

Cryptophycin Analoga: Synthese, Konjugation und biologische Studien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Tobias Bogner

aus Detmold

31. August 2011

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier nach DIN–ISO 9706

1. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald
2. Gutachter: Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald
an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

Für die Möglichkeit über ein Thema zu promovieren, das Bioorganische Chemie und Biochemie miteinander vereint, und die stete Unterstützung in jeder Art danke ich Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald. Bei Frau Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Der gesamten Fakultät für Chemie an der Universität Bielefeld danke ich für die gute kollegiale und unkomplizierte Zusammenarbeit durch viele Personen und an vielen Stellen. Für das kollegiale und freundschaftliche Klima innerhalb der Arbeitsgruppe danke ich allen jetzigen und früheren Mitgliedern der OCIII.

Für die engagierte Mitarbeit im Rahmen von Bachelorarbeiten und Forschungspraktika danke ich allen meinen Praktikantinnen und Praktikanten.

Für die Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion danke ich meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

I. Allgemeiner Teil	7
1. Einleitung	9
1.1. Cryptophycine	9
1.2. Tumor Targeting	14
1.3. Mehrfachresistenz	21
1.4. Zytotoxizitäts-Assay	22
II. Zusammenfassung/Summary	25
2. Zielsetzung	27
3. Zusammenfassung	29
4. Summary	35
III. Experimenteller Teil	41
5. Materialien	43
6. Experimenteller Teil	53
6.1. Synthese des ¹³ C-markierten Cryptophycin-52	53
6.2. Synthese einer Targetinggruppe für ein Prodrug	71
6.3. Synthese des „Auslösers“ eines Prodrugs	81
6.4. Synthese eines Targeting-Konjugates für die Fluoreszenzmikroskopie . .	84
6.5. Zytotoxizitäts-Assay	92

6.6. <i>High Content Screening</i>	98
6.7. Fluoreszenzmikroskopie	99
IV. Ergebnisse und Diskussion	103
7. Ergebnisse und Diskussion	105
7.1. Synthese des ¹³ C-markierten Cryptophycins-52	105
7.2. Synthese von Cryptophycin-Prodrugs	107
7.2.1. Synthese der Erkennungseinheit	110
7.2.2. Synthese der Aktivierungseinheit	112
7.3. Erkennung-Fluoreszenz-Cryptophycin-Konjugat	113
7.4. Zytotoxizitätstests	118
7.4.1. Fragment A Analoga	118
7.4.2. Fragment C Analoga	120
7.4.3. Fragment D Analoga	125
7.4.4. Cryptophycin-52-Triazol-Analogen „Clicktophycin-52“	126
7.4.5. RGD-Konjugat	127
7.4.6. Cryptophycin-52-Diol	129
7.4.7. Fazit	130
7.5. <i>High Content Screening</i> (HCS)	132
V. Anhang	139
7.6. Zytotoxizitätstabellen	141
7.7. Veröffentlichungen im Rahmen dieser Dissertation	147
Abkürzungsverzeichnis	149
Abbildungsverzeichnis	153
Tabellenverzeichnis	155
Literaturverzeichnis	157

Teil I.
Allgemeiner Teil

1. Einleitung

Die Entwicklung neuer Methoden und die Verbesserung bestehender Methoden zur Krebsbekämpfung sind nach wie vor wichtige Aufgaben der medizinischen Forschung. Krebs ist mit 13 % aller Todesfälle weltweit die zweit häufigste Todesursache.^[1] Nach Prognosen der WHO (*World Health Organization*, Weltgesundheitsorganisation) wird die Zahl der an Krebs verstorbenen Menschen pro Jahr weltweit von 7,6 Millionen im Jahr 2007 bis auf 11,5 Millionen im Jahr 2030 steigen.^[2] Eine häufige Behandlungsart ist die Chemotherapie. Dabei werden dem Patienten zytotoxische Substanzen verabreicht. Diese Substanzen natürlicher oder synthetischer Herkunft hemmen das Zellwachstum oder die Zellteilung aller Körperzellen. Krebszellen haben eine wesentlich höhere Wachstums- und Teilungsrate und werden daher durch diese Substanzen stärker geschädigt. Trotzdem kommt es sehr häufig auch zu schweren Nebenwirkungen.

1.1. Cryptophycine

Cryptophycine sind eine Klasse von Naturstoffen deren erster Vertreter, das Cryptophycin-1, 1990 aus Cyanobakterien der Spezies *Nostoc* (ATCC 53789) isoliert wurde.^[3] Der Name beruht auf der hohen Toxizität der Cryptophycine gegenüber Hefen der Gattung *Cryptococcus*.^[3] Später wurden weitere Cryptophycine aus anderen natürlichen Quellen isoliert. Insgesamt wurden bis heute 28 unterschiedliche Cryptophycine aus Cyanobakterien, aber auch aus dem marinen Schwamm *Dysidea arenaria* isoliert.^[4,5] Nachdem die Struktur aufgeklärt worden war, wurden noch viele weitere synthetische Cryptophycine dargestellt. Allgemein sind Cryptophycine 16-gliedrige Makrozyklen, die aus zwei Hydroxycarbonsäuren und zwei Aminosäuren aufgebaut sind.^[5]

In der retrosynthetischen Betrachtung werden diese Hydroxysäuren als Fragmente A und D bzw. die Aminosäuren als Fragmente B und C der Cryptophycine bezeichnet (s. Abbildung 1.1). Diese Art der Bezeichnung wird auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit

1. Einleitung

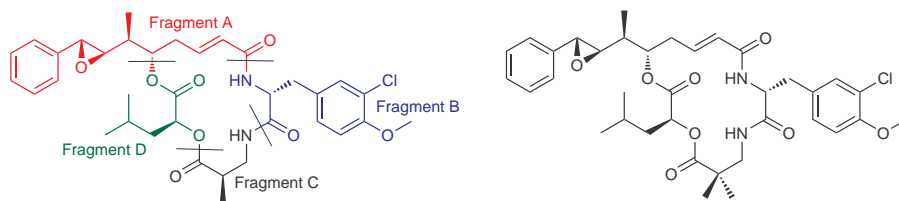
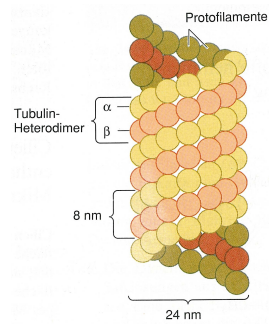


Abbildung 1.1.: **A:** Cryptophycin-1, das erste bekannte Cryptophycin. Die Unterteilung in die Fragmente A–D ist farblich gekennzeichnet; **B:** Cryptophycin-52, ein synthetisches Analogon des Cryptophycin-1.

verwendet. Neben der hohen Toxizität der Cryptophycine gegenüber Hefen der Gattung *Cryptococcus* wurde bei weiteren Untersuchungen entdeckt, dass einige Cryptophycine hoch zytotoxisch sind. Besonders interessant ist die hohe Zytotoxizität auch gegen mehrfach resistente Krebszelllinien, da gerade das Erwerben von Resistenzen der Krebszellen gegen Wirkstoffe die Heilung gefährdet.^[6] Cryptophycin-1 wurde aufgrund dieser Ergebnisse zur Leitstruktur bei der Suche nach einem potenten *anti*-Krebswirkstoff.^[7] Das Ergebnis ist das synthetische Analogon Cryptophycin-52 (LY355703), welches von ELI LILLY zum ersten Mal synthetisiert wurde.^[8] Aufgrund einer zusätzlichen Methylgruppe im Fragment C ist ein Stereozentrum weniger vorhanden, weshalb es auch synthetisch weniger anspruchsvoll als Cryptophycin-1 ist. Eine Hydrolyse des Esters zwischen Fragment C und D ist ebenfalls aufgrund der zusätzlichen Methylgruppe schwieriger, weshalb Cryptophycin-52 eine größere Stabilität gegenüber Hydrolyse besitzt als Cryptophycin-1.^[9] Die Zytotoxizität auch gegen mehrfach resistente Zellen ist vergleichbar mit der Zytotoxizität von Cryptophycin-1. In klinischen Studien gelangte Cryptophycin-52 bis in Phase II, scheiterte dann aber aufgrund starker Neurotoxizität, die es nicht erlaubte die für die Heilung notwendig hohen Dosen zu verabreichen und nicht ausreichender Wirksamkeit *in vivo*.^[10,11]

Die biologische Wirkung der Cryptophycine beruht auf der Wechselwirkung mit der β -Untereinheit des Tubulin.^[12] Tubulin ist ein α , β -Heterodimer (55 kDa), es steht im Gleichgewicht mit durch seine Selbstassoziation entstehenden Mikrotubuli. Diese sind Teil des Zytoskeletts der Zelle. Das Zytoskelett ist ein Netzwerk aus verschiedenen Polymeren innerhalb der Zelle. Es stabilisiert die Zelle, gibt ihr mechanische Stabilität und dient dem Transport in der Zelle. Die α - und die β -Untereinheit des Dimers binden jeweils ein Molekül Guanosintriphosphat (GTP). Während es in der α -Untereinheit fest

Abbildung 1.2.: schematischer Aufbau der Mikrotubuli. ^[13]

gebunden bleibt, kann es in der β -Untereinheit zu Guanosindiphosphat (GDP) und Phosphat hydrolysiert werden. Die Polymerisation der Tubulindimere zu Mikrotubuli geschieht spontan in Abhängigkeit der Konzentration von Tubulindimeren, der GTP-Konzentration, der Temperatur, Mg^{2+} -Konzentration u.a. Faktoren.

Je 13 Tubulindimere bilden eine Windung der Mikrotubuli und sind dabei Kopf-Schwanz angeordnet (s. Abbildung 1.2). Aufgrund der strengen Kopf-Schwanz Anordnung sind die Mikrotubuli polar, es wird zwischen dem Plus- und dem Minus-Ende unterschieden. Wobei das Plus-Ende definiert ist als das schnellwachsende Ende. Hat die β -Untereinheit GTP gebunden, polymerisieren die Dimere zu Mikrotubuli. Daher kommt es bei hohen GTP Konzentrationen zu wachsenden Mikrotubuli. Wird das GTP hydrolysiert, dies geschieht hauptsächlich nur an den Enden der Mikrotubuli, so dissoziiert das Tubulindimer vom Mikrotubulus ab. Am Plus-Ende ist die Hydrolyserate höher, daher ist auch die Depolymerisation am Plus-Ende schneller als am Minus-Ende und das Plus-Ende weist eine insgesamt höhere Dynamik auf. In der Zelle endet das Minus-Ende meist am Zentrosom, oder den Polen des Spindelapparats. Die Microtubuli werden aufgrund ihres steten Prozesses des Polymersierens und Depolymerisierens als dynamisch instabil bezeichnet. Wenn der Mikrotubulus einen konstante Länge behält, sind Assoziation und Dissoziation im Gleichgewicht. Diese Dynamik ist für viele zelluläre Prozesse sehr wichtig, da sie es erlaubt schnelle Anpassungen des Zytoskeletts durchzuführen. Es sind mehrere Wirkstoffe bekannt die diese Dynamik modulieren können. ^[14] Taxane und Epothilone z.B. stabilisieren Mikrotubuli, indem sie die Dissoziation der Tubulindimere verhindern. Colchicin, Vinca-Alkaloide und Cryptophycine begünstigen die Dissoziation und destabilisieren daher die Mikro-

1. Einleitung

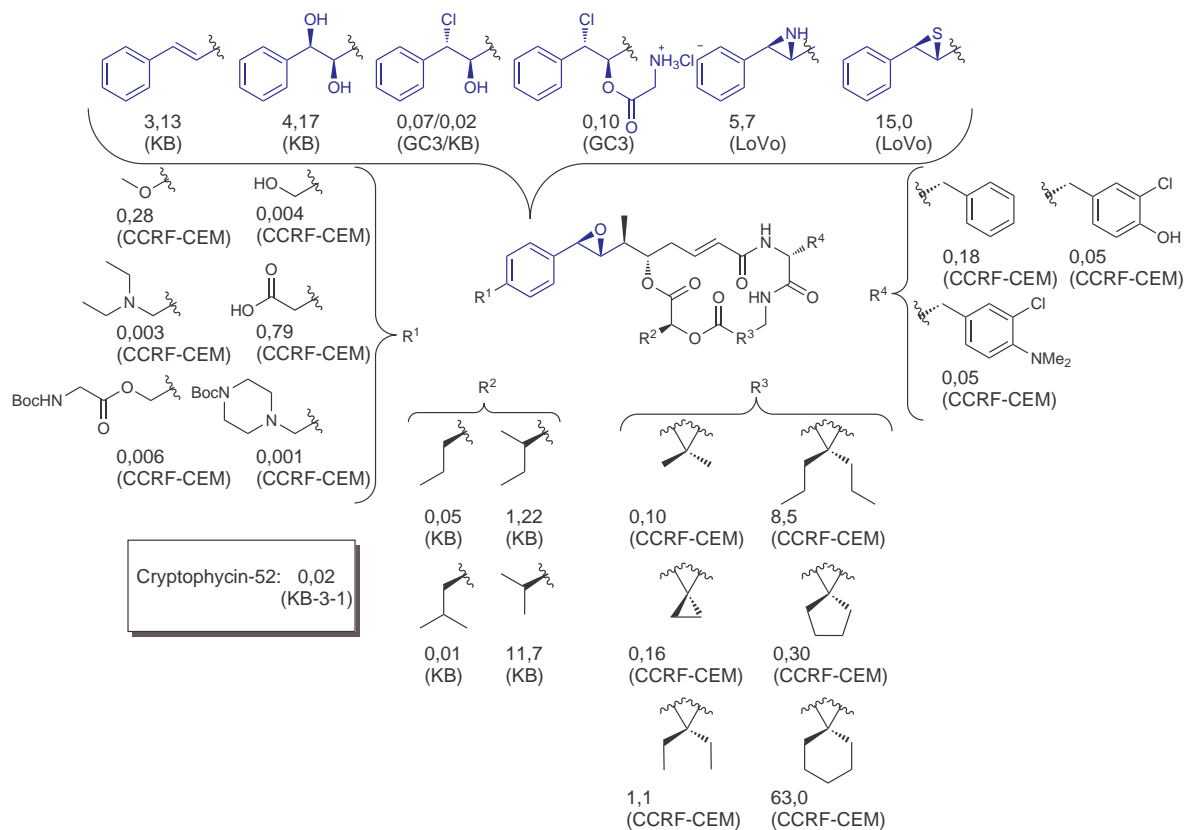


Abbildung 1.3.: Ergebnisse bereits veröffentlichter SAR-Studien basierend auf der Struktur von Cryptophycin-52 (davon abweichend basieren die Strukturen der Derivate mit Änderungen in R² und R³ auf Cryptophycin-1); IC₅₀-Werte sind in nM angegeben, die Zelllinie in Klammern.^[16–21]

tubuli. Die Bindungsstellen aller dieser Wirkstoffe befinden sich dabei immer auf der β -Untereinheit.^[14,15] Die Bindungsstelle des Cryptophycins konnte aber bis heute nicht genau lokalisiert werden. Aus Untersuchungen ist nur bekannt, dass Cryptophycin-1 die Bindung des Vinca-Alkaloids Vinblastin an Tubulin verhindert.^[12,15] Die genaue Art der Inhibition, kompetitiv oder nicht-kompetitiv, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Aufgrund der Inhibition des Vinblastin wird aber allgemein eine Bindestelle der Cryptophycine in der Nähe der Vinca-Alkaloid-Bindestelle vermutet.^[7,12]

Der hohe Gehalt an Tubulin in Neuronen ist vermutlich der Grund für die hohe Neurotoxizität des Cryptophycins-52. Um die schweren Nebenwirkungen zu vermeiden, wurden zahlreiche Struktur-Wirkungs-Beziehung (SAR; *structure activity relation-*

ship) Studien durchgeführt.^[16,18,22–24] Ziel war es Cryptophycin–52 so zu verändern, dass es eine noch höhere biologische Aktivität besäße, oder sich die Nebenwirkungen verringern ließen. Da die Bindestelle unbekannt ist, ist ebenfalls die Orientierung des Cryptophycins während der Koordination an das Tubulin unbekannt. Es ist daher nicht möglich vorherzusagen, an welcher Position des Cryptophycins Modifikationen die Bindung an Tubulin nicht beeinflussen. Untersucht wurden daher alle vier Fragmente des Cryptophycins, wobei viele unterschiedliche Cryptophycin Analoga im Rahmen von SAR–Studien synthetisiert worden. Die Fragmente A und C wurden dabei am gründlichsten untersucht.

Beim Fragment A wurden besonders viele Modifikationen an den drei Stereozentren ausserhalb des Makrozykluses vorgenommen. Die Konfiguration des Epoxides wurde verändert, das Epoxid gegen Aziridin, ein Thiiran, oder eine *trans*–Doppelbindung ausgetauscht.^[17,22,23,25] Die Aktivität sank dabei immer. Auch die Öffnung des Epoxids zum Diol führt zu einem drastischen Verlust an Aktivität.^[17] Dies zeigt, dass das β –Epoxid ein sehr wichtiges Strukturmerkmal der Cryptophycine ist. Das Epoxid wurde auch zu den entsprechenden Halohydrinen geöffnet, wobei die Aktivität mit der Ordnungszahl abnimmt.^[26] Die Chlorhydrine zeigen eine 100– bis 1000–fache höhere *in vivo* Aktivität als das korrespondierende Epoxid, da die Aufnahme in das Tumorgewebe und die Retention dort größer ist.^[17,27] In wässrigen Lösungen sind die Halohydrine instabil, da über eine intramolekulare S_N –Reaktion wieder das Epoxid gebildet wird.^[26] Zur Erhöhung der Stabilität wurden die Chlorhydrine mit verschiedenen Säuren verestert. Die dabei entstehenden Verbindungen zeigen eine hohe Aktivität, vor allem die Glycinester der Chlorhydrine.^[20,21,27] Am Phenylrest des A–Fragmentes wurden vor allem in *para*–Position viele Modifikationen vorgenommen. Modifikationen sind hier z.T. ohne Verlust der Aktivität möglich. Die Substitution mit polaren Gruppen führt häufig zu aktiveren Verbindungen als Cryptophycin–52.^[16,20] Die größere Polarität verbessert die Wasserlöslichkeit dieser Derivate, gleichzeitig ist die Aktivität gegen *multidrug*–resistente Zellen, wie z.B. P–Glycoprotein exprimierende Zellen, stark vermindert.^[20] Vermutlich, da sie durch die größere Polarität bessere Substrate für Effluxpumpen wie das P–Glycoprotein sind und daher die effektive Konzentration innerhalb der Zelle geringer ist (s. a. Abschnitt 1.3 u. 7.4). Modifikationen an Fragment B verringern in allen bekannten Fällen die Aktivität.^[17,23] Viele Cryptophycin Analoga mit Modifikationen im Fragment C zeigen gute Aktivitäten. Die Einführung eines zweiten Methylsubstituenten in α –Position an Fragment C bei Cryptophycin–1 führt zum äußerst aktiven

1. Einleitung

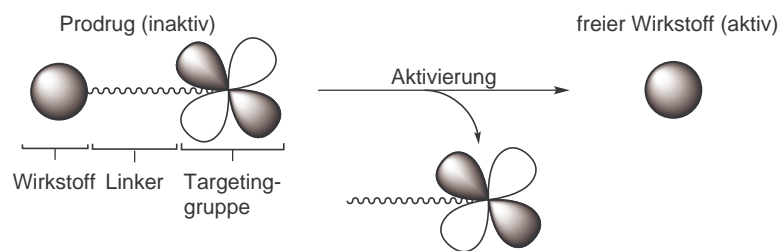


Abbildung 1.4.: schematische Abbildung der Prodrug-Aktivierung.

