

Strukturbasierte Entwicklung und Evaluierung von Sondenmolekülen  
zur allosterischen Regulation von Isoformen der Proteinkinase Akt

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat)

der Fakultät Chemie und Chemische Biologie

der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND

vorgelegt von

Lena Quambusch

aus Dortmund

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





## **DISSERTATION**

Strukturbasierte Entwicklung und Evaluierung von Sondenmolekülen zur allosterischen Regulation von Isoformen der Proteinkinase Akt

Fakultät Chemie und Chemische Biologie

der TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND

Dortmund, 2021

Dekan: Prof. Dr. Stefan Kast

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Norbert Krause

3. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh

4. Gutachter: Prof. Dr. Paul Czodrowski

Abgabe: 30.07.2021

Disputation: 27.09.2021



„[...] when the veil over nature's secret seems suddenly to lift, and when what was dark and chaotic appears in a clear and beautiful light and pattern.”

GERTY CORI, 1954

*National Academy of Science*

Die vorliegende Arbeit entstand unter Betreuung von PROF. DR. DANIEL RAUH und wurde im Zeitraum von November 2017 bis März 2021 an der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden bereits in Form von Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften oder im Rahmen von Bachelor- bzw. Masterarbeiten von Jonas Nabert (2019) und Tonia Kirschner (2020) veröffentlicht; entsprechende Stellen wurden in der Dissertation gekennzeichnet.

## Publikationen

Im Rahmen dieses Promotionsverfahrens entstanden die folgenden Publikationen.

1. **Quambusch, L.**<sup>#</sup>, Depta, L.<sup>#</sup>, Landel, I., Lubeck, M., Kirschner, T., Nabert, J., Uhlenbrock, N., Weinsner, J., Kostka, M., Levy, L. M., Schultz-Fademrecht, C., Müller, M. P., Rauh, D. Cellular Model System to Dissect Isoform-Selectivity of Akt Inhibitors. *Nature Communication* 12, 5297 (2021).
2. Landel, I.<sup>#</sup>, **Quambusch, L.**<sup>#</sup>, Depta, L.<sup>#</sup> & Rauh, D. Spotlight on AKT: Current Therapeutic Challenges. *ACS Med Chem Lett* 11, 225-227 (2020).
3. **Quambusch, L.**, Landel, I., Depta, L., Weinsner, J., Uhlenbrock, N., Muller, M.P., Glanemann, F., Althoff, K., Siveke, J.T. & Rauh, D. Covalent-Allosteric Inhibitors to Achieve Akt Isoform-Selectivity. *Angew Chem Int Ed Engl* 58, 18823-18829 (2019).
4. Uhlenbrock, N.<sup>#</sup>, Smith, S.<sup>#</sup>, Weinsner, 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. *Chemical Science* 10, 3573-3585 (2019).
5. Weinsner, J.<sup>#</sup>, Landel, I.<sup>#</sup>, Reintjes, C.<sup>#</sup>, Uhlenbrock, N.<sup>#</sup>, Trajkovic-Arsic, M., Dienstbier, N., Hardick, J., Ladigan, S., Lindemann, M., Smith, S., **Quambusch, L.**, Scheinpflug, R., Depta, L., Gontla, R., Unger, A., Muller, H., Baumann, M., Schultz-Fademrecht, C., Gunther, G., Maghnoij, A., Muller, 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 Research* 79, 2367-2378 (2019).
6. Tesch, R., Becker, C., Muller, M.P., Beck, M.E., **Quambusch, L.**, Getlik, M., Lategahn, J., Uhlenbrock, N., Costa, F.N., Poletto, M.D., Pinheiro, P.S.M., Rodrigues, D.A., Sant'Anna, C.M.R., Ferreira, F.F., Verli, H., Fraga, C.A.M. & Rauh, D. An Unusual Intramolecular Halogen Bond Guides Conformational Selection. *Angew Chem Int Ed Engl* 57, 9970-9975 (2018).



## Danksagung

Mein erster und größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh für das mir anvertraute Projekt, samt der herausfordernden Fragestellung sowie der Möglichkeit ebendiese mit meinen Ideen und Vorstellungen zu bewältigen. Die kreativen Freiheiten in meinem Projekt sowohl der Zugang zur privilegierten Ausstattung seiner Arbeitsgruppe wusste ich stets zu schätzen. An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls für die frühe und klare Unterstützung meiner Pläne, offenen Worte und zahlreichen Einblicke „Hinter die Kulissen“ in all unseren Gesprächen bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Paul Czodrowski für die Übernahme des Koreferates, für den Zugang der Server-Strukturen der AG CZODROWSKI sowie für den stets freundlichen Austausch.

Besonderem Dank gilt der Studienstiftung des dt. Volkes, welche mich finanziell während der Promotion gefördert hat und es mir zugleich ermöglichte auf ihren Veranstaltungen neue Perspektiven zu erlangen sowie motivierte und inspirierende junge Menschen aller Fachrichtungen kennen zu lernen. Diese Art der Wertschätzung von fachlicher Kompetenz und gesellschaftlichem Engagement ehrt mich zutiefst.

Ich danke all den administrativen und technischen Mitarbeiter:innen der AG RAUH, Petra Alhorn, Maria Sergani, Ulrich Schoppe, Andreas Arndt und besonders Martina Reibner für die reibungslose Unterstützung im Hintergrund, ohne diese der Laboralltag ein deutlich herausfordernder gewesen wäre. Danke!

Darüber hinaus möchte ich mich bei einer Vielzahl von Kollaborationspartner:innen bedanken, die uns spannende neue Einblicke in ihrer Fachwelt erlaubten und im Gegenzug unserer Forschung wertvolle Perspektiven lieferten. Dank gilt der AG SIVEKE aus dem Uniklinikum Essen für die klinisch-relevante Perspektive im Akt Projekt, namentlich Prof. Dr. Jens Siveke, Franziska Glanemann, Kristina Althoff und Marija Trajkovic-Arsic. Im Rahmen des Drug Discovery Hub Dortmund (DDHD) danke ich besonders Laura Levy, Michael Kostka von der Taros GmbH für die Bereitstellung wichtiger Synthese Bausteine und der fachlichen Diskussionen. Ebenso Danke ich Carsten Schultz-Fademrecht (ehemals) und Julian Engel vom Lead Discovery Center GmbH für die medizinalchemischen Eindrücke und Messungen der pharmakokinetischen Parameter. Weiterhin danke ich der AG LORENZ (ISAS) insbesondere Julia Fender für die Analyse der Inhibitoren im Kontext von Cardiotoxizität. Daneben gilt dem gesamten DDHD Konsortium dank für die produktive Zusammenarbeit und spannenden Ergebnisse. Zudem danke ich Dr. Tania Romacho und ihren Kolleg:innen vom KomIT-Konsortium am DDZ in Düsseldorf, für die Analyse unserer Inhibitoren in Diabetes Modellen.

Ferner, bedanke ich mich bei den analytischen Einrichtungen der Fakultät CCB, darunter die NMR-Abteilung für die Aufnahme zahlreicher Daten, die massenspektrometrische Abteilung des MPI für die Bestimmung von hochaufgelösten Massen sowie dem Proteomics-Team rund Dr. Petra Janning für die Tandem-MS/MS Experimente und Auswertung.

Ebenso möchte ich den weiteren aktuellen und ehemaligen Personen der AG RAUH danken, für eine stets angenehm freundliche Atmosphäre, für Waffelfreitage, für Kicker-Turniere, für Spieleabende und für die Bereitschaft in unsere Lab-Meetings. Darunter: Alina, Janina, Mike, Jonas W., Kiru, Rajesh, Shiva, Tonia, Tobi, Lisa, Niklas, Steven, Marina, Patrik, Bianca, Helena, Paul, Jonas L., Christiane, Silke, Christina.

Dem Akt-Projektteam danke ich für unzählige Diskussionen und der wirklichen produktiven Atmosphäre. Darunter Dr. Jörn Weisner als stetiger Akt-Experte und Lehrmeister der biochemischen Assays. Meinen Laborpartnern Marius Lindemann und Sven Brandherm danke ich für den gemeinsamen Laboralltag sowie tollen organisatorischem Teamwork. Dr. Ina Landel danke ich für die Kristallisationsstudien und reibungslose Zusammenarbeit in vielen Fragestellungen. Zu letzte danke ich Laura Depta für die biologischen Arbeiten zu den Akt Isoformen, für den gehaltvollen und inspirierenden Austausch zu unserem Projekt und die reibungslose Ausarbeitung unserer Publikation.

Für die kritische Durchsicht meiner Arbeit in seiner Gänze danke ich Ina und Laura sowie Jörn, Sven, Hannah und der Apothekerin Anna Lena G. für die Korrektur wichtiger Schlüsselkapitel.

Fernab vom Promotionsleben danke ich meinen Freunden für den stetigen Ausgleich und Ablenkung in schwierigen Phasen. Danke Möllers, danke Rudel, danke Hannah, danke TuS Eichlinghofen Damemannschaften und so vielen mehr die mich auf meinem Weg begleitet haben. Danke Franzi, ohne dich wäre dieses letzte Jahr unfassbar anstrengend geworden.

*Last but not least*, danke ich meiner mir gegenüber, sehr loyalen Familie, für den Rückhalt und das stetige Vertrauen in mein Handeln. Meinem Vater Stefan Quambusch danke ich für die immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen.

„Später habe ich begriffen, wie irrtümlich diese meine Auffassung war und wie viel Dank speziell jede in einem geistigen Beruf tätige Frau den Frauen schuldig ist, die um die Gleichberechtigung gekämpft haben.“

LISE MEITNER, 1953

RIAS Berlin





# Inhaltsverzeichnis

<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>VII</b>
<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>IX</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>XII</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>KURZFASSUNG</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XX</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. CHEMISCHE BIOLOGIE: WERKZEUGE FÜR DIE WIRKSTOFFFORSCHUNG.....	2
1.1.1. Sondenmoleküle zur Entschlüsselung biologischer Fragestellungen .....	4
1.1.2. Selektivität niedermolekularer Verbindung.....	5
1.2. DIE PROTEINKINASE AKT .....	8
1.2.1. Die Akt Isoformen und ihre Funktionen.....	11
1.2.2. Akt Isoform-spezifische Signale .....	13
1.3. ADRESSIERUNG DER PROTEINKINASE AKT .....	15
1.3.1. Klinisch-relevante Akt Inhibitoren.....	16
1.3.2. Kovalent-allosterische Modulation von Akt.....	18
<b>2. MOTIVATION UND ZIELSETZUNG</b> .....	<b>20</b>
<b>3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>22</b>
3.1. ENTWICKLUNG EINER FOKUSSierten SUBSTANZBIBLIOTHEK .....	22
3.1.1. Analyse von Homologiemodellen .....	22
3.1.2. Strukturbasiertes Design und Modellierung .....	26
3.1.3. Synthetische Darstellung .....	31
3.1.3.1. Gewinnung des östlichen Molekülteils .....	32
3.1.3.2. Modifikationen der biarylischen Ringsysteme.....	35
3.1.3.3. Derivatisierung des Pyridin-Grundgerüsts .....	40
3.2. CHARAKTERISIERUNG DER SUBSTANZBIBLIOTHEK .....	48
3.2.1. Studien zu inhibitorischen Eigenschaften.....	48
3.2.2. Kinetische Evaluation.....	62
3.2.2.1. Etablierung des kinetischen Assaysystems .....	65
3.2.2.2. Analyse der kovalenten Liganden.....	68
3.2.3. Strukturanalyse Akt isoform-spezifischer Inhibitoren.....	74
3.2.4. Massenspektrometrische Evaluation .....	77
3.3. ZELLULÄRE CHARAKTERISIERUNG DER SELEKTIVEN INHIBITOREN .....	82
3.3.1. Analyse mit dem Ba/F3 Modellsystem.....	82
3.3.2. Studien in Krebszelllinien .....	88
3.4. ENTWICKLUNG UND EINSATZ FUNKTIONALISierter SONDENMOLEKÜLE .....	91
3.4.1. Darstellung selektiver Alkin-Sonden.....	92
3.4.2. Biochemische Charakterisierung der selektiven Sonden.....	94
3.4.3. Modifizierung der Reportergruppe .....	96
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>99</b>

<b>5.</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>102</b>
5.1.	METHODEN.....	102
5.1.1.	Computergestützte Methoden .....	102
5.1.1.1.	Sequenzvergleich.....	102
5.1.1.2.	Homologiemodell .....	102
5.1.1.3.	Docking und Modellierung.....	102
5.1.2.	Biochemische Charakterisierung.....	103
5.1.2.1.	Aktivitätsbasiertes Assaysystem (KinEASE™) .....	103
5.1.2.2.	Kinetischer Assay (PhosphoSens) .....	106
5.1.3.	Expression der Akt Isoformen.....	107
5.1.4.	Kristallisation von Akt1WT .....	109
5.1.5.	Protein Massenspektrometrie .....	109
5.1.5.1.	Tryptischer Verdau und Peptid Reinigung .....	110
5.1.5.2.	Tandem-Massenspektrometrie.....	111
5.1.6.	In-Gel Experimente .....	112
5.1.6.1.	in situ-Click-Chemie.....	112
5.1.6.2.	Proteinauftrennung über SDS-PAGE .....	113
5.1.7.	Zelluläre Charakterisierung.....	113
5.1.7.1.	Zelllinien.....	113
5.1.7.2.	Etablierung des Ba/F3myr-Akt Isoform Systems .....	114
5.1.7.3.	Zellviabilitäts Assay .....	115
5.1.7.4.	Western Blot .....	115
5.1.7.5.	CETSA Experimente .....	117
5.2.	ORGANISCHE SYNTHESE .....	117
5.2.1.	Allgemeine Anmerkungen .....	117
5.2.2.	Materialien und Methoden .....	117
5.2.3.	Allgemeine Synthesevorschriften.....	118
5.2.4.	Verbindungsverzeichnis.....	120
5.2.5.	Synthesevorschriften und Analytik .....	123
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>196</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>211</b>
7.1.	Sequenzvergleich .....	211
7.2.	Homologiemodell.....	212
7.3.	Selektivitätsquotienten.....	213
7.4.	PhosphoSens Etablierung.....	214
7.4.1.	Herleitung der exponentiellen Gleichung (1) .....	214
7.4.2.	Etablierungsdaten.....	217
7.5.	Komplexstrukturen.....	218
7.6.	Massenspektren.....	221
7.6.1.	Proteinmassen .....	221
7.6.2.	Tandem-MS/MS .....	224
7.7.	Viabilitätsdaten .....	226
7.8.	CETSA Immunoblots.....	229
	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG (AFFIDAVIT).....</b>	<b>230</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\mu$ w	Mikrowellenstrahlung
Abb.	Abbildung
ABPP	Aktivitäts-basierte Protein Profilierung
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP-PNP	Adenyl imidophosphat
APBS	<i>Adaptive poisson-boltzmann solver</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i>
BAD	<i>Bcl-2-antagonist of cell death</i>
BCA	Bicinchoininsäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-Gruppe
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
BTK	<i>Brutons tyrosine kinase</i>
Bu	Butanol
CAAI	<i>Covalent-allosteric Akt inhibitors</i>
cAbl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
Cas9	Caspase 9
CETSA	<i>Cellular thermal shift assay</i>
ChEF	<i>Chelation-enhanced fluorescence</i>
CK2	Casein kinase 2
COX	Cyclooxygenase
CRISPER	<i>Clustered regularly interspaced shot palindromic repeat</i>
c-Src	<i>Cellular sarcoma</i>
CTG	CellTiterGlo
CuAAC	Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Zykloaddition
CYP	Cytochrom-Protein
DB	Detektionspuffer
DBPO	Dibenzoylperoxid
DCM	Dichlormethan
dd	doppelt destilliert
DDHD	Drug Discovery Hub Dortmund
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleotide acid</i>

DNA-PK	<i>DNA-dependent serine/threonine protein kinase</i>
dppf	Diphenylphosphino ferrocen
DTT	Dithiothreitol
EB	Enzypuffer
EC50	Halbmaximale effektive Konzentration
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Erk	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FA	<i>Formic acid</i>
Fluoro.	Fluorophor
FOXO	Forkhead-Box-Proteine
FP	<i>Fluorescence polarization</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
ges.	gesättigt
GLUT-4	Glukosetransporter-4
GMP	Guanosinmonophosphat
GSK3	Glykogensynthase-3
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorphosphat
HCD	<i>High energy collision dissociation</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HM	Hydrophobes Motiv
HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HRMS	<i>High-resolution mass spectrometry</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HTRF	<i>Homogenous time-resolved fluorescence</i>
IC50	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IL-3	Interleukin-3
ITC	<i>Isothermal titration calorimetry</i>
Kat	Katalysator
KD	Kinase-Domäne
$K_i$	Reversible Bindungsaffinität
$K_I$	Inhibitionskonstante

$k_{\text{inact}}$	Maximale Inaktivierungsrate
$K_M$	Michaelis-Konstante
LCMS	Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
MAPK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase
Me	Methyl
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSD	Merck Sharpe & Dome
mTORC2	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
NBS	N-Bromsuccinimid
NCT	<i>National clinical trial number</i>
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie
NSCLC	Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
NTA	Nitrilotriessigsäure
ODE	<i>Ordinary differential equations</i>
ovn	Über Nacht
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Pharmakodynamik
pdb	Protein Daten Bank
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PE	Petrolether
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PHLPP	PH-Domänen- und Leucin-reiche Phosphatasen
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIF	PDK1-interagierendes Fragment
PIP <sub>2</sub> /PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat/-triphosphat
PK	Pharmakokinetik
PKB	Proteinkinase B
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PROTAC	<i>Protelysis targeting chimera</i>
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
quant.	quantitativ

RFU	<i>Relative fluorescence unit</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSK1/2	Ribosomale Proteinkinase
rt	Raumtemperatur
SAR	<i>Structure activity relationship</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SH	<i>Src-homology 2 domain</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SILAC	<i>Stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Sox	Sulfonamido-oxin
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
STK	Serin-/Theronin-Kinase
STV	Streptavidin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCM	Tetrachlormethan
TEA	Triethylamin
TEAB	Triethylammoniumbromid
TEV-Protease	<i>Tobacco Etch Virus protease</i>
TFA	Trifluoroessigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLC-MS	Dünnschichtchromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
vgl.	vergleiche
WBB	Wasserstoffbrückenbindungen
wt	Wildtyp

## Kurzfassung

Als zentraler negativer Regulator der Apoptose ist die Proteinkinase Akt mit ihren drei Isoformen (Akt1/Akt2/Akt3) entscheidend für das Überleben der Zelle und eine Schlüssel-Zielstruktur in der Wirkstoffforschung. Für ein anhaltendes Scheitern klinischer Akt Wirkstoff-Kandidaten im Kontext der gezielten Krebstherapie mag der Mangel an Informationen über die Akt Isoformen und ihrer pathophysiologischen Rolle in humanen Krankheitsbildern mitverantwortlich sein. Das komplexe Netzwerk der homologen Proteinkinasen konnte bislang anhand von molekular-biologischen Methoden nicht eindeutig aufgelöst werden. Einschnitte in das Interaktom durch genetische Entfernung von Akt ist überschattet durch Redundanzen der anderen homologen Isoform oder mögliche Kompensierungsprozesse über alternative Signalwege. Es bedarf einer gezielten temporalen Kontrolle der Funktionen ebendieser Enzyme, um verknüpft Interaktionsprofile in einer physiologisch-relevanten Zeitskala zu evaluieren. Diese Pertubationsstudien können elementare Grundsteine für neue innovative therapeutische Ansätze liefern sowie dabei helfen, toxische Nebenwirkungen der bisher bekannten Wirkstoffe einzuordnen und diese Vorteile in vielversprechende Behandlungsstrategien zu übersetzen.

Die allosterische Adressierung einer Interdomänen-Bindetasche in Akt mit pharmakologisch-vorteilhaften kovalenten Liganden erwies sich als äußerst vielversprechend. Besonders in Bezug auf Affinität und Selektivität gegenüber ATP-kompetitiven Inhibitoren. Bereits identifizierte allosterische Verbindungen wiesen ein interessantes Selektivitätsprofil gegenüber den Akt Isoformen auf, welches in Kombination mit einer irreversiblen Alkylierungs-Strategie deutlich verbessert werden konnte. Ausgehend von diesen Einblicken in die Struktur-Aktivitätsbeziehung der jeweiligen vermeintlich Isoform-selektiven Liganden sollten weitere Optimierungen durchgeführt werden, um sehr potente, funktionelle Sondenmoleküle zu gewinnen.

Die eingeschränkte Verfügbarkeit von Akt2 und Akt3 Kristallstrukturen konnte mithilfe von Homologiemodellen und detailliertem Sequenzvergleich überwunden werden, um grundlegende Informationen für ein gezieltes Design allosterischer Liganden zu erlangen. Aus den modell-abgeleiteten Bedingungen wurde eine Substanzbibliothek strukturbasiert entworfen und unter Verwendung effizienter synthetischer Strategien umgesetzt. Auf Basis von 50 kovalent-allosterischen Akt Inhibitoren (CAAI) konnten anhand biochemischer Daten Rückschlüsse auf die Struktur-Aktivitätsbeziehung der Liganden gezogen werden. Infolgedessen gelang eine detaillierte Aufschlüsselung von vermeintlichen Bindepräferenzen der allosterischen Akt Isoform-Bindetaschen samt Offenlegung umfangreicher Selektivitätsprofilen der Inhibitoren. Ferner konnten die irreversiblen Eigenschaften der kovalenten Verbindungen ergründet sowie neue strukturelle Einblicke in die Protein-Ligand-Wechselwirkung mithilfe von Röntgenstrukturanalyse gewonnen werden.



Weiterführend konnten die biochemisch erfassten Selektivitätsprofile der Inhibitoren in ein Akt-Isoform abhängiges Zellsystem übersetzt werden, welches es erlaubt, im Hochdurchsatz und ohne Einschränkung durch gewebsspezifische Expressionslevel die Aktivität der Liganden zu bewerten. Außerdem ermöglichte die Identifizierung von Inhibitoren mit optimalen Selektivitätsfenstern im Ba/F3-Modell-Systemen tiefergehende Studien mit der komplexeren Krebszelllinie PANC1. Daraus resultierte die Ergründung von vorteilhaften Inhibitor-Konzentrationen, welche eine selektive Adressierung der jeweiligen Akt Isoform in zellulären Systemen gewähren.

Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit funktionalisierte Alkin-Sonden aus den Akt2-selektive Pyrazinon CAAs gewonnen werden. Als *proof-of-concept* glückte in ersten *in gel* Fluoreszenz-Studien die gezielte Modifizierung der Alkin-Funktionalität über eine Kupfer-vermittelte *Click*-Reaktion mit einem Fluorophor. Diesen chemischen Werkzeugen vermag es gelingen, die Funktionen der Akt Isoformen in komplexen Systemen zu entschlüsseln und ihre Aufgabe in pathophysiologischen Zusammenhängen aufzuklären. Neben der elementaren Rolle in funktionellen Studien stellen die erarbeiteten selektiven Liganden potentielle Wirkstoff-Vorläufer dar, die ein hohes Potenzial besitzen Teil einer innovativen Lösung zur erfolgreichen Adressierung der Proteinkinase Akt und ihrer Isoformen im klinischen Kontext zu sein.

## Abstract

As a central negative regulator of apoptosis, the protein kinase Akt with its three isoforms (Akt1/Akt2/Akt3) is crucial for cell survival and an essential target structure in drug discovery. The lack of information about Akt isoforms and their pathophysiological role in human disease may be partly responsible for the persistent failure of clinical Akt drug candidates in the context of targeted cancer therapy. Genotypic alterations could not explicitly resolve the complex network of homologous protein kinases. Incisions in the interactome by genetic removal of Akt are governed by the other homologous isoform redundancies or possible compensation processes via alternative signaling pathways. Targeted temporal control of the functions of these same enzymes is required to evaluate linked interaction profiles on a physiologically relevant time scale. These perturbation studies can provide valuable insights for new innovative therapeutic approaches and help classify toxic side effects of the currently known active substances and translate these advantages into clinical perspectives.

Allosteric targeting of an interdomain binding pocket in Akt with pharmacologically beneficial covalent ligands proved exceptionally promising, especially in terms of affinity and selectivity compared to ATP-competitive inhibitors. Already identified allosteric compounds showed an interesting selectivity profile towards Akt isoforms, which could be significantly improved in combination with an irreversible alkylation strategy. Further optimizations should be carried out to seize potent, functional probe molecules based on these insights into the structure-activity relationship of the respective reported isoform-selective ligands.

The limited availability of Akt2 and Akt3 crystal structures could be overcome with the help of homology models and detailed sequence alignment to access basic information for the development of allosteric ligands. A compound library was designed in a structure-based manner from the model-derived conditions and implemented using efficient synthetic strategies. Based on 50 covalent-allosteric Akt inhibitors (CAAI), biochemical data allowed conclusions drawn about the ligands' structure-activity relationship. As a result, a detailed breakdown of putative binding preferences of the allosteric Akt isoform ligands, including wide-ranging selectivity profiles of those inhibitors, was achieved. Likewise, the covalent compound's irreversible properties were elucidated, and with the help of X-ray analysis, new structural insights into the protein-ligand interaction were gained.

Moreover, the biochemically identified selectivity profiles of the inhibitors could be translated into an Akt isoform-dependent cell system, which allows the high-throughput analysis of ligand activity without being limited by tissue-specific expression levels. Identifying inhibitors with optimal selectivity in the Ba/F3 model systems enabled in-depth studies with the more complex cancer cell line PANC1. It led to the discovery of advantageous inhibitor concentrations that facilitate selective targeting of the respective Akt isoform in cellular systems.

Furthermore, functionalized alkyne probes based on Akt2-selective pyrazinone CAAIs were obtained in this work. As a proof-of-concept, the first *in gel* fluorescence studies succeeded in the targeted modification of alkyne functionality via a copper-mediated click reaction with a fluorophore. These chemical tools make it possible to decipher the Akt isoforms' functions in complex systems and elucidate their role in pathophysiological contexts. In addition to their possible role in functional studies, the selective ligands developed represent possible drug precursors that have a high potential to be part of an innovative solution for successfully addressing the protein kinase Akt and its isoforms in a clinical context.



## 1. Einleitung

Der Einsatz von biologisch-aktiven Substanzen zur Behandlung humaner Krankheitsbilder ist seit Beginn der Antike ein Grundstein für die Eindämmung verheerender Pandemien.<sup>1,2</sup> Diese Erkenntnisse bedingen unsere weltliche Zivilisation. Nach über einem Jahrhundert systematischer Arzneimittelforschung sind viele Krankheitsbilder phänotypisch, meist sogar genotypisch kartiert, jedoch fehlen differenzierte Einblicke in das Geschehen zwischen kleinster molekularer und komplexer zellulärer Ebene.

Unter der zentralen Frage: „wie ein Arzneistoff wirke?“, legte vor allem EMIL FISHER, 1894 mit seiner Definition des Schlüssel-Schloss-Prinzips für die Protein-Ligand-Wechselwirkung den wegweisenden Gedanken für die gezielte Arzneistoffentwicklung des 20. Jahrhunderts.<sup>3,4</sup> Ebenso prägte PAUL EHRLICH 1913 mit seiner Beobachtung „die Körper wirken nicht, wenn sie nicht gebunden sind“ (lat. *copora non agunt nisi fixata*) das Forschungsfeld seiner Zeit.<sup>5,6</sup> Als Konsequenz rückte die Auflösung des Protein-Ligand-Komplexes in den Fokus der Forschung. Pionierarbeiten in der strukturbasierten Entwicklung von maßgeschneiderten Wirkstoffen erbrachten BEDELL und GOODFORD 1973, denen die Adressierung von Hämoglobin gelang.<sup>7</sup> Aufgrund technischen Fortschritts und stetiger Optimierung innerhalb der Strukturaufklärung von makromolekularen Komplexen erfuhr die Arzneimittelforschung einen revolutionären Durchbruch. Dank Röntgenbeugungsexperimenten und Elektronen-Mikroskopie gelang die Auflösung von mehr als 150,000 proteinogenen Strukturen bis heute.<sup>a</sup>

Durch die vollständige Entschlüsselung des menschlichen Genoms (2003) erreichte die Lebenswissenschaft eine „postgenomische Ära“.<sup>8,9</sup> Eine Vielzahl molekular-biologischer Methoden (*siRNA*, *shRNA* CRISPER/Cas9) ermöglichen es Gene aufgrund ihrer bekannten Baupläne gezielt auszuschalten.<sup>10-12</sup> Daraus gewonnene phänotypische Beobachtungen erlauben Rückschlüsse auf die Funktionen des genetisch-entfernten Proteins. Diese Art von Eingriffen sind enorm verheerend für ein System mit hoher Komplexität, welches vor allem durch systembiologische Feedback-Mechanismen im Gleichgewicht gehalten wird. Eine Deletion der molekularen Schalter kann keineswegs abbilden was für Auswirkungen das ursprünglich gewollte Ausschalten der Funktion bedeutet, da beispielsweise Kompensierungs-Mechanismen auf zellulärer Ebene einsetzen. Somit ist es unabdingbar robuste Techniken zu entwickeln, die eine gezielte Zerlegung ebendieses dynamischen Geschehens zwischen Protein-Funktion und physiologischer Auswirkung ermöglichen. Fortfolgend vermag diese Aufschlüsselung neue therapeutische Vorteile definieren und alternative Lösungsansätze für die Behandlung bestimmter Krankheitsbilder liefern.

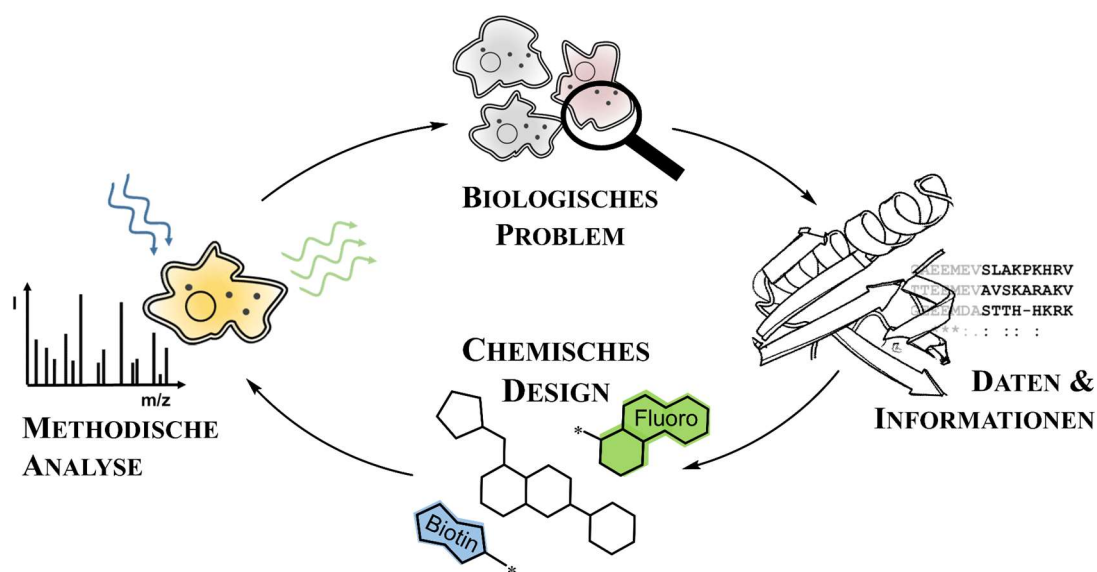
---

<sup>a</sup> Protein Strukturen in der PDB (*open access* Protein Daten Bank, April 2021)

## 1.1. Chemische Biologie: Werkzeuge für die Wirkstoffforschung

Die offensichtliche Wissenslücke zwischen Wirkort und Auswirkung der Arzneimittelgabe auf zellulärer Ebene verhalf bei der Entstehung neuer Wissenschaftsbereiche, welche gezielt Lösungen für ebendiese Phänomene suchen. Das Feld der chemischen Biologie, welches sich in den 90ern als interdisziplinäre Wissenschaft entwickelte und sich mit der Anwendung von chemischen Methoden und Techniken zur Untersuchung von biologischen Fragestellungen auseinandersetzt, ist heutzutage eine wichtige Kenngröße in der Wirkstoffforschung.<sup>13</sup>

Viele Ansätze aus diesem Bereich beginnen mit einer detaillierten Analyse des biologischen Phänomens unter Berücksichtigung struktureller Informationen bezüglich der involvierten Biomakromoleküle oder chemischer Interaktionspartner (vgl. Abb.1.1-1).<sup>14</sup> Diese Grundlage dient der gezielten Entwicklung chemischer Werkzeuge, die es erlauben in weiteren Experimenten die zu adressierende Fragestellung tiefergehend zu beleuchten. Allein aus dem Entstehungs- und Evaluierungsprozess der Modulatoren oder chemischen Reporter können neue Einblicke in die Mechanismen des ursprünglichen Phänomens erhalten werden.



**Abb. 1.1-1: Schematische Darstellung einer iterativen Herangehensweise in der chemischen Biologie.** Startpunkt ist das biologische Problem/Phänomen, abgeleitet davon werden bekannte Daten und strukturelle Informationen analysiert. Darauf folgt das chemische Design möglicher niedermolekularer Verbindungen oder Reportergruppen (Fluorophore oder Affinitäts-Tags wie Biotin), die dann in methodischen Analysen genutzt werden, um die ursprüngliche Frage zu evaluieren. Abbildung adaptiert von WALDMANN & JANNING (2015).<sup>15</sup>

Nicht nur bioaktive Moleküle entstehen aus der chemisch biologischen Sichtweise, sondern ebenso grundlegende Techniken, welche erlauben komplexe Fragestellungen effizienter zu untersuchen bzw. zu veranschaulichen. Es gelang beispielsweise die Entwicklung von bioorthogonalen Methoden für die gezielte chemische Modifizierung von Makromolekülen in ihrer nativen Umgebung, welches erlaubt das System zu beeinflussen. Die Ausarbeitung der „Click-Chemie“ setzte den Grundstein für diese Vorhaben und beschleunigte die *in vitro* sowie *in vivo* Identifizierung von Protein-Modulatoren.<sup>16,17</sup> Weiterhin gelang es SCHULTZ *et al.* nicht-kanonische Aminosäuren im zellulären System durch Erweiterung

des proteinogenen Codes einzuführen, an welchen ebenso chemische Modifikationen ermöglicht werden.<sup>18,19</sup>

Die Entwicklung von RNA-interferierenden (engl. *ribonucleic acid*) Methoden und der dadurch gezielten Ausschaltung von Genen stellt die Basis der modernen *knock-down* Techniken dar.<sup>20</sup> Darin inbegriffen sind Methoden basierend auf siRNA (engl. *small interfering RNA*, shRNA (engl. *short hairpin RNA*) und die CRISPR/Cas9 (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*).<sup>10-12,21,22</sup> Besonders wertvoll ist diese Herangehensweise zur Validierung der postulierten Wirkmechanismen von bioaktiven niedermolekularen Verbindungen in Zellen. Dies ist ebenfalls bekannt als *reverse chemical genetics*.<sup>23,24</sup> Dementsprechend kann daneben die Methode der *forward chemical genetics* eingesetzt werden, in welcher zunächst der Einfluss von bioaktiven Molekülen auf einen Phänotyp evaluiert wird.<sup>25,26</sup> Weitere Untersuchungen liefern letztlich die adressierte Zielstruktur der Verbindung und eröffnen dadurch neue therapeutische Strategien. Vor allem im Kontext der Identifizierung dieser neuerschlossenen Zielstrukturen spielt die Massenspektrometrie und die sogenannten *Proteomics* eine zentrale Rolle.<sup>27</sup> Die Isotopen-Markierung (SILAC, engl. *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) von zellulären Kompartimenten erlaubt beispielsweise quantitative Einblicke in die spezifischen Interaktionspartner der niedermolekularen Verbindung.<sup>28,29</sup>

Eine steigende Bedeutung erhält der chemische *knock-down*, vermittelt durch niedermolekulare Verbindungen, denen es gelingt, die intrinsische, zelluläre Maschinerie des kontrollierten Protein-Abbaus zu nutzen, um die Proteinlevel signifikant zu senken.<sup>30</sup> Die Technik der PROTACS (engl. *proteolysis targeting chimeras*) nutzt bifunktionale Moleküle, die gezielt an die Zielstruktur binden und zeitgleich die E3-Ligase rekrutieren, welche die Ubiquitinierung des Proteins bewirkt und somit das Signal zum proteasomalen Abbau einführt.<sup>31</sup> Eine Anwendung dieses Konzeptes auf weniger affin-bindende, jedoch selektive Liganden, ermöglicht die Transformation dieser Moleküle zu hoch-effektiven Antagonisten.<sup>32</sup>

Nicht zu vernachlässigen sind die Erfolge vieler *in silico* Methoden, welche sich nicht nur mit der Prozessierung der Unmengen an aktivitäts-basierenden Daten von Millionen niedermolekularer Verbindungen beschäftigen, sondern ebenso die Aktivitäts-Vorhersage aus virtuellen Screenings abbilden.<sup>33-35</sup> Dies liefert nicht nur mögliche Auswege für neue, synthetische Zielmoleküle, sondern vermag ebenso Nebenwirkungen und unerwünschte Arzneimittelwirkungen vorherzusagen.<sup>20,36,37</sup> Eine solche Herangehensweise erspart den Wissenschaftler:innen Zeit und wichtige Ressourcen in der Adressierung biologischer Fragestellungen. Weiter kann anhand molekularer Dockingstudien für potentielle Liganden eine relevante Bindungsgeometrie innerhalb der Zielstruktur berechnet und so das Design neuer Inhibitoren unterstützt werden.<sup>38</sup> Vor allem im herannahenden Zeitalter der künstlichen Intelligenz werden computergestützte Methoden mehr Gewichtung erhalten und sicherlich zum Erfolg vieler chemisch biologischer Projekte verhelfen.<sup>39</sup>

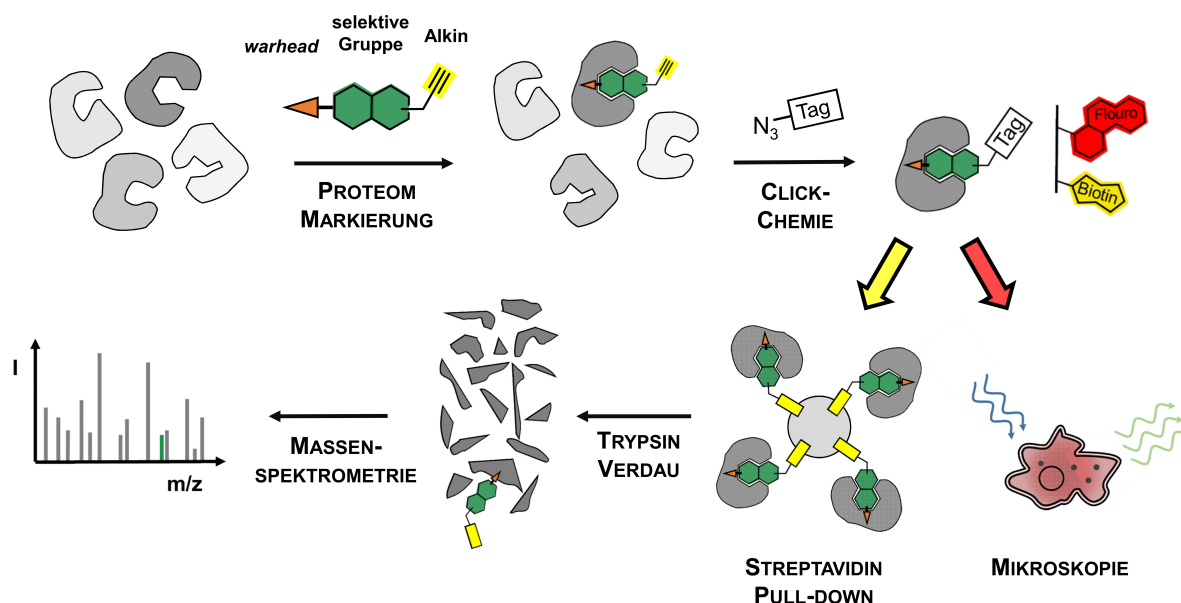
### 1.1.1. Sondenmoleküle zur Entschlüsselung biologischer Fragestellungen

Innerhalb der chemischen Biologie wird oft der Einsatz von niedermolekularen Verbindungen genutzt, um biologische Fragestellungen weitreichender zu beleuchten. Diese bioaktiven Moleküle können eine schnelle und gezielte Modulation der Proteinzielstruktur bewirken, indem sie beispielsweise die katalytische Funktion des Enzyms inhibieren.<sup>40</sup> Solche Pertubationsstudien weisen deutliche Vorteile gegenüber genotypischer *knock-out* Untersuchungen auf, in welchen die vollständige Deletion eines Proteins die komplexen Interaktions-Netzwerke stark beeinflussen. Hingegen ermöglicht die gezielte Adressierung mit molekularen Sondenmolekülen eine schnelle und reversible Modulation der Proteine ohne drastische Alterationen des nativen Systems.<sup>41,42</sup> Die daraus resultierenden Phänotypen können anhand der eingesetzten Dosierung des Modulators zusätzlich beeinflusst werden und letztendlich Informationen bezüglich der Funktionen des zu untersuchenden Proteins liefern.<sup>43</sup>

Eine optimale chemische Sonde hat im Idealfall bestimmte Eigenschaften und erfüllt definierte Kriterien.<sup>44,45</sup> Die Verbindung sollte chemisch stabil und in wässrigen Medien löslich sein sowie eine gute biochemische Aktivität ( $< 100$  nM) für das Zielprotein besitzen. Zusätzlich sollte das Molekül eine gewisse zelluläre Potenz ( $< 1$   $\mu$ M) aufweisen. Bestenfalls gibt es einen biophysikalischen Nachweis über die Bindungseigenschaften und die molekulare Auswirkung auf die Zielstruktur. Außerdem wäre der Zugang zu bekannten inaktiven Strukturanaloga der Sonde wichtig. Weiterhin sollten diese Verbindungen keine unspezifisch-reaktiven Gruppen enthalten, welche beispielsweise UV-abhängige Analysen verfälschen können, weil die Moleküle selbst chromophore Eigenschaften besitzen. Neben der Aktivität ist die Selektivität der bioaktiven Substanzen essentiell, um die Rolle eines Proteins im (patho-)physiologischen Kontext zu analysieren, weshalb ein differenziertes Interaktions-Profil in der Sub-Familie ( $> 30$   $\mu$ M) der adressierten Zielstruktur vorhanden sein sollte.<sup>46</sup> Unter Verwendung dieser Kriterien formulierten im Sommer 2018 etliche Wissenschaftler:innen und Pharmaunternehmen ein ambitioniertes Ziel bis 2035: Die Generierung von molekularen Sonden zur gezielten Adressierung des gesamten menschlichen Genoms (*Target 2035: probing the human proteome*).<sup>47</sup> Schätzungen zu Folge sind nur 11 % des Proteoms bisweilen mit Liganden erreicht worden, wobei für etwa 4 % der Proteine ein entsprechendes Sondenmolekül entwickelt werden konnte.<sup>32</sup>

Als eine sehr prominente Technologie zur Identifizierung von potentiell relevanten Zielstrukturen unter Einsatz funktionalisierter Sondenmoleküle entwickelte sich das Feld der aktivitäts-basierenden Protein-Profilierung (ABPP), welches in Kombination mit massenspektrometrischer Analyse Einblicke in die Proteomik der adressierten Organismen gibt (vgl. Abb. 1.1-2).<sup>48,49</sup> Hierbei beruht die Strategie auf der Entwicklung von kovalenten Liganden, welche die aktive Tasche adressieren und durch die spezifische Reportergruppe quantitative Informationen über den funktionellen Zustand der adressierte Enzymklasse liefern.<sup>50</sup> Dabei ist der Ansatz darauf ausgelegt, basierend auf der Aktivität der ausgewählten Enzyme, dessen Rolle in spezifischen physiologischen und pathologischen Prozessen zu evaluieren.





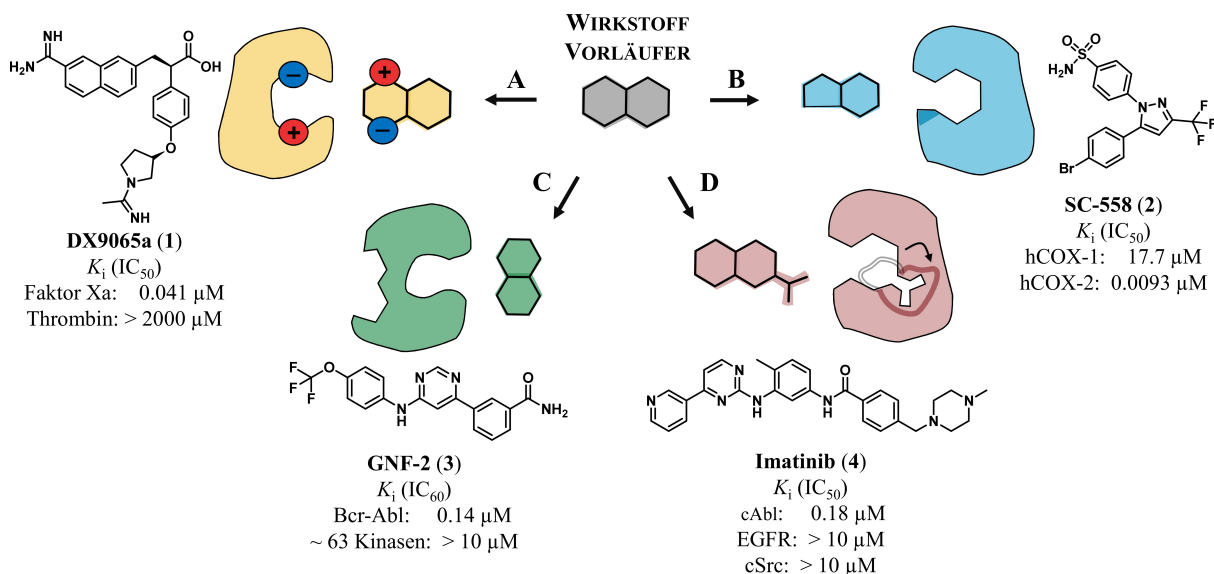
**Abb. 1.1-2: Übersicht der aktivitäts-basierenden Protein-Profilierung (ABPP).** Eine typische aktivitäts-basierende Sonde besitzt eine Bindungsgruppe (grün) mit reaktivem elektrophilen Strukturmotiv (orange) sowie einer funktionalisierbaren chemischen Gruppe (z.B. Alkin), an welcher Reportergruppen in bioorthogonaler Weise eingeführt werden können. In einem Experiment kann somit zunächst das komplexe Proteom durch die Sonde markiert werden. Anschließend wird das Alkin durch den entsprechenden Tag modifiziert, woraufhin spezifische Analysen vorgenommen werden können. Die Markierung mit einem Fluorophor erlaubt die Visualisierung in der Zelle, oder *in gel*. Im Falle einer Biotin-Markierung kann eine Streptavidin-vermittelte Anreicherung der Sonden-modifizierten Proteine erfolgen, welche nach proteolytischem Verdau mittels Massenspektrometrie untersucht und identifiziert werden können.

Der Grundaufbau solcher ABPP-Sonden besteht aus mindestens zwei charakteristischen Elementen, einer elektrophilen Gruppe, die es erlaubt nukleophile Aminosäure-Seitenketten zu adressieren sowie ein spezifisches Bindungselement, um definierte Bindungstaschen zu besetzen. Zusätzlich sollte die Sonde eine analytische Reportergruppe besitzen, welche für weitere Experimente modifiziert bzw. genutzt werden kann.<sup>48</sup> Anhand der bioorthogonal eingeführten Funktionalität kann das adressierte Enzym letztlich analysiert bzw. charakterisiert werden. Dafür eignen sich vor allem Fluorophore, Bindungsgruppen wie Biotin oder eine Vielzahl weiterer Azide, an welchen weitreichendere chemische Modifikationen vollzogen werden können. Somit ist der weitere experimentelle Aufbau von der eingesetzten Reportergruppe bestimmt. Unter anderem konnte die Anwendung dieser Funktionalisierungs-Strategie im Falle eines bekannten selektiven Inhibitors für RSK1/2 (ribosomale Proteinkinase) durch Konjugation mit Fluorophoren oder einem Biotin-Tag genutzt werden, um die biochemische Funktionsweise des Proteins tiefgehend zu untersuchen.<sup>51</sup> Ebenso gelang die quantitative Bestimmung der zellulären Zielstruktur-Besetzung durch Modifikation eines bekannten kovalenten BTK-Inhibitors und entsprechender Fluorophor-Funktionalisierung.<sup>52</sup>

### 1.1.2. Selektivität niedermolekularer Verbindung

Zur Aufklärung spezifischer Fragestellungen und der Analyse von noch unbekannt Funktionen der Zielstruktur ist vor allem die Selektivität der eingesetzten bioaktiven Verbindungen ein elementares

Kriterium. Es gibt eine Vielzahl an Studien, die Selektivitätsgewinnung ihrer Liganden offenlegen. Aus all den Vorarbeiten können gewisse Prinzipien abgeleitet werden, die bereits im Design-Schritt der Moleküle berücksichtigt werden können (vgl. Abb. 1.1-3).



**Abb. 1.1-3: Übersicht selektivitäts-vermittelnder Faktoren in der Wirkstoffforschung, sowie bekannte Beispiele.** (A) Einfluss der elektrostatischen Eigenschaften der Protein Bindetasche. (B) Die strukturelle Komplementarität und Passform sollten berücksichtigt werden. (C) Allosterische Inhibitionsmechanismen verschaffen einen hohen Vorteil gegenüber Struktur-verwandten Proteinen. (D) Konformationelle Unterschiede der Proteine kann Selektivität fördern. Abbildung in Anlehnung an HUGGINS et al.<sup>53</sup>

Ein fundamentaler Aspekt stellt die komplementäre Passform von Molekül und Protein-Bindetasche dar, welcher besonders durch Enzyme und ihre natürlichen Liganden deutlich wird, in welchen die molekulare Plastizität bzw. Erkennung der Struktur eine Voraussetzung für die Interaktion ist. Für die Entwicklung von selektiven COX-2 (Cyclooxygenase-2) Inhibitoren konnte beispielsweise Val5231 als Schlüssel-Seitenkette identifiziert werden, um Liganden wie SC-558 (2) mit 13000-facher Selektivität gegen COX-1 zu entwickeln.<sup>54</sup> Wird eine Konformation des Liganden von einem Protein bevorzugt, kann die Selektivität durch die Konservierung bzw. das Einfrieren ebendieser Passform anhand von chiralen Strukturelementen in der niedermolekularen Verbindung gesteigert werden. Dies gelang beispielsweise in dem kovalenten Ras-Inhibitor ARS-1620 über axiale Chiralität entlang einer biarylyischen Achse.<sup>55</sup> Im Gegensatz dazu kann die sogenannte *bump-and-hole* Strategie genutzt werden, um in einem chemisch-genetischen Ansatz die Bindetasche der Proteine durch Mutation zu vergrößern (*hole*) und dadurch einen Selektivitätsvorteil für entsprechende *bumped*-Liganden gegenüber den Wildtypen zu erzielen.<sup>56</sup>

Unterschiede in der Flexibilität der Zielproteine und besonders innerhalb konservierter Bindetaschen stellt einen weiteren Punkt für die Selektivitätsgewinnung dar, welches sich besonders im Feld der Kinase-Inhibitoren als vorteilhaftes Kriterium herauskristallisiert hat. In der Entwicklung von Imatinib (4) als selektiver Ligand der Kinase Abl (engl. *abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) gelang die Selektivitäts-Steigerung gegenüber anderen Familienmitgliedern durch die Adressierung der

sogenannten DFG-*out* Konformation.<sup>57</sup> Die flexible Aktivierungsschleife besitzt in der inaktiven Form des Enzyms eine andere Position, wodurch eine einzigartige hydrophobe Tasche neben der traditionellen ATP-Bindestelle okkupiert werden kann.

Weiterhin können Variationen in den elektrostatischen Oberflächen-Potentialen der Bindetaschen genutzt werden, um selektive Liganden zu entwickeln. Die chemischen Eigenschaften der Aminosäure-Seitenkette innerhalb der Protein-Kavität bestimmen durch ihre Polarisierung favorisierte und unfavorisierte Bindungspartner. Dem Konzern BOEHRINGER INGELHEIM gelang die Entwicklung eines Faktor Xa selektiven Inhibitors (**1**,  $K_i = 41 \text{ nM}$ ), ohne die homologe Bindetasche der Thrombin Protease ( $K_i > 2000 \text{ }\mu\text{M}$ ) zu adressieren.<sup>58</sup> Dabei nutzen sie eine elektrostatische Repulsion innerhalb des Aktivitätszentrums aus, welche durch Einführung einer Carboxylgruppe in den Liganden mit der negativ geladenen Glu192 Seitenkette in Thrombin kollidiert.<sup>59</sup>

Ebenfalls kann die thermodynamische Betrachtung von kleinen Wassermolekülen in hochkonservierten Bindetaschen dazu beitragen Selektivitätsvorteile für das jeweilige Protein zu identifizieren. Beispielsweise vermag diese Analyse auf nicht-redundante Solvensmoleküle hinweisen, welche durch den Inhibitor verdrängt und energetisch begünstigt freigesetzt werden können.<sup>53</sup> Im Falle der Src-Kinasefamilie (engl. *sarcoma*) konnte gezeigt werden, dass vor allem hinter der ATP-Bindestelle (Adenosintriphosphat), in der sogenannten *back-pocket*, Wassermoleküle unterschiedliche thermodynamische Eigenschaften besitzen, als vergleichsweise in der Bindetasche von anderen Proteinkinasen wie GSK3- $\beta$  (Glykogensynthase-3).<sup>60</sup>

Die innovativste Lösung für hochselektive Inhibitoren ist die Adressierung von allosterischen und somit nicht-kompetitiven Bindungskavitäten der Zielproteine, welche sich meist in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum befinden.<sup>61</sup> Dies umgeht vor allem die Homologie-Basis der natürlichen Liganden der Proteine und steht in viel geringerer Konkurrenz zu strukturell verwandten Bindetaschen. Für die Kinase Abl gelang es einen allosterischen Inhibitor (**3**, GNF-2) zu entwickeln, welcher die Myristoyl-Bindetasche des Proteins besetzt und eine ähnliche Potenz wie Imatinib besitzt.<sup>62</sup>

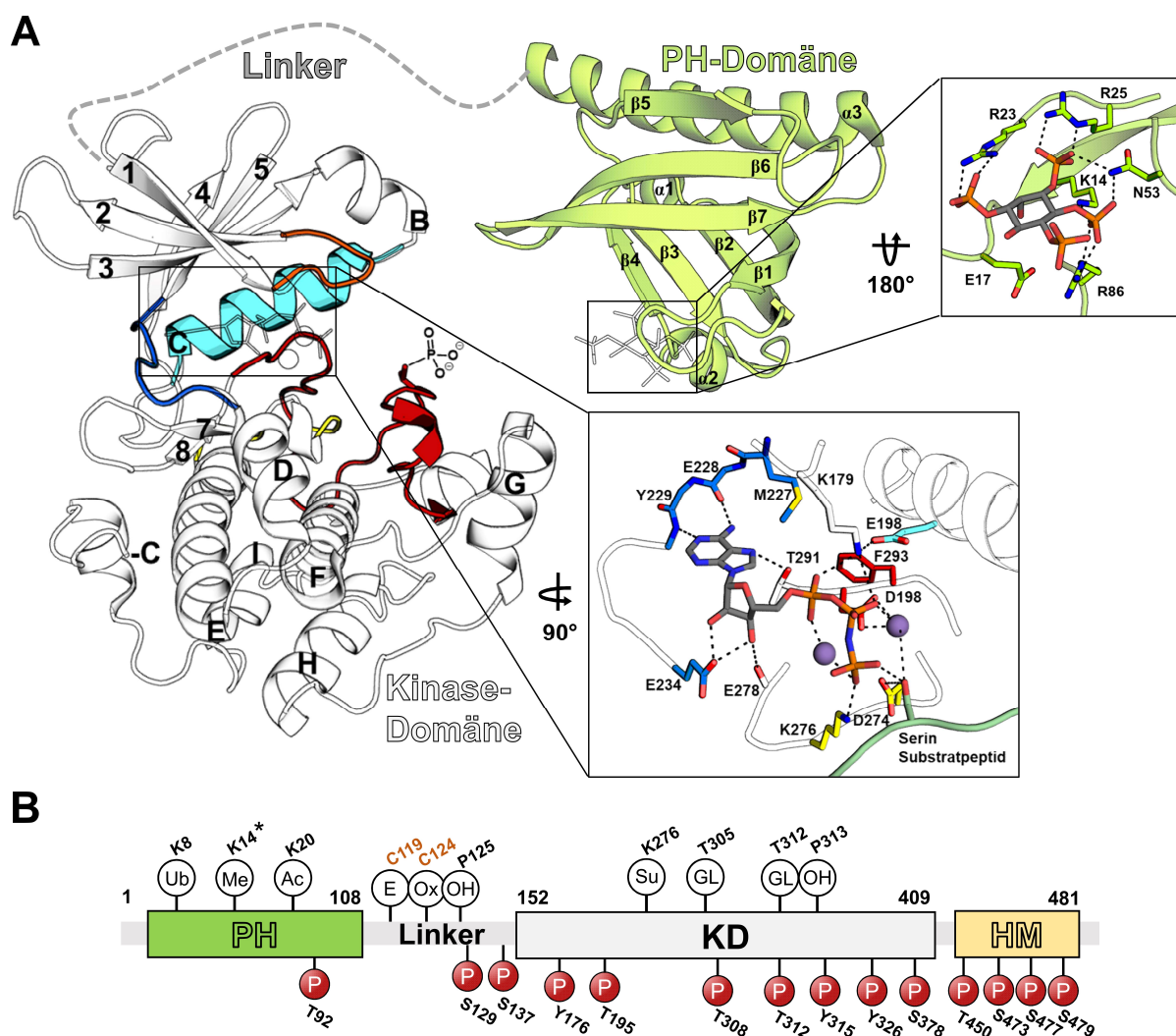
Fernab vom eigentlichen Bindungsprozess der Liganden gibt es unzählige weitere Parameter, welche in der komplexen Umgebung der Zielproteine Einfluss auf die Selektivität haben. Allein der Ungleichgewichtszustand der Zelle und die aktiven Transport-Mechanismen über die Zellmembran können von Nutzen sein, um die Selektivität der Inhibitoren zu beeinflussen.<sup>63</sup> Das Konzept der Prodrugs nutzt eben diesen Transport sowie die Modifikation des Moleküls im Innern der Zelle aus, um eine erhöhte Zellgängigkeit zu erzielen.<sup>64</sup> Der Wirkstoff Banoxantrone kann beispielsweise durch seine Struktur die Blut-Hirnschranke passieren und wird aufgrund von hypoxischen Bedingungen von CYPs (Cytochrom-Proteine) reduziert, wodurch es den selektiven Transport ins Hirn erlangt.<sup>65</sup>

## 1.2. Die Proteinkinase Akt

Die Enzymklasse der Kinasen gehört zu den Transferasen und katalysiert die  $\gamma$ -Phosphatgruppen-Übertragung von ATP auf die Hydroxyl-Gruppen ihrer Substrate oder im Fall der Proteinkinasen auf spezifische Aminosäureseitenketten. Mit der Einführung einer solchen negativ geladenen Phosphatgruppe ist der Einfluss auf die strukturelle Konformation der Zielproteine groß. Diese posttranslationale Modifikation (PTM) kann die Funktion der Proteine stark beeinflussen, darunter die direkte katalytische Aktivität oder die Veränderung der Interaktionsfläche für andere Proteinbindungspartner, welches mit einem „An/Aus“ Schalter verglichen werden kann.<sup>66</sup> Anhand dieser weitreichenden funktionellen Auswirkung wird die Schlüsselfunktion der Klasse der Proteinkinasen innerhalb der Zelle und vor allem in der Signaltransduktion deutlich.

Akt oder auch Proteinkinase B (PKB) ist ein Vertreter der AGC-Familie, verwandt zu AMP/GMP Kinasen (Adenosin-/Guanosinmonophosphat) sowie Proteinkinase C und wurde 1987 von STAAL *et al.* als virales Onkogen in Lymphomen der Maus identifiziert.<sup>67,68</sup> Erst 1991 gelang es ebendiese Kinase zu klonen und exprimieren.<sup>69,70</sup> Es gibt drei strukturell verwandte Akt Isoformen (Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$  und Akt3/PKB $\gamma$ ), die jeweils andere chromosomale Genloci besitzen.<sup>70-74</sup> Aufgrund einer hohen Sequenzhomologie teilen die Isoformen essentielle Strukturelemente (vgl. Abb. 1.2-1, Anhang 7.1).<sup>75</sup>

Die Isoformen von Akt lassen sich in drei konservierte Domänen unterteilen: eine N-terminale PH-Domäne (*pleckstrin homology*), die Kinase-Domäne und eine C-terminale Extension, die ein regulatorische, hydrophobes Motiv enthält.<sup>76</sup> Dabei befindet sich das katalytische Zentrum in der hoch konservierten Kinase-Domäne (Position 152-409). Die aktive Tasche liegt zwischen der N-terminalen,  $\beta$ -Faltblatt-reichen und der C-terminalen,  $\alpha$ -Helix-reichen Subdomäne, welche über eine flexible Scharnierregion verbunden sind (vgl. Abb. 1.2-1A). Diese Domäne und ihre Struktur motive sind ubiquitär innerhalb des menschlichen Kinoms und besitzen eine Redundanz von  $> 87\%$  zwischen den Akt Isoformen.<sup>75</sup> Weiterhin ist über den N-Terminus zuzüglich eines flexiblen Linkers die PH-Domäne an die zuvor beschriebene Kinase-Domäne verknüpft. Dieses ebenfalls hochkonservierte  $\beta$ -Faltblatt-reiche Strukturelement besitzt eine homologe polare Bindetasche für phosphorylierte Inositol-Lipidzucker und ist in vielen Membran-bindenden Proteinen in der Zelle präsent, wie beispielsweise kleinen GTPasen (Guanosintriphosphat) oder Phospholipasen. Im Falle von Akt besitzt die Domäne eine regulative Rolle in der Aktivierung des Enzyms.<sup>77</sup> Am C-Terminus besitzt die Kinase ein hydrophobes Motiv, welches intramolekular mit der N-terminalen Subdomäne der Kinase zwischen  $\alpha$ B- und  $\alpha$ C-Helix wechselwirken kann.



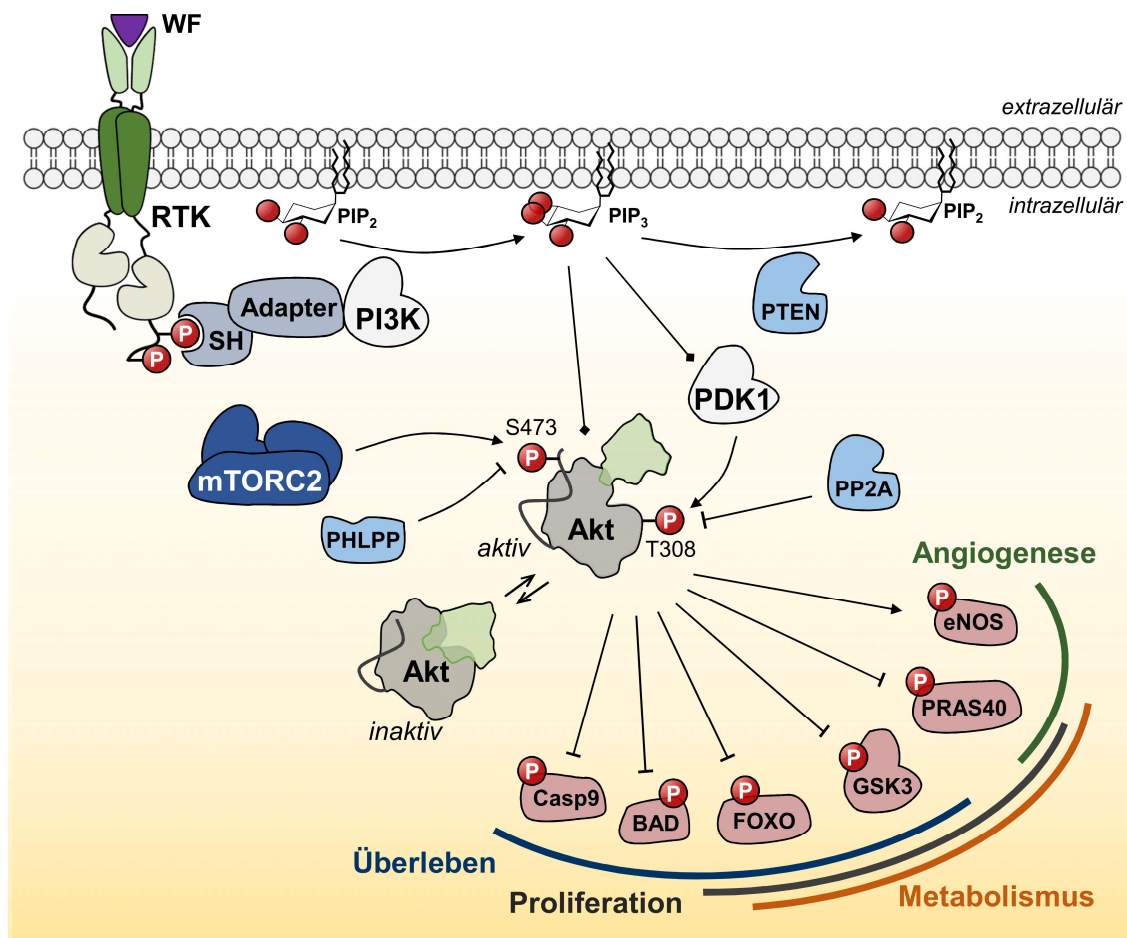
**Abb. 1.2-1. Allgemeiner Aufbau der Proteinkinase Akt sowie ihrer regulatorischen Bindungskavitäten.** (A) Ko-Kristallstruktur der Kinase-Domäne (grau pdb: 4ekk) im Komplex mit ATP Analogon AMP-PNP (Adenyl imidodiphosphat) und Mangan(II)-Ionen. Sekundärelemente des Proteins sind annotiert und regulatorische wichtige Motive farblich markiert (rot: Aktivierungsschleife, türkis:  $\alpha$ C-Helix, blau: Scharnierregion, orange: Glycin-reiche Schleife, gelb: katalytische Schleife; Sekundärelemente definiert nach HANKS und HYVÖNEN).<sup>78,79</sup> Innerhalb der ATP-Bindestasche werden viele polare Wechselwirkungen zu den umliegenden Aminosäure-Seitenketten ausgebildet (schwarz gestrichelt). Vor allem Asp274 besitzt eine Schlüsselrolle in der Übertragung des Phosphats auf die hier abgebildete Serin-Substratpeptid-Seitenkette. Rechts: Ko-Kristallstruktur der PH-Domäne (grün, pdb: 1unq) mit Strukturanaloga natürlichen Phosphoinositol-Liganden. Die konservierte Sekundärstruktur sowie die sehr polare Bindungstasche des Zuckers ist in allen PH-Domänen zu finden. Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen (schwarz gestrichelt) zwischen basischen Aminosäure-Seitenketten und den Phosphatgruppen des Inositols stabilisieren den *second-messenger* an der Domäne. (B) Schematische Darstellung des Aufbaus von Proteinkinase Akt (grün: PH-Domäne, grau/KD: Kinase-Domäne, beige/HM: hydrophobes Motiv) sowie Aminosäure-Seitenketten, an welchen posttranslationale Modifikationen identifiziert wurden: Ub: Ubiquitinierung, Me: Methylierung, Ac: Acetylierung, E: Elektrophil Modifikation, Ox: Thiol-Oxidation, OH: Hydroxylierung, Su: SUMOlierung, GL: Glykolisierung, P: Phosphorylierung, \*: weitere N-Modifikationen. Die Cystein-Modifikationen im Linker sind Akt2 (C124) und Akt3 (C119) spezifisch.<sup>80,81</sup> Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Sequenz von Akt1. Abbildung ist angelehnt an MANNING und TOKER 2017.<sup>82</sup>

Es enthält das sogenannte PDK1-intergierendes Fragment (PIF), welches innerhalb der AGC-Familie konserviert vorliegt.<sup>83</sup> Das Protein besitzt eine inerte Eigenschaft, die Einfluss auf die Regulation der Kinaseaktivität nimmt. Durch Interaktion der PH- und Kinase-Domäne (PH-*in* Konformation) bleibt der Zugang des aktiven Zentrums versperrt. Weitere Modifizierungen von Schlüsselseitenketten des Proteins beeinflussen ebendieses Gleichgewicht und sind verantwortlich für die strukturelle Konformation

des Multidomänenproteins (vgl. Abb. 1.2-1B). Die direkte Aktivierung der Kinase-Funktion erfolgt über Phosphorylierungen an Thr308 in der Aktivierungsschleife und einer einhergehenden Umlagerung dieser.<sup>84</sup> Weiter trägt die Einführung einer Phosphatgruppe an Ser473 des hydrophoben Motivs zur weiteren strukturellen Stabilität anhand intramolekularer Wechselwirkung oberhalb der ATP-Bindetasche bei.<sup>85</sup> Besitzt das Protein beide Phosphorylierungen, erfolgt eine 1000-fache Aktivitätssteigerung im Vergleich zur nicht-modifizierten Variante.

Eine Aktivierung von Akt erfolgt hauptsächlich durch übergeordnete Proteinkinasen und Multidomänen-Komplexen als Komponenten bestimmter zellulärer Signalwege. Diese Signaltransduktionskaskaden erfolgen meist über eine sequentielle Aktivierung mehrerer, nacheinander folgender Proteinkinasen, die eine gezielte Weiterleitung eines äußeren Reizes ins Zellinnere bewirken. Die bekannteste Transduktionskaskade, in welcher Akt eine tragende Rolle spielt, ist der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg (vgl. Abb. 1.2-2).<sup>86</sup> Dort wird das Signal über die Bindung eines Wachstumsfaktors an die entsprechende Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) initiiert. Der Ligand wechselwirkt mit der extrazellulären Domäne des Rezeptors, wodurch die Homo/Hetero-Dimerisierung und eine einhergehende konformationelle Änderung, die Autophosphorylierung und somit Aktivierung der intrazellulären Kinase-Domäne, resultiert. Ausgehend von dieser Phosphorylierung kann die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) selbst an den Rezeptor binden oder mit einem, durch den Rezeptor-aktivierten Adapter-Protein wechselwirken, wie beispielsweise die kleine GTPase Ras. Anschließend kann die aktivierte Lipidkinase PI3-K den *second messenger* Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) an 3'-Position phosphorylieren.<sup>87</sup> Das daraus resultierende Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) dient als neue Interaktionsplattform für PH-Domänen-tragende Proteine. Eine Umkehrung der Modifikation ermöglicht die membrangebundene Phosphatase PTEN (engl. *phosphatase and tensin homology*).<sup>88</sup> Die Proteinkinase Akt liegt im Gleichgewicht zweier Konformationen vor, wobei der inaktive PH-*in* Zustand überwiegt. Ist nun die Möglichkeit der Interaktion des 3-Phosphinositids und der PH-Domäne gegeben, führt dies zu weitreichenden strukturellen Änderungen und der Stabilisierung der sogenannten PH-*out* Konformation, welche sich durch eine zugänglichere ATP-Bindetasche sowie Aktivierungsschleife auszeichnet.<sup>89,90</sup> Die ebenfalls membrangebundene Kinase PDK1 (engl. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) kann die offene Form von Akt durch Phosphorylierung an Aminosäure Thr308 aktivieren.<sup>84</sup> Die entsprechende Dephosphorylierung dieser Seitenkette bewirkt die Protein Phosphatase 2A (PP2A).<sup>91</sup> Zur vollständigen Aktivierung bedarf es einer weiteren Phosphorylierung, welche von mTORC2 (engl. *mammalian target of rapamycin complex 2*) an der Serin-Seitenkette 473 innerhalb des hydrophoben Motivs erfolgt.<sup>92</sup> Die Dephosphorylierung dieser Seitenkette erfolgt durch PHLPP (engl. *PH domain leucine-rich repeat phosphatase*).<sup>93</sup> Infolge einer Einfach- oder Zweifach-Phosphorylierung von Akt wird die Dissoziation der Kinase von der Membran begünstigt und die Wechselwirkung mit nachstehenden Zielproteinen, beispielsweise im Zytosol oder innerhalb des Zellkerns, ermöglicht. Untergestellte Zielsubstrate von Akt besitzen ein konserviertes Sequenz-Motiv (R-X-R-X-X-S/T; wobei R: Arg, X: beliebige AS), auf welches die Kinase eine Phosphatgruppe transferiert.<sup>94,95</sup>

Die resultierenden Zellantworten, welche einer Akt-Aktivierung nachstehen, betreffen metabolische Funktionen wie den Glukosetransport, die Glykolyse und den Glykogen-Aufbau bis hin zur Protein-Synthese, Zellwachstum, Zellzyklus-Progression und Hemmung der Apoptose.<sup>82</sup>



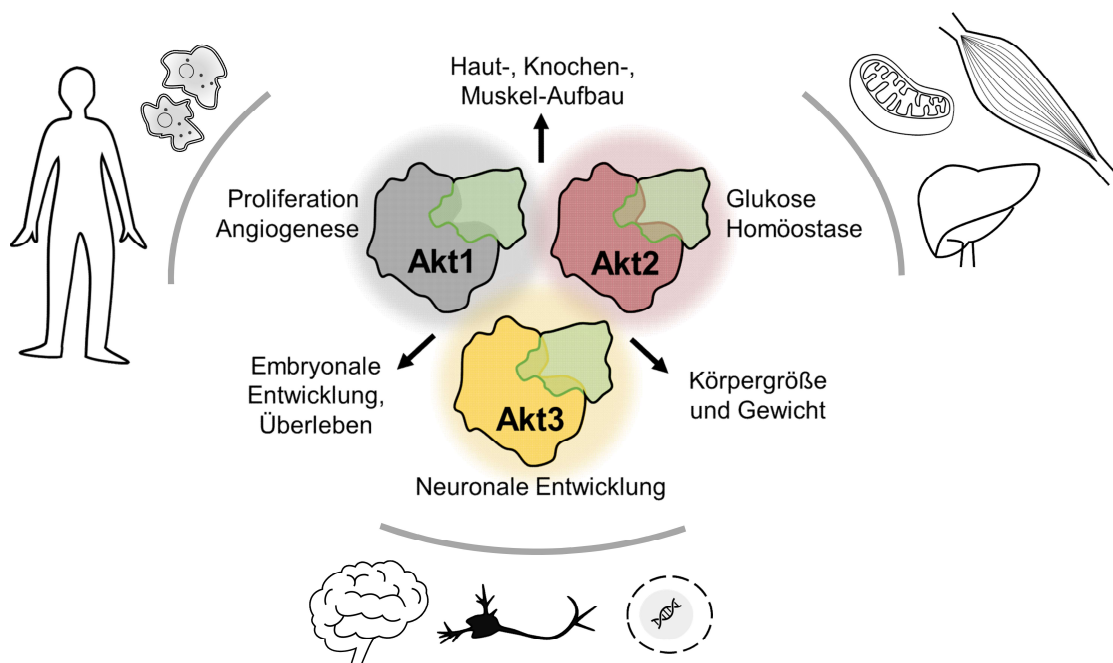
**Abb. 1.2-2: Schematische Darstellung des PI3K/Akt-Signalwegs und entsprechender Zellantworten.** WF: Wachstumsfaktor, RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase, SH: *src homology 2*, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat, PIP<sub>3</sub>: Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat, PTEN: *phosphatase and tensin homolog*, PDK1: *phosphoinositide-dependent kinase-1*, PP2A: *protein phosphatase 2*, mTORC2: *mechanistic target of rapamycin complex 2*, PHLPP: *PH domain and leucin rich repeat phosphatases*, eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, PRAS40: *proline-rich Akt substrate 1*, GSK3: Glykogensynthase-Kinase 3, FOXO: *forkhead box protein*, BAD: *BCL2 associated agonist of cell death*, Casp9: Caspase 9. Abbildung adaptiert von MANNING & CANTLEY.<sup>95</sup>

### 1.2.1. Die Akt Isoformen und ihre Funktionen

Die Vielzahl und Diversität der zellulären Prozesse in welchem Akt involviert ist, verdeutlicht die Komplexität des zu Grunde liegenden Signalwegs, welcher über redundante Prozesse zu unterschiedlichsten Reaktionen führt. Dabei spielen die einzelnen Akt Isoformen eine entscheidende Rolle. Um Rückschlüsse auf redundante und nicht-redundante Funktionen dieser drei Proteine zu ziehen, wurden zahlreiche Studien vorgenommen. Die Entwicklung von Isoform-spezifischen Antikörpern eröffnete die selektive Untersuchung der subzellulären Lokalisation und spezifischen Gewebeverteilung.<sup>71,96,97</sup>



Weiterhin wurde analysiert, wie sich die Abwesenheit der jeweiligen anderen Isoformen oder auch ein äußerer Stimulus auf die Lokalisation auswirkt. Hier konnte gezeigt werden, dass Akt1 ubiquitär im Zytosol vorliegt und sich eine Teilfraktion an der Plasmamembran befindet. Akt2 hingegen konnte an anderen Membranen identifiziert werden, vor allem an und innerhalb der Mitochondrien sowie am Golgi-Apparat. Diese Verteilung lässt sich mit der Beobachtung in Einklang bringen, dass Akt2 mit dem Glukose Transporter-4 (GLUT-4) und mitochondrialer Hexokinase assoziiert.<sup>98</sup> Weiter konnte anhand von Kolokalisations-Studien Akt2 in Zusammenhang mit Proteinen, die für die Zell-Motilität verantwortlich sind, gebracht werden.<sup>99</sup> Letztlich konnte Akt3 in besonders hohem Maße im Zellkern identifiziert werden. Innerhalb des Nukleus vermag Akt3 unspezifisch mit vielen DNA-PKs (DNA-abhängige Proteinkinasen) zu interagieren, welche hauptsächlich in die DNA-Reparatur involviert sind, wohingegen nur Akt1 als einzig weitere Isoform mit einigen wenigen Reparaturproteinen wechselwirkt.<sup>100,101</sup> Aufgrund der zellulären Verteilung der Akt Isoformen sind weitere Aktivierungsmechanismen an internalisierten oder Organell-Membranen, wie etwa der des Nukleus selbst, denkbar. Hinsichtlich der Gewebeverteilung der einzelnen Isoformen ist zu erkennen, dass Akt1 ebenfalls eine ubiquitäre Verteilung besitzt und somit eine zentrale Rolle in vielen zellulären Prozessen besitzen könnte. Hohe Expressionslevel an Akt2 konnten vor allem in Insulin-sensitiven Zellen wie skeletalen Muskel- und Fettzellen sowie Hepatozyten beobachtet werden. Akt3 hingegen ist grundsätzlich weniger präsent und konnte in besonders hohen Leveln innerhalb des Gehirn- und Hodengewebes nachgewiesen werden (vgl. Abb. 1.2-3).<sup>102</sup>



**Abb. 1.2-3: Übersicht der Akt Isoform-Funktionen und ihrer physiologischen Lokalisation.** Evaluation von genetische *knock-out* Modellen verhalf zur Identifizierung von Isoform-spezifischen sowie überlappenden Funktionen der drei Kinasen. Ebenso konnte eine unterschiedliche Gewebsverteilung der Isoformen beobachtet werden. Weiterhin variieren die Expressionslevel sowie die intrazelluläre Lokalisation der drei Isozyme. Adaptiert von GONZALES & MCGRAW.<sup>103</sup>



In genetisch invasiven, phänotypische *knock-out* Studien konnte verdeutlicht werden, dass die Diversität des Akt-Signalwegs zu bedeutenden Teilen auf unterschiedlichen Funktionen der drei Isoformen basiert.<sup>104,105</sup> Maus Modelle mit Akt1-Deletion erschienen kleiner und leichter als entsprechende Kontrollmäuse. Zelluläre Systeme ohne Akt1 wiesen eine gesteigerte Apoptoserate auf, was die Rolle dieser Isoform als negativer Regulator der Apoptose und hinsichtlich des Überlebens einer Zelle hervorhebt. Werden Akt2 *knock-out* Maus-Modelle betrachtet, zeichnet sich ein Typ-2-Diabetes-phänotypischer Zustand ab, d.h. es kann ein Insulin-Überschuss sowie eine Glukose-Intoleranz bzw. Hyperglykämie beobachtet werden.<sup>106,107</sup> Zusätzlich schien die Aufnahme und Weiterverarbeitung von Zucker fehlerhaft abzulaufen. Weitere *in vitro* Studien in Fettzellen verdeutlichten, dass die genetische Herabregulation von Akt2 mittels *siRNA* die Insulin-induzierte Translokation von Glukose-Transporter tragenden Vesikeln an die Plasmamembran inhibiert. Folglich unterstreicht dies eine fundamentale Rolle von Akt2 in der Glukose-Homöostase von Zellen.<sup>108,109</sup> Bei weiterer Betrachtung von Akt3 *knock-out* Maus-Modellen konnten signifikante Fehlbildungen des Hirngewebes beobachtet werden, weshalb der Funktion dieser Isoform eine wichtige regulative Rolle innerhalb der neuronalen Entwicklungsprozesse zuzuordnen ist.<sup>102</sup> Die Vielzahl der genetisch-invasiven Modell-Experimente verdeutlichten ebenfalls, dass die drei Isoformen überlappende Eigenschaften und Funktionen besitzen. Vorerst auszuschließen sei aber eine Art Kompensierung von bestimmten Hauptfunktionen durch Abwesenheit der jeweilig anderen Isoform.<sup>104</sup>

### 1.2.2. Akt Isoform-spezifische Signale

Dieses Zusammenspiel der verschiedenen Funktionen und Lokalisation bekräftigt zum einen die Komplexität und Varietät der involvierten zellulären Prozesse dieser Kinase und zum anderen wirft es folgende ungeklärte Frage auf: Wie kann ein Akt Isoform-spezifisches Signal erzeugt werden? Bei solch homologen Enzymen mag die Spezifität der Aufgaben durch viele Parameter beeinflusst und gesteuert werden.<sup>103</sup> Neben Ausstattung der Zelle, gewebespezifischer Expression sowie Lokalisation scheinen alternative Aktivierungsmechanismen, posttranslationale-Modifikation und selektive Interaktionspartner eine tragende Rolle zu spielen. Hierzu wurden vereinzelt Erkenntnisse aus *in vitro* Studien gewonnen, welche Hypothesen es jedoch weiter zu validieren gilt. Allgemein ist das komplexe Regulationsnetzwerk dieser Signalwege durch positive und negative Feedback Mechanismen gesteuert und so liegt es nahe, dass verschiedene Amplituden und zeitlich versetzte Impulse der Aktivität von PI3-K sowie PHLPP maßgeblich an der resultierenden Akt-Signal-Erzeugung beteiligt sind.<sup>110</sup> Für die einzelnen Isozyme dieser Phosphatase konnten Akt Isoform-selektive Eigenschaften identifiziert werden, so inaktiviert PHLPP1 Akt2 und PHLPP2 hingegen speziell Akt3.<sup>93</sup> Ebenfalls zeigte sich, dass Isoformen von PI3-K Präferenzen in der Aktivierung der Akt Isoformen aufweisen.<sup>87,111</sup> Weitreichenderen Einfluss scheint die intrinsische Affinität der einzelnen Akt Isoformen für den *second messenger* PI(3,4,5)P<sub>3</sub>

bzw. PI(3,4)P<sub>2</sub> zu haben. Das Bisphosphat, welches aus Dephosphorylierung des Triphosphats durch SHIP entsteht, wird vorwiegend von Akt2 gebunden und bildet ein zeitlich versetztes Signal ab.<sup>112</sup> Die Internalisierung von PI(3,4)P<sub>2</sub> hin zum Endosom führt zu der raum-zeitlichen Verlagerung der Akt2 Aktivität und ermöglicht die Aktivierung anderer Substrate, wie beispielsweise GSK3 oder die Translokation von GLUT-4-reichen Vesikeln.<sup>110,113</sup> Solche Unterschiede in der Membranaffinität konnten ebenfalls für die E17K-Mutante von Akt gezeigt werden, die eine gesteigerte Bindung zu PI(4,5)P<sub>2</sub> aufweist.<sup>114</sup>

Des Weiteren sind besonders die Linker-Regionen der Isoformen sehr divers und besitzen jeweils spezifische Interaktionsprofile. Beispielsweise interagiert Palladin, ein Aktin-bündelndes Protein, ausschließlich mit dem Akt1 Linker.<sup>115</sup> Posttranslationale Modifikationen innerhalb der Linker Region wurden ebenfalls verzeichnet, so erhöht die Phosphorylierung an Ser129 von Akt1 durch die Kinase CK2, die Aktivität für die Palladin-Aktivierung.<sup>116</sup> Andere Studien zeigten, dass eine reversible Oxidation an Cys124 in Akt2 durch PDGF erzeugte reaktive Sauerstoff-Spezies ROS (engl. *reactive oxygen species*) zur Inaktivierung dieser Isoform führt.<sup>80</sup> Für Akt3 konnte Cys119 als elektrophile sensitive Regulierungsposition durch den nativen *second-messenger* HNE (4-Hydroxy-2-nonenal) identifiziert werden. Die Modifizierung durch das Enon führt ebenfalls zur Inaktivierung der Proteinkinase.<sup>81,117</sup> Die Kombination der verschiedenen Phosphorylierungsstellen innerhalb des hydrophoben Motivs hat Einfluss auf die Konformation der Kinase. Beispielsweise kann in Akt1 Ser473 mit Arg144 im Linker wechselwirken und die geschlossene Konformation lockern.<sup>118</sup> Wohingegen Phosphorylierungen ausschließlich an Ser477 oder Thr479 ganz andere Interaktion bewirken, welches auf ein gezieltes Zusammenspiel der PTMs in Bezug auf die Aktivität des Enzyms hinweist.<sup>119</sup> Grundsätzlich könnte die intrinsisch-katalytische Aktivität der einzelnen Isoformen anders sein, um bestimmte Substrate zu phosphorylieren bzw. ihnen als Interaktionsfläche zu dienen.

Die Studien deuten auf ein feinreguliertes Zusammenspiel kleinster zeitlicher Veränderungen und strukturelle Modifikationen der Akt Isoformen hin, um Spezifität in der Signalweiterleitung zu erreichen. Eine detailliertere Aufklärung dieser abgestimmten Regulations-Prozesse könnte vor allem mit nicht-invasiven und zeitlich kontrollierbaren Experimenten tiefergehend beleuchtet werden. Im Rahmen eines chemisch-biologischen Ansatzes könnte eine gezielte Adressierung der Akt-Isozyme mit Isoform-selektiven, niedermolekularen Verbindungen dazu beitragen die Komplexität der spezifischen Signale weitreichender zu verstehen und bislang ungeklärte Interaktionen zu identifizieren.

Weiterhin sind Isoform-spezifische Signale im pathophysiologischen Kontext wie Krebs nicht redundant und aktuelle Studien verweisen auf eine vorteilhafte Isozym-selektive Interventions-Strategie.<sup>103,111</sup> Eindeutig ist, die Proteinkinase Akt reguliert die *hallmarks of cancer*: Tumorwachstum, Überleben, Metabolismus und Invasivität der Tumorzellen.<sup>120,121</sup> Die spezifischen Beiträge der Akt Isoformen sind hingegen nicht detailliert genug differenziert und scheinen in verschiedenen Studien sowie Tumormodellen

unterschiedliche Gewichtung zu haben. So konnte in Lungenkrebsmodellen eine Akt1-selektive Inhibierung als vorteilhaft identifiziert werden, da sie das Tumorwachstum verlangsamt, wohingegen das Ausschalten von Akt2 zu einer beschleunigten Progression des Tumors führte.<sup>122</sup> Für Brustkrebs, der zweithöchsten und tödlichsten Krebserkrankung nach Lungenkrebs, gibt es zahlreiche Studien bezüglich der Akt Isoformen. Dort wurden Tumorwachstum, Metastasierung und Angiogenese sowie der therapeutische Vorteil nach Ausschaltung der Akt Isoformen untersucht.<sup>123</sup> Die Resultate sind sehr gegensätzlich, jedoch zeichnet sich für Akt1 eine Tumor-initiiierende Funktion ab, wohingegen Akt2 eine Rolle in der Metastasierung und Vermehrung der Krebszellen besitzt. Dabei fördert Akt2 die Migration und Invasion der Zellen durch Regulation von beispielsweise  $\beta$ -Integrinen und F-Aktin.<sup>124</sup> Anhand der nicht-redundanten und gegensätzlichen Funktionen der Isoformen aus diesen Modellen verdeutlicht sich die unzureichende Strategie einer pan-Akt Inhibierung.

### 1.3. Adressierung der Proteinkinase Akt

Vor allem die Funktion als negativer Regulator der Apoptose sowie die zentrale Rolle in der Zelle von Akt und seinen Isoformen macht die Kinase zu einer wichtigen Zielstruktur in der Therapie verschiedener Erkrankungen. Ein inkohärentes Signal oder eine Fehlregulation innerhalb des PI3K/Akt-Signalwegs korreliert mit vielen Krankheitsbildern, wie beispielsweise Krebs, Diabetes mellitus, kardiovaskuläre oder auch neurologische Leiden.<sup>121</sup> Oftmals werden onkogene Signale durch die GTPase Ras, Src oder Rezeptor-Tyrosinkinase erzeugt und über die Akt-Signalkaskade weitergeleitet, weshalb ein therapeutischer Ansatz zur gezielten Adressierung der Kinase in der Krebsforschung von großem Interesse ist. Die für diesen Signalweg identifizierten Biomarker repräsentieren Alterationen der übergeordneten Enzyme von Akt.<sup>125</sup> Darunter Aktivierungen und Amplifikationen von PI3-K oder die *loss-of-function* Mutation des Tumorsuppressors PTEN, welche mit einer Häufigkeit von bis zu 50 % aller Krebsarten beobachtet wurde.<sup>88,126,127</sup> Eine Erhöhung der Expressionslevel von Akt sowie die konstitutionelle Aktivierung der Kinase ist ausreichend, um in transgenen Mäusen eine onkogene Transformation zu induzieren.<sup>128</sup> Für die Kinase Akt selbst sind wenige, klinisch relevante Mutationen beschrieben.<sup>129</sup> Die signifikanteste Läsion und heutzutage ein weiterer Biomarker ist die E17K Mutation, dessen Aminosäuren-Austausch eine Änderung in der Polarität bewirkt und Einfluss auf das Konformationsgleichgewicht der geschlossenen und offenen Form von Akt nimmt.<sup>114</sup> Diese Veränderung ermöglicht zusätzlich die Interaktion der Akt PH-Domäne mit der (4,5)-Bisphosphat Variante des *second messengers* PIP. Folglich erhöht sich die Fraktion an membrangebundenem Akt und erlaubt die Phosphorylierung der Proteinkinase durch PDK1 an den entsprechenden Stellen, weshalb die Fraktion an aktivierter Kinase massiv zunimmt. Diese Mutation wurde zuvor nur im Zusammenhang mit dem sogenannten Proteus-Syndrom beschrieben, welches eine angeborene, progressive mit lokalen Überwuchs charakte-

risierte Krankheit ist und auf der aktivierenden E17K Läsion in somatischen Zellen beruht.<sup>130</sup> Die tumorgene Auswirkung konnte ebenfalls identifiziert werden, denn bei einem Auftreten dieser Mutation bedarf es keinem onkogenen Signal der übergeordneten Proteine im PI3K/Akt-Signalweg. Schlussendlich wurde festgestellt, dass die gezielte Inhibierung der Kinase zu Apoptose sowie Wachstumshemmung und im Falle von malignem Gewebe sogar zu Tumorregression führen kann.<sup>131</sup>

### 1.3.1. Klinisch-relevante Akt Inhibitoren

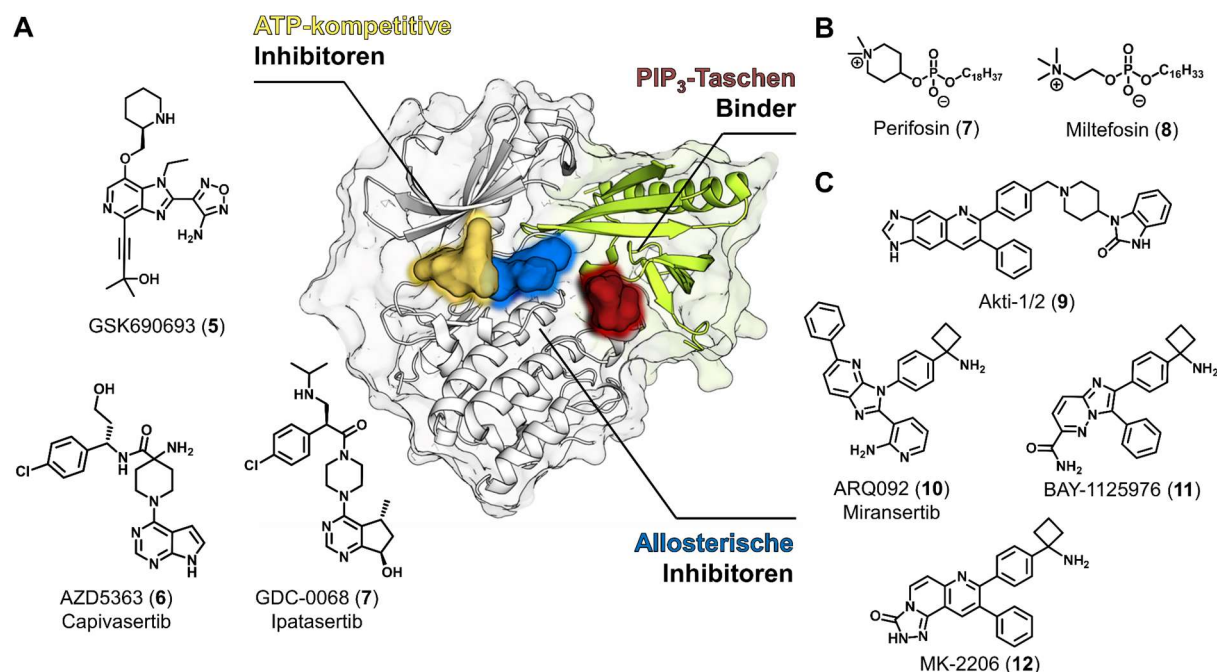
Ein sehr klassischer Ansatz zur gezielten Adressierung von Proteinkinasen stellt die Entwicklung von ATP-kompetitiven Inhibitoren dar, wobei sich hier aufgrund der konservierten Struktur der Cofaktor-Bindetasche die Identifizierung von potenten und selektiven Inhibitoren als große Herausforderung abzeichnet. Insbesondere kann sich solch eine Herangehensweise für ähnlich-konstituierte Enzyme wie die Akt Isoformen als äußerst schwierig erweisen. Neben Kinasen binden viele andere Enzymklassen ATP als Co-Substrat, beispielweise metabolische Enzyme, weshalb oft unerwünschte Arzneimittelwirkungen bzw. sogenannte *off-target* Effekte auftreten können. Trotz dessen gelang es einigen Pharmaunternehmen potente, zellgängige Wirkstoffe für die Adressierung von Akt zu entwickeln. Darunter Roche, Astra Zeneca und GlaxoSmithKline (vgl. Abb. 1.3-1A).<sup>132-135</sup> Aufgrund ihrer hohen Potenz sowie guten präklinischen Evaluation wurden die Wirkstoffe als pan-Akt Inhibitoren in klinische Studien aufgenommen.<sup>136</sup> Die AZD-Verbindung **6** befindet sich zurzeit in Phase I/II-Studien gegen solide Tumore, wie Brust- oder Darmkrebs.<sup>137</sup> Ebenso wurden die anderen kompetitiven Inhibitoren in der Klinik untersucht, zeigen jedoch keine signifikanten Effekte als monotherapeutische Agenzien, weshalb eine große Vielzahl an Kombinations-Studien mit Chemotherapeutika oder anderen zielgerichteten Therapien evaluiert werden.<sup>138</sup> Im Dezember 2020 startete eine Phase III-Studie mit dem Roche-Inhibitor Ipatasertib (**7**) und dem Antiöstrogen Fulvestrant zur Behandlung von fortgeschrittenem Brustkrebs in postmenopausalen Patientinnen.<sup>b139</sup> Nach diversen, vergeblichen Phase I Studien, konnten erste signifikante Erfolge in der Monotherapie kürzlich anhand einer stratifizierten Kohorte mit Akt1<sup>E17K</sup> Mutationen in Kombination mit der Gabe von AZD5363 (**6**) identifiziert werden.<sup>140,141</sup> Die hohe Quote der Misserfolge vermag neben den moderaten Selektivitätsprofilen der ATP-kompetitiven Inhibitoren vor allem auf unvorteilhaftes Studiendesign und falsche Patienten-Stratifizierung zurückzuführen sein.

Ebenfalls wurde die in der PH-Domäne befindlichen Phosphoinositid-Bindetasche als Ansatz zur kompetitiven Adressierung genutzt (vgl. Abb. 1.3-1B). Die Blockierung mit niedermolekularen Verbindungen verhindert, dass die PH-Domäne an der Membran mit PIP<sub>3</sub> wechselwirkt, womit die Signalweiterleitung unterbrochen wird.<sup>142,143</sup>

---

<sup>b</sup> NCT04650581

Solche Phosphoinositid-Analoga (**7**, **8**) weisen eine hohe Ladungsdichte auf was die Bioverfügbarkeit enorm einschränkt. Ferner werden durch diesen Ansatz ebenfalls zahlreiche Proteine mit PH-Domänen adressiert, welche mit PIP<sub>3</sub> interagieren und zu unerwünschten Effekten dieser Wirkstoffklasse führen. Die zunächst vielversprechenden präklinischen Ergebnisse aus diversen Tiermodellen konnten nicht in Phase I-Studien übersetzt werden.<sup>136,144</sup>



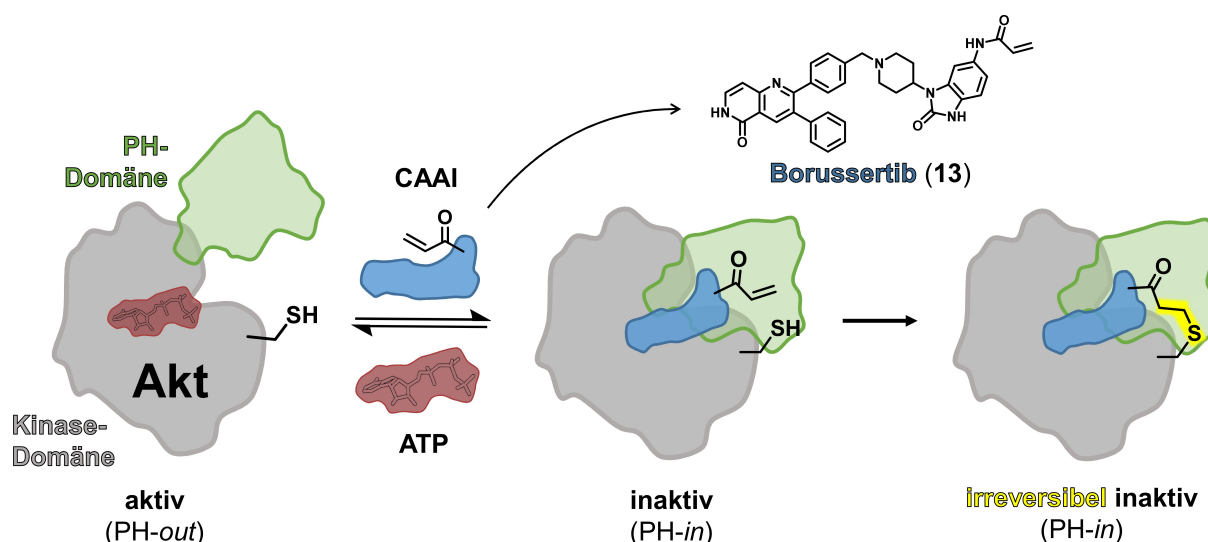
**Abb. 1.3-1: Übersicht klinisch-relevanter Akt Inhibitoren.** (A) Die ATP-kompetitiven Inhibitoren binden in der Cofaktor-Bindetasche innerhalb der Kinase-Domäne (gelb, pdb: 4gv1, **6**). (B) Ebenfalls adressieren die PIP<sub>3</sub>-Liganden die Inositol-Tasche in der PH-Domäne kompetitiv (rot, pdb: 1unq, IP4). (C) Hingegen okkupieren die allosterischen Inhibitoren eine Interdomänen-Bindetasche unter simultaner Stabilisierung der geschlossenen Akt Konformation (blau, pdb: 5kcv, **10**).

Die mangelnde Selektivität der kompetitiven Inhibitoren verschiebt den Fokus der Wirkstoffforschung hin zu Identifizierung von alternativen, adressierbaren Bindungskavitäten wie beispielsweise allosterischen Taschen. Insbesondere für Akt konnte das Konzept der allosterischen Modulation der Aktivität für eine zielgerichtete Adressierung zunutze gemacht werden.<sup>61</sup> Allgemein beruht die Allosterie auf der Bindung eines Effektors an das Protein, welche eine Änderung auf eine distanzierte, funktionelle Region induziert, woraufhin die Reaktivität beeinflusst wird. Erste Verbindungen für diesen alternativen Ansatz zur Modulation von Akt wurden von *Merck Sharp & Dohme* (MSD) beschrieben.<sup>145,146</sup> Dabei binden die Moleküle in einer Interdomänen-Tasche neben dem aktiven Zentrum (vgl. Abb. 1.3-1C). Die niedermolekularen Substanzen stabilisieren die sogenannte PH-*in* Form, welche die Kinase in einer inaktiven Konformation fixiert und den Zugang zur ATP-Bindetasche blockiert. Dabei ist anzumerken, dass die Inhibitor-vermittelte geschlossene Form nicht zwangsläufig der physiologisch-inaktiven Konformation des Proteins gleichen mag.<sup>119</sup> Nichtsdestotrotz scheint die Strategie der nicht-kompetitiven, jedoch PH-Domänen abhängigen Adressierung, von Akt vielversprechend zu sein und führte bereits zur Entwicklung von potenten Wirkstoffen, welche in klinischen Studien eingesetzt werden. Darunter der allosterische pan-Akt Inhibitor MK-2206 (**12**) oder Miransertib (**10**), beide in Phase I/II eingesetzt.<sup>147-149</sup>

Unter anderem als Mono- oder Kombinationsarzneistoffe bei fortgeschrittenen, soliden Tumoren in Pankreas-, Kolorektal-, Brustkrebspatient:innen sowie Prostatakrebspatienten.<sup>150</sup> Die erhoffte Ansprechrate in den zahlreichen klinischen Studien mit den allosterischen Wirkstoffen bleibt bislang unerfüllt. Für eine erfolgreiche Übertragung der präklinischen Daten in humane Studien bedarf es einer klareren Einteilung bzw. Definition an Akt-sensitiven Tumoren.<sup>141</sup> Somit fehlen prädiktive klinische Modelle und Biomarker für den Erfolg einer zielgerichteten Akt-Therapie.<sup>125</sup> Immerhin konnte durch den Einsatz der allosterischen Interdomänen-Inhibitoren letztlich die Selektivität gegenüber anderen Kinasen verbessert werden, erwiesen sich die Modulatoren jedoch als weniger potent hinsichtlich ihrer Affinität.

### 1.3.2. Kovalent-allosterische Modulation von Akt

In der Entwicklung von Wirkstoffen ist es möglich mittels kovalenter Adressierung von nicht-katalytischen, reaktiven Aminosäure-Seitenketten die Effizienz der Inhibitoren zu steigern.<sup>151</sup> Solch eine Modifizierung spezifischer, nicht-konservierter Cystein-Seitenketten besitzt einige Vorteile: Eine verbesserte Selektivität und eine maximale Verweildauer am Zielprotein, welches wiederum mit einer verminderten *off-target* Reaktivität einhergeht. Dabei ist die initiale, reversible Bindung zum Protein elementar, um das durch den Inhibitor präsentierte Elektrophil für die nukleophil-tragende Seitenkette räumlich angreifbar zu machen. Für die Proteinkinase Akt wurden erstmal 2015 solche kovalent-allosterischen Inhibitoren (CAAs) beschrieben (vgl. Abb. 1.3-2).<sup>152</sup> Anhand von zuvor publizierte Akt1 Ko-Kristallstrukturen mit allosterischen Liganden konnten zwei nicht-katalytisch aktive Cysteine an Position 296 und 310 innerhalb der Aktivierungsschleife identifiziert werden.<sup>153</sup> Die räumliche Nähe der Thiole zu den sich in der Bindetasche befindlichen niedermolekulare Verbindungen leitete einen strukturbasierten Ansatz zur Entwicklung der neuen kovalent-allosterischen Inhibitor-Klasse. Dabei wurden privilegierte, reversible Bindungselemente mit einem Cystein-adressierenden Michael-Akzeptor-System versehen und weitreichend charakterisiert.<sup>154</sup> Neben der kovalenten Modifikation von Akt an je einer der zuvor genannten Cysteine erwiesen sich die aus dem Ansatz resultierenden Moleküle als äußerst potent und affin. Der Prototyp dieser neuen Inhibitor-Klasse Borussertib (**13**) weist ein sehr fokussiertes Selektivitätsprofil für die Akt Isoformen auf und konnte bereits in ersten präklinischen Tests als Wirkstoffvorläufer erfolgreich eingesetzt werden.<sup>155</sup> Studien in Maus-Modellen mit Patient:innen-abgeleitetem, Pankreastumorgewebe lieferten vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich dieses innovativen therapeutischen Ansatzes in Kombinationsanwendung mit einem MEK-Inhibitor. Pharmakodynamisch (PD) ist die kovalent-allosterische Adressierung sehr vorteilhaft, jedoch konnten für Borussertib selbst einige Schwachstellen hinsichtlich der pharmakokinetischen (PK) Eigenschaften, wie beispielsweise der Bioverfügbarkeit, offengelegt werden. Eine Überwindung dieser strukturell-bedingten Nachteile der Molekül-Stoffklasse vermag den Ansatz zu weitreichenderem Erfolg zu verhelfen.



