

**Neue EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren  
mit Salicyloyl- oder Chinazolin-  
Teilstrukturen**

**INAUGURAL - DISSERTATION**

**zur Erlangung der Doktorwürde  
im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der Freien Universität Berlin**

**Vorgelegt von  
Rica Albuschat**

**Berlin 2003**

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Löwe

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Wurm

Datum der Disputation: 28.05.2003

*Meinen Eltern in tiefster Dankbarkeit*

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von

**Herrn Prof. Dr. W. Löwe**

am Institut für Pharmazie der  
Freien Universität Berlin angefertigt.

Für die Überlassung des interessanten Themas,  
seine freundliche, motivierende Unterstützung,  
die stete Gesprächsbereitschaft sowie die vielseitige  
Förderung danke ich ihm sehr herzlich.

Mein besonderer Dank gilt den **Kollegen des Arbeitskreises Löwe – Silvia Tappmeyer, Astrid Lumetzberger und Christoph Dietrich** - für das angenehme Arbeitsklima sowie ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Des Weiteren möchte ich **allen Arbeitskollegen**, insbesondere den Assistenten des Chemiepraktikums im 8. Semester, für die gute Arbeitsatmosphäre und die nicht immer nur fachlichen Diskussionen danken.

**Herrn Prof. Dr. R. Gust** danke ich für die Unterstützung bei den pharmakologischen Untersuchungen zur Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften. **Frau Silke Bergemann** danke ich für die Durchführung der Zelltests.

Insbesondere möchte ich den **Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie** für die Aufnahme der Spektren sowie ihre Freundlichkeit und Gesprächsbereitschaft danken.

**Herrn Dr. Holzmann** danke ich für die Aufnahme der FAB-Spektren und seine freundliche Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich außerdem herzlich bei **Herrn Prof. Dr. P. Luger und Frau M. Weber**, Institut für Kristallographie der FU Berlin, für die gemessene Röntgenkristallanalyse und ihre Erklärungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt **meinen Eltern** für ihre - in jeglicher Hinsicht - immer währende Unterstützung, **meinem Freund Christian** für das mir entgegengebrachte Verständnis, seine Geduld und Aufmunterungen sowie **meiner Freundin Bettina** für ihr Interesse, ihre Hilfe und fachlichen sowie freundschaftlichen Ratschläge.

---

## Inhaltsverzeichnis

|                |   |           |
|----------------|---|-----------|
| <b>1</b>       | <b>EINLEITUNG</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b>     | <b>Krebs</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1.1</b>   | <b>Störungen in der zellulären Signaltransduktion als eine Ursache der Krebsentstehung</b>      | <b>1</b>  |
| <b>1.1.2</b>   | <b>EGFR-Targeting als neue Strategie in der Krebstherapie</b>                                   | <b>2</b>  |
| <b>1.2</b>     | <b>Der humane Epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)</b>                                    | <b>4</b>  |
| <b>1.2.1</b>   | <b>Aufbau</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1.2.2</b>   | <b>Die Liganden der EGF-Rezeptor-Familie</b>  | <b>6</b>  |
| <b>1.2.3</b>   | <b>Vergleich des EGF-Rezeptors mit dem Insulinrezeptor</b>                                      | <b>8</b>  |
| <b>1.3</b>     | <b>Funktionsweise des EGF-Rezeptors</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1.3.1</b>   | <b>Aktivierung durch Bindung eines Liganden</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1.3.2</b>   | <b>Auto-/Transphosphorylierung an den Phosphorylierungsstellen im carboxyterminalen Bereich</b> | <b>11</b> |
| <b>1.3.3</b>   | <b>Desaktivierung des Rezeptors</b>   | <b>11</b> |
| <b>1.4</b>     | <b>EGFR-Signaling</b>   | <b>12</b> |
| <b>1.4.1</b>   | <b>Aktivierung der RAS/MAPK-Signalkaskade</b>   | <b>13</b> |
| <b>1.4.2</b>   | <b>Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)</b>                                     | <b>13</b> |
| <b>1.4.3</b>   | <b>Aktivierung der Phospholipase C-<math>\gamma</math> (PLC-<math>\gamma</math>)</b>            | <b>14</b> |
| <b>1.4.4</b>   | <b>Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellwachstum</b>                                  | <b>14</b> |
| <b>1.4.4.1</b> | <b>EGFR-vermittelte Aktivierung von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellwachstum</b> | <b>15</b> |
| <b>1.4.5</b>   | <b>Apoptose</b>   | <b>16</b> |
| <b>1.4.5.1</b> | <b>EGFR-vermittelte Apoptose-Inhibition</b>   | <b>16</b> |
| <b>1.4.6</b>   | <b>Migration</b>  | <b>17</b> |
| <b>1.4.6.1</b> | <b>EGFR-vermittelte Vorgänge der Migration</b>  | <b>18</b> |