und in der klinischen Erprobung gewesenen Cryptophycin-52.^[11,24] In früheren Untersuchungen sind bisher viele apolare Substituenten untersucht worden, wobei C^α immer symmetrisch substituiert war.^[18] Die Aktivität der Analoga ist bei apolaren Substituenten hoch, bei sehr großem sterischen Anspruch geht die Aktivität jedoch stark zurück.^[24] Fragment D variiert bei den natürlich vorkommenden Cryptophycinen, daher ist auch die Synthese verschiedener aktiver Fragment D Analoga möglich.^[17] Mit steigendem sterischen Anspruch sinkt auch hier die Aktivität, allerdings ist die Abnahme weniger stark als bei den Fragment C Analoga.^[17]

1.2. Tumor Targeting

Ein anderer Ansatz starke Nebenwirkungen zu vermeiden ist die spezielle Adressierung der Krebszellen. Bei diesem sogenannten Tumor Targeting wird der Wirkstoff mit einem anderen Molekül konjugiert. Dieses Molekül, eine sogenannte Erkennungseinheit, kann selektiv Krebszellen erkennen und gewährleistet, dass der Wirkstoff hauptsächlich die Krebszellen schädigt. Krebszellen sind Zellen des menschlichen Organismus und unterscheiden sich daher kaum von gesunden Zellen, wie z.B. Bakterien eines bakteriellen Infektes sich von Körperzellen unterscheiden. Daher ist es schwierig gute Erkennungseinheiten zu identifizieren. Ist der Wirkstoff durch die Konjugation mit der Erkennungseinheit nicht mehr biologisch aktiv, wird aber in der Nähe oder in Krebszellen freigesetzt, so wird das Konjugat als Prodrug bezeichnet.^{[28][29]} Der Vorteil solch eines Prodrugs ist, die Möglichkeit hohe Dosen verabreichen zu können ohne Nebenwirkungen auszulösen. Gleichzeitig kann durch die Konjugation eine Verbesserung der physikalischen Eigenschaften erzielt werden, so kann z.B. die Löslichkeit durch polare Gruppen

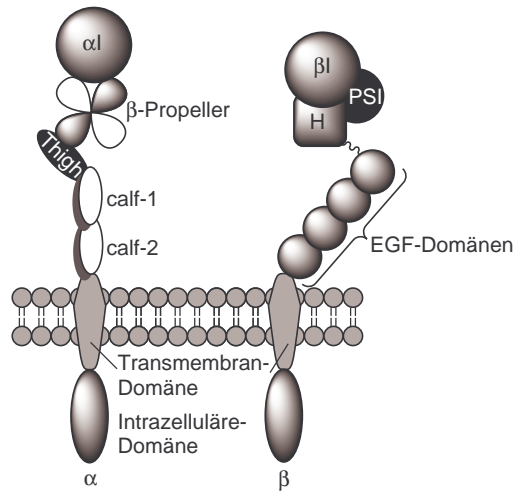


Abbildung 1.5.: schematischer Aufbau der Integrine.

gesteigert werden, die Stabilität unter physiologischen Bedingungen kann erhöht werden, u.v.m. Der Wirkstoff muss beim Erreichen der Krebszellen freigesetzt werden, um aktiv zu sein. Dazu ist der Wirkstoff über einen Linker mit der Erkennungseinheit verbunden. Der Linker zwischen Wirkstoff und Erkennungseinheit verringert die sterische Hinderung der Erkennungseinheit durch den Wirkstoff und muss am Zielort spaltbar sein, um den Wirkstoff freizusetzen. In der Literatur sind viele verschiedene Linker- und Targeting-Strategien diskutiert worden. Häufig sind überexprimierte Rezeptoren auf den Krebszellen Ziele des Targetings, so überexprimieren viele Krebszelllinien z.B. den Folsäurerezeptor und auch das Integrin $\alpha_V\beta_3$.^[30,31]

Integrine sind heterodimere Transmembranproteine. Sie bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit. 18 α - und 8 β -Untereinheiten bilden 24 bisher bekannte Integrine.^[29,32] Integrine sind ubiquitär, jede tierische Zelle exprimiert sie. Die Hauptaufgabe der Integrine ist die Bindung von Proteinen der extrazellulären Matrix, um die Adhäsion der Zelle zu gewährleisten.^[33]

Die α -Untereinheit besteht extrazellulär aus einem siebenblättrigen Propeller, der über einen „Schenkel“ (*thigh domain*) mit den Domänen calf-1 und calf-2 verbunden ist. Daran schließt die Transmembran-Domäne und die intrazelluläre Domäne an. Neun der α -Untereinheiten besitzen zusätzlich eine weitere Domäne. Diese αI -Domäne ist mit dem Propeller verbunden und enthält neben der Ca^{2+} -Bindestelle des Propellers eine

1. Einleitung

weitere Metallionen-Bindungsstelle in Form einer Rossman-Faltung. Der Ligand für diese sogenannte Metallionen-abhängige Bindungsstelle (MIDAS; *metal-ion-dependent adhesion site*) sind Mg^{2+} -Ionen. Die Bindung eines Metallions (Mg^{2+} , aber auch Mn^{2+}) in der MIDAS sind Voraussetzung für die Bindung von Liganden an das Integrin.^[33] Die β -Untereinheit besitzt einen komplexeren Aufbau als die α -Untereinheit. N-terminal befindet sich die Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI) Domäne. Daran schließt sich die Hybrid-Domäne an, die die β I-Domäne umschließt. Analog zur α I-Domäne enthält die β I-Domäne eine MIDAS für die Komplexierung von Mg^{2+} -Ionen. Zusätzlich befindet sich eine weitere Metallionen-Bindungsstelle, die ADMIDAS (*adjacent site metal-ion-dependent adhesion site*) in direkter Nachbarschaft zur MIDAS. Binden Ca^{2+} -Ionen an die ADMIDAS kommt es zur Inhibierung der Bindung des Integrins mit seinen Liganden. An die Hybrid-Domäne schließt sich eine Wiederholung von vier cysteinreichen EGF-Domänen (EGF; *epidermal growth factor*) an, die in die Transmembran-Domäne und die intrazelluläre Domäne übergehen. Die Propeller-Domäne der α -Untereinheit und die β I-Domäne der β -Untereinheit bilden zusammen die Bindestelle für den Liganden des Integrins aus, daher bindet jedes Integrin selektiv verschiedene Liganden.^[33]

Die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) wird von vielen Integrinen als ein Bindungsmotiv erkannt, daher sind kleine RGD enthaltende Peptide gute Liganden für eine Vielzahl an Integrine.^[34] Wichtig für die Spezifität der Bindung der Peptide an die Integrine ist neben der Sequenz auch die Struktur der Peptide, daher können durch Modifizierung der Struktur selektiv bestimmte Integrine von einzelnen Peptiden adressiert werden.^[35] Die Affinität ist am größten, wenn die RGD-Peptide die „bioaktive Konformation“, also die Konformation der natürlichen Liganden während der Bindung an das Integrin, nachahmen.^[36] Zyklische Penta- und Hexa-Peptide sind ausreichend lang um mit dem Integrin zu wechselwirken und ihre Konformation ist aufgrund der zyklischen Struktur besonders starr, so dass sie sehr gute synthetische Integrin-Liganden sind. Zusätzlich sind zyklische RGD-Peptide besonders stabil gegenüber Exoproteasen und besitzen eine geringe immunogene Aktivität.^[37] In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass neben der Konformation die auf das Aspartat des RGD-Motivs folgende Aminosäure wichtig für die Erkennung des Peptids durch das Integrin ist.^[38] Desweiteren bildet die Argininseitenkette Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen zu zwei Aspartatseitenketten des Integrins aus.^[39] Liganden des Integrins $\alpha_V\beta_3$ haben eine hohe Affinität, wenn sich das Glycin des RGD-Motivs in i+1-Position

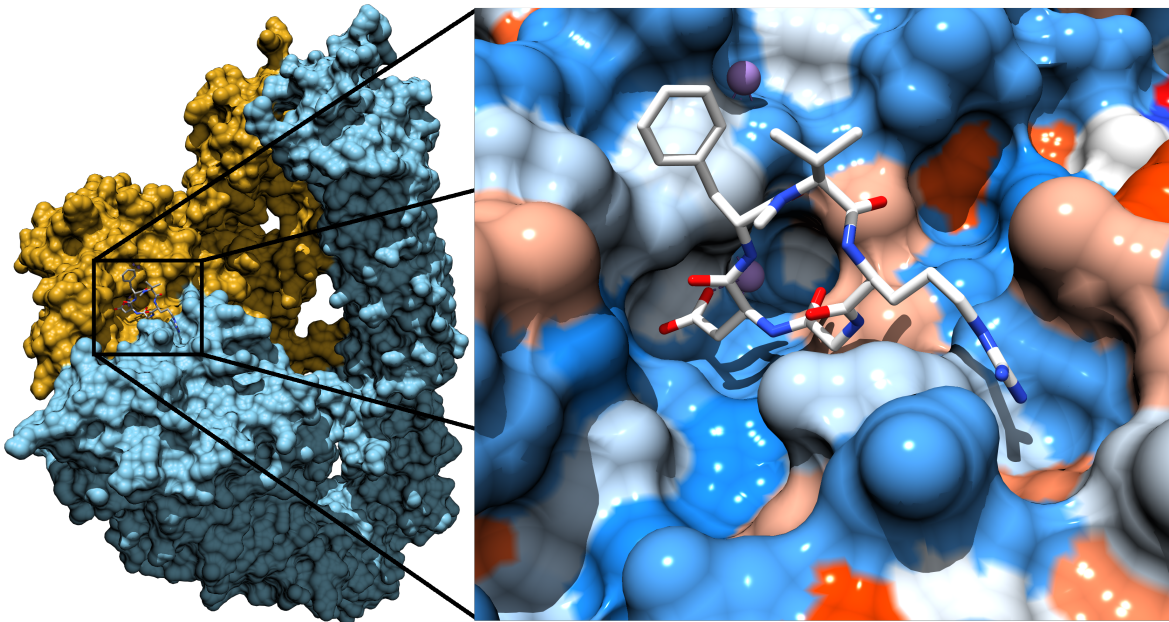


Abbildung 1.6.: Kristallstruktur¹des extrazellulären Segments des Integrins $\alpha_V\beta_3$ in Komplex mit dem RGD-Peptid c-[RGDf-N(Me)V-], das aktuell unter dem Namen Cilengitide in der klinischen Erprobung (Phase III) ist. Erkennbar ist die Bindungstasche des RGD-Peptids am Schnittpunkt von α_V - (blau) und β_3 -Untereinheit (gold). In der Vergrößerung geben die Farben der Proteinoberfläche die Hydrophobizität wieder, von blau stark hydrophob bis rot stark hydrophil.^[41,42]

einer γ -Schleife befindet und sich D-Phenylalanin C-terminal an das RGD-Motiv anschließt.^[35,40] Das D-Phenylalanin geht hydrophobe Wechselwirkungen mit einem Tyrosin des Integrins ein.^[39] In Abbildung 1.6 ist die Kristallstruktur eines Komplexes des Integrins $\alpha_V\beta_3$ und des RGD-Peptides c-[RGDf-N(Me)V-] zu sehen, das alle oben genannten Bedingungen für einen guten Liganden dieses Integrins erfüllt. Es ist zu erkennen, wie gut das Peptid in seiner Konformation in die Bindungstasche des Integrins passt.

Das Integrin $\alpha_V\beta_3$ wird auf einigen Krebszellen überexprimiert, z.B. in Gliomazellen, und eignet sich daher als Target für das Tumor Targeting.^[43] Neben den Krebszellen exprimieren aktivierte Endothelzellen ebenfalls das Integrin $\alpha_V\beta_3$, während es in anderen

¹PDB: 1L5G

1. Einleitung

Gewebe und in nicht aktivierten Endothelzellen fast nicht vorkommt.^[44] Das Adressieren eines Antikrebswirkstoffes an das Integrin $\alpha_V\beta_3$ ist daher auch bei nicht $\alpha_V\beta_3$ exprimierenden Krebsarten viel versprechend, denn ein wachsender Tumor sezerniert Wachstumsfaktoren, die die umgehenden Endothelzellen aktivieren. Diese beginnen neue Blutgefäße auszubilden und exprimieren dabei das Integrin $\alpha_V\beta_3$.^[45] Das Prodrug soll dieses Integrin erkennen, daran binden, endozytiert werden und das Cryptophycin freisetzen. Da die Cryptophycine unpolar sind, wird eine Aufnahme per Diffusion über die Membranen vermutet. Die Diffusion aus dem Vesikel in die Endothelzelle ist daher wahrscheinlich. Aufgrund der Störung der Mitose durch die Cryptophycine, tritt die Zelle in die Apoptose ein. Dadurch wird das Wachstum der Blutgefäße gestört, der Tumor wird unterversorgt und kann nicht weiter wachsen. Das freigesetzte Cryptophycin kann aber auch die Endothelzelle verlassen und in Zellen in der Nachbarschaft gelangen, so dass es auch zu einer direkten Schädigung der Tumorzellen kommen kann.

In der Literatur wurde bereits 1998 von COLIN *et al.* gezeigt, dass eine rezeptorvermittelte Endozytose über das Integrin $\alpha_V\beta_3$ möglich ist.^[46] Später wurde diskutiert, ob die stattfindende Endozytose wirklich durch das Integrin vermittelt wird, oder ob es eine Rezeptor unabhängige Form der Endozytose ist.^[47] Nachfolgende Studien zeigten jedoch mittels verschiedener Experimente immer wieder eine Integrin-vermittelte Endozytose von RGD-Peptiden. Zellen der M21 Zelllinie exprimieren das Integrin $\alpha_V\beta_3$, während M21-L Zellen dies nicht tun. CRESSMANN *et al.* haben gezeigt, dass c-[-RGDfK-] im Vergleich wesentlich schneller von M21 Zellen aufgenommen wird und die Aufnahme eine Sättigung erreicht, während die Aufnahme von c-[-RADfK-] linear mit der Konzentration ansteigt, absolut aber wesentlich geringer ist.^[48] Wird die Aufnahme von c-[-RGDfK-] und c-[-RADfK-] in M21-L Zellen, die kein $\alpha_V\beta_3$ exprimieren,^[49] verglichen, so ist kein großer Unterschied zwischen beiden Peptiden vorhanden. Daher ist eine integrinvermittelte Aufnahme von c-[-RGDfK-] bei $\alpha_V\beta_3$ exprimierenden Zellen sehr wahrscheinlich, die bei hohen Peptidkonzentrationen zu einer Sättigung des Integrins und damit der Aufnahme führen.^[48] Allen Studien ist gemein, dass RGD-Peptide und auch Konjugate von RGD-Peptiden endozytiert werden, daher sind sie als Erkennungseinheit gut geeignet. Durch die Kupplung mehrerer RGD-Peptide als Erkennungseinheiten an ein Prodrug erhöht sich in den meisten Fällen die Aktivität.^[50] Wobei der Linker wiederum eine wichtige Rolle spielt, da er für die Bindung des Prodrugs an zwei oder mehr Integrine gleichzeitig entsprechend lang und verzweigt sein muss.^[51]

Das Prodrug soll an ein Integrin binden und vermittelt durch Integrine in die Zelle aufgenommen werden. Nach der Endozytose befindet es sich in einem frühen Endosom. Protonenpumpen in der Membran des Endosoms senken den pH-Wert innerhalb des Endosoms und das Endosom bewegt sich von der Zellmembran weg. Dadurch wird es zu einem sogenannten späten Endosom. Endosomen können mit Lysosomen fusionieren. Auf diese Weise werden Substanzen aus der Umgebung der Zelle aufgenommen und im Lysosom verdaut, um der Zelle als Energielieferant oder Baustein zu dienen.^[52] Im Lysosom werden viele extrazelluläre und intrazelluläre Stoffe durch den niedrigen pH-Wert und die verschiedenen vorhandenen unspezifischen Hydrolasen (z.B. Proteasen, Esterasen) hydrolysiert. Bei der Planung eines Prodrugs sollte die spätere Lokalisierung des Prodrugs in der Zelle berücksichtigt werden, um den richtigen Linker auszuwählen, der am Zielort den Wirkstoff freisetzt. Erreicht das Prodrug nach erfolgter Endozytose ein Lysosom, so kann ein säurelabiler Linker unter den dort herrschenden Bedingungen abgespalten werden und den aktiven Wirkstoff freisetzen.^[53] Häufig werden auch ausschließlich im Lysosom lokalisierte Proteasen wie z.B. Cathepsin B (EC 3.4.22.1) adressiert. Dann besitzt der Linker ein Peptid mit der Erkennungssequenz des Cathepsin B, meist das Dipeptid –Val–Cit–.^[54] Die Spaltung dieses Peptids durch das Cathepsin B löst die Freisetzung des Wirkstoffes vom Linker aus. Der freie Wirkstoff muss dann allerdings noch die Membran überwinden, die das Lysosom vom Zytosol trennt. Dies gelingt besonders einfach für apolare Wirkstoffe wie den Cryptophycinen, die mittels passiver Diffusion Zellmembranen überwinden können.

Vorgänge dieser Art können mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie in Zellen studiert werden.^[55] Im Unterschied zur Hellfeldmikroskopie werden bei der Fluoreszenzmikroskopie verschiedene fluoreszierende Farbstoffe zur Einfärbung benutzt. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit werden für die Aufnahmen schwarz–weiss Kameras oder Photomultiplier eingesetzt. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen können Aufnahmen der einzelnen Farbstoffe und deren Lokalisierung in der Zelle gemacht werden, wodurch eine Unterscheidung der einzelnen Farbstoffe möglich ist. Diese Aufnahmen werden nachträglich eingefärbt und übereinander gelegt. Eine häufige Fragestellung für die die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt wird, ist die Aufklärung der Lokalisierung eines Objektes innerhalb der Zelle. Dies gelingt, indem ein bekanntes Objekt bzw. Kompartiment innerhalb der Zelle selektiv eingefärbt wird. Das zu untersuchende Objekt muss ebenfalls fluoreszenzmarkiert sein, wobei sich die Anregungs- und Emissionswellenlängen von denen des anderen

1. Einleitung

Farbstoffes unterscheiden müssen. Es wird eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme für beide Anregungs- und Emissionswellenlängen aufgenommen, die Bilder eingefärbt und übereinandergelegt. Befinden sich beide Objekte am selben Ort in der Zelle, sie sind also kolokalisiert, bzw. das zu untersuchende Objekt liegt im markierten Kompartiment der Zelle, überdecken sich die Signale und die Farben addieren sich. Wird z.B. ein grüner und ein roter Fluoreszenzfarbstoff verwendet, so erscheinen Bereiche in denen beide Fluoreszenzfarbstoffe vorhanden sind beim Übereinanderlegen gelb. Da die Zelle ein dreidimensionales Objekt ist, die Bilder aber nur zwei Dimensionen wiedergeben, kommt es auch zur Addition wenn beide Objekte in der Zelle übereinander liegen. Dieses Problem wird in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie gelöst, indem das Anregungslicht fokussiert wird.^{[56][57]} Nur in der Fokusebene der Probe wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt und emittiert Licht. Durch das Ändern des Fokus kann die Probe Ebene für Ebene abgebildet werden, wodurch eine Auflösung auch in der dritten Dimension erreicht wird. Durch die Verwendung von Lasern als Lichtquelle kann sehr präzise nur ein Fluoreszenzfarbstoff angeregt werden und eine ungewollte Anregung anderer Farbstoffe bei der Bildaufnahme unterdrückt werden. Daher ist es möglich mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie eine Kolokalisierung sicher zu detektieren. Für die Fluoreszenzmarkierung der zu untersuchenden Objekte werden verschiedene Techniken angewandt, wobei zwischen der direkten Markierung und dem indirekten Nachweis mittels Antikörpern unterschieden werden kann. Beim direkten Nachweis ist der Fluoreszenzfarbstoff kovalent mit dem Objekt verbunden und ermöglicht so eine direkte Lokalisierung. Der indirekten Nachweis mittels Antikörpern ist aufwendiger. Es wird ein Antikörper benötigt der selektiv ein Epitop des zu untersuchenden Objekts erkennt. Nach der Fixierung muss die Zellmembran permeabilisiert werden, damit der Antikörper in die Zelle gelangen kann. Die Bindung des Antikörpers wird meist mit einem fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen.

