritt wurde auch hier unter saturierenden Konzentrationen des Cofaktors ATP (100 μ M) und des Substrats (1 μ M) gearbeitet, wobei die Kinase-

Reaktion durch Zugabe der Stopp-Lösung (Fluorophor/Substrat = 1/8) zu verschiedenen Zeitpunkten (0-120 min) beendet wurde. Die Auswertung erfolgte, wie im vorherigen Absatz beschrieben, über die Auftragung des Quotienten (Em 665 nm/Em 620 nm) gegen die zu untersuchende Größe, in diesem Fall die Reaktionszeit. Die optimale Reaktionszeit entsprach der Zeit bei der ca. 80% der Kinaseaktivität erreicht wurden. Die so bestimmte Reaktionszeit wurde allen folgenden Schritten zugrunde gelegt.

4.6.1.3. Bestimmung des ATP- und Substrat- K_m s

Mit den zuvor bestimmten Parametern (Proteinmenge pro Well und der Reaktionszeit) wurden im Anschluss der ATP- K_m und der Substrat- K_m bestimmt. Für die Ermittlung des ATP- K_m s wurde zunächst eine Konzentrationsreihe ausgehend von 300 μ M bis hin zu 2 nM ATP generiert, sodass 12 Messpunkte erhalten wurden, wobei mit einem Überschuss des Substrats (1 μ M) gearbeitet wurde. Dann wurde die Reaktion durch die Zugabe der zuvor ermittelten Proteinmenge gestartet und nach Ablauf der Reaktionszeit gestoppt (Fluorophor/Substrat = 1/8). Für die Bestimmung des ATP- K_m s wurde das FRET-Signal gegen die eingesetzten ATP-Konzentrationen aufgetragen und mit Hilfe des Programms Xlfit (IDBS) unter Verwendung der Formel „Michaelis-Menten Kinetik Nr. 250“ (siehe Formel (12)) berechnet.

$$f(c) = \frac{v_{max} \cdot c^n}{c^n + K_M^n} \quad (12)$$

c = ATP-Konzentration v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit

K_M = Michaelis-Menten Konstante n = Steigungsfaktor

Der ATP- K_m wurde in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten ermittelt. Die für spätere biochemische Assays verwendete ATP-Konzentration ergab sich aus dem Mittelwert der zuvor bestimmten ATP- K_m s, um auf der einen Seite das Verdrängungsgleichgewicht zwischen ATP und den Inhibitoren möglichst gering zu halten, aber dennoch gute Umsatzbedingungen für die Kinase zu schaffen.

Die Bestimmung des Substrat- K_m s erfolgte indessen unter ähnlichen Bedingungen wie die Bestimmung des ATP- K_m s, wobei eine Verdünnungsreihe des Substratpeptids (12 Datenpunkte) angefangen bei 2 μ M erstellt wurde. An dieser Stelle wurde mit einem Überschuss des Kofaktors ATP (100 μ M) gearbeitet und es musste zusätzlich eine Verdünnungsreihe des Fluorophors XL665 generiert werden, sodass das Verhältnis 1/8 zwischen STV-XL665 Fluorophor und

eingesetztem Substrat erhalten blieb. Die Berechnung des Substrat- K_m s erfolgte analog zu der Berechnung des ATP- K_m s.

4.6.1.4. Bestimmung des Fluorophor/Substrat-Verhältnisses

Der finale Schritt der Etablierung eines Assaysystems bildete die Messung der IC_{50} -Werte diverser Referenzinhibitoren unter den zuvor ermittelten Assay-Bedingungen ab, wobei das Verhältnis zwischen STV-XL665 Fluorophor und dem Substrat variiert wurde (1/8; 1/4; 1/2; 1/1), um das optimale Assayfenster zu erhalten. Das heißt, dass versucht wurde die Spanne zwischen der positiv und negativ Kontrolle und somit das S/N-Verhältnis (*signal-to-noise*) möglichst maximal zu halten. Es wurde ausschließlich mit Assaysystemen weitergearbeitet, bei denen ein 5-faches Assayfenster beobachtet werden konnte. Des Weiteren konnte das Assaysystem auf diese Art und Weise auch durch den Vergleich mit publizierten Daten validiert werden. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde analog zu Abschnitt 0 vorgenommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden elf Assaysysteme etabliert und mit drei weiteren von Simone Eppmann aufgesetzten Systemen gearbeitet. In Tabelle 4-9 sind sämtliche spezifische Assay-Parameter und die dazugehörigen Proteine gezeigt.

Tabelle 4-9: Übersicht über die Protein-spezifischen Parameter, die innerhalb der Etablierung des Assaysystems ermittelt wurden und für die Aufnahme von IC_{50} -Werten verwendet wurden.

Protein	Kinase pro Well [ng]	Reaktionszeit [min]	ATP [μ M]	Substrat [μ M]	Fluorophor/ Substrat
EGFR-WT	0.6	25	9.5	1	1/8
EGFR-L858R	0.1	15	25	0.225	1/4
EGFR-L858R/ T790M	0.07	20	20	0.275	1/8
EGFR-L858R/ T790M/C797S	0.8	10	11	0.325	1/8
EGFR-L858R/ C797S	0.05	20	75	1	1/8
EGFR-del19/ C797S	0.5	15	80	1	1/8
EGFR-del19	1	60	60	1	1/8
EGFR-del19/ G724S	5	15	20	0.35	1/8
EGFR-D770insNPG	0.02	20	40	1	1/8
HER2-WT	20	40	3	1	1/8
HER2-insYVMA	0.01	40	6	1	1/8

4.6.2. Bestimmung der IC₅₀-Werte

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte im 384-Well Format mit einem Assay-Volumen von 20 µL, sodass 22 Inhibitoren gleichzeitig auf einer Assayplatte untersucht werden konnten. Zunächst wurden die Lösungen gemäß den zuvor bestimmten Protein-spezifischen Parameter (siehe Tabelle 4-9) hergestellt. Dabei wurde die Kinase-Lösung und die Reaktionslösung (ATP/Substrat) mit dem HTRF-Puffer (5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.01% Triton X-100, 5x HTRF KinEASE Reaktions-Puffer, ddH₂O) angesetzt und für die Stopp-Lösung (pTyr-AB, STV-XL665) wurde der HTRF KinEASE Detektionspuffer (50 mM HEPES, 0.1% (w/v) BSA, 800 mM KF, 20 mM EDTA, pH 7.0 bei 4 °C) verwendet. Danach wurden serielle Verdünnungsreihen mit acht Konzentrationen für jeden zu untersuchenden Inhibitoren mit Hilfe des akustischen Dispensers ECHO 520 Liquid Handler (Labcyte) und der zugehörigen Dose-response Software Echo Dose-Response v1.5.4 generiert (V=2.5 µL). Da die Inhibitoren als Stammlösungen in DMSO vorlagen, wurde, um einen Effekt des DMSOs auszuschließen, der DMSO Gehalt in allen Kavitäten auf 2% eingestellt. Ebenso wurden auf jeder Assayplatte Positiv- sowie Negativ-Kontrollen (jeweils 16 Wells) getestet, die das Assayfenster definierten und die Vergleichbarkeit der Primärdaten erlaubten. Im Anschluss wurden 5 µL der Kinase hinzugegeben und diese 30 min mit den Inhibitoren präinkubiert, bevor die Kinase-reaktion durch die Zugabe der Reaktionslösung (2.5 µL, ATP/Substrat) gestartet wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 µL Stopp-Lösung (Detektionspuffer, pTyr-AB, STV-XL665) beendet und nach einer einstündigen Inkubation konnte das FRET-Signal mit Hilfe des EnVision Multimode Plate Readers (Perkin Elmer) ausgelesen werden. Dazu wurde die Fluoreszenz bei 620 nm und 650 nm 50 µs nach der Anregung bei 317 nm detektiert. Im Anschluss wurde der Quotient Em₆₆₅ nm/Em₆₂₀ nm gebildet und graphisch gegen die entsprechende logarithmische Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte mit Hilfe des Programms Quattro-Workflow (Quattro Research) unter der Verwendung eines Nicht-linearen Fittings.

Die Bestimmungen der IC₅₀-Werte erfolgten in mindestens drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten, wobei die Ergebnisse als Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben wurden.

4.6.3. Kinetische Bindungsstudien

Für die detaillierte Charakterisierung der Bindungsbildung einiger ausgewählter kovalenter Verbindungen, wurde die Bindungsaffinität K_i und die Rate der Inaktivierung k_{inact} der entsprechenden Inhibitoren gegenüber verschiedenen EGFR-Varianten bestimmt. Grundsätzlich entsprach die Vorgehensweise der Bestimmung der IC_{50} -Werte, die in Abschnitt 0 beschrieben wurde. Das heißt, dass die Reaktionslösungen, sowie die Reaktionszeit und die Anfertigung der Inhibitor Verdünnungen identisch waren. Der ausschlaggebende Aspekt bei der K_i/k_{inact} -Bestimmung stellt in der Generierung von zeitabhängigen IC_{50} -Werten dar, wozu die Präinkubation der Kinase mit dem Inhibitor variiert wurde (2-90 min) und für jede Präinkubationszeit ein IC_{50} -Wert ermittelt wurde. Nachdem die zeitabhängigen IC_{50} -Werte mit Hilfe der Software Quattro-Workflow (Quattro Research) bestimmt wurden, wurde nach KRIPPENDORFF *et al.* die Bindungsaffinität K_i und die Rate der Inaktivierung k_{inact} berechnet.^[161]

Konkret wurde anhand der folgenden Formeln mit des Programms Xlfit (IDBS) die Parameter determiniert.

$$IC_{50}(t) = K_i \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_M}\right) \cdot \left(\frac{2 - 2e^{-\eta_{IC_{50}} \cdot k_{inact} \cdot t}}{\eta_{IC_{50}} \cdot k_{inact} \cdot t} - 1\right) \quad (9)$$

$$\eta_{IC_{50}} = \frac{IC_{50}(t)}{K_i \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_M}\right) + IC_{50}(t)} \quad (10)$$

[I]=Inhibitorkonzentration t=Inkubationszeit

Die Bestimmungen der Parameter K_i und k_{inact} erfolgte in mindestens drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten, wobei die Ergebnisse als Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben wurden.

4.7. Zellbiologische Methoden

4.7.1. Humane Krebszelllinien

Für Viabilitätsassays wurde im Rahmen dieser Arbeit mit folgenden humanen Zelllinien gearbeitet.

Tabelle 4-10: Übersicht über die verwendeten Zelllinien. Zusätzlich wurde aufgelistet woher die Zellen stammen, welches Medium verwendet wurde und der entsprechende Literaturverweis wurde angeführt.

Zelllinie	Herkunft	Medium	Literatur
A431	ATCC	DMEM Glutamax, 10% FBS Gold, 1% Pen/Strep,	[261]
H1975	ATCC	RPMI 1640 Glutamax, 10% FBS Gold, 1% Pen/Strep,	[48]
PC9 PC9-T790M PC9-T790M/C797S	AG Sos	RPMI 1640 Glutamax, 10% FBS Gold, 1% Pen/Strep,	[196]
H1781	ATCC	RPMI 1640 Glutamax, 10% FBS Gold, 1% Pen/Strep,	[262]

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Krebszelllinien fand in einer wasserdampfgesättigten, 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C statt. Sämtliche Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank mit laminarer Strömung. Aus diesem Grund wurden alle Lösungen autoklaviert, sterilfiltriert oder bereits steril erworben. Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Generell wurden die Zellen in T-75 Flaschen kultiviert und bei einer Konfluenz von 80-90% vereinzelt. Dazu wurde das Medium abgenommen und die adhärennten Zellen mit einem DPBS-Puffer (12 mL) gewaschen. Danach wurde auch dieser abgenommen und durch eine 0,25%ige Trypsin/EDTA Lösung ersetzt. Es erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen in 9.5 mL Kulturmedium aufgenommen. Durch eine Zentrifugation wurden die Zellen sedimentiert und das entstandene Pellet wurde erneut in 12 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung und die Bestimmung der Viabilität der Zellen wurde mithilfe des Countess II Zellzählers vorgenommen, wozu 10 µL der Zellsuspension mit 10 µL einer Trypanblau-Lösung gemischt und auf einen Objektträger überführt wurden. Es wurde ausschließlich mit

Zellenpassagen weitergearbeitet, die eine Viabilität von mindestens 85% aufwiesen. Lediglich kurz nach dem Auftauen von Zellen wurde eine geringere Viabilität toleriert. Zur weiteren Kultivierung wurden 2×10^6 Zellen pro T-75 Flasche in 12 mM Medium ausgesät. Die langfristige Lagerung der Zellen wurde bei $-150\text{ }^\circ\text{C}$ vorgenommen. Dazu wurde im Zuge des Passagierens der Zellen das Zellpellet in Einfriermedium (Zusatz von 10% DMSO zum herkömmlichen Kultivierungsmedium) resuspendiert und die Zelldichte auf 1×10^6 Zellen/mL eingestellt. Je 1 mL dieser Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und 24 h in einem *Freezing* Container bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, um ein schrittweises Abkühlen der Zellen zu gewährleisten. Danach erfolgte die Lagerung bei $-150\text{ }^\circ\text{C}$.

4.7.2. Zelluläre Charakterisierung

Zur Evaluierung von Substanzen im zellulären Kontext erfolgte die Bestimmung von EC_{50} -Werten, oder im Rahmen von Screening-Kampagnen anhand von der prozentualer Reduktion der Zellviabilität, gegenüber klinisch relevanten Zelllinien mit Hilfe des kommerziell erhältlichen *Cell Titer-Glo Assays* (CTG-Assay, Promega GmbH). Dabei wurde der Assay in weißen Mikrotiterplatten mit 384 Kavitäten und flachem Boden durchgeführt, wobei auf jeder Platte 16 Positiv- sowie Negativkontrollen (Staurosporin und DMSO) getestet wurden. Weiterhin wurden alle Datenpunkte in Duplikaten in drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Der allgemeine Arbeitsablauf zur Bestimmung von EC_{50} -Werten wird im Folgenden erläutert. Zuerst wurden Zellen mittels eines Multidrop Dispensers kontaktlos auf einer 384-Well Platte ausgesät und 24 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Die zu untersuchenden Substanzen und Kontrollen wurden mithilfe des ECHO 520 Liquid Handler (LabCyte) transferiert, dabei wurden bei EC_{50} -Bestimmungen Verdünnungsreihen (14 nM-30 μM) generiert und im Fall von Primär-Screens einzelne Substanzkonzentrationen auf die Zellen aufgebracht. Zu beachten war an dieser Stelle, dass die Zeit, in der die Zellen Raumtemperatur ausgesetzt waren, möglichst gering zu halten war, da ansonsten inhomogene Daten erhalten wurden. Es folgte eine Inkubation von 96 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 . Danach erfolgte die Durchführung des CTG-Assays nach Herstellerangaben, wobei 25 μL einer 1:1 Mischung des DPBS-Puffers und des CTG-Reagenzes auf die Zellen pipettiert wurden und die Assayplatte sofort 2 min bei 1 000 rpm geschüttelt wurde, um die Zellyse zu induzieren. Damit sich das lumineszente Signal stabilisieren konnte, wurden die Zellen für 20 min in Dunkelheit inkubiert. Das Auslesen des lumineszenten Signals erfolgte mit dem Envision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) unter Verwendung von 500 ms Integrationszeit. Die Ermittlung des EC_{50} -Werts bzw. die Bestimmung der prozentualen inhibitorischen Aktivität wurde mithilfe des Programms Workflow aus dem Quattro Research Software Paket vorgenommen. Durch die Bestimmung des Z' -Faktors für jede einzelne Assayplatte, wurde die Qualität der erhobenen Daten bestimmt und lediglich die Ergebnisse aus Experimenten mit einem Z' -Faktor von ≥ 0.5 wurden berücksichtigt.

5. ANHANG

5.1. Sequenzen der EGFR Konstrukte

WT	GSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELRE
pMK25	GSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELRE
pMK33	GSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELRE
WT	ATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNI
pMK25	ATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLIMQLMPFGCLLDYVREHKDNI
pMK33	ATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLIMQLMPFGCLLDYVREHKDNI
WT	GSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTTPQHVKITDFGLAKLLGAEKEY
pMK25	GSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTTPQHVKITDFGLAKLLGAAAKEY
pMK33	GSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTTPQHVKITDFGLAKLLGAEKEY
WT	HAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEK
pMK25	HAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEK
pMK33	HAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEK
WT	GERLPQPP ICT IDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHL
pMK25	GERLPQPP ICT IDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHL
pMK33	GERLPQPP ICT IDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHL
WT	PSPTDSNFYRALMDEEDMDVVD ADE YLI PQQG
pMK25	PSPTDSNFYRALMDEEDMDVVD ADE YLI PQQG
pMK33	PSPTDSNFYRALMDEEDMDVVD ADE YLI PQQG

Abbildung 5-1: Sequenzalignment der EGFR Kristallisationskonstrukte pMK25 und pMK33 und dem EGFR-WT Konstrukt (AS 696-1022). Farbig gekennzeichnet wurden die Aminosäuren, die mutiert wurden.

