

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Verbindungen mit Proteinkinase-VEGFR- und EGFR-TK-inhibitorischer Aktivität.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Staurosporin-verwandte Verbindung **7** synthetisiert werden, die als heterozyklische Untereinheit einen 4-Pyronring aufweist und zu einer neuen Gruppe VEGFR-TK-Inhibitoren führen sollte. Staurosporin ist ein aus *Streptomyces staurosporeus* gewonnener Proteinkinase-Inhibitor (**Abb. 108**).

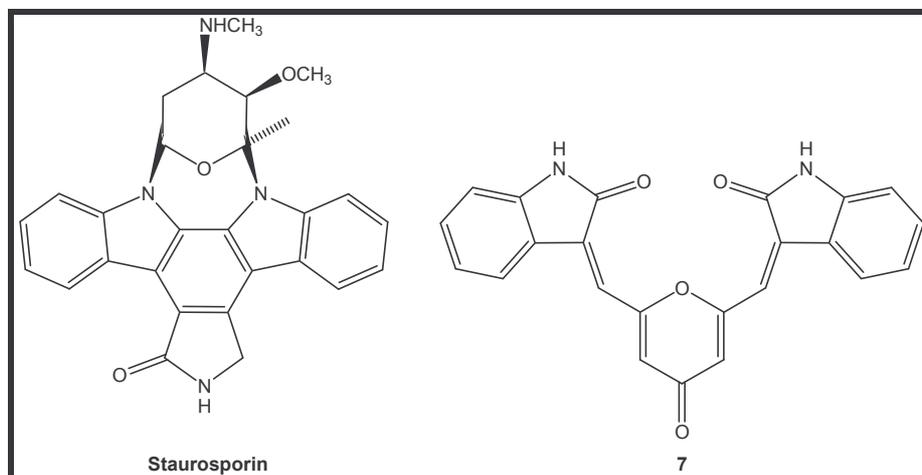


Abb. 108: Der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin und die Staurosporin-verwandte Substanz **7**

Ein wichtiger Synthesebaustein auf dem Weg zur geplanten Verbindung **7** ist der Dialdehyd **6**. Dessen Herstellung erfolgte ausgehend von der Chelidonsäure **1**, die in den Diethylester **2** übergeführt wurde. Nach der Reduktion von **2** entstand der Dialkohol **3** in zufriedenstellender Ausbeute (**Abb. 109**).

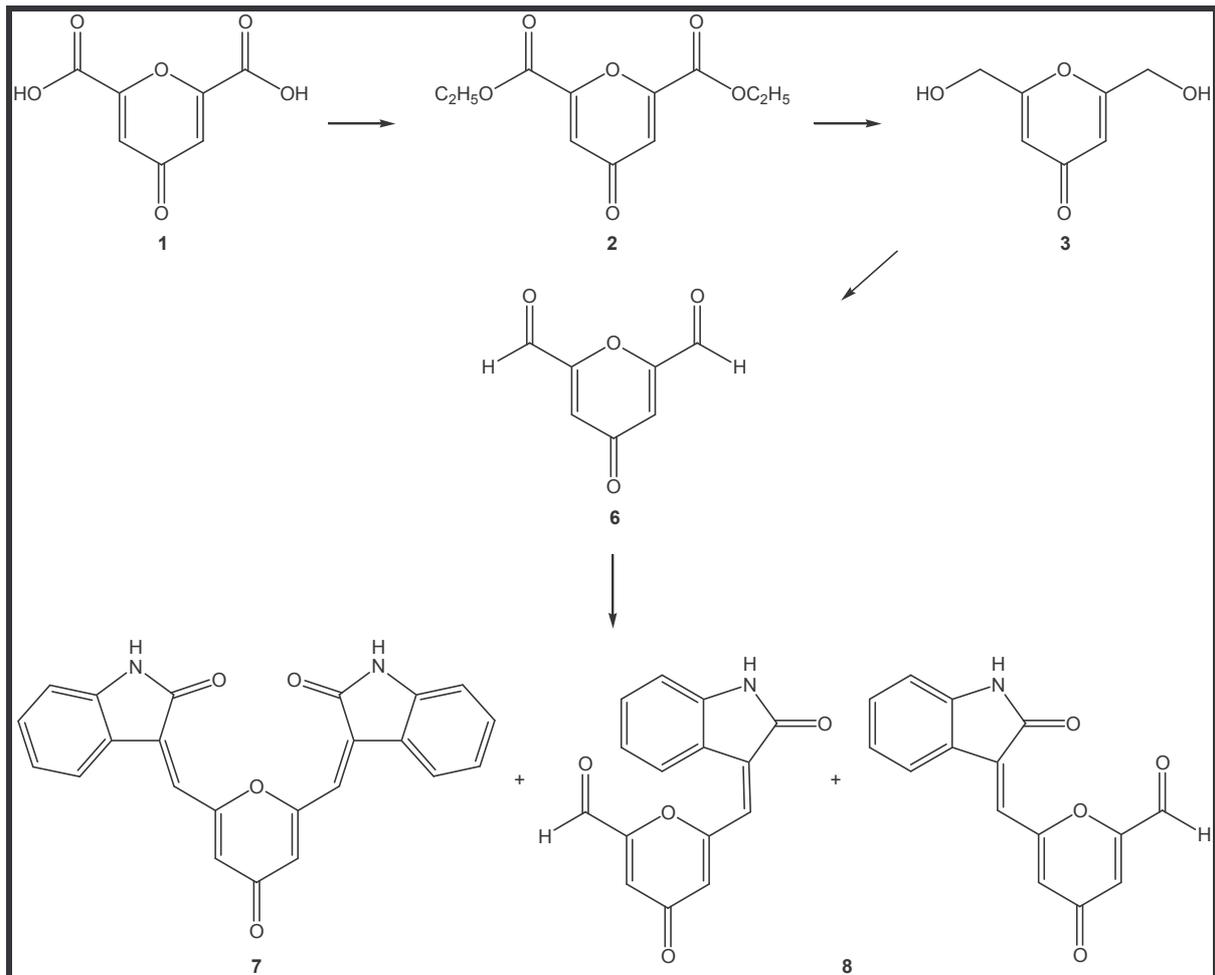


Abb. 109: Synthese von Substanz 7

Aus dem Dialkohol **3** wurde dann der Dialdehyd **6** nach Reaktion mit Nitriersäure gebildet. Dabei wird vermutlich Salpetersäure aus den O-Nitraten eliminiert. Im letzten Syntheseschritt wurde der Dialdehyd **6** mit zwei Molekülen des 2-Indolinons in einer Knoevenagel-Reaktion zur Zielverbindung **7** kondensiert. Neben der biskondensierten Verbindung **7** entstand die monokondensierte Verbindung **8**. Die Auftrennung der Substanzen **7** und **8** scheiterte allerdings aufgrund mangelnder Löslichkeit der Verbindungen (**Abb. 109**).

Im zweiten Teil der Arbeit wurden potentielle VEGFR-TK-Inhibitoren hergestellt. Eine der Zielverbindungen war der Prototyp **19**, der eine 4-Pyridon-Untereinheit besitzt (**Abb. 110**).

