

**Struktur-basiertes Design, Synthese und pharmakokinetische  
Charakterisierung von kovalenten Inhibitoren zur Adressierung von  
Krebs-relevanten Proteinkinasen**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

an der Technischen Universität Dortmund  
Lehrstuhl für Medizinische Chemie und Chemische Biologie

vorgelegt von

**Julia Hardick**

aus Recklinghausen

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
2. Gutachter: Prof. Dr. Paul Czodrowski



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2016 bis Januar 2020 unter der Leitung von Prof. Dr. Daniel Rauh an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie an der Technischen Universität Dortmund angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden bereits in Form von Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften oder im Rahmen der Bachelorarbeit von Tonia Kirschner veröffentlicht und wurden in dieser Dissertation an entsprechender Stelle gekennzeichnet.



## Publikationen

Lategahn, J.\*; Hardick, J.\*; Grabe, T.\*; Niggenaber, J.\*; Jeyakumar, K.; Keul, M.; Tumbrink, H. L.; Becker, C.; Hodson, L.; Kirschner, T.; Klovekorn, P.; Ketzer, J.; Baumann, M.; Terheyden, S.; Unger, A.; Weisner, J.; Müller, M. P.; van Otterlo, W. A. L.; Bauer, S.; Rauh, D., Targeting Her2-insYVMA with Covalent Inhibitors-A Focused Compound Screening and Structure-Based Design Approach. *J Med Chem* **2020**, *63* (20), 11725-11755.

Lategahn, J.; Keul, M.; Klövekorn, P.; Tumbrink, H. L.; Niggenaber, J.; Müller, M. P.; Hodson, L.; Flaßhoff, M.; Hardick, J.; Grabe, T.; Engel, J.; Schultz-Fademrecht, C.; Baumann, M.; Ketzer, J.; Mühlenberg, T.; Hiller, W.; Günther, G.; Unger, A.; Müller, H.; Heimsoeth, A.; Golz, C.; Blank-Landeshammer, B.; Kollipara, L.; Zahedi, R. P.; Strohmann, C.; Hengstler, J. G.; van Otterlo, W. A. L.; Bauer, S.; Rauh, D., Inhibition of osimertinib-resistant epidermal growth factor receptor EGFR-T790M/C797S. *Chem Sci* **2019**, *10* (46), 10789-10801.

Niggenaber, J.\*; Hardick, J.\*; Lategahn, J.; Rauh, D., Structure Defines Function: Clinically Relevant Mutations in ErbB Kinases. *J Med Chem* **2020**, *63* (1), 40-51.

Uhlenbrock, N.; Smith, S.; Weisner, J.; Landel, I.; Lindemann, M.; Le, T. A.; Hardick, J.; Gontla, R.; Scheinpflug, R.; Czodrowski, P.; Janning, P.; Depta, L.; Quambusch, L.; Müller, M. P.; Engels, B.; Rauh, D., Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase Akt. *Chem Sci* **2019**, *10* (12), 3573-3585.

Weisner, J.; Landel, I.; Reintjes, C.; Uhlenbrock, N.; Trajkovic-Arsic, M.; Dienstbier, N.; Hardick, J.; Ladigan, S.; Lindemann, M.; Smith, S.; Quambusch, L.; Scheinpflug, R.; Depta, L.; Gontla, R.; Unger, A.; Müller, H.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Günther, G.; Maghnouj, A.; Müller, M. P.; Pohl, M.; Teschendorf, C.; Wolters, H.; Viebahn, R.; Tannapfel, A.; Uhl, W.; Hengstler, J. G.; Hahn, S. A.; Siveke, J. T.; Rauh, D., Preclinical Efficacy of Covalent-Allosteric AKT Inhibitor Borussertib in Combination with Trametinib in KRAS-Mutant Pancreatic and Colorectal Cancer. *Cancer Res* **2019**, *79* (9), 2367-2378.

Wolle, P.\*; Hardick, J.\*; Cronin, S. J. F.; Engel, J.; Baumann, M.; Lategahn, J.; Penninger, J. M.; Rauh, D., Targeting the MKK7-JNK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7-c-Jun N-Terminal Kinase) Pathway with Covalent Inhibitors. *J Med Chem* **2019**, *62* (5), 2843-2848.

Kaitsiotou, H.; Keul, M.; Hardick, J.; Mühlenberg, T.; Ketzer, J.; Ehrt, C.; Krüll, J.; Medda, F.; Koch, O.; Giordanetto, F.; Bauer, S.; Rauh, D., Inhibitors to Overcome Secondary Mutations in the Stem Cell Factor Receptor KIT. *J Med Chem* **2017**, *60* (21), 8801-8815.

---

\* Diese Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.



## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Rauh für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Du hast mich während dieser spannenden Zeit gefordert und gefördert, sowie du jederzeit beratend zur Seite standest. Danke.

Herrn Prof. Dr. Paul Czodrowski möchte ich herzlich für die Übernahme des Koreferats danken.

Weiterhin möchte ich mich bei dem gesamten Arbeitskreis für anregende Diskussionen, eine harmonische Arbeitsatmosphäre und Hilfe bei jeglichen Fragestellungen bedanken. Mein Dank gilt auch besonders meinen Bürokollegen Tobi, Jonas W., Kiru, Steven, Rajesh und Jonas L., die stets aufkommende Fragen und Probleme mit mir zusammen gelöst haben. Ebenfalls danke ich Tonia Kirschner, die ich während ihrer Bachelorarbeit betreuen durfte. Hervorheben möchte ich Ina, Janina, Laura und Lisa: danke euch für die schöne gemeinsame Zeit auch außerhalb des Labors. Auf uns!

Darüber hinaus danke ich Martina, Petra, Maria und Uli, die bei organisatorischen und administrativen Aufgaben unentbehrlich waren. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Andreas Arndt für die Unterstützung im Laboralltag sowie für die Durchführung verschiedener Assays.

Jörn, Jonas L., Jonas W. und Steven danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Eldar Zent bedanken, der entscheidend zum Verständnis und zur Auswertung der mikrosomalen Stabilitätsassays beigetragen hat. Danke für die detaillierte Einführung an den Geräten und die hilfreichen Diskussionen.

Ebenso haben zahlreiche Kooperationspartner entscheidende Beiträge zu den Erfolgen dieser Projekte beigetragen. Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Josef M. Penninger und Dr. Shane J. F. Cronin vom IMBA in Wien für die fruchtbare Zusammenarbeit innerhalb des MKK7 Projektes bedanken. Außerdem gilt mein Dank Dr. Bernhard Johannes Haubner und Thomas Schütz für die Durchführung der MKK7-Mausstudien. Gleichmaßen möchte ich Prof. Dr. Sebastian Bauer, Dr. Thomas Mühlenberg und Julia Ketzer vom Westdeutschen Tumorzentrum in Essen danken für die Zusammenarbeit in gleich mehreren Projekten. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Sonja Sievers vom COMAS für die wertvolle und unkomplizierte Zusammenarbeit innerhalb des GIST Projektes.

Für die Durchführung der MTD- und PK-Studien möchte ich mich bei Prof. Dr. Jan G. Hengstler, Georgia Günther und Dr. Cristina Cadenas vom IfADo bedanken. Gleichmaßen möchte ich mich bei Dr. Matthias Baumann und Dr. Anke Unger für die Messungen und Auswertungen dieser PK-Studien bedanken.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei der NMR-Abteilung der TU Dortmund für die Aufnahmen der NMR-Spektren, sowie Christiane Heitbrink für die Aufnahmen der hochauflösenden Massenspektren.

Frau Dr. Petra Janning, Malte Metz sowie Andreas Brockmeyer möchte ich für die Auswertung der Ergebnisse der MS/MS-Experimente danken. Ein großer Dank gilt ebenfalls Jens Warmers für den technischen Support der Velos.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Freund Joshua für seine Unterstützung und sein Verständnis, auch in stressigen Phasen. ♥

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir zunächst das Studium ermöglichen haben und mich während der gesamten Zeit bedingungslos unterstützt haben. ♥



## Inhaltsverzeichnis

Publikationen .....	v
Danksagung .....	vii
Inhaltsverzeichnis .....	ix
Abkürzungsverzeichnis .....	xii
1 Einleitung.....	1
1.1 Arzneimittelentwicklung .....	1
1.2 Pharmakokinetik .....	3
1.2.1 Permeabilität.....	5
1.2.2 Löslichkeit.....	6
1.2.3 Stabilität.....	7
1.3 Proteinkinasen.....	9
1.3.1 Die Proteinkinase MKK7 .....	11
1.4 Zielgerichtete Therapien in der Onkologie .....	14
1.4.1 Die Proteinkinase Her2.....	16
1.4.2 Die Proteinkinasen KIT und PDGFR $\alpha$ .....	18
2 Motivation und Zielsetzung .....	23
3 Ergebnisse und Diskussion.....	26
3.1 Phase-I-Metabolismus .....	26
3.2 Etablierung eines Phase-I-Metabolismus Assays (CL <sub>int</sub> Assay) .....	27
3.2.1 Charakterisierung von kovalent-allosterischen Akt Inhibitoren .....	28
3.2.2 Charakterisierung von kovalenten EGFR Inhibitoren .....	35
3.2.3 Charakterisierung von reversiblen KIT Inhibitoren .....	37
3.2.4 Charakterisierung von kovalenten MKK7 Inhibitoren.....	38
3.3 Charakterisierung und Evaluierung von Pyrazolopyrimidin 24 .....	41
3.3.1 Hochskalierung der Synthese von Pyrazolopyrimidin 24.....	43
3.3.2 MS/MS-basierter Nachweis der kovalenten Bindung an Cys218 in MKK7 ..44	
3.3.3 Selektivitätsprofil von Pyrazolopyrimidin 24 .....	45
3.3.4 Zelluläre Analyse von Pyrazolopyrimidin 24.....	47

---

3.3.5	Pharmakokinetische <i>in vitro</i> -Profilierung von Pyrazolopyrimidin 24 .....	48
3.3.6	<i>In vivo</i> PK-Profilierung von Pyrazolopyrimidin 24 .....	50
3.3.7	Darstellung von Salzformen zur Verbesserung der Löslichkeit von Pyrazolopyrimidin 24.....	54
3.3.8	<i>In vivo</i> Anwendung bei ischämischen Reperfusionsschäden.....	57
3.3.9	Zusammenfassung.....	60
3.4	Click-Reaktion zur Generierung einer MKK7 Substanzbibliothek.....	62
3.5	Weiterentwicklung von Inhibitoren der klinisch relevanten Her2 Insertionsmutante in Exon20 (Her2-ins-YVMA) .....	65
3.5.1	Struktur-basiertes Design von kovalenten Her2-Inhibitoren .....	68
3.5.2	Synthese von kovalenten Her2-Inhibitoren zur Verbesserung der Löslichkeit.....	69
3.5.3	Biochemische und zelluläre Charakterisierung der Pyrrolopyrimidine.....	73
3.5.4	MS-basierter Nachweis der kovalenten Bindung an Cys805 in Her2 und Cys797 in EGFR.....	78
3.5.5	Kristallisationsexperimente mit EGFR-T790M/V948R .....	79
3.5.6	Physikochemische und pharmakokinetische Analyse von Pyrrolopyrimidinen.....	81
3.5.7	Zusammenfassung.....	85
3.6	Struktur-basiertes Design, Synthese und Evaluierung von kovalenten Inhibitoren der Tyrosinkinasen KIT und PDGFR $\alpha$ .....	86
3.6.1	Kovalente Ponatinib-basierte Typ-II-Inhibitoren .....	89
3.6.2	Kovalente Ponatinib-basierte Typ-III-Inhibitoren .....	91
3.6.3	Massenspektrometrische Analyse und Tandem-Massenspektrometrie .....	98
3.6.4	Biochemische und zelluläre Charakterisierung der Substanzbibliothek ....	102
3.6.5	Hochdurchsatz-Screening zur Identifizierung neuer Leistrukturen für die Adressierung von mutiertem PDGFR $\alpha$ .....	109
3.6.6	Physikochemische und pharmakokinetische Evaluierung.....	110
3.6.7	Zusammenfassung.....	113
4	Zusammenfassung.....	114
5	Abstract.....	116

---

6	Anhang .....	118
7	Experimenteller Teil .....	119
7.1	Organische Synthese .....	119
7.1.1	Allgemeine Anmerkungen.....	119
7.1.2	Allgemeine Synthesevorschriften.....	120
7.1.3	Synthese und analytische Charakterisierung .....	123
7.2	Mikrosomaler Stabilitätsassay Phase-I (CL <sub>int</sub> ) .....	184
7.3	Protein-Massenspektrometrie .....	185
7.4	Tryptischer In-Gel Verdau.....	185
7.5	Kinase-Profilierung .....	186
8	Literaturverzeichnis.....	187
9	Eidesstattliche Versicherung.....	200

## Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson Kinase
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
Akt	Proteinkinase B
AUC	<i>area under the curve</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
CL <sub>int</sub>	intrinsische <i>Clearance</i>
C <sub>max</sub>	höchste Konzentration
CML	chronische myeloische Leukämie
CNS MPO	<i>central nervous system multiparameter optimization</i>
CuAAC	<i>copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition</i>
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DIPA	Diisopropylamin
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	<i>dorsal root ganglion</i>
EC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EKG	Elektrokardiogramm

---

EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
F	Bioverfügbarkeit
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GI	Gastrointestinaltrakt
GIST	Gastrointestinale Stromatumore
h	Stunde
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N,N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HLM	<i>human liver microsomes</i> (humane Lebermikrosomen)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HP $\beta$ CD	2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie
HTRF	<i>homogeneous time-resolved fluorescence</i>
HTS	<i>high throughput screening</i>
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IG	Immunglobulin
IP	intraperitoneal
IV	intravenös
JM	Juxtamembran
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KID	<i>kinase insertion domain</i>
KIT	Stammzellfaktorrezeptor
LAD	<i>left anterior descending</i>
LLE	<i>Ligand-lipophilicity efficiency</i>

---

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP2K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MAP3K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MDCKII-MDR1	<i>Madin-Darby canine kidney - multidrug resistance gene1</i> )
MKK7	MAP Kinase Kinase 7
MLM	<i>mouse liver microsomes</i> (murine Lebermikrosomen)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTD	<i>maximum tolerated dose</i>
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogen
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
PAMPA	<i>parallel artificial membrane permeability assay</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factors</i>
PDGFR $\alpha$	<i>platelet-derived growth factor receptor<math>\alpha</math></i>
PE	Petrolether
PFS	<i>progression free survival</i>
P-gp	P-Glykoprotein
PK	Pharmakokinetik
PO	peroral
PPh <sub>3</sub>	Triphenylphosphin
ppm	<i>parts per million</i>

RCX	<i>Ramus circumflexus</i>
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rt	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase(n)
SEM-Cl	2-(Trimethylsilyl)-ethoxymethylchlorid
SCF	Stammzellfaktor
SoM	<i>site of metabolism</i>
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor(en)
TMSA	Trimethylsilylacetylen
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TQ-MS	Triple Quadrupol Massenspektrometer
V <sub>z</sub>	Verteilungsvolumen
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem





---

# 1 Einleitung

Die weltweit stetig ansteigende Zahl von Krebs-Neuerkrankungen und Todesfällen macht diese Krankheit zu einem wichtigen Thema in der Gesellschaft (18,1 Million neue Fälle und 9,6 Millionen Tote in 2018).<sup>1-2</sup> Das Robert Koch Institut berichtet von etwa 500.000 Menschen in Deutschland, die jedes Jahr neu an Krebs erkranken.<sup>i</sup> Neben Krebs zählen insbesondere in der westlichen Welt, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Atemwegserkrankungen zu den häufigsten Todesursachen.<sup>ii</sup> Eine passgenaue Therapie für bspw. Krebspatienten erfordert die stetige Neu- und Weiterentwicklung von maßgeschneiderten Therapeutika.

## 1.1 Arzneimittelentwicklung

Das Ziel bei der Entwicklung eines neuen Medikaments ist, dass der Wirkstoff eine bislang noch nicht therapierbare Erkrankung lindern oder womöglich heilen kann. Die Verbesserung oder Vereinfachung der Therapie einer bereits behandelbaren Erkrankung ist ebenso von großem Interesse. Der Prozess der Arzneimittelentwicklung erstreckt sich erfahrungsgemäß über etwa 13 Jahre, wobei sich die Kosten auf 1-2 Milliarden Euro belaufen (Abb. 1). Am Anfang dieses Prozesses steht die Grundlagenforschung. Darunter wird zunächst die Suche nach einer molekularen Zielstruktur verstanden, gefolgt von dem Nachweis, dass das Target eine treibende Rolle bei der zu behandelnden Krankheit ist (Targetvalidierung). Die Identifizierung einer Substanz, welche die gewünschte Wirkung am Target zeigt, ist die Voraussetzung für die eigentliche Wirkstoffsynthese und deren Optimierung. Die Anwendung im menschlichen Körper setzt eine eingehende Charakterisierung der Substanz voraus, wobei toxikologische und sicherheitsrelevante Bewertungen durchgeführt werden, sowie die Substanz einer pharmakologischen Evaluierung unterzogen wird (präklinische Prüfung). Eine weitere Bedingung für die Testung einer Substanz am Menschen ist, dass der zu erzielende Nutzen für die Menschheit die Risiken der Experimente für die Probanden übersteigt. Bei der anschließenden klinischen Prüfung werden vier Phasen unterschieden:

Phase I: erste Anwendung eines Wirkstoffes an gesunden, meist jungen Menschen (*first-in-human*). Hier erfolgt einerseits die initiale Überprüfung der Verträglichkeit, zudem werden Dosierungsvorschläge für die nachfolgenden Phasen gemacht. Die in Tiermodellen der präklinischen Studien beobachteten pharmakodynamischen Effekte werden mit denen

---

<sup>i</sup> Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2019.

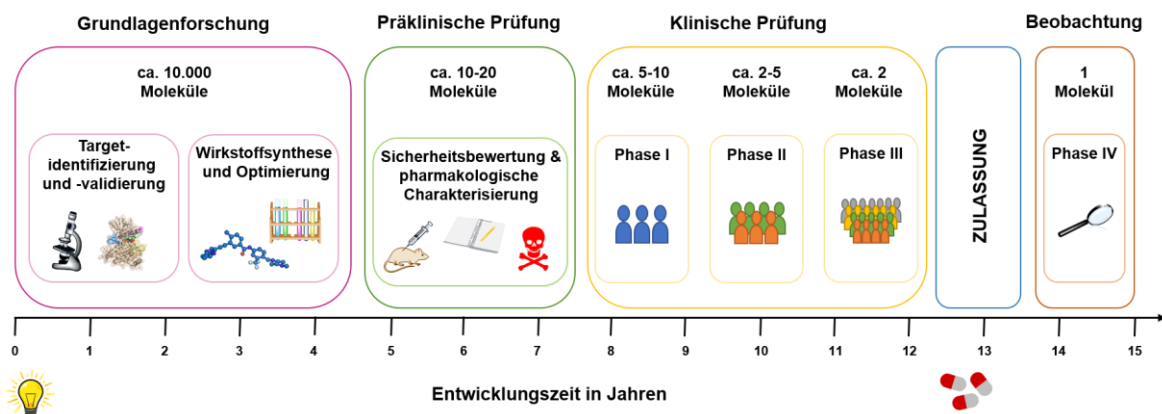
<sup>ii</sup> <https://www.abendblatt.de/adv/diagnose-herz/article110031904/Herz-Kreislauf-Erkrankungen-die-haeufigste-Todesursache-in-der-westlichen-Welt.html>; Letzter Zugriff am 24.11.2020 um 15:32 Uhr. <https://de.statista.com/themen/69/todesursachen/>; Letzter Zugriff am 22.12.2020 um 14:27 Uhr.

am Menschen aufgetretenen verglichen.

Phase II: erste Anwendung der Prüfsubstanz bei einer kleinen Patientengruppe, zumeist bestehend aus 100-500 Personen, die entsprechend erkrankt sind. In dieser Phase werden die Wirksamkeit und die Verträglichkeit der Testsubstanz geprüft. Ferner wird die geringste wirksame und höchste verträgliche Dosis für die weiteren klinischen Prüfungen ermittelt (Dosis-Wirkungs-Beziehung).

Phase III: Anwendung der Prüfsubstanz an einer Vielzahl von Patienten (>1000), um die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit nachzuweisen. Zu Vergleichszwecken werden parallel Studien mit anderen Medikamenten und/oder Placebo durchgeführt. Vorzugsweise finden Phase III Studien multizentrisch und randomisiert statt, der Goldstandard bei der Studienplanung (*randomised controlled trials*).<sup>3</sup>

Phase IV: Beobachtung nach der Zulassung und Markteinführung eines Arzneimittels. Hierbei wird z. B. in Langzeitstudien das Wirkungsprofil weiter analysiert.<sup>4,iii</sup>



**Abbildung 1.** Der Arzneimittelentwicklungsprozess beginnt mit der Grundlagenforschung, woran sich die präklinische und klinische Prüfung anschließt, bis die finale Zulassung erteilt werden kann. Darstellung adaptiert aus Mutschler Arzneimittelwirkungen (11. Auflage).

In Wirkstoffentwicklungsprozessen kommt es häufig vor, dass Projekte eingestellt oder klinische Studien als gescheitert erklärt werden. Eine Analyse der Erfolgsraten von *first-in-human* Experimenten bis zur Zulassung während einer Periode von zehn Jahren im Zeitraum von 1991-2000 offenbarte, dass nur einer von neun Wirkstoffkandidaten (11 %) den Entwicklungsprozess erfolgreich durchläuft und final die Zulassung erhält.<sup>5</sup> Der Erfolg, gemessen an der Anzahl zugelassener Arzneistoffe, zeigte sich in den letzten drei Jahren weitestgehend statisch mit 46, 59 und 48 von der FDA zugelassenen Wirkstoffen.<sup>6,iv</sup> Die Gründe hierfür sind vielseitig und werden im Folgenden näher beleuchtet.

<sup>iii</sup> U.S. Food & Drug Administration - The Drug Development Process. <https://www.fda.gov>; Letzter Zugriff am 19.11.2020 um 18:18 Uhr.

<sup>iv</sup> U.S. Food & Drug Administration – Novel Drug Approvals. <https://www.fda.gov>; Letzter Zugriff am 18.11.2020 um 14:54 Uhr.

---

Die Hauptursachen für das Scheitern von klinischen Studien sind fehlende Wirksamkeit (*efficacy*) und mangelnde Sicherheit (*safety*) des Wirkstoffes.<sup>7</sup> Unzureichende Sicherheit kann bedeuten, dass der Wirkstoffkandidat toxisch auf Organe wie Leber, Niere oder Herz wirkt. Weitere Gründe können auf die Substanz selbst zurückzuführen sein, wie *off-target* Effekte oder veränderte Eigenschaften der Substanz im Vergleich zu vorherigen pharmakologischen Untersuchungen. Eine ausbleibende Wirkung am Target (*target engagement*) oder ein unzureichender Nutzen für die Patienten ohne hohe Sicherheitsrisiken zählen ebenso zu den Auslösern für das Scheitern von klinischen Studien aufgrund von mangelnder Sicherheit des Wirkstoffes. Fehlende Wirksamkeit kann ebenfalls mehrere Ursachen haben, wie bspw. ein schlechtes Verständnis von der Rolle/Aufgabe des Targets, sodass der vorgeschlagene Mechanismus nicht in einem Nutzen für den Patienten resultiert (*mode of action*). Die chemischen Eigenschaften des Wirkstoffes können z.B. zu einer Limitierung in der Dosierung führen, sodass keine ausreichende Wirkstoffanreicherung im relevanten Gewebe erzielt werden kann.<sup>8</sup>

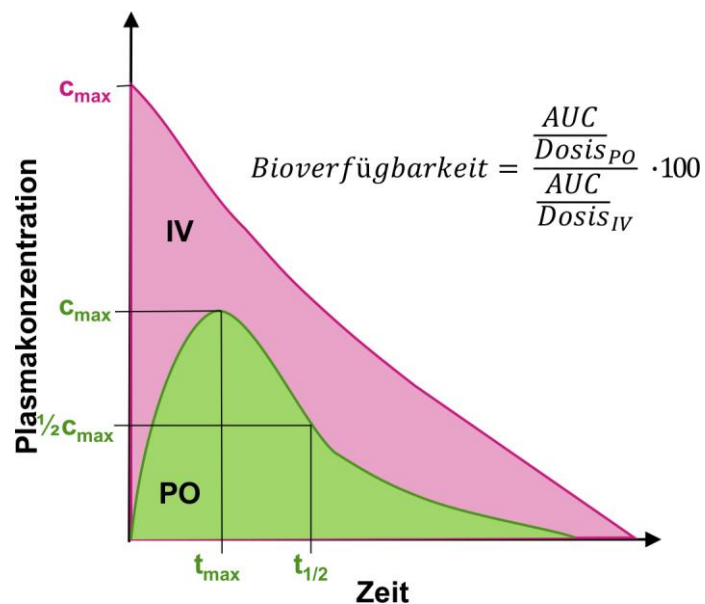
Insgesamt ist der Abbruch zu einem so späten Zeitpunkt im Entwicklungsprozess sehr kostenintensiv. Fraglich bleibt, ob unklare Substanz Eigenschaften oder ein mangelndes Verständnis über das Target selbst auf der Zielgeraden im Arzneimittelentwicklungsprozess auftreten dürfen.

## 1.2 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik beschreibt alle Prozesse, die auf einen Arzneistoff im Körper einwirken.<sup>9</sup> Der menschliche Körper ist ein sehr komplexes System, in dem der Weg des Wirkstoffes räumlich und zeitlich beschreiben werden kann. Hierzu zählen die Aufnahme (*absorption*) und die Verteilung (*distribution*), der Metabolismus (*metabolism*) und die Ausscheidung (*excretion*) des Wirkstoffes aus dem Körper, wodurch sich das bereits seit 1961 gebräuchliche Akronym ADME ableitet.<sup>10-11</sup> Nach peroraler (PO) Applikation findet der Wirkstoff seinen Weg bis in den Magen-Darm-Trakt, wo er resorbiert wird und weiter über die Pfortader in die Leber transportiert wird. Bevor jener Wirkstoff also den Körperkreislauf erreicht um an seinen Wirkort gelangen zu können, muss er die Leber passieren. Diese erste Leberpassage ist für die Wirkung eines Arzneistoffes entscheidend, ob und in welchem Ausmaß er durch die in der Leber befindlichen Enzyme eine erste Metabolisierung und/oder Ausscheidung erfährt (First-Pass-Effekt).<sup>4</sup> Arzneistoffe mit ausgeprägtem First-Pass-Effekt, wie Propranolol, Metoprolol oder auch Morphium, erreichen somit nur zu einem geringen Anteil die systemische Zirkulation (geringe Bioverfügbarkeit).<sup>12-13</sup> Ist der Wirkstoff in die Blutbahn gelangt, wird er mit dem Blutstrom durch den Körper transportiert und kann seinen Wirkort erreichen.

Eine weitere entscheidende Rolle spielt die Leber beim Abbau der Substanzen, sodass diese bspw. mit dem Urin über die Niere ausgeschieden werden können.<sup>4</sup>

In einigen Fällen ist die Umgehung des Magen-Darm-Traktes und des First-Pass-Effektes gewünscht. In der Notfall- oder Intensivmedizin, also in akuten Notsituationen, wenn der Faktor Zeit eine entscheidende Rolle spielt, ist die intravenöse (IV) Applikation der Standard.<sup>4, 14</sup> Hier ist ein schnelles Erreichen des Wirkstoffes an seinem Wirkort mit maximaler Bioverfügbarkeit indiziert, was durch die IV Applikation erreicht werden kann (Abb. 2).



**Abbildung 2** Plasmakonzentration-Zeit-Kurve für einen intravenös (pink) und peroral (grün) verabreichten Wirkstoff. Ein Charakteristikum bei der IV Applikation ist die schnelle Anflutung der Substanz. Intravenös applizierte Substanzen erfahren keinen First-Pass-Effekt, wodurch die Bioverfügbarkeit bei 100 % liegt. Peroral verabreichte Arzneimittel unterliegen dem First-Pass-Effekt und haben somit zumeist eine reduzierte Bioverfügbarkeit. Adaptierte Darstellung aus *Practical Pharmacology for the Pharmacy Technician. Pharmacokinetics: The Absorption, Distribution, and Excretion of Drugs* (Chapter 3).

Das Zusammenspiel von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, also die Reaktion des Körpers auf den Arzneistoff und der finale pharmakologische Effekt, beschreibt die im Organismus ablaufenden Vorgänge nach Applikation eines Arzneimittels.

In einer retrospektiven Analyse zeigten KOLA und LANDIS, dass der Anteil von Pharmakokinetik-assoziierten Ursachen, die zu einem Scheitern von Wirkstoffkandidaten im Rahmen klinischer Studien führten, innerhalb einer Periode von zehn Jahren (1991-2000) um 30 % zurückgegangen ist.<sup>5</sup> In den letzten zwei Jahrzehnten wurde die Vorhersage von menschlichen ADME Eigenschaften, therapeutischer Dosierung und Anreicherung im entsprechenden Gewebe zu einem Standard in der frühen Wirkstoffforschung und -optimierung.<sup>15</sup>

---

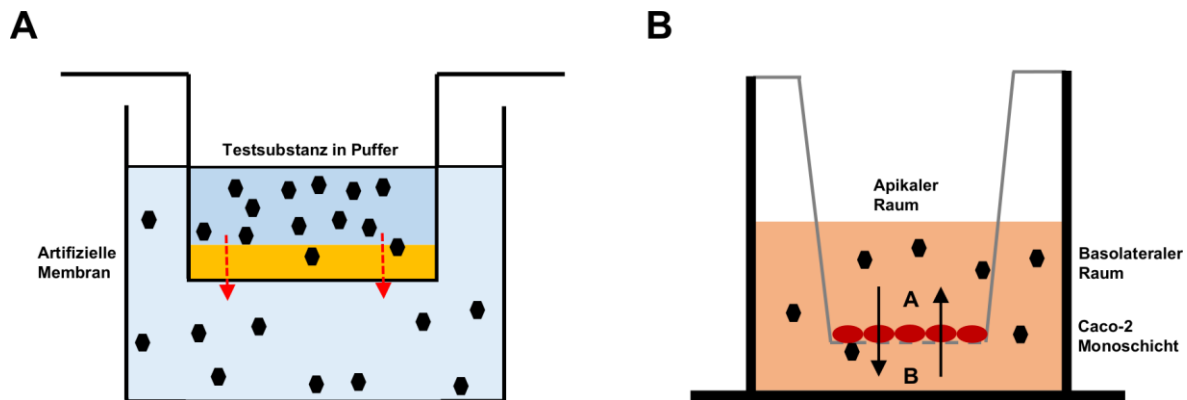
Das Bestreben hierbei liegt in einer detaillierten Profilierung von Wirkstoffvorläufern hinsichtlich ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften, wie bspw. Löslichkeit und Stabilität, anhand derer Substanzen mit einem positiven Profil für die weitere Analyse in (prä-)klinischen Studien selektiert werden können. Ferner können Substanzen hinsichtlich ihres Risikopotenzials evaluiert werden, wobei insbesondere chemische Substanzeigenschaften berücksichtigt werden. Ferner ist das Ziel eine Risikominimierung von kostenintensiven Abbrüchen von weit fortgeschrittenen klinischen Prüfungen.<sup>15-16</sup> Begründet liegt dieser Rückgang demzufolge in der gesteigerten Anwendung einer Reihe von *in vitro* Experimenten, die Eigenschaften wie Permeabilität, Löslichkeit und Stabilität von potentiellen Wirkstoffkandidaten analysieren und somit das Verhalten *in vivo* prognostizieren. Für viele pharmakokinetische Prozesse wurden Modellsysteme entwickelt, um eine Abschätzung der Eigenschaften zu ermöglichen. Diese sollen nun im Folgenden näher beschrieben werden.

### 1.2.1 Permeabilität

Ein Wirkstoff muss auf seinem Weg vom Gastrointestinaltrakt (GI) zum Wirkort zahlreiche Lipidmembranen passieren.<sup>17</sup> Ein grundlegender Mechanismus für oral verabreichte Substanzen ist die passive Diffusion über Membranen, welche im *parallel artificial membrane permeability assay*, kurz PAMPA, abgebildet werden kann. Hierbei wird die unidirektionale, passive Diffusion über eine artifizielle Membran gemessen. Das Testsystem erlaubt die Anwendung verschiedener pH-Werte, sodass die pH-Milieus im Magen-Darm-Trakt nachgestellt werden können und eine erste Abschätzung der Wirkstoffresorption *in vivo* erfolgen kann (Abb. 3A).<sup>17-20</sup> Komplexere Systeme, die biologische Membransysteme aus Zell-Einzelschichten nutzen, sind z. B. der Caco-2 oder MDCKII-MDR1 (*Madin-Darby canine kidney - multidrug resistance gene 1*) Assay (Abb. 3B). Beide Testsysteme ermöglichen die Vorhersage der menschlichen gastrointestinalen Wirkstoffaufnahme und funktionieren bidirektional, d. h. sie können sowohl die Aufnahme wie auch das aktive Ausschleusen von Substanzen wiedergeben.<sup>20-22</sup> Eine relevante Effluxpumpe ist das P-Glykoprotein (P-gp), welches in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers vorkommt (Leber, Niere, Dünn- und Dickdarm, Blut-Hirn-Schranke).<sup>23</sup> Die im Caco-2-Assay verwendeten Zellen sind humane kolorektale Karzinomzellen, welche vergleichbare Eigenschaften von intestinalen Epithelzellen aufweisen.<sup>21</sup> Im MDCKII-MDR1 System hingegen werden Epithelzellen aus der Hundeniere eingesetzt, die mit dem menschlichen MDR1-Gen transfiziert wurden, welches das P-gp codiert.<sup>24</sup> Der MDCKII-MDR1-Assay wird generell genutzt, um die ZNS-Gängigkeit von Substanzen zu beurteilen, wohingegen das Caco-2-System als Standard für die Beurteilung

der oralen Bioverfügbarkeit eingesetzt wird.

Beide Testsysteme sind in der Vorbereitung zeitaufwändiger und kostenintensiver als der PAMPA Assay und damit nur bedingt in Hochdurchsatzformaten anwendbar.<sup>22, 25</sup>



**Abbildung 3.** Schematischer Aufbau von Testsystemen zur Bestimmung der *in vitro* Permeabilität. **A** PAMPA. **B** Caco-2.

## 1.2.2 Löslichkeit

Die Löslichkeit ist ebenfalls ein entscheidender Parameter für die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen, da sich die Substanz zunächst lösen und zum GI gelangen muss, um aufgenommen zu werden. Ferner ist die Löslichkeit von Substanzen auch für *in vitro* Experimente von Bedeutung, da eine schlechte Löslichkeit zu einer limitierten Datenqualität führen kann. Prinzipiell unterschieden wird zwischen kinetischen und thermodynamischen Löslichkeitsexperimenten. Die meist genutzte Methode ist die Bestimmung der kinetischen Löslichkeit in einem organischen Lösungsmittel wie DMSO (TurbiSol oder SolRank). Im turbidometrischen Löslichkeitsassay (TurbiSol) wird die Aggregation mit steigender Inhibitorkonzentration als Absorption bei 620 nm gemessen, sodass hier einzig Präzipitationsbereiche angegeben werden können. Im SolRank-Assay wird die relative Löslichkeit einer Probe in wässrigem Puffer mit einer Probe in MeCN nach einer bestimmten Inkubationszeit als Absorption bei 250-500 nm verglichen. Für eine gute Übereinstimmung und Vergleichbarkeit sollte die im SolRank bestimmte Löslichkeit innerhalb des im TurbiSol ermittelten Bereiches liegen. In thermodynamischen Löslichkeitsexperimenten werden (un-)gepufferte wässrige Lösungen eingesetzt, bei denen sich ein Gleichgewicht zwischen gelöster und ungelöster Substanz einstellt (ThermoSol).<sup>17, 26</sup>

Eine gebräuchliche und effektive Methode, pharmakokinetische Eigenschaften von sauren oder basischen Verbindungen zu verbessern, ist die Salzbildung. Die Bedeutsamkeit dieser Methode wird deutlich durch die Tatsache, dass etwa die Hälfte aller zugelassenen Arzneistoffe als Salze verabreicht werden. Die Salzbildung offeriert einige Vorteile wie

---

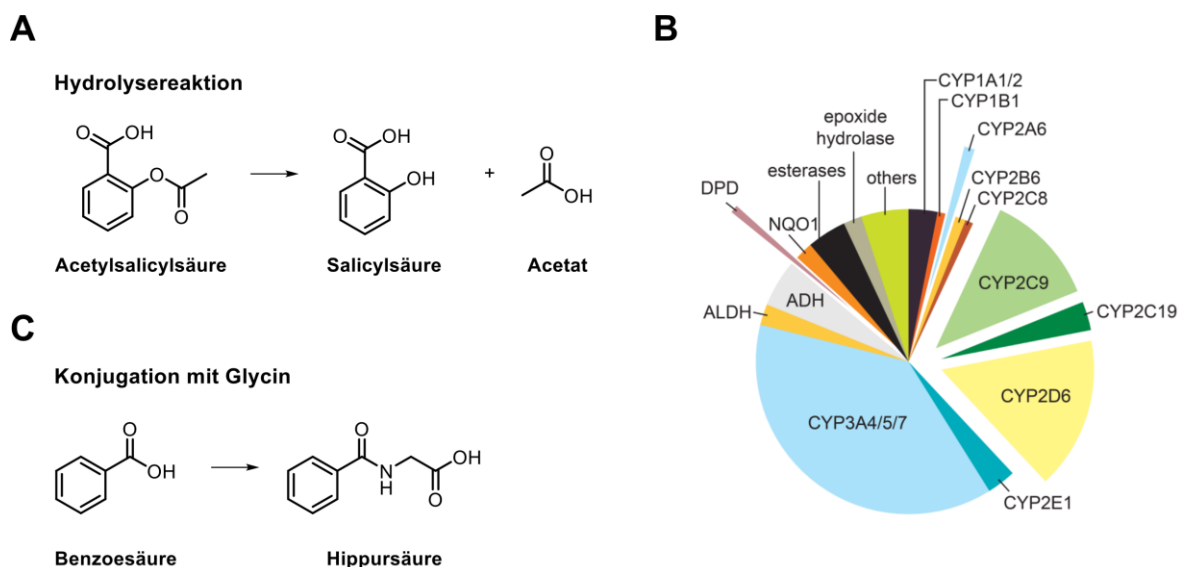
bspw. eine gesteigerte wässrige Löslichkeit sowie eine erhöhte Permeabilität, wodurch die allgemeine Wirksamkeit der Verbindung positiv beeinflusst werden kann. Bei der Wahl der Salzform gibt es verschiedene Aspekte, die beachtet werden müssen. Wird eine Formulierung für Tabletten, Lösungen zum Einnehmen oder Injektionen gesucht, sind die sehr löslichen Hydrochloride und Mesylate bevorzugt. Alternativ werden schlecht lösliche Embonate oder Tosylate beispielsweise für die Herstellung und Applikation von Suspensionen verwendet. Des Weiteren ist das Molekulargewicht des Salzes bzw. des Gegenions zu beachten. Bei Arzneistoffen, die in hohen Dosierungen verabreicht werden, sind vorzugsweise kleine Ionen einzusetzen. Im Vergleich zu Arzneistoffen, die in geringen Dosierungen eingenommen werden, auch größere Ionen toleriert werden. Die Salzbildung stellt demnach das Mittel der Wahl dar, um die Löslichkeit einer Verbindung zu verbessern. Neben den vielen positiven Eigenschaften, gibt es allerdings auch nachteilige Faktoren, die zu beachten sind. Nicht nur die Wahl eines geeigneten Salzes ist entscheidend, vielmehr ist zu beachten, dass das Gegenion selbst keinen therapeutischen Effekt zeigt. Durch die Salzbildung verringert sich demnach der Anteil an aktivem Wirkstoff, wodurch die Dosierung gegebenenfalls erhöht werden muss und sich Schwierigkeiten bei der Administration ergeben können.<sup>27-28</sup>

### 1.2.3 Stabilität

Die Stabilität von Wirkstoffkandidaten wird im frühen Entwicklungsprozess in unterschiedlichen Milieus bestimmt, wozu bspw. die chemische Stabilität im Blutplasma oder die metabolische Stabilität in Lebermikrosomen zählen. Verbindungen mit einer schlechten Plasmastabilität tendieren zu einem schnellen Abbau, einer kurzen Halbwertszeit und somit zu einem limitierten Verhalten *in vivo*. Ebenso entscheidend ist die Plasmastabilität innerhalb pharmakokinetischer Studien, bei denen Blutproben von den Tieren entnommen und analysiert werden. Ein häufig beschriebenes Beispiel für labile Strukturmodule, also für ihre Anfälligkeit gegenüber Hydrolasen sind, Ester- oder Amidfunktionalitäten.<sup>29</sup>

Die Leber ist das wichtigste Organ für Metabolismus, auch wenn Wirkstoffe auf ihrem Weg bis dahin im GI Ziel von z.B. Hydrolyse- oder Oxidationsenzymen geworden sind, oder bereits durch den First-Pass-Effekt abgebaut wurden.<sup>17</sup> Unter Metabolismus wird der biochemische Umwandlungsprozess von lipophilen Verbindungen zu wasserlöslicheren Metaboliten verstanden, die einfacher aus dem menschlichen bzw. tierischen Körper ausgeschieden werden können.<sup>30</sup> Prinzipiell wird zwischen Phase-I, der Funktionalisierung, und Phase-II, der Konjugation, unterschieden. Der Phase-I-Metabolismus umfasst

Oxidations-, Reduktions- und Hydrolysereaktionen, um polare Gruppen einzubauen oder diese zu demaskieren (Abb. 4A).<sup>31</sup> Am wichtigsten für die oxidative Biotransformation von Wirkstoffen sind mikrosomale Sauerstoffüberträger (Monooxygenasen), welche Hämproteine vom Typ Cytochrom P450 (CYP) enthalten.<sup>4</sup> Von dieser Enzymklasse wurden mehr als 500 verschiedene Isoformen in lebenden Organismen identifiziert.<sup>32</sup> Der Katalysemechanismus beruht auf der Übertragung von Elektronen (unter der Oxidation von NADPH) auf P450, der Anlagerung von Sauerstoff und schließlich der Freisetzung von Wasser und dem hydroxylierten Substrat.<sup>4</sup> Der bedeutendste Vertreter ist CYP3A4, welcher für die Metabolisierung der meisten auf dem Markt verfügbaren Arzneistoffe verantwortlich ist (Abb. 4B).<sup>30-31</sup> Zu den wichtigsten Phase-II-Reaktionen zählen Konjugationen mit aktivierter Glucuronsäure und Aminosäuren (meist Glycin), sowie Acetylierungen und Methylierungen (Abb. 4C). Meistens wird durch Phase-I-Reaktionen die Grundlage für Phase-II-Konjugationen geschaffen, der Wirkstoff kann aber auch direkt durch Phase-II-Enzyme modifiziert werden.<sup>4, 30-31</sup>



**Abbildung 4.** **A** Phase-I-Reaktion am Beispiel einer Hydrolysereaktion von Aspirin (Acetylsalicylsäure).<sup>4</sup> **B** Enzyme, die an Phase-I-Reaktionen beteiligt sind, von denen CYPs die Mehrheit bilden.<sup>31</sup> **C** Phase-II-Reaktion am Beispiel einer Konjugationsreaktion mit Glycin an Benzoessäure.<sup>4</sup>

Das am häufigsten eingesetzte Testsystem, um schnell und kostengünstig eine Vielzahl von Substanzen auf ihre metabolische Stabilität zu untersuchen, sind Lebermikrosomen.<sup>33</sup> Hierbei handelt es sich um Fragmente aus dem endoplasmatischen Retikulum, in denen neben den CYP-Enzymen auch Flavinmonooxygenasen (FMO) und Gluconyltransferasen (UGT) membrangebunden enthalten sind. Direkt abzuleiten ist hier der Nachteil bei der Verwendung von Lebermikrosomen, da diese nicht die Gesamtheit der metabolischen Enzyme umfassen und somit nur ein partielles Bild über den Phase-I-Metabolismus von Substanzen abgebildet werden kann.<sup>34</sup> Als Maß für die



---

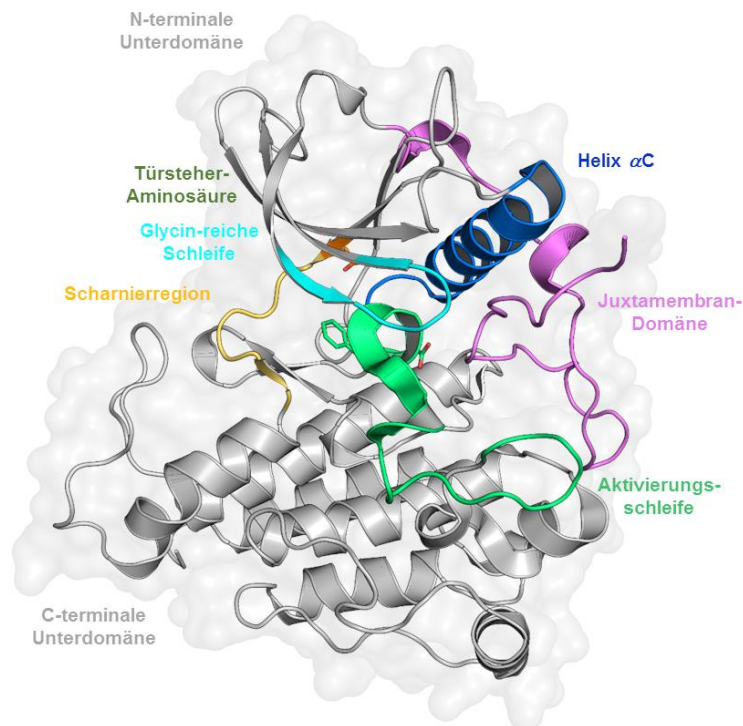
metabolische Stabilität gegenüber Mikrosomen werden die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) der Testsubstanzen und die intrinsische *Clearance* ( $CL_{int}$ ) verwendet. Der  $CL_{int}$ -Wert beschreibt hierbei das pro Zeiteinheit vom Wirkstoff befreite Volumen und kann zum Abschätzen der metabolischen Stabilität eines Inhibitors herangezogen werden.<sup>35</sup> Ein kleiner  $CL_{int}$ -Wert bedeutet eine hohe Halbwertszeit und somit eine gute Stabilität in Lebermikrosomen, da die Substanz nur langsam abgebaut wird.

### 1.3 Proteinkinasen

Das menschliche Kinom umfasst mehr als 500 Proteinkinasen, die eine bedeutsame Rolle in grundlegenden zellulären Prozessen spielen, insbesondere der Signaltransduktion. Proteinkinasen gehören zur Klasse der Transferasen, da sie den Transfer eines  $\gamma$ -Phosphatrestes von Adenosintriphosphat (ATP) auf Hydroxylseitenketten in Proteinsubstraten katalysieren. Hierbei wird hinsichtlich ihrer Substratspezifität in Serin-/Threonin- oder Tyrosin-Kinasen unterschieden. In einem feinregulierten Gleichgewicht stehen Kinasen mit ihren physiologischen Gegenspielern, den Phosphatasen. Störungen dieses Zusammenspiels bspw. in Form von Fehlregulierungen können unter anderem zu Veränderungen des Zellwachstums führen und in verschiedenen Krankheiten (z.B. Krebs) resultieren.<sup>36-38</sup>

Die Regulation der katalytischen Aktivität von Proteinkinasen erfolgt üblicherweise durch Phosphorylierungen von Ser-/Thr- bzw. Tyr-Resten innerhalb der Aktivierungsschleife, welche die Zugänglichkeit der ATP-Bindetasche reguliert (Abb. 5). Die Aktivierungsschleife umfasst etwa 27 Aminosäuren, wobei das konservierte DFG-Motiv (Asp-Phe-Gly) den Anfang markiert. Die Konformation der Aktivierungsschleife wird primär durch die Orientierung der Seitenketten des DFG-Motivs kontrolliert. In der inaktiven, DFG-*out* Konformation belegt das Phe teilweise die ATP-Bindestelle, wodurch die Bindung von ATP nicht mehr möglich ist.<sup>39</sup> Die aktive, DFG-*in* Kinasekonformation zeichnet sich durch eine ausgestreckte Aktivierungsschleife und ein in Richtung Helix  $\alpha C$  orientiertes Phe aus.<sup>39-40</sup> Die Helix  $\alpha C$  stellt ein weiteres Strukturmerkmal dar, die durch Konformationsänderung ebenfalls maßgeblich an der Regulation der katalytischen Aktivität beteiligt ist. Während die Helix  $\alpha C$  im aktivierten Zustand einwärts rotiert ist, nimmt sie im inaktiven Zustand eine nach außen rotierte Konformation ein.<sup>37, 41</sup> Ein weiteres, essentielles Strukturmotiv stellt die Juxtamembran (JM) dar, die etwa 40 Aminosäuren umfasst und eine auto-inhibitorische Funktion einnimmt, wie sie bspw. für Klasse III Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) beschrieben ist. In der auto-inhibierten, DFG-*out* Konformation besetzt ein Teil der JM die katalytische Tasche, sodass ATP nicht binden kann (Abb. 5).

Phosphorylierungen führen zu einer Konformationsänderung der JM, wodurch die Kinase weiterhin inaktiv, aber nicht mehr auto-inhibiert vorliegt und somit die ATP-Bindetasche wieder zugänglich ist.<sup>39, 42</sup>



**Abbildung 5.** Globale Struktur der katalytischen Kinasedomäne in der inaktiven Kinasekonformation (PDB: 4U0I). Wichtige strukturelle Merkmale sind farblich hervorgehoben.

Am Übergang des N-terminalen  $\beta$ -Faltblattes zur Scharnierregion ist die Türsteher-Aminosäure lokalisiert. Diese ist durch ihre Größe und Polarität ebenso verantwortlich für die Besetzung der ATP-Bindetasche und somit Selektivitäts-bestimmend.<sup>36</sup> In der klinischen Anwendung sind Mutationen innerhalb dieser Struktur motive häufig für das Auftreten von Resistenzmutationen verantwortlich und hinreichend für bspw. die Proteinkinasen EGFR (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor), KIT (Stammzellfaktor-rezeptor) und PDGFR $\alpha$  (platelet-derived growth factor receptor $\alpha$ ) beschrieben.<sup>43-45</sup> Mutationen des Thr-Türsteherrestes zu sterisch anspruchsvolleren Seitenketten (Met oder Ile) sind eine häufig beschriebene Modifikation und maßgeblich an der Bindung von Kinaseinhibitoren beteiligt.<sup>43</sup> Mutationen der Aktivierungsschleife von z.B. Klasse III RTK führen zur konstitutiven Aktivierung der Kinase und zu Resistenzen von sog. Typ-II Inhibitoren.<sup>39</sup> Die Klassifizierung von Inhibitoren nach Typ-I bis Typ-III ist abhängig von deren Bindungsmodi am Zielprotein. Typ-I Inhibitoren konkurrieren mit ATP um die ATP-Bindetasche, wobei sich die Kinase weiterhin in der aktiven, DFG-in Konformation befindet. Dabei werden Wasserstoffbrückenbindungen zur Scharnierregion ausgebildet, die

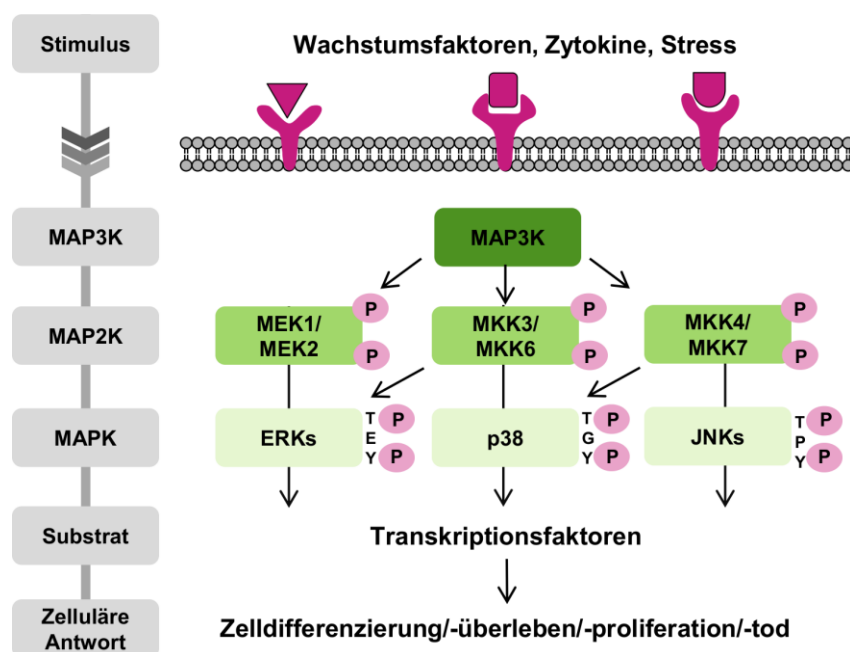
---

den Liganden in der Bindetasche stabilisieren.<sup>36</sup> Ein Vertreter dieser Klasse stellt der zur Behandlung von gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) eingesetzte Inhibitor Avapritinib (Ayvakit, Blueprint Medicines) dar (Abb. 9, Kapitel 1.4.2). Typ-II Inhibitoren sind ATP-kompetitiv und binden zusätzlich in eine hydrophobe allosterische Tasche, wodurch sie sich von Typ-I-Inhibitoren unterscheiden. Die hydrophobe Tasche wird durch die Helix  $\alpha C$  und das DFG-Motiv flankiert und ist ausschließlich in der inaktiven, *DFG-out* Konformation zugänglich. Ein weiteres Charakteristikum ist der Kontakt zur Scharnierregion, wodurch der Inhibitor zusätzlich in der Bindetasche stabilisiert wird.<sup>46</sup> Diese Eigenschaften werden bspw. durch die Inhibitoren Imatinib (Gleevec, Novartis) und Ponatinib (Iclusig, Ariad Pharmaceuticals) erfüllt (Abb. 9, Kapitel 1.4.2). Typ-III Inhibitoren binden in der inaktiven, *DFG-out* Kinasekonformation und besetzen dabei ausschließlich die allosterische Tasche. Mit diesem Charakteristikum unterscheiden sie sich merklich von den zuvor beschriebenen Typ-II Inhibitoren, da sie keinen Kontakt zur Scharnierregion ausbilden. Stabilisiert werden sie durch ein Netzwerk von Interaktionen, wie Wasserstoffbrückenbindungen zu Aminosäureseitenketten in der Helix  $\alpha C$  oder dem Peptidrückgrat des DFG-Motivs. Pyrazolharnstoffe bspw. zählen zu bekannten Vertretern dieser Inhibitor-Klasse.<sup>47</sup>

### 1.3.1 Die Proteinkinase MKK7

Proteinkinasen besitzen eine hochkonservierte ATP-Bindetasche, weshalb die selektive Adressierung mit Kinaseinhibitoren eine große Herausforderung darstellt.<sup>48-49</sup> Das Konzept der kovalenten Modifizierung von Proteinkinasen wurde erfolgreich für bspw. EGFR und die Bruton-Tyrosinkinase (BTK) beschrieben, mit klinisch zugelassenen Wirkstoffen wie Afatinib, Osimertinib oder Ibrutinib.<sup>50-55</sup> Diese adressieren ein Cystein am Ende der Scharnierregion, das innerhalb des gesamten Kinoms lediglich in elf Kinasen vorhanden ist.<sup>56</sup> Eine dieser Proteinkinasen ist MKK7, ein Mitglied aus der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Familie. MAPK bilden ein intrazelluläres Netzwerk, welches exogene und endogene Signale in komplexe zelluläre Reaktionen übersetzt, wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose. Die dreistufige Signalkaskade besteht aus MAP3K, die MAP2K phosphorylieren und somit aktivieren und diese wiederum aktivieren MAPK (Abb. 6).<sup>57</sup> Es gibt drei Unterfamilien der MAPKs: die ERKs (*Extracellular-signal Regulated Kinases*), die p38 Kinasen und die JNKs (c-Jun N-terminale Kinasen).<sup>58</sup> JNKs wurden in verschiedenen Krankheiten wie Parkinson, Alzheimer, rheumatoide Arthritis und entzündlichen Prozessen als pathologische Treiber identifiziert.<sup>59</sup>

Für den JNK-Signalweg sind 14 MAP3K bekannt, die entweder MKK4 und MKK7 aktivieren, oder spezifisch für bspw. MKK7 sind. MKK7 wiederum aktiviert ausschließlich JNK, wohingegen MKK4 zusätzlich auch p38 MAPK phosphoryliert. JNKs werden durch die gleichzeitige Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin innerhalb eines konservierten TPY-Motivs in der Aktivierungsschleife aktiviert.<sup>57</sup> Aus diesem Grund wird MKK7 auch als dual-spezifische Kinase bezeichnet.<sup>60</sup> Wenn beide MAP2K (MKK4 und MKK7) anwesend und aktiviert sind, erfolgt die Phosphorylierung des TPY-Motivs sequentiell, wobei zuerst Tyrosin durch MKK4 und dann Threonin durch MKK7 phosphoryliert wird.<sup>61</sup> Alle drei JNK-Isoformen (JNK1-3) aktivieren Substrate wie Transkriptionsfaktoren, die eine entsprechende Zellantwort initiieren (Abb. 6).<sup>57</sup>



**Abbildung 6.** MAPK-Signalweg. Intrazelluläres Netzwerk von Interaktionen, welches exogene und endogene Signale (Stimulus) in komplexe zelluläre Reaktionen übersetzt, wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose. JNKs werden durch die gleichzeitige Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin innerhalb eines konservierten TPY-Motivs durch MKK4 und MKK7 aktiviert.<sup>57-58</sup>

Während JNK1 und JNK2 ubiquitär exprimiert sind, konnte eine Expression von JNK3 hauptsächlich im Gehirn und Herz nachgewiesen werden. Diese gewebespezifische Verteilung lässt den Schluss zu, dass die verschiedenen Isoformen für unterschiedliche zelluläre Reaktionen verantwortlich sein könnten.<sup>62-63</sup> Die unterschiedlichen Funktionen der JNK-Isoformen lassen sich am besten am Beispiel der Karzinogenese demonstrieren. *In vivo* Mausstudien zeigten, dass JNK1 als ein Tumorsuppressor agiert, wohingegen JNK2 als Tumorpromotor fungiert.<sup>58, 64</sup>

Bis heute ist kein zugelassener Wirkstoff für die selektive Adressierung von JNK auf dem Markt.

---

Einige Wirkstoffkandidaten sind in klinischen Studien aufgrund von fehlender Wirksamkeit und Selektivität gescheitert.<sup>56, 62</sup> SP600125, ein Dibenzimidazol, ist ein ATP-kompetitiver JNK Inhibitor, der in Mausmodellen mit Parkinson Indikation einen Effekt zeigte.<sup>65</sup> Des Weiteren ist die mangelnde Selektivität zwischen den Isoformen problematisch, insbesondere aufgrund der unterschiedlichen Funktionen von JNK1 und JNK2 bei der Behandlung von Krebs.<sup>64</sup> Die schlechte Löslichkeit in wässrigen Lösungsmitteln, sowie die Adressierung von bspw. ERKs und p38 bei höheren Dosierungen limitieren ebenfalls die klinische Wirksamkeit von SP600125.<sup>66</sup> Das Benzothiazol AS601245 wies eine anti-entzündliche Aktivität in einem experimentellen Modell von rheumatoider Arthritis auf, was im Einklang mit der höheren Potenz gegen JNK3 im Vergleich zu JNK1 und JNK2 steht.<sup>64, 67</sup> Trotz vielversprechender Ergebnisse konnte AS601245 aufgrund von mangelnder Wirksamkeit, nicht in klinischen Studien getestet werden.<sup>64</sup> Hinsichtlich der mangelnden Selektivität und Wirksamkeit der bislang entwickelten JNK Inhibitoren, stellt die Adressierung der JNK-aktivierenden Kinase MKK7 eine gute Alternative dar, die genannten Selektivitätsmängel zu umgehen.<sup>56, 64</sup> Bislang sind nur einige wenige Inhibitoren für die Adressierung von MKK7 publiziert, von denen die meisten MKK7 als ein *off-target* treffen.<sup>59</sup> Ein Hypothemycin Derivat (5Z7O), welches kovalent an Cys218 in MKK7 bindet, wies lediglich eine biochemische Aktivität von 1.3  $\mu\text{M}$  auf.<sup>68</sup> Ein selektiver und kovalenter 4-Aminopyrrolopyrimidin-basierter MKK7 Inhibitor (Verbindung 24, Kapitel 3.2.1) mit einem vielversprechenden biochemischen Aktivitätsprofil (halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) von 10 nM gegen MKK7) konnte kürzlich publiziert werden.<sup>59</sup>

Neben der Beteiligung in neurologischen und neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson, spielt der JNK-Signalweg auch eine entscheidende Rolle bei Herzinfarkten und darauffolgenden ischämischen Reperfusionsschäden.<sup>69-71</sup> Bei einem Herzinfarkt wird meist ein großes Herzkranzgefäß durch bspw. ein Blutgerinnsel verstopft, sodass Teile des Herzens nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden können. Diese Durchblutungsstörung (Ischämie) ist akut lebensbedrohlich und bedarf einer sofortigen Hilfe. Gelingt es, den Thrombus aufzulösen und die Durchblutung der Gefäße wiederherzustellen, besteht die Gefahr von Reperfusionsschäden. Darunter wird die plötzlich wiederauftretende Sauerstoffzufuhr verstanden, die das umliegende Gewebe durch sog. reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) schädigen kann.<sup>71</sup>

---

## 1.4 Zielgerichtete Therapien in der Onkologie

Krebs zählt, vor allem in der westlichen Welt, neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen.<sup>v</sup> Die weltweit stetig ansteigende Zahl von Krebs-Neuerkrankungen und Todesfällen macht diese Krankheit zu einem wichtigen Thema in der Gesellschaft.<sup>1-2</sup> Die Beobachtung, dass nicht alle Patienten gleich gut auf denselben Therapieansatz („*one-size-fits-all model*“) anschlagen, wurde schon vor langer Zeit gemacht.<sup>72</sup> Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms 2003 und der Erkenntnis, dass Krebs eine Erkrankung des Genoms ist, wurde der Grundstein für einen neuen Abschnitt in der Krebstherapie gelegt.<sup>73-74</sup> Zusammen mit einer kontinuierlichen Weiterentwicklung von biotechnologischen Verfahren eröffneten sich neue Möglichkeiten, welche die Behandlung von Krebspatienten revolutionierten.<sup>75</sup> Die sogenannte Präzisionsmedizin wird definiert als eine Form der Medizin, die Informationen über die Gene und Proteine der Patienten nutzt, um Krankheiten vorzubeugen, zu diagnostizieren und behandeln.<sup>76,vi</sup> Lange Zeit wurden standardmäßig Operationen, Strahlen- und Chemotherapie auf Basis von histologischen Befunden für die Behandlung von Krebs angewendet.<sup>77</sup> Heutzutage liegt der Schlüssel zum Erfolg in der Identifizierung von sog. Biomarkern, also definierte molekulare und zelluläre Mechanismen, welche der Entstehung, Progression und Therapierbarkeit von Krebs zugrunde liegen.<sup>76</sup> Unter prädiktiven Biomarkern werden somatische Mutationen innerhalb eines für die Krankheit relevanten Signalwegs verstanden.<sup>76, 78</sup> Die Stärke der Präzisionsmedizin ist, die effektivste Therapie für einen Patienten basierend auf genetischen Läsionen zu finden, um weniger erfolgsversprechende Therapien zu umgehen.<sup>74-75</sup>

Amplifikationen, Überexpressionen, aktivierende Mutationen in (Proto-)Onkogenen oder inaktivierende Mutationen in Tumorsuppressorgenen sind ursächlich für die Entstehung von Krebs.<sup>79-80</sup> Diese sind im Wildtyp-Zustand maßgeblich an der physiologischen Regulation von Zellproliferation und -differenzierung sowie der Apoptose beteiligt, weshalb ihre Dysfunktionen in Krebszellen mit einem abnormalen Wachstum und unkontrollierter Ausbreitung assoziiert sind.<sup>81</sup> Die Abhängigkeit einer Krebszelle von einem Onkogen wurde zum ersten Mal im Jahr 2000 von BERNARD WEINSTEIN als *oncogene addiction* bezeichnet.<sup>81-84</sup> Dieses Phänomen ist grundlegend für den Erfolg der zielgerichteten Therapie mit Kinaseinhibitoren, welche gezielt ein bestimmtes Onkogen adressieren und somit das Absterben der Krebszellen herbeiführen (*oncogenic shock*).<sup>44, 84</sup> Hierdurch wird der Vorteil der zielgerichteten Therapie gegenüber der Standardtherapie im Bereich der

---

<sup>v</sup> <https://www.abendblatt.de/adv/diagnose-herz/article110031904/Herz-Kreislauf-Erkrankungen-die-haeufigste-Todesursache-in-der-westlichen-Welt.html>; Letzter Zugriff am 24.11.2020 um 15:32 Uhr.

<sup>vi</sup> <https://www.cancer.gov/>; Letzter Zugriff am 24.11.2020 um 14:33 Uhr.

---

Onkologie verdeutlicht.

Ein Paradebeispiel für die zielgerichtete Therapie mit Kinaseinhibitoren ist Imatinib, ein Wirkstoff für die ABL Kinase, um Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) zu behandeln.<sup>79</sup> Imatinib wurde 2001 als erster Kinaseinhibitor für die Krebstherapie von der FDA zugelassen.<sup>38, 44</sup> Die Präzisionsmedizin hat ebenfalls die Behandlung von Patienten mit EGFR getriebenem nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) revolutioniert.<sup>85</sup> Als prädiktiver Biomarker wurde die Aktivierungsmutation L858R identifiziert, welche die Kinase konstitutiv aktiviert. Unter der Erstbehandlung mit Gefitinib (Iressa, AstraZeneca) oder Erlotinib (Tarceva, Roche) erfahren die Patienten ein verbessertes progressionsfreies Überleben mit weniger Nebenwirkungen im Vergleich zur Standard Chemotherapie.<sup>86-88</sup> Innerhalb des ersten Behandlungsjahres treten jedoch Resistenzen auf, welche die Wirksamkeit dieser Inhibitoren limitieren. Ausschlaggebend hierfür war eine Mutation an der Türsteher-Aminosäure (T790M), welche die Bindung der Erstlinien-Therapeutika verhindert. Der Zweitgenerations-Inhibitor Afatinib (Giotrif, Boehringer Ingelheim), welcher eine kovalente Bindung zu Cys797 ausbildet, konnte sich in klinischen Studien aufgrund von starken Nebenwirkungen nicht etablieren.<sup>85, 89-90</sup> Die Therapie von T790M-positiven Patienten mit kovalenten Drittlinien-Therapeutika wie bspw. Osimertinib (Tagrisso, AstraZeneca) führt ebenfalls innerhalb des ersten Behandlungsjahres zu Resistenzen.<sup>91-93</sup> Cys797 mutiert zu einem weniger nukleophilen Serin, wodurch die kovalente Bindung nicht mehr ausgebildet wird und die Wirksamkeit reduziert wird.<sup>85, 94</sup>

Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll die unglaubliche Stärke der zielgerichteten Krebstherapie mit selektiven Kinaseinhibitoren, aber gleichzeitig auch die Herausforderungen in Bezug auf Resistenzmutationen, die zum Wirkungsverlust der Therapeutika führen. Resistenzen gegen einst wirksame Therapeutika treten auf, wenn resistente Zellen den Tumor dominieren.<sup>95</sup> Die Therapie erschwert sich nach Auftreten von Resistenzen, wie beispielsweise Mutationen in den Zielstrukturen, die eine Bindung der Inhibitoren verhindert oder die Dynamik des gesamten Proteins verändern. Das Beispiel der Proteinkinase EGFR demonstriert, dass auch der Wechsel zu einem anderen Inhibitor mit einem verbesserten Resistenzprofil zu erneuten Resistenzmutationen führt. Dieser Prozess lässt sich mit der genetischen Instabilität von Krebszellen und dem evolutionär bedingten Selektionsdruck erklären.<sup>95-96</sup>

Weitere Beispiele für die zielgerichtete Therapie mit selektiven Inhibitoren sind die Proteinkinasen Her2, KIT und PDGFR $\alpha$ , die in den Kapiteln 1.4.1 und 1.4.2 näher beleuchtet werden.

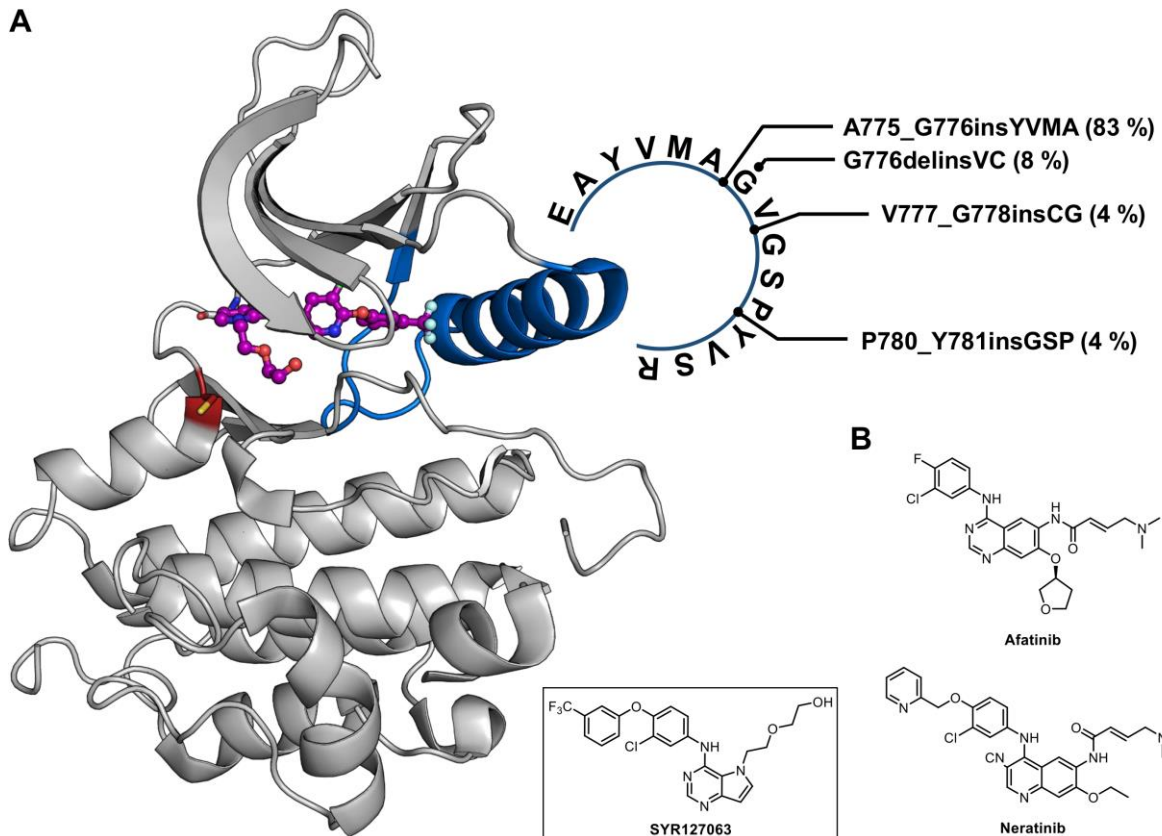
---

### 1.4.1 Die Proteinkinase Her2

Lungenkrebs hat die höchste Krebsinzidenz und Sterblichkeitsrate weltweit, wobei die Mehrheit der Patienten an NSCLC (80 %) leidet.<sup>1, 97</sup> Die Familie der ErbB-Rezeptoren umfasst vier RTKs: EGFR, Her2, Her3 und Her4.<sup>98</sup> Sie bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne, einem Transmembransegment und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne. Nach Ligandenbindung, z.B. durch EGF oder TGF-alpha, erfolgt eine Homo- oder Heterodimerisierung, die durch *trans*-Autophosphorylierung von Tyrosinen innerhalb der Kinasedomäne zur vollständigen Aktivierung führt. Hierdurch werden verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert, z.B. der Ras-Raf-Mek-Erk- oder der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg, welche zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Zellüberleben und Apoptose steuern.<sup>41, 97, 99</sup> Es wurde für Fehlregulierungen wie bspw. eine hochregulierte Aktivität von EGFR und Her2 gezeigt, dass sie eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese spielen und somit pharmazeutisch relevante Zielstrukturen darstellen.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf dem Familienmitglied Her2, welches in mutierter Form als Treiber in 4 % der Patienten mit NSCLC identifiziert wurde.<sup>100-101</sup> Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern ist für Her2 kein endogener Ligand bekannt, weshalb seine biologische Funktion hauptsächlich durch Heterodimerisierung mit EGFR, Her3 oder Her4 zustande kommt.<sup>80, 100</sup> Des Weiteren ist für Her2 eine nur geringe intrinsische Kinaseaktivität beschrieben, die vermutlich auf eine GVG-Sequenz in der Helix  $\alpha$ C zurückzuführen ist, die innerhalb der Familie für Her2 einzigartig ist und der benachbarten Helix  $\alpha$ C eine höhere Flexibilität erlaubt. Durch diese erhöhte Flexibilität und aufgrund der Tatsache, dass die Helix  $\alpha$ C ein wichtiges Strukturelement für die Kinasekonformation darstellt, wird vermutet, dass der aktivierte Zustand weniger andauernd ist.<sup>102-103</sup> Etwa 80 % der in Her2 auftretenden Mutationen sind in der Helix  $\alpha$ C lokalisiert, von denen die A775\_G776insYVMA-Mutation am häufigsten vorkommt und zu einer Duplikation des YVMA-Motivs führt (Abb. 7A). Es wird postuliert, dass diese Mutation zu einer Stabilisierung der aktiven Kinasekonformation führt, wodurch die Kinaseaktivität erhöht wird und somit die Signalübertragung auf die nachgeschalteten Effektoren des Ras-Raf-Mek-Erk-Signalwegs initiiert wird.<sup>41, 100</sup>



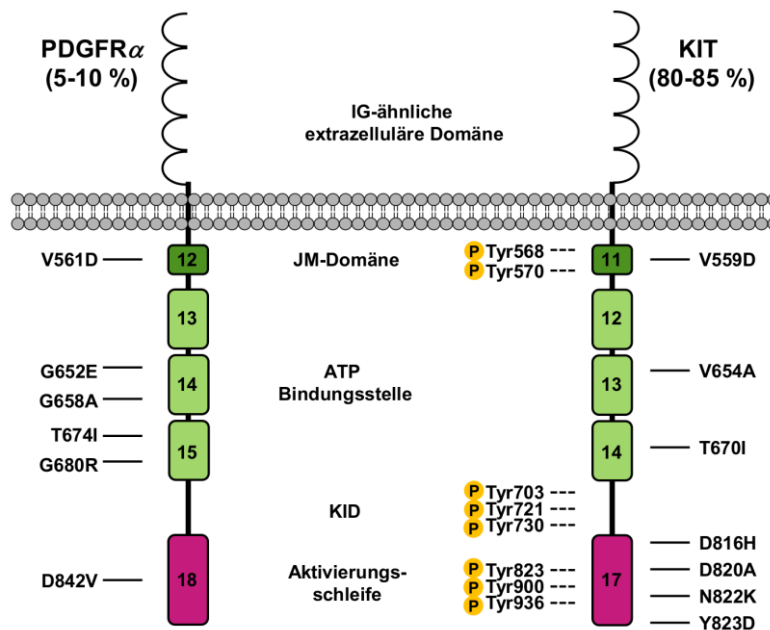
**A****B**

**Abbildung 7. A** Ko-Kristallstruktur von Her2 im Komplex mit SYR127063 (PDB: 3PP0, lila). Mutationen innerhalb der Helix  $\alpha$ C (blau) sind dargestellt. Cys805 (rot) am Ende der Scharnierregion steht für die kovalente Bindungsbildung mit Kinaseinhibitoren zur Verfügung. **B** Afatinib (Typ-I-Inhibitor) und Neratinib (Typ-II-Inhibitor) wurden für die Adressierung von Cys805 in Her2 identifiziert.

