

1 Einleitung

1.1 Krebs

Maligne Tumoren sind in den USA die häufigste und in Deutschland nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache [1, 2]. Jährlich erkranken nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts fast 400.000 Menschen in Deutschland neu an Krebs. Im Jahr 2003 starben knapp 210.000 an den Folgen einer Krebserkrankung.

Krebs hat kein einheitliches Krankheitsbild. Hinter dem Begriff verbergen sich weit mehr als hundert verschiedene bösartige Erkrankungen.

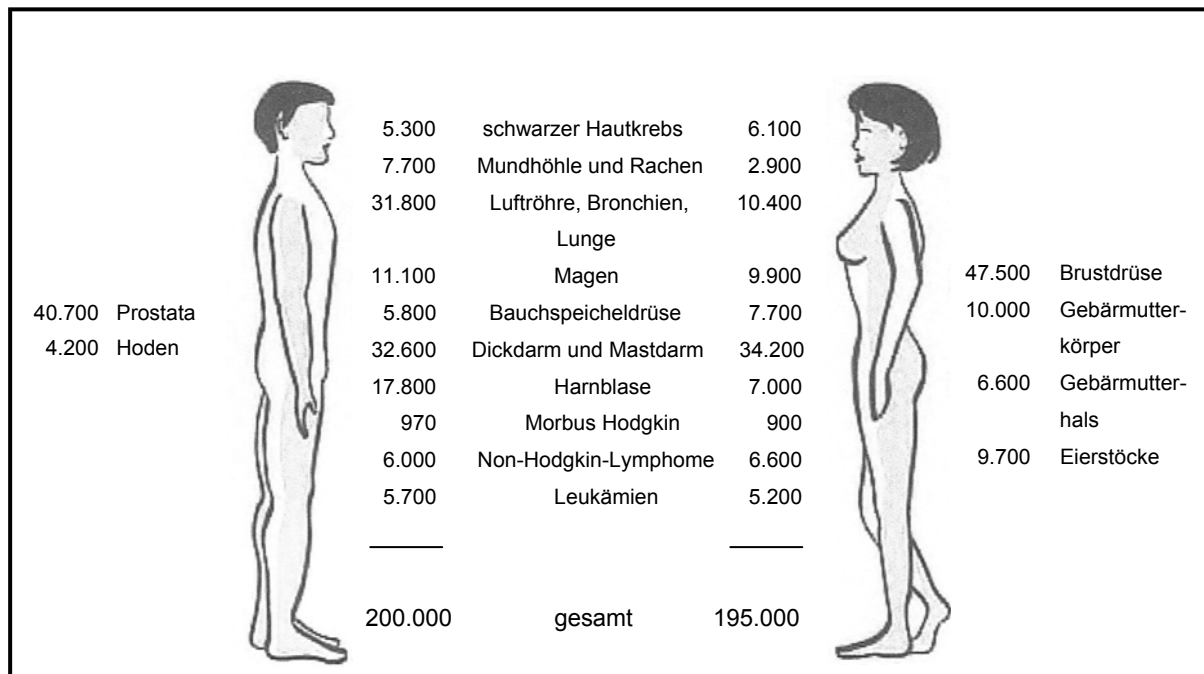


Abb. 1: Geschätzte Zahl der jährlich Neuerkrankten nach Krebsarten und Geschlecht
(Robert Koch Institut, 2004)

Die Tumorentstehung beruht letztlich auf DNA-Veränderungen, für die exogene Noxen wie ionisierende Strahlen, chemische Karzinogene, bestimmte Viren (z. B. humane Papillomaviren), aber auch Zigarettenrauch, erhöhter Alkoholgenuss oder falsche Ernährung verantwortlich gemacht werden. Auch erbliche Faktoren können ein gewisses Tumorrisiko bedingen.

Je älter der Mensch wird, desto unzuverlässiger arbeitet das Reparatursystem der Gene. Dies spiegelt sich in den Neuerkrankungszahlen wider: 72 % der Männer mit Krebs und 70 % der betroffenen Frauen sind älter als 60 Jahre [2, 3].

1.2 Wachstumsfaktoren als attraktive Angriffspunkte für die Tumorbekämpfung

Die Erkenntnisse der modernen Tumorforschung haben einen Paradigmenwechsel in der Therapie eingeleitet. Während die klassischen Therapieformen wie Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie ausschließlich die Eliminierung der Tumorzelle zum Ziel haben, sind die neuen Ansätze darauf gerichtet, eine Wachstumsinhibition zu erreichen. Die konventionelle Chemotherapie ist nur wenig spezifisch für Tumorzellen und verbunden mit einer Vielzahl an Nebenwirkungen auf gesunde Zellen. Daher ist die Entwicklung neuer Medikamente mit spezifischeren Wirkungsmechanismen von großer Bedeutung.

So wurden in den letzten Jahren zahlreiche viel versprechende Substanzen gegen Krebs entwickelt, die extrazelluläre Zellstrukturen oder intrazelluläre Signaltransduktionswege als Angriffsziel haben; denn die Progression von Tumoren und Metastasen wird unter anderem durch Wachstumsfaktoren kontrolliert, die nach Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche komplexe Signaltransduktions-Kaskaden auslösen. Dies führt zu vermehrter Proliferation, Angiogenese, Metastasierung und Invasion sowie verminderter Apoptosefähigkeit der Tumorzellen. Daher sind Wachstumsfaktoren attraktive Angriffspunkte für die Tumorbekämpfung (**Kap. 1.5**) [4].

1.3 Der humane Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR)

Ein Großteil der soliden Tumoren exprimiert den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR, HER1, ErbB1), den ersten und am besten untersuchten von vier Transmembran-Rezeptoren der HER- (oder ErbB-) Familie. 1984 erfolgte die Aufklärung seiner cDNS-Sequenz [5, 6]. Weiterhin gehören der ErbB2 (HER2, Neu)-, ErbB3 (HER3)- und ErbB4 (HER4)-Rezeptor zur HER-Familie. Für den Rezeptor ErbB2 wurde bisher kein Ligand gefunden. Er dient als Hetero-Dimerisierungspartner für die anderen HER-Rezeptoren. Der ErbB3-Rezeptor enthält eine gestörte Tyrosinkinase und kann daher nur inaktive Homodimere bilden (**Abb. 2**) [7, 8].

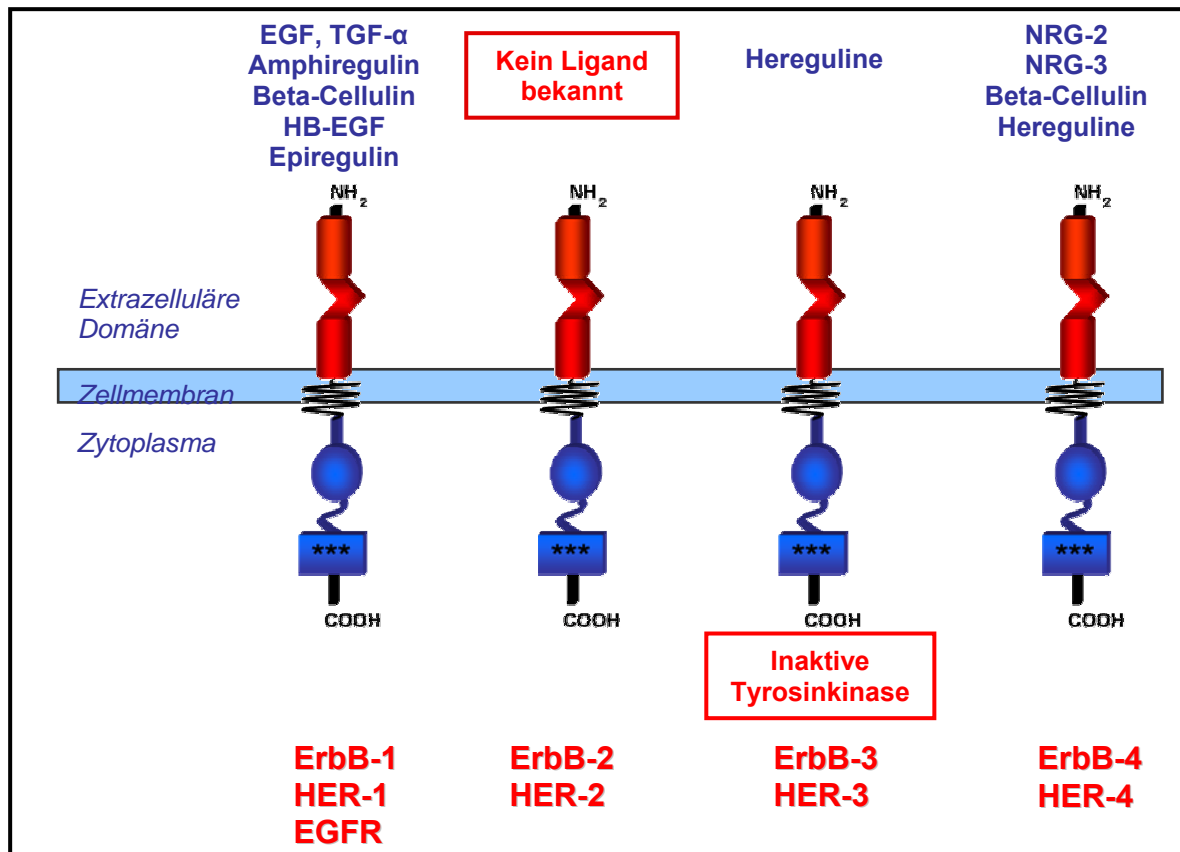


Abb. 2: Die EGF-Rezeptor (ErbB)-Familie und ihre Liganden [8]

