

3 Chemisch-Pharmakologischer Teil

3.1 Syntheseverfahren für 4-(Indol-3-yl)chinazoline

Da eine Umsetzung von 3-(2-Hydroxybenzoyl)indolen mit Formamidinacetat zu 4-(Indol-3-yl)chinazolinen auf direktem Weg nicht möglich ist, soll versucht werden, die 4-(Indol-3-yl)chinazoline mit den im Kapitel 2 beschriebenen Substanzmerkmalen aus ihren beiden Teilstrukturen, dem Chinazolin- und dem Indol-Grundgerüst, zu synthetisieren. Dafür soll zunächst eine Verbindung hergestellt werden, die als Modellsubstanz zur Überprüfung geeigneter Hetarylierungsverfahren dient. Zu diesem Zweck wurde das bisher unbekannte, unsubstituierte 4-(Indol-3-yl)chinazolin (**2**) ausgewählt (**Abb. 18**).

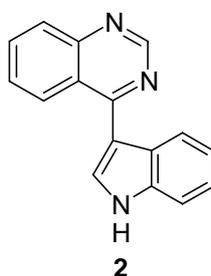


Abb. 18: Die Modellverbindung **2**

Zur Verknüpfung zweier Aryl-Grundgerüste stehen mehrere Aryl-Kopplungsreaktionen zur Auswahl, von denen einige in **Tabelle 4** kurz vorgestellt werden. Diese laufen allerdings nur mit mäßigen bis schlechten Ausbeuten ab [45].

Wurtz-Fittig-Synthese	$\text{Ar-Hal} \xrightarrow{\text{Na}} \text{Ar-Na} \xrightarrow{\text{Ar}'\text{-Hal}} \text{Ar-Ar}'$
Ullmann-Reaktion	$2 \text{ Ar-I} \xrightarrow{\text{Cu}} \text{Ar-Cu} \xrightarrow{\text{Ar}'\text{-I}} \text{Ar-Ar}'$
Suzuki-Kopplung	$\text{Ar-Br} + \text{Ar}'\text{-B(OH)}_2 \xrightarrow{\text{Pd}} \text{Ar-Ar}'$
Gomberg-Bachmann-Reaktion	$\text{Ar-H} + \text{Ar}'\text{-N}\equiv\text{N} \xrightarrow{\text{OH}^-} \text{Ar-Ar}'$

Tabelle 4: Ausgewählte Aryl-Kopplungsverfahren

3.1.1 Angedachte Hetarylierung unter Verwendung zinnorganischer Verbindungen

Für die Herstellung der Verbindung **2** stand deshalb zunächst ein Verfahren zur Diskussion, das zinnorganische Verbindungen verwendet und in mehreren Patentschriften erwähnt wird [46-48].

Bei dieser Hetarylierungsmethode kann entweder der Chinazolinteil (**Abb. 19**) oder der Indolteil (**Abb. 20**) nach vorheriger Halogenierung mit Chlor oder Iod metalliert und im Anschluss daran mit dem entsprechenden halogenierten Indol bzw. Chinazolin verknüpft werden [49, 50].

Bei der in Abbildung 19 dargestellten Methode lassen sich die Schritte **1.)** und **2.)** ohne Probleme nachvollziehen. Allerdings ist im Anschluss daran eine Hetarylierung in Position 3 des Indols, wie in **3.)** dargestellt, selektiv nicht möglich, da das bereits vorhandene Halogenmuster des Indol-Grundgerüsts möglicherweise auch Hetarylierungen an anderen Positionen des Indols zulässt. Infolgedessen würden Mono- und Bis-Substitutionen mit Zinnalkylen das für die Wirksamkeit dieser Verbindungen essentielle Halogenmuster nicht mehr garantieren.

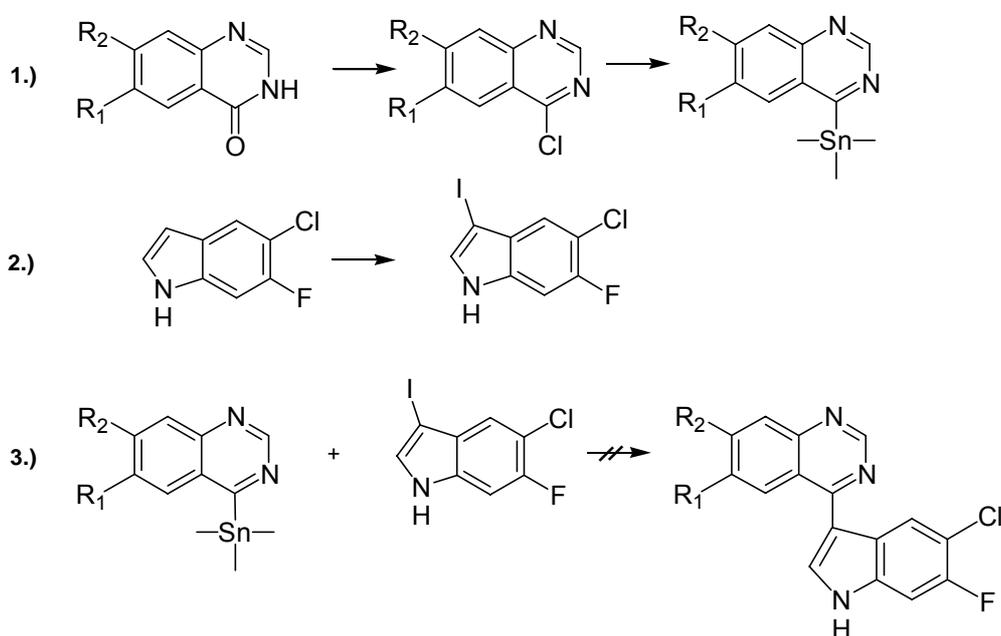


Abb. 19: Hetarylierungsverfahren zur Herstellung halogensubstituierter 4-(Indol-3-yl)chinazoline mit einem metallierten Chinazolin nach Myers et al. [49, 50]

Im Gegensatz dazu soll bei der Methode, die in Abbildung 20 beschrieben wird, das halogensubstituierte Indol nach vorgehender Iodierung bzw. Chlorierung in Position 3 zinnorganisch metalliert werden, um im Anschluss daran mit dem 4-Chlorchinazolin zum 4-(Indol-3-yl)chinazolin umgesetzt zu werden.

Auch hier stellt sich das Problem, dass die zinnorganische Verbindung das halogenierte Indol nicht selektiv in Position 3 metalliert und, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, dadurch das übrige Halogenmuster der Indol-Teilstruktur nicht zu erhalten wäre.

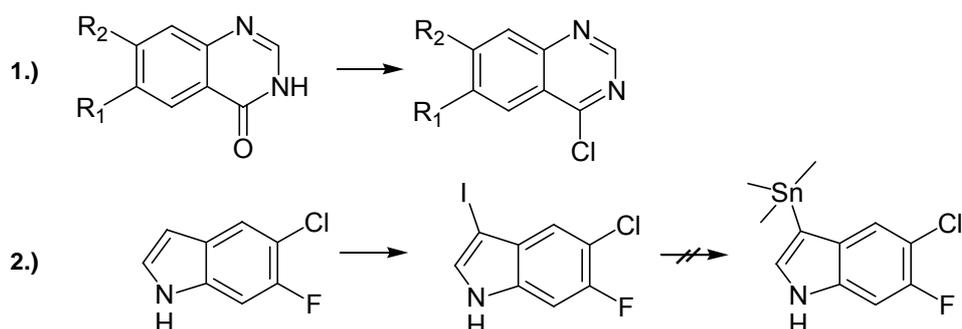


Abb. 20: Hetarylierungsverfahren zur Herstellung halogensubstituierter 4-(Indol-3-yl)chinazoline mit einem metallierten Indol nach Myers et al. [49, 50]

Daher wurde von diesen Methoden zur Herstellung halogensubstituierter 4-(Indol-3-yl)chinazoline (**Abb. 19** und **20**) Abstand genommen, und es wurden andere Syntheseverfahren in Betracht gezogen (**Kap. 3.1.2**).

3.1.2 Versuch zur Herstellung der Modellsubstanz 2 unter Einsatz von Grignard-Verbindungen

Da die im Kapitel 3.1.1 beschriebenen Methoden, über zinnorganische Verbindungen zu den halogensubstituierten 4-(Indol-3-yl)chinazolinen zu gelangen, theoretisch fragwürdig waren, wurden zunächst andere Indol-Metallierungen auf ihre Eignung für eine Hetarylierungssynthese mit Chinazolinen überprüft.

Dabei boten sich Indol-Metallierungsverfahren z. B. mit Lithium-, Natrium-, Kalium-, Silber- und Magnesiumverbindungen an, bei denen das Indol-NH salzartig verändert wird, wodurch ein partial anionischer Charakter im Indolkern induziert und die Elektronendichte an C3 erhöht wird [51].

Indolyl-Metall-Verbindungen weisen allerdings unterschiedliche Bindungseigenschaften auf. Ob die Stickstoff-Metall-Bindung ionisch oder polar-kovalent vorliegt, hängt im Wesentlichen von der Ladung des verwendeten Metalls und der Struktur der organischen Verbindung, aber auch vom verwendeten Lösungsmittel ab.

Während bei den Alkalimetallsalzen, die geringere Elektronegativitäten aufweisen, eher ein ionischer Charakter zum Tragen kommt und sie dadurch schwer löslich in organischen Lösungsmitteln sind, werden Indolyl-Magnesium-Verbindungen in Diethylether durch eine kovalente Bindung beschrieben.

Allerdings hat das Lösungsmittel auf diese Bindung einen erheblichen Einfluss. Beispielsweise bekommt die Indolyl-Magnesium-Verbindung in Tetrahydrofuran, einer stärkeren Base als Ether, einen ähnlich ionischen Charakter wie die entsprechenden Alkalimetallsalze [52, 53].

10 Jahre nach der Entdeckung von Alkylmagnesiumhaliden durch *Grignard*, der dafür und insbesondere für das Studium der Reaktion zwischen Organomagnesium-Verbindungen und Carbonylverbindungen im Jahr 1912 den Nobelpreis für Chemie erhielt, beobachtete *Oddo* die Reaktion von Indol mit Ethylmagnesiumiodid in Diethylether zum Indol-1-ylmagnesiumiodid unter Bildung von Ethan. Von dieser metallierten Indol-Verbindung ist bekannt, dass sie mit vielen Alkylierungs- und Arylierungsreagentien sowie halogenierten Heterocyclen zu 3-substituierten Indolen mit exzellenten Ausbeuten reagiert [51].

Aus diesem Grund soll die Synthese substituierter 4-(Indol-3-yl)-chinazoline über die Hetarylierung von Indolyl-Magnesium-Verbindungen in 3-Position versucht werden.

Die verwendeten Grignard-Verbindungen der Struktur $R-Mg-X$ werden durch Umsetzung von Alkyl- oder Arylhalogeniden mit metallischem Magnesium hergestellt. Dafür überschichtet man die Magnesiumspäne mit einem Ether und tropft anschließend das Alkylhalogenid dazu. Infolgedessen geht das Metall unter Wärmeentwicklung in Lösung. Die Triebkraft dieser Reaktion ist das Bestreben des Metalls, eine ionische Bindung einzugehen. Man nimmt an, dass die Einschlebung des Magnesiums in die R-X-Bindung des Alkylhalogenids radikalisch verläuft.

Die Reaktion wird gewöhnlich in wasserfreiem Diethylether und höheren Ethern, z. B. Dibutylether und Amylether, außerdem in Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan, Anisol, Ligroin, Benzen und Xylen durchgeführt.

In Lösung befindet sich die Grignard-Verbindung im Gleichgewicht mit Dialkylmagnesium und Magnesiumhalogenid (Schlenk-Gleichgewicht), ferner mit einem Dimer, bei dem es sich um eine Elektronenmangelverbindung handelt (**Abb. 21**).

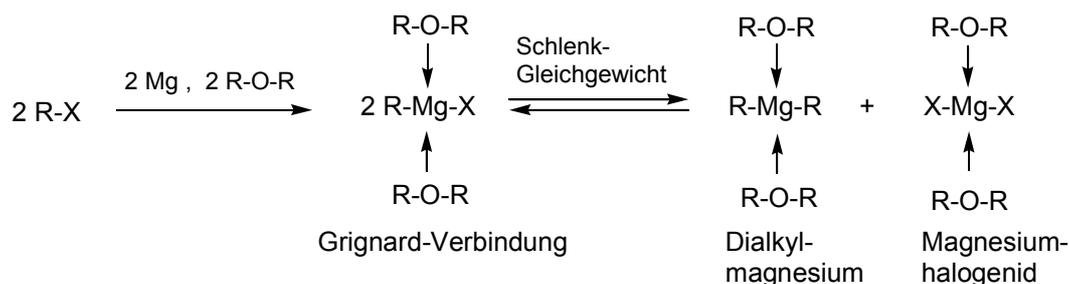


Abb. 21: Darstellung der Grignard-Verbindung und des Schlenk-Gleichgewichtes [53]

Alle Verbindungen sind zudem mit Ether komplexiert, wofür eine Lewis-Säure/Lewis-Base-Reaktion verantwortlich ist. Durch diese erlangt Magnesium eine Oktett-Konfiguration, durch die die Stabilität der Grignard-Verbindung erhöht wird.

Bei Verwendung anderer Lösungsmittel als Diethylether kann sich das Schlenk-Gleichgewicht zur Seite der Nebenprodukte hin verlagern. Dadurch nimmt die Ausbeute an Grignard-Verbindung erheblich ab. Der gleiche Effekt tritt auf, wenn ohne Eiskühlung gearbeitet wird. Der Diethylether ist somit Lösungsmittel und Ligand.

Außerdem ist das verwendete Lösungsmittel eine wichtige Voraussetzung dafür, ob am N1 oder C3 des Indols alkyliert bzw. aryliert wird. Während in Hexamethylphosphortriamid hauptsächlich das N-substituierte Produkt entsteht, dominiert in Diethylether, Tetrahydrofuran und Acetonitril die an C3 substituierte Verbindung. Zudem begünstigen Indolyl-Magnesium-Verbindungen eine C3-Alkylierung, was einen weiteren Vorteil gegenüber den entsprechenden, hauptsächlich N-alkylierenden Alkalimetall-salzen darstellt.

Substanzen wie Wasser, Alkohole, Amine, Alkine und andere C-H-acide Verbindungen zersetzen Grignard-Verbindungen unter Bildung von Kohlenwasserstoffen [51-54].

Die Kohlenstoff-Magnesium-Bindung ist erwartungsgemäß stark polarisiert, wobei der Kohlenstoff die negative Teilladung trägt.

Der partial anionische Charakter der Indolyl-Magnesium-Verbindung ist in **Abb. 22** vereinfacht dargestellt. Hier wird erkennbar, dass die Elektronendichte an C3 im Vergleich zum nicht-metallierten Indol steigt, wodurch eine elektrophile Substitution an dieser Position erst möglich wird.

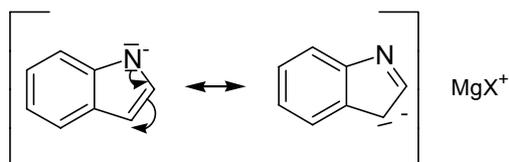


Abb. 22: Vereinfachte Darstellung des partial anionischen Charakters der Indolyl-Magnesium-Verbindung [55]

Die auf diese Weise metallierten Indole sollten sich daher als Nucleophile im Rahmen von Hetarylierungsverfahren eignen [55].

Deshalb wird versucht, das unsubstituierte 4-(Indol-3-yl)chinazolin (**2**) unter Verwendung von Grignard-Reagenz aus käuflich erworbenem Indol und 4-Chlorchinazolin herzustellen.

Zunächst wird 4-Hydroxychinazolin in das entsprechende Elektrophil 4-Chlorchinazolin (**1**) überführt. Dadurch wird die Position 4 des Chinazolins defizitär und zusätzlich mit einer guten Abgangsgruppe versehen (**Abb. 23**).

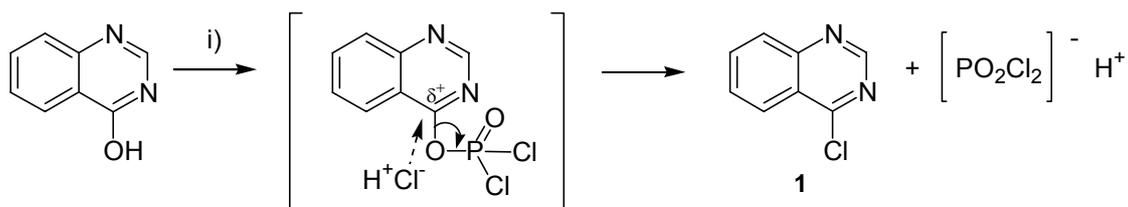
Zu diesem Zweck wird das 4-Hydroxychinazolin mit Thionylchlorid in Dimethylformamid erhitzt. Nach dem Vertreiben des Lösungsmittels wird ein Feststoff erhalten, der einer protonenresonanzspektroskopischen und massenspektrometrischen Untersuchung zugeführt wird. Dabei stellt sich heraus, dass keine Umsetzung zur Verbindung **1** stattgefunden hat.

Daher wird in der Literatur nach anderen Chlorierungsverfahren gesucht und eine Methode gefunden, die Phosphorylchlorid und Phosphorpentachlorid verwendet [56].

Das 4-Hydroxychinazolin wird dazu mit Phosphorylchlorid und Phosphorpentachlorid unter Rückfluss erhitzt. Nach vorsichtigem Vertreiben des Lösungsmittels wird hier tatsächlich das gewünschte Produkt **1** isoliert.

Die Umsetzung mit Phosphorylchlorid erfolgt nach einem $S_{\text{N}}1$ -Mechanismus, bei dem sich ein Esterintermediat als Zwischenstufe bildet. Dadurch wird das C4 des Chinazolins defizitär und kann von dem frei werdenden Chlorid-Ion nucleophil angegriffen werden (**Abb. 23**)

Die entstehende Verbindung **1** ist instabil und wird sofort als Cross-coupling-Komponente weiter umgesetzt.

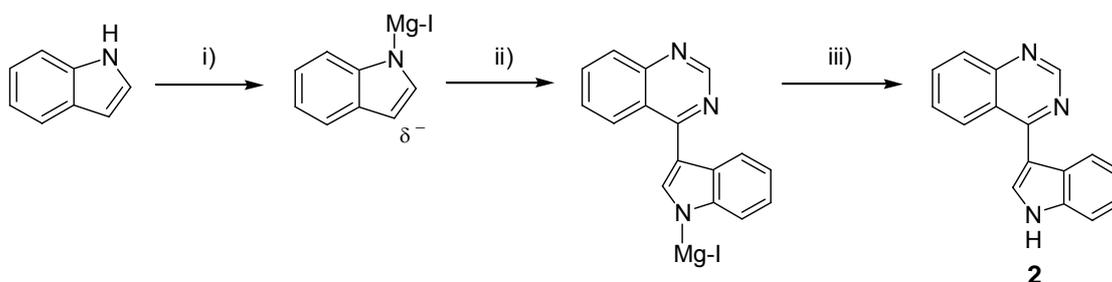


i) Phosphorylchlorid, Phosphorpentachlorid, ΔT

Abb. 23: Herstellung der Verbindung **1**

Im Rahmen des Hetarylierungsverfahrens wird Methylmagnesiumiodid als Grignard-Reagenz gewählt, das aus metallischen Magnesium und Methyljodid in Diethylether zugänglich ist. Bei dieser Reaktion aktiviert zugesetztes Iod die Magnesiumoberfläche und bildet Magnesiumiodid, das letzte Spuren von Wasser bindet [57].

Nach der Zugabe von käuflich erworbenem und in Diethylether gelöstem Indol bildet sich Indol-1-ylmagnesiumiodid. Dieses würde ab einer Konzentration von 0,2 M in Diethylether nicht mehr löslich sein und eine viskose Masse am Boden des Reaktionsgefäßes bilden. Allerdings wird eine solche Konzentration hier nicht erreicht, sodass nur eine leicht trübe Lösung auftritt [51]. Nach der Zugabe des in Diethylether kaum löslichen Elektrophils 4-Chlorchinazolin **1** als Feststoff entsteht ein Bodensatz, der sich durch nachfolgendes Erhitzen unter Rückfluss zu einer klebrigen Masse verfestigt. Im Anschluss daran wird diese Mischung mit Eiswasser hydrolysiert (**Abb. 24**).



i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) 4-Chlorchinazolin (**1**), ΔT ; iii) Wasser, RT

Abb. 24: Herstellung von Verbindung **2**

Nach der Extraktion des Hydrolyseproduktes mit Ethylacetat ist bei der dünnschichtchromatographischen Detektion eine bei einer Wellenlänge von 254 und 366 nm stark hellblau fluoreszierende Substanz auffällig, die durch säulenchromatographische Aufreinigung mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat/Ethanol (9:1) von den noch vorhandenen Edukten abgetrennt und anschließend mittels einer Diffusionsumkristallisation aus Ethylacetat/n-Hexan gereinigt wird.

Die daraus entstehenden gelben Kristalle werden danach einer EI-massenspektrometrischen Untersuchung zugeführt, bei der die molare Masse der Wunschverbindung **2** durch einen Molpeak bei m/z 245 bestätigt wurde.

Ein ^1H -Kernresonanz-Spektrum bestätigt die Struktur der entstandenen Verbindung **2** (**Abb. 25**). Es zeigt ein mit D_2O austauschbares Signal bei 12,16 ppm, das dem Indol-NH zuzuordnen ist. Auch die übrigen Signale im Aromatenbereich (ca. 7-9,5 ppm) passen eindeutig auf das Aromatenmuster der Verbindung **2**. Auffällig ist die starke Tieffeldverschiebung des Protons am C2 des Chinazolins bei 9,34 ppm. Diese Entschirmung dürfte durch die beiden elektronegativeren Stickstoffatome in der Nachbarschaft zum C2 hervorgerufen werden.

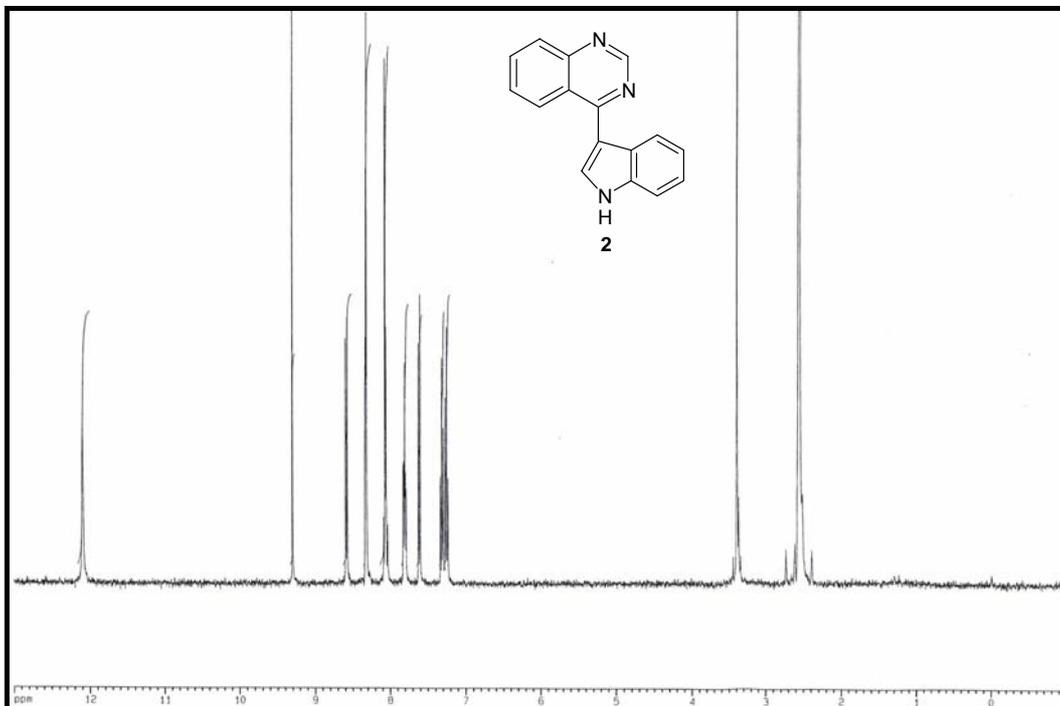


Abb. 25: ^1H -NMR-Spektrum der Modellsubstanz **2**

Des Weiteren wird ein Infrarotspektrum aufgenommen, mit dem die stark verbreiterte NH-Valenzschwingung des Indols bei 3200 cm^{-1} nachgewiesen wird (**Abb. 26**).

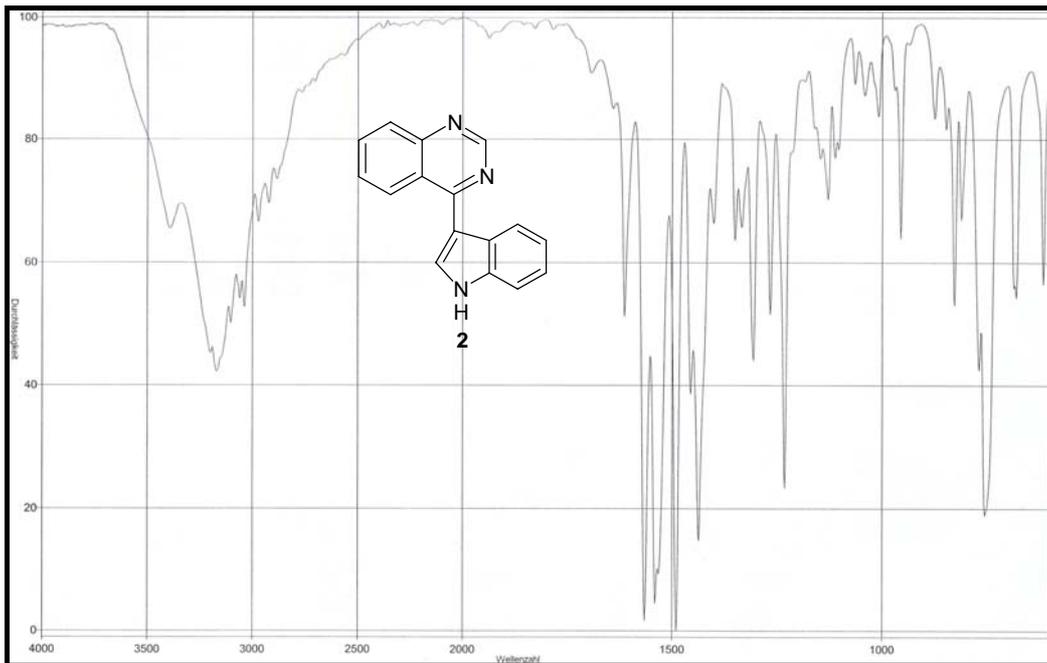


Abb. 26: IR-Spektrum der Verbindung **2**

Durch diese Befunde kann die Struktur der Wunschverbindung **2** eindeutig bestätigt werden. Damit zeigt sich, dass sich in diesem Fall das Hetarylierungsverfahren unter Einsatz von Grignard-Verbindungen bewährt hat.

Dieses Verfahren soll jetzt auf die Herstellung von 4-(5-Bromindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**5**) ausgedehnt werden (**Abb. 27**).

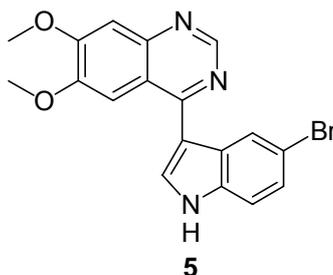


Abb. 27: 4-(5-Bromindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**5**)

Gleichzeitig soll damit überprüft werden, ob diese Methode auch für die Synthese von am Indol-Grundgerüst halogensubstituierten 4-(Indol-3-yl)-chinazolinen geeignet ist.

3.2 Herstellung von 4-(Indol-3-yl)chinazolinen durch Hetarylierung von 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (4) mit verschiedenen, vorrangig halogen-substituierten Indolgrundkörpern

Zunächst soll überprüft werden, ob Halogene am Benzenring des Indols, die bei vergleichbaren Anilinochinazolinen für die Wirksamkeit essenziell sind, während der Grignard-Reaktion unbeeinflusst bleiben [42, 44].

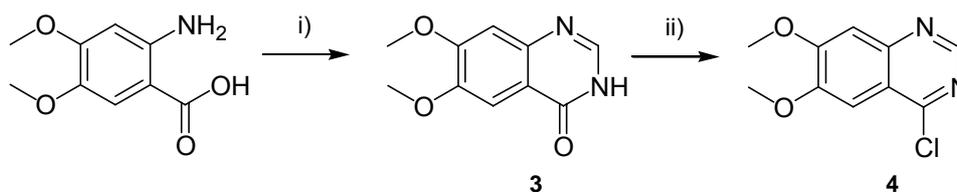
Außerdem wird der Chinazolinenteil mit einer pharmakokinetisch günstigen 6,7-Dimethoxy-Substitution versehen.

3.2.1 4-(5-Bromindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (5)

Zur Synthese des 4-(5-Bromindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolins (5) (**Abb. 27**) wird käuflich erworbenes 5-Bromindol als halogener Indolbaustein eingesetzt. Die 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin-Teilstruktur (4) wird bevorzugt in Anlehnung an eine Patentvorschrift der Zeneca LTD hergestellt [58].

3.2.1.1 Herstellung der Hetarylierungskomponente 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (4)

Zunächst wird versucht, über den nachfolgend gezeigten Syntheseweg zum 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (4) zu gelangen (**Abb. 28**).



i) Formamidinacetat, 2-Methoxyethanol, ΔT ; ii) Thionylchlorid, *N,N*-Dimethylformamid, ΔT

Abb. 28: Herstellung von 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (4)

Zu diesem Zweck wird 3,4-Dimethoxyanthranilsäure mit Formamidinacetat in 2-Methoxyethanol rückfließend erhitzt. Ein Ringschluss führt zu analysenreinem 6,7-Dimethoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on (3).

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist das der cyclischen Säureamidgruppe zuzuordnende und mit D_2O austauschbare NH-Singulett bei 12,07 ppm deutlich sichtbar (**Abb. 29**).

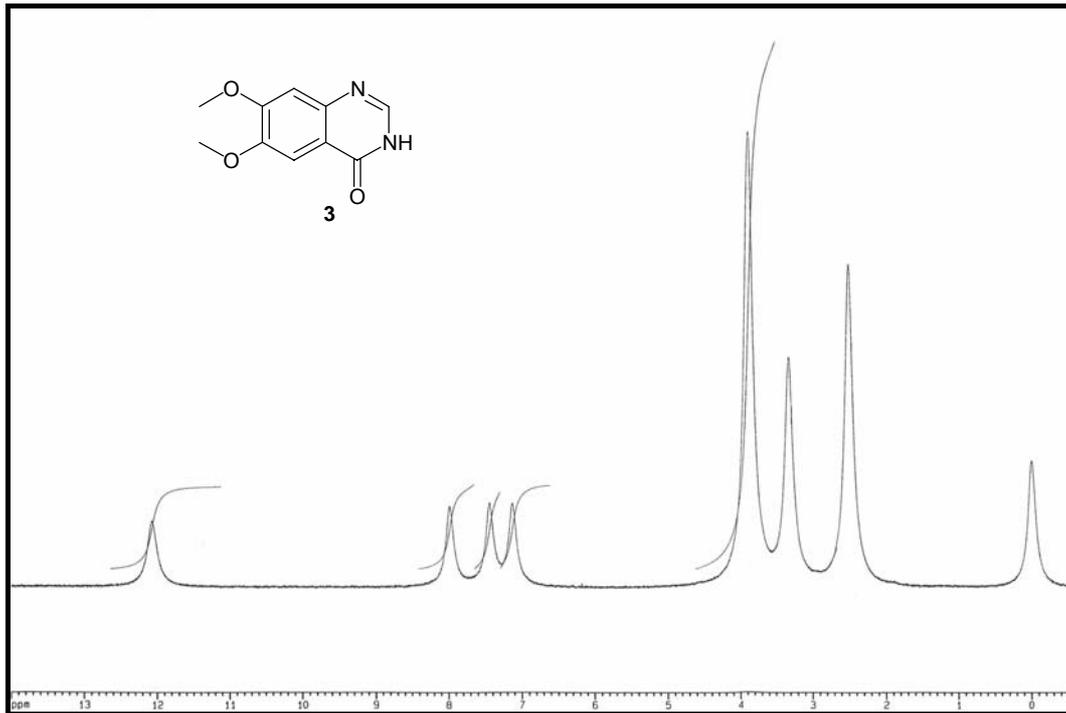


Abb. 29: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **3**

Die Verbindung **3** wird anschließend mit Thionylchlorid und *N,N*-Dimethylformamid zur entsprechenden instabilen 4-Chlorverbindung **4** umgesetzt.

Bei der dabei stattfindenden $\text{S}_{\text{N}}\text{i}$ -Reaktion bildet sich als Zwischenstufe ein Chlorsulfinsäureester mit Elektronen anziehenden Eigenschaften. Ein frei werdendes Chlorid-Ion kann deshalb das C4 des Chinazolins nucleophil gut angreifen. Dabei entsteht die instabile, gewünschte Verbindung **4**, die weitgehend als Hydrochlorid vorliegt (**Abb. 30**).

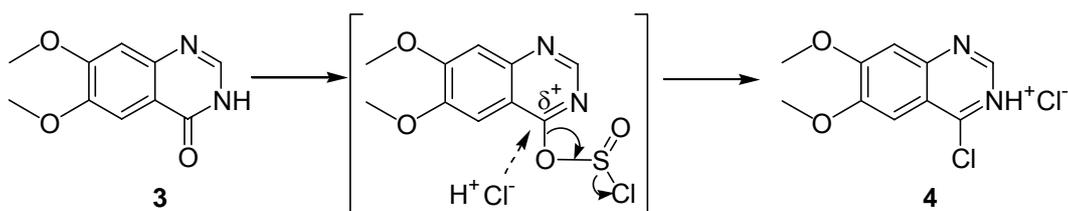
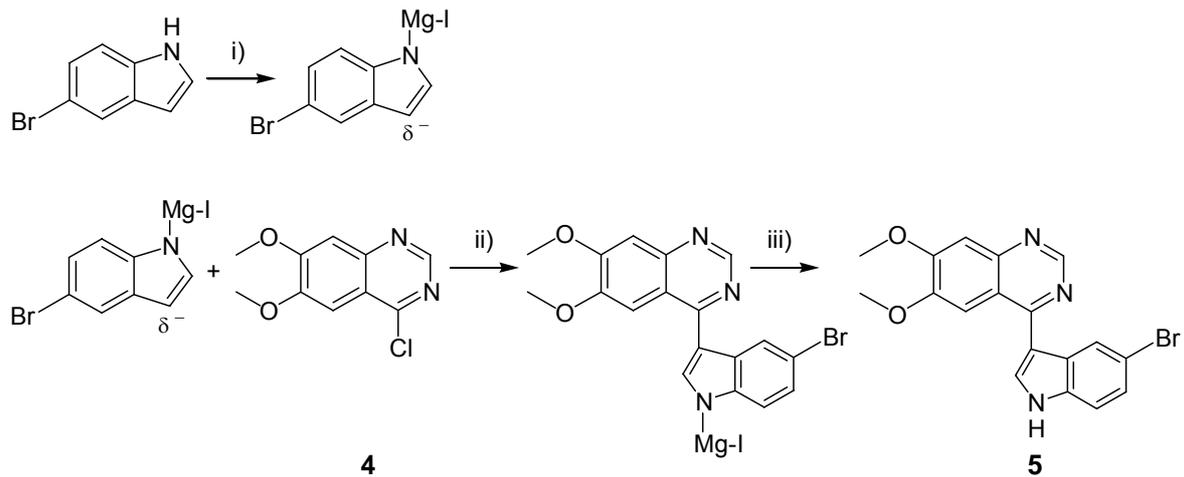


Abb. 30: Chlorierung der Verbindung **3** zum 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (**4**)

3.2.1.2 Herstellung der Verbindung **5** unter Verwendung von Grignard-Reagenz

Die Herstellung der Verbindung **5** aus 5-Bromindol und 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin **4** erfolgt dann unter Einsatz einer Grignard-Verbindung (**Abb. 31**).



i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) ΔT ; iii) Wasser, RT

Abb. 31: Herstellung von Verbindung **5**

Auch bei Verbindung **5** fällt nach dünnschichtchromatographischer Detektion im ultravioletten Licht bei einer Wellenlänge von 254 sowie 366 nm sofort eine starke hellblaue Fluoreszenz auf.

Der säulenchromatographischen Aufreinigung von **5** folgt eine Diffusionsumkristallisation, die zu gelben Kristallen führt.

Das Massenspektrum dieser Verbindung **5** zeigt eindeutig den Molpeak bei m/z 383.

Im IR-Spektrum ist auch hier das verbreiterte Signal der NH-Valenzschwingung des Indol-Grundgerüsts bei einer Wellenzahl von 3430 cm^{-1} gut sichtbar.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum tritt das Signal der NH-Gruppe bei 12,08 ppm auf (**Abb. 32**). Das C2'-Proton des Indols ist als Duplett bei 8,39 ppm erkennbar. Diese Kopplung wird durch das NH-Proton bedingt. Auch alle anderen Signale innerhalb des Aromatenbereiches (ca. 7-9,5 ppm) sind der Wunschverbindung **5** eindeutig zuzuordnen. Die beiden Methoxy-Gruppen des Chinazolins erscheinen jeweils als Singulett bei 4,04 bzw. 4,01 ppm.

Diese Ergebnisse beweisen, dass das Hetarylierungsverfahren auch bei halogen-substituierten Indol-Bausteinen unter Erhalt des für die Wirksamkeit wichtigen Halogenmusters gelingt.

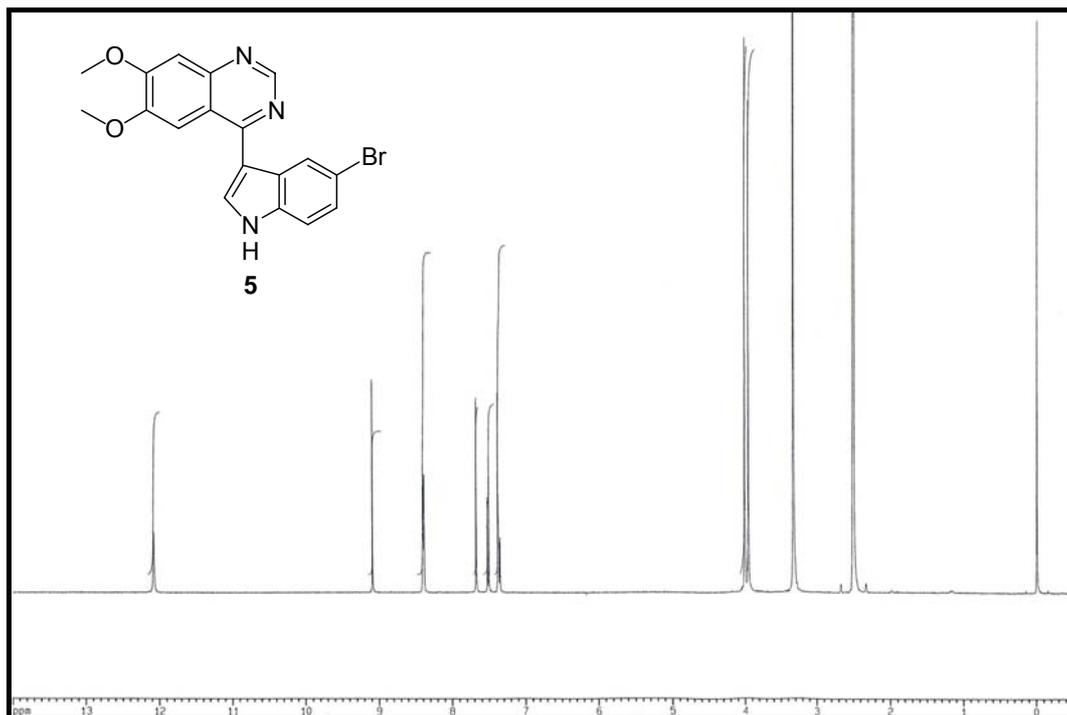


Abb. 32: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **5**

Nachdem die Struktur dieser Verbindung zweifelsfrei geklärt war, wurde die Substanz **5** hinsichtlich einer Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase getestet. (**Kap. 4.4.1**).

Überraschenderweise zeigt bereits diese Verbindung hervorragende EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten von 81 % bei einer Konzentration von 100 nM, sodass sich die Arbeitshypothese bereits im frühen Stadium der Arbeit als Erfolg versprechend erweist.

Außerdem werden durch diese Daten die Aussagen der bereits zitierten Literaturstelle widerlegt, in welcher behauptet wird, dass 4-(Indol-3-yl)chinazoline nur eine moderate HER2-TK-inhibitorische Aktivität im Bereich von 10-20 % bei einer Konzentration von 5 μM und keine verwertbare EGFR-TK-inhibitorische Wirksamkeit zeigt [36]. Allerdings betreffen diese Testergebnisse ausschließlich 4-(Indol-3-yl)chinazoline mit unsubstituierter Indolteilstruktur. Zusätzlich wurde teilweise der Indol-Stickstoff substituiert und dadurch eine Bindungsstelle zur Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors blockiert.

Die hervorragenden inhibitorischen Aktivitäten der Verbindung **5** und die auftretende Fluoreszenz könnte eine interessante Option in der *In-vitro*-Diagnostik von Krebszelllinien mit überexprimierendem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor sein.

Allerdings wird durch die Größe des Broms sowie durch die stärkere Polarität und damit schwächere Lipophilie im Vergleich zu Fluor und Chlor eine schlechtere Zellgängigkeit und damit eine nur unzureichende Zytotoxizität erwartet. Daher wird die Substanz **5** einem Zytotoxizitätstest an der wegen ihres hohen Gehaltes an Steroidrezeptoren

hormonabhängigen MCF-7-Brustkrebszelllinie (Michigan Cancer Foundation) unterzogen (**Kap. 4.4.2**).

Bereits Mitte der 80er Jahre wurde erkannt, dass Estrogen in der Lage ist, eine große Anzahl von Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren sowie das entsprechende Signaling zu stimulieren. Estrogen und Wachstumsfaktoren koregulieren die Expression von Genen, die in die Regulation von Proliferation und Zellüberleben involviert sind, woraus ein synergistisches Wachstum von Mammakarzinomzellen resultiert [59-62].

Die Ergebnisse der *In-vitro*-Zytotoxizitätstests der Verbindung **5** und des im gleichen Durchlauf getesteten Cisplatin sind in **Abb. 33** grafisch dargestellt. Cisplatin dient hier als Vergleichssubstanz.