Für die Adressierung von Her2 wurden die Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) Afatinib, Pozotinib, Dacomitinib, Neratinib und Lapatinib identifiziert, von denen alle bis auf Lapatinib kovalente TKIs sind (Abb. 7B).<sup>50-51, 104-110</sup> Sie tragen ein reaktives Acrylamid, welches in einer optimalen Orientierung zu Cys805 in der Her2 Bindetasche ausgerichtet ist und somit nach kovalenter Bindungsbildung die Kinase dauerhaft inhibieren. Unglücklicherweise zeigen alle oben genannten TKIs nur einen schwachen Effekt in Patienten mit Her2-mutierten Tumoren. Geringe Überlebens- und Ansprechraten von <40 % auf die bislang durchgeführten Therapien mit TKIs verdeutlichen den dringenden Bedarf an wirksamen Inhibitoren für Krebspatienten mit positivem Her2-Mutationsstatus.<sup>103</sup>

## 1.4.2 Die Proteinkinasen KIT und PDGFR $\alpha$

Gastrointestinale Stromatumore (GIST) umfassen die am häufigsten vorkommenden mesenchymalen Tumore des Gastrointestinaltraktes.<sup>111-113</sup> Sie entwickeln sich aus den interstitiellen Zellen von Cajal (ICC), den sog. Schrittmacherzellen des GI, die verantwortlich für die Kontraktionen der glatten Muskeln sind und als Vorläuferzellen für GIST gelten.<sup>114-117</sup> Am häufigsten treten sie im Magen (60 %) und im Dünndarm (30 %) auf, weniger im Rektum oder Dickdarm, wobei sie den gesamten GI befallen können. Bei der Mehrheit der Patienten werden Mutationen in den Proteinkinasen KIT (80-85 %) und PDGFR $\alpha$  (5-10 %) gefunden, die zur Klasse III der RTKs gehören.<sup>39-40, 111, 118-119</sup> Diese Kinasefamilie zeichnet sich durch eine extrazelluläre Domäne, die aus fünf Immunglobulin-ähnlichen (IG) Domänen besteht, einer Transmembranhelix, einer auto-inhibitorischen JM-Domäne und einer cytoplasmatischen Kinasedomäne aus, die eine *kinase insertion domain* (KID) enthält (Abb. 8).<sup>120-121</sup>

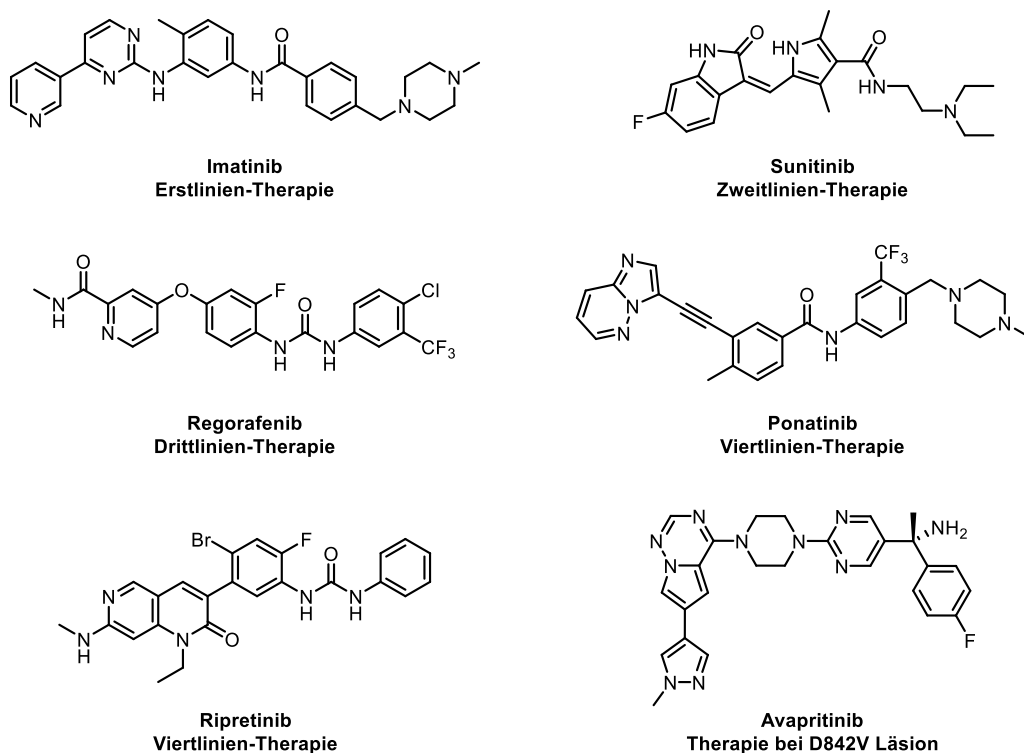


**Abbildung 8.** Schematischer Aufbau der RTKs KIT und PDGFR $\alpha$ . Dargestellt sind die Aktivierungsmutationen in Exon 11 bei KIT und Exon 12 bei PDGFR $\alpha$ , sowie die Resistenzmutationen in Exon 14, 15 und 18 bzw. Exon 13, 14 und 17. Die gestrichelten Linien zeigen die Phosphorylierungsstellen in KIT. KID: *kinase insertion domain*.<sup>115, 122-124</sup>

Nach Ligandenbindung durch einen Dimer des SCF (*stem cell factor*) an die extrazellulären IG Domänen von KIT erfolgt eine Homodimerisierung von zwei KIT RTKs, die durch Phosphorylierungen von Tyrosinseitenketten vollständig aktiviert werden.<sup>39, 125</sup> Initial erfolgt die *trans*-Phosphorylierung von Tyr568 und Tyr570 in der JM-Domäne, die eine konformationelle Änderung erfährt und somit nicht länger die ATP-Bindetasche blockiert. Dies allein ist nicht ausreichend für eine vollständige Aktivierung der Kinase, weshalb

anschließend Tyr703, 721, 730, 823, 900 und 936 phosphoryliert werden (Abb. 8). Studien belegen, dass eine Phosphorylierung von Tyr823 die Kinaseaktivität nicht weiter steigert. Eine gültige These besagt, dass Tyr823 als Pseudosubstrat für die Interaktion mit Asp792 agiert, wodurch die inaktive Kinasekonformation stabilisiert wird. Die genaue Funktion von Tyr823 konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden.<sup>39, 123, 125-128</sup> Nach der Aktivierung werden nachgeschaltete Signalwege stimuliert, wie Ras-Raf-Mek-Erk oder PI3K-Akt-mTOR, die in Zellwachstum, Zellproliferation und -überleben resultieren.<sup>118, 125</sup> Die hohe strukturelle Ähnlichkeit von KIT und PDGFR $\alpha$  erlaubt es, den Aktivierungsmechanismus von KIT zu übertragen, wobei PDGFR $\alpha$  durch homo- und heterodimere Liganden (*platelet-derived growth factors*, PDGFs) aktiviert werden kann.<sup>39, 129</sup> Mutationen, die zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinase in Abwesenheit der extrazellulären Liganden führen, haben wie im Fall von GIST die Entstehung von Krebs zur Folge.<sup>125</sup>

Die Behandlung von KIT/PDGFR $\alpha$ -mutiertem GIST wurde in den letzten zwei Jahrzehnten durch den Einsatz von TKIs revolutioniert. Maßgeschneiderte Inhibitoren für die entsprechenden Genprodukte machen die Proteinkinasen KIT und PDGFR $\alpha$  ebenfalls zu einem Paradebeispiel für die zielgerichtete Tumorthherapie (Abb. 9).



**Abbildung 9.** Chemische Strukturen der derzeit zugelassenen Wirkstoffe für die Behandlung von fortgeschrittenen gastrointestinalen Stromatumoren.

Traditionelle Chemo- und Strahlentherapie sind unwirksam bei GIST, weshalb nach Möglichkeit die chirurgische Resektion die Methode der Wahl darstellt.

---

Mit dem immer umfangreicheren Wissen über auftretende Mutationen in den Tumoren konnte sich die Behandlung entscheidend verbessern.<sup>118, 130</sup> Im Jahr 1998 machten HIROTA *et al.* mit der Identifizierung von *gain-of-function* Mutationen in KIT und PDGFR $\alpha$  bei GIST den Anfang.<sup>129, 131-133</sup> Imatinib, ein 2-Phenylaminopyrimidin, war der erste, gezielt entwickelte Kinaseinhibitor, welcher ursprünglich für die Behandlung von CML entwickelt wurde und hierfür 2001 die Zulassung erhielt. Vielversprechende präklinische Modelle und eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen der ABL Kinase und KIT offerierte die Administration von Imatinib bei Patienten mit fortgeschrittenem GIST.<sup>38, 133-135</sup> Somit konnten JOENSUU *et al.* 2001 von der ersten erfolgreichen Therapie mit Imatinib bei GIST berichten und Imatinib erhielt 2002 ebenfalls die Zulassung für die Behandlung von fortgeschrittenem GIST.<sup>136-141</sup> Bis zum heutigen Tag ist Imatinib Erstlinien-Therapie mit einem durchschnittlichen progressionsfreien Überleben (*median progression-free survival*, PFS) von etwa 2 Jahren.<sup>44, 142-143</sup> Primäre Aktivierungsmutationen in KIT sind in Exon 9 und 11 lokalisiert, wobei Exon 9 einen Abschnitt der extrazellulären Domäne codiert und Mutationen in dieser Region eine Konformation induzieren, die einer Liganden-induzierten Aktivierung ähnelt. Die vermehrt auftretenden Exon 11 Mutationen (V559D) unterbrechen Interaktionen, welche die JM in ihrer auto-inhibierten Konformation hält, sodass das Gleichgewicht zur aktiven Kinasekonformation verschoben wird.<sup>39, 122</sup> Punktmutationen innerhalb der JM in PDGFR $\alpha$  sind sehr viel seltener als in KIT zu beobachten. Am häufigsten ist Val561 betroffen, das homolog zu Val559 in KIT ist.<sup>39</sup>

Die Mehrheit der Patienten unter Imatinib-Behandlung erleiden ein erneutes Tumorwachstum durch sekundäre, Imatinib Resistenz-vermittelnde Mutationen, wobei die Tumore weiterhin von KIT oder PDGFR $\alpha$  abhängig sind (*oncogene addiction*).<sup>144-145</sup> Typischerweise ist die ATP-Bindetasche betroffen, die in KIT durch Exon 13 (V654A) und 14 (T670I) codiert wird, sowie die Aktivierungsschleife, welche durch Exon 17 (D816H, D820A, N822K und Y823D) und 18 (A829P) codiert wird (Abb. 8). Die große Herausforderung bei der Behandlung von Imatinib-resistenten Patienten stellt die hohe Heterogenität der Tumore dar.<sup>122, 146-147</sup> Sunitinib (Sutent, Pfizer) und Regorafenib (Stivarga, Bayer), zwei oral verfügbare Multikinaseinhibitoren, wurden 2006 und 2013 für die Zweit- und Drittlinien-Therapie von fortgeschrittenem GIST zugelassen.<sup>116, 148-150</sup> Unglücklicherweise haben beide nur einen eingeschränkten Effekt mit einem durchschnittlichen PFS von 6.2 bzw. 4.8 Monaten. Sunitinib ist bspw. nicht effektiv bei Mutationen in der Aktivierungsschleife, die zu 50 % als Folge der Imatinibresistenz auftreten, aber wirksam bei Mutationen in Exon 13 und 14.<sup>122, 124</sup> Stark vorbehandelte Patienten sprechen auf die Behandlung mit Ponatinib an, ein zugelassener Wirkstoff für Patienten mit CML.<sup>122, 151</sup>

---

In Verbindung mit Ponatinib wurden arterielle Verschlusskrankungen beschrieben, weshalb weiterhin ein dringender medizinischer Bedarf an potenten und nebenwirkungsarmen Inhibitoren besteht, die ein breites Wirkungsspektrum aufweisen.<sup>152</sup> Das Besondere bei den bislang beschriebenen Wirkstoffen ist, dass diese ursprünglich nicht für die Behandlung von KIT/PDGFR $\alpha$ -mutiertem GIST entwickelt wurden. Erst kürzlich (im Mai 2020) wurde der Wirkstoff Ripretinib (Qinlock, Deciphera) als Viertlinien-Therapie zugelassen, der speziell für die Behandlung von GIST entwickelt wurde.<sup>153-154</sup> Ripretinib zeigt ein medianes PFS von 6.3 Monaten und weist ein breites Wirkungsspektrum bei den Sekundärmutationen in den Exons 13, 14, 17 und 18 auf.<sup>155,vii</sup> Ein weiterer, speziell für die Behandlung von PDGFR $\alpha$  Exon 18 Mutationen (D842V) zugelassener Wirkstoff ist Avapritinib. Die Zulassung erfolgte hierbei durch die FDA im Januar 2020 und durch die EMA im September 2020.<sup>155,viii</sup>

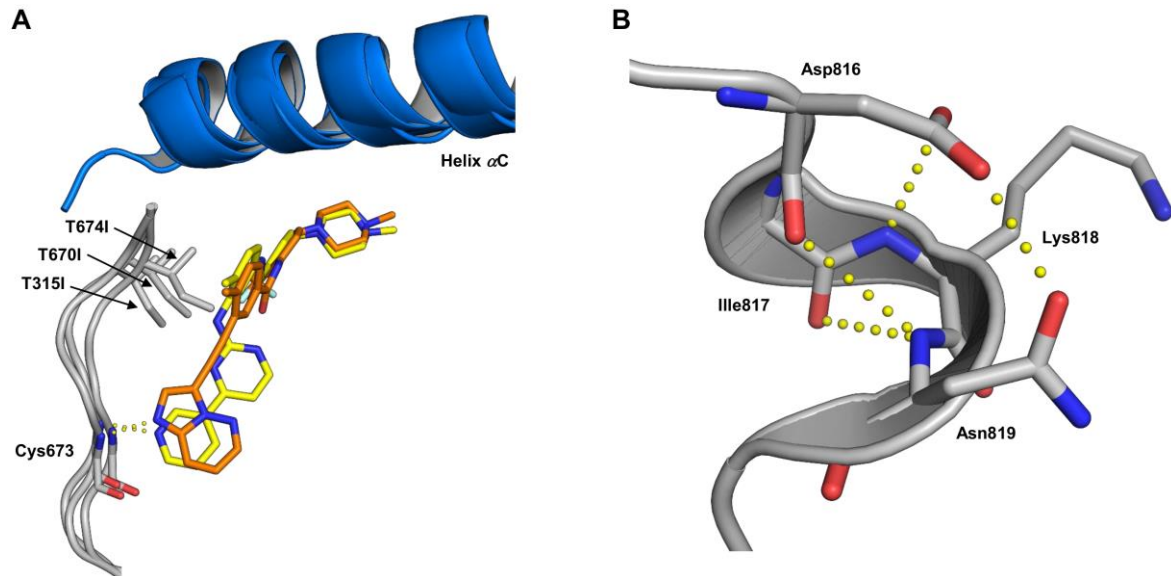
Eine der klinisch relevanten Mutationen ist V654A in der ATP-Bindungstasche, die eine Resistenz gegen Imatinib und Ponatinib vermittelt, aber sensitiv gegen Sunitinib ist (V654A in KIT ist homolog zu V658A in PDGFR $\alpha$ ). Es wird postuliert, dass Val654 von der Waals Interaktionen mit Ponatinib ausbildet, welche durch die Substitution zu einer kleineren Alaninseitenkette verloren gehen.<sup>122, 156</sup> Die Mutation der Türsteher-Aminosäure zu einer sterisch anspruchsvolleren hydrophoben Aminosäure, wie Isoleucin oder Methionin, ist eine häufig auftretende Resistenzmutation in einer Vielzahl von klinisch relevanten Proteinkinasen, wie bspw. EGFR, ABL, KIT und PDGFR $\alpha$ .<sup>44, 98, 157-159</sup> Die T670I Mutation in KIT tritt durch den in Folge der Imatinibtherapie hervorgerufenen Selektionsdruck auf und ist homolog zu T674I in PDGFR $\alpha$  sowie T315I in BCR ABL (Abb. 10A).<sup>160-163</sup> Die Alkineinheit in der Ponatinibstruktur, welche den Imidazolopyridazin Baustein mit dem restlichen Molekül verbindet, umgeht dabei den sterischen Konflikt mit der Türsteher-Mutation.<sup>156, 164</sup> Des Weiteren führen Mutationen innerhalb der Aktivierungsschleife zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinase, sowie zu Resistenzen von Typ-II-Inhibitoren. Die Aktivierungsschleife ist eins der wichtigsten regulatorischen Motive, welches die Zugänglichkeit der ATP-Bindungstasche reguliert. Mutationen in Codon 816 in KIT bzw. 842 in PDGFR $\alpha$  unterbrechen Interaktionen, die verantwortlich für eine Stabilisierung der Kinase in der inaktiven Konformation sind. Die am häufigsten gefundene Veränderung an dieser Position ist die Substitution einer hydrophilen Aminosäure (Aspartat) zu einer hydrophoben Aminosäure (Valin), wodurch sich die Aminosäure bevorzugt ins

---

vii <https://www.sarkome.de/news/fda-zulassung-ripretinib>; Letzter Zugriff am 04.12.2020 um 18:45 Uhr.

viii <https://www.sarkome.de/news/avapritinib-zulassung-eu> und <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-avapritinib-gastrointestinal-stromal-tumor-rare-mutation>; Letzter Zugriff am 04.12.2020 um 19:01 Uhr.

Innere des Proteins dreht, was eine zusätzliche Triebkraft für die Einnahme einer aktiven Konformation sein könnte. Im Wildtyp-Protein hingegen interagiert Asp816 mit den umliegenden drei Aminosäuren durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen und stabilisiert die inaktive, DFG-*out* Kinasekonformation (Abb. 10B).<sup>39</sup>



**Abbildung 10.** **A** Überlagerung der Ko-Kristallstrukturen von BCR ABL im Komplex mit Ponatinib (PDB: 3IK3, orange), PDGFR $\alpha$ -T674I ohne gebundenen Liganden (PDB: 6A32) und KIT im Komplex mit Imatinib (PDB: 1T46, gelb), wobei hier die Mutation der Türsteher-Aminosäure mit ChemDraw erstellt wurde. **B** Netzwerk von Interaktionen innerhalb der Aktivierungsschleife, wodurch die inaktive Kinasekonformation stabilisiert wird (PDB: 6MOB).

Innerhalb der ATP-Bindetasche in KIT liegen Cys788 und Cys809, die potentiell für eine kovalente Bindungsbildung zur Verfügung stehen. Das Prinzip der kovalenten Adressierung wurde bereits von LEPROULT *et al.* auf KIT und PDGFR $\alpha$  übertragen. Hierbei konnte ein reaktives Chloracetamid an die Imatinibstruktur substituiert werden, welches in geeigneter Orientierung für eine Reaktion mit Cys788 in KIT bzw. Cys814 in PDGFR $\alpha$  angebracht wurde. In MS/MS-Experimenten konnte das entsprechende Protein-Ligand-Addukt für beide Proteinkinasen identifiziert werden.<sup>165-166</sup> Erst kürzlich wurden Benzoxazine als reaktive Gruppe für die kovalente Bindung an Cys788 in KIT beschrieben und die erste Ko-Kristallstruktur mit gebundenem Liganden wurde publiziert.<sup>167</sup>

---

## 2 Motivation und Zielsetzung

Zu den Hauptursachen für das Scheitern von klinischen Studien zählen fehlende Wirksamkeit und mangelnde Sicherheit des Wirkstoffes, darüber hinaus werden häufig pharmakokinetische Defizite der getesteten Substanzen erkennbar. Pharmakokinetik beschreibt alle Prozesse, die auf den Arzneistoff im Körper einwirken - von der Aufnahme des Arzneistoffes, über die Verteilung und den Metabolismus, bis hin zu seiner Ausscheidung. Für diese Prozesse wurden Modellsysteme entwickelt, um eine Abschätzung von pharmakokinetischen Eigenschaften wie Permeabilität, Löslichkeit und Stabilität von potentiellen Wirkstoff-kandidaten zu ermöglichen. Dies bietet die Möglichkeit, pharmakokinetische Mängel in einem frühen Stadium der Entwicklung aufzudecken. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der mikrosomalen Stabilität von Wirkstoffen in verschiedenen Testsystemen, wobei hier zunächst die Etablierung eines entsprechenden Assaysystems ( $CL_{int}$  Assay) erfolgen sollte. Neben der Bestimmung der intrinsischen Clearance von einer Vielzahl an Inhibitoren sollten weiterführend auch labile Positionen der Verbindungen identifiziert werden, die bspw. hohe Abbauraten erklären könnten. Diese Studien sollten einen Beitrag zur Inhibitor-Optimierung leisten, indem entsprechend metabolisch anfällige Positionen aufgedeckt werden und somit die rationale Einbringung chemischer Modifikationen zur Erhöhung der mikrosomalen Stabilität ermöglicht wird.

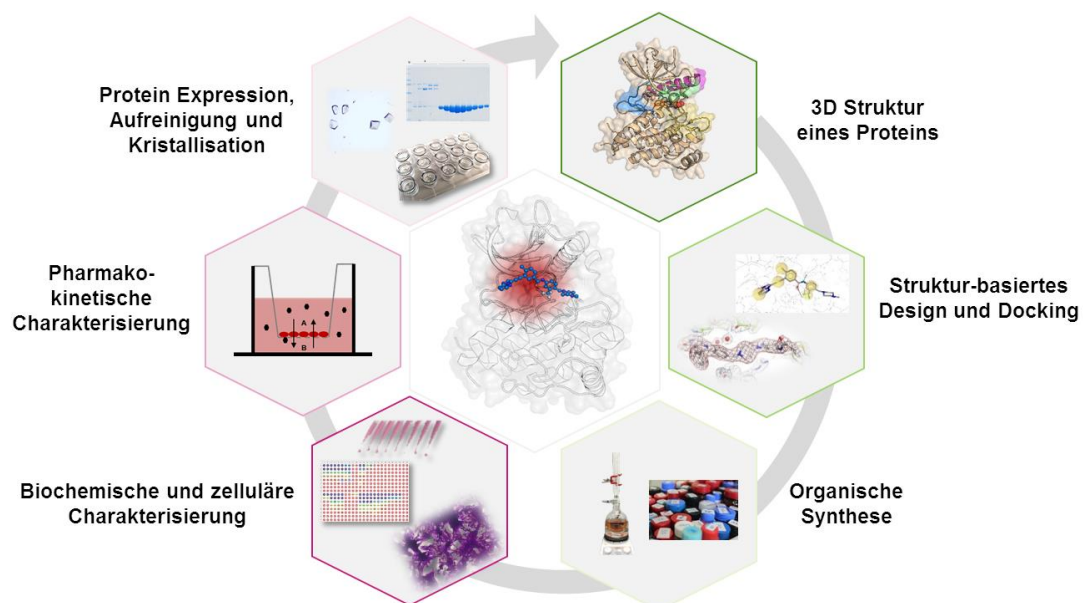
Die Proteinkinase MKK7 ist Teil des JNK-Signalwegs, dem eine bedeutungsvolle Rolle in neurologischen Erkrankungen zukommt und zudem bei der Entstehung von Herzinfarkten mit darauffolgenden ischämischen Reperfusionsschäden beteiligt ist. Die direkte Adressierung von JNK ist aufgrund mangelnder Isoform-Selektivität mit einem breiten Nebenwirkungsspektrum beschrieben, sodass die zielgerichtete Adressierung von MKK7 als vorgeschaltete Kinase in diesem Signalweg einen potentiellen Ansatz zur spezifischen Perturbation darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst der literaturbeschriebene 4-Aminopyrzo-lo-pyrimidin-basierte MKK7 Inhibitor (Verbindung 24, Kapitel 3.2.1) in größerem Maßstab hergestellt werden, um die biologische Funktion von MKK7 anhand komplexerer Modellsystemen untersuchen zu können. Hierzu sollten zelluläre und *in vitro* pharmakokinetische Untersuchungen eine Basis für darauffolgende *in vivo* Experimente in Mäusen bilden. Im Zuge der *in vivo* Charakterisierung sollte im Vorfeld eine geeignete Formulierung der Substanz gefunden sowie die maximal tolerierbare Dosis ermittelt werden. In einer *proof-of-concept*-Studie sollte zum einen die Bioverfügbarkeit auf verschiedenen Applikationswegen ermittelt werden und zum anderen die Verträglichkeit der Substanz bestimmt werden.

Auf Basis der hiermit identifizierten verträglichen Dosis sollten erste Experimente in Mäusen zur Prävention von Reperfusionsschäden nach einem Herzinfarkt in einem

Kooperationsprojekt durchgeführt werden. Als Maß für die Wirksamkeit des verabreichten Wirkstoffes wurde der ischämische Schaden anhand von Schnitten nach Entnahme, histologischer Aufarbeitung und Färbung mit TriChrome der Mausherzen im Vergleich zu DMSO-Kontrollmäusen beurteilt.

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms und die Erkenntnis, dass Krebs eine Erkrankung des Genoms ist, führte zu einem grundlegenden Umdenken in der medizinischen Forschung. Zusammen mit einer kontinuierlichen Weiterentwicklung von biotechnologischen Verfahren eröffneten sich neue Möglichkeiten, im Bereich der klinisch-onkologischen bzw. medizinal-chemischen Forschung sowie bei der Entwicklung innovativer Therapieansätze. Auf diese Weise können bestimmte Patientenpopulationen mit definierten genetischen Läsionen individuell und gezielt behandelt werden (Präzisionsmedizin).<sup>73</sup> Eine große Herausforderung hierbei stellen erworbene Resistenzmutationen dar, welche die Entwicklung maßgeschneiderter Wirkstoffe zur Umgehung solcher Resistenzen erfordern.

In diesem Teil der Arbeit stehen die Proteinkinasen Her2, KIT und PDGFR $\alpha$  als onkogene Zielstrukturen im Fokus, welche aufgrund ihrer tragenden Eigenschaften bei der Entwicklung verschiedener Krebstypen attraktive Targets für die Wirkstoffforschung darstellen. Das Ziel hierbei bestand aus der Weiterentwicklung und Charakterisierung von Inhibitoren durch Struktur-basiertes Wirkstoffdesign (Abb. 11).



**Abbildung 11.** Zyklus des Struktur-basierten Wirkstoffdesigns. Ausgehend von einer (Ko-)Kristallstruktur des Zielproteins wird die Bindungstasche analysiert, um Liganden mit optimierten Bindungseigenschaften und favorisierten Wechselwirkungen innerhalb der Bindungstasche zu entwerfen, die im nachfolgenden Schritt synthetisiert werden.



---

Die sich anschließende biochemische und zelluläre Charakterisierung gibt Einblicke bzgl. der Affinität der Liganden zu ihrem Zielprotein. Ein weiterer Parameter, der in der frühen Entwicklungsphase nicht fehlen darf, ist die Analyse der Pharmakokinetik. Hierbei werden Eigenschaften wie Löslichkeit, Permeabilität und Stabilität in unterschiedlichen Assaybedingungen untersucht. Final erfolgt die Proteinexpression, -reinigung und -(Ko-)Kristallisation mit den synthetisierten Inhibitoren, mit dem Ziel diese in einer Komplex-Kristallstruktur evaluieren zu können. Dies liefert den Startpunkt für einen neuen Zyklus des Struktur-basierten Wirkstoffdesigns.

Für die Weiterentwicklung von Inhibitoren der klinisch relevanten Her2 Insertion in Exon20 (Her2-ins-YVMA) sollte eine fokussierte Substanzbibliothek aus kovalenten Pyrrolopyrimidinen mit verbesserter Löslichkeit aufgebaut werden, die hinsichtlich ihrer biochemischen, zellulären und pharmakokinetischen Eigenschaften näher analysiert wurden. Einblicke in die Bindungseigenschaften der Liganden sollten massenspektrometrische Experimente sowie Kristallisationsstudien liefern.

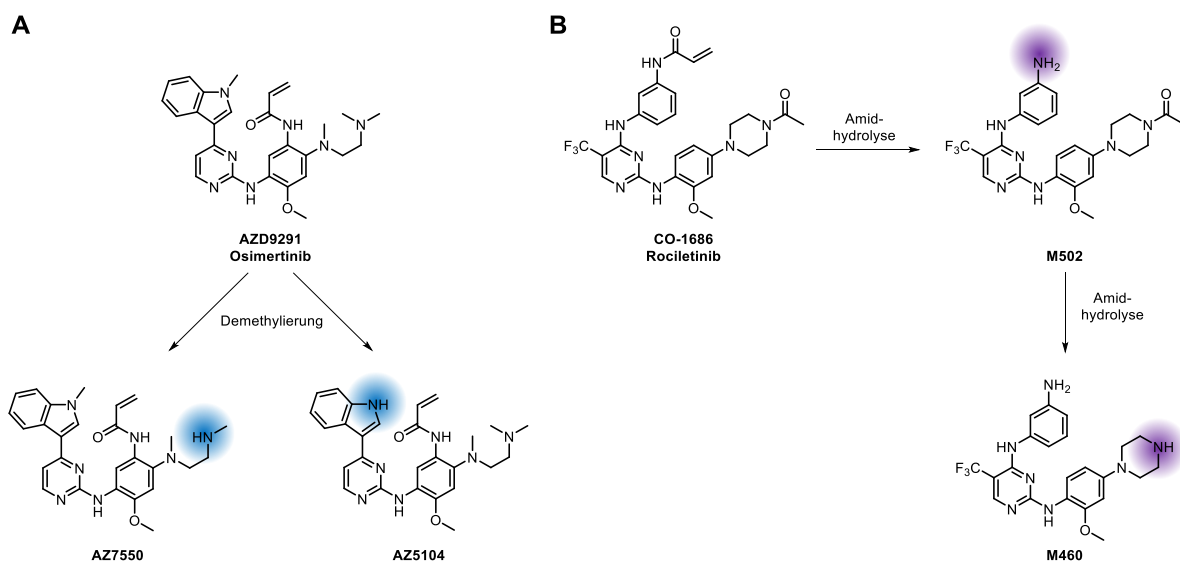
Unter den zugelassenen Wirkstoffen für die Behandlung von fortgeschrittenem GIST sind nur zwei, die speziell für mutiertes KIT bzw. PDGFR $\alpha$  entwickelt wurden. Hierbei handelt es sich um das im Januar 2020 von der FDA zugelassene Medikament Avapritinib, welches speziell für KIT-D816V bzw. PDGFR $\alpha$ -D842V entwickelt wurde und Ripretinib, welches im Mai 2020 von der FDA als Standard Viertlinien-Therapie zugelassen wurde. Hiermit wird der dringende medizinische Bedarf verdeutlicht, neue Inhibitoren für mutiertes KIT bzw. PDGFR $\alpha$  zu entwickeln.

In einer *proof-of-concept* Studie sollte das Prinzip der kovalenten Adressierung von KIT und PDGFR $\alpha$  auf den Viertlinien-Inhibitor Ponatinib übertragen werden, wobei ein kovalenter Inhibitor als Startpunkt für die Etablierung dieses Ansatzes verwendet werden sollte, der in vorangegangenen Studien identifiziert wurde. Im Vordergrund sollte der Aufbau einer fokussierten Substanzbibliothek von Ponatinib-basierten Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren stehen, sowie der eindeutige Nachweis einer kovalenten Adressierung von Cys788 oder Cys809 in KIT mittels massenspektrometrischen Analysen.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Phase-I-Metabolismus

Die Signifikanz um das Wissen von metabolischen Prozessen und deren Auswirkungen auf die Wirksamkeit eines verabreichten Wirkstoffes soll mithilfe von zwei Arzneistoffen, Osimertinib (AZD9291)<sup>53</sup> und Rociletinib (CO-1686)<sup>93</sup>, verdeutlicht werden (Abb. 12). Hierbei handelt es sich um kovalente Drittgenerationsinhibitoren des EGF-Rezeptors, die mit einem reaktiven Acrylamid dekoriert sind, um irreversibel an das Cystein in Position 797 zu binden. Osimertinib weist zwei pharmakologisch aktive Metabolite auf - AZ7550, mit einem sehr ähnlichen Wirkprofil wie die Parentalverbindung und AZ5104, mit einer reduzierten Selektivität gegenüber EGFR Wildtyp im Vergleich zu Osimertinib.<sup>168</sup> Eine Nebenwirkung unter Rociletinibgabe ist Hyperglykämie, verursacht durch die nicht-kovalenten Metabolite M502 und M460, die sowohl IGF-Rezeptoren als auch Insulin-Rezeptor-Kinasen inhibieren und somit zu einer Erhöhung des Glukose- und Insulinspiegels führen. Im Mai 2016 wurde die Entwicklung von Rociletinib aufgrund erheblicher Bedenken bezüglich Wirksamkeit und Sicherheit eingestellt.<sup>169</sup>



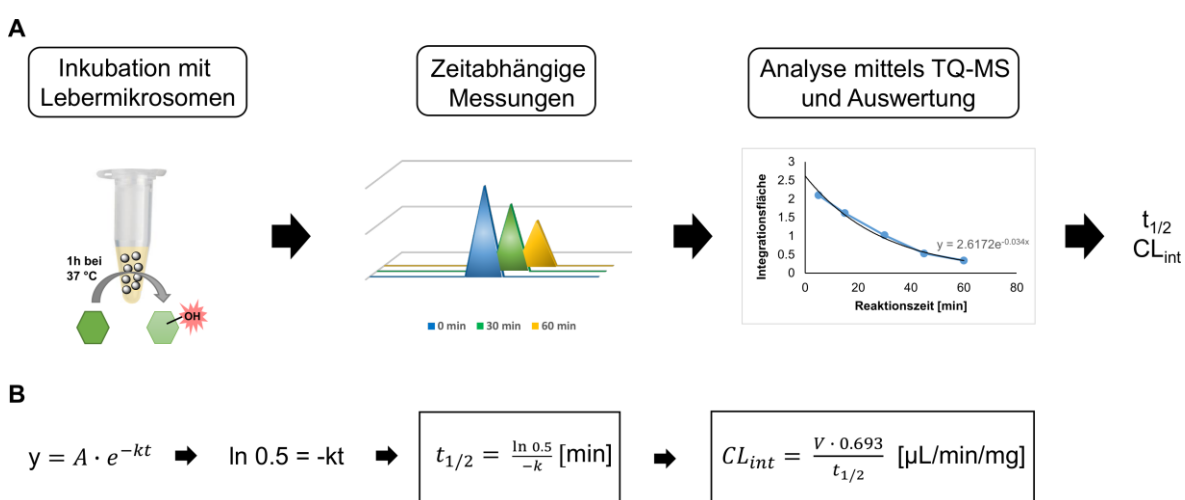
**Abbildung 12.** Biotransformation von Osimertinib (AZD9291) und Rociletinib (CO-1686) im Menschen. **A** Metabolismus von Osimertinib durch Dealkylierung führt zu pharmakologisch aktiven Metaboliten, AZ7550 und AZ5104. **B** Metabolismus von Rociletinib durch Amidhydrolysen führt zu pharmakologisch inaktiven Metaboliten, M502 und M460, mit erheblichen Nebenwirkungen.

Phase-I-Modifikationen, wie Dealkylierungen oder Hydrolyseereaktionen, sind hinreichend beschrieben und führen im Fall von Rociletinib zum Verlust des reaktiven Acrylamids, sodass eine kovalente Bindungsbildung unterbunden wird. Das Fallbeispiel um Rociletinib soll die Notwendigkeit von Phase-I-Metabolismus Studien zu einem frühen Zeitpunkt der Inhibitorentwicklung verdeutlichen, um Inhibitoren hinsichtlich ihrer pharmakokinetischen

Eigenschaften mithilfe von relevanten *in vitro* Modellsystemen zu analysieren und deren Ergebnisse in die weitere Optimierung einfließen lassen zu können.

### 3.2 Etablierung eines Phase-I-Metabolismus Assays ( $CL_{int}$ Assay)

Ein geeignetes Testsystem für Phase-I-Metabolismus Studien stellen Lebermikrosomen dar, die im Rahmen dieser Arbeit mit verschiedenen Testsubstanzen inkubiert wurden. Binnen einer Stunde wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und an einem Triple Quadrupol Massenspektrometer (TQ-MS) analysiert (Abb. 13A). Hierbei wurden die Inhibitoren zunächst bei 37 °C in Anwesenheit von NADH zusammen mit MLM (murine Lebermikrosomen, *mouse liver microsomes*) und HLM (humane Lebermikrosomen, *human liver microsomes*) inkubiert. Zu insgesamt sechs Zeitpunkten wurden Proben entnommen und in Acetonitril überführt, um die Enzymreaktion zu stoppen. Durch Filtration wurden denaturierte Proteine und die Mikrosomen abgetrennt, sodass der Durchfluss für die weitere Analyse genutzt werden konnte. Zunächst wurden die Proben auf eine HPLC injiziert und anschließend im TQ-MS analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte durch Integration der Flächen unter den Graphen zu den jeweiligen Zeitpunkten. Somit konnte die Peakfläche in Abhängigkeit von der Reaktionszeit aufgetragen werden. Die so erhaltenen Datenpunkte wurden auf Basis einer Exponentialfunktion gefittet und für die Ableitung der *in vitro* Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) und der intrinsischen Clearance ( $CL_{int}$ ) herangezogen (Abb. 13B).<sup>170</sup>



**Abbildung 13.** **A** Schematische Darstellung eines mikrosomalen Stabilitätsassays ( $CL_{int}$  Assay). Setup adaptiert vom Lead Discovery Center Dortmund. **B** Auswertung und Berechnung der *in vitro* Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) und der intrinsischen Clearance ( $CL_{int}$ ).

Für eine solide und zuverlässige Auswertung und Beurteilung der Daten sind folgende Kontrollverbindungen eingesetzt worden.

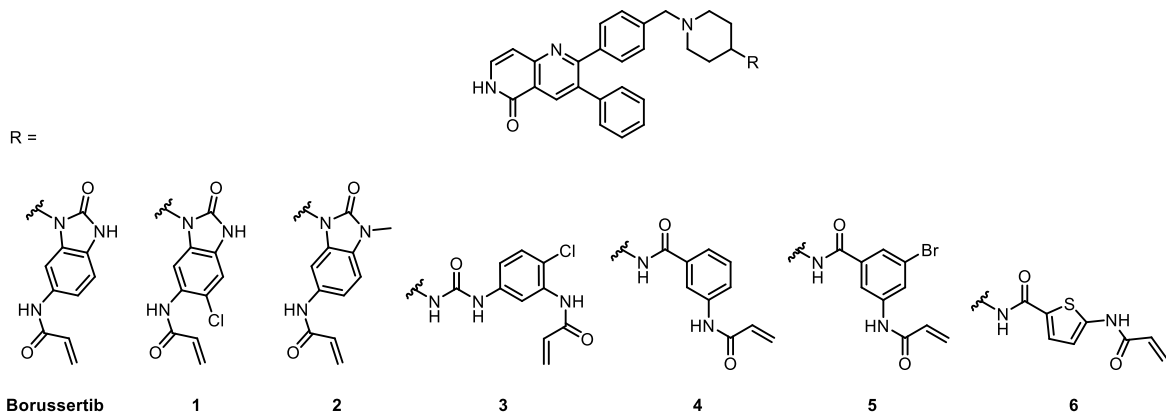
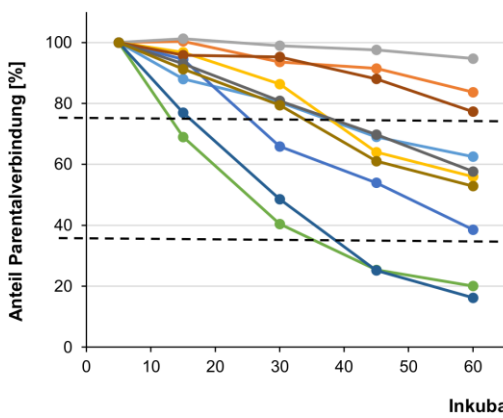
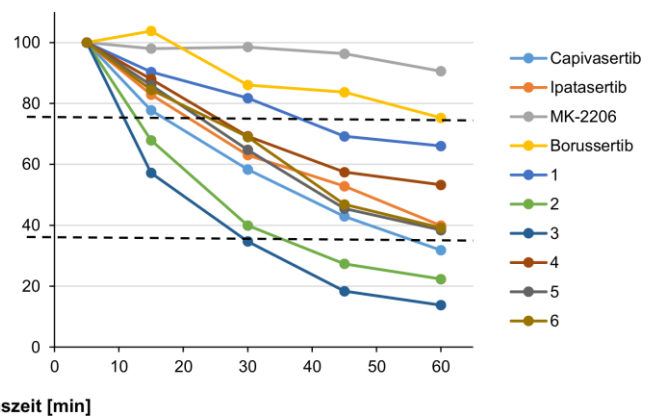
---

In Anwesenheit muriner Lebermikrosomen wurde Erythromycin ( $CL_{int}$  6  $\mu$ L/min/mg) verwendet, wohingegen Propranolol ( $CL_{int}$  7  $\mu$ L/min/mg) in Gegenwart humaner Lebermikrosomen eingesetzt wurde. Die Übereinstimmung der Referenzwerte für Erythromycin und Propranolol mit Literaturwerten und der am Lead Discovery Center (Dortmund) ermittelten Werte untermauerten die Etablierung eines robusten Assaysystems.<sup>33</sup>

Phase-I-Metabolismus Studien basierend auf dem beschriebenen Modellsystem fanden Anwendung in einer Vielzahl an Projekten aus der AG Rauh (Akt, EGFR, KIT und MKK7), wobei insgesamt 200 Inhibitoren in Anwesenheit von murinen und humanen Lebermikrosomen untersucht wurden.<sup>59, 85, 156, 171</sup> Im Folgenden wird eine fokussierte Auswahl an Inhibitoren innerhalb der jeweiligen Projekte hinsichtlich mikrosomaler Stabilitätseigenschaften näher beleuchtet. Die Analysen sollen Einblick in die metabolische Phase-I-Stabilität der untersuchten Verbindungen geben und zukünftig einen wichtigen Beitrag hinsichtlich der Weiterentwicklung und Optimierung von Wirkstoffkandidaten leisten.

### **3.2.1 Charakterisierung von kovalent-allosterischen Akt Inhibitoren**

Die Proteinkinase Akt ist von zentraler Bedeutung im PI3K-Akt-mTOR-Signalweg. Fehlregulationen sind häufig assoziiert mit der Entstehung von Krankheiten und spielen bspw. eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung. Vor diesem Hintergrund ist die Ser-/Thr-spezifische Kinase Akt ein interessantes Ziel in der Wirkstoffforschung und intensive Forschung und Entwicklung hinsichtlich der Adressierung mit kleinen, niedermolekularen Inhibitoren wurde betrieben. In der Arbeitsgruppe wurden kovalent-allosterische Inhibitoren, basierend auf einem 1,6-Naphthyridinon Grundgerüst entwickelt, die ein vielversprechendes biochemisches und zelluläres Profil aufweisen und somit potentielle Kandidaten für weitere präklinische Untersuchungen darstellen.<sup>171</sup> Eine fokussierte Auswahl an 1,6-Naphthyridinon Inhibitoren wurde im Vergleich zu klinischen Kandidaten im mikrosomalen Stabilitätsassay näher beleuchtet (Abb. 14).

**A****B****C**

**Abbildung 14. A** Chemische Strukturen der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren. Normierte Auftragung des Abbaus der Inhibitoren über den Inkubationszeitraum mit Lebermikrosomen. **B** MLM. **C** HLM. Die gestrichelten Linien markieren die Klassifizierungen der hohen (> 75 %), mittleren (> 35 %) und geringen (< 35 %) mikrosomale Stabilität.

Mithilfe der Auftragung war es möglich, eine Klassifizierung in hohe, mittlere und geringe mikrosomale Stabilität vorzunehmen. Am Beispiel der MLM zeigten die oberen drei Verlaufskurven von MK-2206, Ipatasertib und Verbindung **4** eine hohe Stabilität bzw. einen nur geringen Abbau von etwa 20 % (Abb. 14B). Verbindungen **1**, **5**, **6** und Capivasertib wurden der mittleren Kategorie zugeteilt, mit einem Abbau von etwa 40-60 %. Einzig Verbindungen **2** und **3** wurden schnell abgebaut, sodass nach 60 min noch 16-20 % der jeweiligen Parentalsubstanz nachgewiesen werden konnte. Die vorgenommene Klassifizierung ist entsprechend für HLM angewendet worden (Abb. 14C).

Anhand der gemessenen Daten wurden die Parameter  $t_{1/2}$  und  $CL_{int}$  abgeleitet (Tab. 1).

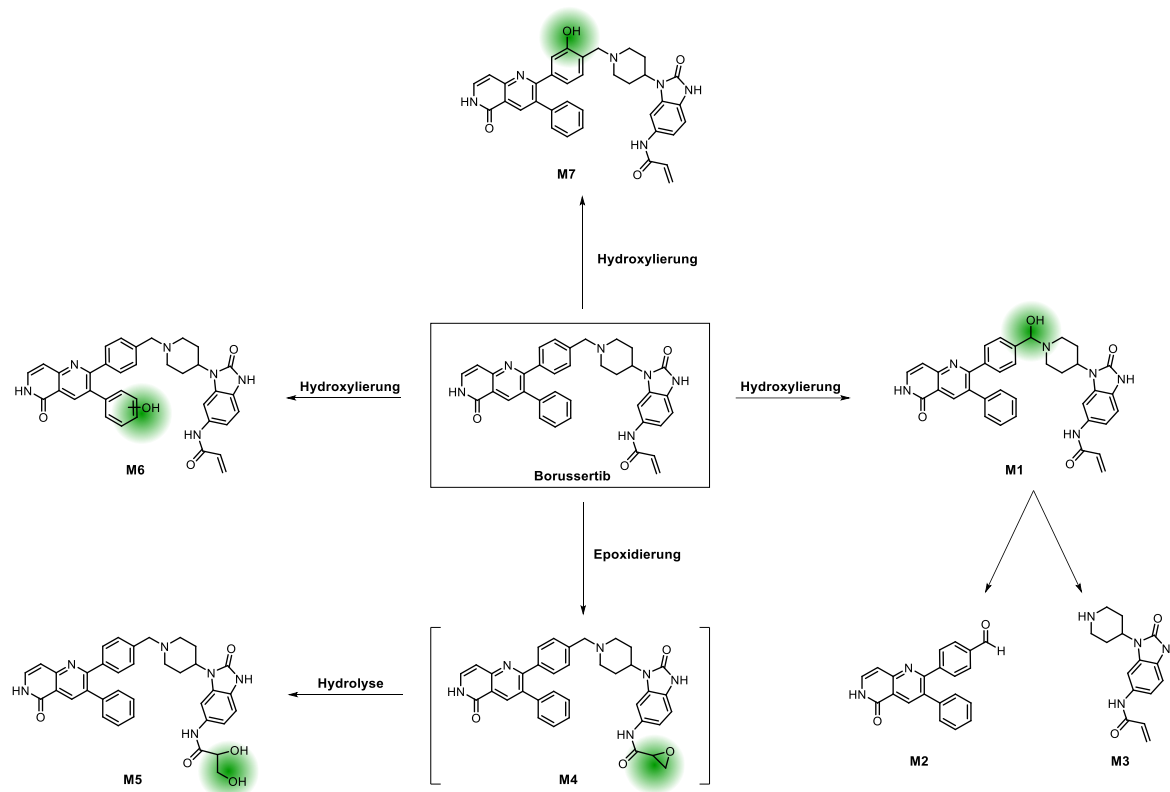
**Tabelle 1.** Charakterisierung von kovalent-allosterischen Akt Inhibitoren im Phase-I-Metabolismus Assay in murinen und humanen Lebermikrosomen.

	Mikrosomaler Stabilitätsassay	
	$t_{1/2}$ [min] (murin / human)	$CL_{int}$ [ $\mu$ L/min/mg] (murin / human)
<b>Capivasertib</b>	87 / 33	16 / 14
<b>Ipatasertib</b>	231 / 39	6 / 12
<b>MK-2206</b>	693 / 347	2 / 1
<b>Borussertib</b>	46 / 99	30 / 5
<b>1</b>	41 / 87	34 / 5
<b>2</b>	23 / 25	60 / 19
<b>3</b>	20 / 19	68 / 24
<b>4</b>	173 / 58	8 / 8
<b>5</b>	69 / 39	20 / 12
<b>6</b>	58 / 39	24 / 12

Borussertib zeigte eine leicht höhere Stabilität in humanen Lebermikrosomen als in murinen ( $CL_{int}$  5 bzw. 30  $\mu$ L/min/mg). Das Chlor-substituierte Benzo[d]imidazol-Derivat **1** wies eine äquivalente Stabilität auf ( $CL_{int}$  5 bzw. 34  $\mu$ L/min/mg), wohingegen das Methyl-Derivat **2** eine vierfach schlechtere Stabilität in humanen Lebermikrosomen zeigte ( $CL_{int}$  19  $\mu$ L/min/mg). Ähnliche Stabilitäten wurden für das Phenylharnstoff-Derivat **3** ermittelt, woraus gefolgert werden kann, dass die zyklische Variante, das Benzo[d]imidazol, favorisiert ist gegenüber dem offenkettigen Harnstoff. Die Benzamide **4** und **5** zeigten beide hohe Stabilitäten in murinen sowie auch in humanen Lebermikrosomen, wobei **4** mit einer vierfach höheren Stabilität in murinen Mikrosomen im Vergleich zu Borussertib hervor zu heben ist ( $CL_{int}$  8 bzw. 30  $\mu$ L/min/mg für **4** bzw. Borussertib). Das Thiophen-Derivat **6** wies vergleichbar gute Stabilitäten wie **5** auf ( $CL_{int}$  24 / 12  $\mu$ L/min/mg). Abschließend kann also festgehalten werden, dass die untersuchten Inhibitoren insgesamt eine gute metabolische Stabilität zeigten, besonders im Vergleich zu den Referenzverbindungen Capivasertib und Ipatasertib.

Aufgrund der besonderen Wichtigkeit von Borussertib für unsere Arbeitsgruppe wurden tieferegehende Untersuchungen durchgeführt, um mögliche Metabolite und metabolisch labile Positionen im Molekül zu identifizieren. Mithilfe der Software GLORY<sup>172</sup> erfolgte eine *in silico* Vorhersage von möglichen Metaboliten, die im Menschen durch Enzyme der Cytochrom P450 Familie generiert werden könnten. Die Voraussage basiert auf einem zweistufigen Mechanismus, bei dem zunächst die *site of metabolism* (SoM), also die

Position im Molekül, an der eine Modifikation stattfinden kann, mit Hilfe von FAME 2<sup>ix</sup> vorhergesagt wird.<sup>173-174</sup> Anschließend erfolgt die Transformation des Moleküls in seine möglichen Metabolite. Exemplarisch sind Modifikationen wie Hydroxylierung, Hydrolyse oder auch Epoxidierung gezeigt, die durch die Software ermittelt wurden (Abb. 15).

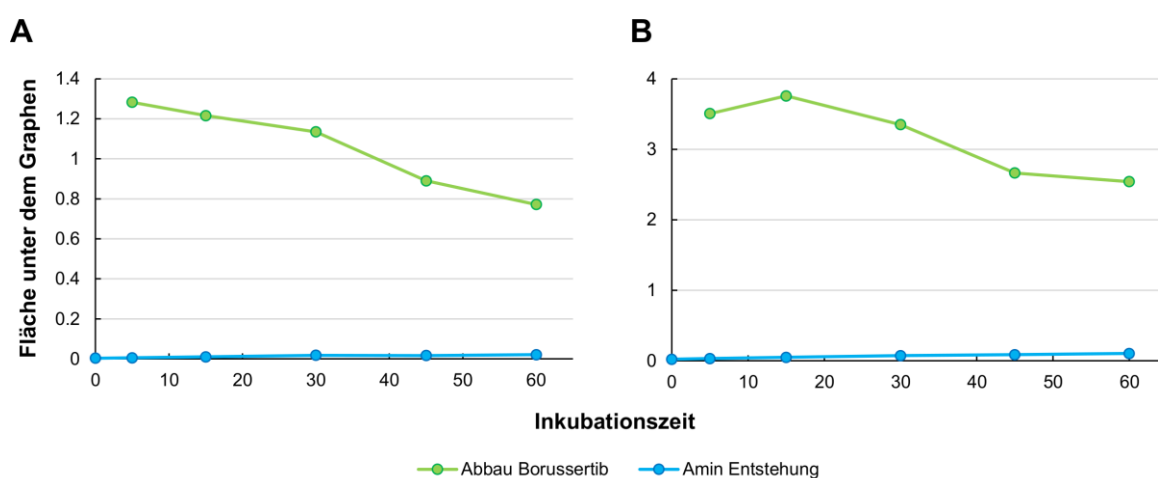


**Abbildung 15.** Vorhersage von möglichen Metaboliten von Borussertib basierend auf der Software GLORY. Mögliche metabolisch labile Positionen sowie Phase-I-Modifikationen sind grün gekennzeichnet. Hierbei wurden diese acht als repräsentative Vertreter (aus insgesamt 39 berechneten Modifikationen) ausgewählt, die mit Hilfe der Software ermittelt wurden.

Eine mögliche Modifikation unter Phase-I-Bedingungen ist bspw. die literaturbeschriebene Epoxidierung der Ethylengruppe eines Acrylamids (**M4**) mit weiterführender Hydrolyse zum Dihydrodiol **M5**.<sup>175-176</sup> Das Epoxid **M4** ist, wie auch das Acrylamid, potentiell in der Lage mit besonders reaktiven Gruppen in Proteinen (z.B. Thiolen) zu reagieren und eine kovalente Bindung auszubilden. Auf der anderen Seite ist ein Epoxid eine hochreaktive, und möglicherweise toxische Spezies, die z. B. durch Adduktbildung an die Nukleobasen zu DNA Schäden führen kann.<sup>176-178</sup> Detoxifikationsmechanismen können zum einen Phase-II-Reaktionen (GSH-Konjugation) sein, oder zum anderen die weitere Umwandlung durch Hydrolasen zum Dihydrodiol-Derivat **M5**.<sup>179</sup> Weitere Modifikationen sind Hydroxylierungen, die bspw. an den Phenylringen erfolgen könnten und in den Metaboliten

<sup>ix</sup> FAME (FAst MEtabolizer) ist eine Kraftfeld-basierte Software, mit der eine Vorhersage von möglichen Positionen in Molekülen erfolgt, an denen eine Modifikation stattfinden kann. FAME 2 ist eine aktualisierte Version.

**M6** sowie **M8** resultieren. Ebenso möglich ist eine Hydroxylierung an der Methylenbrücke, wodurch sich ein N,O-Acetal bildet, welches die Aufspaltung in den Aldehyd **M2** und die freie Base **M3** begünstigt. Basierend auf dieser Annahme und der Zugänglichkeit der entsprechenden Bausteine aus der etablierten Syntheseroute wurde postuliert, dass ein Nachweis des freien Amins **M3** nur dann erfolgen kann, wenn eine Hydroxylierung an der Methylenbrücke im Vorfeld stattgefunden hat (**M1**). Es ist kein anderer Mechanismus denkbar, um diese Bindung aufzubrechen und die Parentalverbindung in die beiden Bausteine **M2** und **M3** zu überführen. Durch die Verwendung eines Triple Quadrupol Massenspektrometers war es möglich den Amin-Baustein eindeutig qualitativ nachzuweisen (Abb. 16).



**Abbildung 16.** Nicht-normierte Auftragung des Abbaus von Borussertib (grün) und der Entstehung des Amin-Bausteins **M3** (blau) in **A** MLM und **B** HLM.

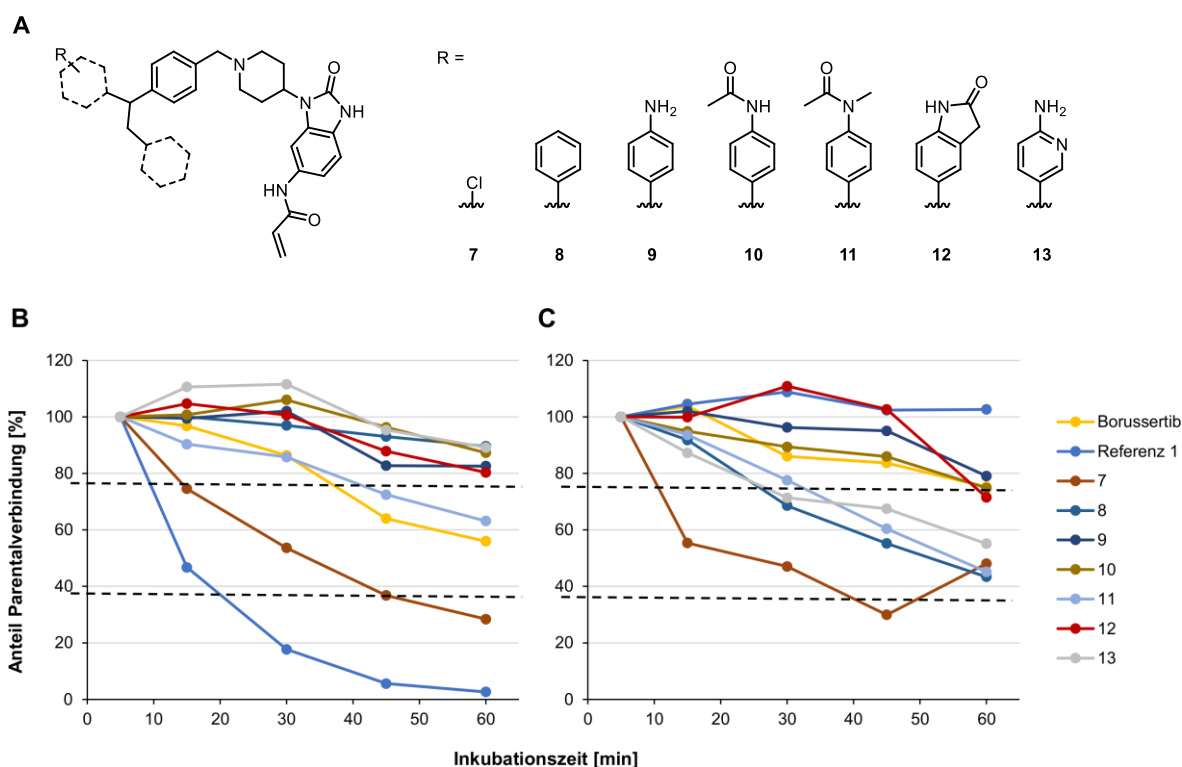
Somit konnte in Phase-I-Metabolismus Studien in murinen und humanen Lebermikrosomen die Bildung des N,O-Acetals bestätigt werden, indem das freie Amin **M3** nachgewiesen werden konnte. Die Entstehung des Aminderivats wurde qualitativ analysiert und eine quantitative Untersuchung sollte in zukünftigen Arbeiten durchgeführt werden, um den prozentualen Anteil des Metaboliten bestimmen zu können und zu schlussfolgern, inwiefern dieser Metabolit relevant ist. Es ist wahrscheinlich, dass **M3** nicht der Hauptmetabolit und vor allem nicht der einzige Metabolit ist.

Des Weiteren wurde Borussertib (im Rahmen der Dissertation von Dr. Niklas Uhlenbrock und der Masterarbeit von Sven Brandherm) in ergänzenden präklinischen Studien sowie in Xenograft-Modellen hinsichtlich der Antitumor-Wirksamkeit untersucht. Neben optimierungsbedürftigen pharmakokinetischen Eigenschaften, wie Permeabilität und Löslichkeit wurde eine gute Pharmakodynamik festgestellt.<sup>x</sup>

<sup>x</sup> Dissertation Dr. Niklas Uhlenbrock, TU Dortmund (AG Rauh), 2019.



Vor dem Hintergrund des Struktur-basierten Designs von kleinen organischen Molekülen wurden Hybridmoleküle synthetisiert, welche die guten pharmakodynamischen Eigenschaften des kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors Borussertib mit den vielversprechenden pharmakokinetischen Eigenschaften eines klinischen Kandidaten (Referenz 1) verknüpfen, um die Löslichkeit und die orale Bioverfügbarkeit zu optimieren.<sup>xi</sup> Eine fokussierte Substanzbibliothek wurde im mikrosomalen Stabilitätsassay näher beleuchtet (Abb. 17).



**Abbildung 17. A** Chemische Strukturen der kovalent-allosterischen Akt Inhibitoren **7-13**. Normierte Auftragung des Abbaus der Inhibitoren über den Inkubationszeitraum mit Lebermikrosomen. **B** MLM. **C** HLM. Die gestrichelten Linien markieren die Klassifizierungen der hohen (> 75 %), mittleren (> 35 %) und geringen (< 35 %) mikrosomale Stabilität.

Mithilfe der Auftragung war es möglich, eine Klassifizierung in hohe, mittlere und geringe mikrosomale Stabilität vorzunehmen. Am Beispiel der MLM zeigten die oberen fünf Verlaufskurven der Verbindungen **8, 9, 10, 12** und **13** eine hohe Stabilität bzw. einen nur geringen Abbau von etwa 20 % (Abb. 17B). Verbindung **11** und Borussertib wurden der mittleren Kategorie zugeteilt, mit einem Abbau von etwa 40 %. Einzig Verbindungen **7** und Referenz 1 wurden schnell abgebaut, sodass nach 60 min noch 3-30 % der jeweiligen Parentalsubstanz nachgewiesen werden konnte.

<sup>xi</sup> Masterarbeit Sven Brandherm, TU Dortmund (AG Rauh), 2019. Unpublizierte Daten, weshalb der Akt Inhibitor nicht beim Namen genannt wird.

Die vorgenommene Klassifizierung ist entsprechend für HLM angewendet worden (Abb. 17C).

Anhand der gemessenen Daten wurden die Parameter  $t_{1/2}$  und  $CL_{int}$  abgeleitet (Tab. 2).

**Tabelle 2.** Charakterisierung von kovalent-allosterischen Akt Hybridinhibitoren im Phase-I-Metabolismus Assay in murinen und humanen Lebermikrosomen.

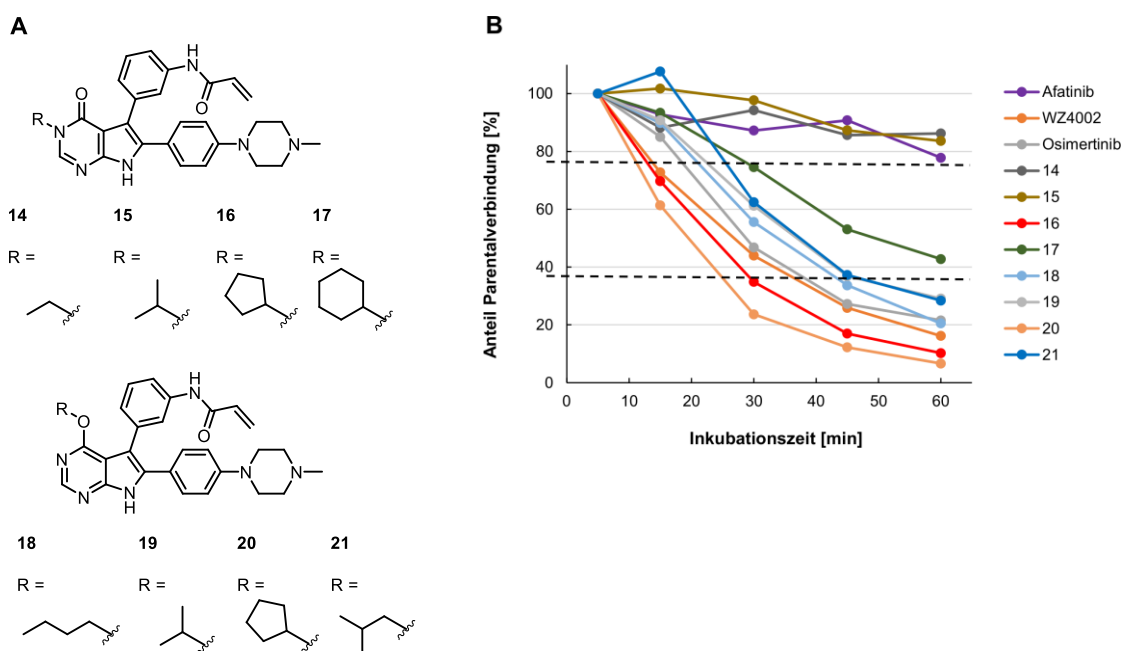
	Mikrosomaler Stabilitätsassay	
	$t_{1/2}$ [min] (murin / human)	$CL_{int}$ [ $\mu$ L/min/mg] (murin / human)
<b>Borussertib</b>	46 / 99	30 / 5
<b>Referenz 1</b>	10 / 6930	134 / 0
<b>7</b>	30 / 36	46 / 13
<b>8</b>	347 / 43	4 / 11
<b>9</b>	173 / 173	8 / 3
<b>10</b>	347 / 139	4 / 3
<b>11</b>	87 / 46	16 / 10
<b>12</b>	139 / 139	10 / 3
<b>13</b>	231 / 69	6 / 7

Referenz 1 wies erwartungsgemäß eine hohe Stabilität in humanen Lebermikrosomen auf ( $CL_{int}$  0  $\mu$ L/min/mg), wohingegen der Wirkstoff in Anwesenheit muriner Lebermikrosomen bereits nach 10 min zur Hälfte abgebaut war. Das Chlor-substituierte Imidazopyridin-Derivat **7** wies eine zu Borussertib äquivalente Stabilität auf, wohingegen die mit einem aromatischen Ringsystem derivatisierten Inhibitoren **8-13** eine leicht höhere mikrosomale Stabilität sowohl in murinen als auch in humanen Lebermikrosomen zeigten. Der einfachste Vertreter, dekoriert mit einem Phenylring (**8**) und Verbindung **10** zeigten die höchste Stabilität in MLM mit 4  $\mu$ L/min/mg. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Substitutionsmuster und metabolischer Stabilität war nicht zu beobachten. So liegt das Anilin-Derivat **9** in derselben Größenordnung wie das 2-Aminopyridin-Derivat **13** ( $CL_{int}$  murin / human 8 / 3 bzw. 6 / 7  $\mu$ L/min/mg). Eine drei- bis vierfach geringere Stabilität wurde für das *N*-Methyl-*N*-Phenylacetamid **11** im Vergleich zum *N*-Phenylacetamid **10** festgestellt, was auf die zusätzliche Methylgruppe zurückzuführen ist, da diese dem Phase-I-Metabolismus durch z.B. Demethylierungsreaktionen unterliegt. Die höchste Stabilität in Anwesenheit von humanen Lebermikrosomen wurde für die Verbindungen **9**, **10** und **12** detektiert ( $CL_{int}$  3  $\mu$ L/min/mg). Basierend auf diesen Daten und unter Berücksichtigung weiterer pharmakokinetischer Parameter wie Löslichkeit und Permeabilität stellen die Inhibitoren **9**, **10** und **12** vielversprechende Kandidaten für

potentielle *in vivo* Studien dar. Abschließend kann festgehalten werden, dass die untersuchten Inhibitoren insgesamt eine hohe metabolische Stabilität zeigten, wobei diese im Vergleich zu Borussertib und in Anwesenheit humaner Lebermikrosomen nicht wesentlich gesteigert werden konnte.

### 3.2.2 Charakterisierung von kovalenten EGFR Inhibitoren

Die Proteinkinase EGFR spielt eine entscheidende Rolle bei Patienten mit NSCLC. Zielgerichtete Therapien mit niedermolekularen Inhibitoren zeigen hohe Ansprechraten und erhöhen das progressionsfreie Überleben verglichen mit der konventionellen Chemotherapie. Neue und immer wiederkehrende Resistenzmutationen limitieren den Behandlungserfolg der Patienten, weshalb eine stetige Neu- und Weiterentwicklung von EGFR-spezifischen Kinaseinhibitoren von großer Bedeutung ist. Hierzu wurden kovalente Inhibitoren, basierend auf einem Pyrrolopyrimidin Grundgerüst entwickelt, die spezifisch die Türstehermutation (T790M) in EGFR adressieren sollen.<sup>85</sup> Eine fokussierte Auswahl an Inhibitoren wurde im mikrosomalen Stabilitätsassay untersucht (Abb. 18).



**Abbildung 18.** **A** Chemische Strukturen der kovalenten EGFR Inhibitoren **14-21**. **B** Normierte Auftragung des Abbaus der Inhibitoren über den Inkubationszeitraum mit murinen Lebermikrosomen. Die gestrichelten Linien markieren die Klassifizierungen der hohen (> 75 %), mittleren (> 35 %) und geringen (< 35 %) mikrosomale Stabilität.

Mithilfe der Auftragung war es möglich, eine Klassifizierung in hohe, mittlere und geringe mikrosomale Stabilität vorzunehmen (Abb. 18B).

Die oberen drei Verlaufskurven von Afatinib, **14** und **15** zeigten eine hohe Stabilität bzw. einen nur geringen Abbau von etwa 20 %. Einzig **17** wurde der mittleren Kategorie zugeteilt – nach 60 min konnten noch etwa 45 % Inhibitor nachgewiesen werden. Die übrigen Inhibitoren wurden schnell abgebaut, sodass nach 60 min noch 7 - 30 % der jeweiligen Parentalsubstanz nachgewiesen werden konnten.

Anhand der gemessenen Daten wurden die Parameter  $t_{1/2}$  und  $CL_{int}$  abgeleitet (Tab. 3).

**Tabelle 3.** Charakterisierung von kovalent EGFR Inhibitoren im Phase-I-Metabolismus Assay in murinen und humanen Lebermikrosomen.

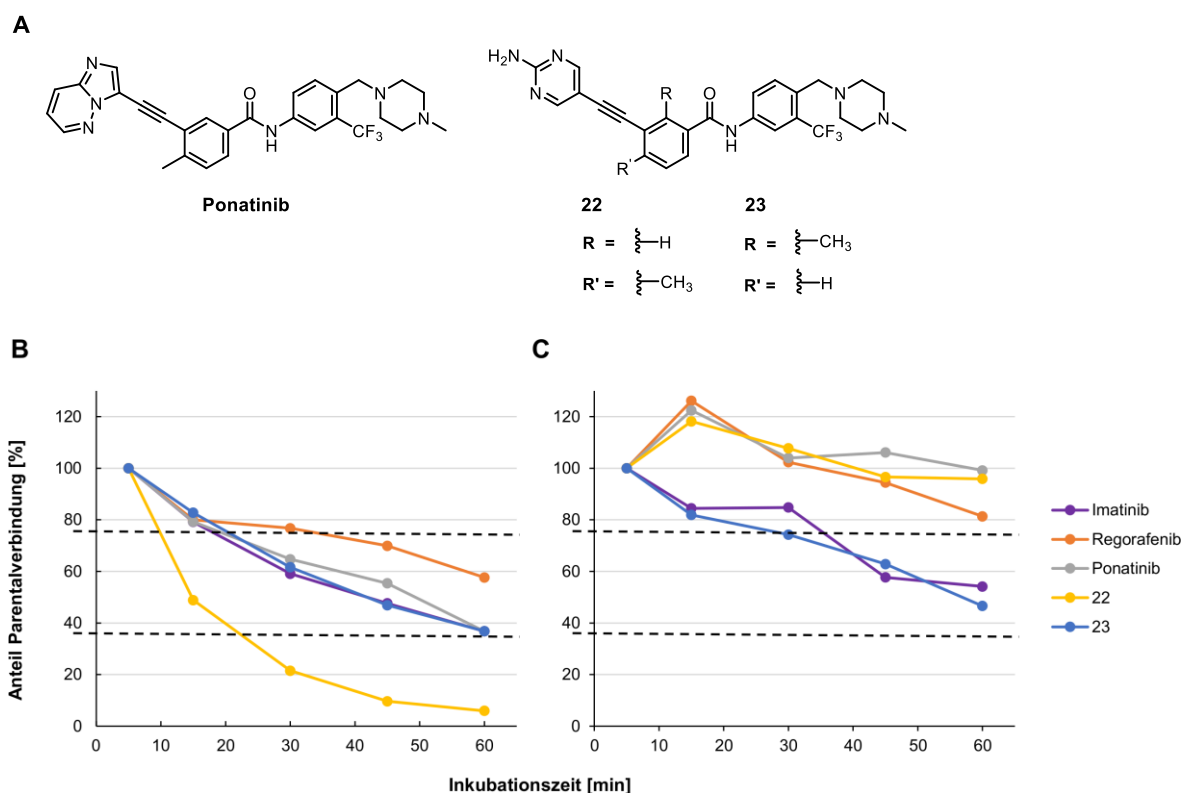
	Mikrosomaler Stabilitätsassay	
	$t_{1/2}$ [min] (murin / human)	$CL_{int}$ [ $\mu$ L/min/mg] (murin / human)
<b>Afatinib</b>	173 / 139	6 / 3
<b>WZ4002</b>	21 / 99	66 / 5
<b>Osimertinib</b>	23 / 173	60 / 3
<b>14</b>	347 / 50	4 / 9
<b>15</b>	173 / 23	8 / 22
<b>16</b>	16 / n.b.	84 / n.b.
<b>17</b>	43 / 25	30 / 19
<b>18</b>	23 / n.b.	50 / n.b.
<b>19</b>	29 / 43	46 / 11
<b>20</b>	14 / n.b.	128 / n.b.
<b>21</b>	27 / 35	46 / 14

n.b.: nicht bestimmt

Es ist auffällig, dass im Allgemeinen die *N*-alkylierten Inhibitoren eine höhere Stabilität in murinen Lebermikrosomen aufwiesen im Vergleich zu den Inhibitoren der *O*-alkylierten Serie. Die Inhibitoren **15** und **19** demonstrieren diesen Trend: **19** wies eine sechsfach geringere Stabilität in murinen Lebermikrosomen auf im Vergleich zu **15**. Die ermittelten Stabilitäten in humanen Lebermikrosomen zeigten nur einen geringen Abbau nach 60 min ( $CL_{int}$  zwischen 9 und 22  $\mu$ L/min/mg). Ebenfalls ist festzuhalten, dass **16** und **20**, derivatisiert mit einem Cyclopentan Substituenten mit Abstand die höchste *Clearance* ergaben (84 und 128  $\mu$ L/min/mg). Es ist denkbar, dass durch die leichte Zugänglichkeit des Cyclopentanrings Modifikationen wie Oxidationen und Hydroxylierungen schnell ablaufen können, wodurch die geringen Stabilitäten erklärt werden könnten. Abschließend lässt sich also festhalten, dass die synthetisierten EGFR Inhibitoren überwiegend eine hohe Stabilität in murinen Lebermikrosomen aufwiesen, besonders im Vergleich zu den Referenzverbindungen WZ4002 und Osimertinib.

### 3.2.3 Charakterisierung von reversiblen KIT Inhibitoren

Weitere Anwendung fand die pharmakokinetische Untersuchung in Lebermikrosomen mit Inhibitoren, welche für die Rezeptortyrosinkinase KIT entwickelt und synthetisiert wurden. Hierbei lag der Fokus auf der Derivatisierung des Scharnierregion-bindenden Motivs, basierend auf dem Ponatinib Grundgerüst. **22** und **23** stellten sich hierbei als vielversprechende Verbindungen heraus, die im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich metabolischer Stabilität näher untersucht wurden (Abb. 19).<sup>156</sup>



**Abbildung 19. A** Chemische Strukturen der reversiblen KIT Inhibitoren **22** und **23**. Normierte Auftragung des Abbaus der Inhibitoren über den Inkubationszeitraum mit Lebermikrosomen. **B** MLM. **C** HLM. Die gestrichelten Linien markieren die Klassifizierungen der hohen (> 75 %), mittleren (> 35 %) und geringen (< 35 %) mikrosomale Stabilität.

Mithilfe der Auftragung war es möglich, eine Klassifizierung in hohe, mittlere und geringe mikrosomale Stabilität vorzunehmen. Am Beispiel der MLM konnten die oberen drei Verlaufskurven von Regorafenib, Ponatinib und Verbindung **23** der mittleren Kategorie zugeteilt werden, mit einem Abbau von etwa 40-60 % (Abb. 19B). Einzig Verbindung **22** und wurde schnell abgebaut, sodass nach 60 min noch 6 % der Parentalsubstanz nachgewiesen werden konnte. Die vorgenommene Klassifizierung ist entsprechend für HLM angewendet worden (Abb. 19C). Anhand der gemessenen Daten wurden die Parameter  $t_{1/2}$  und  $CL_{int}$  abgeleitet (Tab. 4).

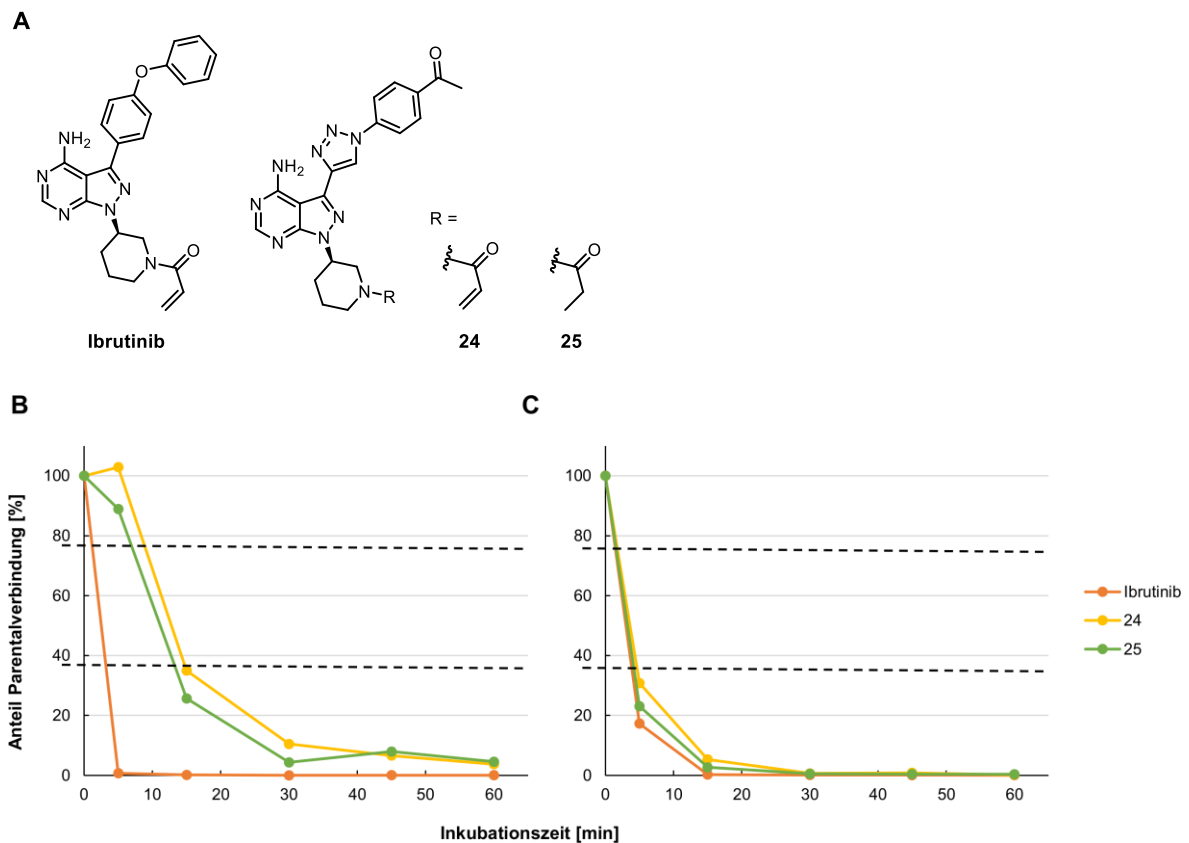
**Tabelle 4.** Charakterisierung von KIT Inhibitoren im Phase-I-Metabolismus Assay in murinen und humanen Lebermikrosomen.

	Mikrosomaler Stabilitätsassay	
	$t_{1/2}$ [min] (murin / human)	$CL_{int}$ [ $\mu$ L/min/mg] (murin / human)
<b>Imatinib</b>	39 / 63	36 / 7
<b>Regorafenib</b>	77 / 139	18 / 3
<b>Ponatinib</b>	41 / 693	34 / 1
<b>22</b>	13 / 347	104 / 1
<b>23</b>	39 / 53	36 / 9

Die untersuchten KIT-Inhibitoren zeigten Stabilität gegenüber humanen Lebermikrosomen ( $CL_{int}$  1-9  $\mu$ L/min/mg). Gegenüber murinen Lebermikrosomen wurden Stabilitäten von 18-36 festgestellt, wobei Verbindung **22** die einzige Ausnahme darstellte ( $CL_{int}$  104  $\mu$ L/min/mg). Die Inhibitoren **22** und **23** unterscheiden sich lediglich in der Substitution der Methylgruppe am zentralen Phenylring in 4- bzw. 2-Position, sodass sich die Stabilität in zukünftigen Projekten vermutlich durch Substitutionen an diesem Ring positiv beeinflussen lässt.

### 3.2.4 Charakterisierung von kovalenten MKK7 Inhibitoren

Im Rahmen des Struktur-basierten Designs und der Synthese von kovalenten MKK7 Inhibitoren, basierend auf einem Pyrazolopyrimidin Grundgerüst, ist Verbindung **24** mit einem vielversprechenden biochemischen Profil hervorgegangen.<sup>59</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde die mikrosomale Stabilität von **24** und dem reversiblen Analogon **25** im Vergleich zu Ibrutinib untersucht (Abb. 20).



**Abbildung 20. A** Chemische Strukturen der MKK7 Inhibitoren **24** und **25**. Normierte Auftragung des Abbaus der Inhibitoren über den Inkubationszeitraum mit Lebermikrosomen. **B** MLM. **C** HLM. Die gestrichelten Linien markieren die Klassifizierungen der hohen (> 75 %), mittleren (> 35 %) und geringen (< 35 %) mikrosomale Stabilität.

Mithilfe der Auftragung konnten alle Inhibitoren einer geringen metabolischen Stabilität sowohl in MLM als auch in HLM zugeordnet werden (Abb. 20B und C), sodass nach 60 min noch < 6 % der jeweiligen Parentalsubstanzen nachgewiesen werden konnten.

Anhand der gemessenen Daten wurden die Parameter  $t_{1/2}$  und  $CL_{int}$  abgeleitet (Tab. 5).

**Tabelle 5.** Charakterisierung von kovalenten MKK7 Inhibitoren im Phase-I-Metabolismus Assay in murinen und humanen Lebermikrosomen.

