

Egert, A.-M.¹, Kohfeld, S.¹, Kubbutat, M. H. G.², Schächtele, C.², Totzke, F.², Zaharevitz, D. W.³ and Kunick, C. ¹

¹ Institut für Pharmazeutische Chemie, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 38106 Braunschweig, Germany

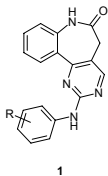
² ProQinase/ KTB Tumorforschungs GmbH, 79106 Freiburg, Germany

³ National Cancer Institute, Bethesda, MD 20892-7444, USA

EINLEITUNG

Da Protein-Kinasen bei zahlreichen Tumor-Erkrankungen eine Überfunktion zeigen, werden Kinase-Inhibitoren erfolgreich als Therapeutika zur Behandlung von Krebs eingesetzt. Seit Kurzem sind dazu auch Multikinase-Inhibitoren zugelassen, wie z.B. Sorafenib, Sunitinib und Dasatinib, die mehrere tumorrelevante Kinasen gleichzeitig hemmen.¹

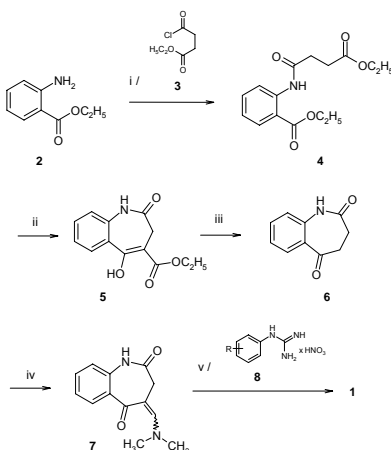
Anilinopyrimidin- und 1-Benzazepin-2-on-Strukturelemente sind häufig Elemente etablierter Kinase-Inhibitoren. Durch Kombination dieser beiden Komponenten wurden die 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-one **1** als neue Strukturklasse erschlossen. Vertreter dieser Verbindungsgruppe hemmen tumorrelevante Proteinkinasen und zeigen in vitro antiproliferative Aktivität an Tumorzelllinien des amerikanischen National Cancer Instituts.



SYNTHESE

Die Synthese der 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-one **1** erfolgte durch eine 5-Stufen-Reaktion:

Anthransäureester (**2**) wird mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**3**) zu dem Amid **4** umgesetzt, welches anschließend in einer Dieckmann-Kondensation mit Kaliumhydrid zum Benzazepin-carbonsäureethylester **5** reagiert. Eine Dealkoxycarbonylierung in wässrigem DMSO führte zum 3,4-Dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**6**). Daraus wurde das 4-[(Dimethylamino)methyliden]-3,4-dihydro-1H-[1]benzazepin-2,5-dion (**7**) durch Erwärmen in überschüssigem DMF-DMA erhalten. Aus der Umsetzung von **7** mit aromatischen Guanidiniumsalzen entstanden schließlich die gewünschten 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-one **1**.



Scheme 1: Synthese der 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-one **1**. Reaktionsbedingungen: (i) Pyridin, Toluol, Δ ; (ii) KH, DMF, Toluol, 80 °C, N₂; (iii) DMSO, H₂O, 150 °C, N₂; (iv) DMF-DMA, 110 °C; (v) 2-Propanol, NaOH, Δ .

KINASE-INHIBITORISCHE AKTIVITÄT

Zur Testung der Kinase-inhibitorischen Aktivität der dargestellten 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on-Derivate **1** wurde jeweils ein IC₅₀-Profil (Inhibitory Concentration 50 %) an 23 verschiedenen, tumorrelevanten Kinasen erstellt. Außerdem wurde untersucht, ob eine Hemmung der essentiellen Insulin-Rezeptor Kinase (INS-R) eintritt, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führen würde.

Die Kinaseaktivitäten wurden anhand der Phosphorylierungsaktivitäten an den entsprechenden Substraten ermittelt. Bestimmt wurde dazu die Einlagerung von radioaktiv markiertem ³³P-Phosphat in die Substrate. Ein typisches Kinase-Profil ist exemplarisch für Verbindung **1e** in Fig. 1 dargestellt. Abb. 2 zeigt die Wirksamkeit von **1a-e** an den Kinasen Aurora A, VEGF-R2 und FAK.

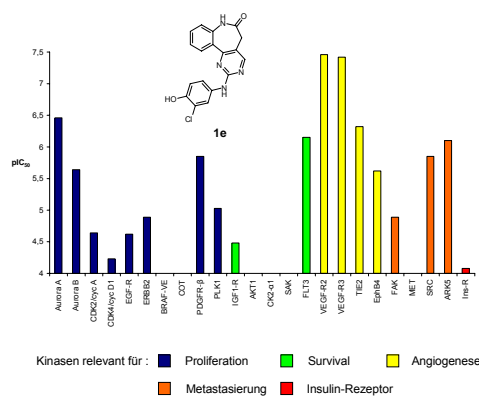
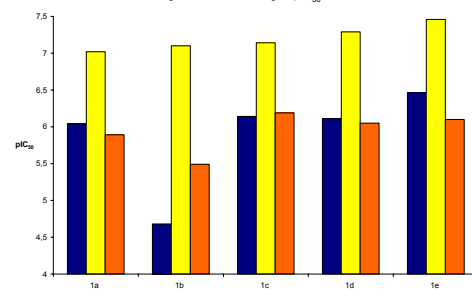
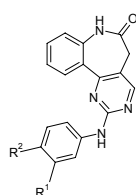


Abbildung 1: pIC₅₀-Werte von **1e** für 24 getestete Kinasen (ATP-Konzentration 1 μ M). Nicht dargestellte Balken zeigen pIC₅₀-Werte < 4.0 an.



