

3 Chemisch-Pharmakologischer Teil

3.1 Entwicklung von Substanzen mit Proteinkinase-inhibitorischer Aktivität

Mit Staurosporin konnte 1977 von OMURA et al.¹⁰¹ ein Naturprodukt aus *Streptomyces staurosporeus* isoliert werden, dessen breite biologische Aktivität von antifungal bis antihypertensiv reicht¹⁰² (**Abb. 14**). Nach weiteren wirkungsorientierten Untersuchungen des Alkaloids konnte 1986 eine potente Proteinkinase-inhibitorische Wirkung bei verschiedenen Proteinkinasen festgestellt werden. So werden cAMP-abhängige Proteinkinasen ($IC_{50} = 7 \text{ nm}$), die Proteinkinase C ($IC_{50} = 0,7 \text{ nm}$), cGMP-abhängige Proteinkinasen ($IC_{50} = 8,5 \text{ nm}$) und Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen ($IC_{50} = 20 \text{ nm}$) gehemmt¹⁰³. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde mit großem Einsatz an der Synthese von Staurosporin gearbeitet, die 1996 von DANISHEVSKY et al.¹⁰⁴ und WOOD et al.¹⁰⁵ erfolgreich abgeschlossen werden konnte.

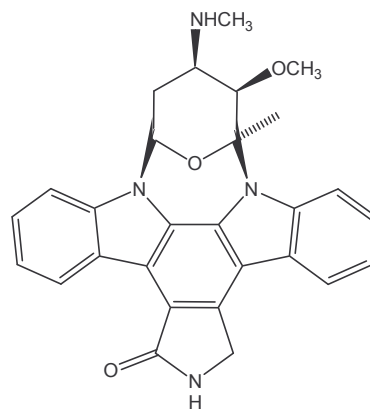


Abb. 14: Staurosporin, Proteinkinase-Inhibitor

Die Strukturformel von Staurosporin kann in Partialstrukturen gegliedert werden. Zum einen weist sie eine sogenannte Zuckereinheit auf und zum anderen enthält sie eine planare, heterozyklische Indol-Carbazol-Untereinheit.

Das Molekül interagiert aufgrund seiner chemischen Struktur mit der ATP-Bindungsstelle von Proteinkinasen als biologischem Target (**Abb. 15**). Seine höhere Affinität zur ATP-Bindungsstelle verhindert die Bindung von ATP kompetitiv. Obwohl

hinsichtlich der Wirkung beeindruckende Ergebnisse gefunden werden konnten, gelangte Staurosporin aufgrund seiner zu hohen Toxizität nie zum therapeutischen Einsatz.

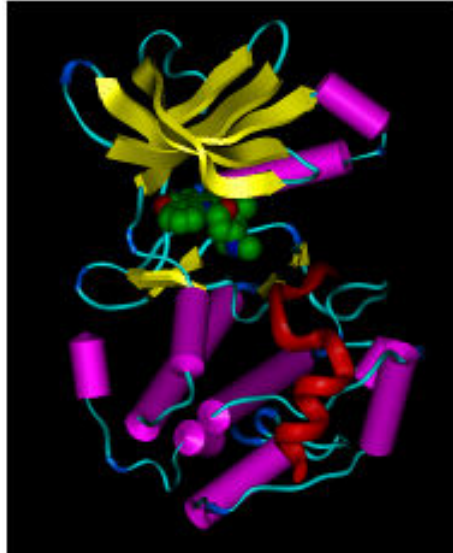


Abb. 15: Staurosporin gebunden an eine Proteinkinase; Staurosporin ist als grünes, blaues und rotes Atommodell dargestellt, die Proteinkinase in gelb und violett

Verschiedene Arbeitsgruppen arbeiten ausgehend von Staurosporin an einer Weiterentwicklung der Proteinkinase-Inhibitoren¹⁰⁶. Besonders kleine Moleküle rücken dabei in den Mittelpunkt des Interesses, da die Substanzen durch die Zellmembran ins Zytoplasma vordringen müssen, um dort an die ATP-Bindungsstelle von Membranständigen- und von Downstream-Proteinkinasen angreifen zu können.

3.1.1 Herstellung des 4-Oxo-4*H*-pyran-2,6-dicarbaldehyds (**6**) als Wirkstoff-Baustein

Zunächst war geplant, angelehnt an die Struktur des Staurosporins, Verbindung **7** zu synthetisieren (**Abb. 16**), in deren Struktur ein 4-Pyron-Anteil mit zwei 2-Indolinonen kondensiert werden sollte.

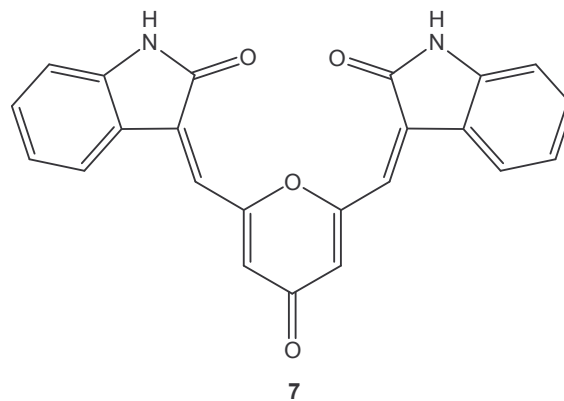


Abb. 16: Die Staurosporin-verwandte Substanz **7**

Zu diesem Zweck musste zuerst die 4-Pyron-Komponente in Form eines Dialdehyds hergestellt werden.

Ende der 1990er Jahre konnte in unserer Arbeitsgruppe durch BRÄTTER¹⁰⁷ der 4-Pyron-2,6-dialdehyd **6** erstmals synthetisiert werden (**Abb. 17**).

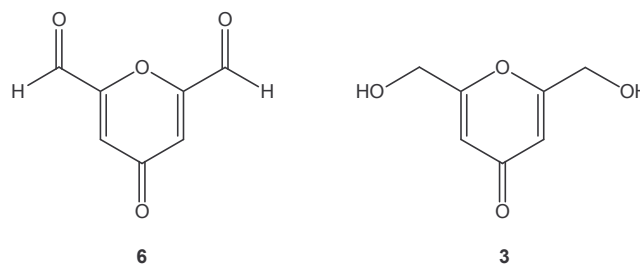


Abb. 17: 2,6-disubstituierte 4-Pyron-Derivate **3** und **6**

Um den Dialdehyd **6** zu erhalten, musste zunächst der 4-Pyrondialkohol **3** hergestellt werden. Hierzu hatten BARTON et al.¹⁰⁸ im Jahre 1975 eine Methode entwickelt, die in unserer Arbeitsgruppe hinsichtlich einer gesteigerten Ausbeute modifiziert werden konnte.

Im Rahmen dieser Synthese wird zuerst der Diethylester **2** aus der Chelidonsäure **1** hergestellt. Da die handelsüblich erhältliche Chelidonsäure sehr teuer ist, wird sie durch Reaktion von Oxalsäurediethylester mit Aceton und Natrium in Ethanol hergestellt. Der offenkettige Diester wird durch anschließende Cyclisierung und nachfolgende Esterspaltung mit Salzsäure in die Dicarbonsäure **1** in zufriedenstellender Ausbeute (76%) überführt (**Abb. 18**).

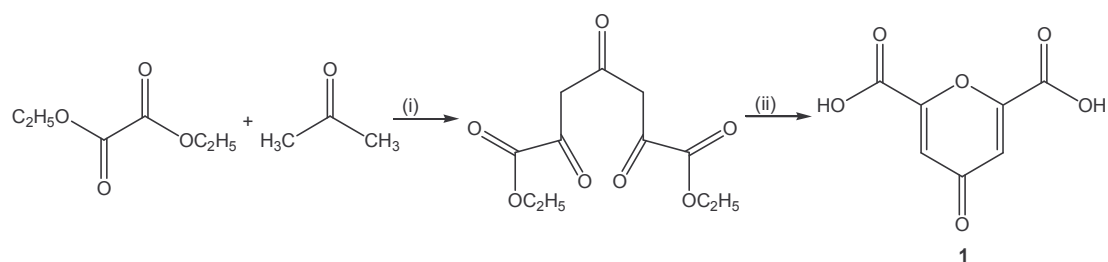


Abb. 18: Synthese der Chelidonsäure (**1**). (i) Na, EtOH, ΔT ; (ii) H_2O , HCl, ΔT

Anschließend wird die Chelidonsäure **1** mit Ethanol unter Zusatz von Schwefelsäure zu Verbindung **2** verestert, die dann durch Reduktion mit Natriumborhydrid ($NaBH_4$) in Methanol zum gewünschten Dialkohol **3** umgesetzt wird. Neben dem Dialkohol entsteht außerdem das Nebenprodukt **4**, das für die weitere Synthese bedeutungslos ist (**Abb. 19**).

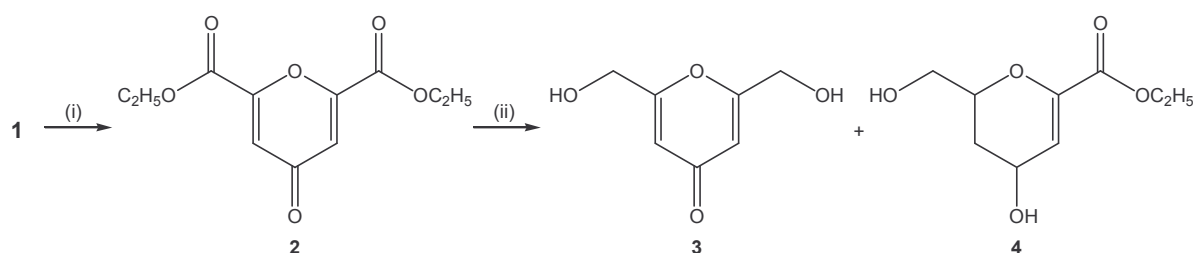


Abb. 19: Reduktion des Diethylesters **2**. (i) EtOH, H_2SO_4 , ΔT ; (ii) $NaBH_4$, MeOH, $-20^\circ C$

Führt man die Reduktion bei $-20^\circ C$ durch, lassen sich zufriedenstellende Ausbeuten (42%) an Dialkohol **3** erzielen. Die Verbindung **3** entsteht dabei mit höherer Ausbeute als das Nebenprodukt **4**.

Die Herstellung des Dialdehyds **6** konnte durch BRÄTTER¹⁰⁷ in einem überraschenden Reaktionsverlauf gelingen. Dabei wird der Dialkohol **3** bei 0°C in Nitriersäure (Salpetersäure/Schwefelsäure: 2/3) 2h lang gerührt, wobei zunächst zwei Nitrate entstehen (**5a** und **6a**), die präparativ durch SC in Ethylacetat getrennt werden können, aber nicht stabil genug sind, um isoliert werden zu können. Es wird beobachtet, dass **5a** und **6a** in die Aldehyde **5** und **6** zerfallen.

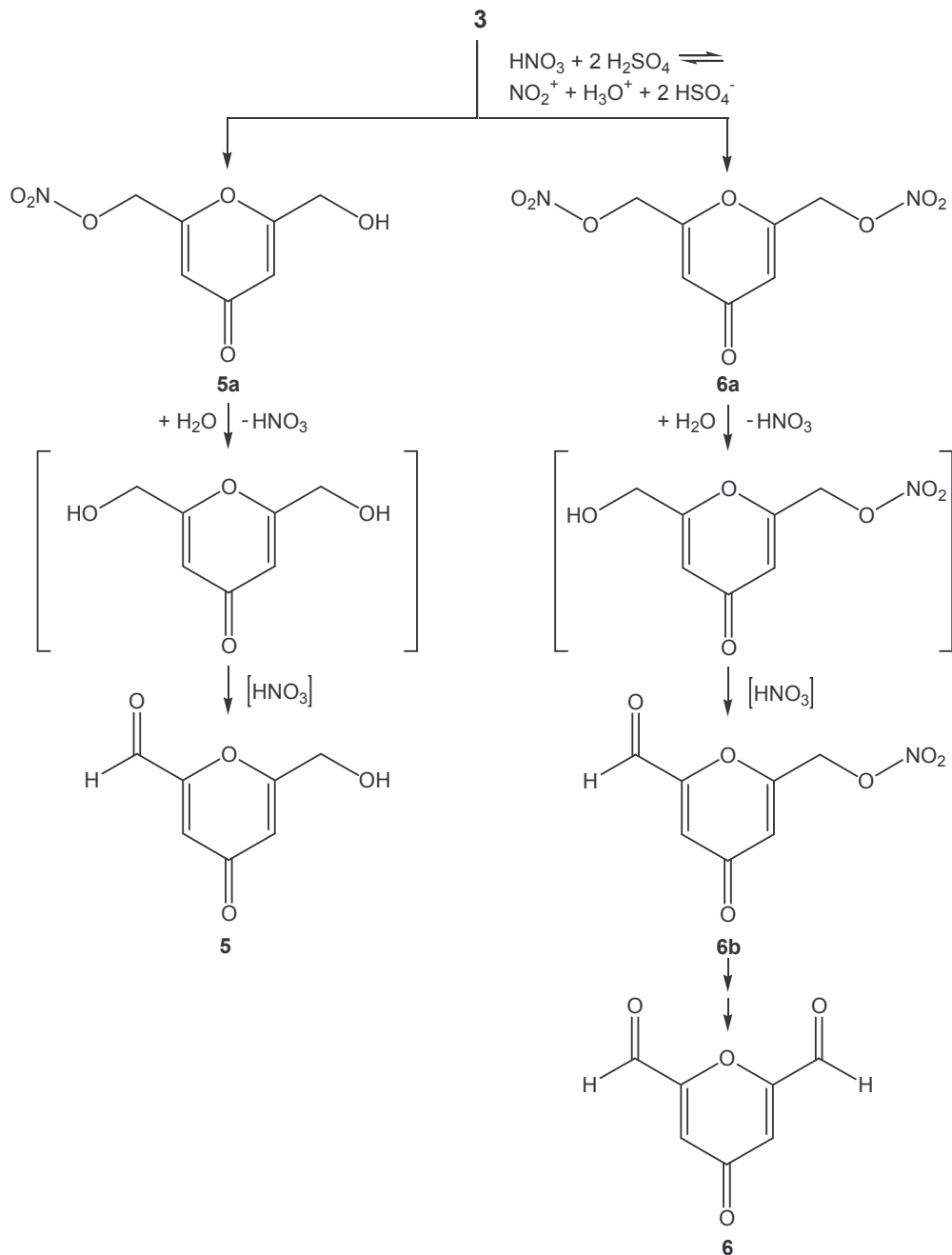


Abb. 20: Vermuteter Ablauf der Synthese des Dialdehyds **6**¹⁰⁷

Eine mögliche Interpretation für diese Reaktion wäre eine solvolytische Spaltung von **6a**, bei der unter Eliminierung eines Äquivalents Salpetersäure intermediär ein Alkohol entsteht, der durch die Salpetersäure zum Aldehyd **6b** oxidiert wird. Durch Wiederholung dieser Reaktion würde aus **6b** der Dialdehyd **6** entstehen (**Abb. 20**). Der Reaktionsverlauf kann mit Hilfe des $^1\text{H-NMR}$ - und des Massenspektrums einer eingeeengten Fraktion der Verbindung **6a** verfolgt werden¹⁰⁷.

Die Substanz **6a** und deren Folgeprodukte **6b** und **6** sind weder Säulen-, noch Dickschicht-chromatographisch voneinander zu trennen. Wird die Verbindung **6a** jedoch in Ethylacetat erhitzt, so fällt ein weißer Niederschlag aus, bei dem es sich um den auf direktem Weg entstandenen reinen Dialdehyd **6** handelt.

Diese Beobachtungen sind auch auf die Strukturen **5a** und **5** anzuwenden. So wird das Produkt **5a** durch Solvolyse und Eliminierung eines Äquivalents Salpetersäure zur Verbindung **5** umgewandelt (**Abb. 20**).

Diese Solvolyse-Interpretation der Aldehyd-Synthese von **5** und **6** muß aber relativiert werden, da die Verbindungen **5a** und **6a** durch bloßes Erhitzen in Ethylacetat in die Endprodukte **5** und **6** übergeführt werden können. Daher scheint das zur Solvolyse notwendige Wasser weitgehend ausgeschlossen zu sein. Deshalb erscheint eher die Eliminierung von Salpetersäure aus den O-Nitraten **5a** und **6a** eine mögliche Erklärung für den Reaktionsverlauf zu sein. Diese Reaktionsfolge wird in **Abb. 21** dargestellt. Diese Eliminierungsreaktionen sind auch deshalb begünstigt, da die gewünschten Aldehyde aufgrund ihrer Konjugation, bzw. gekreuzten Konjugation energetisch günstige Systeme darstellen.

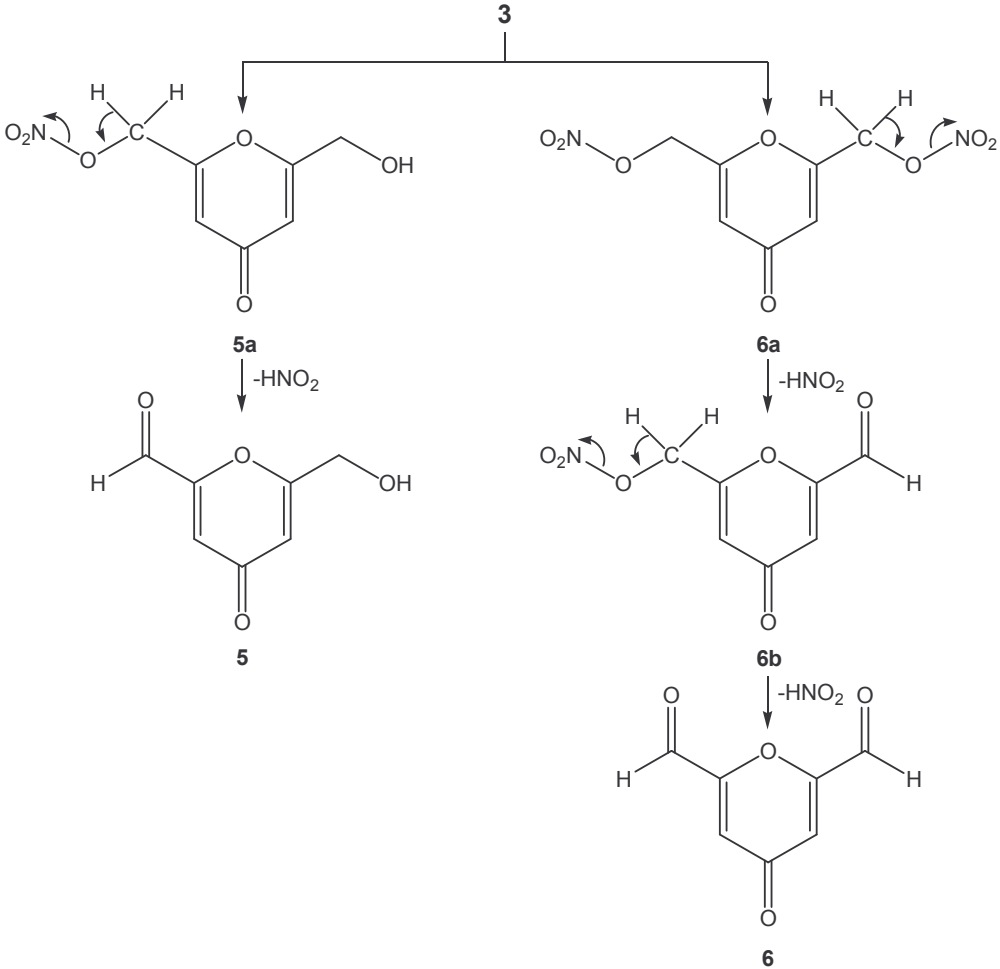


Abb. 21: Herstellung des Dialdehyds 6 ausgehend vom Dialkohol 3

3.1.2 Versuche zur Herstellung der Staurosporin-verwandten Substanz 7

Der Dialdehyd **6** kann jetzt mit den zwei Indolonen in die Staurosporin-verwandte Substanz **7** überführt werden (**Abb. 22**).

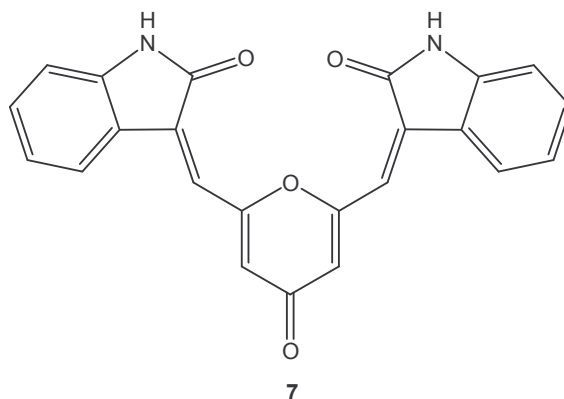


Abb. 22: Die Staurosporin-verwandte Substanz 7

Hierzu muss der Dialdehyd **6** mit zwei Molekülen des Indolons in einer Knoevenagel-Kondensation verknüpft werden. Die eingesetzte CH-acide Verbindung ist in diesem Fall das 2-Indolon, das mit dem Dialdehyd **6** unter Zusatz des basischen Katalysators Piperidin umgesetzt wird. Die Reaktion wird in Ethanol durchgeführt, wobei die Mischung 3h rückfließend erhitzt und ständig Inprozess kontrolliert wird. Dabei entstehen zwei neue Produkte, die auf der DC-Platte eine intensive gelbe Fluoreszenz zeigen. Es wurde versucht, diese beiden Produkte SC in Ethylacetat aufzutrennen. Dabei konnten zwei Fraktionen isoliert werden, die allerdings aufgrund ihrer mangelnden Reinheit mit den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren nicht zweifelsfrei interpretiert werden können.

Hinweise auf eine gelungene Kondensation (**Abb. 23**) geben die Befunde der Massenspektren. Es wird ein Molpeak für die monokondensierte Verbindung **8** bei $m/z = 267$, für die biskondensierte Verbindung **7** bei $m/z = 382$ gefunden.

Trotz Anwendung verschiedenster Trennverfahren war es jedoch nicht möglich, die Fraktionen mit den Substanzen **7** und **8** ausreichend aufzureinigen, um eine umfassende analytische Charakterisierung und Testungen auf Proteinkinase-Aktivität durchführen zu können.

Diese Schwierigkeit liegt insbesondere in der schlechten Löslichkeit der Substanzen begründet.

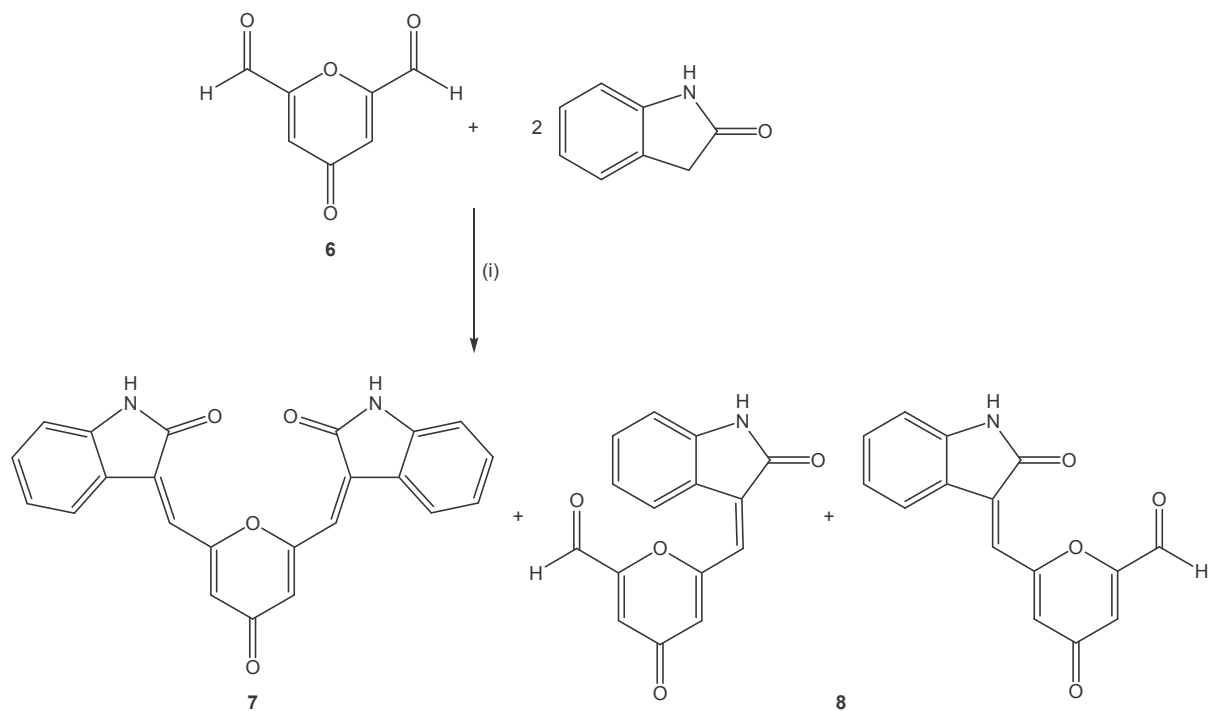


Abb. 23: Reaktionsschema zur Herstellung der Substanz 7. (i) Piperidin, EtOH, ΔT

Es fällt jedoch bei der Struktur 8 eine enge Verwandtschaft zu den Sugen/Pharmacia-Verbindungen mit VEGFR-TK-inhibitorischer Aktivität auf (**Kap. 1.6.1**). Allerdings fehlt bei Verbindung 8 eine intramolekulare Wasserstoff-Brücke von einem NH zum Indolinon-Sauerstoff. Da bei 4-Pyronen der Pyron-Sauerstoff durch Stickstoff ersetzt werden kann, wäre ausgehend von 8 eine Entwicklung zu VEGFR-TK-Inhibitoren möglich.

3.2 VEGFR-TK-Inhibitoren

In den ersten Jahren nach Identifizierung der Struktur des Staurosporins und der Kenntnis seiner Synthese wurden vor allem strukturell sehr ähnliche Substanzen hergestellt¹⁰⁹. Seitdem sind aber auch unzählige weitere Substanzklassen gefunden worden, die als Proteinkinase-Inhibitoren Wirkung zeigen^{106,111}.

Eine wichtige neue Substanzklasse, die auf dem Gebiet der Protein-Tyrosin-Kinase (PTK)-Inhibitoren Bedeutung erzielt hat, ist die der 3-substituierten 2-Indolinone. Sie weist unterschiedliche Selektivität zu den verschiedenen RPTKs auf. Zu ihr gehören die schon in **Kap. 1.6.1** erwähnten, von der Firma Sugen/Pharmacia entwickelten, Substanzen SU5416, SU6669 und SU11248 (**Abb. 24**), die besonders selektiv an der VEGFR-TK, genauer deren ATP-Bindungstasche, angreifen. Aus kristallographischen Daten, die für zwei verschiedene 3-substituierte 2-Indolinon-Derivate im katalytischen Kern der FGFR-TK existieren, wird deutlich, dass die Substanzen an der ATP-Bindungstasche der RPTKs angreifen. Das Pharmakophor 2-Indolinon besetzt die Bindungsstelle, in die sich normalerweise das Adenin des Adenosintriphosphates (ATP) einlagert¹¹⁰.

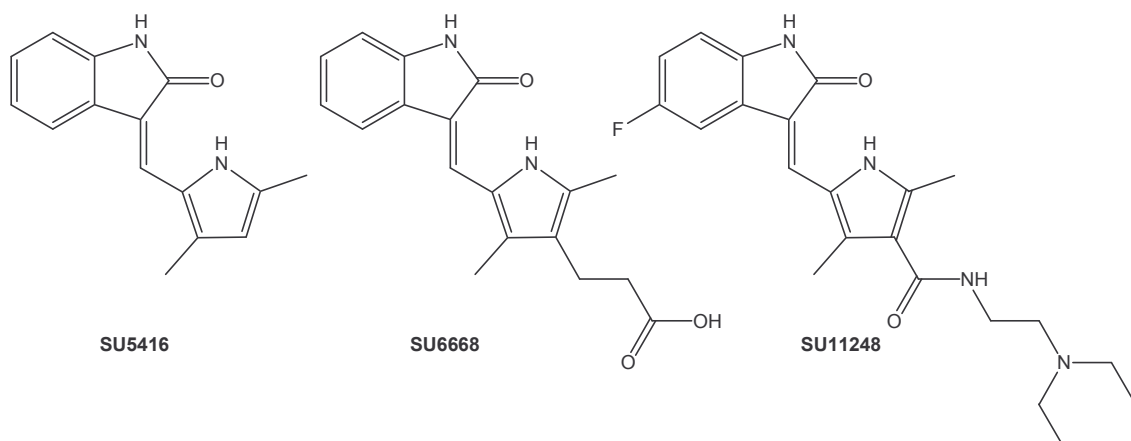


Abb. 24: Die potenten VEGFR-TK-Inhibitoren aus der Klasse der 3-substituierten 2-Indolinone (Sugen/Pharmacia)

In einem 1989 von SUN et al.¹¹¹ veröffentlichten Artikel wird eine Unterteilung der 3-substituierten 2-Indolinone nach Struktur-Wirkungs-Kriterien vorgenommen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Selektivität der Substanzen sehr stark von dem Substituenten in Position 3 des 2-Indolinons abhängig ist (**Abb. 25**).

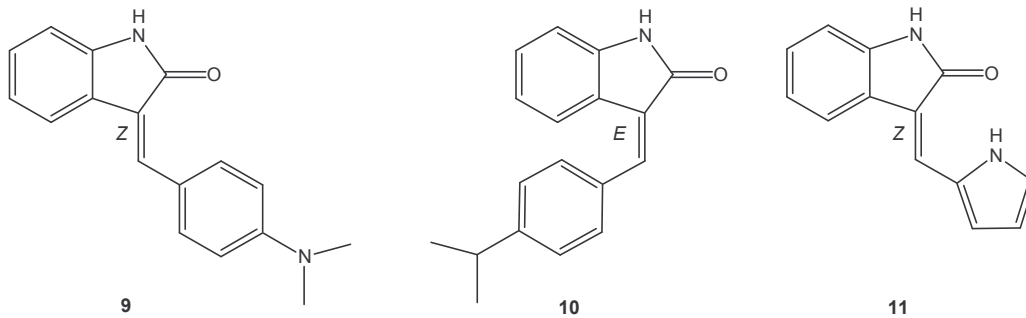


Abb. 25: Leitstrukturen der 2-substituierten 2-Indolinone¹¹¹

Wie an den Leitstrukturen in **Abb. 25** deutlich gemacht wird hat sich als wichtig für die VEGFR-2-TK-inhibitorische Selektivität insbesondere die *Z*-Konfiguration der Substanzen herauskristallisiert. So sind die Verbindungen **9** und **11**, die als *Z*-Isomer existieren, potente und selektive VEGFR-2-TK-Inhibitoren, während Substanzen mit einem Benzylidenyl-Substituenten in Position 3 (**10**), die als *E*-Isomer vorliegen, keine selektive RPTK-Inhibition aufweisen.

In den nachfolgenden Kapiteln sollen Substanzen mit einem 3-substituierten 2-Indolinon Grundgerüst mit VEGFR-TK-inhibitorischer Aktivität hergestellt werden, die diese bereits bekannten Struktur-Wirkungs-Beziehungen berücksichtigen. Außerdem soll besonders die Löslichkeit deutlich verbessert werden, da die bisher bekannten Substanzen aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit trotz bester *in vitro*-Ergebnisse bisher nicht zum Einsatz gelangen konnten (**Kap. 1.6.1**).

3.2.1 Herstellung eines 4-Oxopyridylmethyliden-substituierten 2-Indolinon-Derivates **19**

Da bisher bei 3-substituierten 2-Indolinonen heterozyklische Sechsring-Systeme als Kondensationspartner unbekannt sind, wurde in Anlehnung an die eingangs geschilderte Konzeption ein 4-Pyridon-Monoaldehyd gesucht, der sich als Vorläufer auf dem Weg zu Substanz **19** eignen könnte (**Abb. 26**).

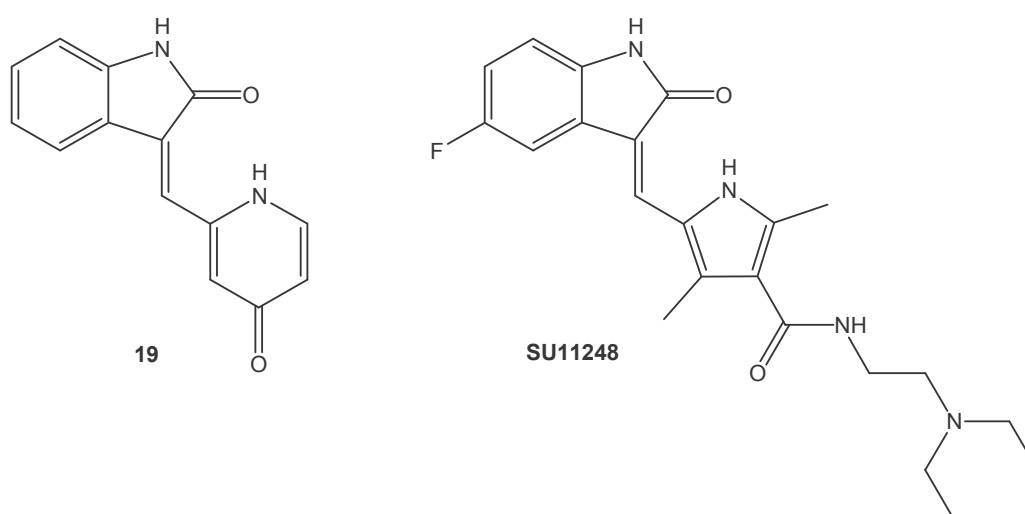


Abb. 26: Der geplante Prototyp **19** und der potente VEGFR-TK-Inhibitor SU11248

Bei der Konzeption des Prototypen **19** liegt der Carbonyl-Sauerstoff der 4-Pyridon-Untereinheit im Areal des Carbonyl-Sauerstoffs der Seitenkette in Position 4' des Pyrrols von SU11248. Hinsichtlich der Konfiguration muß es sich um ein *Z*-Isomer handeln, damit die Selektivität gesichert ist. Als Prototyp der in dieser Arbeit entwickelten Strukturen soll deshalb Substanz **19** entwickelt werden, die als Pharmakophor die gleiche 2-Indolinon Untereinheit aufweist, wie die Verbindungen von Sugen/Pharmacia.