Die Zellen für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung werden im einfachsten Fall fixiert. Die Fixierung ist ein Vorgang bei dem die Zellen abgetötet und die Proteine vernetzt werden, so dass ein Ablösen der Zellen während der Waschstreps und der Montierung auf den Objekträgern weitestgehend verhindert wird. Auch wird der Zustand der Zellen vor der Fixierung konserviert und ein Auswaschen der Farbstoffe verhindert.^[58] Nach der Fixierung ist auch eine begrenzte Lagerung möglich, so dass Präparation der Proben und die Aufnahme der Fluoreszenzmikroskopiebilder zeitlich und räumlich getrennt sein können. Ein Nachteil der Fixierung ist die fehlende zeit-

liche Auflösung. Jede Aufnahme ist immer nur eine Momentaufnahme, eine zeitliche Entwicklung kann nicht beobachtet werden. Dies ist beim sogenannten *live cell imaging* anders, dort wird die lebende Zelle im Fluoreszenzmikroskop untersucht, so dass auch Vorgänge wie z.B. Transportbewegungen und Umverteilungen detektiert werden können.

1.3. Mehrfachresistenz

Werden Krebszellen längere Zeit zytotoxischen Substanzen in geringen Dosen ausgesetzt, so entwickeln viele eine Mehrfachresistenz (MDR; *multi-drug resistance*). Häufig ist die Expression des *MDR1* Gens die Ursache. Das Genprodukt ist das P-Glycoprotein, eine in der Membran lokalisierte, ATP-abhängige Effluxpumpe mit einer äußerst geringen Substratspezifität, so dass eine Vielzahl von Xenobiotika aus der Zelle gepumpt werden können.^[59] Typische Substrate haben eine Masse von 200 - 1900 Da, enthalten häufig aromatische Gruppen, sind nicht geladen, oder sind schwache Basen. Allerdings gibt es eine Vielzahl an Substraten auf, die diese Merkmale nicht zutreffen.^[60] Wichtig ist ein amphiphiler Charakter, da postuliert wird, dass das P-Glycoprotein das Substrat aus der Lipiddoppelschicht der Zellmembran heraus bindet.^[61] Amphiphile Moleküle verbleiben aufgrund ihrer Amphiphilie länger in der Lipiddoppelschicht als apolare Moleküle, dadurch erhöht sich für die amphiphilen Moleküle die Wahrscheinlichkeit vom P-Glycoprotein aus der Zelle gepumpt zu werden im Vergleich zu rein apolaren Substanzen.^[62] Die Ausbildung von Mehrfachresistenzen ist ein großes Problem bei der chemotherapeutischen Behandlung von Krebs. Bis heute wird nach Strategien und Wirkstoffen gesucht eine solche Ausbildung zu verhindern, oder aber zu umgehen. Für viele Stoffe wird daher schon bei der Suche nach neuen Antikrebswirkstoffen die Aktivität gegen verschiedene Krebszelllinien, aber auch gegen mehrfach resistente Krebszelllinien bestimmt. Das Maß für die Wirksamkeit gegen resistente Krebszellen ist der Resistenzfaktor F_R (s. 1.1), wobei ein hoher Resistenzfaktor einen hohen Aktivitätsverlust des Wirkstoffes durch die Resistenzmechanismen der Zelle bedeutet. Im Idealfall wäre der Resistenzfaktor 1, dann wäre die Wirksamkeit des Wirkstoffes nicht durch Resistenzmechanismen beeinträchtigt.

$$F_R = \frac{\text{IC}_{50} \text{ resistente Zelllinie}}{\text{IC}_{50} \text{ nicht-resistente Zelllinie}} \quad (1.1)$$

1. Einleitung

Die Cryptophycine sind bereits in den ersten Studien durch ihre hohe Wirksamkeit gegen mehrfachresistente Zelllinien aufgefallen.^[6] Auch aus diesem Grund wurden sie als mögliche Kandidaten für neue Antikrebsmedikamente in Betracht gezogen. Ihr niedriger Resistenzfaktor resultiert wahrscheinlich aus ihrer sehr geringen Polarität, weshalb sie schlechte Substrate für das P-Glycoprotein sind (s.o.).^[63,64] Dieser Umstand muss bei der Entwicklung neuer Cryptophycin-Derivate berücksichtigt werden, damit auch sie hohe Aktivitäten gegen mehrfachresistente Zellen besitzen.

1.4. Zytotoxizitäts-Assay

Die zytotoxische Wirkung der Cryptophycine wird mittels Zytotoxizitäts-Assays bestimmt. Das gemeinsame Prinzip aller vorhandenen Zytotoxizitäts-Assays ist einen Parameter des Stoffwechsels der Zellen zu messen, der essentiell für die Zellen ist. Die Messung erfolgt meist durch eine chemische Reaktion in deren Verlauf das Produkt proportional zur Stoffwechselaktivität einer bestimmten Zellanzahl gebildet wird und damit auch proportional zur Anzahl lebender Zellen. Die Konzentrationsbestimmung dieses Produktes erfolgt in den meisten Fällen kolorimetrisch, oder aber mittels der Bestimmung der Intensität der Fluoreszenz. Zur Einordnung des Ergebnisses sind sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle notwendig. Die einfachste Art der Messung ist die Endpunktbestimmung, d.h. der Messwert wird nach einer für ausreichend langen Inkubationsdauer einmalig aufgenommen.

Der in dieser Arbeit verwendete Zytotoxizitäts-Assay basiert auf der Reduktion von Resazurin und zeichnet sich durch seine einfache Durchführung, hohe Empfindlichkeit und geringen Giftigkeit aus. Bei diesem Assay wird die Vitalität der Zellen, also die Stoffwechselaktivität anhand des Vorhandenseins von Reduktionsäquivalenten gemessen.^[65] Das blaue Resazurin wird als wässrige Lösung zu der Zellkultur gegeben. Da die Zellmembran für das Resazurin permeabel ist, kann es in die Zellen diffundieren und wird dort von mitochondrialen Enzymen zu Resorufin reduziert.^[66] Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein von Reduktionsäquivalenten, die nur bei lebenden Zellen vom Metabolismus bereitgestellt werden. Das Resorufin hat eine rosa Färbung und fluoresziert im Gegensatz zu Resazurin. Da es ebenfalls über die Zellmembran diffundieren kann, kann die Messung der Fluoreszenz einfach im Überstand erfolgen und ist damit unabhängig vom Erfassen der Zellen während der Messung. Die Messung der

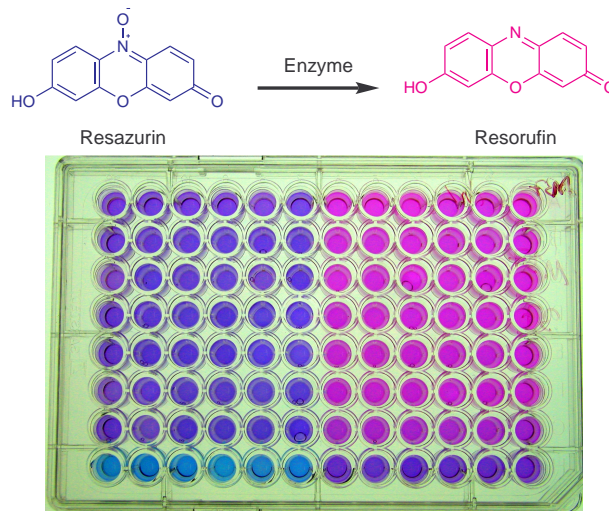


Abbildung 1.7.: **oben:** enzymatische Reduktion von Resazurin zu Resorufin; **unten:** Mikrotiterplatte eines Zytotoxizitäts-Assay; die Farbe ist abhängig von der Konzentration der Testsubstanz, Konzentrationsreihe oben links startend mit geringer Konzentration. Unten links Kontrolle nur Medium mit Resazurin, keine Zellen.

Fluoreszenz ermöglicht eine höhere Empfindlichkeit als die kolorimetrische Messung, die aufgrund des Farbumschlages prinzipiell auch möglich ist.^[65] Die geringe Giftigkeit des Resazurins und des Resorufins für die Zellen als auch für den Menschen, ist ein Grund für die einfache Durchführung dieses Assays.^[65] Nach Ablauf der Inkubationsdauer mit der zu untersuchenden Substanz wird die Resazurinlösung zum Zellkulturmedium zugegeben und weiter inkubiert. Die zweite Inkubationsdauer, zur Reduktion des Resazurins, kann sehr lange gewählt werden, da die Zellen nicht geschädigt werden. Das Protokoll ist so ausgearbeitet worden, dass zu keiner Zeit Flüssigkeiten aus dem *well* wieder entfernt werden müssen, da dadurch die beim Absaugen entstehenden großen Fehler vermieden werden können (z.B. das Absaugen von Zellen). So erfolgt auch die Messung der Fluoreszenz direkt in der 96 *well* Platte ohne weitere Schritte. Nach Abschluß der Messung ist eine Fortsetzung der Zellkultur bzw. Inkubation denkbar. Bei kolorimetrischen Messungen muss untersucht werden, ob der im Zellkulturmedium vorhandene pH-Indikator die Messung beeinflusst. Bei sehr stoffwechselaktiven Zelllinien kann es zu einer weiteren Reduktion des Resorufins zum farblosen Hydroresorufin kommen, wodurch die Ergebnisse verfälscht werden können.^[66] Zur Einordnung der

1. Einleitung

Messwerte in Bezug zu ihrer Präzision wird neben dem Messwert das Konfidenzintervall (CI; 95 %) angegeben. Das Konfidenzintervall ist der Bereich in dem der wahre IC_{50} -Wert mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit liegt.

Teil II.

Zusammenfassung/Summary

2. Zielsetzung

Cryptophycin-52 ist über die entwickelten Synthesen totalsynthetisch verfügbar.^[5,67] Klinische Untersuchungen bis Phase II zeigen eine hohe Wirksamkeit gegen Krebs der Cryptophycine im Allgemeinen und Cryptophycin-52 im Besonderen.^[5,11] Gleichzeitig sind aber auch starke Nebenwirkungen aufgetreten, weshalb nur geringe zur Heilung nicht ausreichende Dosen verabreicht werden können.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch SAR-Studien aktivere bzw. besser verträgliche Cryptophycin Analoga zu finden. Ausserdem sollen Positionen identifiziert werden, die geeignet sein sollen für eine Konjugation, bei der kein oder nur ein geringer Aktivitätsverlust auftritt. Dies soll die Synthese von Cryptophycin Prodrugs ermöglichen. Prodrugs zeichnen sich dadurch aus, dass das Konjugat aus Wirkstoff und Targetinggruppe schwach oder nicht aktiv ist, wodurch die Gabe höherer Dosen möglich ist.^[28] Die Targetinggruppe ermöglicht die selektive Adressierung von Krebszellen. Der Wirkstoff soll dann in oder in der Nähe der Krebszellen freigesetzt werden. Bei der Freisetzung verbleibt meist ein Rest am Cryptophycin, z.B. eine Carboxyl- oder Aminogruppe, die Identifizierung geeigneter Konjugationsstellen soll eine hohe Aktivität trotz dieser Reste sicher stellen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Synthese eines RGD-Cryptophycin-Fluorescein-Konjugats, das als Vorläufer eines Cryptophycin Prodrugs angesehen werden kann. Das RGD-Peptid dient als Targetinggruppe, da es selektiv an das Integrin $\alpha_V\beta_3$ bindet.^[48,68] Die Markierung mit Fluorescein soll die fluoreszenzmikroskopische Verfolgung der Endozytose und der Lokalisierung innerhalb der Zelle ermöglichen. Das Wissen über die Verteilung erlaubt in der Zukunft die Synthese eines gezielt unter den das Konjugat umgebenden Bedingungen spaltbaren (z.B. pH < 7 in Lysosomen) Linkers, zur Freisetzung des Cryptophycins.

Cryptophycine wechselwirken mit der β -Untereinheit von Tubulin.^[7,12,15] Die genaue Art der Bindung und die Bindestelle sind aber bisher nicht bekannt. Für die NMR spektroskopische Untersuchung der Interaktion von Cryptophycin und Tubulin soll ein ^{13}C -markiertes Cryptophycin-52 Analogon synthetisiert werden.

2. Zielsetzung

3. Zusammenfassung

Die Mitglieder der Naturstofffamilie der Cryptophycine zeichnen sich durch ihre hohe zytotoxische Wirkung aus.^[5,6] Selbst gegen mehrfach resistente Krebszellen, wie der *MDR1* exprimierenden KB-V1-Zelllinie, erreichen sie picomolare IC_{50} -Werte (Cryptophycin-52: 261 pM). Die auftretenden Nebenwirkungen verhinderten bislang den erfolgreichen klinischen Einsatz.^[10,11] Aus diesem Grund wurden viele Studien zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) durchgeführt, um die Aktivität weiter zu steigern bzw. die Nebenwirkungen zu verringern.^[16,18,22-24]

In Abbildung 3.1 sind beispielhaft Cryptophycin-1, das erste bekannte und aus Cyanobakterien isolierte Cryptophycin, und Cryptophycin-52, ein bis in die Phase II der klinischen Studien gelangtes synthetisches Analogon abgebildet. Neben den SAR-Studien ist ein zweiter Ansatz für die Verringerung der Nebenwirkungen die Synthese von Cryptophycin-Prodrugs. Darunter werden Cryptophycin-Konjugate verstanden, die zunächst biologisch inaktiv sind.^[28] Das Cryptophycin ist hierbei über einen Linker mit einer Erkennungseinheit verbunden, die es ermöglicht, dass das Konjugat selektiv in oder nahe der Krebszellen angereichert wird. Der Linker wird dort gespalten und das biologisch aktive Cryptophycin freigesetzt. Durch diesen Mechanismus sollen nur Krebs-

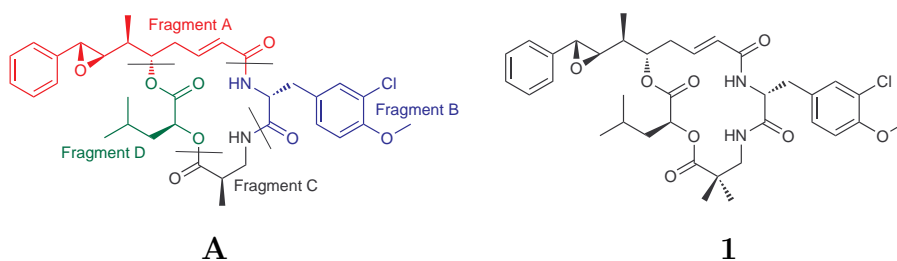


Abbildung 3.1.: **A**: Cryptophycin-1, das erste bekannte Cryptophycin. Die Unterteilung in die Fragmente A–D ist farblich gekennzeichnet; **1**: Cryptophycin-52, ein synthetisches Analogon des Cryptophycin-1.

3. Zusammenfassung

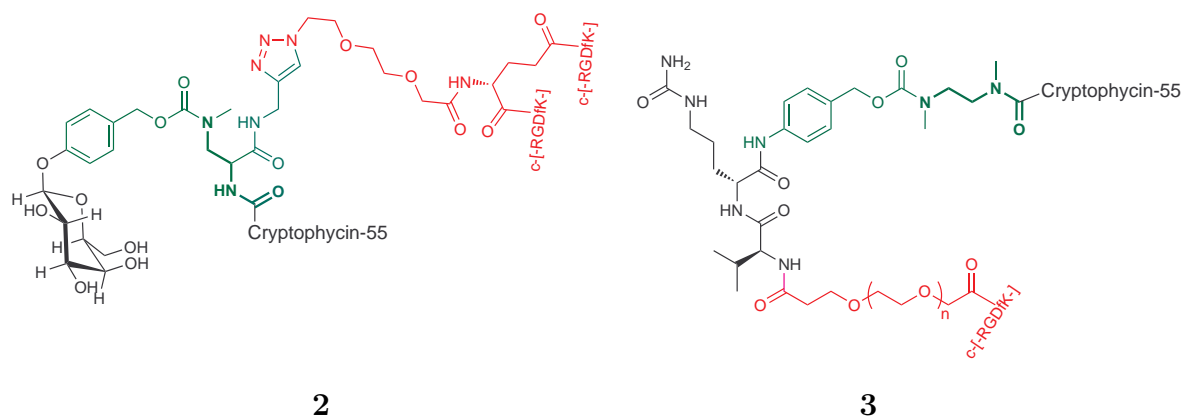
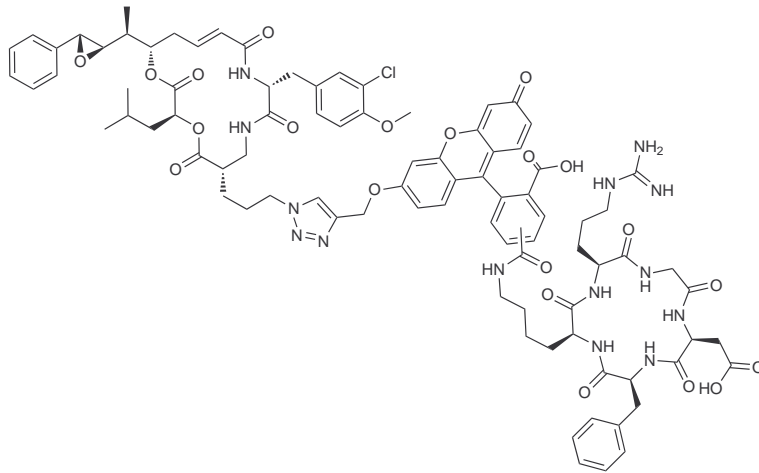


Abbildung 3.2.: **2**: Cryptophycin Prodrug mit Glukuronsäureeinheit als Auslöser; **3**: Cryptophycin Prodrug mit Cathepsin Spaltsequenz –Val–Cit– als Auslöser; die Erkennungseinheit ist rot markiert, der selbsteliminierende Linker in grün.

zellen geschädigt werden, während gesunde Zellen möglichst geringen Konzentrationen von Cryptophycinen ausgesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Erkennungseinheiten synthetisiert. Das RGD–Peptid c-[RGDfK-] wurde sowohl mittels manueller als auch mittels Mikrowellen–unterstützter Festphasensynthese hergestellt. Ein Monomer des c-[RGDfK-] soll in Prodrug **3** als Erkennungseinheit zum Einsatz kommen, während für das Prodrug **2** ein über ein Glutamat-verknüpftes c-[RGDfK-]–Dimer synthetisiert wurde. Über die Aminogruppe des Glutamats wurde dann ein Azid-funktionalisierter, auf Triethylenglykol basierender Linker eingeführt, der eine kupferkatalysierte Alkin–Azid Zyklodaddition (Klickchemie) zur Konjugation der Erkennungseinheit ermöglicht. Im Rahmen der Synthesepipeline für die Glukuronsäure–basierte Aktivierungseinheit des Prodrugs **2** wurden erste Testreaktionen durchgeführt.