Als Maß für die Zytotoxizität werden dabei die ermittelten T/C_{kor} -Werte [%] in Abhängigkeit von der Inkubationszeit [h] herangezogen.

In einer Konzentration von 0,5 bzw. 1 μM zeigt die Verbindung **5** kaum antiproliferative Eigenschaften, während beim Cisplatin in diesen Konzentrationen Wachstum hemmende Wirkungen beobachtet werden.

Cisplatin weist bei einer Konzentration von 5 μM nach ca. 175 Stunden eine komplette Wachstumshemmung auf. Anschließend wird sogar noch eine Zell abtötende Wirkung festgestellt. Im Gegensatz dazu wird bei der Verbindung **5** auch in einer Konzentration von 5 μM keine komplette Wachstumshemmung erreicht.

Diese Ergebnisse bestätigen eine bereits vermutete unzureichende Zytotoxizität der Verbindung **5**, die, wie bereits beschrieben, in der ausgeprägteren Polarität des Bromsubstituenten und damit schlechteren Zellgängigkeit der Verbindung **5** begründet sein könnte.

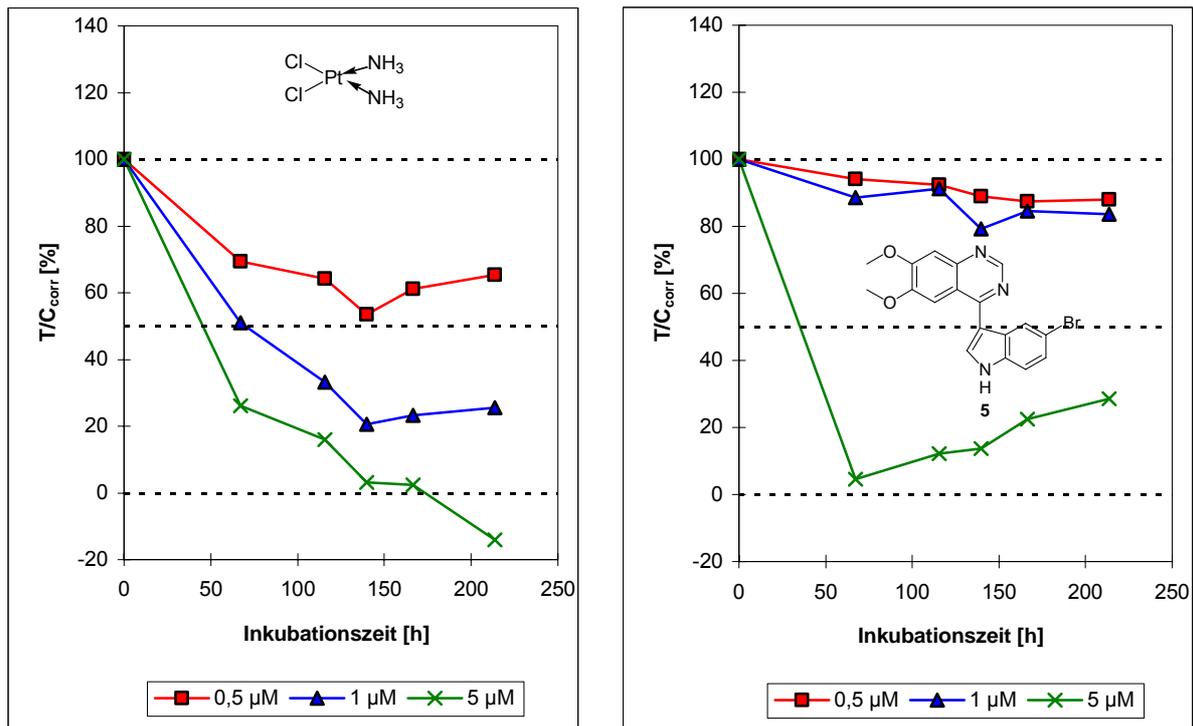


Abb. 33: Effekte der Verbindung **5** sowie des Cisplatin als Standardzytostatikum in Konzentrationen von jeweils 0,5; 1 und 5 μ M auf das Wachstum von MCF-7-Zellen

Deshalb ist auch die Verbindung **5** nur als Modellsubstanz anzusehen, deren Herstellung vorrangig den Zweck hat, das Syntheseverfahren auf seine Eignung zu prüfen.

Zusätzlich wäre eventuell mit toxischen Nebenwirkungen durch den Bromsubstituenten zu rechnen.

3.2.2 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**14**)

Da die Bromsubstitution des Indolteils beim verwendeten Grignard-Syntheseverfahren erhalten bleibt, wurde bei gleichbleibender 6,7-Dimethoxy-Substitution des Chinazolins das 5-Chlor-6-fluor-substituierte Indol als Hetarylierungskomponente eingesetzt.

Die aus der Cross-coupling-Reaktion beider Teilstrukturen resultierende Substanz **14** ist in Abbildung 34 dargestellt.

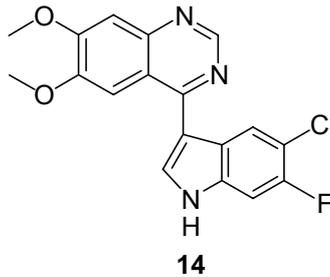


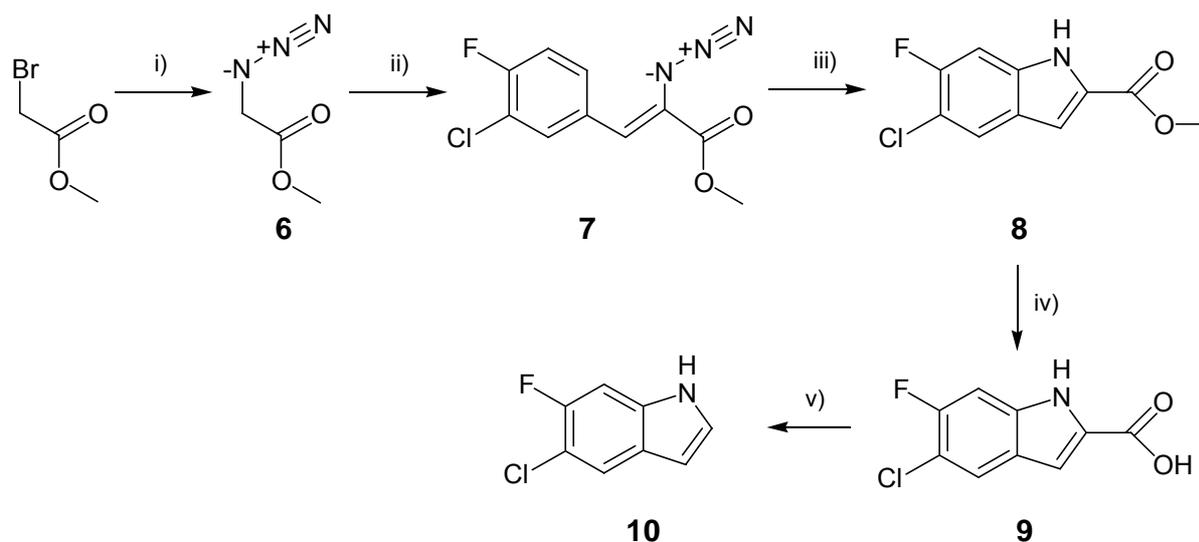
Abb. 34: 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**14**)

Ausschlaggebend für die Auswahl der Chlor-Fluor-Substituenten am Indolringsystem waren die sehr guten EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten der 4-(3-Chlor-4-fluoranilino)chinazoline, zu denen auch das Gefitinib zählt, und die bereits beschriebene, erwartete höhere Zellgängigkeit beim Austausch der 5-Bromindol-Teilstruktur gegen ein 5-Chlor-6-fluorindol-Grundgerüst. Dabei muss allerdings geprüft werden, ob die ausgezeichnete EGFR-TK-inhibitorische Aktivität des 4-(5-Bromindol-3-yl)chinazolins (**5**) weiterhin gegeben ist.

Da das hierfür benötigte 5-Chlor-6-fluorindol **10** nur unter sehr großem finanziellen Aufwand zu erwerben ist, muss es in Anlehnung an die Vorschriften in den Patenten U 6569888 und US 5494928 selbst hergestellt werden [63, 64].

3.2.2.1 Herstellung der Hetarylierungskomponente 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) nach Hemetsberger-Knittel

Nach eingehender Literatur- und Patentrecherche wurden die nachfolgend dargestellten Reaktionsschritte zur Synthese von 5-Chlor-6-fluorindol **10** ausgewählt (**Abb. 35**) [63, 64].



- i) Natriumazid, *N,N*-Dimethylformamid, RT ; ii) Natriummethanolat, 3-Chlor-4-fluorbenzaldehyd, RT ;
 iii) Xylol, ΔT ; iv) Natronlauge, Ethanol, RT ; v) Diphenylether, ΔT

Abb. 35: Angedachter Syntheseweg zur Herstellung von Verbindung 10

a) Methylazidoacetat (6) über eine modifizierte Kolbe-Nitril-Synthese

Dazu wird käuflich erworbenes Methylbromacetat mit Natriumazid zum Methylazidoacetat 6 umgesetzt. Hierbei wird das defizitäre Kohlenstoff-Atom des Methylbromacetats mit dem N-nucleophilen Azid unter Austritt des Bromid-Anions substituiert.

Nach Aufreinigung mithilfe einer Vakuumdestillation wird die Verbindung 6 als farbloses Öl isoliert.

b) Methyl-5-chlor-6-fluorindol-2-carboxylat (8) und Methyl-7-chlor-6-fluorindol-2-carboxylat (11) nach Hemetsberger-Knittel

Die Reaktion nach Hemetsberger-Knittel vereinigt die basenkatalysierte Kondensation eines aromatischen Aldehyds mit einem Alkylazidoacetat und die anschließende thermische intramolekulare Cyclisierung des dabei entstehenden, α,β -ungesättigten Carbonsäureesters 7 zum korrespondierenden Indol-2-carbonsäureester 8 [65, 66].

Für diese Reaktion wird die vorliegende Verbindung 6 zusammen mit Natriummethanolat und käuflich erworbenem 3-Chlor-4-fluorbenzaldehyd in einer Knoevenagel-Reaktion umgesetzt. Dabei deprotoniert das Natriummethanolat die aktivierte Methylengruppe des Methylazidoacetats (6) zum entsprechenden Anion. Dieses addiert anschließend als Carbanion an das Carbonyl-Kohlenstoff-Atom des 3-Chlor-4-fluorbenzaldehyds. Nach Protonierung und anschließender Wasserabspaltung wird das α,β -ungesättigte Methyl- α -azido-3-chlor-4-fluorcinnamat (7) erhalten.

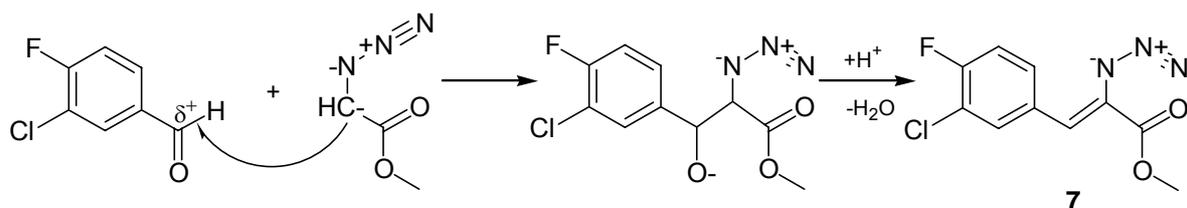


Abb. 36: Mechanismus der Knoevenagel-Reaktion zum Zimtsäureester 7

Diese Reaktionsführung ist aufgrund einer Reihe von Nebenreaktionen mit Schwierigkeiten behaftet:

- Die Zugabe aller benötigten Reagenzien muss innerhalb von 20-30 Minuten nach Herstellung des Natriummethanolats erfolgen, da sonst basenkatalysierte Additionen an die Azidogruppe (Dimroth-Reaktion) eine drastische Ausbeuteminderung bewirken.
- Das Carbanion des Eduktes 6 spaltet in einer raschen exothermen Reaktion Stickstoff ab; infolge dessen muss der Ester 6 im Überschuss eingesetzt werden.
- Die oxidativen Eigenschaften der Azidogruppe im Edukt 6 und im Produkt 7 sind für gleichfalls exotherme Nebenreaktionen, z.B. die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd verantwortlich.
- Bei höheren Temperaturen besteht die Möglichkeit der Kondensation von zwei Molekülen des eingesetzten Esters 6 (Claisen-Kondensation) [67].

Aufgrund dieser unerwünschten Reaktionen muss anfänglich im Kühlbad gearbeitet werden, um die Reaktionsmischung stets unter der maximal zulässigen Temperatur von 10°C zu halten.

Auch bei der abschließenden Eliminierung des Lösungsmittels im Vakuum darf eine Temperatur von 40°C nicht überschritten werden, da sonst eine Zersetzung des Produktes seine Qualität und Quantität mindert [66, 68].

Das in der entsprechenden Patentvorschrift verwendete Fließmittel zur Aufreinigung der Verbindung 7 durch Säulenchromatographie erweist sich als ungeeignet. Daher werden mehrere Lösungsmittelgemische auf ihre Verwendung zur Auftrennung des erhaltenen Produktgemisches getestet, wobei die beste Trennung mit der Mischung Ethylacetat/n-Hexan (1:3) gelingt.

Werden alle Maßnahmen zur Unterdrückung der Entstehung von Nebenprodukten und die Veränderung des Fließmittels berücksichtigt, dann kann dieses Verfahren gute Ausbeuten an Verbindung 7 liefern. Allerdings ist die Stabilität dieser Substanz nur für einige Tage gewährleistet.

Das synthetisierte Zimtsäurederivat **7** wird nun einer Cyclisierung zum Indol-2-carbonsäureester **8** durch Thermolyse unterworfen [69]. Dazu wird die Verbindung **7** in *p*-Xylen unter Rückfluss erhitzt und die nach Eliminierung des größten Anteils des Lösungsmittels entstehende Suspension bei Temperaturen von 5-8°C zum Zwecke der quantitativen Ausfällung aufbewahrt. Nach Separierung des entstandenen Feststoffes wird zu dessen Identifizierung ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen (**Abb. 37**).

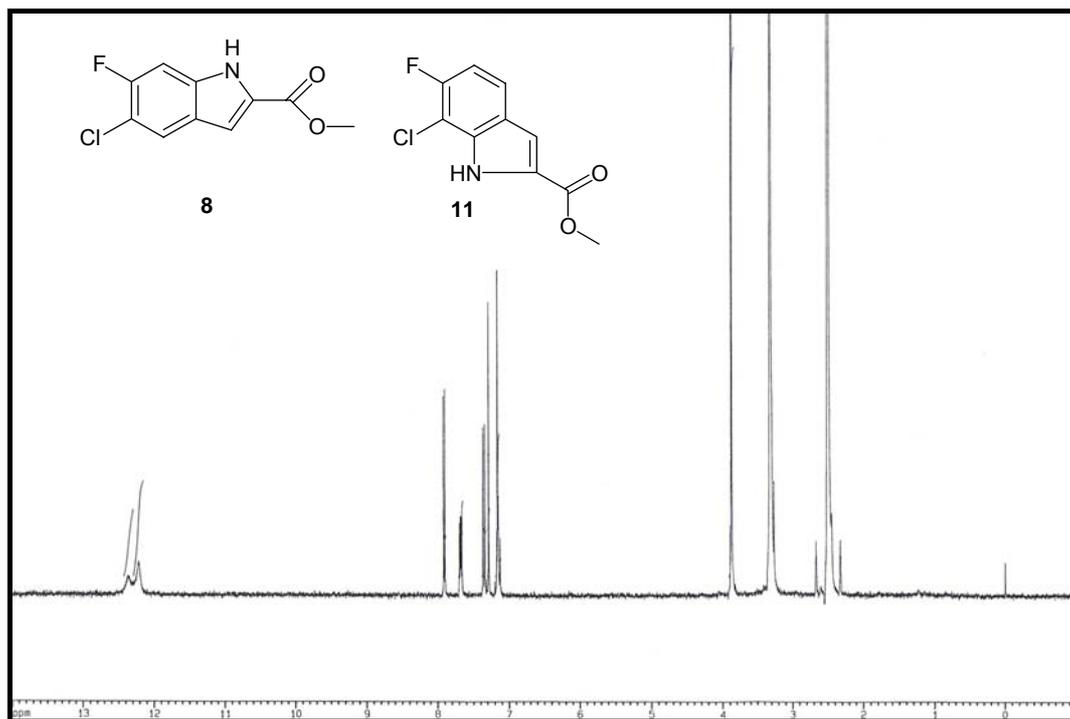


Abb. 37: ¹H-NMR-Spektrum des Gemisches der Wunschverbindung **8** und der durch unselektive Cyclisierung ebenfalls entstandenen Verbindung **11**

Hier treten unerwartet zwei Singulets bei 12,36 und bei 12,22 ppm auf. Eigentlich sollte an dieser Stelle nur ein Signal, nämlich das der NH-Gruppe des Wunsch-Indols **8** erscheinen. Bei näherer Betrachtung liegt der Verdacht nahe, dass die intramolekulare Cyclisierung des Zimtsäureesters **7** nicht regioselektiv an Position 6 des Benzenringes, sondern auch an Position 2 stattgefunden hat (**Abb. 38**). Dadurch entstehen zwei verschiedene halogensubstituierte Indole in ungefähr äquimolarer Menge. Das ist der Grund dafür, dass die beiden oben angesprochenen NH-Singulets beobachtet werden.

Deshalb wird fieberhaft nach der Struktur des dritten unbekanntes Indols gesucht, die dann mithilfe eines Protonenresonanzspektrums identifiziert wird.

Abbildung 39 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des nach der Verseifung vorliegenden Gemisches der drei Indol-2-carbonsäuren.

Der Versuch, das Auftreten des dritten Indols zu erklären, gestaltet sich problematisch, da in der Literatur keine dementsprechende Umlagerung bekannt ist.

Da das dritte Indolderivat nur bei dieser einen Charge des kommerziell erworbenen Benzaldehydes auftritt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine Fehlproduktion des gelieferten Aldehyds seitens der Synthesefirma handelt.

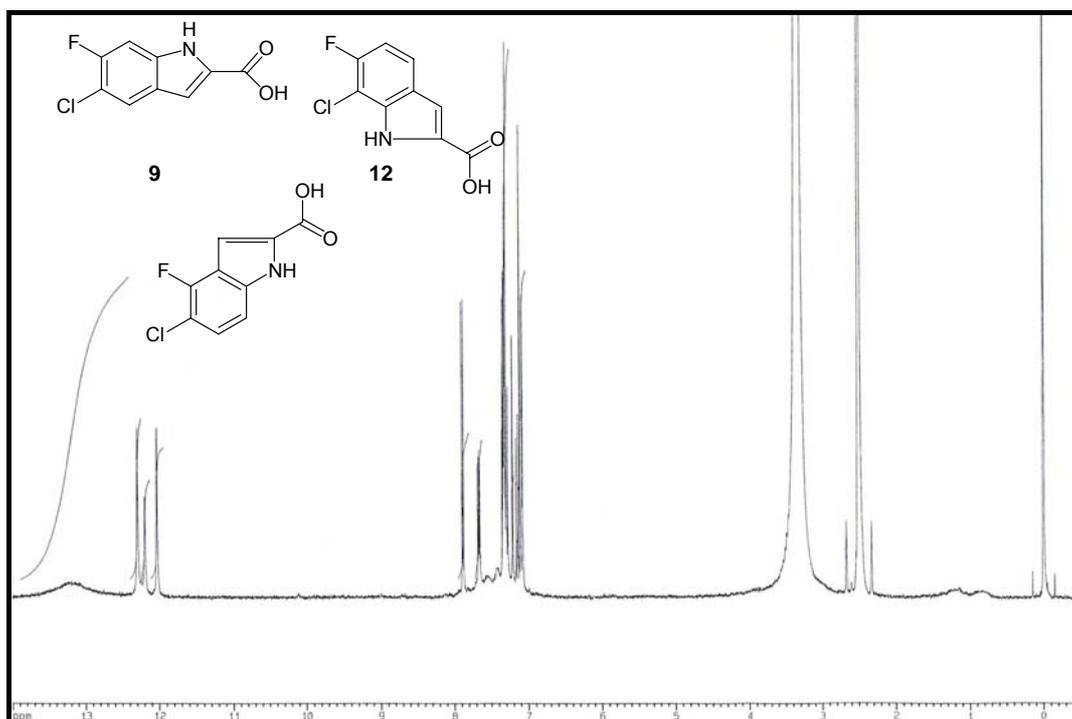


Abb. 39: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Gemisches der drei entstandenen Indolcarbonsäuren, die aus einer Falschlieferung des Benzaldehyds als Ausgangsstoff resultierten

- c) 5-Chlor-6-fluorindol-2-carbonsäure (**9**) und 7-Chlor-6-fluorindol-2-carbonsäure (**12**) durch hydrolytische Spaltung des Gemisches aus Verbindung **8** und **11**

Das Gemisch der Indolcarbonsäuremethylester **8** und **11** wird einer basenkatalysierten Verseifungsreaktion durch nucleophile Substitution unterzogen. Die dabei entstehenden Carboxylate werden durch Ansäuern in die freien Carbonsäuren **9** und **12** überführt, die, wie die durchgeführte Elementaranalyse belegt, keiner weiteren Aufreinigung bedürfen.

Auch auf dieser Stufe ist es aufgrund ähnlicher chemischer und physikalischer Eigenschaften unmöglich, die beiden Substanzen **9** und **12** voneinander zu trennen, sodass

auch die nachfolgende Decarboxylierung mit dem Gemisch beider Verbindungen vollzogen wird.

Das in Abbildung 40 dargestellte Protonenresonanzspektrum zeigt das Gemisch der beiden Indolcarbonsäuren **9** und **12**. Hier erscheinen die Protonen der Säurefunktionen bei 13,1 ppm neben den beiden Singulets der NH-Protonen der Indole. Das charakteristische Singulett der beiden Methoxygruppen der Verbindungen **8** und **11**, das bei etwa 4 ppm auftreten sollte, fehlt hingegen.

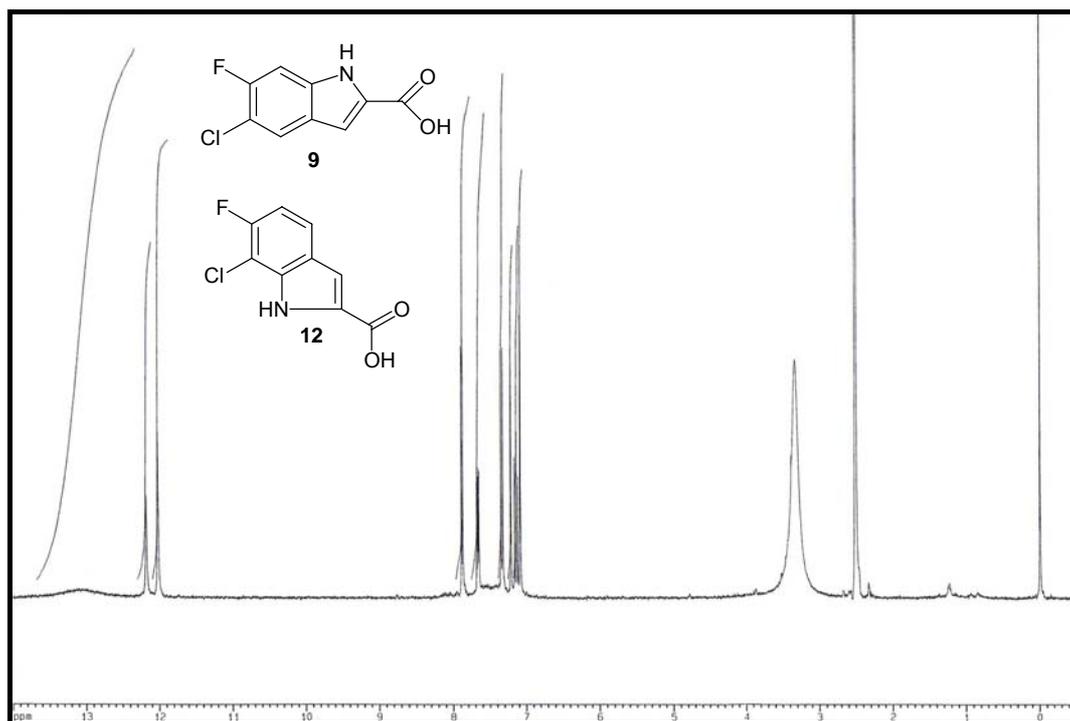


Abb. 40: ¹H-NMR-Spektrum des Gemisches der Verbindungen **9** und **12**

Im Infrarotspektrum ist die Säurefunktion durch einen breiten Säuresack zwischen 3300 und 2700 cm⁻¹ gekennzeichnet, der durch die Banden der an Wasserstoffbrücken beteiligten OH-Gruppen zustande kommt und sich mit den NH-Gruppen der Indole bei 3439 cm⁻¹ überlagert.

- d) 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) und 7-Chlor-6-fluorindol (**13**) durch Decarboxylierung des Gemisches der beiden Indolcarbonsäuren **9** und **12**

Unter Verwendung von Diphenylether soll nun das Indolcarbonsäure-Gemisch (**9**, **12**) bei rund 260°C decarboxyliert werden.

Die anschließende dünnschichtchromatographische Detektion des Reaktionsgemisches im Fließmittelgemisch Toluol/n-Hexan (1:3) zeigt frontal bei 254 nm eine sehr starke Löschung des Diphenylethers. Ferner werden zwei Substanzen mit ähnlicher Laufhöhe sichtbar, die

einen zum Eduktgemisch unterschiedlichen R_f -Wert aufweisen. Nach einer gewissen Zeit sind die beiden Verbindungen sowie der Diphenylether auch im sichtbaren Licht anhand ihrer Farbgebung deutlich zu erkennen.

Aufgrund des hohen Siedepunktes des Diphenylethers von ca. 260°C erweist sich die herkömmliche Methode zur Vertreibung des Lösungsmittels im Vakuum als ungeeignet. Daher wird das im oben genannten Patent beschriebene säulenchromatographische Verfahren gewählt, bei dem zunächst der Diphenylether mit n-Hexan eluiert wird, wobei die beiden Substanzen am Startpunkt der Säule verbleiben. Nachdem kein Diphenylether mehr detektierbar ist, wird die mobile Phase der Säule unter Einsatz des Fließmittelgemisches Toluol/n-Hexan (1:3) gewechselt. Durch Verwendung dieses Elutionsmittels gelingt schließlich eine Trennung der beiden, einen sehr ähnlichen R_f -Wert aufweisenden Verbindungen **10** und **13**.

Die zur Identifizierung herangezogenen Massenspektren zeigen bei beiden Substanzen den gewünschten Molpeak bei m/z 169.

Ebenso wird im IR-Spektrum wieder eindeutig die NH-Valenzschwingung des Indols bei 3390 bzw. 3409 cm^{-1} sichtbar, wohingegen der beim Eduktgemisch auftretende Säuresack komplett fehlt, was als Hinweis auf eine erfolgreich durchgeführte Decarboxylierung gewertet werden kann.

Außerdem werden Protonenresonanzspektren angefertigt (**Abb. 41** und **42**), die die Struktur der beiden Verbindungen belegen. In beiden Spektren erscheinen wieder die Signale der Indol-NHs bei 11,32 bzw. bei 11,61 ppm. Die Peaks der Protonen der Säuregruppen des Eduktgemisches sind hingegen verschwunden.

Abbildung 41 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum des gewünschten 5-Chlor-6-fluorindols (**10**). Bei 7,70 und 7,38 ppm erscheinen die Signale der Protonen der C-Atome des Benzenringes, die deutlich das charakteristische Substitutionsmuster in Abgrenzung zur ebenfalls entstandenen Verbindung **13** identifizieren.

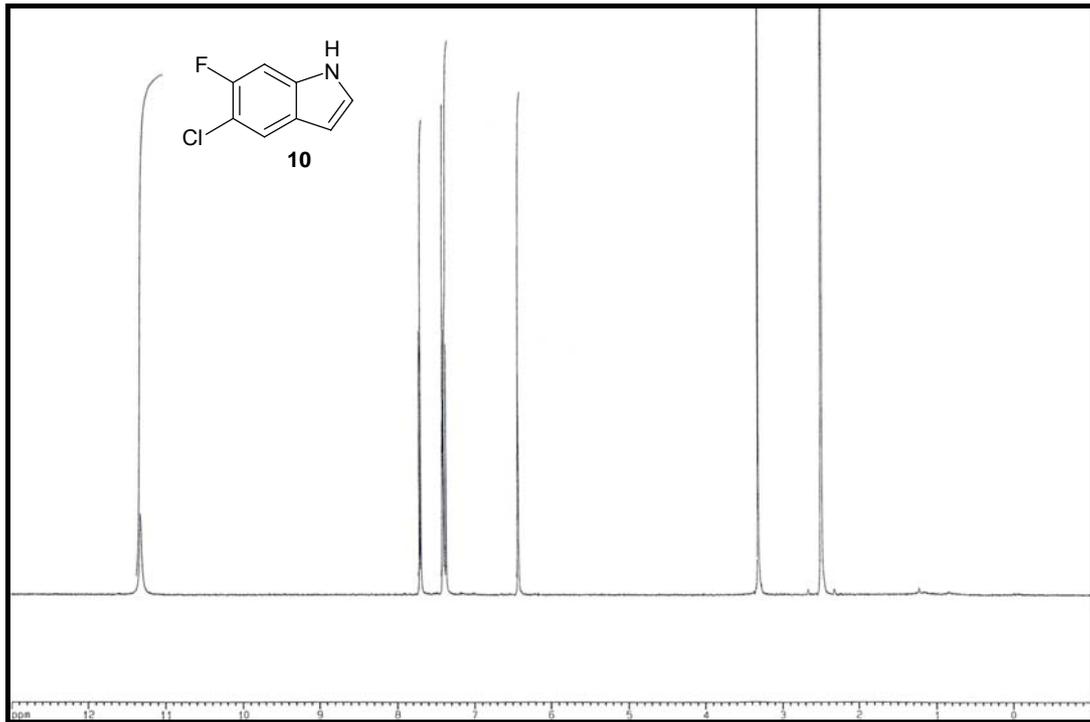


Abb. 41: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 10

Beim Nebenprodukt 13 (Abb. 42) liegen die Peaks der Protonen der C-Atome des Benzenringes bei 7,53 und 7,04 ppm. Sie zeigen ein im Vergleich zur Verbindung 10 anderes Muster.

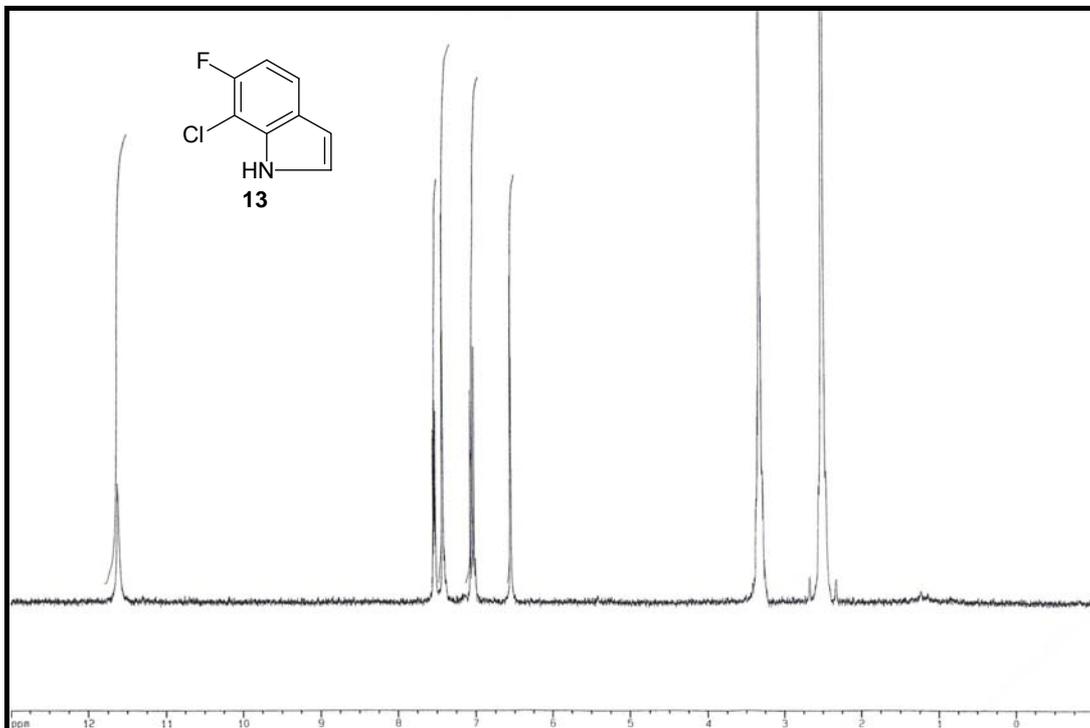


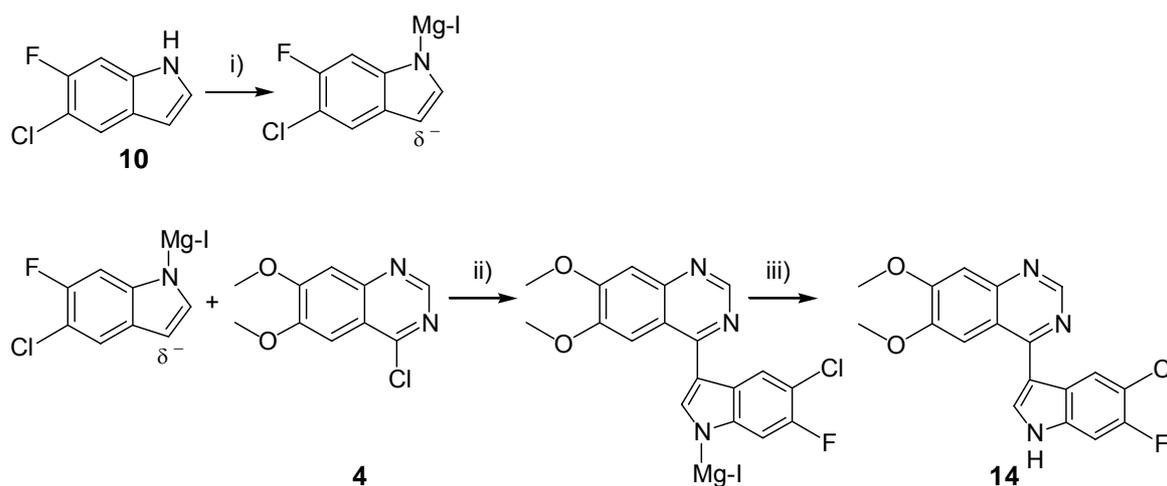
Abb. 42: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 13

Die Gesamtsynthese des Wunschildols **10** liefert in Abweichung zu den Aussagen der oben genannten Patente weiße bis leicht rosafarbene Kristalle von **10** im Gegensatz zu im Patent charakterisierten, leicht braunen Kristallen und weiße bis hellbeige Kristalle des Nebenproduktes **13**, das als dunkelbraunes Öl beschrieben wird [63, 64].

Im Rahmen der erfolgreichen Synthese der wichtigen Zwischenverbindung 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) fällt zusätzlich als Nebenprodukt das interessant erscheinende 7-Chlor-6-fluorindol (**13**) an, das ebenfalls für eine spätere Hetarylierung infrage kommt.

3.2.2.2 Herstellung der Verbindung 14

Zur Synthese des 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolins (**14**) wird das 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) mit dem 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (**4**) unter Einsatz einer Grignard-Verbindung umgesetzt (**Abb. 43**).



i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) ΔT ; iii) Wasser, RT

Abb. 43: Herstellung der Verbindung **14**

Zur Erhöhung der Ausbeute wird hier die nach der Hydrolyse entstehende Suspension mit einem Ultra-Turrax sehr fein in der wässrigen Phase verteilt, wodurch sich die Oberfläche der Teilchen stark vergrößert und somit mehr Angriffsfläche für die Wassermoleküle bietet.

Bei der dünnschichtchromatographischen Detektion ist wieder eine auffallend hellblau fluoreszierende Substanz mit mittlerem R_f -Wert signifikant.

Die Separierung dieser Verbindung erfolgt durch Säulenchromatographie mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat/Ethanol (9:1), die Aufreinigung durch Diffusionsumkristallisation aus Ethylacetat/n-Hexan.

Nachfolgend ist das Protonenresonanzspektrum der Substanz **14** dargestellt (**Abb. 44**). Auch hier findet sich wieder das mit D_2O austauschbare Signal der NH-Gruppe der Indolteilstruktur, welches durch den Elektronen ziehenden, paramagnetischen Effekt des Chinazolin-Grundgerüsts im Vergleich zum 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) entschirmt wird und bei einer chemischen Verschiebung von 12,10 ppm auffällt.

Die NH-Gruppe ist auch im Infrarotspektrum als Valenzschwingung bei einer Wellenzahl von 3432 cm^{-1} sichtbar.

Die im Aromatenbereich des Protonenresonanzspektrums (ca. 7-9 ppm) auftretenden Signale belegen eindeutig die Struktur der Wunschverbindung **14**. So liegt das durch die Nachbarschaft der beiden Stickstoffe entschirmte Singulett des C2-Protons bei 9,09 ppm, das durch die Kopplung mit dem NH leicht angerissene Signal des C2'-Indol-Protons bei 8,44 ppm, die beiden Dupletts der Protonen von C4' bzw. C7' des Indols bei 8,37 bzw. 7,54 ppm, sowie die beiden Singuletts der C5- und C8-Protonen des Chinazolins bei 7,68 bzw. 7,39 ppm.

Somit ist bewiesen, dass bei der verwendeten Cross-coupling-Reaktion auch die Fluor-Chlor-Substitutionsmuster erhalten bleiben, womit sich diese Methode im Vergleich zum Verfahren, das zinnorganische Verbindungen verwendet, als überlegen erweist.

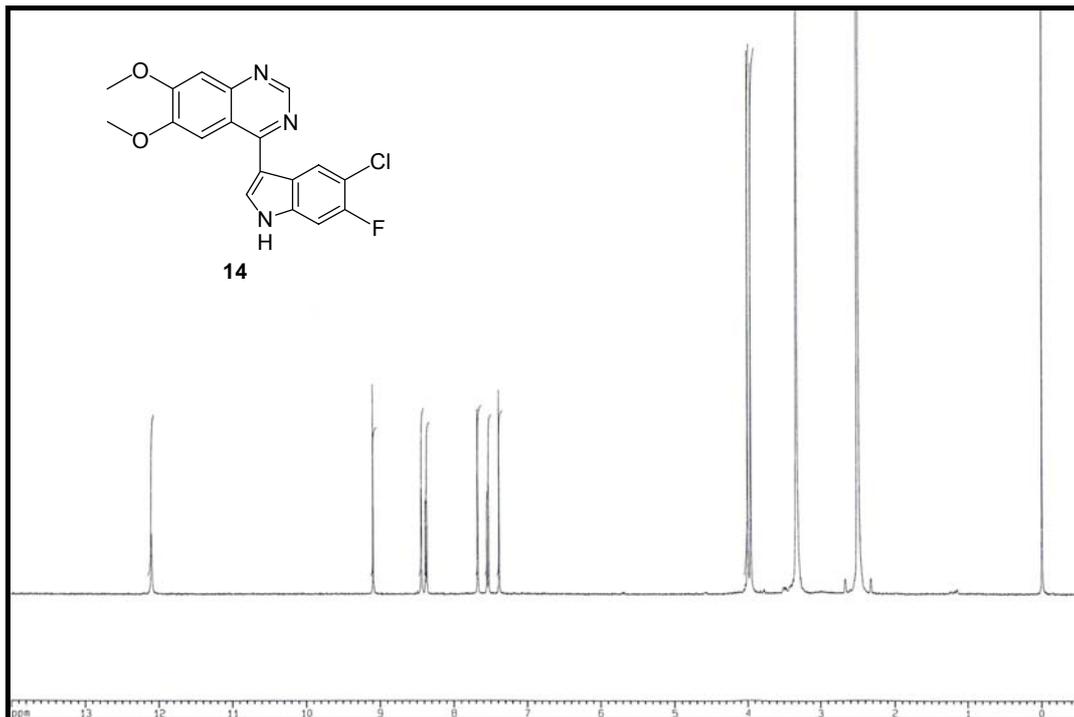


Abb. 44: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **14**

Um die auftretende Fluoreszenz zu charakterisieren, wird die Verbindung **14** in einer Konzentration von $5\ \mu\text{M}$ fluorimetrisch untersucht (Abb. 45, Tabelle 5) [70, 71].

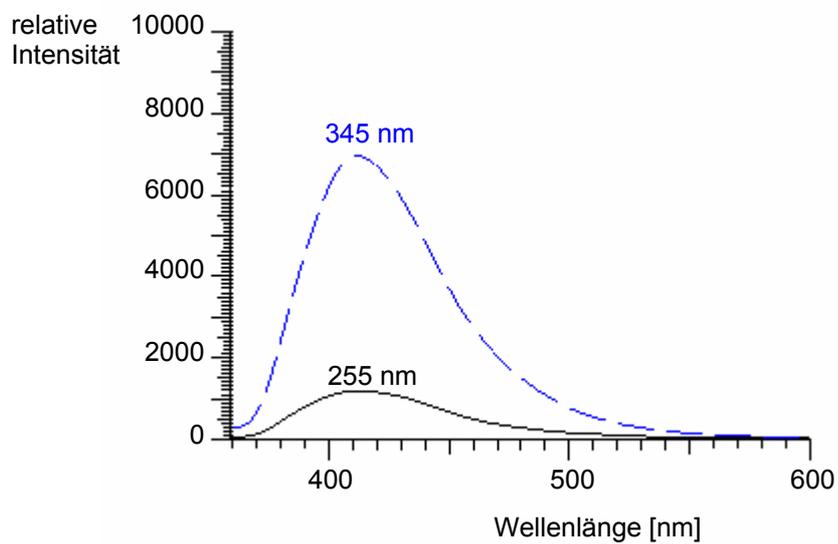


Abb. 45: Fluoreszenzspektrum der Verbindung **14** bei einer Konzentration von $5\ \mu\text{M}$

Exzitation [nm]	Emission [nm]	Relative Intensität
255	409,8	1183
345	411,4	6951

Tabelle 5: Daten zum Fluoreszenzspektrum der Verbindung **14**

Die Substanz **14** weist in Ethylacetat bei 5 μM unter Einstrahlungswellenlängen von 255 nm und 345 nm jeweils ein Emissionsmaximum bei 410 nm auf.