WT	MRRRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVY
pMK15	MRRRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVY
pMK50	MRRRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFSTVY
pMK52	MRRRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVY
WT	KGLWIPEGEKVKIPVAIKE LEREAT TSPKANKEILDEAYVMA SVDNPHVCRLLGICLTSTVQ
pMK15	KGLWIPEGEKVKIPVAIKE LEREAT TSPKANKEILDEAYVMA SVDNPHVCRLLGICLTSTVQ
pMK50	KGLWIPEGEKVKIPVAIK-----TSPKANKEILDEAYVMA SVDNPHVCRLLGICLTSTVQ
pMK52	KGLWIPEGEKVKIPVAIK-----TSPKANKEILDEAYVMA SVDNPHVCRLLGICLTSTVQ
WT	LITQLMPFG C LLDYVREHKDNI GSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKT
pMK15	LIMQLMPFG S LLDYVREHKDNI GSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKT
pMK50	LITQLMPFG C LLDYVREHKDNI GSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKT
pMK52	LITQLMPFG C LLDYVREHKDNI GSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKT
WT	PQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWEL
pMK15	PQHVKITDFGR A LLGAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWEL
pMK50	PQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWEL
pMK52	PQHVKITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWEL
WT	MTFGSKPYDGI PASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELI IE
pMK15	MTFGSKPYDGI PASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELI IE
pMK50	MTFGSKPYDGI PASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELI IE
pMK52	MTFGSKPYDGI PASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELI IE
WT	FSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADEYLI PQQGFFS SP
pMK15	FSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADEYLI PQQGFFS SP
pMK50	FSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADEYLI PQQGFFS SP
pMK52	FSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADEYLI PQQGFFS SP
WT	STSRTPLLSLSSATSNNSTVAC IDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFL
pMK15	STSRTPLLSLSSATSNNSTVAC IDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFL
pMK50	STSRTPLLSLSSATSNNSTVAC IDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFL
pMK52	STSRTPLLSLSSATSNNSTVAC IDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFL
WT	PVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCV
pMK15	PVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCV
pMK50	PVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCV
pMK52	PVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCV
WT	NSTFDSPAHWAKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENA EYLRVAPQSSEF
pMK15	NSTFDSPAHWAKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENA EYLRVAPQSSEF
pMK50	NSTFDSPAHWAKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENA EYLRVAPQSSEF
pMK52	NSTFDSPAHWAKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENA EYLRVAPQSSEF
WT	I GA
pMK15	I GA
pMK50	I GA
pMK52	I GA

Abbildung 5-2: Sequenzalignment der EGFR Assaykonstrukte pMK15, pMK50 und pMK52 und dem EGFR-WT Konstrukt (AS 669-1210).Blau gekennzeichnet sind Aminosäuren, die mutiert wurden.

Tabelle 5-1: Übersicht über relevante Parameter für die Proteinreinigung der EGFR Konstrukte.

Bezeichnung	Länge [AS]	Molekulargewicht [kDa]	pI	Extinktionskoeffizient bei 280 nm [M⁻¹ cm⁻¹]
EGFR-T790M/ E865A/E866A/K867A				
ungespalten	347	39.4	6.11	52745
gespalten	333	37.7	5.77	52745
EGFR-T790M/ V948R				
ungespalten	347	39.6	6.11	52745
gespalten	333	37.9	5.79	52745
EGFR-L858R/ T790M/C797S				
	818	93.2	6.01	114140
EGFR-del19/G724S				
	770	87.6	5.8	110420
EGFR-del19				
	770	87.6	5.8	110420

5.2. Vergleich der Pufferzusammensetzungen

Tabelle 5-2: Vergleich der verschiedenen Pufferzusammensetzungen der alten und neuen Reinigungsstrategie der Kristallisationskonstrukte.

Reinigungsschritt	Pufferzusammensetzung alt	Pufferzusammensetzung neu
Ni²⁺Affinitätschromatographie	500 mM NaCl, 50 mM TRIS, 10 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8 bei 4 °C → 500 mM Imidazol	600 mM NaCl, 50 mM Tris, 15 % (v/v) Glycerol 1 mM TCEP, pH 7.5 bei 4 °C → 250 mM Imidazol
Dialysepuffer	75 mM NaCl, 20 mM TRIS, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8 bei 4 °C	250 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol 1 mM TCEP pH 8
Anionenaustauschchromatographie	75 mM NaCl, 20 mM TRIS, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8 bei 4 °C → 1 M NaCl	50 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 8 bei 4 °C → 1M NaCl
Größenausschlusschromatographie	300 mM NaCl, 30 mM TRIS, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8 bei 4 °C	500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 8 bei 4 °C
Kristallisationspuffer		100 mM NaCl, 25 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP pH 8 bei 4 °C

5.3. Überblick Proteinreinigung des Kristallisationskonstrukts EGFR- T790M/E865A/E866A/K867A

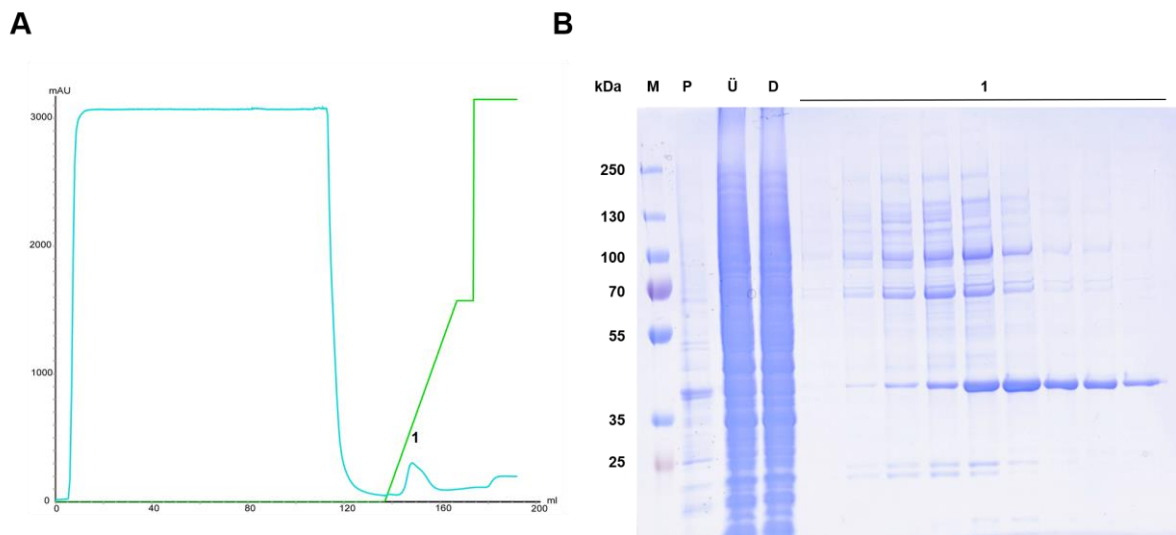


Abbildung 5-3: Erster Reinigungsschritt Affinitätschromatographie. **A:** Chromatogramm der Ni²⁺-Affinitätschromatographie des EGFR- T790M/E865A/E866A/K867A Konstrukts. Blau: UV-Absorption bei 280 nm; Grün: Anteil Elutionspuffer (250 mM Imidazol). **B:** Coomassie-SDS-Page einzelner Fraktionen aus dem ersten Reinigungsschritt. Aufgetragen wurde eine Probe aus dem Pellet (P), dem Überstand (Ü) nach erfolgtem Zellaufschluss, aus dem Durchfluss der Säule (D), sowie aus verschiedenen Fraktionen des Elutionspeaks (1). Wobei hier eine deutliche Bande auf der Höhe von 40 kDa erkennbar ist, die dem EGFR-T790M/E865A/E866A/K867A zugeordnet werden kann.

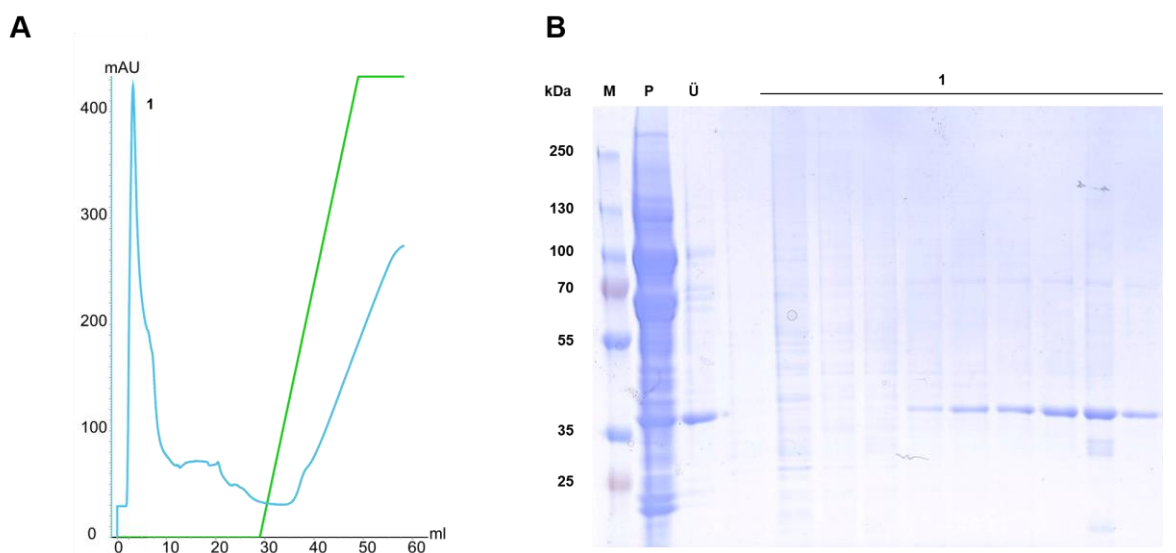


Abbildung 5-4: Zweiter Reinigungsschritt Affinitätschromatographie nach Abspaltung des His-Tags. **A:** Chromatogramm der Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Blau: UV-Absorption bei 280 nm; Grün: Anteil Elutionspuffer (250 mM Imidazol). **B:** Coomassie-SDS-Page einzelner Fraktionen aus dem Durchfluss (1), der durch die Abspaltung des His-Tags das Zielprotein mit einem Molekulargewicht von 38 kDa enthält.

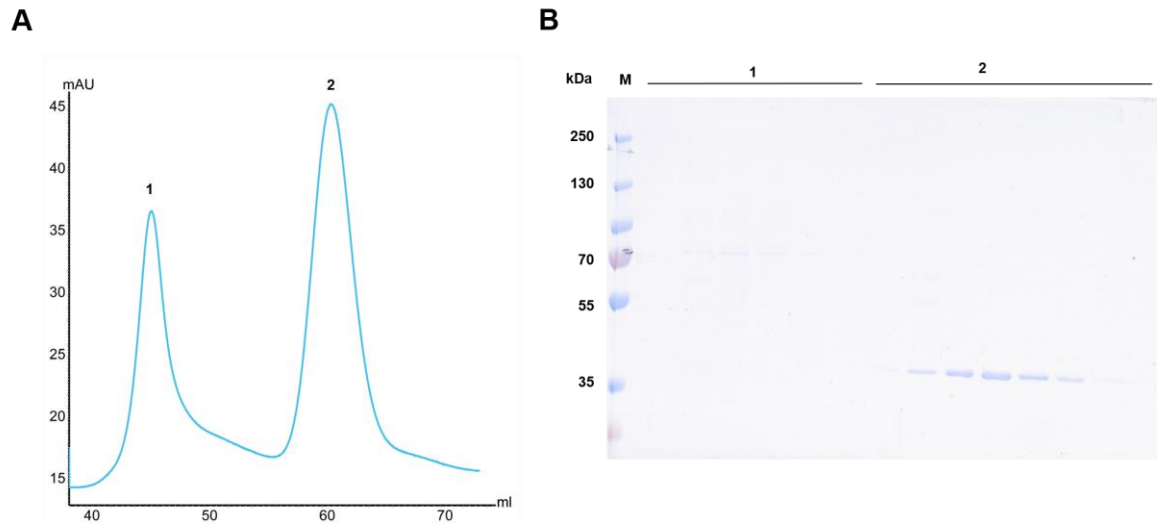


Abbildung 5-5: Dritter Reinigungsschritt Größenausschlusschromatographie. **A:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie. Blau: UV-Absorption bei 280 nm. **B:** Coomassie-SDS-Page einzelner Fraktionen aus dem dritten Reinigungsschritt. Aufgetragen wurden einzelne Proben aus dem ersten und zweiten Elutionspeak. Hier konnten deutliche Banden auf der Höhe von 37 kDa in Proben aus dem zweiten Elutionspeak identifiziert werden, die dem Zielprotein zugeordnet werden können.

5.4. Datenstatistiken der cSrc-Komplexstrukturen

Tabelle 5-3: Datenstatistiken der cSrc-Kristallstrukturen, die im Komplex mit den kovalenten EGFR-Inhibitoren RL2329 und RL2020 erhalten werden konnten. Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	cSrc-T338M/S345C im Komplex mit RL2329	cSrc-T338M/S345C im Komplex mit RL2020
Datensammlung		
Raumgruppe	P1	P1
Zelldimensionen		
a, b, c (Å)	42.14, 63.6, 74.49	42.1, 62.97, 74.54
α , β , γ (°)	101.42, 90.81, 91.13	100.235, 91.64, 90.03
Auflösung (Å)	43.31 – 1.90 (1.93 – 1.90)	43.66 – 2.10 (2.15 – 2.10)
R_{meas} (%)	7 (62.6)	10.8 (69.3)
I/σ	12.82 (2.72)	8.37 (2.1)
$CC_{1/2}$	99.8 (84.3)	99.6 (81.2)
Vollständigkeit (%)	96.4 (95.2)	97.5 (97)
Redundanz	3.5 (3.5)	3.5 (3.6)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	43.31 – 1.90	43.66 – 2.10
Anzahl der Reflexe	57602	42926
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	17.71/20.28 (25.32/29.44)	20.85/24.31 (29.37/34.14)
Anzahl der Atome		
Protein	4127	3873
Liganden	44	98
Wasser	321	171
B-Faktoren		
Protein	37.51	50.72
Liganden	30.18	54.38
Wasser	39.39	46.61
Standardabweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.011	0.006
Bindungswinkel (°)	1.075	0.817
Wellenlänge (Å)	0.9779	0.97856
Temperatur (K)	100	100
Röntgenquelle	PX II at SLS, Villingen, CH	PX II at SLS, Villingen, CH
Detektor	Pilatus 6MF	Pilatus 6MF
Ramachandran-Plot		
Reste in		
bevorzugten Regionen	98.2	96.8
erlaubten Regionen	1.8	3.2
Ausreißer	0	0

5.5. Datenstatistiken der EGFR-Komplexstrukturen

Tabelle 5-4: Datenstatistiken der EGFR-Kristallstrukturen, die im Komplex mit den kovalenten EGFR-Inhibitoren Poziotinib und RL2741 erhalten werden konnten. Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	EGFR-T790M/V948R im Komplex mit Poziotinib	EGFR-T790M/V948R im Komplex mit RL2741
Datensammlung		
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zelldimensionen		
a, b, c (Å)	76.33, 81.76, 89.85	76.5, 82.5, 90.2
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	44.92 – 2.10 (2.175 – 2.10)	45.10 – 1.80 (1.864 – 1.80)
R _{meas} (%)	8.1 (85.8)	7.4 (107.7)
I/σ	21.22 (3.10)	20.25 (2.51)
CC _{1/2}	99.9 (91.8)	100.0 (85.0)
Vollständigkeit (%)	96.4 (95.2)	99.0 (98.3)
Redundanz	33.41 (13.86)	13.3 (14.0)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	44.92 – 2.10	45.10 – 1.80
Anzahl der Reflexe	33404	53043
R _{work} /R _{free}	18.14/21.81 (22.90/33.11)	17.41/20.65 (25.17/23.49)
Anzahl der Atome		
Protein	4214	4281
Liganden	102	137
Wasser	120	218
B-Faktoren		
Protein	48.22	34.46
Liganden	47.98	34.21
Wasser	47.34	40.47
Standardabweichungen		
Bindungslängen (Å)	0.007	0.012
Bindungswinkel (°)	1.14	1.42
Wellenlänge (Å)	0.91504	0.91504
Temperatur (K)	100	100
Röntgenquelle	PX II at SLS, Villingen, CH	PX II at SLS, Villingen, CH
Detektor	Pilatus 6MF	Pilatus 6MF
Ramachandran-Plot		
Reste in		
bevorzugten Regionen	98.1	98.3
erlaubten Regionen	1.9	1.7
Ausreißer	0	0