Bisher wurden zehn Proteine als Liganden der Rezeptoren der EGFR-Familie identifiziert:

- EGF (engl.: epidermal growth factor = epidermaler Wachstumsfaktor)
- TGF-α (engl.: transforming growth factor-alpha = transformierender Wachstumsfaktor-alpha)
- AR (Amphiregulin; auch: Keratinozyten-autokriner Faktor, Kolorektumzellen-abstammender Wachstumsfaktor)
- BTC (Betacellulin)
- EPR (Epiregulin)
- EPI (Epigen)
- Neuroreguline
 - Hereguline (Isoformen α und β)
 - NRG-2s (Isoformen α und β)
 - NRG-3 [9, 10].

EGF (53 Aminosäuren, 6.4 kDa) ist der Prototyp dieser miteinander sehr eng verwandten Wachstumshormone und wird in der Speicheldrüse sowie in Mammaepithel- und Nierentubuluszellen synthetisiert. Alle Proteine der EGF-Familie haben als gemeinsames Merkmal eine aus ca. 50 Aminosäuren bestehende Sequenz, die so genannte EGF-Domäne,

welche sechs Cysteinreste enthält, die untereinander drei in Schleifen gelegte Disulfidbrücken ausbilden [10].

1.3.1 Aufbau des EGF-Rezeptors

Das 170 kDa große und aus 1186 Aminosäuren bestehende membranständige Glykoprotein lässt sich in drei Bereiche einteilen: eine große extrazelluläre, amino-terminale Ligandenbindungsdomäne, die aus 622 Aminosäuren besteht und glykosyliert ist, ein transmembranärer lipophiler Abschnitt in Form einer α -Helix sowie eine intrazelluläre, aus 542 Aminosäuren bestehende Domäne mit Tyrosinkinase-Funktion (**Abb. 3**) [7, 11].

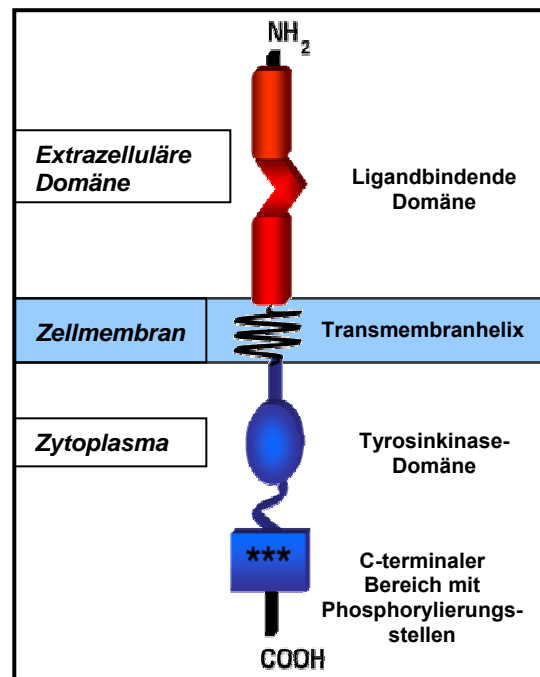


Abb. 3: Schematischer Aufbau des EGF-Rezeptors [12]

Tyrosinkinasen sind Enzyme, die den Transfer von γ -Phosphat-Gruppen des Adenosintriphosphats (ATP) auf Hydroxylgruppen von Zielproteinen mit Tyrosinresten katalysieren [7]. Sie kommen in Rezeptor-gekoppelten Formen als Rezeptor-Tyrosinkinasen und im Zytoplasma als nicht-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinasen vor. Über 90 Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) wurden bisher identifiziert, davon gehören mehr als die Hälfte zum transmembranären Rezeptor-Typ, welchem auch der EGFR zugeordnet wird [13].

1.3.2 EGFR-Tyrosinkinase-abhängige Signalkaskaden

Als EGFR-Signaling bezeichnet man die Übertragung der durch Bindung von Wachstumshormonen an ihre Rezeptoren ausgelösten Signale durch das Zytoplasma von der Zellmembran zum Zellkern.

Bindet ein spezifischer Ligand, z. B. EGF, an der Zelloberfläche an den Rezeptor, so dimerisiert dieser. Das bedeutet, dass ein Wachstumsfaktor an zwei Rezeptoren gleichzeitig bindet. Es entstehen Homomere oder Heterodimere, außerdem können sich zwei Dimere zu Tetrameren zusammenlagern. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren, die Tyrosinkinasen werden dabei aktiviert und ATP wird in der ATP-Bindungstasche gebunden. Die beiden C-terminalen Teile der zytoplasmatischen Domänen der dimerisierten Rezeptoren gelangen infolgedessen durch ihre Flexibilität an die Substratbindungsstellen der Tyrosinkinase-Domänen und werden dort, abhängig vom gebundenen Liganden und Dimerisierungspartner des Rezeptors, an mehreren Tyrosinresten autophosphoryliert. Rezeptor und Proteinkinase sind also durch dasselbe Protein charakterisiert.

Die entstandenen phosphorylierten Tyrosinreste sind hochaffine Bindungsstellen für eine Reihe intrazellulärer Signalproteine der Zielzelle und fungieren dadurch als Überträger des Wachstumssignals innerhalb der Zelle. Es werden verschiedene Reaktionskaskaden angestoßen, über die das Wachstumssignal den Zellkern erreicht (**Kap. 1.3.3**). Dabei werden Gentranskription und DNA-Replikation angeregt, wodurch die Zelle zur Reifung und Proliferation, Angiogenese und Metastasierung befähigt wird.

Dieser als Signaling bezeichnete Vorgang unterliegt normalerweise einer strikten Kontrolle und Regulation. Störungen können zur Tumorbildung führen [14, 15].

1.3.3 EGFR-Downstream-Signaling

Wie im Abschnitt 1.3.2 bereits beschrieben, stellt die durch die Bindung eines Liganden stattfindende Dimerisierung des Rezeptors den Anfangspunkt für die sich von der Zellmembran zum Zellkern fortpflanzenden Signalkaskaden dar. Die bereitgestellten Phosphotyrosine sind Bindungsstellen für Signal- und Adapterproteine und bilden dadurch wichtige Ausgangspunkte für verschiedene im Zytoplasma ablaufende Signalwege, wie das MAPK-, PL-, Akt- und JAK/STAT-Signaling (**Abb. 4, Kap. 1.3.3.1-1.3.3.4**).

Wichtige Signalproteine sind das G-Protein RAS, PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und PLC- γ (Phospholipase C- γ) [16-20].