Zum Vergleich wurde das in Abbildung 46 dargestellte Emissionsspektrum des sehr stark fluoreszierenden Chininsulfats in einer Konzentration von 1 μM in verdünnter Schwefelsäure vermessen.

Das Spektrum von Chininsulfat ist durch vier Maxima charakterisiert, die bei einer Konzentration von 1 μM ähnliche Intensitäten wie die der Verbindung **14** aufweisen.

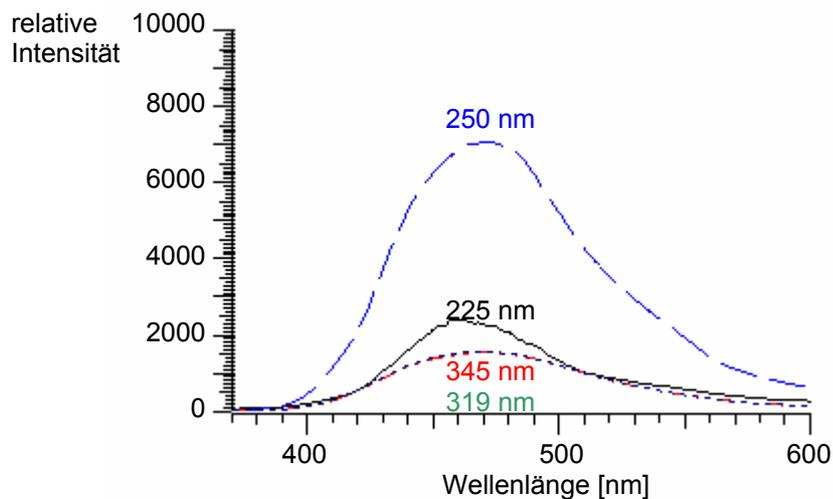


Abb. 46: Fluoreszenzspektrum von Chininsulfat bei einer Konzentration von 1 μM

Exzitation [nm]	Emission [nm]	Relative Intensität
225	461,4	2416
250	470,6	7089
319	468,6	1542
345	468,6	1556

Tabelle 6: Daten zum Fluoreszenzspektrum des Chininsulfats

Damit wird gezeigt, dass die bemerkenswerten, stark fluoreszierenden Eigenschaften der Substanz **14** zwar nicht so ausgeprägt wie die des Chininsulfats sind, aber sie können dennoch als ähnlich bezeichnet werden.

Aufgrund der exzellenten EGFR-TK-inhibitorischen Eigenschaften der Verbindung **5**, wurde auch die Substanz **14** auf eine EGFR-TK-hemmende Wirksamkeit hin untersucht.

Die ermittelten, hervorragenden Aktivitäten sind mit denen des bereits zugelassenen Arzneistoffs Gefitinib (**Kap. 1.5**) vergleichbar (**Tabelle 7**).

Konzentration [nM]	Inhibitorische Aktivität [%]
100	62
20	29

Tabelle 7: EGFR-TK-Inhibition der Verbindung **14**

Die starke Fluoreszenz der Verbindung **14** und die sehr gute EGFR-TK-Inhibition bieten eine zukunftsweisende Option für eine medizinisch-pharmazeutische Anwendung dieser Substanzklasse.

So könnte das 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**14**) beim Einsatz als *In-vitro*-Diagnostikum in Zellpräparationen Wachstumsfaktor-Rezeptoren mithilfe der Fluoreszenz der gebundenen Substanz quantitativ kenntlich machen und damit im Hinblick auf eine für den Patienten abgestimmte Therapie hilfreich sein.

Aufgrund der hervorragenden EGFR-TK-inhibitorischen Ergebnisse wird die Substanz zusätzlich einem Test auf Zytotoxizität an der MCF-7-Brustkrebszelllinie (Michigan Cancer Foundation) unterzogen (**Kap. 4.4.1**).

Infolge der bereits beschriebenen synergistischen Wirkung von Estrogen und Wachstumsfaktoren wird für die Substanz **14** ebenfalls eine beachtliche Zytotoxizität an MCF-7-Brustkrebszellen erwartet.

Die Ergebnisse der *In-vitro* Zytotoxizitätstests der Verbindung **14** sowie als Vergleich die des in demselben Durchlauf getesteten Cisplatin sind in **Abb. 48** graphisch dargestellt.

Als Maß für die Zytotoxizität werden dabei die ermittelten T/C_{kor} -Werte [%] in Abhängigkeit von der Inkubationszeit [h] herangezogen. Demnach hat die Substanz **14** ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften, die überraschenderweise sogar die des Cisplatin wesentlich übertreffen.

In einer Konzentration von 5 μM wird bei Cisplatin nach 175 Stunden, bei der Verbindung **14** sogar schon nach 60 Stunden das Zellwachstum zunächst komplett gehemmt, nachfolgend werden Zellen gar abgetötet. Auch in einer Konzentration von 1 μM ist bei der Substanz **14** nach 60 Stunden eine komplette Wachstumshemmung eingetreten, wohingegen das Cisplatin mit einem T/C_{kor} -Wert von 70 % nach ungefähr 150 Stunden nur schwache antiproliferative Eigenschaften zeigt.

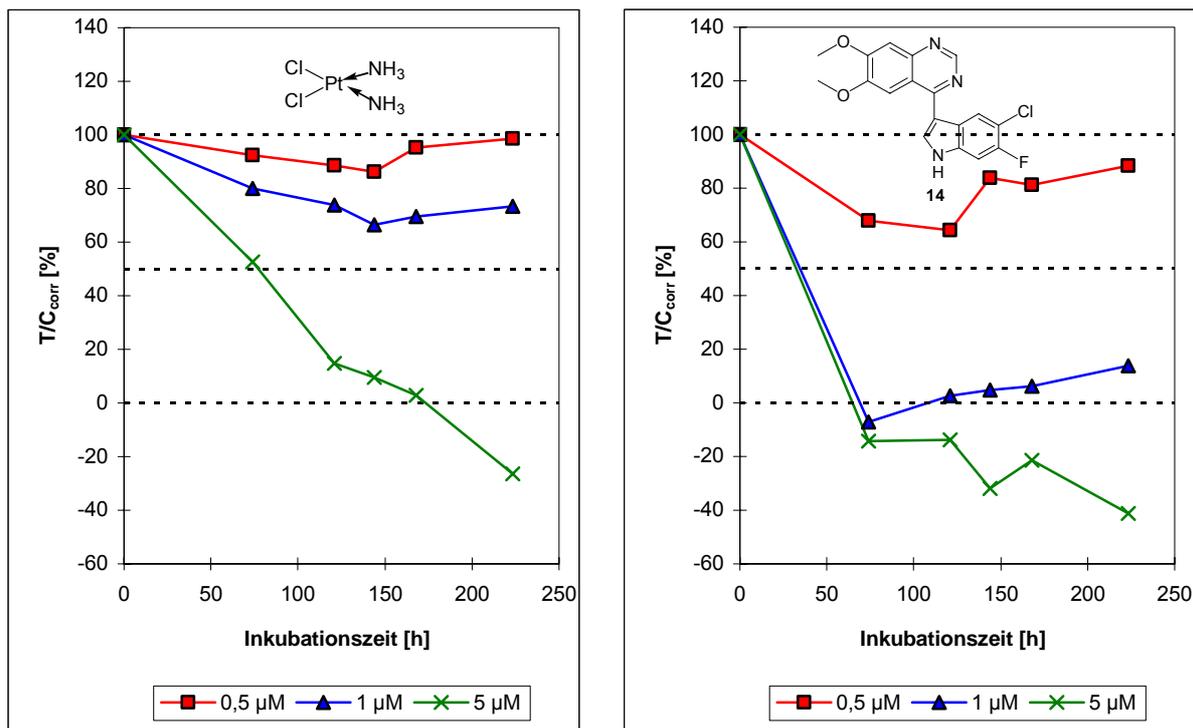


Abb. 48: Effekte der Verbindung **14** sowie des Cisplatin als Standardzytostatikum in Konzentrationen von jeweils 0,5; 1 und 5 μM auf das Wachstum von MCF-7-Zellen

Diese exzellenten zytotoxischen, EGFR-TK-inhibitorischen und fluorimetrischen Ergebnisse dienen als Richtwert für nachfolgende Konzeptionen.

3.2.3 4-(7-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**15**)

Als nächstes soll die Beeinflussung EGFR-inhibitorischen Aktivität durch verschiedene Verbindungen mit unterschiedlichem Substitutionsmuster am Indolteil überprüft werden.

Bei der Synthese des Indols **10** fiel als Nebenprodukt das Indol **13** an, welches durch unselektive Cyclisierung des α -Azido-3-chlor-4-fluorzimtsäuremethylesters (**7**) entstand.

Um den Einfluss der Position der Halogensubstituenten am Indolgrundkörper auf die EGFR-TK-Inhibition deutlich zu machen, soll auch das 7-Chlor-6-fluorindol (**13**) analog der beschriebenen Synthese in einer Hetarylierungsreaktion mit dem 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (**4**) zum 4-(7-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**15**) verknüpft werden (**Abb. 48, 49**).

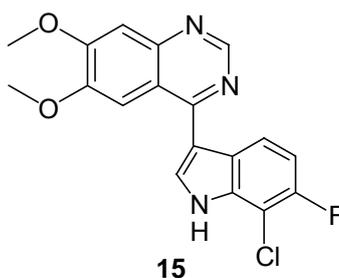
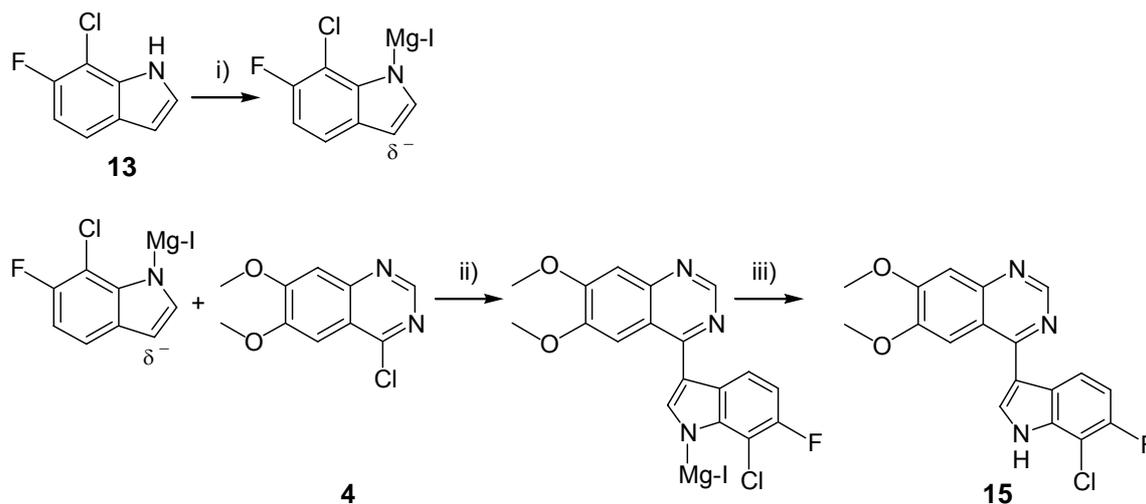


Abb. 48: 4-(7-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**15**)



i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) ΔT ; iii) Wasser, RT

Abb. 49: Herstellung der Verbindung **15**

Der separierte Feststoff **15** ist wiederum durch die signifikante hellblaue Fluoreszenz dieser Stoffklasse charakterisiert.

Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Vermessung zeigt wieder die für diese Substanzklasse signifikante NH-Gruppe des Indols bei 12,44 ppm. Außerdem belegt die Aufspaltung der Signale bei 8,10 bzw. 7,22 ppm eindeutig das Halogenmuster am Indol (**Abb. 50**).

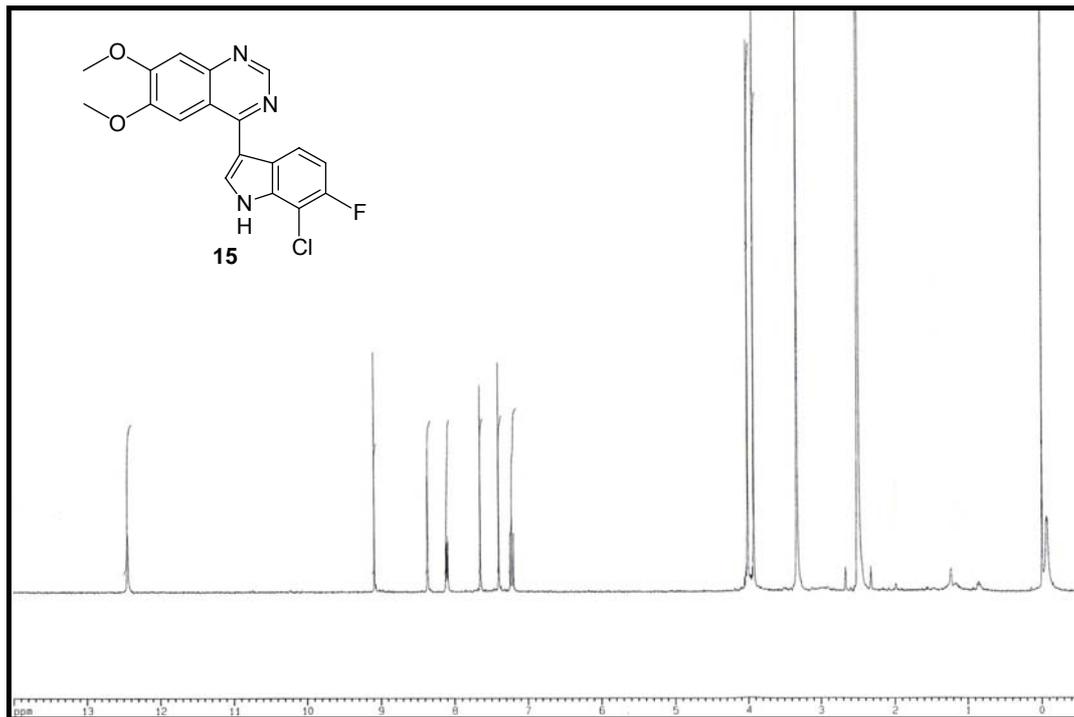


Abb. 50: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **15**

Die Substanz **15** wird einem Test auf ihre EGFR-TK-inhibitorische Aktivität unterzogen. Erstaunlicherweise sinkt die EGFR-TK-Inhibition bei einer Konzentration von 100 nM auf 4 %. Der starke Aktivitätsabfall von 62 % bei der Verbindung **14** auf 4 % bei der Verbindung **15** kommt interessanterweise nur durch den Positionswechsel des Chlor-Substituenten von der Position 5 in die Position 7 zustande. Dies könnte eventuell in einer durch die Nachbarschaft des Chlorsubstituenten verursachten sterischen Hinderung des Indol-NHs als möglicher Bindungsstelle begründet sein.

Im nächsten Schritt soll die Verbindung **23** hergestellt werden, bei der im Gegensatz zu **14** die Chlor-Fluor-Substituenten vertauscht sind. Dabei ist interessant, welchen Einfluss dieser Austausch auf die EGFR-TK-inhibitorische Aktivität hat.

3.2.4 4-(6-Chlor-5-fluorindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (23)

Die Synthese der nachfolgend erwähnten Verbindung **23** geht wieder von den beiden Hetarylierungsteilstrukturen, nämlich dem konstant gehaltenem 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (**4**) sowie dem zu synthetisierenden 6-Chlor-5-fluorindol (**19**), das sich nur durch einen Positionstausch der Halogene von der Verbindung **10** unterscheidet, aus (**Abb. 51**).

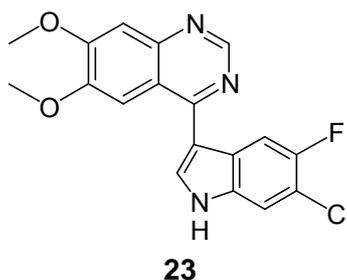
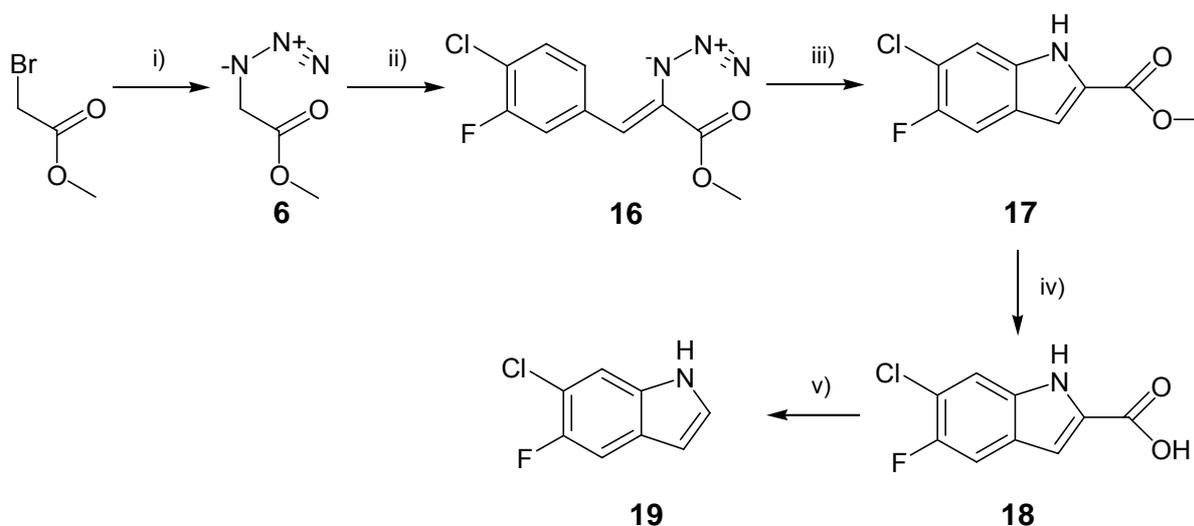


Abb. 51: 4-(6-Chlor-5-fluorindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**23**)

3.2.4.1 Herstellung der Hetarylierungskomponente 6-Chlor-5-fluorindol (**19**) durch eine Hemetsberger-Knittel-Reaktion

Dazu wird zunächst die Indolgrundstruktur **19** mithilfe des bereits erfolgreich verwendeten Verfahrens, bei dem kommerziell erworbener 4-Chlor-3-fluorbenzaldehyd als Edukt für die Hemetsberger-Knittel-Reaktion eingesetzt wird, synthetisiert.



- i) Natriumazid, *N,N*-Dimethylformamid, RT ; ii) Natriummethanolat, 4-Chlor-3-fluorbenzaldehyd, RT ;
 iii) Xylol, ΔT ; iv) Natronlauge, Ethanol, RT ; v) Diphenylether, ΔT

Abb. 52: Syntheseweg zur Herstellung von Verbindung **19**

Aus dem Protonenresonanzspektrum des Methyl-6-chlor-5-fluorindol-2-carboxylats (**17**) wird ersichtlich, dass auch hier keine regioselektive Cyclisierung des Zimtsäureesters **16** stattgefunden hat und wiederum zwei Indole **17** und **20** entstanden sind (**Abb. 53, 54**). Diesmal ist allerdings die Quantität zugunsten der in doppelter Menge vorliegenden Wunschverbindung **17** verschoben.

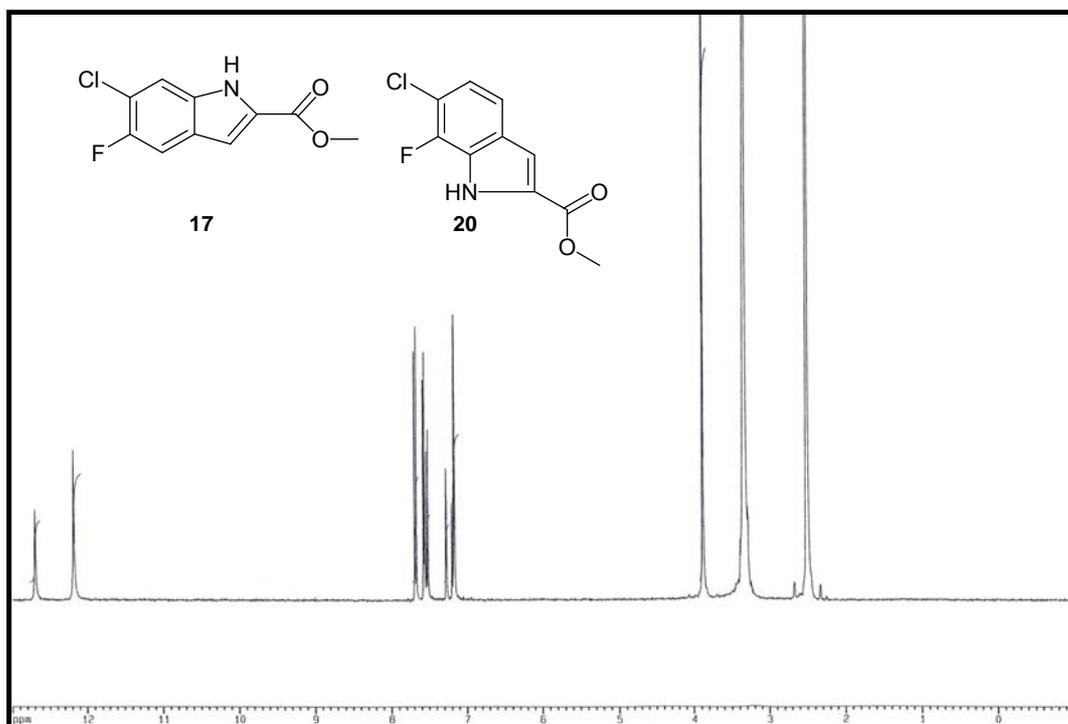


Abb. 53: ^1H -NMR-Spektrum des Gemisches der Verbindungen **17** und **20**

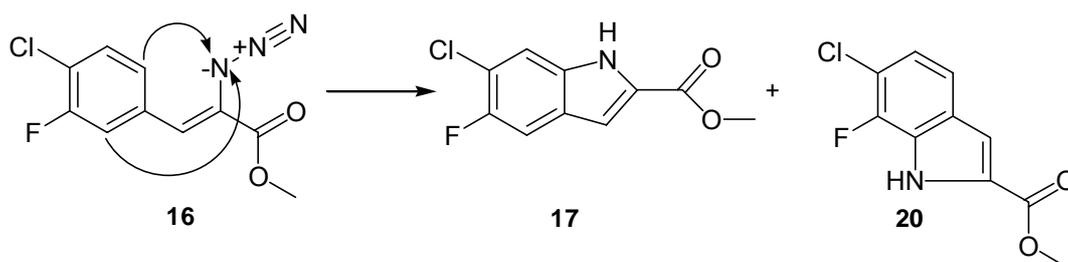


Abb. 54: Intramolekulare Cyclisierung der Verbindung **16** zu den Indolcarbonsäureestern **17** und **20**

Bei der dünnschichtchromatographischen Detektion der beiden Verbindungen **17** und **20** resultieren aus den ähnlichen Eigenschaften fast identische R_f -Werte. Aufgrund dessen lassen sich die beiden Substanzen in verschiedenen Fließmittelgemischen wieder nicht trennen, sodass auch hier die anschließenden Syntheseschritte zunächst mit einem Gemisch beider Verbindungen durchgeführt werden müssen.

Daher liegen auch nach der Verseifung von **17** und **20** die beiden Indol-2-carbonsäuren **18** und **21** nebeneinander vor (**Abb. 55**).

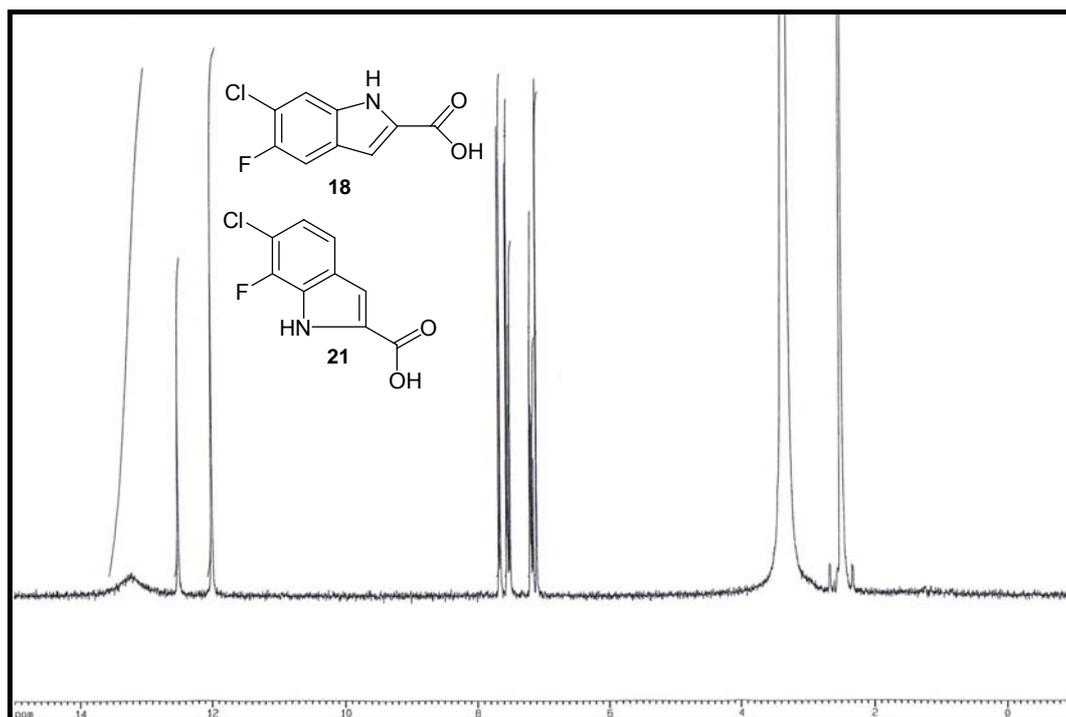


Abb. 55: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Gemisches der Verbindungen **18** und **21**

Die Trennung der beiden Indolderivate **19** und **22** erfolgt erst nach einer Decarboxylierung von **18** und **21** wiederum auf der Stufe des Indols. Zunächst wird auch hier der Diphenylether durch das Fließmittel n-Hexan eluiert. Nach anschließendem Fließmittelwechsel zu einem Toluol/n-Hexan-Gemisch (1:3) sind beide Indole einzeln separierbar.

Die Abbildungen 56 und 57 zeigen die Protonenresonanzspektren der Wunschverbindung **19** und des Nebenproduktes **22**.

Bei einer chemischen Verschiebung von 11,29 bzw. 11,83 ppm liegen die Signale der mit D_2O austauschbaren NH-Gruppen der Indole, die auch sehr gut im Infrarot-Spektrum als NH-Valenzschwingungen bei Wellenzahlen von 3390 bzw. 3459 cm^{-1} sichtbar sind.

Außerdem erscheinen in den Aromatenbereichen der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (ca. 6,5-8 ppm) die Signale mit der charakteristischen Aufspaltung für das jeweilige Substitutionsmuster des entsprechenden Indols.

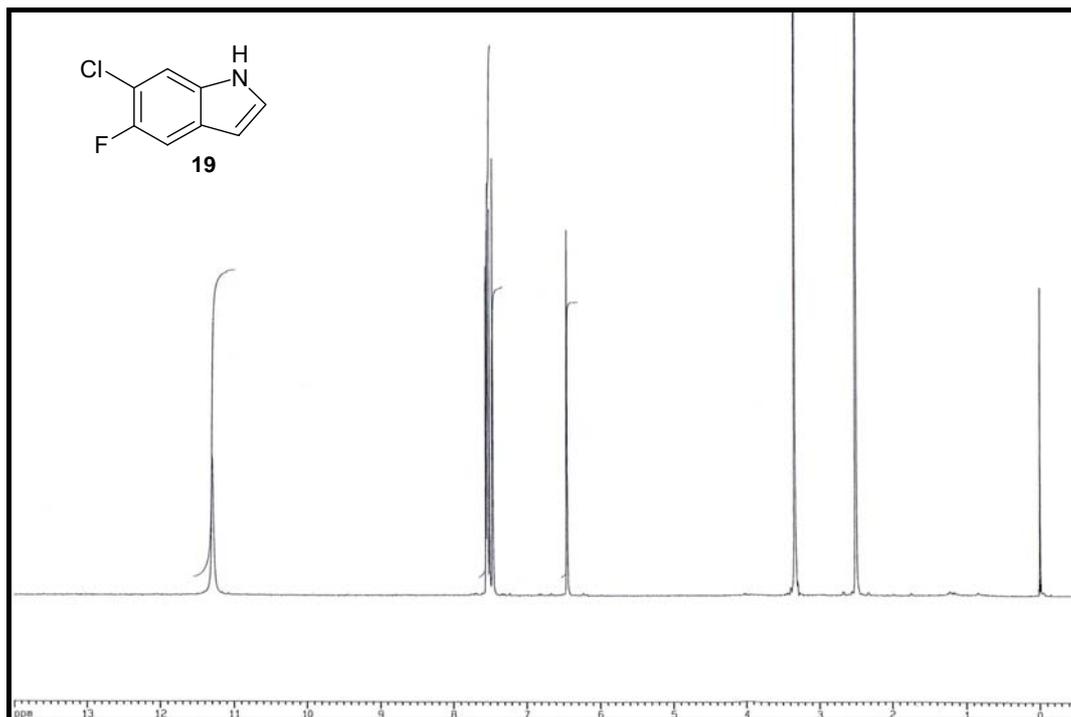


Abb. 56: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 19

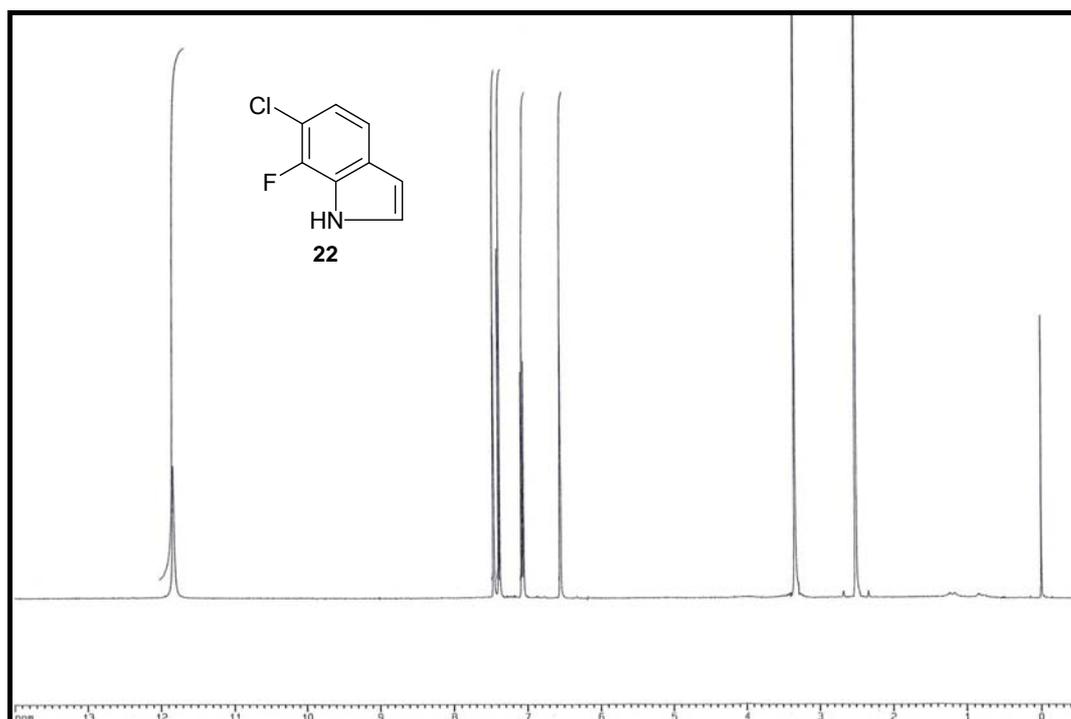
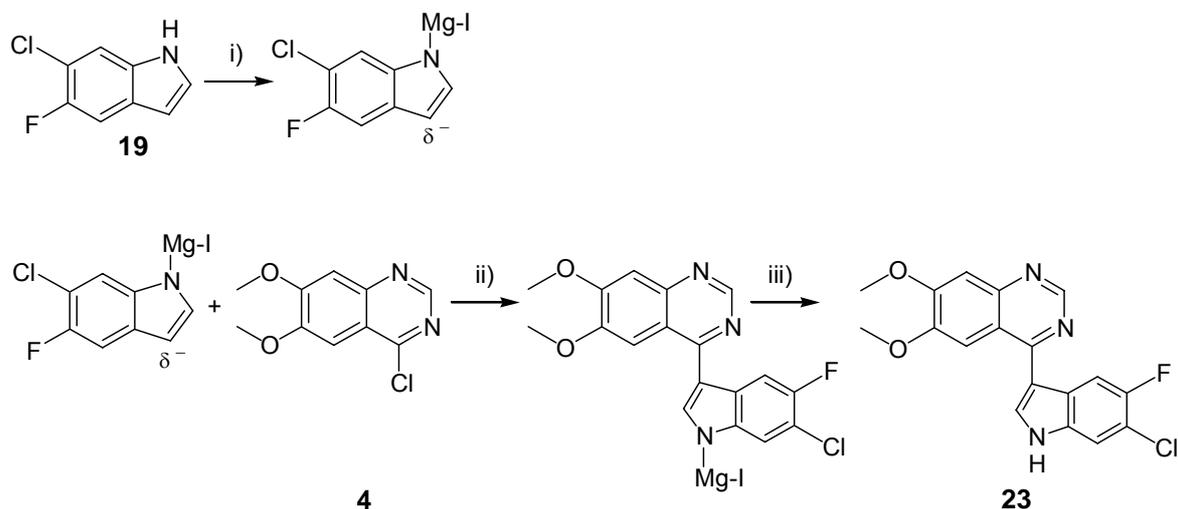


Abb. 57: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 22

Aufgrund der für eine Hetarylierung nicht ausreichenden Menge des Nebenproduktes 22, wird diese Reaktion, wie geplant, nur mit dem 6-Chlor-5-fluorindol (19) durchgeführt.

3.2.4.2 Herstellung der Verbindung 23 mit Hilfe von Grignard-Reagenzien

Zur Synthese der Verbindung **23** wird 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (**4**) und 6-Chlor-5-fluorindol (**19**) einer Cross-coupling-Reaktion mithilfe einer Grignard-Verbindung unterworfen (**Abb. 58**).



i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) Δ ; iii) Wasser, RT

Abb. 58: Herstellung der Verbindung **23**

Nach Aufreinigung und Umkristallisation des dünnstschichtchromatographisch sehr gut detektierbaren, hellblau fluoreszierenden Produktes wurde ein Protonenresonanzspektrum aufgenommen (**Abb. 59**). In diesem fällt wieder das signifikante Singulett der NH-Gruppe des Indols bei 12,14 ppm auf.

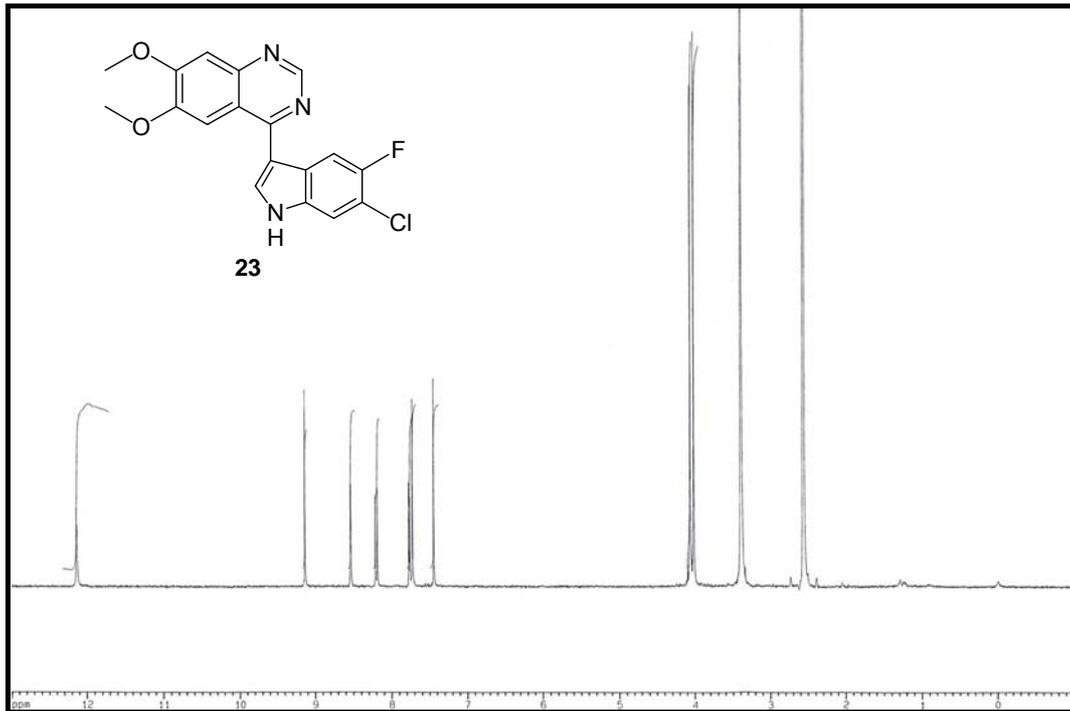


Abb. 59: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **23**

Um den Einfluss des Positionswechsels der Fluor-Chlor-Substituenten im Vergleich zur hervorragend EGFR-TK-inhibierenden Substanz **14** zu beurteilen, wird auch die Substanz **23** auf ihre EGFR-TK-Inhibition getestet.

Dabei wird bei einer Konzentration von 100 nM eine EGFR-TK-inhibitorische Aktivität von 14 % festgestellt, die damit viel niedriger ist, als die bei der gleichen Konzentration gemessene Inhibition der Verbindung **14** von 62 %.

So ist also der Positionstausch der Fluor-Chlor-Substituenten für diesen drastischen Abfall der EGFR-TK-Hemmung verantwortlich.

Auch hier könnte einer der Gründe für diese Aktivitätsminderung darin liegen, dass jetzt der Chlor-Substituent durch seine Größe die Indol-NH-Bindungsstelle stärker abschirmt, und dass dadurch die Bindung zu den Aminosäuren des Rezeptors weniger stark ausgeprägt ist.

3.2.5 4-(6-Fluor-5-methylindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**31**)

Da sich die bisherige Indol-Substitution ausschließlich auf Elektronenakzeptoren mit einem -I-Effekt beschränkt hat, soll jetzt die Beeinflussung der Wirksamkeit durch einen zusätzlichen Substituenten mit +I-Effekt untersucht werden.

Zudem soll geklärt werden, ob sich das bisherige Hetarylierungsverfahren mithilfe einer Grignard-Verbindung trotz der Änderung der elektronischen Eigenschaften des Indols als geeignet erweist.

Ein zu synthetisierendes 4-(6-Fluor-5-methylindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**31**) weist dementsprechend eine Indolteilstruktur mit einem Fluor-Substituenten als Elektronenakzeptor und einen Methyl-Substituenten als Elektronendonator auf (**Abb. 60**).

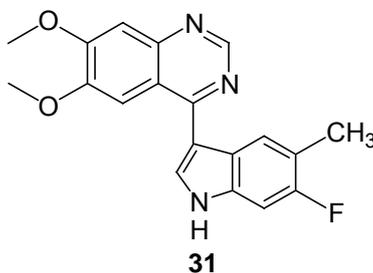
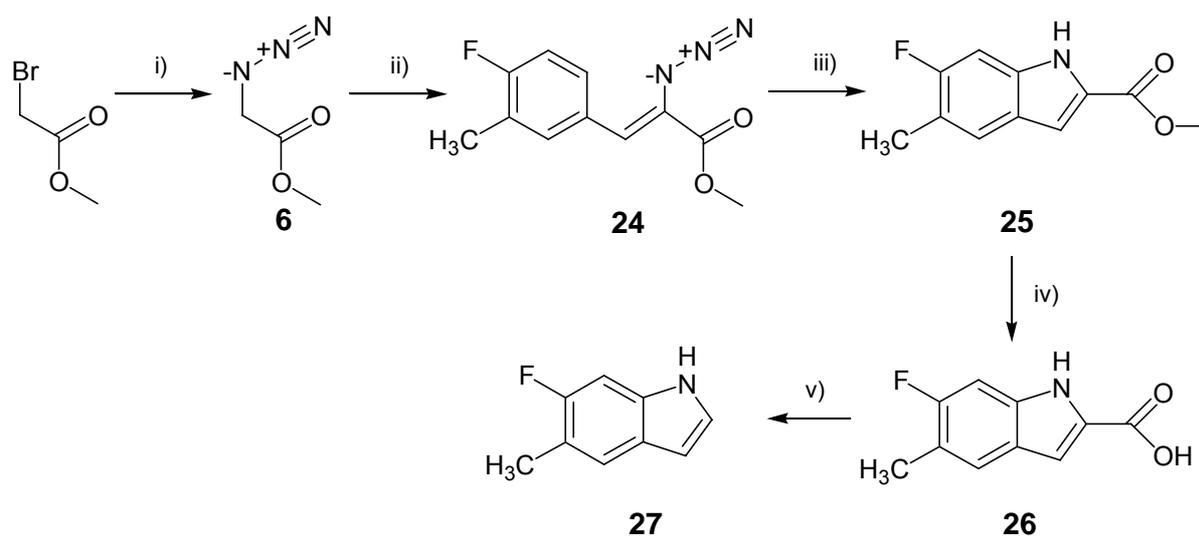


Abb. 60: 4-(6-Fluor-5-methylindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**31**)

Im Rahmen der Synthese von Verbindung **31** wird das 6-Fluor-5-methylindol (**27**) als Indolbaustein ausgewählt.

3.2.5.1 Herstellung der Hetarylierungskomponente 6-Fluor-5-methylindol (**27**) nach Hemetsberger-Knittel

Das entsprechende Indol **27** wird aus dem käuflich erworbenen 4-Fluor-3-methylbenzaldehyd durch eine Hemetsberger-Knittel-Reaktion mit anschließender Verseifung und Decarboxylierung hergestellt (**Abb. 61**).