5.6. Zusatzdaten zum PC9-T790M/C797S Screen

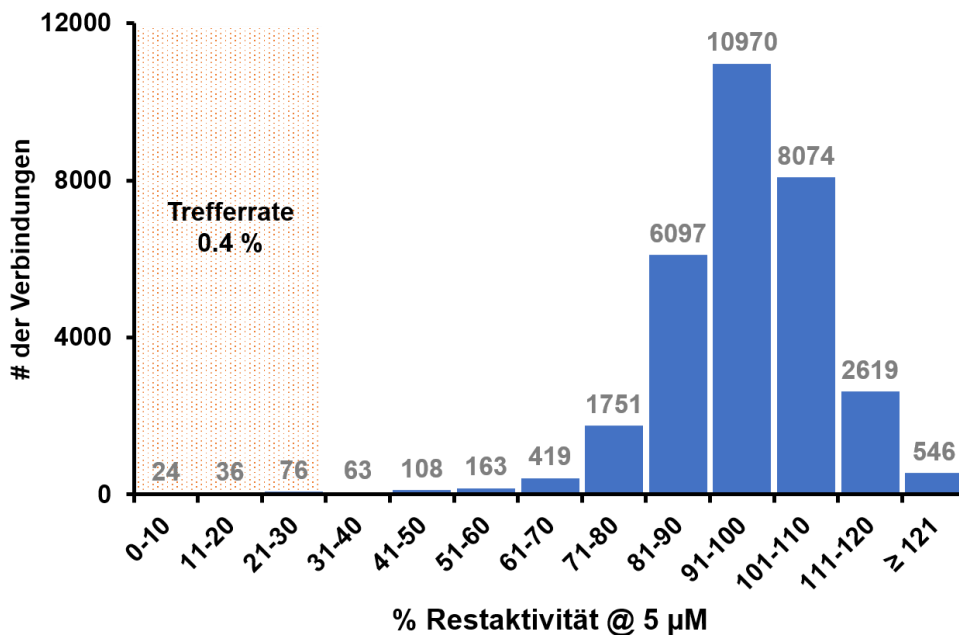


Abbildung 5-6: Aktivitätsverteilung der $\geq 30\,000$ Verbindungen die innerhalb der Screening-Kampagne getestet wurden gegenüber der PC9-T790M Zelllinie. Als Hitverbindungen wurden alle Substanzen mit einer Restaktivität unter 30% gewertet. Diese Substanzen wurden in anschließenden Hitvalidierungen bestätigt oder verworfen.

Tabelle 5-5: Ergebnisse der Hitvalidierung. Es erfolgten EC₅₀-Bestimmungen der Treffersubstanzen gegenüber sechs Zelllinien (EGFR-WT: A431, A549, H358; EGFR-mut.: PC9, PC9-T790M, PC9-T790M/C797S).\$\$\$\$\$\$\$\$

RSL	CTG EC ₅₀ [µM]					
	A431	A549	H358	PC9	PC9-T790M	PC9-T790M/C797S
27742	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
31	1.513 ± 0.399	0.501 ± 0.023	3.657 ± 1.146	3.419 ± 0.161	4.714 ± 0.512	3.577 ± 0.986
19576	6.239 ± 4.795	6.545 ± 7.723	1.854 ± 0.291	8.389 ± 3.863	9.842 ± 4.422	9.553 ± 3.216
23040	5.041 ± 0.763	4.320 ± 0.800	2.592 ± 0.829	12.283 ± 15.344	3.164 ± 0.329	3.159 ± 0.338
26993	4.465 ± 1.527	4.489 ± 1.995	1.936 ± 0.387	3.756 ± 1.309	3.985 ± 0.828	3.926 ± 0.821
28390	16.618 ± 15.470	12.200 ± 15.420	2.774 ± 1.299	20.782 ± 15.965	20.962 ± 15.654	20.613 ± 16.258
00766	0.835 ± 0.215	2.111 ± 0.342	0.852 ± 0.228	2.310 ± 0.382	2.638 ± 0.015	3.220 ± 0.396
02971	3.086 ± 0.623	5.214 ± 2.701	5.375 ± 4.156	6.682 ± 0.656	6.149 ± 0.398	6.969 ± 0.394
06581	1.671 ± 0.287	2.647 ± 0.825	2.828 ± 1.694	2.020 ± 0.091	1.993 ± 0.024	2.371 ± 0.247
09105	12.748 ± 2.949	19.015 ± 5.439	24.351 ± 7.989	5.756 ± 0.795	5.238 ± 0.493	5.163 ± 1.124
09106	5.468 ± 1.714	8.191 ± 1.244	10.625 ± 6.038	4.562 ± 0.506	4.399 ± 1.635	4.211 ± 0.363
09207	0.567 ± 0.247	1.254 ± 1.239	0.714 ± 0.582	2.703 ± 2.131	2.361 ± 1.476	2.241 ± 1.580
09221	17.080 ± 14.922	13.806 ± 14.051	7.334 ± 3.791	21.279 ± 15.105	21.275 ± 15.113	20.807 ± 15.922
13560	0.677 ± 0.200	1.420 ± 0.299	3.284 ± 1.143	1.023 ± 0.090	0.762 ± 0.079	0.911 ± 0.030
16473	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
17553	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
18260	26.706 ± 2.342	14.074 ± 1.999	30.000 ± 0.000	29.710 ± 0.503	28.303 ± 2.049	25.533 ± 2.841
05852	21.316 ± 10.852	22.841 ± 7.238	6.012 ± 2.359	22.411 ± 13.144	22.837 ± 12.407	22.068 ± 13.739
06092	9.064 ± 2.982	18.794 ± 0.425	7.121 ± 1.967	9.326 ± 1.172	8.369 ± 1.891	7.830 ± 0.360
06586	17.490 ± 8.633	30.000 ± 0.000	18.160 ± 16.744	1.363 ± 0.704	2.984 ± 1.370	1.225 ± 0.623
08538	4.475 ± 1.446	6.182 ± 1.583	3.654 ± 1.968	4.676 ± 1.093	4.159 ± 0.109	3.808 ± 1.499
10104	12.567 ± 15.152	8.555 ± 2.436	3.028 ± 1.363	14.228 ± 13.659	13.220 ± 14.534	12.983 ± 14.739
10177	24.811 ± 8.988	4.420 ± 5.223	27.173 ± 4.897	27.400 ± 4.504	26.151 ± 6.667	27.176 ± 4.891
11449	1.664 ± 0.523	4.065 ± 0.747	2.124 ± 0.526	3.328 ± 0.364	2.419 ± 0.142	2.922 ± 0.247
16219	0.841 ± 0.138	1.820 ± 0.634	0.613 ± 0.462	2.122 ± 0.451	1.586 ± 0.230	1.817 ± 0.097
19581	2.379 ± 3.412	1.807 ± 1.050	1.004 ± 0.561	7.839 ± 6.019	6.943 ± 4.764	8.021 ± 5.961
27744	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
10913	0.678 ± 0.153	0.774 ± 0.103	5.559 ± 0.000	0.708 ± 0.084	0.592 ± 0.087	0.790 ± 0.054
21338	0.999 ± 0.159	2.089 ± 0.749	0.808 ± 0.231	11.210 ± 16.272	1.855 ± 0.093	1.517 ± 0.086
29960	3.377 ± 0.945	5.541 ± 1.460	3.969 ± 1.204	7.731 ± 2.538	6.385 ± 2.476	6.536 ± 2.192
15356	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	22.100 ± 3.578	30.000 ± 0.000	20.845 ± 1.344
01738	0.864 ± 0.172	2.276 ± 0.749	0.365 ± 0.246	2.235 ± 1.259	2.484 ± 0.396	1.766 ± 0.683
02651	0.326 ± 0.070	1.161 ± 0.330	0.728 ± 0.390	0.789 ± 0.023	0.681 ± 0.024	0.911 ± 0.290
08894	0.096 ± 0.028	0.156 ± 0.060	0.073 ± 0.022	0.124 ± 0.020	0.097 ± 0.003	0.197 ± 0.043
19760	3.561 ± 1.556	0.498 ± 0.102	30.000 ± 0.000	2.063 ± 0.361	1.753 ± 0.386	2.153 ± 0.394
26703	1.793 ± 0.549	0.193 ± 0.075	30.000 ± 0.000	1.494 ± 0.540	0.973 ± 0.152	2.062 ± 0.581

\$\$\$\$\$\$\$\$ Durchführung der Validierungsexperimente durch H.L. Tumbrink und M. Keul (AG D. Rauh, TU Dortmund)

RSL	CTG EC ₅₀ [µM]					
	A431	A549	H358	PC9	PC9-T790M	PC9-T790M/C797S
01742	2.449 ± 0.296	4.626 ± 1.749	1.794 ± 0.516	2.359 ± 0.578	2.629 ± 0.177	2.550 ± 0.403
02670	22.720 ± 12.609	6.721 ± 4.469	9.932 ± 0.606	23.383 ± 11.460	23.374 ± 11.477	23.269 ± 7.250
02841	16.316 ± 15.803	12.639 ± 15.035	3.069 ± 0.978	21.167 ± 15.299	21.088 ± 15.437	21.261 ± 15.136
04230	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	29.093 ± 1.571
04231	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
04331	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
04419	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
04501	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
04577	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
04796	3.385 ± 1.245	3.571 ± 0.900	7.611 ± 3.227	2.474 ± 0.399	2.696 ± 0.386	2.714 ± 0.648
04878	0.018 ± 0.005	0.014 ± 0.000	22.712 ± 10.307	0.114 ± 0.075	0.183 ± 0.043	0.191 ± 0.023
05862	27.438 ± 5.124	9.672 ± 11.235	9.972 ± 12.428	23.799 ± 10.740	24.293 ± 9.885	26.987 ± 5.219
06822	8.244 ± 1.914	18.003 ± 11.469	30.000 ± 0.000	2.345 ± 1.053	3.930 ± 0.473	2.234 ± 0.409
06825	6.032 ± 0.524	6.059 ± 0.770	9.175 ± 2.549	5.216 ± 2.227	5.330 ± 2.203	4.144 ± 1.241
07193	30.000 ± 0.000	3.710 ± 0.581	29.433 ± 0.982	20.571 ± 16.331	20.426 ± 16.583	20.674 ± 16.153
07375	30.000 ± 0.000	23.040 ± 12.055	28.805 ± 2.070	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
08115	29.066 ± 1.867	19.235 ± 14.178	19.656 ± 14.628	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
08604	11.901 ± 11.657	11.135 ± 15.216	1.607 ± 0.984	18.648 ± 14.367	17.720 ± 14.367	17.979 ± 14.121
09521	16.337 ± 15.777	12.054 ± 15.555	4.462 ± 1.505	20.927 ± 15.714	20.833 ± 15.878	21.059 ± 15.486
09746	11.571 ± 12.356	10.839 ± 4.043	15.311 ± 7.130	20.180 ± 14.619	21.268 ± 15.124	18.780 ± 14.343
10224	15.820 ± 12.298	2.939 ± 0.000	30.000 ± 0.000	4.943 ± 0.419	3.725 ± 1.517	5.599 ± 0.813
10343	1.638 ± 0.194	1.848 ± 1.034	5.954 ± 1.108	2.228 ± 0.068	1.944 ± 0.236	2.151 ± 0.258
10443	23.103 ± 9.754	0.635 ± 0.280	30.000 ± 0.000	20.123 ± 14.741	17.393 ± 13.963	21.246 ± 15.162
10489	0.317 ± 0.149	0.106 ± 0.035	11.303 ± 4.584	0.636 ± 0.114	1.170 ± 0.222	0.940 ± 0.284
10635	2.217 ± 0.672	3.881 ± 0.361	5.762 ± 1.478	2.407 ± 0.227	2.271 ± 0.151	2.112 ± 0.127
11089	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	20.736 ± 3.176	28.330 ± 2.893	19.848 ± 2.619
11141	1.480 ± 0.437	3.513 ± 1.287	1.632 ± 0.679	3.552 ± 0.291	2.419 ± 0.180	2.774 ± 0.440
11260	30.000 ± 0.000	21.052 ± 15.498	28.503 ± 2.117	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
11561	5.230 ± 0.673	6.099 ± 0.882	9.216 ± 1.218	4.349 ± 0.518	4.725 ± 0.277	4.208 ± 0.084
11665	30.000 ± 0.000	25.910 ± 5.959	22.592 ± 8.254	25.969 ± 6.981	28.201 ± 3.115	24.894 ± 8.844
12164	30.000 ± 0.000	28.050 ± 3.377	30.000 ± 0.000	5.078 ± 1.513	8.437 ± 2.501	4.698 ± 1.094
12953	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
13346	29.017 ± 1.702	25.078 ± 5.606	30.000 ± 0.000	23.814 ± 10.714	23.476 ± 11.301	23.591 ± 11.100
13360	30.000 ± 0.000	19.017 ± 9.523	16.465 ± 11.908	24.601 ± 8.769	25.867 ± 7.159	23.589 ± 9.782
14524	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
14671	7.250 ± 1.413	7.610 ± 1.971	13.758 ± 2.512	5.262 ± 0.844	4.993 ± 0.342	4.504 ± 0.672
15109	4.979 ± 3.487	2.815 ± 0.719	0.723 ± 0.000	12.777 ± 8.243	10.325 ± 7.359	9.680 ± 6.654
16652	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
17556	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
17732	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
17881	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
18440	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000

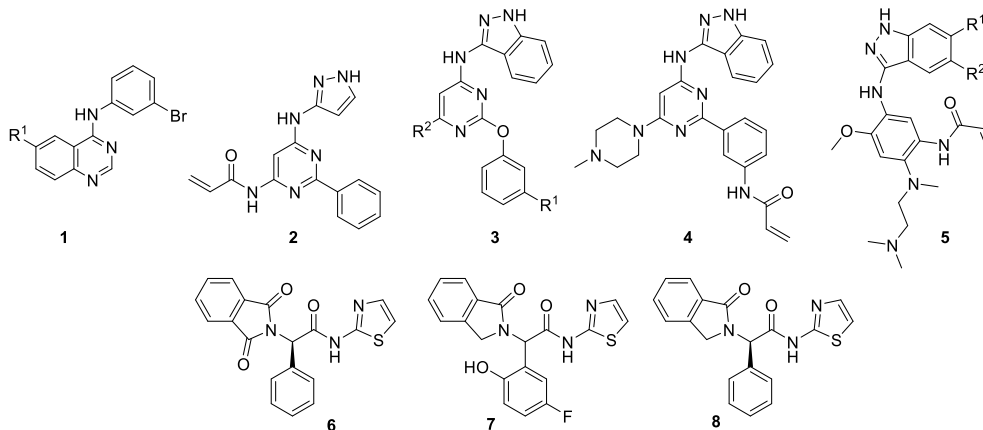
CTG EC₅₀ [µM]