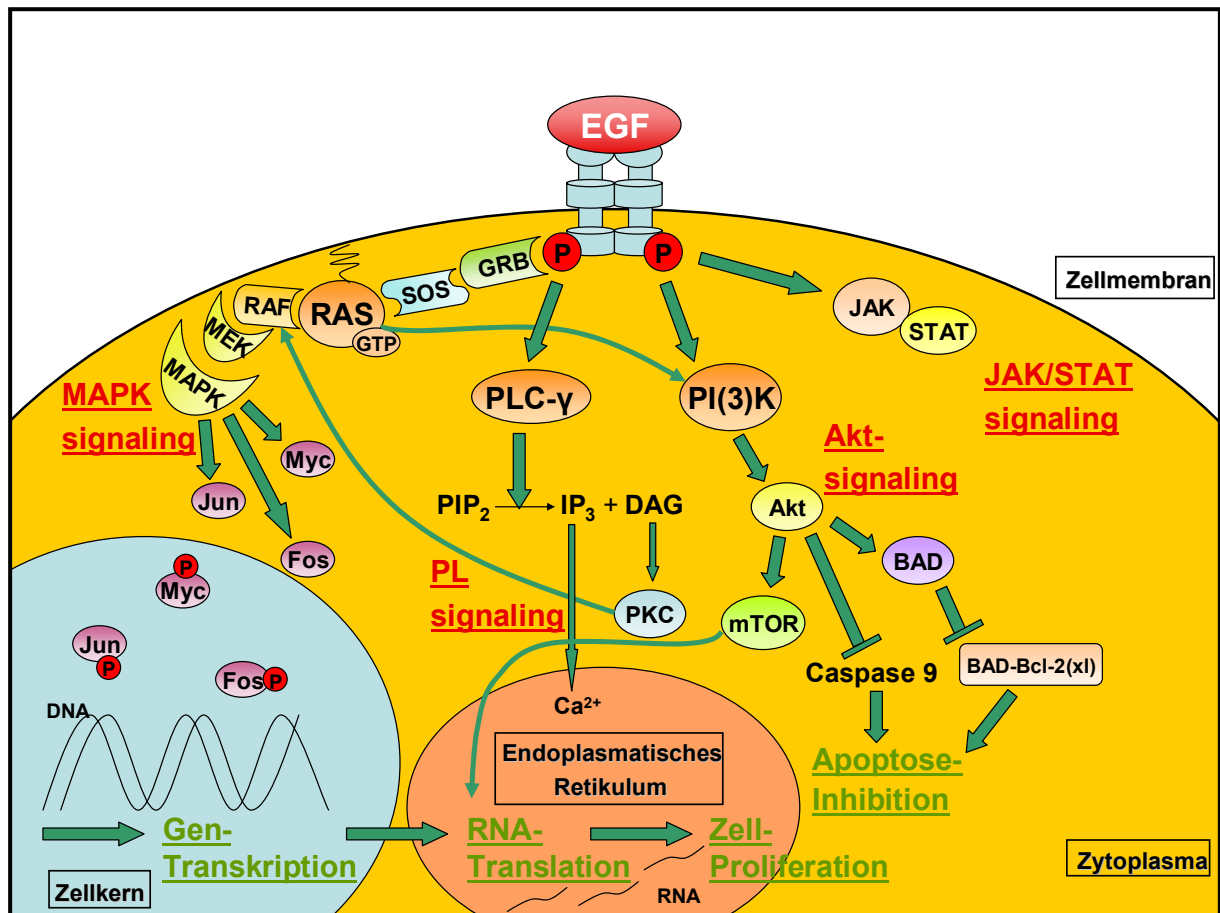


Abb. 4: Vereinfachtes Schema des EGFR-Signaling (Abk. s. Text)

1.3.3.1 MAPK-Signaling

Das Signaling über Mitogenaktivierte Protein- (MAP-) Kinasen reguliert die Gen-Transkription und Proliferation durch Aktivierung von Substratmolekülen im Zytosol, im Zellkern und in der Plasmamembran [21].

Die meisten Autophosphorylierungsstellen liegen in der nicht-katalytischen Region des Rezeptor-Moleküls. Diese haben die Funktion einer Bindungsstelle für SH2-Domänen (SH=Src-homolog, da diese Domänen ursprünglich im Src-Protein gefunden wurden; Src ist eine lösliche, im Zytoplasma lokalisierte Tyrosinkinase) und damit für viele Signalproteine. Solche Proteine können durch die SH2-Domäne an aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen sowie auch an andere intrazelluläre Signalproteine binden. Diese kleinen SH-Adapter-Proteine besitzen selbst keine katalytische Aktivität, sondern werden nur dazu verwendet, Tyrosin-phosphorylierte Proteine mit anderen Proteinen, die keine SH-Domäne besitzen, zu verbrücken.

Ein solches Adapterprotein ist GRB2. Es bindet an SOS (engl.: son of sevenless, ein Ausdruck aus der Drosophila-Genetik), einen Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (GNEF: engl.: guanine nucleotide exchange factor).

Das SOS-Protein ist wiederum an das G-Protein RAS (von Ratten-Sarkom-Virus) gebunden, dessen Aktivitätszustand es durch Guanin-Nukleotid-Austausch reguliert.

Die RAS-Proteine gehören der RAS-Großfamilie monomerer GTPasen an und enthalten einen kovalent verknüpften Prenyl-Rest, der für ihre Verankerung in der Membran wichtig ist. Sie liegen an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran. RAS-Proteine besitzen eine Schalterfunktion und wechseln zwischen zwei Konformationszuständen – als GTP-gebundene Moleküle sind sie aktiviert, während sie in der GDP-gebundenen Form inaktiv sind. RAS setzt unter dem Einfluß von SOS das gebundene GDP frei, bindet GTP und aktiviert eine Serin/Threonin-Phosphorylierungskaskade, die zur Aktivierung der MAP-Kinase führt.

Mitogenaktivierte Protein- (MAP-) Kinasen werden durch ein breites Spektrum unterschiedlicher extrazellulärer Wachstums- und Differenzierungs-Signale eingeschaltet, von denen einige Rezeptor-Tyrosinkinasen, andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren.

Aktives RAS bindet an die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (RAF, Ras-activated-factor), die die Aktivierung der MAP-Kinase-Kinase (MEK) über Phosphorylierung von Serin-/Threonin-Resten katalysiert. MEK wiederum aktiviert die MAP-Kinase (MAPK) durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosin-Resten in der Aktivierungs-Region. Diese leitet das Signal weiter, indem sie in der Zelle verschiedenartige Proteine sowie andere Proteinkinasen und genregulatorische Proteine wie die DNA-Bindungsproteine Jun und Fos phosphoryliert und damit aktiviert [7, 22].

1.3.3.2 Akt-Signaling

Der PI3K/Akt Signalweg vermittelt das Überleben der Zellen. Antiapoptotische Signale werden überexprimiert, wo hingegen proapoptotische Signale unterdrückt werden. Außerdem kommt es zu einer Aktivierung der mRNA-Translation [21].

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ist ein Enzym, das Phosphatidylinositol und verwandte Substrate phosphoryliert. PI3K ist ein Heterodimer und besteht aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit. Über die SH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit bindet PI3K an ein Phosphotyrosin der zytoplasmatischen Domäne des EGFR, wird daraufhin phosphoryliert und aktiviert infolgedessen die zelluläre Ser/Thr-Kinase Akt [23].

Akt ist das am besten untersuchte PI3K-Substrat und spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Gleichgewichtes zwischen der Zellvermehrung (Proliferation) und dem programmierten Zelltod (Apoptose). Sie führt über verschiedene Stimuli zu Verschiebungen

im Zellzyklus, zum Verlust der Zelladhäsion und zu DNA-Schädigungen. Außerdem ist Akt an der Kontrolle der Translation während der Proteinbiosynthese beteiligt.

Akt gilt als Verzweigungspunkt zweier bedeutender Signalwege: einem Proliferationsaktivierenden und einem Apoptose-inhibierenden Signalweg.

Der Akt-Downstream-Effektor mTor (engl.: mammalian target of rapamycin), der ebenfalls eine Ser/Thr-Kinase ist, fungiert als Sensor für das Angebot an Nährstoffen, sorgt für das Gleichgewicht zwischen Nährstoffangebot und Zellwachstum und kann bei Überexpression den Zellzyklus aktivieren.

Darüber hinaus ist die PI3K/Akt-Signalkaskade an Apoptose-inhibierenden Prozessen beteiligt. Apoptose ermöglicht die sichere Beseitigung geschädigter Zellen ohne Entzündungsreaktionen. Zu den Hauptregulatoren gehören Caspasen (Cysteinyl-Aspartasen), eine Familie von Cystein-Proteasen. Ausgehend vom Schlüsselenzym Akt kann der Apoptose-fördernde Faktor Caspase 9 direkt bzw. indirekt inhibiert werden.

Außerdem kann durch Phosphorylierung von BAD der programmierte Zelltod verhindert werden, da das phosphorylierte BAD keine Komplexbildung mit den apoptotischen Proteinen Bcl-2 bzw. Bcl-xl eingeht.

Auch die MAPK (**Kap. 1.3.3.1.**) und die PKC (**Kap. 1.3.3.3.**) sind an Apoptose-Vorgängen beteiligt. Dadurch wird deutlich, dass hier mehrere Signalwege ineinander greifen [7, 24].

