

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer reversibler bzw. irreversibler EGFR-TK-Inhibitoren mit Salicyloyl- bzw. Salicyloyl-bioisosterer Chinazolin-Teilstruktur.

1) Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von entsprechenden Salicyloylindolen. Dabei konnte auf Ergebnisse von *Witzel* zurückgegriffen werden, der die Synthese zytotoxisch wirksamer Salicyloylindole gelungen war [109].

Die Verbindung **SW 62** (Bild 144) zeigt starke zytotoxische Effekte im *In-vitro*-MCF-7-Zelltest, wobei der Wirkmechanismus bisher nicht geklärt ist.

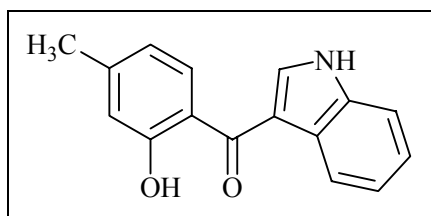


Bild 144: Die Verbindung **SW 62**

SW 62 hat zusätzlich auch schwache EGFR-TK-inhibitorische Eigenschaften (18 Prozent/ 10 μM). Durch Variationen der Salicyloylindol-Struktur, ausgehend von Verbindung **SW 62**, sollte in Anlehnung an *Traxler et al.* eine Steigerung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität erreicht werden [116].

Deshalb wurde zunächst das Salicyloylindol **15** hergestellt. Dieses Salicyloylindol lässt sich strukturell mit dem EGFR-TK-inhibitorisch aktiven Isoflavon **T1** ($\text{IC}_{50} = 0.1 \mu\text{M}$) von *Traxler et al.* vergleichen.

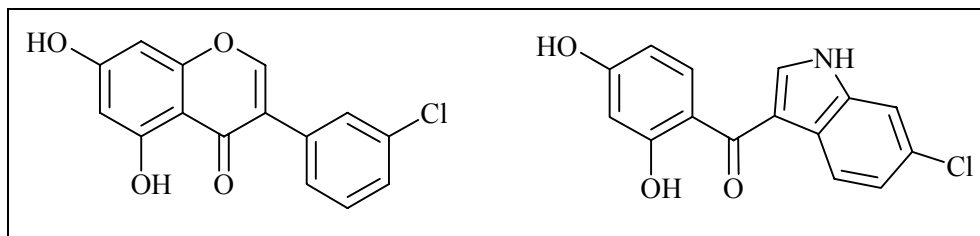


Bild 145: Das Isoflavon **T1** und das Salicyloylindol **15**

Die Herstellung von Salicyloylindolen gelingt durch Reduktion von 2'-Nitroisoflavonen und nachfolgender Ringtransformation.

Die Synthese des 2'-Nitroisoflavons **9** erfolgte dabei über fünf Stufen ausgehend von 4-Chlor-2-nitrotoluen (Bild 146).

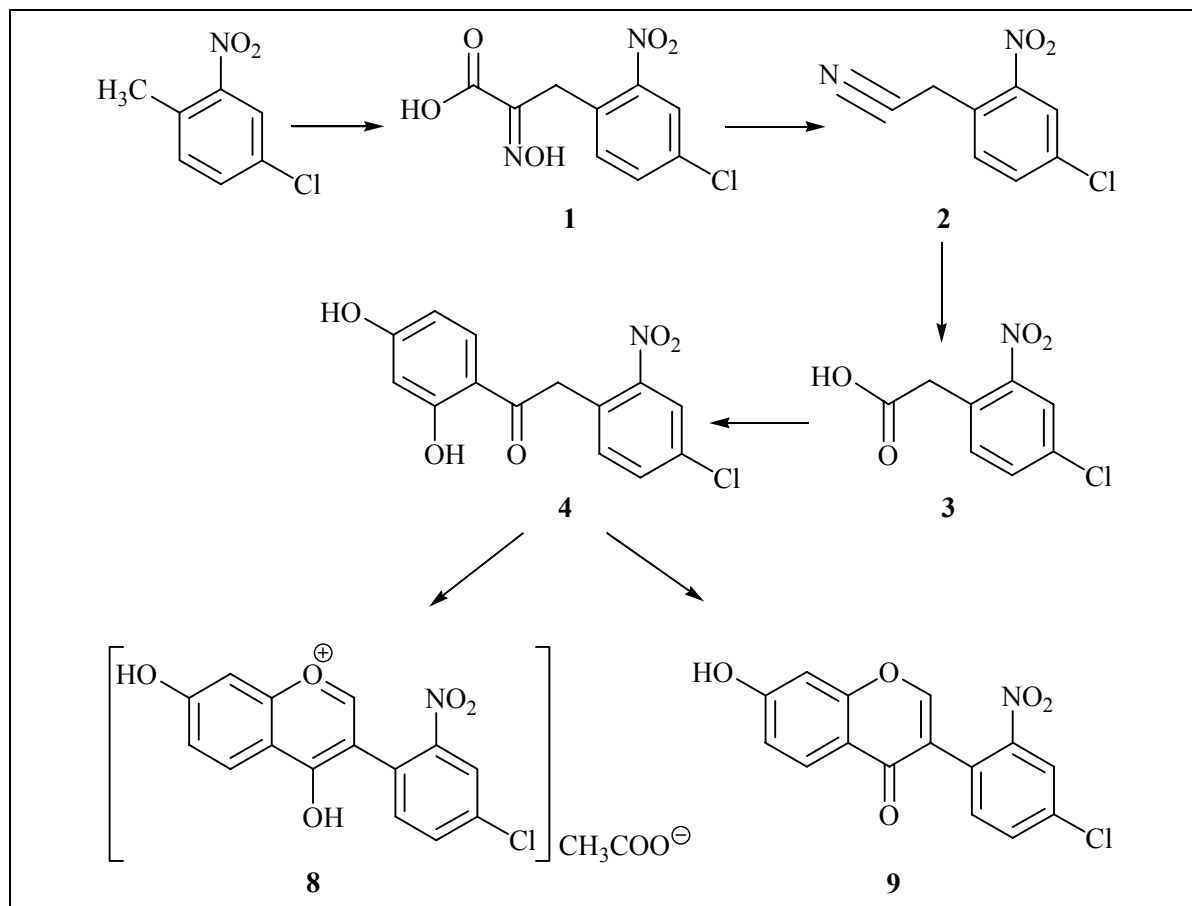


Bild 146: Synthese des Isoflavons **9**

Zunächst wurde die Schlüsselverbindung **2** nach einer Patentschrift der CIBA-GEIGY-AG [117] hergestellt. Durch Verseifung von **2** erhielt man die Phenyllessigsäure **3**, die anschließend mit Resorcin in einer Friedel-Crafts-Alkanoylierung zum Ethanon **4** weiter umgesetzt wurde (Bild 146).

Dieses wurde durch Ringschluss mit *N,N*-Dimethylformamid-dimethylacetal in das Isoflavon **9** übergeführt. Nach Erhitzen in Essigsäure entstand jedoch das Pyryliumsalz **8** (Bild 146).

Das „freie“ Isoflavon **9** wurde nach Neutralisation der essigsauren Lösung und Extraktion mit Ethylacetat erhalten.

