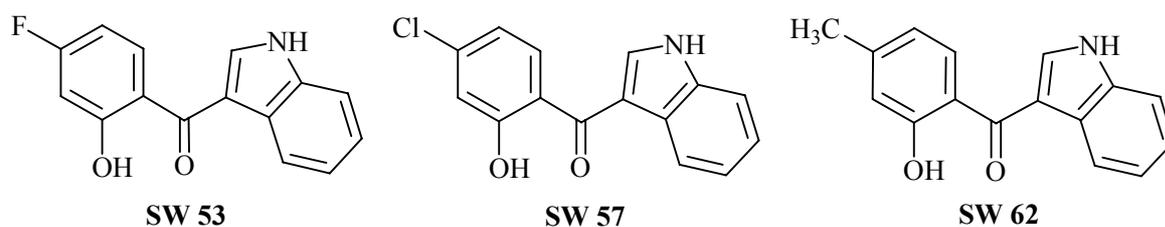


### 3 Chemisch-Pharmakologischer Teil

#### 3.1 Salicyloylindole mit zytotoxischer Wirkung

Ende der 1990er Jahre wurden in unserer Arbeitsgruppe durch *Witzel* [109] die folgenden, neuartigen Salicyloylindole aus speziellen Isoflavonen mittels Ringtransformationsreaktionen synthetisiert:



**Bild 16:** *Salicyloylindole nach Witzel*

Diese Verbindungen wurden auf ihre Zytotoxizität an der MCF-7-Zelllinie getestet. Die zytotoxischen Effekte der Salicyloylindole **SW 53**, **57** und **62** sind im Bild 17 dargestellt (Konzentration jeweils 5  $\mu$ M).

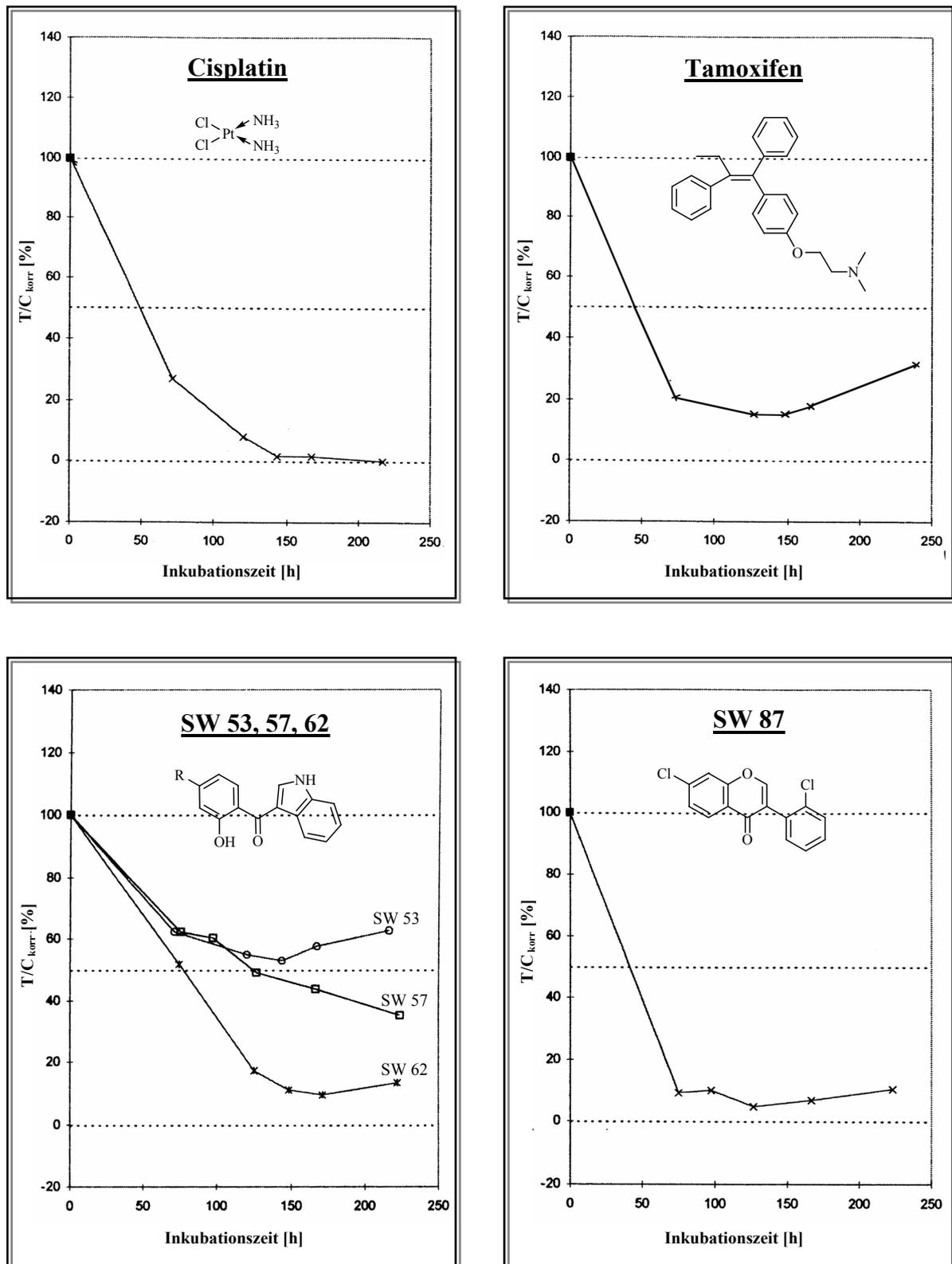
Zum Vergleich werden die zytotoxischen Effekte von Cisplatin und Tamoxifen als Standardzytostatika zur Behandlung des hormonabhängigen Mammakarzinoms, ebenfalls bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M, herangezogen (Bild 17).

Demnach hat besonders die Verbindung **SW 62** ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften, die mit denen des Cisplatin nahezu vergleichbar sind. Dabei wird eine maximale Wachstumshemmung von ca. 90 Prozent nach etwa 175 Stunden beobachtet.

Danach kommt es bis zum Ende der Inkubation wieder zu einem leichten Anstieg des Zellwachstums. Diese Beobachtung wird in etwas stärkerem Ausmaße auch beim Tamoxifen gemacht. Die maximale Wachstumshemmung durch Tamoxifen beträgt etwa 80 Prozent und wird bereits nach ca. 150 Stunden erreicht.

Der Anstieg des Zellwachstums gegen Ende der Inkubationszeit könnte auf eine Resistenzentwicklung zurückzuführen sein.

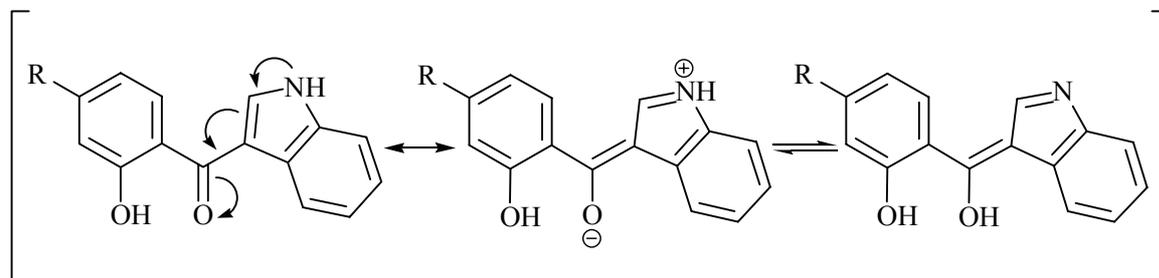
Das Isoflavon **SW 87** zeigt ebenfalls einen ausgeprägten antiproliferativen Effekt auf MCF-7-Zellen. Die maximale Wachstumshemmung liegt bei ca. 95 Prozent und wird nach etwa 125 Stunden erreicht.



**Bild 17:** Effekte der Salicyloylindole **SW 53** (R=F), **SW 57** (R=Cl) und **SW 62** (R=CH<sub>3</sub>), des Isoflavons **SW 87** sowie des Cisplatin und des Tamoxifens als Standardzytostatika (Konzentration jeweils 5  $\mu$ M) auf das Wachstum von MCF-7-Zellen [109,110]

Die MCF-7 Zelllinie (Michigan Cancer Foundation) hat einen hohen Gehalt an Estrogenrezeptoren und wird deshalb als hormonabhängig bezeichnet [111].

Die Salicyloylindole können wie folgt formuliert werden (Bild 18):



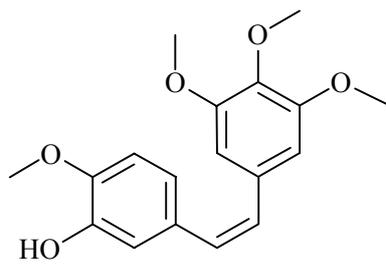
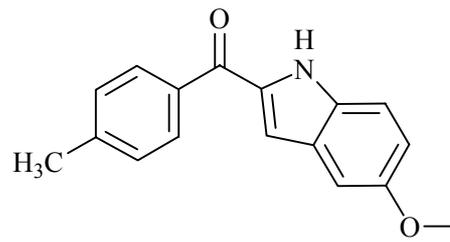
**Bild 18:** Mögliche Strukturen der Salicyloylindole

Da zwei der drei Formeln Stilben-Teilstrukturen aufweisen, kann vermutet werden, dass die Zytotoxizität dieser Verbindungen eventuell auf einen Estrogen-Antagonismus analog dem Tamoxifen zurückzuführen ist. Dazu müssen die Verbindungen eine Affinität zum Estrogenrezeptor (ER) haben.

Um dies zu überprüfen, wurden Radioligandbindungsstudien am ER- $\alpha$  mit den Verbindungen **SW 53** und **SW 57** durchgeführt. Dabei wird die Verdrängung von [ $^3H$ ]Estradiol vom Estrogenrezeptor bestimmt. **SW 53** und **SW 57** zeigten dabei, unter Berücksichtigung der natürlichen Schwankungsbreite biologischer Testmodelle, mit 15- bzw. 3-prozentiger Verringerung der Bindung des Radioliganden aber keine deutlichen Effekte [109].

Die antitumorwirksamen Eigenschaften konnten somit nicht mit einem Estrogen-Antagonismus am ER- $\alpha$  erklärt werden. Allerdings wurde bisher nicht untersucht, ob **SW 53** und **SW 57** Affinitäten zum ER- $\beta$  haben.

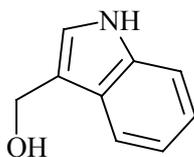
Für andere zytotoxisch wirksame Stilben-Derivate, wie z.B. das Combretastatin A-4 aus *Combretum caffrum* (Verbindung **C1**, Bild 19), wurde als Mechanismus der Zytotoxizität eine Hemmung der Tubulin-Polymerisation nachgewiesen [112]. Eine ebenfalls auf Tubulin-Inhibition zurückzuführende Zytotoxizität ist auch von bestimmten 2-Aroylindolen, wie z.B. dem im Bild 19 dargestellten 5-Methoxyindol-Derivat **M1**, bekannt [113].

**Combretastatin A-4****M1**

**Bild 19:** Beispiele für Verbindungen, die aufgrund einer Inhibition der Tubulin-Polymerisation zytotoxisch wirksam sind

Zum einen aufgrund der Stilben-Struktur (Bild 18), zum anderen aufgrund einer strukturellen Verwandtschaft zu den 2-Aroylindolen könnte die Zytotoxizität der *Witzel'schen* Salicyloylindole auch auf eine Inhibition der Tubulin-Polymerisation zurückzuführen sein.

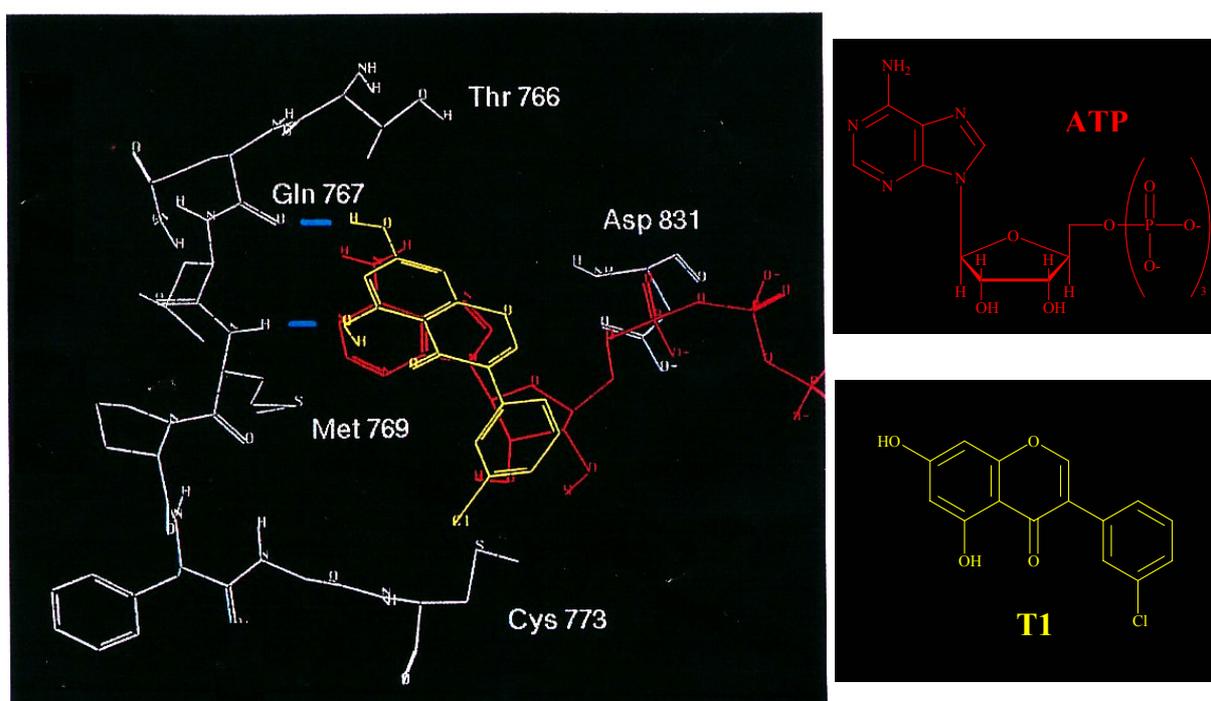
Eine weitere Erklärung für die Hemmung des Zellwachstums von MCF-7-Zellen wäre durch einen Vergleich der Verbindung **SW 62** mit dem Indol-3-carbinol (Bild 20) möglich. Dabei handelt es sich um ein Abbauprodukt des Glucobrassicins, einem in Kohlsorten der Familie *Brassicaceae* verbreiteter Inhaltsstoff [114]. Indol-3-carbinol, bzw. dessen Biotransformationsprodukt DIM (Diindolyl-methan) fördern den Abbau von Estrogen zum protektiv wirkenden 2-OH-Estrogen [115]. Es findet momentan breite Anwendung als Nahrungsergänzungsmittel zur Brustkrebsprophylaxe. Eine entsprechende Wirkung der Salicyloylindole konnte jedoch nicht untersucht werden.

**Bild 20:** Indol-3-carbinol

### 3.1.1 EGFR-TK-inhibitorische Wirkung als eine mögliche Erklärung für die zytotoxischen Eigenschaften der Salicyloylindole

Eine weitere Möglichkeit, die zytotoxischen Effekte der Salicyloylindole zu erklären, ergibt sich durch den Vergleich mit Verbindungen vom Isoflavontyp, die *Traxler et al.* vor einigen Jahren veröffentlichten [116]. Dabei wurde die Struktur des Genisteins zugrunde gelegt. Genistein gilt als ein ATP-kompetitiver EGFR-TK-Inhibitor [116]. Unter den veröffentlichten Isoflavonen zeigte das 3'-Chlor-5,7-dihydroxyisoflavon (Verbindung **T1**) die stärkste EGFR-TK-inhibitorische Wirkung.

Bild 21 zeigt das von *Traxler et al.* postulierte Bindungsmodell dieser Verbindung im Vergleich mit ATP.



**Bild 21:** Postulierte Bindung des Isoflavons **T1** und ATP in der ATP - Bindungstasche der EGFR-TK

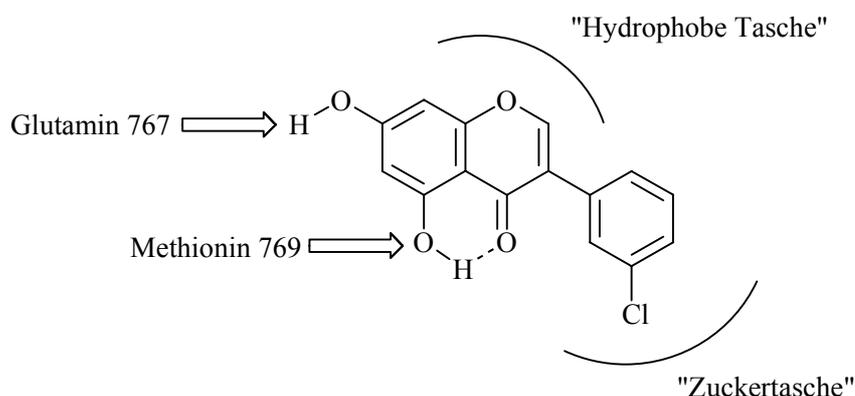
Das Bindungsmodell für ATP (Bild 21, rot) in der ATP-Bindungstasche nach *Traxler et al.* zeigt Wasserstoffbrücken zwischen der Amino-Gruppe des Adenins und dem Amid-Sauerstoff des Glutamins 767 und zwischen dem N1 des Adenins und eines Protons der Amino-Gruppe des Methionins 769.

In entsprechender Weise könnte das Isoflavon **T1** in der ATP-Bindungstasche der EGFR-TK gebunden werden. Hierbei könnten sich Wasserstoffbrücken zwischen dem Sauerstoff der 5-

Hydroxy-Gruppe und dem Glutamin 767 sowie zwischen dem Proton der 7-Hydroxy-Gruppe und dem Methionin 769 ausbilden.

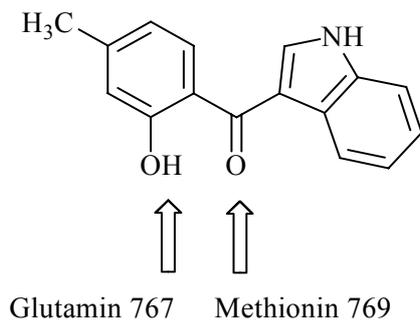
Des Weiteren postulieren *Traxler et al.* eine „Hydrophobe Tasche“ im Bereich des freien Elektronenpaares am N7 des ATP-Adenins sowie eine „Zuckertasche“, in der der Ribose-Anteil des ATP's gebunden wird. Die 4-Keto-Gruppe und die 5-Hydroxy-Gruppe der 5,7-Dihydroxyisoflavone bilden über eine Wasserstoffbrücke einen Pseudo-6-Ring aus, der den Pyrimidinring des Adenins nachahmt (im folgenden Bild 22 angedeutet durch die gestrichelte Linie).

Der 3-Chlorphenylring liegt im Bereich der „Zuckertasche“, wo Wechselwirkungen zwischen dem Aromaten und dem Schwefelatom des Cysteins 773 möglich sein sollen.



**Bild 22:** Schematische Darstellung des EGFR-TK-Bindungsmodells für 5,7-Dihydroxyisoflavone nach Traxler

Nach diesem Bindungsmodell könnte man auch für die Verbindungen **SW 53**, **57** und **62** eine gewisse Affinität zur ATP-Bindungstasche der EGFR-TK annehmen (Bild 23). Deshalb wurde die Verbindung **SW 62** auf inhibitorische Aktivität an der EGFR-TK getestet.



**Bild 23:** Angenommenes EGFR-TK-Bindungsmodell für **SW 62**

In einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zeigt **SW 62** bei der *In-vitro*-Testung an der EGFR-TK eine schwache inhibitorische Aktivität von 18 Prozent. Die starken zytotoxischen Eigenschaften lassen sich also auch mit diesem Test nicht zufriedenstellend erklären.

Allerdings musste die Substanz eine gewisse Affinität zur ATP-Bindungstasche der Kinase haben.

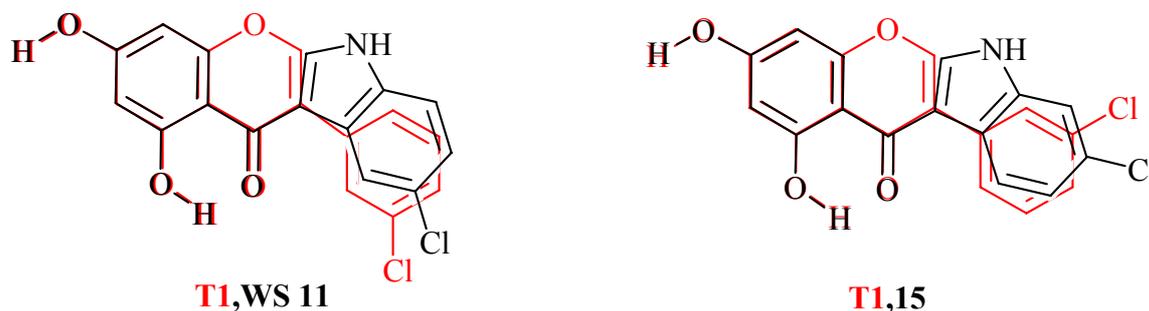
Es soll deshalb versucht werden, diese Affinität und damit den kompetitiven ATP-Antagonismus durch Variationen des Moleküls zu erhöhen.

### 3.2 Strukturvariationen von Salicyloylindolen

Als erstes soll die Methyl-Gruppe von **SW 62** durch eine Hydroxy-Gruppe ersetzt werden ( $\rightarrow$  4'-Hydroxy-salicyloylindole), denn dann wäre es möglich, dass die beiden durch *Traxler et al.* postulierten, vom Glutamin und Methionin in der ATP-Bindungstasche ausgehenden Wasserstoffbrücken zu den beiden Hydroxy-Gruppen ausgebildet werden.

Dadurch würde das Indolgerüst in die Nähe der „Zuckertasche“ gelangen. In diesem Bereich soll laut *Traxler et al.* zusätzlich eine Interaktion zwischen dem Schwefelatom des Cysteins 773 und aromatischen Strukturen möglich sein. Dort befindet sich der Phenylring der Isoflavone, bei denen sich die 3'-Chlor-Substitution als besonders günstig erwiesen hatte [117].

Deshalb sollen die 4'-Hydroxy-salicyloylindole ebenfalls am Indolgerüst Chlor-substituiert sein. Tatsächlich können durch diese Strukturveränderungen die Salicyloylindole mit dem 3'-Chlor-5,7-dihydroxyisoflavon nahezu zur Deckung gebracht werden (Bild 24).



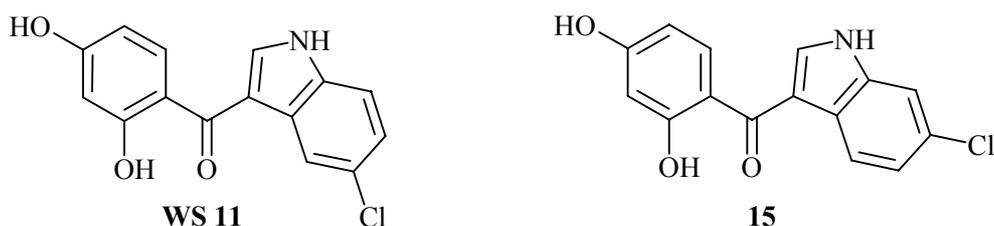
**Bild 24:** Überlagerte Darstellung des Isoflavons **T1** mit den Salicyloylindolen **WS 11** (links) bzw. **15** (rechts)

Da der 3-Chlor-substituierte Phenylring der Isoflavone frei drehbar ist, sollten sowohl das am C5 (**WS 11**), als auch das am C6 (**15**) des Indolgerüsts Chlor-substituierte Salicyloylindol hergestellt und auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestet werden.

### 3.2.1 Chlor-substituierte 4'-Hydroxy-salicyloylindole

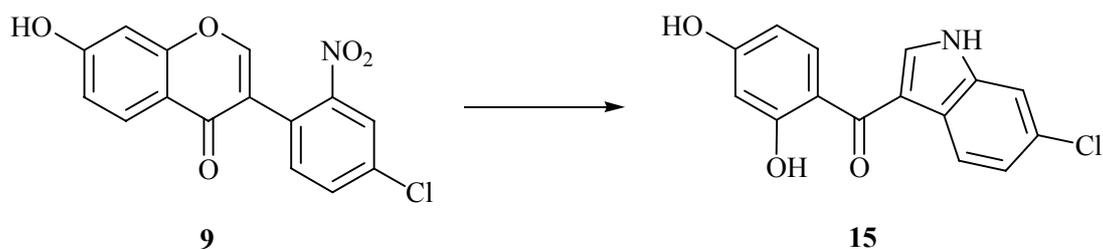
#### 3.2.1.1 Herstellung von (6-Chlor-1*H*-indol-3-yl)-(2,4-dihydroxyphenyl)-methanon (**15**)

Nachdem in unserer Arbeitsgruppe die Herstellung des Indol-Derivates **WS 11** (Bild 25) erfolgreich war, wird nun die Synthese des entsprechenden 6-Chlor-Derivates **15** angestrebt.



**Bild 25:** Das 5-Chlorindol-Derivat **WS 11** und das angestrebte 6-Chlorindol-Derivat **15**

Wie bereits angedeutet, erfolgt die Herstellung der Salicyloylindole nach *Witzel* und *Löwe* durch Reduktion von 2'-Nitroisoflavonen. Zur Herstellung der gewünschten Verbindung **15** wird das Isoflavon-Derivat **9** (Bild 26) benötigt.

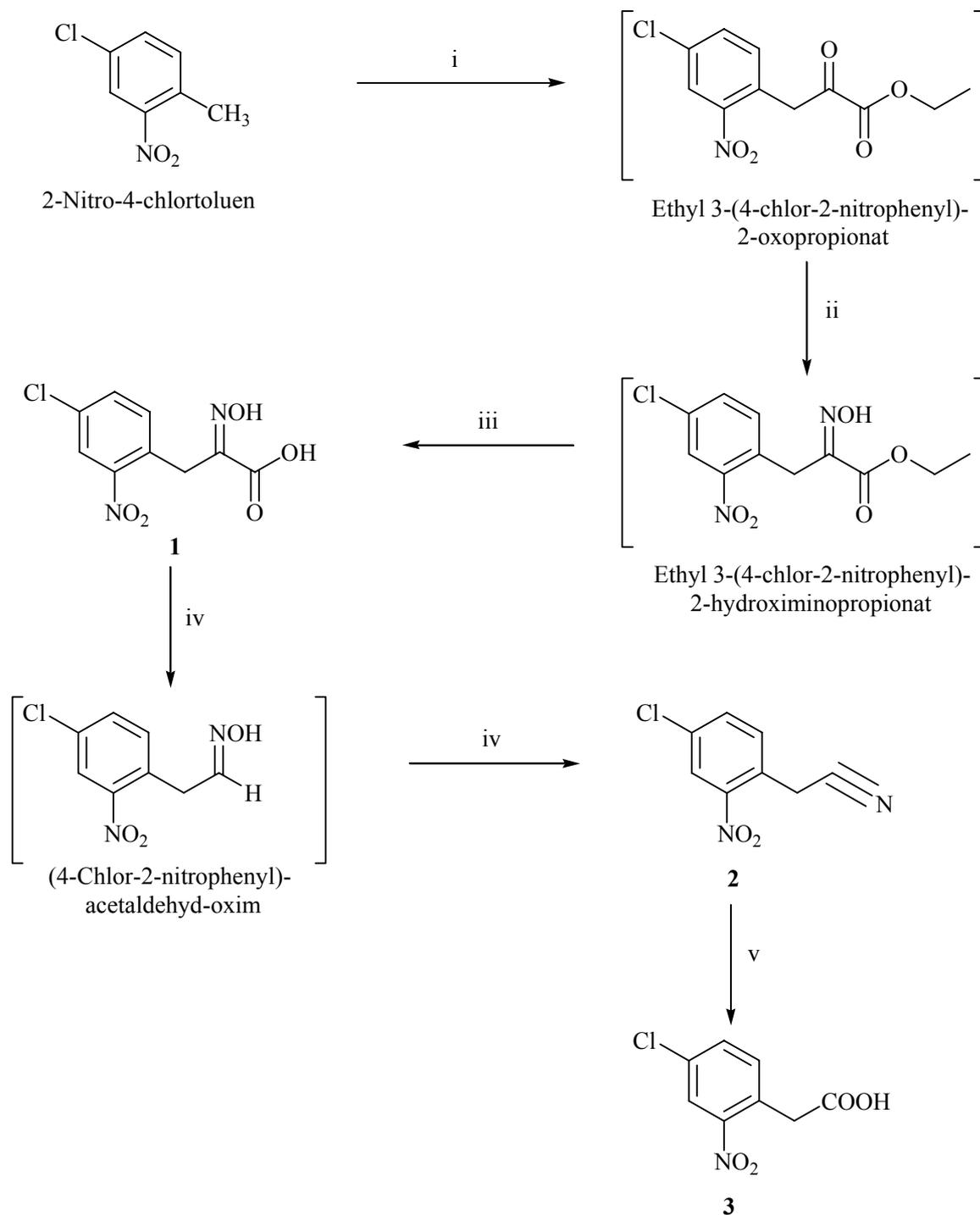


**Bild 26:** Synthese des Salicyloylindols **15** aus dem Isoflavon **9**

Zur Herstellung des Isoflavons **9** wird die 4-Chlor-2-nitrophenylessigsäure (Verbindung **3**) verwendet. Diese war in der Literatur bisher nicht beschrieben, ist aber aus dem entsprechenden Nitril **2** durch Verseifung zugänglich (Bild 27).

Da die Umsetzung von 1-Chlor-3-nitrobenzen mit 2-Chloracetonitril/Kalium-tert.butylat hauptsächlich zum 2-Chlor-6-nitrophenylacetonitril und darüber hinaus zu anderen nicht

erwünschten Isomeren führen würde, erfolgt die Herstellung des Nitrils **2** über mehrere Stufen nach einer Patentvorschrift der CIBA-GEIGY AG [117] (Bild 27).



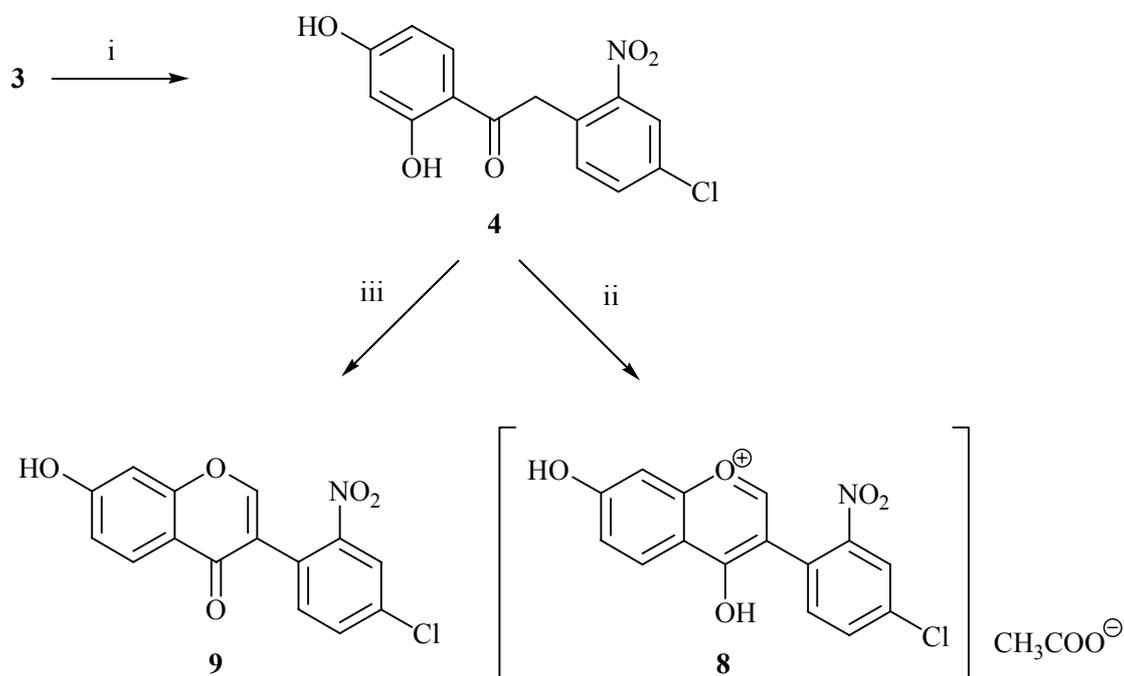
i) Diethyloxalat/ Natriummethylat, abs. Ethanol,  $\Delta T$ , unter Stickstoff; ii) Hydroxylaminhydrochlorid, Wasser,  $\Delta T$ , dann 10 N-Natriumhydroxidlösung bis pH 7, RT; iii) verd. Salzsäure bis pH 1, RT; iv) Essigsäure/Wasser (6+1),  $\Delta T$ , dann RT; v) konz. Schwefelsäure/Wasser (28T+43T)

**Bild 27: Herstellung von 3**

Bei dieser Synthese geht man vom 4-Chlor-2-nitrotoluen aus, das mit Diethyloxalat in Gegenwart von Natriummethylat in einer Claisen-Reaktion zum Ethyl 3-(4-Chlor-2-

nitrophenyl)-2-oxopropionat (Bild 27) umgesetzt wird. Dieser Ester wird *in-situ* mit Hydroxylamin weiter umgesetzt, wobei ausschließlich die 2-Keto-Gruppe mit dem Hydroxylamin reagiert. Durch anschließende *In-situ*-Verseifung des Esters gelangt man zur Säure **1**. Diese ergibt durch Erhitzen in wässriger Essigsäure das Nitril **2**. Dabei entsteht nach Decarboxylierung ein Aldoxim, das *in-situ* unter Wasserabspaltung zum Nitril **2** weiterreagiert. Dieses wird anschließend zur gewünschten Phenylelessigsäure **3** verseift (gesamte Reaktionsfolge s. Bild 27).

Die Verbindung **3** wird dann mit Resorcin in Bortrifluorid-Diethylether-Komplex in einer Friedel-Crafts-Alkanoylierung zum Ethanon **4** weiter umgesetzt (Bild 28).



i) Resorcin, Bortrifluorid-Diethylether-Komplex,  $\Delta T$ ; ii) *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal,  $\Delta T$ , dann 50-proz. Essigsäure,  $\Delta T$ ; s. iii) wie ii) dann Natriumcarbonatlösung bis pH 7, Ethylacetat;

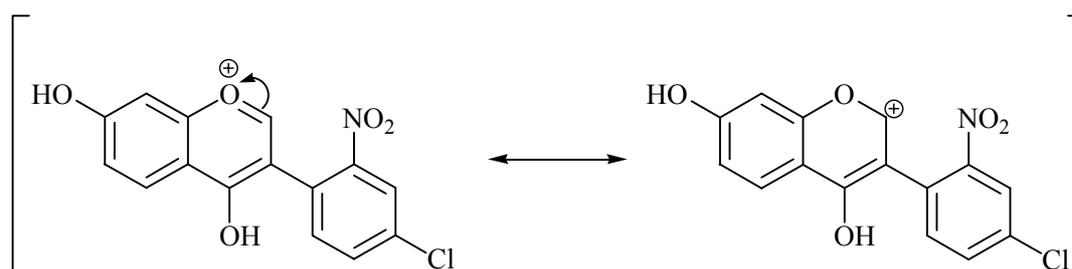
**Bild 28:** *Synthese des Pyryliumacetats 8 und des Isoflavons 9*

Der anschließend gewünschte Ringschluss zum Isoflavon gelingt jetzt leicht mit *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal in absolutem Tetrahydrofuran. Dabei erfolgt die Abspaltung des Dimethylamins durch Aufkochen in 50-prozentiger Essigsäure. Beim Abkühlen kristallisiert das gewünschte Isoflavon aus und kann abgetrennt werden.

Bei diesem Schritt wird allerdings nicht, wie von *Löwe* und *Witzel* bei der Herstellung anderer Isoflavone beobachtet, das „freie“ Isoflavon **9** isoliert, sondern das Pyryliumacetat **8**. Um das

Isoflavon **9** zu erhalten, wird die essigsaure Lösung zunächst mit Natriumcarbonatlösung neutralisiert und Verbindung **9** anschließend durch Extrahieren mit Ethylacetat gefasst (Bild 28).

Bei der nachfolgenden Reduktion der Nitro-Gruppe wird eine aromatische Amino-Funktion erhalten, die dann an das C2-Atom des Chromons Michael-analog addieren kann. Hierbei erweist es sich als besonders vorteilhaft, das aktivierte Pyryliumacetat **8** einzusetzen. Denn dort ist die C2-Position des Chromonsystems aufgrund der Oxonium-Carbenium-Resonanz (Bild 29) positiviert.



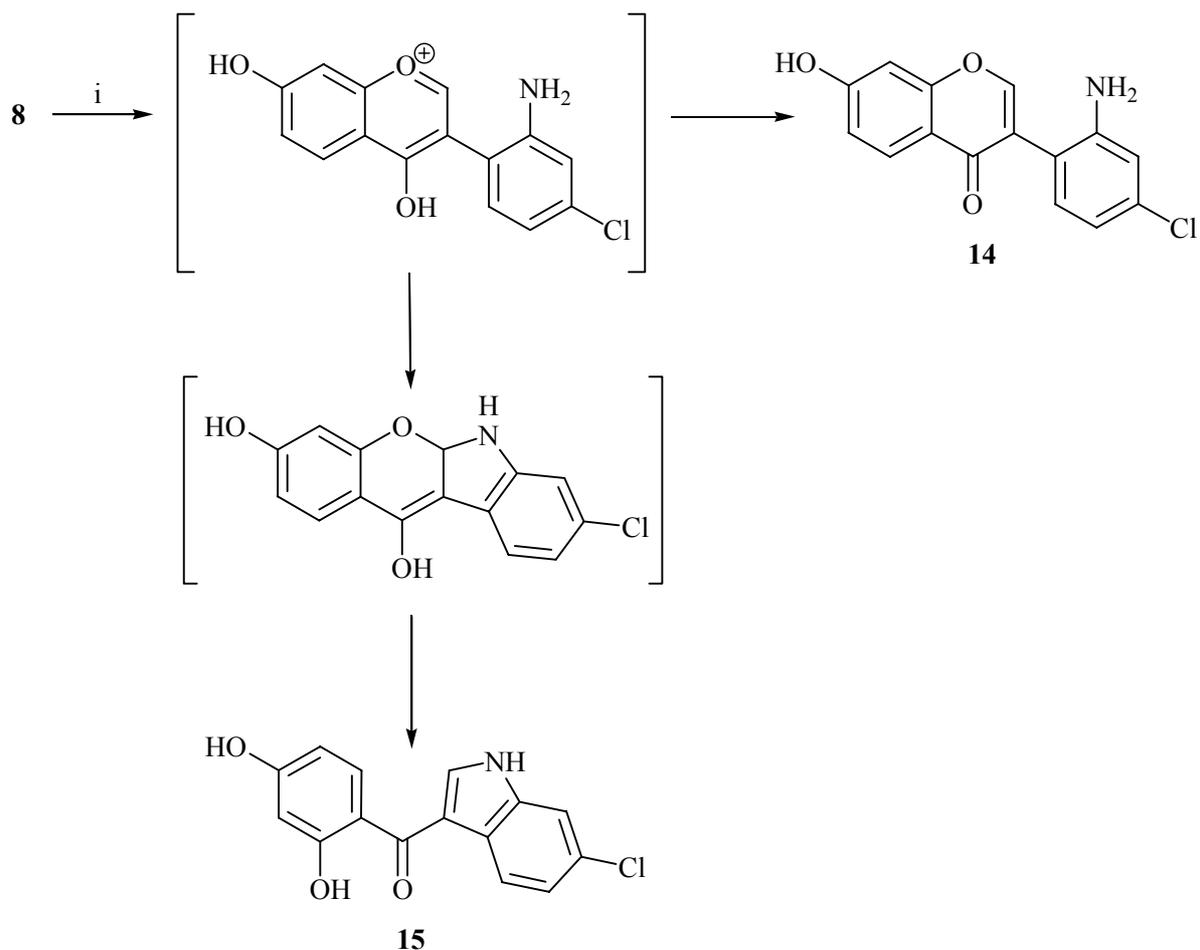
**Bild 29:** Oxonium-Carbenium-Resonanz der Verbindung **8**

Aufgrund von Beobachtungen in unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass ein Verfahren zur Reduktion der 2'-Nitroisoflavone mit Palladiumkohle in Ethanol/Cyclohexen bei der Reduktion der am Phenylrest chlorierten Isoflavone versagt. Zwar führt die Reduktion zu einem Indol-Derivat, allerdings wird unter diesen Bedingungen eine Abspaltung des Chlors beobachtet.

Die Reduktion gelingt aber unter Erhalt des Chlor-Substituenten mit Zinkstaub in verdünnter Essigsäure.

Je nach Wahl der Reduktionsdauer kann dabei das Isoflavon **14** oder das Methanon-Derivat **15** isoliert werden (Bild 30). Beträgt die Reduktionsdauer weniger als 30 Minuten, wird ausschließlich Verbindung **14** isoliert.

Das Optimum der Bildung des Indols **15** wird nach einer Reaktionsdauer von 75 Minuten beobachtet. Wird die Reduktionsdauer ausgedehnt, so erfolgt z.T. auch eine Reduktion der Keto-Gruppe. Das erhaltene Reaktionsgemisch lässt eine Isolierung des Salicyloylindols **15** nicht mehr zu.

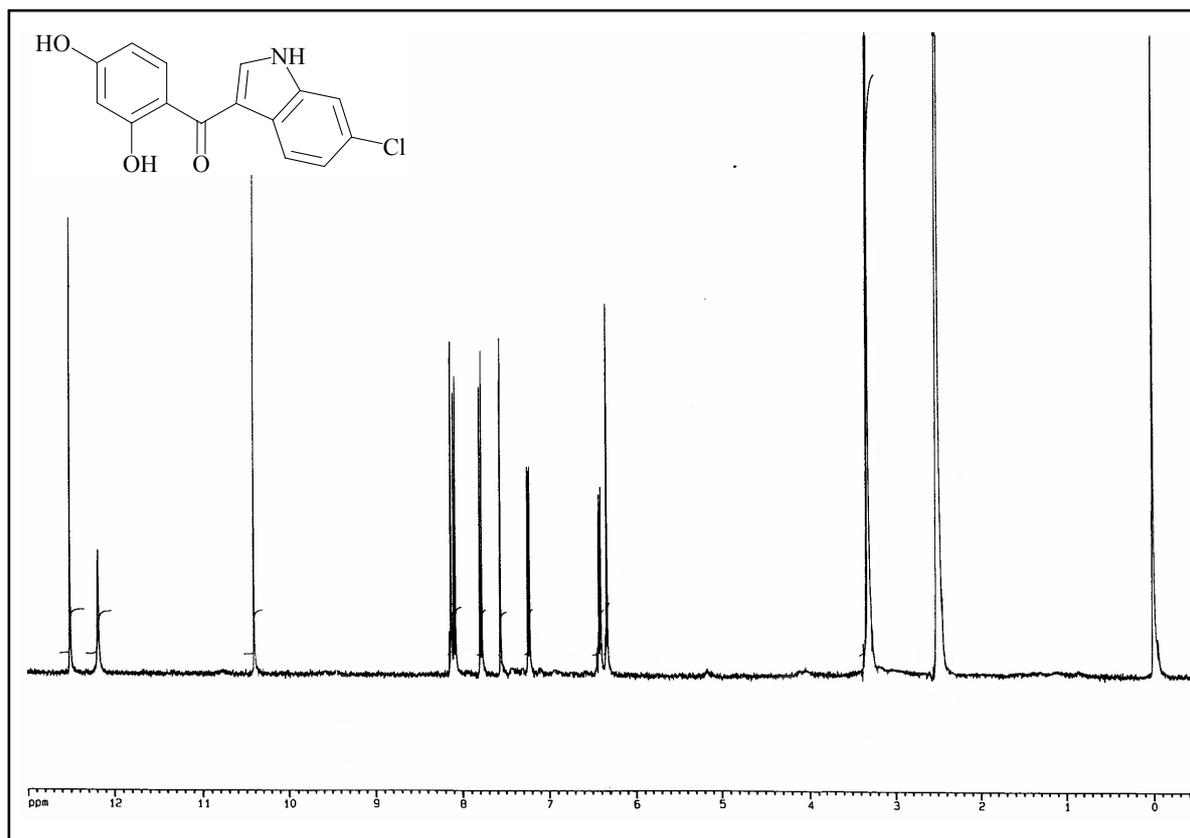


i) Zinkstaub, 50-proz. Essigsäure

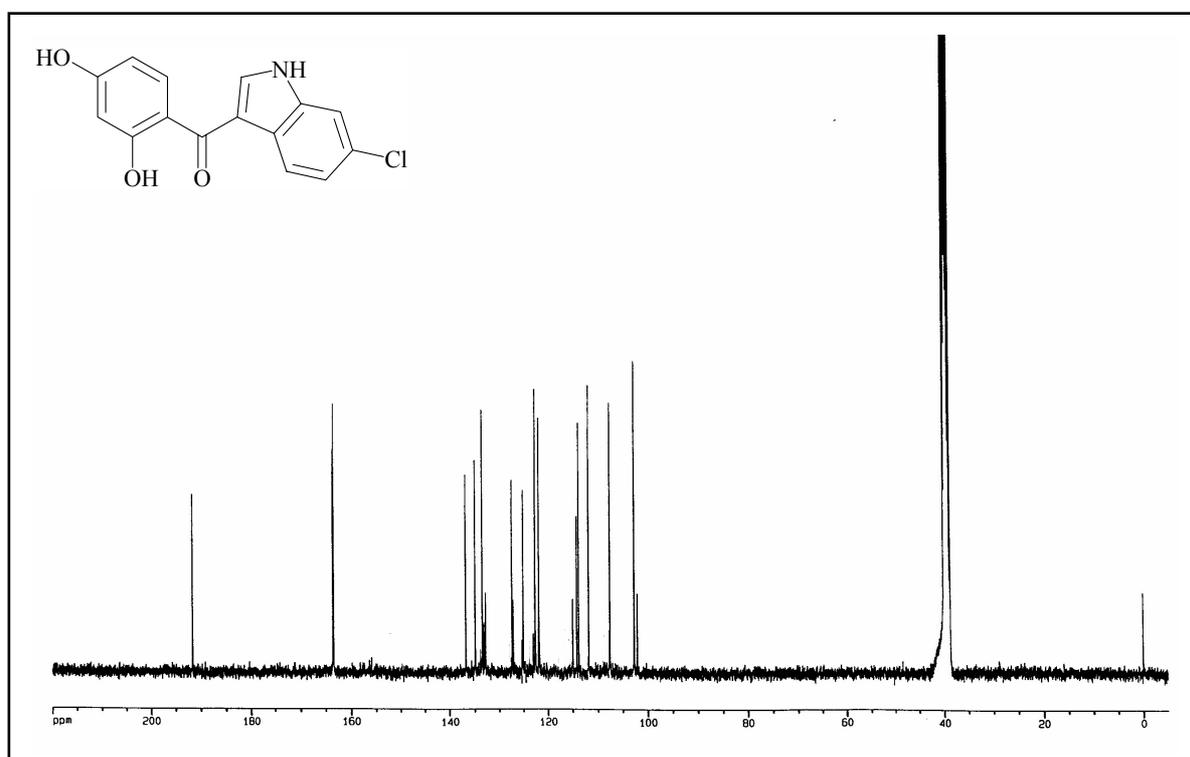
**Bild 30:** Reduktion der Verbindung **8**

Im Verlauf der Reduktion des Nitroisoflavons zum Indol-Derivat findet eine Ringtransformation statt. Im ersten Schritt erfolgt eine Michael-analoge Addition der aromatischen Amino-Gruppe in Verbindung **14** an das elektrophile C2-Atom des Chromons. Ein postuliertes tetrazyklisches Ringsystem erweist sich als energetisch ungünstig und lagert sich nach Ringöffnung in das energieärmere, Wasserstoffbrücken-stabilisierte Salicyloylindol **15** um (Bild 30).