1.3.3.3 PL-Signaling

Die Phospholipase C- γ gehört zu einer Familie von Isoenzymen, die aus dem zweifach phosphorylierten Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP₂) zwei second messenger, nämlich Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG), hydrolysieren kann. Sie bindet mit ihrer SH2-Domäne an die phosphorylierten Tyrosine des Rezeptormoleküls und wird dadurch aktiviert.

Nach der Hydrolyse wandert das hydrophile IP₃ zum endoplasmatischen Retikulum (ER) und bewirkt dort die Freisetzung von Ca²⁺ aus seinen Speichern. Dieses bindet an Calmodulin und aktiviert dadurch Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen. Außerdem werden Ca-abhängige Enzyme und Prozesse aktiviert. Das lipophile DAG verbleibt dagegen in der Membran und aktiviert die Proteinkinase C, eine Ser/Thr-Kinase, die in Gegenwart von Ca²⁺ Proteine phosphoryliert und dadurch deren Funktionszustand ändert. Diese Aktivierung fördert Vorgänge der Transkription im Zellkern, wodurch es zu Proliferation, Differenzierung und Wachstum kommt.

Die Aktivierung der Proteinkinase C hat eine duale Funktion im Signaling, da neben der Weitergabe des Signals zur Transkription an den Zellkern auch ein Eingriff in die PI3K/AKT-Signalkaskade erfolgt (**Kap. 1.3.3.2.**) und so die Apoptose beeinflusst wird [7, 25].

1.3.3.4 JAK/STAT-Signaling

Die Bindung von Lymphokinen, aber auch die Bindung von Liganden wie EGF und PDGF an ihre Rezeptoren, führen an der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors zu nicht-kovalenten Interaktionen mit Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen der JAK-Familie. Es kommt zur Aktivierung von JAK (engl.: just another kinase) und dadurch zur Tyrosin-Phosphorylierung der STATs (engl.: signal transduction and activation of transcription). Diese binden mit ihrer SH2-Domäne an andere STAT. Dadurch kommt es zur Homomer- und Heterodimerbildung. Die dimerisierten STAT-Komplexe migrieren in den Zellkern und aktivieren dort die Gen-Transkription [7].

1.4 Onkogene und Proto-Onkogene

Wie bereits im Kapitel 1.3.2 und 1.3.3 beschrieben, nehmen Proteinkinasen, wie die EGFR-Tyrosinkinase, eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Signalvermittlung ein. Das Zusammenspiel von Proteinphosphorylierung durch Proteinkinasen und Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen dient der Regulation vieler wichtiger Zellprozesse. Viele Proteinkinasen stellen Proto-Onkogene dar [26].

Proto-Onkogene sind an der Kontrolle normaler Wachstums- und Differenzierungsprozesse beteiligt, wobei ihre Wirkung durch Tumor-Supressorgene (Anti-Onkogene) kontrolliert wird. Durch Mutation, Deletion oder Überexpression gewinnen die Proto-Onkogene die Eigenschaften von Onkogenen; sie können also Tumore auslösen, wenn gleichzeitig auch die Kontrolle durch die Tumor-Supressor-Gene gestört ist.

Onkogene sind genetische Elemente, die Tumoren auslösen können. Man unterscheidet virale Onkogene, die zuerst in Tumor verursachenden Viren gefunden wurden, und zelluläre Onkogene.

Eine Gemeinsamkeit aller Onkogene ist ihre Codierung für Proteine, die an Signaltransduktionsprozessen, wie z.B. dem EGFR-Signaling (**Kap. 1.3.3**), teilnehmen.

Tatsächlich wurden viele Gene der in Kapitel 1.3.3 beschriebenen Signalproteine, wie RAS, Src, Raf, Fos und Jun, in mutierter Form in Krebszellen oder in Krebs auslösenden Tumoren identifiziert.

Das erbB-Onkogen codiert für eine verstümmelte Form des EGF-Rezeptors mit einer ständig aktiven intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Der transmembranäre und der zytosolische Anteil des Rezeptors kommen in diesem viralen Onkogenprodukt vor, aber fast der gesamte extrazelluläre, Liganden bindende Bereich fehlt. Zellen, die dieses Onkogen ausdrücken,

werden ständig zur Teilung angeregt, da die Tyrosinkinaseaktivität immer angeschaltet bleibt.

Eine ähnliche Auswirkung zeigt die Infektion von Zellen mit einem Virus, welches das für eine aktivierte Form der SRC-Tyrosinkinase kodierende v-src-Onkogen trägt.

Beim ras-Onkogen kann dessen abnormales Genprodukt nicht mehr inaktiviert werden, da das veränderte RAS-Protein kein GTP mehr hydrolysieren kann [22].

Diese und andere Onkogene spielen eine Schlüsselrolle bei hoch aggressiven Tumoren, wie Mamma-, Prostata- und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, und stellen daher Angriffspunkte in der modernen Tumorthherapie dar (**Kap. 1.5**).

1.5 Inhibition des gesteigerten EGFR-Signalings als Behandlungsoption in der Tumorthherapie

Eine gesunde Körperzelle hat rund 40-100 EGF-Rezeptoren, maligne Zellen dagegen können bis zu zwei Millionen EGF-Rezeptoren aufweisen, unter diesen viele Onkogenprodukte (**Kap. 1.4**) [27]. Erhöhte EGFR-Level sind häufig Marker für ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium.

Seine zentrale Funktion macht den EGFR als Target in der Tumorthherapie hoch interessant. Vor über 20 Jahren wurde er als mögliches Ziel für Antitumorthapien entdeckt und definiert.

Viele Strategien zur EGFR-Inhibition wurden erprobt; zwei Ansätze führten inzwischen zu zugelassenen Arzneistoffen.

Zum einen können monoklonale Antikörper wie Cetuximab (Erbix[®]) und Trastuzumab (Herceptin[®]) die extrazelluläre Rezeptordomäne besetzen und damit kompetitiv die natürliche Ligandenbindung und somit eine Signalweiterleitung verhindern. Außerdem wird eine Internalisierung und zum Teil auch Herunterregulation des EGF-Rezeptors ausgelöst [28].

Allerdings können monoklonale Antikörper bei der durch das erbB-Onkogen codierenden verstümmelten Form des EGFR (**Kap. 1.4**) keinen Antitumoreffekt erzielen, da hier ja die extrazelluläre Rezeptordomäne fehlt.

Die Zulassung von Trastuzumab 1998 für die Behandlung von Brustkrebs ist ein Meilenstein auf dem Gebiet der am EGFR ausgerichteten Therapie. Trastuzumab ist ein rekombinanter, humanisierter, monoklonaler Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne von HER2/NEU auf Mammakarzinomzellen gerichtet ist. Heute wird Trastuzumab weltweit in der Brustkrebsbehandlung eingesetzt.

Cetuximab ist ein chimärer, rekombinant humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre EGFR/ErbB1 Domäne und findet seinen Einsatz in der Behandlung des EGFR-überexprimierenden metastasierenden Kolonkarzinoms in Kombination mit Irinotecan [13, 29].

Zur zweiten großen Therapiestrategie gehören kleine, oral applizierbare Moleküle, wie die bereits zugelassenen Arzneistoffe Gefitinib (Iressa®) und Erlotinib (Tarceva®), die sich reversibel in die intrazelluläre ATP-Bindungstasche des Rezeptors einlagern und so selektiv das Enzym blockieren. Dadurch wird die Aktivierung der sonst ausgelösten Signalkaskade verhindert. Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern kommt es bei dieser Substanzklasse zu keiner Herunterregulation des EGF-Rezeptors [28].

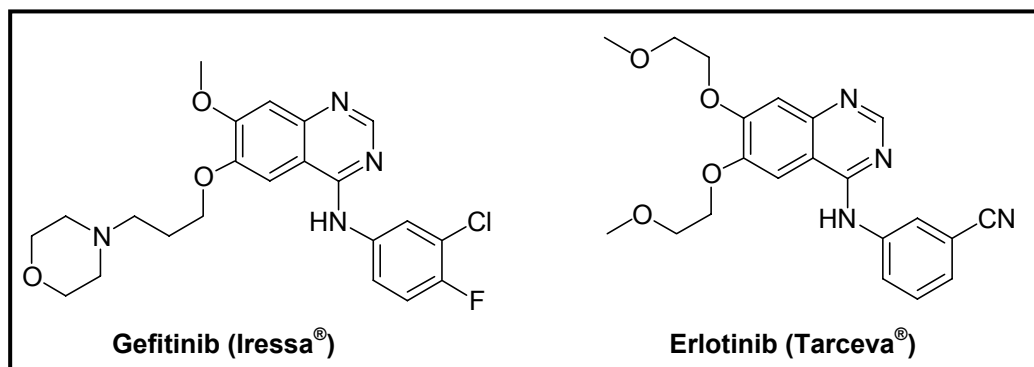


Abb. 5: Die EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib

Gefitinib und Erlotinib sind oral bioverfügbare, EGFR-spezifische 4-Anilinochinazoline, welche mit 100-fach größerer Affinität an die EGFR-Tyrosinkinasedomäne als an andere Kinasen binden. Sie inhibieren reversibel die Autophosphorylierung des Rezeptors durch kompetitive ATP-Blockade an der EGFR-Tyrosinkinase-Domäne.