**Abb. 1.3-2: Schematische Darstellung der Akt Modulation durch kovalent-allosterische Inhibitoren.** In der offenen PH-out Konformation ist die aktive Tasche zugänglich für die Bindung von Co-Substrat ATP. In einem reversiblen Bindungsprozess kann der kovalent-allosterische Akt Inhibitor (CAAI) eine Interdomänen-Tasche zwischen Kinase- und PH-Domäne besetzen, wodurch das Enzym in einer inaktiven PH-in Konformation stabilisiert wird. Dem reversiblen Bindungsereignis folgt die irreversible Alkylierung durch die nukleophile Thiol-Seitenkette, welche das vom Liganden präsentierte Elektrophil in einer Hetero-Michael-Akzeptor Additionsreaktion modifiziert. Über dem Schema ist der Prototyp dieser Klasse Borussertib (**13**) abgebildet, der die Kinase Akt kovalent bindet und in seiner inaktiven Konformation einfriert.

Borussertib wies entgegen der ATP-kompetitiven Inhibitoren nicht nur ein selektives Inhibitionsprofil innerhalb der AGC-Familie auf, sondern besitzt unterschiedliche Potenz auf den Akt Isoformen selbst. Eine Kinase-Profilierung zur Bestimmung der *off-target* Reaktivität ergab, dass Akt1 und Akt2 vollständig inhibiert wurden, wohingegen Akt3 nur zu 60 % inaktiviert wird.<sup>152,154</sup> Möglicherweise vermag das geringe Aussparen von Akt3 bereits therapeutische Vorteile mit sich bringen, denn vor allem im pathophysiologischen Kontext Krebs wurden diverse Isoform-selektive Mechanismen postuliert.<sup>122,124</sup>

Neben dem aktivitäts-abhängigen Substrat-Interaktionen von Akt konnten gleichfalls nicht-katalytische Funktionen beobachtet werden, die vor allem bestimmte konformationelle Zustände der Kinase bedingen. Für etliche Proteinkinasen sind diese sogenannten Kinase-unabhängige Funktionen beschrieben und zeichnen sich meist als Protein-Protein-Interaktionen (PPI) ab, um beispielsweise als Gerüstprotein verschiedene Interaktionspartner in räumliche Nähe zu bringen.<sup>156</sup> Die Inhibition von Akt mit ATP-kompetitiven Liganden bewirkt die Akkumulation der Phosphorylierung der Kinase in der Aktivierungsschleife und äußert sich demnach als aktives Signal für Proteine, die ebendieses Strukturmotiv ablesen.<sup>157</sup> Aufgrund der offenen PH-out Konformation der Kinase in Anwesenheit des ATP-Binders ist der Zugang für PDK1 begünstigt. Dementgegen gelingt es den allosterischen Inhibitoren dieses Signal zu unterbinden und die Phosphorylierungslevel an der Aktivierungsschleife zu löschen.<sup>158</sup> Dies lässt spekulieren, dass Akt konformations-abhängige Interaktionsprofile bzw. Interaktome besitzt, welche ebenfalls in Bezug auf die Isoformen ein Indiz für die beobachtete Komplexität der Funktionen sein könnten.

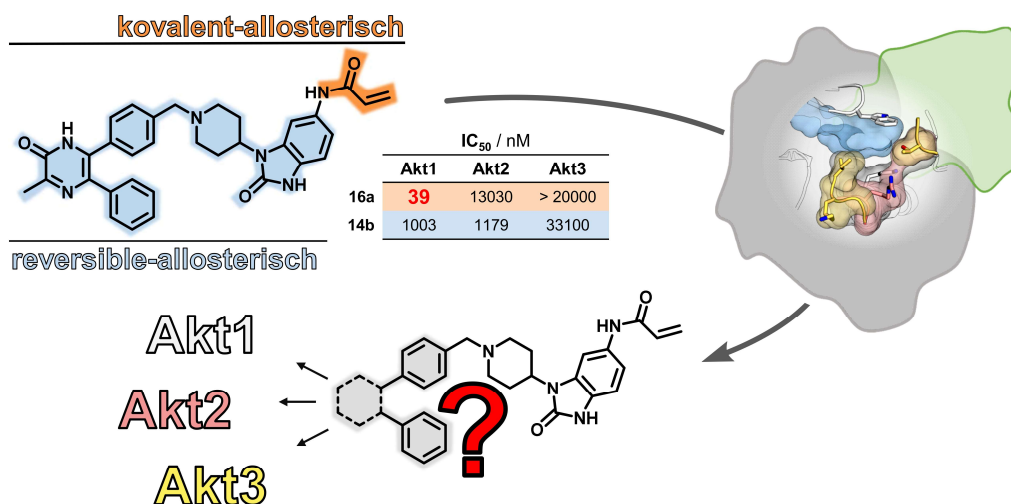
## 2. Motivation und Zielsetzung

Als zentraler negativer Regulator der Apoptose ist die Proteinkinase Akt mit ihren drei Isoformen (Akt1/Akt2/Akt3) entscheidend für das Überleben der Zelle und eine Schlüssel-Zielstruktur in der Wirkstoffforschung. Für ein anhaltendes Scheitern klinischer Wirkstoff-Kandidaten im Kontext der gezielten Krebstherapie mag der Mangel an Informationen über die Akt Isoformen und ihrer pathophysiologischen Rolle in humanen Krankheitsbildern mitverantwortlich sein. Das komplexe Netzwerk der homologen Proteinkinasen konnte bislang anhand von molekular-biologischen Methoden nicht eindeutig aufgelöst werden. Einschnitte in das Interaktom durch genetische Entfernung von Akt ist überschattet durch Redundanzen der anderen homologen Isoform oder mögliche Kompensierungsprozesse über alternative Signalwege. Es bedarf einer gezielten temporalen Kontrolle der Funktionen ebendieser Enzyme, um verknüpft Interaktionsprofile in einer physiologisch-relevanten Zeitskala zu evaluieren. Innerhalb der chemischen Biologie sind hochselektive und funktionalisierte Sondenmoleküle zur genauen Aufklärung von Funktionen der Proteine unabdingbar. Diese Studien können elementare Grundsteine für neue innovative therapeutische Ansätze liefern sowie dabei helfen toxische Nebenwirkungen der bisher bekannten Wirkstoffe einzuordnen und diese Vorteile in Behandlungsstrategien zu übersetzen.

Mit dem Ansatz der allosterischen Adressierung von Akt konnte ein klarer Selektivitätsvorteil gegenüber strukturverwandter Kinase-Familiemitgliedern identifiziert werden. Anhand des kovalent-allosterischen Prototyps Borussertib gelang eine optimale Effektivitätssteigerung des Inhibitionsprofils durch Einbringung vorteilhafter, kovalent-bindender Strukturelemente.<sup>152</sup> Dies ermutigte eine Übertragung des Konzepts auf publizierte, reversible Akt Inhibitoren, welche ein schwach variierendes Selektivitätsprofil auf den Akt Isoformen zeigten.<sup>146</sup> Ebendieses Profil der Pyrazinon-Liganden konnte in Kombination mit dem kovalenten Ansatz um ein Vielfaches gesteigert werden und resultierte in der Darstellung vorteilhafter Akt1 und Akt2 Inhibitoren (vgl. Abb. 2.1).<sup>159</sup> Diese Moleküle implizieren einen vielversprechenden Startpunkt, um die Struktur-Aktivitätsbeziehung (SAR, engl. *structure activity relationship*) anhand gezielt-entwickelter niedermolekularer Verbindungen zu untersuchen und mögliche Unterschiede der allosterischen Bindetaschen offenzulegen.

Ziel dieser Dissertation war die strukturbasierte Entwicklung neuartiger, kovalent-allosterischer Inhibitoren, welchen es gelingt die Akt Isoformen selektiv zu adressieren, wertvolle Einblicke in die Protein-Ligand-Wechselwirkung zu liefern und als Modulatoren in komplexen Systemen zur Charakterisierung der Isoform Funktionen zu dienen.





**Abb. 2.1: Kovalent-allosterische Akt Inhibitoren zur Isoform-selektiven Adressierung.** Die reversibel-allosterischen Akt Inhibitoren konnten durch Einführung elektrophiler *warheads* zu kovalenten Liganden überführt werden. Aufgrund der irreversiblen Modifizierung des Proteins durch diese Klasse der Inhibitoren gelang es zuvor identifizierter Selektivitätsprofile für die Akt Isoformen deutlich zu verbessern, beispielsweise mit Pyrazinon **16a** auf Akt1.<sup>159</sup> Neue Einsichten in die Bindemodi der CAAs dient als Startpunkt für das Design selektiver Liganden, um die Akt Isoformen gezielt adressieren zu können.

Die eingeschränkte Verfügbarkeit von Akt2 und Akt3 Kristallstrukturen sollte mithilfe von Homologiemodellen und detailliertem Sequenzvergleich überwunden werden, um grundlegende Informationen für ein gezieltes Design allosterischer Inhibitoren zu erlangen. Auf Basis einer definierten Substanzbibliothek sollten die Modell-abgeleiteten Bedingungen evaluiert und anhand biochemischer Daten Rückschlüsse auf die Struktur-Aktivitätsbeziehung der Liganden gezogen werden. Infolgedessen sollten die kovalenten Liganden im Detail auf ihre irreversiblen Eigenschaften geprüft werden. In Kombination mit Röntgenstrahlanalyse wurde angestrebt neue strukturelle Einblicke in die Bindemodi der Liganden zu erhalten. Die Informationen der Substanzbibliothek-Charakterisierung ermöglichen einen iterativen Prozess der strukturbasierten Liganden Entwicklung und dient als Grundstein einer zukünftigen Optimierung hochselektiver Moleküle.

Es galt weiter die identifizierten Selektivitätsprofile der Inhibitoren in geeignete Zellsystem zu übersetzen, die es erlauben, im Hochdurchsatz und ohne Einschränkung durch gewebsspezifische Expressionslevel der Akt Isoformen ebendiese Trends zu bewerten. Liganden, welche ein optimales Selektivitätsfenster im Ba/F3 Modell-Systemen vorweisen können, sollten tiefergehender mit komplexeren Krebszelllinien untersucht werden. Anhand dieser Analysen galt es Inhibitor-Konzentrationen zu identifizieren, welche eine selektive Adressierung der jeweiligen Akt Isoform in zellulären Systemen erlauben.

Die Möglichkeit Isoform-selektive Akt-Inhibitoren als Alkin-tragende Sondenmoleküle zu funktionalisieren, galt es ebenfalls in Rahmen dieser Arbeit zu etablieren und weiterhin diese Verbindungen als *proof-of-concept* in ersten *in gel* Fluoreszenz-Studien einzusetzen. Ein Erfolg dieses Ansatzes trägt unmittelbar zur Darstellung und Identifizierung von einzigartigen, chemischen Werkzeugen bei, denen es gelingen mag die Funktionen der Akt Isoformen zu entschlüsseln und ihre Rolle in pathophysiologischen Kontexten aufzuklären.

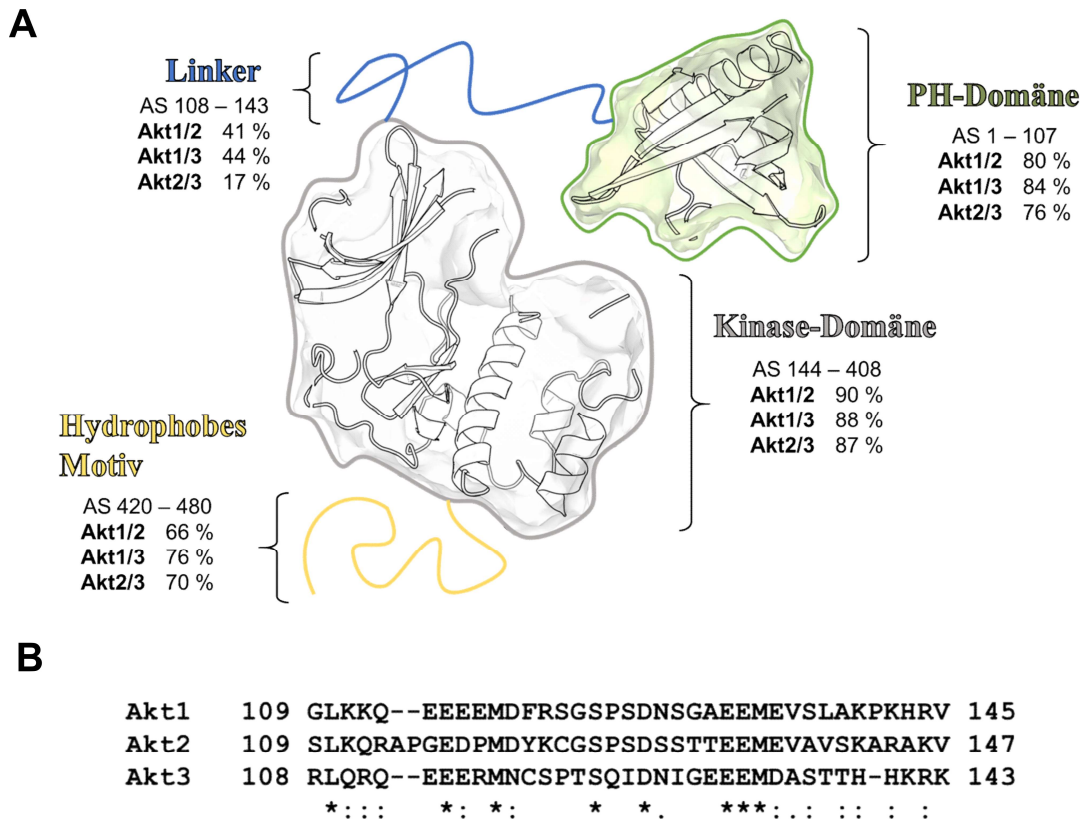
## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1. Entwicklung einer fokussierten Substanzbibliothek

Seit erste Co-Kristallisationsstudien mit Protein-Zielstrukturen und ihrer Liganden oder Inhibitoren durchgeführt werden konnten, hat die Entwicklung selektiver und „maßgeschneiderter“ neuer bioaktiver Verbindungen ihren Lauf genommen und die Wirkstoffforschung revolutioniert.<sup>1,160</sup> Diese Baupläne der Proteine sowie daraus abgeleitete Einsichten in intramolekulare Wechselwirkungen erlaubt den medizinischen Chemiker:innen Moleküle, die zu adressierenden Umgebung durch strukturbasiertes Design anzupassen. Zahlreiche Positivbeispiele dieser Methode sind in der Literatur beschrieben und stellen die Grundlage für die Entstehung von klinisch relevanten Kinase Inhibitoren unter anderem in der Krebstherapie dar.<sup>161-163</sup> Ist das Zielprotein identifiziert, kann die Entwicklung neuer Liganden anhand feinsten Analyse bekannter Kristallstrukturen sowie der Vergleich von *in vitro* Daten publizierter Inhibitoren als vielversprechender Startpunkt für das strukturbasierte Design genutzt werden.<sup>164</sup>

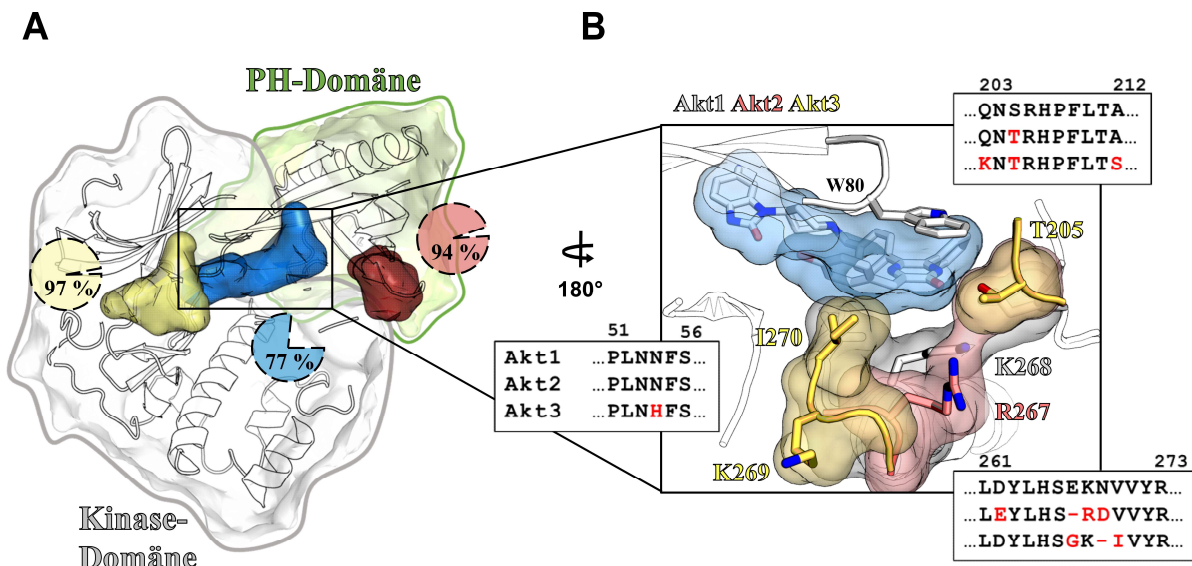
#### 3.1.1. Analyse von Homologiemodellen

Aufgrund fehlender Vollängen-Kristallstrukturen von Akt2 und Akt3 sind andere Methoden zum Vergleich eines möglichen strukturellen Aufbaus der Isozyme notwendig. Eine vorstellbare Herangehensweise wäre die Kombination von Sequenzvergleich und Homologiemodell, um eine detaillierte Analyse von feinen Unterschieden in der Aminosäuresequenz innerhalb der zu adressieren Bindetasche vorzunehmen.<sup>165,166</sup> Wie aus vielen strukturbasierten Ansätzen bekannt ist, können bereits geringfügige Veränderungen in der chemischen Eigenschaft der Aminosäure oder der räumliche Anspruch der Seitenkette maßgeblich den Bindungsprozess von Liganden beeinflussen. Wirkstoffresistenzen durch Punktmutationen innerhalb der Bindetasche oder Studien mit Anwendung des *Bump'n'Hole Approaches* unterstützen diesen Eindruck.<sup>56</sup> Dahingehend sollen zunächst die Akt Isoformen bezüglich ihrer Aminosäure-Sequenz miteinander verglichen werden, um anschließend mit Hilfe von Homologiemodellen diese Informationen dreidimensional weiter zu beleuchten (vgl. Abb. 3.1-1).



**Abb. 3.1-1: Übersicht des Sequenzvergleiches der Akt Isoformen.** (A) Schematische Darstellung der Kinase Akt und ihren strukturellen Elementen sowie die jeweilige prozentuale Sequenzidentität zwischen den Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3. (B) Beispielhafter Sequenzvergleich des flexiblen Linkers der drei Akt Isoformen. Konservierte Aminosäuren sind wie folgt unter der Sequenz konnotiert (\*), konservierte Mutationen (:), semi-konservierte Mutationen (.) und nicht-konservierte Mutationen ( ). Der vollständige Sequenzvergleich befindet sich im Anhang (vgl. 7.1).

Der Sequenzvergleich der drei Isoformen zeigt eine globale Übereinstimmung von 73 %, jedoch liegen in den einzelnen Strukturelementen differenziertere Unterschiede vor. So ist besonders der ca. 40 Aminosäuren flexible, unstrukturierte Linker kaum konserviert und weist nur eine Identität von 17 - 44 % auf (vgl. Abb. 3.1-1B). Das hydrophobe Motiv am C-terminalen Ende der Proteinkinase besitzt eine Übereinstimmung in der Sequenz von 66 - 76 %. Wohingegen die Kinase-Domäne die höchste Ähnlichkeit mit 87 - 90 % aufweist. Ebenfalls ist die PH-Domäne ein Strukturmotiv mit hoher Analogie. Hier sind 76 - 84 % der Aminosäuren gleich. Wie in der Einleitung erwähnt, scheint eine gewisse Spezifität der Signale über Steuerung von PTMs abzulaufen, welche vor allem in dem eher weniger konservierten Linker der Kinase nachgewiesen wurden. Aus der gezielten Adressierung von Akt mit niedermolekularen Verbindungen, wie Borussertib (**13**), konnten unterschiedliche Präferenzen für die Isoformen beobachtet werden, weshalb strukturelle Unterschiede innerhalb der Bindungsdomänen wahrscheinlich sind.<sup>152,154</sup> Eine genauere Betrachtung der Aminosäuresequenzen, welche die bislang bekannten Bindetaschen der Kinase formen, soll dabei helfen Unterschiede zwischen den Isoformen zu identifizieren (vgl. Abb. 3.1-2).



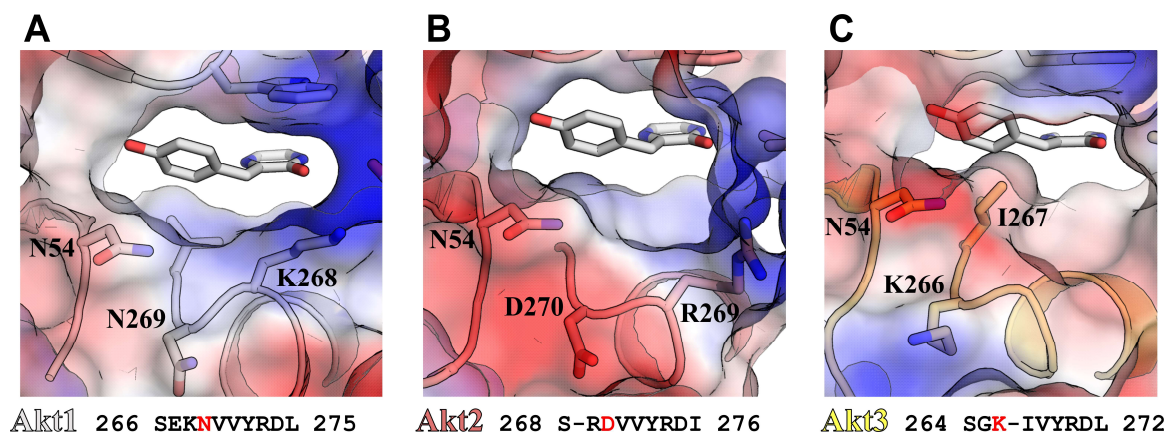
**Abb. 3.1-2. Übersicht der Analyse der Bindetaschen-formenden Aminosäuren der Akt Isoformen.** (A) Schematische geschlossene, PH-in Darstellung von Akt sowie der drei bekannten Bindetaschen besetzt durch Inhibitoren: ATP-kompetitiv Capavasertib **6** (gelb, pdb: 4gv1), PIP<sub>3</sub>-kompetitives Molekül (rot, pdb: 1unq), kovalent-allosterisch **15c** (blau, pdb: 6s9x). Die Übereinstimmung der Aminosäuren-Sequenz, welche die Inhibitoren in einem Radius von 8 Å umgeben, ist in Prozent angegeben. (B) Allosterische Interdomänen Bindetasche von Akt1 in Komplex mit **15c** (blau) sowie die Sequenzvergleiche der Akt Isoformen von Aminosäuren, welche die Tasche umgeben. Die nicht-konservierten Veränderungen (rot) in der Sequenz um 261-273 wurden aus einem Homologiemodell abgeleitet und farblich hervorgehoben (grau: Akt1, rosa, Akt2, gelb: Akt3).

Vor allem die Bindetaschen in den kompetitiv adressierten Domänen des Enzyms wie der ATP- sowie PIP<sub>3</sub>-Kavität weisen eine Übereinstimmung der Aminosäuren von 97 sowie 94 % auf und verdeutlichen die hohe strukturelle Redundanz der jeweiligen Domäne. Überraschenderweise zeichnet die Betrachtung der Interdomänen-Bindetasche ein anderes Bild. Dort liegt nur eine Übereinstimmung von 77 % der Aminosäuren vor. Somit könnte eine detaillierte Analyse dieser Unterschiede in der allosterischen Bindetasche mögliche strukturelle Änderungen offenbaren, welche die Entwicklung von selektiven Molekülen unterstützt. Die Generierung eines Homologiemodells, basierend auf einer Akt1 Vollängen Struktur im Komplex mit Molekül **15c**, soll dazu verhelfen, relevante Veränderungen in der Konstitution der Aminosäuren Sequenzen zu visualisieren (Abb. 3.1-2B). Das Homologiemodell wurde mit dem Web-Server SWISS-MODEL erstellt.<sup>167</sup>

In der Analyse wird deutlich, dass die bindetaschenformenden Aminosäuren, in welchen sich die drei Isoformen unterscheiden, eine ähnliche chemische Beschaffenheit aufweisen. Beispielsweise befindet sich anstelle der Aminosäure Ser205 ein Threonin in Akt2 und Akt3, oder statt des Lys268 in Akt1 ist in Akt2 ein Arginin an dieser Position. Insbesondere die Region in der Schleife rund um Aminosäure 259-273 am C-terminalen Ende der  $\alpha$ E-Helix weist jeweils eine Deletion in Akt2 und Akt3 auf, weshalb die Konstitution der Tasche dort verändert vorliegen könnte. In Akt2 befindet sich direkt neben Arg268 eine Deletion im Vergleich zu Akt1, was unter Umständen die helikale Sekundärstruktur an dieser Stelle beeinflussen könnte. Das Homologiemodell weist in Akt2 eine intramolekulare Interaktion zwischen Arg267 und Thr205 auf, welche in einer Kristallstruktur der Kinasedomäne (pdb: 1mry) nicht beobach-

tet werden kann, jedoch der Vergleich dieser beiden Strukturen an dieser Position eine gute Übereinstimmung zeigt (vgl. Anhang 7.2).<sup>168</sup> Die polare Seitenkette von Lys269 ist deutlich anders orientiert in Akt3 als die vergleichsweise korrespondierenden Aminosäuren in Akt2 (Arg268) und Akt1 (Lys267). Aus dem Modell lässt sich für Akt3 aufgrund der Deletion nach Lys269 eine größere Öffnung der allosterischen Bindetasche hin zu der lösungsmittel-exponierten Seite ableiten. Weiterhin ist neben dem genannten Lysin das Val270 durch ein Isoleucin in Akt3 ausgetauscht, weshalb diese Region der Bindetasche aufgrund des höheren räumlichen Anspruchs der Seitenkette dort verengt sein könnte. Eine Gewissheit über die hier strukturell postulierten Variationen innerhalb der Interdomänen-Bindetasche könnte anhand von Kristallisationsexperimenten erlangt werden.

In genauerer Betrachtung der Position 269 in den drei Akt Isoformen (Asp, Asn, Lys; Nummerierung bezogen auf Akt1) wird deutlich, dass diese Aminosäuren signifikante Unterschiede in ihrer chemischen Eigenschaft besitzen, welche wiederum das elektrostatische Potential der Bindetaschen beeinflussen könnte. Diese Annahme wird durch Evaluation der Oberflächenpolarisierung weiter unterstützt (vgl. Abb. 3.1-3).



**Abb. 3.1-3: Darstellung der elektrostatischen Oberfläche der Akt Isoform Homologiemodelle sowie der entsprechenden Sequenzabschnitte.** An der Position 269 nach der  $\alpha$ E-Helix besitzen die drei Isoformen unterschiedliche Aminosäuren mit anderer chemischer Beschaffenheit: ein Asparagin in Akt1 (A), ein Aspartat in Akt2 (B) sowie ein Lysin in Akt3 (C). Die Visualisierung der polaren Oberfläche verdeutlicht Variationen in dem elektrostatischen Potential dieser Isoform Bindetaschen an dieser Stelle, hauptsächlich geprägt durch die erwähnten Aminosäure-Seitenketten. Elektrostatische Oberfläche wurde mit dem APBS (engl. *adaptive poisson-boltzmann solver*) Plug-In in PyMol erstellt und ist wie folgt definiert: negatives (rot), neutrales (weiß) und positives (blau) Potential.<sup>169</sup>

Der direkte Vergleich der Oberflächen-Polarisierung von den Akt Isoformen zeigt Unterschiede in den elektrostatischen Potentialen in unmittelbarer Nähe der durch die allosterischen Liganden besetzten Bindetasche. Es wird deutlich, dass sich aufgrund unterschiedlicher Aminosäure-Seitenketten rund um das C-terminale Ende der  $\alpha$ E-Helix die Polarisierung von einer neutralen Oberfläche in Akt1 zu einer negativen in Akt2 und zu einer leicht positiven in Akt3 ändert. Ebenso kann aus der Visualisierung entnommen werden, dass in Akt1 und Akt2 die Bindetasche aufgrund der basischen Aminosäuren Lysin bzw.

Arginin seitlich gesäumt wird, wohingegen dies bei Akt3 entfällt. Solche Unterschiede in der elektrostatischen Oberfläche der Isoform Bindetaschen könnten letztlich mögliche Selektivitätsvorteile in der Adressierung mit gegensätzlich polarisierten Liganden liefern.<sup>53</sup>

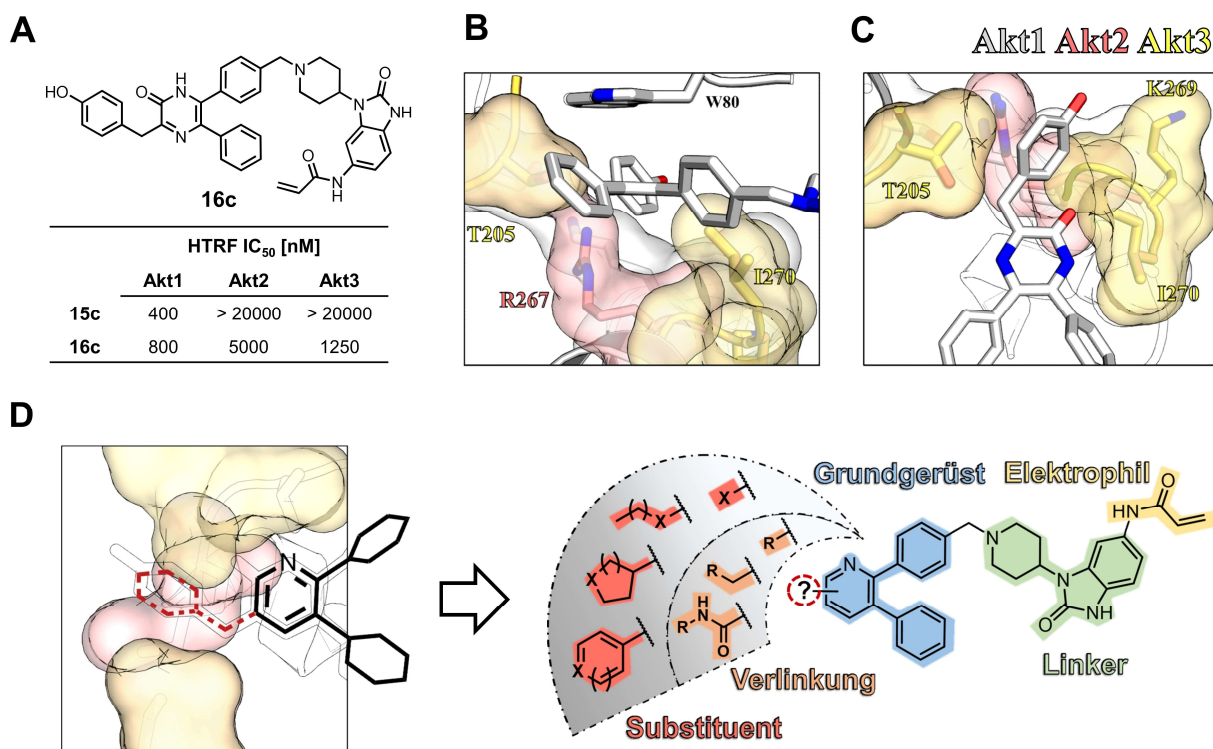
Die anhand der detaillierten Analyse identifizierten strukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen stellen wichtige Angriffspunkte dar, welche gezielt in das Design niedermolekularer Verbindungen einfließen können und möglicherweise einen entscheidenden Beitrag zur Selektivität der Moleküle leisten.

### 3.1.2. Strukturbasiertes Design und Modellierung

Basierend auf den identifizierten strukturellen Unterschieden der Akt Isoformen sollen gezielt niedermolekulare Verbindungen entwickelt werden, welche die Eigenschaften besitzen diese spezifischen Alterationen innerhalb der allosterischen Bindetasche zu adressieren, um mögliche Selektivitätsvorteile offen zu legen. Somit soll die Struktur-Aktivitätsbeziehung der kovalent-allosterischen Akt Inhibitoren im Zusammenhang mit den Akt Isoformen in dieser Arbeit ausgebaut werden.

Als weiterer Ausgangspunkt für das Design eignen sich die bereits dargestellten pyrazinonischen CAAs, anhand welcher zuvor signifikante Selektivitätsunterschiede für die Akt Isoformen identifiziert werden konnten.<sup>146,159</sup> Die Studien verdeutlichten, dass die Bindetaschen von Akt2 und Akt3 eine Adressierung mit größeren Substituenten an einem konservierten aromatischen Grundgerüst tolerieren. Die evaluierten Pyrazinone okkupierten mit ihren unterschiedlichen Substituenten den Bereich der allosterischen Bindetasche, für welchen im vorigen Kapitel deutliche Variationen in den Akt Isoformen beobachtet werden konnte. Weiter gelang es Co-Kristalle zweier Derivate der Serie (**16a,15c**) im Komplex mit Akt1 zu erhalten, welche erste Einblicke in die Bindemodi dieser Inhibitoren lieferte. Das 5-Hydroxybenzyl-Derivat **16c** besitzt die höchste inhibitorische Potenz der Pyrazinon-Serie auf Akt3 und könnte in Docking Studien mit den Homologiemodellen der Isoformen mögliche favorisierte Bindeposen und Interaktionen weiter beleuchten (vgl. Abb. 3.1-4). Neue Erkenntnisse aus der *in silico* Betrachtung sollen dann in das Design einer fokussierten Serie der CAAs einfließen.





**Abb. 3.1-4: Docking-Studien mit den Akt Homologiemodellen und Designansatz für die fokussierte Substanzbibliothek.** (A) Chemische Struktur des Inhibitors **16c** sowie die literatur-bekanntesten IC<sub>50</sub>-Werte der regioisomeren Pyrazinone auf den Akt Isoformen.<sup>146,159</sup> (B) und (C) Ausschnitte der Dockingpose des aromatischen Teils von Ligand **16c** in dem Akt3 Homologiemodell (gelb), in direktem Vergleich zu den Aminosäure Seitenketten von Akt1 (grau, PDB: 6s9x) und Akt2 (rosa, Homologiemodell). (D) Schematische Darstellung des Designansatzes für eine fokussierte Substanzbibliothek an Liganden, welche die Akt Isoformen kovalent adressieren sollen.

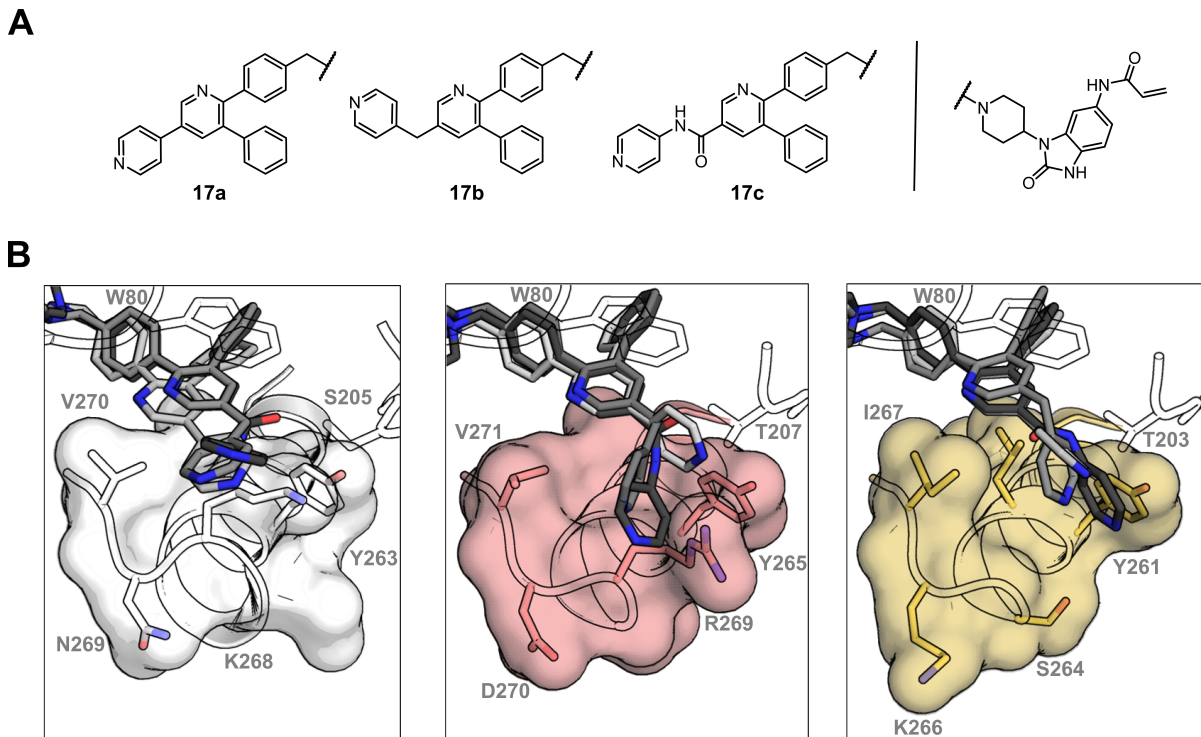
Die Docking-Studien mit Pyrazinon **16c** und dem Homologiemodell von Akt3 veranschaulichten eine mögliche Bindepose des Liganden in der allosterischen Bindetasche, anhand derer redundante Interaktionen zur Makromolekularenstruktur identifiziert werden konnten. Darunter die  $\pi$ - $\pi$  Stapelwechselwirkung zu Trp80. Weiterhin wird deutlich, dass der Hydroxybenzylrest des Liganden den aliphatischen Rest von Ile270 umgehen kann und in einer Art Aussparung der Proteinoberfläche Platz findet. Im direkten Vergleich mit den anderen beiden Isoformen lässt sich ableiten, dass diese okkupierte Kavität durch die basischen Seitenketten von Lysin bzw. Arginin eingenommen wird und die Bindung des aromatischen Restes von **16c** dort erschwert sein könnte. Der flexible Methyllinker des Substituenten würde weitere Bindungsposen in Akt1 und Akt2 erlauben, könnte aber an Akt3 aufgrund der größeren Öffnung an dieser Position bevorzugt binden, welches sich zum Teil in den beobachteten Aktivitäten widerspiegelt.<sup>159</sup>

Unter Berücksichtigung der bereits zuvor publizierten CAAs sollten wichtige Strukturelemente in den neuen Liganden beibehalten werden. Darunter das triaryliche Grundgerüst im westliche Molekülteil, welches wichtige  $\pi$ - $\pi$  Stapelwechselwirkungen mit Trp80 und Tyr272 einght. Weiterhin ist aus Studien zu literatur-bekanntesten Inhibitoren ersichtlich, dass der Stickstoff innerhalb des mit dem Trp80 wechselwirkenden Molekülteils eine Schlüsselrolle spielt, weshalb die in dieser Arbeit zu synthetisierenden Verbindungen auf Pyridin als zentrales Ringsystem basieren sollen.<sup>170</sup>

Im Vergleich zu den synthetisch schwer zugänglichen pyrazinonischen Verbindung ermöglicht die Klasse der Pyridine eine Vielzahl an simplen chemischen Modifikationen. Abgeleitet von der Dockingpose des Moleküls **16c** in Akt3 und einer potentiellen Perturbation der allosterischen Bindetasche mit Liganden, welche räumlich anspruchsvolle Substituenten an 5'-Position des aromatischen Grundgerüsts tragen, sollte der hauptsächliche Fokus der Substanzbibliothek auf Derivatisierung dieses Molekülteils liegen. Darunter galt es an dieser Stelle der Verbindungen Gruppen einzuführen, die neben dem räumlichen Anspruch ebenso verschiedene chemische Eigenschaften besitzen. Die diversen Substituenten sollten an der 5'-Position des Grundgerüsts über verschiedene Verlinkungen eingeführt werden, um ebenfalls das Maß an tolerierter Flexibilität zu untersuchen. Im Speziellen sollten die Verknüpfungen über einen Methyllinker, eine Amidbindung oder gar ohne überbrückende Atome durch direkte Modifikation des Pyridins evaluiert werden. Mögliche Gruppen, die überwiegend an der 5'-Position eingeführt werden sollen, sind Fünfringsysteme mit Heteroatomen und kleinen Resten, die veränderte chemische Eigenschaften mit sich bringen und beispielsweise als Wasserstoffbrücken-Donor oder -Akzeptor fungieren können. Ebenso sind größere aromatische Ringsysteme mit höherem sterischem Anspruch von Interesse. Unterschiedliche elektrostatische Beschaffenheit durch Variation des Heteroatoms in den elektronenreichen Systemen soll analysiert werden. Löslichkeitsvermittelnde Substituenten sowie polare sekundäre und tertiäre Amine eignen sich, um mögliche Variationen der unterschiedlich polarisierten Oberfläche der Akt Isoformen Bindetaschen zu durchdringen. Da sich aus der Serie der Pyrazinon-basierenden CAAs besonders das Molekül **16b** mit Isobutyl-Rest als selektiver und potenter Akt2 Ligand offenbarte, sollen weitere verzweigte und lineare, aliphatische Molekülstrukturen als Substituenten an der 5'-Position untersucht werden. Intermediate aus der Syntheseroute zum Aufbau dieser Moleküle sollen ebenfalls analysiert werden und könnten Rückschlüsse auf den Einfluss kleinerer Modifikationen liefern, welche sich direkt am Grundgerüst der Liganden befinden.

Die potentiellen Verbindungen sollten zunächst in einer weiteren Dockingstudie mit den Akt Isoform Homologiemodellen betrachtet werden, um einen möglichen Einfluss der jeweiligen Linker auf die Orientierung der Substituenten in den Bindetaschen zu erhalten.<sup>171</sup> Dazu wurden drei Liganden mit 4-Pyridin als räumlich anspruchsvoller Rest an dem triarylischen Grundgerüst erstellt, in welchen jeweils eine andere Verknüpfung für die Modifikation gewählt wurden (vgl. Abb. 3.1-5).





**Abb. 3.1-5: Dockingposen potentieller CAIs mit den Akt Isoformen.** (A) Strukturen der potentiellen kovalent-allosterischen Inhibitoren, welche über verschiedene Linker mit einem 4-Pyridin Substituent modifiziert sind. (B) Ausgewählte Dockingposen der drei Liganden **17a-c** in Akt1 (grau) sowie den Homologiemodellen von Akt2 (rot) und Akt3 (gelb). Das Docking wurde mit Ligandscout und AutoDock Vina durchgeführt und unter visuelle Inspektion entsprechende *in silico* berechnete Posen ausgewählt.<sup>172</sup> **17a**: hellgrau, **17b**: mittelgrau, **17c**: dunkelgrau.

Aus den Docking-Studien wird ersichtlich, dass in allen drei Isoformen unterschiedliche Bindungsposen für die drei 4-Pyridin tragenden Liganden **17a**, **17b** und **17c** erhalten werden konnten. Ebenso lässt der Vergleich der Strukturen erkennen, wie unterschiedlich die Umgebung um die Aminosäuren 263-270 am c-terminalen Ende der  $\alpha$ E-Helix in den Isoformen konstituiert ist. Die Substituenten der Liganden **17b** und **17c** haben in Akt3 eine fast lineare Ausrichtung im Gegensatz zu den abgewinkelten Posen dieser Moleküle in Akt1 und Akt2. Aufgrund der Aussparung neben Tyr263 kann dort das 4-Pyridin mit dem Protein wechselwirken, wohingegen diese Position von der Lysin Seitenkette in Akt1 oder Arginin in Akt2 eingenommen wird. Ein ähnliches Bindungsverhalten wäre für etwas kleinere Ringsysteme in Akt3 denkbar. Der Ligand **17a**, ohne Linker zwischen Substituenten und Grundgerüst, nimmt in Akt3 und Akt2 ähnliche Bindemodi ein, wobei er in letzterer Isoform etwas zwischen die beiden Seitenketten von Tyr263 und Arg267 ragt. Aufgrund der flexiblen, basischen Aminosäure (Arg267) wäre eine Kation- $\pi$  Wechselwirkung mit dem aromatischen Rest von **17a** denkbar. In Akt1 hingegen verschiebt sich der Ligand in der Bindetasche, da das 4-Pyridin dort zwischen Lys268 und Tyr263 kein Platz zu finden scheint. Unter der Berücksichtigung, dass es sich um ein eher statisches Docking handelt, wäre nichtsdestotrotz eine Interaktion des Aromaten analog wie bei Akt2 möglich, da die flexible Lysin-Seitenkette Beweglichkeit besitzt. Somit könnten Liganden mit direkter Modifikation des Pyridin-Grundgerüsts in Akt1 und Akt2 bevorzugt binden, falls sie zu der basischen Seitenkette eine Kation- $\pi$  Interaktion ausbilden, die in Akt3 nicht präsent wäre.

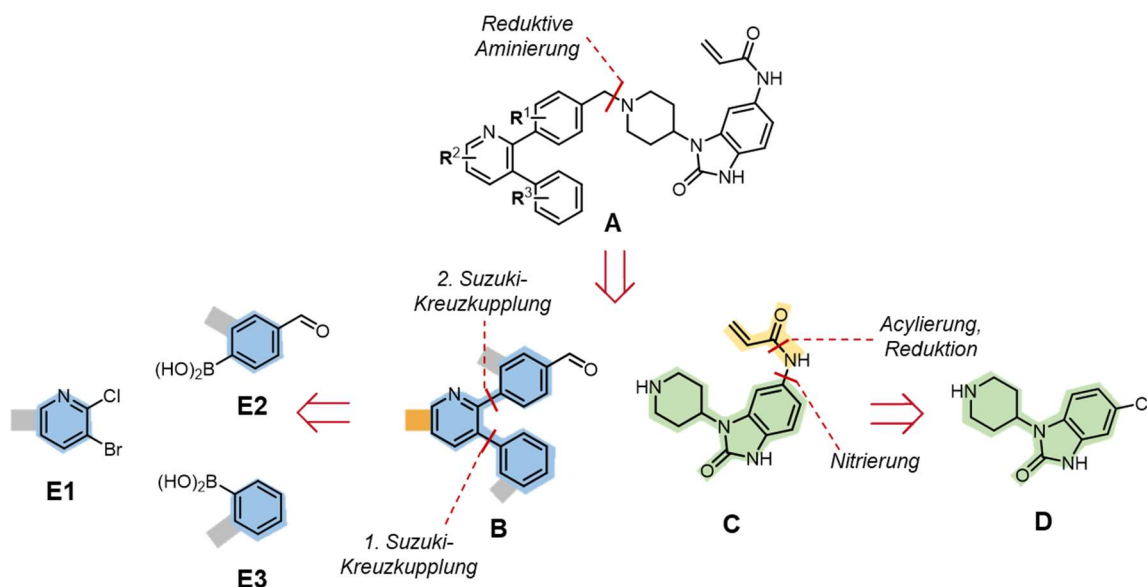
Des Weiteren vermag der längere Linker in **17c** dazu beizutragen, dass die größeren Substituenten wie das 4-Pyridin nicht in einen sterischen Konflikt mit der basischen Seitenkette in Akt1 und Akt2 (Lys, Arg) kommen. Dies ließe vermuten, dass Liganden mit amidisch-verknüpften Resten von diesen beiden Isoformen, im Gegensatz zu den korrespondierenden methylen-verlinkten Versionen bevorzugt binden. Die Unterschiede in der Struktur von Akt2 zu Akt1 am C-terminalen Ende der  $\alpha$ E-Helix könnten weiteren Einfluss auf die Beweglichkeit des Protein-Rückgrats haben. Eine weniger starre Struktur um Arg268 in Akt2 könnte eventuell ermöglichen, dass die Liganden mit aromatischen Ringsystemen einen ähnlichen Bindemodus wie in Akt3 annehmen und die Substituenten zwischen Tyr263 und Arginin binden.

Somit bestätigen die Docking-Studien, dass durch Einsatz verschiedener Linker bereits ein diverses Set an Liganden geschaffen werden kann, welche möglicherweise signifikante Unterschiede in der Aktivität für die jeweiligen Akt Isoformen hervorbringen.

In bekannten Inhibitoren wie Miransertib zeigte sich, dass am unteren 3'-Ringsystem, welcher eine eher hydrophobe Tasche okkupiert, neben dem bisher genutzten Phenylring weitere Struktur motive wie das 2-Aminopyridin toleriert werden.<sup>147</sup> Aus diesem Anlass sollen ebenfalls andere Substituenten und Ringsysteme dort eingeführt, um diese hinsichtlich ihrer Einflüsse auf die Aktivität zu evaluieren. Analog zu dieser Modifikation sind Veränderungen im oberen konservierten 2'-Ringsystems, welches über eine Methylbrücke mit dem Benzimidazol verknüpft ist, gleichermaßen von Interesse. Die Einführung von kleinen Resten an *ortho*-Positionen des Benzylrings sollen in diesem Sinne weiter untersucht werden. Der östliche Molekülteil bietet ebenso mögliche Angriffspunkte zur Modifikation, jedoch werden im Rahmen dieser Arbeit dort keine Veränderungen vorgenommen und der etablierte Baustein ausschließlich als konservierter Linker genutzt, um eines der beiden Cysteine kovalent adressieren zu können. In anderen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass vor allem dieser Molekülteil pharmakologisch benachteiligte Elemente beinhaltet, welche zu einem späteren Zeitpunkt der Wirkstoffentwicklung noch optimiert werden könnten.<sup>154,173</sup>

### 3.1.3. Synthetische Darstellung

Abgeleitet von dem erarbeiteten Design sollte eine möglichst effiziente Synthesestrategie etabliert werden, um die Darstellung der geplanten Zielverbindung zu ermöglichen. Darunter gilt es einige Punkte in der Planung möglicher Strategien zu berücksichtigen. Beispielsweise soll die Derivatisierung des Grundgerüsts in der gewählten Syntheseabfolge erst in spätere Schritte eingebunden werden, so dass zentrale Grundbausteine in ausreichenden Mengen dargestellt werden können, bevor sie eine Modifizierung erfahren. Konvergent verlaufende Reaktionswege sind ebenfalls zu bevorzugen, damit weniger Material über eine lineare Syntheseabfolge verloren geht und Moleküle parallel dargestellt werden können.<sup>174,175</sup> Eine generelle Kompatibilität der reaktiven Gruppen, sowie der Einsatz von chemoselektiven Reaktionen oder orthogonalen Schutzgruppen-Strategien gilt es ebenfalls in Betracht zu ziehen. Basierend auf diesen Grundsätzen sollte zunächst eine retrosynthetische Zerlegung der allgemeinen Zielverbindung erfolgen, welche wiederum die gedankliche Planung sinnvoller Synthesestrategien unterstützt (vgl. Abb. 3.1-6).<sup>176</sup>



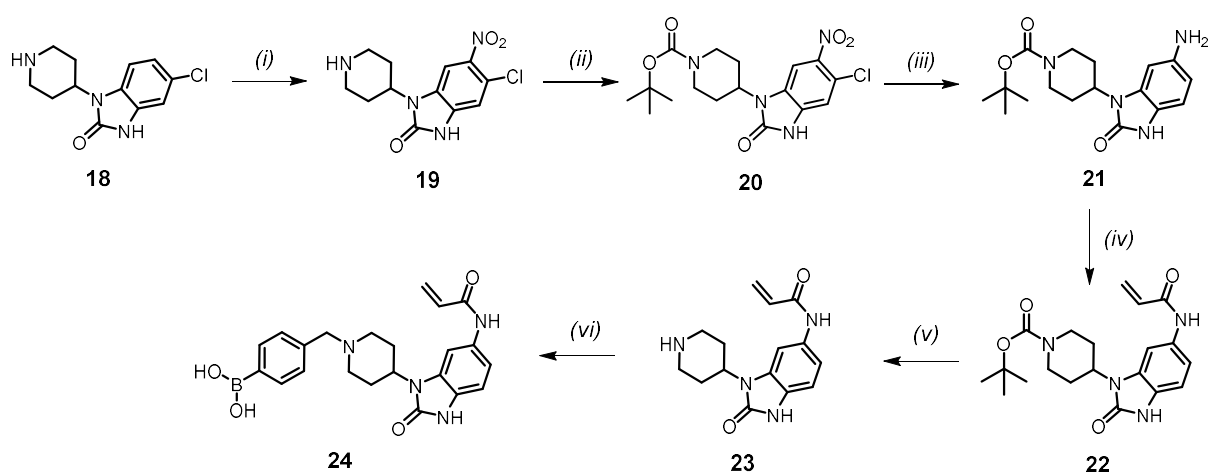
**Abb. 3.1-6: Schematische Darstellung einer möglichen retrosynthetischen Zerlegung der Zielstruktur A.** Wichtige Strukturelemente wurden farblich markiert: elektrophiles Michael-Akzeptor System (gelb), Piperidin-Benzimidazol-Linker (grün), triarylisches Pyridin Grundgerüst (blau), welches an den Ringsystemen mit Substituenten (grau/orange), aus den Startmaterialien versehen ist.

Die Betrachtung der Zielstruktur **A** lässt zunächst die Einteilung in eine östliche und westliche Molekül-Hemispäre zu. Dabei ist der östliche Baustein mit einem Michael-Akzeptor modifiziert und fungiert als Linker, welcher letztlich das elektrophile System den nukleophilen Seitenketten des Enzyms präsentiert. Der westliche Molekülteil dagegen soll genutzt werden, um die geplanten Derivatisierungen und Modifikationen einzuführen. Aus der retrosynthetischen Perspektive sind zwei Synthone ausgehend von der Zielverbindung denkbar, die durch Bindungsbruch im Methylen-Linker der beiden Hemisphären erhalten werden und sich in das sekundäre Amin **C** sowie den Aldehyd **B** vereinfachen lassen, wenn die Verknüpfung über eine reduktive Aminierung aufgebaut wird. Das Benzimidazol-System kann auf die chlorierte Form des annellierten Doppelrings (**D**) reduziert werden, welcher die Einführung des Stickstoffes

mittels Nitrierung samt gefolger Hydrierung sowie anschließender Acylierung erlaubt und als kommerziell verfügbares Startmaterial erhältlich ist. Das triarylsche Molekül mit 2,3-Diphenylpyridin-Kern könnte gedanklich in weitere Fragmente zerteilt werden, wie beispielsweise die entsprechenden Organoborone (**E2**, **E3**) und Halogenaryl (**E1**), welche durch chemoselektive C-C-Bindungsknüpfung verkettet werden können. Da ein Großteil der Modifikation an den arylischen Ringsystemen vorgenommen werden soll, ermöglicht diese Zerlegung der Moleküle eine Strategie, in welcher die Einführung maskierter, reaktiver Gruppen (**B**, orange) in den ersten Schritten der Synthese erfolgen kann, um im späteren Verlauf nach entsprechender Demaskierung dort eine gezielte Derivatisierung vorzunehmen. Des Weiteren stellen die Organoboronsäuren sowie die halogenierten Pyridine kommerziell verfügbare Ausgangsmaterialien dar, welches wiederum den Einsatz von diversifizierten Startmaterialien bereits zu Beginn der Syntheseroute ermöglicht.

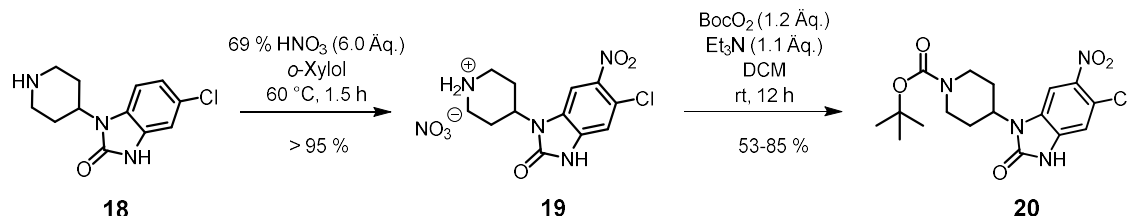
### 3.1.3.1. Gewinnung des östlichen Molekülteils

Dem Design entsprechend soll der östliche Molekülteil nicht weiter modifiziert werden, weshalb die bereits etablierte Syntheseroute des Benzimidazolon-Linkers als Darstellungsgrundlage dient.<sup>152,154</sup> Dabei sollte abgeleitet von der retrosynthetischen Zerlegung der geplanten Zielstrukturen, die bekannte Synthesestrategie für den östlichen Baustein zunächst umgestellt werden, sodass die Möglichkeit besteht in einem letzten Schritt das westliche, derivatisierte Molekülteil einzuführen. Die geplante Umstellung sollte ermöglichen, dass das Thiol adressierende Elektrophil, in diesem Falle ein  $\alpha$ - $\beta$ - ungesättigtes Michael-Akzeptor System bereits im Molekül integriert ist. Weiter soll die Einführung einer Boronsäure als funktionelle Gruppe für den finalen Baustein der Route berücksichtigt werden. Dies ermöglicht eine effiziente Verknüpfung des westlichen Molekülteils mittels Kreuzkupplungsreaktionen (vgl. Abb. 3.1-7).



**Abb. 3.1-7: Allgemeine Syntheseroute zur Darstellung des östlichen Molekülteils und seiner Schlüsselintermediate.** i) Salpetersäure; ii) Diboc-Anhydrid; iii) Pd/C, Ammoniumformiat; iv) Acryloylchlorid; v) TFA; vi) Cyanoborhydrid.

Analog zu der publizierten Darstellung des Benzimidazolion-Molekülteils in der Syntheseroute von Borussertib (**13**) sollte zunächst durch regioselektive Nitrierung der Stickstoff - ein späterer Ausgangsvektor - eingeführt werden.<sup>154</sup> Daraufhin erfolgt eine chemoselektive Maskierung am sekundären Amin des Piperidins (vgl. Abb. 3.1-8).

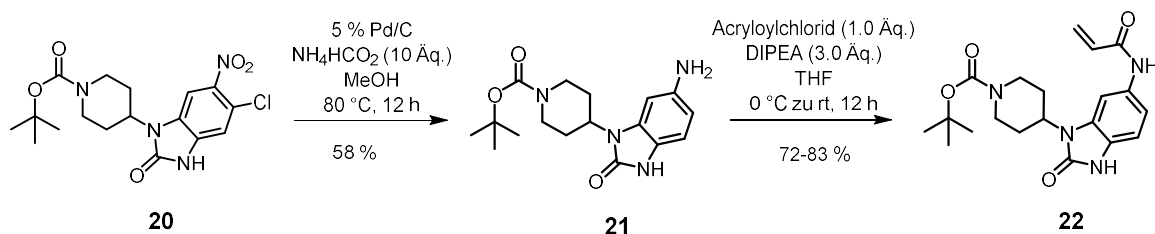


**Abb. 3.1-8: Reaktionsgleichungen zur Darstellung von 20 ausgehend von 18.** Initiale Schritte zum Erhalt von **20** sind die regioselektive Nitrierung, sowie die Maskierung des sekundärenamins am Piperidinring.

Die Nitrierung verläuft als elektrophile aromatische Substitution unter einem Überschuss an Salpetersäure regioselektiv ab. Der positive Mesomerie (+M)-Effekt des Halogens erhöht die Ladungsdichte des Aromaten an der *ortho*-Position und erleichtert den elektrophilen Angriff des *in situ* gebildeten Nitronium-Ions an 6'-Position des  $\pi$ -Systems. Mit Abspaltung des Protons, von der sich im Wheland-Komplex befindlichen Zwischenstufe, geht die Wiederherstellung der Aromatizität einher.<sup>177</sup> Die Ausbildung von multivalenten Nitrat-Salzen führte in einigen Fällen zu einer überquantitativen Ausbeute.

Die Maskierung des basischeren, sekundärenamins erfolgte in einer  $S_N2$ -Reaktion, dort greift der Stickstoff des Piperidins eine der Carbonylgruppen des Anhydrids nukleophil an, woraufhin sich unter C–N Bindungsknüpfung und konzertierter C–O Bindungsspaltung das protonierte Carbamat bildet. Dieses wird durch basische Aufarbeitung deprotoniert, wobei das abgespaltene *tert*-Butylcarbonat in Kohlenstoffdioxid und *tert*-Butoxid dissoziiert.<sup>178</sup> Trotz anwesender weiterer Amine im Molekül verlief die Reaktion chemoselektiv mit einer guten Ausbeute von bis zu 85 %. Die erhöhte Nucleophilie des Piperidin-Amins in gesättigter Umgebung begünstigt diesen selektiven Verlauf.

Nachfolgend sollte die Reduktion der Nitrogruppe mittels Palladium zum Anilin erfolgen, welches im darauffolgenden Schritt unter Einsatz von Acryloylchlorid acyliert wird (Abb. 3.1-9).



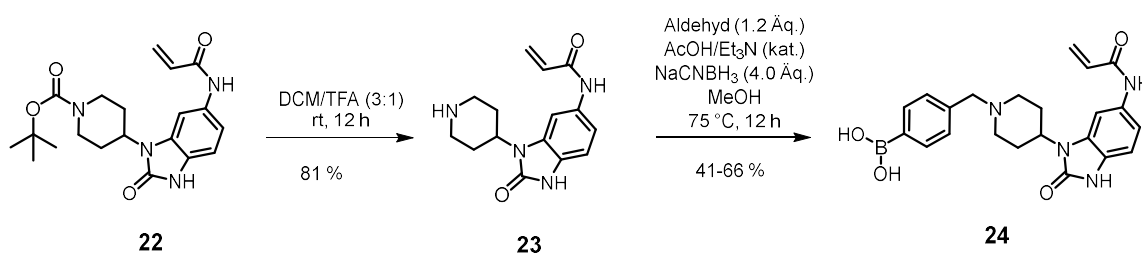
**Abb. 3.1-9: Reaktionsgleichung zur Darstellung von 21 und 22.** Zuerst erfolgt die Palladium-katalysierte Reduktion der Nitrogruppe zusammen mit einer einhergehenden Dehalogenierung woraufhin das Anilin selektiv mit Acryloylchlorid nukleophil substituiert wird.

In einer heterogenen Katalyse und unter Anwesenheit von Ammoniumformiat als Wasserstoffdonor, konnte die Nitrogruppe mit Hilfe des Übergangsmetalls Palladium reduziert werden.<sup>179</sup>

Der inerte Elektronenüberträger ermöglicht den Transfer von Wasserstoffatomen auf die zu reduzierenden Atome, welche aus der *in situ*-Zersetzung von Ammoniumformiat gewonnen und von der Palladium-Oberfläche adsorbiert werden. Eine Wechselwirkung des partiell positiv geladenen Stickstoffs mit der Pd-Oberfläche erleichtert die Hydrid-Übertragung, woraufhin durch Protonierung der Sauerstoffe Wasser abgespalten werden kann. Letztlich wird nach weiterer Hydrid-Übertragung und Wasserfreisetzung das anilinische Amin erhalten. Ähnlich läuft die Dehalogenierung des Benzimidazolons ab, wodurch jedoch Chlorid nicht freigesetzt wird, sondern am Palladium verbleibt.<sup>180</sup> Die vollständige Reduktion der Nitro-Gruppe erfolgt innerhalb weniger Stunden, wohingegen die Dehalogenierung eine längere Reaktionszeit im Bereich von bis zu 12 Stunden benötigt. Allgemein kann ein kompletter Umsatz des Edukts beobachtet und massenspektrometrisch verfolgt werden, jedoch trägt die hohe Polarität der Verbindung sowie das Verbleiben von Ammoniumsalzen in der Lösung zu einer erschwerten Aufreinigung des Rohmaterials bei, weshalb es zu Ausbeuteverlusten kam.

Die Acylierung des Anilins durch Acryloylchlorid verläuft in einer S<sub>N</sub>2-Reaktion ab, dort greift das basische Amin den partiell positiv geladenen Carbonyl-Kohlenstoff nukleophil an, um unter konzertierter Bindungsbildung/-spaltung ein Amid aufzubauen und Chlorid freizusetzen. Letztlich wird das positiv geladene Amin von der Base deprotoniert, was mit der Produktbildung einhergeht. Die Reaktion verzeichnete gute Ausbeuten mit bis zu 83 %, nur geringe Mengen an Startmaterial verblieben in der Lösung, womöglich aufgrund des stöchiometrischen Einsatzes des reaktiven und hydrolyselabilen Säurechlorids.

Anschließend sollte das sekundäre Amin demaskiert werden, um dort in einer nachstehenden Reaktion die benzyliche Boronsäure einzuführen, welche als finaler Baustein für weitere Derivatisierungen dient (vgl. Abb. 3.1-10).



**Abb. 3.1-10: Reaktionsgleichung zur Darstellung der beiden Schlüsselintermediate 23 und 24.** Ausgehend von der sauren Abspaltung des *tert*-Butylcarbamates sowie einer anschließenden reduktiven Aminierung konnten die geplanten Derivate erhalten werden.

Unter sauren Bedingungen kann das *tert*-Butylcarbamate irreversibel mittels Decarboxylierung abgespalten werden, wodurch das Amin für eine reduktive Aminierung freigesetzt wird. Die Protonierung des Carbonyl-Sauerstoffs initiiert die Abspaltung der Carbamat-Gruppe, infolgedessen kommt es zur intramolekularen Elektronenverschiebung des C–O Bindungspaares des *tert*-Butyl-Restes. Dabei entsteht ein *tert*-Butyl-Carbenium-Ion welches sich mittels Protonen-Verschiebung zu Isobuten und Carbamatsäure umlagert. Diese zersetzt sich in Kohlenstoffdioxid und das freie Amin.<sup>178</sup>

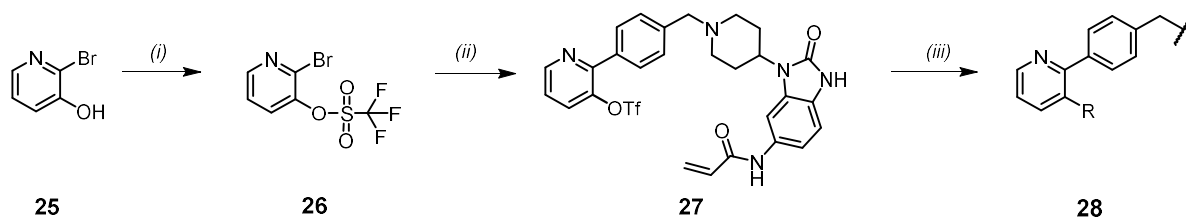
Die Reaktion verlief meist vollständig und gebildete TFA-Salze konnten durch weitere Reinigung entfernt werden, die eher geringen Ausbeuteverluste sind auf mehrfache chromatographische Schritte zurückzuführen.

Innerhalb der reduktiven Aminierung findet zunächst unter Abspaltung von Wasser die Bildung des Iminium-Ions unter leicht sauren Bedingungen statt. Damit die initiale Kondensation vollständig ablaufen kann wurde das Reduktionsmittel erst nach vier Stunden zugesetzt. Die Zugabe des eher milderen Reduzierungsmittels  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  bewirkt den chemoselektiven Hydrid-Transfer auf das Iminium-Ion zum korrespondierenden Amin, wohingegen der verbliebene Aldehyd nur zu geringen Anteilen reduziert wurde.<sup>181</sup> Aufgrund des eher neutralen pHs erfolgt die Reduktion des Imins deutlich schneller als die der Carbonyl-Substrate.<sup>182</sup> Trotz milderer Reaktionsbedingungen sind die Abfallprodukte und  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  selbst sehr toxisch und sollten zukünftig besser durch andere Reduktionsmittel wie beispielsweise  $\text{NaHB}(\text{OAc})_3$  ersetzt werden.<sup>183</sup> Insgesamt wurde ein vollständiger Umsatz der Edukte massenspektrometrisch beobachtet, jedoch erschwerte die freie Boronsäure die Isolierung des Produktes, weshalb durch wiederholte chromatographische Reinigung Material verloren ging und somit in moderaten Ausbeuten von bis zu 66 % resultierte.

Aus der Syntheseroute konnten zwei wichtige Schlüsselintermediate dargestellt werden, das freie Amin **23** sowie der Boronsäure tragende östliche Molekülteil **24**, welche für alle folgenden Synthesewege als finaler Reaktionspartner dienen, um letztlich die fokussierte Substanzbibliothek aufzubauen.

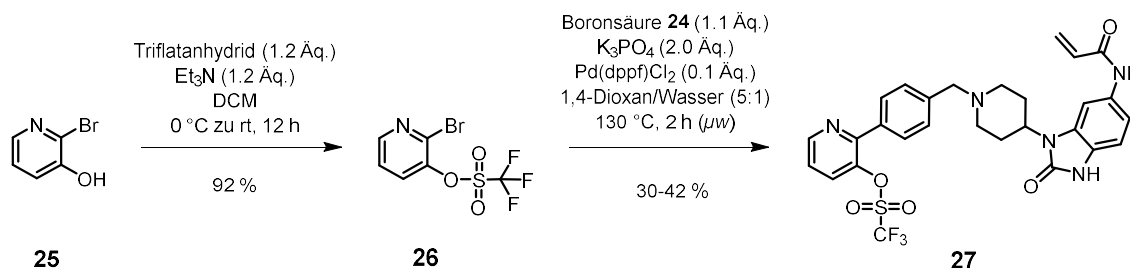
### 3.1.3.2. Modifikationen der biarylischen Ringsysteme

Zunächst sollten Moleküle dargestellt werden, welche Modifikationen an einem der beiden aromatischen Ringsysteme des triarylischen Grundgerüsts tragen. Dafür wird jeweils eine leicht modifizierte Synthese-strategie gewählt. Um den unteren isolierten Phenylring zu substituieren soll diese Modifikation als finaler Schritt der Route erfolgen. Ausgehend von den synthetisch sehr zugänglichen Pyridinen kann über chemoselektive C-C-Bindungs-knüp-fung und Transformation zu einer Fluchtgruppe letztlich der veränderte biarylische Molekülteil in drei Schritten aufgebaut werden (vgl. Abb. 3.1-11).



**Abb. 3.1-11: Allgemeine Syntheseroute zur Darstellung der Zielstrukturen mit Modifizierung des unteren Ringsystems.** i) Triflat-Anhydrid,  $\text{Et}_3\text{N}$ ; ii) Pd-Kat,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ; iii) Pd-Kat,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

Der Einsatz des 2-Bromo-3-Hydroxyl-Pyridins (**25**) ermöglicht, dass das Boronsäure-modifizierte Schlüsselintermediat **27** über eine Suzuki-Kreuzkupplung eingeführt werden kann. Weiterhin soll der Alkohol mittels Triflat zu einer Abgangsgruppe überführt werden, welche in einer weiteren Kreuzkupplung die entsprechend geplante Derivatisierung zulässt (vgl. Abb. 3.1-12).



**Abb. 3.1-12: Reaktionsgleichung zur Darstellung der Zwischenstufen 26 und 27.** Zunächst erfolgt die Transformation des Hydroxyls zur Triflat-Abgangsgruppe sowie anschließend die Suzuki-Kreuzkupplung an 2-Bromopyridin.

Da nicht nur Arylhalogene Substrate für die Suzuki-Kreuzkupplung darstellen wurde die Hydroxylgruppe des Pyridins in einer nukleophilen Substitution an Triflatanhydrid und unter Anwesenheit der organischen Base Et<sub>3</sub>N zur entsprechenden Abgangsgruppe umgesetzt. Generell konnte ein fast vollständiger Umsatz von bis zu 92 % beobachtet werden.

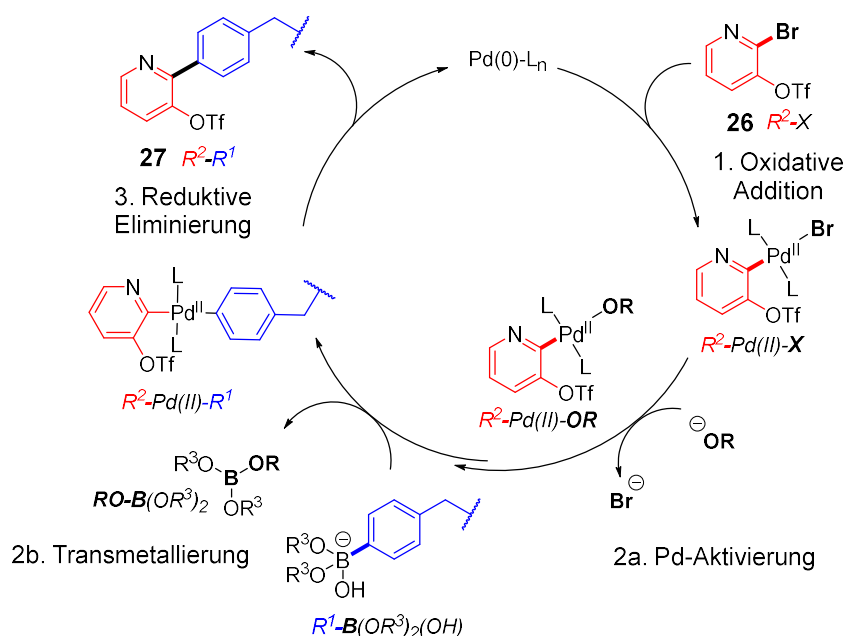
In der SUZUKI-MIYAUURA-Kreuzkupplung wird die Organoboronsäure unter C–C Bindungsknüpfung durch das Arylhalogenid bei Anwesenheit von Palladium(0) sowie einer Base substituiert.<sup>184</sup> Das eingesetzte Übergangsmetall ermöglicht die Bindungsknüpfung über eine Transmetallierung eines *in situ* gebildeten Organometall-Komplexes. Die Reaktion des Brompyridins mit dem Schlüsselintermediat **24** verlief in geringen Ausbeuten, welches auf die hohe Komplexität der Boronsäure zurückzuführen ist.

Die C-C Bindungsknüpfung mittels Suzuki-Kreuzkupplung ist zentraler Bestandteil zum Aufbau der geplanten Substanzbibliothek, weshalb der Verlauf im folgenden Abschnitt genauer betrachtet werden soll (vgl. Abb. 3.1-13). Mechanistische Studien lieferten Hinweise für einen möglichen Ablauf der Reaktion, welche einen drei bzw. vier-schrittigen Katalysezyklus postulieren, wobei es ebenfalls Indizien in der Literatur für alternative Teilschritte gibt.<sup>185-187</sup>

Zunächst reagiert die reaktive Palladium(0)-Spezies mit dem Arylhalogenid in einer oxidativen Addition zum Pd(II)-Aryl-Halogenid-Komplex. In dem darauffolgenden Schritt reagiert die Base bzw. ein Alkoxid mit dem Pd(II)-Komplex unter Freisetzung eines Halogensalzes zu einer reaktiveren Pd-Spezies. Anschließend erfolgt die elektrophile Transmetallierung und beide Aryl-Verbindungen koordinieren an den Palladium-Kern.<sup>188</sup> Das Organoboron bedarf ebenfalls einer Aktivierung durch die Base hin zum Boronat bevor es an der Reaktion teilnehmen kann. Der Ligandenaustausch zwischen den beiden Metallen verläuft meist als Metathese mit vier-zentrigem Übergangszustand und ist geschwindigkeitsbestimmend.<sup>189</sup>



Dieser Schritt verläuft nachweislich unter Beibehalt der Konfiguration am Kohlenstoff weshalb eine elektrophile Substitution zweiter Ordnung mit zeitgleicher Bindungsbildung sowie Bindungsspaltung, oder auch vorderseitige  $S_E2$  Reaktion mit zyklischem Übergangszustand postuliert wird.<sup>190,191</sup> Dem folgt eine reduktive Eliminierung des Produkts nach *cis*-Isomerisierung der zu verknüpfenden Aryle sowie einhergehender Rückgewinnung der reaktiven Palladium(0)-Spezies. Die eingesetzten Halogen bzw. polarisierenden Abgangsgruppen definieren die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte, beispielsweise ist die oxidative Addition an Chlorarylen besonders limitierend.<sup>192</sup> Für dieses Halogen werden hohe Temperaturen benötigt, um die initiale Bildung der Organo-Metall-Komplexes einzuleiten.<sup>193</sup> Die Bindungsstärke der Sigma-Bindung des Halogens zum Aryl-Kohlenstoff ist im Additionsschritt zum Palladium(II)-Komplex maßgeblich für die Geschwindigkeit der Umsetzung verantwortlich, weshalb Kohlenstoffe mit größeren Fluchtgruppen wie Iod oder Triflat einfacher zu oxidieren sind. Der Nachteil von polarisierteren Halogenen wie Brom hingegen, ist eine trägere Transmetallierung.

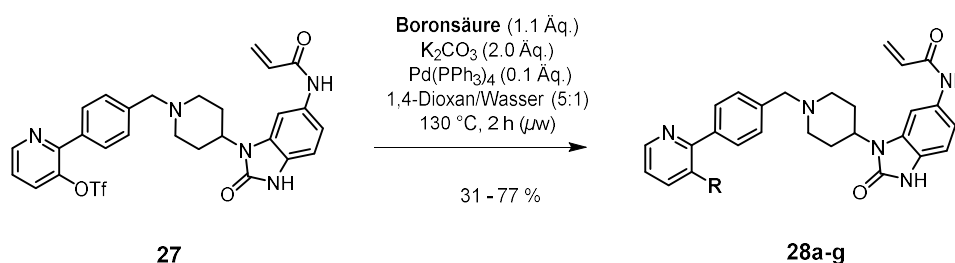


**Abb. 3.1-13: Katalysemechanismus der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung.** Detaillierter, mechanistischer Verlauf der  $C(sp^2)-C(sp^2)$ -Bindungsknüpfung von Halogenarylen mit Organoboronen nach SUZUKI-MIYAUURA am Beispiel der Darstellung von Intermediat **27**.<sup>184</sup>

Es gibt neben der Reaktionsdauer, den eingesetzten Konzentrationen der Edukte und Reaktanden sowie der zugeführten Energie etliche weitere Parameter die für diese Reaktion optimiert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich sehr analoge Bedingungen für alle Suzuki-Kreuzkupplungen gewählt, jedoch variierte das verwendete Katalysator-Basen-System in Bezug auf das adressierte Halogen. Für die elektronenarmen Chlorpyridine wurde Triphenylphosphinpalladium genutzt, welches durch die hohe Elektronendichte um das zentrale Palladium den oxidativen Schritt begünstigt. Die Verwendung von  $Pd(dppf)$  (1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen), einen zweizähligen-Ligand, bewirkt durch eine festere Koordination und entsprechenden „Bißwinkel“ des Metalls eine verminderte sterik, weshalb Reaktionen einfacher und effizienter ablaufen können.<sup>194</sup>

Unter anderem begünstigt dies den Schritt der Transmetallierung, weshalb Reaktionen mit Bromarylen durch Einsatz dieses Katalysators bevorzugt ablaufen können. Die eingesetzte Base sollte idealerweise einen pKa in wässrigen Lösungen besitzen, welcher höher als die der Boronsäure liegt. Denn die Aktivierung des Bors durch Addition von Hydroxid zu einem tetrahedralen Metall ist die Voraussetzung dafür, dass das Organoboron in der Transmetallierung partizipieren kann. Es konnten Pd(II)-oxo Spezies identifiziert werden, weshalb die Annahme besteht, dass nach der oxidativen Addition das Halogen durch ein Hydroxid oder Alkoholat ausgetauscht wird.<sup>195</sup> Aufgrund dieser Substitution kann im nachfolgenden Schritt die Annäherung des Boronates an die Palladium-Sphäre, aufgrund der oxophilie des Hauptgruppenelementes, begünstigt werden.

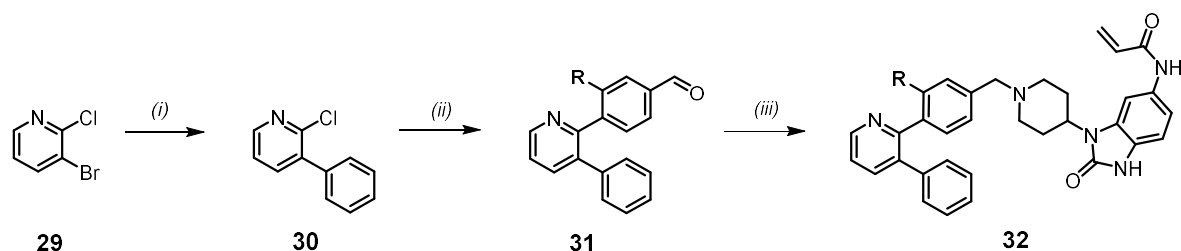
In einem letzten Schritt sollten schließlich verschiedene arylische Organoboronsäuren mittels weiterer Suzuki-Kupplung an das Pyridin eingebracht werden (vgl. Abb. 3.1-14).



**Abb. 3.1-14: Reaktionsgleichung der finalen Suzuki-Kreuzkupplung an Aryltriflat zu den Produkten 28a-g.** Der Einsatz verschiedener Organoborone lieferte insgesamt sieben finale Moleküle.

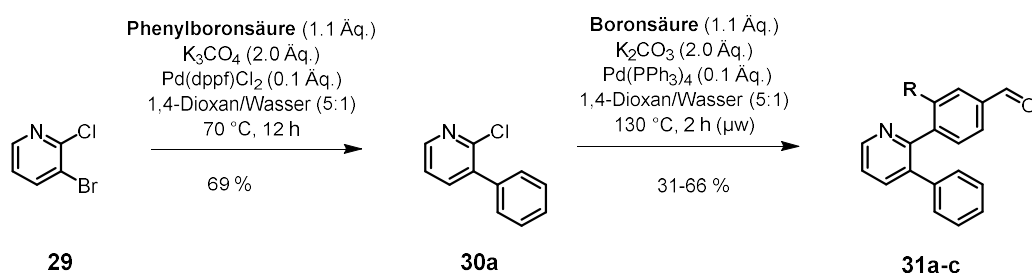
Die im Verlauf der Synthesestrategie konstruierte Abgangsgruppe ermöglichte die Einführung unterschiedlicher Substituenten mittels zuvor beschriebener Palladium katalysierter C-C Bindungsknüpfung. Unter Verwendung von Tetrakis, einem auf Triphenylphosphin-Ligand basierender Katalysator, sowie hoher Energiezufuhr durch den Mikrowellenreaktor konnten insgesamt sieben Moleküle dargestellt werden. Darunter modifizierte Phenylringe, wie das 3'-Phenol **28d** oder 2'-Aminopyridin **28c** oder auch gesättigte Ringsysteme wie das Pyran **28e**. Insgesamt fielen die Ausbeuten moderat bis gut aus, welches zum Teil auf die Komplexität und Polarität der Zielverbindungen zurückgeht, jedoch ebenso auf die empfindlichen Eigenschaften des Katalysators projiziert werden kann. Tetrakis ist sehr sauerstoff-labil, weshalb eine unzureichende Entfernung von Laftsauerstoff in der Reaktionsmischung zur Inaktivierung des Palladiums führen kann. Weiterhin könnten in der verwendeten Tetrakis Fraktion bereits hohe Anteile an oxidierte Spezies vorgelegen haben, wodurch weniger katalyse-aktives Palladium der Reaktion zur Verfügung stand. Die Bildung des Nebenproduktes Triphenylphosphinoxid erschwert ebenfalls die Isolierung der Zielverbindungen, weshalb mehrere chromatographische Schritte nötig waren.

Damit gezielt Modifikationen am *ortho*-Phenylring des Pyridins eingeführt werden können bedarf es einer weiteren Synthesestrategie. Hierbei soll zunächst das 3'-Ringsystem mit dem Pyridin verknüpft werden. Gefolgt von der Einführung des modifizierten oberen Aromaten als benzylicher Aldehyd, der sich für eine spätere reduktive Aminierung mit dem östlichen Baustein **23** eignet (vgl. Abb. 3.1-15).



**Abb. 3.1-15: Allgemeine Syntheseroute zur Darstellung der Zielstrukturen mit modifizierten Ringsystem am oberen biarylichen Aromaten.** i) Pd-Kat,  $K_3PO_4$ ; ii) Pd-Kat,  $K_2CO_3$ ; iii) Cyanoborhydrid.

Als Startmaterial dient das dihalogenierte 3-Bromo-2-Chloro-Pyridin **29** welches chemoselektiv in das Biaryl **30a** überführt werden soll. Anschließend dient eine weitere Suzuki-Kreuzkupplung der Einführung des Aromaten samt gewünschter Modifikation (vgl. Abb. 3.1-16).

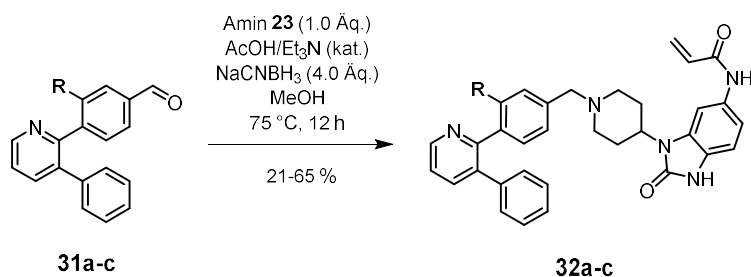


**Abb. 3.1-16: Reaktionsgleichung der chemoselektiven Suzuki-Kreuzkupplungen zu 30a und 31a-c.** Erst wurde eine selektive Substitution an 3-Bromopyridine gefolgt von einer C-C Bindungsknüpfung am verbliebenen *ortho*-Chloropyridin durchgeführt.

Aufgrund der herabgesetzten Temperatur sowie des ausgewählten Katalysatorsystems kann die Reaktion mit 3-Bromo-2-chloropyridin und Phenylboronsäure selektiv hinzu der thermodynamisch begünstigten Substitution des Broms ablaufen. Eine massenspektrometrische Analyse zeigte, dass unter Einsatz von Tetrakis in diesem initialen Schritt ein unselektives Produkt-Gemisch (1:1) der Regioisomere resultierte, wohin entgegen der zweizählige Ligand des Pd(dppf)-Katalysators den Verlauf chemoselektiv steuerte und gute Ausbeuten von bis 78 % lieferte.

Eine weitere C-C Bindungsknüpfung über die Suzuki-Kreuzkupplung unter deutlich energiereicheren Bedingungen verhalf zum Umsatz des Chlorpyridins mit den formylierten Aromaten. Die resultierenden Aldehyde konnten in moderaten Ausbeuten bis zu 71 % dargestellt werden, hierbei erwies sich erneut das Triphenylphosphinoxid als schwierig abzutrennendes Nebenprodukt. Innerhalb dieses Schrittes konnten insgesamt drei Modifikationen an der *meta*-Position des Phenylrings eingeführt werden: ein Fluor (**31a**), ein Methylrest (**31b**) und eine Methoxy-Gruppe (**31c**).

In einem finalen Schritt sollten dann die dargestellten Aldehyde zusammen mit dem Schlüsselintermediat **23** in einer reduktiven Aminierung zu den modifizierten Zielstrukturen umgesetzt werden (vgl. Abb. 3.1-17).



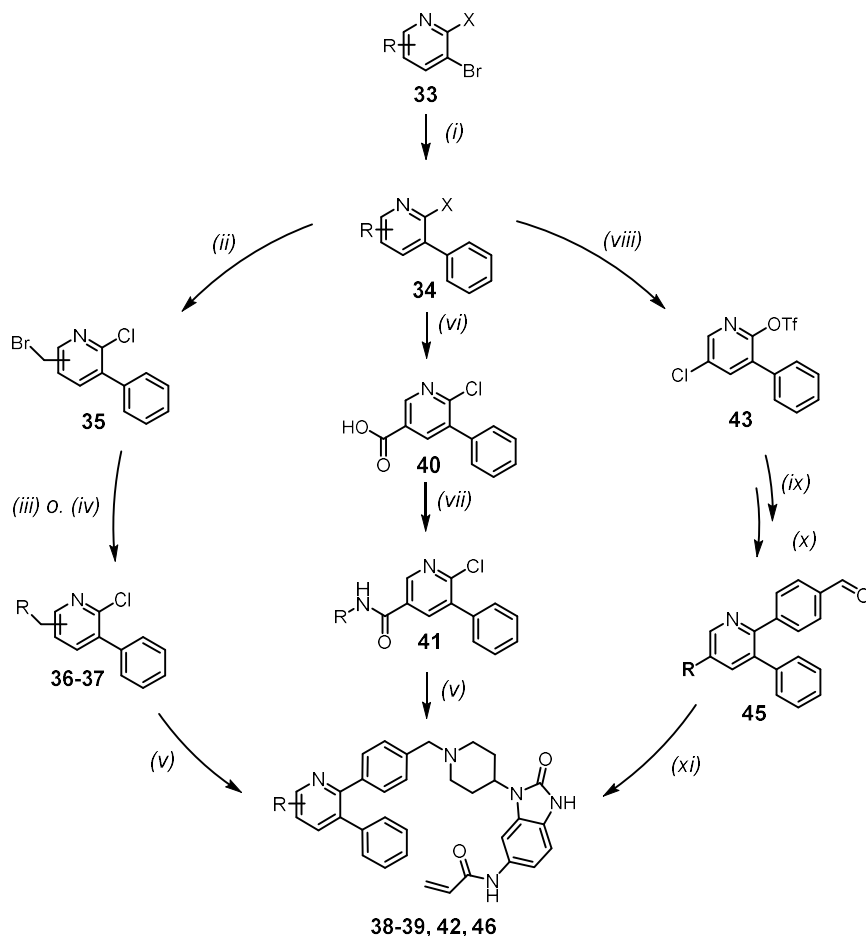
**Abb. 3.1-17: Reaktionsgleichung zur Darstellung der Zielstrukturen 32a-c.** Anhand einer finalen reduktive Aminierung gelang die Darstellung der geplanten Derivate.

Innerhalb der reduktiven Aminierung findet bei leicht sauren Bedingungen und unter Kondensation die Bildung des Iminium-Ions statt. Die Zugabe des milderen Reduzierungsmittels  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  bewirkt den chemoselektiven Hydrid Transfer auf das Iminium-Ion zum korrespondierenden tertiären Amin. Somit konnten aus dieser Reaktion drei Zielstrukturen erhalten und in geringen Ausbeuten isoliert werden. Vor allem bei der Darstellung von **32a** und **32b** wurde der korrespondierende Alkohol des westlichen Molekülteils mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert. Diese Umstände deuten auf eine unzureichende Bildung des Iminium-Ions hin und können zukünftig weiter optimiert werden. Die Änderungen des Solvat-Systems hinzu aprotischen Lösemitteln sowie der Einsatz eines Molekularsiebs zur Komplexierung von Wasser stellen geeignete Lösungsansätze dar.<sup>181</sup>

Aus diesem Unterkapitel und damit dem ersten Ansatz, der Modifizierung des triarylischen Systems, entstanden insgesamt zehn Zielverbindungen, welche es hinsichtlich ihrer Eigenschaften bezüglich der Bindung der Akt Isoformen im späteren Verlauf zu untersuchen gilt (vgl. Kapitel 3.2.1).

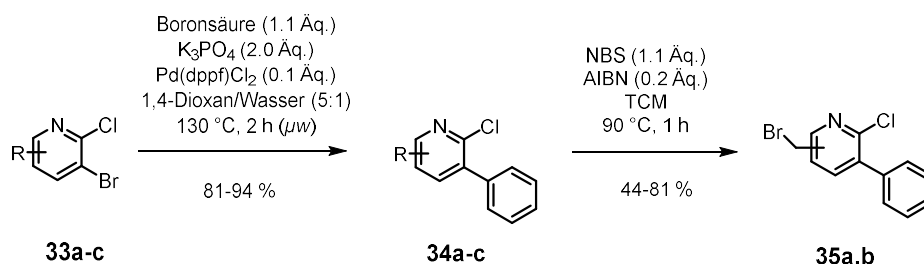
### 3.1.3.3. Derivatisierung des Pyridin-Grundgerüsts

Die hauptsächliche Derivatisierung und einhergehende Diversität des geplanten Ligandensets sollte vor allem durch Einführung unterschiedlichster Reste an der 5'-Position des 2,3-Diphenylpyridin Grundgerüsts erfolgen, um dort gezielt eine mögliche Varianz der Struktur-Aktivitätsbeziehung zu untersuchen. Hierfür sollen die diversen Reste ebenfalls durch die Art der Verknüpfung zum Grundgerüst selbst weitere Aufschlüsse über den Einfluss der Flexibilität sowie beispielsweise der Orientierung geben. Demzufolge sollen drei synthetische Strategien verfolgt werden, um die Reste über einen Methylen- sowie Amidlinker oder durch die direkte Verknüpfung am triarylischen System einzuführen. Als Startmaterial dienen eine Vielzahl an substituierten Dihalogenpyridinen, an welchen zunächst der untere Phenylring aufgebaut werden soll. Ausgehend von dem biarylischen Schlüsselintermediat sollen dann linker-spezifisch die Derivatisierung stattfinden, um letztlich im weiteren Verlauf der Route den östlichen Molekülteil einzuführen und die gewünschten Zielverbindungen darzustellen (vgl. Abb. 3.1-18).



**Abb. 3.1-18. Allgemeine Syntheseroute zur Darstellung unterschiedlich verlinkter Zielstrukturen über drei Syntheserouten.** i) Pd-Kat,  $K_3PO_4$ ; A: ii) NBS, AIBN, iii)  $K_2CO_3$ , iv) Pd-Kat,  $K_3PO_4$ , v) Pd-Kat,  $K_2CO_3$ ; B: vi) NaOH, vii) HATU, DIPEA; C: viii)  $Et_3N$ , Triflatanhydrid; ix), x) Pd-Kat,  $K_2CO_3$ ; xi) Cyanoborhydrid.

Zuerst sollten Zielstrukturen aufgebaut werden, in welchen die Substitutionsmuster über ein Methylene-linker an das Pyridin gebunden sind. Als Ausgangsstoffe dienen die dihalogenierten Pyridine, an welche im Verlauf der Syntheseroute durch Bromierung eine Abgangsgruppe zur weiteren Modifizierung eingeführt werden kann (vgl. Abb. 3.1-19).

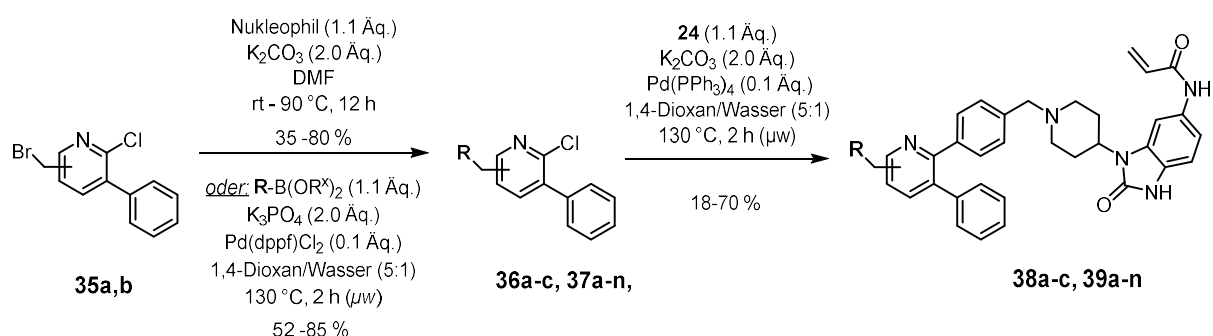


**Abb. 3.1-19. Reaktionsgleichung der Darstellung von Intermediat 34a-c sowie 35a,b.** Eine chemoselektive Suzuki-Kupplung an 3-Bromopyridin sowie der nachfolgenden Wohl-Ziegler-Bromierung lieferte das Schlüsselintermediat **35a,b** für weitere Derivatisierung.

Die C-C-Bindungsknüpfung findet durch Einsatz des Ferrocen-Palladium-Katalysators chemoselektiv am Bromid des Aromaten statt und lieferte das biaryliche System in sehr gute Ausbeuten.

Damit die Methyl-tragenden Pyridine weiter funktionalisiert werden können, erfolgte eine radikalische Wohl-Ziegler Bromierung mit N-Bromosuccinimid (NBS), welches als Bromquelle fungierte und dem Radikalstarter AIBN als Reaktionsinitiator.<sup>196</sup> Die thermische Zersetzung des Radikalstarters durch homolytische Bindungsspaltung und Erzeugung zweier Radikale induzierte die Kettenreaktion. Aufgrund der begünstigten Polarisierung des NBS verhalf die Kettenreaktion zur Produktbildung.<sup>197</sup> Generell schwankten die Ausbeuten dieser Reaktion stark, so führte der Einsatz anderer Radikalstarter wie die Klasse der Peroxide zu keiner Reaktionsoptimierung. Als Nebenprodukte wurde das doppelt benzylich-bromierte Pyridin identifiziert. In vielen Fällen kam es nicht zur vollständigen Produktbildung, weshalb das Edukt reisoliert und erneut eingesetzt werden konnte. Aufgrund eines ähnlichen Laufverhaltens und vergleichbaren Löslichkeitseigenschaften erwies sich die Trennung von Produkt und Edukt als sehr herausfordernd, weshalb meist nur kleinere Reaktionsansätze höhere Umsätze lieferten.

Die eingeführte Abgangsgruppe sollte anschließend in einer Substitutionsreaktion mit diversen Resten modifiziert werden und letztlich über das verbliebene *ortho*-Chlorid des Aromaten mit der Boronsäure des östlichen Molekülteils **24** zur entsprechenden Zielstruktur überführt werden (vgl. Abb.3.1-20).



**Abb. 3.1-20. Reaktionsgleichung der Darstellung von den Pyridinen 36-37 und der Zielstrukturen 38-39.** Die Substitution der Brompyridinde erfolgt mittels C-C Bindungsknüpfung oder  $\text{S}_{\text{N}}2$  Reaktion und einer nachfolgenden Suzuki-Kupplung zum Erhalt der finalen Moleküle.

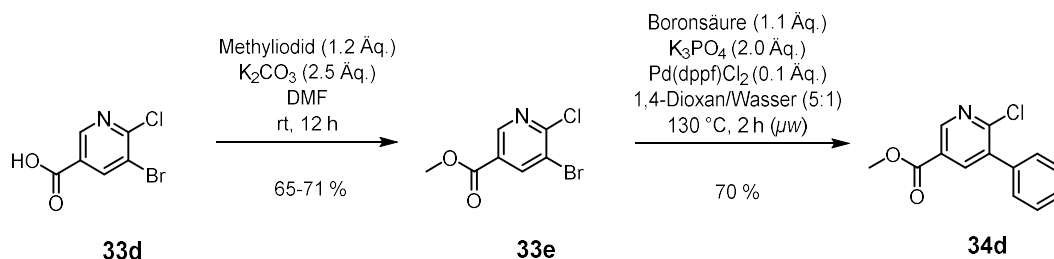
Die Einführung verschiedener Reste an die Bromopyridine über eine nukleophile Substitution unter Anwesenheit der anorganischen Base  $\text{K}_2\text{CO}_3$  lieferte sechs Intermediate, welche alle in moderaten bis guten Ausbeuten (35-80 %) isoliert werden konnten. Eine weitere Optimierung dieses Schrittes in Bezug auf die Edukt Eigenschaften, wie beispielsweise Polarität des Lösemittels oder Stärke der eingesetzten Base hätten im Falle von sekundären Aminen wie dem Morpholin (**37b**, 35 %) möglicherweise zu einer höheren Ausbeute geführt.

Die Umsetzung der bromierten Pyridine (**35a,b**) erfolgte unter Verwendung von elf verschiedenen Boronsäuren mittels Suzuki-Kupplung und verhalf zur Darstellung einer diversen Serie an Bausteinen. Vor allem schienen die Ausbeuten mit der Komplexität und Polarität der eingesetzten Organoboronsäuren zu schwanken, sodass insbesondere das *meta*-Anilin **37i** (52 %) und das Aminopyridin **37g** (55 %) einen geringeren Umsatz aufzeigten im Vergleich zur analogen aromatischen Pyridin Verbindung **37k**

(80 %). Eine Hydrolyse des Organoboronesters konnte in wenigen Fällen über massenspektrometrische Analyse beobachtet werden, welches möglicherweise eine hindernde Wirkung auf die Umsetzung dieser Spezies haben kann.<sup>198</sup>

In einer finalen Suzuki-Kupplung mit dem Boronsäure Baustein des östlichen Molekülteils **24** konnten 21 Zielstrukturen mit unterschiedlichen Methylen-verlinkten Resten erhalten werden. Ebenfalls führte die erhöhte Komplexität und Größe der Molekülstrukturen zu Einbußen in der Ausbeute. Oftmals waren mehrere orthogonale chromatographische Schritte nötig, um die Produkte in gewünschter Reinheit zu isolieren. Besonders herausfordernd war die Isolierung der Benzoesäure **39g** (30 %), sowie die anilinschen Derivate **39k** (21 %) und **39n** (28 %). Möglicherweise hätten Schutzgruppen zur Maskierung der polaren Eigenschaften die Ausbeuten erhöhen können. Die Qualität des eingesetzten Tetrakis Palladium Katalysators trug ebenfalls zum Erfolg der Reaktion bei, oxidierte Spezies des Übergangsmetalls entziehen sich dem Katalyse Zyklus. In einigen Reaktionen verblieb das eingesetzte Chlorpyridin in der Reaktionslösung und konnte reisoliert werden.

Eine weitere Verknüpfung der unterschiedlichen Reste sollte über eine Amidbindung erfolgen, weshalb hier als Startmaterial die dihalogenierte Nikotinsäure **33d** gewählt wurde. Damit das Derivat dieser Säure in einer Suzuki-Reaktion eingesetzt werden kann, bedarf es vorher einer Veresterung, hier wurde die Carboxylgruppe mit Iodmethan methyliert, um daraufhin den Phenylsubstituenten, chemoselektiv an 3'-Position einzuführen (vgl. Abb. 3.1-21).

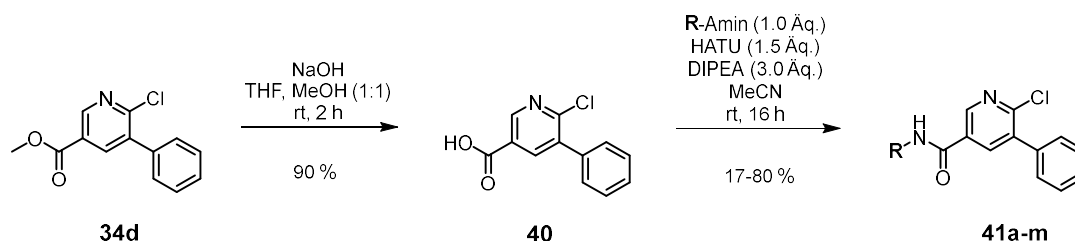


**Abb. 3.1-21. Reaktionsgleichung zur Darstellung der Nikotins\u00e4ureester **33f** und **34d**.** Zun\u00e4chst die Carboxymethylierung mit Iodmethan sowie einer nachstehenden C-C Bindungskn\u00fcpfung zum biarylischen System.

Unter Einsatz des Methylierungsgenozes Methyljodid und Anwesenheit der anorganischen Base konnte das elektronenreiche Carboxyl selektiv in den entsprechenden Ester \u00fcberf\u00fchrt werden. Durch Maskierung der S\u00e4urefunktion und einhergehendem Polarit\u00e4tsverlust wurden die Reinigungsschritte deutlich erleichtert, weshalb die Reaktion gute Ausbeuten von bis zu 71 % lieferte.

Anschließend konnte der Ester in einer C-C Bindungskn\u00fcpfung mit Phenylborons\u00e4ure chemoselektiv am 3'-Bromid modifiziert werden, um das biarylische System **34d** darzustellen. Es konnten mittels massenspektrometrischer Analyse geringe Mengen an entsch\u00fctzter Nikotins\u00e4ure identifiziert werden, welche durch Verseifung aufgrund der anwesenden Base und Wasser als L\u00f6semittel entstanden sein kann und sich damit der Reaktion entzieht.

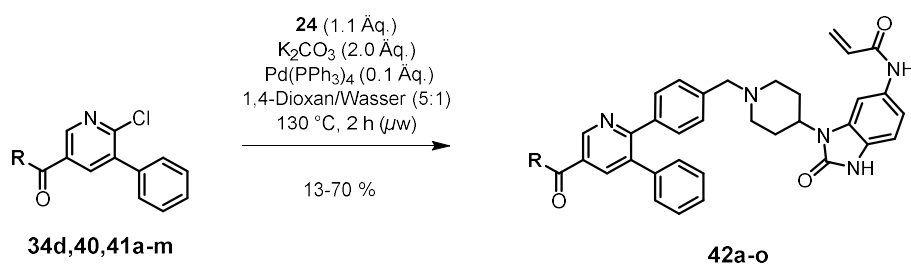
Darauffolgend sollte die zuvor maskierte Säure wieder freigesetzt werden und in einer nachstehenden Amidkupplung die entsprechend derivatisierten Intermediate liefern (vgl. Abb. 3.1-22).



