

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Krebs.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Störungen in der zellulären Signaltransduktion als eine Ursache der Krebsentstehung .....	1
1.1.2	Blockade der Signalübertragung als neue Strategie in der Krebstherapie .....	2
<b>1.2</b>	<b>Membranständige Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen (RPTK) .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>VEGFR und seine Liganden.....</b>	<b>5</b>
1.3.1	Angiogenese und Krebs .....	5
1.3.2	Liganden der VEGF-Rezeptor-Familie .....	6
1.3.3	Der humane Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor (VEGFR) .....	8
<b>1.4</b>	<b>EGFR und seine Liganden .....</b>	<b>10</b>
1.4.1	Gesteigertes EGFR-Signaling als Ursache für die Krebsentstehung .....	10
1.4.2	Liganden der EGF-Rezeptor-Familie.....	11
1.4.3	Der humane Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR).....	12
<b>1.5</b>	<b>Tyrosinkinase-abhängige Signalkaskaden.....</b>	<b>13</b>
1.5.1	Aktivierung der RAS/MAPK-Signalkaskade .....	15
1.5.2	Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) .....	16
1.5.3	Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$ (PLC- $\gamma$ ) .....	17
<b>1.6</b>	<b>Entwicklung von Proteinkinase-Inhibitoren – Neue Krebstherapiestrategien.....</b>	<b>18</b>
1.6.1	VEGFR-Tyrosinkinase (TK)-Inhibitoren.....	19
1.6.2	EGFR-Tyrosinkinase (TK)-Inhibitoren .....	22
<b>2</b>	<b>Problemstellung.....</b>	<b>24</b>

<b>3 Chemisch-Pharmakologischer Teil.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Entwicklung von Substanzen mit Proteinkinase-inhibitorischer Aktivität.....</b>	<b>25</b>
3.1.1 Herstellung des 4-Oxo-4 <i>H</i> -pyran-2,6-dicarbaldehyds ( <b>6</b> ) als Wirkstoff-Baustein .....	27
3.1.2 Versuche zur Herstellung der Staurosporin-verwandten Substanz <b>7</b> .....	32
<b>3.2 VEGFR-TK-Inhibitoren.....</b>	<b>34</b>
3.2.1 Herstellung eines 4-Oxopyridylmethyliden-substituierten 2-Indolinon-Derivates <b>19</b> .....	36
3.2.1.1 Herstellung des 2-(Hydroxymethyl)-4 <i>H</i> -pyran-4-ons ( <b>14</b> ) ..	37
3.2.1.2 Herstellung des 4-Oxo-4 <i>H</i> -pyran-2-carbaldehyds ( <b>16</b> ) .....	38
3.2.1.3 Herstellung des (3 <i>E</i> )-3-[(4-Oxo-4 <i>H</i> -pyran-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -indol-2-ons ( <b>18</b> ).....	42
3.2.1.4 Ringtransformation zum (3 <i>Z</i> )-3-[(4-Oxo-1,4-dihydropyridin-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -indol-2-on ( <b>19</b> ).....	44
3.2.1.5 Herstellung des 2-(Hydroxymethyl)-pyridin-4(1 <i>H</i> )-ons ( <b>20</b> ) und des 4-Oxo-1,4-dihydro-pyridin-2-carbaldehyds ( <b>21</b> ) ...	50
3.2.1.6 Herstellung von Verbindung <b>19</b> nach dem Verfahren von Knoevenagel.....	51
3.2.2 Herstellung eines 2-Indolinon-Derivates <b>27</b> mit einem Methyliden-verbrückten 4-Pyridon in Position 3 und mit Methoxy-Substituenten in der 4-Pyridon-Untereinheit .....	53
3.2.2.1 Herstellung des 2-(Hydroxymethyl)-5-methoxy-4 <i>H</i> -pyran-4-ons ( <b>23</b> ) .....	54
3.2.2.2 Herstellung des (3 <i>E</i> )-3-[(5-Methoxy-4-oxo-4 <i>H</i> -pyran-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -indol-2-ons ( <b>26</b> ) .....	57
3.2.2.3 Ringtransformation des 4-Pyrone <b>26</b> zum 4-Pyridon <b>27</b> ....	59
3.2.2.4 Ringtransformation des 4-Pyrone <b>23</b> zum 4-Pyridon <b>28</b> und nachfolgende Oxidation zum Aldehyd <b>29</b> .....	60
3.2.2.5 Herstellung des (3 <i>Z</i> )-3-[(5-Methoxy-4-oxo-1,4-dihydropyridin-2-yl) methylen]-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -indol-2-ons ( <b>27</b> ) .....	62

3.2.3	Versuche zur Einführung von polaren Alkoxy-Substituenten in Position 5' der 4-Pyridon-Untereinheit.....	64
3.2.3.1	Demethylierung von Substanz <b>27</b> zum (3Z)-3-[(4,5-Dihydroxypyridin-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2H-indol-2-on Hydrochlorid ( <b>30</b> ) .....	64
3.2.3.2	Versuche zur Einführung einer Seitenkette in die Kojisäure <b>22</b> .....	67
3.2.4	Herstellung Imidazolymethylen-substituierter 2-Indolinon-Derivate <b>35</b> und <b>36</b> .....	69
3.2.5	Zytotoxische Aktivitäten der ausgewählten Substanzen <b>19</b> , <b>27</b> und <b>36</b> .....	72
<b>3.3</b>	<b>EGFR-TK-Inhibitoren</b> .....	<b>75</b>
3.3.1	Herstellung eines 4-Chinazolinons <b>40</b> mit Dihydroxybenzylamino-Seitenkette in Position 6.....	88
3.3.1.1	EGFR-TK-inhibitorische Eigenschaften von Verbindung <b>40</b> .....	90
3.3.2	4-Anilinochinazoline mit Lavendustin A-Teilstruktur .....	91
3.3.2.1	Herstellung der 4-Anilinochinazoline <b>54</b> und <b>55</b> mit Morpholin-4-ylpropoxy-Seitenkette in Position 7.....	94
3.3.2.2	Herstellung der 4-Anilinochinazoline <b>62</b> und <b>63</b> mit Methoxy-Gruppe in Position 7 .....	101
3.3.2.3	EGFR-TK-inhibitorische Eigenschaften der 6,7-disubstituierten Verbindung <b>63</b> .....	113
<b>4</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>115</b>
4.1	<b>Chemikalien</b> .....	<b>115</b>
4.2	<b>Geräte</b> .....	<b>115</b>
4.3	<b>Synthesevorschriften und analytische Daten</b> .....	<b>117</b>
4.4	<b>Pharmakologische Testung</b> .....	<b>154</b>
4.4.1	Bestimmung der zytotoxischen Aktivität .....	154
4.4.2	Bestimmung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität .....	156
4.4.2.1	Gewinnung des Enzyms .....	156
4.4.2.2	Bestimmung der inhibitorischen Aktivität .....	156

---

<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>158</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>175</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>190</b>
<b>8 Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>193</b>

**Anhang**

**Lebenslauf**

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs

In den Industrieländern stirbt etwa jede vierte bis fünfte Person an einer Krebserkrankung. Krebs gehört damit zu den häufigsten Todesursachen. Trotz aller Fortschritte auf diagnostischem und therapeutischem Gebiet liegen die Heilungsaussichten für die am häufigsten auftretenden soliden Tumore selten über 20 Prozent<sup>1</sup>. Die häufigsten Krebsarten sind Brust-, Lungen-, Darm-, Prostata-, Bauchspeicheldrüsen-, Speiseröhren-, Leber-, Eierstock- und Brustkrebs. Dabei gibt es geschlechtsspezifische und geographisch-völkerspezifische Unterschiede, die epidemiologisch untersucht werden. Laut WHO (World Health Organisation) gab es im Jahre 1997 weltweit ca. neun Millionen Neuerkrankungen. Diese Zahl wird sich Schätzungen zufolge, bis zum Jahre 2015 mit fünfzehn Millionen Neuerkrankungen nahezu verdoppeln<sup>2</sup>.

Krebs ist der Oberbegriff für mehr als einhundert verschiedene Krankheiten, die durch dysreguliertes, enthemmtes und autonomes Überschusswachstum bestimmter Körperzellen verursacht werden.