Zum Beweis, dass tatsächlich das gewünschte Indol-Derivat und nicht das tetrazyklische Ringsystem (Bild 30) erhalten wird, dienen das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Bild 31) sowie das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Bild 32) des erhaltenen Reduktionsproduktes.



**Bild 31:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 15 in DMSO



**Bild 32:**  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 15 in DMSO

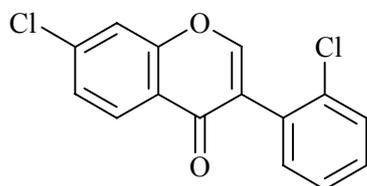
Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt ein mit  $\text{D}_2\text{O}$  austauschbares Signal bei 12.19 ppm, das der NH-Gruppe zuzuordnen ist. Zwei weitere austauschbare Signale werden bei 12.51 und 10.41 ppm beobachtet, die den beiden OH-Gruppen zugeordnet werden können. In der tetrazyklischen Verbindung müssten beide Hydroxy-Gruppen in etwa die gleiche chemische Verschiebung zeigen.

Die starke Tieffeld-Verschiebung der einen Hydroxy-Gruppe kann als Beweis für das Vorliegen der Indol-Verbindung **15** gedeutet werden, da hier die Hydroxy-Gruppe am C2-Atom des Dihydroxyphenyl-Restes durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zur Carbonyl-Gruppe tatsächlich stärker entschirmt sein dürfte, als die andere Hydroxy-Gruppe am C4-Atom.

Das Signal bei 192 ppm im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum kann als eindeutiger Beweis für das Vorhandensein einer Carbonyl-Funktion und damit für die tatsächliche Isolierung der gewünschten Verbindung **15** angesehen werden.

### 3.2.2 Ein Chlor-substituiertes 4'-Methyl-salicyloylindol

*Witzel* hatte eine Reihe verschieden substituierter Isoflavone synthetisiert. Dabei wurden besonders bei den Chlor-substituierten Verbindungen günstige zytotoxische Eigenschaften beobachtet. Bild 33 zeigt die Verbindung **SW 87**, die in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  das Zellwachstum von MCF-7-Zellen bereits nach ca. 75 Stunden Inkubationsdauer nahezu vollständig unterbindet (s. S. 32 Bild 17) [110].

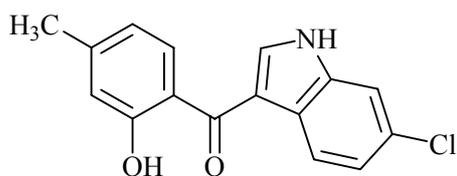


**SW 87**

**Bild 33:** Chlor-substituiertes Isoflavon **SW 87**

Aufgrund dieser Beobachtungen sollte durch eine Chlor-Substitution im Indolteil eine weitere Verstärkung der zytotoxischen Eigenschaften im Vergleich zu **SW 62** erreicht werden können.

Deshalb sollte unter Verwendung des Synthesepinzips zur Herstellung der Verbindungen **15** und **WS 11** die 4-Hydroxy-Gruppe im Salicyloyl-Rest des acylierten Indols **15** durch eine Methyl-Gruppe ersetzt werden (Bild 34).

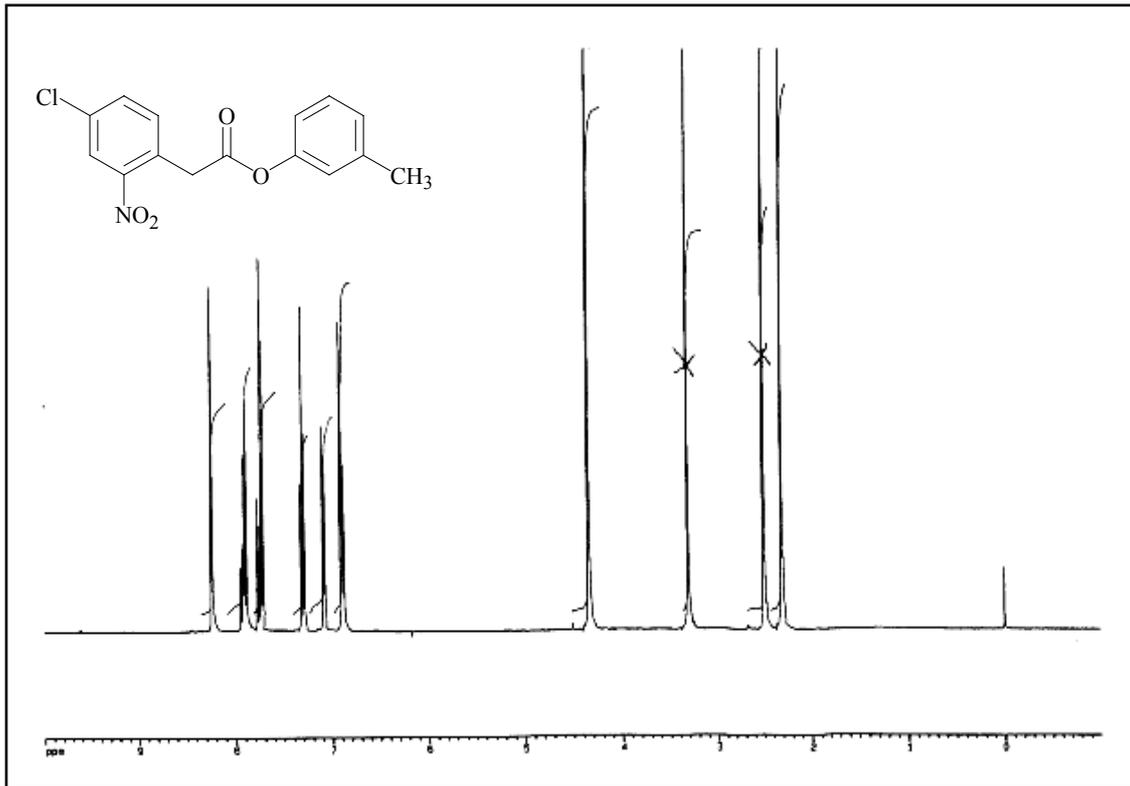


**16**

**Bild 34:** Gewünschtes **SW 62**-analoges Salicyloylindol mit Chlor-Substitution **16**

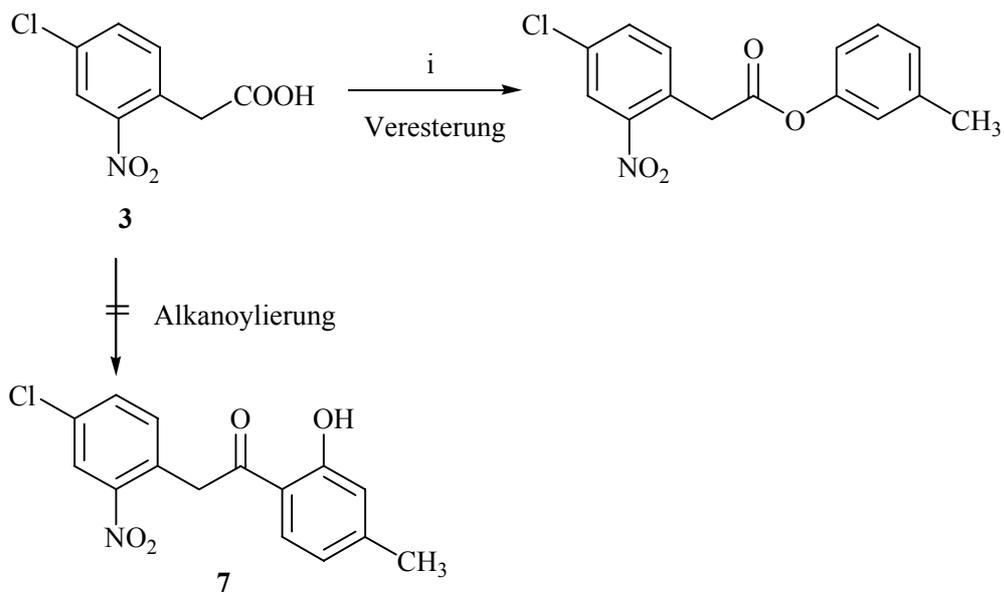
#### 3.2.2.1 Versuche zur Herstellung von (6-Chlor-1H-indol-3-yl)-(2-hydroxy-4-methylphenyl)-methanon (16)

Auch hier wird als Ausgangsverbindung die Phenyllessigsäure **3** hergestellt. Eine nachfolgende Friedel-Crafts-Alkylierung mit m-Kresol (Bild 36) führt allerdings nicht zum gewünschten Ethanon-Derivat **7**, wie das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Bild 35) zeigt: hier fehlt das mit  $\text{D}_2\text{O}$  austauschbare Signal für die aromatische OH-Gruppe des m-Kresol-Restes.



**Bild 35:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produktes der Friedel-Crafts-Alkylierung von *m*-Kresol mit **3**

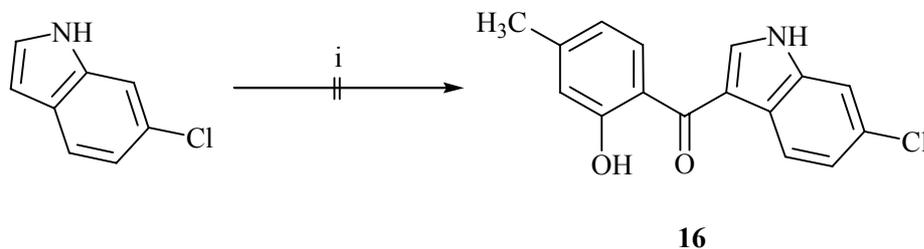
Da die restlichen Signale sowohl dem Aromaten des *m*-Kresol's als auch der Phenyllessigsäure **3** zuzuordnen sind, musste das Veresterungsprodukt entstanden sein (Bild 36).



i) *m*-Kresol/Bortrifluorid-Diethylether-Komplex,  $\Delta\text{T}$

**Bild 36:** Umsetzung von *m*-Kresol mit der Phenyllessigsäure **3**

Unter gleichen Bedingungen wird anschließend versucht, 6-Chlorindol direkt mit 4-Methylsalicylsäure zur Verbindung **16** umzusetzen (Bild 37). Dies gelingt jedoch ebenfalls nicht.



i) 4-Methylsalicylsäure/Bortrifluorid-Diethylether-Komplex,  $\Delta T$

**Bild 37:** Umsetzung von 6-Chlorindol mit 4-Methylsalicylsäure

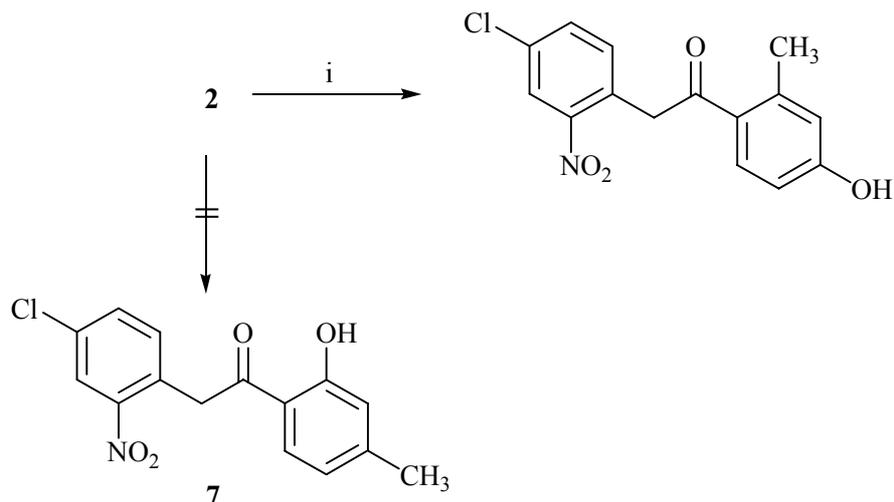
Auch die Friedel-Crafts-Alkanoylierung mit 4-Methylsalicyloylchlorid in Gegenwart von Diethylaluminiumchlorid führt nicht zur gewünschten Verbindung **16** [118]. Man erhält dabei undefinierbare, nicht trennbare Gemische.

In einem späteren Versuch wird dann festgestellt, dass sich das Säurechlorid der 4-Methylsalicylsäure auf herkömmlichem Wege nicht herstellen lässt.

Als nächstes wird versucht, das gewünschte Ethanon **7** im Rahmen einer Fries-Umlagerung zu erhalten. Dazu wird zunächst die Phenylessigsäure **3** mit Oxalylchlorid in das Säurechlorid überführt und dieses dann *in-situ* mit m-Kresol umgesetzt. Man erhält, wie erwartet, den m-Kresylester. Die anschließende Fries-Umlagerung führt allerdings nicht zum gewünschten Ethanon-Derivat **7**.

In einem weiteren Versuch soll das Nitril **2** nach Houben-Hoesch mit m-Kresol zur Verbindung **7** umgesetzt werden (Bild 38). Für eine elektrophile Substitution sind im m-Kresol-Molekül drei Positionen gleichermaßen aktiviert. Theoretisch wären so auch drei Reaktionsprodukte möglich.

Neben dem eingesetzten Nitril **2** wird aber nur ein Produkt isoliert. Dabei handelt es sich allerdings nicht um die Wunschverbindung **7**, sondern möglicherweise um ein in para-Position zur Hydroxy-Gruppe alkanoyliertes m-Kresol-Derivat (Bild 38).

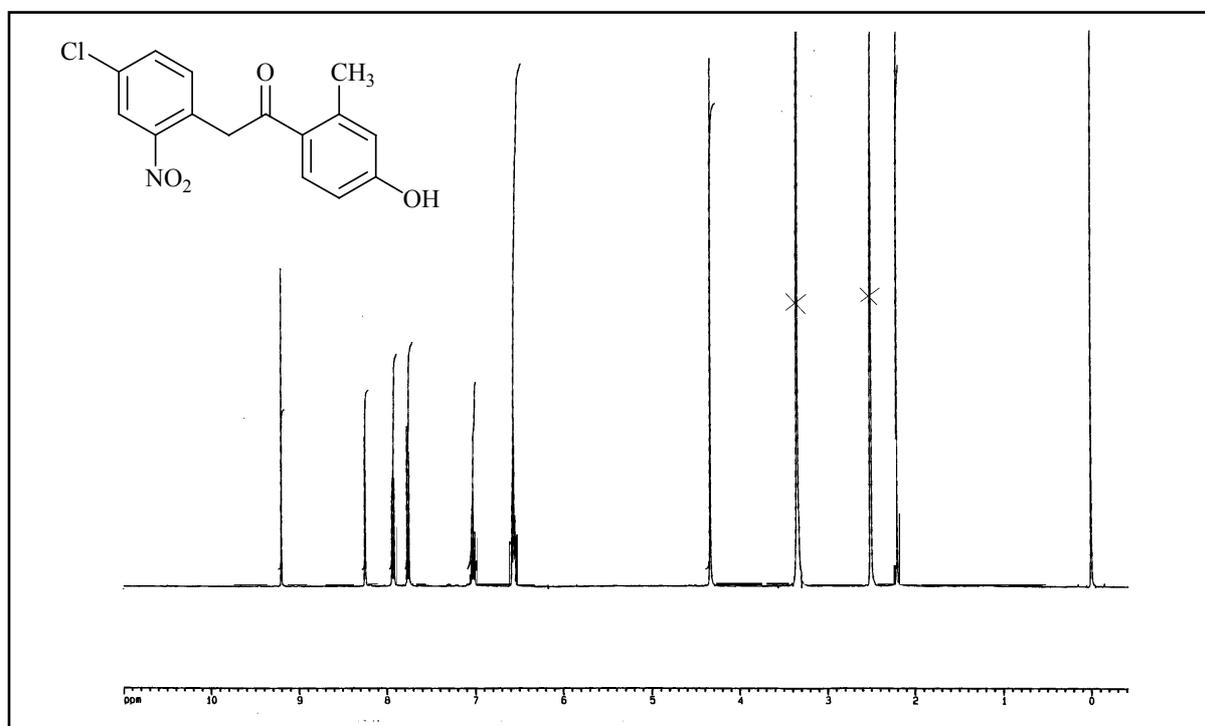


i) Zinkchlorid/ $\text{HCl}_{\text{gasf.}}$  in abs. Diethylether, 0 °C; dann m-Kresol, RT, dann Wasser,  $\Delta T$

**Bild 38:** Umsetzung von Verbindung 3 mit m-Kresol nach Houben-Hoesch

Das wird durch das  $^1\text{H-NMR}$  (Bild 39) wahrscheinlich gemacht.

Das Signal für eine phenolische OH-Gruppe wird bei 9.2 ppm beobachtet. Da die Hydroxy-Gruppe im gewünschten Ethanon-Derivat 7 eine Wasserstoffbrücke zum Keton-Sauerstoff ausbildet, müsste das Signal jedoch, analog der Verbindung 4 und entsprechenden Verbindungen von *Witzel* bei  $\delta > 11$  ppm beobachtet werden.



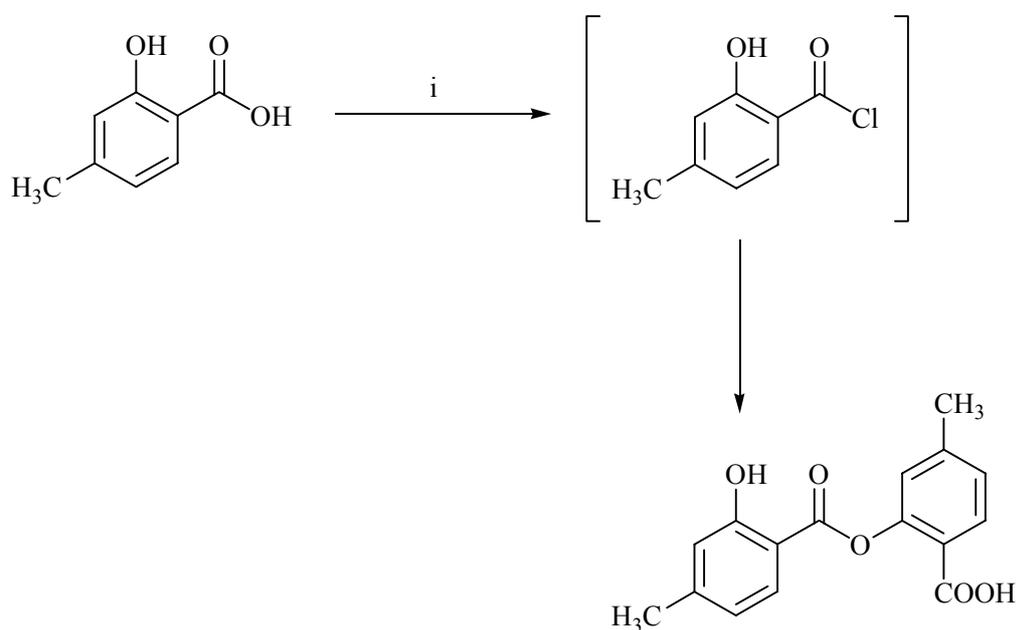
**Bild 39:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Houben-Hoesch-Produktes aus dem Nitril 2 und m-Kresol

Des Weiteren wird versucht, das gewünschte Salicyloylindol **16** in einem Schritt aus 6-Chlorindol und 4-Methylsalicylsäure in Gegenwart einer Grignard-Verbindung zu erhalten [119].

Dazu ist es wiederum nötig, die 4-Methylsalicylsäure in das Säurechlorid zu überführen. Dies wird mit Thionylchlorid versucht. Das erhaltene Produkt wird nach Entfernen des Thionylchlorid-Überschusses *in-situ* mit metalliertem 6-Chlorindol weiter umgesetzt. Bei dieser Reaktion erhält man jedoch Gemische, deren Bestandteile nicht trennbar und demzufolge auch nicht identifizierbar sind.

Nähere Untersuchungen zeigen, dass das Scheitern der Grignard-Reaktion auf eine nicht erfolgte Bildung des Säurechlorids zurückzuführen ist. Bei der Umsetzung der 4-Methylsalicylsäure mit Thionylchlorid wird als Hauptprodukt der Ester aus zwei Molekülen 4-Methylsalicylsäure isoliert (Bild 40).

Es wird deshalb auch versucht, das Säurechlorid durch Umsetzung mit Thionylchlorid bei niedrigerer Temperatur in Petrolether unter Zusatz von Pyridin zu erhalten. Aber das führt ebenfalls hauptsächlich zum beschriebenen Ester (Bild 40).

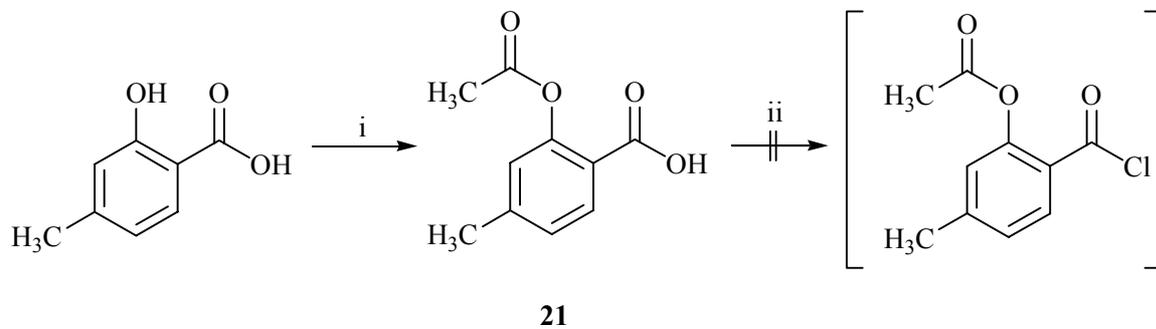


i) Thionylchlorid,  $\Delta T$  bzw. Thionylchlorid/Petrolether/Pyridin,  $\Delta T$

**Bild 40:** Umsetzung der 4-Methylsalicylsäure mit Thionylchlorid

Durch Schutz der Hydroxy-Gruppe mit einem Acetyl- bzw. Trifluoracetylrest soll die Selbstveresterung verhindert werden.

Die Herstellung der Acetyl-geschützten 4-Methylsalicylsäure **21** gelingt durch Erhitzen in einer Mischung aus Essigsäureanhydrid und Pyridin. Die Umsetzung mit Thionylchlorid führt jedoch nicht zum entsprechenden Säurechlorid.



i) Acetanhydrid/Pyridin,  $\Delta T$ ; ii) Thionylchlorid,  $\Delta T$

**Bild 41:** Herstellung des 2-Acetoxy-Derivates **21** und anschließende Umsetzung mit Thionylchlorid

Zur Herstellung der Trifluoracetyl-geschützten 4-Methylsalicylsäure setzt man 4-Methylsalicylsäure mit Trifluoressigsäureanhydrid um. Bereits dabei entsteht jedoch ebenfalls der Ester aus zwei Molekülen 4-Methylsalicylsäure. Auch das Arbeiten unter Zusatz von Pyridin bringt keine Vorteile.

Wenn es gelingt, das Säurechlorid der 4-Methylsalicylsäure herzustellen, kann man durch Umsetzung dieses mit metalliertem 6-Chlorindol sicherlich das gewünschte Methanon-Derivat **16** erhalten.

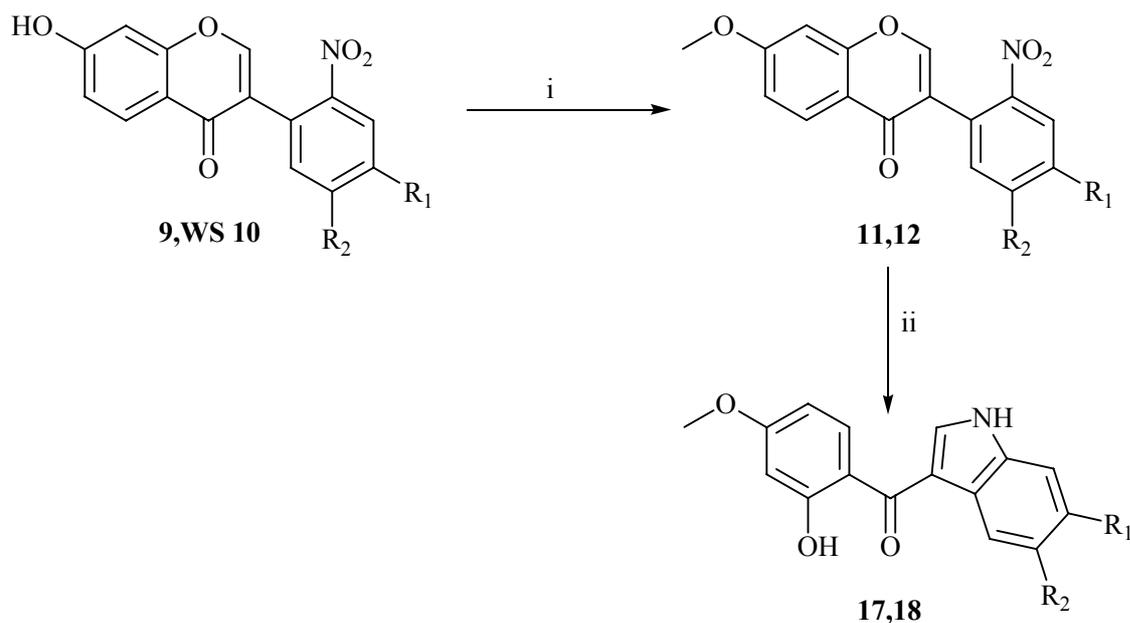
### 3.2.3 4'-Methoxy-salicyloylindole

Aufgrund der Fehlversuche bei der Synthese des Salicyloylindols **16** soll im folgenden die Herstellung von 4'-Methoxy-salicyloylindolen versucht werden.

Durch den Methoxy-Substituenten erhofft man sich eine gewisse Ähnlichkeit mit **SW 62** hinsichtlich des zytotoxischen Wirkprofils, das aufgrund der Chlor-Substitution sogar verstärkt werden sollte.

Des Weiteren sollen die Substanzen auf ihre EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestet werden, um die Notwendigkeit eines Wasserstoffbrücken-Donators in 4'-Position der Salicyloylindole abzuklären. Eine Methoxy-Gruppe könnte lediglich über ihr Sauerstoffatom als Wasserstoffbrücken-Akzeptor fungieren.

Die Einführung der Methoxy-Gruppe gelingt leicht durch Methylierung auf der Stufe der Isoflavone (Bild 42).



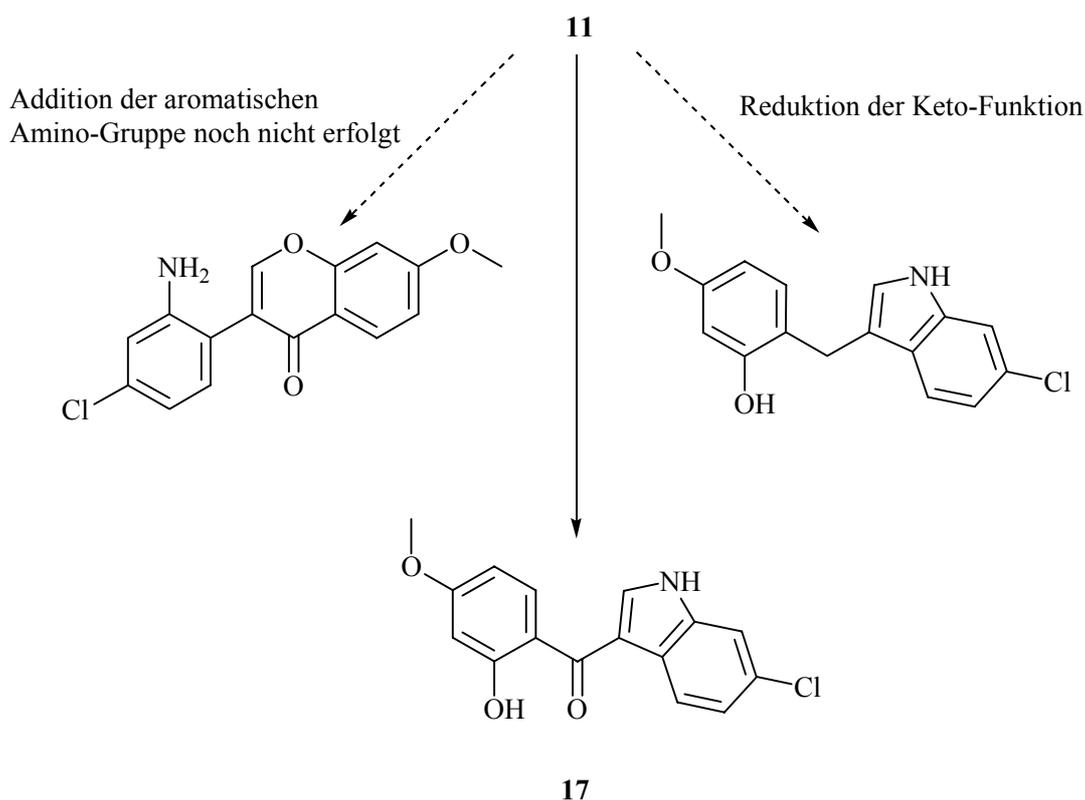
**9,11,17:**  $R_1 = \text{Cl}; R_2 = \text{H}$   
**WS 10,12,18:**  $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{Cl}$

i) Methyljodid/Kaliumcarbonat, Aceton; ii) Zinkstaub, 50-proz. Essigsäure

**Bild 42:** Herstellung der 4'-Methoxy-salicyloylindole **17** und **18**

### 3.2.3.1 Herstellung von (6-Chlor-1H-indol-3-yl)-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-methanon (17)

Dazu wird die 7-Hydroxy-Gruppe des Isoflavons **9** mit Methyljodid alkyliert (Bild 42). Das resultierende 7-Methoxyisoflavin **11** wird dann mit Zinkstaub in verdünnter Essigsäure zum entsprechenden Indol-Derivat **17** umgesetzt. Dabei erreicht man ein Optimum der Indol-Bildung nach einer Reduktionsdauer von 105 Minuten. Die Isolierung des Indols gestaltet sich aufgrund der entstehenden Nebenprodukte (Bild 43) als sehr schwierig. Auch durch mehrfache säulenchromatographische Reinigung gelingt es nicht, die gewünschte Verbindung in ausreichender Reinheit zu erhalten.



**Bild 43:** Produkte der Reduktion von Verbindung **11**

### 3.2.3.2 Herstellung von (5-Chlor-1*H*-indol-3-yl)-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-methanon (**18**)

Hierzu wird das Isoflavon **WS 10** mit Methyljodid zu Verbindung **12** umgesetzt, das dann anschließend mit Zinkstaub in verdünnter Essigsäure reduziert wird (Bild 42).

In diesem Fall gelingt durch mehrfache säulenchromatographische Aufreinigung die Isolierung der Wunschverbindung **18**, allerdings liegt die Ausbeute dabei unter zehn Prozent.

### 3.2.3.3 Herstellung von (2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-(1*H*-indol-3-yl)-methanon (**19**)

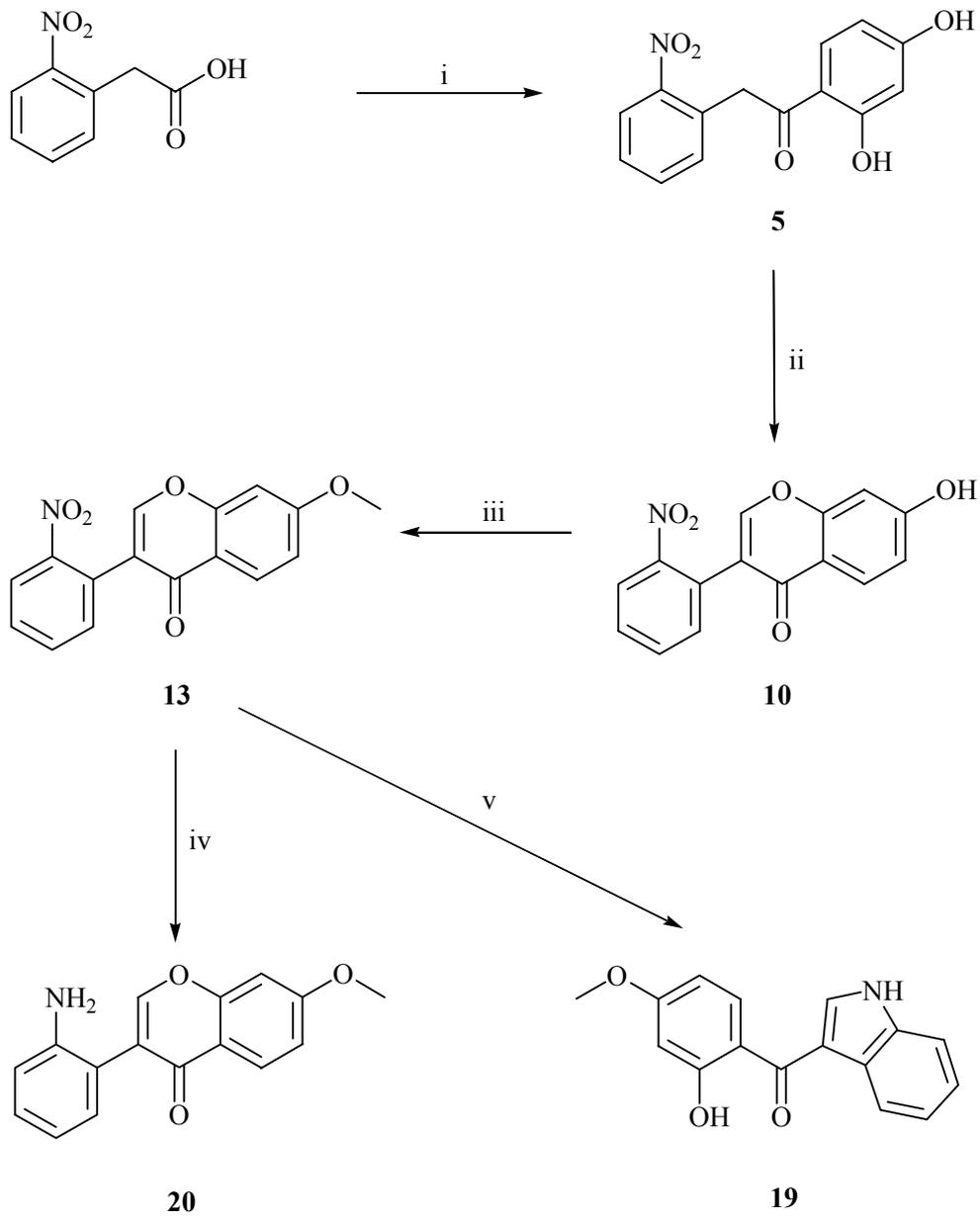
Da die beiden Chlor-substituierten 4'-Methoxy-salicyloylindole **17** und **18** nur mit hohem Aufwand bzw. gar nicht erhalten werden können, soll anschließend noch die Synthese eines 4'-Methoxy-salicyloylindols ohne Chlor-Substitution am Indolring versucht werden.

Hier hat man den Vorteil, dass die Ausgangsverbindung der Synthese die käufliche 2-Nitrophenylessigsäure ist, so dass bis zur Endverbindung nur vier Stufen nötig sind (Bild 44).

Aus der 2-Nitrophenylessigsäure wird über das Ethanon-Derivat **5** das Isoflavon **10** hergestellt, welches dann durch Methylierung zum entsprechenden 7-Methoxy-Derivat **13** umgesetzt wird.

Die Reduktion soll nach *Witzel* mit Palladiumkohle in Ethanol/Cyclohexen erfolgen, allerdings kann man dadurch auch nach 21 Stunden noch kein Indol erhalten, sondern man isoliert nur das 2'-Aminoisoflavon-Derivat **20**.

Deshalb wird auch hier die Reduktion mit Zinkstaub in verdünnter Essigsäure durchgeführt, die dann zur gewünschten Verbindung **19** führt (Bild 44).

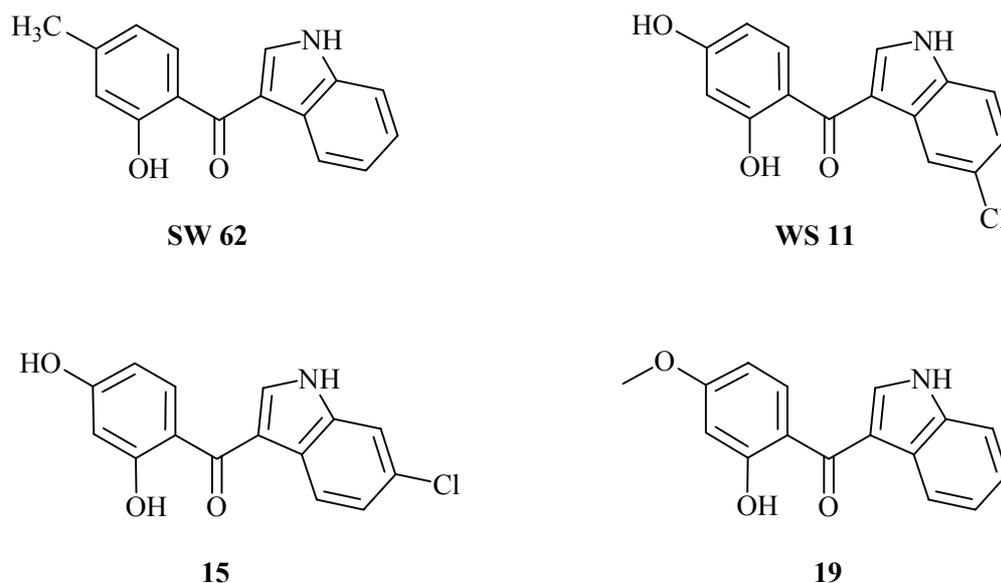


i) Resorcin, Bortrifluorid-Diethylether-Komplex,  $\Delta T$ ; ii) *N,N*-Dimethylformamidimethylacetal, abs. Tetrahydrofuran,  $\Delta T$ ; iii) Methyljodid, Aceton,  $\Delta T$ ; iv) Palladiumkohle, Ethanol/Cyclohexen,  $\Delta T$ ; v) Zinkstaub, 50-proz. Essigsäure,  $\Delta T$

**Bild 44:** Herstellung von 19

### 3.2.4 EGFR-TK-inhibitorische Aktivität ausgewählter Salicyloylindole

Die Salicyloylindole **SW 62**, **WS 11**, **15** und **19** (Bild 45) wurden auf ihre inhibitorische Aktivität gegen die EGFR-TK getestet (Abschnitt 4.2.2, Methode A) und die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgelistet.



**Bild 45:** Auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestete Salicyloylindole

Verbindung	<b>SW 62</b>	<b>WS 11</b>	<b>15</b>	<b>19</b>
EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in % (c = 10 $\mu$ M)	18	59	50	11

**Tabelle 3:** EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der Salicyloylindole

Die beiden 4'-Hydroxy-salicyloylindole **15** und **WS 11** zeigen in einer Konzentration von 10  $\mu$ M moderate EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten. Dagegen können das 4'-Methylsalicyloylindol **SW 62** sowie die 4'-Methoxy-Verbindung **19** in dieser Konzentration als unwirksam eingestuft werden.

Die 4-Hydroxy-Verbindungen unterscheiden sich lediglich durch die Position ihres Chlor-Substituenten. Dies scheint jedoch keinen Einfluss auf die EGFR-TK-inhibitorische Aktivität zu haben.

Wie bereits beschrieben, wurde die Chlor-Substitution gewählt, weil diese von *Traxler* als besonders günstig erachtet wurde. Durch Austausch des 4-Hydroxyphenyl- gegen einen 3-Chlorphenyl-Rest beim 4'-Hydroxy-5,7-dihydroxyisoflavon (Genistein) konnte nach *Traxler* die inhibitorische Aktivität verzehnfacht werden (Genistein:  $IC_{50} = 1.0 \mu\text{M}$ ; 3'-Chlor-5,7-dihydroxyisoflavon:  $IC_{50} = 0.1 \mu\text{M}$ ) [116].

Jedoch kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht eindeutig geklärt werden, ob bei den synthetisierten EGFR-TK-inhibitorischen Salicyloylindolen der 4-Hydroxy-Substituent am Salicylrest oder der 5- bzw. 6-Chlor-Substituent am Indolgerüst ausschlaggebender für die Steigerung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten war. Das ließe sich durch die Synthese und Testung des 4'-Hydroxy-salicyloylindols beweisen.

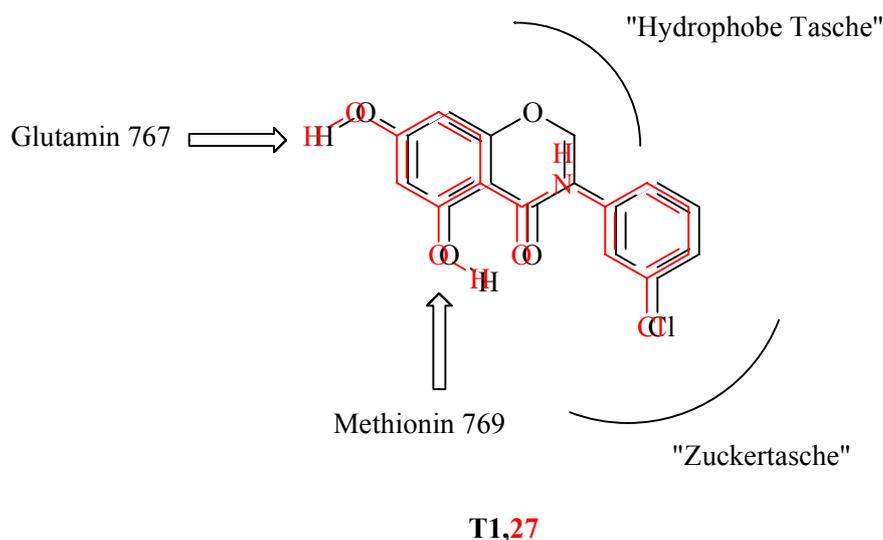
### 3.3 Anilide der 4-Hydroxysalicylsäure als EGFR-TK-Inhibitoren

#### 3.3.1 Das 3-Chloranilid der 4-Hydroxysalicylsäure

Bei den Salicyloylindolen stellt die 4-Hydroxysalicyloyl-Teilstruktur ein wichtiges Strukturelement für eine EGFR-TK-inhibitorische Wirkung dar. Dies wird durch den Vergleich der inhibitorischen Aktivität der 4'-Hydroxysalicyloylindole **15** und **WS 11** mit der des 4'-Methoxy-Derivates **19** und des 4'-Methyl-Derivates **SW 62**, wie bereits beschrieben, deutlich.

Das nächste Ziel der Arbeit ist deshalb, das Amid der 4-Hydroxysalicylsäure mit 3-Chloranilin (Verbindung **27**) herzustellen.

Dieses einfache, kleine Molekül kann ebenfalls mit den Isoflavonen nach *Traxler et al.* zur Deckung gebracht werden (Bild 46).



**Bild 46:** 3'-Chlor-5,7-dihydroxyisoflavon **T1** und das geplante Anilid **27**

Dementsprechend könnte für das Anilid **27** das von *Traxler et al.* für Isoflavone postulierte Bindungsmodell angenommen werden (Bild 46).

Das Amid-NH könnte jedoch als Wasserstoffbrücken-Donator - in Konkurrenz zur 4-Hydroxy-Gruppe - mit dem Glutamin 767 in der von *Traxler et al.* postulierten ATP-Bindungstasche in Wechselwirkung treten.

Dadurch wäre das Molekül am Enzym aber völlig anders ausgerichtet und könnte die anderen postulierten Wechselwirkungen nicht mehr wahrnehmen.