Dargestellte Kinasen: ■ Aurora A ■ VEGF-R2 ■ FAK

Abbildung 2: pIC₅₀-Werte der 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-one **1a-e** für die Kinasen Aurora A, VEGF-R2 und FAK.



1a R¹ = H, R² = OCH₃
1b R¹ = H, R² = OH
1c R¹ = OH, R² = OCH₃
1d R¹ = OH, R² = H
1e R¹ = Cl, R² = OH

Scheme 2: Die synthetisierten 2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-on-Derivate **1a-e**.

ANTIPROLIFERATIVE AKTIVITÄT

Die Verbindungen **1a - e** wurden auf antiproliferative Aktivität im In Vitro Cell Line Screening Project (IVCLSP) des National Cancer Instituts (NCI, Bethesda, USA) getestet. 60 verschiedene humane Tumorzelllinien wurden mit **1a - e** inkubiert und für jede Substanz wurden GI₅₀-Werte (Growth Inhibition 50 %) ermittelt. Der Meangraph-Midpoint (MG-MID) stellt dabei die durchschnittliche antiproliferative Aktivität jeder einzelnen Substanz gegenüber allen 60 Zelllinien dar.

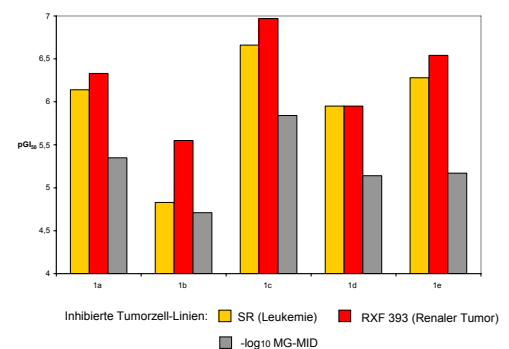


Abbildung 3: pGI₅₀-Werte für 2 Tumorzell-Linien und -log₁₀ MG-MID von **1a - e**. Von **1a - d** sind Durchschnitts-Werte dargestellt.

In Übereinstimmung mit der antiproliferativen Wirkungsweise zeigen die Substanzen **1** ein charakteristisches Selektivitätsprofil im IVCLSP. Durch eine Matrix-COMPARE-Analyse (Abb. 4) können Rückschlüsse auf die Signifikanz dieses Profils gezogen werden. Von den paarweisen Korrelationen der Verbindungen **1a - e** lagen dabei 3 Pearson-Korrelationskoeffizienten (PCCs) > 0,8 und 5 PCCs zwischen 0,7 und 0,8. In anderen Substanzklassen konnte gezeigt werden, dass bereits bei PCCs > 0,35 Wirkstoffe mit gemeinsamem Wirkmechanismus gruppiert werden können.⁴

	1a	1b	1c	1d	1e
1a		0.751	0.828	0.863	0.863
1b	0.751		0.607	0.79	0.654
1c	0.828	0.607		0.791	0.73
1d	0.863	0.79	0.791		0.864
1e	0.863	0.654	0.73	0.864	

Abbildung 4: Matrix-COMPARE-Analyse von **1a-e**. Abgebildet sind die Pearson-Korrelationskoeffizienten, die aus dem IVCLSP-Selektivitätsprofil der Kinase-Inhibitoren ermittelt wurden.

ZUSAMMENFASSUNG

2-Anilino-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-one **1** sind Multikinase-Inhibitoren, die antiproliferative Aktivität an in vitro kultivierten Tumorzelllinien und ein charakteristisches Selektivitätsprofil im IVCLSP des National Cancer Instituts zeigen.

DANKSAGUNG

Wir danken der Europäischen Kommission für die Unterstützung im Rahmen des Integrierten Projektes "ProteinKinaseResearch" (Contract No. LSHB-CT-2004-503467; für A.-M. E., M. H. G. K., C. S., F. T. und C. K.).

LITERATUR

- Dalglish, A., Copier, J.: New multitargeted treatments with antiangiogenic and antitumor activity: focus on sunitinib. *Targ. Oncol.* **2007**, *2*, 17-29.
- Kunick, C.: Fused azepinones with antitumor activity. *Curr. Pharm. Des.* **1999**, *5*, 181-94.
- Boyd, R. B., Paul, K. D.: Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.* **1995**, *34*, 91-109.
- Kunick, C., Blecker, C., Prühs, C., Totzke, F., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Link, A.: Matrix COMPARE analysis discriminates subtle structural differences in a family of novel antiproliferative agents, diaryl-3-hydroxy-2,3,3a,10a-tetrahydrobenzo[b]cyclopenta[e]azepine-4,10(1H,5H)-diones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2148-2153.