### 1.1.1 Störungen in der zellulären Signaltransduktion als eine Ursache der Krebsentstehung

Beim Entstehen und Fortschreiten der meisten Krebserkrankungen spielen Fehlregulationen von Wachstumsprozessen eine Rolle. Das bestehende Gleichgewicht zwischen der Zellvermehrung (Proliferation) und dem programmierten Zelltod (Apoptose) ist gestört. Die zelluläre Signaltransduktion kontrolliert über verschiedene Signalwege Zellwachstum und Zellteilung. Es gibt verschiedene intrazelluläre Kaskaden, die zwischen der Plasmamembran und dem Kern Signale mit Hilfe biochemischer Reaktionen übermitteln. Die verschiedenen Signaltransduktionswege beeinflussen sich gegenseitig, wobei sie sich verstärken oder abschwächen können. Dieser sogenannte Crosstalk ist für die Zelle notwendig,

um die Information von verschiedenen extrazellulären Signalen zu einer Zellantwort zu verarbeiten.

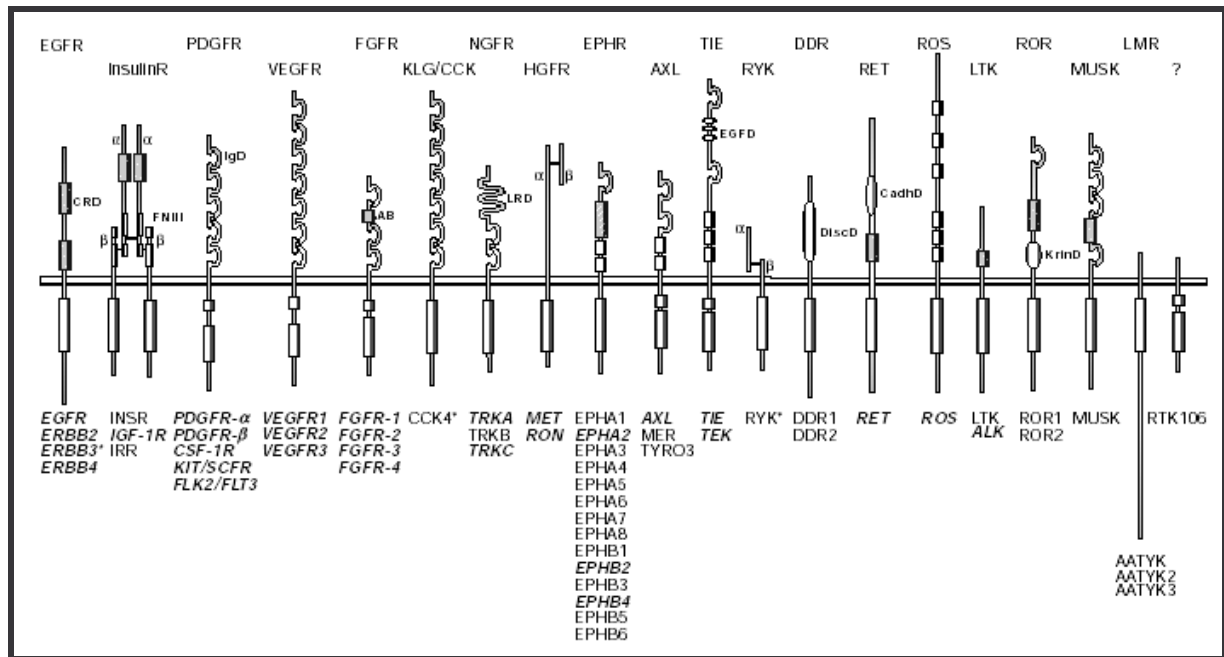
Im Zuge der Genomprojekte werden laufend neue signalübertragende Proteine entdeckt. Es ist bekannt, dass ca. 20 Prozent der über 30.000 menschlichen Gene für Proteine kodieren, die in die Signaltransduktion involviert sind<sup>3</sup>. Eine große Gruppe der Signaling-Proteine ist die Familie der Rezeptor-Protein-Kinasen. Protein-Kinasen gehören zur Gruppe der Enzyme, die Phosphatgruppen aus Adenosintriphosphat (ATP) auf Proteine übertragen.

### **1.1.2 Blockade der Signalübertragung als neue Strategie in der Krebstherapie**

Da die Aktivierung oder Überexpression von Rezeptor-Protein-Kinasen mit zahlreichen Arten von Krebs assoziiert ist, arbeitet man an der Entwicklung von Substanzen, die durch Proteinkinase-Signaling gesteuerte Prozesse hemmen und so Signalübertragungswege in Zellen blockieren können. Inzwischen befinden sich mehrere Wirkstoffe in fortgeschrittenen Phasen der klinischen Entwicklung, im Verfahren der Zulassung oder sind bereits zugelassen. Erfolg versprechende Daten liegen für Iressa<sup>®</sup> (ZD1839, Astra Zeneca) und Tarveca<sup>®</sup> (OSI774, OSI Pharmaceuticals/Roche) vor<sup>4,5</sup>.

## **1.2 Membranständige Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen (RPTK)**

Zu den Rezeptor-Protein-Kinasen zählen Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinasen, Rezeptor-Serin/Threoninkinasen und die Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen (RPTKs). Es sind 58 membranständige RPTKs bekannt, von denen ca. 30 an der Tumorprogression beteiligt sind. Man kann eine Einteilung in 20 Unterfamilien vornehmen (**Abb. 1**).



**Abb. 1:** Die 58 bisher bekannten humanen RPTKs<sup>3</sup>

EGFR (epidermal growth factor receptor), InsR (insulin receptor), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), VEGFR (vascular endothelial growth factor), FGFR (fibroblast growth factor receptor), KLG/CCK (colon carcinoma kinase), NGFR (nerve growth factor receptor), HGFR (hepatocyte growth factor receptor), EphR (ephrin receptor), Axl, a Tyro3 PTK, ROR (receptor orphan), MuSK (muscle-specific kinase), LMR (Lemur)

Abk.: AB (acid box), CadhD (cadherin-like domain), CRD (cystein rich domain), DiscD (discoidin-like domain), EGFD (epidermal growth factor-like domain), FNIII (fibronectin type-III-like domain), IgD (immunoglobulin-like domain), KrinD (kringle-like domain), LRD (leucin-rich domain), α, β (verschiedene RPTK-Untereinheiten), \* (keine intrinsische Kinaseaktivität), fett und kursiv (RPTKs, die in humanen Tumoren eine Rolle spielen)

Eine weitere Gruppe bilden die im Zytoplasma gelöst vorliegenden nicht-Rezeptor-assoziierten PTKs (non-receptor PTKs). Sie sind wichtige Bestandteile der intrazellulären, zytosolischen Signalkaskaden (z.B. Src-, Abl-Kinase).

Allen RPTKs gemeinsam ist, dass sie aus einem extrazellulären, einem hydrophoben transmembranen und einem intrazellulären Bereich bestehen. Die extrazelluläre, sich auf der Zelloberfläche befindende sogenannte Ligandenbindungsregion dient dazu, jeweils verschiedene Wachstumsfaktoren, die Liganden, zu binden. Die Transmembranregion dient der Verankerung in der Membran und der Separierung von extrazellulärer und zytoplasmatischer Domäne. Der intrazelluläre Bereich der

Rezeptoren hat die Funktion eines Enzyms, genauer gesagt, einer Tyrosinkinase. Die Tyrosinkinase-Domäne ist in allen PTKs weitgehend homolog. Sie enthält immer eine Sequenz GlyXGlyXXGlyX(15-20)Lys, die Teil der ATP-Bindungstasche ist<sup>6</sup>.

Neben der ATP-Bindungstasche gibt es innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne eine Substratbindungstasche. Aufgrund der zentralen Rolle im Zellsignaling werden weitere Bindungsstellen für Regulationsfaktoren, Adapterproteine, etc. postuliert.

Der carboxyterminale Bereich ist durch Phosphorylierungsstellen charakterisiert, von denen bisher sechs identifiziert werden konnten (Tyr 992, Tyr 1045, Tyr 1068, Tyr 1086, Tyr 1148, Tyr 1173)<sup>7,8</sup>.

Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne einer RPTK führt zur Dimerisierung zweier Rezeptoren. Durch die Dimerisierung kommt es zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren, wodurch die Tyrosinkinasen aktiviert werden. Nach Aktivierung der Tyrosinkinase erfolgt die Bindung von ATP in der dortigen ATP-Bindungstasche. Der flexible C-terminale Teil gelangt an die Substratbindungsstelle der Tyrosinkinase-Domäne und wird dort an bestimmten Autophosphorylierungsstellen phosphoryliert<sup>7</sup>. Dies kann auch durch die Tyrosinkinase des Dimerisierungspartners, also durch Transphosphorylierung (auch Crossphosphorylierung genannt) erfolgen<sup>9</sup>. Von den Phosphorylierungsstellen ist abhängig, welche Signalwege anschließend aktiviert werden.

