

3 Chemisch-Pharmakologischer Teil

3.1 Salicyloylindole mit zytotoxischer Wirkung

3.1.1 Entwicklung der Salicyloylindole

Die Entwicklung der Salicyloylindole in unserer Arbeitsgruppe lässt sich auf die geplante Synthese von Azarotenoiden zurückführen, welche aufgrund ihrer Verwandtschaft zu den Rotenonen eine insektizide Wirkung erwarten ließen. Darüber hinaus sind Rotenone als Fischgifte bekannt [70]. Die Azarotenoide stellen stickstoffhaltige Derivate der Rotenoide dar, von denen bislang nur Sauerstoff- und Schwefelderivate bekannt waren und die sich von dem Isoflavon-Derivat Rotenon ableiten (**Abb. 17**).

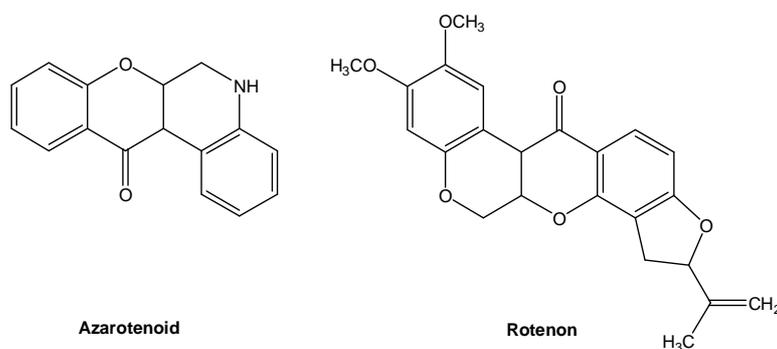
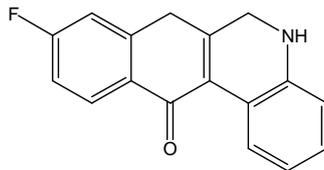


Abb. 17: angestrebtes Azarotenoide und Rotenon

Die Rotenoide werden aus den Wurzeln von bestimmten, in tropischen Regionen heimischen Leguminosen-Pflanzen (*Derris elliptica* und *Deguelia utilis*, *Fabaceae*) gewonnen. Sie hemmen den mitochondrialen Elektronentransport, indem sie die Elektronentransportkette in der Atmungskette unterbrechen. Ein zugelassenes Pflanzenschutzmittel existiert in Deutschland nicht [71-74].

Aus der Sicht des Synthetikers erschien die Herstellung der Azarotenoide wegen der als Zwischenstufe auftretenden Isoflavone besonders interessant. Allerdings verliefen viele geplante Wege zu dem gewünschten Azarotenoide **SW 40** (**Abb. 18**) nicht erfolgreich [75].

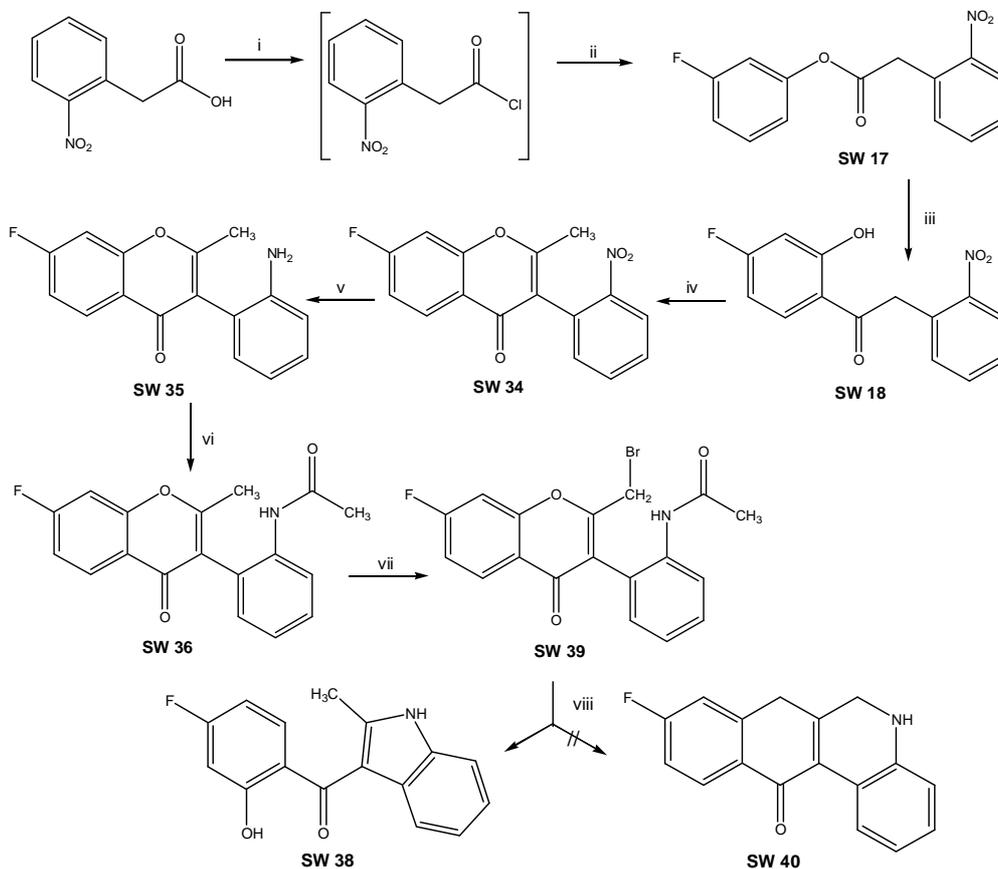


SW 40

Abb. 18: Gewünschte Verbindung SW 40

Retrosynthetische Betrachtungen favorisierten eine Reaktionsfolge, die in **Abb. 19** dokumentiert ist und im Einzelnen erläutert wird.

3.1.1.1 Herstellungsversuch von Verbindung SW 40



- i) Oxalylchlorid, Dichlormethan, RT; ii) 3-Fluorphenol, Triethylamin, ΔT ; iii) AlCl_3 , ΔT
 iv) Natriumacetat, Acetanhydrid, ΔT ; v) Pd/C, Cyclohexen, Ethanol, ΔT ; vi) Acetylchlorid, 1,4-Dioxan, RT;
 vii) NBS, Dibenzoylperoxid, Tetrachlorkohlenstoff, ΔT , viii) Natrium, Toluol, ΔT

Abb. 19: Versuchte Synthese von Verbindung SW 40

Zuerst wird Verbindung **SW 18** angestrebt. Dabei wird die 2-Nitrophenylessigsäure mit Oxalylchlorid in das Säurechlorid überführt. Dieses wird dann mit 3-Fluorphenol zum (3-

Fluorphenyl)2-nitrophenylacetat **SW 17** umgesetzt. Bei der folgenden Fries-Umlagerung bereitet die Wahl der optimalen Reaktionstemperatur einige Schwierigkeiten. Eine gute Umsetzung kann beobachtet werden, wenn zu der Schmelze von Verbindung **SW 17** bei 80°C portionsweise Aluminiumchlorid zugegeben wird und anschließend die Reaktionstemperatur über mehrere Stunden langsam auf 140°C erhöht wird. Eine Abtrennung der gewünschten Substanz **SW 18** erfolgt durch Überführung in das Phenolat, Abfiltrieren und anschließendem Ansäuern und Auskristallisieren.

Die auf diesem Wege erhaltene Verbindung **SW 18** wird dann mit Hilfe von Natriumacetat in Acetanhydrid erwärmt. Das Nitroisoflavin **SW 34** wird durch Reduktion mit Pd/C und Cyclohexen in Ethanol in das Aminoisoflavin **SW 35** überführt und dessen Aminogruppe anschließend mit Acetylchlorid in 1,4-Dioxan geschützt (**SW 36**). In einer Wohl-Ziegler-Bromierung wird die acylierte Verbindung **SW 36** mit NBS in Tetrachlorkohlenstoff zu Verbindung **SW 39** umgesetzt. Bei der Reaktion von **SW 39** mit Natrium in Toluol kann ausschließlich das ringoffene Salicyloylindol **SW 38** statt des gewünschten cyclisierten Produkts **SW 40** isoliert werden.

Auch weitere Versuche, die gewünschte Verbindung **SW 40** auf anderen Wegen herzustellen, missglückten [75]. Es ist aber als Erfolg zu werten, dass im Rahmen dieser Untersuchungen das Salicyloylindol **SW 38** erhalten wurde.

3.1.1.2 Salicyloylindole mit unsubstituiertem Indolteil

Aufgrund der Beobachtungen von *Biberger und v. Angerer* 1998, dass 1-Benzyl-2-phenylindole und 1,2-Diphenylindole zytotoxische Eigenschaften besitzen [76], wurden daraufhin von *Witzel* weitere Indolderivate konzipiert und auf ihre zytotoxischen Wirkungen untersucht. Um zunächst generelle Aussagen machen zu können, wurden Salicyloylindolderivate entwickelt, die am Indolring unsubstituiert blieben. Variationen wurden zunächst nur am Salicylsäureteil vorgenommen. Es entstanden somit die folgenden Verbindungen **SW 53**, **SW 57** und **SW 62** (**Abb. 20**).

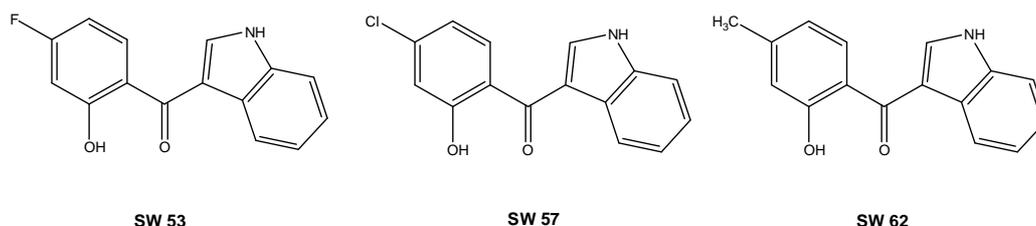
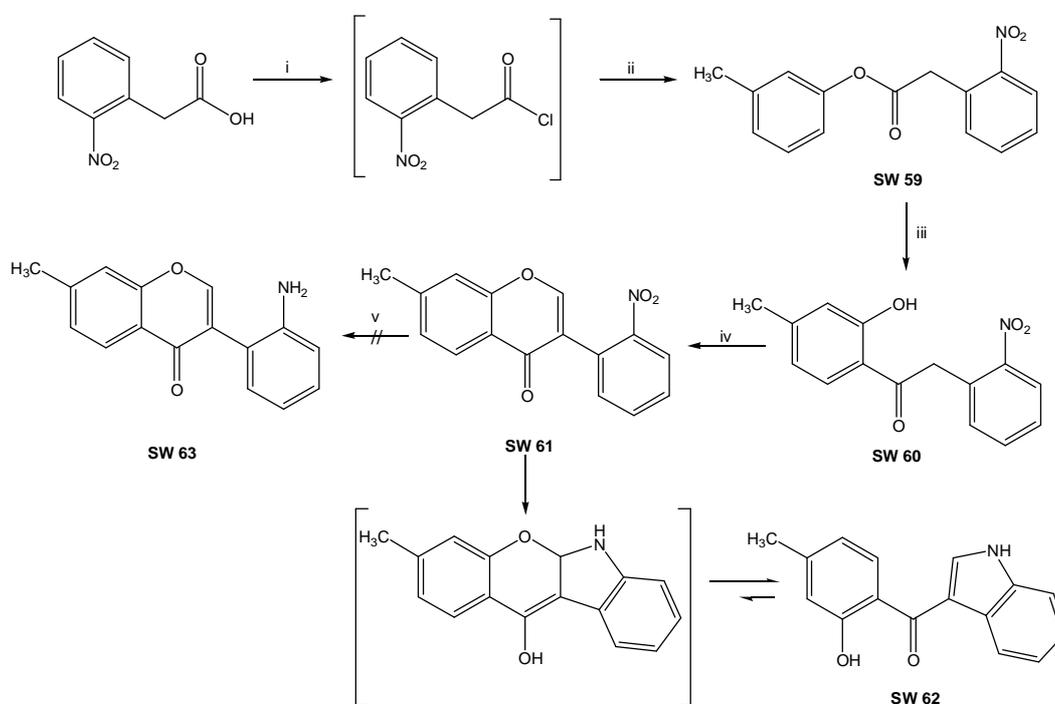


Abb. 20: Salicyloylindole nach *Witzel*

Die Variation der Substituenten am Salicylsäureteil erfolgte aufgrund einer Abstufung der induktiven Effekte von einem starken -I-Effekt des Fluors über einen geringeren des Chlors bis zu einem +I-Effekt der Methylgruppe. Hergestellt wurden die in **Abb. 20** gezeigten Verbindungen durch Reduktion der entsprechenden Fluor- Chlor- oder Methyl-2'-nitroisoflavone und anschließender Ringtransformation. Durch Reduktion der Nitro- zur Aminogruppe mit Pd/C und Cyclohexen in Ethanol wird diese in die Lage versetzt, wiederum an das C-2 des Chromons zu addieren und damit die bereits oben beobachtete Aminoisoflavon-Salicyloylindol-Ringtransformation einzuleiten. Die jeweiligen 2'-Nitroisoflavone wurden wiederum ausgehend von der 2-Nitrophenylessigsäure synthetisiert. Stellvertretend für die drei Salicyloylindole soll in **Abb. 21** der Syntheseweg von Verbindung **SW 62** erläutert werden.



- i) Oxalylchlorid, Dichlormethan, RT; ii) 3-Methylphenol, Triethylamin, Ether, ΔT ; iii) AlCl_3 , ΔT ;
iv) *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal, ΔT ; v) Pd/C, Cyclohexen, Ethanol, ΔT

Abb. 21: Herstellung der Verbindung **SW 62**

Die Synthese geht von der Bildung des Säurechlorids der 2-Nitrophenylessigsäure mit Hilfe von Oxalylchlorid aus. Dieses wird in einem nächsten Schritt mit *m*-Kresol zum Ester **SW 59** umgesetzt und dieser einer Fries-Umlagerung unterworfen, so dass Verbindung **SW 60** erhalten wird. Die Umsetzung mit *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal liefert die Verbindung **SW 61**, welche durch Reduktion mit Pd/C und Cyclohexen in Ethanol nach Ringschluss Verbindung **SW 62** ergibt und nur als Nebenprodukt das gewünschte Aminoisoflavon **SW 63**.

Die drei Verbindungen **SW 53**, **57** und **62** wurden in einer Konzentration von 5 μM auf ihre Zytotoxizität an humanen MCF-7-Zelllinien untersucht. Der Name leitet sich von der Michigan Cancer Foundation ab. Sie stellen die am häufigsten für humanen Brustkrebs genutzten Zelllinien dar und sind sowohl estrogen- als auch EGFR-abhängig [77].

Cisplatin, welches als Standardzytostatikum bei der Behandlung von hormonabhängigem Brustkrebs gilt, dient als Vergleich. Die Ergebnisse sind in **Abb. 22** dargestellt.

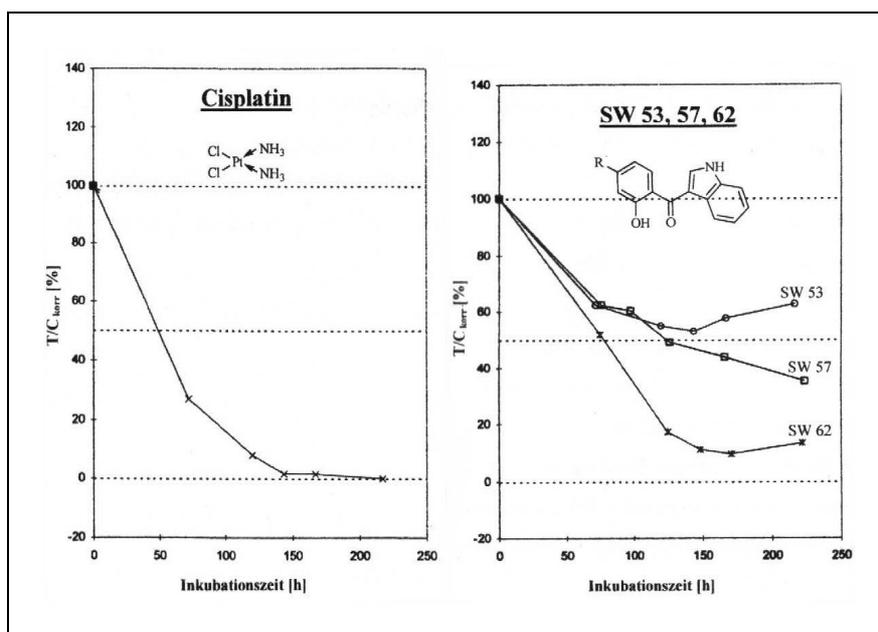
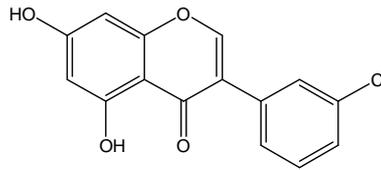


Abb. 22: Vergleich der Effekte von Cisplatin und den Salicyloylindolen **SW 53**, **SW 57**, **SW 62** auf MCF-7-Zellen

Es zeigt sich, dass die Verbindung **SW 62** ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften besitzt, die vergleichbar mit denen des Cisplatin sind. Es wird eine maximale Wachstumshemmung von ca. 90% nach einer Inkubation von etwa 175 Stunden beobachtet.

Demnach scheint die Methylsubstitution in Position 4 der Salicylsäure für die Zytotoxizität von Bedeutung zu sein. Das Salicyloylindol **SW 62**, das sich von der 4-Methylsalicylsäure ableitet, liefert deutlich bessere Ergebnisse als die beiden 4-Fluor- bzw. 4-Chlor-salicylsäureverbindungen **SW 53** und **SW 57** [75].

Ein Versuch, die zytotoxischen Effekte der Salicyloylindole zu erklären, orientiert sich an dem von *Traxler et al.* im Jahre 1999 erarbeiteten Bindungsmodell [67]. Dieses beschreibt das Isoflavon Genistein als ATP-kompetitiven EGFR-TK-Inhibitor und stellt den Vergleich zwischen der Bindung von ATP, Genistein und einem von *Traxler et al.* entwickelten Isoflavon-Derivat T1 mit Salicyloylstruktur dar (**Abb. 23**).

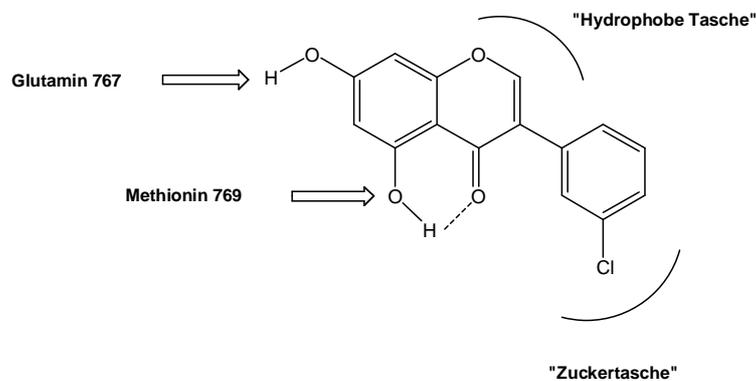


T1

Abb. 23: Von *Traxler et al.* entwickeltes Isoflavon T1

In diesem Bindungsmodell von *Traxler et al.* für ATP zeigen sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Amino-Gruppe des Adenins und dem Amid-Sauerstoff des Glutamins 767 und zwischen dem N1 des Adenins und einem Proton der Amino-Gruppe des Methionins 769. Entsprechend könnte das Isoflavon T1 gebunden werden, wobei sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Sauerstoff der 5-Hydroxy-Gruppe und dem Glutamin 767 sowie zwischen dem Proton der 7-Hydroxy-Gruppe und dem Methionin 769 ausbilden können. Nach *Traxler et al.* existiert weiterhin eine „Hydrophobe Tasche“ im Bereich des freien Elektronenpaares am N7 des ATP-Adenins und eine „Zuckertasche“, in der der Ribose-Anteil gebunden wird. Der 3-Chlorphenylring des Traxler'schen Isoflavons liegt im Bereich der „Zuckertasche“, der restliche Molekülteil in der „Hydrophoben Tasche“.

In **Abb. 24** ist das EGFR-Bindungsmodell nach *Traxler et al.* dargestellt.

**Abb. 24:** Schematische Darstellung des EGFR-TK-Bindungsmodells für 5,7-Dihydroxyisoflavone nach Traxler

Da anhand dieses Bindungsmodells auch für die Verbindungen **SW 53**, **SW 57** und **SW 62** mit ihrer Salicyloylstruktur eine gewisse Affinität zu der ATP-Bindungstasche angenommen wurde, wurde für **SW 62** eine Untersuchung auf mögliche EGFR-TK-inhibitorische Aktivität durchgeführt. **Abb. 25** zeigt das angenommene EGFR-TK-Bindungsmodell für **SW 62**.

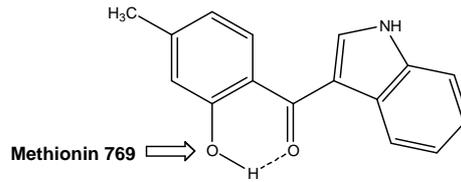


Abb. 25: Angenommenes EGFR-TK-Bindungsmodell für die Verbindung **SW 62**

Durch die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen der Keto- und der Hydroxygruppe können auch hier die Bindungskräfte zum Methionin 769 verringert sein. Außerdem fehlt die Donatorposition der Hydroxygruppe, die hier durch eine Methylgruppe ersetzt wurde. Dadurch kann die Bindung zum Glutamin 767 der EGFR-TK-Domäne gestört sein.

Das könnte der Grund dafür sein, dass für **SW 62** bei einer Konzentration von 10 μM nur eine schwache inhibitorische Aktivität von 18% beobachtet werden konnte. Somit lässt sich der Mechanismus der starken zytotoxischen Eigenschaften nicht zufriedenstellend mit einer EGFR-TK-Inhibition erklären.

Da die Struktur der Salicyloylindole, wie in **Abb. 26** gezeigt, mesomer als Stilben formuliert werden kann, lag aufgrund dieser Teilstruktur die Vermutung nahe, dass Affinitäten zum Estrogenrezeptor (ER) vorliegen könnten.

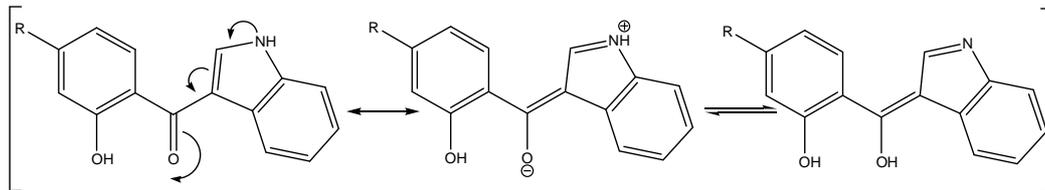


Abb. 26: Struktur der Salicyloylindole

Daraufhin wurden die Verbindungen **SW 53** und **SW 57** in Radioligandbindungsstudien am ER- α getestet. Jedoch zeigten alle drei Substanzen keine Verdrängung des Radioliganden und damit keine Affinität zum ER- α , und somit sind hormonabhängige Zytotoxizitäten ebenfalls unwahrscheinlich.

Deshalb konnte bisher keine Erklärung für die starke Zytotoxizität von Verbindung **SW 62** gefunden werden.

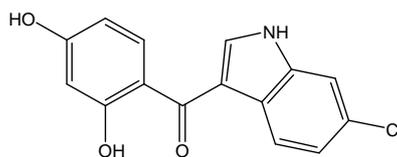
Bei der Entwicklung der Salicyloylindole nach *Witzel* wurden bisher die Variationen der Substituenten ausschließlich am Salicyloylteil vorgenommen. Jetzt werden die

Weiterentwicklungen an den geplanten Verbindungen durch Veränderungen sowohl am Salicyloylteil als auch am Indolteil angestrebt.

3.1.1.3 Variationen der 3-Acylindole am Salicyloylteil

Albuschat ersetzte zunächst die Methylgruppe der Salicylsäure durch eine Hydroxy-Gruppe, weil dadurch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu Glutamin und Methionin in der ATP-Bindungstasche, wie von *Traxler et al.* postuliert, begünstigt werden sollte. Die Position der Substitution sollte dabei nicht verändert werden, da durch die Methylgruppe am C-4 der Salicylsäure bei *Witzel* eine gute zytotoxische Wirkung erreicht werden konnte.

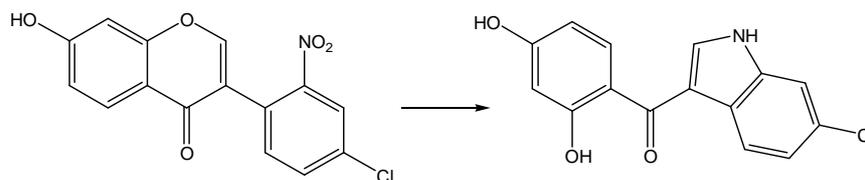
Es wurde daraufhin die folgende Verbindung konzipiert, die in **Abb. 27** dargestellt ist. Bei dieser wurde in Position 6 des Indolrings ein Chlorsubstituent eingeführt. Auch das ist ein Substitutionsmuster, das von *Traxler et al.* favorisiert wird.



RA 15

Abb. 27: Das Salicyloylindol RA 15

Durch Ringtransformation des 2'-Nitroisoflavons **RA 9**, das aus 4-Chlor-2-nitrophenyl-essigsäure hergestellt wird, kann Verbindung **RA 15** hergestellt werden (**Abb. 28**).



RA 9

RA 15

Abb. 28: Herstellung der Verbindung RA 15

Das Isoflavon **RA 9** kann aus 4-Chlor-2-nitrotoluen erhalten werden, das zum Nitril umgesetzt wird. Durch Verseifung des (4-Chlor-2-nitrophenyl)-acetonitrils zur (4-Chlor-2-nitrophenyl)-essigsäure und anschließender Friedel-Crafts-Alkanoylierung mit Resorcin in Bortrifluorid-Diethylether-Komplex entsteht 2-(4-Chlor-2-nitrophenyl)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-ethanon. Dieses liefert durch Ringschluss mit *N,N*-Dimethylformamid in absolutem Tetrahydrofuran das Isoflavon **RA 9**, welches jedoch nicht als „freies“ Isoflavon

vorliegt, sondern als Pyryliumacetat. Die Reduktion des Pyryliumacetats mit Zinkstaub in 50%iger Essigsäure liefert das Salicyloylindol **RA 15** in reiner Form.

Dieser Syntheseweg orientiert sich an dem in **Abb. 19** beschriebenen Schema [78].

3.1.1.4 Variationen der 3-Acyloindole am Indolteil

Zusätzlich sollten weitere Substitutionen am Indolring in Position 5 und 6 erfolgen, wobei sich die Chlor-Substitution als besonders günstig hinsichtlich der Zytotoxizität erweisen könnte. Dafür spricht, dass bei Chlor-substituierten Isoflavonen eine hervorragende Zytotoxizität beobachtet werden konnte [75].

In **Abb. 29** ist das zytotoxisch aktivste Chlor-substituierte Isoflavon dargestellt.

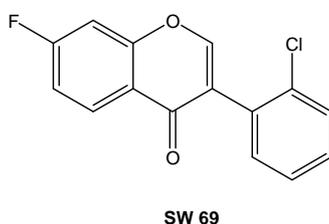
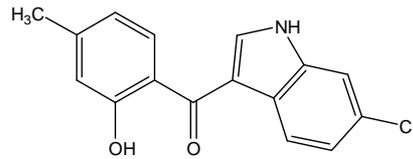


Abb. 29: Zytotoxisch wirksames Isoflavon **SW 69**

Das Isoflavon **SW 69** zeigt im Zytotoxizitäts-Test an 55 humanen Tumorzelllinien bei der Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 einen GI_{50} -Wert von $10^{-5,68}$. Der zur Quantifizierung der Wirksamkeit dienende, durch graphische Interpolation der Konzentrationswirkungskurve ermittelte GI_{50} -Wert ist der dekadische Logarithmus der Konzentration (mol/L) des Wirkstoffs, bei der eine 50%ige Hemmung des Tumorwachstums gegenüber einer unbehandelten Tumorzellkultur beobachtet wird.

Die Chlorsubstitution im Indol-Teil sollte nun mit der 4-Methyl-Substitution im Salicyloyl-Teil der Verbindung **SW 62** zu der Verbindung **RA 16** kombiniert werden.

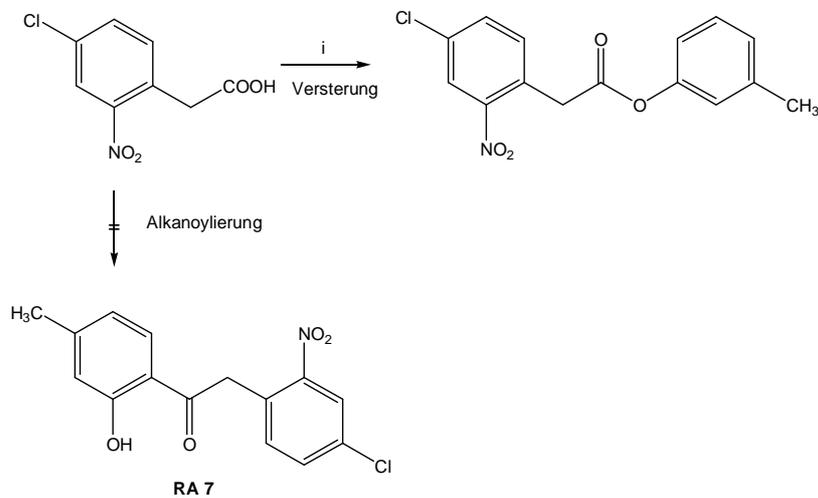
Durch eine Chlorsubstitution der Verbindung **SW 62** wurde eine noch stärkere Wachstumshemmung der MCF-7-Zelllinien erwartet, da bei chlorsubstituierten Isoflavonen von *Witzel* starke zytotoxische Eigenschaften beobachtet wurden. *Albuschat* versuchte auf zahlreichen Wegen, die in **Abb. 30** dargestellte Verbindung **RA 16** zu synthetisieren, welche jedoch alle scheiterten.



RA 16

Abb. 30: gewünschtes Salicyloylindol **RA 16**

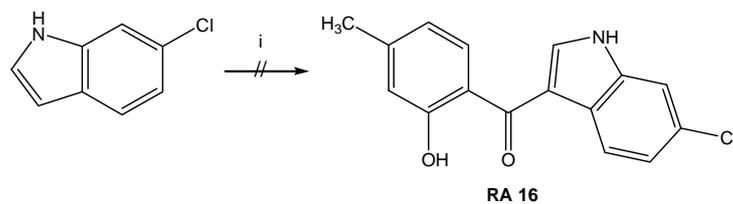
Zunächst wurde versucht, 4-Chlor-2-nitrophenylessigsäure in einer Friedel-Crafts-Alkanoylierung mit m-Kresol umzusetzen, jedoch kann das gewünschte Ethanon-Derivat **RA 7** nicht erhalten werden. Es entstand die in **Abb. 31** dargestellte Esterverbindung.



i) m-Kresol/Bortrifluorid-Diethylether-Komplex, ΔT

Abb. 31: Umsetzung der 4-Chlor-2-nitrophenylessigsäure mit m-Kresol

Unter gleichen Reaktionsbedingungen wurde versucht, 4-Methylsalicylsäure direkt mit 6-Chlorindol umzusetzen (**Abb. 32**). Jedoch scheiterte auch dieser Versuch.



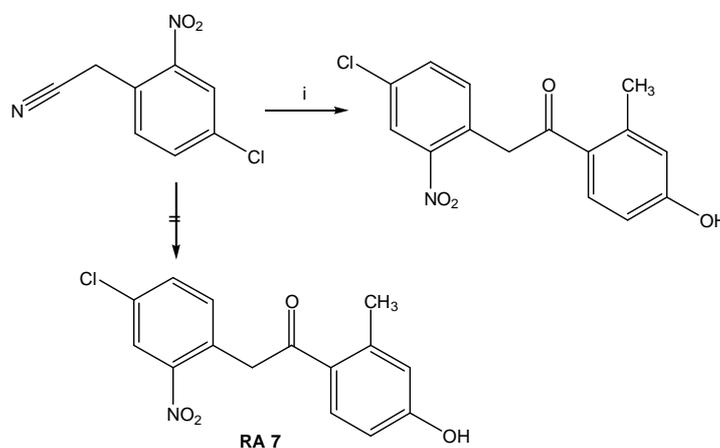
i) 4-Methylsalicylsäure/Bortrifluorid-Diethylether-Komplex, ΔT

Abb. 32: Umsetzung von 6-Chlorindol mit 4-Methylsalicylsäure

Bei einer Friedel-Crafts-Alkanoylierung von 4-Methylsalicylsäurechlorid treten undefinierbare, nicht trennbare Gemische in Gegenwart von Diethylaluminiumchlorid statt der gewünschten Verbindung **RA 16** auf. Das Scheitern dieser Reaktion ist auf Probleme bei der Herstellung des Säurechlorids zurückzuführen.

Auch eine Fries-Umlagerung des m-Kresolesters der 4-Chlor-2-nitrophenylessigsäure liefert nicht das gewünschte Umlagerungsprodukt **RA 16**.

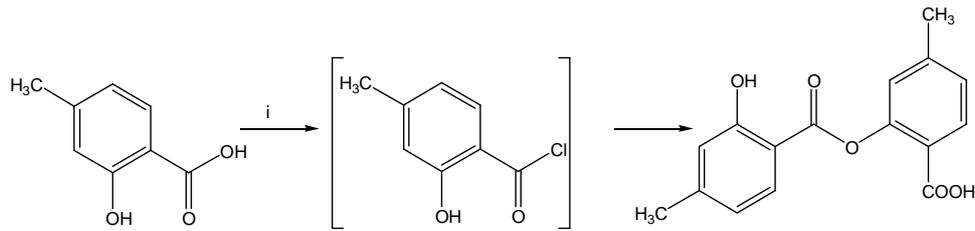
Mit Hilfe einer Houben-Hoesch-Reaktion des Nitrils zum Ethanon-Derivat kann nur das in *para*-Position zur Hydroxy-Gruppe alkanoylierte m-Kresol-Derivat hergestellt werden. Durch die bereits vorhandenen Substituenten erster Ordnung wird das m-Kresol für eine elektrophile Substitution in drei Positionen aktiviert, so dass drei Produkte entstehen müssten. Jedoch konnte nur die abgebildete Verbindung isoliert werden (**Abb. 33**).



i) Zinkchlorid/HCl_{gasf.}, abs. Diethylether, 0°C; m-Kresol, RT, Wasser, ΔT

Abb. 33: Umsetzung nach Houben-Hoesch

Außerdem wird versucht, 4-Methylsalicylsäurechlorid in einer Grignard-induzierten Acylierungsreaktion mit metalliertem 6-Chlorindol umzusetzen. Auch diese Reaktion scheitert an Schwierigkeiten bei der Herstellung des Säurechlorids. Sowohl bei der Umsetzung der 4-Methylsalicylsäure mit Thionylchlorid als auch mit Thionylchlorid unter Zusatz von Petrolether und Pyridin bei niedriger Temperatur entsteht statt des gewünschten Säurechlorids ein Ester aus zwei Molekülen 4-Methylsalicylsäure (**Abb. 34**).



i) Thionylchlorid, ΔT bzw. Thionylchlorid/Petrolether/Pyridin, ΔT

Abb. 34: Umsetzung der 4-Methylsalicylsäure mit Thionylchlorid

Des Weiteren wurde versucht, die Hydroxy-Gruppe durch einem Acetyl- bzw. Trifluoracetylrest vor der Selbstveresterungsreaktion zu schützen, jedoch führte auch diese Reaktion nicht zu dem gewünschten Säurechlorid [78].

3.1.1.5 4'-Methoxysalicyloylindole

Da die Synthese der Verbindung **RA 16** trotz aller vorausgehend beschriebenen Versuche nicht erfolgreich verlief, wurden nun verschiedene 4'-Methoxysalicyloylindole konzipiert. Aufgrund der gewissen Ähnlichkeit in Bezug auf die elektronischen Verhältnisse zum Salicyloylindol **SW 38** versprach man sich vergleichbare zytotoxische Wirkungen, welche durch die Chlorsubstitution am Indolring zusätzlich verstärkt werden sollten (**Abb. 35**).

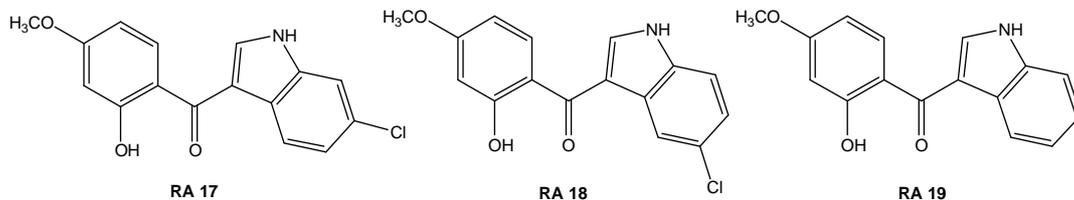
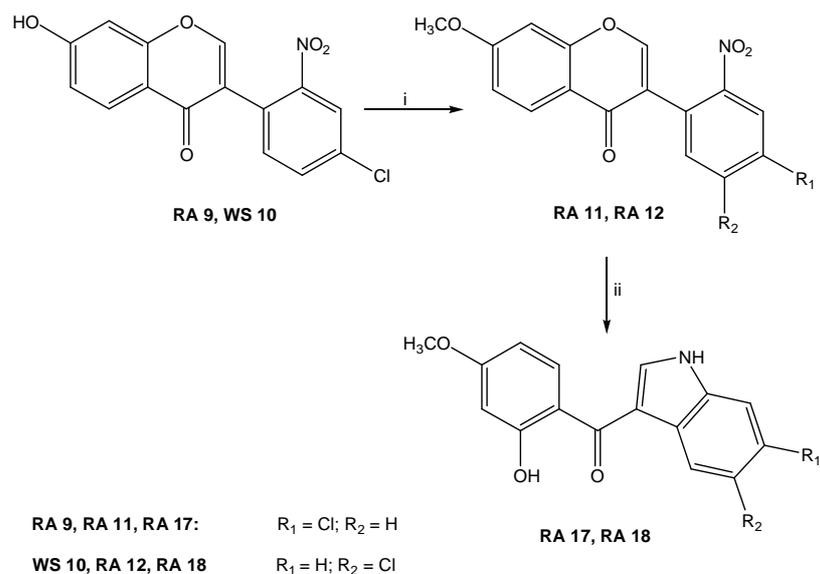


Abb. 35: Die geplanten Methoxy-Salicyloylindole **RA 17**, **RA 18** und **RA 19**

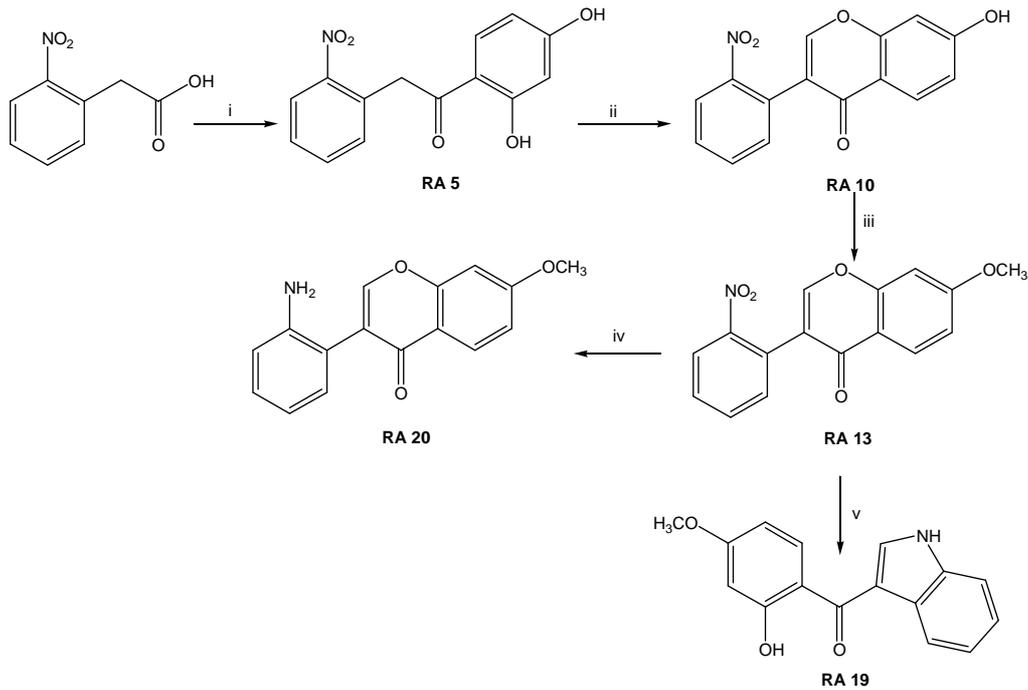
Durch Methylierung der Hydroxy-Isoflavone und anschließender Ringtransformation konnten die gewünschten Verbindungen erhalten werden (**Abb. 36**).



i) Methyljodid/K₂CO₃, Aceton; ii) Zinkstaub, Essigsäure 50%

Abb. 36: Herstellung der 4'-Methoxy-salicyloylindole **RA 17** und **RA 18**

Da sich die Isolierung und die säulenchromatographische Aufreinigung als schwierig erwiesen haben und es nicht gelang, die beiden gewünschten Verbindungen **RA 17** und **RA 18** in ausreichender Reinheit zu erhalten, sollte ein 4'-Methoxysalicyloylindol (**RA 19**) ohne Chlorsubstitution entwickelt werden. Dieses wurde aus 2-Nitrophenylethansäure über das Ethanon-Derivat in das 2'-Nitroisoflavon überführt, anschließend methyliert und zur Wunschverbindung **RA 19** reduziert (**Abb. 37**).



- i) Resorcin, Bortrifluorid-Diethylether-Komplex, ΔT ;
 ii) *N,N*-Dimethylformamididimethylacetal, abs. Tetrahydrofuran, ΔT ; iii) Methyljodid, Aceton, ΔT ;
 iv) Pd/C, Cyclohexen, Ethanol, ΔT ; v) Zinkstaub, Essigsäure 50%, ΔT

Abb. 37: Herstellung von RA 19

3.1.1.6 EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der Salicyloylindole

Da das Salicyloylindol **RA 16** bislang nicht herstellbar war, und die Verbindungen **RA 17** und **RA 18** nicht in genügender Ausbeute und Reinheit isoliert werden konnten, wurden nur die von *Albuschat* synthetisierten Salicyloylindole **RA 15** und **RA 19** auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber der EGFR-TK getestet. Die Ergebnisse sind im Vergleich zu denen der Verbindungen **SW 62** und **WS 11** in **Tab. 3** aufgelistet. Die Strukturen der getesteten Verbindungen zeigt die **Abb. 38**.

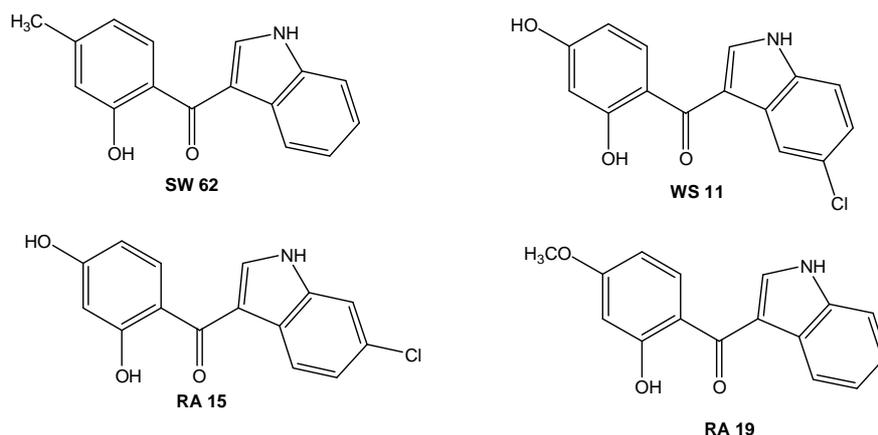


Abb. 38: Auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestete Salicyloylindole

| Verbindung | SW 62 | WS 11 | RA 15 | RA19 |
|--|-------|-------|-------|------|
| EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in % (c=10 μ M) | 18 | 59 | 50 | 11 |

Tab. 3: EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der Salicyloylindole

Die 4'-Hydroxysalicyloylindole **RA 15** und **WS 11** zeigen bei einer Konzentration von 10 μ M moderate EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten, wohingegen das 4'-Methylsalicyloylindol **SW 62** und die 4'-Methoxyverbindung **RA 19** praktisch als unwirksam anzusehen sind. Da die beiden 4'-Hydroxyverbindungen ähnliche Ergebnisse liefern, scheint die Position des Chlorsubstituenten keinen Einfluss auf die EGFR-TK-inhibitorische Aktivität zu haben [78].