---

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1.5</b>   | <b>Gesteigertes EGFR-Signaling als eine Ursache für die Krebsentstehung</b> -----  | <b>19</b> |
| <b>1.5.1</b> | <b>Protoonkogene - Onkogene</b> -----  | <b>19</b> |
| <b>1.5.2</b> | <b>Ursachen eines gesteigerten EGFR-Signalings</b> -----   | <b>19</b> |
| 1.5.2.1      | Überexpression des EGF-Rezeptors-----  | 19        |
| 1.5.2.2      | Autokrine Stimulation-----   | 20        |
| 1.5.2.3      | c-erbB1-Genamutationen-----  | 20        |
| <b>1.6</b>   | <b>Inhibitorischer Eingriff in das EGFR-Signaling – Neue<br/>Krebstherapiestrategien</b> -----                                       | <b>22</b> |
| <b>1.6.1</b> | <b>Angriff an der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors</b> -----   | <b>22</b> |
| 1.6.1.1      | Monoklonale Antikörper-----  | 22        |
| 1.6.1.2      | Bispezifische monoklonale Antikörper-----  | 23        |
| 1.6.1.3      | Ligand-Toxin-Konjugate-----  | 24        |
| 1.6.1.4      | EGF-Genistein-Konjugate-----   | 24        |
| <b>1.6.2</b> | <b>Angriff an der zytoplasmatischen Domäne des EGF-Rezeptors</b> -----   | <b>25</b> |
| 1.6.2.1      | EGFR-Tyrosinkinase (TK)-Inhibitoren-----   | 25        |
| <b>1.6.3</b> | <b>Inhibition der Synthese des EGF-Rezeptors und seiner Liganden</b> -----   | <b>27</b> |
| 1.6.3.1      | Antisense-Oligonukleotide-----   | 27        |
| 1.6.3.2      | Ribozyme-----  | 28        |
| <b>1.6.4</b> | <b>Inhibition von EGFR-Downstream-Effektoren</b> -----   | <b>28</b> |
| <b>2</b>     | <b>PROBLEMSTELLUNG</b> -----   | <b>30</b> |
| <b>3</b>     | <b>CHEMISCH-PHARMAKOLOGISCHER TEIL</b> -----   | <b>31</b> |
| <b>3.1</b>   | <b>Salicyloylindole mit zytotoxischer Wirkung</b> -----  | <b>31</b> |
| <b>3.1.1</b> | <b>EGFR-TK-inhibitorische Wirkung als eine mögliche Erklärung für die<br/>zytotoxischen Eigenschaften der Salicyloylindole</b> ----- | <b>35</b> |
| <b>3.2</b>   | <b>Strukturvariationen von Salicyloylindolen</b> -----   | <b>38</b> |
| <b>3.2.1</b> | <b>Chlor-substituierte 4'-Hydroxy-salicyloylindole</b> -----   | <b>39</b> |
| 3.2.1.1      | Herstellung von (6-Chlor-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-(2,4-dihydroxyphenyl)-methanon (15)----   | 39        |
| <b>3.2.2</b> | <b>Ein Chlor-substituiertes 4'-Methyl-salicyloylindol</b> -----  | <b>46</b> |