**Abb. 3.1-22. Reaktionsgleichung zur Darstellung des Intermediates 40 sowie der Amide 41a-l.** Eine basische Verseifung gefolgt von der Amidkupplung mit verschiedenen Aminen liefern Derivate der nikotinischen Säure.

Der maskierte Carboxylester wurde unter Anwesenheit von Natriumhydroxid in die korrespondierende Säure überführt. Es konnte eine vollständige Umsetzung des Methylesters beobachtet werden. Präzipitation des Produktes im Lösemittel erleichterte die Isolierung des Schlüsselintermediats in sehr guten Ausbeuten. An der freigesetzten Säure-Funktion konnten mittels Uroniumsalz-vermittelter Aktivierung verschiedene Amine zum entsprechenden Amid umgesetzt werden. Dabei dient das Kupplungsreagenz HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) als stöchiometrischer Reaktionspartner für die zu modifizierende Carboxylgruppe, welches unter Freisetzung von Tetramethylharnstoff acyliert vorliegt und dadurch den Angriff von nukleophilen Aminen an den Carbonylkohlenstoff der ursprünglichen Säure erleichtert.<sup>199,200</sup> Letztlich erfolgt die Abspaltung des Triazolpyridin Alkohols als Nebenprodukt sowie des gewünschten Amids. Innerhalb dieser Reaktion konnten 13 Amine mit diversen Resten zu den gewünschten amidischen Intermediaten verknüpft werden, meist mit einem guten Umsatz. Aufgrund der Polarität der verschiedenen Startmaterialien und der Nebenprodukte durch den äquimolaren Verbrauch von HATU beinhaltete die chromatographische Reinigung und Isolierung der Produkte in einigen Fällen mehrere Schritte, wie beispielsweise im Fall der Reaktion von 3-Nitroanilin zu Amid **41m** (41 %). Die Umsetzung einiger Edukte, wie das *N*-Allylamin **41i** (27 %) oder das Pyrrolidin **41g** (19 %) erfolgte nicht vollständig, hier hätte möglicherweise der Einsatz anderer Kupplungsreagenzien oder Basen zu einer effizienteren Produktbildung geführt.

Letztlich sollten diese Amid-verknüpften Pyridine in einer Kupplungsreaktions mit dem östlichen Baustein zu der jeweiligen Zielstruktur umgesetzt werden (vgl. Abb. 3.1-23).

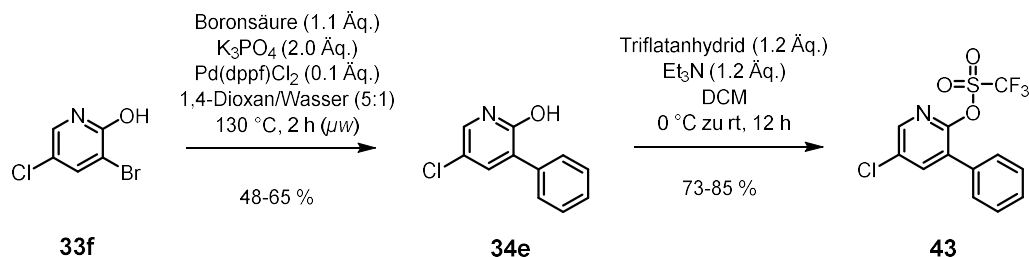


**Abb. 3.1-23. Reaktionsgleichung zur Darstellung der finalen Zielverbindungen 42a-o.** In der Suzuki-Kreuzkupplung mit Schlüsselintermediat **24** konnten die geplanten carbonyl-verlinkten Zielstrukturen erhalten werden.



Der letzte Schritt dieser Syntheseroute zum Aufbau der derivatisierten Substanzbibliothek ist wie zuvor die C-C Bindungsknüpfung des Boronsäure Schlüsselintermediates **24** mit den carbonyl-verlinkten 2-Chlorpyridinen. Komplexität und Basizität der strukturell anspruchsvollen Verbindungen hatten wie zuvor Einfluss auf die Qualität der chromatographischen Reinigung und spiegeln sich in den geringen Ausbeuten wieder. Darunter das Hydroxycyclohexyl Derivat **42k** (13 %), welches aufgrund seiner Polarität schwer zu isolieren war. Hingegen konnten die Zielverbindungen mit aromatischen Substituenten wie das Aminopyridin **42n** (60 %) in guten Mengen erhalten werden. Insgesamt lieferte dieser Schritt 15 amidisch-verknüpfte finale Moleküle für die Substanzbibliothek.

Die letzte Synthesestrategie zur Verknüpfung diverser Reste an das 2,3-Diphenylpyridin-Grundgerüst sollte ohne Linker und anhand der direkten Modifikation zum dreifach substituierten Pyridin erfolgen. Dafür soll ein Pyridinol als Startmaterial dienen, an welches zuerst der Phenylsubstituent eingebracht werden kann, um infolgedessen die Hydroxylgruppe in eine Abgangsgruppe zu überführen (vgl. Abb. 3.1-24).



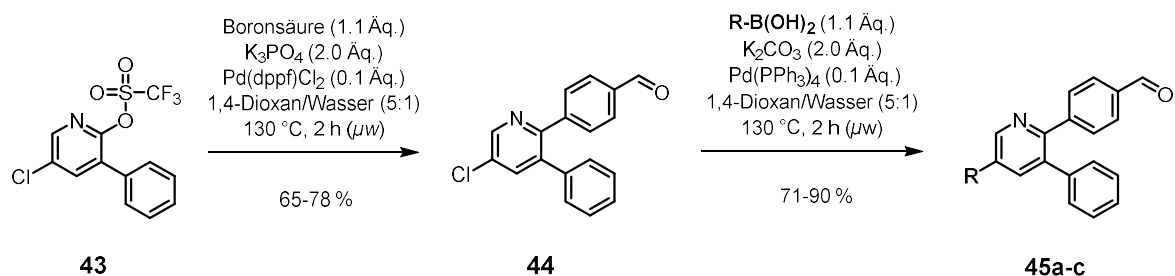
**Abb. 3.1-24. Reaktionsgleichung zur Darstellung der Intermediate 34e und 43.** Nach der C-C-Bindungsknüpfung von Pyridin und Phenyl folgt die Substitution an Hydroxyl-Gruppe mit Triflatanhydrid.

Die Einführung des Phenylringes am 3'-Bromid des Pyridinols **34e** erfolgte selektiv mit Verwendung des Ferrocen-Palladium Katalysators sowie höheren Temperaturen im Mikrowellenreaktor und ohne nachweisliche Bildung des Regioisomers. Hingegen wirkte sich die Anwesenheit des *ortho*-Hydroxyls negativ auf den Umsatz aus und vielfach wurde kein vollständiger Umsatz des Eduktes massenspektrometrisch beobachtet. Aufgrunddessen konnte unmodifiziertes Pyridinol reisoliert werden, welches jedoch eine ähnliche Polarität zum gewünschten Produkt aufwies und die Trennung der beiden Spezies erschwerte. Bei kleineren Ansätzen der Reaktion gelang eine deutlich effizientere Separierung ebendieser ohne massive Mischfraktionen von Edukt und Produkt zu erhalten.

Damit das Pyridin an 2'-Position ebenfalls an einer weiteren C-C-Bindungsknüpfung teilnehmen kann wurde das Hydroxyl mit Trifaltanhydrid unter Anwesenheit von Triethylamin zum Triflat umgesetzt. Es konnte ein guter Umsatz verzeichnet werden und aufgrund der maskierten polaren Gruppe gelang die effiziente Reisolation von zurückgebliebenem Startmaterial.

Die im vorherigen Schritt eingeführte Abgangsgruppe soll daraufhin selektiv in einer Suzuki-Kreuzkupplung mit dem formylierten Phenyl umgesetzt werden, um anschließend das 5'-Chlor des Pyridins

mit einer weiteren C-C Bindungsknüpfung unter Verwendung von diversen Arylboronsäuren zu substituieren (vgl. Abb. 3.1-25).

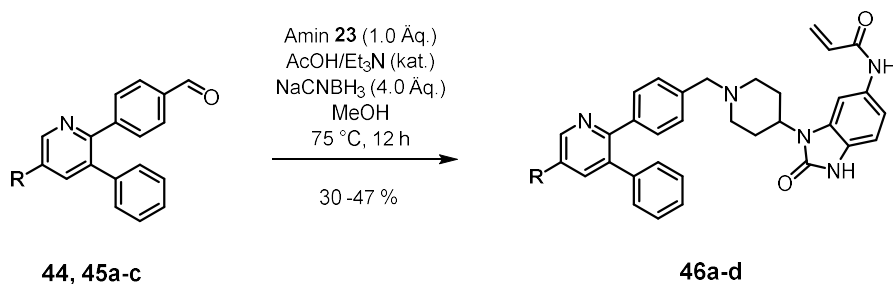


**Abb. 3.1-25. Reaktionsgleichung zur Darstellung von Schlüsselintermediat 44 und den Derivaten 45a-c.** Einer Suzuki-Kreuzkupplung am Triflat zum Aldehyd folgt eine zweite C-C-Bindungsknüpfung um das trisubstituierte Pyridin zu erhalten.

Die Suzuki-Reaktion mit dem, zur Abgangsgruppe modifizierten Pyridin Sulfonat verlief chemoselektiv und erzeugte den Aldehyd **44** in guten Ausbeuten. Es konnte durch massenspektrometrische Analyse keine Substitution des 5'-Chlorids verzeichnet werden, lediglich geringe Mengen des hydrolysierten Pyridinols wurden detektiert.

Das Diphenylpyridin konnte im Anschluss mit einer weiteren Suzuki-Reaktion und unter Einsatz des Tetrakis Palladium Katalysators an der 5'-Position mit verschiedenen aromatischen Ringsystemen derivatisiert werden. Trotz sehr energiereicher Bedingungen verlief die Umsetzung nicht vollständig und unmodifiziertes Chlorpyridin blieb zurück. Das Dipyridin **45a** konnte in sehr guten Mengen (90 %) erhalten werden und insgesamt lieferte die Reaktion zwei weitere Intermediate, darunter das Methylpyrazol **45b** (71 %) und das Methylfuranyl **45c** (75 %). Aus zeitlichen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Reihe der trisubstituierten Pyridine nicht größer gefasst als die beschriebenen drei Ringsysteme. Letztlich wären eine Vielzahl weiterer interessanter Modifizierungen an dieser Position denkbar und Derivate mit direkter Verknüpfung an das Pyridin würden die Substanzbibliothek sinnvoll erweitern.

Für den finalen Schritt und zur Verbindung des derivatisierten westlichen triarylischen Pyridins mit dem östlichen Benzimidazol sollte eine reduktive Aminierung dienen (vgl. Abb. 3.1-26).



**Abb. 3.1-26. Reaktionsgleichung zur Darstellung der finalen Zielstrukturen 46a-d.** Eine reduktive Aminierung der Aldehyde mit dem Schlüsselintermediat **23** liefert die geplanten Derivate.

Die Verknüpfung der beiden Molekülteile über einen methylen Linker gelang in allen Fällen selektiv durch Anwesenheit des Reduktionsagenses Cyanoborhydrid und mit moderaten Ausbeuten. Die parentale Verbindung mit dem Chlorid an 5'-Position **46a** konnte nur in geringen Mengen (30 %) aufgrund eines sehr komplexen Reaktionsgemisches isoliert werden. Versuche das Chloratom am bereits verknüpften Zielmolekül **46a** mittels C-C Bindungsknüpfung zu modifizieren schlugen fehl. Hier mag die Komplexität der Struktur soweit fortgeschritten sein, dass ein anderes Katalysatorsystem benötigt wird, um die gezielte Substitution am 5'-Chlorpyridin zu ermöglichen. Der Austausch der Fluchtgruppe an dieser Position vermag diesem Ansatz zum Erfolg verhelfen. Weiterhin zeigt sich an diesem 5'-Chlorpyridin die Limitationen der Suzuki-Reaktion, welche für Chloraryle aufgrund der gehinderten oxidativen Addition eher unvorteilhaft ist.<sup>192</sup> Ein positiver Verlauf der Substitution kann vielmehr durch Nachbargruppeneffekte und elektronenarmen Aromaten, wie beispielsweise Pyridine, hin zur Produktbildung beeinflusst werden.

Anhand der hier verwendeten Synthesestrategien konnten insgesamt 40 niedermolekulare Verbindungen dargestellt werden, welche ausgehend von einem detaillierten Design-Ansatz geplant wurden. Hauptsächliches Werkzeug zur Generierung der Inhibitoren stellte die Suzuki-Kreuzkupplung dar, welche eine hohe strukturelle Vielfalt und Komplexität der gewählten Bausteine toleriert und in einer sehr effizienten und Ressourcen sparender Weise den Erhalt der Verbindungen ermöglichte. Die dargestellte Substanzbibliothek umfasst diverse Substituenten an 5'-Position des Pyridin Grundgerüsts, die sich nicht nur in ihrer chemischen Beschaffenheit wie Größe, Polarität oder ähnlichem unterscheiden, sondern ebenfalls mit verschiedenen Linkern an das triaryliche Grundgerüst geknüpft wurden. Um Rückschlüsse auf den genauen Einfluss der Substituenten, kleinen Modifikation und der Linker Variation in Bezug auf die Aktivität der adressierten allosterischen Akt Isoform Bindetaschen treffen zu können müssen die Verbindung in robusten biochemischen Testsystem untersucht werden. Eine Anpassung oder weitere Optimierung der Syntheserouten bzw. der Einführung veränderter Substituenten kann erst nach Erhalt dieser Daten getroffen werden und in eine mögliche neue Runde des Designs einfließen.

## 3.2. Charakterisierung der Substanzbibliothek

Eine erste Analyse und Evaluation, der in dieser Arbeit generierten, fokussierten Substanzbibliothek sollten anhand von biochemischen Experimenten erfolgen. Generell soll die Charakterisierung die Eigenschaften des kovalenten Inhibitionsmechanismus weiter beleuchten, die kinetischen Bindungsparameter entschlüsseln, die irreversible Modifikation validieren und strukturelle Informationen bezüglich der Bindemodi innerhalb der Kinase liefern. Ergebnisse dieser Studien tragen dazu bei, die Struktur-Aktivitätsbeziehung der Liganden tiefergehend zu beleuchten sowie mögliche Selektivitätsprofile für die jeweiligen Akt Isoform zu identifizieren. Weiterhin können die Erkenntnisse dieses Kapitels dazu dienen, während des Moleküldesigns berücksichtigten Annahmen und beispielsweise den Einsatz des verwendeten Homologiemodells zu evaluieren. Letztlich kann anhand dieser Ergebnisse ein Set an Inhibitoren mit vorteilhaften Eigenschaften identifiziert und für weiterführende Studien ausgewählt werden.

### 3.2.1. Studien zu inhibitorischen Eigenschaften

Ein großer Vorteil bei der Adressierung von Kinasen wie den Akt Isoformen ist der mögliche Einsatz einer Vielzahl an Testsystemen, ohne das die Nutzung direkter Bindungsassays nötig ist, um entsprechende Bindungspartner hinsichtlich ihrer Eigenschaften in Bezug auf die Aktivität der Proteine zu untersuchen. Aktivitätsbasierte Systeme sind optimal geeignet für einen hohen Durchsatz an niedermolekularen Verbindungen entgegen biophysikalischer Methoden wie FP (Fluoreszenzpolarisation), ITC (isothermale Titrationskalorimetrie), oder SPR (Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie), welche sich besser als orthogonale Analysen eignen, um mögliche initiale Erkenntnisse zu validieren.<sup>201-204</sup>

Damit aus der dargestellten Substanzbibliothek Rückschlüsse hinsichtlich der Struktur-Aktivitätsbeziehung der Moleküle zu der jeweilig adressierten Zielstruktur gezogen werden können, müssen diese zunächst in einem biochemischen Assay auf ihre inhibitorischen Eigenschaften untersucht werden. Ein geeigneter indirekter Bindungsassay für diese Fragestellung stellt das KinEASE™ HTRF® System (*cis-bio*) dar, welches ermöglicht anhand von Fluoreszenz die Übertragung einer Phosphatgruppe auf ein artifizielles Substratpeptid durch die Kinase zu analysieren.<sup>205</sup> Im Falle der Akt Isoformen wurde dieses System bereits in einigen Vorarbeiten erfolgreich eingesetzt.<sup>152,154</sup> An das Biotin-markierte Substratpeptid kann nach Abschluss der Reaktion ein Donorfluorophor-markierter anti-Phospho Antikörper binden, welcher dann mittels Förster-Resonanztransfer (FRET) eine entsprechende Anregungsenergie auf ein Akzeptorfluorophor markiertes Streptavidin überträgt und dessen Signal zur Quantifizierung der Phosphorylierung dient.<sup>206</sup> Anhand der Zugabe einer Inhibitor-Verdünnungsreihe ist es möglich die jeweilige halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) der niedermolekularen Verbindungen in Bezug auf die adressierte Kinase zu bestimmen.

Es wurden kommerziell erhältliche Akt Isoformen zur Durchführung des Assays verwendet, die zuvor durch Inkubation mit PDK1 eine Phosphorylierung der Threonin-Seitenketten in der jeweiligen Aktivierungsschleife erfuhren, wodurch die Enzyme aktiviert werden. Bei den Konstrukten von Akt1<sup>WT</sup> und Akt3<sup>WT</sup> handelt es sich um N-terminal, GST-modifizierte Proteine mit einem deutlich höheren Molekulargewicht (83 kDa) als des physiologischen Enzyms. Das verwendete Akt2<sup>WT</sup>-Konstrukt hingegen ist mit einer poly-Histidin Sequenz versehen und weist ein fast physiologisches Molekulargewicht von 54 kDa auf. Das in Vorarbeiten benutzte Akt2<sup>WT</sup>-Konstrukt für dieses Assaysystem enthält, wie Akt3 und Akt1, eine weitere GST-Domäne, welche ursprünglich zur Reinigung und Isolierung der Proteine aus den jeweiligen Expressionssystemen genutzt wurde. Damit vergleichbare und robuste Daten mit dem Assaysystem erzeugt werden können, müssen dafür zunächst einige Etablierungsschritte gemäß Herstellerangaben durchlaufen werden. Darunter galt es in einer Kinasetitration die optimale Enzymkonzentration zu bestimmen, welche für die weiteren Reaktionen auf 80 % des maximalen Signals eingestellt werden soll. Anschließend wurde in kinetischen Experimenten die optimale Reaktionsdauer bestimmt, in welcher die lineare Korrelation zwischen Signal und Inkubationszeit abgebildet wird. Die Aktivität des Enzyms ist maßgeblich abhängig von der Substratpeptid- und ATP-Konzentration, weshalb im nächsten Schritt die Michaelis-Menten Konstanten für die beiden Substrate unabhängig voneinander bestimmt wurden. Die Konzentration, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit der Kinase halbmaximal ist, bilden den jeweiligen  $K_M$  ab und wurden in den finalen Reaktionsvolumen als konstante Parameter eingesetzt. Obwohl die hier untersuchten Verbindungen keine direkten ATP-kompetitiven Inhibitoren darstellen, wurde aus Vergleichbarkeit bei dem entsprechendem ATP- $K_M$  vermessen, da bekannt ist, dass die Aktivität der orthosterischen Liganden von der eingesetzten Menge an Cosubstrat abhängig ist.<sup>207</sup> Die somit identifizierten Assay-Bedingungen (vgl. Kapitel 5.1.2) wurden mit Literatur-bekanntem Referenzverbindungen getestet, welches eine erste Einschätzung der Qualität des Systems erlaubt (vgl. Tab. 3.2-1).

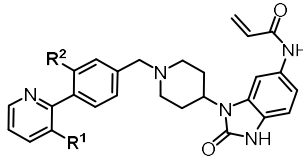










**Tabelle 3.2-1: Inhibitorische Aktivität bekannter Akt Inhibitoren.** Die  $IC_{50}$ -Werte der literatur-bekanntem Moleküle wurden mit dem zuvor etablierten HTRF Assay bestimmt. Ergebnisse sind als Mittelwert mit  $n = 3$  angegeben, sowie die dazugehörigen Fehler als ( $\pm$ ) Standardabweichung.

Inhibitor	#	HTRF $IC_{50}$ [nM]			
		Akt1 <sup>WT</sup>	Akt2 <sup>WT</sup>		Akt3 <sup>WT</sup>
			GST-tag	His6-tag	
Capivasertib	6	2 ± 0.3	5 ± 0.4	4 ± 1	8 ± 1
Ipatasertib	7	4 ± 1	36 ± 5	23 ± 5	17 ± 4
MK-2206	12	21 ± 6	157 ± 45	54 ± 18	720 ± 121
Miransertib	11	1 ± 0.2	24 ± 7	9 ± 1	505 ± 120
Borussertib	13	1 ± 0.4	56 ± 1	14 ± 1	431 ± 31

Die verschiedenen Klassen der Akt Inhibitoren weisen im Vergleich zueinander deutliche Unterschiede in den  $IC_{50}$ -Werten für die jeweilige Isoform auf. Besonders die orthosterischen und ATP-kompetitiven Verbindungen Capivasertib (**6**) und Ipatasertib (**7**) erzielen ähnlich unselektive, jedoch potente nanomolare Werte auf allen drei Isoformen, wobei für **6** ein geringer Aktivitätsverlust auf Akt2 und Akt3 verzeichnet werden konnte. Weiterhin scheint das verwendete Akt2 Konstrukt keinen signifikanten Einfluss auf die resultierenden  $IC_{50}$ -Werte der ATP-Bindetaschen adressierenden Moleküle zu haben. Der Vergleich zu den publizierten Daten, welche mit einem ähnlichen System evaluiert wurden, liefert eine gute Übereinstimmung für diese beiden Inhibitoren.<sup>148</sup> Im Kontrast dazu, zeigen die allosterischen Inhibitoren MK-2206 (**12**) und Miransertib (**11**) ein deutlich anderes Inhibitionsprofil auf den Akt Isoformen, dessen Aktivität auf Akt2 und Akt3 gegenüber Akt1 deutlich abnimmt. Dieser Trend kann ebenfalls für den kovalent-allosterischen Inhibitor Borussertib abgebildet werden.<sup>147,152,208</sup> Der direkte Vergleich des neu etablierten His6-Akt2<sup>WT</sup>-Konstruktes mit der entsprechenden Akt2 GST-tag Variante weist auf einen drei- bis vierfachen Aktivitätsgewinn der allosterischen Inhibitoren hin, welches auf die strukturelle Beschaffenheit der Enzyme zurückzuführen sein könnte. Da es sich bei den allosterischen Inhibitoren um Moleküle handelt, welche eine Interdomänen Bindetasche adressieren, könnte der GST-Tag, der die Größe einer weiteren Domäne besitzt, das konformationelle Gleichgewicht dahingehend beeinflussen, dass die Formation der geschlossenen PH-*in* Variante weniger begünstigt ist und damit große Auswirkungen auf die Bindung von Enzym und Inhibitor hat. Ebenfalls hat das Molekulargewicht einen Einfluss auf die Dynamik und Diffusion von Molekülen in Lösung, weshalb das kleinere His-Tag Konstrukt möglicherweise eine höhere Beweglichkeit besitzt. Letztendlich könnten auch weitere Parameter verantwortlich für die Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Konstrukten sein, beispielweise kann die verwendete Protein-Charge der Hersteller eine unterschiedliche Aktivität besitzen. Würde eine größere Menge an unaktiviertem Enzym in der Charge enthalten sein, kann diese Fraktion nicht an der Reaktion teilnehmen, ermöglicht jedoch das Inhibitor dort bindet und kann somit das tatsächliche Verhältnis von eingesetzter Inhibitorkonzentration und Protein-Aktivität stark beeinflussen. Die Bestimmung des aktiven Anteils einer Enzym-Lösung könnte zukünftig mittels *active-site titration* ermittelt werden.<sup>209,210</sup> Weiterhin würde der analoge Vergleich der Akt1 und Akt3 Konstrukte zu den entsprechenden His-Tag modifizierten Versionen im HTRF-Assay weiteren Aufschluss über den beobachteten Trend für die allosterischen Inhibitoren liefern.

Anschließend an die Etablierung und qualitative Evaluierung des Assaysystems sollten die Moleküle der fokussierten Substanzbibliothek auf den drei Akt Isoformen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität analysiert werden. Zur Untersuchung der Rolle sowie des genauen Einflusses der beiden aromatischen und elektronenreichen Phenylsubstituenten des Pyridin Grundgerüsts sollten diese Aryle leicht modifiziert werden (vgl. Kapitel 3.1.3.2). Anhand der etablierten Synthesestrategie konnten für diese Fragestellung insgesamt 10 Verbindungen generiert werden, welche im Folgenden mittels HTRF evaluiert wurden (vgl. Tab. 3.2-2).

**Tabelle 3.2-2: Inhibitorische Aktivität der CAAs mit modifizierten biarylischen Ringsystemen.** Die IC<sub>50</sub>-Werte der ausgewählten Liganden wurden mit dem zuvor etablierten HTRF Assay bestimmt. Ergebnisse sind als Mittelwert mit  $n = 3$  angegeben, sowie die dazugehörigen Fehler als ( $\pm$ ) Standardabweichung.

				IC <sub>50</sub> [nM]		
#	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Akt1 <sup>WT</sup>	Akt2 <sup>WT</sup>	Akt3 <sup>WT</sup>	
<b>28a</b>	RL2661		H	66 ± 11	599 ± 63	6627 ± 1128
<b>28b</b>	RL2665		H	1586 ± 356	10443 ± 956	> 20000
<b>28c</b>	RL2667		H	5686 ± 945	> 20000	> 20000
<b>28d</b>	RL2813		H	533 ± 81	3182 ± 431	> 20000
<b>28e</b>	RL2834		H	5815 ± 800	4417 ± 419*	7741 ± 1869*
<b>28f</b>	RL2835		H	> 20000	> 20000	> 20000
<b>28g</b>	RL3311		H	3316 ± 663	11588 ± 2278	> 20000
<b>32a</b>	RL2954		F	691 ± 163	5143 ± 507	> 20000
<b>32b</b>	RL2945		H <sub>3</sub> C	1244 ± 215	11701 ± 2430	> 20000
<b>32c</b>	RL2961		Me	15437 ± 1322	> 20000	> 20000

\*Zweifach-Messung

Das unmodifizierte Pyridin-Grundgerüst **28a** zeigt eine fallende Aktivität von Akt1 zu Akt2 und Akt3, jeweils um den Faktor 10 (66, 599, 6627 nM) und ist um ein Vielfaches weniger potent als der Inhibitor Borussertib (**13**). Im Vergleich zu dem bityklischen Naphtyridinon-Teil von **13** ist das Pyridin **28a** deutlich kleiner, welches die Ausbildung der  $\pi$ - $\pi$  Stapelwechselwirkung zu Trp80 beeinflussen vermag.

Die Veränderung des unteren Phenylringes, welcher die hydrophobe Tasche des DFG-*out* Motivs okkupieren soll, führt zu einem drastischen Aktivitätsverlust. Bereits die Einführung eines Ringsystems mit anderer elektronischer Beschaffenheit, wie die des 3-Pyridins **28b**, führt zu einem 200-fach höheren IC<sub>50</sub>-Wert auf Akt1 (1.5  $\mu$ M). Dieser Trend lässt sich ebenso auf die weiteren Isoformen Akt2 und Akt3 übertragen. Die Substitution des Phenylrings durch das Miransertib-abgeleitete 2-Aminopyridin **28c** bewirkt keine Verbesserung und liefert mikromolare Aktivitäten auf Akt1 (5.6  $\mu$ M). Ähnliche Ergebnisse erzeugt das 2-Methylphenyl **28g** mit 3  $\mu$ M auf Akt1, welches andeutet, dass keine Reste an 2'-Position dieses Ringsystems toleriert werden. Ein anderes Ergebnis erzielt das 3'-modifizierte Phenol **28d** mit einer Aktivität von 500 nM auf Akt1 und somit einem 10-fachen Aktivitätsverlust im Vergleich zur

parentalen Verbindung **28a**, welches ebenfalls in Akt2 zu beobachten ist. Für Akt3 konnte mit dem 3-Hydroxyaryl **28d** keine Aktivität verzeichnet werden. Andere Ringsysteme, wie das 2-Methylpyrazol **28f** werden von den Akt Isoformen nicht toleriert. Hier vermag die 2'-Modifizierung des Fünfrings sowie die Veränderung der elektrostatischen Oberfläche für die Interaktion in der Bindetasche unvorteilhaft sein. Ein Vergleich, mit einem nicht-methylierten Pyrazol-Derivat, könnte weiter darüber Aufschluss geben. Der teilweise gesättigte Pyranring **28e** hat ebenfalls eine Aktivität im mikromolaren Bereich (4 – 9  $\mu\text{M}$ ), wobei die Einführung des flexiblen Substituenten geringfügig besser toleriert wird als die direkte Modifikation des Ringsystems durch kleine Reste. Möglicherweise verhilft der Sauerstoff im Pyran zur Stabilisierung einer vorteilhaften Konformation des Cyclohexan-Derivates, welches die hydrophoben Interaktionen zu den Seitenketten verstärkt.<sup>211</sup>

Eine ähnlich unzureichende Toleranz gegenüber Modifikationen kann für andere aromatische Ringsystem beobachtet werden. Die *ortho*-Substitution des Phenylrings an 2'-Position des zentralen Pyridins, welcher über einen benzylichen Linker an das Benzimidazolon verknüpft ist, führt in allen Fällen zu einem Aktivitätsverlust auf den drei Akt Isoformen. Die Einführung eines Fluoratoms in **32a** bewirkt einen 10-fach geringeren des  $\text{IC}_{50}$ -Wert im Vergleich zur parentalen Verbindung **28a**, dieser Trend lässt sich analog auf die anderen beiden Isozyme übertragen. Eine Methylierung an der *ortho*-Position (**32b**) führt zu einem 20-fachen Verlust der Aktivität und die Einführung einer Methoxy-Gruppe (**32c**) scheint die Bindung an Akt2 sowie Akt3 komplett zu unterbinden. Möglicherweise werden Substituenten in *ortho*-Position zum Benzyllinker besser toleriert, welches im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

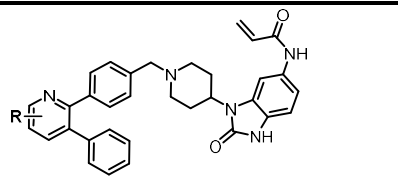














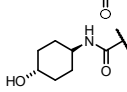





Es konnte somit aus diesem ersten Ansatz keine Optimierung der Aktivität für die drei Isoformen verzeichnet werden. Die Beschaffenheit der beiden arylischen Ringsysteme, welche an das zentrale Pyridin über die 2'- und 3'-Position verknüpft sind, scheinen eine essentielle Funktion in der Bindungsbildung zu den Akt Isoformen zu besitzen. Selbst kleinste Substitutionen, wie die Einführung eines Fluoratoms, führen zu drastischen Aktivitätsverlusten. Alterationen des Phenylrings, welcher die Phenylalanin-Bindetasche des DFG-out Motivs adressiert, bringen kein Aktivitätsgewinn und schränken den Bindungsprozess in die allosterische Interdomänen-Kavität ein. Die Stärke und der Einfluss auf die Stapelwechselwirkung dieser beiden Aryle zu Tyr272 (Akt1) könnte ebenso ausschlaggebend sein für die geringe Akzeptanz anderer Substituenten, welche beispielsweise die Rotation und somit die Ausrichtung zu der aromatischen Seitenkette des Proteins beeinträchtigen. Des Weiteren vermag die Veränderung der chemischen Beschaffenheit, durch elektronenziehende Substituenten oder Heteroatome an bzw. in diesen Arylen die Stärke der  $\pi$ - $\pi$  System-Interaktion drastisch zu beeinflussen bzw. zu schwächen. Möglicherweise könnte für die Bindung in die allosterische Tasche eine gewisse Präorientierung dieser beiden Aromaten zueinander essentiell sein. Die Einführung von axialer Chiralität entlang einer biarylichen Achse sowie der einhergehenden konservierten Konformation dieser Ringsysteme zueinander könnte diese Fragestellung zukünftig weiter beleuchten.



Die Substanzbibliothek umfasst hauptsächlich Moleküle mit Änderungen am Pyridin des triarylichen Grundgerüsts, in welchen die beiden arylischen Ringsysteme als konservierte Strukturelemente im Aufbau ebendieser betrachtet wurden (vgl. Kapitel 3.1.3.3). Mit den Erkenntnissen aus dem vorhergehenden Abschnitt bestätigt sich diese Vorgehensweise, da keine Optimierung für die Änderung der Aryle erzielt werden konnte. Zur weiteren Untersuchung hinsichtlich der Struktur-Aktivitätsbeziehung sowie möglicher Selektivitätsprofile der diversifizierten Liganden wurden die 40 Moleküle mit 5'- oder 6'-Modifizierung des Pyridins **28a** nachstehend evaluiert (vgl. Tab 3.2-3 und Tab. 3.2-4).

Die Analyse der CAAs, welche kleine und nicht-aromatische Substitutionen am Pyridin-Grundgerüst tragen, lieferte ein breites Aktivitätsspektrum für die Akt Isoformen. Aus den Daten für diese Gruppe der Liganden wird für Akt1 ersichtlich, dass vor allem Modifizierung mit kleinen Substituenten, wie die Methylpyridine **38a**, **38e**, **39a**, Chlorpyridin **46a** oder auch Carboxy-Derivate **42a**, **42b** im Vergleich zur parentalen Verbindung **28a** bevorzugt binden. Vor allem der Methylsubstituent an 6'-Position des Pyridins zeigt eine Steigerung des IC<sub>50</sub>-Werts um Faktor 5 sowie eine doppelte Verbesserung zu den anderen beiden methylierten Derivaten (**39a**, **38e**). Dieses Aktivitätsmuster ließ sich bereits aus dem zuvor publizierten methyl-tragenden Pyrazinon **15a** (30 nM) ableiten. Kleinere polare Gruppen wie die benzylichen Alkohole **38b** und **39b** zeigen für Akt1 ebenfalls einen Positionstrend hinzu dem 6'-Isoomer, jedoch fällt die Aktivität um Faktor 5 zum Methylpyridin Vorläufer **38a**. Diese Modifizierungen werden von Akt3 kaum toleriert, wohingegen auf Akt2 eine ähnliche Verschiebung der zuvor erwähnten Faktoren beobachtet werden kann, beispielweise ist das Methylpyridin **39a** mit 150 nM vierfach besser als die parentale Verbindung **28a** (599 nM). Bei Einführung des polaren Hydroxylrestes in **39b** sinkt die Aktivität auf Akt2 (961 nM) wiederum. Die Beobachtung von analogen Trends der Inhibitoren in Akt1 und Akt2 vermag eine gewisse Ähnlichkeit dieser beiden Isoform-Bindetaschen in unmittelbarer struktureller Umgebung des Pyridinrings ableiten, wie zuvor in der Homologiemodell-Modellierung beobachtet werden konnte (vgl. Kapitel 3.1.2). Eine Einführung der Carboxylgruppe an 5'-Position des Grundgerüsts bewirkt kaum eine Änderung der Aktivität zur parentalen Verbindung **28a**, jedoch geht mit der Maskierung der Säurefunktion durch Bildung des Methylesters **42b** eine zweifache Verbesserung der IC<sub>50</sub>-Werte auf allen drei Akt Isoformen einher. Das Methyramid **42c** erzielt wiederum ausschließlich einen Aktivitätsgewinn auf Akt2 mit 108 nM, wohingegen die Einführung des Stickstoffs und Veränderung der chemischen Eigenschaften in Akt1 weniger toleriert wird. Die Basizität, welche durch Einführung eines tertiären Amins an der benzylichen 5'-Position in CAAI **39c** oder **39d** einhergeht, führt zu drastischen Aktivitätsverlusten auf Akt1. Die physiologisch protonierten Amine des Pyrrols sowie Morpholins werden von Akt2 hingegen mit 479 und 614 nM halbwegs toleriert. Das größerer Ringsystem des Morpholins **39d** erzielt wiederum eine moderate mikromolare Potenz von 8.3 µM auf Akt3. Die Reduzierung des basischen Charakters durch die Carbonylgruppe in **42i** und **42j** bewirkt einen fünffachen Aktivitätsverlust auf Akt2, wohingegen diese Veränderung die IC<sub>50</sub>-Werte für Akt1 bis zu Faktor 4 verbessert.

**Tabelle 3.2-3: Inhibitorische Aktivität der CAAs mit kleinen und aliphatischen Modifikationen.** Die IC<sub>50</sub>-Werte der ausgewählten Liganden wurden mit dem zuvor etablierten HTRF Assay bestimmt. Ergebnisse sind als Mittelwert mit  $n = 3$  angegeben, sowie die dazugehörigen Fehler als ( $\pm$ ) Standardabweichung.

#	R (-Position)			IC <sub>50</sub> [nM]		
	4'	5'	6'	Akt1 <sup>WT</sup>	Akt2 <sup>WT</sup>	Akt3 <sup>WT</sup>
						
<b>13</b>	<b>Borussertib</b>			1 ± 0.4	14 ± 1	431 ± 31
<b>15a</b>	6' Methylpyrazinon			30 ± 6	1143 ± 194	> 20000
<b>16b</b>	5' Isobutylpyrazinon			754 ± 77	36 ± 3	12563 ± 496
<b>16c</b>	5' Hydroxybenzylpyrazinon			769 ± 97	1018 ± 231	427 ± 16
<b>28a</b>	RL2661			66 ± 11	599 ± 63	6627 ± 1128
<b>39a</b>	RL3047			22 ± 2	150 ± 5	7509 ± 1821
<b>38a</b>	RL2933			10 ± 2	247 ± 36	7829 ± 1041
<b>38e</b>	RL3224			23 ± 3	199 ± 29	4398 ± 878
<b>46a</b>	RL3375			36 ± 9	356 ± 86	> 20000
<b>39b<sup>x</sup></b>	RL2884			186 ± 79	961 ± 174	> 20000
<b>38b</b>	RL3000			54 ± 6	888 ± 161	> 20000
<b>42a</b>	RL3274			66 ± 18	277 ± 67	6446 ± 742
<b>42b</b>	RL3067			36 ± 3	116 ± 2	3396 ± 406
<b>42c</b>	RL3084			112 ± 17	108 ± 31	4920 ± 1600
<b>39c<sup>x</sup></b>	RL2905			7087 ± 3437	479 ± 91	> 20000
<b>42i</b>	RL3170			4566 ± 197	2068 ± 147	> 20000
<b>39d<sup>x</sup></b>	RL2926			14921 ± 4284	614 ± 62	8385 ± 2099
<b>42j</b>	RL3171			3482 ± 506	2809 ± 359	> 20000
<b>42h</b>	RL3169			1185 ± 268	88 ± 6	1541 ± 217
<b>39f<sup>x</sup></b>	RL2930			5930 ± 793	4214 ± 412	8374 ± 1784
<b>42d</b>	RL3085			1716 ± 166	94 ± 4	1564 ± 75
<b>42k</b>	RL3201			621 ± 112	210 ± 43	3063 ± 285
<b>42f</b>	RL3095			2501 ± 231	273 ± 85	12420 ± 3743
<b>42e</b>	RL3086			368 ± 15	65 ± 3	3916 ± 1167

<sup>x</sup> Verbindung synthetisiert im Rahmen der Bachelorarbeit von Jonas Nabert (AG Rauh, TU Dortmund).

Anhand des exozyklischen Morpholin-Analogs **42h** kann ein positiver Effekt für Akt3 mit 1541 nM und für Akt2 mit 88 nM verzeichnet werden, welches auf die Polarität der Heteroatome zurückzuführen sein könnte. In Anbetracht des amidischen Isobutylpyridins **42d** zeigt sich ein ähnliches Bild in den Aktivitätsprofilen für die Akt Isoformen wie für das Cyclohexan-Derivat, somit könnte der Anstieg der Potenz von **42h** ebenfalls auf dem aliphatischen Charakter und räumlichen Anspruch des Liganden beruhen. Das sekundäre Amin **39f** und nicht-amidische Analog zu **42d** zeigt sehr moderate Aktivität auf den drei Isoformen. Dort bewirkt die Einführung des Amids und die Reduzierung der Flexibilität sowie Basizität des Stickstoffes eine deutliche Verbesserung in den IC<sub>50</sub>-Werten, beispielsweise eine 40-fache Steigerung zu 94 nM in Akt2. Das Isobutyl Strukturelement zeigte sich bereits im zuvor publizierten pyrazinonischen CAAI **16b** als vorteilhaft, um Akt2 selektiv zu adressieren. Dieser beobachtete Trend konnte mit **42d** für die Isoformen teilweise reproduziert werden, wobei die Aktivität für Akt3 (1.5 µM) höher ist als in **16b** (12.5 µM), welches weiter durch die Beschaffenheit des Pyrazinon Grundgerüsts begründet werden könnte.

Nimmt die Größe und der räumliche Anspruch der aliphatischen Reste ab, wie in Allylamid **42k**, geht dies mit einem Aktivitätsgewinn auf Akt1 (621 nM) und zweifach geringeren IC<sub>50</sub>-Werten für Akt2 (210 nM) und Akt3 (3 µM) einher. Die Einführung eines *tert*-Butylrestes (**42f**) und Erhöhung des sterischen Anspruchs in unmittelbarer Nähe des Amids verschlechtert die Potenz auf den drei Isoformen. Wohingegen der starre Cyclopropylrest von **42e**, welches oft als Bioisoster für aromatische Phenylringe dient, bis zu Faktor 5 besser auf Akt1 (368 nM) und Akt2 (65 nM) toleriert wird im Vergleich zu **42f**. Insbesondere lässt sich auf Akt3 der Trend ableiten, dass räumlich anspruchsvollere Reste nicht in direkter Nähe des Amids toleriert werden und somit die unmittelbare Umgebung in der Bindetasche womöglich strukturelle Unterschiede zu Akt1 und Akt2 aufweist. Die Einschränkung der Flexibilität der Substituenten durch das Amid könnte ausschlaggebend für eine bessere Stabilisierung der Liganden in den Akt Isoform Bindetaschen besitzen. Des Weiteren könnte der Aktivitätsgewinn durch die Einführung eines Amids auf Akt1 und Akt2 aufgrund struktureller Interaktionen zum Protein oder der Umgebung begünstigen, wie beispielweise für das endozyklische Amid des Naphthyridinons in Borussertib (**13**) beschrieben werden konnte.<sup>154</sup> Diese ersten Annahmen und Beobachtungen könnten durch die Evaluation der Derivate mit aromatischen Resten weiter beleuchtet werden.

Nachstehend sollte der restliche Teil der fokussierten Substanzbibliothek hinsichtlich ihrer Aktivität auf den Isoformen evaluiert werden, dabei wurden die Verbindungen mit aromatischen Substituenten genauer betrachtet und besonders der Einfluss des Linkers und der Flexibilität dieser Substituierungen analysiert (vgl. Tab 3.2-4).

**Tabelle 3.2-4: Inhibitorische Aktivität der CAAls mit aromatischen Modifikationen.** Die IC<sub>50</sub>-Werte der ausgewählten Liganden wurden mit dem zuvor etablierten HTRF Assay bestimmt. Ergebnisse sind als Mittelwert mit  $n = 3$  (\*:  $n = 2$ ) angegeben, sowie die dazugehörigen Fehler als ( $\pm$ ) Standardabweichung.

#	R	IC <sub>50</sub> [nM]			
		Akt1 <sup>WT</sup>	Akt2 <sup>WT</sup>	Akt3 <sup>WT</sup>	
5'	6'				
13	borussertib				
15a	6' Methylpyrazinon	30 ± 6	1143 ± 194	> 20000	
16b	5' Isobutylpyrazinon	754 ± 77	36 ± 3	12563 ± 496	
16c	5' Hydroxybenzylpyrazinon	769 ± 97	1018 ± 231	427 ± 16	
39e <sup>x</sup>	RL2928		643 ± 117	76 ± 11	1890 ± 621
38d <sup>y</sup>	RL3149		1765 ± 106	2429 ± 519	> 20000
39i	RL3081		1281 ± 18	251 ± 18	607 ± 95
42g	RL3096		98 ± 15	53 ± 5	3543 ± 617
46b	RL3365		40 ± 4	50 ± 8	989 ± 120
39p	RL3341		528 ± 14	23 ± 4	356 ± 88
39l	RL3200		604 ± 31	1400 ± 112	4356 ± 1077
42l	RL3202		381 ± 16	284 ± 40	1515 ± 166
46d	RL3465		398 ± 34	495 ± 78	8344 ± 3428*
39g	RL3241		855 ± 203	1321 ± 435	3371 ± 216
39m	RL3082		9484 ± 665	682 ± 83	5339 ± 2006
39n	RL3271		2853 ± 758	133 ± 9	2108 ± 441
42o	RL3312		91 ± 13	39 ± 6	5266 ± 1030
39h	RL3068		11830 ± 1764	2261 ± 712	2159 ± 1344
39k	RL3225		1797 ± 105	511 ± 62	1509 ± 389
39j	RL3094		1631 ± 149	222 ± 67	170 ± 47
39o	RL3272		2111 ± 268	99 ± 6	272 ± 84
38c <sup>y</sup>	RL3112		638 ± 136	2220 ± 614	7984 ± 1092
42m	RL3279		209 ± 40	48 ± 9	3049 ± 646
46c	RL3400		70 ± 15	30 ± 3	1291 ± 188
42n	RL3310		130 ± 9	151 ± 25	6303 ± 1923

<sup>x,y</sup> Verbindung synthetisiert von Jonas Nabert (<sup>x</sup>), bzw. Tonia Kirschner (<sup>y</sup>) (AG Rauh, TU Dortmund).

Die Einführung aromatischer Substituenten an der 5'-Position bewirkt ein diverses Spektrum an Affinitätsprofilen für die Akt Isoformen. Besonders auffallend ist, dass die deutlich größeren Reste eine bessere Aktivität auf Akt3 mit sich bringen (**39i**, **39j**, **39n**) und sich dieser Trend auf Akt2 übersetzen lässt. Im Falle der stickstoffreichen Fünfringsysteme wie Pyrazol oder Imidazol erreicht Ligand **39e** bereits gute IC<sub>50</sub>-Werte im nanomolaren Bereich für Akt2 (76 nM) mit einem 10- oder bis zu 20-fachen Verlust der Aktivität gegenüber Akt1 (643 nM) und Akt3 (1890 nM). In Anbetracht der 6'-Derivats **38d** wird deutlich, dass diese Substitutionsposition nicht gut toleriert wird von den Isoformen. Das Methylpyrazol **39i** verliert wiederum an Affinität auf Akt1 (1281 nM) und Akt2 (251 nM), wobei sie auf Akt3 (607 nM) um das Dreifache steigt. Die freie Pyrazol-Base **39p** verbessert die Potenz enorm und steigert diese um das 10-fache mit 23 nM auf Akt2, jedoch ist zeitgleich eine Erhöhung auf den anderen beiden Isoformen, um Faktor 2 zu beobachten. Wie zuvor beschrieben verhilft die Einführung eines Amid-Linkers zur Verbesserung der Affinität für Akt1 und Akt2, welches sich gut mit CAAI **42g** im Verhältnis zu **39i** abbildet (Akt1: 98 vs. 1281 nM; Akt2: 53 vs. 251 nM). Die direkte Verbindung des Methylpyrazols an das Pyridin-Grundgerüst in **46b** weist ein ähnliches Aktivitätsprofil für Akt1 (40 nM) und Akt2 (50 nM) auf. Diese Beispiele bestärken weiter, dass möglicherweise eine hohe Homologie in den Bindetaschen von Akt1 und Akt2 vorliegt, besonders hinsichtlich Änderungen in direkter Nähe zum Pyridin-Grundgerüst. Weiterhin scheint die Beschaffenheit des Fünfringes durch Anwesenheit des Stickstoffes und die damit partielle positive Polarisierung der elektrostatischen Oberfläche wichtig zu sein, denn das analoge Furan-Derivat **46d** bewirkt einen 10-fachen Aktivitätsverlust auf den Isoformen. Das Methylfuran **39l** wird im Vergleich zum Methylpyrazol **39i** mit 604 nM ausschließlich von Akt1 besser toleriert. Die erneute Einschränkung der Flexibilität sowie Verlängerung des eingeführten Restes durch einen Amid-Linker in **42l** verbessert die Bindungseigenschaften für Akt2 mit 284 nM und Akt3 mit 1.5 µM.

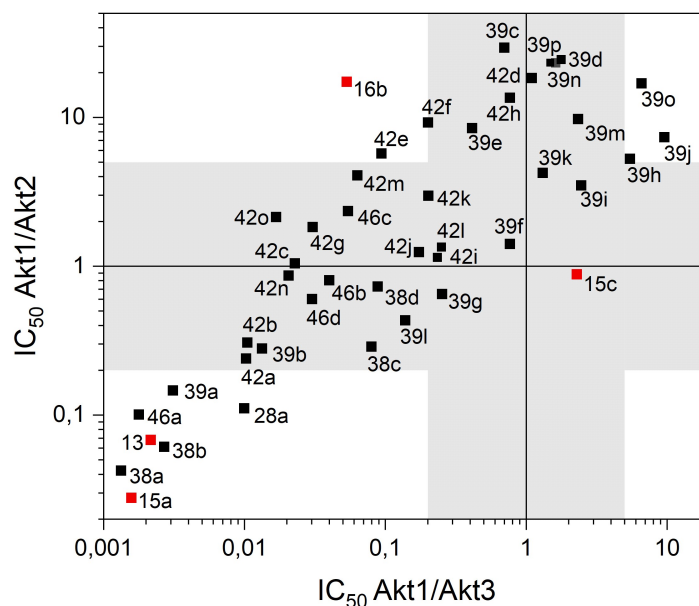
In Anbetracht der aromatischen Sechsringsysteme wird für Akt1 deutlich, dass diese sterisch anspruchsvollen Substituenten nur toleriert werden, wenn diese über ein Amid oder direkt an das Grundgerüst verknüpft sind, wie es Aminopyridin **42o** mit 91 nM, 3- und 2-Pyridin **42m** (209 nM), **42n** (130 nM) sowie **46c** mit 70 nM. Die nich-amidischen Analoga **39n** (2.1 µM) und **39o** (2.8 µM) weisen einen mindestens 10-fach geringeren IC<sub>50</sub>-Wert für Akt1 auf, wohingegen die *para*-substituierte Benzoesäure **39g** mit 855 nM eine submikromolare Aktivität für diese Kinase zeigt. Weiter scheint die Position kleinerer Reste an den aromatischen Systemen vor allem für die Bindung der Akt2 Bindetasche eine Rolle zu spielen, beispielsweise wird das *meta*-Anilin **39n** mit 133 nM fast fünffach besser toleriert als das *para*-Anilin **39k** mit 511 nM. Die Einführung eines Stickstoffatoms in 3-Pyridin **39o** an der *meta*-Position hat ebenfalls einen aktivitätssteigernden Effekt für Akt2 mit einem IC<sub>50</sub> von 99 nM. Abgeleitet davon, zeigt das *para*-Aminopyridin **39j** somit eine moderate Affinität von 222 nM, welche zwischen den jeweiligen einzelnen Komponenten von **39o** und **39k** liegt. Wohingegen das Aminopyridin Strukturelement in Akt3 die größte Affinität aus der Substanzbibliothek für diese Isoform liefert. Ebenfalls zeigt das 6'-Derivat des Pyridins **38c** keinen Aktivitätsgewinn auf Akt2 (2.2 µM) und Akt3 (7.9 µM),

dennoch eine leichte Präferenz für Akt1 mit 638 nM. Das 3-Pyridin **39o** ist mit 272 nM etwas weniger aktiv als **39j**, jedoch fällt die Affinität des *para*-Anilins **39k** mit 1.5  $\mu$ M deutlich für Akt3, weshalb kein direkter additiver Effekt ersichtlich ist, sondern dies vielmehr auf die chemische Beschaffenheit des Ringsystems zurückzuführen sein könnte.

Der Einfluss der Verlinkung dieser aromatischen Substituenten wird vor allem am Beispiel der Pyridine **39o**, **42m** und **46c** deutlich, denn das Amid verhilft zu einer Steigerung der Aktivität auf Akt1 mit Faktor 10 (209 nM) sowie für Akt2 um Faktor 2 (48 nM), wobei die direkte Verknüpfung an das Grundgerüst die IC<sub>50</sub>-Werte erneut für die beiden Isoformen verbessert. Im Gegenzug verschlechtert sich durch die Rigidifizierung und Einführung des Amids das Inhibitionsprofil der Verbindung **42m** für Akt3 (3.0  $\mu$ M) im Vergleich zu Derivat **39o** (272 nM). Die Position des Stickstoffs im Pyridin scheint für Akt1 und Akt2 eine entscheidende Rolle zu spielen, denn das 2-Pyridin **42n** ist geringfügig potenter auf Akt1 (130 nM) im Vergleich zum 3-Pyridin **42m** (209 nM), wohingegen für Akt2 diese Veränderung zu einem dreifachen Verlust der Aktivität führt (151 nM vs. 48 nM).

Aus den vorliegenden Daten lassen sich besonders drei elementare Trends ableiten, zum einen wird für die Adressierung von Akt3 ein sterisch anspruchsvoller und aromatischer Rest benötigt, damit die allosterische Tasche der Kinase erfolgreich besetzt werden kann. Eine vermeintlich größere Bindetasche am C-terminalen Ende der  $\alpha$ E-Helix in Akt3 deutete bereits in der Homologiemodell-Analyse (vgl. Kapitel 3.1.1) auf dieses Verhalten. Zum anderen werden diese größeren Reste gleichermaßen von Akt2 toleriert, wobei die *meta*-Modifizierung der aromatischen Systeme mit einem basischen Stickstoff besonders gute Ergebnisse erzielen. Dieser Hybride Charakter von Akt2 bezüglich Akt3-analoger Bindepräferenzen größerer Reste konnte gleichfalls aus den ursprünglichen Docking-Studien abgeleitet werden. Und zuletzt lässt sich ableiten, dass vor allem die amidische Verknüpfung dieser sterisch anspruchsvollen Reste für Akt1 elementar ist, um bessere Aktivitäten für die Isoform zu verzeichnen. Die Einführung eines weiteren Atoms in den Linker der Substituenten durch die Amid-Bindung führt teilweise zu einer 10-fachen Optimierung der IC<sub>50</sub>-Werte. Ebenfalls zeigt die Rigidifizierung durch direkte Substitution am Pyridinring ähnliche Ergebnisse. Analoges ist für Akt2 zu beobachten, die Linkereigenschaften unterstützen den Aktivitätsgewinn der jeweiligen Verbindung und lässt zunächst vermuten, dass die Akt1 und Akt2 Bindetasche in direkter räumlicher Nähe zum Grundgerüst an 5'-Position eine ähnliche Beschaffenheit aufweisen, weshalb dies vergleichbar positive Effekte auf die Struktur-Aktivitätsbeziehung haben könnte. Ähnliche Rückschlüsse konnten bereits aus den Dockingstudien in Kapitel 3.1.2 in Bezug auf den amidischen Linker gezogen werden. Die postulierten Hypothesen aus dem strukturbasierten Ansatz können somit durch die hier offengelegte SAR untermauert werden. Nichtsdestotrotz, würden Kokristallisationsexperimente in Akt1 und Akt2 genauere Aufschlüsse über diese Beobachtungen und hinsichtlich der strukturellen Beschaffenheit der Bindetasche liefern. Chemisch-genetische Ansätze und der Einbau veränderter Aminosäuren in die jeweilige Isoform könnten ebenfalls helfen diese Hypothesen zu überprüfen.<sup>56</sup>

Um einfachere Rückschlüsse auf die Selektivitätsprofile der CAAs für die einzelnen Akt Isoformen der Substanzbibliothek machen zu können, wurden im Folgenden die Selektivitätsquotienten gebildet und zueinander weiter analysiert (vgl. Abb. 3.2-1 und 3.2-2). Die Auftragung der Quotienten aus dem jeweiligen  $IC_{50}$ -Wert des Inhibitors für die Isoform soll veranschaulichen, ob weitere Zusammenhänge zwischen den einzelnen Verbindungen vorliegen und welche Moleküle ein vorteilhaftes Selektivitätsprofil aufweisen, um beispielsweise für weitere Studien in komplexen zellulären Systemen qualifiziert zu sein.

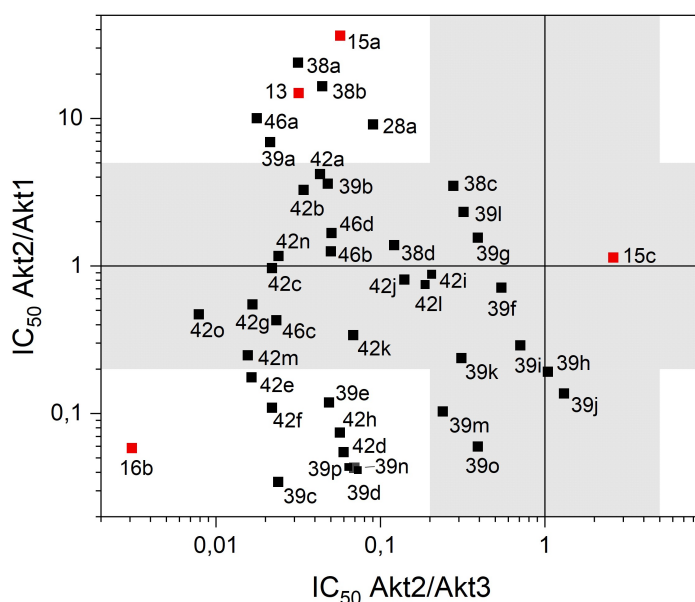


**Abb. 3.2-1: Logarithmischen Auftragung der Isoform Selektivitätsquotienten für die CAAs.** Das Verhältnis der  $IC_{50}$ -Werte für die entsprechende Kinase wurden logarithmisch gegeneinander aufgetragen. Die graue Fläche repräsentiert den unselektiven Bereich, unter der Definition, dass die Selektivität sich um Faktor 5 zu der anderen Kinase unterscheidet (Zahlenwerte im Anhang, vgl. 7.3).

Ein selektiver Inhibitor sollte mindestens Faktor 5-10 Unterschied in der Aktivität zu der jeweilig anderen Isoform aufweisen, damit letztlich diese Konzentrationsgefälle in komplexeren Systemen, wie der Zelle nicht unterschritten werden und eine selektive Adressierung ablaufen kann.<sup>46</sup> Im Falle der gebildeten Selektivitätsquotienten wären diese Unterschiede erreicht, wenn das Verhältnis mindestens unter einem Wert von 0,2 oder über 5 liegt. Die Auftragung veranschaulicht den Zusammenhang zwischen Selektivität für Akt1 gegenüber Akt2 und Akt3. Zunächst wird deutlich, dass mit steigendem  $IC_{50}$ -Wert und erhöhter Selektivität für Akt2 diese ebenso auf Akt3 verzeichnet werden kann. Der Selektivitätsverlust für Akt1 und einhergehender Aktivitätsgewinn für Akt2 und Akt3 scheint proportional zueinander zu sein, weshalb die Verhältnisse eine diagonale Verteilung abbilden. Die CAAs, welche sich im unteren linken Rechteck befinden, stellen nach den zuvor definierten Grenzen selektive Verbindungen für Akt1 dar. Diese sechs Inhibitoren besitzen allerdings ein differenziertes Spektrum an inhibitorischer Aktivität für die Isoform, beispielsweise das Methylpyridin **38a** mit 10 nM oder Derivat **38b** mit 54 nM. Wie zuvor angemerkt erzielt das unmodifizierte Pyridin **28a** ein gutes Selektivitätsprofil für Akt1, welches durch die simple 6'-Methylierung in **2933** zu einer signifikanten Verbesserung dieses Profils führt. Borussertib (**13**) kann ebenfalls als Akt1-selektives Molekül in dieser Grafik identifiziert werden, wobei

die Aktivität auf Akt2 mit 12 nM ebenfalls sehr potent ist und höchstwahrscheinlich ein Konzentrationsunterschied abbildet, der in komplexeren Systemen nicht eingehalten werden kann. Das bekannte Methylpyrazinon **15a** verhält sich ähnlich wie Methylpyridin **38a**, wobei die Aktivität für die hier neu synthetisierte Verbindung dreifach potenter ist. Vor allem für Akt3 kann hier ein sicheres Inhibitionsprofil abgeleitet werden, da beispielsweise **38a** Akt1 bis zu einem Faktor von 1000 bevorzugt.

Weiterhin können die Pyridine **39h**, **39o** und **39j** als nicht-selektive Akt1 Liganden identifiziert werden, welche jedoch auf ähnliche Weise aktiv für Akt2 und Akt3 sind. Der obere Bereich des Graphen verdeutlicht die Vielzahl an Akt2-selektiven Inhibitoren gegenüber Akt1, jedoch scheint eine gewisse Aktivität dieser Verbindungen für Akt3 mit einherzugehen, weshalb eine weitere Auftragung den Zusammenhang zwischen der Selektivität für Akt2 gegenüber Akt1 und Akt3 auflösen soll (vgl. Abb. 3.2-2).



**Abb. 3.2-2: Auftragung der logarithmischen Isoform Selektivitätsquotienten für die CAAs.** Das Verhältnis der  $IC_{50}$ -Werte für die entsprechende Kinase wurden logarithmisch gegeneinander aufgetragen. Die graue Fläche repräsentiert den unselektiven Bereich, unter der Definition, dass die Selektivität sich um Faktor 5 zu der anderen Kinase unterscheidet (Zahlenwerte im Anhang, vgl. 7.3).

Eine selektive Adressierung von Akt3 allein ist mit der vorhandenen Substanzbibliothek nicht möglich, da wie bereits festgestellt die Liganden oft nur geringfügig weniger aktiv sind auf Akt2. Im unteren linken Quadranten befinden sich die CAAs, welche eine gute Selektivität für Akt2 gegenüber Akt1 und Akt3 besitzen. Besonders **16b**, das zuvor beschriebene Pyrazinon, sticht als Akt2-selektiver Ligand hervor. Weiterhin zeigt das Pyrrol **39c** ein gutes Selektivitätsprofil für diese Isoform, welches jedoch mit einer moderaten Potenz von 400 nM keine ausreichende Effektivität für weitere Studien besitzt. Die CAAs **42d**, **42h**, **39d**, **39n**, **39p** weisen ebenfalls ein optimales Profil für Akt2 auf, von welchen das Pyrazol **39p** als potenteste Verbindung identifiziert werden kann. Die bereits publizierte Verbindung **16b** besitzt weiterhin die differenzierteste Selektivität für Akt2, jedoch weisen die pyrazinonischen Moleküle einige Limitation hinsichtlich der zellulären Eigenschaften auf, dazu mehr in Kapitel 3.3.1. **42f**,

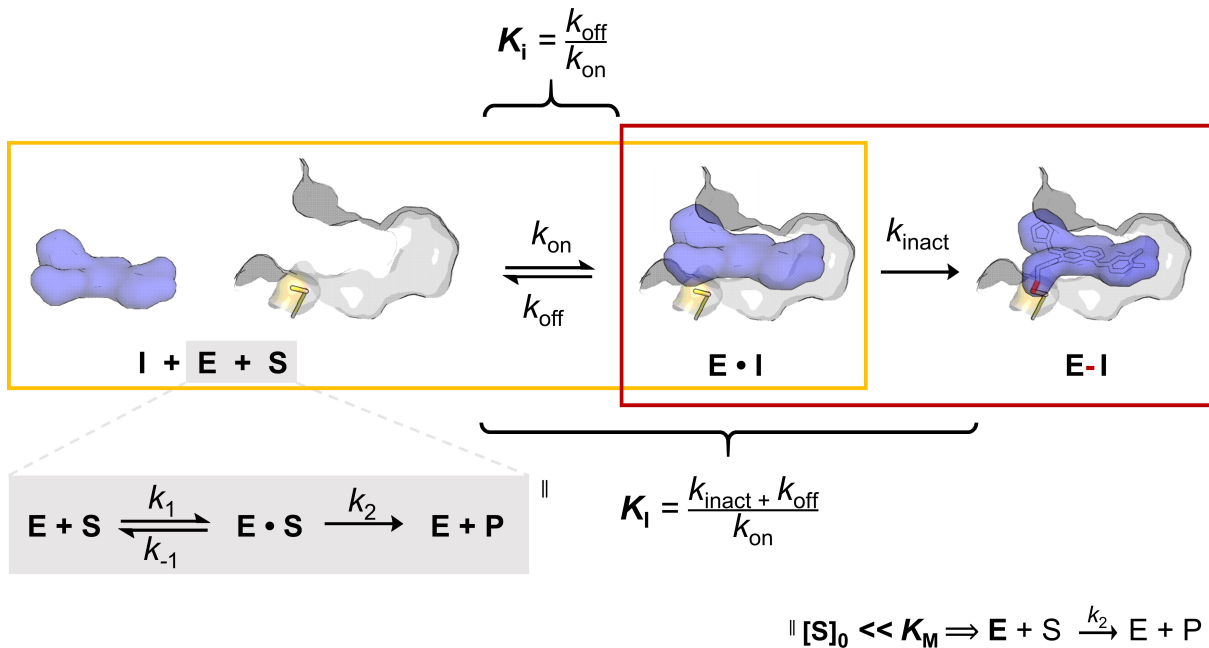


**39e** und **42e** liegen ebenfalls außerhalb der definierten Selektivitätsgrenzen, wobei die Aktivität für Akt1 unter Faktor 10 liegt. Aus der Auftragung wird ersichtlich, dass es keine Inhibitoren für Akt3 dargestellt werden konnten, welche die Eigenschaft besitzen eine erhöhte Selektivität gegenüber Akt2 aufzuweisen. Pyridin **39h** und **39j** distanzieren sich deutlich zu Akt1 in ihren  $IC_{50}$ -Werten besitzen, aber ähnliche Affinitäten für Akt2 wie für Akt3. Nichtsdestotrotz stellt der Ligand **39j** ein potentes Sondenmolekül für die beiden Akt Isoformen dar und könnte beispielsweise in Zellen mit Akt3 Überexpression positive Effekte erzielen. Ebenso kann das Anilin **42o** als dualer Inhibitor für Akt1 und Akt2, mit einem sehr sicheren Selektivitätsprofil gegenüber Akt3 identifiziert werden. Zum Erhalt Akt3-selektiver Liganden bedarf es weitere Anstrengungen, wobei die aus dieser Arbeit erlangten Einsichten in die SAR der Pyridin-Derivate eine wertvolle Grundlage darstellen, um dieses Unterfangen voran zu treiben. So könnten weitere größere, aromatische Substituenten von Vorteil sein sowie die Adressierung anderer nukleophiler Seitenketten in der Nähe zur allosterischen Bindetasche oder im Akt3 Linker wie kürzlich mit Cys119 gezeigt.<sup>117</sup>

Innerhalb der biochemischen Charakterisierung mittels des HTRF Systems konnten für die fokussierte Substanzbibliothek wichtige Rückschlüsse auf die Struktur-Aktivitätsbeziehung gezogen werden. Die Analyse der CAAs mit modifizierten Aryl-Substituenten des triaryllischen Grundgerüsts zeigte, dass keinerlei Veränderung toleriert wird und die Phenylringe wichtige Bindungselemente für die Adressierung der allosterischen Tasche darstellen. Aus der Evaluation der 50 Pyridin Derivaten im Zusammenhang mit ihren  $IC_{50}$ -Werten konnten klare und konsistente Struktur-Aktivitätsbeziehungen für die jeweilige Akt Isoform abgeleitet werden, welche zuvor noch nicht beschrieben wurden. Somit ermöglichte der gewählte Designansatz für dieses Set an Inhibitoren ein breites Spektrum an Aktivitäten und validiert dadurch die gewählte Strategie sowie die aus den Homologiemodellen abgeleitete strukturellen Alterationen der jeweiligen Akt Bindetasche. Weiterhin verhalf dieser Ansatz zur Erzeugung unterschiedlichster Selektivitätsprofile für die Akt Isoformen, aus welchem sehr vorteilhafte Inhibitoren für nachfolgende Studien identifiziert werden konnten. Ebenso ermöglicht die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes die Einschätzung von potentiellen Formulierungen für weiterführende Experimente, wie beispielsweise der Einsatz in zellulären Testsystemen.

### 3.2.2. Kinetische Evaluation

Die biochemische Charakterisierung von Liganden, welche mit reaktiven elektrophilen Gruppen das Zielprotein kovalent modifizieren können, beinhaltet andere Bindungsparameter als die von reversibel bindenden Molekülen, weswegen eine andere Form der Analyse benötigt wird, um ebendiese aufzulösen. Aufgrund der möglichen irreversiblen Bindungsbildung zur Zielstruktur wird das Gleichgewicht der reversiblen Bindung zusätzlich beeinflusst, weshalb der ablaufende Bindungsprozess eine andere Reaktionsordnung besitzt und durch weitere kinetische Parameter definiert wird (vgl. Abb. 3.2-3).<sup>212</sup>



**Abb. 3.2-3: Schematische Darstellung der Enzymkinetik von kovalenten Inhibitoren.** Die Reaktion eines irreversiblen Liganden (blau) mit dem adressierten Protein kann anhand der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_i$  (M) und der Inhibitionskonstante  $K_I$  (M) beschrieben werden. Dabei definiert  $K_i$  die initiale reversible Bindungsbildung zum E·I Komplex (gelb) durch das Verhältnis von  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  und der Schritt der Inaktivierung (rot) samt kovalenten Bindungsbildung wird mit der Reaktionskonstante erster Ordnung  $k_{\text{inact}}$  ( $\text{s}^{-1}$ ) beschrieben. Zu dieser Reaktion findet in Konkurrenz die Enzym-Substrat Reaktion (grau) statt, die ebenfalls durch einen zweistufigen Prozess anhand der Reaktionsraten  $k_1$ ,  $k_{-1}$  und  $k_2$  definiert wird. Unter bestimmten Umständen kann die Enzym-Substrat Reaktion vereinfacht betrachtet werden (||), was die Bestimmung der kinetischen Parameter der kovalenten Inhibitoren experimentell erleichtert. Schematische Darstellung basiert auf Afatinib und EGFR (pdb: 4g5p).

Zunächst erfolgt die reversible Bindung zum E·I Komplex, welche durch die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_i$  beschrieben wird. Dort wird der Ligand über verschiedene Wechselwirkungen in der Bindetasche der makromolekularen Struktur stabilisiert, darunter fallen Wasserstoffbrückenbindungen (WBB) zu Seitenketten des Proteins oder Solvens-vermittelte WBBs. Ebenso tragen polare und elektrostatische Interaktionen der niedermolekularen Verbindung zur Proteinstruktur zu einer Bindepräferenz bei. Hydrophobe Wechselwirkungen, die auf van-der-Waals-Kräften beruhen steuern einen weiteren Teil zur Stabilisierung der Bindung bei. Die Bildung des E·I Komplexes kann zudem durch entropische Effekte, in Form von Lösungsmittel-Freisetzung, begünstigt sein. Dem wirkt die Einschränkung der Freiheitsgrade des Liganden entgegen.<sup>213</sup> Das elektrophile System, welches den nukleophilen Seitenket-

ten zur kovalenten Bindung dienen soll, ist in seiner Reaktivität gemäßigt eingestellt, weshalb die räumliche Nähe durch das reversible Bindungevent eine Voraussetzung für die nachfolgende Reaktion darstellt. In einem zweiten Schritt wird, aufgrund der nukleophilen Reaktion der irreversible E-I Komplex gebildet und durch die Reaktionskonstante  $k_{\text{inact}}$  definiert. Die Rate der kovalenten Modifikation ist abhängig von der Konzentration des reversiblen Adduktes, sodass bei unlimitierter Menge des Inaktivators alle Enzymmoleküle im binären E•I Komplex vorliegen und die beobachtete Inaktivierungsgeschwindigkeit  $k_{\text{inact}}$  entsprechen würde. Daher wird diese Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung meist als maximale Rate der Modifizierung definiert. Den Zusammenhang von  $K_i$  und  $k_{\text{inact}}$  bildet die Inhibitionskonstante  $K_I$  ab und beschreibt die Potenz des kovalenten Inhibitors innerhalb des ersten Reaktionsschrittes. Die benötigte Konzentration des Inhibitors, um die halbmaximale Inaktivierungsrate zu erreichen ( $1/2 k_{\text{inact}}$ ), wird durch  $K_I$  abgebildet und ist der Michaeliskonstante  $K_M$  aus der Michaelis-Menten-Theorie für Enzymsubstrate gleichzusetzen. Ein weiterer Parameter, um diese Art der Reaktion zu beschreiben, wird mit der Reaktionskonstanten zweiter Ordnung  $k_{\text{inact}}/K_I$  ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) gegeben und spiegelt die Effektivität der kovalenten Bindungsbildung wider.

Im Zuge der Bestimmung von kinetischen Parametern der kovalenten Bindungskinetiken konnten KITZ & WILSON sowie TIAN & TSOU (1962) die zeitliche Auflösung der irreversiblen Inhibition in einem Experiment als steigende exponentielle Kurve, unter der Verwendung einiger simplifizierender Annahmen, beschreiben (vgl. Gleichung (1)).<sup>214,215</sup> Unter anderem muss vorausgesetzt sein, dass die Substrat Konzentration deutlich geringer ist als die dazugehörige Michaeliskonstante  $K_M$  ( $[S]_0 \ll K_M$ ;  $K_M = (k_2+k_{-1})/k_1$ ). Davon abgeleitet wird angenommen, dass die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ( $[ES]$ ) sehr klein ist und somit im mathematischen Modell vernachlässigt werden kann. Weiterhin kann Angenommen werden, dass  $k_{\text{inact}}$  ( $k_2$ ) deutlich kleiner ist als  $k_{\text{off}}$  ( $k_{-1}$ ), weshalb in dieser *rapid-equilibrium approximation* der ermittelte  $K_I$  der Dissoziationskonstante  $K_i$  gleicht.<sup>216</sup> Zuletzt sollte sich das System im Gleichgewichtszustand befinden, sodass der E•I Komplex immer genügend vorliegt ( $I_0 > E_0$ ), welches analog zur Michaelis-Menten Gleichung als die sogenannte *steady state* Annahme bezeichnet wird. Effekte, die aufgrund der irreversiblen Modifikation einhergehen, wie der Inhibitor-Verbrauch durch kovalente Bindung an das Enzym, eine allgemeine sinkende Substrat-Konzentration aufgrund des Umsatzes oder eine Änderung der Reaktionsrate werden hier vernachlässigt.

$$(P) = \frac{v}{k_{\text{obs}}} (1 - e^{-k_{\text{obs}}t}) \quad (1)$$

(P): Produktkonzentration;  $v$ : apparente Geschwindigkeit der Produktbildung;  $k_{\text{obs}}$ : apparente Geschwindigkeitskonstante;  $t$ : Zeit.

In der exponentiellen Gleichung (1) wird beschrieben wie die Produktbildung in Anwesenheit eines Enzym-Inaktivators zu der entsprechenden Zeit  $t$  verläuft. Die genaue Herleitung ist im Anhang veranschaulicht (vgl. Kapitel 7.4.1).

Aus der Auftragung der resultierenden Inaktivierungsgeschwindigkeit  $k_{\text{obs}}$  gegen die Inhibitorkonzentration kann je nach Reaktionsmechanismus  $k_{\text{inact}}$  sowie die apparente Inhibitionskonstante  $K_i^{\text{app}}$  bestimmt werden. Für einen zweistufigen Prozess ist dies in der folgenden hyperbolischen Gleichung (2) dargestellt:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}} (I)}{K_i^{\text{app}} + (I)} \quad (2)$$

$$K_i = \frac{K_i^{\text{app}}}{1 + \frac{(S)}{K_M}} \quad (3)$$

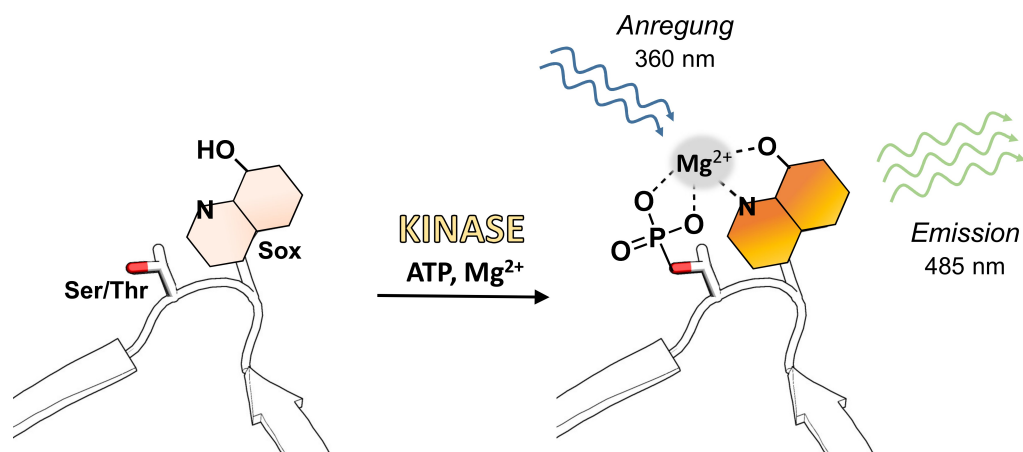
$k_{\text{obs}}$ : apparente Geschwindigkeitskonstante;  $k_{\text{inact}}$ : Geschwindigkeitskonstante der irreversiblen Modifikation; (I): Inhibitor Konzentration; (S): Substratkonzentration;  $K_M$ : Michaelis-Menten Konstante des Substrats;  $K_i^{\text{app}}$ : apparente Inhibitionskonstante.

Eine weitere Bedingung, die berücksichtigt werden sollte, damit die kinetischen Parameter mit dem vorgestellten mathematischen Modell aufgelöst werden können, ist die Situation der sogenannten *tight binding inhibition*. Diese liegt vor, wenn der apparente  $K_i$  der gesamten Enzym-Konzentration gleicht oder kleiner ist ( $K_i^{\text{app}} \leq [E]_0$ ).<sup>217</sup> Unter der Annahme, dass  $k_{\text{on}}$  durch das Diffusionslimit definiert ist ( $k_{\text{on}} \approx 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), würden theoretisch  $k_{\text{off}}$ -Werte von bis zu  $< 1 \text{ s}^{-1}$  in einstelligen nanomolaren  $K_i$ -Werten resultieren.<sup>218</sup> Potente Inhibitoren sind dementsprechend in ihrem  $K_i$ -Wert über die langsame Dissoziation definiert, weshalb sie in der Literatur als *slow dissociation inhibitors* beschrieben werden.<sup>219</sup> Um den  $K_i$  dieser Inhibitoren aufzulösen, müssten Konzentrationen eingesetzt werden, welche in vielen Fällen unterhalb der eingesetzten Menge an Enzym im Testsystem liegen und daher die Annahme entfällt, dass die freie stetig der gesamten Inhibitorkonzentration gleicht. Der Inhibitor-Verbrauch durch die Bildung des irreversiblen Adduktes würde dazu führen, dass bei kleinen Konzentrationen kein Gleichgewichtszustand mehr auf Seiten des reversiblen E•I Komplexes vorliegen kann und somit die *steady state* Modelle nicht mehr greifen.<sup>220</sup>

Die Auswertung dieser irreversiblen Bindungskinetiken mit dem vorgestellten mathematischen Modell ist somit an viele Bedingungen geknüpft und führt zu falschen Ergebnissen sobald von Ihnen abgewichen wird. Bereits KITZ & WILSON beschrieben, dass die Lösung dieser Szenarien nur mit numerischen Methoden möglich sei, d.h. anhand von Differentialgleichungen und ausreichend Rechenleistung.<sup>215</sup> Aufgrund des heutigen technischen Fortschrittes und gut entwickelter Algorithmen können solche ODEs (*ordinary differential equations*) anhand von iterativen Lösungssystemen genutzt werden, um komplexe Kinetiken ohne simplifizierende Annahmen zu lösen.<sup>221,222</sup>

### 3.2.2.1. Etablierung des kinetischen Assaysystems

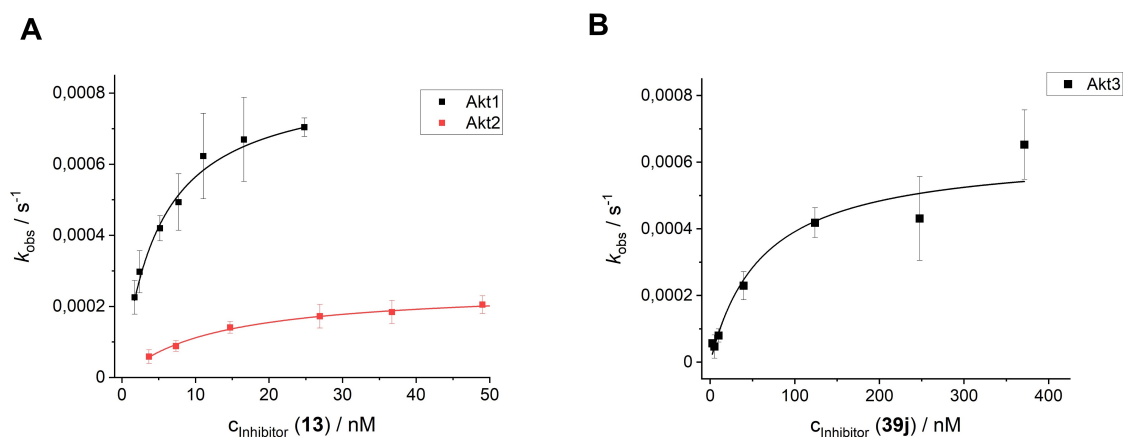
Ein geeignetes experimentelles System zur Analyse der kinetischen Parameter, welches die Inhibitoren in ihrem kovalenten Bindungsverhalten charakterisieren kann, stellt die PhosphoSens-Technologie dar.<sup>223</sup> Innerhalb dieser Methode wird die Fluoreszenz-Änderung des 8-Hydroxychinolin Derivates Sox (Sulfonamido-oxin) aufgezeichnet, dessen Emissionsspektrum sich bei Anwesenheit einer proximalen Phosphatgruppe sowie gekoppelter Chelation eines zweiwertigen Magnesium-Ions massiv in der Intensität steigert (vgl. Abb. 3.2-4). Damit kann anhand eines artifiziellen Substratpeptids für die jeweilige Kinase eine zeitaufgelöste Aktivität bzw. Modifikation verfolgt werden, welches Rückschlüsse auf eine enzymatische Inaktivierung über die Zeit erlaubt. Eine Phosphorylierung in nächster Nähe zum Fluorophor erhöht die Affinität für Mg(II)-Ionen. Die Steigerung der Intensität basiert auf dem Prinzip der *chelation-enhanced fluorescence* (ChEF), welches auf der energetischen Verschiebung bzw. Veränderung angeregter Zustände des Fluorophors beruht, die durch die Komplexbildung des Metall-Ions induziert werden.<sup>224</sup>



**Abb. 3.2-4. Schematische Darstellung des PhosphoSens Assay-Prinzips.** Das artifizielle Substratpeptid besitzt eine  $\alpha$ -Aminosäure mit dem Fluorophor Sox in der Nähe einer Serin/Threonin-Seitenkette. Durch die Zugabe von Kinase, dem Cosubstrat ATP und Magnesium-Ionen kann das Peptid an der Hydroxylfunktion der jeweiligen Aminosäure durch das Enzym mit einer Phosphatgruppe modifiziert werden. Die Komplexbildung eines Magnesium-Ions durch Fluorophor und Phosphat bewirkt wiederum eine intensivere Emission bei Anregung von Sox. Aufgrund dessen kann die Änderung der Aktivität des Enzyms spektrometrisch und zeitaufgelöst verfolgt werden.

Das System sollte im Zuge dieser Arbeit für die drei Akt Isoformen etabliert werden, um die bereits charakterisierte Substanzbibliothek hinsichtlich ihrer kinetischen Parameter zu untersuchen. Hierzu wurde zunächst eine Kinasetitration durchgeführt. Anhand dieser kann bestimmt werden bei welcher Konzentration ein lineares Signalfenster über die Zeit erreicht wird, um eine mögliche Sättigung des Produktes und somit der Fluoreszenz zu vermeiden (vgl. Anhang 7.4.2). Weiterhin wurde über eine Phospho-Standardkurve der Substrat  $K_M$  für das Peptid von jeder Proteinkinase bestimmt. Zuletzt sollte der ATP  $K_M$  der einzelnen Isoformen bestimmt werden, damit die Auswertung der apparenten Inhibitionskonstanten die tatsächliche Größe liefern kann (vgl. Gleichung (3)). Die Ergebnisse dieser initialen Etablierungsschritte sind in Kapitel 5.2.2.2 zusammengefasst.

Eine erste Anwendung des soweit etablierten Systems sollte durch die Verwendung des CAAs Borussertib (**13**) auf Akt1 und Akt2 erfolgen sowie mit Aminopyridin **39j**, als bislang potenteste Verbindung auf Akt3. Dazu wurden unterschiedliche Verdünnungsreihen verwendet, welche laut Hersteller möglichst um den zuvor bestimmten  $IC_{50}$ -Wert (HTRF) gewählt werden sollten (vgl. Abb. 3.2-5).

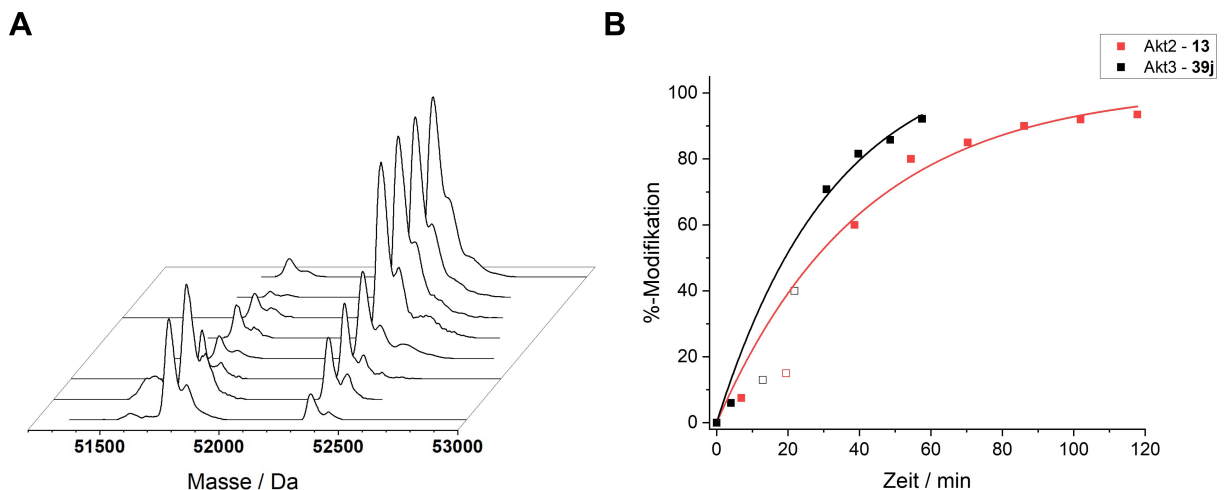


**Abb. 3.2-5: Initiale kinetische Experimente der Akt Isoformen mit selektierten CAAs.** (A) Grafische Auftragung der ermittelten  $k_{obs}$ -Werte gegen die unterschiedlichen Borussertib-Konzentrationen gemessen mit Akt1 (schwarz) oder Akt2 (rot) im zuvor etablierten PhosphoSens Assay. (B) Auftragung der  $k_{obs}$ -Werte von Akt3 unter verschiedenen Konzentrationen an CAAl **39j**. Ein hyperbolischer Verlauf der Datenpunkte ist erkennbar; der verwendete Fit entspricht Gleichung (1); Experimente mit  $n = 3$  sowie der dazugehörigen Standardabweichung.

Die initialen kinetischen Experimente lieferten konzentrationsabhängige Verläufe der beobachteten  $k_{obs}$ -Werte. Eine grafische Auftragung sowie ein hyperbolischer Fit (nach Gleichung (2)) erlaubte die Bestimmung der entsprechenden Parameter, die apparente Inhibitionskonstante  $K_i^{app}$  sowie die Geschwindigkeitskonstante der kovalenten Modifizierung  $k_{inact}$ , welche sich als Plateau oder Limit der erhaltenen Kurve abbildet. Für Borussertib (**13**) konnte auf Akt1 ein  $K_i$ -Wert von  $2 \pm 1$  nM und ein  $k_{inact}$ -Wert von  $0.037 \pm 0.005$   $min^{-1}$  bestimmt werden, welches sich deutlich zu den Daten für Akt2 unterscheidet. Dort weist der Inhibitor einen  $K_i$  von  $6 \pm 1$  nM und einen  $k_{inact}$  von  $0.015 \pm 0.002$   $min^{-1}$  auf. Dieser offensichtliche Unterschied wird ebenfalls durch die Reaktionskonstante  $k_{inact}/K_i$  deutlich, welcher für Akt1 fast 10-fach höher liegt als für Akt2 ( $308 \pm 58$   $mM^{-1}s^{-1}$  zu  $46 \pm 12$   $\mu M^{-1}s^{-1}$ ). Zur Adressierung von Akt3 wurde der kovalente Ligand **39j** genutzt, für welchen ebenfalls durch Auftragung der beobachteten  $k_{obs}$ -Werte gegen die entsprechende Inhibitor Konzentration ein hyperbolischer Verlauf verzeichnet werden konnte. Die Konzentrationsspanne ist deutlich weiter gefasst aufgrund des eher moderaten  $IC_{50}$ -wertes (170 nM) aus dem HTRF Assay. Es konnte letztlich für die Inhibitionskonstante  $K_i$  ein Wert von  $53 \pm 9$  nM, ein  $k_{inact}$  von  $0.044 \pm 0.011$   $min^{-1}$  sowie ein  $k_{inact}/K_i$  von  $10 \pm 3$   $mM^{-1}s^{-1}$  anhand des PhosphoSens Assays bestimmt werden.

Im Falle der kovalenten Adressierung der Proteinkinase Akt stellt die Klasse der CAAs die erste ihrer Art dar, um das Enzym irreversibel in dessen Aktivität zu beeinflussen. Dies erschwert einen Vergleich mit Referenz-Molekülen aus der Literatur, wie es beispielsweise für andere Kinasen gut charakterisierte Verbindungen gibt.<sup>209</sup>

Damit die Ergebnisse dieser Arbeit qualitativ validiert werden können, wurden zeitaufgelöste, massenspektrometrische (MS) Experimente mit intaktem Protein durchgeführt, welche unter gesättigten Bedingungen verlaufen sollten.<sup>225</sup> Ein deutlicher Überschuss an Inhibitor sollte dazu führen, dass die Besetzung des Proteins bei maximaler Geschwindigkeit erfolgt und somit die zu beobachtende zeitliche Modifikation des Proteins bei maximaler Geschwindigkeit erfolgt und somit die zu beobachtende zeitliche Modifikation des Proteins  $k_{\text{obs}}$  der Inaktivierungsrate  $k_{\text{inact}}$  entspricht. Dies würde ermöglichen die Halbwertszeit, also der Zeitpunkt an dem 50 % des Proteins modifiziert sind, zu bestimmen und die Werte mit den zuvor ermittelten kinetischen Parametern der drei Akt Isoformen zu vergleichen (vgl. Abb. 3.2-6).



**Abb. 3.2-6: Zeitaufgelöste, MS-basierte Experimente mit Akt2 und Akt3.** Massenspektrometrische Analyse der kovalenten Protein-Modifikation durch die ausgewählten CAAs über die Zeit und bei Anwesenheit von ATP. (A) Wasserfall-Diagramm der dekonvolvierten Massenspektren für Akt2 mit Borussertib. (B) Graphische Auftragung der prozentualen Modifikation des Proteins, bestimmt durch Integration der Peak-Flächen. Exponentieller Fit, welcher auch für den PhosphoSens Assay verwendet wurde (vgl. Gleichung (2)), liefert apparente Geschwindigkeit für die Modifizierung, Akt2-**13**:  $0.024 \text{ min}^{-1}$ ; Akt3-**39j**:  $0.030 \text{ min}^{-1}$ . Nicht-ausgefüllte Datenpunkte wurden für den Fit vernachlässigt. Das Experiment entspricht einer Einfachmessung.

Der Inhibitor wurde in 75-fachen Überschuss zum Protein eingesetzt und die Enzym-Ligand Reaktion bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  sowie einer konstanten ATP-Konzentration von  $140 \text{ }\mu\text{M}$  (Akt1) bzw.  $80 \text{ }\mu\text{M}$  (Akt3) verfolgt. Die zeitaufgelösten Massenspektren bilden einen exponentiell assoziierenden Verlauf für den Anteil an modifiziertem Protein ab. Für Akt3 mit CAAI **39j** ist eine schnellere Inaktivierung als für Akt2 mit Borussertib erkennbar. Aus der erhaltenen Auftragung sowie den Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{obs}}$ ) aus dem Fit kann letztlich die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  anhand folgender Beziehung evaluiert werden:  $t_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{inact}}$ . Akt2 ist demzufolge nach 29 Minuten zu 50 % modifiziert und Akt3 bereits nach 23 min. Der Vergleich zu den ermittelten Werten aus dem PhosphoSens Assay für die beiden Verbindungen zeigt somit Unterschiede auf. Im Falle von Akt3 und **39j** würde nach dem  $k_{\text{inact}}$ -Wert aus dem Assay die Modifikation von 50 % bereits nach 15 min erreicht sein. Die ermittelte Inaktivierungsrate von  $0.044 \pm 0.011 \text{ min}^{-1}$  liegt jedoch mit ihrer Standardabweichung noch in der Nähe der massenspektrometrisch ermittelten Rate von  $0.030 \text{ min}^{-1}$ . Für den Vergleich der Werte von Akt2 und Borussertib zeigen sich größerer Diskrepanzen, die ermittelte Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung liegt bei  $0.015 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$  und würde zu einer 50%-Modifizierung des Enzyms nach 46 Minuten führen. Daher

konnten für Akt2 die maximale Inaktivierungsrate nicht anhand dieses MS-Experiments validiert werden, unter Umständen vermag die Wiederholung der Messung zu einer weiteren Annäherung der Werte führen. Dabei ist anzumerken, dass das verwendete Proteinkonstrukt C-terminal trunziert vorliegt, wobei unter anderem das hydrophobe Motiv nicht enthalten ist im Vergleich zur kommerziellen, aktivierten Kinase, welche im PhosphoSens Assay eingesetzt wurde. Somit könnten Einflüsse auf die Ligandenbindung, beispielsweise durch aktivierende Phosphorylierungen, nicht in dem für die massenspektrometrischen Experimente genutzten Protein abgebildet sein.<sup>119</sup> Die Qualität der Massenspektren, sowie die Evaluierung der dekonvoluierten Daten eine entscheidende Rolle in der Auswertung, weshalb dortige Fehlerquellen nicht ausgeschlossen werden können. Weiterhin konnten die zeitaufgelösten Experimente nur verlässlich mit Akt2 und Akt3 durchgeführt werden, da das exprimierte Akt1-Konstrukt eine hohe Anzahl an heterogenen Phosphospezies aufwies und die Dekonvolution der minimalen Verschiebungen in den Peptidfragmenten nicht aufzulösen waren. Durch Dephosphorylierung des Proteins hätten weitere Einblicke in das kovalente Verhalten von Borussertib auf Akt1 untersucht werden können.

Die massenspektrometrischen Experimente erlaubten eine hinreichende Reproduktion der erhaltenen kinetischen Parameter aus dem PhosphoSens Assay, wodurch einerseits die Validierung der entsprechenden Kenngröße erfolgte und zeitgleich ein orthogonales System für die kinetische Vermessung von kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren erfolgreich etabliert werden konnte. Weiterhin ist anzumerken, dass der gemessene  $K_i^{\text{app}}$ -Wert für Borussertib auf Akt1 (4 nM) die Bedingung, dass die Konzentration des Inhibitors die Gesamtkonzentration des Enzyms (8 nM) nicht unterschreiten darf bricht, weshalb ein Fall von *tight binding inhibitor* vorliegt. Zur Auflösung des  $K_i$ -Wertes müssen Inhibitor-Verdünnungen unterhalb der Enzym-Konzentration eingesetzt werden, weshalb Größen wie der Liganden-Verbrauch nicht vernachlässigt werden können (vgl. 3.2.2.2). Die aufgezeichneten Daten müssten daher mit anderen mathematischen Modellen, wie den Differentialgleichungen mittels ODE-System evaluiert werden, um validere Lösungen für  $K_i$  und  $k_{\text{inact}}$  zu ermitteln. In dieser Arbeit wurden die kinetischen Parameter lediglich mit der algebraischen Lösung evaluiert und sind somit als Näherungen zu betrachten, weshalb eine zukünftige Analyse mit geeigneten Programmen wie der DynaFit-Software weitere Aufschlüsse über die Sonderfälle liefern könnte.<sup>221</sup>

### 3.2.2.2. Analyse der kovalenten Liganden

Im Folgenden sollten ausgewählte Inhibitoren hinsichtlich ihrer kinetischen Eigenschaften für die Akt Isoformen charakterisiert werden, dafür dient der in dieser Arbeit etablierte Aktivitätsassay. Einblicke in die genaue kinetische Aufschlüsselung der inhibitorischen Potenz helfen dabei die einzelnen Beiträge zur tatsächlichen Bindungsstärke zu identifizieren. Hierfür wurden jene CAAs ausgewählt, welche im HTRF Assay einen  $IC_{50}$  von <500 nM aufweisen konnten (vgl. Tab. 3.2-5).



**Tabelle 3.2-5: Kinetische Parameter ausgewählter CAAs für die Akt Isoformen.** Die Bindungskinetiken wurden mit dem zeitaufgelösten PhosphoSens Assay bestimmt. Experimente mit  $n = 3$ , sowie die zugehörigen Fehler als ( $\pm$ ) Standardabweichung; (-): nicht bestimmt.

#	Akt1			Akt2			Akt3		
	$K_i$ [nM]	$k_{inact}$ [ $10^3 \text{ min}^{-1}$ ]	$k_{inact}/K_i$ [ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$K_i$ [nM]	$k_{inact}$ [ $10^3 \text{ min}^{-1}$ ]	$k_{inact}/K_i$ [ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$K_i$ [nM]	$k_{inact}$ [ $10^3 \text{ min}^{-1}$ ]	$k_{inact}/K_i$ [ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]
<b>13</b>	$2 \pm 1$	$37 \pm 5$	$308 \pm 58$	$6 \pm 1$	$15 \pm 2$	$46 \pm 12$	$91 \pm 17$	$30 \pm 7$	$6 \pm 3$
<b>16b*</b>	-	-	-	$15 \pm 1$	$21 \pm 8$	$24 \pm 9$	-	-	-
<b>28a</b>	$6 \pm 2$	$12 \pm 3$	$38 \pm 10$	-	-	-	-	-	-
<b>39a</b>	$9 \pm 1$	$17 \pm 4$	$32 \pm 4$	$43 \pm 4$	$14 \pm 3$	$6 \pm 1$	-	-	-
<b>39b</b>	$9 \pm 2$	$14 \pm 2$	$26 \pm 2$	-	-	-	-	-	-
<b>39e</b>	$9 \pm 2$	$12 \pm 2$	$26 \pm 2$	$11 \pm 1$	$12 \pm 2$	$20 \pm 4$	-	-	-
<b>39i</b>	-	-	-	$82 \pm 22$	$21 \pm 4$	$5 \pm 2$	$47 \pm 12$	$30 \pm 9$	$11 \pm 2$
<b>39j</b>	-	-	-	$95 \pm 14$	$21 \pm 4$	$4 \pm 1$	$53 \pm 4$	$44 \pm 11$	$10 \pm 3$
<b>39n</b>	-	-	-	$40 \pm 4$	$7 \pm 2$	$3 \pm 1$	-	-	-
<b>39o</b>	-	-	-	$21 \pm 5$	$14 \pm 4$	$12 \pm 5$	$64 \pm 4$	$31 \pm 4$	$8 \pm 1$
<b>39p</b>	-	-	-	$11 \pm 2$	$16 \pm 3$	$25 \pm 6$	$29 \pm 4$	$22 \pm 2$	$13 \pm 2$
<b>42a</b>	$13 \pm 2$	$16 \pm 3$	$31 \pm 3$	$60 \pm 15$	$18 \pm 2$	$5 \pm 1$	-	-	-
<b>42b</b>	$9 \pm 2$	$15 \pm 3$	$27 \pm 3$	$15 \pm 3$	$15 \pm 3$	$17 \pm 5$	-	-	-
<b>42c</b>	$9 \pm 1$	$17 \pm 3$	$34 \pm 10$	$5 \pm 1$	$7 \pm 1$	$25 \pm 7$	-	-	-
<b>42d</b>	-	-	-	$4 \pm 1$	$6 \pm 1$	$25 \pm 5$	-	-	-
<b>42g</b>	$8 \pm 2$	$14 \pm 1$	$31 \pm 11$	$40 \pm 3$	$19 \pm 1$	$8 \pm 1$	-	-	-
<b>42m</b>	$9 \pm 3$	$14 \pm 4$	$26 \pm 1$	$11 \pm 1$	$14 \pm 2$	$23 \pm 7$	-	-	-
<b>42n</b>	$8 \pm 2$	$14 \pm 2$	$30 \pm 11$	$53 \pm 15$	$18 \pm 6$	$6 \pm 3$	-	-	-
<b>42o</b>	$6 \pm 1$	$10 \pm 2$	$32 \pm 5$	$11 \pm 2$	$10 \pm 2$	$15 \pm 1$	-	-	-
<b>46b</b>	-	-	-	$14 \pm 2$	$11 \pm 2$	$13 \pm 1$	-	-	-
<b>46c</b>	-	-	-	$13 \pm 2$	$11 \pm 1$	$15 \pm 3$	-	-	-

\*Zweifachmessung

Borussertib (**13**) wurde als einziger Inhibitor auf allen drei Isoformen mit dem PhosphoSens Assaysystem evaluiert, da dieser eine gute bis moderate Aktivität ( $IC_{50}$ : 1 nM Akt1, 12 nM Akt2, 420 nM Akt3) im vorhergehendem HTRF Assay zeigte und sich somit als ausreichend potente Kontrollverbindung eignet. Besonders für Akt1 weist dieser Inhibitor eine schnelle maximale Rate der kovalenten Modifizierung ( $k_{inact} = 0.037 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$ ) sowie eine hohe reversible Bindungsaffinität ( $K_i = 2 \pm 1 \text{ nM}$ ) auf. Weiterhin kann die inhibitorische Potenz der Verbindung durch das Verhältnis von  $k_{inact}/K_i$  ( $308 \pm 58 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) beschrieben werden, welches in einer vergleichbaren Größenordnung wie andere Literatur-bekannte, kovalente Kinase Inhibitoren liegt, was im weiteren Verlauf dieses Kapitels erörtert wird. Die reversible Bindungsaffinität des Inhibitors ist dreifach geringer für Akt2 ( $K_i = 6 \pm 1 \text{ nM}$ ), wohingegen die Bildung des binären Komplexes im Fall von Akt3 ( $K_i = 91 \pm 17 \text{ nM}$ ) deutlich höheren Konzentrationen bedarf. Analog verhält sich die Geschwindigkeitskonstante der kovalenten Bindungsbildung auf Akt2

( $k_{\text{inact}} = 0.015 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ ) und Akt3 ( $k_{\text{inact}} = 0.030 \pm 0.007 \text{ min}^{-1}$ ), wobei der Schritt der irreversiblen Modifikation für Akt3 ähnlich schnell wie für Akt1 verläuft.

Die Betrachtung der Ergebnisse der CAAs, welche sich als potent auf Akt1 erwiesen haben verdeutlicht, dass die reversible Bindungsaffinität (6 – 13 nM) sowie die maximale Rate der Inaktivierung ( $0.010 - 0.017 \text{ min}^{-1}$ ) sehr ähnlich verlaufen. Die Inhibitoren, welche mit kleinen Resten modifiziert wurden, wie Methylpyridin **39a**, Carbonsäure **42a** oder Methylanid **42c** weisen  $k_{\text{inact}}$ -Werte bis zu  $0.017 \text{ min}^{-1}$  auf, wohingegen sterisch anspruchsvollere Reste, wie Imidazol **39e** und 3-Anilinanid **42o**, geringfügig langsamere Inaktivierungsraten von  $0.0012 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$  bedingen. Das Verhältnis von  $k_{\text{inact}}/K_i$  variiert von 26 bis  $38 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , welches ebenfalls verdeutlicht wie ähnlich sich diese Moleküle hinsichtlich des Bindungsprozesses in Akt1 verhalten. Im direkten Vergleich mit Borusertib wird ersichtlich, dass die Pyridine mit kleinerem Grundgerüst deutlich an reversibler Bindungsaffinität verlieren und ebenfalls kleinere  $k_{\text{inact}}$ -Werte besitzen.