3.1.2 Salicyloylindole als Produkte bei der Herstellung von Isoflavonderivaten

In Anlehnung an diese beiden vorausgehenden Konzeptionen gelang es *Tappmeyer* überraschenderweise, den Mechanismus der Aminoisoflavon-Salicyloylindol-Ringtransformation im Rahmen der Entwicklung von Daidzein- und Genisteinderivaten aufzuklären. Es konnte ein tetrazyklisches Ringsystem, das durch intramolekulare nucleophile Addition des Anilin-NH an das Chromon-C2 entstanden ist, isoliert und nachgewiesen werden.

Dieser Befund wurde im Zusammenhang mit geplanten Isoflavon-Derivaten entdeckt, die als selektive Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) Anwendung finden sollten.

Abb. 39 zeigt die Struktur von Pipendoxifen und dem geplanten Salicyloylindol **ST 31**.

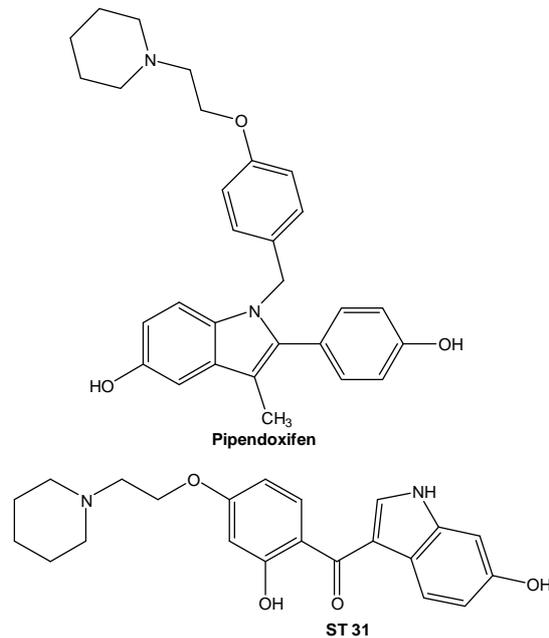
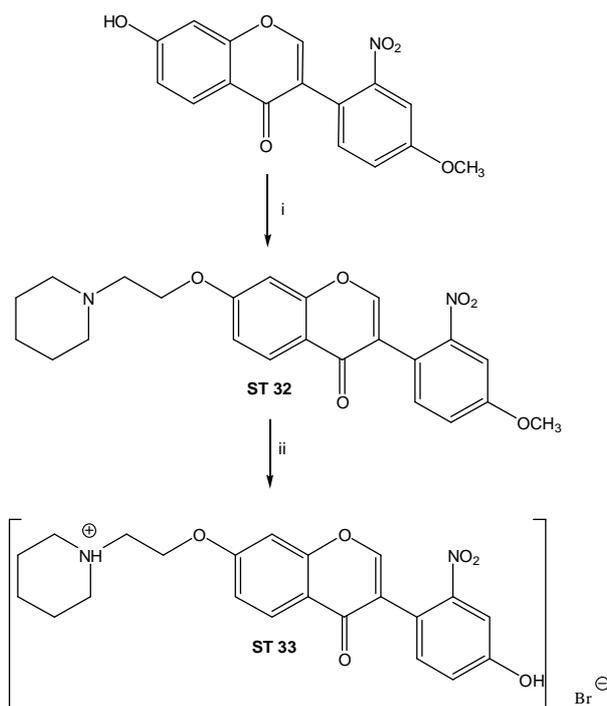


Abb. 39: SERM Pipendoxifen und geplantes Salicyloylindol **ST 31**

Die Verbindung **ST 31** herzustellen war deshalb interessant, weil diese bedingt durch ihre L-förmige Struktur nur an zwei Rezeptorpositionen des ER wechselwirken kann statt wie die SERM Pipendoxifen und Raloxifen an drei. Außerdem erschien das Molekül **ST 31** flexibler in Bezug auf die Ausrichtung innerhalb der Ligandenbindungstasche.

Die Synthese des Salicyloylindols **ST 31** geht vom 2'-Nitroformonetin aus, welches durch Veretherung mit 1-(2-Chloroethyl)-piperidiniumchlorid das Isoflavon **ST 32** ergibt. Mit Bortribromid in Dichlormethan erfolgt die Spaltung der Methoxygruppe, und man erhält das Hydrobromid des 2'-Nitroisoflavons **ST 33** (**Abb. 40**).

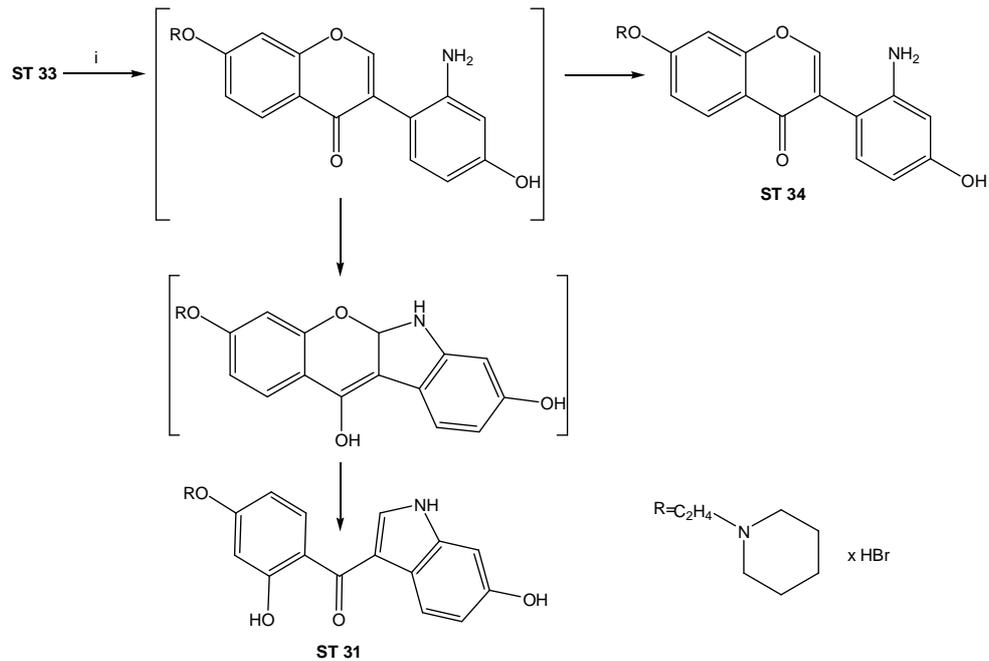


- i) 1-(2-Chloroethyl)-piperidiniumchlorid, K_2CO_3 , Acetonitril, ΔT ;
ii) Bortribromid, Dichlormethan, $70^\circ C \rightarrow RT$;

Abb. 40: Herstellung der Verbindung **ST 33**

Durch Reduktion mit Pd/C und Cyclohexen in Ethanol entstehen zwei Produkte, das 2'-Aminoisoflavon **ST 34** und das Salicyloylindol **ST 31** im Verhältnis ~ 3:1 Isoflavon zu Indol (**Abb. 41**). Eine Trennung der beiden Substanzen gelang jedoch nicht.

Auffällig ist jedoch, dass die Bildung der Verbindung **ST 31** ein tetrazyklisches Ringsystem als Zwischenprodukt voraussetzt, aus dem das stabile Produkt **ST 31** infolge einer Ring-Ketten-Tautomerie entsteht.



i) Pd/C, Cyclohexen, Ethanol, ΔT , pH 9, ges. Na_2CO_3 -Lsg bzw. Zinkstaub, Essigsäure 50%, ΔT

Abb. 41: Herstellung der Verbindung **ST 31**

Deshalb sollte nun versucht werden, die Ringtransformation auf der Stufe des 2'-Nitroformonetinderivates durchzuführen. Bei der Reduktion der Verbindung **ST 32** entsteht jedoch kein 2'-Aminoisoflavan, sondern das Salicyloylindol **ST 35** in sehr geringen Ausbeuten und als Hauptprodukt die tetrazyklische Verbindung **ST 36**, ein Benzopyrano[2,3-b]indol (**Abb. 42**). Die Entstehung beider Verbindungen konnte anhand der Protonenresonanzspektren bewiesen werden.

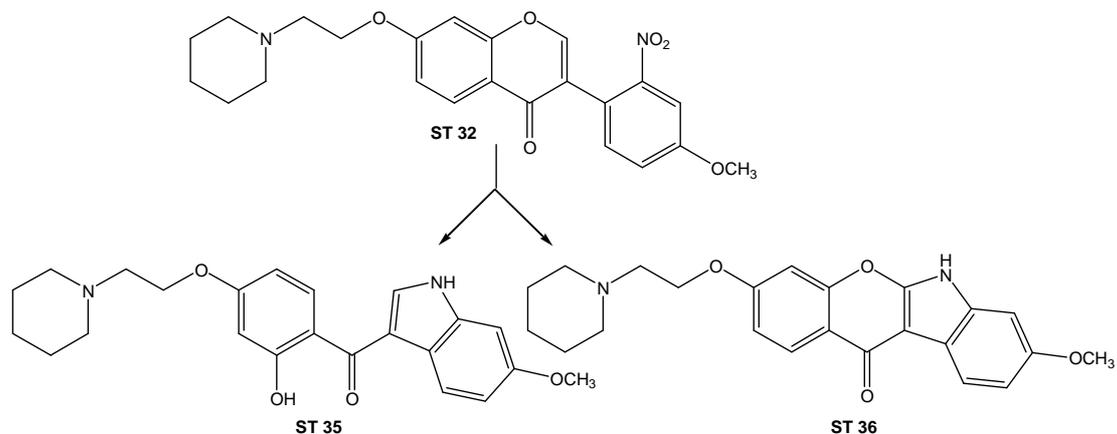
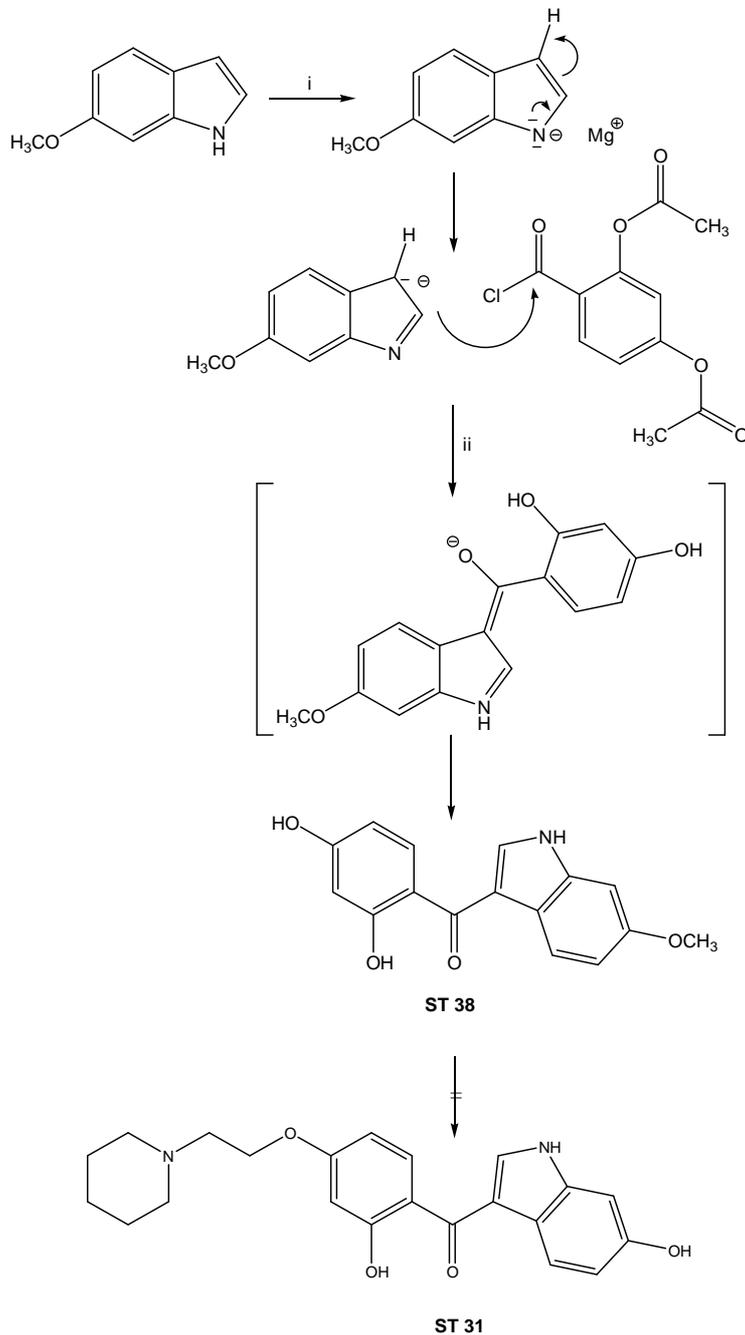


Abb. 42: Die Verbindungen **ST 35** und **ST 36** aus **ST 32**

In einem weiteren Versuch wird das gewünschte Salicyloylindol **ST 31** unter Anwendung von Grignard-Reagenz angestrebt. Dazu wird metalliertes 6-Methoxyindol mit dem Säurechlorid der 2,4-Diacetoxybenzoesäure umgesetzt, wie in **Abb. 44** dargestellt ist.



i) Iod, Methyljodid, Magnesiumspäne, abs. Ether; Eiskühlung ii) Ether, ΔT , Eis

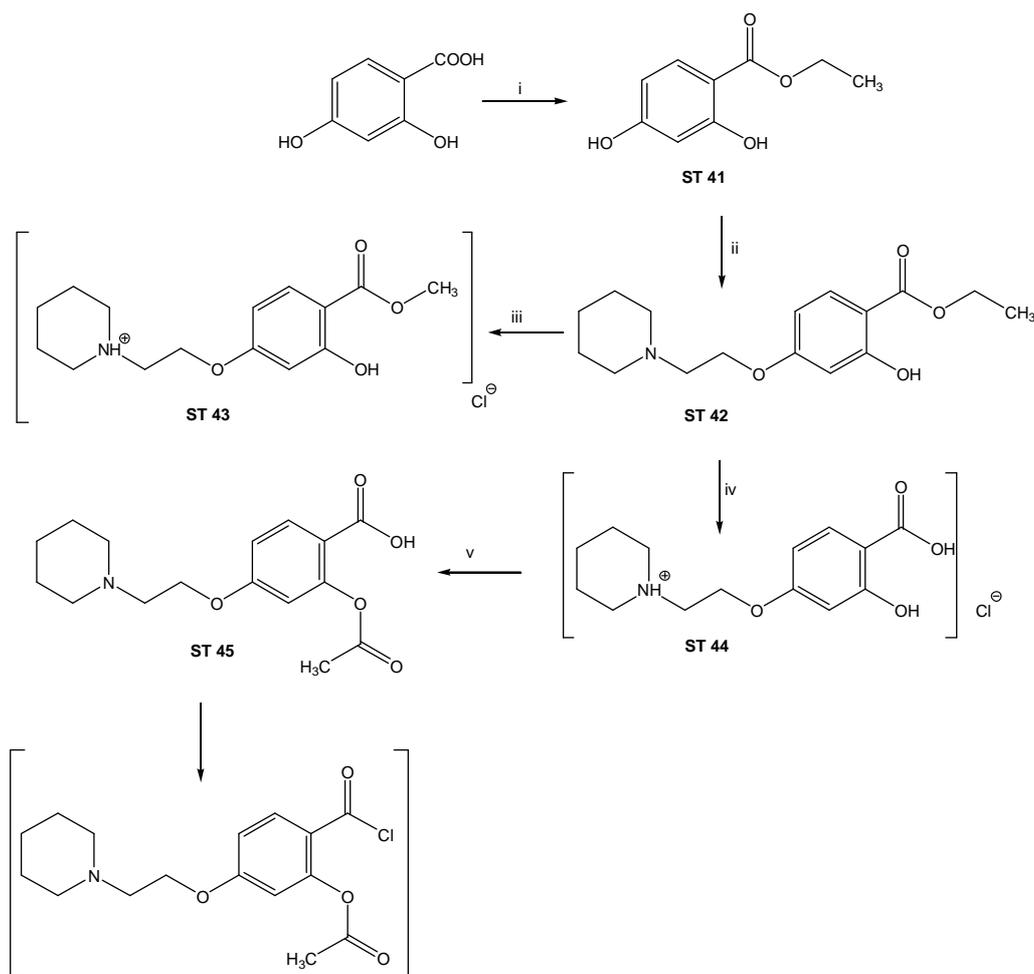
Abb. 44: Geplante Herstellung der Verbindung **ST 31** aus **ST 38**

Die Herstellung der dazu benötigten 2,4-Diacetoxybenzoesäure erfolgt nach *Albuschat* mit einem Acetanhydrid/Pyridin-Gemisch, und durch Umsetzung mit Thionylchlorid in Benzen erhält man das Säurechlorid. Vor der Acylierung wird das Methoxyindol mit

Methylmagnesiumiodid metalliert und bildet anschließend mit dem Säurechlorid das entsprechende Salicyloylindol **ST 38**.

Mit Hilfe dieser Reaktion lässt sich das Intermediat **ST 38** auf dem Weg zu Verbindung **ST 31** herstellen, aber aufgrund der zu geringen Ausbeute waren keine weiteren Syntheseschritte mehr möglich, um das gewünschte Salicyloylindol **ST 31** zu erhalten.

Aus diesem Grund wurde nun versucht, den Salicylsäureteil des Indols im Vorfeld, ausgehend von der 2,4-Dihydroxybenzoesäure, aufzubauen (**Abb. 45**).

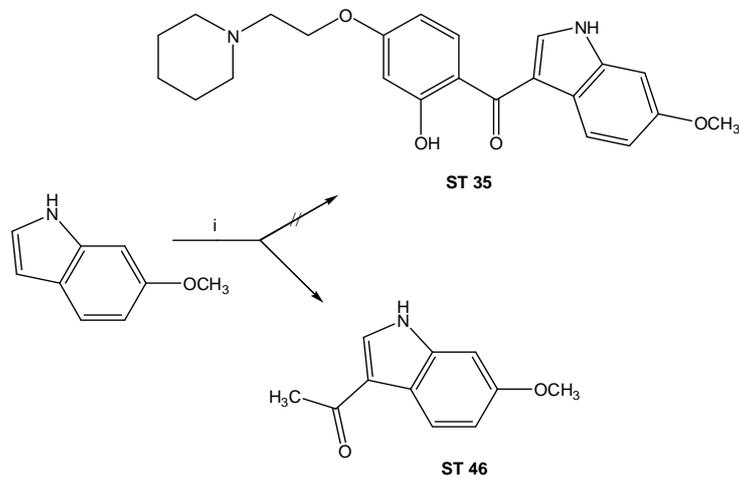


- i) Ethanol, konz. H_2SO_4 ; ii) 1-(2-Chloroethyl)-piperidiniumchlorid, K_2CO_3 , Acetonitril, ΔT ;
 iii) 10N-NaOH, Methanol, RT, pH 1, konz. HCl; iv) 10N-NaOH, Ethanol, ΔT , pH 1, konz. HCl;
 v) Acetanhydrid, Pyridin, ΔT ; vi) Thionylchlorid, Benzen, ΔT

Abb. 45: Herstellung der Verbindung **ST 45** und ihrem Säurechlorid

Aus der 2,4-Dihydroxybenzoesäure wird mit Ethanol der Ethylester **ST 41** hergestellt und dieser in Acetonitril mit 1-(2-Chlorethyl)-piperidiniumchlorid zur Verbindung **ST 42** verethert. Durch die Verseifung mit methanolischer NaOH entsteht nicht die freie Säure, sondern es erfolgt eine Umesterung zum Methylester **ST 43**. Erst durch Verwendung ethanolischer

NaOH kann die gewünschte Benzoesäure **ST 44** erhalten werden, die durch Umsetzung mit einem Acetanhydrid/Pyridin-Gemisch zu Verbindung **ST 45** acetyliert wird. Die Reaktion mit Thionylchlorid liefert das Säurechlorid, welches anschließend mit metalliertem Methoxyindol umgesetzt wird (**Abb. 46**).



i) Iod, Methyljodid, Magnesiumspäne, abs. Ether, Säurechlorid der Verbindung **ST 45**, ΔT , Eis

Abb. 46: Versuch der Herstellung von Verbindung **ST 35** durch Acylierung

Dabei kann allerdings die Umsetzung zur gewünschten Verbindung **ST 35** nicht beobachtet werden. Es wird als Produkt nur das in Position 3 acetylierte Indol isoliert.

Diese Passage gewinnt insofern an Bedeutung, weil bei den Herstellungsversuchen des Piperidinoethoxy-substituierten Salicyloylindols **ST 35** ein bemerkenswertes tetrazyklisches Benzopyranoindol (**ST 36**) isoliert und charakterisiert werden kann. **ST 35** ist eine Vorstufe auf dem Weg zu Verbindung **ST 31**, von der eine selektive Estrogenrezeptormodulation erwartet wurde. Mit Hilfe dieses Tetrazykluses **ST 36** gelang es nun, den Mechanismus der Aminoisoflavon-Salicyloylindol-Ringtransformation aufzuklären.

3.1.3 Mechanismus der Aminoisoflavon-Salicyloylindol-Ringtransformation

Der Wert der vorausgehend beschriebenen vielfältigen Versuche, die mehr oder weniger erfolgreich verliefen, liegt darin, dass ein tetrazyklische Ringsystem (**ST 36**) isoliert werden konnte, das einen zweifelsfreien Hinweis auf den Reaktionsmechanismus der Aminoisoflavon-Salicyloylindol-Ringtransformation gibt. Diese Beobachtung wurde nur bei den aufwendig substituierten Salicyloylindolen gemacht, die als SERM konzipiert wurden. In allen anderen beschriebenen Fällen konnten bei vergleichbaren Ringtransformationen niemals tetrazyklische Zwischenprodukte erhalten werden.

Deshalb war es wichtig, sich eingehend mit den Salicyloylindolen zu beschäftigen, die auf den vorhergehenden Seiten beschrieben wurden.

Die Herstellung von Salicyloylindolen mit Hilfe der Aminoisoflavon-Salicyloylindol-Ringtransformation geht auf die Beobachtungen von *Witzel* Ende der 1990er Jahre in unserer Arbeitsgruppe zurück. Mittlerweile konnte herausgefunden werden, dass der Verlauf dieser Reaktion von dem eingesetzten Reduktionsmittel und der Art und Position der Substituenten des Isoflavons abhängig ist. Bei der Reduktion der Nitroisoflavone nach *Witzel* mit Pd/C und Cyclohexen traten ausschließlich Salicyloylindole als Produkte auf. *Albuschat* führte die Ringtransformation mit Zink und Essigsäure durch, da sie beobachtet hatte, dass die Reduktion von 2'-Nitroisoflavonen mit Pd/C und Cyclohexen eine Abspaltung des Chlorsubstituenten zur Folge hatte. Außerdem traten hier auch zusätzlich Aminoisoflavone als Produkte auf. Bei den Verbindungen **RA 17** und **RA 19** machten sie sogar den Hauptbestandteil aus. Bei der Reduktion mit Zink und Essigsäure nach *Tappmeyer* konnten bei zwei Reaktionen aus dem 2-Nitroisoflavon neben den Salicyloylindolen tetrazyklische Benzopyrano[2,3-b]indole erhalten werden. Diese sind ein Beweis für das Entstehen tetrazyklischer Additionsprodukte im Verlauf dieser Reaktion.

3.1.4 4'-Methylsalicyloylindole mit verschiedenen Substituenten am Indolring

Wie bereits beschrieben, wurden schon zahlreiche Versuche unternommen, verschiedene Salicyloylindole zu synthetisieren, wovon einige gelangen und andere nicht. Die Konzeption der Salicyloylindole geht auf die geplante, jedoch gescheiterte Synthese der Azarotenoide zurück. Die unterschiedlichen Variationen der Strukturen basieren auf verschiedenen Betrachtungsweisen der Eigenschaften der Salicyloylindole.

Die nach *Witzel* hergestellten Salicyloylindole weisen Variationen am Salicylsäureteil auf, wobei der Indolring unsubstituiert bleibt. Die Verbindung **SW 62** stellt das bisher stärkste zytotoxisch auf MCF-7-Zellen wirkende in unserem Arbeitskreis hergestellte Salicyloylindol dar.

Albuschat synthetisierte chloresubstituierte Indolderivate, die am Salicylsäureteil variierten. Die von *Tappmeyer* konzipierten Salicyloylindole orientierten sich an den SERM Pipendoxifen und Raloxifen und hatten in erster Linie dazu beigetragen, dass der Mechanismus der Aminoisoflavon-Salicyloylindol-Ringtransformation aufgeklärt werden konnte.

3.1.4.1 Herstellung von (5-Bromo-1*H*-indol-3-yl)-(2-hydroxy-4-methylphenyl)-methanon (**2**)

Die bisherigen Verfahren, die zu Salicyloylindolen führten, waren jedoch synthetisch aufwendig, insbesondere, was die Einhaltung konstanter Reaktionsbedingungen betraf. Hierbei war vor allem die Kontrolle der Energiezufuhr problematisch, die im Rahmen der Fries-Umlagerung essentiell ist.

Eine wesentliche Verbesserung des Zugangs zu den Salicyloylindolen stellen die im folgenden Kapitel durchgeführten Versuche dar. Hier können Salicyloylindole nämlich in nur zwei Reaktionsschritten hergestellt werden.

Als Leitstruktur wird die in **Abb. 47** dargestellte Verbindung **2**, ein bromsubstituiertes Salicyloylindol, entwickelt.

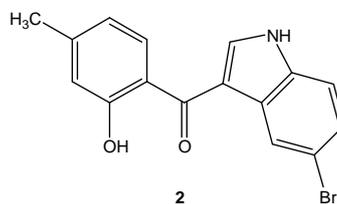
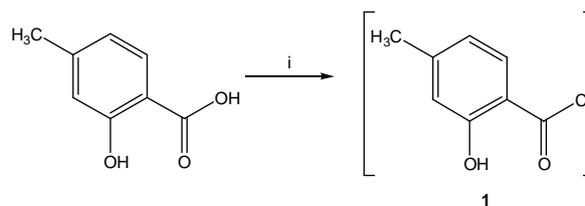


Abb. 47: Leitstruktur **2**

Zunächst wird dazu die 4-Methylsalicylsäure mit einem Überschuss an Thionylchlorid 90 Minuten bei 70°C erhitzt und das überschüssige Lösemittel im Vakuum entfernt (**Abb. 48**).



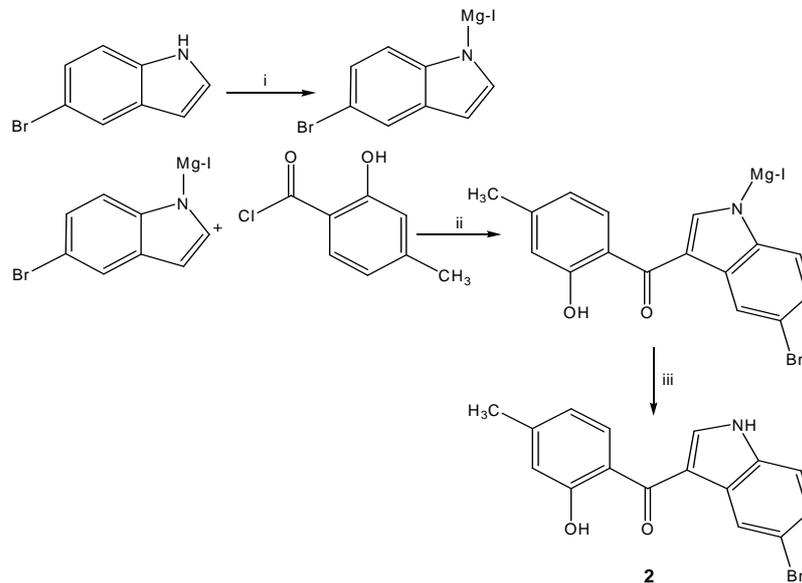
i) Thionylchlorid, ΔT

Abb. 48: Herstellung des 4-Methylsalicylsäurechlorids **1**

Der so erhaltene Rückstand ist das 4-Methylsalicylsäurechlorid **1**, welches massenspektrometrisch belegt werden kann.

Das Scheitern der Acetylierung bei *Albuschat* ist auf die nicht erfolgreiche Herstellung des 4-Methylsalicylsäurechlorids zurückzuführen. Möglicherweise könnte der Fehler dort in der *in-situ* Umsetzung des Säurechlorids mit metalliertem Indol liegen, denn mit dem über Nacht

kühl gelagerten Säurechlorid **1** kann dessen Umsetzung mit 5-Bromindol im Rahmen dieser Arbeit problemlos durchgeführt werden (**Abb. 49**).



i) Jod, Jodmethan, Magnesiumspäne, abs. Ether; Eiskühlung ii) Ether, Δ , Eis iii) Wasser, RT

Abb. 49: Herstellung der Verbindung **2** durch Acylierung

Dazu wird das 5-Bromindol mit Magnesiumspänen und Methyljodid metalliert und mit dem 4-Methylsalicylsäurechlorid **1** unter Kühlung umgesetzt. Nach Erwärmen wird die Reaktionsmischung auf Eis gegossen, mit Ethylacetat extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt, und der erhaltene Rückstand ist die gewünschte Verbindung **2**. Diese Reaktion liefert nur mäßig gute Ausbeuten, sie genügen aber für eine säulenchromatographische Aufreinigung und ausreichende Charakterisierung.

Das angefertigte Protonenresonanzspektrum zeigt die Singulets der NH-Gruppe bei 12,30 ppm und der Hydroxygruppe bei 11,17 ppm. Die aromatischen Protonen sind im Bereich von ca. 6-8 ppm sichtbar, und die Signale der Protonen der Methylgruppe erscheinen bei einer chemischen Verschiebung von 2,30 ppm (**Abb. 50**).

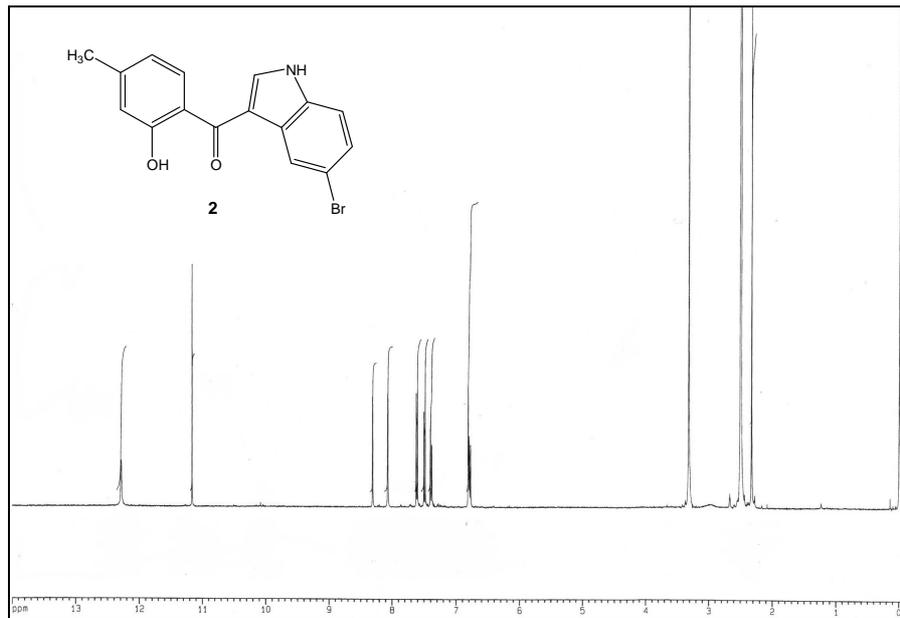


Abb. 50: ^1H -NMR-Spektrum des Salicyloylindols **2**

Ausgehend von der Verbindung **2**, die wegen der schlechten Verträglichkeit und der wahrscheinlich nicht ausreichenden Zellgängigkeit aufgrund der hohen Polarität des Bromsubstituenten nicht in der Therapie eingesetzt werden kann, werden weitere Salicyloylindole konzipiert. Diese können nun aufgrund des erfolgreichen Herstellens des 4-Methylsalicylsäurechlorids **1** durch Grignard-induzierte Acylierungsreaktionen mit den wunschgemäß substituierten Indolen synthetisiert werden und sind in **Abb. 51** dargestellt. Auffallend ist dabei, dass die bevorzugte lipophile Halogen-Substitution im Vordergrund steht.

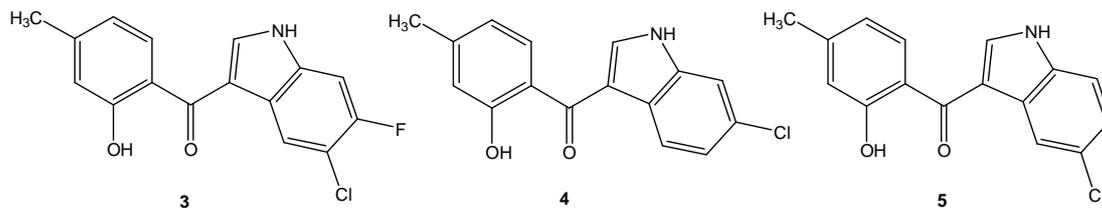


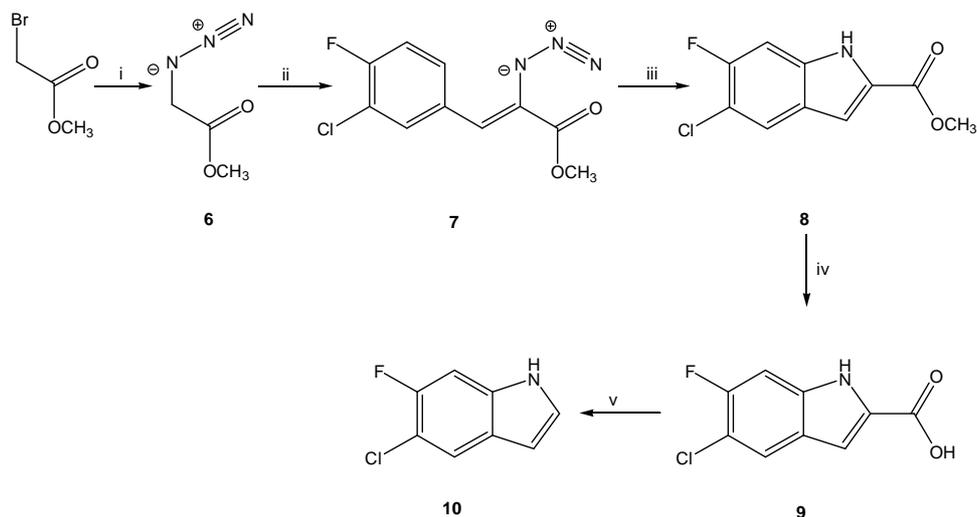
Abb. 51: Durch Acylierungsreaktion hergestellte Salicyloylindole

Die Chlorsubstitution am Indolring beruht auf Beobachtungen von *Witzel*, dass chlorsubstituierte Isoflavone gute zytotoxische Eigenschaften aufweisen [75].

Die Verwendung der 4-Methylsalicylsäure geht auf die starke zytotoxische Aktivität des Salicyloylindols **SW 62** zurück, das an MCF-7-Zellen einen dem Cisplatin vergleichbaren Effekt erzielt. Da der Indolring in der Verbindung **SW 62** jedoch unsubstituiert ist, verspricht eine Chlorsubstitution einen noch stärkeren Effekt.

Das für die Verbindung **3** verwendete 5-Chlor-6-fluorindol wurde in Anlehnung an die Vorschriften der Patente US 6569888 und US 5494928 nach Hemetsberger-Knittel im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellt, da aus finanziellen Gründen ein käuflicher Erwerb nicht möglich war [80-82].

Der Ablauf der Synthese ist in **Abb. 52** dargestellt.



- i) Natriumazid, *N,N*-Dimethylformamid, Methylbromacetat, RT;
 ii) Natriummethanolat, 3-Chlor-4-fluorbenzaldehyd, RT;
 iii) Xylen, Δ T; iv) NaOH, Ethanol, RT; v) Diphenylether, Δ T

Abb. 52: Herstellung des 5-Chlor-6-fluorindols **10**

Die erste Stufe dieser Synthese erfolgt durch eine Umsetzung von Methylbromacetat mit Natriumazid im Rahmen einer modifizierten Kolbe-Nitril-Synthese zum Methylazidoacetat **6**, wobei der defizitäre Kohlenstoff des Methylbromacetats mit dem N-nucleophilen Azid unter Abspaltung des Bromid-Ions in einer S_N2 -Reaktion verknüpft wird. Die anschließende Umsetzung von **6** über das Zimtsäure-Derivat **7** zum Indol-2-carbonsäureester **8** verläuft nach einer Hemetsberger-Knittel-Reaktion. Diese Reaktion umfasst die basenkatalytische Kondensation des aromatischen 3-Chlor-4-fluorbenzaldehyds mit dem Alkylazidoacetat **6** zum α,β -ungesättigtem Carbonsäureester **7** (Knoevenagel-Reaktion) und die anschließende thermische intramolekulare Zyklisierung zum korrespondierenden Indol-2-carbonsäureester **8**.

Das durch Deprotonierung der aktivierten Methylengruppe durch Natrimmethanolat entstehende Anion addiert an den partiell positivierten Kohlenstoff des 3-Chlor-4-fluorbenzaldehyds. Nach Protonierung und Dehydratisierung kann das α,β -ungesättigte Methyl- α -azido-3-chlor-4-fluorcinnamat **7** isoliert werden (**Abb. 53**).

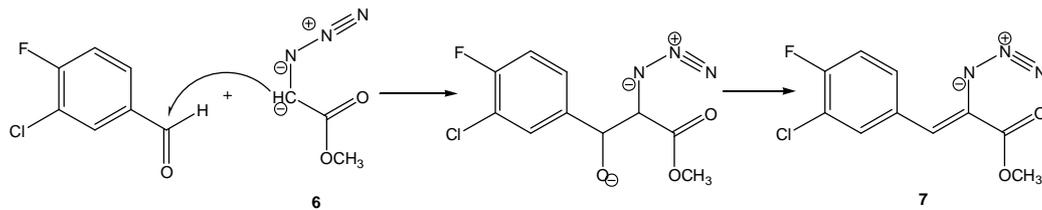


Abb. 53: Synthese der Verbindung **7** nach Knoevenagel

Bei der praktischen Durchführung treten jedoch zahlreiche Schwierigkeiten auf. Alle benötigten Reagenzien müssen innerhalb von 20-30 Minuten nach Herstellung des Natriummethanolats zur Reaktion gebracht werden, da ansonsten basenkatalysierte Additionen an der Azidogruppe (Dimroth-Reaktion) stattfinden und die Ausbeute reduzieren. Das Methylazidoacetat **6** muss im Überschuss eingesetzt werden, da andernfalls aus dem entsprechenden Anion in einer exothermen Reaktion eine Abspaltung von Stickstoff erfolgt. Auch ist zu beachten, dass die Azidogruppe über oxidative Eigenschaften verfügt und somit einige Nebenreaktionen (z.B. Oxidation von Methanol zu Formaldehyd) verursachen kann. Weiterhin können zwei Moleküle **6** im Sinne einer Claisen-Kondensation bei höheren Temperaturen miteinander reagieren.

Um die beschriebenen unerwünschten Reaktionen zu vermeiden, muss die Herstellung des Natriummethanolats und die anschließende Zugabe des 3-Chlor-4-fluorbenzaldehyds und des Methylazidoacetats **6** unterhalb von 10°C erfolgen. Auch darf bei der Entfernung des Lösemittels im Vakuum eine Temperatur von 40°C nicht überschritten werden, um eine Zersetzung zu verhindern.

Um das Zimtsäure-Derivat **7** zum Indol-2-carbonsäureester **8** zu zyklisieren, wird die Verbindung **7** in p-Xylen erhitzt und nach Entfernung des Lösemittels bei 5-8°C aufbewahrt, um eine quantitative Ausfällung zu gewährleisten. Jedoch wird bei Betrachten des Protonenresonanzspektrums festgestellt, dass außer dem gewünschten Produkt auch noch ein Isomer durch intramolekulare Zyklisierung nicht nur in Position 6 des Benzenringes sondern zusätzlich in Position 2 entstanden ist. Diese Vermutung wird außerdem durch die exakten Werte der Elementaranalyse, dem detektierten, für beide Isomere identischen, Molpeak und die typischen Indol-NH-Valenzschwingungen im IR-Spektrum belegt.

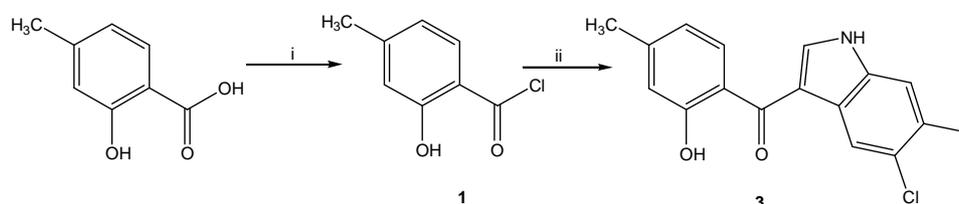
Da eine säulenchromatographische bzw. dickschichtchromatographische Trennung der beiden Verbindungen nicht möglich ist, werden sie gemeinsam weiter durch basenkatalysierte Verseifung zu der Indol-2-carbonsäure **9** umgesetzt. Interessanterweise tritt hier jedoch neben den zwei isomeren Verbindungen ein weiteres Indol auf, das anhand des Protonenresonanzspektrums identifiziert werden kann. Dieses dritte Indol-Derivat kann nur bei einer Charge des käuflich erworbenen 3-Chlor-4-fluorbenzaldehyds nachgewiesen

werden, so dass die Vermutung einer fehlerhaften Produktion seitens der Herstellerfirma nahe liegt.

Aufgrund der ähnlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften der beiden Isomere, ist auch hier keine Trennung möglich und die nachfolgende Decarboxylierung mit Diphenylether bei 260°C wird mit dem Gemisch durchgeführt. Da aufgrund des hohen Siedepunkts des Diphenylethers von ca. 260°C das Lösemittel nicht wie üblicherweise im Vakuum entfernt werden kann, wird die im erwähnten Patent beschriebene säulenchromatographische Methode verwendet. Zunächst wird mit n-Hexan der Diphenylether vollständig eluiert, wobei die beiden Produkte am Startpunkt der Säule verbleiben. Durch den Austausch des Elutionsmittels in Toluol/n-Hexan gelingt die Trennung in die beiden einzelnen Isomere, welche auch beide mit analytischen Daten belegt werden können.

Abweichend von der Patentvorschrift liefert die Synthese jedoch farblose, leicht rosafarbene Kristalle von **10** statt der beschriebenen leicht braunen Kristalle und farblose bis hellbeige Kristalle von **11** statt eines dunkelbraunen Öls.