Die Umwandlung der 2'-Nitroisoflavone in Salicyloylindole erfolgt gewöhnlich durch Reduktion mit Palladiumkohle. Dieses Reduktionsverfahren versagt jedoch im Falle der Verbindung **15**, da unter diesen Bedingungen eine Abspaltung des Halogen-Substituenten erfolgt. Die Reduktion des Isoflavons **9** bzw. des Pyryliumsalzes **8** gelingt aber mit Zink in essigsaurer Lösung unter Erhalt des Chlor-Substituenten.

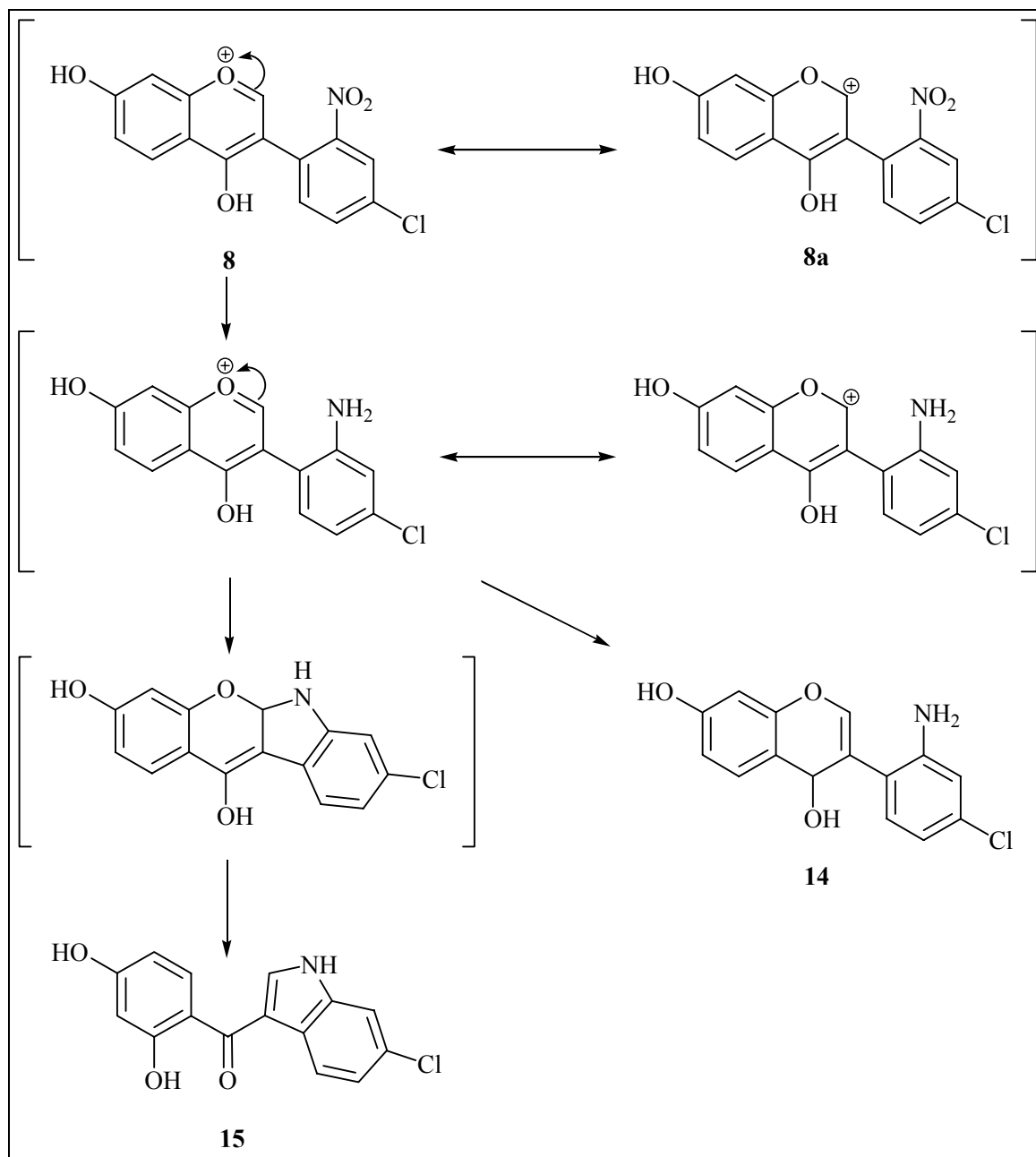


Bild 147: Reduktion des Pyryliumsalzes **8**

Dabei kann nach ca. 30 Minuten das 2'-Aminoisoflavon **14** als Hauptprodukt isoliert werden (Bild 146). Nach 75 Minuten findet die bevorzugte Bildung des Indols **15** statt.

Im Verlauf dieser Reduktion erfolgt eine Ringtransformation. Dabei addiert die resultierende Amino-Gruppe zunächst intramolekular an das Chromon-C2.

Ein resultierendes tetrazyklisches Benzopyranoindol-Derivat lagert sich unter Ringöffnung in das energetisch günstigere, Wasserstoffbrücken-stabilisierte Salicyloylindol **15** um (Bild 147). Es erweist sich als vorteilhaft, das aktivierte Pyryliumsalz **8** einzusetzen, da dessen C2-Atom besonders defizitär ist (Bild 147).

Das Salicyloylindol **15** zeigt in einer Konzentration von 10 μM eine EGFR-TK-inhibitorische Aktivität von 50 Prozent, was eine Wirkungssteigerung im Vergleich zur Verbindung **SW 62** bedeutet.

Des Weiteren wurde versucht, die zytotoxische Wirkung der Verbindung **SW 62** durch Einführung eines Chlor-Substituenten in den Indol-Teil zu erhöhen. Die Herstellung der dazu angestrebten Verbindung **16** (Bild 148) gelang jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht.

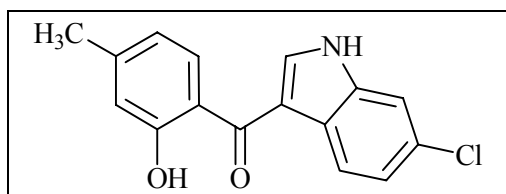
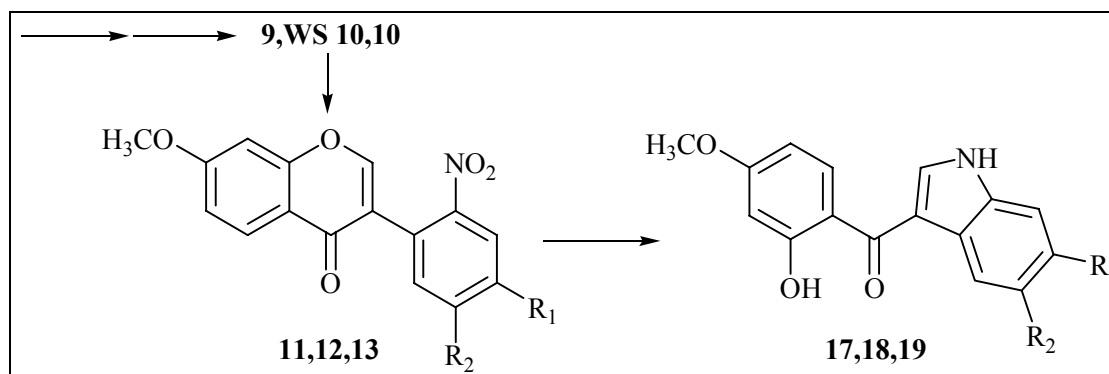


Bild 148: Die angestrebte Verbindung **16**

Als weitere Salicyloylindole wurden die 4'-Methoxy-Verbindungen **17-19** hergestellt. Auch hier erfolgte zunächst die Herstellung der entsprechenden 2'-Nitroisoflavone **9**, **WS 10** und **10**. Nach deren Umsetzung mit Methyljodid gelang die selektive Methylierung der 7-Hydroxy-Gruppen. Die resultierenden 7-Methoxy-2'-nitroisoflavone **11-13** wurden reduktiv in die gewünschten Salicyloylindole **17-19** umgelagert (Bild 149).