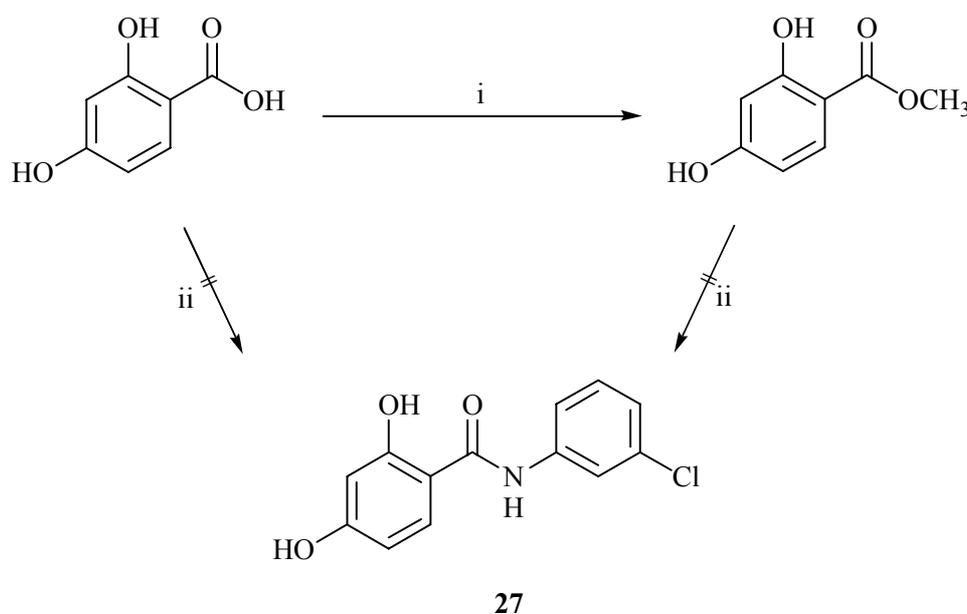
Es ist aber auch denkbar, dass für das Amid-NH ein zusätzlicher Wasserstoffbrücken-Donator bzw. -Akzeptor im entsprechenden Bereich des Enzyms zur Verfügung steht. Somit könnte die Einlagerung der Anilide entsprechend dem *Traxler'schen* Bindungsmodell erfolgen, und die Bindung wäre durch eine weitere Wasserstoffbrücke zusätzlich stabilisiert.

### 3.3.1.1 Herstellung von *N*-(3-Chlorphenyl)-2,4-dihydroxybenzamid (27)

Zunächst wird versucht, auf direktem Wege zum gewünschten Anilid **27** zu gelangen. Dazu werden gleiche Mengen 2,4-Dihydroxybenzoesäure und 3-Chloranilin gemeinsam in Gegenwart wasserentziehender Mittel rückfließend erhitzt. Dabei kommt es jedoch zu keiner Umsetzung (Bild 47).

Deshalb sollte der Methyl ester der 2,4-Dihydroxybenzoesäure hergestellt werden. Dieser lässt sich leicht durch Erhitzen der Säure in absolutem Methanol unter Zusatz katalytischer Mengen konzentrierter Schwefelsäure herstellen (Bild 47).

Allerdings lässt sich das gewünschte Anilid **27** durch Umsetzung dieses Esters mit 3-Chloranilin ebenfalls nicht isolieren (Bild 47).

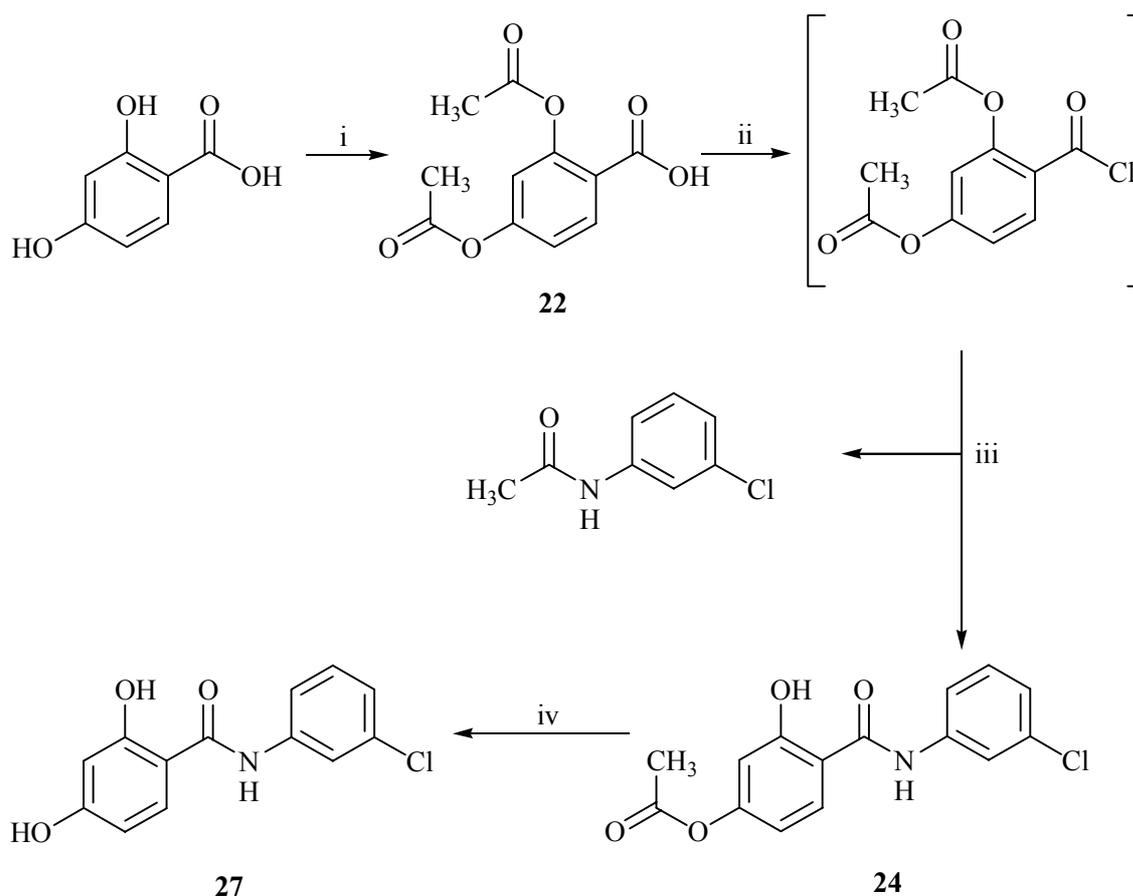


i) abs. Methanol/ konz. Schwefelsäure,  $\Delta T$ ; ii) 3-Chloranilin,  $\Delta T$

**Bild 47:** Versuche zur direkten Herstellung von **27**

Da die Carbonylaktivität des Methylesters nicht ausreicht, muss man das Säurechlorid der 2,4-Dihydroxybenzoesäure einsetzen und dieses mit 3-Chloranilin umsetzen.

Da aus früheren Versuchen bekannt ist, dass es bei der Umsetzung von Derivaten der Salicylsäure mit Thionylchlorid zu einer Selbstveresterung kommen kann, müssen zunächst die Hydroxy-Gruppen durch Einführung einer Schutzgruppe blockiert werden. Als Schutzgruppe wird die Acetyl-Gruppe gewählt.



i) Acetanhydrid/Pyridin,  $\Delta T$ ; ii) Thionylchlorid,  $\Delta T$ ; iii) 3-Chloranilin, Dioxan,  $\Delta T$ ; iv) Natriumcarbonatlösung/Ethanol,  $\Delta T$

**Bild 48:** Herstellung von 27

Die Acetylierung der phenolischen Hydroxy-Gruppen gelingt durch Erhitzen der 4-Hydroxysalicylsäure in einer Mischung aus gleichen Teilen Acetanhydrid und Pyridin (Bild 48). Die erhaltene 2,4-Diacetoxybenzoesäure 22 wird dann mit einem Überschuss Thionylchlorid zum entsprechenden Carbonsäurechlorid umgesetzt. Dabei darf die

Reaktionstemperatur 50 °C nicht übersteigen, da es ansonsten zu Mehrfachchlorierungen des Moleküls kommen kann.

Das geschützte Carbonsäurechlorid wird mit 3-Chloranilin in Dioxan weiter umgesetzt (Bild 48).

Das Hauptprodukt dieser Umsetzung ist überraschend das nur noch einfach acylierte Derivat **24**. Daneben erhält man geringe Mengen des 2,4-Diacetoxy-Derivates sowie das 3-Chloranilid der Essigsäure. Unter den Reaktionsbedingungen kommt es demnach zu einer Spaltung der 2-Acetoxy-Gruppe und infolge dessen zur Bildung von *N*-(3-Chlorphenyl)-acetamid (Bild 48).

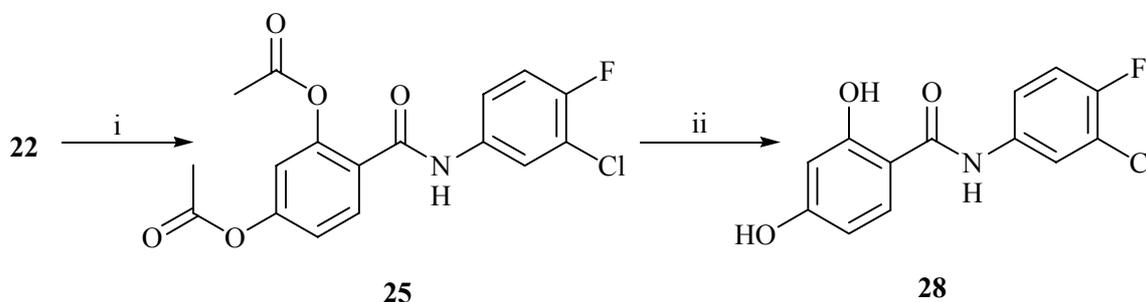
Um zur eigentlichen Wunschverbindung **27** zu gelangen, muss nun noch die verbliebene Acetyl-Gruppe in **24** abgespalten werden. Dies gelingt leicht durch Erhitzen in ethanolisch-wässriger Natriumcarbonatlösung (Bild 48).

### 3.3.1.2 Herstellung von *N*-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-2,4-dihydroxybenzamid (**28**)

Zusätzlich zum Chlor-substituierten Anilid **27** soll das entsprechende Chlor-Fluor-substituierte Anilid **28** hergestellt werden und vergleichend auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestet werden. Die 3-Chlor-4-fluorphenylamino-Gruppe ist z.B. auch im 4-Anilinochinazolin-Derivat IRESSA<sup>®</sup>, einem EGFR-TK-Inhibitor, der bereits kurz vor der Zulassung steht, enthalten.

Die Herstellung des Anilides **28** erfolgt analog der Synthese des 3'-Chlorderivates **27**.

Hier kann das 2,4-Diacetoxy-Derivat **25** als Zwischenstufe isoliert werden (Bild 49).

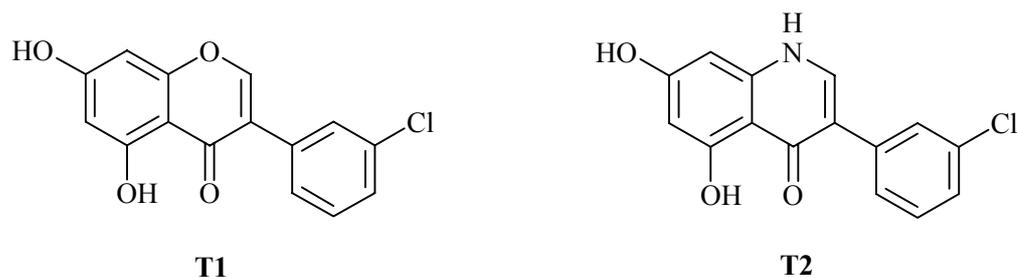


i) Thionylchlorid,  $\Delta T$ ; 3-Chloranilin, Dioxan,  $\Delta T$ ; ii) Natriumcarbonatlösung/Ethanol,  $\Delta T$

**Bild 49:** Herstellung von **28**

### 3.3.2 Das 3-Chloranilid der 4,6-Dihydroxysalicylsäure

Neben dem 3'-Chlor-5,7-dihydroxyisoflavin (**T1**) haben *Traxler et al.* auch einige Chinolin-4-on-Derivate als potente EGFR-TK-Inhibitoren veröffentlicht [117]. Die wirksamste Verbindung dieser Art ist wiederum ein Chlor-substituiertes Derivat (Verbindung **T2**, Bild 50).

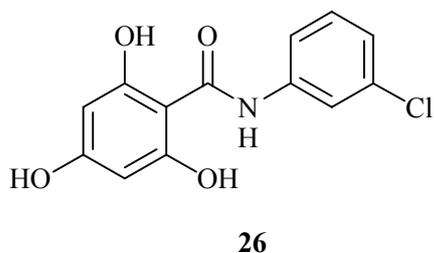


**Bild 50:** Isoflavon-Derivat **T1** und Chinolin-4-on-Derivat **T2** nach *Traxler et al.*

Das im Bild 50 dargestellte Chinolin-4-on-Derivat **T2** ist mit einer  $IC_{50} = 0.01 \mu\text{M}$  um das Zehnfache *in-vitro*-EGFR-TK-inhibitorisch aktiver als das entsprechende Isoflavon-Derivat **T1** ( $IC_{50} = 0.1 \mu\text{M}$ ) [117]. Die beiden Verbindungen **T1** und **T2** unterscheiden sich lediglich dadurch voneinander, dass das Sauerstoffatom im Chromonsystem des Isoflavons **T1** gegen ein  $sp^3$ -hybridisiertes Stickstoffatom ausgetauscht ist.

Laut *Traxler et al.* soll dieser Teil des Moleküls bei Einlagerung in die ATP-Bindungstasche der EGFR-TK im Bereich einer hydrophoben Tasche liegen. Damit kann die durch Austausch des Heteroatoms erfolgende zehnfache Wirkungssteigerung jedoch nicht befriedigend erklärt werden.

Es könnte sein, dass das Proton am Stickstoff eine wesentliche Rolle spielt. Das veranlasst

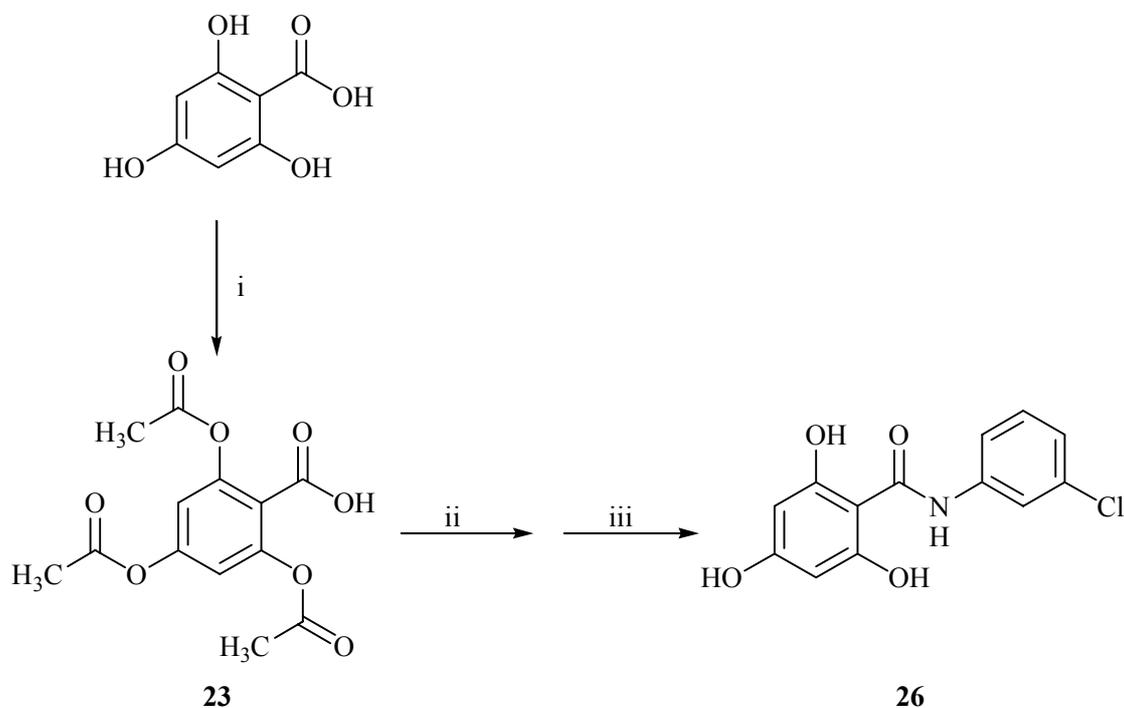


uns, das Anilid aus 4,6-Dihydroxysalicylsäure und 3-Chloranilin (Verbindung **26**, Bild 51) herzustellen. Diese Verbindung sollte dann im Vergleich mit dem entsprechenden 4-Hydroxy-Derivat **26** auf inhibitorische Aktivität gegen die EGFR-TK getestet werden.

**Bild 51:** Verbindung **26**

### 3.3.2.1 Herstellung von *N*-(3-Chlorphenyl)-2,4,6-trihydroxybenzamid (**26**)

Analog den beiden vorangegangenen Synthesen gelingt auch die Herstellung der Verbindung **26** (Bild 52).



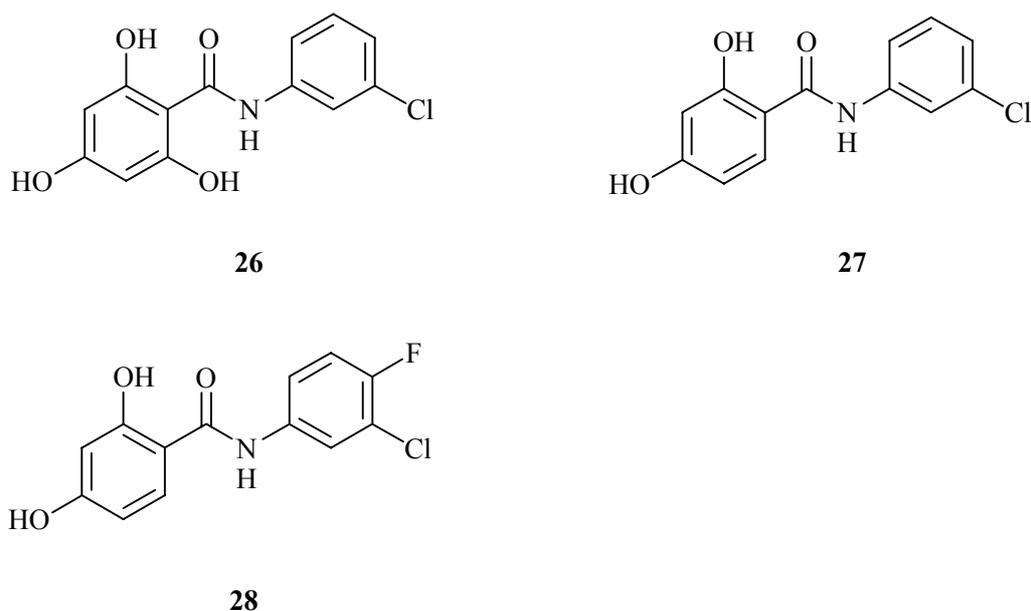
i) Acetanhydrid/Pyridin,  $\Delta T$ ; ii) Thionylchlorid,  $\Delta T$ ; 3-Chloranilin, Dioxan,  $\Delta T$ ; iii) Natriumcarbonatlösung/Ethanol,  $\Delta T$

#### **Bild 52:** Herstellung von **26**

Zunächst werden dazu wiederum die Hydroxy-Gruppen mit Acetyl-Gruppen geschützt. Die so erhaltene Verbindung **23** wird anschließend mit Thionylchlorid umgesetzt. Das Säurechlorid wird *in-situ* mit 3-Chloranilin zur Reaktion gebracht. Dabei kann kein einheitliches Produkt isoliert werden. Es entsteht ein Gemisch aus dem Mono-, Di- und Triacetoxy-Derivat der Wunschverbindung **26**. Deshalb wird das isolierte Gemisch nicht weiter aufgetrennt, sondern gleich zum Anilid **26** hydrolysiert.

### 3.3.3 EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der Salicylanilide 26-28

Die Salicylanilide **26-28** (Bild 53) wurden in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  auf ihre EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestet (Abschnitt 4.4.2, Methode A). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dokumentiert.



**Bild 53:** Auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestete Anilide

Verbindung	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>
EGFR-TK-inhibitorische Aktivitätin % (c = 10 $\mu\text{M}$ )	62	63	-7

**Tabelle 4:** EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der Anilide

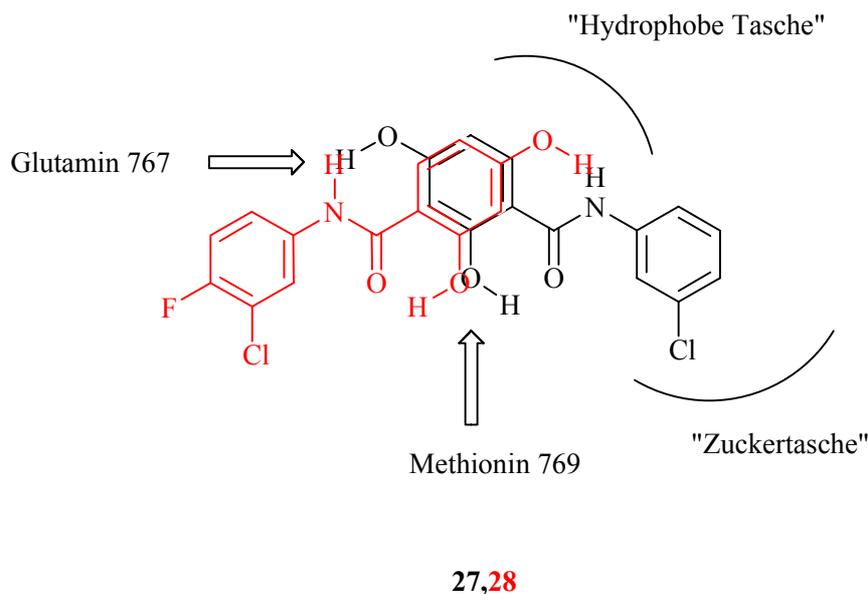
Die beiden Chlor-substituierten Anilide **26** und **27** zeigen moderate EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten, die mit denen der beiden Chlor-substituierten 4'-Hydroxysalicyloylindole **WS 11** und **15** vergleichbar sind. Somit sollte das postulierte Bindungsmodell, das für die Anilide angenommen wird, zutreffend sein.

Im Vergleich mit den Salicyloylindolen kann festgestellt werden, dass das Indolgerüst der hier beschriebenen Phenylamino-Gruppe nicht überlegen ist.

Die von *Traxler et al.* für die Bindung in der ATP-Bindungstasche postulierten Strukturvoraussetzungen, eine aromatische meta-Dihydroxy-Struktur und ein 3-Chlorphenyl-Rest, können mit den synthetisierten Aniliden bestätigt werden.

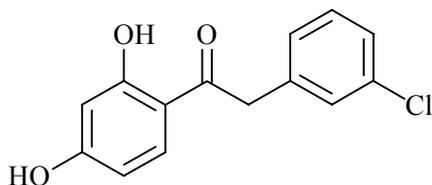
Für die Unwirksamkeit des 3'-Chlor-4'-fluor-Derivates gibt es keine einfache Erklärung. Da der Fluor-Substituent in etwa die Größe eines Protons hat, müsste sich ihrem Volumen nach die Verbindung **28** entsprechend den Chlor-substituierten Verbindungen **26** und **27** in die Bindungstasche einlagern können und demzufolge auch eine ähnliche EGFR-TK-inhibitorische Aktivität zeigen. Das Amid-Proton in **28** ist allerdings durch den Fluor-Substituenten verstärkt acidifiziert. Demzufolge stellt es einen stärkeren Wasserstoffbrücken-Donator dar, als das entsprechende Proton im 3-Chloranilid-Derivat **27**.

Es ist deshalb denkbar, dass das Amid-NH in **28** eine Wasserstoffbrücke ausbildet, die zu einer völlig anderen Einlagerung des Moleküls im Vergleich mit **27** führt. So könnte es z.B. in Konkurrenz zur 4-OH-Gruppe in Wechselwirkung mit Glutamin 767 treten, wie das im folgenden Bild 54 dargestellt ist.



**Bild 54:** Schematische Darstellung eines möglichen Bindungsmodells für Verbindung **28**, wenn deren Amid-Proton eine Wasserstoffbrücke zum Glutamin 767 ausbildet, im Vergleich mit dem für **27** angenommenen Bindungsmodell

Ob die Amid-Funktion der Verbindungen **26** bzw. **27** hingegen an der Bindung an das Enzym beteiligt ist, soll anschließend noch geklärt werden. Dazu wird das Ethanon **6** (Bild 55), bei dem die NH-Gruppe der Verbindung **27** durch eine CH<sub>2</sub>-Gruppe ersetzt ist, hergestellt und auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestet werden.

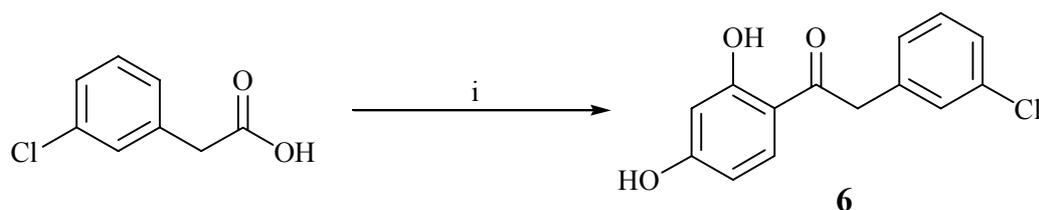


**Bild 55:** 2-(3-Chlorphenyl)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-ethanon (**6**)

### 3.3.4 Herstellung von 2-(3-Chlorphenyl)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-ethanon (**6**)

Die Herstellung des Ethanon-Derivates **6** kann in einem Schritt durch Friedel-Crafts-Alkanoylierung erfolgen.

Dazu werden 3-Chlorphenylessigsäure und Resorcin gemeinsam in Bortrifluorid-Diethylether-Komplex erhitzt (Bild 56).



i) Resorcin, Bortrifluorid-Diethylether-Komplex,  $\Delta T$

**Bild 56:** Herstellung von **6**

### 3.3.5 EGFR-TK-inhibitorische Aktivität des Ethanons **6**

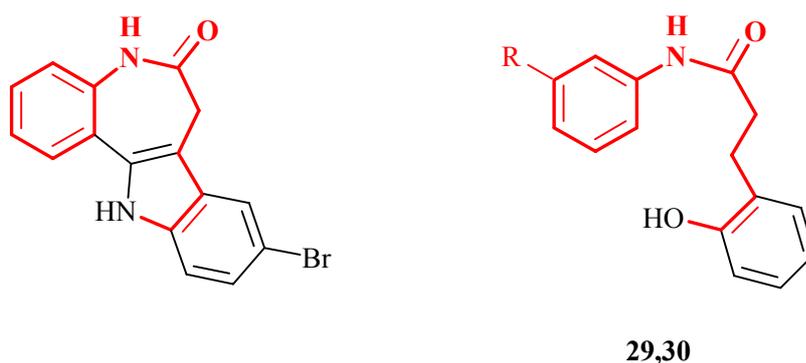
Die EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der Verbindung **6** wurde ebenfalls bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ermittelt (Abschnitt 4.4.2, Methode A) und beträgt 8 Prozent.

Somit führt der Austausch der NH-Gruppe in **27** gegen eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe zu einem Wirkungsverlust. Das spricht dafür, dass das Amid-NH in den Verbindungen **26** bzw. **27** bei der Bindung in der ATP-Bindungstasche der EGFR-TK – wahrscheinlich durch die Ausbildung einer stabilisierenden Wasserstoffbrücke - eine Rolle spielt.

Wenn sich **26** und **27** dabei tatsächlich dem Bindungsmodell nach *Traxler at al.* folgend in die Bindungstasche einlagern, müsste demnach für das Amid-NH ein weiterer Wasserstoffbrücken-Donator bzw. -Akzeptor, wie anfangs erläutert, zur Verfügung stehen.

### 3.3.6 Anilide der 3-(2-Hydroxyphenyl)-propansäure als mögliche EGFR-TK-Inhibitoren

Mit Hilfe des Know-hows der Synthese von Aniliden sollen an dieser Stelle zusätzlich Anilide aus 3-(2-Hydroxyphenyl)-propansäure und Anilin bzw. 3-Chloranilin hergestellt werden. Diese sind den Paullonen nachempfunden (Bild 57).



**Bild 57:** Kenpaullone als Leitstruktur der Paullone (links) und die Anilide **29** ( $R=H$ ) und **30** ( $R=Cl$ ) (rechts)

Paullone sind selektive Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (*engl.*: cyclin-dependent kinase = CDK) [120].

Bei vielen Tumoren findet man eine Überaktivität dieser Kinasen, die nach Aktivierung durch Cycline den Zellzyklus vorantreiben, was zu einer Hyperproliferation führt. Cyclinkinasen sind wie die EGFR-TK Enzyme, die Phosphatgruppen von ATP auf bestimmte Akzeptor-Moleküle übertragen [121,122].

Paullone sind ebenfalls ATP-Antagonisten. Sie verdrängen den Phosphatgruppen-Donator aus dessen Bindungsstelle in der Kinase und unterbrechen damit die Signalübertragung.

Für die Paullone wurde gefunden, dass ihre Bindung in der ATP-Bindungstasche der Kinase durch Wasserstoffbrücken, die von den beiden NH-Gruppen der Paullone zu Carbonyl-Gruppen von bestimmten Aminosäuren ausgebildet werden, stabilisiert wird [123].

Diese Wasserstoffbrücken-Donatoren sind auch in den Aniliden der 3-(2-Hydroxyphenyl)-propansäure enthalten: die sekundäre Lactam-Gruppe wird dabei durch eine offenkettige sekundäre Amid-Struktur ersetzt und die phenolische OH-Gruppe entspricht dem unsubstituierten Indol-NH (Bild 57).

Das Molekül der Paullone ist vollständig sterisch fixiert, was ein Grund für ihre hohe Selektivität für CDKs ist. Die Anilide **29** und **30** sind jedoch beweglich und können sich aufgrund dessen in der ATP-Bindungstasche, die ja in vielen Kinasen weitgehend homolog ist, eventuell besser ausrichten.

Dadurch könnte es im Unterschied zu den Paullonen möglich sein, dass durch die Verbindungen **29** und **30** auch andere Kinasen gehemmt werden.

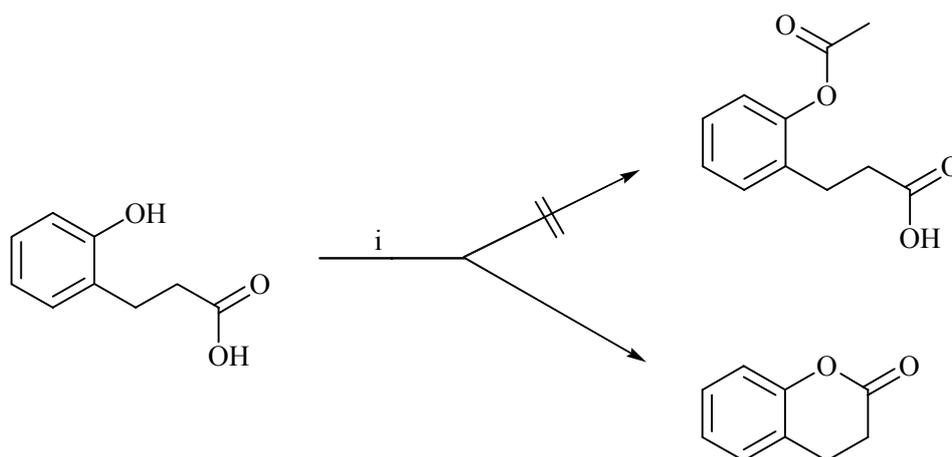
Deshalb erhofft man sich für diese Verbindungen eine EGFR-TK-inhibitorische Wirkung.

### 3.3.6.1 Herstellung von 3-(2-Hydroxyphenyl)-*N*-phenyl-propanamid (**29**) und *N*-(3-Chlorphenyl)-3-(2-hydroxyphenyl)-propanamid (**30**)

Analog der Synthese der Anilide **26-28** soll zur Herstellung der gewünschten Verbindungen **29** und **30** zunächst die phenolische Hydroxy-Gruppe der umzusetzenden 3-(2-Hydroxyphenyl)-propansäure durch die Einführung einer Acetyl-Gruppe geschützt werden.

Dies soll wiederum durch Erhitzen der zu schützenden Verbindung in einem Gemisch aus gleichen Teilen Acetanhydrid und Pyridin erfolgen.

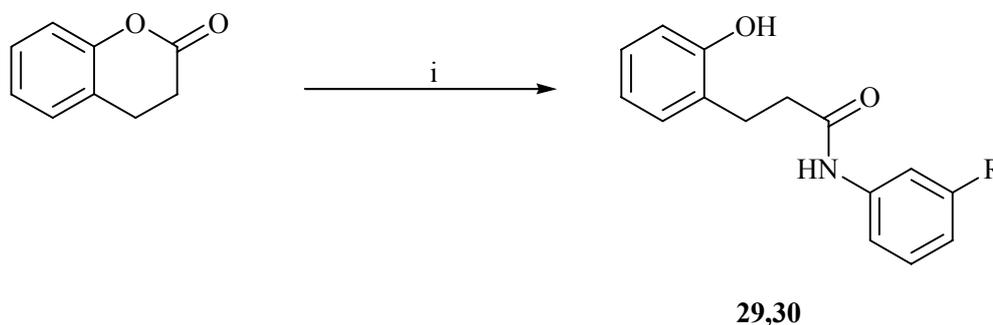
Während dieser Umsetzung bildet sich jedoch aus der 3-(2-Hydroxyphenyl)-propansäure deren „innerer Ester“, das 3,4-Dihydrocumarin (Bild 58).



i) Acetanhydrid/Pyridin,  $\Delta T$

**Bild 58:** Umsetzung der 3-(2-Hydroxyphenyl)-propansäure mit Acetanhydrid/Pyridin

Das 3,4-Dihydrocumarin lässt sich hier durch Aminolyse mit Anilin bzw. 3-Chloranilin zu den gewünschten Aniliden **29** und **30** umsetzen (Bild 59).



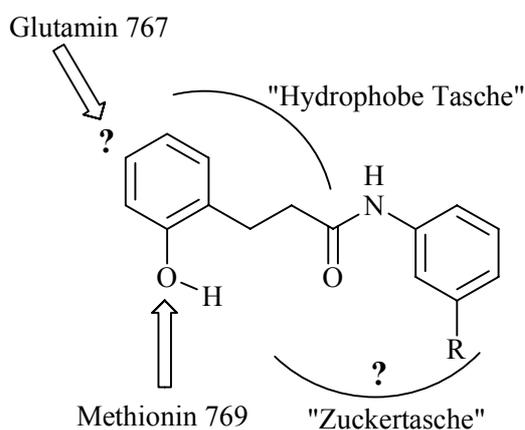
**29:** R=H  
**30:** R=Cl

i) Anilin bzw. 3-Chloranilin,  $\Delta T$

**Bild 59:** Umsetzung von 3,4-Dihydrocumarin zu den Aniliden **29** und **30**

### 3.3.7 EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der 3-(2-Hydroxyphenyl)-propananilide **29** und **30**

Die Anilide **29** und **30** zeigen keine EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten.



Auf der Grundlage des Bindungsmodells nach *Traxler* kann dies folgendermaßen begründet werden: Zum einen fehlt für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum Glutamin 767 ein entsprechender Wasserstoffbrücken-Donator, zum anderen ist es möglich, dass sich aufgrund des im Vergleich mit den Salicylaniliden größeren Abstandes der beiden Phenylringe der *N*-Phenyl-Rest nicht in die „Zuckertasche“ einlagern kann (Bild 60).

**Bild 60:** Mögliche Einlagerung der 3-(2-Hydroxyphenyl)-propananilide in die ATP-Bindungstasche

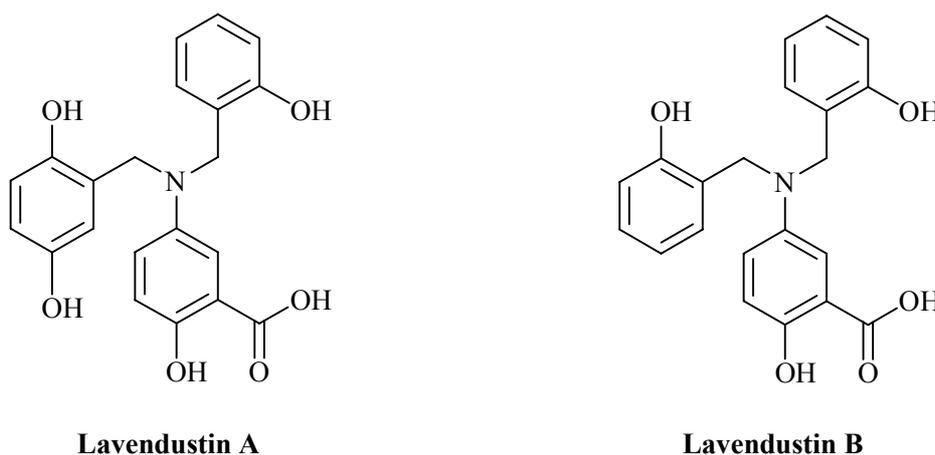
Bei den Aniliden **29** und **30** handelt es sich keinesfalls um EGFR-TK-Inhibitoren. Es ist damit aber nicht ausgeschlossen, dass es sich um CDK-Inhibitoren handeln könnte. Dies wurde aufgrund der fehlenden Möglichkeiten bisher aber noch nicht überprüft.

### 3.4 Lavendustin A als Leitstruktur zur Entwicklung von EGFR-TK-Inhibitoren

Da die im Abschnitt 3.3 beschriebenen Salicylanilide 26-28 moderate EGFR-TK-inhibitorische Eigenschaften aufweisen, wird zur weiteren Optimierung der Wirksamkeit auf die Salicyloyl-Struktur von Lavendustin A zurückgegriffen.

Die Ende der 1980er Jahre von *Onoda et al.* aus dem Bakterium *Streptomyces griseolavendus* isolierten Verbindungen Lavendustin A und B haben nämlich strukturelle Ähnlichkeit mit den vorhergehend beschriebenen Salicylaniliden.

Beide Substanzen sind ebenfalls Salicylsäure-Derivate, nämlich 5-Dibenzylaminosalicylsäure-Abkömmlinge (Bild 61) [124].



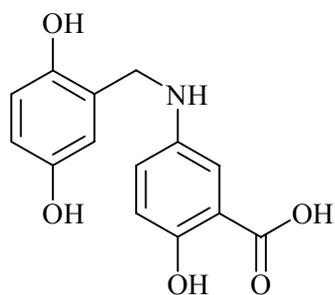
**Bild 61:** Aus *Streptomyces griseolavendus* isolierte EGFR-TK-inhibitorische Substanzen: Lavendustin A und B

Bei den Benzyl-Resten im Lavendustin A handelt es sich um einen 2,5-Dihydroxybenzyl- und einen 2-Hydroxybenzylrest. Die Benzyl-Reste beim Lavendustin B sind beide jeweils 2-Hydroxy-substituiert (Bild 61).

Beide Substanzen sind *in-vitro* potente EGFR-TK-Inhibitoren. Dabei ist Lavendustin A mit einer  $IC_{50}$  von 0.012  $\mu$ M etwa hundertfach stärker inhibitorisch wirksam als Lavendustin B mit einer  $IC_{50}$  von 1.341  $\mu$ M [124,125].

Wird die Salicylsäure im Lavendustin A durch eine 4-Hydroxybenzoesäure ersetzt, besitzt die resultierende Verbindung mit einer  $IC_{50}$  von 0.46  $\mu$ M nur noch etwa 2.5 Prozent der inhibitorischen Aktivität der Muttersubstanz [124,125].

*Onoda et al.* konnten die 5-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-salicylsäure (Verbindung **O1**, Bild 62) als das biologisch aktive Strukturelement von Lavendustin A identifizieren. Dieses hemmt

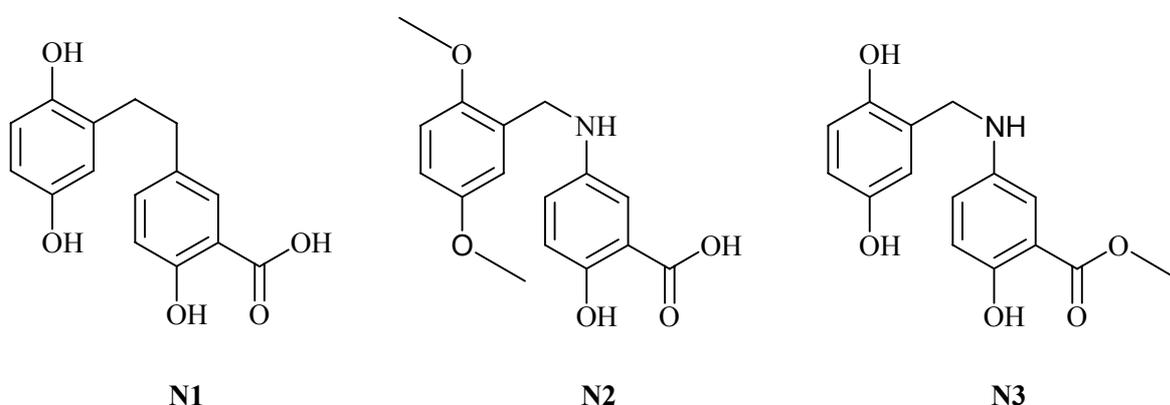
**O1**

die EGFR-TK mit einer  $IC_{50}$  von  $0.044 \mu\text{M}$  [124]. Trotz der sehr guten inhibitorischen Aktivitäten, die Lavendustin A und dessen Pharmakophor an der isolierten EGFR-TK zeigen, sind beide Substanzen in Zellkulturen nahezu unwirksam. Es wird vermutet, dass dies aufgrund der hohen Polarität und dem daraus resultierenden schlechten Penetrationsvermögen der Fall ist [124].

**Bild 62:** Das Lavendustin-A-Pharmakophor **O1**

Die in Bild 62 dargestellte biologisch aktive Teilstruktur von Lavendustin A (Verbindung **O1**) wurde durch *Nussbaumer et al.* gezielt abgewandelt (Bild 63), um weitere Erkenntnisse über die wichtigsten Strukturelemente für eine EGFR-TK-inhibitorische Aktivität zu erlangen. Des Weiteren erhoffte man sich durch bestimmte Strukturvariationen ein verbessertes Penetrationsvermögen im Vergleich mit der Muttersubstanz [125].

Unter anderem wurden dabei Verbindungen hergestellt, in denen die NH- durch eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe ersetzt ist (Bild 63, Verbindung **N1**), die beiden OH-Gruppen im Benzylamino-Rest gegen  $\text{OCH}_3$ -Gruppen ausgetauscht sind (Bild 63, Verbindung **N2**) und die Säurefunktion verestert vorliegt (Bild 63, Verbindung **N3**).

**N1****N2****N3**

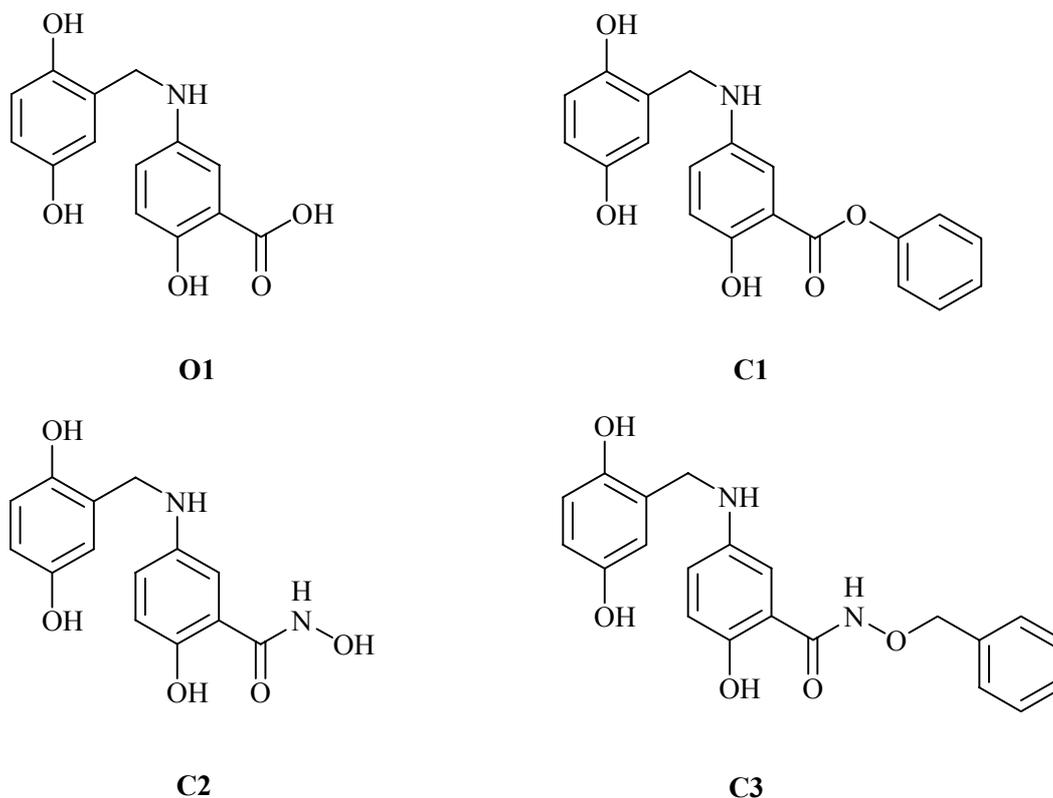
**Bild 63:** Synthetische Abwandlungen der Lavendustin A-Teilstruktur nach *Nussbaumer et al.*

Es wurde gefunden, dass das Derivat **N1** die gleiche EGFR-TK-inhibitorische Aktivität wie die zugrunde gelegte Verbindung **O1** besitzt. Das deutet daraufhin, dass die Amino-Gruppe nicht unmittelbar an der Rezeptorbindung beteiligt ist.

Das Dimethoxy-Derivat **N2** zeigt keine EGFR-TK-inhibitorische Aktivität. Aufgrund dessen kann vermutet werden, dass die Hydroxy-Gruppen im Benzyl-Rest eventuell durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu einer Stabilisierung der Bindung an den Rezeptor beitragen. Deshalb müssen sie „frei“ vorliegen. Es kann aber auch sein, dass es zu Diskrepanzen aufgrund des höheren Raumbedarfs der Methyl-Reste kommt, die eine optimale Einlagerung in die Bindungstasche der zytoplasmatischen EGFR-Domäne verhindern.

Der Methylester **N3** zeigt gegenüber der wirksamen Lavendustin A-Teilstruktur **O1** eine abgeschwächte inhibitorische Aktivität gegen die EGFR-TK. Daraus könnte man schlussfolgern, dass die Säure-Funktion frei vorliegen muss.

*Chen et al.* hingegen synthetisierten eine Reihe von Verbindungen, in denen die Carbonsäure-Funktion des Lavendustin-A-Pharmakophors (**O1**) ohne Aktivitätseinbuße derivatisiert vorliegt (Bild 64).