Die Integrin–vermittelte Endozytose von c-[RGDfK-]–Konjugaten ist in der Literatur bekannt.^[48,69,70] Bisher nicht untersucht war, wo in der Zelle die RGD–Konjugate nach der Endozytose lokalisiert sind. Für die Untersuchung der Lokalisierung wurde ein RGD–Cryptophycin–Konjugat mit einer Fluorescein–Markierung synthetisiert (s. Abb. 3.3). Das Azid-funktionalisierte Cryptophycin CRY 26 und die Zyklodaddition zur Konjugation mit dem Cryptophycin wurden dafür von CHRISTINE WEISS und MAR-



4

Abbildung 3.3.: Konjugat zur Studie der Aufnahme und Lokalisierung von Cryptophycin-Prodrugs aus Cryptophycin, RGD-Peptid und Fluorescein.

KUS NAHRWOLD im Rahmen ihrer Promotion synthetisiert bzw. durchgeführt.^[71] Die Synthese der Erkennungseinheit c-[RGDfK-], die Kupplung der Erkennungseinheit an das 5(6)-Carboxyfluorescein, die Vorbereitung der biologischen Tests (z.B. Zellkultur) und die Durchführung der eigentlichen Lokalisationsstudien fanden im Rahmen dieser Arbeit statt. Die konfokalen Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen wurden von RALF PALMISANO an der Universität Erlangen angefertigt (s. Abb. 3.4).

Es konnte gezeigt werden, dass das RGD-Cryptophycin-Konjugat von den Zellen endozytiert wird. Durch Kolorisierung mit dem selektiv Lysosomen anfärbenden Farbstoff LysoTrackerTM ist erkennbar, dass der größte Anteil des Konjugats in den Lysosomen vorliegt. Das Wissen, dass RGD-Cryptophycin-Konjugate nach der Endozytose in die Lysosomen transportiert werden, kann nun für die Entwicklung eines spaltbaren Linkers genutzt werden, der genau unter den dort herrschenden Bedingungen gespalten wird und das aktive Cryptophycin in den Lysosomen freisetzt.

Neben den Cryptophycin-Konjugaten wurden weiterhin Cryptophycine für SAR-Studien im Arbeitskreis synthetisiert. Die in den Fragmenten A,C und D modifizierten Cryptophycine wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre zytotoxische Aktivität untersucht. Dazu wurde ein zellbasierter Resazurin-Assay etabliert. Die untersuchten Cryptophy-

3. Zusammenfassung

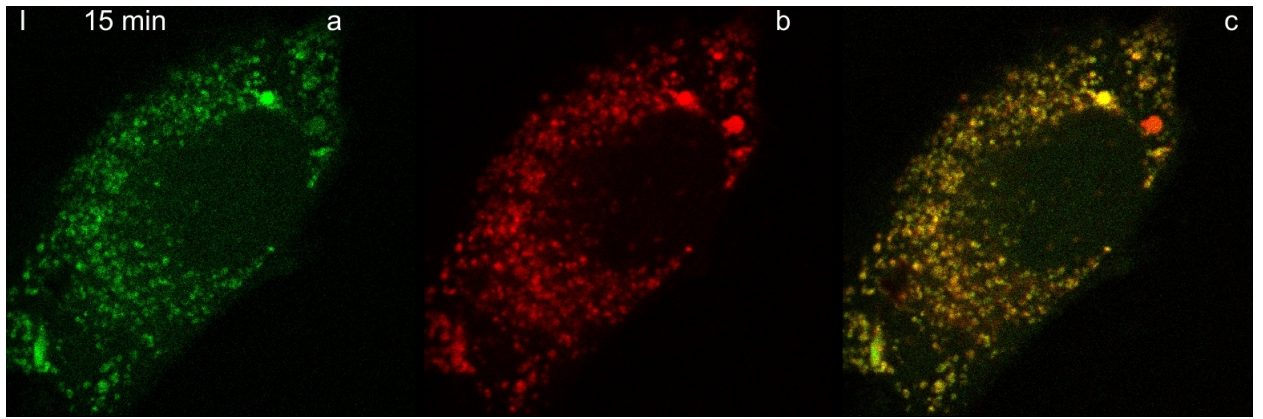


Abbildung 3.4.: Konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von WM-115 Zellen. Die Zellen sind 15 min inkubiert mit Konjugat 4; a) Fluorescein-Kanal (Anregung 458 nm) b) LysoTracker red-Kanal (Anregung: 561 nm) c) Overlay.

eine zeigten je nach Modifikation starke Unterschiede in ihrer biologischen Aktivität. Einige erreichten vergleichbare hohe Aktivitäten wie Cryptophycin-52 ($IC_{50} = 16 \text{ pM}$), z.B. der Methylhydroxymethylether CRY 30 mit einem IC_{50} -Wert von 23 pM. CRY 30 ($IC_{50} = 82 \text{ pM}$) übertrifft sogar Cryptophycin-52 ($IC_{50} = 261 \text{ pM}$) in der Aktivität gegen *multidrug*-resistente KB-V1 Zellen. Ein weiteres Ziel war die Erkennung von möglichen Konjugationsstellen für Biomoleküle an Cryptophycine. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Konjugation mit möglichst geringen Aktivitätsverlust am Fragment A und mit Abstrichen an Fragment D möglich ist.

Die zytotoxischen Eigenschaften der Cryptophycine sollten weiter untersucht werden, daher wurde ein *High Content Assay* etabliert. Dadurch kann in einer Messung basierend auf Fluoreszenzmikroskopie qualitativ und quantitativ bestimmt werden, ob ein Cryptophycin Nekrose und/oder Apoptose in den Zellen induziert.

Für die Interaktion von Cryptophycinen mit Tubulin wird eine nichtkovalente Bindung angenommen.^[12,72] Zur weiteren Untersuchung wurde ein in Benzylstellung ^{13}C -markiertes A-Fragment ausgehend von ^{13}C -Benzoessäure synthetisiert (s. Abb. 3.5), da eine Öffnung des Epoxids durch ein Nukleophil des Tubulins möglich ist.^[12,72] Ausgehend von diesem A-Fragment wurde ein markiertes Cryptophycin-52 dargestellt (s. Abb. 3.5). Die ^{13}C -Markierung soll einen NMR-spektroskopischen Nachweis dieser

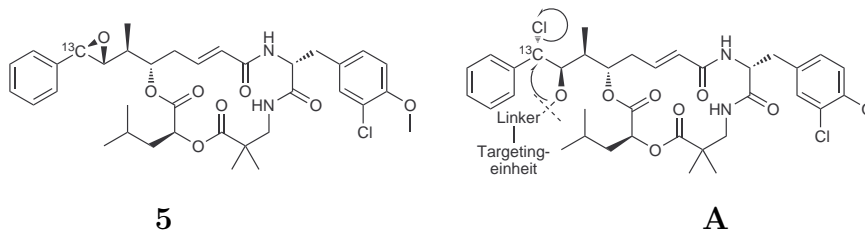


Abbildung 3.5.: **5**: Cryptophycin-52 mit ^{13}C -Isotopenmarkierung in Benzylstellung des A-Fragmentes. Mögliches Werkzeug für die Untersuchung der Cryptophycin-Tubulin Interaktion und kinetischer Studien der Prodrug-Aktivierung. **A**: Cryptophycin-Chlorhydrin Prodrug

Ringöffnung anhand der Verschiebung des Signals ermöglichen. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen des markierten Cryptophycins im wässrigen Medium des Tubulins konnten die eigentlichen NMR-Messungen nicht durchgeführt werden.

Ein weitere mögliche Einsatzmöglichkeit für das markierte Cryptophycin sind Kinetik-Messungen der Abspaltung des Cryptophycins vom Linker, wenn eine Konjugation des Cryptophycins über das Chlorhydrin des A-Fragmentes erfolgt (s. Abb. 3.5 **A**).

3. Zusammenfassung

4. Summary

The members of the natural product family of cryptophycins display very high cytotoxicity.^[5,6] Even for multidrug-resistant (e.g. MDR1 expressing) cell lines, like KB-V1, the IC₅₀ value is in the picomolar range (cryptophycin-52 = 261 pM). However, clinical application failed due to excessive side-effects.^[10,11] Many structure-activity relationship (SAR) studies were conducted to increase activity and accordingly to this decrease adverse reaction.^[16,18,22-24]

Another goal besides the SAR studies is the synthesis of cryptophycin prodrugs. Prodrugs are biologically inactive conjugates of a drug and a targeting unit, leading to an enrichment of the drug (e.g. cryptophycins) in or around the cancer cell. There, linkage is cleaved and the active cryptophycin is released. This strategy allows to administer higher doses which only affect cancer cells and reduces side-effects.

Two different targeting units, both based on the cyclic RGD peptide c-[RGDfK-] were synthesized, using microwave-assisted automated and manual solid phase peptide synthesis. In prodrug **3** a c-[RGDfK-] monomer is the targeting unit, whereas in prodrug **2** a glutamate-linked c-[RGDfK-]-dimer serves as targeting unit. The amino group of the glutamate was used to attach an azide-functionalised linker based on

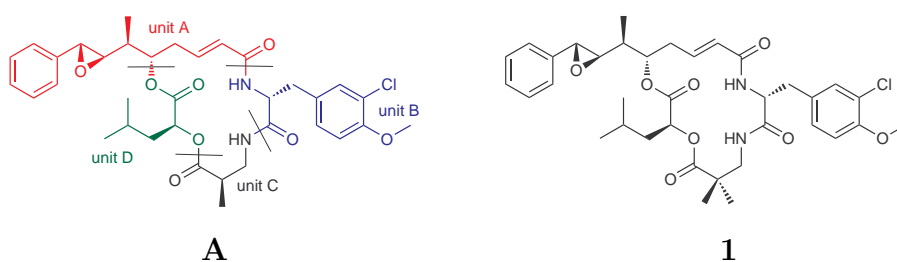


Figure 4.1.: **A**: Cryptophycin-1, first known cryptophycin. Units A–D are marked by color; **1**: Cryptophycin-52, a synthetic analogue of cryptophycin-1.

4. Summary

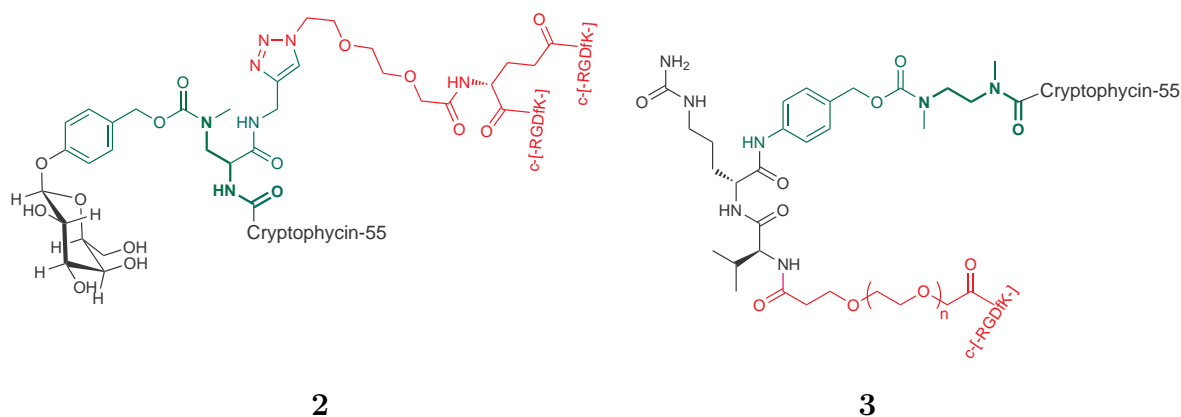
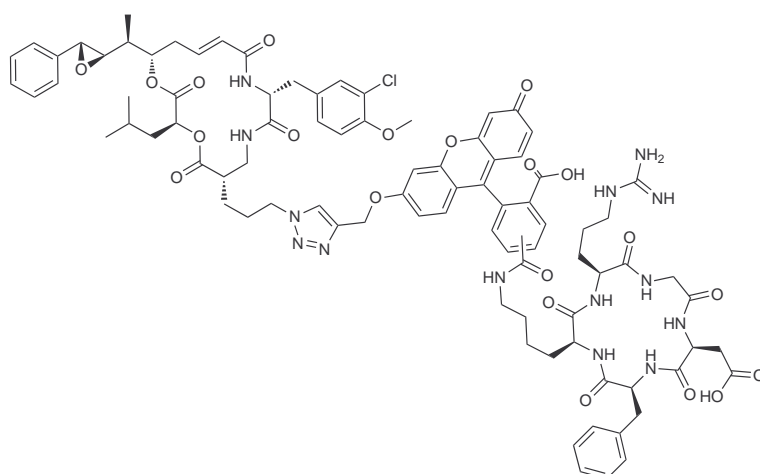


Figure 4.2.: **2**: Cryptophycin prodrug with glucuronic acid as activation unit; **3**: Cryptophycin prodrug using –Val–Cit– sequence for activation by cathepsin B; targeting units are marked in red, the self-immolative linker in green.

triethylenglycol. The resulting targeting unit can then be coupled to a prodrug precursor via copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition (click chemistry). First test reactions were performed for the glucuronic acid-based activation unit of prodrug **2** during synthesis scheduling.

It is known in literature, that c-[RGDfK-] conjugates are endocytosed by an integrin mediated mechanism.^[48,69,70] However, it is not known, where the conjugates are located after endocytosis inside the cell. For this purpose, an RGD-cryptophycin-fluorescein conjugate was synthesized (see fig. 4.3). The synthesis of the azide functionalised cryptophycin CRY 26, the synthesis of the alkyne functionalized fluorescein and the cycloaddition for coupling the fluorescein and also the cryptophycin were done by CHRISTINE WEISS and MARKUS NAHRWOLD during their theses.^[71] Synthesis of the targeting unit, coupling of the targeting unit to 5(6)-carboxyfluorescein, preparation of the biological test (e.g. cell cultur) and accomplishing of the localisation studies was done during this thesis. RALF PALMISANO took the confocal fluorescence microscopy picture at the University of Erlangen (see fig. 4.4).

It could be shown, that after 15 min the RGD-cryptophycin conjugate is endocytosed by the cells. Most of the conjugate is localized inside the lysosomes. This was proven by colocalization with LysoTrackerTM which only stains lysosomes. If the incubation time is prolonged, the percentage of conjugate localized in lysosomes increases to al-



4

Figure 4.3.: RGD–cryptophycin–fluorescein conjugate for uptake and localisation studies.

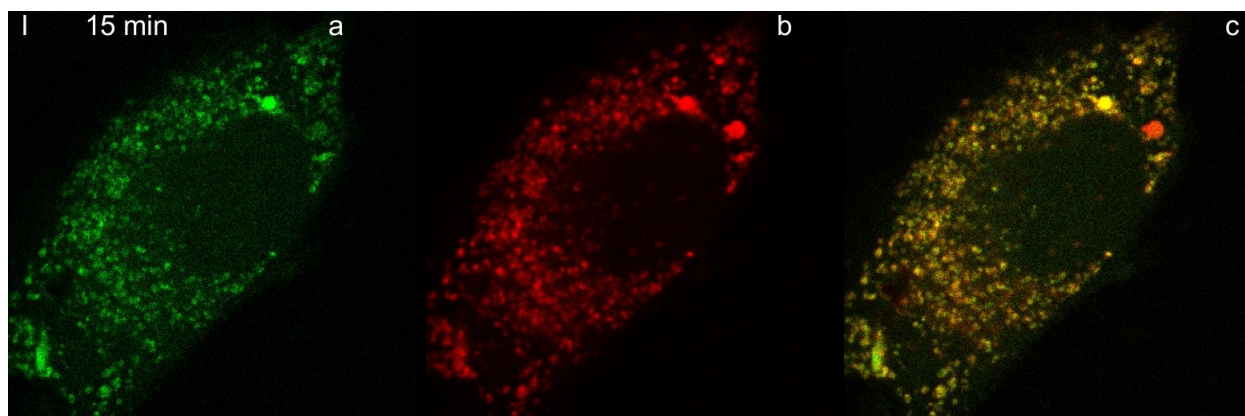


Figure 4.4.: Confocal microscopy picture of WM-115 cells after 15 min incubation with conjugate 4; a) fluorescein channel (excitation 458 nm) b) LysoTracker red channel (excitation: 561 nm) c) overlay.

4. Summary

most 100 %. The knowledge, that the RGD–cryptophycin conjugate is localized inside lysosomes after endocytosis can be used to design a linker, which is cleaved exactly under the conditions inside the lysosomes thereby releasing the active cryptophycin. Also a couple of new cryptophycin analogues were synthesized by my colleagues for SAR studies. The cytotoxicity of these analogues, which are modified in unit A, C and D, were investigated during this thesis. First of all, a cell–based resazurin assay was optimized. Afterwards new cryptophycin analogues were tested for cytotoxicity against KB-3-1 and multidrug–reistant KB-V1 cell lines. Some analogues show cytotoxicity equal to cryptophycin-52 ($IC_{50} = 16$ pM). The analogue methylhydroxymethyl ether CRY 30 for example has an IC_{50} value of 23 pM for KB-3-1 cells. Against multidrug–resistant KB-V1 cells CRY 30 ($IC_{50} = 82$ pM) is even more cytotoxic than cryptophycin-52 ($IC_{50} = 261$ pM). The results showed also that unit A contains an applicable site for conjugation with biomolecules. Also unit D exhibits similiar sites with some limitations. The characteristics of the cytotoxicity of the cryptophycins should be further investigated. Therefore, a fluorescence microscopy–based high content assay was optimized. This high content assay allows to determine qualitatively and quantitatively whether a cryptophycin induces necrosis and/or apoptosis.

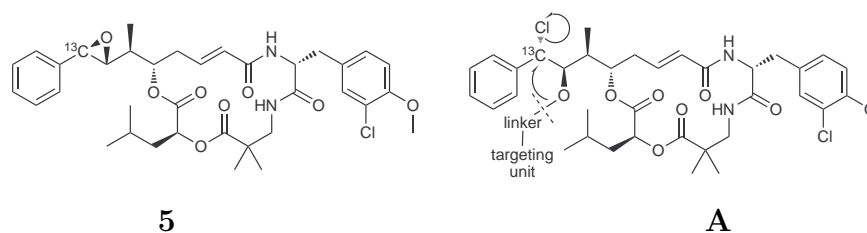


Figure 4.5.: **5**: ^{13}C -labelled cryptophycin-52. Possible tool for the investigation of the cryptophycin–tubulin interaction and kinetic studies of drug–release.

A: Cryptophycin chlorohydrin prodrug.

It has been suggested that the interaction between cryptophycin and tubulin is based on noncovalent binding.^[12,72] However, if there is covalent binding, it is most probable that the epoxide is opened by a nucleophile of the tubulin.^[12,72] For further investigation of this binding, a unit A derivative, ^{13}C -labelled in benzylic position, was synthesized starting from ^{13}C -benzoic acid (see fig. 4.5). A labelled cryptophycin was synthesized using the labelled unit A. NMR spectroscopy should enable to prove ring opening by a

tubulin nucleophile. Due to solubility problems of the labelled cryptophycin in aqueous medium, the NMR spectroscopy experiments were not successful.

The labelled cryptophycin can also be used for kinetic measurements of drug release if the cryptophycin is connected over the chlorhydrin of unit A to the linker (see fig 4.5 **A**).

4. *Summary*

Teil III.