- i) Natriumazid, *N,N*-Dimethylformamid, RT ; ii) Natriummethanolat, 4-Fluor-3-methylbenzaldehyd, RT ;
iii) Xylol, ΔT ; iv) Natronlauge, Ethanol, RT ; v) Diphenylether, ΔT

Abb. 61: Syntheseweg zur Herstellung von Verbindung **27**

Auch hier cyclisiert der Zimtsäureester **24** nicht regioselektiv, sodass wieder zwei Indolcarbonsäureester **25** und **28** entstehen (**Abb. 62**).

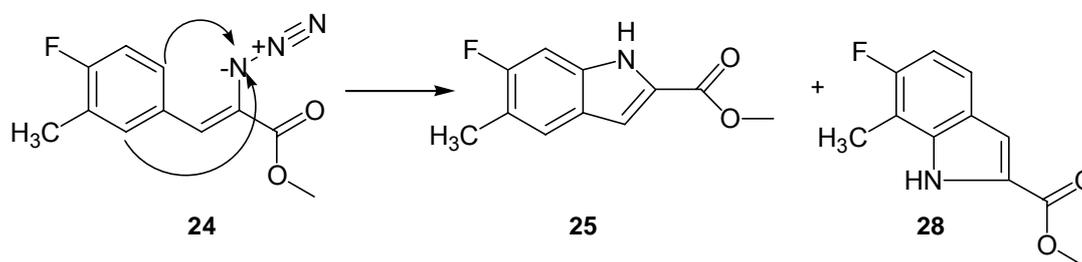


Abb. 62: Intramolekulare Cyclisierung der Verbindung **24** zu den Indolcarbonsäureestern **25** und **28**

Allerdings wird aufgrund des Protonenresonanzspektrums (**Abb. 63**) vermutet, dass die Eigenschaften der Verbindungen **25** und **28** wahrscheinlich noch ähnlicher sind, als bei den zuvor synthetisierten Indolbausteinen, da die beiden signifikanten Indol-NH-Gruppen nahezu die gleiche chemische Verschiebung bei 11,82 bzw. 11,79 ppm aufweisen.

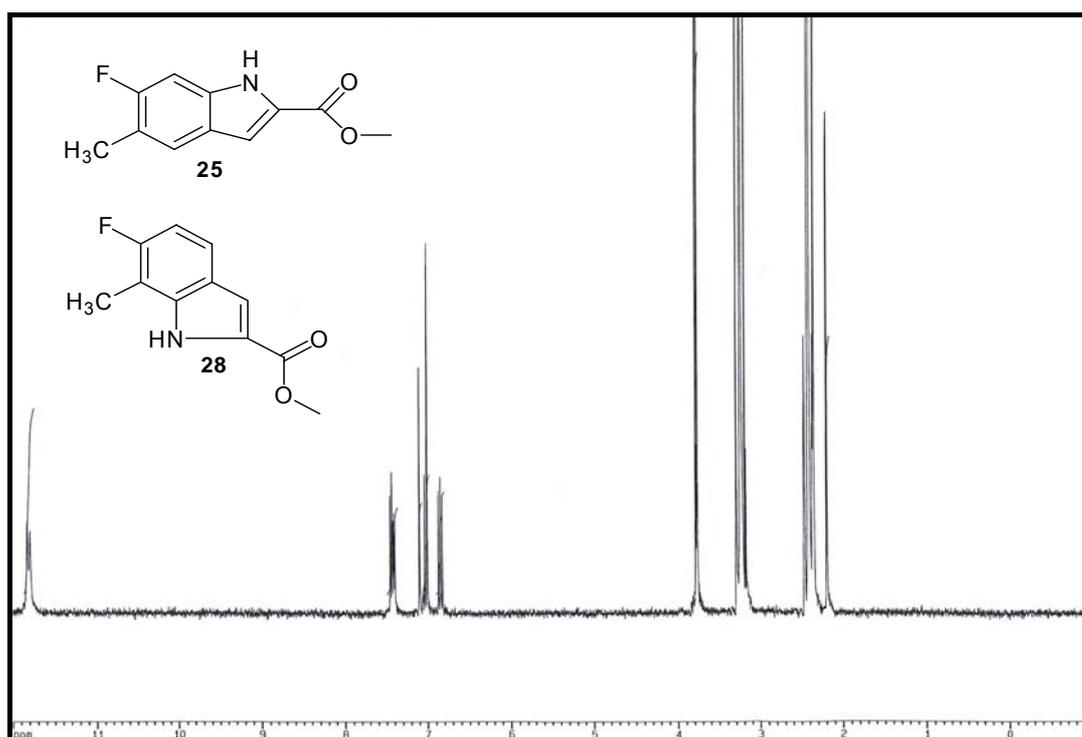


Abb. 63: ^1H -NMR-Spektrum des Gemisches der Verbindungen **25** und **28**

Die nachfolgende Verseifung mit verdünnter Natronlauge ergibt wieder zwei Indolcarbonsäuren, **26** und **29**, die anschließend zu dem Gemisch der entsprechenden Indole **27** und **30** decarboxyliert werden.

Der Versuch, die beiden im Gemisch vorliegenden Indole nach Eluierung des Diphenylethers mit dem üblichen Verfahren der Säulenchromatographie unter Verwendung des Fließmittelgemisches Toluol/n-Hexan (1:3) zu trennen, schlug aufgrund zu ähnlicher Eigenschaften der beiden Substanzen fehl. Auch der Einsatz verschiedener anderer Elutionsmittel, die Trennung mit Dickschichtchromatographie bzw. eine Umkristallisation der Indolderivate erwiesen sich als ungeeignet.

Das Protonenresonanzspektrum des nicht trennbaren Gemisches der beiden Indole **27** und **30** lässt die Singulets der beiden NH-Gruppen der Indole bei einer chemischen Verschiebung von 11,23 bzw. 11,05 ppm und die der beiden Methylgruppen bei 2,44 bzw. 2,34 ppm erkennen (**Abb. 64**).

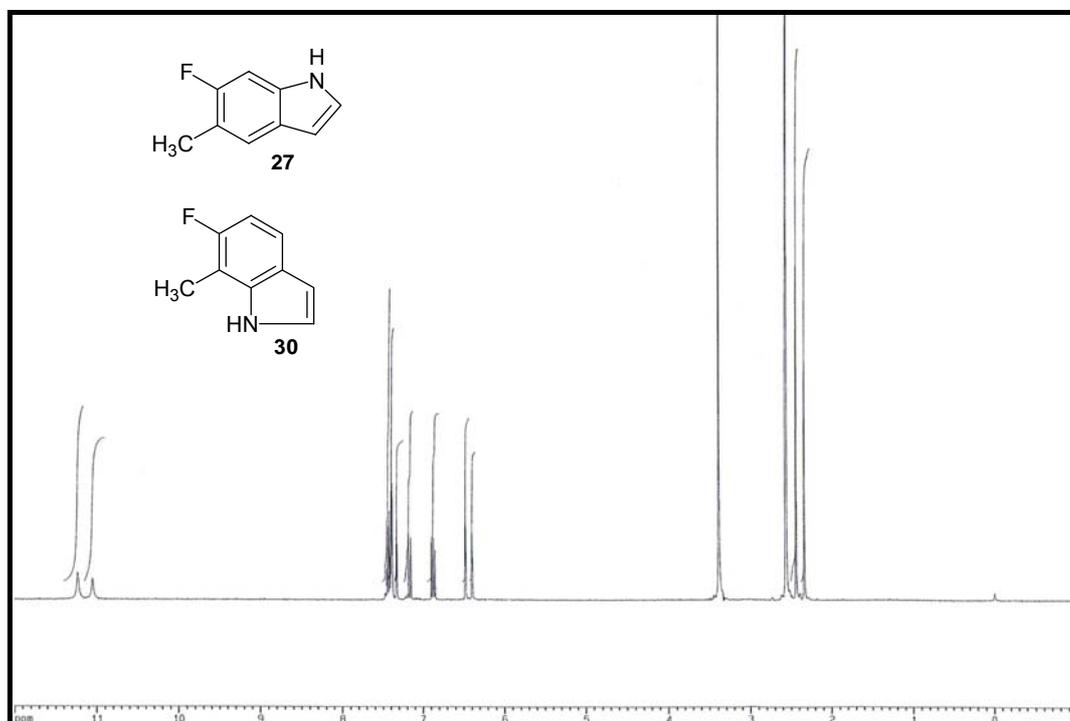


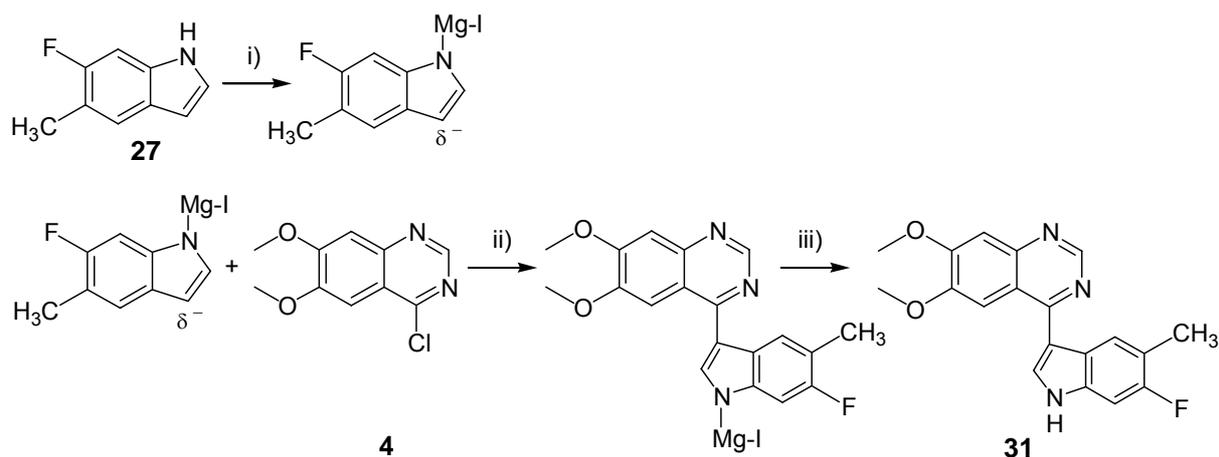
Abb. 64: ¹H-NMR-Spektrum des Gemisches der beiden Indole **27** und **30**

Aufgrund der nicht erfolgreichen Trennung soll die nachfolgende Cross-coupling-Reaktion zunächst mit dem Gemisch der beiden Indole durchgeführt werden und ein eventuell auftretendes Produktgemisch auf der Schlussstufe getrennt werden.

3.2.5.2 Herstellung der Verbindung 31 unter Verwendung von Grignard-Reagenz

Für die Synthese der Verbindung **31** (**Abb. 60**) wird wieder auf das bereits bewährte Hetarylierungsverfahren zurückgegriffen.

Dazu werden 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (**4**) und das Gemisch der metallierten Indole **27** und **30** umgesetzt (**Abb. 65**). Zur Vereinfachung der Abbildung wurde hier nur die Reaktion mit dem Wunschindol **27** dargestellt.



i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) ΔT ; iii) Wasser, RT

Abb. 65: Herstellung der Verbindung **31** (vereinfachte Darstellung)

Bei der dünnschichtchromatographischen Detektion werden zwei dicht beieinander liegende, stark hellblau fluoreszierende Substanzen sichtbar.

Zur Aufreinigung der Substanzen wird säulenchromatographisch mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat/Ethanol (9:1) getrennt.

Eine erste $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Kontrolle nach der Aufreinigung zeigt Edukt-freies Substanzgemisch in Form von 4-(6-Fluor-5-methylindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**31**) und 4-(6-Fluor-7-methylindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**32**).

Deshalb wurden verschiedene Fließmittelgemische für die Säulenchromatographie getestet und damit die Verbindung **31** weiter aufgereinigt. Allerdings konnte dabei die Menge an Verbindung **32** nur reduziert, aber nicht komplett eliminiert werden.

Nach zweimaliger Diffusionsumkristallisation aus Ethylacetat/n-Hexan wurde dann aber doch die reine Wunschverbindung **31** isoliert.

Das Protonenresonanzspektrum des 4-(6-Fluor-5-methylindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolins (**31**) (**Abb. 66**) weist große Ähnlichkeiten mit dem des 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolins (**14**) auf, da das einzige Unterscheidungsmerkmal dieser beiden Substanzen nur der Methyl-Substituent in Position 5 des Indols ist.

Die Abschirmung und die damit begründete Hochfeldverschiebung der Protonen des Indolteils der Substanz **31** sind durch die Methylgruppe im Gegensatz zum Chlorsubstituenten der Verbindung **14** erklärbar.

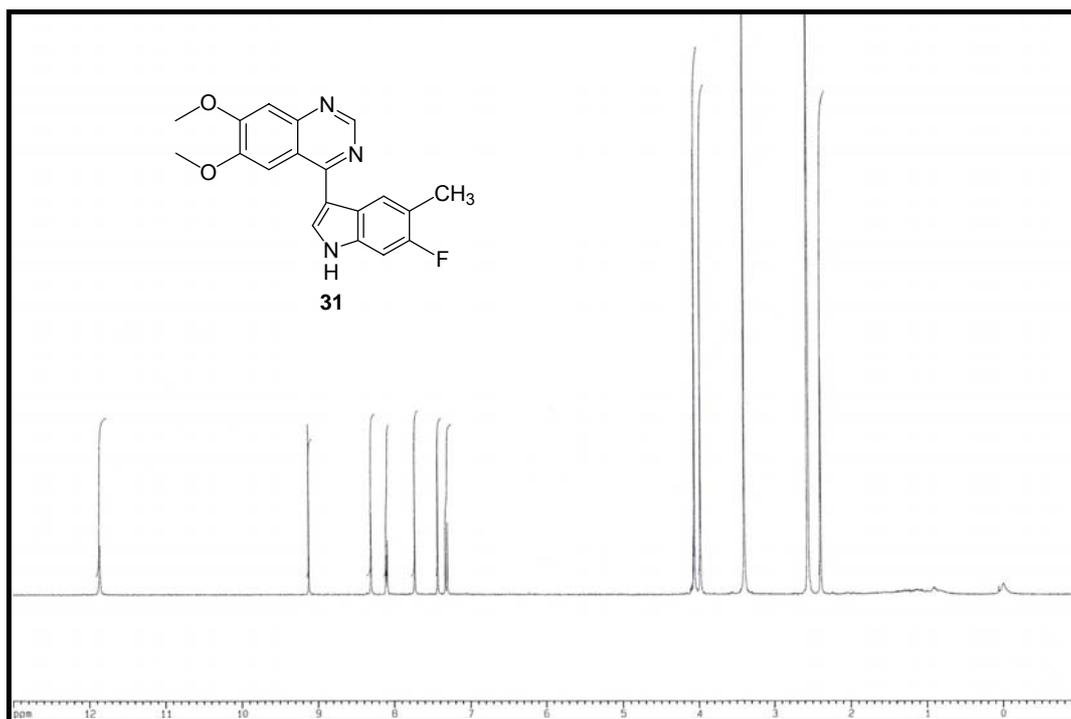


Abb. 66: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **31**

Anschließend wurde auch diese Substanz auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität hin getestet. Erstaunlicherweise beträgt die EGFR-TK-Inhibition bei einer Konzentration von 100 nM -9 %, was bedeutet, dass die Substanz **31** das EGFR-TK-abhängige Zellwachstum stimuliert. Nur durch den Austausch des Chlorsubstituenten der Verbindung **14** gegen einen Methylsubstituenten der Verbindung **31** verändert sich die EGFR-TK-inhibitorische Aktivität bei gleich bleibender Konzentration von 100 nM von 62 % auf -9 % drastisch.

Aus diesem unerwarteten Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass 4-(Indol-3-yl)chinazoline mit partiell donatorsubstituierten Indolbausteinen ihre EGFR-TK-inhibitorische Aktivität einbüßen.

3.2.6 4-(5,6-Dimethoxyindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**33**)

Die folgende geplante Synthese eines 4-(Indol-3-yl)chinazolins **33** mit ausschließlicher Donatorsubstitution am Indolteil soll der Untermauerung der oben genannten These dienen.

Dazu soll käuflich erworbenes und mit zwei Elektronendonatoren substituiertes 5,6-Dimethoxyindol mit 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (**4**) zum 4-(5,6-Dimethoxyindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**33**) umgesetzt werden (**Abb. 67**).

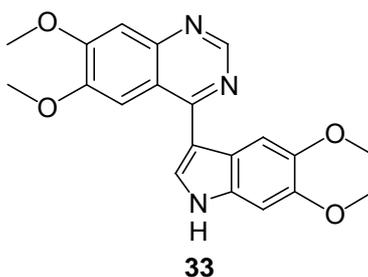
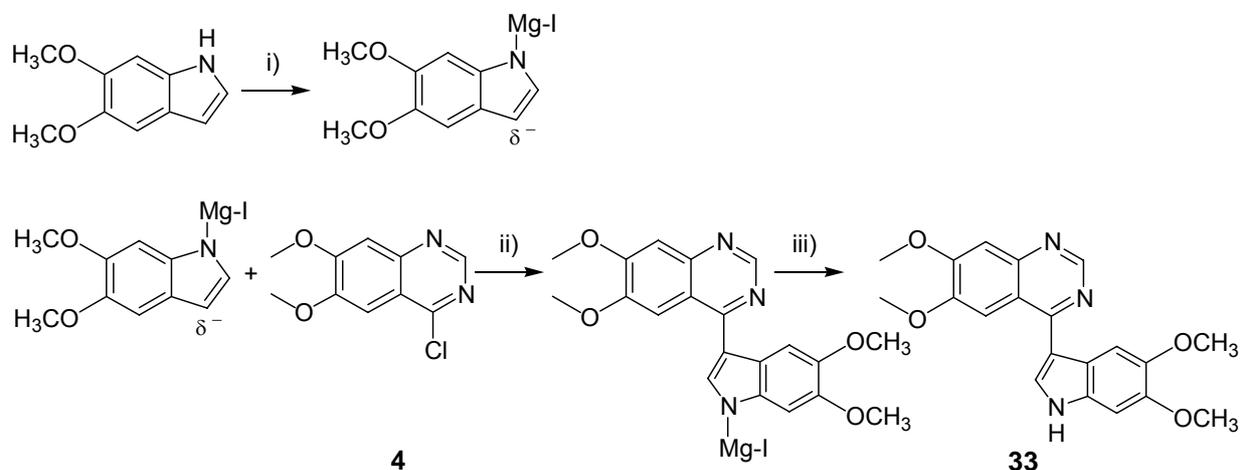


Abb. 67: 4-(5,6-Dimethoxyindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**33**)

Die Synthese soll mit der bereits beschriebenen Cross-coupling-Reaktion unter Einsatz einer Grignard-Verbindung erfolgen (**Abb. 68**).



i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) ΔT ; iii) Wasser, RT

Abb. 68: angedachter Syntheseweg zur Herstellung der Verbindung **33**

Dabei gestaltet sich die sehr schlechte Löslichkeit des 5,6-Dimethoxyindols in Diethylether problematisch, da sich auch durch eine Erhöhung der Lösungsmittelmenge und Erwärmen keine nachhaltige Verbesserung erzielen lässt. Deshalb erfolgt die Zugabe des Indols zum Methylmagnesiumiodid größtenteils in Form einer Suspension.

Schon zu diesem Zeitpunkt fällt die farbliche Veränderung der Mischung auf. Während sich beim Zutropfen der in Diethylether löslichen Indole zum Methylmagnesiumiodid eine gelbe, leicht trübe Lösung bildet, entsteht bei Zugabe des schwer löslichen 5,6-Dimethoxyindols eine weiße Suspension.

Nach der Hydrolyse wird ein gelber Feststoff isoliert, der bei dünnschichtchromatographischer Kontrolle mit anschließender Detektion im ultravioletten Licht bei einer Wellenlänge von 254 und 366 nm nicht die charakteristische Fluoreszenz dieser Stoffklasse aufweist. Trotzdem wird zur Trennung des Stoffgemisches eine Säulenchromatographie durchgeführt. Die isolierten Substanzen werden einer massenspektroskopischen sowie einer protonenresonanzspektroskopischen Überprüfung unterzogen.

Die Massenspektren zeigen Basispeaks bei m/z 177 bzw. m/z 224. Diese sind eindeutig den beiden Edukten zuzuordnen. Ein für die Verbindung **33** erwarteter Molpeak bei m/z 365 tritt nicht auf. Auch in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sind nur die Signale des 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolins (**4**) bzw. des 5,6-Dimethoxyindols zu erkennen.

Daraufhin wird nach einem besseren Lösungsmittel für das Indol gesucht, das gleichzeitig für Grignard-Reaktionen geeignet sein muss. Diese Eigenschaften finden sich in dem cyclischen Ether 1,4-Dioxan. In diesem weist das 5,6-Dimethoxyindol eine gute Löslichkeit auf, die auch nach Zugabe von Diethylether erhalten bleibt.

Daher wird das Methylmagnesiumiodid mit dem üblichen Verfahren in Gegenwart von Diethylether hergestellt, um auf diese Weise über die Ligandenfunktion des Diethylethers die Oktettkonfiguration des Magnesiums zu erhalten. Das Indol wird in 1,4-Dioxan gelöst. Aber sofort nach dem Hinzutropfen zum Methylmagnesiumiodid fällt ein farbloses Produkt schleimiger Konsistenz aus, das sich auch nach weiterer Dioxan-Zugabe nicht wieder auflöst.

Auch hier wird nach der Hydrolyse ein gelber Feststoff isoliert, der keine charakteristische Fluoreszenz bei der dünnschichtchromatographischen Detektion erkennen lässt. Daher wird zunächst auf eine Aufreinigung der Mischung durch Säulenchromatographie verzichtet und sofort eine massenspektroskopische Kontrolle durchgeführt (**Abb. 69**).

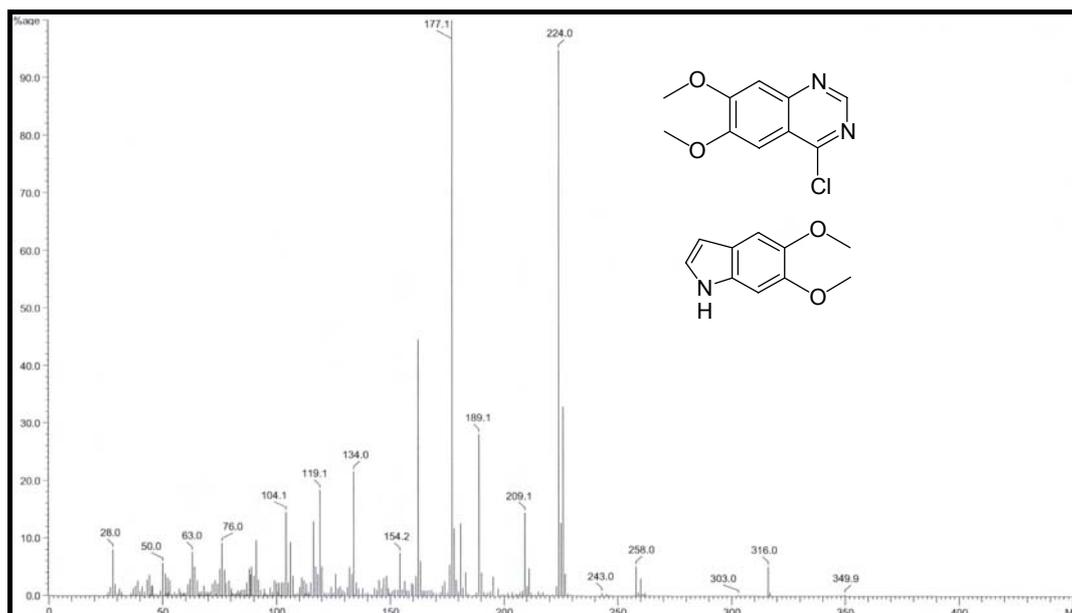


Abb. 69: Massenspektrum des entstandenen Gemisches der beiden Edukte

Hier liegen die zwei Basispeaks der Edukte bei m/z 177 und 224 nebeneinander vor. Der erwartete Molpeak der Wunschverbindung **33** von m/z 365 fehlt erneut.

Aufgrund der unzureichenden Löslichkeit des Eduktes 5,6-Dimethoxyindol in Diethylether bzw. anderer für die Grignard-Reaktion geeigneter Lösungsmittel führt die Cross-coupling-Reaktion mit 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (**4**) nicht zum gewünschten Produkt. Daher kann auch keine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit bei der Substanzklasse der 4-(Indol-3-yl)chinazoline eine Indolsubstitution partiell mit Elektronendonatoren die EGFR-TK-inhibitorische Aktivität beeinflusst.

3.3 Übersicht über die EGFR-TK-Inhibition synthetisierter 4-(Indol-3-yl)chinazoline mit variabler Indol-Grundstruktur

Zusammenfassend wird hier noch einmal eine Übersicht über die EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten der synthetisierten 4-(Indol-3-yl)chinazoline **5**, **14**, **15**, **23** und **31** mit konstant gehaltener 6,7-Dimethoxy-Substitution des Chinazolins und variabel substituiertem Indol-Teil tabellarisch vorgestellt (**Tabelle 8**).

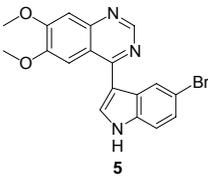
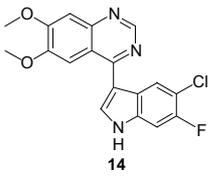
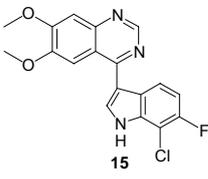
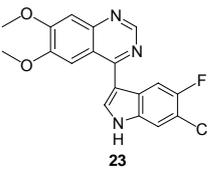
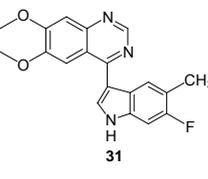
Substanz	EGFR-TK-Inhibition [%] bei einer Konzentration von 100 nM
 <p style="text-align: center;">5</p>	81
 <p style="text-align: center;">14</p>	62
 <p style="text-align: center;">15</p>	4
 <p style="text-align: center;">23</p>	14
 <p style="text-align: center;">31</p>	-9

Tabelle 8: EGFR-Inhibition synthetisierter 4-(Indol-3-yl)chinazolinen mit variabler Indolsubstitution

Anhand dieser Gegenüberstellung der Ergebnisse sind überraschenderweise trotz nur geringer Variation der Indol-Substituenten große Unterschiede in der inhibitorischen Wirksamkeit dieser Substanzklasse erkennbar.

Eine exzellente EGFR-TK-Inhibition wird bei der Verbindung **5** erzielt. Allerdings ist hier eine gute Zellgängigkeit aufgrund der geringeren Lipophilie fraglich.

Auch bei der Verbindung **14** wurden hervorragende EGFR-inhibitorische Testergebnisse bei zusätzlich exzellenter Zytotoxizität festgestellt.

Alle anderen hergestellten Verbindungen weisen allerdings eine mit Abstand schlechtere EGFR-TK-hemmende Aktivität auf, die bei den Verbindungen **15** und **23** mit einer durch die Nähe des größeren Chlor-Substituenten bedingten Abschirmung des Indol-NHs als möglicher Bindungsstelle zu den Aminosäuren des Rezeptors zu begründen ist. Bei der Verbindung **31** werden dieser drastische Aktivitätsabfall und der EGFR-TK-stimulierende Effekt mit dem als Elektronendonator fungierenden Methyl-Substituenten begründet.

Zusammenfassend ist die Verbindung **14** deshalb als Leitsubstanz dieser Substanzklasse zu bezeichnen.

Im nächsten Teil der Arbeit soll versucht werden, die pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanz **14** durch Variation der Substitution des Chinazolinteils zu optimieren. Dabei soll der Indolteil mit der bewährten 5-Chlor-6-fluor-Substitution konstant gehalten werden.

3.4 Herstellung von 4-(Indol-3-yl)chinazolinen durch Hetarylierung unterschiedlich substituierter Chinazolingrundkörper mit 5-Chlor-6-fluorindol (10)

Bei Cross-coupling-Reaktionen des 6,7-Dimethoxychinazolins (4) mit am Benzenring unterschiedlich substituierten Indolen zeigt das 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (14) eine hervorragende EGFR-TK-inhibitorische Aktivität bei gleichzeitig exzellenter Zytotoxizität und dient als Leitsubstanz für weitere Strukturvariationen (Abb. 34).

Aufgrund dessen wird das 5-Chlor-6-fluorindol (10) als Indolbaustein für nachfolgende Hetarylierungsreaktionen mit variabel substituierten Chinazolinen ausgewählt. Ziel dieser Synthesen ist eine Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanzklasse.

Dafür soll auf Substitutionsmuster zugelassener 4-Anilinochinazoline zurückgegriffen werden, die bereits einen optimierten Chinazolinbaustein aufweisen.

3.4.1 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-di-(2-methoxyethoxy)chinazolin (39)

Zunächst wird die Struktur des Arzneistoffes Erlotinib genauer analysiert (Abb. 70). Erlotinib besitzt 6,7-Di-(2-methoxyethoxy)-Substituenten am Chinazolingrundkörper. Diese könnten sich laut *Traxler* in der Phosphatbindungsregion des EGF-Rezeptors anstelle des Triphosphatrestes des ATP's ausrichten [72].

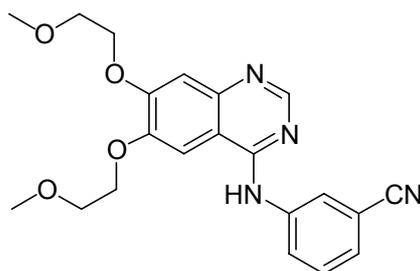


Abb. 70: Erlotinib (Tarceva®)

Daher soll versucht werden, das bereits bewährte 5-Chlor-6-fluorindol (10) mit dem Chinazolinbaustein des Erlotinibs in einer Cross-coupling-Reaktion zum 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-di-(2-methoxyethoxy)chinazolin (39) umzusetzen (Abb. 71).

a) Ethyl-3,4-di-(2-methoxyethoxy)benzoat (**34**) mit Hilfe einer Williamson-Ethersynthese

Der erste Schritt der in Abbildung 72 gezeigten Synthese geht vom kommerziell erworbenen Ausgangsstoff Ethyl 3,4-Dihydroxybenzoat aus, der mit 2-Bromethylmethylether, Kaliumcarbonat und Aceton unter Rückfluss erhitzt wird. Bei der dabei stattfindenden Williamson-Ethersynthese werden die beiden phenolischen Hydroxygruppen entsprechend verethert (**Abb. 73**).

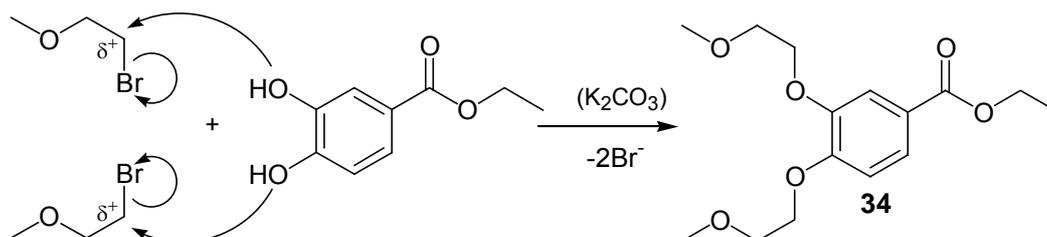


Abb. 73: Herstellung von Ethyl-3,4-di-(2-methoxyethoxy)benzoat (**34**) mit Hilfe einer Williamson-Ethersynthese

Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie unter Verwendung des Fließmittelgemisches Ethylacetat/n-Hexan (2:3) wird die Verbindung **34** als farbloses, wachsartiges Produkt isoliert.

b) Ethyl-4,5-di-(2-methoxyethoxy)-2-nitrobenzoat (**35**) durch Nitrierung über einen Wheland-Komplex

Im Anschluss daran wird die Substanz **34** einer Nitrierung unterzogen. Dazu wird gekühlte konzentrierte Salpetersäure in Anteilen zum Ethyl 3,4-Di-(2-methoxyethoxy)benzoat (**34**) gegeben und gerührt. Zum Schluss wird die Reaktionsmischung in Wasser gegossen und die dabei entstehende kolloidale, hellgelbe Lösung mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Elimination des Lösungsmittels im Vakuum bleibt ein braunes Öl zurück, das durch Säulenchromatographie mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat/n-Hexan (2:3) aufgereinigt und dadurch von Nebenprodukten und unumgesetztem Edukt befreit wird.

Da unter diesen Bedingungen keine vollständige Nitrierung stattgefunden hat, wird die Reaktionszeit von Verbindung **34** in konzentrierter Salpetersäure von der im Patent angegebenen Zeit von zehn Minuten auf zwei Stunden verlängert. Zusätzlich wurde die Menge der konzentrierten Salpetersäure erhöht. Durch diese Maßnahmen konnte die Ausbeute gesteigert werden, sodass eine vollständige Umsetzung die Aufreinigung der Verbindung **35** durch nicht mehr vorhandenes Edukt wesentlich erleichterte.

Bei der Nitrierung greift das Nitronium-Kation als Elektrophil den mäßig aktivierten Aromaten an. Dabei würden die bereits vorhandenen Substituenten den Eintritt der Nitrogruppe hauptsächlich in meta-Position zur Estergruppe begünstigen. Aber aufgrund der sperrigen Seitenketten erfolgt die Nitrierung in Position 2 des Aromaten, obwohl diese Position nur einmal durch den para-ständige Ethersubstituenten aktiviert und zweimal durch die meta-ständige Ethergruppe und die ortho-ständige Estergruppe deaktiviert ist.

Die Bildung eines Wheland- bzw. σ -Komplexes ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Zweistufen-Reaktion. Wheland-Komplexe sind Hochenergie-Zwischenstufen, da sie nicht über das durchkonjugierte aromatische Elektronensystem von Edukt und Produkt verfügen. Im zweiten Teilschritt wird durch die Abspaltung des Protons der Aromat regeneriert (**Abb. 74**) [74].

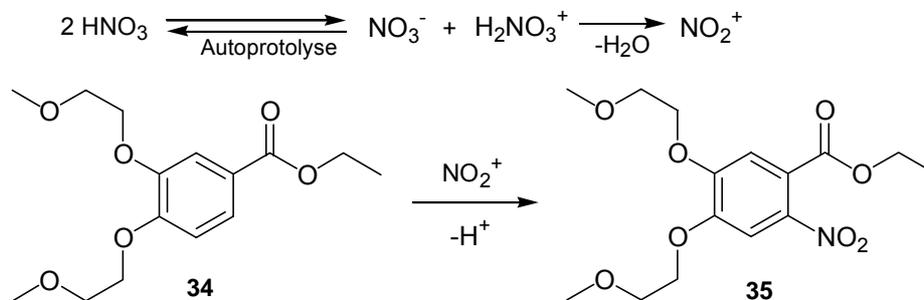


Abb. 74: Nitrierung der Verbindung **34**

- c) Reduktion der Nitrogruppe der Verbindung **35** zum Ethyl-2-amino-4,5-di-(2-methoxyethoxy)benzoat (**36**)

Im Anschluss daran wird die Nitrogruppe der Substanz **35** zur Aminofunktion reduziert. In der Versuchsvorschrift des oben erwähnten Patentes werden Cyclohexen als Wasserstoffdonator und Palladium auf Aktivkohle als Katalysator vorgeschlagen. Bei diesem Wasserstofftransfer überträgt Cyclohexen in Gegenwart von Palladium/Kohle zwei Wasserstoffmoleküle und wird dabei selbst zum Benzol dehydriert. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Katalysator möglichst frisch verwendet wird.

Auch hier wird nach der Aufreinigung von **36** durch Säulenchromatographie mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat/n-Hexan (2:3) als Produkt ein braunes Öl erhalten.

- d) Ringschluss zum 6,7-Di-(2-methoxyethoxy)-3,4-dihydrochinazolin-4-on (**37**)

Durch Erhitzen der Verbindung **36** mit Formamidinacetat in 2-Methoxyethanol wird der Ringschluss zum Chinazolin-4-on vollzogen. Nach Eliminierung des Lösungsmittels im Vakuum kann die Verbindung **37** als Feststoff separiert werden. Die Aufreinigung erfolgt

mittels Säulenchromatographie unter Verwendung des Fließmittelgemisches Dichlormethan/Methanol (9:1).

Im Protonenresonanzspektrum zeigt die NH-Gruppe ein verbreitertes Signal bei 12,07 ppm. Bei einer chemischen Verschiebung zwischen 3,5 und 4,5 ppm liegen die Signale der Protonen der beiden Seitenketten (**Abb. 75**).

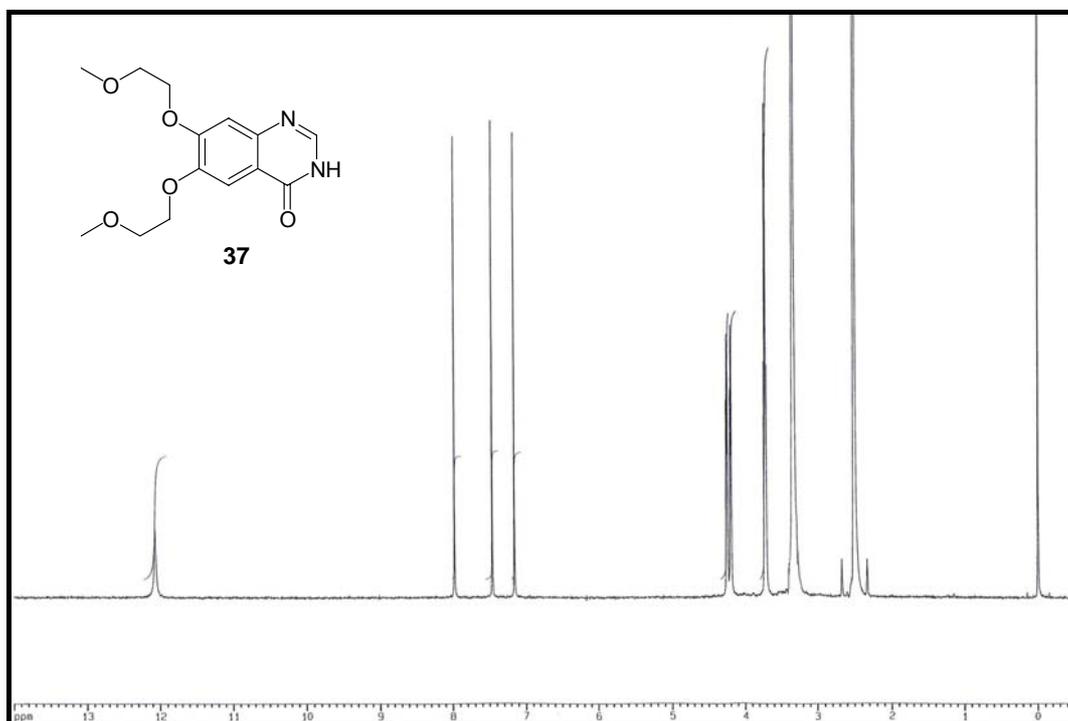


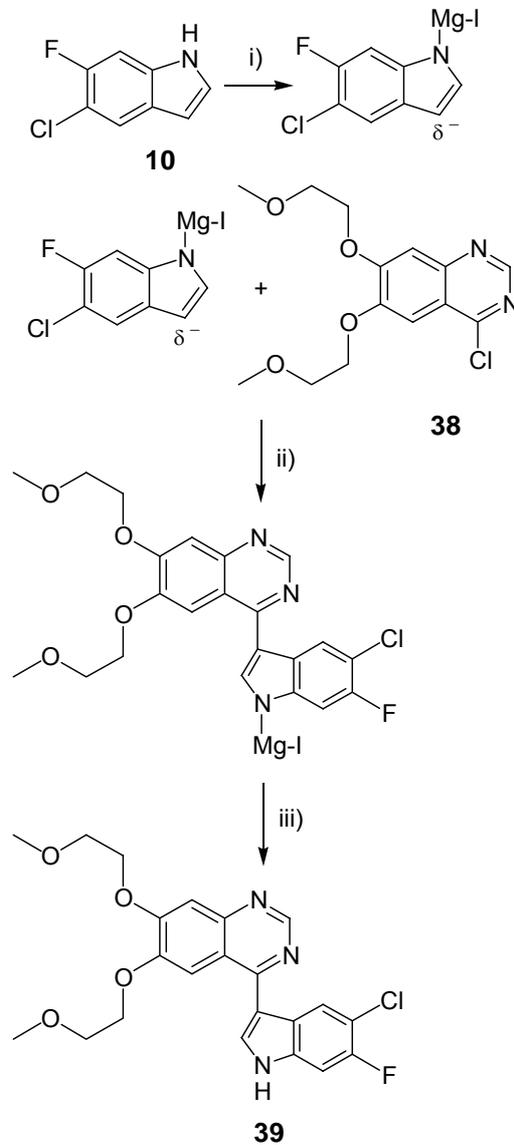
Abb. 75: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **37**

e) Chlorierung der Verbindung **37** zum 4-Chlor-6,7-di-(2-methoxyethoxy)chinazolin (**38**)

Die Verbindung **37** wird nach dem bereits bewährten Verfahren mit Thionylchlorid und *N,N*-Dimethylformamid in einer $\text{S}_{\text{N}}\text{i}$ -Reaktion in der Position 4 chloriert. Die dabei entstehende Verbindung **38** wird nach kurzem Trocken aufgrund ihrer Instabilität sofort in einer Cross-coupling-Reaktion weiterverarbeitet.

3.4.1.2 Herstellung der Verbindung 39 unter Einsatz einer Grignard-Verbindung

Die beiden Kopplungskomponenten 4-Chlor-6,7-di-(2-methoxyethoxy)-chinazolin (**38**) und 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) werden jetzt zum Wunschprodukt **39** weiter umgesetzt (**Abb. 76**).



i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) Δ ; iii) Wasser, RT

Abb. 76: Herstellung der Verbindung **39**

Nach der Extraktion von Verbindung **39** mit Ethylacetat wird eine dünnschichtchromatographische Untersuchung mit Detektion bei Wellenlängen von 254 und 366 nm durchgeführt. Dabei ist wieder eine stark hellblau fluoreszierende Substanz auffällig, die durch Säulenchromatographie mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat/Ethanol (9:1) separiert wird.

Das angefertigte Protonenresonanzspektrum zeigt das verbreiterte Signal des Indol-NHs bei 12,11 ppm. Im Aromatenbereich (ca. 7-9 ppm) sind die charakteristischen Muster der Protonen der Chinazolin- und Indolkomponente erkennbar. Die Signale der Protonen der beiden Seitenketten des Chinazolins liegen zwischen 3,5 und 4,5 ppm (**Abb. 77**).