**Bild 64:** Carbonsäure-Derivate des Lavendustin A-Pharmakophors **O1** nach *Chen et al.* [126]

Zu den gleichermaßen gut wirksamen Verbindungen zählen z. B. der Phenylester (Bild 64, Verbindung C1), der Benzylester, aber auch das *N*-Hydroxybenzamid (Bild 64, Verbindung C2) und das Benzyloxyamid (Bild 64, Verbindung C3).

Durch diese Strukturvariationen konnten auch die inhibitorischen Aktivitäten in Zellkulturen erhöht werden [126].

Bisher existiert für Lavendustin A kein eindeutiges Bindungsmodell, das die Bindung an die TK-Domäne des EGFR's zufriedenstellend beschreibt. Es liegen auch unterschiedliche Meinungen zur Bindungsstelle selbst und den Mechanismus der Inhibition vor.

Die von *Onoda et al.* veröffentlichten Studien zur Kinetik der Inhibition der EGFR-TK deuten darauf hin, dass es sich beim Lavendustin A um einen kompetitiven ATP-Antagonisten und einen nicht-kompetitiven Substrat-Antagonisten handelt [124].

*Hsu et al.* vermuten aufgrund eigener Untersuchungen zur Kinetik jedoch eher einen nicht-kompetitiven ATP-Antagonismus. Demnach könnte Lavendustin A eventuell an eine allosterische Bindungsstelle an der zytoplasmatischen Domäne des EGFR's binden. Durch die dadurch herbeigeführte Konformationsänderung werden die Bindungsaffinitäten von ATP und Substrat verringert [127].

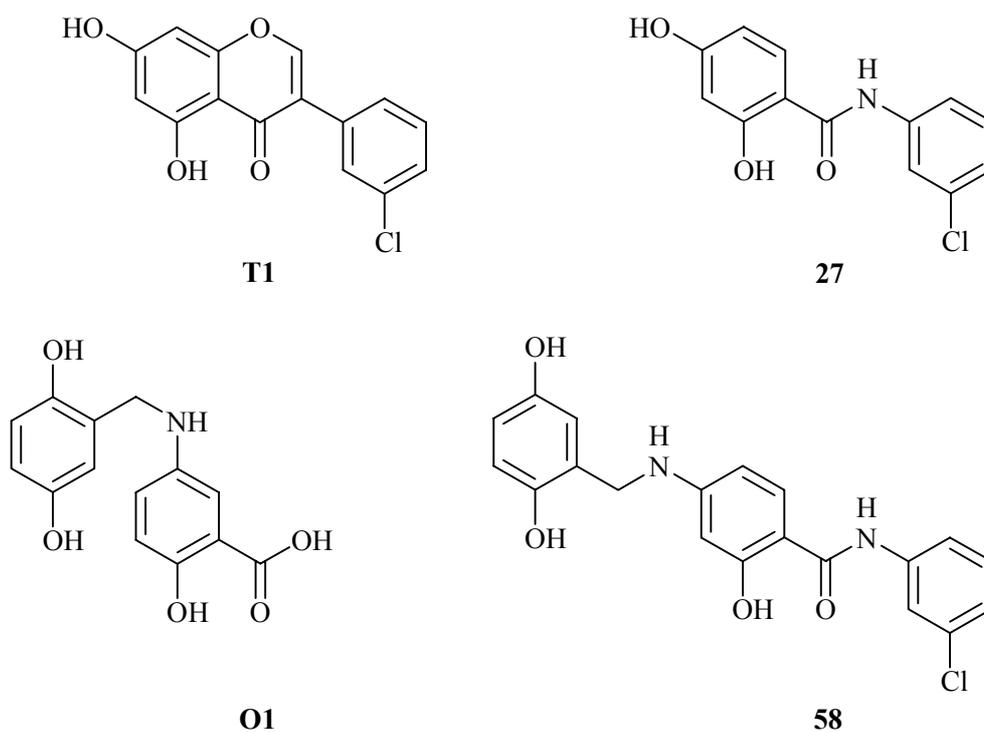
Zusammenfassend ist festzustellen, dass Lavendustin A aufgrund seiner potenten EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität eine gute Leitstruktur für das Design neuer EGFR-TK-Inhibitoren darstellt, selbst jedoch aufgrund seines schlechten Penetrationsvermögens nicht in der Therapie eingesetzt werden kann.

### 3.4.1 Lavendustin A-Derivate mit Salicylsäure-Teilstruktur

#### 3.4.1.1 Salicylanilide mit 4-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-Substitution

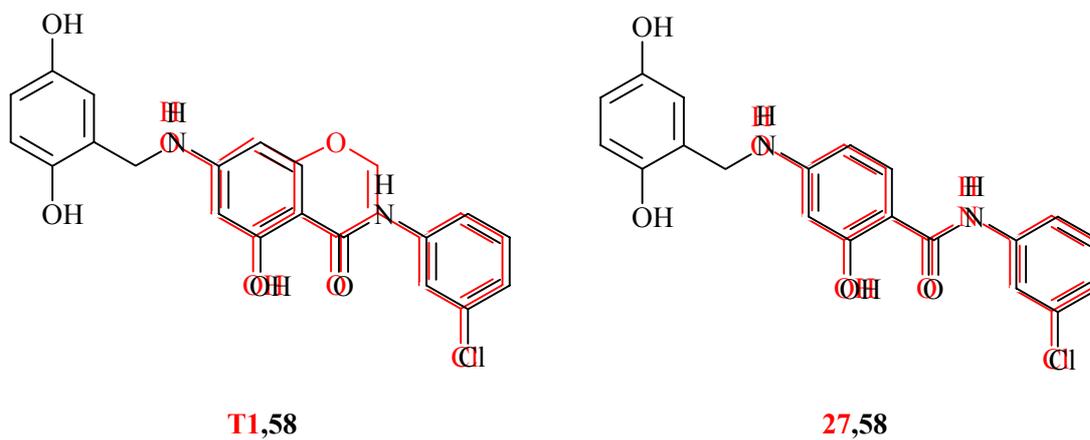
Das nächste Ziel der Arbeit ist, Salicylanilide mit 4-Benzylamino-Substitution in Anlehnung an die Lavendustin-A-Teilstruktur (Bild 65, Verbindung **O1**) herzustellen.

Dieser Substitutionstyp ist eng an Verbindung **27** angelehnt, wobei deren 4-Hydroxy-Gruppe durch die Amino-Gruppe des Benzylamino-Restes ausgetauscht ist (Bild 65, Verbindung **58**). Diese Verbindungen lassen sich mit denen von *Traxler* zur Deckung bringen. Das Substitutionsmuster des Salicylsäure-Anteils entspricht somit nicht der Struktur des Lavendustin A-Pharmakophors **O1**, da sich die Dihydroxybenzylamino-Seitenkette nicht in Position 5, sondern in Position 4 befindet.



**Bild 65:** Angestrebtes Salicylanilid mit 4-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-Substitution **58**, zum Vergleich sind das Isoflavon **T1**, das Anilid **27** sowie das Lavendustin A-Pharmakophor **O1** dargestellt

Die angestrebten Verbindungen können mit dem *Traxler'schen* Isoflavon **T1** und demzufolge auch mit dem 4-Hydroxysalicylanilid **27** zur Deckung gebracht werden. Dabei befindet sich die Amino-Gruppe der angestrebten Verbindung **58** im Bereich der 7-Hydroxy-Gruppe des Isoflavons **T1** bzw. der 4-Hydroxy-Gruppe des Salicylanilides **27** (Bild 66).



**Bild 66:** Überlagerte Darstellung von **58** und **T1** (links) bzw. **27** (rechts)

Dem Bindungsmodell nach *Traxler et al.* folgend, sollten der Sauerstoff der 2-Hydroxy-Gruppe und das Proton der 4-Amino-Gruppe die postulierten Wasserstoffbrücken zum Methionin 769 und Glutamin 767 in der ATP-Bindungstasche der Kinase ausbilden. Der *N*-Halophenyl-Rest würde sich dann wiederum im Bereich der ebenfalls postulierten Zuckertasche befinden.

Das wäre so aber nur möglich, wenn eine zusätzliche Tasche für die Einlagerung der 2,5-Dihydroxybenzyl-Seitenkette zur Verfügung stünde (Bild 67).



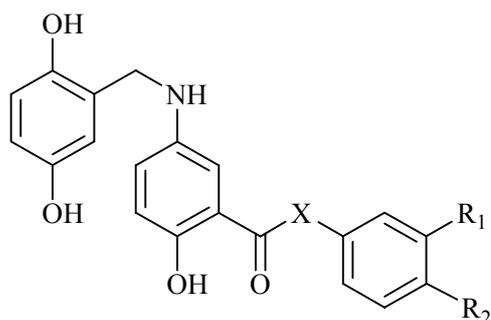
*Chen et al.* ermittelten für das Lavendustin A-Pharmakophor (**O1**, Bild 68) für die Inhibition der EGFR-TK *in-vitro* eine  $IC_{50}$  von 0.03  $\mu\text{M}$ , *in-vivo* eine  $IC_{50}$  von 92  $\mu\text{M}$  [126].

Der abgeleitete Ester **C1** (Bild 68) ist *in-vitro* mit einer  $IC_{50}$  von 0.07  $\mu\text{M}$  zwar etwas schwächer EGFR-TK-inhibitorisch wirksam, dafür ist er aber *in-vivo* mit einer  $IC_{50}$  von 10  $\mu\text{M}$  etwa zehnmal stärker wirksam als die zugrunde gelegte Säure [126].

In Anlehnung an diese Befunde und bereits erbrachter positiver Befunde in der Salicylsäure-Reihe (s. Abschnitt 3.3.3) sollen nun Anilide der pharmakophoren Lavendustin A-Teilstruktur **O1** mit unterschiedlichen Substitutionsmustern hergestellt werden.

Dabei werden Aniline eingesetzt, die Chlor-, Brom- oder Fluor-Substituenten besitzen und dabei einfach bzw. zweifach Halogen-substituiert sind (Bild 69).

Außerdem wird in enger struktureller Verwandtschaft zu den Estern nach *Chen et al.* der 3-Chlor-phenylester hergestellt (Bild 69).



X	NH			O
R <sub>1</sub>	Cl	Br	Cl	Cl
R <sub>2</sub>	H	H	F	H

**Bild 69:** Angestrebte Verbindungen in Anlehnung an *Chen et al.*

### 3.4.2 Versuche zur Herstellung von 4- bzw. 5-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-salicylaniliden aus entsprechenden Phenylsalicylaten

Zunächst wird die Herstellung der gewünschten Salicylanilide mit Dihydroxybenzylamino-Teilstruktur über die entsprechenden Phenylsalicylate angestrebt. Dabei sollte der Phenylester aufgrund seiner resonanzstabilisierten Phenolat-Abgangsgruppe problemlos mit den Halogensubstituierten Anilin-Derivaten zu Aniliden umgesetzt werden können.

Allerdings ist durch vorangegangene Versuche bekannt, dass sich Salicylanilide nicht durch Umsetzung der Methylester herstellen lassen.

Die Einführung des 2,5-Dihydroxybenzylamino-Restes soll durch Kondensation der Phenyl 4- bzw. 5-aminosalicylate mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd erfolgen.

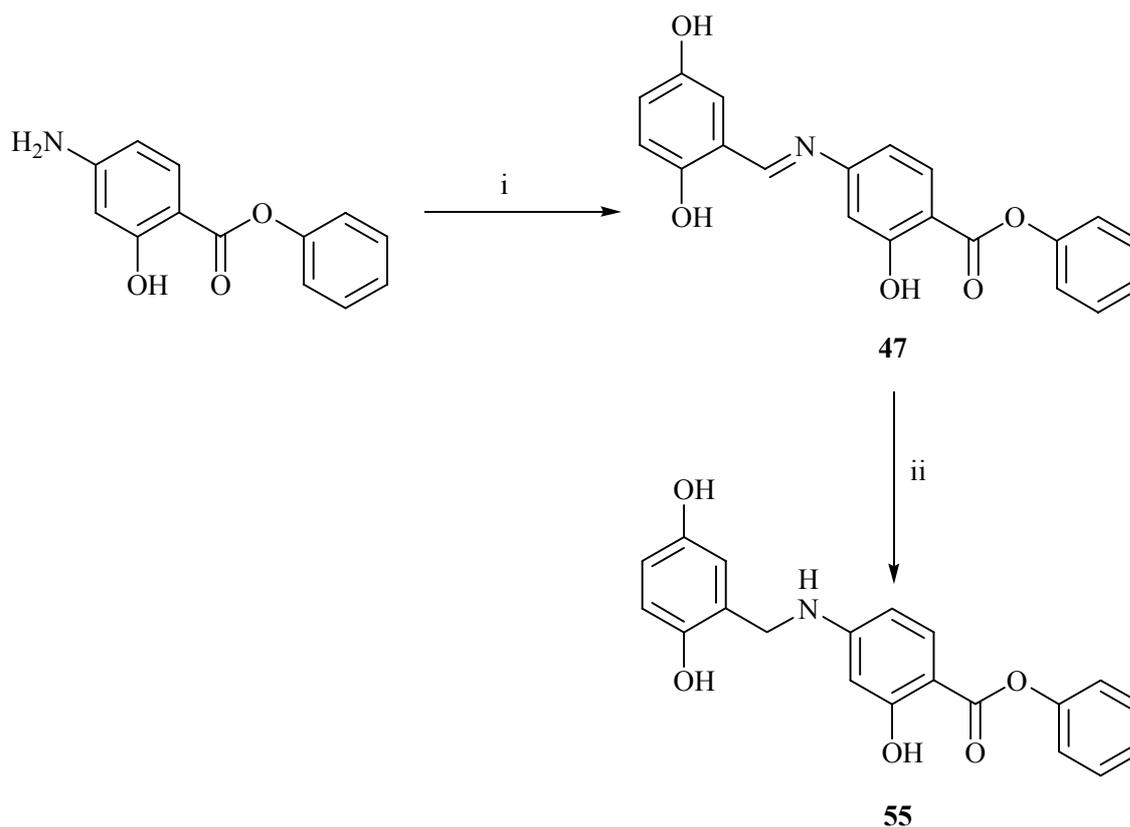
#### 3.4.2.1 Herstellung von Phenyl 4-(2,5-dihydroxybenzylamino)-salicylat (55)

Im Rahmen der Herstellung des Phenylsalicylates **55** wird käufliches Phenyl 4-aminosalicylat mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd in einer Kondensationsreaktion zur Schiff'schen Base **47** umgesetzt.

Durch Reduktion der Imino-Gruppe ist aus **47** das Amin **55** zugänglich.

Damit die Carbonyl-Gruppe dabei nicht reduziert wird, soll die Reduktion mit Borandimethylamin-Komplex in Eisessig erfolgen [128]. Dazu soll laut Literaturangaben die Schiff'sche Base mit dem Reduktionsmittel in Eisessig rückfließend erhitzt werden. Dabei beobachtet man jedoch in diesem Fall eine Zerstörung des Moleküls.

Die Reduktion gelingt nur, wenn die Zugabe des Reduktionsmittels bei 0 °C erfolgt und die Mischung anschließend bei Raumtemperatur gerührt wird (Bild 70).



i) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig,  $\Delta T$ ; ii) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig

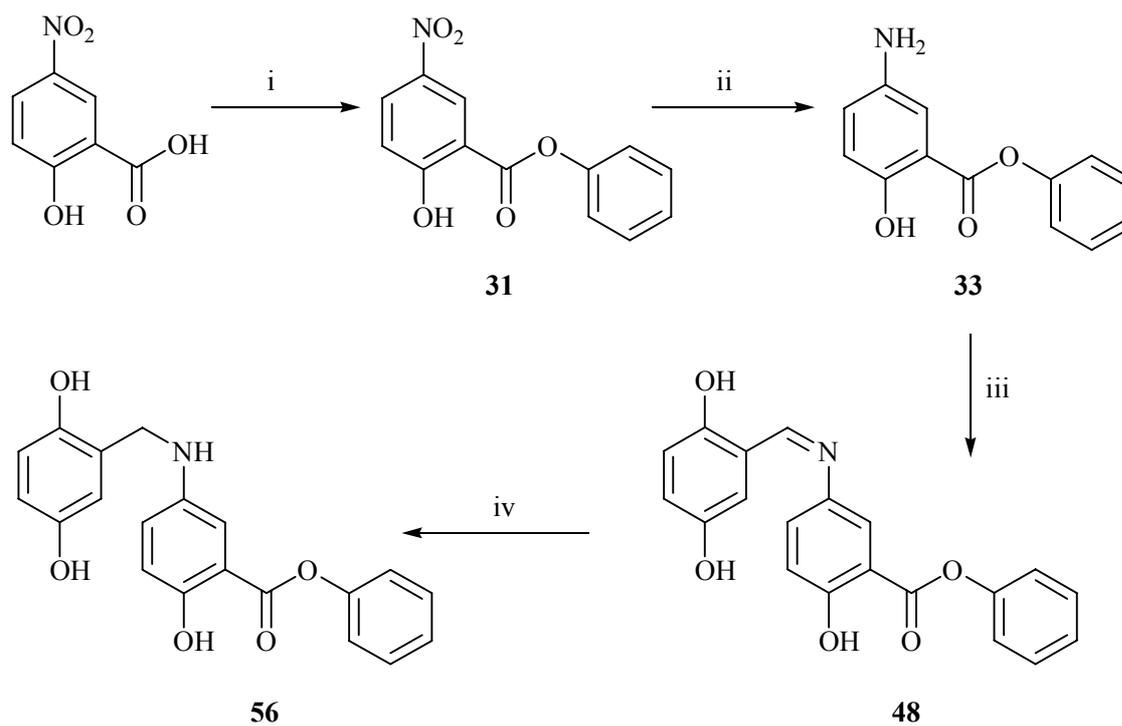
**Bild 70:** Herstellung von 55

### 3.4.2.2 Herstellung von Phenyl 5-(2,5-dihydroxybenzylamino)-salicylat (56)

Im Rahmen der Herstellung von Verbindung 56, deren Substitutionsmuster dem des Lavendustin A - Pharmakophors vollständig entspricht, muss zunächst das Phenyl 5-nitrosalicylat (31) hergestellt werden. Das gelingt leicht durch Umsetzung von 5-Nitrosalicylsäure mit Phenol in Gegenwart von Phosphorylchlorid [129].

Die Reduktion der Nitro-Gruppe wird dann mit Palladiumkohle in Ethanol/Cyclohexen durchgeführt. Man erhält die gewünschte Verbindung 33 in guten Ausbeuten.

Durch anschließende Umsetzung mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd wird wiederum das gewünschte Imin 48 erhalten, das mit Borandimethylamin-Komplex zum Amin 56 weiter umgesetzt wird (Bild 71).

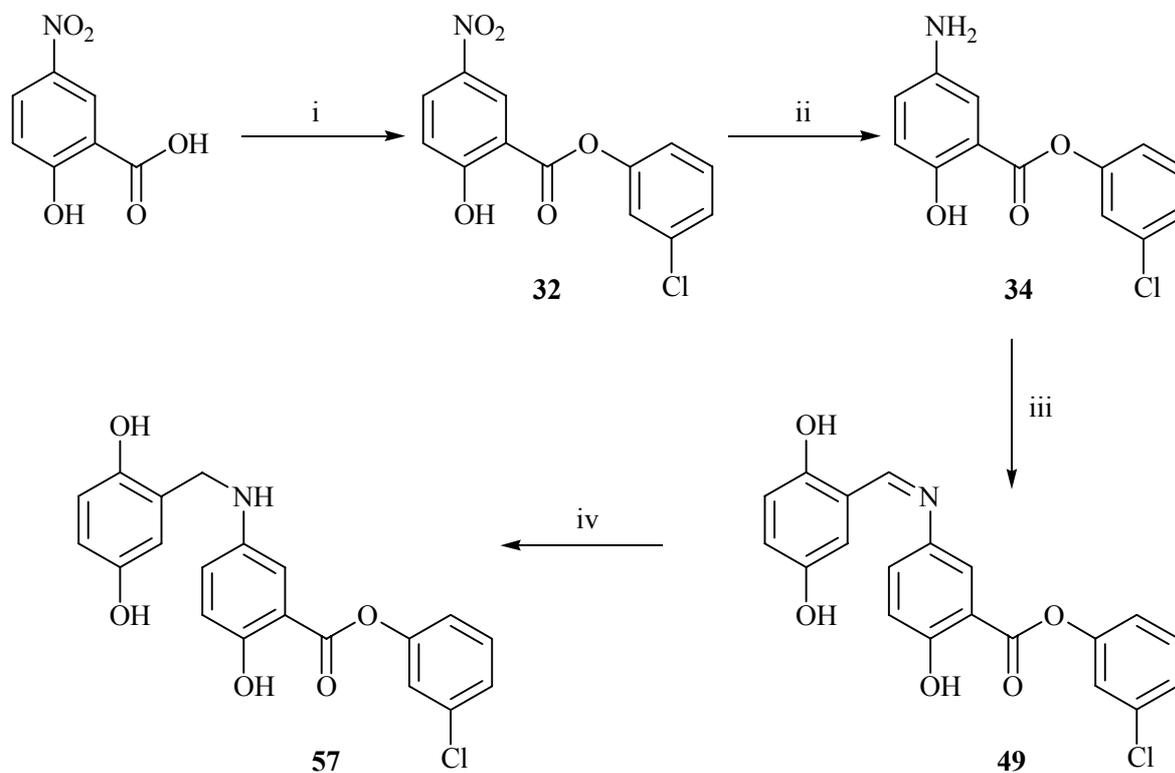


i) Phenol, Phosphorylchlorid,  $\Delta T$ ; ii) Palladiumkohle, Cyclohexen/Ethanol,  $\Delta T$ ; iii) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig,  $\Delta T$ ; iv) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig

**Bild 71:** Herstellung von **56**

### 3.4.2.3 Herstellung von 3-Chlorphenyl 5-(2,5-dihydroxybenzylamino)-salicylat (57)

Analog der zuvor beschriebenen Synthese soll die Herstellung eines 3-Chlorphenylesters des Lavendustin A - Pharmakophors erfolgen.



i) 3-Chlorphenol/Phosphorylchlorid,  $\Delta T$ ; ii) Zinkstaub, verdünnte Essigsäure,  $\Delta T$ ; iii) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig,  $\Delta T$ ; iv) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

#### Bild 72: Herstellung von 57

Die entsprechende Reaktionssequenz ist im Bild 72 dargestellt. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die Reduktion mit Palladiumkohle zur Abspaltung von Halogen führen kann. Deshalb soll die Reduktion des 3-Chlorphenyl 5-nitrosalicylates (32) mit Zink versucht werden.

Wegen der säurelabilen Esterstruktur soll der Versuch jedoch nicht in verdünnter Essigsäure durchgeführt werden, sondern in 50-prozentigem Ethanol unter Zusatz von Ammoniumchlorid [130].

Dabei wird das gewünschte Amin 34 aber nur in einer Ausbeute von weniger als fünf Prozent erhalten.

Aufgrund der unbefriedigenden Ausbeuten wird die Reduktion anschließend in verdünnter Essigsäure versucht. Dabei kann bereits nach zehn Minuten Reaktionsdauer keine Ausgangsverbindung mehr nachgewiesen werden. Als Produkt wird das gewünschte Amin **34** in einer befriedigenden Ausbeute von ca. 40 Prozent isoliert.

Verbindung **34** wird mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd zur Schiff'schen Base **49** weiter umgesetzt. Durch Reduktion der Imino-Gruppe mit Borandimethylamin-Komplex gelangt man zur gewünschten Verbindung **57**.

#### 3.4.2.4 Versuche zur Umwandlung der Phenylsalicylate **55** und **56** in Anilide

Die beiden Phenylsalicylate **55** und **56** sollen jetzt mit den entsprechenden Anilin-Derivaten zu Aniliden umgesetzt werden.

Zunächst wird versucht, Verbindung **55** mit einem Überschuss 3-Chloranilin bei ca. 200 °C zur Reaktion zu bringen. Unter diesen Bedingungen kommt es jedoch zu einer Zersetzung des Moleküls.

Deshalb wird als nächstes versucht, die Reaktion in einer Dioxan-Wasser-Mischung bei Temperaturen von ca. 120 °C durchzuführen.

Der Ansatz wird in regelmäßigen Abständen dünnschichtchromatographisch untersucht. Dabei beobachtet man nach 24 Stunden einen neuen, leicht bläulich fluoreszierenden Fleck. Diese blaue Fluoreszenz ist auch bei den zuvor hergestellten Salicylaniliden beobachtet worden. Nach 30 Stunden wird die Reaktion abgebrochen, da keine deutliche Zunahme des Reaktionsproduktes mehr erkennbar ist.

Die Isolierung des Gemisches erfolgt zunächst durch Extraktion mit Ethylacetat aus dem angesäuerten Ansatz. Damit gelingt die Abtrennung des größten Teils des nicht umgesetzten 3-Chloranilins.

Die weitere Aufarbeitung des erhaltenen Rohproduktes bereitet jedoch erhebliche Schwierigkeiten, da zum einen nur geringe Mengen Reaktionsprodukt entstanden sind und zum anderen die Ausgangsverbindung **55** und das zu isolierende Produkt aufgrund nahezu gleicher R<sub>f</sub>-Werte chromatographisch kaum trennbar sind.

Dünnschichtchromatographisch gelingt die Auftrennung von Ausgangsverbindung und Produkt mit Dichlormethan/Methanol (9+1). Die daraufhin mehrfach durchgeführte Säulenchromatographie mit diesem Eluierungsmittel gelingt jedoch nicht.

Deshalb wird anschließend die Auftrennung mittels präparativer Dünnschichtchromatographie an Kieselgelplatten versucht. Dazu wird eine Lösung des zu trennenden Gemisches auf die

Platte aufgetragen und diese dann in Dichlormethan/Methanol (9+1) über eine Laufstrecke von 18 cm entwickelt. Als Referenz dient Verbindung **55**.

Nach dem Trocknen der entwickelten Platten werden die Banden unter dem UV-Licht eingezeichnet und die entsprechenden Bereiche gefasst. Die erhaltenen Kieselgelfractionen werden getrennt gesammelt, in Ethylacetat suspendiert und filtriert. Die Filtrate werden eingedampft.

Laut  $^1\text{H-NMR}$ - und Massenspektrum wird hierbei tatsächlich die Wunschverbindung erhalten. Die Ausbeute beträgt jedoch weniger als ein Prozent und die Verbindung ist nicht analysenrein isolierbar.

Die analog durchgeführte Umsetzung von Verbindung **56** mit 3-Chloranilin liefert nach mehreren Trennschritten ebenfalls das gewünschte Anilid. Aber auch hier ist es nicht möglich, dieses in ausreichender Reinheit und Menge zu erhalten.

Um die Ausbeuten eventuell zu steigern, wird die Umsetzung mit 3-Chloranilin in  $\alpha$ -Methylnaphthalen bei Temperaturen um 200 °C erneut versucht. Laut Literatur sollen so bei der Umsetzung von Phenylsalicylaten mit Chloranilinen Ausbeuten von 89 Prozent erreicht werden können [131].

Unter diesen Bedingungen kann bereits nach 60 Minuten die Wunschverbindung dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden.

Zur Aufarbeitung wird der Ansatz mit Aktivkohle aufgeköcht und heiß filtriert. Dabei sollen die entsprechenden Anilide ausfallen. Die hier entstehenden 2,5-Dihydroxybenzylamino-substituierten Salicylanilide können so jedoch nicht gewonnen werden. Deshalb wird auch versucht, die Produkte durch Säulenchromatographie aus der Mischung zu isolieren, was aber ebenfalls nicht gelingt.

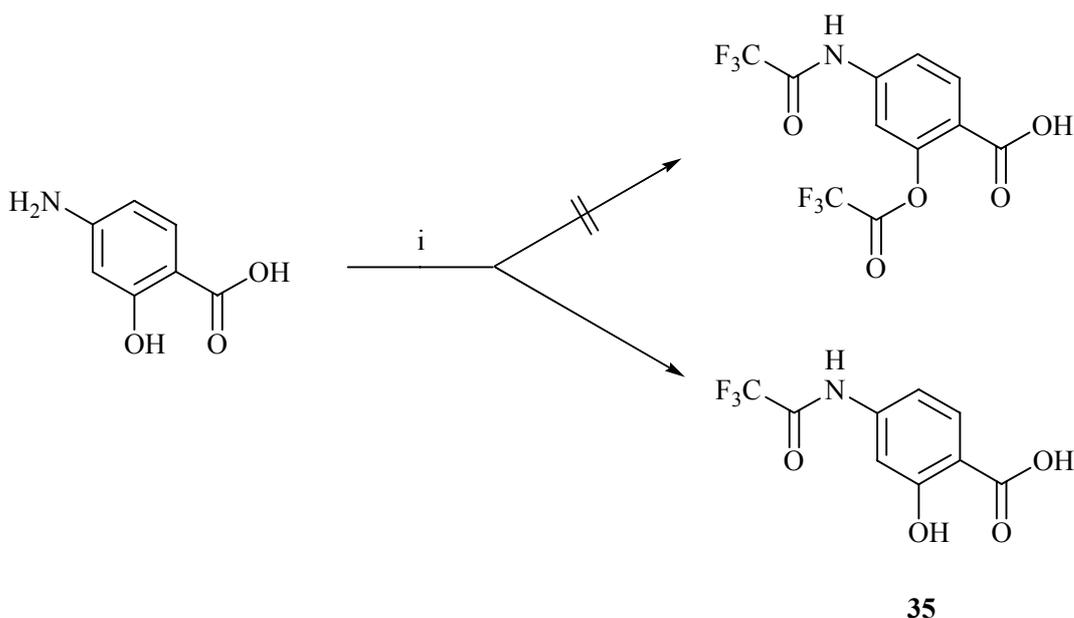
### 3.4.3 Herstellung von 4- bzw. 5-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-salicylaniliden aus entsprechenden Säurechloriden

Da der Syntheseweg zu den Aniliden über die Phenylester nicht zur Isolierung ausreichender Mengen der gewünschten Anilide führte, wird als nächstes ein anderer Syntheseweg versucht. Dabei wird von der 4- bzw. 5-Aminosalicylsäure ausgegangen, die zunächst ins Säurechlorid übergeführt wird, das dann mit einem Anilin-Derivat zum Anilid umgesetzt wird.

Bei der Herstellung des Säurechlorids besteht neben der Gefahr der Selbstveresterung zusätzlich auch die Möglichkeit der Selbstamidierung. Um diese Nebenreaktionen zu verhindern, sollen beide Funktionen durch Einführung einer Trifluoracetyl-Schutzgruppe blockiert werden.

Nach der Umsetzung der geschützten 4- bzw. 5-Aminosalicylsäuren können die 4- bzw. 5-Aminosalicylanilide nach Abspaltung der Trifluoracetyl-Reste in freier Form erhalten werden. Diese werden dann mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd kondensiert und die resultierenden Schiff'schen Basen wiederum mit Borandimethylamin-Komplex zu den gewünschten Verbindungen **58-62** weiter umgesetzt.

#### 3.4.3.1 Herstellung von *N*-(3-Chlorphenyl)- und *N*-(3-Bromphenyl)-4-(2,5-dihydroxybenzylamino)-2-hydroxybenzamid (**58,59**)



i) Trifluoressigsäureanhydrid, abs. Dioxan, RT

**Bild 73:** Umsetzung von 4-Aminosalicylsäure mit Trifluoressigsäureanhydrid

Zur Einführung der Trifluoracetyl-Schutzgruppe wird 4-Aminosalicylsäure mit Trifluoressigsäureanhydrid umgesetzt [132]. Dabei wird aber nicht, wie gewünscht, eine zweifach acylierte Form isoliert, sondern das ausschließlich an der Amino-Gruppe monoacylierte Produkt **35** (Bild 73).

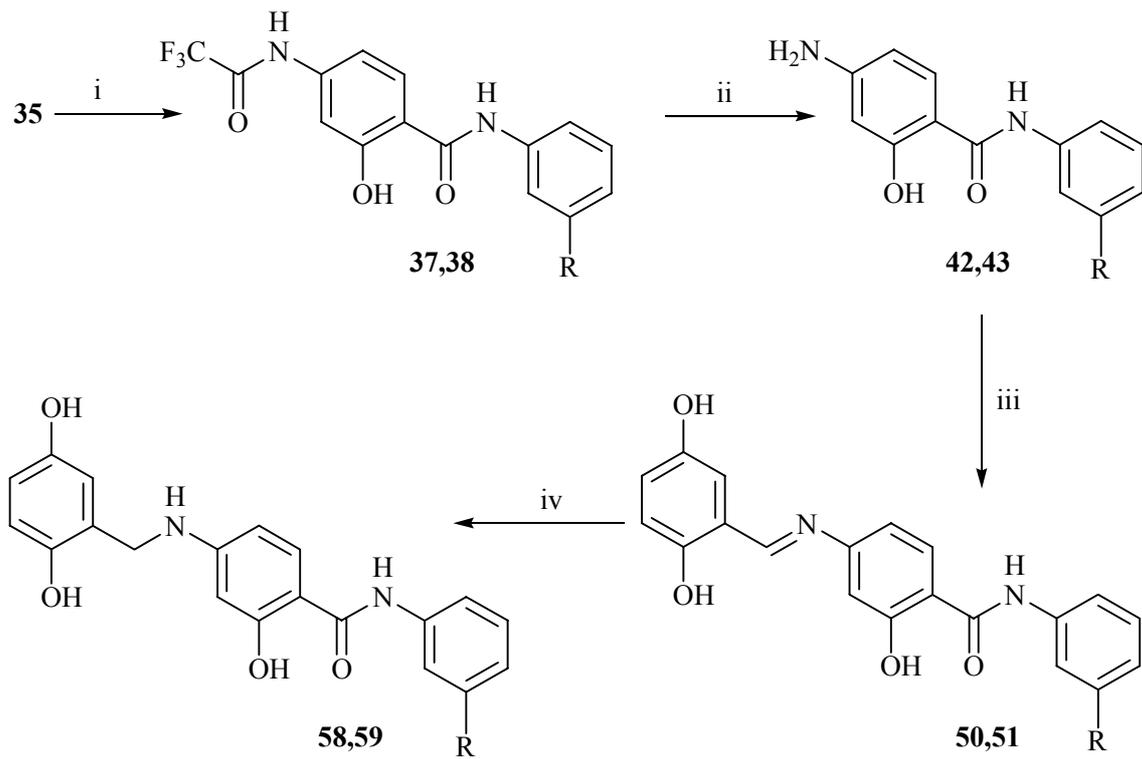
Die Salicylsäure liegt durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der phenolischen OH-Gruppe und dem Carbonyl-Sauerstoff als intramolekulares Chelat vor. Dadurch ist der Angriff des Trifluoressigsäureanhydrids an der phenolischen Hydroxy-Funktion erschwert. Eventuell wird deshalb primär die Amino-Gruppe acyliert.

Durch den starken Elektronen-ziehenden Effekt der Trifluoracetyl-amino-Gruppe wiederum kommt es zu einer weiteren Acidifizierung der phenolischen Hydroxy-Funktion und damit zu einer Stabilisierung des intramolekularen Chelates, so dass die Veresterung der OH-Gruppe verhindert wird.

Unter diesen Umständen sollte es auch nicht zu einer Selbstveresterung kommen. Deshalb wird als nächstes versucht, das Säurechlorid der mono-trifluoracetylierten Verbindung **35** herzustellen und dieses mit 3-Chloranilin umzusetzen. Man erhält dabei das gewünschte Salicylanilid **37** in guten Ausbeuten. Analog erhält man durch Umsetzung mit 3-Bromanilin die Verbindung **38**.

Um als nächstes die 2,5-Dihydroxybenzyl-Seitenkette einzuführen, muss zunächst die Schutzgruppe abgespalten werden. Dies gelingt leicht durch Erhitzen von **37** und **38** in methanolischer Kaliumcarbonatlösung, wobei die gewünschten Verbindungen **42** und **43** erhalten werden [132].

Diese werden anschließend mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd zu den Imino-Verbindungen **50** und **51** weiter umgesetzt, die durch Umsetzung mit Borandimethylamin-Komplex zu den angestrebten Aminen **58** und **59** reduziert werden können (Bild 74).



**37,42,50,58:** R = Cl

**38,43,51,59:** R = Br

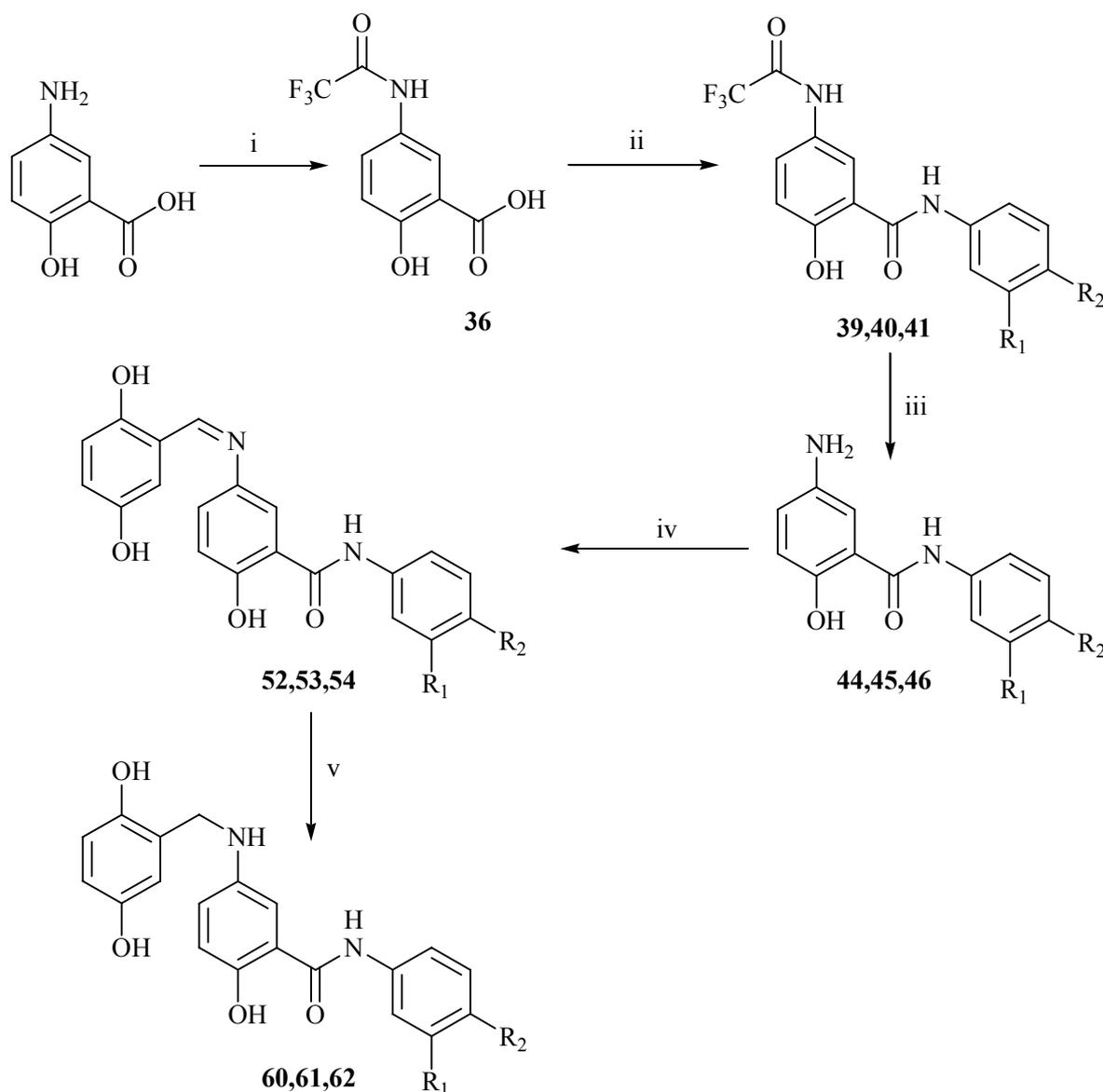
i) Thionylchlorid,  $\Delta T$ ; dann 3-Chlor- bzw. 3-Bromanilin, Dioxan,  $\Delta T$ ; ii) methanolische Kaliumcarbonatlösung,  $\Delta T$ ; iii) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig,  $\Delta T$ ; iv) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

**Bild 74:** Herstellung von 58 und 59

### 3.4.3.2 Herstellung von *N*-(3-Chlorphenyl)-, *N*-(3-Bromphenyl)- und *N*-(3-Chlor-4-fluor)- 5-(2,5-dihydroxy-benzylamino)-2-hydroxybenzamid (60-62)

Nach demselben Synthesepinzip, nach dem die Verbindungen **58** und **59** erhalten wurden, erfolgt nun die Herstellung der Anilide **60** bis **62**. Die Reaktionsfolge ist im Bild 75 dargestellt.

In dieser Reihe erfolgt zusätzlich die Herstellung der *N*-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-Verbindung **62**.



**39,44,52,60:** R<sub>1</sub> = Cl; R<sub>2</sub> = H

**40,45,53,61:** R<sub>1</sub> = Br; R<sub>2</sub> = H

**41,46,54,62:** R<sub>1</sub> = Cl; R<sub>2</sub> = F

i) Trifluoressigsäureanhydrid, abs. Dioxan, RT; ii) Thionylchlorid, ΔT, dann 3-Chlor-, 3-Brom- bzw. 3-Chlor-4-fluoranilin, Dioxan, ΔT; iii) methanolische Kaliumcarbonatlösung, ΔT; iv) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig, ΔT; v) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

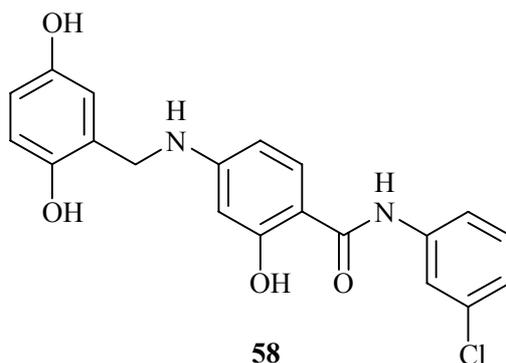
**Bild 75:** Herstellung von **60**, **61** und **62**

Auch hier startet die Synthese mit der 5-Aminosalicylsäure, aus der das monoacetylgeschützte Derivat **36** hergestellt wird. Dieses wird nach Überführung in das Säurechlorid mit 3-Chlor-, 3-Brom- bzw. 3-Chlor-4-fluoranilin zu den Aniliden **39** bis **41** umgesetzt.

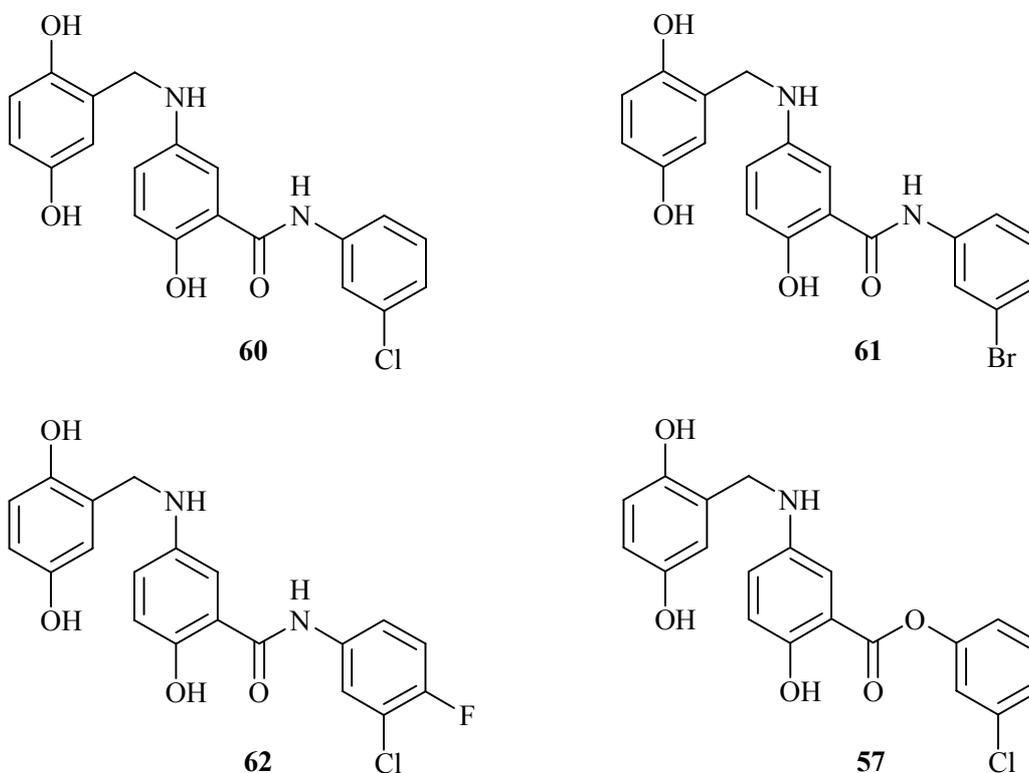
Nach Abspaltung der Schutzgruppe erhält man daraus die primären aromatischen Amino-Verbindungen **44** bis **46**. Diese werden mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd zu den Schiff'schen Basen **52** bis **54** weiter umgesetzt, die nachfolgend zu den Wunschverbindungen **60** bis **62** reduziert werden (Bild 75).

### 3.4.4 EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der Salicylanilide mit 2,5-Dihydroxybenzylamino-Substitution

Die nachfolgend abgebildeten Salicylsäure-Derivate mit Lavendustin A-Teilstruktur **57**, **58** und **60** bis **62** wurden auf ihre *in-vitro*-EGFR-TK-inhibitorische Aktivität hin getestet (Abschnitt 4.4.2, Methode B). Die Ergebnisse dokumentiert die Tabelle 5.



**Bild 76:** Auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestetes 4-(2,5-dihydroxybenzylamino)-salicylanilid **58**



**Bild 77:** Auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestete 5-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-salicylsäure-Derivate **57**, **60** bis **62**

Verbindung	<b>58</b>	<b>60</b>	<b>61</b>	<b>62</b>	<b>57</b>
EGFR-TK-inhibitorische Aktivitätin % (c = 10 µM)	83	88	90	96	74

**Tabelle 5:** EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der Salicylsäure-Derivate mit Lavendustin A-Teilstruktur

Alle getesteten Verbindungen (Bild 76, Bild 77) führen in einer Konzentration von jeweils 10 µM zu einer nahezu vollständigen Inhibition der EGFR-TK (Tabelle 5), was bedeutet, dass die IC<sub>50</sub>-Werte im mindestens mikromolaren Bereich liegen dürften.