Experimenteller Teil

5. Materialien

Arbeitstechniken:

Reaktionen, die den Ausschluß von Feuchtigkeit und/oder Sauerstoff erfordern, wurden in ausgeheizten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dazu wurden die Gefäße evakuiert (0,05-0,01 mbar) und mit einem Heißluftgebläse erhitzt. Die Apparaturen wurden unter Vakuum abgekühlt und anschließend mit getrockneten Argon befüllt. Das Argon der Qualitätsstufe 4,6 (99,9996 %) wurde über Sicapent[®] getrocknet. Die feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden wie die sauerstoffempfindlichen Reaktionen unter einer statischen Argonatmosphäre durchgeführt. Lösungsmittelreste wurden im Drehschieberpumpenvakuum ($\leq 0,05$ mbar) von den Produkten abgetrennt.

Chemikalien und Reagenzien:

Chemikalien und Reagenzien wurden in angemessener Qualität bezogen und wurden, wenn nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung verwendet. Trimethylorthoformiat wurde durch fraktionierte Destillation aufgereinigt.

Lösungsmittel:

Dichlormethan wurde generell über Kaliumcarbonat destilliert. Für wasserfreie Reaktionen wurde es zusätzlich über Calciumhydrid absolutiert. DMF, Et₂O und Petrolether (PE) wurden ebenfalls destilliert verwendet. Et₂O wurde durch Destillation über Natrium/Benzophenonketylradikal absolutiert. DMF wurde im Vakuum über Ninhydrin destilliert, Et₂O über KOH destilliert, vom Petrolether wurde der Siedebereich 40-60 °C verwendet. *n*-Hexan wurde ebenfalls nur destilliert verwendet. Ethylenglykol wurde über Natriumsulfat getrocknet, fraktioniert abdestilliert, mit Natrium versetzt und nochmals fraktioniert destilliert. Dimethylether (DME) wurde zur Trocknung, wie THF, über Natrium/Benzophenonketylradikal destilliert. Für Lösungen und das Waschen von Phasen wurde deionisiertes Wasser eingesetzt, für alle biologischen Unter-

5. Materialien

suchungen wurde Reinstwasser verwendet. Dieses wurde mittels einer Milli-Q biocel Anlage der Firma MILLIPORE hergestellt.

Chromatographie:

Zur Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel 60 (MERCK) auf Aluminiumfolie verwendet. Die stationäre Phase enthält den Fluoreszenzfarbstoff F₂₅₄. Die Detektion erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm. In einigen Fällen erfolgte anschließend eine Färbung mit Ninhydrin-Lösung (5 % in EtOH) oder Ammoniumheptamolybdat/Cer(IV)sulfat-Reagenz (50,0 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 2 g Ce(SO₄)₂, 50 ml konz. H₂SO₄, 898 ml H₂O). Die stationäre Phase für die präparative Flash-Säulenchromatographie war ebenfalls Kieselgel 60 (MACHEREY-NAGEL), die Korngröße wird angegeben.

NMR-Spektroskopie:

Die Spektren wurden mit folgenden BRUKER-Geräten aufgenommen: ARX 250 (¹H: 250 MHz, ¹³C: 63 MHz), Avance III 300 (¹H: 300 MHz, ¹³C: 75 MHz), DRX 500 (¹H: 500 MHz, ¹³C: 126 MHz), Avance 600 (¹H: 600 MHz, ¹³C: 151 MHz). Wenn nicht anders angegeben wurden die Spektren bei 298 K aufgenommen. Das Lösungsmittel der Proben wird angegeben, bei Messung in CDCl₃ wurde Tetramethylsilan als Standard (¹H, ¹³C: 0,00 ppm) zugesetzt. Die Kalibrierung bei anderen Lösungsmitteln erfolgte anhand des Lösungsmittelsignals (DMSO-d₆: ¹H: 2,50 ppm, ¹³C: 39,5 ppm; Aceton-d₆: ¹H: 2,05 ppm, ¹³C: 29,8 ppm; 206,3 ppm; D₂O: ¹H: 4,79 ppm).^[73]

IR-Spektroskopie:

Alle Proben wurden auf einem Nicolet 380 FT-IR Spektrometer mit ATR Zelle der Firma THERMO SCIENTIFIC vermessen.

Massenspektrometrie:

ESI-Massenspektren wurden mit einem Ionenfallen-ESI-Massenspektrometer (Esquire 3000) der Firma BRUKER DALTONIK aufgenommen. Alle EI-Massenspektren wurden auf einem Autospec X (FISONS) gemessen. Massenfeinbestimmungen (HRMS) wurden an einem FT-ICR-Massenspektrometer des Typs APEX III (BRUKER DALTONIK)

durchgeführt. Ein Voyager DE der Firma PE BIOSYSTEMS wurde für alle MALDI-ToF-Massenspektren eingesetzt. Als Matrix kamen 2,4-Dihydroxybenzoesäure (DHB), α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (CHCA) und „Super-DHB“ zum Einsatz.

- DHB-Matrix
10 mg DHB
500 μ l ACN
500 μ l MPW
1 μ l TFA
- CHCA-Matrix
10 mg CHCA
500 μ l ACN
500 μ l MPW
1 μ l TFA
- Super-DHB-Matrix
Lösung A: 10 mg DHB in 20 % ACN
Lösung B: 10 mg 5-Methoxysalicylsäure in 50 % ACN
Lösung A mit Lösung B im Verhältnis 9:1 mischen

Analytische HPLC:

Als HPLC-Geräte kamen sowohl eine Accela als auch eine SpectraSYSTEM, beide von THERMO SCIENTIFIC, zum Einsatz. Die Accela Anlage besteht aus dem Accela PDA Detektor (Diodenarray), dem Accela Autosampler und der Accela 600 Pumpe. Die Accela Anlage war mit folgender Säule ausgestattet: Hypersil Gold, 3 μ m, 150 \times 2,1 mm (THERMO SCIENTIFIC). Das SpectraSYSTEM besteht aus dem UV6000LP Diodenarray-Detektor, dem AS100 Autosampler und der Pumpe P4000. Als Säule wurde eine Jupiter, 5 μ m, C₁₈, 300 Å, 250 \times 4,6 mm (PHENOMENEX) verwendet. Standardmäßig erfolgte die Messung der Absorption bei 220 nm und 254 nm. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Eluent A (H₂O/CH₃CN/TFA 95:5:0,1 v/v/v) und aus Eluent B (H₂O/CH₃CN/TFA 5:95:0,1 v/v/v) verwendet. Bei beiden Anlagen kamen Vorsäulen der Firma PHENOMENEX (C₁₈, 4 \times 3,0 mm) zum Einsatz.

5. Materialien

Methode 1

Flußrate: 0,7 ml/min

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
5,0	0	100
6,0	100	0
6,5	100	0

Methode 2

Flußrate: 1,0 ml/min

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
3,0	100	0
40,0	0	100
50,0	100	0

Methode 3

Flußrate: 1,0 ml/min

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
3,0	100	0
30,0	0	100
40,0	100	0

Methode 4

Flußrate: 1,0 ml/min

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
3,0	65	35
20,0	0	100
22,0	100	0

Präparative HPLC:

Für präparative HPLC standen zwei Anlagen zur Verfügung, eine LaChrom der Firma MERCK HITACHI bestehend aus dem Interface D-7000, dem UV-Vis Detektor L-7420 und der Pumpe L-7150 ausgestattet mit einer Jupiter, 10 μm , C_{18} , 300 \AA , 250 \times 21,2 mm (PHENOMENEX) als Säule. Die zweite Anlage besteht aus der Pumpe P-4000 und dem UV-Vis Detektor UV-1000, beides Produkte der Firma THERMO SCIENTIFIC. Folgende C_{12} -Säule wurde verwendet: Jupiter, 10 μm , 300 \AA , 250 \times 21,2 mm. Als Eluenten wurden Mischungen folgender Eluenten verwendet: Eluent A ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ 95:5:0,1 v/v/v); Eluent B ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ 5:95:0,1 v/v/v).

Methode 5

Flußrate: 10 ml/min

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
5,0	100	0
35,0	0	100
40	0	100
45,0	100	0

Methode 6

Flußrate: 10 ml/min

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
5,0	100	0
35,0	30	70
40,0	30	70
45,0	100	0

5. Materialien

Methode 7

Flußrate: 7,5 ml/min

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
3,0	100	0
25,0	45	55
30,0	0	100
32,0	100	0

Methode 8

Flußrate: 10 ml/min

min	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
3,0	100	0
40,0	50	50
45,0	0	100

Gas-Chromatographie:

Alle Gas-Chromatogramme wurden mit einem SHIMADZU GC-17A mit Autosampler (AOC-20i) gemessen. Trägergas ist Wasserstoff. Die Detektion erfolgte über einen Flammenionisationsdetektor. Die Detektortemperatur betrug 300 °C; die Injektortemperatur war 280 °C. Folgende Säule war installiert: HP-5MS (quervernetzt 5 % PH ME Siloxan, 25 m × 0,20 mm × 0,33 µm Filmdicke; HEWLETT PACKARD).

Methode A

Pretreatment oc3.AoC; Flußrate: 0,4 ml/min

min	Temperatur [°C]
0	60
2,0	60
15,0	270
30	270

Fluoreszenzmikroskopie

Erste Versuchsmessungen zur Optimierung des Versuchsaufbaus wurden an einem Fluoreszenzmikroskop DM5000 B der Firma LEICA durchgeführt. Als Lichtquelle ist ein X-Cite 120PC von EXFO installiert. Die Aufnahmen wurden mit dem Kamerasystem DFC350FX von LEICA aufgenommen. Für die finalen Kolokalisierungsstudien wurde ein inverses konfokales Laser Scanning Mikroskop des Typs SP5 II *Fast Resonant Scanner* (LEICA) eingesetzt. Das Fluorescein-Derivat wurde mit dem Licht eines Argonlasers der Wellenlänge 458 nm angeregt. Die Anregung des LysoTracker erfolgte mit einem diodengepumpten Festkörperlaser (*diode pumped solid state*; DPSS) bei einer Wellenlänge von 561 nm. Die Filter für die Fluoreszenz des Fluoresceins haben eine hohe Transmission für die Wellenlängen von 498-571 nm und für die Fluoreszenz des LysoTrackers von 600-709 nm. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm LAS AF 2.2.1 build 4842 von LEICA bearbeitet.

Geräte

Autoklav Typ 2540 EL V	SYSTEC GmbH (Wettenberg)
Inkubator 311	FORMA SCIENTIFIC (Marietta, USA)
Cleanbench HS12	HEREAUS (Hanau)
Digitalkamera C-4040 Zoom	OLYMPUS (Hamburg)
Mikrotiterplatten-Reader M200 Infinite	TECAN (Crailsheim)
Mikrowellen Peptidsynthesizer Liberty	CEM (Kamp-Lintfort)
pH-Meter MP 220	METTLER TOLEDO (Gießen)
pH-Elektrode Inlab 420	METTLER TOLEDO (Gießen)
Spritzenpumpe Modell 200	KD SCIENTIFIC (Holliston, USA)
UV-Spektrometer Helios γ	SPECTRONIC UNICAM (Leeds, UK)
Analysenwaage XS105	METTLER TOLEDO (Gießen)
Laborwaage FA-210-4i	FAUST (Meckenheim)
Laborwaage BP410S	SARTORIUS (Göttingen)
Zentrifuge MiniSpin	EPPENDORF (Hamburg)
Zentrifuge 5804 R R	EPPENDORF (Hamburg)
Zentrifugen-Ausschwingrotor A-04-62	EPPENDORF (Hamburg)
Zentrifugen-Festwinkelrotor F-34-06-38	EPPENDORF (Hamburg)
Zentrifugen-Festwinkelrotor F-45-30-11	EPPENDORF (Hamburg)

5. Materialien

Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen	BRAND (Wertheim)
Einwegküvetten	BRAND (Wertheim)
Mikrotiterplatten, Polystyrol, 96 well	NUNC; SARSTEDT; GREINER BIO ONE (Langensfeld, Nümbrecht, Frickenhausen)
Mikrotiterplatten Glasboden, 96 well	GREINER BIO ONE (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	SARSTEDT (Nümbrecht)
PE-Röhrchen (15 und 50 ml)	SARSTEDT; GREINER BIO ONE (Nümbrecht, Frickenhausen)
Reaktionsgefäße	SARSTEDT (Nümbrecht)
Spritzenfilter 0,2 und 0,45 μm	SARSTEDT; PALL (Nümbrecht, Dreieich)
Sterilfilter, Cellulose, 0,22/0,45 μm	GE HEALTHCARE (München)

Software

Chromquest 5.0 Version 3.2.1	THERMO SCIENTIFIC (Schwerte)	HPLC
Chromquest 2.51 Version 3.2.1	THERMO SCIENTIFIC (Schwerte)	HPLC
OMNIC 7.3	THERMO SCIENTIFIC (Schwerte)	FT-IR
MestreNova 6.0.4-5850	MESTRELAB RESEARCH (Santiago de Compostela, Spanien)	NMR-Prozessierung und Analyse
GraphPad Prism 4.03	GRAPHPAD SOFTWARE (San Diego, USA)	Datenauswertung
Voyager Instrument Control Panel Version 5.10	APPLIED BIOSYSTEMS (Darmstadt)	MALDI-ToF
Data Explorer Version 4.0.0.0	APPLIED BIOSYSTEMS (Darmstadt)	MALDI-ToF
LAS AF 2.2.1 build 4842	LEICA (Wetzlar)	CLSM
Pepdriver 2.5.4	CEM (Kamp-Lintfort)	Mikrowellen- Peptidsynthesizer

Sonstiges

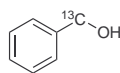
- Resazurinlösung
 - 116 mM NaCl
 - 26 mM NaHCO₃
 - 500 ml H₂O
 - 175 μM Resazurin
 - pH 7,3
- 10 × Trypsinlösung/EDTA; (PAA)
 - 5,0 mg/ml Trypsin (porcine)
 - 2,2 mg/ml EDTA (Titriplex III)
 - PBS Ca²⁺/Mg²⁺ frei
 - pH 7,0-7,5
- Medium DMEM (Glukose: 4,5 g/l; mit L-Glutamin, Natriumpyruvat (PAA))
- 3,7 % *para*-Formaldehyd, pH 7,4 in PBS
- ProLong Gold (INVITROGEN)
- FBS Gold (PAA)

5. *Materialien*

6. Experimenteller Teil

6.1. Synthese des ^{13}C -markierten Cryptophycin-52

Reduktion von ^{13}C -Benzoessäure zu ^{13}C -Benzylalkohol (**6**)



6

Unter wasserfreien Bedingungen werden 387 mg (10,2 mmol; 3 Äquiv.) LiAlH_4 in 6 ml abs. Et_2O suspendiert. 418 mg ^{13}C -Benzoessäure (3,40 mmol; 1 Äquiv.) werden in 12 ml abs. Et_2O gelöst und über 20 min der Lithiumalanat-Suspension zugetropft. Die Reaktionslösung wird über Nacht refluxiert. Zum Beenden der Reaktion wird im Eisbad gekühlt und vorsichtig H_2O zugetropft bis kein H_2 mehr entsteht. Der sich bildende farblose Niederschlag wird durch Zutropfen von 10 %iger Schwefelsäure aufgelöst. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase mit Et_2O (4×25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) und im Hochvakuum (HV) entfernt. Das Rohprodukt ist ein klares, farbloses Öl. In der Dünnschichtchromatographie (DC) erkennbare leichte Verunreinigungen werden mittels Flash-Chromatographie (Kieselgel 60; 0,040-0,063 mm; *n*-Hexan/ EtOAc 8:1) abgetrennt. 301 mg (2,76 mmol; 81 %) ^{13}C -Benzylalkohol **6** werden als farblose Flüssigkeit erhalten.

Summenformel: $\text{C}_6^{13}\text{CH}_8\text{O}$ (109,14 g mol $^{-1}$).

6. Experimenteller Teil

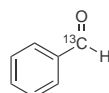
R_f (*n*-Hexan/EtOAc 8:1) = 0,15.

MS (EI, Kationen-Modus): $m/z = 109,0$ $[M]^+$ (berechnet für $[C_6^{13}CH_8O]^+$: 109,1); 92,0 $[M-OH]^+$ (berechnet für $[C_6^{13}CH_7]^+$: 92,1); 77,0 $[M-^{13}CH_3O]^+$ (berechnet für $[C_6H_5]^+$: 77,0); 51,0 $[M-C_2^{13}CH_5O]^+$ (berechnet für $[C_4H_3]^+$: 51,0).

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7,49-7,45 (m, 2H, Ph), 7,38-7,34 (m, 3H, Ph), 4,68 (d, 2H, $^1J_{CH} = 143,3$ Hz, CH_2), 3,46 (m, 1H, OH).

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 65,4 (C^1), 127,0 (d, 2C, $^2J = 3,3$ Hz, C^3 , C^7), 127,7 (C^5), 128,6 (d, 2C, $^3J = 4,5$ Hz, C^4 , C^6), 140,1 (d, $^1J = 47,1$ Hz, C^2).

Oxidation von ^{13}C -Benzylalkohol zu ^{13}C -Benzaldehyd (**7**)



7

1,45 g Pyridiniumchlorochromat (6,70 mmol; 1,5 Äquiv.) werden in abs. Dichlormethan (DCM) suspendiert. Zu dieser orangenen Suspension werden 500 mg ^{13}C -Benzylalkohol (**6**; 4,62 mmol; 1 Äquiv.) gelöst in 22 ml abs. DCM langsam zugetropft. Die Suspension verfärbt sich langsam schwarz. Nach vierstündigem Rühren bei RT werden 110 ml abs. Et_2O zugegeben, wobei sich die Suspension braun verfärbt. Die Lösung wird vom Feststoff abdekantiert und der Feststoff anschließend mit abs. Et_2O (3 \times) gewaschen. Die vereinigten, organischen Fraktionen werden durch 3 cm Florisil[®] (60-100 mesh) filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) und HV entfernt. 431 mg (4,10 mmol; 88 %) ^{13}C -Benzaldehyd **7** werden als farblose, aromatisch duftende Flüssigkeit isoliert.

Summenformel: $C_6H^{13}C_6O$ (107,12 g mol⁻¹).

R_f (EtOAc/Petrolether 1:1) = 0,64.

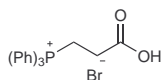
GC(M2): t_R = 6,69 min.

MS (EI, Kationen-Modus): m/z = 107,0 $[\text{M}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_6^{13}\text{CH}_6\text{O}]^+$: 107,1); 77,0 $[\text{M}-^{13}\text{CHO}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$: 77,0) 51,0 $[\text{M}-\text{C}_2^{13}\text{CH}_3\text{O}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_4\text{H}_3]^+$: 51,0).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 10,04 (d, 1H, $^1J_{\text{CH}} = 172,4$ Hz, CHO), 7,90 (m, 2H, C^3H , C^7H), 7,65 (m, 1H, C^5H), 7,55 (m, 2H, C^4H , C^6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 129,0 (d, 2C, $^3J = 4,5$ Hz, C^4 , C^6), 129,8 (d, 2C, $^2J = 4,0$ Hz, C^3 , C^7), 134,5 (C^5), 136,4 (d, $^1J = 53,5$ Hz, C^2), 192,5 (C^1).

Propansäuretriphenylphosphoniumbromid (8)



8

Basierend auf einer Literaturvorschrift^[74] werden 3,56 g Triphenylphosphin (13,6 mmol; 1,04 Äquiv.) und 2,02 g 3-Brompropionsäure (13,1 mmol; 1 Äquiv.) unter wasserfreien Bedingungen vermischt und für 4 h bei 120 °C gerührt. Die Reaktionsschmelze wird abgekühlt und mit Et_2O gewaschen. Anschließend wird die erstarrte Schmelze mittels Spatel und Ultraschall zerkleinert. Es wird Et_2O zugegeben und über Nacht gerührt, wodurch 4,90 g (11,8 mmol; 89 %) Propansäuretriphenylphosphoniumbromid **8** als homogener farbloser Niederschlag erhalten werden.