RSL	A431	A549	H358	PC9	PC9-T790M	PC9-T790M/C797S
18764	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
23809	9.728 ± 13.763	9.766 ± 13.686	1.526 ± 0.720	20.770 ± 15.987	20.618 ± 15.955	20.527 ± 16.408
26004	5.291 ± 1.292	6.933 ± 3.406	3.953 ± 3.064	7.867 ± 1.333	7.441 ± 0.541	8.459 ± 1.192
27015	3.043 ± 0.897	1.556 ± 0.409	20.007 ± 14.132	4.754 ± 0.550	5.454 ± 0.762	5.027 ± 0.659
27737	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
27828	3.082 ± 0.637	4.348 ± 1.285	4.534 ± 2.747	4.075 ± 0.632	3.835 ± 0.588	4.747 ± 0.409
27903	1.227 ± 0.200	4.099 ± 1.055	4.533 ± 0.582	2.511 ± 0.150	1.945 ± 0.183	2.373 ± 0.415
28817	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
29841	0.982 ± 0.763	0.500 ± 0.259	30.000 ± 0.000	1.761 ± 0.325	1.767 ± 0.103	2.125 ± 1.110
00417	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
00878	3.491 ± 1.165	4.537 ± 1.080	6.192 ± 2.569	6.517 ± 6.360	3.189 ± 0.716	2.853 ± 0.266
08499	17.523 ± 10.606	13.518 ± 9.918	18.894 ± 7.887	21.979 ± 13.892	21.685 ± 14.403	21.555 ± 14.627
27431	2.000 ± 1.229	0.754 ± 0.213	20.697 ± 5.290	2.313 ± 1.243	2.282 ± 0.266	3.296 ± 1.589
04225	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
04305	4.152 ± 0.592	6.385 ± 1.222	8.171 ± 1.828	2.377 ± 0.927	3.516 ± 0.546	1.692 ± 0.682
04306	17.780 ± 14.478	1.560 ± 0.326	1.939 ± 0.469	12.757 ± 15.026	20.570 ± 16.334	20.556 ± 16.357
04307	9.810 ± 13.996	2.354 ± 0.319	2.420 ± 0.698	11.059 ± 16.404	11.196 ± 16.285	7.893 ± 10.629
04308	2.637 ± 0.171	3.611 ± 1.328	2.836 ± 0.626	3.255 ± 0.497	2.963 ± 0.478	3.104 ± 0.728
06827	24.369 ± 9.752	12.103 ± 1.027	19.084 ± 9.455	12.151 ± 9.750	17.778 ± 12.398	9.882 ± 7.265
08422	9.900 ± 1.247	6.636 ± 0.932	12.273 ± 4.240	4.158 ± 0.443	5.297 ± 0.524	4.127 ± 0.808
27917	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
64	5.094 ± 0.997	0.213 ± 0.042	26.891 ± 3.693	2.571 ± 0.118	3.683 ± 0.393	4.363 ± 0.616
27612	6.243 ± 0.995	5.010 ± 1.614	8.263 ± 0.130	4.665 ± 0.690	5.440 ± 0.670	5.845 ± 0.706
09112	27.899 ± 4.202	16.449 ± 14.263	16.240 ± 19.459	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
16508	8.652 ± 14.232	3.682 ± 1.167	1.334 ± 0.918	20.916 ± 15.734	20.698 ± 16.111	20.756 ± 16.011
18436	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
24237	19.447 ± 12.188	17.974 ± 10.651	9.053 ± 5.228	20.828 ± 15.887	21.439 ± 14.828	21.103 ± 15.410
27740	30.000 ± 0.000	28.242 ± 3.045	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
27743	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
27915	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
27741	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
27919	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
00353	17.922 ± 8.809	12.085 ± 4.775	10.988 ± 3.781	21.851 ± 14.115	21.975 ± 13.900	21.150 ± 15.329
00763	0.383 ± 0.193	0.917 ± 0.496	0.391 ± 0.000	0.482 ± 0.039	0.478 ± 0.094	0.446 ± 0.109
00780	27.591 ± 4.819	14.161 ± 14.805	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
00884	26.789 ± 5.562	1.650 ± 0.478	30.000 ± 0.000	2.419 ± 1.879	1.586 ± 1.198	2.060 ± 1.213
23769	0.899 ± 0.484	0.635 ± 0.310	2.911 ± 2.369	0.913 ± 0.376	1.195 ± 0.113	1.024 ± 0.727
29323	3.863 ± 1.509	4.510 ± 0.556	2.288 ± 0.952	3.851 ± 0.401	3.652 ± 0.546	3.788 ± 0.543
29764	1.635 ± 0.197	1.324 ± 0.357	2.859 ± 1.289	1.589 ± 0.255	1.774 ± 0.156	1.853 ± 0.258
02981	4.881 ± 5.676	4.145 ± 4.632	1.814 ± 1.034	9.425 ± 9.059	6.914 ± 5.923	6.466 ± 5.701
19623	1.957 ± 0.445	2.382 ± 0.246	2.577 ± 1.414	5.649 ± 1.866	5.283 ± 0.596	5.823 ± 2.735
27488	18.694 ± 10.367	5.944 ± 1.745	4.529 ± 0.568	15.831 ± 7.940	15.940 ± 9.552	18.656 ± 10.212

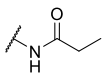
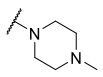
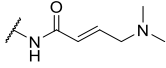
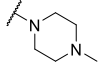
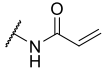
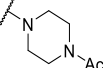
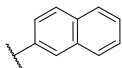
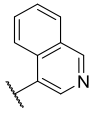
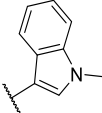
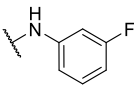
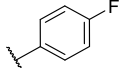
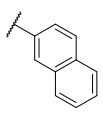
RSL	CTG EC ₅₀ [µM]					
	A431	A549	H358	PC9	PC9-T790M	PC9-T790M/C797S
06520	0.880 ± 0.181	2.125 ± 0.855	1.334 ± 0.824	1.182 ± 0.149	1.006 ± 0.030	1.351 ± 0.267
06576	30.000 ± 0.000	21.612 ± 14.529	15.948 ± 19.873	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
06767	2.023 ± 0.481	5.191 ± 0.995	5.061 ± 0.842	4.203 ± 0.372	3.089 ± 0.384	3.370 ± 0.325
06993	22.381 ± 3.640	12.994 ± 2.988	25.940 ± 7.031	21.230 ± 1.193	24.285 ± 1.123	22.383 ± 3.754
07004	2.501 ± 0.745	4.801 ± 1.222	3.443 ± 1.570	5.712 ± 2.268	3.805 ± 1.176	12.429 ± 15.254
08212	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	27.123 ± 4.984
08289	18.286 ± 13.712	13.369 ± 14.435	3.397 ± 0.000	24.406 ± 9.689	23.715 ± 10.885	30.000 ± 0.000
08423	1.734 ± 0.603	0.738 ± 0.115	15.352 ± 2.482	3.753 ± 1.661	5.050 ± 0.899	4.182 ± 1.231
08629	15.674 ± 16.542	10.206 ± 17.142	28.813 ± 1.678	20.688 ± 16.128	20.697 ± 16.113	20.783 ± 15.964
09092	23.745 ± 7.226	30.000 ± 0.000	26.863 ± 4.437	21.147 ± 15.334	22.177 ± 13.550	21.348 ± 14.987
09438	25.458 ± 9.084	19.361 ± 15.570	18.031 ± 16.926	27.650 ± 4.070	24.818 ± 8.976	24.207 ± 10.033
09441	23.182 ± 13.637	13.770 ± 14.057	23.627 ± 8.203	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
09643	2.484 ± 0.781	5.189 ± 2.402	2.677 ± 1.638	3.233 ± 0.591	2.693 ± 0.181	3.256 ± 0.363
10897	1.204 ± 0.486	3.418 ± 1.240	1.727 ± 0.249	2.969 ± 0.229	2.217 ± 0.240	2.517 ± 0.250
15082	8.738 ± 2.121	6.143 ± 0.942	14.078 ± 2.338	2.686 ± 0.791	4.008 ± 0.790	2.590 ± 0.195
16017	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
16900	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
17356	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
17555	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
21673	4.792 ± 3.516	4.132 ± 1.462	1.356 ± 0.434	11.835 ± 7.055	11.699 ± 7.204	11.839 ± 6.549
28377	2.276 ± 0.829	0.565 ± 0.094	16.270 ± 3.089	2.955 ± 0.559	3.723 ± 0.165	4.110 ± 0.848
85	2.448 ± 3.990	3.946 ± 4.635	0.835 ± 0.303	20.234 ± 15.906	14.653 ± 14.391	18.495 ± 14.755
01697	10.037 ± 13.312	2.774 ± 0.484	3.249 ± 1.162	21.787 ± 14.226	21.458 ± 14.795	21.711 ± 14.357
19020	16.088 ± 9.306	7.118 ± 1.385	8.224 ± 1.154	21.531 ± 14.669	21.459 ± 14.793	21.575 ± 14.593
27739	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000	30.000 ± 0.000
00166	3.062 ± 0.680	1.661 ± 0.073	2.011 ± 0.330	2.467 ± 0.601	2.117 ± 0.200	3.896 ± 0.569
00167	6.284 ± 3.730	2.343 ± 2.563	0.867 ± 0.925	5.701 ± 3.062	5.636 ± 1.590	11.392 ± 4.390
08545	25.649 ± 8.702	13.360 ± 14.852	5.057 ± 5.254	25.400 ± 7.968	24.673 ± 9.227	30.000 ± 0.000
15618	2.736 ± 2.146	0.844 ± 0.606	1.574 ± 0.351	2.208 ± 1.235	1.962 ± 1.367	3.193 ± 1.950
17193	23.325 ± 13.350	11.124 ± 16.347	1.606 ± 0.309	24.186 ± 10.070	24.065 ± 10.280	24.883 ± 8.863
27549	24.283 ± 6.105	9.954 ± 6.868	18.104 ± 16.824	12.010 ± 6.710	14.596 ± 8.643	17.770 ± 9.872

5.7. Rohdaten der Screening-Kampagne mit EGFR-del19/G724S

Tabelle 5-6: IC₅₀-Werte der ausgewählten Verbindungen gegenüber der EGFR-del19/G724S Mutante, die in Abbildung 3-48 graphisch dargestellt wurden. Jeder Wert wurde in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten bestimmt, wobei der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben wurde.



Subgr.	Verbindung	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ [nM]	
1 st Gen. TKI	Gefitinib				40.3 ± 7.1	
	Erlotinib				49.4 ± 9.3	
	Vandetanib				25.8 ± 8.6	
	Lapatinib				91.4 ± 17.5	
	1a					49.8 ± 4.1
	1b					50.8 ± 8.7
2 nd Gen. TKI	Afatinib				2.1 ± 1.0	
	Pelitinib				<1	
	Allitinib				<1	
	Poziotinib				<1	
	Canertinib				<1	
	Dacomitinib				<1	
3 rd Gen. TKI	Osimertinib				33.7 ± 3.7	
	Rociletinib				41.0 ± 9.5	
	Olmutinib				55.3 ± 3.4	
	WZ4002				31.1 ± 7.5	
	EGF816				68.4 ± 10.1	
	Naquotinib				>2.000	
	Brigatinib				112.0 ± 25.5	
	Ibrutinib				91.4 ± 27.9	
2					1282.5 ± 420.8	
3a						540.4 ± 69.9

	3b			>2.000
	3c			>2.000
	3d			459.3 ± 67.3
	4			>2.000
	5a		H	>2.000
	5b		H	844.5 ± 98.4
	5c		H	255.6 ± 30.4
	5d		H	3.0 ± 1.2
	5e		H	50.8 ± 2.2
	5f	H		106.5 ± 8.0
alloster.	6			20000
EGFR-	7			20000
Inh.	8			20000

6. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. Lategahn, M. Keul, D. Rauh. Lessons To Be Learned: The Molecular Basis of Kinase-Targeted Therapies and Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Angew Chem Int Ed Engl* **2018**, *57*, 2307-2313.
- [2] J. Engel, J. Lategahn, D. Rauh. Hope and Disappointment: Covalent Inhibitors to Overcome Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 2-5.
- [3] S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, D. A. Haber. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature reviews. Cancer* **2007**, *7*, 169-181.
- [4] W. Pao, V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L. Fulton, E. Mardis, D. Kupfer, R. Wilson, M. Kris, H. Varmus. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 13306-13311.
- [5] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczyk, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.-F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- [6] E. S. Lander. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* **2011**, *470*, 187.
- [7] S. G. Gregory, K. F. Barlow, K. E. McLay, R. Kaul, D. Swarbreck, A. Dunham, C. E. Scott, K. L. Howe, K. Woodfine, C. C. A. Spencer, M. C. Jones, C. Gillson, S. Searle, Y. Zhou, F. Kokocinski, L. McDonald, R. Evans, K. Phillips, A. Atkinson, R. Cooper, C. Jones, R. E. Hall, T. D. Andrews, C. Lloyd, R. Ainscough, J. P. Almeida, K. D. Ambrose, F. Anderson, R. W. Andrew, R. I. S. Ashwell, K. Aubin, A. K. Babbage, C. L. Bagguley, J. Bailey, H. Beasley, G. Bethel, C. P. Bird, S. Bray-Allen, J. Y. Brown, A. J. Brown, D. Buckley, J. Burton, J. Bye, C. Carder, J. C. Chapman, S. Y. Clark, G. Clarke, C. Clee, V. Cobley, R. E. Collier, N. Corby, G. J. Coville, J. Davies, R. Deadman, M. Dunn, M. Earthrowl, A. G. Ellington, H. Errington, A. Frankish, J. Frankland, L. French, P. Garner, J. Garnett, L. Gay, M. R. J. Ghori, R. Gibson, L. M.

- Gilby, W. Gillett, R. J. Glithero, D. V. Grafham, C. Griffiths, S. Griffiths-Jones, R. Grocock, S. Hammond, E. S. I. Harrison, E. Hart, E. Haugen, P. D. Heath, S. Holmes, K. Holt, P. J. Howden, A. R. Hunt, S. E. Hunt, G. Hunter, J. Isherwood, R. James, C. Johnson, D. Johnson, A. Joy, M. Kay, J. K. Kershaw, M. Kibukawa, A. M. Kimberley, A. King, A. J. Knights, H. Lad, G. Laird, S. Lawlor, D. A. Leongamornlert, D. M. Lloyd, et al. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature* **2006**, *441*, 315-321.
- [8] S. O. Dolly, D. C. Collins, R. Sundar, S. Popat, T. A. Yap. Advances in the Development of Molecularly Targeted Agents in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Drugs* **2017**, *77*, 813-827.
- [9] C. Sawyers. Targeted cancer therapy. *Nature* **2004**, *432*, 294-297.
- [10] V. V. Padma. An overview of targeted cancer therapy. *Biomedicine (Taipei)* **2015**, *5*, 19-19.
- [11] M. K. Mayekar, T. G. Bivona. Current Landscape of Targeted Therapy in Lung Cancer. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2017**, *102*, 757-764.
- [12] P. Ehrlich, Leipzig Universität (Leipzig), **1878**.
- [13] P. Ehrlich. Address in Pathology ON CHEMOTHERAPEUTICS:: SCIENTIFIC PRINCIPLES, METHODS, AND RESULTS. *The Lancet* **1913**, *182*, 445-451.
- [14] K. Strebhardt, A. Ullrich. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer* **2008**, *8*, 473.
- [15] P. Ehrlich. Die Behandlung der Syphilis mit dem Ehrlichschen Präparat 606. *Deutsche medizinische Wochenschrift* **1910**, 1893–1896.
- [16] P. Rous. A Transmissible Avian Neoplasm. (Sarcoma of the Common Fowl.). *J Exp Med* **1910**, *12*, 696-705.
- [17] P. Rous. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* **1911**, *13*, 397-411.
- [18] R. J. Huebner, G. J. Todaro. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1969**, *64*, 1087-1094.
- [19] G. J. Todaro, R. J. Huebner. N.A.S. symposium: new evidence as the basis for increased efforts in cancer research. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1972**, *69*, 1009-1015.
- [20] D. Stehelin, H. E. Varmus, J. M. Bishop, P. K. Vogt. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **1976**, *260*, 170-173.
- [21] S. G. O'Brien, F. Guilhot, R. A. Larson, I. Gathmann, M. Baccarani, F. Cervantes, J. J. Cornelissen, T. Fischer, A. Hochhaus, T. Hughes, K. Lechner, J. L. Nielsen, P. Rousselot, J. Reiffers, G. Saglio, J. Shepherd, B. Simonsson, A. Gratwohl, J. M. Goldman, H. Kantarjian, K. Taylor, G. Verhoef, A. E. Bolton, R. Capdeville, B. J. Druker. Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **2003**, *348*, 994-1004.

- [22] B. J. Druker, M. Talpaz, D. J. Resta, B. Peng, E. Buchdunger, J. M. Ford, N. B. Lydon, H. Kantarjian, R. Capdeville, S. Ohno-Jones, C. L. Sawyers. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **2001**, *344*, 1031-1037.
- [23] A. Hochhaus, R. A. Larson, F. Guilhot, J. P. Radich, S. Branford, T. P. Hughes, M. Baccarani, M. W. Deininger, F. Cervantes, S. Fujihara, C.-E. Ortmann, H. D. Menssen, H. Kantarjian, S. G. O'Brien, B. J. Druker. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **2017**, *376*, 917-927.
- [24] B. J. Druker, N. B. Lydon. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* **2000**, *105*, 3-7.
- [25] E. Buchdunger, C. L. Cioffi, N. Law, D. Stover, S. Ohno-Jones, B. J. Druker, N. B. Lydon. Abl Protein-Tyrosine Kinase Inhibitor STI571 Inhibits In Vitro Signal Transduction Mediated by c-Kit and Platelet-Derived Growth Factor Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2000**, *295*, 139.
- [26] H. Joensuu, P. J. Roberts, M. Sarlomo-Rikala, L. C. Andersson, P. Tervahartiala, D. Tuveson, S. L. Silberman, R. Capdeville, S. Dimitrijevic, B. Druker, G. D. Demetri. Effect of the Tyrosine Kinase Inhibitor STI571 in a Patient with a Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor. *New England Journal of Medicine* **2001**, *344*, 1052-1056.
- [27] A. T. van Oosterom, I. Judson, J. Verweij, S. Stroobants, E. D. di Paola, S. Dimitrijevic, M. Martens, A. Webb, R. Scot, M. Van Glabbeke, S. Silberman, O. S. Nielsen. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *The Lancet* **2001**, *358*, 1421-1423.
- [28] G. D. Demetri, M. von Mehren, C. D. Blanke, A. D. Van den Abbeele, B. Eisenberg, P. J. Roberts, M. C. Heinrich, D. A. Tuveson, S. Singer, M. Janicek, J. A. Fletcher, S. G. Silverman, S. L. Silberman, R. Capdeville, B. Kiese, B. Peng, S. Dimitrijevic, B. J. Druker, C. Corless, C. D. M. Fletcher, H. Joensuu. Efficacy and Safety of Imatinib Mesylate in Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors. *New England Journal of Medicine* **2002**, *347*, 472-480.
- [29] M. S. Lawrence, P. Stojanov, C. H. Mermel, J. T. Robinson, L. A. Garraway, T. R. Golub, M. Meyerson, S. B. Gabriel, E. S. Lander, G. Getz. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* **2014**, *505*, 495.
- [30] E. Cerami, J. Gao, U. Dogrusoz, B. E. Gross, S. O. Sumer, B. A. Aksoy, A. Jacobsen, C. J. Byrne, M. L. Heuer, E. Larsson, Y. Antipin, B. Reva, A. P. Goldberg, C. Sander, N. Schultz. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery* **2012**, *2*, 401.
- [31] D. Hanahan, R. A. Weinberg. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.