Diese Annahme konnte durch eine Nachtestung von **61** in einer Konzentration von 0.1 µM bestätigt werden, wobei eine inhibitorische Aktivität von 42 Prozent festgestellt wurde. Damit besitzt Verbindung **61** eine durchaus bemerkenswerte inhibitorische Aktivität.

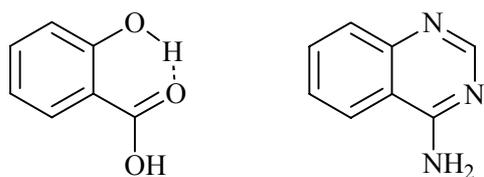
Die IC<sub>50</sub>-Werte der zuvor getesteten Anilide **25** und **26** liegen näherungsweise bei 10 µM. Damit führt die Einführung des 2,5-Dihydroxybenzylrestes zu einer nahezu hundertfachen Wirkungssteigerung.

Interessant ist, dass alle Substanzen die gleiche inhibitorische Aktivität zeigen, unabhängig davon, ob es sich um die 4- oder 5-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-Verbindungen handelt und welche Halogen-Substitution vorhanden ist.

Da keine echten IC<sub>50</sub>-Werte vorliegen, können die Aktivitäten nicht mit denen von bereits veröffentlichten Lavendustin A-verwandten Verbindungen verglichen werden. Interessant wäre aber besonders ein Vergleich des von *Chen et al.* veröffentlichten Phenylesters **C1** (IC<sub>50</sub> = 0.07 µM) [126] des Lavendustin A-Pharmakophors mit dem Ester **57**, um den Einfluss des 3-Chlor-Substituenten abzuklären.

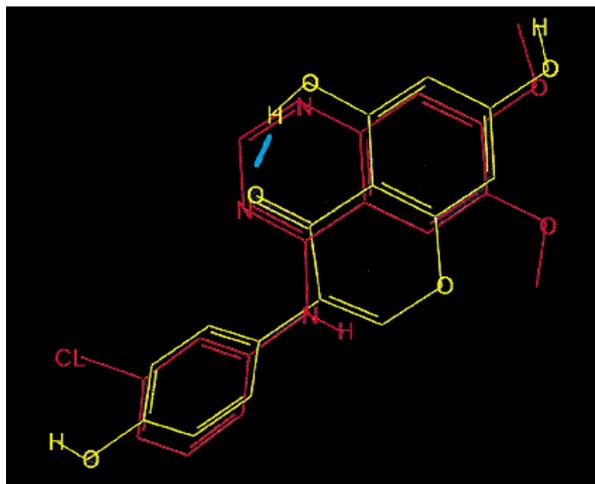
Zum Bindungsmodell können keine sicheren Angaben gemacht werden. Da die Verbindungen aber in überwiegenden Maße mit der *Traxler*-Konzeption in Einklang gebracht werden können, handelt es sich wahrscheinlich um kompetitive ATP-Antagonisten.

Nach *Traxler* ist der durch die Wasserstoffbrücke zwischen der Carbonyl- und der Hydroxy-Gruppe der Salicylsäure ausgebildete 6-Ring bioisoster zum Pyrimidinring [133]. Damit kann die Salicylsäure als ein Bioisoster des 4-Aminochinazolins aufgefasst werden (Bild 78, Bild 79).



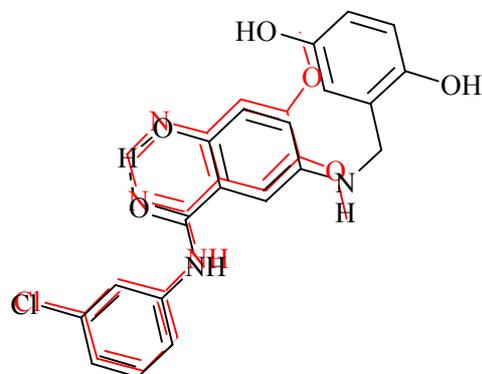
Demzufolge kommt auch ein für 4-Anilinochinazoline postuliertes Bindungsmodell für die oben aufgeführten Verbindungen **57**, **58** und **60** bis **62** in Frage.

**Bild 78:** Salicylsäure und 4-Aminochinazolin



**Bild 79:** Der Chinazolinring des 4-(3-Chlorphenyl-amino)-6,7-dimethoxychinazolins (Parke-Davis, Zeneca, rot) und das Salicylsäure-Element des 3'-Chlor-4,7-dihydroxyisoflavons (Traxler, gelb) als Bioisostere nach Traxler [116]

Im Bild 80 ist schlussfolgernd daraus dargestellt, wie Verbindung **60** - als Beispiel für die Salicylanilide mit 5-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-Substitution - mit einem 4-Anilinochinazolin zur Deckung gebracht werden kann.

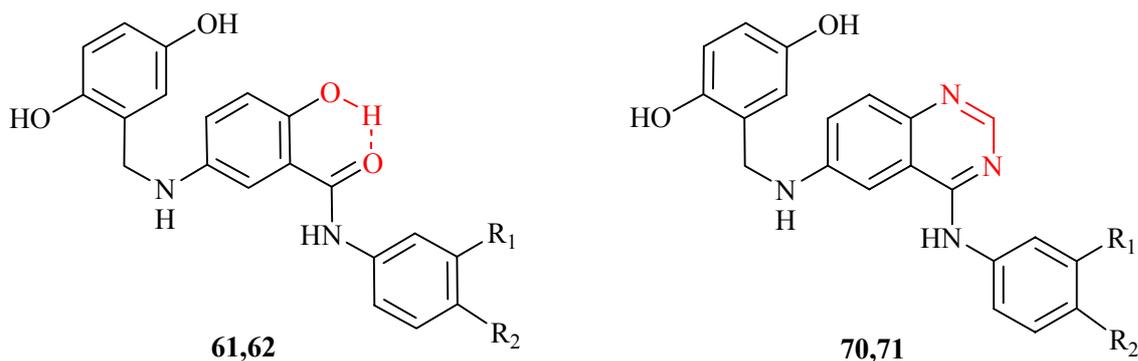


**Bild 80:** Die Verbindung **60** (schwarz) und das 4-(3-Chlorphenylamino)-6,7-dimethoxychinazolin (rot) überlagert dargestellt

Deshalb bietet sich an, im weiteren Verlauf der Untersuchungen eine Wirkstoffoptimierung in dem Sinne voranzutreiben, dass der Salicylsäure-Anteil des Lavendustin A - Pharmakophors in der bioisosteren 4-Aminochinazolin-Form fixiert wird.

### 3.5 4-Anilinochinazoline mit Lavendustin A-Teilstruktur

Durch einen Einbau der Salicylsäure-Teilstruktur der zuvor hergestellten Lavendustin A-Derivate **61** und **62** in einen Chinazolin-Ring resultieren Verbindungen, die als 4-Anilinochinazoline mit einem 6-Dihydroxybenzylamino-Substituenten zu formulieren sind (Bild 81).



**61,70:** R<sub>1</sub>=Br, R<sub>2</sub>=H

**62,71:** R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=F

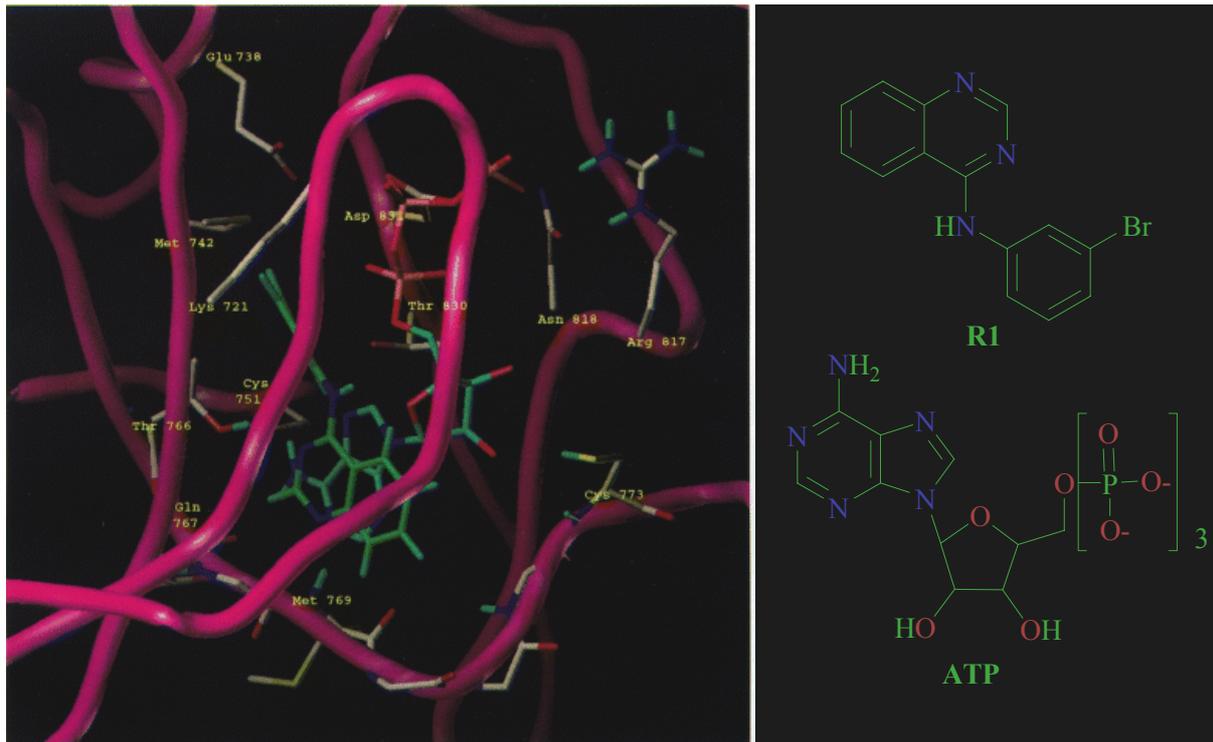
**Bild 81:** Die Verbindungen **61** und **62** und die durch Fixierung der Salicylsäure-Teilstruktur daraus resultierenden 4-Anilinochinazoline **70** und **71**

Bereits Anfang der 1990er Jahre entdeckte man die potente EGFR-TK-inhibitorische Wirkung von Verbindungen mit 4-Anilinochinazolin-Grundstruktur [134,135].

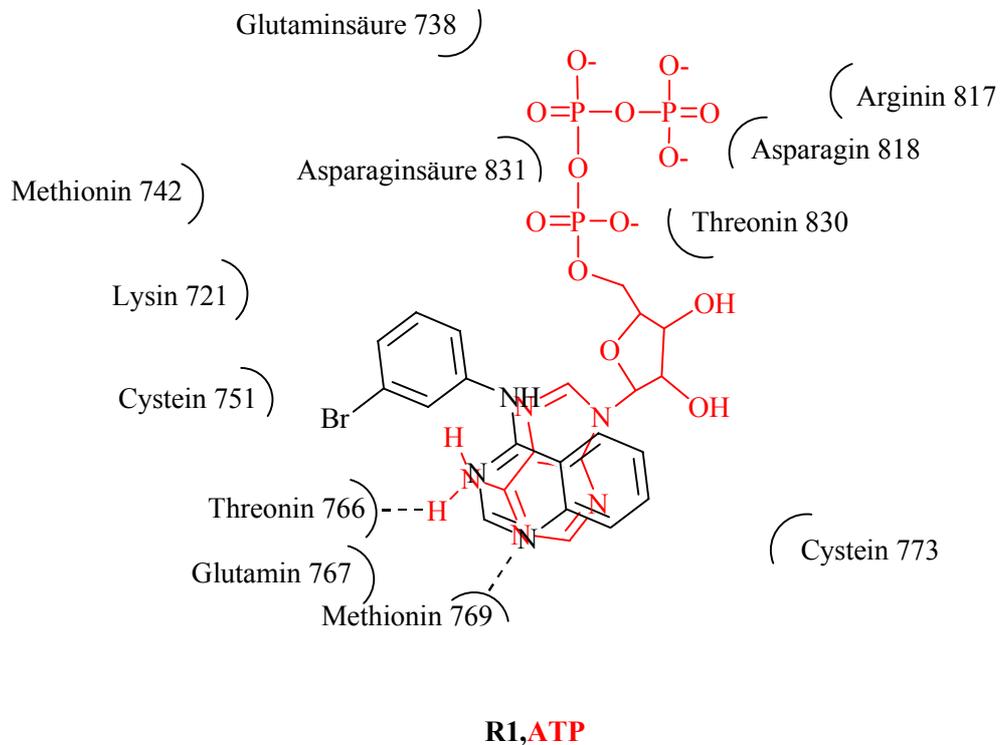
Seitdem werden zahlreiche Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen und zur Aufklärung des Wirkmechanismus unternommen. Es gilt als gesichert, dass es sich bei den 4-Anilinochinazolinen um kompetitive ATP-Antagonisten handelt [134].

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Verbindungen vom Isoflavon-Typ nach *Traxler* und dem Lavendustin A hemmen Verbindungen dieses Typs die EGFR-TK auch in Zellkulturen.

Bild 82 zeigt das von *Palmer et al.* postulierte Bindungsmodell für 4-Anilinochinazoline in der ATP-Bindungstasche der EGFR-TK am Beispiel des *N*<sup>4</sup>-(3-Bromphenyl)-chinazolin-4-ylamins (Verbindung **R1**) [136].



**Bild 82:** Das 4-Anilinochinazolin **R1** und **ATP** in der Bindungstasche der EGFR-TK nach Palmer et al. [136]



**Bild 83:** Schematische Darstellung des von Palmer et al. für 4-Anilinochinazoline postulierten Bindungsmodells, zum Vergleich ist zusätzlich ATP dargestellt

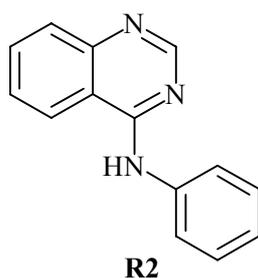
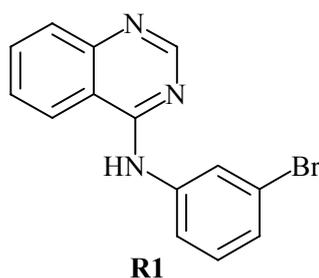
Im Bild 81 ist dieses Bindungsmodell noch einmal schematisch dargestellt. Demnach kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem N1 des Chinazolins und Methionin 769 und dem N3 des Chinazolins und Threonin 766.

Der 3-Bromphenylamino-Rest befindet sich in einem Bereich der Bindungstasche, die durch ATP nicht besetzt wird. Hier sind spezifische Wechselwirkungen zwischen diesem Phenylrest und Schwefelatomen der Aminosäuren Methionin 742 und Cystein 751 möglich.

Des Weiteren ist eine „Zuckertasche“ vorhanden, in der sich der Ribosetriphosphat-Rest des ATP's befindet. Diese Tasche kann von 6-und/oder 7-Substituenten am Chinazolinring ausgefüllt werden (Bild 82, Bild 83).

Tatsächlich führen Substitutionen in den Positionen 6 und 7 des Chinazolin-Rings zu einer Wirkungssteigerung, besonders wenn es sich dabei um Elektronen-Donatoren handelt.

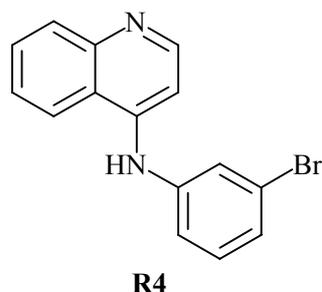
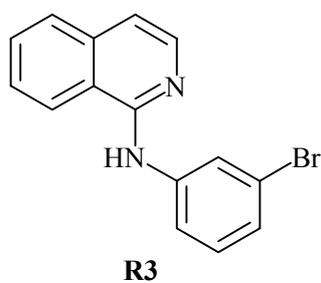
Auf die wichtigsten Struktur-Wirkungs-Beziehungen nach *Rewcastle et al.* soll nun kurz eingegangen werden [137]. Das unsubstituierte 4-Anilinochinazolin **R2** (Bild 84) hemmt die EGFR-TK mit einer  $IC_{50}$  von 344 nM, durch die Einführung eines 3'-Brom-Substituenten erhält man die um das zehnfache stärker wirksame Verbindung **R1** (Bild 84) mit einer  $IC_{50}$



von 27 nM. Allgemein wird durch die Einführung Elektronen-ziehender Substituenten in die 4-Phenylamino-Seitenkette eine Wirkungssteigerung erreicht.

**Bild 84:** 4-(3-Bromanilino)-chinazolin (**R1**) und 4-Anilinochinazolin (**R2**) nach *Rewcastle et al.*

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Chinazolin-Grundkörpers gegen Isochinolin bzw. Chinolin zu einem starken Aktivitätsverlust führt. So haben die



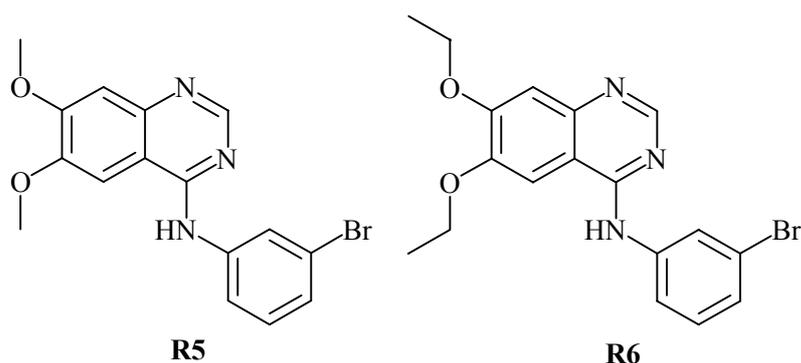
resultierenden Verbindungen **R3** und **R4** (Bild 85)  $IC_{50}$ -Werte von  $\geq 100 \mu\text{M}$  bzw.  $5.5 \mu\text{M}$ . Dabei führt der Austausch des N1 des Chinazolin-Rings durch CH zu einem ungleich stärkeren Wirkungsverlust.

**Bild 85:** Isochinolin-Derivat **R3** und Chinolin-Derivat **R4** nach *Rewcastle et al.*

Auch der Austausch des Chinazolin-Grundkörpers gegen die isomeren Heterozyklen Cinnolin, Phthalazin und Chinoxalin hat einen Wirkungsverlust zur Folge [137].

Des Weiteren ist festgestellt worden, dass die Einführung eines 4-Benzylamino-Restes eine Aktivitätseinbuße zur Folge hat [137].

Wie bereits kurz erwähnt, wirkt sich die Einführung von 6- und/oder 7-Substituenten in das Chinazolin-Ringsystem auf die inhibitorische Aktivität steigernd aus. Als Beispiele dafür sind das 6,7-Dimethoxy- und das 6,7-Diethoxy-Derivat des 4-(3-Bromphenyl-amino)-chinazolins

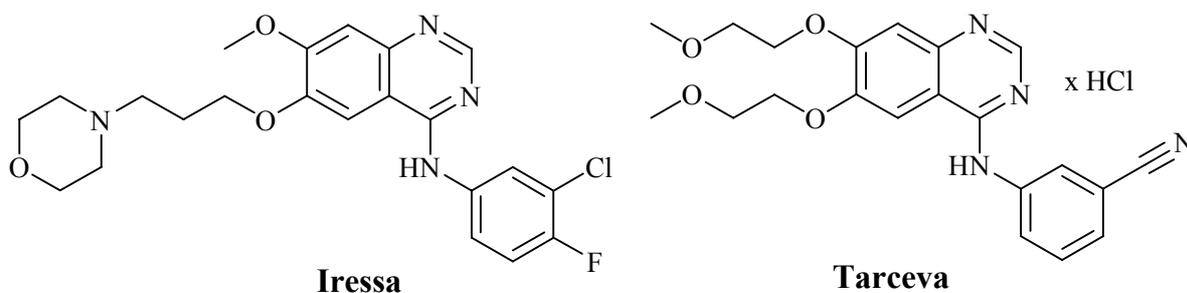


in Bild 86 dargestellt. Die  $IC_{50}$ -Werte betragen nach *Rewcastle et al.* für die Dimethoxy-Verbindung **R5** 0.029 nM und 0.006 nM für die entsprechende Diethoxy-Verbindung **R6** [138].

**Bild 86:** 4-Anilinochinazoline mit 6,7-Dimethoxy-(**R5**) bzw. 6,7-Diethoxy-(**R6**)-Substitution nach *Rewcastle et al.*

Beispiele für Verbindungen vom 4-Anilinochinazolin-Typ, die sich bereits in späten Phasen klinischer Studien befinden, sind die im Bild 87 dargestellten Verbindungen Iressa® (Gefitinib, AstraZeneca) und Tarceva® (Erlotinib, OSI Pharmaceuticals, Genetech und Hoffmann-La Roche AG) [139,140].

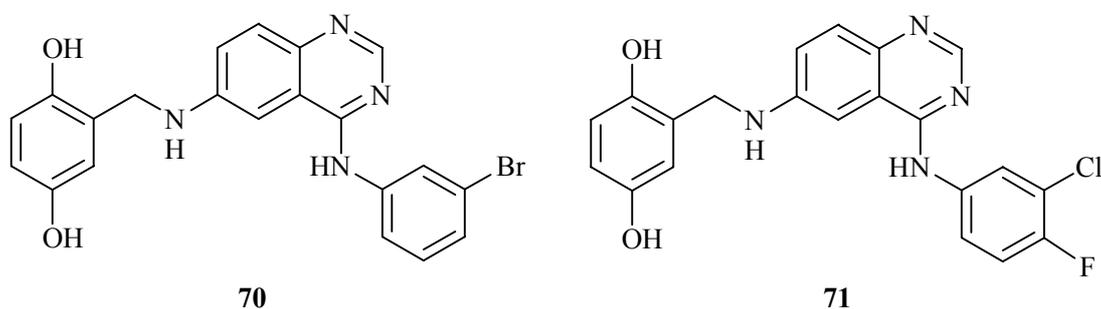
Diese Substanzen hemmen die EGFR-TK selektiv und reversibel. Die  $IC_{50}$ -Werte für die Inhibition der isolierten EGFR-TK betragen 20 nM für Iressa [141] und 17 nM für Tarceva [142]. Auch in intakten Zellen wird die EGFR-TK durch beide Substanzen mit  $IC_{50}$ -Werten im nanomolaren Bereich gehemmt [143,144].



**Bild 87:** Die 4-Anilinochinazoline Iressa® und Tarceva®

Iressa und Tarceva sind peroral verfügbar. Beide Substanzen sind für den Einsatz in der Krebstherapie in Kombination mit herkömmlichen Zytostatika und Strahlentherapie vorgesehen [139,140].

Aufgrund dieser Befunde sollen nun Verbindungen hergestellt werden, in denen die zuvor hergestellten 5-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-salicylanilide **61** und **62** in der 4-Anilinochinazolin-Form fixiert vorliegen. Dadurch erhofft man sich eine weitere Steigerung der inhibitorischen Aktivitäten im Vergleich mit den hergestellten „offenkettigen“ Verbindungen.



**Bild 88:** Die geplanten 4-Anilinochinazoline **70** und **71**

Als Elektronen-ziehende Substituenten im 4-Phenylamino-Rest sind zum einen Brom, zum anderen Chlor und Fluor vorgesehen.

Der Dihydroxybenzylamino-Rest in den gewünschten Verbindungen **70** und **71** befindet sich jeweils in Position 6 des Chinazolin-Gerüsts. Wie bereits geschildert, wirkt sich ein Substituent in dieser Position auf die EGFR-TK-inhibitorische Aktivität positiv aus, insbesondere wenn es sich, wie in diesem Fall, um einen Elektronen-Donator handelt.

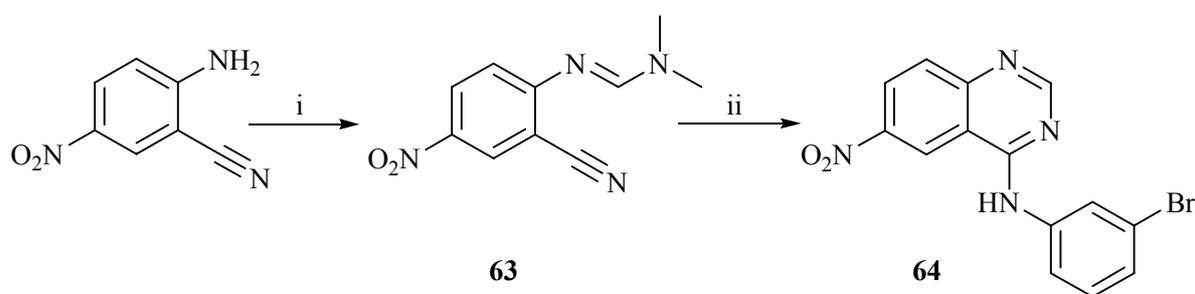
Des Weiteren sollten sich diese Verbindungen durch eine gute Penetrationsfähigkeit in die Zelle auszeichnen, was für eine EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in Zellkulturen Voraussetzung ist, da sich die TK an der zytoplasmatischen Domäne des EGFR's befindet.

### 3.5.1 Herstellung von 2-{-4-(3-Bromphenylamino)-chinazolin-6-yl-amino}-methyl}-benzen-1,4-diol (70)

Zur Herstellung der Wunschverbindung **70** wird zunächst das entsprechende 4-Anilinochinazolin **64** mit einer 6-Nitro-Substitution hergestellt (Bild 89).

Dazu geht man vom 2-Cyano-4-nitroanilin aus, das mit *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal zum Amidin **63** kondensiert wird.

Durch anschließendes Erhitzen von **63** mit 3-Bromanilin in Essigsäure erhält man unter Ringschluss und gleichzeitigem Einbau des 4-Anilino-Substituenten die Verbindung **64** [145].



i) *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal,  $\Delta T$ ; ii) 3-Bromanilin, Essigsäure,  $\Delta T$

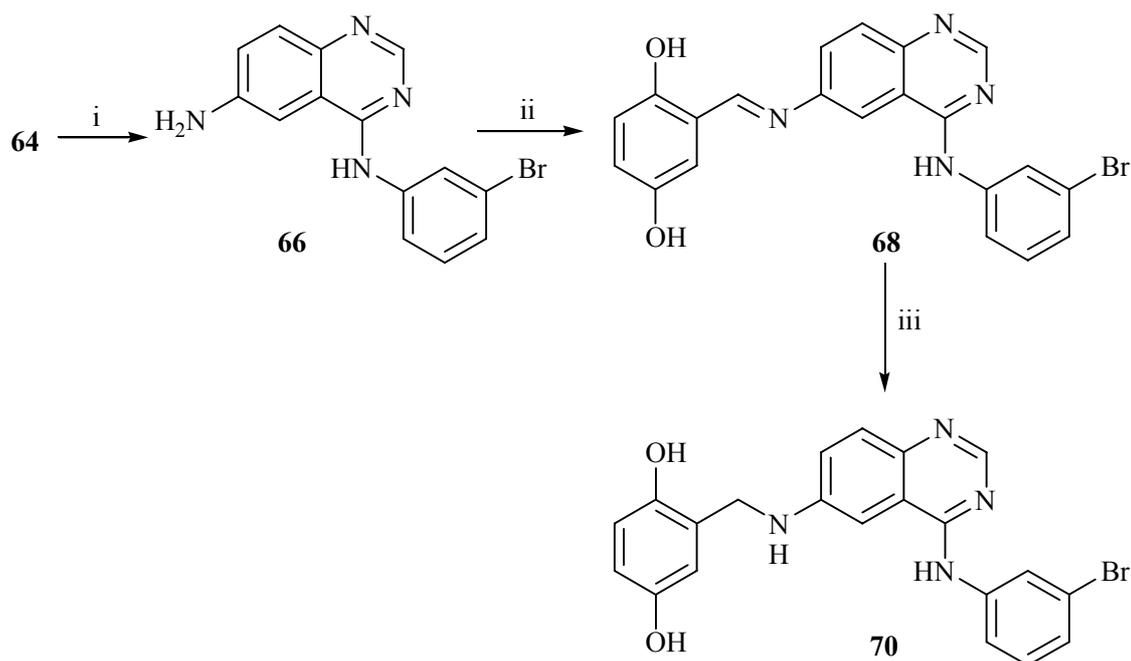
#### Bild 89: Herstellung von **64**

Durch Reduktion der Nitro-Gruppe mit Eisen gelangt man zur 6-Amino-Verbindung **66**.

Der Einbau des Dihydroxybenzyl-Substituenten erfolgt dann durch rückfließendes Erhitzen des Amins **66** mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd in einer Mischung aus gleichen Teilen Ethanol und Eisessig. Man erhält die gewünschte Schiff'sche Base **68** in guten Ausbeuten.

Durch Reduktion der Imino-Funktion von Verbindung **68** mit Borandimethylamin-Komplex in Eisessig gelangt man schließlich zur Wunschverbindung **70** (Bild 90).

Zu deren Isolierung wird die Mischung auf Eis gegossen und mit verdünnter Natriumhydroxidlösung neutralisiert. Dabei fällt die Wunschverbindung **70** aus und kann abgetrennt werden. Diese wird jedoch nicht analysenrein erhalten, obwohl dünnschichtchromatographisch keine Verunreinigungen nachweisbar sind. Die Identität der Verunreinigung kann nicht zweifelsfrei geklärt werden.



i) Eisenspäne, Ethanol/Essigsäure,  $\Delta T$ ; ii) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig,  $\Delta T$ ; iii) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

**Bild 90:** Herstellung von 70

Eine Vermutung ist, dass die Wunschverbindung das aus dem eingesetzten Reduktionsmittel stammende Dimethylamin eingeschlossen hat.

Zum anderen wird während der Aufarbeitung im wässrigen Milieu der Borandimethylamin-Komplex hydrolysiert. Das könnte auch zur Folge haben, dass eine Einlagerung von Borsäure stattfindet. Allerdings lässt sich Bor nicht im isolierten Rohprodukt nachweisen.

Für eine Einlagerung von Dimethylamin sprechen jedoch signifikante Signale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. So zeigt das Spektrum des Rohproduktes ein Signal bei 2 ppm, das der Struktur des Bromanilino-Derivates 70 nicht zugeordnet werden kann. Dabei kann es sich um die Methyl-Gruppen des Dimethylamins handeln.

Eine säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes ist wegen der Schwerlöslichkeit der Verbindung in dazu geeigneten unpolaren Lösungsmitteln nicht möglich.

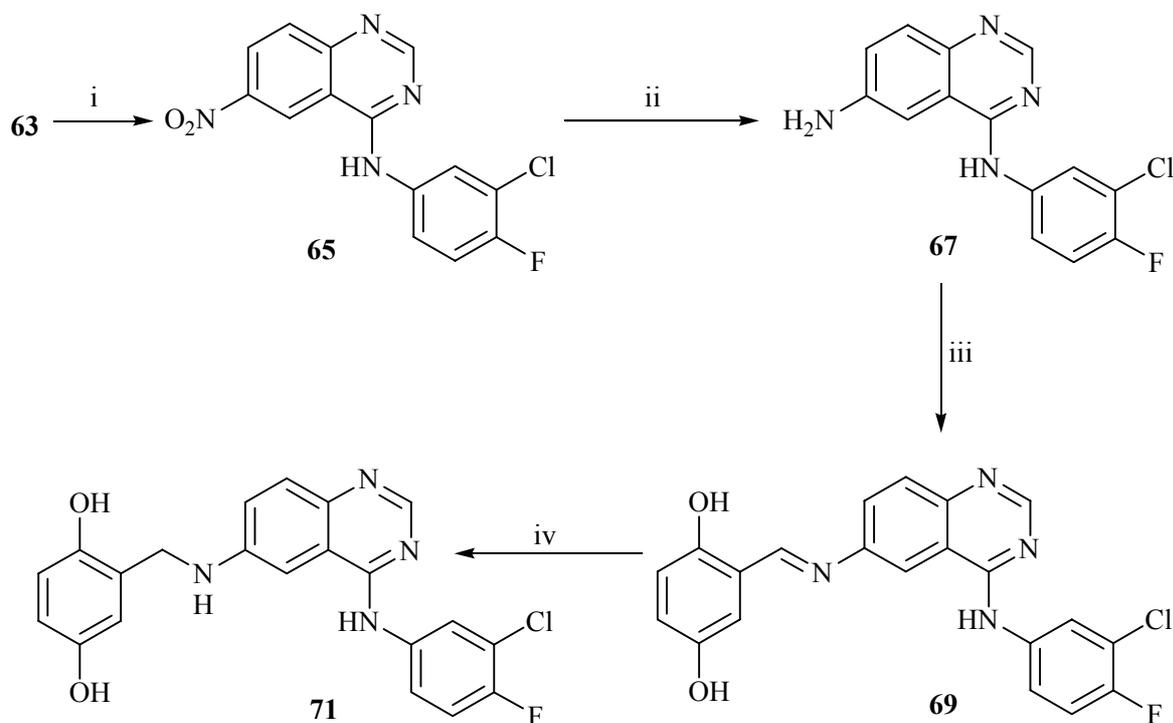
Die Aufreinigung gelingt jedoch, indem das Rohprodukt in einer Mischung aus neun Teilen Dichlormethan und einem Teil Methanol kurz rückfließend erhitzt wird und der verbleibende Rückstand aus der noch heißen Mischung abgetrennt wird.

### 3.5.2 Herstellung von 2-{-4-(3-Chlor-4-fluorphenylamino)-chinazolin-6-yl-amino]-methyl}-benzen-1,4-diol (71)

Die Herstellung der Chlor-fluoranilino-Verbindung **71** erfolgt analog der unter 3.5.1 beschriebenen Synthese des entsprechenden Bromanilino-Derivates **70**.

Dazu wird jetzt das Amidin **63** mit 3-Chlor-4-fluoranilin zur Verbindung **65** umgesetzt. Die anschließende Reduktion des 6-Nitro-4-anilinochinazolins **65** mit Eisen zur entsprechenden 6-Amino-Verbindung **67** gelingt auch in diesem Fall problemlos.

Durch Kondensation des primären aromatischenamins mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd gelangt man auch hier zur Schiff'schen Base **69**. Die nachfolgende Reduktion des Imins **69** ergibt die angestrebte Verbindung **71**.



i) 3-Chlor-4-fluoranilin, Eisessig,  $\Delta T$ ; ii) Eisenspäne, Ethanol/Essigsäure,  $\Delta T$ ; iii) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig,  $\Delta T$ ; iv) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

#### Bild 91: Herstellung von 71

Während der letzten beiden Schritte wird eine interessante Beobachtung gemacht.

Zur Aufreinigung der Schiff'schen Base **69** wird eine Säulenchromatographie mit dem Fließmittelgemisch Ethylacetat/n-Hexan durchgeführt. Da **69** in diesen unpolaren

Lösungsmitteln jedoch sehr schwer löslich ist, wird sie dazu in wenig Dimethylformamid angelöst, mit etwas Eluierungsmittel aufgefüllt und anschließend auf die Säule aufgetragen.

Das nach der Säulenchromatographie aufgenommene  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der isolierten Substanz in Dimethylsulfoxid zeigt zusätzliche Signale bei 7.95 (1H), 2.92 und 2.76 ppm (jeweils 3H), die eindeutig dem Dimethylformamid zugeordnet werden können. Das Verhältnis Dimethylformamid : Verbindung **69** beträgt dabei 1 : 1. Dieser Befund ist ein Beweis dafür, dass die Verbindung **69** mit eingeschlossenem Dimethylformamid erhalten wird.

Trotz dieses Lösungsmiteleinschlusses wird anschließend die Reduktion mit Borandimethylamin-Komplex durchgeführt. Interessanterweise bleibt der Einschluss dabei erhalten.

Man erhält auf Anhieb ein analysenreines Gemisch aus äquimolaren Mengen der Wunschverbindung **71**, Dimethylformamid und Wasser. Das kann wiederum durch die zusätzlichen Signale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sowie eine Elementaranalyse bewiesen werden.

Das eingeschlossene Dimethylformamid lässt sich aus Verbindung **71** entfernen, in dem das Gemisch im Achatmörser gemörsert wird und anschließend mehrere Tage im Vakuum bei 100 °C getrocknet wird.

Eine weitere Möglichkeit zur Entfernung des Dimethylformamid-Einschlusses besteht darin, die Substanz aus einer Ethanol - Petrolether - Mischung umzukristallisieren. Der Niederschlag wird im Achatmörser feinst verrieben und einige Tage bei 100 °C im Vakuum getrocknet.

In einem parallel durchgeführten Versuch wird die nachweislich einschlussfreie Schiff'sche Base **69** der Reduktion mit Borandimethylamin-Komplex unterzogen. Das dabei erhaltene Rohprodukt der Verbindung **71** wird in Dimethylsulfoxid angelöst, mit einer Mischung aus Ethylacetat und n-Hexan aufgefüllt und anschließend einer Säulenchromatographie unterzogen.

Bei dem dabei isolierten Produkt handelt es sich um ein analysenreines Gemisch äquimolarer Mengen der Wunschverbindung **71**, Dimethylsulfoxid und Wasser. Dies kann durch  $^1\text{H-NMR}$ - und Massen-Spektroskopie nachgewiesen werden. Eine zusätzlich durchgeführte Lasseigne-Probe auf Schwefel fällt positiv aus und liefert einen zusätzlichen Beweis für die Einlagerung von Dimethylsulfoxid.

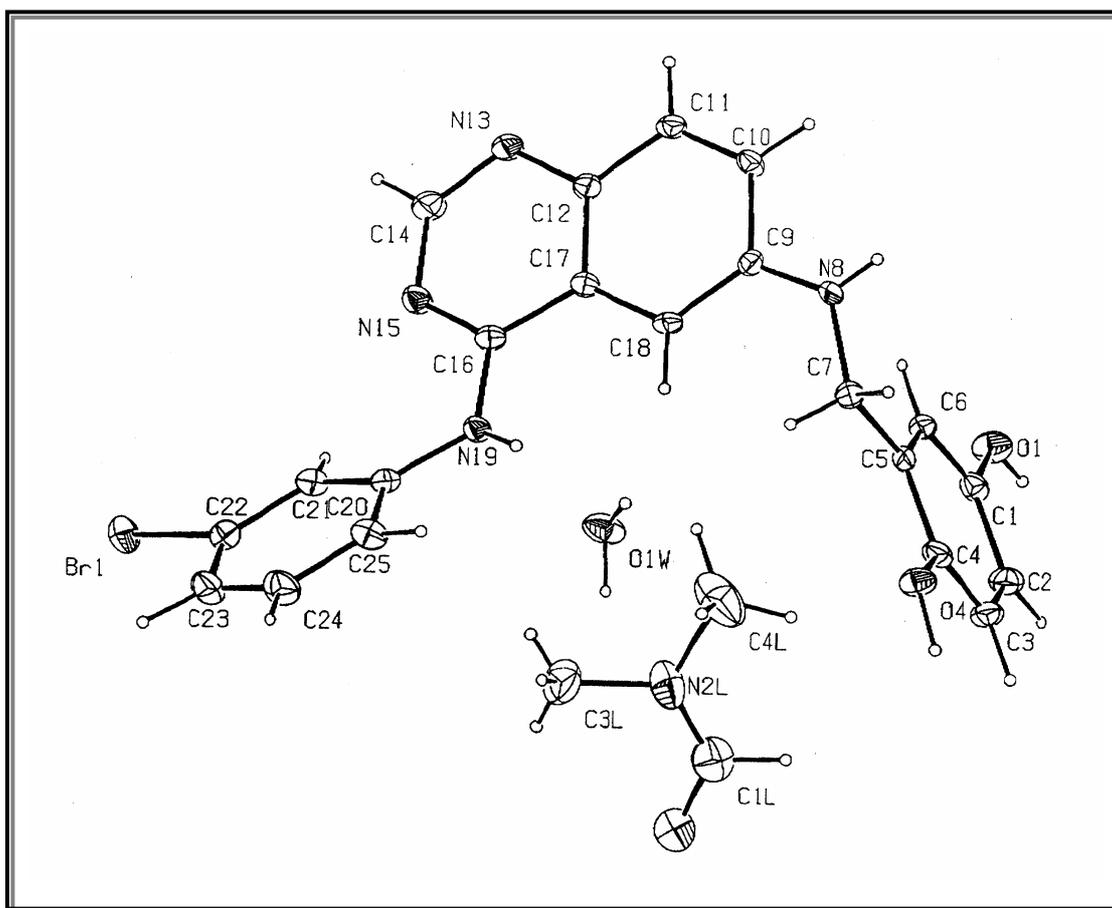
### 3.5.3 Eigenschaften der 4-Anilinochinazoline 70 und 71

Wie bereits während der Herstellung beobachtet wurde, neigen die 4-Anilinochinazoline mit 6-Dihydroxybenzylamino-Substitution **70** und **71**, aber auch ihre Vorstufen, die Schiff'schen Basen **68** und **69** dazu, polare Lösungsmittel, wie Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid und Wasser einzuschließen.

Dies kann durch eine Röntgenkristallaufnahme der Brom-Verbindung **70** zusätzlich bestätigt werden.

Die dazu benötigten Kristalle ausreichender Größe erhält man durch Umkristallisation der Verbindung **70** aus Dimethylformamid. Dabei ist entscheidend, dass **70** nicht wasserfrei ist.

Im Bild 92 ist die Struktur der Verbindung **70** dargestellt.



**Bild 92:** Röntgenkristallaufnahme von Verbindung **70**

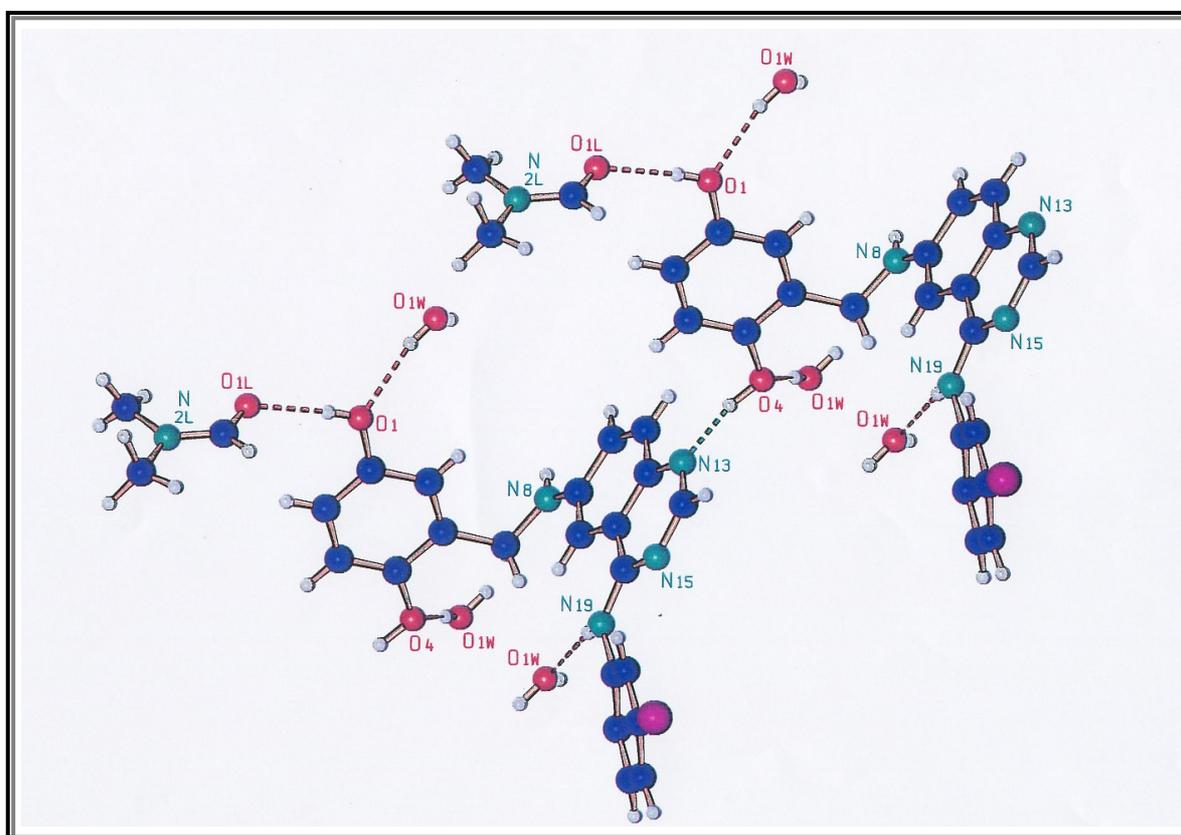
Hier wird deutlich und damit eindeutig bewiesen, dass das Molekül neben Wasser auch das zum Kristallisieren benutzte Dimethylformamid eingelagert hat.

Bild 93 zeigt einen Ausschnitt des vermessenen Kristalls.

Zunächst sind zwei Moleküle der Verbindung **70** über eine Wasserstoffbrücke zwischen dem N1 des Chinazolins (N13) des einen Moleküls und der OH-Gruppe am C1 des Dihydroxyphenyl-Restes (O4) des zweiten Moleküls verbunden.

Des Weiteren bildet jedes Molekül drei Wasserstoffbrücken zu insgesamt jeweils drei Wassermolekülen aus. Im Einzelnen werden diese jeweils von den Sauerstoffen der Hydroxy-Gruppen (O1, O4) und dem Proton der Amino-Gruppe der Anilino-Seitenkette (N19) ausgebildet.

Das Sauerstoffatom des Dimethylformamids (O1L) bildet eine Wasserstoffbrücke zur OH-Gruppe am C4 des Dihydroxyphenyl-Restes (O1) aus.