Im Infrarot-Spektrum ist die NH-Valenzschwingung des Indols bei einer Wellenzahl von 2929 cm^{-1} deutlich erkennbar.

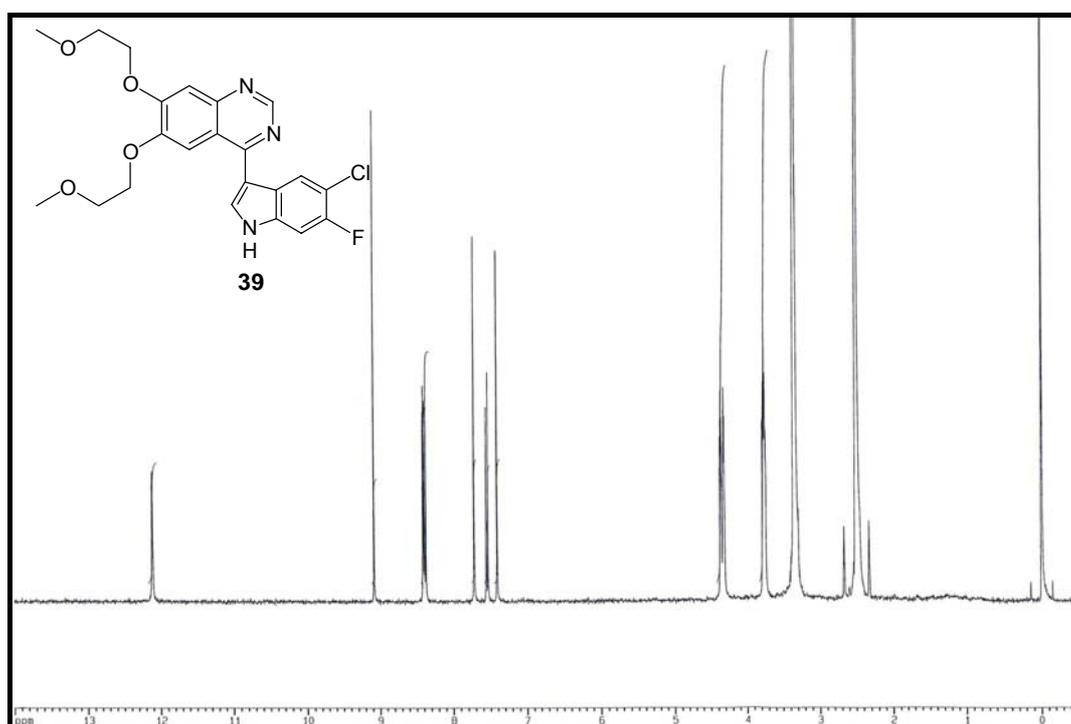


Abb. 77: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **39**

Die in ihrer Struktur bewiesene Substanz **39** wird ebenfalls auf ihre EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestet. Dabei wird bei einer Konzentration von 100 nM eine sehr gute Inhibition von 43 % ermittelt. Das bedeutet, dass durch die Einführung der längeren und damit sterisch anspruchsvolleren Seitenketten am Chinazolinanteil kaum eine Aktivitätseinbuße im Vergleich zu Substanz **14** (62 %) mit zwei Dimethoxy-Substituenten resultiert. Allerdings zeigt der Arzneistoff Erlotinib mit einer IC_{50} von 2 nM/L eine noch stärkere inhibitorische Aktivität.

Aufgrund ihrer sehr guten EGFR-TK-Inhibition wurde die Zytotoxizität der Verbindung **39** an der MCF-7-Brustkrebszelllinie überprüft. Da Wachstumsfaktoren und Estrogene die Genexpression coregulieren und Wachstumsfaktoren durch Estrogene stimuliert werden können, wird auch bei dieser Verbindung ein gutes Ergebnis erwartet [59-62].

Die Ergebnisse der *In-vitro*-Zytotoxizitätstests sind in **Abb. 78** graphisch dargestellt. Zum Vergleich wurde die Zytotoxizität von Cisplatin als Standardzytostatikum im gleichen Durchlauf getestet.

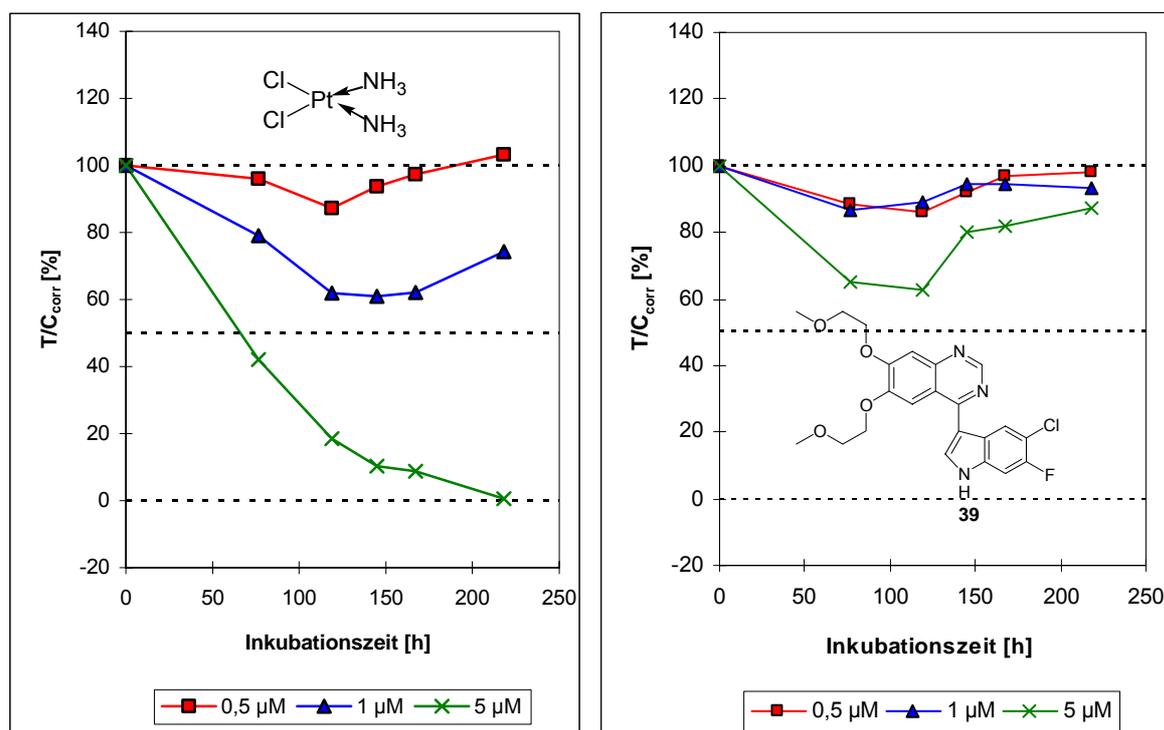


Abb. 78: Effekte der Verbindung **39** sowie des Cisplatin als Standardzytostatikum in Konzentrationen von jeweils 0,5, 1 und 5 µM auf das Wachstum von MCF-7-Zellen

Als Maß für die Zytotoxizität werden auch hier die ermittelten T/C_{corr}-Werte [%] in Abhängigkeit von der Inkubationszeit [h] herangezogen.

Erstaunlicherweise wird hier eine wesentlich schlechtere Zytotoxizität der Verbindung **39** im Vergleich zu Cisplatin und zur bereits getesteten, zytotoxisch exzellent wirksamen Substanz **14** festgestellt. Sogar bei einer Konzentration von 5 µM ist nur eine schwache antiproliferative Wirkung erkennbar. Eine Ursache für die deutlich schlechtere Zytotoxizität könnten die längeren und dadurch Raum einnehmenden Seitenketten und eine damit verbundene geringere Zellgängigkeit sein.

Zusätzlich wurde auch die Substanz **39** in einer Konzentration von 5 μM in Ethylacetat fluoreszenzspektroskopisch vermessen (**Abb. 79, Tabelle 9**) [70, 71].

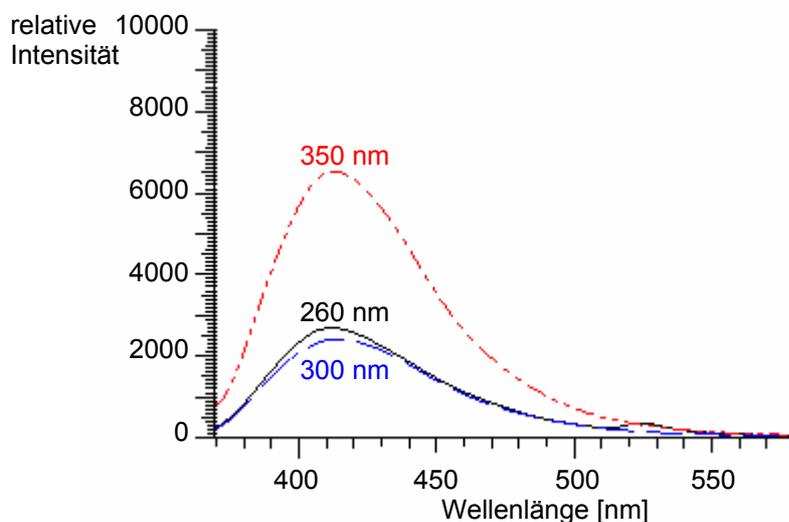


Abb. 79: Fluoreszenzspektrum der Verbindung **39** bei einer Konzentration von 5 μM

Exzitation [nm]	Emission [nm]	Relative Intensität
260	411,8	2701
300	414,4	2413
350	412,6	6530

Tabelle 9: Daten zum Fluoreszenzspektrum der Verbindung **39**

Die Substanz **39** weist in Ethylacetat bei Einstrahlungswellenlängen von 260 nm, 300 nm und 350 nm jeweils ein Emissionsmaximum auf (**Tabelle 9**). Die Lage der Maxima bei einer Einstrahlung von 260 und 350 nm und ihre jeweiligen Intensitäten sind mit denen der Verbindung **14** vergleichbar. Zusätzlich tritt ein Maximum bei 300 nm auf. Diese vergleichbaren Fluoreszenzen liegen in dem sehr ähnlichen Fluophor der beiden Substanzen begründet.

4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-di-(2-methoxyethoxy)chinazolin (**39**) zeigt also durch die Einführung der längeren Seitenketten eine leichte Abschwächung der EGFR-TK-Inhibition sowie eine deutlich schwächere Zytotoxizität an der MCF-7-Zelllinie im Vergleich zur Substanz **14**.

Daher soll versucht werden, die Seitenketten weniger stark zu verändern, um damit die hervorragende EGFR-TK-Inhibition und Zytotoxizität der Substanz **14** bei gleichzeitig optimierter Pharmakokinetik zu erhalten.

3.4.2 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-7-methoxy-6-(2-methoxyethoxy)chinazolin (47)

Um sich wieder den hervorragenden pharmakologischen Testergebnissen der Substanz **14** zu nähern, wird bei der Konzeption der folgenden Substanz **47** eine Strukturvariante gewählt, bei der das Substitutionsmuster des Chinazolins eine 7-Methoxy-Gruppe, vergleichbar mit Substanz **14**, und eine 6-(2-Methoxyethoxy)-Gruppierung, vergleichbar mit Verbindung **39**, besitzt (**Abb. 80**).

Durch die Verwendung dieser Chinazolin-Teilstruktur wird erwartet, dass sowohl die EGFR-TK-Inhibition als auch die Zytotoxizität der Substanz **39** verbessert werden können.

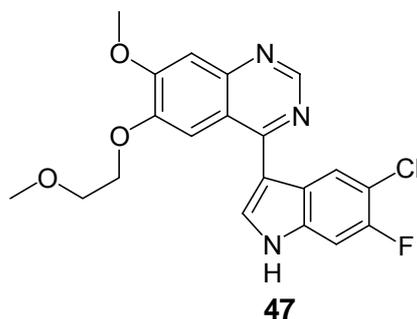
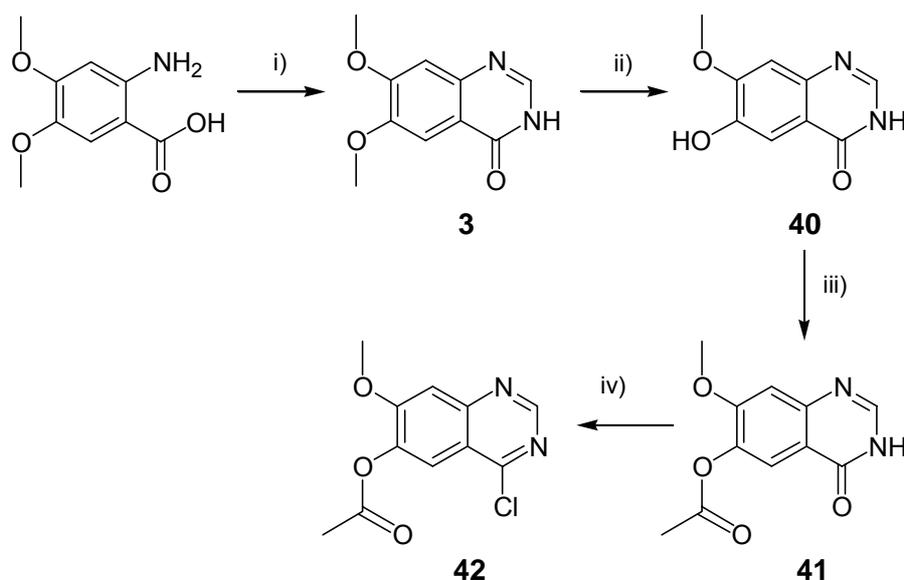


Abb. 80: 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-7-methoxy-6-(2-methoxyethoxy)chinazolin (**47**)

Der Syntheseweg führt zunächst zum 6-Acetoxy-4-chlor-7-methoxychinazolin als Kopplungskomponente für die Hetarylierung. Erst nach der Cross-coupling-Reaktion mit 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) wird die Seitenkette in Position 6 eingeführt.

3.4.2.1 Herstellung der Cross-coupling-Komponente 4-Chlor-6-acetoxy-7-methoxychinazolin (**42**)

Bei der Synthese der Verbindung **47** wird zunächst das 6,7-Dimethoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on (**3**) hergestellt, das zum 6-Hydroxy-7-methoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on (**40**) demethyliert wird. Anschließend wird die 6-Hydroxygruppe acetyliert (**41**), um so die nachfolgende Chlorierung selektiv in Position 4 des Chinazolins zu ermöglichen (**42**) (**Abb. 81**).



i) Formamidinacetat, 2-Methoxyethanol, ΔT ; ii) Methansulfonsäure, Methionin, ΔT ; iii) Acetanhydrid, Pyridin, ΔT ; iv) Thionylchlorid, *N,N*-Dimethylformamid, ΔT

Abb. 81: Herstellung von 4-Chlor-6-acetoxy-7-methoxychinazolin (**42**)

a) Ringschluss zum 6,7-Dimethoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on (**3**)

Im Rahmen der in **Abb. 81** gezeigten Synthese wird zunächst 3,4-Dimethoxyanthranilsäure, wie bereits beschrieben, mit Formamidinacetat in 2-Methoxyethanol zum 6,7-Dimethoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on (**3**) umgesetzt.

b) Regioselektive Etherspaltung der Verbindung **3** zum 6-Hydroxy-7-methoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on (**40**) in Anlehnung an die Zeisel-Vieböck-Methode

Nachfolgend wird die Verbindung **3** mit Methansulfonsäure und Methionin unter Rückfluss (250°C) erhitzt. Im Anschluss daran wird die Reaktionsmischung in Eiswasser gegeben und mit 40 prozentiger Natronlauge neutralisiert. Aus der Suspension wird zunächst ein schwarzer, kohleähnlicher Niederschlag isoliert, der nach Optimierung der Reaktionstemperatur auf 160°C eine violette Farbe zeigt.

Bei der dabei stattfindenden Demethylierung spaltet Methansulfonsäure ($\text{pK}_s = 1,75$) in Anwesenheit des soft-Nukleophils und Methylgruppen-Akzeptors Methionin den Methylether in Position 6 des Chinazolins zur phenolischen Hydroxygruppe (**Abb. 82**).

Die Reaktion wird durch Protonierung des Ethersauerstoffs und der Aminofunktion des Methionins eingeleitet. Ein Phenoether-Oxoniumion aktiviert die Methylgruppe, an die der Thioether des Methionins in einer $\text{S}_\text{N}2$ -Reaktion nucleophil angreift. In Position 6 des Chinazolins bildet sich die phenolische Hydroxygruppe. Durch die nennenswerte Affinität des

Methylierungen am Schwefel entstehen außerdem S-Methyl-methioninbismethansulfonat (**Abb. 82**) [75, 76].

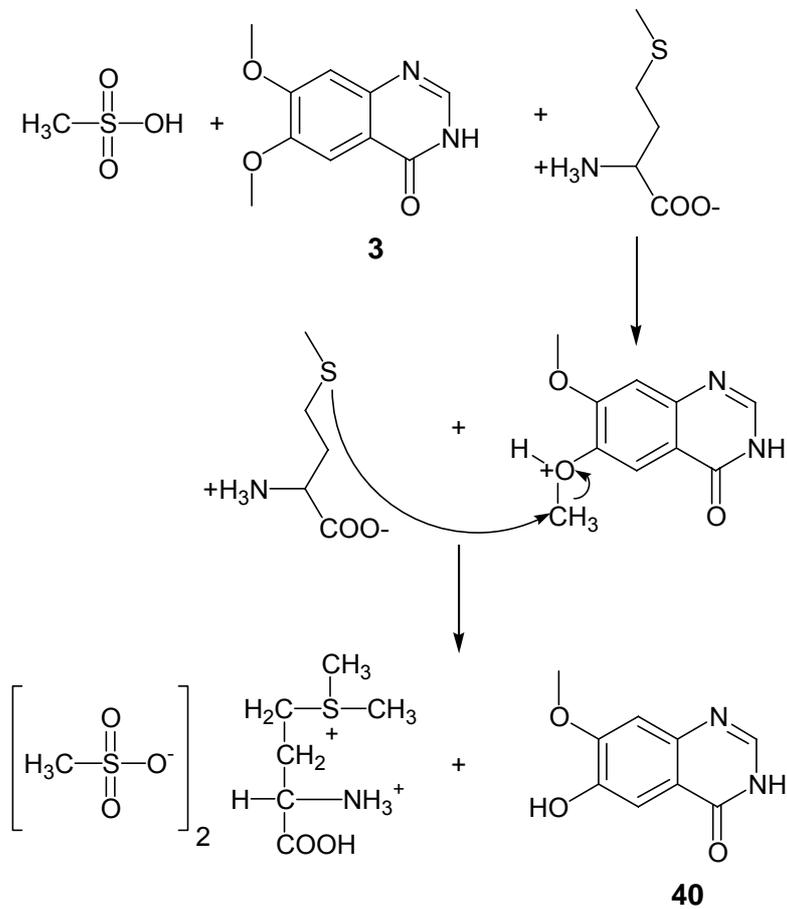


Abb. 82: Regioselektive Etherspaltung der Verbindung **3** zur Verbindung **40**

Das zunächst entstehende violette Produkt wird durch Säulenchromatographie mit dem Fließmittelgemisch Dichlormethan/Methanol (9:1) zu einem weißen Feststoff aufgereinigt.

Das angefertigte Protonenresonanzspektrum zeigt die Singulett der NH-Gruppe bei 11,92 ppm und der Hydroxygruppe bei 9,81 ppm. Im Bereich von ca. 7-8 ppm sind die aromatischen Protonen sichtbar. Die Signale der Protonen der Methoxygruppe erscheinen bei einer chemischen Verschiebung von 4,08 ppm (**Abb. 83**).

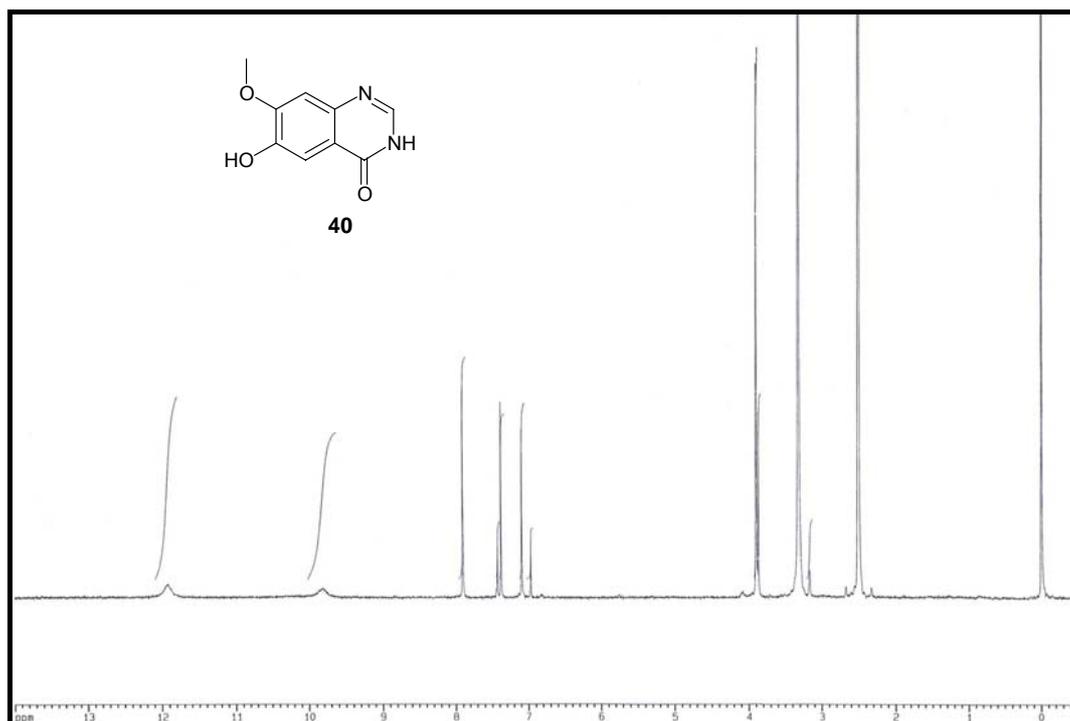


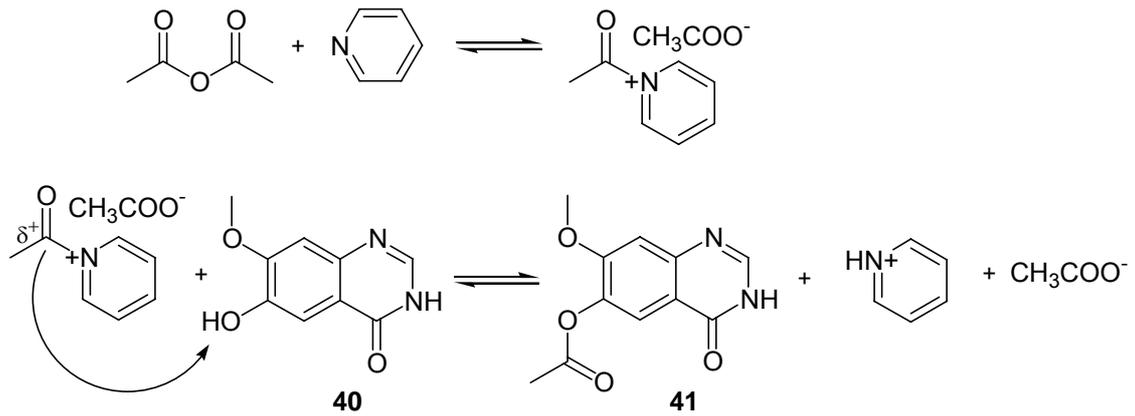
Abb. 83: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **40**

c) Einführung einer Acetyl-Schutzgruppe in Position 6 der Verbindung **40**

Da mit der Hydroxygruppe in Position 6 der Verbindung **40** eine zusätzliche Angriffstelle für die nachfolgende Behandlung mit Thionylchlorid vorliegt, soll die Einführung der Acetyl-Schutzgruppe in Position 6 zum 6-Acetoxy-7-methoxy-3,4-dihydrochinazolin-4-on (**41**) eine selektive Chlorierung an Position 4 des Chinazolins ermöglichen. Dabei wird auf das am meisten verwendete Verfahren zum Schutz primärer und sekundärer Alkohole zurückgegriffen, bei dem Acetanhydrid und Pyridin verwendet werden [77].

Nach dem Erhitzen der Verbindung **40** mit Acetanhydrid und Pyridin wird die Reaktionsmischung sorgfältig in Eiswasser ausgerührt bis die entstehende Suspension feinkörnige Eigenschaften aufweist. Der isolierte, schmutzig-weiße Niederschlag wird einer Aufreinigung mittels Säulenchromatographie mit dem Fließmittelgemisch Dichlormethan/Methanol (9:1) unterzogen. Es entsteht ein farbloser Feststoff.

Bei der stattfindenden Acylierung beruht die katalytische Wirkung des Pyridins auf der Bildung eines intermediären Acylpyridinium-Ions, das anschließend mit der phenolischen Hydroxygruppe reagiert. Dabei dient das Pyridin als Protonenfänger und verschiebt die Reaktion im gewünschten Sinne (**Abb. 84**).



Als wichtiges Indiz für eine erfolgreiche Veresterung dient die fehlende Hydroxygruppe im Protonenresonanzspektrum (**Abb. 85**). Dafür erscheinen bei 2,3 ppm die Protonen der Acetylgruppe.

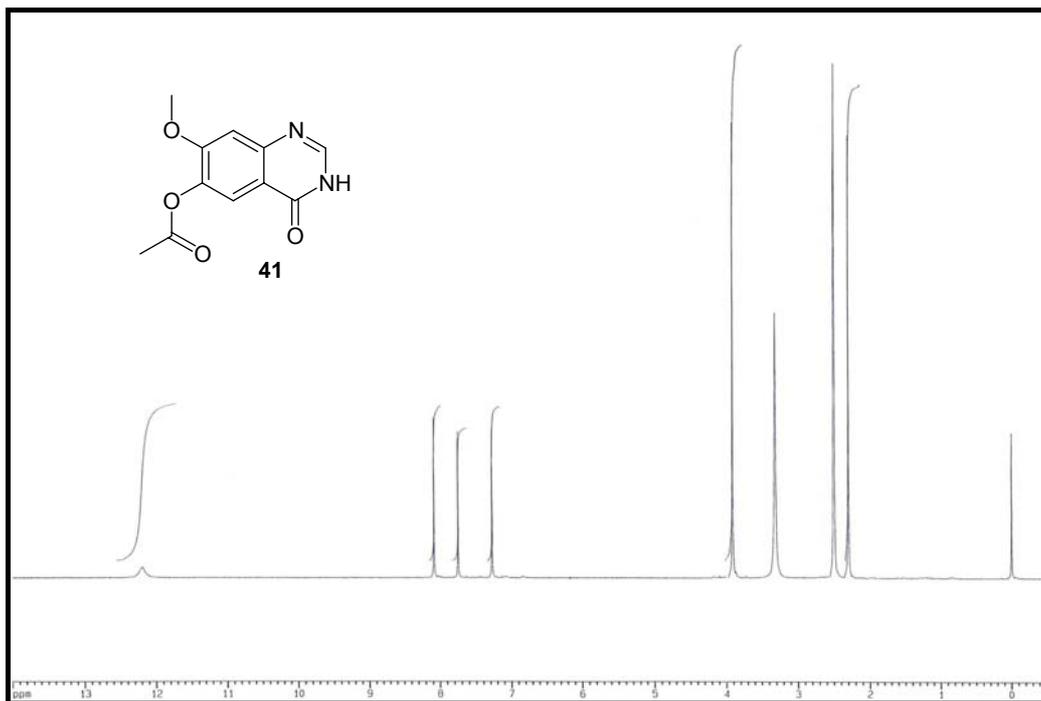
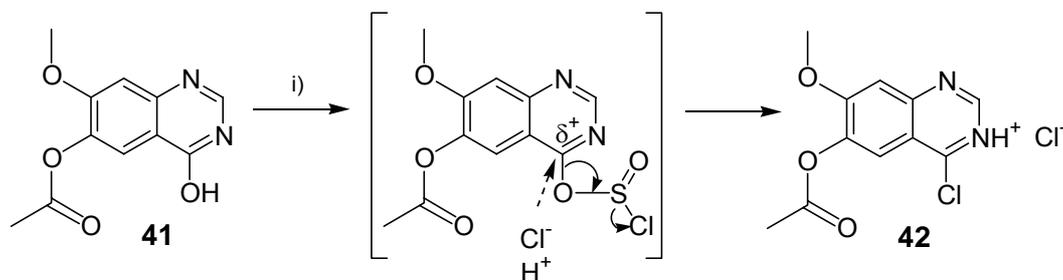


Abb. 85: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **41**

d) Chlorierung der Verbindung **41**

Mit der geschützten Hydroxygruppe in Position 6 kann die Chlorierung nur in Position 4 stattfinden. Dabei kommt das bereits beschriebene Verfahren mit Thionylchlorid und *N,N*-Dimethylformamid zur Anwendung (**Abb. 86**).



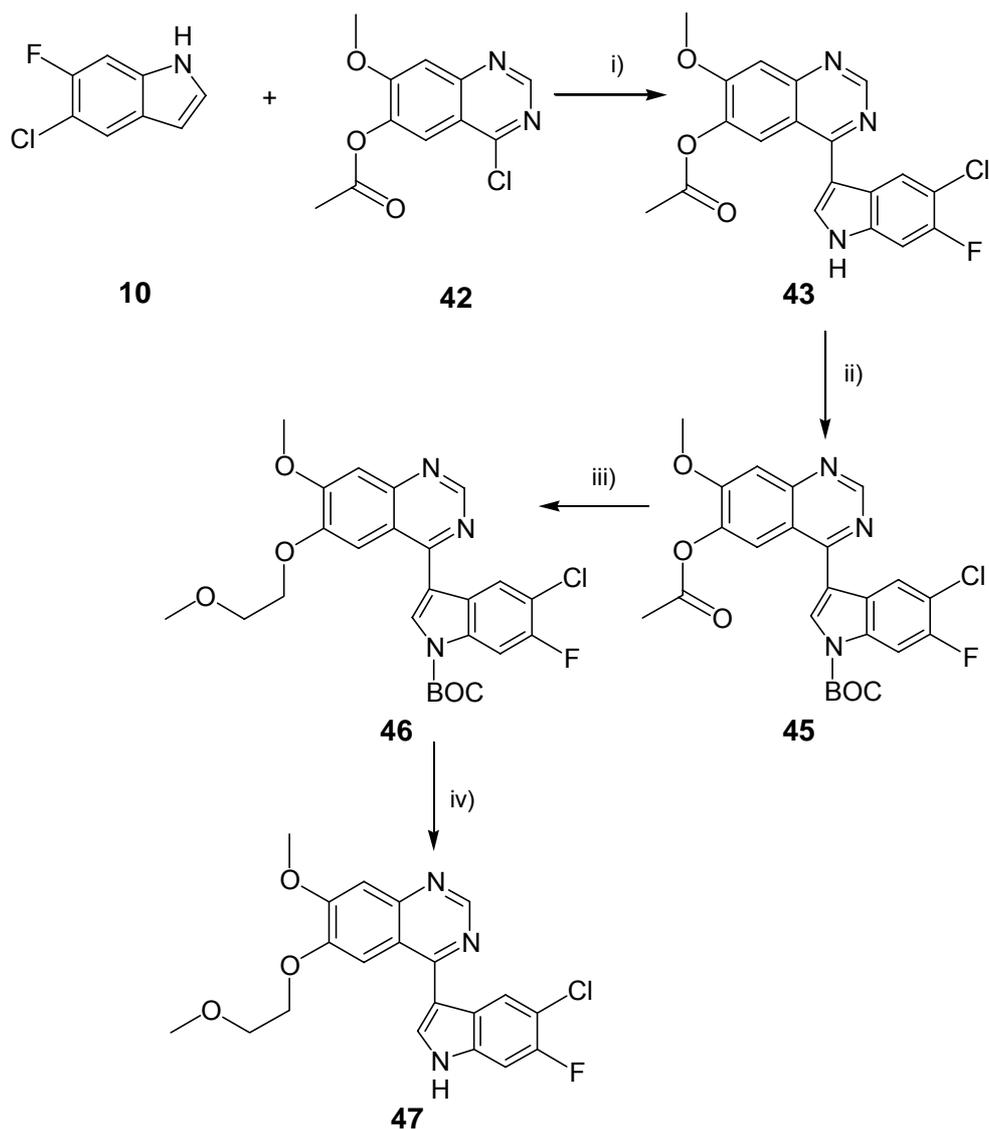
i) Thionylchlorid, *N,N*-Dimethylformamid

Abb. 86: Herstellung der Verbindung **42**

Es entsteht 6-Acetoxy-4-chlor-7-methoxychinazolin (**42**), das aufgrund seiner Instabilität nach kurzem Trocken sofort als Hetarylierungskomponente in der nachfolgenden Cross-coupling-Reaktion eingesetzt wird.

3.4.2.2 Herstellung von Verbindung **47** mit nachfolgender Seitenketteneinführung

Bei der Synthese der Verbindung **47** soll zunächst eine Hetarylierung der beiden Cross-coupling-Komponenten **42** und **10** vorgenommen und nachfolgend die Seitenkette eingeführt werden (**Abb. 87**).

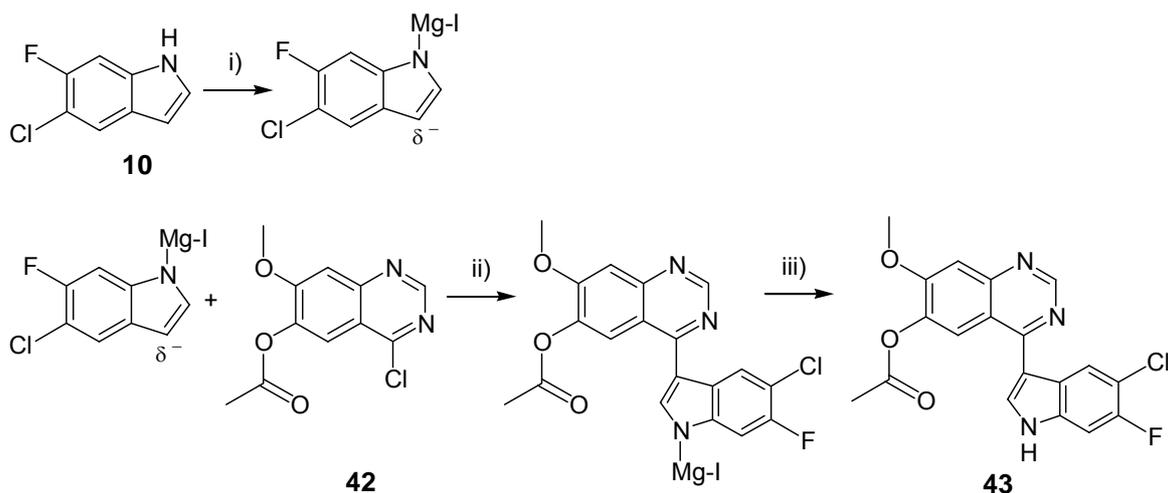


i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether (**Abb. 88**); ii) BOC, 4-Dimethylaminopyridin, Acetonitril, RT;
 iii) 2-Brommethylethylether, Kaliumcarbonat, 18-Krone-6, Acetonitril; iv) Ameisensäure

Abb. 87: Herstellung der Verbindung **47**

a) Hetarylierung von Verbindung **42** mit Verbindung **10**

Die Cross-coupling-Reaktion mit 6-Acetoxy-4-chlor-7-methoxychinazolin (**42**) und 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) wird nach dem bereits durchgeführten Verfahren in Gegenwart von Grignard-Verbindungen erfolgreich abgeschlossen (**Abb. 88**).



i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) ΔT ; iii) Wasser, RT

Abb. 88: Herstellung der Verbindung **43**

Nach der Extraktion des Reaktionsgemisches mit Ethylacetat wird eine erste dünnschichtchromatographische Kontrolle durchgeführt. Bei 254 nm verursachen die beiden Edukte **10** und **42** gut sichtbare Löschungen. Erstaunlicherweise erscheinen außerdem zwei stark hellblau fluoreszierende Substanzen, deren Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 366 nm noch verstärkt wird. Allerdings wird in diesem Bereich nur die Verbindung **43** mit diesen Eigenschaften erwartet.

Das Substanzgemisch wird durch Säulenchromatographie mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat/Ethanol (9:1) aufgereinigt. Dabei können die beiden fluoreszierenden Substanzen einzeln separiert werden.

Von beiden Verbindungen werden jeweils Massenspektren angefertigt. Die Verbindung **43** zeigt den gewünschten Molpeak bei m/z 385. Bei der zweiten Substanz tritt ein Basispeak bei m/z 343 auf. Aus dem charakteristischen Abbau dieser Substanz kann man auf das durch Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe entstandene 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6-hydroxy-7-methoxychinazolin (**44**) schließen.

Im Infrarotspektrum der vermuteten Wunschverbindung **43** tritt die Valenzschwingung einer Acetoxygruppe bei einer Wellenzahl von 1763 cm^{-1} auf, die im Spektrum der anderen Verbindung **44** nicht erkennbar ist.

Die aufgenommenen Protonenresonanzspektren sollen zur Beweisführung beitragen. Abbildung 89 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum der vermuteten Wunschverbindung **43**. Bei 12,28 ppm ist die NH-Gruppe des Indols als Singulett sichtbar. Im Bereich von 7,5-9,5 ppm liegen die aromatischen Protonen der Chinazolin- und Indolteilstruktur. Das Singulett bei 4,02 ppm ist den Protonen der Methoxygruppe zuzuordnen und bei 2,34 ppm erscheint das Singulett der Protonen der Acetylgruppe.

Diese Beobachtungen bestätigen die Struktur der Wunschverbindung **43**.

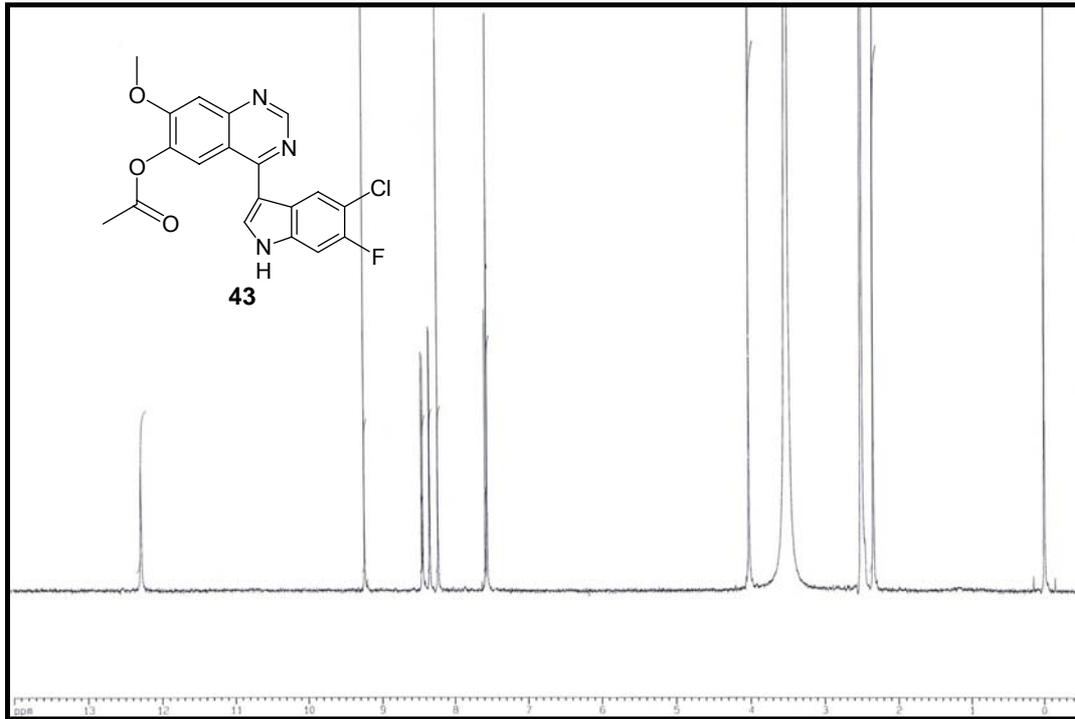


Abb. 89: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **43**

Im Gegensatz dazu ist im Spektrum der anderen Verbindung keine Acetylgruppe mehr nachweisbar. Dafür tritt bei 10,17 ppm ein zusätzliches Signal auf, das durch eine Hydroxygruppe an Position 6 hervorgerufen wird (**Abb. 90**).

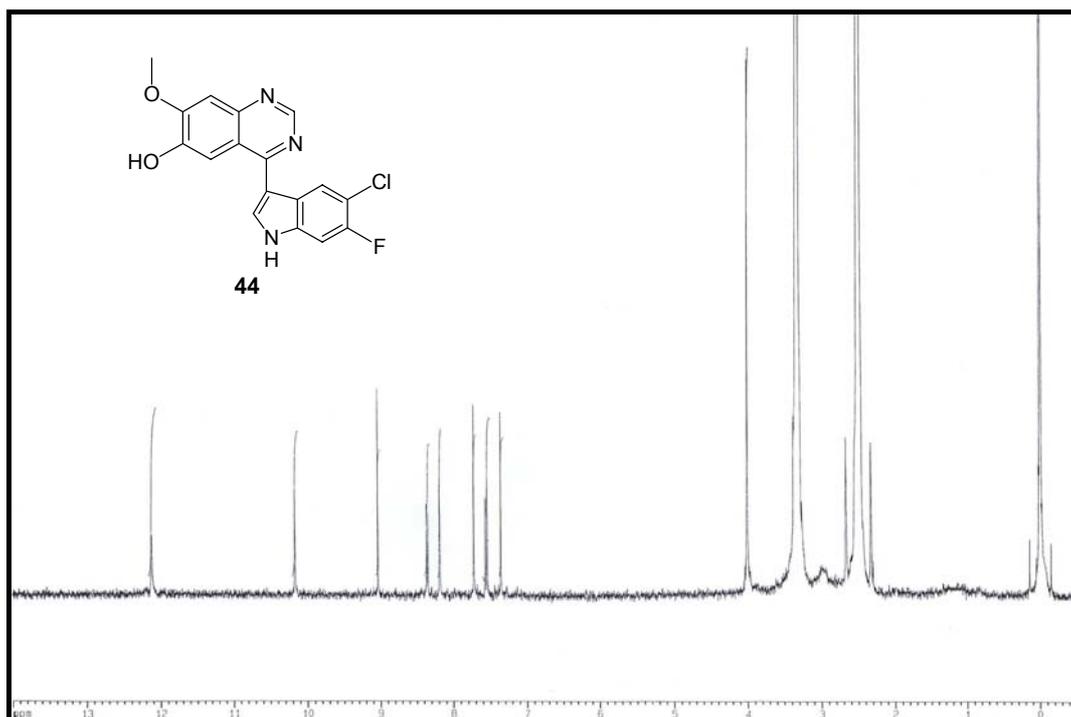


Abb. 90: ^1H -NMR-Spektrum der zusätzlich entstandenen Verbindung **44**

Infolgedessen ist bewiesen, dass bei dieser Hetarylierung außer der Wunschverbindung **43** noch eine weitere Substanz **44** durch Esterspaltung entsteht (**Abb. 91**).