- [32] D. Hanahan, Robert A. Weinberg. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
- [33] R. Dienstmann, I. S. Jang, B. Bot, S. Friend, J. Guinney. Database of Genomic Biomarkers for Cancer Drugs and Clinical Targetability in Solid Tumors. *Cancer Discovery* **2015**, *5*, 118.
- [34] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, F. Bray. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359-386.
- [35] J. R. Molina, P. Yang, S. D. Cassivi, S. E. Schild, A. A. Adjei. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* **2008**, *83*, 584-594.
- [36] A. Thomas, S. V. Liu, D. S. Subramaniam, G. Giaccone. Refining the treatment of NSCLC according to histological and molecular subtypes. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12*, 511-526.
- [37] J. G. Paez, P. A. Jänne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson, M. Meyerson. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* **2004**, *304* 1497-1500.
- [38] A. T. Shaw, B. Y. Yeap, M. Mino-Kenudson, S. R. Digumarthy, D. B. Costa, R. S. Heist, B. Solomon, H. Stubbs, S. Admane, U. McDermott, J. Settleman, S. Kobayashi, E. J. Mark, S. J. Rodig, L. R. Chirieac, E. L. Kwak, T. J. Lynch, A. J. Iafrate. Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *Journal of Clinical Oncology* **2009**, *27*, 4247-4253.
- [39] K. Inamura, K. Takeuchi, Y. Togashi, S. Hatano, H. Ninomiya, N. Motoi, M.-y. Mun, Y. Sakao, S. Okumura, K. Nakagawa, M. Soda, Y. Lim Choi, H. Mano, Y. Ishikawa. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Modern Pathology* **2009**, *22*, 508.
- [40] J. H. Schiller, D. Harrington, C. P. Belani, C. Langer, A. Sandler, J. Krook, J. Zhu, D. H. Johnson, Eastern Cooperative Oncology Group. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 92-98.
- [41] Clinical Lung Cancer Genome Project, Network Genomic Medicine. A genomics-based classification of human lung tumors. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 209ra153.
- [42] 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. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 2240-2247.
- [43] C. M. Lovly, A. T. Shaw. Molecular Pathways: Resistance to Kinase Inhibitors and Implications for Therapeutic Strategies. *Clinical Cancer Research* **2014**, *20*, 2249.

- [44] C. T. Hiley, J. Le Quesne, G. Santis, R. Sharpe, D. G. de Castro, G. Middleton, C. Swanton. Challenges in molecular testing in non-small-cell lung cancer patients with advanced disease. *The Lancet* **2016**, *388*, 1002-1011.
- [45] B. Herzberg, M. J. Campo, J. F. Gainor. Immune Checkpoint Inhibitors in Non - Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist* **2017**, *22*, 81-88.
- [46] K. Oda, Y. Matsuoka, A. Funahashi, H. Kitano. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology* **2005**, *1*, 2005.0010-2005.0010.
- [47] Y. Yarden, G. Pines. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nature Reviews Cancer* **2012**, *12*, 553.
- [48] R. Sordella, D. W. Bell, D. A. Haber, J. Settleman. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* **2004**, *305*, 1163-1167.
- [49] A. F. Gazdar. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* **2009**, *28 Suppl 1*, S24-S31.
- [50] C. H. Yun, T. J. Boggon, Y. Li, M. S. Woo, H. Greulich, M. Meyerson, M. J. Eck. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 217-227.
- [51] S. Kobayashi, T. J. Boggon, T. Dayaram, P. A. Jänne, O. Kocher, M. Meyerson, B. E. Johnson, M. J. Eck, D. G. Tenen, B. Halmos. EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine* **2005**, *352*, 786-792.
- [52] L. V. Sequist, B. A. Waltman, D. Dias-Santagata, S. Digumarthy, A. B. Turke, P. Fidias, K. Bergethon, A. T. Shaw, S. Gettinger, A. K. Cosper, S. Akhavanfard, R. S. Heist, J. Temel, J. G. Christensen, J. C. Wain, T. J. Lynch, K. Vernovsky, E. J. Mark, M. Lanuti, A. J. Iafrate, M. Mino-Kenudson, J. A. Engelman. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Science Translational Medicine* **2011**, *3*, 75ra26.
- [53] W. Pao, V. A. Miller, K. A. Politi, G. J. Riely, R. Somwar, M. F. Zakowski, M. G. Kris, H. Varmus. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS medicine* **2005**, *2*, e73.
- [54] C. H. Yun, K. E. Mengwasser, A. V. Toms, M. S. Woo, H. Greulich, K. K. Wong, M. Meyerson, M. J. Eck. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 2070-2075.
- [55] D. Li, L. Ambrogio, T. Shimamura, S. Kubo, M. Takahashi, L. R. Chirieac, R. F. Padera, G. I. Shapiro, A. Baum, F. Himmelsbach, W. J. Rettig, M. Meyerson, F. Solca, H. Greulich, K. K. Wong. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* **2008**, *27*, 4702-4711.

- [56] J. A. Engelman, K. Zejnullahu, C.-M. Gale, E. Lifshits, A. J. Gonzales, T. Shimamura, F. Zhao, P. W. Vincent, G. N. Naumov, J. E. Bradner, I. W. Althaus, L. Gandhi, G. I. Shapiro, J. M. Nelson, J. V. Heymach, M. Meyerson, K.-K. Wong, P. A. Jänne. PF00299804, an Irreversible Pan-ERBB Inhibitor, Is Effective in Lung Cancer Models with EGFR and ERBB2 Mutations that Are Resistant to Gefitinib. *Cancer Research* **2007**, 67, 11924.
- [57] E. L. Kwak, R. Sordella, D. W. Bell, N. Godin-Heymann, R. A. Okimoto, B. W. Brannigan, P. L. Harris, D. R. Driscoll, P. Fidias, T. J. Lynch, S. K. Rabindran, J. P. McGinnis, A. Wissner, S. V. Sharma, K. J. Isselbacher, J. Settleman, D. A. Haber. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, 7665.
- [58] V. A. Miller, V. Hirsh, J. Cadranel, Y. M. Chen, K. Park, S. W. Kim, C. Zhou, W. C. Su, M. Wang, Y. Sun, D. S. Heo, L. Crino, E. H. Tan, T. Y. Chao, M. Shahidi, X. J. Cong, R. M. Lorence, J. C. Yang. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol.* **2012**, 13, 528-538.
- [59] N. Katakami, S. Atagi, K. Goto, T. Hida, T. Horai, A. Inoue, Y. Ichinose, K. Koboyashi, K. Takeda, K. Kiura, K. Nishio, Y. Seki, R. Ebisawa, M. Shahidi, N. Yamamoto. LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J. Clin. Oncol.* **2013**, 31, 3335-3341.
- [60] W. Zhou, D. Ercan, L. Chen, C. H. Yun, D. Li, M. Capelletti, A. B. Cortot, L. Chirieac, R. E. Jacob, R. Padera, J. R. Engen, K. K. Wong, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Janne. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature* **2009**, 462, 1070-1074.
- [61] D. A. Cross, S. E. Ashton, S. Ghiorghiu, C. Eberlein, C. A. Nebhan, P. J. Spitzler, J. P. Orme, M. R. Finlay, R. A. Ward, M. J. Mellor, G. Hughes, A. Rahi, V. N. Jacobs, M. Red Brewer, E. Ichihara, J. Sun, H. Jin, P. Ballard, K. Al-Kadhimi, R. Rowlinson, T. Klinowska, G. H. Richmond, M. Cantarini, D. W. Kim, M. R. Ranson, W. Pao. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov.* **2014**, 4, 1046-1061.
- [62] A. O. Walter, R. T. Sjin, H. J. Haringsma, K. Ohashi, J. Sun, K. Lee, A. Dubrovskiy, M. Labenski, Z. Zhu, Z. Wang, M. Sheets, T. St Martin, R. Karp, D. van Kalken, P. Chaturvedi, D. Niu, M. Nacht, R. C. Petter, W. Westlin, K. Lin, S. Jaw-Tsai, M. Raponi, T. Van Dyke, J. Etter, Z. Weaver, W. Pao, J. Singh, A. D. Simmons, T. C. Harding, A. Allen. Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC. *Cancer Discov.* **2013**, 3, 1404-1415.
- [63] 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. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* **2017**, 376, 629-640.

- [64] W. Zhou, D. Ercan, P. A. Jänne, N. S. Gray. Discovery of selective irreversible inhibitors for EGFR-T790M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 638-643.
- [65] M. J. Niederst, H. Hu, H. E. Mulvey, E. L. Lockerman, A. R. Garcia, Z. Piotrowska, L. V. Sequist, J. A. Engelman. The Allelic Context of the C797S Mutation Acquired upon Treatment with Third-Generation EGFR Inhibitors Impacts Sensitivity to Subsequent Treatment Strategies. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 3924-3933.
- [66] D. Ercan, H. G. Choi, C. H. Yun, M. Capelletti, T. Xie, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Janne. EGFR Mutations and Resistance to Irreversible Pyrimidine-Based EGFR Inhibitors. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 3913-3923.
- [67] K. Uchibori, N. Inase, M. Araki, M. Kamada, S. Sato, Y. Okuno, N. Fujita, R. Katayama. Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *Nature Comm.* **2017**, *8*, 14768.
- [68] A. A. Romu, Z. Lei, B. Zhou, Z. S. Chen, V. Korlipara. Design, synthesis and biological evaluation of WZ4002 analogues as EGFR inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2017**, *27*, 4832-4837.
- [69] 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.
- [70] 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. Jänne, M. J. Eck. Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors. *Nature* **2016**, *534*, 129-132.
- [71] 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. Single and dual targeting of mutant EGFR with an allosteric inhibitor. *Cancer Discovery* **2019**, CD-18-0903.
- [72] P. Ballard, J. W. T. Yates, Z. Yang, D.-W. Kim, J. C.-H. Yang, M. Cantarini, K. Pickup, A. Jordan, M. Hickey, M. Grist, M. Box, P. Johnström, K. Varnäs, J. Malmquist, K. S. Thress, P. A. Jänne, D. Cross. Preclinical Comparison of Osimertinib with Other EGFR-TKIs in EGFR-Mutant NSCLC Brain Metastases Models, and Early Evidence of Clinical Brain Metastases Activity. *Clinical Cancer Research* **2016**, *22*, 5130.
- [73] T. Mok, M.-J. Ahn, J.-Y. Han, J. H. Kang, N. Katakami, H. Kim, R. Hodge, D. C. Ghiorghiu, M. Cantarini, Y.-L. Wu, V. Papadimitrakopoulou, M. C. Garassino. CNS response to osimertinib in patients (pts) with T790M-positive advanced NSCLC: Data from a randomized phase III trial (AURA3). *Journal of Clinical Oncology* **2017**, *35*, 9005-9005.
- [74] G. Goss, C. M. Tsai, F. A. Shepherd, M. J. Ahn, L. Bazhenova, L. Crinò, F. de Marinis, E. Felip, A. Morabito, R. Hodge, M. Cantarini, M. Johnson, T.

- Mitsudomi, P. A. Jänne, J. C. H. Yang. CNS response to osimertinib in patients with T790M-positive advanced NSCLC: pooled data from two phase II trials. *Annals of Oncology* **2017**, *29*, 687-693.
- [75] C. B. Meador, H. Jin, E. de Stanchina, C. A. Nebhan, V. Pirazzoli, L. Wang, P. Lu, H. Vuong, K. E. Hutchinson, P. Jia, X. Chen, R. Eisenberg, M. Ladanyi, K. Politi, Z. Zhao, C. M. Lovly, D. A. E. Cross, W. Pao. Optimizing the Sequence of Anti-EGFR-Targeted Therapy in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* **2015**, *14*, 542.
- [76] H. Patel, R. Pawara, A. Ansari, S. Surana. Recent updates on third generation EGFR inhibitors and emergence of fourth generation EGFR inhibitors to combat C797S resistance. *Eur J Med Chem* **2017**, *142*, 32-47.
- [77] 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. Rukazenkov, S. S. Ramalingam, F. Investigators. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **2018**, *378*, 113-125.
- [78] M. Soda, Y. L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara, H. Watanabe, K. Kurashina, H. Hatanaka, M. Bando, S. Ohno, Y. Ishikawa, H. Aburatani, T. Niki, Y. Sohara, Y. Sugiyama, H. Mano. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **2007**, *448*, 561-566.
- [79] T. Sasaki, S. J. Rodig, L. R. Chirieac, P. A. Jänne. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 1773-1780.
- [80] J. J. Cui, M. Tran-Dube, H. Shen, M. Nambu, P. P. Kung, M. Pairish, L. Jia, J. Meng, L. Funk, I. Botrous, M. McTigue, N. Grodsky, K. Ryan, E. Padrique, G. Alton, S. Timofeevski, S. Yamazaki, Q. Li, H. Zou, J. Christensen, B. Mroczkowski, S. Bender, R. S. Kania, M. P. Edwards. Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Journal of medicinal chemistry* **2011**, *54*, 6342-6363.
- [81] H. Y. Zou, Q. Li, J. H. Lee, M. E. Arango, S. R. McDonnell, S. Yamazaki, T. B. Koudriakova, G. Alton, J. J. Cui, P. P. Kung, M. D. Nambu, G. Los, S. L. Bender, B. Mroczkowski, J. G. Christensen. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4408-4417.
- [82] B. J. Solomon, T. Mok, D. W. Kim, Y. L. Wu, K. Nakagawa, T. Mekhail, E. Felip, F. Cappuzzo, J. Paolini, T. Usari, S. Iyer, A. Reisman, K. D. Wilner, J. Tursi, F. Blackhall, Profile Investigators. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 2167-2177.