Die Ergebnisse der CAAs für Akt2 sind diverser und weisen klarere Unterschiede zwischen den einzelnen Strukturen auf, beispielsweise ist das Isobutylanid-Derivat **42d** hauptsächlich durch die hohe reversible Bindungsaffinität von  $4 \pm 1 \text{ nM}$  befähigt die Kinase effektiv zu inhibieren, wobei die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung  $k_{\text{inact}}$  bei  $0.006 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$  liegt. Ein vergleichbarer Trend ist für das Methylanid **42c** ( $K_i$ :  $5 \pm 1 \text{ nM}$ ,  $k_{\text{inact}}$   $0.007 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ ) zu beobachten. Ein interessantes Molekülpaar sind das Anilin **39n** und das Pyridin **39o**, denn die beiden Inhibitoren unterschieden sich nur am angebrachten Aromaten an 3'-Position. Das Molekül mit der freien Aminogruppe **39n** weist einen halb so großen  $k_{\text{inact}}$ -Wert auf wie das Pyridin ( $0.007 \text{ min}^{-1}$  zu  $0.014 \text{ min}^{-1}$ ) und eine ebenfalls Faktor 2 schwächere reversible Bindungsaffinität. Dieser Unterschied deutet auf eine Favorisierung der positiv polarisierten Pyridine innerhalb der allosterischen Bindetasche in Akt2 hin. Die Amid-verknüpfte Pyridin Variante von **39o**, Verbindung **42m**, erzielt eine höhere reversible Affinität ( $21 \pm 5 \text{ nM}$ ,  $11 \pm 1 \text{ nM}$ ) und weist einen ähnlichen  $k_{\text{inact}}$  von  $0.014 \text{ min}^{-1}$  auf, welches den Einfluss des Amidlinkers auf den reversiblen Bindungsprozess verdeutlichen könnte. Diese Annahme bestätigt sich weiter durch Anilin-Derivat **39n** und das amidische Analogon **42o**, dessen  $K_i$  bei  $11 \text{ nM}$  liegt und somit 3-fach potenter ist, wobei sich der Wert für die maximale Inaktivierungsrate kaum erhöht ( $0.007$  zu  $0.010 \text{ min}^{-1}$ ). Letztlich äußern sich weitere Unterschiede in der Positionierung des Stickstoffes im Pyridinring, wobei die Verschiebung zum 2-Pyridinanid **42n** einen 4-fachen Verlust an Affinität zum 3-Pyridin Derivat **42m** zur Folge hat ( $53$  zu  $11 \text{ nM}$ ). Die direkte Verknüpfung von 3-Pyridin an das Grundgerüst in Derivat **46c** verhält sich mit einem  $K_i$  von  $13 \pm 2 \text{ nM}$  ähnlich wie **42m**. Somit scheinen die genauen chemischen Eigenschaften des aromatischen Ringsystems elementar für die reversible Bindung und Stabilisation im Protein zu sein; womöglich verliert das 2-Pyridin Derivat **42n** aufgrund des *ortho*-Amids an Polarität, wodurch eine potentielle Wechselwirkung geschwächt wird.

Die Derivate mit Pyrazol-Substituenten verdeutlichen weitere Effekte in Bezug auf die Polarität und Art der Verknüpfung des kleinen Ringsystems. Das Methylpyrazol **39i** zeigt im Vergleich zur freien Base **39p** den Verlust in der Bindungsaffinität (82 zu 11 nM), wohingegen der  $k_{\text{inact}}$  des unmethylierten Aromaten geringfügig kleiner ausfällt (0.021 zu 0.016  $\text{min}^{-1}$ ). Weiter bekräftigen die Daten für das amidische Pyrazol **42g**, dass der reversible Charakter mit einem 2-fach niedrigeren  $K_i$  von  $40 \pm 3$  nM, durch den unflexibleren Linker gesteigert wird. Wie bei den Pyridin Derivaten lässt die direkte Verknüpfung des Methylpyrazols an das Grundgerüst in Verbindung **46b** ebenfalls gute Bindungsaffinitäten von  $14 \pm 2$  nM zu, wohingegen die maximale Rate der kovalenten Modifizierung auf  $0.011 \pm 0.002$   $\text{min}^{-1}$  um den Faktor 2 sinkt. In dem Verhältnis von  $k_{\text{inact}}/K_i$  wird bei den Pyrazol-Derivaten deutlich, dass die reversible Bindungsaffinität den wichtigeren Einfluss für die Potenz des Moleküls darzustellen scheint, welche bei **39p** mit  $25 \pm 6$   $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  trotz kleinerem  $k_{\text{inact}}$ -Wert im Vergleich zu den methylierten Verbindungen **39i** und **42g** am größten ist.

Die beiden Moleküle **46b** und **46c** mit direkter Modifizierung des Pyridin Grundgerüsts sind im Vergleich zu den Linker-substituierten Analoga nicht potenter und besitzen zueinander vergleichbare  $K_i$ - sowie  $k_{\text{inact}}$ -Werte. Die unflexible Verknüpfung der aromatischen Ringsysteme scheint einen positiven Einfluss auf die reversible Bindungsaffinität zu haben, vergleichbar mit den amidischen Derivaten. Durch die Rigidifizierung geht jedoch der kovalente Charakter dieser Verbindungen zum Teil verloren, was potenziell auf eine unvorteilhaftere Orientierung der elektrophilen *warheads* zu den adressierten Thiolen schließen lässt. Der beobachtete Trend sollte zur Veranschaulichung graphisch aufgetragen werden, um diese Hypothese weiter zu beleuchten (vgl. Abb. 3.2-7).

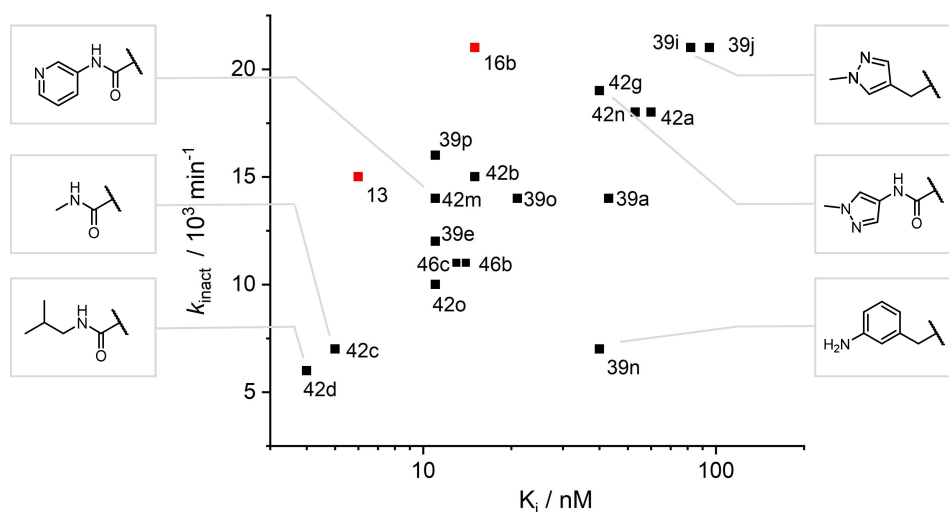


Abb. 3.2-7: Logarithmischen Auftragung der  $k_{\text{inact}}$ -Werte gegen die Affinitäten ( $K_i$ ) von Akt2.

Alkylierende Substanzen befinden sich zunehmend in dem oberen rechten Quadranten, wohingegen mehr reversibel bindende Moleküle mit höheren reversiblen Bindungscharakter unten links zu finden sind. Mittels dieser Darstellung wird das breite Spektrum der CAAs, welche Akt2 adressieren deutlich. Vor allem die beiden Alkyl-modifizierten amidischen Inhibitoren **42c** und **42d** weisen eine hohe rever-

sible Bindungsaffinität auf, wohingegen die maximale Inaktivierungsrate  $k_{\text{inact}}$  eher gering ausfällt. Einen vergleichsweise kleinen  $k_{\text{inact}}$  sowie 10-fach höheren  $K_i$  als Verbindung **42d** besitzt das Anilin **39n**. Weiter gibt es eine Reihe von CAAs, in welchen der alkylierende Charakter überwiegt, wohingegen der  $K_i$  deutlich größer ausfällt, darunter die methyl-verlinkten Derivate **39i** und **39j** sowie das amidische Methylpyrazol **42g** und Pyridin **42n**. Die Annahme, dass die flexibler substituierten Liganden tendenziell höhere Inaktivierungsraten ermöglichen, ist nicht ganz bestätigt, jedoch wird deutlich, dass die amidischen Analoga eine Verbesserung hinsichtlich der reversiblen Affinität erzielen können.

Für Akt3 wurden insgesamt fünf Verbindungen, inklusive Borussertib (**13**) bezüglich ihrer kinetischen Eigenschaften untersucht, da nur eine geringere Anzahl an CAAs hinreichende Aktivitäten im HTRF-Assay ( $\text{IC}_{50} < 500 \text{ nM}$ ) erzielten. Allgemein fallen die ermittelten Bindungsaffinitäten für Akt3 geringer aus als für die anderen beiden Isoformen, wohingegen die Größenordnung der  $k_{\text{inact}}$ -Werte moderat höher liegt. Möglicherweise ist die intrinsische Reaktivität der jeweils adressierten Cysteine in Akt2 und Akt3 unterschiedlich, weshalb der direkte Vergleich nur bedingt aussagekräftig ist. Es wurden ausschließlich Inhibitoren mit methyl-verlinkten aromatischen Resten evaluiert. Das Methylpyrazol **39i** und das freie Pyrazol **39p** besitzen minimal unterschiedliche reversible Bindungsaffinitäten; der  $K_i$  sinkt von 47 auf 29 nM, wenn die Methylgruppe entfernt wird. Zudem sinkt die Inaktivierungsrate  $k_{\text{inact}}$  von 0.030 auf  $0.022 \text{ min}^{-1}$  durch die Präsenz des freien aromatischen Amins im Pyrazol-Ring von **39p**. Die beiden CAAs **39j** und **42m** unterscheiden sich in ihren Resten anhand des *para*-Amins im substituierten Ringsystem und weisen ähnliche  $K_i$ -Werte von 53 und 64 nM auf. Die Anwesenheit des Amins im Aminopyridin von **39j** scheint jedoch einen größeren Einfluss auf die irreversible Modifikation zu haben wie der höhere  $k_{\text{inact}}$  von  $0.044 \pm 11 \text{ min}^{-1}$  im Vergleich zu  $0.031 \pm 4 \text{ min}^{-1}$  von Ligand **39o** zeigt. Ähnlich wie bei Akt2 vermag die polare Gruppe durch weitere Interaktionen mit dem Protein den Inhibitor anders zu positionieren, sodass das elektrophile Michael-Akzeptor System in optimierter räumlicher Nähe zu den adressierten Thiolen ausgerichtet ist. Ko-Kristallisationsexperimente könnten zusätzlichen Aufschluss über diese strukturellen Annahmen geben. Weiterhin ist für Akt2 sowie Akt3 nicht bekannt welche Reaktivität die Thiole in der Aktivierungsschleife besitzen, was beispielsweise mit entsprechenden Serin-Mutanten zukünftig untersucht werden könnten. Vorerst wurden Tandem-MS-Studien mit den Molekülen **39b**, **42c** in Akt1, **39p** in Akt2 und **39j** in Akt3 durchgeführt, um qualitative Einsichten in die Besetzung der Cysteine zu erhalten (vgl. Kapitel 3.2.4). Ebenfalls ist in diesem Assay zu berücksichtigen, dass das Akt1 Enzymkonstrukte mit einem GST-Tag modifiziert vorliegt und somit der Einfluss auf das Konformationsgleichgewicht von Kinase- und PH-Domäne unklar sein mag. Möglicherweise hätten die entsprechenden His-Tag modifizierten Konstrukte wie bei Akt2 und Akt3 zu anderen Ergebnissen geführt.

Bei den Aktivitäten, welche über den HTRF-Assay bestimmt wurden, handelt es sich um Endpunkt-Messungen, weshalb sich ein direkter Vergleich zu den in diesem Kapitel präsentierten Daten nicht geeignet ist.

Des Weiteren sind die  $IC_{50}$ -Werte mit einstündiger Vorinkubation von Kinase und Inhibitor durchgeführt worden, somit würden Moleküle die einen  $k_{inact}$  von  $> 0.012 \text{ min}^{-1}$  besitzen das Protein unter gesättigten Bedingungen mindestens zu 50 % irreversibel modifizieren. Die anschließende Messung einer inhibitorischen Potenz ist dann stark durch diese inaktivierte Fraktion an Enzym beeinflusst. Ein direkter Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte und den Parametern aus dem PhosphoSens-Aktivitätsassay zeigen keinen ersichtlichen Trend oder eine Korrelation, jedoch lassen sich ähnliche Rückschlüsse auf strukturelle Eigenschaften der Verbindungen ziehen, wie es zuvor für die amidischen Pyridine und Akt2 erläutert wurde. Aufgrund der eingeschränkten Vergleichbarkeit der beiden Assaysysteme könnte die Untersuchung von Verbindungen mit höheren  $IC_{50}$ -Werten aus der fokussierten Substanzbibliothek auf den Akt Isoformen weitere Aufschlüsse hinsichtlich der kinetischen Bindungsparameter liefern.

Um eine weitere qualitative Einordnung der erhaltenen maximalen Inaktivierungsraten vornehmen zu können, können die  $k_{inact}$ -Werte anderer kovalenter Inhibitoren mit den hier präsentierten Daten in Verhältnis gesetzt werden. Der Vergleich mit klinisch relevanten Kinase-Inhibitoren wie Afatinib zeigt für den EGFR Wildtyp ( $0.054 \text{ min}^{-1}$ ) eine ähnliche Größenordnung der maximalen Inaktivierungsrate wie es bei Borussertib (**13**) auf Akt1 beobachtet werden konnte ( $0.037 \text{ min}^{-1}$ ).<sup>209</sup> Für die EGFR<sup>T790M</sup>-Mutante hingegen sind die Werte um ein zwanzigfaches höher ( $0.9 \text{ min}^{-1}$ ). Ebenso konnte dieser sehr hohe  $k_{inact}$  für andere Kinase Inhibitoren wie Ibrutinib auf BTK ( $0.66 \text{ min}^{-1}$ ) beobachtet werden.<sup>226</sup> Die in dem Fall adressierten Cysteine befinden sich direkt am C-terminalen Ende der Scharnierregion der Nukleotid-Bindetasche, in welche diese Inhibitoren binden. Somit ist die nukleophile Seitenkette stark Lösungsmittel-exponiert, eingeschränkt in der Flexibilität und durch das Sekundärstrukturelemente der  $\alpha$ -Helix stabilisiert, welches einen großen Einfluss auf die kovalente Bindungsbildung haben kann.<sup>227,228</sup> Die Cysteine, welche mit den kovalent-allosterischen Inhibitoren in Akt adressiert werden, befinden sich in der Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne, einer deutlich flexibleren und dynamischeren Region des Enzyms. Letztlich ist die Umgebung der adressierten Thiol-Seitenketten entscheidend für den nukleophilen Charakter des Schwefels, da sie beispielsweise Einfluss auf den lokalen  $pK_a$  hat und somit die Bildung eine Thiolats durch benachbarte basische Aminosäuren begünstigt sein kann.<sup>229,230</sup>

Anhand der kinetischen Charakterisierung ausgewählter CAAs konnten weitere Rückschlüsse auf die Struktur-Aktivitätsbeziehung der Verbindungen für die Akt Isoformen gewonnen werden. Es wurde deutlich, dass die kovalente Modifikation nicht ausschließlicher Treiber für die potente Inhibition der Kinasen darstellt, diese Eigenschaft jedoch letztlich zur gewünschten permanenten Inaktivierung ebendieser beiträgt, was insbesondere in biologischen Systemen von Vorteil sein kann. Vor allem die reversiblen Bindungsbeiträge haben zusätzliche Erkenntnisse für die Selektivität der CAAs gegeben und lassen sich in einigen Teilen mit der SAR aus dem HTRF Assay in Einklang bringen. Es bedarf jedoch weitere Analysen, um tiefere strukturelle Einblicke in die genauen Bindungsmodi der Verbindungen zur erhalten, oder auch massenspektrometrische Experimente zu Evaluierung der kovalenten Modifikation.

### 3.2.3. Strukturanalyse Akt isoform-spezifischer Inhibitoren

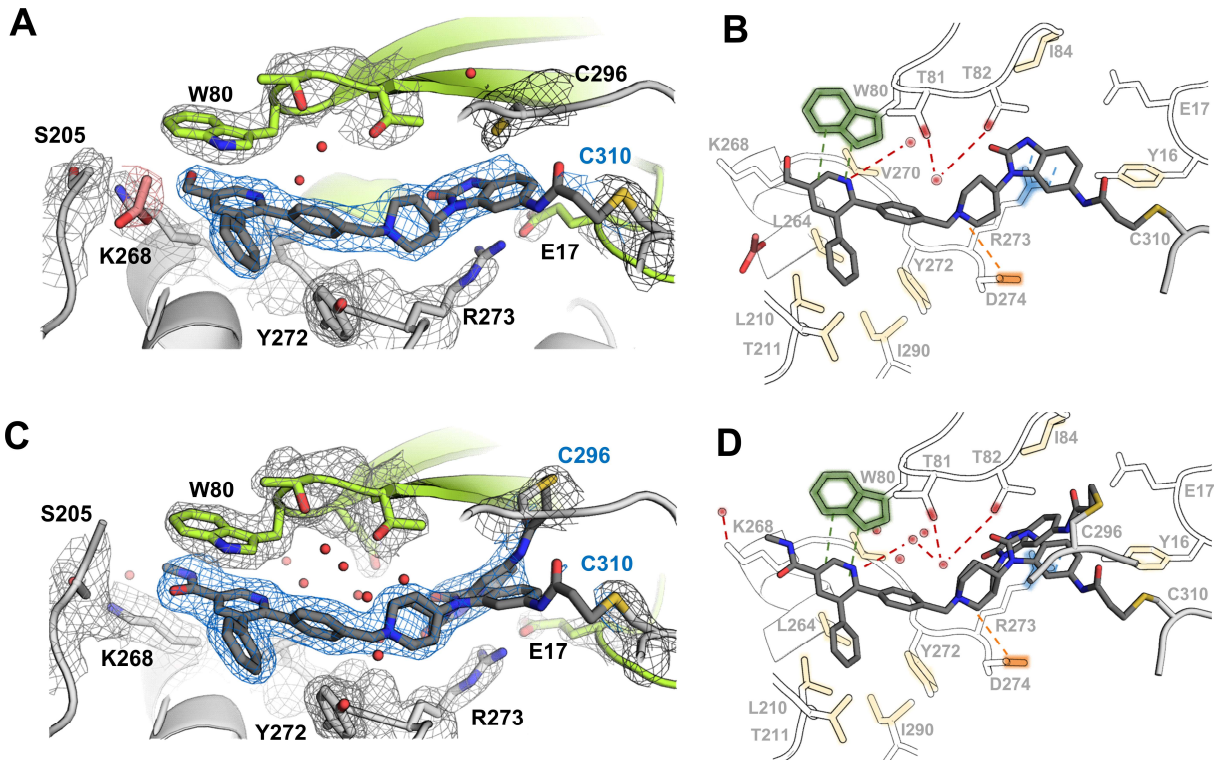
Zur weiteren Analyse der Bindungsmodi dargestellter Liganden innerhalb der adressierten allosterischen Taschen von Akt sollten Ko-Kristallisationsstudien durchgeführt werden. Diese Methode ermöglicht, dass mittels Röntgenbeugungsexperimenten an den erhaltenen kristallinen Strukturen eine Elektronendichtekarte berechnet und anschließend durch Verfahren wie das *molecular replacement* hin zu ihrem dreidimensionalen Aufbau gelöst werden kann.<sup>231</sup> Für einen erfolgreichen Verlauf solcher Unterfangen wird ein robustes Kristallisationssystem des Enzyms benötigt. Genauere Studien dazu wurden innerhalb der Dissertation von INA LANDEL durchgeführt.<sup>232</sup> Zentrale Eigenschaften des Systems sind zum einen eine ertragreiche Proteinexpression mit möglichst effizienter Reinigungsstrategie sowie die optimalen Bedingungen für das entsprechende Proteinkonstrukt, damit es in einer höchst geordneten Art und Weise Kristalle bilden kann. Sind diese Bedingungen erfüllt, ist die Anwendung des Kristallisationssystems ein essentielles Werkzeug in der Wirkstoff-Entwicklung und die Basis für strukturbasiertes Design, wie es zuvor beschrieben wurde (vgl. Kapitel 3.1.2). Die Aufklärung vorliegender Bindungsmodi von den zuvor dargestellten niedermolekularen Verbindungen in Zusammenhang mit der umgebenden Proteinstruktur kann neue Erkenntnisse über Wechselwirkungen und Veränderungen innerhalb der Bindetasche liefern, welche sich auf eine nächste Designrunde auswirken. Die gewonnenen Schnappschüsse der Interaktionen zwischen dem Liganden und der makromolekularen Struktur sind als Momentaufnahmen zu betrachten, denn der tatsächliche Bindungsprozess der beiden Interaktionspartner ist höchst dynamisch.

Aus der in dieser Arbeit dargestellten Substanzbibliothek konnten in Ko-Kristallisationsexperimenten mit einem Akt1<sup>WT</sup> Volllängenkonstrukt<sup>c</sup> zwei Komplexe erhalten und gelöst werden (vgl. Abb. 3.2-8).<sup>d</sup> Darunter das Hydroxymethylen **39b** sowie das Methylamid **42c**, welche für Akt1 gute IC<sub>50</sub>-Werte aufweisen.

---

<sup>c</sup> Konstrukt mit Aminosäure 2-446

<sup>d</sup> Etablierung, Durchführung und Auswertung der Kristallisationsexperimente durch Dr. Ina Landel (AG D. Rauh TU Dortmund)



**Abb. 3.2-8: Komplexstrukturen von Akt1<sup>WT</sup> mit dargestellten Liganden aus der Substanzbibliothek.** (A) Kristallstruktur mit Hydroxymethyl-Derivat **39b** (pdb: 7nh4, 2.3 Å).<sup>°</sup> (C) Kristallstruktur mit Methylamido-Derivat **42c** (pdb: 7nh5, 1.9 Å).<sup>°</sup> Die 2F<sub>o</sub>F<sub>c</sub>-Elektronendichte ist auf  $\sigma = 0.8$  konturiert. In den schematischen Darstellungen auf der rechten Seite (B) und (D) sind die wesentlichen Interaktionen der Liganden (grau) zu den Seitenketten des Proteins abgebildet, darunter elementare Wechselwirkungen: Wasserstoffbrückenbindungen (rot); hydrophobe Wechselwirkung (beige); elektrostatische Interaktion, Salzbrücke (orange);  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkung (grün); Kation- $\pi$  Wechselwirkung (hellblau). Die genauen Parameter der Strukturverfeinerung befinden sich im Anhang (7.5).

Die gelösten Komplexstrukturen von Akt1<sup>WT</sup> mit den beiden CAAs zeigen die Besetzung der adressierten Bindungstasche und eine damit einhergehende Stabilisierung der PH-*in* Konformation der Kinase. Weiterhin bilden alle zwei Liganden eine kovalente Bindung zu einem der adressierten Thiole aus, wobei für die Verbindung **42c** zwei Konformationen innerhalb der Struktur aufgelöst werden konnten und somit der Komplex die simultane Modifizierung beider Cysteine erstmalig abbildet. Oftmals konnte in publizierten Datensätzen die Modifikation der jeweiligen Seitenkette anhand der Orientierung des Benzimidazolons und durch entsprechende Strukturverfeinerung ermittelt werden, eine derart ausgeglichene Dichterverteilung hin zu beiden Cysteinen wurde zuvor nicht beobachtet und kann anhand einer OMIT-Map belegt werden (vgl. Anhang 7.5). Die Reaktivität der beiden adressierten Thiole wurde bislang nicht eindeutig aufgeklärt und aus den Kristallstrukturen mit Akt1 konnte die Elektronendichte der kovalenten Modifizierung meist nicht vollständig gelöst werden, welches zunächst für die unvollständige Besetzung im Kristall spricht. Ob die Modifizierung rein über strukturelle Eigenschaften gesteuert wird oder die Besetzung zufällig passiert bleibt weiterhin offen, da keine eindeutige Erklärung aus den Bindemodi der Moleküle abgeleitet werden kann.

<sup>°</sup> Teil der eingereichten Publikation QUAMBUSCH und DEPTA *et al.* (vgl. Publikationsliste), noch nicht in der PDB veröffentlicht.

Wiederkehrende Interaktionen zwischen den Liganden und dem Protein können identifiziert werden, welche zuvor für andere Strukturen von Akt1 mit dieser Klasse der Inhibitoren ebenfalls beschrieben wurden. Der Benzimidazol-Linker kann über eine Kation- $\pi$  Wechselwirkung mit Arg273 stabilisiert werden und ermöglicht so eine optimale Orientierung des Michael-Akzeptor Systems zu dem entsprechenden Thiol bzw. Thiolat. Eine weitere Stabilisierung des Cys310 adressierenden Elektrophils in der Struktur von **39b** und **42c** findet über eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Proteinerückgrat von Tyr297 statt. Weiterhin gehören zwei  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkungen zu den aromatischen Seitenketten von Tyr272 und Trp80, welche mit dem Phenylring des Pyridins sowie dem Pyridin selbst ausgebildet werden, zu bekannten Interaktionen dieser Inhibitor-Klasse. Der untere Phenylring an 3'-Position des Pyridin-Grundgerüsts bindet in eine, hauptsächlich durch Leucin-umgebende hydrophobe Kavität und stabilisiert Stapelwechselwirkung der Aryl-Systeme. Diese kleine hydrophobe Tasche wird in der aktiven Form des Enzyms (*DFG-in*) durch die aromatische Seitenkette des Phenylalanins aus dem DFG Motiv okkupiert. Die geschlossene *PH-in* Konformation des Proteins bewirkt eine strukturelle Veränderung der Aktivierungsschleife und Phe293 rotiert um 180°, wodurch sich die zuvor eingenommene Position für den aromatischen Rest des Liganden öffnet. Hydrophobe Interaktionen zu der *PH*-Domäne ist für den Benzimidazol-Linker zu Tyr16 und Ile83 erkennbar. Das Pyridin-Grundgerüst befindet sich in direkter Nähe zu weiteren aliphatischen Seitenketten wie Leu265 und Val270. Ebenfalls kann eine wichtige elektrostatische Wechselwirkung vom physiologisch protonierten, tertiären Amin des Piperidin-Rings zu Glu274 der katalytischen Schleife in den Strukturen beobachtet werden. Diese Salzbrücke ist eine konservierte Interaktion dieser Ligandenklasse und wurde ebenfalls in anderen Inhibitoren als essentiell beschrieben, wie beispielsweise in dem klinisch-relevanten Wirkstoff Miransertib (**11**), dass durch ein primäres Amin diese Wechselwirkung erheblich verstärkt.<sup>147</sup> Der Stickstoff des aromatischen Pyridin-Ringsystems der Moleküle geht eine Wasser-vermittelte Wasserstoffbrückenbindung zu den polaren Seitenketten Asn54 und Gln79 aus der *PH*-Domäne ein. Ebenso sind Thr81 und Thr82 der *PH*-Domäne an dem Netzwerk von Wassermolekülen beteiligt und stabilisieren den Liganden in seiner Position. Innerhalb des Komplexes mit **39b** können weniger dieser polaren Interaktionen aufgrund fehlender Wassermoleküle beobachtet werden, welches auf die niedrigere Auflösung von 2.3 Å des Datensatzes zurückzuführen ist und somit innerhalb der Strukturverfeinerung geringfügigere oder keine Dichte für die kleinen Solvatmoleküle berechnet werden konnte.

Direkte strukturelle Unterschiede in den Seitenketten der Bindetasche-bildenden Aminosäuren konnte im Vergleich der drei Strukturen nicht verzeichnet werden. Einen Einfluss auf das sehr flexible C-terminale Ende der  $\alpha$ C-Helix ist ebenfalls nicht ersichtlich. In dem Komplex von Akt1 mit **39b** konnte zwischen dem Liganden und ebendiesem Ende der  $\alpha$ C-Helix ein Acetat-Ion aufgelöst werden, welches die Entfernung dieses Strukturelementes zum Inhibitor etwas erhöht und die erwähnte Flexibilität dieses Bereiches verdeutlicht. Ein Vergleich zwischen den beiden 5'-Substituenten der Pyridine **39b** und **42c** vermag erste Rückschlüsse auf den Einfluss des gewählten Linkers und der einhergehenden Orientierung möglicher größerer Substituenten zu schließen.



Das Amid und die zusätzliche Carbonylgruppe, im Vergleich zum Methyllinker von **39b** verhilft zu einer größeren Entfernung des Restes in Bezug auf das Pyridin-Grundgerüst, wohingegen das Hydroxymethyl ein höheres Maß an Flexibilität in direkter Nähe des Aromaten besitzt.

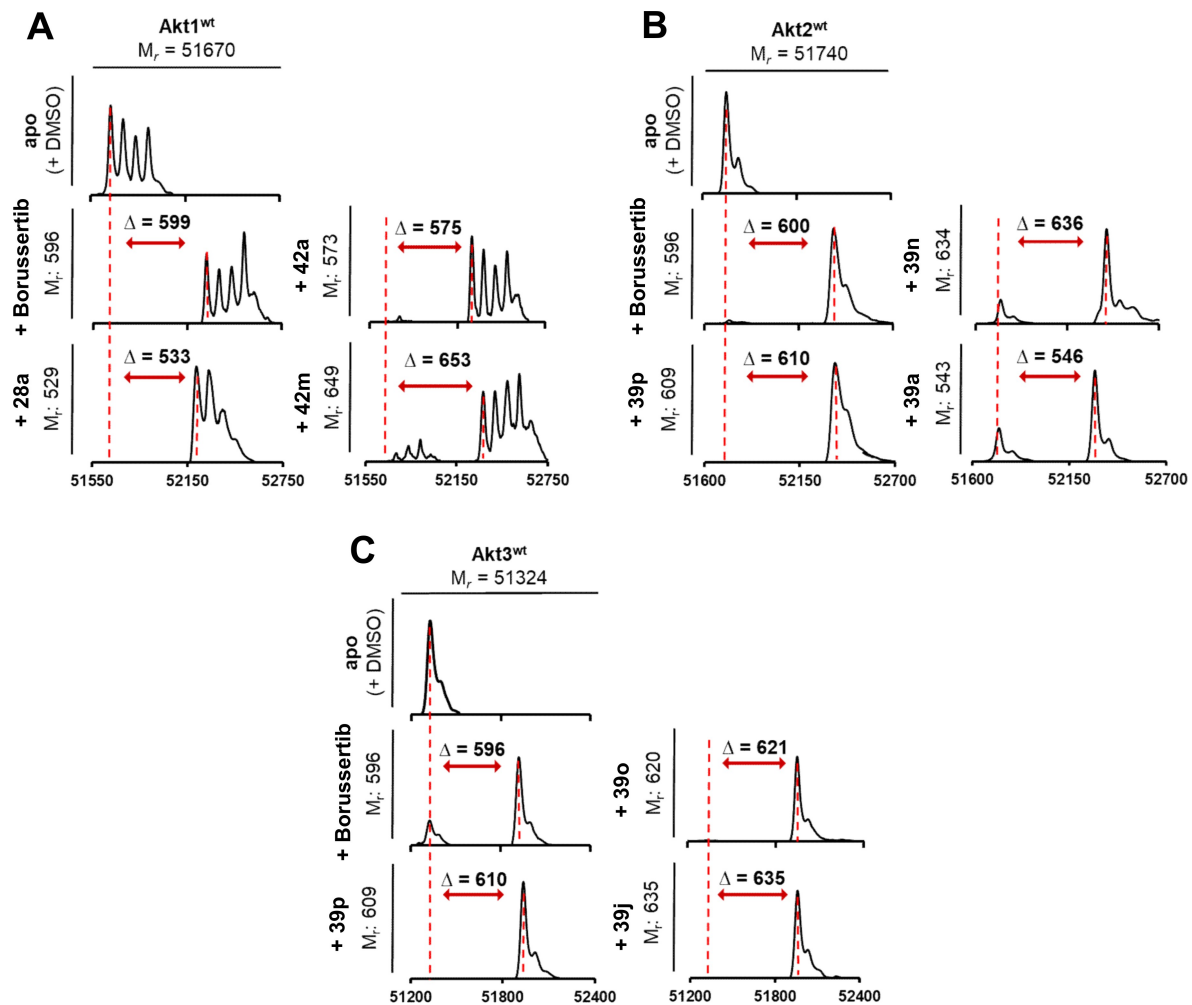
Weitere wichtige Beiträge zur Entwicklung isoform-selektiver CAAs würden Kristallisationsexperimente mit Akt2 und Akt3 liefern. Einblicke aus diesen Studien könnten weitere Annahmen aus dem Design sowie die Rückschlüsse aus den Homologiemodellen verifizieren oder widerlegen. Die beobachteten Struktur-Aktivitätsbeziehungen der niedermolekularen Verbindungen könnten ebenso durch Ko-Kristallstrukturen validiert werden. An der Etablierung eines robusten Kristallisationssystems für Akt2<sup>WT</sup> und Akt3<sup>WT</sup> wird zurzeit mit Hochdruck gearbeitet, konnte jedoch bis zum Abschluss dieser Arbeit noch nicht erfolgreich umgesetzt werden.<sup>f</sup> Ein Gelingen dieses Vorhabens wäre, zusammen mit der hier präsentierten SAR, der Grundstein für eine neue Generation an isoform-selektiven CAAs.

### 3.2.4. Massenspektrometrische Evaluation

Die kovalente Bindungsbildung des Elektrophil-modifizierten Liganden zur makromolekularen Zielstruktur kann mittels massenspektrometrischer Analyse untersucht werden. Der Einsatz dieser Methodik erlaubt nicht nur die qualitative Bestimmung einer Massenverschiebung, sondern ermöglicht weiterhin die Untersuchung und Identifizierung der modifizierten nukleophilen Seitenkette des Proteins. Unter Verwendung von Standard-Analyten kann die Methodik ebenfalls quantitative Einblicke in die Modifizierung gewähren, darauf wurde in dieser Arbeit verzichtet und zunächst nur die Ausbildung des kovalenten Komplexes untersucht.<sup>233</sup> Eine Analyse mit der MS-Technik liefert orthogonale Beweise für die globale Modifizierung des Proteins, in welcher beispielsweise eine mehrfache Besetzung nachgewiesen werden kann, sollte es zur unspezifischen Bindung der elektrophilen tragenden Liganden kommen. Ausgewählte Moleküle mit sehr guten, bis moderaten Aktivitäten für die jeweilige Akt Isoformen wurden mittels Massenspektrometrie hinsichtlich einer kovalenten Modifizierung der Proteine untersucht (vgl. Abb. 3.2-9). Weitere Spektren mit weniger potenten Inhibitoren befinden sich im Anhang (vgl. 7.6.1).

---

<sup>f</sup> Aktuelle Studien von M.Sc. Laura Depta (AG Rauh TU Dortmund)



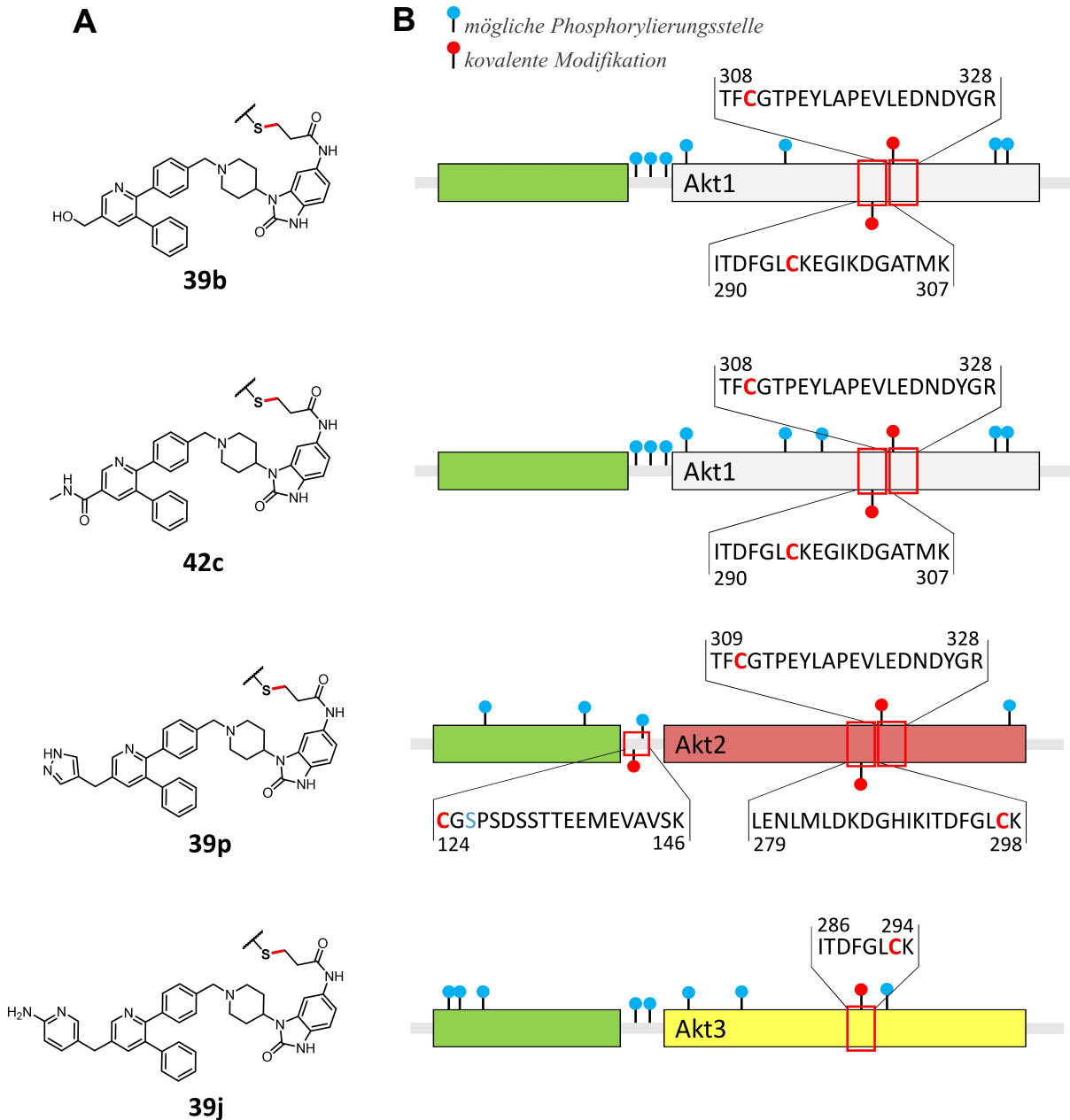
**Abb. 3.2-9: Massenspektrometrische Analyse der Akt Isoformen mit ausgewählten CAAs.** Dekonvulierte Massen Spektren von Akt1<sup>WT</sup> (A), Akt2<sup>WT</sup> (B) und Akt3<sup>WT</sup> (C) nach Inkubation mit DMSO (apo) und ausgewählter kovalent-allosterischer Inhibitoren. Alle getesteten Verbindungen zeigen eine Massenverschiebung hin zu der einfach modifizierten Protein-Spezies, welches mit der Aktivität der jeweiligen Inhibitoren für die entsprechenden Isoform einhergeht. Die Spektren wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgezeichnet.

Die dekonvulierten Spektren der Akt Isoform zusammen mit dem jeweiligen Inhibitor zeigen bei drei- bis fünffachem Überschuss die mono-Alkylierung des Proteins. Die Besetzung ist in vielen Fällen nach der gewählten Inkubationszeit von bis zu 2 Stunden bei 4 °C nicht zu 100 % vollzogen. Aufgrund der sehr heterogenen Phosphorylierungen in dem verwendeten Akt1 Konstrukt erwies sich die Auswertung der Massenspektren bzw. die Dekonvolvierung der Peptidfragmente dieser Isoform als herausfordernd. Die Aktivität der jeweiligen Inhibitoren lässt sich auf das Maß der Modifizierung der Proteine übertragen, denn CAAs mit moderaten IC<sub>50</sub>-Werten weisen eine geringere Alkylierung der Zielstruktur auf. Beispielsweise zeigt Borussertib keine volle Besetzung von Akt3 nach 2 Stunden. In vielen Fällen korrelieren die zuvor bestimmten kinetischen Parameter, wie die maximale Inaktivierungsrate ebenfalls mit den Einsichten aus den MS-Experimenten. Besonders die Verbindung **39n**, für welche ein geringer  $k_{\text{inact}}$  (0.007 min<sup>-1</sup>) bestimmt werden konnte, weist eine kleine modifizierte Fraktion des Proteins nach 2 Stunden Inkubation auf, wohingegen geringe Mengen an apo-Protein in der Probe verblieb. Im Gegensatz dazu, konnten die Inhibitoren mit höheren  $k_{\text{inact}}$ -Werten, wie Borussertib (**13**) auf Akt1 sowie **39p** auf

Akt2 eine vollständige Besetzung des entsprechenden Enzyms bewirken. Proben mit geringerer Modifizierung könnten anhand von längerer Inkubationszeit sowie höherer Temperatur zu einer vollständigeren Besetzung optimiert werden. Weitere Parameter wie der eingesetzte pH könnten ebenso zu einer gesteigerten Modifikation des Proteins führen, da beispielsweise die Umgebung der adressierten Thiole durch das Lösemittel beeinflusst wird, könnte in basischerem Milieu eine Deprotonierung letztlich die Nukleophilie des elektronenreichen Schwefels erhöhen.<sup>230</sup> Weiterhin spielt der Einsatz des Reduktionsagens DTT (Dithiothreitol) eine wichtige Rolle, es konnte beobachtet werden, dass Proben mit 1 mM DTT vor allem mit Akt2 eine deutlich geringere Modifizierung aufwiesen als bei der Verwendung von 5 mM DTT. Mögliche Gründe für dieses Verhalten mag die Ausbildung intramolekularer Disulfid-Brücken sein, die entweder zwischen den beiden adressierten Cysteinen 297 und 311 vorliegen kann oder auch zu Cys124 des flexibleren Linkers von Akt2. Letzteres wurde als Redox-Sensor für die Akt2 Reaktivität in einigen Zellen beschrieben, möglicherweise stabilisiert diese intramolekulare Bindung eine inaktive Form der Kinase und im Falle der kovalenten Inhibitoren könnte eine kovalente Bindungsbildung zu Cys297/311 erschwert sein.<sup>80</sup> Diese Annahme gilt es in zukünftigen Studien zu untersuchen, beispielsweise könnte die *in vitro* Aktivität von Akt2 unter variierendem Einsatz der Reduktionsagenzien weiteren Aufschluss geben.

Zur Evaluation der exakten Alkylierungsstelle wird die Tandem-MS/MS Methode genutzt, in welcher durch proteolytischen Verdau entstandene Peptidfragmente untersucht und identifiziert werden können.<sup>234</sup> Die Gewinnung und anschließende Analyse dieser Fragmente ist sehr zeitintensiv, weshalb sie im Rahmen dieser Arbeit nur mit ausgewählten CAAs durchgeführt wurde. Es wurden **39b** und **42c** mit Akt1, **39p** mit Akt2 sowie **39j** mit Akt3 mit dieser sensitiven proteomischen Methode evaluiert (vgl. Abb. 3.2-10). Annotierte Spektren befinden sich im Anhang (vgl. 7.6.2).

Aus der Tandem-MS/MS Analyse wird ersichtlich, dass jede Akt Isoform durch die entsprechenden Inhibitoren kovalent an den adressierten Cysteinen modifiziert wird. Dabei alkylieren **39b**, **42c** und **39p** jeweils eines der beiden Thiole der Aktivierungsschleife. In Akt3 wiederum wurde nur Cys293 von **39j** kovalent modifiziert. In Akt2 kann eine dritte, durch die elektrophil-tragende Verbindung, modifiziertes Fragment beobachtet werden, dabei handelt es sich um das Linker Cys124. Wie zuvor erwähnt, weist diese nukleophile Seitenkette eine erhöhte Reaktivität in Zellen auf und könnte hier eine unspezifische Bindung darstellen, welche aufgrund des Inhibitor-Überschusses und der Inkubation bei Raumtemperatur während der Probenvorbereitung begünstigt sein kann. In den massenspektrometrischen Untersuchungen konnte in vorherigen Experimenten keine doppelte Modifizierung dieses Proteinkonstrukts beobachtet werden, weshalb ein alternativer Bindemodus, bzw. die Interaktion des Linkers mit den Thiolen der Aktivierungsschleife nicht ausgeschlossen werden kann und weiterer Aufklärung bedarf.



**Abb. 3.2-10: Schematische Darstellung der proteomischen Tandem-MS/MS Analyse der Akt Isoformen mit ausgewählten CAAs.** (A) Strukturen der kovalenten Inhibitoren, welche Thiol-Seitenketten der Akt Isoformen adressieren. (B) Übersicht der identifizierten Modifikationen der jeweiligen Akt Isoform. Die MS/MS-Analyse lieferte mögliche Phosphorylierungsstellen (blau) der Enzyme sowie die Peptidfragmente, welche durch die Inhibitoren an den Cysteinen alkyliert wurden (rot). Annotierte Spektren befinden sich im Anhang (vgl. 7.6.2).

Zusätzlich konnten andere Modifizierungen von Aminosäure-Seitenketten, wie diverse Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, welche durch die Expression in Insektenzellen unspezifisch an das Protein geknüpft wurden. Besonders für Akt1 konnte eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen detektiert werden, die bereits in den klassischen Massenspektren dieses Proteinkonstrukts beobachtet wurden (vgl. Abb. 3.2-9). Analog dazu, kann die Mischung aus un- oder einfach phosphorylierter Spezies in Akt2 und Akt3 auf eine geringere Anzahl an identifizierten Phosphorylierungsstellen zurückgeführt werden. Der Einfluss dieser verschiedenen Spezies auf die Bindungseigenschaften der CAAs wurde nicht weiter untersucht, möglicherweise könnte eine spezifische Form der Phosphorylierung die

Interaktion der allosterischen Inhibitoren begünstigen oder hindern.<sup>119</sup> Eine Trennung der jeweiligen Spezies müsste weiterhin so spezifisch funktionieren, dass homogene Fraktionen erhalten werden können, in welchen nur genau eine Modifikation an der gleichen Stelle vorliegt. In zeitaufgelösten massenspektrometrischen Studien (vgl. Kapitel 3.2.2.1) wäre es möglich solche Unterschiede und den Einfluss auf die maximale Inaktivierungsrate der Inhibitoren zu evaluieren. Die genutzte Methode lässt keine Rückschlüsse auf die genaue Besetzungsverteilung der kovalenten Modifikationen zu, daher ist in den Fällen, in welchen beide Thiole als modifiziert beobachtet werden konnten, das Verhältnis nicht auflösbar.<sup>234</sup> Aufgrund der hohen Komplexität des Peptidgemisches können mit der Auswertung nur Wahrscheinlichkeiten ermittelt werden, welche die relative Modifizierung der adressierten Seitenketten widerspiegelt. Die Reaktivität der einzelnen adressierten Cysteine müssten ebenfalls in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Somit ist nicht eindeutig festzuhalten, ob beispielsweise **39j** aus intrinsisch strukturellen Gründen nur Cys293 modifizieren konnte, weil die Verbindung durch eine mögliche Präorientierung sich in unmittelbarer Nähe des Thiols befindet, oder ob dies mit der Reaktivität der adressierten Cysteine zusammenhängt. Eine Möglichkeit zur Auflösung dieser Fragestellung wäre der Einsatz von genetisch veränderten Enzymen, welche jeweils ein Serin anstatt des Cysteins tragen, und anschließend die aktivierten Formen in kinetischen Experimenten mit den CAAs zu evaluieren.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mittels der massenspektrometrischen Analyse ein orthogonaler Beweis für die kovalente Modifikation der Akt Isoformen durch die CAAs beobachtet werden konnte. Es bedarf weiterer Analysemethoden, um genau Rückschlüsse über die Verteilung der adressierten Aktivierungsschleifen-Cysteine sowie deren Reaktivität in den Akt Isoformen zu erhalten. Ebenso wirft die Alkylierung von Cys124 des Linkers in Akt2 durch **39p** neue Fragen hinsichtlich der Rolle und intramolekularer Orientierung dieses Strukturelementes auf. Diese strukturell-dynamischen Problemstellungen könnten über NMR-Bindungsstudien oder mit dem Einsatz von EPR-Sensoren detaillierter untersucht werden.<sup>235-238</sup>

### 3.3. Zelluläre Charakterisierung der selektiven Inhibitoren

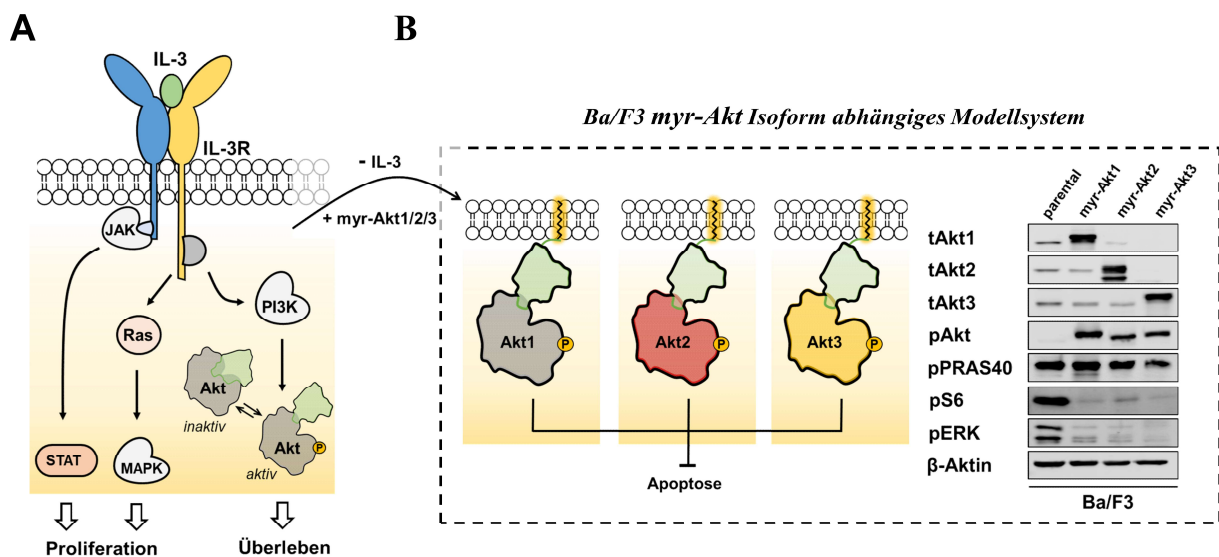
Die Translation von identifizierten Selektivitätsprofilen in zelluläre Systeme ist eine Herausforderung in den pharmazeutischen Wissenschaften.<sup>45,239,240</sup> Viele Faktoren nehmen Einfluss auf die Zusammensetzung der komplexen Systeme, darunter spielen gewebsspezifische Expressionslevel oder auch die Lokalisierung in den zellulären Kompartimenten eine große Rolle. Die somit einzigartige Ausstattung der jeweiligen Zelle erschwert die Vergleichbarkeit und Evaluierung von isoform-spezifischen Inhibitoren.<sup>241</sup> Direkte Bindungvalidierung mittels Western Blot Experimenten oder anderen Methoden beeinträchtigt ebenfalls einen Hochdurchsatz an zu charakterisierenden Liganden. Die Verwendung von Modellsystem könnte dabei helfen den Durchsatz zu steigern und zeitgleich eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen. Daraus resultierende Ergebnisse wiederum erleichtern Liganden mit vielversprechenden Merkmalen und Eigenschaften zu präselektieren, bevor weitere tieferegehende Studien in nativen zellulären Systemen durchgeführt werden.

Mit den Pyrazinonen **15a** und **16b** konnten erste Selektivitäten in genetisch-modifizierten *knock-out* Modellen übersetzt werden, dort zeigte sich eine konzentrationsabhängige Effektivität sowie die tatsächliche Inhibierung der jeweils adressierten Akt Isoform.<sup>159</sup> Jedoch konnte die verwendete Krebszelllinie nicht genutzt werden, um beispielsweise weitere Aufschlüsse über die anti-proliferative Aktivität der Inhibitoren zu liefern, da die Sensitivität gegenüber Akt-Inhibition zu gering ist und andere proliferative Signalwege überwiegen. Somit bedarf die weitere Analyse der hier präsentierten Substanzbibliothek ein System, welches die Evaluierung im Hochdurchsatz ermöglicht, um weitere Information über die zelluläre Aktivität der CAAs zu erhalten und zu prüfen, ob die Selektivitätsprofile sich in die Zellen übersetzen lassen.

#### 3.3.1. Analyse mit dem Ba/F3 Modellsystem

Ein bekanntes Modellsystem, um onkogen-abhängige Zellen darzustellen ist die murine pro-B Ba/F3-Zelllinie, welche besonders oft in der Kinase Forschung eingesetzt wird.<sup>242</sup> Abgeleitet von diesem Modell sollten Akt isoform-abhängige Zellen generiert werden, welche ermöglichen in effizienter Weise eine Vielzahl von Inhibitoren hinsichtlich ihrer Selektivität für die einzelnen Isozyme zu evaluieren. Die Proliferation sowie das Überleben dieser Zelllinie wird durch den exogenen Wachstumsfaktor Interleukin-3 (IL-3) bestimmt.<sup>243</sup> Einige Studien validierten die Rolle des Akt Signalwegs innerhalb des IL-3 vermittelten Überlebenssignals, durch die Inhibierung des intrinsischen apoptotischen Mechanismus der Ba/F3-Zellen.<sup>244,245</sup> Durch Einführung dominanter Onkogene beispielsweise über retrovirale Transduktion, kann die Abhängigkeit dieser Zellen bezüglich des Wachstumsfaktors IL-3 auf das konstitutiv eingeführte Signal der Treibermutation übertragen werden und somit eine onkogene Abhängigkeit, be-

zogen auf das eingeführte Transgen, erzeugen. Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich dieses artifizelle murine Modell hervorragend, um die Potenz verschiedener Wirkstoffvorläufer und ganzer Molekülbibliotheken im Hochdurchsatz Verfahren zu evaluieren.<sup>242</sup> Daher gehend sollte dieses System ebenfalls für die einzelnen Akt-Isoformen genutzt werden, um Selektivitäten und Effektivität der CAAs in Bezug auf die Zielstrukturen zu untersuchen. Zur Einführung der konstitutiv aktiven Varianten der Akt Isoformen in die Ba/F3-Zellen wurden die entsprechenden Protein-Konstrukte mit einer Myristoylierungs-Sequenz versehen. Die intrazelluläre Lipidierung dieses Motivs führt zu einer permanent erhöhten Membran-Assoziation, welches wiederum eine begünstigte Aktivierung durch Phosphorylierung der Akt Aktivatoren wie PDK1 ermöglicht. Die entsprechenden Ba/F3 myr-Akt<sup>WT</sup>-Zellen wurden nach der Etablierung mit Akt isoform-spezifischen Antikörpern hinsichtlich der Isoform Expressions- und Phosphorylierungsniveaus untersucht (vgl. Abb. 3.3-1).<sup>§</sup>

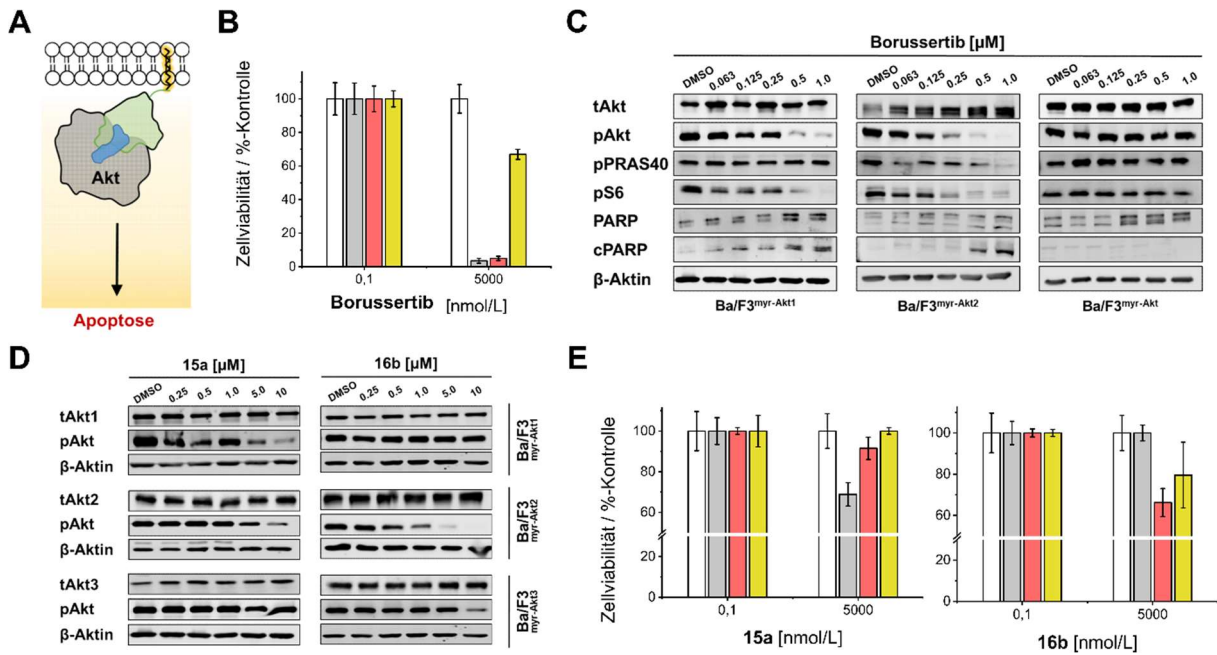


**Abb. 3.3-1: Schematische Darstellung und initiale Experimente des Ba/F3 Akt<sup>myr</sup> Isoform Zellsystems.** (A) IL-3 vermittelte Signalwege, in welchem die Kinase Akt involviert ist und durch Aktivierung das Überleben der Ba/F3-Zellen fördert. (B) Vereinfachte Darstellung der Ba/F3-myr Akt Isoform abhängige und IL-3 unabhängigen Systeme (grau: Ba/F3<sup>myr-Akt1</sup>; rot: Ba/F3<sup>myr-Akt2</sup>; gelb: Ba/F3<sup>myr-Akt3</sup>), welche aufgrund der myristoyl-bedingten Membran-Assoziation die Apoptose der Zelle hemmen. Immunoblot der neuen Zellsysteme unter Evaluation der molekularen Expressionslevel, Aktivitäten sowie Veränderungen der nachgeordneten Substrate von Akt.

Eine erhöhte Überexpression im Vergleich zur parentalen Zelle konnte beobachtet werden sowie gesteigerte Präsenz von p-Akt<sup>S473</sup> in dem jeweiligen Akt Isoform System, welches auf einen hohen Anteil an aktivierter Kinase schließen lässt. Weiterhin beeinflusst die Überexpression der aktivierten Isoformen den Zustand der untergeordneten Signalwegs-Komponenten, wie das Substrat PRAS40. Wohingegen andere Signalwege und *downstream* Mediatoren, wie Erk eine deutliche geringere Phosphorylierung im Vergleich zu den parentalen Zellen aufweisen. Diese Beobachtungen sprechen zunächst für die Abhängigkeit der Modellsysteme von den jeweiligen onkogenen myr-Akt Isoform Konstrukten.

<sup>§</sup> Experimente und Etablierung der Ba/F3-Systeme von M.Sc. Laura Depta und M.Sc. Melissa Lubeck (AG Rauh, TU Dortmund) durchgeführt.

Zur weiteren Untersuchung sollte der lumineszente Zellviabilitätsassay CellTiterGlo® (CTG, Promega, Fitchburg, WI, US) genutzt werden, um das Wachstumsverhalten der Zellen sowie die metabolische Aktivität nach Behandlung mit den Inhibitoren zu analysieren. Der Einsatz von Borussertib und Capivasertib (**6**) sollte zunächst den Einfluss der Adressierung auf den onkogen-abhängigen Signalweg veranschaulichen (vgl. Abb. 3.3-2B-C, Anhang 7.7). Borussertib zeigte eine konzentrations-abhängige Herabsetzung des Phosphosignals pAkt, sowie des nachgestellten Substrat Proteins PRAS40, wohingegen sich der orthosterische Inhibitor als weniger effektiv erwies.



**Abb. 3.3-2: Evaluation der Adressierung des Ba/F3 Akt Isoform Systems mit bekannten CAIs.** (A) Schematische Darstellung der Inaktivierung von Akt durch kovalent-allosterische Inhibitoren. (B) Das Diagramm stellt die prozentuale Zellviabilität in der Ba/F3-Systeme nach Behandlung mit entsprechender Borussertib Konzentration dar (weiß: parental, grau: Ba/F3<sup>myr-Akt1</sup>; rot: Ba/F3<sup>myr-Akt2</sup>; gelb: Ba/F3<sup>myr-Akt3</sup>). (C) Immunoblots lösten die individuelle Aktivität sowie Veränderungen der untergeordneten Proteine nach Behandlung (4 h) mit verschiedenen Borussertib-Konzentrationen (13) für die drei Modellsysteme auf und validieren einen apoptotischen Mechanismus durch c-PARP Abspaltung. (D) Western Blots lösten die individuelle Aktivität der Akt Isoformen nach Behandlung (4 h) mit verschiedenen Inhibitor Konzentrationen für die drei Modellsysteme auf. (E) Das Diagramm stellt die prozentuale Zellviabilität in der Ba/F3-Systeme nach Behandlung mit entsprechenden Konzentrationen von **15a** und **16b** dar. Experimente (B, E) wurden mit n = 3 durchgeführt und Fehlerbalken sind als Standardabweichung angegeben.

Hier konnte keine Reduzierung des aktiven Signals beobachtet werden, was möglicherweise auf den Bindemodus des ATP-Inhibitors zurückzuführen ist. Der Ligand blockiert die aktive Tasche für das Co-Substrat, hat jedoch keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt selbst, wodurch kinase-unabhängige Funktionen weiter erhalten bleiben.<sup>157</sup> Die induzierte Apoptose durch Inhibierung von Akt mit Borussertib konnte anhand der erhöhten c-PARP Level belegt werden. Der zuvor erwähnte Viabilitätsassay verdeutlicht ebenfalls eine starke Reduzierung an vitalen Ba/F3-Zellen nach Behandlung mit dem potenten CAAI. Wohingegen die Ansprechrate der myr-Akt3<sup>WT</sup>-Zelllinien signifikant geringer ausfiel als die des myr-Akt1<sup>WT</sup>- und myr-Akt2<sup>WT</sup>-Systems, welches ein erstes Indiz sein könnte für die Translation von zuvor identifizierter Selektivität.

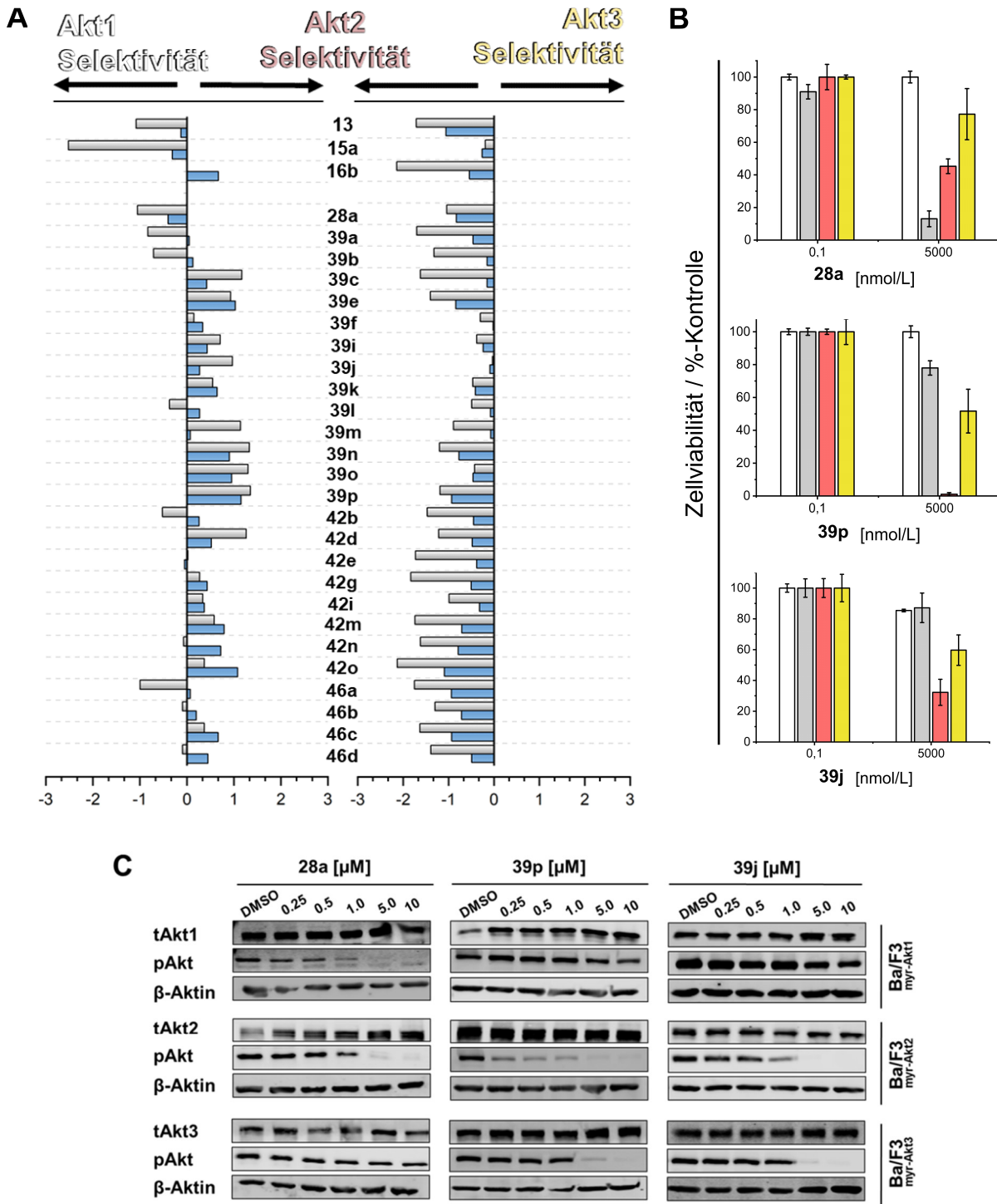


Für Borussertib konnten in biochemischen Assays moderate Aktivitäten für Akt3 ( $IC_{50} = 500 \text{ nM}$ ) im Vergleich zu Akt1 (1 nM) und Akt2 (12 nM) ermittelt werden. Eine Analyse der zuvor beschriebenen isoform-selektiven Pyrazinone **15a** und **16b** sollte die Annahme einer möglichen Übertragung von biochemischen Selektivitätsprofilen in das Modellsystem weiter validieren (vgl. Abb. 3.3-2D-E).

Die Behandlung mit den kovalenten Liganden erzielte unterschiedliche Sensitivitäten in den Ba/F3 Zellen und bestärkt die zuvor getroffene Annahme hinsichtlich der Selektivitätsprofil Übertragung. Insbesondere zeigten die beiden Inhibitoren **15a** und **16b** auf der, für sie als selektiv identifizierte, Isoform eine bessere Sensitivität im Vergleich zu den jeweilig anderen. Das Methylpyrazinon **15a** hat bei  $10 \mu\text{M}$  den größeren Effekt auf die Phosphorylierung von Akt1, wohingegen **16b** bereits bei  $5 \mu\text{M}$  eine signifikante Reduzierung des phospho-Akt2 Signals bewirkt. Trotz einer deutlich geringeren, allgemeinen Aktivität der beiden Pyrazinone im Vergleich zu Borussertib liegt eine klare Korrelation der biochemischen Daten und der beschriebenen Isoform-Selektivität vor. Somit eignet sich die etablierten Ba/F3-myr-Akt-Isoform Zellen zur Evaluierung der in dieser Arbeit dargestellten niedermolekularen Verbindungen, um die Effektivität der Inhibitoren in einem komplexeren System zu untersuchen und vorteilhafte Selektivitätsprofile zu validieren.

Damit weitere Aussagen über eine Translation der zuvor beobachteten Selektivitätsprofile der Liganden hinsichtlich der Akt Isoformen in die Zellen getroffen werden können, sollen die CTG  $EC_{50}$  Verhältnisse von Akt1/Akt2 und Akt2/Akt3 mit den entsprechenden HTRF  $IC_{50}$  Verhältnissen gegenübergestellt werden (vgl. Abb. 3.3-3, Anhang 7.7). Zusätzlich galt es ausgewählte selektive CAAs in Immunoblots detaillierter auf den Einfluss auf die Aktivität der Akt Isoformen zu evaluieren.

Die Analyse der fokussierten Substanzbibliothek mit dem Ba/F3-Modellsystem und die daraus erhaltenen Ergebnisse sind überwiegend kohärent zu den zuvor bestimmten biochemischen Daten. Generell fallen die beobachteten  $EC_{50}$ -Werte moderat aus und liegen im unteren mikromolaren Bereich. Besonders Liganden mit polaren Gruppen, wie das Carboxylsäure Derivat **42b** oder Hydroxypyridin **39b** erwiesen sich als inaktiv auf den Zelllinien, welches unter Umständen auf verminderte Zellgängigkeit zurückgeführt werden kann. Trotz geringerer halbmaximaler effektiver Konzentration ließ sich eine gute Übereinstimmung der zuvor identifizierten Selektivitätsverhältnisse feststellen. Die Ergebnisse zeigen das vor allem die CAAs **39e**, **39n** und **39p** ihr sehr prägnantes Selektivitätsprofil für Akt2<sup>myr</sup> im zellulären Kontext beibehalten und bestätigen das größere Reste an 5'-Position diese Isoform favorisiert binden. Im weiteren Einklang mit den biochemischen Ergebnissen erwiesen sich Aminopyridin **39j**, Pyridin **39o** sowie Methylpyrazol **39i** als gute Liganden für myr-Akt3<sup>WT</sup> und skizzieren die benötigte Anwesenheit eines Stickstoffatoms im eingeführten Ringsystem für den Aktivitätsgewinn. Weiterhin verdeutlichen die Ergebnisse rund um myr-Akt1<sup>WT</sup>, das ebenfalls in zellulären Kontext die Einführung größerer Reste am Pyridin Grundgerüst zum Aktivitätsverlust führt, wohingegen kleinere Modifikation wie bei Methylpyridin **39a** oder Methylester **42b** toleriert werden.



**Abb. 3.3-3: Evaluation ausgewählter Liganden der Substanzbibliothek mit dem Ba/F3 Akt Isoform System.** (A) Graphischer Vergleich der logarithmischen Selektivitätsverhältnisse von Akt1/Akt2 und Akt3/Akt2 aus den HTRF  $IC_{50}$ -Daten, sowie den CTG  $EC_{50}$  Ergebnissen.  $EC_{50}$ -Daten sowie ermittelte Quotienten befinden sich im Anhang (vgl. 7.7) (B) Das Diagramm stellt die prozentuale Zellviabilität in den Ba/F3-Systemen nach Behandlung mit entsprechenden Konzentrationen (0.1, 5000 nM) von **28a**, **39p** und **39j** dar (weiß: parental, grau: Ba/F3<sup>myr-Akt1</sup>; rot: Ba/F3<sup>myr-Akt2</sup>; gelb: Ba/F3<sup>myr-Akt3</sup>). Experimente wurden mit  $n = 3$  durchgeführt und Fehlerbalken sind als Standardabweichung angegeben. (C) Immunoblots lösten die individuelle Aktivität der Akt Isoformen nach Behandlung (4 h) mit verschiedenen Inhibitor Konzentrationen (0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 10  $\mu$ M) für die drei Modellsysteme auf.

Die Vorteile der Pyridin-basierten Substanzbibliothek werden vor allem in diesen Zellviabilitätsstudien deutlich, da die Effektivität der CAAs besser ist als die der pyrazinonsichen Inhibitoren **15a** und **16b**. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  erzielen die Pyridine **28a**, **39p** und **39j** eine signifikantere Reduzierung des Zellwachstums von mindestens 60 %, wobei das Akt2-selektive Pyrazol sogar die komplette metabolische Aktivität der Zellen eindämmt. Trotz des sehr guten biochemischen Profils der beiden CAAs **15a** für Akt1 und **16b** für Akt2 sind diese Verbindung limitiert in ihrer zellulären Effektivität, welche Problematik die Pyridine anhand anderer struktureller Eigenschaften zu lösen scheinen. Möglicherweise sind die Pyrazinone einer höheren metabolischen Modifikation durch beispielsweise CYPs in der Zelle ausgesetzt oder werden über Membranpumpen schneller wieder in den extrazellulären Raum befördert. Ein Vergleich von PK Parametern könnte diese Punkte im Detail adressieren.

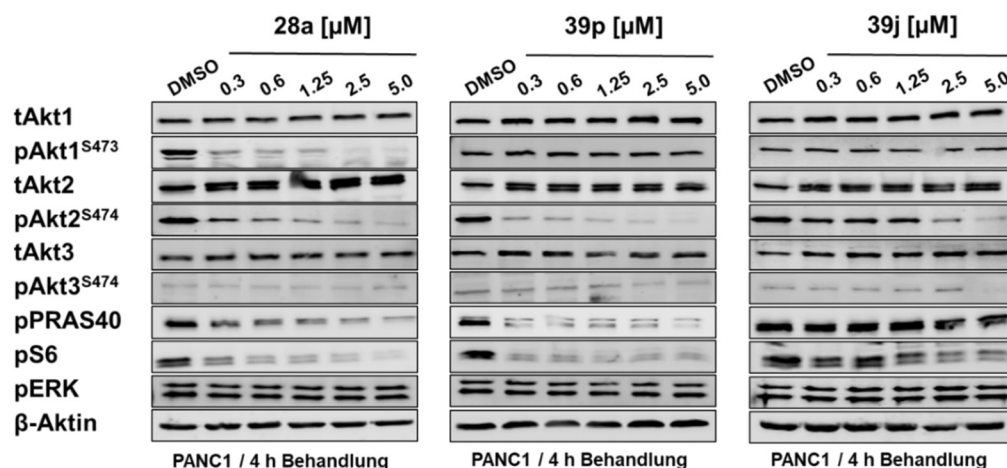
Die drei vielversprechenden CAAs **28a**, **39p** und **39j** wurden in Immunoblot Experimenten hinsichtlich ihre inhibitorischen Eigenschaften in Bezug auf die Akt Isoformen untersucht und zeigten einen konzentrations-abhängigen Verlauf in den Ba/F3-Systemen. Das unmodifizierte Pyridin **28a** erzielte eine signifikante Reduzierung der Phosphorylierung bei Akt1 und Akt2 ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und sehr geringe Effekte auf Akt3. Redundant zu den Ergebnissen der Viabilitätsanalyse besitzt Pyrazol **39p** ein starkes Inhibitionsprofil auf Akt2, wohingegen für einen Einfluss auf die Akt3 Aktivität 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt werden müssen. Das Aminopyridin **39j** zeigt in den Ba/F3-Systemen eine ähnliche Effektivität auf Akt2 und Akt3, wobei entgegen der biochemischen Daten die Experimente einen etwas stärkeren Einfluss auf Akt2 abbilden. In den CTG Daten konnte jedoch bereits eine etwas höhere Sensitivität des myr-Akt2<sup>WT</sup> gegenüber des myr-Akt3<sup>WT</sup> Systems vernommen werden, welches sich durch die Entschlüsselung der Aktivität aus den Blots bestärkt. Weiterhin ist anzumerken, dass die Konstruktion dieser artifiziellen murinen Systeme zu sehr unterschiedlich ausgestatteten Ba/F3 Zellen führen kann. Je nach vorliegendem myr-Onkogen können andere Netzwerke in der Zelle aktiv sein. Beispielsweise besitzen die Akt Isoformen eine Vielzahl nicht-redundanter Interaktionspartner, welche wiederum für diverse untergeordnete Signale verantwortlich sind. Somit sind leichte Variationen in der Sensitivität der drei Systeme denkbar und schränkt die direkte Vergleichbarkeit weiter ein.

Durch erfolgreiche Etablierung des Ba/F3myr-Akt-Isoform Systems konnte dieses im weiteren Verlauf genutzt werden, um 28 Moleküle hinsichtlich ihrer zellulären Aktivität tiefergehend zu untersuchen. Wichtig ist anzumerken, dass die Lipidierung der Proteine großen Einfluss auf das konformationelle Gleichgewicht der Kinase haben kann, beispielsweise in dem die aktive PH-out Konformation stabilisiert wird. Der Bindungsmechanismus der präsentierten CAAs nutzt ebendieses Gleichgewicht aus, weshalb die Affinität im Vergleich zum nativen Protein dezimiert sein könnte. Oder vielmehr sind aufgrund der Membranassoziiierung bestimmte Konformationen der Kinase nicht begünstigt, die jedoch den Bindungsprozess der allosterischen Inhibitoren im normalen Zustand erleichtern. Nichtsdestotrotz ließen sich die biochemischen Daten mit den EC<sub>50</sub>-Werten des Viabilitätsassays gut in Übereinstimmung

bringen. Der Einsatz des Ba/F3-Akt-Isoform Systems sollte verhelfen vorteilhafte Moleküle zu identifizieren, welchen es gelingt in komplexerer Umgebung weiterhin ihre Selektivität beizubehalten und letztlich die adressierte Isoform gezielt ausschalten. Im Einklang mit dieser Betrachtung konnten drei Moleküle ausgewählt werden, welche diesen Kriterien erfüllen und mit welchen weitere Studien durchgeführt werden sollen. Mit den potentiell selektiven Inhibitoren sollen detaillierte Einblicke in native zelluläre Systeme gewonnen werden, um die tatsächliche Effektivität auf den Akt Isoformen tiefergehend zu evaluieren. Diese Experimente würden letztlich Rückschlüsse auf den Einsatz des Ba/F3-Modellsystems als selektivitäts-auflösendes Werkzeug liefern.

### 3.3.2. Studien in Krebszelllinien

Zur umfassenderen Untersuchung der ausgewählten Inhibitoren in einer nativeren und komplexeren zellulären Umgebung sollten Immunoblot Studien mit der Bauchspeicheldrüsentumor Krebszelllinie PANC1 durchgeführt werden (vgl. Abb. 3.3-4).<sup>h</sup> Diese Zelllinie ist aufgrund diverser onkogenen Treiber sehr robust, wodurch die Effekte der Akt Inhibition ungehinderter untersucht werden können, da die Veränderung des Akt Signalweges keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat. Sensitivere Systeme könnten erschweren die *on target* Inhibierung der Isoformen gänzlich auflösen, weshalb sich die PANC1 als geeignetes Modell zur weiteren Validierung dient.



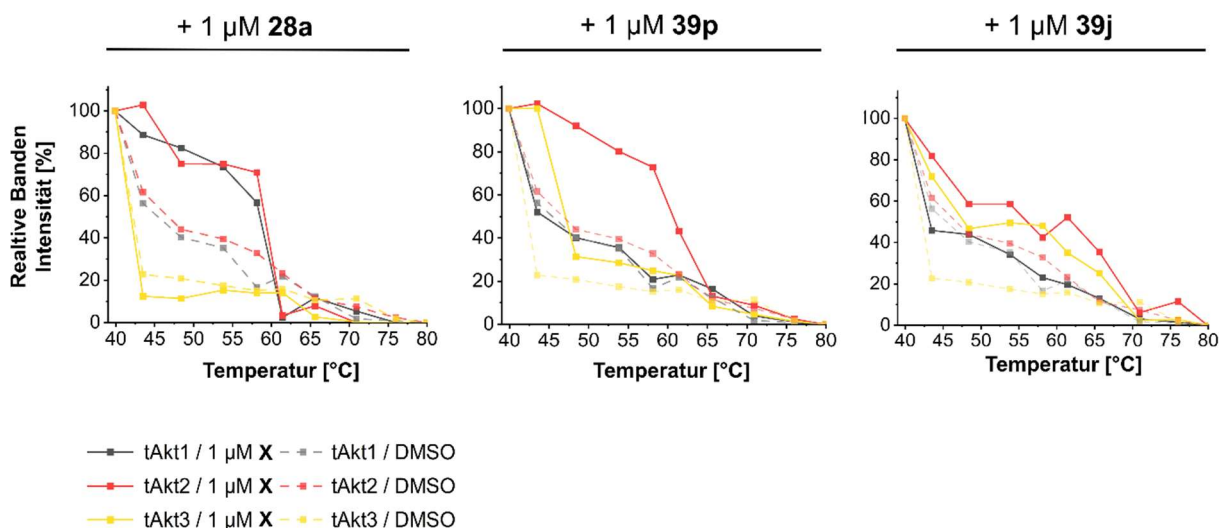
**Abb. 3.3-4: Evaluation ausgewählter CAAs mit der Krebszelllinie PANC1.** Immunoblots lösten die individuelle Aktivität der Akt Isoformen nach Behandlung (4 h) mit verschiedenen Inhibitor Konzentrationen (0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5.0 μM) in den PANC1 Zellen auf. Es wurden ebenfalls untergeordnete Proteine hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht.

<sup>h</sup> PANC1-Studien von M.Sc. Laura Depta durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

Die Behandlung der Zellen mit dem Pyridin **28a** zeigte eine Herabsetzung des p-Akt1 und p-Akt2 Signals mit steigender Konzentration an Inhibitor, welches zunächst darauf schließen lässt das die Verbindung ihre zuvor beobachtete Selektivität nicht in diesem Modell aufrechterhalten kann. Jedoch besitzen diese Zelllinie eine Akt2 Überexpression, was wiederum einen Einfluss auf die Sensitivität dieser Isoform gegenüber einer Inhibierung mit **28a** haben könnte. Bei der eingesetzten Konzentration von 300 nM an Pyridin kann ein vermeintlich drastischer Abfall der Akt2 Aktivität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle identifiziert werden, welches unter dem IC<sub>50</sub>-Wert (600 nM) der Verbindung liegt. Das tAkt2 Signal zeigt auf der Membran eine Doppelbande nach Behandlung mit Inhibitor, welches auf eine kürzere Spleiß-Variante der Kinase zurückzuführen sein könnte, in welcher das hydrophobe Motiv (AS 420 - 480) abgespalten wurde.<sup>246,247</sup> Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die isoform-spezifischen Akt2 Phospho-Antikörper, welche das Ser474 innerhalb des erwähnten Motivs binden, ebendiese verkürzte Spezies nicht auflösen können. Die tatsächliche Aktivität von Akt2 könnte somit höher liegen als auf der Membran abgebildet. Die Verwendung von Akt Isoform spezifischen Phospho-Antikörpern welche das Thr308 binden, könnten weitere Einblicke dazu liefern. Des Weiteren, kann die Inaktivierung der untergeordneten Proteine S6 und PRAS40 beobachtet werden, wobei die MAPK ERK nicht in ihrer Aktivität beeinflusst wird. Ebenfalls ist festzustellen, dass die Aktivität der Akt Substrate durch Gabe der Inhibitoren nicht vollständig ausgeschaltet werden können, welches auf diverse alternative Aktivierungs- und Signalwege zurückzuführen sein könnte.<sup>157</sup> Insgesamt sind die Aktivität und Expressionslevel von Akt3 nicht sehr ausgeprägt in dieser Zelllinie. Die Behandlung mit Pyrazol **39p** zeigt eine effiziente Runterregulierung der Akt2 Phosphorylierung sowie der nachgestellte Substrate PRAS40 und S6, wohingegen das Akt1 Signal selbst bei 5 µM nicht signifikant beeinträchtigt wurde. Für Inhibitor **39p** konnte ein IC<sub>50</sub>-Wert von 23 nM für Akt2 bestimmt werden und die geringste hier eingesetzte Konzentration liegt deutlich darüber, weshalb zur genaueren Auflösung der effektiven inhibitorischen Konzentration eine andere Verdünnungsreihe gewählt werden müsste. Ein Einfluss auf die Akt3 Aktivität dieses Inhibitors ist nicht ganz aus den Experimenten abzuleiten, da möglicherweise bereits geringe Effekte nicht von der sehr niedrigen basalen Phosphorylierung getrennt werden können. Eine Analyse mit Aminopyridin **39j** zeigte neben Akt3 ebenfalls Aktivität auf Akt2, welches bereits in den biochemischen IC<sub>50</sub>-Werten (222 nM für Akt2, 170 nM für Akt3) des Inhibitors verzeichnet werden konnte. Die Phosphorylierung von Akt1 wird durch Gabe des CAAs **39j** wiederum nicht beeinflusst. Ab einer Konzentration von 1.25 µM ist ein Effekt auf dem nachstehenden Protein S6 erkennbar, welches auf den Aktivitätsverlust von Akt2 sowie Akt3 zurückzuführen sein könnte. Aufgrund des geringen Phosphorylierungslevels von Akt3 in den PANC1 Zellen kann der exakte Einfluss auf dieses Signal nicht optimal mit Immunoblots aufgelöst werden. Für die höchste Konzentration von 5 µM wird eine signifikante Veränderung zu den anderen Akt3 Phospho-Signalen deutlich, jedoch kann ein Effekt bei geringerer Gabe des Inhibitors nicht ausgeschlossen werden.

Eine Alternative Methode zum Nachweis möglicher inhibitorischer Effekte auf zelluläres Akt3 durch die Verbindung **39j** oder den anderen beiden CAAs in den PANC1 Zellen stellt das CETSA (*cellular*

*thermal shift assay*) Experiment dar.<sup>248</sup> Dabei wird die Stabilität des Proteins bei steigender Temperatur analysiert und unter der Annahme das Ligand die Zielstruktur durch die Bindung stabilisiert, sollte eine Verschiebung des Schmelzpunktes hin zu höheren Temperaturen verzeichnet werden können. Die Identifizierung des Proteins aus dem komplexen Zellgemisch erfolgt über Antikörperbindung, für welches die sehr spezifisch-bindenden Immunglobuline (tAkt) genutzt werden. Es sollten die Akt Isoformen nach Behandlung mit den drei Inhibitoren bezüglich ihrer Temperaturstabilität evaluiert und mit einer entsprechenden DMSO Kontrolle verglichen werden (vgl. Abb. 3.3-5).<sup>i</sup>



**Abb. 3.3-5: Evaluation der selektierten Inhibitoren in CETSA-Experimenten der PANC1 Zelllinie.** Die graphische Auftragung zeigt die relative Banden Intensität in Prozent mit steigender Temperatur und bezieht sich jeweils auf die Probe bei 40 °C (vgl. Anhang 7.8). Die PANC1 Zellen wurden mit 1  $\mu\text{M}$  CAAI für 4.5 Stunden behandelt und anschließend für 3 Minuten erhitzt bevor die Lyse erfolgte. Als Vergleich diente eine DMSO-Kontrolle (gestrichelt). Akt1 (grau), Akt2 (rot), Akt3 (gelb).

Aus dem CETSA Experiment mit Pyridin **28a** wird deutlich, dass der Einfluss des Inhibitors auf Akt3 sehr gering ist, wohingegen für Akt1 und Akt2 ein vergleichbarer Effekt beobachtet werden kann. Die beiden Schmelzkurven für Akt1 und Akt2 verschieben sich hin zu einer höheren Temperatur von 60 °C im direkten Vergleich zu der DMSO-Kontrolle. Wie bereits aus der Evaluation der zellulären Aktivität hervorging vermag CAAI **28a** keine spezifische Selektivität für die beiden Isoformen in dem komplexen System zu haben. Wobei hier berücksichtigt werden sollte, dass die gewählte Konzentration bereits über den biochemisch ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werten liegt und eine Anpassung der Dosierung möglicherweise die beobachtete Selektivität in dieses System übersetzen könnte. Trotz der höheren Inhibitorkonzentration konnte für Pyrazol **39p** ein selektiver Effekt für Akt2 beobachtet werden, dort verschiebt sich der Schmelzpunkt ebenfalls zu höheren Temperaturen. Für Akt1 ist keine Stabilisierung durch die Verbindung ersichtlich, wohingegen Akt3 eine leichte Verschiebung von 5 °C aufweist. Ein ähnliches Bild kann für das Aminopyridin **39j** identifiziert werden, wobei die Stabilisierung von Akt3 eine signifikantere Veränderung in Bezug auf die DMSO-Kontrolle aufweist. Der Inhibitor erhöht ebenfalls die prozentuale Intensität der Banden von Akt2 bei steigender Temperatur, welches sich im Einklang zu der

<sup>i</sup> CETSA-Experimente von M.Sc. Laura Depta durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

beobachteten Aktivität in den PANC1 Zellen befindet. Eine Bindung von **39j** in Akt1 scheint bei der eingesetzten Konzentration nicht stattzufinden.

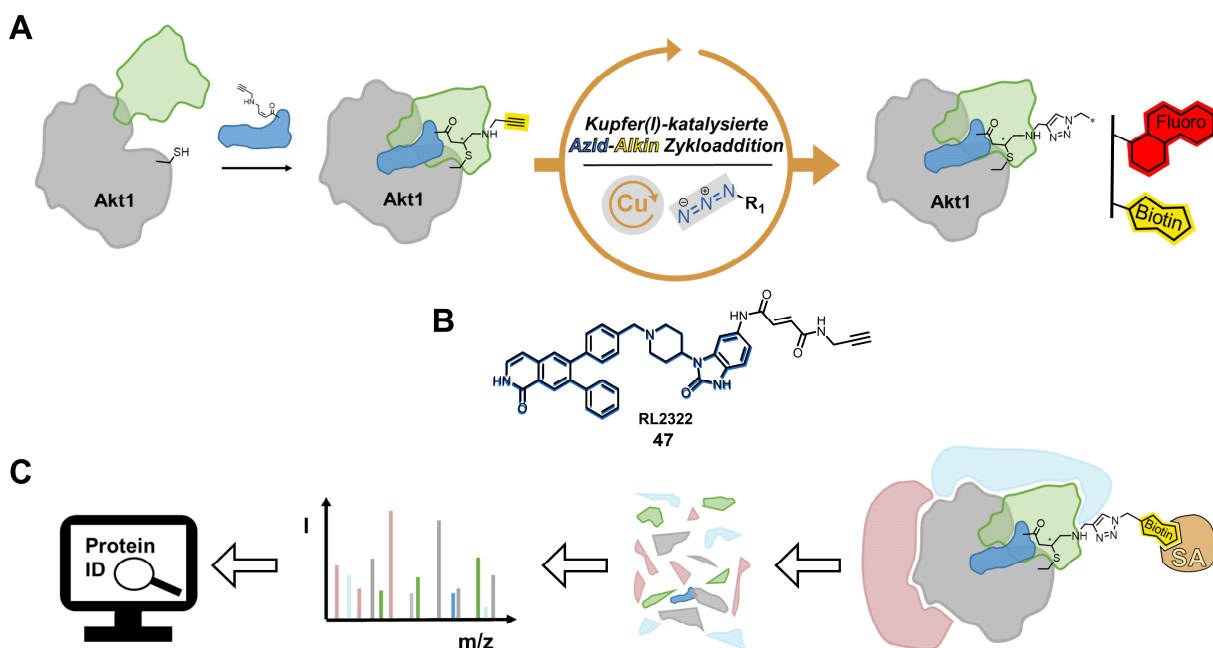
Der Einsatz dieser zellulären Methode verhalf die Selektivitätsprofile der drei CAAs bezüglich der Akt Isoformen gründlicher zu beleuchten und bestärkt die Identifizierung von **39p** als Akt2-selektiver Ligand innerhalb des deutlich komplexeren Systems. Eine weitere Optimierung der Profile von den anderen beiden Inhibitoren könnte bereits durch die Anpassung der eingesetzten Konzentrationen erreicht werden, vor allem für **28a**. Weiterhin bedarf es erneute Studien in Zelllinien, die andere Expressionslevel der Akt Isoformen vorweisen, um genauere Einflüsse der selektiven Inhibitoren untersuchen zu können. Beispielsweise vermag der leicht Akt1-selektive CAAI **28a** in Zellen mit Akt1 Überexpression ein besseres Profil aufweisen, als in der Akt2 dominierenden PANC1 Krebszelllinie.

### 3.4. Entwicklung und Einsatz funktionalisierter Sondenmoleküle

Inhibitoren, welche die optimale Selektivität für ein Enzym zeigen eignen sich nicht nur als Moleküle um gezielt die Aktivität dieser Proteine zu beeinflussen, sondern sind prädestiniert für einen Einsatz als molekulare Sonde und chemisches Werkzeug, welche letztlich eine Bandbreite an weiterführenden Experimenten erlauben.<sup>43</sup> Anhand der Einführung eines Alkin-Substituenten an Solvens-exponierter Stelle der Inhibitoren gehen meist geringe Einflüsse auf das Bindevverhalten dieser Liganden einher und ermöglicht die weitere Modifikation dieser sogenannten terminalen Reportergruppe.<sup>48,49</sup> Ausgehend von den bereits etablierten und gut charakterisierten pyrazinonischen CAAs sollten funktionalisierte Sondenmoleküle erstellt werden, welche es erlauben die Akt Isoformen selektiv zu adressieren.<sup>159</sup> Nach kovalenter Modifizierung des Enzyms soll die Reportergruppe der Sonde genutzt werden, um spezifische Tags einzuführen, je nach Eigenschaften der Markierung ermöglicht dies, gegebene Fragestellungen zu beantworten. Die niedermolekularen Verbindungen **15a** und **16b** weisen ein gutes Selektivitätsprofil für Akt1 und Akt2 auf, weshalb erste Alkin-Sonden auf Basis dieser Grundgerüste etabliert werden sollen. Die Rolle von Akt2 ist weniger in Detail untersucht und mögliche Erfolge dieser Strategie vermag einen großen Einfluss auf die Entschlüsselung von Funktionen dieser Isoform haben, weshalb die initialen Schritte mit Vorläufern des Akt2 selektiven Moleküls **16b** durchgeführt werden sollen.

In Vorarbeiten von MARIUS LINDEMANN konnte das Konzept der kovalent-allosterischen Alkin-Sonden auf dem Borussertib Grundgerüst etabliert werden.<sup>249</sup> Hier wurde das elektrophile Michael-Akzeptor System durch die symmetrische Fumaryl-Gruppe teilweise konserviert beibehalten und simultan erweitert, dass dort mittels Amidkupplung terminale Alkine eingeführt werden konnten (vgl. Abb. 3.4-1). Der angepasste *warhead* basiert auf bekannten Strukturelementen zugelassener, sehr reaktiver Therapeutika wie Tecfidera oder Vumerity.<sup>250,251</sup> Das Design der Moleküle beruht auf der löslichkeits-exponierten Position der beiden adressierten Cysteine in der Aktivierungsschleife.

Die kovalente Bindung an eines der Thiol-Seitenketten ermöglicht einen gezielten Austritt des Alkins aus der allosterischen Bindungstasche. In Folgeexperimenten konnte die Modifizierung der Alkin-Gruppe durch Kupfer-katalysierte *Click*-Chemie untersucht werden, welches die Einführung eines Fluorophors wie Cyanin3 oder von Affinitäts-Tags wie Biotin erlaubte. Anhand der eingeführten Gruppen konnte *in gel* Fluoreszenz evaluiert werden und weiter gelang eine erste Isolierung von Akt aus der Zelle über die Biotin-Streptavidin-Interaktion.<sup>48</sup> Die Affinitäts-vermittelten *pull-down* Experimente könnten im Falle von Akt2-selektiven Sonden dazu dienen direkte Bindungs- bzw. Interaktionspartner aus dem komplexen Zellgemisch zu isolieren, um sie dann über proteomische Tandem-MS/MS-Analyse und Datenbank-Vergleich zu identifizieren (vgl. Abb. 3.4-1C).<sup>234</sup>



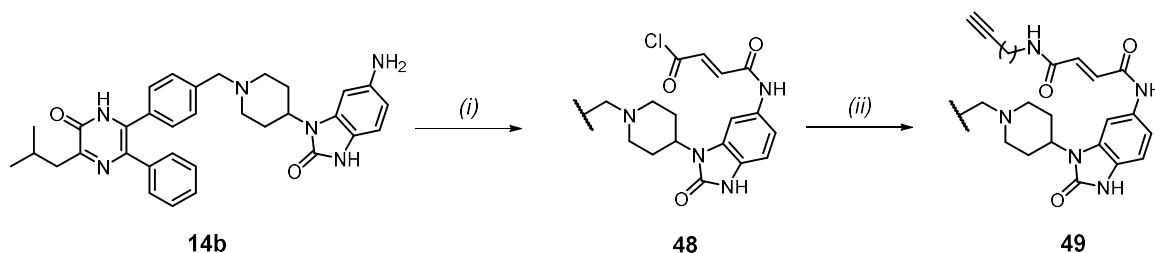
**Abb. 3.4-1: Einsatz der CAAs als Alkin-verknüpfte Sondenmoleküle.** (A) Schematische Darstellung der Modifizierung der Alkin Sondenmoleküle welche zunächst an das Protein kovalent binden, woraufhin das terminale Alkin mittels Kupfer-katalysierter Zyklisierung (CuAAC) und entsprechender Aziden funktionalisiert werden kann. Je nach Beschaffenheit der Reporter-Tags können verschiedene weiterführende Experimente vorgenommen werden, beispielsweise Visualisierung durch Fluorophore oder Affinitätstags für Pull-down Studien. (B) Struktur des auf Borussertib basierenden Sondenmoleküls **47**, welches bereits erfolgreich in Vorarbeiten für weiterführende Experimente mit Akt1 genutzt werden konnte.<sup>249</sup> (C) Mit einer Biotin-Markierung kann eine Streptavidin-vermittelte Anreicherung des Sonden-modifizierten Akt Proteins sowie potentieller Interaktionspartner erfolgen, welche nach proteolytischem Verdau mittels MS untersucht und anhand eines Datenbank-Abgleichs identifiziert werden können.

### 3.4.1. Darstellung selektiver Alkin-Sonden

Ein effizienter Aufbau der Akt Isoform-selektiven Alkin-Sonden sollte anhand bekannter Synthesestrategien erfolgen. Zur Darstellung des Pyrazinons wurde der bereits beschriebene Syntheseweg verwendet, um das anilinische Schlüsselintermediat **14b** zu erhalten.<sup>159</sup> Basierend auf dieser niedermolekularen Verbindung sollte dann das C<sub>2</sub>-symmetrische Fumaryl, analog zu den Vorarbeiten des Moleküls **47**,

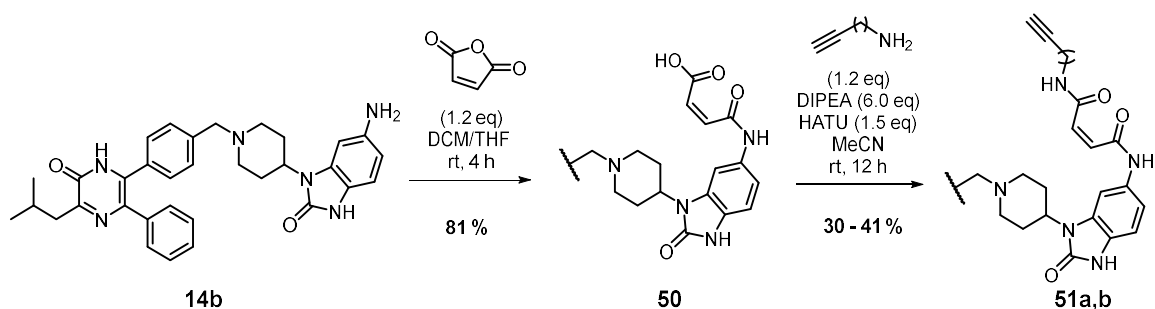


eingeführt werden. Zuletzt sollten in einem finalen Schritt entsprechende Alkine mit unterschiedlicher Linkerlänge an den Liganden geknüpft werden (vgl. Abb. 3.4-2)



**Abb. 3.4-2: Übersicht zu Darstellung Alkin-modifizierter kovalent-allosterischer Akt Sondenmoleküle.** i) Fumarylchlorid, 0 °C, ii) Amin, DIPEA, rt.

Die nukleophile Substitution an Fumarylchlorid mit Anilin **14b** verlief trotz mehrfacher Wiederholungen nicht vollständig ab und es konnten nur geringe Produktmengen massenspektrometrisch identifiziert werden. Höchstwahrscheinlich beruht der unvollständige Umsatz auf der Instabilität des reaktiven Säurechlorids sowie einer gewissen Unreaktivität des Benzimidazolone Anilins. Zusätzlich ist die Komplexität der Molekülstruktur ein weiterer Faktor, weshalb die Reaktion mit hochreaktiven Reagenzien zu Ausbeute Verlusten führen kann. In Kontrast dazu, gelang die Umsetzung mit dem Acryloylsäurechlorid für diese Aniline zuvor in soliden Ausbeuten.<sup>159</sup> Eine alternative Amidkupplung mit der analogen Fumarylsäure scheiterten ebenfalls. Aus vorigen Syntheseschritten der Benzimidazolone ist bekannt, dass die Reaktion mit Anhydriden wie beispielsweise Boc-Anhydrid zur Maskierung desamins meist mit sehr guten Ausbeuten verlaufen, weshalb die Verwendung des Maleinsäure Anhydrids als Alternative Quelle für das ungesättigte  $\gamma$ -Keton Motiv dienen sollte (vgl. Abb. 3.4-3). Ob sich die Reaktivität oder die Fähigkeit hinsichtlich einer kovalenten Bindungsbildung zu den adressierten Thiol-Seitenketten aufgrund der *Z*-Konfiguration des Allylketons ändert muss in Folgeexperimenten weiter untersucht werden.



**Abb. 3.4-3: Darstellung der Alkin Sonden 51a,b mittels Maleinsäure Anhydrid.** Das Anilin **14b** wird mit dem Anhydrid zur Säure umgesetzt, an welcher wiederum mit einer HATU vermittelten Amidkupplung die Alkine eingeführt werden.

Die nukleophile Substitution an dem zyklischen Maleinsäureanhydrid durch Anilin **14b** verlief chemoselektiv und in guter Ausbeute. Aufgrund der polaren Carbonsäure fiel das Intermediat **50** in Lösung aus und erleichterte die Isolierung der Substanz. Zu sehr geringen Teilen konnte eine doppelt modifizierte Spezies anhand von massenspektrometrischer Analyse beobachtet werden, möglicherweise ging

dies mit der leicht erhöhten Stöchiometrie einher. Im darauffolgenden Schritt konnte die zuvor eingeführte Säurefunktionalität für die HATU-vermittelte Amid Kupplung genutzt werden, wobei es gelang Propion- und Butinamin an das  $\gamma$ -Carbonyl zu knüpfen. Unabhängig von dem eingesetzten Amin und trotz hohem Überschuss der organischen Base verlief die Kondensationsreaktion in moderaten Ausbeuten, welches unter Umständen auf die elektronenreiche Beschaffenheit des Carbonyls zurückzuführen ist und daher die Bildung der Uronium-Abgangsgruppe erschwert sein könnte. Weiterhin ist die hohe Zahl an basischen Aminen der komplexen Verbindung hindernd für einen nahezu äquimolaren Einsatz des Kupplungsreagenzes. Der Einsatz von anderen Agenzien könnte die Ausbeute dieses finalen Schrittes erhöhen und die Produktbildung begünstigen.

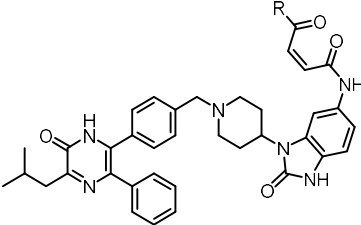


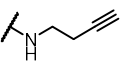
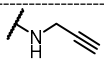
Im Zuge der gezeigten Synthesestrategie gelang die Darstellung zweier Alkin-tragender Sondenmoleküle basierend auf Ligand **16b**, für welchen zuvor ein optimales Selektivitätsprofil für Akt2 identifiziert werden konnte. Bevor eine Funktionalisierung der terminalen Alkine stattfinden kann, müssen die CAAs zunächst in ihren Eigenschaften charakterisiert werden, um beispielsweise Aktivitätsverluste, Veränderungen der Selektivitätsprofile sowie den Einfluss des *Z*-konfigurierten *warheads* abschätzen zu können.

### 3.4.2. Biochemische Charakterisierung der selektiven Sonden

Zur weiteren Evaluierung der Alkin-modifizierten Sondenmoleküle sollte zunächst die biochemische Aktivität der Inhibitoren für die einzelnen Akt Isoformen bestimmt werden. Des Weiteren galt es die Fähigkeit des veränderten Elektrophils bezüglich einer kovalenten Modifizierung der adressierten Cysteine des Proteins mittels MS Analyse zu untersuchen. Die Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration erfolgte über den zuvor beschriebenen HTRF Assay und sollte weitere Einblicke in die Selektivitätsprofile der leicht modifizierten Akt Liganden geben (vgl. Tab. 3.4-1).

Die Ergebnisse des Aktivitätsassays verdeutlichen insgesamt eher konservierte Selektivitätsprofile für die Inhibitoren **50**, **51a** und **51b**. Es lässt sich ein leichter Abfall der Aktivität dieser Verbindungen beobachten, die freie Säure **50** hat mit  $64 \pm 4$  nM einen zweifach schlechteren  $IC_{50}$ -Wert als die parentale Verbindung **16b** für Akt2, welches sich ähnlich auf die anderen beiden Isoformen übertragen lässt. Für die beiden Alkin-Derivate **51a** und **51b** scheint der Abfall in der Aktivität analog zu verlaufen, wobei für die Sonde mit längerem Linker ein geringfügig größerer Unterschied in Bezug auf Akt2 ( $103 \pm 13$  nM) beobachtet werden kann. Neben den neusynthetisierten Verbindungen wurde ebenfalls die Borussertib Sonde **47**, welche analog zu **51a** ein Propionamid trägt, auf den drei Akt Isoformen evaluiert. Im Vergleich zur parentalen Inhibitor **13** kann ein genereller zweifacher Aktivitätsverlust für die Isozyme beobachtet werden, welches im Einklang mit den Ergebnissen der Akt2-selektiven Liganden steht.