Gefitinib hemmt die EGFR-Tyrosinkinase *In vitro* mit einer IC_{50} von 33 nmol/L; noch potenter ist Erlotinib mit einer IC_{50} von 2 nmol/L [13, 30].

Gefitinib ist in den USA, Kanada, Japan, Korea und der Schweiz für die Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) in der Drittlinientherapie zugelassen. Gerade vor kurzem haben Studien für Aufsehen gesorgt, die prädiktive Faktoren - das sind Faktoren, die ein Ansprechen auf eine Antitumorthérapie voraussagen - identifizieren, insbesondere Mutationen des EGF-Rezeptors. Demnach kommt es zu einem hohen Ansprechen einer Gefitinib-Therapie bei Patienten mit EGFR-Mutationen (**Kap. 1.4**) [13, 28]. Allerdings hat die amerikanische Zulassungsbehörde FDA die Zulassung von Gefitinib im Juni 2005 praktisch auf Eis gelegt. US-Ärzte dürfen Patienten, die das Medikament bisher erhalten haben, im Rahmen eines „Iressa Access Program“ weiter behandeln. Neue

Patienten dürfen jedoch nur im Zusammenhang mit laufenden oder neuen Zulassungsstudien mit Iressa® behandelt werden. Der Grund dafür ist ein klinisch kaum relevanter, nur statistisch tendenzieller Überlebensvorteil unter Gefitinib-Behandlung, der in der ISEL-Studie („IRESSA Survival Evaluation in Lung cancer“) nachgewiesen wurde. Der Hersteller hat daraufhin seinen Antrag auf Zulassung in der EU zurückgezogen [31].

Der EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib erhielt im Oktober 2005 in Deutschland die Zulassung für die Therapie von Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem, nicht-kleinzelligem, EGFR-positivem Lungenkarzinom, bei denen mindestens eine vorausgegangene Chemotherapie versagt hat [32].

Eine weitere große Errungenschaft auf dem Gebiet der Tyrosinkinase-Inhibitoren ist der Wirkstoff Lapatinib zur Behandlung von ErbB1 (EGFR)- und ErbB2-überexprimierenden Mammakarzinomen. Die Hemmung zweier verschiedener Wachstumsfaktorrezeptoren stellt einen großen Vorteil im Vergleich zu anderen EGFR-Tyrosinkinasehemmern und zu monoklonalen Antikörpern dar. Lapatinib befindet sich in frühen Phase III-Studien und zeigt bereits viel versprechende Ergebnisse. Die Zulassung wird Ende 2006/Anfang 2007 erwartet [33, 34].

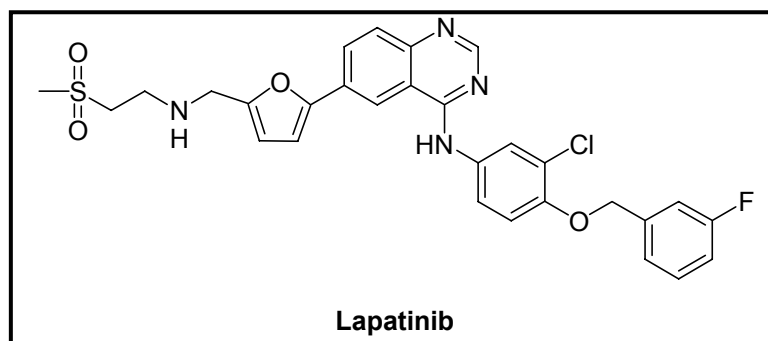
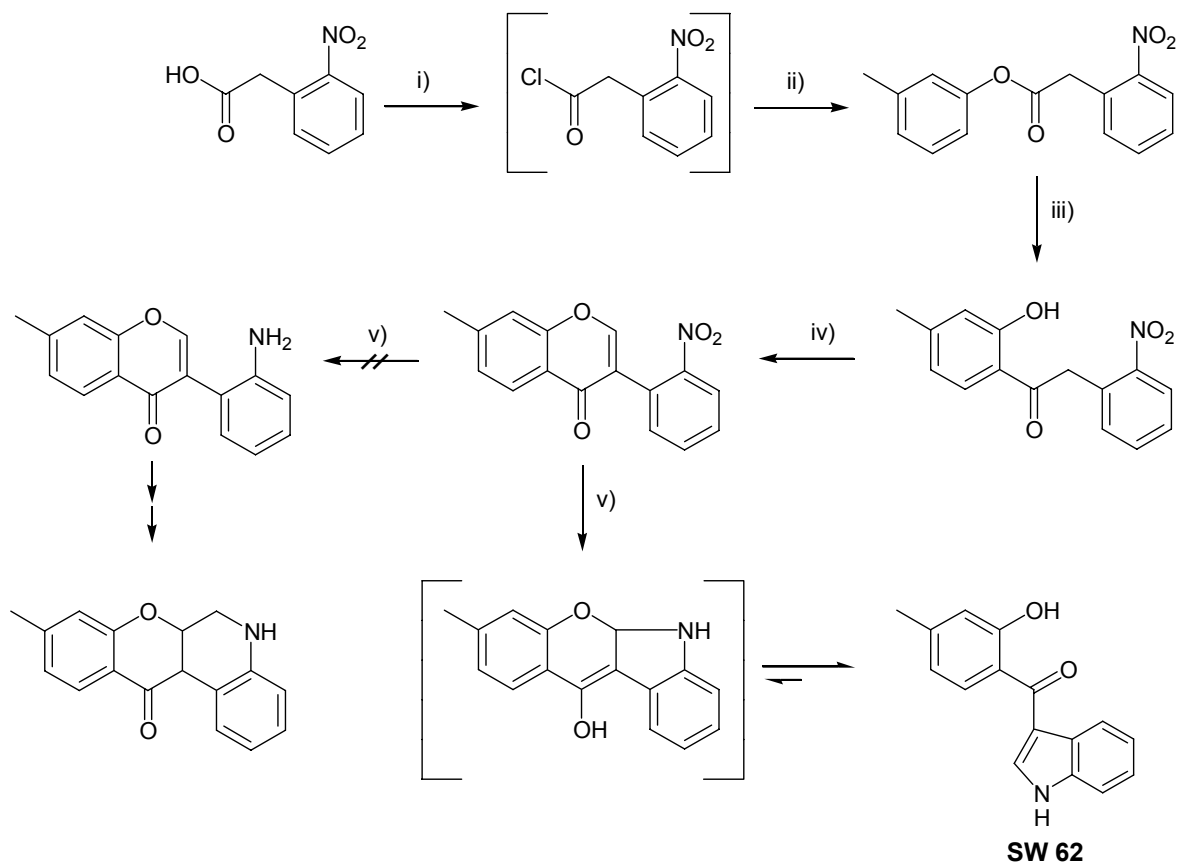


Abb. 6: Der ErbB1- und ErbB2-Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib [34]

1.6 Entwicklung neuer EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit längerer Zeit mit Synthesen neuartiger EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren.

Ausgangspunkt hierfür war die Synthese von Salicyloylindolen aus speziellen Isoflavonen mittels Ringtransformationsreaktionen durch *Witze!* Ende der 90 er Jahre. Dabei wurden beim Versuch, Azarotenoide über Isoflavone als Zwischenprodukte zu erhalten, Salicyloylindole synthetisiert (**Abb. 7**) [35].



i) $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$, CH_2Cl_2 , RT; ii) 3-Methylphenol, NEt_3 , Ether, ΔT ; iii) AlCl_3 , ΔT ; iv) *N,N*-Dimethylformamididimethylacetal, ΔT ; v) Pd/C, Cyclohexen, Ethanol, ΔT

Abb. 7: Herstellung von Salicyloylindolen nach *Witzel* [35]

Die hergestellten Salicyloylindole wurden auf ihre zytotoxischen Eigenschaften an der MCF-7- (engl.: Michigan Cancer Foundation) Zelllinie, einer humanen Mammatumorzelllinie, untersucht (**Abb. 8**). Zum Vergleich wurden die zytotoxischen Effekte von Cisplatin und Tamoxifen als Standardzytostatika zur Behandlung des hormonabhängigen Mammakarzinoms herangezogen. Demnach hat besonders die Verbindung **SW 62** ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften, die mit denen des Cisplatins nahezu vergleichbar sind. Die MCF-7-Zelllinie hat einen hohen Gehalt an Estrogenrezeptoren und wird deshalb als hormonabhängig bezeichnet.