	Mikrosomaler Stabilitätsassay	
	$t_{1/2}$ [min] (murin / human)	$CL_{int}$ [ $\mu$ L/min/mg] (murin / human)
<b>Ibrutinib</b>	1 / 2	1984 / 234
<b>24</b>	11 / 3	124 / 154
<b>25</b>	9 / 2	152 / 194

Der Metabolismus von Ibrutinib ist detailliert beschrieben und es wurde gezeigt, dass der Wirkstoff zu vielen Metaboliten abgebaut wird, hauptsächlich durch CYP3A4 und zu einem

---

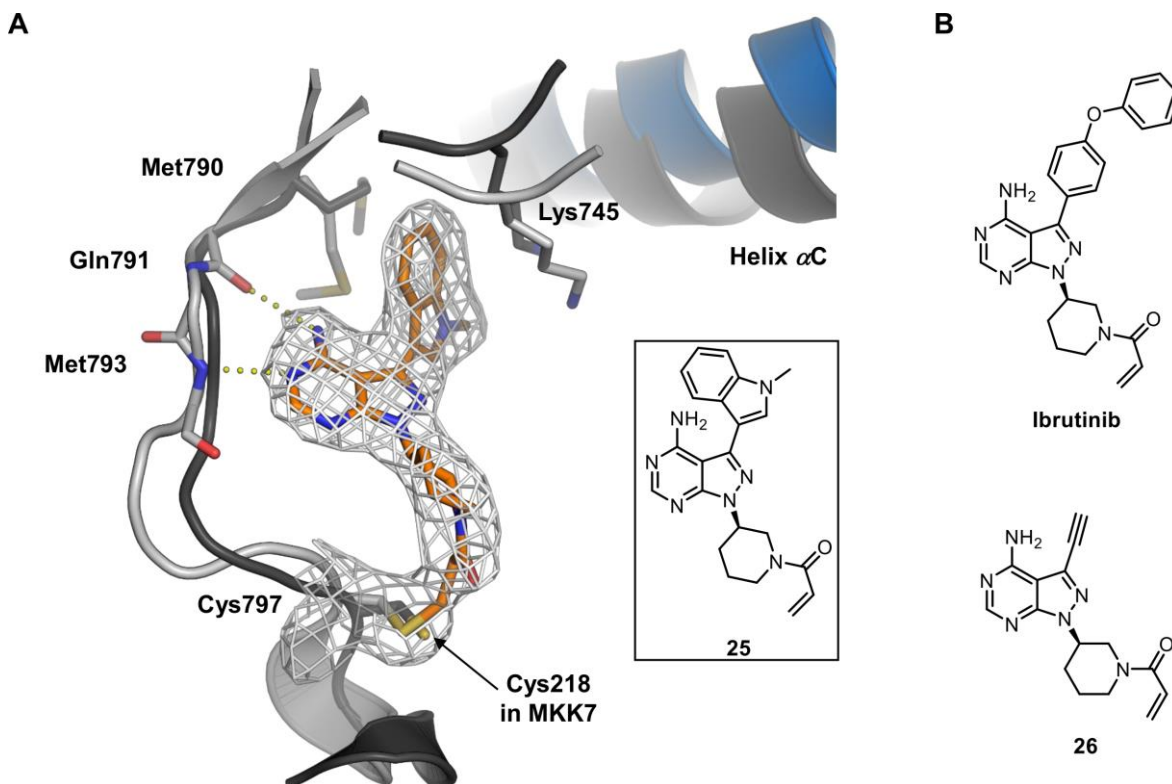
geringeren Teil über CYP2D6. Die Hauptabbauege sind Hydroxylierung des Phenyls, Ringöffnung des Piperidins und Epoxidierung der Ethyleneinheit. Hierbei entsteht der aktive Metabolit PCI-45227, ein Dihydrodiol-Derivat, durch vorherige Epoxidierung des Acrylamids. Dieser Metabolit inhibiert BTK ca. 15-fach weniger potent im Vergleich zu Ibrutinib, aufgrund der ausbleibenden irreversiblen Bindung an das Protein.<sup>175, 180</sup> Im mikrosomalen Stabilitätsassay zeigte Ibrutinib sowohl in murinen als auch in humanen Lebermikrosomen eine sehr hohe *Clearance* (1984 und 234  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ). Der synthetisierte Inhibitor **24** dagegen stach besonders in Gegenwart muriner Mikrosomen mit einer 16-fach höheren Stabilität im Vergleich zur Referenzverbindung Ibrutinib hervor (124  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ). Das reversible Gegenstück **25** zeigte in beiden Modellsystemen leicht höhere, aber dennoch vergleichbare Stabilitäten wie **24**. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Einführung des Triazol-verbrückten Acetophenons (im Vergleich zur Phenylether-Einheit in Ibrutinib) das CYP-Spektrum derartig verändert, sodass die synthetisierten Inhibitoren weniger anfällig für Metabolismus Phase-I-Reaktionen waren. Obwohl die erhebliche Verbesserung von **24** hervorzuheben ist, wurde der Inhibitor innerhalb von 60 min fast komplett abgebaut.

Verbindung **24** wurde auch hinsichtlich zellulärer Aktivität, Selektivität gegenüber anderen Proteinkinasen sowie weiterer pharmakokinetischer Parameter charakterisiert und soll im Folgenden näher beschrieben werden.<sup>59</sup>



### 3.3 Charakterisierung und Evaluierung von Pyrazolopyrimidin **24**

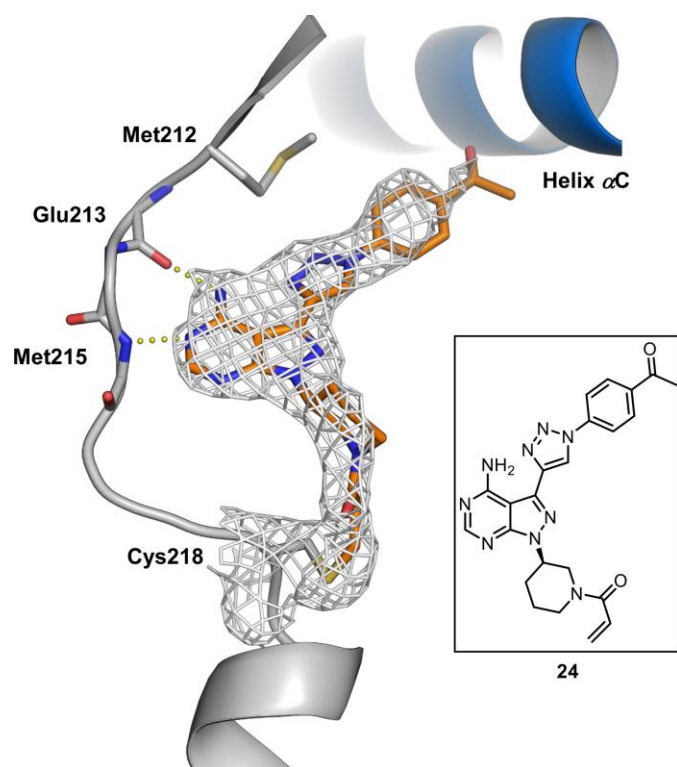
In vorangegangenen Arbeiten wurden Pyrazolopyrimidin-basierte Inhibitoren publiziert, welche die Türsteher-Mutation (T790M) in EGFR adressieren.<sup>159</sup> Die Überlagerung einer EGFR Komplex-Kristallstruktur mit gebundenem Pyrazolopyrimidin (**25**, PDB: 5J9Z) und einer MKK7 Apo-Struktur (PDB: 2DYL) zeigte eine hohe strukturelle Ähnlichkeit bezüglich der ATP-Bindungstasche (Abb. 21A).



**Abbildung 21.** A Überlagerung der Kristallstruktur von EGFR-T790M im Komplex mit Pyrazolopyrimidin **25** (orange, PDB: 5J9Z) und einer MKK7 Apo-Struktur (dunkelgrau, PDB: 2DYL). B Chemische Strukturen von Ibrutinib und Alkin-Baustein **26**.

Beiden Kinasen gemeinsam ist die Türsteher-Aminosäure Methionin, das konservierte Lysin sowie ein Cystein am Ende der Scharnierregion.<sup>59</sup> Des Weiteren wurde für Ibrutinib, ein Pyrazolopyrimidin-basierter BTK Inhibitor beschrieben, MKK7 als ein *off-target* zu treffen (Abb. 21B).<sup>181</sup> Somit wurden Pyrazolopyrimidine als geeignete Liganden für die gezielte Adressierung von MKK7 identifiziert. Zusätzlich wurde durch eine Analyse der Bindungstasche Raum für weitere Derivatisierung in der allosterischen Tasche zwischen der Türsteher-Aminosäure und dem katalytischen Lysin identifiziert, wobei Alkin-Baustein **26** als geeigneter Startpunkt für Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Cycloadditionen (*copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*, CuAAC) diene (Abb. 21B). Auf diese Weise wurde eine fokussierte Substanzbibliothek erstellt und Verbindung **24** wurde mit hoher biochemischer Aktivität von 10 nM gegen MKK7 und Selektivität gegenüber EGFR

und der L858R/T790M-Mutante als Spitzenkandidat identifiziert. In MS-Experimenten wurde eine kovalente Bindung an MKK7 nachgewiesen und Kristallisationsstudien lieferten den eindeutigen Beweis der kovalenten Bindungsbildung von **24** an Cys218 (Abb. 22).<sup>xii, 59</sup>



**Abbildung 22.** Kristallstruktur von MKK7 im Komplex mit Pyrazolopyrimidin **24** (orange, PDB: 6IB2).

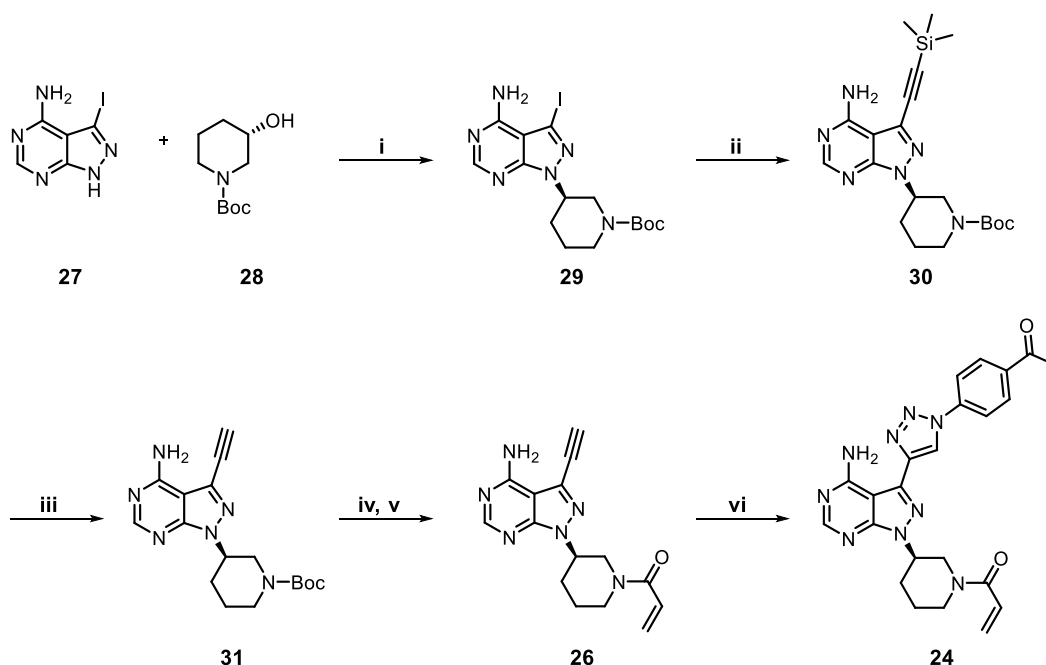
Für die bisherigen biochemischen Untersuchungen und Kristallisationsstudien waren Inhibitormengen im einstelligen Milligrammbereich ausreichend. Für weitergehende Studien, wie eine pharmakokinetische Charakterisierung, Formulierungsstudien und folgende *in vivo* Experimente waren zunächst größere Mengen an Inhibitor notwendig (>0.5 g). Hierzu konnten bereits optimierte Synthesevorschriften genutzt werden, die im Folgenden beschrieben werden.

<sup>xii</sup> Die biochemische Charakterisierung sowie die Kristallisationsstudien wurden von M. Sc. Patrik Wolle im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt, TU Dortmund (AG Rauh).

### 3.3.1 Hochskalierung der Synthese von Pyrazolopyrimidin **24**

Für die Darstellung der Zielverbindung **24** konnte auf eine bereits etablierte Syntheseroute zurückgegriffen werden (Schema 1).<sup>43, 159</sup>

**Schema 1.** Syntheseroute zur Darstellung von **24**.

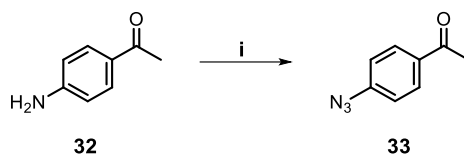


**Reagenzien und Bedingungen:** (i) THF, PPh<sub>3</sub>, DIAD, 40 °C, 45 min, Ultraschallbad; (ii) DCM, TEA, Cu(I), TMSA, Tetrakis, 0 °C zu rt, 2 h; (iii) MeOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, rt, 1 h; (iv) DCM:TFA (4:1), 0 °C zu rt, 1 h; (v) THF, DIPEA, Acryloylchlorid, 0 °C, 45 min; (vi) H<sub>2</sub>O:BuOH (1:1), Cu(II)SO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, Natriumascorbat, Azid **33**, rt, 3 h.

Zunächst wurden die beiden kommerziell erhältlichen Startmaterialien **27** und **28** mittels Mitsunobu-Reaktion in den gewünschten Baustein **29** überführt. Hierbei wurden insgesamt 22 g des 4-Aminopyrazolo[3,4-d]pyrimidins umgesetzt und **29** konnte mit einer Ausbeute von 43 % (16,2 g) erhalten werden. Der Grund für die moderate Ausbeute ließ sich auf die schwierige Abtrennung des Triphenylphosphinoxids zurückführen, weshalb das Aufreinigungsprotokoll eine aufwendige und mehrmals durchzuführende säulenchromatographische Aufreinigung beinhaltete. Im Verlauf der Arbeit ergab sich die Möglichkeit, Baustein **29** kommerziell zu erwerben, wodurch die Schwierigkeiten umgangen werden konnten. Im nächsten Schritt wurde das trimethylsilylierte Alkin **30** über eine Amin-vermittelte palladiumkatalysierte Sonogashira-Kupplungsreaktion erschlossen (59 %). Anschließend wurde die Trimethylsilyl-Schutzgruppe unter basischen Konditionen in Methanol entfernt. Die Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe erfolgte mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan, sodass das dabei entstehende freie Amin im Anschluss mit Acryloylchlorid in Gegenwart von DIPEA zum Alkin-Baustein **26** umgesetzt werden konnte (19 % über zwei Schritte). Im letzten Schritt wurde mittels

Kupfer-katalysierter Alkin-Azid Cycloaddition das finale Produkt **24** dargestellt (75 %). Das eingesetzte Azid wurde im Vorfeld aus dem entsprechenden Amin hergestellt (Schema 2).

**Schema 2.** Syntheseschritt zur Darstellung des Azids **33**.

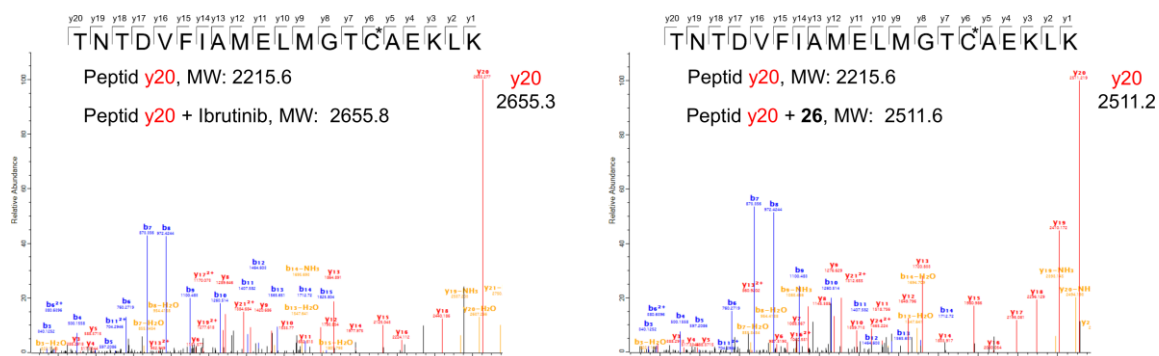


**Reagenzien und Bedingungen:** (i) H<sub>2</sub>O, HCl, NaNO<sub>2</sub>, NaN<sub>3</sub>, 0 °C zu rt, 90 min.

Im Rahmen dieser Arbeit und basierend auf der oben beschriebenen Syntheseroute wurden 31 g (3*R*)-1-Boc-3-(4-amino-3-iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin (**29**) unter den aufgeführten Bedingungen zu 1 g **24** umgesetzt, das somit für alle weiteren Experimente verfügbar war.

### 3.3.2 MS/MS-basierter Nachweis der kovalenten Bindung an Cys218 in MKK7

Die kovalente Modifikation eines gewünschten Cysteins kann mittels MS/MS-Analyse oder durch Komplexkristallstrukturen eindeutig dargestellt werden. Komplexkristallstrukturen liefern ein detailliertes Bild über den Bindungsmodus und bieten eine exzellente Grundlage für das Design von Inhibitor-spezifischen Modifikationen. Ko-Kristallstrukturen sind oftmals nicht einfach zu generieren, sodass ein tryptischer (In-Gel-)Verdau des Proteins mit gekoppelter MS/MS-Analyse eine gute Möglichkeit darstellt, die kovalente Modifikation des gewünschten Cysteins nachzuweisen. Hierzu wurden die Verbindungen **24**, **26** und Ibrutinib nach Inkubation mit MKK7 unter Zugabe der Serinprotease Trypsin verdaut und die entstandenen Peptidfragmente massenspektrometrisch analysiert. Die Analyse zeigte das Peptidfragment TNTDVFIAMELMGTC<sub>218</sub>AEKLN, welches das designierte Cystein 218 enthielt und durch Massenzunahme in diesem Fragment um die jeweilige Inhibitormasse konnte für Ibrutinib und **26** die Alkylierung an Cys218 erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 23).

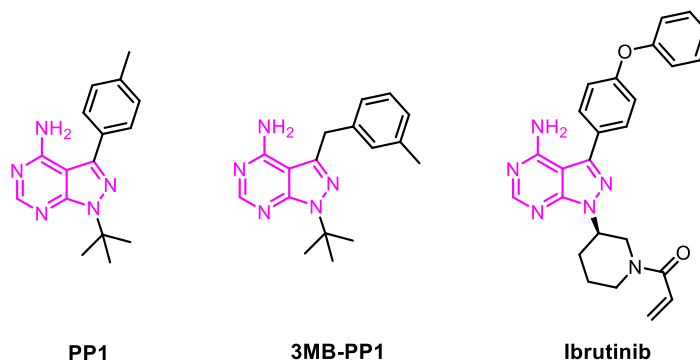


**Abbildung 23.** MS/MMS Spektrum von MKK7 nach Inkubation mit Ibrutinib (links) und Verbindung **26** (rechts), tryptischem In-Gel-Verdau und Auswertung des erhaltenen Peptidfragments TNTDVFIAEMLMGTC<sub>218</sub>AEKLLK.

Unglücklicherweise konnte das gesuchte Peptid in der Probe mit **24** nicht identifiziert werden. Die Proteinsequenzabdeckung lag in dieser Probe bei lediglich 80 %, wohingegen in den Proben mit Ibrutinib und **26** die Abdeckung bei 93 % lag. Es ist denkbar, dass die Protease nicht vollständig geschnitten hat, wodurch das gewünschte Peptidfragment nicht identifiziert werden konnte.

### 3.3.3 Selektivitätsprofil von Pyrazolopyrimidin **24**

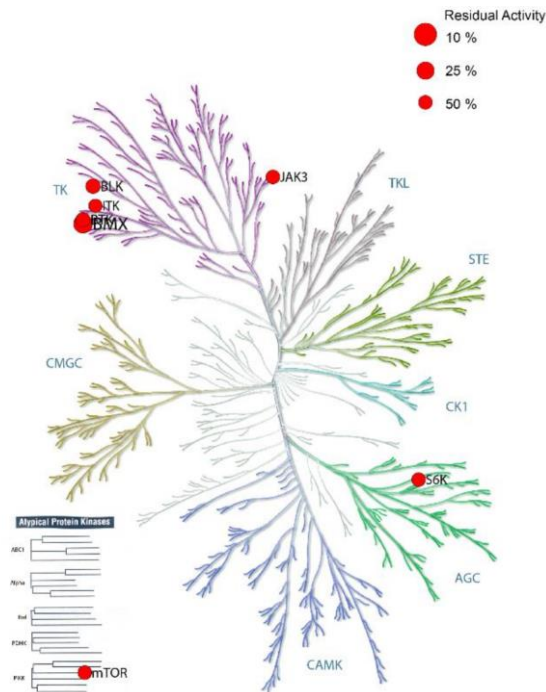
Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine sind bekannte Strukturelemente bei Kinaseinhibitoren und stellen bspw. das Grundgerüst der Inhibitoren PP1, 3MB-PP1 (ein PP1 Analog) sowie Ibrutinib dar (Abb. 24).



**Abbildung 24.** Chemische Strukturen von Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidinen.

Eine besonders große Herausforderung in der Entwicklung von Kinaseinhibitoren stellt die Selektivität zu anderen Proteinkinasen dar, da die ATP-Bindungstasche hochkonserviert ist. Der zunächst als cSrc-selektiv beschriebene Inhibitor PP1 zeigte in weiterführenden Studien ebenfalls Aktivität gegenüber anderen Proteinkinasen wie z.B. EGFR, KIT und ABL.<sup>182-183</sup>

Das Selektivitätsprofil von Ibrutinib zeigte eine Vielzahl von adressierten *off-targets* neben BTK<sup>184</sup>, weshalb die Selektivität von Verbindung **24** in einem Kinase Selektivitätsassay (durchgeführt von der Firma ProQinase) bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M gegen ein Set von 320 Kinasen eruiert werden sollte (Abb. 25).



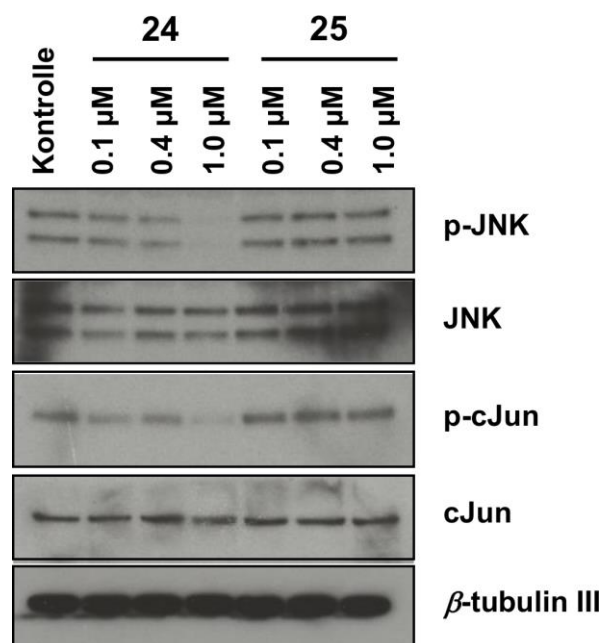
**Abbildung 25.** Kinom-Dendrogramm von **24** bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M gegen ein Set von 320 Kinasen (ProQinase). Das Kinom-Dendrogramm wurde mit Hilfe von Kinome Render illustriert (Cell Signaling Technology, Inc.). (M. Chartier, T. Chenard, J. Barker, R. Najmanovich, PeerJ 2013, 1, e126.)

Verbindung **24** zeigte ein exzellentes Selektivitätsprofil wobei sieben weitere Kinasen, nämlich BLK, BMX, BTK, ITK, JAK3, mTOR und S6K, zu ca. 50 % inhibiert wurden. Cys218 in MKK7 ist am unteren Ende der Scharnierregion lokalisiert und an analoger Position in zehn weiteren Kinasen vorhanden. Darunter waren die *off-target*-Kinasen BLK, BMX, BTK, ITK und JAK3, wobei mTOR und S6K kein vergleichbares Cystein aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich ein vielversprechendes Selektivitätsprofil von Verbindung **24** festhalten, welche in zukünftigen Studien für eine umfassende Analyse gegen das gesamte Kinom getestet werden sollte.

### 3.3.4 Zelluläre Analyse von Pyrazolopyrimidin **24**

Neben der biochemischen Charakterisierung erfolgte zudem eine zelluläre Evaluierung, um den Einfluss der Verbindungen auf die Phosphorylierung von JNK und den nachgeschalteten Transkriptionsfaktor cJun zu ermitteln. Hierzu wurden Nervenzellen verwendet (*dorsal root ganglion (DRG) neurons*, Spinalganglionen), die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Josef M. Penninger etabliert wurden.<sup>xiii</sup> Getestet wurden **24** und das reversible Gegenstück **25** bei Konzentrationen von 1 – 0,1  $\mu\text{M}$  (Abb. 26).



**Abbildung 26.** Western Blot Analyse von **24** und **25** gegen den JNK-Signalweg.

Durch die Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass Verbindung **24** auch einen Effekt auf zellulärer Ebene bei 1  $\mu\text{M}$  hat, sowie die Runterregulierung des nachgeschalteten p-JNK und p-cJun Signals bei jeweils gleichbleibender Gesamtproteinmenge von JNK und cJun. Der reversible Inhibitor **25** konnte keinen Effekt auf die Zellen ausüben, wodurch die Bedeutung der kovalenten Bindungsbildung von **24** hinsichtlich der potenten Inhibition von MKK7 im zellulären Kontext untermalt wurde. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den erhobenen biochemischen Daten für Verbindung **25** ( $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$  gegen MKK7), die ebenfalls keine Aktivität gegenüber MKK7 zeigte. Das vielversprechende biochemische und zelluläre Profil von **24**, sowie die hohe Selektivität gegenüber anderen Tyrosinkinasen veranlasste uns, tiefere Untersuchungen hinsichtlich pharmakokinetischer Eigenschaften durchzuführen.

<sup>xiii</sup> Western Blot Experimente wurden von Dr. Shane J. F. Cronin aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Josef M. Penninger (IMBA in Wien) durchgeführt.

### 3.3.5 Pharmakokinetische *in vitro*-Profilierung von Pyrazolopyrimidin **24**

Pharmakokinetische Parameter wie Permeabilität, Löslichkeit, Stabilität im Blutplasma oder mikrosomale Stabilität sind entscheidend für den Erfolg von Wirkstoffkandidaten während der Entwicklungsphase. Daher ist es von Vorteil die *in vitro*-ADME Charakterisierung zu einem möglichst frühen Zeitpunkt durchzuführen und Verbindung **24** sowie die Referenzverbindung Ibrutinib wurden einer *in vitro*-Profilierung unterzogen (Tab. 6).

**Tabelle 6.** *In vitro* pharmakokinetische Parameter für Ibrutinib und **24**.

PK-Parameter	Ibrutinib	<b>24</b>
<b>Kinetische Löslichkeit<sup>a</sup></b>		
cLogP <sup>b</sup>	3.63	1.78
SolRank, pH 7.4 [ $\mu$ M]	36	8
TurbiSol, pH 7.4 [ $\mu$ M]	40-50 $\mu$ M	10-20 $\mu$ M
<b>Permeabilität<sup>a</sup></b>		
PAMPA (% Flux)	38	n.b.
Caco-2 P <sub>app</sub> (A-B) [ $\times 10^{-6}$ cm/s]	40	20
Caco-2 P <sub>app</sub> (B-A) [ $\times 10^{-6}$ cm/s]	0.9	13
Caco-2 Verhältnis P <sub>app</sub> ((B-A) / (A-B))	0.02	0.6
<b>Stabilität<sup>a</sup></b>		
Plasmastabilität murin / human [%]	97.5 / 79.7	70.4 / >99
Plasmaproteinbindung murin / human [%]	98.9 / 97.6	92.7 / 96.0
Mikrosomale Stabilität Phase I (CL <sub>int</sub> ) murin / human [ $\mu$ L/min/mg] <sup>c</sup>	1984 / 234	124 / 154
Halbwertszeit murin / human [min] <sup>c</sup>	2 / 1	3 / 11

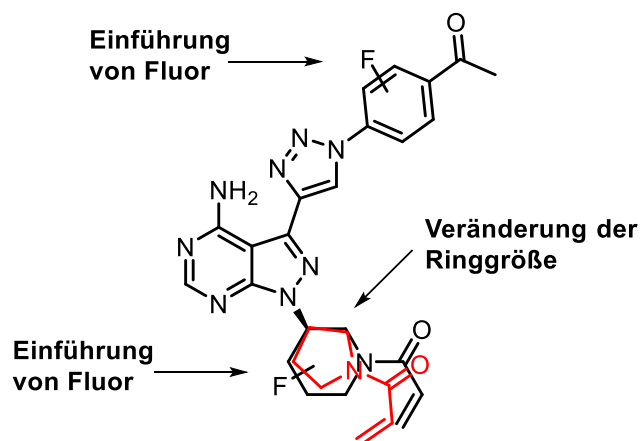
<sup>a</sup>Durchgeführt und ausgewertet von Dr. Matthias Baumann und Dr. Anke Unger vom Lead Discovery Center in Dortmund. <sup>b</sup>cLogP wurde mit der Software Seurat berechnet. <sup>c</sup>Im Rahmen dieser Arbeit erhobene Daten. n.b. = nicht bestimmt.

Verbindung **24** zeigte im kinetischen Löslichkeitsassay (SolRank) eine geringe wässrige Löslichkeit von 8  $\mu$ M. Ibrutinib wies eine moderate Löslichkeit von 36  $\mu$ M auf, obwohl die berechneten cLogP-Werte den entgegengesetzten Trend vermuten ließen. Lipophilie, also die Verteilung einer Substanz zwischen einer Wasser- und Octanolphase wird durch den Verteilungskoeffizienten *P* (*partition coefficient*) bestimmt, wobei in der Regel der Logarithmus dieser Größe betrachtet wird (LogP).<sup>185</sup> Praktische Anwendung findet häufig der berechnete LogP (*calculated* LogP, cLogP). Ein hoher cLogP bedeutet eine eher lipophile Verbindung und somit eine verminderte wässrige Löslichkeit. Der im Vergleich zu Ibrutinib geringere cLogP von 1.78 hatte dennoch eine schlechtere Löslichkeit von **24** zur Folge, sodass ein weiterer Löslichkeitsassay (TurbiSol) durchgeführt wurde, um die Ergebnisse des SolRank-Assays zu bestätigen.



---

Hierbei wurde die Aggregation der Testsubstanz mit steigender Konzentration anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen, sodass hier lediglich ein Präzipitationsbereich zwischen 10 und 100  $\mu\text{M}$  angegeben werden. Die Ergebnisse des TurbiSol Assays waren in der gleichen Größenordnung wie die Daten aus dem SolRank Assay, sodass **24** trotz des kleineren cLogP-Wertes eine schlechte Löslichkeit im Vergleich zu Ibrutinib aufwies. Der nicht zu bestimmende Fluss über die artifizielle Membran im PAMPA Assay liegt vermutlich in der geringen Löslichkeit begründet. Ein sehr viel komplexeres Modellsystem stellte der Caco-2 Assay dar, in welchem die Permeabilität über eine Caco-2-Zellmonoschicht zur Abschätzung der oralen Bioverfügbarkeit untersucht wurde. Hierbei wurde der bidirektionale Fluss von apikaler (A) zu basolateraler (B) Seite sowie von basolateraler zur apikalen Seite ermittelt, anhand dessen das Effluxverhältnis abgeleitet wurde. Ibrutinib und Verbindung **24** zeigten eine hohe zelluläre Permeabilität von A zu B mit 40 bzw.  $20 \times 10^{-6}$  cm/s. Deutlich geringere Effluxwerte von 0.9 bzw.  $13 \times 10^{-6}$  cm/s ließen eine gute orale Absorption vermuten. In weiteren Analysen wurde die Stabilität der Verbindung in verschiedenen Milieus untersucht, wie bspw. die chemische Stabilität im Blutplasma. Hierbei wurde eine gute Stabilität von **24** in menschlichem Blutplasma von >99 % festgestellt und ist somit überlegen zu der Stabilität von Ibrutinib mit 79.9 %. Erwartungsgemäß zeigte sich eine hohe Plasmaproteinbindung von > 92 % für beide Testsubstanzen. Eine hohe Plasmaproteinbindung von kovalenten Kinaseinhibitoren ist in der Literatur beschrieben und konnte für beide Testsubstanzen erhalten werden.<sup>186</sup> Die metabolische Stabilität in Lebermikrosomen wurde bereits in Abschnitt 3.1.4 beschrieben. Zusammenfassend lässt sich für die pharmakokinetische *in vitro*-Profilierung von **24** ein vielversprechendes Profil festhalten. Ungeachtet dessen besteht Optimierungsbedarf zum einen bei der Löslichkeit, zum anderen sollte die Stabilität in Lebermikrosomen erhöht werden. Eine generelle Strategie zur Erhöhung der metabolischen Stabilität ist die chemische Modifikation des Inhibitors, wie die Einführung von Fluor, Chlor oder Nitrilen, die bspw. eine Hydroxylierung durch Cytochrom P450 Enzyme an entsprechender Stelle unterbinden. In zukünftigen Arbeiten könnte in Bezug auf Verbindung **24** die Einführung von Fluor z.B. am aromatischen Ring sowie am Piperidinring erfolgen, wodurch eine Hydroxylierung bzw. Oxidation unterbunden werden könnte (Abb. 27).



**Abbildung 27.** Mögliche chemische Modifikationen von Verbindung **24** zur Optimierung der metabolischen Stabilität.

Strukturelle Änderungen können die Bindungseigenschaften von Inhibitoren zu Cytochrom P450 Enzymen verändern und somit die Affinität gegenüber diesen Enzymen reduzieren, um die metabolische Stabilität einer Verbindung zu erhöhen. Veränderungen hinsichtlich der Ringgröße (z.B. Cyclopentan statt Cyclohexan, Abb. 27) oder die Maskierung bzw. Entfernung von metabolisch instabilen Gruppen, wie *N*- oder *O*-Alkylierungen (z.B. Methoxymethyl) sind Beispiele für generelle Strategien, um die metabolische Stabilität von Verbindungen während des Phase-I-Metabolismus zu erhöhen.<sup>187</sup>

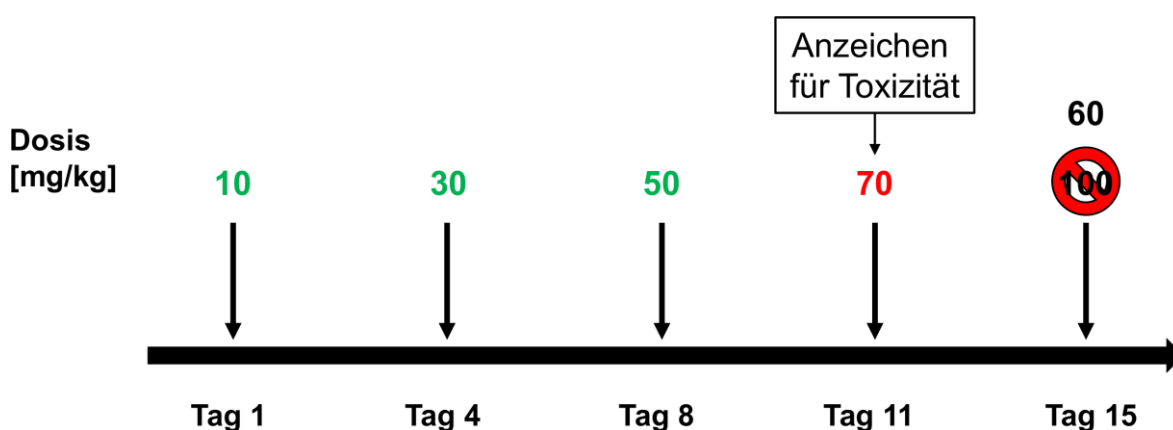
### 3.3.6 *In vivo* PK-Profilierung von Pyrazolopyrimidin **24**

Aufgrund des vielversprechenden *in vitro* pharmakokinetischen Profils wurde Verbindung **24** in *in vivo* Mausstudien hinsichtlich der Bioverfügbarkeit untersucht. Um die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffkandidaten in Mäusen zu untersuchen, stehen drei relevante Applikationsrouten zur Verfügung: intravenös (IV), intraperitoneal (IP) und peroral (PO). Hierbei ist es von besonderer Wichtigkeit eine geeignete Formulierung zu finden, die zu einer vollständigen Löslichkeit der Verbindung führt.

Folglich wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Susanne Terheyden vom Lead Discovery Center in Dortmund Formulierungsexperimente mit **24** durchgeführt. Im Rahmen dieser Formulierungsstudien wurde nach Durchmusterung von verschiedenen Komponenten und Mischungsverhältnissen für die höchst mögliche Konzentration von 7 mg/mL folgende Zusammensetzung gefunden, bei der die Verbindung vollständig gelöst war: 10 % DMSO, 50 % PEG400 und 40 % einer 40 %igen (2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD) Lösung. Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide, die als Löslichkeitsvermittler agieren können.

Sie stellen eine Möglichkeit dar, die Löslichkeit von lipophilen Verbindungen durch Komplexierung mit dem Cyclodextrin zu verbessern. Die hydrophoben Kavitäten des Zuckers ermöglichen die Einlagerung der Verbindung, was eine gesteigerte Löslichkeit zur Folge hat. PEG400 ist ein hydrophiler, löslichkeitsvermittelnder Hilfsstoff in der pharmazeutischen Galenik.<sup>188</sup> Ziel einer jeden Formulierung sollte es sein, den Anteil an organischem Lösungsmittel so gering wie möglich zu halten. 60 % organischer Anteil in der ermittelten Formulierung verdeutlichen die mangelnde Löslichkeit von Verbindung **24** und stehen in Korrelation zu den ermittelten *in vitro* SolRank Daten (Tab. 6), die bereits eine mangelnde Löslichkeit der Verbindung prognostizierten.

Mit dieser für Inhibitor **24** ermittelten Formulierung wurde im nächsten Schritt die maximal tolerierbare Dosis (*maximum tolerated dose*, MTD) bestimmt. Darunter wird die höchste Dosis der Testsubstanz verstanden, bei welcher keine unannehmbaren Nebenwirkungen (erste Anzeichen von Toxizität) auftreten. Die generelle Durchführung zur Bestimmung der MTD ist in nachfolgender Abbildung gezeigt (Abb. 28).



**Abbildung 28.** Generelle Durchführung zur Bestimmung der MTD. Die MTD-Studien wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jan G. Hengstler am Leibnitz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund durchgeführt.

In einem festgelegten Rhythmus von drei bzw. vier Tagen wird sukzessive die Dosis erhöht, angefangen am ersten Tag mit 10 mg der Testsubstanz pro kg Körpergewicht der Maus. Werden bspw. bei 70 mg/kg Körpergewicht erste Anzeichen von Unverträglichkeiten oder Verhaltensauffälligkeiten bei den Mäusen festgestellt, wird am nächsten Applikationstag (Tag 15) eine Dosis zwischen der zuvor noch gut verträglichen (50 mg/kg) und der toxischen Dosis (70 mg/kg) gewählt. Anhand dieses Beispiels würden an Tag 15 folglich 60 mg/kg getestet werden, um entweder 50 oder 60 mg der Testsubstanz pro kg Körpergewicht der Maus als MTD zu identifizieren. Erfahrungsgemäß wurde in vorangegangenen MTDs anderer Projekte unserer Arbeitsgruppe (EGFR: Verbindung **25** und Akt: Borussertib) bis zu einer Konzentration von 20 mg/kg Körpergewicht der Mäuse

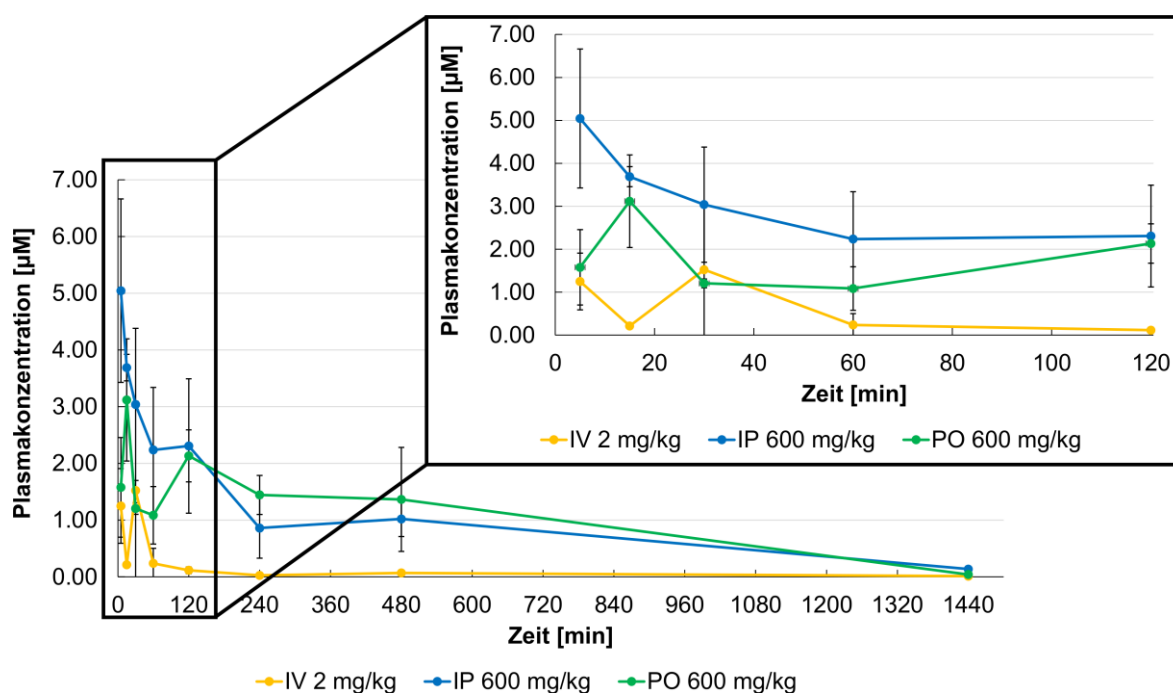
eskaliert<sup>43</sup>, weshalb die ermittelte Formulierung für 70 mg/kg von Verbindung **24** ausreichend sein sollte. Unglücklicherweise führte die Formulierung am IfADo zu einer nicht vollständig gelösten Substanz, sodass die Ermittlung der MTD sowie auch die anschließende PK-Studie mit einer Suspension von 70 mg/kg von Verbindung **24** durchgeführt wurde. Der Grund für die nicht gelungene Reproduzierbarkeit verblieb unklar.

Im Rahmen der MTD Studie für **24** zeigten sich keine Anzeichen von Toxizität, sodass bis zu einer hohen Dosierung von 600 mg/kg Körpergewicht der Maus eskaliert wurde (entspricht dem absoluten Maximum am IfADo) ohne Anzeichen von Unverträglichkeiten oder unerwünschten Begleiterscheinungen. Bereits jetzt konnte von einer guten Verträglichkeit der Testsubstanz **24** ausgegangen werden.

Mit dieser hohen Dosierung wurde im Folgenden eine PK-Studie durchgeführt (Tab. 7 und Abb. 29).

**Tabelle 7.** *In vivo* pharmakokinetische Parameter für **24**.

Parameter	IV (2 mg/kg)	IP (600 mg/kg)	PO (600 mg/kg)
$t_{1/2}$ (h)	6.87	5.65	3.83
$t_{max}$ (h)	0.5	0.08	0.25
$c_{max}$ [ng/ml] <sup>a</sup> / [μM] <sup>b</sup>	696.75 <sup>a</sup> / 1.52 <sup>b</sup>	2307.81 <sup>a</sup> / 5.04 <sup>b</sup>	1426.71 <sup>a</sup> / 3.12 <sup>b</sup>
AUC 0-t [h*ng/mL]	971.6	9865.3	10809.9
AUC 0-inf_obs [h*ng/mL]	1036.2	10377.2	10916.7
CL/F_obs [l/h/kg]	1.95	57.82	54.96
Vz/F_obs [l/kg]	19.30	471.02	303.91
F [%] <sub>0-inf_obs</sub>	-	3.37	3.55



---

**Abbildung 29.** *In vivo* Mausstudie mit 600 mg/kg **24** nach intraperitonealer (IP, n=3) und peroraler (PO, n=3) Applikation in 10 % DMSO, 50 % PEG400 und 40 % einer 40 %igen HP $\beta$ CD-Lösung und 2 mg/kg nach intravenöser (IV, n=3) Gabe in 100 % DMSO. Blutproben wurden nach 5, 15, 30, 60, 120, 240, 480 und 1440 min entnommen und im Anschluss mittels LCMS/MS analysiert. Die analytische Auswertung wurde von Dr. Matthias Baumann und Dr. Anke Unger vom Lead Discovery Center GmbH in Dortmund vorgenommen. **Rechts:** Vergrößerung der ersten fünf Zeitpunkte der Blutentnahmen.

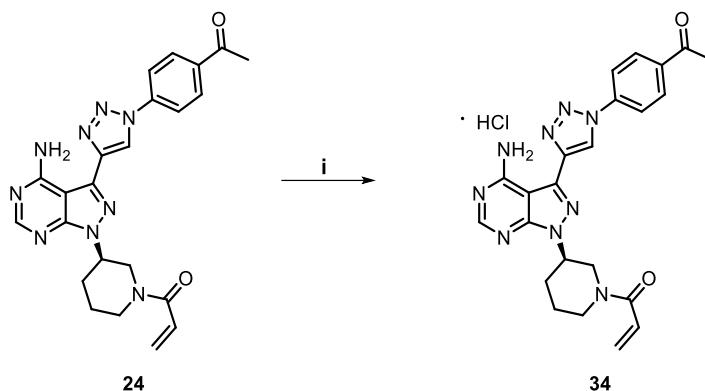
Ein Charakteristikum bei der IV-Applikation ist die schnelle Anflutung der Substanz. Intravenös verabreichte Substanzen erfahren keinen *First-Pass*-Effekt, wodurch sie ungehindert in den Blutkreislauf gelangen und somit eine hohe Bioverfügbarkeit zur Folge haben ( $F = 100\%$ ). Daher sind in der Regel schon geringe Dosierungen für eine klinisch relevante Wirkung ausreichend. Mittels der Daten aus der IV-Route wurden die Bioverfügbarkeiten der IP und PO Applikationen berechnet (Abb. 29 und Tab. 7). Unglücklicherweise konnte hierbei kein rasches Anfluten von **24** beobachtet werden, sodass eine maximale Plasmakonzentration ( $C_{max}$ ) von 1.52  $\mu\text{M}$  nach 30 min ( $t_{max}$ ) gemessen wurde. Die sehr niedrige *Clearance* ( $CL/F_{obs}$ ) von 1.95 l/h/kg geht einher mit einer hohen Halbwertszeit von fast 7 Stunden. Im Vergleich dazu wurden bei der intraperitonealen und peroralen Gabe maximale Plasmakonzentrationen von 5.04 und 3.12  $\mu\text{M}$  nach 5 bzw. 15 min beobachtet. Die Plasmakonzentration-Zeit-Profile für IP und PO zeigten keine standardmäßigen Kurvenverläufe, was bspw. durch den wellenförmigen Verlauf nach PO-Gabe deutlich wurde. Hierbei kann es aufgrund der hohen Dosierung und mangelnden Löslichkeit der Substanz zu einem Depot-Effekt gekommen sein. Darunter wird die Ansammlung der nicht gelösten Substanz verstanden, die nach und nach resorbiert wird und wie ein Depot im Körper fungiert. Dies könnte den erneuten Anstieg der Plasmakonzentration bei 120 min erklären. Bei der IP Applikation könnte die maximale Plasmakonzentration nach bereits 5 min auf ein durch die Injektion verletztes Blutgefäßes hindeuten, weshalb beim ersten Zeitpunkt die Plasmakonzentration maximal ist.

Abschließend lassen sich aus der *in vivo* Mausstudie folgende Erkenntnisse ziehen: Verbindung **24** ist besonders gut in allen drei Applikationsrouten vertragen worden, ohne dass die Tiere Anzeichen von Toxizität zeigten sowie Plasmakonzentrationen im mikromolaren Bereich gemessen wurden. Aufgrund der nicht vollständig gelösten Substanz sollte in weiterführenden Experimenten die Löslichkeit von Verbindung **24** verbessert und die Bioverfügbarkeit in einer erneuten PK-Studie analysiert werden.

### 3.3.7 Darstellung von Salzformen zur Verbesserung der Löslichkeit von Pyrazolopyrimidin **24**

Das Konzept der Salzbildung wurde bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben und aufgrund der potentiellen Vorteile auf Verbindung **24** angewendet, wobei drei unterschiedliche Salzformen dargestellt und anschließend in einem thermodynamischen Löslichkeitsassay analysiert wurden.

**Schema 3.** Syntheseschritt zur Darstellung verschiedener Salzformen am Beispiel des HCl-Salzes **34**.



**Reagenzien und Bedingungen:** (i) H<sub>2</sub>O:MeCN (1:1); 1 eq 1M HCl; lyophilisieren 16 h.

Auf diese Weise wurden erfolgreich ein HCl-Salz, ein Mesylat und ein TFA-Salz dargestellt und in einem thermodynamischen Löslichkeitsassay (ThermoSol) charakterisiert (Tab. 8).

**Tabelle 8.** Ergebnisse des thermodynamischen Löslichkeitsassays (ThermoSol) in einer ungepufferten, wässrigen Lösung und in PBS bei pH 7.4 für die Salzformen **34-36** im Vergleich zur freien Base **24**.

Thermodynamische Löslichkeitsbestimmung		
	Ungepufferte Lösung [ $\mu$ M]	PBS bei pH 7.4 [ $\mu$ M]
<b>Freie Base (24)</b>	29.3 $\pm$ 3.7	122.9 $\pm$ 11.2
<b>HCl-Salz (34)</b>	825.6 $\pm$ 57.3	63.2 $\pm$ 5.2
<b>Mesylat (35)</b>	612 $\pm$ 99.4	54.4 $\pm$ 2.6
<b>TFA-Salz (36)</b>	314.3 $\pm$ 38	62.3 $\pm$ 4.9

Hierbei wurden die Verbindungen bei einer Konzentration von 2 mg/mL eingelöst und für 24-48 h geschüttelt. Über die gesamte Inkubationsdauer ergab sich eine gesättigte Lösung. Nach Inkubation wurde der Überstand abgenommen, filtriert und in technischen Duplikaten verschiedener Verdünnungen (100-, 500- und 1000-fach) mittels LCMS/MS analysiert. Für die freie Base **24** wurde im ungepufferten, wässrigen Milieu eine geringe Konzentration von 29  $\mu$ M detektiert, woraus geschlossen werden konnte, dass der Großteil der eingesetzten Substanz ungelöst vorlag.

Eine 28-fach erhöhte Löslichkeit konnte für das HCl-Salz ermittelt werden, für das eine Konzentration von 826  $\mu\text{M}$  gemessen wurde. Ebenfalls deutlich gesteigert werden konnte die Löslichkeit durch das Mesylat, wobei hier eine 20-fach höhere Löslichkeit ermittelt werden konnte. Lediglich eine zehnfache Steigerung wurde für das TFA-Salz beobachtet und ergab somit eine gemessene Konzentration von 314  $\mu\text{M}$ . Parallel dazu wurde die thermodynamische Löslichkeit der vier Verbindungen in PBS bei pH 7.4 bestimmt. Hierbei ergab sich ein inverser Trend: für die freie Base wurde eine Konzentration von 123  $\mu\text{M}$  gemessen, die vergleichsweise etwa doppelt so hoch war wie die Konzentrationen der Salzformen. Folglich ist die pH-Abhängigkeit der Verbindungen zu nennen, da sich die Salzformen besser in einem leicht sauren Milieu, im Vergleich zu einer gepufferten Lösung (PBS bei pH 7.4), lösen.

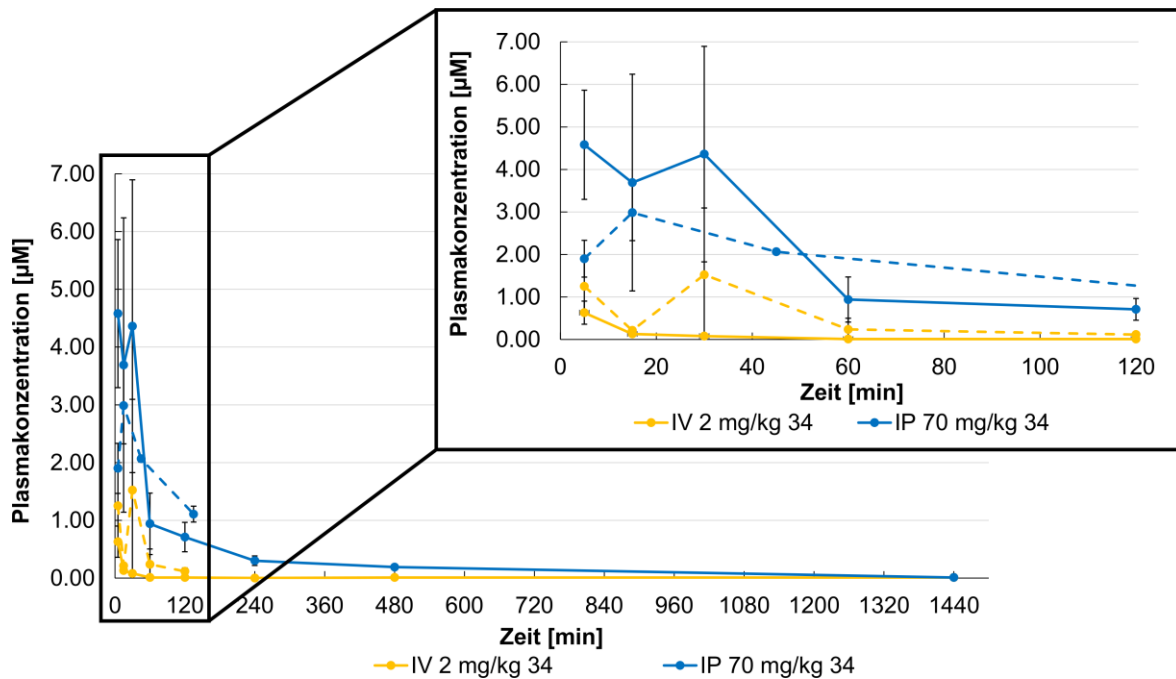
Für nachfolgende Experimente wurde die HCl-Form verwendet. Mit dieser wurden zunächst Formulierungsexperimente durchgeführt<sup>xiv</sup> und anschließend sollte in einer weiteren *in vivo* PK-Studie geprüft werden, ob mit gesteigerter Löslichkeit und optimierter Formulierung höhere Plasmalevel in Folge der IP Applikation erreicht werden können.

Im Zuge der Formulierungsfindung wurde schließlich für 10 mg/mL des HCl-Salzes **34** folgende Bedingung gefunden, bei der die Substanz vollständig gelöst war: 10 % *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)<sup>189</sup>, 40 % PEG400 und 50 % einer 40 %igen HP $\beta$ CD Lösung. Nachfolgend wurde eine weitere PK-Studie durchgeführt, bei der 70 mg von Verbindung **34** pro kg Körpergewicht IP sowie 2 mg pro kg Körpergewicht IV verabreicht wurden und diese im Vergleich zu Verbindung **24** betrachtet werden (Tab. 9 und Abb. 30). Für beide IV-Routen wurden die Testsubstanzen **24** und **34** jeweils in 100 % DMSO gelöst, weshalb die Salzform keinen Einfluss auf die Löslichkeit hatte.

**Tabelle 9.** *In vivo* pharmakokinetische Parameter für **34** und **24** im Vergleich.

Parameter	<b>34</b>		<b>24</b>	
	IV (2 mg/kg)	IP (70 mg/kg)	IV (2 mg/kg)	IP (70 mg/kg)
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>	0.4	3.7	6.87	1.45
<b>t<sub>max</sub> (h)</b>	-	0.1	0.5	0.25
<b>c<sub>max</sub> [ng/ml]<sup>a</sup> / [<math>\mu\text{M}</math>]<sup>b</sup></b>	-	2094.28 <sup>a</sup> / 4.58 <sup>b</sup>	696.75 <sup>a</sup> / 1.52 <sup>b</sup>	1365.38 <sup>a</sup> / 2.98 <sup>b</sup>
<b>AUC 0-t [h*ng/mL]</b>	94.2	3462.8	971.6	1887.9
<b>AUC 0-inf_obs [h*ng/mL]</b>	97.5	3482.8	1036.2	2948.3
<b>CL/F_obs [l/h/kg]</b>	20.5	-	1.95	23.74
<b>Vz/F_obs [l/kg]</b>	6.4	-	19.30	49.72
<b>F [%]<sub>0-inf_obs</sub></b>	-	102.1	-	8.21

<sup>xiv</sup> Formulierungsstudien wurden von Ayesha Pasha vom Lead Discovery Center in Dortmund durchgeführt.



**Abbildung 30.** *In vivo* Mausstudie mit 70 mg/kg **34** nach intraperitonealer (IP, n=3) Applikation in 10 % NMP, 40 % PEG400 und 50 % einer 40 %igen HP $\beta$ CD Lösung und 2 mg/kg nach intravenöser (IV, n=3) Gabe in 100 % DMSO. Im Vergleich dazu 70 mg/kg **24** nach intraperitonealer (IP, n=2) Applikation in 10 % DMSO, 50 % PEG400 und 40 % einer 40 %igen HP $\beta$ CD-Lösung und 2 mg/kg nach intravenöser (IV, n=3) Gabe in 100 % DMSO (gestrichelte Linien). Blutproben wurden nach 5, 15, 30, 60, 120, 240, 480 und 1440 min entnommen und im Anschluss mittels LCMS/MS analysiert. Die analytische Auswertung wurde von Dr. Matthias Baumann und Dr. Anke Unger vom Lead Discovery Center GmbH in Dortmund vorgenommen. **Rechts:** Vergrößerung der ersten fünf Zeitpunkte der Blutentnahmen.

Bei der IP-Applikation von Verbindung **34** wurde eine maximale Plasmakonzentration ( $c_{max}$ ) von 4.58  $\mu\text{M}$  nach 6 min ( $t_{max}$ ) gemessen, die somit höher war im Vergleich zu **24** mit einer maximalen Plasmakonzentration ( $c_{max}$ ) von 2.98  $\mu\text{M}$  nach 25 min ( $t_{max}$ ). Ein Vergleich der Expositionen zwischen AUC 0-t und AUC 0-inf\_obs für **34** zeigte eine gute Übereinstimmung (3462.8 und 3482.8  $\text{h}\cdot\text{ng}/\text{mL}$ ), wohingegen für **24** eine große Diskrepanz gemessen wurde (1887.9 und 2948.3  $\text{h}\cdot\text{ng}/\text{mL}$ ), die vermutlich auf die hohen Standardabweichungen der ersten zwei Zeitpunkte zurück zu führen ist sowie der Probenumfang (n=2) zu berücksichtigen ist. Ebenfalls ist eine fast dreifach gesteigerte Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von 222 min für **34** festzuhalten (Tab. 9). Bei der IV Applikation von Verbindung **34** wurde eine sehr geringe Exposition (AUC 0-inf\_obs) von 97.5  $\text{h}\cdot\text{ng}/\text{mL}$  gemessen, die somit zehnfach geringer war, als die ermittelte Exposition (AUC 0-inf\_obs) von 1036.2  $\text{h}\cdot\text{ng}/\text{mL}$  in der durchgeführten PK-Studie für Verbindung **24** (Tab. 9). Die Ursache für die große Diskrepanz zwischen den beiden IV Applikationen ist unklar, da beide mit 100 % DMSO durchgeführt wurden. Die jeweiligen Bioverfügbarkeiten (F) wurden anhand der zugehörigen IV-Applikationen berechnet. Zu berücksichtigen ist, dass die oben beschriebenen PK-Studien nicht simultan durchgeführt wurden, weshalb in zukünftigen



---

Arbeiten ein Direktvergleich zwischen der freien Base **24** und dem HCl-Salz **34** durchgeführt werden sollte, um die beschriebenen Auffälligkeiten zwischen den IV Applikationen aufzuklären. Im Anschluss daran sollten ebenfalls die Bioverfügbarkeiten basierend auf den neuen Daten berechnet werden.

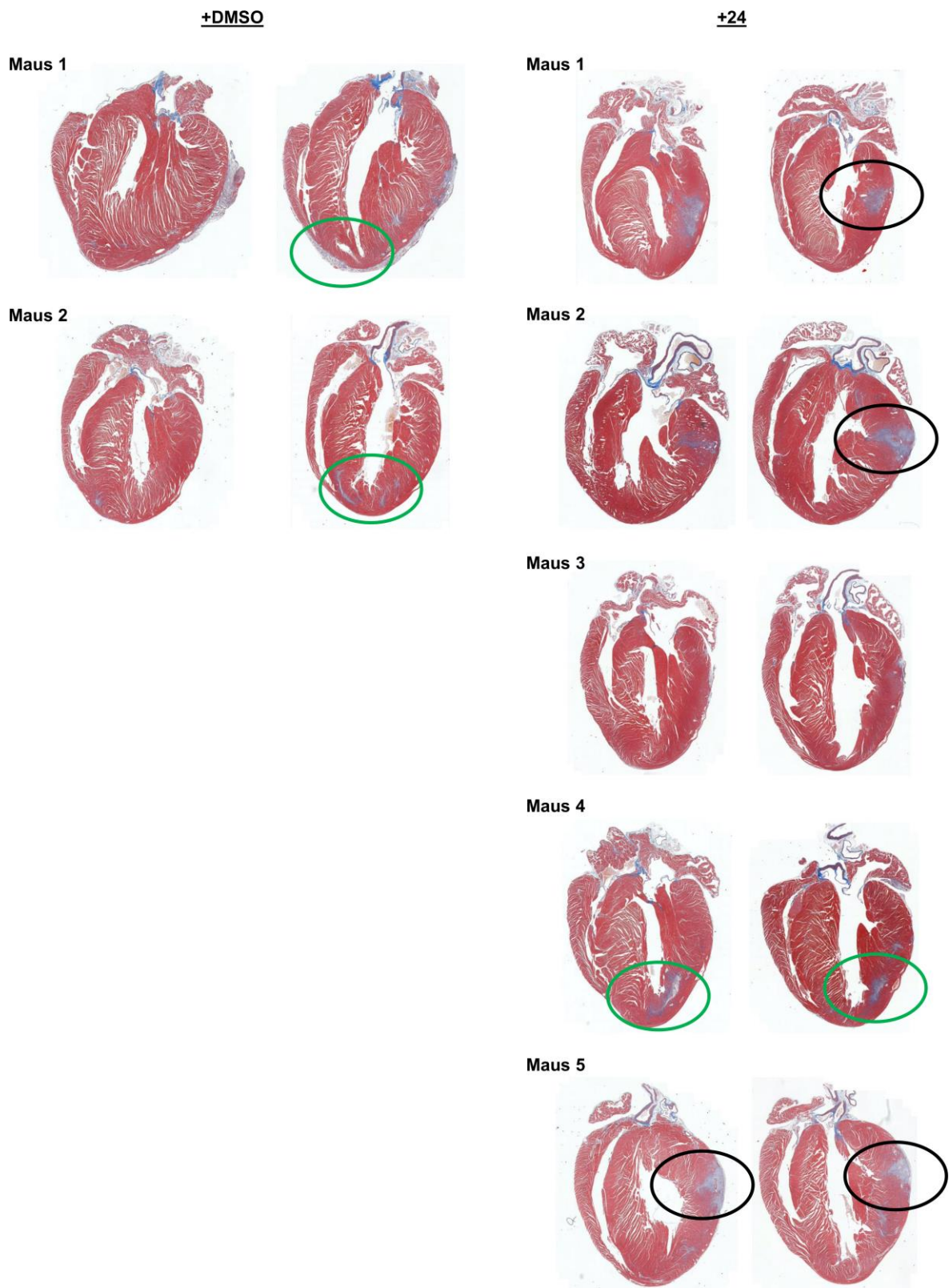
Abschließend lässt sich festhalten, dass das Konzept der Salzbildung erfolgreich auf Verbindung **24** übertragen werden konnte und in einer gesteigerten Löslichkeit in einem ungepufferten, wässrigen Milieu für alle drei Salzformen resultierte. Durch die gesteigerte Löslichkeit konnte mit dem HCl-Salz **34** eine bessere Exposition in Folge der IP Applikation erzielt werden sowie die maximale Plasmakonzentration gesteigert werden konnte.

### **3.3.8 *In vivo* Anwendung bei ischämischen Reperfusionsschäden**

Nach erfolgreicher (Weiter-)Entwicklung und Charakterisierung wurde Verbindung **24** in *proof-of-concept* Mausstudien eingesetzt. Bei Herzinfarkten mit darauffolgenden ischämischen Reperfusionsschäden kann das umliegende Gewebe geschädigt werden (siehe Kapitel 1.3.1). Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, inwiefern es möglich ist, den Gewebeschaden durch Applikation von Verbindung **24** zu reduzieren. Hierzu wurden die Tiere narkotisiert, intubiert und in Rechtsseitenlage am linken Herzkranzgefäß operiert. Dieses wurde mittels Druckverband für 30 min abgebunden (ligiert) und somit ein Herzinfarkt simuliert. Der Inhibitor wurde vor Beginn der Operation einmalig in einer Konzentration von 2 mg pro kg Körpergewicht den Mäusen IV injiziert. Nach 24 h und 7 Tagen wurden EKG's aufgenommen, im Anschluss die Herzen entnommen und histologisch aufgearbeitet (Abb. 31).<sup>xv</sup>

---

<sup>xv</sup> Mausstudien wurden unter der Leitung von Dr. Bernhard Haubner an der Medizinischen Universität Innsbruck durchgeführt.



**Abbildung 31.** Mauserzen nach histologischer Aufarbeitung und Färbung mit TriChrome von DMSO-Kontrollmäusen (links) und Herzen behandelter Mäuse mit Inhibitor **24** (rechts). Bereiche des Herzens mit ischämischen Schaden infolge des simulierten Herzinfarktes (grün umrandet). Schaden verursacht durch die Ligatur (schwarz umrandet). Die Mausstudien wurden unter der Leitung von Dr. Bernhard Haubner an der Medizinischen Universität Innsbruck durchgeführt.

---

Die aufgenommenen EKG's der Inhibitor-behandelten Tiere zeigten keine besonderen Auffälligkeiten im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die linke Herzkranzarterie teilt sich nach 1-3 cm in zwei Äste auf, den *Ramus circumflexus* (RCX) und den *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) oder auch *left anterior descending* (LAD).<sup>190</sup> Der LAD versorgt das Herz bis in die Herzspitze, weshalb auch dort der durch Ischämie verursachte Schaden zu beobachten war (Abb. 30, grün umrandete Bereiche). Die durch die Ligatur verursachten Schäden, im rechten mittleren Bereich des Herzens, sind demnach zu vernachlässigen (Abb. 30, schwarz umrandete Bereiche). Auf den bislang durchgeführten Schnitten scheint das durch die Ischämie geschädigte Areal relativ klein zu sein, weshalb sich vermutlich kein Effekt in den EKG's beobachten ließ. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich vermuten, dass die Tiere, die den Inhibitor **24** im Vorfeld bekommen haben, einen geringeren ischämischen Schaden davongetragen haben als die Kontrollmäuse. Zur Verifizierung sollten in zukünftigen Arbeiten die vorhandenen Daten quantifiziert werden sowie weitere, tiefergehende Schnitte durchgeführt werden, um den ischämischen Schaden genauer darstellen zu können.

---

### 3.3.9 Zusammenfassung

Der MAPK-Signalweg ist ein bedeutsames Signalsystem, welches extrazelluläre Stimuli in eine Vielzahl zellulärer Prozesse übersetzt. In Säugetieren wurden drei Unterfamilien der MAPKs identifiziert, wovon einer der MKK7-JNK Signalweg ist. Die Beteiligung der JNKs wurde in einer Vielzahl von Erkrankungen beschrieben, wie neurologische Erkrankungen (z.B. Parkinson oder Alzheimer), Diabetes, entzündlichen Prozessen sowie auch Krebs. Die bisherige Adressierung mit ATP-kompetitiven Inhibitoren oder auch Peptiden zeigte teilweise eine mangelnde Wirksamkeit, keine Isoform-Selektivität und damit einhergehende unerwünschte Nebenwirkungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-basierte Inhibitoren als geeignete Liganden für MKK7 identifiziert und sollten somit hinsichtlich der gezielten Adressierung des MKK7-JNK-Signalwegs evaluiert werden. Vor diesem Hintergrund wurde der bereits beschriebene kovalente Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-basierte Inhibitor **24** zunächst im größeren Maßstab resynthetisiert und anschließend in tiefergehenden Studien eingesetzt, um die biologische Funktion von MKK7 zu untersuchen. Das vielversprechende biochemische und zelluläre Profil von **24**, sowie die hohe Selektivität gegenüber anderen Tyrosinkinase stellte eine solide Basis für die nachfolgende pharmakokinetische Charakterisierung dar. Hierbei wurde mit einer  $P_{app}$  (A-B) von  $20 \times 10^{-6}$  cm/s eine gute orale Bioverfügbarkeit sowie eine hohe humane Plasmastabilität (> 99 %) ermittelt, auch wenn Optimierungsbedarf bzgl. Löslichkeit und Stabilität in Lebermikrosomen besteht. Zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit wurde zunächst eine geeignete Formulierung für die Substanz gefunden, sodass anschließend Verbindung **24** in *in vivo* Testmodellen untersucht werden konnte. Positiv hervorzuheben ist hierbei die gute Verträglichkeit des Inhibitors bis zu einer Konzentration von 600 mg pro kg Körpergewicht der Maus. In dieser PK-Studie wurden nach intraperitonealer und peroraler Gabe maximale Plasmakonzentrationen von bis zu 5.04 und 3.12  $\mu$ M erreicht. Aufgrund der nicht vollständig gelösten Substanz wurde in weiterführenden Experimenten die Löslichkeit von Verbindung **24** verbessert und die Bioverfügbarkeit in einer erneuten PK-Studie analysiert. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde das Konzept der Salzbildung erfolgreich auf Verbindung **24** übertragen und resultierte in einer gesteigerten Löslichkeit in einem ungepufferten, wässrigen Milieu für alle drei Salzformen (HCl-, Mesylat- und TFA-Salz). Durch die gesteigerte Löslichkeit wurde mit dem HCl-Salz **34** eine bessere Exposition in Folge der IP Applikation bei einer Konzentration von 70 mg pro kg Körpergewicht der Maus erzielt sowie die maximale Plasmakonzentration von 2.98 auf 4.58  $\mu$ M (siehe Tab. 9) gesteigert werden konnte.

Der JNK-Signalweg spielt auch eine entscheidende Rolle bei Herzinfarkten und darauffolgenden ischämischen Reperfusionsschäden.

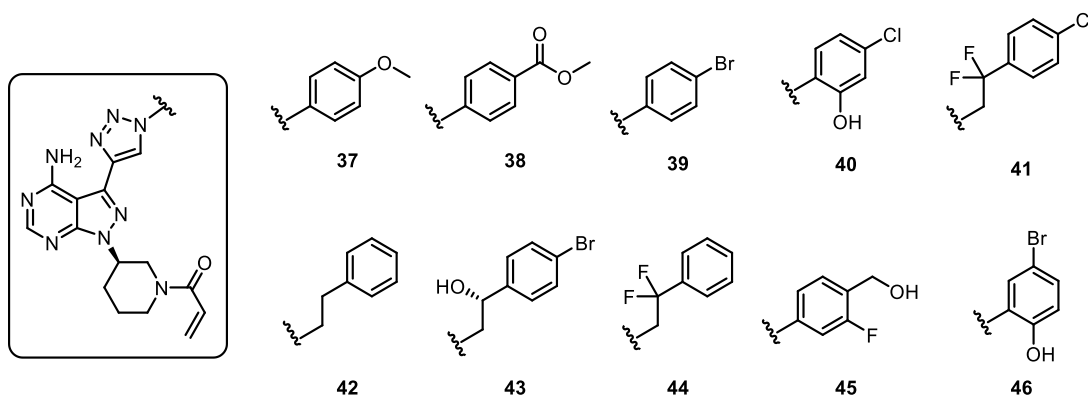
---

In einem Kooperationsprojekt wurde in *proof-of-concept* Mausstudien untersucht, inwiefern es möglich ist einen Gewebeschaden in Folge eines simulierten Herzinfarktes durch Gabe von **24** zu reduzieren. Initiale Ergebnisse lassen vermuten, dass **24** das Potential besitzt den ischämischen Schaden zu vermindern.

### 3.4 Click-Reaktion zur Generierung einer MKK7 Substanzbibliothek

Eine zentrale Herausforderung in der Wirkstoffforschung ist der möglichst zeitsparende und effiziente Aufbau von zielgerichteten Substanzbibliotheken mit hoher Diversität mit Hilfe von chemischen Reaktionen. Diese sollten eine schnelle und robuste Synthese von neuen Inhibitoren ermöglichen. Die Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC) stellt eine solche Methode dar. Dabei sind die zwei erforderlichen Alkin- und Azid-Bausteine leicht zugänglich und weitgehend reaktionsträge gegenüber anderen funktionellen Gruppen. Zudem wird die unter milden Bedingungen ablaufende Click-Reaktion als sehr effizient beschrieben. Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der Chemo- und Regioselektivität dieser Methode, da hier ausschließlich 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazolverbindungen gebildet werden.<sup>191-193</sup>

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Nir London wurde der Alkin-Baustein **31** in Hochdurchsatz-Click-Reaktionen zur Identifizierung von neuen biologisch aktiven Substanzen eingesetzt. Hierzu wurden 448 Azide mit Baustein **31** in der CuAAC-Reaktion umgesetzt, von denen 420 aus der Reaktionsmischung in zellulären *in-cell Western* Experimenten hinsichtlich ihres Potentials der Inhibition der JNK Phosphorylierung analysiert wurden. Auf diese Weise wurden zehn vielversprechende Verbindungen ausgewählt, die eine Runterregulierung des pJNK-Signals zeigten (Abb. 32).<sup>xvi</sup> Interessanterweise ging Verbindung **24** als Positivkontrolle aus den Experimenten hervor.



**Abbildung 32.** *In-cell Western*-Hits, die eine Runterregulierung des pJNK-Signals zeigten.

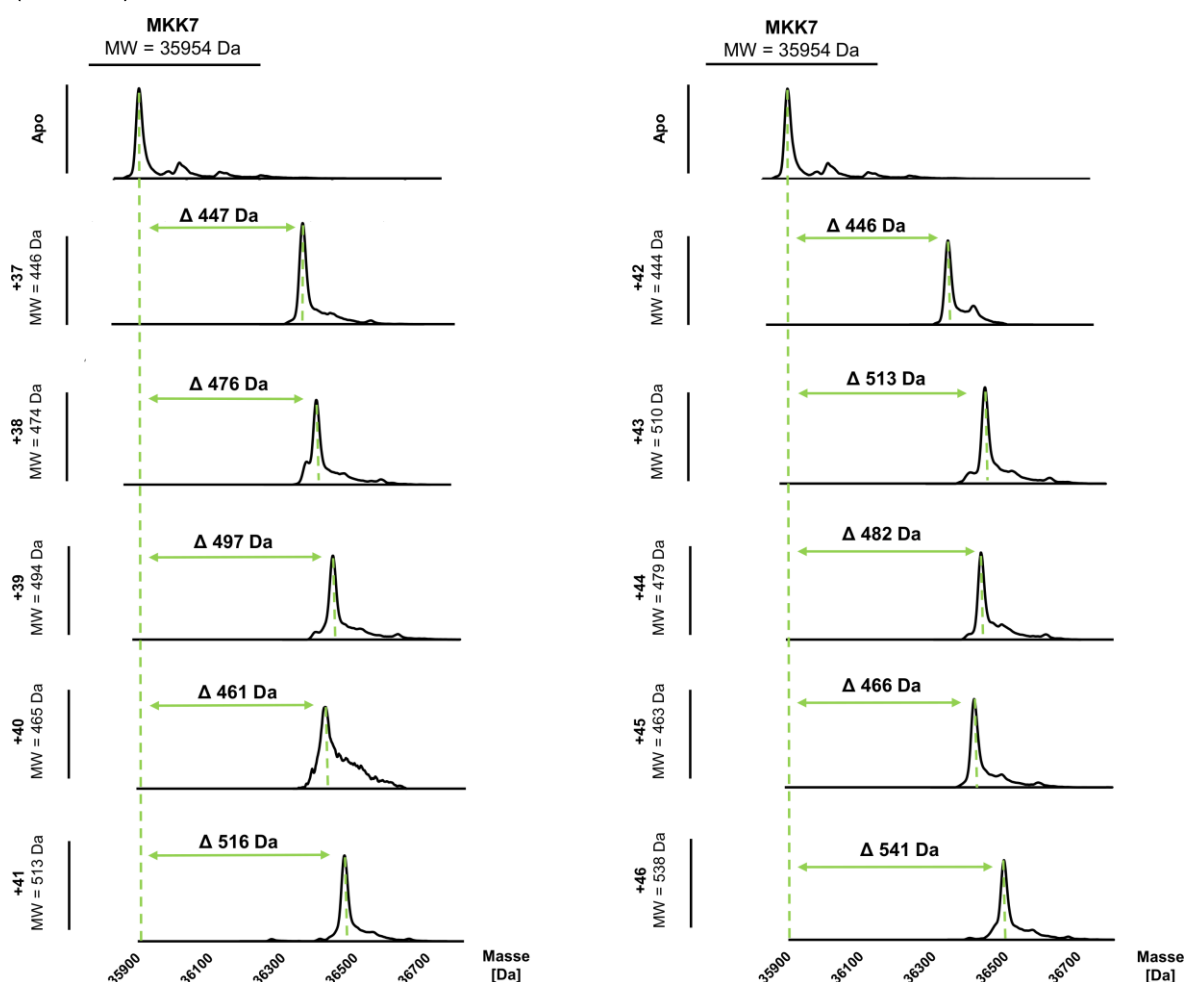
Im Rahmen dieser Arbeit sollten die zehn Hits resynthetisiert, säulenchromatographisch gereinigt und anschließend in weiterführenden *in-cell Western* Experimenten mit unterschiedlichen Konzentrationen validiert werden (Hit-Validierung). Des Weiteren sollten die Inhibitoren in MS-Experimenten und Ko-Kristallisationsstudien eingesetzt werden, um

<sup>xvi</sup> *In-cell Western*-Experimente wurden von Dr. Paul Gehrtz und Amit Shraga aus der Arbeitsgruppe von Dr. Nir London vom Weizmann Institute of Science in Israel, durchgeführt.

den angenommenen kovalenten Bindungsmodus der Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-basierten Inhibitoren zu validieren.

Die Synthese der Zielverbindungen erfolgte unter den bereits etablierten Reaktionsbedingungen für die Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition in Anwesenheit von Cu(II)SO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O und Natriumascorbat in einem Gemisch aus H<sub>2</sub>O:tBuOH (siehe Schema 1), sodass die Zielverbindungen **37-46** mit Ausbeuten von 11-42 % erhalten wurden.

Die Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-basierten Inhibitoren wurden hinsichtlich einer kovalenten Adressierung von Cys218 in MKK7 designt und synthetisiert. Zur Validierung des kovalenten Bindungsmodus wurde die gereinigte MKK7-Kinasedomäne mit einem dreifachen Inhibitorüberschuss für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte mittels massenspektrometrischer Analyse ein Nachweis von entsprechenden Proteinaddukten (Abb. 33).<sup>xvii</sup>



**Abbildung 33.** Dekonvolvierte Massenspektren von MKK7 nach Inkubation mit DMSO (Apo) und Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-basierten Inhibitoren.

<sup>xvii</sup> MS-Experimente wurden von Dr. Silke Kleinböling durchgeführt, TU Dortmund (AG Rauh).