11,17: $R_1=\text{Cl}$, $R_2=\text{H}$

12,18: $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{Cl}$

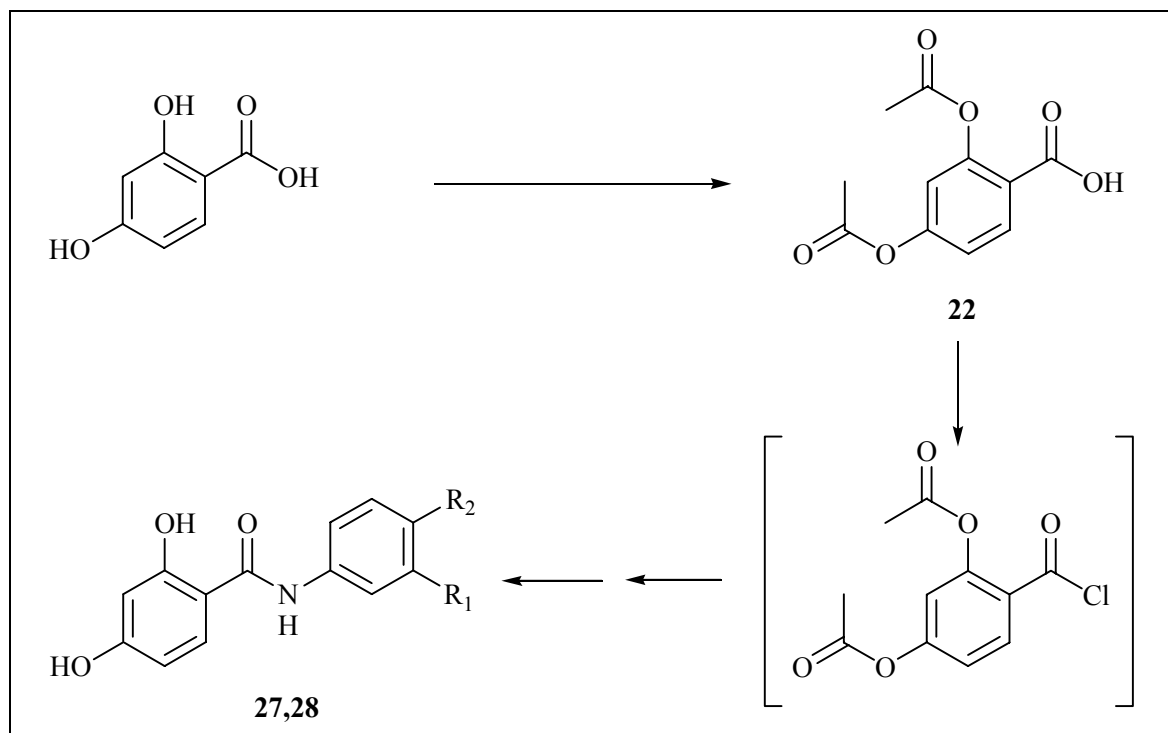
13,19: $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{H}$

Bild 149: Synthese der 4'-Methoxysalicyloylindole **17-19**

Stellvertretend für alle 4'-Methoxysalicyloylindole wurde die Verbindung **19** auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestet. Dabei wurde festgestellt, dass **19** in einer Konzentration von 10 μM nahezu unwirksam ist (inhibitorische Aktivität: 11 Prozent).

2) Im zweiten Kapitel wurden einfache 4-Hydroxysalicylanilide hergestellt. Diese sind, wie Verbindung **15**, an die *Traxler*-Konzeption angelehnt und können mit dem *Traxler'schen* Isoflavon **T1** verglichen werden.

Die Carbonyllaktivität der 4-Hydroxysalicylsäure musste durch Überführung in das Säurechlorid erhöht werden. Zuvor wurden die Hydroxy-Gruppen geschützt, da es sonst zu einer Selbstveresterung kommt (Bild 150).



27: R₁=Cl, R₂=H

28: R₁=Cl, R₂=F

Bild 150: Herstellung der Anilide **27** und **28**

Das resultierende Säurechlorid wurde *in-situ* mit 3-Chloranilin oder mit 3-Chlor-4-fluoranilin umgesetzt. Nach Abspaltung der Schutzgruppen gelangte man zu den angestrebten Salicylaniliden **27** und **28**.

Auf demselben Weg wurde das 4,6-Dihydroxysalicylanilid **26** erhalten (Bild 151).

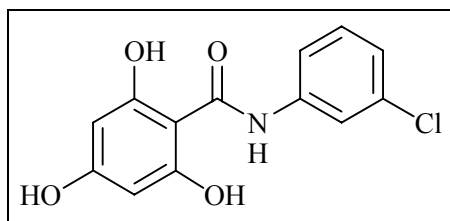


Bild 151: Salicylanilid **26**

Die Anilide **26** und **27** zeigen in einer Konzentration von 10 μM moderate EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten von 62 bzw. 63 Prozent.

Mit Hilfe des „Know-how“ der Anilid-Herstellung erfolgte in Anlehnung an Paullone (Bild 152) die Herstellung von Aniliden der 3-(2-Hydroxyphenyl)-propansäure.

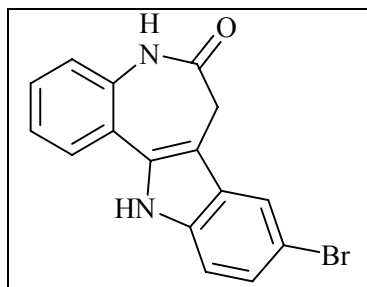
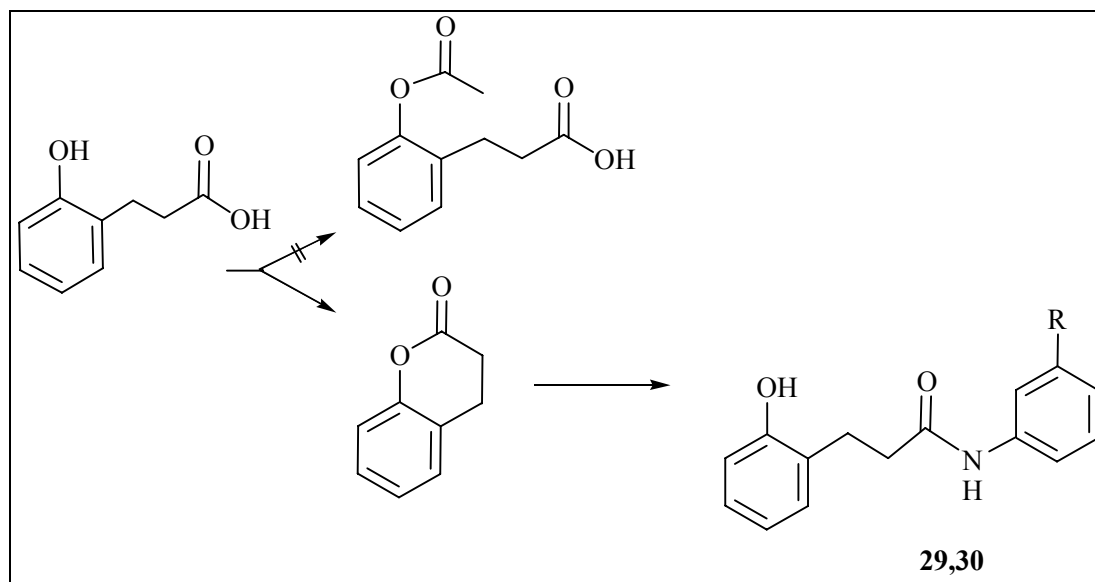