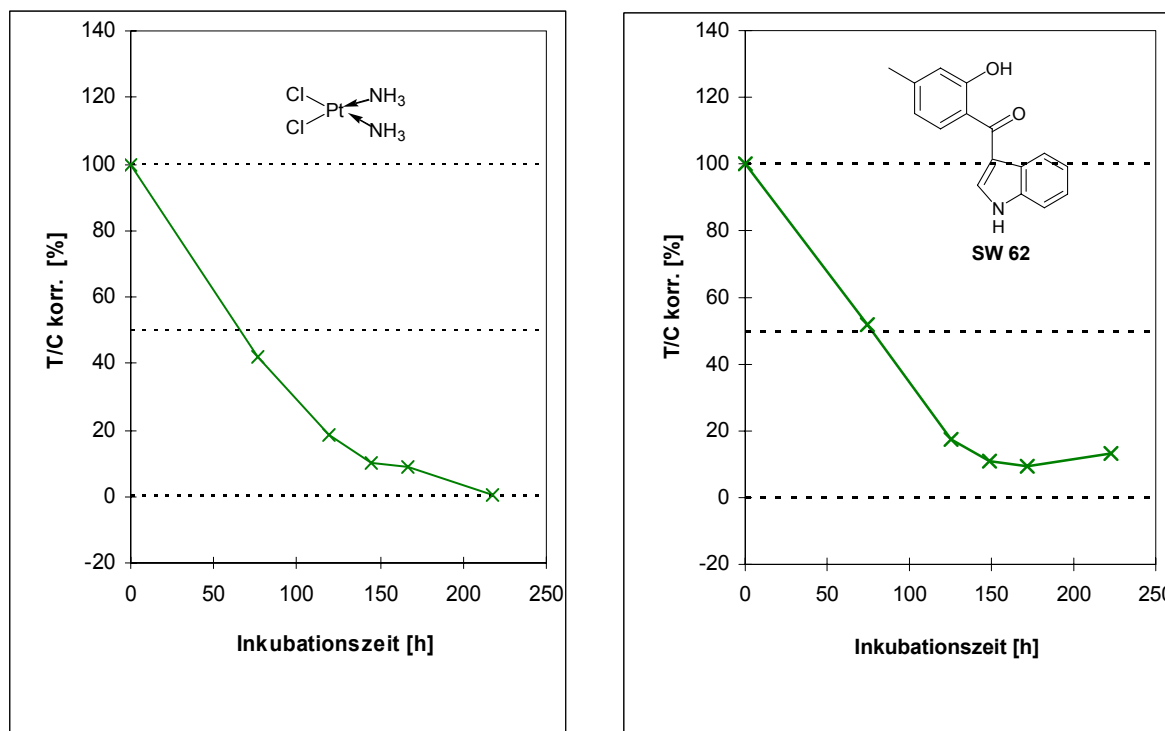


Abb. 8: Effekte des Salicyloylindols **SW 62** und des Cisplatins als Standardzytostatikum (Konzentration jeweils 5 μ M) auf das Wachstum von MCF-7-Zellen

Da die Salicyloylindole über mesomere bzw. tautomere Formulierungen auch Stilben-Teilstrukturen aufweisen, wurde ein Estrogen-Antagonismus wie bei Tamoxifen als Grund für die Zytotoxizität vermutet. Daher wurden Radioligandbindungsstudien der Salicyloylindole **SW 53** und **SW 57** am Estrogenrezeptor- α (ER- α) durchgeführt, bei der die Verdrängung von [3 H]Estradiol vom Estrogenrezeptor bestimmt wird. Die beiden Substanzen zeigten dabei mit 15- bzw. 3-prozentiger Verringerung der Bindung des Radioliganden keine deutlichen Effekte [35]. Daher konnten die tumorwirksamen Eigenschaften nicht mit einem ER- α -Antagonismus erklärt werden. Inwieweit Affinitäten zum ER- β bestehen, wurde nicht untersucht.

Witzel wurde für diese Untersuchungen auf dem Gebiet der Chromanol-, Isoflavon- und Indolderivate 1998 auf dem „18th European Colloquium on Heterocyclic Chemistry“ in Rouen mit einem Poster-Award auf dem Gebiet der biologisch-medizinischen Heterocyclenchemie ausgezeichnet.

Aufgrund der Stilben-Struktur bzw. des Bestehens einer strukturellen Verwandtschaft zu den 2-Aroylindolen könnte die Zytotoxizität der *Witzel*'schen Salicyloylindole allerdings auf eine Inhibition der Tubulin-Polymerisation zurückzuführen sein.

Eine Veröffentlichung von *Traxler et al.* 1999 zeigt eine weitere Möglichkeit auf, die zytotoxischen Effekte der Salicyloylindole durch den Vergleich mit Verbindungen vom Isoflavon-Typ zu erklären [36].

Abb. 9 zeigt das von *Traxler et al.* postulierte Modell für die Bindung von 3'-Chlor-5,7-dihydroxyisoflavin (Verbindung **T1**, gelb) bzw. ATP (rot) an den EGF-Rezeptor.

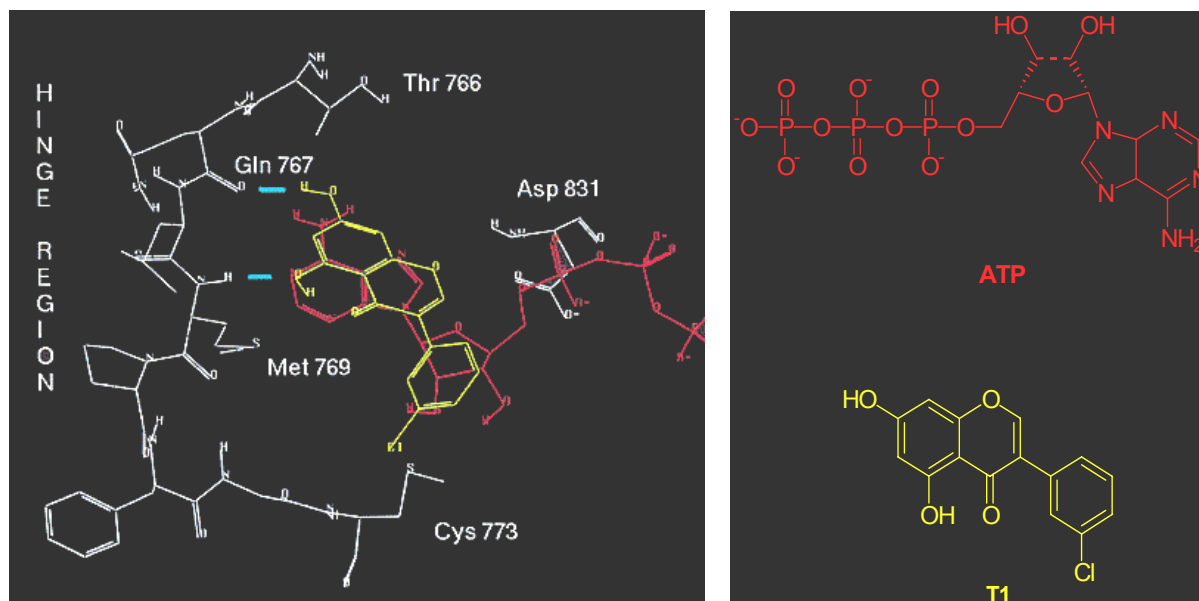


Abb. 9: Postulierte Bindung des Isoflavons **T1** und **ATP** in der ATP- Bindungstasche der EGFR-TK [36]

Im Bindungsmodell für ATP (**Abb. 9**) in der ATP-Bindungstasche nach *Traxler et al.* sind Wasserstoffbrücken zwischen der Aminogruppe des Adenins und dem Amid-Sauerstoff des Glutamins 767 sowie zwischen dem N1 des Adenins und einem Proton der Amino-Gruppe des Methionins 769 erkennbar. Es handelt sich hierbei um ein so genanntes Donor-Akzeptor-System, da das Adenin eine Elektronen-Donor- und eine Elektronen-Akzeptor-Position beinhaltet. Für die Entwicklung potenter Proteinkinase-Inhibitoren ist nach *Traxler et al.* ein Donor-Akzeptor-System wichtig, damit sich die potenziellen Wirkstoffe, vergleichbar mit Adenin, in die Rezeptortasche einpassen können.