**Tab. 3.4-1: Inhibitorische Aktivität der Alkin-Sonden.** Die  $IC_{50}$ -Werte der ausgewählten Liganden wurden mit dem zuvor etablierten HTRF Assay bestimmt. Ergebnisse sind als Mittelwert mit  $n = 3$  angegeben, sowie die dazugehörigen Fehler als ( $\pm$ ) Standardabweichung.

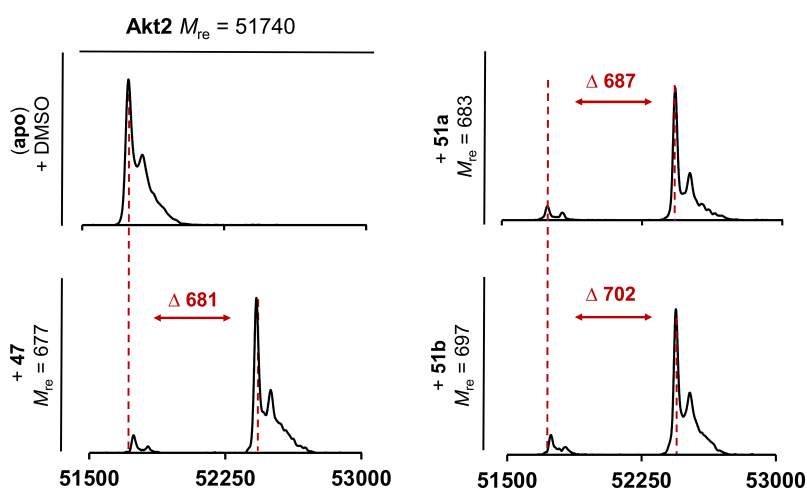
#	R	HTRF $IC_{50}$ [nM]		
		Akt1 <sup>WT</sup>	Akt2 <sup>WT</sup>	Akt3 <sup>WT</sup>
<b>16b</b>		754 $\pm$ 77	36 $\pm$ 3	12563 $\pm$ 496
<b>50</b>	RL3355 	3506 $\pm$ 561	64 $\pm$ 4	9466 $\pm$ 127
<b>51a</b>	RL3357 	3242 $\pm$ 343	72 $\pm$ 7	11398 $\pm$ 1272
<b>51b</b>	RL3358 	2061 $\pm$ 336	103 $\pm$ 13	13329 $\pm$ 772
<b>47</b>	RL2322 <i>Borussertib</i> 	2.2 $\pm$ 0.8	84 $\pm$ 43*	812 $\pm$ 120

\*Akt2<sup>GST-tag</sup> Konstrukt

Somit sind die drei Derivate trotz Einführung eines alternativen Michael-Akzeptor Systems nicht zu drastisch in ihrer inhibitorischen Eigenschaft für Akt2 beeinflusst worden und können in weiteren Experimenten als Akt2-selektive Sonden eingesetzt werden. Der direkte Einfluss dieser Veränderung ist aus den Daten nicht abzuleiten, da die polare Carboxylgruppe sowohl als auch die flexibleren Alkin-Reste möglicherweise für den Aktivitätsverlust verantwortlich sein könnten. Der Methyl ester von **50** oder ein entsprechendes Methylamid könnten weitere Einsichten diesbezüglich liefern. Letztlich würde die Analyse mit dem kinetischen PhosphoSens-Assay ebenfalls tiefere Einblicke bezüglich der maximalen Inaktivierungsrate  $k_{inact}$  dieser drei Derivate liefern. Für den weiteren Einsatz der Sondenmoleküle ist die Grundsätzliche Fähigkeit einer Ausbildung der kovalenten Bindung zum Zielprotein bedeutsamer, weshalb für diese Liganden auf die kinetische Charakterisierung verzichtet wurde und es die Alkylierung mittels Massenspektrometrie zu analysieren galt (vgl. Abb. 3.4-4).

Anhand der massenspektrometrischen Experimente konnten die Sondenmoleküle hinsichtlich der kovalenten Modifizierung von Akt2 untersucht werden. Es wird deutlich, dass die Alkin-tragenden Derivate die Protein Masse hinzu der einfach alkylierten Spezies verschieben konnten. Nach zwei Stunden Inkubation ist keine vollständige Besetzung der Kinase zu beobachten und ein geringer Anteil an unmodifizierten Enzym blieb zurück. Die Z-Konfiguration des ungesättigten Elektrophils erlaubt die Ausbildung einer kovalenten Bindung zur Thiol-Seitenkette, ebenso kann für **47** erstmalig die irreversible Modifikation von Akt2 aufgelöst werden. Zur genauen Differenzierung, welches der beiden Cysteine in Akt2 alkyliert wird von den neueingeführten *warheads* müssten zeitaufwendigerer Tandem-MS/MS Studien

durchgeführt werden. Für die geplanten Funktionalisierungen der Alkin-Gruppe sind diese Sondenmoleküle, vor allem aufgrund der nachweislich ausgebildeten kovalenten Bindung zum Protein, besonders gut geeignet.



**Abb. 3.4-4: Massenspektrometrische Analyse von Akt2 mit den Alkin-Sonden.** Dekonvolutierte Massenspektren von Akt2<sup>WT</sup> nach Inkubation mit DMSO und den drei Sondenmolekülen (**50**, **51a**, **51b**) für 2 Stunden bei rt. Alle getesteten Verbindungen zeigen eine Massenverschiebung hinzu der einfach modifizierten Protein-Spezies. Die Spektren wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgezeichnet.

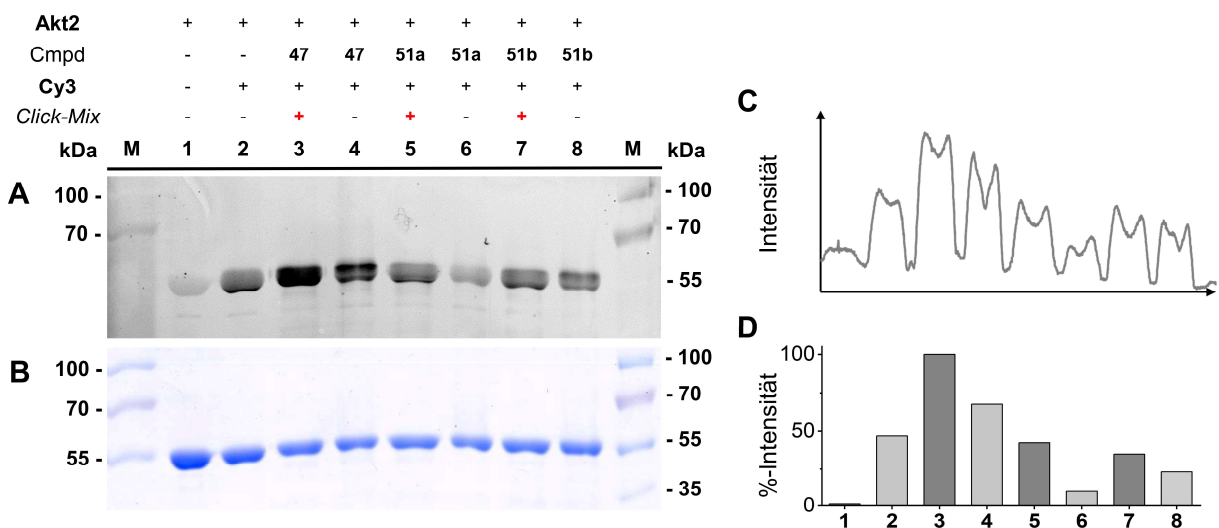
Anhand der massenspektrometrischen Experimente konnten die Sondenmoleküle hinsichtlich der kovalenten Modifizierung von Akt2 untersucht werden. Es wird deutlich, dass die Alkin-tragenden Derivate die Protein Masse hinzu der einfach alkylierten Spezies verschieben konnten. Nach zwei Stunden Inkubation ist keine vollständige Besetzung der Kinase zu beobachten und ein geringer Anteil an unmodifizierten Enzym blieb zurück. Die Z-Konfiguration des ungesättigten Elektrophils erlaubt die Ausbildung einer kovalenten Bindung zur Thiol-Seitenkette, ebenso kann für **47** erstmalig die irreversible Modifikation von Akt2 aufgelöst werden. Zur genauen Differenzierung, welches der beiden Cysteine in Akt2 alkyliert wird von den neueingeführten *warheads* müssten zeitaufwendigerer Tandem-MS/MS Studien durchgeführt werden. Für die geplanten Funktionalisierungen der Alkin-Gruppe sind diese Sondenmoleküle, vor allem aufgrund der nachweislich ausgebildeten kovalenten Bindung zum Protein, besonders gut geeignet.

### 3.4.3. Modifizierung der Reportergruppe

Die dargestellten Sondenmoleküle, welche mit einer Alkin-Gruppe modifiziert wurden, sollen zunächst nach Inkubation mit isoliertem Protein an der Reportergruppe funktionalisiert werden, um den möglichen Einsatz dieser Inhibitoren in komplexeren Systemen, wie der Zelle, für zukünftige Studien zu etablieren. Mit elektronenreichen terminalen Alkinen kann eine Vielzahl an chemischer Modifizierung vorgenommen werden, darunter beispielsweise diverse Zykoadditionen wie der Diels-Alder Reaktion oder Pd-katalysierte Kreuzkupplungen.<sup>190,252,253</sup>

In Anlehnung an HUISGENS 1,3-dipolare Zyklisierungen von Aziden und Alkinen prägten SHARPLESS et al. (2002) sowie andere, die Kupfer(I)-katalysierte Ligation der beiden funktionellen Gruppen zum Triazol Fünfringsystem in wässriger Lösung.<sup>16,254</sup> Besonders die Toleranz von Wasser ermöglichte den Einsatz dieser Reaktion in biokompatibler Weise und ist weitverbreitet als kontrollierte bioorthogonale Reaktion zur weiteren Modifizierung in komplexer Umgebung. In der chemischen Biologie sind zahlreiche Beispiele für den Einsatz der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin Zyklisierung (CuAAC) beschrieben und soll hier im Zuge der dargestellten Akt2-Sonden angewandt werden, um weitere Funktionalisierungen einzuführen.<sup>255</sup>

Die ersten Studien sollten mit den drei Inhibitoren **47**, **51a**, **51b** sowie dem Azid des Fluorophors Cyanin-3 *in vitro* stattfinden, welches nach anschließender gelelektrophoretischer Trennung erlaubt die Kupfer-vermittelte Modifizierung der Alkin-Sonden anhand spezifischer photometrischer Anregung zu quantifizieren (vgl. Abb. 3.4-5).



**Abb. 3.4-5: Übersicht der *in gel* Fluoreszenz selektierter Alkin-Sonden mit Akt2.** (A) Emissionsbild des SDS-Gels mit den Akt2 Click Proben nach Anregung mit 512 nm. (B) Coomassie angefärbtes Gelbild. (C) Graphische Auftragung der Quantifizierung der Banden aus Gel A. Die relative Intensität ist gegen die Entfernung aufgetragen. Werte wurden mit *ImageJ* bestimmt. (D) Hintergrund subtrahierte Auftragung der Banden Intensitäten aus Plot C.

Das Fluoreszenzbild des SDS-Gels zeigt die Markierung des Akt2 Proteins durch Anregung des Cyanin-3 Farbstoffes. In allen Bahnen kann jeweils eine prominente Bande auf gleicher Höhe, von etwa 55 kDa identifiziert werden. Ein leichtes Hintergrundsignal wird anhand der Protein Kontrolle auf Bahn 1 ersichtlich, dies kann vor allem mit der hohen Proteinkonzentration (10  $\mu$ M) zusammenhängen. Ebenso lassen sich die Markerbanden zu geringen Teilen erkennen. Auf Bahn 2 wurde eine Probe aus Protein mit Azid aufgetragen, die resultierende Bande gibt ein höheres Signal als die Proteinkontrolle, welches möglicherweise auf die Konzentration und zehnfachen Überschuss an Fluorophor (100  $\mu$ M) zurückzuführen sein könnte. Die funktionelle Azid Gruppe, kann unter Umständen durch thermische Zersetzung in unspezifischer Weise mit dem Protein reagieren, sodass hier ein Signal detektiert wird.<sup>256</sup> Die drei Sondenmoleküle mit Akt2 wurden in Duplikaten aufgetragen, wobei jeweils eine Probe mit Kupfer-

freien Click-Mix versetzt wurde und als Negativkontrolle dienen soll. Bahn 3 und 4 enthalten **47**-gelabeltes Akt2, für welches ein starkes Signal in der Positiv-Probe beobachtet werden kann. Die Bande in Bahn 3 ist die intensivste auf dem SDS-Gel, wohingegen die Kontrollbahn ein geringeres Signal liefert. Analog kann dies für **51a** und **51b** verzeichnet werden und auf Bahn 5 ist die Fluoreszenz größer als auf Bahn 6. Die Unterschiede von Bahn 7 und Bahn 8 fallen hingegen geringer aus. Die Coomassie Gel-Färbung bestätigt, dass auf Bahn 3-8 die Proben in vergleichbarer Konzentration aufgetragen wurden, wohingegen die ersten beiden Proben mehr Protein aufweisen. Damit eine klarere Aussage über den Verlauf des Experimentes getroffen werden kann, wurden die Banden mittels *ImageJ* quantifiziert und letztlich nach Abzug der Hintergrundintensität von Probe 1, in Bezug auf das stärkste Signal in Prozent aufgetragen. Daraus lässt sich erkennen, dass die Positiv-Proben der Click-Reaktion (3,5,7) ein höheres Signal als die entsprechende Kontrolle ergeben. Der signifikanteste Unterschied gibt Akt2 mit **51a**, gefolgt von Akt2 mit **47**. Wie aus der Azid Probe in Bahn 2 erkennbar ist, vermag die Hintergrund-Fluoreszenz der Kupfer-freien Kontrollen auf das Cyanin3 zurückzuführen sein. Neben der Anpassung der eingesetzten Konzentrationen sollte das Experimente mit anderen Aziden, wie beispielsweise Biotin oder weiteren Fluorophoren wiederholt werden.

Somit kann an dieser Stelle von einem erfolgreichen Verlauf des Experimentes gesprochen werden und es gelang die Alkin-tragenden Sondenmoleküle nach kovalenter Modifizierung von Akt2 mittels *CuAAC* und Cyanin-3 zu funktionalisieren. Nichtsdestotrotz ergeben sich eine Vielzahl an Parametern die es zukünftig zu optimieren gilt, bevor Studien in komplexeren Systemen vorgenommen werden können. Ferner kann das in dieser Arbeit etablierte Konzept der Alkin-Sonden zukünftig auf die Akt Isoform-selektiven Pyridine wie **39p** oder **28a** unter Beibehaltung des Selektivitätsprofils übertragen werden, um weitere wertvolle chemische Werkzeuge zur Verfügung zu haben.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Die Proteinkinase Akt mit ihren drei Isoformen (Akt1/Akt2/Akt3) hat eine entscheidende Rolle für das Überleben der Zelle und stellt eine Schlüssel-Zielstruktur in der Krebsforschung dar. Das anhaltende Scheitern klinischer Akt Wirkstoff-Kandidaten kann auf einen Informationsmangel über die Akt Isoformen und ihrer pathophysiologischen Rolle in humanen Krankheitsbildern zurückgeführt werden. Es bedarf gezielter Pertubationsstudien mit hochselektiven chemischen Werkzeugen, um die Funktionen ebendieser Enzyme tiefergehend, anhand nicht-invasiver Eingriffe, zu untersuchen. Dies könnte elementare Grundsteine für neue innovative therapeutische Ansätze liefern sowie dabei helfen, toxische Nebenwirkungen der bisher bekannten Wirkstoffe einzuordnen und diese Vorteile in vielversprechende Behandlungsstrategien zu übersetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es anhand von strukturbasiertem Liganden-Design neuartige, kovalent-allosterische Inhibitoren zu entwickeln, welche ein sehr diverses Selektivitätsprofil gegenüber den Akt Isoformen aufweisen. Für den gedanklichen Aufbau der benötigten fokussierten Substanzbibliothek konnten zunächst wertvolle Einsichten aus der Analyse von Akt2 und Akt3 Homologiemodellen gewonnen werden. Der Fokus des Liganden-Designs lag auf einem triarylischen Pyridin-Grundgerüst, das vor allem an 5'-Position mit unterschiedlichen aliphatischen oder aromatischen Substituenten sowie variierenden Verlinkungen modifiziert wurde. Es gelang über fünf konvergente Synthesestrategien insgesamt 50 CAAs dazustellen, die den gewünschten Design-Kriterien entsprachen.

Wertvolle Einblicke in die Protein-Ligand-Wechselwirkung der dargestellten Substanzbibliothek konnte über biochemische Evaluation gewonnen werden. Das Set an Inhibitoren erlaubte die Identifizierung einer konsistenten Struktur-Aktivitätsbeziehung hinsichtlich der jeweils adressierten Akt Isoform-Bindetasche. Zusammenfassend lassen sich besonders drei elementare Trends ableiten. Zum einen wird für die Adressierung von Akt3 ein sterisch anspruchsvoller und aromatischer Rest benötigt. Zum anderen werden diese größeren Reste gleichermaßen von Akt2 toleriert. Und zuletzt scheint vor allem die amidische Verknüpfung der sterisch anspruchsvollen Reste für Akt1 elementar für einen positiven Bindungsbeitrag zu sein. Analoges ist für Akt2 zu beobachten. Die Linkereigenschaften unterstützen den Aktivitätsgewinn der jeweiligen Verbindung und lassen vermuten, dass die Akt1 und Akt2 Bindetasche in direkter räumlicher Nähe zum Grundgerüst eine ähnliche Beschaffenheit aufweisen. Dieser hybride Charakter von Akt2 bezüglich Akt1- sowie Akt3-ähnlicher Bindepräferenzen konnte bereits in den Docking-Studien abgeleitet werden. Es gelang somit die postulierten Hypothesen aus dem strukturbasierten Ansatz durch die hier offengelegte SAR zu unterstützen. Nichtsdestotrotz, würden Ko-Kristallisationsexperimente in Akt1 und Akt2 oder chemisch-genetische Ansätze genauere Aufschlüsse über diese Beobachtungen liefern.

Zur Darstellung von Akt3-selektiven Inhibitoren müssen noch abermalige Anstrengungen unternommen werden, um diese Proteinkinase gezielt ausschalten zu können. Möglicherweise kann dieses Unterfangen mit Hilfe der Adressierung alternativer Cystein-Seitenketten im Enzym erreicht werden, wie kürzlich von LIU et al gezeigt.<sup>117</sup>

Weiter gelang die Etablierung sowie die Analyse des kovalenten Inhibitionsmechanismus der Liganden mithilfe des kinetischen PhosphoSens-Assaysystems. Es wurde deutlich, dass die kovalente Modifikation nicht ausschließlicher Treiber für die effiziente Inhibition der Kinasen darstellt, diese Eigenschaft jedoch letztlich zur gewünschten permanenten Inaktivierung ebendieser beiträgt. Orthogonal zur kinetischen Analyse, konnte die kovalente Modifizierung der Proteine über massenspektrometrische Methoden zeitlich verfolgt sowie die Alkylierung der nukleophilen Seitenkette identifiziert werden. Es bedarf weitere intensive Bemühungen, um genaue Rückschlüsse über die Verteilung der adressierten Aktivierungsschleifen-Cysteine sowie deren Reaktivität in den Akt Isoformen zu erhalten. Ferner gelang es neue Einblicke in die exakten Bindemodi zweier CAAIs in Komplex mit Akt1<sup>WT</sup> durch Röntgenstrukturanalyse zu erhalten. Zwar stellen diese Strukturen bereits sehr bedeutsame Beiträge für die weitere Entwicklung neuer Isoform-selektiver CAAIs dar, jedoch würden Kristallisationsexperimente mit Akt2<sup>WT</sup> und Akt3<sup>WT</sup> eine deutlich wertvollere Grundlage für die Optimierung ebendieser liefern.

Die identifizierten Selektivitätsprofile der Inhibitoren konnte unter Verwendung eines Ba/F3-Modellsystems in eine zelluläre Umgebung übersetzt werden. Anhand dieser wertvollen Translation konnten vielversprechende Moleküle für erste Studien in komplexeren Krebszelllinien ausgewählt werden. Darunter drei CAAIs mit spannendem Selektivitätsprofil anhand derer die Analyse pharmakodynamischer Effekte sowie direkter *on target* Inhibierung gelang. Weiter konnte die selektive Stabilisierung der Zielstrukturen mittels CETSA-Experimenten in PANC1-Zellen validiert werden. Somit qualifiziert sich diese Klasse der Inhibitoren als äußerst vielversprechende Modulatoren in komplexen Systemen zur selektiven Adressierung der Akt Isoformen.

Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit das Konzept der funktionalisierten Alkin-Sonden über die Einführung eines neuartigen elektrophilen Michael-Akzeptor-Systems für Akt2-selektive pyrazinische CAAIs etabliert werden. In einer ersten Anwendung glückte die gezielte Modifizierung der Alkin-Funktionalität über eine Kupfer-vermittelte *Click*-Reaktion mit einer fluoreszenten Reportergruppe und dessen spektroskopischer Nachweis. Somit steht der zukünftigen Übertragung dieses Konzeptes auf die identifizierten Isoform-selektiven Pyridine nichts im Wege. Funktionalisierte Sonden ermöglichen eine spezifische Analyse auf molekularer Ebene. Beispielsweise kann anhand farbgebender Moleküle die Verteilung und Lokalisation der inaktivierten Isoform in der Zelle zeitaufgelöst verfolgt werden. Demnach können Anreicherungen in definierten zellulären Kompartimenten identifiziert werden. Der Einsatz von *pull down* Studien vermag das Interaktom der ausgeschalteten Kinase zu analysieren und



durch Einbringung von photo-aktivierbaren Gruppen umliegende Proteine zugleich anreichern. Ebenfalls kann diese Untersuchung detaillierten Aufschluss über zelluläre PTMs geben und vermag neue Einsichten über die Regulation der Kinase zu liefern.

Die hier präsentierten Werkzeuge eröffnen nun vor allem für Akt1 und Akt2, dessen Rollen besonders einschlägig in vielen Studien diskutiert wurde, in kontrollierter Weise und in ihrer nativen Umgebung die Funktionen effektiv auszuschalten. Konsequenzen dieser Intervention können anhand von RNA-Sequenzierung und gekoppelter Gen-Aktivitätsanalyse hinsichtlich möglicher Veränderungen evaluiert werden. Diese Daten ermöglichen Rückschlüsse auf die phänotypischen Auswirkungen zu geben und neue zell-spezifische Signalwege offen zu legen. Besonders die Rolle von Akt2 kann durch dieses chemische Eingreifen auf Abweichungen in der metabolischen Aktivität der Zelle untersucht werden. Zuvor beobachtetes hyperglykämisches Verhalten könnte durch diese Studien mit individuellen Isoform-Funktionen in Korrelation gesetzt werden und zuzüglich gewebsspezifische Aspekte offenlegen. Von großem Interesse ist die gezielte Intervention von Akt2 im Kontext von Diabetes mellitus oder auch Leberkrebs.<sup>257-262</sup> Aus dem Verständnis der Akt Isoform zugrundeliegenden Biologie könnten letztlich neue innovative therapeutische Ansätze hervorgehen. Ferner kann anhand selektiver Moleküle der Zusammenhang zwischen physiologisch nachteiliger Intervention und gewünschtem therapeutischen Nutzen im pathophysiologischen Kontext weiter beleuchtet werden.

Über funktionelle Studien hinaus dienen die hier gezeigten Moleküle als Basis neuartiger Wirkstoffvorläufer, denn bereits anhand der pharmakodynamischen Effektivität von Borussertib konnte das Potential dieses innovativen Ansatzes validiert werden. Eine Verbesserung der pharmakokinetischen Parameter müsste idealerweise in einem iterativen Prozess und unter Einhaltung der hochselektiven Eigenschaften dieser Molekülklasse erfolgen. Ebendiese Optimierungen werden zurzeit innerhalb des *Drug Discovery Hub Dortmund* (DDHD) unternommen und lassen auf einen vielversprechenden Ausgang hoffen. Weiterhin wäre der Einsatz als dualer Inhibitor oder in Form von Kombinationstherapien zur gewünschten Intervention der pathologischen Signale denkbar.

Abschließend ist festzuhalten, dass die in dieser Arbeit präsentierten Verbindungen als relevante Moleküle für das Projekt: *Target 2035* dienen könnten, zum einen als selektive Akt Isoform-Ligand selbst, zum anderen als funktionelle Sonden zur Identifizierung neuer Zielstrukturen.

## 5. Experimenteller Teil

### 5.1. Methoden

#### 5.1.1. Computergestützte Methoden

##### 5.1.1.1. Sequenzvergleich

Das Sequenzalignment der drei Akt Isoformen wurde mit dem Clustal Omega Webserver (EMBL-EBI)<sup>j</sup> unter Verwendung folgender UniProtKB-Sequenzen durchgeführt: Akt1\_HUMAN P31749, Akt2\_HUMAN P31751, Akt3\_Human Q9Y243 (vgl. Anhang 7.1).<sup>263</sup>

##### 5.1.1.2. Homologiemodell

Die Homologiemodelle für Akt2 und Akt3 wurden mit dem online Homologie-Modellierungsserver SWISS-MODEL<sup>k</sup> auf der Grundlage der Akt1-Vollängen Ko-Kristallstruktur (PDB: 6s9x) sowie den zuvor genannten UniProtKB-Sequenzen berechnet.<sup>167</sup>

##### 5.1.1.3. Docking und Modellierung

Die Generierung von relevanten Dockingposen ausgewählter Inhibitoren erfolgte mittels AutoDock Vina 1.1 innerhalb der Software Ligandscout 4.0 (Inte:Ligand GmbH, Wien Österreich). Akt1 Dockingstudien erfolgten auf der Basis einer bekannten PDB-Struktur (pdb: 6s9w), wohingegen für Akt2 und Akt3 die zuvor generierten Homologiemodelle genutzt wurden. Dafür musste zunächst die Interdomänen-Bindetasche in der Struktur im Programm definiert werden. Das Ligandenset konnte dann nach Energie-Minimierung als Bibliothek eingefügt werden. Anschließend erfolgte das Docking über das implementierte *open-source* Tool AutoDock Vina 1.1 mit einer maximalen Energie Differenz von 3 kcal/mol und 9 zu berechnenden Posen. Das Tool generiert die benötigte Umgebung für die Berechnungen, protoniert die beteiligten Komponenten und erstellt die entsprechenden *grid-maps*. Anhand der implementierten *scoring*-Funktion wird die Interaktion der Liganden zu der Bindetasche berechnet und evaluiert.<sup>172</sup> Die resultierenden Bindungsposen wurden als SDF-Datei exportiert und nach *state-splitting* in PyMOL Molecular Graphics System (Version 2.2.3, Schrödinger, New York, NY, US) visualisiert.

---

<sup>j</sup> <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

<sup>k</sup> <https://swissmodel.expasy.org/interactive>

### 5.1.2. Biochemische Charakterisierung

Die aktiven Proteinkinasen, welche für die der in dieser Arbeit verwendeten biochemischen Charakterisierungen dienten, wurden kommerziell über die Anbieter SignalChem, ProQinase sowie Thermo Fisher Scientific erworben.

Akt1<sup>WT</sup> – GST-Tag (ProQinase, Freiburg, DE)

Akt2<sup>WT</sup> – GST-Tag (SignalChem, Richmond, BC, CA)

Akt2<sup>WT</sup> – GST-Tag (ProQinase, Freiburg, DE)

Akt2<sup>WT</sup> – His<sub>6</sub>-Tag (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

Akt3<sup>WT</sup> – GST-Tag (SignalChem, Richmond, BC, CA)

Akt3<sup>WT</sup> – GST-Tag (ProQinase, Freiburg, DE)

Akt3<sup>WT</sup> – His<sub>6</sub>-Tag (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

#### 5.1.2.1. Aktivitätsbasiertes Assaysystem (KinEASE™)

Dem aktivitätsbasierten HTRF<sup>®</sup>-Assaysystem von Cisbio zu Grunde liegenden Messprinzip wurde bereits in Kapitel 3.2.1 erläutert. Alle Schritte und daraus ermittelten Daten wurden in weißen Mikrotiterplatten mit 384 Kavitäten und je 25 µL Fassungsvermögen der Firma Greiner Bio One GmbH generiert. Die Bestimmung der Fluoreszenzemission erfolgte mittels PerkinElmer EnVision Multimode Plattenlesegerät bei einer Emissionswellenlänge von 620 und 665 nm, welche 60 µs nach der entsprechenden Anregung bei 317 nm detektiert wurde.

Damit dieses System vergleichbare und robuste Daten erzeugt müssen zunächst einige Etablierungsschritte für jedes verwendete Proteinkonstrukt vollzogen werden. Die Durchführung der jeweiligen Schritte erfolgte nach Herstellerangaben. Der initiale Schritt ist die Bestimmung der Enzymaktivität anhand einer Konzentrationsreihe. Mit der optimalen Proteinkonzentration konnte daraufhin die Kinetik der Substratphosphorylierung verfolgt werden, welche die optimale Reaktionszeit ableiten lässt. Zur weiteren Charakterisierung mussten dann die  $K_M$  Werte für Substrat und ATP bestimmt werden. Diese Parameter gewährleisten einen robusten Assay, da bei Messung mit halbmaximalem katalytischem Umsatz das Enzym optimal und vor allem vergleichbar die gewünschte Reaktion umsetzt. Die Verwendung des Kinase-spezifischen ATP- $K_{MS}$  mindert die Konkurrenzsituationen zwischen kompetitiven Inhibitoren und ATP.

Zur weiteren Optimierung des Assayfensters (Faktor zwischen minimaler und maximaler Aktivität) kann der Fluorophorgehalt angepasst werden. Dabei werden Fluorophor/Substrat-Verhältnisse von 1/8, 1/4, 1/2, und 1/1 vom Hersteller vorgeschlagen, jedoch wurde auf diese Optimierung für die hier verwendeten Konstrukte verzichtet und stets mit einem Verhältnis von 1/8 gearbeitet. Die in der Etablierung des Assays ermittelten Parameter für die entsprechenden Kinasekonstrukte sind in der nachstehenden Tabelle 7.1-1 zusammengefasst.

**Tabelle 5.1-1: Ermittelte Parameter zur Durchführung des aktivitätsbasierenden KinEASE Assay für die entsprechenden Kinasekonstrukte.**

Hersteller	Akt1 <sup>WT</sup>		Akt2 <sup>WT</sup>		Akt3 <sup>WT</sup>	
	ProQinase	SignalChem	ProQinase	Thermo	ProQinase	Signal-Chem
Enzympuffer (EB)	0.1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 0.02 (w/v) NaN <sub>3</sub> , 0.01 % (w/v) BSA, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, 0.01 % (v/v) Triton X-100, 50 mM HEPES, pH 7.0 in ddH <sub>2</sub> O					
Detektionspuffer (DB)	0.1 % (w/v) BSA, 0.8 M KF, 20 mM EDTA, verd. STK-AB (laut Hersteller), 50 mM HEPES, pH 7.0 in ddH <sub>2</sub> O					
Kinase in EB	260 pM	2.3 nM	11.8 nM	1.46 nM	1.97 nM	364 pM
Startreagenzien in EB	1 µM STK S3, 320 µM ATP	2.5 µM STK S3, 360 µM ATP	3.4 µM STK S3, 240 µM ATP	1 µM STK S3, 120 µM ATP	4 µM STK S3, 440 µM ATP	4 µM STK S3, 520 µM ATP
Stoppreagenzien in DB	31.2 nM SA-XL665	78.7 nM SA-XL665	105 nM SA-XL665	31.2 nM SA-XL665	125 nM SA-XL665	125 nM SA-XL665
Reaktionszeit	60 min	60 min	90 min	20 min	20 min	15 min

Der Assay wurde dann unter den zuvor bestimmten Parametern für die jeweilige Kinase durchgeführt um Dosis-Wirkungskurven der Inhibitoren zu erhalten und daraus die entsprechenden IC<sub>50</sub>-Werte abzuleiten. Es wurden 2,5 µL Kinasepuffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.01 % Triton X-100, 5 x Enzymepuffer, ddH<sub>2</sub>O) zur Erstellung der Inhibitorkonzentrationsreihe vorgelegt, um dann die zu untersuchende Verbindung (10 mM DMSO Stammlösung) mit dem Echo<sup>®</sup> 520 Liquid Handler der Firma Labcyte (San José, CA, USA) in einer 8-fach Verdünnung (0.714 nM–20 µM) hinzuzufügen. Daraufhin wurde mit 5 µL der jeweiligen Kinase in Enzympuffer für 1 h präinkubiert und die Katalysereaktion anschließend durch Zugabe von 2,5 µL einer Lösung mit ATP und Substrat, mit Konzentrationen im Bereich der entsprechende ermittelten K<sub>M</sub>-Werte, gestartet. Nach Ablauf der optimalen Reaktionszeit für die jeweilige Kinasereaktion wurde durch Zugabe von 10 µL Detektionslösung (Detektionspuffer, STK-Antikörper, STV-XL665) mittels EDTA-vermittelter Mg<sup>2+</sup>-Komplexierung die Reaktion gestoppt. Die relative Menge des Phosphotransfers auf das Substrat für die jeweilige Verdünnung konnte nach einer weiteren Stunde Inkubation anhand von FRET und die daraus folgende Emission photometrisch bestimmt wer-

den. Die Auswertung erfolgte durch Auftragung der Quotienten  $\text{Em}_{665\text{nm}}/\text{Em}_{620\text{nm}}$  der Emission gegen die verwendete acht Inhibitorkonzentrationen in logarithmischer Darstellung und anschließendem logistischem Fitting, welches die Inhibitionskurve sowie den dazugehörigen  $\text{IC}_{50}$ -Wert am Wendepunkt lieferte. Mithilfe der *Quattro Software Suite* konnte diese Auswertung unter Berücksichtigung und Normierung auf die Positiv- und Negativ-Kontrollen (ATP-kompetitiver Inhibitor AZD5363 (6) /DMSO) effizienter durchgeführt werden. Die Ermittelten Werte wurden in Duplikaten in mindestens drei unabhängige Messungen durchgeführt und die Resultate als Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung angegeben.

Die hier verwendeten Puffer und genutzten Materialien sind kommerziell erhältlich und zunächst von Cisbio erworben worden. Eine Herstellung des 5 x Enzympuffers sowie des Detektionspuffers ist ebenfalls möglich. Dabei ist besonders die genaue Reihenfolge der einzelnen Komponenten unter Berücksichtigung des pH-Wertes zu beachten, um die Funktionalität des Enzyms und die Kompatibilität mit dem Assay zu gewährleisten. Daher sind im Nachfolgenden die Mengen und die Zugabe-Reihenfolge der entsprechenden Reagenzien gelistet.

**5 x Enzympuffer (100 mL):** 250 mM HEPES (5.96 g, 238.31 g/mol), 0.5 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (250  $\mu\text{L}$  200 mM Aliquot); 0.1 %  $\text{NaN}_3$  (100 mg), pH auf 7 einstellen (NaOH/HCl); 0.05 % BSA (50 mg); in ddH<sub>2</sub>O.

**Detektionspuffer (500 mL):** 50 mM HEPES (5.96 g, 238.31 g/mol), pH auf 7 einstellen (KOH/HCl); 0.1 % BSA (500 mg); 0.8 M KF (23.24 g, 58.1 g/mol); 20 mM EDTA (3.72 g, 372,34 g/mol); in ddH<sub>2</sub>O.

#### Aktivierung des Orthovanadats:

Für eine 200 mM Lösung an Natriumorthovanadat werden 0.32 g  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  in 10 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst und mit 1 N HCl sowie 1 N NaOH auf pH 10 eingestellt (Gelbfärbung). Daraufhin wird die Lösung auf der Heizplatte unter ständigem Rühren erwärmt bis sie farblos ist. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird der pH-Wert geprüft und erneut auf pH 10 eingestellt. Dieser Prozess wird solange wiederholt bis die Lösung farblos bleibt und ein konstanter pH-Wert erreicht wurde. Die Lagerung des aktivierten Orthovanadats erfolgt in entsprechenden Aliquots bei -20 °C.

### 5.1.2.2. Kinetischer Assay (PhosphoSens)

Die kinetische Evaluierung der kovalenten Inhibitoren wurde mit dem PhosphoSens fluorometrischen Kinase Assay (AssayQuant Marlboro, MA, USA) unter Verwendung des Sox-modifizierten (Sulfonamido-Oxin) Peptid AQT0535 durchgeführt. Der Umsatz zum Phosphopeptid wurde in 20  $\mu\text{L}$  Volumen in einer 384-Kavitäten-Platte mit dem Tecan Infinite M1000 Pro Platten Leser (Ex 360 nm/ EM 485 nm) in einem 45 s Intervall für 1.5 h verfolgt. Dieses System ermöglicht eine homogene, Fluoreszenz-basierte Detektion von Phosphorylierungen durch Kinasen auf ein artifizielles Substrat, in welchem eine veränderte Fluoreszenz durch Einführung der PTM photometrisch bestimmt werden kann. Das Prinzip beruht auf ChEF (engl. *chelated enhanced fluorescence*), die Eigenschaften des Fluorophors Sox werden durch Anwesenheit einer proximalen Phosphogruppe insofern beeinflusst, dass dort die Koordination eines Mg(II)-Ions durch die beiden elektronenreichen Gruppen eine gesteigerte Intensität der fluoreszierenden Wellenlänge verzeichnet werden kann. Welches letztlich eine zeitaufgelöste Beobachtung der Kinase Aktivität erlaubt.

Damit vergleichbare und robuste Daten erzeugt werden können müssen zunächst einige Etablierungsschritte für jedes verwendete Proteinkonstrukt vollzogen werden. Die Durchführung der jeweiligen Schritte erfolgte nach Herstellerangaben. Der initiale Schritt ist die Bestimmung der Enzymaktivität anhand einer Konzentrationsreihe. Zur weiteren Charakterisierung mussten dann die  $K_M$  Werte für Substratpeptid und ATP bestimmt werden. Die Verwendung des kinase-spezifischen ATP- $K_{MS}$  mindert die Konkurrenzsituationen zwischen kompetitiven Inhibitoren und ATP.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Inhibitoren wurde erst 2  $\mu\text{L}$  Wasser in die entsprechenden Kavitäten der Assayplatte mittels Multidrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) transferiert, woraufhin die erforderliche Menge an niedermolekularer Verbindung in DMSO durch den ECHO Labcyte zeilenweise in 11 Konzentrationen (1.5 bis 1.2-fache Verdünnung, rund um die individuellen  $IC_{50}$ -Werte der Inhibitoren aus HTRF-Assay) hinzugesetzt wurden. In allen Reaktionen lag ein konstanter DMSO-Gehalt von 1 % (200 nL) vor, wobei die 12. Spalte als Kontroll-Kavität definiert wurde. Anschließend konnten 14  $\mu\text{L}$  des Reaktionsgemisches mittels Multidispenser hinzugesetzt werden. Das Gemisch enthielt den Reaktionspuffer, das Substratpeptid (10  $\mu\text{M}$ ), ATP sowie DTT und sollte bei Zugabe unbedingt Raumtemperatur aufweisen. ATP Konzentrationen wurden dem ermittelten  $K_M$  angepasst (140  $\mu\text{M}$  für Akt1, 500  $\mu\text{M}$  für Akt2, und 80  $\mu\text{M}$  für Akt3). Die Zugabe von 8 nM Akt1, 2 nM Akt2 oder 5 nM Akt3 (finale Konzentration), ebenfalls durch den Multidrop, initiierte die Reaktion. Zur Kontrolle wurden in der 12. Spalte die Hälfte der Kavitäten 4  $\mu\text{L}$  Enzympuffer (Hintergrundsignal) und die andere Hälfte mit Kinase Lösung versehen (positiv Kontrolle, Einschätzung der Signalstärke). Die Reaktionen enthielten weiterhin 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.01 % Brij-35, 1.25 % Glycerol, 1 mM DTT in 54 mM HEPES bei pH 7.5.

Zur weiteren Analyse wurde zunächst das Hintergrundsignal, aus der negativ Kontrolle (ohne Kinase) von jedem Zeitpunkt des Signals abgezogen um die korrigierte RFU (engl. *relative fluorescence unit*) zu erhalten. Daraus erfolgte die Auftragung der Fluoreszenz gegen die Zeit für jede Inhibitor Konzentration. Die erhaltenen Progressionskurven wurden mit folgender Formel (1) ausgewertet (Origin) und lieferte die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit  $k_{\text{obs}}$  für jede Inhibitorkonzentration.

$$F \text{ (RFU)} = \left( \frac{A}{k_{\text{obs}}} \right) * (1 - \exp(-k_{\text{obs}} * t)) \quad (1)$$

$F$ : Fluoreszenz in RFU;  $A$ : Amplitude;  $k_{\text{obs}}$ : beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit;  $t$ : Zeit.

Die erhaltenen Werte wurden daraufhin gegen die Inhibitor-Konzentration aufgetragen, welches nach Berechnung mit dem nachstehenden hyperbolischen Fit (2) die gesuchten Parameter  $k_{\text{inact}}$  sowie  $K_i^*$  ergaben.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}}[I]}{[I] + K_i^*} \quad (2)$$

$k_{\text{inact}}$ : Rate der kovalenten Inaktivierung;  $K_i^*$ : apparterer  $K_i$ ;  $I$ : Konzentration Inhibitor.

Durch Berücksichtigung der ATP-Substratkonzentration in den Reaktionen konnte aus dem apparenten  $K_i^*$  der eigentlich reversible Bindungsaffinität  $K_i$  bestimmt werden (3).

$$K_i = K_i^* * \left( 1 + \frac{[S]}{K_M} \right) \quad (3)$$

$K_i$ : reversible Bindungsaffinität;  $S$ : Konzentration Substrat;  $K_M$ : Michaelis-Menten Konstante für das Substrat.

**Enzympuffer (EDB, 1x):** 20 mM HEPES, pH 7.5, 0.01 % Brij-35, 5 % Glycerol, 1 mg/mL Bovine Serum Albumin; in ddH<sub>2</sub>O.

**Reaktionspuffer (10x):** 500 mM HEPES, pH 7.5, 0.1 % Brij-35, 100 mM MgCl<sub>2</sub>; in ddH<sub>2</sub>O.

### 5.1.3. Expression der Akt Isoformen<sup>1</sup>

Die genutzten Proteinkonstrukte für die MS-basierten Studien sowie für die Kristallisationsexperimente wurden in der AG Rauh hergestellt. Folgende Gene samt N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag und TEV-Protease Erkennungssequenz wurden von der GeneArt AG (Regensburg, Deutschland) erworben: AKT1(2-446, E114/115/116A), AKT2(2-447) und AKT3(2-443, E114/115/116A). Diese Sequenzen wurden in einen

<sup>1</sup> Die Expression der Akt Isoformen wurde von Dr. Ina Landel und M.Sc. Laura Depta durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

pLEX/Bac3 Expressions Vektor (Merck Millipore) über *NcoI* und *BamHI* Restriktionsstellen kloniert. Transfektion, Virus Generation, Amplifizierung und Expression wurden dann in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Zellen (Thermo Fisher Scientific) nach Anleitung des BacMagic Protokolls (Merck Millipore) durchgeführt. Infizierte Zellen wuchsen in Erlenmeyer Flaschen bei 27 °C für 72 Stunden und 120 rpm. Die Ernte der Zellen erfolgte mit Zentrifugation bei 3000 g für 20 min und anschließend waschen mit PBS, bevor sie in flüssigem Stickstoff Schock gefroren wurden. Nach auftauen der Zellen wurden diese mit Lyse Puffer resuspendiert und durch den Mikrofluidizer lysiert sowie für 1 Stunde bei 40000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Ni-NTA Superflow Säule (Qiagen) geladen und gebundenes Protein mit Elutionspuffer von der Säule gewaschen. Die His<sub>6</sub>-Tag Abspaltung erfolgte mit der TEV-Protease und Dialyse-Puffer bei 4 °C über Nacht. Das gespaltene Protein wurde weiter über eine Anionen-Austausch Chromatographie mit der HiTrap Q HP Säule (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) gefolgt von einer Größenausschluss Chromatographie (HiLoad 16/60 Superdex 75 pg Säule, GE Healthcare) unter Verwendung eines entsprechenden Puffers gereinigt. Zuletzt wurde das Protein in den Lagerungspuffer durch die Superdex 75 10/300 GL Säule (GE Healthcare) überführt, anschließend konzentriert und bei -80 °C gelagert.

<b>Lyse Puffer:</b>	50 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 10 % Glycerol, 0.1 % Triton X-100, pH 8.0, EDTA-freier Protease Inhibitor Mix (Sigma Aldrich); in ddH <sub>2</sub> O.
<b>Elutionspuffer:</b>	50 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L Imidazol, 1 mmol/L DTT, 10 % Glycerol, pH 8.0; in ddH <sub>2</sub> O.
<b>Dialyse-Puffer:</b>	25 mmol/L Tris, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 5 % Glycerol, pH 8.0; in ddH <sub>2</sub> O.
<b>Anionen-Austausch-Puffer:</b>	25 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 10 % Glycerol, pH 7.3; in ddH <sub>2</sub> O.
<b>Lagerungspuffer:</b>	25 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L DTT, 10 % Glycerol, pH 7.5; in ddH <sub>2</sub> O.



#### 5.1.4. Kristallisation von Akt1<sup>WT</sup><sup>m</sup>

Zur Kristallisation von Akt1<sup>WT</sup> wurde die Proteinkonzentration auf 3 mg/mL eingestellt und mit 3 Äquivalenten des Inhibitors für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 20,000 g für 10 min zentrifugiert, bevor entsprechende Tropfen nach der *hanging drop*-Methode in einer 15-Kavitäten Kristallisationsplatte (EasyXtal Tool, Qiagen) mit der Reservoir-Lösung (1:1) vermischt wurden. Innerhalb von 3 Tagen bei 20 °C wuchsen beugungsfähige Kristalle, welche vor dem Schock-frieren in flüssigem Stickstoff mit einer kryogenen Lösung aus 20 % Ethylenglykol geschützt wurden. Röntgendiffraktionsdatensätze wurden in der PXII-X10SA *beamline* des Synchotrons am Paul-Scherrer-Institut (Villingen, Schweiz) mit einer Wellenlänge nahe 1.0 Å aufgenommen. Für die Auswertung der Daten wurden die Diffraktionsbilder mit XDS integriert und mit XSCALE skaliert.<sup>264-266</sup> Die Strukturen wurden mit dem Programm PHASER und unter Verwendung zuvor publizierter Kristallstrukturen (PDB: 6hhg) als Vorlage durch einen molekularen Ersatz gelöst.<sup>267</sup> Daraufhin konnten mit der Software WINCOOT Moleküle aus der asymmetrischen Einheit modifiziert und Liganden-Informationen durch den PRODRG-Server definiert werden.<sup>268,269</sup> Weiterhin wurde die Strukturverfeinerung mit dem Programm PHENIX.REFINE vorgenommen und letztlich die finalen Komplexstrukturen mittels MolProbity-Server einer Qualitätsprüfung unterzogen.<sup>270-272</sup> Vor der Veröffentlichung erfolgte eine letzte Validierung der Kristallstrukturen mithilfe des PDB\_REDO-Servers.<sup>273</sup>

**Reservoir-Lösung:** 1.25 mmol/L Natrium Acetat pH 6, 3.75 mmol/L Natrium Citrat pH 6.5, 12 % PEG MME 2000; in ddH<sub>2</sub>O.

#### 5.1.5. Protein Massenspektrometrie

Zur massenspektrometrischen Analyse wurden das entsprechende Vollängen-Konstrukt von Akt1, Akt2 und Akt3 (10 µM) zusammen mit 3-fachem Überschuss (30 µM) des jeweiligen Inhibitors im Storage-Puffer (vgl. 5.1.3) für 1 h und im Falle von Akt2 für 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (5 min bei 5000 g), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und massenspektrometrisch analysiert. Dazu wurde eine Thermo Fisher Scientific Ultimate 300 HPLC in Verbindung mit einer Thermo Fisher Scientific Velos Pro (2D Ionen Falle) genutzt. Es wurden maximal 2 µL der Probe zunächst über eine AdvanceBio Desalting RP-Cartridge (Agilent Technologies) bei 21 °C getrennt, unter Verwendung eines zunächst polaren Gradienten beginnend von 95 % Solvens A (0.1 FA in Wasser) und 5 % Lösungsmittel B (0.1 % FA in MeCN) für 30 Sekunden, gefolgt von einem

<sup>m</sup> Die Ko-Kristallisationsexperimente sowie Strukturlösung wurde von Dr. Ina Landel durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

linearen Gradienten für 2.5 min bis, hinzu 80 % Laufmittel B. Ein Massenbereich von 700 – 2000 m/z wurde aufgenommen und die Rohdaten daraufhin mit MagTran o. ProMass for Xcalibur (Novatia, PA, USA) dekonvolutiert. Die resultierenden Spektren wurden mit OriginPro (Version 2020b, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA), auf den relevanten Massenbereich geschnitten und die Kurven geglättet.

Zeitaufgelöste Protein Massen wurden bei einer System-Temperatur von 25 °C gemessen und an kontinuierlichen Zeitintervallen von 8 oder 16 Minuten ins System eingespritzt. Der Zeitpunkt der Entnahme und Zugabe des sauren Laufmittels entspricht dem Abbruch der Reaktion und stellt den erfassten zeitlichen Datenpunkt dar. Damit die maximale Geschwindigkeit der kovalenten Modifikation erreicht werden kann, wurde ein 75-facher Überschuss an Inhibitor eingesetzt und die ATP-Konzentrationen verwendet, welche mittels PhosphoSens Assay als  $K_M$ -Wert bestimmt wurde. Die wie zuvor beschriebenen dekonvolutierten Spektren wurden daraufhin mit Origin nach ihrer Integrationsfläche AUC (*area under the curve*) analysiert.

#### 5.1.5.1. Tryptischer Verdau und Peptid Reinigung

Zur genauen Bestimmung der Cystein Alkylierung durch die kovalenten Inhibitoren wurden Tandem-Massenspektrometrie Experimente durchgeführt, welche dazu dienen proteolytisch verdaute Peptide eindeutig ihrer Sequenz zu zuordnen. Hierfür wurde ein trypischer Verdau in Lösung gewählt und anschließend mittels *StageTip* Reinigung entsalzt sowie konzentriert.<sup>274</sup> Jedwige Kontamination durch Fremdprotein, beispielweise Keratin der Haut kann in dieser Analyse die Detektionsgrenze des gesuchten Peptidsequenzen herabsetzen und den Datenbank Abgleich erschweren, weshalb jeder Schritt unter einem Abzug durchgeführt werden sollte sowie mit geeigneter Schutzkleidung (Nitril Handschuhe, frischer Laborkittel, zusätzliche sterile Ärmel). Zur Reinigung der Peptide wurde der *pull-down* Raum der Abteilung IV des MPI Dortmund genutzt. Das Protein wurde wie zuvor beschrieben mit den entsprechenden kovalenten Inhibitoren bei 4 °C für eine Stunde inkubiert, woraufhin 75 µL der Probe in ein *loBinding* Reaktionsgefäß (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) überführt und 75 µL eines 100 mM Triethylammoniumbromid (TEAB) Puffers hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Reduktion des Proteins durch Zugabe von 7.5 µL 200 mM TCEP in 100 mM TEAB Puffer. Nach gründlichem vermischen und kurzer Zentrifugation bei 10.000 g erfolgte die Inkubation bei 55 °C für 1 h. Zur Alkylierung des Proteins wird eine frische Iodacetamid Lösung (375 mM in 200 mM TEAB Puffer) angesetzt von welcher 7.5 µL zur Probe hinzugegeben werden und diese für 30 min bei rt und Dunkelheit inkubiert. Die Fällung des Proteins erfolgt über Nacht unter Verwendung von gekühltem Aceton (900 µL) bei -20 °C. Durch Zentrifugation für 10 min bei 8000 g und 4 °C kann das gefällte Protein konzentriert werden. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Proben für 45 min mit offenem Reaktionsgefäß Deckel getrocknet. Zur Vorbereitung der Trypsin-Lösung wurden zunächst 100 µg Trypsin in 250 µL 10 mM HCl gelöst, um eine 0.4 µg/µL Stammlösung zu erhalten, von welcher wiederum 165 µL zu

2200  $\mu\text{L}$  eines 100 mM TEAB Puffers gegeben wurden. Aus dieser finalen Trypsin-Lösung werden 107.5  $\mu\text{L}$  zu den getrockneten Proben gegeben, welche anschließend für 20 sec mittels Vortexer vermischt wurden. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Reaktionsgefäße bei 37 °C und 300 rpm für 3 Stunden. Der Verdau wurde durch Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  0.1 % TFA in Wasser beendet und die Proben weiter bei 37 °C über Nacht geschüttelt.

Bevor die Peptid Proben zur Massenspektrometrischen Analyse aufgesetzt werden können sollten sie zunächst vom Salz befreit, gewaschen und konzentriert werden. Hierzu wurde eine Reinigung mit C18-Material an umgekehrter Phase im kleinen Maßstab durchgeführt. Das vorbereitete C18-Material (AsstractSPE™Disks Bio C18, 47 mm) doppelagig in eine Petri Schale gelegt und davon mit einer flachen Kanüle ausgestochen sowie anschließend in eine gelbe Pipetten Spitze (200  $\mu\text{L}$  Volumen) überführt. Die Aktivierung erfolgte mit 100  $\mu\text{L}$  Methanol, welche durch Zentrifugation das Material passierte und entfernt wurde. In einem nachfolgenden Waschschrift wurden einmal 100  $\mu\text{L}$  Puffer B (80 % MeCN in Wasser mit 0.1 % FA) sowie zweimal 100  $\mu\text{L}$  Puffer A (Wasser mit 0.1 % FA) ebenfalls durch Zentrifugation durch die Spitze geleitet. Die Probenflüssigkeit wurde dann auf die Membran gegeben, für 1 min inkubiert und zentrifugiert, ohne die vordere Spitze zu leeren, je nach Proben Volumen musste der Schritt wiederholt werden. Die nun beladene Membran wurde mit 100  $\mu\text{L}$  Puffer A gewaschen und diesmal soweit zentrifugiert bis keine Flüssigkeit mehr in der Spitze verblieb. Eluiert wurden die Peptide mit 20  $\mu\text{L}$  Puffer B, dazu inkubiert die Lösung zunächst 1 min und wurde dann bei 4000 rpm für 5 min in neue *loBind*-Reaktionsgefäße durch Zentrifugation überführt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Zuletzt erfolgte die Entfernung des Lösungsmittels mit einer SpeedVac (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 30 °C für 1 h.

### 5.1.5.2. Tandem-Massenspektrometrie<sup>n</sup>

Die Tandem-Massenspektrometrie mit den zuvor tryptisch-verdauten Proteinproben sowie die proteomische Analyse erfolgte durch Dr. Petra Janning, Andreas Brockmeyer und Malte Metz (MPI Dortmund). Vor der massenspektrometrischen Vermessung wurden die Proben mit 20  $\mu\text{L}$  Wasser (TFA 0.1%) aufgenommen und für 15 min Ultraschallwellen bei rt ausgesetzt sowie im Anschluss bei 15000 g für 1 min zentrifugiert. Daraufhin wurden 3  $\mu\text{L}$  der Probe auf eine Vorsäule geladen und für 5 min mit Wasser (0.1 %TFA) als Eluent bei einer Fließgeschwindigkeit von 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  entsalzen. Während der gesamten Analyse wird die aufgetragene Probe von der Vorsäule auf die nano-HPLC Säule übertragen. Die Elution erfolgte mit einem anfänglichen Gradienten von 5 % B hinzu 30 % B über einen Zeitraum von 35

---

<sup>n</sup> Die Tandem-Massenspektrometrie mit den zuvor tryptisch-verdauten Proteinproben sowie die proteomische Analyse erfolgte durch Dr. Petra Janning, Andreas Brockmeyer und Malte Metz (MPI Dortmund).

min (Flussrate 300 nL/min) bei 40 °C. Es wurden folgenden Laufmittel genutzt, Eluent A 0.1 % Ameisensäure in Wasser sowie Laufmittel B 0.1 % Ameisensäure in. Die nano-HPLC wurde anschließend mit steigenden Laufmittel B bis zu 60 % über 5 min sowie bis zu 95 % in weiteren 5 min gewaschen, woraufhin nach weiteren 14 min der Startgradient eingestellt wurde. Während der Elution erfolgte eine typische „TOP10 *shot-gun proteomics*“-Methode für die MS und MS/MS Analyse.<sup>275</sup> Zunächst erfolgte eine globale MS-Messung mit einem Massenbereich  $m/z$  von 300 bis 1650 bei einer Auflösung von 70000. Für die MS/MS Experimente wurde im Anschluss bis zu zehn *high energy collision dissociation* (HCD) MS/MS Scans mit einer Auflösung von 17500 der intensivsten und mindestens doppelt geladenen Ionen durchgeführt. Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Software MaxQuant. Die Spektren wurden gegen die spezifische Akt Sequenz verglichen sowie eine Sequenz Datenbank für Kontamination. Der Datenbank Abgleich erfolgte unter Berücksichtigung einer Fehlerrate von 1 % für Peptid und Protein Level, welche Rate ebenfalls durch eine weitere Datenbank validiert wurde. Zusätzliche variable Proteinmodifikationen wie Oxidation von Methioninen, N-terminale Acetylierungen der Proteine, Carboimidomethylierung von Cysteinen und artifizielle Cystein-Modifizierungen wurden in der Suche und dem Datenbank Abgleich berücksichtigt.

## 5.1.6. In-Gel Experimente

### 5.1.6.1. *in situ*-Click-Chemie

Zuerst wurde die entsprechende Akt Isoform (10  $\mu\text{M}$ ) mit einem 10-fachen Überschuss an Alkin-Sonde (5 mM Stammlösung in DMSO) bei rt für 2 h inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe des Fluorophor-Azids (1.2 Äq. bezogen auf die Menge an eingesetzte Alkin-Sonde, 5 mM Stammlösung in DMSO) sowie eine frisch angesetzte Click-Lösung, bestehend aus  $\text{CuSO}_4$  (500  $\mu\text{M}$ , 50 mM Stammlösung in  $\text{ddH}_2\text{O}$ ), TCEP (500  $\mu\text{M}$ , 50 mM Stammlösung in  $\text{ddH}_2\text{O}$ ) und TBTA (50  $\mu\text{M}$ , 1.7 mM Stammlösung in  $\text{DMSO}/\text{BuOH}$  (1:4)), wobei die Reihenfolge der Zugabe einzuhalten ist.<sup>276,277</sup> Die Proben wurden gut durchmischt und für eine weitere Stunde bei rt inkubiert. Sollte sich ein Niederschlag gebildet haben, wurde der Überstand nach Zentrifugation (5 min bei 5000 g) entfernt und das Pellet mit wässriger SDS-Lösung (0.5 % (w/v)) resuspendiert. Im Anschluss wurden die Proben kurz zentrifugiert und dann mit SDS-Probenpuffer versehen. Daraufhin wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt (siehe Kapitel 5.16.2). Die Bestimmung der *in gel*-Fluoreszenz erfolgte durch Scan des angeregten Gels (Cyanin-3, 512 nm) mit dem Typhoon FLA 9000 Imagers (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

### 5.1.6.2. Proteinauftrennung über SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteinproben wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) verwendet. Die elektrische Spannung für die Trennung lieferte das PowerPac™HC (BioRad, Hercules, CA, USA). Die jeweilige Akt Isoform wurde mit den synthetisierten Alkin-Sonden für 2 h bei rt inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe des SDS-Probenpuffers (4x) und eine Inkubation für 5 min bei 95 °C. Das 12 %ige Acrylamid-Gel wurde dann mit 10 -20 µL Probe sowie 3-5 µL des Größenstandards PageRuler™ (Plus Prestained Protein Ladder 0 -250 kDa, *Thermo Scientific*) beladen. Eine Auftrennung der Proben erfolgte über 40 -50 min bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel. Anschließend wurde das Gel mit einer Coomassie-Brillant-Blau R-250 Lösung und unter Verwendung von Mikrowellenstrahlung angefärbt. Eine nachgestellte Entfärbung des Gels erfolgte durch 20 min Inkubation mit Essigsäure/Ethanol Lösung.

<b>SDS-Probenpuffer (4x):</b>	100 mM Tris, 200 mM DTT, 1 M $\beta$ -Mercaptoethanol, 4 % (w/v) SDS, 0.2 % Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerol, pH 6.8.
<b>Laufpuffer:</b>	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.3.
<b>Coomasie-Färbelösung:</b>	0.3 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Ethanol.
<b>Entfärbelösung:</b>	10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Ethanol.

### 5.1.7. Zelluläre Charakterisierung<sup>o</sup>

#### 5.1.7.1. Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sowie die Zusammensetzung des entsprechenden Kultivierungsmediums und die Quelle, bzw. Herkunft der zum Teil immortalisierten Systeme ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

---

<sup>o</sup> Die Zelluläre Charakterisierung wurde von M.Sc. Laura Depta, Dr. Ina Landel und M.Sc. Melissa Lubeck durchgeführt (AG Rauh, TU Dortmund).

**Tabelle 5.1-2. Übersicht der verwendeten Zelllinien und Kultivierungsmedien.**

Zelllinie	Medium	Quelle
Ba/F3	RPMI-1640 GlutaMax (Gibco), 10 % FBS Good (PAN-Biotech), 10 µg/µL Interleukin-3 (Pepro-Tech), 1 % Penicilin-Streptomycin (Gibco)	DSMZ, Leibniz-Institut, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Martin Sos (Uniklinik Köln)
HEK293T	DMEM high glucose (Gibco), GlutaMax, 10 % FBS Good (PAN-Biotech), 1 % Penicilin-Streptomycin (Gibco)	ATCC, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Daniel Summerer (TU Dortmund)
PANC1	DMEM high glucose (Gibco), GlutaMax, 10 % FBS Good (PAN-Biotech), 1 % Penicilin-Streptomycin (Gibco)	ATCC, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Jens Siveke (Universitätsklinikum Essen)

### 5.1.7.2. Etablierung des Ba/F3myr-Akt Isoform Systems

Zur Generierung der Ba/F3myr-Akt-Isoform Systeme wurden folgenden Plasmide genutzt: pBABEpuroL-Akt1 (1051, RRID: Addgene\_9011), pBABEpuroL-Myr-HA-Akt2 (1271, RRID: Addgene\_9018) und pBABEpuroL-Myr-HA-Akt3 (1272, RRID: Addgene\_9019). In den Akt1 Vektor wurde nachträglich der Myr-Tag eingeführt. Zur Infektion der Ba/F3-Zellen wurde ein Retrovirus durch liposomale Transfektion in HEK293T-Zellen erzeugt. Dazu wurden zunächst  $7,5 \cdot 10^4$  HEK293T-Zellen in einer TC-Schale 60 in 5 mL Kultivierungsmedium ausgesät. Nach 24 h wurde der Transfektionsansatz mit dem jeweiligen pBabe-Plasmid, dem Verpackungsvektor pCL-Eco und dem Transfektionsreagenz TRANSIT-LT. pipettiert, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vorsichtig zu den HEK293T-Zellen zugetropft. Nach 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Virusernte. Dazu wurde der Virus enthaltende Überstand mit Hilfe eines 0.45 µm Spritzenfilters steril filtriert und direkt für die Infektion der Ba/F3-Zellen verwendet oder bei -80 °C gelagert. Für die Infektion wurden zunächst  $6 \cdot 10^6$  parentale Ba/F3-Zellen in 3 mL Infektionsmedium in einer TC-Flasche T25 vorgelegt und mit 2 mL des zuvor erzeugten Retrovirus versetzt. Zusätzlich wurden 0,5 µL murines IL-3 (c = 0,1 mg/mL) als notwendiger Wachstumsfaktor parentaler Ba/F3-Zellen sowie 4 µL Polybrene (c = 10 mg/mL) zur Verbesserung der Infektionseffizienz zugefügt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit Ba/F3-Kultivierungsmedium sowie erneuter Zugabe von 0,5 µL IL-3 (c = 0,1 mg/mL). Nach weiteren 48 h wurden die Zellen in das Ba/F3-Selektionsmedium inklusive 0,5 µL IL-3 (c = 0,1 mg/mL) überführt. Die Selektion der erfolgreich infizierten Zellen erfolgte für sieben Tage, dabei wurde alle 48 h – 72 h eine Erneuerung des Mediums vorgenommen. Anschließend erfolgte ein radikaler IL-3 Entzug, sodass die Zellen fortlaufend in Ba/F3- Kultivierungsmedium ohne IL-3 kultiviert wurden. Nach Wiedereintreten des Zellwachstums und der Proliferation der infizierten Ba/F3-Zellen ohne IL-3 wurden diese alle 48 h – 72 h passagiert (Verhältnis 1:5). Die infizierten Zellen wurden in Ba/F3-Einfriermedium bei -150 °C konserviert.

Zur Verifizierung der korrekt infizierten Ba/F3-Zellen wurde eine Genom-Isolierung und anschließende Sequenzierung mit Fokus auf das Zielgen durchgeführt. Mittels des QIAmp DNA Mini Kit von Qiagen wurde zunächst die genomische DNA der Ba/F3-Zellen isoliert und folgend das gesuchte Zielgen durch Verwendung von Zielgen flankierenden Primern mittels PCR spezifisch amplifiziert. Anschließend wurde das PCR Produkt durch Anwendung des QIAquick PCR-Purification Kits aufgereinigt und von der Firma Eurofins Genomics sequenziert.

### 5.1.7.3. Zellviabilitäts Assay

Um die Inhibitoren hinsichtlich ihrer Eigenschaften auf die Zell-Proliferation zu evaluieren wurde der CellTiter-Glo<sup>®</sup> Assay (Promega) verwendet. Für eine robuste Handhabung und den zuverlässigen Erhalt der Daten wurden initiale Etablierungsschritte mit dem System für jede Zelllinie durchgeführt. Darunter galt es die geeignete Zellzahl für diesen Assay zu bestimmen, bei welcher die Zellzahl 50 % der maximalen Lumineszenz Intensität in einem linearen Bereich abdeckt wird (Ba/F3myr-Akt1: 600 Zellen/well, Ba/F3myr-Akt2: 800 Zellen/well, Ba/F3myr-Akt3: 800 Zellen/well).

Zunächst wurden die Zellen basierend auf der ermittelten Zellzahl an Tag 0 in 384-Multikavitätsplatten (Greiner BioOne) mittels MultiDrop<sup>™</sup> Mehrkanal-Dispenser (Thermo Fisher Scientific) verteilt. Nach weiterer Kultivierung für 24 h bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Behandlung mit der Inhibitor Verdünnungsreihe mit 8 Datenpunkten von 0.1 nM bis 30 µM in Duplikaten durch den Pipettierroboter (ECHO 520 Liquid Handler, LabCyte) zu den Zellen in die 384-well-Platte gegeben. Als positiv und Negativkontrolle wurden 30 µM Staurosporin und DMSO verwendet. Anschließend wurde nach 96-stündiger Inkubation das Lumineszenzsignal nach Herstellerangaben ausgelesen. Dazu wurden 25 µL des frisch angesetzten CTG-Reagenzes mit dem Dispensiergerät zu den Zellen pipettiert und nach dem Schütteln (2 min bei 1000 rpm) der Platte 20 min inkubiert. Letztlich konnte mit dem EnVision Mikrotiterplattenleser (Perkin Elmer) das Lumineszenzsignal der einzelnen Kavitäten bestimmt werden. Eine Analyse der erhaltenen Daten erfolgte durch Fit einer 4-Parameter logistische Funktion in der *Quattro Software Suite* und lieferte die jeweiligen EC<sub>50</sub>-Werte.<sup>155</sup>

### 5.1.7.4. Western Blot

Zur Untersuchung von *in vitro* Pharmakodynamischen Effekten der Inhibitoren in den jeweiligen Zellsystemen wurden die Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitorkonzentration und angegebener Inkubationszeit lysiert. Die Protein-Konzentration wurde anschließend mit dem Pierce<sup>™</sup> BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben ermittelt und durch Zugabe von SDS-

Probenpuffer und autoklaviertem Wasser auf 1 mg/mL eingestellt. Nach Trennung der komplexen Gemische über SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon-FL, Merck Millipore) mithilfe einer Powerstation (Pierce, Thermo Fisher Scientific) bei einer Spannung von 25 V sowie unter Anwesenheit eines Transferpuffers übertragen. Anschließend wurde die Membran für 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, dann für 1 h geblockt mit dem Intercept<sup>®</sup>Blocking Puffer TBS (Li-Cor) und letztlich mit den entsprechenden primären Antikörper Lösungen in Intercept<sup>®</sup>Blocking Puffer TBS über Nacht bei 4 °C inkubiert (vgl. Tab. 5.1-3). Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal mit TBS-T Puffer für jeweils 5 min gewaschen bevor die Zugabe der sekundäre Antikörperlösung in Intercept<sup>®</sup>Blocking Puffer TBS und Inkubation für 1 h bei rt erfolgte. Nach wiederholtem waschen mit TBS-T Puffer wurden die Fluoreszenz-markierten Proteine auf der Membran mit dem Fluoreszenzleser (Odyssey CLx Imaging System, Li-Cor) detektiert.

**Transferpuffer:** 336 mM Tris, 260 mM Glycin, 140 mM Tricin, 2.5 mM EDTA; in ddH<sub>2</sub>O.

**TBS-T Puffer:** 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.4; in ddH<sub>2</sub>O.

**Tabelle 5.1-3: Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper.**

Epitop	Produkt-Nr.	Spezies	Hersteller
pAkt <sup>Ser473</sup>	4060	Hase	CST
tAkt1	2938	Hase	CST
tAkt2	3063	Hase	CST
tAkt3	3788	Hase	CST
pAkt1 <sup>Ser473</sup>	9018	Hase	CST
pAkt2 <sup>Ser473</sup>	8599	Hase	CST
pAkt3 <sup>Ser473</sup>	PA5-12898	Hase	Thermo Fisher Scientific
pPRAS40 <sup>T246</sup>	2997	Hase	CST
pS6 <sup>Ser235/236</sup>	2317	Hase	CST
pERK1/2 <sup>Thr202/204</sup>	4370	Hase	CST
cPARP/PARP	9542	Hase	CST
$\beta$ -Aktin	A5441	Maus	Sigma Aldrich
Anti-Maus IgG, DyLight <sup>™</sup> 680 Conjugate	5470	Ziege	CST
Anti-Hase IgG, DyLight <sup>™</sup> 800 4X PEG Conjugate	5151	Ziege	CST



### 5.1.7.5. CETSA Experimente

Die Zellen (PANC1:  $10^6$  Zellen) wurden in 100 mm Kultivierungsschalen (Sarstedt) gegeben und nach 24 h mit 1  $\mu$ M Inhibitor bzw. DMSO für 4.5 h behandelt. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit kalten PBS gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Es wurden gleich Volumen á 100  $\mu$ L der Zellen aliquotiert und anschließend auf die jeweilige Temperatur (40 - 80 °C) drei Minuten lang erhitzt sowie für weitere 3 min bei rt inkubiert. Nach der Zelllyse und Zentrifugation bei 15,000 rpm für 10 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach der zuvor beschriebenen Western Blot Methode analysiert.

## 5.2. Organische Synthese

### 5.2.1. Allgemeine Anmerkungen

Die hier verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden bei Acros, Activate Scientific, Alfa Aesar, Apollo Scientific, Combi-Blocks, Merck, Sigma-Aldrich, TCI-Chemicals oder VWR gekauft und ohne weitere Reinigung verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden als wasserfreie Reagenzien von den zuvor genannten kommerziellen Anbietern. Für Hydrolyse- und Redox-sensitive Reaktionen wurden die dafür benötigten Glasapparaturen nach Ausheizen unter Argon-Schutzgasatmosphäre gestellt und durchgeführt.

### 5.2.2. Materialien und Methoden

Die **Mikrowellen-unterstützten Reaktionen** wurden in einem Microwave 300 Reaktor der Firma Anton Paar vollzogen. Etwaige **Lyophilisierungen** wurden an einer Gefriertrocknungsanlage Apha 2-4 Dplus der Firma Christ vorgenommen.

Die **NMR Spektroskopie** der  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Kernen wurden auf folgenden Geräten aufgenommen: Bruker Avance DRX AV500 (500 MHz und 125 MHz), AV600 (600 MHz und 151 MHz) und AV700 (700 MHz und 176 MHz). Die  $^1\text{H}$  chemischen Verschiebungen sind in  $\delta$  ppm als singulett (s), dublett (d), dublett vom dublett (dd), triplett (t), quartett (q) oder multiplett (m) angegeben und beziehen sich auf den jeweiligen internen Standard für die deuterierten Lösemittel  $\text{CDCl}_3$  (7.21),  $\text{DMSO-}d_6$  (2.50) oder  $\text{MeOD-}d_4$  (4.78, 3.34). Die Auswertung der erhaltenen NMR-Spektren erfolgte anhand der ACD/NMR Processor Software (Version 12.01, ACDlabs, Toronto, Kanada).

Zur generellen **massenspektrometrischen Analyse (LCMS)** wurde ein Agilent HPLC-System (1100er Serie) mit CC 125/4 Nucleodur C18 gravity Säule (3  $\mu\text{m}$ ) von Macherey-Nagel verbunden mit einem Thermo Scientific Finnigan LCQ Advantage Max Ionenfallen-Massenspektrometer verwendet. Eine Auswertung der Daten wurde mithilfe des Programms Xcalibur (Thermo Scientific, Version 2.2) getätigt. Für **hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)** wurde ein Thermo LTQ-Orbitrap hochauflösendes Massenspektrometer der Firma Thermo Electron mit einem Accela HPLC-System und einer Hypersil GOLD-Säule (Thermo Electron) genutzt. Analytische Dünnschicht-Chromatographie erfolgte auf Merck 60 F254 Kieselgelplatten (Aluminium). Zur weiteren Analyse wurde **Dünnschicht-Chromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie (TLC-MS)** mittels einem *expressionL* CMS-System und Plate Express der Firma Advion durchgeführt.

Die in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen wurden über **Säulenchromatographie** an Kieselgel (VWR, Partikelgröße: 40 – 63  $\mu\text{m}$ ) oder über **Flash-Chromatographie**-Anlagen gereinigt, darunter ein Biotage Isolera One System (Wellenlängendetektion bei  $\lambda = 254$  und  $280$  nm) sowie ein Büchi Reveleris System (Wellenlängendetektion bei  $\lambda = 210, 254, 280$  nm), unter Verwendung von C18- oder Kieselgel-Kartuschen von Büchi Reveleris (4 – 330 g). Ebenfalls erfolgte teilweise eine Isolierung über **präparative HPLC** mit einem Agilent HPLC-System (1200er Serie) oder dem Büchi Reveleris System mit einer VP 125/21 oder VP 250/21 Nucleodur C18 Säule (Macherey-Nagel; Wellenlängendetektion bei  $\lambda = 210\text{--}254$  nm). Alle finalen Verbindungen wiesen eine Reinheit von  $> 95\%$  auf.

### 5.2.3. Allgemeine Synthesevorschriften

#### Allgemeine Synthesevorschrift A: Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung an 3-Brompyridinen

Unter Argon wurde in einem Mikrowellenreaktionsgefäß (10 o. 30 mL) 1.0 Äq. des Brompyridins und 1.1 Äq. der Phenylboronsäure oder dem entsprechenden Ester vorgelegt und mit 1,4-Dioxan-Wasser Gemisch (5:1, 2 mL/mmol) suspendiert. Das Gemisch wurde für 10 min unter Argonstrom entgast und anschließend mit 2.0 Äq. der Base  $\text{K}_3\text{PO}_4$  sowie 0.1 Äq. des Katalysators [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)chlorid versetzt. Daraufhin wurde die Suspension für 1 h bei  $130^\circ\text{C}$  unter Einfluss von Mikrowellenstrahlung gerührt. Das resultierende Gemisch wurde über *Celite* gefiltert, mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen sowie anschließend über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (1 – 30 % EtOAc/PE) lieferte das gewünschte Produkt.

Allgemeine Synthesevorschrift B: Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung an benzyli­cher Position

Unter Argon Atmosphäre wurden 1.0 Äq. des Pyridinderivats und 1.2 Äq. der allylischen Boronsäure oder dem entsprechenden Ester in einem Gemisch aus 1,4-Dioxan-Wasser (5:1, 2 mL/mmol) gelöst. Das Gemisch wurde für 10 min unter Argonstrom entgast und anschließend mit 2.0 Äq. der Base  $K_3PO_4$  sowie 0.1 Äq. des Katalysators [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)chlorid versetzt. Daraufhin wurde die Suspension für 12 h bei 75 °C gerührt. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde zunächst über *Celite* gefiltert und das Filtrat mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über  $Na_2SO_4$  getrocknet sowie das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (1 – 4 % MeOH/DCM + 1 %  $NH_3$ ) lieferte das gewünschte Produkt.

Allgemeine Synthesevorschrift C: Amid Kupplung mit nikotinischer Säure

In einem Rundkolben wurden 1.0 Äq. der nikotinischen Säure in MeCN (5 mL/mmol) suspendiert und anschließend unter Rühren 3.0 Äq. der Base DIPEA sowie 1.5 Äq. des Kupplungsreagenzes HATU hinzugegeben. Nach weiteren 30 min bei rt wurden dem Gemisch 1.2 Äq. des Amins langsam zugeführt und für 16 h gerührt. Die Lösung wurde mit DCM extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, dann über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gewünschte Produkt konnte nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (2 – 5 % MeOH/DCM + 1 %  $NH_3$ ) erhalten werden.

Allgemeine Synthesevorschrift D: Nukleophile Substitution an benzyli­cher Position

Zuerst wurden 1.0 Äq. des Pyridins und 3.0 Äq. der Base  $K_2CO_3$  in DMF o. THF (3 mL/mmol) vorgelegt und anschließend 2.0 Äq. des Nukleophils hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde je nach eingesetztem Nukleophil bei rt oder 90 °C für 12 h gerührt. Die Lösung wurde mit DCM extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, dann über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gewünschte Produkt konnte nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (4 – 8 % MeOH/DCM + 1 %  $NH_3$ ) erhalten werden.

Allgemeine Synthesevorschrift E: Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung an 2-Chloridpyridine Derivaten

Unter Argon Atmosphäre wurde in einem Mikrowellenreaktionsgefäß 1.0 Äq. des Pyridinderivats und 1.1 Äq. der Boronsäure **24** in einem Gemisch aus 1,4-Dioxan-Wasser (5:1, 2 mL/mmol) gelöst. Das Gemisch wurde für 10 min unter Argonstrom entgast und anschließend mit 2.0 Äq. der Base  $K_2CO_3$

sowie 0.1 Äq. des Katalysators Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) versetzt. Daraufhin wurde die Suspension für 2 h bei 130 °C gerührt. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde zunächst über *Celite* gefiltert und das Filtrat mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet sowie das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (6 – 10 % MeOH/DCM + 1 % NH<sub>3</sub>) lieferte das gewünschte Produkt.

#### Allgemeine Synthesevorschrift F: Reduktive Aminierung mit Cyanoborhydrid

Es wurden 1. Äq. des sekundärenamins und 1.2 Äq. des Aldehyds in trockenem MeOH (5 mL/mmol) gelöst. Wenige Tropfen Et<sub>3</sub>N und AcOH wurden zugesetzt und das Gemisch für 4 h bei 75 °C unter Argon Atmosphäre gerührt. Anschließend wurden 4.0 Äq. NaCNBH<sub>3</sub> langsam hinzugegeben und das Gemisch weitere 12 h bei 75 °C gerührt. Das Präzipitat wurde entfernt und das Lösemittel unter Vakuum evaporiert. Daraufhin konnte das Rohprodukt mit DCM aufgenommen und mit ges. NaHCO<sub>3</sub> gewaschen werden. Nach trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Entfernung des Lösemittels *in vacuo*, lieferte eine säulenchromatographische Reinigung an reverser C18-Phase (Wasser/MeCN + 0.01 % TFA) das gewünschte Produkt.

### 5.2.4. Verbindungsverzeichnis

Genauere Ausführungen zur Darstellung von den Verbindungen **14b**, **15a**, **16b**, **16c** und **19** befinden sich in der Masterarbeit „Design und Synthese kovalent-allosterischer Liganden zur Isoform-selektiven Adressierung der Proteinkinase Akt“ (Lena Quambusch, 2017, TU Dortmund) sowie in der Publikation QUAMBUSCH *et al.* (2019).<sup>159,278</sup>

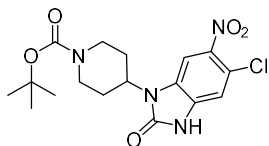
Verbindung 20 .....	123
Verbindung 21 .....	123
Verbindung 22 .....	124
Verbindung 23 .....	125
Verbindung 24 .....	125
Verbindung 26 .....	126
Verbindung 27 .....	127
Verbindung 28a .....	128
Verbindung 28b .....	128
Verbindung 28c .....	129
Verbindung 28d .....	130
Verbindung 28e .....	130
Verbindung 28f .....	131
Verbindung 28g .....	132
Verbindung 30a .....	133
Verbindung 30b .....	133

Verbindung 31a .....	133
Verbindung 31b .....	134
Verbindung 31c .....	134
Verbindung 32a .....	135
Verbindung 32b .....	136
Verbindung 32c .....	136
Verbindung 33c .....	137
Verbindung 33e .....	138
Verbindung 34a .....	138
Verbindung 34b .....	139
Verbindung 34c .....	139
Verbindung 34d .....	140
Verbindung 34e .....	140
Verbindung 34f .....	141
Verbindung 35a .....	141
Verbindung 35b .....	142
Verbindung 36a .....	143
Verbindung 36b .....	143
Verbindung 36c .....	144
Verbindung 37a .....	144
Verbindung 37b .....	144
Verbindung 37c .....	145
Verbindung 37d .....	145
Verbindung 37e .....	146
Verbindung 37f .....	146
Verbindung 37g .....	147
Verbindung 37h .....	147
Verbindung 37i .....	148
Verbindung 37j .....	148
Verbindung 37k .....	149
Verbindung 37l .....	149
Verbindung 37m .....	150
Verbindung 37n .....	151
Verbindung 38a .....	151
Verbindung 38b .....	152
Verbindung 38c .....	152
Verbindung 38d .....	153
Verbindung 38e .....	154
Verbindung 39a .....	155
Verbindung 39b .....	155
Verbindung 39c .....	156
Verbindung 39d .....	157
Verbindung 39e .....	158
Verbindung 39f .....	158
Verbindung 39g .....	159
Verbindung 39h .....	160
Verbindung 39i .....	160
Verbindung 39j .....	162
Verbindung 39k .....	162
Verbindung 39l .....	163
Verbindung 39m .....	164
Verbindung 39n .....	165
Verbindung 39o .....	165

Verbindung 39p .....	166
Verbindung 40 .....	167
Verbindung 41a .....	167
Verbindung 41b .....	168
Verbindung 41c .....	168
Verbindung 41d .....	169
Verbindung 41e .....	169
Verbindung 41f .....	170
Verbindung 41g .....	170
Verbindung 41h .....	171
Verbindung 41i .....	171
Verbindung 41j .....	172
Verbindung 41k .....	172
Verbindung 41l .....	173
Verbindung 41m .....	173
Verbindung 41n .....	174
Verbindung 42a .....	174
Verbindung 42b .....	175
Verbindung 42c .....	176
Verbindung 42d .....	176
Verbindung 42e .....	178
Verbindung 42f .....	179
Verbindung 42g .....	180
Verbindung 42h .....	180
Verbindung 42i .....	181
Verbindung 42j .....	182
Verbindung 42k .....	183
Verbindung 42l .....	184
Verbindung 42m .....	185
Verbindung 42n .....	186
Verbindung 42o .....	186
Verbindung 43 .....	187
Verbindung 44 .....	188
Verbindung 45a .....	188
Verbindung 45b .....	189
Verbindung 45c .....	189
Verbindung 46a .....	190
Verbindung 46b .....	191
Verbindung 46c .....	191
Verbindung 46d .....	192
Verbindung 50 .....	193
Verbindung 51a .....	194
Verbindung 51b .....	194

## 5.2.5. Synthesevorschriften und Analytik

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

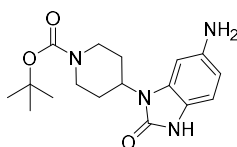


#### Verbindung 20

Die Nitroverbindung (**19**, 5.4 g, 18.2 mmol) wurde in 50 mL DCM vorgelegt und dann 2.4 mL der Base Triethylamin (20.2 mmol, 1.1 Äq.) hinzugefügt. Daraufhin wurden 1.2 Äq. Boc<sub>2</sub>O (4.4 mL, 21.8 mmol) in 10 mL DCM gelöst und tropfenweise dem Gemisch zugesetzt, welches nach vollständiger Zugabe für weitere 12 h bei rt rührte. Im Anschluss wurde 30 mL Wasser hinzugegeben und mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. NaHCO<sub>3</sub> Lösung gewaschen. Nachdem trocknen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Filtration und Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck, wurde eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (1-2 % MeOH/DCM + 1 % NH<sub>3</sub>) durchgeführt und lieferte so das gewünschte Produkt als gelben Feststoff **20** (6.3 g, 15.9 mmol, 85 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d) δ ppm 1.66 - 1.70 (m, 9H) 1.80 (dd, *J* = 12.15, 1.74 Hz, 4H) 2.32 (m, 4 H) 4.38 (m, 1H) 7.66 (s, 1H) 8.14 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d) δ ppm 27.98, 52.39, 80.28, 86.60, 105.80, 117.23, 121.89, 127.91, 129.91, 143.35, 147.96, 149.80, 154.52; HPLC-MS (ESI): *m/z* für C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Cl ([M+H<sup>+</sup>]), 397.83 berechnet, 397.40 gefunden.

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



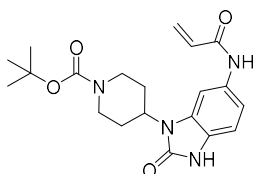
#### Verbindung 21

Das Startmaterial (**20**, 5.0 g, 12.0 mmol, 1.0 Äq.), der Katalysator 5 % Pd/C (0.2 g) und Ammoniumformiat (7.56 g, 120.0 mmol, 10 Äq.) wurden in MeOH (36 mL, 3 mL/mmol) suspendiert und für 16 h bei 80 °C refluxiert. Das Reaktionsgemisch wurde über *Celite* filtriert, das Lösemittel evaporiert und das Rohprodukt in DCM gelöst sowie mit ges. NaHCO<sub>3</sub> Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, anschließender Filtration und Entfernung des Lösemittels, lieferte eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (3-4 % MeOH/DCM + 1 % NH<sub>3</sub>) das gewünschte Produkt **21** als Feststoff (2.32 g, 7.0 mmol, 58 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.55 (s, 9H) 1.69 (d, *J* = 10.99 Hz, 4H) 2.15 (m, 4H) 4.23 (m, 1H) 6.30 (dd, *J* = 8.62, 2.06 Hz, 1H) 6.53 (s, 1H) 7.38 (s, 1H); **<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 28.57, 50.95, 79.35, 83.74, 95.49, 107.62, 114.99, 116.22, 129.65, 146.28, 148.80, 150.13, 154.26; **HPLC-MS (ESI)**: [R<sub>t</sub>]: 5.03 min, *m/z* für C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 333.40 berechnet, 333.84 gefunden.

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



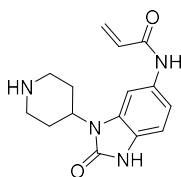
#### Verbindung 22

Das Anilin (**21**, 2.32 g, 7.0 mmol 1.0 Äq.), wurde in trockenem THF (10 mL/mmol) gelöst, dann 3.0 Äq. DIPEA (3.4 mL, 21.0 mmol) hinzugefügt und das Gemisch für 15 min bei 0 °C unter Argon Atmosphäre gerührt. Daraufhin wurde eine Lösung von 1.0 Äq. Acryloylchlorid (0.5 mL, 7.0 mmol) in 5 mL THF langsam zugetropft und für weitere 12 h bei rt gerührt. Die Zugabe von ges. NaHCO<sub>3</sub> Lösung beendete die Reaktion. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit ges. NaCl Lösung gewaschen sowie über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde *in vacuo* evaporiert und eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (3 - 4 % MeOH/DCM + 1 % NH<sub>3</sub>) liefert das Produkt **22** (2.2 g, 5.8 mmol, 83 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.58 (s, 9H) 1.74 (d, *J* = 12.05 Hz, 4H) 2.15 (m, 4H) 4.32 (m, 1H) 5.76 (d, *J* = 7.48 Hz, 2H) 6.25 (dd, *J* = 17.01, 1.91 Hz, 1H) 7.66 (d, *J* = 8.70 Hz, 1H) 7.83 (d, *J* = 1.68 Hz, 1H) 10.24 (s, 1H); **<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 28.11, 51.17, 55.40, 79.43, 84.45, 101.18, 114.47, 121.90, 127.43, 128.83, 132.22, 135.78, 148.58, 149.99, 154.31, 163.54; **HPLC-MS (ESI)**: [R<sub>t</sub>]: 7.34 min, *m/z* für C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 387.45 berechnet, 387.81 gefunden.



#### 5.2.5.4. Darstellung von *N*-(2-Oxo-3-(piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid

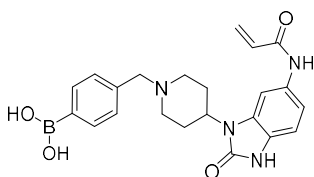


#### Verbindung 23

Eine Lösung aus *tert*-Butyl 4-(6-acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-carboxylat (**22**, 2.2 g, 5.8 mmol, 1.0 Äq.) in DCM und TFA (3:1) (5 mL/mmol) wurde für 12 h bei rt gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit 10 M NaOH Lösung versetzt und neutralisiert. Das entstandene Präzipitat wurde entfernt und die Lösung mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösemittel evaporiert. Das gewünschte Produkt **23** (1.3 g, 4.7 mmol, 81 %) konnte nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (7 – 8 % MeOH/DCM + 1 % NH<sub>3</sub>) erhalten werden.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.88 (d, *J* = 12.51 Hz, 1H) 2.55 (m, 4H) 3.12 (q, *J* = 12.00 Hz, 4H) 4.42 (m, 1H) 5.99 (dd, *J* = 252.23, 17.09 Hz, 1H) 6.45 (dd, *J* = 17.01, 10.15 Hz, 1H) 6.92 - 6.96 (m, 1H) 6.98 (s, 1H) 7.85 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 26.11, 43.49, 47.96, 102.11, 109.31, 113.80, 125.17, 126.88, 129.45, 132.82, 154.41, 163.31; HPLC-MS (ESI): [R<sub>t</sub>]: 3.25 min, *m/z* für C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 287.34 berechnet, 287.18 gefunden.

#### 5.2.5.5. Darstellung von (4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)boronsäure



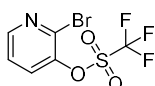
#### Verbindung 24

Das sekundäre Amin (**23**, 1.0 g, 3.5 mmol, 1.0 Äq.) und 4-Formylphenylboronsäure (625 mg, 4.2 mmol, 1.2 Äq.) wurden in trockenem MeOH (5 mL/mmol) gelöst. Wenige Tropfen Et<sub>3</sub>N und AcOH wurden zugesetzt und das Gemisch für 4 h bei 75 °C unter Argon Atmosphäre gerührt. Anschließend wurden 4.0 Äq. NaCNBH<sub>3</sub> (877 mg, 13.9 mmol) langsam hinzugegeben und das Gemisch weitere 12 h bei 75 °C gerührt. Das Präzipitat wurde entfernt und das Lösemittel unter Vakuum evaporiert.

Daraufhin konnte das Rohprodukt mit DCM aufgenommen und mit ges. NaHCO<sub>3</sub> gewaschen werden. Nach trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Entfernung des Lösemittels *in vacuo*, lieferte eine säulenchromatographische Reinigung an reverser C18-Phase (Wasser/MeCN + 0.01 % TFA) das gewünschte Produkt **24** (980 mg, 2.3 mmol, 66 %).

<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.94 (d, *J* = 12.80 Hz, 2H) 2.63 (d, *J* = 12.80 Hz, 2H) 3.22 (d, *J* = 11.40 Hz, 2H) 3.50 (d, *J* = 11.19 Hz, 2H) 4.34 (d, *J* = 3.98 Hz, 2H) 4.41 - 4.47 (m, 1H) 5.71 - 5.76 (m, 1H) 6.24 (dd, *J* = 17.05, 1.88 Hz, 1H) 6.44 (dd, *J* = 16.94, 10.16 Hz, 1H) 6.91 - 7.02 (m, 2H) 7.22 - 7.29 (m, 2H) 7.49 (d, *J* = 7.96 Hz, 1H) 7.70 - 7.78 (m, 2H) 7.89 (d, *J* = 7.96 Hz, 2H) 10.10 (s, 1H) 10.89 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 26.23, 47.52, 51.08, 59.29, 62.92, 101.22, 108.58, 113.34, 124.69, 125.37, 128.89, 130.32, 131.13, 132.29, 133.97, 134.50, 140.08, 144.39, 153.81, 162.87; HPLC-MS (ESI): [R<sub>t</sub>]: 4.57 min, *m/z* für C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>BN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 421.28 berechnet, 421.27 gefunden.

#### 5.2.5.6. Darstellung von 2-Bromopyridin-3-yl trifluoromethanesulfonat

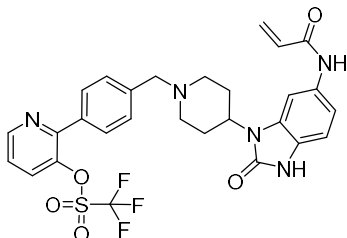


#### Verbindung 26

2-Bromopyridin-3-ol (**25**, 100 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DCM (5 mL, 10 mL/mmol) gelöst und mit einem Eisbad unter Rühren auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde die Base Triethylamin (0.09 mL, 0.63 mmol, 1.1 Äq.) zugesetzt und dann langsam Tirflatanhydrid (0.1 mL, 0.69 mmol, 1.2 Äq.) zur Lösung getropft. Das Reaktionsgemisch rührte für weitere 12 h bei rt. Durch Zugabe von ges. NaHCO<sub>3</sub> Lösung wurde die Reaktion beendet. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (3 - 5 % EtOAc/PE) lieferte das Produkt als Öl (**26**, 96.7 mg, 0.31 mmol, 55 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 7.70 (dd, *J* = 8.24, 4.58 Hz, 1 H) 8.16 (d, *J* = 8.24 Hz, 6 H) 8.55 (dd, *J* = 4.58, 1.22 Hz, 6 H); <sup>13</sup>C NMR (116 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 126.05 (s, 1 C) 132.71 (s, 1 C) 135.32 (s, 1 C) 144.63 (s, 1 C) 150.77 (s, 2 C); HPLC-MS (ESI): [R<sub>t</sub>]: 7.65 min, *m/z* für C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>BrF<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>S ([M+H<sup>+</sup>]), 307.69 berechnet, 307.06 gefunden.

**5.2.5.7. Darstellung von 2-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)pyridin-3-yl trifluoromethanesulfonat**

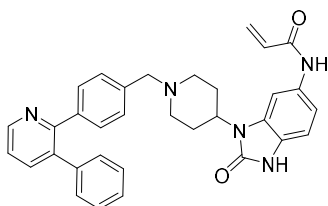


**Verbindung 27**

Brompyridin (**26**, 50.0 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (90.2 mg, 0.18 mmol, 1.1 Äq.), die Base  $K_3PO_4$  (69.3 mg, 0.33 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (11.9 mg, 0.02 mmol, 0.1 Äq) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift A umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als kristalliner Feststoff (**27**, 41.2 mg, 0.07 mmol, 42 %).

**$^1H$ -NMR** (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1.62 - 1.72 (m, 6 H) 2.07 - 2.18 (m, 6 H) 2.26 - 2.37 (m, 2 H) 2.92 - 3.04 (m, 2 H) 3.53 - 3.58 (m, 1 H) 4.06 - 4.18 (m, 1 H) 5.71 - 5.78 (m, 1 H) 6.26 (d,  $J = 16.87$  Hz, 1 H) 6.42 (dd,  $J = 17.06, 10.09$  Hz, 1 H) 6.88 - 6.96 (m, 1 H) 7.24 - 7.32 (m, 1 H) 7.33 - 7.41 (m, 2 H) 7.50 - 7.57 (m, 1 H) 7.67 (d,  $J = 7.70$  Hz, 1 H) 7.70 - 7.76 (m, 2 H) 8.13 (d,  $J = 8.07$  Hz, 1 H) 8.79 (d,  $J = 3.67$  Hz, 1 H) 10.09 (s, 1 H) 10.78 - 10.82 (m, 1 H);  **$^{13}C$ -NMR** (151 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 25.16 (s, 1 C) 29.17 (s, 1 C) 50.64 (s, 1 C) 53.13 (s, 1 C) 60.23 (s, 1 C) 84.04 (s, 1 C) 101.38 (s, 1 C) 109.12 (s, 1 C) 112.60 (s, 1 C) 124.58 (s, 1 C) 126.83 (s, 1 C) 127.43 (s, 1 C) 128.68 (s, 1 C) 128.88 (s, 1 C) 129.35 (s, 1 C) 131.72 (s, 1 C) 132.52 (s, 1 C) 133.12 (s, 1 C) 134.10 (s, 1 C) 134.89 (s, 1 C) 138.82 (s, 1 C) 142.38 (s, 1 C) 144.77 (s, 1 C) 150.23 (s, 1 C) 151.44 (s, 1 C) 154.48 (s, 1 C) 163.25 (s, 1 C); **HRMS (ESI)**:  $m/z$  für  $C_{28}H_{37}F_3N_5O_2S$  ( $[M+H]^+$ ), 602.61 berechnet, 602.15 gefunden.

**5.2.5.8. Darstellung von *N*-(2-oxo-3-(1-(4-(3-Phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

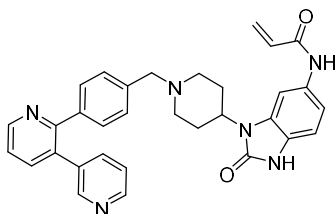


**Verbindung 28a**

Chlorpyridin (**30a**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (19.4 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**28a**, 34.0 mg, 0.18 mmol, 69 %).

$^1H$ -NMR (700 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 1.79 (d,  $J = 10.00$  Hz, 2 H) 2.26 (t,  $J = 11.45$  Hz, 2 H) 2.50 - 2.59 (m, 2 H) 3.09 (d,  $J = 11.83$  Hz, 2 H) 3.64 (s, 2 H) 4.30 (s, 1 H) 5.80 (dd,  $J = 10.00$ , 1.72 Hz, 1 H) 6.35 - 6.41 (m, 1 H) 6.43 - 6.50 (m, 1 H) 7.04 (d,  $J = 8.39$  Hz, 1 H) 7.19 (dd,  $J = 6.67$ , 2.90 Hz, 2 H) 7.25 - 7.37 (m, 8 H) 7.52 (dd,  $J = 7.74$ , 4.95 Hz, 1 H) 7.74 (d,  $J = 1.72$  Hz, 1 H) 7.90 (dd,  $J = 7.74$ , 1.72 Hz, 1 H) 8.62 (dd,  $J = 4.89$ , 1.67 Hz, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 29.82, 52.40, 54.17, 63.35, 104.24, 110.53, 115.66, 124.13, 126.78, 127.71, 128.67, 129.55, 130.44, 130.68, 130.85, 131.15, 132.63, 133.84, 138.47, 140.52, 140.66, 140.95, 148.95, 156.78, 158.45, 166.24; HRMS (ESI): [ $R_t$ ]: 5.98 min,  $m/z$  für  $C_{33}H_{31}N_5O_2$  ( $[M+H]^+$ ), 530.2550 berechnet, 530.2557 gefunden.

**5.2.5.9. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-([3,3'-Bipyridin]-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

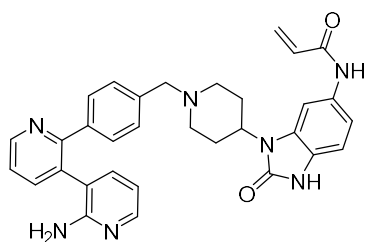


**Verbindung 28b**

Triflat (**27**, 15.0 mg, 0.02 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure (3.0 mg, 0.02 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_3PO_4$  (10.6 mg, 0.05 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (1.8 mg, 0.002 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift A umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als kristalliner Feststoff (**28b**, 10.1 mg, 0.01 mmol, 77 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 1.78 (d, *J* = 10.09 Hz, 2 H) 2.19 - 2.30 (m, 2 H) 2.47 - 2.60 (m, 2 H) 3.08 (d, *J* = 10.64 Hz, 2 H) 3.64 (s, 2 H) 4.28 (s, 1 H) 5.78 (d, *J* = 11.55 Hz, 1 H) 6.32 - 6.40 (m, 1 H) 6.41 - 6.49 (m, 1 H) 7.02 (d, *J* = 8.44 Hz, 1 H) 7.25 (d, *J* = 8.44 Hz, 1 H) 7.28 - 7.33 (m, 2 H) 7.35 - 7.44 (m, 3 H) 7.57 (d, *J* = 12.65 Hz, 1 H) 7.71 (d, *J* = 9.72 Hz, 1 H) 7.75 (s, 1 H) 7.97 (d, *J* = 7.70 Hz, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 8.44 (d, *J* = 3.85 Hz, 1 H) 8.68 (d, *J* = 4.77 Hz, 1 H); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 29.79 (s, 1 C) 52.35 (s, 1 C) 54.21 (s, 1 C) 63.26 (s, 1 C) 104.14 (s, 1 C) 110.52 (s, 1 C) 115.58 (s, 1 C) 124.45 (s, 1 C) 125.13 (s, 1 C) 126.75 (s, 1 C) 127.72 (s, 1 C) 130.67 (s, 1 C) 131.29 (s, 1 C) 132.65 (s, 1 C) 133.88 (s, 1 C) 134.43 (s, 1 C) 137.52 (s, 1 C) 139.35 (s, 1 C) 139.92 (s, 1 C) 140.72 (s, 1 C) 148.98 (s, 1 C) 149.99 (s, 1 C) 150.69 (s, 1 C) 156.75 (s, 1 C) 158.82 (s, 1 C) 166.20 (s, 1 C); **HRMS (ESI)**: [*R*<sub>t</sub>]: 4.94 min, *m/z* für C<sub>32</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> ([*M*+*H*<sup>+</sup>]), 531.2530 berechnet, 530.2522 gefunden.

#### 5.2.5.10. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(2'-Amino-[3,3'-bipyridin]-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid

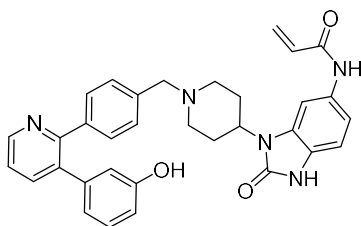


#### Verbindung 28c

Triflat (**27**, 25.0 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure (9.1 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.), die Base K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (17.6 mg, 0.08 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (3.0 mg, 0.004 mmol, 0.1 Äq) wurden nach der allgemeinen Synthesvorschrift A umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als kristalliner Feststoff (**28c**, 7.0 mg, 0.01mmol, 31 %).

**HRMS (ESI)**: *m/z* für C<sub>32</sub>H<sub>32</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> ([*M*+*H*<sup>+</sup>]), 546.2612 berechnet, 546.2625 gefunden.

**5.2.5.11. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(3-(3-Hydroxyphenyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

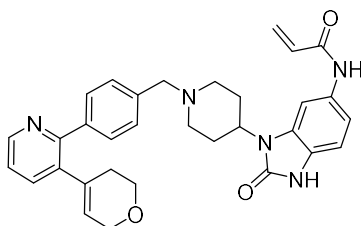


**Verbindung 28d**

Triflat (**27**, 25.0 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure (5.7 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_3PO_4$  (17.6 mg, 0.08 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (3.0 mg, 0.004 mmol, 0.1 Äq) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift A umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als kristalliner Feststoff (**28d**, 14.0 mg, 0.02 mmol, 62 %).

$^1H$ -NMR (700 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 1.32 - 1.38 (m, 2 H) 1.79 (d,  $J = 12.26$  Hz, 2 H) 2.49 - 2.61 (m, 1 H) 3.11 (d,  $J = 10.97$  Hz, 2 H) 3.63 - 3.70 (m, 2 H) 4.29 (t,  $J = 12.48$  Hz, 1 H) 5.78 (d,  $J = 10.11$  Hz, 1 H) 6.34 - 6.39 (m, 1 H) 6.41 - 6.46 (m, 1 H) 6.54 (s, 1 H) 6.63 - 6.70 (m, 1 H) 7.00 - 7.04 (m, 2 H) 7.09 (t,  $J = 7.85$  Hz, 1 H) 7.21 - 7.26 (m, 2 H) 7.30 - 7.36 (m, 4 H) 7.48 (dd,  $J = 7.53, 5.16$  Hz, 1 H) 7.72 (s, 1 H) 7.86 (d,  $J = 6.67$  Hz, 1 H) 8.58 (d,  $J = 4.09$  Hz, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 29.66 (s, 1 C) 50.00 (s, 1 C) 52.24 (s, 1 C) 54.11 (s, 1 C) 63.29 (s, 1 C) 104.26 (s, 1 C) 110.53 (s, 1 C) 115.56 (s, 1 C) 115.71 (s, 1 C) 117.80 (s, 1 C) 121.99 (s, 1 C) 124.08 (s, 1 C) 126.80 (s, 1 C) 127.75 (s, 1 C) 130.57 (s, 1 C) 130.64 (s, 1 C) 131.08 (s, 1 C) 132.62 (s, 1 C) 133.83 (s, 1 C) 138.57 (s, 1 C) 140.50 (s, 1 C) 142.21 (s, 1 C) 148.88 (s, 1 C) 156.77 (s, 1 C) 158.31 (s, 1 C) 158.65 (s, 1 C) 166.26 (s, 1 C); HPLC-MS (ESI):  $m/z$  für  $C_{33}H_{32}N_5O_3$  ( $[M+H]^+$ ), 546.64 berechnet, 546.25 gefunden.