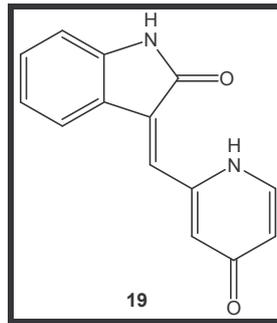


Abb. 110: Der Prototyp **19**

Als Leitstrukturen für dessen Entwicklung dienten die von der Firma Sugen/Pharmacia hergestellten und als potente VEGFR-TK-Inhibitoren beschriebenen Substanzen SU5416, SU6668 und SU11248, die das Strukturelement eines Pyrrol-2-ylmethyliden-substituierten 2-Indolinons aufweisen (**Abb. 111**).

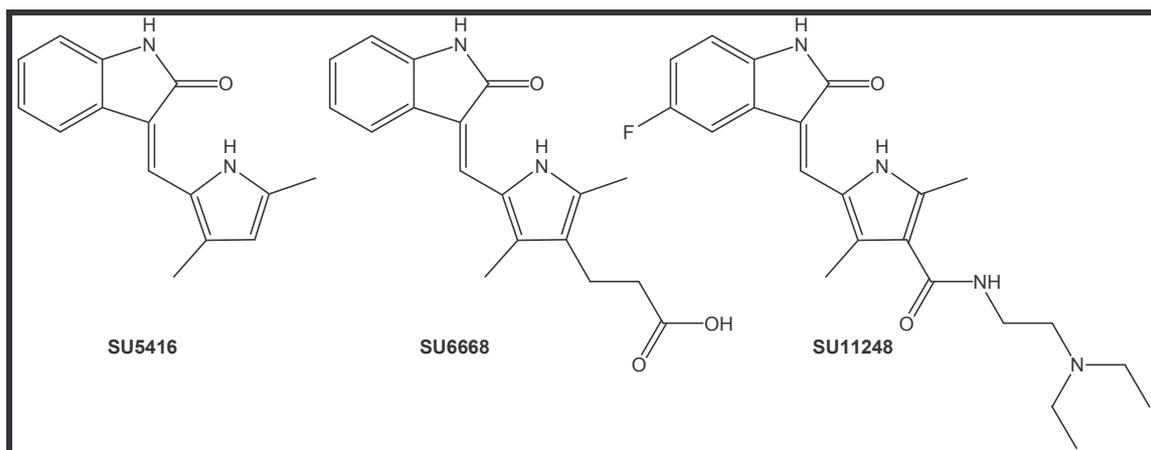


Abb. 111: Leitstrukturen für die Entwicklung potenter VEGFR-TK-Inhibitoren

Hinsichtlich der Konfiguration hat sich das *Z*-Isomer als aktiv gegenüber der VEGF-Tyrosinkinase erwiesen.

Die in **Abb. 112** dargestellte Synthese von Verbindung **19** erfolgte ausgehend von der Chelidonsäure **1**, die partiell verestert wurde. Das entstandene Monoethylchelidonat **12** wurde zum Ethylcomanat **13** decarboxyliert. Nach anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid wurde der Monoalkohol **14** erhalten. Die Oxidation dieses Alkohols **14** zum Aldehyd **16** und seiner geminalen Dioform **16a** erfolgt durch Reaktion mit Nitriersäure. Da der Monoaldehyd nur mit schlechten

Ausbeuten (38%) entstand, wurde die Oxidation durch Veränderung der Reaktionsbedingungen verbessert. Mit aktivem Mangan(IV)-oxid in einem Lösungsmittelgemisch aus gleichen Teilen Methanol/Aceton/Dichlormethan konnte eine Ausbeutesteigerung (48%) erzielt werden.

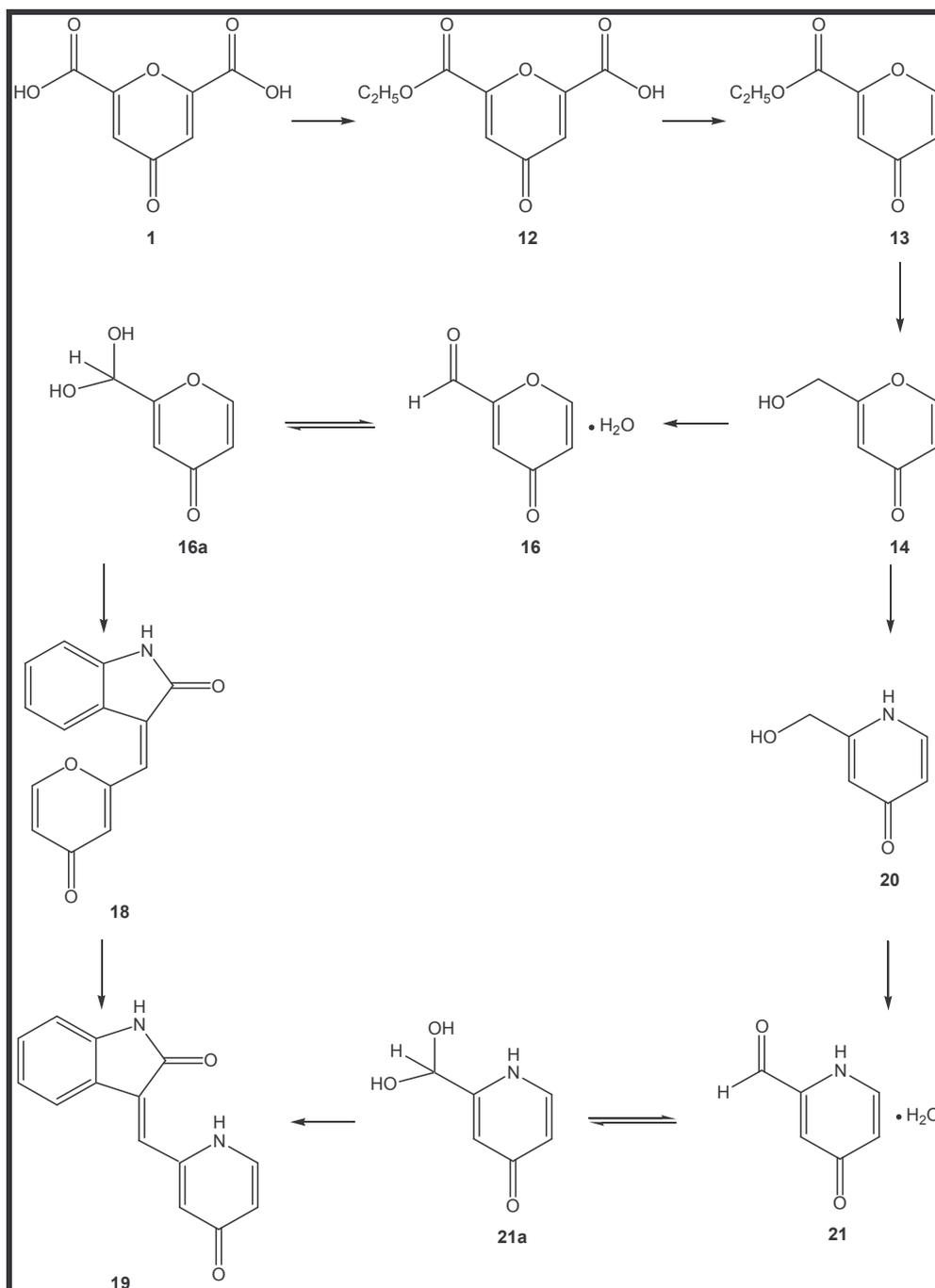


Abb. 112: Synthese des Prototypen **19**

Dieser Aldehyd **16** wurde mit 2-Indolinon zu Substanz **18** kondensiert. Die Röntgenkristallaufnahme zeigte deutlich, dass es sich bei **18** um das unerwünschte

E-Isomer handelte. Die abschließende Ringtransformation wurde zum 4-Pyridon mit Ammoniumacetat in Essigsäure durchgeführt. Diese Ringtransformation erfolgte unter Konfigurationsänderung vom *E*-Isomer bei Verbindung **18** zum *Z*-Isomer bei Verbindung **19** (**Abb. 112**).