Bild 152: Kenpaullon als Leitstruktur der Paullone [120]

Dabei gelang die Herstellung der Verbindungen **29** und **30** durch Aminolyse des 3,4-Dihydrocoumarins, dem „inneren“ Ester der 3-(2-Hydroxyphenyl)-propansäure.

Diesen Ester hatte man überraschend erhalten, als man das 2-Acetoxy-Derivat der 3-(2-Hydroxyphenyl)-propansäure herstellen wollte.



29: R=H
30: R=Cl

Bild 153: Herstellung von **29** und **30**

Die Anilide **29** und **30** zeigen in der getesteten Konzentration von 10 μM keine EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten.

3) Im dritten Abschnitt wurde versucht, die EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten der Salicylanilide zu optimieren. Dazu wurde die Salicyloyl-Struktur von Lavendustin A abgewandelt.

Lavendustin A ist ein aus *Streptomyces griseolavendus* isolierter, potenter *In-vitro*-EGFR-TK-Inhibitor mit der pharmakophoren Teilstruktur **O1** (Bild 154).

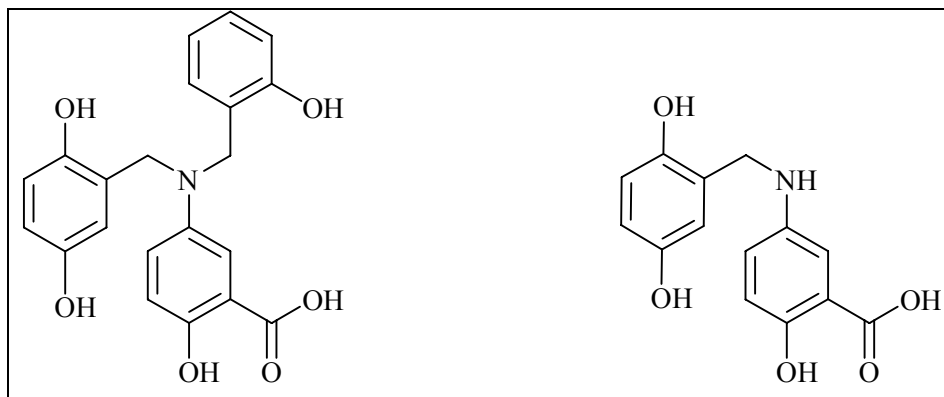


Bild 154: Lavendustin A (links) und dessen Pharmakophor **O1** (rechts) [88]

In Anlehnung an die *Traxler*-Konzeption wurden die Salicylanilide **58** und **59** hergestellt, deren Benzylamino-Seitenkette paraständig zur Carboxamid-Funktion angeordnet ist (Bild 155).

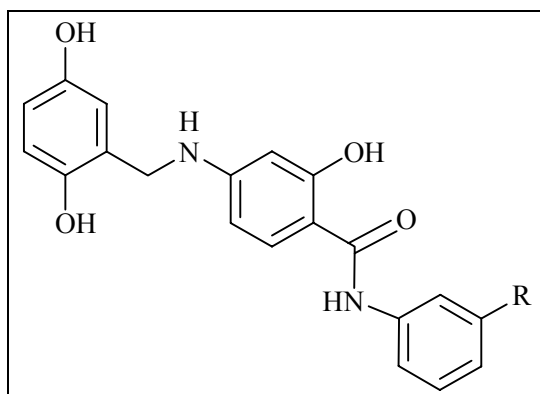
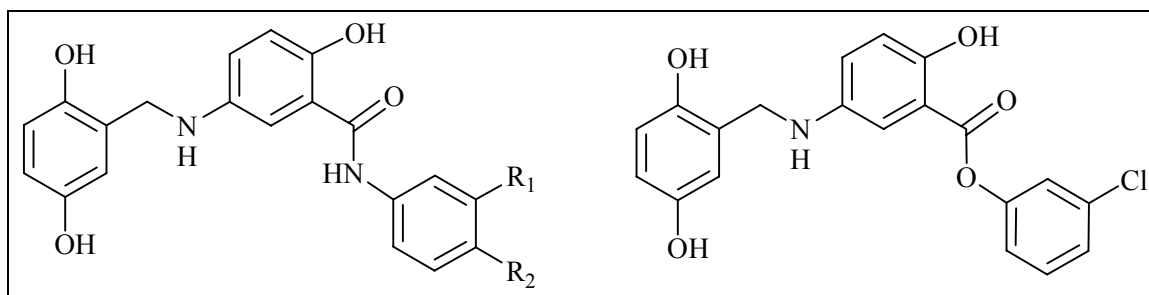


Bild 155: Verbindungen **58** ($R=Cl$) und **59** ($R=Br$)

Des Weiteren wurden Verbindungen hergestellt, die die Benzylamino-Struktur metaständig zur Carboxamid-Funktion aufweisen. Dabei war an Anilide (**60-62**) und Ester (**57**) gedacht worden (Bild 156).



60: R₁=Cl, R₂=H

61: R₁=Br, R₂=H

62: R₁=Cl, R₂=F

Bild 156: Die Anilide **60-62** und der Ester **57**

Die Herstellung der angestrebten Anilide **58-62** sollte aus den entsprechenden Phenylsalicylaten **55** und **56** erfolgen.

Zur Herstellung von **55** wurde Phenyl 4-aminosalicylat mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd zur Schiff'schen Base **47** umgesetzt. Durch selektive Reduktion der Imino-Funktion in **47** mit Boran-Dimethylamin-Komplex gelangte man zum Ester **55** (Bild 157).