**5.2.5.12. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(3-(3,6-Dihydro-2H-pyran-4-yl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**



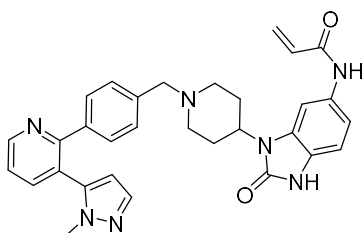
**Verbindung 28e**

Triflat (**27**, 20.0 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure (6.9 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_3PO_4$  (14.1 mg, 0.06 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid 130

(2.4 mg, 0.003 mmol, 0.1 Äq) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift A umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als kristalliner Feststoff (**28e**, 9.2 mg, 0.01 mmol, 52 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 1.18 - 1.43 (m, 2 H) 2.02 (s, 2 H) 2.14 (d, *J* = 11.92 Hz, 2 H) 2.82 (d, *J* = 10.45 Hz, 2 H) 3.68 (s, 3 H) 4.19 (s, 1 H) 4.48 (s, 1 H) 4.54 (s, 1 H) 5.75 - 5.89 (m, 2 H) 6.32 - 6.49 (m, 2 H) 6.97 (d, *J* = 6.97 Hz, 1 H) 7.04 (d, *J* = 7.15 Hz, 1 H) 7.56 (s, 1 H) 7.69 (s, 2 H) 7.77 (d, *J* = 6.97 Hz, 2 H) 7.89 - 8.02 (m, 2 H) 8.61 (s, 1 H); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 27.43 (s, 1 C) 29.85 (s, 1 C) 53.32 (s, 1 C) 61.38 (s, 1 C) 65.12 (s, 1 C) 66.52 (s, 1 C) 103.34 (s, 1 C) 110.72 (s, 1 C) 115.48 (s, 1 C) 124.95 (s, 1 C) 126.56 (s, 1 C) 127.77 (s, 1 C) 129.75 (s, 1 C) 130.35 (s, 1 C) 131.16 (s, 1 C) 132.40 (s, 1 C) 132.57 (s, 1 C) 135.49 (s, 1 C) 139.45 (s, 1 C) 140.86 (s, 1 C) 142.24 (s, 1 C) 147.94 (s, 1 C) 155.81 (s, 1 C) 156.48 (s, 1 C) 166.03 (s, 1 C); **HRMS (ESI)**: *m/z* für C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 536.2656 berechnet, 536.2671 gefunden.

### 5.2.5.13. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(3-(1-Methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid



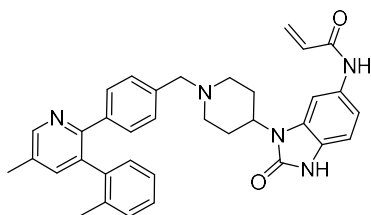
#### Verbindung **28f**

Triflat (**27**, 30.0 mg, 0.05 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure (11.4 mg, 0.053 mmol, 1.1 Äq.), die Base K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (21.1 mg, 0.1 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (3.6 mg, 0.005 mmol, 0.1 Äq) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift A umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als kristalliner Feststoff (**28f**, 11.7 mg, 0.02 mmol, 44 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 2.01 - 2.17 (m, 2 H) 2.75 - 2.84 (m, 2 H) 3.22 - 3.29 (m, 1 H) 3.62 - 3.70 (m, 2 H) 4.37 - 4.42 (m, 2 H) 4.47 - 4.55 (m, 1 H) 5.79 (dd, *J* = 9.81, 1.56 Hz, 1 H) 6.32 - 6.40 (m, 1 H) 6.41 - 6.49 (m, 1 H) 6.92 - 7.05 (m, 2 H) 7.32 - 7.41 (m, 1 H) 7.47 - 7.58 (m, 4 H) 7.91 - 8.04 (m, 1 H) 8.71 (s, 1 H) 8.80 (dd, *J* = 4.77, 1.47 Hz, 1 H) 10.05 (s, 1 H) 10.75 (s, 1H); **<sup>13</sup>C-NMR** (176 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 26.01 (s, 1 C) 35.54 (s, 1 C) 51.74 (s, 1 C) 60.43 (s, 1 C) 101.96 (s, 1 C) 107.80 (s, 1 C) 109.28 (s, 1 C) 114.06 (s, 1 C) 123.02 (s, 1 C) 124.15 (s, 1 C) 125.15 (s, 1 C) 125.42 (s, 1 C) 126.36 (s, 1 C) 128.92 (s, 1 C) 129.09 (s, 1 C) 129.62 (s, 1 C) 130.06 (s, 1 C) 130.98 (s, 1 C) 131.07 (s, 1 C) 132.48 (s, 1 C) 137.52 (s, 1 C) 137.66 (s, 1 C) 138.42 (s, 1 C) 140.35 (s, 1 C) 149.85 (s, 1 C)

155.04 (s, 1 C) 156.34 (s, 1 C) 164.62 (s, 1 C); **HRMS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{31}H_{32}N_7O_2$  ( $[M+H^+]$ ), 533.2612 berechnet, 533.2628 gefunden.

#### 5.2.5.14. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-Methyl-3-(*o*-tolyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid

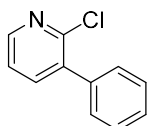


#### Verbindung 28g

Chlorpyridin (**30b**, 25.0 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (48.2 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (31.7 mg, 0.23 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (13.2 mg, 0.01 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**28g**, 30.1 mg, 0.05 mmol, 47 %).

**$^1H$ -NMR** (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1.87 (s, 3 H) 1.94 (d,  $J = 11.90$  Hz, 3 H) 2.42 (s, 3 H) 2.58 - 2.65 (m, 2 H) 3.13 - 3.25 (m, 3 H) 3.42 (s, 2 H) 3.47 - 3.53 (m, 1 H) 4.28 (d,  $J = 4.27$  Hz, 2 H) 4.33 - 4.40 (m, 2 H) 5.71 - 5.76 (m, 1 H) 6.23 (dd,  $J = 17.01, 1.91$  Hz, 2 H) 6.43 (dd,  $J = 16.94, 10.22$  Hz, 2 H) 6.95 (s, 3 H) 7.13 - 7.30 (m, 5 H) 7.38 (s, 4 H) 7.47 - 7.56 (m, 2 H) 7.69 (d,  $J = 0.92$  Hz, 1 H) 7.83 (s, 1 H) 8.61 (d,  $J = 1.68$  Hz, 1 H) 9.70 - 9.80 (m, 2 H) 10.11 (s, 1 H) 10.90 (s, 1 H);  **$^{13}C$ -NMR** (176 MHz,  $MeOD-d_4$ )  $\delta$  ppm 17.43 (s, 1 C) 19.63 (s, 1 C) 25.91 (s, 1 C) 47.54 (s, 1 C) 51.02 (br. s., 1 C) 58.83 (s, 1 C) 101.42 (s, 1 C) 108.90 (s, 1 C) 112.25 (s, 1 C) 113.31 (s, 1 C) 114.57 (s, 1 C) 116.89 (s, 1 C) 119.22 (s, 1 C) 124.66 (s, 1 C) 126.01 (s, 1 C) 126.49 (s, 1 C) 128.06 (s, 1 C) 128.94 (s, 1 C) 129.03 (s, 1 C) 129.22 (s, 1 C) 129.44 (s, 1 C) 129.71 (s, 1 C) 130.10 (s, 1 C) 130.79 (s, 1 C) 131.44 (s, 1 C) 131.91 (s, 1 C) 132.41 (s, 1 C) 132.67 (s, 1 C) 135.03 (s, 1 C) 135.14 (s, 1 C) 138.52 (s, 1 C) 147.99 (s, 1 C) 151.83 (s, 1 C) 153.97 (s, 1 C) 162.86 (s, 1 C); **HPLC-MS (ESI):** [ $R_t$ ]: 6.27 min,  $m/z$  für  $C_{35}H_{36}N_5O_2$  ( $[M+H^+]$ ), 558.76 berechnet, 558.19 gefunden.

#### 5.2.5.15. Darstellung von 2-Chloro-3-phenylpyridin

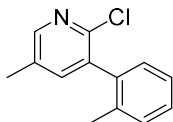




**Verbindung 30a**

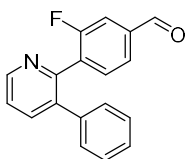
3-Bromo-2-chloropyridine (**29**, 50.0 mg, 0.26 mmol, 1.0 Äq.), Phenylboronsäure (63.6 mg, 0.31 mmol, 1.2 Äq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (107.7 mg, 0.77 mmol, 3.0 Äq.) sowie [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (19.1 mg, 0.026 mol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesvorschrift A umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als weißen Feststoff (**30**, 34.0 mg, 0.18 mmol, 69 %).

<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 7.41 - 7.56 (m, 6 H) 7.88 (d, *J* = 7.53 Hz, 4 H) 8.44 (d, *J* = 4.73 Hz, 4 H); <sup>13</sup>C-NMR (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 123.44, 128.28, 128.37, 129.18, 136.21, 137.04, 140.31, 148.34, 148.68; **HPLC-MS (ESI)**: [R<sub>t</sub>]: 9.16 min, *m/z* für C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>ClN ([M+H<sup>+</sup>]), 190.64 berechnet, 190.12 gefunden.

**5.2.5.16. Darstellung von 2-Chloro-5-methyl-3-(*o*-tolyl)pyridin****Verbindung 30b**

3-Bromo-2-chloro-4-methylpyridin (250 mg, 1.2 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure (164 mg, 1.2 mmol, 1.0 Äq.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (514 mg, 2.4 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (44 mg, 0.06 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesvorschrift A umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als kristalliner Feststoff (**30b**, 213 g, 0.9 mmol, 82 %).

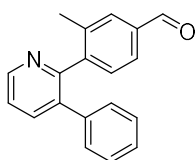
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2.15 (s, 3 H) 2.38 (s, 3 H) 7.13 (dd, *J* = 7.52, 0.92 Hz, 1 H) 7.26 (d, *J* = 0.73 Hz, 1 H) 7.28 - 7.31 (m, 1 H) 7.32 - 7.36 (m, 1 H) 7.42 (d, *J* = 1.83 Hz, 1 H) 8.26 (d, *J* = 2.02 Hz, 1 H); **HPLC-MS (ESI)**: [R<sub>t</sub>]: 10.21 min *m/z* für C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>ClN ([M+H<sup>+</sup>]), 218.67 berechnet, 218.16 gefunden.

**5.2.5.17. Darstellung von 3-Fluoro-4-(3-phenylpyridin-2-yl)benzaldehyd****Verbindung 31a**

Das Chloropyridin (**30a**, 50.0 mg, 0.26 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure (44.2 mg, 0.26 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (72.8 mg, 0.53 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (30.5 mg, 0.03 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**31a**, 48.2 mg, 0.17 mmol, 66 %).

$^1H$ -NMR (700 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 7.12 (d,  $J = 10.54$  Hz, 1 H) 7.18 (d,  $J = 8.28$  Hz, 3 H) 7.23 - 7.31 (m, 5 H) 7.40 (t,  $J = 7.58$  Hz, 2 H) 7.80 - 7.88 (m, 1 H) 8.28 (d,  $J = 7.96$  Hz, 1 H) 8.75 (d,  $J = 5.27$  Hz, 1 H) 9.93 (s, 1 H); **TLC-MS (ESI)**:  $m/z$  für  $C_{18}H_{13}FNO$  ( $[M+H^+]$ ), 278.30 berechnet, 278.13 gefunden.

#### 5.2.5.18. Darstellung von 3-Methyl-4-(3-phenylpyridin-2-yl)benzaldehyd

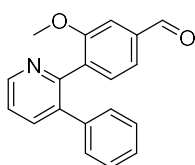


#### Verbindung 31b

Das Chloropyridin (**30a**, 50.0 mg, 0.26 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure (43.4 mg, 0.26 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (72.8 mg, 0.53 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (30.5 mg, 0.02 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**31b**, 22.3 mg, 0.08 mmol, 31 %).

$^1H$ -NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 2.02 (s, 3 H) 7.11 - 7.15 (m, 2 H) 7.20 - 7.26 (m, 3 H) 7.30 (d,  $J = 7.74$  Hz, 1 H) 7.56 (dd,  $J = 7.80, 4.79$  Hz, 1 H) 7.64 (dd,  $J = 7.80, 1.13$  Hz, 1 H) 7.69 (s, 1 H) 7.93 (dd,  $J = 7.80, 1.67$  Hz, 1 H) 8.69 (dd,  $J = 4.79, 1.67$  Hz, 1 H) 9.95 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 19.75 (s, 1 C) 123.71 (s, 1 C) 126.91 (s, 1 C) 127.93 (s, 1 C) 128.72 (s, 1 C) 129.53 (s, 1 C) 131.45 (s, 1 C) 135.82 (s, 1 C) 136.61 (s, 1 C) 137.10 (s, 1 C) 138.46 (s, 1 C) 138.93 (s, 1 C) 146.64 (s, 1 C) 148.58 (s, 1 C) 156.56 (s, 1 C); **TLC-MS (ESI)**:  $m/z$  für  $C_{19}H_{16}NO$  ( $[M+H^+]$ ), 274.33 berechnet, 274.13 gefunden.

#### 5.2.5.19. Darstellung von 3-Methoxy-4-(3-phenylpyridin-2-yl)benzaldehyd

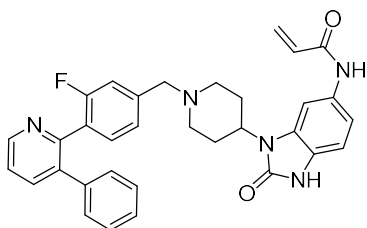


#### Verbindung 31c

Das Chloropyridin (**30a**, 50.0 mg, 0.26 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure (47.4 mg, 0.26 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (72.9 mg, 0.53 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (30.5 mg, 0.02 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**31c**, 42.6 mg, 0.15 mmol, 73 %).

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 3.33 (s, 3 H) 7.11 (d,  $J = 7.70$  Hz, 1 H) 7.23 (s, 2 H) 7.29 (s, 1 H) 7.30 - 7.34 (m, 2 H) 7.35 - 7.41 (m, 2 H) 7.49 - 7.53 (m, 1 H) 7.57 (s, 1 H) 7.78 (d,  $J = 6.79$  Hz, 2 H) 7.83 (d,  $J = 9.35$  Hz, 1 H) 8.02 (s, 2 H) 8.66 (d,  $J = 6.42$  Hz, 1 H) 9.97 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 55.46 (s, 1 C) 110.90 (s, 1 C) 123.18 (s, 1 C) 123.59 (s, 1 C) 127.67 (s, 1 C) 127.86 (s, 2 C) 128.38 (s, 1 C) 128.79 (s, 1 C) 130.47 (s, 1 C) 132.39 (s, 1 C) 134.54 (s, 1 C) 136.31 (s, 1 C) 139.73 (s, 1 C) 148.53 (s, 1 C) 156.90 (s, 1 C) 193.22 (s, 1 C); **TLC-MS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{19}H_{16}NO_2$  ( $[M+H^+]$ ), 290.93 berechnet, 290.12 gefunden.

#### 5.2.5.20. Darstellung von *N*-(3-(1-(3-Fluoro-4-(3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzod[imidazol-5-yl]acrylamid

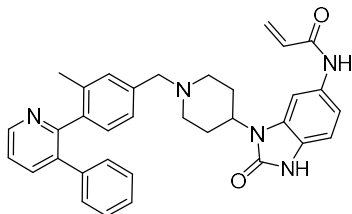


#### Verbindung 32a

Der Aldehyd (**31a**, 25.0 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.) und das Amin **23** (25.8 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.) und  $NaCNBH_3$  (22.6 mg, 0.36 mmol, 4.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**32a**, 10.3 mg, 0.02 mmol, 21 %).

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1.97 (d,  $J = 11.92$  Hz, 2 H) 2.60 - 2.69 (m, 2 H) 3.15 - 3.27 (m, 2 H) 3.46 - 3.50 (m, 2 H) 4.35 (d,  $J = 3.48$  Hz, 2 H) 4.36 - 4.42 (m, 1 H) 5.71 - 5.76 (m, 1 H) 6.24 (dd,  $J = 16.87, 1.83$  Hz, 1 H) 6.39 - 6.46 (m, 1 H) 6.91 - 6.98 (m, 2 H) 7.11 - 7.18 (m, 2 H) 7.22 - 7.31 (m, 4 H) 7.34 - 7.42 (m, 1 H) 7.53 - 7.61 (m, 2 H) 7.85 (s, 1 H) 7.89 - 7.94 (m, 1 H) 8.68 - 8.74 (m, 1 H) 9.77 (s, 1 H) 10.10 (s, 1 H) 10.88 - 10.93 (m, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 25.90 (s, 1 C) 45.72 (s, 1 C) 51.17 (s, 1 C) 58.28 (s, 1 C) 101.34 (s, 1 C) 108.88 (s, 1 C) 113.26 (s, 1 C) 114.99 (s, 1 C) 116.93 (s, 1 C) 121.79 (s, 1 C) 123.66 (s, 1 C) 124.64 (s, 1 C) 126.44 (s, 1 C) 127.36 (s, 1 C) 127.57 (s, 1 C) 128.23 (s, 1 C) 128.54 (s, 1 C) 129.00 (s, 1 C) 131.80 (s, 1 C) 132.26 (s, 1 C) 137.12 (s, 1 C) 137.80 (s, 1 C) 138.55 (s, 1 C) 148.31 (s, 1 C) 151.17 (s, 1 C) 153.96 (s, 1 C) 162.84 (s, 1 C); **HRMS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{33}H_{31}FN_5O_2$  ( $[M+H^+]$ ), 548.2456 berechnet, 548.2452 gefunden.

**5.2.5.21. Darstellung von *N*-(3-(1-(3-Methyl-4-(3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

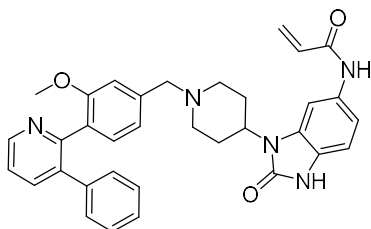


**Verbindung 32b**

Der Aldehyd (**31b**, 30.0 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.) und das Amin **23** (34.5 mg, 0.12 mmol, 1.1 Äq.) und NaCNBH<sub>3</sub> (27.9 mg, 0.44 mmol, 4.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**32b**, 20.8 mg, 0.04 mmol, 35 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 1.94 (d, *J* = 11.00 Hz, 3 H) 2.01 (s, 3 H) 2.65 (d, *J* = 11.00 Hz, 2 H) 2.72 (s, 2 H) 3.96 (s, 2 H) 4.40 (s, 1 H) 5.78 (d, *J* = 11.74 Hz, 1 H) 6.32 - 6.40 (m, 1 H) 6.41 - 6.48 (m, 1 H) 7.03 (d, *J* = 8.44 Hz, 1 H) 7.09 - 7.16 (m, 3 H) 7.18 - 7.23 (m, 4 H) 7.26 (s, 2 H) 7.53 - 7.59 (m, 1 H) 7.84 (s, 1 H) 7.95 (d, *J* = 9.35 Hz, 1 H) 8.61 (d, *J* = 6.42 Hz, 1 H) 10.03 (s, 1 H) 10.74 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 20.01 (s, 1 C) 28.49 (s, 1 C) 50.99 (s, 1 C) 53.62 (s, 1 C) 62.36 (s, 1 C) 103.90 (s, 1 C) 110.69 (s, 1 C) 115.67 (s, 1 C) 124.70 (s, 1 C) 126.75 (s, 1 C) 127.80 (s, 1 C) 128.80 (s, 1 C) 129.35 (s, 1 C) 130.58 (s, 1 C) 131.95 (s, 1 C) 132.59 (s, 1 C) 133.34 (s, 1 C) 133.95 (s, 1 C) 138.07 (s, 1 C) 139.20 (s, 1 C) 140.17 (s, 1 C) 148.67 (s, 1 C) 156.68 (s, 1 C) 158.56 (s, 1 C) 166.19 (s, 1 C); HRMS (ESI): *m/z* für C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 544.2707 berechnet, 544.2706 gefunden.

**5.2.5.22. Darstellung von *N*-(3-(1-(3-Methoxy-4-(3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

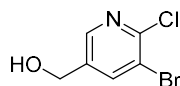


**Verbindung 32c**

Der Aldehyd (**31c**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.) und das Amin **23** (19.7 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.) und NaCNBH<sub>3</sub> (17.3 mg, 0.28 mmol, 4.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**32c**, 25.1 mg, 0.04 mmol, 65 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 1.74 - 1.81 (m, 2 H) 2.23 (t, *J* = 11.46 Hz, 2 H) 2.53 (qd, *J* = 12.53, 3.67 Hz, 2 H) 3.06 (d, *J* = 11.74 Hz, 2 H) 3.39 (s, 3 H) 3.58 - 3.63 (m, 2 H) 4.28 (tt, *J* = 12.43, 4.17 Hz, 1 H) 5.76 (dd, *J* = 10.09, 1.83 Hz, 1 H) 6.32 - 6.38 (m, 1 H) 6.39 - 6.46 (m, 1 H) 6.90 (d, *J* = 0.73 Hz, 1 H) 6.99 - 7.03 (m, 2 H) 7.11 - 7.15 (m, 2 H) 7.16 - 7.20 (m, 3 H) 7.22 (dd, *J* = 8.44, 1.83 Hz, 1 H) 7.27 (d, *J* = 7.52 Hz, 1 H) 7.49 (dd, *J* = 7.70, 4.95 Hz, 1 H) 7.77 (d, *J* = 1.65 Hz, 1 H) 7.85 (dd, *J* = 7.70, 1.65 Hz, 1 H) 8.54 (dd, *J* = 4.95, 1.65 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 29.84 (s, 1 C) 52.46 (s, 1 C) 54.17 (s, 1 C) 55.65 (s, 1 C) 63.68 (s, 1 C) 104.22 (s, 1 C) 110.53 (s, 1 C) 113.23 (s, 1 C) 115.58 (s, 1 C) 122.84 (s, 1 C) 124.21 (s, 1 C) 126.76 (s, 1 C) 127.68 (s, 1 C) 128.45 (s, 1 C) 128.99 (s, 1 C) 129.80 (s, 1 C) 130.04 (s, 1 C) 130.69 (s, 1 C) 132.16 (s, 1 C) 132.65 (s, 1 C) 133.88 (s, 1 C) 139.47 (s, 1 C) 140.03 (s, 1 C) 141.11 (s, 1 C) 148.36 (s, 1 C) 156.72 (s, 1 C) 158.15 (s, 1 C) 166.18 (s, 1 C); **HRMS (ESI):** *m/z* für C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 560.2656 berechnet, 560.2662 gefunden.

### 5.2.5.23. Darstellung von 5-Bromo-6-chloropyridin-3-yl)methanol



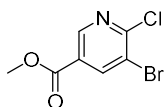
#### Verbindung 33c

Zu einer Lösung von 5-Bromo-6-chloronikotinischer Säure (**33d**, 1.0 g, 4.2 mmol, 1.0 Äq.) in THF (15 mL) bei 0 °C wurde 1 M Boran Lösung (12.7 mL, 12.7 mmol, 3.0 Äq.) tropfenweise hinzugegeben und für 30 min gerührt. Nach weiteren 2 h rühren bei rt wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser (30 mL) gestoppt. Das Gemisch wurde mit EtOAc extrahiert und mit ges. NaHCO<sub>3</sub> Lösung gewaschen sowie anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet.

Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das gewünschte Produkt **33c** (410.0 mg, 1.8 mmol, 44 %) nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (10 % EtOAc/PE) als Öl erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 4.54 (d, *J* = 5.65 Hz, 2 H) 8.15 (s, 1 H) 8.36 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 59.64, 119.41, 139.89, 141.44, 147.16, 147.87; **HPLC-MS (ESI):** *m/z* für C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>BrClNO ([M+H<sup>+</sup>]), 222.47 berechnet, 222.60 gefunden.

#### 5.2.5.24. Darstellung von *Methyl 5-bromo-6-chloropyridine-3-carboxylat*

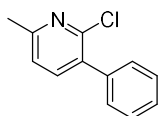


#### Verbindung 33e

Zu einer Lösung von 5-Bromo-6-chloronikotinischer Säure (**33d**, 3.0 g, 12.6 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (25 mL, 0.5 mmol/mL) wurden 2.5 Äq. der Base  $K_2CO_3$  (4.3 g, 31.7 mmol) hinzugegeben, sowie 1.2 Äq. Methyljodid (2.16 g, 0.98 mL, 15.2 mmol). Das Gemisch wurde bei rt über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der verbleibende Feststoff in DCM gelöst alles mit ges. NaCl Lösung gewaschen und die vereinten organischen Phasen über  $Na_2SO_4$  getrocknet sowie das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt **33e** (2,2 g, 9.0 mmol, 71 %) wurde nach einer säulenchromatographischen Reinigung (5 – 10 % EtOAc/PE) als Feststoff erhalten.

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 3.90 (s, 3 H) 8.60 (s, 1 H) 8.89 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 52.88, 119.75, 126.38, 142.90, 148.72, 153.47, 163.36; **HPLC-MS (ESI):**  $[R_t]$ : 9.61 min,  $m/z$  für  $C_7H_5BrClNO_2$  ( $[M+H^+]$ ), 250.48 berechnet, 250.12 gefunden.

#### 5.2.5.25. Darstellung von *2-Chloro-6-methyl-3-phenylpyridin*

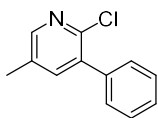


#### Verbindung 34a

3-Bromo-2-chloro-6-methylpyridin (2.0 g, 9.6 mmol, 1.0 Äq.), Phenylboronsäure (1.2 g, 9.6 mmol, 1.0 Äq.),  $K_3PO_4$  (4.1 g, 19.3 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (328 mg, 0.45 mol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift A umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als kristalliner Feststoff (**34a**, 1.8 g, 9.1 mmol, 94 %).

$^1H$  NMR (700 MHz,  $MeOD-d_4$ )  $\delta$  ppm 2.54 (s, 3 H) 7.31 (d,  $J = 7.64$  Hz, 1 H) 7.37 - 7.49 (m, 5 H) 7.69 (d,  $J = 7.64$  Hz, 1 H);  $^{13}C$  NMR (176 MHz,  $MeOD-d_4$ )  $\delta$  ppm 23.48, 123.96, 129.36, 129.54, 130.53, 135.66, 138.95, 142.04, 149.38, 159.56; **HPLC-MS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{12}H_{11}ClN$  ( $[M+H^+]$ ), 204.67 berechnet, 204.12 gefunden.

### 5.2.5.26. Darstellung von 2-Chloro-5-methyl-3-phenylpyridin

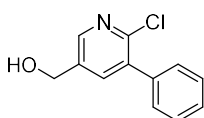


#### Verbindung 34b

3-Bromo-2-chloro-5-methylpyridin (2.0 g, 9.6 mmol, 1.0 Äq.), Phenylboronsäure (1.2 g, 9.6 mmol, 1.0 Äq.),  $K_3PO_4$  (4.1 g, 19.3 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (328 mg, 0.45 mol, 0.05 Äq) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift A umgesetzt und erhielten das gewünschte Produkt als kristalliner Feststoff (**34b**, 1.8 g, 9.1 mmol, 94 %).

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 2.33 (s, 3 H) 7.37 - 7.54 (m, 5 H) 7.70 (s, 1 H) 8.26 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 16.93, 128.21, 128.34 129.17, 133.06, 135.44, 137.10, 140.78, 145.51, 148.62; **HPLC-MS (ESI)**:  $m/z$  für  $C_{12}H_{11}ClN$  ( $[M+H]^+$ ), 204.67 berechnet, 204.15 gefunden.

### 5.2.5.27. Darstellung von (6-Chloro-5-phenylpyridin-3-yl)methanol

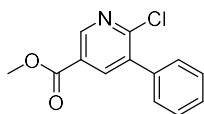


#### Verbindung 34c

(5-Bromo-6-chloropyridin-3-yl)methanol (**33c**, 150 mg, 0.67 mmol, 1.0 Äq.), Phenylboronsäure (82.1 mg, 0.67 mmol, 1.0 Äq.),  $K_3PO_4$  (285 mg, 1.3 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (43.8 mg, 0.06 mol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift A umgesetzt und erhielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**34c**, 110 mg, 0.5 mmol, 75 %).

$^1H$ -NMR (700 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 4.57 (dd,  $J = 36.35, 6.02$  Hz, 2 H) 5.41 - 5.52 (m, 1 H) 7.42 - 7.53 (m, 5 H) 7.77 (s, 1 H) 8.37 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 59.96, 128.77, 128.89, 129.62, 138.16, 139.00, 139.89, 141.43, 147.15, 147.26; **HPLC-MS (ESI)**:  $m/z$  für  $C_{12}H_{10}ClNO$  ( $[M+H]^+$ ), 220.67 berechnet, 220.15 gefunden.

### 5.2.5.28. Darstellung von *Methyl 6-chloro-5-phenylnicotinischer Säure*

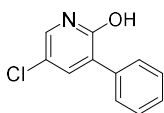


#### Verbindung 34d

Der Ester (**33e**, 1.0 g, 3.9 mmol, 1.0 Äq.), Phenylboronsäure (486 mg, 3.9 mmol, 1.0 Äq.),  $K_3PO_4$  (1.6 g, 7.9 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (142 mg, 0.19 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift A umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als kristallinen Feststoff (**34d**, 730 mg, 2.9 mmol, 73 %).

$^1H$ -NMR (700 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 3.91 (s, 3 H) 7.46 - 7.55 (m, 5 H) 8.21 (d,  $J = 2.37$  Hz, 1 H) 8.91 (d,  $J = 2.37$  Hz, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 52.68, 125.35, 128.52, 128.75, 129.17, 136.03, 136.23, 140.18, 148.91, 152.49, 164.31; **HPLC-MS (ESI)**:  $m/z$  für  $C_{13}H_{11}ClNO_2$  ( $[M+H]^+$ ), 248.68 berechnet, 248.12 gefunden.

### 5.2.5.29. Darstellung von *5-Chloro-3-phenylpyridin-2-ol*



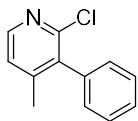
#### Verbindung 34e

3-Bromo-5-chloropyridin-2-ol (**33f**, 500 mg, 2.4 mmol, 1.0 Äq.), Phenylboronsäure (292 mg, 2.4 mmol, 1.0 Äq.),  $K_3PO_4$  (1.0 g, 4.8 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (175 mg, 0.24 mol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift A umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**34e**, 345 mg, 1.6 mmol, 70 %)

$^1H$  NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 7.32 - 7.36 (m, 1 H) 7.37 - 7.41 (m, 2 H) 7.62 (d,  $J = 2.93$  Hz, 1 H) 7.67 (d,  $J = 2.75$  Hz, 1 H) 7.70 - 7.74 (m, 2 H) 12.06 (s, 1 H);  $^{13}C$  NMR (151 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 111.38, 127.87, 127.96, 128.34, 130.67, 133.16, 135.47, 138.57, 159.92; **HPLC-MS (ESI)**:  $[R_t]$ : 7.65 min,  $m/z$  für  $C_{12}H_{10}ClNO$  ( $[M+H]^+$ ), 206.64 berechnet, 206.14 gefunden.



### 5.2.5.30. Darstellung von 2-Chloro-4-methyl-3-phenylpyridin

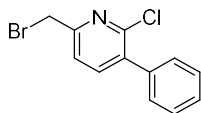


#### Verbindung 34f

3-Bromo-2-chloro-4-methylpyridin (**33g**, 100 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.), Phenylboronsäure (59.1 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.),  $K_3PO_4$  (205 mg, 1.0 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (17.7 mg, 0.02 mol, 0.05 Äq) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift A umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als kristalliner Feststoff (**34f**, 203 mg, 0.4 mmol, 81 %).

$^1H$ -NMR (700 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 2.06 (s, 3 H) 7.25 (d,  $J = 7.21$  Hz, 2 H) 7.39 (d,  $J = 5.06$  Hz, 1 H) 7.41 - 7.45 (m, 1 H) 7.47 - 7.52 (m, 2 H) 8.28 (d,  $J = 5.06$  Hz, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 20.18 (s, 1 C) 124.78 (s, 1 C) 128.00 (s, 1 C) 128.60 (s, 2 C) 128.94 (s, 2 C) 136.17 (s, 1 C) 136.21 (s, 1 C) 147.98 (s, 1 C) 148.98 (s, 1 C) 149.45 (s, 1 C); HPLC-MS (ESI):  $m/z$  für  $C_{12}H_{11}ClN$  ( $[M+H]^+$ ), 204.67 berechnet, 204.15 gefunden.

### 5.2.5.31. Darstellung von 6-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin



#### Verbindung 35a

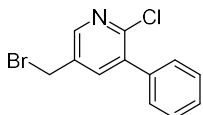
2-Chloro-6-methyl-3-phenylpyridin (**34a**, 1.0 g, 4.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 25 mL TCM gelöst, anschließend AIBN (80.3 mg, 0.49 mmol, 0.1 Äq.) und N-Bromosuccinimid (961 mg, 5.4 mmol, 1.1 Äq.) zugesetzt. Das Gemisch wurde für 1h bei 90 °C refluxiert. Daraufhin wurde das Succinimid durch Filtration entfernt und das Lösemittel evaporiert.

Der Feststoff wurde in DCM gelöst und mit ges. NaCl Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt **35a** (440 mg, 1.9 mmol, 37 %) konnte nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (3-4 % EtOAc/PE) erhalten werden.

$^1H$  NMR (700 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 4.74 (s, 2 H) 7.46 (s, 1 H) 7.49 (s, 4 H) 7.67 (d,  $J = 7.64$  Hz, 1 H) 7.90 (d,  $J = 7.64$  Hz, 1 H);  $^{13}C$  NMR (176 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 33.23, 123.18, 128.40, 129.23,

135.62, 136.60, 141.39, 147.75, 156.25; **HPLC-MS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{12}H_{10}BrClN$  ( $[M+H^+]$ ), 283.57 berechnet, 283.98 gefunden.

### 5.2.5.32. Darstellung von 5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin

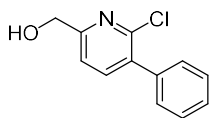


#### Verbindung 35b

Das Pyridin (**34b**, 1.0 g, 4.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 25 mL TCM gelöst, anschließend AIBN (80.3 mg, 0.49 mmol, 0.1 Äq.) und N-Bromosuccinimid (961 mg, 5.4 mmol, 1.1 Äq.) zugesetzt. Das Gemisch wurde für 1h bei 90 °C refluxiert. Daraufhin wurde das Succinimid durch Filtration entfernt und das Lösemittel evaporiert. Der Feststoff wurde in DCM gelöst und mit ges. NaCl Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt **35b** (602 mg, 2.3 mmol, 44 %) konnte nach einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel (3-4 % EtOAc/PE) erhalten werden.

$^1H$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 4.79 (s, 2H) 7.40 - 7.54 (m, 5H) 7.96 - 7.99 (m, 1H) 8.51 - 8.54 (m, 1H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 29.34, 66.19, 128.48, 129.15, 134.20, 136.05, 136.53, 140.84, 147.89, 148.79; **HPLC-MS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{12}H_{10}BrClN$  ( $[M+H^+]$ ), 283.57 berechnet, 284.01 gefunden.

### 5.2.5.33. Darstellung von (6-Chloro-5-phenylpyridin-2-yl)methanol

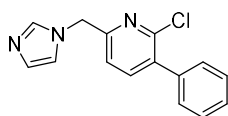


#### Verbindung 36a

6-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridine (**35a**, 30.0 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.) und 5.0 Äq.  $K_2CO_3$  (73.4 mg, 0.53 mmol) wurden in einem 1,4-Dioxan/Wasser Gemisch (10 mL/mmol) suspendiert und für 4 h bei 75 ° C gerührt. Die vereinten organischen Phasen wurden mit  $NaHCO_3$  gewaschen, anschließend über  $Na_2SO_4$  getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (5 - 10 % EtOAc/PE) lieferte das Produkt als Öl (**36a**, 18.5 mg, 0.08 mmol, 76 %).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 4.58 (s, 2 H) 5.58 - 5.66 (m, 2 H) 7.37 - 7.51 (m, 6 H) 7.55 (d,  $J = 7.78$  Hz, 1 H) 7.88 (d,  $J = 7.63$  Hz, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (126 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 63.41, 119.64, 128.19, 128.40, 129.28, 134.03, 137.14, 140.85, 147.17, 162.06; HPLC-MS (ESI):  $m/z$  für  $C_{12}H_{10}ClNO$  ( $[M+H^+]$ ), 220.67 berechnet, 220.17 gefunden.

### 5.2.5.34. Darstellung von 6-((1H-Imidazol-1-yl)methyl)-2-chloro-3-phenylpyridin

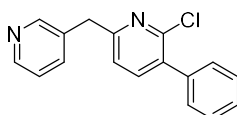


#### Verbindung 36b

6-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin (**35a**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), 3.0 Äq.  $K_2CO_3$  (73.4 mg, 0.53 mmol) sowie das Nukleophil (28.3 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift C umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**36b**, 32.0 mg, 0.11 mmol, 64 %).

HPLC-MS (ESI):  $m/z$  für  $C_{15}H_{13}ClN_3$  ( $[M+H^+]$ ), 270.73 berechnet, 269.35 gefunden.

### 5.2.5.35. Darstellung von 2-Chloro-3-phenyl-6-(pyridin-3-ylmethyl)pyridin

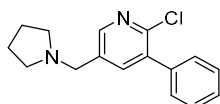


### Verbindung 36c

6-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridine (**35a**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure (29.2 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (75.1 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**36c**, 25.5 mg, 0.09 mmol, 53 %).

<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 4.12 (s, 2H) 7.38 - 7.43 (m, 4H) 7.44 (s, 1H) 7.44 - 7.47 (m, 1H) 7.69 (d, *J* = 2.47 Hz, 1H) 7.75 (d, *J* = 7.90 Hz, 1H) 8.29 (d, *J* = 2.47 Hz, 1H) 8.42 (dd, *J* = 4.95, 1.51 Hz, 1H) 8.51 (d, *J* = 1.72 Hz, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (156 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 35.82, 125.65, 129.41, 129.67, 130.47, 137.37, 137.83, 138.63, 138.69, 138.84, 142.04, 148.59, 148.76, 149.43, 150.49; HPLC-MS (ESI): *m/z* für C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 281.75 berechnet, 281.21 gefunden.

### 5.2.5.36. Darstellung von 2-Chloro-3-phenyl-5-(pyrrolidin-1-ylmethyl)pyridin

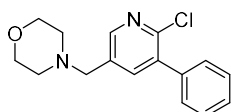


### Verbindung 37a

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridine (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), 3.0 Äq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (73.4 mg, 0.53 mmol) sowie das Nukleophil (25.1 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift C umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Öl (**37a**, 35.0 mg, 0.12 mmol, 64 %).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.70 (dt, *J* = 6.65, 3.48 Hz, 4 H) 2.47 (t, *J* = 6.46 Hz, 4 H) 3.66 (s, 2 H) 7.43 - 7.51 (m, 5 H) 7.76 (s, 1 H) 8.35 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 23.61, 53.86, 56.00, 128.88, 129.70, 135.32, 136.09, 137.50, 140.73, 147.17, 148.83; HPLC-MS (ESI): *m/z* für C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 273.78 berechnet, 272.40 gefunden.

### 5.2.5.37. Darstellung von 4-((6-Chloro-5-phenylpyridin-3-yl)methyl)morpholin

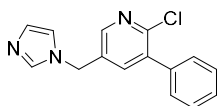


### Verbindung 37b

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), 3.0 Äq.  $K_2CO_3$  (73.4 mg, 0.53 mmol) sowie das Nukleophil (30.4 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift C umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Öl (**37b**, 17.2 mg, 0.06 mmol, 35 %).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3-d$ )  $\delta$  ppm 1.62 (s, 2 H) 2.61 (s, 3 H) 3.81 (s, 5 H) 7.42 - 7.46 (m, 1 H) 7.49 (m,  $J = 9.30, 7.20, 7.20$  Hz, 4 H) 8.35 (s, 1 H); **HPLC-MS (ESI)**:  $m/z$  für  $C_{16}H_{18}ClN_2O$  ( $[M+H^+]$ ), 289.78 berechnet, 289.10 gefunden.

### 5.2.5.38. Darstellung von 5-((1H-Imidazol-1-yl)methyl)-2-chloro-3-phenylpyridine Y

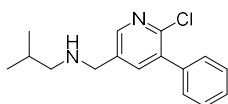


#### Verbindung 37c

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), 3.0 Äq.  $K_2CO_3$  (73.4 mg, 0.53 mmol) sowie das Nukleophil (28.3 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift C umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Öl (**37c**, 29.5 mg, 0.11 mmol, 69 %).

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 5.30 (s, 2 H) 6.91 (t,  $J = 1.15$  Hz, 1 H) 7.30 (t,  $J = 1.15$  Hz, 1 H) 7.48 (ddd,  $J = 22.20, 14.60, 6.90$  Hz, 5 H) 7.81 (d,  $J = 2.34$  Hz, 1 H) 7.82 (s, 1 H) 8.41 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 46.46, 119.92, 128.92, 129.51, 129.65, 133.86, 137.15, 137.91, 140.16; **HPLC-MS (ESI)**:  $m/z$  für  $C_{15}H_{13}ClN_3$  ( $[M+H^+]$ ), 270.73 berechnet, 269.20 gefunden.

### 5.2.5.39. Darstellung von N-((6-Chloro-5-phenylpyridin-3-yl)methyl)-2-methylpropan-1-amin

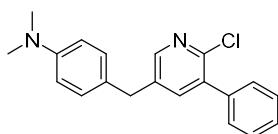


#### Verbindung 37d

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), 3.0 Äq.  $K_2CO_3$  (73.4 mg, 0.53 mmol) sowie das Nukleophil (24.8 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift C umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**37d**, 38.3 mg, 0.14 mmol, 80 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 0.98 (dd, *J* = 91.38, 6.69 Hz, 6 H) 2.05 (m, 1 H) 2.95 (dd, *J* = 27.05, 7.24 Hz, 2 H) 4.33 (s, 2 H) 7.45 - 7.53 (m, 5 H) 8.01 (s, 1 H) 8.50 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 20.00, 27.07, 29.97, 56.01, 128.04, 129.34, 130.03, 137.79, 138.42, 142.90, 150.36, 151.38; HPLC-MS (ESI): *m/z* für C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 275.79 berechnet, 275.50 gefunden.

#### 5.2.5.40. Darstellung von 4-((6-Chloro-5-phenylpyridin-3-yl)methyl)-*N,N*-dimethylanilin

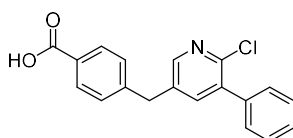


#### Verbindung 37e

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure (29.2 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (75.1 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesvorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**37e**, 40.5 mg, 0.12 mmol, 71 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2.80 - 2.85 (m, 6 H) 3.89 (s, 2 H) 6.66 (d, *J* = 8.62 Hz, 2 H) 7.10 (d, *J* = 8.62 Hz, 2 H) 7.40 - 7.50 (m, 5 H) 7.67 (d, *J* = 2.38 Hz, 1 H) 8.31 (d, *J* = 2.38 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 36.09, 40.21, 112.74, 127.38, 128.26, 128.37, 129.16, 129.20, 135.66, 137.06, 137.80, 140.13, 145.80, 148.29, 149.08; HPLC-MS (ESI): *m/z* für C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 323.84 berechnet, 323.16 gefunden.

#### 5.2.5.41. Darstellung von 4-((6-Chloro-5-phenylpyridin-3-yl)methyl)benzoesäure

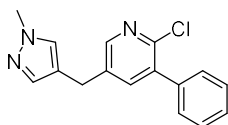


#### Verbindung 37f

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), Boronester (43.8 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (75.1 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesvorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**37f**, 34.3 mg, 0.10 mmol, 60 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 4.13 (s, 2 H) 7.33 - 7.50 (m, 7 H) 7.66 (d, *J* = 2.45 Hz, 1 H) 7.98 (d, *J* = 8.56 Hz, 2 H) 8.26 (d, *J* = 2.45 Hz, 1 H); **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 38.76, 129.59, 129.63, 130.16, 130.48, 130.65, 131.47, 137.87, 138.53, 138.74, 142.11, 146.56, 148.50, 149.44, 169.84; **HPLC-MS (ESI)**: [*R*<sub>t</sub>]: 9.24 min, *m/z* für C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>ClNO<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 324.78 berechnet, 324.18 gefunden.

#### 5.2.5.42. Darstellung von 2-Chloro-5-((1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)-3-phenylpyridin

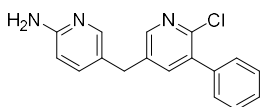


#### Verbindung 37g

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure (22.3 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (75.1 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesvorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**37g**, 42.5 mg, 0.14 mmol, 85 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 3.75 (s, 3 H) 3.83 (s, 2 H) 7.32 (s, 1 H) 7.41 - 7.51 (m, 5 H) 7.53 (s, 1 H) 7.69 (d, *J* = 2.20 Hz, 1 H) 8.31 (d, *J* = 2.20 Hz, 1 H); **<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 25.99, 38.38, 118.72, 128.27, 128.36, 129.19, 129.32, 135.68, 137.04, 137.20, 138.07, 140.08, 145.89, 148.22; **HPLC-MS (ESI)**: [*R*<sub>t</sub>]: 8.84 min, *m/z* für C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>3</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 284.76 berechnet, 284.17 gefunden.

#### 5.2.5.43. Darstellung von 5-((6-Chloro-5-phenylpyridin-3-yl)methyl)pyridin-2-amin



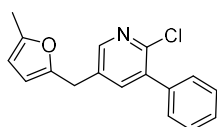
#### Verbindung 37h

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), Boronester (38.9 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (75.1 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesvorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**37h**, 42.5 mg, 0.14 mmol, 85 %).

rocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**37h**, 27.6 mg, 0.09 mmol, 55 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 3.94 (s, 2 H) 6.93 (d, *J* = 8.99 Hz, 1 H) 7.41 - 7.54 (m, 5 H) 7.81 (d, *J* = 2.20 Hz, 1 H) 7.86 - 7.90 (m, 1 H) 7.93 (s, 1 H) 7.99 (s, 2 H) 8.38 (s, 1 H); **<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 32.71, 114.27, 117.62, 124.48, 128.86, 129.72, 134.70, 135.82, 136.37, 137.35, 141.03, 145.65, 147.09, 149.03, 153.42; **HPLC-MS (ESI)**: [*R*<sub>t</sub>]: 6.04 min, *m/z* für C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>3</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 296.76 berechnet, 296.23 gefunden.

#### 5.2.5.44. Darstellung von 2-Chloro-5-((5-methylfuran-2-yl)methyl)-3-phenylpyridin

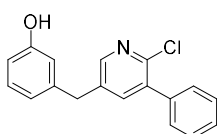


#### Verbindung 37i

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), Boronester (36.8 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (75.1 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als gelben Feststoff (**37i**, 33.5 mg, 0.11 mmol, 67 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*)  $\delta$  ppm 2.25 (s, 3 H) 3.96 (s, 2 H) 5.88 (s, 1 H) 5.96 (s, 1 H) 7.41 - 7.49 (m, 5 H) 7.58 (s, 1 H) 8.32 (s, 1 H); **<sup>13</sup>C-NMR** (176 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*)  $\delta$  ppm 13.51, 31.04, 106.20, 107.74, 128.33, 128.37, 129.33, 133.51, 136.71, 137.20, 140.37, 147.51, 148.08, 150.30, 151.78; **HPLC-MS (ESI)**: [*R*<sub>t</sub>]: 10.91 min, *m/z* für C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClNO ([M+H<sup>+</sup>]), 284.76 berechnet, 284.17 gefunden.

#### 5.2.5.45. Darstellung von 3-((6-Chloro-5-phenylpyridin-3-yl)methyl)phenol



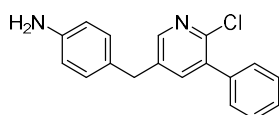
#### Verbindung 37j



5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure (24.4 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.),  $K_3PO_4$  (75.1 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als weißen Feststoff (**37j**, 29.0 mg, 0.09 mmol, 58 %).

$^1H$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 3.93 (s, 2 H) 6.60 (d,  $J = 8.07$  Hz, 1 H) 6.65 (s, 1 H) 6.71 (d,  $J = 7.34$  Hz, 1 H) 7.09 (t,  $J = 7.79$  Hz, 1 H) 7.45 (s, 5 H) 7.72 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1 H) 8.33 (s, 1 H) 9.32 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 36.89, 113.35, 115.49, 119.28, 128.30, 128.39, 129.17, 129.62, 135.71, 136.86, 136.98, 140.37, 141.34, 146.06, 148.48, 157.52; HPLC-MS (ESI):  $[R_t]$ : 9.57 min,  $m/z$  für  $C_{18}H_{16}ClNO$  ( $[M+H^+]$ ), 296.77 berechnet, 296.18 gefunden.

#### 5.2.5.46. Darstellung von 4-((6-Chloro-5-phenylpyridin-3-yl)methyl)anilin

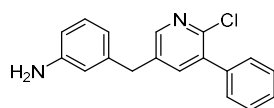


#### Verbindung 37k

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), Boronester (38.7 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.),  $K_3PO_4$  (75.1 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als gelben Feststoff (**37k**, 38.9 mg, 0.13 mmol, 78 %).

$^1H$ -NMR (500 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 4.07 (s, 2H) 5.51 - 5.85 (m, 2 H) 7.10 (d,  $J = 7.89$  Hz, 1H) 7.12 (s, 1H) 7.28 (d,  $J = 7.70$  Hz, 1H) 7.36 - 7.40 (m, 1H) 7.43 - 7.51 (m, 5H) 7.77 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1H) 8.37 (d,  $J = 2.38$  Hz, 1H);  $^{13}C$ -NMR (126 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 36.50, 112.71, 114.63, 116.55, 118.42, 120.00, 121.87, 127.01, 128.09, 129.19, 130.05, 135.87, 136.27, 136.89, 140.51, 141.84, 146.30, 148.62; HPLC-MS (ESI):  $m/z$  für  $C_{18}H_{16}ClN_2$  ( $[M+H^+]$ ), 295.78 berechnet, 295.15 gefunden.

#### 5.2.5.47. Darstellung von 3-((6-Chloro-5-phenylpyridin-3-yl)methyl)anilin

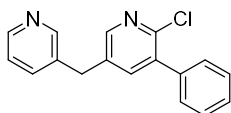


#### Verbindung 37l

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridine (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), Boronester (38.7 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (75.1 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als gelben Feststoff (**37l**, 26.5 mg, 0.09 mmol, 52 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 4.07 (s, 2H) 5.51 - 5.85 (m, 2 H) 7.10 (d, *J* = 7.89 Hz, 1H) 7.12 (s, 1H) 7.28 (d, *J* = 7.70 Hz, 1H) 7.36 - 7.40 (m, 1H) 7.43 - 7.51 (m, 5H) 7.77 (d, *J* = 2.20 Hz, 1H) 8.37 (d, *J* = 2.38 Hz, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 36.50, 112.71, 114.63, 116.55, 118.42, 120.00, 121.87, 127.01, 128.09, 129.19, 130.05, 135.87, 136.27, 136.89, 140.51, 141.84, 146.30, 148.62; HPLC-MS (ESI): [R<sub>t</sub>]: 8.14 min, *m/z* für C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 295.78 berechnet, 295.22 gefunden.

#### 5.2.5.48. Darstellung von 2-Chloro-3-phenyl-5-(pyridin-3-ylmethyl)pyridin

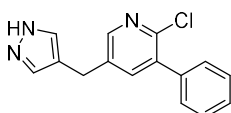


#### Verbindung 37m

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridine (**35b**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure (21.7 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (75.1 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als gelben Feststoff (**37m**, 41.0 mg, 0.13 mmol, 81 %).

<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 4.12 (s, 2H) 7.38 - 7.43 (m, 4H) 7.44 (s, 1H) 7.44 - 7.47 (m, 1H) 7.69 (d, *J* = 2.47 Hz, 1H) 7.75 (d, *J* = 7.90 Hz, 1H) 8.29 (d, *J* = 2.47 Hz, 1H) 8.42 (dd, *J* = 4.95, 1.51 Hz, 1H) 8.51 (d, *J* = 1.72 Hz, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (156 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 35.82, 125.65, 129.41, 129.67, 130.47, 137.37, 137.83, 138.63, 138.69, 138.84, 142.04, 148.59, 148.76, 149.43, 150.49; HPLC-MS (ESI): [R<sub>t</sub>]: 6.43min, *m/z* für C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 281.75 berechnet, 281.22 gefunden.

#### 5.2.5.49. Darstellung von 5-((1H-Pyrazol-4-yl)methyl)-2-chloro-3-phenylpyridin

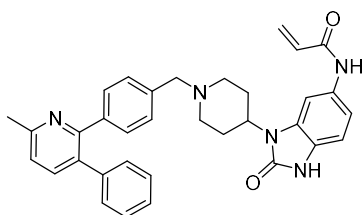


**Verbindung 37n**

5-(Bromomethyl)-2-chloro-3-phenylpyridin (**35b**, 50.0 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure (22.2 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (68.1 mg, 0.30 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als gelben Feststoff (**37n**, 34.2 mg, 0.12 mmol, 70 %).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 5.46 (s, 2H) 6.36 (t, *J* = 2.14 Hz, 1H) 7.36 - 7.48 (m, 5H) 7.56 (d, *J* = 1.83 Hz, 1H) 7.64 (d, *J* = 2.29 Hz, 1H) 7.81 (d, *J* = 2.44 Hz, 1H) 8.24 (d, *J* = 2.44 Hz, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 52.84, 107.50, 129.36, 129.76, 130.30, 132.13, 134.46, 138.51, 138.56, 140.88, 141.41, 148.40, 149.96; HPLC-MS (ESI): [R<sub>t</sub>]: 8.25 min, *m/z* für C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>3</sub>([M+H<sup>+</sup>]), 270.73 berechnet, 270.12 gefunden.

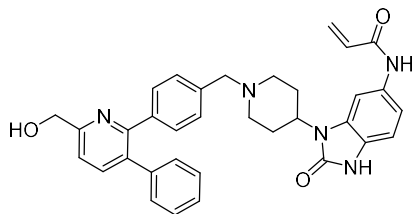
**5.2.5.50. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(6-Methyl-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

**Verbindung 38a**

Chlorpyridin (**34a**, 20.0 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (22.9 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äq.), die Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (27.1 mg, 0.20 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (11.3 mg, 0.01 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**38a**, 22.9 mg, 0.04 mmol, 43 %).

<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 1.78 (d, *J* = 11.08 Hz, 2 H) 2.26 - 2.35 (m, 2 H) 2.53 (dd, *J* = 12.75, 3.60 Hz, 2 H) 2.58 - 2.63 (m, 3 H) 3.09 (d, *J* = 11.19 Hz, 2 H) 3.66 (s, 2 H) 4.23 - 4.32 (m, 1 H) 5.77 (dd, *J* = 10.11, 1.72 Hz, 1 H) 6.34 - 6.38 (m, 1 H) 6.40 - 6.47 (m, 1 H) 7.01 (d, *J* = 8.39 Hz, 1 H) 7.10 - 7.14 (m, 2 H) 7.18 - 7.24 (m, 4 H) 7.26 - 7.31 (m, 4 H) 7.34 (d, *J* = 7.85 Hz, 1 H) 7.70 - 7.77 (m, 2 H); HRMS (ESI): [R<sub>t</sub>]: 6.11 min, *m/z* für C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 544.2707 berechnet, 544.2711 gefunden.

**5.2.5.51. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(6-(Hydroxymethyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

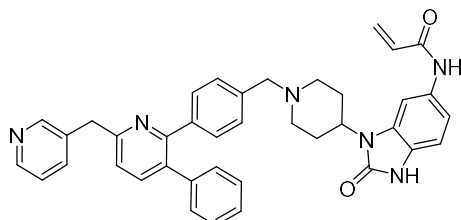


**Verbindung 38b**

Chlorpyridin (**36a**, 20.0 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (37.8 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (24.5 mg, 0.18 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (10.3 mg, 0.009 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**38b**, 25.5 mg, 0.04 mmol, 51 %).

$^1H$ -NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 1.56 - 1.72 (m, 2 H) 2.00 - 2.15 (m, 2 H) 2.21 - 2.37 (m, 2 H) 2.88 - 2.99 (m, 2 H) 3.30 (s, 2 H) 3.44 - 3.54 (m, 2 H) 4.05 - 4.20 (m, 1 H) 4.65 (d,  $J = 5.81$  Hz, 2 H) 5.48 (s, 1 H) 5.73 (d,  $J = 11.94$  Hz, 1 H) 6.25 (d,  $J = 1.72$  Hz, 1 H) 6.36 - 6.47 (m, 1 H) 6.91 (d,  $J = 8.28$  Hz, 1 H) 7.12 - 7.20 (m, 2 H) 7.20 - 7.37 (m, 4 H) 7.47 - 7.58 (m, 1 H) 7.64 - 7.73 (m, 1 H) 7.82 (s, 1 H) 10.08 (s, 1 H) 10.75 - 10.87 (m, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 28.90, 52.60, 64.67, 101.43, 109.13, 119.27, 124.98, 126.80, 127.59, 128.80, 129.46, 129.84, 130.07, 132.52, 133.11, 134.02, 139.58, 140.14, 154.46, 161.19, 163.26; HRMS (ESI):  $m/z$  für  $C_{34}H_{33}N_5O_3$  ( $[M+H]^+$ ), 560.2656 berechnet, 560.2651 gefunden.

**5.2.5.52. Darstellung von *N*-(2-oxo-3-(1-(4-(3-Phenyl-6-(pyridin-3-ylmethyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**



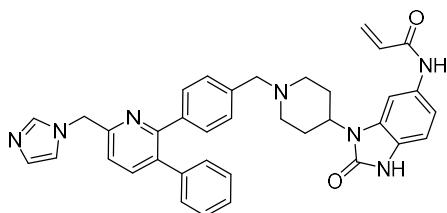
**Verbindung 38c**

Chlorpyridin (**36c**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (18.6 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg,

0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (8.0 mg, 0.01 mmol, 21 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 2.04 - 2.17 (m, 9 H) 2.80 (d, *J* = 12.65 Hz, 2 H) 3.16 - 3.28 (m, 1 H) 3.54 - 3.69 (m, 2 H) 4.32 - 4.42 (m, 2 H) 4.47 - 4.52 (m, 2 H) 4.53 - 4.59 (m, 1 H) 5.79 (dd, *J* = 10.09, 1.65 Hz, 1 H) 6.35 - 6.41 (m, 1 H) 6.43 - 6.50 (m, 1 H) 7.01 - 7.05 (m, 1 H) 7.05 - 7.10 (m, 1 H) 7.12 - 7.18 (m, 2 H) 7.22 - 7.30 (m, 4 H) 7.41 - 7.44 (m, 2 H) 7.45 - 7.51 (m, 3 H) 7.52 - 7.58 (m, 2 H) 7.87 (d, *J* = 7.89 Hz, 2 H) 7.95 - 8.01 (m, 1 H) 8.58 (d, *J* = 8.07 Hz, 1 H) 8.72 (d, *J* = 5.32 Hz, 1 H) 8.92 (s, 1 H); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 27.50 (s, 1 C) 40.99 (s, 1 C) 53.28 (s, 1 C) 61.30 (s, 1 C) 103.25 (s, 1 C) 110.82 (s, 1 C) 115.52 (s, 1 C) 124.17 (s, 1 C) 126.65 (s, 1 C) 127.85 (s, 1 C) 128.08 (s, 1 C) 128.86 (s, 1 C) 129.73 (s, 1 C) 130.86 (s, 1 C) 132.17 (s, 1 C) 132.60 (s, 1 C) 136.81 (s, 1 C) 140.52 (s, 1 C) 141.24 (s, 1 C) 141.69 (s, 1 C) 142.10 (s, 1 C) 143.29 (s, 1 C) 144.24 (s, 1 C) 147.61 (s, 1 C) 156.52 (s, 1 C) 157.27 (s, 1 C) 157.90 (s, 1 C) 166.19 (s, 1 C); **HRMS (ESI)**•, *m/z* für C<sub>39</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 621.2972 berechnet, 621.2962 gefunden.

**5.2.5.53. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(6-((1*H*-Imidazol-1-yl)methyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid**



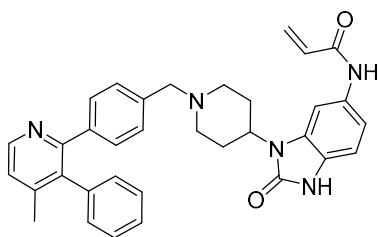
**Verbindung 38d**

Chlorpyridin (**36a**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (19.4 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**38d**, 5.0 mg, 0.02 mmol, 12 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 1.80 (d, *J* = 10.38 Hz, 1 H) 2.32 (t, *J* = 11.52 Hz, 1 H) 2.45 - 2.59 (m, 2 H) 3.11 (d, *J* = 11.29 Hz, 1 H) 3.65 - 3.72 (m, 1 H) 4.24 - 4.34 (m, 1 H) 5.43 (s, 1 H) 5.78 (dd, *J* = 9.77, 1.98 Hz, 1 H) 6.33 - 6.40 (m, 1 H) 6.41 - 6.51 (m, 1 H) 6.99 - 7.08 (m, 1 H) 7.13 - 7.18 (m, 1 H) 7.22 (dd, *J* = 8.47, 1.60 Hz, 1 H) 7.24 - 7.34 (m, 5 H) 7.75 (d, *J* = 1.37 Hz, 1 H) 7.80 - 7.85 (m, 1 H) 7.90 (s, 1 H); **<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 29.59 (s, 1 C) 30.93 (s, 1 C) 49.66 (s, 1 C) 52.13 (s, 1 C) 54.10 (s, 1 C) 63.19 (s, 1 C) 104.16 (s, 1 C) 110.55 (s, 1 C) 115.63 (s, 1 C) 116.59 (s, 1 C) 121.68 - 121.99 (m, 1 C) 126.76 (s, 1 C) 127.78 (s, 1 C) 128.72 (s, 1 C) 129.60 (s, 1 C) 130.54 (s, 1 C)

130.64 (s, 1 C) 130.84 (s, 1 C) 131.32 (s, 1 C) 132.61 (s, 1 C) 133.04 (s, 1 C) 133.86 (s, 1 C) 137.38 (s, 1 C) 140.76 (s, 1 C) 141.51 (s, 1 C) 143.41 (s, 1 C) 156.42 (s, 1 C) 156.74 (s, 1 C) 157.42 (s, 1 C) 158.24 (s, 1 C) 166.21 (s, 1 C). **HRMS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{37}H_{35}N_7O_2$  ( $[M+H^+]$ ), 610.2925 berechnet, 610.2923 gefunden.

#### 5.2.5.54. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(4-methyl-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzof[imidazol-5-yl)acrylamid

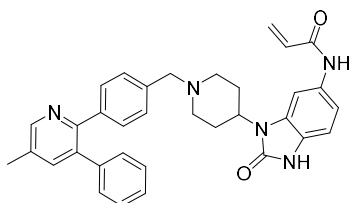


#### Verbindung 38e

Chlorpyridin (**34e**, 20.0 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (49.3 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (27.1 mg, 0.2 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (11.3 mg, 0.01 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**38e**, 20.8 mg, 0.04 mmol, 39 %).

**$^1H$ -NMR** (700 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1.95 (d,  $J = 12.69$  Hz, 2 H) 2.19 (s, 3 H) 2.55 - 2.69 (m, 2 H) 3.11 - 3.24 (m, 2 H) 3.39 (d,  $J = 11.62$  Hz, 2 H) 4.28 (d,  $J = 4.41$  Hz, 2 H) 4.32 - 4.41 (m, 1 H) 5.74 (d,  $J = 11.94$  Hz, 1 H) 6.24 (d,  $J = 18.93$  Hz, 1 H) 6.43 (dd,  $J = 16.99, 10.22$  Hz, 1 H) 6.95 (s, 2 H) 7.15 (d,  $J = 6.67$  Hz, 2 H) 7.26 - 7.39 (m, 4 H) 7.57 (s, 1 H) 7.83 (s, 1 H) 8.63 (d,  $J = 2.69$  Hz, 1 H) 9.74 (s, 1 H) 10.09 (s, 1 H) 10.88 (s, 1 H);  **$^{13}C$ -NMR** (176 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 20.40 (s, 1 C) 25.85 (s, 1 C) 47.53 (s, 1 C) 51.05 (s, 1 C) 58.78 (s, 1 C) 101.39 (s, 1 C) 108.86 (s, 1 C) 113.27 (s, 1 C) 115.02 (s, 1 C) 116.68 (s, 1 C) 118.34 (s, 1 C) 124.64 (s, 1 C) 125.08 (s, 1 C) 126.40 (s, 1 C) 127.58 (s, 1 C) 128.31 (s, 2 C) 129.01 (s, 1 C) 129.92 (s, 2 C) 130.07 (s, 1 C) 130.52 (s, 1 C) 131.39 (s, 1 C) 131.89 (s, 1 C) 132.39 (s, 1 C) 136.75 (s, 1 C) 153.94 (s, 1 C) 162.84 (s, 1 C); **HRMS (ESI):**  $[R_1]$ : 5.85 min,  $m/z$  für  $C_{34}H_{34}N_5O_2$  ( $[M+H^+]$ ), 544.2634 berechnet, 544.2696 gefunden.

**5.2.5.55. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-Methyl-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

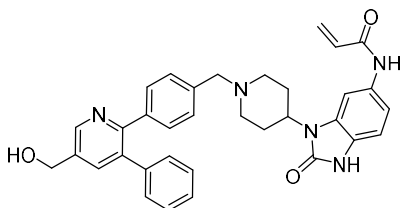


**Verbindung 39a**

Chlorpyridin (**34b**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (19.4 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39a**, 27.0 mg, 0.05 mmol, 70 %).

$^1H$ -NMR (700 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 2.14 (d,  $J = 13.44$  Hz, 2 H) 2.60 (s, 3 H) 2.81 (d,  $J = 8.17$  Hz, 2 H) 3.24 - 3.32 (m, 2 H) 3.64 (d,  $J = 10.65$  Hz, 2 H) 4.43 (s, 2 H) 4.54 (t,  $J = 11.99$  Hz, 1 H) 5.81 (d,  $J = 11.72$  Hz, 1 H) 6.36 - 6.42 (m, 1 H) 6.43 - 6.52 (m, 1 H) 7.00 (d,  $J = 8.39$  Hz, 1 H) 7.05 (d,  $J = 8.28$  Hz, 1 H) 7.24 (d,  $J = 7.96$  Hz, 2 H) 7.32 - 7.37 (m, 3 H) 7.50 - 7.54 (m, 2 H) 7.57 (d,  $J = 7.64$  Hz, 2 H) 7.97 (s, 1 H) 8.18 (s, 1 H) 8.66 (s, 1 H) 10.08 (s, 1 H) 10.79 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 18.16 (s, 1 C) 27.52 (s, 2 C) 49.68 (s, 1 C) 53.45 (s, 2 C) 61.32 (s, 1 C) 101.56 (s, 1 C) 103.48 (s, 1 C) 110.87 (s, 1 C) 115.05 (s, 1 C) 115.62 (s, 1 C) 116.69 (s, 1 C) 118.33 (s, 1 C) 126.70 (s, 1 C) 127.87 (s, 1 C) 129.65 (s, 1 C) 129.90 (s, 2 C) 130.45 (s, 1 C) 130.94 (s, 2 C) 132.17 (s, 1 C) 132.56 (s, 2 C) 134.09 (s, 1 C) 137.30 (s, 1 C) 138.64 (s, 1 C) 138.96 (s, 1 C) 139.94 (s, 1 C) 145.71 (s, 1 C) 151.99 (s, 1 C) 156.60 (s, 1 C) 166.18 (s, 1 C); **HRMS (ESI):** [ $R_t$ ]: 5.85 min,  $m/z$  für  $C_{34}H_{34}N_5O_2$  ( $[M+H]^+$ ), 544.2634 berechnet, 544.2696 gefunden.

**5.2.5.56. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-(Hydroxymethyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

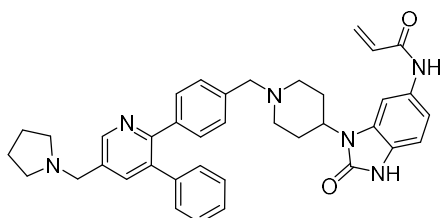


**Verbindung 39b**

Chlorpyridin (**34c**, 20.0 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (37.8 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.), die Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (24.5 mg, 0.18 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (10.3 mg, 0.009 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39b**, 18.1 mg, 0.03 mmol, 36 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2.51 - 2.62 (m, 1 H) 3.20 (m, 2 H) 3.88 (m, 4 H) 4.37 (m, 1 H) 4.67 (s, 4 H) 5.99 (dd, *J* = 301.42, 16.96 Hz, 2 H) 6.43 (dd, *J* = 16.99, 10.16 Hz, 1 H) 6.94 (s, 1 H) 7.20 (d, *J* = 7.79 Hz, 1 H) 7.22 - 7.30 (m, 1 H) 7.33 (m, 5 H) 7.41 (m, 3 H) 7.82 (d, *J* = 22.28 Hz, 1 H) 8.65 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 25.35 (s, 2C) 47.01 (s, 1C) 50.52 (s, 2C) 58.35 (s, 1C) 59.67 (s, 2C) 61.90 (s, 1C) 100.86 (s, 1C) 108.32 (s, 1C) 112.74 (s, 1C) 124.09 (s, 1C) 125.28 (s, 1C) 127.94 (s, 2C) 128.78 (s, 2C) 128.98 (s, 2C) 129.55 (s, 2C) 130.29 (s, 2C) 131.34 (s, 1C) 131.83 (s, 1C) 134.72 (s, 1C) 138.69 (s, 1C) 145.99 (s, 1C) 153.40 (s, 1C) 162.29 (s, 1C); HRMS (ESI): *m/z* für C<sub>34</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 560.2656 berechnet, 560.2654 gefunden.

#### 5.2.5.57. Darstellung von *N*-(2-oxo-3-(1-(4-(3-Phenyl-5-(pyrrolidin-1-ylmethyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid



#### Verbindung 39c

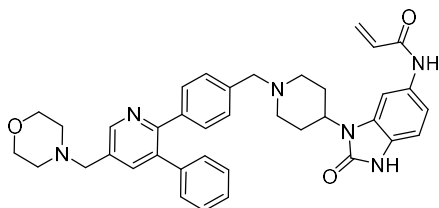
Chlorpyridin (**37a**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (19.4 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**37a**, 7.7 mg, 0.01 mmol, 18 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.64 (d, *J* = 9.92 Hz, 4 H) 1.72 (s, 4 H) 3.51 (s, 4 H) 3.66 - 3.75 (m, 2 H) 4.10 (m, 1 H) 5.99 (dd, *J* = 1.00 Hz, 1 H) 6.41 (dd, *J* = 11.14, 10.07 Hz, 1 H) 7.19 (m, 4 H) 7.24 (m, 5 H) 7.30 (t, *J* = 6.33 Hz, 5 H) 7.69 (d, *J* = 4.58 Hz, 4 H) 8.58 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 23.15 (s, 2C) 28.68 (s, 1) 50.12 (s, 1C) 52.64 (s, 1C) 53.55 (s, 2C) 56.24 (s, 1C) 61.55 (s, 1C) 96.70 (s, 1C) 100.90 (s, 1C) 108.66 (s, 1C) 112.10 (s, 1C) 124.49 (s, 1C) 127.29 (s, 1C) 128.25 (s, 1C) 128.40 (s, 2C) 129.34 (s, 2C) 129.56 (s, 2C) 134.91 (s, 1C) 138.63 (s, 1C) 139.65 (s, 1C) 148.30



(s, 1C) 154.00 (s, 1C) 162.77 (s, 1C); **HPLC-MS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{38}H_{40}N_6O_2$  ( $[M+H]^+$ ), 613.3285 berechnet, 613.3288 gefunden.

**5.2.5.58. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-(Morpholinomethyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

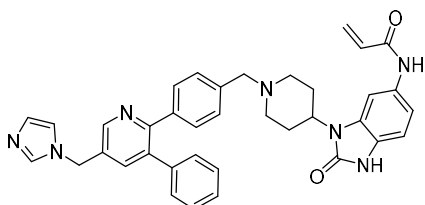


**Verbindung 39d**

Chlorpyridin (**37b**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (19.4 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39d**, 17.1 mg, 0.03 mmol, 39 %).

**$^1H$ -NMR** (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1.87 - 2.00 (m, 1 H) 3.34 (d,  $J = 146.49$  Hz, 2 H) 3.83 (d,  $J = 186.15$  Hz, 8 H) 4.29 - 4.34 (m, 2 H) 4.37 (m, 1 H) 4.48 - 4.53 (m, 2 H) 5.71 - 6.27 (m, 2 H) 6.43 (dd,  $J = 16.92, 10.18$  Hz, 1 H) 7.05 (s, 1 H) 7.14 (s, 4 H) 7.22 (s, 1 H) 7.32 - 7.37 (m, 5 H) 7.43 (dd,  $J = 19.17, 10.36$  Hz, 4 H) 7.84 (d,  $J = 111.46$  Hz, 4 H) 8.77 (s, 1 H);  **$^{13}C$ -NMR** (151 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 25.34 (s, 1C) 46.98 (s, 1C) 50.53 (s, 2C) 55.74 (s, 1C) 58.29 (s, 1C) 62.89 (s, 1C) 100.83 (s, 1C) 108.32 (s, 1C) 112.71 (s, 1C) 115.23 (s, 1C) 117.21 (s, 1C) 124.09 (s, 1C) 125.87 (s, 1C) 127.24 (s, 1C) 127.97 (s, 2C) 128.80 (s, 2C) 129.52 (s, 2C) 130.40 (s, 1C) 131.36 (s, 1C) 134.82 (s, 1C) 138.04 (s, 1C) 140.08 (s, 1C) 153.40 (s, 1C) 157.85 (s, 1C) 162.29 (s, 1C); **HRMS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{38}H_{40}N_6O_3$  ( $[M+H]^+$ ), 629.3234 berechnet, 629.3233 gefunden.

**5.2.5.59. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-((1H-imidazol-1-yl)methyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

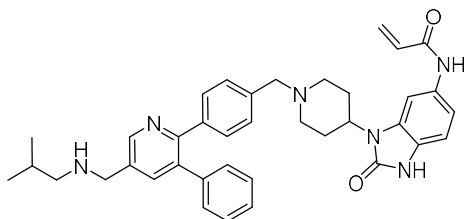


## Verbindung 39e

Chlorpyridin (**37c**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (19.4 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39e**, 8.9 mg, 0.02 mmol, 21 %).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 2.08 (dd, *J*=30.21, 13.58 Hz, 2 H) 4.38 (s, 2 H) 4.48 - 4.56 (m, 1 H) 5.65 (d, *J*=4.73 Hz, 2 H) 6.08 (dd, *J*=297.85, 292.51 Hz, 4 H) 6.45 (dd, *J*=26.55, 9.00 Hz, 1 H) 7.14 (d, *J*=8.24 Hz, 4 H) 7.17 - 7.22 (m, 1 H) 7.24 - 7.32 (m, 5 H) 7.32 - 7.44 (m, 2 H) 7.48 (s, 2 H) 7.64 (s, 4 H) 7.79 (s, 1 H) 7.99 (s, 1 H) 8.76 (s, 1 H) 9.18 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 49.49 (s, 2C) 49.61 (s, 2C) 50.74 (s, 2C) 53.16 (s, 1C) 121.82 (s, 2C) 123.36 (s, 2C) 124.35 (s, 1C) 124.66 (s, 1C) 127.72 (s, 1C) 128.83 (s, 1C) 129.09 (s, 2C) 129.67 (s, 2C) 130.72 (s, 2C) 130.88 (s, 1C) 131.16 (s, 1C) 131.91 (s, 1C) 132.16 (s, 2C) 132.37 (s, 2C) 136.95 (s, 2C) 138.68 (s, 1C) 139.77 (s, 1C) 140.73 (s, 2C) 142.44 (s, 1C) 148.94 (s, 2C) 157.97 (s, 1C) 164.01 (s, 1C) 179.72 (s, 1C); **HRMS (ESI):** *m/z* für C<sub>37</sub>H<sub>35</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 610.2925 berechnet, 610.2923 gefunden.

### 5.2.5.60. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-((*isobutylamino*)methyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid



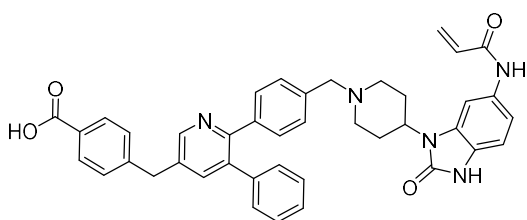
## Verbindung 39f

Chlorpyridin (**37d**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (19.4 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39f**, 34.4 mg, 0.06 mmol, 80 %).

<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 1.07 (s, 6 H) 2.10 (m, 2 H) 3.02 (dd, *J* = 7.10, 3.01 Hz, 2 H) 4.54 (m, 2 H) 6.14 (dd, *J* = 17.97, 18.93 Hz, 4 H) 6.46 (dd, *J* = 16.99, 10.11 Hz, 1 H) 7.16 (dd, *J* = 139.18, 135.31 Hz, 4 H) 7.31 (dd, *J* = 19.79, 8.60 Hz, 4 H) 7.49 (s, 5 H) 7.55 (s, 2 H) 7.57 (dd, *J* = 7.96, 3.01 Hz, 2 H) 7.64 (s, 2 H) 7.66 (m, 4 H) 8.10 (s, 1 H) 8.79 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 8.96 (s, 2C) 20.10 (s, 2C) 27.13 (s, 1C) 47.69 (s, 2C) 49.54 (s, 1C) 52.54 (s, 1C) 56.06 (s, 1C)

110.46 (s, 1C) 126.33 (s, 1C) 127.46 (s, 1C) 127.93 (s, 1C) 128.89 (s, 1C) 129.49 (s, 1C) 129.73 (s, 2C) 129.80 (s, 2C) 130.47 (s, 1C) 131.69 (s, 1C) 131.95 (s, 1C) 132.11 (s, 1C) 132.20 (s, 1C) 132.71 (s, 1C) 132.84 (s, 2C) 132.90 (s, 2C) 133.57 (s, 1C) 133.58 (s, 1C) 133.67 (s, 1C); **HRMS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{38}H_{42}N_6O_2$  ( $[M+H]^+$ ), 615.3442 berechnet, 615.3441 gefunden.

**5.2.5.61. Darstellung von 4-((6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-5-phenylpyridin-3-yl)methyl)benzoesäure**

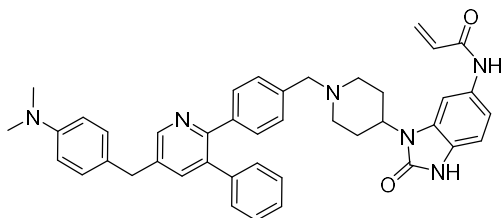


**Verbindung 39g**

Chlorpyridin (**37f**, 20.0 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (25.2 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (15.3 mg, 0.12 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (6.9 mg, 0.006 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39g**, 12.0 mg, 0.02 mmol, 30 %).

**$^1H$ -NMR** (700 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1.95 (d,  $J = 12.26$  Hz, 1 H) 2.56 - 2.67 (m, 1 H) 3.19 (d,  $J = 12.05$  Hz, 1 H) 3.45 (d,  $J = 11.29$  Hz, 1 H) 4.17 (s, 2 H) 4.27 - 4.32 (m, 2 H) 4.34 - 4.40 (m, 1 H) 5.72 - 5.78 (m, 1 H) 6.23 (dd,  $J = 16.99, 1.83$  Hz, 1 H) 6.43 (dd,  $J = 16.99, 10.22$  Hz, 1 H) 6.94 (s, 1 H) 7.15 - 7.18 (m, 1 H) 7.29 - 7.33 (m, 2 H) 7.35 - 7.41 (m, 2 H) 7.49 (d,  $J = 8.17$  Hz, 2 H) 7.75 (d,  $J = 1.94$  Hz, 1 H) 7.82 (s, 1 H) 7.88 - 7.92 (m, 1 H) 8.64 (d,  $J = 2.04$  Hz, 1 H) 9.68 - 9.74 (m, 1 H) 10.08 (s, 1 H) 10.88 (s, 1 H);  **$^{13}C$ -NMR** (176 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 25.89 (s, 1 C) 37.41 (s, 1 C) 47.55 (s, 1 C) 51.07 (s, 1 C) 58.77 (s, 1 C) 108.85 (s, 1 C) 113.30 (s, 1 C) 115.33 (s, 1 C) 117.00 (s, 1 C) 124.64 (s, 1 C) 126.42 (s, 1 C) 127.06 (s, 1 C) 127.48 (s, 1 C) 128.41 (s, 1 C) 128.84 (s, 1 C) 128.95 (s, 1 C) 129.20 (s, 1 C) 129.36 (s, 1 C) 129.75 (s, 1 C) 130.05 (s, 1 C) 130.80 (s, 1 C) 131.88 (s, 1 C) 132.37 (s, 1 C) 135.44 (s, 1 C) 135.47 - 135.53 (m, 1 C) 138.87 (s, 1 C) 139.05 (s, 1 C) 140.87 (s, 1 C) 145.50 (s, 1 C) 148.35 (s, 1 C) 153.38 (s, 1 C) 153.94 (s, 1 C) 162.84 (s, 1 C) 167.13 (s, 1 C); **HRMS (ESI):**  $[R_t]$ : 7.10 min,  $m/z$  für  $C_{41}H_{37}N_5O_4$  ( $[M+H]^+$ ), 664.2918 berechnet, 664.2918 gefunden.

**5.2.5.62. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-(4-(Dimethylamino)benzyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

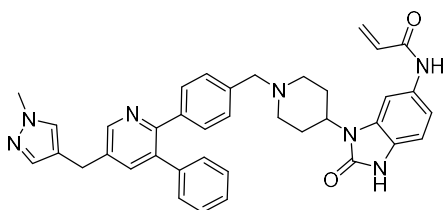


**Verbindung 39h**

Chlorpyridin (**37e**, 20.0 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (25.2 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (15.5 mg, 0.12 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (6.9 mg, 0.006 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39h**, 21.7 mg, 0.03 mmol, 53 %).

$^1H$ -NMR (600 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 1.75 (d,  $J = 10.27$  Hz, 2 H) 2.19 (t,  $J = 11.28$  Hz, 2 H) 2.44 - 2.56 (m, 2 H) 2.89 (s, 6 H) 3.04 (d,  $J = 11.55$  Hz, 2 H) 3.58 (s, 2 H) 4.00 (s, 2 H) 4.22 - 4.30 (m, 1 H) 5.77 (d,  $J = 11.55$  Hz, 1 H) 6.33 - 6.38 (m, 1 H) 6.40 - 6.47 (m, 1 H) 6.77 (d,  $J = 8.62$  Hz, 2 H) 7.01 (d,  $J = 8.25$  Hz, 1 H) 7.09 - 7.16 (m, 4 H) 7.21 - 7.30 (m, 8 H) 7.64 (d,  $J = 1.10$  Hz, 1 H) 7.69 (d,  $J = 1.47$  Hz, 1 H) 8.42 (d,  $J = 1.65$  Hz, 1 H) 8.55 (s, 1 H) 9.98 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 29.87 (s, 2 C) 38.59 (s, 1 C) 41.39 (s, 2 C) 49.71 (1 C) 52.47 (s, 1 C) 54.21 (s, 2 C) 63.45 (s, 1 C) 104.26 (s, 1 C) 110.50 (s, 1 C) 114.93 (s, 2 C) 115.66 (s, 1 C) 126.78 (s, 1 C) 127.72 (s, 1 C) 128.58 (s, 1 C) 129.49 (s, 2 C) 129.75 (s, 1 C) 130.34 (s, 2 C) 130.69 (s, 2 C) 130.84 (s, 2 C) 131.12 (s, 1 C) 132.63 (s, 1 C) 133.82 (s, 1 C) 138.04 (s, 1 C) 138.77 (s, 1 C) 138.88 (s, 1 C) 140.32 (s, 1 C) 140.67 (s, 1 C) 141.02 (s, 1 C) 148.95 (s, 2 C) 151.29 (s, 1 C) 156.02 (s, 1 C) 156.76 (s, 1 C) 166.22 (s, 1 C).

**5.2.5.63. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-((1-methyl-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

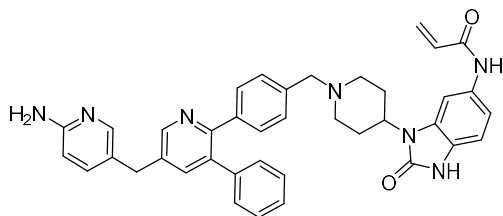


**Verbindung 39i**

Chlorpyridin (**37g**, 20.0 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (28.2 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (15.5 mg, 0.12 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (6.9 mg, 0.006 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39i**, 13.0 mg, 0.02 mmol, 35 %).

**$^1H$ -NMR** (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 1.64 (d,  $J = 9.90$  Hz, 2H) 2.07 (s, 2H) 2.21 - 2.34 (m, 2H) 2.93 (d,  $J = 10.64$  Hz, 2H) 3.77 (s, 3H) 3.87 (s, 2H) 4.07 - 4.15 (m, 1H) 5.73 (dd,  $J = 10.27, 1.83$  Hz, 1H) 6.25 (d,  $J = 1.83$  Hz, 1H) 6.39 (d,  $J = 10.27$  Hz, 1H) 6.91 (d,  $J = 8.44$  Hz, 1H) 7.16 (dd,  $J = 7.52, 1.65$  Hz, 2H) 7.19 - 7.25 (m, 4H) 7.26 - 7.32 (m, 4H) 7.35 (s, 2H) 7.57 (s, 1H) 7.61 (d,  $J = 1.83$  Hz, 1H) 7.68 (s, 1H) 8.55 (d,  $J = 1.83$  Hz, 1H) 10.07 (s, 1H) 10.80 (s, 1H);  **$^{13}C$ -NMR** (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 25.71 (s, 2C) 26.97 (s, 1C) 29.15 (s, 1C) 38.87 (s, 1C) 50.60 (s, 1C) 53.09 (s, 2C) 56.50 (s, 1C) 62.01 (s, 1C) 62.49 (s, 1C) 101.38 (s, 1C) 109.11 (s, 1C) 112.58 (s, 1C) 119.52 (s, 1C) 124.96 (s, 1C) 126.81 (s, 1C) 127.70 (s, 1C) 128.68 (s, 1C) 128.81 (s, 2C) 129.45 (s, 1C) 129.79 (s, 3C) 129.97 (s, 1C) 132.51 (s, 1C) 133.12 (s, 1C) 135.49 (s, 1C) 136.31 (s, 1C) 138.04 (s, 1C) 138.66 (s, 1C) 139.11 (s, 1C) 140.13 (s, 1C) 148.58 (s, 1C) 154.32 (s, 1C) 154.47 (s, 1C) 163.24 (s, 1C); **HRMS (ESI)**: [ $R_t$ ]: 4.88 min,  $m/z$  für  $C_{38}H_{37}N_7O_2$  ( $[M+H]^+$ ), 624.3081 berechnet, 624.3071 gefunden.

**5.2.5.64. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-((6-aminopyridin-3-yl)methyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

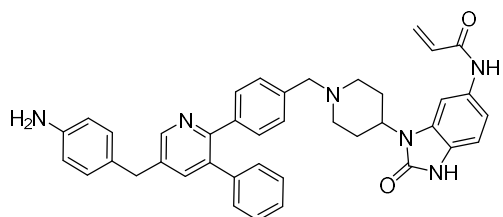


**Verbindung 39j**

Chlorpyridin (**37h**, 20.0 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (28.2 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (15.5 mg, 0.12 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (6.9 mg, 0.006 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39j**, 10.8 mg, 0.02 mmol, 28 %).

$^1H$ -NMR (500 M Hz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 2.06 - 2.13 (m, 2H) 2.71 - 2.84 (m, 2H) 3.19 - 3.29 (m, 2H) 3.58 - 3.68 (m, 2H) 4.12 (s, 2H) 4.39 (s, 2H) 4.48 - 4.56 (m, 1H) 5.76 - 5.81 (m, 1H) 6.33 - 6.40 (m, 1H) 6.44 (d,  $J = 9.77$  Hz, 1H) 6.96 - 7.06 (m, 3H) 7.16 - 7.21 (m, 2H) 7.30 (dd,  $J = 5.11, 1.91$  Hz, 3H) 7.45 - 7.54 (m, 4H) 7.86 (d,  $J = 1.37$  Hz, 1H) 7.91 - 7.94 (m, 2H) 7.97 (d,  $J = 1.98$  Hz, 1H) 8.64 (d,  $J = 2.14$  Hz, 1H);  $^{13}C$ -NMR (176 M Hz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 22.87 (s, 2C) 27.21 (s, 1C) 33.04 (s, 1C) 49.72 (s, 1C) 51.66 (s, 2C) 60.78 (s, 1C) 101.76 (s, 1C) 107.97 (s, 1C) 108.42 (s, 1C) 113.09 (s, 1C) 123.42 (s, 1C) 125.26 (s, 1C) 126.27 (s, 1C) 127.11 (s, 2C) 128.02 (s, 1C) 128.39 (s, 2C) 128.69 (s, 2C) 130.16 (s, 2C) 131.37 (s, 1C) 135.38 (s, 1C) 135.72 (s, 1C) 137.81 - (s, 1C) 138.20 (s, 1C) 138.40 (s, 1C) 145.06 (s, 1C) 146.56 (s, 1C) 153.87 (s, 1C) 154.26 (s, 1C) 157.17 (s, 1C) 163.62 (s, 1C); **HRMS (ESI):** [ $R_t$ ]: 5.68 min,  $m/z$  für  $C_{39}H_{38}N_7O_2$  ( $[M+H]^+$ ), 636.3081 Berechnet, 636.3078 gefunden.

**5.2.5.65. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-(4-aminobenzyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

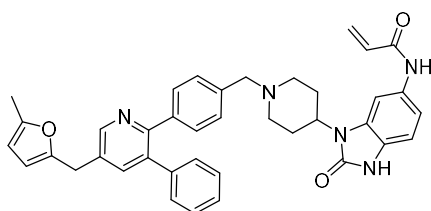


**Verbindung 39k**

Chlorpyridin (**37k**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (18.7 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39k**, 9.4 mg, 0.01 mmol, 21 %).

$^1H$ -NMR (700 M Hz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 1.95 (d,  $J = 12.26$  Hz, 2 H) 2.61 (d,  $J = 14.09$  Hz, 2 H) 3.15 - 3.24 (m, 2 H) 3.45 (d,  $J = 11.51$  Hz, 2 H) 4.07 (s, 2 H) 4.27 - 4.32 (m, 2 H) 4.35 - 4.39 (m, 1 H) 4.51 (s, 2 H) 5.74 (d,  $J = 10.22$  Hz, 1 H) 6.23 (d,  $J = 17.21$  Hz, 1 H) 6.43 (dd,  $J = 16.83, 10.16$  Hz, 1 H) 6.95 (s, 2 H) 7.10 - 7.17 (m, 4 H) 7.30 (s, 2 H) 7.35 - 7.41 (m, 5 H) 7.71 (s, 1 H) 7.83 (s, 1 H) 8.61 (s, 1 H) 9.72 (s, 1 H) 10.08 (s, 1 H) 10.88 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (126 M Hz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 25.89 (s, 2 C) 36.88 (s, 1C) 47.55 (s, 1C) 51.06 (s, 2 C) 58.90 (s, 1C) 101.39 (s, 1C) 108.86 (s, 1C) 113.27 (s, 1C) 115.34 (s, 1C) 117.02 (s, 1C) 124.63 (s, 1C) 126.41 (s, 1C) 127.47 (s, 1C) 128.42 (s, 2 C) 128.88 (s, 1C) 129.01 (s, 1C) 129.33 (s, 2 C) 129.93 (s, 3 C) 130.04 (s, 2 C) 130.79 (s, 2 C) 131.89 (s, 1C) 132.38 (s, 1C) 135.42 (s, 1C) 136.03 (s, 1C) 138.74 (s, 1C) 139.11 (s, 1C) 140.99 (s, 1C) 148.25 (s, 2 C) 153.23 (s, 1C) 153.94 (s, 1C) 162.83 (s, 1C); **HRMS (ESI):** [ $R_t$ ]: 5.71 min,  $m/z$  für  $C_{40}H_{38}N_6O_2$  ( $[M+H^+]$ ), 635.3129 berechnet, 635.3128 gefunden.

### 5.2.5.66. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-((5-Methylfuran-2-yl)methyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzof[d]imidazol-5-yl)acrylamid



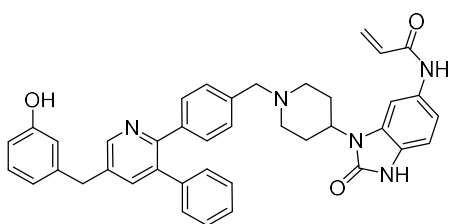
### Verbindung 39l

Chlorpyridin (**37i**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (18.7 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39l**, 17.4 mg, 0.03 mmol, 39 %).

$^1H$ -NMR (500 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 1.60 - 1.69 (m, 2H) 2.03 - 2.14 (m, 2H) 2.21 (s, 3H) 2.25 - 2.35 (m, 2H) 2.90 - 2.99 (m, 2H) 3.55 (m, 2H) 4.04 (s, 1H) 4.08 - 4.14 (m, 1H) 5.69 - 5.76 (m, 1H) 6.20 - 6.27 (m, 1H) 6.34 - 6.44 (m, 1H) 6.88 - 6.94 (m, 1H) 7.14 - 7.23 (m, 4H) 7.23 - 7.32 (m, 5H) 7.35 (s, 2H) 7.62 - 7.74 (m, 2H) 8.52 - 8.56 (m, 1H) 10.02 (s, 1H) 10.73 (s, 1H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 13.26 (s, 1C) 25.47 (s, 1C) 28.65 (s, 1C) 30.29 (s, 1C) 50.12 (s, 2C) 52.62 (s, 1C) 56.00 (s,

1C) 61.51 (s, 1C) 100.88 (s, 1C) 106.46 (s, 1C) 107.40 (s, 1C) 108.61 (s, 1C) 112.10 (s, 1C) 115.27 (s, 1C) 124.47 (s, 1C) 126.31 (s, 1C) 126.44 (s, 1C) 126.93 (s, 1C) 127.29 (s, 1C) 128.20 (s, 1C) 128.36 (s, 1C) 128.88 (s, 1C) 128.96 (s, 1C) 129.26 (s, 1C) 129.49 (s, 1C) 132.03 (s, 1C) 132.62 (s, 1C) 132.67 (s, 1C) 135.05 (s, 1C) 137.70 (s, 1C) 138.46 (s, 1C) 139.50 (s, 1C) 148.19 (s, 1C) 150.66 (s, 1C) 151.38 (s, 1C) 153.98 (s, 1C) 154.34 (s, 1C) 162.75 (s, 1C); **HPLC-MS (ESI):** [R<sub>t</sub>]: 5.09 min, *m/z* für C<sub>39</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 624.2969 berechnet, 624.2969 gefunden.

### 5.2.5.67. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-(3-hydroxybenzyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid



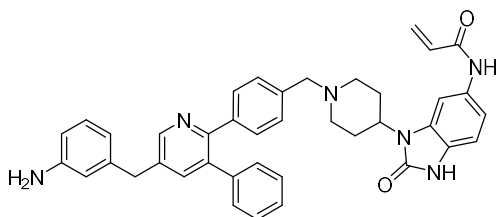
#### Verbindung 39m

Chlorpyridin (**37j**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (18.6 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39m**, 21.2 mg, 0.03 mmol, 47 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.95 (d, *J* = 12.26 Hz, 2 H) 2.61 (d, *J* = 14.09 Hz, 2 H) 3.15 - 3.24 (m, 2 H) 3.45 (d, *J* = 11.51 Hz, 2 H) 4.07 (s, 2 H) 4.27 - 4.32 (m, 2 H) 4.35 - 4.39 (m, 1 H) 4.51 (s, 2 H) 5.74 (d, *J* = 10.22 Hz, 1 H) 6.23 (d, *J* = 17.21 Hz, 1 H) 6.43 (dd, *J* = 16.83, 10.16 Hz, 1 H) 6.95 (s, 2 H) 7.10 - 7.17 (m, 4 H) 7.30 (s, 2 H) 7.35 - 7.41 (m, 5 H) 7.71 (s, 1 H) 7.83 (s, 1 H) 8.61 (s, 1 H) 9.72 (s, 1 H) 10.08 (s, 1 H) 10.88 (s, 1 H); **<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 25.89 (s, 2 C) 36.88 (s, 1C) 47.55 (s, 1C) 51.06 (s, 2 C) 58.90 (s, 1C) 101.39 (s, 1C) 108.86 (s, 1C) 113.27 (s, 1C) 115.34 (s, 1C) 117.02 (s, 1C) 124.63 (s, 1C) 126.41 (s, 1C) 127.47 (s, 1C) 128.42 (s, 2 C) 128.88 (s, 1C) 129.01 (s, 1C) 129.33 (s, 2 C) 129.93 (s, 3 C) 130.04 (s, 2 C) 130.79 (s, 2 C) 131.89 (s, 1C) 132.38 (s, 1C) 135.42 (s, 1C) 136.03 (s, 1C) 138.74 (s, 1C) 139.11 (s, 1C) 140.99 (s, 1C) 148.25 (s, 2 C) 153.23 (s, 1C) 153.94 (s, 1C) 162.83 (s, 1C); **HPLC-MS (ESI):** [R<sub>t</sub>]: 6.07 min, *m/z* für C<sub>40</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 636.2969 berechnet, 636.2968 gefunden.



**5.2.5.68. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-(3-Aminobenzyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

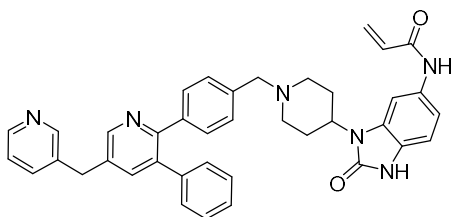


**Verbindung 39n**

Chlorpyridin (**371**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (18.6 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39n**, 9.4 mg, 0.01 mmol, 21 %).

$^1H$ -NMR (600 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 2.06 - 2.14 (m, 2H) 2.71 - 2.84 (m, 2H) 3.21 - 3.29 (m, 2H) 3.56 - 3.71 (m, 2H) 4.28 (s, 2H) 4.35 - 4.42 (m, 2H) 4.47 - 4.57 (m, 1H) 5.74 - 5.84 (m, 1H) 6.35 - 6.41 (m, 1H) 6.42 - 6.48 (m, 1H) 6.94 - 7.06 (m, 2H) 7.14 - 7.20 (m, 1H) 7.30 (s, 4H) 7.33 - 7.39 (m, 1H) 7.47 (s, 2H) 7.52 (d,  $J = 7.70$  Hz, 4H) 7.91 - 7.94 (m, 1H) 7.97 - 8.00 (m, 1H) 8.61 - 8.66 (m, 1H) 8.98 - 9.01 (m, 1H) 10.05 - 10.07 (m, 1H) 10.76 - 10.79 (m, 1H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 27.55 (s, 2C) 38.78 (s, 1C) 53.37 (s, 2C) 61.35 (s, 1C) 103.53 (s, 1C) 110.85 (s, 1C) 115.65 (s, 1C) 117.20 (s, 1C) 122.36 (s, 1C) 124.12 (s, 1C) 124.55 (s, 1C) 126.70 (s, 1C) 127.62 (s, 1C) 129.41 (s, 2C) 129.84 (s, 1C) 130.43 (s, 2C) 130.62 (s, 1C) 130.87 (s, 1C) 131.59 (s, 1C) 131.86 (s, 2C) 132.11 (s, 1C) 132.31 (s, 1C) 133.37 (s, 1C) 134.09 (s, 1C) 138.74 (s, 1C) 139.35 (s, 1C) 139.49 (s, 1C) 140.65 (s, 1C) 143.34 (s, 1C) 143.63 (s, 1C) 147.31 (s, 1C) 154.19 (s, 1C) 156.58 (s, 1C) 166.17 (s, 1C); **HRMS (ESI):** [ $R_t$ ]: 5.38 min,  $m/z$  für  $C_{40}H_{39}N_6O_2$  ( $[M+H]^+$ ), 635.3219 berechnet, 635.3128 gefunden.

**5.2.5.69. Darstellung von *N*-(2-oxo-3-(1-(4-(3-Phenyl-5-(pyridin-3-ylmethyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

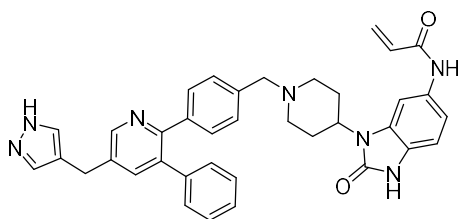


**Verbindung 39o**

Chlorpyridin (**37m**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (18.6 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39o**, 15.2 mg, 0.02 mmol, 40 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 M Hz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.92 - 1.98 (m, 2H) 2.57 - 2.65 (m, 2H) 3.16 - 3.24 (m, 2H) 3.41 - 3.48 (m, 2H) 4.27 (s, 2H) 4.30 (s, 3H) 4.34 - 4.40 (m, 2H) 5.71 - 5.76 (m, 1H) 6.21 - 6.26 (m, 1H) 6.39 - 6.47 (m, 1H) 6.95 (s, 2H) 7.04 (s, 1H) 7.13 (s, 1H) 7.14 - 7.19 (m, 3H) 7.21 (s, 1H) 7.28 - 7.34 (m, 5H) 7.35 - 7.38 (m, 3H) 7.39 - 7.44 (m, 3H) 7.79 - 7.82 (m, 2H) 7.83 - 7.87 (m, 4H) 8.32 - 8.37 (m, 1H) 8.70 (d, *J* = 2.20 Hz, 4H) 8.90 (d, *J* = 1.47 Hz, 1H) 9.73 - 9.78 (m, 1H) 10.09 (s, 1H) 10.89 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (151 M Hz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 26.37 (s, 2C) 34.64 (s, 1C) 48.02 (s, 1C) 51.55 (s, 2C) 59.36 (s, 1C) 101.88 (s, 1C) 109.36 (s, 1C) 113.40 (s, 1C) 113.76 (s, 1C) 115.34 (s, 1C) 117.28 (s, 1C) 119.21 (s, 1C) 125.12 (s, 1C) 126.47 (s, 1C) 126.91 (s, 1C) 128.04 (s, 1C) 128.90 (s, 2C) 129.50 (s, 1C) 129.88 (s, 2C) 130.53 (s, 1C) 131.32 (s, 1C) 132.37 (s, 1C) 132.87 (s, 1C) 134.84 (s, 1C) 136.10 (s, 1C) 139.14 (s, 1C) 139.40 (s, 1C) 139.64 (s, 1C) 141.31 (s, 1C) 143.48 (s, 1C) 145.13 (s, 1C) 148.85 (s, 1C) 154.19 (s, 1C) 154.43 (s, 1C) 163.32 (s, 1C); **HRMS (ESI)**: *m/z* für C<sub>39</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 621.2972 berechnet, 621.2962 gefunden.

#### 5.2.5.70. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-((1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid



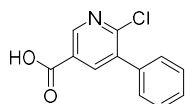
#### Verbindung 39p

Chlorpyridin (**37n**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (18.6 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**39p**, 12.8 mg, 0.02 mmol, 33 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.64 (d, *J* = 9.90 Hz, 2H) 1.98 - 2.14 (m, 2H) 2.29 (d, *J* = 10.27 Hz, 2H) 2.94 (d, *J* = 9.54 Hz, 2H) 3.51 (s, 2H) 4.07 - 4.15 (m, 1H) 5.48 (s, 2H) 5.70 - 5.77 (m, 1H) 6.24 (dd, *J* = 17.06, 2.02 Hz, 1H) 6.27 - 6.31 (m, 1H) 6.41 (dd, *J* = 16.87, 9.90 Hz, 1H) 6.91 (d, *J* = 8.44 Hz,

<sup>1</sup>H) 7.09 - 7.13 (m, 1H) 7.20 - 7.25 (m, 4H) 7.27 - 7.33 (m, 4H) 7.50 (d,  $J = 1.10$  Hz, 1H) 7.60 - 7.72 (m, 2H) 7.95 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1H) 8.56 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1H) 10.07 (s, 1H) 10.80 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 28.62 (s, 2C) 50.08 (s, 1C) 51.70 (s, 2C) 52.59 (s, 1C) 54.73 (s, 1C) 61.33 (s, 1C) 100.91 (s, 1C) 105.66 (s, 1C) 108.63 (s, 1C) 112.13 (s, 1C) 124.48 (s, 1C) 126.34 (s, 1C) 127.40 (s, 1C) 128.29 (s, 1C) 128.41 (s, 2C) 128.97 (s, 1C) 129.21 (s, 2C) 129.52 (s, 1C) 130.43 (s, 2C) 131.88 (s, 1C) 132.04 (s, 1C) 132.63 (s, 1C) 135.09 (s, 1C) 137.84 (s, 1C) 139.30 (s, 1C) 139.41 (s, 2C) 147.48 (s, 1C) 153.99 (s, 1C) 155.49 (s, 1C) 162.76 (s, 1C); **HRMS (ESI):** [*R*<sub>t</sub>]: 6.19 min,  $m/z$  für C<sub>37</sub>H<sub>36</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 610.2925 berechnet, 610.2925 gefunden.