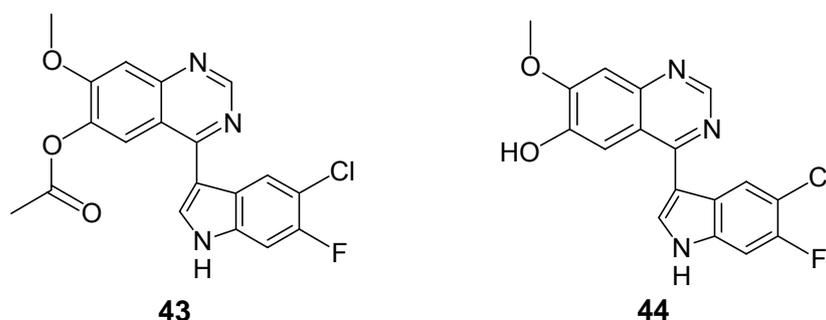


Abb. 91: Die bei der Hetarylierung entstandenen Produkte **43** und **44**

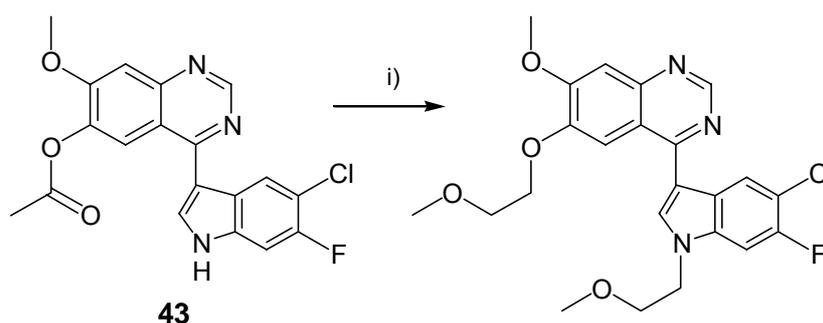
Da beide Verbindungen auch durch mehrmalige Säulenchromatographie nicht analysenrein aufzutrennen sind, wird beim nächsten Hetarylierungs-Ansatz kein Natriumsulfat als Trocknungsmittel im Rahmen der Aufarbeitung verwendet, sondern das wirkungsvollere Magnesiumsulfat mit einem größeren Kation. Dadurch könnten Einschlüsse des Trocknungsmittels verhindert werden.

Zusätzlich wird versucht, die Reaktion zugunsten der Ausbeuten an Wunschverbindung **43** zu verschieben. Dazu wird die bei der Hydrolyse auftretende Suspension zusätzlich mit Hilfe eines Ultraturrax fein verteilt. Diese Methode erweist sich jedoch als ungünstig, da die Verbindung **44** verstärkt gebildet wird. Dies ist mit einer bevorzugten Hydrolyse aufgrund der größeren Oberfläche der Teilchen erklärbar.

Auch durch Änderung der Reaktionsbedingungen ist die Steuerung der Ausbeuten der Produkte nicht garantiert. Allerdings macht sich ein gewisser Einfluss der Lagerungszeit des Indols bemerkbar. Durch die Verwendung frisch hergestellter Verbindung **10** lässt sich eine größere Menge der Wunschverbindung **43** erzielen.

b) Einführung der *tert*-Butoxycarbonyl (BOC) - Schutzgruppe

Da die Gefahr besteht, bei sofortiger Einführung einer Seitenkette in Position 6 ein dialkyliertes Produkt zu erhalten, soll durch eine Schutzgruppe die Alkylierung des Indol-NHs und damit einer möglichen Bindungsstelle zum EGF-Rezeptor verhindert werden (**Abb. 92**).



i) 2-Bromethylmethylether, K_2CO_3 , *N,N*-Dimethylformamid

Abb. 92: Vermutete Einführung der Seitenkette ohne vorherigen Schutz des Indol-NHs

Dazu wird die NH-Gruppe mit Hilfe von Di-*tert*-butyl-dicarbonat (BOC_2O) in einen Carbamidester übergeführt. Die BOC-Gruppe ist ein gebräuchliches Schutzreagenz für Aminogruppen, das unter basischen Bedingungen nicht hydrolysiert. Außerdem ist es leicht abspaltbar, erzeugt wenig Nebenprodukte und ist inert gegenüber vielen Nucleophilen [78, 79].

Die Verbindung **43** reagiert mit BOC-Anhydrid in einer nucleophilen Substitution. Dabei entsteht das *tert*-Butylcarbamat **45** und ein Kohlensäure-Halbester, der zu *tert*-Butanol und Kohlendioxid zerfällt (**Abb. 92**).

Für den geforderten alkalischen pH-Wert wird 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP, „Steglich-Katalysator“) als basische Komponente zugesetzt. Als Knölker 1995 die kombinierte Einwirkung von BOC_2O und 4-DMAP auf primäre Amine untersuchte, war das Resultat

überraschend. Es entstand kein *tert*-Butylcarbamat, sondern ein Isocyanat. Dabei verbindet sich das BOC-Anhydrid mit dem 4-DMAP zu einem Reagenz, das vom primären Amin nucleophil angegriffen wird [78, 80].

Da aber hier kein primäres Amin vorliegt, wird das Indol-NH in das *tert*-Butylcarbamat **45** übergeführt. Den Beweis für diese in **Abb. 92** dargestellte Reaktionsführung liefern die aufgenommenen Massen- und Protonenresonanzspektren.

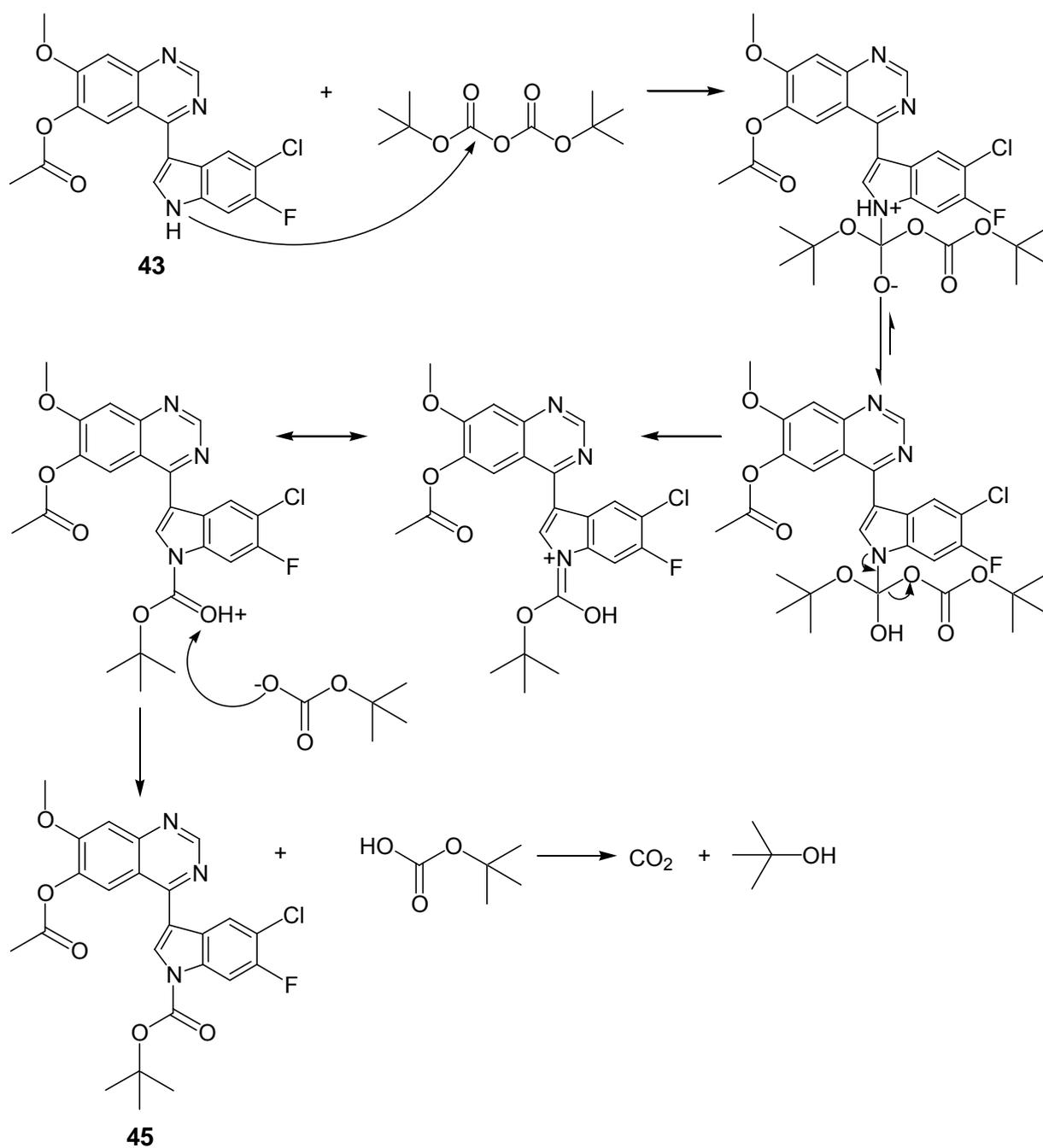


Abb. 92: Mechanismus der Einführung der BOC-Schutzgruppe

Die massenspektrometrische Vermessung zeigt den Molpeak bei m/z 485.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum liegen die Protonen der *tert*-Butylgruppe bei 1,68 ppm (**Abb. 93**).

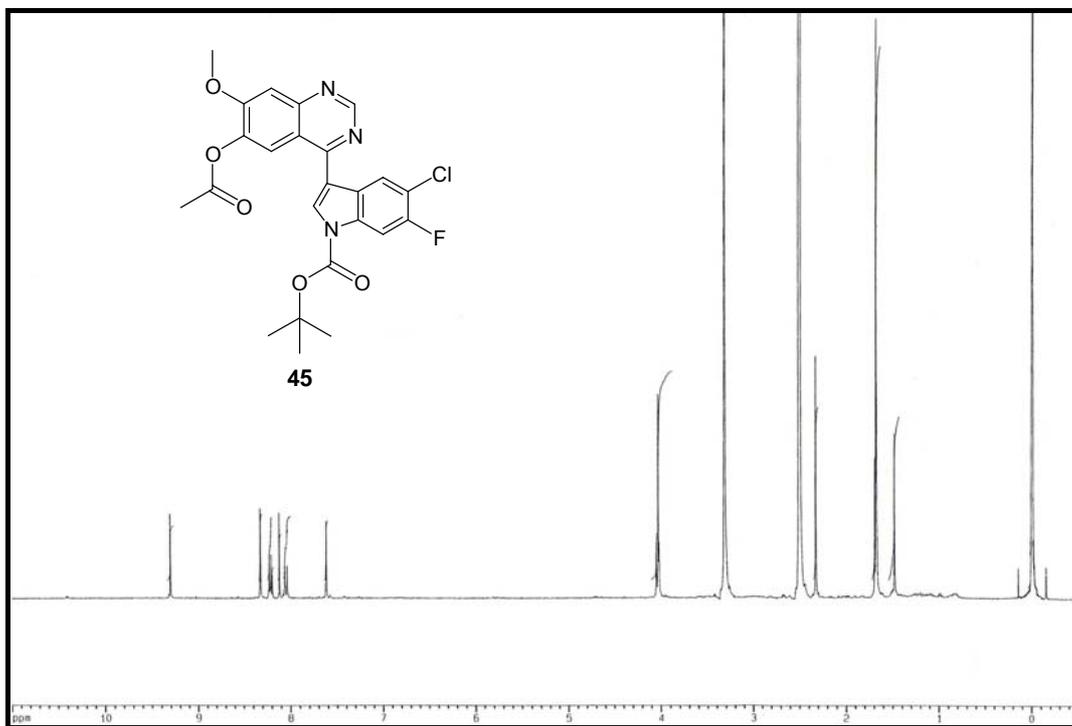


Abb. 93: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **45**

- c) Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe und Seitenketteneinführung in Position 6 der Chinazolin-Teilstruktur

Nach dem BOC-Schutz des Indol-NHs der Verbindung **45** kann jetzt die 2-Methoxyethoxy-Seitenkette in Position 6 selektiv eingeführt werden.

Dazu wird die Verbindung **45** mit Kaliumcarbonat, 18-Krone-6 und 2-Bromethylmethylether in Acetonitril unter Rückfluss erhitzt.

18-Krone-6 enthält einen gesättigten, achtzehngliedrigen Ring, bestehend aus sechs aufeinanderfolgenden $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$ -Einheiten. Als multidentaler Komplexbildner bildet der Kronenether eine Koordinationsverbindung mit den Kalium-Ionen, indem er diese Ionen in seinen Hohlraum aufnimmt (**Abb. 94**).

Kronenether erhöhen aber nicht nur die Löslichkeit eines anorganischen Salzes in einem organischen Lösungsmittel, sondern steigern auch die Reaktivität des entsprechenden Anions. So liegen die Carbonat-Ionen frei und unsolvatisiert, d. h. „nackt“ vor. Infolge dessen kommt es zu einem drastischen Anstieg ihrer Basizität und damit ihrer Reaktivität.

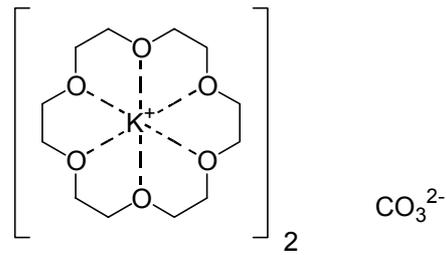


Abb. 94: Kalium-Ionen komplexiert von 18-Krone-6

Die unsolvatisierten Carbonat-Ionen begünstigen die Verseifung, wodurch es zur Abspaltung der Acetylgruppe und damit zur Einleitung der Williamson-Ether-Synthese kommt. Infolge dessen kann das entstehende Phenolat als O-Nucleophil das positiviert Kohlenstoffatom des 2-Bromethylmethylethers in einer S_N2 -Reaktion unter Austritt des Bromidions angreifen (**Abb. 95**).

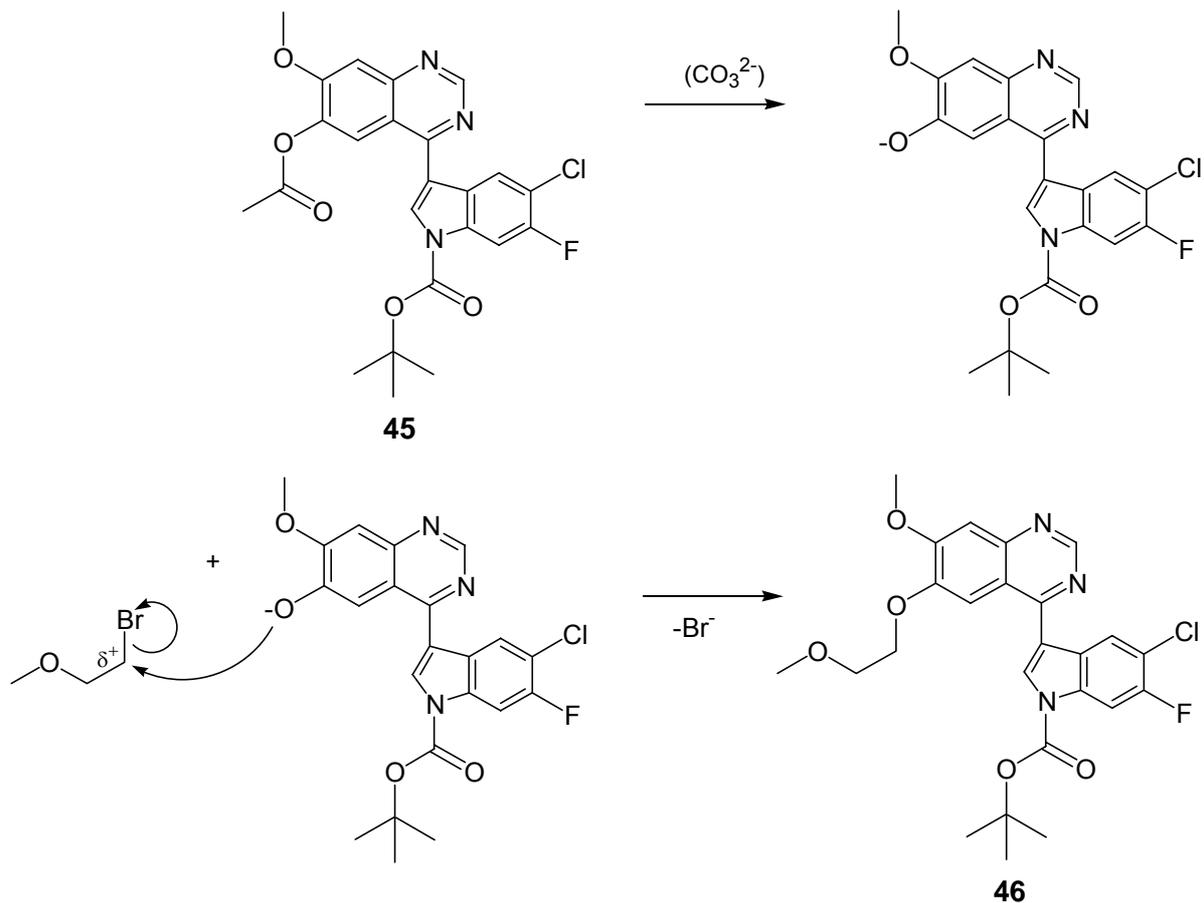


Abb. 95: Einführung der Seitenkette in Position 6 des Chinazolin-Grundkörpers

Die Aufreinigung des Produktes **46** erfolgt durch Säulenchromatographie unter Verwendung des Fließmittelgemisches Ethylacetat/Ethanol (9:1).

d) Abspaltung der BOC-Schutzgruppe

Damit die Wunschverbindung **47** isoliert werden kann, muss die BOC-Schutzgruppe abgespalten werden. Dazu wird die Substanz **46** mit Ameisensäure bei Raumtemperatur umgesetzt. Hier wird nicht, wie bei von primären oder sekundären Alkoholen abgeleiteten Estern, ein Alkoholat abgespalten, sondern die Triebkraft der S_N1 -Reaktion ist in diesem Fall die Bildung eines stabilen *tert*-Butylkations [81, 82]. Es entsteht ein Carbamidsäure-Derivat, das durch Benzyltrimethylammoniumhydroxid (Triton B) zur Verbindung **47** und CO_2 hydrolysiert wird (**Abb. 96**).

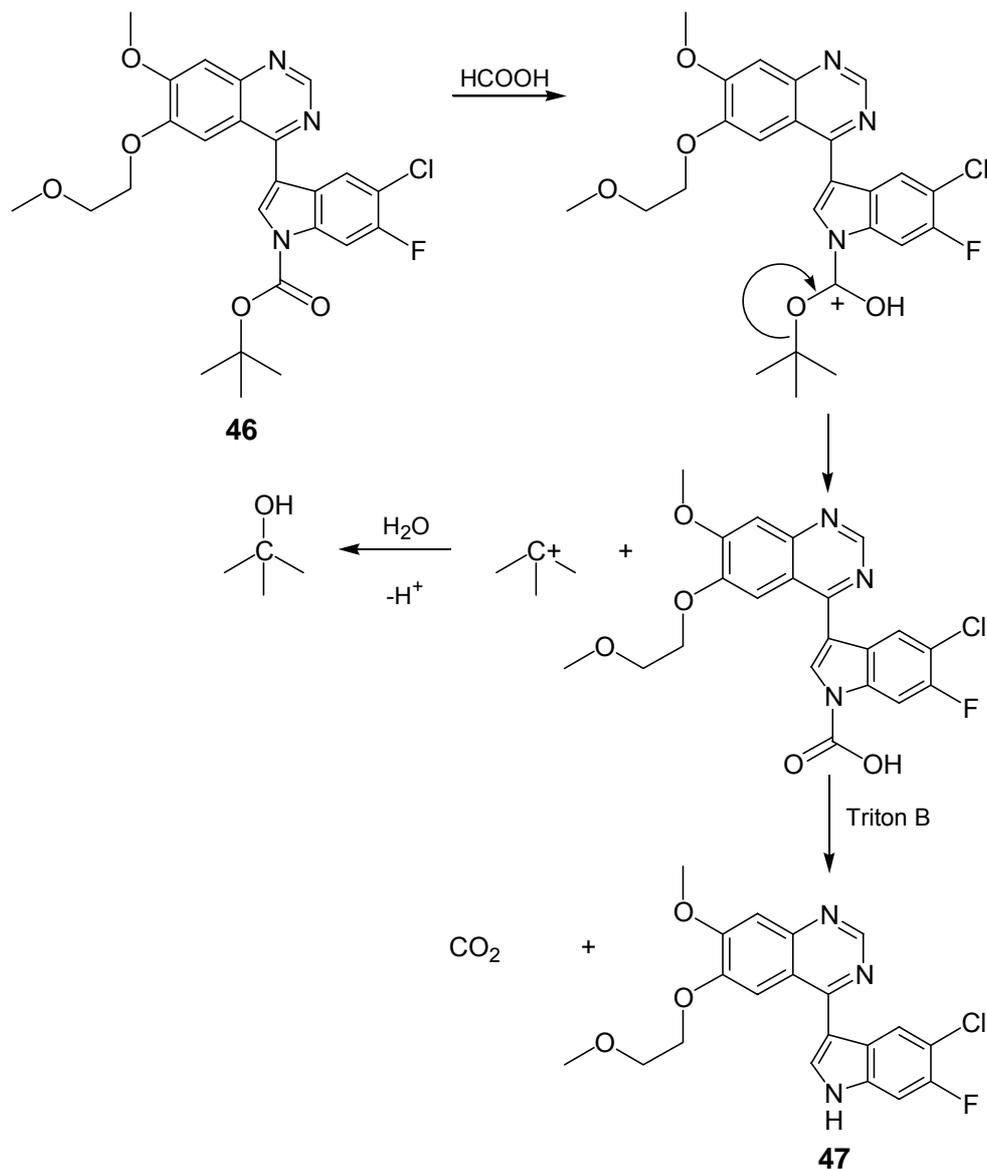


Abb. 96: Mechanismus der Abspaltung der BOC-Schutzgruppe

Bei der tropfenweisen Zugabe der sauren Lösung zur Triton B-Eismischung muss darauf geachtet werden, dass der pH-Wert immer im alkalischen Bereich liegt.

Nach der Extraktion von **47** mit Ethylacetat und Diethylether wird eine Säulenchromatographie unter Verwendung des Fließmittelgemisches Ethylacetat/Ethanol (9:1) durchgeführt. Die organische Phase wird über Molekularsieb getrocknet. Nach Filtration und Eliminierung des Lösungsmittels wird ein gelber Feststoff isoliert, der einer weiteren Aufreinigung mittels Diffusionsumkristallisation aus Ethylacetat/n-Hexan unterworfen wird.

Das angefertigte Protonenresonanzspektrum der isolierten Substanz **47** zeigt die NH-Gruppe des Indols bei einer chemischen Verschiebung von 12,10 ppm. Die aromatischen Protonen erscheinen im Bereich von ca. 7-9 ppm und die Protonen der Seitenketten des Chinazolins sind bei ca. 3,5-4,5 ppm sichtbar (**Abb. 97**).

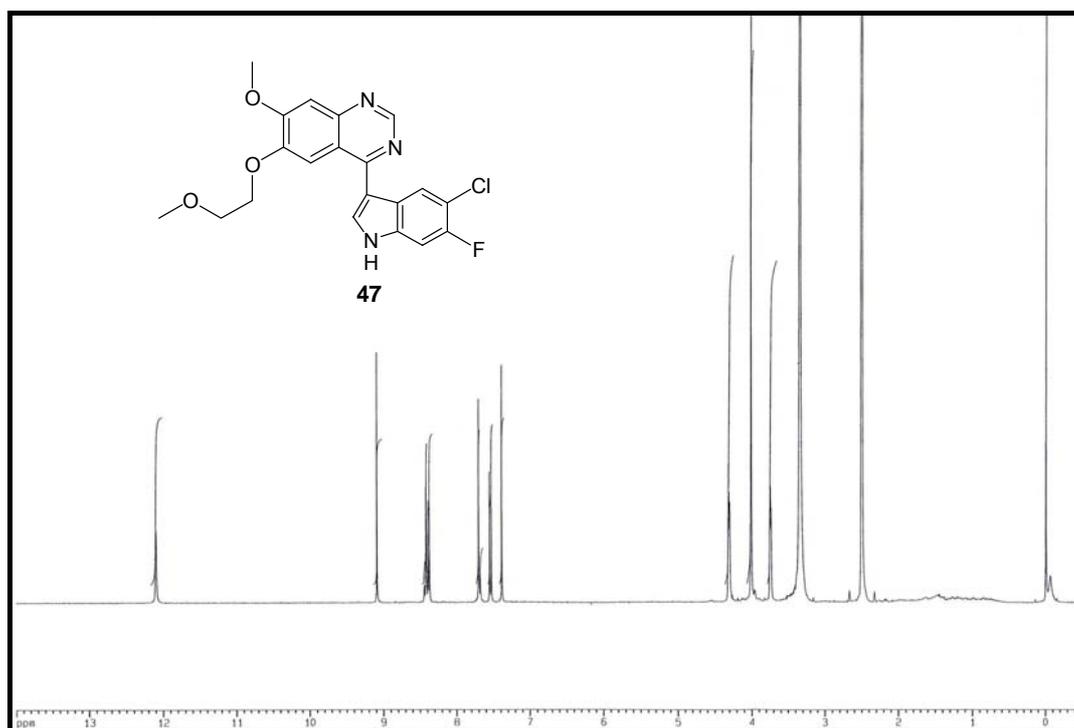


Abb. 97: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **47**

Da die 7-Methoxygruppe des Chinazolins nicht erkennbar ist, wurde ein D₂O-Austausch durchgeführt. Auf diese Weise werden die gesuchten Signale, die vorher vom DMSO-Peak verdeckt wurden, bei einer chemischen Verschiebung von 3,35 ppm sichtbar. Außerdem findet ein H/D-Austausch der NH-Gruppe des Indols statt (**Abb. 98**).

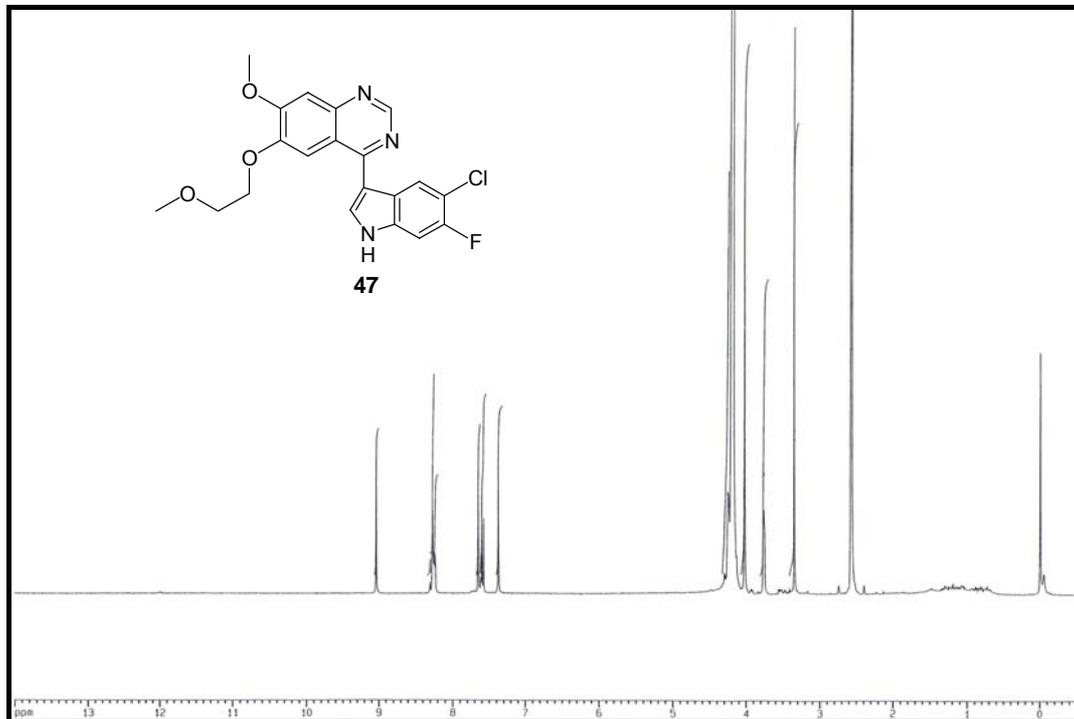


Abb. 98: ¹H-NMR-Spektrum (D₂O-Austausch) der Verbindung **47**

Nachdem die Struktur eindeutig der Wunschverbindung **47** zugeordnet werden konnte, wird die Substanz auf ihre EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestet. Das dabei erzielte Ergebnis erfüllt die Erwartungen, die an diese Substanz gestellt wurden, überhaupt nicht. Die Verbindung **47** hemmt die Aktivität des EGF-Rezeptors bei einer Konzentration von 100 nM nur zu 1 % und stellt sich damit in dieser Konzentration als wirkungslos dar.

Eigentlich wurde für diese Substanz eine Verbesserung der EGFR-Inhibition im Vergleich zur Substanz **39** mit zwei identischen 2-Methoxyethoxy-Seitenketten in Position 6 und 7 erwartet. Hier erweist sich jedoch der Austausch der Seitenkette am C7 des Chinazolins gegen eine Methoxygruppe als unvorteilhaft.

Aufgrund dieser schlechten Ergebnisse wird von einer Überprüfung der Zytotoxizität der Verbindung **47** abgesehen.

3.4.3 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-7-methoxy-6-(3-morpholin-4-ylpropoxy)chinazolin (51)

Als Vorlage für die Konzeption der folgenden Verbindung **51** dient die Struktur von Gefitinib (Iressa[®]).

Gefitinib gehört zur Gruppe der 4-Anilinochinazoline. Die Anilin-Struktur weist hier eine Fluor-Chlor-Substitution auf. Der Chinazolinenteil ist durch die basische Morpholinylpropoxy-Seitenkette an Position 6 und durch eine Methoxygruppe in Position 7 gekennzeichnet (**Abb. 99**).

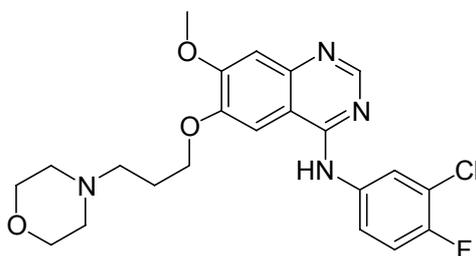


Abb. 99: Gefitinib (Iressa[®])

In Anlehnung an das Gefitinib soll das entsprechend substituierte 4-(Indol-3-yl)chinazolin **51** synthetisiert werden (**Abb. 100**).

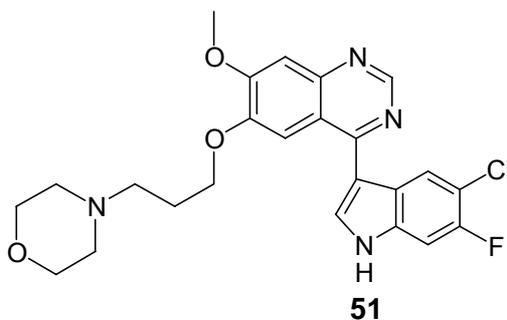
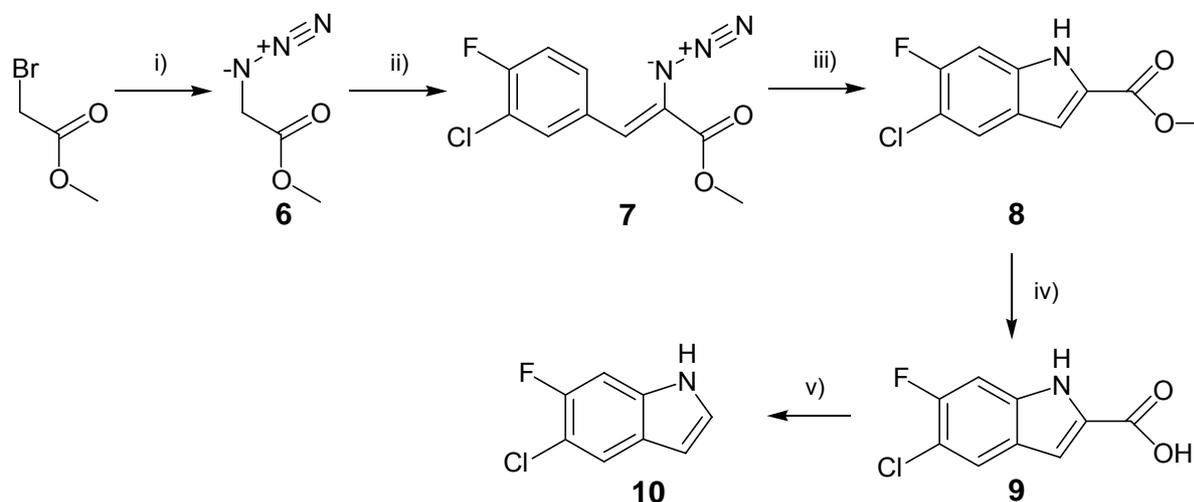


Abb. 100: 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-7-methoxy-6-(3-morpholin-4-ylpropoxy)chinazolin (**51**)

Die Herstellung der Zielverbindung **51** erfolgt wieder durch Verknüpfung des 4-Chlor-6-acetoxy-7-methoxychinazolins (**42**) mit 5-Chlor-6-fluorindol (**10**). Anschließend wird die basische Seitenkette in Position 6 des Chinazolins eingeführt.

3.4.3.1 Herstellung der Cross-coupling-Komponente 5-Chlor-6-fluorindol (10)

Die Herstellung des Indolteils ist bereits in Kapitel 3.2.2.1 genau beschrieben. Daher wird an dieser Stelle nur noch einmal eine kurze Übersicht des Syntheseweges gegeben (**Abb. 101**).

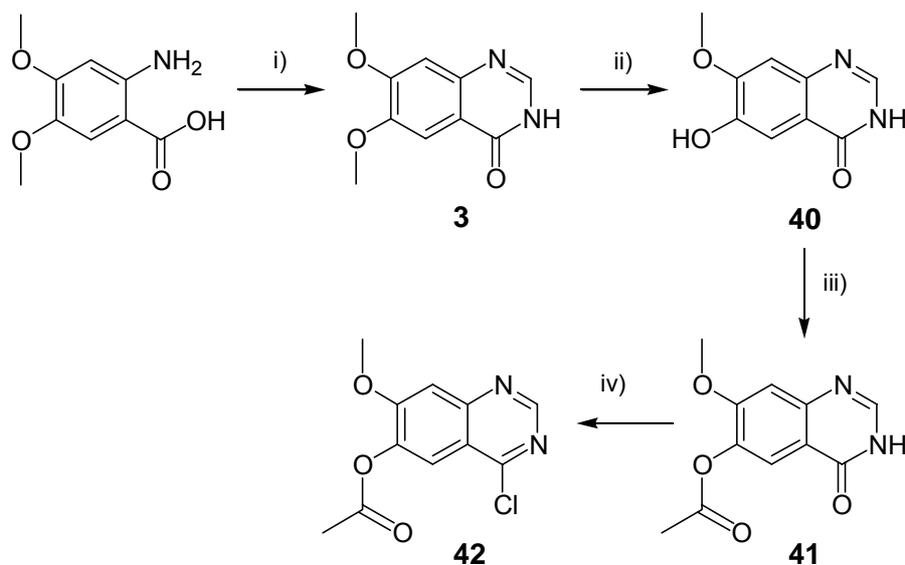


- 4) Natriumazid, *N,N*-Dimethylformamid, RT ; ii) Natriummethanolat, 3-Chlor-4-fluorbenzaldehyd, RT ;
 iii) Xylol, ΔT ; iv) Natronlauge, Ethanol, RT ; v) Diphenylether, ΔT

Abb. 101: Herstellung von Verbindung 10

3.4.3.2 Herstellung der Cross-coupling-Komponente 4-Chlor-6-acetoxy-7-methoxychinazolin (42)

Diese Substanz 42 wurde bereits im Rahmen der Herstellung der Verbindung 47 synthetisiert (**Kap. 3.4.2.1**). Deshalb wird hier nur ein Formelschema aufgezeigt, das den Syntheseweg zu 42 verdeutlichen soll (**Abb. 102**).

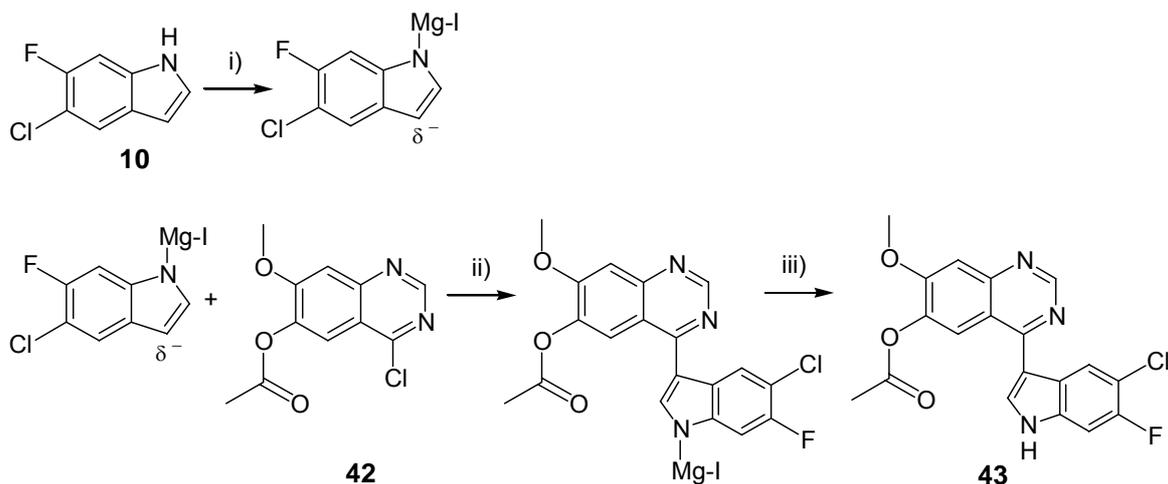


- 4) Formamidinacetat, 2-Methoxyethanol, ΔT ; ii) Methansulfonsäure, Methionin, ΔT ; iii) Acetanhydrid, Pyridin, ΔT ; iv) Thionylchlorid, *N,N*-Dimethylformamid, ΔT

Abb. 102: Herstellung von 4-Chlor-6-acetoxy-7-methoxychinazolin (**42**)

3.4.3.3 Synthese von Verbindung 51 mit nachfolgender Seitenketteneinführung

Im Rahmen einer Hetarylierungsreaktion werden die beiden Edukte 4-Chlor-6-acetoxy-7-methoxychinazolin (**42**) und 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) mit Hilfe von Grignard-Reagenz zum 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6-acetoxy-7-methoxychinazolin (**43**) umgesetzt (**Abb. 103**).



- 4) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) ΔT ; iii) Wasser, RT

Abb. 103: Herstellung der Verbindung **43**

Nach der Hydrolyse bildet sich aber nicht nur die Wunschverbindung **43**, sondern zusätzlich 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6-hydroxy-7-methoxychinazolin (**44**), was anhand der aufgenommenen Infrarot- und Protonenresonanzspektren bewiesen werden konnte.

Die Versuche, das Gleichgewicht der Reaktion durch Änderung von Reaktionszeiten und –temperaturen sowie Aufarbeitungsverfahren zugunsten der Verbindung **43** zu verschieben, scheiterten. Der gewünschte Erfolg stellte sich nur manchmal ein, deshalb war eine Standardisierung des Verfahrens nicht möglich.

Allerdings lässt sich durch die Verwendung von frisch hergestelltem 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) eine gewisse Steigerung der Ausbeute an Verbindung **43** erreichen.

Deshalb kann theoretisch eine nachfolgende Seitenketteneinführung mit zwei, durch Säulenchromatographie einzeln separierbaren Verbindungen **43** und **44** vorgenommen werden (**Abb. 104**).

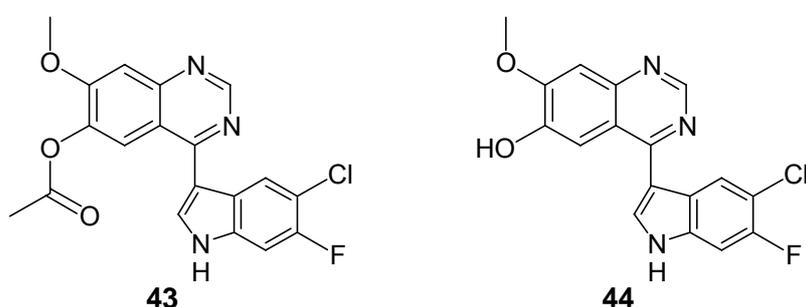


Abb. 104: Nach der Hetarylierung vorliegende Verbindungen **43** und **44**

3.4.3.4 Herstellung der Seitenkette 4-(3-Chlorpropyl)morpholin (**48**)

Zur Herstellung der basischen Seitenkette werden Morpholin und 1-Brom-3-chlorpropan in Toluol erhitzt. Der dabei entstehende Feststoff wird abfiltriert und verworfen. Anschließend wird das Filtrat mit verdünnter Salzsäure extrahiert, die Wasserphase mit Natronlauge alkalisiert und gegen Ether geschüttelt. Die organische Phase wird einrotiert und die entstehende ölige Flüssigkeit durch Vakuumdestillation aufgereinigt.

Da Bromid im Vergleich zu Chlorid die bessere Abgangsgruppe ist, greift der Stickstoff des Morpholins das positiviertete C1-Atom des 1-Brom-3-chlorpropans in einer S_N2 -Reaktion nucleophil an (**Abb. 105**). Dabei entsteht 4-(3-Chlorpropyl)morpholin (**48**), das nachfolgend in die Verbindung **43** bzw. **44** eingeführt werden soll.