Die Verknüpfung des hergestellten und metallierten 5-Chlor-6-fluorindols **10** mit dem 4-Methylsalicylsäurechlorid **1** erfolgt analog der anderen Salicyloylindole mit Hilfe der Acylierungsreaktion (**Abb. 54**).



i) Thionylchlorid, Δ T ii) Jod, Jodmethan, Magnesiumspäne, abs. Ether, **10**, Δ T, Eis, Wasser, RT

Abb. 54: Herstellung der Verbindung **3** durch Grignard-induzierte Acylierungsreaktion

Dazu wird das 5-Chlor-6-fluorindol **10** zunächst deprotoniert, metalliert und mit 4-Methylsalicylsäurechlorid **1** umgesetzt. Nach Erwärmen erfolgt die Hydrolyse, Extraktion mit Ethylacetat, Trocknung der vereinigten organischen Phasen und Entfernung des Lösemittels im Vakuum. Der verbleibende Rückstand ist die Wunschverbindung **3**, welche anhand des Protonenresonanzspektrums (**Abb. 55**) identifiziert werden kann.

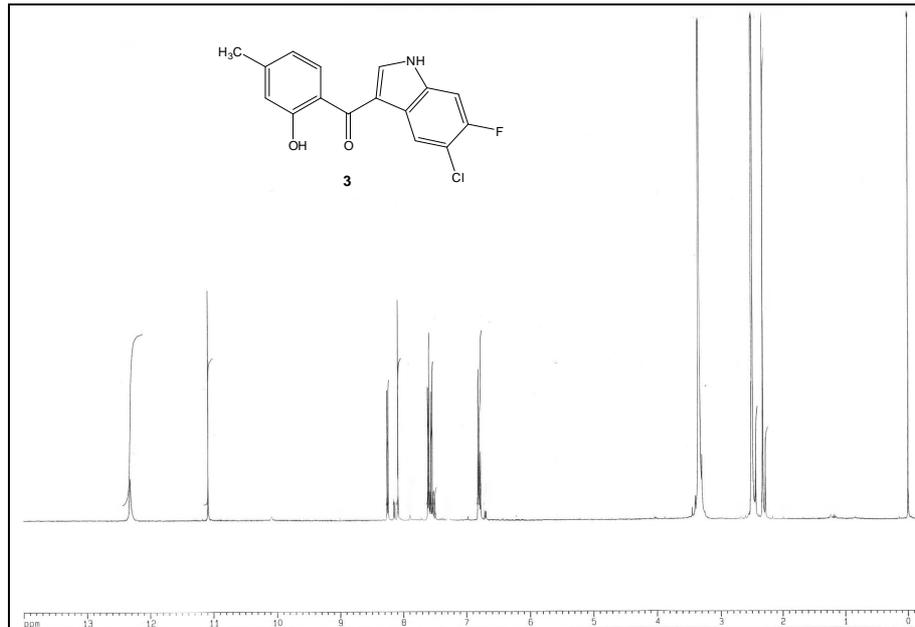


Abb. 55: Protonenresonanzspektrum der Verbindung 3

Das angefertigte Protonenresonanzspektrum zeigt die Singulets der NH-Gruppe bei 12,32 ppm und die der Hydroxygruppe bei 11,10 ppm. Die aromatischen Protonen sind in einem Bereich von ca. 6-8 ppm sichtbar, und die Protonen der Methylgruppe treten bei einer chemischen Verschiebung von 2,30 ppm auf und beweisen damit die postulierte Strukturformel des Salicyloylindols **3**.

3.1.4.2 Zytotoxische Untersuchungen der Verbindungen 3–5

Die drei Salicyloylindole **3**, **4** und **5** wurden an humanen MCF-Zelllinien auf Zytotoxizität untersucht. Die Ergebnisse zeigt **Abb. 56**.

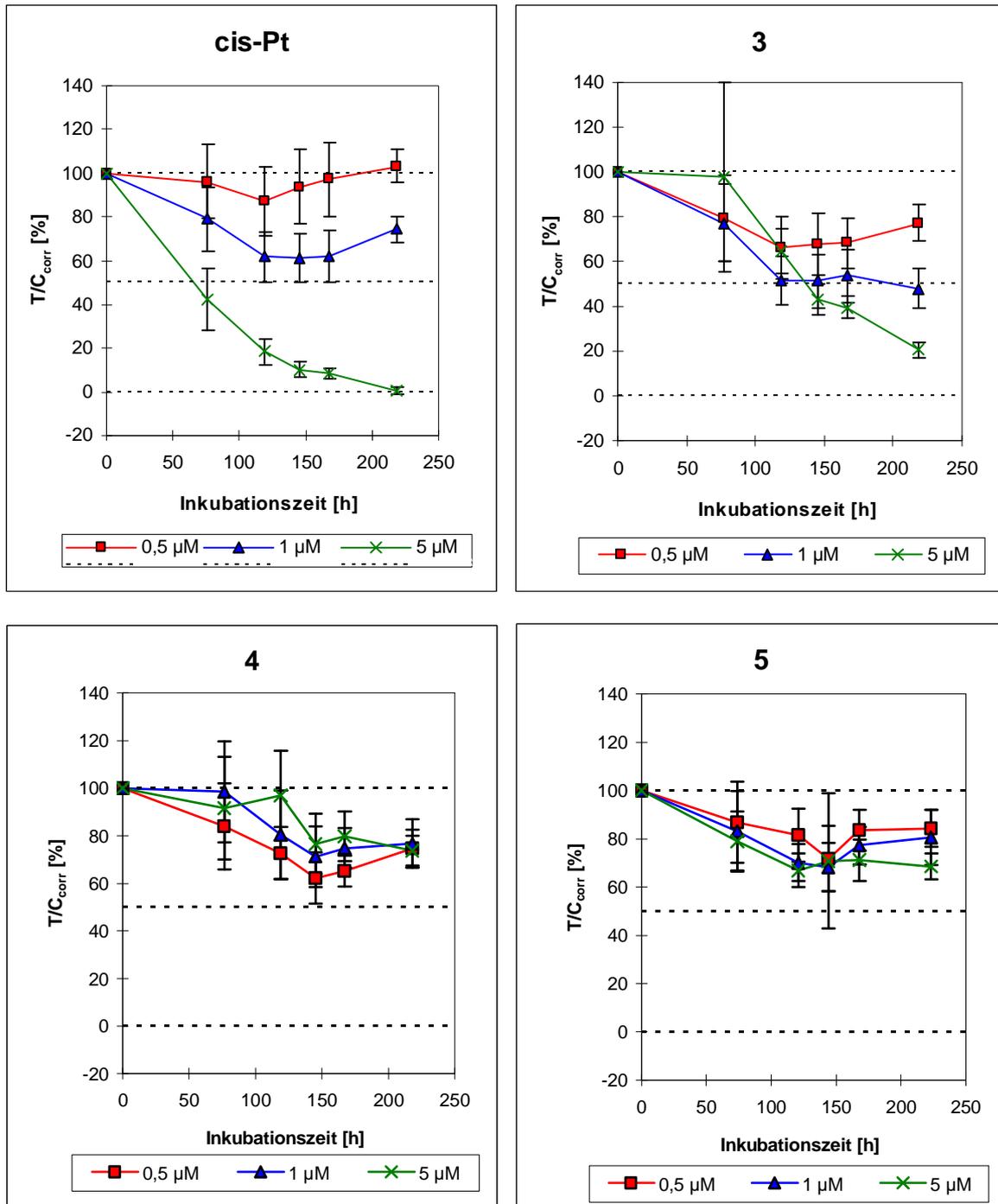


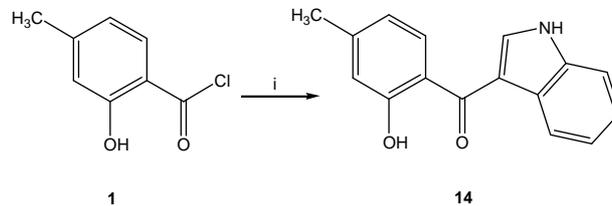
Abb. 56: Ergebnisse der Salicyloylindole und Cisplatin als Vergleich im MCF-7-Test

Aus diesen Diagrammen ist ersichtlich, dass sich die Vermutung einer starken Zytotoxizität nicht bestätigt hat. Alle drei Verbindungen zeigen zwar zytotoxische Wirkungen an MCF-7-Zelllinien, wobei die Verbindung **3** mit der Fluor- und Chlorsubstitution am Indolteil die stärkste Wirkung hervorruft, jedoch ist keine vergleichbar mit Cisplatin.

Um eine mögliche EGFR-TK-Inhibition zu untersuchen, wurde stellvertretend für die drei Salicyloylindole die Verbindung **4** getestet. Dabei zeigte sich, dass diese in einer Konzentration von 10 μM eine sehr geringe Aktivität von 13% aufweist.

3.1.4.3 Herstellung von (2-Hydroxy-4-methylphenyl)(1*H*-indol-3-yl)methanon (**14**)

Diese neue Konzeption der Herstellung der Salicyloylindole bot nun die Möglichkeit, die bisher wirksamste Verbindung **SW 62** im Rahmen dieser Arbeit in einer praktikablen und gut durchzuführenden Reaktion als Verbindung **14** mit akzeptablen Ausbeuten herzustellen. Die Synthese verlief analog der anderen Salicyloylindole in nur zwei Schritten unter Verwendung von **1** und Indol (**Abb. 57**).



i) Jod, Jodmethan, Magnesiumspäne, Eiskühlung; Indol, abs. Ether; Δ T; Eis

Abb. 57: Herstellung des Salicyloylindols **14** durch Grignard-induzierte Acylierungsreaktion

Sowohl das angefertigte EI-Massenspektrum (**Abb. 58**) als auch das Protonenresonanzspektrum (**Abb. 59**) bestätigen die Entstehung von Verbindung **14**.

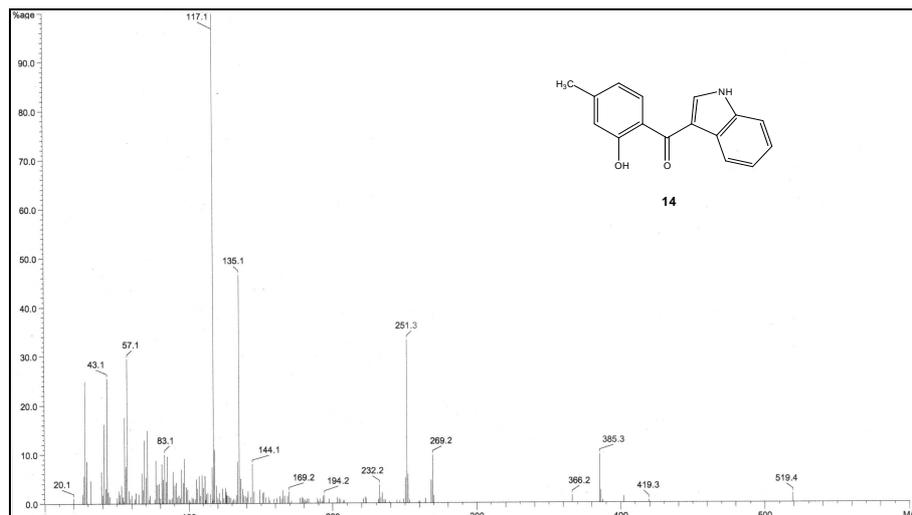


Abb. 58: EI-Massenspektrum des Salicyloylindols **14**

In dem abgebildeten Massenspektrum ist deutlich der berechnete Molpeak bei m/z 251 sichtbar. Auch das signifikante Bruchstück der 4-Methylsalicylsäure bei m/z 135 kann detektiert werden.

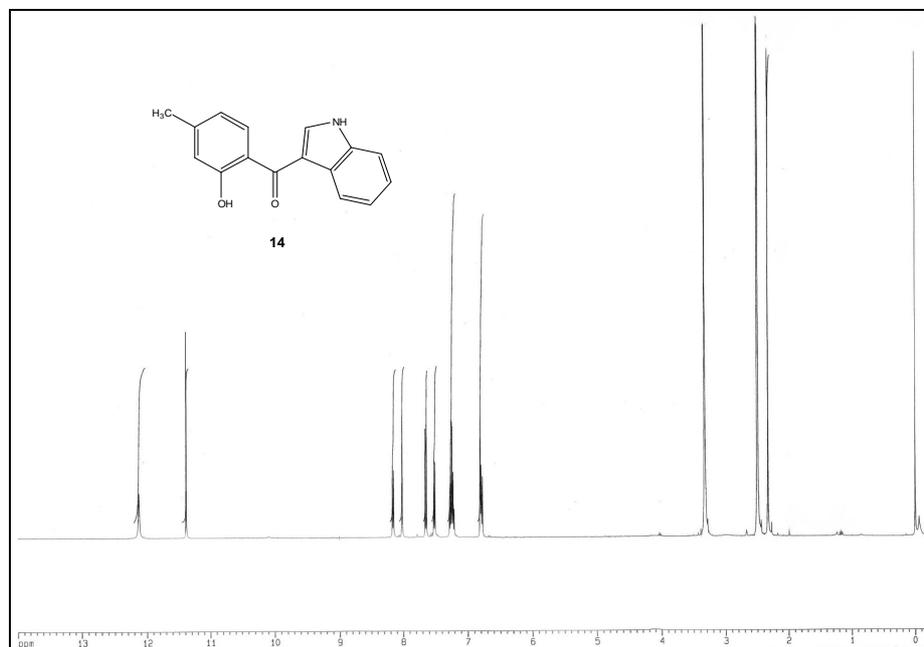


Abb. 59: Protonenresonanzspektrum der Verbindung **14**

Das Singulett des Indol-NH tritt bei 12,17 ppm auf und das Singulett der Hydroxygruppe bei 11,43 ppm. In einem Bereich von ca. 6-8 ppm sind die aromatischen Protonen sichtbar, und die Protonen der Methylgruppe erscheinen bei einer chemischen Verschiebung von 2,30 ppm. Diese Befunde beweisen, dass die von mir hergestellte Verbindung **14** mit der auf anderem Wege synthetisierten Verbindung **SW 62** identisch ist.

Da die Verbindung **14** als **SW 62** eine hervorragende zytotoxische Aktivität an der MCF-7-Zelllinie zeigte, der Mechanismus der zytotoxischen Wirkung aber bisher unklar ist, wurde ein Colchicin-Radioligand-Binding-Assay durchgeführt, um eine mögliche Tubulin-Inhibition zu untersuchen. Dabei wird das Ausmaß der kompetitiven Verdrängung des radioaktiv markierten Colchicins durch die zu testende Substanz von der Bindungsstelle am Tubulin untersucht. Bei anderen zytotoxischen Stilben-Derivaten, z.B. dem Combretastatin A-4 (**Abb. 60**) aus dem südafrikanischen Baum *Combretum caffrum*, konnte als Mechanismus der Zytotoxizität eine Hemmung der Tubulin-Polymerisation (IC_{50} 2-3 μ M) nachgewiesen werden [84-86].

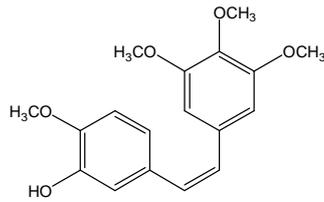


Abb. 60: Combretastatin A-4

Combretastatin-Derivate binden kompetitiv an die Colchicin-Bindungsstelle am Tubulin und bewirken dadurch eine Anhäufung von in der Metaphase arretierten Zellen und verhindern somit die Anordnung der Mikrotubuline [85-87].

Da sich die Salicyloylindole als Stilben-Derivate formulieren lassen (**Abb. 26**), schien eine Untersuchung hinsichtlich antimittotischer Eigenschaften interessant.

Im Colchicin-Radioligand-Binding-Assay zeigt Verbindung **14** allerdings eher eine minimale Stimulation von 5% bei einer Konzentration von 10 μM statt einer erwarteten Inhibition.

Damit bleibt der Mechanismus der starken Zytotoxizität des Salicyloylindols **14** weiterhin ungeklärt.

3.1.5 2-Amino-4-methylsalicyloylindol

Um die Relevanz der Donatorfunktion der Hydroxygruppe der Salicylsäure für die Bindung an den EGF-Rezeptor zu untersuchen, wird das Anthranilsäure-Derivat **15** konzipiert (**Abb. 61**).

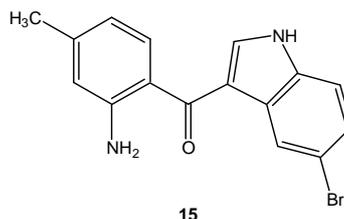
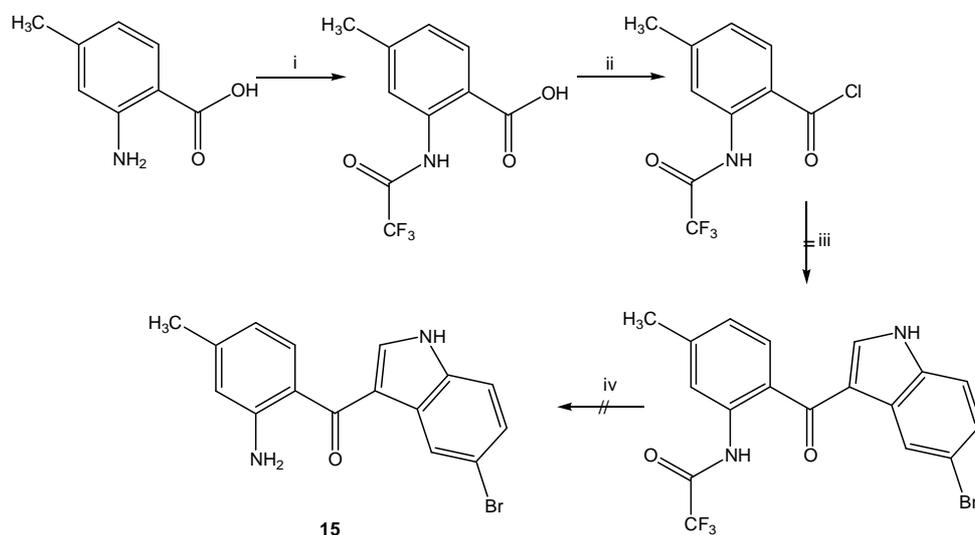


Abb. 61: Angestrebtes Anthranilsäure-Derivat **15**

Die Bindung an den Rezeptor wird vermutlich über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen erfolgen. Dabei fungiert die Hydroxygruppe der Salicyloylindole als Donator, die Aminogruppe der Anthranilsäure jedoch als Akzeptor. Ein Vergleich der EGFR-TK-Inhibition mit den Salicyloylindolen schien deshalb hinsichtlich einer eventuellen Wirkungssteigerung interessant.

Die Herstellung von **15** verläuft analog der Salicyloylindole, nur dass hier vorher die Amino-Gruppe durch N-Acetylierung mit Trifluoracetanhydrid geschützt werden muss, da ansonsten dort eine unerwünschte Reaktion mit dem Thionylchlorid stattfinden könnte. Der Syntheseverlauf ist in **Abb. 62** dargestellt.



- i) Trifluoracetanhydrid, abs. 1,4-Dioxan, RT ii) Thionylchlorid, ΔT ;
iii) Jod, Jodmethan, Magnesiumspäne, Eiskühlung; 5-Bromindol, abs. Ether, Eiskühlung; ΔT ; Eis;
iv) K_2CO_3 , Methanol/Wasser, ΔT

Abb. 62: Herstellung der Verbindung **15**

Das erfolgreiche Gelingen der N-Acetylierung der 4-Methylantranilsäure kann magnetresonanzspektroskopisch belegt werden (**Abb. 63**).

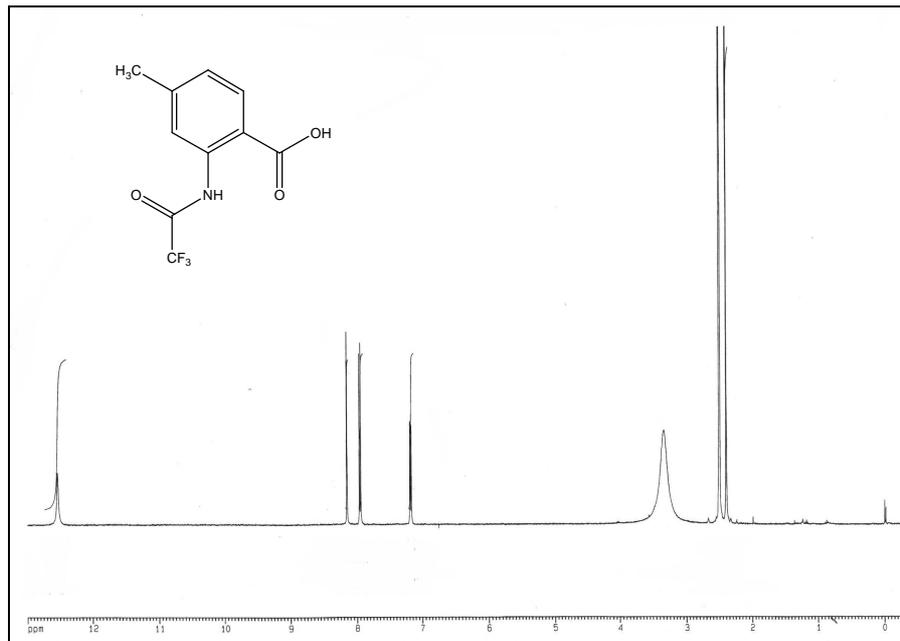


Abb 63: Protonenresonanzspektrum der acetylierten 4-Methylantranilsäure

Das erhaltene Säurechlorid wurde anschließend gleich weiter mit dem metallierten 5-Bromindol umgesetzt. Die Acylierung wird wie bereits beschrieben durchgeführt.

Überraschenderweise erfolgte hier jedoch nicht wie erwartet die Verknüpfung des Antranilsäureteils in der Position 3 des Indols sondern in der Position 1 am Stickstoff. Die Struktur der entstandenen Verbindung konnte durch Magnetresonanzspektroskopie belegt werden.

Abb. 64 zeigt die Struktur der entstandenen Verbindung und **Abb. 65** das dazugehörige Protonenresonanzspektrum.

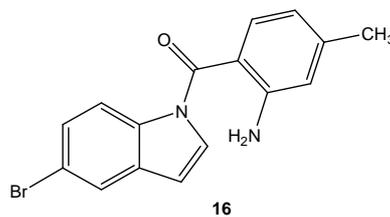


Abb. 64: Das durch Acylierung entstandene Anthraniloylindol **16**

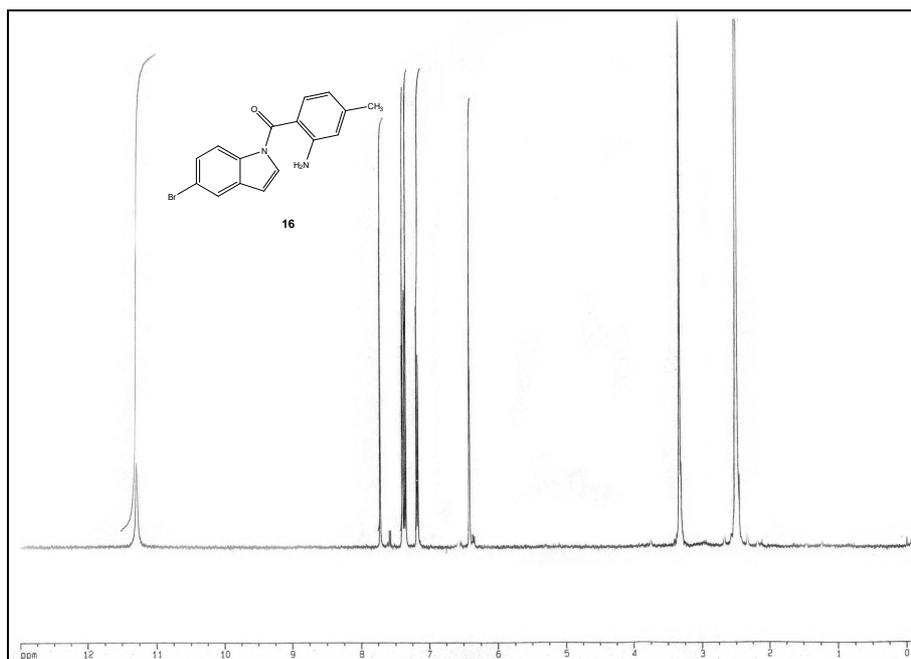


Abb. 65: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **16**

In dem Protonenresonanzspektrum sind deutlich die beiden *ortho*-Kopplungen für die Wasserstoffe in Position 2 und 3 des Indols zu erkennen (d, $^4J=7,24$ Hz, H2' und d, $^4J=8,92$ Hz, H3'). Bei der geplanten Verbindung **15** würde das Indol-H2' aufgrund des fehlenden Kopplungspartners ein Singulett ergeben, und außerdem wäre ein deutliches Signal für das Indol-NH sichtbar. Also lässt sich anhand des abgebildeten Protonenresonanzspektrums die Entstehung des Anthraniloylindols **16** belegen. Jedoch konnte durch massenspektroskopische Untersuchungen kein Molpeak identifiziert werden.

Da die Verbindung nicht in der gewünschten reinen Form isoliert werden konnte und die von den Salicyloylindolen abweichende Struktur keine EGFR- bzw. zytotoxische Aktivitäten erwarten ließen, wurde auf eine pharmakologische Testung in diesem Fall verzichtet.

3.2 Lavendustin A-Derivate mit EGFR-TK-inhibitorischer und zytotoxischer Wirkung

3.2.1 Salicylsäure-Derivate mit Lavendustin A-Teilstruktur

Die 4-Methylsalicyloylstruktur bei Verbindung **SW 62** war entscheidend für die hervorragenden zytotoxischen Eigenschaften, aber es konnte kein Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität und einer EGFR-TK-Inhibition gefunden werden. **SW 62** zeigt nur eine schwache EGFR-TK-inhibitorische Aktivität. Aus diesem Grund werden nun Salicylsäure-Derivate gesucht, die sich im Salicylsäure-Teil von **SW 62** unterscheiden. Hier wurde die 4-Hydroxysalicyloylstruktur bevorzugt, da dieses Strukturelement bei der Traxler-Verbindung T1 offensichtlich für gute EGFR-TK-inhibitorische Aktivität sorgt ($IC_{50} = 0,1 \mu M$).

Es werden in erster Linie Salicylsäureanilide mit mehrfachen phenolischen Hydroxygruppen im Salicylteil konzipiert, z.B. **RA 26** (**Abb. 66**).

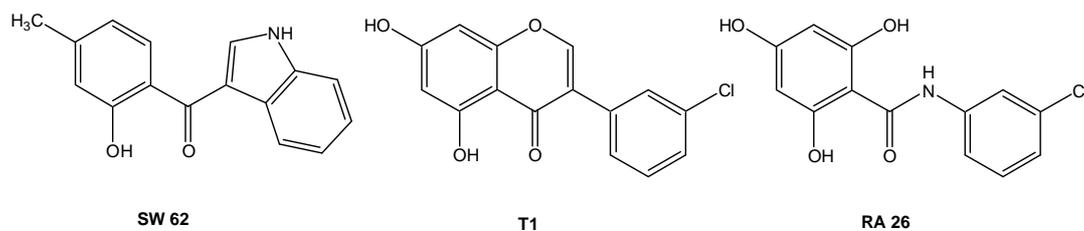


Abb. 66: Das Salicyloylindol **SW 62**, das Isoflavon-Derivat **T1** nach *Traxler* et al. und das geplante Salicylanilid **RA 26**

Aus diesen Gründen entwickelte *Albuschat* zunächst verschiedene halogensubstituierte Anilide der 4-Hydroxysalicylsäure (**RA 26** und **RA 27**), die auf ihre EGFR-TK-inhibitorische Aktivität untersucht wurden (**Abb. 67**).

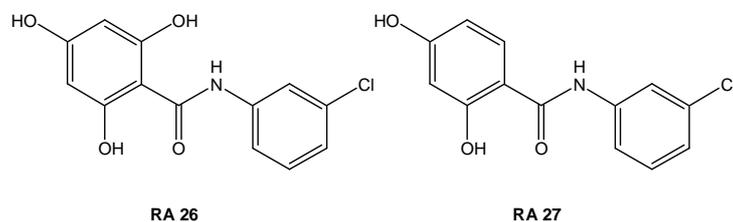


Abb. 67: Von *Albuschat* hergestellte und auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestete Salicylanilide

Die Ergebnisse der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität sind in **Tab. 4** dokumentiert.

| Verbindung | RA 26 | RA 27 |
|---|-------|-------|
| EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in % (c=10 µM) | 62 | 63 |

Tab. 4: EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der Anilide **RA 26** und **RA 27**

Die beiden Salicylanilide **RA 26** und **RA 27** zeigen trotz mehrerer eingeführter Hydroxy-Gruppen nur moderate EGFR-TK-inhibitorische Wirkungen [78].

Um diese zu optimieren, wurden schließlich in Anlehnung an die Salicyloyl-Struktur des Bakterien-Toxins Lavendustin A verschieden substituierte Aminosalicylsäureanilide konzipiert und hergestellt, bei denen die para-Aminofunktion N-benzilyliert ist. Solche Strukturen besitzen eine enge Verwandtschaft mit dem **Pharmakophor 01** des Lavendustin A.

Das Pharmakophor der beiden Ende der 1980er Jahre aus dem Bakterium *Streptomyces griseolavendus* isolierten Verbindungen Lavendustin A und B diente dabei als Vorbild bei der Entwicklung neuer EGFR-TK-Inhibitoren. **Abb. 68** zeigt Lavendustin A und B zusammen mit dem **Pharmakophor 01**.

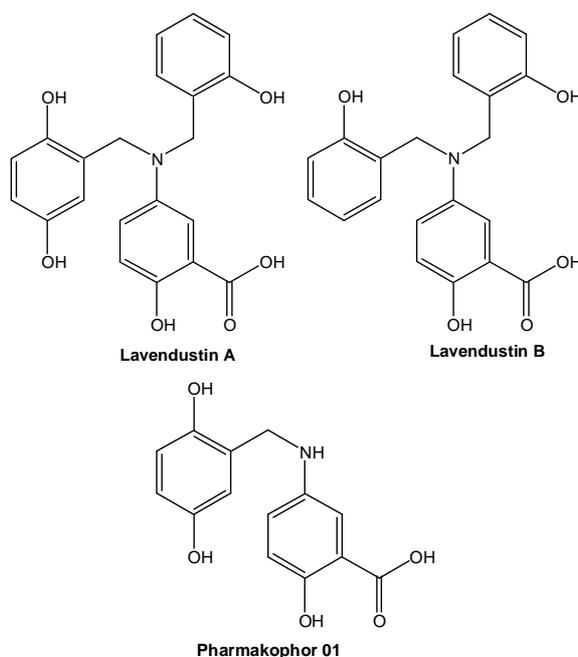


Abb. 68: Lavendustin A und B und das Pharmakophor 01

Lavendustin A und B sind Derivate der 5-Dibenzylaminosalicylsäure mit einer ringoffenen Salicyloylstruktur. Als biologisch aktives Strukturelement konnte von *Onoda et al.* die 5-(2,5-Dihydroxybenzylamino)-salicylsäure als **Pharmakophor 01** identifiziert werden, die eine *in-vitro* EGFR-TK-Inhibition mit einer IC_{50} von 0,0044 μM zeigt.

Lavendustin A und B stellen potente *in-vitro* EGFR-Inhibitoren dar, wobei Lavendustin A mit einer IC_{50} von 0,012 μM etwa 100fach stärker wirksam ist als Lavendustin B ($IC_{50}=1,341 \mu\text{M}$). Sie sind jedoch vermutlich aufgrund der hohen Polarität und dem daraus resultierenden schlechten Penetrationsvermögen in Zellkulturen nahezu unwirksam [88, 89].

Deshalb sollte das Pharmakophor neben der erwarteten EGFR-TK-Inhibition durch veränderte pharmakologische Parameter in zytotoxisch aktive Verbindungen überführt werden. Beispiele für eine derartige Konzeption sind die in **Abb. 69** erwähnten Verbindungen.

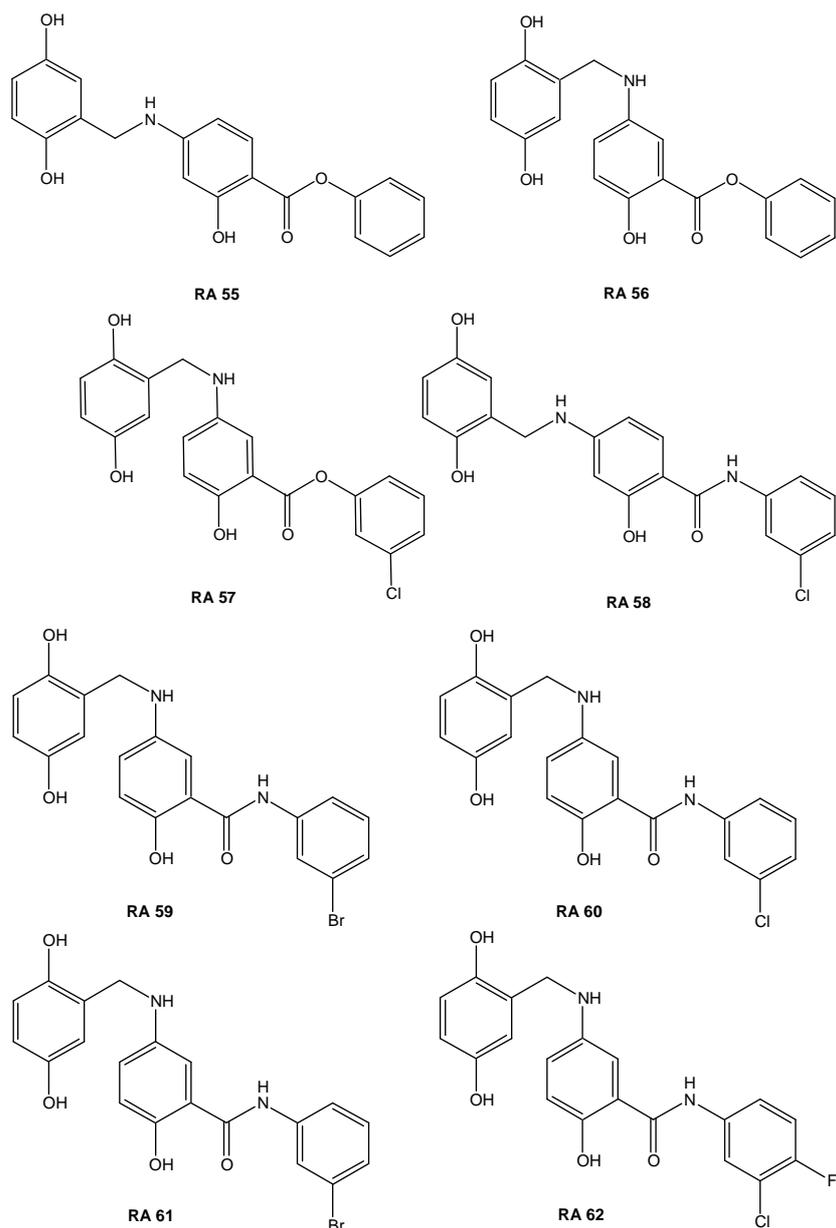


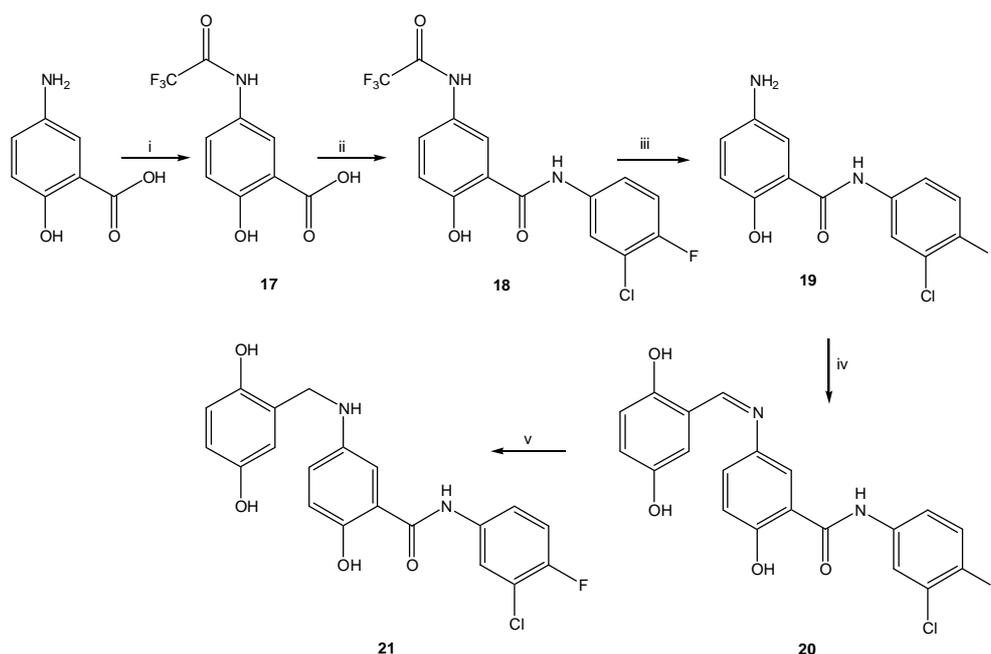
Abb. 69: Lavendustinderivate nach *Albuschat*

Die von *Albuschat* hergestellten 4- bzw. 5-Aminosalicylsäure-Derivate sind entweder verschieden halogensubstituierte Phenylester (**RA 55–RA 57**) oder Säureanilide (**RA 58–RA 62**) [68].

Da bei der Verbindung **RA 62** aufgrund der höheren Lipophilie durch den Fluor-Chlor-Anilin-Rest die stärkste EGFR-TK-inhibitorische Aktivität von allen hergestellten Derivaten beobachtet wurde und diese auch in einem *in-vitro* Anti-Tumor-Screen zunächst an drei und anschließend an 60 humanen Tumorzelllinien ausgeprägte zytotoxische Effekte zeigte, wurden vom National Cancer Institute für das *in-vivo* Testprogramm 250 mg Substanz angefordert. Die Verbindung **RA 62** entspricht der in dieser Arbeit zitierten Verbindung **21**.

3.2.1.1 Herstellung der Verbindung 21

Die Synthese zur Herstellung der erforderlichen Substanzmenge orientiert sich an dem von *Albuschat* beschriebenen Herstellungsweg für die Verbindung **RA 62**. Jedoch bereitete das upscaling von einer durch *Albuschat* erreichten Ausbeute von etwa 60 mg auf die benötigten 250 mg vor allem durch die problematische Aufreinigung zahlreiche Schwierigkeiten, so dass einige Optimierungen vorgenommen wurden. **Abb. 70** zeigt den durchgeführten Syntheseweg, der zu Verbindung **21** führt.



- i) Trifluoressigsäureanhydrid, abs. 1,4-Dioxan, RT; ii) Thionylchlorid, Δ T, 3-Chlor-4-fluoranilin, 1,4-Dioxan, Δ T;
 iii) methanolische K_2CO_3 -Lsg., Δ T; iv) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig, Δ T;
 v) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

Abb. 70: Herstellung der Verbindung 21

Ausgehend von der 5-Aminosalicylsäure erfolgt zuerst eine N-Acetylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid in absolutem 1,4-Dioxan zu Verbindung **17**, um die Amino-Gruppe vor einem unerwünschten Angriff durch das Thionylchlorid im nächsten Schritt zu schützen. Verwendet wird Trifluoressigsäureanhydrid, weil es im Vergleich zu Acetanhydrid durch die elektronenziehenden Effekte der Trifluormethylgruppe eine stärkere Carbonylaktivität besitzt und die Reaktion somit besser verläuft.

Im zweiten Schritt wird in einer S_N intern-Reaktion mit Thionylchlorid das Säurechlorid der trifluoressigsäure-5-Aminosalicylsäure gebildet und dieses nach Entfernen des überschüssigen Lösemittels gleich weiter mit 3-Chlor-4-fluoranilin in 1,4-Dioxan zu Verbindung **18** umgesetzt. Die phenolische Hydroxy-Gruppe reagiert aufgrund der Ausbildung

einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung nicht und muss demnach auch nicht geschützt werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit Ethylacetat/Ethanol [9+1] gelingt eine zweifelsfreie Identifikation des geschützten Anilids **18** der 5-Aminosalicylsäure.

Nach Abspalten der Schutzgruppe mit K_2CO_3 in Ethanol/Wasser wird das Amin **19** erhalten. Hierbei ist häufiges Extrahieren mit Ethylacetat wichtig, da sich die Verbindung **19** aufgrund der freien Amino-Gruppe in Position 5 in der wässrigen Phase stark anreichert. Nach dem Entfernen des Lösemittels kann **19** als hautfarbendes Pulver isoliert werden.

Im nächsten Schritt erfolgt die Kondensation von **19** mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd in Ethanol/Eisessig zur Schiff'schen Base **20**. Hier ist es essentiell, dass nach Entfernen des Ethanols der Eisessig vollständig neutralisiert wird, um einen orangefarbenen Feststoff zu erhalten. Andernfalls bleibt die Verbindung **20** durch Einschluss von Eisessig ölig.

Durch Reduktion von **20** mit Borandimethylamin-Komplex in Eisessig unter Eiskühlung und anschließendem Rühren bei Raumtemperatur kann die gewünschte Endverbindung **21** isoliert werden. Auch hier ist wieder die vollständige Entfernung des Eisessigs für das Auskristallisieren von Bedeutung. Es bildete sich zunächst durch Lösemiteleinschlüsse ein brauner öliges Rückstand, der häufig durch mehrmaliges Ausrühren mit Dichlormethan und anschließendem Einrotieren zum Auskristallisieren gebracht werden konnte. Es erwies sich jedoch als vorteilhaft, so wenig wie möglich Eisessig einzusetzen, mit einem leichten Überschuss an Borandimethylamin-Komplex zu arbeiten, den Eisessig gut durch Neutralisieren mit 5N-NaOH zu entfernen und die Reaktionsmischung so lange bei Raumtemperatur rühren zu lassen, bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Je nach Aktivität des Bor-Komplexes kann sich somit die Reaktionsdauer von ca. einer Stunde bis zu 48 Stunden und mehr unterscheiden.

Wenn diese Punkte beachtet wurden, ließ sich das Produkt nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit Ethylacetat/Ethanol [9+1] problemlos isolieren und ergab ein leicht elektrostatisch aufladbares gelbes Pulver.

Durch mehrmaliges Durchführen dieser Syntheseschritte konnte schließlich die erforderliche Menge von 250 mg hergestellt werden.

Die anderen von *Albuschat* entwickelten Anilide **RA 58–RA 61** wurden nach dem gleichen Syntheschema hergestellt.

Unter Verwendung von 3-Chlor- bzw. 3-Bromanilin statt des 3-Chlor-4-fluoranilins können die Verbindungen **RA 60** bzw. **RA 61** erhalten werden.

Die Ester-Verbindungen **RA 58** und **RA 59** können auf dem gleichen Weg durch Umsetzung mit 4-Amino- statt mit 5-Aminosalicylsäure und 3-Chlor- bzw. 3-Bromanilin hergestellt werden.

Die Verbindung **RA 55** kann durch Kondensation von 2,5-Dihydroxybenzaldehyd mit Phenyl-4-aminosalicylat zur Schiff'schen Base und anschließender Reduktion mit Borandimethylamin-Komplex in Eisessig hergestellt werden.

Die Synthese von Verbindung **RA 56** weicht etwas vom bisherigen Syntheschema ab, weil hier von der 5-Nitrosalicylsäure ausgegangen wird, welche zunächst mit Phenol in Gegenwart von Phosphorylchlorid zu Pheny-5-nitrosalicylat umgesetzt wird. Anschließend erfolgt die Reduktion der Nitro-Gruppe mit Pd/C in Ethanol/Cyclohexen, die Kondensation mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd zur Schiff'schen Base und deren Reduktion mit Borandimethylamin-Komplex zu Verbindung **RA 56**.

Unter Verwendung von 3-Chlorphenol kann analog zu diesem Weg Verbindung **RA 57** synthetisiert werden [78].

3.2.1.2 EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der Lavendustin-Anilide RA 58-62 und des Esters RA 57

Da **RA 55** und **RA 56** nicht in ausreichender Menge und Reinheit hergestellt werden konnten und **RA 58** als Brom-substituierte Verbindung nur als Modellsubstanz dient, wurden nur die Verbindungen **RA 57**, **RA 58** und **RA 60- 62** (**Abb. 71**) auf ihre *in-vitro*-EGFR-TK-inhibitorische Aktivität getestet. Die Ergebnisse zeigt die **Tab. 5**.