---

Die dekonvolvierten Massenspektren zeigten eine Massenzunahme im Vergleich zur Apo-Masse des Proteins, die einer einfachen Modifizierung mit dem jeweiligen Inhibitor zugeordnet werden konnte (zur Bestätigung der einfachen Modifikation wird beispielhaft das Spektrum für Verbindung **37** für einen Massenbereich von 20.000-60.000 Da gezeigt, siehe Anhang Abb. 54). Somit wurde der angenommene kovalente Bindungsmodus der Inhibitoren validiert. Ko-Kristallisationsstudien hinsichtlich des eindeutigen Nachweises der kovalenten Modifikation von Cys218 sowie *in-cell Western* Experimente sind Bestandteil der aktuellen Forschung.<sup>xviii</sup>

---

<sup>xviii</sup> Kristallisationsexperimente wurden von Dr. Silke Kleinbölting, Dr. Mike Bührmann und B. Sc. Jan-Niklas Wiese durchgeführt, TU Dortmund (AG Rauh).



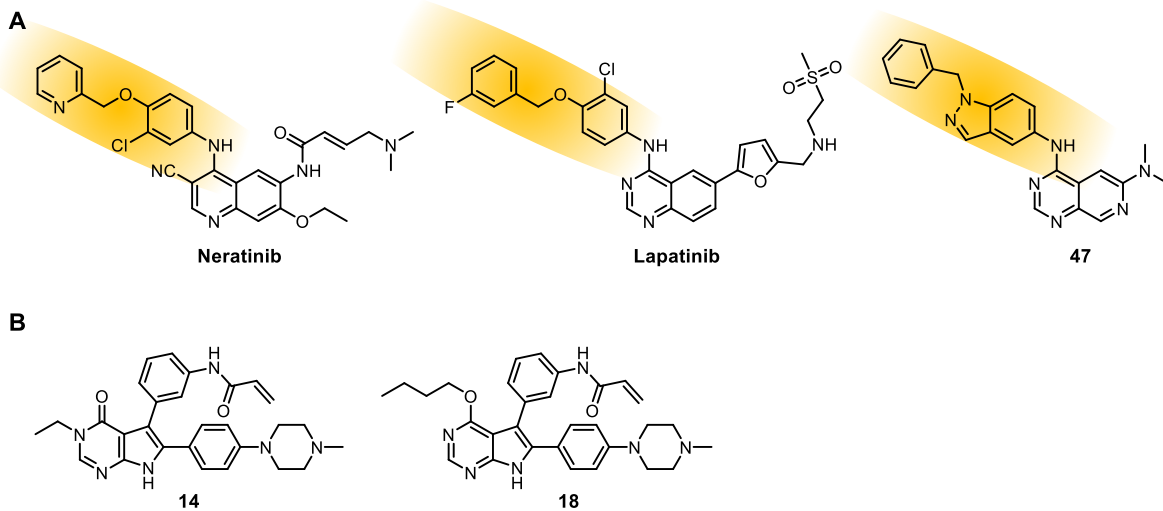
---

### 3.5 Weiterentwicklung von Inhibitoren der klinisch relevanten Her2 Insertionsmutante in Exon20 (Her2-ins-YVMA)

In vorangegangenen Arbeiten wurden Pyrrolopyrimidin-basierte Inhibitoren identifiziert, welche den Wildtyp sowie Mutationsvarianten des EGF-Rezeptors mit hoher biochemischer und zellulärer Aktivität adressieren.<sup>85</sup> Ein besonderes Merkmal dieser Inhibitoren besteht in der kovalenten Adressierung von Cys797 in EGFR, was im Vergleich zu den reversibel bindenden Gegenstücken in einer gesteigerten inhibitorischen Potenz resultiert (siehe Kapitel 1.4.1). Die RTK Her2, welche wie auch EGFR zur ErbB-Familie zählt, weist an isostruktureller Position ebenfalls ein nukleophiles Cystein auf (Cys805), woraus eine potentielle irreversible Adressierbarkeit von Her2 durch die zuvor erwähnten Pyrrolopyrimidin-basierten Substanzen postuliert wurde.

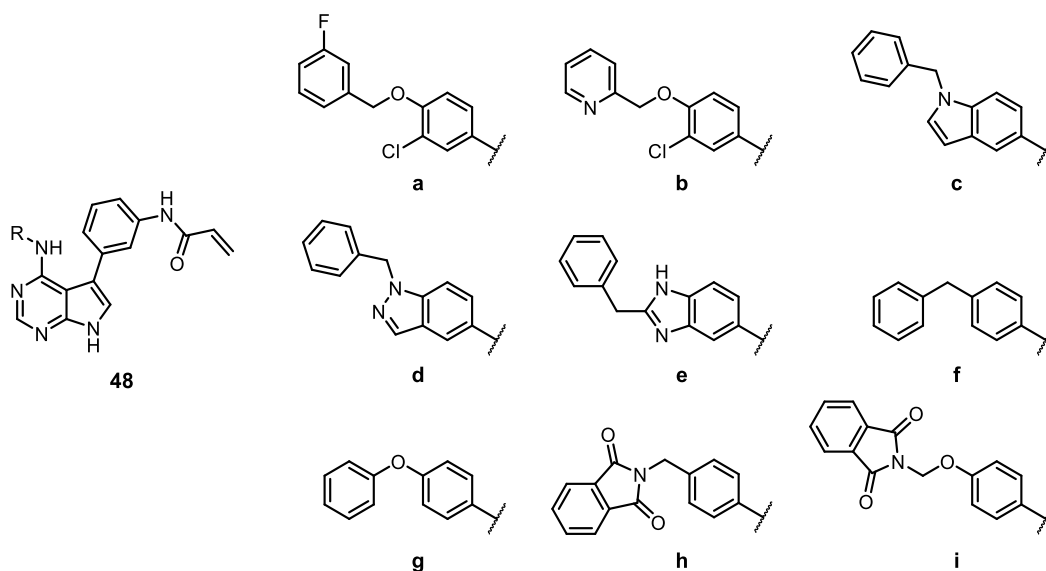
Vor diesem Hintergrund wurden die Verbindungen **14-21** aus der oben erwähnten Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitorserie im biochemischen Aktivitätsassay (HTRF) gegen Her2 Wildtyp sowie die YVMA-Insertionsmutante getestet. Insbesondere die Verbindungen **18-21** zeigten hohe biochemische Aktivitäten mit halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen von 3-18 nM gegen Her2-insYVMA. Lediglich eine moderate Aktivität wurde auf zellulärer Ebene in den Modellsystemen H1781 (Lungenkrebs; Her2\_G776delinsVC) und Ba/F3 (stabil transduzierte, murine Pro-B-Zellen; Her2\_A775-G77insYVMA) mit EC<sub>50</sub>-Werten von >300 nM gemessen, was eine erhebliche Limitation für die weitere Entwicklung von bioaktiven Her2-Inhibitoren darstellte.<sup>85</sup>

Um neue Ansatzpunkte für die Derivatisierung und chemische Optimierung der etablierten Substanzklasse zu identifizieren, wurde eine Kinaseinhibitor-fokussierte Substanzbibliothek bestehend aus 1600 Verbindungen in einem biochemischen Assay durchmustert. Hierbei wurden Verbindungen mit hydrophoben und sterisch anspruchsvollen Substituenten identifiziert, welche den Literaturbekannten Inhibitoren Neratinib und Lapatinib ähnelten (Abb. 34A). Vergleichsweise sind zwei repräsentative Vertreter (Verbindungen **14** und **18**) aus der oben erwähnten parentalen Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitorserie gegenübergestellt, welche keine hydrophoben Substituenten tragen (Abb. 34B).



**Abbildung 34. A** Chemische Strukturen von Neratinib, Lapatinib und einer repräsentativen Struktur aus der Durchmusterung der Kinaseinhibitor-fokussierten Substanzbibliothek **47**. Hydrophobe und sterisch anspruchsvolle Substituenten sind gelb hervorgehoben. **B** Repräsentative Vertreter (Verbindungen **14** und **18**) aus der oben erwähnten parentalen Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitorserie, welche keine hydrophoben Substituenten tragen.

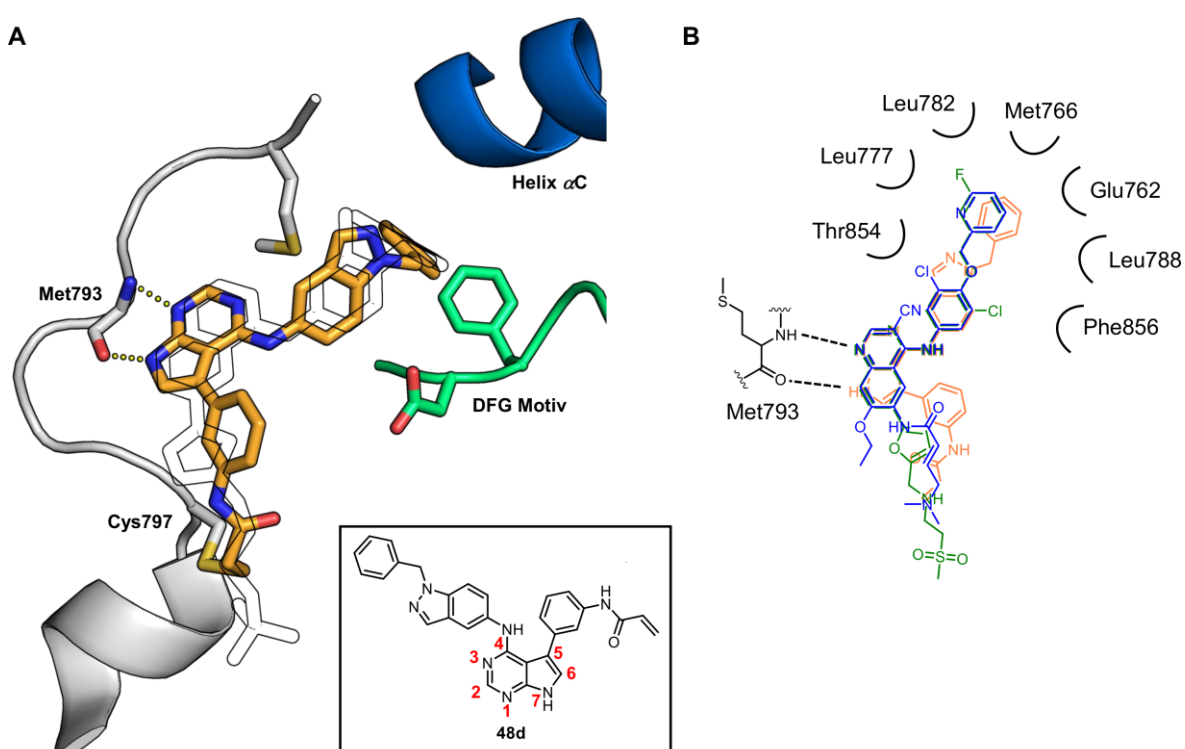
Basierend auf diesem Screen wurde das vielversprechende Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst mit solchen hydrophoben Elementen zu kovalenten Typ-II-Kinaseinhibitoren kombiniert, die analog zu Neratinib und Lapatinib die hydrophobe Subtasche besetzen und die zelluläre Aktivität der Verbindungen steigern sollten. Im Rahmen dieses kombinatorischen Ansatzes wurde eine fokussierte Substanzbibliothek dargestellt, in der verschiedene Substituenten in 4-Position an das Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst substituiert wurden (Abb. 35).



**Abbildung 35.** Chemische Strukturen der fokussierten Substanzbibliothek, bei der verschiedene hydrophobe Substituenten in 4-Position an das Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst substituiert wurden.

Hinsichtlich der zellulären Potenz wurden für Verbindung **48b** und **48d** verbesserte anti-proliferative Aktivitäten mit  $EC_{50}$ -Werten unterhalb von 200 nM auf beiden Zelllinien gemessen.

Kristallisationsstudien wurden stellvertretend mit einem verfügbaren EGFR-Kristallisationssystem (EGFR-T790M/V948R) durchgeführt, da in den bisherigen Kristallisationsstudien mit Her2 keine Komplex-Kristallstrukturen erhalten werden konnten (Abb. 36). EGFR ist ein naher Verwandter zu Her2 innerhalb der ErbB-Rezeptorfamilie mit hoher struktureller Ähnlichkeit innerhalb der ATP-Bindungsstelle. Die Herausforderung hinsichtlich der Kristallisation mit Her2 wird ebenfalls durch lediglich zwei publizierte Kristallstrukturen in der Protein Datenbank verdeutlicht.



**Abbildung 36. A** Überlagerung der Ko-Kristallstrukturen von EGFR im Komplex mit Lapatinib (PDB: 1XKK, schwarz-weiße Darstellung) und des Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitors **48d** (PDB: 6TFU, orange). **B** Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von **48d** (orange), Neratinib (blau) und Lapatinib (grün) innerhalb der ATP-Bindetasche mit Fokus auf der hydrophoben Subtasche, welche durch die Aminosäure-Seitenketten Thr854, Leu777, Leu782, Met766, Glu762, Leu788 und Phe856 aufgespannt wird. Gepunktete Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar und hydrophoben Interaktionen mit den Proteinseitenketten sind als Halbkreise dargestellt.

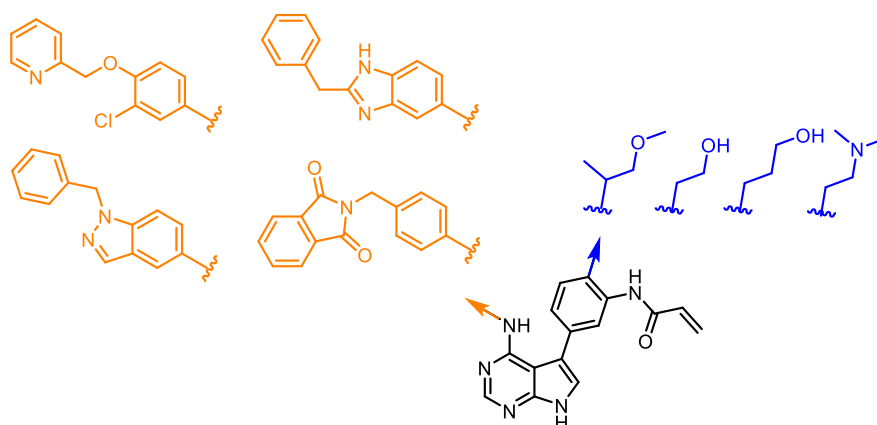
Mithilfe der erhaltenen Ko-Kristallstruktur von **48d** konnte der antizipierte Bindungsmodus bestätigt werden (Abb. 36 A). Wasserstoffbrückenbindungen werden vom Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst zu Met793 im Peptidrückgrat ausgebildet. Der Substituent in 4-Position (1-Benzyl-1H-indazol) besetzt dieselbe hydrophobe Subtasche wie auch die Referenzverbindungen Lapatinib und Neratinib, welche lediglich in der inaktiven

Kinasekonformation zugänglich ist (Abb. 36B). Die hydrophobe Subtasche wird durch die Aminosäure-Seitenketten Thr854, Leu777, Leu782, Met766, Glu762, Leu788 und Phe856 aufgespannt. Ebenfalls aufgelöst ist die kovalente Bindung zu Cys797.

Insgesamt wurde für diese Inhibitorserie (**48a-i**) eine geringe Löslichkeit beobachtet, weshalb diese durch die Einführung von Löslichkeits-vermittelnden Gruppen erhöht werden sollte, um die Inhibitoreigenschaften wie Permeabilität und damit verbundene zelluläre Potenz zu verbessern.<sup>103</sup>

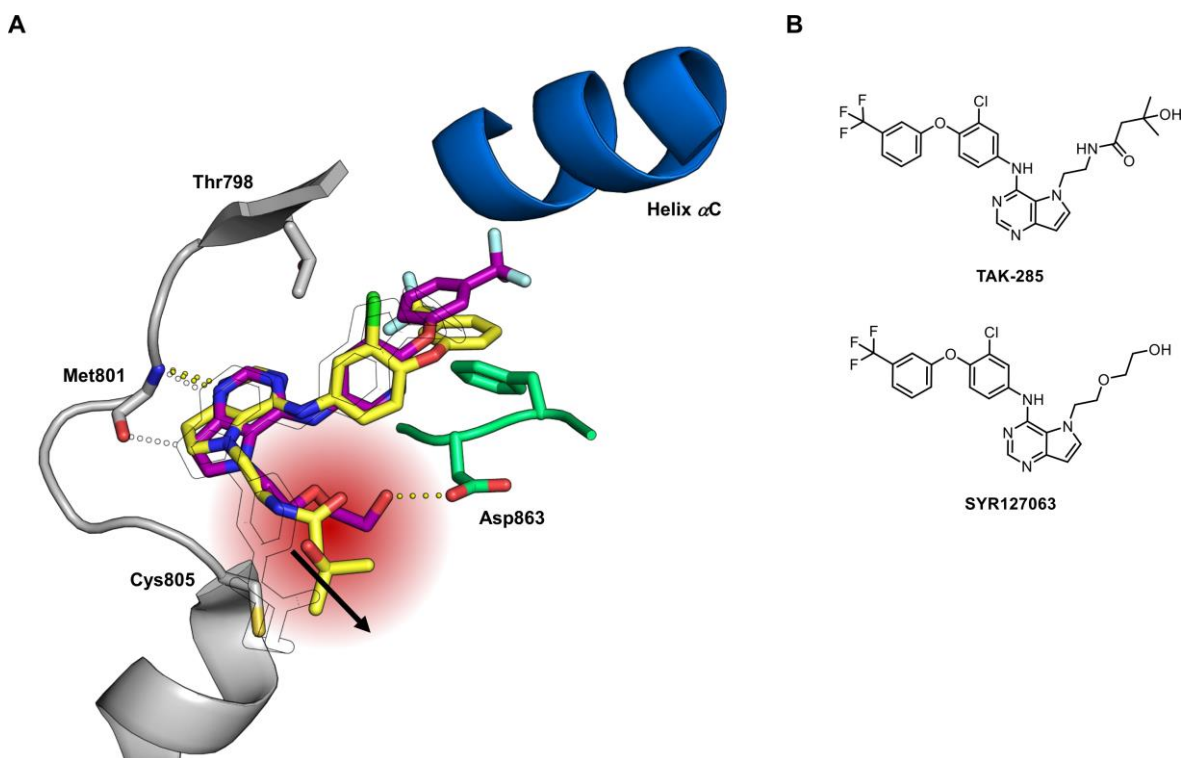
### 3.5.1 Struktur-basiertes Design von kovalenten Her2-Inhibitoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Alkylketten mit endständigen Alkohol-, Amin- oder Etherfunktionalitäten in *ortho*-Position zum Acrylamid-Linker eingeführt um die Löslichkeit der Inhibitoren zu verbessern und resultierten in einer kleinen Substanzbibliothek von acht weiteren Inhibitoren (Abb. 37).



**Abbildung 37.** Design von Her2 Inhibitoren basierend auf den im Screen gefundenen hydrophoben Substituenten und zusätzlich eingebrachten Löslichkeits-vermittelnden Gruppen in *ortho*-Position zum Michael-Akzeptor.

Inspiziert wurde das Design durch den EGFR/Her2-Dualinhibitor TAK-285 ( $IC_{50,EGFR} = 23$  nM,  $IC_{50,Her2} = 17$  nM) und den Her2-Inhibitor SYR127063 ( $IC_{50,EGFR} = 426$  nM,  $IC_{50,Her2} = 11$  nM), zwei Pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-basierte Inhibitoren.<sup>102</sup> Die publizierten Kristallstrukturen beider Inhibitoren zeigten den bereits beschriebenen Bindungsmodus: Bindung in die ATP-Bindungstasche, wobei eine direkte Wasserstoffbrückenbindungen vom *N1* Stickstoffatom des Pyrrolopyrimidin-Grundgerüsts zu Met801 im Peptidrückgrat ausgebildet wird, und die Besetzung der hydrophoben Subtasche durch den Substituenten in 4-Position (Abb. 38).



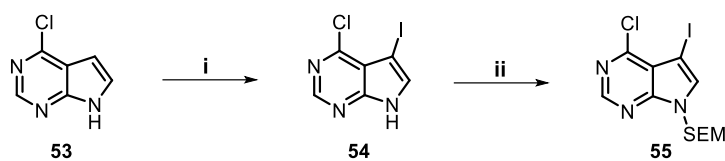
**Abbildung 38. A** Überlagerung der Ko-Kristallstrukturen von Her2 im Komplex mit TAK-285 (PDB: 3RCD, lila), SYR127063 (PDB: 3PP0, gelb) und dem Typ-II-Inhibitor **48d** (PDB: 6TFU, schwarz-weiße Darstellung). Der rot hervorgehobene Bereich sowie der schwarze Pfeil zeigen am Beispiel von **48d** die Derivatisierungsposition (*ortho*-Position zum Acrylamid) für die Löslichkeits-vermittelnden Gruppen an. **B** Chemische Strukturen der Referenzverbindungen TAK-285 und SYR127063.

Basierend auf diesen Kristallstrukturen wurde die *ortho*-Position zum Acrylamid als geeignete Position für die Installation der Alkylketten identifiziert.

### 3.5.2 Synthese von kovalenten Her2-Inhibitoren zur Verbesserung der Löslichkeit

Im Folgenden werden drei Reaktionsschemata beschrieben, welche die Darstellung des 4,5-substituierten Pyrrolopyrimidin-Grundgerüsts, die Synthese der hydrophoben Elemente für eine Derivatisierung in 4-Position sowie die allgemeine Route zur Darstellung der Zielverbindungen **49a-d**, **50**, **51** und **52a,b** zeigen. Die Darstellung der 4,5-substituierten Pyrrolopyrimidine erfolgte nach einer linearen zweistufigen Synthesestrategie (Schema 4).

**Schema 4.** Syntheseschritte zur Darstellung des 4,5-substituierten Pyrrolopyrimidin-Grundgerüsts **55**.



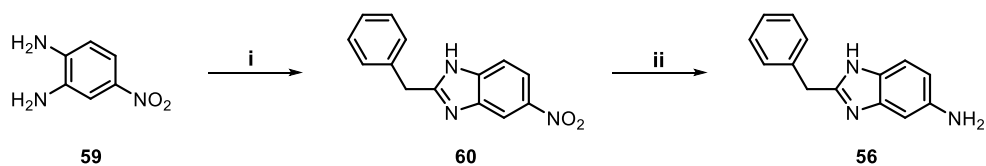
**Reagenzien und Bedingungen:** (i) NIS, DMF, rt, 16 h; (ii) SEM-Cl, NaH, DMF, 0 °C zu rt, 16 h.

Im ersten Schritt wurde das kommerziell erhältliche 4-Chlorpyrrolopyrimidin **53** in Gegenwart von *N*-Iodsuccinimid selektiv an 5-Position iodiert und das Zwischenprodukt **54** mit einer Ausbeute von 87 % erhalten. Im zweiten Schritt erfolgte die Maskierung des sekundären Amins in 7-Position mit der SEM-Schutzgruppe. Auf diese Weise wurde das Grundgerüst **55** mit einer nur moderaten Ausbeute, aber hohen Reinheit von 30 % dargestellt.

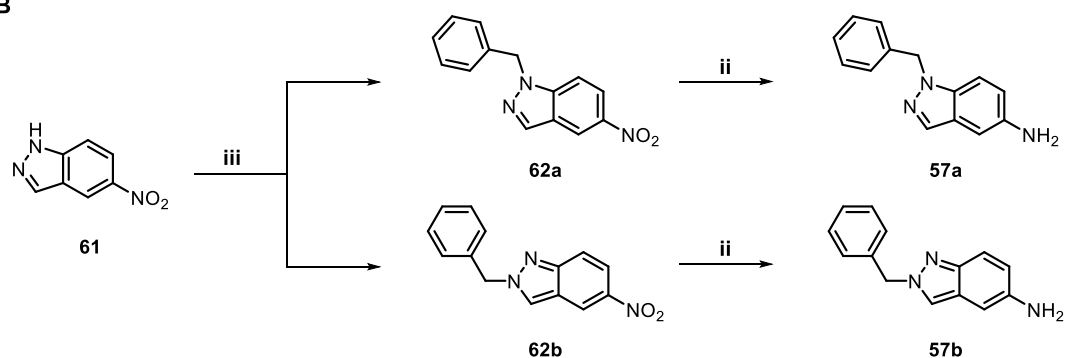
Die Amine **56**, **57a**, **57b** und **58** wurden gemäß dem nachstehenden Schema synthetisiert (Schema 5).

**Schema 5.** Syntheseschritte zur Darstellung der hydrophoben Elemente **56**, **57a**, **57b** und **58**.

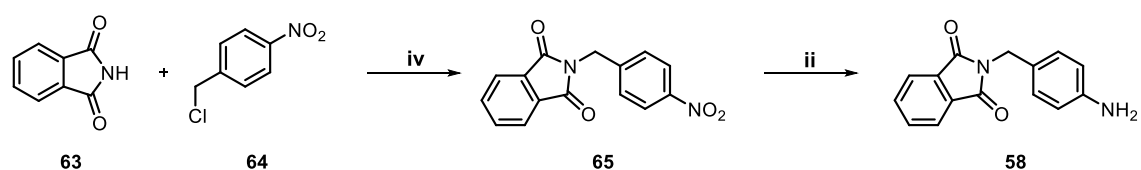
**A**



**B**



**C**

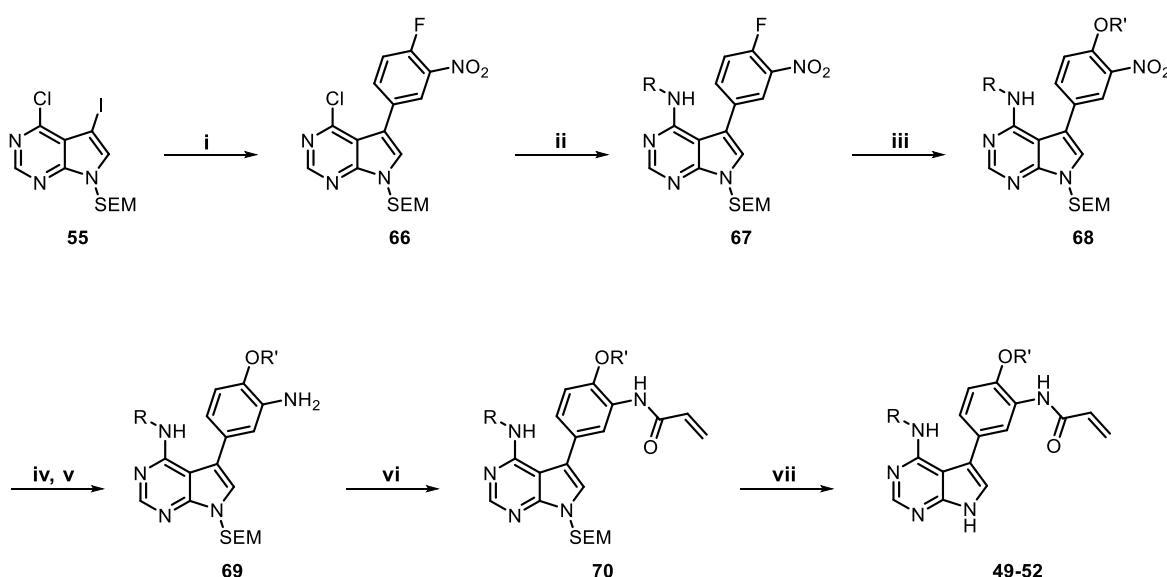


**Reagenzien und Bedingungen:** (i) Phenyllessigsäure, 180 °C, 1 h, Mikrowelle; (ii) Fe, NH<sub>4</sub>Cl, EtOH:H<sub>2</sub>O (9:1), 60 °C, 4 h; (iii) Benzylbromid, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, rt, 3 h; (iv) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, rt, 16 h.

Amin **56** wurde ausgehend von 4-Nitrobenzol-1,2-diamin **59** mittels Phillips-Ladenburg-Benzimidazol-Synthese mit Phenyllessigsäure bei 180 °C im Mikrowellenreaktor und anschließender Fe-Reduktion mit einer Ausbeute von 68 % dargestellt. Die Synthese der regioisomeren Verbindungen **57a** und **57b** erfolgte ausgehend von der nukleophilen Substitution von Benzylbromid mit dem kommerziell erhältlichen Indazol **61** und anschließender Fe-Reduktion. Mit einer Ausbeute von 83 % wurde 1-*N*-benzyl-5-nitro-1*H*-Indazol **57a** erhalten.<sup>108</sup> Amin **58** wurde mittels nukleophiler Substitution von 1-Chloromethyl-4-nitrobenzol **64** mit Phthalimid (**63**) und anschließender Fe-Reduktion mit einer Ausbeute von 75 % erhalten.

Die Synthese der acht Zielverbindungen **49a-d**, **50**, **51** und **52a,b** erfolgte nun mit Hilfe einer sechsstufigen Syntheseroute, ausgehend vom Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst **55** (Schema 6).

**Schema 6.** Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindungen **49a-d**, **50**, **51** und **52a,b**.

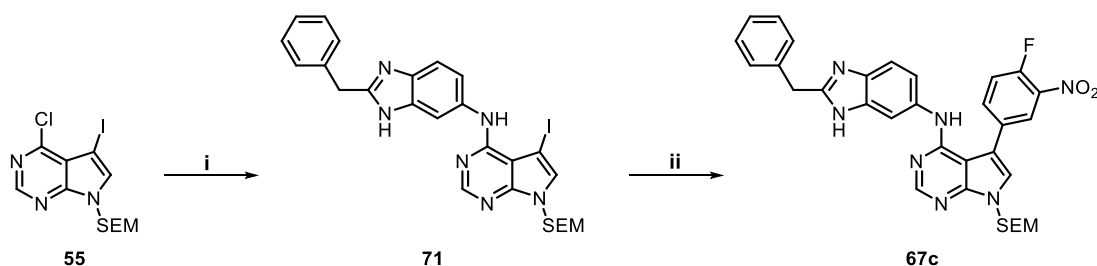


**Reagenzien und Bedingungen:** (i) 4-Fluoro-3-nitrophenylboronsäure, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Dioxan:H<sub>2</sub>O (3:1), Argon Atmosphäre, 80 °C, 16 h; (ii) RNH<sub>2</sub>, HCl/Dioxan (4 M), <sup>n</sup>BuOH, 80 °C, 24 h; (iii) HOR', NaH, trockenes THF, rt, 16 h; (iv) Fe, NH<sub>4</sub>Cl, EtOH:H<sub>2</sub>O (9:1), 60 °C, 4 h; (v) H-Cube, Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, 50 °C, Flussrate 1 mL/min; (vi) Acryloylchlorid, DIPEA, trockenes THF, 0 °C zu rt, 3 h; (vii) TFA:DCM (1:3), rt, 4 h, dann 1 M KOH in THF (1:1), rt, 2 h.

Bei der Umsetzung von **55** in einer Pd-katalysierten Suzuki-Kupplung mit 4-Fluoro-3-nitrophenylboronsäure in Anwesenheit von Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in einem Gemisch aus Dioxan:H<sub>2</sub>O (3:1) wurde Verbindung **66** mit einer Ausbeute von 84 % erhalten. Intermediat **66** wurde anschließend in einer nukleophilen Substitution mit einer Bibliothek von vier verschiedenen hydrophoben Substituenten unter Zugabe katalytischer Mengen HCl/Dioxan in <sup>n</sup>BuOH derivatisiert, wobei für **67a-d** Ausbeuten von 51-76 % erreicht wurden.

Bei der Substitution von Amin **56** an Baustein **66** traten Schwierigkeiten auf, da die Reaktion nicht selektiv an 4-Position erfolgte, sondern an dem zuvor eingebrachten Fluoratom (mittels LC/MS-Analysen analysiert). Für die Darstellung der gewünschten Zielverbindung **67c** wurde die Reaktionsroute für das Einbringen von Amin **56** angepasst (Schema 7).

**Schema 7.** Syntheseroute zur Darstellung der Zwischenstufe **67c**.



**Reagenzien und Bedingungen:** (i) RNH<sub>2</sub>, HCl/Dioxan (4 M), <sup>n</sup>BuOH, 80 °C, 24 h; (ii) 4-Fluoro-3-nitrophenylboronsäure, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Dioxan:H<sub>2</sub>O (3:1), Argon Atmosphäre, 80 °C, 16 h.

Hierzu wurde im ersten Schritt Amin **56** an Baustein **55** substituiert, sodass im nachfolgenden Schritt die Pd-katalysierte Suzuki Kupplung mit 4-Fluoro-3-nitrophenylboronsäure erfolgen konnte. Auf diese Weise wurde **67c** mit einer Ausbeute von 67 % erhalten und konnte in allen weiteren Reaktionen wie geplant weiter umgesetzt werden.

Gemäß der Syntheseroute (Schema 6) erfolgte im nächsten Schritt die Einführung von vier verschiedenen Löslichkeitsgruppen in Anwesenheit von Natriumhydrid, sodass die Bausteine **68a-h** mit Ausbeuten von 9-87 % erhalten wurden. Die anschließende Reduktion der Nitrogruppe erfolgte für die Verbindungen mit der 2-Dimethylamino Löslichkeitsgruppe (**68d** und **68h**) im Durchflusshydrogenator (H-Cube) mit Pd/C und H<sub>2</sub> in MeOH bei 50 °C mit Ausbeuten von 16-85 %. Verbindungen **69a-c** und **69e-f** konnten mittels Fe-Reduktion in Ausbeuten von 20-88 % erhalten werden. Im nächsten Reaktionsschritt wurde die somit erzeugte Anilin-Bibliothek einer Kupplung mit Acryloylchlorid in Anwesenheit von DIPEA unterzogen, wobei die gewünschten Produkte **70a-h** mit moderaten bis guten Ausbeuten von 30-95 % erhalten werden konnten. Im letzten Schritt der Synthesesequenz wurde die SEM-Schutzgruppe nach einer klassisch-etablierten Methodik abgespalten, sodass die acht Zielverbindungen **49a-d**, **50**, **51** und **52a,b** mit moderaten Ausbeuten von 19-75 % erhalten wurden (siehe Tab. 14). Die zum Teil geringen Ausbeuten resultierten zum einen daher, dass nur die reinsten Fraktionen nach der Aufreinigung vereinigt wurden, zum anderen lief bspw. die Substitution der Löslichkeitsgruppen nicht immer vollständig ab.<sup>xix</sup>

<sup>xix</sup> Die Synthese der kovalenten Inhibitoren **50** und **51** erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Tonia Kirschner, TU Dortmund (AG Rauh), 2018.



### 3.5.3 Biochemische und zelluläre Charakterisierung der Pyrrolopyrimidine

Die synthetisierte Substanzbibliothek der Pyrrolopyrimidine wurde hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität in einem Aktivitäts-basierten *homogeneous time-resolved fluorescence* (HTRF) KinEASE Assay (Cisbio) untersucht, sowie der Effekt in relevanten Krebszelllinien analysiert wurde. Hierzu wurde die Zellviabilität nach Inhibitorgabe mittels *CellTiter-Glo* Assay (Promega) ermittelt (Tab. 10).<sup>xx</sup>

**Tabelle 10.** Biochemische und zelluläre Charakterisierung der Pyrrolopyrimidine **49a-d**, **50**, **51** und **52a,b**.

	R'	Her2 HTRF IC <sub>50</sub> [nM]		Her2 CTG EC <sub>50</sub> [nM]	
		wt	insYVMA	H1781 (GdelinsVC)	Ba/F3 (insYVMA)
<b>49a</b>		14 ± 0	45 ± 13	549 ± 269	259 ± 101
<b>49b</b>		1.9 ± 0.2	7.9 ± 0.5	201 ± 53	84 ± 28
<b>49c</b>		9.3 ± 1.7	10 ± 1	271 ± 56	41 ± 11
<b>49d</b>		15 ± 4	7.4 ± 1.2	164 ± 56	120 ± 18
<b>50</b>		14 ± 1	46 ± 2	508 ± 80	159 ± 30
<b>51</b>		188 ± 39	1266 ± 196	>3000	>3000
<b>52a</b>		15 ± 2	230 ± 13	1610 ± 382	675 ± 338
<b>52b</b>		23 ± 4	153 ± 66	1200 ± 282	621 ± 12
<b>48b<sup>xxi</sup></b>		11 ± 1	17 ± 3	161 ± 72	83 ± 20

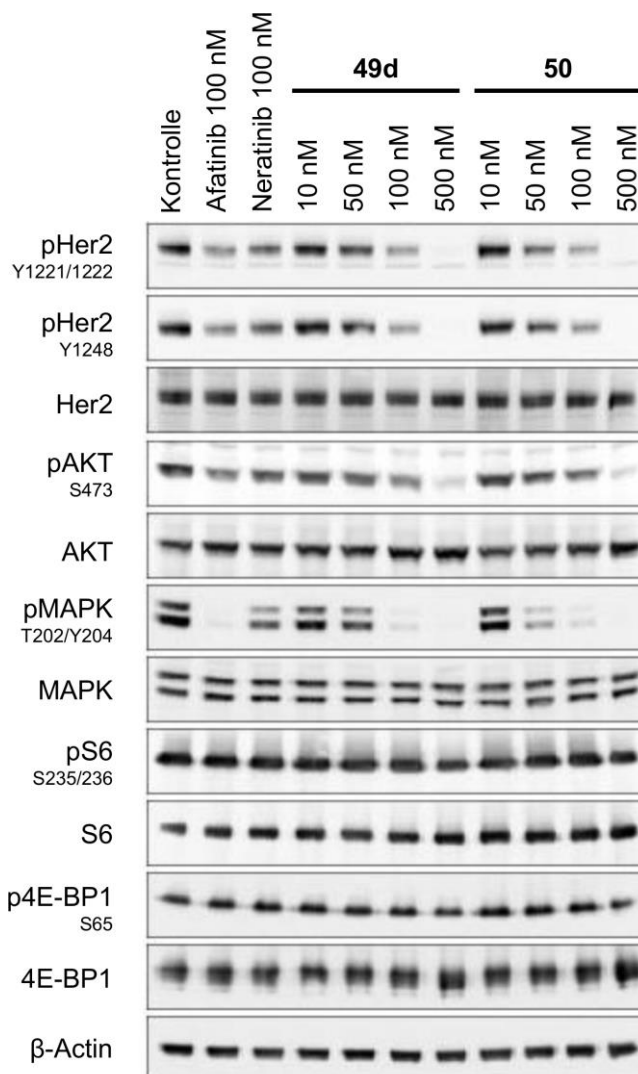
<sup>xx</sup> Die biochemische und zelluläre Charakterisierung wurde von M. Sc. Kirujan Jeyakumar, Dr. Jonas Lategahn, Dr. Marina Keul und M. Sc. Hannah Lea Tumbrink durchgeführt, TU Dortmund (AG Rauh).

<sup>xxi</sup> **48b** wurde von Philip Klövekorn im Rahmen seiner Masterarbeit synthetisiert, TU Dortmund (AG Rauh), 2015.

---

Die Inhibitoren **49a-d** sind mit einem 3-Chlor-4-(pyridin-2-ylmethoxy)amin-Substituenten in 4-Position dekoriert und tragen Ether-, Amin- oder Alkohollinker als Löslichkeits-vermittelnde Gruppe. Der Methylether-tragende Inhibitor **49a** zeigte moderate Aktivitäten im biochemischen Assay sowie auf zellulärem Level. Verbindungen **49b** und **49c** mit C2- bzw. C3-Alkylketten und endständiger Alkoholfunktionalität zeigten hohe biochemische Aktivitäten mit  $IC_{50}$ -Werten von unter 10 nM und zelluläre Potenzen von 84 bzw. 41 nM auf der Ba/F3 Zelllinie. Auf der Krebs-relevanten Zelllinie H1781 wurden moderate Effekte beobachtet mit  $EC_{50}$ -Werten von 201 bzw. 270 nM. Molekül **49d**, derivatisiert mit einem tertiären Amin, zeigte ähnliche biochemische Eigenschaften mit einem  $IC_{50}$  von 7.4 nM auf der Her2-insYVMA mutierten Kinase, sowie ausgeprägte zelluläre Inhibition von 164 und 120 nM auf der H1781 bzw. der Ba/F3 Zelllinie. Die Einführung anderer hydrophober Substituenten in 4-Position führte zu reduzierter biochemischer und zellulärer Aktivität der dargestellten Inhibitoren **50-52a,b**. Folglich stellten **49b-d** die aktivsten Verbindungen innerhalb der Serie mit gesteigerter biochemischer Aktivität im Vergleich zu **48b** dar. Verbindungen **48b**, ohne Löslichkeits-vermittelnde Gruppe, zeigte  $EC_{50}$ -Werte von <200 nM auf der H1781 sowie der Ba/F3 Zelllinie (Tab. 10 und siehe Kapitel 3.4). Dementsprechend konnte eine weitere Steigerung der zellulären Aktivität mit dieser Inhibitorserie nicht erreicht werden.

Um den beschriebenen Trend zu untermauern wurden Western-Blot-Analysen anhand der H1781 Zelllinie durchgeführt.<sup>xxii</sup> Hierbei wurde der Einfluss auf das Phosphorylierungslevel von Her2 und nachgeschalteten Kinasen im Signalweg mit den Inhibitoren **49d** und **50** sowie den Referenzverbindungen Afatinib und Neratinib untersucht (Abb. 39).



**Abbildung 39.** Western-Blot-Analyse von **49d** und **50** in der Lungenkrebszelllinie H1781.

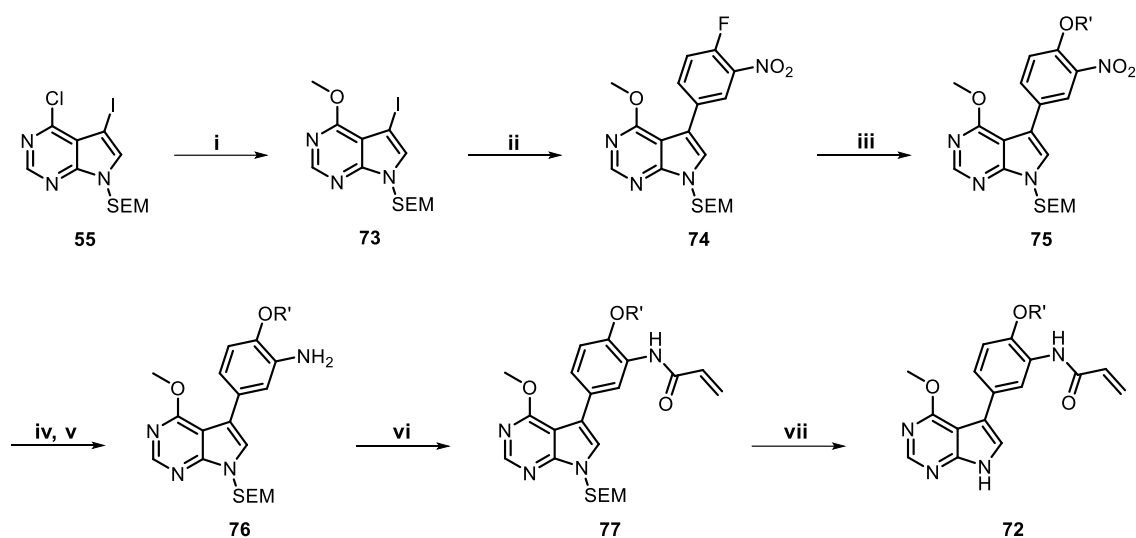
In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem *CellTiter-Glo* Assay war ein Effekt auf zellulärer Ebene zwischen 100 und 500 nM zu beobachten, sowie die Runterregulierung des nachgeschalteten pAKT und pMAPK Signals bei jeweils gleichbleibender Gesamtproteinmenge von AKT und MAPK.

Im Rahmen dieser SAR-Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass entweder die Methylpiperazin-Löslichkeitsgruppe in 6-Position der initialen Verbindungen **14-21**

<sup>xxii</sup> Western-Blot-Analysen wurden von Julia Ketzner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sebastian Bauer, Westdeutsches Tumorzentrum in Essen, durchgeführt.

(Verbindung **14** siehe Abb. 34) oder die in 4-Position eingebrachten hydrophoben Substituenten am Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst für die richtige Orientierung und damit verbundener Potenz der Inhibitoren notwendig sind. Zur Validierung wurden deshalb Inhibitoren synthetisiert, die keines der beiden Struktur motive tragen (**72a-f**). Diese neu entstandene Substanzbibliothek wurde anschließend biochemisch und zellulär getestet (Schema 8, Tab. 15).

**Schema 8.** Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindungen **72a-f**.



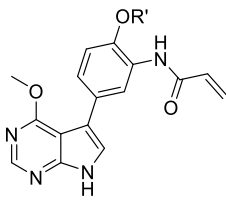
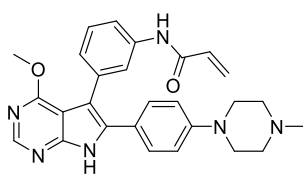
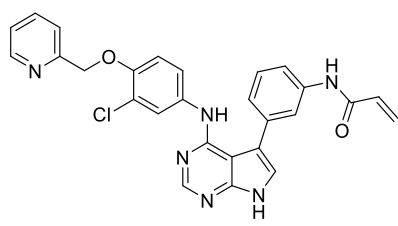
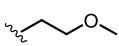
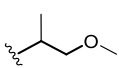
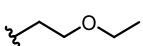
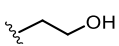
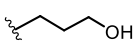
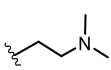
**Reagenzien und Bedingungen:** (i)  $K_2CO_3$ , MeOH, rt, 20 h; (ii) 4-Fluoro-3-nitrophenylboronsäure,  $Na_2CO_3$ ,  $Pd(PPh_3)_4$ , Dioxan:H<sub>2</sub>O (3:1), Argon Atmosphäre, 80 °C, 16 h; (iii) HOR', NaH, trockenes THF, rt, 16 h; (iv) Fe,  $NH_4Cl$ , EtOH:H<sub>2</sub>O (9:1), 60 °C, 4 h; (v) H-Cube, Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, 50 °C, Flussrate 1 mL/min; (vi) Acryloylchlorid, DIPEA, trockenes THF, 0 °C zu rt, 3 h; (vii) TFA:DCM (1:3), rt, 4 h, dann 1 M KOH in THF (1:1), rt, 2 h.

In dieser sechsstufigen Syntheseroute wurde initial in 4-Position eine Methoxygruppe in Anwesenheit von Methanol und unter leicht basischen Bedingungen eingeführt (**73**, 96 % Ausbeute). Verbindung **73** wurde in einer Pd-katalysierten Suzuki-Kupplung mit 4-Fluoro-3-nitrophenylboronsäure zu Verbindung **74** mit einer Ausbeute von 91 % umgesetzt. Im nächsten Schritt erfolgte die Einführung von sechs verschiedenen Löslichkeitsgruppen und Bausteine **75a-f** wurden mit Ausbeuten von 66-88 % erhalten. Die anschließende Reduktion der Nitrogruppe erfolgte erneut für die Verbindung mit der 2-Dimethylamino Löslichkeitsgruppe (**76f**) im H-Cube mit Pd/C und H<sub>2</sub> in MeOH bei 50 °C mit einer Ausbeute von 74 %. Verbindungen **75a-e** konnten mittels Fe-Reduktion in Ausbeuten von 13-98 % erhalten werden. Im nächsten Reaktionsschritt erfolgte die Kupplung mit Acryloylchlorid in Anwesenheit von DIPEA und die gewünschten Produkte **77a-f** wurden mit Ausbeuten von 40-75 % erhalten. Im letzten Schritt der Syntheseroute

wurde die SEM-Schutzgruppe abgespalten, sodass die drei Zielverbindungen **72d-f** mit Ausbeuten von 42-92 % erhalten wurden.<sup>xxiii</sup>

Die biochemische Charakterisierung der Verbindungen erfolgte mittels HTRF Assay und die zelluläre Untersuchung wurde mit dem *CellTiter-Glo* Assay durchgeführt (Tab. 11).<sup>xxiv</sup>

**Tabelle 11.** Biochemische und zelluläre Charakterisierung der Pyrrolopyrimidine **72a-f**.

	R'	Her2 HTRF IC <sub>50</sub> [nM]		Her2 CTG EC <sub>50</sub> [nM]	
		wt	insYVMA	H1781 (GdelinsVC)	Ba/F3 (insYVMA)
<b>72a-f</b>					
<b>18</b>					
<b>48b</b>					
<b>72a</b>		2074 ± 262	704 ± 145	>3000	>3000
<b>72b</b>		741 ± 103	284 ± 30	>3000	>3000
<b>72c</b>		2794 ± 502	875 ± 73	>3000	>3000
<b>72d</b>		n.b.	>2000	>3000	>3000
<b>72e</b>		n.b.	>2000	>3000	>3000
<b>72f</b>		n.b.	>2000	>3000	>3000
<b>18</b>	-	50 ± 3.3	11 ± 2	357 ± 92	910 ± 71
<b>48b</b>	-	11 ± 1	17 ± 3	161 ± 72	83 ± 20

n.b. = nicht bestimmt.

Die biochemische und zelluläre Charakterisierung der Verbindungen **72a-f** zeigte IC<sub>50</sub>- und EC<sub>50</sub>-Werte im mikromolaren Bereich (Ausnahme ist Verbindung **72b** mit IC<sub>50</sub>-Werten

<sup>xxiii</sup> Verbindungen **72a-c** der Pyrrolopyrimidin-basierten Substanzbibliothek wurden von Luke Hudson während seines Forschungsaufenthaltes in der AG Rauh synthetisiert. Verbindung **78** wurde arbeitsgruppenintern von Philip Klövekörn im Rahmen seiner Masterarbeit synthetisiert (2015).

<sup>xxiv</sup> Die biochemische und zelluläre Charakterisierung wurde von M. Sc. Kirujan Jeyakumar, Dr. Jonas Lategahn, Dr. Marina Keul und M. Sc. Hannah Lea Tumbrink durchgeführt, TU Dortmund (AG Rauh).

---

<750 nM). Zum Vergleich wurden die Inhibitoren **18** und **48b** aufgeführt, die jeweils eins der beiden Struktur motive tragen und untermauerten die aufgestellte Hypothese. Die korrekte Besetzung der Bindungstasche und die damit verbundene Potenz kann demnach nur in Anwesenheit der sterisch anspruchsvollen Methylpiperazin-Löslichkeitsgruppe (Beispiel Verbindung **18**) oder mit Hilfe eines hydrophoben Substituenten in 4-Position erfolgen (Beispiel Verbindung **48b**).

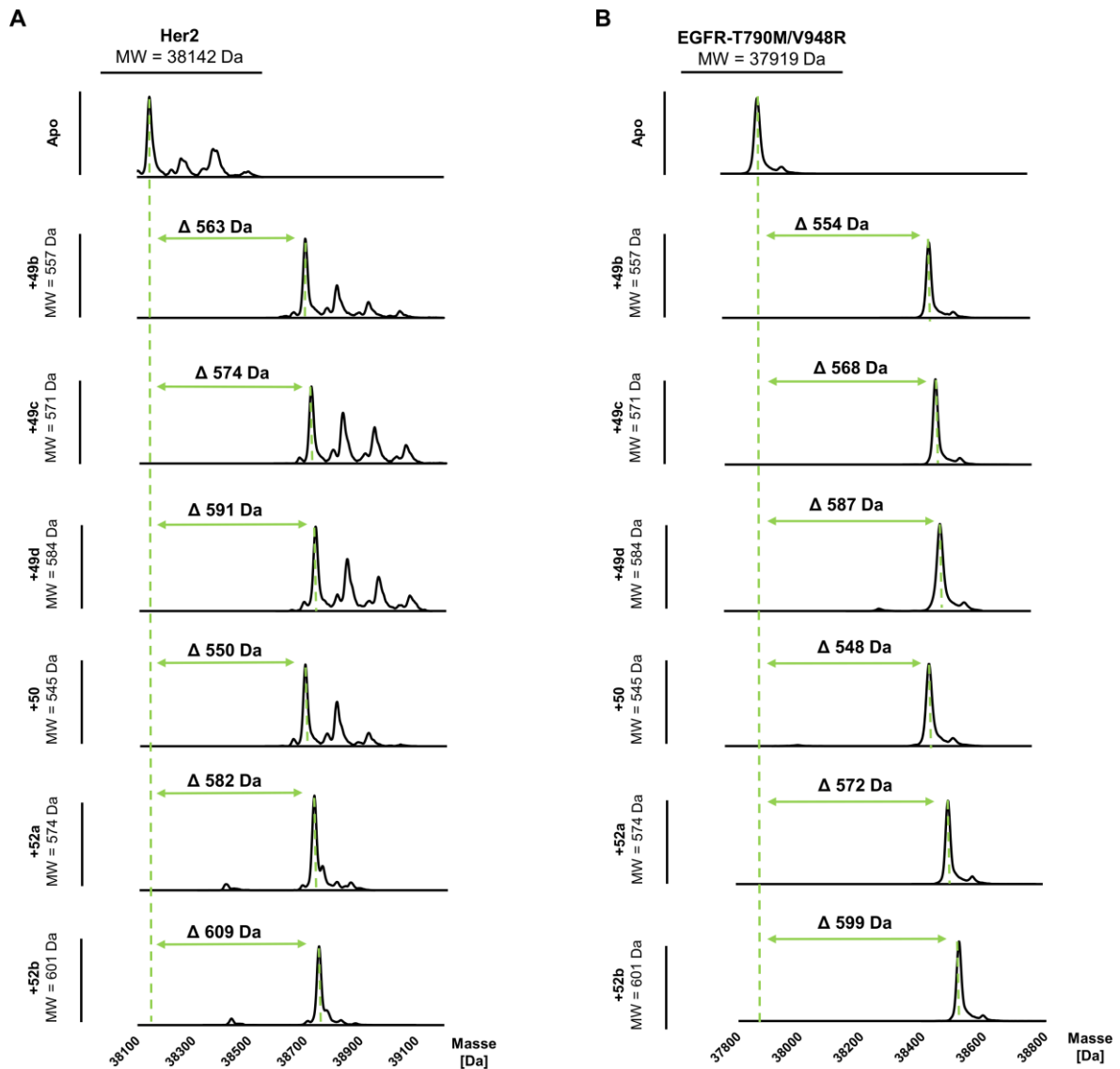
### **3.5.4 MS-basierter Nachweis der kovalenten Bindung an Cys805 in Her2 und Cys797 in EGFR**

Die Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren wurden hinsichtlich einer kovalenten Adressierung von Cys805 in Her2 designt und synthetisiert. Zur Validierung wurde die gereinigte rekombinante Her2-Kinasedomäne mit einem dreifachen Inhibitorüberschuss für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte mittels massenspektrometrischer Analyse ein Nachweis von entsprechenden Proteinaddukten.<sup>xxv</sup> Die dekonvolutierte Massenspektren zeigten eine Massenzunahme im Vergleich zur Apo-Masse des Proteins, die einer einfachen Modifizierung mit dem jeweiligen Inhibitor zugeordnet werden konnte (Abb. 40A). Zur Bestätigung der einfachen Modifikation wird beispielhaft das Spektrum für Verbindung **49b** für einen Massenbereich von 20.000-60.000 Da gezeigt (siehe Anhang Abb. 55). Wie bereits eingangs beschrieben wurden Kristallisationsstudien stellvertretend mit einem EGFR-T790M/V948R<sup>xxvi, 194</sup> Modellsystem durchgeführt (Abb. 36A). Aus diesem Grund wurde, analog zu Her2, die Bindung an EGFR-T790M/V948R untersucht, wobei gleichermaßen die kovalente Bindungsbildung bestätigt werden konnte (Abb. 40B).

---

<sup>xxv</sup> Proteine wurden von M. Sc. Janina Niggenaber (TU Dortmund, AG Rauh) bereitgestellt.

<sup>xxvi</sup> Val948 befindet sich in der C-terminalen Unterdomäne der EGFR-Proteinkinasedomäne. Die Mutation zu Arginin (V948R) wurde eingeführt, um die Kristallisation zu verbessern.



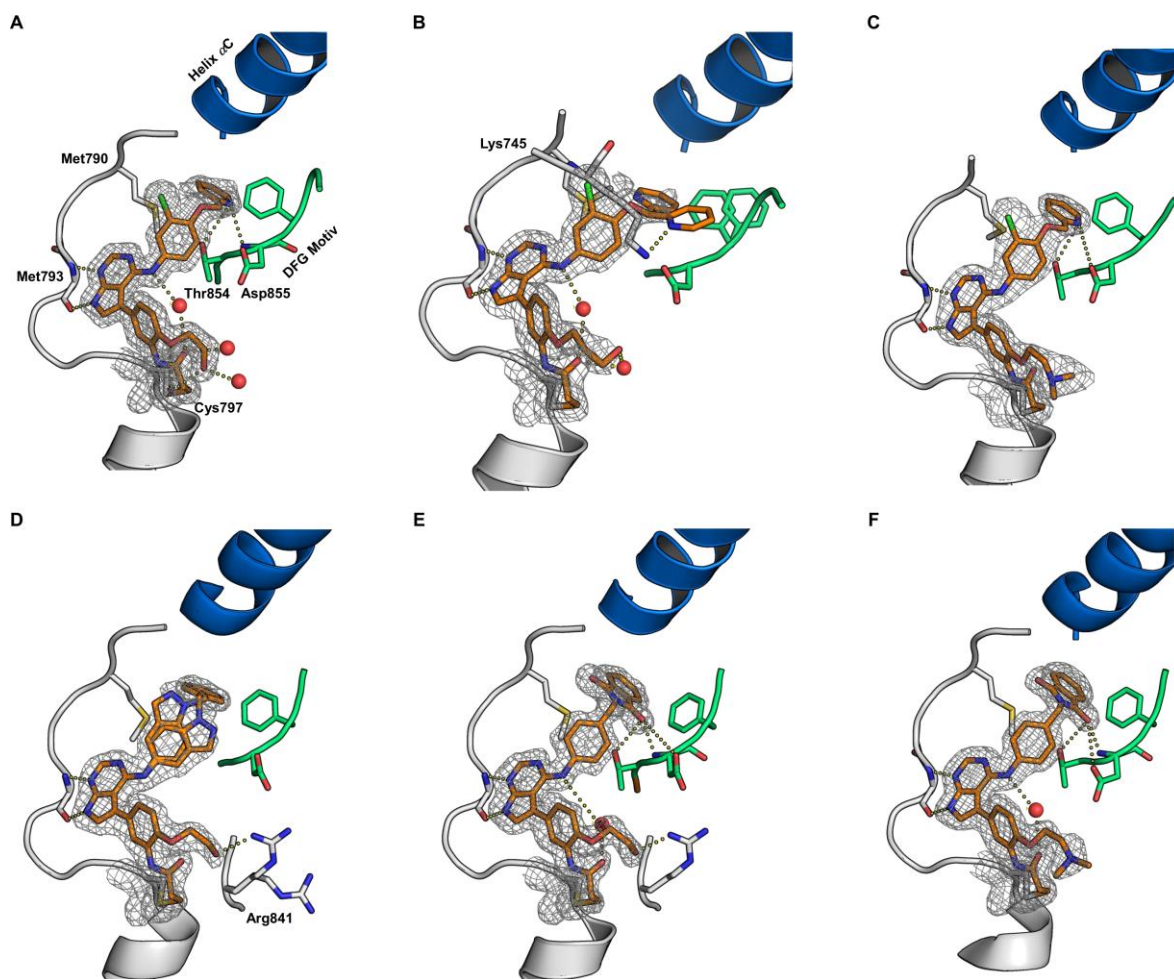
**Abbildung 40.** Dekonvolvierte Massenspektren von **A** Her2 und **B** EGFR-T790M/V948R nach Inkubation mit DMSO (Apo) und einer Serie von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren.

Basierend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen wurden Ko-Kristallisationsstudien mit dem EGFR-T790M/V948R Modellsystem durchgeführt, um den Bindungsmodus der Inhibitoren zu validieren.

### 3.5.5 Kristallisationsexperimente mit EGFR-T790M/V948R

Die Ko-Kristallisation von EGFR-T790M/V948R mit den synthetisierten Kinaseinhibitoren wurde im hängenden Tropfen durchgeführt, um den angenommenen Bindungsmodus der Inhibitoren zu bestätigen (Abb. 41).<sup>xxvii</sup>

<sup>xxvii</sup> Ko-Kristallisationsexperimente wurden von M. Sc. Janina Niggenaber durchgeführt, TU Dortmund (AG Rauh).



**Abbildung 41.** Kristallstrukturen von EGFR-T790M/V948R im Komplex mit einer Serie von Pyrrolopyrimidinen. **A** EGFR-T790M/V948R im Komplex mit **49b** bei 1.5 Å (PDB: 6TFV); **B** EGFR-T790M/V948R im Komplex mit **49c** bei 1.7 Å (PDB: 6TFY); **C** EGFR-T790M/V948R im Komplex mit **49d** bei 2.0 Å (PDB: 6TFW); **D** EGFR-T790M/V948R im Komplex mit **50** bei 1.8 Å (PDB: 6TFZ); **E** EGFR-T790M/V948R im Komplex mit **52a** bei 1.5 Å (PDB: 6TG0); **F** EGFR-T790M/V948R im Komplex mit **52b** bei 1.6 Å (PDB: 6TG1). Die 2*Fo*-*Fc*-Elektronendichtekarten wurden bei einem r.m.s.d. von 1 konturiert.

Anhand der gelösten Ko-Kristallstrukturen konnte die Alkylierung von Cys797 mit allen Verbindungen eindeutig gezeigt werden. Die Inhibitoren werden durch ein Netzwerk von Interaktionen in der Bindungstasche stabilisiert. Allen Strukturen gemeinsam sind zwei Wasserstoffbrückenbindungen vom Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst zu dem Peptidrückgrat von Met793 in der Scharnierregion, wobei das Stickstoffatom *N1* des Pyrrolopyrimidins als Wasserstoffbrückendonator und das Stickstoffatom *N7* als Wasserstoffbrückenakzeptor fungiert. Für die Verbindungen **49b-d** und **52a,b** konnte ein Wassermolekül aufgelöst werden, welches zwischen dem Amin in 4-Position und dem Carbonylkohlenstoffatom des Michaelakzeptors Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet. Die hydrophoben Substituenten in 4-Position besetzen erwartungsgemäß die Subtasche, welche ausschließlich in der inaktiven Kinasekonformation zugänglich ist. Hierbei wechselwirkt das Pyridin in den Strukturen **49b,d** mit der Seitenkette von Thr854 und dem



---

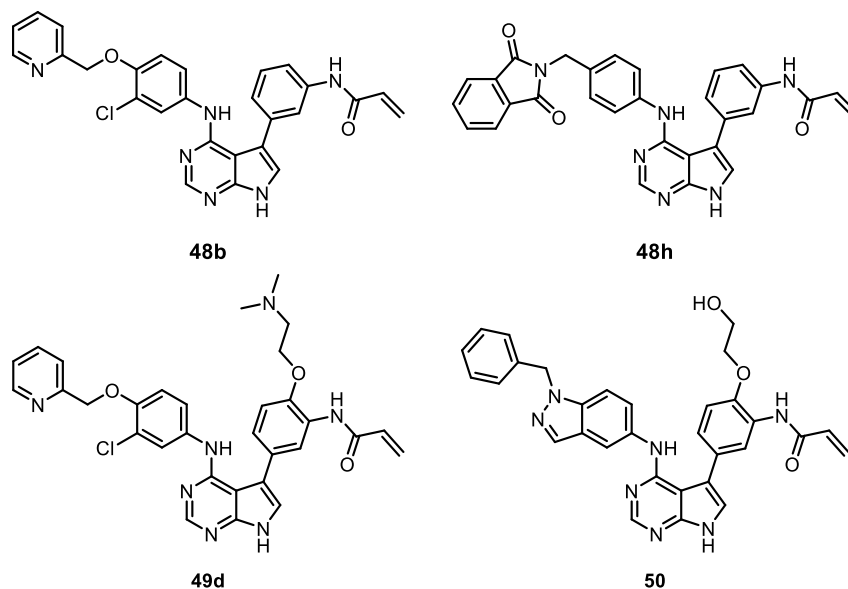
Carbonylkohlenstoffatom von Asp855 innerhalb des DFG-Motivs. In der Kristallstruktur mit **49c** wurden zwei mögliche Konformere des Pyridins beobachtet, wovon eins mit Lys745 interagiert. Ebenfalls wurde der hydrophobe Substituent in **50** als Rotamer registriert. Das Isoindolin-1,3-Dion der Inhibitoren **52a,b** bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu Thr854, Asp855 und zum Carbonylkohlenstoffatom von Asp855 aus und ferner steht es in einem 90 ° Winkel zum Phe856 ( $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung). Des Weiteren konnte für die eingeführten Löslichkeits-vermittelnden Gruppen mit endständiger Alkoholgruppe eine Wechselwirkung zu einem Wassermolekül beobachtet werden (Verbindungen **49b,c**), wodurch diese in einer Konformation gehalten wurden und somit die flexiblen Substituenten in den Kristallstrukturen aufgelöst werden konnten. Interessanterweise zeigten die C2-kettigen Alkohole der Inhibitoren **50** und **52a** eine Wechselwirkung zu einem Rotamer der Agr841 Seitenkette.

Abschließend lässt sich die hohe strukturelle Ähnlichkeit hinsichtlich der ATP-Bindungstaschen der ErbB-Familienmitglieder Her2 und EGFR festhalten, weshalb das EGFR-T790M/V948R Modellsystem als ein entsprechendes Surrogat genutzt wurde. Durch die gelösten Ko-Kristallstrukturen konnte die kovalente Modifizierung von Cys797 in EGFR-T790M/V948R eindeutig nachgewiesen werden. Ebenso wurde das Design der Inhibitoren Struktur-basiert untermauert, da die Komplexstrukturen zeigten, dass die Alkylketten mit endständigen Alkoholfunktionalitäten zu zusätzlichen Protein-Ligand-Wechselwirkungen führen können. Die Einführung der Löslichkeits-vermittelnden Gruppen in *ortho*-Position zum Michaelakzeptor erwies sich somit als durchaus vorteilhaft. Des Weiteren kann durch die Erkenntnisse der Ko-Kristallstrukturen von **49b,c** und **50** für mögliche folgende chemische Optimierungen abgeleitet werden, dass die hydrophobe Subtasche bspw. auch durch Substituenten mit einem aromatischen 3-Ringsystem besetzt werden kann. Zusätzliche Heteroatome könnten dabei Wechselwirkungen mit Lys745, Thr854 und Asp855 ausbilden und somit die inaktive Kinasekonformation stabilisieren.

### **3.5.6 Physikochemische und pharmakokinetische Analyse von Pyrrolopyrimidinen**

Im Rahmen der weiteren Profilierung wurde ein Set aus vier Inhibitoren und drei Referenzverbindungen ausgewählt, die hinsichtlich ihrer *in silico* physikochemischen und *in vitro* pharmakokinetischen Parameter analysiert wurden (Tab. 12).

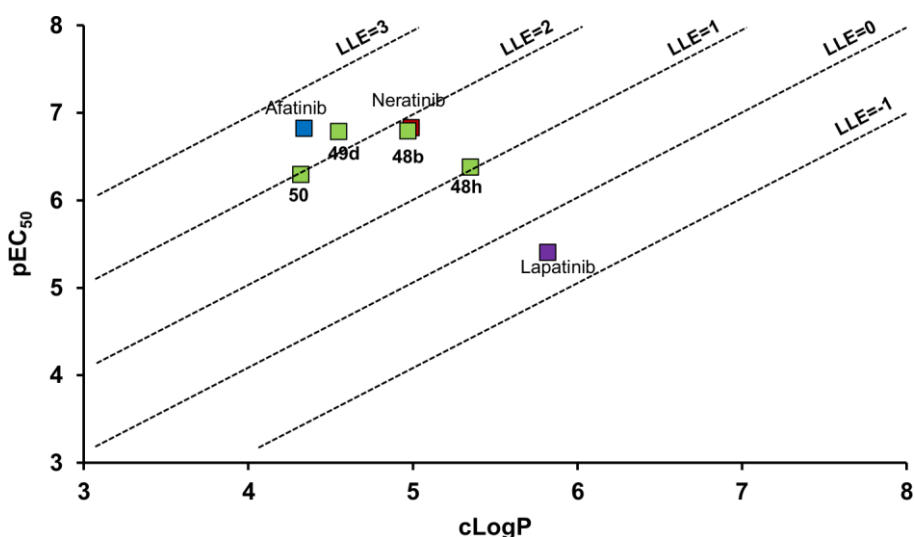
**Tabelle 12.** *In silico* physikochemische und *in vitro* pharmakokinetische Parameter für Afatinib, Neratinib, Lapatinib als Referenzen und **48b**, **48h**, **49d** und **50**.



	Afa- tinib	Nera- tinib	Lapa- tinib	48b	48h	49d	50
<b>Physikochemische Parameter</b>							
MW	485.9	557.0	581.0	496.9	514.5	584.0	545.6
cLogP <sup>a</sup>	4.34	4.99	5.82	4.97	5.35	4.55	4.32
LLE <sup>b</sup>	2.48	1.84	-0.42	1.82	1.03	2.24	1.97
<b>Kinetische Löslichkeit<sup>c</sup></b>							
SolRank, pH 7.4 [μM]	281.2	1.2	4.1	n.b.	8.3	60.6	16.8
TurbiSol, pH 7.4 [μM]	n.b.	>10	3-10	30-100	~30	~100	30-100
<b>Permeabilität<sup>c</sup></b>							
Caco-2 P <sub>app</sub> (A-B) [x10 <sup>-6</sup> cm/s]	2.4	0.09	0.7	1.9	0.5	2.1	1.2
Caco-2 P <sub>app</sub> (B-A) [x10 <sup>-6</sup> cm/s]	55.4	0.4	0.2	0.6	0.1	23.9	5.2
Caco-2 Verhältnis P <sub>app</sub> ((B-A) / (A-B))	23.2	4.3	0.2	0.3	0.2	11.4	4.5
<b>Stabilität<sup>c</sup></b>							
Plasmastabilität human / murin [%]	96.5 / 100.6	80.7 / 97.4	99.7 / 95.9	79.8 / 49.0	78.1 / 81.3	74.4 / 0.8	90.9 / 88.4
Mikrosomale Stabilität Phase I (CL <sub>int</sub> ) [μL/min/mg] human / murin	1.4 / 9.4	42.0 / 126.0	16.7 / 73.7	27.7 / 124.9	96.3 <sup>d</sup> / 770.2 <sup>d</sup>	64.2 <sup>d</sup> / 866.4 <sup>d</sup>	66.0 <sup>d</sup> / 602.7 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>cLogP wurde mit der Software ChemDraw, PerkinElmer berechnet. <sup>b</sup>Ligand-lipophilicity efficiency (LLE) wurde berechnet aus  $pEC_{50}(H1781) - cLogP$ . <sup>c</sup>Durchgeführt und ausgewertet von Dr. Matthias Baumann und Dr. Anke Unger vom Lead Discovery Center in Dortmund. <sup>d</sup>Gemessen bei 1  $\mu$ M. n.b. = nicht bestimmt.

Die Typ-II-Inhibitoren Neratinib und Lapatinib zeigten neben erhöhtem Molekulargewicht (557-581 Da) auch hohe cLogP Werte (4.99-5.82), wohingegen der Typ-I-Inhibitor Afatinib mit einem Molekulargewicht von 486 Da und einem cLogP von 4.34 darunter liegt. Die Verbindungen **49d** und **50** wiesen neben einem erhöhten Molekulargewicht im Vergleich zu **48b** und **48h** geringere cLogP Werte auf, die mit der Einführung der Löslichkeits-vermittelnden Gruppen und damit einhergehender verbesserter Löslichkeit begründet werden konnten. Die bestimmte *ligand-lipophilicity efficiency* (LLE) kombiniert die Lipophilie mit der *in vitro* Potenz in H1781 Zellen. Für das ausgewählte Set von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren ist eine Auftragung der  $pEC_{50}$ -Werte gegen den cLogP erstellt worden (Abb. 42).



**Abbildung 42.** Auftragung der  $pEC_{50}$ -Werte (aus H1781 Zellen) gegen den cLogP der Referenzverbindungen Afatinib (blau), Neratinib (rot) und Lapatinib (lila), sowie vier repräsentativer Inhibitoren **48b**, **48h**, **49d** und **50** aus der Serie (grün).

Die bestimmten LLE-Werte für die Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren **49d** und **50** waren lediglich leicht erhöht (LLE = 2.2 und 2) im Vergleich zu Neratinib mit einem LLE von 1.8. Lapatinib stach mit einem negativen, nicht favorisierten LLE von -0.4 heraus. Die hohe Lipophilie der Verbindungen korrelierte mit den schlechten bis moderaten Löslichkeiten. Lediglich Inhibitor **49d** zeigte eine hinreichende Löslichkeit von 60.6  $\mu$ M im SolRank Assay, welche in guter Übereinstimmung mit dem im TurbiSol bestimmten Löslichkeitsbereich von 30-100  $\mu$ M liegt. Verbindung **49d** wie auch **50** wiesen bessere kinetische Löslichkeiten im Vergleich zu Neratinib und Lapatinib auf. Neben der Bestimmung der Löslichkeit wurde ein komplexeres Modellsystem zur Einschätzung der oralen Verfügbarkeit des Wirkstoffes gewählt.

---

Im Caco-2 Assay zeigten Neratinib und Lapatinib sehr geringe zelluläre Permeabilitäten von der apikalen (A) zur basolateralen (B) Seite mit  $0.09\text{-}0.7 \times 10^{-6}$  cm/s, wohingegen die synthetisierten Inhibitoren **48b**, **48d** und **49** verbesserte Eigenschaften mit  $P_{app}$  (A-B) von  $1.9$ ,  $2.1$  und  $1.2 \times 10^{-6}$  cm/s zeigten. Die Verbindungen **48b** und **48h** wiesen einen höheren Influx ( $P_{app}$  (A-B)  $1.9 \times 10^{-6}$  und  $0.5 \times 10^{-6}$  cm/s) als Efflux ( $P_{app}$  (B-A)  $0.6 \times 10^{-6}$  und  $0.1 \times 10^{-6}$  cm/s) auf, was in einem favorisierten Verhältnis  $P_{app}$  ((B-A) / (A-B)) von  $0.3$  bzw.  $0.2$  resultierte und somit für eine orale Verfügbarkeit spricht. Diese Eigenschaften sind überlegen im Vergleich zu Neratinib mit einem  $P_{app}$  ((B-A) / (A-B)) von  $4.3$ , welches ein deutlich höheres Ausschleusen der Substanz als gastrointestinale Aufnahme beschreibt. Des Weiteren wurde eine gute Plasmastabilität von  $> 74\%$  in humanem Plasma festgestellt, wie auch eine moderate bis gute Stabilität in humanen Lebermikrosomen ( $CL_{int} = 28\text{-}96$   $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ). Auf der anderen Seite wurden nur sehr geringe Stabilitäten von  $0.8$  bzw.  $49\%$  für **49d** und **48b** in murinem Plasma festgestellt, sowie hohe Clearance in murinem Phase-I-Metabolismus Assay von  $125\text{-}866$   $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  für alle synthetisierten Inhibitoren. Neratinib und **48b** zeigten im humanen Phase-I-Metabolismus Assay Clearance-Werte in ähnlicher Größenordnung, was in der strukturellen Gleichheit durch den hydrophoben Substituenten begründet liegt. Somit kann auf eine gewisse Instabilität dieses Substituenten geschlossen werden, die in zukünftigen Arbeiten optimiert werden sollte. Verbindung **49d** zeigte den größten Abbau in murinen Lebermikrosomen ( $CL_{int} = 866$   $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ), was möglicherweise in der eingebrachten Dimethylamin-Löslichkeitsgruppe begründet liegt, da hier häufig Demethylierungsreaktionen beobachtet werden.

Im Zuge der *in silico* physikochemischen und *in vitro* pharmakokinetischen Charakterisierung einer Serie von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren konnten die Verbindungen **48b** und **49d** mit vergleichbaren Eigenschaften wie Neratinib identifiziert werden. Die Einführung der Löslichkeits-vermittelnden Gruppe von Verbindung **49d** führte zu einem schnellen Abbau in murinen Lebermikrosomen, aber auch zu einer gesteigerten kinetischen Löslichkeit im Vergleich zu Neratinib und Inhibitor **48b**. In zukünftigen Optimierungszyklen sollten die Plasmastabilität sowie auch die Permeabilität im Fokus stehen und verbessert werden.

---

### 3.5.7 Zusammenfassung

Etwa 4 % aller Patienten mit NSCLC haben Mutationen in Her2, wovon ca. 80 % Insertionsmutationen in Exon20 entsprechen. Am häufigsten wurde die Insertion der vier Aminosäuren YVMA in Codon 776 gefunden (Her2-insYVMA), was zu einer Verdopplung dieses Motivs führt. Die geringen Ansprechraten von <40 % auf die bisherigen Therapien mit TKI's verdeutlichen den Bedarf an wirksamen Inhibitoren für mutiertes Her2 und ermutigten uns, tieferegehende Forschung und Entwicklung für neue Inhibitoren zu betreiben, die effektiv die Insertionsmutante von Her2 adressieren sollten. Vor diesem Hintergrund wurden kovalente, Pyrrolopyrimidin-basierte Typ-II-Inhibitoren entwickelt und tiefergehend charakterisiert. Aus Vorarbeiten gingen im Zuge der Durchmusterung einer Kinaseinhibitor-fokussierten Substanzbibliothek Verbindungen mit hydrophoben und sterisch anspruchsvollen Substituenten hervor, die mit dem Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst kombiniert wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Löslichkeit der Inhibitoren durch Einführung von Löslichkeits-vermittelten Gruppen (Alkylketten mit endständigen Alkohol-, Amin- oder Etherfunktionalitäten) verbessert werden. Basierend auf einer Ko-Kristallstruktur von EGFR-T790M/V948R im Komplex mit Verbindung **48d** wurden durch Struktur-basiertes Design neue, vielversprechende Inhibitoren entworfen und synthetisiert. Die anschließende Evaluation zeigte eine verbesserte biochemische Aktivität, wohingegen die zelluläre Aktivität gleichbleibend war. Western-Blot Experimente untermauerten die zuvor erhobenen Daten. Hierbei wurde ein zellulärer Effekt zwischen 100 und 500 nM beobachtet, sowie die Runterregulierung des nachgeschalteten pAKT und pMAPK Signals bei jeweils gleichbleibender Gesamtproteinmenge von AKT und MAPK. In MS-Analysen konnten für alle Inhibitoren der Serie entsprechende Proteinaddukte nachgewiesen werden und in abschließenden Kristallisationsstudien die kovalente Bindung zu Cys797 in EGFR-T790M/V948R als Modellsystem eindeutig aufgelöst werden. Die pharmakokinetische Profilierung zeigte Optimierungsbedarf bzgl. der Stabilität in murinem Blutplasma sowie in murinen Lebermikrosomen. Die Verbindungen **48b** und **48h** zeigten guten Flux über Caco-2-Zellen mit einem vorteilhaften Verhältnis  $P_{app} ((B-A) / (A-B))$ , womit sie im Vergleich zu Neratinib überlegen waren. Insgesamt bieten die hier erhaltenen Ergebnisse eine gute Grundlage für künftige Arbeiten an kovalenten Typ-II-Inhibitoren für mutiertes Her2.