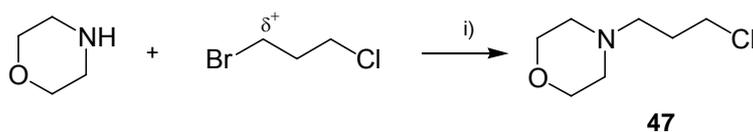


Abb. 105: Herstellung der Verbindung **48**

3.4.3.5 Versuche zur Einführung der Seitenkette **48** in die Verbindung **44**

Zunächst soll versucht werden, die basische Seitenkette in die Verbindung **44** mit freier Hydroxylgruppe in Position 6 einzuführen.

Dazu wird 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6-hydroxy-7-methoxychinazolin (**44**) mit 4-(3-Chlorpropyl)morpholin (**48**) und wasserfreiem Kaliumcarbonat in *N,N*-Dimethylformamid erhitzt. Nach der Filtration erfolgt eine Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit dem Fließmittelgemisch Dichlormethan/Methanol (9:1).

Das angefertigte Protonenresonanzspektrum zeigt die Signale der Seitenkette und des Chinazolin- bzw. Indolteils, aber interessanterweise fehlt das Singulett der Indol-NH-Gruppe. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass eventuell gleichzeitig eine O- und eine N-Alkylierung stattgefunden hat (**Abb. 106**).

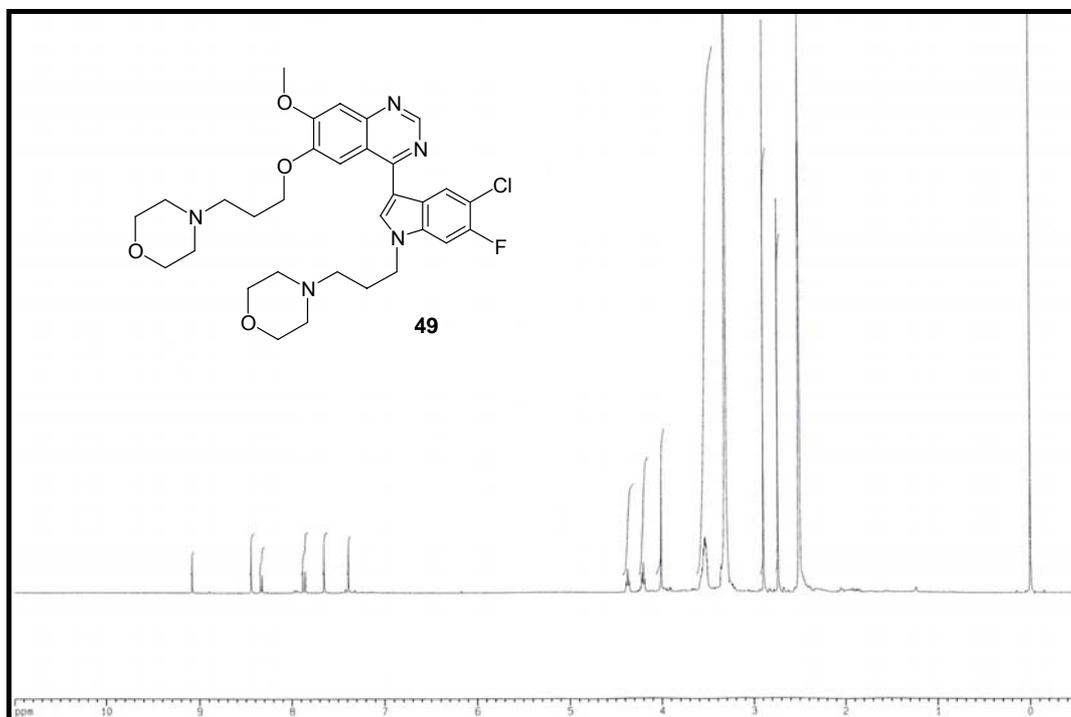


Abb. 106: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **49**

Daraufhin wurde ein Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektrum (EI) angefertigt. Hier tritt zwar der gewünschte Molpeak bei m/z 470 nicht auf, aber bei m/z 597 erscheint ein Signal mit einer Intensität von 19,7 %. Dieser Befund weist auf eine doppelte Alkylierung, nämlich an der Hydroxygruppe des Chinazolins und am Stickstoff des Indols hin. Außerdem treten charakteristische Bruchstücke vom Abbau der basischen Seitenkette in Erscheinung (**Abb. 107**) [83].

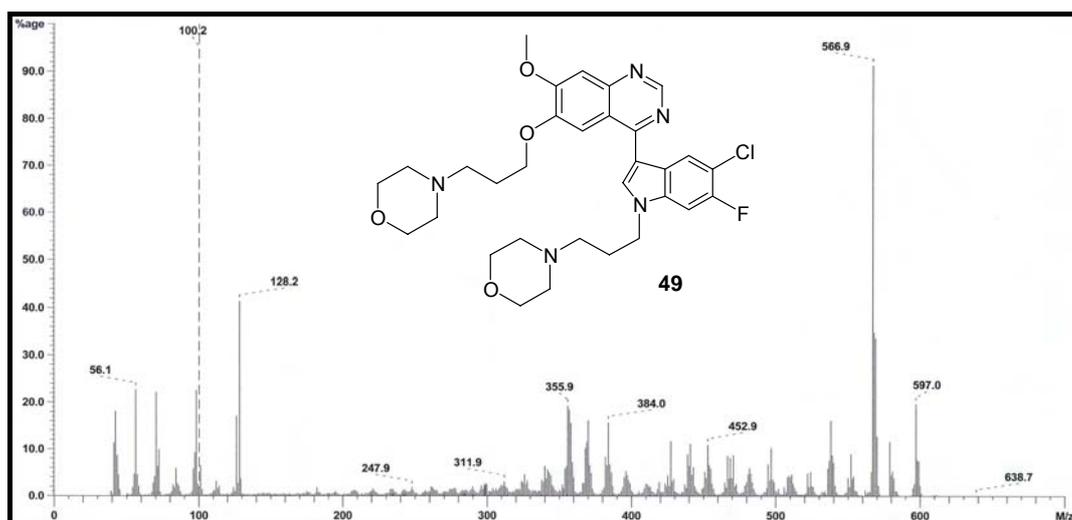


Abb. 107: EI-Massenspektrum der Verbindung **49**

Da weder mithilfe des Protonenresonanzspektrums noch mithilfe des EI-Massenspektrums eine eindeutige Strukturaufklärung vollzogen werden konnte, wird auf die Möglichkeit eines Fast Atom Bombardment Massenspektrums (FAB) zurückgegriffen (**Abb. 108**) [84].

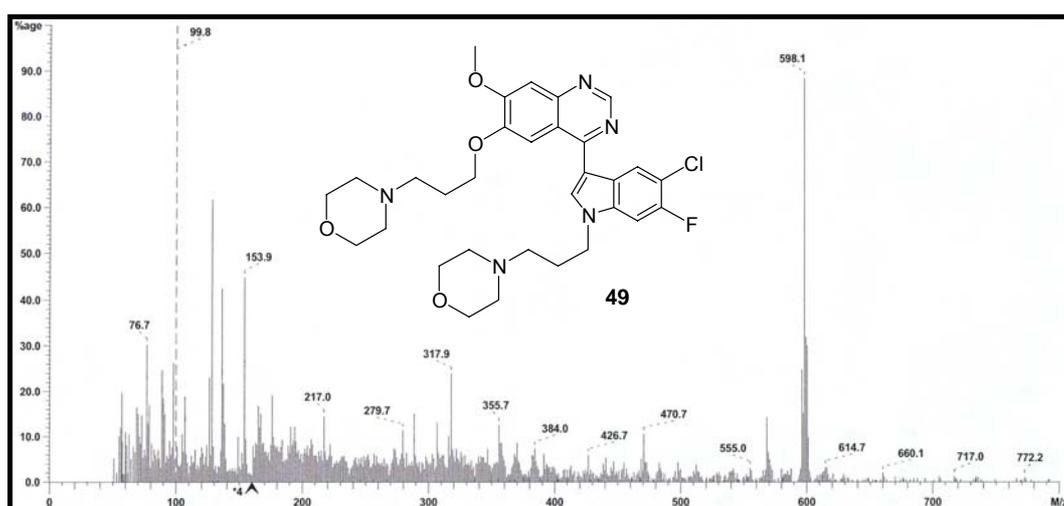


Abb. 108: FAB(+)-Massenspektrum der Verbindung **49**

Hier ist der charakteristische Abbau der Seitenkette anhand der Signale m/z 128 und m/z 100 erkennbar. Mit geringer Intensität (2,64 %) erscheint im FAB(+)-Spektrum sogar der

Molpeak der Wunschverbindung **51** bei m/z 471 ($M+H^+$), der im EI-Spektrum nicht sichtbar war, während der Molpeak des doppelt alkylierten Produkts **49** m/z 598 ($M+H^+$) eine Intensität von 22,08 % aufweist.

Aufgrund der Ergebnisse des FAB(+)-Spektrums und der Masse des Molpeaks ist mit Sicherheit davon auszugehen, dass hier ein Produkt **49** entstanden ist, das an zwei Stellen basische Seitenketten aufweist (**Abb. 109**).

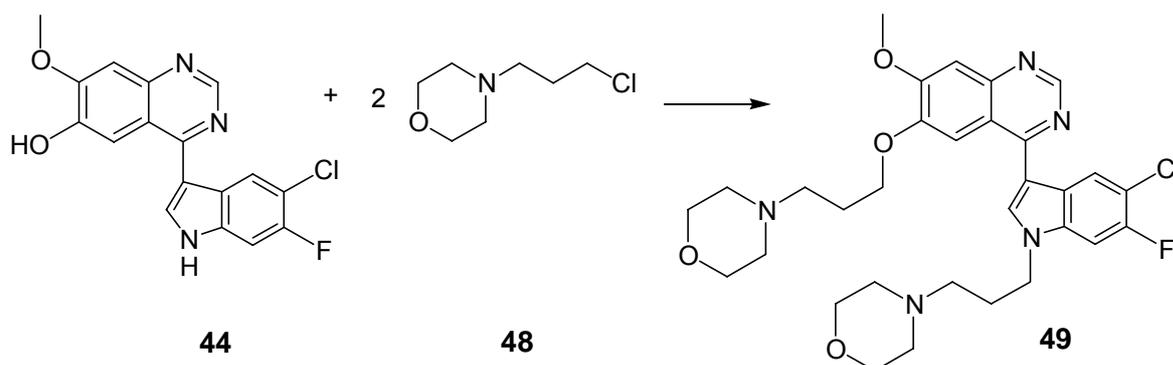


Abb. 109: Die unerwünschte zweifache Alkylierung der Verbindung **44**

Da eine solche Substitution das Proton am Indol-Stickstoff verdrängt und damit eine mögliche Bindungsstelle zu den Aminosäuren des Rezeptors blockiert, ist sie unerwünscht.

Infolge dessen muss nach anderen Möglichkeiten für die Einführung der Seitenkette ausschließlich in Position 6 des Chinazolins gesucht werden.

Dabei bietet es sich an, das Indol-NH vor der Einführung der Seitenkette zu schützen. Diese Konzeption wurde bereits bei der Herstellung der Verbindung **47** erfolgreich angewandt.

3.4.3.6 Schutz des Indol-Stickstoffes vor der Alkylierung

Um eine zweifache Alkylierung der Verbindung **44** zu vermeiden, wird wie bereits im **Kapitel 3.4.2.2** ausführlich beschrieben, das Indol-NH mithilfe von Di-*tert*-butyl-dicarbonat (BOC_2O) in einen Carbamidester überführt (**Abb. 110**). Dabei reagiert die Verbindung **43** mit BOC-Anhydrid in einer nucleophilen Substitution zum gewünschten *tert*-Butylcarbamat **45**. In diesem Fall kann nur das 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6-acetoxy-7-methoxychinazolin (**43**) als Edukt verwendet werden, da hier die Acetoxy-Gruppe in Position 6 des Chinazolins eine Einführung der BOC-Schutzgruppe auch an dieser Stelle verhindert.

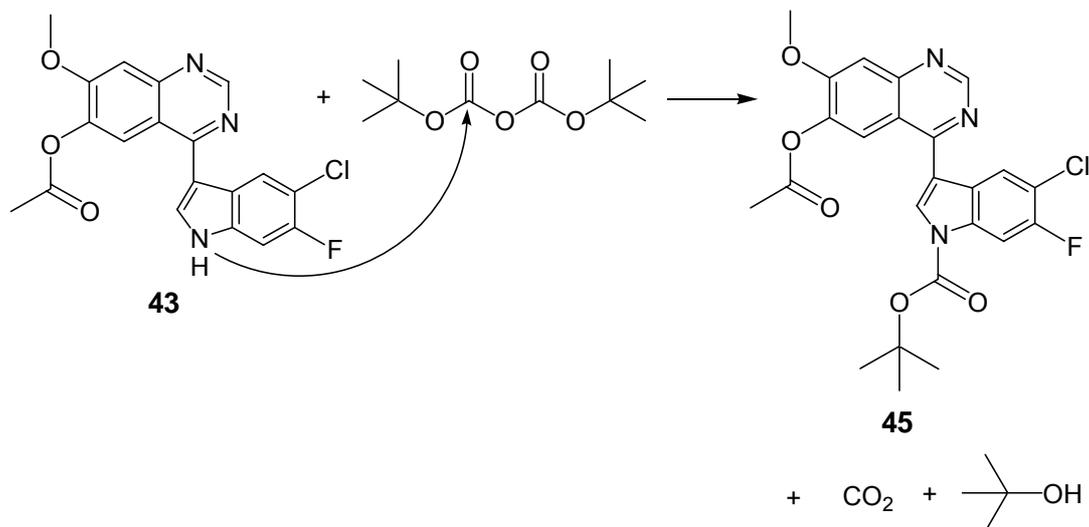


Abb. 110: Einführung der BOC-Schutzgruppe

Die nachfolgende Einführung der Seitenkette erfordert ein basisches Milieu, gegen das sich die BOC-Schutzgruppe als inert erweist. Eine BOC-Abspaltung erfolgt nur in saurer Umgebung, daher ist Di-*tert*-butyl-dicarbonat ein ideales Reagenz, um eine einfache Alkylierung am C6 des Chinazolins zu ermöglichen.

3.4.3.7 Abspaltung der Acetylschutzgruppe und nachfolgende Einführung der Seitenkette in Position 6 des Chinazolins

Zur Seitenketteneinführung wird die Verbindung **45** mit 4-(3-Chlorpropyl)morpholin (**48**), Kaliumcarbonat und 18-Krone-6 in Acetonitril erhitzt. Wie bereits im Kapitel 3.4.2.2 beschrieben, komplexiert der Kronenether auch hier die Kaliumionen, sodass die „nackten“ Carbonationen unsolvatisiert im aprotischen Lösungsmittel Acetonitril vorliegen. Infolge dessen wird ihre Basizität drastisch gesteigert, was zur Abspaltung der Acetylschutzgruppe beiträgt.

In einer Williamson-Ether-Synthese greift das entstehende Phenolat als O-Nucleophil das positiviert Kohlenstoffatom des 4-(3-Chlorpropyl)morpholins (**48**) in einer S_N2-Reaktion unter Austritt des Chlorid-Ions an (**Abb. 111**).

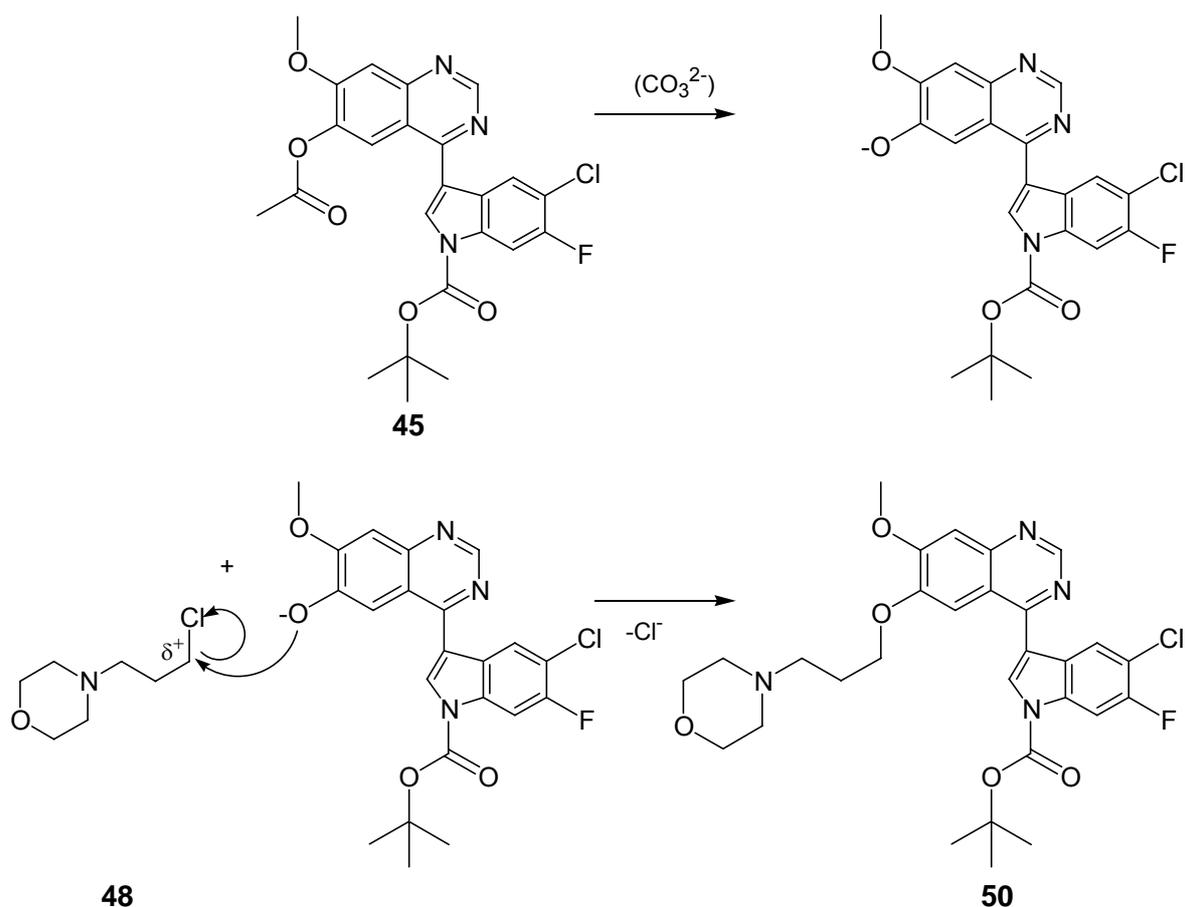


Abb. 111: Einführung der Seitenkette in Position 6 des Chinazolin-Grundkörpers

Es entsteht *tert*-Butyl-[5-chlor-6-fluor-3-(7-methoxy-6-(3-morpholin-4-ylpropoxy)chinazolin-4-yl)]-indol-1-carboxylat (**50**) in Form eines farblosen Feststoffes, der durch Säulenchromatographie mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat/Ethanol (9:1) aufgereinigt wird.

3.4.3.8 Abspaltung der BOC-Schutzgruppe zum Wunschprodukt 51

Die Abspaltung der BOC-Schutzgruppe erfolgt im sauren Milieu. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Morpholin-Stickstoff, der einen pK_B -Wert von 5-6 aufweist, unprotoniert bleibt. Bei erfolgter Protonierung wäre eine spätere Deprotonierung immer mit Ausbeuteverlusten und eventuellen Nebenreaktionen verbunden. Aufgrund dessen ist eine Verseifung der Schutzgruppe nicht mit Mineralsäuren, sondern mit schwächeren Säuren sinnvoller.

Zu diesem Zweck wurde die Ameisensäure mit einem pK_S -Wert von 3,75 ausgewählt.

Die Verbindung **50** wird mit Ameisensäure bei Raumtemperatur gerührt. Bei der dabei stattfindenden S_N1 -Reaktion bildet sich ein stabiles *tert*-Butylkation sowie ein Carbamidsäure-Derivat, das durch Zugabe einer Base zur Wunschverbindung **51** und CO_2 hydrolysiert wird (**Abb. 112**) [81, 82]. Als basische Verbindung wird zunächst eine Soda-Eis-Mischung gewählt, die zum Reaktionsansatz gegeben wird.

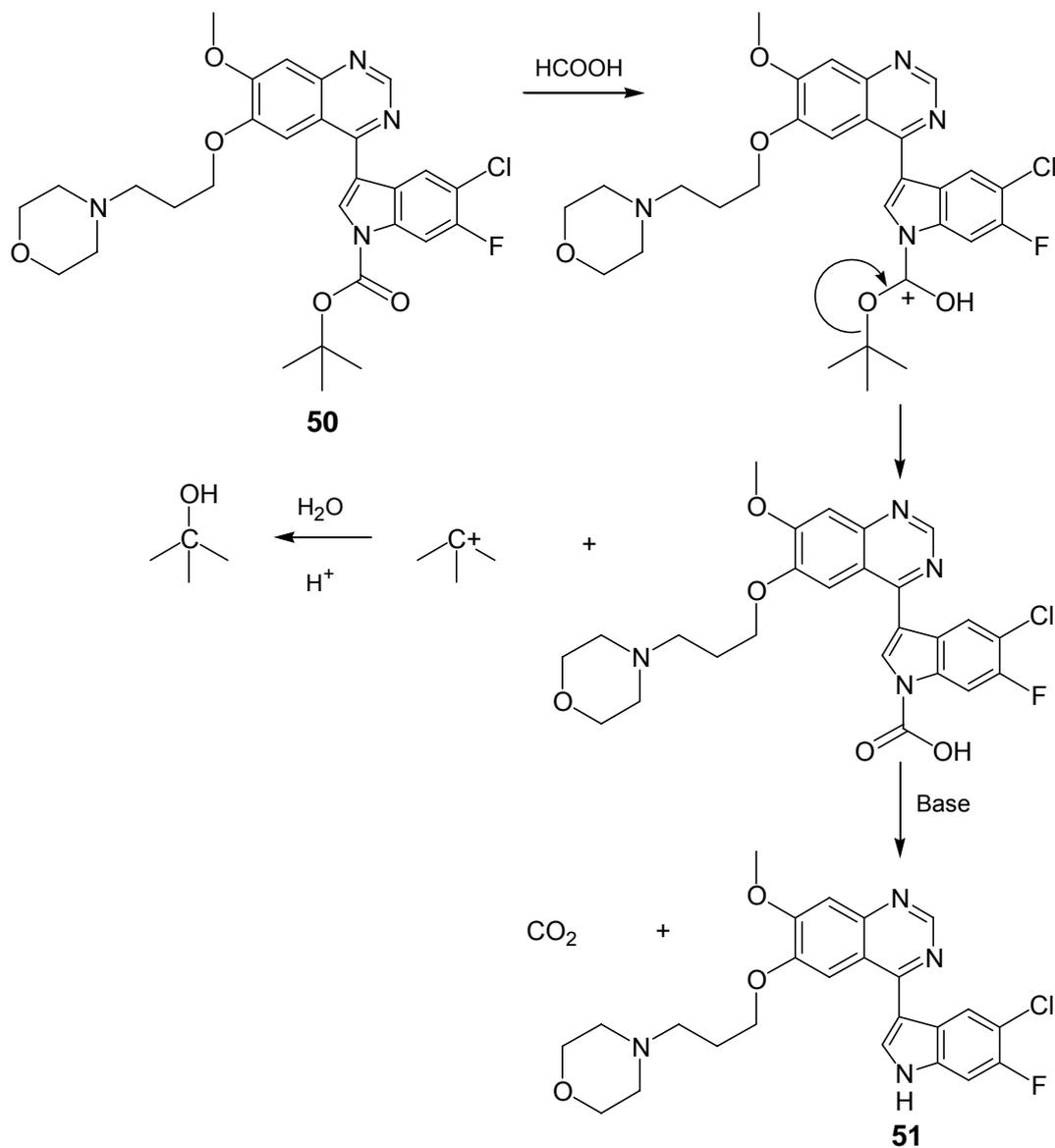


Abb. 112: Mechanismus der Abspaltung der BOC-Schutzgruppe

Nach der Extraktion von **51** mit Diethylether sowie mit Ethylacetat und nachfolgender Eliminierung der Lösungsmittel im Vakuum entsteht ein gelber, öliger Rückstand, der säulenchromatographisch aufgereinigt wird. Zu diesem Zweck werden vorher viele verschiedene Fließmittelgemische dünnenschichtchromatographisch getestet. Allerdings eignet sich keines für eine gute Trennung der Substanzen. Aber schließlich wird mit dem Gemisch Ether/Ethylacetat/Methanol (3:1:1) eine gute Abgrenzung der einzelnen Verbindungen zueinander erzielt, die eine säulenchromatographische Aufreinigung zulässt. Dabei kann eine stark fluoreszierende Substanz mit öligen Eigenschaften separiert werden.

Im aufgenommenen Protonenresonanzspektrum von **51** erscheint das Singulett des Indol-NHs bei einer chemischen Verschiebung von 12,10 ppm, das als Beleg für eine erfolgreiche Schutzgruppenabspaltung gelten kann. Die aromatischen Protonen werden im Bereich von ca. 7-9 ppm sichtbar und die Protonen der Seitenketten liegen im Bereich von etwa 2-4,5 ppm (**Abb. 113**).

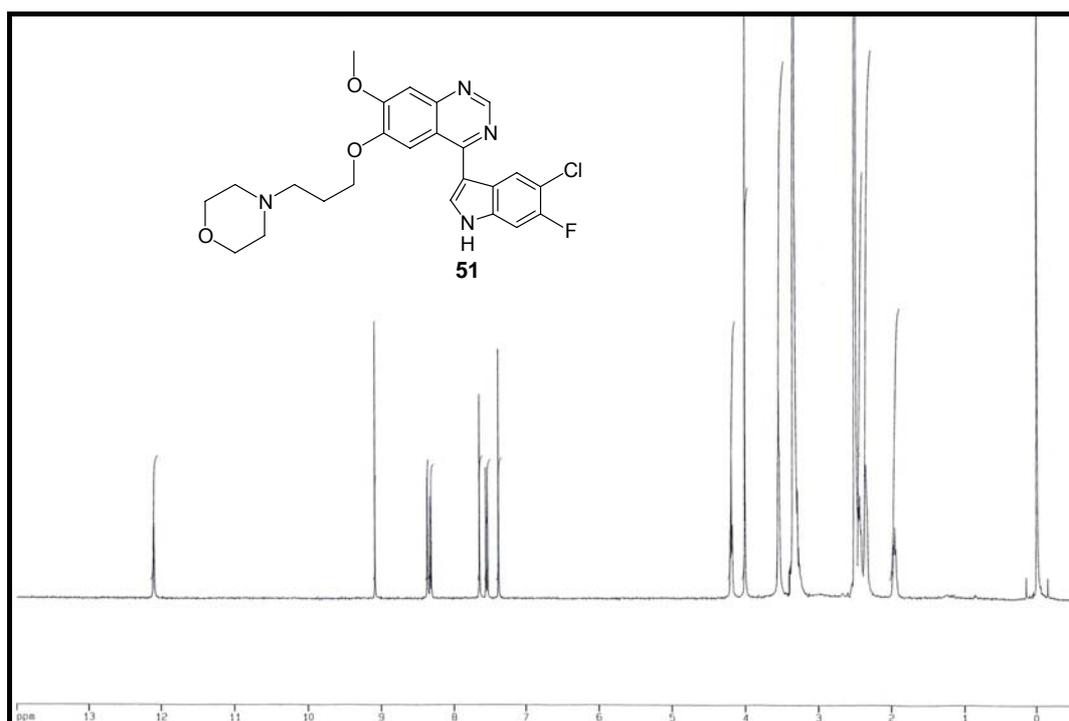


Abb. 113: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **51**

Außerdem wird ein Massenspektrum angefertigt (**Abb. 114**). Hier erscheint deutlich der Molpeak bei m/z 470; zusätzlich wird der Abbau der Seitenkette mithilfe der charakteristischen Bruchstücke bei m/z 100 und m/z 128 plausibel gemacht.

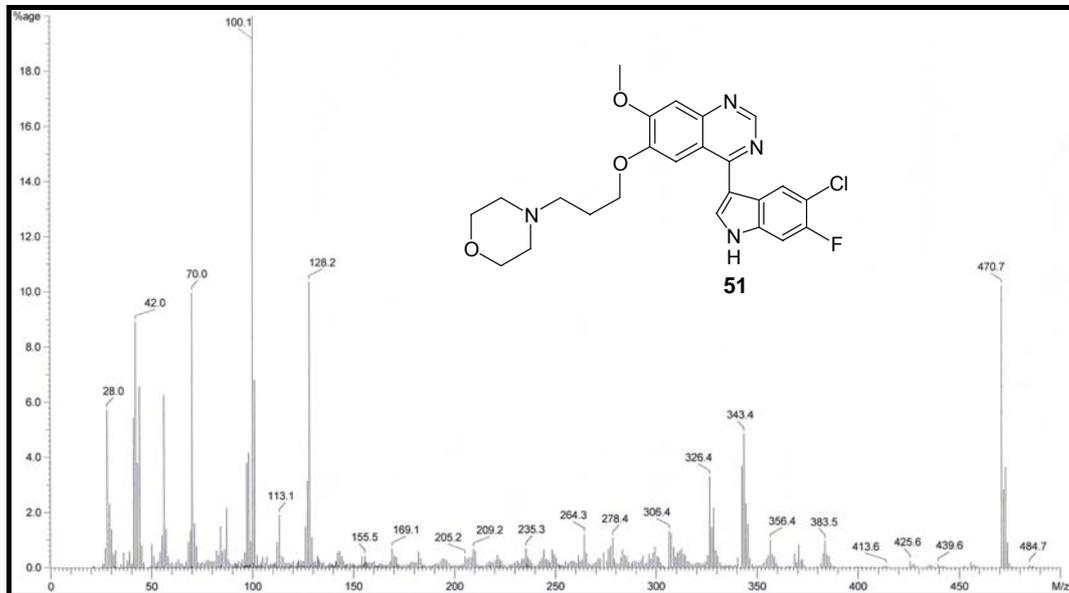


Abb. 114: EI-Massenspektrum der Verbindung **51**

Aufgrund dieser Spektren kann die Struktur der synthetisierten Substanz eindeutig der Wunschverbindung **51** zugeordnet werden.

Die Reinheit der Substanz soll durch die Elementaranalyse bestätigt werden. Obwohl das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **51** keine Verunreinigungen erkennen lässt, stimmen die gefundenen C,H,N-Werte der Elementaranalyse merkwürdigerweise überhaupt nicht mit den berechneten theoretischen Werten überein.

Auf der Suche nach dem Grund für diesen Befund wird zunächst ein Struktur-Modell der Verbindung **51** erstellt (**Abb. 115**).

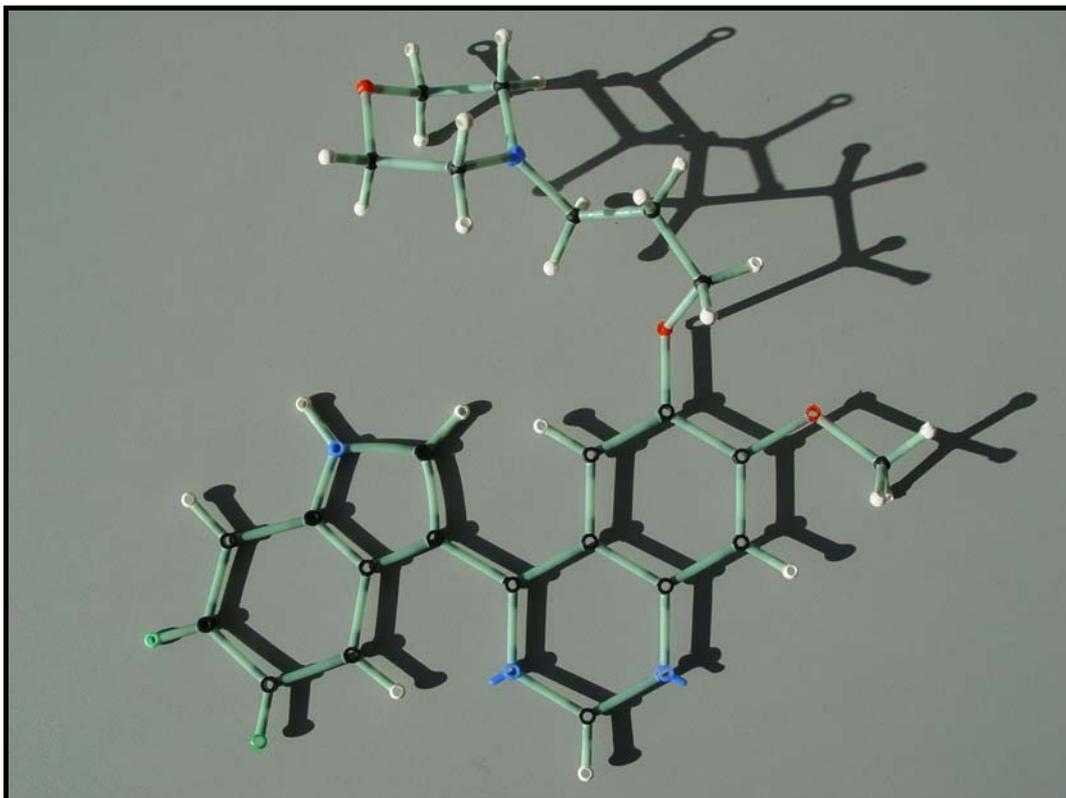


Abb. 115: Modell der Verbindung **51**

Auf dem Bild wird sichtbar, dass durch die lange, sperrige Seitenkette am C6 des Chinazolins eine Podand-artige Struktur geschaffen wird. In die Tasche könnten kleine Moleküle, Ionen oder Lösungsmittel eingeschlossen werden, die mit den beiden Heteroatomen des Morpholins, dem Indol-NH sowie dem Ethersauerstoff am Kohlenstoffatom 6 des Chinazolins gute Liganden besitzen. Damit wären die schlechten Ergebnisse der Elementaranalysen erklärbar; denn auch bei weiteren Syntheseansätzen wurde trotz mehrfach durchgeführter Säulenchromatographie keine reine Substanz isoliert.

Bereits *Albuschat* hat beobachtet, dass 4-Anilinochinazoline mit 6-Dihydroxybenzylamino-Substituenten dazu neigen, polare Lösungsmittel, wie Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid und Wasser, einzuschließen. Diese Annahme konnte durch eine Röntgenkristallaufnahme des 4-Anilinochinazolins **RA 70** bestätigt werden (**Abb. 116, 117**). Bei der Umkristallisation der Verbindung aus wasserhaltigem *N,N*-Dimethylformamid wurden sowohl das Lösungsmittel als auch Wasser eingelagert [36].

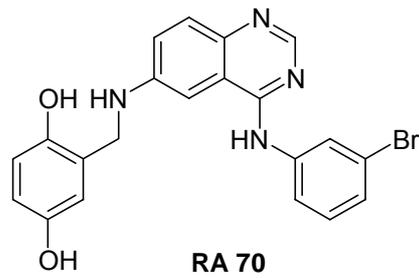


Abb. 116: Die Verbindung **RA 70**

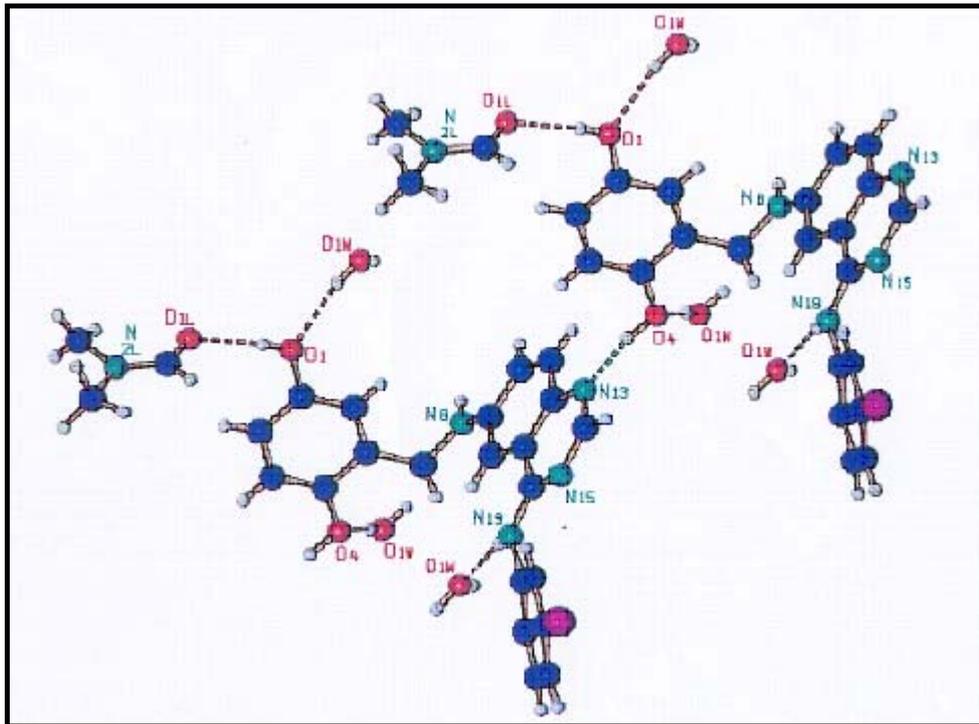


Abb. 117: Röntgenkristallanalyse der Verbindung **RA 70** (Kristallausschnitt) [36]

Wie in **Abb. 117** zu erkennen ist, sind zunächst zwei Moleküle **RA 70** über eine Wasserstoffbrücke zwischen dem N1 des Chinazolins (N13) und der OH-Gruppe des Dihydroxybenzylamino-Restes (O4) verbunden.

Des Weiteren bindet jedes Molekül drei Wassermoleküle, nämlich die Sauerstoffe der Hydroxygruppen (O1, O4) und die Amino-Gruppe der Anilino-Seitenkette (N19).

Das Sauerstoffatom des Dimethylformamids (O1L) tritt in Kontakt mit der OH-Gruppe am C4 des Dihydroxyphenyl-Restes (O1).

Da auch die Verbindung **51** am C6 des Chinazolins eine Seitenkette mit ähnlichen Eigenschaften besitzt, wäre also auch hier ein Einschluss denkbar.

In Tabelle 10 wurden die Ergebnisse von CHN-Analysen zusammengestellt, die die großen Abweichungen zwischen theoretisch berechneten und tatsächlich gemessenen Werten erkennen lassen. Dabei wurde versucht, verschiedene Stoffe und Lösungsmittel in die Berechnungen mit einzubeziehen.

				Theoretische Werte unter Berücksichtigung eventuell eingelagerter Stoffe		
	C	H	N	C	H	N
Theoretische Werte in %	61,21	5,14	11,9	-	-	-
Gefundene Werte in %				MgSO ₄ , 2 CH ₃ OH, 2 H ₂ O		
1	45,38	4,85	7,83	45,16	5,25	8,10
2	51,73	4,81	9,68	Na ₂ CO ₃ , ¼ H ₂ O		
				51,64	4,25	9,64
3	52,85	5,44	9,85	½ Na ₂ CO ₃ , 2 H ₂ O		
				52,55	5,04	10,01
4	50,92	4,60	9,70	Na ₂ CO ₃ , H ₂ O		
				50,47	4,40	9,41
5	46,07	5,38	6,81	6 HCOOH, 2 H ₂ O		
				46,01	5,15	7,15

Tabelle 10: Einige Ergebnisse der CHN-Analysen der Substanz **51**

Besonders auffällig wurde die zur Neutralisation des Ameisensäure-Überschusses und Abspaltung der Carbamidsäure verwendete Soda-Lösung. Die kleinen Natrium-Ionen sind prädestiniert dafür, sich in Hohlräume einzulagern.

Aufgenommene FAB(+)- bzw. FAB(-)-Massenspektren sollen über eine eventuelle Soda-Einlagerung Aufschluss geben. Insbesondere Carbonat- bzw. Hydrogencarbonat-Ionen hätten anhand des Basispeaks erkannt werden müssen. Allerdings ergibt sich aus den Spektren kein Hinweis auf einen derartigen Einschluss.

Trotzdem liegt aufgrund des gebauten Modells und der Eigenschaften der strukturell ähnlichen 4-Anilinochinazoline weiterhin die Vermutung einer Ein- bzw. Anlagerung von Stoffen bzw. Lösungsmitteln während der verschiedenen Syntheseschritte nahe.

Daher wurden die Herstellungsmethoden vom Zeitpunkt der Hetarylierung an sorgfältig überprüft.

Das bei allen Synthesestufen verwendete Trocknungsmittel Natriumsulfat, das ein kleines, gut einschließbares Alkali-Kation aufweist, wurde gegen Magnesiumsulfat mit einem größeren Erdalkali-Kation ausgetauscht.

Bei der Phasentrennung der organischen und wässrigen Phase wurde auf Hilfsstoffe wie gesättigte Kochsalz- oder Natriumsulfat-Lösung verzichtet.

Ein grosses Problem stellt der Austausch der im letzten Schritt verwendeten Soda-Lösung dar. Hier muss für die Abspaltung der Carbamidsäure ein basisches Reagenz mit ausreichender Kation-Größe gefunden werden, das durch Substanzen mit podand-artiger Struktur nicht eingeschlossen wird.

Daher wird die Hydrolyse, wie auch schon bei der Synthese von **47**, mit wässriger Benzyltrimethylammoniumhydroxid-Lösung (Triton B) durchgeführt. Triton B ist eine, als basischer Katalysator eingesetzte quartäre Ammoniumverbindung mit großräumiger Kation-Substitution (**Abb. 118**) [85].

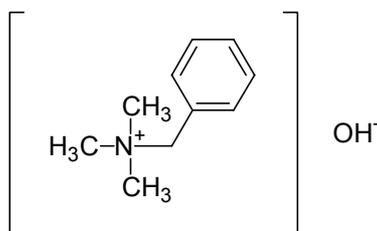


Abb. 118: Triton B

Zu diesem Zweck wird eine Triton B-Eismischung vorgelegt und die saure Reaktionslösung vorsichtig dazugetropft. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der pH-Wert immer alkalisch bleibt, was durch ständige Überprüfung und regelmäßiges erneutes Zutropfen von Triton B erreicht wird.