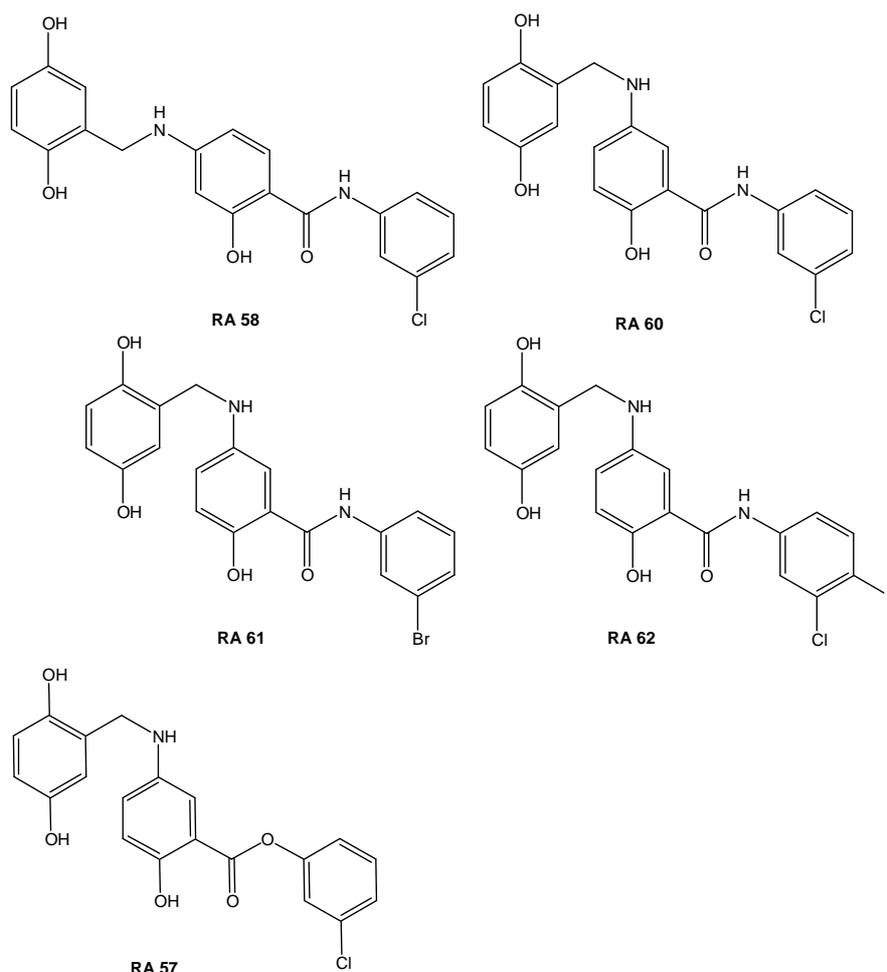


Abb. 71: Die auf EGFR-TK inhibitorische Aktivitäten getesteten Verbindungen

| Verbindung | RA 58 | RA 60 | RA 61 | RA 62 | RA 57 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in % (c=10 μ M) | 83 | 88 | 90 | 96 | 74 |

Tab. 5: EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der Salicylsäure-Derivate mit Lavendustin A-Teilstruktur

Dabei ist interessant, dass alle Verbindungen nahezu gleiche Aktivitäten zeigen, unabhängig von ihrer Substitution und der Position des 2,5-Dihydroxybenzylrestes. Verbindung **RA 61** lieferte außerdem in einer Nachtestung bei einer Konzentration von 0,1 μ M eine bemerkenswerte inhibitorische Aktivität von 42 %. Damit konnte eine Wirkungssteigerung um etwa das Hundertfache gegenüber den Salicylaniliden erreicht werden [78].

Die Entwicklung der Lavendustin-Derivate nach *Albuschat* orientierte sich an dem bereits beschriebenen Bindungsmodell von *Traxler et al.* Die Verbindung **RA 58** beispielsweise

lässt sich mit dem Traxler'schen Isoflavon T1 in Deckung bringen. Somit könnte das Proton der 4-Amino-Gruppe die postulierten Wasserstoffbrücken zu Methionin 769 und Glutamin 767 in der ATP-Bindungstasche der EGFR-Tyrosinkinase ausbilden, und der Halogen-substituierte Anilin-Rest würde die Zuckertasche besetzen. **Abb. 72** zeigt exemplarisch für **RA 58** ein mögliches Bindungsmodell, das sich an dem Modell von *Traxler et al.* orientiert.

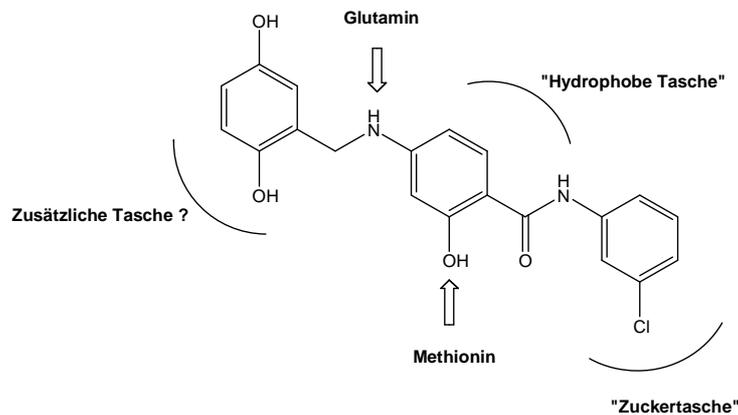


Abb. 72: Mögliches Bindungsmodell für **RA 58**

Bei den anderen Lavendustin A-Derivaten sind ähnliche Bindungsverhältnisse zu erwarten, so dass das Traxler-Modell für diese Strukturen gleichfalls formuliert werden könnte.

3.2.1.3 *in-vitro* und *in-vivo* Tests mit Ergebnissen der Verbindung 21

Da die Verbindung **21** als **RA 62** von *Albuschats* Lavendustin A-Derivaten die stärkste EGFR-TK-inhibitorische Aktivität zeigt, wurde diese am National Cancer Institute, Bethesda, Maryland (USA) in einem *in-vitro* Anti-Tumor-Screen zunächst an drei und anschließend an 60 humanen Tumorzelllinien getestet. Bei dem ersten Test wurden Zelllinien von Brustkrebs (MCF-7), Lungenkrebs (NCI-H469) und ZNS-Krebs (SF-268) verwendet. Die 60 Zelllinien stammten von Leukämie, nichtkleinzelligem Lungenkarzinom, Kolonkrebs, ZNS-Krebs, Melanom, Eierstock-, Nieren-, Prostata- und Brustkrebs.

Dabei stellten sich ausgeprägte zytotoxische Effekte bei einigen Zelllinien heraus. Vor allem bei den beiden Leukämiezelllinien MOLT-4 und RPMI-8226, bei der Zelllinie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms HOP-92, der ZNS-Zelllinie U251, der Melanomzelllinie UACC-62 und der Brustkrebszelllinie BT-549 zeigt **RA 96** eine sehr gute zytotoxische Aktivität im 10^{-6} -molaren Bereich und bei der Lungenkrebszelllinie NCI-H522 sogar im 10^{-7} -molaren Bereich. Eine detaillierte tabellarische Auflistung der Ergebnisse folgt in den Kapiteln 3.2.2.3 und 3.2.2.4.

Anschließend wurde die Substanz **21** in das *in-vivo* Testprogramm des National Cancer Institutes aufgenommen. Für diesen Hollow Fiber Assay benötigte das NCI 200 mg Substanz, die wiederum im Rahmen dieser Arbeit entsprechend der Beschreibung im Kapitel 3.2.1.1 hergestellt wurden.

Die Verbindung **21** wurde dabei an 12 verschiedenen humanen Tumorzelllinien auf Zytotoxizität getestet, wobei die folgenden Zelllinien verwendet wurden: NCI-H23 und NCI-H522 (Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom), MDA-MB-231 und MDA-MB-435 (Brustkrebs), SW-620 und COLO-205 (Kolonkrebs), LOX IMVI und UACC-62 (Melanom), OVCAR-3 und OVCAR-5 (Eierstockkrebs), U 251 und SF-295 (ZNS-Krebs). Die präparierten Zelllinien wurden auf Glasfasern aufgebracht und Mäusen implantiert. Dabei erhielt jede Maus drei intraperitoneale und drei subkutane Implantate. Nach Verabreichen der Testsubstanz wurde mit einem MTT assay die Endpunktmessung mit Hilfe der optischen Dichte bei 540 nm durchgeführt. Das prozentuale Zellwachstum wurde berechnet und mit der Kontrollsubstanz verglichen.

Für die Aufnahme in den darauffolgenden subcutanen humanen Tumor-Xenograft Assay gelten bestimmte Kriterien. Die Reduktion des Zellwachstums muss z.B. mindestens 50 % in 10 der 48 möglichen Testkombinationen betragen.

Verbindung **21** stellte sich im Hollow Fiber Assay jedoch als inaktiv heraus. Die erforderliche Punktzahl für den sich anschließenden Xenograft Assay wurde nicht erreicht. Jedoch führte das National Cancer Institute aufgrund der bemerkenswerten EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität noch einen Special EGFR + Hollow Fiber Assay an EGFR-abhängigen Zelllinien durch. Die dafür benötigten 250 mg Substanz wurden auch im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Auch hier ergaben sich wieder die bereits beschriebenen Schwierigkeiten bei der praktischen Durchführung. Die benötigte Menge konnte aber schließlich analysenrein erhalten werden.

Bei diesem Special EGFR + Hollow Fiber Assay wurden EGFR-abhängige humane Zelllinien des Ovarialkarzinoms (OVCAR-5), des Nierenkrebses (RXF-393 und A498), des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NCI-H226 und NCI-H322M) und des Prostatakrebses (DU-145) verwendet und mit Taxol als positiver Kontrollsubstanz verglichen. Dieser Test ergab eine komplette Inaktivität von **21**.

Die moderate zytotoxische *in-vitro* Aktivität aus dem 60-Zelllinien-Test hat sich damit im präklinischen *in-vivo* Special EGFR+Hollow Fiber Assay nicht bestätigt.

3.2.2 Isomere Verbindungen 26 und 33

Aufgrund der bemerkenswerten EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität der Verbindung **21** und um die Auswirkungen der Position des 2,5-Dihydroxybenzylrestes auf die zytotoxischen und EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere Isomere entwickelt, die sich von der 3-Aminosalicylsäure (Verbindung **33**) und der 4-Aminosalicylsäure (Verbindung **26**) ableiten lassen. In **Abb. 73** sind die beiden Verbindungen **26** und **33** zusammen mit **21** dargestellt.

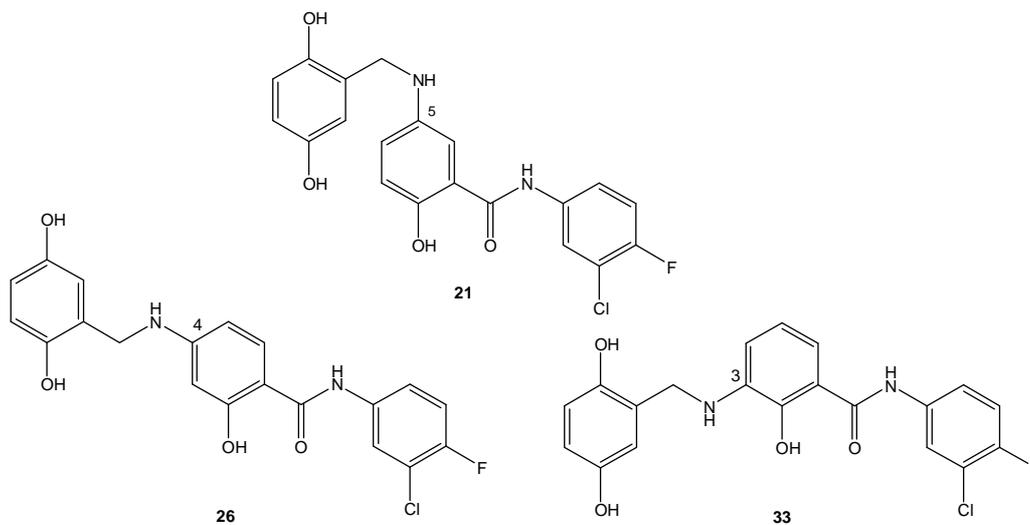


Abb. 73: Die beiden Isomere **26** und **33** zusammen mit **21**

Verbindung **21** wird aus der 5-Aminosalicylsäure aufgebaut, welche als Mesalazin aufgrund ihrer antiinflammatorischen und antiproliferativen Wirkung bei der Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa und auch als Chemoprotektor zur Vorbeugung gegen kolorektale Karzinome bei der Colitis ulcerosa eingesetzt wird. Mesalazin vermittelt über die Bindung an den PPAR-gamma (Peroxisomen Proliferator Activated Receptor gamma) eine Proliferation von Epithelzellen im Kolon und fördert die Apoptose [90-93].

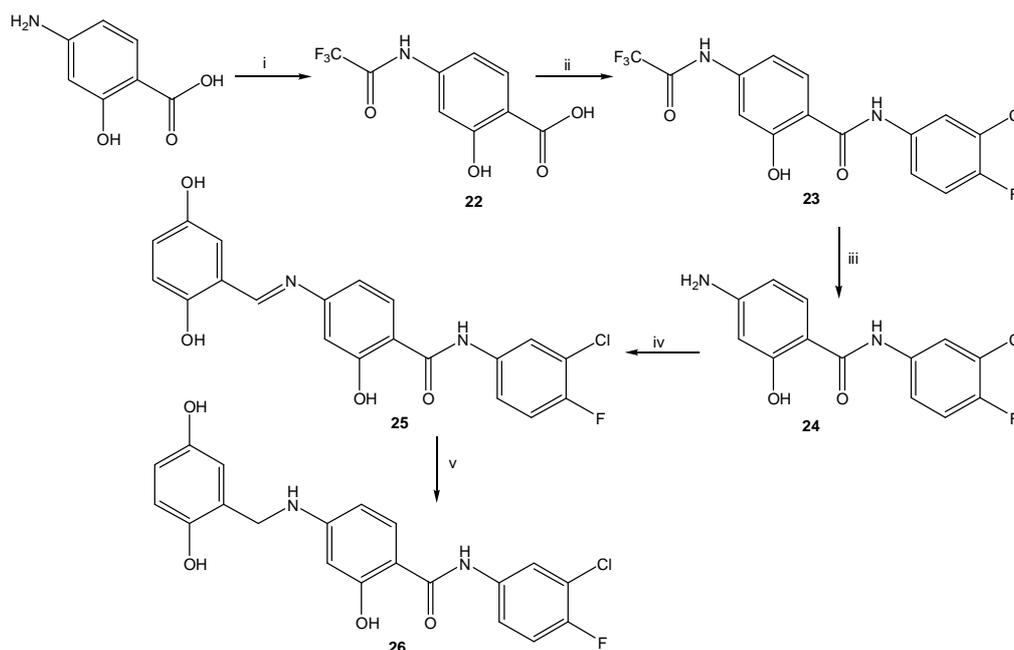
Es erschien nun interessant, ein weiteres Lavendustin A-Derivat zu entwickeln, welches sich wiederum von einem bekannten Arzneistoff ableitet. Verbindung **26** wird ausgehend von der 4-Aminosalicylsäure (PAS) synthetisiert. Diese wird seit 1946 als Tuberkulostatikum eingesetzt [94], das als Antimetabolit kompetitiv die p-Aminobenzoesäure bei der bakteriellen Folsäuresynthese verdrängt und als bakteriostatisches Reservemittel dient [95]. In der Standardtherapie der Tuberkulose werden heute Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol oder Streptomycin verwendet [96].

Aufgrund der hohen Raumbeanspruchung der drei vicinalen Substituenten besitzt die Verbindung **33** eine bemerkenswerte Struktur, die eventuell einige Probleme bei der Synthese bereiten könnte. Bei der 3-Aminosalicylsäure handelt es sich zwar nicht um einen Arzneistoff, aber auch bezüglich der Ausrichtung des Moleküls in der Rezeptorbindungstasche des EGFR und des Vergleichs mit den beiden anderen Isomeren erscheint die Herstellung von Verbindung **33** interessant.

3.2.2.1 Herstellung der Verbindung 26

Von diesen beiden interessanten Strukturen **26** und **33** wird zunächst das Augenmerk auf die Verbindung **26** gelegt.

Die Synthese von **26** (**Abb. 74**) verläuft analog der von **21**, jedoch wird aufgrund des veränderten Substitutionsmusters ein anderes chemisches Verhalten hinsichtlich der Durchführung der einzelnen Syntheseschritte beobachtet.



- i) Trifluoressigsäureanhydrid, abs. 1,4-Dioxan, RT; ii) Thionylchlorid, Δ T, 3-Chlor-4-fluoranilin, 1,4-Dioxan, Δ T;
 iii) methanolische K₂CO₃-Lsg., Δ T; iv) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig, Δ T;
 v) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, Eiskühlung \rightarrow RT

Abb. 74: Syntheseverlauf für die Verbindung **26**

Analog der Synthese von **21** geht die Herstellung von **26** von der 4-Aminosalicylsäure aus, die in einem ersten Schritt mit Trifluoressigsäureanhydrid in absolutem 1,4-Dioxan zu Verbindung **22** umgesetzt wird.

Nach dieser Schutzgruppeneinführung erfolgt nach Chlorierung mit Thionylchlorid und Entfernen des überschüssigen Lösemittels die Umsetzung von **22** mit 3-Chlor-4-fluoranilin zu Verbindung **23**. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit Ethylacetat/Ethanol [9+1] kann das Produkt als hautfarbenes Pulver isoliert werden.

Mit K_2CO_3 in Ethanol/Wasser wird die Schutzgruppe abgespalten, und man erhält das freie Amin **24**. Ebenso wie bei der Herstellung von **21** ist hier eine starke Verteilung der Aminoverbindung in der wässrigen Phase zu beobachten. Aber durch häufiges Extrahieren mit Ethylacetat kann eine ausreichende Anreicherung der Wunschverbindung **24** in der organischen Phase erreicht werden.

Durch Umsetzung von Verbindung **24** mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd in Ethanol/Eisessig wird die Schiff'sche Base **25** erhalten. Auch hier ist wieder die vollständige Neutralisation des Eisessigs essentiell für das Anreichern der Verbindung. Nach kompletter Entfernung des Eisessigs wird ein purpurrotes Pulver erhalten.

Bei der anschließenden Reduktion mit Borandimethylamin-Komplex in Eisessig und nachfolgender vollständiger Neutralisation wird die Endverbindung **26** isoliert, die nach Ausrühren mit Dichlormethan analysenrein ist.

Die Entstehung der Verbindung **26** kann durch EI-Massenspektrometrie, FAB-MS und Magnetresonanzspektroskopie belegt werden. Das Protonenresonanzspektrum liefert zusätzliche Hinweise auf die gewünschte Struktur (**Abb. 75**).

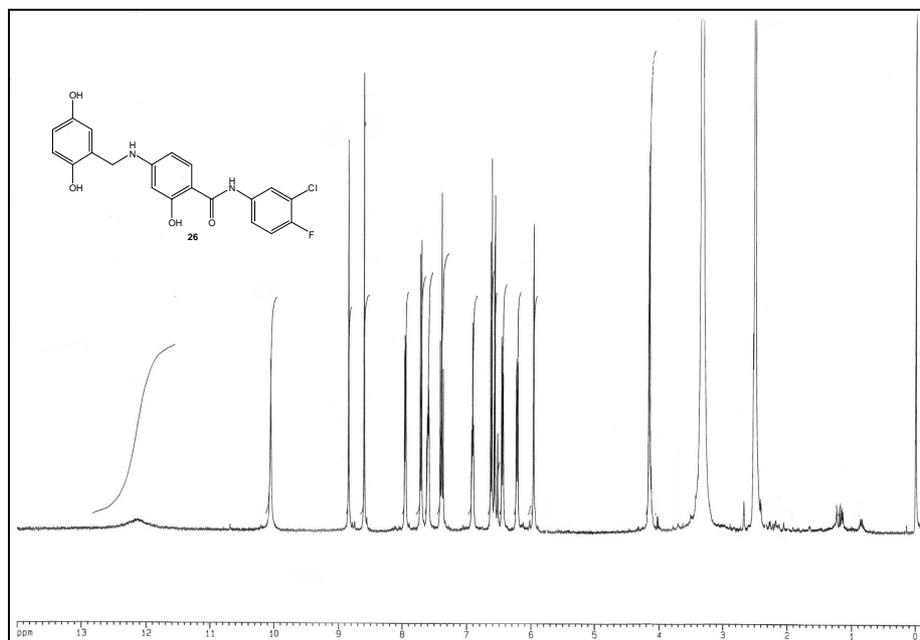


Abb. 75: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Lavendustin A-Derivates **26**

Signifikant für das Entstehen der reduzierten Verbindung aus der Schiff'schen Base ist das Fehlen des CH-Signals bei 8,86 ppm und das Auftreten des Signals für die Methylengruppe

bei 4,15 ppm. Außerdem erscheint nun ein Triplett für das 4-Aminosalicylsäure-NH bei 6,91 ppm durch Kopplung mit den Methylen-Protonen. Auffallend ist im Vergleich zu dem Spektrum der 5-Aminosalicyloyl-Verbindung **21**, dass bei **21** die Hydroxy-Gruppe der Salicylsäure und das Anilin-NH nebeneinander bei 10,50 ppm auftreten und die entsprechenden Signale von Verbindung **26** bei 12,16 (Salicylsäure-OH) und bei 10,05 ppm (Anilin-NH) detektiert werden. Die aromatischen Protonen treten in einem Bereich von etwa 6-8 ppm auf.

Da aufgrund des fehlenden Molpeaks das EI-MS-Spektrum nicht eindeutig die Verbindung **26** beweist, wurde zusätzlich eine FAB-Messung (Fast Atom Bombardment-Massenspektrometrie) durchgeführt. Diese ermöglicht eine Detektion von schwer verdampfenden Substanzen, bei denen bei der Elektronenionisation schon vor der Verdampfung eine Zersetzung eintritt. Da bei Verbindung **26** im EI-Massenspektrum kein Molpeak sichtbar ist, könnte sie sich zersetzt haben.

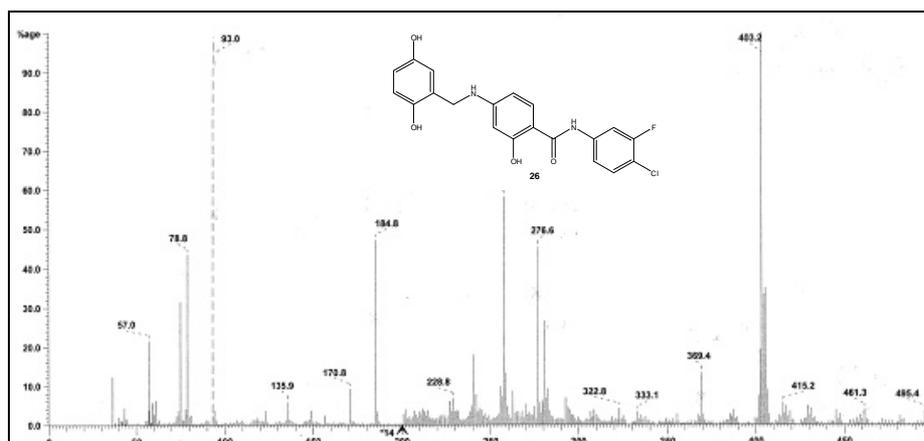


Abb. 76: FAB⁺-Spektrum der Verbindung **26**

Im FAB-Spektrum sind sowohl der Peak [M+H] bei m/z 403 als auch die Fragmente des Abbaus der Verbindung **26** deutlich zu erkennen [Abb. 76]. Durch Spaltung der Säureamidbindung entsteht das Bruchstück bei m/z 258 [C₁₄H₁₂NO₄]⁺.

Diese Befunde bestätigen die Struktur der Verbindung **26**.

3.2.2.2 Herstellung der Verbindung **33**

Da die Synthese von Verbindung **26** erfolgreich und mit guten Ausbeuten verlief, wird nun die Verbindung **33** hergestellt (Abb. 77).

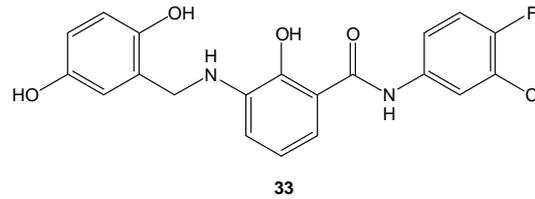
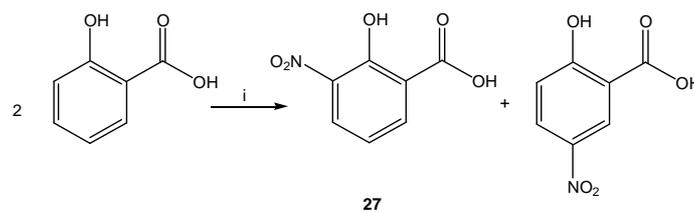


Abb. 77: Das 3-Aminosalicylsäure-Derivat **33**

Das Herstellungsverfahren verläuft jedoch nicht analog dem der beiden Isomere **21** und **26**. Im Gegensatz zu den Wegen, die zu **21** und **26** führen, kann bei der Herstellung von **33** aus Kostengründen nicht die 3-Aminosalicylsäure käuflich erworben werden. Aus diesem Grund wird mit dem Aufbau der 3-Aminosalicylsäure auf der Stufe der Salicylsäure begonnen.

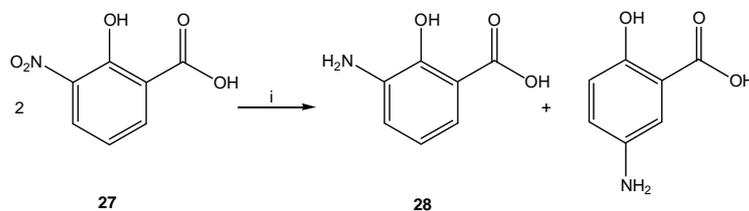
Diese wird zuerst mit Tetrabutylammoniumhydrogensulfat und Isopropylnitrat in Anwesenheit von konz. H_2SO_4 zur 3-Nitrosalicylsäure **27** umgesetzt (**Abb. 78**) [97]. Bei diesem Verfahren entsteht aber zusätzlich die unerwünschte 5-Nitrosalicylsäure.



i) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, Isopropylnitrat, konz. H_2SO_4 , Dichlormethan; Eiskühlung \rightarrow RT;

Abb. 78: Nitrierung der Salicylsäure

Anschließend werden die beiden Nitrosalicylsäuren zusammen mit Pd/C und Cyclohexen in Ethanol zu einem Gemisch aus der 3-Aminosalicylsäure **28** und der 5-Aminosalicylsäure reduziert (**Abb. 79**).



ii) Pd/C, Cyclohexen, Ethanol, Δ T

Abb. 79: Reduktion der 3-Nitrosalicylsäure **27**

Allerdings gestaltet sich die bereits oben erwähnte Nitrierung problematisch. Im Gegensatz zu der Beschreibung der Patentvorschrift GB 2377934 entsteht bei dieser Reaktion immer ein Gemisch aus der 3- und der 5-Nitroverbindung, welches sehr schwierig aufzutrennen ist. Nach der Vorschrift soll eine ortho-/para-Selektivität von 5,7:1 erreicht werden, die gewünschte 3-Nitrosalicylsäure soll auskristallisieren, und die 5-Nitrosalicylsäure soll sich im Filtrat befinden. Jedoch wird beobachtet, dass die gewünschte 3-Nitrosalicylsäure eine bessere Löslichkeit besitzt als das unerwünschte Nebenprodukt, was auf die Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen sein könnte. Diese Eigenschaft erschwert die Trennung des Gemisches. Aufgrund dessen werden zunächst die einzelnen Syntheseschritte mit dem Gemisch durchgeführt, um erst einmal eine generelle Aussage über das Gelingen machen zu können.

Dabei wurde beobachtet, dass sich dieses Vorgehen mit einem Substanzgemisch nicht bis zum Ende der Synthese durchhalten lässt. Deswegen muss die Trennung möglichst früh im Verlauf der Synthese erfolgen, da sonst das Löslichkeitsproblem bei jeder der sieben Stufen erhalten bliebe und damit eine Anreicherung des unerwünschten Isomeren bei jeder Stufe erfolgt, so dass am Ende ein reines 5-Aminosalicylsäurederivat erwartet wird.

Deshalb wird eine Trennung der beiden Nitroisomere auf mehreren unterschiedlichen Wegen versucht.

Zunächst erfolgt eine säulenchromatographische Trennung der isomeren Nitrosalicylsäuren mit Ethylacetat/Ethanol [9+1], bei der jedoch keine verwertbaren Rückstände erhalten werden. Daraufhin wird eine Interaktion mit dem Kieselgel aufgrund der hohen Polarität der Nitrosalicylsäuren vermutet.

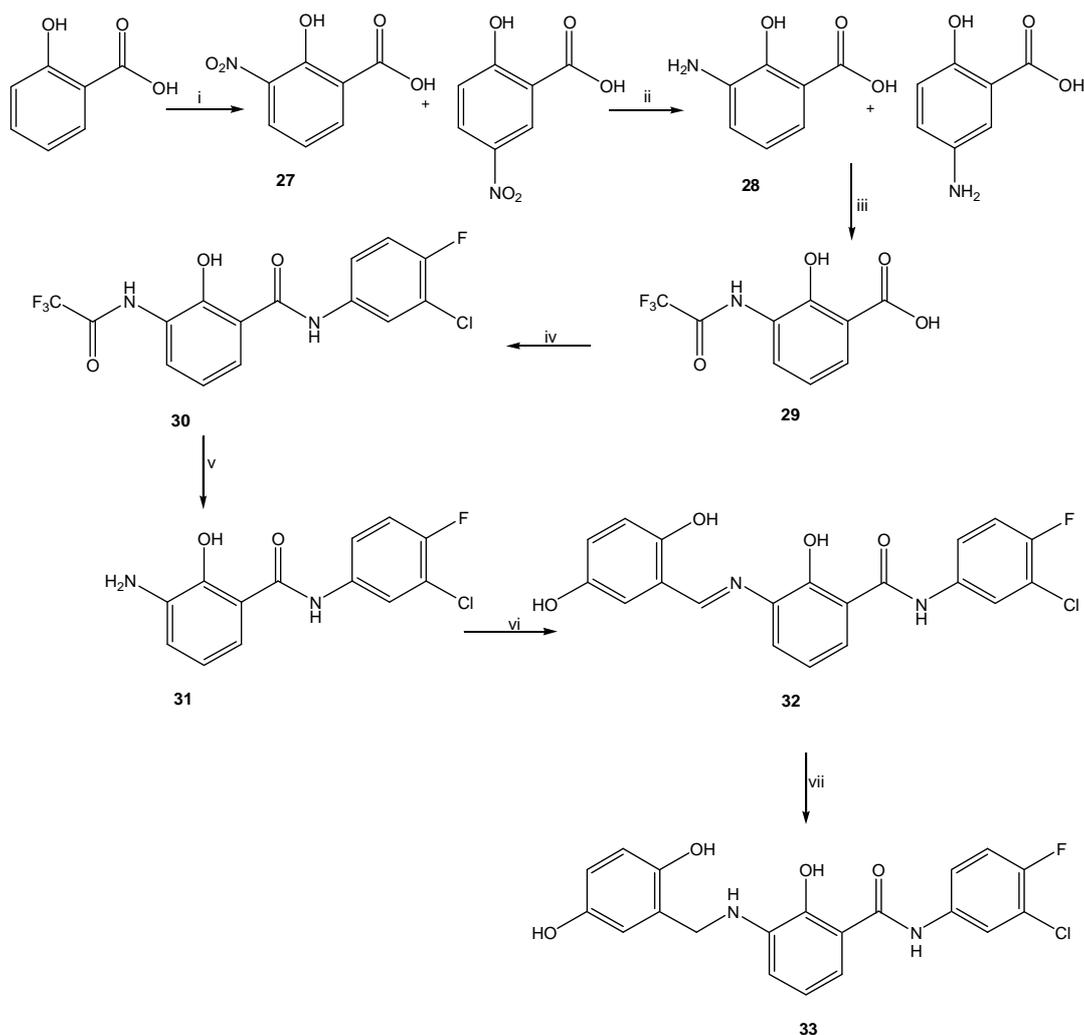
Auch eine Trennung der beiden Nitro-Derivate durch Dickschichtchromatographie bleibt erfolglos.

Weiterhin wird versucht, mittels Sublimation eine Trennung der beiden Isomere zu erreichen, da sich die Schmelzpunkte und damit die Dampfdrücke deutlich voneinander unterscheiden (3-Nitrosalicylsäure: 121-122°C, 5-Nitrosalicylsäure: 226-228°C). Außerdem bildet die phenolische OH-Gruppe im Falle der 3-Nitrosalicylsäure eine deutliche Wasserstoff-Brücke aus, wodurch die Sublimation begünstigt wird. Dadurch kann die 3-Nitrosalicylsäure verdampft werden, zu einem Feststoff kondensieren und gesammelt werden. Die unerwünschte 5-Nitrosalicylsäure verbleibt aufgrund ihrer höheren Polarität als Rückstand im Kolben. Mit Hilfe der Sublimation, die über fünf Stunden lang bei 120°C durchgeführt wird, wird zwar eine bemerkenswerte Anreicherung der gewünschten Verbindung erzielt, jedoch erscheinen die Ausbeuten von ca. 5-10% für die darauf folgenden sechs Stufen zu gering.

Durch fraktioniertes Ausfällen mit Dichlormethan kann ein einziges Mal die 3-Nitrosalicylsäure erhalten werden, jedoch ist diese Methode nicht reproduzierbar.

Als beste Variante stellt sich das fraktionierte Ausfällen des Substanzgemisches mit Ethanol auf der Stufe der Amine heraus. Dazu werden die beiden Aminosalicylsäuren mit Ethanol bei 50°C erwärmt, abgekühlt und der Niederschlag (5-Aminosalicylsäure) abgesaugt. Die gewünschte 3-Aminosalicylsäure befindet sich im Filtrat.

Nachdem die vollständige Trennung der beiden Isomere auf der Stufe der Amine gelingt, wird die Synthese nach folgendem Schema weitergeführt (**Abb. 80**).



- i) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, Isopropylnitrat, konz. H_2SO_4 , Dichlormethan; Eiskühlung \rightarrow RT;
 ii) Pd/C, Cyclohexen, Ethanol, Δ T; iii) Trifluoressigsäureanhydrid, abs. 1,4-Dioxan, RT;
 iv) Thionylchlorid, Δ T, 3-Chlor-4-fluoranilin, 1,4-Dioxan, Δ T; v) methanolische K_2CO_3 -Lsg., Δ T;
 vi) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig, Δ T; vii) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

Abb. 80: Herstellung der Verbindung 33

Wie bereits beschrieben entsteht bei der Nitrierung der Salicylsäure ein untrennbares Gemisch aus der 3-Nitrosalicylsäure 27 und der 5-Nitrosalicylsäure. Bei der nachfolgenden Reduktion entsteht die gewünschte 3-Aminosalicylsäure 28 zusammen mit der

unerwünschten 5-Aminosalicylsäure. Auf dieser Stufe wird die vorangehend beschriebene Trennung durch fraktioniertes Ausfällen mit Ethanol durchgeführt. Durch N-Acetylierung der reinen Verbindung **28** mit Trifluoressigsäureanhydrid in absolutem 1,4-Dioxan entsteht Verbindung **29**. Nach Chlorierung mit Thionylchlorid und Entfernen des überschüssigen Lösemittels im Vakuum kann die Umsetzung mit 3-Chlor-4-fluoranilin zu Verbindung **30** erfolgen. Durch Verseifung mit Na_2CO_3 in Methanol wird die Trifluoressigsäure-Schutzgruppe abgespalten, und die Verbindung **31** wird als freies Amin in Form eines braunen Pulvers isoliert. Im nächsten Schritt erfolgt die Bildung der stark weinrot gefärbten Schiff'schen Base **32** durch Reaktion von **31** mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd in Eisessig/Ethanol. Für die Auskristallisation ist auch hier wieder die vollständige Neutralisation des Eisessigs essentiell.

Durch anschließende Reduktion mit Borandimethylaminkomplex in Eisessig entsteht die gewünschte Endverbindung **33**, die nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit Ethylacetat/n-Hexan [9+1] anhand von EI-Massenspektrometrie und Magnetresonanzspektroskopie identifiziert werden kann (**Abb. 81**).

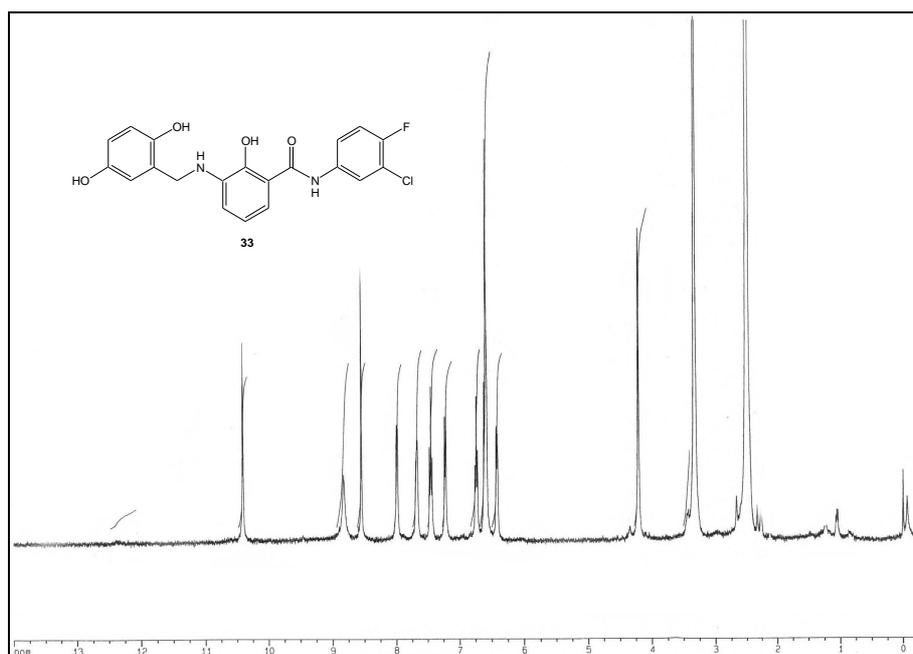


Abb. 81: Protonenresonanzspektrum der Verbindung **33**

Signifikant für die Entstehung der reduzierten Verbindung **33** aus der Schiff'schen Base **32** ist das Fehlen des CH-Singulets im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei 8,80 ppm und das Auftreten der beiden Protonen der Methylengruppe bei 4,29 ppm. Die Singulets der beiden phenolischen Hydroxygruppen treten bei 8,74 (OH-2'') und bei 8,45 ppm (OH-5'') auf. Die Singulets der OH-2-Gruppe und des NH-1' werden bei 12,08 und 12,33 ppm sichtbar, und in einem

Bereich zwischen 6-8 ppm können die aromatischen Protonen detektiert werden. Damit kann die Struktur der dargestellten Verbindung **33** bestätigt werden.

3.2.2.3 EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der drei isomeren Verbindungen **21**, **26** und **33**

Aufgrund der bereits gängigen Anwendung als Arzneimittel wurden zunächst die 4- und die 5-Aminosalicylsäure als Modellsubstanzen auf mögliche EGFR-TK-inhibitorische Eigenschaften untersucht, denn die davon abgeleiteten Lavendustin A-Derivate zeigen EGFR-TK-inhibitorische Wirkungen, so dass eine Untersuchung dieser beiden einzelnen Bausteine hinsichtlich ihrer Aktivität interessant war.

| Verbindung | 4-ASA | 5-ASA |
|--|-------|-------|
| EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in % (c=1 µM) | 0% | 2% |

Tab. 6: EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der 4-Aminosalicylsäure (4-ASA) und der 5-Aminosalicylsäure (5-ASA)

Anhand der Testergebnisse lassen sich jedoch sowohl bei der 4- als auch bei der 5-Aminosalicylsäure keine EGFR-TK-inhibitorischen Wirkungen erkennen [**Tab. 6**].

Durch die Gewinnung der Lavendustin A-Analogen **21**, **26** und **33**, die sich von der 3-, 4- und 5-Aminosalicylsäure ableiten, bot sich nun die Möglichkeit, diese bezüglich ihrer pharmakologischen Eigenschaften zu vergleichen. Alle drei wurden auf ihre EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten jeweils in einer Konzentration von 100 nM untersucht. Die Ergebnisse sind in **Tab. 7** zusammengestellt.

| Verbindung | 21 | 26 | 33 |
|--|-----------|-----------|-----------|
| EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in % (c=100 nM) | 13 | 22 | 54 |

Tab. 7: EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der Lavendustin A-Derivate **21**, **26** und **33**

Es ist ersichtlich, dass alle drei Isomere EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten besitzen, wobei sich aber das 4-Aminosalicylsäure- und das 5-Aminosalicylsäure-Derivat hinsichtlich ihrer Wirkung nicht signifikant unterscheiden. Das 3-Aminosalicylsäure-Derivat mit den drei vicinalen Substituenten zeigt jedoch eine bemerkenswerte und herausragende EGFR-TK-Inhibition. Daraus lässt sich ableiten, dass der EGF-Rezeptor sehr flexibel bezüglich der Ausrichtung des bindenden Liganden sein muss, da sich die drei Isomere stark in ihrer räumlichen Beanspruchung und damit auch der möglichen Bindungsstellen unterscheiden.

3.2.2.4 Zytotoxische Aktivitäten der Lavendustin A-Derivate 21, 26 und 33

Wie auch Verbindung **21** wurden die beiden Isomere **26** und **33** vom National Cancer Institute an 60 humanen Tumorzelllinien auf Zytotoxizität getestet. Die Ergebnisse der Tests an ausgewählten Zelllinien sind zusammen mit denen von **21** in **Tab. 8** aufgeführt.

| | 21 | 26 | 33 |
|---|--|--|---|
| Zelllinie (Krebsart) GI ₅₀ -Wert in M | MOLT-4 (Leukämie) 1,26*10 ⁻⁶ | CCRF-CEM (Leukämie) 6,89*10 ⁻⁸ | CCRF-CEM (Leukämie) 6,29*10 ⁻⁷ |
| | RPMI-8226 (Leukämie) 1,65*10 ⁻⁶ | RPMI-8226 (Leukämie) 6,92*10 ⁻⁷ | SK-MEL28 (Melanom) 5,97*10 ⁻⁷ |
| | HOP-92 (NSCLC) 1,58*10 ⁻⁶ | HOP-92 (NSCLC) 3,43*10 ⁻⁷ | HOP-92 (NSCLC) 2,56*10 ⁻⁶ |
| | NCI-H522 (NSCLC) 2,40*10 ⁻⁷ | HCT-15 (Kolon) 3,75*10 ⁻⁷ | HCT-15 (Kolon) 1,86*10 ⁻⁶ |
| | U251 (ZNS) 1,73*10 ⁻⁶ | HS 578T (Brust) 5,35*10 ⁻⁷ | HS 578T (Brust) 2,47*10 ⁻⁶ |
| | BT-549 (Brust) 1,52*10 ⁻⁶ | BT-549 (Brust) 7,65*10 ⁻⁷ | BT-549 (Brust) 2,08*10 ⁻⁶ |

Tab. 8: Tabellarische Darstellung der zytotoxischen Aktivitäten von **21**, **26** und **33** an ausgewählten humanen Krebs-Zelllinien

Vergleicht man die Ergebnisse dieser zytotoxischen Untersuchungen der drei Isomere **21**, **26** und **33**, so ist zu beobachten, dass durchweg bei allen Zelllinien GI₅₀-Werte von 10⁻⁵ bzw. 10⁻⁶ M erreicht werden. Bei einzelnen, in **Tab. 6** aufgeführten Zelllinien, wird das Zellwachstum sogar schon in Konzentrationen von 10⁻⁷ bzw. 10⁻⁸ M inhibiert. Der Befund, dass das Wachstum der meisten Zelllinien bei einer Konzentration von 10⁻⁵ M gehemmt wird, ist dahingehend positiv zu bewerten, dass keine generelle Zytotoxizität vorliegt. Die Tatsache, dass bei einigen Zelllinien sogar GI₅₀-Werte von 10⁻⁷ bzw. 10⁻⁸ M erreicht werden ist erfreulich, da eine besonders selektive Ansprechrate bei diesen ausgewählten Zelllinien beobachtet werden kann.