Zusätzlich konnte Substanz **19** auch auf andere Art synthetisiert werden. Bereits beim Monoalkohol **14** wurde in einer Ringtransformationsreaktion das 4-Pyridon **20** hergestellt, dessen Oxidation mit aktivem Mangan(IV)-oxid zu einem Gleichgewicht aus 4-Pyridon-2-carbaldehyd Hydrat **21** und dessen geminaler Diolform **21a** führte. Durch Umsetzung des Pyridon-Aldehyds mit 2-Indolinon gelangte man dann ebenfalls zum Produkt **19** (**Abb. 112**).

Da eine VEGFR-TK-Testung aus Kostengründen nicht möglich war, konnte lediglich eine Untersuchung auf Zytotoxizität am National Cancer Institute, Bethesda, Maryland (USA) durchgeführt werden. Die Untersuchung auf Zytotoxizität erfolgte in *in vitro*-Zelltests. Gegenüber der MCF-7-Brustkrebs-, der NCI-H460-Lungenkrebs- und der SF-268-Zelllinie für das Zentrale Nervensystem zeigte Substanz **19** in einer Konzentration von 100 μ M keine Wachstumshemmung.

Eine Weiterentwicklung zu Verbindung **19** stellte die Substanz **27** dar, die in Position 5' der 4-Pyridon-Untereinheit eine Alkoxy-Gruppe besitzt. Diese Struktur ist an die Sugen/Pharmacia Verbindung SU11248 angelehnt, die einen Substituenten in Position 4' des Pyrrol-Ringes besitzt und erhöhte VEGFR-TK-inhibitorische Aktivität aufweist (**Abb. 113**).

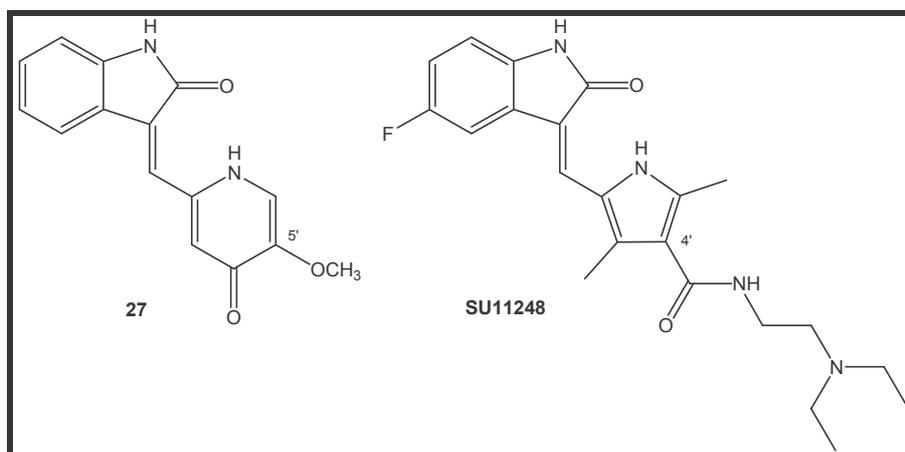


Abb. 113: Substanz **27** und der potente VEGFR-TK-Inhibitor SU11248

Die Synthese von Verbindung **27** erfolgte analog dem in **Abb. 114** dargestellten Schema. Als Ausgangssubstanz für die Synthese wurde die Kojisäure (**22**) verwendet, deren Hydroxygruppe in Position 5 mit p-Toluolsulfonsäuremethylester selektiv methyliert wurde. Substanz **23** wurde dann mit aktivem Mangan(IV)-oxid zum Aldehyd **25** oxidiert und mit 2-Indolinon zu **26** kondensiert.

Dieser Weg scheiterte jedoch, da der geplante Austausch des Ringsauerstoffs bei **26** durch NH zu Verbindung **27** trotz vielfältiger Variation der Reaktionsbedingungen nicht gelang.

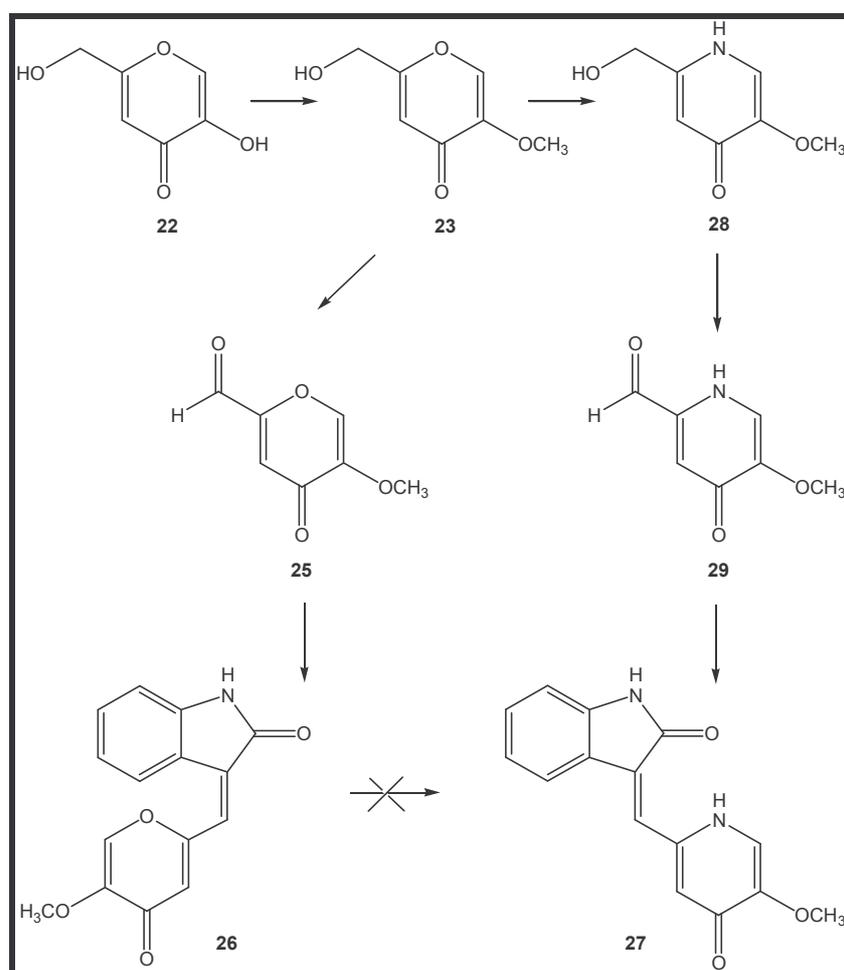


Abb. 114: Synthese von Substanz **27**

Zum Ziel führte der in **Abb. 114** dargestellte Weg, bei dem der Ligandenaustausch nicht erst auf der letzten Synthese-Stufe erfolgte. Hier wurde der Pyron-Sauerstoff bereits auf der Stufe des 2-Hydroxymethyl-5-methoxy-4-pyrone (**23**) gegen NH zum entsprechenden 4-Pyridon **28** ausgetauscht.