---

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| 3.2.2.1      | Versuche zur Herstellung von (6-Chlor-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-(2-hydroxy-4-methylphenyl)-methanon (16)-----                                   | 46        |
| <b>3.2.3</b> | <b>4'-Methoxy-salicyloylindole-----</b>   | <b>52</b> |
| 3.2.3.1      | Herstellung von (6-Chlor-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-methanon (17)-----   | 53        |
| 3.2.3.2      | Herstellung von (5-Chlor-1 <i>H</i> -indol-3-yl)-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-methanon (18)-----   | 54        |
| 3.2.3.3      | Herstellung von (2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-methanon (19)----  | 54        |
| <b>3.2.4</b> | <b>EGFR-TK-inhibitorische Aktivität ausgewählter Salicyloylindole -----</b>   | <b>56</b> |
| <b>3.3</b>   | <b>Anilide der 4-Hydroxysalicylsäure als EGFR-TK-Inhibitoren -----</b>  | <b>58</b> |
| <b>3.3.1</b> | <b>Das 3-Chloranilid der 4-Hydroxysalicylsäure-----</b>   | <b>58</b> |
| 3.3.1.1      | Herstellung von <i>N</i> -(3-Chlorphenyl)-2,4-dihydroxybenzamid (27) -----  | 60        |
| 3.3.1.2      | Herstellung von <i>N</i> -(3-Chlor-4-fluorphenyl)-2,4-dihydroxybenzamid (28) -----  | 62        |
| <b>3.3.2</b> | <b>Das 3-Chloranilid der 4,6-Dihydroxysalicylsäure -----</b>  | <b>63</b> |
| 3.3.2.1      | Herstellung von <i>N</i> -(3-Chlorphenyl)-2,4,6-trihydroxybenzamid (26)-----  | 64        |
| <b>3.3.3</b> | <b>EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der Salicylanilide 26-28 -----</b>  | <b>65</b> |
| <b>3.3.4</b> | <b>Herstellung von 2-(3-Chlorphenyl)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-ethanon (6) -----</b>  | <b>67</b> |
| <b>3.3.5</b> | <b>EGFR-TK-inhibitorische Aktivität des Ethanons 6-----</b>   | <b>67</b> |
| <b>3.3.6</b> | <b>Anilide der 3-(2-Hydroxyphenyl)-propansäure als mögliche EGFR-TK-Inhibitoren -----</b>   | <b>68</b> |
| 3.3.6.1      | Herstellung von 3-(2-Hydroxyphenyl)- <i>N</i> -phenyl-propanamid (29) und <i>N</i> -(3-Chlorphenyl)-3-(2-hydroxyphenyl)-propanamid (30) ----- | 69        |
| <b>3.3.7</b> | <b>EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der 3-(2-Hydroxyphenyl)-propanilide 29 und 30 -----</b>   | <b>70</b> |
| <b>3.4</b>   | <b>Lavendustin A als Leitstruktur zur Entwicklung von EGFR-TK-Inhibitoren -----</b>   | <b>71</b> |
| <b>3.4.1</b> | <b>Lavendustin A-Derivate mit Salicylsäure-Teilstruktur -----</b>   | <b>75</b> |
| 3.4.1.1      | Salicylanilide mit 4-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-Substitution -----  | 75        |
| 3.4.1.2      | Salicylanilide und -ester mit 5-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-Substitution-----  | 77        |
| <b>3.4.2</b> | <b>Versuche zur Herstellung von 4- bzw. 5-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-salicylaniliden aus entsprechenden Phenylsalicylaten-----</b>            | <b>79</b> |
| 3.4.2.1      | Herstellung von Phenyl 4-(2,5-dihydroxybenzylamino)-salicylat (55)-----   | 79        |
| 3.4.2.2      | Herstellung von Phenyl 5-(2,5-dihydroxybenzylamino)-salicylat (56)-----   | 80        |