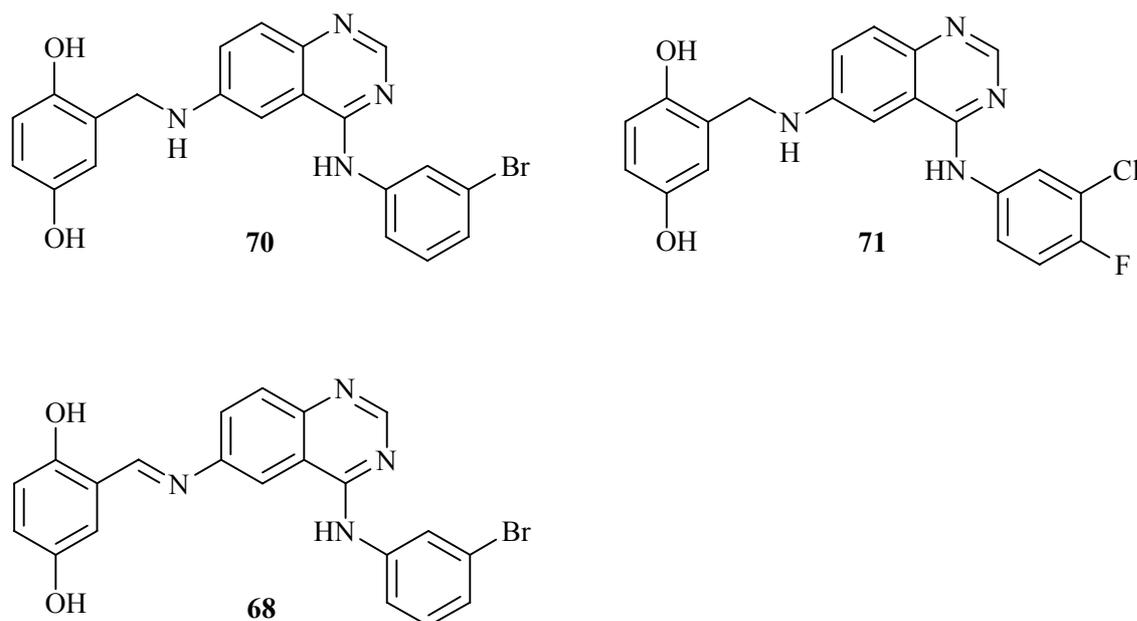
**Bild 93:** Ausschnitt eines Kristalls der Verbindung **70**

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

### 3.5.4 EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der 4-Anilinochinazoline 70 und 71

Bild 94 zeigt die auf ihre EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getesteten 4-Anilinochinazolin-Derivate (Abschnitt 4.4.2, Methode B). Die getesteten Verbindungen waren nachweislich Lösungsmittelschluss-frei.

In Tabelle 6 sind die Testergebnisse dokumentiert.



**Bild 94:** Die auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getesteten Chinazoline 68, 70 und 71

Verbindung	70		71		68	
Konzentration in $\mu\text{M}$	1	0.1	1	0.1	1	0.1
EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in %	65	45	71	22	58	Nicht getestet

**Tabelle 6:** EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der getesteten Chinazolin-Derivate

Zunächst wurden die inhibitorischen Aktivitäten der Dihydroxybenzylamino-substituierten Chinazolin-Derivate 70 und 71 in einer Konzentration von jeweils 1  $\mu\text{M}$  bestimmt, wobei das

Bromanilino-Derivat **70** eine inhibitorische Aktivität von 65 Prozent und das entsprechende Chlor-fluoranilino-Derivat **71** eine inhibitorische Aktivität von 71 Prozent zeigt.

Darüber hinaus wurden beide Substanzen in einer Konzentration von jeweils 0.1  $\mu\text{M}$  nachgetestet.

Das Bromanilino-Derivat **70** zeigt in dieser Konzentration noch immer eine nahezu 50-prozentige Inhibition der EGFR-TK. Das entsprechende Chlor-fluoranilino-Derivat **71** hemmt die EGFR-TK in dieser Konzentration jedoch nur noch zu 22 Prozent und zeigt damit eine etwas schwächere EGFR-TK-inhibitorische Aktivität.

Außerdem wurde das Dihydroxybenzylimino-Derivat **68** in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestet. Mit einer inhibitorischen Aktivität von 58 Prozent ist es in etwa gleich stark wirksam wie das entsprechende Amino-Derivat **70**.

Der Austausch des Dihydroxybenzylamino-Substituenten gegen einen entsprechenden Imino-Substituenten hat somit keinen deutlichen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität.

### 3.5.5 Zytotoxische Aktivitäten der 4-Anilinochinazoline 70 und 71

Zusätzlich zu den EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten sollen die zytotoxischen Aktivitäten der Verbindungen **70** und **71** bestimmt werden.

Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität stehen in unserem Fachbereich im Arbeitskreis von Prof. R. Gust zwei Brustkrebszelllinien zur Verfügung, zum einen die hormonabhängige Zelllinie MCF-7, zum anderen die hormonunabhängige Zelllinie MDA-MB<sub>231</sub>.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde die MCF-7-Zelllinie ausgewählt.

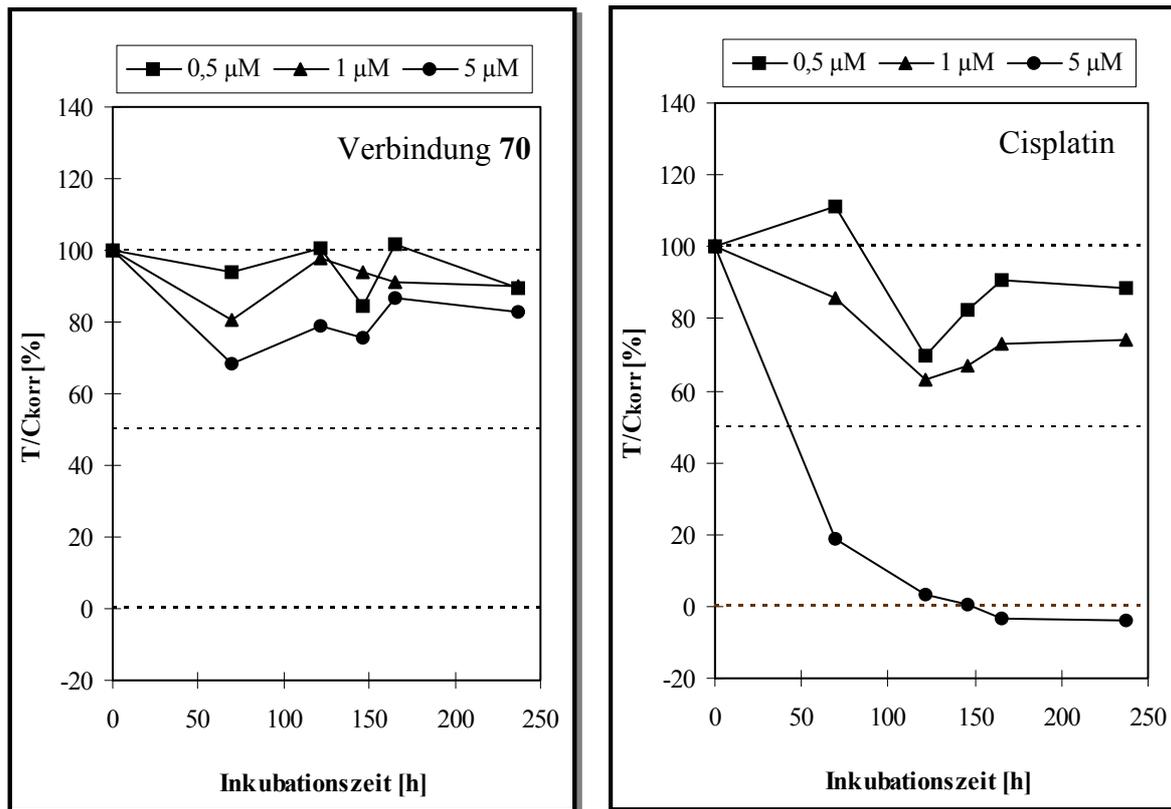
Die MCF-7-Zelllinie wird aufgrund ihres hohen Gehaltes an Estrogenrezeptoren als Estrogen-abhängig eingestuft [111].

Es ist bekannt, dass es zwischen Estrogen- und EGF-vermittelten Signalwegen zu Überschneidungen kommen kann, und dass Wachstumsfaktoren als Koaktivatoren des Estrogenrezeptors agieren können. Die dabei ablaufenden Prozesse sind bisher nicht in allen Einzelheiten geklärt [146].

MCF-7-Zellen exprimieren normale Level des HER2-Rezeptors (ErbB2). Die TK-Domäne des HER2-Rezeptors weist eine weitgehende Homologie zu der des EGFR's (HER1, ErbB1) auf. Durch Hemmung der TK werden wichtige Signalkaskaden, die u.a. zu Wachstum und Differenzierung der Zellen führen, unterbrochen. Des Weiteren kann dadurch aber eventuell auch die Koaktivierung des Estrogenrezeptors durch Wachstumsfaktoren unterbunden werden.

Die Summe all dieser Effekte müsste sich negativ auf das Wachstum der MCF-7-Zellen auswirken.

Die Durchführung der *In-vitro*-Zytotoxizitätstests an MCF-7-Zellen erfolgte im Arbeitskreis von Prof. R. Gust durch Frau S. Bergemann nach der im Abschnitt **4.4.1** beschriebenen Methode. Die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.



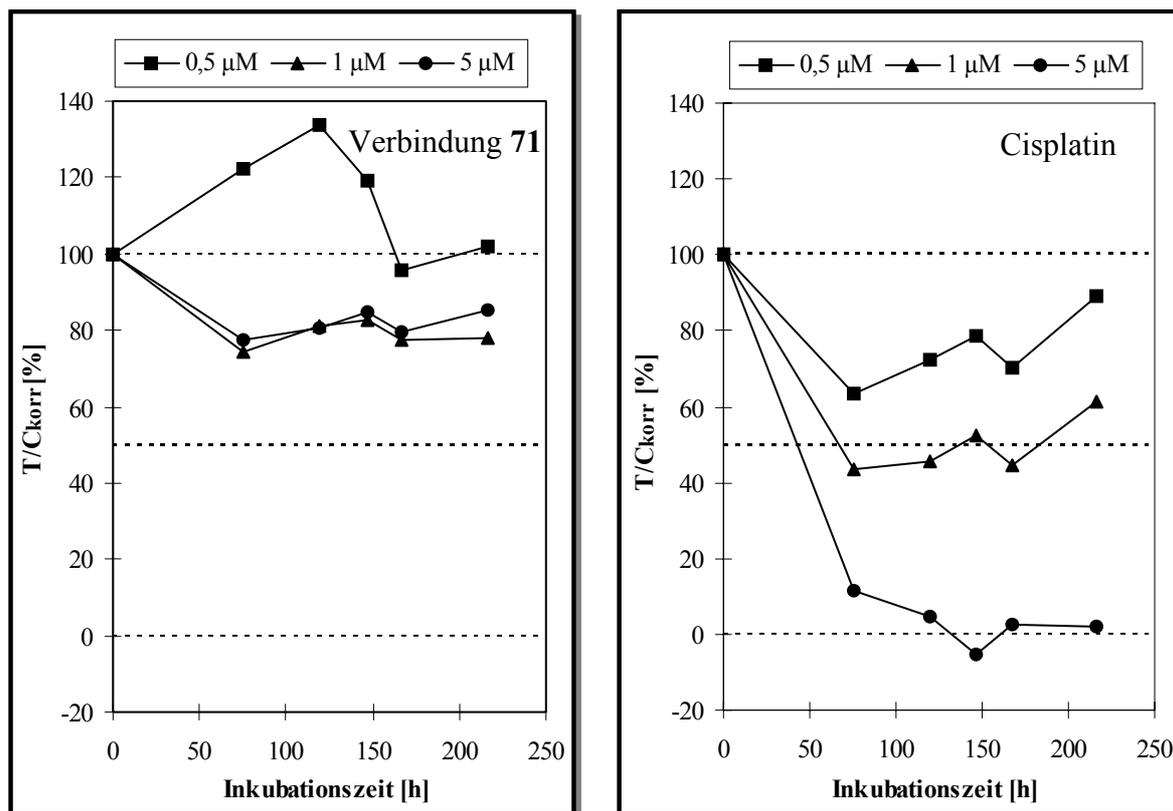
**Bild 95:** Effekte der Verbindung **70** auf das Wachstum von MCF-7-Zellen im Vergleich mit denen des Cisplatin im selben Testdurchlauf

Im Bild 95 (linkes Diagramm) ist der Effekt des 4-Anilinochinazolins **70** auf das Wachstum von MCF-7-Zellen graphisch dargestellt. Als Maß für die Zytotoxizität werden dabei die ermittelten T/C<sub>korrr</sub>-Werte [%] in Abhängigkeit von der Inkubationszeit [h] herangezogen. Dabei wurde **70** in drei verschiedenen Konzentrationen (0,5, 1 und 5 µM) getestet.

Zum Vergleich ist im Bild 95 (rechtes Diagramm) der im selben Testdurchlauf ermittelte zytotoxische Effekt des Cisplatin als T/C<sub>korrr</sub>[%]-Inkubationszeit[h]-Diagramm dargestellt.

Demnach zeigt Verbindung **70** im Vergleich mit Cisplatin nur schwache zytotoxische Effekte. Eine maximale Wachstumshemmung (T/C<sub>korrr</sub>-Wert von 70 Prozent) wird in einer Konzentration von 5 µM nach einer Inkubationsdauer von ca. 60 Stunden beobachtet. Das bedeutet, dass das Wachstum der MCF-7-Zellen um 30 Prozent gehemmt wird. Bei weiterer Inkubation steigt das Wachstum der MCF-7-Zellen wieder an (Toleranzentwicklung?).

Eine etwas schwächere Hemmung des Zellwachstums ist auch noch in einer Konzentration von 1 µM erkennbar, wobei der maximale Hemmeffekt mit einem T/C<sub>korrr</sub>-Wert von 80 Prozent nach ebenfalls ca. 60 Stunden erreicht wird. In der kleinsten getesteten Konzentration von 0,5 µM zeigt Verbindung **70** nahezu keine zytotoxischen Effekte.



**Bild 96:** Effekte der Verbindung 71 auf das Wachstum von MCF-7-Zellen im Vergleich mit denen des Cisplatin im selben Testdurchlauf

Im Bild 96 (linkes Diagramm) ist der Effekt des 4-Anilinochinazolins **71** auf das Wachstum von MCF-7-Zellen sowie der im selben Testdurchlauf für Cisplatin ermittelte Effekt (rechtes Diagramm) graphisch dargestellt.

Das Chlor-fluoranilino-Derivat **71** zeigt sowohl in einer Konzentration von 1 µM, als auch in einer Konzentration von 5 µM in etwa die gleichen hemmenden Effekte auf das Zellwachstum der MCF-7-Zellen. Der maximale Hemmeffekt ( $T/C_{\text{kor.}} = 75$  Prozent) wird nach 75 Stunden Inkubationsdauer beobachtet.

In einer Konzentration von 0.5 µM wird allerdings in den ersten 125 Stunden der Inkubation eine Stimulation des Zellwachstums beobachtet. Dieser unerwünschte Effekt müsste durch weitere Untersuchungen genauer geklärt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die beiden Substanzen **70** und **71** nur schwache zytotoxische Effekte gegenüber MCF-7-Zellen aufweisen. Im Vergleich dazu wurde für das 4-Anilinochinazolin Iressa® eine signifikante zytotoxische Wirkung auf MCF-7-Zellen nachgewiesen [147].

Wie bereits erwähnt, exprimiert die MCF-7-Zelllinie keine EGF-Rezeptoren (HER1), sondern nur normale Level des HER2-Rezeptors. Die Tyrosinkinase-Domäne des HER2-Rezeptors zeigt zwar eine weitgehende Homologie (82 %) zu der des EGF-Rezeptors HER1, eine Hemmung der HER2-TK durch **70** und **71** kann jedoch nicht mit Sicherheit angenommen werden. Somit könnten für die Hemmung des Wachstums von MCF-7-Zellen durch **70** und **71** auch andere Mechanismen als eine TK-Inhibition in Betracht kommen.

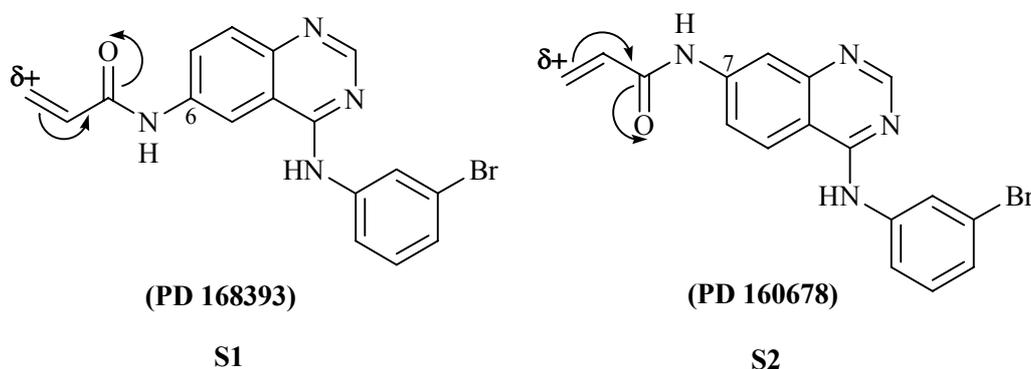
Weitergehende Untersuchungen zu den zytotoxischen Eigenschaften der Chinazoline **70** und **71** werden momentan im National Cancer Institute, Bethesda, Maryland (USA) durchgeführt. Im Rahmen eines „Prä-Screenings“ ist dabei auch ein *In-vitro*-Test an der A431-Zelllinie vorgesehen. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine Überexprimierung des EGFR's (HER1) aus.

### 3.6 Geplante irreversible EGFR-TK-Inhibitoren

Durch eine Einführung alkylierender Seitenketten in das Chinazolin-Ringsystems der 4-Anilinochinazoline gelangte man erstmals auch zu irreversiblen EGFR-TK-Inhibitoren.

Verbindungen diesen Typs wurden Ende der 1990er Jahre zeitgleich von Parke-Davis und Wyeth-Ayerst entwickelt [148,151].

Im Bild 97 sind als Beispiele für die ersten irreversiblen EGFR-TK-Inhibitoren das 6- und das 7-Acrylamido-Derivat des 4-(3-Bromphenylamino)-chinazolins dargestellt.



**Bild 97:** Das 6-Acrylamid-substituierte Chinazolin-Derivat **S1** (PD168393, Pfizer) und das 7-Acrylamid-substituierte Chinazolin-Derivat **S2** (PD 160678, ebenfalls Pfizer)

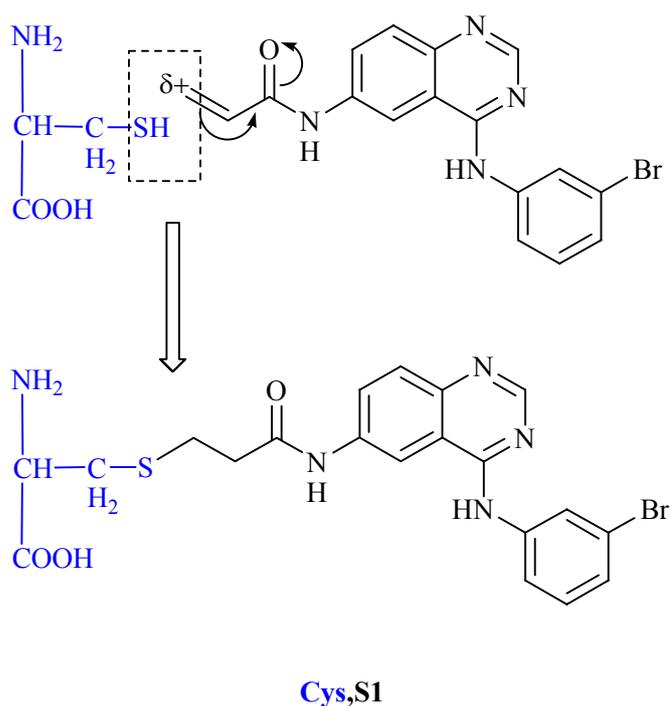
Wie im Bild 97 angedeutet ist, zeigt das  $\beta$ -Kohlenstoffatom der Acrylamid-Seitenkette einen Ladungsunterschuss. Dadurch könnte es als Michael-Akzeptor mit nukleophilen Strukturelementen in der Kinase, wie z.B. SH-Gruppen, unter Bildung einer kovalenten Bindung reagieren.

Durch Modelling-Experimente mit dem bereits vorgestellten 3D-Bindungsmodell für 4-Anilinochinazoline nach *Palmer et al.* stellte man fest, dass das elektrophile  $\beta$ -Kohlenstoffatom der Acrylamid-Seitenkette in die Nähe der nukleophilen SH-Gruppe des Cysteins 773 gelangt. Dabei hat das elektrophile Kohlenstoffatom im Falle des 6-Acrylamids **S1** einen Abstand von 2.8 Å, das des 7-Acrylamids **S2** einen Abstand von 7 Å zur SH-Gruppe des Cysteins 773 [154].

Die SH-Gruppe des Cysteins 773 stellt damit eine potentielle Angriffsstelle für das elektrophile  $\beta$ -Kohlenstoffatom dar. Durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen

dem Schwefelatom und dem elektrophilen Kohlenstoffatom wäre das Enzym irreversibel blockiert.

Unter anderem konnte durch massenspektroskopische Untersuchungen des **S1**-Enzym- und des **S2**-Enzym-Komplexes bewiesen werden, dass tatsächlich eine kovalente Bindung zwischen dem  $\beta$ -Kohlenstoffatom der Acrylamid-Seitenkette und dem Cystein 773 ausgebildet wird (Bild 98) [148].



**Bild 98:** Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem  $\beta$ -Kohlenstoffatom der Acrylamid-Seitenkette der Verbindung **S1** und Cystein

Kinetische Untersuchungen ergaben, dass die 7-Acrylamid-substituierte Verbindung **S2** das Enzym nach ca. zwei Stunden, die analoge 6-substituierte Verbindung **S1** jedoch bereits innerhalb einer Minute vollständig zu inhibieren vermag [148].

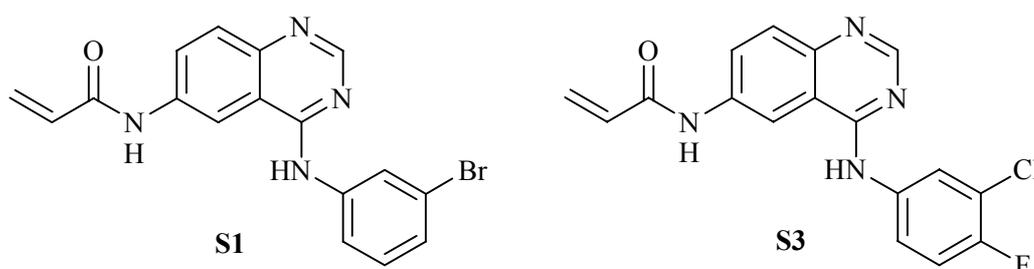
Dies entspricht den Ergebnissen der Modelling-Experimente, wonach der  $\beta$ -Kohlenstoff der 6-Acrylamid-Seitenkette dem Cystein 773 in der ATP-Bindungstasche um etwa 4Å näher ist, als der der 7-Acrylamid-Seitenkette.

Durch Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen ist weiterhin bekannt, dass auch die Einführung anderer alkylierender Seitenketten in Chinazoline, wie z.B. 3-

Chloracrylamido-, Crotonamido- oder 3-Phenylacrylamido-, zu irreversiblen Inhibitoren führt [149,150,151,152,153].

Als optimale Substitutionsstelle wurde dabei die Position 6 des Chinazolin-Ringsystems bestätigt. Von Bedeutung sind vor allem die Länge der Seitenkette und die Position des Michael-Akzeptors innerhalb der Seitenkette. Als wichtiger Parameter für die Selektivität und damit auch für die Toxizität kommt die Reaktivität der Seitenkette in Betracht [154].

Durch Parke-Davis wurde zusätzlich zur 6-Acrylamid-substituierten Bromanilino-Verbindung **S1** die entsprechende Verbindung mit einem Chlor-fluorphenylamino-Rest **S3** (Bild 99) hergestellt und getestet. Die  $IC_{50}$ -Werte der Verbindungen betragen 0.7 bzw. 0.75 nM für das isolierte Enzym und für die Hemmung der EGFR-Autophosphorylierung in A431-Zellen 2.7 bzw. 3.1 nM [151].



**Bild 99:** Bromanilino-(**S1**) und Chlor-fluoranilino-(**S3**)-chinazoline mit 6-Acrylamid-Substitution nach *Smaill et al.* (Pfizer)

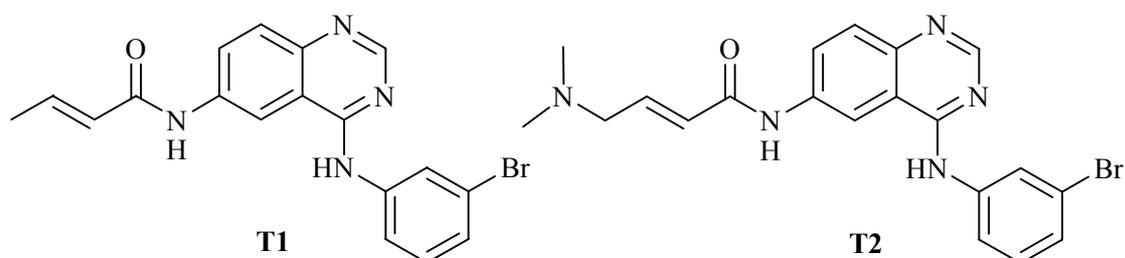
Die Verbindungen **S1** und **S3** haben aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit in Wasser und den meisten organischen Lösungsmitteln eine begrenzte Bioverfügbarkeit. Aufgrund dessen zeigen sie, trotz ihres irreversiblen Charakters, in A431-Xenograft-Experimenten keine deutlich stärkeren zytotoxischen Effekte als der reversible EGFR-TK-Inhibitor Iressa®, obwohl sie *in-vitro* deutlich höhere EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten zeigen (s. Tabelle 7) [155].

Durch Einführung geeigneter Substituenten versuchte man deshalb, die Löslichkeit und damit die Bioverfügbarkeit zu erhöhen.

Versuche dazu wurden unabhängig voneinander durch *Tsou et al.* (Wyest-Ayerst) [153] und *Smaill et al.* (Pfizer) [151] durchgeführt.

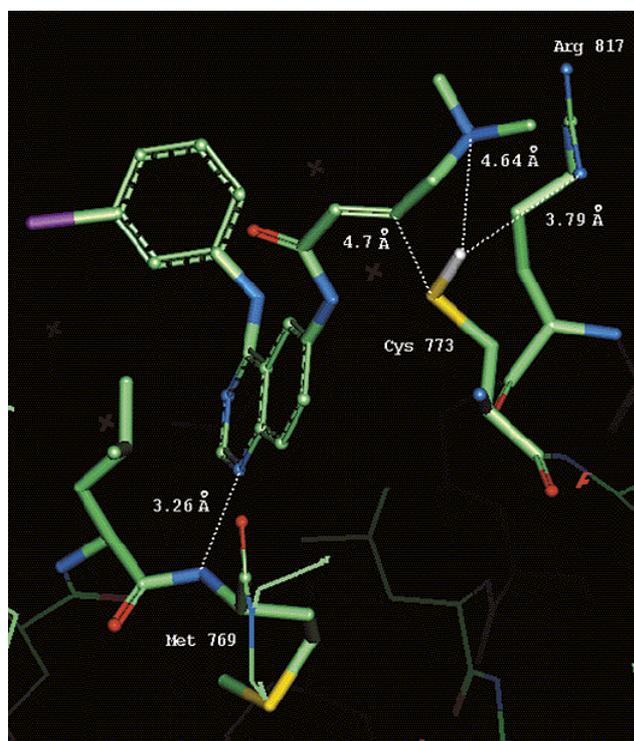
*Tsou et al.* gingen dabei unter anderem vom 6-Crotonamid-substituierten 4-(3-Bromanilino)-chinazolin-Derivat **T1** aus. Durch Einführung einer 4-(*N,N*-Dimethylamino)-Gruppe in die

$\alpha,\beta$ -ungesättigte Seitenkette gelangte man zur ebenfalls irreversibel EGFR-TK-inhibitorisch wirksamen Verbindung **T2**. Diese zeigt mit  $IC_{50}$ -Werten von 11 nM an der isolierten EGFR-TK und 94 nmol/L in Zellen im Vergleich zur Muttersubstanz **T1** (236 nM bzw. 5.84  $\mu$ M) deutlich höhere EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten [153].



**Bild 100:** Das 6-Crotonamid-substituierte 4-Anilinochinazolin-Derivat **T1** und das 6-(4-*N,N*-Dimethylamino-crotonamid)-substituierte 4-Anilinochinazolin-Derivat **T2** nach Tsou et al.

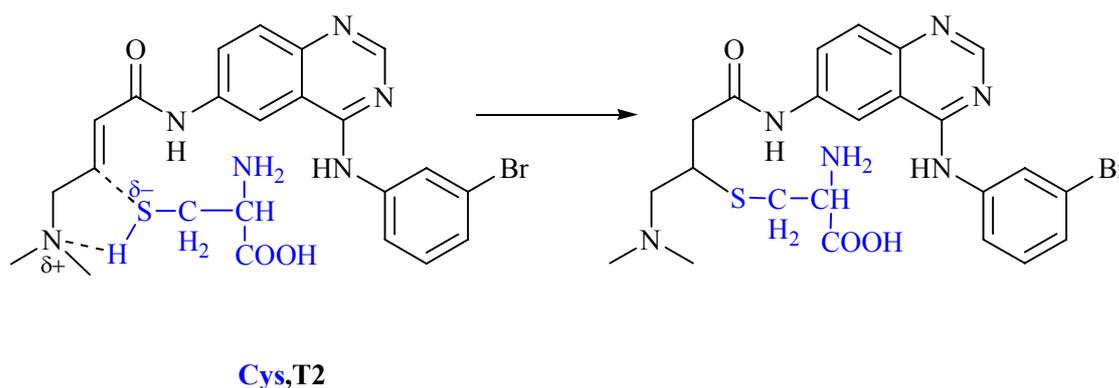
Molecular-Modelling-Experimente zeigen, dass nach Einlagerung der Verbindung **T2** in die ATP-Bindungstasche der EGFR-TK (Bindungsmodell nach Wissner et al. [156]) das  $\beta$ -Kohlenstoffatom der Crotonamid-Seitenkette einen Abstand von 4.7 Å zur Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins 773 hat. Das Stickstoffatom des Dimethylamino-Restes hat dabei einen Abstand von 4.64 Å zum Proton dieser Sulfhydryl-Gruppe (Bild 101) [153].



**Bild 101:** Bindungsmodell für **T2** in der ATP-Bindungstasche der EGFR-TK-Domäne nach Wissner et al. [156]

Es wird postuliert, dass der Dimethylamino-Substituent als intermolekularer Katalysator für die zur irreversiblen Bindung des Inhibitors führenden Michael-Reaktion zwischen der SH-Gruppe des Cysteins und dem elektrophilen Kohlenstoff der Crotonamid-Seitenkette agieren kann.

Die SH-Gruppe könnte demnach ihr Proton auf den Stickstoff der Dimethylamino-Gruppe übertragen und anschließend als Anion an das elektrophile  $\beta$ -Kohlenstoffatom der Verbindung **T2** addieren (Bild 102).

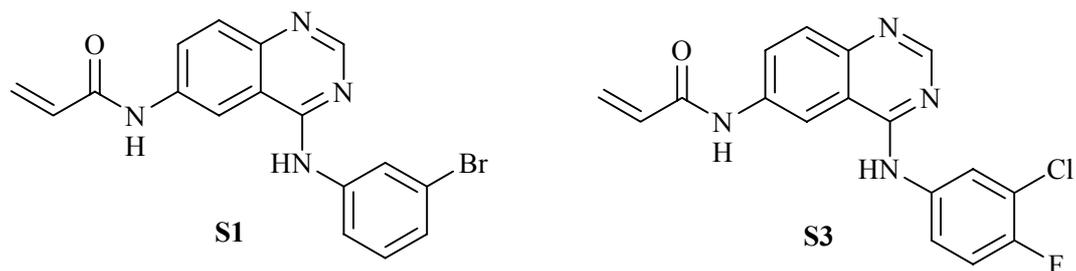


**Bild 102:** Die durch Tsou et al. postulierte intermolekulare Katalyse der Michael-Reaktion zwischen Cys 773 und **T2** [153]

Durch die Einführung der Löslichkeits-verbessernden Dimethylamino-Gruppe hat die Verbindung **T2** auch eine höhere Bioverfügbarkeit als die zugrunde gelegte Verbindung **T1**. Nach Tsou et al. zeigt sie im A431-Xenograft-Modell nach peroraler Gabe (40 mg pro kgKörpergewicht) eine mehr als 90-prozentige Hemmung des Tumorwachstums, die noch zwölf Tage nach Behandlungsende anhält [153].

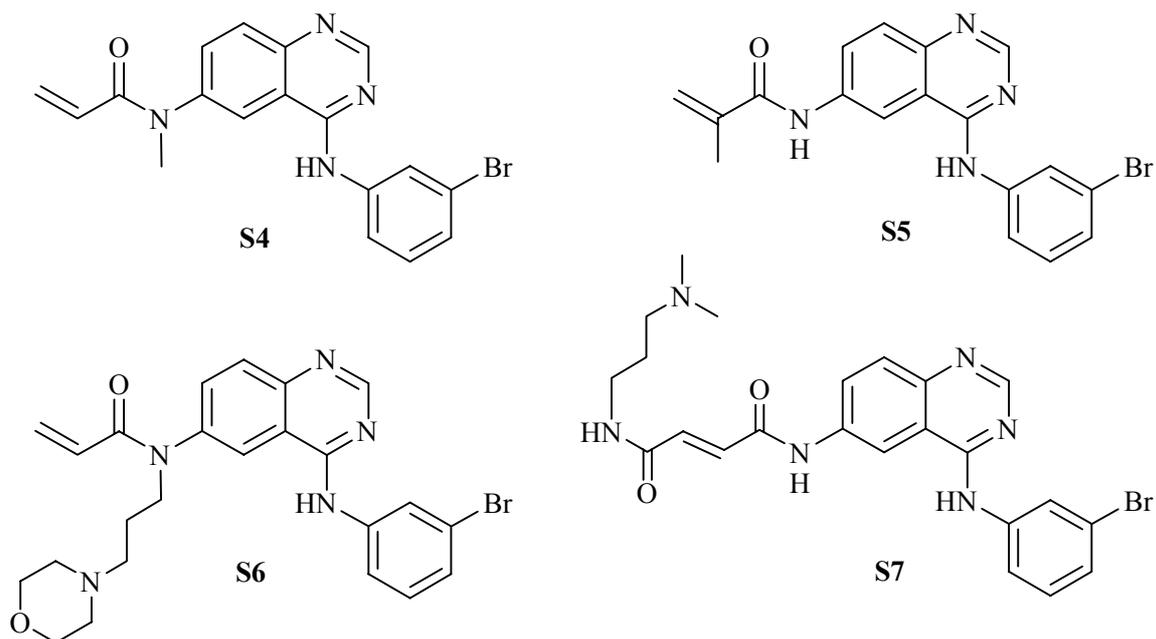
Small et al. (Pfizer) gingen von den 6-Acrylamid-substituierten Verbindungen **S1** und **S3** aus (Bild 103).

Zum einen wurden dabei, analog den vorher beschriebenen Versuchen nach Tsou et al., Verbindungen hergestellt, die in der Acrylamid-Seitenkette selbst substituiert sind. Zum anderen führte man entsprechende Löslichkeits-verbessernde Substituenten aber auch in die freie Position 7 des Chinazolins ein [157].



**Bild 103:** 6-Acrylamid-substituierte 4-Anilinochinazoline nach Smaill et al.

Eine Substitution der Acrylamid-Seitenkette erfolgte dabei am Amid-Stickstoff, am  $\alpha$ - oder am  $\beta$ -Kohlenstoffatom. Eine Auswahl resultierender Verbindungen ist im Bild 104 dargestellt.



**Bild 104:** Einführung löslichkeitsverbesserender Gruppen in die Acrylamid-Seitenkette von S1 [157]

Verbindung	IC <sub>50</sub> [nmol/L] EGFR <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> [nmol/L] A431 <sup>b</sup>	irreversible?	(T/C)x100 [%] A431-Xenograft <sup>c</sup>
<b>Iressa®</b>	20 [141]	30 [143]	nein	12.9 (po, 50 mg/kg <sub>KG</sub> ) [158]
<b>S1</b>	0.7 [152]	2.7 [152]	ja	2 (po, 47 mg/kg <sub>KG</sub> ) [152]
<b>S3</b>	0.75 [152]	3.1 [152]	ja	11 (po, 40 mg/kg <sub>KG</sub> ) [152]
<b>S4</b>	0.17 [157]	13.0 [157]	ja	62 (po, 200 mg/kg <sub>KG</sub> ) [157]
<b>S5</b>	1.20 [157]	16.0 [157]	nein	nicht getestet
<b>S6</b>	3.30 [157]	194.0 [157]	nein	nicht getestet
<b>S7</b>	2.40 [157]	108 [157]	ja	nicht getestet

<sup>a</sup>: ermittelt am isolierten Enzym

<sup>b</sup>: Hemmung der EGFR-Autophosphorylierung in intakten A431-Zellen

<sup>c</sup>: antiproliferativer Effekt auf A431-Tumorzellen in nackten Mäusen, T = durchschnittliche Tumormasse behandelter Tiere, C = durchschnittliche Tumormasse unbehandelter Tiere (po: perorale Gabe des Inhibitors, KG: Körpergewicht)

**Tabelle 7:** *In-vitro-* und *In-vivo*-Aktivitäten ausgewählter 4-Anilinochinazoline

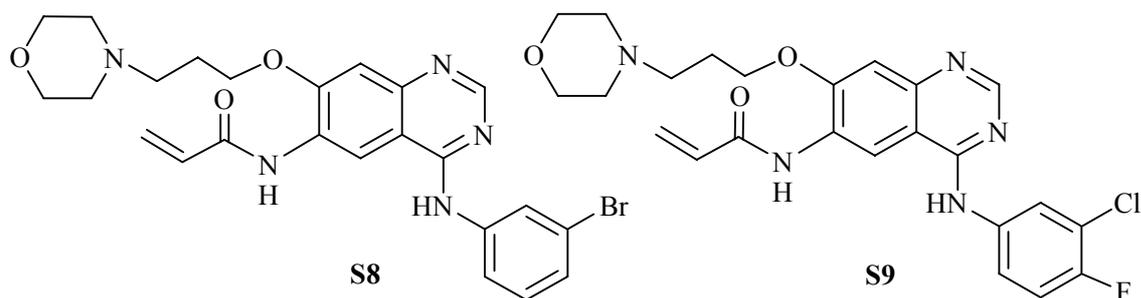
Die Verbindungen **S4** bis **S7** zeigen im Vergleich mit der „Muttersubstanz“ **S1** überwiegend schlechtere EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten.

Sowohl eine Morpholin-4-ylpropyl-Substitution am Amid-Stickstoff (Verbindung **S6**), als auch eine Methyl-Substitution am  $\beta$ -Kohlenstoffatom (Verbindung **S5**) führen sogar zu einem Verlust der Irreversibilität.

Verbindung **S4** wurde zusätzlich am A431-Xenograft-Modell getestet. Dort zeigt es jedoch im Vergleich mit der „Muttersubstanz“ **S1** (T/C = 2 Prozent) trotz einer mehr als viermal höheren Dosierung eine deutlich schwächere zytotoxische Aktivität (T/C = 62 Prozent, Tabelle 7).

Weiterhin wurden durch *Smaill et al.* Verbindungen hergestellt, bei denen entsprechende Löslichkeits-verbessernde Substituenten in Position 7 des Chinazolins eingeführt worden sind.

Die wirksamsten Verbindungen dieser Art sind die im folgenden Bild 105 dargestellten 7-(Morpholino-4-ylpropyloxy)-Derivate **S8** und **S9** [151,152].



**Bild 105:** Irreversible EGFR-TK-Inhibitoren mit 7-(Morpholin-4-ylpropyloxy)-Substitution nach Smaill et al.

Beide Verbindungen inhibieren die EGFR-TK irreversibel und zeigen mit  $IC_{50}$ -Werten von 3 bzw. 1.5 nM potente inhibitorische Aktivitäten am isolierten Enzym. Smaill et al. geben für die Hemmung der EGFR-Autophosphorylierung in intakten A431-Zellen  $IC_{50}$ -Werte von 5.3 bzw. 7.4 nM an [151,152].

Zusätzlich zeigen beide Verbindungen *in-vivo*, je nach Dosierung, zytostatische bis zytotoxische Effekte an verschiedenen Xenograft-Tumormodellen [155].

Verbindung S9 befindet sich in Form des Dihydrochlorides unter der Bezeichnung CI-1033 momentan in Phase I klinischer Prüfungen.

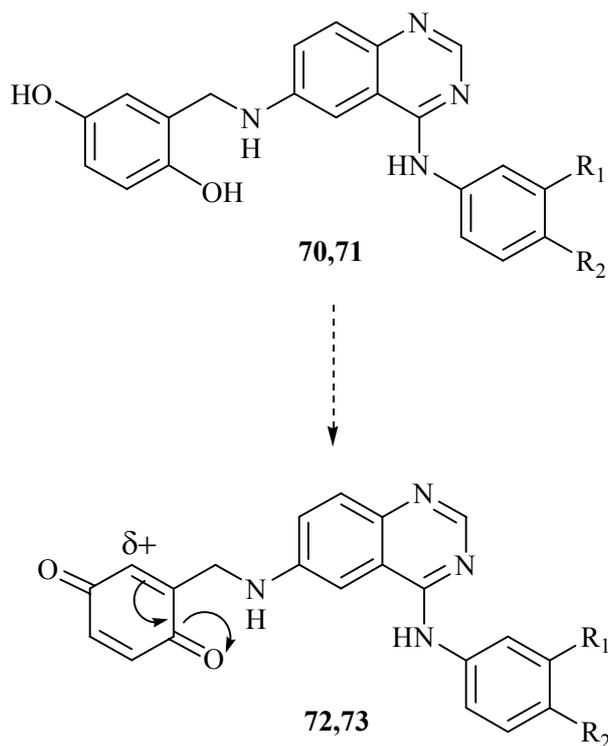
CI-1033 ist gut wasserlöslich (5 mg/mL) und zeigt eine perorale Bioverfügbarkeit von 30 Prozent (Ratte).

Eine einmalige perorale Gabe von 40 mg CI-1033 je kg Körpergewicht (KG) führt im A431-Tumormodell zu einer 72 Stunden anhaltenden 75-prozentigen EGFR-TK-Inhibition. In A431-Xenograft-Experimenten führt es in einer Dosierung von 2.5 mg/kg<sub>KG</sub> zur Zytostase, in Dosierungen über 5 mg/kg<sub>KG</sub> kommt es zu lang anhaltenden Regressionen. Eine völlige Hemmung des Zellwachstums wird in einer Dosierung von 18 mg/kg<sub>KG</sub> erreicht [155].

Weiterhin wurden exzellente zytotoxische Aktivitäten in Lungen-, Brust-, Eierstock-, Darm-, Pankreas- sowie Glioblastom-Tumormodellen beobachtet. CI-1033 verstärkt die Wirksamkeit von Strahlentherapie und herkömmlichen Zytostatika [158,159].

### 3.6.1 4-Anilinochinazoline mit Benzochinon-Teilstruktur

Wie im Bild 106 dargestellt ist, kommt man durch Oxidation der Dihydroxyphenyl-Teilstruktur der zuvor beschriebenen 4-Anilinochinazoline **70** und **71** zu Benzochinon-Substituenten mit einer Michael-Akzeptor-Position.

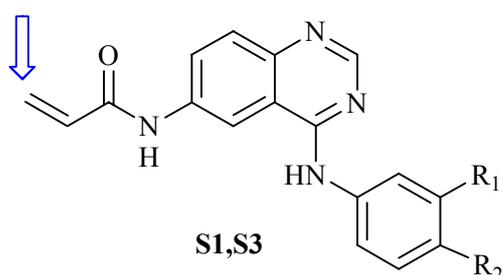
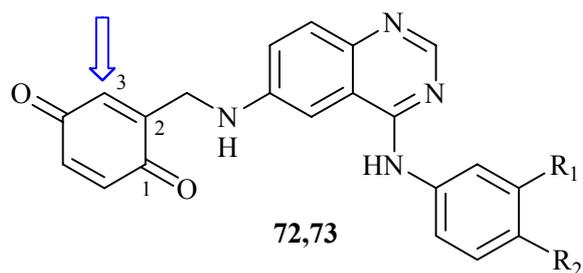


**70,71:** R<sub>1</sub>=Br, R<sub>2</sub>=H

**71,73:** R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=F

**Bild 106:** Austausch des 1,4-Dihydroxyphenyl-Restes der Verbindungen **70** und **71** gegen 1,4-Benzochinon

Die Position des Michael-Akzeptors in der chinoiden Seitenkette der Verbindungen **71** und **72** entspricht dabei genau der des elektrophilen β-Kohlenstoffatoms in den zuvor beschriebenen 6-Acrylamid-substituierten 4-Anilinochinazolinen **S1** und **S3** (Bild 107).



72, S1:  $R_1 = \text{Br}$ ,  $R_2 = \text{H}$

73, S3:  $R_1 = \text{Cl}$ ,  $R_2 = \text{F}$

**Bild 107:** Position des Michael-Akzeptors in 72 und 73 im Vergleich mit der in S1 und S3

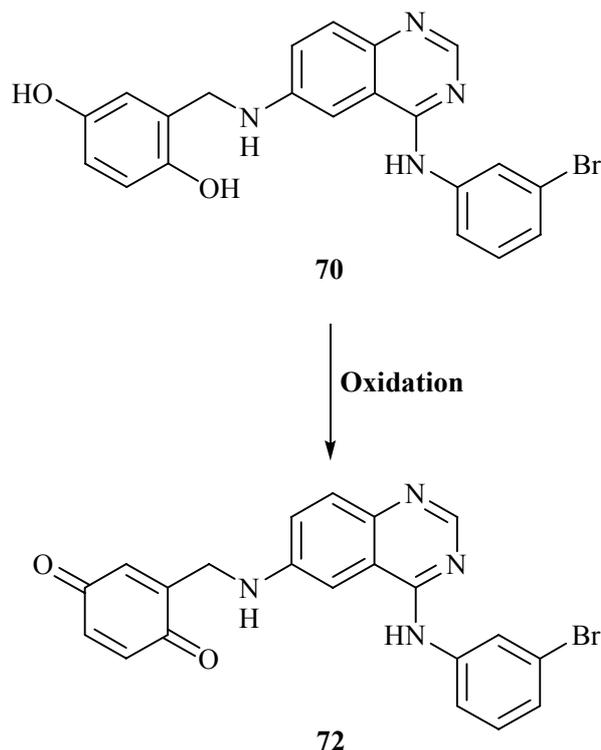
Das C3-Atom der 1,4-Benzochinon-Teilstruktur der resultierenden Chinon-Derivate **72** und **73** könnte aufgrund seiner Elektrophilie ebenfalls eine kovalente Bindung zum Cystein 773 in der ATP-Bindungstasche der EGFR-TK ausbilden. Des Weiteren kann die 4-Keto-Gruppe als Protonen-Akzeptor fungieren und damit die gewünschte Michael-Addition des elektrophilen C3-Atoms an die SH-Gruppe des Cysteins 773 katalysieren.