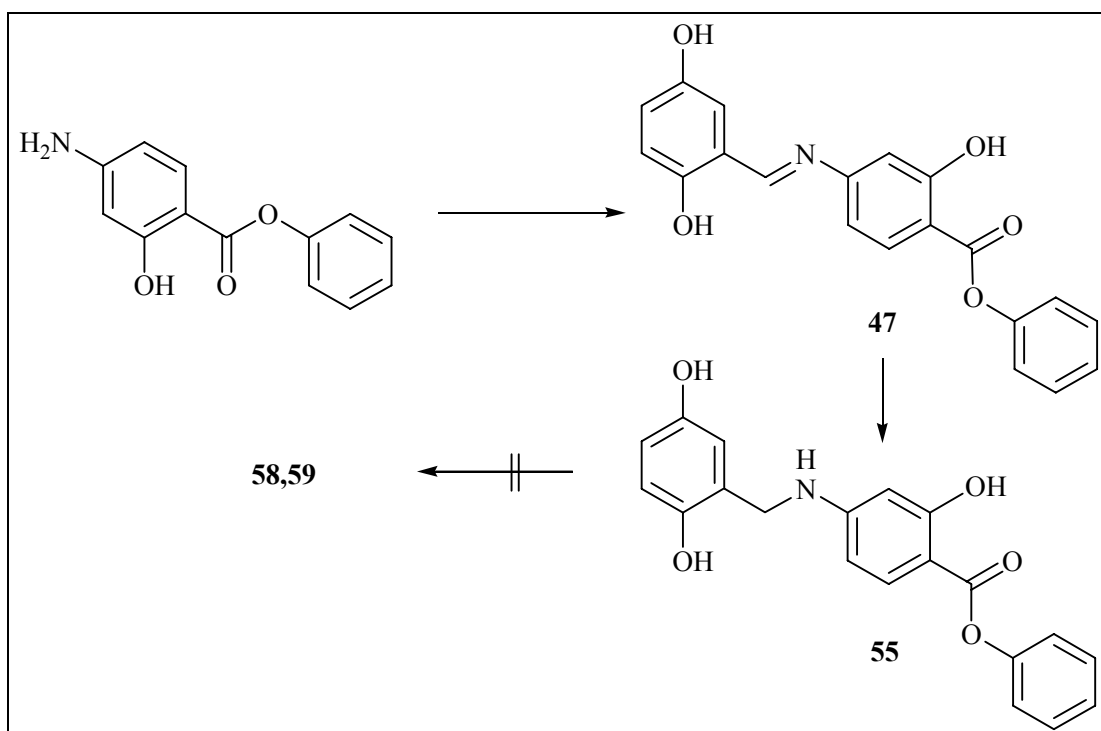


Bild 157: Herstellung von **55**

In entsprechender Weise erfolgte die Herstellung von **56**. In diesem Fall musste jedoch zunächst das Phenyl 5-aminosalicylat **33** aus 5-Nitrosalicylsäure hergestellt werden (Bild 158).

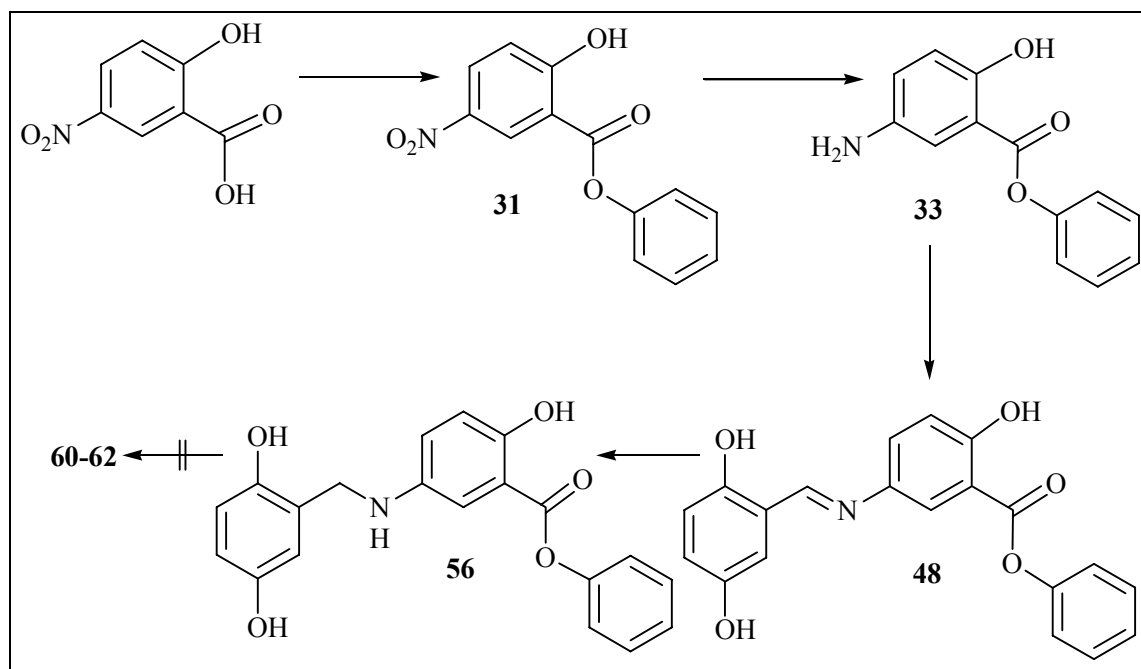


Bild 158: Herstellung von **56**

Auf gleichem Wege wurde der Ester **57** hergestellt, wobei die Veresterung mit 3-Chlorphenol erfolgte.

Die Aminolyse der Phenylester **55** und **56** zu den gewünschten Aniliden schlug jedoch fehl.

Die Synthese der Verbindungen **58-62** erfolgte deshalb durch Aminolyse der 4- und 5-Aminosalicylchloride. Zuvor mussten jedoch die 4- und die 5-Aminosalicylsäure durch Umsetzung mit Trifluoressigsäureanhydrid geschützt werden (**35,36**).

Im Bild 159 ist, stellvertretend für die Herstellung der Anilide **58-62**, die Synthese der Verbindung **58** dargestellt.