---

### 3.6 Struktur-basiertes Design, Synthese und Evaluierung von kovalenten Inhibitoren der Tyrosinkinase KIT und PDGFR $\alpha$

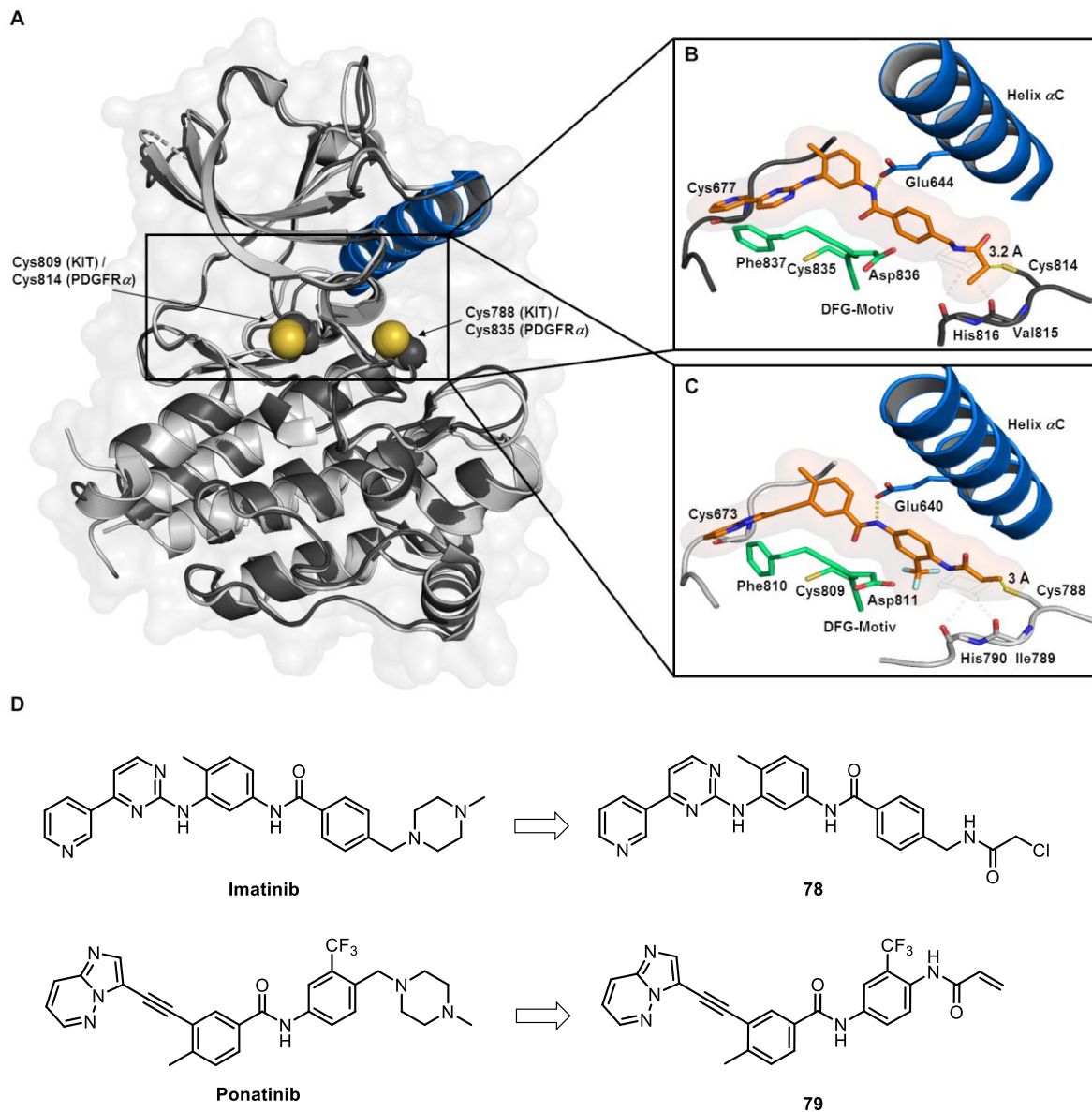
Bei den derzeitig zugelassenen Wirkstoffen für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem GIST handelt es sich um ATP-kompetitive, reversible TKI's, welche die RTKs KIT und PDGFR $\alpha$  adressieren. Zu dem Nebenwirkungsspektrum gehören Symptome wie Blutarmut, Müdigkeit und Erschöpfung, Hautverfärbungen, Durchfälle, Übelkeit oder das sog. Hand-Fuß-Syndrom. Es wurde eine Dosis-abhängige Nebenwirkung unter Ponatinib-Gabe beschrieben, bei der 11.8 % der Patienten mit BCR-ABL positiver Leukämie arterielle thrombotische Vorfälle erlitten.<sup>142</sup> Einer der Vorteile von kovalenten Kinaseinhibitoren ist die maximale Verweildauer am Protein, die es in der Regel ermöglicht, geringere Dosen einsetzen zu können. Auf diese Weise könnten aufgrund einer hohen Dosis hervorgerufene Nebenwirkungen umgangen werden und somit die Lebensqualität der Patienten während der Therapie gesteigert werden.

Die WT-Proteinkinase KIT trägt in ihrer Aminosäuresequenz acht native Cysteine, von denen Cys788 und Cys809 in der ATP-Bindungstasche liegen. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen KIT und PDGFR $\alpha$  trägt die Proteinkinase PDGFR $\alpha$  isostrukturelle Cysteine an Position 814 und Position 835 (Abb. 43A). LEPROULT *et al.* konnten im Jahr 2011 die generelle Adressierbarkeit von Cys788 in KIT sowie Cys814 in PDGFR $\alpha$  mit einem Imatinib-basierten kovalenten Inhibitor (**78**) basierend auf MS/MS-Experimenten zeigen (Abb. 43B und D).<sup>165</sup>

Zum Zeitpunkt der arbeitsgruppeninternen Vorarbeiten von Dr. Helena Kaitsiotou<sup>xxviii</sup> war Ponatinib Viertlinien-Therapie mit einer klinischen Benefit-Rate von 55 % bei bereits vortherapierten Patienten mit KIT Exon11 Mutationen.<sup>142</sup> In Analogie zu den Arbeiten von LEPROULT *et al.* wurde ein Ponatinib-basierter, Elektrophil-dekorierter Inhibitor (**79**) entworfen, welcher an Cys788 irreversibel binden sollte (Abb. 43C und D).

---

<sup>xxviii</sup> Dissertation Helena Kaitsiotou, TU Dortmund (AG Rauh), 2018.



**Abbildung 43.** **A** Überlagerung der Kristallstrukturen der Proteinkinasedomänen von KIT (hellgrau, PDB: 4U0I) und PDGFR $\alpha$  (dunkelgrau, PDB: 6JOL). Die relevanten Cysteine an Positionen 788 bzw. 835 und 809 bzw. 814 innerhalb der ATP-Bindungstasche sind als Sphären dargestellt. **B** Ausschnitt der ATP-Bindungstasche mit Modellierung des kovalenten, Imatinib-basierten Typ-II-Inhibitors **78** (orange) in PDGFR $\alpha$  basierend auf der Ko-Kristallstruktur von Imatinib (schwarz-weiße Darstellung, PDB: 6JOL). Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat und Glu644 sind als gepunktete gelbe Linie dargestellt. **C** Ausschnitt der ATP-Bindungstasche mit Modellierung des potentiell kovalenten, Ponatinib-basierten Typ-II-Inhibitors **79** (orange) in KIT basierend auf der Ko-Kristallstruktur von Ponatinib (schwarz-weiße Darstellung, PDB: 4U0I). Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat und Glu640 sind als gepunktete gelbe Linie dargestellt. **D** Chemische Strukturen der Referenzverbindungen Imatinib und Ponatinib sowie deren jeweilige Modifikation hinsichtlich der Elektrophile. Modelliert wurde mit der Software Discovery Studio 3.1 sowie eine Energieminimierung der Liganden durchgeführt wurde.

Durch ein Netzwerk von Interaktionen wird Ponatinib in der Bindetasche stabilisiert. Wasserstoffbrückenbindungen werden vom tertiären Amin des Methylpiperazins zum

---

Peptidrückgrat von Ile789 und His790 ausgebildet, sowie vom Amin der zentralen Amidbindung in Ponatinib zur Seitenkette von Glu640 in der Helix  $\alpha$ C. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung bildet den Kontakt zur Scharnierregion zwischen Cys673 und dem Imidazolopyridazin aus. Die CF<sub>3</sub>-Gruppe besetzt eine hydrophobe Kavität und stabilisiert somit zusätzlich den Liganden in der Bindungstasche. Ponatinib ist ein Typ-II-Inhibitor, der lediglich in der inaktiven, *DFG-out* Kinasekonformation an das Protein binden kann, was hier deutlich durch die nach außen rotierte Seitenkette des Phenylalanins an Position 810 zu erkennen ist. Cys788 befindet sich im hinteren Teil der ATP-Bindungstasche, wohingegen Cys809 direkt vor dem DFG-Motiv lokalisiert ist, womit sich aufgrund der Rotation des DFG-Motivs (aktive und inaktive Konformation, siehe Kapitel 1.3) eine hohe Flexibilität für dieses Cysteins ergibt (Abb. 43C).

Basierend auf der Ko-Kristallstruktur von Ponatinib im Komplex mit KIT und dem beschriebenen Bindungsmodus wurde eine Position am Grundgerüst ausgewählt, die sich für eine Substitution mit entsprechenden Elektrophilen eignet. Aus den Modellierungsstudien für **79** geht hervor, dass die Einführung des Acrylamids in *ortho*-Position zur CF<sub>3</sub>-Gruppe eine gute Orientierung für eine Reaktion an Cys788 aufweist (Abb. 43C). Durch diese Substitution geht die Interaktion vom tertiären Amin des Methylpiperazins zum Peptidrückgrat von Ile789 und His790 verloren, wobei davon ausgegangen wurde, dass durch die verbleibenden Wechselwirkungen eine ausreichende Affinität erzielt werden kann (Abb. 43C, schwarz-weiße Darstellung).

Im Rahmen von biochemischen Aktivitätsmessungen (HTRF) wurde eine halbmaximale inhibitorische Potenz von 1 nM von Verbindung **79** gegen KIT Wildtyp gemessen. In massenspektrometrischen Experimenten wurde keine Modifikation von **79** an der isolierten Kinasedomäne von KIT bei pH 7.5 nach 24 h Inkubation auf Eis mit einem fünffachen Inhibitorüberschuss beobachtet. Signifikant erhöht (aber nicht vollständig) wurde die Modifikation durch Erhöhung des pH Wertes auf 8.5, weshalb auf eine geringe Nukleophilie von Cys788 unter den gegebenen Bedingungen geschlossen wurde. In weiterführenden MS/MS-Experimenten konnte die Modifikation von Cys788 durch Verbindung **79** nicht bestätigt werden.<sup>xxix</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst Verbindung **79** resynthetisiert werden, um das Bindungsverhalten aufzuklären (*mode-of-action*). Innerhalb des Struktur-basierten Designs wurden weitere Ponatinib-basierte Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren entworfen, die im Folgenden näher betrachtet werden.

---

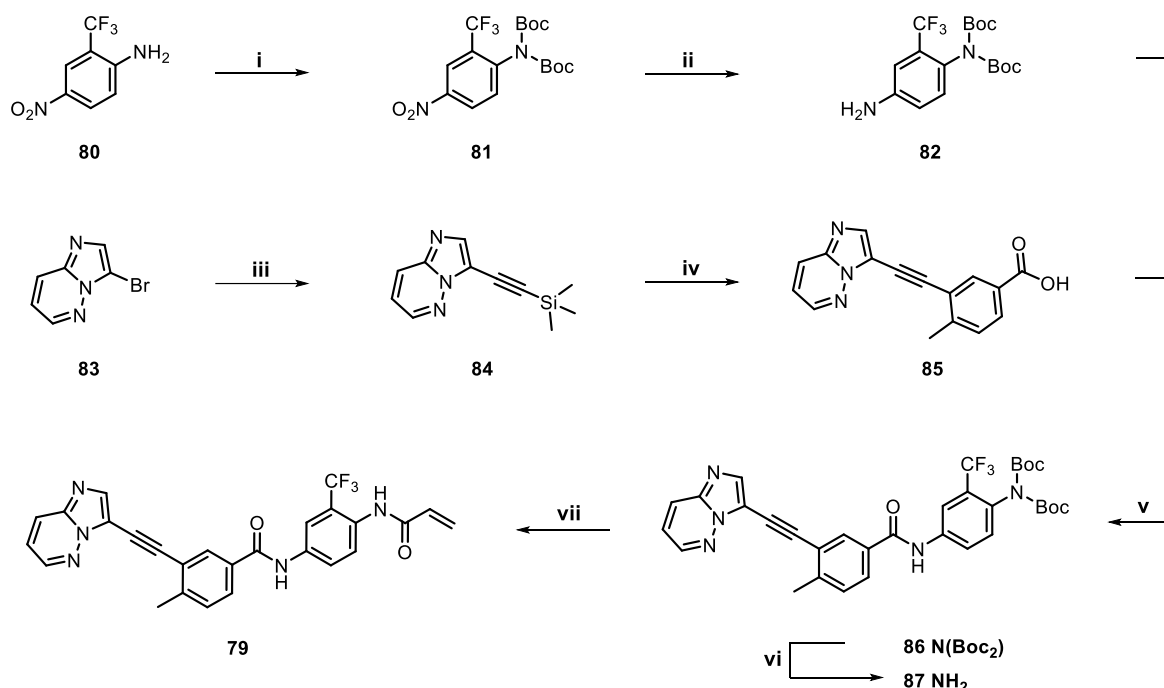
<sup>xxix</sup> Dissertation Helena Kaitsiotou, TU Dortmund (AG Rauh), 2018.



### 3.6.1 Kovalente Ponatinib-basierte Typ-II-Inhibitoren

Die Synthesestrategie von Verbindung **79** wurde bereits in den Vorarbeiten von Dr. Helena Kaitsiotou beschrieben, sollte allerdings im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich leicht zugänglichen Derivatisierungsmöglichkeiten optimiert werden. Die neu aufgestellte, siebenstufige konvergente Syntheseroute zur Darstellung von **79** ist im nachfolgenden Reaktionsschema abgebildet (Schema 9).<sup>xxx</sup>

**Schema 9.** Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindung **81**.



**Reagenzien und Bedingungen:** (i) Et<sub>3</sub>N, DMAP, Boc<sub>2</sub>O, THF, 80 °C, 1d; (ii) Fe, NH<sub>4</sub>Cl, EtOH:H<sub>2</sub>O (9:1), 60 °C, 16 h; (iii) TMSA; DIPA, Pd(PPh<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub>, CuI, MeCN, 80 °C, 16 h; (iv) 3-Iodo-4-methylbenzoesäure, DIPA, Pd(PPh<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub>, CuI, MeCN, 60 °C, 30 min, dann abkühlen auf rt und Zugabe von TBAF, 80 °C, 16 h; (v) HATU; DIPEA, 3-Iodo-4-methylbenzoesäure, THF, rt, 16 h; (vi) TFA:DCM (1:3), rt, 16 h; (vii) Acryloylchlorid, DIPEA, trockenes THF, 0 °C zu rt, 2d.

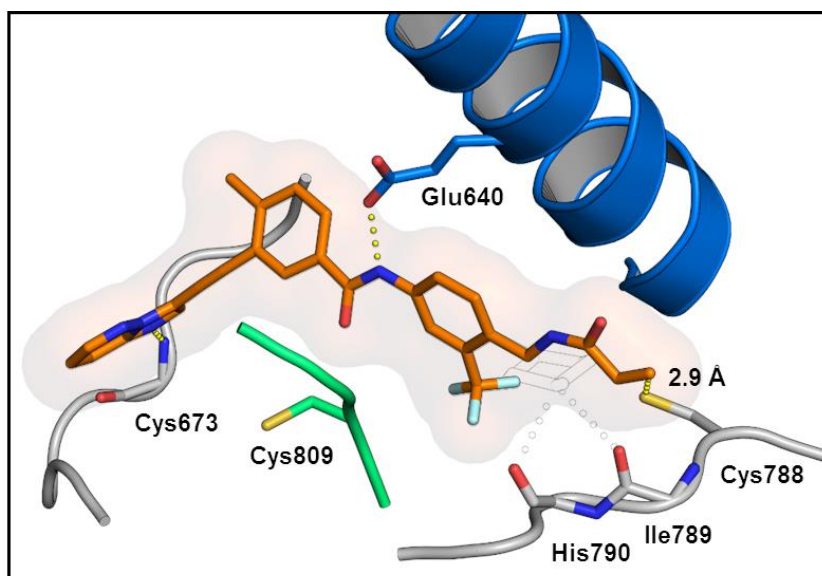
Der obere, zweistufige Synthesestrang zeigt die Darstellung des Amin-Bausteins **82**. Ausgehend vom kommerziell erhältlichen 4-Nitro-2-trifluoromethyl Anilin **80** wurde im ersten Schritt das freie Amin über eine Kondensationsreaktion mit Di-*tert*-butyldicarbonat mit einer nahezu quantitativen Ausbeute von 95 % in das Carbamat **81** überführt. Die anschließende Reduktion der Nitrogruppe erfolgte mittels Fe-Reduktion in Anwesenheit von Ammoniumchlorid und lieferte Amin-Baustein **82**. Der untere, zweistufige Synthesestrang zeigt die Darstellung des Carbonsäure-Bausteins **85**. Ausgehend vom kommerziell erhältlichen 3-Bromoimidazol[1,2-*b*]pyridazin **83** wurde in einer zweifachen

<sup>xxx</sup> Die Darstellung von Verbindung **85** wurde überwiegend von Dr. Rajesh Gontla etabliert (TU Dortmund, AG Rauh)

Sonogashira-Kupplungskaskade Zwischenstufe **85** mit einer Ausbeute von 35 % über zwei Schritte erhalten. Im nächsten Reaktionsschritt erfolgte eine Amidkupplung in Anwesenheit des Kupplungsreagenzes HATU und der Base DIPEA, sodass Zwischenprodukt **86** nach exzessiver säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 10 % erhalten wurde. Die anschließende Entschützung wurde mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan durchgeführt und lieferte Verbindung **87** mit einer Ausbeute von 97 %. Im finalen Schritt der Synthese wurde das reaktive Elektrophil substituiert. Die Kupplung mit Acryloylchlorid in Anwesenheit von DIPEA lieferte das gewünschte Produkt **79** mit einer Ausbeute von 11 %.

Die hier beschriebene Syntheseroute hat den Vorteil gegenüber der zuvor etablierten Route, dass beliebige Amin- und Carbonsäure-Bausteine eingesetzt werden können, welche im fünften Reaktionsschritt der Synthese miteinander verbunden werden. Auf diese Weise fanden die mit vielen Nebenprodukten ablaufenden Sonogashira-Kupplungen separiert vom restlichen Molekül statt.

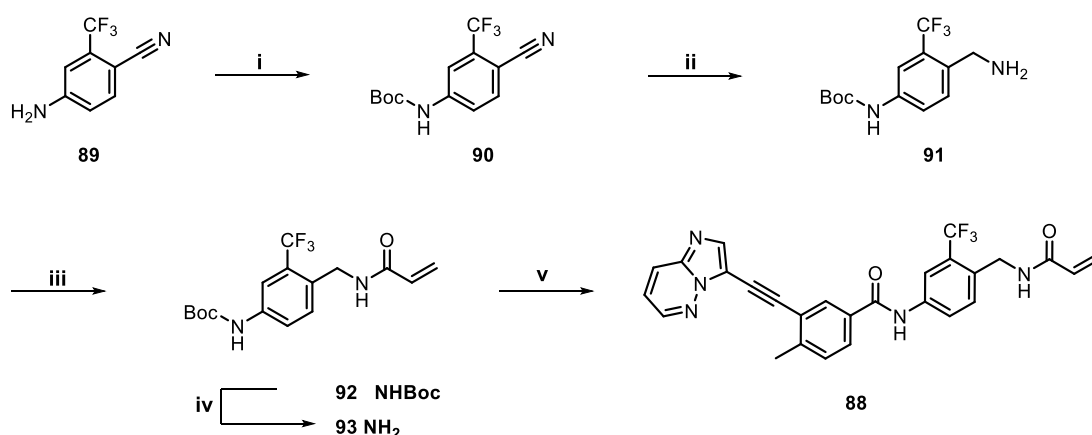
In weiteren Modellierungsstudien wurde die Einbringung einer methylenverbrückten Acrylamideinheit evaluiert, woraus Verbindung **88** resultierte (Abb. 44).



**Abbildung 44.** Modellierung vom designten Elektrophil-modifizierten und Ponatinib-basierten Typ-II-Inhibitor **88** in KIT basierend auf der Ko-Kristallstruktur von Ponatinib (schwarz-weiße Darstellung, PDB: 4U0I). Modelliert wurde mit der Software Discovery Studio 3.1 sowie eine Energieminimierung der Liganden durchgeführt wurde.

Aus den Modellierungsstudien für **88** geht hervor, dass die Einführung des Acrylamids, welches über eine Methylengruppe verbrückt an das endständige Ringsystem eingebracht wurde, ebenfalls eine gute Orientierung für eine Reaktion des Elektrophils an Cys788 aufweisen sollte. Die Synthese von Verbindung **88** wird im folgenden Reaktionsschema beschrieben (Schema 10).

**Schema 10.** Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindung **88**.

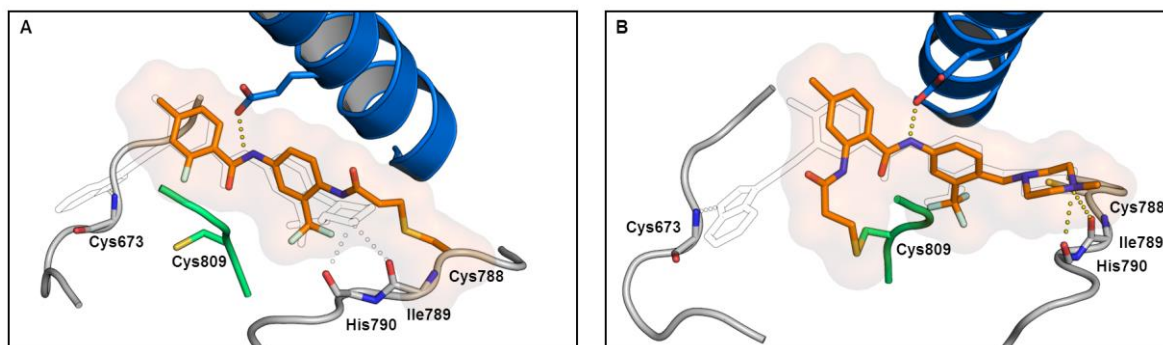


**Reagenzien und Bedingungen:** (i) Et<sub>3</sub>N, DMAP, Boc<sub>2</sub>O, THF, 80 °C, 16 h; (ii) 10 % Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, 24 h; (iii) Acryloylchlorid, DIPEA, trockenes THF, 0 °C zu rt, 1.5 h; (iv) TFA:DCM (1:3), rt, 2.5 h (v) HATU; DIPEA, **86**, THF, rt, 16 h; (vi) TFA:DCM (1:3), rt, 16 h.

Ausgehend vom kommerziell erhältlichen 4-Amino-2-trifluoromethylbenzonitril wurde zunächst das freie Amin über eine Kondensationsreaktion mit Di-*tert*-butyldicarbonat mit einer nahezu quantitativen Ausbeute von 94 % in das Carbamat **90** überführt. Die anschließende Reduktion der Nitrilgruppe erfolgte in Anwesenheit von 10 % Pd/C und einem H<sub>2</sub>-Ballon und lieferte Amin-Baustein **91** mit einer Ausbeute von 55 %. In der Route erfolgte die Einbringung des reaktiven Michael-Akzeptors bereits an dieser Stelle und Verbindung **92** wurde mit einer Ausbeute von 87 % erhalten. Die anschließende Entschützung wurde mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan durchgeführt und lieferte Zwischenprodukt **93** mit einer Ausbeute von 84 %. Im finalen Schritt der Synthese wurde der bereits synthetisierte Baustein **85** in einer Amidkupplung in Anwesenheit von HATU und DIPEA an den Amin-Baustein **93** gekuppelt, sodass die Zielverbindung **88** nach exzessiver säulenchromatographischen Aufreinigung mit einer Ausbeute von 20 % erhalten wurde.

### 3.6.2 Kovalente Ponatinib-basierte Typ-III-Inhibitoren

Die Modellierungs- und Dockingstudien für Ponatinib-basierte Typ-III-Inhibitoren zeigten vielversprechende Molekülstrukturen, welche die gewünschte Orientierung des Inhibitors in der Bindungstasche sowie die Alkylierung von Cys788 mit bspw. Verbindung **94** (Abb. 45A) oder Cys809 mit bspw. Verbindung **95** (Abb. 45B) ermöglichen könnten.

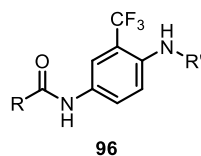


**Abbildung 45.** Kovalente Dockingstudien<sup>xxx</sup> von designten Ponatinib-basierten Typ-III-Inhibitoren in KIT basierend auf der Ko-Kristallstruktur von Ponatinib (schwarz-weiße Darstellung, PDB: 4U0I). **A:** Dockingpose eines Typ-III-Inhibitors **94** nach kovalentem Docking an Cys788. **B:** Dockingpose eines Typ-III-Inhibitors **95** nach kovalentem Docking an Cys809.

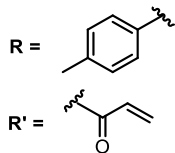
Das kovalente Docking von **94**, bei dem die Bindung an Cys788 vorgegeben wurde, zeigte eine gute Übereinstimmung hinsichtlich des Bindungsmodus im Vergleich zu Ponatinib. Somit bleibt die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der zentralen Amidbindung und der Seitenkette Glu640 in der Helix  $\alpha C$  erhalten, sowie die  $CF_3$ -Gruppe in die hydrophobe Kavität hineinragt. Das kovalente Docking von **95**, bei dem die Bindung an Cys809 vorgegeben wurde, zeigte ebenfalls eine gute Übereinstimmung hinsichtlich des Bindungsmodus im Vergleich zu Ponatinib. Stabilisiert wird **95** durch ein Netzwerk von Interaktionen innerhalb der Bindetasche, wie eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der zentralen Amidbindung und der Seitenkette von Glu640 in der Helix  $\alpha C$ , sowie zwischen dem tertiären Amin des endständigen Methylpiperazinrings zum Peptidrückgrat von Ile789 und His790, wie sie bereits in der Ko-Kristallstruktur von KIT im Komplex mit Ponatinib beobachtet wurden.

Basierend auf der Dockingpose von **94** (Abb. 45A) wurde eine fokussierte Substanzbibliothek von Typ-III-Inhibitoren entworfen (**96a-f** und **97a-j**), bei denen ein Elektrophil in *ortho*-Position zur  $CF_3$ -Gruppe eingebracht wurde, um eine Reaktion mit Cys788 zu ermöglichen. Des Weiteren wurden verschiedene hydrophobe Carbonsäuren in *meta*-Position zur  $CF_3$ -Gruppe substituiert, welche in Richtung der Scharnierregion zeigen (Abb. 46).

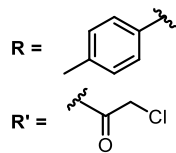
<sup>xxx</sup> Dockingstudien wurden von Dr. Christiane Eehrt durchgeführt, TU Dortmund (AG Rauh).

**A**

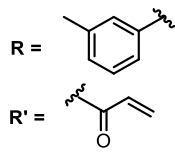
96a



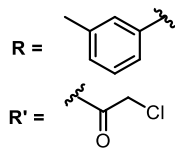
96b



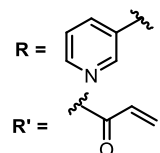
96c



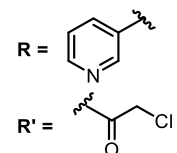
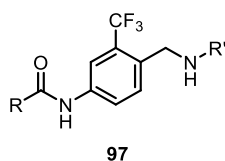
96d



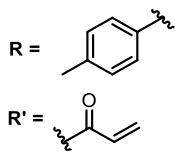
96e



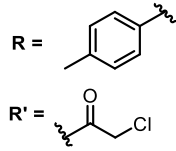
96f

**B**

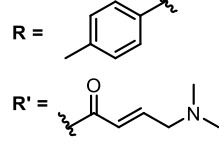
97a



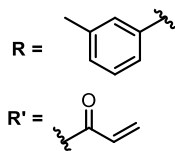
97b



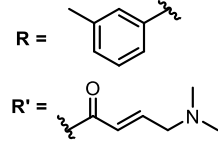
97c



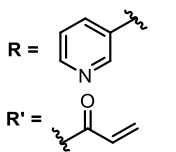
97d



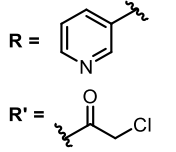
97e



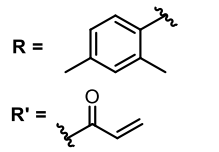
97f



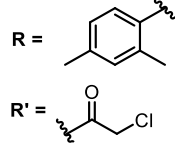
97g



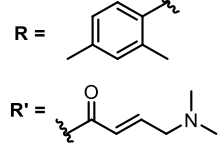
97h



97i

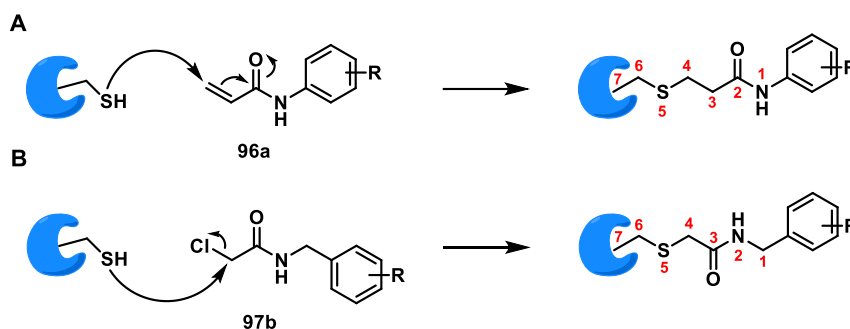


97j



**Abbildung 46.** Chemische Strukturen der entworfenen Typ-III-Inhibitoren, wobei das Elektrophil direkt am Ringsystem substituiert ist (**A**, **96a-f**) oder über eine Methylengruppe verbrückt installiert wurde (**B**, **97a-j**).

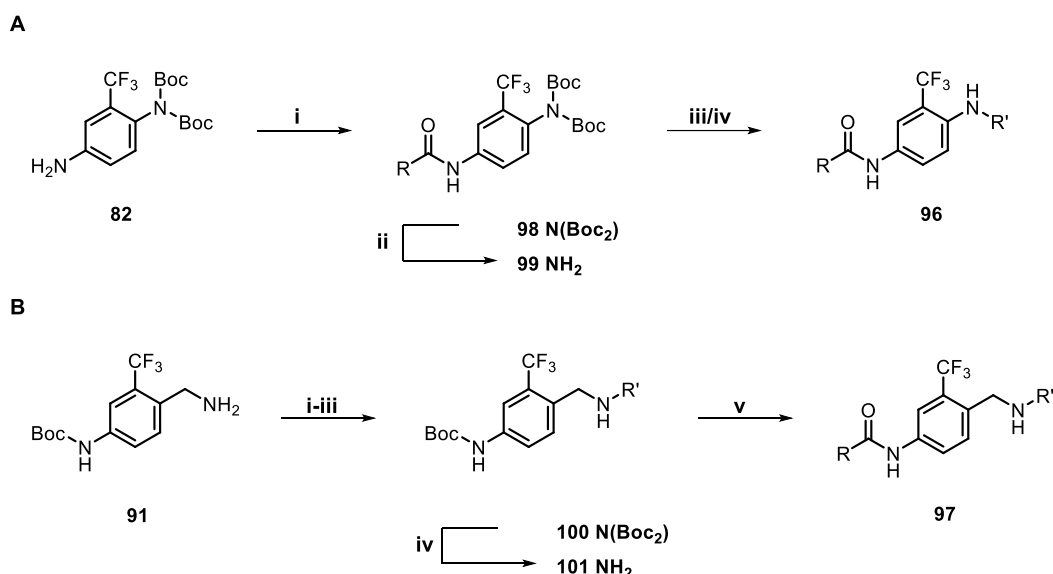
Hierbei wurden, in Analogie zu den Typ-II-Inhibitoren, die reaktiven Elektrophile entweder direkt oder über eine Methylengruppe verbrückt an das endständige Ringsystem angebracht (Schema 11). Mit Bezug auf die generelle Mechanismushypothese der kovalenten Modifikation von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylen und  $\alpha$ -halo-substituierten Carbonylen ist festzuhalten, dass bspw. die kovalente Modifikation von **96a** und **97b** mit entsprechendem Thiol in derselben Bindungslänge (hinsichtlich der Distanz zwischen dem Thiol und dem aromatischen Ringsystem) resultiert (Abb. 47).



**Abbildung 47.** Generelle Mechanismushypothese der kovalenten Modifikation einer Cysteinseitenkette mit **A**  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylen am Beispiel von Verbindung **96a** und **B**  $\alpha$ -halo-substituierten Carbonylen am Beispiel von Verbindung **97b**.

Die Synthese der Substanzbibliothek wird im nachfolgenden Reaktionsschema gezeigt (Schema 11).

**Schema 11.** Syntheschema zur Darstellung der Zielverbindungen **96a-f** und **97a-j**.

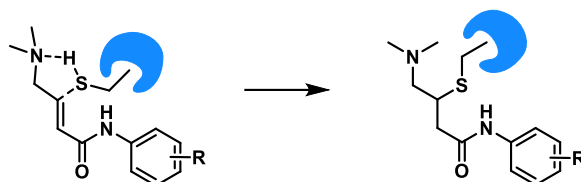


**Reagenzien und Bedingungen:** **A:** (i) HATU, DIPEA, Säure, THF, rt, 16 h; (ii) TFA:DCM (1:3), 0 °C zu rt, 5 h; (iii) Acryloylchlorid, DIPEA, trockenes THF, 0 °C zu rt, 4 h - 1 d; (iv) Chloracetylchlorid, DIPEA, trockenes THF, 0 °C zu rt, 3 h; **B:** (i) HATU; DIPEA, 4-Dimethylamin-2-Butensäure, THF, rt, 16 h; (ii) Chloracetylchlorid, DIPEA, trockenes THF, 0 °C zu rt, 3 h; (iii) Acryloylchlorid, DIPEA, trockenes THF, 0 °C zu rt, 2 h; (iv) TFA:DCM (1:3), 0 °C zu rt, 2.5 h; (v) HATU, DIPEA, Säure, THF, rt, 16 h.

Der obere, dreistufige Synthesestrang (Schema 11A) zeigt die Darstellung der sechs Inhibitoren **96a-f**. Ausgehend vom Amin **82** erfolgte im ersten Schritt eine Amidkupplung in Anwesenheit von HATU, DIPEA und verschiedenen Carbonsäuren, sodass die Zwischenprodukte **98a-c** mit Ausbeuten von 20-68 % erhalten wurden. Die anschließende Entschützung wurde mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan durchgeführt und lieferte die Verbindungen **99a-c** mit Ausbeuten von 78-87 %.

Im finalen Schritt der Synthese wurden die reaktiven Elektrophile eingebracht. Die Kupplungen mit Acryloylchlorid bzw. Chloracetylchlorid in Anwesenheit von DIPEA lieferten die gewünschten Produkte **96a-f** mit moderaten Ausbeuten von 25-27 %, da hier nur die saubersten Fraktionen vereinigt wurden (Abb. 44A). Der untere, dreistufige Synthesestrang (Schema 11B) zeigt die Darstellung der zehn Inhibitoren **97a-j**. Ausgehend von Baustein **91** erfolgten die Substitutionen mit Acryloylchlorid, Chloracetylchlorid oder 4-Dimethylamin-2-Butensäure und lieferten die Bausteine **100a-c** mit Ausbeuten von 55-87 %. Die sich anschließende Entschützung mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan lieferte die Zwischenprodukte **100a-c**, sodass im letzten Schritt der Syntheseroute die weitere Derivatisierung mit unterschiedlichen Carbonsäuren erfolgen konnte. Die Amidkupplungen wurden in Anwesenheit von HATU und DIPEA durchgeführt und lieferten die zehn Typ-III-Inhibitoren **97a-j** mit Ausbeuten von 13-47 % (Abb. 44B).

Mit Hilfe der beiden etablierten Syntheserouten wurde eine Substanzbibliothek mit 16 potentiell kovalenten Typ-III-Inhibitoren synthetisiert, deren Elektrophile Cys788 adressieren sollen. Hierbei wurden Acrylamide, reaktivere Chloracetamide und 4-Dimethylamin-2-Butensäureamide eingebracht. Die endständige Dimethylamingruppe sollte die Wechselwirkung des Methylpiperazins aus der Ponatinibstruktur vermitteln, zum anderen weist diese funktionelle Gruppe Löslichkeits-vermittelnde Eigenschaften auf. Des Weiteren ist für diese Dialkylamino-Gruppen eine intramolekulare Basen-Katalyse beschrieben, bei welcher ein zyklischer Übergangszustand ausgebildet wird (Abb. 48).<sup>195</sup>

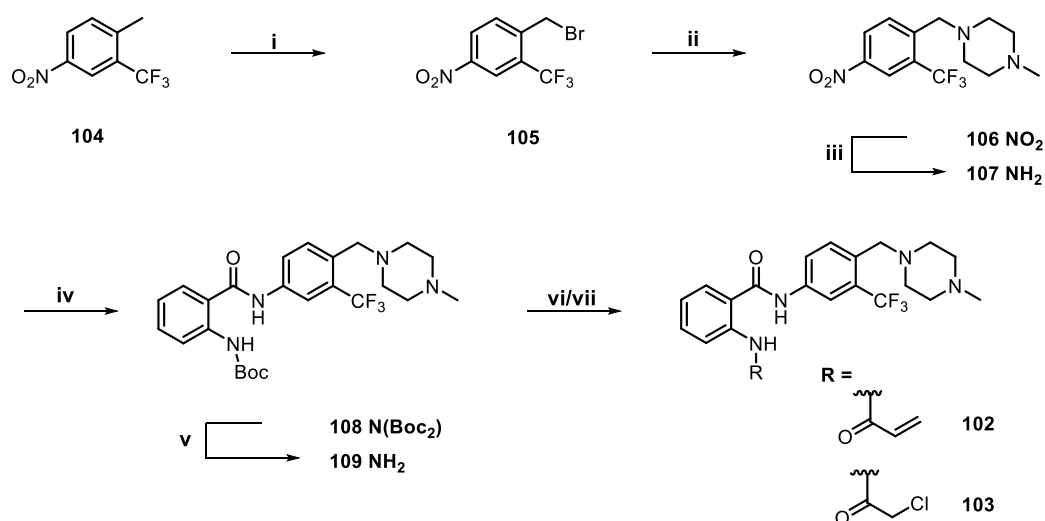


**Abbildung 48.** Generelle Mechanismushypothese der intramolekularen Basen-Katalyse von Dialkylamino-Funktionalitäten.

Hierbei könnte der pKa-Wert des Cysteins gesenkt werden und somit die Bindungsbildung an das wenig nukleophile Cys788 positiv beeinflussen.

Eine weitere Synthesestrategie wurde basierend auf Dockingpose **95** (Abb. 45B) für die Adressierung von Cys809 entworfen. Hierbei wurde die Methylpiperazin-Einheit der Ponatinibstruktur beibehalten und ein Elektrophil am endständigen Phenylring installiert. Aus diesem Design- und Syntheseansatz wurden zwei weitere Inhibitoren synthetisiert, die mittels der nachstehenden Syntheseroute erhalten wurden (Schema 12).

**Schema 12.** Syntheschema zur Darstellung der Zielverbindungen **102** und **103**.

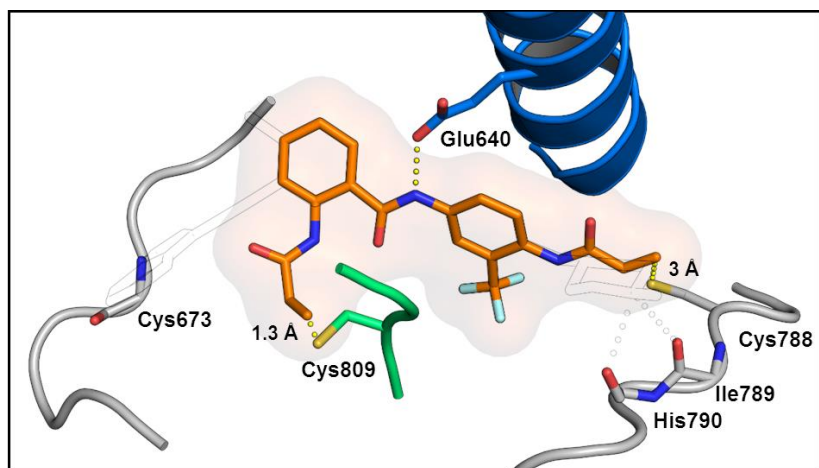


**Reagenzien und Bedingungen:** A: (i) NBS, AIBN, DCE, 80 °C, 16 h; (ii) 1-Methylpiperazin, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DCM, rt, 4 h; (iii) Fe, NH<sub>4</sub>Cl, EtOH:H<sub>2</sub>O (9:1), 70 °C, 8 h; (iv) EDC·HCl, DIPEA, HOBt, DMAP, 2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure, DMF, rt, 16 h; (v) TFA:DCM (1:3), 0 °C zu rt, 16 h; (vi) Acryloylchlorid, DIPEA, trockenes THF, 0 °C zu rt, 16 h; (vii) Chloroacetylchlorid, DIPEA, trockenes THF, 0 °C zu rt, 16 h.

Die Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindungen **102** und **103** geht aus von dem kommerziell erhältlichen 1-Methyl-4-nitro-2-(trifluoromethyl)benzol **104**, welches im ersten Schritt selektiv an der benzylichen Position bromiert wurde. In der folgenden nukleophilen Substitution mit 1-Methylpiperazin wurde das Zwischenprodukt **106** mit einer Ausbeute von 92 % erhalten. Die Eisen-Reduktion in Anwesenheit von Ammoniumchlorid lieferte Baustein **107** mit einer Ausbeute von 80 %. Im nächsten Schritt erfolgte erneut eine nukleophile Substitution von 2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure mit dem Amin **107** in Anwesenheit von EDC·HCl, DIPEA, HOBt und DMAP und lieferte Zwischenstufe **108** mit einer Ausbeute von 96 %. Die Entschützung des Amins wurde mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan durchgeführt und resultierte in Verbindung **109** mit einer Ausbeute von 27 %. Im finalen Reaktionsschritt wurden die reaktiven Elektrophile eingebracht und lieferten die Zielverbindungen **102** und **103** mit Ausbeuten von 13 bzw. 15 %.

Ferner wurde das Konzept für einen zweifach kovalenten Inhibitor entwickelt, der sowohl Cys788 wie auch Cys809 adressieren sollte. Hierzu wurden die beiden zuvor vorgestellten Synthesestrategien kombiniert, sodass die Elektrophile jeweils optimal ausgerichtet sein sollten (Abb. 49).

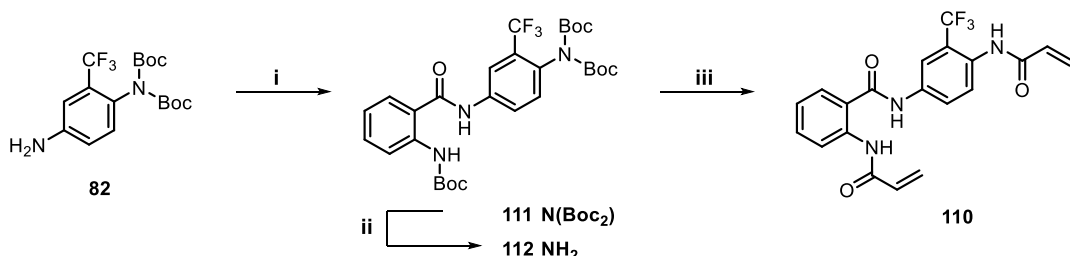




**Abbildung 49.** Modellierungsstudie des potentiell doppelt kovalenten, Ponatinib-basierten Typ-III-Inhibitors **110** in KIT basierend auf der Ko-Kristallstruktur von Ponatinib (PDB: 4U0I). Modelliert wurde mit der Software Discovery Studio 3.1 sowie eine Energieminimierung der Liganden durchgeführt wurde.

Die Modellierungsstudie von **110** zeigt den bereits beschriebenen Bindungsmodus der Typ-III-Inhibitoren und lässt die simultane Adressierbarkeit von Cys788 und Cys809 vermuten. Die Synthese der Verbindung ist im nachstehenden Reaktionsschema gezeigt (Schema 13).

**Schema 13.** Syntheschema zur Darstellung der Zielverbindungen **110**.



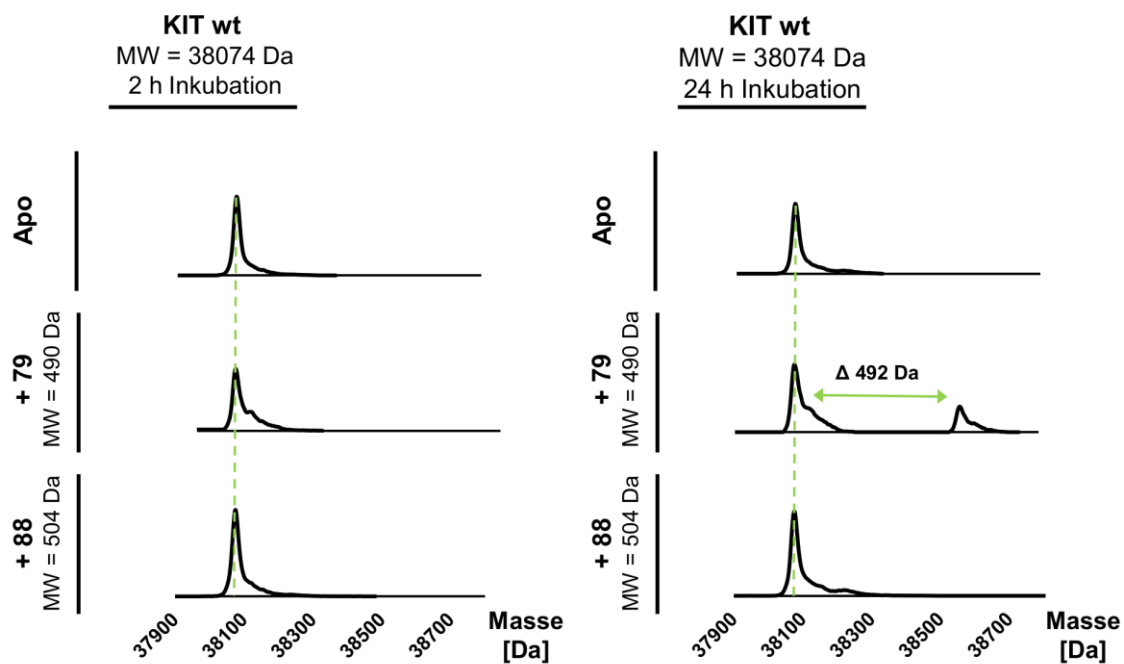
**Reagenzien und Bedingungen:** (i) EDC·HCl, DIPEA, HOBt, DMAP, 2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure, DMF, rt, 16 h; (ii) TFA:DCM (1:3), 0 °C zu rt, 5 h; (iii) Acryloylchlorid, DIPEA, trockenes THF, 0 °C zu rt, 16 h.

Ausgehend vom Amin **82** erfolgte im ersten Schritt eine nukleophile Substitution mit 2-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)benzoesäure in Anwesenheit von EDC·HCl, DIPEA, HOBt und DMAP und lieferte Zwischenstufe **111** mit einer Ausbeute von 53 %. Die anschließende Entschützung wurde mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan durchgeführt und lieferte die Verbindung **112** mit einer geringen Ausbeute von nur 20 %, da sich aufgrund der hohen Polarität die Aufreinigung als schwierig erwies. Im finalen Schritt der Synthese erfolgte die Substitution mit Acryloylchlorid in Anwesenheit von DIPEA lieferte das gewünschte Produkt **110** mit einer Ausbeute von 12 %.

Auf diese Weise wurde eine Substanzbibliothek aus 21 potentiell kovalenten Inhibitoren für die Adressierung von Cys788 und Cys809 in KIT (bzw. Cys814 und Cys835 in PDGFR $\alpha$ ) synthetisiert. Die Adressierung beider Proteinkinasen ist von Interesse, da sie aufgrund der hohen Sequenzhomologie isostrukturelle Cysteine tragen. Zum Zeitpunkt der Experimente stand die isolierte Proteinkinase KIT zur Verfügung, weshalb die nachfolgenden massenspektrometrischen Experimente mit KIT erfolgten.

### 3.6.3 Massenspektrometrische Analyse und Tandem-Massenspektrometrie

Um die generelle Adressierbarkeit von Cys788 in KIT mit der synthetisierten Substanzbibliothek von Ponatinib-basierten Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren zu demonstrieren, wurde die isolierte Kinase mit einem dreifachen Inhibitorüberschuss für 2 h und 24 h auf Eis bei pH 8.0 inkubiert. Anschließend erfolgte mittels massenspektrometrischer Analyse ein Nachweis von entsprechenden Proteinaddukten (Abb. 50).<sup>xxxii</sup>



**Abbildung 50.** Dekonvolutierte Massenspektren von KIT wt nach 2 h Inkubation (links) und 24 h Inkubation (rechts) mit DMSO (Apo) und den Ponatinib-basierten Typ-II-Inhibitoren **79** und **88** bei pH 8.0.

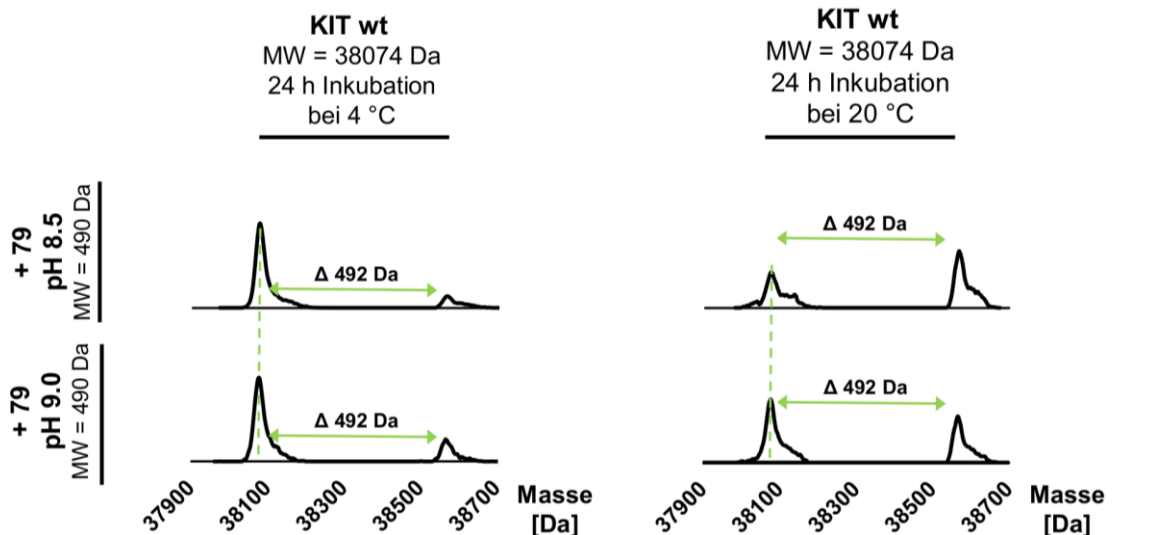
Die dekonvolutierten Massenspektren zeigten keinerlei Massenzunahme nach Inkubation mit **88**, wohingegen Verbindung **79** nach 24 h teilweise eine Massenzunahme im Vergleich zur Apo-Masse des Proteins zeigte, die einer einfachen Modifizierung mit dem Inhibitor

<sup>xxxii</sup> Protein wurde von M. Sc. Ina Landel bereitgestellt, TU Dortmund (AG Rauh).

---

zugeordnet werden konnte (Abb. 50, rechts). Die unvollständige und erst nach 24 h aufgetretene Modifizierung wurde bereits in den Vorarbeiten von Dr. Helena Kaitsiotou beobachtet. Um die kovalente Bindung an Cys788 in KIT eindeutig nachzuweisen wurden MS/MS-Experimente durchgeführt. Hierzu wurde ein tryptischer In-Gel-Verdau des Proteins mit gekoppelter MS/MS-Analyse durchgeführt, indem **79** und **88** nach 24 h Inkubation unter Zugabe der Serinprotease Trypsin verdaut und die entstandenen Peptidfragmente massenspektrometrisch analysiert wurden. Die Analyse ergab jeweils nur moderate Sequenzabdeckungen (KIT Apo: 62.1 %, KIT wt-**79**: 55.2 % und KIT wt-**88**: 62.2 %), wobei das Peptidfragment um das gesuchte Cys788 in allen drei Proben identifiziert werden konnte. Hierbei wurde keine Massenzunahme in diesem Fragment gefunden und die spezifische Alkylierung an Cys788 konnte somit nicht bestätigt werden. Mögliche Erklärungen umfassen bspw. die Ionisierungseffizienz eines modifizierten Peptids, die eventuell bei diesen Proben zu gering war. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die Modifikation selbst fragmentiert und somit nach einem falschen Masse-zu-Ladungsverhältnis am Cystein gesucht wurde. Des Weiteren kann die Anzahl an Argininen und Lysinen im Protein zu vielen kleinen Bruchstücken, oder zu großen tryptischen Fragmenten führen, die zu groß für eine massenspektrometrische Analyse sind. In zukünftigen Arbeiten sollten weitere Proteasen getestet werden, sodass andere Fragmentierungsmuster mit veränderten Peptiden erhalten werden können. Mögliche Alternativen bieten Chymotrypsin, das bevorzugt nach aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan oder Phenylalanin schneidet oder Elastase, welches bevorzugt nach kleinen hydrophoben Aminosäuren wie Glycin, Alanin oder Valin schneidet. Ferner wurden diese Experimente nur einmal durchgeführt, sodass auch eine Wiederholung der Analyse durchgeführt werden sollte.

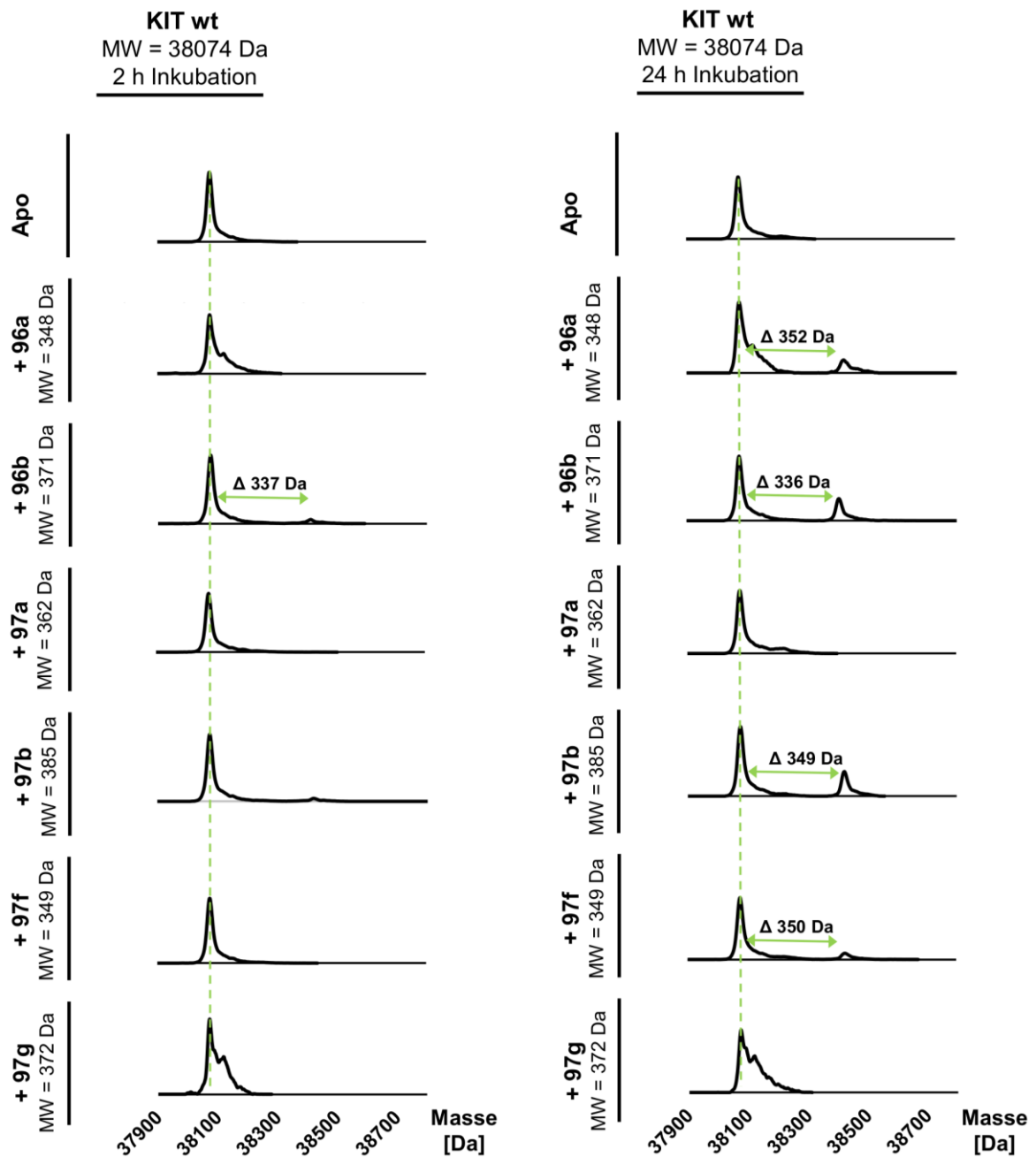
Weiterhin sollte durch Variation des pH-Wertes und der Temperatur die Alkylierungsreaktion begünstigt werden, weil davon ausgegangen wurde, dass Cys788 ein eher unreaktives Cystein ist. Folglich wurden MS-Experimente mit einem fünffachen Inhibitorüberschuss nach 24 h Inkubation auf Eis, bei Raumtemperatur und bei pH 8.5 und 9.0 durchgeführt (Abb. 51).



**Abbildung 51.** Dekonvolutierte Massenspektren von KIT wt nach 24 h Inkubation bei 4 °C (links) und 24 h Inkubation bei Raumtemperatur (rechts) mit **81** bei pH 8.5 (obere Reihe) und pH 9.0 (untere Reihe).

Durch Variation des pH-Wertes konnte keine Verbesserung im Alkylierungsverhalten des Inhibitors beobachtet werden. Das dekonvolutierte Massenspektrum bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 8.5 zeigte eine signifikante Massenzunahme im Vergleich zur Apo-Masse des Proteins, die einer einfachen Modifizierung mit dem Inhibitor zugeordnet werden konnte. Allerdings zeigte das Spektrum dieser Probe ein sehr schlechtes Signal-zu-Rausch Verhältnis, sowie auch das entsprechende Chromatogramm einen verbreiterten Peak aufwies. Ursächlich hierfür könnte eine unzureichende Stabilität des Proteins bei Raumtemperatur sein und die damit einhergehende Degradierung. Weiterhin wurden dieselben Proben nach 48 h Inkubation vermessen, wobei aufgrund einer unzureichenden Signalintensität eine Auswertung nicht mehr möglich war, was z.B. auf ein Ausfallen des Proteins hindeuten könnte.

Des Weiteren wurde ein Set von sechs Ponatinib-basierten Typ-III-Inhibitoren massenspektrometrisch analysiert (Abb. 52).

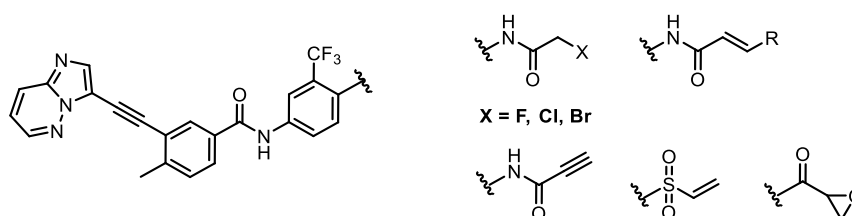


**Abbildung 52.** Dekonvolutierte Massenspektren von KIT wt nach 2 h Inkubation (links) und 24 h Inkubation (rechts) mit DMSO (Apo) und einem ausgewählten Set von sechs Ponatinib-basierten Typ-III-Inhibitoren bei pH 8.0.

Die dekonvolutierte Massenspektren zeigten für die Verbindungen **96a**, **96b**, **97b** und **97f** nach 24 h eine geringe Massenzunahme im Vergleich zur Apo Masse des Proteins, die einer einfachen Modifizierung mit dem Inhibitor zugeordnet werden konnten (Abb. 52, rechts). In Analogie zu den Typ-II-Inhibitoren wurde auch hier ein tryptischer In-Gel-Verdau des Proteins mit gekoppelter MS/MS-Analyse nach Inkubation mit den Inhibitoren **96b** und **97b** durchgeführt, um die Ausbildung der kovalenten Bindung zu Cys788 in KIT eindeutig nachzuweisen. Die Analyse ergab jeweils nur moderate Sequenzabdeckungen

(KIT Apo: 62.1 %, KIT wt-**97b**: 55.8 % und KIT wt-**97b**: 55.2 %), wobei das Peptidfragment um das gesuchte Cys788 in beiden Proben identifiziert werden konnte. Hierbei wurde keine Massenzunahme in diesem Fragment gefunden und die spezifische Alkylierung an Cys788 konnte nicht bestätigt werden. Interessanterweise ergab die Analyse das Peptidfragment DSFIC<sub>691</sub>SK, welches ein Oberflächencystein (Cys691) enthielt. Durch Massenzunahme in diesem Fragment um die Inhibitormasse konnte für **96b** die unspezifische Alkylierung an Cys691 nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte in den MS- und MS/MS-Experimenten die spezifische Bindung der synthetisierten Inhibitoren an Cys788 in KIT nicht nachgewiesen werden. Die Variation der Temperatur, des pH-Wertes, der Inkubationszeit sowie drei- bis fünffacher Inhibitorüberschuss führten ebenfalls nicht zu einer erhöhten Modifizierung des Proteins. In zukünftigen Arbeiten sollten die MS-Experimente optimiert werden, indem bspw. Puffersysteme eingesetzt werden die eine weitere Erhöhung des pH Wertes ermöglichen um die Reaktivität des Cysteins positiv zu beeinflussen. Des Weiteren sollte ein entsprechendes Kristallisationssystem entwickelt werden sollte, um die angenommenen Bindungsmodi der Inhibitoren zu verifizieren und neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von maßgeschneiderten Inhibitoren zu erhalten. Für die kovalente Bindungsbildung an Cys788 in KIT könnte eine Durchmusterung von unterschiedlichen Michael-Akzeptorsystemen mit verschiedenen Reaktivitäten erfolgen (Abb. 53).



**Abbildung 53.** Unterschiedliche reaktive Gruppen für die Adressierung von Cysteinen

### 3.6.4 Biochemische und zelluläre Charakterisierung der Substanzbibliothek

Die synthetisierte Substanzbibliothek der potentiell kovalenten Ponatinib-basierten Inhibitoren wurde hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität in einem Aktivitäts-basierten *homogeneous time-resolved fluorescence* (HTRF) KinEASE Assay (Cisbio) untersucht, sowie der Effekt in relevanten Krebszelllinien analysiert wurde. Hierzu wurde die Zellviabilität nach Inhibitorgabe mittels *CellTiter-Glo* Assay (Promega) ermittelt und mit Referenzverbindungen verglichen (Abb. 9 und Tab. 13).

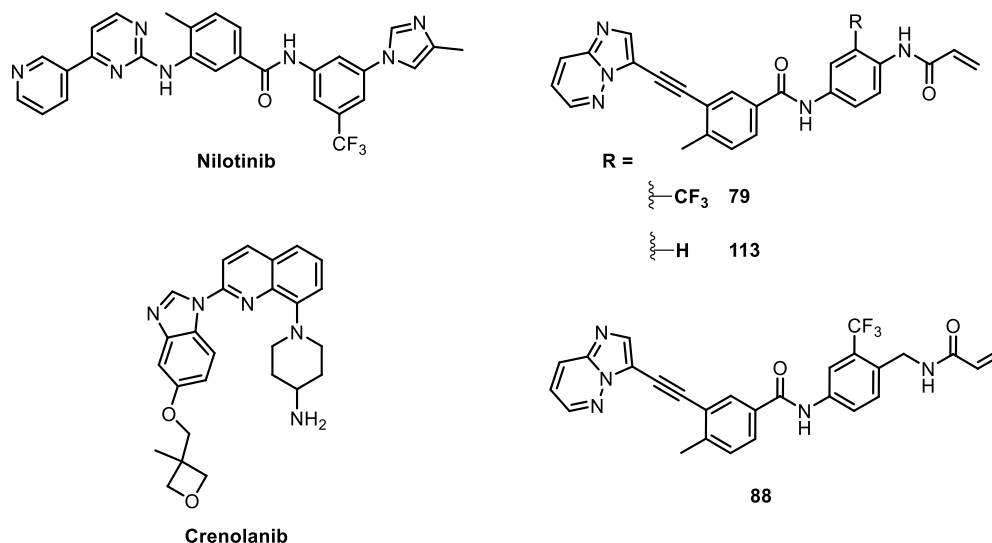
---

Die eingesetzten Zelllinien<sup>xxxiii</sup> wurden mittels der *Genome-Editing*-Methode CRISPR/Cas9 (**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats/ **CRISPR-associated**) hergestellt, für die Emanuelle Charpentier und Jennifer Doudna den Chemie-Nobelpreis 2020 erhielten. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, in zellulären und komplexen biologischen Systemen gezielte Veränderungen auf DNA-Ebene zu erzeugen. Auf diese Weise war es möglich, in Patienten-abgeleitete PDGFR $\alpha$  Zelllinien zunächst die Mutation D842V in Exon 18 einzubringen und folglich weitere, klinisch relevante Sekundärmutationen einzubauen. Des Weiteren wurde das KIT-Gen komplett inaktiviert, sodass die Zellen ausschließlich PDGFR $\alpha$  abhängig sind. Als Kontrollzelllinie wurde GIST48B eingesetzt, die weder von KIT noch von PDGFR $\alpha$  abhängig ist. Diese klinisch relevanten und einzigartigen Zelllinien sollten nun genutzt werden, um auftretende Resistenzmechanismen zu analysieren und potente Inhibitoren zu identifizieren, die vielversprechende Startpunkte für die Entwicklung von Wirkstoffen speziell für mutiertes PDGFR $\alpha$  darstellen.

---

<sup>xxxiii</sup> Die Zelllinien wurden von Dr. Thomas Mühlenberg aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sebastian Bauer, Westdeutsches Tumorzentrum in Essen, mittels CRISPR/Cas9-Methode generiert.

**Tabelle 13.** Biochemische und zelluläre Charakterisierung der kovalenten Typ-II-Inhibitoren **79**, **113**, **88** sowie Referenzverbindungen.



	KIT HTRF* IC <sub>50</sub> [nM]	PDGFR $\alpha$ CTG** EC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]				
		wt	GIST48B	T1-D842V	T1-D842V-T674I	T1-D842V-G680R
<b>Imatinib</b>	10.4 $\pm$ 3.9	9.7 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.07	>10	9.2 $\pm$ 0.5	>10
<b>Sunitinib</b>	1.2 $\pm$ 0.9	2.8 $\pm$ 0.04	1.1 $\pm$ 0.02	1.9 $\pm$ 0.6	9.9 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.3
<b>Regorafenib</b>	5.6 $\pm$ 3.0	5.2 $\pm$ 0.3	0.39 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.02	3.3 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.08
<b>Ponatinib</b>	0.4 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.007	0.04 $\pm$ 0.002	0.7 $\pm$ 0.04	0.5 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.03
<b>Ripretinib</b>	1.4 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.8	0.9 $\pm$ 0.07	3.0 $\pm$ 0.2	7.3 $\pm$ 1.2	3.7 $\pm$ 0.1
<b>Avapritinib</b>	3.0 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.2	0.04 $\pm$ 0.005	0.5 $\pm$ 0.009	2.2 $\pm$ 0.1	1.25 $\pm$ 0.2
<b>Crenolanib</b>	16.9 $\pm$ 3.6	>10	0.004 $\pm$ 0.0005	0.2 $\pm$ 0.2	>2	0.4 $\pm$ 0.03
<b>Nilotinib</b>	7.1 $\pm$ 2.1	>2	0.6 $\pm$ 0.04	n.b.	>2	n.b.
<b>79</b>	1.7 $\pm$ 0.9	>10	5.7 $\pm$ 1.0	>10	>10	>10
<b>113<sup>xxxiv</sup></b>	8.8 $\pm$ 4.4	>10	>10	>10	>10	>10
<b>88</b>	1.7 $\pm$ 0.4	>10	2.4 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 2.7	7.7 $\pm$ 0.7	8.5 $\pm$ 0.6

\*HTRF Daten wurden von Kirujan Jeyakumar und Alina Teuber erhoben. \*\*CTG Daten wurden von Dr. Sonja Sievers (COMAS) erhoben; Zweifachmessungen. n.b. = nicht bestimmt.

<sup>xxxiv</sup> Verbindung **113** wurde arbeitsgruppenintern von Dr. Rajesh Gontla synthetisiert.



---

Trotz intensiver Bemühungen konnten keine  $IC_{50}$ -Werte für  $PDGFR\alpha$  aufgenommen werden, sodass KIT als Surrogat verwendet wurde. Hierbei konnten für die Verbindungen **79** und **88** hohe Potenzen mit halbmaximalen inhibitorischen Aktivitäten ( $IC_{50}$ ) von 1.7 nM ermittelt werden. Inhibitor **113** wies eine fünffach geringere inhibitorische Aktivität mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 8.8 nM auf, welche auf die fehlende  $CF_3$ -Gruppe zurück zu führen ist. In den vorangegangenen Modellierungsstudien wurde die Bedeutung dieses Substituenten beschrieben, welche sich hier in den biochemischen Aktivitäten abbilden ließ.

Die synthetisierten Inhibitoren **79**, **113** und **88** waren inaktiv gegenüber der Kontrollzelllinie GIST48B und hatten daher vermutlich wenig *off-target* Aktivität. Die hohen biochemischen Potenzen konnten in den zellulären Experimenten nicht beobachtet werden und somit wurden keine inhibitorischen Effekte der drei Verbindungen auf die  $PDGFR\alpha$ -abhängigen Zelllinien verzeichnet. Verbindung **88** zeigte eine vierfach stärkere Inhibition der T1-D842V-Zelllinie im Vergleich zu GIST48B mit 2.4  $\mu$ M. Der zuvor beschriebene biochemische Trend zwischen den Verbindungen **79** und **113** ließ sich auch auf zellulärer Ebene abbilden: der Austausch der  $CF_3$ -Gruppe zu einem Wasserstoff-Atom führte bei Verbindung **113** zu einem kompletten Aktivitätsverlust auf allen Zelllinien.

Die T1-D842V-Zelllinie zeigte Resistenz gegenüber fast allen Referenzverbindungen ( $EC_{50} = 0.39$ - $1.2 \mu$ M), lediglich von Avapritinib und Crenolanib wurde sie stark inhibiert ( $EC_{50} = 0.04 \mu$ M und  $EC_{50} = 0.004 \mu$ M). Das herausragende Profil von Avapritinib konnte durch diese Messungen bestätigt werden, sowie der literaturbekannte  $EC_{50}$ -Wert von  $0.04 \mu$ M reproduziert werden konnte.<sup>115</sup> Interessanterweise wurde die T1-D842V-Zelllinie ebenfalls von Ponatinib stark inhibiert ( $EC_{50} = 0.04 \mu$ M). *In silico* Modellierungsstudien zeigten, dass der Austausch von Aspartat zu Valin an Position 842 die Kinase in ihre aktive Konformation drängt, wobei das Phenylalanin des DFG-Motivs in Richtung der Helix  $\alpha C$  orientiert ist.<sup>115</sup> Dieser Zustand erlaubt die Bindung von Typ-I-Inhibitoren wie Avapritinib, aber nicht die Bindung von Typ-II-Inhibitoren wie bspw. Ponatinib. Folglich muss Ponatinib in der Lage sein, das Gleichgewicht der  $PDGFR\alpha$ -D842V mutierten Kinase zugunsten der inaktiven, DFG-out Konformation zu verschieben, um den angenommenen Bindungsmodus einzunehmen. Die drei Sekundärmutationen tragenden Zelllinien T1-D842V-T674I, T1-D842V-G680R und T1-D842V-G652E/V658A waren ebenfalls resistent gegenüber den getesteten Referenzverbindungen, wobei Crenolanib die Ausnahme darstellte. Die T1-D842V- und T1-D842V-T674I-Zelllinien waren sensitiv gegenüber Crenolanib mit  $EC_{50}$ -Werten von 0.004 bzw. 0.2  $\mu$ M. Der schwache Effekt der Ponatinib-basierten Typ-II-Inhibitoren und der getesteten Referenzverbindungen unterstreicht die Herausforderungen hinsichtlich einer selektiven Adressierung der  $PDGFR\alpha$ -mutierten Zelllinien.

Des Weiteren wurden die potentiell kovalenten Typ-III-Inhibitoren **96a-f** und **97a-j** charakterisiert, bei denen das reaktive Elektrophil entweder direkt oder über eine Methylengruppe verbrückt an das endständige Ringsystem angebracht wurde (Tab. 14).

**Tabelle 14.** Biochemische und zelluläre Charakterisierung der Typ-III-Inhibitoren **96a-f** und **97a-j**.

	KIT HTRF*		PDGFR $\alpha$ CTG**				
	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]		EC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]				
	wt		GIST48B	T1-D842V	T1-D842V-T674I	T1-D842V-G680R	T1-D842V-G652E/V658A
<b>Ponatinib</b>	0.0004 $\pm$ 0.0002		0.6 $\pm$ 0.007	0.04 $\pm$ 0.002	0.7 $\pm$ 0.04	0.5 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.03
<b>96a</b>	>20		>10	>10	>10	>10	>10
<b>96b</b>	4.4 $\pm$ 2.4		3.2 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.5	5.0 $\pm$ 0.7	4.4 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.5
<b>96c</b>	18.5 $\pm$ 2.6		>10	>10	>10	>10	>10
<b>96d</b>	8.6 $\pm$ 1.3		>10	>10	>10	>10	>10
<b>96e</b>	>20		>10	>10	>10	>10	>10
<b>96f</b>	>20		>10	>10	>10	>10	>10
<b>97a</b>	11.6 $\pm$ 3.7		>10	>10	>10	>10	>10
<b>97b</b>	10.3 $\pm$ 8.2		8.1 $\pm$ 1.7	5.8 $\pm$ 1.0	6.2 $\pm$ 1.6	6.9 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.6
<b>97c</b>	13.5 $\pm$ 7.6		>10	>10	>10	>10	>10
<b>97d</b>	17.2 $\pm$ 6.1		>10	>10	>10	>10	>10
<b>97e</b>	15.5 $\pm$ 5.4		>10	>10	>10	>10	>10
<b>97f</b>	>20		>10	>10	>10	>10	>10
<b>97g</b>	>20		>10	8.4 $\pm$ 1.2	>10	9.4 $\pm$ 0.7	8.5 $\pm$ 1.3
<b>97h</b>	18.6 $\pm$ 2.9		>10	>10	>10	>10	>10
<b>97i</b>	2.2 $\pm$ 0.2		7.0 $\pm$ 1.6	6.2 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 1.8	4.1 $\pm$ 0.3
<b>97j</b>	12.4 $\pm$ 3.1		>10	>10	>10	>10	>10

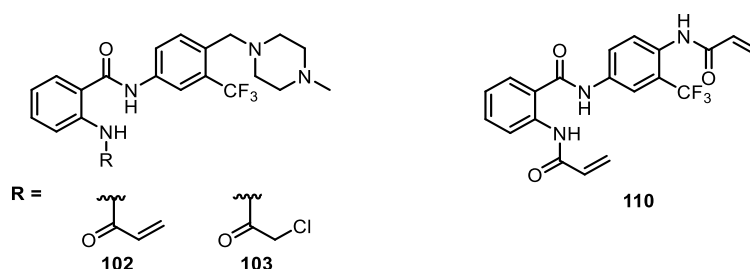
\*HTRF Daten wurden von Kirujan Jeyakumar erhoben. \*\*CTG Daten wurden von Dr. Sonja Sievers (COMAS) erhoben.

---

Die Verbindungen **96a-f** konnten weder biochemisch noch zellulär signifikante inhibitorische Effekte hervorrufen. Kombinationen von Acrylamiden und Chloracetamiden mit unterschiedlich substituierten aromatischen Ringsysteme zeigten keinerlei Wirksamkeit. Eine mikromolare inhibitorische Aktivität wurde für Verbindung **96b** beobachtet, welche mit einem Chloracetamid und einer *para*-Methylgruppe dekoriert war (KIT HTRF IC<sub>50</sub> = 4.4 µM und PDGFR $\alpha$ -mutierte Zelllinien mit EC<sub>50</sub> von 3.2 – 5.0 µM). Mitunter den größten Effekt zeigte **96b** auf der Kontrollzelllinie GIST48B und T1-D842V-G652E/V658A mit 3.2 µM. Die Inhibitoren **97a-j** zeigten identische biochemische und zelluläre Effekte, wie zuvor für die Verbindungen **96a-f** beschrieben. Alle synthetisierten Inhibitoren, derivatisiert mit unterschiedlich substituierten aromatischen Ringsystemen, sowie Acrylamiden oder Chloracetamiden sind inaktiv auf allen PDGFR $\alpha$ -mutierte Zelllinien (Tab. 14). Für die Inhibitoren **97b** und **97i**, mit einem Chloracetamid und einer *para*-Methylgruppe bzw. disubstituiert mit *ortho*- und *para*-Methylgruppe am endständigen Ringsystem, wurden EC<sub>50</sub>-Werte im mikromolaren Bereich gemessen (**97b** auf der T1-D842V mit EC<sub>50</sub> = 5.8 µM und **97i** auf der T1-D842V-T674I mit EC<sub>50</sub> = 5.4 µM). Klinisch zugelassene Wirkstoffe tragen Acrylamid-basierte Elektrophile wie z.B. Afatinib, Neratinib oder Ibrutinib (siehe Kapitel 1.4.1 und 3.2). Die im Vergleich zu Acrylamiden reaktiveren Chloracetamide sind ebenfalls eine vielversprechende Substanzklasse hinsichtlich der kovalenten Adressierung von Proteinkinasen in der Wirkstoffforschung. Als Beispiele sind die literaturbeschriebenen Verbindungen SML-8-73-1, ein kovalenter Inhibitor für KRas G12C, sowie ein Imatinib-basiertes Chloracetamid-Derivat zu nennen.<sup>165, 196-197</sup>

Anhand der ermittelten zellulären Aktivitäten könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass eine *ortho*- oder/und *para*-Methylgruppe am endständigen Ringsystem favorisiert ist, wohingegen eine Substitution in *meta*-Position sowie ein Pyridinring nicht toleriert werden. Generell lässt sich jedoch festhalten, dass alle PDGFR $\alpha$ -abhängigen Zelllinien resistent gegenüber den Inhibitoren **96a-f** und **97a-j** waren, auch wenn drei Inhibitoren mit leicht erhöhter zellulärer Aktivität identifiziert werden konnten. Weiterhin wurden die Verbindungen **102** und **103**, die für eine kovalente Adressierung von Cys809 designt wurden, sowie der doppelt-kovalente Inhibitor **110**, auf ihre biochemische und zelluläre Aktivität untersucht (Tab. 15). In Analogie zu den oben beschriebenen Typ-III-Inhibitoren wurde auch hier für alle PDGFR $\alpha$ -abhängigen Zelllinien eine Resistenz gegenüber den Inhibitoren **102**, **103** und **110** festgestellt, obwohl wichtige strukturelle Motive, wie die Methylpiperazin- und CF<sub>3</sub>-Gruppe beibehalten wurden, um die Affinität der Inhibitoren zur Proteinkinase zu steigern (Tab. 15).