Die Phosphotyrosine dienen intrazellulären, SH<sub>2</sub>-Domänen tragenden Signalproteinen (SH = src-homolog; src ist eine lösliche, im Zytoplasma lokalisierte Tyrosinkinase) als Bindungsstellen, welche nun die durch die Ligandenbindung induzierte Signalkaskade einleiten (**Kap. 1.5**).

Im Folgenden wird auf den VEGF-Rezeptor (VEGFR: engl.: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor = Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor) und den EGF-Rezeptor (EGFR: engl.: Epidermal Growth Factor Receptor = Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) und deren Liganden genauer eingegangen. Beide Rezeptoren sind bedeutende Vertreter der RPTK-Familie.



## 1.3 VEGFR und seine Liganden

### 1.3.1 Angiogenese und Krebs

Für eine adäquate Gewebefunktion ist die Sauerstoffversorgung über die Blutgefäße Voraussetzung. Bei dem Vorgang der so genannten Vaskulogenese handelt es sich um die Ausbildung eines komplexen Gefäßnetzwerkes, das bereits während der embryonalen Entwicklung angelegt wird. Die Ausbildung neuer Blutgefäße, auch als Neovaskularisierung oder Angiogenese bezeichnet, findet als physiologischer Vorgang nur dort statt, wo neue Gewebe versorgt werden müssen. Also zum Beispiel im Wundheilungsprozess oder während des Zyklus der Frau, sowie bei der Einnistung des Embryos. Angiogenese tritt außerdem im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen auf, wie zum Beispiel bei der diabetischen Retinopathie, der rheumatoiden Arthritis, der Atherosklerose und der Psoriasis vulgaris. Eine besonders starke Angiogenese findet man im Verlauf von Tumorwachstum und Metastasierung<sup>10</sup>. Tumorgewebe wird bis zu einem Volumen von 2 mm<sup>3</sup> durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt. Bei größeren Zellverbänden wird ein Anschluss mittels Kapillaren an das Gefäßsystem des Körpers notwendig, um die nutritive Versorgung zu gewährleisten. FOLKMANN identifizierte 1970 einen Faktor aus Tumorgewebe, den er verantwortlich für dessen Angiogenese machte. Er postulierte im selben Jahr, dass die Inhibierung der Angiogenese eine mögliche Therapie für solide Tumoren bedeuten könnte<sup>11</sup>.

Die Angiogenese wird durch angiogenetische und anti-angiogenetische Faktoren gesteuert, die sich in physiologischer Weise im Gleichgewicht, der so genannten Gefäßhomöostase, befinden<sup>12</sup>. Durch Tumore kann allerdings eine Verschiebung des Gleichgewichtes stattfinden, da diese selbst in der Lage sind, angiogenetische Faktoren zu sezernieren oder Blutgefäßendothelzellen zu stimulieren<sup>13</sup>. Zu der Vielzahl der angiogenetischen Regulatoren zählen Wachstumsfaktoren, die Migration, Proliferation und Differenzierung der Endothelzellen auslösen und die Sekretion der endothelialen Wachstumsfaktoren stimulieren<sup>12</sup>. Hierzu gehören die spezifisch auf Endothelzellen wirkenden vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) sowie die Angiopoietine<sup>12,13,14</sup>. Fast alle anderen

Wachstumsfaktoren aktivieren neben den Endothelzellen noch andere Zellen. Prototypen hierfür sind der basale Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF-2) und der Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)<sup>12,15</sup>. Die Expression von VEGF wird hauptsächlich durch Hypoxie gesteigert, das heißt mit Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes ( $pO_2$ ) steigt bei einer Vielzahl normaler und transformierter Zellkulturen die Ausschüttung von VEGF mRNA schnell und reversibel<sup>16,17</sup>. Außerdem ist eine Vielzahl von Hormonen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Onkogenen und glykosylierten Proteinen, die durch erhöhte Glucose-Spiegel generiert werden, an dem Anstieg der VEGF-Konzentration beteiligt. Die Ausschüttung von VEGF ist im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe deutlich hochreguliert<sup>18</sup>.

### 1.3.2 Liganden der VEGF-Rezeptor-Familie

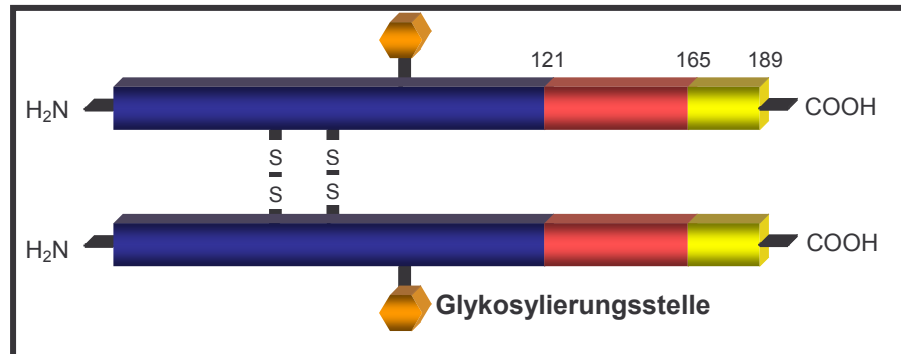
Der vaskuläre VEGF (VEGF-A) wurde erstmals 1983 von SENER et al. als „vascular permeability factor“ (VPF) beschrieben<sup>19</sup>. Inzwischen kennt man weitere Mitglieder der VEGF-Familie, wie z. B. VEGF-B, -C, -D und -E oder den Placenta-Wachstumsfaktor PlGF. Die am besten charakterisierte Form, der VEGF-A, ist ein Cysteinknoten-Protein. Alle acht vorliegenden Cysteinreste sind stark konserviert und dienen der Disulfidbrückenbindung. Diese Verbindungen stabilisieren die einzelnen Monomere und verbinden sie zu aktiven VEGF Dimeren<sup>20</sup>. Das VEGF-Gen ist auf dem Chromosom 6p21.3 lokalisiert<sup>21</sup> und besteht aus 8 Exons, die von 7 Introns unterbrochen werden. Der kodierende Bereich umfasst 14 kb<sup>22,23</sup>. Durch alternatives Spleißen des Exons erhält man vier verschiedene Molekularformen, die nach Länge ihrer resultierenden Aminosäureketten als VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> bezeichnet werden. VEGF<sub>165</sub> ist die vorherrschend vorkommende Form, die von einer Vielzahl normaler und transformierter Zellen produziert wird<sup>22</sup>. Die Spleißvarianten werden unterschiedlich aus verschiedenen Exons aufgebaut, wobei die Exons 1 bis 5 für den N-terminalen sowie Exon 8 für den C-terminalen Bereich immer exprimiert werden. Die entstehenden Proteine haben eine molare Masse von 18 bis 24 kDa<sup>24,25,26</sup>. Trotz des 26 Aminosäuren langen Signalpeptides findet nur eine effektive Sekretion der kürzeren Proteine statt; die Derivate mit 189 und 206 Aminosäuren liegen an Heparansulfate der Zelloberfläche und der extrazellulären

Matrix gebunden vor. Dieses unterschiedliche Verhalten resultiert aus den alternativ gespleißten Exons 6 und 7, welche die Heparin-Bindung und die Zellassoziation vermitteln<sup>22</sup>.

Bei dem physiologisch vorkommenden VEGF handelt es sich um ein basisches, homodimeres Glykoprotein von ca. 45 kDa Größe<sup>26</sup>, dessen Eigenschaften mit denen von VEGF<sub>165</sub> übereinstimmen.

Für VEGF-B wurde gezeigt, dass es Heterodimere mit VEGF<sub>165</sub> ausbilden kann<sup>27</sup>. VEGF-C und VEGF-D bilden eine neue Untergruppe der VEGF-Familie, da diese beiden Proteine zwar dem VEGF-A ähnliche strukturelle Merkmale aufweisen, darüber hinaus aber auch neue Eigenschaften zeigen, die für VEGF-A nicht bekannt sind. Beide Proteine werden erst im Laufe einer proteolytischen Umwandlung aktiv und beeinflussen die Bildung des lymphatischen Endothels<sup>28,29,30</sup>. VEGF-E wurde als homologe Sequenz im Genom des Orf-Virus entdeckt, dessen entsprechendes Protein VEGFR-2 aktivieren und *in vivo* eine Angiogenese induzieren kann<sup>31,32</sup>.