3.2.1.1 Herstellung des 2-(Hydroxymethyl)-4H-pyran-4-ons (14)

Um zum Prototyp **19** zu gelangen war es die erste Aufgabe, mit den aus der Synthese des Dialkohols (**Kap. 3.1.1**) gesammelten Erkenntnissen, das kleine und wegen geringer Ausbeuten schwer zugängliche Molekül des 2-Hydroxymethyl-4-pyrans **14** bereitzustellen (**Abb. 27**).

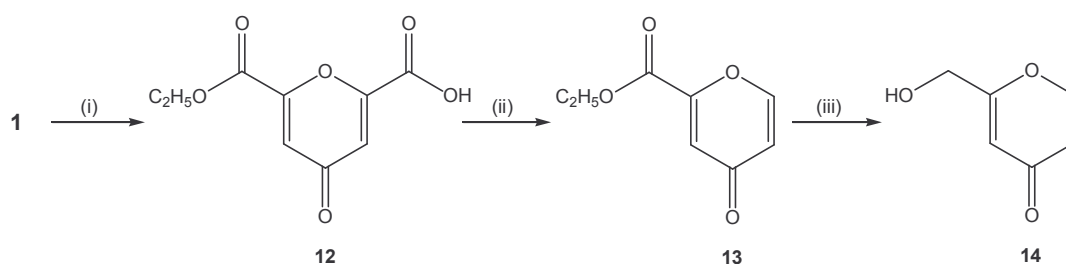


Abb. 27: Herstellung von **14**. (i) 5% eth. HCl; (ii) 230°C; (iii) NaBH₄, MeOH, -20°C

Wie von ATTENBURROW et al¹¹² im Jahr 1945 beschrieben, wird dazu die Chelidonsäure **1** (**Kap. 3.1.1**) mit 5%iger ethanolischer Salzsäure partiell verestert. Das dabei entstandene Monoethylchelidonat **12** wird durch trockenes Erhitzen in einem Kolben mit Luftkühler bei 230°C decarboxyliert. Bei der blaß gelben überdestillierten Flüssigkeit handelt es sich um das entstandene Ethylcomanat **13**, das zum Teil schon im Luftkühler auskristallisiert. Die Decarboxylierungsreaktion findet nur mit sehr geringen Ausbeuten statt (25%). Die anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid in Methanol kann wie auch schon bei der Herstellung des Dialkohols **3** bei -20°C durchgeführt werden. Das gewünschte 2-Hydroxymethyl-4-pyran **14** wird in einer Ausbeute von 50% erhalten.

3.2.1.2 Herstellung des 4-Oxo-4H-pyran-2-carbaldehyds (16)

In Anlehnung an die von BRÄTTER beschriebene Herstellung des Dialdehyds **6** (Kap. 3.1.1) soll zunächst auch das 2-Hydroxymethyl-4-pyron **14** mit Nitriersäure umgesetzt werden (Abb. 28).

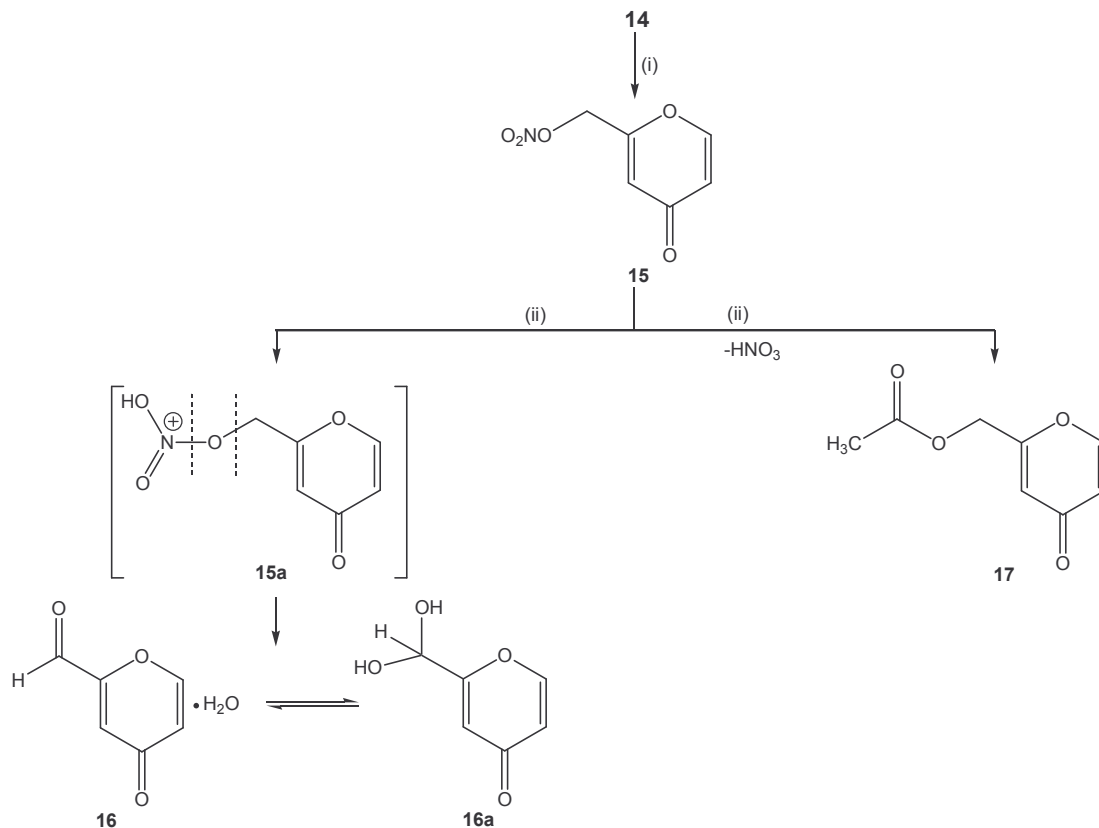


Abb. 28: Syntheschema des 4-Oxo-4H-pyran-2-carbaldehyd (**16**). (i) HNO₃/H₂SO₄ (2/3), 0°C; (ii) Essigsäure konz., H₂SO₄, ΔT

Hierzu rührt man **14** bei 0°C in Nitriersäure (Salpetersäure/Schwefelsäure: 2/3) 2h und reinigt das entstandene gelbe Öl mit Ethylacetat SC auf. Man erhält das mit ¹H-NMR- und Massenspektren identifizierbare Zwischenprodukt 2-Nitrooxymethyl-4-pyron **15**, das aber nicht stabil genug ist, um es zu isolieren. In einer Veröffentlichung von Ross et al. wird die Umsetzung von Nitratestern zu Aldehyden in konz. Essigsäure mit einer katalytischen Menge Schwefelsäure beschrieben¹¹³. In Anlehnung an dieses Verfahren wird das Zwischenprodukt **15** in konz. Essigsäure unter Zusatz von konz. Schwefelsäure rückfließend erhitzt. Da die Reaktion zum Aldehyd nur in Anwesenheit von Schwefelsäure stattfinden kann, ist die konjugierte

Säure von Produkt **15** (**15a**) in den Reaktionsmechanismus involviert. Bei der Umsetzung zum Aldehyd wird eine Spaltung des Moleküls entweder an der C-O Bindung oder an der N-O Bindung diskutiert. Eine vollständige Aufklärung des Mechanismus der Umsetzung zum Aldehyd ist nicht beschrieben. Außerdem kann ein drittes Produkt **17**, das mit einer Ausbeute von 17% entsteht, identifiziert werden (**Abb. 28**). Es handelt sich hierbei um das 4-Pyron-2-ylmethylacetat, das durch einen Austausch der Säuregruppen gebildet wird.

Man erhält mit einer Ausbeute von 38% ein Gemisch aus dem 4-Pyron-2-carbaldehyd **16** und seiner geminalen Diolform **16a**. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und die CHN-Analyse ergeben übereinstimmend, dass das Gemisch in einem Verhältnis 6:4 zugunsten der Aldehydform **16** vorliegt (**Abb. 30**).

Die Verhältnisse der im Gemisch vorliegenden Substanzen **16** und **16a** sind im folgenden Spektrum deutlich erkennbar (**Abb. 29**).

Für die Aldehyd-Funktion von **16** ermittelt man im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Signal mit einer chemischen Verschiebung von 9.64 ppm, während die Hydratform **16a** ein Dublett bei 6.84 ppm für die beiden Hydroxy-Funktionen liefert. Das bei 5.47 ppm zu erkennende Signal stammt vom CH des geminalen Diols.

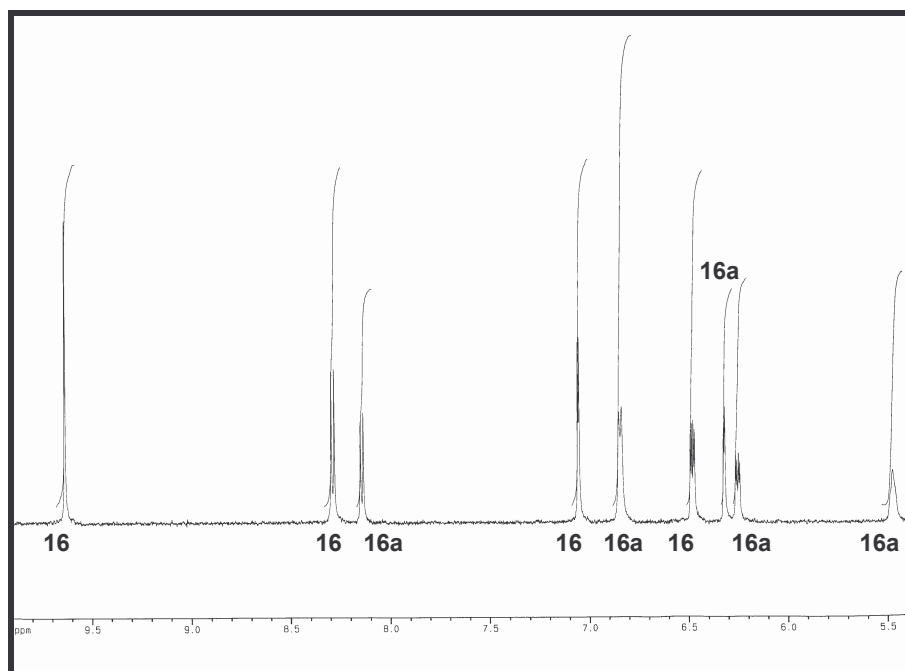


Abb. 29: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Gemisches aus dem Aldehyd **16** und seiner geminalen Diolform **16a** (60:40)

Da der 4-Pyron-2-carbaldehyd auf diesem Weg und mit einer schlechten Ausbeute entsteht, soll eine bessere Möglichkeit zu seiner Herstellung gefunden werden. Eine Umsetzung des 2-Hydroxymethyl-4-pyrons **14** mit aktivem Mangan(IV)-oxid (MnO_2) zum Aldehyd **16** ist Erfolg versprechend, da zumindest die Nebenreaktion zum Acetat **17** unterbunden wird (**Abb. 30**). Außerdem gilt MnO_2 als mildes, selektives und heterogenes Oxidationsmittel für die Oxidation von verschiedenen Verbindungsklassen.

Die ersten Versuche einer Oxidation mit aktivem MnO_2 werden in wasserfreiem Aceton durchgeführt. Man erhitzt den Ansatz auf 50°C und bricht die Inprozess kontrollierte Reaktion nach 1h ab, da sich ein neues Produkt gebildet hat. Die Aufreinigung erfolgt SC in dem Fließmittel Dichlormethan/Methanol (9:1). Die analytische Aufklärung zeigt, dass sich auch auf diese Weise der Aldehyd **16** darstellen lässt, allerdings nur mit einer Ausbeute von 18%. Das ist darauf zurückzuführen, dass schon das Ausgangsprodukt schwer löslich ist und daher nicht vollständig umgesetzt werden kann. Eine Verbesserung der Reaktion soll deshalb durch erhöhte Löslichkeit des Alkohols **14** erreicht werden. Aus diesem Grund variiert man das Lösungsmittel. Allerdings bringt auch der Einsatz von Dichlormethan oder Chloroform als Lösungsmittel keine signifikante Steigerung der Ausbeute mit sich. Auch die Kombination von Aceton und Dichlormethan hat die Löslichkeit der Ausgangssubstanz **14** nicht verbessert. Erst in einem Gemisch aus drei Lösungsmittelkomponenten (Methanol/Aceton/ Dichlormethan, 1:1:1) kann eine Ausbeute von 48% erzielt werden (**Abb. 30**).

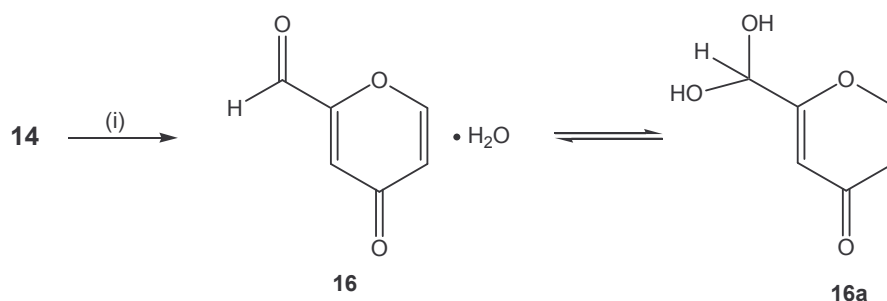


Abb. 30: Oxidation des Alkohols **14** zum 4-Oxo-4H-pyran-2-carbaldehyd (**16**). (i) MeOH/Aceton/ CH_2Cl_2 (1:1:1), aktives MnO_2 , 50°C

Die genaue Klärung des Mechanismus einer Oxidation mit aktivem MnO_2 in der organischen Chemie gestaltet sich als schwierig, da neben den Einflüssen des organischen Substrates auch die Eigenschaften der aktiven Oberfläche des MnO_2 und deren adsorptive Effekte eine Rolle spielen¹¹⁴. In der Literatur wird hauptsächlich ein dreiphasiger Mechanismus diskutiert, der aus der Adsorption des organischen Substrates an die Oberfläche des aktivem MnO_2 und der Bildung eines koordinierten Komplexes, der Oxidation, über einen radikalischen Mechanismus und der Desorption des Produktes besteht¹¹⁵. Dieser postulierte dreiphasige Mechanismus wird in **Abb. 31** am Beispiel des Benzylalkohols dargestellt und könnte im vorliegenden Fall ähnlich ablaufen.

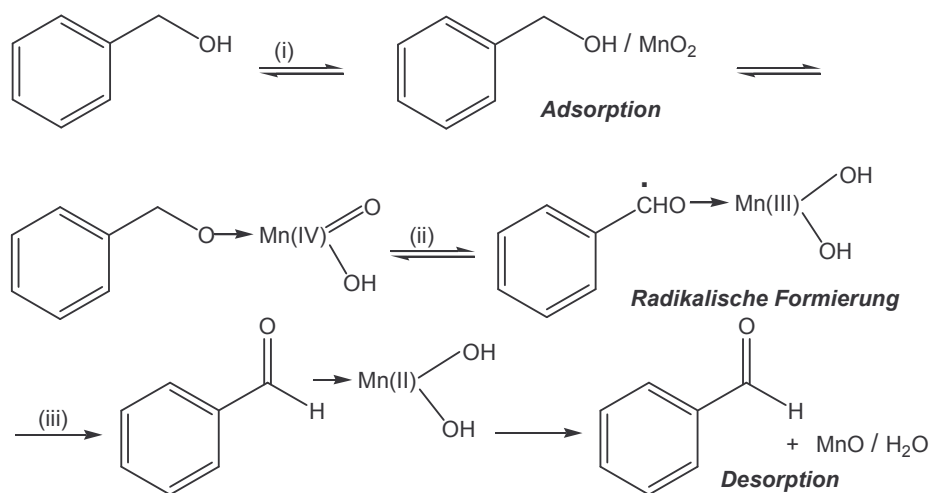


Abb. 31: Dreiphasiger Mechanismus der Oxidation mit aktivem MnO_2 über einen radikalischen Mechanismus. Formuliert am Beispiel von Benzylalkohol. (i) aktives MnO_2 , Adsorption des Substrates am aktiven MnO_2 ; (ii) Hydridtransfer zum stabilen Radikal; (iii) intramolekularer Elektronentransfer¹¹⁵

Insgesamt kann die Oxidation eines primären Alkohols mit aktivem Mangan(IV)-oxid im Rahmen der Aldehyd-Synthese von kleinen Strukturen, wie z. B. den vorliegenden 4-Pyronen, als deutliche Verbesserung betrachtet werden, da ein eindeutiger Reaktionsverlauf und eine Erhöhung der Ausbeute beobachtet werden kann.

3.2.1.3 Herstellung des (3*E*)-3-[(4-Oxo-4*H*-pyran-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2*H*-indol-2-ons (18)

Den nächsten Schritt auf dem Weg zum Prototypen **19** stellt eine Knoevenagel-Kondensation des Aldehyds **16** mit dem käuflich erworbenen 2-Indolinon dar. Dabei werden äquimolare Mengen des Aldehyds **16** und des 2-Indolinons in Pyridin gelöst und 30 min rückfließend erhitzt. Die Substanz wird aus Ethanol umkristallisiert. Da gemäß pharmakologischer Erkenntnisse für eine selektive VEGFR-TK-Inhibition das *Z*-Isomer benötigt wird, muß das entstandene Kondensationsprodukt **18** eingehend analytisch charakterisiert werden (**Abb. 32**).

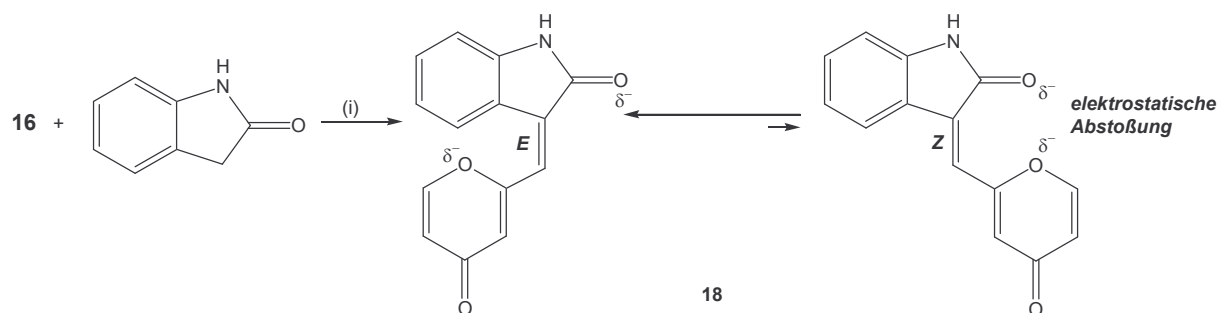


Abb. 32: Begründung für die Entstehung des *E*-Isomers in Verbindung **18**. (i) Pyridin, ΔT

Die Konfiguration kann durch eine Röntgenstrukturanalyse geklärt werden. Die dazu benötigten Kristalle ausreichender Größe erhält man durch Umkristallisation der Verbindung **18** aus Ethanol. Der Befund der Röntgenkristallaufnahme zeigt deutlich, dass es sich bei der synthetisierten Verbindung um das unerwünschte *E*-Isomer handelt (**Abb. 33**).

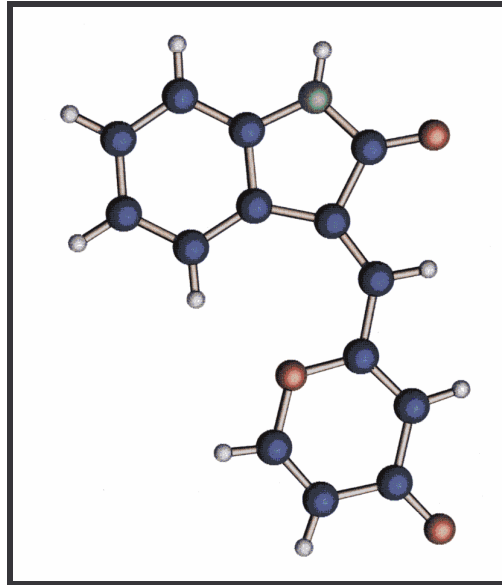


Abb. 33: Röntgenkristallstruktur der Verbindung **18**

Das bestehende Gleichgewicht zwischen dem *E*- und dem *Z*-Isomer liegt in diesem Falle deutlich auf der Seite des *E*-Isomers. Eine Begründung für die favorisierte Entstehung des *E*-Isomers könnte in der elektrostatischen Abstoßung zu finden sein, die zwischen dem Sauerstoffatom am C2 des 2-Indolinons und dem Sauerstoffatom in Position 1 des 4-Pyrone besteht. Zusätzlich scheint der Kontakt zwischen H4 und dem Pyron-Sauerstoff das *E*-Isomer zu begünstigen (**Abb. 32**).

Außerdem zeigt sich in den Kristallaufnahmen, dass eine Cluster-Bildung auftritt. Es entstehen langkettige Strukturelemente, bei denen das Proton am Stickstoff des 2-Indolinons eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonyl-Sauerstoff des 4-Pyrone ausbildet. Die intermolekulare Verbindung der Strukturen über Wasserstoffbrücken erklärt auch die Auskristallisation der Substanz in Form von langen Kristallnadeln (**Abb. 34**).

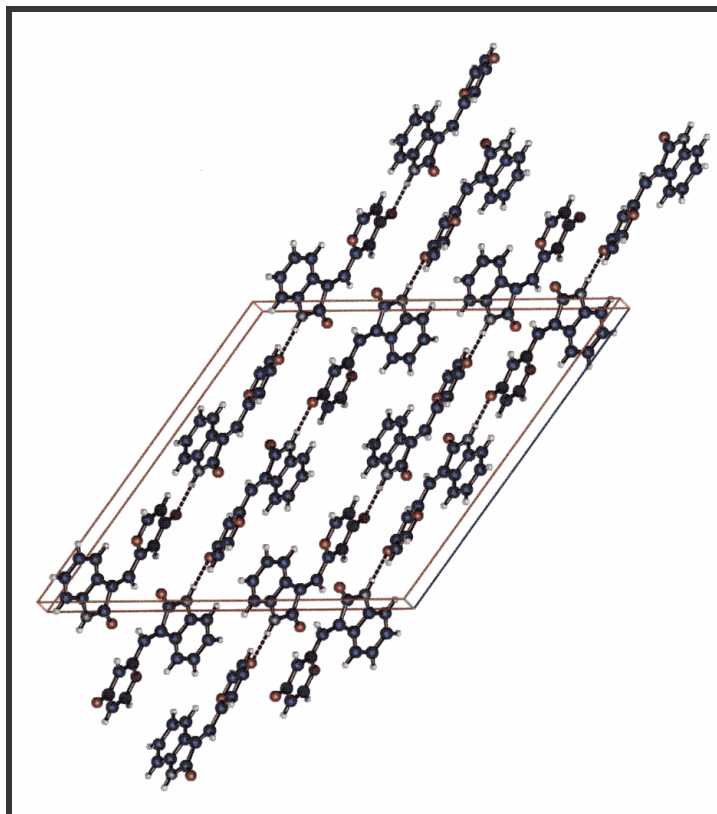


Abb. 34: Röntgenkristallaufnahme als Beweis für die Cluster-Bildung von Verbindung **18**

3.2.1.4 Ringtransformation zum (3Z)-3-[(4-Oxo-1,4-dihydropyridin-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2H-indol-2-on (**19**)

Diese Befunde waren zunächst enttäuschend und schienen den weiteren Fortgang der Synthese zu gefährden. Trotzdem wurde ein letzter Schritt zur Herstellung des Prototypen **19** durch eine Ringtransformation gewagt. Dabei wurde zunächst kein bevorzugtes Z-Isomer erwartet.

Durch Austausch des Sauerstoffs im 4-Pyron gegen Stickstoff soll ein 4-Pyridon erhalten werden. Diese Ringtransformation wird in der Literatur mehrfach beschrieben. Schon 1910 zeigte BAEYER¹¹⁶, dass durch Einwirkung von Ammoniumcarbonat-Lösung auf das Methoxyppyrylium-Salz von 2,6-Dimethyl-4-pyron, das 2,6-Dimethyl-4-methoxypyridin entsteht¹¹⁶. HEYNS und VOGELSANG¹¹⁷ beschreiben die Umsetzung von 4-Pyronen zu den entsprechenden 4-Pyridonen mit Ammoniak, Methylenamin, bifunktionellen Aminen und Aminosäuren.

Ein derartiger Ligandenaustausch soll nun mit Verbindung **18** durchgeführt werden. Der Mechanismus der Reaktion wird in **Abb. 35** dargestellt.

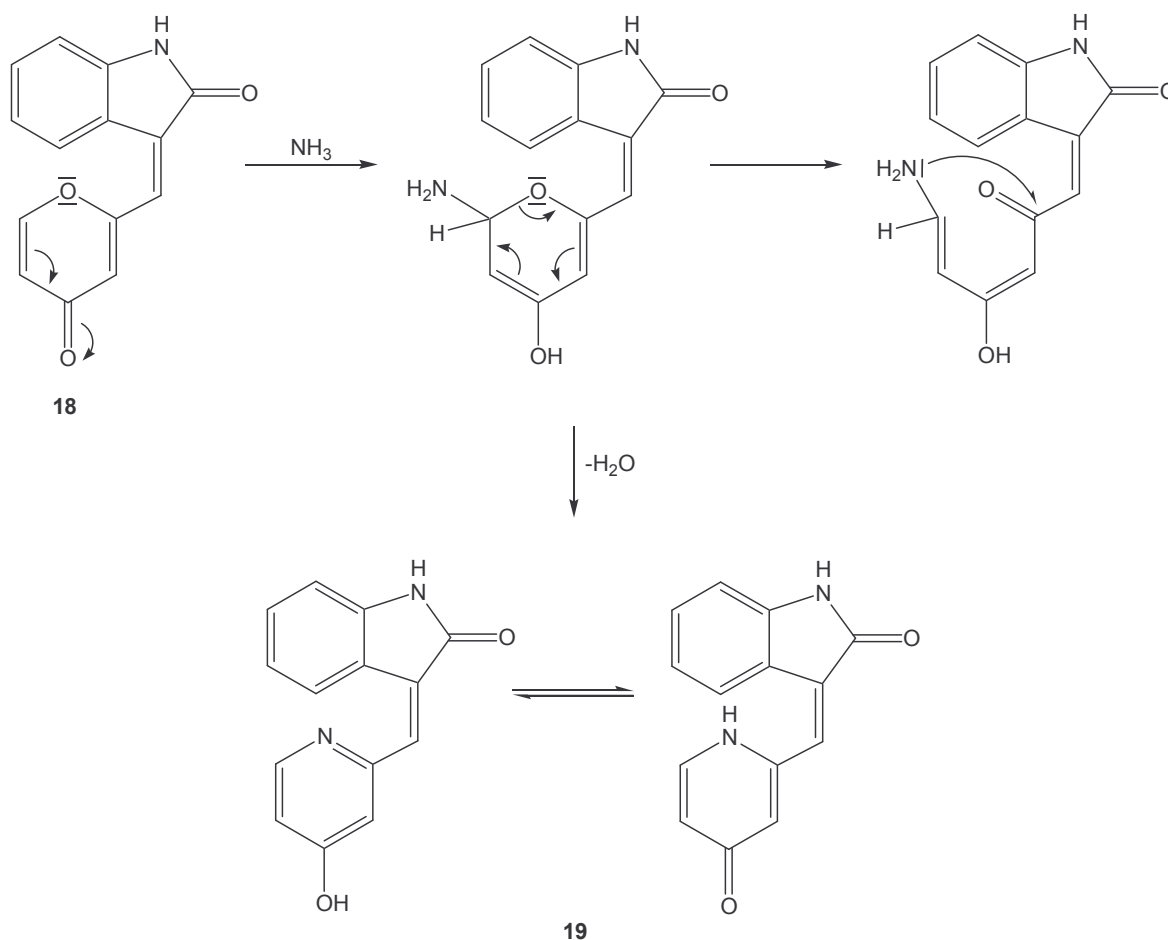


Abb. 35: Mechanismus des Ligandenaustausches von Verbindung **18** mit Ammoniak zu Substanz **19**

Es handelt sich dabei um eine typische Ringtransformation, da nach einer nukleophilen Addition eine Ringöffnungsreaktion folgt. Anschließend erfolgt eine Rezyklisierung zu einem anderen heterozyklischen System. Die Positionen 2, 4 und 6 sind im 4-Pyron-Strukturelement defizitär und werden daher von Nukleophilen bevorzugt angegriffen.

Die Ringtransformationsreaktion wurde sowohl mit einem Gemisch aus 20%iger Ammoniumcarbonat-Lösung und Ammoniak 25% (1:1), als auch unter Einsatz von konz. Ammoniak bei 100°C durchgeführt. Es konnte auch unter diesen drastischen Reaktionsbedingungen kein neu entstandenes Produkt isoliert werden. Eine weitere Möglichkeit der Umsetzung zum gewünschten Produkt bietet eventuell ein

Ligandenaustausch unter sauren Bedingungen. Substanz **18** und Ammoniumacetat werden 3h in konz. Essigsäure rückfließend erhitzt. Bei der Inprozess-Kontrolle wird deutlich, dass ein neues Produkt entstanden ist. Die Aufreinigung erfolgt SC in Ethylacetat/Ethanol (8:2). Nach anschließender Umkristallisation können rote Kristalle isoliert werden, deren erste analytische Ergebnisse zeigen, dass der Ligandenaustausch unter sauren Bedingungen zu Verbindung **19** erfolgreich war. Der 4-Pyron-Rest konnte somit in einen 4-Pyridon-Rest umgeformt werden.

Die erhaltene Verbindung **19** muß nun hinsichtlich ihrer Konfiguration genauer untersucht werden. Eine Röntgenstrukturanalyse war in diesem Fall nicht möglich, da die Qualität der nadelförmig auskristallisierten Kristalle zu schlecht war. Ihre Größe von weniger als 0,02 mm war zu klein um eine einzige kristalline Nadel zu isolieren. Die Bestimmung der Konfiguration muß also mit einem anderen Analyseverfahren erfolgen.

Eine geeignete Möglichkeit bietet die NOESY-1D- (auch NOE-Differenz-) Spektroskopie, die besonders zur Detektion von Kern-Overhauser-Effekten (engl.: NOE = Nuclear Overhauser Effect) in kleinen Molekülen zum Einsatz kommt. Bei diesem Effekt werden Magnetismen über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen durch den Raum übertragen. Wird im NOESY-1D Verfahren auf das Vinyl-Proton eingestrahlt, verstärken sich die Signalintensitäten des H4 und H3' (**Abb. 36**).

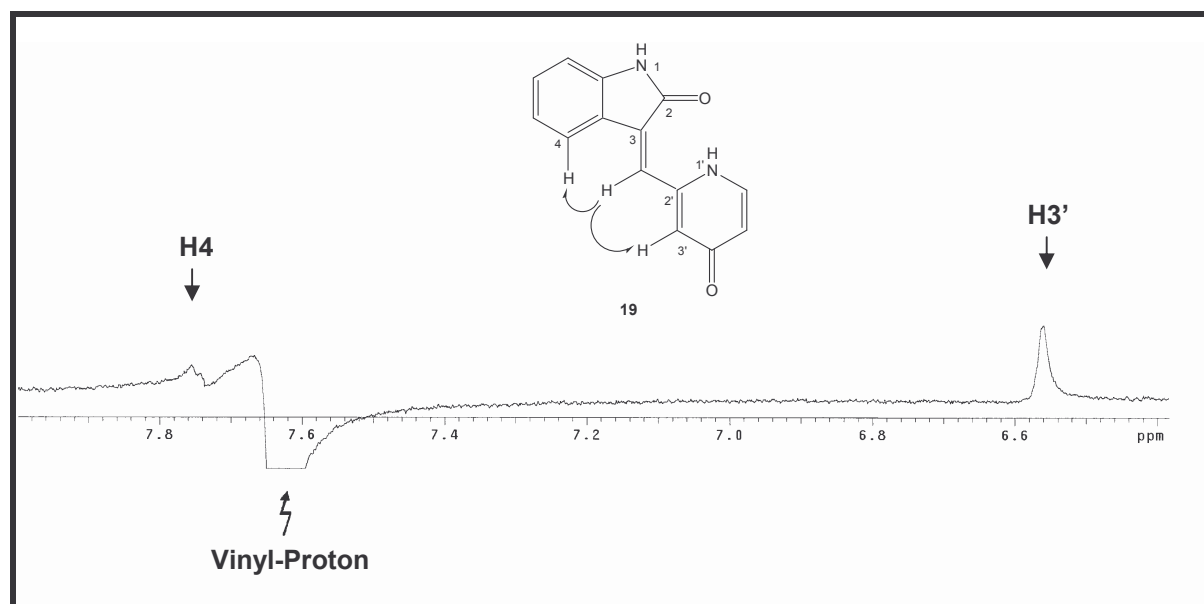


Abb. 36: NOESY-1D (NOE-Differenz), Einstrahlung auf das Vinyl-Proton der Substanz **19**

Bei Einstrahlung auf H4 verstärken sich die Signalintensitäten des Vinyl-Protons und des H5 (**Abb. 37**). Dieses Ergebnis ist am besten mit der Z-Form der Struktur **19** vereinbar.