### 5.2.5.71. Darstellung von 6-Chloro-5-phenylnicotinischer Säure

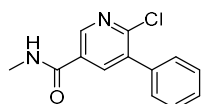


#### Verbindung 40

Der Methyl ester (**34d**, 200 mg, 0.8 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF und MeOH (1:1, 10 mL/mmol) gelöst woraufhin 2 mL konzentrierte NaOH Lösung zugesetzt wurden. Das Gemisch wurde bei rt für 2 h gerührt. Anschließend wurde DCM hinzugegeben und der pH wurde mit HCl auf 1 angepasst. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 N HCl gewaschen und dann über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert sowie das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gewünschte Produkt konnte ohne weitere Reinigungsschritte erhalten werden (**40**, 168 mg, 0.72 mmol, 90 %).

<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 7.41 - 7.59 (m, 5 H) 8.18 (d,  $J = 2.26$  Hz, 1 H) 8.89 (d,  $J = 2.26$  Hz, 1 H) 13.71 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (176 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 126.40, 128.51, 128.68, 129.18, 136.10, 136.21, 140.34, 149.16, 152.13, 165.29; **HPLC-MS (ESI):** [*R*<sub>t</sub>]: 8.28 min,  $m/z$  für C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>ClNO<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 234.65 berechnet, 234.12 gefunden.

### 5.2.5.72. Darstellung von 6-Chloro-N-methyl-5-phenylnicotinamid



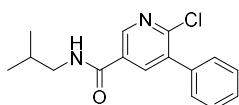
#### Verbindung 41a

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), Amin (14.4 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.3 mmol, 6.0 Äq.)

wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41a**, 30.1 mg, 0.12 mmol, 60 %).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2.78 - 2.83 (m, 3 H) 7.43 - 7.58 (m, 5 H) 8.23 (d, *J* = 2.44 Hz, 1 H) 8.76 (d, *J* = 4.42 Hz, 1 H) 8.82 (d, *J* = 2.44 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 26.25, 28.50, 128.64, 129.30, 129.45, 135.65, 136.50, 138.61, 147.54, 150.40, 163.89; HPLC-MS (ESI): *m/z* für C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>2</sub>O ([M+H<sup>+</sup>]), 247.69 berechnet, 247.15 gefunden.

#### 5.2.5.73. Darstellung von 6-Chloro-*N*-isobutyl-5-phenylnicotinamid

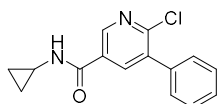


#### Verbindung 41b

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), Amin (17.2 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.3 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41b**, 31.0 mg, 0.10 mmol, 51 %).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 0.85 - 0.94 (m, 6 H) 1.84 (dt, *J* = 13.50, 6.83 Hz, 1 H) 3.10 (dd, *J* = 6.87, 5.80 Hz, 2 H) 7.43 - 7.61 (m, 5 H) 8.26 (d, *J* = 2.44 Hz, 1 H) 8.76 (t, *J* = 5.72 Hz, 1 H) 8.83 (d, *J* = 2.29 Hz, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 20.24, 28.05, 46.82, 128.49, 128.62, 129.32, 129.60, 135.62, 136.54, 138.64, 147.71, 150.39, 163.51; HPLC-MS (ESI): [R<sub>t</sub>]: 9.03 min, *m/z* für C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>O ([M+H<sup>+</sup>]), 289.78 berechnet, 289.13 gefunden.

#### 5.2.5.74. Darstellung von 6-Chloro-*N*-cyclopropyl-5-phenylnicotinamid

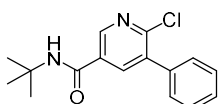


#### Verbindung 41c

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), Amin (12.2 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.3 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41c**, 38.0 mg, 0.14 mmol, 66 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 0.56 - 0.60 (m, 2 H) 0.69 - 0.75 (m, 2 H) 2.87 (tq,  $J = 7.40$ , 3.92 Hz, 1 H) 7.44 - 7.57 (m, 5 H) 8.22 (d,  $J = 2.44$  Hz, 1 H) 8.73 (d,  $J = 4.12$  Hz, 1 H) 8.80 (d,  $J = 2.44$  Hz, 1 H); **<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 5.70, 23.11, 128.49, 128.62, 129.30, 135.59, 136.52, 138.60, 147.67, 150.45, 164.67; **HPLC-MS (ESI)**:  $m/z$  für C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O ([M+H<sup>+</sup>]), 273.73 berechnet, 273.03 gefunden.

### 5.2.5.75. Darstellung von *N*-(*tert*-butyl)-6-Chloro-5-phenylnicotinamid

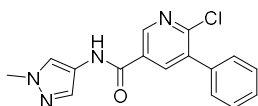


#### Verbindung 41d

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), Amin (15.6 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.3 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41d**, 32.4 mg, 0.11 mmol, 53 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 1.47 (s, 9 H) 7.42 - 7.53 (m, 6 H) 8.12 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1 H) 8.70 (d,  $J = 2.45$  Hz, 1 H); **<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 28.97, 53.27, 129.71, 129.89, 130.54, 132.64, 138.21, 138.36, 140.33, 148.43, 152.62, 166.89; **HPLC-MS (ESI)**: [R<sub>t</sub>]: 9.26 min,  $m/z$  für C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O ([M+H<sup>+</sup>]), 288.78 berechnet, 289.05 gefunden.

### 5.2.5.76. Darstellung von 6-Chloro-*N*-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-5-phenylnicotinamid



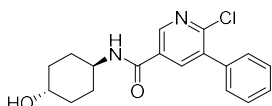
#### Verbindung 41e

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), Amin (20.7 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.3 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41e**, 15.5 mg, 0.05 mmol, 24 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 3.93 (s, 3 H) 7.48 - 7.58 (m, 5 H) 7.67 (d,  $J = 0.49$  Hz, 1 H) 7.86 (s, 1 H) 8.08 (s, 1 H) 8.34 (d,  $J = 2.45$  Hz, 1 H) 8.93 (d,  $J = 2.45$  Hz, 1 H); **<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, MeOD-

$d_4$ )  $\delta$  ppm 37.98, 121.44, 122.57, 128.25, 128.51, 129.01, 129.39, 130.52, 136.63, 136.98, 138.81, 147.01, 151.77, 162.16; **HPLC-MS (ESI):** [ $R_t$ ]: 6.70 min,  $m/z$  für  $C_{16}H_{13}ClN_4O$  ( $[M+H^+]$ ), 313.76 berechnet, 313.10 gefunden.

### 5.2.5.77. Darstellung von 6-Chloro-N-((1*r*,4*r*)-4-hydroxycyclohexyl)-5-phenylnicotinamid

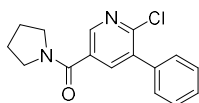


#### Verbindung 41f

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), Amin (24.6 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.3 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41f**, 27.6 mg, 0.08 mmol, 39 %).

$^1\text{H-NMR}$  (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 1.21 - 1.28 (m, 6 H) 1.29 - 1.39 (m, 2 H) 3.38 (s, 1 H) 3.74 (s, 1 H) 4.56 (s, 1 H) 7.45 - 7.56 (m, 5 H) 8.24 (s, 1 H) 8.48 (s, 1 H) 8.81 (s, 1 H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (176 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 30.17, 34.08, 48.14, 68.24, 128.45, 128.57, 129.26, 129.54, 135.55, 136.54, 138.58, 147.79, 150.36, 162.7; **HPLC-MS (ESI):** [ $R_t$ ]: 6.56 min,  $m/z$  für  $C_{18}H_{19}ClN_2O_2$  ( $[M+H^+]$ ), 330.81 berechnet, 331.04 gefunden.

### 5.2.5.78. Darstellung von (6-Chloro-5-phenylpyridin-3-yl)(pyrrolidin-1-yl)methanon



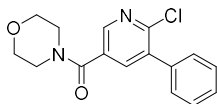
#### Verbindung 41g

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), Amin (15.2 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.3 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41g**, 11.5 mg, 0.04 mmol, 19 %).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3-d$ )  $\delta$  ppm 1.91 - 2.05 (m, 4 H) 3.53 (t,  $J = 6.48$  Hz, 2 H) 3.68 (t,  $J = 6.87$  Hz, 2 H) 7.42 - 7.53 (m, 5 H) 7.88 (d,  $J = 2.29$  Hz, 1 H) 8.57 (d,  $J = 2.29$  Hz, 1 H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3-d$ )  $\delta$  ppm 24.34, 26.43, 46.60, 49.66, 128.45, 128.67, 129.20, 131.81, 136.54, 136.84, 138.80, 170

146.49, 150.76, 165.93; **HPLC-MS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{16}H_{16}ClN_2O$  ( $[M+H^+]$ ), 287.76 berechnet, 287.07 gefunden.

### 5.2.5.79. Darstellung von (6-Chloro-5-phenylpyridin-3-yl)(morpholino)methanon

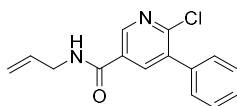


#### Verbindung 41h

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), Amin (18.6 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.3 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41h**, 29.5 mg, 0.09 mmol, 46 %).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 3.47 - 3.57 (m, 2 H) 3.60 - 3.72 (m, 2 H) 3.73 - 3.84 (m, 4 H) 7.43 - 7.52 (m, 5 H) 7.89 (d,  $J = 2.29$  Hz, 1 H) 8.47 (d,  $J = 2.29$  Hz, 1 H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 44.29, 67.83, 129.74, 129.98, 130.55, 132.27, 138.15, 138.74, 140.31, 147.84, 151.92, 168.55; **HPLC-MS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{16}H_{16}ClN_2O_2$  ( $[M+H^+]$ ), 303.76 berechnet, 303.19 gefunden.

### 5.2.5.80. Darstellung von *N*-Allyl-6-chloro-5-phenylnicotinamid

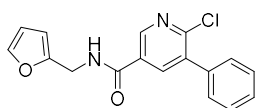


#### Verbindung 41i

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), Amin (10.5 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.3 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41i**, 16.7 mg, 0.06 mmol, 29 %).

$^1\text{H-NMR}$  (700 MHz,  $CDCl_3$ - $d$ )  $\delta$  ppm 4.12 (tt,  $J = 5.74, 1.36$  Hz, 2 H) 5.23 (d,  $J = 8.93$  Hz, 1 H) 5.27 - 5.31 (m, 1 H) 5.91 - 5.98 (m, 1 H) 6.28 (s, 1 H) 7.44 - 7.50 (m, 5 H) 8.10 (d,  $J = 2.37$  Hz, 1 H) 8.76 (d,  $J = 2.37$  Hz, 1 H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (176 MHz,  $CDCl_3$ - $d$ )  $\delta$  ppm 42.62, 117.45, 128.49, 128.75, 129.20, 129.27, 133.44, 137.06, 138.64, 146.19, 152.40, 164.28; **HPLC-MS (ESI):**  $[R_t]$ : min,  $m/z$  für  $C_{15}H_{13}ClN_2O$  ( $[M+H^+]$ ), 272.73 berechnet, 272.21 gefunden

### 5.2.5.81. Darstellung von 6-Chloro-N-(furan-2-ylmethyl)-5-phenylnicotinamid

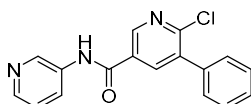


#### Verbindung 41j

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 40.0 mg, 0.2 mmol, 1.0 Äq.), Amin (16.6 mg, 0.2 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.3 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.0 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41j**, 10.4 mg, 0.03 mmol, 17 %).

<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d)  $\delta$  ppm 4.67 (d,  $J = 5.38$  Hz, 2 H) 6.31 - 6.38 (m, 2 H) 6.55 (s, 1 H) 7.39 (d,  $J = 2.58$  Hz, 1 H) 7.44 - 7.50 (m, 5 H) 8.10 (d,  $J = 2.37$  Hz, 1 H) 8.76 (d,  $J = 2.37$  Hz, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (176 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>)  $\delta$  ppm 37.09, 108.19, 110.60, 128.48, 128.75, 129.00, 129.20, 136.46, 137.02, 138.64, 142.56, 146.36, 150.38, 152.48, 164.20; HPLC-MS (ESI):  $m/z$  für C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 313.75 berechnet, 313.01 gefunden.

### 5.2.5.82. Darstellung von 6-Chloro-5-phenyl-N-(pyridin-3-yl)nicotinamid

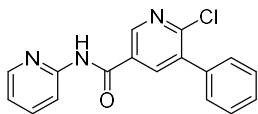


#### Verbindung 41k

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), Amin (20.1 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.3 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41k**, 48.8 mg, 0.06 mmol, 74 %).

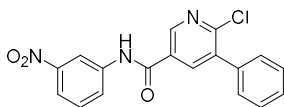
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 7.42 - 7.63 (m, 6H) 8.33 (d,  $J = 8.44$  Hz, 1H) 8.41 - 8.48 (m, 2H) 8.97 (d,  $J = 2.38$  Hz, 1H) 9.05 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1H) 10.88 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 124.75, 128.40, 128.74, 129.17, 129.21, 129.75, 135.75, 136.10, 136.33, 139.18, 139.55, 142.95, 148.18, 151.24, 163.29; HPLC-MS (ESI): [R<sub>t</sub>]: 7.02 min,  $m/z$  für C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>3</sub>O ([M+H<sup>+</sup>]), 310.76 berechnet, 310.13 gefunden.



**5.2.5.83. Darstellung von 6-Chloro-5-phenyl-N-(pyridin-2-yl)nicotinamid****Verbindung 41l**

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), Amin (20.1 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.3 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41l**, 52.5 mg, 0.18 mmol, 80 %).

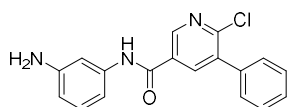
<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 7.16 - 7.24 (m, 1H) 7.47 - 7.51 (m, 1H) 7.54 (t, *J* = 7.58 Hz, 2H) 7.60 - 7.63 (m, 2H) 7.85 - 7.89 (m, 1H) 8.20 (d, *J* = 8.28 Hz, 1H) 8.39 - 8.41 (m, 1H) 8.45 (d, *J* = 2.37 Hz, 1H) 8.95 (d, *J* = 2.37 Hz, 1H) 11.24 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 114.66, 120.18, 128.42, 128.61, 129.36, 129.48, 135.42, 136.35, 138.29, 139.56, 148.03, 148.23, 150.94, 151.84, 163.49; **HPLC-MS (ESI):** [R<sub>t</sub>]: 9.10 min, *m/z* für C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>3</sub>O ([M+H<sup>+</sup>]), 310.76 berechnet, 310.08 gefunden.

**5.2.5.84. Darstellung von 6-Chloro-N-(3-nitrophenyl)-5-phenylnicotinamid****Verbindung 41m**

5-Bromo-6-chloropyridine-3-carboxylsäure (**40**, 50.0 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), Amin (29.5 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.), HATU (121 mg, 0.32 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.22 mL, 1.3 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**41m**, 31.0 mg, 0.09 mmol, 41 %).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 7.43 - 7.55 (m, 5H) 7.59 (t, *J* = 8.24 Hz, 1H) 8.01 (ddd, *J* = 8.24, 2.29, 0.92 Hz, 1H) 8.08 (ddd, *J* = 8.16, 2.06, 0.92 Hz, 1H) 8.34 (d, *J* = 2.44 Hz, 1H) 8.74 (t, *J* = 2.14 Hz, 1H) 8.93 (d, *J* = 2.44 Hz, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ ppm 116.41, 120.09, 127.37, 129.54, 129.83, 130.29, 130.83, 130.91, 137.75, 138.25, 140.22, 140.79, 148.32, 149.74, 153.42, 165.34; **HPLC-MS (ESI):** [R<sub>t</sub>]: 10.07 min, *m/z* für C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 354.76 berechnet, 354.16 gefunden.

### 5.2.5.85. Darstellung von 6-Chloro-N-(3-aminophenyl)-5-phenylnicotinamid

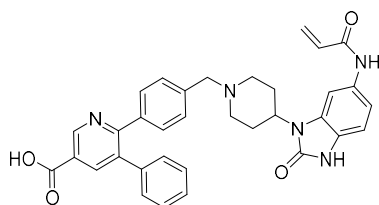


#### Verbindung 41n

Die Nitroverbindung **41m** (50.0 mg, 0.14 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Ethanol/Water (5:1, 10 mL) gelöst und anschließend Eisen (39.5 mg, 0.7 mmol, 5.0 Äq.) sowie NH<sub>4</sub>Cl (0.37 g 7.0 mmol, 10 Äq.) hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 30 min bei rt im Ultraschallbad reagieren gelassen. Das entstandene Präzipitat wurde entfernt und das Filtrat mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt **41n** (29.0 mg, 0.09 mmol, 64 %) wurde nach Säulenchromatographie an Kieselgel (3 % MeOH/DCM + 1 % NH<sub>3</sub>) als Feststoff erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 6.89 (d, *J* = 7.34 Hz, 1H) 7.36 (d, *J* = 7.58 Hz, 1H) 7.39 - 7.46 (m, 1H) 7.47 - 7.62 (m, 5H) 7.75 (s, 1H) 8.38 (d, *J* = 2.45 Hz, 1H) 8.94 (d, *J* = 2.45 Hz, 1H) 10.58 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 128.53, 128.70, 129.32, 129.85, 135.63, 136.40, 139.13, 139.65, 148.08, 150.88, 162.89; HPLC-MS (ESI): [R<sub>t</sub>]: 7.60 min, *m/z* für C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>1</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 324.78 berechnet, 324.14 gefunden.

### 5.2.5.86. Darstellung von 6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-5-phenylnicotinat



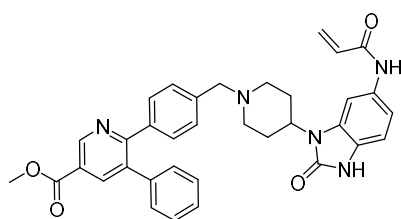
#### Verbindung 42a

Chlorpyridin (**40**, 20.0 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (28.2 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Base K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15.5 mg, 0.12 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (6.9 mg, 0.006 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42a**, 21.1 mg, 0.04 mmol, 70 %).

<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.96 (d, *J* = 12.58 Hz, 2H) 2.62 (d, *J* = 12.69 Hz, 2H) 3.20 (d, *J* = 11.29 Hz, 2H) 3.46 (d, *J* = 11.08 Hz, 2H) 4.33 (d, *J* = 2.47 Hz, 2H) 4.37 (s, 1H) 5.74 (d, *J* = 10.11 Hz, 1H) 6.24 (d, *J* = 16.99 Hz, 1H) 6.39 - 6.46 (m, 1H) 6.93 - 6.93 (m, 1H) 6.95 (s, 2H) 7.24 - 7.28 (m, 1H) 7.35 (s, 2H) 7.45 (s, 2H) 7.49 - 7.75 (m, 2H) 7.81 - 7.92 (m, 1H) 8.23 (s, 1H) 9.16 (s, 1H) 9.71 -

9.79 (m, 1H) 10.08 (s, 1H) 10.88 (s, 1H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (176 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 25.91 (s, 2C) 47.54 (s, 1C) 51.10 (s, 2C) 58.84 (s, 1C) 101.12 (s, 1C) 108.86 (s, 1C) 113.28 (s, 1C) 115.11 (s, 1C) 116.78 (s, 1C) 124.64 (s, 1C) 125.43 (s, 1C) 126.41 (s, 1C) 127.70 (s, 1C) 128.59 (s, 2C) 129.03 (s, 1C) 129.34 (s, 2C) 129.68 (s, 1C) 130.15 (s, 1C) 130.92 (s, 1C) 131.89 (s, 1C) 132.38 (s, 1C) 135.48 (s, 1C) 138.39 (s, 1C) 139.17 (s, 1C) 140.47 (s, 1C) 148.76 (s, 1C) 153.95 (s, 1C) 158.92 (s, 1C) 162.84 (s, 1C) 165.97 (s, 1C); **HRMS (ESI)**: [ $R_t$ ]: 5.88 min,  $m/z$  for  $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_4$  ( $[\text{M}+\text{H}^+]$ ), 574.2448 berechnet, 574.2441 gefunden.

### 5.2.5.87. Darstellung von *Methyl 6-(4-((4-(6-acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-5-phenylnicotinat*

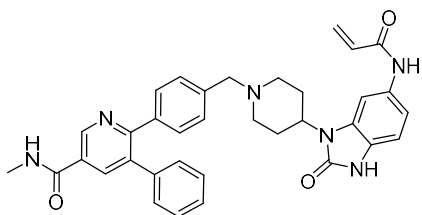


#### Verbindung 42b

Chlorpyridin (**34d**, 40.0 mg, 0.12 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (50.4 mg, 0.12 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (33.2 mg, 0.24 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (9.2 mg, 0.008 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42b**, 47.6 mg, 0.08 mmol, 50 %).

$^1\text{H-NMR}$  (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 1.95 (d,  $J = 12.48$  Hz, 2 H) 2.62 (d,  $J = 13.01$  Hz, 2 H) 3.20 (d,  $J = 12.37$  Hz, 2 H) 3.46 (d,  $J = 11.51$  Hz, 2 H) 3.94 (s, 3 H) 4.33 (d,  $J = 4.95$  Hz, 2 H) 4.35 - 4.41 (m, 1 H) 5.74 (d,  $J = 11.94$  Hz, 1 H) 6.24 (d,  $J = 16.89$  Hz, 1 H) 6.39 - 6.47 (m, 1 H) 6.94 (s, 2 H) 7.26 (d,  $J = 5.92$  Hz, 2 H) 7.33 - 7.39 (m, 3 H) 7.43 - 7.48 (m, 3 H) 7.84 (s, 1 H) 8.25 (s, 1 H) 9.18 (s, 1 H) 9.71 - 9.78 (m, 1 H) 10.08 (s, 1 H) 10.88 (s, 1 H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (176 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm 25.90 (s, 2 C) 47.54 (s, 1 C) 51.10 (s, 1 C) 52.58 (s, 2 C) 58.81 (s, 1 C) 101.39 (s, 1 C) 108.86 (s, 1 C) 113.28 (s, 1 C) 115.23 (s, 1 C) 116.90 (s, 1 C) 124.42 (s, 1 C) 124.63 (s, 1 C) 126.42 (s, 1 C) 127.93 (s, 1 C) 128.62 (s, 2 C) 129.03 (s, 1 C) 129.33 (s, 2 C) 129.79 (s, 1 C) 130.15 (s, 1 C) 130.94 (s, 1 C) 131.88 (s, 1 C) 132.38 (s, 1 C) 135.57 (s, 1 C) 138.21 (s, 1 C) 139.03 (s, 1 C) 140.31 (s, 1 C) 148.49 (s, 1 C) 153.94 (s, 1 C) 159.26 (s, 1 C) 162.83 (s, 1 C) 164.96 (s, 1 C); **HRMS (ESI)**: [ $R_t$ ]: 4.81 min,  $m/z$  für  $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_4$  ( $[\text{M}+\text{H}^+]$ ), 588.2605 berechnet, 588.2600 gefunden.

**5.2.5.88. Darstellung von 6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-N-methyl-5-phenylnicotinamid**

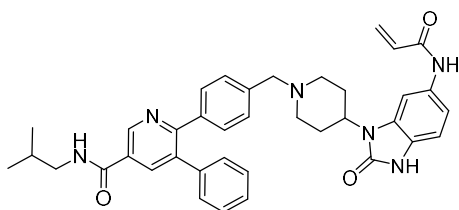


**Verbindung 42c**

Chlorpyridin (**41a**, 20.0 mg, 0.08 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (33.6 mg, 0.08 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (22.4 mg, 0.16 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (9.2 mg, 0.008 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42c**, 23.3 mg, 0.04 mmol, 49 %).

$^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 1.96 (d,  $J = 12.72$  Hz, 2 H) 2.55 - 2.69 (m, 2 H) 2.84 (d,  $J = 4.65$  Hz, 3 H) 3.13 - 3.26 (m, 2 H) 3.46 (d,  $J = 11.25$  Hz, 2 H) 4.32 (d,  $J = 4.16$  Hz, 2 H) 4.37 - 4.41 (m, 1 H) 5.71 - 5.77 (m, 1 H) 6.24 (dd,  $J = 16.99, 2.08$  Hz, 1 H) 6.43 (dd,  $J = 16.87, 10.03$  Hz, 1 H) 6.94 (s, 1 H) 7.22 - 7.28 (m, 2 H) 7.32 - 7.38 (m, 3 H) 7.44 (s, 4 H) 7.84 (s, 1 H) 8.24 (d,  $J = 1.96$  Hz, 1 H) 8.77 (d,  $J = 4.65$  Hz, 1 H) 9.08 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1 H) 9.70 - 9.78 (m, 1 H) 10.09 (s, 1 H) 10.88 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 25.96 (s, 1C) 26.30 (s, 2C) 47.61 (s, 1C) 51.16 (s, 2C) 58.96 (s, 1C) 101.53 (s, 1C) 108.97 (s, 1C) 113.43 (s, 1C) 115.02 (s, 1C) 116.68 (s, 1C) 124.73 (s, 1C) 126.59 (s, 1C) 127.82 (s, 1C) 128.61 (s, 1C) 128.67 (s, 1C) 129.10 (s, 1C) 129.50 (s, 2C) 130.20 (s, 1C) 130.99 (s, 1C) 131.91 (s, 1C) 132.43 (s, 1C) 135.21 (s, 1C) 137.27 (s, 1C) 138.74 (s, 1C) 140.71 (s, 1C) 147.15 (s, 1C) 154.04 (s, 1C) 157.41 (s, 1C) 158.17 (s, 1C) 158.39 (s, 1C) 162.97 (s, 1C) 164.80 (s, 1C); HRMS (ESI): [ $R_f$ ]: 5.60 min,  $m/z$  für  $C_{35}H_{35}N_6O_3$  ( $[M+H]^+$ ), 587.2765 berechnet, 587.2757 gefunden.

**5.2.5.89. Darstellung von 6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-N-isobutyl-5-phenylnicotinamid**

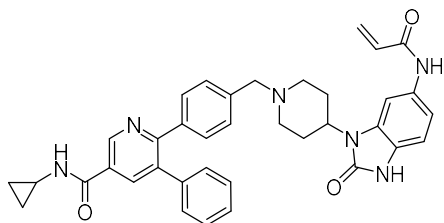


**Verbindung 42d**

Chlorpyridin (**41b**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (19.4 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42d**, 23.0 mg, 0.03 mmol, 52 %).

**$^1H$ -NMR** (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 0.91 (d,  $J = 6.85$  Hz, 6 H) 1.87 (dt,  $J = 13.45, 6.72$  Hz, 1 H) 1.96 (d,  $J = 11.25$  Hz, 2 H) 2.55 - 2.68 (m, 2 H) 3.11 - 3.17 (m, 2 H) 3.17 - 3.27 (m, 2 H) 3.46 (d,  $J = 11.00$  Hz, 2 H) 4.32 (d,  $J = 4.16$  Hz, 2 H) 4.37 (s, 1 H) 5.74 (d,  $J = 12.23$  Hz, 1 H) 6.24 (dd,  $J = 16.99, 2.08$  Hz, 1 H) 6.43 (dd,  $J = 16.87, 10.03$  Hz, 1 H) 6.94 (s, 2 H) 7.22 - 7.29 (m, 2 H) 7.32 - 7.39 (m, 3 H) 7.44 (s, 3 H) 7.84 (s, 1 H) 8.27 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1 H) 8.78 (t,  $J = 5.75$  Hz, 1 H) 9.09 (d,  $J = 1.96$  Hz, 1 H) 9.74 (s, 1 H) 10.09 (s, 1 H) 10.88 (s, 1 H);  **$^{13}C$ -NMR** (176 MHz,  $MeOD-d_4$ )  $\delta$  ppm 20.28 (s, 2C) 25.98 (s, 2C) 28.18 (s, 1C) 46.85 (s, 2C) 47.63 (s, 1C) 51.17 (s, 1C) 59.01 (s, 1C) 108.99 (s, 1C) 113.43 (s, 1C) 115.15 (s, 1C) 116.85 (s, 1C) 124.70 (s, 1C) 126.61 (s, 1C) 127.82 (s, 1C) 128.60 (s, 1C) 128.83 (s, 2C) 129.10 (s, 1C) 129.49 (s, 2C) 130.18 (s, 1C) 130.99 (s, 1C) 131.92 (s, 1C) 132.43 (s, 1C) 135.18 (s, 1C) 137.27 (s, 1C) 138.76 (s, 1C) 140.75 (s, 1C) 147.33 (s, 1C) 154.06 (s, 1C) 157.40 (s, 1C) 162.99 (s, 1C) 164.44 (s, 1C); **HRMS (ESI)**:  $[R_t]$ : 6.34 min,  $m/z$  für  $C_{38}H_{41}N_6O_3$  ( $[M+H^+]$ ), 629.3234 berechnet, 629.3223 gefunden.

**5.2.5.90. Darstellung von 6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzodjimidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-N-cyclopropyl-5-phenylnicotinamid**

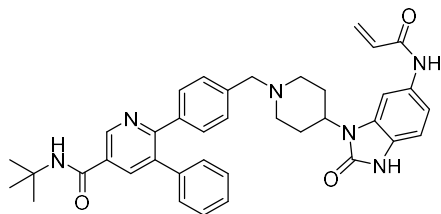


**Verbindung 42e**

Chlorpyridin (**41c**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (19.4 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42e**, 19.1 mg, 0.03 mmol, 44 %).

$^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 0.57 - 0.63 (m, 2 H) 0.70 - 0.79 (m, 2 H) 1.95 (d,  $J = 12.23$  Hz, 2 H) 2.55 - 2.69 (m, 2 H) 2.86 - 2.96 (m, 1 H) 3.13 - 3.27 (m, 2 H) 3.46 (d,  $J = 11.98$  Hz, 2 H) 4.32 (s, 2 H) 4.35 - 4.41 (m, 1 H) 5.71 - 5.76 (m, 1 H) 6.24 (dd,  $J = 16.99, 1.83$  Hz, 1 H) 6.43 (dd,  $J = 16.87, 10.03$  Hz, 1 H) 6.94 (s, 2 H) 7.22 - 7.28 (m, 2 H) 7.32 - 7.38 (m, 3 H) 7.43 (s, 3 H) 7.84 (s, 1 H) 8.23 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1 H) 8.74 (d,  $J = 4.16$  Hz, 1 H) 9.06 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1 H) 9.74 (s, 1 H) 10.09 (s, 1 H) 10.88 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 5.76 (s, 4 C) 23.12 (s, 2 C) 25.95 (s, 2 C) 47.58 (s, 1 C) 51.14 (s, 3 C) 58.90 (s, 1 C) 101.47 (s, 1 C) 108.92 (s, 1 C) 113.35 (s, 1 C) 114.99 (s, 1 C) 116.64 (s, 1 C) 124.68 (s, 1 C) 126.51 (s, 1 C) 127.76 (s, 1 C) 128.47 (s, 1 C) 128.55 (s, 4 C) 129.07 (s, 1 C) 129.47 (s, 6 C) 130.17 (s, 3 C) 130.94 (s, 3 C) 131.90 (s, 1 C) 132.40 (s, 1 C) 135.10 (s, 1 C) 137.23 (s, 2 C) 138.75 (s, 1 C) 140.67 (s, 1 C) 147.26 (s, 1 C) 153.99 (s, 1 C) 157.38 (s, 1 C) 162.91 (s, 1 C) 165.53 (s, 1 C); **HRMS (ESI)**: [ $R_t$ ]: 5.87 min,  $m/z$  für  $C_{37}H_{37}N_6O_3$  ( $[M+H]^+$ ), 613.2921 berechnet, 613.2911 gefunden.

**5.2.5.91. Darstellung von 6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-N-(tert-butyl)-5-phenylnicotinamid**

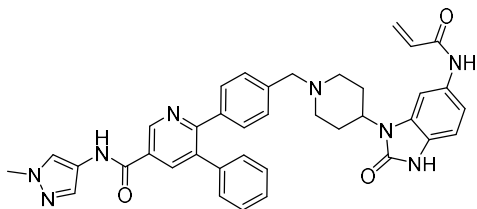


**Verbindung 42f**

Chlorpyridin (**41d**, 10.0 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (12.6 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (8.3 mg, 0.06 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (3.4 mg, 0.003 mol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42f**, 12.1 mg, 0.02 mmol, 64 %).

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1.41 (s, 9 H) 1.95 (d,  $J = 12.51$  Hz, 2 H) 2.56 - 2.66 (m, 2 H) 3.20 (d,  $J = 11.75$  Hz, 2 H) 3.46 (d,  $J = 10.99$  Hz, 2 H) 4.32 (s, 2 H) 4.36 - 4.41 (m, 1 H) 5.71 - 5.77 (m, 1 H) 6.23 (dd,  $J = 16.94, 1.83$  Hz, 1 H) 6.43 (dd,  $J = 16.94, 10.22$  Hz, 1 H) 6.95 (s, 1 H) 7.04 (s, 2 H) 7.14 (s, 2 H) 7.26 - 7.28 (m, 2 H) 7.33 - 7.38 (m, 2 H) 7.43 (m, 2 H) 7.83 (s, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 8.23 (d,  $J = 2.14$  Hz, 1 H) 9.03 (d,  $J = 1.98$  Hz, 1 H) 10.11 (s, 1 H) 10.90 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 25.93 (s, 1 C) 28.54 (s, 1 C) 47.57 (s, 1 C) 51.09 (s, 1 C) 51.24 (s, 1 C) 58.88 (s, 1 C) 108.92 (s, 1 C) 113.35 (s, 1 C) 114.55 (s, 1 C) 116.25 (s, 1 C) 117.93 (s, 1 C) 124.70 (s, 1 C) 126.47 (s, 1 C) 127.67 (s, 1 C) 128.54 (s, 1 C) 129.02 (s, 1 C) 129.50 (s, 1 C) 129.79 (s, 1 C) 130.14 (s, 1 C) 130.92 (s, 1 C) 131.91 (s, 1 C) 132.40 (s, 1 C) 134.85 (s, 1 C) 137.38 (s, 1 C) 138.87 (s, 1 C) 147.50 (s, 1 C) 153.97 (s, 1 C) 157.06 (s, 1 C) 162.91 (s, 1 C) 164.27 (s, 1 C); **HPLC-MS (ESI)**:  $m/z$  für  $C_{38}H_{40}N_6O_3$  ( $[M+H]^+$ ), 629.78 berechnet, 629.29 gefunden.

**5.2.5.92. Darstellung von 6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-N-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-5-phenylnicotinamid**

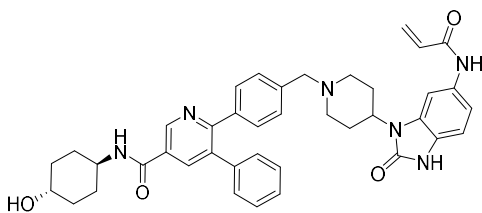


**Verbindung 42g**

Chlorpyridin (**41e**, 10.0 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (12.6 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (8.3 mg, 0.06 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (3.4 mg, 0.003 mol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42g**, 10.7 mg, 0.02 mmol, 54 %).

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1.64 (d,  $J = 9.90$  Hz, 2H) 2.07 (s, 2H) 2.21 - 2.34 (m, 2H) 2.93 (d,  $J = 10.64$  Hz, 2H) 3.77 (s, 3H) 3.87 (s, 2H) 4.07 - 4.15 (m, 1H) 5.73 (dd,  $J = 10.27, 1.83$  Hz, 1H) 6.25 (d,  $J = 1.83$  Hz, 1H) 6.39 (d,  $J = 10.27$  Hz, 1H) 6.91 (d,  $J = 8.44$  Hz, 1H) 7.16 (dd,  $J = 7.52, 1.65$  Hz, 2H) 7.19 - 7.25 (m, 4H) 7.26 - 7.32 (m, 4H) 7.35 (s, 2H) 7.57 (s, 1H) 7.61 (d,  $J = 1.83$  Hz, 1H) 7.68 (s, 1H) 8.55 (d,  $J = 1.83$  Hz, 1H) 10.07 (s, 1H) 10.80 (s, 1H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 25.71 (s, 2C) 26.97 (s, 1C) 29.15 (s, 1C) 38.87 (s, 1C) 50.60 (s, 1C) 53.09 (s, 2C) 56.50 (s, 1C) 62.01 (s, 1C) 62.49 (s, 1C) 101.38 (s, 1C) 109.11 (s, 1C) 112.58 (s, 1C) 119.52 (s, 1C) 124.96 (s, 1C) 126.81 (s, 1C) 127.70 (s, 1C) 128.68 (s, 1C) 128.81 (s, 2C) 129.45 (s, 1C) 129.79 (s, 3C) 129.97 (s, 1C) 132.51 (s, 1C) 133.12 (s, 1C) 135.49 (s, 1C) 136.31 (s, 1C) 138.04 (s, 1C) 138.66 (s, 1C) 139.11 (s, 1C) 140.13 (s, 1C) 148.58 (s, 1C) 154.32 (s, 1C) 154.47 (s, 1C) 163.24 (s, 1C); HRMS (ESI):  $[R_t]$ : 4.88 min,  $m/z$  für  $C_{38}H_{37}N_7O_2$  ( $[M+H]^+$ ), 624.3081 berechnet, 624.3071 gefunden.

**5.2.5.93. Darstellung von 6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-N-((1r,4r)-4-hydroxycyclohexyl)-5-phenylnicotinamid**



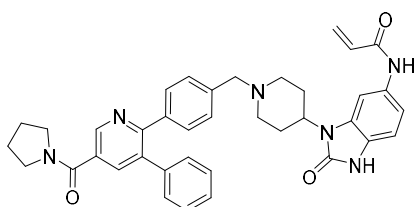
**Verbindung 42h**



Chlorpyridin (**41f**, 20.0 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (25.2 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (15.3 mg, 0.12 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (6.9 mg, 0.006 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42h**, 5.2 mg, 0.007 mmol, 13 %).

$^1H$ -NMR (700 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 1.96 - 2.06 (m, 4 H) 2.08 - 2.15 (m, 2 H) 2.72 - 2.84 (m, 2 H) 3.22 - 3.30 (m, 3 H) 3.59 - 3.70 (m, 6 H) 4.35 - 4.41 (m, 2 H) 4.49 - 4.55 (m, 1 H) 4.95 - 4.97 (m, 1 H) 5.34 - 5.35 (m, 1 H) 5.76 - 5.81 (m, 1 H) 6.36 - 6.40 (m, 1 H) 6.42 - 6.47 (m, 1 H) 6.95 - 6.98 (m, 1 H) 7.01 - 7.05 (m, 1 H) 7.22 - 7.24 (m, 2 H) 7.31 (d,  $J = 3.33$  Hz, 3 H) 7.50 (s, 4 H) 7.95 (s, 1 H) 8.05 - 8.06 (m, 1 H) 8.83 (s, 1 H) 9.00 (s, 1 H) 10.05 (s, 1 H) 10.76 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (176 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 25.44 (s, 2 C) 27.43 (s, 1 C) 27.56 (s, 1 C) 47.91 (s, 2 C) 49.68 (s, 1 C) 50.94 (s, 2 C) 53.37 (s, 2 C) 61.49 (s, 1 C) 103.50 (s, 1 C) 110.84 (s, 1 C) 115.61 (s, 1 C) 116.62 (s, 1 C) 126.68 (s, 1 C) 127.87 (s, 2 C) 129.20 (s, 2 C) 129.80 (s, 2 C) 130.45 (s, 1 C) 130.92 (s, 2 C) 132.12 (s, 2 C) 132.28 (s, 1 C) 132.54 (s, 1 C) 133.48 (s, 1 C) 138.16 (s, 1 C) 139.32 (s, 1 C) 139.94 (s, 1 C) 142.68 (s, 1 C) 147.52 (s, 1 C) 156.60 (s, 1 C) 158.50 (s, 1 C) 166.15 (s, 1 C) 168.51 (s, 1 C); **HRMS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{40}H_{43}N_6O_4$  ( $[M+H]^+$ ), 671.3340 berechnet, 671.3332 gefunden.

#### 5.2.5.94. Darstellung von *N*-(2-oxo-3-(1-(4-(3-Phenyl-5-(pyrrolidine-1-carbonyl)pyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid



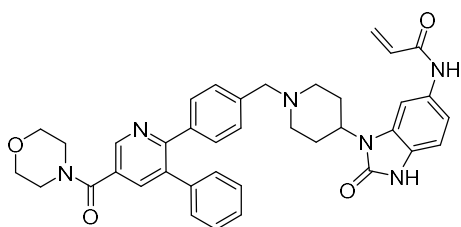
#### Verbindung **42i**

Chlorpyridin (**41g**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (19.4 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42i**, 15.1 mg, 0.02 mmol, 34 %).

$^1H$ -NMR (600 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 1.95 - 2.06 (m, 4H) 2.08 - 2.15 (m, 2H) 2.73 - 2.84 (m, 2H) 3.20 - 3.29 (m, 2H) 3.59 - 3.70 (m, 4H) 4.36 - 4.41 (m, 2H) 4.47 - 4.57 (m, 1H) 5.75 - 5.82 (m, 1H) 6.35 - 6.49 (m, 1H) 6.94 - 6.98 (m, 1H) 7.02 - 7.06 (m, 1H) 7.20 - 7.26 (m, 2H) 7.28 - 7.34 (m, 4H) 7.44 - 7.53 (m, 6H) 7.94 - 7.98 (m, 1H) 8.02 (s, 1H) 8.77 (s, 1H) 10.06 (s, 1H) 10.76 (s, 1H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 25.39 (s, 2C) 27.42 (s, 2C) 47.87 (s, 2C) 51.09 (s, 1C) 53.42 (s, 2C) 61.42 (s, 1C)

101.47 (s, 1C) 103.62 (s, 1C) 110.89 (s, 1C) 115.61 (s, 1C) 126.70 (s, 1C) 127.96 (s, 1C) 129.19 (s, 1C) 129.91 (s, 2C) 130.95 (s, 2C) 132.13 (s, 1C) 132.30 (s, 1C) 132.53 (s, 1C) 133.38 (s, 1C) 134.11 (s, 1C) 138.09 (s, 1C) 139.05 (s, 1C) 139.14 (s, 1C) 140.03 (s, 1C) 142.82 (s, 1C) 147.70 (s, 1C) 156.59 (s, 1C) 158.67 (s, 1C) 166.21 (s, 1C) 168.63 (s, 1C); **HRMS (ESI):** [ $R_t$ ]: 6.21 min,  $m/z$  für  $C_{38}H_{39}N_6O_3$  ( $[M+H^+]$ ), 626.3078 berechnet, 627.3068 gefunden.

### 5.2.5.95. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-(morpholine-4-carbonyl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid

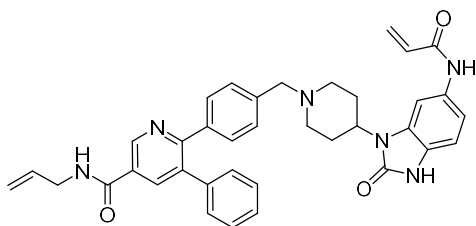


#### Verbindung 42j

Chlorpyridin (**41h**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (29.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (19.4 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (8.0 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42j**, 20.3 mg, 0.03 mmol, 45 %).

**$^1H$ -NMR** (700 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1.96 (d,  $J = 12.69$  Hz, 2 H) 2.57 - 2.67 (m, 2 H) 3.17 - 3.25 (m, 2 H) 3.42 - 3.53 (m, 4 H) 3.56 - 3.73 (m, 6 H) 4.32 (d,  $J = 4.52$  Hz, 2 H) 4.37 (s, 1 H) 5.74 (d,  $J = 10.54$  Hz, 1 H) 6.24 (d,  $J = 16.89$  Hz, 1 H) 6.43 (dd,  $J = 16.94, 10.16$  Hz, 1 H) 6.94 (s, 2 H) 7.21 - 7.26 (m, 2 H) 7.30 - 7.36 (m, 3 H) 7.39 - 7.46 (m, 3 H) 7.84 (s, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 8.74 (s, 1 H) 9.73 (s, 1 H) 10.08 (s, 1 H) 10.88 (s, 1 H);  **$^{13}C$ -NMR** (176 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 25.90 (s, 2 C) 40.03 (s, 2 C) 47.55 (s, 2 C) 51.08 (s, 2 C) 58.86 (s, 1 C) 101.38 (s, 1 C) 108.87 (s, 1 C) 113.30 (s, 1 C) 114.95 (s, 1 C) 116.61 (s, 1 C) 124.64 (s, 1 C) 126.40 (s, 1 C) 127.75 (s, 1 C) 128.49 (s, 2 C) 129.03 (s, 1 C) 129.33 (s, 1 C) 129.47 (s, 2 C) 130.08 (s, 1 C) 130.34 (s, 1 C) 130.89 (s, 2 C) 131.88 (s, 1 C) 132.38 (s, 1 C) 135.23 (s, 1 C) 137.17 (s, 1 C) 138.47 (s, 1 C) 140.74 (s, 1 C) 146.46 (s, 1 C) 153.94 (s, 1 C) 156.18 (s, 1 C) 162.84 (s, 1 C) 166.34 (s, 1 C); **HRMS (ESI):** [ $R_t$ ]: 5.94 min,  $m/z$  für  $C_{38}H_{39}N_6O_4$  ( $[M+H^+]$ ), 643.3027 berechnet, 643.3017 gefunden.

**5.2.5.96. Darstellung von 6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-N-allyl-5-phenylnicotinamid**

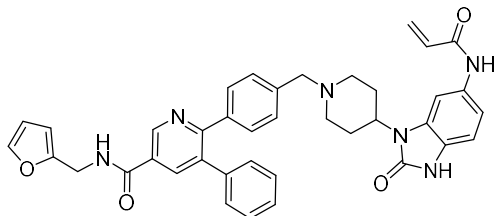


**Verbindung 42k**

Chlorpyridin (**41i**, 20.0 mg, 0.08 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (33.6 mg, 0.08 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (22.4 mg, 0.16 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (9.2 mg, 0.008 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42k**, 13.5 mg, 0.02 mmol, 27 %).

**$^1H$ -NMR** (500 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 2.07 - 2.15 (m, 2 H) 2.78 (q,  $J = 12.36$  Hz, 2 H) 3.21 - 3.29 (m, 2 H) 3.64 (d,  $J = 12.51$  Hz, 2 H) 4.06 (d,  $J = 5.49$  Hz, 2 H) 4.39 (s, 2 H) 4.48 - 4.56 (m, 1 H) 5.18 (d,  $J = 11.44$  Hz, 1 H) 5.28 (d,  $J = 15.72$  Hz, 1 H) 5.79 (d,  $J = 7.63$  Hz, 1 H) 5.91 - 6.04 (m, 1 H) 6.34 - 6.51 (m, 2 H) 6.96 (d,  $J = 8.39$  Hz, 1 H) 7.01 - 7.07 (m, 1 H) 7.22 - 7.28 (m, 2 H) 7.29 - 7.35 (m, 3 H) 7.51 (s, 4 H) 7.97 (s, 1 H) 8.31 (d,  $J = 1.98$  Hz, 1 H) 9.09 (d,  $J = 2.14$  Hz, 1 H) 10.09 (s, 1 H) 10.79 (s, 1 H);  **$^{13}C$ -NMR** (151 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 27.53 (s, 1 C) 43.68 (s, 1 C) 53.32 (s, 1 C) 61.49 (s, 255 C) 103.49 (s, 1 C) 110.84 (s, 1 C) 115.64 (s, 1 C) 116.85 (s, 1 C) 126.72 (s, 1 C) 127.95 (s, 1 C) 129.21 (s, 1 C) 129.87 (s, 1 C) 130.44 (s, 1 C) 130.69 (s, 1 C) 130.94 (s, 1 C) 132.11 (s, 1 C) 132.27 (s, 1 C) 132.54 (s, 1 C) 134.08 (s, 1 C) 135.39 (s, 1 C) 138.11 (s, 1 C) 139.37 (s, 1 C) 140.11 (s, 1 C) 142.74 (s, 1 C) 148.26 (s, 1 C) 156.60 (s, 1 C) 159.77 (s, 1 C) 166.17 (s, 1 C) 167.41 (s, 1 C); **HRMS (ESI):** [ $R_t$ ]: 6.24 min,  $m/z$  für  $C_{37}H_{37}N_6O_3$  ( $[M+H]^+$ ), 613.2921 berechnet, 613.2927 gefunden.

**5.2.5.97. Darstellung von 6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzodjimidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-N-(furan-2-ylmethyl)-5-phenylnicotinamid**

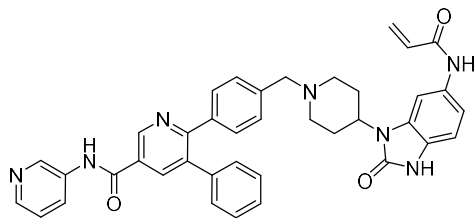


**Verbindung 421**

Chlorpyridin (**41j**, 20.0 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (25.2 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (15.3 mg, 0.12 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (6.9 mg, 0.006 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**421**, 14.0 mg, 0.02 mmol, 35 %).

$^1H$ -NMR (500 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 2.11 (d,  $J = 13.28$  Hz, 2 H) 2.72 - 2.84 (m, 2 H) 3.21 - 3.29 (m, 2 H) 3.64 (d,  $J = 11.90$  Hz, 2 H) 4.38 (s, 2 H) 4.47 - 4.57 (m, 1 H) 4.62 (s, 2 H) 5.79 (dd,  $J = 9.77$ , 1.83 Hz, 1 H) 6.33 - 6.41 (m, 3 H) 6.45 (m, 1 H) 6.96 (d,  $J = 8.39$  Hz, 1 H) 7.01 - 7.07 (m, 1 H) 7.22 - 7.27 (m, 2 H) 7.29 - 7.34 (m, 3 H) 7.44 - 7.52 (m, 5 H) 7.95 (s, 1 H) 8.30 (d,  $J = 1.98$  Hz, 1 H) 9.08 (d,  $J = 1.98$  Hz, 1 H) 10.09 (s, 1 H) 10.79 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz, MeOD- $d_4$ )  $\delta$  ppm 27.54 (s, 1 C) 37.82 (s, 1 C) 49.72 (s, 1 C) 53.43 (s, 1 C) 61.53 (s, 1 C) 103.52 (s, 1 C) 108.68 (s, 1 C) 110.86 (s, 1 C) 111.60 (s, 1 C) 115.62 (s, 1 C) 117.16 (s, 1 C) 126.68 (s, 1 C) 127.92 (s, 1 C) 128.23 (s, 1 C) 129.21 (s, 1 C) 129.84 (s, 1 C) 130.23 (s, 1 C) 130.46 (s, 1 C) 130.56 (s, 1 C) 130.94 (s, 1 C) 132.13 (s, 1 C) 132.27 (s, 1 C) 132.55 (s, 1 C) 134.06 (s, 1 C) 138.10 (s, 1 C) 139.41 (s, 1 C) 140.09 (s, 1 C) 142.74 (s, 1 C) 143.64 (s, 1 C) 148.28 (s, 1 C) 152.98 (s, 1 C) 156.59 (s, 1 C) 159.84 (s, 1 C) 166.17 (s, 1 C) 167.42 (s, 1 C); HRMS (ESI): [ $R_t$ ]: 6.45 min,  $m/z$  für  $C_{39}H_{37}N_6O_4$  ( $[M+H]^+$ ), 653.2870 berechnet, 653.2869 gefunden.

**5.2.5.98. Darstellung von 6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-5-phenyl-N-(pyridin-3-yl)nicotinamid**

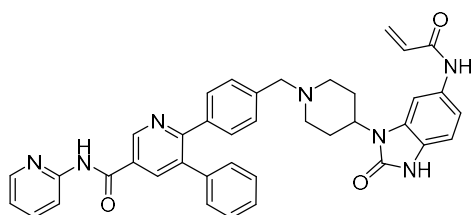


**Verbindung 42m**

Chlorpyridin (**41k**, 20.0 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), Boronsäure **24** (25.2 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (15.3 mg, 0.12 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (6.9 mg, 0.006 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42m**, 13.4 mg, 0.02 mmol, 34 %).

$^1H$ -NMR (500 M Hz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1.61 - 1.70 (m, 2H) 1.91 (s, 3H) 2.04 - 2.15 (m, 2H) 2.23 - 2.36 (m, 2H) 2.91 - 3.01 (m, 2H) 3.54 (s, 2H) 4.06 - 4.17 (m, 1H) 5.66 - 5.78 (m, 1H) 6.26 (s, 1H) 6.35 - 6.51 (m, 1H) 6.92 (d,  $J = 8.39$  Hz, 1H) 7.23 - 7.41 (m, 6H) 7.41 - 7.47 (m, 1H) 7.70 (d,  $J = 1.37$  Hz, 1H) 8.17 - 8.24 (m, 1H) 8.35 (dd,  $J = 4.65, 1.45$  Hz, 1H) 8.38 (d,  $J = 2.29$  Hz, 1H) 8.95 (d,  $J = 2.44$  Hz, 1H) 9.19 (d,  $J = 2.14$  Hz, 1H) 10.09 (s, 1H) 10.70 (s, 1H) 10.82 (s, 1H) 12.00 - 12.20 (m, 1H);  $^{13}C$ -NMR (126 M Hz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 19.05 (s, 1C) 29.14 (s, 2C) 50.56 (s, 1C) 53.12 (s, 2C) 56.49 (s, 1C) 61.96 (s, 1C) 101.37 (s, 1C) 109.13 (s, 1C) 112.58 (s, 1C) 124.13 (s, 1C) 124.95 (s, 1C) 126.87 (s, 1C) 127.88 (s, 2C) 128.18 (s, 1C) 128.68 (s, 1C) 128.84 (s, 1C) 129.02 (s, 2C) 129.43 (s, 2C) 129.89 (s, 1C) 130.15 (s, 1C) 132.50 (s, 1C) 133.11 (s, 1C) 135.36 (s, 1C) 136.02 (s, 1C) 138.18 (s, 1C) 139.41 (s, 1C) 142.44 (s, 2C) 145.38 (s, 1C) 148.08 (s, 1C) 154.46 (s, 1C) 159.15 (s, 1C) 163.23 (s, 1C) 164.55 (s, 1C); HRMS (ESI):  $[R_t]$ : 5.63 min,  $m/z$  für  $C_{39}H_{36}N_7O_3$  ( $[M+H^+]$ ), 650.2874 berechnet, 650.2866 gefunden.

**5.2.5.99. Darstellung von 6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-5-phenyl-N-(pyridin-2-yl)nicotinamid**

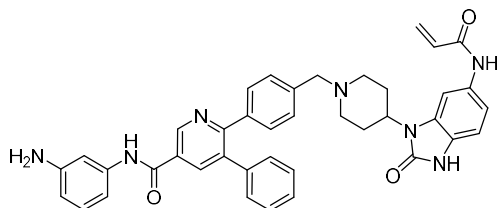


## Verbindung 42n

Chlorpyridin (**41i**, 20.0 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (25.2 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (15.3 mg, 0.12 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (6.9 mg, 0.006 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42n**, 23.5 mg, 0.04 mmol, 60 %).

$^1H$ -NMR (600 M Hz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 1.96 (d,  $J = 12.29$  Hz, 2H) 2.56 - 2.69 (m, 2H) 3.21 (d,  $J = 12.29$  Hz, 2H) 3.47 (d,  $J = 11.55$  Hz, 2H) 4.34 (d,  $J = 4.22$  Hz, 2H) 4.37 - 4.45 (m, 1H) 5.72 - 5.77 (m, 1H) 6.24 (dd,  $J = 16.96, 1.93$  Hz, 1H) 6.43 (dd,  $J = 16.96, 10.18$  Hz, 1H) 6.95 (s, 2H) 7.21 (ddd,  $J = 7.29, 4.91, 1.01$  Hz, 1H) 7.29 - 7.40 (m, 5H) 7.42 - 7.48 (m, 4H) 7.84 (s, 1H) 7.89 (ddd,  $J = 8.34, 7.43, 2.02$  Hz, 1H) 8.24 (d,  $J = 8.44$  Hz, 1H) 8.42 (ddd,  $J = 4.91, 1.88, 0.92$  Hz, 1H) 8.48 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1H) 9.22 (d,  $J = 2.02$  Hz, 1H) 9.72 - 9.81 (m, 1H) 10.09 (s, 1H) 10.89 (s, 1H) 11.27 (s, 1H);  $^{13}C$ -NMR (151 M Hz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 25.92 (s, 2C) 47.55 (s, 1C) 51.10 (s, 2C) 58.86 (s, 1C) 101.41 (s, 1C) 108.87 (s, 1C) 113.29 (s, 1C) 114.73 (s, 1C) 114.94 (s, 2C) 116.88 (s, 1C) 120.15 (s, 1C) 124.65 (s, 1C) 126.44 (s, 1C) 127.77 (s, 1C) 128.50 (s, 2C) 129.04 (s, 1C) 129.52 (s, 2C) 129.59 (s, 1C) 130.17 (s, 1C) 130.96 (s, 2C) 131.90 (s, 1C) 132.39 (s, 1C) 134.90 (s, 1C) 138.23 (s, 1C) 138.40 (s, 1C) 138.57 (s, 1C) 140.61 (s, 1C) 147.83 (s, 1C) 147.95 (s, 1C) 151.95 (s, 1C) 153.96 (s, 1C) 157.92 (s, 1C) 162.84 (s, 1C) 164.25 (s, 1C); HRMS (ESI): [R<sub>t</sub>]: 6.38 min,  $m/z$  für  $C_{39}H_{36}N_7O_3$  ( $[M+H]^+$ ), 650.2874 berechnet, 650.2868 gefunden.

### 5.2.5.100. Darstellung von 6-(4-((4-(6-Acrylamido-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-N-(3-aminophenyl)-5-phenylnicotinamid



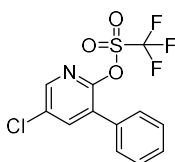
## Verbindung 42o

Chlorpyridin (**41n**, 20.0 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure **24** (25.2 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.), die Base  $K_2CO_3$  (15.3 mg, 0.12 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (6.9 mg, 0.006 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift E umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**42o**, 17.0 mg, 0.03 mmol, 42 %).

$^1H$ -NMR (600 M Hz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 1.65 (d,  $J = 9.90$  Hz, 2H) 2.09 (t,  $J = 11.10$  Hz, 2H) 2.30 (dd,  $J = 12.47, 3.48$  Hz, 2H) 2.95 (d,  $J = 11.19$  Hz, 2H) 3.53 (s, 2H) 4.11 (s, 1H) 5.12 (s, 2H) 5.71 - 5.78

(m, 1H) 6.21 - 6.27 (m, 1H) 6.32 - 6.36 (m, 1H) 6.41 (dd,  $J = 16.96, 10.18$  Hz, 1H) 6.88 (d,  $J = 8.99$  Hz, 1H) 6.91 (d,  $J = 8.44$  Hz, 1H) 6.96 - 7.02 (m, 1H) 7.11 (t,  $J = 1.93$  Hz, 1H) 7.24 - 7.31 (m, 5H) 7.31 - 7.39 (m, 5H) 7.70 (d,  $J = 1.65$  Hz, 1H) 8.31 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1H) 9.13 (d,  $J = 2.02$  Hz, 1H) 10.07 (s, 1H) 10.20 (s, 1H) 10.80 (s, 1H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 M Hz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 25.43 (s, 2C) 29.15 (s, 1C) 50.60 (s, 1C) 53.12 (s, 2C) 61.98 (s, 1C) 101.38 (s, 1C) 104.66 (s, 1C) 106.54 (s, 1C) 108.76 (s, 1C) 109.11 (s, 1C) 110.51 (s, 1C) 112.58 (s, 1C) 124.96 (s, 1C) 126.82 (s, 1C) 128.08 (s, 1C) 128.81 (s, 2C) 128.96 (s, 2C) 129.36 (s, 2C) 129.45 (s, 1C) 129.54 (s, 1C) 129.89 (s, 1C) 130.11 (s, 2C) 132.52 (s, 1C) 133.12 (s, 1C) 135.23 (s, 1C) 138.02 (s, 1C) 138.49 (s, 1C) 138.98 (s, 1C) 139.53 (s, 1C) 139.90 (s, 1C) 147.95 (s, 1C) 149.50 (s, 1C) 154.47 (s, 1C) 158.69 (s, 1C) 163.24 (s, 1C) 163.80 (s, 1C); **HRMS (ESI):** [ $R_t$ ]: 5.68 min,  $m/z$  für  $\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}_3$  ( $[\text{M}+\text{H}^+]$ ), 664.3030 berechnet, 664.3030 gefunden.

### 5.2.5.101. Darstellung von 5-Chloro-3-phenylpyridin-2-yl trifluoromethanesulfonat

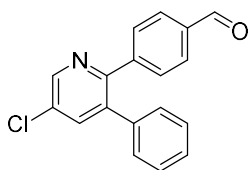


#### Verbindung 43

Das Phenol **34e** (100 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DCM (5 mL, 10 mL/mmol) gelöst und mit einem Eisbad unter Rühren auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde die Base Triethylamin (0.08 mL, 0.58 mmol, 1.2 Äq.) zugesetzt und dann langsam Tirflatanhydrid (0.1 mL, 0.58 mmol, 1.2 Äq.) zur Lösung getropft. Das Reaktionsgemisch rührte für weitere 12 h bei rt. Durch Zugabe von ges.  $\text{NaHCO}_3$  Lösung wurde die Reaktion beendet. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (3 - 5 % EtOAc/PE) lieferte das Produkt als Öl (**43**, 121 mg, 0.35 mmol, 73 %).

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 2.63 - 2.73 (m, 3 H) 4.00 - 4.12 (m, 4 H) 6.62 - 6.71 (m, 3 H) 6.73 - 6.77 (m, 2 H) 7.21 - 7.24 (m, 1 H) 7.53 - 7.56 (m, 1 H);  $^{13}\text{C NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 15.53, 32.12, 120.27, 120.52, 120.88, 122.31, 125.46, 132.17, 136.67, 144.74; **HPLC-MS (ESI):** [ $R_t$ ]: 7.65 min,  $m/z$  für  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{ClF}_3\text{NO}_3\text{S}$  ( $[\text{M}+\text{H}^+]$ ), 338.69 berechnet, 340.84 gefunden.

### 5.2.5.102. Darstellung von 4-(5-Chloro-3-phenylpyridin-2-yl)benzaldehyd

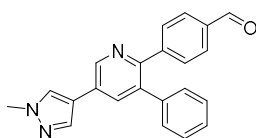


#### Verbindung 44

Das Triflat (**43**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), 4-Formylphenylboronsäure (19.8 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.),  $K_3PO_4$  (75.1 mg, 0.35 mmol, 2.0 Äq.) und [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)dichlorid (6.21 mg, 0.03 mmol, 0.05 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Öl (**44**, 31.3 mg, 0.11 mmol, 72 %)

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $CDCl_3-d$ )  $\delta$  ppm 7.07 - 7.10 (m, 2 H) 7.18 - 7.25 (m, 4 H) 7.41 - 7.45 (m, 2 H) 7.68 - 7.72 (m, 3 H) 8.60 (d,  $J = 2.38$  Hz, 1 H) 9.92 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz,  $CDCl_3-d$ )  $\delta$  ppm 126.46, 128.21, 128.54, 128.77, 129.30, 129.67, 130.51, 131.33, 135.59, 137.60, 138.18, 145.07, 147.29, 153.80, 191.97; **HPLC-MS (ESI)**: [ $R_t$ ]: 10.77 min,  $m/z$  für  $C_{18}H_{13}ClNO$  ( $[M+H]^+$ ), 294.75 berechnet, 294.13 gefunden.

### 5.2.5.103. Darstellung von 4-(5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzaldehyd



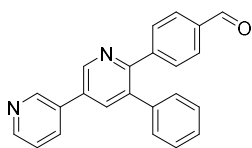
#### Verbindung 45a

Der Aldehyd (**44**, 40.0 mg, 0.14 mmol, 1.0 Äq.), die Boronsäure (16.7 mg, 0.14 mmol, 1.0 Äq.),  $K_2CO_3$  (37.6 mg, 0.27 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (15.7 mg, 0.01 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**45a**, 31.2 mg, 0.11 mmol, 81 %).

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3-d$ )  $\delta$  ppm 4.04 (s, 3 H) 7.16 - 7.21 (m, 2 H) 7.33 - 7.43 (m, 3 H) 7.53 (d,  $J = 8.31$  Hz, 2 H) 7.85 (d,  $J = 8.07$  Hz, 2 H) 7.96 (s, 2 H) 7.99 (s, 1 H) 8.20 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1 H) 9.15 (s, 1 H) 10.04 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (101 MHz,  $CDCl_3-d$ )  $\delta$  ppm 39.38, 116.90, 128.60, 129.01, 129.08, 129.34, 129.67, 130.67, 136.25, 136.70, 136.94, 139.15, 139.39, 140.63, 148.95, 149.55, 170.75, 191.50; **HPLC-MS (ESI)**: [ $R_t$ ]: 8.71 min,  $m/z$  für  $C_{22}H_{17}N_2O$  ( $[M+H]^+$ ), 340.39 berechnet, 340.22 gefunden.



### 5.2.5.104. Darstellung von 4-(5-Phenyl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzaldehyd

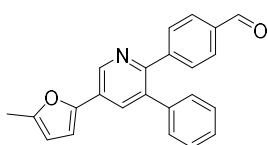


#### Verbindung 45b

Der Aldehyd (**44**, 50.0 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.), die Boronester (35.2 mg, 0.14 mmol, 1.0 Äq.),  $K_2CO_3$  (47.0 mg, 0.34 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (19.6 mg, 0.01 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**45b**, 52.0 mg, 0.15 mmol, 90 %).

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $CDCl_3-d$ )  $\delta$  ppm 7.18 - 7.23 (m, 1 H) 7.26 - 7.33 (m, 2 H) 7.35 (d,  $J = 4.22$  Hz, 1 H) 7.42 (d,  $J = 6.42$  Hz, 0 H) 7.54 (dd,  $J = 7.98, 6.14$  Hz, 1 H) 7.74 (s, 1 H) 7.77 - 7.81 (m, 1 H) 8.06 - 8.11 (m, 1 H) 8.31 - 8.38 (m, 1 H) 8.71 (s, 1 H) 8.89 - 8.94 (m, 1 H) 9.02 (s, 1 H) 9.96 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (151 MHz,  $CDCl_3-d$ )  $\delta$  ppm 126.12, 127.02, 128.54, 128.71, 129.09, 129.26, 129.94, 130.23, 131.08, 131.57, 132.10, 134.89, 136.20, 138.05, 138.61, 145.57, 145.82, 146.68, 146.94, 156.38, 157.23, 193.13; **HPLC-MS (ESI)**: [ $R_t$ ]: 8.15 min,  $m/z$  für  $C_{23}H_{17}N_2O$  ( $[M+H]^+$ ), 337.39 berechnet, 337.21 gefunden.

### 5.2.5.105. Darstellung von 4-(5-Phenyl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzaldehyd



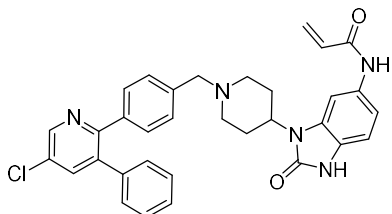
#### Verbindung 45c

Der Aldehyd (**44**, 20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), die Boronester (14.7 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.),  $K_2CO_3$  (18.8 mg, 0.14 mmol, 2.0 Äq.) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (7.8 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift B umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**45c**, 7.4 mg, 0.15 mmol, 32 %).

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3-d$ )  $\delta$  ppm 2.44 (s, 3 H) 7.13 - 7.23 (m, 5 H) 7.30 - 7.41 (m, 2 H) 7.47 - 7.59 (m, 5 H) 7.74 - 7.88 (m, 4 H) 8.29 (d,  $J = 1.96$  Hz, 1 H) 9.13 (d,  $J = 1.96$  Hz, 1 H) 10.01 (s, 1 H);  $^{13}C$ -NMR (101 MHz,  $CDCl_3-d$ )  $\delta$  ppm 13.84 (s, 1 C) 109.08 (s, 1 C) 111.32 (s, 1 C) 128.94 (s, 1 C) 129.02 (s, 2 C) 129.35 (s, 2 C) 129.41 (s, 2 C) 129.62 (s, 2 C) 130.69 (s, 2 C) 136.52 (s, 1 C) 138.64 (s, 1 C)

147.42 (s, 1 C) 149.19 (s, 1 C) 155.63 (s, 1 C) 191.55 (s, 1 C); **TLC-MS (ESI):** [ $R_f$ ]:  $m/z$  für  $C_{23}H_{18}N_1O_2$ ([ $M+H^+$ ]), 340.39 berechnet, 340.12 gefunden.

**5.2.5.106. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-chloro-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzod[*j*]imidazol-5-yl)acrylamid**

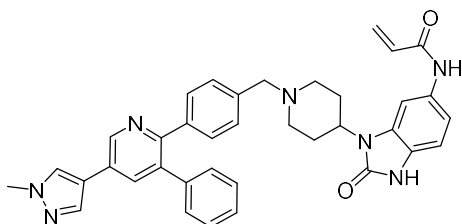


**Verbindung 46a**

Der Aldehyd (**44**, 24.0 mg, 0.08 mmol, 1.2 Äq.) und das Amin **23** (19.4 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.) und  $NaCNBH_3$  (17.1 mg, 0.27 mmol, 4.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**46a**, 26.8 mg, 0.05 mmol, 70 %).

**$^1H$ -NMR** (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 1.64 (d,  $J = 10.27$  Hz, 2 H) 2.07 (t,  $J = 11.28$  Hz, 2 H) 2.23 - 2.34 (m, 2 H) 2.93 (d,  $J = 10.45$  Hz, 2 H) 3.51 (s, 2 H) 4.06 - 4.15 (m, 1 H) 5.71 - 5.75 (m, 1 H) 6.24 (dd,  $J = 16.96, 1.93$  Hz, 1 H) 6.41 (dd,  $J = 16.96, 10.18$  Hz, 1 H) 6.89 - 6.94 (m, 1 H) 7.19 - 7.26 (m, 7 H) 7.27 - 7.35 (m, 4 H) 7.69 (s, 1 H) 7.96 (d,  $J = 2.38$  Hz, 1 H) 8.71 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1 H) 10.07 (s, 1 H) 10.80 (s, 1 H);  **$^{13}C$ -NMR** (151 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 18.55 (s, 1 C) 25.48 (s, 1 C) 28.65 (s, 1 C) 50.11 (s, 1 C) 52.60 (s, 1 C) 56.01 (s, 1 C) 61.46 (s, 1 C) 100.89 (s, 1 C) 108.62 (s, 1 C) 112.10 (s, 1 C) 124.47 (s, 1 C) 126.33 (s, 1 C) 127.80 (s, 1 C) 128.30 (s, 1 C) 128.43 (s, 1 C) 128.96 (s, 1 C) 129.35 (s, 1 C) 129.48 (s, 1 C) 129.56 (s, 1 C) 132.03 (s, 1 C) 132.63 (s, 1 C) 136.74 (s, 1 C) 137.76 (s, 1 C) 138.12 (s, 1 C) 146.58 (s, 1 C) 153.98 (s, 1 C) 154.79 (s, 1 C) 162.75 (s, 1 C); **HRMS (ESI):**  $m/z$  für  $C_{33}H_{31}N_5O_2Cl$  ([ $M+H^+$ ]), 564.2160 berechnet, 564.2157 gefunden.

**5.2.5.107. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzod[*j*]imidazol-5-yl)acrylamid**

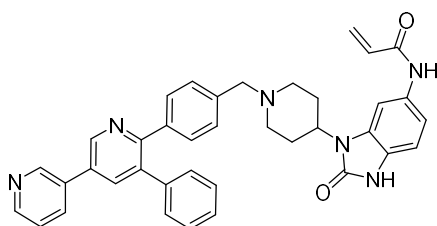


**Verbindung 46b**

Der Aldehyd (**45a**, 25.0 mg, 0.07 mmol, 1.2 Äq.) und das Amin **23** (17.6 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.) und NaCNBH<sub>3</sub> (15.4 mg, 0.25 mmol, 4.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**46b**, 15.3 mg, 0.03 mmol, 41 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.65 (d, *J* = 10.09 Hz, 2 H) 2.08 (t, *J* = 11.10 Hz, 2 H) 2.29 (qd, *J* = 12.29, 3.48 Hz, 2 H) 2.94 (d, *J* = 11.19 Hz, 2 H) 3.51 (s, 2 H) 3.89 (s, 3 H) 4.05 - 4.16 (m, 1 H) 5.70 - 5.76 (m, 1 H) 6.24 (dd, *J* = 17.06, 2.02 Hz, 1 H) 6.41 (dd, *J* = 16.96, 10.18 Hz, 1 H) 6.91 (d, *J* = 8.44 Hz, 1 H) 7.17 - 7.35 (m, 11 H) 7.68 (d, *J* = 1.28 Hz, 1 H) 7.97 (d, *J* = 2.20 Hz, 1 H) 8.07 (d, *J* = 0.73 Hz, 1 H) 8.37 (s, 1 H) 8.91 (d, *J* = 2.20 Hz, 1 H) 10.07 (s, 1 H) 10.80 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 18.55 (s, 1 C) 25.48 (s, 1 C) 28.67 (s, 1 C) 38.77 (s, 1 C) 50.13 (s, 1 C) 52.63 (s, 1 C) 56.01 (s, 1 C) 61.54 (s, 1 C) 62.00 (s, 1 C) 100.89 (s, 1 C) 108.62 (s, 1 C) 112.09 (s, 1 C) 118.05 (s, 1 C) 124.47 (s, 1 C) 126.33 (s, 1 C) 127.16 (s, 1 C) 127.30 (s, 1 C) 128.19 (s, 1 C) 128.32 (s, 1 C) 128.57 (s, 1 C) 128.97 (s, 1 C) 129.41 (s, 1 C) 129.45 (s, 1 C) 132.03 (s, 1 C) 132.63 (s, 1 C) 134.23 (s, 1 C) 135.47 (s, 1 C) 136.56 (s, 1 C) 137.62 (s, 1 C) 138.60 (s, 1 C) 139.62 (s, 1 C) 144.74 (s, 1 C) 153.42 (s, 1 C) 153.98 (s, 1 C) 162.75 (s, 1 C); HRMS (ESI): [R<sub>t</sub>]: 6.14 min, *m/z* für C<sub>37</sub>H<sub>36</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 610.2925 berechnet, 610.2922 gefunden.

**5.2.5.108. Darstellung von *N*-(2-oxo-3-(1-(4-(5-phenyl-[3,3'-bipyridin]-6-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2,3-dihydro-1H-benzof[*d*]imidazol-5-yl)acrylamid**

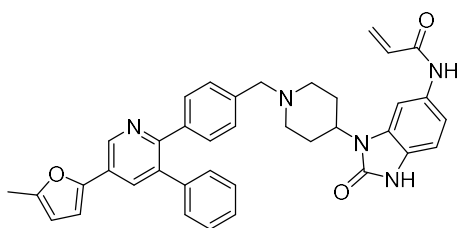
**Verbindung 46c**

Der Aldehyd (**45b**, 30.0 mg, 0.09 mmol, 1.2 Äq.) und das Amin **23** (21.3 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.) und NaCNBH<sub>3</sub> (18.7 mg, 0.30 mmol, 4.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**46c**, 28.8 mg, 0.05 mmol, 64 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1.65 (d, *J* = 10.27 Hz, 2 H) 2.09 (d, *J* = 1.28 Hz, 2 H) 2.30 (qd, *J* = 12.35, 3.67 Hz, 2 H) 2.95 (d, *J* = 11.92 Hz, 2 H) 3.53 (s, 2 H) 4.11 (tt, *J* = 12.36, 4.15 Hz, 1 H) 5.72 - 5.75 (m, 1 H) 6.24 (dd, *J* = 16.87, 2.02 Hz, 1 H) 6.40 (d, *J* = 10.27 Hz, 1 H) 6.91 (d, *J* = 8.44 Hz, 1 H) 7.25 (d, *J* = 8.25 Hz, 2 H) 7.28 - 7.37 (m, 8 H) 7.54 (dd, *J* = 4.77, 0.73 Hz, 1 H) 7.69 (d, *J* = 1.65 Hz, 1 H) 8.16 (d, *J* = 2.20 Hz, 1 H) 8.28 - 8.33 (m, 1 H) 8.65 (dd, *J* = 4.77, 1.65 Hz, 1 H) 9.05 (d, *J* = 2.20 Hz,

1 H) 9.09 (dd,  $J = 2.38, 0.73$  Hz, 1 H) 10.08 (s, 1 H) 10.80 (s, 1 H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 19.04 (s, 1 C) 25.97 (s, 1 C) 29.16 (s, 1 C) 50.61 (s, 1 C) 53.12 (s, 1 C) 56.49 (s, 1 C) 62.01 (s, 1 C) 101.38 (s, 1 C) 109.11 (s, 1 C) 112.58 (s, 1 C) 124.46 (s, 1 C) 124.96 (s, 1 C) 126.82 (s, 1 C) 127.95 (s, 1 C) 128.78 (s, 1 C) 128.86 (s, 1 C) 129.46 (s, 1 C) 130.02 (d,  $J = 2.20$  Hz, 1 C) 131.73 (s, 1 C) 132.52 (s, 1 C) 132.75 (s, 1 C) 133.12 (s, 1 C) 135.05 (s, 1 C) 135.99 (s, 1 C) 137.16 (s, 1 C) 138.54 (s, 1 C) 138.79 (s, 1 C) 139.74 (s, 1 C) 146.77 (s, 1 C) 148.42 (s, 1 C) 149.68 (s, 1 C) 154.47 (s, 1 C) 156.14 (s, 1 C) 163.24 (s, 1 C); **HRMS (ESI):** [ $R_t$ ]: 5.87 min,  $m/z$  für  $\text{C}_{38}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_2$  ( $[\text{M}+\text{H}^+]$ ), 607.2816 berechnet, 607.2814 gefunden.

**5.2.5.109. Darstellung von *N*-(3-(1-(4-(5-(5-methylfuran-2-yl)-3-phenylpyridin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)acrylamid**

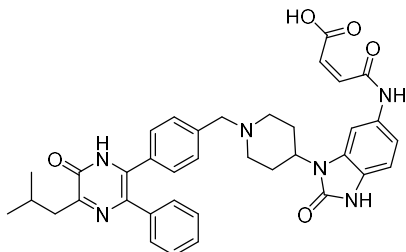


**Verbindung 46d**

Der Aldehyd (**45d**, 25.0 mg, 0.07 mmol, 1.2 Äq.) und das Amin **23** (17.6 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.) und  $\text{NaCNBH}_3$  (15.4 mg, 0.25 mmol, 4.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift F umgesetzt und erzielten das gewünschte Produkt als Feststoff (**46d**, 12.3 mg, 0.02 mmol, 33 %).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, METHANOL- $d_4$ )  $\delta$  ppm 2.12 (d,  $J = 12.97$  Hz, 2 H) 2.39 - 2.46 (m, 3 H) 2.72 - 2.85 (m, 2 H) 3.21 - 3.29 (m, 2 H) 3.60 - 3.68 (m, 2 H) 4.39 (s, 2 H) 4.47 - 4.57 (m, 1 H) 5.76 - 5.82 (m, 1 H) 6.21 - 6.27 (m, 1 H) 6.35 - 6.51 (m, 2 H) 6.94 - 7.07 (m, 3 H) 7.22 - 7.28 (m, 2 H) 7.29 - 7.38 (m, 3 H) 7.45 - 7.56 (m, 4 H) 7.91 - 7.99 (m, 1 H) 8.20 (d,  $J = 2.14$  Hz, 1 H) 8.95 (d,  $J = 2.14$  Hz, 1 H) 10.09 (s, 1 H) 10.80 (s, 1 H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, METHANOL- $d_4$ )  $\delta$  ppm 12.16 (s, 1 C) 25.96 (s, 1 C) 51.80 (s, 1 C) 101.95 (s, 1 C) 108.27 (s, 1 C) 109.30 (s, 1 C) 109.58 (s, 1 C) 114.08 (s, 1 C) 114.84 (s, 1 C) 117.17 (s, 1 C) 125.14 (s, 1 C) 126.37 (s, 1 C) 127.29 (s, 1 C) 127.78 (s, 1 C) 128.30 (s, 1 C) 128.88 (s, 1 C) 129.36 (s, 1 C) 130.53 (s, 1 C) 130.83 (s, 1 C) 130.97 (s, 1 C) 134.06 (s, 1 C) 137.75 (s, 1 C) 138.27 (s, 1 C) 140.88 (s, 1 C) 147.74 (s, 1 C) 152.19 (s, 1 C) 154.31 (s, 1 C) 155.02 (s, 1 C) 159.91 (s, 1 C) 164.60 (s, 1 C); **HRMS (ESI):** [ $R_t$ ]: 7.28 min,  $m/z$  für  $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_3$  ( $[\text{M}+\text{H}^+]$ ), 610.2812 berechnet, 610.2812 gefunden.

**5.2.5.110. Darstellung von (Z)-4-((3-(1-(4-(5-Isobutyl-6-oxo-3-phenyl-1,6-dihydropyrazin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d]imidazol-5-yl)amino)-4-oxobut-2-enonische Säure**

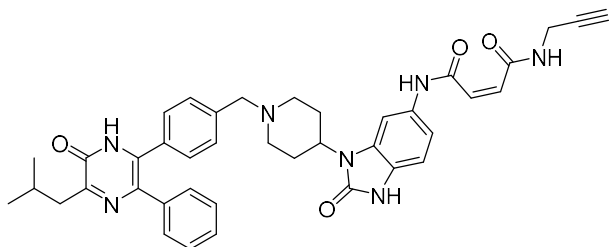


**Verbindung 50**

Das Amin **14b** (50.0 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Gemisch aus trockenem DCM und THF (1:1, 5 mL, 10 mL/mmol) gelöst und mit Maleinsäureanhydrid (10.7 mg, 0.11 mmol, 1.2 Äq.) versehen. Das Reaktionsgemisch rührte für weitere 4 h bei rt. Das Präzipitat wurde abgefiltert, mit wenig Ethylacetat gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Das Produkt konnte ohne weitere Reinigungsschritte als gelber Feststoff erhalten werden (**50**, 52 mg, 0.08 mmol, 89 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 0.97 (d, *J* = 6.60 Hz, 7 H) 1.99 (d, *J* = 12.10 Hz, 2 H) 2.17 - 2.26 (m, 1 H) 2.60 - 2.69 (m, 4 H) 3.17 - 3.28 (m, 2 H) 3.42 (d, *J* = 11.00 Hz, 2 H) 4.34 (s, 3 H) 6.24 (s, 1 H) 6.35 (d, *J* = 12.10 Hz, 1 H) 6.45 (d, *J* = 12.10 Hz, 1 H) 6.90 - 7.00 (m, 2 H) 7.22 (s, 5 H) 7.41 - 7.45 (m, 2 H) 7.46 - 7.50 (m, 2 H) 7.79 (s, 1 H) 9.75 - 9.85 (m, 1 H) 10.44 (s, 1 H) 10.94 (s, 1 H); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 23.06 (s, 1 C) 26.30 (s, 1 C) 26.79 (s, 1 C) 41.37 (s, 1 C) 48.26 (s, 1 C) 51.60 (s, 1 C) 59.33 (s, 1 C) 101.58 (s, 1 C) 109.45 (s, 1 C) 113.97 (s, 1 C) 116.38 (s, 1 C) 118.35 (s, 1 C) 125.48 (s, 1 C) 127.62 (s, 1 C) 128.35 (s, 1 C) 129.66 (s, 1 C) 129.76 (s, 1 C) 130.64 (s, 1 C) 131.28 (s, 1 C) 131.66 (s, 1 C) 131.81 (s, 1 C) 132.34 (s, 1 C) 154.43 (s, 1 C) 163.25 (s, 1 C) 165.50 (s, 1 C) 167.22 (s, 1 C) 167.35 (s, 1 C); **HRMS (ESI)**: [*R*<sub>t</sub>]: 6.67 min, *m/z* für C<sub>37</sub>H<sub>39</sub>C<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 647.2976 berechnet, 647.29755 gefunden.

**5.2.5.111. Darstellung von *N*1-(3-(1-(4-(5-Isobutyl-6-oxo-3-phenyl-1,6-dihydropyrazin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)-*N*4-(prop-2-yn-1-yl)maleamid**

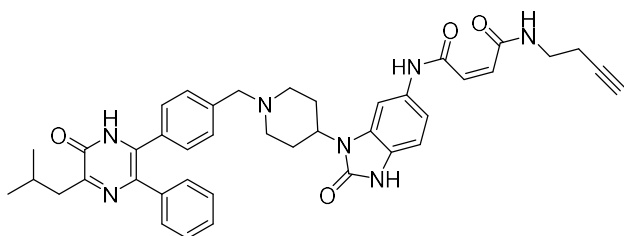


**Verbindung 51a**

Die Carboxylsäure (**50**, 10.0 mg, 0.015 mmol, 1.0 Äq.), Amin (0.85 mg, 0.015 mmol, 1.0 Äq.), HATU (8.8 mg, 0.023 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.017 mL, 0.093 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**51a**, 3.1 mg, 0.005 mmol, 30 %).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 0.98 (m, 6 H) 1.96 (d, *J* = 12.10 Hz, 2 H) 2.42 (s, 2 H) 2.57 - 2.70 (m, 2 H) 3.11 - 3.25 (m, 2 H) 3.44 (d, *J* = 10.64 Hz, 2 H) 3.95 (dd, *J* = 5.32, 2.38 Hz, 1 H) 4.27 - 4.38 (m, 3 H) 6.20 - 6.28 (m, 1 H) 6.31 - 6.38 (m, 1 H) 6.89 - 7.01 (m, 2 H) 7.15 - 7.20 (m, 3 H) 7.26 - 7.33 (m, 3 H) 7.36 - 7.44 (m, 4 H) 7.70 (s, 1 H) 7.75 - 7.82 (m, 2 H) 8.57 (s, 1 H) 9.10 (t, *J* = 5.32 Hz, 1 H) 9.75 (s, 1 H) 10.91 (s, 2 H); **HRMS (ESI):** [*R*<sub>i</sub>]: 6.69 min, *m/z* für C<sub>40</sub>H<sub>42</sub>C<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub> ([*M*+*H*<sup>+</sup>]), 684.3292 berechnet, 684.3288 gefunden.

**5.2.5.112. Darstellung von *N*1-(but-3-yn-1-yl)-*N*4-(3-(1-(4-(5-isobutyl-6-oxo-3-phenyl-1,6-dihydropyrazin-2-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)maleamide**



**Verbindung 51b**

Die Carboxylsäure (**50**, 10.0 mg, 0.015 mmol, 1.0 Äq.), Amin (1.06 mg, 0.015 mmol, 1.0 Äq.), HATU (8.8 mg, 0.023 mmol, 1.5 Äq.) und DIPEA (0.017 mL, 0.093 mmol, 6.0 Äq.) wurden nach der allgemeinen Synthesevorschrift D umgesetzt und lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff (**51b**, 4.4 mg, 0.006 mmol, 41 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 0.97 (d,  $J = 6.60$  Hz, 7 H) 1.99 (d,  $J = 12.10$  Hz, 2 H) 2.17 - 2.26 (m, 3 H) 2.60 - 2.69 (m, 4 H) 3.17 - 3.28 (m, 3 H) 3.42 (m, 2 H) 4.34 (s, 3 H) 6.24 (s, 1 H) 6.21 - 6.29 (m, 1 H) 6.32 - 6.37 (m, 1 H) 6.90 - 7.00 (m, 2 H) 7.22 (s, 5 H) 7.41 - 7.46 (m, 2 H) 7.47 - 7.51 (m, 2 H) 7.79 (s, 1 H) 9.75 - 9.85 (m, 1 H) 10.44 (s, 1 H) 10.91 (s, 1 H) 10.94 (s, 1 H); **HRMS (ESI):** [ $R_t$ ]: 6.71 min,  $m/z$  für C<sub>41</sub>H<sub>44</sub>C<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub> ([M+H<sup>+</sup>]), 698.3449 berechnet, 684.3447 gefunden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Klebe, G. *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, (Springer-Verlag, 2009).
2. Müller-Jahncke, W.-D., Friedrich, C. & Meyer, U. *Arzneimittelgeschichte*, (Wiss. Verlagsgesellschaft, 2005).
3. Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **27**, 2985-2993 (1894).
4. Lichtenthaler, F.W. 100 years "Schlüssel - Schloss - Prinzip": what made Emil Fischer use this analogy? *Angewandte Chemie International Edition in English* **33**, 2364-2374 (1995).
5. Ehrlich, P. Chemotherapeutics: scientific principles, methods, and result. *Lancet* **16**, 445-451 (1913).
6. Strebhardt, K. & Ullrich, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer* **8**, 473-480 (2008).
7. Beddell, C., Goodford, P., Norrington, F., Wilkinson, S. & Wootton, R. Compounds designed to fit a site of known structure in human haemoglobin. *British journal of pharmacology* **57**, 201-209 (1976).
8. Peltonen, L. & McKusick, V.A. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science* **291**, 1224-1229 (2001).
9. Collins, F.S., Morgan, M. & Patrinos, A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* **300**, 286-290 (2003).
10. Sharp, P.A. RNA interference—2001. *Genes & development* **15**, 485-490 (2001).
11. Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S. & Khvorov, A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* **22**, 326-330 (2004).
12. Silva, J.M., Li, M.Z., Chang, K., Ge, W., Golding, M.C., Rickles, R.J., Siolas, D., Hu, G., Paddison, P.J. & Schlabach, M.R. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nature genetics* **37**, 1281-1288 (2005).
13. Bucci, M., Goodman, C. & Sheppard, T.L. A decade of chemical biology. *Nature chemical biology* **6**, 847-854 (2010).
14. Rauh, D. & Rabiller, M. Chemische Biologie. in *Bioanalytik* (eds. Lottspeich, F., Engels, J.W. & Solodkoff, Z.L.) 1121 - 1137 (Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 2012).
15. Front Matter. in *Concepts and Case Studies in Chemical Biology I-XL* (2014).
16. Kolb, H.C., Finn, M.G. & Sharpless, K.B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **40**, 2004-2021 (2001).
17. Thirumurugan, P., Matosiuk, D. & Jozwiak, K. Click chemistry for drug development and diverse chemical–biology applications. *Chemical reviews* **113**, 4905-4979 (2013).
18. Noren, C.J., Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C. & Schultz, P.G. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science* **244**, 182-188 (1989).
19. Wang, L., Brock, A., Herberich, B. & Schultz, P.G. Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science* **292**, 498-500 (2001).
20. Schenone, M., Dančík, V., Wagner, B.K. & Clemons, P.A. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nature Chemical Biology* **9**, 232-240 (2013).
21. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *nature* **411**, 494-498 (2001).
22. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature* **391**, 806-811 (1998).
23. Terstappen, G.C., Schlüpen, C., Raggiaschi, R. & Gaviraghi, G. Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **6**, 891-903 (2007).
24. García-García, M.J., Eggenschwiler, J.T., Caspary, T., Alcorn, H.L., Wyler, M.R., Huangfu, D., Rakeman, A.S., Lee, J.D., Feinberg, E.H. & Timmer, J.R. Analysis of mouse embryonic patterning and morphogenesis by forward genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 5913-5919 (2005).



25. Pickart, M.A., Klee, E.W., Nielsen, A.L., Sivasubbu, S., Mendenhall, E.M., Bill, B.R., Chen, E., Eckfeldt, C.E., Knowlton, M. & Robu, M.E. Genome-wide reverse genetics framework to identify novel functions of the vertebrate secretome. *PLoS one* **1**, e104 (2006).
26. Ecker, A., Bushell, E.S., Tewari, R. & Sinden, R.E. Reverse genetics screen identifies six proteins important for malaria development in the mosquito. *Molecular microbiology* **70**, 209-220 (2008).
27. Tyers, M. & Mann, M. From genomics to proteomics. *Nature* **422**, 193-197 (2003).
28. Mann, M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**, 952-958 (2006).
29. Ong, S.-E. & Mann, M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nature protocols* **1**, 2650 (2006).
30. Sakamoto, K.M., Kim, K.B., Kumagai, A., Mercurio, F., Crews, C.M. & Deshaies, R.J. Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 8554-8559 (2001).
31. Bondeson, D.P., Mares, A., Smith, I.E.D., Ko, E., Campos, S., Miah, A.H., Mulholland, K.E., Routly, N., Buckley, D.L., Gustafson, J.L., Zinn, N., Grandi, P., Shimamura, S., Bergamini, G., Faeltz-Savitski, M., Bantscheff, M., Cox, C., Gordon, D.A., Willard, R.R., Flanagan, J.J., Casillas, L.N., Votta, B.J., den Besten, W., Famm, K., Kruidenier, L., Carter, P.S., Harling, J.D., Churcher, I. & Crews, C.M. Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs. *Nature Chemical Biology* **11**, 611-617 (2015).
32. Mullard, A. A probe for every protein. *Nature Reviews Drug Discovery* **18**, 733-737 (2019).
33. Koutsoukas, A., Simms, B., Kirchmair, J., Bond, P.J., Whitmore, A.V., Zimmer, S., Young, M.P., Jenkins, J.L., Glick, M. & Glen, R.C. From in silico target prediction to multi-target drug design: current databases, methods and applications. *Journal of proteomics* **74**, 2554-2574 (2011).
34. Barrett, T., Troup, D.B., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Rudnev, D., Evangelista, C., Kim, I.F., Soboleva, A., Tomashevsky, M. & Edgar, R. NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles—database and tools update. *Nucleic acids research* **35**, D760-D765 (2007).
35. Seiler, K.P., George, G.A., Happ, M.P., Bodycombe, N.E., Carrinski, H.A., Norton, S., Brudz, S., Sullivan, J.P., Muhlich, J. & Serrano, M. ChemBank: a small-molecule screening and cheminformatics resource database. *Nucleic acids research* **36**, D351-D359 (2007).
36. Zaharevitz, D.W., Gussio, R., Leost, M., Senderowicz, A.M., Lahusen, T., Kunick, C., Meijer, L. & Sausville, E.A. Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer research* **59**, 2566-2569 (1999).
37. Ganter, B., Tugendreich, S., Pearson, C.I., Ayanoglu, E., Baumhueter, S., Bostian, K.A., Brady, L., Browne, L.J., Calvin, J.T. & Day, G.-J. Development of a large-scale chemogenomics database to improve drug candidate selection and to understand mechanisms of chemical toxicity and action. *Journal of biotechnology* **119**, 219-244 (2005).
38. Ferreira, L.G., Dos Santos, R.N., Oliva, G. & Andricopulo, A.D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* **20**, 13384-13421 (2015).
39. Vamathevan, J., Clark, D., Czodrowski, P., Dunham, I., Ferran, E., Lee, G., Li, B., Madabhushi, A., Shah, P., Spitzer, M. & Zhao, S. Applications of machine learning in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery* **18**, 463-477 (2019).
40. Schreiber, S.L. Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorganic & medicinal chemistry* **6**, 1127-1152 (1998).
41. Stockwell, B.R. Chemical genetics: ligand-based discovery of gene function. *Nature Reviews Genetics* **1**, 116-125 (2000).
42. Bunnage, M.E., Chekler, E.L.P. & Jones, L.H. Target validation using chemical probes. *Nature Chemical Biology* **9**, 195-199 (2013).
43. Stockwell, B.R. Exploring biology with small organic molecules. *Nature* **432**, 846-854 (2004).
44. Müller, S., Ackloo, S., Arrowsmith, C.H., Bauser, M., Baryza, J.L., Blagg, J., Böttcher, J., Bountra, C., Brown, P.J., Bunnage, M.E., Carter, A.J., Damerell, D., Dötsch, V., Drewry, D.H., Edwards, A.M., Edwards, J., Elkins, J.M., Fischer, C., Frye, S.V., Gollner, A., Grimshaw, C.E., Ijzerman, A., Hanke, T., Hartung, I.V., Hitchcock, S., Howe, T., Hughes, T.V., Laufer, S., Li, V.M.J., Liras, S., Marsden, B.D., Matsui, H., Mathias, J., O'Hagan, R.C., Owen, D.R., Pande, V., Rauh, D., Rosenberg, S.H., Roth, B.L., Schneider, N.S., Scholten, C., Singh Saikatendu, K.,

- Simeonov, A., Takizawa, M., Tse, C., Thompson, P.R., Treiber, D.K., Viana, A.Y.I., Wells, C.I., Willson, T.M., Zuercher, W.J., Knapp, S. & Mueller-Fahrnow, A. Donated chemical probes for open science. *eLife* **7**, e34311 (2018).
45. Arrowsmith, C.H., Audia, J.E., Austin, C., Baell, J., Bennett, J., Blagg, J., Bountra, C., Brennan, P.E., Brown, P.J., Bunnage, M.E., Buser-Doepner, C., Campbell, R.M., Carter, A.J., Cohen, P., Copeland, R.A., Cravatt, B., Dahlin, J.L., Dhanak, D., Edwards, A.M., Frederiksen, M., Frye, S.V., Gray, N., Grimshaw, C.E., Hepworth, D., Howe, T., Huber, K.V., Jin, J., Knapp, S., Kotz, J.D., Kruger, R.G., Lowe, D., Mader, M.M., Marsden, B., Mueller-Fahrnow, A., Müller, S., O'Hagan, R.C., Overington, J.P., Owen, D.R., Rosenberg, S.H., Roth, B., Ross, R., Schapira, M., Schreiber, S.L., Shoichet, B., Sundström, M., Superti-Furga, G., Taunton, J., Toledo-Sherman, L., Walpole, C., Walters, M.A., Willson, T.M., Workman, P., Young, R.N. & Zuercher, W.J. The promise and peril of chemical probes. *Nat Chem Biol* **11**, 536-41 (2015).
46. Blagg, J. & Workman, P. Choose and Use Your Chemical Probe Wisely to Explore Cancer Biology. *Cancer Cell* **32**, 9-25 (2017).
47. Carter, A.J., Kraemer, O., Zwick, M., Mueller-Fahrnow, A., Arrowsmith, C.H. & Edwards, A.M. Target 2035: probing the human proteome. *Drug Discovery Today* **24**, 2111-2115 (2019).
48. Evans, M.J. & Cravatt, B.F. Mechanism-based profiling of enzyme families. *Chemical reviews* **106**, 3279-3301 (2006).
49. Speers, A.E., Adam, G.C. & Cravatt, B.F. Activity-based protein profiling in vivo using a copper(i)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *J Am Chem Soc* **125**, 4686-7 (2003).
50. Adam, G.C., Sorensen, E.J. & Cravatt, B.F. Chemical strategies for functional proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **1**, 781-790 (2002).
51. Cohen, M.S., Hadjivassiliou, H. & Taunton, J. A clickable inhibitor reveals context-dependent autoactivation of p90 RSK. *Nature chemical biology* **3**, 156-160 (2007).
52. Honigberg, L.A., Smith, A.M., Sirisawad, M., Verner, E., Loury, D., Chang, B., Li, S., Pan, Z., Thamm, D.H., Miller, R.A. & Buggy, J.J. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13075-80 (2010).
53. Huggins, D.J., Sherman, W. & Tidor, B. Rational approaches to improving selectivity in drug design. *Journal of medicinal chemistry* **55**, 1424-1444 (2012).
54. Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Penning, T.D., Seibert, K. & Isakson, P.C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**, 644-648 (1996).
55. Janes, M.R., Zhang, J., Li, L.S., Hansen, R., Peters, U., Guo, X., Chen, Y., Babbar, A., Firdaus, S.J., Darjania, L., Feng, J., Chen, J.H., Li, S., Li, S., Long, Y.O., Thach, C., Liu, Y., Zariwala, A., Ely, T., Kucharski, J.M., Kessler, L.V., Wu, T., Yu, K., Wang, Y., Yao, Y., Deng, X., Zarrinkar, P.P., Brehmer, D., Dhanak, D., Lorenzi, M.V., Hu-Lowe, D., Patricelli, M.P., Ren, P. & Liu, Y. Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell* **172**, 578-589.e17 (2018).
56. Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., Wood, J.L., Morgan, D.O. & Shokat, K.M. A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**, 395-401 (2000).
57. Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W.T., Clarkson, B. & Kuriyan, J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**, 1938-1942 (2000).
58. Brandstetter, H., Kühne, A., Bode, W., Huber, R., von der Saal, W., Wirthensohn, K. & Engh, R.A. X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa: implications for drug design and substrate recognition. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 29988-29992 (1996).
59. Stubbs, M.T., Huber, R. & Bode, W. Crystal structures of factor Xa specific inhibitors in complex with trypsin: structural grounds for inhibition of factor Xa and selectivity against thrombin. *FEBS letters* **375**, 103-107 (1995).
60. Robinson, D.D., Sherman, W. & Farid, R. Understanding kinase selectivity through energetic analysis of binding site waters. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery* **5**, 618-627 (2010).
61. Fang, Z., Grutter, C. & Rauh, D. Strategies for the selective regulation of kinases with allosteric modulators: exploiting exclusive structural features. *ACS Chem Biol* **8**, 58-70 (2013).

62. Adrián, F.J., Ding, Q., Sim, T., Velentza, A., Sloan, C., Liu, Y., Zhang, G., Hur, W., Ding, S. & Manley, P. Allosteric inhibitors of Bcr-abl–dependent cell proliferation. *Nature chemical biology* **2**, 95-102 (2006).
63. Mizuno, N., Niwa, T., Yotsumoto, Y. & Sugiyama, Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacological reviews* **55**, 425-461 (2003).
64. Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T. & Savolainen, J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nature reviews Drug discovery* **7**, 255-270 (2008).
65. Patterson, L. & McKeown, S. AQ4N: a new approach to hypoxia-activated cancer chemotherapy. *British journal of cancer* **83**, 1589-1593 (2000).
66. Rabiller, M., Getlik, M., Kluter, S., Richters, A., Tuckmantel, S., Simard, J.R. & Rauh, D. Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases. *Arch Pharm (Weinheim)* **343**, 193-206 (2010).
67. Staal, S.P., Hartley, J.W. & Rowe, W.P. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 3065-3067 (1977).
68. Staal, S.P. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 5034-5037 (1987).
69. Bellacosa, A., Staal, S. & Tsichlis, P. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* **254**, 274-277 (1991).
70. Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F. & Hemmings, B.A. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 4171-4175 (1991).
71. Konishi, H., Kuroda, S.i., Tanaka, M., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kameyama, K., Haga, T. & Kikkawa, U. Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of 3 types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and  $\beta\gamma$  subunits of G proteins. *Biochemical and biophysical research communications* **216**, 526-534 (1995).
72. Staal, S.P., Huebner, K., Croce, C.M., Parsa, N.Z. & Testa, J.R. The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics* **2**, 96-98 (1988).
73. Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T.F., Hamilton, T.C., Tsichlis, P.N. & Testa, J.R. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 9267-9271 (1992).
74. Nakatani, K., Thompson, D.A., Barthel, A., Sakae, H., Liu, W., Weigel, R.J. & Roth, R.A. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 21528-21532 (1999).
75. Kumar, C.C. & Madison, V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* **24**, 7493-7501 (2005).
76. Hanada, M., Feng, J. & Hemmings, B.A. Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **1697**, 3-16 (2004).
77. Milburn, C.C., Deak, M., Kelly, S.M., Price, N.C., Alessi, D.R. & Van Aalten, D.M. Binding of phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochemical Journal* **375**, 531-538 (2003).
78. Hyvönen, M., Macias, M.J., Nilges, M., Oschkinat, H., Saraste, M. & Wilmanns, M. Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *The EMBO Journal* **14**, 4676-4685 (1995).
79. Hanks, S.K. & Hunter, T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification1. *The FASEB Journal* **9**, 576-596 (1995).
80. Wani, R., Qian, J., Yin, L., Bechtold, E., King, S.B., Poole, L.B., Paek, E., Tsang, A.W. & Furdui, C.M. Isoform-specific regulation of Akt by PDGF-induced reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10550-5 (2011).
81. Long, M.J.C., Parvez, S., Zhao, Y., Surya, S.L., Wang, Y., Zhang, S. & Aye, Y. Akt3 is a privileged first responder in isozyme-specific electrophile response. *Nature Chemical Biology* **13**, 333-338 (2017).