- [83] Y. L. Choi, M. Soda, Y. Yamashita, T. Ueno, J. Takashima, T. Nakajima, Y. Yatabe, K. Takeuchi, T. Hamada, H. Haruta, Y. Ishikawa, H. Kimura, T. Mitsudomi, Y. Tanio, H. Mano, A. L. K. Lung Cancer Study Group. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 1734-1739.
- [84] T. Sasaki, K. Okuda, W. Zheng, J. Butrynski, M. Capelletti, L. Wang, N. S. Gray, K. Wilner, J. G. Christensen, G. Demetri, G. I. Shapiro, S. J. Rodig, M. J. Eck, P. A. Janne. The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 10038-10043.
- [85] J. M. Heuckmann, M. Holzel, M. L. Sos, S. Heynck, H. Balke-Want, M. Koker, M. Peifer, J. Weiss, C. M. Lovly, C. Grütter, D. Rauh, W. Pao, R. K. Thomas. ALK mutations conferring differential resistance to structurally diverse ALK inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 7394-7401.
- [86] R. C. Doebele, A. B. Pilling, D. L. Aisner, T. G. Kutateladze, A. T. Le, A. J. Weickhardt, K. L. Kondo, D. J. Linderman, L. E. Heasley, W. A. Franklin, M. Varella-Garcia, D. R. Camidge. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 1472-1482.
- [87] S. C. Tang, L. N. Nguyen, R. W. Sparidans, E. Wagenaar, J. H. Beijnen, A. H. Schinkel. Increased oral availability and brain accumulation of the ALK inhibitor crizotinib by coadministration of the P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) inhibitor elacridar. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 1484-1494.
- [88] D. B. Costa, A. T. Shaw, S. H. Ou, B. J. Solomon, G. J. Riely, M. J. Ahn, C. Zhou, S. M. Shreeve, P. Selaru, A. Polli, P. Schnell, K. D. Wilner, R. Wiltshire, D. R. Camidge, L. Crino. Clinical Experience With Crizotinib in Patients With Advanced ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer and Brain Metastases. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1881-1888.
- [89] J. Li, W. Liu, H. Luo, J. Bao. Insight into drug resistance mechanisms and discovery of potential inhibitors against wild-type and L1196M mutant ALK from FDA-approved drugs. *J. Mol. Model* **2016**, *22*, 231.
- [90] K. McKeage. Alectinib: a review of its use in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancer. *Drugs* **2015**, *75*, 75-82.
- [91] S. Dhillon, M. Clark. Ceritinib: first global approval. *Drugs* **2014**, *74*, 1285-1291.
- [92] A. Markham. Brigatinib: First Global Approval. *Drugs* **2017**, *77*, 1131-1135.
- [93] T. W. Johnson, P. F. Richardson, S. Bailey, A. Brooun, B. J. Burke, M. R. Collins, J. J. Cui, J. G. Deal, Y. L. Deng, D. Dinh, L. D. Engstrom, M. He, J. Hoffman, R. L. Hoffman, Q. Huang, R. S. Kania, J. C. Kath, H. Lam, J. L. Lam, P. T. Le, L. Lingardo, W. Liu, M. McTigue, C. L. Palmer, N. W. Sach, T. Smeal, G. L. Smith, A. E. Stewart, S. Timofeevski, H. Zhu, J. Zhu, H. Y. Zou, M. P. Edwards. Discovery of (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4-(m etheno)pyrazolo[4,3-h][2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic

- inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations. *Journal of medicinal chemistry* **2014**, *57*, 4720-4744.
- [94] H. Y. Zou, L. Friboulet, D. P. Kodack, L. D. Engstrom, Q. Li, M. West, R. W. Tang, H. Wang, K. Tsaparikos, J. Wang, S. Timofeevski, R. Katayama, D. M. Dinh, H. Lam, J. L. Lam, S. Yamazaki, W. Hu, B. Patel, D. Bezwada, R. L. Frias, E. Lifshits, S. Mahmood, J. F. Gainor, T. Affolter, P. B. Lappin, H. Gukasyan, N. Lee, S. Deng, R. K. Jain, T. W. Johnson, A. T. Shaw, V. R. Fantin, T. Smeal. PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 70-81.
- [95] L. Nogova, L. V. Sequist, P. A. Cassier, M. Hidalgo, J. P. Delord, M. H. Schuler, W. T. Lim, D. R. Camidge, R. Büttner, L. C. Heukamp, M. Gardizi, M. Scheffler, K. Kambartel, F. P. Ringeisen, S. Sen, R. Isaacs, M. Joannaert, C. Lefebvre, J. Wolf. Targeting FGFR1-amplified lung squamous cell carcinoma with the selective pan-FGFR inhibitor BGJ398. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 8034-8034.
- [96] P. K. Paik, R. Shen, M. F. Berger, D. Ferry, J.-C. Soria, A. Mathewson, C. Rooney, N. R. Smith, M. Cullberg, E. Kilgour, D. Landers, P. Frewer, N. Brooks, F. André. A Phase Ib Open-Label Multicenter Study of AZD4547 in Patients with Advanced Squamous Cell Lung Cancers. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 5366-5373.
- [97] J. Wolf, L. Nogova, L. C. Heukamp, M. Bos, M. Schuler, L. Sequist, G. G. Tian, F. Ringeisen, R. Büttner, R. Thomas. Developments in Targeted Therapy: Fgfr1 Inhibition in Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2012**, *7*, S23-S23.
- [98] F. Malchers, F. Dietlein, J. Schottle, X. Lu, L. Nogova, K. Albus, L. Fernandez-Cuesta, J. M. Heuckmann, O. Gautschi, J. Diebold, D. Plenker, M. Gardizi, M. Scheffler, M. Bos, D. Seidel, F. Leenders, A. Richters, M. Peifer, A. Florin, P. S. Mainkar, N. Karre, S. Chandrasekhar, J. George, S. Silling, D. Rauh, T. Zander, R. T. Ullrich, H. C. Reinhardt, F. Ringeisen, R. Büttner, L. C. Heukamp, J. Wolf, R. K. Thomas. Cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of transformation by amplified FGFR1 in lung cancer. *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 246-257.
- [99] T. Kubo, H. Yamamoto, W. W. Lockwood, I. Valencia, J. Sob, M. Peyton, M. Jida, H. Otani, T. Fujii, M. Ouchida, N. Takigawa, K. Kiura, K. Shimizu, H. Date, J. D. Minna, M. Varella-Garcia, W. L. Lam, A. F. Gazdar, S. Toyooka. MET gene amplification or EGFR mutation activate MET in lung cancers untreated with EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 1778-1784.
- [100] G. Scagliotti, J. von Pawel, S. Novello, R. Ramlau, A. Favaretto, F. Barlesi, W. Akerley, S. Orlov, A. Santoro, D. Spigel, V. Hirsh, F. A. Shepherd, L. V. Sequist, A. Sandler, J. S. Ross, Q. Wang, R. von Roemeling, D. Shuster, B. Schwartz. Phase III Multinational, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Tivantinib (ARQ 197) Plus Erlotinib Versus Erlotinib Alone in Previously Treated Patients With Locally Advanced or Metastatic

- Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 2667-2674.
- [101] C. Basilico, S. Pennacchietti, E. Vigna, C. Chiriaco, S. Arena, A. Bardelli, D. Valdembri, G. Serini, P. Michieli. Tivantinib (ARQ197) Displays Cytotoxic Activity That Is Independent of Its Ability to Bind MET. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 2381-2392.
- [102] G. M. Frampton, S. M. Ali, M. Rosenzweig, J. Chmielecki, X. Lu, T. M. Bauer, M. Akimov, J. A. Bufill, C. Lee, D. Jentz, R. Hoover, S. H. Ou, R. Salgia, T. Brennan, Z. R. Chalmers, S. Jaeger, A. Huang, J. A. Elvin, R. Erlich, A. Fichtenholtz, K. A. Gowen, J. Greenbowe, A. Johnson, D. Khaira, C. McMahan, E. M. Sanford, S. Roels, J. White, J. Greshock, R. Schlegel, D. Lipson, R. Yelensky, D. Morosini, J. S. Ross, E. Collisson, M. Peters, P. J. Stephens, V. A. Miller. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov.* **2015**, *5*, 850-859.
- [103] B. Melosky. Current Treatment Algorithms for Patients with Metastatic Non-Small Cell, Non-Squamous Lung Cancer. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 38.
- [104] M. A. J. Iafora, R. A. Juergens. Update on Programmed Death-1 and Programmed Death-Ligand 1 Inhibition in the Treatment of Advanced or Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 67.
- [105] R. M. Poole. Pembrolizumab: first global approval. *Drugs* **2014**, *74*, 1973-1981.
- [106] G. M. Keating. Nivolumab: A Review in Advanced Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Drugs* **2016**, *76*, 969-978.
- [107] A. Markham. Atezolizumab: First Global Approval. *Drugs* **2016**, *76*, 1227-1232.
- [108] T. S. K. Mok, H. H. Loong. Are we ready for immune checkpoint inhibitors for advanced non-small-cell lung cancer? *The Lancet* **2016**, *387*, 1488-1490.
- [109] R. S. Herbst, P. Baas, D.-W. Kim, E. Felip, J. L. Pérez-Gracia, J.-Y. Han, J. Molina, J.-H. Kim, C. D. Arvis, M.-J. Ahn, M. Majem, M. J. Fidler, G. de Castro, M. Garrido, G. M. Lubiniecki, Y. Shentu, E. Im, M. Dolled-Filhart, E. B. Garon. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *The Lancet* **2016**, *387*, 1540-1550.
- [110] J. Lategahn, M. Keul, D. Rauh. Lessons To Be Learned: The Molecular Basis of Kinase-Targeted Therapies and Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Angewandte Chemie - International Edition* **2018**, *57*, 2307-2313.
- [111] L. Leder, F. Freuler, M. Forstner, L. M. Mayr. New methods for efficient protein production in drug discovery. *Current opinion in drug discovery & development* **2007**, *10*, 193-202.
- [112] M. Forstner, L. Leder, L. M. Mayr, M. Forstner, L. Leder, L. M. Mayr. Expert Review of Proteomics modern drug discovery Optimization of protein expression systems for modern drug discovery. **2014**, 9450.

- [113] D. G. Yansura, R. Crea, T. Hirosef, A. Kraszewskit, K. Itakuraf, A. D. Riggstt. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. **1979**, 76, 106-110.
- [114] B. Voedisch, C. Menzel, E. Jordan, A. El-ghezal, T. Schirrmann, M. Hust, T. U. Braunschweig. Heterologe Expression von rekombinanten Proteinpharmazeutika. *Laborwelt* **2005**, 6, 31-35.
- [115] S. C. Almo, S. J. Garforth, B. S. Hillerich, J. D. Love, R. D. Seidel, S. K. Burley. Protein production from the structural genomics perspective : achievements and future needs INSECT MAMMALIAN. *Current Opinion in Structural Biology* **2013**, 23, 335-344.
- [116] I. Berger, L. M. Mayr. Protein production for structural biology : new solutions to new challenges Editorial overview. *Current Opinion in Structural Biology* **2013**, 23, 317-318.
- [117] K. Terpe. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production : from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **2006**, 211-222.
- [118] G. L. Rosano, E. A. Ceccarelli. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* : advances and challenges. **2014**, 5, 1-17.
- [119] S. Sahdev, Æ. S. K. Khattar, Æ. K. Singh, Á. P. Á. Glycosylation. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems : a review of the existing biotechnology strategies. **2008**, 249-264.
- [120] C. Geisler, D. Jarvis. Insect Cell Glycosylation Patterns in the Context of Biopharmaceuticals Insect Cell Glycosylation Patterns in the Context. **2018**.
- [121] H.-d. Klenk. Post-translational modifications in insect cells. **1996**, 139-144.
- [122] D. L. Jarvis. Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods in enzymology* **2009**, 463, 191-222.
- [123] N. van Beek, D. C. Davis. Baculovirus Insecticide Production in Insect Larvae. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2016**, 1350, 393-405.
- [124] A. C. Chambers, M. Aksular, L. P. Graves, S. L. Irons, R. D. Possee, L. A. King. Overview of the Baculovirus Expression System. **2018**, 1-6.
- [125] G. E. Smith, M. D. Summers, M. J. Fraser. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* **1983**, 3, 2156-2165.
- [126] I. Berger, A. Poterszman. Baculovirus expression: old dog, new tricks. *Bioengineered* **2015**, 6, 316-322.
- [127] G. Gilliland, H. M. Berman, H. Weissig, I. N. Shindyalov, J. Westbrook, P. E. Bourne, T. N. Bhat, Z. Feng. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **2000**, 28, 235-242.
- [128] T. A. Kost, J. P. Condreay, D. L. Jarvis. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **2005**, 23, 567-575.
- [129] V. A. Luckow, M. D. Summers. Trends in the Development of Baculovirus Expression vectors. **1988**, 6, 47-55.

- [130] R. D. Possee, R. B. Hitchman, K. S. Richards, S. G. Mann, E. Siaterli, C. P. Nixon, H. Irving, R. Assenberg, D. Alderton, R. J. Owens, L. A. King. Generation of Baculovirus Vectors for the High- Throughput Production of Proteins in Insect Cells. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, *101*, 1115-1122.
- [131] Y. H. Je, J. H. Chang, J. Y. Choi, J. Y. Roh, B. R. Jin, R. David, O. Reilly, S. K. Kang. A defective viral genome maintained in *Escherichia coli* for the generation of baculovirus expression vectors. **2001**, 575-582.
- [132] Y. Zhao, D. A. G. Chapman, I. M. Jones. Improving baculovirus recombination. **2003**, 31.
- [133] R. B. Hitchman, R. D. Possee, A. T. Crombie, A. Chambers, K. Ho, E. Siaterli, O. Lissina, H. Sternard, R. Novy, K. Loomis, L. E. Bird, R. J. Owens, L. A. King. Genetic modification of a baculovirus vector for increased expression in insect cells. **2010**, 57-68.
- [134] S. A. Kaba, A. M. Salcedo, P. O. Wafula, J. M. Vlak, M. M. V. Oers. Development of a chitinase and v-cathepsin negative bacmid for improved integrity of secreted recombinant proteins. **2004**, *122*, 113-118.
- [135] V. A. Luckow, S. C. Lee, G. F. Barry, P. Olins. Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*. **1993**, *67*, 4566-4579.
- [136] V. C. Ciccarone, D. A. Polayes, V. A. Luckow, in *Methods in Molecular Medicine, Vol. 13*, Humana Press Inc, **1997**, pp. 213-235.
- [137] D. J. Fitzgerald, P. Berger, C. Schaffitzel, K. Yamada, T. J. Richmond, I. Berger. Protein complex expression by using multigene baculoviral vectors. *Nature Methods* **2006**, *3*, 1021.
- [138] C. Bieniossek, T. J. Richmond, I. Berger. MultiBac : Multigene Baculovirus-Based Eukaryotic Protein Complex Production. **2008**, 1-26.
- [139] I. Berger, D. J. Fitzgerald, T. J. Richmond. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. **2004**, *22*, 1583-1587.
- [140] D. J. Fitzgerald, C. Schaffitzel, P. Berger, R. Wellinger, C. Bieniossek, T. J. Richmond, I. Berger. Ways & Means Multiprotein Expression Strategy for Structural Biology of Eukaryotic Complexes. **2007**, 275-279.
- [141] C. Becker. Charakterisierung von Rezeptortyrosinkinasen in Tumorzellen. *Dissertation, TU Dortmund* **2016**.
- [142] X. Zhang, J. Gureasko, K. Shen, P. A. Cole, J. Kuriyan. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **2006**, *125*, 1137-1149.
- [143] L. Goldschmidt, D. R. Cooper, Z. S. Derewenda, D. Eisenberg. Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants. *Protein Sci* **2007**, *16*, 1569-1576.

- [144] L. Goldschmidt, D. Eisenberg, Z. S. Derewenda. Salvage or recovery of failed targets by mutagenesis to reduce surface entropy. *Methods Mol Biol* **2014**, *1140*, 201-209.
- [145] Z. S. Derewenda. Rational protein crystallization by mutational surface engineering. *Structure* **2004**, *12*, 529-535.
- [146] Z. S. Derewenda, P. G. Vekilov. Entropy and surface engineering in protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2006**, *62*, 116-124.
- [147] E. J. Hanan, C. Eigenbrot, M. C. Bryan, D. J. Burdick, B. K. Chan, Y. Chen, J. Dotson, R. A. Heald, P. S. Jackson, H. La, M. D. Lainchbury, S. Malek, H. E. Purkey, G. Schaefer, S. Schmidt, E. M. Seward, S. Sideris, C. Tam, S. Wang, S. K. Yeap, I. Yen, J. Yin, C. Yu, I. Zilberleyb, T. P. Heffron. Discovery of selective and noncovalent diaminopyrimidine-based inhibitors of epidermal growth factor receptor containing the T790M resistance mutation. *J Med Chem* **2014**, *57*, 10176-10191.
- [148] J. Engel, C. Becker, J. Lategahn, M. Keul, J. Ketzer, T. Mühlenberg, L. Kollipara, C. Schultz-Fademrecht, R. P. Zahedi, S. Bauer, D. Rauh. Insight into the Inhibition of Drug-Resistant Mutants of the Receptor Tyrosine Kinase EGFR. *Angewandte Chemie - International Edition* **2016**, *55*, 10909-10912.
- [149] Y. Liu, K. Shah, F. Yang, L. Witucki, K. M. Shokat. A molecular gate which controls unnatural ATP analogue recognition by the tyrosine kinase v-Src. *Bioorganic & medicinal chemistry* **1998**, *6*, 1219-1226.
- [150] D. L. Gibbons, S. Pricl, H. Kantarjian, J. Cortes, A. Quintás-Cardama. The rise and fall of gatekeeper mutations? The BCR-ABL1 T315I paradigm. *Cancer* **2012**, *118*, 293-299.
- [151] R. Katayama, A. T. Shaw, T. M. Khan, M. Mino-Kenudson, B. J. Solomon, B. Halmos, N. A. Jessop, J. C. Wain, A. T. Yeo, C. Benes, L. Drew, J. C. Saeh, K. Crosby, L. V. Sequist, A. J. Iafrate, J. A. Engelman. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 120ra117.
- [152] M. C. Heinrich, C. L. Corless, C. D. Blanke, G. D. Demetri, H. Joensuu, P. J. Roberts, B. L. Eisenberg, M. von Mehren, C. D. M. Fletcher, K. Sandau, K. McDougall, W.-b. Ou, C.-J. Chen, J. A. Fletcher. Molecular Correlates of Imatinib Resistance in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Journal of Clinical Oncology* **2006**, *24*, 4764-4774.
- [153] H. Kaitsiotou, M. Keul, J. Hardick, T. Mühlenberg, J. Ketzer, C. Ehrh, J. Krüll, F. Medda, O. Koch, F. Giordanetto, S. Bauer, D. Rauh. Inhibitors to Overcome Secondary Mutations in the Stem Cell Factor Receptor KIT. *Journal of medicinal chemistry* **2017**, *60*, 8801-8815.
- [154] A. Michalczyk, S. Klüter, H. B. Rode, J. R. Simard, C. Grütter, M. Rabiller, D. Rauh. Structural insights into how irreversible inhibitors can overcome drug resistance in EGFR. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, *16*, 3482-3488.
- [155] K. S. Thress, C. P. Paweletz, E. Felip, B. C. Cho, D. Stetson, B. Dougherty, Z. Lai, A. Markovets, A. Vivancos, Y. Kuang, D. Ercan, S. E. Matthews, M. Cantarini, J. C. Barrett, P. A. Jänne, G. R. Oxnard. Acquired EGFR C797S

- mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nature Med.* **2015**, *21*, 560-562.
- [156] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty. The resurgence of covalent drugs. *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, *10*, 307-317.
- [157] I. Miyahisa, T. Sameshima, M. S. Hixon. Rapid Determination of the Specificity Constant of Irreversible Inhibitors (kinact/KI) by Means of an Endpoint Competition Assay. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 14099-14102.
- [158] C. Yung-Chi, W. H. Prusoff. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **1973**, *22*, 3099-3108.
- [159] R. A. Copeland, *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, 2nd Edition, Vol. 2*, WILEY, **2000**.
- [160] P. A. Schwartz, P. Kuzmic, J. Solowiej, S. Bergqvist, B. Bolanos, C. Almaden, A. Nagata, K. Ryan, J. Feng, D. Dalvie, J. C. Kath, M. Xu, R. Wani, B. W. Murray. Covalent EGFR inhibitor analysis reveals importance of reversible interactions to potency and mechanisms of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 173-178.
- [161] B. F. Krippendorff, R. Neuhaus, P. Lienau, A. Reichel, W. Huisinga. Mechanism-based inhibition: deriving K(I) and k(inact) directly from time-dependent IC(50) values. *J Biomol Screen* **2009**, *14*, 913-923.
- [162] Z. Zhi-Yi, Y. N. Wong. Enzyme Kinetics for Clinically Relevant CYP Inhibition. *Current Drug Metabolism* **2005**, *6*, 241-257.
- [163] R. S. Obach, R. L. Walsky, K. Venkatakrishnan. Mechanism-Based Inactivation of Human Cytochrome P450 Enzymes and the Prediction of Drug-Drug Interactions. *Drug Metabolism and Disposition* **2007**, *35*, 246-255.
- [164] S. Fowler, H. Zhang. In Vitro Evaluation of Reversible and Irreversible Cytochrome P450 Inhibition: Current Status on Methodologies and their Utility for Predicting Drug-Drug Interactions. *The AAPS Journal* **2008**, *10*, 410-424.
- [165] J. Engel, A. Richters, M. Getlik, S. Tomassi, M. Keul, M. Termathe, J. Lategahn, C. Becker, S. Mayer-Wrangowski, C. Grütter, N. Uhlenbrock, J. Krüll, N. Schaumann, S. Eppmann, P. Kibies, F. Hoffgaard, J. Heil, S. Menninger, S. Ortiz-Cuaran, J. M. Heuckmann, V. Tinnefeld, R. P. Zahedi, M. L. Sos, C. Schultz-Fademrecht, R. K. Thomas, S. M. Kast, D. Rauh. Targeting Drug Resistance in EGFR with Covalent Inhibitors: A Structure-Based Design Approach. *Journal of medicinal chemistry* **2015**, *58*, 6844-6863.
- [166] J. A. Blair, D. Rauh, C. Kung, C. H. Yun, Q. W. Fan, H. Rode, C. Zhang, M. J. Eck, W. A. Weiss, K. M. Shokat. Structure-guided development of affinity probes for tyrosine kinases using chemical genetics. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 229-238.
- [167] A. C. Pierce, E. ter Haar, H. M. Binch, D. P. Kay, S. R. Patel, P. Li. CH...O and CH...N Hydrogen Bonds in Ligand Design: A Novel Quinazolin-4-

- ylthiazol-2-ylamine Protein Kinase Inhibitor. *Journal of medicinal chemistry* **2005**, *48*, 1278-1281.
- [168] R. A. Ward, M. J. Anderton, S. Ashton, P. A. Bethel, M. Box, S. Butterworth, N. Colclough, C. G. Chorley, C. Chuaqui, D. A. Cross, L. A. Dakin, J. E. Debreczeni, C. Eberlein, M. R. Finlay, G. B. Hill, M. Grist, T. C. Klinowska, C. Lane, S. Martin, J. P. Orme, P. Smith, F. Wang, M. J. Waring. Structure- and reactivity-based development of covalent inhibitors of the activating and gatekeeper mutant forms of the epidermal growth factor receptor (EGFR). *Journal of medicinal chemistry* **2013**, *56*, 7025-7048.
- [169] S. Tomassi, J. Lategahn, J. Engel, M. Keul, H. L. Tumbrink, J. Ketzer, T. Mühlenberg, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, S. Bauer, D. Rauh. Indazole-Based Covalent Inhibitors To Target Drug-Resistant Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of medicinal chemistry* **2017**, *60*, 2361-2372.
- [170] J. Engel, S. Smith, J. Lategahn, H. L. Tumbrink, L. Goebel, C. Becker, E. Hennes, M. Keul, A. Unger, H. Müller, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, G. Günther, J. G. Hengstler, D. Rauh. Structure-Guided Development of Covalent and Mutant-Selective Pyrazolopyrimidines to Target T790M Drug Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of medicinal chemistry* **2017**, *60*, 7725-7744.
- [171] S. Smith, M. Keul, J. Engel, D. Basu, S. Eppmann, D. Rauh. Characterization of Covalent-Reversible EGFR Inhibitors. *ACS Omega* **2017**, *2*, 1563-1575.
- [172] I. M. Serafimova, M. A. Pufall, S. Krishnan, K. Duda, M. S. Cohen, R. L. Maglathlin, J. M. McFarland, R. M. Miller, M. Frödin, J. Taunton. Reversible targeting of noncatalytic cysteines with chemically tuned electrophiles. *Nature Chemical Biology* **2012**, *8*, 471.
- [173] M. C. Noe, A. M. Gilbert, in *Annual Reports in Medicinal Chemistry, Vol. 47* (Ed.: M. C. Desai), Academic Press, **2012**, pp. 413-439.
- [174] G. Caravatti, J. Brügggen, E. Buchdunger, R. Cozens, P. Furet, N. Lydon, T. O'Reilly, P. Traxler, in *Anticancer Agents, Vol. 796*, American Chemical Society, **2001**, pp. 231-244.
- [175] P. Traxler, P. R. Allegrini, R. Brandt, J. Brueggen, R. Cozens, D. Fabbro, K. Grosios, H. A. Lane, P. McSheehy, J. Mestan, T. Meyer, C. Tang, M. Wartmann, J. Wood, G. Caravatti. AEE788: a dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4931-4941.
- [176] S. J. Kaspersen, C. Sorum, V. Willassen, E. Fuglseth, E. Kjobli, G. Bjorkoy, E. Sundby, B. H. Hoff. Synthesis and in vitro EGFR (ErbB1) tyrosine kinase inhibitory activity of 4-N-substituted 6-aryl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-4-amines. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 6002-6014.
- [177] J. Lategahn. Design, Synthese und zelluläre Charakterisierung von Inhibitoren onkogener und Wirkstoff-resistenter Mutanten der ErbB-Familie. *Dissertation, TU Dortmund* **2018**.

- [178] M. Getlik, C. Grütter, J. R. Simard, S. Klüter, M. Rabiller, H. B. Rode, A. Robubi, D. Rauh. Hybrid Compound Design To Overcome the Gatekeeper T338M Mutation in cSrc. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52*, 3915-3926.
- [179] J. R. Simard, S. Klüter, C. Grütter, M. Getlik, M. Rabiller, H. B. Rode, D. Rauh. A new screening assay for allosteric inhibitors of cSrc. *Nature chemical biology* **2009**, *5*, 394-396.
- [180] A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein engineering* **1995**, *8*, 127-134.
- [181] P. Zhao, M.-Y. Yao, S.-J. Zhu, J.-Y. Chen, C.-H. Yun. Crystal structure of EGFR T790M/C797S/V948R in complex with EAI045. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2018**, *502*, 332-337.
- [182] 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. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **2004**, *350*, 2129-2139.
- [183] A. Bezjak, D. Tu, L. Seymour, G. Clark, A. Trajkovic, M. Zukin, J. Ayoub, S. Lago, R. d. A. Ribeiro, A. Gerogianni, A. Cyjon, J. Noble, F. Laberge, R. T.-T. Chan, D. Fenton, J. v. Pawel, M. Reck, F. A. Shepherd. Symptom Improvement in Lung Cancer Patients Treated With Erlotinib: Quality of Life Analysis of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *Journal of Clinical Oncology* **2006**, *24*, 3831-3837.
- [184] R. Rosell, E. Carcereny, R. Gervais, A. Vergnenegre, B. Massuti, E. Felip, R. Palmero, R. Garcia-Gomez, C. Pallares, J. M. Sanchez, R. Porta, M. Cobo, P. Garrido, F. Longo, T. Moran, A. Insa, F. De Marinis, R. Corre, I. Bover, A. Illiano, E. Dansin, J. de Castro, M. Milella, N. Reguart, G. Altavilla, U. Jimenez, M. Provencio, M. A. Moreno, J. Terrasa, J. Muñoz-Langa, J. Valdivia, D. Isla, M. Domine, O. Molinier, J. Mazieres, N. Baize, R. Garcia-Campelo, G. Robinet, D. Rodriguez-Abreu, G. Lopez-Vivanco, V. Gebbia, L. Ferrera-Delgado, P. Bombaron, R. Bernabe, A. Bearz, A. Artal, E. Cortesi, C. Rolfo, M. Sanchez-Ronco, A. Drozdowskyj, C. Queralt, I. de Aguirre, J. L. Ramirez, J. J. Sanchez, M. A. Molina, M. Taron, L. Paz-Ares. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology* **2012**, *13*, 239-246.
- [185] Y. Wang, G. Schmid-Bindert, C. Zhou. Erlotinib in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: an update for clinicians. *Therapeutic advances in medical oncology* **2012**, *4*, 19-29.
- [186] T. Mitsudomi, S. Morita, Y. Yatabe, S. Negoro, I. Okamoto, J. Tsurutani, T. Seto, M. Satouchi, H. Tada, T. Hirashima, K. Asami, N. Katakami, M. Takada, H. Yoshioka, K. Shibata, S. Kudoh, E. Shimizu, H. Saito, S. Toyooka, K. Nakagawa, M. Fukuoka. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth

- factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology* **2010**, *11*, 121-128.
- [187] L. V. Sequist, R. G. Martins, D. Spigel, S. M. Grunberg, A. Spira, P. A. Jänne, V. A. Joshi, D. McCollum, T. L. Evans, A. Muzikansky, G. L. Kuhlmann, M. Han, J. S. Goldberg, J. Settleman, A. J. Iafrate, J. A. Engelman, D. A. Haber, B. E. Johnson, T. J. Lynch. First-Line Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Somatic EGFR Mutations. *Journal of Clinical Oncology* **2008**, *26*, 2442-2449.
- [188] T. Mitsudomi, Y. Yatabe. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci* **2007**, *98*, 1817-1824.
- [189] G. R. Oxnard, P. C. Lo, M. Nishino, S. E. Dahlberg, N. I. Lindeman, M. Butaney, D. M. Jackman, B. E. Johnson, P. A. Jänne. Natural history and molecular characteristics of lung cancers harboring EGFR exon 20 insertions. *J. Thorac. Oncol.* **2013**, *8*, 179-184.
- [190] M. E. Arcila, K. Nafa, J. E. Chaft, N. Rekhtman, C. Lau, B. A. Reva, M. F. Zakowski, M. G. Kris, M. Ladanyi. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 220-229.
- [191] H. Yasuda, S. Kobayashi, D. B. Costa. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, e23-e31.
- [192] Y. Kobayashi, T. Mitsudomi. Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer science* **2016**, *107*, 1179-1186.
- [193] J. Naidoo, C. S. Sima, K. Rodriguez, N. Busby, K. Nafa, M. Ladanyi, G. J. Riely, M. G. Kris, M. E. Arcila, H. A. Yu. Epidermal growth factor receptor exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: Clinical outcomes and response to erlotinib. *Cancer* **2015**, *121*, 3212-3220.
- [194] A.-C. Voegeli, M. Legrain, M. Beau-Faller, L. Lacroix, F. Escande, S. Lizard, J.-L. Pretet, I. Rouquette, P. de Crémoux, J. Solassol, F. de Fraipont, I. Bièche, A. Cayre, E. Favre-Guillevin, P. Tomasini, H. Blons, F. Morin, L. Baudrin, B. Besse, G. Zalcman, E. Quoix, A.-M. Ruppert, J. Cadranet, M. Wislez, N. Prim, I. Nanni-Metellus, R. Lacave. Rare EGFR exon 18 and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10 117 patients: a multicentre observational study by the French ERMETIC-IFCT network. *Annals of Oncology* **2013**, *25*, 126-131.
- [195] H. Yasuda, E. Park, C. H. Yun, N. J. Sng, A. R. Lucena-Araujo, W. L. Yeo, M. S. Huberman, D. W. Cohen, S. Nakayama, K. Ishioka, N. Yamaguchi, M. Hanna, G. R. Oxnard, C. S. Lathan, T. Moran, L. V. Sequist, J. E. Chaft, G. J. Riely, M. E. Arcila, R. A. Soo, M. Meyerson, M. J. Eck, S. S. Kobayashi, D. B. Costa. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 216ra177.

- [196] S. Sakiyama, Y. Nakamura, S. Yasuda. Expression of epidermal growth factor receptor gene in cultured human lung cancer cells. *Japanese journal of cancer research : Gann* **1986**, 77, 965-969.
- [197] S. Vyse, P. H. Huang. Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther* **2019**, 4, 5.
- [198] M. E. Arcila, J. E. Chaft, K. Nafa, S. Roy-Chowdhuri, C. Lau, M. Zaidinski, P. K. Paik, M. F. Zakowski, M. G. Kris, M. Ladanyi. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* **2012**, 18, 4910-4918.
- [199] J. Mazières, S. Peters, B. Lepage, A. B. Cortot, F. Barlesi, M. Beau-Faller, B. Besse, H. Blons, A. Mansuet-Lupo, T. Urban, D. Moro-Sibilot, E. Dansin, C. Chouaid, M. Wislez, J. Diebold, E. Felip, I. Rouquette, J. D. Milia, O. Gautschi. Lung Cancer That Harbors an HER2 Mutation: Epidemiologic Characteristics and Therapeutic Perspectives. *Journal of Clinical Oncology* **2013**, 31, 1997-2003.
- [200] L. V. Sequist, B. Besse, T. J. Lynch, V. A. Miller, K. K. Wong, B. Gitlitz, K. Eaton, C. Zacharchuk, A. Freyman, C. Powell, R. Ananthakrishnan, S. Quinn, J.-C. Soria. Neratinib, an Irreversible Pan-ErbB Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor: Results of a Phase II Trial in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2010**, 28, 3076-3083.
- [201] J. C. H. Yang, L. V. Sequist, S. L. Geater, C.-M. Tsai, T. S. K. Mok, M. Schuler, N. Yamamoto, C.-J. Yu, S.-H. I. Ou, C. Zhou, D. Massey, V. Zazulina, Y.-L. Wu. Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *The lancet oncology* **2015**, 16, 830-838.
- [202] 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. Mechanisms and clinical activity of an EGFR and HER2 exon 20-selective kinase inhibitor in non-small cell lung cancer. *Nature medicine* **2018**.
- [203] M. Y. Cha, K. O. Lee, M. Kim, J. Y. Song, K. H. Lee, J. Park, Y. J. Chae, Y. H. Kim, K. H. Suh, G. S. Lee, S. B. Park, M. S. Kim. Antitumor activity of HM781-36B, a highly effective pan-HER inhibitor in erlotinib-resistant NSCLC and other EGFR-dependent cancer models. *Int. J. Cancer* **2012**, 130, 2445-2454.
- [204] T. M. Kim, K. W. Lee, D. Y. Oh, J. S. Lee, S. A. Im, D. W. Kim, S. W. Han, Y. J. Kim, T. Y. Kim, J. H. Kim, H. Han, W. H. Kim, Y. J. Bang. Phase 1 Studies of Poziotinib, an Irreversible Pan-HER Tyrosine Kinase Inhibitor in Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Res Treat* **2018**, 50, 835-842.
- [205] J. Y. Han, K. H. Lee, S. W. Kim, Y. J. Min, E. Cho, Y. Lee, S. H. Lee, H. Y. Kim, G. K. Lee, B. H. Nam, H. Han, J. Jung, J. S. Lee. A Phase II Study of Poziotinib in Patients with Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Mutant Lung Adenocarcinoma Who Have Acquired Resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res Treat* **2017**, 49, 10-19.