Demnach könnte es sich bei den 4-Anilinochinazolin-2(1H)-onen mit Benzochinon-Teilstruktur **72** und **73** ebenfalls um irreversible EGFR-TK-Inhibitoren handeln.

Als nächstes soll deshalb versucht werden, den Dihydroxyphenyl-Rest der Verbindungen **70** und **71** durch Oxidation in einen Benzochinon-Rest zu überführen. Wenn es sich bei den resultierenden Verbindungen um irreversible EGFR-TK-Inhibitoren handelt, sollten sie höhere EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten zeigen als die zugrunde gelegten Verbindungen.

### 3.6.1.1 Versuche zur Herstellung von 2{[4-(3-Bromphenylamino)-chinazolin-6-ylamino]-methyl}-[1,4]-benzochinon (72)

Wie bereits erwähnt, werden Versuche durchgeführt, die zu Verbindung **72**, ausgehend von Verbindung **70** führen (Bild 108).

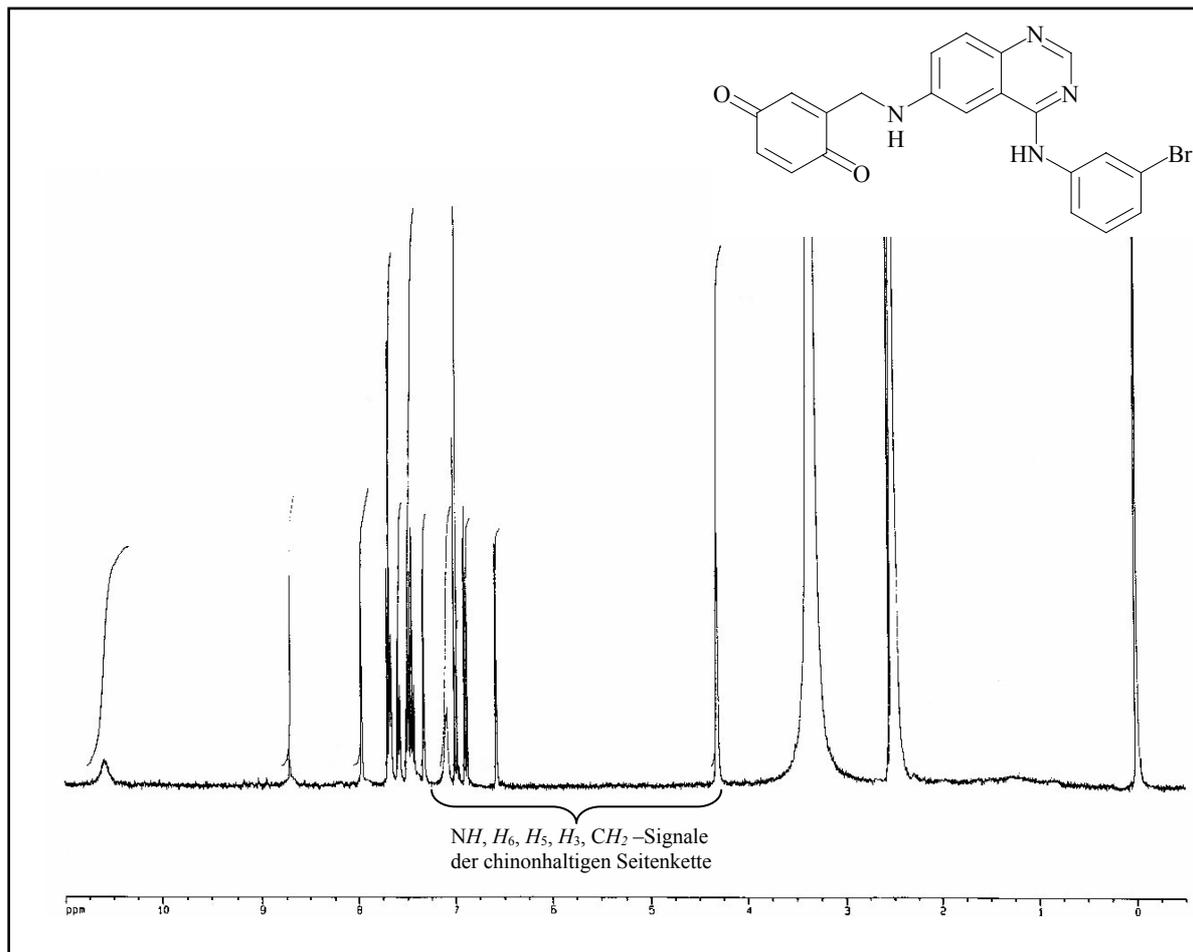


**Bild 108:** Herstellung des gewünschten Chinon-Derivates **72** aus Verbindung **70** durch Oxidation

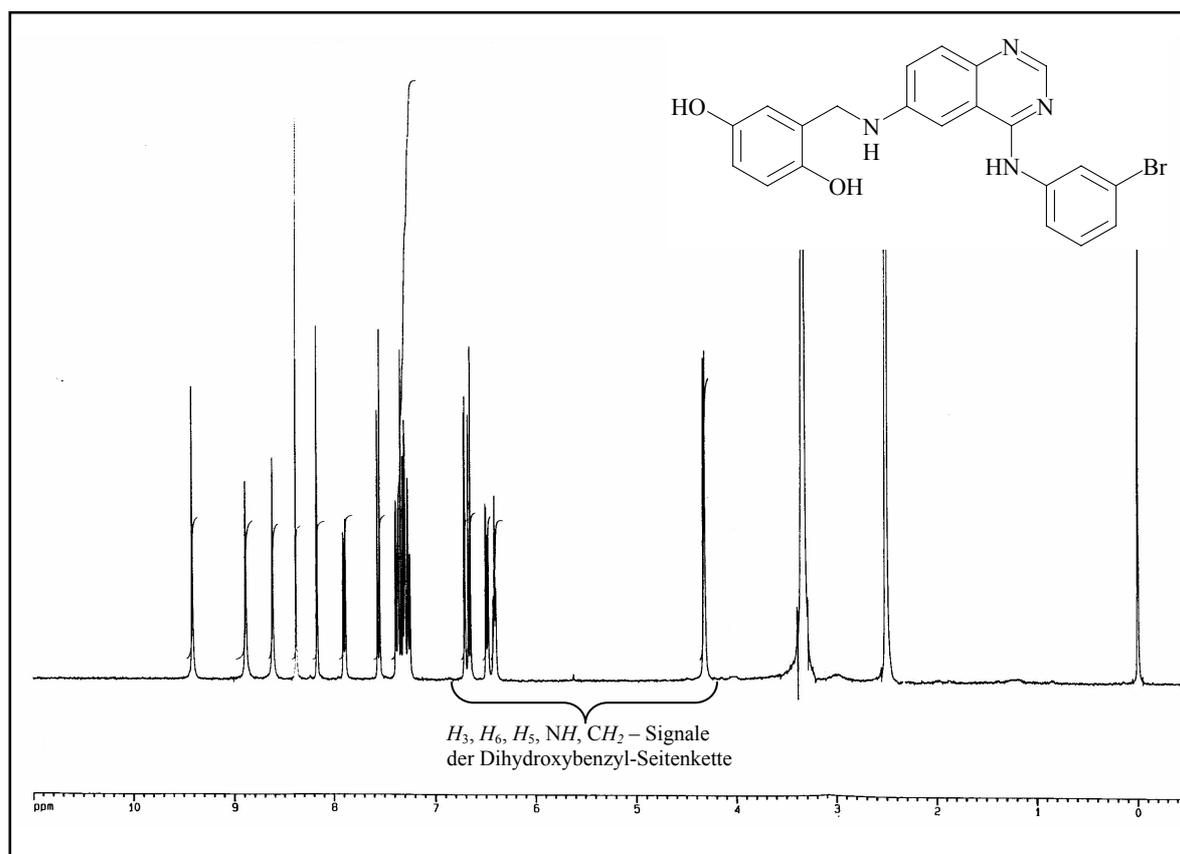
Die Oxidation wird zunächst mit Cer(IV)-ammoniumnitrat versucht. Dazu wird eine Lösung der Verbindung **70** in Dimethylsulfoxid mit der wässrigen Lösung des Oxidationsmittels versetzt und 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der entstehende Niederschlag wird gesammelt und anschließend untersucht.

Laut Dünnschichtchromatographie ist das erhaltene Reaktionsprodukt ( $R_{f_{EtOAc}} = 0.72$ ) unpolarer als die Ausgangsverbindung **70** ( $R_{f_{EtOAc}} = 0.68$ ). Dies kann ein Hinweis auf die erfolgreiche Oxidation der beiden OH-Gruppen sein, da das resultierende Chinon-Derivat **72** tatsächlich unpolare Charakter haben dürfte, als die zugrunde gelegte Dihydroxy-Verbindung **70**.

Einen deutlicheren Beweis für das Gelingen der Oxidation liefert ein Vergleich des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des erhaltenen Produktes (Bild 109) mit dem der Ausgangsverbindung **70** (Bild 110). Zum einen fehlen Signale der phenolischen OH-Gruppen, zum anderen sind einige Signale, besonders die der veränderten Seitenkette (s. Tabelle 8), charakteristisch Tieffeld- oder Hochfeld- verschoben.



**Bild 109:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des bei der Oxidation der Verbindung **70** erhaltenen Produktes in DMSO



**Bild 110:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der bei der Oxidation eingesetzten Verbindung **70** in DMSO

$\delta$ [ppm]	$\delta$ [ppm]
6.41	NH
4.31	$\text{CH}_2$
6.71	H(3)
6.48	H(5)
6.65	H(6)
	7.09
	4.31
	6.56
	6.87
	6.99

**Tabelle 8:** Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Resonanzen der Protonen der Seitenketten von Verbindung **70** mit den entsprechenden Protonenresonanzen von dessen Oxidationsprodukt

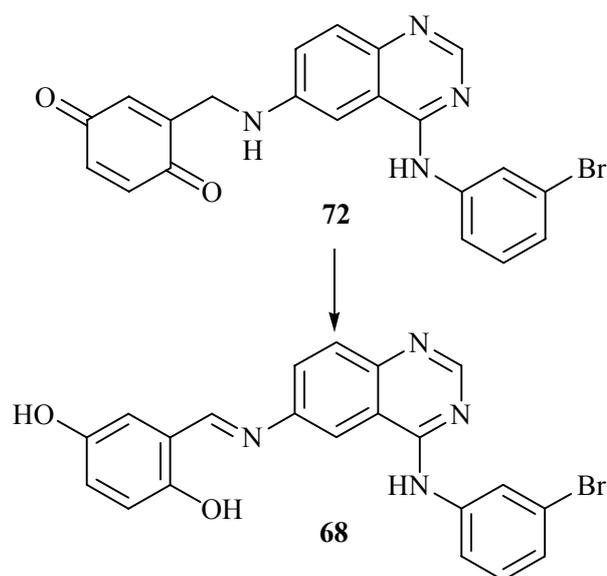
Wie in Tabelle 8 dargestellt ist, wird im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Oxidationsproduktes für die NH-Gruppe ein Signal bei 7.09 ppm beobachtet. Damit ist es im Vergleich mit dem entsprechenden Signal im Spektrum der Ausgangsverbindung **70** um 0.68 ppm Tieffeld-verschoben. Der Grund dafür kann, wie in der Formel der 6-Seitenkette der Verbindung **72** (s. Tabelle 8) angedeutet ist, die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Amino-Gruppe und dem Chinon-Sauerstoff sein.

Des Weiteren werden Resonanzen bei 6.87 und 6.99 ppm beobachtet, die aufgrund ihrer Kopplungskonstanten den Protonen der benachbarten C-Atome 5 und 6 des Chinons zugeordnet werden können. Diese sind, aufgrund der Elektronen-anziehenden Effekte der Chinon-Sauerstoffe an den jeweils benachbarten C-Atomen, im Vergleich mit den entsprechenden aromatischen Protonensignalen des Dihydroxyphenyl-Restes der Verbindung **70** ebenfalls Tieffeld-verschoben.

Ein Signal bei 6.56 ppm kann dem Proton am C3-Atom des Chinon-Rings zugeordnet werden. Es ist im Vergleich mit dem entsprechenden Signal im Spektrum der Ausgangsverbindung **70** leicht Hochfeld-verschoben, da es weniger entschirmt ist als sein aromatisches Äquivalent.

Alle weiteren Signale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des erhaltenen Oxidationsproduktes können der Wunschverbindung **72** zugeordnet werden, so dass die Oxidation der Verbindung **70** mit Cer(IV)-ammoniumnitrat in diesem Fall wahrscheinlich tatsächlich zum gewünschten Chinon **72** geführt hat.

Allerdings wird eine rasche Umwandlung des Chinons **72** in die Schiff'sche Base **68** beobachtet.



**Bild 111:** Beobachtete Umwandlung des Chinon-Derivates **72** in die Schiff'sche Base **68**

Diese Umwandlung verläuft noch schneller, wenn die Verbindung in polaren Lösungsmitteln gelöst wird.

Um für weitere Untersuchungen mehr Substanz zur Verfügung zu haben, wird die Oxidation wiederholt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt werden, da zunächst angenommen wird, dass die Umwandlung durch Spuren des Oxidationsmittels, die eventuell im Rohprodukt enthalten sein könnten, ausgelöst oder beschleunigt wird.

Während der Säulenchromatographie [Dichlormethan/Methanol (9+1)] kann noch keine Umwandlung beobachtet werden. Doch bereits nach dem Einengen der gesammelten Fraktionen erhält man ein Gemisch aus dem gewünschten Chinon-Derivat **72** und der Schiff'schen Base **68**.

Des Weiteren können dünnschichtchromatographisch Spuren des 2,5-Dihydroxybenzaldehyds und des Amins **66** nachgewiesen werden. Diese könnten das Resultat einer teilweisen Verseifung der Schiff'schen Base **68** sein.

Ebenfalls durchgeführte Oxidationsversuche mit Eisen(III)-chlorid, Blei(IV)-acetat und Tetrabutylammoniumperjodat führen ebenfalls zunächst zum Chinon **72**. Die Isolierung von **72** in reiner Form gelingt jedoch aufgrund der schnellen Umwandlung auch in diesen Fällen nicht.

### 3.6.1.2 Mögliche Reaktionsmechanismen für die Umwandlung des Chinons 72 in die Schiff'sche Base 68

Als Mechanismen für die zur Umwandlung der Chinon-Verbindung 72 führende Umlagerung in die Schiff'sche Base 68 kommen eine Hydridwanderung, eine Protonenwanderung sowie ein Radikal-Mechanismus in Betracht.

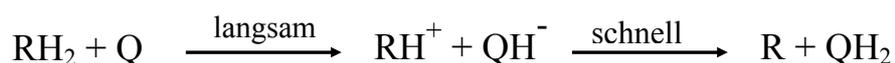
#### a) Hydridtransfer:

Die Umlagerung des Chinons 72 in die Schiff'sche Base 68 kann als intramolekulare Redoxreaktion erklärt werden, da es dabei zu einer Oxidation der Imin-Teilstruktur unter gleichzeitiger Reduktion des Chinons kommt.

Chinone sind Oxidationsmittel und finden breite Anwendung als Dehydrierungsreagenzien. Dabei werden defizitäre Chinon-Derivate, wie z.B. das 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-benzochinon (DDQ), aufgrund ihres, im Vergleich mit Donator- oder unsubstituierten Chinonen, höheren Redoxpotentials bevorzugt eingesetzt. Jedoch ist laut *Braude et al.* auch das 1,4-Benzochinon in der Lage, z.B. Dihydroaromaten zu dehydrieren [160].

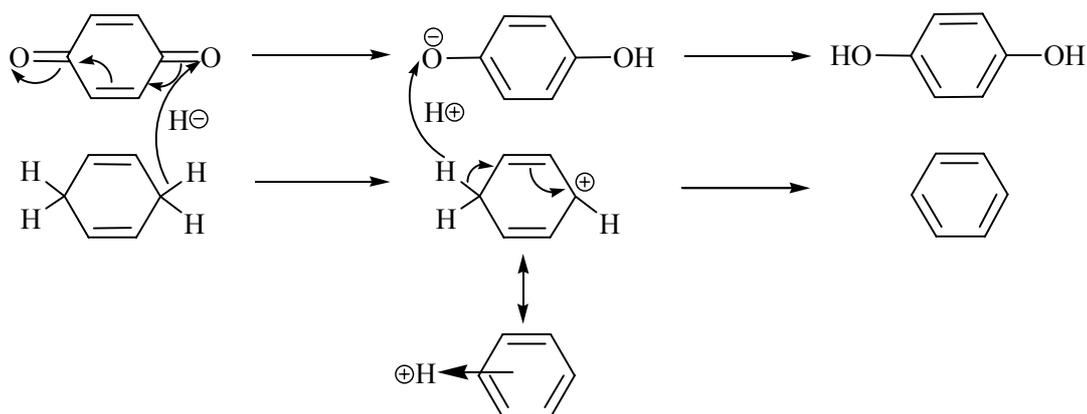
Als Mechanismus wird hierbei ein intermolekularer Hydridtransfer diskutiert.

Die Redoxreaktion zwischen Dihydrobenzen und Benzochinon verläuft dabei vereinfacht nach der folgenden Gleichung ab:



**Gleichung 1:** Vereinfachte Gleichung für die intermolekulare Redoxreaktion zwischen Dihydrobenzenen und Benzochinon nach *Braude et al.*  
(Q: Benzochinon, R: Aromat)

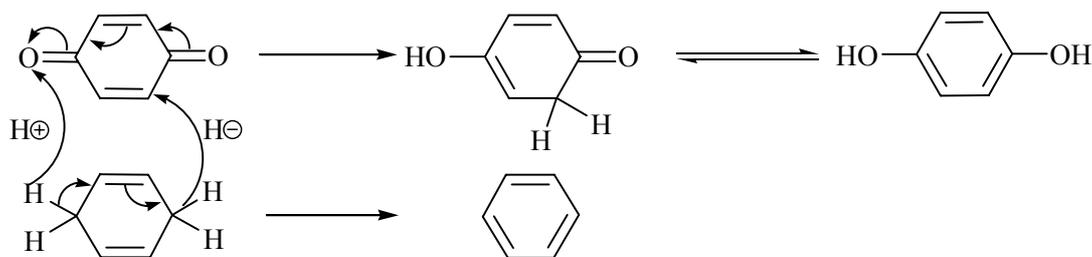
Bei diesem ionischen 2-Schritt-Mechanismus ist der geschwindigkeitsbestimmende erste Schritt ein intermolekularer Hydridtransfer auf das Chinon, gefolgt von einem schnell stattfindenden, in die gleiche Richtung verlaufenden Protonentransfer (Bild 112) [161].



**Bild 112:** Für die Dehydrierung von 1,4-Dihydroaromaten durch 1,4-Benzochinone postulierter 2-Schritt Mechanismus

Für die gleiche Reaktion postulieren *Rocek et al.* jedoch auch den im folgenden Bild 113 dargestellten 1-Schritt-Mechanismus, bei dem Hydrid- und Protonentransfer synchron verlaufen [162].

Dabei soll das Hydridion auf das C3-Atom des Chinons übertragen werden.

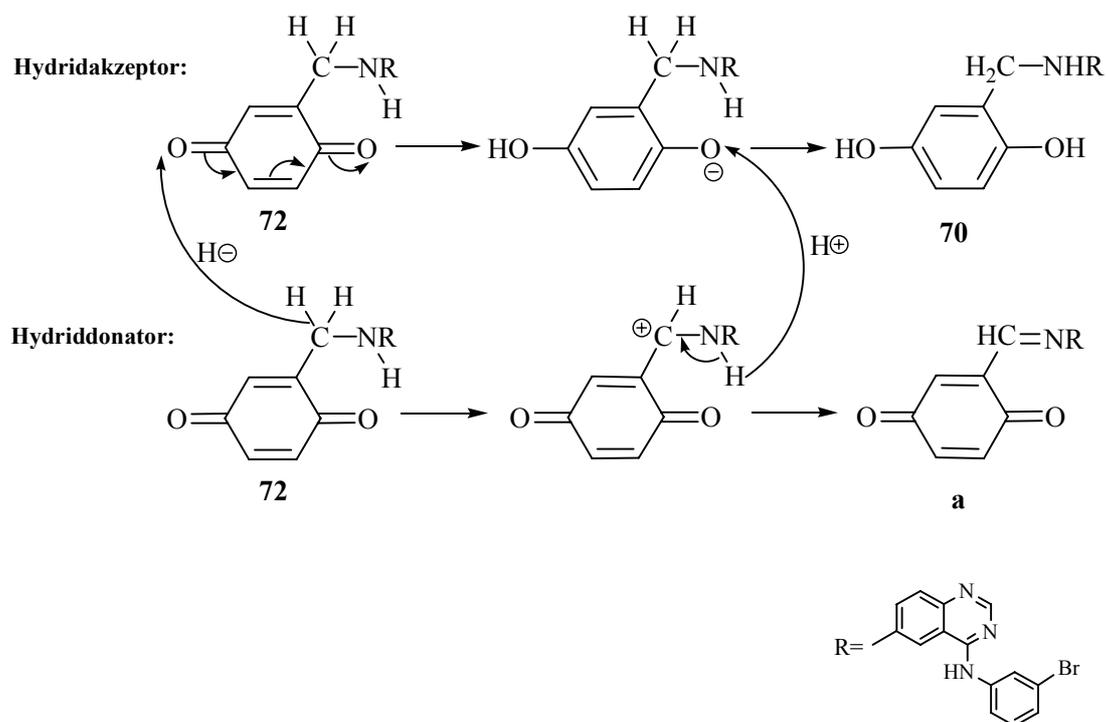


**Bild 113:** Für die Dehydrierung von 1,4-Dihydroaromaten durch 1,4-Benzochinone postulierter 1-Schritt-Mechanismus

Sowohl bei den von *Braude et al.*, als auch bei den von *Rocek et al.* diskutierten Mechanismen der Dehydrierung von Dihydroaromaten durch Chinone handelt es sich um intermolekulare Redoxprozesse.

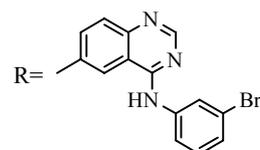
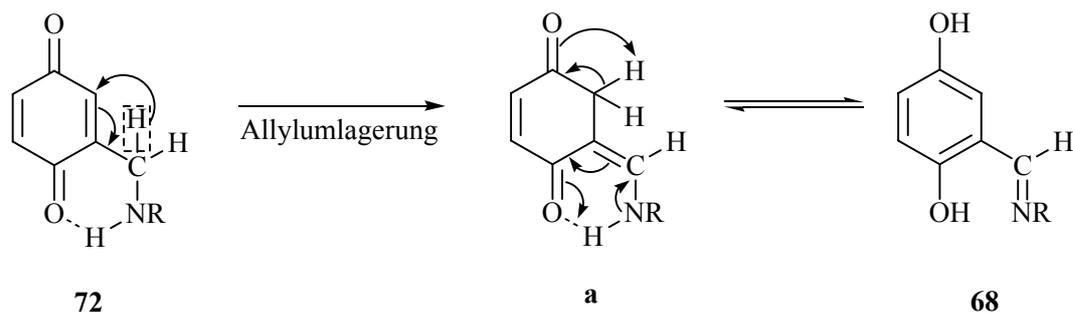
Im Falle der Umlagerung der Verbindung **72** kommt jedoch eine intermolekulare Hydridwanderung nicht in Frage, denn dabei würde ein Hydridtransfer von einem Molekül

(Hydrid-Donator) auf ein anderes Molekül (Hydrid-Akzeptor) der Verbindung **72** stattfinden. Dabei würde der Hydrid-Donator zum Imin **a** oxidiert und der Hydrid-Akzeptor zum Diol **70** reduziert werden (Bild 114). Das Chinon mit Imin-Teilstruktur **a** kann jedoch als Umlagerungsprodukt nicht nachgewiesen werden.



**Bild 114:** Für die Umwandlung von **72** in **68** als unwahrscheinlich anzusehender Mechanismus eines intermolekularen Hydridtransfers

Die Umlagerung könnte jedoch nach dem im folgenden Bild 115 dargestellten Mechanismus einer intramolekularen Redoxreaktion verlaufen. Dabei würde die Amin-Teilstruktur durch die chinoide Partialstruktur zum Imin oxidiert werden, wobei das Chinon zum Diol reduziert wird.

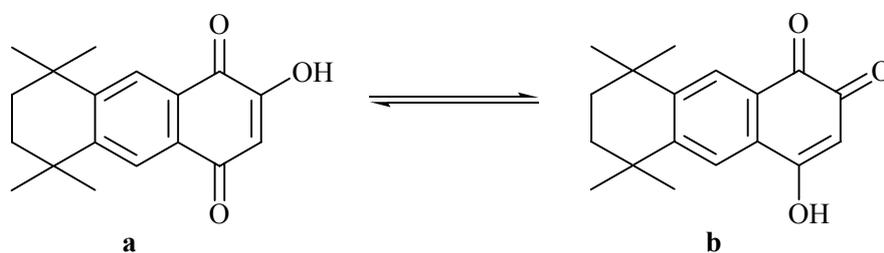


**Bild 115:** *Intramolekularer Hydridtransfer als möglicher Mechanismus der Umlagerung von 72 zu 68*

Wie im Bild 115 dargestellt ist, könnte es sich im ersten Schritt um eine Allylumlagerung handeln, in deren Verlauf ein Hydridion von der Methylen-Gruppe zum C3-Atom des Chinons wandert. Als Resultat würde eine Enaminon-Teilstruktur (Verbindung **a**) ausgebildet werden, die im tautomeren Gleichgewicht mit der Schiff'schen Base **68** steht.

### **b) Protonenwanderung:**

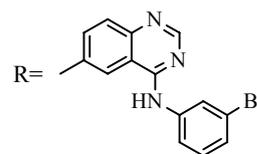
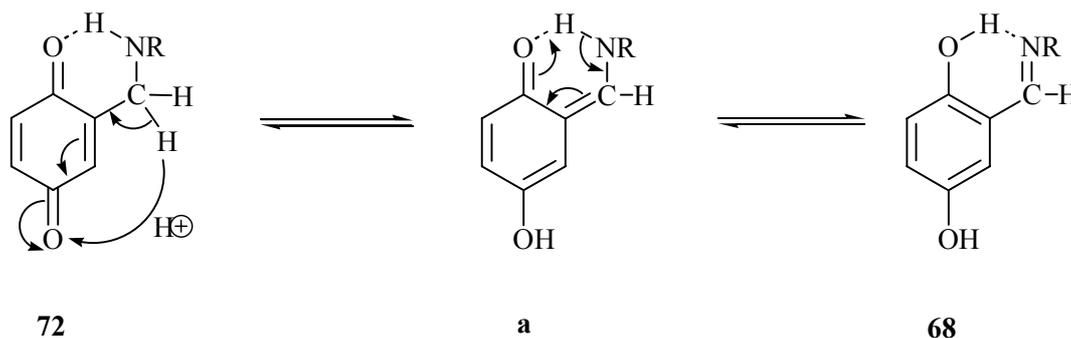
Bei geeigneter Substitution eines p-Chinons können Gleichgewichte des folgenden Typs beobachtet werden:



**Bild 116:** *Tautomeres Gleichgewicht einer Verbindung mit 2-Hydroxy-1,4-benzochinon-Teilstruktur nach Probst [163]*

Bei den im Bild 116 dargestellten Verbindungen **a** (p-chinoide Form) und **b** (o-chinoide Form) handelt es sich um Tautomere. Dabei ist Verbindung **b** durch die mögliche Wanderung des sauren Protons der 2-Hydroxy-Gruppe zur 4-Keto-Gruppe erklärbar.

Auch die Umlagerung des Chinons **72** in die Schiff'sche Base **68** könnte als einfache Tautomerie gedeutet werden.



**Bild 117:** **68** als Tautomer von **72**

Im ersten Schritt handelt es sich um eine Keto-Enol-Tautomerie. Das Enol **a** resultiert aus der Verbindung **72** nach Wanderung eines Protons von der exozyklischen Methylene- zur Chinoncarbonyl-Gruppe. Die Acidität der exozyklischen Methylene-Gruppe wird durch elektronische Effekte des Chinazolins (Unterschuss-Aromat) noch verstärkt.

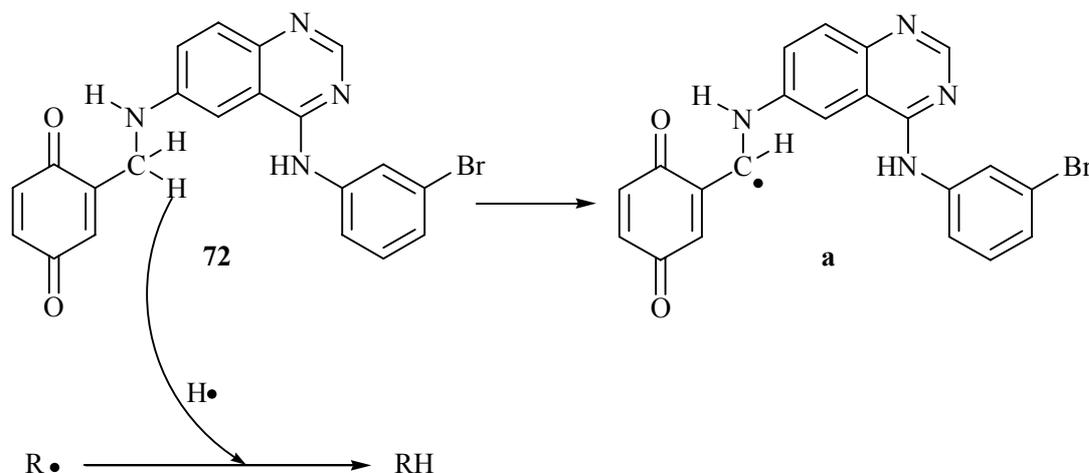
Verbindung **a** bildet zusätzlich eine vinyloge Säureamid-Teilstruktur aus, die im Gleichgewicht mit der tautomeren Imino-Enol-Form **68** steht.

Da in beiden Fällen ionale Zwischenstufen auftreten, gehen die postulierten Umlagerungsmechanismen **a)** und **b)** konform mit der Beobachtung, dass die Umwandlung der Verbindung **72** in das Imin **68** in polaren Lösungsmitteln beschleunigt abläuft.

### **c) Radikal-Mechanismus:**

Zur Umlagerung der Verbindung **72** nach einem Radikalmechanismus wäre zunächst ein Radikalbildner nötig. Des Weiteren müsste eine Stabilisierung des entstehenden Radikals gewährleistet sein.

Als Radikalbildner ( $R\cdot$ ) kämen z.B. Sauerstoffradikale in Frage.

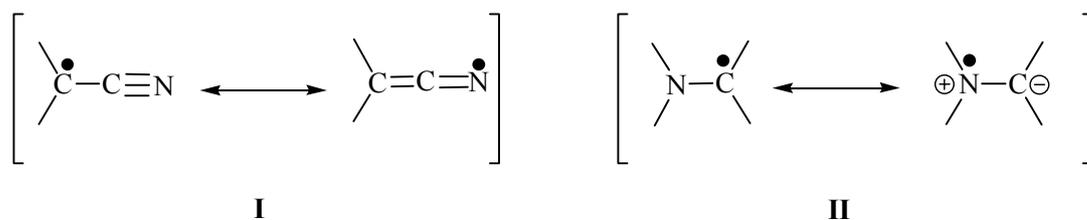


**Bild 118:** Aus der homolytischen Spaltung einer CH-Bindung der Methylen-Gruppe der Verbindung 72 resultierendes Radikal **a**, Radikalbildner  $R\cdot$ : z.B.  $\cdot O$  aus Triplett-Sauerstoff ( $\cdot O-O\cdot$ )

Durch die captodative Substitution des Radikalzentrums ist eine ausgeprägte Resonanzstabilisierung des Radikals **a** möglich (= captodativer oder „push-pull“-Effekt) [164].

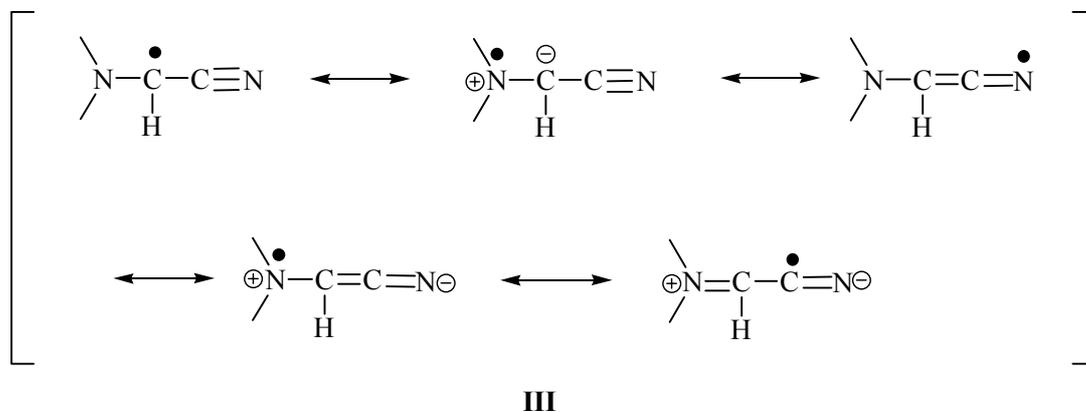
Ein captodativer Effekt resultiert, wenn auf ein Radikalzentrum gleichzeitig ein Elektronen-Akzeptor- (= Captor) und ein Elektronen-Donator-Substituent einwirken. Im Falle des Radikals **a** wird die Elektronendichte am Radikalzentrum durch die vinyloge Keto-Gruppe erniedrigt und durch die Amino-Gruppe erhöht.

Durch den captodativen Effekt können vergleichsweise mehr Resonanzformen formuliert werden [165,166]. So wären z.B. für die mono-substituierten Radikale, dem Cyano- (= Akzeptor) substituierten (**I**) und dem Amino- (= Donator) substituierten (**II**) nur jeweils zwei Resonanzstrukturen formulierbar (Bild 119):



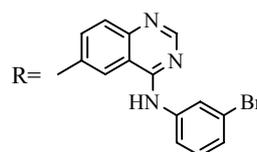
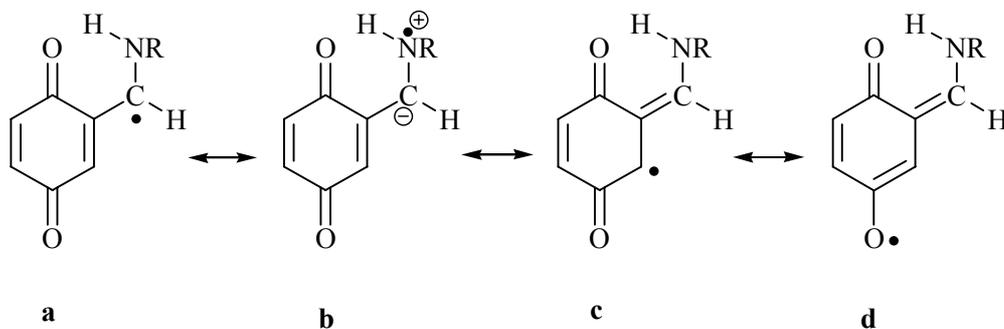
**Bild 119:** Resonanz in mono-substituierten Radikalen: Radikal **I**: Substitution des Radikalzentrums mit einer Elektronen-ziehenden Cyano-Gruppe; Radikal **II**: Substitution des Radikalzentrums mit einer Elektronen-schiebenden Amino-Gruppe

Durch einen captodativen Effekt können jedoch vom Amino-Cyano- (Donator-Akzeptor-) substituierten Radikal **III** fünf Resonanzstrukturen formuliert werden (Bild 120):



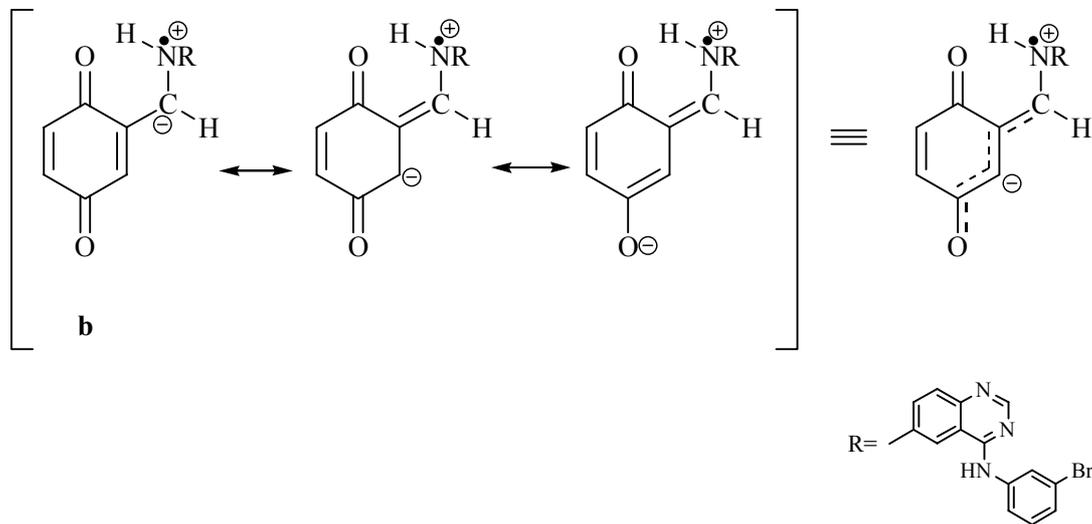
**Bild 120:** Die durch einen captodativen Effekt verbesserte Resonanzstabilisierung eines Donator-Akzeptor-substituierten Radikals

Aufgrund des erläuterten captodativen Effektes sind vom Radikal **a** (Bild 118) zunächst die folgenden Resonanzstrukturen denkbar (Bild 121):



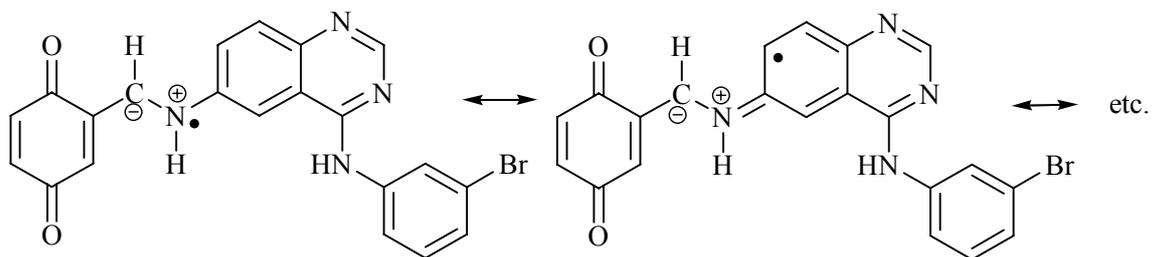
**Bild 121:** Aufgrund des captodativen Effektes durch die Amino-Keto-Substitution mögliche Resonanz-stabilisierung des Radikals **a**

Eine zusätzliche Radikalstabilisierung ist durch die Verteilung der negativen Ladung im Radikalion **b** möglich (Bild 122):



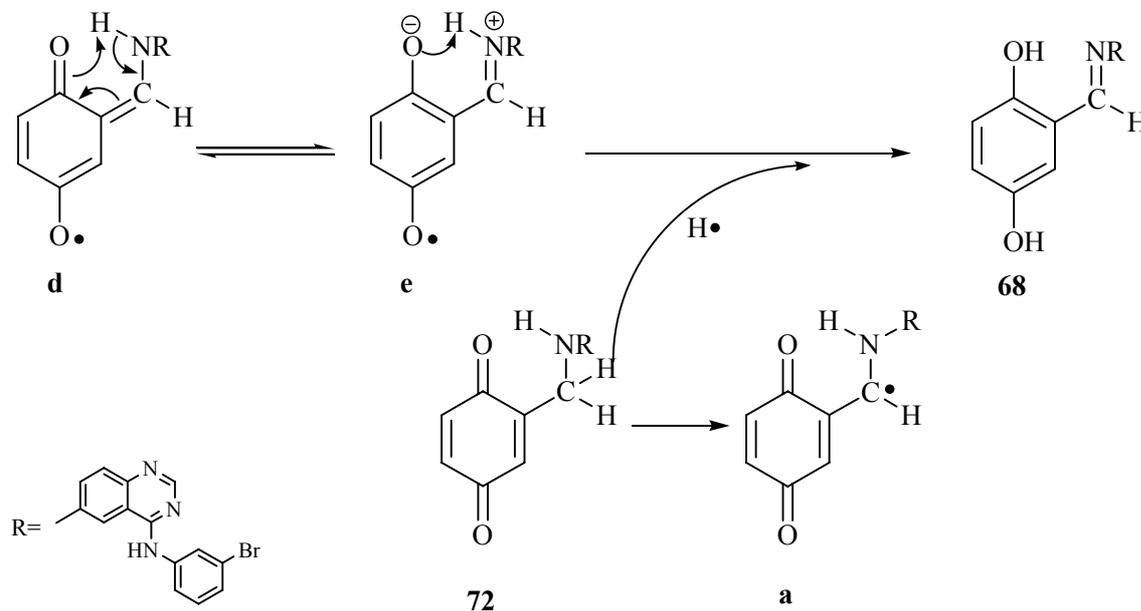
**Bild 122:** Radikalstabilisierung durch die mögliche Verteilung der negativen Ladung im Radikalion **b**

Zusätzlich ist die Teilnahme des Chinazolin-Restes an der Stabilisierung des Radikals, wie im Bild 123 angedeutet ist, denkbar:



**Bild 123:** Resonanzstabilisierung unter Beteiligung des Chinazolin-Ringsystems

Das Tautomer des Radikals **d** ist ein Semichinon-Anion-Radikal (**e**). Dieses könnte durch Reaktion mit einem weiteren Molekül des Chinons **72** leicht in die Schiff'sche Base **68** umgewandelt werden (Bild 124), wodurch erneut ein Radikal **a** (Bild 118) entstehen würde.



**Bild 124:** Bildung der Schiff'schen Base **68** durch Reaktion des Radikals **d** bzw. seines Tautomers **e** mit einem Wasserstoffradikal, das z.B. von einem weiteren Molekül des Chinons **72** stammen könnte

Nach welchem der drei vorgeschlagenen Mechanismen die Umlagerung des Chinons **72** in die Schiff'sche Base **68** wirklich erfolgt, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden.

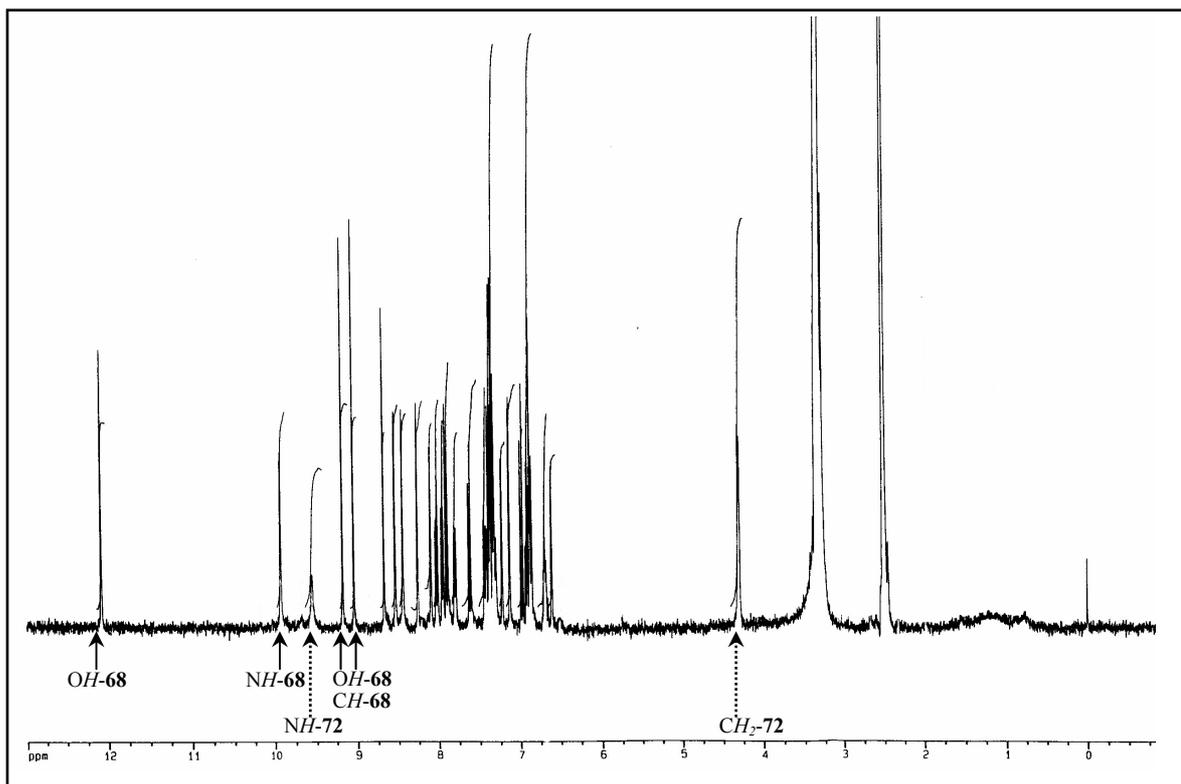
Da als Zwischenstufen in allen drei Fällen Ionen auftreten bzw. solche transportiert werden, kann die in polaren Lösungsmitteln gemachte Beobachtung der beschleunigten Umlagerung nicht unbedingt als Entscheidungskriterium für einen der postulierten Mechanismen herangezogen werden.

$^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Oxidationsproduktes der Verbindung **70** nach unterschiedlicher „Lagerungsdauer“ zeigen Gemische vom Chinon **72** und der Schiff'schen Base **68**, die auf eine Gleichgewichtseinstellung hindeuten.