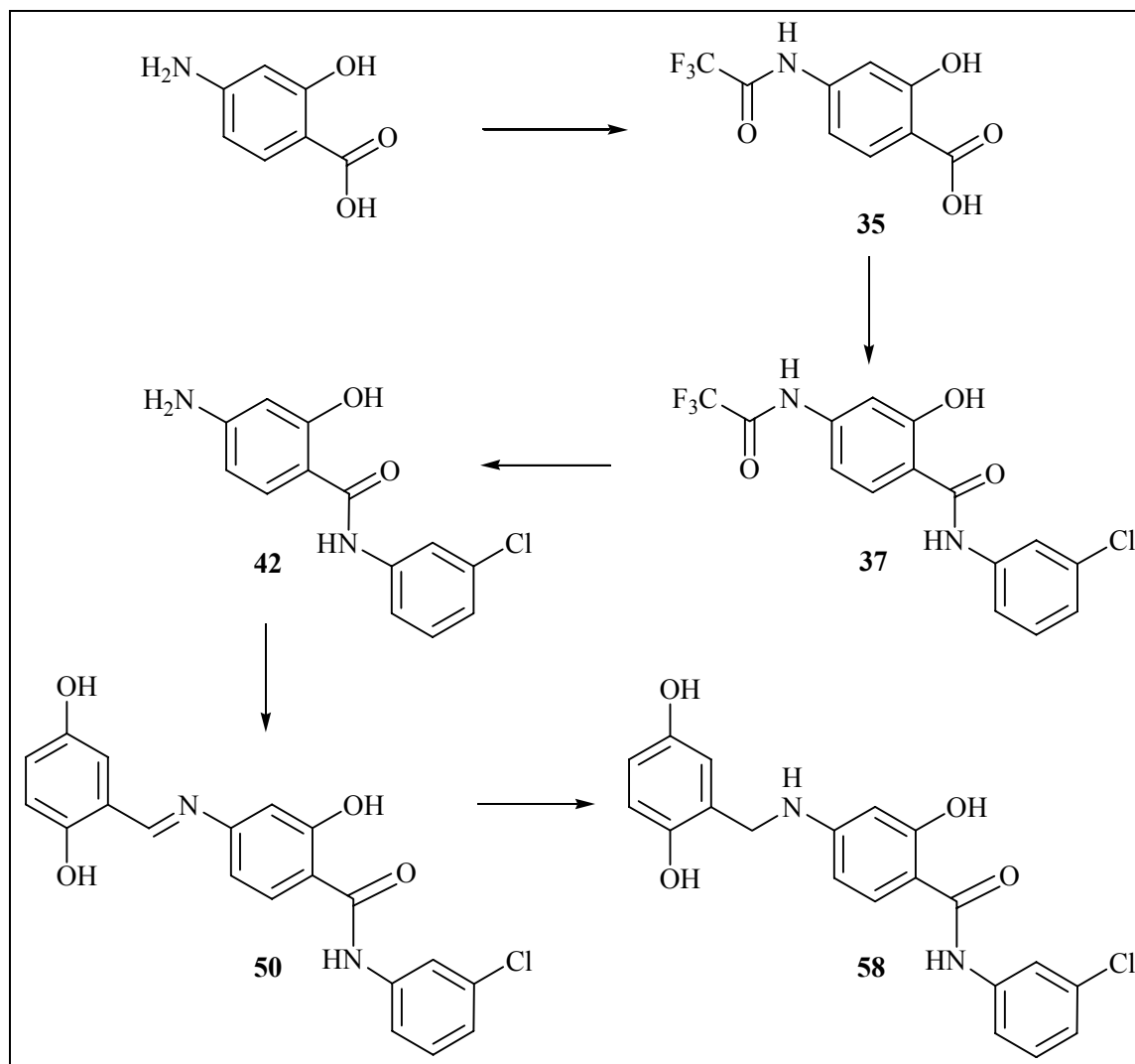


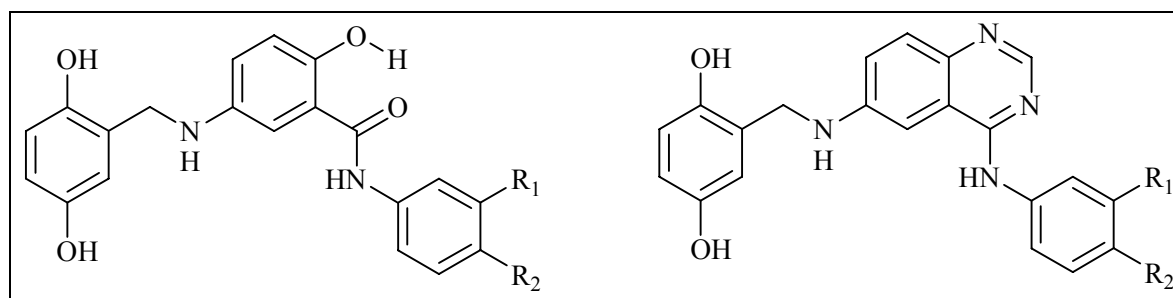
Bild 159: Herstellung von 58

Von den hergestellten Lavendustin A-Derivaten mit 4- bzw. 5-Dihydroxybenzylamino-Seitenkette wurden der Ester **57** und die Anilide **58**, **60-62** in einer Konzentration von 10 μM auf ihre EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestet.

Dabei wurde festgestellt, dass alle Salicylanilide in einer Testkonzentration von 10 μM in etwa die gleiche inhibitorische Aktivität (83 bis 96 Prozent) zeigen, unabhängig davon, ob sich die Benzylamino-Seitenkette in Position 4 oder 5 befindet und welche Halogensubstitution vorliegt.

Damit kann festgestellt werden, dass bei den Lavendustin A-verwandten Salicylaniliden **58** sowie **60-62** eine durchaus bemerkenswerte Aktivitätssteigerung im Vergleich mit den unsubstituierten Salicylaniliden **26** und **27** erkennbar ist.

4) Aufgrund dieser ermutigenden Befunde war der Einbau der Salicyloyl-Struktur der Salicylanilide **61** und **62** in das bioisostere Chinazolin-Ringsystem das nächste Ziel der Arbeit. Die angestrebten Verbindungen **70** und **71** sollten aufgrund ihrer Bioisosterie zu **61** und **62** entsprechende EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten zeigen. Zusätzlich wurde von **70** und **71** eine im Vergleich mit den „offenkettigen“ Verbindungen **61** und **62** bessere Zellgängigkeit erwartet.



61,70: $R_1=Br$, $R_2=H$

62,71: $R_1=Cl$, $R_2=F$

Bild 160: Salicylanilide **61** und **62** (links) und die angestrebten 4-Anilinochinazoline **70** und **71** (rechts)

Die Herstellung von **70** und **71** erfolgte nach dem im Bild 161 dargestellten Schema.

Dabei ging man vom 2-Cyano-4-nitroanilin aus, das durch Kondensation mit *N,N*-Dimethylformamid-dimethylacetal in das Amidin **63** übergeführt wurde. Durch die Umsetzung von **63** mit 3-Brom- bzw. 3-Chlor-4-fluoranilin gelangte man zu den 6-Nitrochinazolinen **64** und **65**, die anschließend zu den 6-Amino-Derivaten **66** und **67** reduziert wurden [145].

Die Einführung der 6-Seitenkette gelang durch Kondensation der primären aromatischen Amine **66** und **67** mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd.

Durch die selektive Reduktion der Imino-Funktion in den resultierenden Schiff'schen Basen **68** und **69** gelangte man zu den Wunschverbindungen **70** und **71**.