Damit ist Verbindung **26**, die sich von der 4-Aminosalicylsäure ableitet, als die am stärksten zytotoxische Substanz anzusehen. Verbindung **33** zeigt eine bemerkenswerte EGFR-TK-Inhibition von 54% bei einer Konzentration von 100 nM, jedoch sind anhand des Zytotoxizitäts-Testes keine herausragenden Ergebnisse ersichtlich. Dagegen wurde Verbindung **21**, die sich von der 5-Aminosalicylsäure ableitet, und sogar schwächere GI₅₀-Werte als **26** erreichte, für einen Hollow Fiber Assay und anschließend sogar für den Special EGFR+Hollow Fiber Assay ausgesucht. Wahrscheinlich entsprachen hier die Ergebnisse des

zytotoxischen Tests an 60 humanen Zelllinien einem entsprechenden internen Muster des National Cancer Institutes.

Da diese Beobachtungen jedoch nicht mit EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten korrelieren, und auch nicht alle der verwendeten Zelllinien EGFR-TK-abhängig sind, lässt sich keine Aussage über den zytotoxischen Wirkmechanismus machen. Auch könnten für die zytotoxische Aktivität neben der EGFR-TK-Inhibition andere Mechanismen eine wichtige Rolle spielen, so dass ein direkter Zusammenhang nicht hergestellt werden kann.

3.2.3 Methoxy-substituierte Lavendustin-Derivate

Als Weiterentwicklung der Hydroxy-substituierten Lavendustin A-Derivate wurden entsprechende Methyl-derivate von **26** und **21** (**Abb. 82**) entwickelt. Diese weisen eine geringere Polarität auf, da die Dissoziation zweier phenolischer Hydroxygruppen im Benzylteil durch Veretherung nicht mehr möglich ist. Phenolether, wie beispielsweise das Combretastatin A-4, spielen bei der Tubulin-Inhibition eine Rolle.

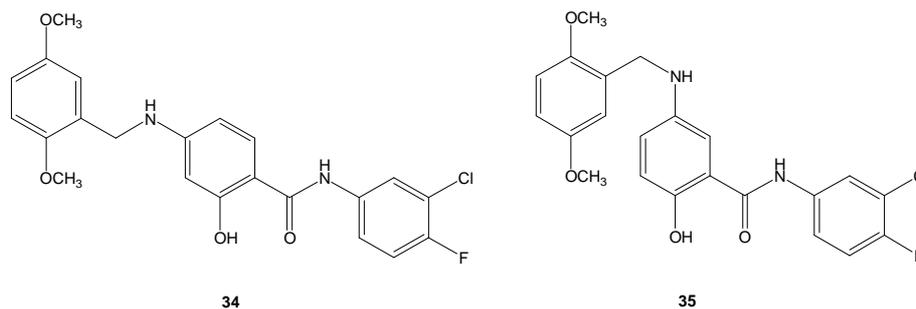


Abb. 82: Die Methoxyderivate **34** und **35**

Die Zellteilung (Mitose) von eukaryotischen Zellen bildet die Grundlage für die Entwicklung, das Wachstum und sämtliche Reparaturvorgänge des Organismus aber auch für pathologische Vorgänge wie die Tumorbildung. Eine funktionierende Mitosespindel ist dafür verantwortlich, die zuvor duplizierten Chromosomen in die jeweiligen Schwesterchromatiden zu trennen und auf die beiden Tochterzellen zu verteilen. Die Spindelfasern (Mikrotubuli) werden aus Tubulin-Molekülen gebildet. Tubulin wiederum stellt ein Heterodimer dar, welches sich aus zwei Polypeptid-Untereinheiten (α und β) zusammensetzt.

Binden Mitosehemmstoffe an Tubulin von Krebszellen, bilden sich abnorme Mikrotubulusstrukturen oder verkürzte Mikrotubuli aus, so dass die Zellteilung nicht mehr ordnungsgemäß ablaufen kann und die Krebszellen meist durch apoptotische Vorgänge absterben.

Das aus dem südafrikanischen Baum *combretum caffrum* isolierte Stilben-Derivat Combretastatin-A zeigt zytotoxische Eigenschaften aufgrund einer Hemmung der Tubulin-Polymerisation (**Abb. 83**) [98, 99].

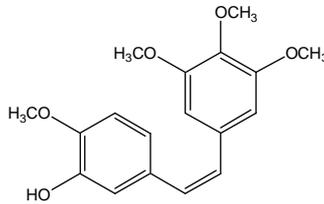


Abb. 83: Combretastatin A-4

Es bindet an die Colchicin-Bindungsstelle und unterbindet so die Tubulin-Polymerisation. Die Zelle wird in der Meta-Phase angehalten.

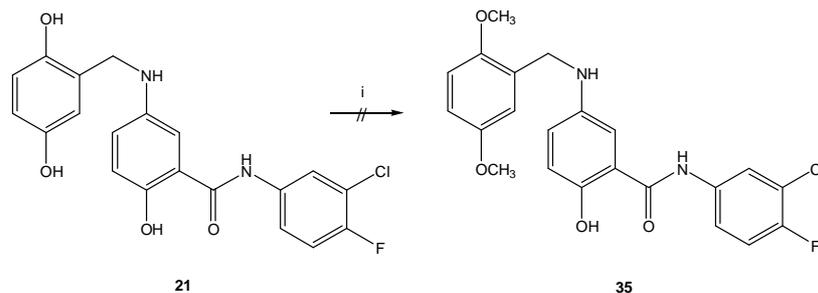
Combretastatin zeigt potente zytotoxische Eigenschaften nicht nur gegenüber zahlreichen humanen Tumorarten, sondern sogar auch gegen multidrug resistant cancer cell lines (MDR) [84].

Diese hervorragenden Eigenschaften haben zu einem großen Interesse geführt, strukturähnliche Verbindungen zu entwickeln.

Aufgrund der Strukturähnlichkeit zwischen Combretastatin A-4 und den beiden Dimethoxy-Lavendustin A-Derivaten könnte bei den Verbindungen **34** und **35** eine Hemmung der Tubulin-Polymerisation in Frage kommen. Die 5-Aminosalicylsäure-Verbindung **35** kann z.B. als hydriertes *cis*-Aza-Stilben angesehen werden, welches ebenfalls Methoxy-substituiert ist [**Abb. 82**].

3.2.3.1 Herstellung der Verbindungen 34 und 35

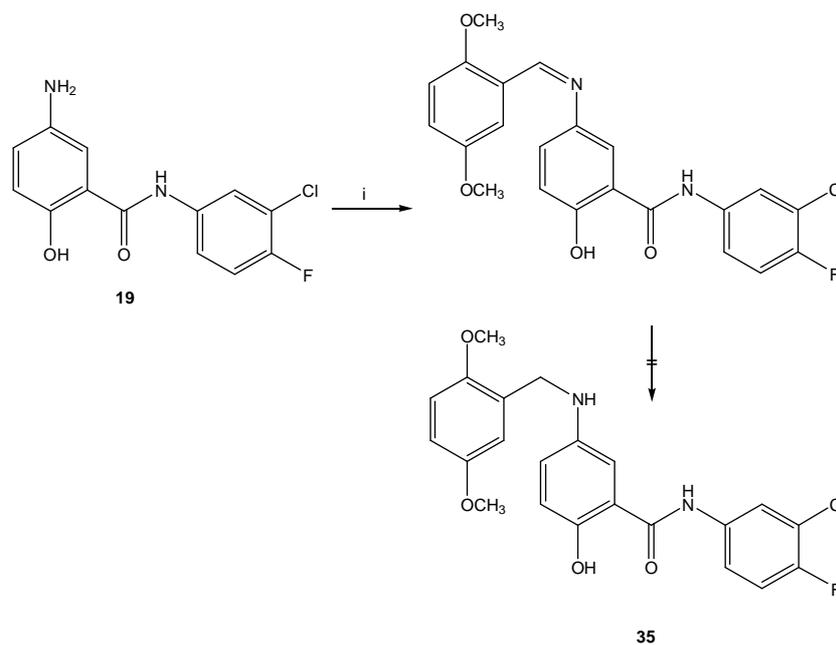
Die als Tubulin-Inhibitor konzipierten Verbindungen **34** und **35** werden ausgehend von der jeweiligen Hydroxy-Verbindung **21** oder **26**, direkt mit Iodmethan in Aceton methyliert. Exemplarisch für beide Verbindungen wird in **Abb. 84** der Syntheseweg für die Verbindung **35** dargestellt.



i) Iodmethan, K_2CO_3 , abs. Aceton

Abb. 84: Versuchte direkte Methylierung von **21**

Jedoch kann das Gelingen dieser Reaktion bei beiden Verbindungen nicht eindeutig bestätigt werden. Daraufhin wird analog der Herstellung der Hydroxy-Derivate käuflich erworbener 2,5-Dimethoxybenzaldehyd mit dem jeweiligen freien Amin zur Schiff'schen Base umgesetzt und diese mit Borandimethylamin-Komplex reduziert. Beispielhaft ist der Syntheseverlauf für Verbindung **35** dargestellt (**Abb. 85**).



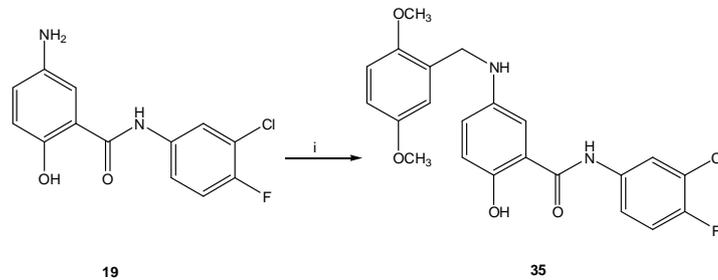
i) 2,5-Dimethoxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig, ΔT

Abb. 85: Syntheseverlauf für die Verbindung **35** über die Schiff'sche Base

Die Entstehung der Schiff'schen Base kann zwar durch Protonenresonanzspektroskopie und EI-Massenspektrometrie nachgewiesen werden, allerdings kann sie nicht in ausreichender Reinheit erhalten werden, um damit die nachfolgende Reduktion durchzuführen.

Aus diesem Grund wird in einer „Eintopfmethode“ das freie Amin mit 2,5-Dimethoxybenzaldehyd unter Zusatz von Triacetoxyborhydrid in Dichlormethan umgesetzt [100].

Dabei wird die Verbindung **35** analysenrein erhalten (**Abb. 86**).



i) 2,5-Dimethoxybenzaldehyd, Triacetoxyborhydrid, Dichlormethan, RT

Abb. 86: Herstellung der Dimethoxyverbindung **35** mit Hilfe der „Eintopfmethode“

Das Protonenresonanzspektrum von Verbindung **35** ist in **Abb. 87** dargestellt.

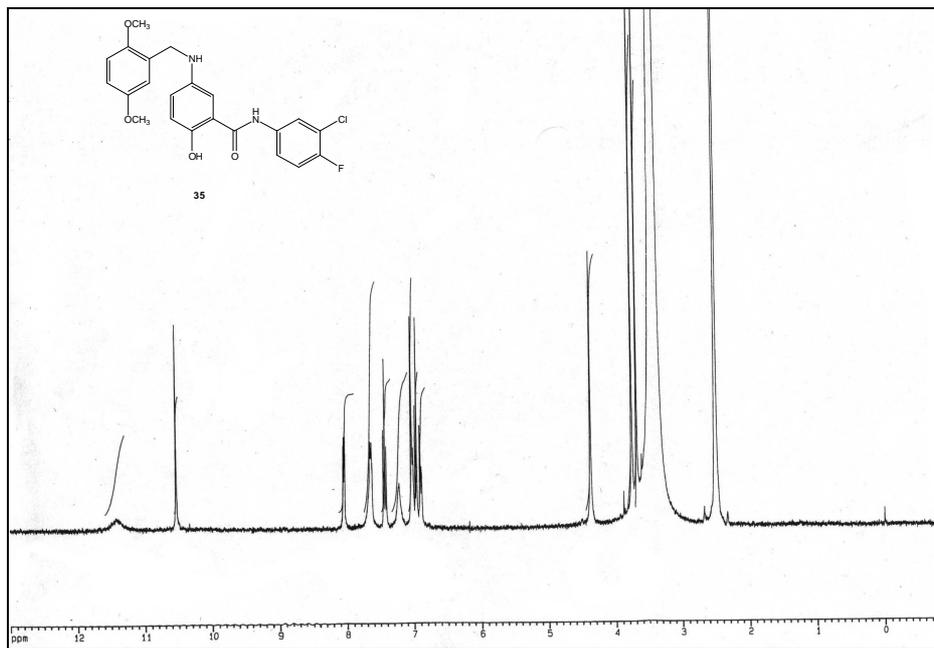


Abb. 87: ^1H -NMR-Spektrum des Dimethoxyderivates **35**

Signifikant für die Entstehung von **35** sind die beiden Signale der Methoxygruppen im Bereich von 3,70 ppm und die der Methylengruppe bei 4,30 ppm. Im Vergleich zu der entsprechenden Dihydroxyverbindung liegen hier die Signale der Hydroxy-Gruppe der Salicylsäure und das Anilin-NH in dem gleichen Bereich von 10,50 bis 11,50 ppm.

3.2.3.2 EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten der Lavendustin A-Derivate im Vergleich

Ebenso wie die hydroxysubstituierten Lavendustin-Derivate **21**, **26** und **33** wurde das Methoxy-Derivat **35** in einer Konzentration von 100 nM auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität untersucht. Die Ergebnisse sind in **Tab. 9** aufgeführt.

| Verbindung | 21 | 26 | 33 | 35 |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in % (c=100 nM) | 13 | 22 | 54 | 34 |

Tab. 9: EGFR-TK-inhibitorische Aktivität der Lavendustin A-Derivate

Damit ist die Wirksamkeit von Verbindung **35** mit einer guten EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität von 34% bei einer Konzentration von 100 nM am EGF-Rezeptor belegt. Es ist bemerkenswert, dass gegenüber der entsprechenden Hydroxy-Verbindung **21** eine Wirkungssteigerung erzielt werden konnte. Jedoch bleibt die Verbindung **33**, von der 3-Aminosalicylsäure abgeleitet, das wirksamste Lavendustin A-Derivat.

3.2.3.3 Zytotoxizitätstest der Verbindung 35

Die Verbindung **35** wurde außerdem vom National Cancer Institute in einem Primary Screen in einer Konzentration von 100 μ M an drei humanen Tumorzelllinien auf zytotoxische Aktivität untersucht. Verwendet wurden Zelllinien des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms (NCI-H460), des Brustkrebses (MCF-7) und des ZNS-Krebses (SF-268). Die Ergebnisse für die einzelnen Zelllinien sind in PTC (percent of control) in der folgenden **Tab. 10** angegeben.

| Zelllinie | PTC |
|-----------|-----|
| NCI-H460 | 76 |
| MCF-7 | 75 |
| SF-268 | 89 |

Tab. 10: Ergebnisse des Drei-Zelllinien-Tests von Verbindung **35**

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Verbindung **35** nicht für einen darauffolgenden Test an 60 humanen Zelllinien ausgewählt, da niedrige PTC-Werte für eine hohe Aktivität stehen würden und für diese Verbindung relativ hohe Ergebnisse (PTC 75-89) erzielt wurden.

3.2.3.4 Tubulin-Radioligand-Binding-Assay der Verbindung **35**

Um **35** auf eine mögliche Tubulin-Inhibition zu untersuchen, wurde ein Radioligand-Binding-Assay im Vergleich zu radioaktivmarkiertem [³H]Colchicin in einer Konzentration von 10 µM durchgeführt.

Die dabei ermittelte Inhibition von –1 % lässt jedoch eher auf eine minimale Stimulation als auf eine Hemmung schließen, wobei als Signifikanzkriterium eine Stimulation oder Inhibition von mehr als 50 % angesehen wird. Colchicin als Kontrollsubstanz weist einen IC₅₀-Wert von 3,74 µM auf. Damit konnte unsere Vermutung, dass hier aufgrund der Methoxy-Gruppen und der hydrierten *cis* Aza-Stilben-Struktur eine Tubulin-Inhibition beobachtet werden könnte, leider nicht bestätigt werden.

3.2.3.5 Hypothetisches Dimethoxy-Derivat der 3-Aminosalicylsäure

Die Herstellung des entsprechenden Dimethoxy-Derivates, ausgehend von der 3-Aminosalicylsäure, wäre interessant für eine vergleichende Beurteilung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten und einer eventuellen Tubulin-Inhibition. Jedoch wurde aufgrund der bereits beschriebenen Schwierigkeiten bei der Methylierung oder der „Eintopfmethod“ bei **34** auf die Synthese dieser Verbindung verzichtet. **Abb. 88** zeigt das mögliche Dimethoxy-Derivat der 3-Aminosalicylsäure.

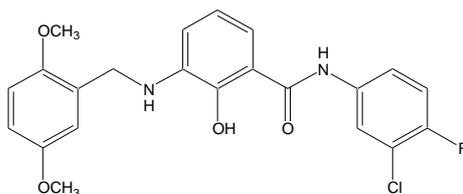


Abb. 88: Hypothetisches Dimethoxy-Derivat der 3-Aminosalicylsäure

3.2.3.6 Diskussion der Farbigkeit der Azomethin-Vorstufen

Eine interessante Beobachtung hinsichtlich der unterschiedlichen Farbigkeit wurde bei den als Vorstufen der jeweiligen hergestellten Lavendustin A-Derivate auftretenden Schiff'schen Basen gemacht. Dabei fällt auf, dass die Schiff'schen Basen der Hydroxy-Verbindungen wesentlich intensiver gefärbt sind als es bei den beiden Dimethoxyverbindungen der Fall ist. In **Abb. 89** sind die Strukturen der Schiff'schen Basen der Hydroxy-Verbindungen dargestellt und in **Abb. 90** die der Dimethoxyverbindungen.

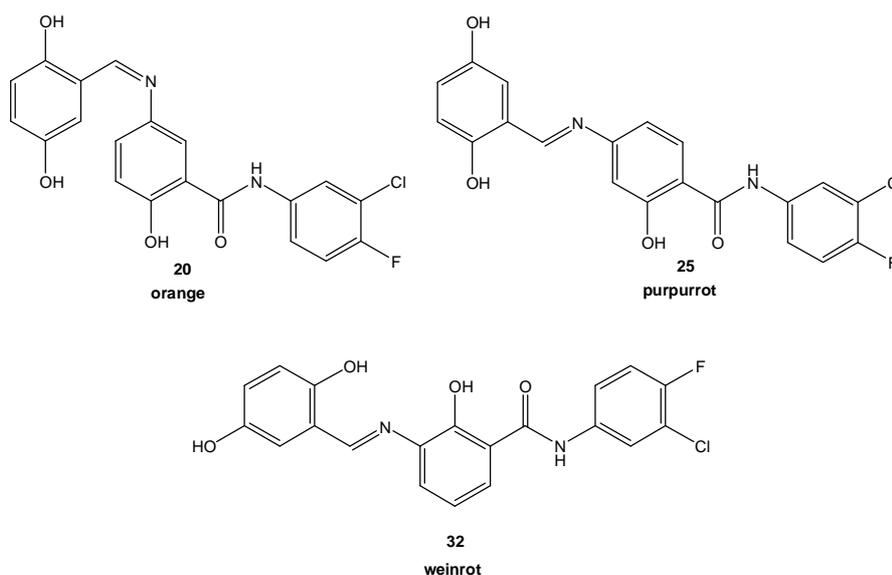


Abb. 89: Strukturen der Schiff'sche Basen **20**, **25** und **32** der Hydroxyverbindungen

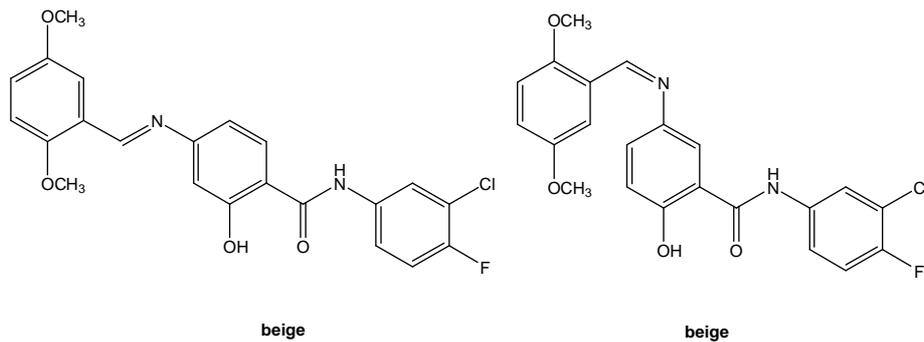


Abb. 90: Strukturen der Schiff'sche Basen der Dimethoxyverbindungen

Die Schiff'sche Base **25** stellt einen purpurroten kristallinen Feststoff dar und die Schiff'sche Base **20** ein orangefarbenes Pulver. Im Gegensatz dazu zeigen die entsprechenden Dimethoxyverbindungen eine gelb-beige Färbung. Die stärkere und auffallende Färbung der Schiff'schen Base aus dem 2,5-Dihydroxybenzaldehyd könnte auf die Ausbildung eines ortho-chinoiden Systems zurückzuführen sein, welches bei der Dimethoxyverbindung nicht möglich ist (**Abb. 91**).

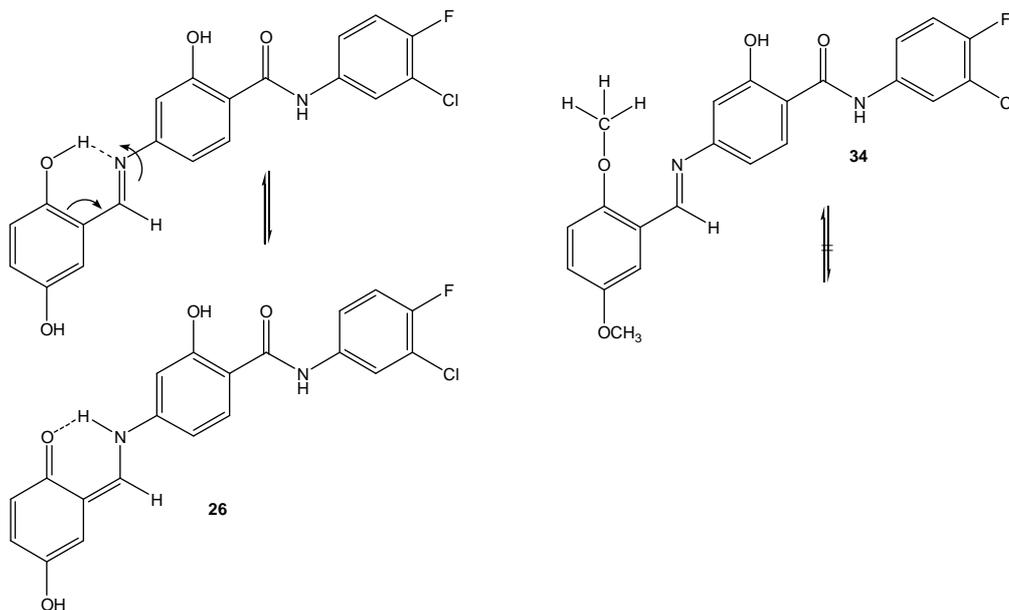


Abb. 91: ortho-chinoides System des Lavendustin A-Derivates **26** im Vergleich zu Verbindung **34**

Die Schiff'schen Basen der Hydroxy-Verbindungen besitzen aufgrund des tautomeren ortho-chinoiden Systems eine intensivere Farbe als die Dimethoxy-Verbindungen, bei denen kein Tautomeren-Gleichgewicht formuliert werden kann.

3.2.4 Lavendustin A-Derivate mit verschiedenen N-haltigen Heterozyklen

Als weitere Variationen wurden im Rahmen dieser Arbeit Verbindungen konzipiert, bei denen statt des 3-Chlor-4-fluoranilins ein stickstoffhaltiger Heterozyklus verwendet werden sollte.

Abb. 92 zeigt zunächst die geplanten Derivate der 4-Aminosalicylsäure **36**, **37** und **38**.

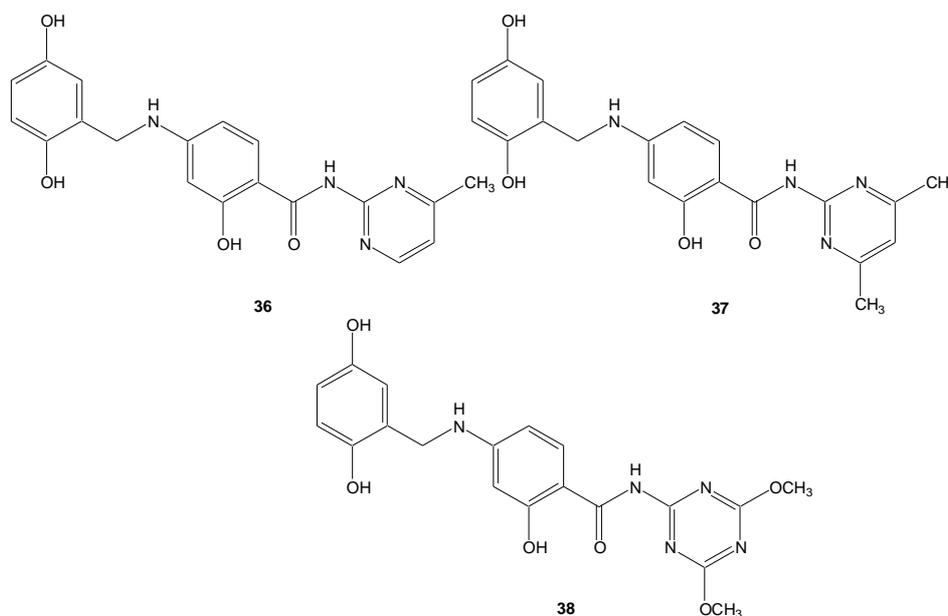


Abb. 92: Heterozyklische Derivate der 4-Aminosalicylsäure **36**, **37** und **38**

In diesem Zusammenhang soll versucht werden, die Säureamide **36-38** aus einem 4-Methylpyrimidin, 4,6-Dimethylpyrimidin und 2,4-Dimethoxytriazin herzustellen.

Unter Verwendung der gleichen N-haltigen Heterozyklen wurden darüberhinaus die entsprechenden Derivate **39-41** der 5-Aminosalicylsäure konzipiert (**Abb. 93**).

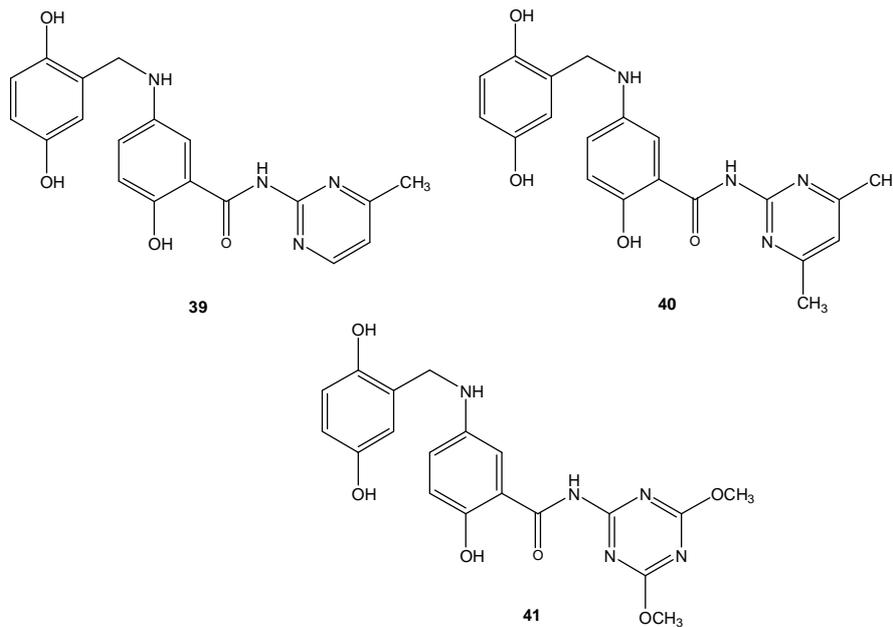


Abb. 93: Heterozyklische Derivate der 5-Aminosalicylsäure **39**, **40**, und **41**

3.2.4.1 Versuche zur Herstellung der verschiedenen N-haltigen heterozyklischen Lavendustin A-Derivate

Die Herstellung wird analog der in Kapitel 3.2.1.1 beschriebenen Synthese von Verbindung **21** versucht. Jedoch verlaufen die jeweiligen Syntheseschritte nicht wunschgemäß oder liefern schon auf der Stufe der Umsetzung des Heterozyklus mit dem Trifluoracetyl-geschützten Amin zu schlechten Ausbeuten, um damit weiter arbeiten zu können. Keine der angestrebten Verbindungen konnte somit erhalten werden.

Im Vergleich zu dem 3-Chlor-4-fluoranilin-Rest liegt jetzt in den heterozyklischen Verbindungen durch die Guanidin-Struktur eine starke Basizität und damit ein verändertes Reaktionsverhalten vor. Möglicherweise kann das basische Guanidin sogar von der Salicylsäure protoniert werden, so dass diese Verbindungen wasserlöslich werden und sich deshalb nicht in genügender Konzentration in der organischen Phase anreichern.

Die Konzeption erschien aber deshalb interessant, weil durch den Austausch des 3-Chlor-4-fluoranilins durch einen Heterozyklus die Notwendigkeit des Anilins für die Bindung in der Rezeptortasche des EGFR bestätigt werden sollte.

3.2.5 Angestrebte reduzierte Verbindung 42

Um eine Aussage über die Bindung der verschiedenen Lavendustin A-Derivate an den EGF-Rezeptor und deren Ausrichtung innerhalb der Rezeptorbindungstasche machen zu können,

war außerdem die Reduktion der Salicylamidstruktur von Verbindung **26** zum Amin **42** vorgesehen (**Abb. 94**).

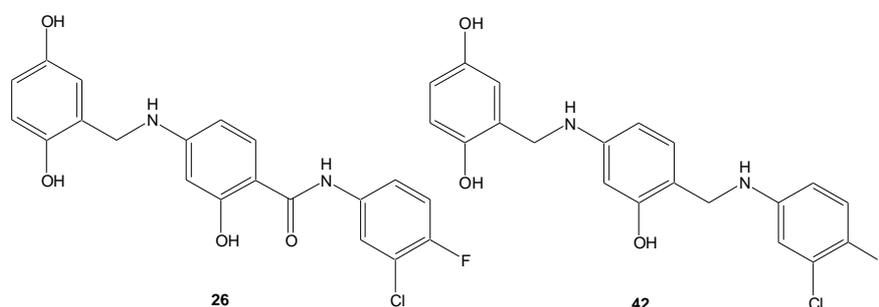


Abb. 94: Geplante Verbindung **42** als reduzierte Form von **26**

Diese Verbindung **42** erscheint deshalb interessant, weil durch die fehlende Carbonylgruppe eine Position für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum Aminosäurerückgrat der EGFR-TK fehlt.

Durch die Reduktion der Carbonylgruppe entstehen rotationsfähige Partialstrukturen, wodurch sich die Ausrichtung zum Rezeptor ändern könnte. Es kann vermutet werden, dass die Verbindung **42** deshalb keine Affinität zur EGFR-TK zeigen dürfte.

Die Reduktion von **26** wird mit LiAlH_4 in Tetrahydrofuran, einem spezifischen Reduktionsmittel für Carbonsäureamide [101], bei Raumtemperatur durchgeführt (**Abb. 95**).

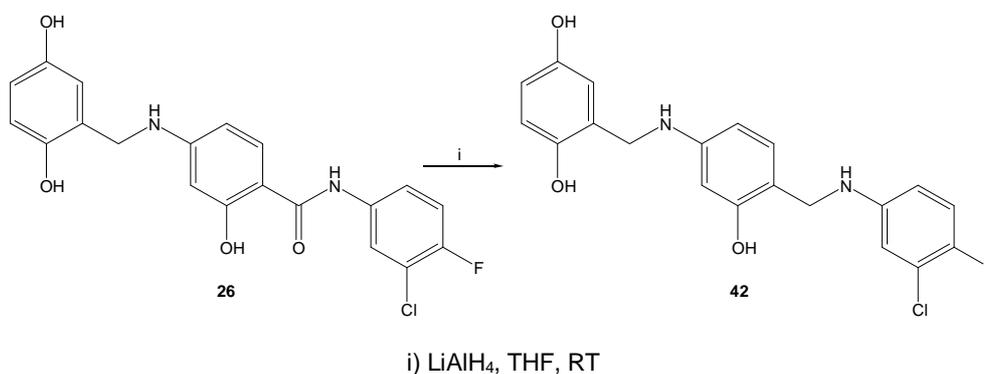


Abb. 95: Herstellungsversuch der Verbindung **42**

Das dabei anfallende Produkt lieferte aber kein auswertbares Protonenresonanzspektrum. Auch eine Erhöhung der Menge an LiAlH_4 und auch der Reaktionstemperatur brachte nicht das gewünschte Ergebnis. Damit kann die Entstehung der Verbindung **42** nicht bestätigt werden.

Auf die Entwicklung der von Verbindung **21** abgeleiteten reduzierten Verbindung wurde deshalb verzichtet (**Abb. 96**).

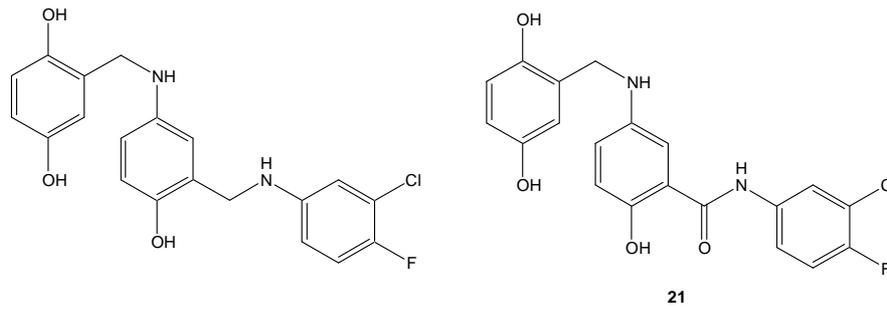


Abb. 96: Mögliche reduzierte Verbindung von **21** im Vergleich mit Verbindung **21**

Durch die beschriebenen Variationen konnten somit im Rahmen dieser Arbeit verschiedene EGFR-TK-inhibitorisch wirksame und zytotoxisch aktive Lavendustin A-Derivate hergestellt werden, wobei die drei Isomere **21**, **26** und **33** hervorzuheben sind. Eine Weiterentwicklung zum Wirkstoff könnte ins Auge gefasst werden, zumal ein nicht erfolgreich bestandener Hollow Fiber Assay kein Ausschlusskriterium für eine Weiterentwicklung zum Wirkstoff sein sollte. Es wäre mit Sicherheit, pharmakologisch gesehen, aussagekräftiger, wenn die aussichtsreichen Verbindungen **21**, **26** und **33** einem Tumor Xenograft Modell zugeführt werden könnten.

3.3 4-(Indol-3-yl)chinazoline mit EGFR-TK-inhibitorischer Aktivität und zytotoxischer Wirkung

Die Anilinochinazolin-Struktur der selektiv EGFR-TK-inhibitorisch wirksamen und oral bioverfügbaren Arzneimittel Gefitinib (Iressa®) und Erlotinib (Tarceva®) ist mit der bioisosteren Salicylsäurestruktur verwandt. In **Abb. 97** ist diese Beobachtung dargestellt.

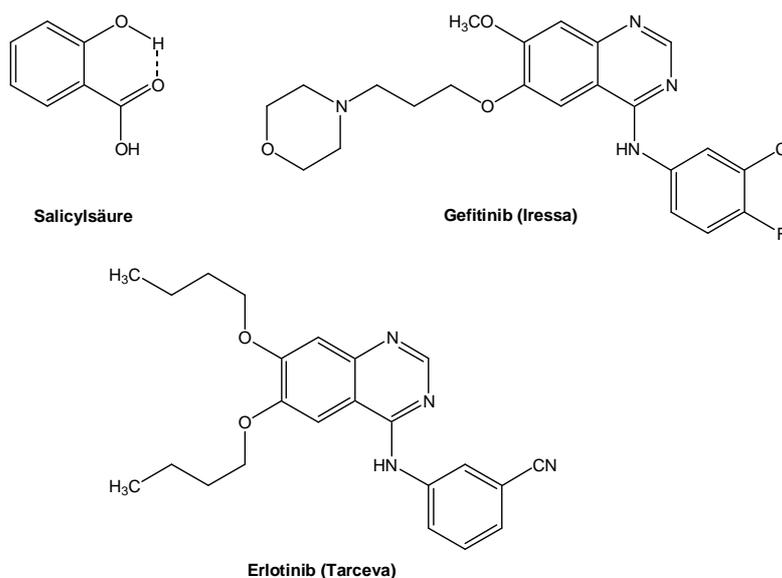


Abb. 97: Bioisostere Beziehung zwischen der Salicylsäure und den 4-Anilinochinazolinen Gefitinib und Erlotinib

Um die Wirkstoffoptimierung der vielversprechenden Albuschat'schen Salicylanilide mit 2,5-Dihydroxybenzylamino-Struktur (s. **Abb. 69**, Seite 63) hinsichtlich ihrer EGFR-TK-Inhibition und zytotoxischen Aktivität voranzutreiben, soll deren Salicyloyl-Struktur durch bioisostere Umwandlung in ein Chinazolin-Grundgerüst überführt werden. Diese Konzeption orientiert sich an den EGFR-spezifisch wirksamen 4-Anilinochinazolinen Gefitinib und Erlotinib, die sich reversibel in die intrazelluläre ATP-Bindungstasche des EGF-Rezeptors einlagern und so selektiv die Tyrosinkinase hemmen. Gefitinib hemmt die EGFR-TK *in-vitro* mit einer IC_{50} von 33 nmol/L und Erlotinib mit einer IC_{50} von 2 nmol/L [102,103]. Daher kann allgemein durch die bioisostere Umwandlung der Salicyloyl-Teilstruktur in ein Chinazolin-Grundgerüst eine Steigerung der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität erwartet werden.

Außerdem scheint die 2,5-Dihydroxybenzylamino-Seitenkette des Lavendustin A wichtig für eine EGFR-TK-inhibitorische Aktivität zu sein. Deshalb soll diese in Position 6 des Chinazolins eingeführt werden.

Da bei *Lüth* hervorragende EGFR-TK-inhibitorische und zytotoxische Eigenschaften mit 4-(Indol-3-yl)-chinazolinen erzielt werden konnten, sollte auch hier statt des Anilinrestes ein Indolrest eingeführt werden [82].

Das aus diesen Beobachtungen konzipierte 4-(Indol-3-yl)chinazolin **64** mit Dihydroxybenzylamino-Seitenkette ist zusammen mit der pharmakophoren Teilstruktur **01** des Lavendustin A in **Abb. 98** dargestellt.

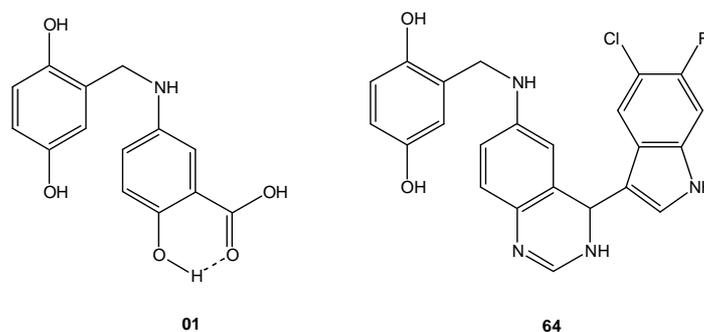


Abb. 98: Die pharmakophore Teilstruktur **01** und das geplante 4-(Indol-3-yl)-chinazolin **64** mit Dihydroxybenzylamino-Seitenkette in Position 6

Als Modellsubstanz wird außerdem die Verbindung **63** mit dem Brom-substituierten Indol angestrebt (**Abb. 99**).

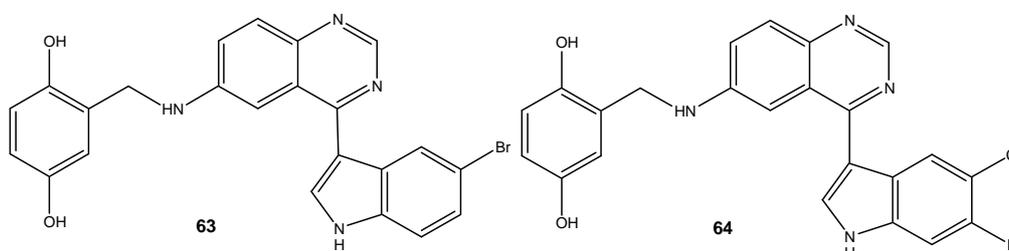


Abb. 99: Geplante Indolylchinazoline **63** und **64**

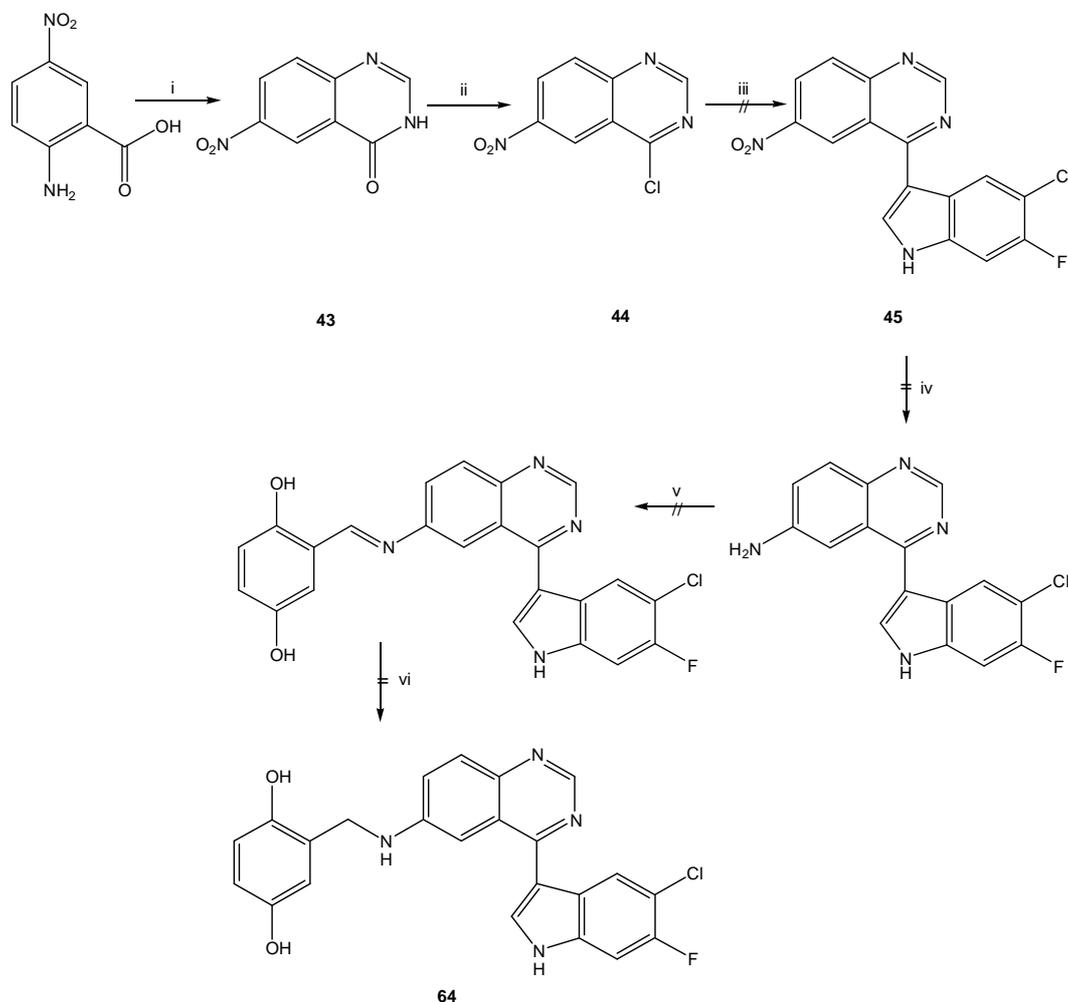
Aufgrund der Teilstrukturen, die für eine EGFR-TK-inhibitorischen Aktivität verantwortlich sind (Dihydroxybenzylamino-Seitenkette, Chinazolin-Grundkörper und Indol-Rest) kann man bei den beiden Verbindungen **63** und **64** von einer guten Wirksamkeit ausgehen.