Durch diese Abänderung wurde ein Endprodukt synthetisiert, das nicht mehr komplett ölig ist, sondern die Eigenschaften eines festen Öls aufweist. Die theoretisch errechneten Werte für die Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff wurden aber immer noch nicht erreicht.

Deshalb wird im Verlauf der letzten Synthesestufe nach dem Extrahieren mit Ether und Ethylacetat kein salzartiges Trocknungsmittel mehr verwendet, sondern die organische Phase wird mehrere Tage über Molekularsieb getrocknet. Durch diese Maßnahme kann das Endprodukt **51** als pulveriger Feststoff isoliert werden, der anschließend umkristallisiert wird. Dabei wird, wie schon bei den anderen Endprodukten beschrieben, die Methode der Diffusionsumkristallisation gewählt. Dazu wird die Verbindung **51** in Ethylacetat gelöst, die Lösung in ein kleines Rollrandglas filtriert und dieses wiederum offen in ein größeres Rollrandglas mit n-Hexan gestellt, welches fest verschlossen wird. Durch das offene kleine Glas ist über die Gasphase ein permanenter Austausch zwischen Ethylacetat und n-Hexan möglich. Dadurch ändert sich die Zusammensetzung des Lösungsmittels für die Verbindung **51** ständig. Zu einem bestimmten Zeitpunkt ist dann ein Mischungsverhältnis erreicht, an dem die Substanz ihre geringste Löslichkeit aufweist und infolge dessen ausfällt.

So sind nach ungefähr einer Woche die ersten Kristalle im kleinen Rollrandglas sichtbar. Nach weiteren zwei Wochen ist die am Anfang gelbe Lösung farblos geworden und die entstandenen zahlreichen Kristalle, die oft in Form langer Spieße auftreten, werden separiert und wiederum einer Elementaranalyse zugeführt.

Hier zeigt sich dann endlich der gewünschte Erfolg (**Tabelle 11**). Die ermittelten Werte nähern sich den theoretisch berechneten soweit an, dass die Substanz als rein und frei von Einschlüssen betrachtet werden kann.

	C	H	N
Theoretische Werte in %	61,21	5,14	11,9
Tatsächlich ermittelte Werte in %	61,31	5,28	12,10

Tabelle 11: reine Elementaranalyse der Verbindung **51** nach vielen Abänderungen der Synthesevorschrift

Einige der gezüchteten Kristalle mit geeigneter Größe werden röntgenkristallographisch untersucht.

In der Abbildung 119 ist zunächst ein Molekül der Verbindung **51** dargestellt. Ganz deutlich ist zu erkennen, dass der Indol-Ring eine s-trans-Anordnung zum Chinazolin eingenommen hat und beide Ringsysteme gegeneinander etwas verdreht, also nicht ganz planar sind.

Die sperrige Seitenkette an C6 des Chinazolins lässt, wie schon anhand des gebauten Modells vermutet, eine Art Tasche entstehen, in die andere Moleküle leicht eingeschlossen werden können.

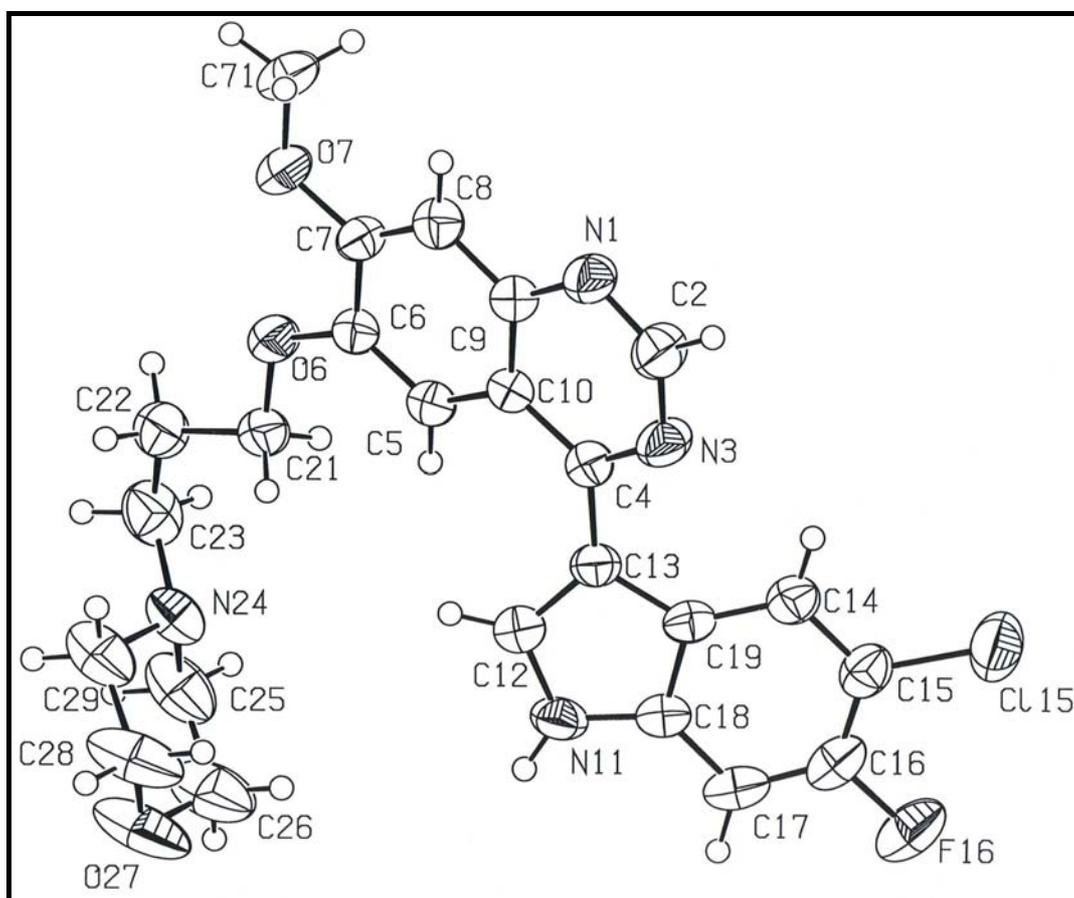


Abb. 119: Röntgenkristallaufnahme von Verbindung **51**

Sehr interessant ist der Ausschnitt aus einem Kristall der Verbindung **51** (**Abb. 120**). Erstaunlicherweise haben sich hier zwei Moleküle zusammengelagert, sodass nicht nur eine Tasche, sondern ein echter Hohlraum entsteht, in dem sich Einschlüsse bilden können.

Bei diesem intermolekularen Zusammenschluss bilden jeweils die Protonen der beiden Indol-Stickstoffe Wasserstoffbrücken zu den Morpholin-Sauerstoffen aus.

Die hohe Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken ist eine wichtige Voraussetzung für die Rezeptorbindung und kann deshalb, auch wenn dies zu Schwierigkeiten während der Aufarbeitung führt, als positiv angesehen werden.

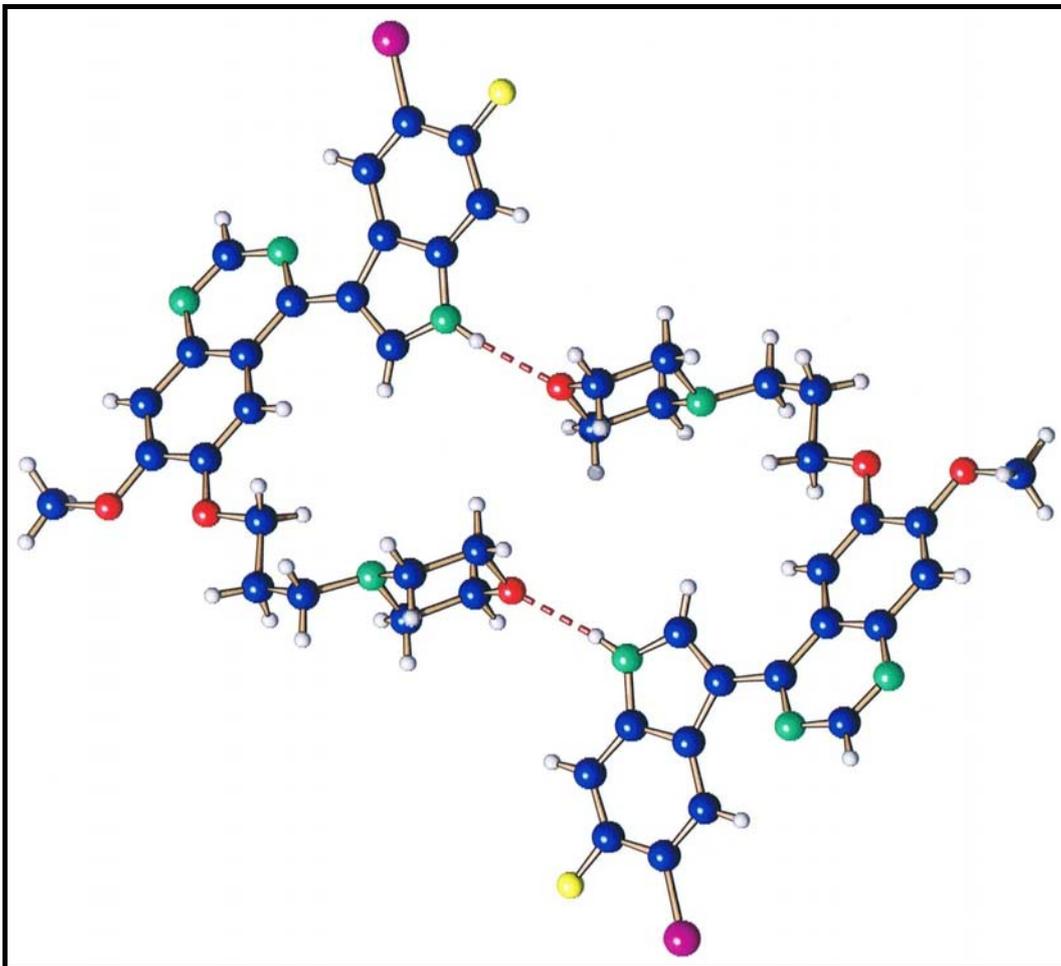


Abb. 120: Röntgenkristallaufnahme der dimeren Verbindung **51**

Da auch Verbindung **51** stark fluoresziert, wird eine Fluoreszenzanalyse durchgeführt. Als Vergleichssubstanz dient wiederum Chininsulfat in einer Konzentration von 1 μM in verdünnter Schwefelsäure. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen sind in den Abbildungen 121 und 122 graphisch dargestellt.

Die Substanz **51** weist in Ethylacetat in einer Konzentration von 5 μM bei Einstrahlungswellenlängen von 260 nm, 300 nm und 350 nm jeweils ein Emissionsmaximum auf (**Tabelle 12**).

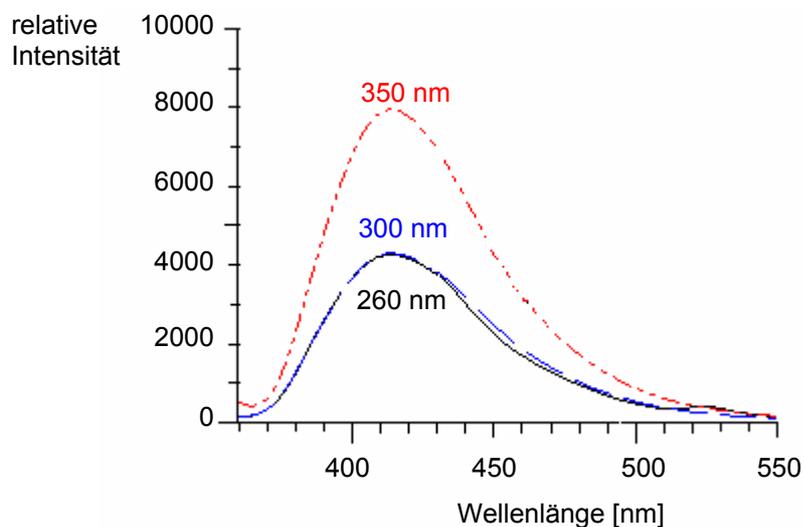


Abb. 121: Fluoreszenzspektrum der Verbindung **51** bei einer Konzentration von 5 μM

Exzitation [nm]	Emission [nm]	Relative Intensität
260	413,8	4258
300	413,8	4268
350	413,6	7948

Tabelle 12: Daten zum Fluoreszenzspektrum der Verbindung **51**

Die vier Emissionsmaxima des Chininsulfats zeigen bei einer Konzentration von 1 μM ähnliche Intensitäten wie die der Verbindung **51**.

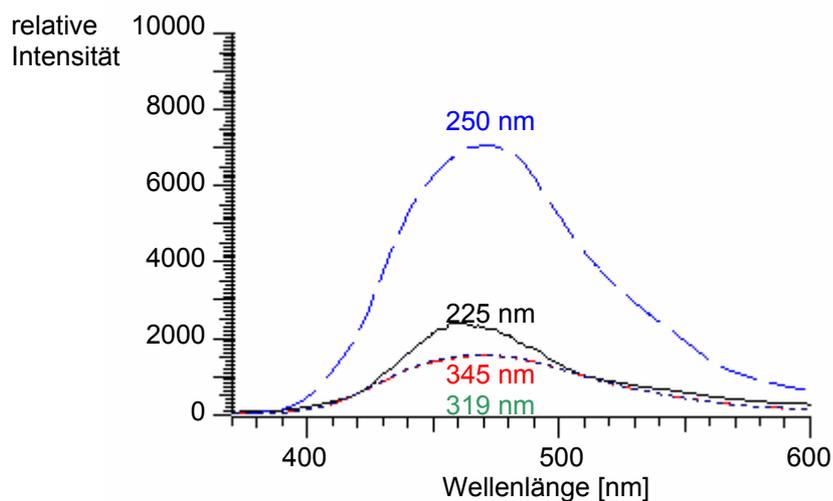


Abb. 122: Fluoreszenzspektrum von Chininsulfat bei einer Konzentration von 1 μM

Exzitation [nm]	Emission [nm]	Relative Intensität
225	461,4	2416
250	470,6	7089
319	468,6	1542
345	468,6	1556

Tabelle 13: Daten zum Fluoreszenzspektrum des Chininsulfats

Damit zeigt auch die Verbindung **51** die bemerkenswerte, starke Fluoreszenz dieser Substanzklasse, die bei allen bisher synthetisierten 4-(Indol-3-yl)chinazolinen aufgetreten ist.

Darüber hinaus wird die Substanz **51** einem EGFR-TK-Inhibitions-Test zugeführt. Durch die Ähnlichkeit einiger Strukturelemente mit Gefitinib (Iressa[®]) und der bewährten Substitution des Chinazolins mit 5-Chlor-6-fluorindol wird eine gute EGFR-TK-Inhibition vermutet.

Die ermittelten Aktivitäten (**Tabelle 14**) stellen ein hervorragendes Resultat dar, das die Dimensionen der bereits zugelassenen Arzneistoffe Gefitinib und Erlotinib erreicht (**Kap. 1.5**) [13].

Konzentration [nM]	Inhibitorische Aktivität [%]
100	61
50	26

Tabelle 14: EGFR-Inhibition der Verbindung **51**

Aufgrund der exzellenten EGFR-TK-Inhibition wird wiederum die Zytotoxizität an MCF-7-Brustkrebszellen als Bestätigung für die Signalunterbrechung überprüft. Durch das synergistische Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und Estrogenen werden auch hier beachtliche Ergebnisse erwartet.

Die Ergebnisse der *In-vitro* Zytotoxizitätstests der Verbindung **51** mit denen des in demselben Durchlauf getesteten Cisplatin als Standardzytostatikum sind in Abbildung 123 graphisch dargestellt. Als Maß für die Zytotoxizität dienen die ermittelten T/C_{corr} -Werte [%] in Abhängigkeit von der Inkubationszeit [h].

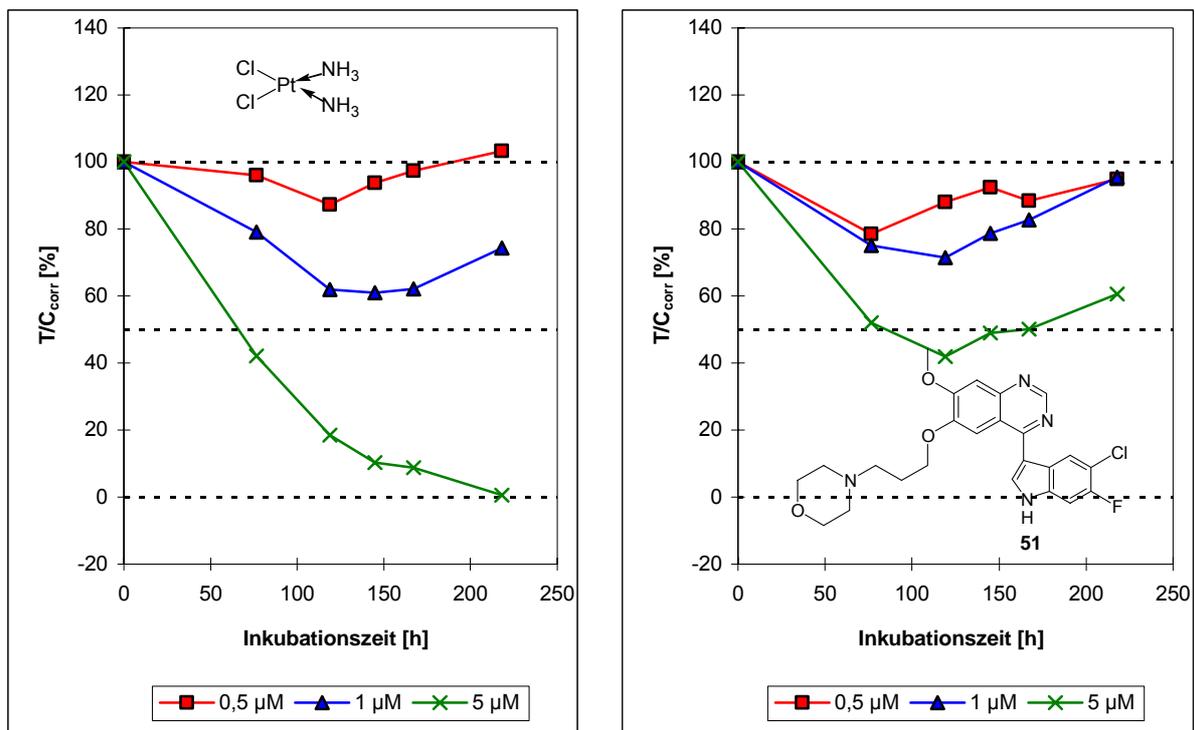


Abb. 123: Effekte der Verbindung **51** sowie des Cisplatin als Standardzytostatikum in Konzentrationen von jeweils 0,5, 1 und 5 µM auf das Wachstum von MCF-7-Zellen

Interessanterweise weist die Substanz **51** in den drei vermessenen Konzentrationen grundsätzlich weniger ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften als Cisplatin auf. In Konzentrationen von 0,5 bzw. 1 μM zeigt die Verbindung nur schwache antiproliferative Eigenschaften und eine komplette Wachstumshemmung tritt selbst bei einer Konzentration von 5 μM nicht auf. Das betrifft jedoch nur die MCF-7-Zelllinie. Tests an 60 weiteren Krebszelllinien werden zurzeit am NCI (National Cancer Institute) in den USA durchgeführt. Damit werden zwar an der MCF-7-Zelllinie die erhofften hervorragenden zytotoxischen Ergebnisse nicht erreicht, aber in Verbindung mit der exzellenten EGFR-Tyrosinkinase-Inhibition und der charakteristischen Fluoreszenz stellt die Substanz **51** eine zukunftsweisende Option in der medizinisch-pharmazeutischen Anwendung dieser Substanzklasse dar.

3.5 Übersicht über die EGFR-TK-Inhibition synthetisierter 4-(Indol-3-yl)chinazoline mit Chinazolin-Seitenketten, die von bekannten Arzneistoffen abgeleitet sind

An dieser Stelle soll zusammenfassend noch einmal eine Übersicht über die EGFR-TK inhibitorischen Aktivitäten der synthetisierten 4-(Indol-3-yl)chinazoline **39**, **47** und **51** mit konstant gehaltener 5-Chlor-6-fluor-Substitution des Indols und variabel substituiertem Chinazolin-Teil gegeben werden (**Tabelle 15**).

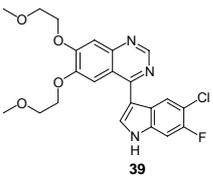
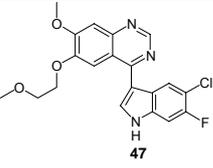
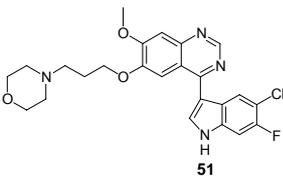
Substanz	EGFR-TK-Inhibition [%] bei einer Konzentration von 100 nM
 <p style="text-align: center;">39</p>	43
 <p style="text-align: center;">47</p>	1
 <p style="text-align: center;">51</p>	61

Tabelle 15: EGFR-TK-Inhibition synthetisierter 4-(Indol-3-yl)chinazoline mit variabler Chinazolin-Substitution

Nachdem sich die 5-Chlor-6-fluor-Substitution des Indols, wie im ersten Teil der Arbeit beschrieben, bewährt hat, wurden die Substituenten des Chinazolins in Anlehnung an Strukturen bereits zugelassener Arzneistoffe verändert.

In der in **Tabelle 15** dargestellten Übersicht ist zu erkennen, dass sich die Verbindungen **39** und **51**, die sich an der Substitution von Erlotinib bzw. Gefitinib orientieren, eine exzellente EGFR-TK-Inhibition aufweisen. Aber schon durch die Veränderung eines Substituenten, wie bei Verbindung **47**, sinkt die Aktivität der Substanz drastisch.

3.6 Diskussion der Struktur der Tyrosinkinase-Domäne nach Bindung verschiedener Liganden

Ein Inhibitor der EGFR-Tyrosinkinase sollte aufgrund seiner Struktur optimal in das aktive Zentrum der ATP-Bindungstasche passen, wobei die konzipierten Verbindungen in der Lage sein sollten, ähnlich dem Adenin Wasserstoffbrücken zum aktiven Zentrum auszubilden.

Für die Entwicklung potenter Proteinkinase-Inhibitoren ist ein Donor-Akzeptor-System wichtig, damit sich die potenziellen Wirkstoffe ähnlich dem Adenin in die Rezeptortasche einpassen können. Zudem sind im ATP nur drei der fünf Bindungstaschen besetzt, nämlich die Adenin-, die Ribose- und die Phosphatbindungstasche. Die beiden hydrophoben Regionen werden vom natürlichen Substrat nicht ausgefüllt, könnten aber den synthetisch hergestellten Molekülen zu einer stärkeren Bindung verhelfen [72].

Bisher wurden vier bedeutende Rezeptortheorien für den epidermalen Wachstumsfaktor aufgestellt (**Tabelle 16**). Dabei beziehen sich die Forschungen von *Traxler et al.* hauptsächlich auf ein Bindungsmodell für das natürliche Substrat Adenosintri-phosphat zum EGFR. Die Bindungsmodelle von *Palmer et al.*, *Wissner et al.*, *Hou et al.* und *Wood et al.* beschreiben die 4-Anilinochinazoline.

Modell	Wasserstoffbrückenbindungen zum EGF-Rezeptor			
	Bindungsmodell für ATP			
<i>Traxler</i> (1996)	N1 des Adenins ← NH von Methionin 769	6-Aminogruppe des Adenins → Amid-Sauerstoff des Glutamins 767		
<i>Palmer</i> (1997)	N1 des Chinazolins ← NH von Methionin 769	N3 des Chinazolins ← NH von Threonin 766		
<i>Wissner</i> (2000)	N1 des Chinazolins ← NH von Methionin 769	N3 des Chinazolins ← H ₂ O ← OH von Threonin 830		
<i>Hou</i> (2003)	N1 des Chinazolins ← NH von Methionin 769	N3 des Chinazolins ← H ₂ O ← OH von Threonin 766		
<i>Wood</i> (2004)	N1 des Chinazolins ← NH von Methionin 769	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">Kleine Substituenten: N3 des Chinazolins ← H₂O ← OH von Threonin 766 (<i>Hou</i>-Modell)</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">Voluminöse Substituenten: N3 des Chinazolins ← H₂O ← OH von Threonin 830 (<i>Wissner</i>-Modell)</td> </tr> </table>	Kleine Substituenten: N3 des Chinazolins ← H ₂ O ← OH von Threonin 766 (<i>Hou</i> -Modell)	Voluminöse Substituenten: N3 des Chinazolins ← H ₂ O ← OH von Threonin 830 (<i>Wissner</i> -Modell)
Kleine Substituenten: N3 des Chinazolins ← H ₂ O ← OH von Threonin 766 (<i>Hou</i> -Modell)	Voluminöse Substituenten: N3 des Chinazolins ← H ₂ O ← OH von Threonin 830 (<i>Wissner</i> -Modell)			

Tabelle 16: Rezeptorbindungsmodelle für ATP bzw. 4-Anilinochinazoline mit dem EGFR [72, 86-90]

Neuere Erkenntnisse von *Wood* et al. besagen, dass das N3 der 4-Anilinochinazoline mit kleinem 4-Anilino-Rest (Gefitinib, Erlotinib), wie von *Hou* et al. beschrieben, über ein Wassermolekül mit der Hydroxylgruppe von Threonin 766 wechselwirken kann (**Abb.124**).

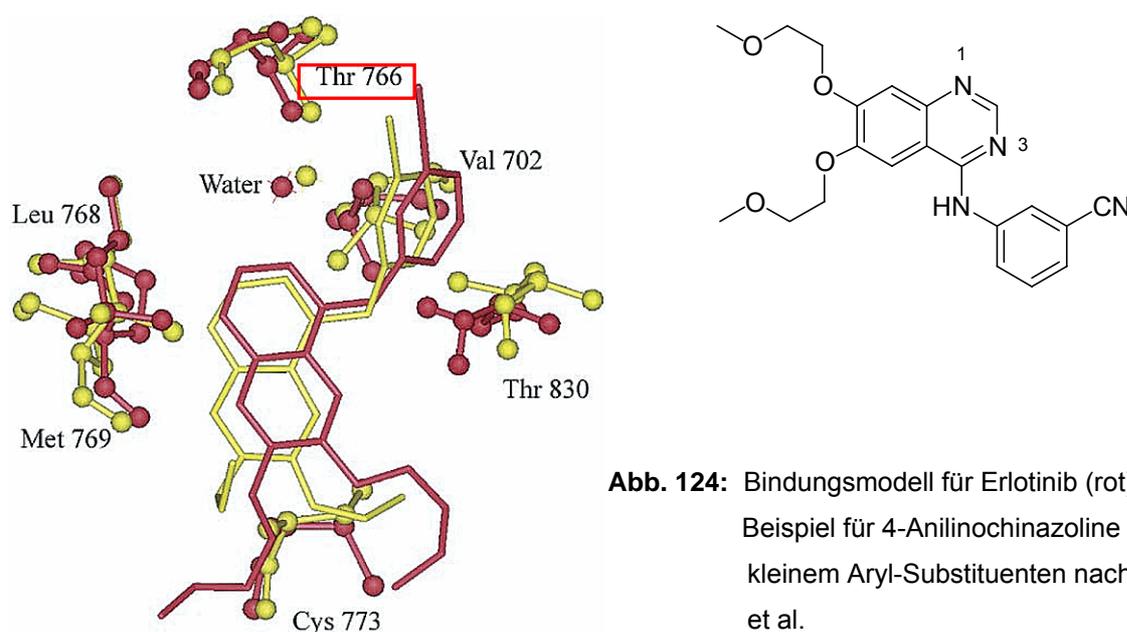


Abb. 124: Bindungsmodell für Erlotinib (rot) als Beispiel für 4-Anilinochinazoline mit kleinem Aryl-Substituenten nach *Hou* et al.

Die Biotechnologiefirma Axxima Pharmaceuticals bezieht sich auf das *Traxler'sche* Bindungsmodell [91]. Da die Aminosäuren eines Proteins immer auf die gleiche Weise peptidisch miteinander verknüpft sind, entsteht unabhängig von den Aminosäure-Bausteinen ein Backbone, die so genannte Hinge-Region, an die das natürliche Substrat ATP (**Abb. 126**), die 4-Anilinochinazoline (**Abb. 127**) und auch die neuen 4-(Indol-3-yl)chinazoline (**Abb. 128**) über Wasserstoffbrücken binden können.

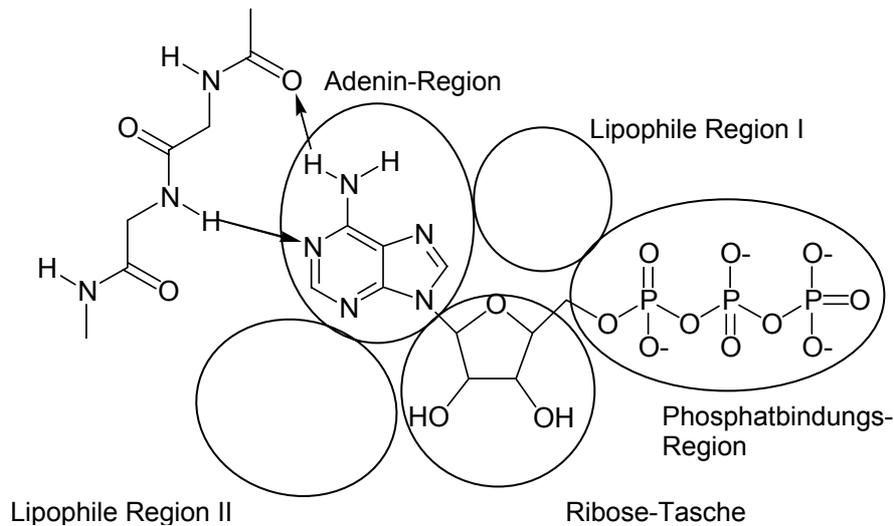


Abb. 126: Bindungsmodell der Firma Axxima Pharmaceuticals für ATP an die Hinge-Region des EGFR [91]

Während beim natürlichen Substrat ATP die Lipophile Region I unbesetzt ist, könnte sich der Phenylrest des Gefitinibs in die Lipophile Region I einlagern (**Abb. 127**) und somit für eine festere Bindung des Arzneistoffes an den Rezeptor sorgen, was den kompetitiven Antagonismus zum ATP erklären würde.

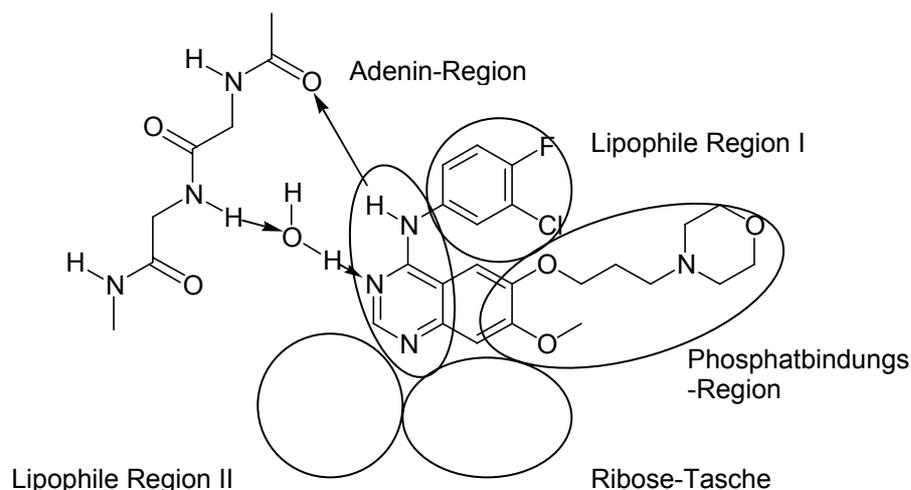


Abb. 127: An das Bindungsmodell der Firma Axxima Pharmaceuticals angelehnte Simulation für die Bindung von Gefitinib an die Hinge-Region des EGFR

Passt man die neuen 4-(Indol-3-yl)chinazoline in dieses Modell ein, könnte sich vom Indol-NH eine Wasserstoffbrücke zu einer Carbonylgruppe des Rezeptor-Backbones ausbilden. Für das postulierte Modell müsste für die Verbindung **51** allerdings eine s-cis-Anordnung einnehmen (**Abb. 128**), was sterisch und energetisch relativ unwahrscheinlich ist. Außerdem wurde mit der Röntgenkristallaufnahme eine s-trans-Konformation nachgewiesen.

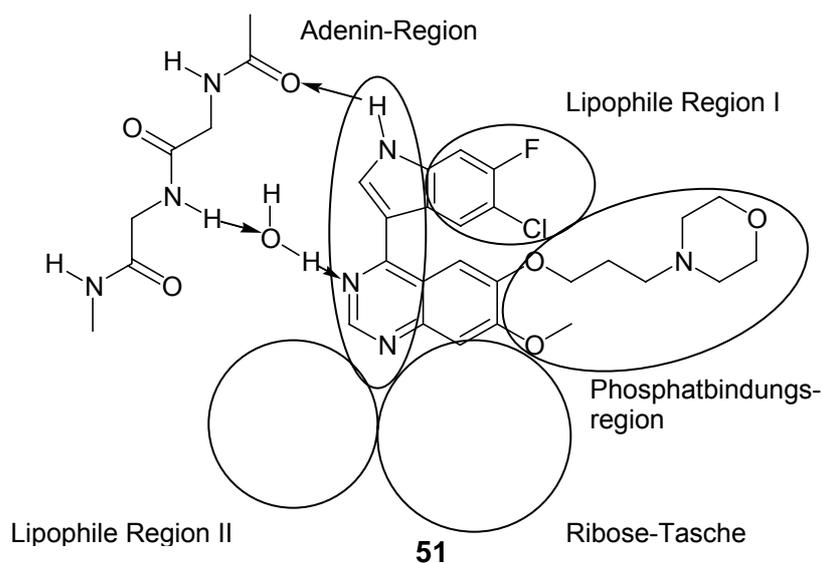


Abb. 128: An das Bindungsmodell der Firma Axxima Pharmaceuticals angelehnte Simulation für die Bindung der 4-(Indol-3-yl)chinazoline an die Hinge-Region des EGFR

Daher soll wiederum über ein nachgebautes Modell die Backbone-Bindung zum EGF-Rezeptor simuliert werden. Dabei wird von einer räumlichen Anordnung zwischen Rezeptor und Verbindung **51** ausgegangen (**Abb. 129**).

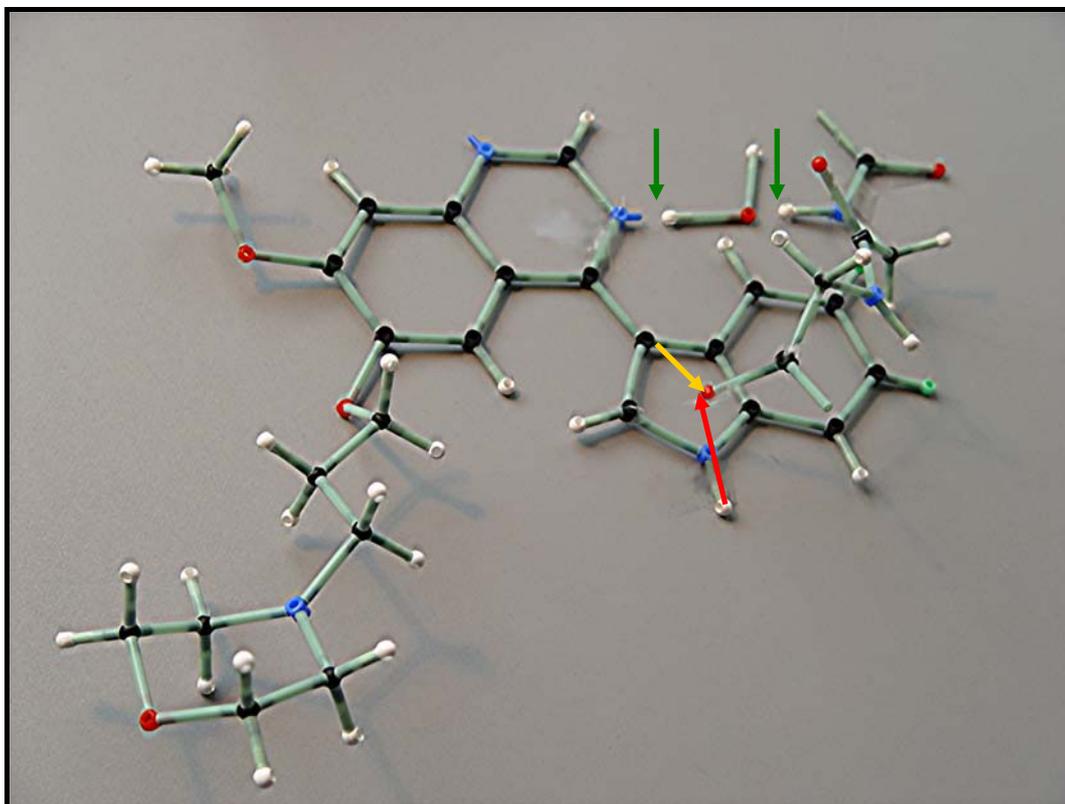


Abb. 129: Gebautes Modell zur Simulation der Bindung zwischen Verbindung **51** und dem EGFR

Aus diesem Modellversuch ist eindeutig ersichtlich, dass sich die Aminosäure-Kette in Form eines Bügels über die Verbindung **51** legen und dadurch eine Backbone-Interaktion zum Rezeptor ausbilden kann. Dabei ist sehr gut erkennbar, dass eine Carbonylgruppe des Rezeptors mittig über dem Indol-Ring steht und sich aufgrund dessen eine Wasserstoffbrücke sowohl vom Indol-NH der 4-(Indol-3-yl)chinazoline (**Abb. 129**, roter Pfeil) als auch vom Anilino-NH der 4-Anilinochinazoline (**Abb. 129**, gelber Pfeil) ausbilden kann. Durch den Anisotropie-Effekt der Carbonylgruppe wird dieser Effekt noch verstärkt. Da das C3 des Indols eine ähnliche Position wie das Anilino-NH einnimmt, geht zur Verdeutlichung der Aussage im Modell der gelbe Pfeil vom C3 des Indols aus.

Damit weist diese Bindungsstelle eine gewisse Flexibilität auf, sodass die 4-Anilino-Gruppe in dieser Position nicht zwingend notwendig ist und durch andere Wasserstoffbrücken-Donatoren, wie in Position 3, gebundene Indole ersetzt werden kann. Diese Erkenntnis gibt eine Erklärung für die Wirksamkeit der 4-(Indol-3-yl)chinazoline und eröffnet damit ganz neue Wege zu einer Vielzahl moderner und innovativer EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren, die dann alle variable 4-Chinazolinsubstituenten besitzen würden.

Durch diese Bügel-Anordnung zwischen Rezeptor und Substanz wäre in dem Modell die Lipophile Region I durch die s-trans-Anordnung der Verbindung **51** entweder unbesetzt, oder sie ist lokal flexibel und nicht auf die Position rechts oben beschränkt. Dann könnten sich Teile des Indols in einer links oben im Modell lokalisierten Lipophilen Tasche I befinden (**Abb. 130**).

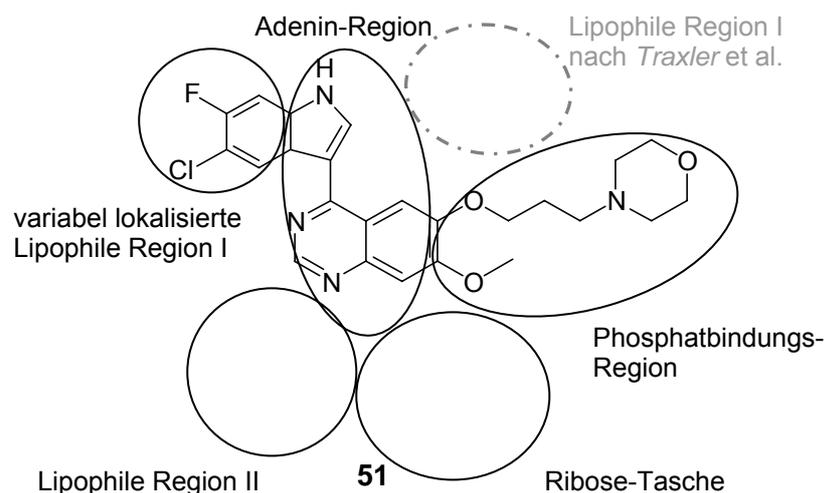


Abb. 130: Darstellung der vermuteten verschiedenen Bindungsregionen der s-trans konfigurierten Verbindung **51**

Für genaue Rezeptorbindungsstudien müssten aus dem EGF-Rezeptor und den 4-(Indol-3-yl)chinazolinen Mischkristalle gezüchtet werden.

Um diese Rezeptorbindung zu simulieren, wurde eine Co-Kristallisation von Verbindung **51** mit dem Tripeptid Gly-Gly-Gly versucht. Die Bemühungen scheiterten aber an der unterschiedlichen Löslichkeit der Stoffe. Während das Tripeptid eher wasserlösliche Eigenschaften aufweist, ist die Verbindung **51** nur in organischen Lösungsmitteln löslich.

Bei erfolgreicher Co-Kristallisation könnten mithilfe einer Röntgenkristallanalyse der entstandenen Mischkristalle die Interaktionen der Stoffklasse mit dem Rezeptor nachgewiesen und dadurch eventuell eine weitere Optimierung der Strukturen vorgenommen werden.

Aus der großen strukturellen Ähnlichkeit der katalytischen Domäne von verschiedenen Proteinkinasen ergeben sich insbesondere für die Entwicklung spezifisch wirkender Substanzen Probleme: Es besteht die Möglichkeit, dass neben dem Zielenzym auch die Signaltransduktion anderer Proteinkinasen gehemmt wird. Daher sollte die Wirkung der 4-(Indol-3-yl)chinazoline auch auf andere Kinasen hin überprüft werden.

Aufgrund der vermuteten Flexibilität der Bindungsregion der EGFR-Tyrosinkinase eröffnet sich ein weites Feld für moderne und innovative EGFR-TK-Inhibitoren. Dabei ist die Substanzklasse nicht nur wie bisher auf 4-Anilinochinazoline beschränkt, sondern durch die wahrscheinlich variabel lokalisierte Lipophile Region I und die Bügelanordnung zwischen Rezeptor und Substanz ist die 4-Anilino-Gruppe durch andere Strukturen ersetzbar. Dadurch werden neue Strukturvarianten für EGFR-TK-Inhibitoren möglich.