Nach Oxidation des Alkohols zum 4-Pyridon-Aldehyd **29** erfolgte im letzten Schritt eine Knoevenagel-Kondensation mit 2-Indolinon zum gewünschten Z-Isomer der Zielverbindung **27**.

Die Untersuchungen der zytotoxischen Aktivität von Substanz **27** durch das National Cancer Institut (USA) an getesteten Brust-, Lungen- und ZNS-Zelllinien zeigten eine deutlich verbesserte Wachstumshemmung verglichen mit Substanz **19**. Bei einer Konzentration von 100 μM mit einer 55-prozentigen Wachstumshemmung wurde gegenüber der Lungenkrebszelllinie das beste Ergebnis erzielt. Dieses Ergebnis ist nicht unbedingt mit einer VEGFR-TK-Inhibition zu korrelieren.

Da durch die Ergebnisse bestätigt wurde, dass eine Alkoxy-Substitution in Position 5' der 4-Pyridon-Untereinheit zu einer Wirkungsverbesserung führte, sollte nach Demethylierung von Substanz **27** ein langkettiger Ether durch Umsetzung mit Bromessigsäure hergestellt werden (**Abb. 115**).

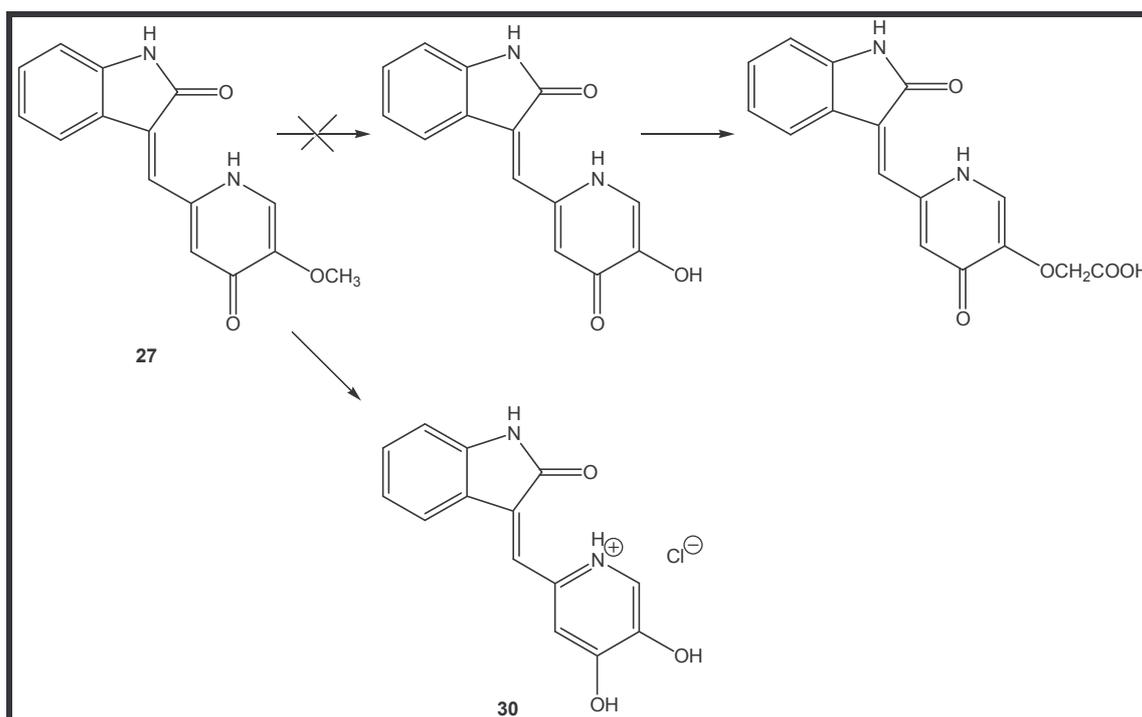


Abb. 115: Geplante Synthese zur Einführung eines Substituenten

Da jedoch schon der erste Syntheseschritt, nämlich die Demethylierung von Substanz **27** nicht zur geplanten Hydroxy-Funktion führte, sondern ein Hydrochlorid

eines dihydroxylierten Pyridin-Derivates **30** entstanden war, wurde die Herstellung gestoppt. Es wurden unbrauchbare Diether erwartet.

Im Folgenden wurde nun versucht Substanz **34** herzustellen, bei der die Seitenkette in Position 5' auf einem anderen Weg eingeführt werden sollte. Dazu wurde die Hydroxy-Gruppe bereits bei auf der Stufe der Kojisäure **22** in Position 5 verethert (**Abb. 116**).

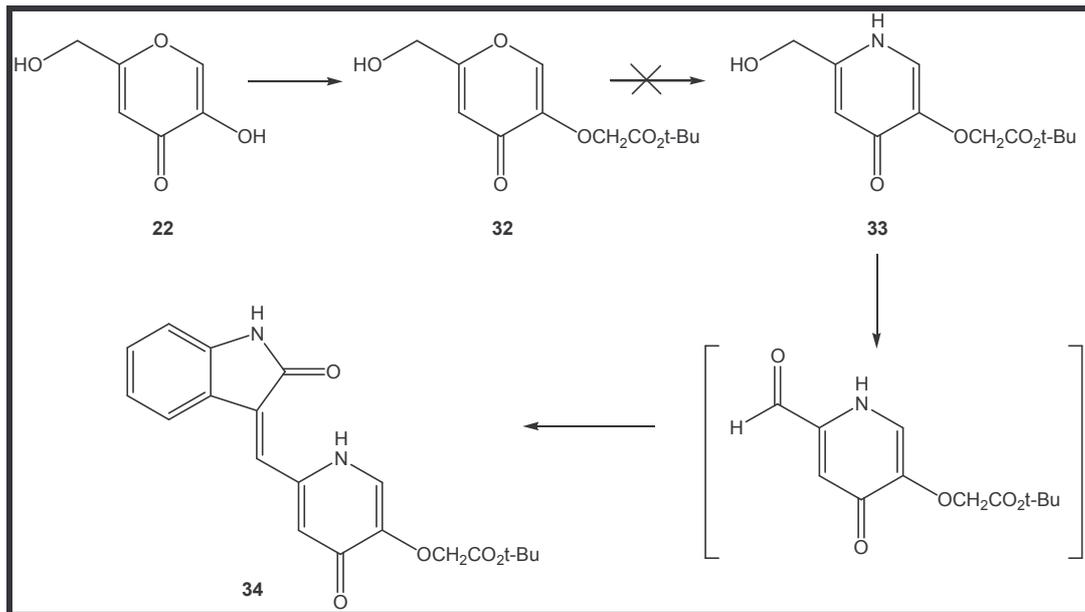


Abb. 116: Geplante Synthese zur Einführung eines Substituenten

Die Veretherung wurde mit Bromessigsäuretertbutylester durchgeführt. Das entstandene 4-Pyron **32** konnte auch nach zahlreichen Variationen der Reagenzien und der Reaktionsbedingungen nicht zum Pyridon **33** umgesetzt werden. Deshalb scheiterte die Synthese der geplanten Verbindung **34** bereits auf dieser Stufe.