82. Manning, B.D. & Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **169**, 381-405 (2017).
83. Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V.M., Hess, D., Hemmings, B.A. & Barford, D. Molecular Mechanism for the Regulation of Protein Kinase B/Akt by Hydrophobic Motif Phosphorylation. *Molecular Cell* **9**, 1227-1240 (2002).
84. Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B. & Cohen, P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Ba. *Current biology* **7**, 261-269 (1997).
85. Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. & Hemmings, B.A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF - 1. *The EMBO journal* **15**, 6541-6551 (1996).
86. Franke, T.F. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* **27**, 6473-88 (2008).
87. Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. & Bilanges, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 329-41 (2010).
88. Stambolic, V., Suzuki, A., De La Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P. & Mak, T.W. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**, 29-39 (1998).
89. Calleja, V., Alcor, D., Laguerre, M., Park, J., Vojnovic, B., Hemmings, B.A., Downward, J., Parker, P.J. & Larijani, B. Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol* **5**, e95 (2007).
90. Calleja, V., Laguerre, M., Parker, P.J. & Larijani, B. Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS Biol* **7**, e1000017 (2009).
91. Ugi, S., Imamura, T., Maegawa, H., Egawa, K., Yoshizaki, T., Shi, K., Obata, T., Ebina, Y., Kashiwagi, A. & Olefsky, J.M. Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and cellular biology* **24**, 8778-8789 (2004).
92. Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. & Sabatini, D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101 (2005).
93. Brognard, J., Sierceki, E., Gao, T. & Newton, A.C. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell* **25**, 917-31 (2007).
94. Obata, T., Yaffe, M.B., Leparo, G.G., Piro, E.T., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Kikkawa, R. & Cantley, L.C. Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 36108-36115 (2000).
95. Manning, B.D. & Cantley, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274 (2007).
96. Santi, S.A. & Lee, H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C580-91 (2010).
97. Dummer, B. & Hemmings, B.A. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochemical Society Transactions* **35**, 231-235 (2007).
98. Kupriyanova, T.A. & Kandror, K.V. Akt-2 binds to Glut4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. *J Biol Chem* **274**, 1458-64 (1999).
99. Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbavar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y. & Slamon, D.J. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* **63**, 196-206 (2003).
100. Bozulic, L., Surucu, B., Hynx, D. & Hemmings, B.A. PKBa/Akt1 Acts Downstream of DNA-PK in the DNA Double-Strand Break Response and Promotes Survival. *Molecular Cell* **30**, 203-213 (2008).
101. Toulany, M., Maier, J., Iida, M., Rebholz, S., Holler, M., Grottke, A., Jüker, M., Wheeler, D.L., Rothbauer, U. & Rodemann, H.P. Akt1 and Akt3 but not Akt2 through interaction with DNA-PKcs stimulate proliferation and post-irradiation cell survival of K-RAS-mutated cancer cells. *Cell Death Discovery* **3**, 17072 (2017).

102. Tschopp, O., Yang, Z.Z., Brodbeck, D., Dummler, B.A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J. & Hemmings, B.A. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132**, 2943-54 (2005).
103. Gonzalez, E. & McGraw, T.E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **8**, 2502-8 (2009).
104. Dummler, B., Tschopp, O., Hynx, D., Yang, Z.Z., Dirnhofer, S. & Hemmings, B.A. Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol Cell Biol* **26**, 8042-51 (2006).
105. Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Di-Poi, N., Bruder, E., Baudry, A., Dümmler, B., Wahli, W. & Hemmings, B.A. Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase B $\alpha$  (PKB $\alpha$ ) and Akt3/PKB $\gamma$  on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Molecular and cellular biology* **25**, 10407-10418 (2005).
106. Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J. & Wicks, J.R. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB $\beta$ . *The Journal of clinical investigation* **112**, 197-208 (2003).
107. Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I. & Birnbaum, M.J. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* **292**, 1728-31 (2001).
108. Yamada, E., Okada, S., Saito, T., Ohshima, K., Sato, M., Tsuchiya, T., Uehara, Y., Shimizu, H. & Mori, M. Akt2 phosphorylates Synip to regulate docking and fusion of GLUT4-containing vesicles. *Journal of Cell Biology* **168**, 921-928 (2005).
109. Calera, M.R., Martinez, C., Liu, H., El Jack, A.K., Birnbaum, M.J. & Pilch, P.F. Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 7201-7204 (1998).
110. Liu, S.-L., Wang, Z.-G., Hu, Y., Xin, Y., Singaram, I., Gorai, S., Zhou, X., Shim, Y., Min, J.-H., Gong, L.-W., Hay, N., Zhang, J. & Cho, W. Quantitative Lipid Imaging Reveals a New Signaling Function of Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphate: Isoform- and Site-Specific Activation of Akt. *Molecular Cell* **71**, 1092-1104.e5 (2018).
111. Toker, A. Achieving specificity in Akt signaling in cancer. *Adv Biol Regul* **52**, 78-87 (2012).
112. Huber, M., Helgason, C.D., Damen, J.E., Scheid, M., Duronio, V., Liu, L., Ware, M.D., Humphries, R.K. & Krystal, G. The role of SHIP in growth factor induced signalling. *Progress in biophysics and molecular biology* **71**, 423-434 (1999).
113. Braccini, L., Ciraolo, E., Campa, C.C., Perino, A., Longo, D.L., Tibolla, G., Pregnotato, M., Cao, Y., Tassone, B. & Damilano, F. PI3K-C2 $\gamma$  is a Rab5 effector selectively controlling endosomal Akt2 activation downstream of insulin signalling. *Nature communications* **6**, 1-15 (2015).
114. Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y. & Savage, S. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448**, 439-444 (2007).
115. Chin, Y.R. & Toker, A. The actin-bundling protein palladin is an Akt1-specific substrate that regulates breast cancer cell migration. *Molecular cell* **38**, 333-344 (2010).
116. Girardi, C., James, P., Zanin, S., Pinna, L.A. & Ruzzene, M. Differential phosphorylation of Akt1 and Akt2 by protein kinase CK2 may account for isoform specific functions. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 1865-74 (2014).
117. Liu, X., Long, M.J.C., Hopkins, B.D., Luo, C., Wang, L. & Aye, Y. Precision Targeting of pten-Null Triple-Negative Breast Tumors Guided by Electrophilic Metabolite Sensing. *ACS Cent Sci* **6**, 892-902 (2020).
118. Chu, N., Salguero, A.L., Liu, A.Z., Chen, Z., Dempsey, D.R., Ficarro, S.B., Alexander, W.M., Marto, J.A., Li, Y., Amzel, L.M., Gabelli, S.B. & Cole, P.A. Akt Kinase Activation Mechanisms Revealed Using Protein Semisynthesis. *Cell* **174**, 897-907.e14 (2018).
119. Chu, N., Viennet, T., Bae, H., Salguero, A., Boeszoermyenyi, A., Arthanari, H. & Cole, P.A. The structural determinants of PH domain-mediated regulation of Akt revealed by segmental labeling. *eLife* **9**, e59151 (2020).
120. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *cell* **100**, 57-70 (2000).

121. Hers, I., Vincent, E.E. & Tavaré, J.M. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* **23**, 1515-27 (2011).
122. Linnerth-Petrik, N.M., Santry, L.A., Petrik, J.J. & Wootton, S.K. Opposing functions of Akt isoforms in lung tumor initiation and progression. *PLoS One* **9**, e94595 (2014).
123. Hinz, N. & Jücker, M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Communication and Signaling* **17**, 154 (2019).
124. Riggio, M., Perrone, M.C., Polo, M.L., Rodriguez, M.J., May, M., Abba, M., Lanari, C. & Novaro, V. AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. *Sci Rep* **7**, 44244 (2017).
125. Landel, I., Quambusch, L., Depta, L. & Rauh, D. Spotlight on AKT: Current Therapeutic Challenges. *ACS Med Chem Lett* **11**, 225-227 (2020).
126. Haas-Kogan, D., Shalev, N., Wong, M., Mills, G., Yount, G. & Stokoe, D. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Current Biology* **8**, 1195-S1 (1998).
127. Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareisis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H. & Parsons, R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-7 (1997).
128. Altomare, D.A. & Testa, J.R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* **24**, 7455-64 (2005).
129. Hyman, D.M., Smyth, L.M., Donoghue, M.T.A., Westin, S.N., Bedard, P.L., Dean, E.J., Bando, H., El-Khoueiry, A.B., Perez-Fidalgo, J.A., Mita, A., Schellens, J.H.M., Chang, M.T., Reichel, J.B., Bouvier, N., Selcuklu, S.D., Soumerai, T.E., Torrisi, J., Erinjeri, J.P., Ambrose, H., Barrett, J.C., Dougherty, B., Foxley, A., Lindemann, J.P.O., McEwen, R., Pass, M., Schiavon, G., Berger, M.F., Chandarlapaty, S., Solit, D.B., Banerji, U., Baselga, J. & Taylor, B.S. AKT Inhibition in Solid Tumors With AKT1 Mutations. *J Clin Oncol* **35**, 2251-2259 (2017).
130. Lindhurst, M.J., Sapp, J.C., Teer, J.K., Johnston, J.J., Finn, E.M., Peters, K., Turner, J., Cannons, J.L., Bick, D. & Blakemore, L. A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome. *New England Journal of Medicine* **365**, 611-619 (2011).
131. Cheng, J.Q., Lindsley, C.W., Cheng, G.Z., Yang, H. & Nicosia, S.V. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* **24**, 7482-7492 (2005).
132. Blake, J.F., Xu, R., Bencsik, J.R., Xiao, D., Kallan, N.C., Schlachter, S., Mitchell, I.S., Spencer, K.L., Banka, A.L. & Wallace, E.M. Discovery and preclinical pharmacology of a selective ATP-competitive Akt inhibitor (GDC-0068) for the treatment of human tumors. *Journal of medicinal chemistry* **55**, 8110-8127 (2012).
133. Addie, M., Ballard, P., Buttar, D., Crafter, C., Currie, G., Davies, B.R., Debreczeni, J., Dry, H., Dudley, P. & Greenwood, R. Discovery of 4-Amino-N-[(1S)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl]-1-(7H-pyrrolo [2,3-d] pyrimidin-4-yl) piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an Orally Bioavailable, Potent Inhibitor of Akt Kinases. *Journal of medicinal chemistry* **56**, 2059-2073 (2013).
134. McHardy, T., Caldwell, J.J., Cheung, K.-M., Hunter, L.J., Taylor, K., Rowlands, M., Ruddle, R., Henley, A., de Haven Brandon, A. & Valenti, M. Discovery of 4-amino-1-(7H-pyrrolo [2,3-d] pyrimidin-4-yl) piperidine-4-carboxamides as selective, orally active inhibitors of protein kinase B (Akt). *Journal of medicinal chemistry* **53**, 2239-2249 (2010).
135. Heerding, D.A., Rhodes, N., Leber, J.D., Clark, T.J., Keenan, R.M., Lafrance, L.V., Li, M., Safonov, I.G., Takata, D.T. & Venslavsky, J.W. Identification of 4-(2-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethyl-7-[[[3S]-3-piperidinylmethyl]oxy]-1H-imidazo [4,5-c] pyridin-4-yl)-2-methyl-3-butyn-2-ol (GSK690693), a novel inhibitor of AKT kinase. *Journal of medicinal chemistry* **51**, 5663-5679 (2008).
136. Nitulescu, G.M., Margina, D., Juzenas, P., Peng, Q., Olaru, O.T., Saloustros, E., Fenga, C., Spandidos, D., Libra, M. & Tsatsakis, A.M. Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int J Oncol* **48**, 869-85 (2016).
137. Jiang, N., Dai, Q., Su, X., Fu, J., Feng, X. & Peng, J. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Molecular Biology Reports* **47**, 4587-4629 (2020).
138. Song, M., Bode, A.M., Dong, Z. & Lee, M.-H. AKT as a therapeutic target for cancer. *Cancer research* **79**, 1019-1031 (2019).

139. Smyth, L.M., Tamura, K., Oliveira, M., Ciruelos, E.M., Mayer, I.A., Sablin, M.-P., Biganzoli, L., Ambrose, H.J., Ashton, J., Barnicle, A., Cashell, D.D., Corcoran, C., de Bruin, E.C., Foxley, A., Hauser, J., Lindemann, J.P.O., Maudsley, R., McEwen, R., Moschetta, M., Pass, M., Rowlands, V., Schiavon, G., Banerji, U., Scaltriti, M., Taylor, B.S., Chandarlapaty, S., Baselga, J. & Hyman, D.M. Capivasertib, an AKT Kinase Inhibitor, as Monotherapy or in Combination with Fulvestrant in Patients with *AKT1*<sup>E17K</sup>-Mutant, ER-Positive Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* **26**, 3947-3957 (2020).
140. AZD5363 Has Clinical Activity in Patients with *AKT1*-Mutant Solid Tumors. *Cancer Discovery* **7**, 662-662 (2017).
141. Martorana, F., Motta, G., Pavone, G., Motta, L., Stella, S., Vitale, S.R., Manzella, L. & Vigneri, P. AKT Inhibitors: New Weapons in the Fight Against Breast Cancer? *Frontiers in Pharmacology* **12**(2021).
142. Reis-Sobreiro, M., Roué, G., Moros, A., Gajate, C., De La Iglesia-Vicente, J., Colomer, D. & Mollinedo, F. Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood cancer journal* **3**, e118-e118 (2013).
143. de Almeida Pachioni, J., Magalhães, J.G., Lima, E.J.C., de Moura Bueno, L., Barbosa, J.F., de Sá, M.M. & Rangel-Yagui, C.O. Alkylphospholipids—a promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **16**, 742-759 (2013).
144. Becher, R., Kloke, K., Füger, A., Bremer, K., Drozd, A., Kleeberg, U., Fritze, D., Rieche, K. & Sindermann, H. Phase II trial of orally administered miltefosine in advanced colorectal cancer. *Oncology Research and Treatment* **16**, 11-15 (1993).
145. Barnett, S.F., Defeo-Jones, D., Fu, S., Hancock, P.J., Haskell, K.M., Jones, R.E., Kahana, J.A., Kral, A.M., Leander, K. & Lee, L.L. Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. *Biochemical Journal* **385**, 399-408 (2005).
146. Lindsley, C.W., Zhao, Z., Leister, W.H., Robinson, R.G., Barnett, S.F., Defeo-Jones, D., Jones, R.E., Hartman, G.D., Huff, J.R., Huber, H.E. & Duggan, M.E. Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 761-4 (2005).
147. Lapierre, J.-M., Eathiraj, S., Vensel, D., Liu, Y., Bull, C.O., Cornell-Kennon, S., Iimura, S., Kelleher, E.W., Kizer, D.E., Koerner, S., Makhija, S., Matsuda, A., Moussa, M., Namdev, N., Savage, R.E., Szwaya, J., Volckova, E., Westlund, N., Wu, H. & Schwartz, B. Discovery of 3-(3-(4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl)-5-phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amine (ARQ 092): An Orally Bioavailable, Selective, and Potent Allosteric AKT Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* **59**, 6455-6469 (2016).
148. Yu, Y., Savage, R.E., Eathiraj, S., Meade, J., Wick, M.J., Hall, T., Abbadessa, G. & Schwartz, B. Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT Pathway with an Allosteric AKT Inhibitor, ARQ 092. *PLOS ONE* **10**, e0140479 (2015).
149. Hirai, H., Sootome, H., Nakatsuru, Y., Miyama, K., Taguchi, S., Tsujioka, K., Ueno, Y., Hatch, H., Majumder, P.K. & Pan, B.-S. MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* **9**, 1956-1967 (2010).
150. Nitulescu, G.M., Van De Venter, M., Nitulescu, G., Ungurianu, A., Juzenas, P., Peng, Q., Oлару, O.T., Gradinaru, D., Tsatsakis, A., Tsoukalas, D., Spandidos, D.A. & Margina, D. The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review). *Int J Oncol* **53**, 2319-2331 (2018).
151. Singh, J., Petter, R.C., Baillie, T.A. & Whitty, A. The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 307-17 (2011).
152. Weisner, J., Gontla, R., van der Westhuizen, L., Oeck, S., Ketzer, J., Janning, P., Richters, A., Muhlenberg, T., Fang, Z., Taher, A., Jendrosseck, V., Pelly, S.C., Bauer, S., van Otterlo, W.A. & Rauh, D. Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**, 10313-6 (2015).
153. Wu, W.-I., Voegtli, W.C., Sturgis, H.L., Dizon, F.P., Vigers, G.P. & Brandhuber, B.J. Crystal structure of human AKT1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition. *PLoS one* **5**, e12913 (2010).
154. 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. *Chemical Science* **10**, 3573-3585 (2019).
155. 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., Muller, H., Baumann, M., Schultz-Fademrecht, C., Gunther, G., Maghnoij, A., Muller, 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* **79**, 2367-2378 (2019).
  156. Rauch, J., Volinsky, N., Romano, D. & Kolch, W. The secret life of kinases: functions beyond catalysis. *Cell Commun Signal* **9**, 23 (2011).
  157. Vivanco, I., Chen, Z.C., Tanos, B., Oldrini, B., Hsieh, W.Y., Yannuzzi, N., Campos, C. & Mellingerhoff, I.K. A kinase-independent function of AKT promotes cancer cell survival. *Elife* **3**(2014).
  158. Lazaro, G., Kostaras, E. & Vivanco, I. Inhibitors in AKTion: ATP-competitive vs allosteric. *Biochemical Society Transactions* **48**, 933-943 (2020).
  159. Quambusch, L., Landel, I., Depta, L., Weisner, J., Uhlenbrock, N., Muller, M.P., Glanemann, F., Althoff, K., Siveke, J.T. & Rauh, D. Covalent-Allosteric Inhibitors to Achieve Akt Isoform-Selectivity. *Angew Chem Int Ed Engl* **58**, 18823-18829 (2019).
  160. Kuntz, I.D. Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery. *Science* **257**, 1078-1082 (1992).
  161. Zhang, J., Yang, P.L. & Gray, N.S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature reviews cancer* **9**, 28-39 (2009).
  162. Ferguson, F.M. & Gray, N.S. Kinase inhibitors: the road ahead. *Nature reviews Drug discovery* **17**, 353 (2018).
  163. Cohen, P., Cross, D. & Jänne, P.A. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery* (2021).
  164. Bohacek, R.S., McMartin, C. & Guida, W.C. The art and practice of structure - based drug design: a molecular modeling perspective. *Medicinal research reviews* **16**, 3-50 (1996).
  165. Cavasotto, C.N. & Phatak, S.S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug discovery today* **14**, 676-683 (2009).
  166. Muhammed, M.T. & Aki - Yalcin, E. Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chemical biology & drug design* **93**, 12-20 (2019).
  167. Waterhouse, A., Rempfer, C., Heer, F.T., Studer, G., Tauriello, G., Bordoli, L., Bertoni, M., Gumieny, R., Lepore, R., Bienert, S., de Beer, T.A.P. & Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* **46**, W296-W303 (2018).
  168. Huang, X., Begley, M., Morgenstern, K.A., Gu, Y., Rose, P., Zhao, H. & Zhu, X. Crystal Structure of an Inactive Akt2 Kinase Domain. *Structure* **11**, 21-30 (2003).
  169. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 10037-10041 (2001).
  170. Zhao, Z., Leister, W.H., Robinson, R.G., Barnett, S.F., Defeo-Jones, D., Jones, R.E., Hartman, G.D., Huff, J.R., Huber, H.E. & Duggan, M.E. Discovery of 2, 3, 5-trisubstituted pyridine derivatives as potent Akt1 and Akt2 dual inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **15**, 905-909 (2005).
  171. Seeliger, D. & de Groot, B.L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **24**, 417-422 (2010).
  172. Trott, O. & Olson, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry* **31**, 455-461 (2010).
  173. Uhlenbrock, N. Struktur-basiertes Design, Synthese und Evaluation von Sondenmolekülen und Wirkstoffkandidaten zur Adressierung der Proteinkinase Akt, *Dissertation*, TU Dortmund (2019).



174. Blakemore, D.C., Castro, L., Churcher, I., Rees, D.C., Thomas, A.W., Wilson, D.M. & Wood, A. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. *Nature chemistry* **10**, 383-394 (2018).
175. Burke, M.D. & Schreiber, S.L. A planning strategy for diversity - oriented synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **43**, 46-58 (2004).
176. Corey, E.J. The logic of chemical synthesis: multistep synthesis of complex carbogenic molecules (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English* **30**, 455-465 (1991).
177. Olah, G.A., Kuhn, S.J., Flood, S.H. & Evans, J.C. Aromatic Substitution. XIII. 1a Comparison of Nitric Acid and Mixed Acid Nitration of Alkylbenzenes and Benzene with Nitronium Salt Nitrations. *Journal of the American Chemical Society* **84**, 3687-3693 (1962).
178. Caplow, M. Kinetics of carbamate formation and breakdown. *Journal of the American Chemical Society* **90**, 6795-6803 (1968).
179. Ram, S. & Ehrenkauf, R.E. Ammonium formate in organic synthesis: a versatile agent in catalytic hydrogen transfer reductions. *Synthesis* **1988**, 91-95 (1988).
180. Grushin, V.V. & Alper, H. Activation of otherwise unreactive C-Cl bonds. in *Activation of unreactive bonds and organic synthesis* 193-226 (Springer, 1999).
181. Clinton, F. Sodium cyanoborohydride—a highly selective reducing agent for organic functional groups. *Synthesis* **3**, 135-146 (1975).
182. Abdel-Magid, A.F., Carson, K.G., Harris, B.D., Maryanoff, C.A. & Shah, R.D. Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. studies on direct and indirect reductive amination procedures. *The Journal of organic chemistry* **61**, 3849-3862 (1996).
183. Grenga, P.N., Sumbler, B.L., Beland, F. & Priefer, R. Reductive amination agents: comparison of Na (CN) BH<sub>3</sub> and Si-CBH. *Tetrahedron Letters* **50**, 6658-6660 (2009).
184. Miyaura, N., Yano, T. & Suzuki, A. The palladium-catalyzed cross-coupling reaction of 1-alkenylboranes with allylic or benzylic bromides. Convenient syntheses of 1, 4-alkadienes and allylbenzenes from alkynes via hydroboration. *Tetrahedron Letters* **21**, 2865-2868 (1980).
185. Pérez-Lorenzo, M.s. Palladium nanoparticles as efficient catalysts for Suzuki cross-coupling reactions. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **3**, 167-174 (2012).
186. Braga, A.A., Ujaque, G. & Maseras, F. A DFT study of the full catalytic cycle of the Suzuki–Miyaura cross-coupling on a model system. *Organometallics* **25**, 3647-3658 (2006).
187. Amatore, C. & Jutand, A. Anionic Pd (0) and Pd (II) intermediates in palladium-catalyzed Heck and cross-coupling reactions. *Accounts of Chemical Research* **33**, 314-321 (2000).
188. Aliprantis, A.O. & Canary, J.W. Observation of catalytic intermediates in the Suzuki reaction by electrospray mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **116**, 6985-6986 (1994).
189. Miyaura, N. Cross-coupling reaction of organoboron compounds via base-assisted transmetalation to palladium(II) complexes. *Journal of Organometallic Chemistry* **653**, 54-57 (2002).
190. Miyaura, N., Yamada, K., Suginome, H. & Suzuki, A. Novel and convenient method for the stereo- and regiospecific synthesis of conjugated alkadienes and alkenynes via the palladium-catalyzed cross-coupling reaction of 1-alkenylboranes with bromoalkenes and bromoalkynes. *Journal of the American Chemical Society* **107**, 972-980 (1985).
191. Ridgway, B.H. & Woerpel, K. Transmetalation of alkylboranes to palladium in the Suzuki coupling reaction proceeds with retention of stereochemistry. *The Journal of organic chemistry* **63**, 458-460 (1998).
192. Stille, J.K. & Lau, K.S. Mechanisms of oxidative addition of organic halides to Group 8 transition-metal complexes. *Accounts of Chemical Research* **10**, 434-442 (1977).
193. Ishiyama, T., Kizaki, H., Hayashi, T., Suzuki, A. & Miyaura, N. Palladium-catalyzed carbonylative cross-coupling reaction of arylboronic acids with aryl electrophiles: Synthesis of biaryl ketones. *The Journal of Organic Chemistry* **63**, 4726-4731 (1998).
194. Barder, T.E., Walker, S.D., Martinelli, J.R. & Buchwald, S.L. Catalysts for Suzuki–Miyaura coupling processes: scope and studies of the effect of ligand structure. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 4685-4696 (2005).

195. Thomas, A.A. & Denmark, S.E. Pre-transmetalation intermediates in the Suzuki-Miyaura reaction revealed: The missing link. *Science* **352**, 329-332 (2016).
196. Zysman-Colman, E., Arias, K. & Siegel, J.S. Synthesis of arylbromides from arenes and N-bromosuccinimide (NBS) in acetonitrile—A convenient method for aromatic bromination. *Canadian Journal of Chemistry* **87**(2009).
197. Podgoršek, A., Stavber, S., Zupan, M. & Iskra, J. Visible light induced ‘on water’benzylic bromination with N-bromosuccinimide. *Tetrahedron letters* **47**, 1097-1099 (2006).
198. Molander, G.A. & Ellis, N. Organotrifluoroborates: Protected Boronic Acids That Expand the Versatility of the Suzuki Coupling Reaction. *Accounts of Chemical Research* **40**, 275-286 (2007).
199. Carpino, L.A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 4397-4398 (1993).
200. Carpino, L.A., Imazumi, H., El - Faham, A., Ferrer, F.J., Zhang, C., Lee, Y., Foxman, B.M., Henklein, P., Hanay, C. & Mügge, C. The uronium/guanidinium peptide coupling reagents: Finally the true uronium salts. *Angewandte Chemie International Edition* **41**, 441-445 (2002).
201. Jameson, D.M. & Ross, J.A. Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging. *Chemical reviews* **110**, 2685-2708 (2010).
202. Homola, J. & Piliarik, M. Surface plasmon resonance (SPR) sensors. in *Surface plasmon resonance based sensors* 45-67 (Springer, 2006).
203. Pierce, M.M., Raman, C. & Nall, B.T. Isothermal titration calorimetry of protein–protein interactions. *Methods* **19**, 213-221 (1999).
204. Rossi, A.M. & Taylor, C.W. Analysis of protein-ligand interactions by fluorescence polarization. *Nature protocols* **6**, 365-387 (2011).
205. Mathis, G. HTRF® technology. *Journal of biomolecular screening* **4**, 309-313 (1999).
206. Degorce, F., Card, A., Soh, S., Trinquet, E., Knapik, G.P. & Xie, B. HTRF: a technology tailored for drug discovery—a review of theoretical aspects and recent applications. *Current chemical genomics* **3**, 22 (2009).
207. Knight, Z.A. & Shokat, K.M. Features of Selective Kinase Inhibitors. *Chemistry & Biology* **12**, 621-637 (2005).
208. Yan, L. Abstract #DDT01-1: MK-2206: A potent oral allosteric AKT inhibitor. *Cancer Research* **69**, DDT01-1 (2009).
209. Schwartz, P.A., Kuzmic, P., Solowiej, J., Bergqvist, S., Bolanos, B., Almaden, C., Nagata, A., Ryan, K., Feng, J., Dalvie, D., Kath, J.C., Xu, M., Wani, R. & Murray, B.W. Covalent EGFR inhibitor analysis reveals importance of reversible interactions to potency and mechanisms of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 173-8 (2014).
210. Zhai, X., Ward, R.A., Doig, P. & Argyrou, A. Insight into the Therapeutic Selectivity of the Irreversible EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Osimertinib through Enzyme Kinetic Studies. *Biochemistry* **59**, 1428-1441 (2020).
211. Achmatowicz Jr, O., Chmielewski, M., Jurczak, J., Kozerski, L. & Zamojski, A. The NMR spectra and conformations of dihydropyran derivatives—II: The conformational energies of carbomethoxy, hydroxymethyl and acetoxymethyl groups at c-6 of the 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyran ring. *Organic Magnetic Resonance* **4**, 537-545 (1972).
212. Strelow, J.M. A Perspective on the Kinetics of Covalent and Irreversible Inhibition. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery* **22**, 3-20 (2016).
213. Böhm, H.J. & Klebe, G. Was läßt sich aus der molekularen Erkennung in Protein - Ligand - Komplexen für das Design neuer Wirkstoffe lernen? *Angewandte Chemie* **108**, 2750-2778 (1996).
214. Tian, W.X. & Tsou, C.L. Determination of the rate constant of enzyme modification by measuring the substrate reaction in the presence of the modifier. *Biochemistry* **21**, 1028-1032 (1982).
215. Kitz, R. & Wilson, I.B. Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry* **237**, 3245-3249 (1962).
216. Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of enzyme kinetics*, (John Wiley & Sons, 2013).

217. Copeland, R.A., Lombardo, D., Giannaras, J. & Decicco, C.P. Estimating KI values for tight binding inhibitors from dose-response plots. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **5**, 1947-1952 (1995).
218. Copeland, R.A., Pompliano, D.L. & Meek, T.D. Drug–target residence time and its implications for lead optimization. *Nature reviews Drug discovery* **5**, 730-739 (2006).
219. Tight Binding Inhibition. in *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery* 245-285 (2013).
220. Kuzmič, P., Solowiej, J. & Murray, B.W. An algebraic model for the kinetics of covalent enzyme inhibition at low substrate concentrations. *Analytical Biochemistry* **484**, 82-90 (2015).
221. Kuzmič, P. Chapter 10 - DynaFit—A Software Package for Enzymology. in *Methods in Enzymology*, Vol. 467 (eds. Johnson, M.L. & Brand, L.) 247-280 (Academic Press, 2009).
222. Kuzmič, P. A steady-state algebraic model for the time course of covalent enzyme inhibition. *bioRxiv*, 2020.06.10.144220 (2020).
223. Shults, M.D., Carrico-Moniz, D. & Imperiali, B. Optimal Sox-based fluorescent chemosensor design for serine/threonine protein kinases. *Analytical Biochemistry* **352**, 198-207 (2006).
224. Akkaya, E.U., Huston, M.E. & Czarnik, A.W. Chelation-enhanced fluorescence of anthrylazamacrocyclic conjugate probes in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* **112**, 3590-3593 (1990).
225. Huang, H., Howard, C.A., Zari, S., Cho, H.J., Shukla, S., Li, H., Ndoj, J., González-Alonso, P., Nikolaidis, C., Abbott, J., Rogawski, D.S., Potopnyk, M.A., Kempinska, K., Miao, H., Purohit, T., Henderson, A., Mapp, A., Sulis, M.L., Ferrando, A., Grembecka, J. & Cierpicki, T. Covalent inhibition of NSD1 histone methyltransferase. *Nature Chemical Biology* **16**, 1403-1410 (2020).
226. Hopper, M., Gururaja, T., Kinoshita, T., Dean, J.P., Hill, R.J. & Mongan, A. Relative Selectivity of Covalent Inhibitors Requires Assessment of Inactivation Kinetics and Cellular Occupancy: A Case Study of Ibrutinib and Acalabrutinib. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **372**, 331-338 (2020).
227. Bulaj, G., Kortemme, T. & Goldenberg, D.P. Ionization– reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* **37**, 8965-8972 (1998).
228. Kortemme, T. & Creighton, T.E. Ionisation of Cysteine Residues at the Termini of Model  $\alpha$ -Helical Peptides. Relevance to Unusual Thiol pKa Values in Proteins of the Thioredoxin Family. *Journal of molecular biology* **253**, 799-812 (1995).
229. Zhang, Z.Y. & Dixon, J.E. Active site labeling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: the determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402. *Biochemistry* **32**, 9340-9345 (1993).
230. Li, H., Robertson, A.D. & Jensen, J.H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **61**, 704-721 (2005).
231. Rossmann, M.G. The molecular replacement method. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography* **46**, 73-82 (1990).
232. Landel, I. Strukturbiologische Untersuchung und Zelluläre Charakterisierung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren, *Dissertation*, TU Dortmund (2021).
233. Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry* **389**, 1017-1031 (2007).
234. Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W. & Gygi, S.P. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 6940-6945 (2003).
235. Ishima, R. & Torchia, D.A. Protein dynamics from NMR. *Nature structural biology* **7**, 740-743 (2000).
236. Kempf, J.G. & Loria, J.P. Protein dynamics from solution NMR. *Cell biochemistry and biophysics* **37**, 187-211 (2002).
237. Mittermaier, A. & Kay, L.E. New tools provide new insights in NMR studies of protein dynamics. *science* **312**, 224-228 (2006).
238. Neshmelov, Y.E. & Thomas, D.D. Protein structural dynamics revealed by site-directed spin labeling and multifrequency EPR. *Biophysical reviews* **2**, 91-99 (2010).

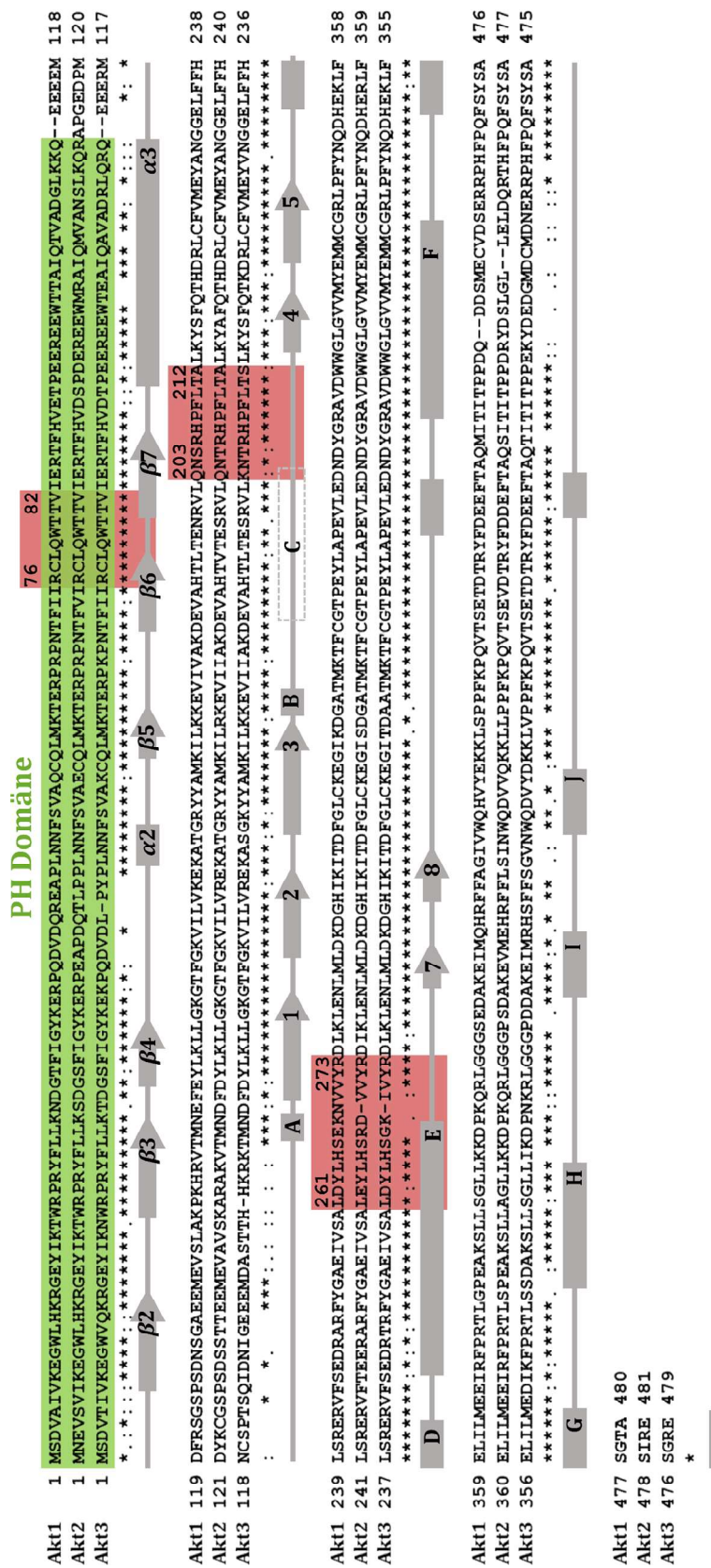
239. Michel, M.C. & Seifert, R. Selectivity of pharmacological tools: implications for use in cell physiology. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **308**, C505-C520 (2015).
240. Jorda, R., Hendrychová, D., Voller, J., Řezníčková, E., Gucký, T. & Kryštof, V. How Selective Are Pharmacological Inhibitors of Cell-Cycle-Regulating Cyclin-Dependent Kinases? *Journal of Medicinal Chemistry* **61**, 9105-9120 (2018).
241. Telliez, J.-B., Dowty, M.E., Wang, L., Jussif, J., Lin, T., Li, L., Moy, E., Balbo, P., Li, W., Zhao, Y., Crouse, K., Dickinson, C., Symanowicz, P., Hegen, M., Banker, M.E., Vincent, F., Unwalla, R., Liang, S., Gilbert, A.M., Brown, M.F., Hayward, M., Montgomery, J., Yang, X., Bauman, J., Trujillo, J.I., Casimiro-Garcia, A., Vajdos, F.F., Leung, L., Geoghegan, K.F., Quazi, A., Xuan, D., Jones, L., Hett, E., Wright, K., Clark, J.D. & Thorarensen, A. Discovery of a JAK3-Selective Inhibitor: Functional Differentiation of JAK3-Selective Inhibition over pan-JAK or JAK1-Selective Inhibition. *ACS Chemical Biology* **11**, 3442-3451 (2016).
242. Warmuth, M., Kim, S., Gu, X.J., Xia, G. & Adrian, F. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Curr Opin Oncol* **19**, 55-60 (2007).
243. Socolovsky, M., Fallon, A.E., Wang, S., Brugnara, C. & Lodish, H.F. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a<sup>-/-</sup>5b<sup>-/-</sup> mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* **98**, 181-91 (1999).
244. Songyang, Z., Baltimore, D., Cantley, L.C., Kaplan, D.R. & Franke, T.F. Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11345-50 (1997).
245. Leverrier, Y., Thomas, J., Mathieu, A.L., Low, W., Blanquier, B. & Marvel, J. Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells. *Cell Death Differ* **6**, 290-6 (1999).
246. Plotz, G., Lopez-Garcia, L.A., Brieger, A., Zeuzem, S. & Biondi, R.M. Alternative AKT2 splicing produces protein lacking the hydrophobic motif regulatory region. *PLOS ONE* **15**, e0242819 (2020).
247. Suyama, K., Yao, J., Liang, H., Benard, O., Loudig, O.D., Amgalan, D., McKimpton, W.M., Phillips, G.R., Segall, J., Wang, Y., Fineberg, S., Norton, L., Kitsis, R.N. & Hazan, R.B. An Akt3 Splice Variant Lacking the Serine 472 Phosphorylation Site Promotes Apoptosis and Suppresses Mammary Tumorigenesis. *Cancer Research* **78**, 103-114 (2018).
248. Molina, D.M., Jafari, R., Ignatushchenko, M., Seki, T., Larsson, E.A., Dan, C., Sreekumar, L., Cao, Y. & Nordlund, P. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science* **341**, 84-87 (2013).
249. Lindemann, M. Synthese von kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren als molekulare Sonden zur Untersuchung der Proteinkinase Akt, *Masterarbeit*, TU Dortmund (2017).
250. Venci, J.V. & Gandhi, M.A. Dimethyl Fumarate (Tecfidera) A New Oral Agent for Multiple Sclerosis. *Annals of Pharmacotherapy* **47**, 1697-1702 (2013).
251. Naismith, R.T., Wundes, A., Ziemssen, T., Jasinska, E., Freedman, M.S., Lembo, A.J., Selmaj, K., Bidollari, I., Chen, H. & Hanna, J. Diroximel fumarate demonstrates an improved gastrointestinal tolerability profile compared with dimethyl fumarate in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis: results from the randomized, double-blind, phase III EVOLVE-MS-2 study. *CNS drugs* **34**, 185-196 (2020).
252. Agard, N.J., Prescher, J.A. & Bertozzi, C.R. A strain-promoted [3+ 2] azide–alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 15046-15047 (2004).
253. Evans, D.A., Chapman, K. & Bisaha, J. Asymmetric Diels-Alder cycloaddition reactions with chiral. alpha.,. beta.-unsaturated N-acyloxazolidinones. *Journal of the American Chemical Society* **110**, 1238-1256 (1988).
254. 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. *Angewandte Chemie International Edition* **41**, 2596-2599 (2002).
255. Liang, L. & Astruc, D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. *Coordination Chemistry Reviews* **255**, 2933-2945 (2011).

256. Albuszis, M., Roth, P.J., Pauer, W. & Moritz, H.-U. Two in one: use of azide functionality for controlled photo-crosslinking and click-modification of polymer microspheres. *Polymer Chemistry* **7**, 5414-5425 (2016).
257. He, L., Hou, X., Kanel, G., Zeng, N., Galicia, V., Wang, Y., Yang, J., Wu, H., Birnbaum, M.J. & Stiles, B.L. The critical role of AKT2 in hepatic steatosis induced by PTEN loss. *The American journal of pathology* **176**, 2302-2308 (2010).
258. Huang, X., Liu, G., Guo, J. & Su, Z. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International journal of biological sciences* **14**, 1483 (2018).
259. Saini, V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World journal of diabetes* **1**, 68 (2010).
260. Tan, K., Kimber, W.A., Luan, J.a., Soos, M.A., Semple, R.K., Wareham, N.J., O’Rahilly, S. & Barroso, I. Analysis of genetic variation in Akt2/PKB- $\beta$  in severe insulin resistance, lipodystrophy, type 2 diabetes, and related metabolic phenotypes. *Diabetes* **56**, 714-719 (2007).
261. Nakanishi, K., Sakamoto, M., Yamasaki, S., Todo, S. & Hirohashi, S. Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **103**, 307-312 (2005).
262. Xu, X., Sakon, M., Nagano, H., Hiraoka, N., Yamamoto, H., Hayashi, N., Dono, K., Nakamori, S., Umeshita, K. & Ito, Y. Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncology reports* **11**, 25-32 (2004).
263. Sievers, F. & Higgins, D.G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science* **27**, 135-145 (2018).
264. Kabsch, W. Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 795-800 (1993).
265. Kabsch, W. XDS. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 125-132 (2010).
266. Gildea, R.J., Waterman, D.G., Parkhurst, J.M., Axford, D., Sutton, G., Stuart, D.I., Sauter, N.K., Evans, G. & Winter, G. New methods for indexing multi-lattice diffraction data. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **70**, 2652-2666 (2014).
267. Read, R.J. Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **57**, 1373-1382 (2001).
268. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **60**, 2126-2132 (2004).
269. Schuttelkopf, A.W. & van Aalten, D.M.F. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology* **60**, 1355-1363 (2004).
270. Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C. & Zwart, P.H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **66**, 213-221 (2010).
271. Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Echols, N., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H. & Adams, P.D. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **68**, 352-367 (2012).
272. Chen, V.B., Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S. & Richardson, D.C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology* **66**, 12-21 (2010).
273. Joosten, R.P., Long, F., Murshudov, G.N. & Perrakis, A. The PDB\_REDO server for macromolecular structure model optimization. *Iucrj* **1**, 213-220 (2014).
274. Rappsilber, J., Mann, M. & Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* **2**, 1896-906 (2007).

275. Michalski, A., Cox, J. & Mann, M. More than 100,000 detectable peptide species elute in single shotgun proteomics runs but the majority is inaccessible to data-dependent LC– MS/MS. *Journal of proteome research* **10**, 1785-1793 (2011).
276. Presolski, S.I., Hong, V.P. & Finn, M. Copper - catalyzed azide–alkyne click chemistry for bioconjugation. *Current protocols in chemical biology* **3**, 153-162 (2011).
277. Speers, A.E. & Cravatt, B.F. Activity - based protein profiling (ABPP) and click chemistry (CC)–ABPP by MudPIT mass spectrometry. *Current protocols in chemical biology* **1**, 29-41 (2009).
278. Quambusch, L. Design und Synthese kovalent-allosterischer Liganden zur isoform-selektiven Adressierung der Proteinkinase Akt, *Masterarbeit*, TU Dortmund (2017).
279. Dinos, G.P. & Coutsogeorgopoulos, C. Kinetic study of irreversible inhibition of an enzyme consumed in the reaction it catalyses. Application to the inhibition of the puromycin reaction by spiramycin and hydroxylamine. *Journal of enzyme inhibition* **12**, 79-99 (1997).
280. Palacios, R. & Steinmetz, M. Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* **41**, 727-34 (1985).

## 7. Anhang

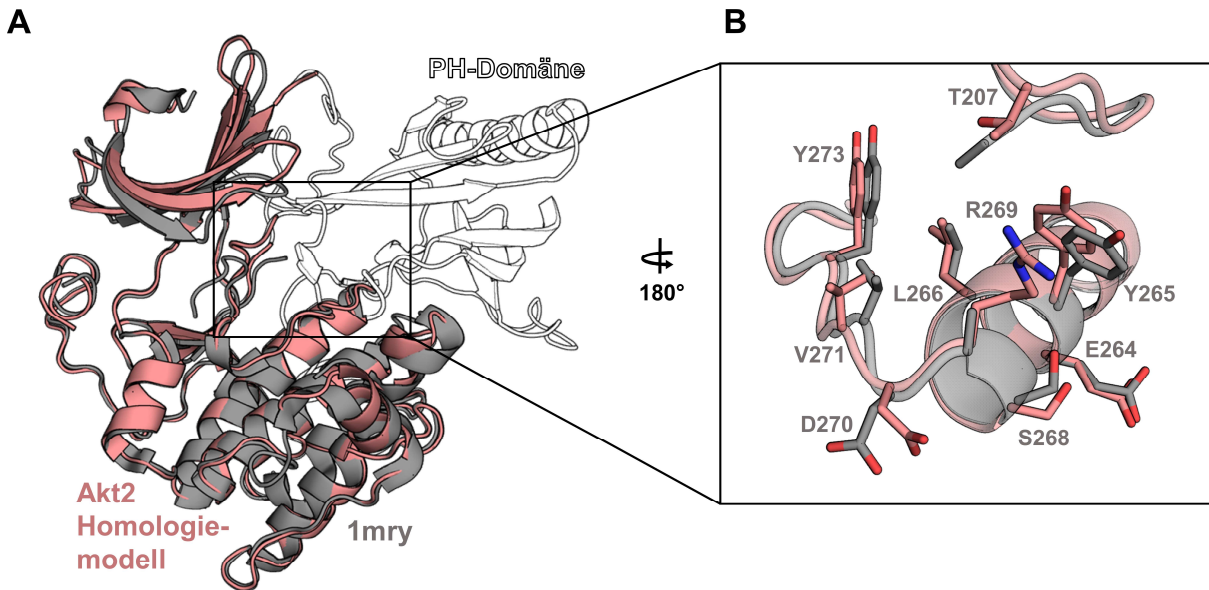
### 7.1. Sequenzvergleich



**Abb. 7.1-1. Sequenzvergleich der Proteinkinase Akt Isoformen.** Alignment wurde erstellt mit Clustal Omega und folgenden UniProtKB-Sequenzen: Akt1\_HUMAN P31749, Akt2\_HUMAN P31751, Akt3\_HUMAN Q9Y243. Sekundärelemente sind abgeleitet von der Kristallstruktur 6hhf (pdb) eingezeichnet und nach HANKS und HYVÖNEN definiert. Einige Elemente sind farblich hinterlegt, darunter die PH-Domäne (grün) sowie die in der allosterischen Bindeta-sche identifizierten Aminosäuren, welche am am direkten Bindeprozess der CAAs beteiligt sind (rot).



## 7.2. Homologiemodell



**Abb. 7.2-1. Übersicht des Homologiemodell-Vergleichs von Akt2 mit bekannter Kristallstruktur.** (A) Überlagerung der Kinase-Domäne von dem erstellten Akt2 Homologiemodell (rosa) und einer literatur-bekanntem Kristallstruktur (grau, pdb: 1mry).<sup>168</sup> Es wurden nur die vorhandenen Strukturelemente überlagert, daher ist die PH-Domäne aus dem Akt2 Homologiemodell nur angedeutet (weiß). (B) Ausschnitt aus der Allosterische Interdomänen Bindetasche von Akt2 im Bereich des c-terminalen Endes der  $\alpha$ E-Helix (grau: Akt2 KD, pdb: 1mry; rosa, Akt2 Homologiemodell). Die Aminosäure-Seitenkette und Sekundärstrukturelemente zeigen eine gute Übereinstimmung in den beiden Modellen. Einige flexible Seitenketten wie Arg269 konnten in der pdb-Struktur *1mry* nicht vollständig aufgelöst werden.



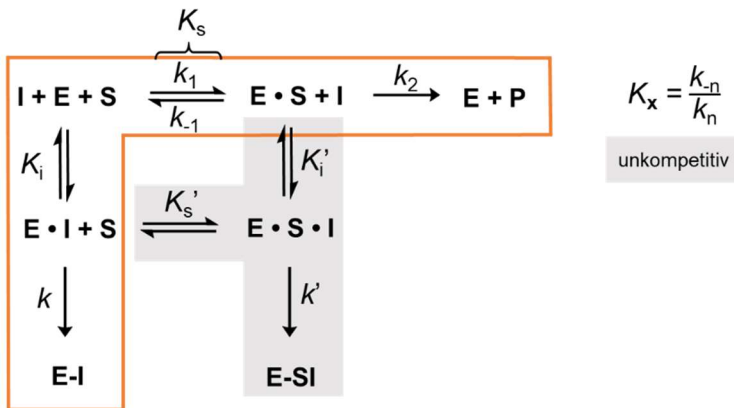
### 7.3. Selektivitätsquotienten

Tab.7.3. Übersicht der Selektivitätsquotienten aus dem Verhältnis der IC<sub>50</sub>-Werte. (vgl. Kapitel 3.2.1)

#	Name	Verhältnis IC <sub>50</sub> [Akt]/ IC <sub>50</sub> [Akt]				
		Akt1/Akt2	Akt2/Akt3	Akt1/Akt3	Akt3/Akt2	Akt2/Akt1
<b>13</b>	Borussertib	0,068	0,032	0,002	31,320	14,748
<b>15a</b>		0,028	0,057	0,002	17,492	36,148
<b>15c</b>		0,879	2,615	2,298	0,382	1,138
<b>16b</b>		17,225	0,003	0,053	323,430	0,058
<b>28a</b>	RL2661	0,110	0,090	0,010	11,067	9,057
<b>38a</b>	RL2933	0,042	0,032	0,001	31,650	23,731
<b>38b</b>	RL3000	0,061	0,044	0,003	22,518	16,435
<b>38c</b>	RL3112	0,287	0,278	0,080	3,596	3,479
<b>38d</b>	RL3149	0,727	0,121	0,088	8,232	1,376
<b>39a</b>	RL3047	0,146	0,021	0,003	46,754	6,867
<b>39b</b>	RL2884	0,279	0,048	0,013	20,818	3,587
<b>39c</b>	RL2905	29,210	0,024	0,700	41,735	0,034
<b>39d</b>	RL2926	24,284	0,073	1,780	13,646	0,041
<b>39e</b>	RL2928	8,445	0,049	0,413	20,439	0,118
<b>39f</b>	RL2930	1,407	0,546	0,768	1,832	0,711
<b>39g</b>	RL3241	0,647	0,392	0,254	2,553	1,545
<b>39h</b>	RL3068	5,233	1,047	5,479	0,955	0,191
<b>39i</b>	RL3081	3,472	0,710	2,465	1,409	0,288
<b>39j</b>	RL3094	7,333	1,311	9,610	0,763	0,136
<b>39k</b>	RL3225	4,221	0,312	1,315	3,210	0,237
<b>39l</b>	RL3200	0,432	0,321	0,139	3,112	2,317
<b>39m</b>	RL3082	9,711	0,241	2,338	4,154	0,103
<b>39n</b>	RL3271	23,260	0,070	1,618	14,373	0,043
<b>39o</b>	RL3272	16,820	0,393	6,609	2,545	0,059
<b>39p</b>	RL3341	23,179	0,064	1,482	15,637	0,043
<b>42a</b>	RL3274	0,229	0,043	0,010	23,199	4,373
<b>42b</b>	RL3067	0,306	0,034	0,010	29,189	3,269
<b>42c</b>	RL3084	1,039	0,022	0,023	45,532	0,962
<b>42d</b>	RL3085	18,309	0,060	1,097	16,694	0,055
<b>42e</b>	RL3086	5,696	0,017	0,094	60,556	0,176
<b>42f</b>	RL3095	9,174	0,022	0,201	45,562	0,109
<b>42g</b>	RL3096	1,826	0,017	0,031	59,798	0,548
<b>42h</b>	RL3169	13,505	0,057	0,769	17,561	0,074
<b>42i</b>	RL3170	1,143	0,206	0,235	4,865	0,875
<b>42j</b>	RL3171	1,240	0,140	0,174	7,120	0,807
<b>42k</b>	RL3201	2,960	0,069	0,203	14,598	0,338
<b>42l</b>	RL3202	1,342	0,187	0,251	5,336	0,745
<b>42m</b>	RL3279	4,052	0,016	0,064	63,719	0,247
<b>42n</b>	RL3310	0,860	0,024	0,021	41,609	1,163
<b>42o</b>	RL3312	2,133	0,008	0,017	126,796	0,469
<b>46a</b>	RL3375	0,100	0,018	0,002	56,154	9,979
<b>46b</b>	RL3365	0,801	0,050	0,040	19,968	1,249
<b>46c</b>	RL3400	2,338	0,023	0,055	42,845	0,428
<b>46d</b>	RL3465	0,806	0,040	0,033	24,707	1,241

## 7.4. PhosphoSens Etablierung

### 7.4.1. Herleitung der exponentiellen Gleichung (1)



**Abb. 7.4.-1: Mechanismus der Enzym-Substrat Reaktion bei Anwesenheit eines kovalenten Inhibitors.** Die Enzym-Substrat Reaktion in Anwesenheit eines kovalenten Inhibitors ist als nicht-kompetitiver (orange) und unkompetitiver Mechanismus dargestellt. Die Definition der Geschwindigkeitskonstanten  $K_x$  und im Falle des unkompetitiven (grau) Reaktionsmechanismus  $K_x'$  ist rechts abgebildet. E: Enzym, S: Substrat, I: Inhibitor, P: Produkt, E·I: reversibler Enzym-Inhibitor-Komplex, E·S: reversibler Enzym-Substrat-Komplex; E·I: kovalent gebundener Enzym-Inhibitor-Komplex. Adaptiert von DINOS & COUTSOGEOPOULOS.<sup>279</sup>

Im Folgenden wird ein zwei-schrittiger nicht-kompetitiver Mechanismus der kovalenten Modifikation eines Enzyms durch einen Inhibitor betrachtet. Dafür sind zunächst einige Annahmen als gegeben zu setzen:

1. Die Substrat Konzentration ist deutlich kleiner als die Enzymkonzentration:  $S_0 \ll E_0$ ;
2. Der Inhibitor liegt in nicht-limitierenden Mengen vor und die tatsächliche Konzentration entspricht stetig der Anfangskonzentration:  $I \gg E_0$ ;
3. Der Gleichgewichtszustand zwischen den binären Komplexen ist schnell erreicht: *rapid equilibrium approximation*.

Aus dem abgebildeten Mechanismus können die Gleichgewichtskonstanten  $K_s$  und  $K_i$  anhand des Massenwirkungsgesetzes wie folgt beschrieben werden:

$$K_s = \frac{(E)(S)}{(ES)} \quad (4)$$

$$K_i = \frac{(E)(I)}{(EI)} \quad (5)$$

Weiterhin definiert sich die nicht-inaktivierte ( $E_T$ ) sowie die totale Enzym Konzentration ( $E_0$ ) aus der Massenbilanz mit:

$$(E_T) = (E) + (E \cdot S) + (E \cdot I) \quad (6)$$

$$(E_0) = (E_T) + (EI) \quad (7)$$

Für die Bildung des binären Komplexes ergibt sich dementsprechend durch Einsetzen und Umformen folgender Term:

$$(\text{ES}) = \frac{((\text{E}_0) - (\text{ES}))(\text{S})}{K_s} \iff (\text{ES}) = \frac{(\text{S})(\text{E}_0)}{K_s + (\text{S})} \quad (8)$$

Unter Anbetracht der Definition von  $(\text{E}_0)$  und  $(\text{E}_T)$  können nun die binären Komplexe neu definiert werden:

$$(\text{ES}) = \frac{(\text{S})(\text{E}_T)}{K_s + (\text{S})} \quad (9)$$

$$(\text{EI}) = \frac{(\text{I})(\text{E}_T)}{K_i + (\text{I})} \quad (10)$$

Die Änderung der nicht-inaktivierten Fraktion des Enzyms über die Zeit ist abhängig von  $(\text{ES})$  und der Umsetzung von  $(\text{EI})$  und kann als die nachstehende Differentialgleichung definiert werden:

$$-\frac{d(\text{E}_T)}{dt} = k_2(\text{ES}) + k(\text{EI}) = A [\text{E}_T] \quad (11)$$

Durch Einsetzen der zuvor definierten Terme für  $(\text{ES})$  und  $(\text{EI})$  können wir eine apparente Geschwindigkeitskonstante  $A$  beschreiben:

$$A = \frac{k_2(\text{S})}{K_s \left(1 + \frac{(\text{I})}{K_i}\right) + (\text{S})} + \frac{k(\text{I})}{K_i \left(1 + \frac{(\text{S})}{K_s}\right) + (\text{I})} \quad (12)$$

Integration der Differentialgleichung liefert folgende Gleichung für die nicht-inaktivierte Fraktion  $(\text{E}_T)$  zu jedem Zeitpunkt  $t$ :

$$(\text{E}_T) = (\text{E}_0)e^{-At} \quad (13)$$

Die Produktbildung über die Zeit hängt von der Umsetzung des  $(\text{ES})$  Komplexes ab und kann mit der nachstehenden Differentialgleichung definiert werden:

$$\frac{d(\text{P})}{dt} = k_2(\text{ES}) = B e^{-At} \quad (14)$$

Durch Einsetzen der zuvor definierten Terme für  $(\text{ES})$  und Änderung von  $(\text{E}_T)$  können wir eine apparente Geschwindigkeitsrate  $B$  beschreiben:

$$B = \frac{k_2(\text{S})(\text{E}_0)}{K_s \left(1 + \frac{(\text{I})}{K_i}\right) + (\text{S})} \quad (15)$$

Integration der Differentialgleichung liefert folgenden exponentiellen Term für die Konzentration des Produktes zu jedem Zeitpunkt  $t$ :

$$(P) = \frac{B}{A} (1 - e^{-At}) \quad (16)$$

Daraus kann eine experimentell gültige Gleichung, beispielsweise für einen fluoreszentes Signal definiert werden, welche eine basale Fluoreszenz  $F_0$  und einen molaren und proportional konstanten Geräte-Koeffizienten  $r_p$  berücksichtigt:

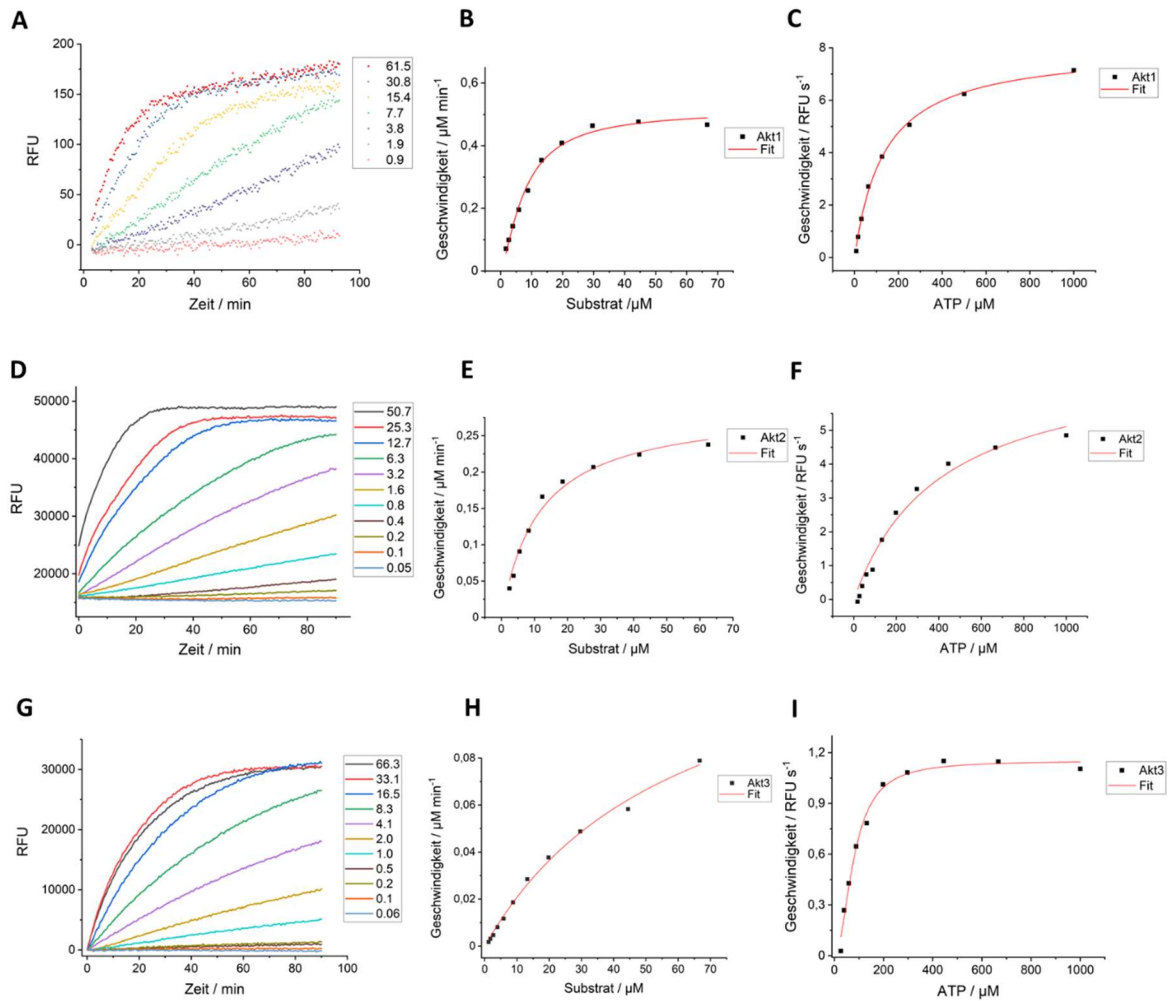
$$F = F_0 + r_p(P) \quad (17)$$

Konkret für den PhosphoSens Assay, ist die apparente Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$  durch  $A$  definiert und kann, wenn die Substratkonzentration deutlich unter dem  $K_M$ -Wert liegt ( $S_0 \ll K_M$ ), wie folgt vereinfacht werden:

$$k_{obs} = A = \frac{k(I)}{K_i \left(1 + \frac{(S)}{K_s}\right) + (I)} \quad (18)$$

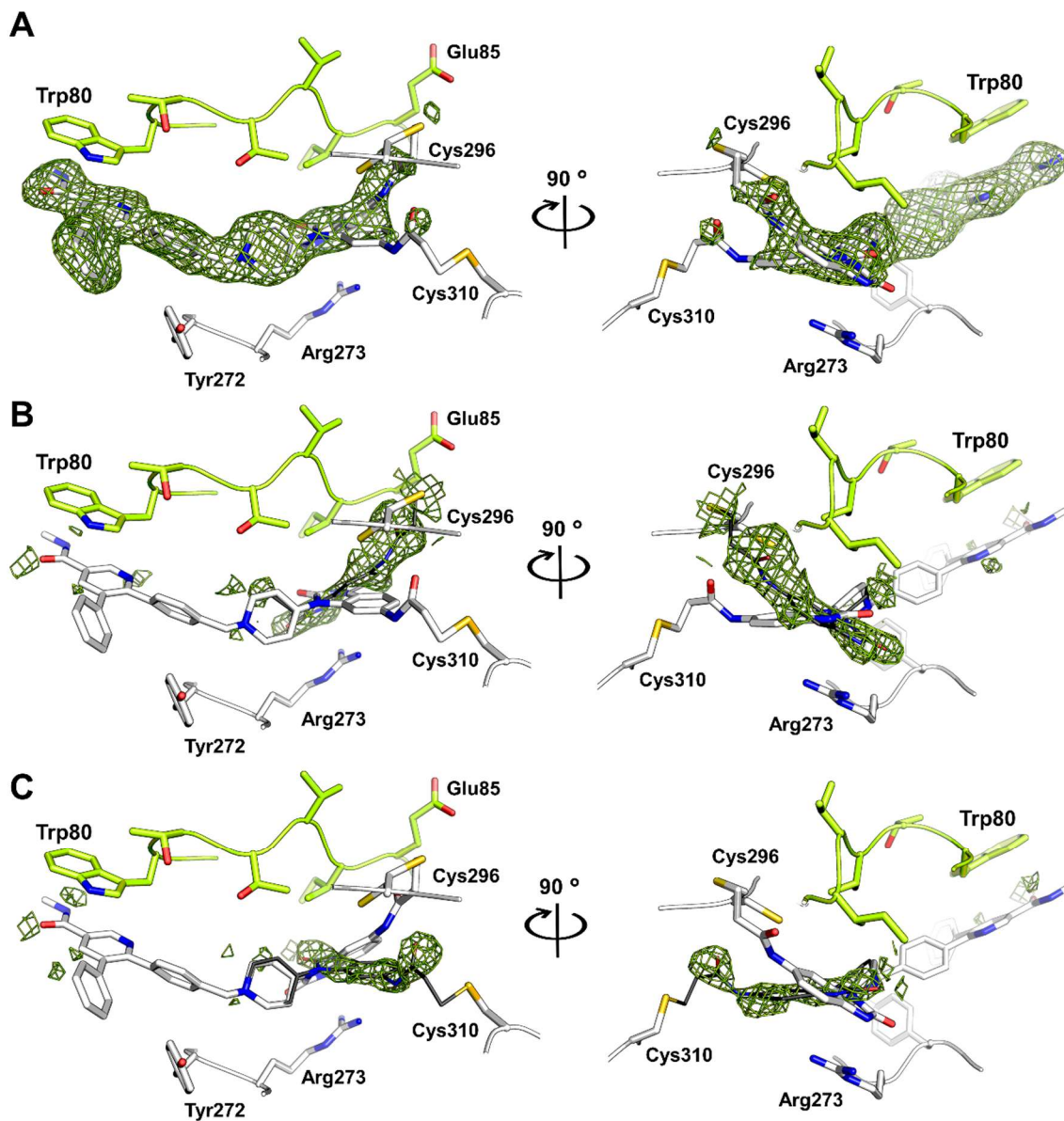
$$k = k_{inact}; (S) = (ATP), K_s = K_{M,ATP}$$

## 7.4.2. Etablierungsdaten

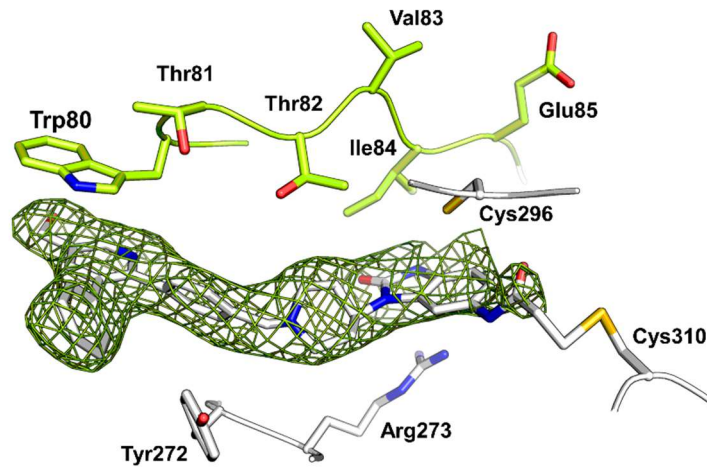


**Abb. 7.4-2. Etablierung des PhosphoSens-Assaysystems für die Akt Isoformen.** Initiale Etablierungsschritte für Akt1 (A-C), Akt2 (D-F) und Akt3 (G-I). Die Kinetitration lieferte eine Proteinkonzentration bei welcher das beobachtete Zeitfenster ein lineares Signal gibt (A, D, G). Bestimmung des Peptid-Substrat  $K_M$ s über die grafische Auftragung von Peptid Konzentration gegen die Reaktionsgeschwindigkeit (B, E, H). Ein hyperbolischer Fit nach der Michaelis-Menten-Gleichung liefert die entsprechende Größe. Zu letzte erfolgt die Bestimmung des ATP- $K_M$ s über die grafische Auftragung von ATP Konzentration gegen die Umsatzgeschwindigkeit (C, F, I). Ein hyperbolischer Fit nach der Michaelis-Menten-Gleichung liefert die entsprechende Größe. Experimente mit  $n = 1$ ; RFU: engl. *relative fluorescence unit*.

## 7.5. Komplexstrukturen



**Abb. 7.5-1. Komplexstrukturen von Akt1<sup>WT</sup> (2-446) mit CAAI 42c.** (A) Modellierung der beiden Liganden-Konformationen welche die Thiol-Seitenketten von Cys296 und Cys310 adressieren. In grün ist die *F<sub>O</sub>-F<sub>C</sub> simulated annealing omit map* Elektronendichte abgebildet ( $\sigma = 2$ ). Die kovalente Bindungsbildung zu den beiden Cysteinen wurde zusätzlich per Tandem MS/MS nachgewiesen. (B) Modellierung von **42c** gebunden an Cys310. Die *F<sub>O</sub>-F<sub>C</sub> simulated annealing omit map* ( $\sigma = 2$ ) der alternativen Liganden-Konformation (schwarze Linien) ist gezeigt. (C) Modellierung von **42c** gebunden an Cys296. Die *F<sub>O</sub>-F<sub>C</sub> simulated annealing omit map* ( $\sigma = 2$ ) der alternativen Liganden-Konformation (schwarze Linien) ist gezeigt.



**Abb. 7.5-2. Komplexstrukturen von Akt1<sup>WT</sup> (2-446) mit CAAI 39b.** (A) Modellierung des Liganden welcher die Thiol-Seitenketten von Cys310 adressiert. In grün ist die  $F_O-F_C$  simulated annealing omit map Elektronendichte abgebildet ( $\sigma = 2$ ).

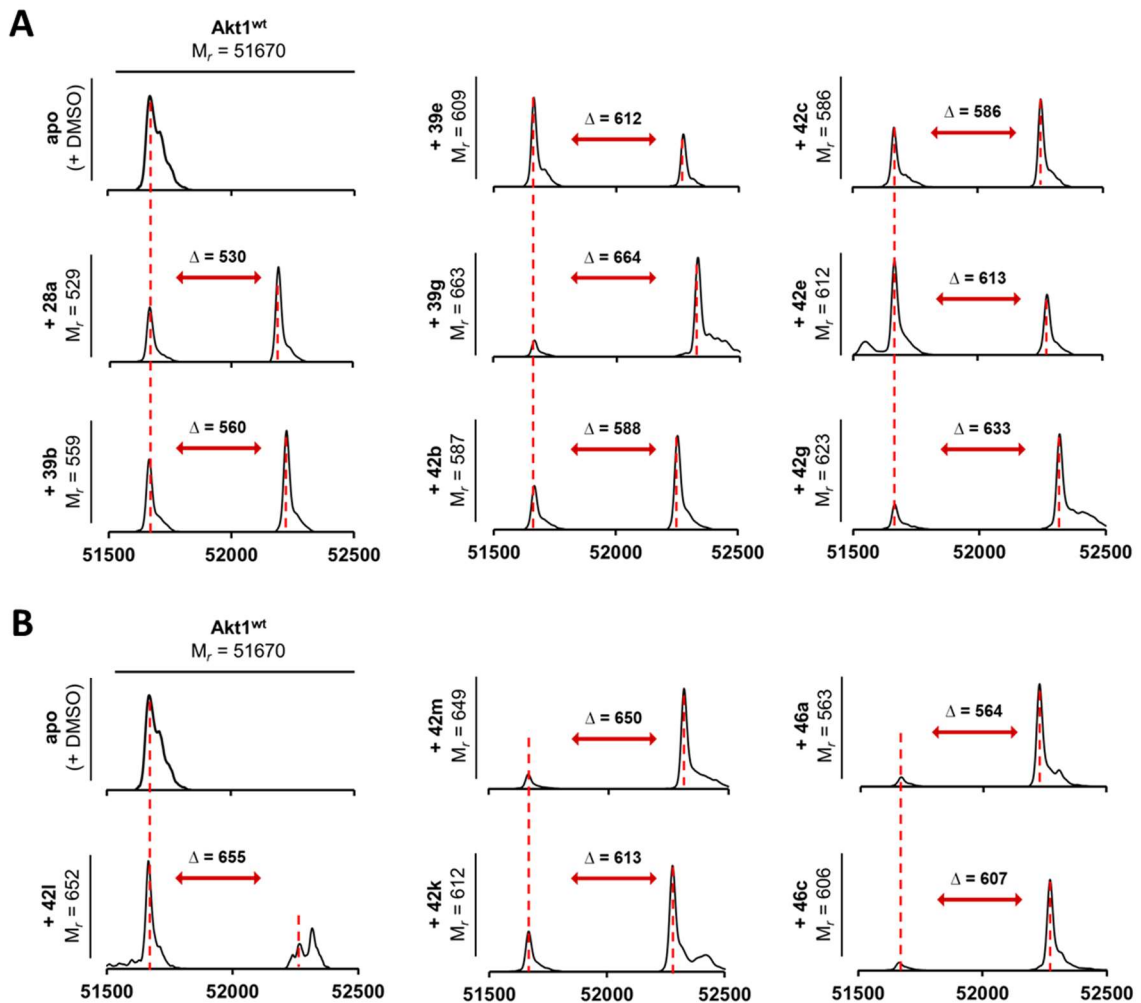
**Tab. 7.5-1. Datenstatistiken der Akt1<sup>WT</sup>-Kristallstrukturen.** Die Werte in den Klammern beziehen sich jeweils auf die höchste Auflösungsschale. Daten aufgenommen und verfeinert von Dr. INA LANDEL (AG Rauh, TU Dortmund).

<b>Datensammlung</b>		
	<b>39b, pdb: 7nh4</b>	<b>42c, pdb: 7nh5</b>
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellkonstanten		
a, b, c (Å)	70.76, 70.95, 91.13	70.65, 71.41, 91.02
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	45.56 – 2.30 (2.40 – 2.30)	43.97 – 1.90 (1.90 – 2.00)
R <sub>meas</sub> (%)	6.4 (161.4)	5.0 (188.5)
R <sub>merge</sub> (%)	6.0 (150.2)	4.8 (181.7)
I/σI	15.03 (1.05)	25.85 (1.47)
CC <sub>1/2</sub>	99.9 (60.8)	100.0 (67.9)
Vollständigkeit (%)	99.9 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundanz	7.4 (7.5)	13.5 (14.1)
<b>Verfeinerung</b>		
Auflösung (Å)	45.56 – 2.30	43.97 – 1.90
Anzahl der Reflexe	20958	36964
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> (%)	22.28/24.57 (33.86/36.77)	19.98/22.84 (34.80/37.23)
Anzahl der Atome		
Protein	3045	3149
Ligand	42	65
Wasser	15	83
B-Faktoren		
Protein	82.18	58.00
Ligand	73.12	42.04
Wasser	68.24	56.10
Standardabweichung		
Bindungslängen (Å)	0.002	0.010
Bindungswinkel (°)	0.494	1.084
Wellenlänge (Å)	0.99999	0.99998
Temperatur (K)	100	100
Röntgenquelle	PX II at SLS, Villigen, CH	PX II at SLS, Villigen, CH
Detektor	Eiger2 X 16M	Eiger2 X 16M
<b>Ramachandran Plot</b>		
Reste in		
bevorzugten Bereichen	97.32 %	97.32 %
erlaubten Bereichen	2.68 %	2.68 %
Ausreißer	0.00 %	0.00 %

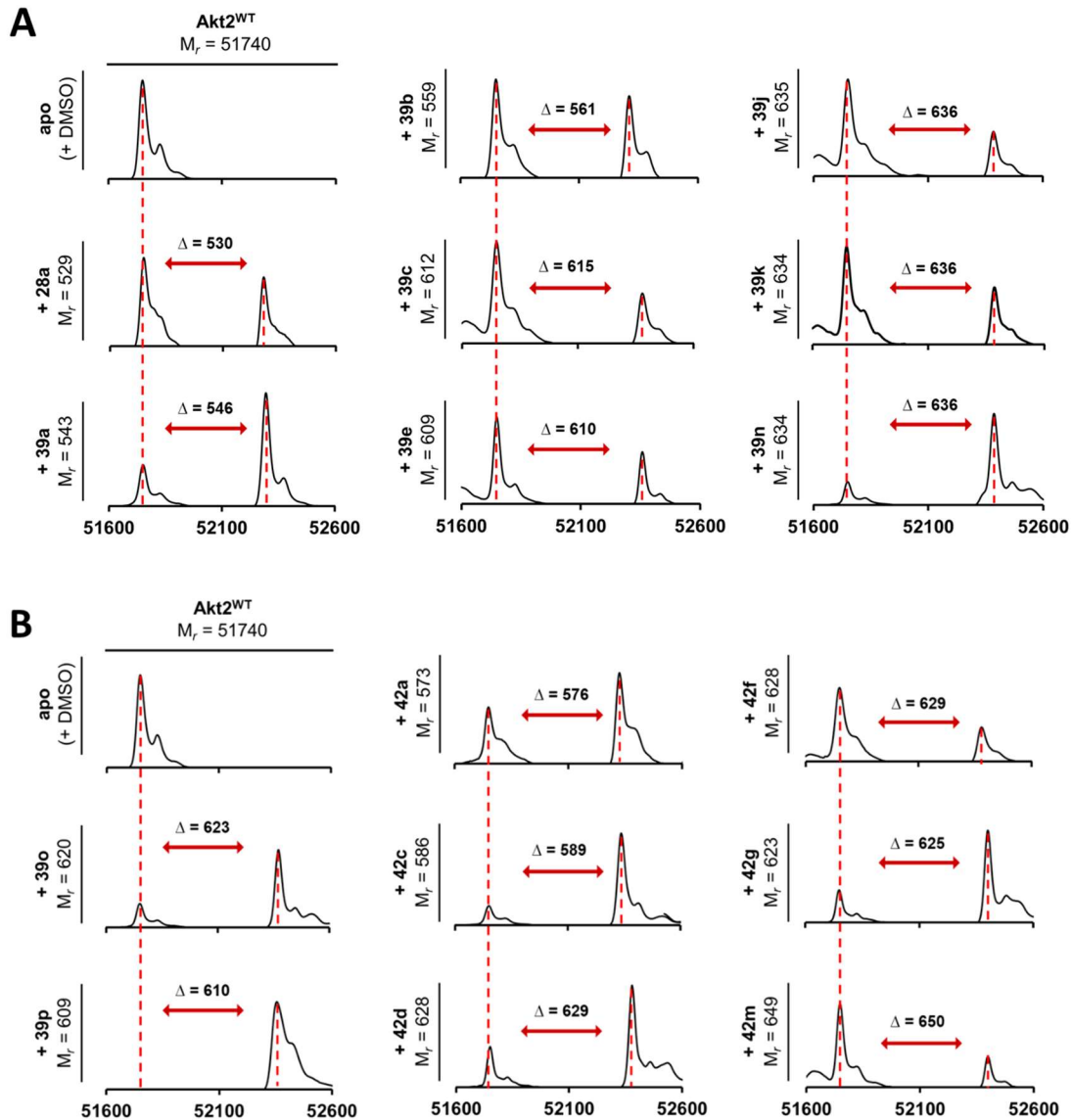


## 7.6. Massenspektren

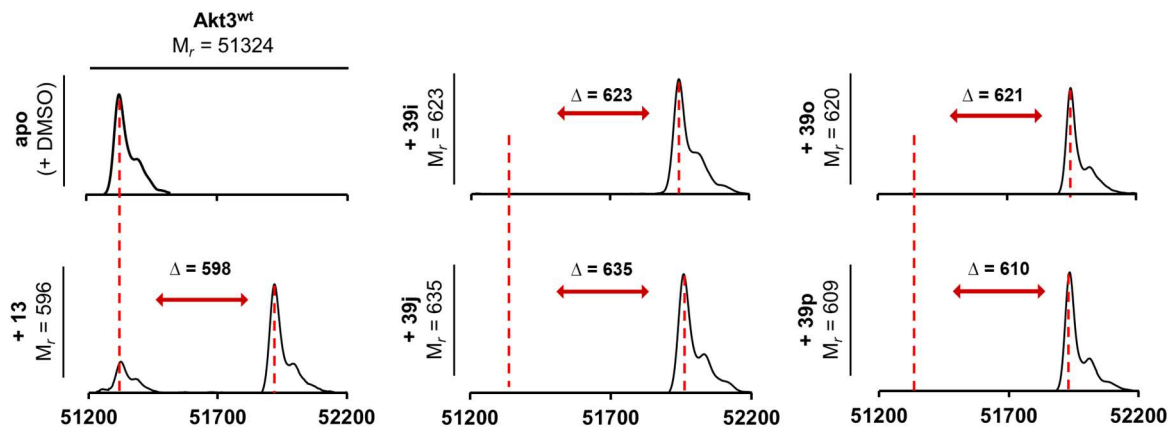
### 7.6.1. Proteinmassen



**Abb. 7.6-1: Massenspektrometrische Analyse von Akt1<sup>WT</sup> mit ausgewählten CAAs.** Dekonvolvierte Massen Spektren von dephosphoryliertem Akt1<sup>WT</sup> nach Inkubation mit DMSO (apo) und ausgewählter kovalent-allosterischer Inhibitoren. Alle getesteten Verbindungen zeigen eine Massenverschiebung hin zu der einfach modifizierten Protein-Spezies, welches mit der Aktivität der jeweiligen Inhibitoren für die entsprechenden Isoform einhergeht. Die Spektren wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgezeichnet.



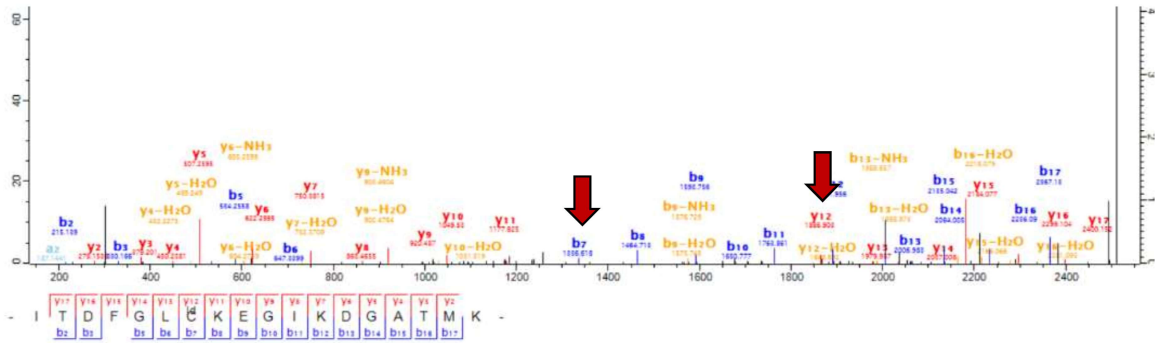
**Abb. 7.6-2: Massenspektrometrische Analyse von Akt2<sup>WT</sup> mit ausgewählten CAAs.** Dekonvulierte Massen Spektren von Akt2<sup>WT</sup> nach Inkubation mit DMSO (apo) und ausgewählter kovalent-allosterischer Inhibitoren. Alle getesteten Verbindungen zeigen eine Massenverschiebung hin zu der einfach modifizierten Protein-Spezies, welches mit der Aktivität der jeweiligen Inhibitoren für die entsprechenden Isoform einhergeht. Die Spektren wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgezeichnet.



**Abb. 7.6-3: Massenspektrometrische Analyse von Akt3<sup>WT</sup> mit ausgewählten CAAs.** Dekonvolvierte Massen Spektren von Akt3<sup>WT</sup> nach Inkubation mit DMSO (apo) und ausgewählter kovalent-allosterischer Inhibitoren. Alle getesteten Verbindungen zeigen eine Massenverschiebung hin zu der einfach modifizierten Protein-Spezies, welches mit der Aktivität der jeweiligen Inhibitoren für die entsprechenden Isoform einhergeht. Die Spektren wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgezeichnet.

## 7.6.2. Tandem-MS/MS

**A**



**B**

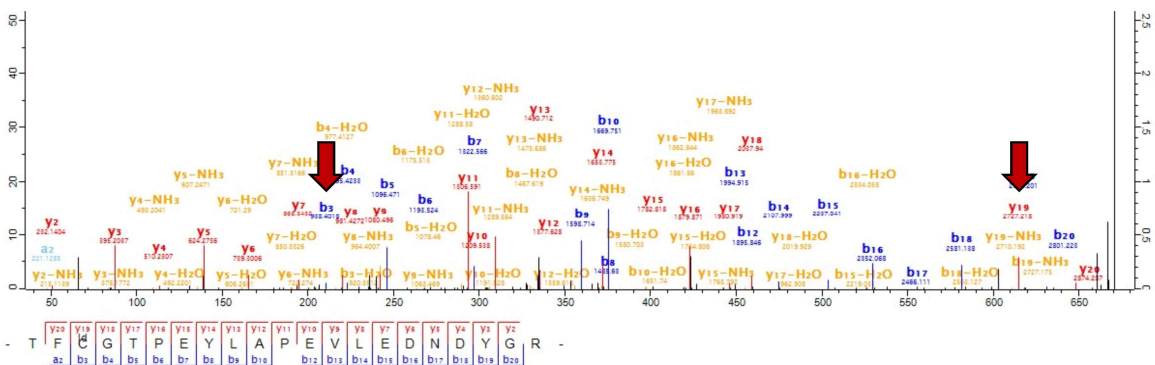
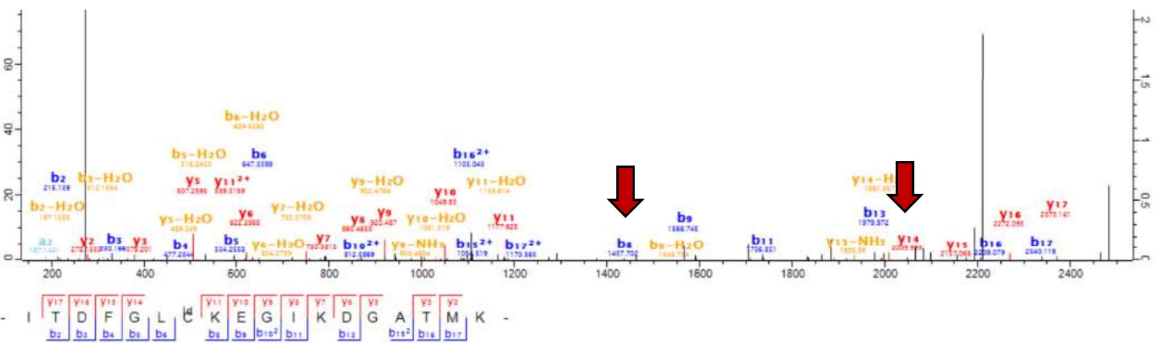


Abb. 7.6-4. Massenspektrum der Peptidfragmente von Akt1 kovalent modifiziert von CAAI 42c. Ausschnitte der annotierten Spektren der Tandem-MS/MS-Analyse mit entsprechender Peptid-Zuordnung. Rote Pfeile markieren die kovalent-modifizierten Fragmente. Modifizierung von Cys296 (A) und Cys310 (B).

**A**



**B**

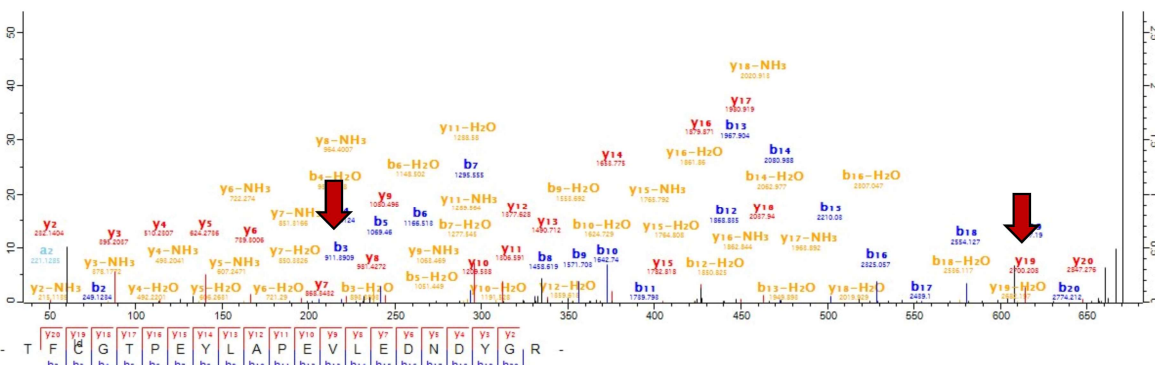
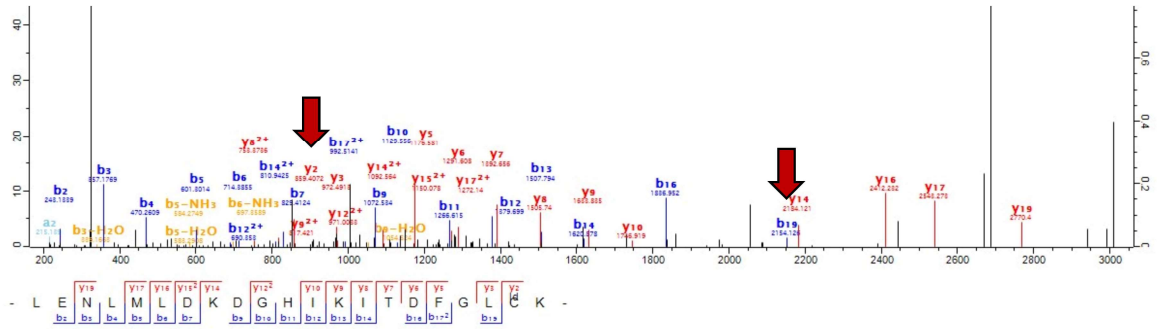
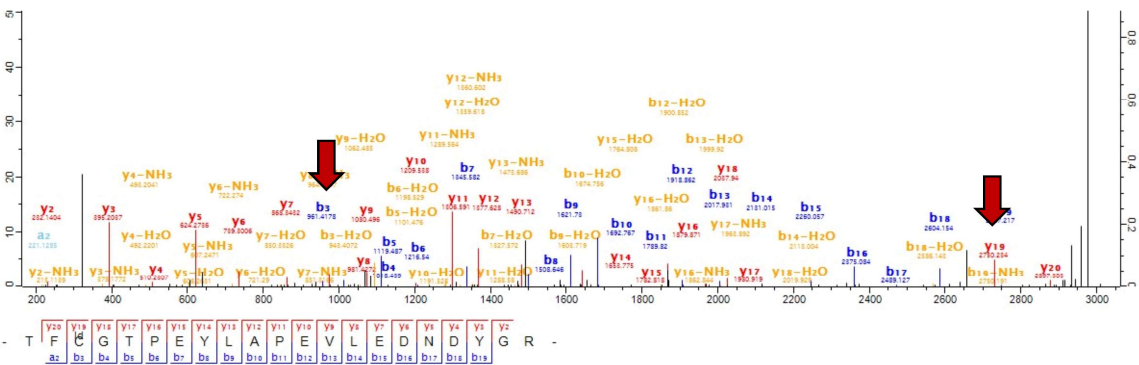


Abb. 7.6-5. Massenspektrum der Peptidfragmente von Akt1 kovalent modifiziert von CAAI 39b. Ausschnitte der annotierten Spektren der Tandem-MS/MS-Analyse mit entsprechender Peptid-Zuordnung. Rote Pfeile markieren die kovalent-modifizierten Fragmente. Modifizierung von Cys296 (A) und Cys310 (B).

**A**

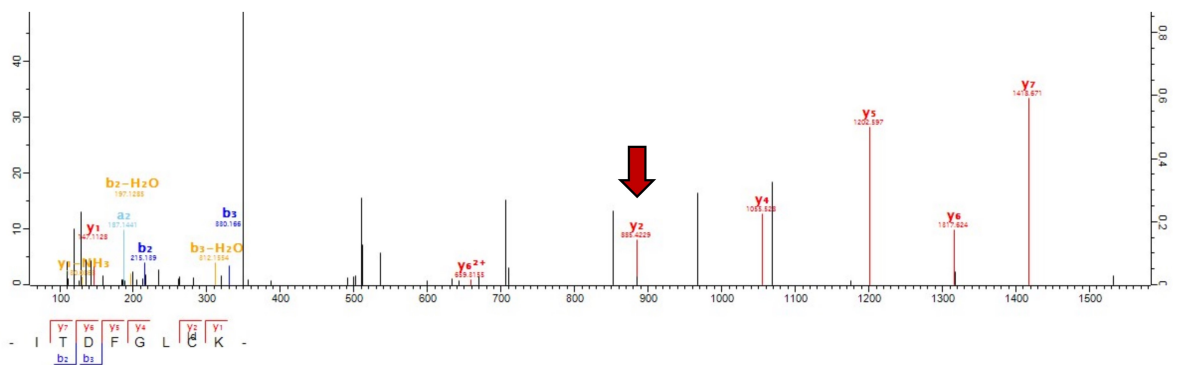


**B**



**Abb. 7.6-6. Massenspektrum der Peptidfragmente von Akt2 kovalent modifiziert von CAAI 39p.** Ausschnitte der annotierten Spektren der Tandem-MS/MS-Analyse mit entsprechender Peptid-Zuordnung. Rote Pfeile markieren die kovalent-modifizierten Fragmenten. Modifizierung von Cys297 (A) und Cys311 (B).

**A**



**Abb. 7.6-7. Massenspektrum der Peptidfragmente von Akt3 kovalent modifiziert von CAAI 39j.** Ausschnitte der annotierten Spektren der Tandem-MS/MS-Analyse mit entsprechender Peptid-Zuordnung. Roter Pfeil markieren das kovalent-modifizierte Fragment. Modifizierung von Cys293 (A).

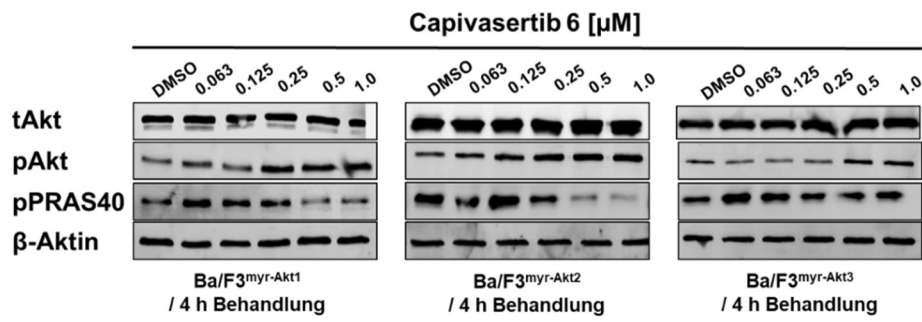
## 7.7. Viabilitätsdaten

**Tab. 7.7-1. Zelluläre Evaluation der CAAs in myr-Akt Isoform-abhängigen BA/F3 Zelllinien.** Neben dem Modellsystem wurde ebenfalls die Viabilitätsdaten in der parentalen Ba/F3 Zelllinie bestimmt. Die EC<sub>50</sub>-Werte der Liganden wurden mit dem CTG Assay bestimmt. Ergebnisse sind als Mittelwert mit  $n = 3$  angegeben, sowie die dazugehörigen Fehler als ( $\pm$ ) Standardabweichung (-: nicht bestimmt).

		EC <sub>50</sub> / nM			
#		Ba/F3 <sup>myr-Akt1</sup>	Ba/F3 <sup>myr-Akt2</sup>	Ba/F3 <sup>myr-Akt3</sup>	Ba/F3
<b>6</b>	Capivasertib	1074 $\pm$ 223	938 $\pm$ 240	848 $\pm$ 103	15997 $\pm$ 5100
<b>12</b>	MK-2206	1124 $\pm$ 100	1339 $\pm$ 449	5734 $\pm$ 169	7386 $\pm$ 1553
<b>13</b>	Borussertib	440 $\pm$ 99	599 $\pm$ 214	6837 $\pm$ 670	20068 $\pm$ 3660
<b>15a</b>		7211 $\pm$ 600	14866 $\pm$ 4051	26950 $\pm$ 5283	> 30000
<b>16b</b>		29835 $\pm$ 130	6343 $\pm$ 597	21959 $\pm$ 7802	20125 $\pm$ 3002
<b>28a</b>		1787 $\pm$ 637	4473 $\pm$ 2127	> 30000	6894 $\pm$ 692
<b>39a</b>		3095 $\pm$ 307	2785 $\pm$ 1205	> 30000	11455 $\pm$ 1236
<b>39b</b>		28324 $\pm$ 1676	21194 $\pm$ 8807	> 30000	> 30000
<b>39c</b>		4711 $\pm$ 863	1781 $\pm$ 719	2509 $\pm$ 522	8462 $\pm$ 1441
<b>39e</b>		28817 $\pm$ 1242	2690 $\pm$ 355	18561 $\pm$ 3885	> 30000
<b>39f</b>		> 30000	13602 $\pm$ 2591	14110 $\pm$ 3455	29492 $\pm$ 718
<b>39i</b>		8290 $\pm$ 1252	3046 $\pm$ 672	5288 $\pm$ 2956	24711 $\pm$ 5297
<b>39j</b>		9483 $\pm$ 366	4093 $\pm$ 806	5054 $\pm$ 595	12145 $\pm$ 3732
<b>39k</b>		12736 $\pm$ 4925	2893 $\pm$ 688	7442 $\pm$ 642	12490 $\pm$ 5265
<b>39l</b>		26685 $\pm$ 2087	14308 $\pm$ 5914	17160 $\pm$ 1422	28578 $\pm$ 2011
<b>39m</b>		> 30000	25496 $\pm$ 6370	> 30000	> 30000
<b>39n</b>		> 30000	3750 $\pm$ 426	22036 $\pm$ 2694	> 30000
<b>39o</b>		19686 $\pm$ 4737	2234 $\pm$ 194	6515 $\pm$ 654	14739 $\pm$ 2368
<b>39p</b>		7557 $\pm$ 482	529 $\pm$ 51	4468 $\pm$ 148	8643 $\pm$ 1221
<b>42a</b>		> 30000	> 30000	> 30000	> 30000
<b>42b</b>		4919 $\pm$ 689	2714 $\pm$ 1039	7650 $\pm$ 202	16331 $\pm$ 2626
<b>42c</b>		9614 $\pm$ 1622	10803 $\pm$ 2563	25686 $\pm$ 3148	> 30000
<b>42d</b>		26661 $\pm$ 3929	7987 $\pm$ 1821	24273 $\pm$ 1724	24525 $\pm$ 6003
<b>42g</b>		19283 $\pm$ 1743	7179 $\pm$ 679	22620 $\pm$ 4994	25580 $\pm$ 8253
<b>42i</b>		> 30000	12785 $\pm$ 948	26478 $\pm$ 1737	25613 $\pm$ 5480
<b>42m</b>		22535 $\pm$ 6092	3683 $\pm$ 1254	18840 $\pm$ 1056	> 30000
<b>42n</b>		14641 $\pm$ 1219	2760 $\pm$ 504	17064 $\pm$ 7359	> 30000
<b>42o</b>		17806 $\pm$ 499	1479 $\pm$ 710	18153 $\pm$ 7820	> 30000
<b>46a</b>		745 $\pm$ 165	631 $\pm$ 280	5486 $\pm$ 752	-
<b>46b</b>		733 $\pm$ 205	465 $\pm$ 27	2393 $\pm$ 248	-
<b>46c</b>		1432 $\pm$ 134	310 $\pm$ 97	2643 $\pm$ 240	-
<b>46d</b>		7029 $\pm$ 77	2512 $\pm$ 942	7747 $\pm$ 94	-

**Tab. 7.7-2. Logarithmische Selektivitätsverhältnisse der CAAs für die Akt Isoformen.** Daten wurden aus der biochemischen oder zellulären Charakterisierung erhalten.

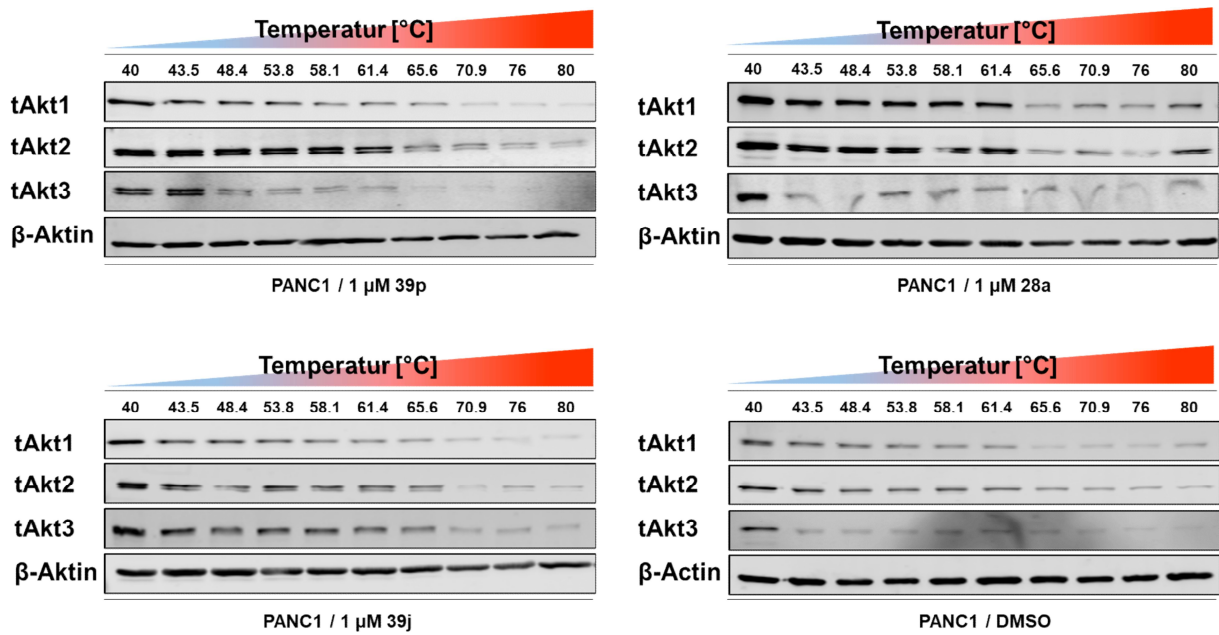
#		Log IC <sub>50</sub> [Akt] / IC <sub>50</sub> [Akt]		Log EC <sub>50</sub> [Akt] / EC <sub>50</sub> [Akt]	
		Akt1 / Akt2	Akt3 / Akt2	Akt1 / Akt2	Akt3 / Akt2
6	Capivasertib	-0.40	-0.20	0.06	0.04
12	MK-2206	-0.99	-0.78	-0.08	-0.63
13	Borussertib	-1.08	-1.71	-0.13	-1.06
15a		-2.52	-0.19	-0.31	-0.26
16b		0.98	-2.14	0.67	-0.54
28b		-1.05	-1.04	-0.40	-0.83
39a		-0.83	-1.70	0.05	-0.46
39b		-0.71	-1.32	0.13	-0.15
39c		1.17	-1.62	0.42	-0.15
39e		0.93	-1.40	1.03	-0.84
39f		0.15	-0.30	0.34	-0.02
39i		0.71	-0.38	0.43	-0.24
39j		0.97	-0.03	0.27	-0.09
39k		0.55	-0.47	0.64	-0.41
39l		-0.37	-0.49	0.27	-0.08
39m		1.14	-0.89	0.07	-0.07
39n		1.33	-1.20	0.90	-0.77
39n		1.30	-0.43	0.95	-0.46
39p		1.35	-1.19	1.15	-0.93
42a		-0.75	-1.41	0	0
42b		-0.52	-1.47	0.26	-0.45
42c		0.02	-1.73	-0.05	-0.38
42d		1.26	-1.22	0.52	-0.48
42g		0.27	-1.83	0.43	-0.50
42i		0.34	-0.99	0.37	-0.32
42m		0.58	-1.74	0.79	-0.71
42n		-0.07	-1.62	0.72	-0.79
42o		0.37	-2.13	1.08	-1.09
46a		-0.99	-1.74	0.07	-0.93
46b		-0.09	-1.30	0.19	-0.71
46c		0.36	-1.63	0.66	-0.93
46d		-0.09	-1.39	-0.44	-0.48



**Abb. 7.7-1: Evaluation der Adressierung des Ba/F3-Akt-Isoform-Systems mit Capivasertib** Immunoblots lösten die individuelle Aktivität sowie Veränderungen der untergeordneten Proteine nach Behandlung (4 h) mit verschiedenen Capivasertib-Konzentrationen (6) für die drei Modellsysteme.



## 7.8. CETSA Immunoblots



**Abb. 7.8-1. Evaluation der selektierten Inhibitoren in CETSA-Experimenten der PANC1 Zelllinie.** Immunoblots der CETSA-Experimente. Die PANC1 Zellen wurden mit 1 μM CAAI für 4.5 Stunden behandelt und anschließend für 3 Minuten erhitzt bevor die Lyse erfolgte.

# Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Quambusch, Lena

149239

Name, Vorname  
(Surname, first name)

Matrikel-Nr.  
(Enrolment number)

## Belehrung:

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

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

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

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

## Official notification:

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

The submission of a false affidavit is punishable.

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

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum  
(Place, date)

Unterschrift  
(Signature)

Titel der Dissertation:  
(Title of the thesis):

Strukturbasierte Entwicklung und Evaluierung von Sondenmolekülen zur  
allosterischen Regulation von Isoformen der Proteinkinase Akt

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

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

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

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

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

Ort, Datum  
(Place, date)

Unterschrift  
(Signature)

„Prof. Arnold is there anything you would tell a young female scientist who considers to stay in academia?“

„Just Do it!“

FRANCIS ARNOLD, 2019

Dortmund