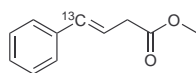
Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrO}_2\text{P}$ (415,26 g mol^{-1}).

6. Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 10,03 (s, 1H, COOH), 7,83-7,69 (m, 15H, Ph), 3,77 (m, 2H, C^2H_2), 3,03 (m, 2H, C^3H_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 19,0 (d, $^1J_{\text{PC}} = 55,0$ Hz, C^3H_2), 28,2 (d, $^2J_{\text{PC}} = 2,1$ Hz, C^2H_2), 117,5 (d, 3C, $^1J_{\text{PC}} = 86,7$ Hz, $\text{C}^{1'}$), 130,7 (d, 4C, $^2J_{\text{PC}} = 12,6$ Hz, $\text{C}^{2',6'}$), 133,7 (d, 4C, $^3J_{\text{PC}} = 10,1$ Hz, $\text{C}^{3',5'}$), 135,4 (d, 2C, $^4J_{\text{PC}} = 2,6$ Hz, $\text{C}^{4'}$), 171,4 (d, $^3J_{\text{PC}} = 13,8$ Hz, C^1OO).

^{13}C -(*E*)-4-Phenylbut-3-ensäuremethylester (**9**)



9

7,59 g Propansäuretriphenylphosphoniumbromid (**8**; 18,3 mmol; 1,3 Äquiv.) werden unter wasserfreien Bedingungen in 37 ml abs. THF mittels Ultraschall (60 min) suspendiert. 1,51 g Benzaldehyd (**7**; 14,1 mmol; 1 Äquiv.) werden hinzugefügt und die Suspension im Aceton/Trockeneisbad auf -20 °C gekühlt. Über 40 min wird eine Lösung von 4,10 g Kalium-*tert*-butoxid (36,6 mmol; 2,6 Äquiv.) in 91 ml abs. THF unter Rühren zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wird das Kältebad entfernt und weitere 6 h bei RT gerührt. 4,38 ml MeI (9,98 g; 70,4 mmol; 5 Äquiv.) werden mittels einer Kanüle zu der braungefärbten Reaktionsmischung hinzugefügt und weiter über Nacht gerührt. Zu der beigefarbenen Lösung werden 145 ml H_2O und 145 ml Et_2O (destilliert) hinzugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit Et_2O (4×145 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaHCO_3 -Lösung (2×145 ml) und 5 %iger KHSO_4 -Lösung gewaschen. Anschließend wird über NaSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Triphenylphosphinoxid wird durch Kristallisation aus EtOAc größtenteils entfernt. Der Überstand wird eingeeengt und säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 60; 0,040-0,063 mm; *n*-Hexan/ EtOAc 8:1). 861 mg (4,9 mmol; 35 %) ^{13}C -(*E*)-4-Phenylbut-3-ensäuremethylester (**9**) werden als farblose Flüssigkeit isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{10}^{13}\text{CH}_{12}\text{O}_2$ (177,21 g mol $^{-1}$).

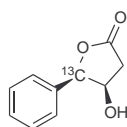
R_f (*n*-Hexan/EtOAc 8:1) = 0,24.

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 200,0$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $[\text{C}_{10}^{13}\text{CH}_{12}\text{NaO}_2]^+$: 200,07).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.37-7.20 (m, 5H, Ph), 6,47 (dd, 1H, $^1J_{\text{CH}} = 149,5$ Hz, $^3J = 15,9$ Hz, PhCH), 6,28 (m, 1H, PhCHCH), 3,68 (s, 3H, CH_3), 3,22 (dd, 2H, $^3J = 6,9$ Hz, $^2J = 1,2$ Hz, $\text{C}^\alpha\text{H}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 38,4 (d, $^2J = 35,7$ Hz, C^2), 52,0 (CH_3), 121,6 (d, $^1J = 73,6$ Hz C^3), 126,3 ($\text{C}^{3',5'}$), 127,6 ($\text{C}^{4'}$), 128,6 (d, $^2J = 4,4$ Hz, $\text{C}^{2',6'}$), 133,5 (PhC), 136,8 (d, $^1J = 56,2$ Hz, $\text{C}^{1'}$), 172,0 (COO).

^{13}C -(4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-5-phenyl-dihydrofuran-2(3*H*)-on (10)



10

5,16 g rotes Blutlaugensalz ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; 15,7 mmol, 2,5 Äquiv.) und 2,60 g K_2CO_3 (18,8 mmol, 3 Äquiv.) werden in 18 ml H_2O vorgelegt. 23,1 mg $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (62 μmol , 0,01 Äquiv.) werden mittels 8,8 ml Wasser in den Reaktionskolben überführt und anschließend 615 mg Methansulfonamid (6,5 mmol, 1 Äquiv.) und 48,4 mg (DHQD) $_2$ -PHAL (62 μmol , 0,01 Äquiv.) mit 8,8 ml *tert*-Butanol in den Kolben gespült. Die Reaktionslösung wird auf 0 °C abgekühlt und eine Lösung aus 1,1 g ^{13}C -(*E*)-4-Phenylbut-3-ensäuremethylester (**9**; 6,3 mmol, 1 Äquiv.) in 17 ml *tert*-Butanol addiert. Bei 0 °C wird 2 Tage kräftig gerührt bis das Edukt verbraucht ist (DC-Kontrolle; Hexan/EtOAc

6. Experimenteller Teil

1:1). Anschließend werden 15,9 g $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (63 mmol, 10 Äquiv.) als Lösung in 12 ml H_2O zugefügt und weitere 2 h gerührt, wobei sich die Reaktionslösung auf RT erwärmen darf. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird mit Et_2O (5×17 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit H_2O (17 ml), sowie mit ges. NaCl -Lösung (17 ml) gewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer i.V. (40°C Badtemperatur) entfernt. Der Rückstand wird in 17 ml EtOAc aufgenommen und durch eine 2-3 cm starke Silicagelschicht filtriert. Es wird mit viel EtOAc gespült, das Lösungsmittel wird wiederum im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird aus EtOAc/n -Hexan umkristallisiert. Die Kristalle werden aus der Mutterlauge isoliert und der Rückstand der Mutterlauge säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 60; 0,040-0,063 mm; n -Hexan/ EtOAc 1:1). 527 mg (2,94 mmol; 47 %) ^{13}C -(4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-5-phenyl-dihydrofuran-2(3*H*)-on (**10**) werden als farblose Kristalle isoliert.

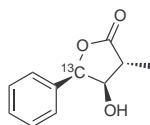
Summenformel: $\text{C}_9^{13}\text{CH}_{10}\text{O}_3$ ($179,18 \text{ g mol}^{-1}$).

R_f (n -Hexan/ EtOAc 1:1) = 0,13.

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 201,9$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (berechnet für [$\text{C}_9^{13}\text{CH}_{10}\text{NaO}_3$] $^+$: 202,05).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7,48-7,36 (m, 5H, Ph), 5,52 (dd, 1H, $^1J_{\text{CH}} = 149,1 \text{ Hz}$, $^3J = 3,3 \text{ Hz}$, $^3J = 3,3 \text{ Hz}$, PhCH), 4,62 (m, 1H, C^βH), 2,82 (ddd, 2H, $^3J_{\text{CH}} = 79,3 \text{ Hz}$, $^3J = 5,3 \text{ Hz}$, $^2J = 17,5 \text{ Hz}$, $\text{C}^\alpha\text{H}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 38,5 (C^α), 70,2 (d, $^1J = 31,3 \text{ Hz}$, C^β), 85,0 (C^γ), 126,3 (d, $^3J = 2,3 \text{ Hz}$, $\text{C}^{3',5'}$), 129,0 (d, $^2J = 3,6 \text{ Hz}$, $\text{C}^{2',6'}$), 129,1 ($\text{C}^{4'}$), 133,0 (d, $^1J = 51,3 \text{ Hz}$, $\text{C}^{1,\text{aryl}}$), 175,4 (COO).

^{13}C -(3*R*,4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-3-methyl-5-phenyl-dihydrofuran-2(3*H*)-on (11)

11

1,0 ml Diisopropylamin (717 mg, 7,39 mmol, 2,5 Äquiv.) werden in 18 ml trockenem THF auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. 4,6 ml *n*-BuLi (1,6 N, 471 mg, 7,35 mmol, 2,5 Äquiv.) werden tropfenweise zugegeben und die Lösung erst 15 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und anschließend 30 min ohne Kältebad, wobei sich die Reaktionslösung langsam erwärmt. Nachdem die Lösung wiederum auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt wurde, werden 527 mg ^{13}C -(4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-5-phenyl-dihydrofuran-2(3*H*)-on (**10**; 2,94 mmol; 1 Äquiv.), gelöst in 12 ml abs. THF, über 90 min zugetropft. Die Reaktionslösung wird für weitere 45 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und anschließend werden 0,6 ml MeI (1,3 g, 8,8 mmol, 1,2 Äquiv.) in 9,1 ml abs. THF über 150 min bei $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ zugegeben. Nach Beendigung der Zugabe wird weitere 2 Tage bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,4 ml Essigsäure in 0,6 ml THF gestoppt und die Reaktionsmischung auf RT erwärmt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer i.V. ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$ Badtemperatur) entfernt. Der pinke Rückstand wird in 20 ml Et₂O gelöst und mit H₂O (20 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wird mit Et₂O (4 × 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 5 %iger KHSO₄-Lösung (10 ml) sowie mit ges. NaCl-Lösung (10 ml) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i.V. ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$ Badtemperatur) entfernt wurde, wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel 60; 0,040-0,063 mm; *n*-Hexan/EtOAc 1:1) aufgereinigt. Es werden 324 mg (1,7 mmol; 57 %) ^{13}C -(3*R*,4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-3-methyl-5-phenyldihydrofuran-2(3*H*)-on (**11**) als viskoses Öl isoliert.

Summenformel: C₁₀¹³CH₁₂O₃ (193,21 g mol⁻¹).

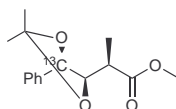
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,46-7,34 (m, 5H, C^{aryl}H), 5,60 (dd, ¹J_{CH} =

6. Experimenteller Teil

150,4 Hz, $^3J = 4,4$ Hz, 1H, $C^\gamma\text{H}$), 4,28 (ddd, $^2J_{\text{CH}} = 7,4$ Hz, $^3J = 3,3$ Hz, 4,4 Hz, 1H, $C^\beta\text{H}$), 2,75 (dq, $^3J = 7,6$ Hz, 3,2 Hz, 1H, $C^\alpha\text{H}$), 1,39 (d, $^3J = 7,7$ Hz, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 13,0 (CH_3), 43,5 (C^α), 75,9 (d, $^1J = 32,6$ Hz, C^β), 82,4 (C^γ), 126,3 (d, $^3J = 3,0$ Hz, $C^{3',5'}$), 129,0 (d, $^2J = 4,2$ Hz, $C^{2',6'}$), 129,0 ($C^{4'}$), 133,1 (d, $^1J = 51,5$ Hz, $C^{1'}$), 178,3 (COO).

^{13}C -(*R*)-2-[(4*R*, 5*R*)-2,2-Dimethyl-5-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl]propansäuremethylester (**12**)



12

2,1 ml 2,2-Dimethoxypropan (16,8 mmol, 10 Äquiv.) und 0,6 ml abs. Methanol werden zu einer Mischung aus 324 mg ^{13}C -(3*R*,4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-3-methyl-5-phenyldihydrofuran-2(3*H*)-on (**11**; 1,7 mmol, 1 Äquiv.) und 33,5 mg Amberlyst-15[®] pipettiert. Die Lösung wird 5 Tage bei RT gerührt, wobei sie sich dunkelrot färbt. Das Amberlyst-15[®] wird per Filtration abgetrennt und mit viel *n*-Hexan gewaschen. Die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung (5 ml) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Kieselgel 60; 0,040-0,063 mm; *n*-Hexan/EtOAc 1:1) werden 355 mg ^{13}C -(*R*)-2-[(4*R*, 5*R*)-2,2-Dimethyl-5-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl]propansäuremethylester (**12**) (1,33 mmol; 80 %) isoliert.

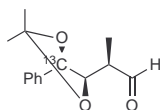
Summenformel: $\text{C}_{14}^{13}\text{CH}_{20}\text{O}_4$ (265,32 g mol⁻¹).

R_f (*n*-Hexan/EtOAc 1:1) = 0,37.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7,37-7,30 (m, 5H, $\text{C}^{\text{aryl}}\text{H}$), 4,74 (dd, $^1J_{\text{CH}} = 147,1$ Hz, $^3J = 8,5$ Hz, 1H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$), 4,11 (ddd, $^2J_{\text{CH}} = 6,0$ Hz, $^3J = 8,3$ Hz, 6,0 Hz, 1H, C^{β}H), 3,40 (s, 3H, COOCH_3), 2,68 (m, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$), 1,57 (s, 3H, CCH_3), 1,48 (s, 3H, CCH_3), 1,28 (d, $^3J = 7,0$ Hz, 3H, $\text{C}^{\alpha}\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12,9 ($\text{C}^{\alpha}\text{CH}_3$), 27,1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 27,2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 41,4 (C^{α}), 51,6 (CO_2CH_3), 81,3 (C^{γ}), 83,2 (d, $^1J = 35,1$ Hz, C^{β}), 109,0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 127,4 (d, $^3J = 2,9$ Hz, $\text{C}^{3',5'}$), 128,5 (d, $^2J = 4,2$ Hz, $\text{C}^{2',6'}$), 128,5 ($\text{C}^{4'}$), 128,6 (C^{aryl}), 137,2 (d, $^1J = 50,3$ Hz, $\text{C}^{1,\text{aryl}}$), 173,8 (CO_2CH_3).

^{13}C -(*R*)-2-[(4*R*,5*R*)-2,2-Dimethyl-5-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl]propanal (**13**)



13

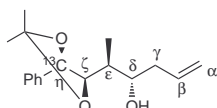
355 mg farblosen ^{13}C -(*R*)-2-[(4*R*, 5*R*)-2,2-Dimethyl-5-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl]propan säuremethylesters (**12**, 1,34 mmol, 1 Äquiv.) werden in 8,3 ml abs. Dichlormethan gelöst und auf -90 °C gekühlt. Langsam werden 3,1 ml DIBAL-H in Toluol (1 M; 3,1 mmol, 2,3 Äquiv.) zugetropft. Die Lösung wird für 4 h bei -78 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktion mit 1,7 ml trockenem Methanol gequencht und auf RT erwärmt. Nachdem Verdünnen der Lösung mit 31 ml Essigsäure (1 M), werden 31 ml *n*-Hexan zugefügt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit *n*-Hexan extrahiert (4×31 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Essigsäure (1 M; 15 ml) und ges. NaCl-Lösung (15 ml) gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 , wird sie durch Celite filtriert, wobei mit viel *n*-Hexan gespült wird. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) entfernt. Es werden 307 mg (1,3 mmol; 97 %) des instabilen Aldehyds **13** isoliert, welcher bei -80 °C bis zur Durchführung der Allylierung gelagert wird.

6. Experimenteller Teil

Summenformel: $^{13}\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$ (235,29 g mol $^{-1}$).

GC(M2): $t_R = 13,34$ min.

^{13}C -Fragment A (14)



14

560 mg MgBr $_2$ ·Et $_2$ O (2,17 mmol, 1,5 Äquiv.) werden in 2,2 ml abs. Dichlormethan durch 10 minütige Behandlung im Ultraschallbad suspendiert. Die Suspension wird auf -78 °C abgekühlt und 335 mg ^{13}C -(*R*)-2-((4*R*,5*R*)-2,2-Dimethyl-5-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl)propanal (**13**; 1,42 mmol, 1 Äquiv.) werden in 1,8 ml abs. Dichlormethan zu der Suspension gegeben. Es wird 15 min bei -78 °C gerührt, wobei eine Braunfärbung eintritt. 0,66 ml Allyltributylzinn (2,15 mmol, 714 mg, 1,5 Äquiv) gelöst in 4,5 ml abs. Dichlormethan werden über 1 h zugetropft und die Reaktionssuspension weitere 12 h bei -78 °C gerührt. Anschließend werden 66 ml Et $_2$ O und 17 ml H $_2$ O zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit Et $_2$ O (3×66 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung (17 ml) gewaschen und über Na $_2$ SO $_4$ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) entfernt wurde, wird das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel 60; 0,040-0,063 mm; *n*-Hexan/EtOAc 4:1) aufgereinigt. Es werden 218 mg (0,79 mmol; 55 %) ^{13}C -(2*S*, 3*S*)-2-[(4*R*,5*R*)-2,2-Dimethyl-5-phenyl-1,3-dioxolan-4-yl]hex-5-en-3-ol (**14**) und 83 mg des Aldehyds **13** (25 %) isoliert.

Summenformel: C $_{16}$ $^{13}\text{C}\text{H}_{24}\text{O}_3$ (277,37 g mol $^{-1}$).

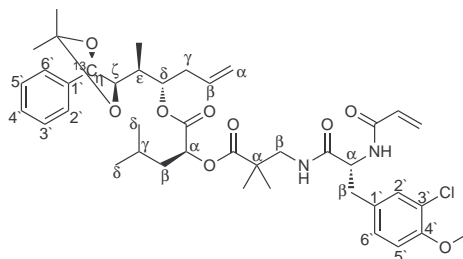
R $_f$ (*n*-Hexan/EtOAc 1:1) = 0,26.

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 300,1 [M+Na]^+$ (berechnet für $[C_{16}^{13}CH_{24}NaO_3]^+$: 300,17); $576,8 [2M+Na]^+$ (berechnet für $[C_{32}^{13}C_2H_{48}NaO_6]^+$: 577,34).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,37-7,29 (m, 5H, C^{aryl}H), 5,71 (ddt, 1H, ³J = 17,1 Hz, 10,2 Hz, 7,2 Hz, C^βH), 5,03-4,95 (m, 2H, C^αH₂), 4,78 (dd, 1H, ¹J_{CH} = 147,1 Hz, ³J = 8,9 Hz, C^ηH), 4,11 (m, 1H, C^ζH), 3,60 (m, 1H, C^δH), 2,33 (s, 1H, OH), 2,26 (m, 1H, C^γH₂), 2,14 (m, 1H, C^γH₂), 1,78 (m, 1H, C^εH), 1,57 (s, 3H, C(CH₃)), 1,50 (s, 3H, C(CH₃)), 1,08 (d, 3H, ³J = 7,0 Hz, C^εCH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 10,7 (d, ³J = 1,4 Hz, C^εCH₃), 27,1 (C(CH₃)₂), 27,2 (C(CH₃)₂), 36,2 (br s, C^ε), 39,5 (C^γ), 73,6 (d, ³J = 3,1 Hz, C^δ), 80,0 (C^η), 82,7 (d, ¹J = 35,3 Hz, C^ζ), 108,8 (C(CH₃)₂), 117,8 (C^α), 126,8 (d, ²J = 3,0 Hz, C^{3',5'}), 128,4 (C^{4'}), 128,6 (d, ²J = 3,8 Hz, C^{2',6'}), 134,8 (C^β), 137,6 (d, ¹J = 50,3 Hz, C^{1'}).