Zur Vervollständigung der von Sugen/Pharmacia entwickelten 3-substituierten 2-Indolinone wurden zwei weitere bislang unbekannte Imidazol-Derivate **35** und **36** hergestellt (**Abb. 117**).

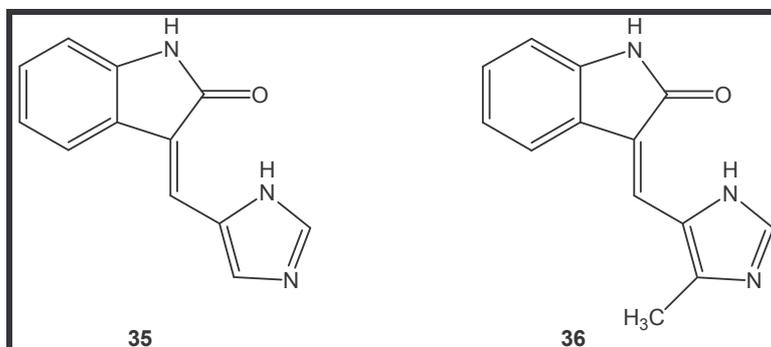


Abb. 117: Substanzen **35** und **36**

Durch Kondensationen von 2-Indolinon mit den entsprechenden Imidazol-Aldehyden wurden die Verbindungen **35** und **36** erhalten.

Die Untersuchungen auf zytotoxische Aktivität mit der Lungenkrebszelllinie durch das National Cancer Institute (USA) ergaben für Substanz **36** lediglich eine 79-prozentige Wachstumshemmung bei einer Konzentration von 100 μM . Eine Hemmwirkung gegenüber der Brustkrebs- und der ZNS-Zelllinie konnte nicht nachgewiesen werden.

Obwohl die Schwierigkeiten der Synthesen bei den bisher beschriebenen Indol-Derivaten überwunden werden konnten, erfüllten die Verbindungen in den pharmakologischen Tests nicht die in sie gesetzten Erwartungen. Deshalb wurden VEGFR-TK-Inhibitoren der 4-Anilinochinazolin-Familie angestrebt. Solche Verbindungen können neben VEGFR-TK-Inhibition auch bemerkenswerte EGFR-TK-inhibitorische Aktivität zeigen.

Die Konzeption solcher 4-Anilinochinazoline als EGFR-TK-Inhibitoren stützt sich zunächst auf Ergebnisse von ALBUSCHAT, die ringoffene Salicylanilide mit bemerkenswerter EGFR-TK-inhibitorischer Aktivität entwickelt hatte.

Solche Salicylanilide weisen eine Lavendustin A-Teilstruktur auf (**RA61** und **RA62**, **Abb. 118**). Lavendustin A ist ein aus *Streptomyces griseolavendus* isolierter, potenter *in vitro*-EGFR-TK-Inhibitor mit der pharmakophoren Teilstruktur **O1** (**Abb. 118**).

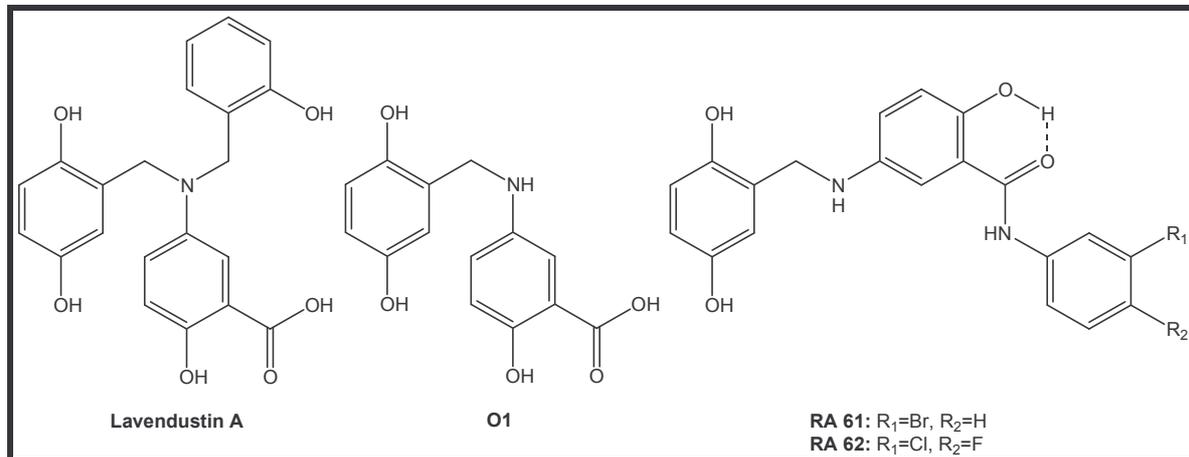


Abb. 118: Lavendustin A und dessen Pharmakophor **O1**

Zunächst sollte das Chinazolin **40** ohne 4-Anilino-Rest hergestellt werden, bei dem der Salicylsäure-Anteil des Lavendustin A-Pharmakophors in der bioisosteren Chinazolin-Form fixiert wird (**Abb. 119**).

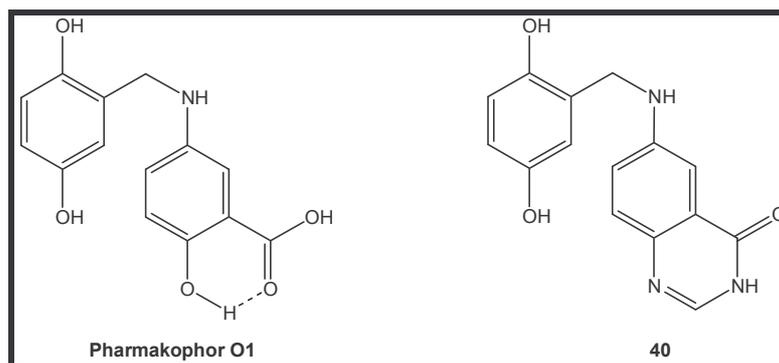


Abb. 119: Substanz **40** und das Pharmakophor **O1**

Wie in **Abb. 120** dargestellt ist, wurde zunächst der Ringschluss zum Chinazolin **37**, ausgehend von 5-Nitroanthranilsäure, mit Formamid durchgeführt. Nach Reduktion der Nitro-Gruppe von **37** zum Amin **38** mit Eisenspänen in Ethanol/Eisessig folgte eine Kondensation mit dem käuflich erworbenen 2,5-Dihydroxybenzaldehyd zum Azomethin **39**.

Im abschließenden Syntheseschritt wurde die Zielstruktur **40** durch eine selektive Reduktion der Imino-Funktion zugänglich.