- [206] X. Lu, L. Yu, Z. Zhang, X. Ren, J. B. Smaill, K. Ding. Targeting EGFR(L858R/T790M) and EGFR(L858R/T790M/C797S) resistance mutations in NSCLC: Current developments in medicinal chemistry. *Med Res Rev* **2018**, *38*, 1550-1581.
- [207] J. A. Woyach, R. R. Furman, T. M. Liu, H. G. Ozer, M. Zapatka, A. S. Ruppert, L. Xue, D. H. Li, S. M. Steggerda, M. Versele, S. S. Dave, J. Zhang, A. S. Yilmaz, S. M. Jaglowski, K. A. Blum, A. Lozanski, G. Lozanski, D. F. James, J. C. Barrientos, P. Lichter, S. Stilgenbauer, J. J. Buggy, B. Y. Chang, A. J. Johnson, J. C. Byrd. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 2286-2294.
- [208] J. A. Burger, D. A. Landau, A. Taylor-Weiner, I. Bozic, H. Zhang, K. Sarosiek, L. Wang, C. Stewart, J. Fan, J. Hoellenriegel, M. Sivina, A. M. Dubuc, C. Fraser, Y. Han, S. Li, K. J. Livak, L. Zou, Y. Wan, S. Konoplev, C. Sougnez, J. R. Brown, L. V. Abruzzo, S. L. Carter, M. J. Keating, M. S. Davids, W. G. Wierda, K. Cibulskis, T. Zenz, L. Werner, P. D. Cin, P. Kharchencko, D. Neuberg, H. Kantarjian, E. Lander, S. Gabriel, S. O'Brien, A. Letai, D. A. Weitz, M. A. Nowak, G. Getz, C. J. Wu. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nature Communications* **2016**, *7*, 11589.
- [209] H. A. Yu, S. K. Tian, A. E. Drilon, L. Borsu, G. J. Riely, M. E. Arcila, M. Ladanyi. Acquired Resistance of EGFR-Mutant Lung Cancer to a T790M-Specific EGFR Inhibitor: Emergence of a Third Mutation (C797S) in the EGFR Tyrosine Kinase Domain. *JAMA Oncol* **2015**, *1*, 982-984.
- [210] M. Günther, J. Lategahn, M. Juchum, E. Döring, M. Keul, J. Engel, H. L. Tumbrink, D. Rauh, S. Laufer. Trisubstituted Pyridinylimidazoles as Potent Inhibitors of the Clinically Resistant L858R/T790M/C797S EGFR Mutant: Targeting of Both Hydrophobic Regions and the Phosphate Binding Site. *Journal of medicinal chemistry* **2017**, *60*, 5613-5637.
- [211] J. Holenz, D. G. Brown, in *Lead Generation: Methods and Strategies* (Eds.: J. Holenz, D. G. Brown), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2016**, pp. 13-33.
- [212] D. G. Brown, J. Boström. Where do recent small molecule clinical development candidates come from? *Journal of medicinal chemistry* **2018**.
- [213] R. MacArron, M. N. Banks, D. Bojanic, D. J. Burns, D. A. Cirovic, T. Garyantes, D. V. S. Green, R. P. Hertzberg, W. P. Janzen, J. W. Paslay, U. Schopfer, G. S. Sittampalam. Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nature Reviews Drug Discovery* **2011**, *10*, 188-195.
- [214] D. W. Fry, A. J. Kraker, A. McMichael, L. A. Ambroso, J. M. Nelson, W. R. Leopold, R. W. Connors, A. J. Bridges. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science* **1994**, *265*, 1093-1095.
- [215] J. Das, P. Chen, D. Norris, R. Padmanabha, J. Lin, R. V. Moquin, Z. Shen, L. S. Cook, A. M. Doweyko, S. Pitt, S. Pang, D. R. Shen, Q. Fang, H. F. De Fex, K. W. McIntyre, D. J. Shuster, K. M. Gillooly, K. Behnia, G. L. Schieven, J. Wityak, J. C. Barrish. 2-Aminothiazole as a novel kinase inhibitor template. Structure-activity relationship studies toward the discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-

- pyrimidinyl]amino]-1, 3-thiazole-5-carboxamide (Dasatini. *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49*, 6819-6832.
- [216] P. Wolle, J. Weisner, M. Keul, I. Landel, J. Lategahn, D. Rauh. RASPELD to Perform High-End Screening in an Academic Environment toward the Development of Cancer Therapeutics. *ChemMedChem* **2018**, 2065-2072.
- [217] J. B. Baell, G. A. Holloway. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *Journal of medicinal chemistry* **2010**.
- [218] C. A. Lipinski, in *Drug Discovery Today: Technologies*, **2004**.
- [219] J. R. Simard, D. Rauh. FLiK: A direct-binding assay for the identification and kinetic characterization of stabilizers of inactive kinase conformations. *Methods in Enzymology* **2014**.
- [220] R. Schneider, C. Beumer, J. R. Simard, C. Grütter, D. Rauh. Selective detection of allosteric phosphatase inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* **2013**.
- [221] C. Becker, S. Öcal, H. D. Nguyen, T. Phan, M. Keul, J. R. Simard, D. Rauh. Monitoring Conformational Changes in the Receptor Tyrosine Kinase EGFR. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2016**, *17*, 990-994.
- [222] S. C. Mayer-Wrangowski, D. Rauh. Monitoring ligand-induced conformational changes for the identification of estrogen receptor agonists and antagonists. *Angewandte Chemie - International Edition* **2015**.
- [223] J.-H. Zhang, T. D. Y. Chung, K. R. Oldenburg. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening* **1999**, *4*, 67-73.
- [224] L. Xing, J. Klug-Mcleod, B. Rai, E. A. Lunney. Kinase hinge binding scaffolds and their hydrogen bond patterns. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2015**, *23*, 6520-6527.
- [225] E. Strocchi, F. Fornari, M. Minguzzi, L. Gramantieri, M. Milazzo, V. Rebuttini, S. Breviglieri, C. M. Camaggi, E. Locatelli, L. Bolondi, M. Comes-Franchini. Design, synthesis and biological evaluation of pyrazole derivatives as potential multi-kinase inhibitors in hepatocellular carcinoma. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *48*, 391-401.
- [226] L. Adnane, P. A. Trail, I. Taylor, S. M. Wilhelm, in *Methods in Enzymology*, Vol. 407, Academic Press, **2006**, pp. 597-612.
- [227] M. W. Eugen Lounkine, Anne Mai Wassermann, and Jürgen Bajorath. SARANEA: A Freely Available Program To Mine Structure-Activity and Structure-Selectivity Relationship Information in Compound Data Sets. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 68-78.
- [228] M. R. Berthold, N. Cebon, F. Dill, T. R. Gabriel, T. Kötter, T. Meinel, P. Ohl, C. Sieb, K. Thiel, B. Wiswedel, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2008**, pp. 319-326.
- [229] D. J. Rogers, T. T. Tanimoto. A Computer Program for Classifying Plants. *Science* **1960**, *132*, 1115-1118.

- [230] A. Jadhav, R. S. Ferreira, C. Klumpp, B. T. Mott, C. P. Austin, J. Inglese, C. J. Thomas, D. J. Maloney, B. K. Shoichet, A. Simeonov. Quantitative analyses of aggregation, autofluorescence, and reactivity artifacts in a screen for inhibitors of a thiol protease. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 37-51.
- [231] R. F. Bruns, I. A. Watson. Rules for Identifying Potentially Reactive or Promiscuous Compounds. *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55*, 9763-9772.
- [232] G. M. Rishton. Reactive compounds and in vitro false positives in HTS. *Drug discovery today* **1997**, *2*, 382-384.
- [233] J. Kazius, R. McGuire, R. Bursi. Derivation and Validation of Toxicophores for Mutagenicity Prediction. *Journal of medicinal chemistry* **2005**, *48*, 312-320.
- [234] R. Brenk, A. Schipani, D. James, A. Krasowski, I. H. Gilbert, J. Frearson, P. G. Wyatt. Lessons Learnt from Assembling Screening Libraries for Drug Discovery for Neglected Diseases. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 435-444.
- [235] K. E. Hevener, R. Pesavento, J. Ren, H. Lee, K. Ratia, M. E. Johnson, in *Methods in Enzymology*, Vol. 610 (Ed.: C. A. Lesburg), Academic Press, **2018**, pp. 265-309.
- [236] S. M. Devine, M. D. Mulcair, C. O. Debono, E. W. W. Leung, J. W. M. Nissink, S. S. Lim, I. R. Chandrashekar, M. Vazirani, B. Mohanty, J. S. Simpson, J. B. Baell, P. J. Scammells, R. S. Norton, M. J. Scanlon. Promiscuous 2-Aminothiazoles (PrATs): A Frequent Hitting Scaffold. *Journal of medicinal chemistry* **2015**, *58*, 1205-1214.
- [237] M. Maemondo, A. Inoue, K. Kobayashi, S. Sugawara, S. Oizumi, H. Isobe, A. Gemma, M. Harada, H. Yoshizawa, I. Kinoshita, Y. Fujita, S. Okinaga, H. Hirano, K. Yoshimori, T. Harada, T. Ogura, M. Ando, H. Miyazawa, T. Tanaka, Y. Saijo, K. Hagiwara, S. Morita, T. Nukiwa. Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *New England Journal of Medicine* **2010**, *362*, 2380-2388.
- [238] L. V. Sequist, J. C. Yang, N. Yamamoto, K. O'Byrne, V. Hirsh, T. Mok, S. L. Geater, S. Orlov, C. M. Tsai, M. Boyer, W. C. Su, J. Bennouna, T. Kato, V. Gorbunova, K. H. Lee, R. Shah, D. Massey, V. Zazulina, M. Shahidi, M. Schuler. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* **2013**, *31*, 3327-3334.
- [239] P. A. Jänne, J. C. Yang, D. W. Kim, D. Planchard, Y. Ohe, S. S. Ramalingam, M. J. Ahn, S. W. Kim, W. C. Su, L. Horn, D. Haggstrom, E. Felip, J. H. Kim, P. Frewer, M. Cantarini, K. H. Brown, P. A. Dickinson, S. Giorghiu, M. Ranson. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 1689-1699.
- [240] G. R. Oxnard, K. Thress, C. Paweletz, D. Stetson, B. Dougherty, Z. Lai, A. Markovets, E. Felip, A. Vivancos, Y. Kuang, L. Sholl, A. J. Redig, M. Cantarini, J. C. Barrett, R. N. Pillai, B. C. Cho, L. Lacroix, D. Planchard, J. C. Soria, P. A. Jänne. Mechanisms of Acquired Resistance to AZD9291 in

- EGFR T790M Positive Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2015**, *10* (suppl 2): ORAL17.07.
- [241] A. Oztan, S. Fischer, A. B. Schrock, R. L. Erlich, C. M. Lovly, P. J. Stephens, J. S. Ross, V. Miller, S. M. Ali, S. I. Ou, L. E. Raez. Emergence of EGFR G724S mutation in EGFR-mutant lung adenocarcinoma post progression on osimertinib. *Lung Cancer* **2017**, *111*, 84-87.
- [242] N. Peled, L. C. Roisman, B. Miron, R. Pfeffer, R. B. Lanman, M. Ilouze, A. Dvir, L. Soussan-Gutman, F. Barlesi, G. Tarcic, O. Edelheit, D. Gandara, Y. Elkabetz. Subclonal Therapy by Two EGFR TKIs Guided by Sequential Plasma Cell-free DNA in EGFR-Mutated Lung Cancer. *J Thorac Oncol* **2017**, *12*, e81-e84.
- [243] Z. Piotrowska, H. Isozaki, J. K. Lennerz, J. F. Gainor, I. T. Lennes, V. W. Zhu, N. Marcoux, M. K. Banwait, S. R. Digumarthy, W. Su, S. Yoda, A. K. Riley, V. Nangia, J. J. Lin, R. J. Nagy, R. B. Lanman, D. Dias-Santagata, M. Mino-Kenudson, A. J. Iafrate, R. S. Heist, A. T. Shaw, E. K. Evans, C. Clifford, S. I. Ou, B. Wolf, A. N. Hata, L. V. Sequist. Landscape of Acquired Resistance to Osimertinib in EGFR-Mutant NSCLC and Clinical Validation of Combined EGFR and RET Inhibition with Osimertinib and BLU-667 for Acquired RET Fusion. *Cancer Discov* **2018**, *8*, 1529-1539.
- [244] D. Bossemeyer. The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element. *Trends in Biochemical Sciences* **1994**, *19*, 201-205.
- [245] M. Huse, J. Kuriyan. The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell* **2002**, *109*, 275-282.
- [246] S. Branford, Z. Rudzki, S. Walsh, I. Parkinson, A. Grigg, J. Szer, K. Taylor, R. Herrmann, J. F. Seymour, C. Arthur, D. Joske, K. Lynch, T. Hughes. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* **2003**, *102*, 276-283.
- [247] S. W. Cowan-Jacob, G. Fendrich, A. Floersheimer, P. Furet, J. Liebetanz, G. Rummel, P. Rheinberger, M. Centeleghe, D. Fabbro, P. W. Manley. Structural biology contributions to the discovery of drugs to treat chronic myelogenous leukaemia. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2007**, *63*, 80-93.
- [248] J. Fassunke, F. Müller, M. Keul, S. Michels, M. A. Dammert, A. Schmitt, D. Plenker, J. Lategahn, C. Heydt, J. Brägelmann, 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. Püsken, 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. Büttner, M. L. Sos. Overcoming EGFR G724S-mediated osimertinib resistance through unique binding characteristics of second-generation EGFR inhibitors. *Nature Communications* **2018**, *9*.
- [249] R. Palacios, M. Steinmetz. IL3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* **1985**, *41*, 727-734.

- [250] C. H. Yun, K. E. Mengwasser, A. V. Toms, M. S. Woo, H. Greulich, K. K. Wong, M. Meyerson, M. J. Eck. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 2070-2075.
- [251] 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. Proteome-wide Map of Targets of T790M-EGFR-Directed Covalent Inhibitors. *Cell chemical biology* **2017**, *24*, 1388-1400.e1387.
- [252] B. P. Brown, Y. K. Zhang, D. Westover, Y. Yan, H. Qiao, V. Huang, Z. Du, J. A. Smith, J. S. Ross, V. A. Miller, S. M. Ali, L. Bazhenova, A. B. Schrock, J. Meiler, C. M. Lovly. On-target resistance to the mutant-selective EGFR inhibitor osimertinib can develop in an allele specific manner dependent on the original EGFR activating mutation. *Clin Cancer Res* **2019**.
- [253] W. Kabsch. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography* **1993**, *26*, 795-800.
- [254] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **2007**, *40*, 658-674.
- [255] 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. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 213-221.
- [256] P. Emsley, K. Cowtan. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D* **2004**, *60*, 2126-2132.
- [257] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan. Features and development of Coot. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2010**, *66*, 486-501.
- [258] A. W. Schuttelkopf, D. M. F. van Aalten. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D* **2004**, *60*, 1355-1363.
- [259] H. Berman, K. Henrick, H. Nakamura. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nature Structural Biology* **2003**, *10*, 980.
- [260] Schrodinger, LLC, **2015**.
- [261] D. J. Giard, S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik, W. P. Parks. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1417-1423.
- [262] H. Shigematsu, T. Takahashi, M. Nomura, K. Majmudar, M. Suzuki, H. Lee, Wistuba, II, K. M. Fong, S. Toyooka, N. Shimizu, T. Fujisawa, J. D. Minna, A.

F. Gazdar. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* **2005**, 65, 1642-1646.

7. Eidesstattliche Versicherung (Affidativ)

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Keul, Marina

Name, Vorname
(Surname, first name)

Matrikel-Nr.

(Enrolment number)

Belehrung:

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

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

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

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

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

The submission of a false affidavit is punishable.

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

I have taken note of the above official notification.

Dortmund, den

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift

(Signature)

Titel der Dissertation:

(Title of the thesis):

Etablierung von biochemischen und strukturbasierten Systemen zur Charakterisierung

wirkstoffresistenter EGFR-Mutanten

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

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

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

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

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

Dortmund, den

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift

(Signature)