**Tabelle 15.** Biochemische und zelluläre Charakterisierung der Typ-III-Inhibitoren **102**, **103** und **110**.



	KIT HTRF*	PDGFR $\alpha$ CTG**				
	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	EC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]				
	wt	GIST48B	T1-D842V	T1-D842V-T674I	T1-D842V-G680R	T1-D842V-G652E/V658A
<b>Ponatinib</b>	0.0004 $\pm$ 0.0002	0.6 $\pm$ 0.007	0.04 $\pm$ 0.002	0.7 $\pm$ 0.04	0.5 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.03
<b>102</b>	3.8 $\pm$ 2.5	>10	>10	>10	>10	>10
<b>103</b>	17.1 $\pm$ 2.5	>10	>10	>10	>10	>10
<b>110</b>	17.3 $\pm$ 5.3	>10	9.1 $\pm$ 1.1	9.0 $\pm$ 0.7	>10	8.0 $\pm$ 0.2

\*HTRF Daten wurden von Kirujan Jeyakumar erhoben. \*\*CTG Daten wurden von Dr. Sonja Sievers (COMAS) erhoben.

Insgesamt konnten die 21 synthetisierten, Ponatinib-basierten Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren keine inhibitorischen Effekte in den PDGFR $\alpha$ -abhängigen Zelllinien hervorrufen. Weder eine Derivatisierung am endständigen Ringsystem, noch die Substitution unterschiedlich reaktiver Elektrophile konnte zu einer Aktivitätssteigerung beitragen. Es ist denkbar, dass die hohen biochemischen Aktivitäten der Verbindungen **79**, **113** und **88** auf die Interaktion des Imidazopyridazin Substituenten mit der Scharnierregion zurück zu führen sind. In zukünftigen Arbeiten sollte die Etablierung des biochemischen Aktivitätsassays (HTRF) für PDGFR $\alpha$  Wildtyp und der klinisch relevanten Mutanten erfolgen, um die Inhibition der Kinaseaktivitäten zu evaluieren. Vermutlich führte die Entfernung des Imidazopyridazins und der daraus resultierende Verlust der Wechselwirkung mit der Scharnierregion in den Typ-III-Inhibitoren zu den Aktivitätsverlusten auf KIT wt. Die im angenommenen Bindungsmodus beschriebenen Interaktionen der zentralen Amidbindung mit der Seitenkette von Glu640 und die Besetzung der hydrophoben Kavität durch die CF<sub>3</sub>-Gruppe scheinen zu gering für eine entsprechende biochemische und zelluläre Affinität in KIT bzw. PDGFR $\alpha$ .

---

### 3.6.5 Hochdurchsatz-Screening zur Identifizierung neuer Leistrukturen für die Adressierung von mutiertem PDGFR $\alpha$

Hochdurchsatz-Screening (*high-throughput screening*, HTS) ist eine gängige Methode in der modernen Wirkstoffforschung, die nicht nur in der Pharmaindustrie sondern auch in der akademischen Forschung Anwendung findet. Hierbei werden große Substanzbibliotheken (10.000-100.000 Verbindungen pro Tag) auf ihre Aktivität gegen ein biologisches Target getestet, mit dem Ziel neue, chemische Startpunkte für die Entwicklung von Wirkstoffkandidaten zu identifizieren.<sup>198</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein fokussierter zellulärer Screen durchgeführt, bei dem bekannte und kommerziell erhältliche Tyrosinkinaseinhibitoren gegen PDGFR $\alpha$  mutierte Zelllinien getestet wurden (Target-basierter Screen).<sup>xxxv</sup> Gescreent wurde auf der Kontrollzelllinie GIST48B, T1-D842V, sowie den drei Sekundärmutationen tragenden Zelllinien T1-D842V-T674I, T1-D842V-G680R und T1-D842V-G652E/V658A. Hierbei wurde die Zellviabilität nach Inhibitorgabe (2-10  $\mu$ M) mittels *CellTiter-Glo* Assay nach sechs Tagen ermittelt.

Anfänglich wurde ein Pilot-Kinaseinhibitorscreen durchgeführt, bei dem 1400 kommerzielle Inhibitoren aus verschiedenen Substanzbibliotheken gegen die Zelllinien getestet wurden. Aus diesem wurden fünfzehn Inhibitoren (1.07 %) selektiert, die mindestens eine vierfach höhere Aktivität auf einer der PDGFR $\alpha$  mutierten Zelllinien zeigten im Vergleich zur Kontrollzelllinie und in weiterführenden Dosis-Wirkungs-Messungen evaluiert wurden. Anschließend wurde ein weiterer Screen durchgeführt, bei dem 5200 Verbindungen getestet wurden. Aus diesem wurden (in Analogie zum Pilot-Kinaseinhibitorscreen) 130 Verbindungen (2.5 %) für weiterführende Dosis-Wirkungs-Messungen ausgewählt. Aus diesen konnten 29 Verbindungen ausgemacht werden, die mindestens eine dreifach höhere Aktivität auf einer der PDGFR $\alpha$  mutierten Zelllinien zeigten im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Im finalen HTS wurden 12.000 Verbindungen gegen die Kontrollzelllinie GIST48B sowie T1-D842V und T1-D842V-G680R getestet. Hierbei lag der Fokus auf der klinisch relevantesten und resistentesten Sekundärmutation tragenden Zelllinie T1-D842V-G680R. Die ausführliche Auswertung und Beurteilung von interessanten strukturellen Motiven, die sich für den nächsten Zyklus von Struktur-basiertem Design, Synthese und Evaluierung eignen, ist Bestandteil derzeitiger Bemühungen. Auf diese Weise könnte die nächste Generation von (kovalenten) TKIs entwickelt werden, um die immer wiederkehrenden Resistenzmutationen in der Proteinkinase PDGFR $\alpha$  zu umgehen.

---

<sup>xxxv</sup> HTS durchgeführt von Dr. Sonja Sievers (COMAS). Die Zelllinien wurden von Dr. Thomas Mühlenberg aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sebastian Bauer, Westdeutsches Tumorzentrum in Essen, zur Verfügung gestellt.

---

### 3.6.6 Physikochemische und pharmakokinetische Evaluierung

Im Rahmen der weiteren Charakterisierung wurden **79**, **88**, **102** sowie vier Referenzverbindungen ausgewählt, die hinsichtlich ihrer *in silico* physikochemischen Parameter analysiert wurden. Ferner wurde die *in vitro* pharmakokinetische Permeabilität in einem MDCKII-MDR1 Assay untersucht (Tab. 21). Unter Avapritinib Behandlung wurden Nebenwirkungen beschrieben, die auf eine liquorgängige Eigenschaft hindeuten. Hierbei handelte es sich um Anzeichen für Demenzerkrankungen, Sprachstörungen sowie paranoide Psychosen.<sup>xxxvi</sup> Mit Hilfe des MDCKII-MDR1 Modellsystems sollte die *in vitro* Permeabilität der Verbindungen untersucht werden, anhand dessen beurteilt werden kann, ob diese potentiell die Blut-Hirn-Schranke überwinden können.

Eine weitere Möglichkeit für die Charakterisierung von potentiellen Wirkstoffkandidaten hinsichtlich einer möglichen ZNS Permeabilität, basierend auf physikochemischen Eigenschaften, bietet der von WAGER *et al.* beschriebene *central nervous system multiparameter optimization*, kurz CNS MPO Wert. Dieser beruht auf einem Algorithmus, der sechs physikochemische Parameter einbezieht: (i) Lipophilie, berechneter Partitionskoeffizient (cLogP), (ii) berechneter Verteilungskoeffizient (cLogD), (iii) Molekulargewicht (MW), (iv) topologische polare Oberfläche (TPSA), (v) Anzahl an Wasserstoffbrückendonatoren (HBD) und (vi) das basischste Zentrum (pK<sub>a</sub>). Für jede dieser Eigenschaften gibt es einen favorisierten und einen weniger favorisierten Bereich, der durch einen transformierten Wert (T0) angegeben wird. Dies bedeutet bspw. für einen cLogP ≤ 3 ein T0 = 1.0, also favorisiert, wohingegen cLogP > 5 ein T0 = 0.0 anzeigt, also den weniger favorisierten Bereich darstellt (siehe Anhang, Tab. 17). Die Summe der transformierten Werte resultiert schließlich in dem finalen CNS MPO Wert, welche Werte von 0 bis 6 annehmen kann und somit eine Abschätzung hinsichtlich einer potentiellen ZNS Permeabilität basierend auf *in silico* Parametern erfolgen kann. Inhibitoren, die einen Wert von ≥ 4 aufweisen, können als ZNS-gängig eingestuft werden. Im Folgenden werden diese Parameter für vier Referenzverbindungen und ein ausgewähltes Set von synthetisierten Inhibitoren dargestellt (Tab. 16).

---

<sup>xxxvi</sup> European Medicines Agency, Aynakyt - Assessment Report, 2020. Center for Drug Evaluation and Research, NDA/BLA Multi-Disciplinary Review and Evaluation, 2019. Symptome wurden von Prof. Dr. Sebastian Bauer vom Westdeutschen Tumorzentrum in Essen während der Behandlung von Patienten mit Avapritinib beschrieben.

**Tabelle 16.** *In silico* physikochemische Parameter zur Berechnung des CNS MPO Wertes und der *in vitro* Permeabilität (MDCKII-MDR1 Assay) der Verbindungen **79**, **88**, **102** und Referenzverbindungen.

	Ima- tinib	Pona- tinib	Ripre- tinib	Avapri- tinib	79	88	102
<b>Physikochemische Parameter<sup>a</sup></b>							
cLogP	3.83	4.74	5.27	3.58	5.17	4.88	3.73
cLogD	3.25	4.31	5.26	2.43	5.17	4.88	3.30
TPSA	86.28	65.77	86.36	106.29	88.39	88.39	64.68
MW	493.6	532.6	510.4	498.57	489.45	503.48	446.47
HBD	2	1	3	1	2	2	2
pK <sub>a</sub>	7.84	7.62	5.85	8.25	2.66	2.66	7.62
<b>Transformierte Werte T0<sup>b</sup></b>							
cLogP	0.59	0.13	0.00	0.71	0.00	0.06	0.64
cLogD	0.38	0.00	0.00	0.79	0.00	0.00	0.35
TPSA	1.00	1.00	1.00	0.46	1.00	1.00	1.00
MW	0.05	0.00	0.00	0.01	0.08	0.00	0.38
HBD	0.50	0.83	0.17	0.83	0.50	0.50	0.50
pK <sub>a</sub>	1.00	1.00	1.00	0.88	1.00	1.00	1.00
<b>CNS MPO Wert</b>	3.5	3.0	2.2	3.7	2.6	2.6	3.9
<b>Permeabilität<sup>c</sup></b>							
MDCKII-MDR1 P <sub>app</sub> (A-B) [x10 <sup>-6</sup> cm/s]	n.b.	n.b.	n.b.	12.5	2.26	6.08	17.93
MDCKII-MDR1 P <sub>app</sub> (B-A) [x10 <sup>-6</sup> cm/s]	n.b.	n.b.	n.b.	0.95	0.39	1.27	15.09
MDCKII-MDR1 P <sub>app</sub> [(B-A) / (A-B)]	n.b.	n.b.	n.b.	0.24	0.17	0.21	0.84

<sup>a</sup>Berechnet mit der Software Seurat, Methode: ChemAxon, von Dr. Julian Engel vom Lead Discovery Center in Dortmund. <sup>b</sup>Transformierte Werte T0 wurden basierend auf dem Algorithmus von WAGER *et al.* berechnet.

<sup>c</sup>Durchgeführt und ausgewertet von Dr. Matthias Baumann vom Lead Discovery Center in Dortmund. n.b. = nicht bestimmt.

Die berechneten CNS MPO Werte ergaben sich aus der Summe der transformierten Werte T0. Anhand der Farbkodierung fällt das hohe Molekulargewicht der Verbindungen auf (490-532, rot markiert). Weiterhin sind hohe cLogP Werte  $\geq 4$  für die Referenzverbindungen Ponatinib und Ripretinib, sowie für **79** und **88** ein Hinweis auf eine mäßige Löslichkeit der Verbindungen. Mithilfe des berechneten CNS MPO Werts für Avapritinib von 3.7 wurde das Potential hinsichtlich der ZNS Gängigkeit bestätigt. Für Verbindung **102** wurde ein CNS MPO Wert von 3.9 berechnet, der ebenfalls auf eine ZNS Permeabilität der Substanz

---

hindeutet. Verbindungen **79** und **88** zeigten im Vergleich zu Ponatinib einen verringerten CNS MPO Wert von 2.6.

Die *in vitro* Charakterisierung hinsichtlich der Beurteilung, ob die Verbindungen potentiell die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, zeigten anhand des MDCKII-MDR1 Assays für Avapritinib eine hohe Aufnahme mit  $P_{app} (A-B)$   $12.5 \times 10^{-6}$  cm/s und für Verbindung **88**  $P_{app} (A-B)$  mit  $6.08 \times 10^{-6}$  cm/s. Die Verhältnisse  $P_{app} ((B-A) / (A-B))$  waren für diese Verbindungen  $< 1$ , sodass hier die Aufnahme größer war, als das aktive Ausschleusen der Substanz, und somit eine ZNS-Gängigkeit abgeleitet werden konnte. Für Verbindung **79** wurde ein im Vergleich zu Avapritinib geringer Flux ermittelt ( $P_{app} (A-B)$   $2.26 \times 10^{-6}$  cm/s), wohingegen für Verbindung **102** der höchste Flux innerhalb dieses ausgewählten Sets ermittelt wurde mit  $P_{app} (A-B)$   $17.93 \times 10^{-6}$  cm/s.

Abschließend kann festgehalten werden, dass sowohl der MDCKII-MDR1 Assay, wie auch die *in silico* Abschätzung basierend auf dem CNS MPO Wert das Potential von Avapritinib hinsichtlich der ZNS Gängigkeit bestätigten. Die Vergleichbarkeit der beiden Methoden konnte anhand von Avapritinib verdeutlicht werden, wohingegen die synthetisierte Verbindung **88** auf Basis des MDCKII-MDR1 Assays ebenfalls als potentiell ZNS-gängig eingestuft wurde, der berechnete CNS MPO Wert dies allerdings nicht bestätigen konnte. In zukünftigen Arbeiten sollte der MDCKII-MDR1 Assay für Verbindung **88** wiederholt werden, um die Diskrepanz zwischen *in silico* bestimmtem CNS MPO Wert und *in vitro* Charakterisierung aufzuklären. Des Weiteren sollte untersucht werden, wie die ZNS Permeabilität von Avapritinib umgangen werden kann. Hierzu könnten chemische Modifikationen am Molekül vorgenommen werden und die neu dargestellten Verbindungen anschließend im MDCKII-MDR1 Assay charakterisiert werden.



---

### 3.6.7 Zusammenfassung

Gastrointestinale Stromatumore (GISTs) sind die am häufigsten vorkommenden mesenchymalen Sarkome, welche durch eine Fehlregulierung der Proteinkinasen KIT und PDGFR $\alpha$  entstehen können. In klinischen Studien wurde für 75-90 % der Patienten mit fortgeschrittenem GIST ein klinischer Nutzen unter Imatinib Therapie festgestellt, was anhand eines progressionsfreien Überlebens von 2.5 Jahren bei Patienten mit KIT Exon 11 Mutationen deutlich wird. Dabei treten jedoch häufig Resistenzmutationen auf, sodass ein dringender Bedarf an selektiven Inhibitoren, speziell für mutiertes KIT oder PDGFR $\alpha$  besteht.

In Vorarbeiten wurde ein potentiell kovalenter, Ponatinib-basierter Inhibitor (**79**) dargestellt, welcher eine hohe biochemische Potenz aufwies. Basierend auf diesem Designansatz wurden Synthesestrategien entwickelt, welche die kovalente Adressierung von Cys788 und Cys809 in KIT in einer *proof-of-concept* Studie ermöglichen sollten. Hierbei wurde eine Substanzbibliothek aus 21 Ponatinib-basierten Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren synthetisiert, welche in MS- und MS/MS-Experimenten hinsichtlich der Adressierbarkeit von Cys788 in KIT evaluiert wurden. Die spezifische Bindung der synthetisierten Inhibitoren an Cys788 konnte hierbei nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren standen einzigartige, Patienten abgeleiteten PDGFR $\alpha$ -mutierte Zelllinien zur Verfügung, welche zunächst die zelluläre Charakterisierung der synthetisierten Inhibitoren ermöglichte. Hierbei konnte die hohe biochemische Aktivität der Verbindungen **79** und **88** auf KIT nicht in den zellulären Experimenten nachgewiesen werden. Zudem wurden diese Zelllinien in einem HTS eingesetzt, welcher chemisch interessante Startpunkte für die zukünftige Entwicklung von neuen Inhibitoren für mutiertes PDGFR $\alpha$  identifizieren soll. Die pharmakokinetische Charakterisierung von Avapritinib und einem Set ausgewählter Inhibitoren im MDCKII-MDR1 Assay bestätigte das Potential von Avapritinib die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Ferner wurde Verbindung **88** ebenfalls als potentiell ZNS-gängig eingestuft.

---

## 4 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beinhaltet zwei Abschnitte: (i) die pharmakokinetische Charakterisierung von Inhibitoren mit dem Fokus auf der Analyse der metabolischen Stabilität in Anwesenheit von Lebermikrosomen, die einen Phase-I-Metabolismus nachbilden. Hierzu wurde ein entsprechendes Assaysystem in der Arbeitsgruppe etabliert. (ii) Das Struktur-basierte Wirkstoffdesign, die organische Synthese von niedermolekularen Verbindungen und deren Charakterisierung, mit dem Ziel selektive und potente Inhibitoren für Krebs-relevante Proteinkinasen zu identifizieren. Die Kombination aus biochemischem Aktivitätsassay und zellulärem Viabilitätsassay erlaubte eine Bewertung der generierten Substanzbibliotheken. Massenspektrometrische Studien ermöglichten die Analyse der kovalenten Adressierung des Zielproteins, sowie Komplexkristallstrukturen verwendet wurden, welche tiefere Einblicke in die Bindungsmodi der Inhibitoren erlaubten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Phase-I-Metabolismus Assays etabliert, der einen wichtigen Beitrag zur Optimierung und Weiterentwicklung der Inhibitoren leistet. Der Assay wurde in Gegenwart von humanen und murinen Lebermikrosomen durchgeführt, welche die Cytochrom P450 Enzyme beinhalten, durch die die Mehrheit der auf dem Markt zugelassenen Wirkstoffe abgebaut werden. Untersucht wurde die metabolische Stabilität von 200 Verbindungen über die Zeit, sodass Parameter wie die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) und die intrinsische Clearance ( $CL_{int}$ ) für eine Vielzahl an Verbindungen aus unterschiedlichen Projekten bestimmt und mit Referenzverbindungen verglichen werden konnten.

Die Proteinkinase MKK7 ist Teil des JNK Signalwegs, dessen Fehlregulierung in neurodegenerativen Erkrankungen sowie bei Herzinfarkten mit darauffolgenden ischämischen Reperfusionsschäden identifiziert wurde. Unzureichende Selektivitätsprofile und mangelnde Wirksamkeit wurden bislang für JNK Inhibitoren beschrieben, weshalb die Adressierung der JNK-aktivierenden Kinase MKK7 eine gute Alternative darstellt die genannten Selektivitätsmängel zu umgehen. Der literaturbeschriebene, potente Pyrazolopyrimidin-basierte kovalente MKK7-Inhibitor **24** sollte in komplexen zelluläre *in vitro* und ersten *in vivo* Modellsystemen getestet werden, weshalb zunächst ein Gramm der Verbindung hergestellt wurde. Die Identifizierung einer geeigneten Formulierung für die Substanz sowie die Bestimmung der maximal tolerierbaren Dosis bildeten die Grundlage für erste *in vivo* Mausstudien. Aus diesen ging bei 600 mg pro kg Körpergewicht der Maus durch IV Applikation eine maximale Plasmakonzentration von 5  $\mu$ M hervor, sowie eine gute Verträglichkeit der Substanz. Die nur mäßige Löslichkeit der Verbindung stellte sich als problematisch dar, weshalb verschiedene Salzformen dargestellt wurden, von denen das HCl-Salz **34** eine verbesserte Löslichkeit zeigte. Weiterhin wurde der Einfluss von **24** auf Reperfusionsschäden infolge eines Herzinfarktes in Mausmodellen untersucht.

---

Hierbei wurden Herzinfarkte induziert und durch die präventive Vorab-Gabe der entstandene ischämische Reperfusionsschaden im Vergleich zu unbehandelten Mäusen analysiert. Basierend auf den bislang erzielten Ergebnissen lässt sich ein geringerer ischämischer Reperfusionsschaden bei vorheriger Verabreichung von **24** vermuten.

Die Behandlung von Krebs wurde in den letzten Jahren durch den Ansatz der Präzisionsmedizin revolutioniert. Hierbei können durch die Identifizierung von prädiktiven Biomarkern große Patientenpopulationen in Subgruppen unterteilt werden, die somit eine individuelle und maßgeschneiderte Therapie erhalten. Die zielgerichtete Adressierung mit TKIs wurde erfolgreich für die Proteinkinasen EGFR, KIT und PDGFR $\alpha$  beschrieben. Her2, ein Mitglied der ErbB-Rezeptorfamilie, wurde bei etwa 4 % aller Patienten mit NSCLC als Treiber identifiziert, wovon ca. 80 % Insertionsmutationen in Exon20 entsprechen. Geringe Überlebens- und Ansprechraten von < 40 % auf die bislang angewendeten Therapien mit TKIs verdeutlichen den dringenden Bedarf an wirksamen Inhibitoren für Krebspatienten mit positivem Her2-Mutationsstatus. In dieser Arbeit wurden kovalente, Pyrrolopyrimidin-basierte Typ-II-Inhibitoren mit dem Ziel weiterentwickelt, die Löslichkeit der Inhibitoren durch Einführung von Löslichkeitsgruppen zu steigern und somit eine verbesserte zelluläre Aktivität erzielen zu können. Durch Einbringung von polaren Alkohol- und Amin-funktionalitäten in *ortho*-Position zum Michael-Akzeptor wurde eine gesteigerte biochemische, aber gleichbleibende zelluläre Aktivität festgestellt. Kristallisationsstudien verifizierten den angenommenen Bindungsmodus und die pharmakokinetische Charakterisierung zeigte bspw. Optimierungsbedarf bzgl. der Stabilität in murinem Blutplasma sowie in Lebermikrosomen.

Mutationen in den Proteinkinasen KIT und PDGFR $\alpha$  wurden bei der Mehrheit von Patienten mit gastrointestinalen Stromatumoren identifiziert. Die derzeitig zugelassenen Wirkstoffe für die Behandlung von GIST sind reversible, ATP-kompetitive Inhibitoren, von denen lediglich Avapritinib und Ripretinib speziell für die Therapie von GIST entwickelt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde basierend auf der Ponatinibstruktur eine Substanzbibliothek von Typ-II- bzw. Typ-III-Inhibitoren synthetisiert. Diese wurden mit einer reaktiven Gruppe dekoriert, um eine kovalente Bindung mit Cys788 oder Cys809 in KIT bzw. Cys814 oder Cys835 in PDGFR $\alpha$  auszubilden. In MS- und MS/MS-Experimenten konnte die spezifische Bindung der synthetisierten Inhibitoren an Cys788 in KIT nicht nachgewiesen werden. Ferner wurden einzigartige, Patienten abgeleitete PDGFR $\alpha$ -mutierte Zelllinien entwickelt und in einem HTS eingesetzt. Die Durchmusterung von fokussierten Kinaseinhibitorbibliotheken sollte zukünftig neue Leitstrukturen identifizieren, um spezifische Inhibitoren für PDGFR $\alpha$ -mutierte gastrointestinale Stromatumore designen und synthetisieren zu können.

---

## 5 Abstract

The present thesis is divided into two parts. First, the pharmacokinetic characterization of inhibitors, focused on assessing the metabolic stability in liver microsomes to mimic a phase I metabolism. Therefore, a suitable assay system was established in our working group. Second, structure-based drug design, synthesis and evaluation of potent and selective inhibitors addressing relevant protein targets in oncology disorders. To assess the generated small molecule compound libraries, a biochemical activity-based assay was combined with cellular viability analyses, followed by mass spectrometry-based experiments to confirm a covalent bond formation. In addition, complex crystal structures provided deeper insights into the binding mode.

Within this work a phase I metabolism assay was established with the aim to improve compound optimization and further development. The assay was performed with human and mouse liver microsomes, which contain the essential cytochrome P450 enzymes for phase I metabolism. Here, the metabolic stability of 200 synthesized compounds was evaluated over time to derive parameters like half-life ( $t_{1/2}$ ) and intrinsic clearance ( $CL_{int}$ ) for a set of compounds from different projects.

The protein kinase MKK7 is part of the JNK signalling pathway, which is involved in numerous human disorders such as neurodegenerative diseases and the occurrence of reperfusion damages as a consequence of cardiac infarction. So far, only a limited number of inhibitors have been described to target MKK7 and most of them inhibit MKK7 as an off-target. Due to unwanted side effects associated with targeting JNKs, targeting MKK7 turned out to be an alternative strategy. The potent and literature known pyrazolopyrimidine-based covalent MKK7 inhibitor **24** was set out to be tested in complex *in vitro* and first *in vivo* model systems and therefore the synthesis was scaled to prepare 1 gram for further studies. Formulation and dose escalation studies were performed to initiate the first *in vivo* mouse study. This experiment yielded in a maximum plasma concentration of 5  $\mu$ M after IV application of 600 mg per kg bodyweight, as well as a good tolerability even at high compound concentrations as high as 600 mg/mL. To overcome low aqueous solubility which represents a limiting factor for compound **24** in *in vivo* studies, various salt forms were generated and the corresponding HCl salt **34** indeed exhibited improved solubility. Furthermore, the potential therapeutic use of **24** toward the occurrence of reperfusion damages as a consequence of cardiac infarction was assessed in a mouse model system. Here, cardiac infarction events were induced and the comparison between pre-treated and untreated mice regarding reperfusion damages was analysed. Initial results hint at reduced reperfusion damage upon preceding inhibitor application.

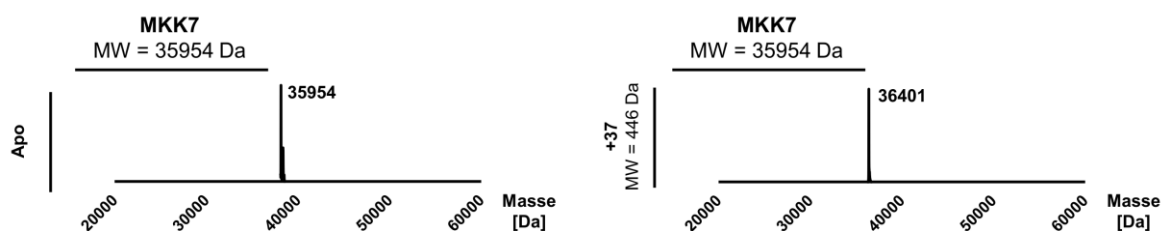
---

The concept of personalized medicine has revolutionized the treatment of cancer patients in the last decade. Here, the identification of predictive biomarkers enables the classification of large patient populations into smaller subgroups based on their genomic profiles allowing for targeted treatment of these sub-cohorts using tailor-made therapeutics. These target-oriented approaches were successfully established for protein kinases such as EGFR, KIT and PDGFR $\alpha$ .

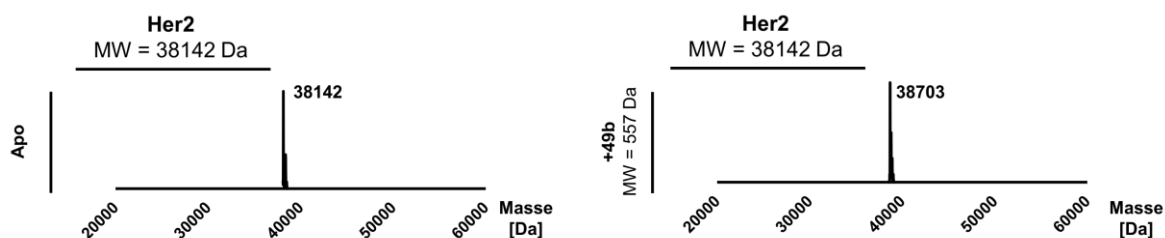
Her2, a member of the ErbB-family, was found to be a driver in 4 % of patients harbouring NSCLC. Most frequently found was the insertion mutation in exon 20 (Her2-ins-YVMA). Poor survival and response rates to the current therapies with TKIs illustrate the urgent medical need for new inhibitors targeting Her2-mutants. Within this project, covalent pyrrolopyrimidine-based type-II inhibitors were further developed to improve cellular activity by introduction of solubility enhancing moieties. Therefore, different polar groups, like alcohol and amine functionalities, were substituted in *ortho* position to the Michael acceptor system and the corresponding inhibitors displayed improved biochemical activities, but whereas cellular potencies were remained. Complex crystal structures substantiated the anticipated binding mode and pharmacokinetic evaluation revealed an overall good pharmacokinetic profile. Future optimizations should be focussed on stability in blood plasma and liver microsomes.

Gastrointestinal stroma tumors are the most common type of mesenchymal tumors in the gastrointestinal tract, and disease-driving mutations in KIT or PDGFR $\alpha$  were found in the majority of patients. So far, only reversible and ATP-competitive inhibitors have been approved for the treatment of GIST, of which only avapritinib and ripretinib were specifically developed for GIST therapy. Based on the chemical structure of type II inhibitor Ponatinib a focused compound library was synthesized with more than 20 small molecule inhibitors to target Cys788 or Cys809 in KIT and Cys814 or Cys835 in PDGFR $\alpha$ , respectively. Mass spectrometry-based experiments and tandem mass spectrometry studies could not identify the specific labelling of Cys788 in KIT. Furthermore, unique, patient-derived PDGFR $\alpha$  mutated cell lines were developed and used in a high-throughput screening campaign. Screening of focused kinase inhibitor libraries should identify additional starting points to design and synthesize specific inhibitors targeting PDGFR $\alpha$  mutated GIST.

## 6 Anhang



**Abbildung 54.** Dekonvolutierte Massenspektren von MKK7 nach 1 h Inkubation auf Eis mit DMSO (Apo) und Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin **37**. Gezeigt ist der Massenbereich von 20.000-60.000 Da um die einfache Modifikation mit dem Inhibitor zu bestätigen.



**Abbildung 55.** Dekonvolutierte Massenspektren von Her2 nach 1 h Inkubation auf Eis mit DMSO (Apo) und Pyrrolopyrimidin **49b**. Gezeigt ist der Massenbereich von 20.000-60.000 Da um die einfache Modifikation mit dem Inhibitor zu bestätigen.

**Tabelle 17.** *In silico* physikochemische Parameter zur Berechnung des CNS MPO Wertes. Eigenschaften und Wertebereiche sind angegeben.<sup>199</sup>

Physikochemische Parameter	Favorisierter Bereich	Weniger favorisierter Bereich
	T0 = 1.0	T0 = 0.0
cLogP	cLogP ≤ 3	cLogP > 5
cLogD	cLogD ≤ 2	cLogD > 4
TPSA	MW ≤ 360	MW > 500
MW	40 < TPSA ≤ 90	TPSA ≤ 20; TPSA > 120
HBD	HBD ≤ 0.5	HBD > 3.5
pK <sub>a</sub>	pK <sub>a</sub> ≤ 8	pK <sub>a</sub> > 10

---

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Organische Synthese

#### 7.1.1 Allgemeine Anmerkungen

Die verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden von verschiedenen Anbietern wie Activate Scientific, Alfa Aesar, Apollo Scientific, Enamine, Merck oder VWR kommerziell bezogen und, sofern nicht anders angegeben, ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden mit den Geräten Avance III HD NanoBay – 400 MHz, Avance III HD – 500 und 600 MHz der Firma Bruker aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist in ppm angegeben und bezieht sich auf deuteriertes Dimethylsulfoxid ( $^1\text{H}$ -NMR: 2.50 ppm bzw.  $^{13}\text{C}$ -NMR: 39.52 ppm), deuteriertes Chlorform ( $^1\text{H}$ -NMR: 7.26 ppm bzw.  $^{13}\text{C}$ -NMR: 77 ppm) oder deuteriertes Methanol ( $^1\text{H}$ -NMR: 4.87 ppm bzw.  $^{13}\text{C}$ -NMR: 49 ppm) als interner Standard. Für die Spinmultiplizität der  $^1\text{H}$ -Spektren wurde die folgende Darstellung gewählt: (s) Singulett, (d) Dublett, (t) Triplett und (m) Multiplett.

Dünnschichtchromatographie Platten der Firma Merck wurden bei der analytischen Dünnschichtchromatographie eingesetzt (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>), und im Anschluss mittels UV-Licht ( $\lambda = 254$  bzw. 366 nm) ausgewertet.

Zur säulenchromatographischen Aufreinigung wurde Kieselgel 60 F<sub>254</sub> der Firma VWR verwendet. Die automatisierte Aufreinigung erfolgte über ein Biotage Isolera One System mit Büchi Reveleris Kieselgel-Kartuschen (4 g – 80 g) oder wurde an einem Flash Massenspektrometer der Firma Axel Semrau durchgeführt (CombiFlash NextGen 300+ System).

LC-MS-Spektren wurden an einem Agilent HPLC-System LCQ Advantage Max der 1100er Serie, verbunden mit einem Thermo Scientific Finnigan LCQ Advantage Max Ionenfallen-Massenspektrometer mit ESA Corona Detektor, aufgenommen (CC 125/4 Nucleodur C18 gravity Säule, 3  $\mu\text{m}$ ; mobile Phase 0.1 % Ameisensäure in Wasser und 0.1 % Ameisensäure in Acetonitril). Die Auswertung erfolgte über die Software Xcalibur (Thermo Scientific, Version 2.2).

---

## 7.1.2 Allgemeine Synthesevorschriften

### Allgemeine Synthesevorschrift zur Boc-Entschützung von Aminen (A)

Die jeweiligen Boc-geschützten Bausteine wurden in DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt, bevor das TFA:DCM Gemisch (1:4) zugetropft wurde. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei rt gerührt, anschließend mit DCM verdünnt und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung auf pH 8 eingestellt. Die Extraktion erfolgte in einem Gemisch aus 10 % MeOH in DCM, die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

### Allgemeine Synthesevorschrift zur Substitution mit Säurechloriden (B)

Die jeweiligen Amine wurden in trockenem THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von DIPEA (5 eq) und entsprechenden Säurechloriden wurde die Reaktionsmischung auf rt erwärmt und für 45 min gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung in DCM aufgenommen, mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

### Allgemeine Synthesevorschrift der Kupfer-katalysierten Alkin-Azid Cycloaddition (C)

Alkin-Baustein **31** wurde in einem H<sub>2</sub>O:tBuOH Gemisch (1:1) gelöst, mit katalytischen Mengen Cu(II)SO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.007 eq), Natriumascorbat (0.07 eq) und entsprechendem Azid (1.1 eq) versetzt und für 3 h bei rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in DCM aufgenommen und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Anschließend wurde zusätzlich mit in einem Gemisch aus 10 % MeOH in DCM erneut extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

### Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung von Salzformen (D)

10 mg (0.02 mmol) Edukt **24** wurden in 1 mL H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit 22 µL 1M Salzlösung versetzt und für 15 min stehen gelassen. Anschließend wurde die Reaktionsmischung zur vollständigen Trocknung für 18 h lyophilisiert.

### Allgemeine Synthesevorschrift zur Einführung der Boc-Schutzgruppe (E)

Die jeweiligen Amine (1 eq) wurden in THF gelöst, mit DMAP (0.7 eq), Et<sub>3</sub>N (1.5 eq) und Boc<sub>2</sub>O (2.1 eq) versetzt und für 48 h bei 80 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung in DCM aufgenommen, mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.



---

### **Allgemeine Synthesevorschrift für die Reduktion von aromatischen Nitrogruppen (F)**

Die jeweiligen Nitroverbindungen (1 eq) wurden in einem Gemisch aus EtOH:H<sub>2</sub>O (9:1) gelöst, mit NH<sub>4</sub>Cl (10 eq) und Fe (5 eq) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei 60 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

### **Allgemeine Synthesevorschrift für Sonogashira-Kupplungsreaktionen (G)**

Entsprechende Edukte (1 eq), TMSA (15 eq) und DIPA (3 eq) wurden in trockenem MeCN gelöst. Unter Schutzgas wurden der Pd-Katalysator Pd(PPh<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub> (0.1 eq) und CuI (0.2 eq) hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 80 °C für 16 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

### **Allgemeine Synthesevorschrift für HATU-vermittelte Amidkupplungen (H)**

Entsprechende Carbonsäuren (1.1 eq) wurden in THF gelöst, HATU (1.5 eq) und DIPEA (3 eq) wurden hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei rt gerührt, anschließend erfolgte die Zugabe entsprechender Amine (1 eq) und die Reaktion wurde für 16 h bei rt gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in DCM aufgenommen und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

### **Allgemeine Synthesevorschrift für Suzuki-Miyaura-Reaktionen (I)**

Das Arylhalogenid (1 eq), die Boronsäure (1.2 eq), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.1 eq) und Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.5 eq) wurden in einem Gemisch aus Dioxan:H<sub>2</sub>O (3:1) gelöst und mit Stickstoff geflutet. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf 80 °C erwärmt und für 16 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch in EtOAc aufgenommen und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

### **Allgemeine Synthesevorschrift für die nukleophile Substitution von hydrophoben Substituenten (J)**

Das 4-Chloro-pyrrolopyrimidin (1 eq) wurde in nBuOH gelöst und mit 4M HCl/Dioxan (0.25 eq) versetzt. Anschließend wurde das entsprechende Amin (1.5 eq) zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde bei 80 °C für 24 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in DCM aufgenommen und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

---

### **Allgemeine Synthesevorschrift für die nukleophile aromatische Substitution (K)**

Zu einer Lösung aus Natriumhydrid (2.4 eq) in trockenem THF wurde der entsprechende Alkylalkohol (10 eq) gegeben und die Reaktionsmischung für 30 min gerührt. Anschließend wurde das entsprechende Pyrrolopyrimidin (1 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 16 h gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch in DCM aufgenommen und mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

---

### 7.1.3 Synthese und analytische Charakterisierung

#### Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-iodo-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**29**)

500 mg (1.92 mmol, 1 eq) Amin **27** wurden in 20 mL trockenem THF gelöst. Nach Zugabe von 540 mg **28** (1.4 eq) und TPP (1.5 eq, 755 mg) wurde nach weiteren 5 min DIAD (1.5 eq, 566 µL) zugegeben und das Reaktionsmischung für 45 min im Ultraschallbad bei 40 °C gehalten. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in EtOAc aufgenommen, mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde **29** nach insgesamt 44 Ansätzen (22 g) mit einer Ausbeute von 16.16 g (36.4 mmol, 43 %) erhalten.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 445.27 für C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 445.01.

#### Darstellung von *tert*-Butyl (*R*)-3-(4-amino-3-((trimethylsilyl)ethynyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**30**)

2000 mg (4.5 mmol, 1 eq) Edukt **29** wurden in trockenem DCM gelöst und mit TEA (4 eq) und Cu(I)I (0.2 eq) auf 0 °C gekühlt, sodass die langsame Zugabe von TMSA (20 eq) erfolgen konnte. Nach Zugabe von Pd(0) (0.1 eq) als Katalysator wurde das Reaktionsgemisch auf rt erwärmt und für 2 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und säulenchromatographisch (DCM/MeOH) aufgereinigt. **30** wurde mit einer Ausbeute von 1092 mg (2.6 mmol, 59 %) erhalten.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 415.58 für C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 415.10.

#### Darstellung von *tert*-butyl (*R*)-3-(4-Amino-3-ethynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**31**)

3850 mg (11.2 mmol, 1 eq) Edukt **30** wurden in MeOH gelöst, mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.3 eq) versetzt und für 1 h bei rt gerührt. Anschließend erfolgte die Extraktion in einem Gemisch aus 10 % MeOH in DCM, die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das auf diese Weise erhaltene Produkt **31** (2539 mg, 7.4 mmol, 66 %) wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Reaktionsschritt umgesetzt.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 343.40 für C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 343.06.

---

**Darstellung von (R)-1-(3-(4-Amino-3-ethynyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (26)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschriften **A** und **B** wurde Alkin-Baustein **26** durch entsprechende Substitution mit Acryloylchlorid (1.4 eq) und nach säulenchromatographischer Aufreinigung dargestellt. Über zwei Syntheseschritte wurde **26** mit einer Ausbeute von 397 mg (1.34 mmol, 19 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, MeOD)  $\delta$  8.24 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 6.75 (ddd,  $J = 81.2, 16.7, 10.7$  Hz, 1H), 6.19 (dd,  $J = 27.5, 16.8$  Hz, 1H), 5.72 (dd,  $J = 63.0, 10.4$  Hz, 1H), 4.84 – 4.74 (m, 1H), 4.61 (d,  $J = 14.9$  Hz, 1H), 4.34 (d,  $J = 13.0$  Hz, 1H), 4.22 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 4.12 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 4.10 (s, 1H), 3.78 (dd,  $J = 13.3, 9.8$  Hz, 1H), 3.45 – 3.37 (m, 1H), 3.30 – 3.26 (m, 1H), 3.13 (t,  $J = 10.7$  Hz, 1H), 2.37 – 2.24 (m, 1H), 2.23 – 2.16 (m, 1H), 2.09 – 2.02 (m, 1H), 1.77 – 1.66 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, MeOD)  $\delta$  166.55 (s), 158.15 (s), 156.08 (s), 152.64 (d,  $J = 16.1$  Hz), 127.66 (s), 127.26 (s), 126.06 (s), 101.37 (s), 83.52 (d,  $J = 3.0$  Hz), 74.49 (s), 53.48 (s), 49.53 (s), 48.16 (s), 29.61 (s), 23.18 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 279.33 für C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 297.10.

**Darstellung von (R)-1-(3-(3-(1-(4-Acetylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-4-amino-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (24)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **C** wurden 350 mg (1.18 mmol, 1 eq) Alkin-Baustein **31** umgesetzt. **24** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 159 mg (0.88 mmol, 75 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO)  $\delta$  9.50 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.26 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 8.19 (d, 2H), 6.93 – 6.72 (m,  $J = 79.9, 15.9, 10.7$  Hz, 1H), 6.12 (dd,  $J = 29.0, 16.7$  Hz, 1H), 5.68 (dd,  $J = 57.2, 10.0$  Hz, 1H), 4.77 – 4.67 (m,  $J = 11.1$  Hz, 1H), 4.63 (d,  $J = 11.1$  Hz, 0.5H), 4.31 (dd,  $J = 40.9, 12.0$  Hz, 1H), 4.13 (d,  $J = 12.5$  Hz, 0.5H), 3.68 (t,  $J = 11.4$  Hz, 0.5H), 3.17 (dd,  $J = 28.4, 12.8$  Hz, 1H), 2.91 (t,  $J = 10.8$  Hz, 0.5H), 2.66 (s, 3H), 2.35 – 2.27 (m,  $J = 12.4, 4.0$  Hz, 1H), 2.20 – 2.13 (m, 1H), 2.01 – 1.91 (m, 1H), 1.68 – 1.56 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO)  $\delta$  196.96 (s), 164.63 (s), 158.24 (s), 156.40 (s), 153.86 (s), 142.35 (s), 139.17 (s), 136.86 (s), 134.66 (s), 130.00 (s), 128.35 (s), 127.56 (s), 120.84 (s), 120.31 (s), 97.79 (s), 52.52 (s), 45.73 (s), 41.66 (s), 26.88 (s), 22.46 (s), 19.26 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 458.49 für C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>9</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 458.15.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 458.4980 für C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>9</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 458.2048.

---

### Darstellung von 1-(4-Azidophenyl)ethan-1-on (**33**)

1000 mg (7.4 mmol, 1 eq) Amin **32** wurden in H<sub>2</sub>O gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit katalytischen Mengen konzentrierter HCl versetzt. In H<sub>2</sub>O gelöstes NaNO<sub>2</sub> (1.1 eq) wurde zum Amin gegeben und die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von NaN<sub>3</sub> (1.2 eq) wurde das Gemisch für 1 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in EtOAc aufgenommen und extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde **33** mit einer Ausbeute von 1059 mg (6.6 mmol, 89 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD) δ 7.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 2.54 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, MeOD) δ 198.92 (s), 146.56 (s), 135.00 (s), 131.51 (s), 120.07 (s), 26.55 (s).

### Darstellung von (*R*)-1-(3-(3-(1-(4-Acetylphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-4-amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on als Hydrochlorid (**34**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **D** wurde **24** mit 22 µL 1M HCl-Lösung versetzt.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.84 (d, *J* = 53.7 Hz, 1H), 9.64 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 9.11 (d, *J* = 36.2 Hz, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.82 (ddd, *J* = 69.9, 16.4, 10.7 Hz, 1H), 6.11 (dd, *J* = 32.9, 15.2 Hz, 1H), 5.69 (dd, *J* = 39.4, 10.4 Hz, 1H), 4.84 – 4.72 (m, 1H), 4.65 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.33 (t, *J* = 13.7 Hz, 1H), 4.14 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.66 (t, 1H), 3.18 (t, *J* = 11.2 Hz, 1H), 2.91 (t, *J* = 11.3 Hz, 1H), 2.67 (s, 3H), 2.34 – 2.25 (m, *J* = 11.9 Hz, 1H), 2.23 – 2.16 (m, 1H), 2.02 – 1.93 (m, 1H), 1.72 – 1.56 (m, *J* = 12.4 Hz, 1H).

**Elementaranalyse** für C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>9</sub>O<sub>2</sub>: Theoretisch: % C: 52.08; % H: 4.75; % N: 23.77. Berechnet: % C: 52.00; % H: 5.10; % N: 23.70.

### Darstellung von (*R*)-1-(3-(3-(1-(4-Acetylphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-4-amino-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on als Mesylat (**35**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **D** wurde **24** mit 22 µL 1M Ms-Cl-Lösung versetzt.

---

**Darstellung von (R)-1-(3-(3-(1-(4-Acetylphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-4-amino-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on als Trifluoroacetat (36)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **D** wurde **24** mit 22  $\mu$ L 1M TFA-Lösung versetzt.

**Darstellung von (R)-1-(3-(4-Amino-3-(1-(4-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (37)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **C** wurden 15 mg (0.05 mmol, 1 eq) Alkin-Baustein **31** umgesetzt. **37** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 6 mg (0.01 mmol, 27 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  9.26 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.98 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 7.20 – 7.15 (m, 2H), 6.82 (ddd,  $J$  = 68.4, 16.3, 10.5 Hz, 1H), 6.12 (dd,  $J$  = 24.8, 16.9 Hz, 1H), 5.67 (dd,  $J$  = 49.9, 10.3 Hz, 1H), 4.76 – 4.65 (m, 1H), 4.61 (d,  $J$  = 11.2 Hz, 0.5H), 4.29 (dd,  $J$  = 32.8, 12.3 Hz, 1H), 4.12 (d,  $J$  = 12.4 Hz, 0.5H), 3.86 (s, 3H), 3.68 (t, 0.5H), 3.16 (dd,  $J$  = 24.4, 12.5 Hz, 1H), 2.91 (t,  $J$  = 11.6 Hz, 0.5H), 2.35 – 2.25 (m, 1H), 2.19 – 2.12 (m, 1H), 1.99 – 1.91 (m,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 1.67 – 1.55 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  164.63 (s), 159.71 (s), 158.31 (s), 156.40 (s), 153.86 (s), 141.92 (s), 135.05 (s), 129.62 (s), 128.37 (s), 128.20 (s), 127.59 (s), 122.18 (s), 114.92 (s), 97.77 (s), 55.60 (s), 52.47 (s), 45.73 (s), 45.25 (s), 29.04 (s), 22.09 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 446.48 für C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>9</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 446.19.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 446.1975 für C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>9</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 446.2047.

**Darstellung von Methyl (R)-4-(4-(1-(1-acryloylpiperidin-3-yl)-4-amino-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)benzoat (38)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **C** wurden 15 mg (0.05 mmol, 1 eq) Alkin-Baustein **31** umgesetzt. **39** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 10 mg (0.02 mmol, 42 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  9.52 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.28 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 3H), 8.20 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.82 (ddd, 1H), 6.12 (dd,  $J$  = 26.2, 16.8 Hz, 1H), 5.68 (dd,  $J$  = 51.7, 10.1 Hz, 1H), 4.77 – 4.67 (m,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 4.62 (d,  $J$  = 10.8 Hz, 0.5H), 4.31 (dd,  $J$  = 30.1, 13.6 Hz, 1H), 4.13 (d,  $J$  = 14.4 Hz, 0.5H), 3.68 (t, 0.5H), 3.17 (dd, 1H), 2.91 (t,  $J$  = 11.4 Hz, 0.5H),

---

2.34 – 2.25 (m, 1H), 2.20 – 2.13 (m,  $J = 8.7, 4.1$  Hz, 1H), 2.00 – 1.92 (m,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 1.68 – 1.56 (m, 1H).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  165.29 (s), 164.54 (s), 158.24 (s), 156.43 (s), 142.38 (s), 139.44 (s), 134.65 (s), 130.94 (s), 129.94 (s), 128.37 (s), 128.17 (s), 127.61 (s), 120.92 (s), 120.51 (s), 97.79 (s), 52.45 (s), 49.17 (s), 45.67 (s), 45.25 (s), 29.55 (s), 24.91 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 474.49 für  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_9\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 474.16.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 474.1924 für  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_9\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 474.1993.

### **Darstellung von Methyl (*R*)-1-(3-(4-amino-3-(1-(4-bromophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (39)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **C** wurden 15 mg (0.05 mmol, 1 eq) Alkin-Baustein **31** umgesetzt. **39** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 3 mg (0.006 mmol, 12 %) erhalten.

**$^1\text{H}$  NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  9.42 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.22 (d,  $J = 60.2$  Hz, 2H), 8.06 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.86 (d, 2H), 6.82 (ddd, 1H), 6.11 (dd,  $J = 26.5, 16.8$  Hz, 1H), 5.67 (dd,  $J = 52.0, 10.5$  Hz, 1H), 4.76 – 4.66 (m,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 4.61 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 4.30 (dd,  $J = 32.2, 13.1$  Hz, 1H), 4.13 (d,  $J = 13.7$  Hz, 1H), 3.67 (t, 1H), 3.16 (dd, 1H), 2.91 (t,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 2.35 – 2.26 (m,  $J = 15.9, 14.4, 5.9$  Hz, 1H), 2.20 – 2.13 (m,  $J = 11.3, 5.2$  Hz, 1H), 2.00 – 1.92 (m,  $J = 13.0$  Hz, 1H), 1.67 – 1.56 (m, 1H).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  164.64 (s), 163.76 (s), 158.27 (s), 156.43 (s), 142.24 (s), 135.50 (s), 132.84 (s), 128.35 (s), 127.60 (s), 122.54 (s), 122.11 (s), 120.86 (s), 100.55 (s), 59.26 (s), 52.45 (s), 45.61 (s), 29.00 (s), 22.06 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 495.35 für  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_9\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 494.08.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 494.0974 für  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_9\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 494.1042.

### **Darstellung von Methyl (*R*)-1-(3-(4-amino-3-(1-(4-chloro-2-hydroxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (40)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **C** wurden 15 mg (0.05 mmol, 1 eq) Alkin-Baustein **31** umgesetzt. **40** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 4 mg (0.009 mmol, 17 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  11.30 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.92 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H), 8.21 (d,  $J = 77.7$  Hz, 3H), 7.74 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.19 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 7.12 (dd,  $J = 8.5, 2.2$  Hz, 1H), 6.82 (ddd, 1H), 6.08 (dd, 1H), 5.64 (dd, 1H), 4.79 – 4.65 (m, 1H), 4.57 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 4.19 (dd,  $J = 16.1$  Hz, 1H), 4.09 (d,  $J = 13.4$  Hz, 1H), 3.75 (t, 1H), 3.19 (dd, 1H), 3.07 (t,  $J = 10.7$  Hz, 1H), 2.32 – 2.22 (m, 1H), 2.18 – 2.11 (m, 1H), 1.98 – 1.90 (m, 2H), 1.65 – 1.54 (m,  $J = 26.8, 15.8$  Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  164.59 (s), 158.35 (s), 156.38 (s), 153.91 (s), 151.18 (s), 141.08 (s), 134.57 (s), 128.37 (s), 128.22 (s), 127.54 (s), 127.07 (s), 123.91 (s), 123.23 (s), 119.59 (s), 116.79 (s), 97.76 (s), 55.98 (s), 49.01 (s), 45.62 (s), 29.00 (s), 22.08 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 466.90 für C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>9</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 466.15.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 466.1428 für C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>9</sub>O [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 466.1499

**Darstellung von Methyl (*R*)-1-(3-(4-amino-3-(1-(2-(4-chlorophenyl)-2,2-difluoroethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (41)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **C** wurden 15 mg (0.05 mmol, 1 eq) Alkin-Baustein **31** umgesetzt. **41** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 4 mg (0.008 mmol, 16 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  8.91 (s, 1H), 8.68 (d,  $J = 13.1, 9.3$  Hz, 1H), 8.16 (d,  $J = 70.1, 25.6$  Hz, 3H), 7.65 (s, 4H), 6.79 (ddd, 1H), 6.09 (dd,  $J = 30.3, 15.3$  Hz, 1H), 5.65 (dd,  $J = 69.9, 10.4$  Hz, 1H), 5.48 (t,  $J = 14.3$  Hz, 3H), 4.79 – 4.63 (m, 1H), 4.55 (d,  $J = 11.2$  Hz, 1H), 4.19 (dd,  $J = 14.7, 9.3$  Hz, 1H), 4.09 (d, 1H), 3.70 (t, 1H), 3.18 (dd,  $J = 8.6, 7.6$  Hz, 1H), 3.07 (t,  $J = 11.2$  Hz, 1H), 2.31 – 2.20 (m,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.19 – 2.09 (m,  $J = 24.0, 8.0$  Hz, 2H), 2.00 – 1.88 (m,  $J = 28.4$  Hz, 2H), 1.65 – 1.54 (m,  $J = 29.4, 19.8$  Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  164.55 (s), 158.25 (s), 156.36 (s), 153.86 (s), 141.22 (s), 135.99 (s), 134.83 (s), 131.93 (s), 129.03 (s), 128.34 (s), 127.47 (s), 124.24 (s), 118.88 (s), 97.64 (s), 69.76 (s), 54.17 (s), 49.12 (s), 45.68 (s), 29.01 (s), 22.09 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 514.39 für C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>9</sub>O [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 514.21.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 514.1604 für C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>9</sub>O [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 514.1671.



---

**Darstellung von Methyl (*R*)-1-(3-(4-amino-3-(1-phenethyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (42)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **C** wurden 15 mg (0.05 mmol, 1 eq) Alkin-Baustein **31** umgesetzt. **42** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 7 mg (0.02 mmol, 32 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO)  $\delta$  9.13 (s, 1H), 8.68 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H), 8.14 (d, 3H), 7.32 – 7.18 (m, 7H), 6.80 (ddd, 1H), 6.10 (dd,  $J = 25.3, 16.8$  Hz, 1H), 5.66 (dd,  $J = 51.9, 11.1$  Hz, 1H), 4.72 – 4.61 (m, 1H), 4.57 (d,  $J = 13.0$  Hz, 1H), 4.24 (dd,  $J = 25.4, 13.0$  Hz, 1H), 4.11 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H), 3.64 (t, 1H), 3.14 (dd,  $J = 21.9, 10.5$  Hz, 2H), 2.94 (t,  $J = 11.3$  Hz, 1H), 2.29 – 2.21 (m,  $J = 20.3, 9.0$  Hz, 2H), 2.15 – 2.07 (m,  $J = 12.1, 3.4$  Hz, 2H), 1.99 – 1.91 (m,  $J = 24.1, 7.2$  Hz, 2H), 1.65 – 1.56 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO)  $\delta$  169.58 (s), 158.29 (s), 156.34 (s), 153.84 (s), 140.96 (s), 137.46 (s), 133.06 (s), 131.47 (s), 128.74 (s), 128.51 (s), 127.67 (s), 126.70 (s), 122.69 (s), 101.53 (s), 69.80 (s), 67.76 (s), 51.00 (s), 48.01 (s), 35.45 (s), 29.05 (s), 22.13 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 444.51 für C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>9</sub>O [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 444.25.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 444.2182 für C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>9</sub>O [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 444.2252.

**Darstellung von Methyl 1-((*R*)-3-(4-amino-3-(1-((*R*)-2-(4-bromophenyl)-2-hydroxyethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (43)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **C** wurden 15 mg (0.05 mmol, 1 eq) Alkin-Baustein **31** umgesetzt. **43** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 3 mg (0.006 mmol, 11 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  9.11 (s, 1H), 8.64 (d, 1H), 8.14 (d, 2H), 7.56 (d, 2H), 7.38 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.80 (ddd, 1H), 6.11 (dd,  $J = 29.9, 16.6$  Hz, 1H), 5.99 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H), 5.65 (dd,  $J = 26.3, 13.3$  Hz, 1H), 5.14 – 5.09 (m, 1H), 4.69 – 4.63 (m,  $J = 13.8, 3.9$  Hz, 2H), 4.59 (dd,  $J = 13.8, 8.3$  Hz, 2H), 4.29 – 4.19 (m, 1H), 4.10 (d,  $J = 9.6, 3.4$  Hz, 1H), 3.68 (t,  $J = 22.0, 7.8$  Hz, 1H), 3.16 (dd,  $J = 13.1, 7.8$  Hz, 1H), 2.99 (t,  $J = 11.2$  Hz, 1H), 2.30 – 2.22 (m,  $J = 15.5, 12.8, 5.7$  Hz, 1H), 2.16 – 2.10 (m,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 1.97 – 1.91 (m,  $J = 11.5$  Hz, 1H), 1.65 – 1.55 (m,  $J = 30.9, 17.6$  Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  174.47 (s), 164.60 (s), 158.29 (s), 156.34 (s), 153.77 (s), 141.22 (s), 140.79 (s), 135.42 (s), 131.14 (s), 128.34 (s), 127.58 (s), 123.24 (s), 120.69 (s), 97.52 (s), 70.45 (s), 69.79 (s), 56.69 (s), 49.13 (s), 45.68 (s), 29.00 (s), 22.06 (s).

---

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 539.41 für C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>BrN<sub>9</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 538.15.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 538.1236 für C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>BrN<sub>9</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 538.1307.

**Darstellung von Methyl (*R*)-1-(3-(4-amino-3-(1-(2,2-difluoro-2-phenylethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (44)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **C** wurden 15 mg (0.05 mmol, 1 eq) Alkin-Baustein **31** umgesetzt. **44** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 4 mg (0.008 mmol, 17 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO) δ 8.94 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 86.9 Hz, 3H), 7.65 – 7.52 (m, 7H), 6.79 (ddd, 1H), 6.11 (dd, *J* = 26.8, 16.9 Hz, 1H), 5.65 (dd, *J* = 67.6, 10.4 Hz, 1H), 5.46 (td, *J* = 14.5 Hz, 2H), 4.77 – 4.64 (m, *J* = 21.1, 16.5 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.23 – 4.15 (m, 1H), 4.09 (d, 1H), 3.72 (t, 1H), 3.20 (dd, 1H), 3.06 (t, *J* = 11.3 Hz, 1H), 2.30 – 2.20 (m, 1H), 2.16 – 2.09 (m, *J* = 9.2 Hz, 1H), 1.99 – 1.90 (m, *J* = 16.9 Hz, 1H), 1.65 – 1.53 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO) δ 164.59 (s), 158.24 (s), 156.40 (s), 153.83 (s), 141.20 (s), 133.08 (s), 131.12 (s), 128.91 (s), 125.28 (t, *J* = 5.8 Hz), 124.27 (s), 120.80 (s), 119.17 (s), 97.59 (s), 69.74 (d, *J* = 15.5 Hz), 52.82 (s), 49.12 (s), 45.69 (s), 29.00 (s), 22.09 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 480.49 für C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>F<sub>2</sub>N<sub>9</sub>O [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 480.22.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 480.1994 für C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>F<sub>2</sub>N<sub>9</sub>O [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 480.2061.

**Darstellung von Methyl (*R*)-1-(3-(4-amino-3-(1-(3-fluoro-4-(hydroxymethyl)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (45)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **C** wurden 18 mg (0.06 mmol, 1 eq) Alkin-Baustein **31** umgesetzt. **45** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 5 mg (0.01 mmol, 22 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO) δ 9.43 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.22 (d, *J* = 40.6 Hz, 2H), 7.99 (dd, *J* = 10.7, 2.0 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.72 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.82 (ddd, 1H), 6.12 (dd, 1H), 5.68 (dd, *J* = 41.3, 10.8 Hz, 1H), 4.76 – 4.66 (m, 1H), 4.62 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H), 4.61 (d, 1H), 4.33 (dd, *J* = 27.2, 16.1, 9.0 Hz, 1H), 4.14 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 3.66 (t, 1H), 3.20 – 3.11 (m, *J* = 18.2, 9.1 Hz, 1H), 2.89 (t, *J* = 11.3 Hz, 1H), 2.34 – 2.25 (m, 1H), 2.20 – 2.15 (m, *J* = 13.7, 6.4 Hz, 1H), 2.00 – 1.92 (m, *J* = 13.1 Hz, 1H), 1.67 – 1.57 (m, 1H).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 464.47 für C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>9</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 464.21.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 464.1880 für C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>9</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 464.1948.

**Darstellung von Methyl (*R*)-1-(3-(4-amino-3-(1-(4-bromo-2-hydroxyphenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on (**46**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **C** wurden 18 mg (0.06 mmol, 1 eq) Alkin-Baustein **31** umgesetzt. **46** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 5 mg (0.009 mmol, 16 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO)  $\delta$  11.13 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 9.02 (d, *J* = 21.5 Hz, 1H), 8.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 50.5 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.81 (ddd, 1H), 6.10 (dd, *J* = 33.8, 17.4 Hz, 1H), 5.66 (dd, *J* = 48.9, 11.1 Hz, 1H), 4.78 – 4.65 (m, 1H), 4.57 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.20 (dd, *J* = 13.7 Hz, 1H), 4.09 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.75 (t, *J* = 13.1, 9.8 Hz, 1H), 3.20 (dd, *J* = 21.2, 10.5 Hz, 1H), 3.06 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.33 – 2.23 (m, *J* = 20.6, 11.2 Hz, 1H), 2.18 – 2.10 (m, 1H), 1.97 – 1.86 (m, 1H), 1.67 – 1.53 (m, *J* = 22.4 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO)  $\delta$  164.61 (s), 158.31 (s), 156.43 (s), 153.86 (s), 149.69 (s), 141.09 (s), 134.80 (s), 133.48 (s), 128.34 (s), 127.86 (s), 127.62 (s), 125.22 (s), 124.00 (s), 119.16 (s), 109.88 (s), 97.73 (s), 52.43 (s), 49.09 (s), 45.69 (s), 29.51 (s), 24.88 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 511.35 für C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>9</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 510.12.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 510.0923 für C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>9</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 510.0991.

**Darstellung von methyl 4-Chloro-5-iod-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**54**)**

Über einen Zeitraum von 15 min wurde eine Lösung aus 12.3 g N-Iodsuccinimid (54.67 mmol, 1.05 eq) in 20 mL DMF tröpfchenweise zu einer Lösung aus 8 g (52.1 mmol, 1 eq) 4-chloro-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin in 80 mL DMF gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei rt im dunklen gerührt (Alufolie). Anschließend wurde eine 10 mol %ige Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, bis sich die Reaktionsmischung vollständig entfärbte und mit EtOAc und H<sub>2</sub>O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **53** wurde ohne weitere Aufreinigung mit einer Ausbeute von 12.7 g (45.44 mmol, 87 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.95 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H).

---

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  151.5, 150.8, 150.5, 133.9, 115.8, 51.7.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 280.47 für C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>ClIN<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 280.18.

### **Darstellung von 4-Chloro-5-iodo-7-[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (55)**

Zu einer Lösung aus 1.2 g NaH (52.26 mmol, 1.15 eq) in trockenem DMF auf Eis wurde tröpfchenweise eine Lösung aus 12.7 g (45.44 mmol, 1 eq) **53** in DMF zugegeben und für 30 min gerührt. Nach Zugabe von 10.05 mL (56.80 mmol, 1.25 eq) 2-[(trimethylsilyl)ethoxy]methyl-chlorid wurde die Reaktionsmischung für 16 h bei rt gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe von H<sub>2</sub>O gequencht, mit EtOAc extrahiert und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **54** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit einer Ausbeute von 5668 mg (13.8 mmol, 30 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.68 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 5.60 (s, 2H), 3.50 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.81 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.11 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  151.2, 151.1, 150.9, 136.6, 116.2, 72.9, 66.1, 52.9, 17.1, -1.43.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 410.72 für C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>ClIN<sub>3</sub>OSi [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 409.89.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 411.9947 für C<sub>12</sub>H<sub>17</sub><sup>37</sup>ClIN<sub>3</sub>OSi [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 411.9910.

### **Darstellung von 2-Benzyl-5-nitro-1H-benzo[*d*]imidazol (60)**

1.36 g (10 mmol, 1 eq) 2-Phenylelessigsäure und 1.53 g 4-Nitrobenzol-1,2-diamin (10 mmol, 1 eq) wurden für 1 h in einem Mikrowellenreaktor behandelt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend in H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **60** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 507 mg (2 mmol, 20 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  13.00 (br. s., 1H), 8.44 (br. s., 1H), 8.07 (br. s., 1H), 7.61 (br. s., 1H), 7.29–7.40 (m, 4H), 7.21–7.29 (m, 1H), 4.26 (s, 2H).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 254.09 für C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 254.12.

### Darstellung von 2-Benzyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-amin (**56**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 368 mg (1.45 mmol, 1 eq) 2-Benzyl-5-nitro-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**60**) umgesetzt. **56** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 255 mg (1.14 mmol, 79 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.26–7.33 (m, 4H), 7.18–7.25 (m, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.45 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 4.05 (s, 2H).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 224.12 für C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 224.16.

### Darstellung von 1-Benzyl-5-nitro-1*H*-indazol (**62a**)

Zu einer Lösung aus 326 mg 5-Nitroindazol (2.0 mmol, 1 eq) in DMF wurden 553 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.0 mmol, 2 eq) und 290  $\mu$ L Benzylbromid (2.4 mmol, 2 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 5 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe von H<sub>2</sub>O und NaHCO<sub>3</sub> gequenchet und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **62a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 210 mg (0.83 mmol, 41 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.82 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.44 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 8.21 (dd, *J* = 9.2, 2.2 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.29–7.33 (m, 2H), 7.23–7.28 (m, 3H), 5.75 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  141.73, 141.06, 136.76, 136.54, 128.62, 128.60, 127.74, 127.41, 127.39, 122.88, 121.09, 119.13, 110.64, 52.17.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 254.09 für C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 254.12.

### Darstellung von 1-Benzyl-1*H*-indazol-5-amin (**57a**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 140 mg (0.55 mmol, 1 eq) 1-Benzyl-5-nitro-1*H*-indazol (**62a**) umgesetzt. **57a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 120 mg (0.54 mmol, 98 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.75 (s, 1H), 7.16–7.35 (m, 6H), 6.74–6.80 (m, 2H), 5.51 (s, 2H), 4.81 (s, 2H).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 224.12 für C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 224.21.

### Darstellung von 2-(4-Nitrobenzyl)isoindolin-1,3-dion (**65**)

Zu einer Lösung auf 1000 mg Isoindolin-1,3-dion (6.8 mmol, 1 eq) in DMF wurden 1283 mg 1-(Chloromethyl)-4-nitrobenzol (7.5 mmol, 1.1 eq) und 1880 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (13.6 mmol, 2 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 16 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit H<sub>2</sub>O und NaHCO<sub>3</sub> gewaschen und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **65** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 1700 mg (6.02 mmol, 89 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.19 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.93–7.91 (m, 2H), 7.89–7.86 (m, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.91 (s, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 167.66, 146.82, 144.31, 134.65, 131.60, 128.47, 123.72, 123.33, 40.38.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 283.06 für C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 282.16.

### Darstellung von 2-(4-Aminobenzyl)isoindolin-1,3-dion (**58**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 1700 mg (6.02 mmol, 1 eq) 2-(4-Nitrobenzyl)isoindolin-1,3-dion (**65**) umgesetzt. **58** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 1136 mg (4.5 mmol, 75 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.88–7.86 (m, 2H), 7.85–7.82 (m, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.48 (d, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.57 (s, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 167.69, 148.11, 134.48, 131.56, 128.69, 123.55, 123.09, 113.68, 40.65.

LC-MS (ESI-MS): Berechnet: 253.10 für C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 253.00.

### Darstellung von 4-Chloro-5-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**66**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **I** wurden 500 mg (1.22 mmol, 1 eq) 4-Chloro-5-iodo-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**55**) umgesetzt. **66** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 434 mg (1.03 mmol, 84 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.76 (s, 1H), 8.30 (dd, *J* = 7.1, 2.2 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.01–7.98 (m, 1H), 7.71 (dd, *J* = 11.2, 8.6 Hz, 1H), 5.71 (s, 2H), 3.60 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.08 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 153.16, 151.78, 150.96, 150.73, 137.74, 136.61, 130.93, 129.64, 127.03, 118.28, 114.15, 112.73, 73.08, 66.33, 17.07, -1.43.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 423.09 für C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>ClFN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 423.14.

**Darstellung von *N*-(3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-5-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (67a)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **J** wurden 426 mg (1.00 mmol, 1 eq) 4-Chloro-5-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**66**) und 354.6 mg (1.51 mmol, 1.5 eq) 3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)anilin umgesetzt. **67a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 381 mg (0.61 mmol, 61 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.60–8.58 (m, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.22–8.18 (m, 2H), 7.90–7.86 (m, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.66 (dd, *J* = 11.2, 8.7 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.38–7.36 (m, 1H), 7.34 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.61 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.59 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.07 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 156.58, 153.99, 151.88, 149.31, 149.23, 137.25, 136.97, 136.03, 134.07, 132.99, 131.88, 131.33, 126.25, 125.37, 123.33, 123.17, 121.59, 121.47, 120.98, 118.77, 114.33, 113.32, 101.11, 72.63, 71.32, 65.90, 17.27, -1.23.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 621.18 für C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>ClFN<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 621.29.

**Darstellung von *N*-(1-Benzyl-1*H*-indazol-5-yl)-5-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (67b)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **J** wurden 300 mg (0.79 mmol, 1 eq) 4-Chloro-5-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**66**) und 235.6 mg (1.06 mmol, 1.5 eq) 1-Benzyl-1*H*-indazol-5-amin (**57a**) umgesetzt. **67b** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 218 mg (0.38 mmol, 45 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.37 (s, 1H), 8.22 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.90–7.87 (m, 1H), 7.78 (s, 1H),

---

7.61–7.58 (m, 1H), 7.57 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.36 (dd, 1H), 7.32–7.29 (m, 2H), 7.26 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.20 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 5.62 (s, 2H), 5.61 (s, 2H), 3.60 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 0.87 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), -0.06 (s, 9H).

$^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  154.49, 154.16, 152.68, 151.66, 137.92, 137.61, 136.49, 133.03, 132.72, 130.90, 128.48, 127.21, 125.77, 125.25, 123.69, 123.34, 118.12, 113.27, 112.50, 109.97, 109.48, 100.83, 72.46, 65.73, 51.87, 17.13, -1.38.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 610.23 für  $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{FN}_7\text{O}_3\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 610.43.

#### **Darstellung von *N*-(2-Benzyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)-5-iodo-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (71)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **J** wurden 450 mg (1.09 mmol, 1 eq) 4-Chloro-5-iodo-7-[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**55**) und 369 mg (1.65 mmol, 1.5 eq) 2-Benzyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-amin (**56**) umgesetzt. **71** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 274 mg (0.46 mmol, 42 %) erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.25 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.13 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.52 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.41 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.34–7.33 (m, 4H), 7.24 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 4.17 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.52 (t,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 0.83 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), -0.08 (s, 9H).

$^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158.21, 153.61, 151.67, 150.10, 143.88, 139.87, 137.66, 133.13, 130.80, 128.73, 128.46, 126.50, 118.18, 115.27, 110.67, 102.14, 72.23, 65.61, 51.03, 35.00, 17.08, -1.39.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 597.12 für  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{IN}_6\text{OSi}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 597.16.

#### **Darstellung von *N*-(2-Benzyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)-5-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (67c)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **I** wurden 274 mg (0.46 mmol, 1 eq) *N*-(2-benzyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)-5-iodo-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (**71**) umgesetzt. **67c** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 185 mg (0.30 mmol, 66 %) erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.12 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.89–7.85 (m, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.64–7.63 (m, 2H), 7.62 (t,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 7.61–7.60 (m, 2H), 7.56 (d,  $J = 3.0$



Hz, 2H), 7.54 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 5.61 (d,  $J = 1.8$  Hz, 2H), 4.13 (d,  $J = 3.5$  Hz, 2H), 3.59 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 0.87 (t,  $J = 8.0$  Hz, 5H), -0.06 (s, 9H).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 610.23 für  $C_{32}H_{32}FN_7O_3Si$  [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 610.30.

**Darstellung von *N*-(2-Benzyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)-5-iodo-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (67d)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **J** wurden 670 mg (1.58 mmol, 1 eq) 4-Chloro-5-iodo-7-[2-(trimethylsilyl)ethoxy]methyl-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**55**) und 369 mg (1.65 mmol, 1.5 eq) 2-(4-Aminobenzyl)isoindolin-1,3-dion (**58**) umgesetzt. **67d** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 770 mg (1.20 mmol, 76 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.39 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.19 (dd,  $J = 7.0, 2.2$  Hz, 1H), 7.90 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 7.87–7.85 (m, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.59 (dd,  $J = 11.2, 8.7$  Hz, 1H), 7.45 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.20 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 6.98 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.48 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 3.58 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 0.85 (t,  $J = 8.1$  Hz, 2H), -0.08 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  167.73, 153.84, 151.83, 151.52, 148.16, 139.21, 134.58, 131.60, 130.85, 128.74, 127.74, 126.18, 123.24, 121.06, 118.57, 113.70, 113.23, 101.33, 72.50, 65.77, 40.52, 17.13, -1.35.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 639.21 für  $C_{33}H_{31}FN_6O_5Si$  [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 639.31.

**Darstellung von *N*-(3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-5-(4-((1-methoxypropan-2-yl)oxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (68a)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **K** wurden 300 mg (0.48 mmol, 1 eq) *N*-(3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-5-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (**67a**) und 433 mg (4.8 mmol, 10 eq) 1-methoxypropan-2-ol umgesetzt. **68a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH und C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 154 mg (0.22 mmol, 46 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.63 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 8.40 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 8.00 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 7.97 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.95 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.74 (dd,  $J = 5.0, 2.5$  Hz, 2H), 7.73–7.70 (m, 1H), 7.68 (dd,  $J = 8.6, 2.2$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.50 (d,  $J =$

8.9 Hz, 1H), 7.44 (t,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 7.41–7.37 (m, 1H), 7.22–7.17 (m, 2H), 5.61 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 3.60–3.56 (m, 2H), 3.51 (dd,  $J = 4.9, 2.7$  Hz, 1H), 3.29 (s, 3H), 1.27 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 0.86 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), -0.06 (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  158.61, 158.36, 158.12, 157.87, 155.81, 149.38, 148.42, 140.55, 138.19, 136.75, 135.26, 133.76, 126.60, 124.58, 124.29, 123.44, 121.84, 121.13, 119.62, 117.00, 116.38, 114.44, 100.99, 75.13, 74.84, 72.55, 70.75, 65.79, 58.57, 17.14, 16.43, -1.36.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 691.24 für  $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{ClN}_6\text{O}_6\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 621.14.

**Darstellung von 2-(4-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)ethan-1-ol (68b)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **K** wurden 323 mg (0.52 mmol, 1 eq) *N*-(3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-5-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amin (**67a**) und 322.8 mg (5.2 mmol, 10 eq) Ethylenglykol umgesetzt. **68b** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 300 mg (0.45 mmol, 87 %) erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.59 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.97 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.87 (ddd,  $J = 7.7, 7.7, 1.7$  Hz, 1H), 7.77 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.73 (dd,  $J = 8.7, 2.3$  Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.56 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.46 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.39–7.34 (m, 2H), 7.14 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.23 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 4.92 (s, 1H), 4.21 (t,  $J = 4.9$  Hz, 2H), 3.75 (d,  $J = 3.4$  Hz, 2H), 3.58 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 0.86 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), -0.06 (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  156.48, 153.82, 151.48, 151.37, 150.32, 149.10, 149.06, 139.65, 137.09, 133.98, 133.92, 126.77, 125.34, 124.29, 123.01, 122.91, 121.35, 121.14, 120.88, 115.79, 114.22, 113.78, 101.11, 72.39, 71.41, 71.19, 65.69, 59.31, 17.13, -1.37.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 663.21 für  $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{ClN}_6\text{O}_6\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 663.41.

**Darstellung von 3-(4-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)propan-1-ol (68c)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **K** wurden 300 mg (0.48 mmol, 1 eq) *N*-(3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-5-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)

ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (**67a**) und 365.2 mg (4.8 mmol, 10 eq) Propan-1,3-diol umgesetzt. **68c** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 278 mg (0.41 mmol, 86 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.59 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.87 (ddd, *J* = 7.7, 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.75 (ddd, *J* = 2.6, 2.3, 2.3 Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.38–7.34 (m, 2H), 7.14 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.57 (s, 1H), 4.25 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.59 (t, *J* = 4.2 Hz, 2H), 3.56 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 1.89 (app. p, *J* = 6.1 Hz, 2H), 0.86 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), -0.07 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  156.48, 153.86, 151.50, 151.37, 150.29, 149.10, 139.42, 137.08, 136.97, 134.13, 133.92, 126.65, 125.34, 124.35, 123.02, 122.99, 121.33, 121.21, 120.87, 115.45, 114.21, 113.81, 101.10, 72.36, 71.16, 66.37, 65.67, 57.00, 31.78, 17.11, -1.45.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 677.22 für C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>6</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 677.21.

**Darstellung von *N*-(3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-5-(4-(2-(dimethylamino)ethoxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (**68d**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **K** wurden 300 mg (0.48 mmol, 1 eq) *N*-(3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-5-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (**67a**) und 427.8 mg (4.8 mmol, 10 eq) 2-(Dimethylamino)ethan-1-ol umgesetzt. **68d** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 122 mg (0.18 mmol, 37 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.58 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.87 (ddd, *J* = 7.7, 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.75–7.72 (m, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.38–7.34 (m, 2H), 7.13 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.27 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.67 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.23 (s, 6H), 0.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.07 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  156.48, 153.87, 151.52, 151.38, 150.05, 149.10, 149.06, 139.55, 137.08, 134.05, 133.96, 126.84, 125.36, 124.31, 123.01, 122.93, 121.33, 121.14, 120.88, 115.58, 114.21, 113.79, 101.12, 72.41, 71.20, 68.10, 65.66, 57.25, 45.56, 17.17, -1.43.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 690.26 für C<sub>34</sub>H<sub>40</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 690.20.

**Darstellung von 2-(4-(4-((1-Benzyl-1H-indazol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)ethan-1-ol (68e)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **K** wurden 218 mg (0.36 mmol, 1 eq) *N*-(1-Benzyl-1H-indazol-5-yl)-5-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amin (**67b**) und 271.6 mg (3.6 mmol, 10 eq) Ethylenglykol umgesetzt. **68e** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 125 mg (0.19 mmol, 54 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.36 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 0.8 Hz, 2H), 8.01 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.75 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.59 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 9.0, 1.9 Hz, 1H), 7.31 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.25 (dd, *J* = 8.4, 6.2 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 5.63 (s, 2H), 5.60 (s, 2H), 4.91 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.19 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.74 (dd, *J* = 10.0, 5.2 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.06 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  154.43, 151.51, 151.32, 150.33, 139.66, 137.65, 136.44, 134.02, 132.93, 132.77, 128.50, 127.46, 127.25, 126.82, 125.06, 124.38, 123.75, 123.09, 115.80, 113.81, 112.17, 109.54, 100.96, 72.35, 71.36, 65.63, 59.30, 51.86, 17.13, -1.35.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 652.26 für C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 652.23.