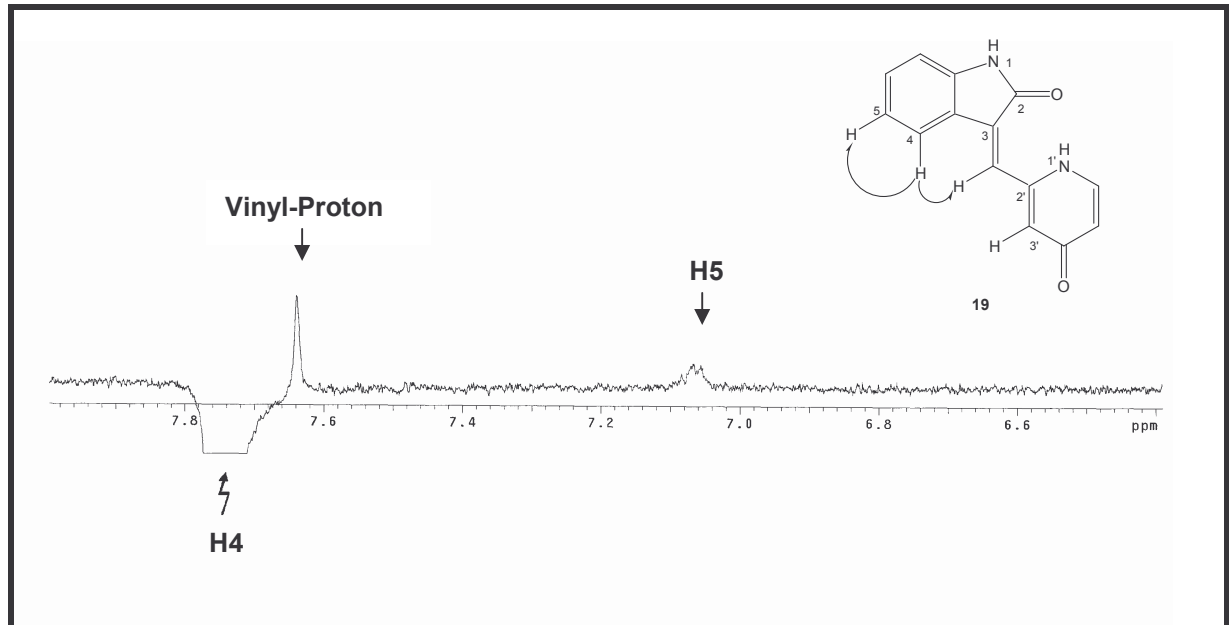


Abb. 37: NOESY-1D (NOE-Differenz), Einstrahlung auf das Proton H4 des 2-Indolinons der Substanz **19**

Zusätzlich wird ein NOESY Spektrum aufgenommen. Es handelt sich hierbei um ein spezielles zweidimensionales Verfahren der NMR-Spektroskopie, bei dem neben dem Kern-Overhauser-Effekt auch chemische Austauschprozesse erfasst werden können, die die Magnetisierung übertragen. Im NOESY treten zwischen dem Vinyl-Proton und dem H4 und dem Vinyl-Proton und dem H3' Kreuzsignale auf, die ebenfalls die Existenz des Z-Isomers verdeutlichen (**Abb. 38**).

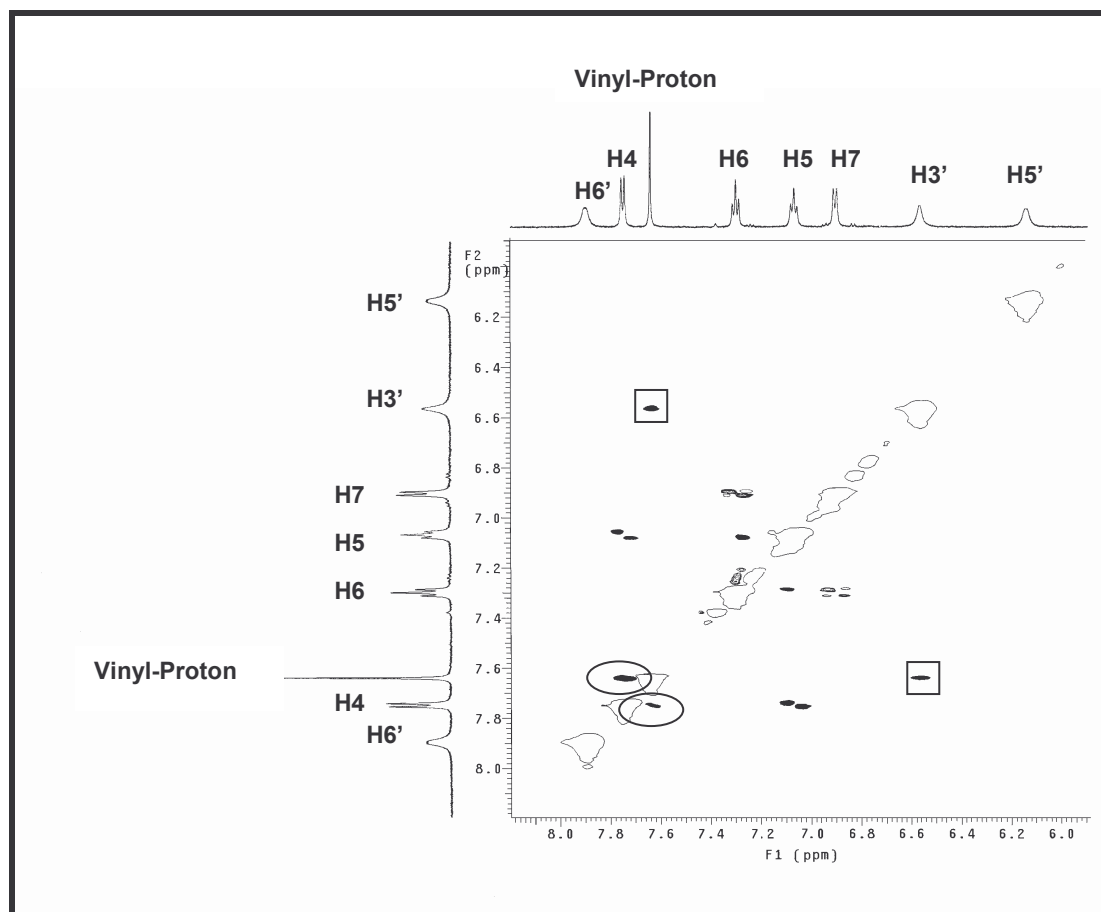


Abb. 38: Kreuzsignale im NOESY-Spektrum von Substanz **19**. Die Markierungen verdeutlichen die Kreuzsignale, die zwischen den Signalen auftreten und der Bestimmung der Konfiguration dienen.

Diese analytischen Resultate zeigen deutlich, dass der Ligandenaustausch unter den beschriebenen sauren Reaktionsbedingungen überraschenderweise zum ursprünglich gewünschten Z-Isomer geführt hat (**Abb. 39**). Der Ligandenaustausch findet also gleichzeitig unter einer Konfigurationsänderung statt. Eine mögliche Ursache dafür könnte das Auftreten einer intramolekularen Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen dem Proton am Stickstoff des 4-Pyridons und dem Sauerstoff an Position 3 des Indolinons sein.

3.2.1.5 Herstellung des 2-(Hydroxymethyl)-pyridin-4(1H)-ons (20) und des 4-Oxo-1,4-dihydro-pyridin-2-carbaldehyds (21)

Es wird eine weitere Variante der Synthese von Substanz **19** durchgeführt. Hierbei wird aus dem in **Kap. 3.2.1.1** beschriebenen 2-Hydroxymethyl-4-pyridon **14** in einer Ringtransformationsreaktion das 2-Hydroxymethyl-4-pyridon **20** gleich zu Beginn der Synthese hergestellt. Dieser Reaktionsschritt kann, wie von HEYNS und VOGELSANG¹¹⁷ beschrieben, in basischem Milieu stattfinden. Hierzu wird der Alkohol **14** in einem Gemisch aus 20%iger Ammoniumcarbonat-Lösung und Ammoniak 25% (1:1) rückfließend erhitzt. Die Aufreinigung von Verbindung **20** erfolgt durch Umkristallisation aus Ethanol.

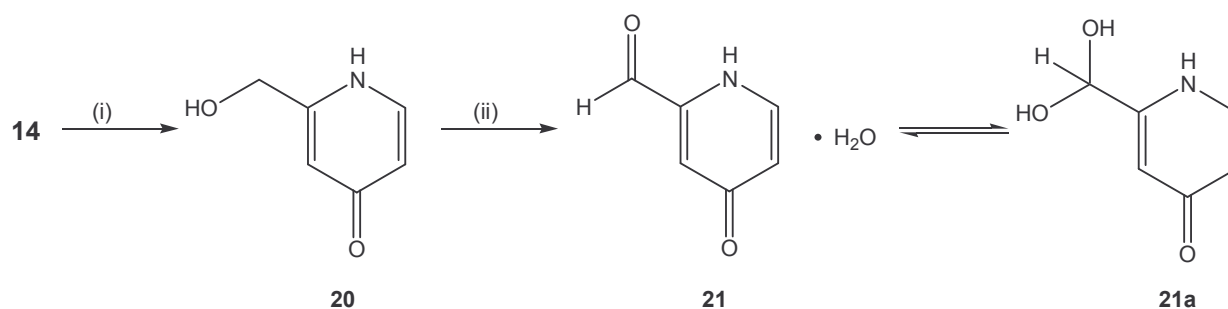


Abb. 41: Herstellung des 2-(Hydroxymethyl)-pyridin-4(1H)-on **20** und des 4-Oxo-1,4-dihydro-pyridin-2-carbaldehyd **21** und seiner Hydratform **21a**. (i) 10%ige Ammoniumcarbonat-Lsg., Ammoniak 25%, ΔT ; (ii) MeOH/Aceton/ CH_2Cl_2 (1:1:1), aktives MnO_2 , 50°C

Der nachfolgende Syntheseschritt ist eine Oxidation mit aktivem Mangan(IV)-oxid zum 4-Pyridon-2-carbaldehyd **21**. Die Oxidation ist in **Kap. 3.2.1.2** genauer erläutert. Die Reaktion findet ebenfalls in einem Gemisch aus drei Lösungsmittelkomponenten (Methanol/Aceton/Dichlormethan, 1:1:1) bei einer Temperatur von 50°C statt. Aufgereinigt wird die entstandene Substanz SC mit Ethylacetat. Wie der 4-Pyridon-2-carbaldehyd **16** liegt auch der 4-Pyridon-2-carbaldehyd **21** in einem Gleichgewicht mit seiner Hydratform **21a** vor (**Abb. 41**).

Das Verhältnis der Strukturen **21** und **21a** beträgt 8:2 zugunsten der geminalen Diolform **21a**. Das wird durch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und die CHN-Analyse bestätigt. Das in **Abb. 42** abgebildete Spektrum zeigt für den Aldehyd **21** bei einer chemischen

Verschiebung von 9.94 ppm das Signal für die Aldehyd-Funktion, während bei einer Verschiebung von 6.79 ppm deutlich ein Dublett der zwei Hydroxy-Gruppen der Hydratform **21a** auftaucht. Zusätzlich findet man für das Hydrat-CH von **21a** ein Triplett bei 5.57 ppm.

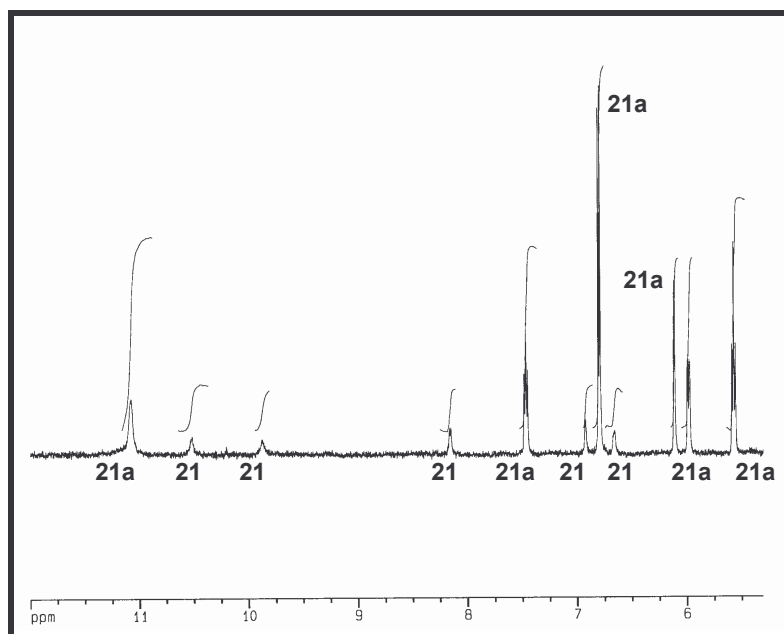


Abb. 42: ^1H -NMR-Spektrum des Gemisches aus dem Aldehyd **21** und seiner geminalen Diolform **21a** (2:8)

3.2.1.6 Herstellung von Verbindung **19** nach dem Verfahren von Knoevenagel

Durch die abschließende Knoevenagel-Kondensation soll überprüft werden, ob auch auf diesem Syntheseweg das Produkt **19** als Z-Isomer entstehen kann. Die Reaktion erfolgt durch die Umsetzung des 4-Pyridon-2-carbaldehyds **21** mit der CH-aciden Komponente 2-Indolinon. Die Reaktion soll ähnlich der in **Kap. 3.2.1.3** beschriebenen Knoevenagel-Kondensation in Pyridin durchgeführt werden. Trotz mehrerer Versuche unter Variation der Reaktionstemperatur konnte das Kondensationsprodukt jedoch nicht isoliert werden. Deshalb wird die basische Komponente variiert und statt Pyridin das stärker basische Piperidin in katalytischen Mengen eingesetzt. Man erhofft sich dadurch eine stärkere Aktivierung der Position 3 des 2-Indolinons. Die Substanzen werden in Ethanol gelöst und unter Zusatz von wenig Piperidin rückfließend erhitzt.

Die Aufreinigung der entstandenen Substanz **19** erfolgt SC in Ethylacetat/Ethanol (8:2) und unter anschließender Umkristallisation aus Ethanol (**Abb. 43**).

Die $^1\text{H-NMR}$ - und Massenspektroskopie ergibt eindeutig, dass auch auf diesem Wege das Produkt **19** hergestellt werden kann. Zur Überprüfung der Konfiguration genügt in diesem Fall ein Vergleich der Verschiebungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum mit dem Spektrum der durch NOESY-1D-Spektroskopie überprüften Substanz **19** (**Kap. 3.2.1.4**). Da sich die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren gleichen, ist die Synthese von **19** auf beiden Wegen möglich. Eine wichtige Begründung hierfür ist die in **Abb. 43** dargestellte intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung, die den Eintritt des 4-Pyridon-2-carbaldehyds **21** in die gewünschte Z-Position begünstigt.

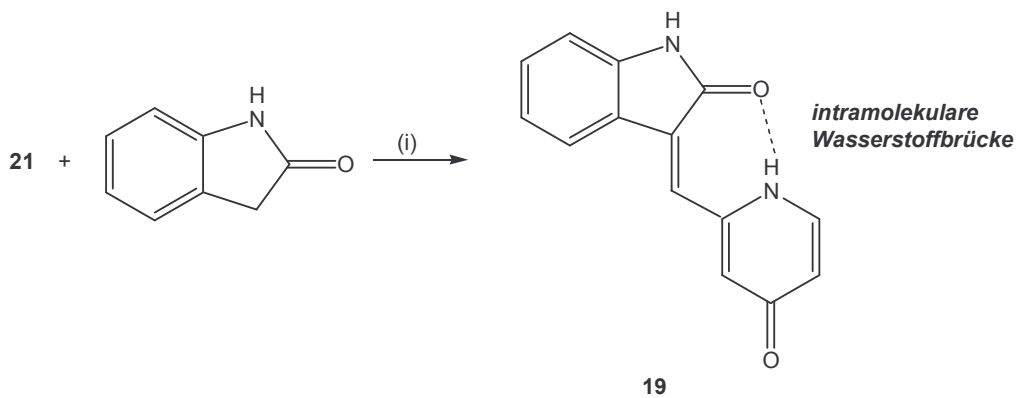


Abb. 43: Herstellung von Substanz **19**. (i) Ethanol, Piperidin, ΔT

3.2.2 Herstellung eines 2-Indolinon-Derivates **27** mit einem Methylen-verbrückten 4-Pyridon in Position 3 und mit Methoxy-Substituenten in der 4-Pyridon-Untereinheit

Als Weiterentwicklung des Prototypen **19** soll mit der geplanten Struktur **27** ein Z-Isomer synthetisiert werden, das in Position 5' der 4-Pyridon-Untereinheit eine Alkoxy-Gruppe besitzt (**Abb. 44**). Diese Entwicklungsrichtung steht in engem Zusammenhang mit den von SUN et al.¹¹¹ gemachten Erfahrungen. Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei Derivaten von SU5416 (**Abb. 24**) zeigen, dass die Einführung eines Substituenten in Position 4' des Pyrrol-Ringes für die VEGFR-TK-inhibitorische Aktivität von Vorteil ist. So erhält man für Substanz SU11248, die unter Berücksichtigung dieser Kriterien hergestellt wurde, eine deutliche Steigerung der VEGFR-TK-inhibitorischen Aktivität. Wie aus den Strukturen in **Abb. 44** ersichtlich ist, bedient eine Alkoxy-Gruppe in Position 5' der 4-Pyridon-Untereinheit vermutlich die entsprechende Funktion der VEGFR-TK wie der Alkyl-Substituent in Position 4' des Pyrrols. Außerdem liegt die Carbonyl-Funktion der Seitenkette von SU11248 im Areal der geplanten 4-Pyridon-Carbonyl-Gruppe. Des Weiteren fällt auf, dass die Carbonyl-Gruppe der Seitenkette bei SU11248 mit dem Pyrrol-Ring ein vinyloges Säureamid-System ausbildet, das beim Pyridon ebenfalls zu finden ist.

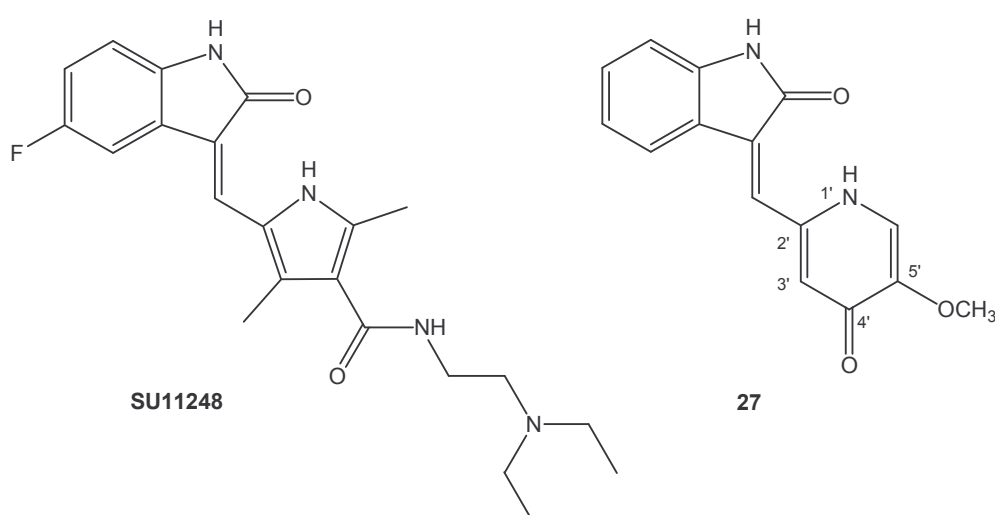


Abb. 44: Die geplante Substanz **27** und der potente VEGFR-TK-Inhibitor SU11248

Aus diesen Gründen sollte die den Sugen-Strukturen wesentlich enger verwandte Verbindung **27** hergestellt werden. Ob allerdings der Syntheseweg der unsubstituierten Verbindung **19** hier Anwendung finden kann, muß überprüft werden.

3.2.2.1 Herstellung des 2-(Hydroxymethyl)-5-methoxy-4H-pyran-4-ons (**23**)

Eine Ausgangssubstanz zur Verwirklichung dieser Synthesekonzepte stellt die Kojisäure (**22**) dar (**Abb. 45**).

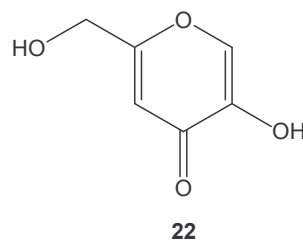


Abb. 45: Kojisäure (**22**) gewonnen aus *Aspergillus*-Arten

Kojisäure ist ein Toxin, das von *Aspergillus*-Arten gebildet wird und aus *Aspergillus oryzae* isoliert werden konnte. In verschiedenen Studien konnte eine antibiotische Wirkung gegen viele Gram-positive und Gram-negative Organismen und außerdem gegen Hefen und Pilze bewiesen werden^{118,119}. Die Struktur wurde 1924 von YABUTA¹²⁰ aufgeklärt. Der Nachweis der Verbindung wurde mit Hilfe von Derivaten der Kojisäure und vergleichbaren bekannten Verbindungen geführt. Man vermutete eine Biosynthese direkt aus Zuckerbausteinen. CHALLENGER et al.¹²¹ gelangten allerdings zu dem Ergebnis, dass die Biosynthese aus kleineren Keton- oder Aldehyd-Bausteinen erfolgt. Die synthetische Herstellung der Kojisäure konnte dann 1930 von MAURER^{122,123} direkt aus den beiden Zuckern Glucose und Galaktose gelingen. Die enge Verwandtschaft zu den Zuckern könnte sich besonders auf die Affinität zur sogenannten Zuckertasche in der ATP-Bindungsstelle bei Tyrosinkinasen positiv auswirken.

Zunächst soll die Hydroxygruppe in Position 5 der Kojisäure **22** selektiv methyliert werden. Es handelt sich dabei um eine Williamson analoge Veretherung von Enolen, bei der ein intermediär gebildetes Enolat mit dem Alkylierungsmittel reagiert. Die Veretherung erfolgt in Anlehnung an eine Vorschrift von YABUTA¹²⁰, der mit p-Toluensulfonsäureethylester als Alkylierungsmittel den Monoethylether der Kojisäure hergestellt hat.

Für die selektive Methylierung werden deshalb Kojisäure und p-Toluensulfonsäuremethylester in absolutem Methanol gelöst, nach Zugabe von Natriummethanolat 24h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 2h rückfließend erhitzt. Nach der Aufarbeitung kristallisieren gelbe Nadeln (**24**) aus, die spektralanalytisch untersucht werden. Das ¹H-NMR-Spektrum liefert den Hinweis, dass neben dem gewünschten 2-Hydroxymethyl-5-methoxy-4-pyron **23** auch noch der p-Toluensulfonsäuremethylester in äquimolaren Mengen enthalten ist. Die Substanz **23** kann erst nach Aufreinigung durch SC in Dichlormethan/Methanol (9:1) isoliert werden (**Abb. 46**).

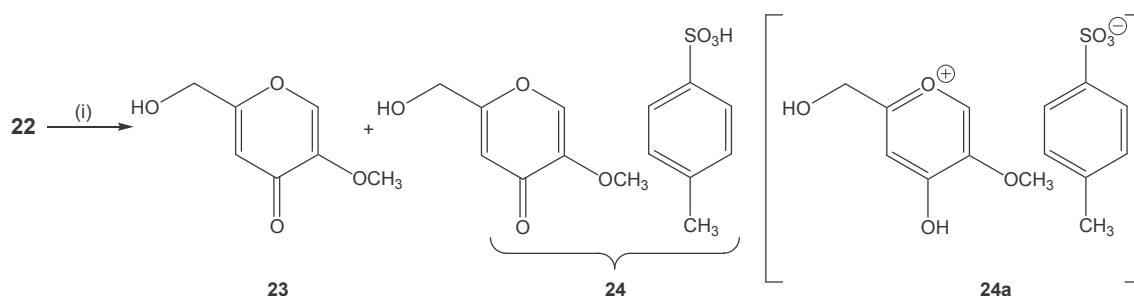


Abb. 46: Selektive Methylierung der Kojisäure **22** mit p-Toluolsulfonsäuremethylester. (i) p-Toluensulfonsäuremethylester, Methanol, Natriummethanolat, 24h bei RT, 2h Δ T

Die Vermutung, dass es sich bei den gelben Kristallnadeln **24** um ein Salz **24a** (**Abb. 46**) handelt, kann nicht bestätigt werden, da im ¹H-NMR-Spektrum im Gegensatz zu dem von Substanz **23** keine signifikante Verschiebung der Signale des 4-Pyrone auftritt (**Abb. 47**).

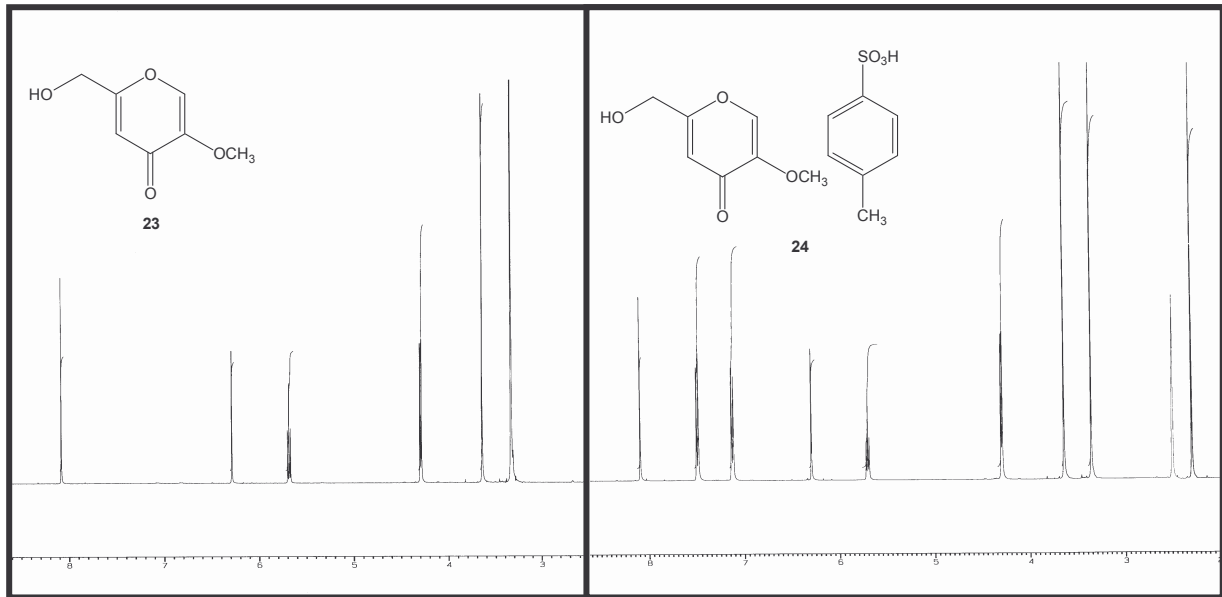


Abb. 47: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von der aufgereinigten Substanz **23** und Verbindung **24**

Vergleichbare Effekte, dass sich die Protonierung des 4-Pyrone auf die Signallagen der Protonen auswirkt, beschreibt BRÄTTER¹⁰⁷ am Beispiel von ^1H -NMR-Spektren von 2,6-Dimethyl-4-pyron (**a**) und 2,6-Dimethyl-4-hydroxy-pyrylium chlorid (**b**) (**Abb. 48**).

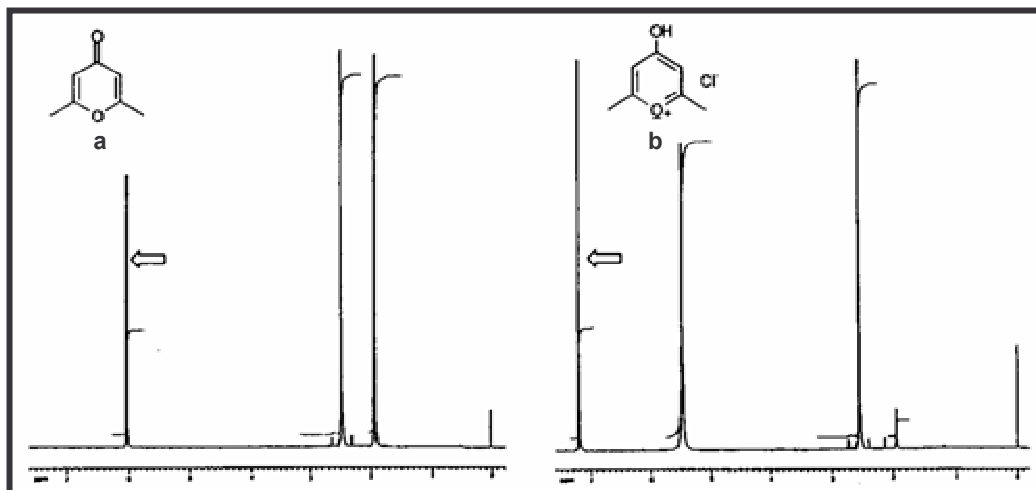


Abb. 48: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von 2,6-Dimethyl-4-pyron (**a**) und 2,6-Dimethyl-4-hydroxy-pyryliumchlorid(**b**) nach BRÄTTER

Die 4-Pyron-Protonen (**a**) treten bei 6.01 ppm in Resonanz, und die Pyrylium-Protonen (**b**) zeigen ihre Resonanzen bei 7.21 ppm. Sie erfahren bei der Protonierung eine Tieffeldverschiebung von etwa 1 ppm, weil die ringständigen Wasserstoffatome stark entschirmt werden. Das ist als eine Folge der positiven

Partiellladung sowie als Ergebnis eines diamagnetischen Ringstromeffektes zu erwarten¹²⁴.

Da im vorliegenden Fall keine Verschiebung beobachtet werden kann, bildet das Nebenprodukt **24** demnach vermutlich den in **Abb. 46** dargestellten Charge-Transfer-Komplex bestehend aus dem 2-Hydroxymethyl-5-methoxy-4-pyron und dem p-Toluensulfonsäuremethylester. Das 2-Hydroxymethyl-5-methoxy-4-pyron könnte dabei der Anteil mit hoher Elektronendichte, der p-Toluensulfonsäuremethylester der mit geringer Elektronendichte sein.

Diese Erfahrungen konnten von YABUTA¹²⁰ nach der Umsetzung mit p-Toluensulfonsäureethylester nicht gemacht werden, da in der Literatur die Entstehung von gelben Kristallnadeln nicht beschrieben worden ist. Es handelt sich daher scheinbar um ein Phänomen, das nur bei der Methylierung auftritt.

3.2.2.2 Herstellung des (3E)-3-[(5-Methoxy-4-oxo-4H-pyran-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2H-indol-2-ons (**26**)

Nach der Aufreinigung des gewünschten 2-Hydroxymethyl-5-methoxy-4-pyrons **23** muß nun dessen primäre Alkohol-Funktion in Position 2 in einer Oxidationsreaktion zum entsprechenden Aldehyd umgesetzt werden. Dabei wird als Oxidationsmittel aktives Mangan(IV)-oxid verwendet, das seine beste Aktivität in einem Lösungsmittelgemisch aus den Komponenten Methanol/Aceton/Dichlormethan (1:1:1) besitzt. Die Oxidation erfolgt bei 50°C unter Rühren über einen Zeitraum von 24 h. Der unter diesen schonenden Bedingungen entstandene 5-Methoxy-4-pyron-2-carbaldehyd **25** wird anschließend mit 2-Indolinon unter Zusatz von katalytischen Mengen Piperidin in einer Knoevenagel-Kondensation zum Produkt **26** umgesetzt (**Abb. 49**).