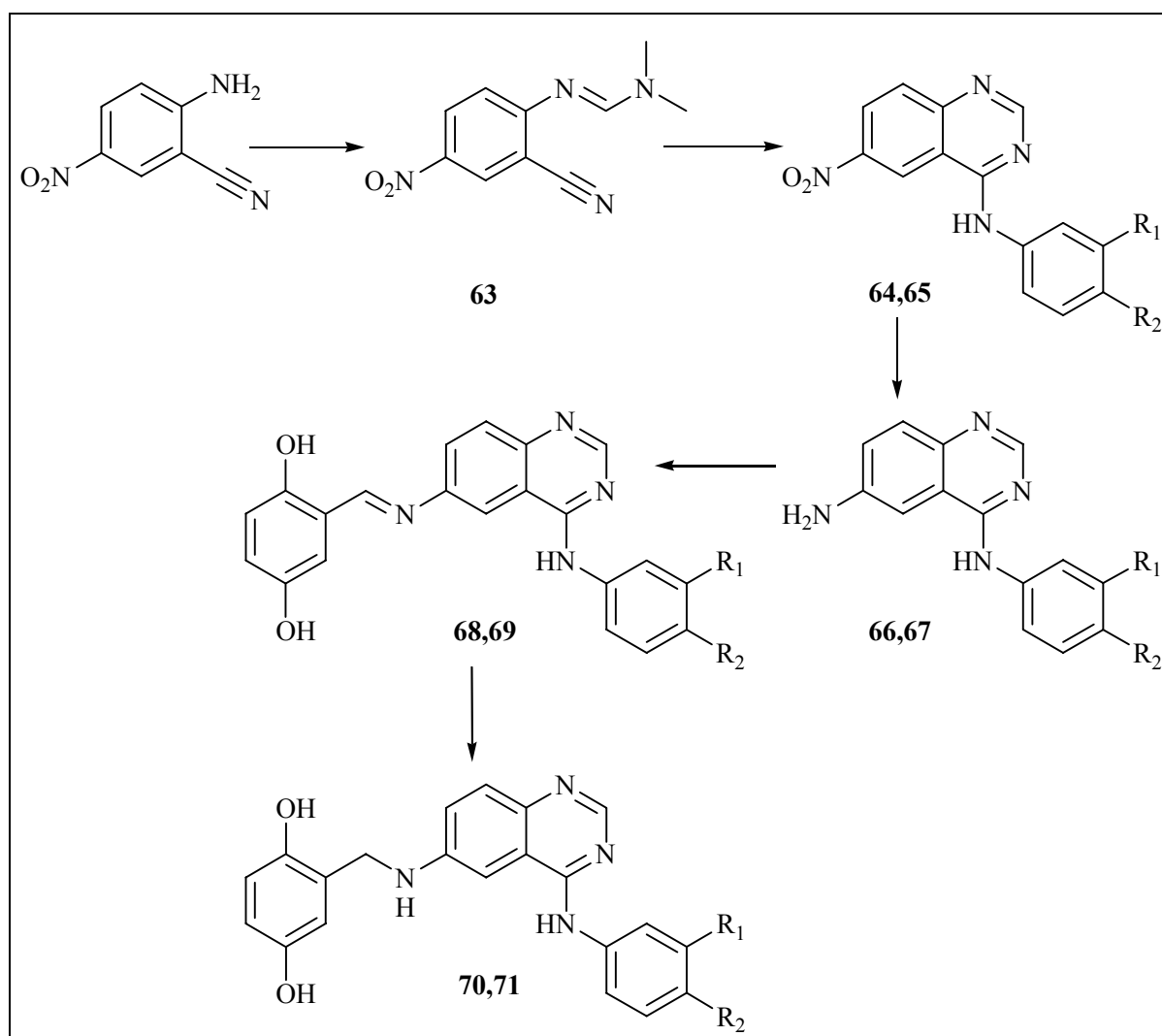


Bild 161: Herstellung von **70** und **71**

Die 4-Anilinochinazoline **70** und **71** zeigen eine hohe Tendenz, bestimmte polare Lösungsmittel, wie Wasser, Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid, einzulagern. Diese Beobachtung konnte durch eine Röntgenkristallaufnahme von **70** zusätzlich bestätigt werden.

Die EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten von **70** und **71** betragen in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ 65 bzw. 71 Prozent und in einer Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$ 45 bzw. 22 Prozent. Vergleichsweise dazu wurde das Brom-substituierte Salicylanilid **61**, ebenfalls in einer Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$, nachgetestet. Dabei zeigte es eine bemerkenswerte EGFR-TK-inhibitorische Aktivität von 42 Prozent.

Demzufolge kann festgestellt werden, dass das „offenkettige“ Salicylanilid **61** und das Chinazolin-Derivat **70** in einer Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$ nahezu die gleiche *In-vitro*-EGFR-

TK-inhibitorische Aktivität zeigen. Das kann als Bestätigung für die Bioisosterie der Salicyloyl-Teilstruktur zum Chinazolin betrachtet werden.

Die Chinazoline **70** und **71** wurden in einem *In-vitro*-MCF-7-Zelltest auf ihre zytotoxischen Eigenschaften getestet.

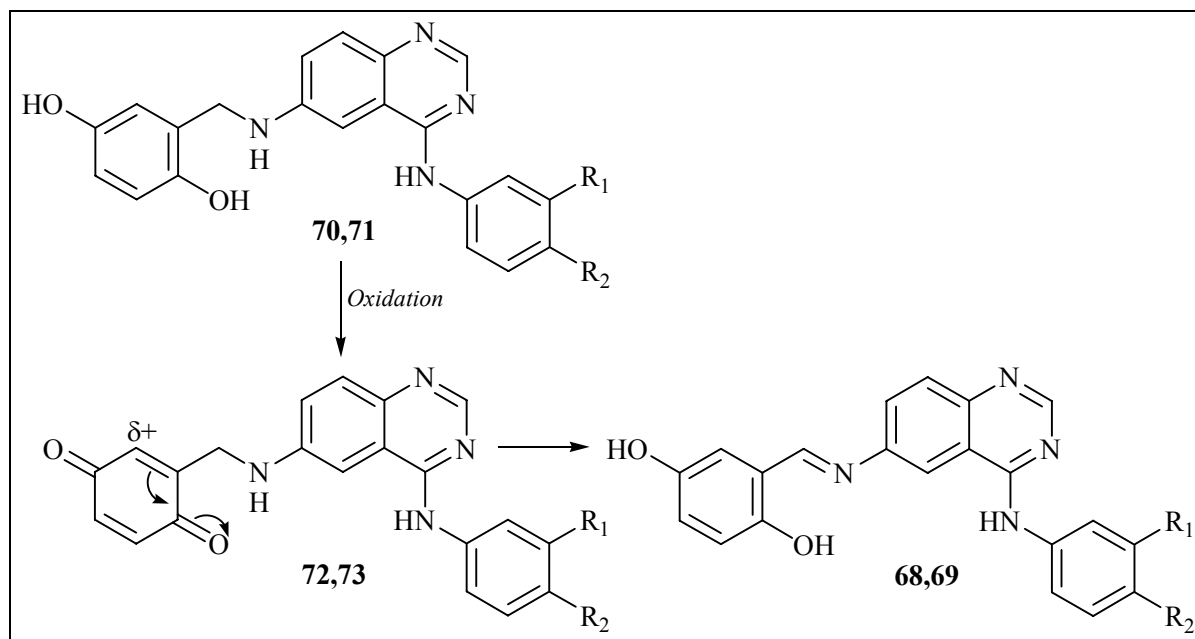
Dabei führen beide Verbindungen in einer Konzentration von 5 μM zu Wachstumshemmungen von 30 bzw. 25 Prozent, wobei **71** auch in einer Konzentration von 1 μM noch eine 25-prozentige Wachstumshemmung aufweist.

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.

5) Der fünfte Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich mit Versuchen zur Herstellung von irreversiblen EGFR-TK-Inhibitoren. Dazu wurden Verbindungen mit einer Michael-Akzeptor-Position in der 6-Seitenkette in Anlehnung an 6-Acrylamid-substituierte 4-Anilinochinazoline von Pfizer und Wyeth-Ayerst hergestellt [151,152,153].

Zunächst versuchte man durch Oxidation des Dihydroxyphenyl-Restes der Verbindungen **70** und **71**, zu den Chinon-Verbindungen **72** und **73** zu gelangen.

Dabei ist das C3-Atom des Chinon-Substituenten in den angestrebten Verbindungen **72** und **73** defizitär und sollte in der Lage sein, an die SH-Gruppe des Cysteins 773 in der ATP-Bindungstasche der EGFR-TK zu addieren und damit das Enzym irreversibel zu blockieren (Bild 162).