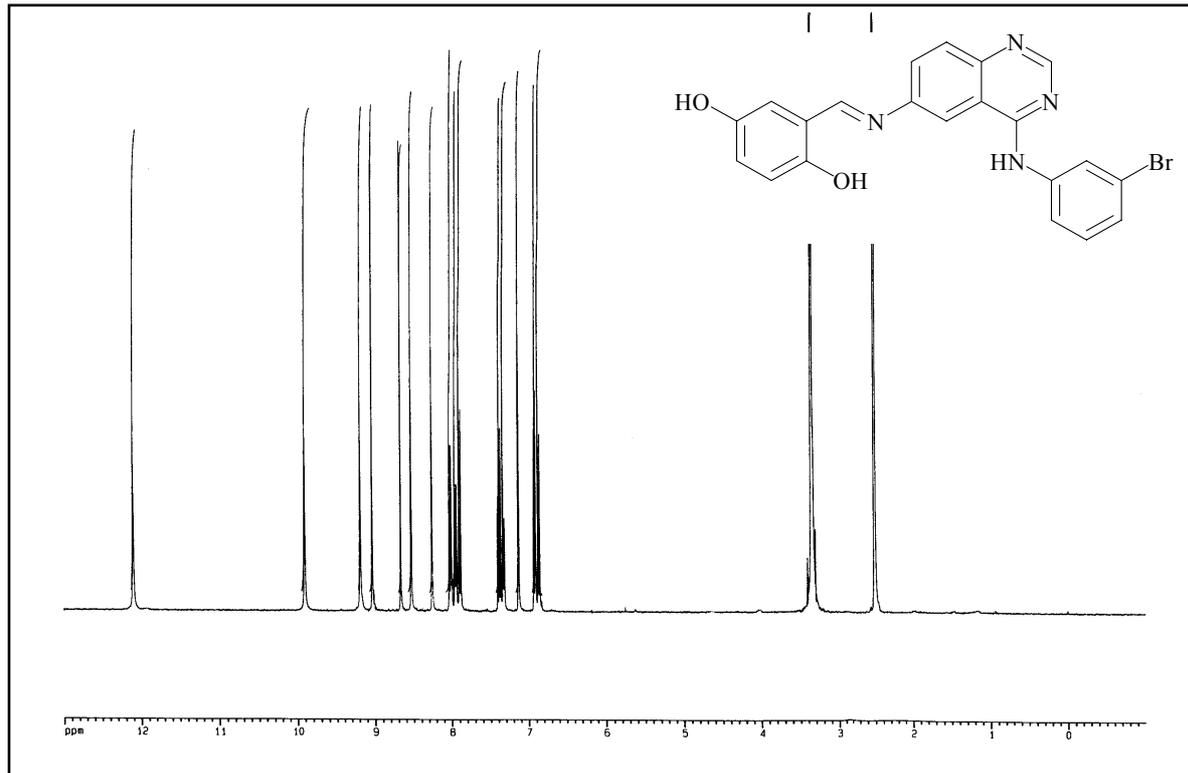
Im Protonenresonanzspektrum (Bild 125) wird aufgrund des Signalmusters ein solches Gemisch nachgewiesen. Zum Vergleich ist dazu im Bild 126 ein  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Schiff'schen Base **68** abgebildet.

Die Umlagerung nach einem Radikal-Mechanismus würde jedoch vermutlich ausschließlich zur Schiff'schen Base **68** führen. Diese Beobachtung kann in den durchgeführten Experimenten jedoch nicht gemacht werden.

Ob eine intramolekulare Hydridwanderung oder ein intramolekularer Protonentransfer als wahrscheinlichster Mechanismus angesehen werden kann, kann mit den in den Experimenten gemachten Beobachtungen nicht grundsätzlich entschieden werden.



**Bild 125:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (DMSO) eines Gemisches der Verbindungen **72** und **68** (Verhältnis ca. 1:1)



**Bild 126:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Schiff'schen Base **68**, dem Umwandlungsprodukt des Chinons **72**

### 3.6.1.3 Versuche zur Herstellung von 2{[4-(3-Chlor-4-fluorphenylamino)-chinazolin-6-ylamino]-methyl}-[1,4]-benzochinon (**73**)

Analog der vorhergehenden Versuche gelingt auch die Oxidation des Chlor-fluoranilinochinazolin-Derivates **71** zum gewünschten Chinon-Derivat **73**.

Aber auch in diesem Fall wird eine schnelle Umwandlung in die entsprechende Schiff'sche Base **69** beobachtet, so dass die Isolierung des gewünschten Chinons **73** in reiner Form nicht möglich ist.

### 3.6.2 Mögliche *In-vivo*-Aktivierung der 6-Dihydroxybenzylamino-substituierten Chinazoline 70 und 71 zu irreversiblen EGFR-TK-Inhibitoren

Wie vorhergehend beschrieben ist, kann die Oxidation der Diole 70 und 71 zu den entsprechenden Chinon-Derivaten 72 und 73 führen. Diese sind jedoch aufgrund ihrer schnellen Umwandlung in die entsprechenden Schiff'schen Basen 68 und 69 nicht in reiner Form isolierbar.

Die Halbwertszeit der Chinon-Verbindungen 72 und 73 beträgt je nach Bedingungen (Lösungsmittel, Temperatur etc.) einige Stunden bis Tage.

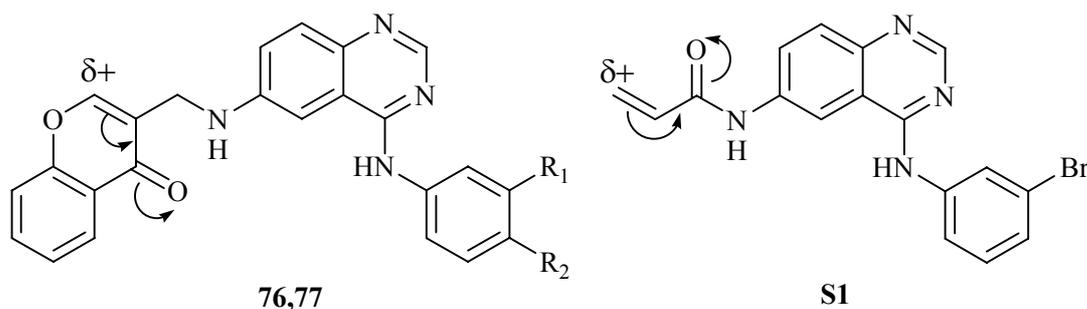
Es ist jedoch theoretisch denkbar, dass die Chinazoline 70 und 71 durch oxidative Biotransformation unter *In-vivo*-Bedingungen in die entsprechenden Chinon-Derivate umgewandelt werden und so als irreversible EGFR-TK-Inhibitoren wirken.

Eine entsprechende Oxidation des Dihydroxyphenyl-Restes ist z.B. durch die zellulären Enzymsysteme Prostaglandin-Endoperoxidase, Makrophagen-Peroxidase (beides Peroxidasen) oder Cytochrom-P450 möglich, die nachweislich die Oxidation von Hydrochinonen zu Chinonen katalysieren können [167,168].

Dies ist in ähnlicher Weise für die Phenol-Derivate Phenacetin und Paracetamol bekannt, die im Rahmen ihrer Biotransformation durch Cytochrom-P450 zu reaktiven Chinoniminen oxidiert werden können. Von diesen weiß man, dass sie aufgrund ihrer Elektrophilie kovalent an Proteine binden können [169].

### 3.6.3 4-Anilinochinazoline und Salicylsäure-Derivate mit Chromon-Teilstruktur

Da die selektive Isolierung der 4-Anilinochinazoline mit einer Chinon-Teilstruktur (Verbindungen **72** und **73**) nicht gelingt, soll ein anderer Michael-Akzeptor in die 6-Seitenkette eingebaut werden. Dafür bieten sich 4-Chromone an.



**76:** R<sub>1</sub>=Br, R<sub>2</sub>=H

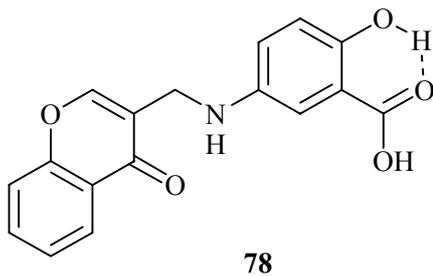
**77:** R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=F

**Bild 127:** Chromon-Derivate **76** und **77** und der irreversible EGFR-TK-Inhibitor **S1**

Wie im Bild 127 dargestellt ist, enthalten auch die Verbindungen **76** und **77** eine, den Acrylamid-Derivaten nach *Smaill et al.* entsprechende, Michael-Akzeptor-Position am C2-Atom der Chromon-Teilstruktur.

Das elektrophile C2-Atom der Chromon-Teilstruktur sollte wiederum in der Lage sein, kovalent an die SH-Gruppe des Cysteins 773 zu binden. Allerdings sind durch den vergleichsweise großen Chromon-Substituenten auch räumliche Diskrepanzen bei der Einlagerung in die ATP-Bindungstasche der EGFR-TK-Domäne möglich, die die zur Bindungsbildung nötige Annäherung zwischen dem C2-Atom und Cystein verhindern könnten.

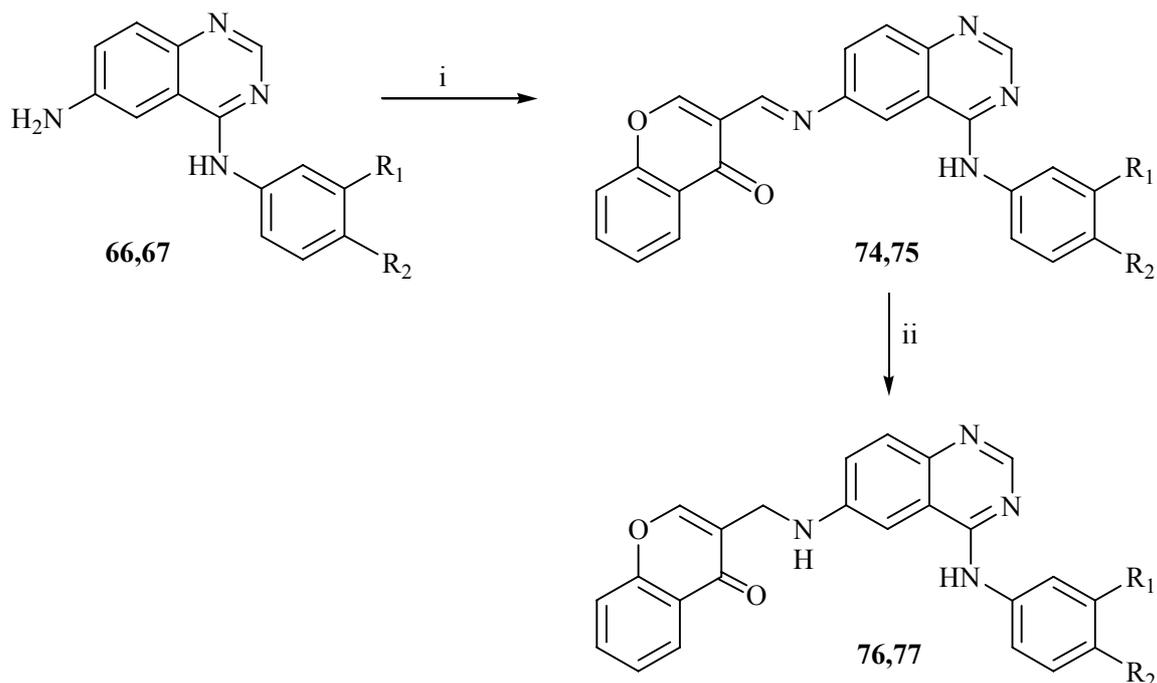
Des Weiteren soll das Salicylsäure-Derivat **78** (Bild 128) hergestellt und auf seine EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestet werden. Infolge der bioisosteren Verwandtschaft des Chinazolins mit der Salicylsäure erhofft man sich eine den Chinazolininen entsprechende Einlagerung der Verbindung in die ATP-Bindungstasche der EGFR-TK. Dadurch wäre eventuell auch in diesem Fall eine Michael-Reaktion zwischen dem elektrophilen C2-Atom der Chromon-Teilstruktur und der SH-Gruppe des Cysteins 773 möglich.



**Bild 128:** Das Salicylsäure-Derivat **78**

### 3.6.3.1 Herstellung von 4-Anilinochinazolinen mit Chromon-Teilstruktur (76,77)

Wie im Bild 129 dargestellt ist, soll zur Herstellung der Chromon-Derivate **76** und **77** zunächst versucht werden, die 6-Aminochinazoline **66** und **67** in einer Kondensationsreaktion mit 3-Formylchromon zu den entsprechenden Schiff'schen Basen **74** und **75** umzusetzen. Aus diesen sollen durch selektive Reduktion der Imino-Gruppe die Wunschverbindungen **76** und **77** erhalten werden.



**66,74,76:** R<sub>1</sub>=Br, R<sub>2</sub>=H

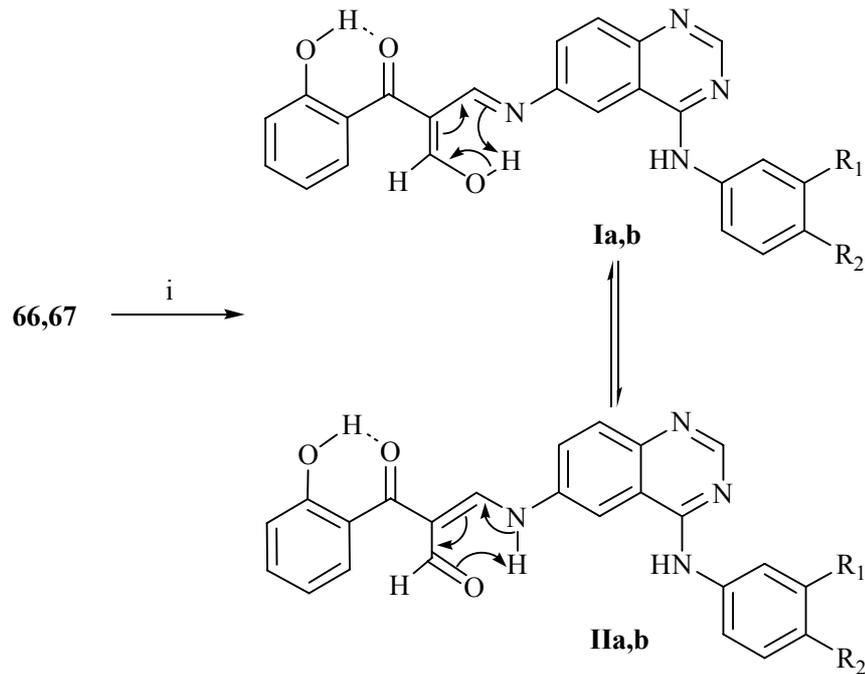
**67,75,77:** R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=F

i) 3-Formylchromon, Eisessig/Ethanol, ΔT; ii) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

**Bild 129:** Syntheseplanung zur Herstellung von **76** und **77**

Als Produkte der Kondensationsreaktionen der Amine **66** und **67** mit dem 3-Formylchromon können jedoch nicht, wie erwartet, die Imine **74** und **75** isoliert werden. Das jeweils isolierte Reaktionsprodukt konnte in beiden Fällen nicht vollständig charakterisiert werden.

Laut den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren kann es sich bei den isolierten Produkten um Gemische der ringoffenen, tautomeren Verbindungen **I** und **II** handeln (Bild 130).



**66, Ia, Iia:**  $R_1 = \text{Br}$ ,  $R_2 = \text{H}$

**67, Ib, IIb:**  $R_1 = \text{Cl}$ ,  $R_2 = \text{F}$

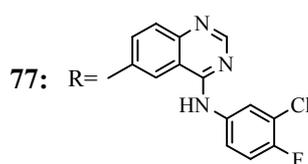
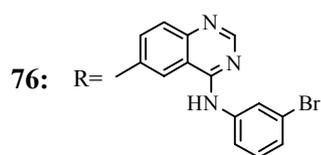
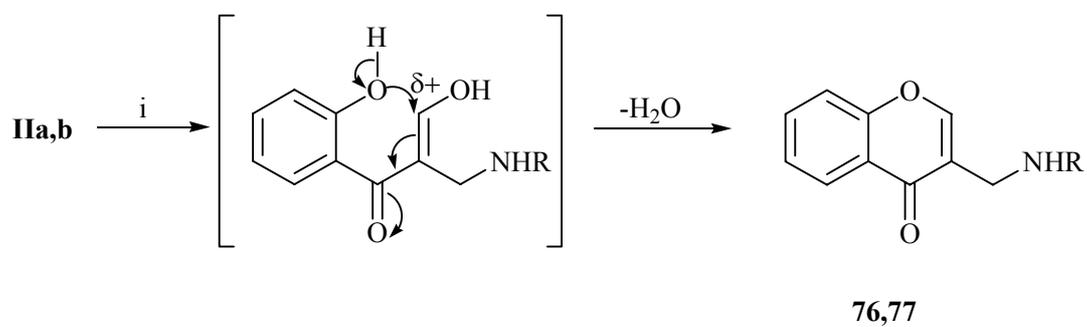
i) 3-Formylchromon, Eisessig/Ethanol,  $\Delta T$

**Bild 130:** Postuliertes Produktgemisch der Umsetzung der Amine **66** und **67** mit 3-Formylchromon

Diese tautomeren Verbindungen **Ia,b** und **IIa,b** resultieren aus dem nukleophilen Angriff der primären aromatischen Amino-Gruppe an das elektrophile C2-Atom des Chromon-Rings. Das hat eine Ringöffnung zur Folge (Bild 131).



Gruppe auf den elektrophilen  $\beta$ -Kohlenstoff der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonyl-Teilstruktur und nachfolgender Wasserabspaltung (Bild 132).

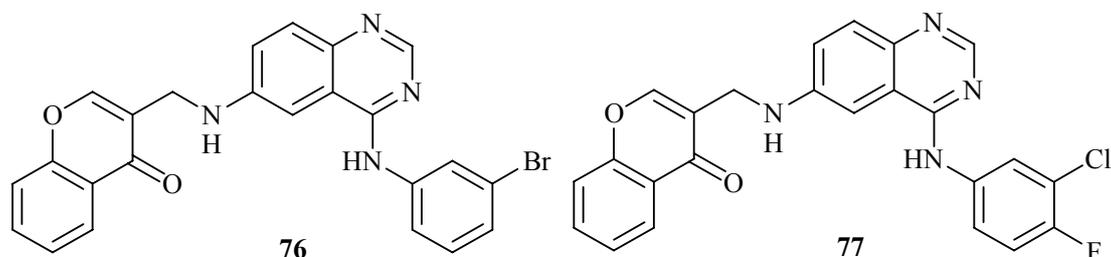


i) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

**Bild 132:** Herstellung von **76** und **77**

### 3.6.4 EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der Chromon-Derivate 76 und 77

Die im Bild 133 dargestellten Chromon-Derivate **76** und **77** wurden auf ihre *In-vitro*-EGFR-TK inhibitorische Aktivität getestet.



**Bild 133:** Die auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getesteten Chromon-Derivate **76** und **77**

Die inhibitorischen Aktivitäten beider Verbindungen wurden in einer Konzentration von jeweils 1  $\mu$ M bestimmt (Abschnitt 4.4.2, Methode **B**). In dieser Konzentration wird das Enzym durch das Bromanilino-Derivat **76** zu 32 Prozent und durch das Chlor-fluoranilino-Derivat **77** zu 25 Prozent inhibiert.

Damit sind beide Verbindungen im Vergleich mit den zuvor getesteten 4-Anilinochinazolinen **70** und **71** deutlich schwächer wirksam.

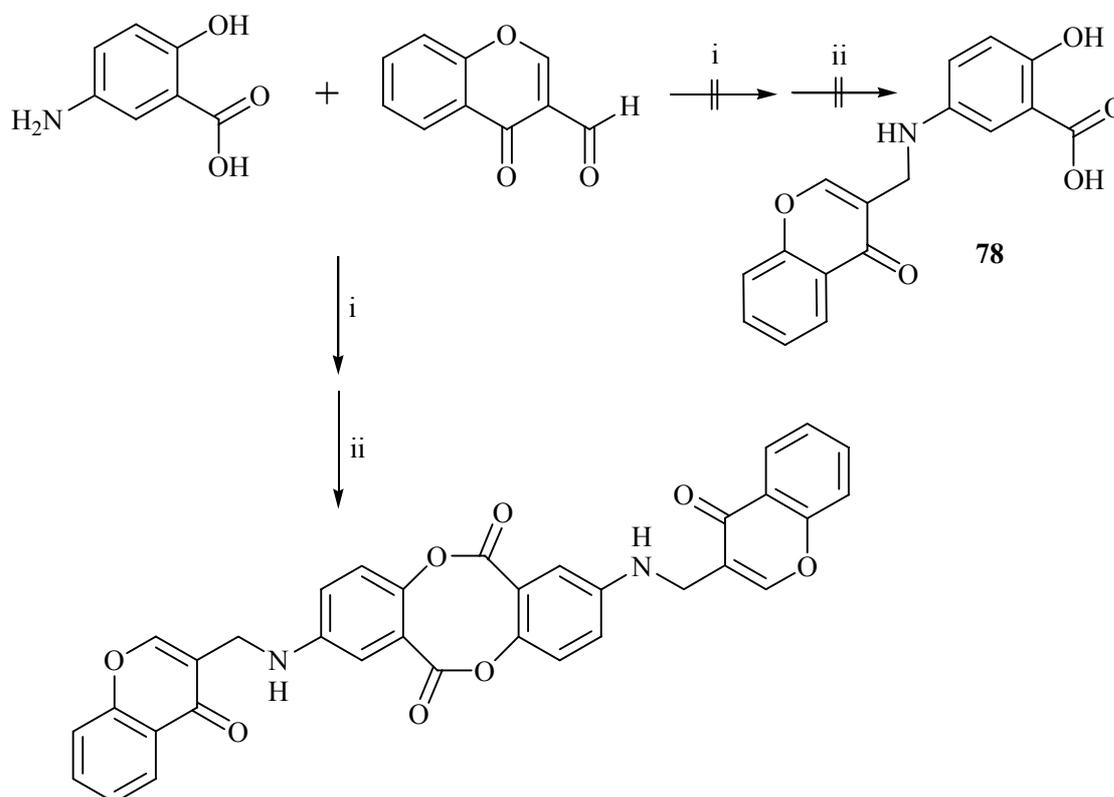
Ob die Chromon-Derivate **76** und **77** dabei zu einer irreversiblen Hemmung des Enzyms führen, konnte bisher nicht überprüft werden.

### 3.6.5 Versuch zur Herstellung eines Salicylsäure-Derivates mit Chromon-Teilstruktur

Zur Herstellung des gewünschten Salicylsäure-Derivates **78** wird zunächst die 5-Aminosalicylsäure mit 3-Formylchromon umgesetzt. Analog der vorhergehend beschriebenen Umsetzung der 6-Aminochinazolin-Derivate **66** und **67** mit 3-Formylchromon wird unter diesen Bedingungen wiederum eine Öffnung des Chromon-Rings beobachtet.

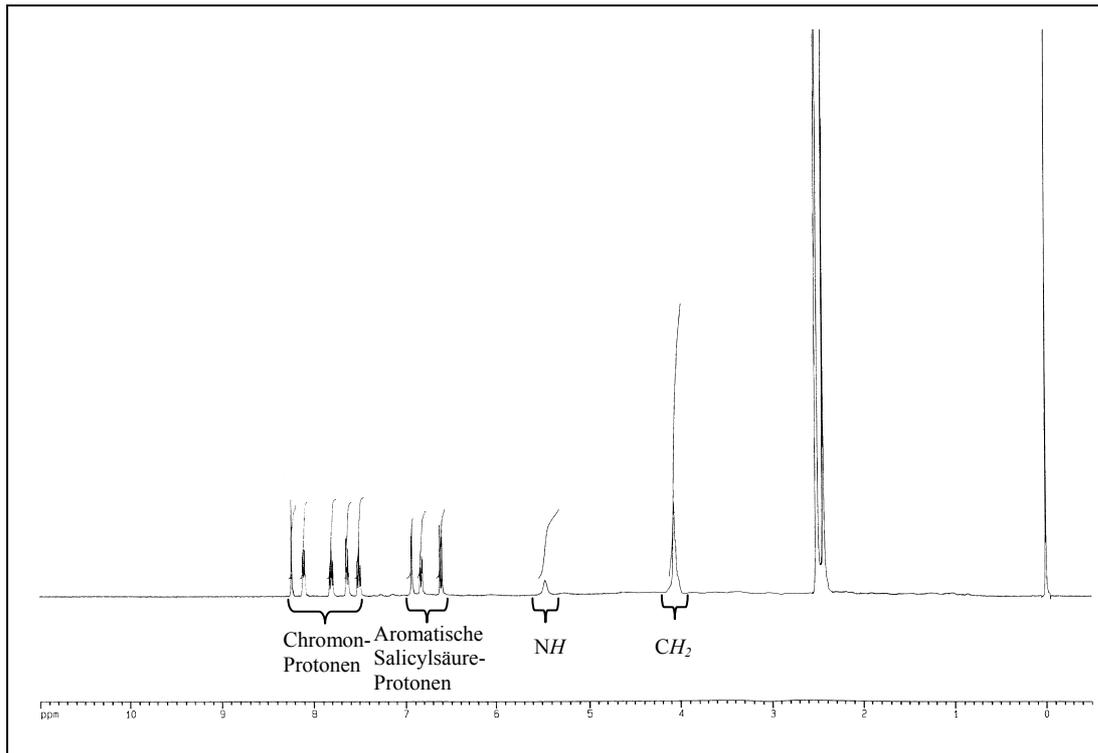
Die anschließend durchgeführte Reduktion mit Borandimethylamin-Komplex führt jedoch in diesem Fall nicht zum gewünschten Chromon-Derivat **78**, sondern wahrscheinlich zu dem im folgenden Bild 134 dargestellten Ester aus zwei Molekülen der Wunschverbindung.

Das wird aus dem im Bild 135 dargestellten Kernresonanzspektrum ersichtlich.



i) Ethanol/Eisessig,  $\Delta T$ ; ii) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

**Bild 134:** Umsetzung der 5-Aminosalicylsäure mit 3-Formylchromon und nachfolgende Reduktion



**Bild 135:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (DMSO) des als Produkt postulierten Dimers

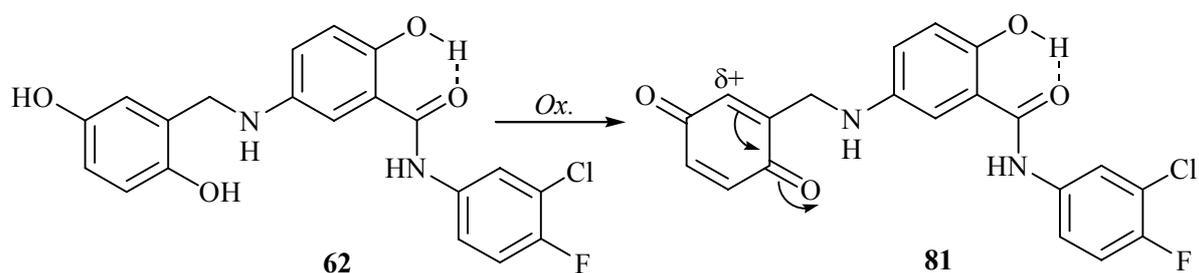
Das Kernresonanzspektrum des erhaltenen Produktes zeigt nur noch ein austauschbares Signal bei 5.46 ppm, das der NH-Gruppe zugeordnet werden kann. Somit fehlen die Resonanzen der beiden OH-Gruppen.

Da alle anderen Signale den Protonen der Chromon- sowie der Salicyloyl-Teilstruktur und einer Methylen-Gruppe zugeordnet werden können, kommt als Reaktionsprodukt ein Ester aus zwei Molekülen der Wunschverbindung in Betracht.

### 3.6.6 Salicylanilide mit Chinon-Teilstruktur

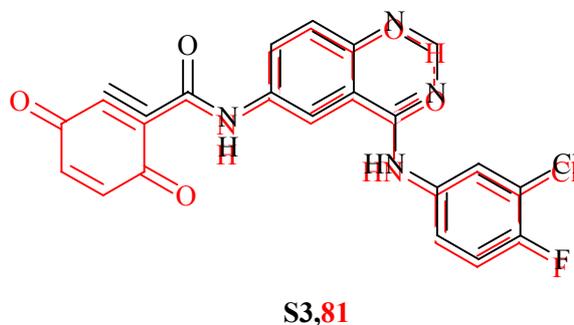
Da die Oxidation der 1,4-Hydrochinon-Teilstruktur zum entsprechenden Chinon bei den Chinazolinen **70** und **71** zu instabilen Produkten führt, soll als nächstes versucht werden, die in dem zu **71** bioisosteren Lavendustin A-Derivat **62** ebenfalls enthaltene Hydrochinon-Teilstruktur in ein Chinon zu überführen.

Bild 136 zeigt das gewünschte Salicylanilid mit Chinon-Teilstruktur (Verbindung **81**).



**Bild 136:** Herstellung von **81** ausgehend von **62**

Im nachfolgenden Bild 137 ist dargestellt, wie das 6-Acrylamid-Derivat des 4-Anilinochinazolins **S3** und das gewünschte Salicylanilid mit Chinon-Teilstruktur **81** aufgrund der angenommenen Bioisosterie der Salicylsäure und des 4-Aminochinazolins zur Deckung gebracht werden können.



**Bild 137:** Das 4-Anilinochinazolin **S3** und das Salicylanilid **81** überlagert dargestellt

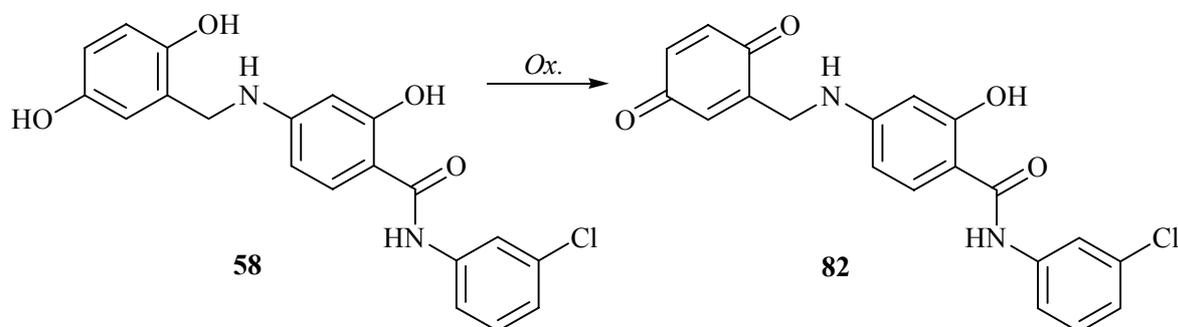
Dabei ist erkennbar, dass die Position des elektrophilen Kohlenstoffatoms des Chinonrings in **81** genau der des Michael-Akzeptors in der 6-Acrylamid-Seitenkette des irreversiblen EGFR-TK-Inhibitors **S3** entspricht.

Demnach müsste das elektrophile Kohlenstoffatom der Chinon-Teilstruktur in **81** bei Einlagerung in die ATP-Bindungstasche der EGFR-TK-Domäne ebenfalls in die Nähe des Cysteins 773 gelangen, von dem bekannt ist, dass dessen SH-Gruppe nukleophil an das  $\beta$ -Kohlenstoffatom der Acrylamid-Seitenkette der Verbindung **S3** addieren kann.

Wie Verbindung **S3** müsste das Salicylanilid mit Chinon-Teilstruktur **81** deshalb in der Lage sein, eine kovalente Bindung zum Cystein 773 auszubilden und das Enzym irreversibel zu blockieren.

Des Weiteren wird das Chinon-Derivat **82** angestrebt. Dies wäre durch Oxidation des Salicylanilides mit 4-Dihydroxybenzylamino-Seitenkette **58** zugänglich.

Im Gegensatz zum Salicylanilid **81** mit 5-Aminosalicylsäure-Struktur, die der des Lavendustin A's entspricht, handelt es sich bei Verbindung **82** um ein Derivat der 4-Aminosalicylsäure.



**Bild 138:** Herstellung von **82** ausgehend von **58**

Wie jedoch bereits beschrieben, zeigen alle Lavendustin A-verwandten Salicylanilide, also sowohl die 5-Aminosalicylsäure-, als auch die 4-Aminosalicylsäure-Derivate, nahezu die gleichen EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten.

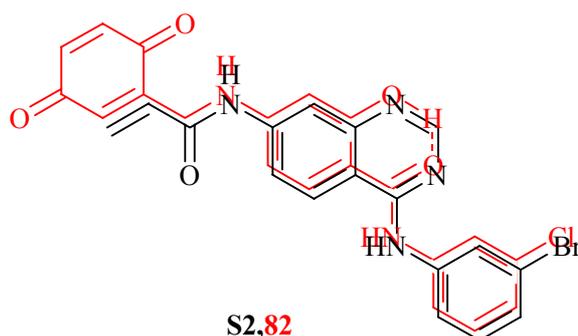
Dies kann wiederum auf die Bioisosterie der Salicylsäure mit dem 4-Aminochinazolin zurückgeführt werden. Aufgrund dieser entspricht nämlich eine Substitution der Salicylsäure

in Position 4 der einer 7-Substitution des Chinazolins und eine Substitution der Salicylsäure in Position 5 der einer 6-Substitution des Chinazolins.

Durch die bereits beschriebenen Untersuchungen zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen der 4-Anilinochinazoline ist bekannt, dass sowohl eine 6-, als auch eine 7-Substitution des Chinazolins zu einer Steigerung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten im Vergleich mit den entsprechenden 6- bzw. 7- unsubstituierten 4-Anilinochinazolinen führt.

Des Weiteren sind nach Befunden von *Smaill et al.* auch 7-Acrylamid-substituierte 4-Anilinochinazoline in der Lage, die EGFR-TK durch Michael-Addition des  $\beta$ -Kohlenstoffatoms der Acrylamid-Seitenkette an die SH-Gruppe des Cysteins 773 irreversibel zu inhibieren [151,152].

Somit könnte der Austausch der Hydrochinon- gegen eine Chinon-Teilstruktur in der 4-Seitenkette des Salicylanilides **58** zu einem irreversiblen EGFR-TK-Inhibitor führen.



**Bild 139:** Das 4-Anilinochinazolin **S2** und das Salicylanilid **82** überlagert dargestellt

Wie im Bild 139 dargestellt ist, kann das gewünschte Salicylanilid mit Chinon-Teilstruktur **82** mit dem irreversibel EGFR-TK-inhibitorisch wirksamen 7-Acrylamid-substituierten 4-Anilinochinazolin **S2** nach *Smaill et al.* zur Deckung gebracht werden.

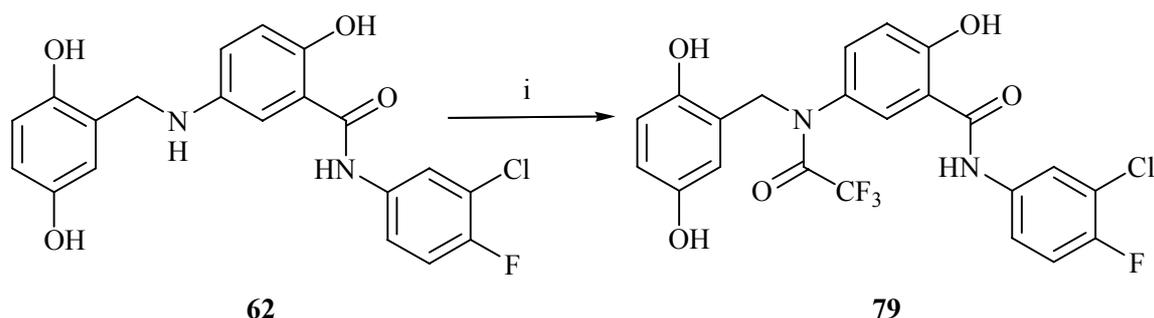
### 3.6.6.1 Versuche zur Herstellung von *N*-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-5-[(3,6-dioxocyclohexa-1,4-dienylmethyl)-amino]-2-hydroxybenzamid (**81**)

Die Herstellung der Verbindung **81** soll durch Oxidation der Hydrochinon-Teilstruktur des entsprechenden Salicylanilides **62** erfolgen.

Wegen der ebenfalls leicht oxidierbaren *p*-Aminophenol-Teilstruktur ist die selektive Oxidation der Hydrochinon-Teilstruktur in Verbindung **62** jedoch nicht möglich.

Durch eine Acylierung der Amino-Funktion könnte aber die Oxidation der *p*-Aminophenol-Teilstruktur verhindert werden.

Deshalb wird zunächst versucht, Verbindung **62** durch Erhitzen in Essigsäureanhydrid in das *N*-Acetyl-Derivat zu überführen. Unter diesen Bedingungen wird jedoch ein Zerfall des Moleküls beobachtet. Allerdings gelingt die Acylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid bei Raumtemperatur. Man erhält das gewünschte *N*-Trifluoracetyl-Derivat **79**.

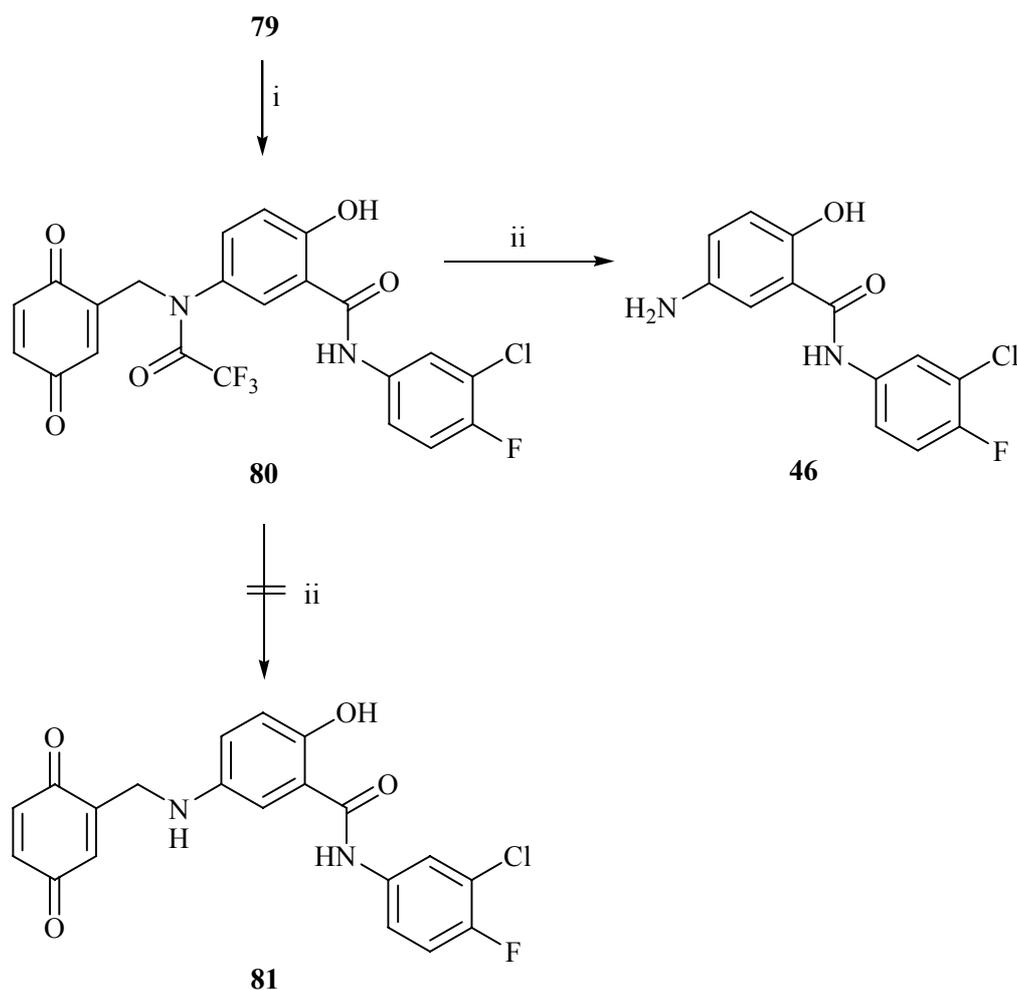


i) Trifluoressigsäureanhydrid, abs. Dioxan, RT

#### **Bild 140:** Herstellung von **79**

Verbindung **79** wird anschließend der Oxidation mit Cer(IV)-ammoniumnitrat unterzogen. Durch mehrfache säulenchromatographische Reinigung des dabei erhaltenen Rohproduktes kann das Chinon-Derivat **80** in reiner Form erhalten werden (Bild 141).

Zur anschließenden Abspaltung des Trifluoracetyl-Restes wird Verbindung **80** mit Kaliumcarbonat in wässrigem Methanol rückfließend erhitzt. Als Produkt wird allerdings nicht das gewünschte Chinon-Derivat **81**, sondern das 5-Aminosalicylanilid (**46**) isoliert (Bild 141).



i) Cer(IV)-ammoniumnitrat, Acetonitril/Wasser, RT; ii) Kaliumcarbonat, Methanol/Wasser,  $\Delta T$

**Bild 141:** Oxidation von **79** zu **80** und anschließender Versuch zur Abspaltung der Trifluoracetyl-Schutzgruppe

Demnach kommt es unter den Bedingungen der Hydrolyse neben der erwünschten Abspaltung des Trifluoracetyl-Restes auch zu einer Abspaltung des „Chinon-2-ylmethyl“-Substituenten.

Der Versuch wird deshalb bei Raumtemperatur wiederholt. Dabei kann jedoch bereits nach einigen Minuten ebenfalls das primäre aromatische Amin **46** als Hauptprodukt nachgewiesen werden.

In einem weiteren Versuch wird Verbindung **80** in einer Mischung aus gleichen Teilen Ethanol und Wasser in Gegenwart von Kaliumcarbonat bei Raumtemperatur gerührt. Da nach

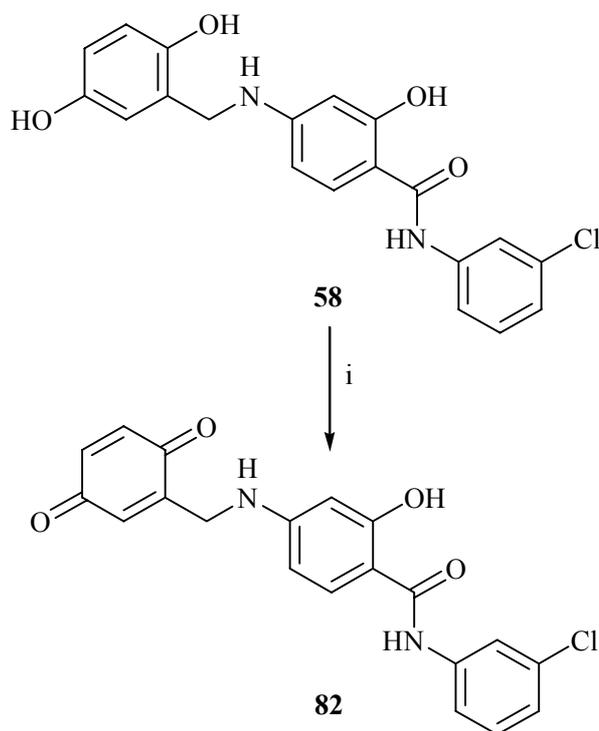
20 Stunden noch keine Umsetzung beobachtet werden kann, wird die Mischung weitere 24 Stunden bei 60 °C gerührt. Unter diesen Bedingungen kann kein Molekülbruch beobachtet werden.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt jedoch - neben den Signalen für die 2-OH-Gruppe, das 5-Amino-NH und das Amid-NH - weitere austauschbare Signale bei 8.76 und 8.55 ppm.

Diese können den phenolischen OH-Gruppen einer Hydrochinon-Verbindung zugeordnet werden. Eine weitere Aufreinigung des Rohproduktes wird deshalb nicht versucht.

### 3.6.6.2 Herstellung von *N*-(3-Chlorphenyl)-4-[(3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-dienyl-methyl)-amino]-2-hydroxybenzamid (**82**)

Die Herstellung des gewünschten Salicylanilid-Derivates mit Chinon-Teilstruktur **82** erfolgt direkt durch Oxidation des entsprechenden Hydrochinon-Derivates **58** mit Tetrabutylammoniumperjodat.



i) Tetrabutylammoniumperjodat, Dichlormethan/Methanol, RT

**Bild 142:** Herstellung von **82**

Durch mehrfache säulenchromatographische Reinigung des dabei erhaltenen Rohproduktes gelingt tatsächlich die Isolierung der gewünschten Verbindung **82** in analysenreiner Form.

Diese ist relativ stabil, allerdings wird auch hier eine, wenn auch schwache, Tendenz zur Umlagerung in das entsprechende Hydrochinon-Derivat der Schiff'schen Base **50** beobachtet.

### **3.6.7 EGFR-TK-inhibitorische Aktivität des Salicylanilides mit Chinon-Teilstruktur **82****

Die EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der Verbindung **82** beträgt in einer Konzentration von 0.1  $\mu\text{M}$  19 Prozent (Abschnitt 4.4.2, Methode B).

Ob dabei eine irreversible Hemmung des Enzyms erfolgt, konnte bisher nicht überprüft werden.

Ein direkter Vergleich mit der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität des entsprechenden Hydrochinon-Derivates **58** ist nicht möglich, da dieses nur in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  getestet wurde.

In dieser Konzentration beträgt dessen inhibitorische Aktivität 83 Prozent. Dadurch kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob Verbindung **82** inhibitorisch aktiver oder weniger aktiv ist als Verbindung **58**.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Oxidation des ringoffenen Salicylanilides **58** zum Chinon zu einer stabileren Verbindung führt, als das bei den Chinazolin-Verbindungen der Fall ist.

Hier kann eine Rückumwandlung der Chinon-Verbindung in eine Schiff'sche Base mit Hydrochinon-Struktur dementsprechend nicht in dem Maße beobachtet werden, wie es in der 4-Anilinochinazolin-Reihe der Fall ist.

Das ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in der Chinazolin-Reihe die Schiff'schen Basen, in denen die Imino-Funktion ein Hydrochinon-Strukturelement mit einem Chinazolin-Ring über eine Konjugation verbindet, energetisch günstiger sind, als im Falle des vergleichbaren ringoffenen Salicylanilides. Hier würde eine Imino-Funktion den Hydrochinon- mit einem Salicyloyl- Rest verbinden, was energetisch ungünstiger sein könnte.