Geschütztes ¹³C-*seco*-ABCD-Fragment (15)



15

Das DCB-Fragment ist aufgrund der Acrylamidfunktion lichtempfindlich, daher werden alle Arbeiten möglichst unter Lichtausschluß durchgeführt. 99,8 mg partiell geschütztes DCB-Fragment (0,20 mmol, 1,1 Äquiv.) werden in 1,4 ml abs. THF und 92 μ l NEt₃ (66,9 mg, 0,66 mmol, 3,7 Äquiv.) gelöst und die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt. 38 μ l 2,4,6-Trichlorbenzoesäurechlorid (0,24 mmol, 58,9 mg, 1,3 Äquiv.) werden tropfenweise zugefügt und 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wird weitere

6. Experimenteller Teil

30 min ohne Kühlung gerührt. Die Lösung wird wiederum auf 0 °C abgekühlt und 49,9 mg Fragment A (**14**, 0,18 mmol, 1 Äquiv), sowie 32,9 mg 4-Dimethylaminopyridin (DMAP, 0,27 mmol, 1,5 Äquiv.) in 1,0 ml abs. THF gelöst über 15 min zugetropft. Im Anschluß wird 70 min lang im Dunkeln bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 ml ges. NH₄Cl-Lösung beendet und 50 ml Et₂O, 50 ml EtOAc und 10 ml H₂O zugefügt. Die Phasen werden getrennt, die wässrige Phase wird mit Et₂O/EtOAc (1:1, 3×30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 20 ml ges. NaHCO₃-Lösung und mit 20 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel werden am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) entfernt. Das Rohprodukt wird aufgrund der geringen Stabilität direkt im Anschluß unter Lichtausschluß säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 60; 0,040-0,063 mm; *n*-Hexan/EtOAc 1:1). 99,8 mg (0,13 mmol; 73 %) geschütztes ¹³C-*seco*-ABCD-Fragment **15** werden isoliert.

Summenformel: C₄₀¹³CH₅₅ClN₂O₉ (755,34 g mol⁻¹).

R_f (*n*-Hexan/EtOAc 1:1) = 0,20.

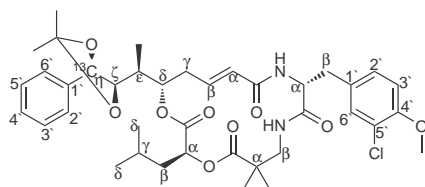
MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 778,4$ [M+Na]⁺ (berechnet für [C₄₀¹³CH₅₅ClN₂NaO₉]⁺: 778,35).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,35-7,39 (m, 5H, C^{aryl}H), 7,19 (d, 1H, ³J = 1,9 Hz, uB-C^{2'}), 7,11 (dd, 1H, ³J = 7,8 Hz, 4,5 Hz, uC-NH), 7,04 (dd, 1H, ³J = 8,4 Hz, 1,9 Hz, uB-C^{6'}), 6,81 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, uB-C^{5'}), 6,67 (d, 1H, ³J = 7,8 Hz, uB-NH), 6,27 (m, 1H, uB-NHC(O)CH=CH_B), 6,09 (dd, 1H, ³J = 17,0 Hz, 10,3 Hz, uB-NHC(O)CH=CH₂), 5,62 (dm, 1H, ²J = 10,4 Hz, uB-NHC(O)CH=CH_A), 5,55 (m, 1H, uA-C^βH), 4,96-5,00 (m, 3H, uA-C^αH_B, uA-C^δH, uD-C^αH), 4,89 (dm, 1H, ³J = 17,1 Hz, uA-C^αH_A), 4,76 (ddd, 1H, ³J = 7,8 Hz, 6,6 Hz, 6,1 Hz, uB-C^αH), 4,71 (dd, 1H, ¹J_{CH} = 120 Hz, ³J = 8,9 Hz, uA-CⁿH), 3,83 (dm, 1H, ²J_{CH} = 60,0 Hz, uA-C^ζH), 3,86 (s, 3H, uB-C^{4'}OCH₃), 3,58 (dd, 1H, ²J = 13,3 Hz, ³J = 8,3 Hz, uC-C^βH_B), 3,26 (dd, 1H, ²J = 13,3 Hz, ³J = 4,3 Hz, uC-C^βH_A), 3,08 (dd, 1H, ²J = 13,9 Hz, ³J = 6,1 Hz, uB-C^βH_B), 2,97 (dd, 1H, ²J = 13,9 Hz, ³J = 6,6 Hz, uB-C^βH_A), 2,33 (m,

1H, uA-C^γH_B), 2,26 (ddm, 1H, ²J = 14,6 Hz, ³J = 7,4 Hz, uA-C^γH_A), 1,92 (m, 1H, uA-C^εH), 1,65-1,74 (m, 2H, uD-C^βH_B, uD-C^γH), 1,57-1,53 (m, 1H, uD-C^βH_A), 1,52 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1,45 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1,18 (s, 3H, uC-C^αCH₃), 1,14 (s, 3H, uC-C^αCH₃), 1,12 (d, 3H, ³J = 6,9 Hz, uA-C^εCH₃), 0,94 (d, 3H, ³J = 6,3 Hz, uD-C^δH₃), 0,87 (d, 3H, ³J = 6,3 Hz, uD-C^δH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9,8 (uA-C^εCH₃), 21,1 (uD-C^δ), 22,1 (uC-C^αCH₃), 23,2 (uD-C^δ), 23,3 (uC-C^αCH₃), 24,7 (uD-C^γ), 27,1 (uA-C(CH₃)₂), 27,2 (uA-C(CH₃)₂), 34,8 (uA-C^ε), 35,5 (uA-C^γ), 37,5 (uB-C^β), 39,2 (uD-C^β), 43,8 (uC-C^α), 47,3 (uC-C^β), 54,2 (uB-C^α), 56,0 (uB-C^{4'}OCH₃), 70,6 (uA-C^δ), 80,2 (uA-C^η), 81,7 (d, ¹J = 34,8 Hz, uA-C^ζ), 108,9 (uA-C(CH₃)₂), 111,7 (uB-C^{5'}), 118,7 (uA-C^α), 121,8 (uB-C^{3'}), 126,7 (d, ³J = 2,5 Hz, uA-C^{3',5'}), 127,0 (uB-NHC(O)CH=CH₂), 128,5 (uA-C^{4'}), 128,6 (uB-C^{6'}), 128,7 (d, ²J = 3,7 Hz, uA-C^{2',6'}), 129,5 (uB-C^{1'}), 130,4 (uB-NHC(O)CH=CH₂), 131,1 (uB-C^{2'}), 132,3 (uA-C^β), 137,4 (d, ¹J = 50,4 Hz, uA-C^{1'}), 153,6 (uB-C^{4'}), 164,9 (uB-NHC(O)), 170,9 (C(O)NH/O), 171,6 (C(O)NH/O), 175,6 (uC-CO₂).

Geschütztes, zyklisches ¹³C-Depsipeptid **16**



16

103 mg geschütztes ¹³C-*seco*-ABCD-Fragment **15** (137 μmol, 1 Äquiv.) werden in 14 ml abs. DCM gelöst. Es werden 5,9 mg Grubbs-Katalysator der 2. Generation (6,9 μmol, 5 %-mol) als Feststoff zugegeben und die Reaktionsmischung refluxiert. Nach 6 h wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 60; 0,040-0,063 mm; *n*-Hexan/EtOAc 1:2). Es werden 74,8 mg des zyklischen Depsipeptids **16** (103 μmol; 75 %) isoliert.

6. Experimenteller Teil

Summenformel: $C_{38}^{13}CH_{51}ClN_2O_9$ (728,28 g mol⁻¹).

R_f (*n*-Hexan/EtOAc 1:2) = 0,24.

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 750,5 [M+Na]^+$ (berechnet für $[C_{38}^{13}CH_{51}ClN_2NaO_9]^+$: 750,32).

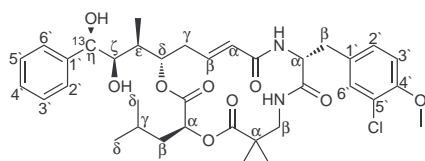
MS (ESI-MS, Anionen-Modus): $m/z = 726,5 [M-H^+]$ (berechnet für $[C_{38}^{13}CH_{50}ClN_2O_9]^-$: 726,32).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,40-7,30 (m, 5H, C^{aryl}H), 7,19 (d, 1H, ⁴J = 2,0 Hz, uB-C^{1'}H), 7,17 (m, 1H, NH), 7,05 (dd, 1H, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 2,0 Hz, uB-C^{6'}H), 6,84 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, uB-C^{5'}H), 6,63 (ddd, 1H, ³J = 15,0 Hz, 10,6 Hz, 4,4 Hz, uA-C ^{β} H), 5,66 (dd, 1H, ³J = 15,2 Hz, ⁴J = 1,0 Hz, uA-C ^{α} H), 5,54 (d, 1H, ³J = 7,9 Hz, NH), 5,08-5,00 (m, 1H, uA-C ^{δ} H), 4,78 (dd, 1H, ³J = 10,4 Hz, 3,7 Hz, uD-C ^{α} H), 4,72 (ddm, 1H, ³J = 7,6 Hz, 5,4 Hz, uB-C ^{α} H), 4,70 (dd, 1H, ¹J_{CH} = 145 Hz, ³J = 8,8 Hz, uA-C ^{η} H), 3,87 (s, 3H, uB-C^{4'}OCH₃), 3,79 (ddd, 1H, ³J = 8,8 Hz, 2,1 Hz, ⁴J = 2,0 Hz, uA-C ^{ζ} H), 3,38 (dd, 1H, ³J = 13,5 Hz, ²J = 8,4 Hz, uC-C ^{β} H_B), 3,14 (dd, 1H, ²J = 13,7 Hz, ³J = 3,7 Hz, uC-C ^{β} H_A), 3,12 (dd, 1H, ²J = 15,8 Hz, ³J = 5,1 Hz, uB-C ^{β} H_B), 3,04 (dd, 1H, ²J = 14,5 Hz, ³J = 7,6 Hz, uB-C ^{β} H_A), 2,46 (dm, 1H, ²J = 14,5 Hz, uA-C ^{γ} H_B), 2,21 (ddd, 1H, ²J = 14,5 Hz, ³J = 11,1 Hz, 11,0 Hz, uA-C ^{γ} H_A), 1,83 (m, 1H, uA-C ^{ϵ} H), 1,75 (ddd, 1H, ²J = 13,9 Hz, ³J = 10,4 Hz, 5,1 Hz, uD-C ^{β} H_B), 1,65 (m, 1H, uD-C ^{γ} H), 1,50 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1,46 (s, 3H, uA-C(CH₃)₂), 1,35 (ddd, 1H, ²J = 12,9 Hz, ³J = 7,5 Hz, 3,8 Hz, uD-C ^{β} H_A), 1,22 (s, 3H, uC-C ^{α} CH₃), 1,15 (s, 3H, uC-C ^{α} CH₃), 1,13 (d, 3H, ³J = 6,9 Hz, uA-C ^{ϵ} CH₃), 0,92 (d, 3H, ³J = 6,6 Hz, uD-C ^{δ} H₃), 0,83 (d, 3H, ³J = 6,6 Hz, uD-C ^{δ} H₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9,7 (uA-C ^{ϵ} CH₃), 21,4 (uD-C ^{δ}), 22,7 (uC-C ^{α} CH₃), 22,9 (uD-C ^{δ}), 23,0 (uC-C ^{α} CH₃), 24,7 (uD-C ^{γ}), 27,0 (uA-C(CH₃)₂), 27,2 (uA-C(CH₃)₂), 35,3 (uB-C ^{β}), 35,8 (uA-C ^{γ}), 36,8 (uA-C ^{ϵ}), 39,5 (uD-C ^{β}), 42,8 (uC-C ^{α}), 46,5 (uC-C ^{β}), 54,3 (uB-C ^{α}), 56,2 (uB-C^{4'}OCH₃), 71,1 (uD-C ^{α}), 75,8 (d, ³J =

2,4 Hz, uA-C $^{\delta}$), 80,2 (uA-C $^{\eta}$), 82,4 (d, $^1J = 35,1$ Hz, uA-C $^{\zeta}$), 109,1 (uA-C(CH $_3$) $_2$)
 112,3 (uB-C $^{5'}$), 122,5 (uB-C $^{3'}$), 124,4 (uA-C $^{\alpha}$), 126,6 (d, $^3J = 2,5$ Hz, uA-C $^{3',5'}$),
 128,3 (uB-C $^{6'}$), 128,6 (uA-C $^{4'}$), 128,7 (d, $^2J = 3,7$ Hz, uA-C $^{2',6'}$), 129,6 (uB-C $^{1'}$),
 130,1 (uB-C $^{2'}$), 137,6 (d, $^1J = 50,2$ Hz, uA-C 1), 142,4 (uA-C $^{\beta}$), 154,1 (uB-C $^{4'}$), 165,0
 (uA-CONH), 170,2 (C(O)NH/O), 170,3 (C(O)NH/O), 177,9 (C(O)NH/O).

Zyklisches ^{13}C -Depsipeptid (17)



17

91,5 mg geschütztes, zyklisches ^{13}C -Depsipeptid **16** (126 μmol , 1 Äquiv.) werden in 870 μl H $_2\text{O}$ und 1,9 ml Acetonitril (ACN) gelöst und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. 144 μl Trifluoressigsäure (TFA) (221 mg, 1,94 mmol, 15,4 Äquiv.) werden tropfenweise zugegeben und die Reaktionslösung 36 h gerührt, wobei sie auf RT erwärmt wird. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels DC (Probenvorbereitung: 1. Waschen mit NaHCO $_3$ -Lösung; 2. Extrahieren mit EtOAc, Eluent: EtOAc). Ist die Umsetzung unvollständig, werden nochmals 70 μl TFA zugegeben, nach 15 min erneut die Umsetzung überprüft und gegebenenfalls wiederum TFA zugegeben. Ist eine vollständige Umsetzung erreicht, wird die Reaktionslösung mit H $_2\text{O}$ versetzt, eingefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt (Kieselgel 60; 0,040-0,063 mm; EtOAc). Es werden 55,6 mg (80,9 μmol ; 64 %) farbloses Öl des zyklischen ^{13}C -Depsipeptids **17** isoliert.

Summenformel: C $_{35}$ ^{13}C H $_{47}$ ClN $_2$ O $_9$ (688,22 g mol $^{-1}$).

R $_f$ (EtOAc) = 0,30.

6. Experimenteller Teil

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 710,3$ $[M+Na]^+$ (berechnet für $[C_{35}^{13}CH_{47}ClN_2NaO_9]^+$: 710,29).

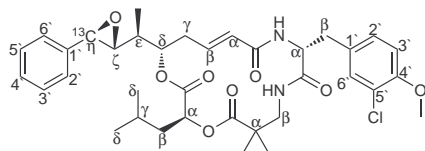
1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7,36-7,28 (m, 5H, uA-C^{aryl}H), 7,24 (dd, 1H, $^3J = 7,9$ Hz, 3,9 Hz, NH), 7,19 (d, 1H, $^3J = 2,0$ Hz, uB-C^{2'}H), 7,05 (dd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, uB-C^{6'}H), 6,82 (d, 1H, $^3J = 8,5$ Hz, uB-C^{5'}H), 6,72 (ddd, 1H, $^3J = 15,1$ Hz, 10,8 Hz, $^3J = 4,2$ Hz, uA-C ^{β} H), 5,98 (d, 1H, $^3J = 7,8$ Hz, NH), 5,73 (dd, 1H, $^3J = 15,2$ Hz, $^4J = 0,9$ Hz, uA-C ^{α} H), 5,07 (m, 1H, uA-C ^{δ}), 4,87 (dd, 1H, $^3J = 10,1$ Hz, 3,6 Hz, uD-C ^{α} H), 4,72 (m, 1H, uB-C ^{α} H), 4,57 (dd, 1H, $^1J_{CH} = 145$ Hz, $^3J = 8,4$ Hz, uA-C ^{η} H), 3,86 (s, 3H, uB-C^{4'}OCH₃), 3,78 (dd, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, 4,6 Hz, uA-C ^{ζ} H), 3,35 (dd, 1H, $^2J = 13,5$ Hz, $^3J = 8,1$ Hz, uC-C ^{β} H_B), 3,16 (dd, 1H, $^2J = 13,5$ Hz, $^3J = 3,7$ Hz, uC-C ^{β} H_A), 3,09 (dd, 1H, $^2J = 14,5$ Hz, $^3J = 4,9$ Hz, uB-C ^{β} H_B), 2,96 (dd, 1H, $^2J = 14,5$ Hz, $^3J = 8,1$ Hz, uB-C ^{β} H_A), 2,43 (dm, 1H, $^2J = 14,3$ Hz, uA-C ^{γ} H_B), 2,24 (ddd, 1H, $^2J = 14,4$ Hz, $^3J = 11,2$ Hz, 2,9 Hz, uA-C ^{γ} H_A), 1,79 (ddd, 1H, $^2J = 14,6$ Hz, $^3J = 10,1$ Hz, 4,4 Hz, uD-C ^{β} H_B), 1,64 (m, 1H, uD-C ^{γ} H), 1,50-1,42 (m, 2H, uA-C ^{ϵ} H u. uD-C ^{β} H_B), 1,23 (s, 3H, uC-C ^{α} CH₃), 1,17 (s, 3H, uC-C ^{α} CH₃), 1,00 (d, 3H, $^3J = 7,0$ Hz, uA-C ^{ϵ} CH₃), 0,93 (s, 3H, $^3J = 6,7$ Hz, uD-C ^{δ} H₃), 0,87 (s, 3H, $^3J = 6,6$ Hz, uD-C ^{δ} H₃).

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9,7 (uA-C ^{ϵ} CH₃), 21,6 (uD-C ^{δ}), 22,8 (uC-C ^{α} CH₃), 23,0 (uC-C ^{α} CH₃ u. uD-C ^{δ}), 24,8 (uD-C ^{γ}), 35,2 (uB-C ^{β}), 36,2 (uA-C ^{γ}), 38,0 (uA-C ^{ϵ}), 39,6 (uD-C ^{β}), 42,7 (uC-C ^{α}), 46,5 (uC-C ^{β}), 54,5 (uB-C ^{α}), 56,1 (uB-C^{4'}OCH₃), 71,1 (uD-C ^{α}), 74,8 (d, $^1J = 40,4$ Hz, uA-C ^{ζ}), 75,7 (uA-C ^{η}), 76,5 (d, $^3J = 2,9$ Hz, uA-C ^{δ}), 112,3 (uB-C^{5'}), 122,4 (uB-C^{3'}), 124,4 (uA-C ^{α}), 126,9 (d, $^3J = 1,3$ Hz, uA-C^{3',5'}), 128,2 (uA-C^{4'}), 128,4 (uB-C^{6'}), 128,7 (d, $^2J = 2,9$ Hz, uA-C^{2',6'}), 129,7 (uB-C^{1'}), 130,8 (uB-C^{2'}), 140,6 (d, $^1J = 48,3$ Hz, uA-C^{1'}), 142,6 (uA-C ^{β}), 154,0 (uB-C^{4'}), 165,4 (uA-C(O)NH), 170,6 (C(O)NH/O), 170,7 (C(O)NH/O), 177,6 (C(O)NH/O).