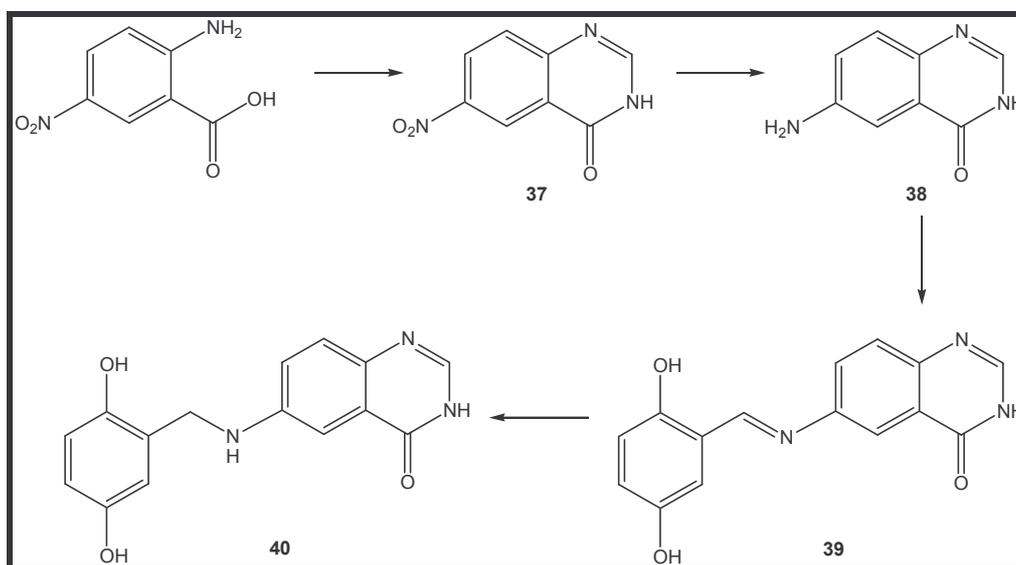


Abb. 120: Synthese von Substanz **40**

Die hergestellte Substanz wurde in einer Konzentration von 1 μM auf ihre EGFR-TK-inhibitorische Aktivität durch die Firma MDS Pharma Services-Discovery, Taiwan (R.O.C.) getestet. Mit einer EGFR-TK-Inhibition von nur 17 Prozent bei einer Konzentration von 1 μM weist die Substanz **40** eine nur schwache Aktivität auf.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden zur Wirkstoffoptimierung Chinazoline entwickelt, die in Position 4 einen Anilino-Substituenten tragen. Die in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Verbindungen **RA70** und **RA71** zeigten die besten Wirkungen (**Abb. 121**).

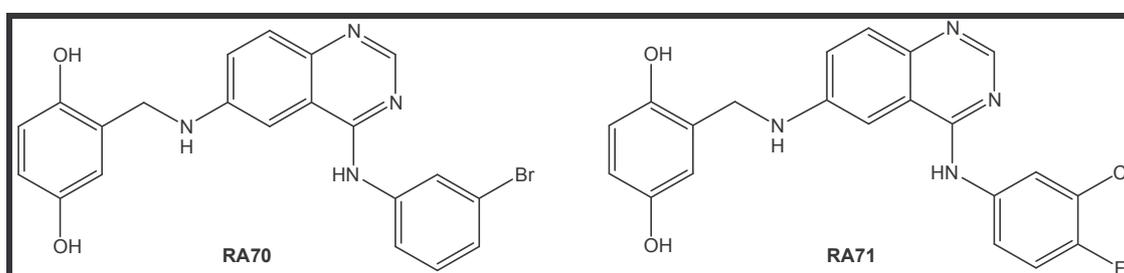


Abb. 121: Die 4-Anilinochinazoline **RA70** und **RA71**

Im folgenden Kapitel wurden diese Substanzen mit Elektronen-Donatoren in Position 7 des Chinazolin-Grundgerüsts zusätzlich substituiert. Zu diesem Zweck sollten zunächst die Substanzen **54** und **55** synthetisiert werden, die zwei Substituenten in Position 6 und 7 des Chinazolins aufweisen. Die Morpholin-4-ylpropoxy-Seitenkette hat sich schon bei dem potenten EGFR-TK-Inhibitor Iressa® als Aktivitäts-fördernd erwiesen (**Abb. 122**).

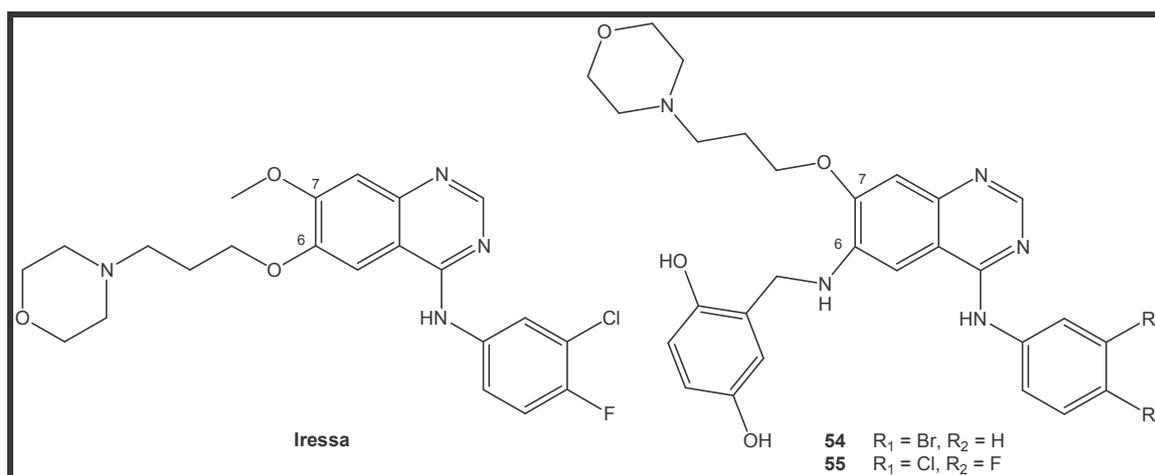


Abb. 122: Iressa® und die Substanzen **54** und **55**

Die Herstellung von **54** und **55** wurde ausgehend von 4-Fluoranthranilsäure (**42**) begonnen, um den Morpholin-4-ylpropoxy-Substituenten durch einen Austausch gegen Fluor im späteren Verlauf der Synthese einführen zu können. Da die Verbindung **42** nur teuer zu beziehen war, wurde sie durch Oxidation von 4-Fluor-2-nitrotoluol mit Kaliumpermanganat und anschließender Reduktion mit einer Mischung aus Eisenpulver und Eisenspänen unter Zusatz von Eisessig hergestellt.

Der Ringschluss der Anthranilsäure zum Chinazolin **43** erfolgte mit Formamidinacetat (**Abb. 123**).