Der Placenta Wachstumsfaktor (PlGF) wird als dimeres Glykoprotein exprimiert und die Aminosäure-Homologie zu VEGF beträgt bis zu 53%<sup>33</sup>.



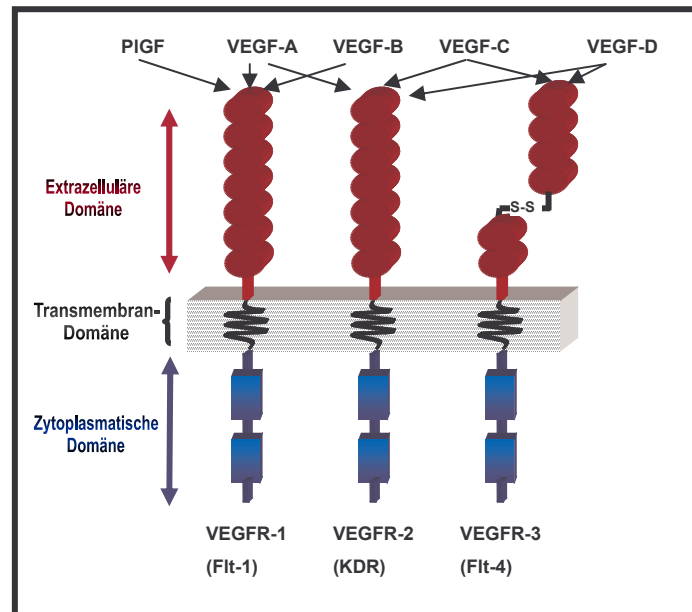
**Abb. 2:** Schema des dimeren VEGF-Peptids. Es besteht aus zwei über Disulfidbrücken verknüpften Peptidketten. Gezeigt sind die unterschiedlich langen Aminosäureketten der Splicevarianten und die Glykosylierungsstellen<sup>34</sup>

Bei VEGF handelt es sich um einen Tumorangiosefaktor von zentraler Bedeutung. VEGF wird von nahezu allen soliden Tumoren gebildet und sezerniert<sup>35</sup>. VEGF wirkt migrations- und proliferationsfördernd auf Endothelzellen und lässt sie anschließend tubulär differenzieren. Außerdem senkt VEGF die Apoptoserate von Endothelzellen<sup>13</sup>, dilatiert die Gefäße und leitet die vaskuläre Destabilisierung ein. Des Weiteren induziert es die Hochregulierung verschiedener Proteasen und ihrer

Rezeptoren, die die Degradation von Basalmembran und Matrix, bestehend aus den extrazellulären Matrixproteinen (ECM), zur Folge haben<sup>12</sup>.

### 1.3.3 Der humane Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor (VEGFR)

Aus der zur Superfamilie der RPTK gehörenden Familie der VEGF-Rezeptoren (VEGFR) sind bisher drei Rezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität und Affinität bekannt. Für die Vermittlung der Effekte von VEGF sind im wesentlichen zwei der bisher bekannten VEGFR verantwortlich, der VEGFR-1 und der VEGFR-2, denn nur diese beiden auf den Gefäßendothelzellen befindlichen Rezeptoren binden alle Splicevarianten des VEGF-A (**Abb. 3**). Der VEGFR-3 (Flt-4) hingegen bindet ausschließlich die Isoformen VEGF-C und -D und wird im Gegensatz zu den anderen VEGF-Rezeptoren auf embryonalen und adulten Lymph-Endothelzellen exprimiert<sup>36</sup>. Für die Untersuchungen der Effekte des VEGF an Gefäßendothelzellen stehen daher die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 im Mittelpunkt des Interesses. Für beide Rezeptoren existieren synonyme Bezeichnungen. So heißt der VEGFR-1 auch Flt-1 (fms-like tyrosine kinase), der VEGFR-2 auch KDR (kinase insert domain containing receptor) und sein murines Homolog heißt Flk-1 (fetal liver kinase)<sup>37,38</sup>. Sie sind aus sieben Immunglobulin(Ig)-artigen extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion und einer übereinstimmenden intrazellulären Tyrosinkinase-Sequenz, die durch Kinase-Insert-Domänen unterbrochen wird, aufgebaut<sup>38,39,40</sup> (**Abb. 3**).



**Abb. 3:** Schematischer Aufbau der verschiedenen VEGF-Rezeptoren

Die drei Rezeptoren, deren molare Masse beträgt zwischen 180 und 220 kDa betragen<sup>41,42</sup>, zeigen unterschiedliche Verhaltensweisen zu den Liganden. VEGFR-1 bindet alle Isoformen von VEGF-A, PIGF und VEGF-B<sup>43,44,45</sup>. Er hat mit einer Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von etwa 10-20 pM<sup>37</sup> eine etwas höhere Affinität zum VEGF<sub>165</sub> als der VEGFR-2 mit einem  $K_d$ -Wert von 75-125 pM<sup>38</sup>. VEGFR-2 bindet neben VEGF auch bestimmte Formen von VEGF-C, -D<sup>28</sup> und -E<sup>32</sup>. VEGF-C und -D binden außerdem mit höherer Affinität an VEGFR-3<sup>28</sup>. VEGF-E und PIGF gehören auch zu den Liganden der VEGFR-Familie, binden allerdings mit höherer Affinität nur an jeweils einen oder zwei der VEGF-Rezeptoren.

Während VEGFR-1 auch noch auf einigen weiteren Zellen wie Monozyten<sup>46</sup>, dendritischen Zellen<sup>47</sup> und glatten Muskelzellen vorhanden ist, wird VEGFR-2 spezifisch von Gefäßendothelzellen und wenigen Arten von Neuronen exprimiert.

## 1.4 EGFR und seine Liganden

### 1.4.1 Gesteigertes EGFR-Signaling als Ursache für die Krebsentstehung

Eine wichtige Gruppe signalübertragender Proteine, die bei vielen epidermalen Tumoren eine Rolle spielt, ist die Familie der EGFR. Diese Rezeptorfamilie ist in der Tyrosinkinase-Domäne mit den VEGF-Rezeptoren eng verwandt<sup>48</sup>. Störungen im EGFR-Signaling können zur Tumorbildung führen. Die EGFR-Aktivierung kann über eine Reihe von Signalwegen, die sich untereinander kreuzen und überlappen, zu Genexpression, Zellteilung, Differenzierung, Steigerung der Zellbeweglichkeit und Inhibition der Apoptose führen. Diese physiologischen Vorgänge unterliegen normalerweise einer strikten Kontrolle und Regulation. Die Ursachen für eine gesteigerte Expression des EGFRs können Genamplifikation, gesteigerte Aktivität des EGFR-Promotors und Dysregulation von Prozessen der Translation und Posttranslation sein. Die Anzahl an EGF-Rezeptoren beträgt in normalen Zellen ungefähr 40-100, maligne Zellen können bis zu zwei Millionen EGF-Rezeptoren besitzen<sup>49</sup>. Diese Überexpression wirkt sich in einer Steigerung von Zellbeweglichkeit, Zelladhäsion und Zellinvasionskapazität aus, die mit einem erhöhten Metastasierungspotential einhergeht<sup>50,51,52</sup>. Außerdem kommt es über Störungen der normalen Zellzykluskontrolle und Blockierung der Apoptose zu einer gesteigerten Proliferation<sup>53,54</sup> und zu einer Förderung der Angiogenese<sup>55</sup>. Obwohl die Daten variieren, findet man bei den meisten soliden Tumoren eine vermehrte EGFR-Expression. Darüber hinaus exprimieren die meisten Tumore auch verstärkt die anderen Mitglieder der EGFR-Familie<sup>56</sup>. Dabei sind erhöhte EGFR-Level häufig ein Marker für ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium mit schlechter Prognose<sup>57,58</sup>.