3.3.1 Angedachter Syntheseweg für die Verbindung **64**, ausgehend vom 6-Nitro-3,4-dihydrochinazolin (**43**)

In einem ersten Syntheseweg zur geplanten Verbindung **64** wird mit der Herstellung des 6-Nitro-3,4-dihydrochinazolins **43** begonnen, welches nach der Chlorierung zu **44** mit dem

metallierten Indol-Teil verknüpft werden soll. Nach Reduktion der Nitrogruppe zur Aminogruppe soll die Seitenkette mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd umgesetzt werden. Die nachfolgende Reduktion zum Amin soll zu den Wunschverbindungen **64** bzw. **63** führen.

Abb. 100 verdeutlicht den geplanten Syntheseweg für das Indolylchinazolin **64**.



- i) Formamidinacetat, 2-Methoxyethanol, ΔT ; ii) Thionylchlorid, *N,N*-Dimethylformamid, ΔT ;
 iii) Magnesium, Iodmethan, Ether, Eiskühlung; **10**; Eis; ΔT ; iv) Eisenpulver, Ethanol/Eisessig, ΔT ;
 v) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Eisessig/Ethanol, ΔT ;
 vi) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

Abb. 100: Geplanter Syntheseweg für die Verbindung **64**

Der erste Schritt dieser Synthese ist eine Zyklisierung der 5-Anthranilsäure mit Formamidinacetat in 2-Methoxyethanol zu Verbindung **43**. Nach dem Entfernen des Lösemittels im Vakuum wird **43** als gelber Feststoff isoliert, der anhand des abgebildeten Protonenresonanzspektrums charakterisiert werden kann (**Abb. 101**), denn es zeigt ein Singulett für das Chinazolin-NH bei 12,78 ppm und die Signale für die aromatischen Protonen in einem Bereich von ca. 7-8 ppm.

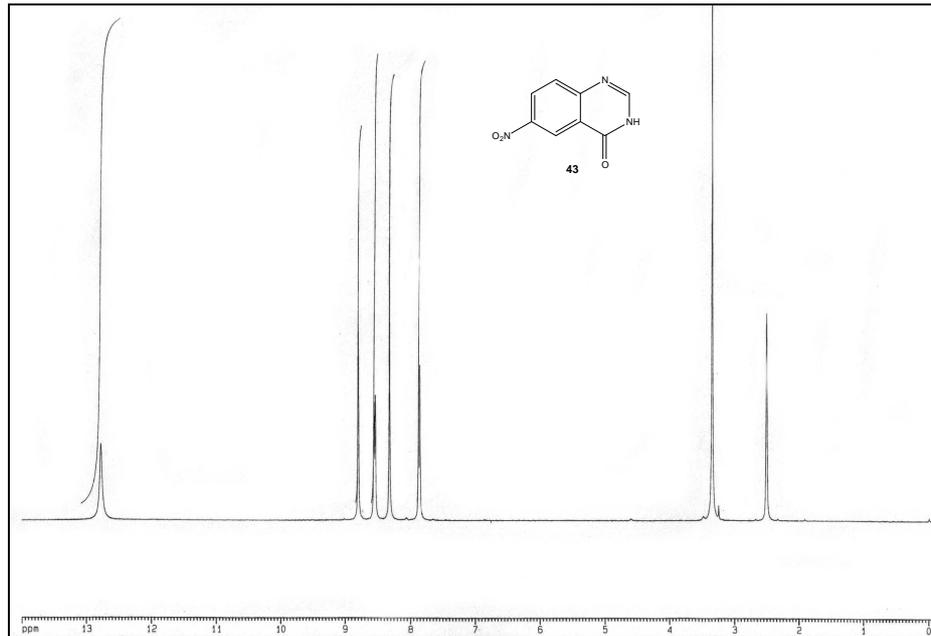


Abb. 101: Protonenresonanzspektrum des 6-Nitro-3,4-dihydrochinazolins **43**

Nach der folgenden Umsetzung von **43** mit Thionylchlorid und *N,N*-Dimethylformamid entsteht in einer S_N1 -Reaktion die Chlor-Verbindung **44** (**Abb. 102**) [104].

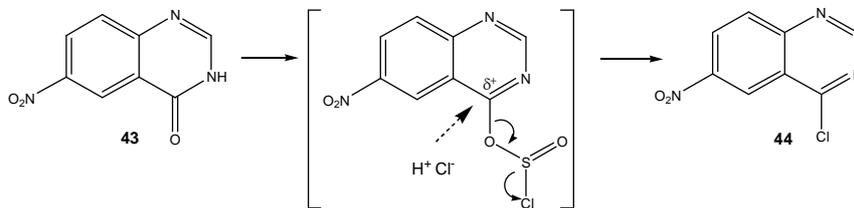


Abb. 102: Chlorierung der Verbindung **43** zum 4-Chlor-6-nitrochinazolin **44**

Während dieser Reaktion wird zunächst ein Chlorsulfinsäureester gebildet, der nach SO_2 -Eliminierung die Verbindung **44** liefert.

Die Struktur von **44** wird durch das 1H -NMR-Spektrum bestätigt (**Abb. 103**).

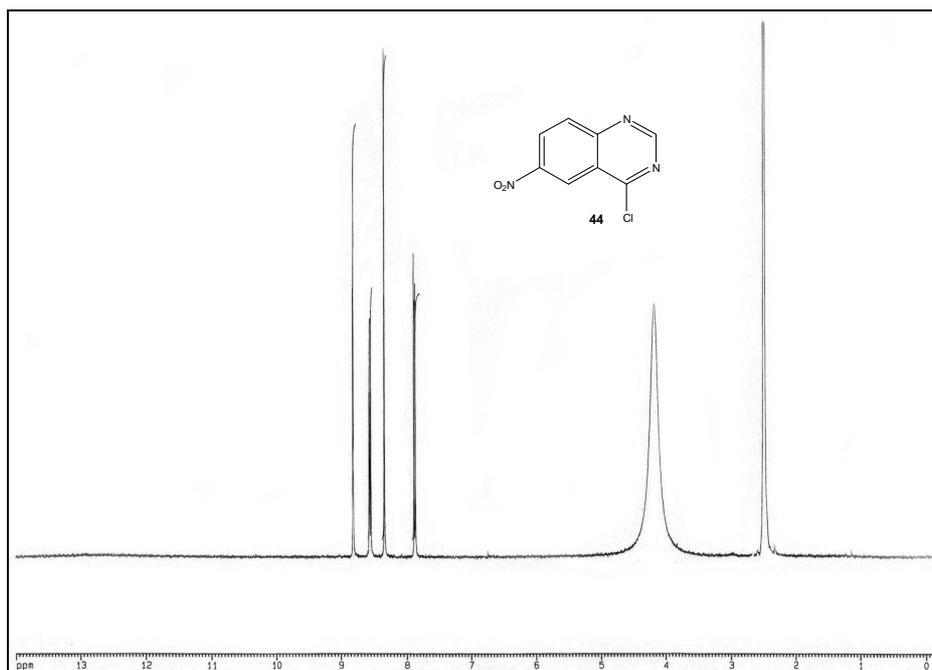


Abb. 103: ¹H-NMR-Spektrum der Chlorverbindung **44**

Daraus ist ersichtlich, dass das Singulett des Chinazolin-NH bei der chlorierten Verbindung **44** nicht mehr vorhanden ist. Das Muster der aromatischen Protonen ist gleich geblieben, jedoch kann keine Tieffeldverschiebung beobachtet werden, die aufgrund des Chlorid-Substituenten erwartet wird.

Bei der anschließend durchgeführten cross-coupling-Reaktion sowohl mit metalliertem 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) als auch mit 5-Bromindol kann jedoch nur das jeweilige Indol und die unchlorierte Verbindung **43** mittels Massenspektrometrie und Magnetresonanzspektroskopie identifiziert werden. Die gewünschten Verbindungen **45** und **46** (Abb. 104) konnten aber nicht gefunden werden.

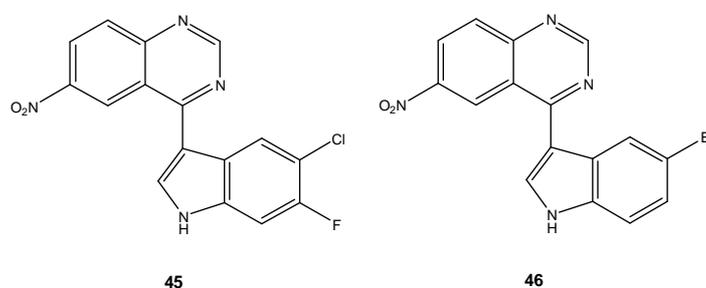


Abb. 104: Gewünschte cross-coupling-Produkte **45** und **46**

Obwohl eine Nitrogruppe die positive Partiaalladung in der Position 4 des Chinazolins zusätzlich verstärkt, findet keine Reaktion statt. Aufgrund der verstärkten positiven

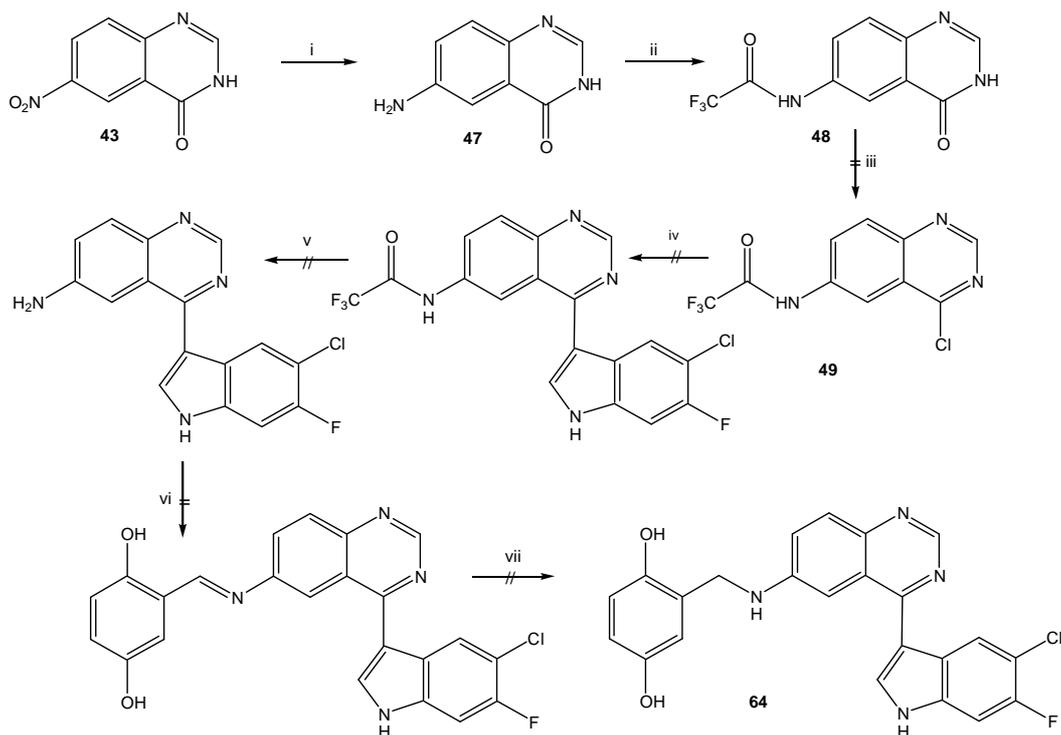
Teilladung müsste die Verknüpfung mit der partiell negativ geladenen Position 3 des 5-Chlor-6-fluorindols zwar begünstigt ablaufen, eine erfolgreiche Umsetzung des 5-Chlor-6-fluorindols (**10**) mit **43** kann allerdings nicht bestätigt werden.

Damit scheiterte diese Synthese bereits zu Beginn an der cross-coupling-Reaktion, obwohl die beiden Edukte, das 4-Chlorchinazolin **44** und das 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) erfolgreich hergestellt werden konnten.

3.3.2 Syntheseversuch von Verbindung **64** mit eingeführter Amino-Schutzgruppe

Da auf dem diesem Weg die gewünschten Verbindungen nicht erhalten werden konnten, soll nun das 6-Nitro-3,4-dihydrochinazolin **43** mit Eisenpulver zum Aminochinazolin **47** reduziert und dieses vor der Chlorierung durch Einführen einer Trifluoracetylgruppe geschützt werden (**48**). Mit dieser geschützten Verbindung **48** wird nach Chlorierung die cross-coupling-Reaktion mit dem Indol vorgenommen. Nach Abspalten der Trifluoracetyl-Schutzgruppe soll dann über die Bildung einer Schiff'schen Base die Dihydroxybenzylamin-Seitenkette eingeführt werden. Nach Reduktion zum Amin könnte dann die Wunschverbindung **64** entstehen.

Abb. 105 zeigt das vorgesehene Syntheschema für den Herstellungsweg von Verbindung **64**.



- i) Eisenpulver, Ethanol/Eisessig, ΔT ; ii) Trifluoressigsäure, 1,4-Dioxan, RT;
 iii) Thionylchlorid/Phosphorylchlorid oder Phosphorylchlorid/Phosphorpentachlorid; ΔT ;
 iv) Magnesium, Iodmethan, Ether, Eiskühlung; **10**; Eis, ΔT ;
 v) K_2CO_3 , Methanol/Wasser, ΔT ;
 vi) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Eisessig/Ethanol, ΔT ; vii) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT

Abb. 105: Syntheschema für die Herstellung von **64**

Die Verbindung **43** wird wie bereits beschrieben durch Zyklisierung der 5-Anthranilsäure mit Formamidinacetat in 2-Methoxyethanol erhalten. Die Reduktion der Nitro-Gruppe erfolgt mit Eisenpulver in Ethanol/Eisessig. Sie liefert jedoch nur geringe Ausbeuten an Amin **47**. Die Entstehung des 6-Amino-3,4-dihydrochinazolin-4-ons **47** kann aber zweifelsfrei anhand des Protonenresonanzspektrums bestätigt werden (**Abb. 106**).

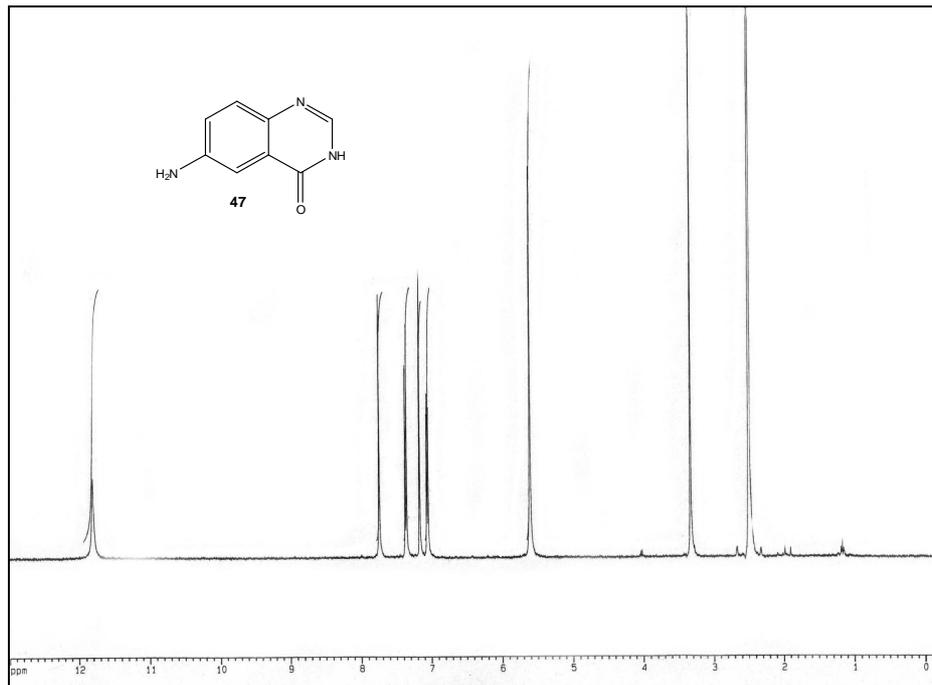


Abb. 106: ¹H-NMR-Spektrum des 6-Amino-3,4-dihydrochinazolin-4-ons **47**

Bei 11,81 ppm ist das Singulett des Chinazolin-NH deutlich sichtbar, und bei 5,61 ppm treten die beiden Protonen der Amino-Gruppe auf. Die aromatischen Protonen werden in einem Bereich von ca. 7-8 ppm detektiert.

Durch Umsetzung von Verbindung **47** mit Trifluoracetanhydrid in 1,4-Dioxan wird dann die geschützte Verbindung **48** erhalten, welche durch das in **Abb. 107** dargestellte Protonenresonanzspektrum identifiziert werden kann.

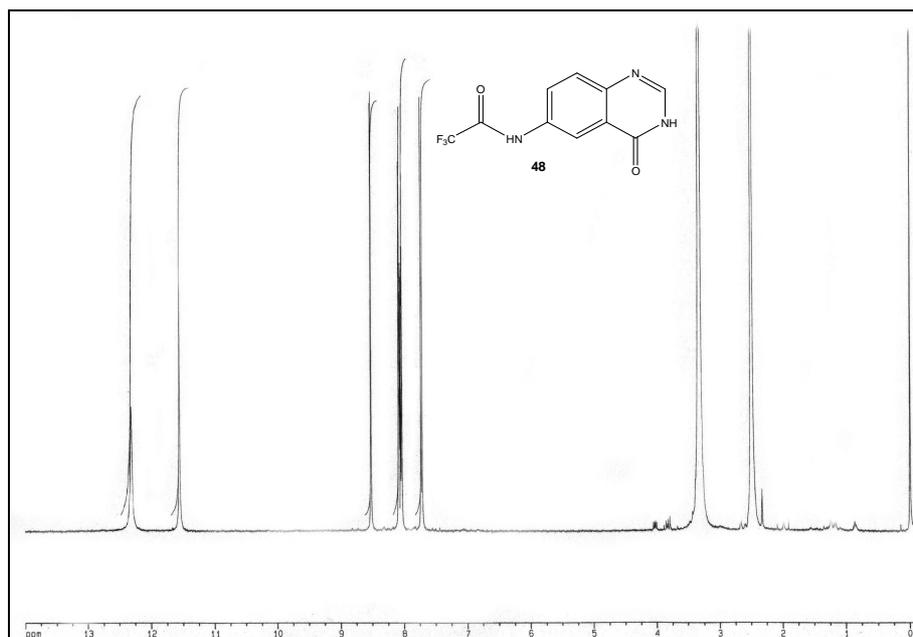


Abb. 107: Protonenresonanzspektrum der Verbindung **48**

Im Unterschied zu der Vorstufe **47** ist jetzt bei Verbindung **48** das NH der Trifluoracetylgruppe bei 12,72 ppm sichtbar. Das Signal der beiden Protonen der Aminogruppe ist verschwunden. Die aromatischen Protonen werden tieffeldverschoben in einem Bereich von ca. 7,7-8,5 ppm detektiert.

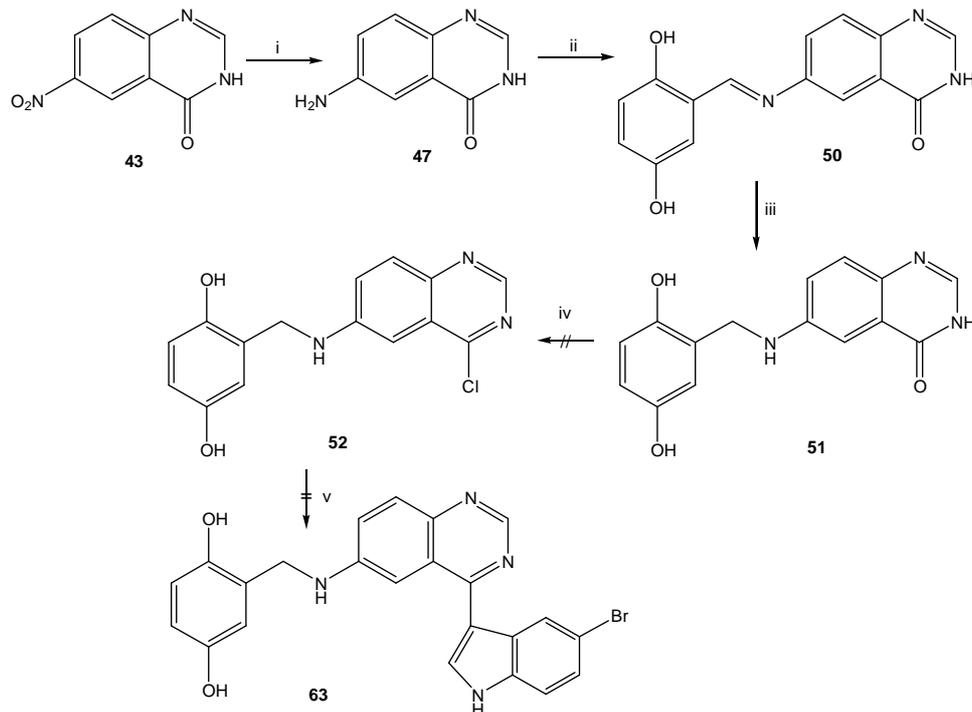
Damit kann die Entstehung der geschützten Verbindung **48** sowohl anhand des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums als auch durch das Auftreten des Molpeaks im EI-Massenspektrum eindeutig bestätigt werden.

Die Verbindung **48** kann jedoch auch durch unterschiedliche Reagenzien und Variationen der Reaktionsbedingungen nicht erfolgreich in die gewünschte Chlorverbindung **49** überführt werden. Trotz Verlängerung der Reaktionszeit und der Steigerung der Menge an Thionylchlorid und Phosphorylchlorid kann nur die unchlorierte Ausgangsverbindung **48** isoliert werden. Auch der Versuch, **48** mit Phosphorpentachlorid und Phosphorylchlorid zu chlorieren ist erfolglos. Hier werden gar keine auswertbaren Ergebnisse erhalten.

Damit scheitert dieser Syntheseweg bereits an der Herstellung der für die cross-coupling-Reaktion benötigten Chlorverbindung. Diese Konzeption scheitert somit bereits zu Beginn der insgesamt siebenstufigen Synthese.

3.3.3 Herstellung des Chinazolin-Teils 52 mit Lavendustin-Seitenkette

Des Weiteren wird nun versucht, wie in **Abb. 108** aufgeführt, zuerst den Chinazolin-Grundkörper komplett mit der Seitenkette aufzubauen, diesen Teil zu chlorieren und das Chlorprodukt **52** zunächst mit dem metallierten 5-Bromindol zu Verbindung **63** zu hetarylieren.



- i) Eisenpulver, Ethanol/Eisessig, ΔT ; ii) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Eisessig/Ethanol, ΔT ;
 iii) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig, RT; iv) Thionylchlorid, *N,N*-Dimethylformamid, ΔT ;
 v) Magnesium, Iodmethan, Ether, Eiskühlung; 5-Bromindol; ΔT ; Eis,

Abb. 108: Geplanter Syntheseverlauf zur Herstellung der Verbindung **63**

Die hierfür wiederum benötigten Verbindungen **43** und **47** werden wie bereits erwähnt hergestellt. Aus der Aminoverbindung **47** wird mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd in Ethanol/Eisessig die Schiff'sche Base **50** erfolgreich erhalten, welche durch Reduktion mit Borandimethylamin-Komplex in Eisessig zu **51** reduziert wird.

Das Protonenresonanzspektrum bestätigt die Entstehung der Schiff'schen Base **50** (**Abb. 109**).

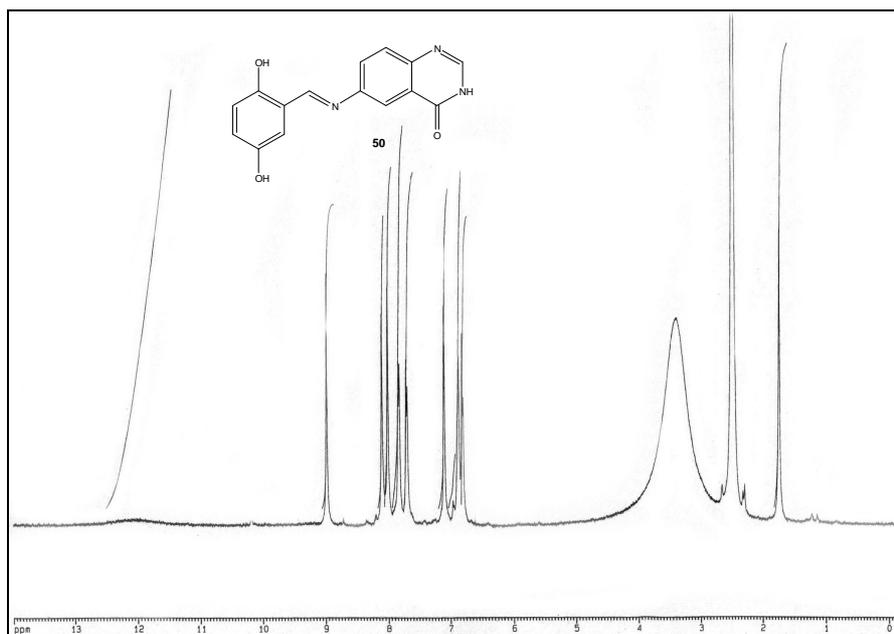


Abb. 109: Protonenresonanzspektrum der Schiff'schen Base **50**

Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Signal für das Imin-CH bei 9,06 ppm auftritt und das Signal der Aminogruppe verschwunden ist. Die Signale der aromatischen Protonen liegen in einem Bereich von ca. 6,75-8 ppm.

Das ¹H-NMR-Spektrum der durch Reduktion der Schiff'schen Base entstandenen Verbindung **51** wird in **Abb. 110** gezeigt.

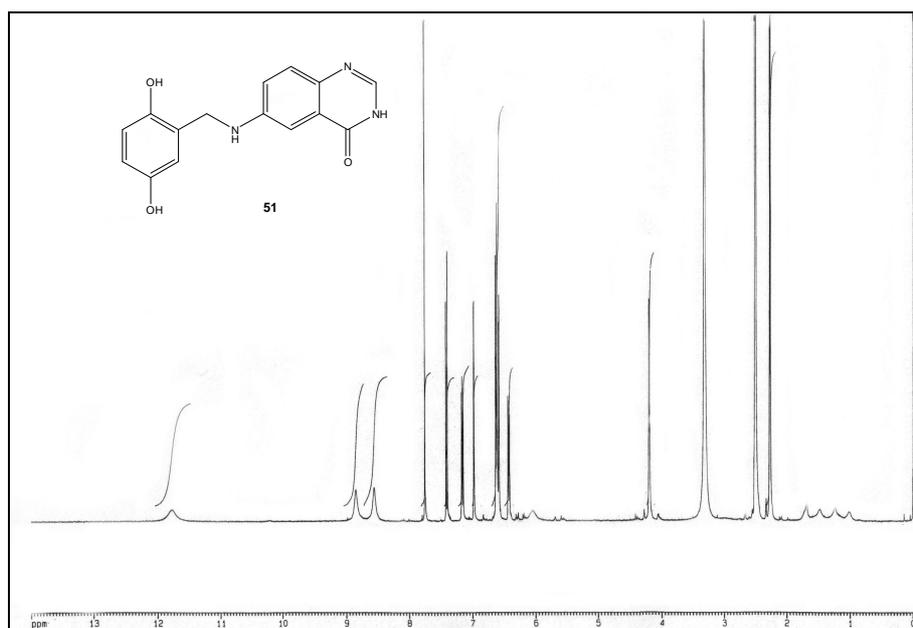


Abb. 110: Protonenresonanzspektrum der Verbindung **51**

Es sind die beiden Protonen der Methylengruppe bei 4,20 ppm deutlich zu erkennen, während das Imin-CH verschwunden ist. Die Signale der aromatischen Protonen zeigen gegenüber der Schiff'schen Base **50** eine Hochfeldverschiebung und liegen in einem Bereich von ca. 6,50-7,80 ppm.

Die Umsetzung von **51** mit Thionylchlorid und *N,N*-Dimethylformamid zu der 4-Chlorverbindung **52** liefert jedoch keine auswertbaren Ergebnisse, so dass auch die anschließende cross-coupling-Reaktion nicht durchgeführt werden kann. Auch durch Verwendung von Phosphorylchlorid wird die gewünschte Chlorverbindung **52** nicht erhalten. Mit dieser Synthese ist es zwar gelungen, den Chinazolin-Grundkörper inklusive Seitenkette aufzubauen (**51**), der dann nach einer erfolgreichen Chlorierung mit dem 5-Bromindol zum gewünschten Endprodukt **63** verknüpft werden sollte. Allerdings war wie bereits erwähnt, die Chlorierung nicht erfolgreich, so dass der letzte Schritt der Synthese, die cross-coupling Reaktion nicht mehr durchgeführt werden konnte.

3.3.4 Geplanter Herstellungsweg von Verbindung **64** nach Veresterung der freien phenolischen Hydroxy-Gruppen

Da nicht auszuschließen ist, dass die beiden freien phenolischen Hydroxygruppen auch mit dem Chlorierungsreagenz reagieren, wird in einem weiteren Syntheseversuch angestrebt, diese durch Reaktion der Verbindung **52** mit Trifluoracetanhydrid vorher zu schützen (**Abb. 111**). Anschließend soll nach einer erfolgreichen Chlorierung die Hetarylierung stattfinden, der sich dann die Abspaltung der Schutzgruppen anschließt.

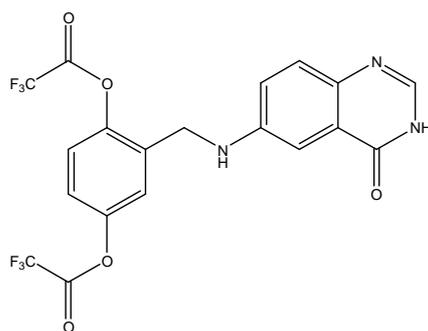


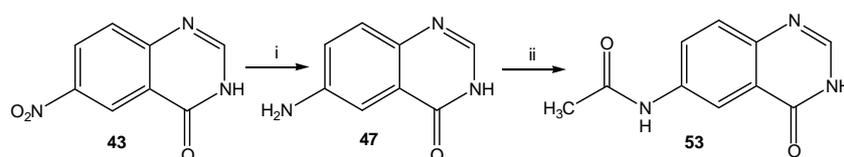
Abb. 111: Angestrebte geschützte Verbindung

Die Reaktion von **52** mit Trifluoracetanhydrid und Pyridin liefert jedoch nicht das gewünschte Resultat. Somit scheiterte auch diese angedachte Synthese wieder bereits am Anfang.

3.3.5 Synthese des exozyklischen Säureamids 54

Da bislang alle bisherigen Synthesewege erfolglos verliefen, wird nun versucht, das Aminochinazolin **47** statt mit Trifluoracetanhydrid mit Acetanhydrid zu schützen, um die Synthese anschließend weiter nach dem in **Abb. 106** dargestellten Schema voranzutreiben. Obwohl durch den stärker Elektronen anziehenden Effekt der Trifluoracetylgruppe die Position 4 des Chinazolin-Teils eine größere positive Partialladung erhält und dadurch die Chlorierung im Vergleich zu einem Acetylgruppen-Schutz begünstigt ist, kann auf diesem Weg das gewünschte 4-Chlorprodukt nicht erhalten werden. Daher wird nun die Chlorierung erst nach der Umsetzung mit Acetanhydrid vorgenommen.

Dazu wird wieder zuerst das 6-Nitro-3,4-dihydrochinazolin **43** hergestellt, dieses zum Aminochinazolin **47** reduziert und dann eine Umsetzung mit Acetanhydrid unter Zusatz von Pyridin zu Verbindung **53** durchgeführt (**Abb. 112**).



i) Eisenpulver, Ethanol/Eisessig, ΔT ; ii) Acetanhydrid, Pyridin, ΔT

Abb. 112: Herstellung der Verbindung **53**

Die Entstehung der so geschützten Verbindung **53** kann zweifelsfrei durch Protonenresonanzspektroskopie und EI-Massenspektrometrie bestätigt werden. Um die Chlorverbindung zu erhalten, wird die Verbindung **53** zusammen mit Phosphorylchlorid erhitzt. Nachdem sich die Reaktionsmischung bei 70-80°C verflüssigt hat, erfolgt die Zugabe von Phosphorpentachlorid, und der Ansatz wird 90 Minuten lang bei 80°C gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels bleibt die Verbindung **54** als gelbes Pulver zurück (**Abb. 113**).

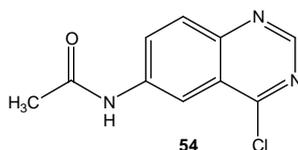


Abb. 113: Chlorverbindung **54**

Mit diesem Chlorchinazolin **54** soll nun eine Hetarylierung einerseits mit metalliertem 5-Bromindol und andererseits mit 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) durchgeführt werden, die zu den Verbindungen **55** und **56** führen sollten (**Abb. 114**), welche anschließend nach Abspalten

der Schutzgruppe mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd in die Schiff'schen Basen überführt werden sollen. Aus dieser sollten nach Reduktion die gewünschten Endverbindungen **64** und **63** entstehen.

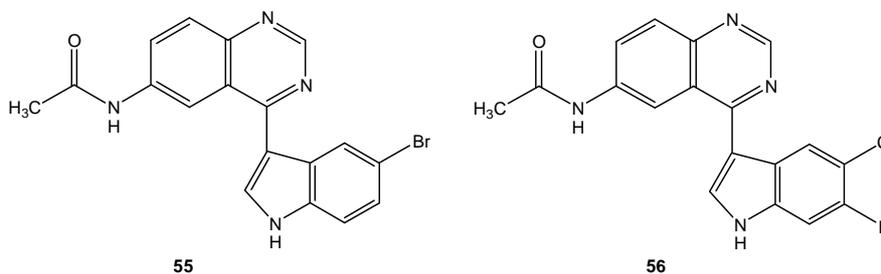
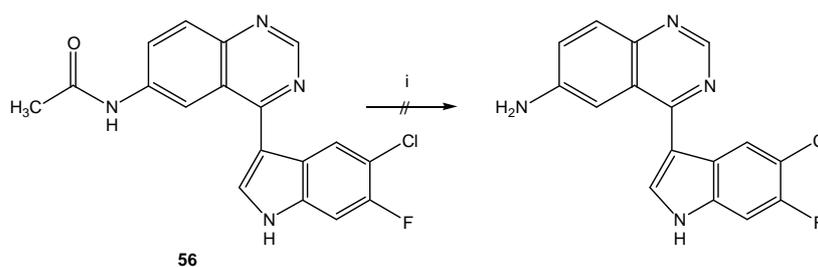


Abb. 114: Die gewünschten Zwischenprodukte **55** und **56**

Nach der Reaktion von **54** mit 5-Bromindol werden allerdings wieder nur die einzelnen Ausgangsstoffe, die hydroxylierte Verbindung **53** und das Bromindol, isoliert. Bei der Reaktion von **54** mit 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) wird einmal im EI-Massenspektrum der gewünschte Molpeak von Verbindung **56** detektiert, und auch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum liefert einige Hinweise auf eine erfolgreiche Entstehung der Wunschverbindung **56**.

Jedoch gelingt auch nach säulenchromatographischer Aufreinigung keine zweifelsfreie Zuordnung der Signale. Durch die zu geringe Ausbeute können keine weiteren Aufreinigungsschritte unternommen werden.

Trotzdem wird versucht, bei der nicht vollständig aufgereinigten Verbindung **56** durch Abspaltung der Acetylgruppe am Chinazolinteil eine Aminogruppe freizusetzen (**Abb. 115**).



i) K_2CO_3 , Methanol/Wasser, ΔT oder Triton B, RT oder ethanolische NaOH

Abb. 115: Abspaltung der Acetylgruppe von **56**

Die Abspaltung wird zuerst analog der der Lavendustin-A-Derivate mit K_2CO_3 in Methanol/Wasser (8:1) bei 70°C versucht. Es kann jedoch kein Verlust der Schutzgruppe nachgewiesen werden. Es wird lediglich die geschützte Verbindung **56** isoliert.

Da die Basizität des K_2CO_3 nicht auszureichen scheint, wird nun die Verbindung **56** mit einer 40%igen wässrigen Benzyltrimethylammoniumhydroxid-Lösung (Triton B) bei Raum-

temperatur umgesetzt. Jedoch scheitert auch hier eine Abspaltung der Schutzgruppe, und es wird wieder nur die Verbindung **56** erhalten.

Daraufhin erfolgt nun eine Reaktion mit ethanolischer NaOH. Dabei wird im EI-Massenspektrum neben der acetylierten Verbindung **56** der gewünschte Molpeak der Amino-Verbindung detektiert. Das Protonenresonanzspektrum ist jedoch nicht auswertbar.

Bei der weiter folgenden Umsetzung mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd zur Schiff'schen Base (**Abb. 116**) kann massenspektrometrisch und magnetresonanzspektroskopisch nur der 2,5-Dihydroxybenzaldehyd nachgewiesen werden und nicht die gewünschte Verbindung **57**.

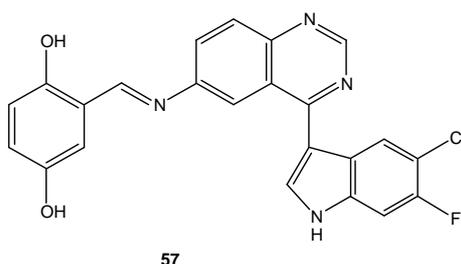
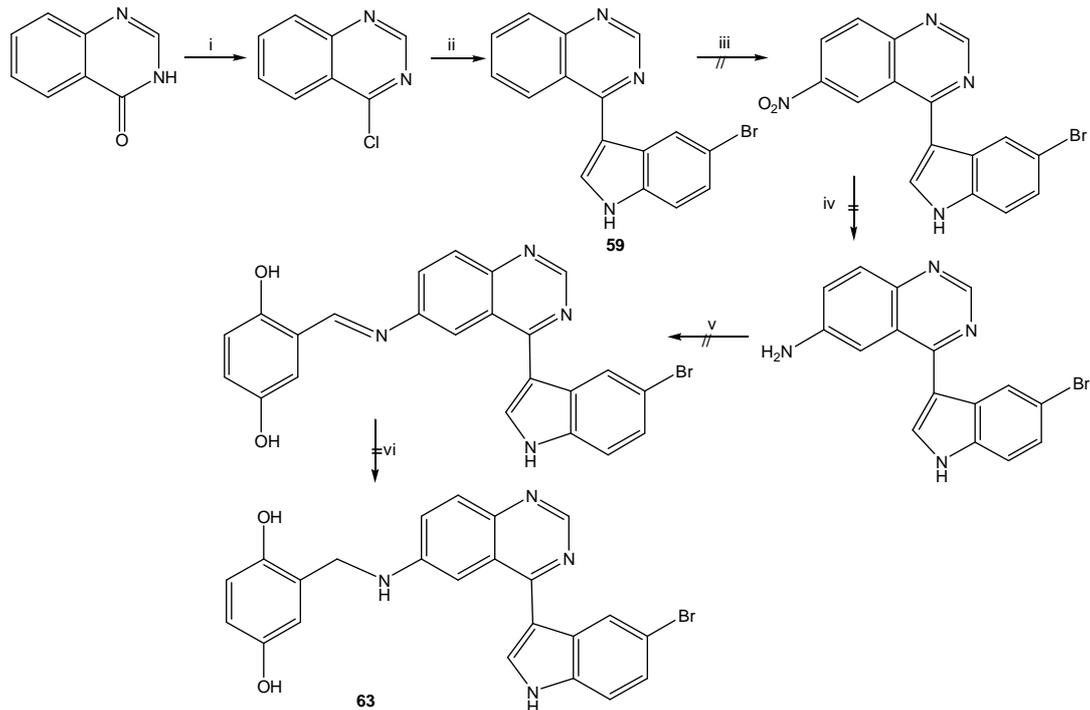


Abb. 116: Nicht gelungene Schiff'sche Base **57**

Somit blieb auch dieser Syntheseverlauf ohne das gewünschte Ergebnis. Diese Synthese, die zur Entstehung von Verbindung **64** führen sollte, verlief zunächst aufgrund der möglicherweise geglückten Verknüpfung des Chinazolin-Teils mit dem 5-Chlor-6-fluorindol **10** zu Verbindung **56** vielversprechend. Die weiteren Stufen konnten allerdings nicht realisiert werden, so dass die Synthese bis zur Wunschverbindung **64** ebenfalls nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte.

3.3.6 Versuch zur Herstellung des 4-(Indol-3-yl)chinazolins **63**

In einem weiteren Syntheseweg soll zunächst das unsubstituierte Chinazolin-4-on in einer Hetarylierungsreaktion mit 5-Bromindol verknüpft werden und anschließend nach Nitrierung und Reduktion zum freien Amin die Dihydroxybenzylamino-Seitenkette eingeführt werden (**Abb. 117**).



- i) Phosphorylchlorid/Phosphorpentachlorid, ΔT ;
 ii) Magnesium, Iodmethan, Ether, Eiskühlung, 5-Bromindol; ΔT ; Eis; iii) konz. HNO_3
 iv) Eisenpulver, Ethanol/Eisessig, ΔT ; v) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Eisessig/Ethanol, ΔT ;
 vi) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig; Eiskühlung \rightarrow RT

Abb. 117: Syntheseverlauf für die Verbindung **63**, ausgehend vom Chinazolin-4-on

Durch Umsetzen mit Phosphorylchlorid und Phosphorpentachlorid wird aus dem Chinazolin-4-on das 4-Chlorchinazolin hergestellt und dieses erfolgreich mit 5-Bromindol zum Indolylchinazolin **59** umgesetzt (**Abb. 118**).

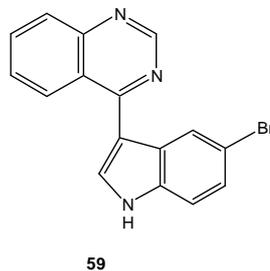


Abb. 118: 4-(Indol-3-yl)chinazolin **59**

Das Gelingen dieser Reaktion bestätigt das abgebildete Protonenresonanzspektrum (**Abb. 119**).

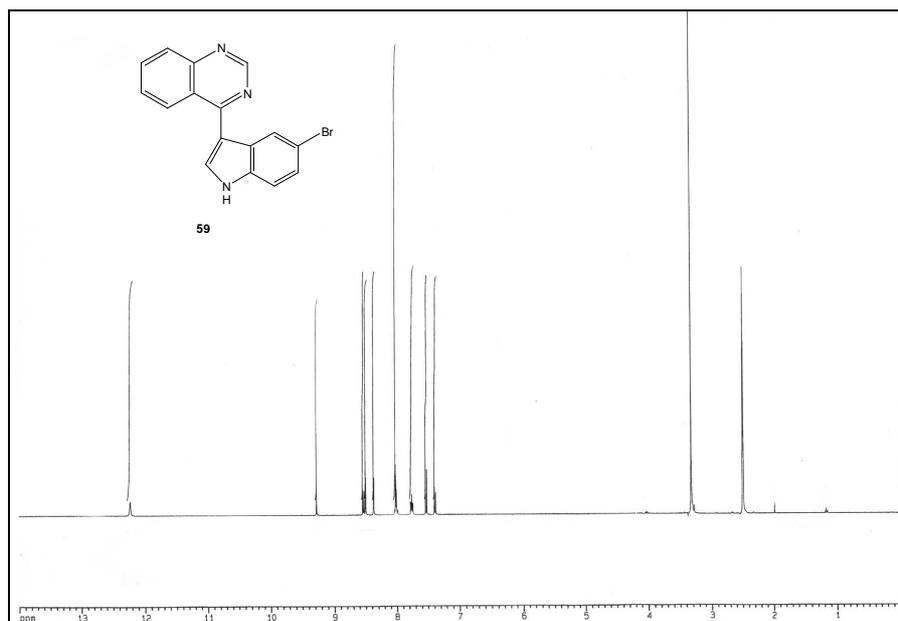


Abb. 119: Protonenresonanzspektrum des 4-(Indol-3-yl)chinazolins **59**

Signifikant für die Entstehung der gewünschten Verbindung ist das Singulett für das H2 des Chinazolin-Teils bei 9,30 ppm und das NH-Signal bei 12,30 ppm. Die anderen aromatischen Protonen treten in einem Bereich von ca. 7,40-8,50 ppm auf. Die Struktur der Verbindung **59** kann außerdem durch das Auftreten des Molpeaks bei m/z 323 bewiesen werden.