Des Weiteren postulieren *Traxler et al.* eine „hydrophobe Tasche“ im Bereich des freien Elektronenpaares am N7 des ATP-Adenins sowie eine „Zuckertasche“, in der der Ribose-Anteil des ATPs gebunden wird.

In Anlehnung an dieses Modell lässt sich auch die Bindung der 5,7-Dihydroxyisoflavone in der ATP-Bindungstasche der EGFR-TK beschreiben, wobei sich Wasserstoffbrücken zwischen dem Sauerstoff der 7-Hydroxygruppe und dem Glutamin 767 sowie zwischen dem Proton der 5-Hydroxygruppe und dem Methionin 769 ausbilden.

Ähnlich wie der Pyrimidinring des Adenins, bilden die 4-Keto-Gruppe und die 5-Hydroxy-Gruppe der 5,7-Dihydroxyisoflavone, vermittelt durch Wasserstoffbrücken, einen Pseudo-6-Ring aus. Allerdings ist es aufgrund dieser intramolekularen Wasserstoffbrücke möglich, dass die Bindungskräfte zum Methionin 769 verringert werden.

Im Bereich der „Zuckertasche“, in der beim ATP die Ribose gebunden wird, liegt der 3-Chlorphenylring. Hier sollen Wechselwirkungen zwischen dem Aromaten und dem Schwefelatom des Cysteins 773 möglich sein.

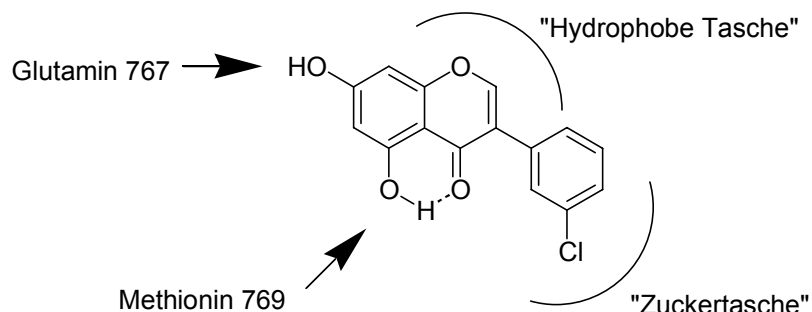


Abb. 10: Schematische Darstellung des EGFR-TK-Bindungsmodells für 5,7-Dihydroxyisoflavone nach Traxler

Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit den 5,7-Dihydroxyisoflavonen könnte man auch für die Verbindung **SW 62** eine gewisse Affinität zur ATP-Bindungstasche der EGFR-TK annehmen (**Abb. 11**).

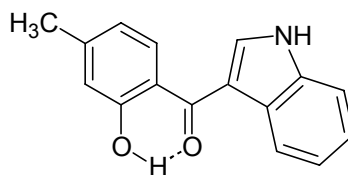


Abb. 11: **SW 62**

Allerdings kann sich auch hier die Wasserstoffbrücke zwischen der Keto- und der Hydroxygruppe störend auf die Bindung zur EGFR-TK-Domäne auswirken. Außerdem fehlt die Donatorposition der 7-Hydroxygruppe und damit die Möglichkeit zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke an dieser Position zum Amid-Sauerstoff des Glutamins 767.

Bei der *In-vitro*-Testung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität zeigt **SW 62** bei einer Konzentration von 10 μM nur eine schwache inhibitorische Aktivität von 18 %. Die starken zytotoxischen Eigenschaften der Substanz lassen sich also auch mit diesem Test nicht zufrieden stellend erklären.

Da **SW 62** trotzdem eine gewisse Affinität zur ATP-Bindungstasche der Kinase hat, versuchte *Albuschat* diese Affinität und damit den kompetitiven ATP-Antagonismus durch Variationen des Moleküls zu erhöhen [37].

Zunächst wurde die 4'-Methylgruppe von **SW 62** durch eine Hydroxygruppe ersetzt (**WS 11**). Dadurch ist es möglich, dass die beiden Wasserstoffbrücken, die vom Glutamin 767 und Methionin 769 der ATP-Bindungstasche ausgehen, zu den beiden Hydroxygruppen ausgebildet werden. Das Indolgerüst würde dadurch in die Nähe der Zuckertasche gelangen. Hier soll laut *Traxler et al.* eine Interaktion zwischen dem Schwefelatom des Cysteins 773 und aromatischen Strukturen möglich sein.

Bei der Verbindung **RA 19** wurde die 4'-Methylgruppe von **SW 62** gegen eine Methoxygruppe ausgetauscht. Eine Methoxygruppe könnte lediglich über ihr Sauerstoffatom als Wasserstoffbrücken-Akzeptor fungieren.

Die Ergebnisse der Testung auf EGFR-inhibitorische Aktivität belegen aber, dass in dieser Position ein Wasserstoffbrückendonator nötig ist (**Tabelle 1**).

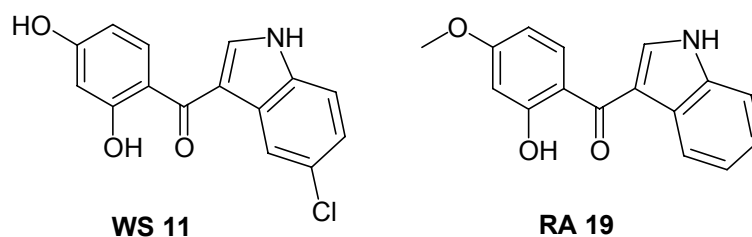


Abb. 12: Ausgewählte, auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestete Salicyloylindole

Verbindung	WS 11	RA 19
EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in % (c=10 µM)	59	11

Tabelle 1: EGFR-inhibitorische Aktivität ausgewählter Salicyloylindole

Das 4'-Hydroxysalicyloylindol **WS 11** zeigt bei einer Konzentration von 10 µM moderate EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten. Dagegen kann das 4'-Methoxysalicyloylindol **RA 19** in dieser Konzentration als unwirksam eingestuft werden.

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse hinsichtlich der EGFR-TK-Inhibition der Salicyloylindole, versuchte *Albuschat* durch Variation der Grundstruktur des Salicyloylteils des Moleküls die EGFR-inhibitorische Aktivität zu steigern.

Nach *Traxler* ist der durch die Wasserstoffbrücke zwischen der Carbonyl- und der Hydroxygruppe der Salicylsäure ausgebildete Pseudo-6-Ring bioisoster zum Pyrimidinring [38]. Daher kann die Salicylsäure als ein Bioisoster des 4-Aminochinazolins aufgefasst werden.

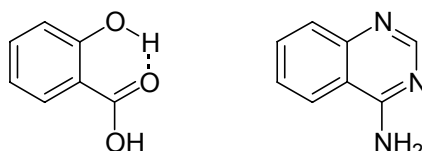
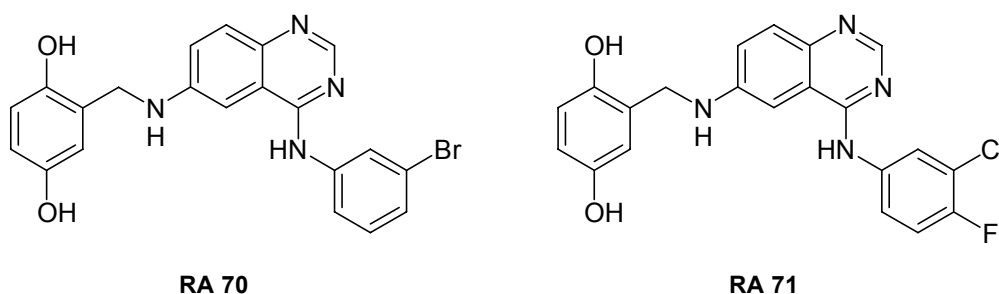


Abb. 13: Salicylsäure und 4-Aminochinazolin

Aufgrund dieser Tatsache tauschte *Albuschat* die Salicyloyl-Teilstruktur der Salicyloylindole gegen eine 4-Anilinochinazolin-Grundstruktur aus [37].

Bereits Anfang der 90er Jahre wurde die potente EGFR-TK-inhibitorische Wirkung von Verbindungen mit 4-Anilinochinazolin-Grundstrukturen entdeckt [39, 40]. Seitdem wurde versucht, die Struktur-Wirkungs-Beziehungen und den Wirkungsmechanismus dieser Substanzklasse aufzuklären. Es gilt als bewiesen, dass die 4-Anilinochinazoline den kompetitiven ATP-Antagonisten zuzuordnen sind [39].