## 1.4.2 Liganden der EGF-Rezeptor-Familie

Zur EGF-Familie gehören über 3000 Proteine mit verschiedenen Funktionen. Von diesen konnten bisher zehn als Liganden der Rezeptoren der EGFR-Familie identifiziert werden:

- EGF (engl.: epidermal growth factor = epidermaler Wachstumsfaktor)
- TGF- $\alpha$  (engl.: transforming growth factor-alpha = transformierender Wachstumsfaktor-alpha)
- AR (Amphiregulin; auch: Kerationzyten-autokriner Faktor, Kolorektumzellen-abstammender Wachstumsfaktor)
- HB-EGF (engl.: heparin binding epidermal growth factor-like factor = Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor-ähnlicher Faktor)
- BTC (Betacellulin)
- EPR (Epiregulin)
- EPI (Epigen)
- Neuroreguline
  - Hereguline (Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$ ), (auch: Neureguline, gliale Wachstumsfaktoren, Acetylcholinrezeptor-induzierende Faktoren)
  - NRG-2s (Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$ ), (Neuregulin-2; auch: Kleinhirn-abstammender Wachstumsfaktor)
  - NRG-3<sup>59,60</sup>

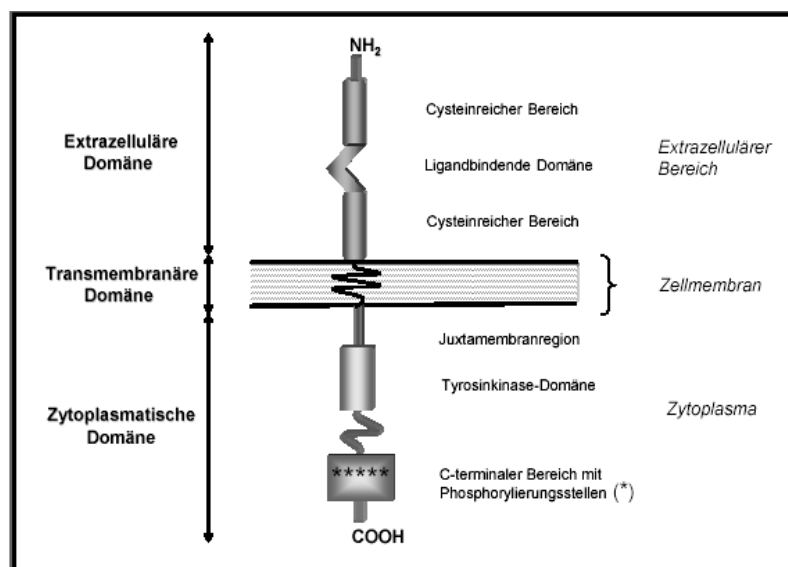
EGF (53 Aminosäuren, 6.4 kDa) ist der Prototyp dieser sehr eng verwandten Wachstumshormone<sup>61</sup>. Alle Proteine der EGF-Familie haben als gemeinsames Merkmal eine aus ca. 50 Aminosäuren bestehende Sequenz, die so genannte EGF-Domäne (**Abb. 4**).

In ihr sind sechs Cysteinreste enthalten, die untereinander drei Disulfidbrücken ausbilden. Dadurch ist die Entstehung von drei Schleifen bedingt. Es kann auch zu einem mehrfachen Auftreten der Sequenz kommen. Über die nicht-EGF-Sequenzen ist wenig bekannt. EGF-Syntheseorte sind die Speicheldrüse sowie Mammaepithel- und Nierentubuluszellen<sup>62</sup>.





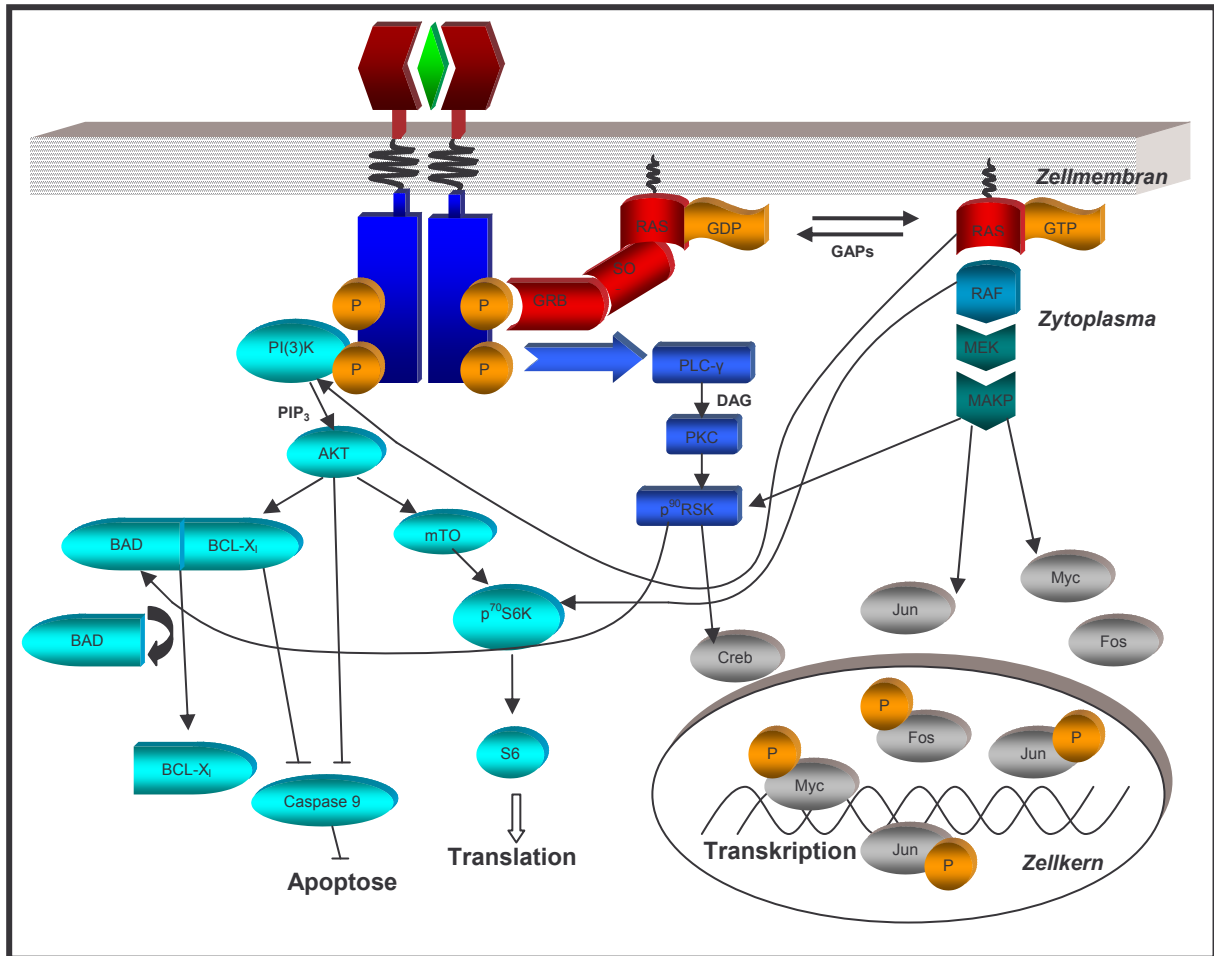
Die extrazelluläre Domäne besteht aus 621 Aminosäuren, mehreren Oligosaccharidketten und hat zwei cysteinreiche Sequenzen ( $\Sigma 10$  Prozent), zwischen denen sich die eigentliche ligandbindende Domäne befindet<sup>59</sup>. Die Transmembranregion ist aus 23, hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren aufgebaut. Die zytoplasmatische Domäne besteht aus 542 Aminosäuren und kann nochmals in juxtamembrane Region, Tyrosinkinase-Domäne und carboxyterminalen Bereich unterteilt werden<sup>49</sup>. Als juxtamembrane Region bezeichnet man die Sequenz zwischen der Transmembran-Domäne und der in **Kap. 1.2** beschriebenen Tyrosinkinase-Domäne (**Abb. 5**).



**Abb. 5:** Schematischer Aufbau des EGF-Rezeptors<sup>67</sup>

## 1.5 Tyrosinkinase-abhängige Signalkaskaden

Wie schon in **Kap. 1.2** erläutert kommt es nach der Bindung eines Wachstumsfaktors zur Dimerisierung von Rezeptoren und dadurch zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase. Über verschiedene Signalkaskaden werden dann die ausgelösten Signale durch das Zytoplasma zum Zellkern übertragen. Der als Signaling bezeichnete Vorgang unterliegt normalerweise einer strikten Kontrolle und Regulation. Störungen, wie in **Kap. 1.1.1** beschrieben, können zur Tumorbildung führen.