Das Indolylchinazolin **59** wird mit konzentrierter HNO_3 unter Eiskühlung nitriert. Dabei kann nur die Ausgangsverbindung **59** isoliert werden. Nach einer Umsetzung mit konzentrierter HNO_3 bei Raumtemperatur wird zwar der Molpeak der gewünschten Nitroverbindung detektiert, aber eine zweifelsfreie Zuordnung der Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist unmöglich.

Auch durch die säulenchromatographische Aufreinigung wird leider kein eindeutiges Spektrum erhalten.

Jedoch wird in einer Fraktion eine zusätzliche Verbindung beobachtet, bei der die Nitrierung nicht wie gewünscht am Chinazolinteil stattgefunden hat sondern am Indol. Die aus dem Protonenresonanzspektrum (**Abb. 120**) resultierende Strukturformel zeigt **Abb. 121**.

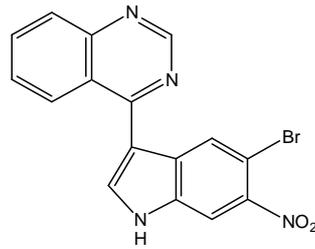


Abb. 120: Nitrierte Verbindung

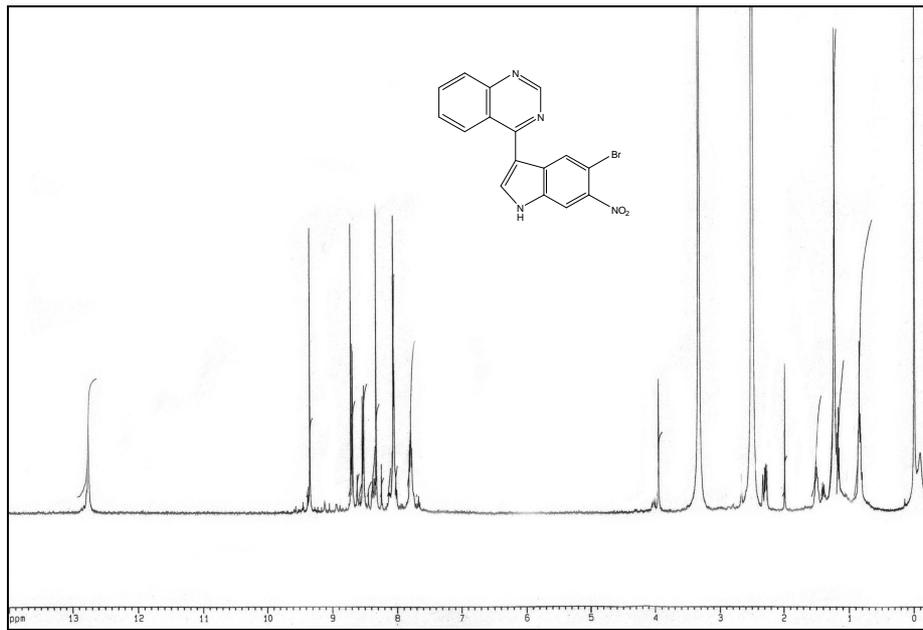


Abb. 121: ^1H -NMR-Spektrum der nitrierten Verbindung

Anhand dieses Protonenresonanzspektrums lässt sich die vermutete Struktur bestätigen. Aufgrund des Auftretens eines Signals des H6 des Chinazolin-Teils, des fehlenden Signals für das H6' des Indol-Teils und des gesamten Musters der Signale kann von einer Nitrierung am Indol-Teil in Position 6 ausgegangen werden.

Somit mussten die Nitrierungsbedingungen noch einmal verändert werden.

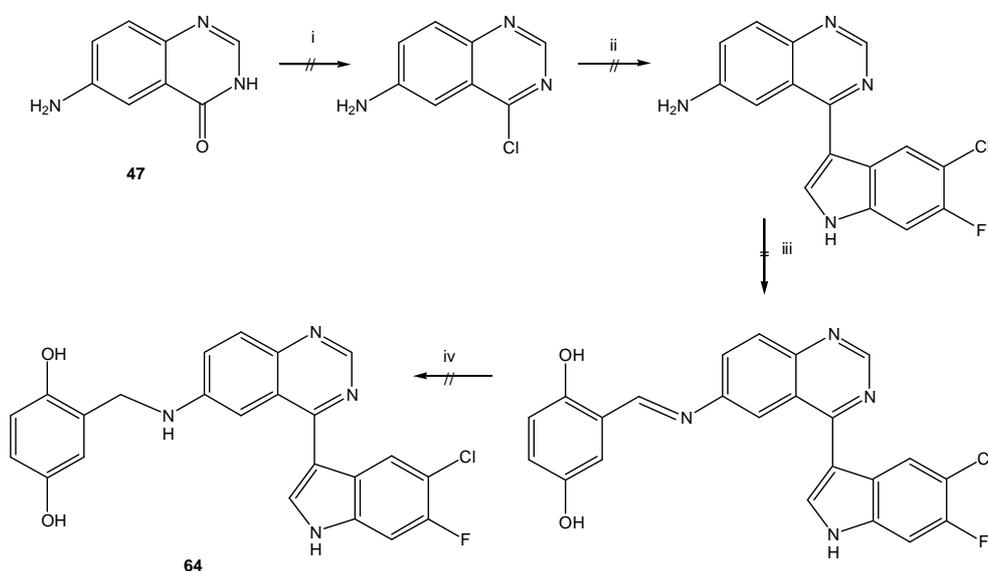
Nach der Vorschrift von *Lumetzberger* wird deshalb eine Nitrierung mit einer Mischung aus konzentrierter H_2SO_4 und HNO_3 bei 80°C durchgeführt. Dabei wird aber wieder nur die Ausgangsverbindung **59** isoliert [105].

Dieser Syntheserversuch, das gewünschte 4-(Indol-3-yl)chinazolin **63** herzustellen, blieb somit ebenfalls erfolglos. Die Synthese scheiterte bereits auf der dritten Stufe. Es konnte zwar eine erfolgreiche Hetarylierung durchgeführt werden, da aber die Nitrierung nicht

geglückt ist, konnte die Lavendustin-Seitenkette nicht aufgebaut werden und die gewünschte Verbindung **64** nicht erhalten werden.

3.3.7 Versuch zur Herstellung von Verbindung **64**

Abschließend soll nun versucht werden, die Verbindung **64** aus dem 6-Amino-3,4-dihydrochinazolin **47** ohne die Einführung einer Schutzgruppe zu erhalten. Dabei soll die ungeschützte Verbindung **47** direkt chloriert werden. Anschließend könnte dann die freie Aminogruppe mit 2,5-Dihydroxybenzaldehyd zur Schiff'schen Base umgesetzt werden. Aus dieser würde dann nach Reduktion die Wunschverbindung **64** entstehen. **Abb. 122** zeigt den angedachten Syntheseverlauf.



- i) Phosphorylchlorid/Phosphorpentachlorid, ΔT ; oder Thionylchlorid/Phosphorylchlorid, ΔT oder Thionylchlorid/ *N,N*-Dimethylformamid, ΔT ; ii) Magnesium, Iodmethan, Ether, Eiskühlung; **10**; ΔT ; Eis, iii) 2,5-Dihydroxybenzaldehyd, Eisessig/Ethanol, ΔT ; iv) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig; Eis \rightarrow RT

Abb. 122: Herstellungsweg für die Verbindung **64**

Die Chlorierung von **47** mit Phosphorylchlorid und Phosphorpentachlorid liefert jedoch keine auswertbaren Ergebnisse. Auch bei der Reaktion mit einer Mischung aus Thionylchlorid und Phosphorylchlorid tritt nicht die gewünschte 4-Chlor-Verbindung auf. Bei der Umsetzung mit Thionylchlorid und *N,N*-Dimethylformamid findet vermutlich eine Addition des *N,N*-Dimethylformamids statt. Die vermutete Struktur ist in **Abb. 123** dargestellt.

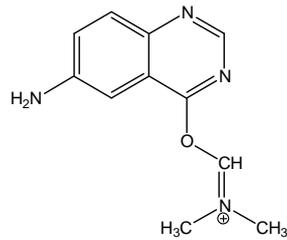


Abb. 123: Vermutete Struktur nach Addition von *N,N*-Dimethylformamid

Das Protonenresonanzspektrum in **Abb. 124** liefert Hinweise auf die Struktur der entstandenen Verbindung.

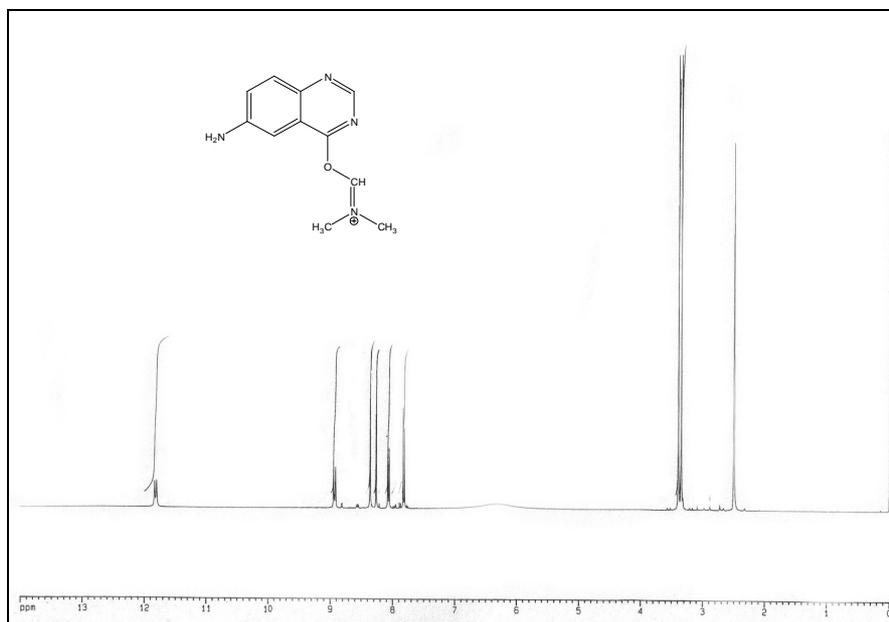


Abb. 124: Protonenresonanzspektrum der vermuteten Struktur nach Addition von DMF

Für die vermutete Struktur sprechen die beiden Signale für die beiden inäquivalenten Methylgruppen bei 3,40 und 3,33 ppm. Allerdings kann kein Signal für die beiden Protonen der Aminogruppe detektiert werden, sondern dafür ein NH-Signal bei 11,80 ppm. Dieser Hinweis würde für eine zusätzliche Chlorsulfinylamid-Struktur sprechen (**Abb. 125**).

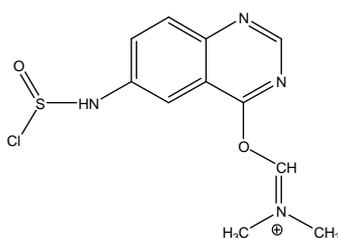


Abb. 125: Vermutete Struktur nach Auswertung des Protonenresonanzspektrums

Außerdem treten aber im Protonenresonanzspektrum fünf Protonensignale im Bereich von 7-9 ppm auf, wovon vier Signale den Chinazolin-Protonen zuzuordnen sind. Das fünfte Proton könnte auf die exozyklische Methylen-Iminium-Struktur hinweisen.

Das EI-Massenspektrum ist nicht eindeutig. Es wird ein Molpeak bei m/z 216 detektiert. Nach Berechnung müsste aber die in **Abb. 123** gezeigte Struktur eine molare Masse von m/z 217 besitzen, und die gewünschte Chlorverbindung (in **Abb. 122**) würde einen Molpeak bei m/z 179 zeigen.

Die tatsächliche Struktur der bei der Chlorierung von **47** entstandenen Verbindung kann somit anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig aufgeklärt werden.

Damit kann auch auf diesem Weg das gewünschte 4-(Indol-3-yl)chinazolin **64** nicht erhalten werden.

Da hier die Chlorierung des 6-Amino-3,4-dihydrochinazolins **47** nicht erfolgreich verlaufen ist, scheiterte diese Synthese auch wieder in einem frühen Stadium.

3.3.8 [4-(5-Chlor-6 fluor-1*H*-indol-3-yl)-chinazolin-6-yl]-(2,5-dimethoxybenzyl)amin

Da alle bisherigen Syntheseveruche zur Verbindung **64** scheiterten, wird nun in Anlehnung an die EGFR-TK-inhibitorisch wirksame Verbindung **35** (Kapitel 3.2.3) die Methoxy-substituierte Verbindung konzipiert. (**Abb. 126**).

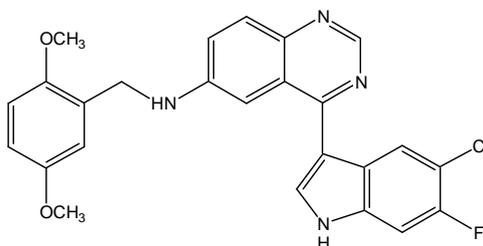
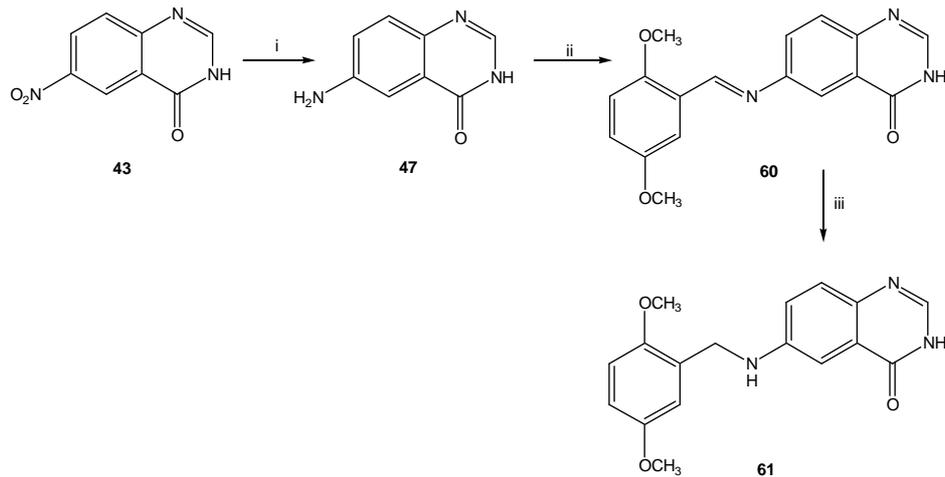


Abb. 126: Angestrebte methoxysubstituierte Verbindung

Durch den Einsatz von 2,5-Dimethoxybenzaldehyd kann außerdem eine Reaktion der freien phenolischen Hydroxygruppen mit dem Chlorierungsreagenz verhindert werden.

Der nachfolgend dargestellte Syntheseweg (**Abb. 127**) geht wiederum von 6-Nitro-3,4-dihydrochinazolin-4-on **43** aus, welches auch wie bisher zu **47** reduziert wird. Durch Umsetzung der Aminoverbindung **47** mit 2,5-Dimethoxybenzaldehyd in Ethanol/Eisessig erhält man die Schiff'sche Base **60**, die anschließend durch Reduktion mit Boran-dimethylamin-Komplex in Eisessig in Verbindung **61** überführt wird.



- i) Ethanol, Eisessig, Eisenspäne, ΔT ; ii) 2,5-Dimethoxybenzaldehyd, Ethanol/Eisessig, ΔT ;
 iii) Borandimethylamin-Komplex, Eisessig; Eiskühlung \rightarrow RT

Abb. 127: Herstellung der Dimethoxy-Verbindung **61**

Sowohl die Entstehung der Schiff'schen Base **60** als auch der reduzierten Verbindung **61** kann zweifelsfrei durch Protonenresonanzspektroskopie (**Abb. 128** und **129**) und EI-Massenspektrometrie bestätigt werden.

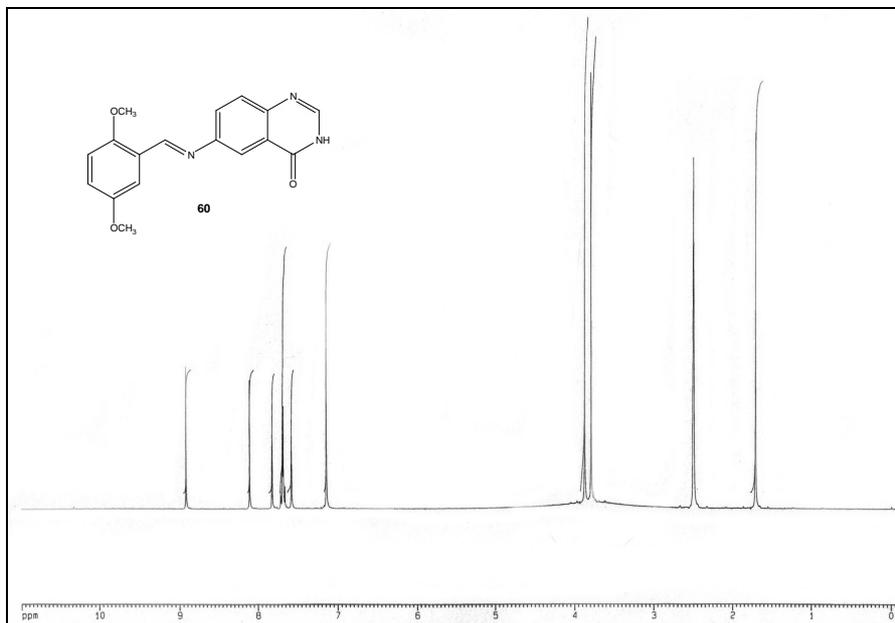


Abb. 128: Protonenresonanzspektrum der Schiff'schen Base **60**

In dem aufgenommenen Protonenresonanzspektrum ist deutlich das Singulett für das Imin-CH bei 8,95 ppm zu erkennen, während das Signal für die Aminogruppe verschwunden ist. Bei 3,80 und 3,70 ppm treten die Signale der beiden Methoxygruppen auf, und die

aromatischen Protonen werden in einem Bereich von 7-8 ppm registriert. Damit kann die angenommene Struktur der Schiff'schen Base **60** bestätigt werden.

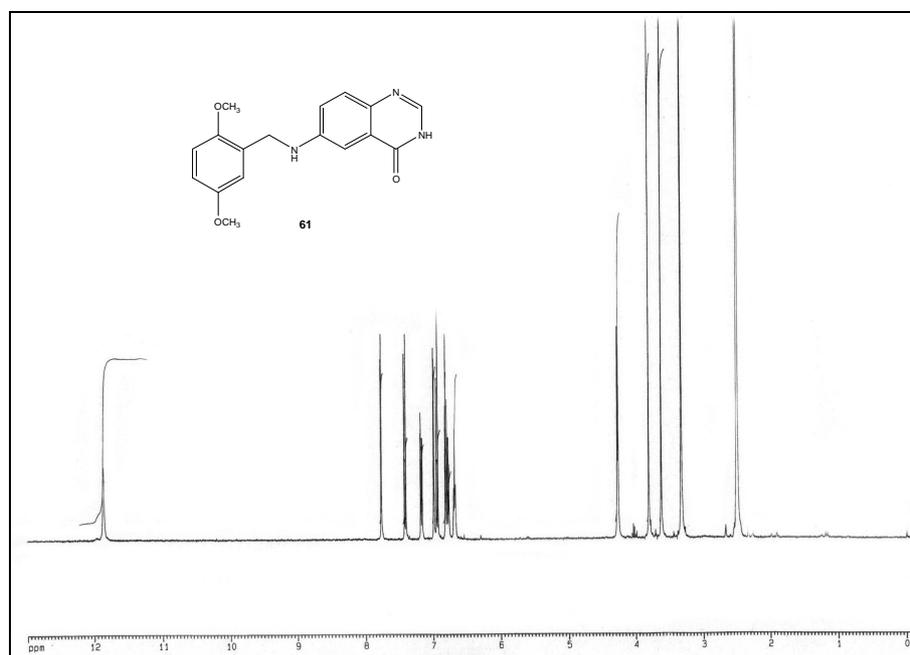


Abb. 129: Protonenresonanzspektrum der Verbindung **61**

Die erfolgreiche Reduktion der Schiff'schen Base kann durch das Auftreten des Signals für die Methylengruppe bei 4,30 ppm und des NH-Tripletts bei 6,70 ppm bewiesen werden. Das Signal des Imin-CH ist verschwunden. Die aromatischen Protonen sind in einem Bereich von ca. 7-8 ppm zu erkennen.

Die nachfolgende Chlorierung von **61** mit Thionylchlorid unter Zusatz von *N,N*-Dimethylformamid liefert jedoch überraschende Ergebnisse. Diese Chlorierungsmethode wird gewählt, da sie sich bereits bei der Chlorierung von 4-(Indol-3-yl)chinazolinen bei *Lüth* bewährt hat. Doch statt der erwarteten berechneten molaren Masse von m/z 329 der gewünschten Verbindung **62** erscheint im EI-Massenspektrum ein Molpeak bei m/z 366. Daraus lässt sich schließen, dass vermutlich eine modifizierte Vilsmeier-Haack-Synthese des *N,N*-Dimethylformamids in Position 4 des Chinazolins stattgefunden haben könnte. Der Ablauf der Reaktion von Thionylchlorid mit *N,N*-Dimethylformamid nach Vilsmeier-Haack zeigt **Abb. 130**.

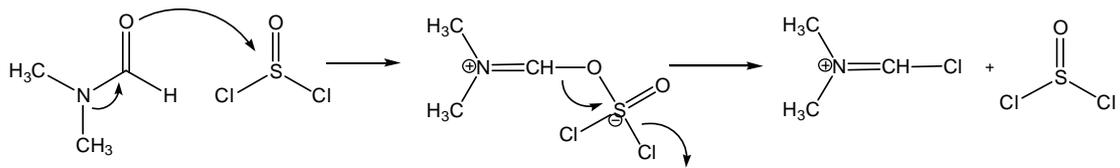


Abb. 130: Reaktion von Thionylchlorid mit *N,N*-Dimethylformamid nach Vilsmeier-Haack

Das erhaltene Imin kann Verbindung **61** in Position 4 elektrophil angreifen, wobei sich folgende Struktur aus den nachfolgend näher erläuterten Beobachtungen ableiten lässt (**Abb. 131**).

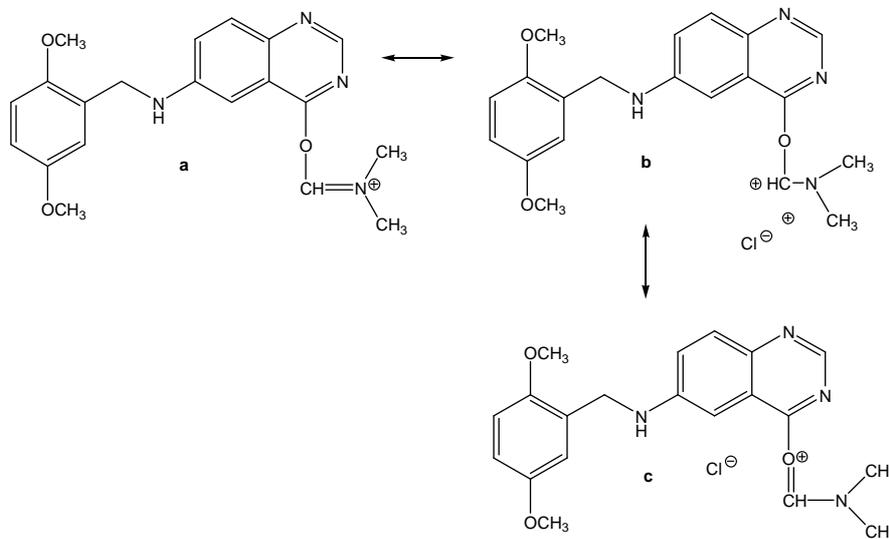


Abb. 131: Mögliche Resonanzformeln der Verbindung **62**

Auch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigt die Vermutung der Addition von *N,N*-Dimethylformamid, denn es treten 2 Signale auf, die den beiden *N*-Methylgruppen entsprechen. Ein Singulett erscheint bei einer chemischen Verschiebung von 3,35 ppm und das zweite bei 2,45 ppm. Außerdem ist eine Tieffeldverschiebung gegenüber Verbindung **61** sichtbar, welche für eine Veränderung am Chinazolin-Teil spricht. Für die Annahme einer möglicherweise stattgefundenen zweifachen Formylierung fehlt jedoch im Aromatenbereich ein Signal (**Abb. 132**).

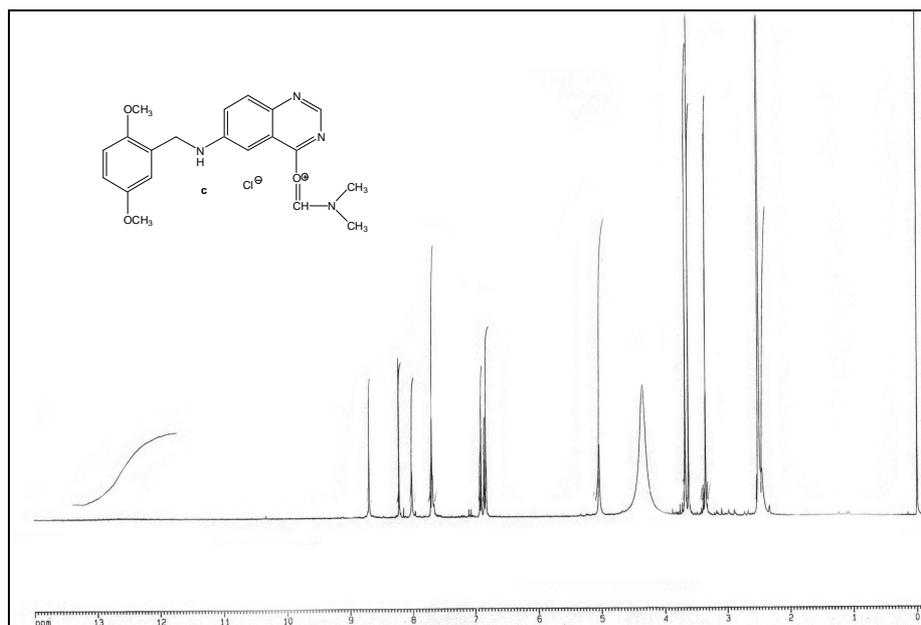


Abb. 132: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **62**

Weiterhin ist im EI-Massenspektrum beim Molpeak kein Chlor-Isotopenpeak aufgetreten, weshalb die Entstehung der gewünschten Chlorverbindung **62** nicht wahrscheinlich ist.

Durch die drei formulierbaren Resonanzformeln **a-c** entsteht gegenüber der gewünschten Chlorverbindung **62** eine sehr stabile Struktur, wobei die Formel **c** vermutlich aufgrund der exocyclischen Konjugation am stabilsten ist. Außerdem kann im EI-Massenspektrum kein Bruchstück des sauerstoffsubstituierten Chinazolins gefunden werden, welches durch Abspaltung der Formylgruppe bei den Formeln **a** und **b** entstanden sein könnte. **Abb. 133** zeigt das im EI-Massenspektrum nicht gefundene Bruchstück.

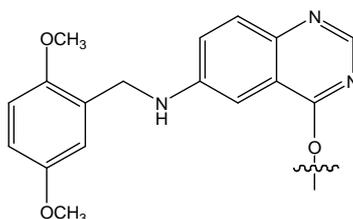


Abb. 133: Nicht detektiertes Bruchstück

Das Formyl-Proton ist aufgrund der Mesomerie sehr acide und liefert dadurch Mischsignale mit DMSO. Die Methylgruppen in Formel **a** sind aufgrund der Doppelbindung inäquivalent und zeigen deshalb im ^1H -NMR-Spektrum unterschiedliche chemische Verschiebungen. Bei einer zusätzlichen N-Formylierung müsste aus dem NH-Triplett ein Dublett entstehen, was jedoch hier nicht zu erkennen ist. Außerdem hätte diese Substanz ein Molekulargewicht von m/z 367, welches jedoch nicht registriert werden kann.

Obwohl sich diese Chlorierungsmethode zur Chlorierung von Chinazolinen bei *Lüth* bewährt hat, kann sie in diesem Fall durch die abweichenden elektronischen Verhältnisse nicht angewendet werden.

In einem nächsten Versuch wurde Verbindung **61** mit einer Mischung aus Thionylchlorid und Phosphorylchlorid umgesetzt. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum liefert hier leider keine auswertbaren Ergebnisse, jedoch wird im EI-Massenspektrum der gewünschte Molpeak der Verbindung **62** detektiert. **Abb. 134** zeigt die Chlorverbindung **62**.

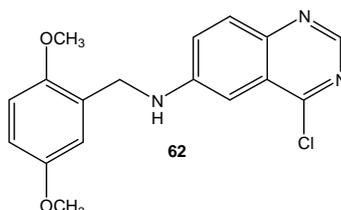


Abb. 134: Chlorverbindung **62**

Diese Chlorierung konnte einmal verifiziert werden, jedoch scheiterten alle Versuche zur Reproduktion dieses Verfahrens. Auch Änderungen der Verhältnisse von Thionylchlorid zu Phosphorylchlorid, der Temperatur und der Reaktionsdauer liefern nicht das gewünschte Ergebnis. Ein weiterer Versuch mit Phosphorylchlorid und Phosphorpentachlorid scheitert ebenfalls. Die Verbindung **62** kann also nicht ein zweites Mal erhalten werden.

Die nachfolgende cross-coupling-Reaktion mit der einmal erfolgreich hergestellten Verbindung **62** und 5-Bromindol gelingt auch nicht.

Mit dieser Synthese ist es zwar wieder gelungen, den vollständigen Chinazolin-Teil aufzubauen (**61**). Jedoch konnte aufgrund der gescheiterten Chlorierung die nachfolgende Hetarylierung, die schließlich zu den gewünschten Endprodukten **63** oder **64** geführt hätte, nicht durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen ist es leider trotz zahlreicher Versuche und Anstrengungen nicht gelungen, das Lavendustin A-Pharmakophor in ein strukturverwandtes Chinazolin-4-on-Derivat zu überführen und dieses mit 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) oder 5-Bromindol im Rahmen einer cross-coupling-Reaktion zu verknüpfen.

Einige dieser Synthesversuche scheiterten bereits in den ersten Stufen. Bei anderen ist schließlich die Verknüpfung des zuvor hergestellten Chinazolin-Teils mit dem metallierten Indol mißlungen. Nach einer sogar erfolgreichen Hetarylierung des Chinazolin-4-on mit dem 5-Chlor-6-fluorindol **10** konnte jedoch anschließend die Lavendustin-Seitenkette nicht aufgebaut werden.

3.4 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6-methoxy-7-(3-morpholin-4-ylpropoxy)chinazolin (72)

Im letzten Teil dieser Arbeit wird ein Chinazolin-Derivat (Verbindung **72**) synthetisiert, das aufgrund seiner Bioisosterie zu Salicyloyl-Verbindungen eine Fortführung der vorangegangenen Untersuchungen darstellt. Bei der geplanten Verbindung wird die in die Zuckertasche des Rezeptors ragende Lavendustin-Teilstruktur durch eine Morpholinopropoxy-Seitenkette ersetzt.

In Anlehnung an den bereits als Arzneistoff zugelassenen EGFR-TK-Inhibitor Iressa[®] und an die von *Lüth* hergestellte Verbindung **LA 51** soll die Auswirkung einer Veränderung der Positionen des Methoxy- und des Morpholinopropoxy-Restes auf die EGFR-TK-inhibitorische Wirkung untersucht werden. Die **Abb. 135** zeigt die Strukturen von **Gefitinib**, **LA 51** und **72** im Vergleich.

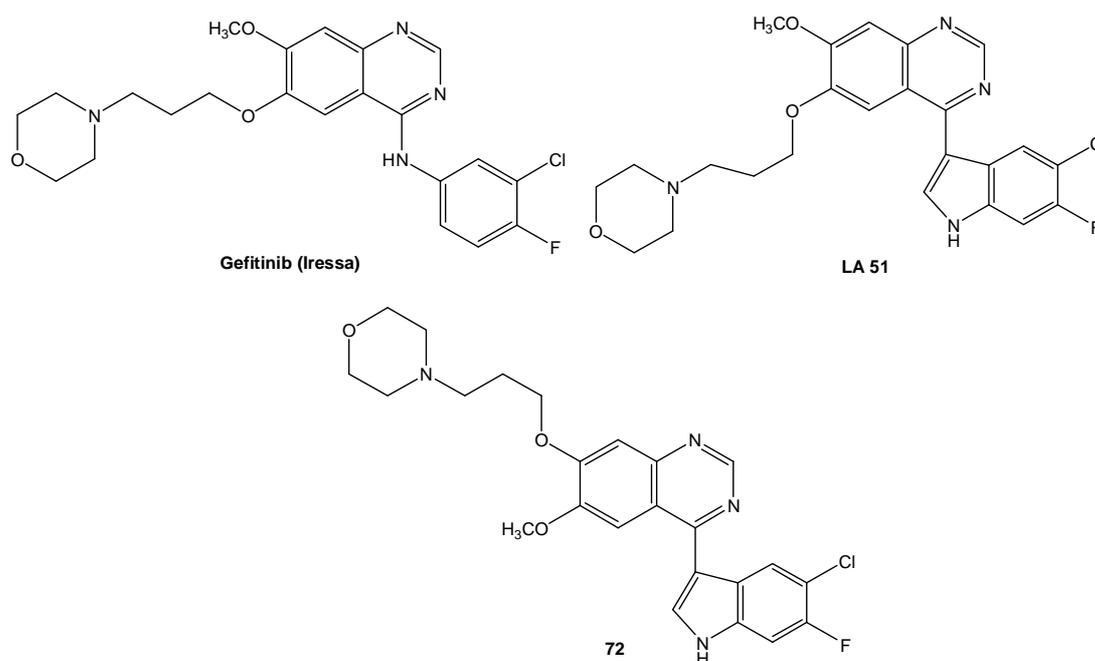


Abb. 135: In Anlehnung an Gefitinib (Iressa[®]) konzipierte Verbindungen **LA 51** und **72**

Lüth entwickelte das 4-(Indol-3-yl)chinazolin **LA 51** nach dem Vorbild des EGFR-TK-Inhibitors Gefitinib (Iressa[®]). Durch den Austausch des 3-Chlor-4-fluoranilinrestes gegen 5-Chlor-6-fluor-indol konnte *Lüth* eine sehr gute EGFR-TK-hemmende Wirkung mit einer IC_{50} von 333 nmol/L beobachten und zusätzlich hervorragende zytotoxische Wirkungen erzielen [106].

Als Weiterentwicklung des von *Lüth* hergestellten hoch wirksamen 4-(Indol-3-yl)chinazolins **LA 51** wird in diesem Teil der Arbeit die Verbindung **72** hergestellt, bei welcher sich die Methoxygruppe in Position 6 und die Morpholinopropoxy-Seitenkette in Position 7 befindet.

Die Verbindung **LA 51** wurde zunächst nach einem Syntheseverfahren erhalten, in dessen Rahmen eine Verknüpfung des zuvor hergestellten 5-Chlor-6-fluorindols (**10**) mit dem 4-Chlor-6-acetoxy-7-methoxychinazolin und anschließender Seitenketteneinführung zum Intermediat **LA 43** erfolgt (**Abb. 136**).

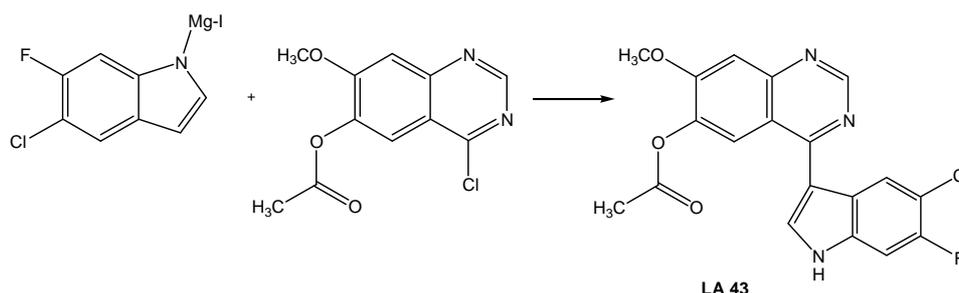


Abb. 136: Herstellung von **LA 43**

Die so erhaltene Verbindung **LA 43** wurde in einem nächsten Schritt mit Hilfe von Di-*tert*-butyl-dicarbonat (BOC) am Indol-NH in einen Carbamidsäureester überführt, um eine zweifache Alkylierung zu vermeiden. Anschließend wurde die Seitenkette eingeführt. Nach Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit Ameisensäure und Triton B wurde die Verbindung **LA 51** erhalten [82].

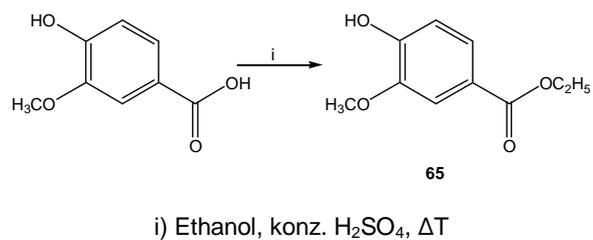
3.4.1 Synthese der Verbindung **72**

Da die Durchführung der einzelnen Syntheseschritte auf dem Weg zu Verbindung **LA 51** sehr aufwendig war und mit schlechten Ausbeuten verlief, wurde ein neuer Syntheseweg konzipiert. Nach diesem Verfahren wird auch die Verbindung **72** hergestellt.

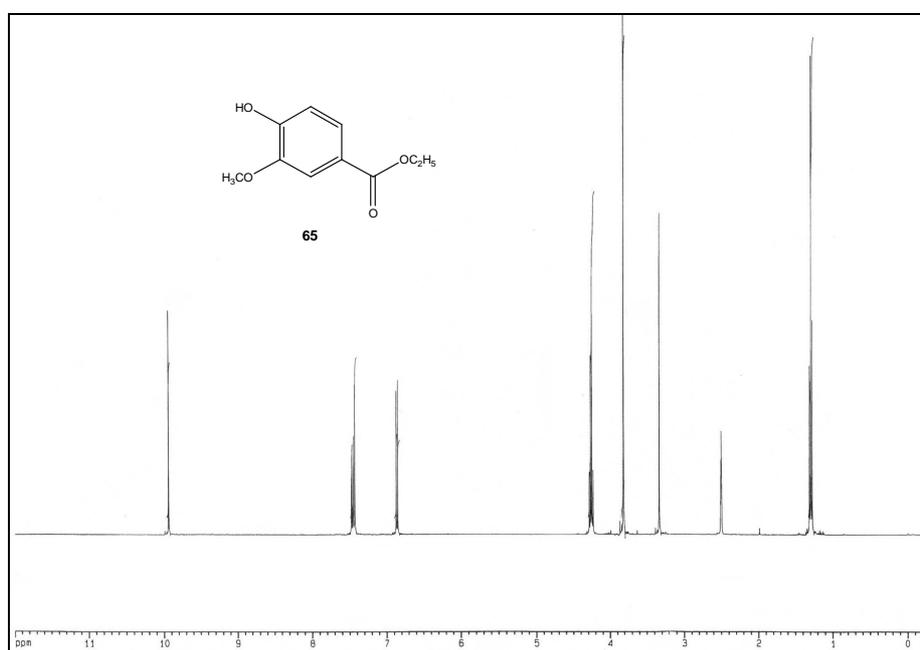
Dabei wird die Synthese des Chinazolin-Teils in Anlehnung an ein Patent der American Cyanamid Company durchgeführt [107].

3.4.1.1 Synthese des 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäuremethylesters (**65**)

Die Herstellung von **72** beginnt mit der Veresterung der Vanillinsäure mit Ethanol und konz. Schwefelsäure zu Verbindung **65** (**Abb. 137**).

**Abb. 137:** Herstellung von **65**

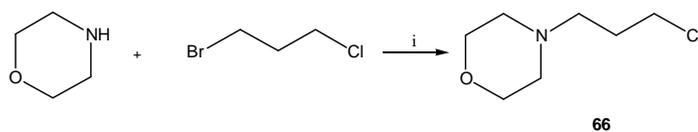
Deren Struktur wird durch das Protonenresonanzspektrum (**Abb. 138**) und EI-Massenspektrometrie bestätigt.

**Abb. 138:** Protonenresonanzspektrum von **65**

Ein deutlicher Beweis für das Gelingen der Veresterungsreaktion ist das Fehlen des Signals der Säurefunktion bei ca. 13 ppm. Das Singulett des Protons der phenolischen OH-Gruppe tritt bei 9,90 ppm auf. Die aromatischen Protonen werden in einem Bereich von ca. 6,80–7,50 ppm sichtbar, und die Protonen der Methylengruppe erscheinen bei 3,87 ppm. Bei 3,82 ppm kann die Methoxygruppe detektiert werden und bei 1,30 ppm die Methylgruppe. Ergänzt werden diese Befunde durch das Auftreten des Molpeaks bei m/z 196 im EI-Massenspektrum und durch die charakteristischen Bruchstücke bei m/z 168 und m/z 151.

3.4.1.2 Herstellung der Seitenkette 66

Die für die nächste Synthesestufe benötigte basische Seitenkette **66** erhält man nach einer Vorschrift des Patents WO 2002092579 durch Erhitzen von Morpholin mit 1-Brom-3-chlorpropan in Toluol und anschließender Aufreinigung mittels Vakuumdestillation (**Abb. 139**) [108].

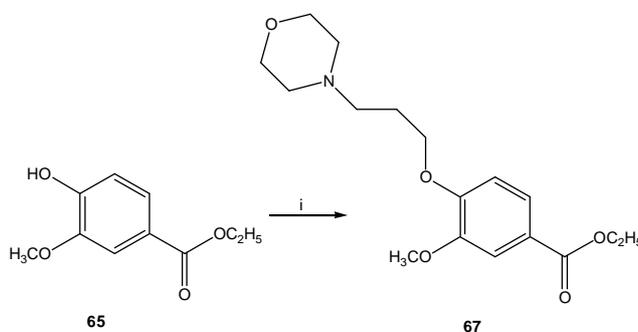


i) 1-Brom-3-chlorpropan, Toluol, ΔT

Abb. 139: Herstellung der Seitenkette 4-(3-Chlorpropyl)morpholin (**66**)

3.4.1.3 Einführung der Seitenkette in Verbindung 65

Die so erhaltene basische Seitenkette wird dann an der freien Hydroxygruppe, in Anwesenheit von K_2CO_3 und 18-Krone-6 in Acetonitril, in Verbindung **65** eingeführt. Es entsteht dabei die Verbindung **67** (**Abb. 140**).



i) K_2CO_3 , 18-Krone-6, Acetonitril, **66**, ΔT

Abb. 140: Seitenketteneinführung

Durch Komplexbildung des Kalium-Ions durch den achtzehngliedrigen gesättigten Ring des Kronenethers, der aus sechs aneinandergereihten zyklischen CH_2-O-CH_2 -Einheiten besteht, liegt das Carbonat-Ion frei und unsolvatisiert vor. Dadurch werden Basizität und Reaktivität erhöht, und der für die Einführung der Seitenkette optimale pH-Wert kann somit erreicht werden.

Nach Aufreinigung durch SC [Ethylacetat/Ethanol (9+1)] kann **67** als Feststoff isoliert und mittels 1H -NMR-Aufnahmen (**Abb. 141**) identifiziert werden.