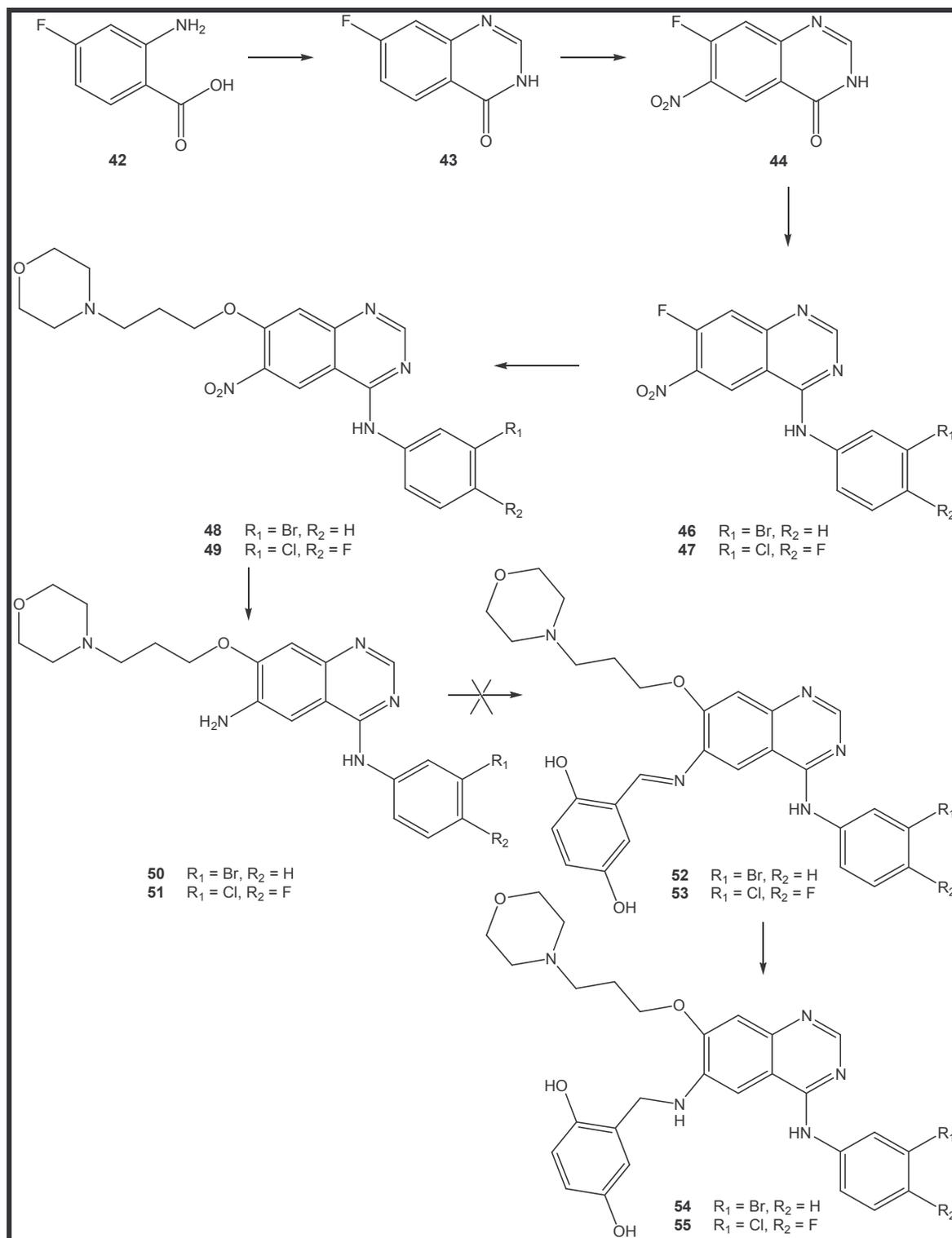


Abb. 123: Syntheseverlauf zur Herstellung der Substanzen **54** und **55**

Anschließend wurde Verbindung **43** zu **44** nitriert. Durch die Umsetzung von **44** mit 3-Brom- bzw. 3-Chlor-4-fluoranilin gelangte man zu den 7-Fluor-6-nitrochinazolinen **46** und **47**.

Anschließend wurde der Fluor- gegen den Morpholin-4-ylpropoxy-Substituenten ausgetauscht, so dass man die Substanzen **48** und **49** erhielt.

Exemplarisch wurde der Synthesepfad mit Substanz **49** weitergeführt, da aus pharmakologischen Untersuchungen bekannt ist, dass die 4-(3-Chlor-4-fluor)anilinochinazoline eine bessere zytotoxische Aktivität aufweisen.

Nach Reduktion der Nitro- zur Amino-Funktion gelangt man zu Substanz **51**.

Die Einführung der Seitenkette in Position 6 sollte durch eine Kondensation des primären aromatischen Amins **51** mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd erfolgen. Trotz vielfältiger Variation der Reaktionsbedingungen konnte eine Substitution in Position 6 nicht gelingen. Eine mögliche Erklärung könnte eine sterische Hinderung durch den großen Morpholin-4-ylpropoxy-Rest in der Nachbarposition 7 bieten.

Deshalb wurde die Einführung eines kleineren Substituenten, nämlich einer Methoxy-Gruppe, in Position 7 versucht. Über einen ähnlichen Syntheseweg, der bei der Herstellung der Verbindungen **54** und **55** angewendet wurde, sollten die Substanzen **62** und **63** synthetisiert werden (**Abb. 124**).

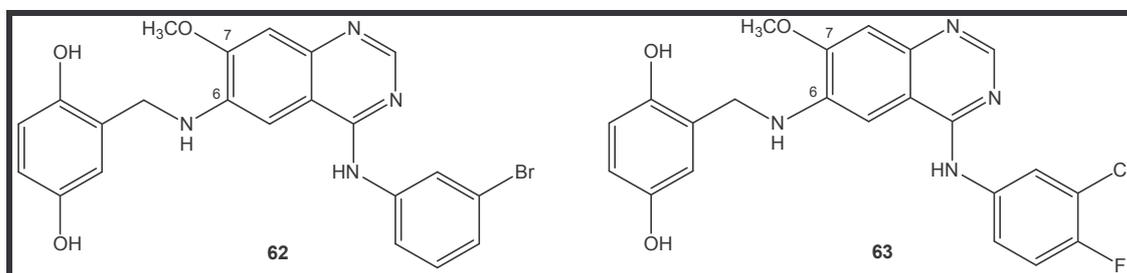


Abb. 124: Substanzen **62** und **63**

Zu diesem Zweck wurde von den Fluornitrochinazolinen **46** und **47** ausgegangen. Ein Austausch des Fluor-Substituenten gegen die Methoxy-Gruppe führte zu den Verbindungen **56** und **57** (**Abb. 125**).