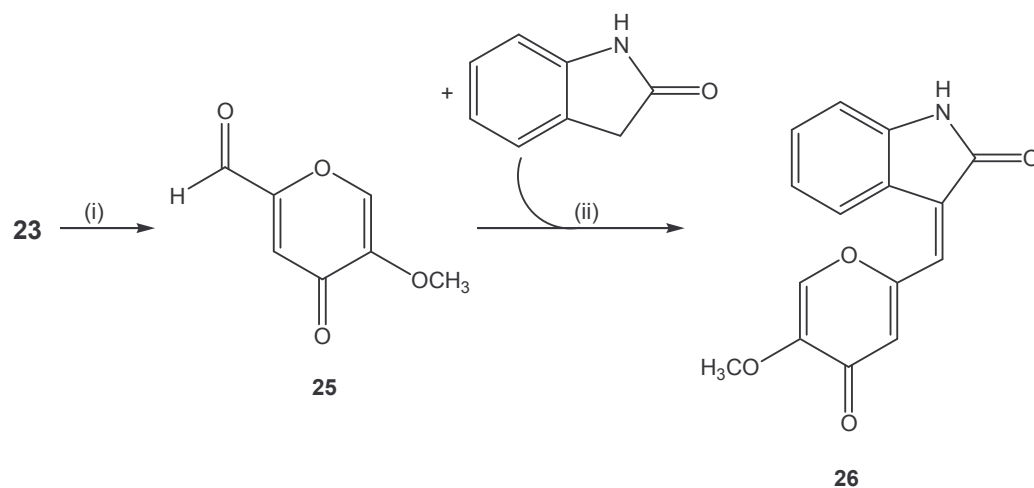


Abb. 49: Oxidation von **23** zum 5-Methoxy-4-pyron-2-carbaldehyd **25** und anschließende Knoevenagel-Kondensation zu Substanz **26**. (i) MeOH/Aceton/CH₂Cl₂ (1:1:1), aktives MnO₂, 50°C; (ii) Ethanol, Piperidin, ΔT

Bei der Substanz **26** handelt es sich vermutlich um das *E*-Isomer, da wie auch bei Substanz **18** (Kap. 3.2.1.3) eine elektrostatische Abstoßung zwischen dem Sauerstoffatom am C2 des 2-Indolinons und dem Sauerstoffatom in Position 1 des 5-Methoxy-4-Pyrons zu erwarten ist.

Die Überprüfung der Konfiguration wird in diesem Fall mit Hilfe der chemischen Verschiebung der Signale im ¹H-NMR-Spektrum durchgeführt. Die chemische Verschiebung des Vinyl-Protons und des Protons an Position 4 des 2-Indolinons ist ein wichtiges Indiz für die vorliegende Konfiguration des Moleküls. Im Spektrum des *Z*-Isomers finden sich für das Vinyl-Proton Werte, die zu tieferem Feld verschoben sind. So ist zum Beispiel bei der als *Z*-Isomer vorliegenden Substanz **19** das Signal des Vinyl-Protons bei 7.66 ppm zu finden, während es im *E*-Isomer **18** bei 7.09 ppm liegt. Das gegenteilige Phänomen tritt für das Signal von H4 auf. Hier zeigt das Spektrum von Substanz **19** das Signal von H4 bei 7.77 ppm und das Spektrum von Substanz **18** das ins Tieffeld verschobene Signal bei 8.10 ppm. Für Substanz **26** ermittelt man im ¹H-NMR-Spektrum eine chemische Verschiebung für das Vinyl-Proton bei 7.18 ppm und für H4 bei 8.11 ppm (**Abb. 50**). Es handelt sich demnach um das *E*-Isomer. Entsprechende Beobachtungen haben auch SUN et al.¹¹¹ gemacht.

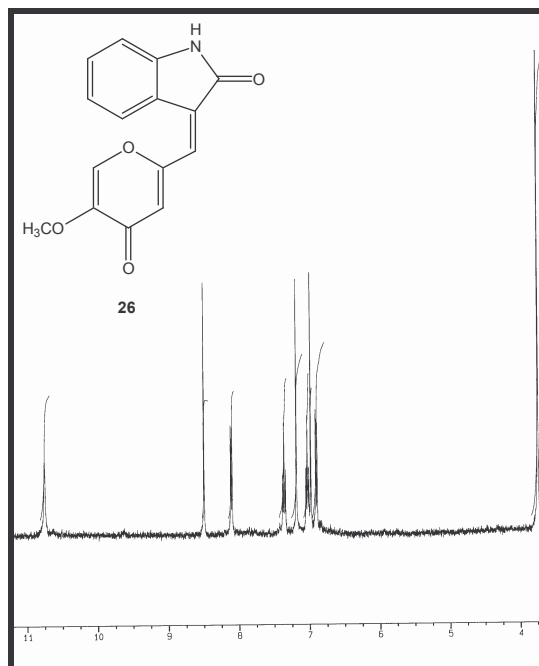


Abb. 50: ^1H -NMR-Spektrum von Substanz **26**

3.2.2.3 Ringtransformation des 4-Pyrone **26** zum 4-Pyridon **27**

In einer folgenden Ringtransformations-Reaktion soll der Ringsauerstoff durch ein NH ersetzt werden. Dieser Ligandenaustausch bei Substanz **26** wird auch hier in saurem Milieu unter Zugabe von Ammoniumacetat in konz. Essigsäure durchgeführt. Der Verlauf der Reaktion wurde Inprozess-kontrolliert. Auch nach Variation der Reaktionsbedingungen konnte kein neues Produkt identifiziert werden. Ohne Rücksicht auf die in **Kap. 3.2.1.4** gemachten Erfahrungen hinsichtlich einer Konfigurationsänderung wurden auch hier Versuche zum Ligandenaustausch unternommen, die nach BAEYER¹¹⁶ mit Ammoniumcarbonat-Lösung und nach HEYNS und VOGELSANG¹¹⁷ mit Ammoniak durchgeführt worden sind.

Bei der Umsetzung mit Ammoniumcarbonat-Lösung (15%) wurde zusätzlich Ammoniak (25%) in gleicher Menge hinzugefügt und rückfließend erhitzt. Ein Austausch der Heteroatome zum gewünschten Produkt **27** konnte auf diesem Weg nicht beobachtet werden. Der Austausch des Pyron-Sauerstoffs der 2-Hydroxymethyl-5-methoxy-4-pyron-Untereinheit gegen Stickstoff wird deshalb mit konz. Ammoniak bei 100°C versucht. Auch diese drastischen Bedingungen führen nicht zu dem angestrebten Ergebnis.

Ein Ligandenaustausch beim Knoevenagel-Kondensat **26** verläuft weder in saurem Milieu unter Zugabe von Ammoniumacetat in konz. Essigsäure, unter milderer Bedingungen mit Ammoniumcarbonat-Lösung, noch unter Einsatz von konz. Ammoniak erfolgreich. Die Synthese der Zielstruktur **27** kann also nicht analog der Darstellung des Prototypen **19**, die in den **Kap. 3.2.1.2** bis **3.2.1.4** erläutert wurde, erfolgen. Ein Grund hierfür kann der von der Methoxy-Gruppe in Position 5' der 4-Pyron-Untereinheit ausgeübte +M-Effekt sein, der eine Addition von Ammoniak unmöglich macht.

Um die Herstellung von Substanz **27** dennoch erfolgreich zu gestalten, muß ein neuer Syntheseweg erdacht werden, auf den in den folgenden Kapiteln eingegangen wird.

3.2.2.4 Ringtransformation des 4-Pyrone 23 zum 4-Pyridon 28 und nachfolgende Oxidation zum Aldehyd 29

Da der Ligandenaustausch nicht erst auf der letzten Synthese-Stufe erfolgen kann (**Kap. 3.2.2.3**), muß der Pyron-Sauerstoff in einem der ersten Synthese-Schritte gegen Stickstoff ausgetauscht werden. Eine Ringtransformation der käuflich erworbenen Kojisäure kann nach eingehender Literaturrecherche als Möglichkeit ausgeschlossen werden, da HEYNS und VOGELSANG¹¹⁷ beschreiben, dass eine Umsetzung der 4-Pyrone zu den zugehörigen 4-Pyridonen nur aus den Derivaten, nicht jedoch aus der Kojisäure selbst gelungen ist.

Demnach soll aus dem 2-Hydroxymethyl-5-methoxy-4-pyron **23**, einem Derivat der Kojisäure, das entsprechende 4-Pyridon entstehen. Schon 1931 zeigten ARMIT und NOLAN¹²⁵, dass ein Austausch des Pyron-Sauerstoffs gegen Stickstoff bei Substanz **23** unter Einsatz von konz. Ammoniak in hohen Ausbeuten stattfindet. Die Substanz **23** wird dabei in konz. Ammoniak 2 h bei 100°C gerührt. Nach Abdampfen des Ammoniaks erfolgt die Aufreinigung durch Umkristallisation mit Ethylacetat/n-Hexan. Man erhält in einer sehr hohen Ausbeute (91%) das erwartete 2-Hydroxymethyl-5-methoxy-4-pyridon **28** (**Abb. 51**).

Der nachfolgende Schritt muß eine Oxidation des Alkohols **28** zum Carbaldehyd **29** sein. Hierzu wird das schon mehrfach eingesetzte Verfahren der Oxidation mit aktivem Mangan(IV)-oxid angewandt (**Kap. 3.2.1.2**). Wie schon bei den vorhergehenden Oxidationen bietet sich diese Variante auch in diesem Fall an, da die Oxidation auf der Oxidationsstufe des Aldehyds stehen bleiben soll.

Ein deutlicher Überschuß an Mangan(IV)-oxid wird zu diesem Zweck in eine Lösung aus 2-Hydroxymethyl-5-methoxy-4-pyridon **28** in Dichlormethan/Aceton/Methanol (1:1:1) gebracht und der Ansatz 4 h bei 50°C gerührt. Der erhaltene Carbaldehyd **29** wird zunächst in Ethylacetat/Ethanol (8:2) SC aufgearbeitet und anschließend aus Ethylacetat/n-Hexan umkristallisiert (**Abb. 51**).

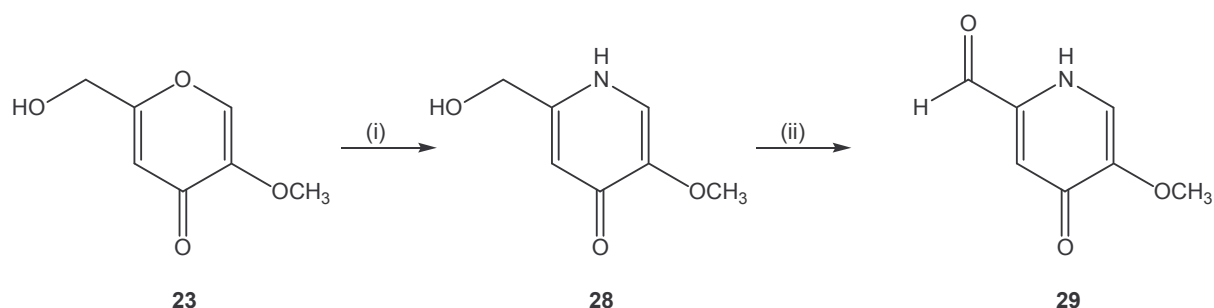


Abb. 51: Herstellung des Pyridons **28** und Oxidation zum Aldehyd **29**. (i) Ammoniak (25%), 100°C; (ii) MeOH/Aceton/CH₂Cl₂ (1:1:1), aktives MnO₂, 50°C

Bemerkenswert ist, dass in diesem Fall der Aldehyd nicht als Hydrat vorliegt und auch Gleichgewichte zwischen Aldehyd und Hydrat nicht beobachtet werden konnten. Das ist sicher auf eine Verminderung der Carbonyl-Aktivität zurückzuführen, die durch den Einfluss des Methoxy-Substituenten zustande kommt.

3.2.2.5 Herstellung des (3Z)-3-[(5-Methoxy-4-oxo-1,4-dihydropyridin-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2H-indol-2-ons (27)

Der letzte Schritt der Synthese der gewünschten Verbindung **27** ist eine Knoevenagel-Kondensation. Es wird unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der Herstellung von Produkt **26** gearbeitet. Der Carbaldehyd **29** wird in Ethanol vollständig gelöst und unter Zusatz von Piperidin mit 2-Indolinon als CH-acider Komponente bei 60°C umgesetzt. Es entsteht ein orange-rotes Pulver, das nach der Aufreinigung mit Ethanol/Ethylacetat umkristallisiert wird (**Abb. 52**).

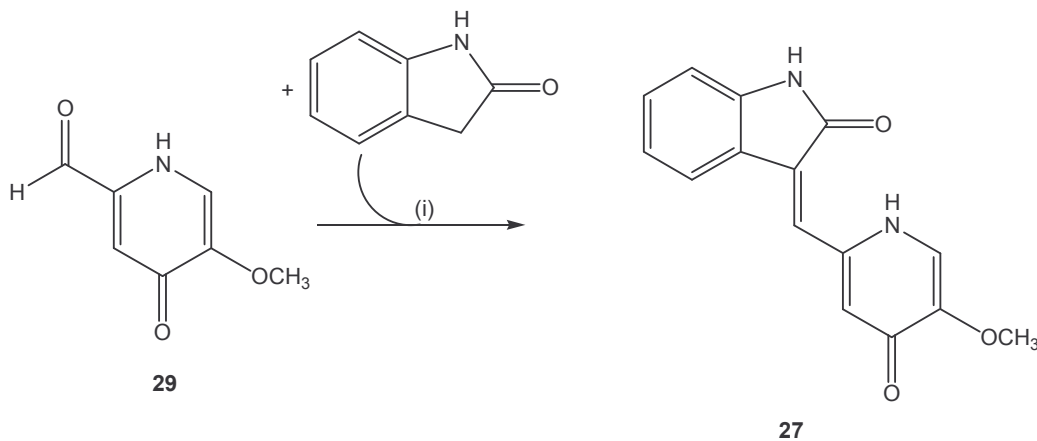


Abb. 52: Herstellung von Verbindung **27**. (i) Ethanol, Piperidin, ΔT

Die chemische Verschiebung der Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dient auch hier dem Nachweis der Konfiguration (**Abb. 53**). Das Signal des Vinyl-Protons findet man bei 7.69 ppm und das Signal für das H4 des 2-Indolinons bei 7.77 ppm.

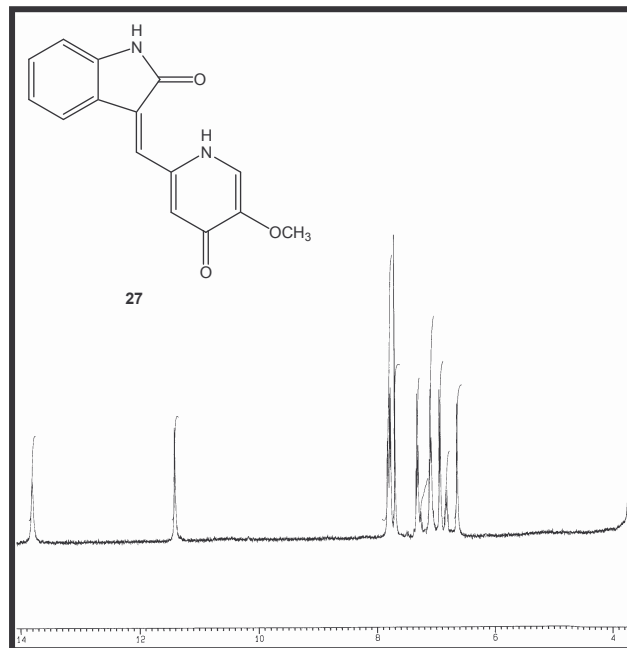


Abb. 53: ¹H-NMR-Spektrum von Substanz 27

Aus den in **Kap. 3.2.2.2** aufgezeigten Erkenntnissen wird deutlich, dass die chemische Verschiebung des Signals für das Vinyl-Proton zu tieferem Feld und die Verschiebung des H4-Signals ins Hochfeld auf das Vorliegen des Z-Isomers hinweist. Es bestätigt sich also auch hier, dass der 4-Pyridon-carbaldehyd durch intramolekulare Wasserstoffbrücken-Ausbildung direkt in die gewünschte Z-Position gebracht wird (**Kap. 3.2.1.6**).

3.2.3 Versuche zur Einführung von polaren Alkoxy-Substituenten in Position 5' der 4-Pyridon-Untereinheit

3.2.3.1 Demethylierung von Substanz **27** zum (3Z)-3-[(4,5-Dihydroxypyridin-2-yl)methylen]-1,3-dihydro-2H-indol-2-on Hydrochlorid (**30**)

Wie in **Kap. 3.2.2** geschildert ist aufgrund neuester Kenntnisse eine Substitution in Position 5' der 4-Pyridon-Untereinheit hinsichtlich der VEGFR-TK-inhibitorischen Aktivität favorisiert. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass besonders eine Elektronen-ziehende, polare Substitution erstrebenswert ist¹¹¹. Daher soll versucht werden nach Demethylierung der Substanz **27** einen neuen polaren Substituenten in Form der Bromessigsäure in Position 5' einzuführen (**Abb. 54**).

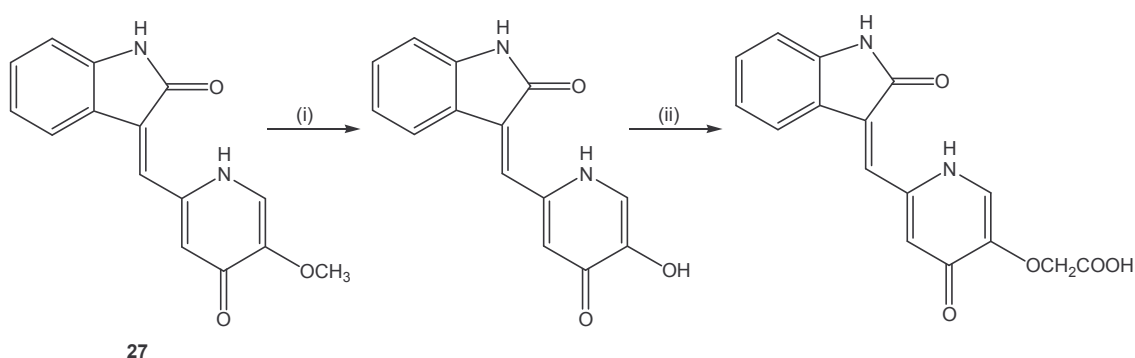


Abb. 54: Geplanter Syntheseverlauf zur Einführung einer polaren Seitenkette. (i) Pyridin-Hydrochlorid, 170°C; (ii) Umsetzung mit z.B. Bromessigsäure

Die Etherspaltung bei Substanz **27** wird unter Einsatz von Pyridin-Hydrochlorid durchgeführt. Zur Demethylierung von Verbindung **27** nach PREY¹²⁶, einer Vorschrift nach der man für normalerweise schwer zu spaltende einfache Phenoether gute Ergebnisse erhält, setzt man das Reagenz Pyridin-Hydrochlorid in einem zehnfachen Überschuß ein und erhitzt auf 170°C. Die entstandene Schmelze verbleibt 15 min bei dieser Temperatur und wird anschließend mit Ethanol gewaschen. Bei dem verbleibenden Rückstand handelt es sich um das als Hydrochlorid vorliegende demethylierte Produkt **30** mit vicinalen OH-Gruppen (**Abb. 56**). Das in **Abb. 55**

dargestellte $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt deutlich, dass die 4-Pyridon-Struktur nicht mehr vorhanden ist, da ein Signal für das Pyridon-NH fehlt.

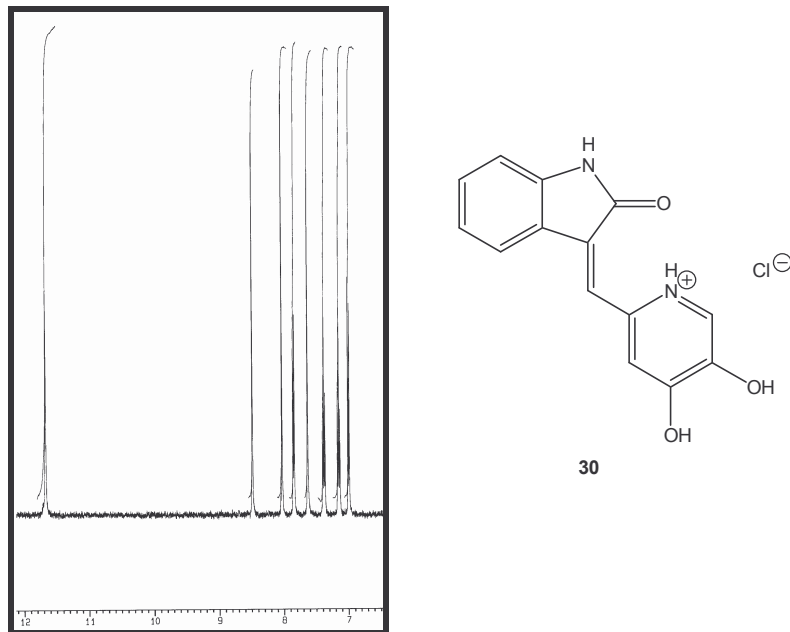


Abb. 55: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des demethylierten Hydrochlorids **30**

Ein chemischer Nachweis auf die benachbarten Hydroxy-Gruppen gelingt mit der Bildung eines farbigen Eisen-Komplexes mit drei Molekülen der Verbindung **30**. In einer ethanolischen Lösung von **30** tritt nach Zugabe von Eisen(III)-chlorid-Lösung eine Farbänderung von rot nach grün-braun auf. Es entsteht der Chelatkomplex **31** mit Eisen(III) als Zentralatom (**Abb. 56**).

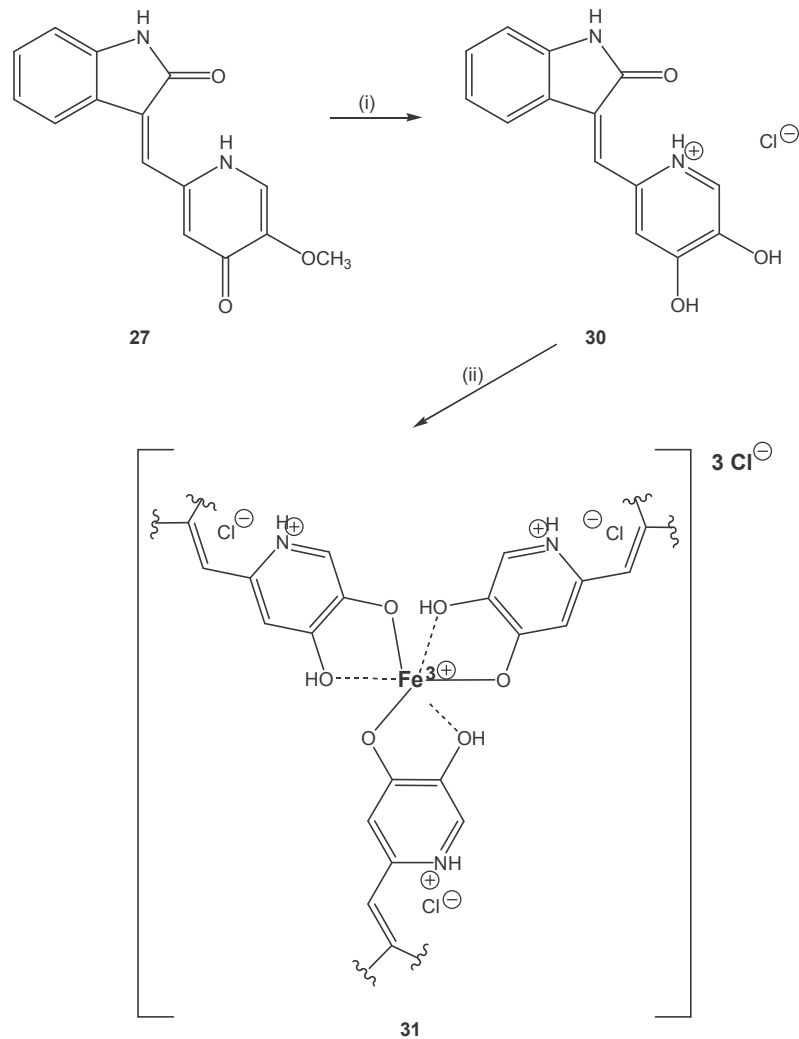


Abb. 56: Herstellung von Substanz **30**, Bildung des Komplexes **31**. (i) Pyridin-Hydrochlorid, 170°C; (ii) Eisen(III)-chlorid-Lösung, Ethanol

Da die Demethylierung nicht unter Erhalt der 4-Pyridon-Struktur stattgefunden hat, sondern das Hydrochlorid **30** entstanden ist, wurde die Synthesepaltung schon auf dieser Stufe gestoppt. Jetzt sind zwei phenolische Hydroxy-Gruppen im Molekül enthalten und es ist davon auszugehen, dass die selektive Einführung einer polaren Seitenkette ungünstig ist. Es werden zwei Ether-Seitenketten erwartet.

3.2.3.2 Versuche zur Einführung einer Seitenkette in die Kojisäure **22**

Zur Einführung eines polaren Substituenten in Position 5' soll deshalb ausgehend von der Kojisäure **22** ein kleines reaktives Molekül mit einer polaren Seitenkette in Position 5' hergestellt werden, das in einer abschließenden Kondensation mit dem Pharmakophor 2-Indolinon verknüpft werden soll (**Abb. 57**).

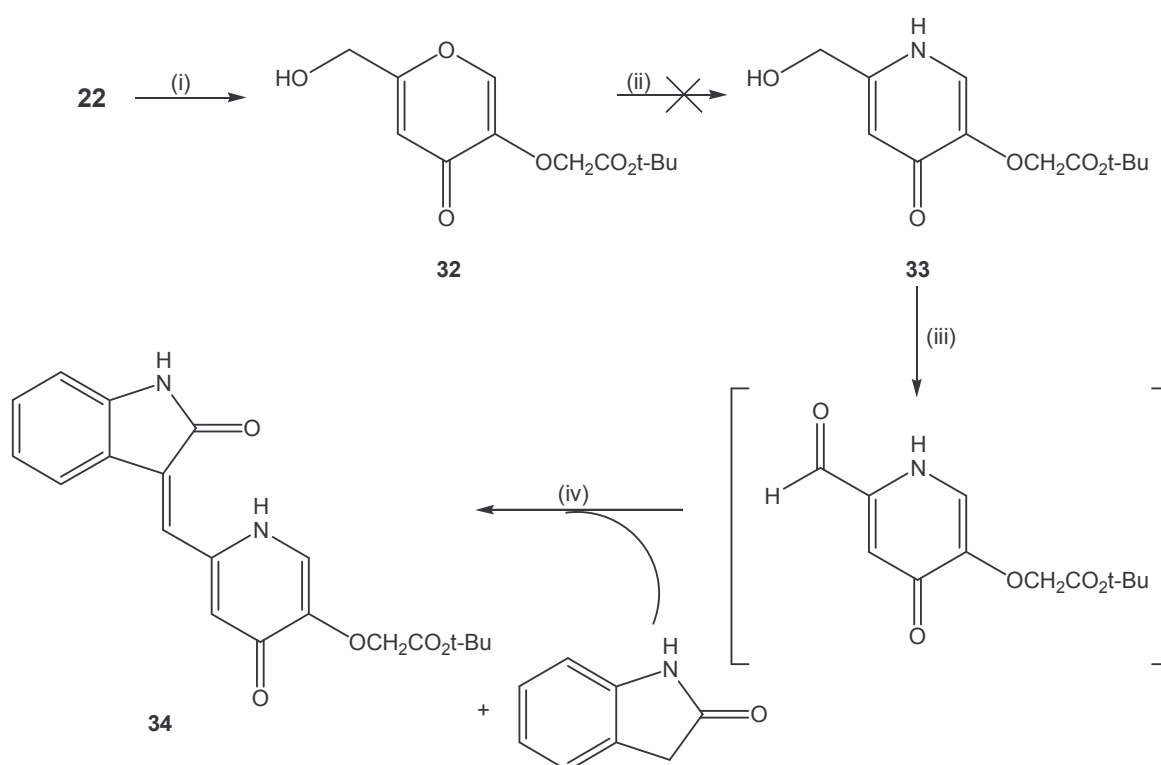


Abb. 57: Geplanter Syntheseverlauf zur Herstellung der Substanz **34** über die Zwischenstufen **32** und **33**. (i) Bromessigsäuretertbutylester, Kaliumcarbonat, abs. Dimethylformamid, 80°C; (ii) Ammoniak (25%), 100°C; (iii) MeOH/Aceton/CH₂Cl₂ (1:1:1), aktives MnO₂, 50°C; (iv) Ethanol, Piperidin, ΔT

Der erste Schritt des geplanten Syntheseverlaufes sieht die Veretherung der Hydroxy-Gruppe in Position 5' vor. Dazu wird mit Bromessigsäuretertbutylester unter Zusatz von Kaliumcarbonat in wasserfreiem Dimethylformamid 24 h bei 80°C gerührt. Es handelt sich dabei um eine Variante der Williamson-Veretherung von Enolen mit Alkylhalogeniden. Nachdem die Reaktionsmischung zur Trockene eingengt wurde, fällt aus Ethylacetat ein weißer Niederschlag aus, der als Substanz **32** identifiziert wird (**Abb. 57**).

Das 4-Pyron mit der in Position 5' eingeführten Seitenkette **32** soll dann in einer Ringtransformationsreaktion in das entsprechende 4-Pyridon **33** umgesetzt werden. Der O-N-Ligandenaustausch wurde auch in diesem Fall mit einem Gemisch aus Ammoniumcarbonat-Lösung (20%)/Ammoniak (25%) (1:1) versucht. Dieses Verfahren war zunächst erfolglos, deshalb wurde mit Ammoniak (25%) bei 100°C gearbeitet. Auch unter diesen Bedingungen konnte das erwartete Ergebnis nicht erzielt werden (**Abb. 57**).

Es ist darauf hinzuweisen, dass konkurrierend zu einer Ringtransformation zusätzlich die Esterstruktur der Seitenkette mit Ammoniak reagieren kann. Aus den dadurch in situ entstehenden Produkten ist eine große Anzahl von Rezyklisierungsvarianten möglich. Daher wird diese Reaktion unübersichtlich. Somit musste die geplante Synthese des Pyridons **34** noch vor der abschließenden Knoevenagel-Kondensation abgebrochen werden, da schon die Herstellung des 4-Pyridons **33** nicht möglich war.

3.2.4 Herstellung Imidazolymethyliden-substituierter 2-Indolinon-Derivate **35** und **36**

Zur Vervollständigung der von Sugen/Pharmacia hergestellten Verbindungen mit einem Fünfring-Heteroaromaten in Position 3 des 2-Indolinons wurden zwei weitere bisher unbekannte Derivate hergestellt. Dabei handelt es sich um die Substanzen **35** und **36**, die in Position 3 des 2-Indolinon einen Imidazol-Ring tragen (**Abb. 58**).

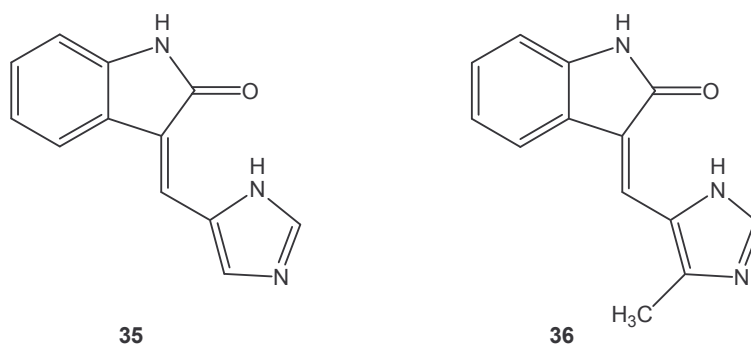


Abb. 58: Die geplanten Verbindungen **35** und **36**

Die Synthese von Substanz **35** gelang durch Knoevenagel-Kondensation des käuflich erworbenen 5-Imidazolaldehyds mit dem 2-Indolinon. Die Darstellung von Substanz **36** wurde mit dem ebenfalls käuflich erworbenen 4-Methylimidazol-5-carboxaldehyd und 2-Indolinon unter den gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Bei beiden Reaktionen wurde in Ethanol unter Zusatz katalytischer Mengen Piperidin gearbeitet (**Abb. 59**).

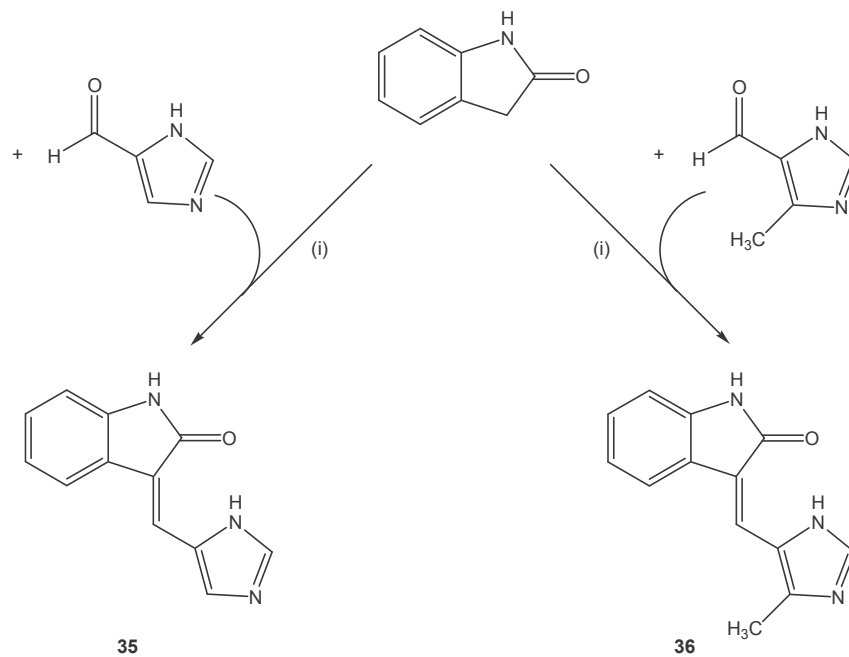


Abb. 59: Synthese der Substanzen **35** und **36**. (i) Ethanol, Piperidin, ΔT

Die Aufarbeitung von Substanz **35** kann durch Umkristallisation aus Ethanol/Ethylacetat erfolgen, während Substanz **36** zunächst in Ethylacetat/Ethanol (8:2) SC aufgereinigt werden muß. Erst anschließend kann aus Ethylacetat/Ethanol umkristallisiert werden kann. Das Kernresonanzspektrum von Substanz **36** in **Abb. 60** belegt die erfolgreiche Synthese eines 2-Indolinon-Derivates mit einem Imidazol-Ring in Position 3 exemplarisch.