Beispiele für bereits zugelassene Verbindungen vom 4-Anilinochinazolin-Typ sind die im Kapitel 1.5 beschriebenen Substanzen Gefitinib (Iressa[®], Astra Zeneca) und Erlotinib (Tarceva[®], OSI Pharmaceuticals, Genentech und Hoffmann-La Roche AG). Sie hemmen im nanomolaren Bereich die EGFR-TK selektiv und reversibel. Daher erhoffte sich *Albuschat* durch Austausch der Salicyloyl-Teilstruktur gegen die 4-Anilinochinazolin-Grundstruktur eine weitere Steigerung der inhibitorischen Aktivität. Bei der Testung dieser Verbindungen (**Abb. 14**) kam es tatsächlich zu einer stärkeren EGFR-TK-Inhibition (**Tabelle 2**). Selbst bei einer Konzentration von 0,1 μM wurden sehr gute Ergebnisse erzielt.



RA 70

RA 71

Abb. 14: Die 4-Anilinochinazoline **RA 70** und **RA 71**

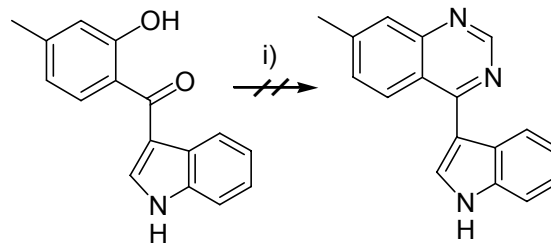
Verbindung	RA 70		RA 71	
	Konzentration in μM		Konzentration in μM	
Konzentration in μM	1	0,1	1	0,1
EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in %	65	45	71	22

Tabelle 2: EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der getesteten 4-Anilinochinazolin-Derivate **RA 70** und **RA 71**

Außerdem wurden diese Substanzen auf ihre Zytotoxizität an der MCF-7-Brustkrebszelllinie getestet. Hierbei wurden nur schwach ausgeprägte zytotoxische Effekte festgestellt. Im Vergleich dazu wurde für das 4-Anilinochinazolin Gefitinib eine signifikante zytotoxische Wirkung auf MCF-7-Zellen nachgewiesen [41].

2 Problemstellung

Wie *Albuschat* gezeigt hat, wirkt sich die bioisostere Umwandlung von Salicyloyl-Teilstrukturen in Chinazolingrundkörper sehr positiv auf die EGFR-TK-inhibierenden Aktivitäten aus. Deshalb wurde versucht, die von *Witzel* und *Albuschat* synthetisierten Salicyloylindole in die bioisosteren 4-(Indol-3-yl)-chinazoline umzuwandeln (**Abb. 15**).



i) Formamidinacetat, 2-Methoxyethanol, ΔT

Abb. 15: Angedachte Reaktion zur Herstellung von 4-(Indol-3-yl)chinazolinen

Die in der Abbildung 15 dargestellte Reaktion zeigt den Weg zu den 4-(Indol-3-yl)-chinazolinen auf. Allerdings konnte trotz Variation von Edukten und Reaktionsbedingungen der Ringschluss zum Chinazolin nicht direkt vollzogen werden. Deshalb sollte versucht werden, auf anderen Wegen zur Substanzklasse der 4-(Indol-3-yl)-chinazoline zu gelangen.

Das Ziel dieses Austausches des Salicyloyl-Teils durch eine Chinazolin-Grundstruktur ist die Umwandlung der phenolischen Donor-Hydroxygruppe der Salicyloylindole in einen Akzeptor-Stickstoff in Position 1 des Chinazolins. Eine Überarbeitung der bisherigen Bindungsmodelle von *Traxler et al.*, *Palmer et al.* und *Wissner et al.* durch *Hou et al.* im Jahr 2003 mithilfe modernster molekular-dynamischer (MD) Technik hat nämlich gezeigt, dass es, wie in Abbildung 16 deutlich wird, zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem N1 des Chinazolins als Akzeptor und der NH-Gruppe von Methionin 769 sowie zu einer Wasserstoffbrücke zwischen dem N3 des Chinazolins als Elektronen-Akzeptor und einem Wassermolekül als Elektronen-Donor kommt. Ausgehend von diesem Wassermolekül wird wiederum eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxygruppe des Threonins 766 gebildet [42].

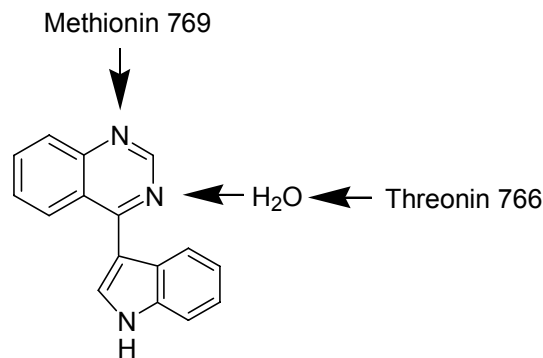


Abb. 16: 4-(Indol-3-yl)-chinazoline und ihre Rezeptorbindungsstellen nach *Hou et al.*

Nach eingehendem Literaturstudium wurde festgestellt, dass in einer Patentschrift der Firma Rhone-Poulenc-Rorer drei solcher angestrebten 4-(Indol-3-yl)-chinazolin-Verbindungen beschrieben sind (**Abb. 17**) [43].

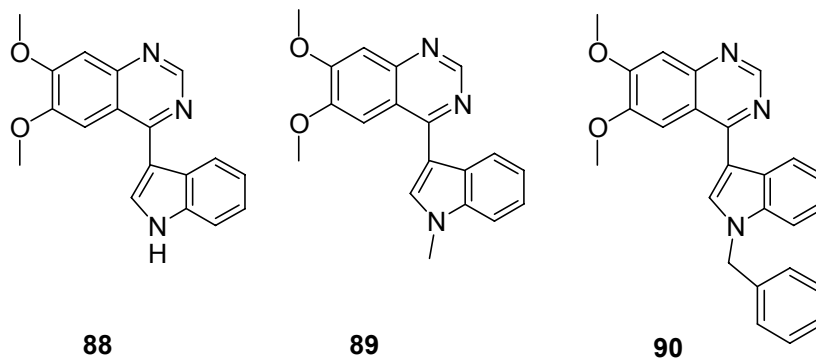


Abb. 17: Die in der Patentschrift von Rhone-Poulenc-Rorer beschriebenen 4-(Indol-3-yl)-chinazoline **88 - 90**

Die Strukturen **88 - 90** wurden hinsichtlich ihrer Inhibition der HER2-TK untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Eine Überprüfung der EGFR-TK inhibitorischen Aktivität dieser Substanzen fand nicht statt.

Verbindung	88	89	90
HER2-TK-inhibitorische Aktivität	10% bei 5 μ M	20% bei 5 μ M	0,5 - 1 μ M

Tabelle 3: HER2-TK inhibitorische Aktivität der Verbindungen **88 - 90** [43]

Diese Ergebnisse wurden in einem Übersichtsartikel von A. Bridges wie folgt kommentiert: „Compound 90 represents a more fundamental change in the pharmacophore and claims moderate ErbB-2-activity with little or no EGFR activity“ [44].

Hier wird also von einer schlechten bis gar keiner EGFR-TK inhibitorischen Aktivität ausgegangen.

Allerdings ist bei diesen Verbindungen zu bemerken, dass zwei Strukturparameter, die für eine Wirksamkeit essenziell zu sein scheinen, fehlen:

- ein unsubstituiertes Indol-NH bei den Verbindungen **89** und **90**, da dieser Stickstoff möglicherweise eine Bindungsstelle zum EGFR darstellt,
- Substituenten am Benzen-Ring des Indols, vorzugsweise Halogene wie F, Cl, Br bzw. niedriges Alkyl, die bei vergleichbaren Anilinochinazolinen für die Wirksamkeit essenziell sind [42, 44].

Deshalb sollen im Rahmen dieser Arbeit 4-(Indol-3-yl)-chinazoline synthetisiert werden, bei denen

1. das Indol-NH als Bindungsstelle zum EGFR unsubstituiert bleibt,
2. der Indol-Benzen-Ring gezielt Halogen- bzw. Alkyl-substituiert ist und
3. die pharmakokinetischen Eigenschaften durch Variationen der Substituenten in den Positionen 6 bzw. 7 des Chinazolins und in den Positionen 5, 6 und 7 des Indols verbessert werden sollen.