**Abb. 6:** Vereinfachtes Schema des RPTK-Signalings (Abk. s. Text)<sup>68,69,70,71,72,73</sup>

Die durch Auto-/Transphosphorylierung bereitgestellten Phosphotyrosine bilden wichtige Ausgangspunkte für das im Zytoplasma ablaufende Signaling, da sie Bindungsstellen für Signal- und Adapterproteine sind. Durch die Phosphorylierung werden sogenannte Adapterproteine (z.B. GRB, SCH, etc.) aktiviert, die das Phosphorylierungssignal durch eine Kette von Signalmolekülen weitergeben. Wichtige Signalmoleküle sind das G-Protein Ras, PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und PLC-γ (Phospholipase C-γ).

### 1.5.1 Aktivierung der RAS/MAPK-Signalkaskade

RAS ist ein in der Membran verankertes G-Protein, das in der inaktiven GDP- und der aktiven GTP-gebundenen Form existiert. Die Bildung des aktiven, GTP-gebundenen RAS, erfolgt durch die Bindung an SOS (engl.: son of sevenless) oder an einen anderen Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (GNEF: engl.: guanine nucleotide exchange factor)<sup>74</sup>.

Die Bindung von SOS an RAS bewirkt dessen Konformationsänderung, die eine Dissoziation von GDP und die Bildung von GTP zur Folge hat.

RAS-GTP aktiviert die Serin/Threonin-Kinase (Ser/Thr-Kinase) RAF (auch MAPKKK: engl.: mitogen-activated protein kinase kinase kinase), die dann über weitere Ser/Thr-Kinasen wie MEK (auch MAPKK: engl.: mitogen-activated protein kinase kinase) und MAPK (engl.: mitogen-activated protein kinase; auch ERK: engl.: extracellular signal-regulated kinase) das Phosphorylierungssignal in den Zellkern weitertragen und dort die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. Elk-1, c-fos, c-myc, etc.) initiieren<sup>75</sup>. Dort lösen sie durch Wechselwirkungen mit DNS-Elementen in der Promotorregion von Genen deren Transkription aus<sup>76</sup>. Dabei handelt es sich um Gene, die für Proteine mit Einfluß auf den Zellzyklus kodieren, wie z.B. Cyclin D1, das den Eintritt in einen neuen Zellzyklus fördert.

Durch die MAPK werden u.a. die Ser/Thr-Kinasen p90RS6K (engl.: 90kDa ribosomal S6 kinase) und MSK-1 (engl.: mitogen and stress activated kinase-1) aktiviert<sup>75,77</sup>. Die beiden Ser/Thr-Kinasen können an der Transkription beteiligte Proteine phosphorylieren und sie dadurch aktivieren.

Das G-Protein RAS aktiviert vermutlich auch PI3K, PLC- $\gamma$  und weitere Downstream-Effektoren (z.B. RAC, RHO) (**Kap. 1.5.2** und **1.5.3**).

Die Aktivierung der RAS/MAPK-Signalkaskade fördert Vorgänge der Transkription und der Translation, wodurch es zu Proliferation, Differenzierung und Wachstum kommt.

### 1.5.2 Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase ist ein Enzym, das Phosphatidylinositol (z.B.  $\text{PIP}_2 \rightarrow \text{PIP}_3$ ) und verwandte Substrate phosphoryliert. Sie ist ein Heterodimer aus einer katalytischen und regulatorischen Untereinheit.

Über eine SH2-Domäne in der regulatorischen Untereinheit erfolgt die Bindung an Phosphotyrosin in der zytoplasmatischen Domäne der RPTK, wodurch die Phosphorylierung ermöglicht wird<sup>78</sup>.

Das am intensivsten untersuchte PI3K-Substrat ist AKT, eine zelluläre Ser/Thr-Kinase. Diese Kinase gilt als Verzweigungspunkt zweier bedeutender Signalwege, einen Proliferations-aktivierenden und einen Apoptose-inhibierenden Signalweg. AKT spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Gleichgewichtes zwischen der Zellvermehrung (Proliferation) und dem programmierten Zelltod (Apoptose).

Die PI3K/AKT-Signalkaskade ist an der Kontrolle der Translation während der Proteinbiosynthese beteiligt. Der AKT-Downstream-Effektor mTor (engl.: mammalian target of rapamycin), ebenfalls eine Ser/Thr-Kinase, fungiert als Sensor für das Angebot an Nährstoffen und sorgt für Gleichgewicht zwischen Nährstoffangebot und Zellwachstum. Wenn ausreichend Nährstoffe vorhanden sind, gibt mTor ein positives Signal an die Ser/Thr-Kinase p70S6K. Nach anschließender Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 kommt es zur Steigerung der Translation. Es entstehen Proteine, die am Zellzyklus und an der Translation beteiligt sind<sup>79</sup>. Die Kinasen mTOR und p70S6K sind somit wichtige Aktivatoren des Zellzyklus.

Darüberhinaus ist die PI3K/AKT-Signalkaskade an Apoptose-inhibierenden Prozessen beteiligt. Die Apoptose ermöglicht die sichere Beseitigung geschädigter Zellen ohne Entzündungsreaktionen. Zu den Hauptregulatoren gehören Caspasen (Cysteiny-l-Aspartasen; früher ICE: engl.: Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme-like Proteasen), eine Familie von Cystein-Proteasen. Ausgehend vom Schlüsselenzym AKT kann der Apoptose-fördernde Faktor Caspase 9 direkt oder über BAD phosphoryliert und dadurch inhibiert werden. Das proapoptotische Protein BAD kann nicht mehr an BCL-X<sub>L</sub> binden, um dieses zu inhibieren. Bei BCL-X<sub>L</sub> handelt es sich um ein antiapoptotisches Protein, welches Caspase 9-Aktivierung und somit die Apoptose verhindert<sup>80</sup>.

Die MAPK (**Kap. 1.5.1**) und die PKC (**Kap. 1.5.3**) aktivieren die Kinase p90RSK (90kDa-ribosomale S6-Kinase), die nachfolgend den Transkriptionsfaktor CREB (engl.: cAMP response element-binding protein) bildet, was zur Steigerung der Expression antiapoptotischer Proteine der BCL-2-Familie (z.B. BCL-X<sub>L</sub>) führt. Außerdem kann p90RSK zusätzlich das BAD-Protein phosphorylieren und damit inhibieren<sup>69,70,81</sup>. Es wird deutlich, dass mehrere Signalwege an Apoptose-Vorgängen beteiligt sind.

### 1.5.3 Aktivierung der Phospholipase C-γ (PLC-γ)

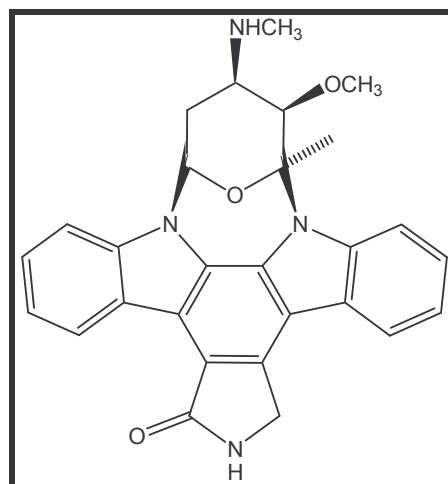
Die phosphorylierten Tyrosine Tyr 992, Tyr 1068 und Tyr 1173 sind potentielle Bindungsstellen für die SH2-Domänen der PLC-γ, die dann durch Tyrosinphosphorylierung durch RPTK aktiviert werden<sup>7</sup>. Zusätzlich kann die Aktivierung auch an Serinresten mit Hilfe einer Serinkinase erfolgen, die vermutlich im Rahmen des Signalings aktiviert wird. PLC-γ gehört zu einer Familie von Isoenzymen, die Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysieren<sup>82</sup>. IP<sub>3</sub> ist ein intrazellulärer Botenstoff, der im endoplasmatischen Retikulum gespeicherte Calciumionen freisetzt, wodurch Ca-abhängige Enzyme und Prozesse aktiviert werden<sup>83</sup>. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC)<sup>82</sup>, eine Ser/Thr-Kinase, die wiederum die Ser/Thr-Kinase p90RS6K aktiviert. Diese kann wiederum an der Transkription beteiligte Proteine phosphorylieren und sie dadurch aktivieren. Die Aktivierung fördert Vorgänge der Transkription im Zellkern, wodurch es zu Proliferation, Differenzierung und Wachstum kommt.