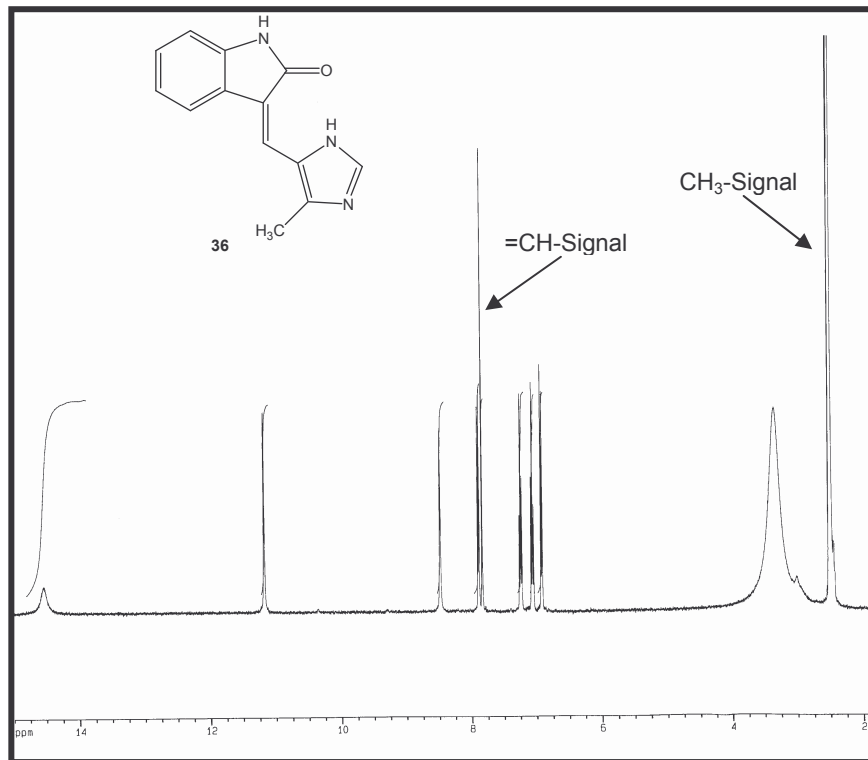


Abb. 60: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Substanz **36**

Das Auftreten eines Vinyl-Singulettts bei einer chemischen Verschiebung von 7.83 ppm bestätigt die gelungene Reaktion. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Substanz **35** unterscheidet sich vom Spektrum der Verbindung **36** nur durch das Fehlen eines Signales für die Methyl-Gruppe bei 2.53 ppm.

3.2.5 Zytotoxische Aktivitäten der ausgewählten Substanzen 19, 27 und 36

Das Ziel der Entwicklung von VEGFR-TK-Inhibitoren ist die Blockade der Vaskularisation und der Angiogenese, um eine Unterbrechung der Versorgung des malignen Gewebes zu erzielen. Die dazu konzipierten niedermolekularen Substanzen müssen daher hinsichtlich ihrer VEGFR-TK-inhibitorischen Aktivität getestet werden. Besonders die Autophosphorylierung der Rezeptorsubtypen VEGFR-1 und VEGFR-2 soll unterbunden werden. Testungen an den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sollen extern durchgeführt werden.

Unsere Bemühungen, die Ressourcen bestehender Testmodelle zu nutzen, haben uns veranlasst, Kontakt zu Instituten aufzunehmen, die auf eine langjährige Erfahrung im Bereich der Signaltransduktion und Angiogeneseforschung zurückblicken können. Zu deren Angebot gehört ein Screeningservice, bei dem die Bestimmung der IC_{50} -Werte bei zehn verschiedenen Konzentrationen erfolgt. Es ist dabei möglich gleichzeitig auf vier verschiedene Kinasen testen zu lassen. Zu dem Spektrum der Firma gehören mittlerweile 65 Proteinkinasen unter ihnen auch VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3. Da das Angebot die uns zur Verfügung stehenden finanziellen Mittel bei weitem überstiegen hat, musste eine andere Möglichkeit der Überprüfung der pharmakologischen Wirkung gesucht werden. Da es sich bei dem Gebiet der VEGFR-TK-Inhibitoren um einen sehr modernen Bereich der Krebsforschung handelt, sind auch die Testmöglichkeiten innerhalb der Universität noch nicht uneingeschränkt verfügbar. Somit ist keine Überprüfung der hergestellten Substanzen hinsichtlich der VEGFR-TK-inhibitorischen Aktivität möglich. Es können bei dieser Substanzklasse zunächst nur Untersuchungen der zytotoxischen Aktivität erfolgen, die jedoch nicht mit einer VEGFR-TK-Inhibition zu korrelieren sind.

Das National Cancer Institut, Bethesda, Maryland (USA) bietet seit 1990 in einem *in vitro*-Zelllinien Screening Projekt Untersuchungen der zytotoxischen Aktivität an. Nach einem „Prä-Screening“ an drei Zelllinien werden Untersuchungen an 60 weiteren humanen Tumorzelllinien durchgeführt. Im Rahmen des „Prä-Screenings“ werden zur Überprüfung der Toxizität die MCF-7-Brustkrebszelllinie, die NCI-H460-

Lungenkrebszelllinie und die SF-268-Zelllinie für das Zentrale Nervensystem eingesetzt¹²⁷. Erst bei erfolgreichen Ergebnissen dieser Screening-Verfahren wird eine kostenfreie VEGFR-TK-Testung in Aussicht gestellt.

Vom National Cancer Institut sind die nachfolgenden drei Substanzen **19**, **27** und **36** in das Screening Programm aufgenommen worden (**Abb. 61**).

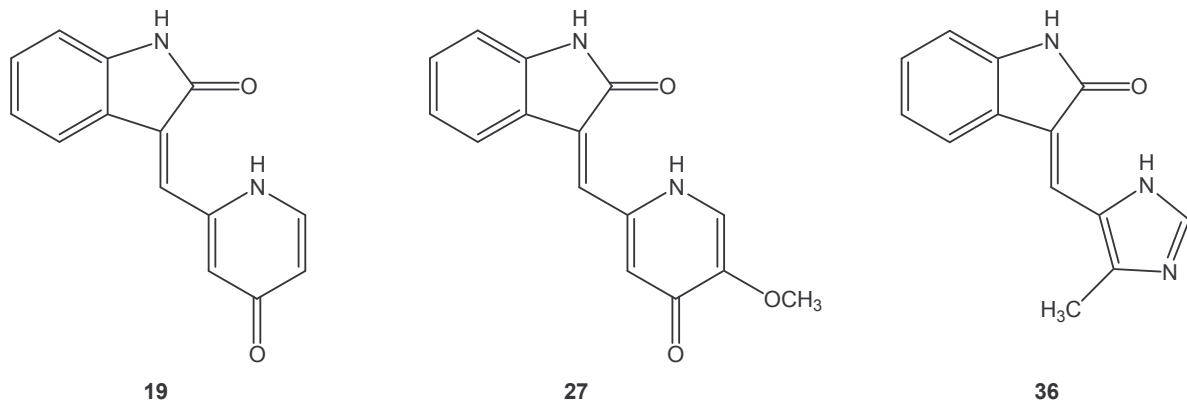


Abb. 61: Potentielle VEGFR-TK-Inhibitoren, die vom National Cancer Institut für Untersuchungen zu zytotoxischen Aktivität akzeptiert worden sind (**19**, **27**, **36**)

Für die Hemmung des Wachstums der im „Prä-Screening“ eingesetzten Zelllinien kommen neben der Tyrosinkinase-Inhibition auch andere Mechanismen in Betracht. So ist z. B. bekannt, dass es zwischen Estrogen- und EGF-vermittelten Signalwegen zum Crosstalk kommen kann, und dass Wachstumsfaktoren als Koaktivatoren des Estrogenrezeptors agieren können. Die dabei ablaufenden Prozesse sind bisher nicht in allen Einzelheiten geklärt¹²⁸. Die Untersuchung dient dazu, einen ersten Hinweis auf Zytotoxizität zu erhalten.

Als Maß für die Zytotoxizität werden T/C-Werte in Prozent herangezogen. Dabei handelt es sich um die prozentuale Beziehung zwischen dem Zellwachstum bei der Testsubstanz und dem Wachstum von Kontrollzellen. Im Testverfahren des National Cancer Instituts werden außerdem zwei Wirkstoffe als Kontrollsubstanzen mitgeführt. Dabei handelt es sich um die Zytostatika 5-Fluorouracil und Doxorubicin. Die Substanzen werden in einer Konzentration getestet (100 μ M) und 48 h inkubiert. Die Ergebnisse für die drei Substanzen bei den verschiedenen Krebszelllinien werden in **Abb. 62** tabellarisch dargestellt.

| Ausgewählte Substanz | Konzentration in μM | MCF-7 (Brust) T/C-Wert [%] | NCI-H460 (Lunge) T/C-Wert [%] | SF-268 (ZNS) T/C-Wert [%] |
|----------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 19 | 100 | 157 | 92 | 105 |
| 27 | 100 | 65 | 55 | 75 |
| 36 | 100 | 96 | 79 | 97 |

Abb. 62: Tabellarische Darstellung der zytotoxischen Aktivität der Substanzen **19**, **27** und **36**, gemessen bei drei verschiedenen Krebszelllinien

Die vom National Cancer Institut ermittelten Werte für die Zytotoxizität zeigen die größte Wachstumshemmung bei einem T/C-Wert von 55 Prozent für Substanz **27** bei der NCI-H460-Lungenkrebszelllinie.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Substanz **27** die besten Ergebnisse zeigt. Betrachtet man die ermittelten T/C-Werte unter dem Aspekt der Einführung eines Sechsrings-Systems, wie in Substanz **19** und **27**, lässt sich feststellen, dass eine Verbesserung der Wachstumshemmung nur dann auftritt, wenn in Position 5' der 4-Pyridon-Untereinheit ein Substituent eingeführt ist. Eine Erklärung dafür kann eventuell in der verbesserten Löslichkeit und somit in einer Erhöhung der zellulären Aufnahme zu finden sein. Diese Erkenntnis deckt sich mit den in **Kap. 3.2.2** erläuterten Erfahrungen von SUN et al.¹¹¹, die zeigen, dass die Einführung eines Substituenten in Position 4' des Pyrrol-Ringes für die VEGFR-TK-inhibitorische Aktivität von Vorteil ist. Da aber für die zytotoxische Aktivität neben der Tyrosinkinase-Aktivität noch andere Faktoren eine Rolle spielen, ist ein Zusammenhang nicht schlussfolgernd.

Die Ergebnisse der Substanzen **19**, **27** und **36** weisen im „Prä-Screening“ zu schwache zytotoxische Effekte gegenüber den drei verschiedenen Zelllinien auf. Sie genügen den Kriterien des National Cancer Instituts nicht, und werden daher nicht zu den im Screening Projekt folgenden Testungen an 60 verschiedenen Krebszelllinien zugelassen und für ein VEGF-TK-Screening vorgeschlagen.

3.3 EGFR-TK-Inhibitoren

Wie schon in **Kap. 1.2** der Einleitung erwähnt, spielen bei der Tumorentstehung etwa 30 Proteinkinasen eine Rolle, indem sie zelluläre Signale weiterleiten sowie den Zellzyklus oder die Angiogenese kontrollieren. Sie gelten als interessante Angriffspunkte für die Arzneimittelforschung. Den meisten Proteinkinasen ist ein sehr ähnlicher Aufbau der intrazellulären katalytischen Domäne gemeinsam. Das trifft auch auf VEGFR- und EGFR-Tyrosinkinasen zu. Die katalytische Domäne besteht aus ca. 250 Aminosäuren, die durch Sequenz-Ähnlichkeiten zwischen 32 und 95% gekennzeichnet sind⁴⁸. Im Zentrum der katalytischen Domäne befindet sich die ATP-Bindungsstelle, die einen starren Hohlraum bildet.

Das Ziel der Wirkstoffentwicklung ist einen Inhibitor zu finden, der aufgrund seiner Struktur optimal in das aktive Zentrum der ATP-Bindungsstelle passt. Eine wichtige Strategie war es Substanzen zu finden, die ähnlich dem Adenin Wasserstoffbrücken zum aktiven Zentrum ausbilden können. Außerdem wurde in Kristallstrukturen deutlich, dass neben einer ATP-, Ribose- und Phosphatbindungsstelle noch zwei hydrophobe Regionen bestehen. Diese werden zwar vom natürlichen Substrat nicht ausgefüllt, könnten den synthetisch hergestellten Substanzen aber zu einer stärkeren Bindung verhelfen. Diese verschiedenen Aspekte haben zu einer Vielzahl an kleinen synthetisch hergestellten Molekülen geführt, die unterschiedlichen Substanzklassen angehören.

Aus der großen strukturellen Ähnlichkeit der katalytischen Domäne von verschiedenen Proteinkinasen ergeben sich insbesondere für die Entwicklung spezifisch wirkender Substanzen Probleme. Es besteht die Möglichkeit, dass neben dem Zielenzym auch die Signaltransduktion anderer Proteinkinasen gehemmt wird. Deutlich wird das insbesondere auch an strukturell ähnlichen Substanzen, die über ein pharmakologisch anderes Wirkungsspektrum verfügen. Als Beispiel sollen die Eigenschaften der in **Abb. 63** dargestellten 4-Anilinochinazoline genauer untersucht werden.

Wie schon in **Kap. 1.6.1** erwähnt, zeigt die von der Firma AstraZeneca entwickelte Substanz ZD6474 eine hervorragende Hemmung der VEGF-induzierten Proliferation und gehört mit einem IC_{50} -Wert von $0,04 \mu\text{M}$ für die Inhibition von VEGFR-2 zu den wichtigsten Beispielen VEGFR-TK-inhibitorischer Wirkstoffe. Die Hemmung anderer Proteinkinasen, wie z. B. EGF-, PDGF- und FGF-Rezeptor-TK liegt bei IC_{50} -Werten von $1,1$ bis über $100 \mu\text{M}$ ¹²⁹. Man kann daher von einer Substanz mit einer ausgeprägten Selektivität gegenüber VEGFR-2 sprechen.

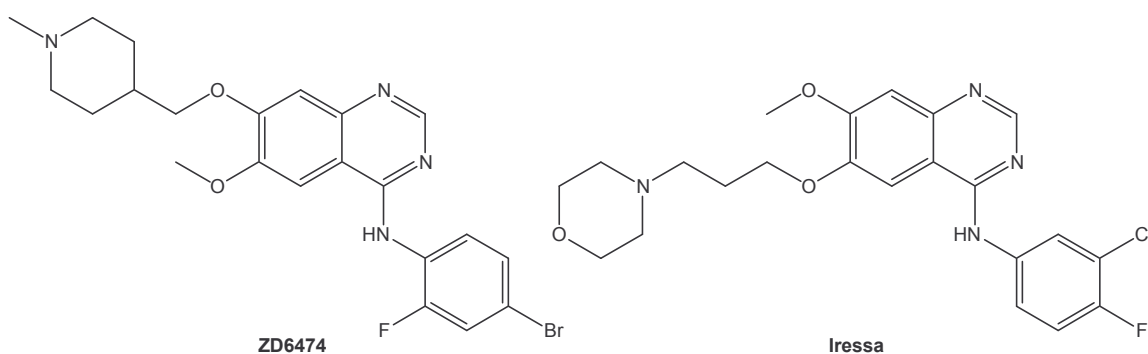


Abb. 63: Die strukturell verwandten 4-Anilinochinazoline ZD6474 und Gefitinib (Iressa®)

Im Gegensatz dazu hat sich Gefitinib (Iressa®) als sehr potenter selektiver EGFR-Inhibitor erwiesen, dessen IC_{50} -Wert bei $0,023 \mu\text{M}$ liegt. Im Vergleich zu anderen Tyrosinkinase ist die selektive Wirkung auf EGFR-TK mindestens 50mal größer¹³⁰. Die Substanz hemmt kompetitiv und reversibel die Bindung von ATP an die EGFR-TK-Domäne des HER1-Rezeptors. Nach sehr guten Ergebnissen in den klinischen Prüfungen liegt den Behörden in Europa der Zulassungsantrag zum Einsatz in der Therapie des kleinzelligen Lungenkarzinoms vor.

Aufgrund der dargestellten engen Zusammenhänge zwischen der VEGFR- und der EGFR-Tyrosinkinase und vor allem deren ähnlicher Aminosäuresequenz in der katalytischen Domäne, sollte in der vorliegenden Arbeit neben der Synthese der bereits beschriebenen potentiellen VEGFR-TK-Inhibitoren auch die Entwicklung von Substanzen mit 4-Anilinochinazolin-Struktur erfolgen. Allerdings ist, wie bereits erwähnt, auch eine starke EGFR-TK-inhibitorische Aktivität zu beachten. Die Gemeinsamkeit beider inhibitorischer Zielgruppen liegt in der ATP-Bindungsregion, von der in beiden Fällen noch keine auskristallisierte Proteinkinasestruktur publiziert

worden ist. Eine Modellstruktur der ATP-Bindungsstelle wird daher anhand veröffentlichter Daten von mehreren Proteinkinasen erstellt.

Dieses von TRAXLER et al.¹³¹ 1996 postulierte Modell kann in fünf Regionen unterteilt werden. Es wird dabei in eine Zuckertasche, eine Adenin-, eine Phosphat-Bindungs- und zwei hydrophobe Regionen unterteilt. Das Bindungsmodell für ATP in der ATP-Bindungstasche wird in **Abb. 64** gezeigt. Man kann eine Wasserstoffbrücke zwischen der Amino-Gruppe des Adenins und dem Amid-Sauerstoff des Glutamins 767 und eine weitere zwischen dem N1 des Adenins und einem Proton der Amino-Gruppe des Methionins 769 deutlich erkennen. Es handelt sich hierbei um ein sogenanntes Donor-Akzeptor-System, da das Adenin eine Elektronen-Donor- und eine Elektronen-Akzeptor-Stelle beinhaltet.

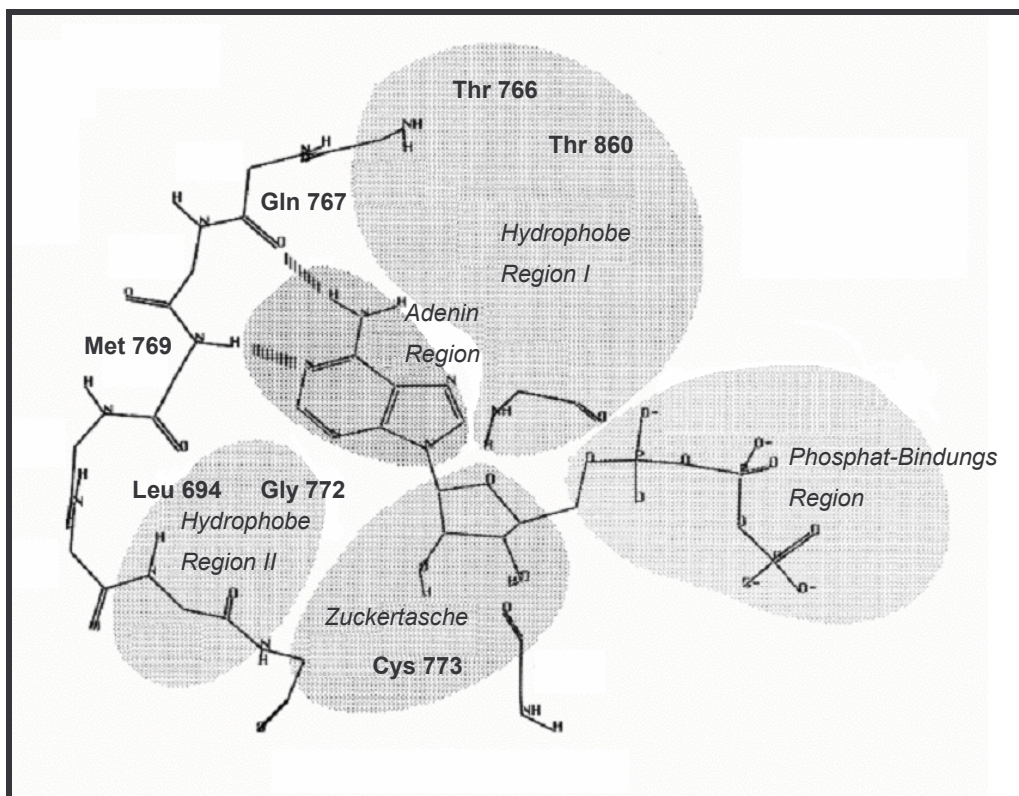


Abb. 64: Modelldarstellung der ATP-Bindungsstelle von TRAXLER¹³¹ mit **ATP** gebunden

Die Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen dem Adenin-Ring und den Aminosäuren Gln 767 und Met 769 gelten als Schlüsselpositionen in der ATP-Bindungsstelle des Enzyms. Für die Entwicklung potenter Proteinkinase-Inhibitoren ist ein Donor-Akzeptor-System wichtig, damit die potentiellen Wirkstoffe sich ähnlich

dem Adenin in die Rezeptortasche einpassen können. Das Bindungsmodell von TRAXLER wurde vor allem im Hinblick auf Studien zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei den EGFR-TK-inhibitorisch wirkenden Substanzklassen der 4-(Phenylamino)pyrrolopyrimidine¹³², der 3-Phenyl-4(1H)-chinolone und von Isoflavonen¹³³ entwickelt.

Unabhängig von den TRAXLER'schen Bindungsstudien hat PALMER et al.¹³⁴ 1997 ein Modell für die Bindung von 4-Anilinochinazolinen, Pyrrolo- und Pyrazolochinazolinen in der ATP-Bindungstasche der EGFR-TK postuliert. **Abb. 65** zeigt das 4-Anilinochinazolin **R1** und **ATP** in der Bindungstasche der EGFR-TK nach PALMER.

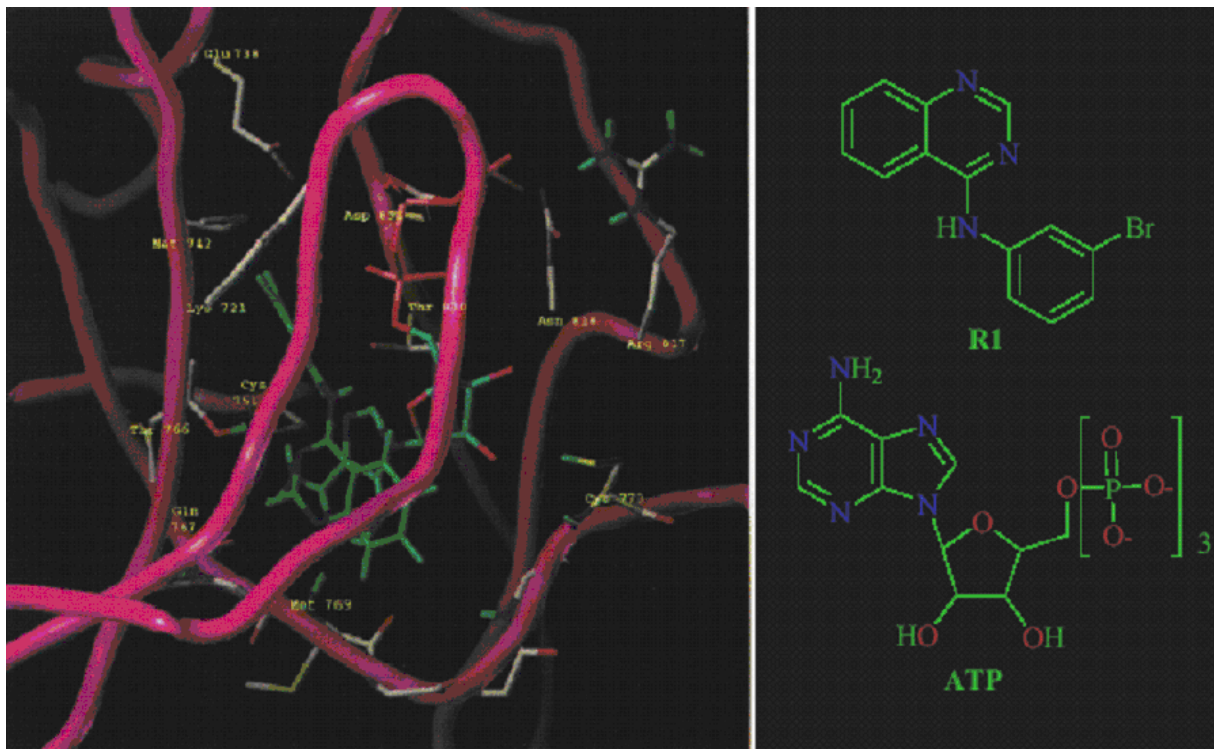


Abb. 65: Das 4-Anilinochinazolin **R1** und **ATP** in der Bindungstasche der EGFR-TK nach PALMER et al.¹³⁴

Eine schematische Darstellung in **Abb. 66** verdeutlicht, dass es in PALMER's Modell zur Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken kommt. Zum einen findet man eine Wasserstoffbrücke zwischen dem N1 des Chinazolins und dem NH von Methionin 769 und zum anderen zwischen dem N3 des Chinazolins und der Aminosäure Threonin 766.

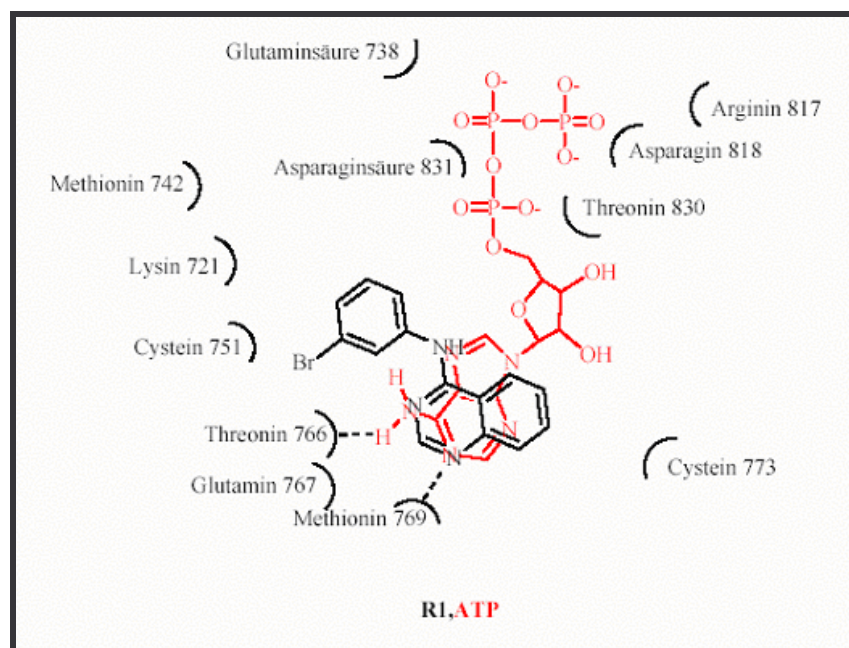


Abb. 66: Schematische Darstellung des von PALMER et al. für 4-Anilinochinazolin postulierten Bindungsmodells im Vergleich mit ATP¹³⁵

Außerdem kann man erkennen, dass der 3-Bromphenyl-Rest in einem Bereich der Bindungstasche gelegen ist, der durch ATP nicht besetzt wird. Hier sind spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Phenyl-Rest und den Schwefelatomen der Aminosäuren Methionin 742 und Cystein 751 möglich. Eine strukturelle Variation in diesem Bereich könnte die Bindungsaffinität von Substanzen erhöhen.

Die sogenannte Zuckertasche wird von dem Ribosetriphosphat-Rest des ATPs ausgefüllt und lässt in der Syntheseplanung Spielraum für Substitutionen des 4-Anilinochinazolins in Position 6 und 7.

Eine Überarbeitung des PALMER'schen Bindungsmodells von HOU et al.¹³⁶ im Jahr 2003 mit Hilfe modernster molekular dynamischer (MD) Technik hat gezeigt, dass das herkömmliche Modell nur teilweise bestätigt werden konnte. Wie **Abb. 67** deutlich macht, bleibt die Wasserstoffbrücke zwischen dem N1 des Chinazolins und

dem NH von Methionin 769 bestehen, während der Abstand zwischen dem N3 des Chinazolins und der Aminosäure Thr 766 in dem MD-simulierten Modell von Hou auf 6 Å ansteigt und somit die zuvor postulierte Wasserstoffbrücken-Bildung ausgeschlossen werden kann.

Die Aktivitätsdaten von über 100 Substanzen mit dem Grundgerüst von **R1** wurden bei der Berechnung berücksichtigt. In der Abbildung wird das von REWCASTLE et al.¹³⁷ hergestellte 4-(3-Bromanilino)-6,7-diethoxychinazolin (**R6**) in das Modell der EGFR-TK eingelagert dargestellt.

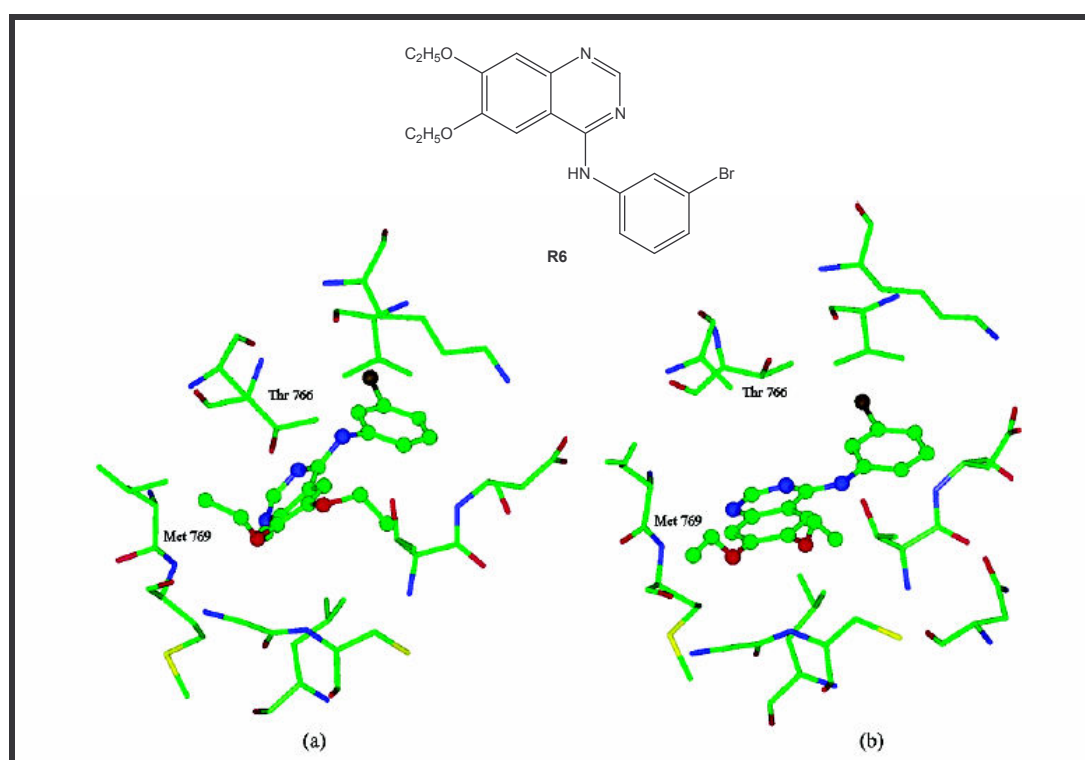


Abb. 67: Überarbeitung des Bindungsmodells von Hou et al. am Beispiel der Verbindung **R6**, (a) Modell nach Palmer; (b) neues Modell, erstellt mit Hilfe MD-Simulation¹³⁶

Ein im Jahr 2000 von WISSNER et al.¹³⁸ postuliertes Bindungsmodell für das 4-Anilinochinazolin Derivat, 4-(3-Bromanilino)-6,7-dimethoxychinazolin (**R5**)¹³⁷, geht auch von einer Wasserstoffbrücke zwischen dem N1 des Chinazolins und der NH-Gruppe des Met 769 aus. Eine Neuerung zu den bereits vorgestellten Modellen nach TRAXLER und PALMER ergibt sich dann aber bei Betrachtung des Chinazolin-N3. WISSNER formuliert eine Wasserstoffbrücke zwischen dem N3 des Chinazolins als Elektronen-Donor und einem Wassermolekül als Elektronen-Akzeptor (**Abb. 68**).

Ausgehend von dem Wassermolekül wird wiederum eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxy-Gruppe des Thr 830 gebildet.