**Darstellung von 2-(4-(4-((2-Benzyl-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)ethan-1-ol (68f)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **K** wurden 185 mg (0.30 mmol, 1 eq) *N*-(2-Benzyl-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)-5-(4-fluoro-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amin (**67c**) und 229.8 mg (3.02 mmol, 10 eq) Ethylenglykol umgesetzt. **68f** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 70 mg (0.11 mmol, 36 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.16 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.00 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.90–7.87 (m, 1H), 7.80 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 7.77–7.74 (m, 1H), 7.66 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 4.5 Hz, 4H), 7.29 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 8.7, 4.4 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 4.93 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.20 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 4.14 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.01 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 0.85 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), -0.06 (s, 9H).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 652.26 für C<sub>34</sub>H<sub>37</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 652.31.

---

**Darstellung von 2-(4-((5-(4-(2-hydroxyethoxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)benzyl)isoindoline-1,3-dion (68g)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **K** wurden 360 mg (0.56 mmol, 1 eq) *N*-(2-Benzyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)-5-iodo-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (**67d**) und 347.6 mg (3.02 mmol, 10 eq) Ethylenglykol umgesetzt. **68g** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 37 mg (0.05 mmol, 9 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.37 (s, 1H), 7.98 (s, 2H), 7.91–7.89 (m, 2H), 7.87–7.84 (m, 2H), 7.72 (dd, *J* = 8.6, 1.5 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.59 (s, 2H), 4.89 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.20 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.73 (dd, *J* = 10.0, 5.0 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.85 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), -0.07 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  167.69, 153.78, 151.44, 151.32, 150.31, 139.70, 138.99, 134.54, 133.97, 131.57, 130.75, 127.73, 126.74, 125.35, 124.27, 123.19, 120.84, 115.81, 113.71, 101.39, 72.39, 71.40, 65.68, 59.32, 40.52, 20.75, -1.38.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 681.24 für C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 681.33.

**Darstellung von 2-(4-((5-(4-(2-(Dimethylamino)ethoxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)benzyl)isoindolin-1,3-dion (68h)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **K** wurden 360 mg (0.56 mmol, 1 eq) *N*-(2-Benzyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)-5-iodo-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (**67d**) und 360 mg (0.56 mmol, 10 eq) 2-(Dimethylamino)ethan-1-ol umgesetzt. **68h** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 38 mg (0.05 mmol, 9 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.37 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.99 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.91–7.89 (m, 2H), 7.87–7.84 (m, 2H), 7.72 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.51 (dd, *J* = 7.4, 1.8 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.59 (s, 2H), 4.72 (s, 2H), 4.26 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 0.85 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.08 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  167.71, 153.81, 151.47, 151.34, 150.05, 139.61, 139.03, 134.57, 134.04, 131.57, 130.75, 127.74, 126.78, 125.40, 124.28, 123.21, 120.88, 115.60, 113.71, 101.40, 72.40, 68.08, 65.69, 57.29, 45.60, 40.06, 17.12, -1.37.

---

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 708.29 für C<sub>37</sub>H<sub>41</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 708.30.

**Darstellung von 5-(3-Amino-4-((1-methoxypropan-2-yl)oxy)phenyl)-N-(3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amin (69a)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 1700 mg (6.02 mmol, 1 eq) *N*-(3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-5-(4-((1-methoxypropan-2-yl)oxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (**68a**) umgesetzt. **69a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH und C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 29 mg (0.04 mmol, 20 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, MeOD) δ 8.64 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.12–8.06 (m, 1H), 7.83 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.59–7.54 (m, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.47–7.38 (m, 2H), 7.34 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.70 (s, 2H), 5.34 (s, 2H), 4.81–4.76 (m, 1H), 3.68–3.63 (m, 3H), 3.61 (dd, *J* = 10.6, 3.4 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 1.38 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.93 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.03 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, MeOD) δ 156.47, 153.61, 153.47, 151.28, 150.94, 149.89, 148.43, 148.09, 141.25, 132.25, 128.98, 127.97, 127.23, 127.14, 125.42, 124.88, 124.85, 124.22, 123.42, 118.56, 116.36, 116.17, 102.31, 76.62, 75.79, 74.60, 71.51, 67.85, 59.47, 18.60, 16.75, -1.40.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 661.26 für C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 661.22.

**Darstellung von 2-(2-Amino-4-(4-((3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenoxy)ethan-1-ol (69b)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 293 mg (0.44 mmol, 1 eq) 2-(4-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)ethan-1-ol (**68b**) umgesetzt. **69b** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 197 mg (0.31 mmol, 71 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.58 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.86 (ddd, *J* = 7.7, 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.42 (s, 1H), 7.35 (dd, *J* = 7.1, 5.2 Hz, 1H), 7.25 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.65 (dd, *J* = 8.0, 2.1 Hz, 1H), 5.58 (s, 2H), 5.24 (s, 2H),

5.17 (s, 2H), 4.94 (t,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 4.00 (t,  $J = 4.7$  Hz, 2H), 3.76 (dd,  $J = 10.3, 5.3$  Hz, 2H), 3.57 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 0.84 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), -0.07 (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  156.38, 153.42, 151.22, 150.47, 149.11, 148.96, 145.18, 138.98, 137.04, 133.31, 126.70, 123.50, 122.99, 121.68, 121.35, 121.23, 119.74, 116.26, 116.11, 114.60, 113.46, 112.38, 101.17, 72.11, 71.16, 70.11, 65.53, 59.72, 17.05, -1.45.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 633.23 für  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{ClN}_6\text{O}_4\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 633.34.

**Darstellung von 3-(2-Amino-4-(4-((3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)phenoxy)propan-1-ol (69c)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 271 mg (0.40 mmol, 1 eq) 3-(4-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy) propan-1-ol (**68c**) umgesetzt. **69c** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 138 mg (0.21 mmol, 53 %) erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.58 (d,  $J = 4.3$  Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.98 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.86 (ddd,  $J = 7.7, 7.7, 1.6$  Hz, 1H), 7.55 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.35 (dd,  $J = 7.0, 5.1$  Hz, 1H), 7.25 (dd,  $J = 8.9, 2.5$  Hz, 1H), 7.19 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 6.85 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.67 (dd,  $J = 8.0, 2.1$  Hz, 1H), 5.58 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 5.01 (s, 1H), 4.55 (t,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 4.08 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 3.62 (dd,  $J = 11.5, 6.0$  Hz, 2H), 3.57 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 1.92 (app. p,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 0.84 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H), -0.07 (s, 9H).

$^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  156.44, 153.45, 151.22, 150.49, 149.11, 148.95, 145.19, 138.75, 137.08, 133.32, 126.51, 123.49, 123.01, 121.77, 121.35, 121.24, 119.83, 116.29, 116.26, 114.63, 113.59, 112.22, 101.23, 72.22, 71.21, 65.55, 65.01, 57.44, 32.23, 17.09, -1.36.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 647.25 für  $\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{ClN}_6\text{O}_4\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 647.21.

**Darstellung von 5-(3-Amino-4-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-N-(3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amin (69d)**

115 mg (0.17 mmol) *N*-(3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-5-(4-(2-(dimethylamino)ethoxy)-3-nitrophenyl) -7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d] pyrimidin-4-

---

amin (**68d**) wurden in MeOH gelöst und im Durchflusshydrogenator (H-Cube) mit Pd/C und H<sub>2</sub> bei 50 °C umgesetzt. **69d** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 93 mg (0.14 mmol, 85 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.58 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.35 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.67 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.58 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.55 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.84 (s, 2H), 2.37 (s, 6H), 2.12 (s, 2H), 0.85 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), -0.08 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 156.43, 153.46, 151.27, 150.53, 149.16, 148.99, 144.85, 139.06, 137.14, 136.99, 133.34, 127.06, 123.07, 121.78, 121.38, 121.23, 121.13, 119.86, 116.23, 114.59, 113.68, 112.96, 101.24, 72.24, 71.19, 65.61, 57.34, 54.97, 44.92, 17.14, -1.33.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 660.28 für C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 660.28.

**Darstellung von 2-(2-Amino-4-(4-((1-benzyl-1H-indazol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenoxy)ethan-1-ol (**69e**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 125 mg (0.19 mmol, 1 eq) 2-(4-(4-((1-Benzyl-1*H*-indazol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)ethan-1-ol (**68e**) umgesetzt. **69e** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 105 mg (0.17 mmol, 88 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.38 (s, 1H), 8.29 (d, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.24–7.21 (m, 1H), 7.20 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.68 (dd, *J* = 8.0, 2.1 Hz, 1H), 5.63 (s, 2H), 5.58 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 4.93 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.01 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.76 (dd, *J* = 10.3, 5.3 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.06 (s, 9H).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 622.29 für C<sub>34</sub>H<sub>39</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 622.26.



**Darstellung von 2-(2-Amino-4-(4-((2-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)phenoxy)ethan-1-ol (69f)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 70 mg (0.11 mmol, 1 eq) 2-(4-(4-((2-Benzyl-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)ethan-1-ol (**68f**) umgesetzt. **69f** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 49 mg (0.08 mmol, 72 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.24 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.54–7.42 (m, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.25–7.20 (m, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 5.58 (s, 2H), 5.19 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 4.02 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.77 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 0.86 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), -0.07 (s, 9H).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 622.29 für C<sub>34</sub>H<sub>39</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 622.29.

**Darstellung von 2-(4-((5-(3-Amino-4-(2-hydroxyethoxy)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)benzyl)isoindoline-1,3-dion (69g)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 37 mg (0.08 mmol, 1 eq) 2-(4-((5-(4-(2-hydroxyethoxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)benzyl)isoindoline-1,3-dion (**68g**) umgesetzt. **69g** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 22 mg (0.03 mmol, 68 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.38 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.91–7.88 (m, 2H), 7.87–7.84 (m, 2H), 7.59 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 5.58 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.92 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.00 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.75 (dd, *J* = 10.2, 5.2 Hz, 2H), 3.56 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 0.84 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), -0.08 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  168.56, 163.17, 154.33, 152.08, 151.34, 146.12, 139.89, 139.34, 135.43, 132.45, 131.67, 129.03, 127.54, 124.35, 124.08, 120.57, 117.05, 114.47, 113.31, 102.32, 70.98, 66.38, 60.63, 55.70, 41.31, 17.99, -0.50.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 651.27 für C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 650.60.

**Darstellung von 2-(4-((5-(3-Amino-4-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)benzyl)isoindoline-1,3-dion (69h)**

38 mg (0.17 mmol) 2-(4-((5-(4-(2-(Dimethylamino)ethoxy)-3-nitrophenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)amino)benzyl) isoindolin-1,3-dion (**68h**) wurden in MeOH gelöst und im Durchflusshydrogenator (H-Cube) mit Pd/C und H<sub>2</sub> bei 50 °C umgesetzt. **69h** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 6 mg (0.009 mmol, 16 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, MeOD)  $\delta$  8.32 (s, 1H), 7.86–7.83 (m, 2H), 7.80–7.77 (m, 2H), 7.48 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 7.30 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.23 (s, 1H), 6.98 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 6.91 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 6.78 (dd,  $J$  = 8.0, 2.1 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 4.19 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 2H), 3.61 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 2.89 (t,  $J$  = 5.1 Hz, 2H), 2.43 (s, 6H), 0.89 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), -0.06 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, MeOD)  $\delta$  169.43, 155.51, 152.45, 151.60, 147.67, 139.82, 139.56, 135.42, 133.34, 132.92, 129.92, 128.48, 124.47, 124.19, 121.37, 119.46, 118.41, 116.62, 113.09, 103.52, 73.99, 67.33, 66.21, 59.07, 45.45, 41.91, 18.58, -1.36.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 678.31 für C<sub>37</sub>H<sub>43</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 677.70.

**Darstellung von N-(5-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2-((1-methoxypropan-2-yl)oxy)phenyl)acrylamidemethylbenzamid (70a)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 16 mg (0.02 mmol, 1 eq) 5-(3-Amino-4-((1-methoxypropan-2-yl)oxy)phenyl)-N-(3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amin (**69a**) und 2.1  $\mu$ L Acryloylchlorid (0.03 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **70a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 11 mg (0.02 mmol, 64 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, MeOD)  $\delta$  8.49 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.83 (ddd,  $J$  = 7.7, 7.7, 1.6 Hz, 1H), 7.72 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 7.63 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.32 (dd,  $J$  = 7.0, 5.3 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.26 (dd,  $J$  = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 7.18 (s, 2H), 6.95 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 6.51 (dd,  $J$  = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.33 (dd,  $J$  = 17.0, 1.4 Hz, 1H), 5.76 (dd,  $J$  = 10.3, 1.1 Hz, 1H), 5.57 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.52–4.56 (m, 1H), 3.63–3.58 (m, 2H), 3.57 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 1.34 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H), 0.86 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), -0.09 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, MeOD)  $\delta$  166.11, 157.94, 155.66, 152.42, 152.02, 151.45, 149.74, 148.82, 139.04, 134.57, 132.41, 130.86, 129.07, 128.29, 126.47, 125.19, 124.85, 124.47, 123.79, 123.16, 122.27, 117.95, 117.62, 115.25, 108.89, 103.12, 76.94, 76.63, 74.13, 72.21, 67.43, 59.56, 30.12, 16.84, -1.36.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 715.28 für C<sub>37</sub>H<sub>43</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 715.23.

**Darstellung von *N*-(5-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-hydroxyethoxy)phenyl)acrylamid (70b)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 113 mg (0.18 mmol, 1 eq) 2-(2-Amino-4-(4-((3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenoxy)ethan-1-ol (**69b**) und 15.6  $\mu$ L Acryloylchlorid (0.19 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **70b** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 84 mg (0.12 mmol, 69 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.38 (s, 1H), 8.58 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.88–7.84 (m, 2H), 7.60 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.35 (ddd, *J* = 5.6, 2.9, 2.9 Hz, 2H), 7.22 (s, 2H), 7.13 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.68 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J* = 17.0, 1.5 Hz, 1H), 5.79 (dd, *J* = 10.2, 1.3 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.07 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.11 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.80 (dd, *J* = 10.1, 5.3 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.85 (t, *J* = 13.2, 5.3 Hz, 2H), -0.07 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  163.46, 156.44, 153.73, 151.25, 150.97, 149.15 (s, *J* = 3.6 Hz), 149.10, 147.79, 137.07, 133.38, 131.80, 128.07, 127.23, 126.51, 124.59, 124.25, 123.01, 122.84, 121.33, 121.17, 121.08, 120.94, 115.67, 114.24, 113.45, 101.15, 72.28, 71.17, 71.01, 65.62, 59.52, 17.13, -1.36.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 687.24 für C<sub>35</sub>H<sub>39</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 687.38.

**Darstellung von *N*-(5-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(3-hydroxypropoxy)phenyl)acrylamid (70c)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 133 mg (0.21 mmol, 1 eq) 3-(2-Amino-4-(4-((3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenoxy)propan-1-ol (**69c**) und 19.95  $\mu$ L

Acryloylchlorid (0.23 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **70c** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 105 mg (0.15 mmol, 73 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.41 (s, 1H), 8.58 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.36 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.71 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 17.0, 1.8 Hz, 1H), 5.76 (dd, *J* = 10.4, 1.3 Hz, 1H), 5.60 (s, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.19 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.63 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.42–3.46 (m, 1H), 1.96 (app. p, *J* = 6.2 Hz, 2H), 0.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.06 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.53, 156.42, 153.74, 151.19, 150.94, 149.19, 149.07, 148.33, 137.09, 133.35, 131.89, 127.83, 126.96, 126.17, 124.88, 124.23, 123.01, 122.94, 121.85, 121.35, 121.16, 120.96, 115.66, 114.25, 113.22, 101.17, 71.17, 65.61, 57.66, 56.07, 48.58, 31.83, 17.13, -1.38.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 701.26 für C<sub>36</sub>H<sub>41</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 701.24.

**Darstellung von *N*-(5-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)acrylamid (**70d**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 86 mg (0.13 mmol, 1 eq) 5-(3-Amino-4-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-*N*-(3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amin (**69d**) und 11.38 µL Acryloylchlorid (0.14 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **70d** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 28 mg (0.04 mmol, 30 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.81 (s, 1H), 8.58 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.86 (ddd, *J* = 7.8, 7.8, 1.6 Hz, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.38 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 6.9, 5.2 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.57 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 16.9, 1.7 Hz, 1H), 5.78 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 4.21 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.27 (s, 6H), 0.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.07 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.39, 156.43, 153.70, 151.25, 150.99, 149.11, 149.08, 147.85, 137.05, 133.43, 131.78, 129.33, 127.35, 127.10, 124.81, 124.30, 123.00, 122.73,

121.53, 121.33, 120.95, 115.87, 115.62, 114.25, 101.14, 97.14, 72.28, 71.11, 65.67, 65.61, 57.25, 45.18, 17.02, -1.46.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 714.29 für C<sub>37</sub>H<sub>44</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>4</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 714.28.

**Darstellung von *N*-(5-(4-((1-Benzyl-1H-indazol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-hydroxyethoxy)phenyl)acrylamid (70e)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 105 mg (0.17 mmol, 1 eq) 2-(2-Amino-4-(4-((1-benzyl-1H-indazol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethyl-silyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenoxy)ethan-1-ol (**69e**) und 19.15 µL Acryloylchlorid (0.19 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **70e** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 72 mg (0.11 mmol, 63 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.52 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H), 7.25 (dd, *J* = 10.8, 4.7 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.78 (dd, *J* = 16.6, 10.3 Hz, 1H), 6.24 (dd, *J* = 16.9 Hz, 1H), 5.76 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 5.60 (s, 2H), 4.11 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.80 (t, *J* = 4.2 Hz, 2H), 3.59 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 0.86 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.07 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.55, 154.23, 151.41, 150.77, 147.92, 137.60, 136.42, 132.81, 132.46, 131.99, 128.48, 128.19, 127.44, 127.24, 127.02, 126.48, 124.57, 123.97, 123.80, 122.60, 121.33, 115.68, 113.33, 111.84, 109.72, 101.11, 72.26, 71.04, 65.60, 59.46, 51.90, 17.14, -1.37.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 676.29 für C<sub>37</sub>H<sub>41</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>Si+H]<sup>+</sup>. Gefunden 676.29.

**Darstellung von *N*-(5-(4-((4-((1,3-Dioxoisindolin-2-yl)methyl)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-hydroxyethoxy)phenyl)acrylamid (70g)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 20 mg (0.03 mmol, 1 eq) 2-(4-((5-(3-Amino-4-(2-hydroxyethoxy)phenyl)-7-((2-(trimethyl-silyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)amino)benzyl)isoindoline-1,3-dion (**69g**) und 2.7 µL Acryloylchlorid (0.03 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **70g** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 20 mg (0.03 mmol, 95 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.35 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.91–7.88 (m, 2H), 7.86–7.84 (m, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.51 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 9.6 Hz, 4H), 6.65 (dd, *J* = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.22 (dd, *J* = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.05 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 4.11 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.79 (dd, *J* = 10.1, 5.4 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.85 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.08 (s, 9H).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 705.28 für C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 704.60.

**Darstellung von *N*-(2-(2-(Dimethylamino)ethoxy)-5-(4-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (70h)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 6 mg (0.009 mmol, 1 eq) 2-(4-((5-(3-Amino-4-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-7-((2-(tri-methylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)amino)benzyl) isoindoline-1,3-dion (**69h**) und 0.7  $\mu$ L Acryloylchlorid (0.009 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **70h** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 4 mg (0.006 mmol, 62 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, MeOD)  $\delta$  8.49 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.87–7.84 (m, 2H), 7.80–7.78 (m, 2H), 7.50–7.48 (m, 2H), 7.34 (s, 1H), 7.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.25 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.61 (dd, *J* = 17.0, 10.3 Hz, 1H), 6.33 (dd, *J* = 17.0, 1.5 Hz, 1H), 5.76 (dd, *J* = 10.3, 1.5 Hz, 1H), 5.63 (s, 2H), 4.77 (s, 2H), 4.23 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.62 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.86 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 2.44 (s, 6H), 0.90 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), -0.05 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, MeOD)  $\delta$  169.44, 166.44, 155.67, 152.52, 152.02, 149.84, 139.81, 135.45, 133.37, 133.15, 132.40, 130.80, 129.83, 129.36, 128.11, 126.59, 125.13, 124.21, 123.51, 122.08, 117.89, 113.48, 103.45, 74.12, 67.42, 66.20, 58.86, 45.17, 41.92, 18.58, -1.39.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 732.32 für C<sub>40</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 731.61.

**Darstellung von *N*-(5-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-((1-methoxypropan-2-yl)oxy)phenyl)acrylamid (49a)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 12 mg (0.02 mmol, 1 eq) *N*-(5-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-((1-methoxypropan-2-yl)oxy)phenyl)acrylamidemethyl-

benzamid (**70a**) umgesetzt. **49a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN)) mit einer Ausbeute von 7 mg (0.01 mmol, 71 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, MeOD)  $\delta$  8.60 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.01–7.96 (m, 1H), 7.76 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 7.50–7.45 (m, 2H), 7.41 (dd,  $J$  = 8.7, 1.5 Hz, 1H), 7.32 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.24 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 2H), 6.54 (dd,  $J$  = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.38 (d,  $J$  = 16.6 Hz, 1H), 5.81 (d,  $J$  = 10.3 Hz, 1H), 5.32 (s, 2H), 4.63–4.56 (m, 1H), 3.67–3.58 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 1.37 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, MeOD)  $\delta$  166.17, 157.09, 154.71, 152.54, 150.22, 149.41, 149.32, 144.74, 139.89, 132.33, 130.66, 130.37, 129.27, 128.24, 127.85, 126.77, 126.39, 124.94, 124.87, 124.47, 123.62, 123.49, 120.30, 117.67, 115.87, 101.31, 76.83, 76.67, 71.97, 59.53, 16.80.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 585.19 für C<sub>31</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 585.16.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 585.1939 für C<sub>31</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 585.2011.

#### **Darstellung von *N*-(5-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7*H*-pyrrolo [2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-hydroxyethoxy)phenyl)acrylamid (**49b**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 77 mg (0.11 mmol, 1 eq) *N*-(5-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-hydroxyethoxy)phenyl)acrylamid (**70b**) umgesetzt.

**49b** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 35 mg (0.06 mmol, 55 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.03 (s, 1H), 9.39 (s, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.89 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 7.86 (ddd,  $J$  = 7.7, 7.7, 1.5 Hz, 1H), 7.55 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.38–7.34 (m, 2H), 7.32 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 7.23 (dd,  $J$  = 5.3, 2.7 Hz, 1H), 7.20 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.13 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 6.68 (dd,  $J$  = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.27 (dd,  $J$  = 17.0, 1.5 Hz, 1H), 5.79 (d,  $J$  = 10.2 Hz, 1H), 5.23 (s, 2H), 5.07 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 1H), 4.11 (t,  $J$  = 4.7 Hz, 2H), 3.80 (dd,  $J$  = 10.1, 5.3 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  163.46, 156.46, 153.57, 151.39, 150.87, 149.08, 148.94, 147.63, 137.07, 133.62, 131.81, 128.01, 127.29, 127.21, 124.74, 123.00, 122.56, 121.32, 121.29, 121.17, 120.95, 120.78, 115.14, 114.28, 113.48, 100.92, 71.18, 71.00, 59.49.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 557.16 für C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 557.40.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 557.1684 für C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 557.1698.

---

**Darstellung von *N*-(5-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(3-hydroxypropoxy)phenyl)acrylamid (49c)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 100 mg (0.14 mmol, 1 eq) *N*-(5-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(3-hydroxypropoxy) phenyl)acrylamid (**70c**) umgesetzt. **49c** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 47 mg (0.08 mmol, 59 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.03 (s, 1H), 9.41 (s, 1H), 8.58 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.86 (ddd, *J* = 7.7, 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.36 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J* = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J* = 8.0, 3.6 Hz, 1H), 5.23 (s, 2H), 4.19 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.63 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.95 (app. p, *J* = 6.2 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163.50, 156.41, 153.51, 151.30, 150.77, 149.08, 149.02, 148.17, 137.03, 133.53, 131.86, 127.73, 126.90, 124.96, 123.00, 122.67, 121.96, 121.34, 121.16, 120.94, 120.85, 115.11, 114.29, 113.24, 100.92, 71.18, 66.27, 57.58, 31.84.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 571.17 für C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 571.16.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 571.1851 für C<sub>30</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 571.1855.

**Darstellung von *N*-(5-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)acrylamid (49d)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 26 mg (0.05 mmol, 1 eq) *N*-(5-(4-((3-Chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)acrylamid (**70d**) umgesetzt. **49d** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 12 mg (0.02 mmol, 58 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, MeOD) δ 8.53 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.88 (ddd, *J* = 7.7, 7.7, 1.4 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 6.9, 5.0 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.26 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.64 (dd, *J* = 17.0, 10.3 Hz, 1H), 6.39 (dd, *J* = 17.0, 1.3 Hz, 1H), 5.80 (dd, *J* = 10.4, 1.1 Hz, 1H), 5.19 (s, 2H), 4.27 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.00 (t, *J* = 3.7 Hz, 2H), 2.54 (s, 6H).



<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, MeOD)  $\delta$  166.43, 157.96, 155.71, 152.09, 151.92, 151.44, 149.76, 149.55, 139.00, 134.75, 132.39, 129.13, 129.06, 128.19, 126.76, 124.88, 124.47, 123.87, 123.65, 123.19, 122.29, 122.08, 117.34, 115.36, 113.58, 102.82, 72.35, 65.74, 58.64, 44.93.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 584.21 für C<sub>31</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 584.18.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 584.2169 für C<sub>31</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 584.2171.

**Darstellung von *N*-(5-(4-((1-Benzyl-1H-indazol-5-yl)amino)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-hydroxyethoxy)phenyl)acrylamid (50)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 72 mg (0.11 mmol, 1 eq) *N*-(5-(4-((1-Benzyl-1H-indazol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-hydroxyethoxy)phenyl) acrylamid (**70e**) umgesetzt. **50** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 30 mg (0.05 mmol, 52 %) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.99 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 9.37 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.20 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 0.6 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.32–7.27 (m, 4H), 7.27–7.24 (m, 2H), 7.22 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.67 (dd, *J* = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.25 (dd, *J* = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.78 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 5.06 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.12 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.80 (dd, *J* = 10.0, 5.3 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  163.42, 154.07, 151.16, 151.03, 147.67, 137.61, 136.31, 132.75, 132.68, 131.83, 128.47, 128.10, 127.43, 127.37, 127.22, 127.17, 124.73, 123.81, 122.43, 121.38, 120.86, 115.11, 113.50, 111.46, 109.68, 100.86, 71.04, 59.52, 51.88.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 546.21 für C<sub>31</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 546.29.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 546.2240 für C<sub>31</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 546.2248.

**Darstellung von *N*-(5-(4-((2-Benzyl-1H-benzo[*d*]imidazol-5-yl)amino)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-hydroxyethoxy)phenyl)acrylamid (51)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 49 mg (0.08 mmol, 1 eq) 2-(2-Amino-4-(4-((2-benzyl-1H-benzo[*d*]imidazol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenoxy)ethan-1-ol (**69f**) und 7.9  $\mu$ L Acryloylchlorid (0.08 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. Im Anschluss wurden entsprechend der allgemeinen

---

Synthesevorschrift **A** 49 mg (0.11 mmol, 1 eq) *N*-(5-(4-((2-Benzyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)amino)-7-((2-(trimethyl-silyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-hydroxyethoxy)phenyl)acrylamid (**70f**) umgesetzt. **51** wurde nach säulenchromato-graphischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 5 mg (0.01 mmol, 12 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  11.98 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.73–7.69 (m, 1H), 7.69–7.64 (m, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.39–7.34 (m, 5H), 7.33–7.28 (m, 2H), 7.26 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.67 (dd, *J* = 16.9, 10.3 Hz, 1H), 6.22 (dd, *J* = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.77 (dd, *J* = 10.1, 1.6 Hz, 1H), 5.32 (t, *J* = 4.4 Hz, 2H), 4.32 (s, 1H), 4.12 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.80 (s, 2H).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 546.21 für C<sub>31</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 546.54.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 546.2233 C<sub>31</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 546.2248.

**Darstellung von *N*-(5-(4-((4-((1,3-Dioxoisindolin-2-yl)methyl)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-hydroxyethoxy)phenyl)acrylamid (**52a**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 20 mg (0.03 mmol, 1 eq) *N*-(5-(4-((4-((1,3-Dioxoisindolin-2-yl)methyl)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-(2-hydroxyethoxy)phenyl)acrylamid (**70g**) umgesetzt. **52a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 5 mg (0.0009 mmol, 29 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.35 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.90–7.88 (m, 2H), 7.86–7.84 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.53 (dd, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.23 (s, 2H), 7.21 (s, 2H), 6.63 (dd, *J* = 16.4, 8.9 Hz, 2H), 6.22 (dd, *J* = 17.0, 1.7 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J* = 10.2, 1.6 Hz, 1H), 5.58 (s, 1H), 5.06 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 4.11 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.79 (dd, *J* = 10.3, 5.2 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  167.68, 163.35, 153.55, 150.98, 149.97, 147.77, 138.63, 134.56, 131.84, 131.57, 130.78, 128.14, 127.89, 127.15, 126.60, 124.50, 123.68, 123.20, 120.35, 120.19, 115.16, 113.41, 101.49, 70.99, 59.49, 40.06.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 575.2035 für C<sub>32</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 575.2037.

**Darstellung von *N*-(2-(2-(Dimethylamino)ethoxy)-5-(4-((4-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)phenyl)amino)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (**52b**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 4 mg (0.006 mmol, 1 eq) *N*-

---

(2-(2-(Dimethylamino)ethoxy)-5-(4-((4-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)phenyl)amino)-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (**70h**) umgesetzt. **52b** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 2.47 mg (0.004 mmol, 75 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  8.37 (s, 4H), 7.91–7.88 (m, 2H), 7.87–7.84 (m, 2H), 7.56–7.51 (m, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.63 (dd,  $J = 18.6, 11.2$  Hz, 1H), 6.24 (dd,  $J = 17.0, 1.5$  Hz, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.59 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 4.39–4.31 (m, 2H), 3.17 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  174.50, 170.34, 167.69, 163.42, 153.58, 151.02, 150.00, 138.64, 134.59, 131.78, 131.56, 130.84, 129.65, 127.92, 127.38, 127.27, 124.76, 123.78, 123.21, 121.81, 120.40, 115.00, 101.50, 66.40, 59.73, 54.90, 48.58.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 602.2510 für C<sub>34</sub>H<sub>31</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 602.2510.

#### **Darstellung von 5-Iodo-4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**73**)**

Zu einer Lösung aus 1800 mg (4.39 mmol, 1 eq) 4-Chloro-5-iodo-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**55**) in MeOH wurden 1336 mg (9.67 mmol, 2.2 eq) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gegeben und die Reaktionsmischung für 20 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (PE/EtOAc) wurde **73** mit einer Ausbeute von 1700 mg (4.19 mmol, 96 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.45 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 5.53 (s, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.48 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 0.80 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), -0.11 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  162.3, 151.9, 151.3, 132.3, 106.3, 72.5, 65.7, 53.7, 50.9, 17.1, -1.42.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 406.04 für C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 405.84.

#### **Darstellung von 5-(4-Fluoro-3-nitrophenyl)-4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**74**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesvorschrift I wurden 1700 mg (4.19 mmol, 1 eq) 5-iodo-4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**73**) umge-

setzt. **74** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 1603 mg (3.83 mmol, 91 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.50 (s, 1H), 8.49 (dd, *J* = 7.3, 2.2 Hz, 1H), 8.09 (ddd, *J* = 8.8, 3.9, 2.4 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.62 (dd, *J* = 11.1, 8.8 Hz, 1H), 5.61 (s, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.56 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.84 (t, *J* = 8.0, 2H), -0.09 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  162.5, 152.7, 151.3, 136.6, 135.5, 130.9, 126.7, 125.2, 118.4, 118.3, 112.9, 102.1, 72.8, 65.9, 53.8, 17.1, -1.45.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 419.14 für C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 419.02.

#### **Darstellung von 2-(4-(4-Methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)ethan-1-ol (75d)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **K** wurden 500 mg (1.19 mmol, 1 eq) 5-(4-Fluoro-3-nitrophenyl)-4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy) methyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**74**) und 738.6 mg (11.9 mmol, 10 eq) Ethylenglykol umgesetzt. **75d** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH und PE/EtOAc) mit einer Ausbeute von 363 mg (0.80 mmol, 68 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.51 (s, 1H), 8.21 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.94 (d, 1H), 7.93 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.92 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.23 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.75 (dd, *J* = 10.0, 5.2 Hz, 2H), 3.56 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.85 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.09 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  170.33, 162.59, 152.61, 151.19, 150.12, 139.46, 133.67, 126.11, 125.80, 124.40, 115.39, 113.60, 102.22, 71.37, 65.79, 59.34, 53.72, 17.09, -1.40.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 461.18 für C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 461.02.

#### **Darstellung von 3-(4-(4-Methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)propan-1-ol (75e)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **K** wurden 482 mg (1.15 mmol, 1 eq) 5-(4-Fluoro-3-nitrophenyl)-4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy) methyl)-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**74**) und 875 mg (11.5 mmol, 10 eq) Propan-1,3-diol umgesetzt. **75e** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 361 mg (0.76 mmol, 66 %) erhalten.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 475.19 für C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 475.02.

---

**Darstellung von 2-(4-(4-Methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)-N,N-dimethylethan-1-amin (75f)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **K** wurden 600 mg (1.43 mmol, 1 eq) 5-(4-Fluoro-3-nitrophenyl)-4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (**74**) und 1274.6 mg (11.5 mmol, 10 eq) 2-(Dimethylamino)ethan-1-ol umgesetzt. **75f** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 610 mg (1.25 mmol, 88 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.51 (s, 1H), 8.21 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.95–7.92 (m, 2H), 7.45 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.28 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.56 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.67 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.23 (s, 6H), 0.85 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.09 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  162.58, 152.59, 151.15, 149.84, 139.34, 133.70, 126.43, 126.12, 125.81, 124.38, 115.18, 113.57, 102.22, 68.09, 65.79, 57.34, 53.72, 45.60, 17.09, -1.41.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 488.22 für C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 488.24.

**Darstellung von 2-(2-Amino-4-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)phenoxy)ethan-1-ol (76d)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 363 mg (0.78 mmol, 1 eq) 2-(4-(4-Methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)ethan-1-ol (**75d**) umgesetzt. **76d** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (PE/EtOAc) mit einer Ausbeute von 331 mg (0.77 mmol, 98 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.45 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 6.95 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.79 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.60 (s, 2H), 4.87 (s, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.96 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.73 (dd, *J* = 10.1, 5.4 Hz, 2H), 3.54 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.84 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.09 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  162.73, 152.39, 150.70, 144.78, 128.69, 126.52, 126.06, 124.22, 116.89, 116.46, 114.37, 111.81, 102.46, 70.19, 65.60, 59.86, 53.53, 17.10, -1.39.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 431.20 für C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 431.13.

**Darstellung von 3-(2-Amino-4-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)phenoxy)propan-1-ol (76e)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 361 mg (0.76 mmol, 1 eq) 3-

---

(4-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo [2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)propan-1-ol (**75e**) umgesetzt. **76e** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (PE/EtOAc) mit einer Ausbeute von 44 mg (0.09 mmol, 13 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.45 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 6.96 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.53 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 4.04 (t, *J* = 3.2 Hz, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.61 (dd, *J* = 11.3, 6.1 Hz, 2H), 3.54 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.89 (app. p, *J* = 6.2 Hz, 2H), 0.84 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.09 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.72, 152.39, 150.70, 144.79, 131.51, 128.78, 126.28, 124.19, 116.88, 114.46, 111.50, 102.46, 72.51, 65.58, 64.97, 57.51, 53.50, 32.28, 17.10, -1.39.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 445.22 für C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 445.16.

#### **Darstellung von 2-(2-(Dimethylamino)ethoxy)-5-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)anilin (**76f**)**

610 mg (1.25 mmol) 2-(4-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo [2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)-2-nitrophenoxy)-*N,N*-dimethylethan-1-amin (**75f**) wurden in MeOH gelöst und im Durchflusshydrogenator (H-Cube) mit Pd/C und H<sub>2</sub> bei 50 °C umgesetzt. **76f** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 483 mg (1.06 mmol, 74 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, MeOD) δ 8.44 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 4.52 (t, *J* = 4.1 Hz, 2H), 4.09 (s, 3H), 3.68 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.60 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.03 (s, 6H), 0.89 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.08 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, MeOD) δ 164.81, 154.09, 152.35, 149.65, 129.87, 128.58, 125.84, 125.06, 123.76, 117.40, 113.64, 104.41, 74.30, 67.54, 63.68, 57.62, 54.32, 43.66, 18.55, -1.52.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 458.25 für C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 458.20.

#### **Darstellung von *N*-(2-(2-Hydroxyethoxy)-5-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (**77d**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesvorschrift **B** wurden 285 mg (0.66 mmol, 1 eq) 2-(2-amino-4-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenoxy)ethan-1-ol (**76d**) und 57.6 µL Acryloylchlorid (0.73 mmol, 1.1 eq) umgesetzt.

---

**77d** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 240 mg (0.49 mmol, 75 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.23 (s, 1H), 8.48 (s, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.37 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.65 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H), 6.27 (dd, *J* = 17.0, 1.8 Hz, 1H), 5.78 (dd, *J* = 10.2, 1.8 Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 5.06 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.09 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.78 (dd, *J* = 10.2, 5.2 Hz, 2H), 3.56 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.85 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.09 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  163.10, 162.76, 152.48, 150.92, 132.03, 128.90, 127.43, 126.79, 126.22, 125.46, 124.72, 124.39, 116.00, 112.63, 102.36, 70.98, 65.61, 59.49, 54.89, 53.49, 17.03, -1.44.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 485.21 für C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 485.13.

**Darstellung von *N*-(2-(3-Hydroxypropoxy)-5-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (77e)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 21 mg (0.05 mmol, 1 eq) 3-(2-amino-4-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenoxy)propan-1-ol (**76e**) und 4.1  $\mu$ L Acryloylchlorid (0.05 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **77e** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 10 mg (0.02 mmol, 40 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, MeOD)  $\delta$  8.42 (s, 1H), 7.65 (dd, *J* = 7.1, 3.0 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 7.4, 2.8 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.5, 3.4 Hz, 1H), 6.58 (dd, *J* = 17.0, 10.3 Hz, 1H), 6.38 (dd, *J* = 17.0, 1.5 Hz, 1H), 5.79 (dd, *J* = 10.3, 1.4 Hz, 1H), 5.66 (s, 2H), 4.25 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.10 (s, 3H), 3.81 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.61 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.08 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 0.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), -0.06 ppm (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, MeOD)  $\delta$  164.97, 153.93, 152.06, 133.78, 133.12, 133.05, 130.02, 129.94, 129.79, 127.84 (d, *J* = 4.6 Hz), 127.65, 126.92, 125.44, 113.05, 104.64, 99.22, 74.26, 67.44, 59.93, 54.24, 33.06, 18.55, -1.41.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 499.23 für C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 499.08.

**Darstellung von *N*-(2-(2-(Dimethylamino)ethoxy)-5-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (77f)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 460 mg (1.00 mmol, 1 eq) 2-

---

(2-(dimethylamino)ethoxy)-5-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)anilin (**76f**) und 87.9  $\mu\text{L}$  Acryloylchlorid (1.1 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **77f** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 225 mg (0.44 mmol, 44 %) erhalten.

**$^1\text{H NMR}$**  (600 MHz, MeOD)  $\delta$  8.58 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.42 (dd,  $J = 8.5, 2.2$  Hz, 1H), 7.08 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.64 (dd,  $J = 17.0, 10.3$  Hz, 1H), 6.40 (dd,  $J = 17.0, 1.6$  Hz, 1H), 5.79 (dd,  $J = 10.3, 1.6$  Hz, 1H), 5.67 (s, 2H), 4.21 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H), 4.11 (s, 3H), 3.61 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.82 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H), 2.41 (s, 6H), 0.90 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), -0.06 (s, 9H).

**$^{13}\text{C NMR}$**  (151 MHz, MeOD)  $\delta$  166.25, 164.99, 153.94, 152.07, 149.26, 132.73, 128.33, 128.06, 127.61, 126.47, 125.48, 123.77, 118.77, 112.48, 104.66, 74.27, 67.44, 66.29, 59.00, 54.24, 45.26, 18.55, -1.41.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 512.26 für  $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_4\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 512.20.

#### **Darstellung von *N*-(2-(2-Hydroxyethoxy)-5-(4-methoxy-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (**72d**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 230 mg (0.65 mmol, 1 eq) *N*-(2-(2-Hydroxyethoxy)-5-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (**77d**) umgesetzt. **72d** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 18 mg (0.05 mmol, 11 %) erhalten.

**$^1\text{H NMR}$**  (700 MHz, MeOD)  $\delta$  8.56 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.43 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.08 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.62 (dd,  $J = 17.0, 10.3$  Hz, 1H), 6.41 (dd,  $J = 17.0, 1.3$  Hz, 1H), 5.83–5.80 (m, 1H), 4.19 (t,  $J = 4.2$  Hz, 2H), 4.11 (s, 3H), 3.97 (t,  $J = 4.3$  Hz, 2H).

**$^{13}\text{C NMR}$**  (176 MHz, MeOD)  $\delta$  166.13, 164.94, 153.86, 151.60, 149.11, 132.70, 128.82, 128.30, 127.70, 126.50, 123.55, 122.44, 118.24, 112.96, 104.16, 71.73, 61.54, 54.09.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 355.13 für  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 355.13.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 355.1400 für  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Gefunden 355.1400.

#### **Darstellung von *N*-(2-(3-Hydroxypropoxy)-5-(4-methoxy-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (**72e**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 9 mg (0.02 mmol, 1 eq) *N*-(2-



---

(3-Hydroxypropoxy)-5-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (**77e**) umgesetzt. **72e** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 3 mg (0.008 mmol, 45 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, MeOD)  $\delta$  8.40 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.46 (dd,  $J = 8.3, 1.6$  Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.10 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.59 (dd,  $J = 16.9, 10.3$  Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J = 17.0, 1.3$  Hz, 1H), 5.81 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 4.26 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 3.82 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 2.07–2.11 (m, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, MeOD)  $\delta$  166.20, 164.94, 153.86, 151.63, 149.95, 132.68, 128.53, 127.95, 127.65, 126.94, 124.30, 122.39, 118.22, 113.10, 104.18, 67.50, 59.96, 54.09, 33.08.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 369.14 für C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 369.18.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 369.1557 für C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>, Gefunden 369.1557.

#### **Darstellung von *N*-(2-(2-(Dimethylamino)ethoxy)-5-(4-methoxy-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (**72f**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 100 mg (0.19 mmol, 1 eq) *N*-(2-(2-(Dimethylamino)ethoxy)-5-(4-methoxy-7-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methyl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-yl)phenyl)acrylamid (**77f**) umgesetzt. **72f** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 69 mg (0.18 mmol, 92 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, MeOD)  $\delta$  8.34 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.49 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.54 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J = 16.9, 1.5$  Hz, 1H), 5.80 (dd,  $J = 10.3, 1.2$  Hz, 1H), 4.46 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H), 3.61 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H), 2.99 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, MeOD)  $\delta$  166.61, 164.91, 153.56, 151.51, 149.47, 132.20, 129.79, 128.39, 127.88, 127.27, 125.80, 122.77, 117.65, 113.22, 104.14, 63.59, 57.65, 54.24, 43.83.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 382.18 für C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 382.11.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 382.1874 für C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 382.1873.

---

**Darstellung von *tert*-Butyl (tert-butoxycarbonyl)(4-nitro-2-(trifluoromethyl)phenyl) carbamat (81)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **E** wurden 2000 mg (9.7 mmol, 1 eq) 4-nitro-2-(trifluoromethyl)anilin umgesetzt. **81** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (PE/EtOAc) mit einer Ausbeute von 3750 mg (9.2 mmol, 95 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  8.58 (dd,  $J = 8.7, 2.6$  Hz, 1H), 8.51 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.95 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 1.32 (s, 18H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  149.12 (s), 146.90 (s), 142.36 (s), 133.58 (s), 128.40 (s), 123.12 (s), 122.09 (s), 121.31 (s), 83.28 (s), 27.29 (s).

**Darstellung von *tert*-Butyl(4-amino-2-(trifluoromethyl)phenyl)(tert-butoxycarbonyl) carbamat (82)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 1243 mg (3.06 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (tert-butoxycarbonyl)(4-nitro-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbamate (**81**) umgesetzt. **82** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH und C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 411 mg (1.09 mmol, 36 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  6.97 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 6.75 (dd,  $J = 8.5, 2.2$  Hz, 1H), 5.65 (s, 2H), 1.32 (s, 18H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  150.87 (s), 148.67 (s), 131.67 (s), 124.57 (s), 124.00 (s), 122.76 (s), 116.96 (s), 110.35 (s), 81.63 (s), 27.40 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 377.26 für C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 276.90.

**Darstellung von 3-((Trimethylsilyl)ethynyl)imidazo[1,2-*b*]pyridazin (84)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **G** wurden 1000 mg (5.05 mmol, 1 eq) 3-bromoimidazo[1,2-*b*]pyridazin (**83**) umgesetzt. **84** wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

**Darstellung von 3-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylbenzoesäure (85)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **G** wurden 400 mg (1.5 mmol, 1 eq) 3-Iodo-4-methylbenzoesäure mit 986 mg (4.6 mmol, 3 eq) **85** umgesetzt. Nach Zugabe der Reagenzien wurde die Reaktionsmischung für 30 min bei 60 °C gerührt und danach auf rt abgekühlt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von TBAF (4.5 mmol, 3 eq) und die

---

Reaktionsmischung wurde für 16 h bei 80 °C gerührt. **85** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH und C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 440 mg (1.59 mmol, 35 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO) δ 8.72 (dd, *J* = 4.4, 1.4 Hz, 1H), 8.25 (dd, *J* = 9.2, 1.5 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.38 (dd, *J* = 9.2, 4.4 Hz, 1H), 2.55 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO) δ 167.32 (s), 145.02 (s), 142.08 (s), 139.55 (s), 138.04 (s), 132.18 (s), 129.82 (s), 129.58 (s), 126.02 (s), 121.27 (s), 118.93 (s), 111.92 (s), 96.92 (s), 80.29 (s), 45.85 (s), 19.07 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 278.28 für C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 278.18.

**Darstellung von *tert*-Butyl (tert-butoxycarbonyl)(4-(3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylbenzamid)-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbamate (**86**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 20 mg (0.05 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-amino-2-(trifluoromethyl)phenyl)(*tert*-butoxycarbonyl)carbamate (**82**) und 15 mg (0.055 mmol, 1.1 eq) 3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylbenzoesäure (**85**) umgesetzt. **86** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 7 mg (0.01 mmol, 22 %) erhalten.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 636.64 für C<sub>33</sub>H<sub>32</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 635.98.

**Darstellung von *N*-(4-Amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylbenzamid (**87**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 25 mg (0.05 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (tert-butoxycarbonyl)(4-(3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylbenzamid)-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbamate (**86**) umgesetzt und für 5 h gerührt. **87** wurde ohne weitere Aufreinigung mit einer Ausbeute von 17 mg (0.04 mmol, 97 %) erhalten.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 436.41 für C<sub>23</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 436.15.

**Darstellung von *N*-(4-Acrylamido-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylbenzamid (**79**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 15 mg (0.03 mmol, 1 eq) *N*-

---

(4-Amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylbenzamid (**87**) umgesetzt und für 48 h gerührt. **79** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 1.6 mg (0.003 mmol, 11 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, MeOD)  $\delta$  8.64 (dd,  $J = 4.4, 1.2$  Hz, 1H), 8.28 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 8.20 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 8.11 (dd,  $J = 9.2, 1.4$  Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.01 (dd,  $J = 8.7, 2.2$  Hz, 1H), 7.92 (dd,  $J = 8.0, 1.9$  Hz, 1H), 7.56 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.51 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.38 (dd,  $J = 9.2, 4.4$  Hz, 1H), 6.52 (dd,  $J = 16.9, 10.2$  Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J = 17.1, 1.5$  Hz, 1H), 5.83 (dd, 1H), 2.68 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, MeOD)  $\delta$  167.76 (s), 163.08 (s), 146.12 (s), 145.61 (s), 139.21 (s), 138.17 (s), 133.69 (s), 131.83 (s), 131.64 (s), 131.49 (s), 131.16 (s), 129.24 (s), 128.54 (s), 127.69 (s), 127.54 (s), 126.49 (s), 125.74 (s), 125.46 (s), 124.01 (s), 123.93 (s), 120.52 (s), 119.52 (s), 97.71 (s), 81.43 (s), 71.58 (s), 20.97 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 490.45 für C<sub>26</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 490.12.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 490.1413 für C<sub>26</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 490.1482.

#### **Darstellung von *tert*-Butyl (4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (**90**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **E** wurden 1000 mg (5.37 mmol, 1 eq) 4-amino-2-(trifluoromethyl)benzonnitril (**89**) umgesetzt. **90** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 1450 mg (5.06 mmol, 94 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.28 (s, 1H), 8.13 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 8.04 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.81 (dd,  $J = 8.6, 1.9$  Hz, 1H), 1.49 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  152.20 (s), 144.46 (s), 136.39 (s), 132.85 (s), 121.59 (s), 120.76 (s), 115.85 (s), 115.11 (s), 100.25 (s), 80.84 (s), 27.89 (s).

#### **Darstellung von *tert*-Butyl (4-(aminomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (**91**)**

Zu einer Lösung von 628 mg (2,19 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat in MeOH wurde eine Spatelspitze 10 Pd/C zugegeben und mit einem H<sub>2</sub>-Ballon für 24 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **91** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 348 mg (1.2 mmol, 55 %) erhalten.

---

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  9.60 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.63 (q,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 3.80 (s, 2H), 1.48 (s, 11H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  152.73 (s), 138.07 (s), 130.01 (s), 126.10 (s), 125.41 (s), 123.57 (s), 121.45 (s), 114.43 (s), 79.52 (s), 40.06 (s), 28.06 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 291.28 für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 290.73.

### **Darstellung von *tert*-Butyl (4-(acrylamidomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamat (92)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 170 mg (0.59 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-(aminomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamate (**91**) umgesetzt. **92** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 176 mg (0.51 mmol, 87 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  9.67 (s, 1H), 8.56 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.62 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.37 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 6.31 (dd,  $J$  = 17.1, 10.2 Hz, 1H), 6.13 (dd,  $J$  = 17.1, 2.1 Hz, 1H), 5.64 (dd, 1H), 4.43 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H), 1.48 (s, 10H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  164.69 (s), 152.70 (s), 138.88 (s), 131.37 (s), 130.12 (s), 130.03 (s), 125.71 (s), 125.16 (s), 123.35 (s), 121.49 (s), 114.90 (s), 79.65 (s), 40.06 (s), 28.04 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 291.28 für C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 290.73.

### **Darstellung von *N*-(4-Amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)acrylamid (93)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 176 mg (0.51 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-(acrylamidomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamate (**92**) umgesetzt. **93** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 104 mg (0.43 mmol, 84 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  8.38 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 1H), 7.13 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.88 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 6.75 (dd,  $J$  = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 6.29 (dd,  $J$  = 17.1, 10.2 Hz, 1H), 6.11 (dd,  $J$  = 17.1, 2.2 Hz, 1H), 5.62 – 5.59 (m, 1H), 5.50 (s, 2H), 4.31 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  164.46 (s), 148.11 (s), 131.57 (s), 131.00 (s), 127.05 (s), 125.38 (s), 123.72 (s), 122.41 (s), 116.83 (s), 110.35 (s), 40.06 (s).

---

**Darstellung von *N*-(4-(Acrylamidomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methylbenzamid (**88**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 10 mg (0.04 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)acrylamide (**93**) umgesetzt. **88** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 4 mg (0.19 mmol, 20 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO)  $\delta$  10.59 (s, 1H), 8.73 (td,  $J = 4.2, 1.3$  Hz, 3H), 8.63 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 8.26 (t,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 8.23 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 8.05 (d,  $J = 1.4$  Hz, 2H), 7.96 (dd,  $J = 8.0, 1.8$  Hz, 1H), 7.89 (dd,  $J = 7.9, 1.6$  Hz, 1H), 7.56 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.39 (dt,  $J = 9.4, 4.9$  Hz, 3H), 6.34 (dd,  $J = 17.1, 10.3$  Hz, 1H), 6.16 (dd,  $J = 17.1, 2.0$  Hz, 1H), 5.66 (dd,  $J = 10.2, 2.0$  Hz, 1H), 4.50 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 2.61 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO)  $\delta$  166.46 (s), 164.76 (s), 145.06 (s), 144.35 (s), 143.53 (s), 139.64 (s), 138.26 (s), 132.12 (s), 131.92 (s), 131.36 (s), 130.22 (s), 130.15 (s), 130.10 (s), 129.93 (s), 129.66 (s), 128.51 (s), 126.08 (s), 125.77 (s), 123.71 (s), 122.01 (s), 121.76 (s), 119.07 (s), 96.16 (s), 81.08 (s), 69.75 (s), 40.02 (s), 22.07 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 504.48 für C<sub>27</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 504.07.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 504.1653 für C<sub>26</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 504.1569.

**Darstellung von *tert*-Butyl (4-(4-methylbenzamido)-2-(trifluoromethyl)phenyl) carbamat (**98a**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 10 mg (0.036 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-amino-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbamate (**82**) und 5.4 mg (0.04 mmol, 1.1 eq) 4-methylbenzoesäure umgesetzt. **98a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH und PE/EtOAc) mit einer Ausbeute von 28 mg (0.07 mmol, 64 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.43 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.20 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 8.02 (dd,  $J = 8.7, 2.4$  Hz, 1H), 7.90 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.40 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.43 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  165.55 (s), 154.16 (s), 141.94 (s), 137.47 (s), 131.44 (s), 130.77 (s), 128.98 (s), 127.73 (s), 125.61 (s), 125.42 (s), 124.40 (s), 124.06 (s), 122.59 (s), 117.54 (s), 117.50 (s), 79.00 (s), 28.04 (s), 21.03 (s,  $J = 13.8$  Hz).

---

### Darstellung von *N*-(4-Amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methylbenzamid (**99a**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 28 mg (0.07 mmol, 1 eq) tert-butyl (4-(4-methylbenzamido)-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (**98a**) umgesetzt. **99a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 128 mg (0.43 mmol, 87 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.00 (s, 1H), 7.85 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 7.83 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.63 (dd,  $J$  = 8.8, 1.8 Hz, 1H), 7.31 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 5.42 (s, 2H), 2.37 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  164.80 (s), 142.54 (s), 141.36 (s), 131.95 (s), 128.87 (s), 127.94 (s), 127.49 (s), 126.25 (s), 125.90 (s), 124.10 (s), 118.23 (s), 117.00 (s), 20.99 (s).

### Darstellung von *N*-(4-Acrylamido-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methylbenzamid (**96a**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 20 mg (0.07 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methylbenzamid (**99a**) und 6.1  $\mu$ L Acryloylchlorid (0.08 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **96a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 6 mg (0.02 mmol, 25 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO)  $\delta$  10.47 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 8.26 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 8.06 (dd,  $J$  = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 7.90 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 3H), 7.49 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.36 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 3H), 6.52 (dd,  $J$  = 16.0, 10.5 Hz, 1H), 6.24 (dd,  $J$  = 17.1, 1.7 Hz, 1H), 5.77 (dd,  $J$  = 10.3 Hz, 1H), 2.40 (s, 4H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO)  $\delta$  165.61 (s), 164.36 (s), 142.03 (s), 137.85 (s), 131.45 (s), 131.12 (s), 130.84 (s), 129.95 (s), 128.97 (s), 127.75 (s), 127.11 (s), 124.17 (s), 123.96 (s), 122.61 (s), 117.46 (s), 21.03 (s).

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 349.1096 für C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 349.1168.

### Darstellung von *N*-(4-Acrylamido-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methylbenzamid (**96b**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 20 mg (0.07 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methylbenzamid (**99a**) und 6.1  $\mu$ L 2-Chloracetylchlorid (0.08 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **96b** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 7 mg (0.02 mmol, 27 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO)  $\delta$  10.48 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.26 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 8.07 (dd,  $J$  = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 7.90 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 3H), 7.48 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.36 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 3H), 4.30 (s, 3H), 2.40 (s, 5H).

---

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO)  $\delta$  165.99 (s), 165.63 (s), 142.06 (s), 138.13 (s), 131.40 (s), 130.60 (s), 129.40 (s), 128.98 (s), 128.86 (s), 127.74 (s), 127.47 (s), 124.07 (s), 117.52 (s), 42.65 (s), 21.02 (s).

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 371.0609 für C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 371.0768.

### **Darstellung von *tert*-Butyl (*tert*-butoxycarbonyl)(4-(3-methylbenzamido)-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (**98b**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 191 mg (0.51 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-amino-2-(trifluoromethyl)phenyl)(*tert*-butoxycarbonyl)carbammat (**82**) und 76.4 mg (0.56 mmol, 1.1 eq) 3-methylbenzoesäure umgesetzt. **98b** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH und C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 51 mg (0.1 mmol, 20 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.57 (s, 1H), 8.27 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.09 (dd,  $J$  = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.77 (ddd,  $J$  = 5.5, 3.5, 1.7 Hz, 1H), 7.46 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J$  = 4.0, 1.6 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.33 (s, 18H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  166.10 (s), 150.19 (s), 139.27 (s), 137.84 (s), 134.33 (s), 132.57 (s), 131.82 (s), 131.50 (s), 128.42 (s), 128.19 (s), 125.98 (s), 125.78 (s), 124.93 (s), 124.21 (s), 123.96 (s), 122.40 (s), 117.43 (s), 82.31 (s), 27.37 (s), 20.96 (s).

### **Darstellung von *N*-(4-Amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-methylbenzamid (**99b**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 51 mg (0.1 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (*tert*-butoxycarbonyl)(4-(3-methylbenzamido)-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (**98b**) umgesetzt. **99b** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 23 mg (0.08 mmol, 78 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO)  $\delta$  10.04 (s, 1H), 7.84 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.72 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 7.65 (dd,  $J$  = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 7.40 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 7.39 – 7.36 (m, 2H), 6.83 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 2.39 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO)  $\delta$  165.08 (s), 142.58 (s), 137.62 (s), 134.84 (s), 131.95 (s), 128.24 (s), 127.94 (s), 126.21 (s), 125.77 (s), 124.63 (s), 124.22 (s), 118.17 (s), 117.01 (s), 110.28 (s), 20.95 (s).



---

### Darstellung von *N*-(4-Acrylamido-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-methylbenzamid (**96c**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 12 mg (0.04 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-methylbenzamid (**99b**) und 3.5  $\mu$ L Acryloylchlorid (0.04 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **96c** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (zweimal C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 3 mg (0.009 mmol, 22 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.52 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 8.25 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.06 (dd,  $J$  = 8.7, 2.2 Hz, 1H), 7.80 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 7.78 (dd,  $J$  = 4.9, 3.5 Hz, 1H), 7.49 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 7.45 – 7.43 (m, 2H), 6.52 (dd,  $J$  = 16.6, 10.4 Hz, 1H), 6.24 (dd,  $J$  = 17.1, 1.7 Hz, 1H), 5.77 (dd,  $J$  = 10.3 Hz, 1H), 2.41 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  165.93 (s), 164.38 (s), 137.83 (s), 134.36 (s), 132.51 (s), 131.13 (s), 130.89 (s), 130.03 (s), 128.40 (s), 128.14 (s), 127.16 (s), 124.89 (s), 124.30 (s), 123.97 (s), 123.88 (s), 122.49 (s), 117.50 (s), 20.96 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 349.32 für C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 349.02.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 349.1086 für C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 349.1168.

### Darstellung von *N*-(4-(2-Chloroacetamido)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-methylbenzamid (**96d**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 18 mg (0.06 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-methylbenzamid (**99b**) und 5.3  $\mu$ L 2-Chloroacetylchlorid (0.07 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **96d** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 5 mg (0.01 mmol, 23 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO)  $\delta$  10.53 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.25 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H), 8.08 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.77 (d,  $J$  = 4.0 Hz, 1H), 7.49 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.41 – 7.38 (m, 1H), 4.30 (s, 2H), 2.41 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO)  $\delta$  166.00 (s), 165.93 (s), 137.81 (s), 134.83 (s), 134.30 (s), 132.52 (s), 131.93 (s), 130.63 (s), 128.38 (s), 128.14 (s), 127.93 (s), 124.89 (s), 124.61 (s), 124.06 (s), 117.00 (s), 42.65 (s), 20.94 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 371.75 für C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 371.02.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 371.0696 für C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 371.0769.

---

### Darstellung von *tert*-Butyl (4-(nikotinamido)-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (98c)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 134 mg (0.36 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-amino-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (**82**) und 49 mg (0.39 mmol, 1.1 eq) Nikotinsäure umgesetzt. **98c** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 92 mg (0.19 mmol, 53 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO)  $\delta$  10.70 (s, 1H), 9.14 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H), 8.78 (dd,  $J$  = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.33 – 8.31 (m, 1H), 8.20 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.01 (dd,  $J$  = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.60 – 7.58 (m, 1H), 7.45 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 1.43 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO)  $\delta$  164.31 (s), 154.11 (s), 152.37 (s), 148.75 (s), 137.01 (s), 135.49 (s), 131.21 (s), 130.80 (s), 130.09 (s), 124.16 (s), 123.54 (s), 117.63 (s), 79.06 (s), 28.01 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 382.35 für C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 381.91.

### Darstellung von *N*-(4-Amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)nikotinamid (99c)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 92 mg (0.19 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-(nikotinamido)-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (**98c**) umgesetzt. **99c** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 34 mg (0.12 mmol, 63 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.28 (s, 1H), 9.08 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H), 8.74 (dd,  $J$  = 4.8, 1.5 Hz, 1H), 8.27 (dt,  $J$  = 7.9, 1.9 Hz, 1H), 7.83 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 7.63 (dd,  $J$  = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 7.55 (dd,  $J$  = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 6.84 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 5.48 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  163.44 (s), 151.95 (s), 148.52 (s), 142.89 (s), 135.22 (s), 130.44 (s), 127.42 (s), 126.22 (s), 125.84 (s), 123.46 (s), 118.30 (s), 117.06 (s), 110.04 (s).

### Darstellung von *N*-(4-Acrylamido-3-(trifluoromethyl)phenyl)nikotinamid (96e)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 15 mg (0.05 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)nikotinamid (**99c**) und 4.7  $\mu$ L Acryloylchlorid (0.06 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **96e** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 2 mg (0.006 mmol, 12 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO)  $\delta$  10.77 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 9.14 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H), 8.79 (dd,  $J$  = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.34 – 8.31 (m, 1H), 8.26 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 8.04 (dd,  $J$  = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 7.62 – 7.59 (m, 1H), 7.54 – 7.51 (m, 1H), 6.52 (dd,  $J$  = 16.8, 10.3 Hz, 1H), 6.24 (dd,  $J$  = 17.1, 1.8 Hz, 1H), 5.78 (dd,  $J$  = 10.3, 1.6 Hz, 1H).

---

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO)  $\delta$  164.42 (s), 152.46 (s), 148.77 (s), 137.46 (s), 135.59 (s), 131.11 (s), 131.05 (s), 130.40 (s), 130.11 (s), 127.28 (s), 124.45 (s), 124.11 (s), 123.62 (s), 117.60 (s).

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 336.0882 für C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 336.0964.

**Darstellung von *N*-(4-(2-Chloroacetamido)-3-(trifluoromethyl)phenyl)nikotinamid (96f)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 15 mg (0.05 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)nikotinamid (**99c**) und 4.4  $\mu$ L 2-Chloracetylchlorid (0.06 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **96f** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH und C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 3 mg (0.008 mmol, 17 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.76 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 9.14 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.79 (dd, *J* = 4.8, 1.5 Hz, 1H), 8.32 (dt, *J* = 8.0, 1.9 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.06 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.31 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  166.01 (s), 164.40 (s), 152.44 (s), 148.74 (s), 137.69 (s), 135.53 (s), 130.72 (s), 130.04 (s), 124.18 (s), 123.57 (s), 122.35 (s), 117.66 (s), 42.67 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 358.05 für C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 358.08.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 358.0492 für C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 358.0575.

**Darstellung von *tert*-Butyl (4-(acrylamidomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (100a)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 170 mg (0.59 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-(aminomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (**91**) und 58.7  $\mu$ L Acryloylchlorid (0.65 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **100a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH und C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 176 mg (0.51 mmol, 87 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  9.67 (s, 1H), 8.56 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.31 (dd, *J* = 17.1, 10.2 Hz, 1H), 6.13 (dd, *J* = 17.1, 2.1 Hz, 1H), 5.64 (dd, 1H), 4.43 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.48 (s, 9H).

---

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  164.69 (s), 152.70 (s), 138.88 (s), 131.37 (s), 130.12 (s), 130.03 (s), 126.80 (s), 126.60 (s), 125.71 (s), 125.16 (s), 123.35 (s), 121.49 (s), 114.90 (s), 79.65 (s), 40.06 (s), 28.04 (s).

#### **Darstellung von *N*-(4-Amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)acrylamid (**101a**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 170 mg (0.49 mmol, 1 eq) tert-butyl 4-(acrylamidomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl carbamat (**100a**) umgesetzt. **101a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 104 mg (0.43 mmol, 84 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  8.38 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 1H), 7.13 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.88 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H), 6.75 (dd,  $J$  = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 6.29 (dd,  $J$  = 17.1, 10.2 Hz, 1H), 6.11 (dd,  $J$  = 17.1, 2.2 Hz, 1H), 5.60 (dd,  $J$  = 10.2, 2.2 Hz, 1H), 5.50 (s, 2H), 4.31 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  164.46 (s), 148.11 (s), 131.57 (s), 131.00 (s), 127.05 (s), 125.38 (s), 123.72 (s), 122.41 (s), 116.83 (s), 110.35 (s), 40.06 (s).

#### **Darstellung von *N*-(4-(Acrylamidomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methylbenzamid (**97a**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 20 mg (0.08 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-methylbenzamid (**101a**) und 12 mg (0.09 mmol, 1.1 eq) 4-Methylbenzoesäure umgesetzt. **97a** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 11 mg (0.03 mmol, 38 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO)  $\delta$  10.43 (s, 1H), 8.62 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 8.24 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 8.03 (dd,  $J$  = 8.5, 1.8 Hz, 1H), 7.90 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.47 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.35 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 6.33 (dd,  $J$  = 17.1, 10.3 Hz, 1H), 6.16 (dd,  $J$  = 17.1, 2.1 Hz, 1H), 5.66 (dd,  $J$  = 10.2, 2.1 Hz, 1H), 4.49 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO)  $\delta$  165.56 (s), 164.76 (s), 141.99 (s), 138.51 (s), 131.65 (s), 131.44 (s), 131.37 (s), 129.89 (s), 129.31 (s), 128.98 (s), 127.73 (s), 126.60 (s), 125.77 (s), 123.62 (s), 117.25 (s), 40.02 (s), 21.02 (s).

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 363.1242 für C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 363.1324.

---

### Darstellung von *tert*-Butyl (4-((2-chloroacetamido)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (**100b**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 80 mg (0.28 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-(aminomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (**91**) und 24.1  $\mu$ L 2-Chloracetylchlorid (0.3 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **100b** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 64 mg (0.17 mmol, 62 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  9.68 (s, 1H), 8.70 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.62 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.38 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 4.39 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H), 4.15 (s, 2H), 1.48 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  166.17 (s), 152.70 (s), 138.94 (s), 129.82 (s), 129.58 (s), 126.73 (s), 126.53 (s), 125.13 (s), 123.31 (s), 121.43 (s), 114.86 (s), 79.70 (s), 54.92 (s), 42.54 (s), 28.04 (s).

### Darstellung von *N*-(4-Amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)-2-chloroacetamid (**101b**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 60 mg (0.16 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-((2-chloroacetamido)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamate (**100b**) umgesetzt. **101b** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 40 mg (0.15 mmol, 94 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  8.51 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 1H), 7.13 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.88 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 6.76 (dd,  $J$  = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 5.53 (s, 2H), 4.27 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 2H), 4.10 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  165.83 (s), 148.14 (s), 130.82 (s), 125.49 (s), 123.68 (s), 121.94 (s), 116.80 (s), 110.41 (s), 42.56 (s), 40.06 (s,  $J$  = 7.8 Hz).

### Darstellung von *N*-(4-(Acrylamidomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methylbenzamid (**97b**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 20 mg (0.08 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)-2-chloroacetamid (**101b**) und 12 mg (0.09 mmol, 1.1 eq) 4-Methylbenzoesäure umgesetzt. **97b** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 4 mg (0.01 mmol, 13 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.44 (s, 1H), 8.76 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 8.24 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 8.04 (dd,  $J$  = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.90 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 7.48 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.36 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 4.45 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H), 4.18 (s, 2H), 2.39 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  166.26 (s), 165.61 (s), 142.02 (s), 138.58 (s), 131.45 (s), 131.19 (s), 129.63 (s), 129.01 (s), 127.75 (s), 126.57 (s), 126.37 (s), 123.57 (s), 117.27 (s), 42.57 (s), 40.06 (s), 21.04 (s).

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 385.0852 für C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 385.0936.

#### **Darstellung von *tert*-Butyl (*E*)-(4-((4-(dimethylamino)but-2-enamido)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamat (100c)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 197 mg (0.69 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-(aminomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamat (**91**) und 102 mg (0.75 mmol, 1.1 eq) (*E*)-4-(dimethylamino)2-butansäure umgesetzt. **100c** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 159 mg (0.39 mmol, 58 %) erhalten.

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 402.43 für C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 402.13.

#### **Darstellung von (*E*)-*N*-(4-Amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)-4-(dimethylamino)but-2-enamid (101c)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 117 mg (0.29 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (*E*)-(4-((4-(dimethylamino)but-2-enamido)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamat (**100c**) umgesetzt. **101c** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 56 mg (0.19 mmol, 64 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO)  $\delta$  8.28 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 7.12 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.87 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 6.75 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.58 (dt,  $J$  = 15.5, 6.1 Hz, 1H), 6.11 (d,  $J$  = 15.5 Hz, 1H), 5.48 (s,  $J$  = 12.6 Hz, 2H), 4.30 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 2H), 2.98 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 2H), 2.14 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO)  $\delta$  164.51 (s,  $J$  = 6.6 Hz), 147.99 (s), 139.67 (s), 130.80 (s), 126.95 (s), 125.72 (s), 123.85 (s), 122.65 (s), 116.79 (s), 110.29 (s), 59.76 (s), 45.07 (s), 40.02 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 302.31 für C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 302.02.

---

**Darstellung von (E)-N-(4-((4-(Dimethylamino)but-2-enamido)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-4-methylbenzamid (97c)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 14 mg (0.05 mmol, 1 eq) (E)-N-(4-amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)-4-(dimethylamino)but-2-enamid (**103c**) und 7.5 mg (0.06 mmol, 1.1 eq) 4-Methylbenzoesäure umgesetzt. **99c** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 6 mg (0.01 mmol, 29 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.46 (s, 1H), 8.82 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 8.23 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 8.06 (dd,  $J = 8.5, 1.5$  Hz, 1H), 7.90 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.48 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 6.64 (dt,  $J = 14.7, 7.2$  Hz, 1H), 6.36 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H), 4.50 (d,  $J = 5.4$  Hz, 2H), 3.90 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.78 (s, 6H), 2.39 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  165.60 (s), 163.59 (s), 142.05 (s), 138.63 (s), 131.56 (s), 131.42 (s), 131.34 (s), 130.66 (s), 130.04 (s), 129.33 (s), 129.13 (s), 129.01 (s), 127.74 (s), 123.61 (s), 117.36 (s), 56.80 (s), 42.02 (s), 40.06 (s), 21.03 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 420.45 für C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 420.19.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 420.1821 für C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 420.1892.

**Darstellung von N-(4-(Acrylamidomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-methylbenzamid (97d)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 25 mg (0.1 mmol, 1 eq) N-(4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-methylbenzamid (**101a**) und 15 mg (0.11 mmol, 1.1 eq) 3-Methylbenzoesäure umgesetzt. **97d** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 27 mg (0.07 mmol, 75 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO)  $\delta$  10.48 (s, 1H), 8.62 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 8.24 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 8.03 (dd,  $J = 8.5, 2.0$  Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.78 – 7.75 (m, 1H), 7.48 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.43 (dd,  $J = 4.1, 1.9$  Hz, 2H), 6.33 (dd,  $J = 17.1, 10.3$  Hz, 1H), 6.16 (dd,  $J = 17.1, 2.1$  Hz, 1H), 5.66 (dd,  $J = 10.2, 2.1$  Hz, 1H), 4.49 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 2.40 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO)  $\delta$  165.87 (s), 164.75 (s), 138.46 (s), 137.78 (s), 134.34 (s), 132.46 (s), 131.74 (s), 131.36 (s), 129.91 (s), 128.36 (s), 128.12 (s), 125.77 (s), 125.03 (s), 124.87 (s), 123.63 (s), 123.48 (s), 117.28 (s), 48.58 (s), 20.94 (s).

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 363.1242 für C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 363.1324.

---

**Darstellung von (*E*)-*N*-(4-((4-(Dimethylamino)but-2-enamido)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-methylbenzamid (**97e**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 14 mg (0.05 mmol, 1 eq) (*E*)-*N*-(4-amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)-4-(dimethylamino)but-2-enamid (**101c**) und 7.5 mg (0.06 mmol, 1.1 eq) 3-Methylbenzoesäure umgesetzt. **97e** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 1 mg (0.002 mmol, 5 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.50 (s, 1H), 8.82 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.06 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.77 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.49 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.43 (d,  $J = 4.9$  Hz, 2H), 6.68 – 6.61 (m, 1H), 6.36 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H), 4.50 (d,  $J = 5.3$  Hz, 2H), 3.90 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.78 (s, 6H), 2.41 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  165.90 (s), 163.58 (s), 138.57 (s), 137.81 (s), 134.31 (s), 133.45 (s), 132.49 (s), 131.49 (s), 130.04 (s), 129.71 (s), 128.44 (s), 128.39 (s), 128.11 (s), 126.43 (s), 124.87 (s), 123.58 (s), 117.36 (s), 56.79 (s), 42.05 (s), 40.06 (s), 20.96 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 420.45 für C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 420.10.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 420.1821 für C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 420.1891.

**Darstellung von *N*-(4-(Acrylamidomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)nikotinamid (**97f**)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 20 mg (0.08 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)acrylamid (**101a**) und 11 mg (0.11 mmol, 1.1 eq) Nikotinsäure umgesetzt. **97f** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 13 mg (0.04 mmol, 47 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO)  $\delta$  10.71 (s, 1H), 9.13 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 8.78 (dd,  $J = 4.8, 1.5$  Hz, 1H), 8.64 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 8.32 (dt,  $J = 7.9, 1.9$  Hz, 1H), 8.23 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 8.01 (dd,  $J = 8.5, 1.7$  Hz, 1H), 7.59 (dd,  $J = 7.9, 4.8$  Hz, 1H), 7.50 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 5.66 (dd,  $J = 10.2, 2.0$  Hz, 1H), 4.50 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO)  $\delta$  164.78 (s), 164.34 (s), 152.38 (s), 148.71 (s), 138.06 (s), 135.48 (s), 132.20 (s), 131.35 (s), 130.05 (s), 129.95 (s), 126.50 (s), 125.80 (s), 124.98 (s), 123.74 (s), 123.53 (s), 117.36 (s), 40.02 (s).

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 350.1038 für C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 350.1122.



---

**Darstellung von *N*-(4-((2-Chloroacetamido)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)nikotinamid (97g)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 20 mg (0.08 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)-2-chloroacetamid (**101b**) und 11 mg (0.09 mmol, 1.1 eq) Nikotinsäure umgesetzt. **97g** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 11 mg (0.03 mmol, 37 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO) δ 10.71 (s, 1H), 9.13 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.78 (dd, *J* = 4.8, 1.5 Hz, 1H), 8.77 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.32 (dt, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.18 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO) δ 166.27 (s), 164.36 (s), 152.40 (s), 148.71 (s), 138.14 (s), 135.48 (s), 131.73 (s), 130.05 (s), 129.69 (s), 126.44 (s), 124.95 (s), 123.66 (s), 123.53 (s), 117.34 (s), 42.55 (s), 40.02 (s).

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 372.0648 für C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 372.0735.

**Darstellung von *N*-(4-(Acrylamidomethyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-2,4-dimethylbenzamid (97h)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 99 mg (0.41 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)acrylamid (**101a**) und 68 mg (0.45 mmol, 1.1 eq) 2,4-dimethylbenzoesäure umgesetzt. **97h** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN und DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 19 mg (0.05 mmol, 12 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO) δ 10.51 (s, 1H), 8.62 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.14 – 7.10 (m, 2H), 6.32 (dd, *J* = 17.1, 10.2 Hz, 1H), 6.15 (dd, *J* = 17.1, 2.1 Hz, 1H), 5.65 (dd, *J* = 10.2, 2.1 Hz, 1H), 4.48 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO) δ 168.17 (s), 164.77 (s), 139.68 (s), 138.62 (s), 137.66 (s), 135.66 (s), 133.63 (s), 131.60 (s), 131.38 (s), 131.33 (s), 130.04 (s), 127.53 (s), 126.50 (s), 126.14 (s), 125.84 (s), 123.06 (s), 123.03 (s), 40.11 (s), 20.85 (s), 19.44 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 377.37 für C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 377.00.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 377.1399 für C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 377.1471.

---

**Darstellung von *N*-(4-((2-Chloroacetamido)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-2,4-dimethylbenzamid (97i)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 84 mg (0.32 mmol, 1 eq) *N*-(4-amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)-2-chloroacetamid (**101b**) und 53 mg (0.35 mmol, 1.1 eq) 2,4-dimethylbenzoesäure umgesetzt. **97i** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN und DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 17 mg (0.04 mmol, 13 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO)  $\delta$  10.51 (s, 1H), 8.76 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H), 8.22 (d,  $J$  = 1.4 Hz, 1H), 7.92 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.47 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.40 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.15 – 7.10 (m, 2H), 4.43 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H), 4.17 (s, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO)  $\delta$  168.19 (s), 166.27 (s), 139.69 (s), 138.67 (s), 135.67 (s), 133.63 (s), 131.34 (s), 131.14 (s), 129.73 (s), 127.53 (s), 126.44 (s), 126.15 (s), 123.15 (s), 122.96 (s), 116.60 (s), 42.59 (s), 40.11 (s), 20.85 (s), 19.43 (s).

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 399.1009 für C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 399.1081.

**Darstellung von (*E*)-*N*-(4-((4-(Dimethylamino)but-2-enamido)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-2,4-dimethylbenzamid (97j)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **H** wurden 14 mg (0.05 mmol, 1 eq) (*E*)-*N*-(4-amino-2-(trifluoromethyl)benzyl)-4-(dimethylamino)but-2-enamid (**101c**) und 8.3 mg (0.06 mmol, 1.1 eq) 2,4-dimethylbenzoesäure umgesetzt. **97j** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 4 mg (0.009 mmol, 18 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.50 (s, 1H), 8.69 (t,  $J$  = 5.3 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.93 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.73 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.40 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.08 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 6.63 (dt,  $J$  = 15.2, 6.8 Hz, 1H), 6.27 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H), 4.48 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 2H), 3.56 (s,  $J$  = 21.0 Hz, 2H), 2.54 (s,  $J$  = 13.2 Hz, 6H), 2.35 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  168.48 (s), 164.03 (s), 141.77 (s), 139.67 (s), 139.28 (s), 138.63 (s), 135.63 (s), 133.60 (s), 132.20 (s), 131.31 (s), 130.53 (s), 130.06 (s), 127.49 (s), 126.43 (s), 126.11 (s), 122.99 (s), 116.58 (s), 69.79 (s), 43.20 (s), 40.06 (s), 21.33 (s), 19.40 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 437.47 für C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 434.16.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 434.1977 für C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 434.2047.