68,70,72: $R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$

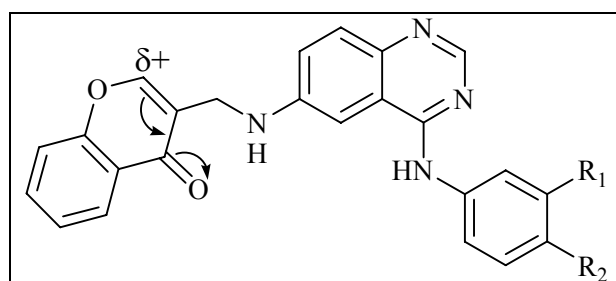
69,71,73: $R_1 = \text{Cl}$, $R_2 = \text{F}$

Bild 162: Herstellung und Umlagerung der Chinone **72** und **73**

Die Oxidation von **70** und **71** gelang zwar, jedoch konnten **72** und **73** aufgrund einer raschen Umwandlung in die entsprechenden Schiff'schen Basen **68** und **69** nicht selektiv isoliert werden.

Als Mechanismen, die zu dieser Umwandlung führen, werden ein Protonentransfer, eine Hydridwanderung sowie ein radikalischer Mechanismus diskutiert.

Als weitere Strukturvariante wurden 4-Anilinochinazoline mit Chromon-Teilstruktur hergestellt (**76,77**; Bild 163). Diese enthalten ebenfalls eine den Chinonen **72** und **73** entsprechende Michael-Akzeptor-Position an C3.

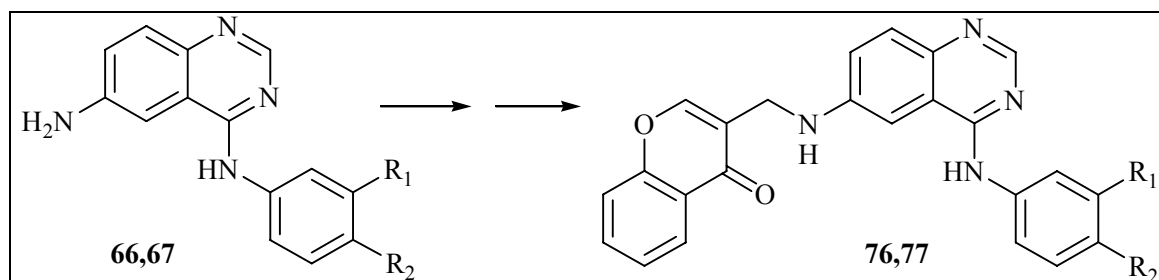


76: $R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$

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

Bild 163: Die Chromon-Derivate **76** und **77**

Die Herstellung von **76** und **77** gelang durch die Umsetzung der 6-Aminochinazoline **66** und **67** mit 3-Formylchromon und nachfolgender Reduktion mit Borandimethylamin-Komplex (Bild 164).



66,76: R₁=Br, R₂=H

67,77: R₁=Cl, R₂=F

Bild 164: Herstellung von **76** und **77**

Die Chromone **76** und **77** sind im Vergleich mit **70** und **71** allerdings schwächer EGFR-TK-inhibitorisch aktiv. In einer Konzentration von 1 μ M führen sie zu einer 32- bzw. 25-prozentigen Hemmung des Enzyms. Ob das Enzym dabei tatsächlich irreversibel inhibiert wird, konnte bisher noch nicht überprüft werden.

Außerdem wurde der - möglicherweise irreversible - EGFR-TK-Inhibitor mit Salicyloyl-Teilstruktur **82** hergestellt.

Verbindung **82** konnte in einem Schritt durch Oxidation des Dihydroxybenzylamino-substituierten Salicylanilides **57** erhalten werden (Bild 165).

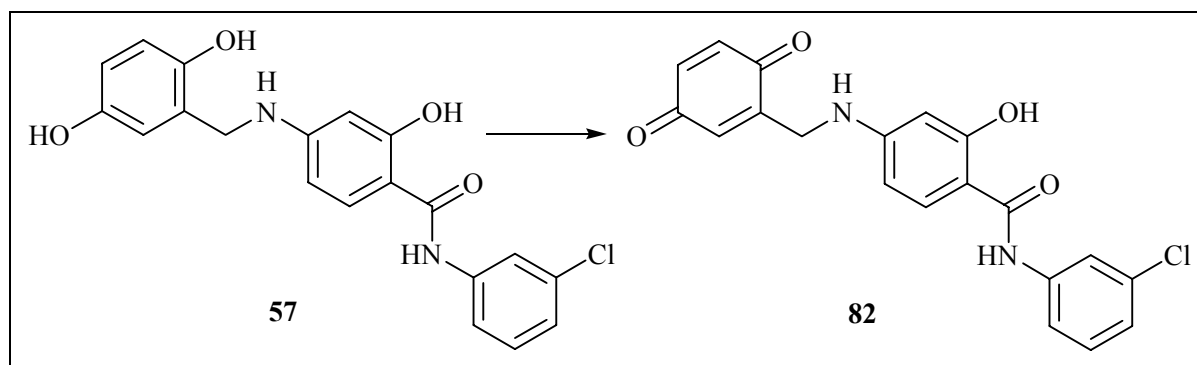


Bild 165: Herstellung von **82**

Die EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der Verbindung **82** beträgt in einer Konzentration von 0.1 μ M 19 Prozent. Ein direkter Vergleich mit der inhibitorischen Aktivität von **57** ist nicht möglich, da diese Verbindung nur in einer Konzentration von 10 μ M getestet wurde. In dieser Konzentration wird das Enzym durch **57** zu 83 Prozent gehemmt.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Herstellung neuer EGFR-TK-Inhibitoren mit Salicyloyl- bzw. Chinazolin-Teilstrukturen. Dabei zeigen besonders die 4-Anilinochinazoline **70** und **71** sowie das Salicylanilid mit 2,5-Dihydroxybenzylamino-Seitenkette **61** gute inhibitorische Eigenschaften. Bei diesen Verbindungen können näherungsweise IC_{50} -Werte um 100 nM angenommen werden.

Im Vergleich dazu inhibiert der, momentan das Zulassungsverfahren durchlaufende, reversible EGFR-TK-Inhibitor Iressa® (Bild 166) die EGFR-TK *in-vitro* mit einem IC_{50} -Wert von 20 nM [139].

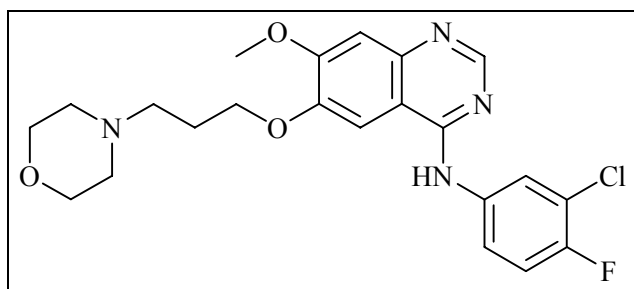


Bild 166: Der reversible EGFR-TK-Inhibitor *Iressa*®

Eine Steigerung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten von **70** und **71** könnte durch die Einführung einer weiteren Seitenkette in die freie Position 7 dieser 4-Anilinochinazoline erreicht werden.

Geeignete Seitenketten wären solche mit Elektronen-Donator-Eigenschaften, wie Methoxy- oder Morpholin-4-ylpropoxy-Substituenten.

Neben deren Elektronen-Donator-Eigenschaften, die sich im Allgemeinen positiv auf die EGFR-TK-inhibitorische Aktivität auswirken sollen, würden derartige Substituenten gleichzeitig einen positiven Einfluss auf die Löslichkeitseigenschaften und damit die Bioverfügbarkeit der resultierenden 4-Anilinochinazoline nehmen.