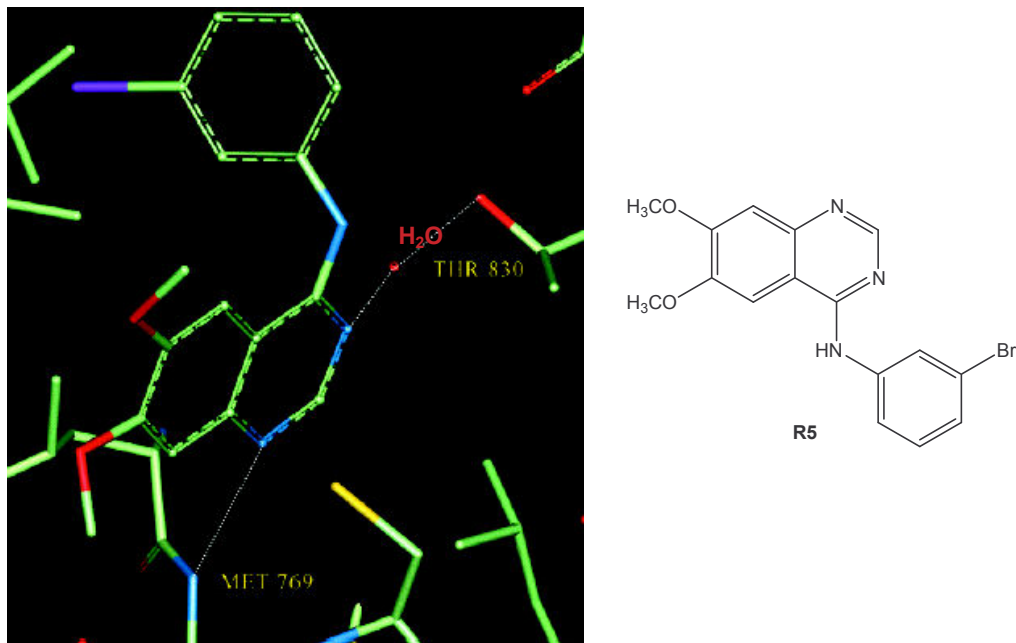


Abb. 68: Das 4-Anilinochinazolin **R5** in der Bindungstasche der EGFR-TK nach WISSNER et al.¹³⁸

Da im Modell nach WISSNER das Wassermolekül manuell platziert worden ist, konnte auch in diesem Fall das modernere MD-Verfahren von Hou¹³⁶ angewandt und eine komplexere Aussage getroffen werden.

In **Abb. 69** wird deutlich, dass eine Überarbeitung des Modells, in diesem Fall mit Substanz **R6**, eine eindeutige Veränderung der Position des Wassermoleküls zeigt. So bleibt es nicht lokalisiert zwischen N3 des Chinazolins und Thr 830, sondern liegt in dem von Hou postulierten Modell zwischen N3 des Chinazolins und der Hydroxy-Gruppe des Thr-766. Es bilden sich also wieder zwei Wasserstoffbrücken aus, die für die Interaktion zwischen Ligand und Enzym eine wichtige Rolle spielen.

Darüber hinaus werden in dem Modell noch weitere favorisierte Interaktionen angedeutet, wie z. B. zwischen dem NH-Atom an Position 4 des Chinazolins und der Aminosäure Leu 694 und der SH-Gruppe des Cys 773.

Der 3-Bromphenyl-Rest ist in einer relativ großen Bindungstasche lokalisiert, die an die Adenin-Bindungsregion angrenzt.

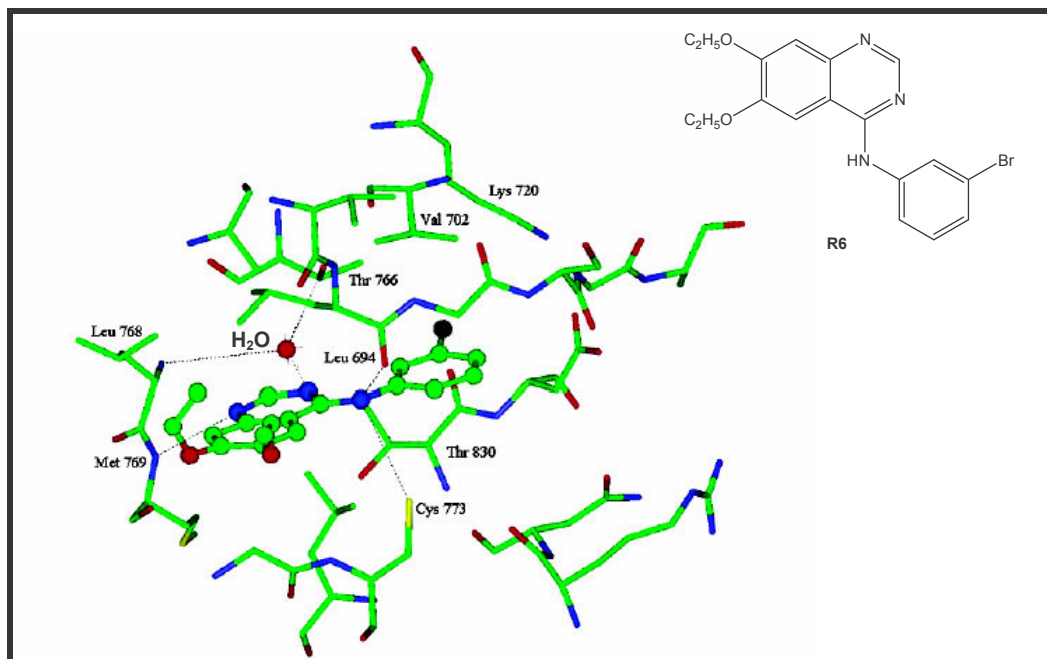


Abb. 69: Überarbeitung des Bindungsmodells nach WISSNER von Hou et al. am Beispiel der Verbindung **R6** mit Hilfe der MD-Simulation¹³⁶

Aus dem von HOU neu formulierten Bindungsmodell von WISSNER kann die Vermutung geäußert werden, dass sich die Bindungsaffinität des Inhibitors zur ATP-Bindungsstelle der EGFR-TK sensibler gegenüber Änderungen des Chinazolin-N1 verhält, als gegenüber Änderungen des N3 im Chinazolin, da N3 nur eine indirekte Interaktion zwischen Ligand und Enzym aufweist.

Da in der Publikation von HOU das von ihm postulierte Modell mit bisher noch nicht veröffentlichten Röntgenkristall-analytischen Daten der EGFR-TK verglichen wird, sollen die daraus resultierenden Ergebnisse in die Arbeit aufgenommen werden.

Es wird ein Vergleich zwischen dem in **Abb. 69** erläuterten Bindungsmodell und den bisher nur in der Brookhaven Protein Datenbank vorhandenen Daten der Röntgenstrukturanalyse von EGFR-TK¹³⁹ angestellt.

Wie in **Abb. 70** dargestellt, ähneln die Daten der Kristallstruktur deutlich denen des Bindungsmodells.

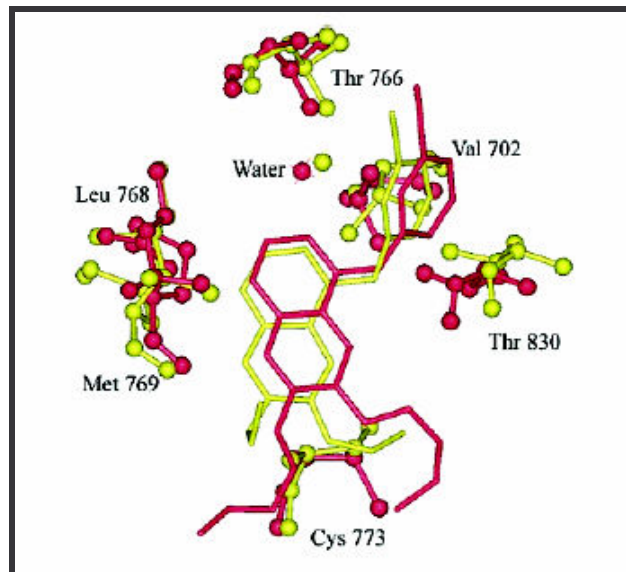


Abb. 70: Übereinstimmung der Kristalldaten (rot) mit dem Bindungsmodell von HOU et al.¹³⁶ (gelb)

Nach der Diskussion verschiedener Bindungsmodelle sollen die wichtigsten Struktur-Wirkungs-Beziehungen der 4-Anilinochinazoline vorgestellt werden¹³⁷. Das unsubstituierte 4-Anilinochinazolin **R2** (**Abb. 71**) hemmt die EGFR-TK mit einer IC_{50} von 344 nM. Durch die Einführung eines 3'-Brom-Substituenten erhält man die um rund zehnfach stärker wirkende Verbindung **R1** (**Abb. 71**) mit einer IC_{50} von 27 nM. Allgemein wird durch die Einführung von Akzeptoren in die 4-Phenylamino-Seitenkette eine Wirkungssteigerung erreicht.

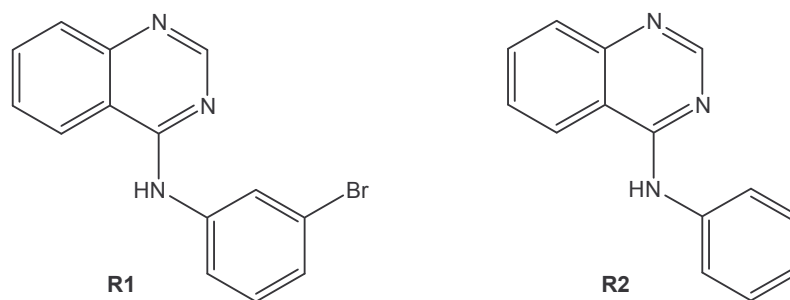


Abb. 71: 4-(3-Bromanilino)-chinazolin (**R1**) und 4-Anilinochinazolin (**R2**) nach REWCASTLE et al.¹³⁷

Übereinstimmend mit den Bindungsmodellstudien kann gezeigt werden, dass der Austausch des Chinazolin-Grundgerüsts gegen Isochinolin bzw. Chinolin zu einem starken Aktivitätsverlust führt.

So haben die resultierenden Verbindungen **R3** und **R4** (**Abb. 72**) IC_{50} -Werte von $> 100 \mu\text{M}$ bzw. $5,5 \mu\text{M}$. Der Grund dafür ist, dass die Möglichkeit der Wasserstoffbrücken-Ausbildung zwischen N1 oder N3 als Elektronen-Donor und einer Elektronen-Akzeptor-Position im Enzym nicht mehr gegeben ist. Der Austausch des N1 des Chinazolin-Rings durch CH führt zu einem ungleich größeren Wirkungsverlust.

Auch der Austausch des Chinazolin-Grundgerüsts gegen die Heterozyklen Cinnolin, Phthalazin und Chinoxalin hat eine Wirkungsabschwächung zu Folge¹⁴⁰.

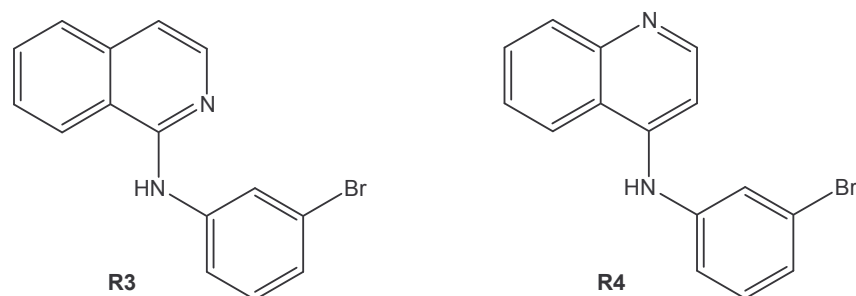


Abb. 72: Isochinolin-Derivat **R3** und Chinolin-Derivat **R4** nach Rewcastle et al.¹³⁷

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Einführung eines 4-Benzylamino-Restes eine Aktivitätseinbuße nach sich zieht¹³⁷.

Eine Substitution in Position 6 und/oder 7 im Chinazolin-Ringsystem hat zur Folge, dass sich Elektronen-Donor Funktionen positiv auf die inhibitorische Aktivität auswirken. Beispiele dafür sind die schon erwähnten 6,7-Dimethoxy- (**R5**) und 6,7-Diethoxy-Derivate (**R6**) (**Abb. 73**). Deren IC_{50} -Werte betragen für die Dimethoxy-Verbindung **R5** $0,029 \text{ nM}$ und $0,006 \text{ nM}$ für die Diethoxy-Verbindung **R6**¹³⁷.

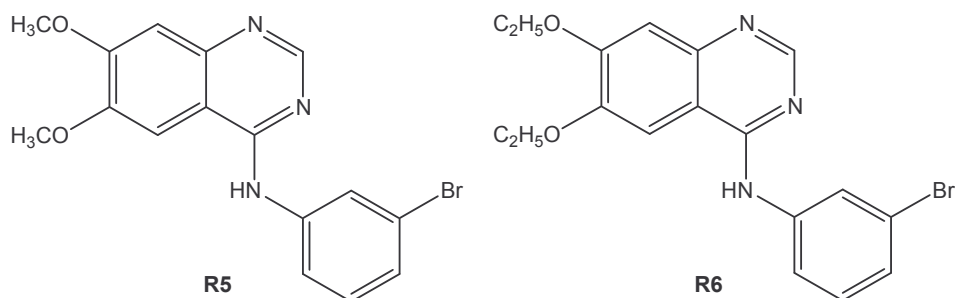


Abb. 73: 4-Anilinochinazoline mit 6,7-Dimethoxy- (**R5**) bzw. 6,7-Diethoxy-Substitution (**R6**) nach REWCASTLE et al.¹³⁷

Weitere bekannte Beispiele für Verbindungen vom 4-Anilinochinazolin-Typ, die bereits für bestimmte Indikationen zugelassen sind oder sich in späten Phasen klinischer Studien befinden, sind die in **Abb. 74** dargestellten Verbindungen Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca) und Erlotinib (Tarveca®, OSI Pharmaceuticals, Genetech und Hoffman-La Roche AG)^{141,142}. Diese Substanzen hemmen die EGFR-TK selektiv und reversibel. Die IC₅₀-Werte für die Inhibition der isolierten EGFR-TK betragen 20 nM für Iressa®¹⁴³ und 17 nM für Tarveca®¹⁴⁴. Auch in intakten Zellen wird die EGFR-TK durch beide Substanzen mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich gehemmt^{145,146}.

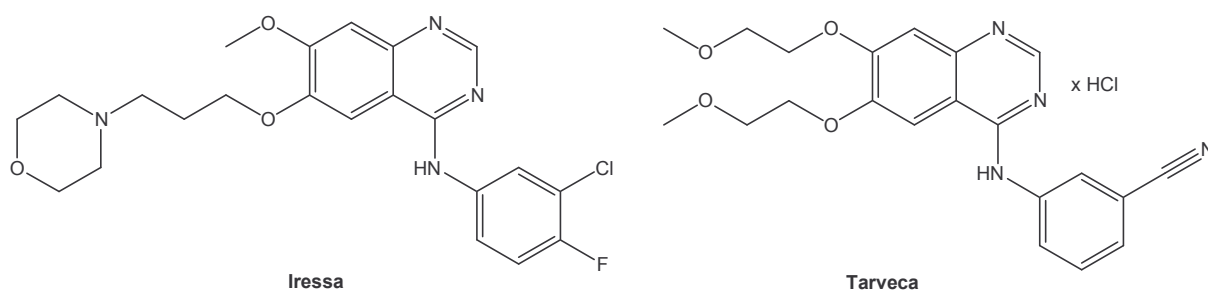


Abb. 74: Die 4-Anilinochinazoline Iressa® und Tarveca®

Iressa® und Tarveca® sind peroral verwendbar. Beide Substanzen sind für den Einsatz in der Krebstherapie, auch in Kombination mit herkömmlichen Zytostatika und einer Strahlentherapie vorgesehen^{141,142}.

Die Erkenntnisse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei 4-Anilinochinazolinen haben in unserer Arbeitsgruppe zunächst zur Entwicklung von ringoffenen Salicylaniliden als Vorläufer-Substanzen geführt. Es wurden die Substanzen **RA61** und **RA62**, durch ALBUSCHAT¹³⁵, entwickelt, die eine Benzylamino-Struktur metaständig zur Carboxamid-Funktion des Salicylanilids enthalten.

Bei der Benzylamino-Struktur handelt es sich um einen Dihydroxybenzylamino-Rest, der als Teilstruktur ein Bestandteil von Lavendustin A ist¹³⁵. Lavendustin A ist eine Ende der 1980er Jahre von ONODA et al.¹⁴⁷ aus dem Bakterium *Streptomyces griseolavendus* isolierte Verbindung mit der pharmakophoren Teilstruktur **O1**.

Mit einem IC_{50} -Wert von $0,012 \mu\text{M}$ hat sie sich *in vitro* als potenter EGFR-TK-Inhibitor erwiesen (**Abb. 75**)^{147,148}.

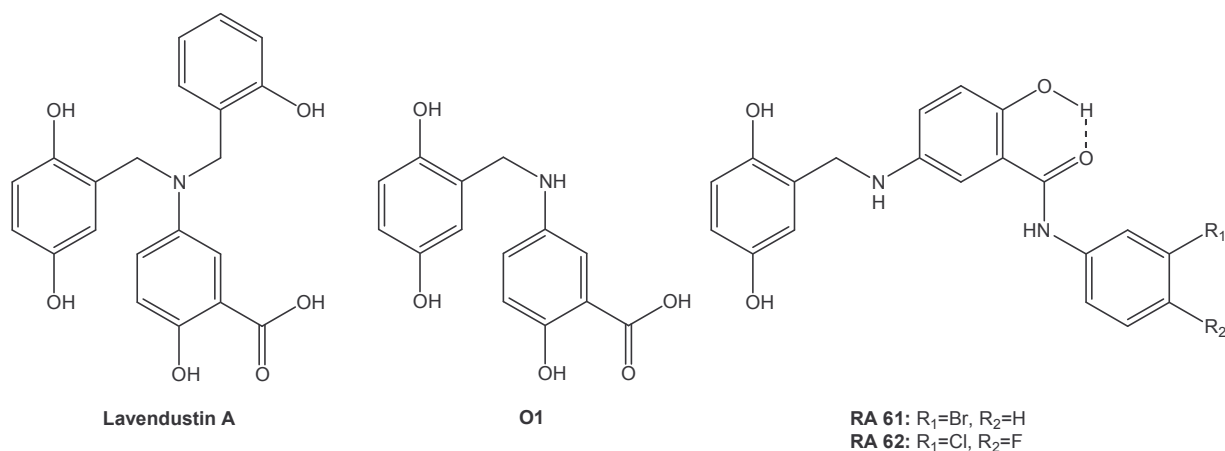


Abb. 75: Aus *Streptomyces griseolavendus* isolierte EGFR-TK-inhibitorische Substanz Lavendustin A, deren Pharmakophor **O1** und die Lavendustin A-verwandten Salicylanilide **RA61** und **RA62**

Des Weiteren hat der Einbau der 2,5-Dihydroxybenzyl-Seitenkette in unsubstituierte Salicylanilide zu einer deutlichen Steigerung der inhibitorischen Aktivität geführt¹⁵⁴. Bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ hemmen beide Substanzen nahezu vollständig die EGFR-TK. Bei einer Nachtestung von **RA61** in einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ wurde eine inhibitorische Aktivität von 42 Prozent festgestellt.

Aufgrund dieser bemerkenswerten Ergebnisse soll in der weiteren Wirkstoffentwicklung der Salicylsäure-Anteil des Lavendustin A-Pharmakophors in der bioisosteren Chinazolin-Form fixiert werden.

Mit Substanz **40** wird demzufolge eine Lavendustin A-verwandte Struktur mit dem Dihydroxybenzylamino-Substituenten in Position 6 des Chinazolins hergestellt. Die strukturelle Ähnlichkeit und Bioisosterie zwischen Substanz **40** und der pharmakophoren Teilstruktur **O1** von Lavendustin A wird in **Abb. 76** verdeutlicht.

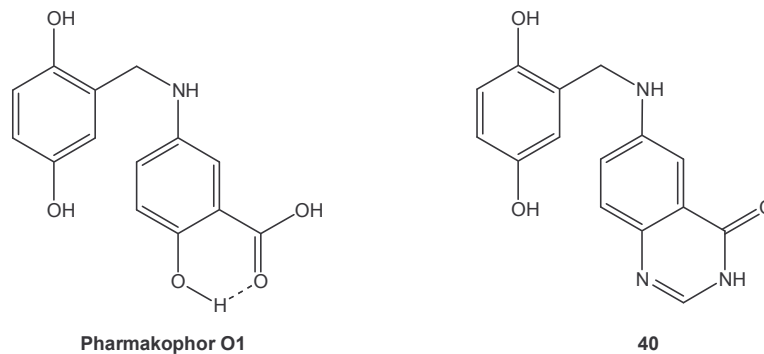


Abb. 76: Das geplante Chinazolin-4-on mit Dihydroxybenzylamino-Substituenten in Position 6 (**40**) und die pharmakophore Teilstruktur **O1**

Im folgenden Kapitel wird auf die Synthese und die EGFR-TK-inhibitorische Testung von Substanz **40** eingegangen.

3.3.1 Herstellung eines 4-Chinazolinons **40** mit Dihydroxybenzylamino-Seitenkette in Position 6

Im Gegensatz zur Synthese der in unserer Arbeitsgruppe von ALBUSCHAT initiierten 4-Anilinochinazoline erfolgt die Herstellung der gewünschten Verbindung **40** nicht ausgehend von 2-Cyano-4-nitroanilin, sondern von 5-Nitroanthranilsäure. Unter Bedingungen, wie sie in der Literatur von STEVENSON¹⁴⁹ beschrieben worden sind, soll der Ringschluss zum Chinazolin-4-on zunächst unter Zusatz von Formamidinacetat in 2-Methoxyethanol durchgeführt werden. Auch nach Variation der Temperatur und der Reaktionszeit konnte das gewünschte Produkt nicht erhalten werden.

Der Ringschluss der 5-Nitroanthranilsäure zum gewünschten 6-Nitro-3*H*-chinazolin-4-on (**37**) gelang erst nach Umsetzung mit Formamid bei einer Temperatur von 125°C und einer Reaktionsdauer von 24 h (**Abb. 77**). Durch die darauf folgende Reduktion mit Eisenspänen unter Zusatz von Eisessig gelangt man zur 6-Amino-Verbindung **38** (**Abb. 77**).

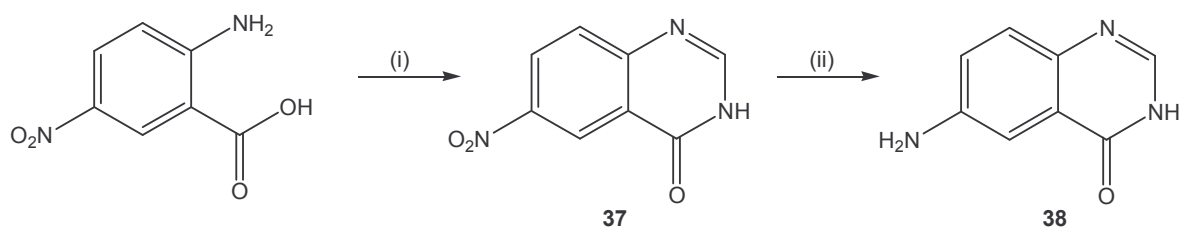


Abb. 77: Ringschluss-Reaktion zu Verbindung **37** und anschließende Reduktionsreaktion zum Amin **38**. (i) Formamid, 125°C; (ii) Eisenspäne, Ethanol/Eisessig, ΔT

Im nächsten Reaktionsschritt soll die Herstellung einer Schiff'schen Base erfolgen. Dazu wird das freie Amin **38** mit käuflich erworbenem 2,5-Dihydroxybenzaldehyd kondensiert. Die Umsetzung erfolgt in einer Mischung aus Ethanol und Eisessig unter Rückfluß. Man erhält die gewünschte Schiff'sche Base **39** in guten Ausbeuten. Durch anschließende selektive Reduktion der Imino-Funktion von Verbindung **39** ist die Wunschverbindung **40** zugänglich. Um die Imino-Funktion zu reduzieren, wird wie bei ALBUSCHAT mit Borandimethylamin-Komplex in Eisessig gearbeitet. Man erhält

schließlich die Verbindung **40** nach einer Reaktionsdauer von 2 h bei Raumtemperatur (**Abb. 78**).

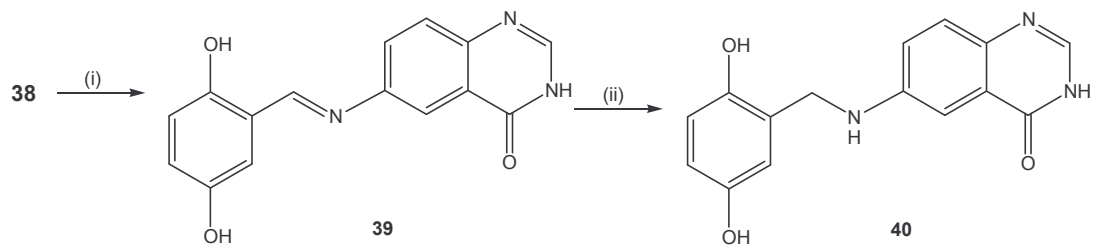


Abb. 78: Herstellung der Schiff'schen Base **39** und deren anschließende Reduktion zur Verbindung **40**. (i) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig, ΔT ; (ii) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

Die Umwandlung des Lavendustin A-Pharmakophors in ein strukturverwandtes 4-Chinazolinon-Derivat **40** konnte somit problemlos durchgeführt werden.

3.3.1.1 EGFR-TK-inhibitorische Eigenschaften von Verbindung 40

Das Chinazolin-Derivat **40** mit Lavendustin A-Teilstruktur und Bioisosterie zur Salicylsäure-Struktur wurde auf seine *in vitro*-EGFR-inhibitorische Aktivität getestet.

Die in **Abb. 79** dargestellte inhibitorische Aktivität von **40** wurde durch die Firma MDS Pharma Services-Discovery, Taiwan (R.O.C.), ermittelt. Bei dem dazu durchgeführten Test handelt es sich um einen Enzymassay^{150,151,152} (Kap. 4.5).

| Ausgewählte Substanz | Konzentration in μM | EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in % |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| 40 | 1 | 17 |

Abb. 79: Tabellarische Darstellung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität von Substanz **40**

Das Chinazolin-4-on mit einem Dihydroxybenzylamino-Substituenten in Position 6 (**40**) zeigt in einer Konzentration von 1 μM eine EGFR-TK-inhibitorische Aktivität von nur 17 Prozent. Die Substanz kann demnach als nahezu wirkungslos eingestuft werden. Das ist ein enttäuschendes Ergebnis, da sich Lavendustin A *in vitro* mit einem IC_{50} -Wert von 0,012 μM als potenter EGFR-TK-Inhibitor erwiesen hat^{147,153}.

Das Ergebnis zeigt, dass die Wirkung des Chinazolin-4-ons mit Lavendustin A-Teilstruktur gegenüber den von ALBUSCHAT synthetisierten Verbindungen **RA61** und **RA62** deutlich abgeschwächt ist.

Daher werden zur Wirkstoffoptimierung Chinazoline entwickelt, die in Position 4 des Chinazolins einen Substituenten tragen.

3.3.2 4-Anilinochinazoline mit Lavendustin A-Teilstruktur

Die Erkenntnisse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei 4-Anilinochinazolinen haben in unserer Arbeitsgruppe zur Entwicklung der Substanzen **RA70** und **RA71**, durch ALBUSCHAT¹⁵⁴, geführt (**Abb. 80**).

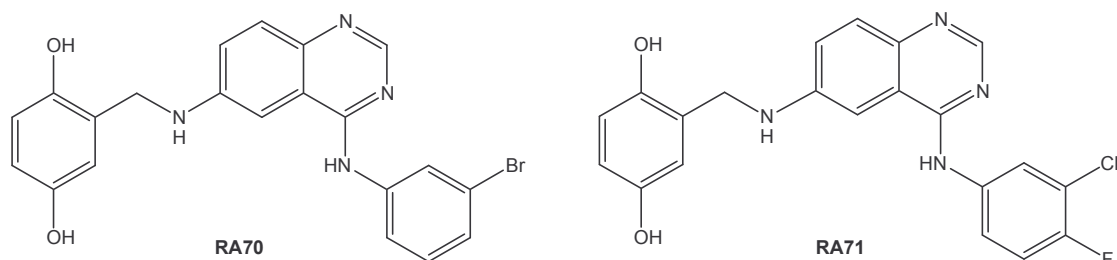


Abb. 80: Die 4-Anilinochinazoline **RA70** und **RA71**¹⁵⁴

Das Konzept beruht zum einen auf der Einführung Elektronen-anziehender Substituenten im 4-Phenylamino-Rest, wie Brom oder Chlor und Fluor, und zum anderen auf einer Substitution des Chinazolin-Grundgerüsts in Position 6 mit der Benzylamin-Seitenkette.

Die aufgrund der Bioisosterie des Chinazolin-Gerüsts zur Salicyloyl-Struktur der Salicylanilide erwartete ähnlich hohe EGFR-TK-inhibitorische Wirkung, wie bei **RA61** und **RA62** konnte in Untersuchungen bestätigt werden.

Bei Konzentrationen von 1 μM betragen die Aktivitäten von **RA70** und **RA71** 65 bzw. 71 Prozent und in einer Konzentration von 0,1 μM 45 bzw. 22 Prozent.

Des Weiteren wurden die 4-Anilinochinazoline **RA70** und **RA71** auf ihre zytotoxischen Eigenschaften in einem *in vitro*-MCF-7-Zelltest überprüft. Dabei führen beide Verbindungen in einer Konzentration von 5 μM zu Wachstumshemmungen von 30 bzw. 25 Prozent, wobei **RA71** auch in einer Konzentration von 1 μM noch eine 25-prozentige Wachstumshemmung aufweist.

Weitergehende Untersuchungen zu den zytotoxischen Eigenschaften der Chinazoline **RA70** und **RA71** wurden im National Cancer Institute, Bethesda, Maryland (USA) durchgeführt. Die ermittelten GI_{50} -Werte (engl.: growth inhibition) bei 60 humanen Krebszelllinien liegen für beide Verbindungen bei den meisten Zelllinien im 10^{-6} bis 10^{-5} molaren Bereich. Herausragend sind die GI_{50} -Werte des Chlor-

fluoranilinochinazolins **RA71** bei der EKVX-Lungenkrebs-, der A498- und der ACHN-Nierenkrebszelllinie, die im 10^{-7} molaren Bereich und bei der CCRF-CEM-Leukämiezelllinie sogar im 10^{-8} molaren Bereich liegen. Obwohl das Brom-substituierte Derivat **RA70** die besseren EGFR-inhibitorischen Aktivitäten zeigt, geht aus den *in vitro*-Testergebnissen des National Cancer Institutes hervor, dass die Zytotoxizität von Chlor-Fluor-substituierten 4-Anilinochinazolinen besser ist.

Eine Optimierung der durch ALBUSCHAT hergestellten 4-Anilinochinazoline **RA70** und **RA71** mit 2,5-Dihydroxybenzylamino-Seitenkette in Position 6 des Chinazolin-Gerüsts sollte zusätzlich eine Substitution in Position 7 des Chinazolin-Gerüsts beinhalten. Durch die Einführung von Elektronen-Donatoren erhofft man sich eine Steigerung der Löslichkeit, die sich dann vor allem in einer verbesserten Penetrationsfähigkeit der Substanzen durch die Zellmembran niederschlagen soll und somit zu einer Erhöhung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität führen könnte. Als Substituent in Position 7 ist zunächst eine Morpholin-4-ylpropoxy-Seitenkette vorgesehen.

Der Morpholin-4-ylpropoxy-Substituent hat sich schon bei dem potenten EGFR-TK-Inhibitor Iressa® als Aktivitäts-fördernd erwiesen (**Abb. 81**).

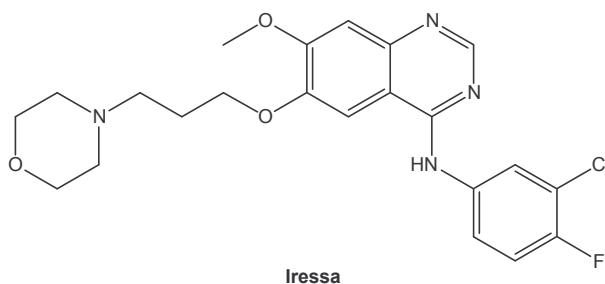


Abb. 81: Der potente EGFR-TK-Inhibitor Iressa®

Durch die Herstellung der Substanzen **54** und **55** mit dieser Morpholin-4-ylpropoxy-Seitenkette in Position 7 soll diese Konzeption verwirklicht werden. Einhergehend damit soll eine Verbesserung der Löslichkeitseigenschaften erzielt werden und so die Bioverfügbarkeit gesteigert werden (**Abb. 82**).

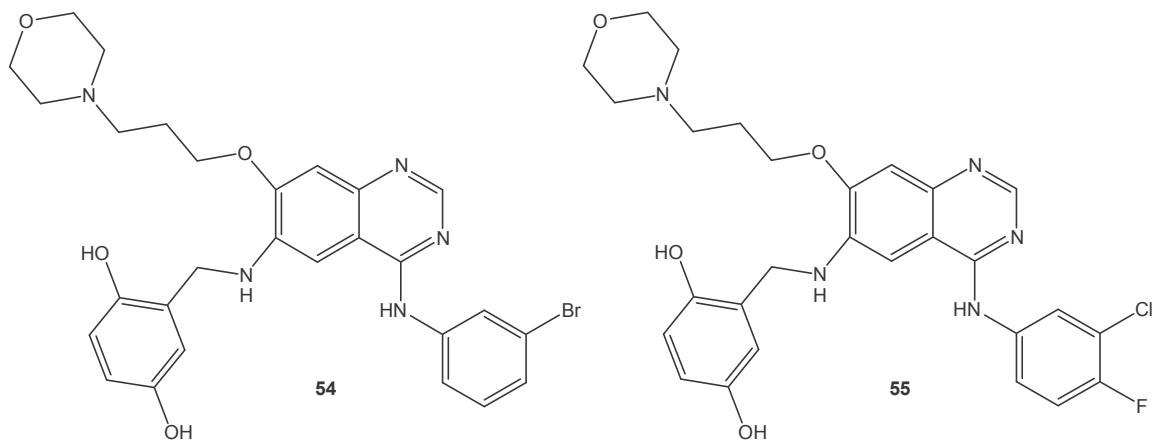


Abb. 82: Die geplanten 4-Anilinochinazoline **54** und **55**

Neben der Einführung der Morpholin-4-ylpropoxy-Seitenkette sollen die Substanzen **62** und **63** hergestellt werden, die in Position 6 einen 2,5-Dihydroxybenzylamino-Substituenten und außerdem in Position 7 des Chinazolin-Gerüsts einen Methoxy-Substituenten besitzen (**Abb. 83**).