Die Aktivierung der Ser/Thr-Kinase p90RS6K hat eine duale Funktion im Signaling, da neben der Weitergabe des Signals zur Transkription an den Zellkern auch ein Eingriff in die PI3K/AKT-Signalkaskade erfolgt (**Kap. 1.5.2**).

Die Bindung des proapoptotischen Proteins BAD an BCL-X<sub>L</sub> wird durch p90RS6K unterbunden und führt über die in **Kap. 1.5.2** Signalwege zu einem Apoptose-inhibierenden Effekt. So wird auch über diese Signalkaskade die Apoptose beeinflusst.

## 1.6 Entwicklung von Proteinkinase-Inhibitoren – Neue Krebstherapiestrategien

Die Erkenntnis hinsichtlich der Signaltransduktion unter Vermittlung von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) führte dazu, dass in jüngerer Zeit vermehrt Anstrengungen unternommen wurden kleine Moleküle zu synthetisieren, die als PTK-Inhibitoren Verwendung finden können. Eine der Synthese-Strategien geht von dem aus *Streptomyces staurosporeus* gewonnenen Staurosporin (**Abb. 7**) aus. Staurosporin wurde 1986 als ein niedermolekularer, unspezifischer Proteinkinase C (PKC)-Inhibitor identifiziert. Wie schon in **Kap. 1.5.3** angeführt, ist die ubiquitär vorkommende PKC eine Ser/Thr-Kinase, die für zelluläre Funktionen bedeutend ist. Staurosporin bindet an den ATP-Bindungsort von PKC und verhindert somit die ATP-Bindung (kompetitive Hemmung). Die Substanz wird aufgrund ihrer Toxizität therapeutisch nicht verwendet. Dennoch beginnt mit ihr die Entwicklung von Proteinkinase-Inhibitoren, deren Wirkung durch kompetitiven ATP- und/oder Substrat-Antagonismus erzielt wird.



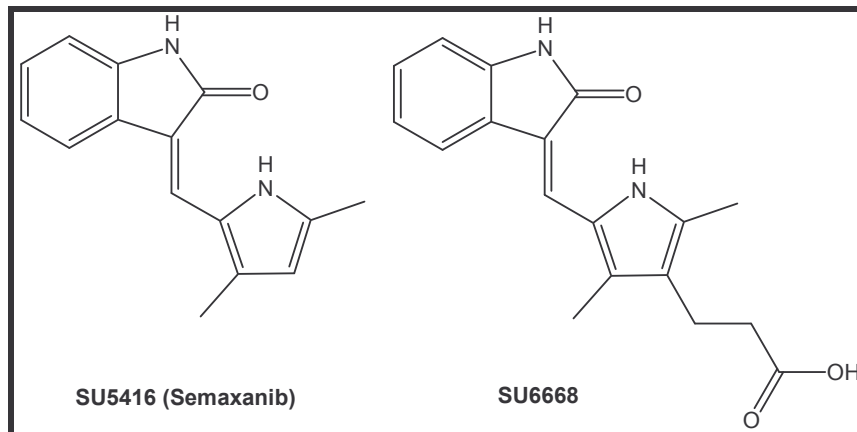
**Abb. 7:** Der PKC-Inhibitor Staurosporin

Bei Tyrosinkinase-Inhibitoren handelt es sich in der Regel um Substanzen, die sowohl aus Naturprodukten isoliert, als auch synthetisch gewonnen werden können. Um an ihren Wirkort im Zytoplasma zu gelangen, müssen TK-Inhibitoren die Zellmembran durchdringen. Niedermolekulare Inhibitoren haben den Vorteil, dass sie meistens oral bioverfügbar sind.

### 1.6.1 VEGFR-Tyrosinkinase (TK)-Inhibitoren

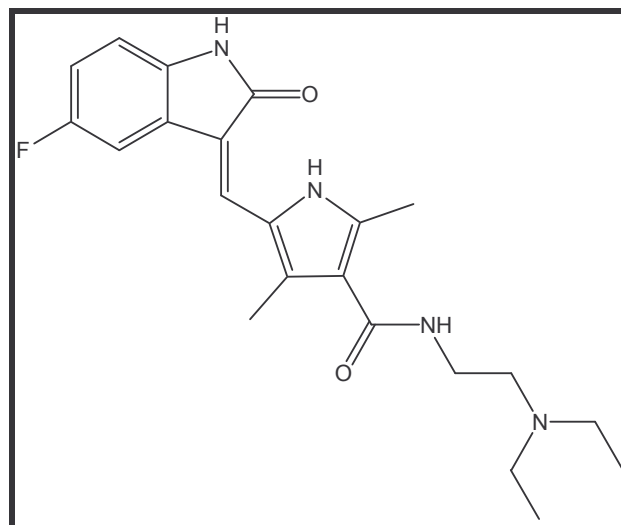
Der erste VEGFR-2/KDR-TK-Inhibitor, der in klinischen Studien zum Einsatz kam, war das von der Firma Sugen/Pharmacia entwickelte Indolinon SU5416 (**Abb. 8**), das später als Semaxanib bezeichnet wurde<sup>84</sup>. Die Substanz zeigt selektiv eine kompetitive Hemmung der ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase-Funktion des VEGFR-2 und blockiert so die Signalweiterleitung. SU5416 hemmt die VEGF-stimulierte DNA-Expression in kultivierten humanen Gefäßendothelzellen ( $IC_{50} = 0,70 \mu\text{M}$ ), obwohl es sehr schlecht löslich ist. Die Substanz ist nach herausragenden *in vitro*-Testergebnissen und der Bestätigung einer nur geringen Toxizität<sup>85</sup> für klinische Studien der Phasen-II und -III zugelassen worden. 1999 konnte eine Phase III-Studie beginnen, in der mit oder ohne SU5416 in Kombination mit 5-Fluorouracil (5-FU), Leucovorin und Irinotecan behandelt wurde. Anfang 2002 wurde die Studie beendet, weil der klinische Nutzen von SU5416 nicht nachgewiesen werden konnte. Die Ursache des Misserfolges wird auf die schlechte Pharmakokinetik des Wirkstoffs zurückgeführt.

Der ebenfalls von der Firma Sugen/Pharmacia entwickelte TK-Inhibitor SU6668 (**Abb. 8**) ist oral bioverfügbar und weist eine bessere Löslichkeit als SU5416 auf. Man findet ebenfalls eine kompetitive, diesmal unselektive ATP-Inhibition. Neben dem VEGFR-2 ( $IC_{50} = 0,02 \mu\text{M}$ ) drosselt die Substanz auch die Aktivität der PDGF- und FGF-Rezeptoren<sup>86</sup>. Die Phase-I-Studie mit soliden fortgeschrittenen Tumoren wurde Ende 2002 abgeschlossen, sodass inzwischen Phase-II-Studien mit Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen, gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), multiplem Myelom und akuter myeloischer Leukämie (AML) begonnen werden konnten<sup>87,88,89</sup>.



**Abb. 8:** Die VEGFR-TK-Inhibitoren mit Indolinon-Grundgerüst SU5416 und SU6668

Der neueste von Sugen/Pharmacia entwickelte TK-Inhibitor SU11248 (**Abb. 9**) ist eine oral bioverfügbare Substanz, die selektiv VEGFR-2 ( $IC_{50} = 0,080 \mu M$ )<sup>90</sup>, PDGFR und Flt-3 hemmt. Die Substanz wird derzeit in einer Phase-I-Studie bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren geprüft.