---

|              |   |            |
|--------------|---|------------|
| 3.4.2.3      | Herstellung von 3-Chlorphenyl 5-(2,5-dihydroxybenzylamino)-salicylat (57) -----   | 82         |
| 3.4.2.4      | Versuche zur Umwandlung der Phenylsalicylate 55 und 56 in Anilide-----  | 83         |
| <b>3.4.3</b> | <b>Herstellung von 4- bzw. 5-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-salicylaniliden aus<br/>entsprechenden Säurechloriden-----</b>  | <b>85</b>  |
| 3.4.3.1      | Herstellung von <i>N</i> -(3-Chlorphenyl)- und <i>N</i> -(3-Bromphenyl)-4-(2,5-dihydroxy-<br>benzylamino)-2-hydroxybenzamid (58,59) -----                               | 85         |
| 3.4.3.2      | Herstellung von <i>N</i> -(3-Chlorphenyl)-, <i>N</i> -(3-Bromphenyl)- und <i>N</i> -(3-Chlor-4-fluor)- 5-<br>(2,5-dihydroxy-benzylamino)-2-hydroxybenzamid (60-62)----- | 88         |
| <b>3.4.4</b> | <b>EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der Salicylanilide mit 2,5-Dihydroxy-<br/>benzylamino-Substitution -----</b>  | <b>90</b>  |
| <b>3.5</b>   | <b>4-Anilinochinazoline mit Lavendustin A-Teilstruktur-----</b>   | <b>94</b>  |
| <b>3.5.1</b> | <b>Herstellung von 2-{-4-(3-Bromphenylamino)-chinazolin-6-yl-amino}-methyl}-<br/>benzen-1,4-diol (70)-----</b>  | <b>99</b>  |
| <b>3.5.2</b> | <b>Herstellung von 2-{-4-(3-Chlor-4-fluorphenylamino)-chinazolin-6-yl-amino}-<br/>methyl}-benzen-1,4-diol (71)-----</b>   | <b>101</b> |
| <b>3.5.3</b> | <b>Eigenschaften der 4-Anilinochinazoline 70 und 71-----</b>  | <b>103</b> |
| <b>3.5.4</b> | <b>EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der 4-Anilinochinazoline 70 und 71 ----</b>   | <b>105</b> |
| <b>3.5.5</b> | <b>Zytotoxische Aktivitäten der 4-Anilinochinazoline 70 und 71 -----</b>  | <b>107</b> |
| <b>3.6</b>   | <b>Geplante irreversible EGFR-TK-Inhibitoren -----</b>  | <b>111</b> |
| <b>3.6.1</b> | <b>4-Anilinochinazoline mit Benzochinon-Teilstruktur-----</b>   | <b>119</b> |
| 3.6.1.1      | Versuche zur Herstellung von 2{[4-(3-Bromphenylamino)-chinazolin-6-ylamino]-<br>methyl}-[1,4]-benzochinon (72)-----   | 121        |
| 3.6.1.2      | Mögliche Reaktionsmechanismen für die Umwandlung des Chinons 72 in die<br>Schiff'sche Base 68 -----   | 126        |
| 3.6.1.3      | Versuche zur Herstellung von 2{[4-(3-Chlor-4-fluorphenylamino)-chinazolin-6-<br>ylamino]-methyl}-[1,4]-benzochinon (73)-----  | 136        |
| <b>3.6.2</b> | <b>Mögliche <i>In-vivo</i>-Aktivierung der 6-Dihydroxybenzylamino-substituierten<br/>Chinazoline 70 und 71 zu irreversiblen EGFR-TK-Inhibitoren-----</b>                | <b>137</b> |
| <b>3.6.3</b> | <b>4-Anilinochinazoline und Salicylsäure-Derivate mit Chromon-Teilstruktur --</b>   | <b>138</b> |
| 3.6.3.1      | Herstellung von 4-Anilinochinazolinen mit Chromon-Teilstruktur (76,77) -----  | 140        |
| <b>3.6.4</b> | <b>EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der Chromon-Derivate 76 und 77 -----</b>  | <b>144</b> |
| <b>3.6.5</b> | <b>Versuch zur Herstellung eines Salicylsäure-Derivates mit Chromon-Teilstruktur<br/>-----</b>  | <b>145</b> |
| <b>3.6.6</b> | <b>Salicylanilide mit Chinon-Teilstruktur-----</b>  | <b>147</b> |

---

|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| 3.6.6.1      | Versuche zur Herstellung von <i>N</i> -(3-Chlor-4-fluorphenyl)-5-[(3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-dienylmethyl)-amino]-2-hydroxybenzamid (81) | 150        |
| 3.6.6.2      | Herstellung von <i>N</i> -(3-Chlorphenyl)-4-[(3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-dienyl-methyl)-amino]-2-hydroxybenzamid (82)                     | 152        |
| <b>3.6.7</b> | <b>EGFR-TK-inhibitorische Aktivität des Salicylanilides mit Chinon-Teilstruktur 82</b>   | <b>153</b> |
| <b>4</b>     | <b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>  | <b>154</b> |
| 4.1          | Chemikalien  | 154        |
| 4.2          | Geräte   | 154        |
| 4.3          | Synthesevorschriften und analytische Daten   | 156        |
| 4.4          | Pharmakologische Testungen   | 220        |
| 4.4.1        | Untersuchungen zur zytotoxischen Aktivität an MCF-7-Zellen   | 220        |
| 4.4.2        | Bestimmung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität   | 223        |
| 4.4.2.1      | Gewinnung des Enzyms   | 223        |
| 4.4.2.2      | Bestimmung der inhibitorischen Aktivität   | 223        |
| <b>5</b>     | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>   | <b>225</b> |
| <b>6</b>     | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>  | <b>241</b> |
| <b>7</b>     | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>   | <b>256</b> |
| <b>8</b>     | <b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</b>   | <b>260</b> |

**ANHANG**