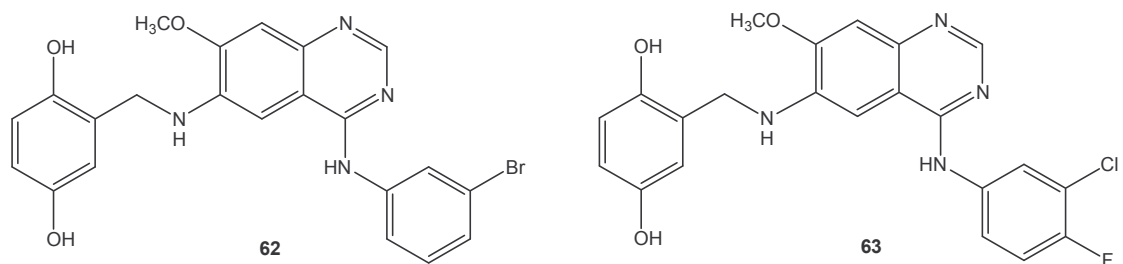


Abb. 83: Die geplanten 4-Anilinochinazoline **62** und **63**

3.3.2.1 Herstellung der 4-Anilinochinazoline **54** und **55** mit Morpholin-4-ylpropoxy-Seitenkette in Position 7

Die Substanzen **54** und **55** werden als Weiterentwicklung der von ALBUSCHAT synthetisierten Substanzen mit EGFR-TK-inhibitorischer Aktivität **RA70** und **RA71** mit einem zusätzlichen Substituenten in Position 7 des Chinazolin-Gerüsts hergestellt.

Zur Herstellung von **54** und **55** soll der Ringschluss zum Chinazolin erneut ausgehend von einer Anthranilsäure erfolgen. Dabei soll die 4-Fluoranthranilsäure (**42**) eingesetzt werden, um den gewünschten Substituenten bei den Zielverbindungen **54/55** und **62/63** in die richtige Position 7, nach einem Austausch gegen Fluor, einzubringen. Da Verbindung **42** nur teuer zu beziehen ist, wird sie durch Oxidation von 4-Fluor-2-nitrotoluol mit Kaliumpermanganat zur Carbonsäure **41** und durch anschließende Reduktion mit einer Mischung gleicher Teile Eisenpulver/-späne unter Zusatz von Eisessig in zufriedenstellender Ausbeute erhalten (**Abb. 84**).

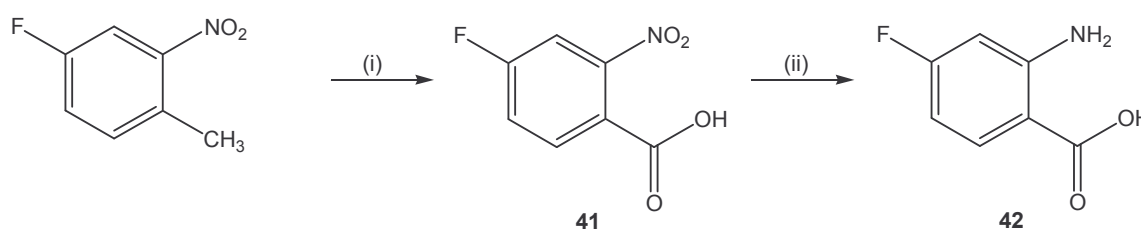


Abb. 84: Herstellung der 4-Fluoranthranilsäure **42** ausgehend von 4-Fluor-2-nitrotoluol. (i) Kaliumpermanganat, Magnesiumsulfat, Wasser, 80°C; (ii) Eisenpulver/-späne, Eisessig, 95°C

Der folgende Ringschluss zu Verbindung **43**, kann wie bei STEVENSON¹⁴⁹ beschrieben, mit Formamidinacetat in 2-Methoxyethanol durchgeführt werden. Man erhält das 7-Fluor-chinazolin-4-on (**43**) (**Abb. 85**).

Anschließend wird eine Nitrierung durchgeführt, bei der sowohl das 6-Nitro-Produkt **44**, als auch das 8-Nitro-Produkt **45** entstehen (**Abb. 85**)¹⁵⁵.

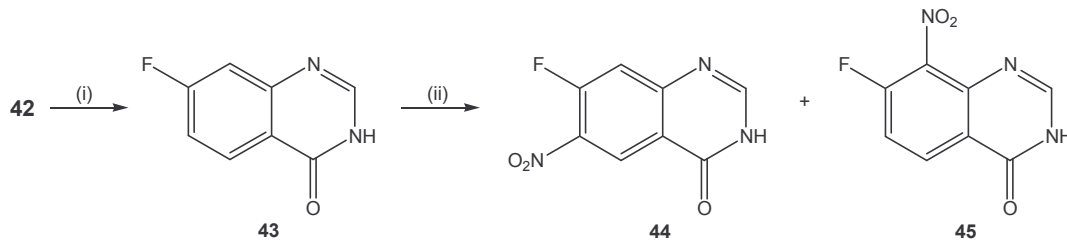


Abb. 85: Herstellung der Substanz **43** und Nitrierung zu den Verbindungen **44** und **45**. (i) Formamidinacetat, 2-Methoxyethanol, ΔT ; (ii) rauchende Salpetersäure/konz. Schwefelsäure (1:1), 100°C

Die Nitrierung erfolgt mit einer Mischung aus rauchender Salpetersäure und konz. Schwefelsäure (1:1) bei 100°C. Nach 1 h wird die Mischung mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert. Dabei fällt ein Niederschlag aus, der als die gewünschte 6-Nitro-Verbindung **44** identifiziert werden kann. Nach Extraktion des Filtrates mit Ether findet man ein Gemisch der Substanzen **44** und **45**, das mit Ethylacetat/Ethanol (9:1) getrennt werden kann.

Die beiden Verbindungen können mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie deutlich voneinander unterschieden werden (**Abb. 86**). Besonders das Signalmuster und die Kopplung zwischen dem Wasserstoff-Atom und dem Fluor macht eine eindeutige Identifizierung der Substanzen möglich.

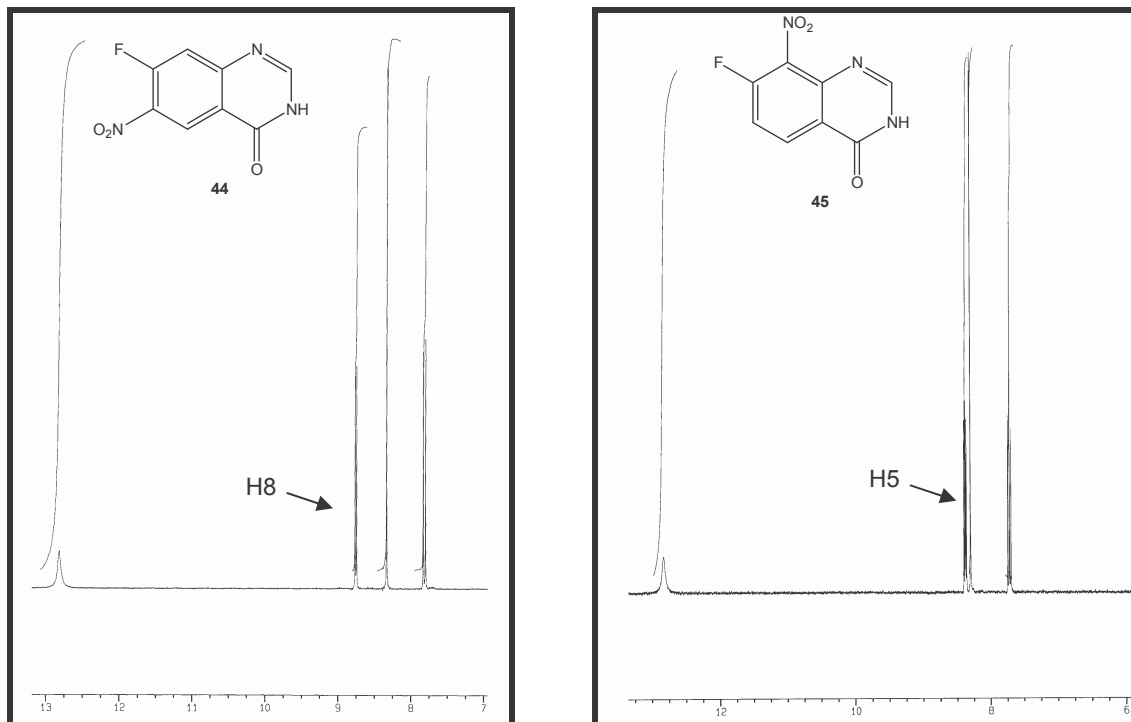


Abb. 86: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Substanzen **44** und **45**

Dabei zeigt die Substanz **44** ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 12.4 Hz, bei einer chemischen Verschiebung von 7.87 ppm, das aufgrund einer ^3J -Kopplung zwischen dem H8 und dem Fluor-Atom in Position 7 zustande kommt. Hingegen findet man bei Substanz **45** ein Signal bei 8.37 ppm (Dublett vom Dublett), das eine H-F-Kopplung erkennen lässt. Dabei handelt es sich um H5, das mit einer Kopplungskonstante von 6.0 Hz eine ^3J -Kopplung zwischen H5 und H6 und mit einer Kopplungskonstante von 9.0 Hz eine ^4J -Kopplung zwischen H5 und dem Fluor-Atom in Position 7 aufweist.

Im folgenden Schritt wird der 4-Anilino-Substituent in Verbindung **44** nach einer Vorschrift von REWCASTLE et al.¹⁵⁵ eingebaut. Dazu wird **44** in Thionylchlorid unter Zusatz von wenigen Tropfen Dimethylformamid gelöst und unter Rühren rückfließend erhitzt. Das im Überschuß eingesetzte Thionylchlorid wird vertrieben und das entstandene Rohprodukt 4-Chlor-7-fluor-6-nitrochinazolin entweder mit 3-Bromanilin oder mit 3-Chlor-4-fluoranilin bei Raumtemperatur weiter umgesetzt. Die entstehenden Hydrochloride werden mit Triethylamin neutralisiert. Bei der Reaktion mit 3-Bromanilin wird Verbindung **46** und mit 3-Chlor-4-fluoranilin Verbindung **47** erhalten (**Abb. 87**).

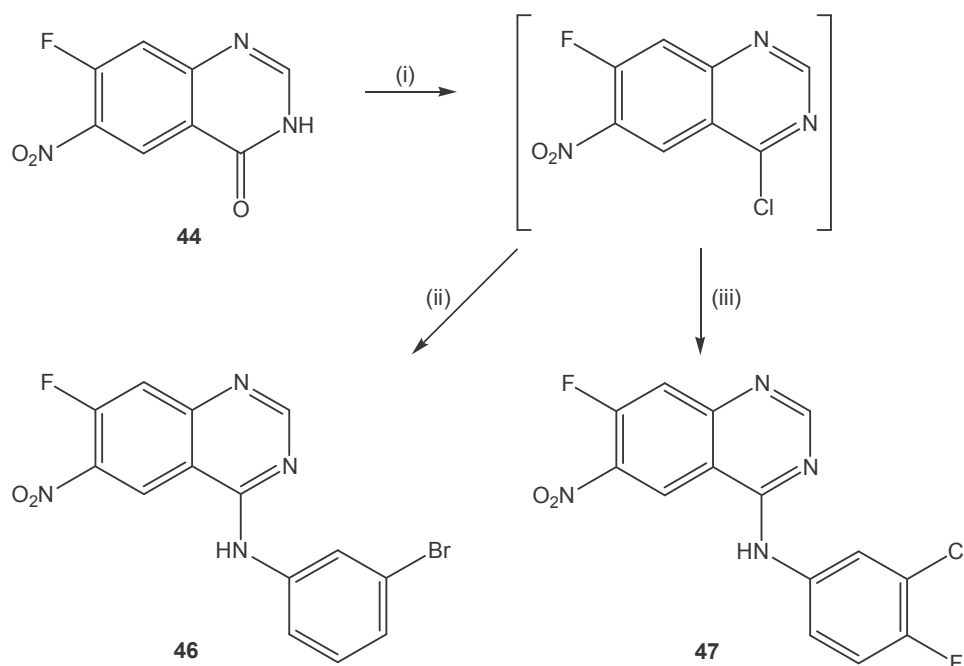


Abb. 87: Herstellung von **46** und **47**. (i) Thionylchlorid, Dimethylformamid, ΔT ; (ii) 3-Bromanilin, Isopropanol, Dichlormethan, Triethylamin, RT; (iii) 3-Chlor-4-fluoranilin, Dichlormethan, RT

Ausgehend von den hergestellten 4-Anilinochinazolinen **46** und **47** kann nun Fluor gegen den gewünschten Alkoxy-Substituenten ausgetauscht werden. SMAILL et al. haben diese Umsetzung im Jahr 2000 beschrieben¹⁵⁶.

Hierfür muß zunächst das Natrium-Alkoholat des einzuführenden Substituenten hergestellt werden. Da zur Herstellung der Verbindungen **53** und **54** in Position 7 des Chinazolin-Grundgerüsts eine Morpholin-4-ylpropoxy-Seitenkette eingebracht werden soll, wird sehr reaktives Natriumhydrid mit einer Lösung aus 3-(4-Morpholinyl)-1-propanol in Tetrahydrofuran 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Suspension soll nun mit den 4-Anilinochinazolinen **46** oder **47** 18 h rückfließend erhitzt werden. Wie in **Abb. 88** dargestellt, werden nach der Aufarbeitung die Substanzen **48** und **49** erwartet.

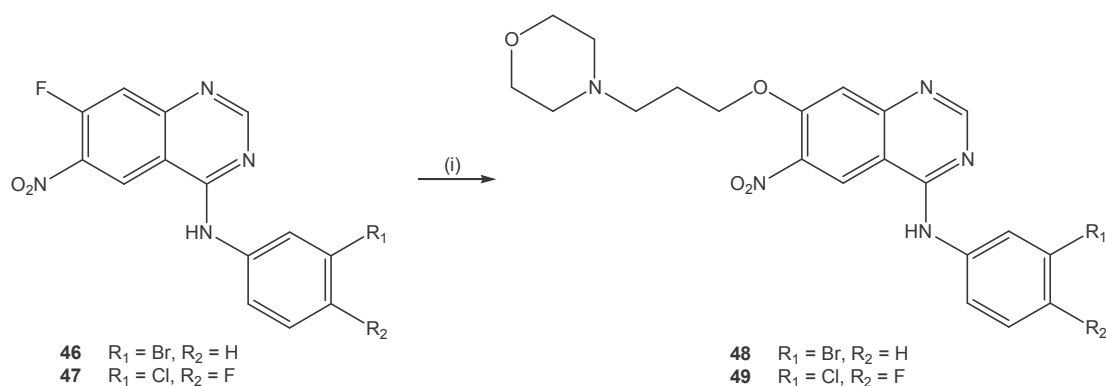


Abb. 88: Schema zur Herstellung von **48** und **49**. (i) 3-(4-Morpholinyl)-1-propanol, Natriumhydrid, Tetrahydrofuran, RT, Δ T

Pharmakologische Ergebnisse von ALBUSCHAT haben allerdings gezeigt, dass 4-(3-Brom)anilinochinazoline trotz stärkerer EGFR-TK-inhibitorischer Wirkung eine schlechtere zytotoxische Aktivität aufweisen als die 4-(3-Chlor-4-fluor)anilinochinazoline.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wird die in **Abb. 88** gezeigte Reaktion zunächst exemplarisch mit dem Chlor-Fluor-substituierten 4-Anilinochinazolin **47** durchgeführt. Die Aufarbeitung der entstandenen Substanz **49** erfolgt SC. Eine vollständige Reinigung der Substanz gelingt auch nach Variation der Fließmittelgemische nicht.

Mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ - und Massenspektroskopie kann jedoch die Entstehung von Verbindung **49** hinreichend bewiesen werden (**Abb. 89**).

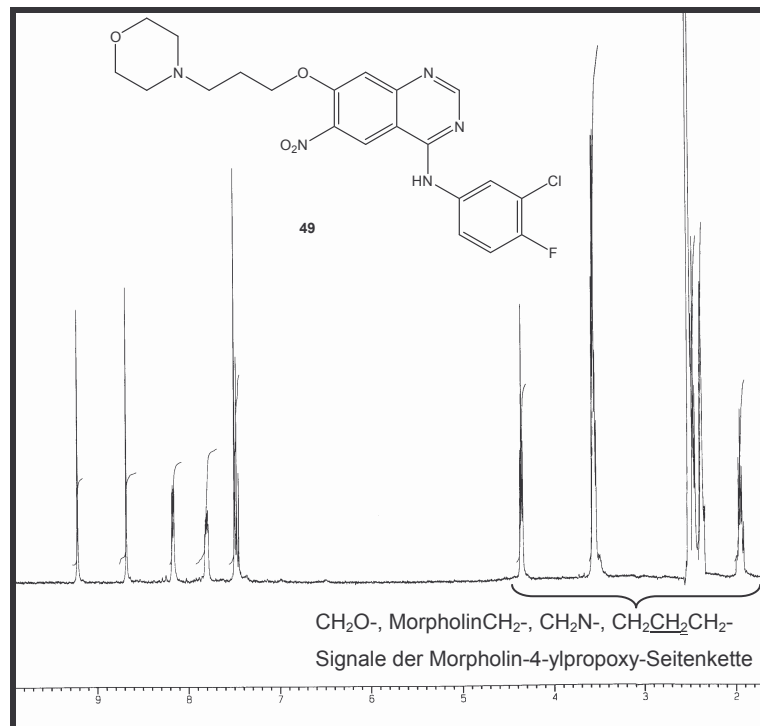


Abb. 89: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Substanz **49**

Dabei zeigt die Substanz **49** Signale bei 4.36, 3.57, 2.46, 2.37 und 1.94 ppm mit dem charakteristischen Aufspaltungsmuster der Morpholin-4-ylpropoxy-Seitenkette. Außerdem beweist der Peak bei $m/z = 461$ im Massenspektrum, dass der Austausch von Fluor gegen den Morpholin-4-ylpropoxy-Substituenten stattgefunden hat.

Die weitere Reaktionsfolge zur Herstellung der Substanzen **54** und **55** soll an dieser Stelle erläutert werden (**Abb. 90**).

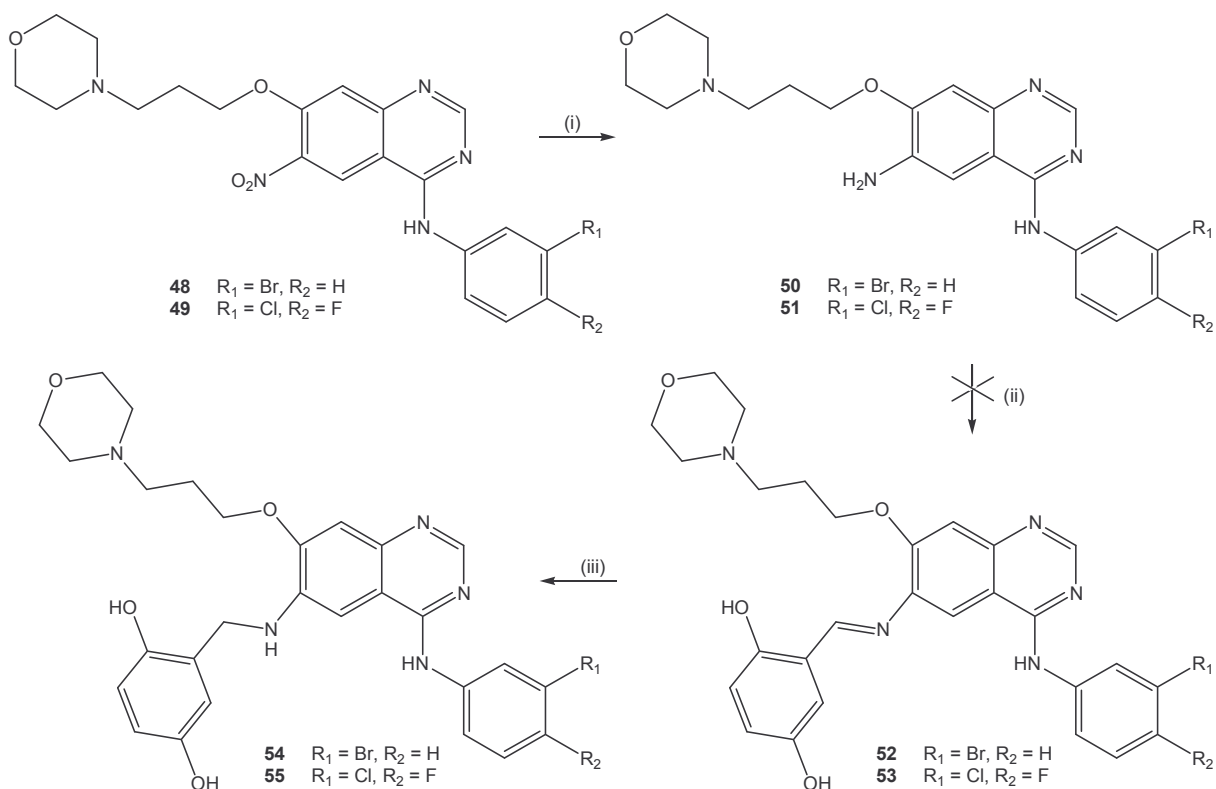


Abb. 90: Geplanter Syntheseverlauf zur Herstellung der Substanzen **54** und **55**. (i) Eisenspäne, Ethanol, Eisessig, ΔT ; (ii) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol, Eisessig, ΔT ; (iii) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

Zuerst soll dabei die Nitro-Gruppe in Position 6 des Chinazolin-Grundgerüsts nach Einführung der Morpholin-4-ylpropoxy-Seitenkette in Position 7 (Substanzen **48** und **49**) zur Amino-Gruppe reduziert werden. Diese Reaktion kann nach einer Vorschrift von SMAILL et al.¹⁵⁶ mit Eisenspänen unter Zusatz von Eisessig und Ethanol durchgeführt werden. Die dabei erwarteten Verbindungen **50** und **51** sollen dann durch Kondensation des freien Amins mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd zu den Schiff'schen Basen **52** und **53** umgesetzt werden.

Den letzten Schritt auf dem Weg zu den Zielverbindungen **54** und **55** würde dann eine Reduktion der Imino-Funktion mit Borandimethylamin-Komplex in Eisessig bilden.

Exemplarisch wird die geschilderte Reaktionsfolge mit dem Chlor-Fluor-substituierten 4-Anilinochinazolin durchgeführt, da die Chlor-Fluor- im Gegensatz zur Brom-Substitution, wie bereits erwähnt, bessere zytotoxische Ergebnisse liefert.

Demzufolge wird die Nitro-Gruppe in Position 6 des Chinazolins **49** mit Eisenspänen in Ethanol unter Zusatz von Eisessig zur Amino-Gruppe reduziert. Dabei erhält man Substanz **51**, deren Nachweis mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ - und Massenspektroskopie erfolgen kann (**Abb. 91**).

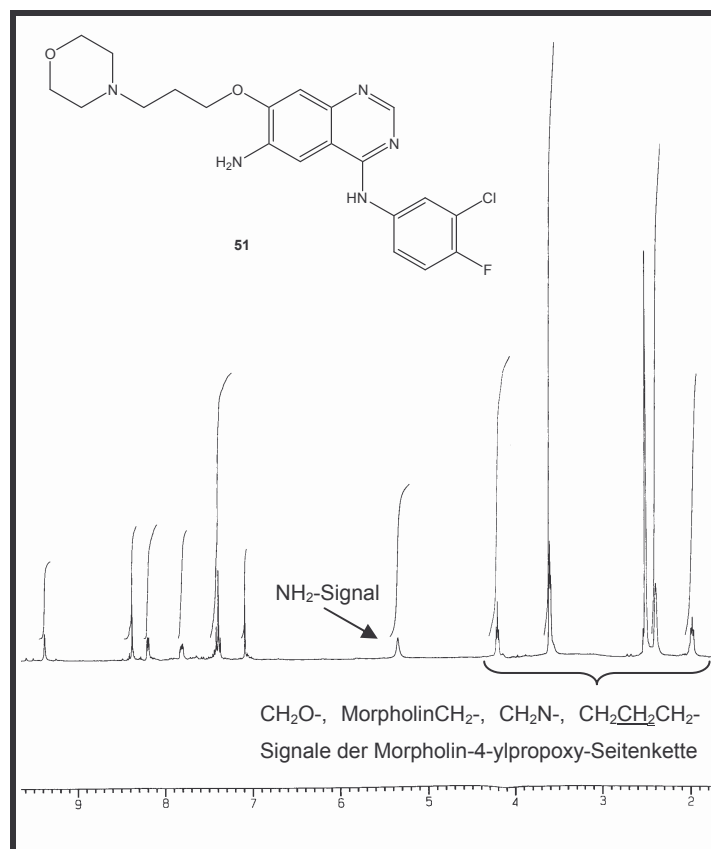


Abb. 91: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Substanz **51**

Das Kernresonanzspektrum der Verbindung **51** belegt die erfolgreiche Reduktion der Nitro-Gruppe zum primären Amin durch das Auftreten eines breiten Signals bei 5.34 ppm. Die Reduktion kann unter Erhalt des Morpholin-4-ylpropoxy-Substituenten durchgeführt werden, was durch die dafür charakteristischen Signale bei 4.20, 3.59, 2.51, 2.41 und 1.97 ppm bestätigt wird. Der Molekülpeak im Massenspektrum bei $m/z = 431$ zeigt deutlich, dass Substanz **51** entstanden ist.

Im letzten Schritt soll die Herstellung der Schiff'schen Base **53** in Position 6 durch Reaktion des freienamins **51** mit dem käuflich erworbenen 2,5-Dihydroxybenzaldehyd durch rückfließendes Erhitzen in einer Mischung aus Ethanol und Eisessig erzielt werden. Trotz vielfältiger Variationen von Reaktionstemperatur

und -dauer gelang es jedoch nicht, aus dem Aldehyd und der Amino-Funktion die Schiff'sche Base zu erhalten.

Eine mögliche Erklärung könnte eine sterische Hinderung durch den großen Morpholin-4-ylpropoxy-Rest in der Nachbarposition 7 bieten, die eine Reaktion zwischen dem 2,5-Dihydroxybenzaldehyd und der Amino-Gruppe verhindert.

Aus diesem Grund wird die Einführung eines kleineren Substituenten in Position 7 des Chinazolins, wie zum Beispiel einer Methoxy-Gruppe, versucht. Im folgenden Kapitel wird die Synthese der Zielstrukturen **62** und **63** beschrieben (**Abb. 92**).

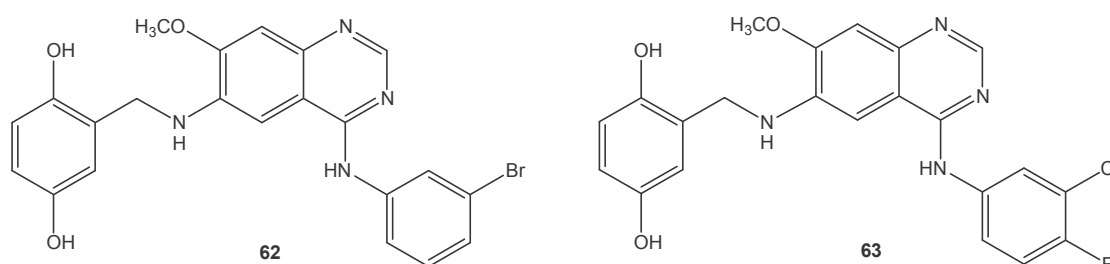


Abb. 92: Die geplanten 4-Anilinochinazoline **62** und **63**

3.3.2.2 Herstellung der 4-Anilinochinazoline **62** und **63** mit Methoxy-Gruppe in Position 7

Die Synthese soll ausgehend von den Fluoronitrochinazolinen **46** oder **47** durchgeführt werden. Die Fluor-Substituenten des Chinazolins können im Verlauf der Herstellung gegen einen Methoxy-Substituenten ausgetauscht werden. Die Synthese wird parallel mit dem 4-(3-Brom)anilinochinazolin- (**46**) und dem 4-(3-Chlor-4-fluor)anilinochinazolin-Derivat (**47**) durchgeführt. Nach SMAILL et al.¹⁵⁶ wird eine Lösung aus **46** oder **47** in Tetrahydrofuran mit einer Suspension aus käuflich erworbenem Natriummethylat in Tetrahydrofuran versetzt. Die Mischung wird 18 h rückfließend erhitzt. Im Rahmen der Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum vertrieben und der verbleibende Rückstand mit Wasser aufgenommen. Die entstandenen Verbindungen **56** oder **57** werden in Ethylacetat/Ethanol (9:1) SC aufgearbeitet (**Abb. 93**).

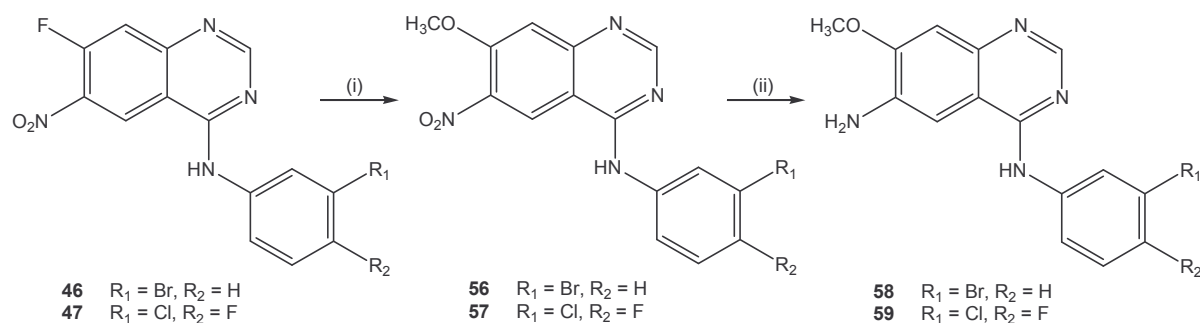


Abb. 93: Herstellung von Substanz **56/57** und anschließende Reduktion zu Substanz **58/59**. (i) Natriummethylat, Tetrahydrofuran, Δ T; (ii) Eisenspäne, Ethanol/Essigsäure (10%ig), 90°C

Anschließend wird die Nitro-Gruppe zur Amino-Gruppe reduziert. Wie schon bei der vorangegangenen Synthese wird auch hier eine Reduktion mit Eisenspänen in einem Gemisch aus Eisessig und Ethanol versucht.

Bei mehreren Reaktionen kann beobachtet werden, dass die Reduktion zwar gelingt, dass dabei aber der Methoxy-Substituent eliminiert wird. Deshalb müssen die Reaktionsbedingungen variiert werden. Die Reduktion wird mit wenig verdünnter Essigsäure durchgeführt, um eine Abspaltung des Methoxy-Substituenten zu verhindern. Nach dreistündigem Rühren bei 90°C wird mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung auf pH 5-6 gebracht und vollständig mit Ether extrahiert. Die Aufarbeitung der vereinigten organischen Phasen erfolgt in Ethylacetat/Ethanol (9:1) SC. Man erhält die Verbindungen **58** und **59** (**Abb. 93**).

Deren Nachweis erfolgt mit Hilfe der Massen- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Dabei zeigt die Substanz **58** Molekülpeaks bei $m/z = 344/346$ und die Substanz **59** bei $m/z = 318$.

Die Kernresonanzspektren von **58** und **59** belegen die erfolgreiche Reduktion unter Erhalt des Methoxy-Substituenten in Position 7 durch das Auftreten eines Signals für die Amino- und dem Erhalt des Signals für die Methoxy-Gruppe. So zeigt das Bromsubstituierte 4-Anilinochinazolin **58** bei 5.59 ppm ein breites Signal für die Amino- und bei 3.99 ppm ein Singulett für die Methoxy-Gruppe. Die Chlor-Fluor-substituierte Substanz **59** lässt bei 5.38 ppm ein breites Signal für die Amin- und bei 3.97 ppm ein Singulett für die Methoxy-Substitution erkennen.

Die Kondensation des Aldehyds mit dem Amin zum Imin gelingt in Nachbarstellung zur Methoxy-Gruppe im Gegensatz zu den in **Kap. 3.3.2.1** geschilderten Versuchen mit dem Morpholin-4-ylpropoxy-Substituenten problemlos.