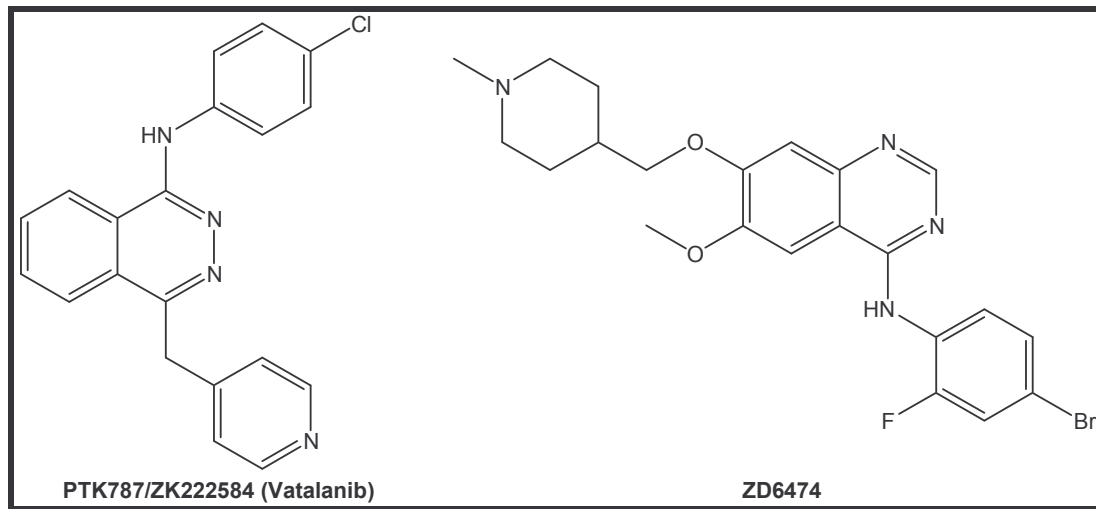


**Abb. 9:** Der VEGFR-TK-Inhibitor mit Indolinon-Grundgerüst SU11248

Die von den Firmen Novartis und Schering in Koproduktion entwickelte Substanz PTK787/ZK222584 (Vatalanib) (**Abb. 10**) ist ein potenter Inhibitor, der sowohl VEGFR-2 als auch in gleichem Maße VEGFR-1 bindet. Außerdem zeigt die Substanz Affinitäten zu den Rezeptoren anderer Wachstumsfaktoren<sup>91</sup>. In einem Nierenzellkarzinom-Modell konnte sowohl das Wachstum des Primärtumors als auch die Metastasierung in Lymphknoten und Lunge effektiv mit PTK787/ZK222584



gehemmt werden<sup>92</sup>. Die Substanz befindet sich in Phase-I-Studien mit soliden Tumoren und zeigt bisher viel versprechende Ergebnisse.

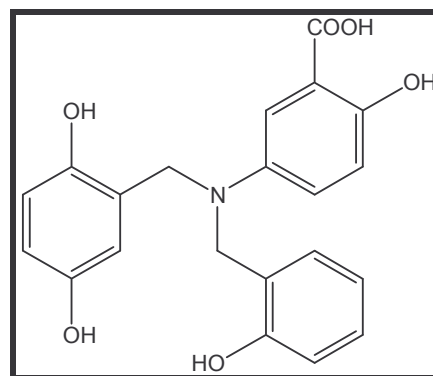


**Abb. 10:** Die VEGFR-TK-Inhibitoren PTK787/ZK222584 (Vatalanib) und ZD6474

Eine neue Substanzklasse eines potenten VEGFR-TK-Inhibitors konnte von der Firma AstraZeneca mit einem 4-Anilinochinazolin-Derivat gefunden werden. Die mit ZD6474 bezeichnete Substanz (**Abb. 10**) hemmt neben VEGFR-2 auch EGF-, PDGF- und FGF-Rezeptoren<sup>93</sup>. In *in vitro*-Modellen zeigt die Substanz Wirkung sowohl auf das Wachstum von Primärtumoren als auch auf die Metastasierung<sup>94,95</sup>. Da in Studien der Phase-I mit fortgeschrittenen soliden Tumoren Toxizitäten auftraten, ist die weitere klinische Prüfung der Substanz ungewiss<sup>96</sup>.

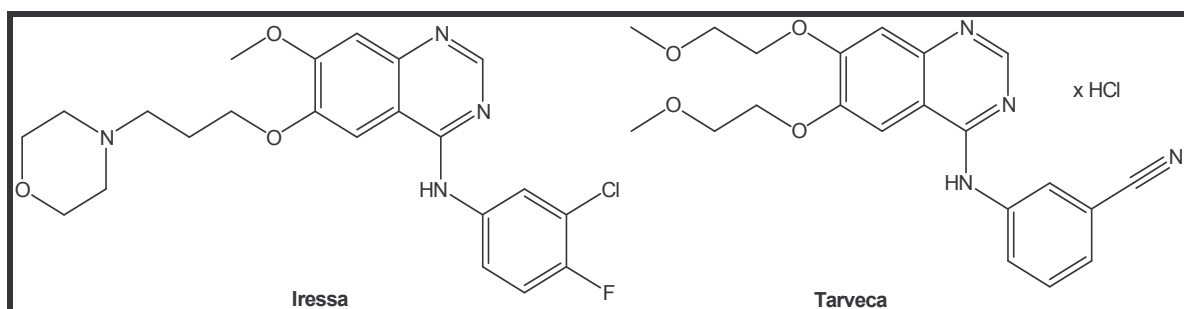
### 1.6.2 EGFR-Tyrosinkinase (TK)-Inhibitoren

Ein sehr potenter EGFR-TK-Inhibitor natürlichen Ursprungs ist das aus *Streptomyces griseolavendus* isolierte Lavendustin A (**Abb. 11**). Die Substanz hat eine hohe *in vitro*-Aktivität gegen EGFR-TK ( $IC_{50} = 0,011 \mu\text{M}$ ). Sie ist aber, wahrscheinlich aufgrund schlechten Penetrationsvermögens, *in vivo* nahezu wirkungslos<sup>97,98</sup>.



**Abb. 11:** Der aus *Streptomyces griseolavendus* isolierte EGFR-TK-Inhibitor Lavendustin A

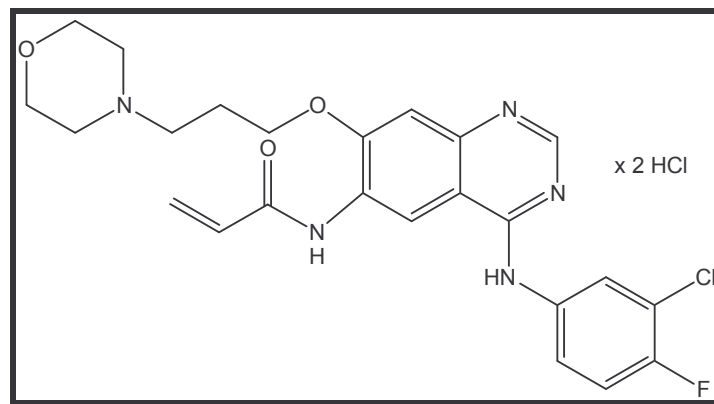
Der Durchbruch in der Entwicklung von EGFR-TK-Inhibitoren gelang Mitte der 90er Jahre mit den 4-Anilinochinazolin- und Pyridopyrimidin-Derivaten (AstraZeneca, Pfizer). Die am weitesten entwickelten Substanzen dieser Strukturklassen, ZD1839 (Iressa®, AstraZeneca,  $IC_{50} = 0,023 \mu\text{M}$ ) und OSI-774 (Tarveca®, OSI/Roche,  $IC_{50} = 0,02 \mu\text{M}$ ) (**Abb. 12**) zeigen in Phase III der klinischen Prüfung besonders in Kombination mit konventioneller Chemo- und Strahlentherapie sehr gute Wirksamkeit. Sie erhöhen die Apoptose-Induktion herkömmlicher Therapien um das 2- bis 3,5-fache<sup>4,5</sup>.



**Abb. 12:** Die EGFR-TK-Inhibitoren mit Chinazolin-Grundgerüst Iressa® und Tarveca®

Beide Substanzen hemmen kompetitiv und reversibel die Bindung von ATP an die EGFR-TK-Domäne des HER1-Rezeptors. Dadurch wird das Tumorstadium gestoppt (zytostatischer Effekt). In höheren Dosen konnte außerdem eine Rückbildung des Tumors beobachtet werden<sup>99</sup>.

Ein weiteres Ziel war die Entwicklung irreversibler EGFR-TK-Inhibitoren. CI-1033 (Pfizer,  $IC_{50} = 0,0014 \mu\text{M}$ ) (**Abb. 13**), ebenfalls aus der Gruppe der 4-Anilinochinazoline, ist ein irreversibler EGFR-TK-Inhibitor, der momentan in Phase I der klinischen Prüfung getestet wird<sup>100</sup>.



**Abb. 13:** Der irreversible EGFR-TK-Inhibitor CI-1033

Die Substanz bindet über eine Michael-Akzeptor-Position an Cys 773 in der ATP-Bindungstasche der Tyrosinkinase-Domäne. CI-1033 hemmt die Tyrosinkinasen aller EGF-Rezeptoren (HER1-4)<sup>100</sup>.