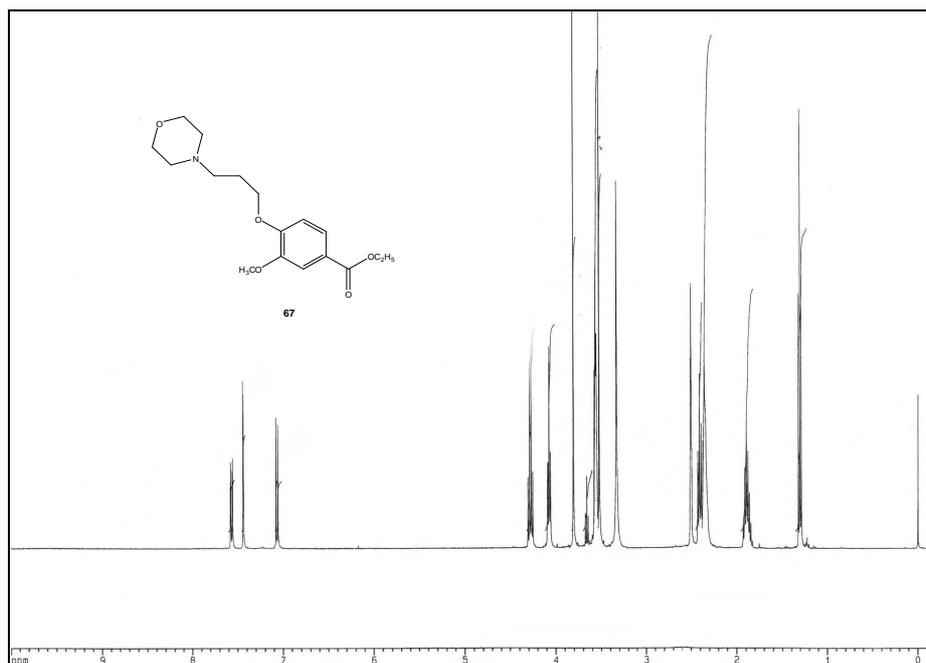


Abb. 141: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **67**

Signifikant für die Entstehung der Verbindung **67** ist das Verschwinden des OH-Signals im ^1H -NMR-Spektrum aufgrund der Seitenketteneinführung an dieser Position. Die Signale der Methylenprotonen erscheinen etwa zwischen 1-4 ppm. In einem Bereich von ca. 7-7,5 ppm lassen sich die drei aromatischen Protonen detektieren.

Das EI-Massenspektrum bestätigt die Struktur von **67**. Der Molpeak tritt bei m/z 323 auf.

3.4.1.4 Ethyl-4-(3-morpholinopropoxy)-3-methoxy-2-nitrobenzoat (**68**)

Um in Position 2 der Vanillinsäure eine Aminogruppe für den Ringschluss zum Chinazolin-4-on zur Verfügung zu haben, wird **67** zunächst mit konzentrierter HNO_3 unter Eiskühlung nitriert (**Abb. 142**).

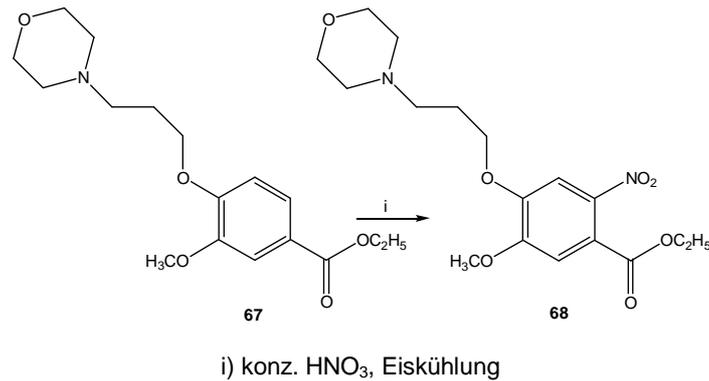


Abb. 142: Nitrierung der Verbindung **67**

Die Struktur der Nitroverbindung **68** kann durch Protonenresonanzspektroskopie (**Abb. 143**) und EI-Massenspektrometrie bestätigt werden.

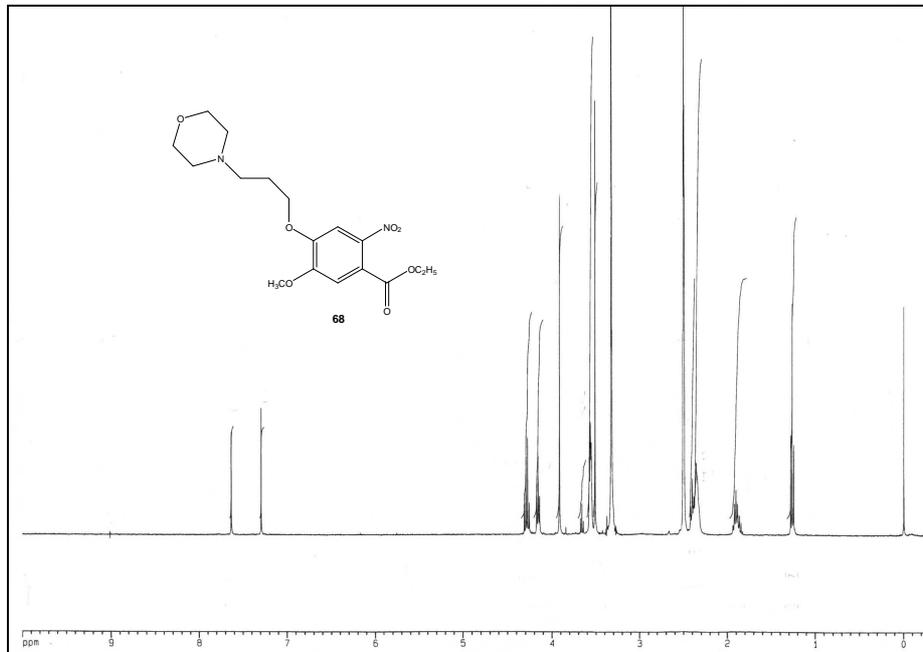


Abb. 143: Protonenresonanzspektrum der Nitroverbindung **68**

Die erfolgreiche Nitrierung in der gewünschten Position wird durch die beiden Singulets der beiden aromatischen Protonen zwischen 7,30 und 7,60 ppm belegt. Hätte die Nitrierung an einer der beiden anderen zusätzlichen Positionen stattgefunden, würden andere Kopplungen zwischen den aromatischen Protonen auftreten, was hier jedoch nicht der Fall ist. Die Signale der Morpholinopropoxy-Seitenkette liegen wieder in einem Bereich von ca. 1-4 ppm. Zusätzlich ist im EI-Massenspektrum der Molpeak bei m/z 368 sichtbar.

Der Eintritt der Nitro-Gruppe entspricht überraschenderweise nicht den Regeln der Mehrfachsubstitution am Aromaten. Die theoretisch günstigere Position für den Eintritt der

Nitro-Gruppe sollte eigentlich das C-3 sein, da dieses durch die bereits vorhandenen beiden Substituenten doppelt aktiviert ist. Eventuell wird aber diese C-3-Position durch die flexible Morpholinopropoxy-Seitenkette abgeschirmt, so dass die Nitrierung in Position 2 erfolgt, obwohl diese nur einfach aktiviert ist.

3.4.1.5 Reduktion der Nitro-Verbindung 68

Durch Umsetzen der Nitro-Verbindung **68** mit Pd/C und Cyclohexen in Ethanol wird die Verbindung **69** erhalten (**Abb. 144**) und diese mittels Protonenresonanzspektroskopie und EI-Massenspektrometrie identifiziert (**Abb. 145**).

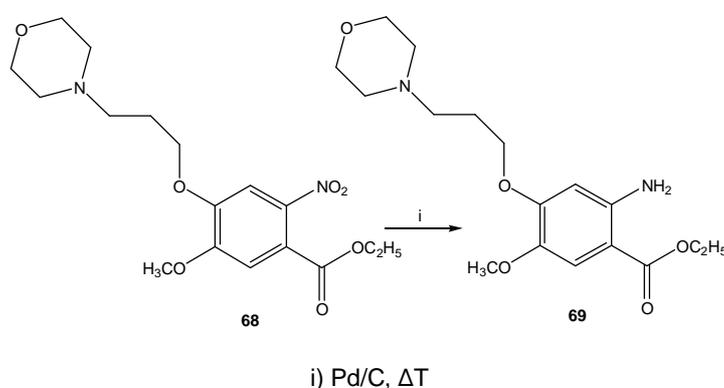


Abb. 144: Reduktion der Nitro-Gruppe zur Amino-Gruppe (**69**)

Bei dieser Reaktion fungiert Cyclohexen als Wasserstoffdonator und wird dabei selbst zum Benzen dehydriert. Der benötigte Katalysator muss dabei frisch verwendet werden.

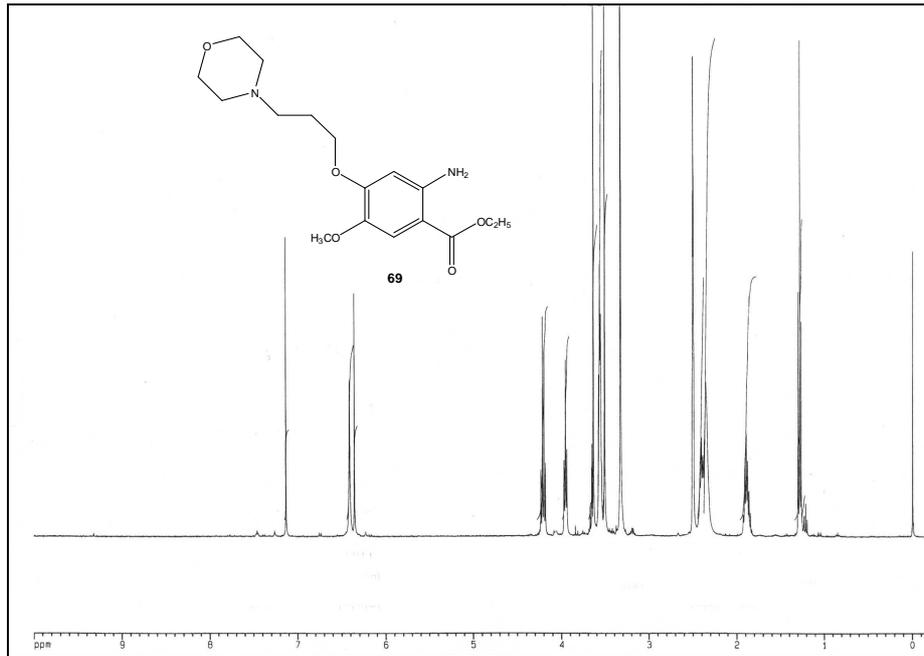
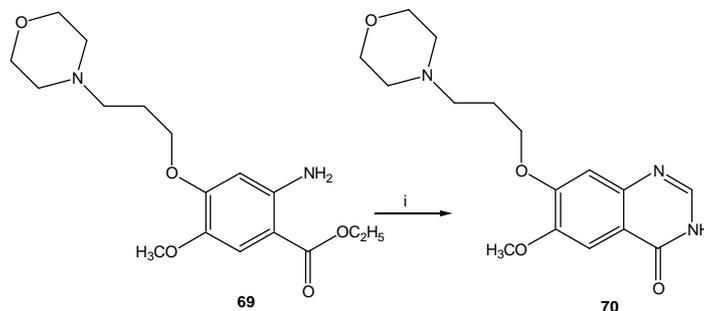


Abb. 145: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **69**

Signifikant für die erfolgreiche Reduktion der Nitro-Gruppe ist das Auftreten des Signals der Amino-Gruppe bei 6,40 ppm. Zusätzlich wird für **69** das Auftreten des Molpeaks bei m/z 338 im EI-Massenspektrum beobachtet.

3.4.1.6 Zyklisierung von **69** zum 7-(3-Morpholinopropoxy)-6-methoxychinazolin-4-(3*H*)-on (**70**)

Mit Formamidinacetat und 2-Methoxyethanol wird **69** zum Chinazolinon **70** zyklisiert (Abb. 146).



i) Formamidinacetat, 2-Methoxyethanol, ΔT

Abbildung 146: Zyklisierung der Verbindung **69** zur Chinazolin-4-on **70**

Das abgebildete Protonenresonanzspektrum (**Abb. 147**) und ein EI-Massenspektrum bestätigen dessen Struktur.

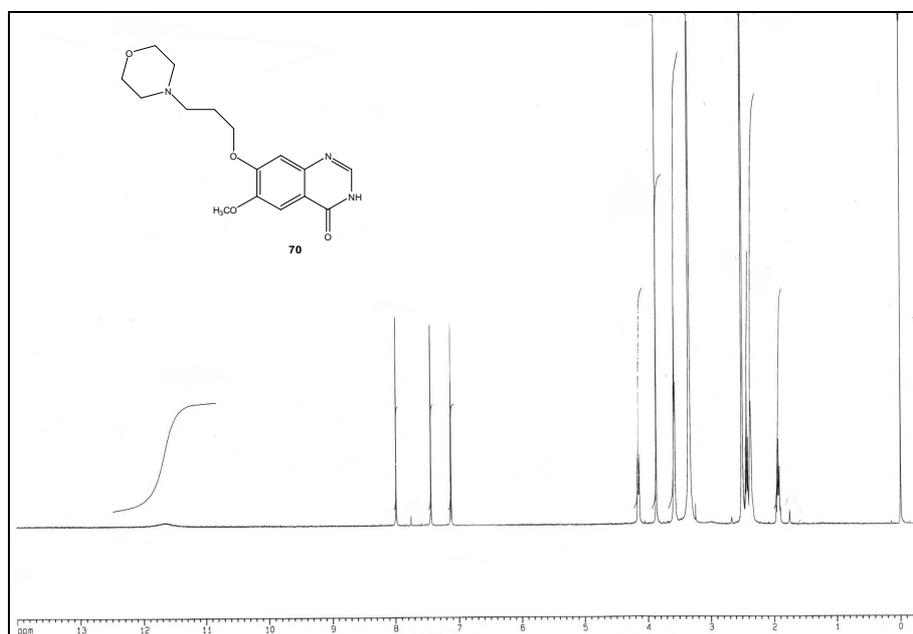


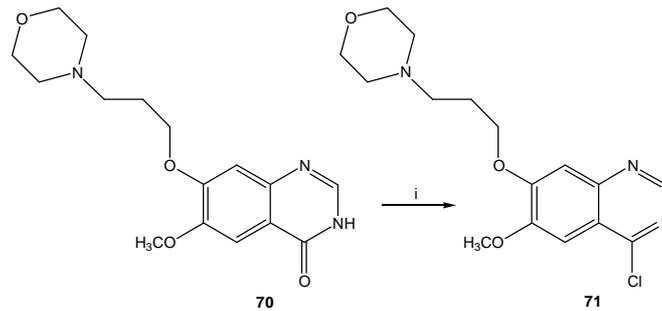
Abb. 147: Protonenresonanzspektrum der Verbindung **70**

Man erkennt deutlich das NH-Signal des Chinazolins bei 11,62 ppm. Zwischen 7-8 ppm treten die aromatischen Protonen auf, und die CH₂-Signale der Seitenkette liegen wieder in einem Bereich von ca. 1-4 ppm.

Der gewünschte Molpeak tritt bei m/z 319 auf.

3.4.1.7 Chlorierung der Verbindung **70**

Die Chlorierung von **70** wird zunächst mit Thionylchlorid und *N,N*-Dimethylformamid durchgeführt. Sie führt allerdings nicht hauptsächlich zu der gewünschten Chlor-Verbindung. In einem schlecht auswertbaren Protonenresonanzspektrum wird gefunden, dass die Verbindung **71** neben anderen Produkten enthalten ist. Um die Ausbeuten an **71** zu optimieren, wird die Chlorierung nun mit Phosphorylchlorid und Phosphorpentachlorid durchgeführt, und nach Entfernen des überschüssigen Lösemittels kann Verbindung **71** als Feststoff isoliert werden (**Abb. 148**).

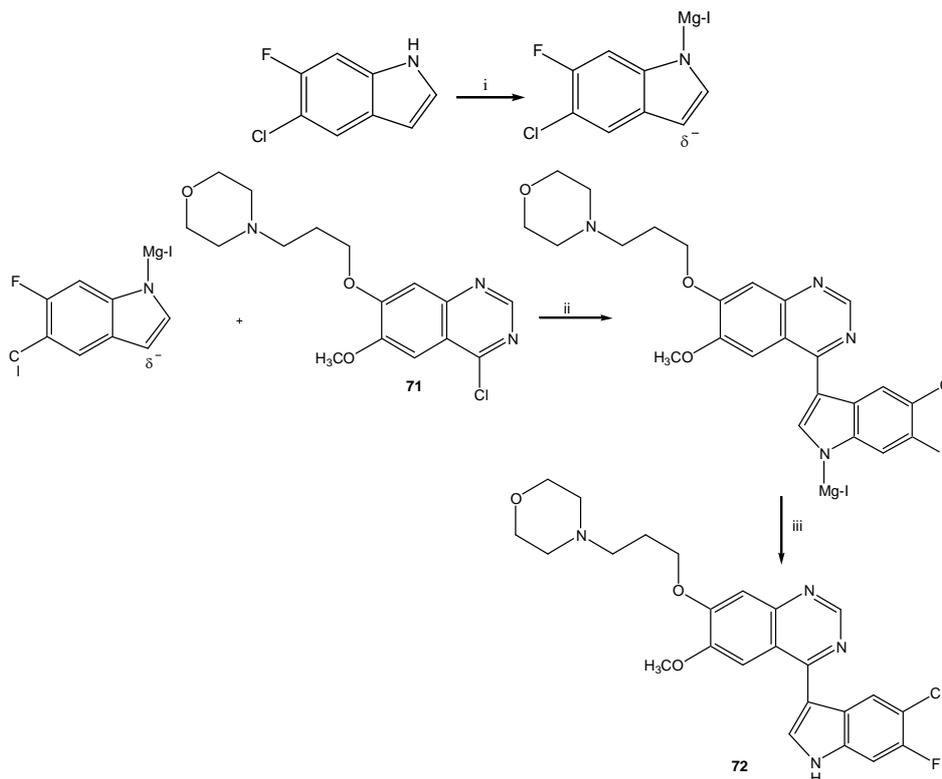


i) Phosphorylchlorid/Phosphorpentachlorid, ΔT

Abb. 148: Herstellung der Chlorverbindung **71**

3.4.1.8 Aufbau des Indolyl-chinazolins **72**

In der anschließenden Cross-coupling Reaktion wird die Chlorverbindung **71** mit dem zuvor wie in Kapitel 3.1.4.1 beschrieben hergestellten 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) zu Verbindung **72** verknüpft. Den Verlauf dieser Reaktion zeigt die **Abb. 149**.



i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) RT \rightarrow ΔT ; iii) Wasser, RT

Abb. 149: Verknüpfung des Chlorchinazolins **71** mit 5-Chlor-6-fluorindol (**10**)

Zunächst wird die Grignard-Verbindung aus Magnesiumspänen und Iodmethan in wasserfreiem Ether unter Eiskühlung hergestellt. Nach Zugabe des zuvor synthetisierten 5-

Chlor-6-fluorindols (**10**) wird dieses durch Deprotonierung in eine metallorganische Verbindung übergeführt. Durch Reaktion mit dem chlorierten Chinazolin **71** erfolgt die Verknüpfung zum 4-(Indol-3-yl)chinazolin **72**, welches nach Hydrolyse und Extraktion mit Ethylacetat isoliert werden kann.

Nach säulenchromatischer Aufreinigung und anschließender Diffusionsumkristallisation aus Ethylacetat/n-Hexan wird die Wunschverbindung **72** analysenrein als gelber Feststoff erhalten. Die **Abb. 150** zeigt das Protonenresonanzspektrum von **72**.

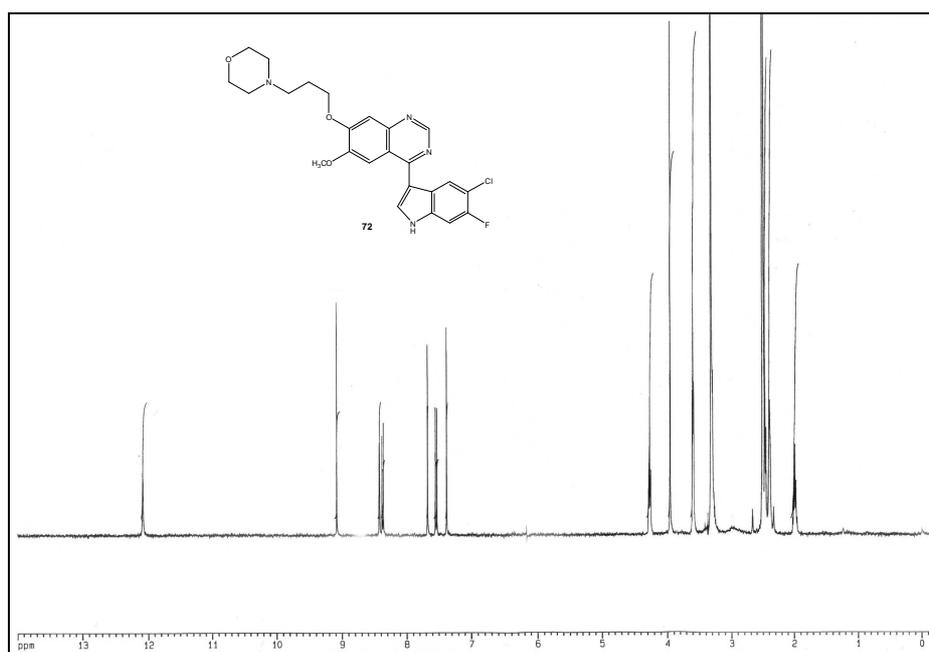


Abb. 150: Protonenresonanzspektrum der Verbindung **72**

Das Protonenresonanzspektrum liefert den eindeutigen Nachweis für die Entstehung von **72**. Bei einer chemischen Verschiebung von 12,05 ppm erscheint das Singulett des Indol-NH, die aromatischen Protonen liegen in einem Bereich von 7-9 ppm, und die Protonen der Seitenkette werden etwa bei 2-4 ppm sichtbar.

Die Beweisführung wird zusätzlich durch EI-Massenspektren ergänzt (**Abb. 151**).

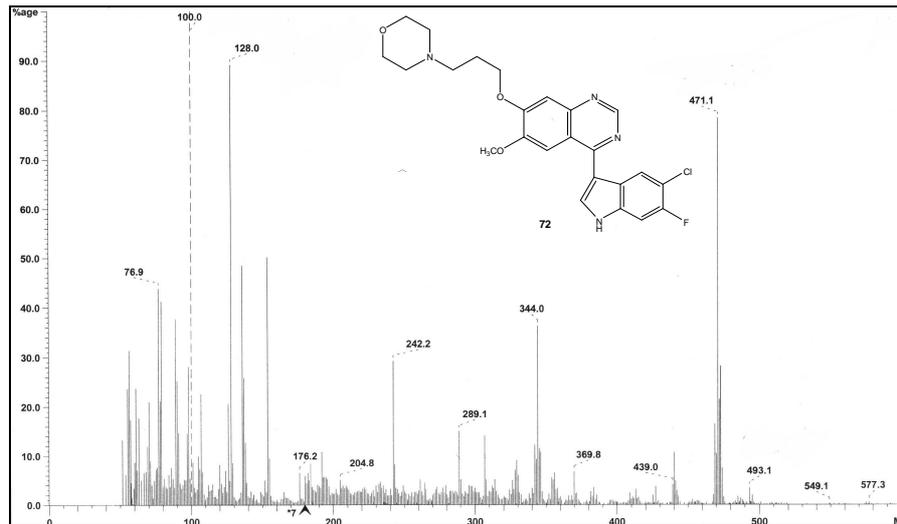


Abb. 151: EI-MS-Spektrum der Verbindung **72**

Da in dem angefertigten EI-Massenspektrum der gewünschte Molpeak bei m/z 470 nur mit einer schwachen Intensität von 1,89% detektiert wird, wird außerdem ein FAB^+ -Spektrum aufgenommen (**Abb. 152**).

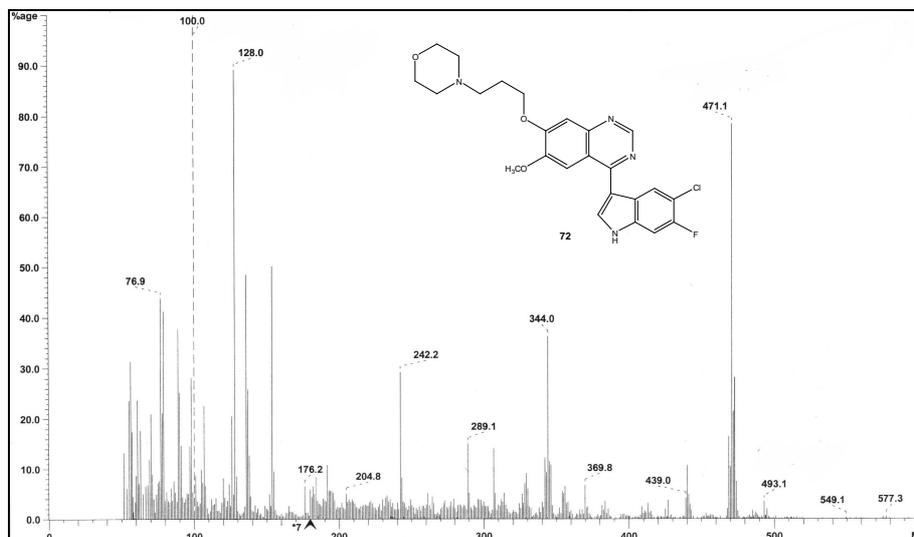


Abb. 152: FAB^+ -Spektrum der Verbindung **72**

In dem FAB^+ -Spektrum wird bei m/z 471,1 $[M+H]^+$ ein deutliches Signal sichtbar. Die charakteristischen Bruchstücke der Seitenkette bei m/z 128 ($[C_7H_{14}NO]$) und m/z 100 ($[C_5H_{10}NO]$) bestätigen den Abbau.

Im Gegensatz zu Verbindung **LA 51** gibt es hier keine Probleme mit Lösemitelein schlüssen. Bei **LA 51** wird durch die lange, sperrige Seitenkette am C6 des Chinazolins eine Podand-artige Struktur geschaffen, in die kleine Moleküle, Ionen oder Lösemittel eingeschlossen werden können. Das ist bei Verbindung **72** nicht der Fall.

3.4.2 Vergleich der EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten der Verbindungen 72, LA 51 und LA 12

Durch die Strukturähnlichkeit mit Gefitinib (Iressa®) und LA 51 wird 72 auch auf EGFR- und HER-2-TK-Inhibition untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 11 zusammengestellt.

| Verbindung | LA 51 | 72 |
|---|-------|----|
| EGFR-TK-inhibitorische Aktivität in % (c=100 nM) | 61 | 43 |
| HER-2-TK-inhibitorische Aktivität in % (c=100 nM) | 19 | 37 |

Tab. 11: EGFR-Inhibition der Isomere LA 51 und 72

Es ist daraus ersichtlich, dass beide Substanzen bezüglich ihrer EGFR-TK-inhibitorischen und HER-2-inhibitorischen Aktivitäten nahezu vergleichbar sind.

Um noch detailliertere Aussagen hinsichtlich der Wirkungen machen zu können, wurden von Verbindung 72 die IC₅₀-Werte bestimmt, die sowohl graphisch in Abb. 159 als auch tabellarisch dargestellt sind (Tab. 12).

In den beiden abgebildeten Graphiken ist der Verlauf der prozentualen Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase und der HER-2-Tyrosinkinase durch 72 und Tyrphostin als Vergleich zu sehen (Abb. 153).

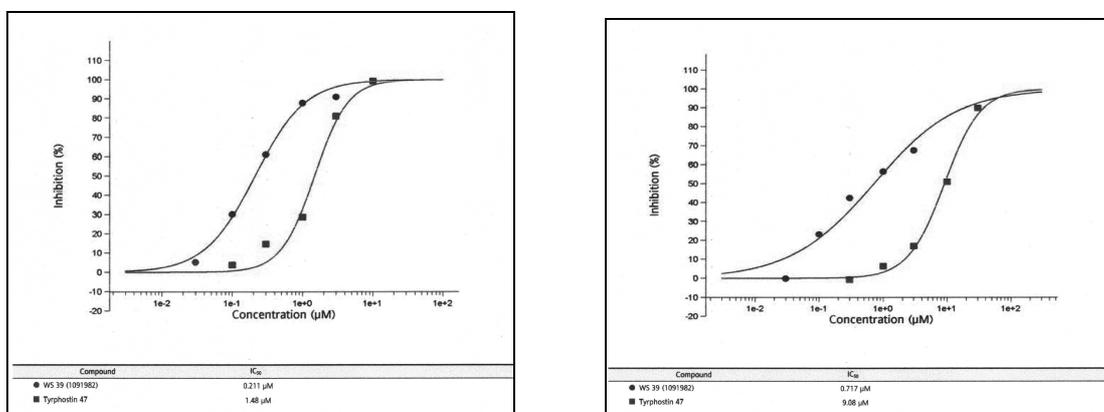


Abb. 153: Dosis-Wirkungskurven der Verbindung 72 für die EGFR-Tyrosinkinase und die HER-2-Tyrosinkinase

Die Verbindung **72** zeigt dabei sowohl eine stärkere EGFR-TK-Inhibition als die Vergleichssubstanz Tyrphostin als auch eine stärkere HER-2-TK-inhibitorische Aktivität. Schon im Bereich von 10^{-8} M beginnt die Hemmung durch **72**. Die HER-2-Tyrosinkinase wird durch **72** sogar schon unterhalb von 10^{-8} M gehemmt.

Die Ergebnisse der IC_{50} -Messungen von **LA 51** und **72** werden außerdem mit denen des von *Lüth* hergestellten Dimethoxy-substituierten 4-(Indol-3-yl)chinazolins **LA 12** verglichen (**Abb. 154**).

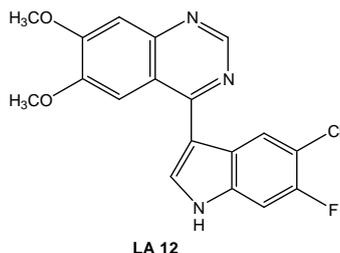


Abb. 154: Dimethoxy-Verbindung **LA 12**

| Verbindung | LA 51 | 72 | LA 12 |
|----------------------|------------------|-----------|------------------|
| IC_{50} (EGFR-TK) | 333 nM | 211 nM | 209 nM |
| IC_{50} (HER-2-TK) | Nicht untersucht | 717 nM | Nicht untersucht |

Tab. 12: IC_{50} -Werte von **LA 51** und **72**

Die Ergebnisse unterstützen die oben erwähnten Beobachtungen. Die Verbindung **72** zeigt mit einem IC_{50} -Wert von 211 nM für den EGFR gegenüber **LA 51** mit 333 nM sogar noch eine Steigerung der inhibitorischen Aktivität. Die IC_{50} -Werte von **LA 51** und **LA 12** für den HER-2-Rezeptor wurden nicht untersucht, so dass hier kein Vergleich angestellt werden kann. Bemerkenswert ist außerdem, dass der IC_{50} -Wert von **72** vergleichbar ist mit dem der Dimethoxy-Verbindung **LA 12**. Demnach spielt es für die EGFR-TK-inhibitorische Aktivität wahrscheinlich keine Rolle, ob die Methoxygruppe oder die Seitenkette in Position 6 oder 7 substituiert ist. Aber auch das Vorhandensein der Seitenkette scheint zumindest für die EGFR-TK-inhibitorische Wirkung nicht essentiell zu sein, da auch die Dimethoxy-substituierte Verbindung **LA 12** ein hervorragendes Resultat zeigt. Auch für die zytotoxische Aktivität scheint die Seitenkette nicht unbedingt notwendig zu sein, denn die Verbindungen **LA 51** und **LA 12** zeigen annähernd vergleichbare zytotoxische Eigenschaften.

Die Ergebnisse des MCF-7-Testes der Verbindungen **72**, **LA 51** und **LA 12** sind in **Abb. 155** und **Abb. 156** dargestellt.

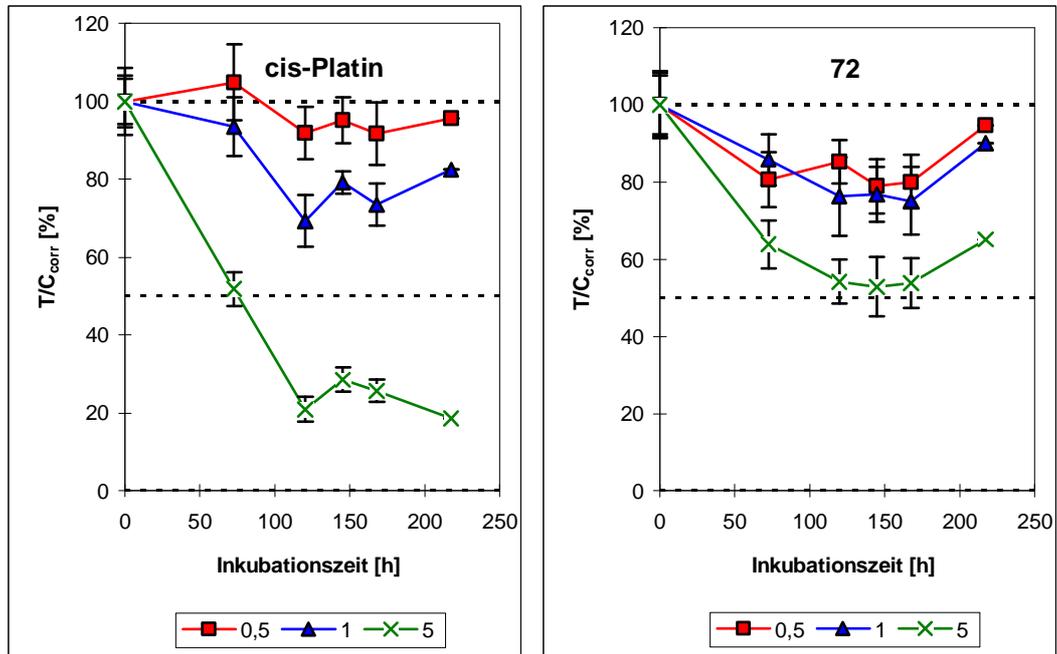


Abb. 155: Aktivität der Verbindung **72** auf das Wachstum humaner MCF-7-Zellen in den Konzentrationen 0,5, 1 und 5 μM im Vergleich zu Cisplatin

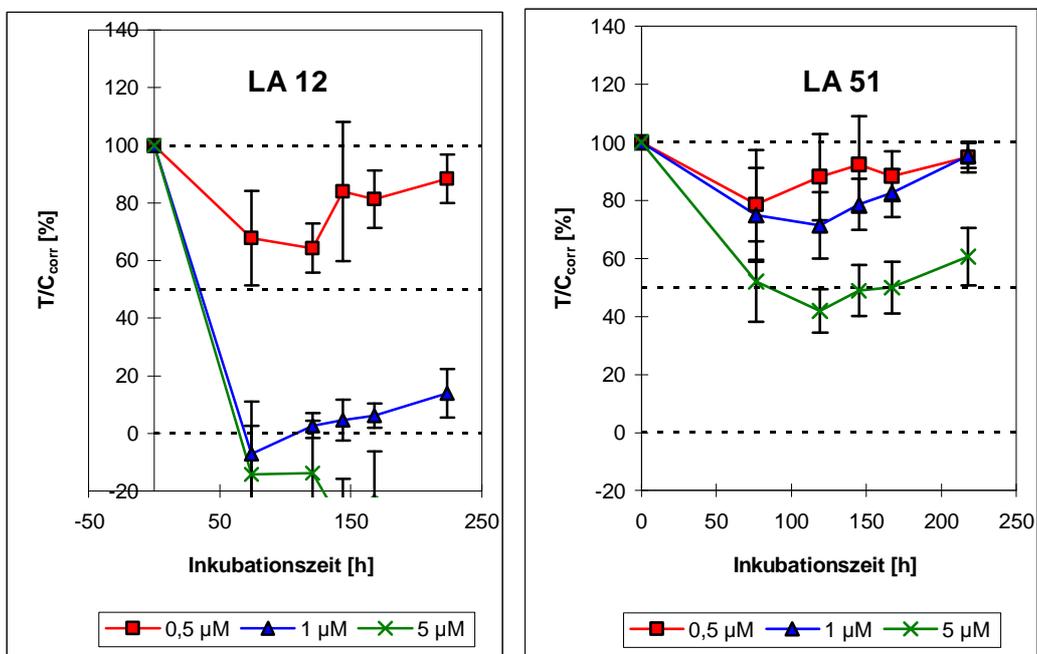


Abb. 156: Aktivität der Verbindungen **LA 12** und **LA 51** auf das Wachstum humaner MCF-7-Zellen in den Konzentrationen 0,5, 1 und 5 μM

Das Wachstum der MCF-7-Zellen wird durch die beiden Isomere **LA 51** und **72** in einer Konzentration von 5 μM mit ähnlichen Aktivitäten gehemmt. So wird bei beiden Verbindungen nach einer Inkubation von etwa 150 Stunden ein T/C_{corr} -Wert von ca. 50% erreicht. Die Position der Morpholinopropoxy-Seitenkette und der Methoxy-Gruppe scheint demnach keinen Einfluss auf die Zytotoxizität gegenüber MCF-7-Zellen zu haben.

Die Dimethoxy-Verbindung **LA 12** zeigt jedoch eine wesentlich stärkere Wachstumshemmung der MCF-7-Zellen. Überraschenderweise übertrifft die Aktivität noch diejenige des Standardzytostatikums Cisplatin. Sogar bei einer Konzentration von 1 μM tritt bei **LA 12** nach 60 Stunden eine komplette Wachstumshemmung auf. Im Vergleich dazu zeigt Cisplatin in dieser Konzentration mit einem TC_{corr} -Wert von etwa 80% nach 150 Stunden nur schwache antiproliferative Eigenschaften.

3.4.3 Die Verbindung 73 mit unsubstituiertem Chinazolinteil

Um die Notwendigkeit der Substituenten am Chinazolin-Teil für die EGFR-TK-Inhibition zu untersuchen, wurde die dort unsubstituierte Verbindung **73** als Modell konzipiert (**Abb. 157**).

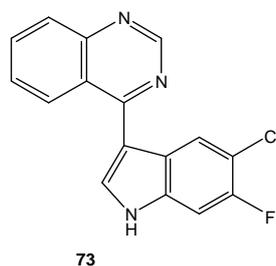
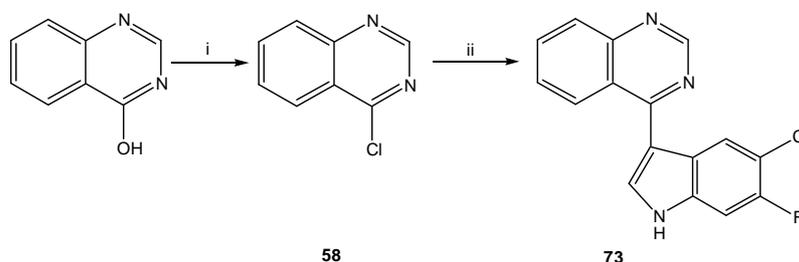


Abb. 157: Die Verbindung **73** mit unsubstituiertem Chinazolinteil

Diese Verbindung **73** konnte nach dem in **Abb. 158** skizzierten Verlauf hergestellt werden.



- i) Phosphorylchlorid/Phosphorpentachlorid, ΔT ;
 ii) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, **10**, Eiskühlung; ΔT ; Wasser, RT

Abb. 158: Synthese der Verbindung **73**

Dabei geht man von Chinazolin-4-on aus, das mit Phosphorylchlorid und Phosphor-pentachlorid zu der Chlorverbindung **58** umgesetzt wird. Diese wird dann mit dem metallierten 5-Chlor-6-fluorindol (**10**) zu Verbindung **73** verknüpft. Die **Abb. 159** zeigt das Protonenresonanzspektrum.

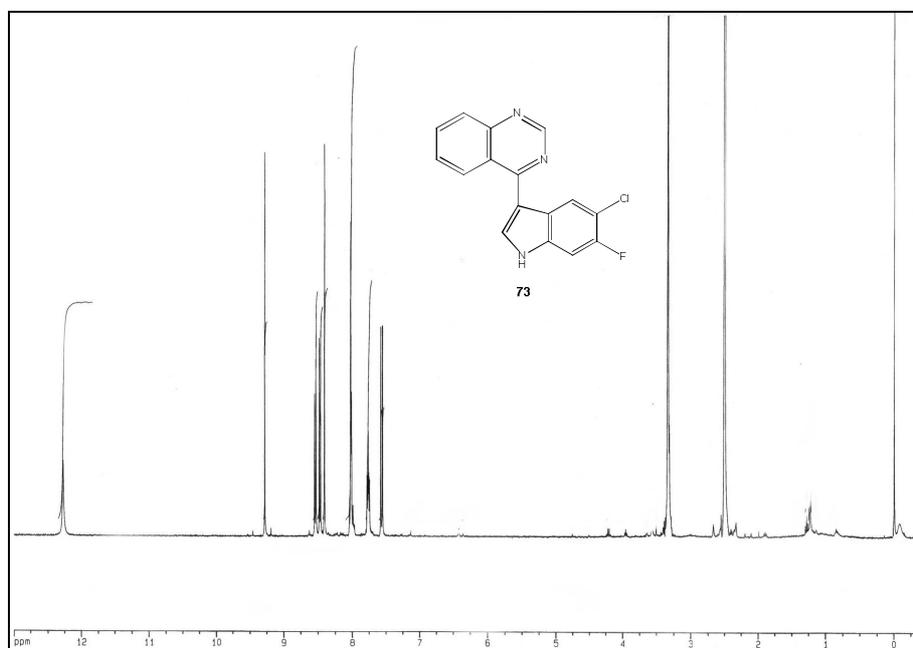


Abb. 159: Protonenresonanzspektrum der Verbindung **73**

Bei einer chemischen Verschiebung von 12,31 ppm ist das Singulett des Indol-NH zu sehen. Die aromatischen Protonen lassen sich etwa in einem Bereich von 7-9 ppm detektieren. Zusätzlich wird der gewünschte Molpeak bei m/z 297 im Massenspektrum beobachtet.

Die Untersuchung auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivität brachte bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ ein Ergebnis von -18%, was leider keiner Hemmung, sondern vielmehr einer Stimulation der EGFR-Tyrosinkinase entspricht. Dadurch, dass dieses am Chinazolinteil unsubstituierte 4-(Indol-3-yl)chinazolin **73** statt einer bisher bei dieser Substanzklasse beobachteten Inhibition eine Stimulation der EGFR-Tyrosinkinase hervorruft, lag die Vermutung einer möglichen allosterischen Beeinflussung der Tyrosinkinasedomäne nahe. Um diese zu untersuchen, sollte eine IC_{50} -Bestimmung durchgeführt werden. Da sich jedoch bei dem im Vorfeld durchgeführten Test bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ die Stimulation nicht bestätigt hat, sondern eine Inhibition von 40% ermittelt wurde, wurde auf die IC_{50} -Bestimmung verzichtet.

Anhand dieser beiden Ergebnisse für die Verbindung **73** lassen sich jedoch keine eindeutigen Aussagen hinsichtlich der Wirkung und einer eventuellen allosterischen Beeinflussung der EGFR-Tyrosinkinase machen. Dazu müssten weitere Untersuchungen in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt werden, um herauszufinden, ob die Verbindung **73** die EGFR-TK inhibiert oder stimuliert, und ob diese Wirkungen eventuell konzentrationsabhängig sind.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das 4-(Indol-3-yl)chinazolin **72** mit der Methoxy-Gruppe und der Morpholinopropoxy-Seitenkette einen potentiellen, hoch aktiven Wirkstoff darstellt, dessen EGFR-TK-inhibitorische Aktivität bemerkenswert ist. Weitergehende Untersuchungen zu den zytotoxischen Eigenschaften wären interessant. Da diese Tests am National Cancer Institute jedoch längere Zeit erfordern, war es bisher nicht möglich, Hinweise auf eventuelle Zytotoxizitäten zu bekommen.

Diese Untersuchungen wären aber zwingend erforderlich, um ein komplexes Bild von diesem aussichtsreichen Wirkstoff zu erhalten.