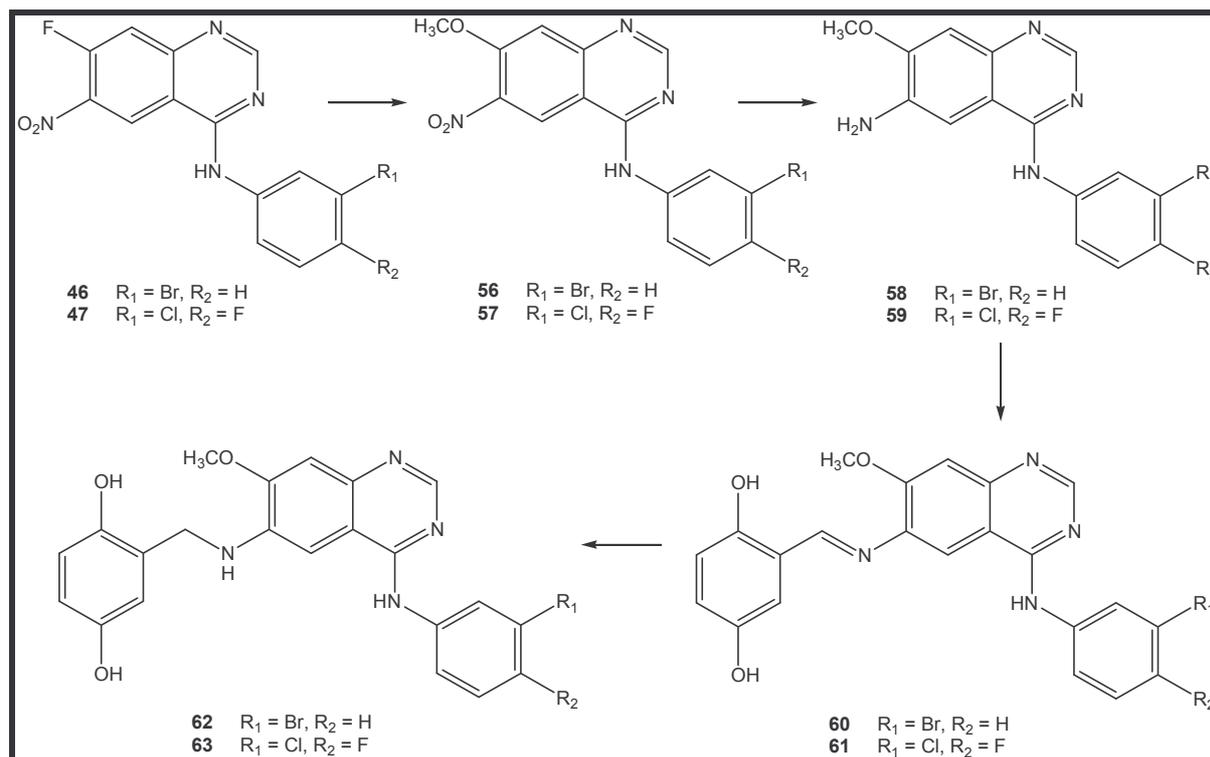


Abb. 125: Synthese der Verbindungen **62** und **63**

Aus **56** und **57** wurden nach einer Reduktion die Substanzen **58** und **59** erhalten. Die Reduktion mit Eisen konnte nicht in Eisessig durchgeführt werden, da dabei der Methoxy-Substituent eliminiert wurde. Die Reduktion fand unter Zusatz von wenig verdünnter Essigsäure statt.

Die Einführung der Seitenkette in Position 6 gelang durch Kondensation der primären aromatischen Amine **58** und **59** mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd.

Durch selektive Reduktion der Imino-Funktion in den resultierenden Schiff'schen Basen **60** und **61** gelangte man zu den Wunschverbindungen **62** und **63**.

Die Substanz **62** konnte nicht testrein erhalten werden. Auf ihre vollständige Aufreinigung wurde aber aufgrund der zu erwartenden schlechteren zytotoxischen Aktivität verzichtet.

Nach verschiedenen Versuchen zur Reinigung von Verbindung **63** gelang es mit Hilfe der präparativen HPLC-Säulenchromatographie wenig Substanz sauber von Nebenprodukten abzutrennen, so dass eine Identifizierung mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zweifelsfrei möglich war.

Als weiterer Identitätsnachweis dienten massenspektroskopische Analysemethoden, die einen Molpeak bei $m/z = 440$ zeigten. Bemerkenswert war das Auftreten eines Fragments $m/z = 302$, das mit einer durchkonjugierten Chinon-Imin-Form in Einklang

zu bringen ist. Diese Struktur entsteht nach Eliminierung von Methyl aus der ursprünglichen Methoxy-Gruppe (**Abb. 126**).

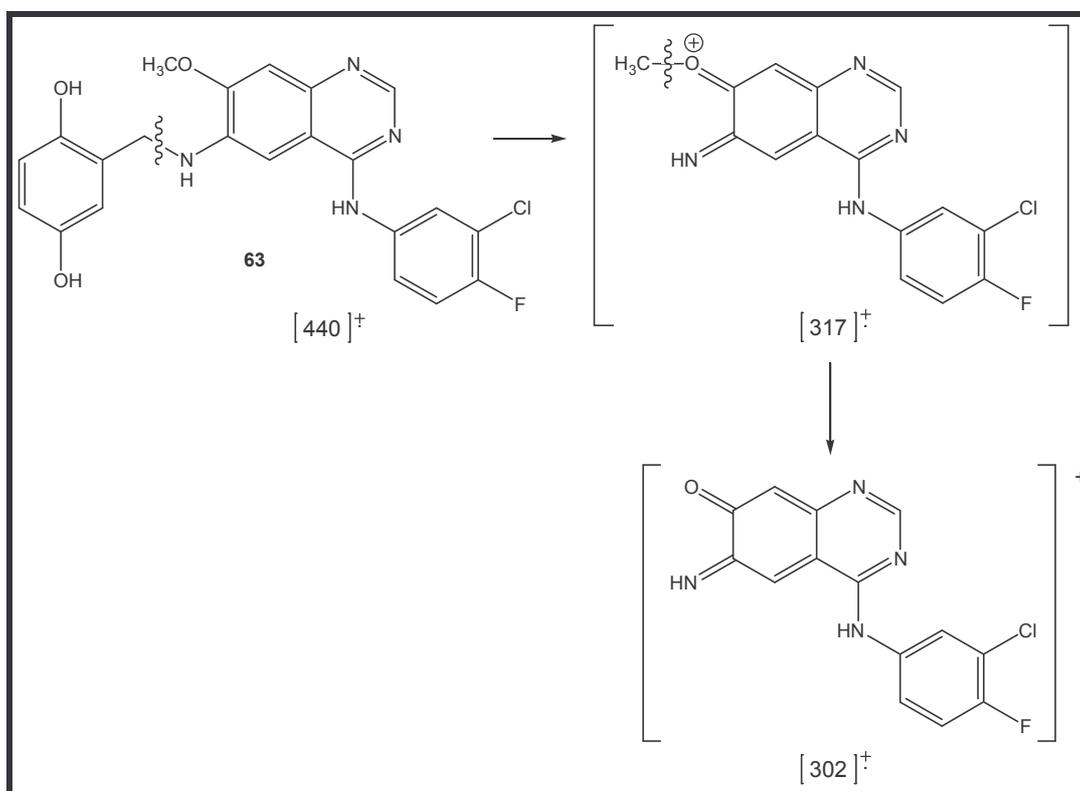


Abb. 126: Fragmentierung zur Chinon-Imin-Form

Dieses Ergebnis ist ein erster Hinweis auf Stabilitätsprobleme, die im Rahmen der Isolierung von **63** auftreten können. Zur Überprüfung der Stabilität von Substanz **63** wurde nach zwei Wochen erneut ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen, das eine Zersetzung der Verbindung bestätigte.

Dennoch wurde die Verbindung **63** sofort nach ihrer Identifizierung auf ihre EGFR-TK-inhibitorischen Eigenschaften untersucht. Obwohl nicht sichergestellt werden konnte, welchem Zersetzungsgrad die Substanz während der Testung unterlag, zeigte sie sogar bei der geringen Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ mit 39 Prozent eine hervorragende inhibitorische Wirkung.

Die 6,7-Disubstitution des 4-Anilinochinazolins **63** erwies sich demnach als Aktivitätssteigernd gegenüber der Verbindung **RA71** hinsichtlich der EGFR-TK-inhibitorischen Wirkung.

Aufgrund dieser bemerkenswerten EGFR-inhibitorischen Aktivität sollten weitere Anstrengungen unternommen werden, um die Stabilität der Verbindung **63** zu garantieren.