---

### Darstellung von 1-(Bromomethyl)-4-nitro-2-(trifluoromethyl)benzol (**105**)

Zu einer Lösung aus 500 mg (2.4 mmol, 1 eq) 1-methyl-4-nitro-2-(trifluoromethyl)benzol (**105**) in DCE wurden NBS (2.4 mmol, 1 eq) und AIBN (0.24 mmol, 0.1 eq) gegeben und bei 80 °C für 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Reaktionsgemisch wurde anschließend in DCM aufgenommen und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **105** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (PE/EtOAc) mit einer Ausbeute von 127 mg (0.45 mmol, 19 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, DMSO)  $\delta$  8.54 (dd,  $J = 8.5, 2.2$  Hz, 1H), 8.43 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 8.05 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 4.89 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, DMSO)  $\delta$  147.14 (s), 143.09 (s), 135.04 (s), 127.93 (s), 127.76 (s), 121.65 (s,  $J = 4.5$  Hz), 121.62 (s), 27.48 (s).

### Darstellung von 1-Methyl-4-(4-nitro-2-(trifluoromethyl)benzyl)piperazin (**106**)

Zu einer Lösung aus 127 mg (0.45 mmol, 1 eq) in DCM wurden 1-Methylpiperazin (0.9 mmol, 2 eq) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.45 mmol, 1 eq) gegeben und für 4 h bei rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in DCM aufgenommen und mit H<sub>2</sub>O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **106** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 125 mg (0.41 mmol, 92 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.52 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 8.38 (dd,  $J = 8.5, 2.1$  Hz, 1H), 8.01 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 3.80 (s, 2H), 2.80 (s,  $J = 37.6$  Hz, 4H), 2.69 (s, 4H), 2.54 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  146.87 (s,  $J = 8.5$  Hz), 144.93 (s), 131.72 (s), 130.17 (s), 126.62 (s,  $J = 14.1$  Hz), 124.07 (s,  $J = 4.9$  Hz), 122.25 (s), 57.70 (d,  $J = 1.7$  Hz), 54.54 (s), 51.74 (s), 44.92 (s).

### Darstellung von 4-((4-Methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)anilin (**107**)

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **F** wurden 122 mg (0.4 mmol, 1 eq) 1-methyl-4-(4-nitro-2-(trifluoromethyl)benzyl)piperazin (**106**) umgesetzt. **107** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 87 mg (0.32 mmol, 80 %) erhalten.

---

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  7.27 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.86 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 6.75 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 5.48 (s, 2H), 3.43 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  148.04 (s), 131.98 (s), 125.61 (s), 123.78 (s), 122.04 (s), 116.82 (s), 110.36 (s), 57.10 (s), 53.61 (s), 50.79 (s), 43.77 (s).

### **Darstellung von *tert*-Butyl (2-((4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)phenyl)carbammat (108)**

Zu einer Lösung aus 93 mg (0.34 mmol, 1 eq) 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)benzoesäure in DMF wurden EDC $\cdot$ HCl (0.34 mmol, 1 eq), DIPEA (1.03 mmol, 3 eq), HOBt (0,34 mmol, 1 eq) und DMAP (0.24 mmol, 0.7 eq) gegeben und für 30 min bei rt gerührt. Anschließend wurden 94 mg (0.34 mmol, 1 eq) 4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)anilin (**107**) zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Luftstrom verdampft und das Reaktionsgemisch in DCM aufgenommen und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **108** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 163 mg (0.34 mmol, 96 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, MeOD)  $\delta$  8.07 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.97 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.74 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.35 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.93 (dd,  $J$  = 10.6, 4.6 Hz, 2H), 6.82 (dd,  $J$  = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 3.55 (s, 2H), 2.97 (s, 4H), 2.84 (s, 4H), 2.61 (s,  $J$  = 8.4 Hz, 3H), 1.48 (s, 9H).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 493.54 für C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 493.14.

### **Darstellung von 2-Amino-*N*-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (109)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 163 mg (0.34 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (2-((4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)phenyl)carbammat (**108**) umgesetzt. **109** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 36 mg (0.09 mmol, 27 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, MeOD)  $\delta$  8.10 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.89 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H), 7.76 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.63 (dd,  $J$  = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 7.26 (ddd,  $J$  = 8.5, 7.2, 1.5 Hz, 1H), 6.81 (dd,  $J$  = 8.2, 0.8 Hz, 1H), 6.72 – 6.69 (m, 1H), 3.68 (s, 2H), 2.56 (s,  $J$  = 92.3 Hz, 8H), 2.34 (s, 3H).

---

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, MeOD)  $\delta$  170.50 (s), 150.95 (s), 139.58 (s), 133.68 (s), 133.49 (s), 132.49 (s), 130.14 (s), 129.96 (s), 129.37 (s), 126.60 (s), 125.08 (s), 119.24 (s), 118.20 (s), 117.25 (s), 58.93 (s), 55.99 (s), 53.64 (s), 45.93 (s).

**Darstellung von 2-Acrylamido-*N*-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (102)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 18 mg (0.05 mmol, 1 eq) 2-amino-*N*-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (**109**) und 4  $\mu$ L Acryloylchlorid (0.05 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **102** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 3 mg (0.007 mmol, 13 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, MeOD)  $\delta$  8.32 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 8.11 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 7.93 (dd,  $J$  = 8.4, 1.4 Hz, 1H), 7.85 (dd,  $J$  = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.79 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.59 (ddd,  $J$  = 8.5, 5.9, 1.5 Hz, 1H), 7.30 (td,  $J$  = 7.7, 1.1 Hz, 1H), 6.41 (dd,  $J$  = 17.0, 9.9 Hz, 1H), 6.36 (dd,  $J$  = 17.0, 1.6 Hz, 1H), 5.83 (dd,  $J$  = 9.9, 1.6 Hz, 1H), 3.71 (s, 2H), 2.76 (s,  $J$  = 51.8 Hz, 4H), 2.62 (s, 4H), 2.48 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, MeOD)  $\delta$  169.57 (s), 166.10 (s), 139.16 (s), 133.96 (s), 133.37 (s), 132.98 (s), 132.62 (s), 130.25 (s), 130.07 (s), 129.51 (s), 128.10 (s), 127.09 (s), 126.51 (s), 125.30 (s), 124.95 (s), 123.52 (s), 119.47 (s), 58.73 (s), 55.74 (s), 52.98 (s), 45.31 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 447.47 für C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 447.15.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 447.1930 für C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 447.1999.

**Darstellung von 2-(2-Chloroacetamid)-*N*-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (103)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 18 mg (0.05 mmol, 1 eq) 2-amino-*N*-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (**109**) und 4  $\mu$ L 2-Chloroacetylchlorid (0.05 mmol, 1.1 eq) umgesetzt. **103** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 4 mg (0.008 mmol, 15 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, MeOD)  $\delta$  8.36 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 8.10 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.95 (dd,  $J$  = 8.4, 1.9 Hz, 1H), 7.86 (dd,  $J$  = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.80 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.61 – 7.58 (m, 1H), 7.32 (ddd,  $J$  = 8.7, 5.2, 1.1 Hz, 1H), 4.29 (s, 2H), 3.70 (s, 2H), 2.60 (s,  $J$  = 67.9 Hz, 8H), 2.41 (s, 3H).

---

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, MeOD)  $\delta$  169.28 (s), 167.39 (s), 139.03 (s), 138.71 (s), 134.18 (s), 133.39 (s), 132.64 (s), 130.25 (s), 130.08 (s), 129.44 (s), 125.47 (s), 125.31 (s), 125.07 (s), 123.12 (s), 119.42 (s), 58.82 (s), 55.87 (s), 53.32 (s), 45.63 (s), 43.92 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 469.90 für C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 469.09.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 469.1540 für C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 469.1609.

**Darstellung von *tert*-Butyl (4-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)benzamido)-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (111)**

Zu einer Lösung aus 95 mg (0.35 mmol, 1 eq) 2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)benzoesäure in DMF wurden EDC·HCl (0.35 mmol, 1 eq), DIPEA (1.05 mmol, 3 eq), HOBt (0.35 mmol, 1 eq) und DMAP (0.25 mmol, 0.7 eq) gegeben und für 30 min bei rt gerührt. Anschließend wurden 97 mg (0.35 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-amino-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (**82**) zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Luftstrom verdampft und das Reaktionsgemisch in DCM aufgenommen und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **111** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (C18 mit H<sub>2</sub>O/MeCN) mit einer Ausbeute von 92 mg (0.19 mmol, 53 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10.64 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.95 – 7.91 (m, 1H), 7.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.53 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 8.6, 5.0 Hz, 1H), 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 1.44 (s, *J* = 3.6 Hz, 9H), 1.43 – 1.42 (m, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, DMSO)  $\delta$  167.35 (s), 152.28 (s), 138.67 (s), 136.91 (s), 132.24 (s), 131.22 (s), 130.74 (s), 128.88 (s), 124.55 (s), 124.44 (s), 124.34 (s), 122.54 (s), 122.07 (s), 119.94 (d, *J* = 5.7 Hz), 118.04 (s), 79.03 (s), 27.93 (s).

**Darstellung von 2-Amino-*N*-(4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (112)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **A** wurden 92 mg (0.19 mmol, 1 eq) *tert*-butyl (4-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)benzamido)-2-(trifluoromethyl)phenyl)carbammat (**111**) umgesetzt. **112** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 11 mg (0.04 mmol, 20 %) erhalten.

---

**<sup>1</sup>H NMR** (700 MHz, MeOD)  $\delta$  7.72 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 7.59 (dd,  $J$  = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 7.53 (dd,  $J$  = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.24 (ddd,  $J$  = 8.5, 7.2, 1.5 Hz, 1H), 6.87 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 6.80 (dd,  $J$  = 8.2, 0.9 Hz, 1H), 6.71 – 6.68 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (176 MHz, MeOD)  $\delta$  170.42 (s), 150.55 (s), 144.10 (s), 133.35 (s), 129.47 (s), 129.25 (s), 128.29 (s), 127.16 (s), 125.62 (s), 120.96 (s), 118.55 (s), 118.18 (s), 117.80 (s), 117.38 (s).

### **Darstellung von 2-Acrylamid-*N*-(4-acrylamid-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (110)**

Entsprechend der allgemeinen Synthesevorschrift **B** wurden 11 mg (0.04 mmol, 1 eq) 2-amino-*N*-(4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamid (**112**) und 6.5  $\mu$ L Acryloylchlorid (0.08 mmol, 2.2 eq) umgesetzt. **110** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH) mit einer Ausbeute von 2 mg (0.005 mmol, 12 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO)  $\delta$  10.72 (s, 1H), 10.48 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 8.20 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 8.09 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.94 (dd,  $J$  = 8.6, 1.8 Hz, 1H), 7.79 – 7.75 (m, 1H), 7.59 – 7.54 (m, 1H), 7.49 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 6.52 (dd,  $J$  = 16.9, 10.3 Hz, 1H), 6.44 (dd,  $J$  = 17.0, 10.2 Hz, 1H), 6.23 (ddd,  $J$  = 17.0, 10.0, 1.7 Hz, 2H), 5.76 (ddd,  $J$  = 10.2, 6.6, 1.5 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO)  $\delta$  166.98 (s), 163.29 (s), 139.22 (s), 137.01 (s), 132.11 (s), 131.71 (s), 131.15 (s), 131.12 (s), 130.95 (s), 130.27 (s), 128.83 (s), 127.25 (s), 125.69 (s), 124.28 (s), 123.85 (s), 122.59 (s), 117.84 (s).

**LC-MS (ESI-MS):** Berechnet: 404.36 für C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 403.36.

**HRMS (ESI-MS):** Berechnet: 404.1144 für C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>. Gefunden 404.1216.

---

## 7.2 Mikrosomaler Stabilitätsassay Phase-I (CL<sub>int</sub>)

Die metabolische Stabilität unter oxidativen Bedingungen wurde in Lebermikrosomen verschiedener Spezies gemessen. Der Abbau der Parentalverbindung wurde bei einer Konzentration von 3 µM über einen Zeitraum von 60 min bei 37 °C mittels LCMS-basierter Methode verfolgt. Basierend auf der Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) der Verbindungen wurde die intrinsische *Clearance in vitro* bestimmt (CL<sub>int</sub>).

Für die Probenvorbereitung wurden zunächst 10 mM Inhibitor-Lösungen auf 6 µM verdünnt. NADPH Regenerating System Solution A (Katalognummer: 451220) und NADPH Regenerating System Solution B (Katalognummer: 451200) wurden von der Firma Corning verwendet. Zur Herstellung vom Reaktionsmix (R+) wurden 424 µL KPO<sub>4</sub> (pH 7.4, 500 mM), 296.8 µL ddH<sub>2</sub>O, 106 µL NADPH Regenerating System Solution A und 21.2 µL NADPH Regenerating System Solution B vereinigt. Humane Lebermikrosomen (50-Donor Pool, Katalognummer:452156, LOT: 17358) und murine Lebermikrosomen (pooled male mouse liver microsomes (CD-1), Katalognummer:452701, LOT: 2215859) wurden von der Firma BD Biosciences – Discovery Labware bezogen. MLM wurden auf 5 mg/mL verdünnt mit KPO<sub>4</sub> (pH 7.4, 50 mM) und HLM wurden auf 1.5 mg/mL mit KPO<sub>4</sub> (pH 7.4, 50 mM) verdünnt. Für die Kontrollproben bei  $t_0$  und  $t_{60}$  wurden 40 µL R+ und 50 µL 0.4 % DMSO mit 10 µL Mikrosomen bei 37 °C inkubiert. Für die Kontrollproben ohne NADPH (Ref-, 1-, 2-, 3-, 4- und 5-) wurden 15 µL der 6 µM Inhibitor-Lösung und 12 µL KPO<sub>4</sub> (pH 7.4, 250 mM) mit 3 µL Mikrosomen bei 37 °C inkubiert. Die Inhibitor-Proben wurden in Duplikaten vermessen und dazu wurden 52 µL R+ und 65 µL der 6 µM Inhibitor-Lösungen mit 13 µL Mikrosomen bei 37 °C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 15, 30, 45 und 60 min wurden 20 µL aus allen Proben entnommen und die Enzymreaktion wurde mit 40 µL MeCN auf Eis gestoppt. Anschließend wurden die Proben gefiltert und 33.3 µL des Durchflusses wurden mit 100 µL ddH<sub>2</sub>O verdünnt (auf eine finale Konzentration von 250 mM) und auf Analytikplatten der Firma Greiner Bio-One (Microplatte, 96 Well, PP, U-Boden, Natur, Bestellnummer: 650201) vermessen.

Die verwendeten Geräte sind Eigentum vom Lead Discovery Center in Dortmund. Gemessen wurde an einer HPLC der Firma Shimadzu (Modell: SIL30AC MP mit einer C18 Säule (Eclipse Plus 1.8 µm 2.1 x 50 mm)). Die massenspektroskopische Analyse erfolgte mit einem AB Sciex QTrap 5500 Massenspektrometer. Die Auswertung erfolgte mit der Software Analyst.



---

### 7.3 Protein-Massenspektrometrie

Für die MS-Experimente wurden EGFR-T790M/V948R und Her2-wt (1 mg/mL) verwendet. Die Proteine wurden mit einem dreifachen Inhibitorüberschuss für 1 h auf Eis inkubiert (Puffer: 100 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, 10% glycerol und 1 mM TCEP, pH 8.0). Proteinmassen-Spektren wurden an einem Thermo Fisher Scientific Dionex UltiMate 3000 HPLC System, verbunden mit einem Thermo Fisher Scientific Velos Pro Ionenfallen-Massenspektrometer, aufgenommen (AdvanceBio Desalting-RP Kartusche der Firma Agilent; mobile Phase 0.1 % Ameisensäure in Wasser und 0.1 % Ameisensäure in Acetonitril). Die Auswertung erfolgte über die Software Xcalibur (Thermo Scientific, Version 2.2), sowie die Rohdaten mittels MagTran (Version 1.02) dekonvolviert und analysiert wurden (Z.Q. Zhang, A.G. Marshall, *J. Am. Soc. Mass. Spectr.* **1998**, 9, 225-233).

### 7.4 Tryptischer In-Gel Verdau

Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu den in **6.3** geschilderten Massenexperimenten. Das Gel für die SDS-PAGE wurde mit einer Mischung aus 1.3 µL Protein, 7.7 µL H<sub>2</sub>O sowie 3 µL Probenpuffer beladen, anschließend angefärbt (10 % Essigsäure, 40 % H<sub>2</sub>O, 50 % EtOH, 500 mg Coomassie Brilliant Blau R-250 und 500 mg Coomassie Brilliant Blau G-250) und über Nacht entfärbt (10 % Essigsäure, 60 % H<sub>2</sub>O und 30 % EtOH). Die Proteinbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein bis zwei Millimeter große Stücke zerkleinert. Für den weiteren Verlauf wurden verschiedene Lösungen vorbereitet:

- Waschlösung 1: 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/MeCN (3:1)
- Waschlösung 2: 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/MeCN (1:1)
- Reduktionslösung: 50 mM DTT in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung
- Alkylierungslösung: 55 mM Iodacetamid in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung
- Verdauungslösung (0.01 µg/µL): 10 µL 0.1 mg/mL Trypsinlösung in 10 mM HCL mit 90 µL NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung mischen.

Waschvorgang: Die Gelstücke wurden mit 200 µL Waschlösung 1 für 30 min bei 37 °C geschüttelt, danach wurde diese wieder entfernt und die Gelstücke für 15 min bei 37 °C mit Waschlösung 2 versetzt.

Reduktions- und Alkylierungsvorgang: Im Anschluss an den Waschvorgang wurde die Waschlösung durch 100 µL Reduktionslösung ersetzt und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Reduktionslösung durch Alkylierungslösung ausgetauscht und für 1 h bei rt im Dunkeln stehen gelassen.

Trocknung des Gels: Die Alkylierungslösung wurde entfernt und zweimal für 15 min mit Waschlösung 2 bei rt gewaschen. Zur Trocknung wurde die Waschlösung entfernt und die

---

Probe für 10 min mit MeCN dehydrieren. Das MeCN wurde wieder entfernt und die Gelstücke in einem Vakuumkonzentrator getrocknet.

Tryptischer Verdau: Hierzu wurden 10  $\mu\text{L}$  Verdaulösung zu den Gelstücken gegeben und nach 15 min 20  $\mu\text{L}$  25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung zugegeben und bei 30 °C über Nacht geschüttelt.

Vorbereitung für MS: Die Gelstücke wurden mit 3.5  $\mu\text{L}$  10 %iger Trifluoressigsäure versetzt und für 30 min in einem Ultraschallbad bei 0 °C behandelt. Anschließend wurde die Flüssigkeitsmenge entnommen, mit MeCN gewaschen und im Vakuumkonzentrator zur Trocknung gebracht.

Die weitere Probenaufbereitung, Messung sowie Auswertung wurde von Frau Dr. Petra Janning und Malte Metz durchgeführt. Tandem-Massenspektren wurden mit einer Q-Exactive HF sowie einer Q-Exactive Plus von Thermo Scientific aufgenommen (HPLC: Ultimate 2000 nanoHPLC; Säule: Acclaim PepMap RSLC 75 mm \* 500mm, 100A, 2  $\mu\text{m}$ ).

## 7.5 Kinase-Profilierung

Die ausgewählte Verbindung **24** wurde in einem Kinase Selektivitätsassay von der Firma ProQinase bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  gegen ein Set von 320 Kinasen profiliert.

---

## 8 Literaturverzeichnis

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **2018**, *68* (6), 394-424.
2. Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A., Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* **2019**, *69* (1), 7-34.
3. Hariton, E.; Locascio, J. J., Randomised controlled trials - the gold standard for effectiveness research: Study design: randomised controlled trials. *BJOG* **2018**, *125* (13), 1716.
4. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Menzel, S.; Ruth, P., Mutschler Arzneimittelwirkungen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft* **2020**, *11*, 1-1295.
5. Kola, I.; Landis, J., Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 711-715.
6. Mullard, A., 2018 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* **2019**, *18* (2), 85-89.
7. Harrison, R. K., Phase II and phase III failures: 2013-2015. *Nat Rev Drug Discov* **2016**, *15* (12), 817-818.
8. Cook, D.; Brown, D.; Alexander, R.; March, R.; Morgan, P.; Satterthwaite, G.; Pangalos, M. N., Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat Rev Drug Discov* **2014**, *13* (6), 419-431.
9. Ruiz-Garcia, A.; Bermejo, M.; Moss, A.; Casabo, V. G., Pharmacokinetics in drug discovery. *J Pharm Sci* **2008**, *97* (2), 654-690.
10. Doogue, M. P.; Polasek, T. M., The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Ther Adv Drug Saf* **2013**, *4* (1), 5-7.
11. Nelson, E., Kinetics of drug absorption, distribution, metabolism, and excretion. *J Pharm Sci* **1961**, *50* (3), 181-192.
12. Lalka, D.; Griffith, R. K.; Cronenberger, C. L., The hepatic first-pass metabolism of problematic drugs. *J Clin Pharmacol* **1993**, *33* (7), 657-669.
13. Pond, S. M.; Tozer, T. N., First-pass elimination. Basic concepts and clinical consequences. *Clin Pharmacokinet* **1984**, *9* (1), 1-25.
14. Thiel, H.; Roewer, N., Anästhesiologische Pharmakotherapie. In *Anästhesiologische Pharmakotherapie*, 3., überarbeitete Auflage Thiemeverlagsgruppe: Stuttgart, **2014**.
15. Lucas, A. J.; Sproston, J. L.; Barton, P.; Riley, R. J., Estimating human ADME properties, pharmacokinetic parameters and likely clinical dose in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **2019**, *14* (12), 1313-1327.
16. Di, L.; Feng, B.; Goosen, T. C.; Lai, Y.; Steyn, S. J.; Varma, M. V.; Obach, R. S., A perspective on the prediction of drug pharmacokinetics and disposition in drug research and development. *Drug Metab Dispos* **2013**, *41* (12), 1975-1993.
17. Kerns, E.; Di, L., Automation in Pharmaceutical Profiling. *Journal of the Association for Laboratory Automation* **2005**, *10* (2), 114-123.
18. Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K., Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem* **1998**, *41* (7), 1007-1010.
19. Kerns, E. H., High Throughput Physicochemical Profiling for Drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical Science* **2001**, *90* (10), 1838-1858.
20. Zhu, C.; Jiang, L.; Chen, T. M.; Hwang, K. K., A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur J Med Chem* **2002**, *37* (5), 399-407.
21. Wang, Z.; Hop, C. E. C. A.; Leung, K. H.; Pang, J., Determination of in vitro permeability of drug candidates through a Caco-2 cell monolayer by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **2000**, *35* (1), 71-76.
22. Wohnsland, F.; Faller, B., High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J Med Chem* **2001**, *44* (6), 923-930.

- 
23. Pastan, I.; Gottesman, M. M.; Ueda, K.; Lovelace, E.; Rutherford, A. V.; Willingham, M. C., A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **1988**, *85*, 4486-4490.
  24. Wang, Q.; Rager, J. D.; Weinstein, K.; Kardos, P. S.; Dobson, G. L.; Li, J.; Hidalgo, I. J., Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Int J Pharm* **2005**, *288* (2), 349-359.
  25. Lundquist, S.; Renftel, M.; Brillault, J.; Fenart, L.; Cecchelli, R.; Dehouck, M. P., Prediction of Drug Transport through the Blood-Brain Barrier in Vivo: A Comparison between Two in Vitro Cell Models. *Pharm Res* **2002**, *19* (7), 976-981.
  26. Alsenz, J.; Kansy, M., High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv Drug Deliv Rev* **2007**, *59* (7), 546-567.
  27. Serajuddin, A. T. M., Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Deliv Rev* **2007**, *59* (7), 603-616.
  28. Makary, P., Principles of salt formation. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences* **2014**, *2* (4), 1-4.
  29. Di, L.; Kerns, E. H.; Hong, Y.; Chen, H., Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery. *Int J Pharm* **2005**, *297* (1-2), 110-119.
  30. Baranczewski, P.; Stanczak, A.; Sundberg, K.; Svensson, R.; Wallin, A.; Jansson, J.; Garberg, P.; Postlind, H., Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol Rep* **2006**, *58* (4), 453-472.
  31. Evans, W. E.; Relling, M. V., Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* **1999**, *286* (5439), 487-491.
  32. Rendic, S.; Di Carlo, F. J., Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* **1997**, *29* (1&2), 413-580.
  33. Riley, R. J.; McGinnity, D. F.; Austin, R. P., A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from in vitro intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. *Drug Metab Dispos* **2005**, *33* (9), 1304-1311.
  34. Plant, N., Strategies for using in vitro screens in drug metabolism. *Drug Discovery Today* **2004**, *9* (7), 328-336.
  35. Houston, J. B., Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochem Pharmacol* **1994**, *47* (9), 1469-1479.
  36. Rabiller, M.; Getlik, M.; Klüter, S.; Richters, A.; Tückmantel, S.; Simard, J. R.; Rauh, D., Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases. *Arch Pharm (Weinheim)* **2010**, *343* (4), 193-206.
  37. Huse, M.; Kuriyan, J., The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell* **2002**, *109* (3), 275-282.
  38. Cohen, M. H.; Williams, G.; Johnson, J. R.; Duan, J.; Gobburu, J.; Rahman, A.; Benson, K.; Leighton, J.; Kim, S. K.; Wood, R.; Rothmann, M.; Chen, G.; U, K. M.; Staten, A. M.; Pazdur, R., Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* **2002**, *8* (5), 935-942.
  39. Klug, L. R.; Kent, J. D.; Heinrich, M. C., Structural and clinical consequences of activation loop mutations in class III receptor tyrosine kinases. *Pharmacol Ther* **2018**, *191*, 123-134.
  40. Gajiwala, K. S.; Wu, J. C.; Christensen, J.; Deshmukh, G. D.; Diehl, W.; DiNitto, J. P.; English, J. M.; Greig, M. J.; He, Y. A.; Jacques, S. L.; Lunney, E. A.; McTigue, M.; Molina, D.; Quenzer, T.; Wells, P. A.; Yu, X.; Zhang, Y.; Zou, A.; Emmett, M. R.; Marshall, A. G.; Zhang, H. M.; Demetri, G. D., KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **2009**, *106* (5), 1542-1547.
  41. Niggenaber, J.; Hardick, J.; Lategahn, J.; Rauh, D., Structure Defines Function: Clinically Relevant Mutations in ErbB Kinases. *J Med Chem* **2020**, *63* (1), 40-51.

- 
42. Dibb, N. J.; Dilworth, S. M.; Mol, C. D., Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4* (9), 718-727.
  43. Engel, J.; Smith, S.; Lategahn, J.; Tumbrink, H. L.; Goebel, L.; Becker, C.; Hennes, E.; Keul, M.; Unger, A.; Müller, H.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Günther, G.; Hengstler, J. G.; Rauh, D., Structure-Guided Development of Covalent and Mutant-Selective Pyrazolopyrimidines to Target T790M Drug Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor. *J Med Chem* **2017**, *60* (18), 7725-7744.
  44. Pao, W.; Girard, N., Clinical Applications of Kinase Inhibitors in Solid Tumors. *Handbook of Cell Signaling, 2/e* **2010**, *2*, 615-631.
  45. Azam, M.; Seeliger, M. A.; Gray, N. S.; Kuriyan, J.; Daley, G. Q., Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine. *Nat Struct Mol Biol* **2008**, *15* (10), 1109-1118.
  46. Backes, A.; Zech, B.; Felber, B.; Klebl, B.; Müller, G., Small-molecule inhibitors binding to protein kinase. Part II: the novel pharmacophore approach of type II and type III inhibition. *Expert Opin Drug Discov* **2008**, *3* (12), 1427-1449.
  47. Getlik, M.; Grütter, C.; Simard, J. R.; Klüter, S.; Rabiller, M.; Rode, H. B.; Robubi, A.; Rauh, D., Hybrid compound design to overcome the gatekeeper T338M mutation in cSrc. *J Med Chem* **2009**, *52* (13), 3915-3926.
  48. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S., The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, *298* (5600), 1912-1934.
  49. Duong-Ly, K. C.; Peterson, J. R., The human kinome and kinase inhibition. *Curr Protoc Pharmacol* **2013**, *Chapter 2*, Unit2.9, 1-21.
  50. Dungo, R. T.; Keating, G. M., Afatinib: first global approval. *Drugs* **2013**, *73* (13), 1503-1515.
  51. Li, D.; Ambrogio, L.; Shimamura, T.; Kubo, S.; Takahashi, M.; Chirieac, L. R.; Padera, R. F.; Shapiro, G. I.; Baum, A.; Himmelsbach, F.; Rettig, W. J.; Meyerson, M.; Solca, F.; Greulich, H.; Wong, K. K., BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* **2008**, *27* (34), 4702-4711.
  52. Cross, D. A. E.; Ashton, S. E.; Ghiorghiu, S.; Eberlein, C.; Nebhan, C. A.; Spitzler, P. J.; Orme, J. P.; Finlay, M. R.; Ward, R. A.; Mellor, M. J.; Hughes, G.; Rahi, A.; Jacobs, V. N.; Red Brewer, M.; Ichihara, E.; Sun, J.; Jin, H.; Ballard, P.; Al-Kadhimi, K.; Rowlinson, R.; Klinowska, T.; Richmond, G. H. P.; Cantarini, M.; Kim, D. W.; Ranson, M. R.; Pao, W., AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* **2014**, *4* (9), 1046-1061.
  53. Jänne, P. A.; Yang, J. C. H.; Kim, D. W.; Planchard, D.; Ohe, Y.; Ramalingam, S. S.; Ahn, M. J.; Kim, S. W.; Su, W. C.; Horn, L.; Haggstrom, D.; Felip, E.; Kim, J. H.; Frewer, P.; Cantarini, M.; Brown, K. H.; Dickinson, P. A.; Ghiorghiu, S.; Ranson, M., AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **2015**, *372* (18), 1689-1699.
  54. Byrd, J. C.; Furman, R. R.; Coutre, S. E.; Flinn, I. W.; Burger, J. A.; Blum, K. A.; Grant, B.; Sharman, J. P.; Coleman, M.; Wierda, W. G.; Jones, J. A.; Zhao, W.; Heerema, N. A.; Johnson, A. J.; Sukbuntherng, J.; Chang, B. Y.; Clow, F.; Hedrick, E.; Buggy, J. J.; James, D. F.; O'Brien, S., Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **2013**, *369* (1), 32-42.
  55. Pan, Z.; Scheerens, H.; Li, S. J.; Schultz, B. E.; Sprengeler, P. A.; Burrill, L. C.; Mendonca, R. V.; Sweeney, M. D.; Scott, K. C. K.; Grothaus, P. G.; Jeffery, D. A.; Spoerke, J. M.; Honigberg, L. A.; Young, P. R.; Dalrymple, S. A.; Palmer, J. T., Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem* **2007**, *2* (1), 58-61.
  56. Shraga, A.; Olshvang, E.; Davidzohn, N.; Khoshkenar, P.; Germain, N.; Shurrush, K.; Carvalho, S.; Avram, L.; Albeck, S.; Unger, T.; Lefker, B.; Subramanyam, C.; Hudkins, R. L.; Mitchell, A.; Shulman, Z.; Kinoshita, T.; London, N., Covalent Docking Identifies a Potent and Selective MKK7 Inhibitor. *Cell Chem Biol* **2019**, *26* (1), 1-11.

- 
57. Haeusgen, W.; Herdegen, T.; Waetzig, V., The bottleneck of JNK signaling: molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7. *Eur J Cell Biol* **2011**, *90* (6-7), 536-544.
  58. Bubici, C.; Papa, S., JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *Br J Pharmacol* **2014**, *171* (1), 24-37.
  59. Wolle, P.; Hardick, J.; Cronin, S. J. F.; Engel, J.; Baumann, M.; Lategahn, J.; Penninger, J. M.; Rauh, D., Targeting the MKK7-JNK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7-c-Jun N-Terminal Kinase) Pathway with Covalent Inhibitors. *J Med Chem* **2019**, *62* (5), 2843-2848.
  60. Tournier, C.; Dong, C.; Turner, T. K.; Jones, S. N.; Flavell, R. A.; Davis, R. J., MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* **2001**, *15* (11), 1419-1426.
  61. Kishimoto, H.; Nakagawa, K.; Watanabe, T.; Kitagawa, D.; Momose, H.; Seo, J.; Nishitai, G.; Shimizu, N.; Ohata, S.; Tanemura, S.; Asaka, S.; Goto, T.; Fukushi, H.; Yoshida, H.; Suzuki, A.; Sasaki, T.; Wada, T.; Penninger, J. M.; Nishina, H.; Katada, T., Different properties of SEK1 and MKK7 in dual phosphorylation of stress-induced activated protein kinase SAPK/JNK in embryonic stem cells. *J Biol Chem* **2003**, *278* (19), 16595-16601.
  62. Sabapathy, K., Role of the JNK pathway in human diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* **2012**, *106*, 145-169.
  63. Bogoyevitch, M. A.; Kobe, B., Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **2006**, *70* (4), 1061-1095.
  64. Davies, C.; Tournier, C., Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochem Soc Trans* **2012**, *40* (1), 85-89.
  65. Wang, W.; Shi, L.; Xie, Y.; Ma, C.; Li, W.; Su, X.; Huang, S.; Chen, R.; Zhu, Z.; Mao, Z.; Han, Y.; Li, M., SP600125, a new JNK inhibitor, protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* **2004**, *48* (2), 195-202.
  66. Bennett, B. L.; Sasaki, D. T.; Murray, B. W.; O'Leary, E. C.; Sakata, S. T.; Xu, W.; Leisten, J. C.; Motiwala, A.; Pierce, S.; Satoh, Y.; Bhagwat, S. S.; Manning, A. M.; Anderson, D. W., SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, *98* (24), 13681-13686.
  67. Gaillard, P.; Jeanclaude-Etter, I.; Ardisson, V.; Arkinstall, S.; Cambet, Y.; Camps, M.; Chabert, C.; Church, D.; Cirillo, R.; Gretener, D.; Halazy, S.; Nichols, A.; Szyndralewicz, C.; Vitte, P. A.; Gotteland, J. P., Design and synthesis of the first generation of novel potent, selective, and in vivo active (benzothiazol-2-yl)acetonitrile inhibitors of the c-Jun N-terminal kinase. *J Med Chem* **2005**, *48* (14), 4596-4607.
  68. Sogabe, Y.; Matsumoto, T.; Hashimoto, T.; Kirii, Y.; Sawa, M.; Kinoshita, T., 5Z-7-Oxozeaenol covalently binds to MAP2K7 at Cys218 in an unprecedented manner. *Bioorg Med Chem Lett* **2015**, *25* (3), 593-596.
  69. Tachibana, H.; Perrino, C.; Takaoka, H.; Davis, R. J.; Naga Prasad, S. V.; Rockman, H. A., JNK1 is required to preserve cardiac function in the early response to pressure overload. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, *343* (4), 1060-1066.
  70. Kaiser, R. A.; Liang, Q.; Bueno, O.; Huang, Y.; Lackey, T.; Klevitsky, R.; Hewett, T. E.; Molkentin, J. D., Genetic inhibition or activation of JNK1/2 protects the myocardium from ischemia-reperfusion-induced cell death in vivo. *J Biol Chem* **2005**, *280* (38), 32602-32608.
  71. Shvedova, M.; Anfinogenova, Y.; Atochina-Vasserman, E. N.; Schepetkin, I. A.; Atochin, D. N., c-Jun N-Terminal Kinases (JNKs) in Myocardial and Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, Article 715.
  72. Vogenberg, F. R.; Isaacson Barash, C.; Pursel, M., Personalized medicine: Part 1: Evolution and development into theranostics. *Pharm Ther* **2010**, *35*, 560-567.
  73. MacConaill, L. E.; Garraway, L. A., Clinical implications of the cancer genome. *J Clin Oncol* **2010**, *28* (35), 5219-5228.

- 
74. Ginsburg, G. S.; Phillips, K. A., Precision Medicine: From Science To Value. *Health Aff (Millwood)* **2018**, *37* (5), 694-701.
  75. Kent, A., Risk and Benefit in Personalised Medicine: An End User View. *New Bioeth* **2017**, *23* (1), 49-54.
  76. Kalia, M., Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism* **2015**, *64* (3 Suppl 1), S16-S21.
  77. Redekop, W. K.; Mladsı, D., The faces of personalized medicine: a framework for understanding its meaning and scope. *Value Health* **2013**, *16* (6 Suppl), S4-S9.
  78. Nalejska, E.; Maczynska, E.; Lewandowska, M. A., Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology. *Mol Diagn Ther* **2014**, *18* (3), 273-284.
  79. Hubner, A.; Jaeschke, A.; Davis, R. J., Oncogene addiction: role of signal attenuation. *Dev Cell* **2006**, *11* (6), 752-754.
  80. Ishikawa, T.; Seto, M.; Banno, H.; Kawakita, Y.; Oorui, M.; Taniguchi, T.; Ohta, Y.; Tamura, T.; Nakayama, A.; Miki, H.; Kamiguchi, H.; Tanaka, T.; Habuka, N.; Sogabe, S.; Yano, J.; Aertgeerts, K.; Kamiyama, K., Design and synthesis of novel human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)/epidermal growth factor receptor (EGFR) dual inhibitors bearing a pyrrolo[3,2-d]pyrimidine scaffold. *J Med Chem* **2011**, *54* (23), 8030-8050.
  81. Weinstein, I. B., Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer. *Science* **2002**, *297* (5578), 63-64.
  82. Weinstein, I. B.; Joe, A., Oncogene addiction. *Cancer Res* **2008**, *68* (9), 3077-3080.
  83. Torti, D.; Trusolino, L., Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils. *EMBO Mol Med* **2011**, *3* (11), 623-636.
  84. Sharma, S. V.; Fischbach, M. A.; Haber, D. A.; Settleman, J., "Oncogenic shock": explaining oncogene addiction through differential signal attenuation. *Clin Cancer Res* **2006**, *12* (14 Suppl), 4392s-4395s.
  85. Lategahn, J.; Keul, M.; Klövekorn, P.; Tumbrink, H. L.; Niggenaber, J.; Müller, M. P.; Hodson, L.; Flaßhoff, M.; Hardick, J.; Grabe, T.; Engel, J.; Schultz-Fademrecht, C.; Baumann, M.; Ketzer, J.; Mühlenberg, T.; Hiller, W.; Günther, G.; Unger, A.; Müller, H.; Heimsoeth, A.; Golz, C.; Blank-Landeshammer, B.; Kollipara, L.; Zahedi, R. P.; Strohmann, C.; Hengstler, J. G.; van Otterlo, W. A. L.; Bauer, S.; Rauh, D., Inhibition of osimertinib-resistant epidermal growth factor receptor EGFR-T790M/C797S. *Chem Sci* **2019**, *10* (46), 10789-10801.
  86. Maemondo, M.; Inoue, A.; Kobayashi, K.; Sugawara, S.; Oizumi, S.; Isobe, H.; Gemma, A.; Harada, M.; Yoshizawa, H.; Kinoshita, I.; Fujita, Y.; Okinaga, S.; Hirano, H.; Yoshimori, K.; Harada, T.; Ogura, T.; Ando, M.; Miyazawa, H.; Tanaka, T.; Saijo, Y.; Hagiwara, K.; Morita, S.; Nukiwa, T.; North-East Japan Study, G., Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* **2010**, *362* (25), 2380-2388.
  87. Rosell, R.; Carcereny, E.; Gervais, R.; Vergnenegre, A.; Massuti, B.; Felip, E.; Palmero, R.; Garcia-Gomez, R.; Pallares, C.; Sanchez, J. M.; Porta, R.; Cobo, M.; Garrido, P.; Longo, F.; Moran, T.; Insa, A.; De Marinis, F.; Corre, R.; Bover, I.; Illiano, A.; Dansin, E.; de Castro, J.; Milella, M.; Reguart, N.; Altavilla, G.; Jimenez, U.; Provencio, M.; Moreno, M. A.; Terrasa, J.; Muñoz-Langa, J.; Valdivia, J.; Isla, D.; Domine, M.; Molinier, O.; Mazieres, J.; Baize, N.; Garcia-Campelo, R.; Robinet, G.; Rodriguez-Abreu, D.; Lopez-Vivanco, G.; Gebbia, V.; Ferrera-Delgado, L.; Bombaron, P.; Bernabe, R.; Bearz, A.; Artal, A.; Cortesi, E.; Rolfo, C.; Sanchez-Ronco, M.; Drozdowskyj, A.; Queralt, C.; de Aguirre, I.; Ramirez, J. L.; Sanchez, J. J.; Molina, M. A.; Taron, M.; Paz-Ares, L., 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* (3), 239-246.
  88. Douillard, J. Y.; Ostoros, G.; Cobo, M.; Ciuleanu, T.; McCormack, R.; Webster, A.; Milenkova, T., First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* **2014**, *110* (1), 55-62.

- 
89. Kwak, E. L.; Sordella, R.; Bell, D. W.; Godin-Heymann, N.; Okimoto, R. A.; Brannigan, B. W.; Harris, P. L.; Driscoll, D. R.; Fidias, P.; Lynch, T. J.; Rabindran, S. K.; McGinnis, J. P.; Wissner, A.; Sharma, S. V.; Isselbacher, K. J.; Settleman, J.; Haber, D. A., Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci USA* **2005**, *102* (21), 7665-7670.
  90. Nakamura, T.; Nakashima, C.; Komiya, K.; Kitera, K.; Hirai, M.; Kimura, S.; Aragane, N., Mechanisms of acquired resistance to afatinib clarified with liquid biopsy. *PLoS One* **2018**, *13* (12), e0209384.
  91. Ahn, M. J.; Tsai, C. M.; Shepherd, F. A.; Bazhenova, L.; Sequist, L. V.; Hida, T.; Yang, J. C. H.; Ramalingam, S. S.; Mitsudomi, T.; Jänne, P. A.; Mann, H.; Cantarini, M.; Goss, G., Osimertinib in patients with T790M mutation-positive, advanced non-small cell lung cancer: Long-term follow-up from a pooled analysis of 2 phase 2 studies. *Cancer* **2019**, *125* (6), 892-901.
  92. Ichihara, E.; Lovly, C. M., Shades of T790M: Intratumor Heterogeneity in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Cancer Discov* **2015**, *5* (7), 694-696.
  93. Tran, P. N.; Klempner, S. J., Profile of rociletinib and its potential in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer (Auckl)* **2016**, *7*, 91-97.
  94. Engel, J.; Lategahn, J.; Rauh, D., Hope and Disappointment: Covalent Inhibitors to Overcome Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *ACS Med Chem Lett* **2016**, *7* (1), 2-5.
  95. Friedman, R., Drug resistance in cancer: molecular evolution and compensatory proliferation. *Oncotarget* **2016**, *7* (11), 11746-11755.
  96. Soverini, S.; Hochhaus, A.; Nicolini, F. E.; Gruber, F.; Lange, T.; Saglio, G.; Pane, F.; Müller, M. C.; Ernst, T.; Rosti, G.; Porkka, K.; Baccarani, M.; Cross, N. C.; Martinelli, G., BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* **2011**, *118* (5), 1208-1215.
  97. Juchum, M.; Günther, M.; Laufer, S. A., Fighting cancer drug resistance: Opportunities and challenges for mutation-specific EGFR inhibitors. *Drug Resist Updat* **2015**, *20*, 12-28.
  98. Sharma, S. V.; Bell, D. W.; Settleman, J.; Haber, D. A., Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7* (3), 169-181.
  99. Yun, C. H.; Boggon, T. J.; Li, Y.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Meyerson, M.; Eck, M. J., Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* **2007**, *11* (3), 217-227.
  100. Arcila, M. E.; Chaft, J. E.; Nafa, K.; Roy-Chowdhuri, S.; Lau, C.; Zaidinski, M.; Paik, P. K.; Zakowski, M. F.; Kris, M. G.; Ladanyi, M., Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* **2012**, *18* (18), 4910-4918.
  101. Pillai, R. N.; Behera, M.; Berry, L. D.; Rossi, M. R.; Kris, M. G.; Johnson, B. E.; Bunn, P. A.; Ramalingam, S. S.; Khuri, F. R., HER2 mutations in lung adenocarcinomas: A report from the Lung Cancer Mutation Consortium. *Cancer* **2017**, *123* (21), 4099-4105.
  102. Aertgeerts, K.; Skene, R.; Yano, J.; Sang, B. C.; Zou, H.; Snell, G.; Jennings, A.; Iwamoto, K.; Habuka, N.; Hirokawa, A.; Ishikawa, T.; Tanaka, T.; Miki, H.; Ohta, Y.; Sogabe, S., Structural analysis of the mechanism of inhibition and allosteric activation of the kinase domain of HER2 protein. *J Biol Chem* **2011**, *286* (21), 18756-18765.
  103. Lategahn, J.; Hardick, J.; Grabe, T.; Niggenaber, J.; Jeyakumar, K.; Keul, M.; Tumbrink, H. L.; Becker, C.; Hodson, L.; Kirschner, T.; Klovekorn, P.; Ketzer, J.; Baumann, M.; Terheyden, S.; Unger, A.; Weisner, J.; Muller, M. P.; van Otterlo, W. A. L.; Bauer, S.; Rauh, D., Targeting Her2-insYVMA with Covalent Inhibitors-A Focused Compound Screening and Structure-Based Design Approach. *J Med Chem* **2020**, *63* (20), 11725-11755.



- 
104. Robichaux, J. P.; Elamin, Y. Y.; Tan, Z.; Carter, B. W.; Zhang, S.; Liu, S.; Li, S.; Chen, T.; Poteete, A.; Estrada-Bernal, A.; Le, A. T.; Truini, A.; Nilsson, M. B.; Sun, H.; Roarty, E.; Goldberg, S. B.; Brahmer, J. R.; Altan, M.; Lu, C.; Papadimitrakopoulou, V.; Politi, K.; Doebele, R. C.; Wong, K. K.; Heymach, J. V., Mechanisms and clinical activity of an EGFR and HER2 exon 20-selective kinase inhibitor in non-small cell lung cancer. *Nat Med* **2018**, *24* (5), 638-646.
105. Smail, J. B.; Gonzales, A. J.; Spicer, J. A.; Lee, H.; Reed, J. E.; Sexton, K.; Althaus, I. W.; Zhu, T.; Black, S. L.; Blaser, A.; Denny, W. A.; Ellis, P. A.; Fakhoury, S.; Harvey, P. J.; Hook, K.; McCarthy, F. O. J.; Palmer, B. D.; Rivault, F.; Schlosser, K.; Ellis, T.; Thompson, A. M.; Trachet, E.; Winters, R. T.; Tecle, H.; Bridges, A., Tyrosine Kinase Inhibitors. 20. Optimization of Substituted Quinazoline and Pyrido[3,4-d]pyrimidine Derivatives as Orally Active, Irreversible Inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor Family. *J Med Chem* **2016**, *59* (17), 8103-8124.
106. Gonzales, A. J.; Hook, K. E.; Althaus, I. W.; Ellis, P. A.; Trachet, E.; Delaney, A. M.; Harvey, P. J.; Ellis, T. A.; Amato, D. M.; Nelson, J. M.; Fry, D. W.; Zhu, T.; Loi, C. M.; Fakhoury, S. A.; Schlosser, K. M.; Sexton, K. E.; Winters, R. T.; Reed, J. E.; Bridges, A. J.; Lettiere, D. J.; Baker, D. A.; Yang, J.; Lee, H. T.; Tecle, H.; Vincent, P. W., Antitumor activity and pharmacokinetic properties of PF-00299804, a second-generation irreversible pan-erbB receptor tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther* **2008**, *7* (7), 1880-1889.
107. Wissner, A.; Overbeek, E.; Reich, M. F.; Floyd, M. B.; Johnson, B. D.; Mamuya, N.; Rosfjord, E. C.; Discifani, C.; Davis, R.; Shi, X.; Rabindran, S. K.; Gruber, B. C.; Ye, F.; Hallett, W. A.; Nilakantan, R.; Shen, R.; Wang, Y. F.; Greenberger, L. M.; Tsou, H. R., Synthesis and Structure-Activity Relationships of 6,7-Disubstituted 4-Anilinoquinoline-3-carbonitriles. The Design of an Orally Active, Irreversible Inhibitor of the Tyrosine Kinase Activity of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and the Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER-2). *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 49-63.
108. Tsou, H. R.; Overbeek-Klumpers, E. G.; Hallett, W. A.; Reich, M. F.; Floyd, M. B.; Johnson, B. D.; Michalak, R. S.; Nilakantan, R.; Discifani, C.; Golas, J.; Rabindran, S. K.; Shen, R.; Shi, X. Q.; Wang, Y. F.; Upešlacis, J.; Wissner, A., Optimization of 6,7-disubstituted-4-(arylamino)quinoline-3-carbonitriles as orally active, irreversible inhibitors of human epidermal growth factor receptor-2 kinase activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48* (4), 1107-1131.
109. Rabindran, S. K.; Discifani, C. M.; Rosfjord, E. C.; Baxter, M.; Floyd, M. B.; Golas, J.; Hallett, W. A.; Johnson, B. D.; Nilakantan, R.; Overbeek, E.; Reich, M. F.; Shen, R.; Shi, X.; Tsou, H. R.; Wang, Y. F.; Wissner, A., Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Res* **2004**, *64* (11), 3958-3965.
110. Xia, W.; Mullin, R. J.; Keith, B. R.; Liu, L. H.; Ma, H.; Rusnak, D. W.; Owens, G.; Alligood, K. J.; Spector, N. L., Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene* **2002**, *21* (41), 6255-6263.
111. Falkenhorst, J.; Hamacher, R.; Bauer, S., New therapeutic agents in gastrointestinal stromal tumours. *Curr Opin Oncol* **2019**, *31* (4), 322-328.
112. Bardell, T.; Jalink, D. W.; Hurlbut, D. J.; Mercer, C. D., Gastrointestinal stromal tumour: varied presentation of a rare disease. *J Can Chir* **2006**, *49* (4), 286-289.
113. Nilsson, B.; Bumming, P.; Meis-Kindblom, J. M.; Oden, A.; Dortok, A.; Gustavsson, B.; Sablinska, K.; Kindblom, L. G., Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era--a population-based study in western Sweden. *Cancer* **2005**, *103* (4), 821-829.
114. Min, K. W.; Leabu, M., Interstitial cells of Cajal (ICC) and gastrointestinal stromal tumor (GIST): facts, speculations, and myths. *J Cell Mol Med* **2006**, *10* (4), 995-1013.
115. Grunewald, S.; Klug, L. R.; Mühlberg, T.; Lategahn, J.; Falkenhorst, J.; Town, A.; Ehart, C.; Wardelmann, E.; Hartmann, W.; Schildhaus, H. U.; Treckmann, J.; Fletcher,

- 
- J. A.; Jung, S.; Czodrowski, P.; Miller, S.; Schmidt-Kittler, O.; Rauh, D.; Heinrich, M. C.; Bauer, S., Resistance to avapritinib in PDGFRA-driven GIST is caused by secondary mutations in the PDGFRA kinase domain. *Cancer Discov* **2020**.
116. Khoshnood, A., Gastrointestinal stromal tumor - A review of clinical studies. *J Oncol Pharm Pract* **2019**, *25* (6), 1473-1485.
117. Lopes, L. F.; Bacchi, C. E., Imatinib treatment for gastrointestinal stromal tumour (GIST). *J Cell Mol Med* **2010**, *14* (1-2), 42-50.
118. Nemunaitis, J.; Bauer, S.; Blay, J. Y.; Choucair, K.; Gelderblom, H.; George, S.; Schöffski, P.; von Mehren, M.; Zalcberg, J.; Achour, H.; Ruiz-Soto, R.; Heinrich, M. C., Intrigue: Phase III study of ripretinib versus sunitinib in advanced gastrointestinal stromal tumor after imatinib. *Future Oncol* **2020**, *16* (1), 4251-4264.
119. Joensuu, H.; Fletcher, C.; Dimitrijevic, S.; Silberman, S.; Roberts, P.; Demetri, G., Management of malignant gastrointestinal stromal tumours. *The Lancet Oncology* **2002**, *3* (11), 655-664.
120. Lemmon, M. A.; Schlessinger, J., Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **2010**, *141* (7), 111117-34.
121. Liang, L.; Yan, X. E.; Yin, Y.; Yun, C. H., Structural and biochemical studies of the PDGFRA kinase domain. *Biochem Biophys Res Commun* **2016**, *477* (4), 667-672.
122. Garner, A. P.; Gozgit, J. M.; Anjum, R.; Vodala, S.; Schrock, A.; Zhou, T.; Serrano, C.; Eilers, G.; Zhu, M.; Ketzer, J.; Wardwell, S.; Ning, Y.; Song, Y.; Kohlmann, A.; Wang, F.; Clackson, T.; Heinrich, M. C.; Fletcher, J. A.; Bauer, S.; Rivera, V. M., Ponatinib inhibits polyclonal drug-resistant KIT oncoproteins and shows therapeutic potential in heavily pretreated gastrointestinal stromal tumor (GIST) patients. *Clin Cancer Res* **2014**, *20* (22), 5745-5755.
123. Roskoski, R., Jr., Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *337* (1), 1-13.
124. Serrano, C.; Marino-Enriquez, A.; Tao, D. L.; Ketzer, J.; Eilers, G.; Zhu, M.; Yu, C.; Mannan, A. M.; Rubin, B. P.; Demetri, G. D.; Raut, C. P.; Presnell, A.; McKinley, A.; Heinrich, M. C.; Czaplinski, J. T.; Sicinska, E.; Bauer, S.; George, S.; Fletcher, J. A., Complementary activity of tyrosine kinase inhibitors against secondary kit mutations in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumours. *Br J Cancer* **2019**, *120* (6), 612-620.
125. Mol, C. D.; Dougan, D. R.; Schneider, T. R.; Skene, R. J.; Kraus, M. L.; Scheibe, D. N.; Snell, G. P.; Zou, H.; Sang, B. C.; Wilson, K. P., Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J Biol Chem* **2004**, *279* (30), 31655-31663.
126. DiNitto, J. P.; Deshmukh, G. D.; Zhang, Y.; Jacques, S. L.; Coli, R.; Worrall, J. W.; Diehl, W.; English, J. M.; Wu, J. C., Function of activation loop tyrosine phosphorylation in the mechanism of c-Kit auto-activation and its implication in sunitinib resistance. *J Biochem* **2010**, *147* (4), 601-609.
127. Lennartsson, J.; Ronnstrand, L., Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev* **2012**, *92* (4), 1619-1649.
128. Chauvot de Beauchene, I.; Allain, A.; Panel, N.; Laine, E.; Trouve, A.; Dubreuil, P.; Tchertanov, L., Hotspot mutations in KIT receptor differentially modulate its allosterically coupled conformational dynamics: impact on activation and drug sensitivity. *PLoS Comput Biol* **2014**, *10* (7), e1003749.
129. Lasota, J.; Miettinen, M., KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Semin Diagn Pathol* **2006**, *23* (2), 91-102.
130. Parab, T. M.; DeRogatis, M. J.; Boaz, A. M.; Grasso, S. A.; Issack, P. S.; Duarte, D. A.; Urayeneza, O.; Vahdat, S.; Qiao, J. H.; Hinika, G. S., Gastrointestinal stromal tumors: a comprehensive review. *J Gastrointest Oncol* **2019**, *10* (1), 144-154.
131. Hirota, S.; Isozaki, K.; Moriyama, Y.; Hashimoto, K.; Nishida, T.; Ishiguro, S.; Kawano, K.; Hanada, M.; Kurata, A.; Takeda, M.; Muhammad Tunio, G.; Matsuzawa, Y.; Kanakura, Y.; Shinomura, Y.; Kitamura, Y., Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **1998**, *279* (5350), 577-580.

- 
132. Hirota, S.; Ohashi, A.; Nishida, T.; Isozaki, K.; Kinoshita, K.; Shinomura, Y.; Kitamura, Y., Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* **2003**, *125* (3), 660-667.
  133. Balachandran, V. P.; DeMatteo, R. P., Gastrointestinal stromal tumors: who should get imatinib and for how long? *Adv Surg* **2014**, *48* (1), 165-183.
  134. Heinrich, M. C.; Griffith, D. J.; Druker, B. J.; Wait, C. L.; Ott, K. A.; Zigler, A. J., Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* **2000**, *96* (3), 925-932.
  135. Druker, B. J.; Lydon, N. B., Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* **2000**, *105* (1), 3-7.
  136. Joensuu, H.; Roberts, P. J.; Sarlomo-Rikala, M.; Andersson, L. C.; Tervahartiala, P.; Tuveson, D.; Silberman, S.; Capdeville, R.; Dimitrijevic, S.; Druker, B.; Demetri, G. D., Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* **2001**, *344* (14), 1052-1056.
  137. Bümming, P.; Andersson, J.; Meis-Kindblom, J. M.; Klingenstierna, H.; Engström, K.; Stierner, U.; Wängberg, B.; Jansson, S.; Ahlman, H.; Kindblom, L. G.; Nilsson, B., Neoadjuvant, adjuvant and palliative treatment of gastrointestinal stromal tumours (GIST) with imatinib: a centre-based study of 17 patients. *Br J Cancer* **2003**, *89* (3), 460-464.
  138. Dagher, R.; Cohen, M.; Williams, G.; Rothmann, M.; Gobburu, J.; Robbie, G.; Rahman, A.; Chen, G.; Staten, A.; Griebel, D.; Pazdur, R., Approval Summary: Imatinib Mesylate in the Treatment of Metastatic and/or Unresectable Malignant Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Cancer Res* **2002**, *8* (10), 3034-3038.
  139. van Oosterom, A. T.; Judson, I.; Verweij, J.; Stroobants, S.; di Paola, E. D.; Dimitrijevic, S.; Martens, M.; Webb, A.; Sciot, R.; Van Glabbeke, M.; Silberman, S.; Nielsen, O. S., Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *The Lancet* **2001**, *358* (9291), 1421-1423.
  140. Demetri, G. D.; von Mehren, M.; Blanke, C. D.; Van den Abbeele, A. D.; Eisenberg, B.; Roberts, P. J.; Heinrich, M. C.; Tuveson, D. A.; Singer, S.; Janicek, M.; Fletcher, J. A.; Silverman, S. G.; Silberman, S. L.; Capdeville, R.; Kiese, B.; Peng, B.; Dimitrijevic, S.; Druker, B. J.; Corless, C.; Fletcher, C. D. M.; Joensuu, H., Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* **2002**, *347* (7), 472-480.
  141. Debiec-Rychter, M.; Sciot, R.; Le Cesne, A.; Schlemmer, M.; Hohenberger, P.; van Oosterom, A. T.; Blay, J. Y.; Leyvraz, S.; Stul, M.; Casali, P. G.; Zalcberg, J.; Verweij, J.; Van Glabbeke, M.; Hagemeyer, A.; Judson, I., KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Cancer* **2006**, *42* (8), 1093-1103.
  142. Bauer, S.; Joensuu, H., Emerging Agents for the Treatment of Advanced, Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumors: Current Status and Future Directions. *Drugs* **2015**, *75* (12), 1323-1334.
  143. Blanke, C. D.; Demetri, G. D.; von Mehren, M.; Heinrich, M. C.; Eisenberg, B.; Fletcher, J. A.; Corless, C. L.; Fletcher, C. D.; Roberts, P. J.; Heinz, D.; Wehre, E.; Nikolova, Z.; Joensuu, H., Long-term results from a randomized phase II trial of standard- versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing KIT. *J Clin Oncol* **2008**, *26* (4), 620-625.
  144. Casali, P. G.; Zalcberg, J.; Le Cesne, A.; Reichardt, P.; Blay, J. Y.; Lindner, L. H.; Judson, I. R.; Schöffski, P.; Leyvraz, S.; Italiano, A.; Grunwald, V.; Pousa, A. L.; Kotasek, D.; Sleijfer, S.; Kerst, J. M.; Rutkowski, P.; Fumagalli, E.; Hogendoorn, P.; Litiere, S.; Marreaud, S.; van der Graaf, W.; Gronchi, A.; Verweij, J.; European Organisation for, R.; Treatment of Cancer Soft, T.; Bone Sarcoma Group, I. S. G.; Australasian Gastrointestinal Trials, G., Ten-Year Progression-Free and Overall Survival in Patients With Unresectable or Metastatic GI Stromal Tumors: Long-Term Analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Italian

- 
- Sarcoma Group, and Australasian Gastrointestinal Trials Group Intergroup Phase III Randomized Trial on Imatinib at Two Dose Levels. *J Clin Oncol* **2017**, *35* (15), 1713-1720.
145. Heinrich, M. C.; Corless, C. L.; Blanke, C. D.; Demetri, G. D.; Joensuu, H.; Roberts, P. J.; Eisenberg, B. L.; von Mehren, M.; Fletcher, C. D. M.; Sandau, K.; McDougall, K.; Ou, W. B.; Chen, C. J.; Fletcher, J. A., Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* **2006**, *24* (29), 4764-4774.
  146. Liegl, B.; Kepten, I.; Le, C.; Zhu, M.; Demetri, G. D.; Heinrich, M. C.; Fletcher, C. D. M.; Corless, C. L.; Fletcher, J. A., Heterogeneity of kinase inhibitor resistance mechanisms in GIST. *J Pathol* **2008**, *216* (1), 64-74.
  147. Serrano, C.; George, S.; Valverde, C.; Olivares, D.; Garcia-Valverde, A.; Suarez, C.; Morales-Barrera, R.; Carles, J., Novel Insights into the Treatment of Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumors. *Target Oncol* **2017**, *12* (3), 277-288.
  148. Demetri, G. D.; Reichardt, P.; Kang, Y.-K.; Blay, J.-Y.; Rutkowski, P.; Gelderblom, H.; Hohenberger, P.; Leahy, M.; von Mehren, M.; Joensuu, H.; Badalamenti, G.; Blackstein, M.; Le Cesne, A.; Schöffski, P.; Maki, R. G.; Bauer, S.; Nguyen, B. B.; Xu, J.; Nishida, T.; Chung, J.; Kappeler, C.; Kuss, I.; Laurent, D.; Casali, P. G., Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* **2013**, *381* (9863), 295-302.
  149. Demetri, G. D.; van Oosterom, A. T.; Garrett, C. R.; Blackstein, M. E.; Shah, M. H.; Verweij, J.; McArthur, G.; Judson, I. R.; Heinrich, M. C.; Morgan, J. A.; Desai, J.; Fletcher, C. D.; George, S.; Bello, C. L.; Huang, X.; Baum, C. M.; Casali, P. G., Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *The Lancet* **2006**, *368* (9544), 1329-1338.
  150. George, S.; Wang, Q.; Heinrich, M. C.; Corless, C. L.; Zhu, M.; Butrynski, J. E.; Morgan, J. A.; Wagner, A. J.; Choy, E.; Tap, W. D.; Yap, J. T.; Van den Abbeele, A. D.; Manola, J. B.; Solomon, S. M.; Fletcher, J. A.; von Mehren, M.; Demetri, G. D., Efficacy and safety of regorafenib in patients with metastatic and/or unresectable GI stromal tumor after failure of imatinib and sunitinib: a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* **2012**, *30* (19), 2401-2407.
  151. Tan, F. H.; Putoczki, T. L.; Stylli, S. S.; Luwor, R. B., Ponatinib: a novel multi-tyrosine kinase inhibitor against human malignancies. *Onco Targets Ther* **2019**, *12*, 635-645.
  152. Massaro, F.; Molica, M.; Breccia, M., Ponatinib: A Review of Efficacy and Safety. *Curr Cancer Drug Targets* **2018**, *18* (9), 847-856.
  153. von Mehren, M.; Serrano, C.; Bauer, S.; Gelderblom, H.; George, S.; Heinrich, M.; Schöffski, P.; Zalcberg, J.; Chi, P.; Jones, R. L.; Reichardt, P.; Attia, S.; D'Amato, G.; Meade, J.; Shi, K.; Ruiz-Soto, R.; Blay, J. Y., INVICTUS: A phase III, interventional, double-blind, placebo-controlled study to assess the safety and efficacy of ripretinib as  $\geq$  4th-line therapy in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST) who have received treatment with prior anticancer therapies (NCT03353753). *Annals of Oncology* **2019**, *30*, v925-v926.
  154. Smith, B. D.; Kaufman, M. D.; Lu, W. P.; Gupta, A.; Leary, C. B.; Wise, S. C.; Rutkoski, T. J.; Ahn, Y. M.; Al-Ani, G.; Bulfer, S. L.; Caldwell, T. M.; Chun, L.; Ensinger, C. L.; Hood, M. M.; McKinley, A.; Patt, W. C.; Ruiz-Soto, R.; Su, Y.; Telikepalli, H.; Town, A.; Turner, B. A.; Vogeti, L.; Vogeti, S.; Yates, K.; Janku, F.; Abdul Razak, A. R.; Rosen, O.; Heinrich, M. C.; Flynn, D. L., Ripretinib (DCC-2618) Is a Switch Control Kinase Inhibitor of a Broad Spectrum of Oncogenic and Drug-Resistant KIT and PDGFRA Variants. *Cancer Cell* **2019**, *35* (5), 738-751.
  155. Blay, J.-Y.; Serrano, C.; Heinrich, M. C.; Zalcberg, J.; Bauer, S.; Gelderblom, H.; Schöffski, P.; Jones, R. L.; Attia, S.; D'Amato, G.; Chi, P.; Reichardt, P.; Meade, J.; Shi, K.; Ruiz-Soto, R.; George, S.; von Mehren, M., Ripretinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours (INVICTUS): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **2020**, *21* (7), 923-934.

- 
156. Kaisiotou, H.; Keul, M.; Hardick, J.; Mühlenberg, T.; Ketzer, J.; Ehrh, C.; Krüll, J.; Medda, F.; Koch, O.; Giordanetto, F.; Bauer, S.; Rauh, D., Inhibitors to Overcome Secondary Mutations in the Stem Cell Factor Receptor KIT. *J Med Chem* **2017**, *60* (21), 8801-8815.
157. Liu, F.; Zou, F.; Chen, C.; Yu, K.; Liu, X.; Qi, S.; Wu, J.; Hu, C.; Hu, Z.; Liu, J.; Liu, X.; Wang, L.; Ge, J.; Wang, W.; Ren, T.; Bai, M.; Cai, Y.; Xiao, X.; Qian, F.; Tang, J.; Liu, Q.; Liu, J., Axitinib overcomes multiple imatinib resistant cKIT mutations including the gatekeeper mutation T670I in gastrointestinal stromal tumors. *Ther Adv Med Oncol* **2019**, *11*,1-15.
158. Hantschel, O.; Grebien, F.; Superti-Furga, G., The growing arsenal of ATP-competitive and allosteric inhibitors of BCR-ABL. *Cancer Res* **2012**, *72* (19), 4890-4895.
159. Engel, J.; Becker, C.; Lategahn, J.; Keul, M.; Ketzer, J.; Mühlenberg, T.; Kollipara, L.; Schultz-Fademrecht, C.; Zahedi, R. P.; Bauer, S.; Rauh, D., Insight into the Inhibition of Drug-Resistant Mutants of the Receptor Tyrosine Kinase EGFR. *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55* (36), 10909-10912.
160. Weisberg, E.; Choi, H. G.; Ray, A.; Barrett, R.; Zhang, J.; Sim, T.; Zhou, W.; Seeliger, M.; Cameron, M.; Azam, M.; Fletcher, J. A.; Debiec-Rychter, M.; Mayeda, M.; Moreno, D.; Kung, A. L.; Janne, P. A.; Khosravi-Far, R.; Melo, J. V.; Manley, P. W.; Adamia, S.; Wu, C.; Gray, N.; Griffin, J. D., Discovery of a small-molecule type II inhibitor of wild-type and gatekeeper mutants of BCR-ABL, PDGFRalpha, Kit, and Src kinases: novel type II inhibitor of gatekeeper mutants. *Blood* **2010**, *115* (21), 4206-4216.
161. Tamborini, E.; Bonadiman, L.; Greco, A.; Albertini, V.; Negri, T.; Gronchi, A.; Bertulli, R.; Colecchia, M.; Casali, P. G.; Pierotti, M. A.; Pilotti, S., A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient. *Gastroenterology* **2004**, *127* (1), 294-299.
162. Tamborini, E.; Pricl, S.; Negri, T.; Lagonigro, M. S.; Miselli, F.; Greco, A.; Gronchi, A.; Casali, P. G.; Ferrone, M.; Fermeglia, M.; Carbone, A.; Pierotti, M. A.; Pilotti, S., Functional analyses and molecular modeling of two c-Kit mutations responsible for imatinib secondary resistance in GIST patients. *Oncogene* **2006**, *25* (45), 6140-6146.
163. Barouch-Bentov, R.; Sauer, K., Mechanisms of drug resistance in kinases. *Expert Opin Investig Drugs* **2011**, *20* (2), 153-208.
164. O'Hare, T.; Shakespeare, W. C.; Zhu, X.; Eide, C. A.; Rivera, V. M.; Wang, F.; Adrian, L. T.; Zhou, T.; Huang, W. S.; Xu, Q.; Metcalf, C. A., 3rd; Tyner, J. W.; Loriaux, M. M.; Corbin, A. S.; Wardwell, S.; Ning, Y.; Keats, J. A.; Wang, Y.; Sundaramoorthi, R.; Thomas, M.; Zhou, D.; Snodgrass, J.; Commodore, L.; Sawyer, T. K.; Dalgarno, D. C.; Deininger, M. W.; Druker, B. J.; Clackson, T., AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* **2009**, *16* (5), 401-412.
165. Leproult, E.; Barluenga, S.; Moras, D.; Wurtz, J. M.; Winssinger, N., Cysteine mapping in conformationally distinct kinase nucleotide binding sites: application to the design of selective covalent inhibitors. *J Med Chem* **2011**, *54* (5), 1347-1455.
166. Zhao, Z.; Bourne, P. E., Progress with covalent small-molecule kinase inhibitors. *Drug Discov Today* **2018**, *23* (3), 727-735.
167. McAulay, K.; Hoyt, E. A.; Thomas, M.; Schimpl, M.; Bodnarchuk, M. S.; Lewis, H. J.; Barratt, D.; Bhavsar, D.; Robinson, D. M.; Deery, M. J.; Ogg, D. J.; Bernardes, G. J. L.; Ward, R. A.; Waring, M. J.; Kettle, J. G., Alkynyl Benzoxazines and Dihydroquinazolines as Cysteine Targeting Covalent Warheads and Their Application in Identification of Selective Irreversible Kinase Inhibitors. *J Am Chem Soc* **2020**, *142* (23), 10358-10372.
168. Greig, S. L., Osimertinib: First Global Approval. *Drugs* **2016**, *76* (2), 263-273.
169. Van Der Steen, N.; Caparello, C.; Rolfo, C.; Pauwels, P.; Peters, G. J.; Giovannetti, E., New developments in the management of non-small-cell lung cancer, focus on rociletinib: what went wrong? *Onco Targets Ther* **2016**, *9*, 6065-6074.

- 
170. McGinnity, D. F.; Soars, M. G.; Urbanowicz, R. A.; Riley, R. J., Evaluation of fresh and cryopreserved hepatocytes as in vitro drug metabolism tools for the prediction of metabolic clearance. *Drug Metab Dispos* **2004**, *32* (11), 1247-1253.
171. Uhlenbrock, N.; Smith, S.; Weisner, J.; Landel, I.; Lindemann, M.; Le, T. A.; Hardick, J.; Gontla, R.; Scheinpflug, R.; Czodrowski, P.; Janning, P.; Depta, L.; Quambusch, L.; Müller, M. P.; Engels, B.; Rauh, D., Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase Akt. *Chem Sci* **2019**, *10* (12), 3573-3585.
172. de Bruyn Kops, C.; Stork, C.; Sicho, M.; Kochev, N.; Svozil, D.; Jeliaskova, N.; Kirchmair, J., GLORY: Generator of the Structures of Likely Cytochrome P450 Metabolites Based on Predicted Sites of Metabolism. *Front Chem* **2019**, *7*, 1-15.
173. Kirchmair, J.; Williamson, M. J.; Afzal, A. M.; Tyzack, J. D.; Choy, A. P.; Howlett, A.; Rydberg, P.; Glen, R. C., FASt METabolizer (FAME): A rapid and accurate predictor of sites of metabolism in multiple species by endogenous enzymes. *J Chem Inf Model* **2013**, *53* (11), 2896-2907.
174. Sicho, M.; de Bruyn Kops, C.; Stork, C.; Svozil, D.; Kirchmair, J., FAME 2: Simple and Effective Machine Learning Model of Cytochrome P450 Regioselectivity. *J Chem Inf Model* **2017**, *57* (8), 1832-1846.
175. Scheers, E.; Leclercq, L.; de Jong, J.; Bode, N.; Bockx, M.; Laenen, A.; Cuyckens, F.; Skee, D.; Murphy, J.; Sukbuntherng, J.; Mannens, G., Absorption, metabolism, and excretion of oral (1)(4)C radiolabeled ibrutinib: an open-label, phase I, single-dose study in healthy men. *Drug Metab Dispos* **2015**, *43* (2), 289-297.
176. Motwani, H. V.; Frostne, C.; Törnqvist, M., Parallelogram based approach for in vivo dose estimation of genotoxic metabolites in humans with relevance to reduction of animal experiments. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 17560.
177. Norris, K. K.; DeAngelo, T. M.; Vesell, E. S., Genetic and environmental factors that regulate cytosolic epoxide hydrolase activity in normal human lymphocytes. *J Clin Invest* **1989**, *84* (6), 1749-1756.
178. Eisenbrand, G., Revisiting the evidence for genotoxicity of acrylamide (AA), key to risk assessment of dietary AA exposure. *Arch Toxicol* **2020**, *94* (9), 2939-2950.
179. Paulsson, B.; Rannug, A.; Henderson, A. P.; Golding, B. T.; Törnqvist, M.; Warholm, M., In vitro studies of the influence of glutathione transferases and epoxide hydrolase on the detoxification of acrylamide and glycidamide in blood. *Mutat Res* **2005**, *580* (1-2), 53-59.
180. Highlights Of Prescribing Information; Reference ID: 3395788.
181. Bradshaw, J. M.; McFarland, J. M.; Paavilainen, V. O.; Bisconte, A.; Tam, D.; Phan, V. T.; Romanov, S.; Finkle, D.; Shu, J.; Patel, V.; Ton, T.; Li, X.; Loughhead, D. G.; Nunn, P. A.; Karr, D. E.; Gerritsen, M. E.; Funk, J. O.; Owens, T. D.; Verner, E.; Brameld, K. A.; Hill, R. J.; Goldstein, D. M.; Taunton, J., Prolonged and tunable residence time using reversible covalent kinase inhibitors. *Nat Chem Biol* **2015**, *11* (7), 525-531.
182. Tatton, L.; Morley, G. M.; Chopra, R.; Khwaja, A., The Src-selective kinase inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases. *J Biol Chem* **2003**, *278* (7), 4847-4853.
183. Hanke, J. H.; Gardner, J. P.; Dow, R. L.; Changelian, P. S.; Brissette, W. H.; Weringer, E. J.; Pollok, B. A.; Connelly, P. A., Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* **1996**, *271* (2), 695-701.
184. Haselmayer, P.; Camps, M.; Liu-Bujalski, L.; Nguyen, N.; Morandi, F.; Head, J.; O'Mahony, A.; Zimmerli, S. C.; Bruns, L.; Bender, A. T.; Schroeder, P.; Grenningloh, R., Efficacy and Pharmacodynamic Modeling of the BTK Inhibitor Evobrutinib in Autoimmune Disease Models. *J Immunol* **2019**, *202* (10), 2888-2906.
185. Klebe, G., Wirkstoffdesign Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen. *Spektrum Akademischer Verlag* **2009**, *2*.

- 
186. Bose, P.; Gandhi, V. V.; Keating, M. J., Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of ibrutinib for the treatment of chronic lymphocytic leukemia: rationale for lower doses. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2016**, *12* (11), 1381-1392.
  187. Di, L.; Kerns, E. H., Chapter 29 - Metabolic Stability **2016**, 161-194.
  188. Basit, A. W.; Podczeck, F.; Newton, J. M.; Waddington, W. A.; Ell, P. J.; Lacey, L. F., Influence of polyethylene glycol 400 on the gastrointestinal absorption of ranitidine. *Pharm Res* **2002**, *19* (9), 1368-1374.
  189. Stoffmonographie für N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) und „Human-Biomonitoring“-Werte für die Metaboliten 5-Hydroxy-NMP und 2-Hydroxy-N-methylsuccinimid im Urin von Erwachsenen und Kindern. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **2015**, *58* (10), 1175-1191.
  190. Baer, F. M.; Rosenkranz, S., Koronare Herzkrankheit und akutes Koronarsyndrom. In *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*, Erdmann, E., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2009**, 13-71.
  191. Srinivasan, R.; Tan, L. P.; Wu, H.; Yang, P. Y.; Kalesh, K. A.; Yao, S. Q., High-throughput synthesis of azide libraries suitable for direct "click" chemistry and in situ screening. *Org Biomol Chem* **2009**, *7* (9), 1821-1828.
  192. Breugst, M.; Reißig, H. U., The Huisgen Reaction: Milestones of the 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Angew Chem Int Ed Engl* **2020**, *59*, 12293-12307.
  193. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, *41* (14), 2596-2599.
  194. Gajiwala, K. S.; Feng, J.; Ferre, R.; Ryan, K.; Brodsky, O.; Weinrich, S.; Kath, J. C.; Stewart, A., Insights into the aberrant activity of mutant EGFR kinase domain and drug recognition. *Structure* **2013**, *21* (2), 209-219.
  195. Wissner, A.; Mansour, T. S., The development of HKI-272 and related compounds for the treatment of cancer. *Arch Pharm Chem Life Sci* **2008**, *341* (8), 465-477.
  196. Abdeldayem, A.; Raouf, Y. S.; Constantinescu, S. N.; Moriggl, R.; Gunning, P. T., Advances in covalent kinase inhibitors. *Chem Soc Rev* **2020**, *49* (9), 2617-2687.
  197. Goody, R. S.; Müller, M. P.; Rauh, D., Mutant-Specific Targeting of Ras G12C Activity by Covalently Reacting Small Molecules. *Cell Chem Biol* **2019**, *26* (10), 1338-1348.
  198. Mayr, L. M.; Bojanic, D., Novel trends in high-throughput screening. *Curr Opin Pharmacol* **2009**, *9* (5), 580-588.
  199. Wager, T. T.; Hou, X.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A., Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties. *ACS Chem Neurosci* **2010**, *1* (6), 435-449.

## 9 Eidesstattliche Versicherung

### Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Hardick, Julia

Name, Vorname  
(Surname, first name)

141261

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.

Recklinghausen,

Ort, Datum  
(Place, date)

Unterschrift  
(Signature)

Titel der Dissertation:  
(Title of the thesis):

Struktur basiertes Design, Synthese und pharmakokinetische Charakterisierung

von kovalenten Inhibitoren zur Adressierung von Krebs relevanten Proteinkinasen

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.

Recklinghausen,

Ort, Datum  
(Place, date)

Unterschrift  
(Signature)