Die Amino-Verbindungen **58** oder **59** werden allerdings nicht in einer Mischung aus gleichen Teilen Ethanol und Eisessig mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd umgesetzt. Um den Methoxy-Substituenten zu erhalten, muß, ähnlich der oben geschilderten Reduktion, darauf geachtet werden, nicht in Eisessig zu arbeiten. In verschiedenen Versuchen konnte festgestellt werden, dass selbst verdünnte Essigsäure eine Abspaltung des Methoxy-Substituenten bewirkt. Die Umsetzung der Amino-Verbindung **58** oder **59** mit dem 2,5-Dihydroxybenzaldehyd wird daher nur in Ethanol durchgeführt. Nach zweistündigem Erhitzen unter Rückfluß wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Ansatz auf Eis gegeben. Die dabei ausfallenden Schiff'schen Basen **60** und **61** sind intensiv rot gefärbt (**Abb. 94**).

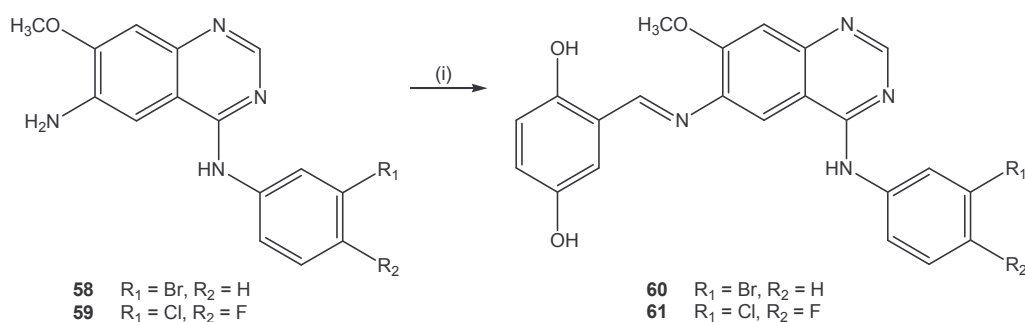


Abb. 94: Herstellung der Substanzen **60** und **61**. (i) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol, ΔT

Die Aufreinigung der Schiff'schen Base **61** erfolgt in Ethylacetat/Ethanol (9:1) SC. Die Verbindung wird in guten Ausbeuten erhalten. Deren Kernresonanzspektrum belegt die erfolgreiche Kondensation zum Imin zum einen durch das Auftreten eines Singulett für das Imin-CH bei 8.92 ppm und zum anderen durch das Fehlen eines Signales für die freie Amino-Funktion bei 5-6 ppm (**Abb. 95**).

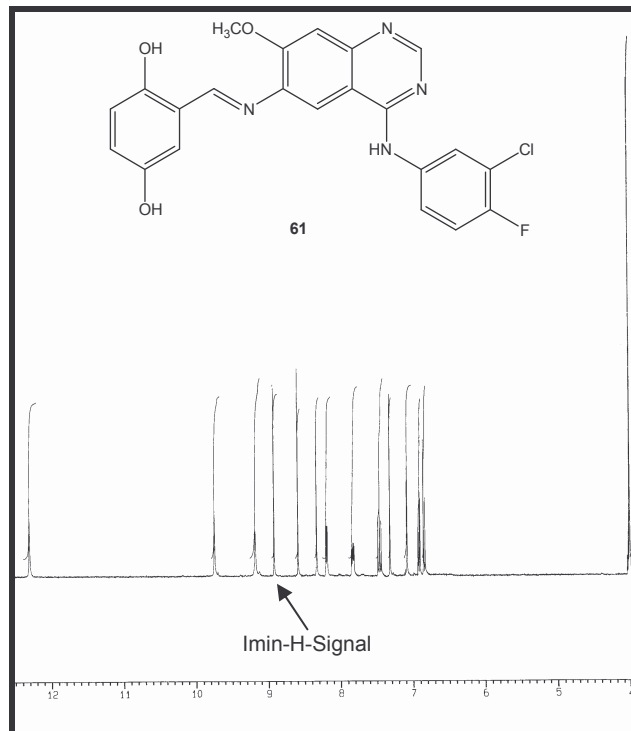


Abb. 95: ¹H-NMR-Spektrum von Substanz **61**

Der Molpeak bei $m/z = 438$ im Massenspektrum bestätigt die Entstehung der Schiff'schen Base.

Obwohl eine Aufreinigung des 4-(3-Brom)anilinochinazolin-Derivates **60** nicht vollständig gelingt, wird der folgende Reaktionsschritt auch mit dieser Substanz durchgeführt, da sowohl ¹H-NMR- als auch Massenspektren Hinweise auf die Entstehung der Substanz geben.

Den abschließenden Reaktionsschritt zur Herstellung der Verbindungen **62** und **63** stellt die Reduktion der Imino-Funktionen von **60** und **61** mit Borandimethylamin-Komplex dar. Die Reaktion wird in Abwesenheit von Essigsäure durchgeführt, um den Erhalt der Methoxy-Gruppe zu gewährleisten. Dabei wird die Schiff'sche Base **60** oder **61** in Methanol gelöst und eine Lösung aus Borandimethylamin-Komplex in Methanol bei Raumtemperatur langsam zugetropft. Nach zweistündigem Rühren gießt man auf Eis und extrahiert vollständig mit Ether. Man erhält die Substanzen **62** und **63** (**Abb. 96**).

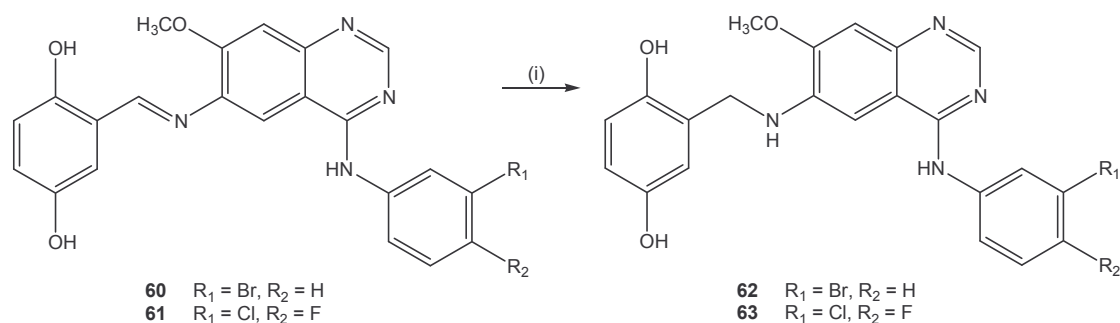


Abb. 96: Herstellung der Substanzen **62** und **63**. (i) Borandimethylamin-Komplex, Methanol, RT

Die Reinigung der Substanzen **62** und **63** wird mit Hilfe der Säulenchromatographie durchgeführt. Die Zielverbindungen sind auf der DC-Platte sehr gut zu erkennen, da sie bei einer Wellenlänge von 365 nm dunkelblau fluoreszieren.

Um eine gute Trennung der Verbindungen **62** und **63** von zusätzlich auftretenden Nebenprodukten zu erzielen, werden verschiedene Fließmittel-Gemische getestet. Wie bei ALBUSCHAT wird zunächst mit einem Lösungsmittelgemisch aus Ethylacetat/n-Hexan (9:1) gearbeitet. Allerdings konnte auch nach Variation des Verhältnisses von Ethylacetat zu n-Hexan keine ausreichende Trennung erreicht werden. Des Weiteren wurden die folgenden Fließmittel-Gemische getestet (**Abb. 97**).

| Fließmittel-Gemisch | Verhältnis |
|------------------------|------------|
| Ethylacetat/n-Hexan | 9:1 |
| | 6:1 |
| | 3:1 |
| | 1:1 |
| Ethylacetat/Ethanol | 9:1 |
| | 8:2 |
| Ethylacetat/Methanol | 9:1 |
| | 8:2 |
| Dichlormethan/Ethanol | 9:1 |
| | 8:2 |
| Dichlormethan/Methanol | 9:1 |
| | 8:2 |

Abb. 97: Tabelle der verschiedenen Fließmittel-Mischungen und ihre Verhältnisse

Am geeignetsten erscheint eine Auftrennung in einem Fließmittel aus den Komponenten Dichlormethan und Methanol (9:1). Die Trennleistung der Säulenchromatographie ist allerdings nicht ausreichend, um die Substanzen **62** oder **63** rein zu isolieren. Selbst nach Einsatz von besonders feinkörnigem Kieselgel der Korngröße 40-63 μm konnten die Verbindungen **62** und **63** nicht isoliert werden.

Das in **Abb. 98** dargestellte Kernresonanzspektrum von Substanz **62** beweist, dass das gewünschte 4-(3-Brom)anilinochinazolin-Derivat im letzten Reaktionsschritt entstanden ist.

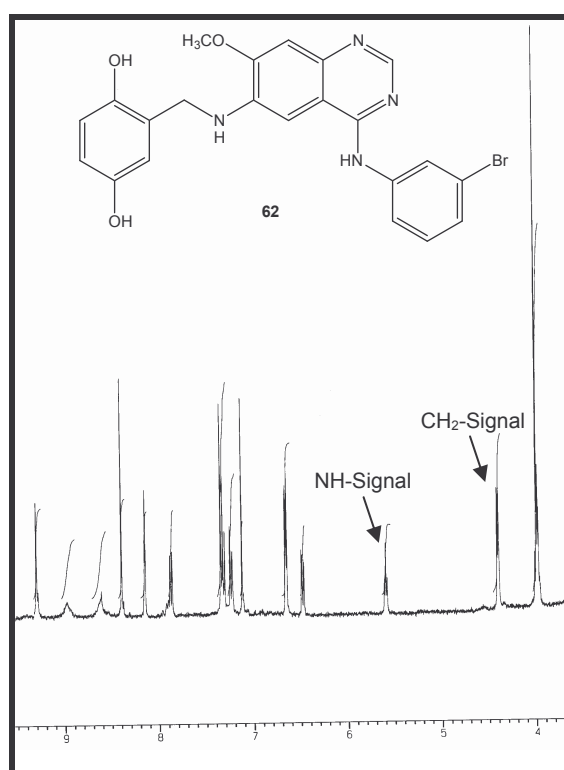


Abb. 98: ^1H -NMR-Spektrum von Substanz **62**

Einen deutlichen Beweis für das Gelingen der Reduktion der Imino-Verbindung liefert zum einen das Triplett bei 5.59 ppm, das der Amin-Funktion der Dihydroxybenzylamino-Seitenkette zugeordnet werden kann. Zum anderen findet man ein Dublett bei 4.39 ppm, bei dem es sich um das Signal der CH_2 -Gruppe handelt.

Das 4-(3-Brom)anilinochinazolin-Derivat **62** konnte nicht testrein erhalten werden. Auf eine vollständige Aufreinigung wurde aber aufgrund der zu erwartenden schlechteren zytotoxischen Aktivität im Vergleich zu **63** verzichtet. Die Substanz ist

demnach als Modellsubstanz anzusehen, mit deren Hilfe gezeigt werden soll, dass bei Vorhandensein eines Methoxy-Substituenten in Position 7 die Dihydroxybenzyl-Seitenkette in Position 6 einführbar ist.

Die weiteren Versuche zur Reinigung wurden nur noch mit Verbindung **63** durchgeführt, die aufgrund der Chlor-Fluor-Substitution im Anilin-Ring vermutlich bessere zytotoxische Eigenschaften besitzt.

Zur Aufreinigung wird nun mit dem Verfahren der Dickschicht-Chromatographie weitergearbeitet. Obwohl die Methode bei Einsatz des Fließmittelgemisches Dichlormethan/Methanol (9:1) viel versprechend scheint, wird auch hier kein zufriedenstellendes Ergebnis bezüglich der CHN-Analysen erhalten.

Eine weitere Möglichkeit der chromatographischen Isolierung von Substanz **63** bietet die präparative, zentrifugal beschleunigte, radiale Chromatographie (Rotationschromatographie), bei der mit einem Chromatotron gearbeitet wird. Es wurden Glasplatten eingesetzt, die mit gipshaltigem Kieselgel 60 PF₂₅₄ (Merck) beschichtet sind. Aufgrund der geringen Substanzmenge betrug die Schichtdicke der benutzten Platten 1 mm. Der Auftrag der Verbindung erfolgte in einem Fließmittelgemisch von Dichlormethan/Methanol (95:5). Auch diese chromatographische Methode hat nicht zur gewünschten Trennung geführt.

Da im Institut für Pharmazeutische Biologie ein Gerät zur präparativen HPLC-Säulenchromatographie (engl.: high performance liquid chromatography) zur Verfügung steht, konnte eine Aufreinigung der Substanz auf diese Weise versucht werden. Bei der Säule handelt es sich um eine C18 (RP18) Umkehrphase, die in der Pharmazie breite Anwendung findet. Es werden häufig Methanol/Wasser- oder Acetonitril/Wasser-Mischungen mit den entsprechenden Zusätzen, wie z. B. Puffer oder Säuren, als Fließmittel verwendet. Auf den Zusatz von Säuren musste verzichtet werden, da mit einer Abspaltung des Methoxy-Substituenten gerechnet werden musste. Nach orientierenden Versuchen zur Ermittlung der optimalen mobilen Phase, hat eine Mischung aus Methanol/Wasser eine deutlich bessere Trennleistung gezeigt als ein Gemisch aus Acetonitril/Wasser. Zur Optimierung der Trennung wurde außerdem versucht mit einem Fließmittelgradienten zu arbeiten.

Dabei wird während des chromatographischen Laufes die Zusammensetzung des Fließmittels geändert. Es werden Versuche durchgeführt, bei denen das Verhältnis von Methanol zu Wasser zu Beginn ein Verhältnis von 30:70, nach 20 Minuten von 70:30 und nach 30 Minuten von 99:1 besitzt. Außerdem wird die Trennleistung untersucht, wenn der Fließmittelgradient zu Beginn des chromatographischen Laufes ein Verhältnis von Methanol zu Wasser von 50:50, nach 20 Minuten von 80:20 und nach 30 Minuten von 99:1 hat.

Da die Gradientenelution keine Verbesserung der Komponententrennung zeigt, wird die präparative HPLC-Säulenchromatographie in einem isokratischen Fließmittelgemisch von Methanol/Wasser (55:45) durchgeführt (**Abb. 99**).

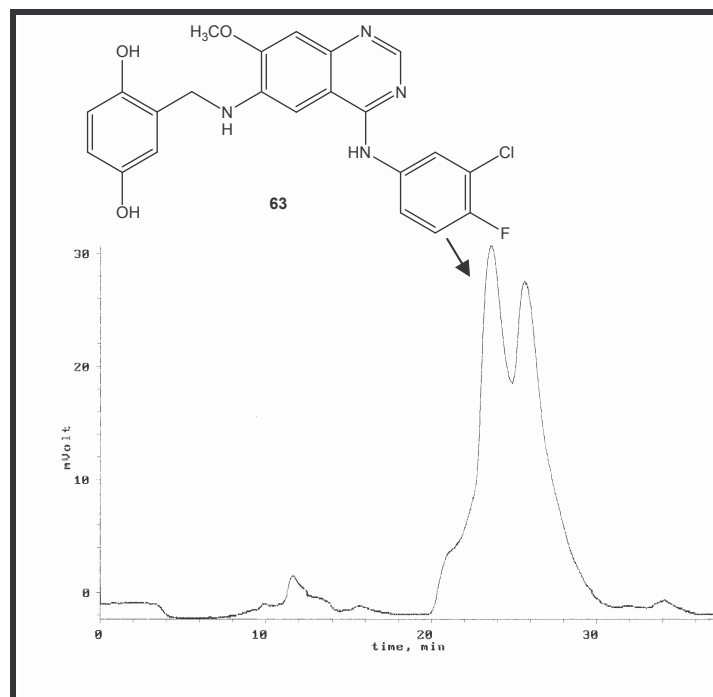


Abb. 99: Trennung von Substanz **63** mit präparativer HPLC-Säulenchromatographie

Wie in der **Abb. 99** deutlich wird, ist auch mit Hilfe der HPLC-Methode keine optimale Trennung der Komponenten möglich. Man kann erkennen, dass zwei Hauptbestandteile mit eventueller struktureller Verwandtschaft sehr ähnliche Retentionszeiten aufweisen. Dennoch wird versucht durch fraktionierte Trennung und Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen Substanz **63** zu isolieren.

Es gelingt, wenig Substanz sauber abzutrennen, so dass die Verbindung mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zweifelsfrei charakterisiert werden kann (**Abb. 100**).

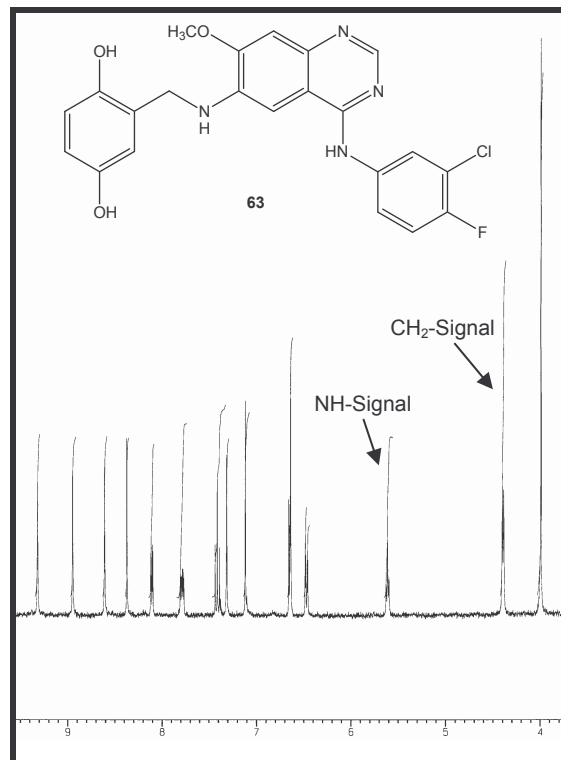


Abb. 100: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Substanz **63**

Dabei zeigt die Substanz **63** ein Triplet bei einer Verschiebung von 5.61 ppm, das aufgrund einer Kopplung des NH-Signals mit der benachbarten CH_2 -Gruppe zustande kommt. Für die CH_2 -Gruppe findet man bei 4.39 ppm ein Dublett, das mit der Amino-Funktion koppelt.

Als weiterer Identitätsnachweis der Substanz werden aufgrund der geringen Substanzmenge massenspektroskopische Analysemethoden gegenüber der CHN-Analyse bevorzugt. Dabei werden neben EI-Massenspektren auch FAB(+)- und FAB(-)-Massenspektren mit Methanol als Lösungsmittel aufgenommen. Wie in **Abb. 101** dargestellt zeigt das Signal bei $m/z = 440,1$ im EI-Massenspektrum deutlich, dass die Verbindung **63** entstanden ist.

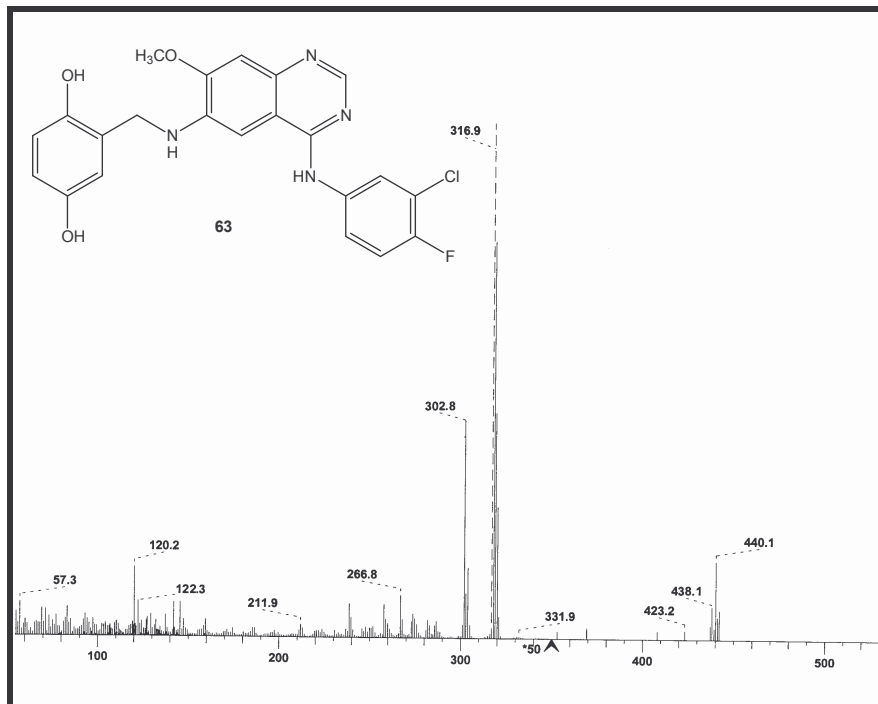


Abb. 101: EI-Massenspektrum von Substanz **63**

Die Interpretation der Massenspektren führt zu einem überraschenden Ergebnis.

Nach Abspaltung des Resonanz-stabilisierten Benzyl-Restes tritt ein Fragment mit $m/z = 317$ auf, das sich nach Eliminierung von Methyl in Form des durchkonjugierten Chinon-Imins ($m/z = 302$) wiederfindet. Daneben treten die oxidierte Chinon-Form **63a** ($m/z = 438$) und das freie Amin ($m/z = 318$) als Fragmente auf (**Abb. 102**).

Die Erkenntnisse aus dem EI- werden durch das FAB(+)- und das FAB(-)-Massenspektrum bestätigt.

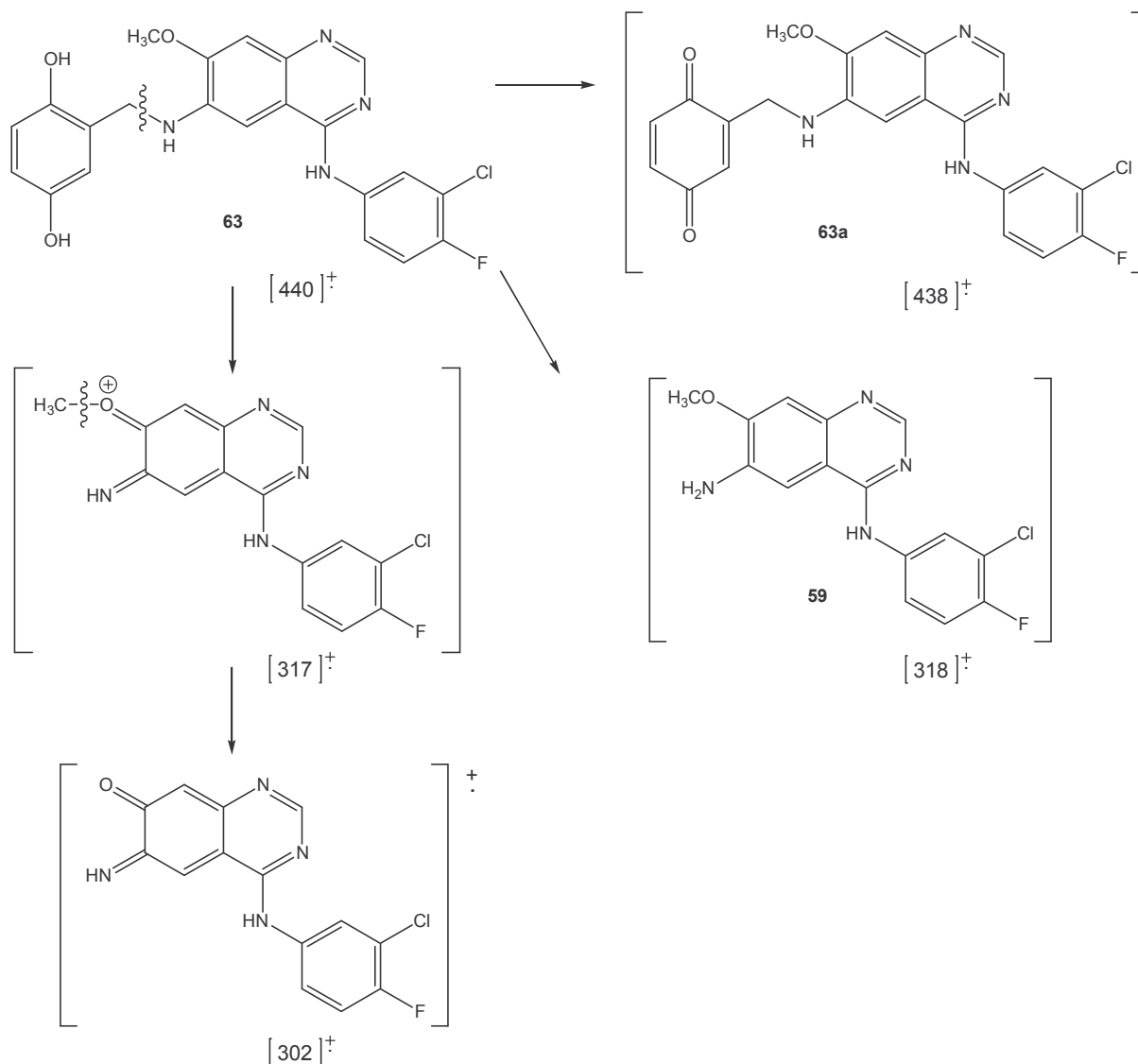


Abb. 102: Übersicht über Fragmentierung von Substanz **63**

Die Ergebnisse zeigen, dass aufgrund der Ausbildung des durchkonjugierten Systems mit Chinon-Imin-Struktur eine Abspaltung der Dihydroxybenzyl-Seitenkette und der Methyl-Funktion bevorzugt stattfinden können. Die Reaktion zum freien Amin **59** kann sich beeinträchtigend auf die Stabilität der Substanz auswirken.

Um die Stabilität zu überprüfen, wurde nach zwei Wochen aus derselben Probe wie auch für das Spektrum in **Abb. 100** erneut ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen (**Abb. 103**). Man erkennt deutlich, dass die Verbindung einem Zersetzungsprozess unterliegt, da neben den Signalen von Substanz **63** zusätzliche Signale auftauchen. Die Lage und das Aufspaltungsmuster der Signale beweist, dass neben **63** auch das freie Amin **59** enthalten ist. Verbindung **63** und **59** liegen, dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zufolge, in einem Verhältnis von 2:1 vor.

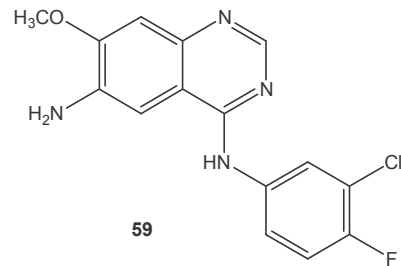
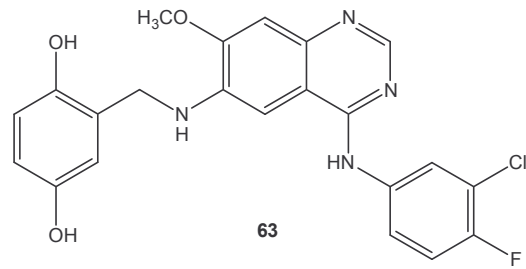
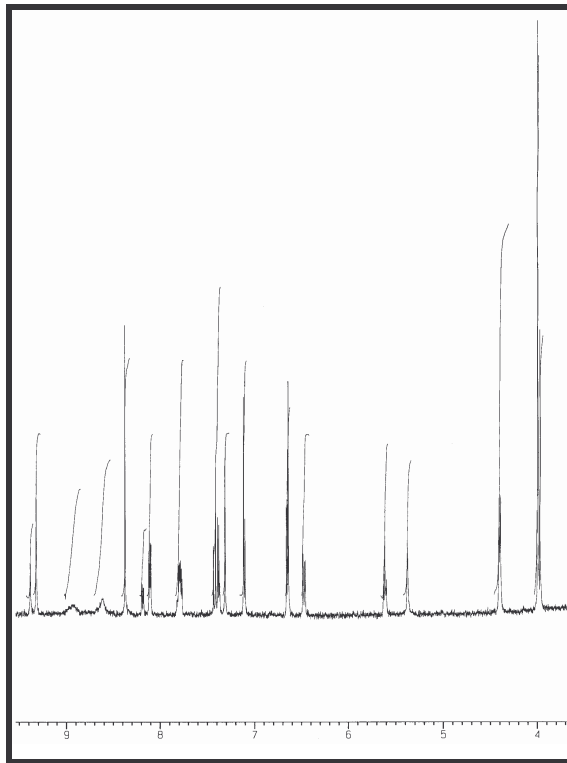


Abb. 103: ^1H -NMR-Spektrum von Substanz **63** nach zwei Wochen

Obwohl sich die Verbindung nach einigen Wochen als instabil erwies, wurden ihre Tyrosinkinase-inhibitorischen Eigenschaften untersucht, da sie aufgrund der 6,7-Disubstitution besonders für die Wirkungssteigerung prädestiniert scheint.

3.3.2.3 EGFR-TK-inhibitorische Eigenschaften der 6,7-disubstituierten Verbindung 63

Das nachfolgend abgebildete 4-Anilinochinazolin-Derivat **63** mit Lavendustin A-Teilstruktur wurde sofort, nach seiner Identifizierung mit Hilfe der Massenspektroskopie, auf seine *in vitro*-EGFR-TK-inhibitorischen Eigenschaften überprüft (**Abb. 104**).

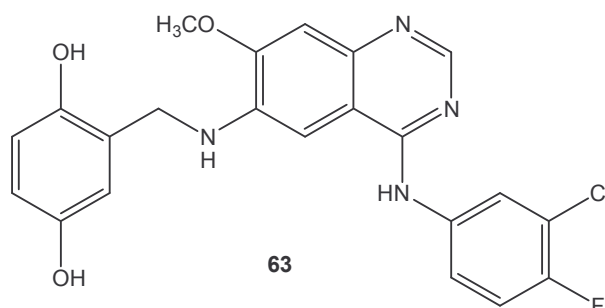


Abb. 104: Auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestete Verbindung **63**

Die in **Abb. 105** dargestellte inhibitorische Aktivität wurden durch die Firma MDS Pharma Services–Discovery, Taiwan (R.O.C), ermittelt. Bei dem dazu durchgeführten Test handelt es sich um einen Enzymassay^{150,151,152}.

| Ausgewählte Substanz | Konzentration in μM | EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in % |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| 63 | 0,1 | 39 |

Abb. 105: Tabellarische Darstellung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität von Substanz **63**

Das 4-Anilinochinazolin **63** zeigt sogar in der geringeren Konzentration von 0,1 μM eine sehr gute inhibitorische Aktivität von 39 Prozent. Die Hemmung der EGFR-Tyrosinkinase liegt demnach fast in dem Bereich der inhibitorischen Wirkung der von ALBUSCHAT entwickelten Verbindung **RA70**, die bisher in unserer Arbeitsgruppe mit 45 Prozent bei gleicher Konzentration die besten Ergebnisse geliefert hat. Bei Verbindung **RA70** handelt es sich allerdings um ein Bromanilino-Derivat, die zwar bessere EGFR-TK-inhibitorische Aktivität zeigen, aber schlechtere zytotoxische

Eigenschaften besitzen. Die entsprechende Chlor-fluoranilino-Verbindung **RA71** weist hingegen mit 22 Prozent eine deutlich schlechtere EGFR-TK-inhibitorische Wirkung auf als das Chlor-fluoranilino-Derivat **63** mit zusätzlicher Methoxy-Substitution in Position 7 (**Abb. 106**).

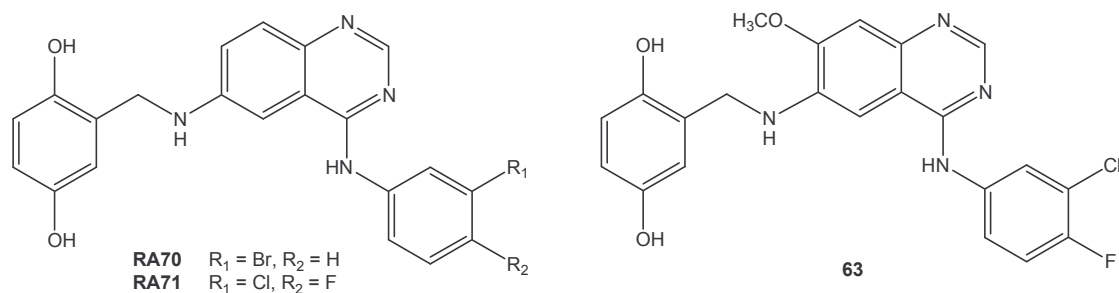


Abb. 106: Auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestete Verbindung **63** und die Substanzen **RA70** und **71**

Obwohl nicht sichergestellt werden kann, dass bei der Testung nur Substanz **63** vorliegt, oder ob durch den erläuterten Zersetzungsprozess ein Gemisch der Verbindungen **63** und **59** vorliegt, deutet das Ergebnis auf eine sehr gute Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase hin.

Der Einbau eines Substituenten mit Elektronen-Donator-Effekt in Position 7 führt demnach zu einer Steigerung der EGFR-TK-inhibitorische Aktivität von 4-Anilinochinazolinen. Eine Verbesserung der Löslichkeit, die sich eventuell in einer verbesserten Penetrationsfähigkeit der Substanzen durch die Zellmembran niederschlägt, könnte für eine Aktivitätssteigerung der EGFR-TK-Inhibitor verantwortlich sein.

Zusätzlich zur Testung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität wäre es erwägenswert die zytotoxische und VEGFR-TK-inhibitorische Aktivität von Substanz **63** zu untersuchen. Dazu müsste aber die Stabilität der Substanz zu garantieren sein und finanziell akzeptable Testmodelle zur Verfügung stehen.