^{13}C -Cryptophycin-52 (5)

55,6 mg zyklisches ^{13}C -Depsipeptid **17** (80,9 μ mol, 1 Äquiv.) werden zusammen mit 50,8 mg Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTS; 202,0 μ mol, 2,5 Äquiv.) mehrere Stunden

6.1. Synthese des ¹³C-markierten Cryptophycin-52



5

im Hochvakuum getrocknet. Unter Rühren werden gleichzeitig, aus unterschiedlichen Spritzen 8 ml DCM (30 ml/mmol) und 2,7 ml Trimethylorthoformiat (10 ml/mmol) zutropft. Die Reaktionslösung wird 3 h bei RT gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels DC (EtOAc/*n*-Hexan 2:1). Ist die Umsetzung vollständig, wird die Reaktionslösung durch Kieselgel (5×2cm für Ansatzgrößen 0,05-0,25 mmol) filtriert. Das Kieselgel wird mit EtOAc/DCM (1:1, 300 ml) gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum zur Trockene eingeengt und weiter im HV getrocknet. Das erhaltene zyklische Orthoformiat **18** wird ohne weitere Reinigung und Analytik im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

66,6 mg des zyklischen Orthoformiats (**18**; 91,2 μmol, 1 Äquiv.) werden in 1,4 ml abs. DCM (15 ml/mmol) gelöst. 457 μl einer 0,5 M Acetylbromidlösung (DCM; 228 μmol, 2,5 Äquiv.) werden hinzugefügt und die Reaktionslösung 4 h bei RT gerührt. Anschließend werden 10 ml DCM hinzugefügt, die Reaktionslösung auf 0 °C abgekühlt und in eine eiskalte Mischung aus gesättigter NaHCO₃-Lösung und H₂O (1:1; 50 ml) gegossen. Der Reaktionskolben wird portionsweise mit 12 ml DCM gespült, welches ebenfalls zur Mischung aus ges. NaHCO₃-Lösung und H₂O hinzugefügt wird. Nach Durchmischung und Phasentrennung wird die wässrige Phase mit DCM (3×20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) zur Trockene eingeengt. Das so gewonnene Bromhydrinformiat **19** wird im HV getrocknet.

Eine 0,2 M K₂CO₃/Ethylenglycol/Dimethylether Emulsion (25 ml/mmol; 5 Äquiv. K₂CO₃) wird durch Schütteln homogenisiert. 57,2 mg Bromhydrinformiat **19** (73,4 μmol, 1 Äquiv.) wird in 1,8 ml dieser homogenen Emulsion aufgenommen und 2,5 min bei RT gerührt. Anschließend werden sofort 20 ml DCM zugegeben und die Emulsion in einen Scheidetrichter überführt, in dem eine eiskalte 0,5 %ige KHSO₄-Lösung (20 ml) vorgelegt wurde. Der Reaktionskolben wird mit weiteren 20 ml DCM gespült. Nach Durchmischung und Trennung der Phasen wird die wässrige Phase mit

6. Experimenteller Teil

DCM (2×20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) alle Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Kieselgel 60; 0,040-0,063 mm; EtOAc/*n*-Hexan 3:1) aufgereinigt. Es werden 14,9 mg (22,2 μmol; 28 % ausgehend vom Diol **17**) ¹³C-Cryptophycin-52 **5** als farbloser Feststoff erhalten.

Summenformel: C₃₅¹³CH₄₅ClN₂O₈ (670,20 g mol⁻¹).

R_f (EtOAc/*n*-Hexan 3:1) = 0,26.

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): *m/z* = 692,2 [M+Na]⁺ (berechnet für [C₃₅¹³CH₄₅ClN₂NaO₈]⁺: 692,19).

HRMS (ESI-FT-ICR, Kationen-Modus): *m/z* = 692,2781 [M+Na]⁺ (berechnet für [C₃₅¹³CH₄₅ClN₂NaO₈]⁺: 692,2800).

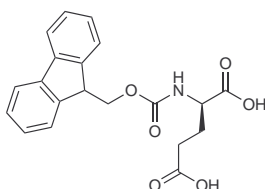
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,21-7,39 (m, 5H, C^{aryl}H), 7,19 (d, 1H, ⁴*J* = 2,0 Hz, uB-C^{2'}H), 7,05 (dd, 1H, ³*J* = 8,4 Hz, ⁴*J* = 2,1 Hz, uB-C^{6'}H), 6,84 (d, 1H, ³*J* = 8,4 Hz, uB-C^{5'}H), 6,77 (ddd, 1H, ³*J* = 15,0 Hz, 10,7 Hz, 4,2 Hz, uA-C^βH), 5,72 (dd, 1H, ³*J* = 15,1 Hz, ⁴*J* = 1,3 Hz, uA-C^αH), 5,52 (d, 1H, ³*J* = 7,7 Hz, NH), 5,20 (ddd, 1H, ³*J* = 11,3 Hz, 5,0 Hz, 1,6 Hz, uA-C^δH), 4,83 (dd, 1H, ³*J* = 10,2 Hz, 3,4 Hz, uD-C^αH), 4,75 (m, 1H, uB-C^αH), 3,87 (s, 3H, uB-C^{4'}OCH₃), 3,78 (s, 1H, NH), 3,69 (dd, 1H, ¹*J*_{CH} = 174 Hz, ³*J* = 1,5 Hz, uA-C^ηH), 3,43 (dd, 1H, ²*J* = 13,5 Hz, ³*J* = 8,7 Hz, uC-C^βH_B), 3,12-3,07 (m, 2H, uB-C^βH_B u. uC-C^βH_A), 3,05 (dd, 1H, ²*J* = 14,7 Hz, ³*J* = 7,4 Hz, uB-C^βH_A), 2,92 (dm, 1H, ³*J* = 7,6 Hz, uA-C^ζH), 2,58 (dm, 1H, ²*J* = 14,6 Hz, uA-C^γH_B), 2,46 (m, 1H, uA-C^γH_A), 1,79 (m, 1H, uA-C^εH), 1,73 (ddm, 1H, ²*J* = 14,5 Hz, ³*J* = 4,2 Hz, uD-C^βH_B), 1,65 (m, 1H, uD-C^γH), 1,31 (ddd, 1H, ²*J* = 13,0 Hz, ³*J* = 8,6 Hz, ³*J* = 3,2 Hz, uD-C^βH_A), 1,22 (s, 3H, uC-C^αCH₃), 1,16 (s, 3H, uC-C^αCH₃), 1,15 (d, 3H, ³*J* = 7,0 Hz, uA-C^εCH₃), 0,85 (d, 3H, ³*J* = 6,6 Hz, uD-C^δH₃), 0,83 (d, 3H, ³*J* = 6,5 Hz, uD-C^δH₃).

6.2. Synthese einer Targetinggruppe für ein Prodrug

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 13,7 (uA-C $^{\epsilon}$ CH $_3$), 21,2 (uD-C $^{\delta}$), 22,8 (uC-C $^{\alpha}$ CH $_3$), 22,9 (uC-C $^{\alpha}$ CH $_3$), 24,6 (uD-C $^{\gamma}$), 35,3 (uB-C $^{\beta}$), 36,9 (uA-C $^{\gamma}$), 39,3 (uD-C $^{\beta}$), 40,7 (uA-C $^{\epsilon}$), 42,7 (uC-C $^{\alpha}$), 46,4 (uC-C $^{\beta}$), 54,3 (uB-C $^{\alpha}$), 56,2 (uB-C $^{4'}$ OCH $_3$), 59,1 (uA-C $^{\eta}$), 63,1 (d, $^1J = 28,9$ Hz, uA-C $^{\zeta}$), 71,2 (uD-C $^{\alpha}$), 75,9 (uA-C $^{\delta}$), 112,3 (uB-C $^{5'}$), 122,5 (uB-C $^{3'}$), 124,6 (uA-C $^{\alpha}$), 125,6 (d, $^3J = 3,5$ Hz, uA-C $^{3',5'}$), 128,3 (uB-C $^{6'}$), 128,6 (uA-C $^{4'}$), 128,8 (d, $^2J = 4,4$ Hz, uA-C $^{2',6'}$), 129,4 (uB-C $^{1'}$), 130,9 (uB-C $^{2'}$), 136,7 (d, $^1J = 56,8$ Hz, uA-C $^{1'}$), 141,9 (uA-C $^{\beta}$), 154,1 (uB-C $^{4'}$), 164,9 (uA-C(O)NH), 170,3 (C(O)NH/O), 170,5 (C(O)NH/O), 178,1 (C(O)NH/O).

6.2. Synthese einer Targetinggruppe für ein Prodrug

N-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-L-Glutaminsäure (**20**)



20

1,00 g L-Glutaminsäure (6,80 mmol, 1 Äquiv.) wird in 24 ml 1,4-Dioxan gelöst. 24 ml einer 10 %igen Na_2CO_3 -Lösung werden zugegeben und Wasser zugetropft bis der Feststoff gelöst ist. Eine Lösung von 2,00 g Fmoc-*N*-hydroxysuccinimidester (5,93 mmol, 0,9 Äquiv.) in 11 ml 1,4-Dioxan wird mittels Spritzenpumpe über 3 h bei RT zugegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Wasser versetzt und der pH-Wert mit 10 %iger HCl unter Eiskühlung auf pH 3 eingestellt. Die Lösung wird mit EtOAc extrahiert (3×75 ml), mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über NaSO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus *n*-Hexan und 2-Propanol aufgereinigt. Es werden 1,19 g Fmoc-Glutaminsäure (**20**) (3,2 mmol; 55 %) als farbloser Feststoff isoliert.

Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_6$ (369,37 g mol $^{-1}$).

6. Experimenteller Teil

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 392,1$ $[M+Na]^+$ (berechnet für $[C_{20}H_{19}NNaO_6]^+$: 392,11); $408,2$ $[M+K]^+$ (berechnet für $[C_{20}H_{19}KNO_6]^+$: 408,08).

t_R (Methode 3; Accela) = 3,67 min.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 12,43 (s, 2H, COOH), 7,90 (m, 2H, CH^{aryl}), 7,73 (m, 2H, CH^{aryl}), 7,42 (m, 2H, CH^{aryl}), 7,33 (m, 2H, CH^{aryl}), 4,30-4,27 (m, 2H, NCOOCH₂), 4,24 (m, 1H, NCOOCH₂CH), 4,01 (m, 1H, C $^\alpha$ H), 3,36 (s, 1H, NH), 2,38-2,25 (m, 2H, C $^\gamma$ H), 2,04-1,94 (m, 1H, C $^\beta$ H₂), 1,84-1,74 (m, 1H, C $^\beta$ H₂).

^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 26,0 (C $^\beta$), 30,1 (C $^\gamma$), 46,6 (CH^{Fmoc}), 53,0 (C $^\alpha$), 65,6 (CH₂^{Fmoc}), 120,1 ($2 \times C^{aryl}$), 125,2 (C^{aryl}), 125,3 (C^{aryl}), 127,1 ($2 \times C^{aryl}$), 127,6 ($2 \times C^{aryl}$), 140,7 ($2 \times C^{aryl}$), 143,8 ($2 \times C^{aryl}$), 156,1 (OCONH), 173,6 (COOH), 173,7 (C $^\delta$ OOH).

Festphasenpeptidsynthese

Harzbeladung

1 Äquiv. 2-Chlortritylchloridharz ([0,3 g Harz]/[mmol Aminosäure]) und 2 Äquiv. Fmoc-Glycin werden unter Schutzgasatmosphäre in einer Mischung aus abs. DCM ([2,2 ml]/[mmol Aminosäure]) und 2 Äquiv. DIPEA ([0,34 ml]/[mmol Aminosäure]) suspendiert und 2 h geschüttelt. Anschließend wird der Suspension MeOH ([1,1 ml]/[mmol Aminosäure]) zugesetzt und weitere 15 min geschüttelt. Zur Aufreinigung wird das Harz in eine Spritze mit Fritte umgefüllt und mehrmals alternierend mit DCM und 2-Propanol gewaschen. Nachdem das Harz im Vakuum getrocknet wurde wird ca. 1 mg Harz entnommen und die Beladung mit der Methode von CHANG et al. (s. Gleichung 6.1) bestimmt.^[75]

Bestimmung der Harzbeladung

In einer UV-Küvette wird ca. 1 mg Harz eingewogen. Die Fmoc-Schutzgruppe wird durch Zugabe einer Lösung von DBU (4 Vol.-%) und Piperidin (4 Vol.-%) in Dimethylformamid (DMF) abgespalten. Die Absorption dieser Lösung wird bei 590 nm be-

6.2. Synthese einer Targetinggruppe für ein Prodrug

$$z = \frac{A \cdot X}{\epsilon \cdot Y \cdot l} \quad (6.1)$$

z = Beladung [mmol/g], A = Absorption, X = Volumen [ml], ϵ = Extinktionskoeffizient bei 590 nm; 5800 $\left[\frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}}\right]$, Y = Einwaage Harz [mg], l = Länge der Küvette [cm]

stimmt, wobei als Leerwert eine weitere Messung einer nur mit DBU-Piperidinlösung befüllten UV-Küvette dient. Dazu wird alle 5 min die Küvette mit der Harzprobe invertiert und nach Absinken des Harzes die Absorption gemessen. Der erreichte Maximalwert wird zur Berechnung der Beladung nach Gleichung 6.1 verwendet.^[75]

Kupplung einer Aminosäure

Das Harz wird mehrere Minuten in DCM quellen gelassen. 3 Äquiv. der zu kuppelnden Aminosäure, 3 Äquiv. TBTU und 6 Äquiv. DIPEA werden in wenig DCM/DMF (1:1) gelöst. Bei manchen Aminosäuren muss das Mischungsverhältnis angepasst werden, um ein vollständiges Lösen zu erreichen. Die Lösung wird zur Voraktivierung 3 min geschüttelt, dann zum Harz gegeben und anschließend wird die Suspension wiederum geschüttelt (90 min). Zum Aufreinigen wird das Harz mehrfach alternierend mit DCM und 2-Propanol gewaschen. Zur Reaktionskontrolle werden einige Harzkügelchen in ein Reaktionsgefäß überführt und das Peptid durch Zugabe von 100 μl Hexafluorisopropanol (HFIP)/DCM (1:4) Lösung abgespalten, wobei sich die Kügelchen rot färben. 1 μl der Peptidlösung wird auf ein Target aufgetragen, nach dem Trocknen in 1 μl Matrix aufgenommen und mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie analysiert. Ist die Reaktion unvollständig wird die Kupplung der Aminosäure wiederholt.

Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Nachdem das Harz mehrere Minuten gequollen war, werden je nach Ansatzgröße 10-20 ml einer Lösung von 4 Vol.-% DBU und 4 Vol.-% Piperidin in DMF zugegeben und gelegentlich geschüttelt. Nach 20 min wird die Lösung entfernt, durch frische ersetzt und weitere 20 min geschüttelt. Die Lösung wird wieder entfernt und das Harz mehrfach alternierend mit DCM und 2-Propanol gewaschen. Der Erfolg der Reaktion wird nach der oben beschriebenen Methode mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie ermittelt.

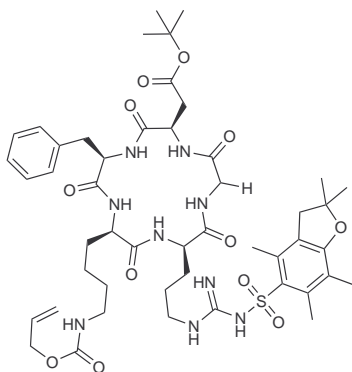
H-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys(Alloc)-Arg(Pbf)-Gly-OH (21)

1,5 g 2-Chlortritylchloridharz wird mit 1,3 g Fmoc-Glycin (4,5 mmol, 1 Äquiv.) wie in Abschnitt 6.2 beschrieben beladen. Nachdem das Harz im Vakuum getrocknet wurde, wird ca. 1 mg Harz entnommen und die Beladung mit der Methode von CHANG *et al.* (s. Gleichung 6.1) bestimmt, wobei eine Beladung von 0,9 mmol/g gemessen wurde.^[75] Die Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt und die nächste Aminosäure, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, wie in Abschnitt 6.2 beschrieben, gekuppelt. Der Vorgang der Fmoc-Abspaltung und Kupplung der nächsten Aminosäure wird wiederholt, bis die Sequenz vollständig ist. Die verbliebene Fmoc-Schutzgruppe der letzten Aminosäure Aspartat wird aufgrund möglicher Aspartimidbildung mit Piperazin anstatt von Piperidin abgespalten. 10 ml einer ges. Piperazinlösung ($\approx 6\%$) in DMF werden zum Harz gegeben und 45 min gelegentlich geschüttelt. Nachdem die Lösung entfernt und mehrmals mit DCM gewaschen wurde, werden erneut 10 ml der Piperazinlösung zum Harz gegeben und ebenfalls 45 min gelegentlich geschüttelt. Anschließend wird mehrmals alternierend mit DCM und 2-Propanol gewaschen. Das Peptid wird durch Zugabe von 10 ml einer 1 %igen TFA Lösung in DCM vom Harz abgespalten. Das Harz wird 5 min geschüttelt, die Lösung wird in einen Kolben überführt, das Harz zweimal mit DCM gewaschen und erneut mit 1 %iger TFA Lösung versetzt. Dieses wird solange wiederholt bis das Harz sich dauerhaft rot verfärbt, danach folgen noch 8 weitere Abspaltungen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt (40 °C Badtemperatur), wobei sukzessive 2-Propanol hinzugefügt wird, um eine Aufkonzentration der TFA und damit ein mögliches Abspalten der Seitenschutzgruppen zu verhindern. Es werden 173,3 mg des linearen Peptids **21** (175 μ mol; 35 %) als farbloser Feststoff erhalten.

Summenformel: C₄₈H₇₁N₉O₁₃S (1014,19 g mol⁻¹).

t_R (Methode 2; SpectraSYSTEM) = 27,6 min.

MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): $m/z = 762,2$ [M-Pbf+H]⁺ (berechnet für [C₃₅H₅₆N₉O₁₀]⁺: 762,4); 1014,7 [M+H]⁺ (berechnet für [C₄₈H₇₂N₉O₁₃S]⁺: 1014,5); 1036,1 [M+Na]⁺ (berechnet für [C₄₈H₇₁N₉NaO₁₃S]⁺: 1036,5); 1052,1 [M+K]⁺ (berechnet für [C₄₈H₇₁KN₉O₁₃S]⁺: 1052,5).

c-[-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys(Alloc)-Arg(Pbf)-Gly-] (22)**22**

Die Zyklisierung erfolgen anlehnend an eine Vorschrift von K. JENSEN.^[76] 77,5 ml DMF (275 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$) und 145 μl DIPEA (110 mg, 849 μmol , 3,0 Äquiv.) werden vorgelegt. 286 mg des linearen Peptid H-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys(Alloc)-Arg(Pbf)-Gly-OH **21** (282 μmol) wird in 45,1 ml DMF (160 μl DMF/ μmol Peptid) gelöst. 107 mg HATU (282 μmol , 1 Äquiv.) und 38,4 mg HOAt (282 μmol , 1 Äquiv.) werden in ebenfalls 45,1 ml DMF gelöst. Die Peptidlösung als auch die HATU-, HOAt-Lösung werden mittels einer Zweikanalspritzenpumpe mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/h in die vorgelegte DIPEA-Lösung getropft. Nach Beendigung der Zugabe wird noch 2 h weiter gerührt und anschließend das Solvens am Rotationsverdampfer im Hochvakuum (45 °C Badtemperatur) entfernt. Das Rohpeptid wird mittels RP-HPLC aufgereinigt (Methode 5; Hitachi). Es werden 21 mg Peptid **22** (21,1 μmol ; 7 %) als farbloser Feststoff isoliert.

Summenformel: C₄₈H₆₉N₉O₁₂S (996,18 g mol⁻¹).

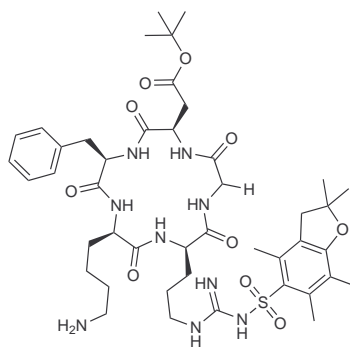
t_R (Methode 2; SpectraSYSTEM) = 32,9 min

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 1018,5$ [M+Na]⁺ (berechnet für [C₄₈H₆₉N₉NaO₁₂S]⁺: 1018,47).

6. Experimenteller Teil

MS (ESI-MS, Anionen-Modus): $m/z = 994,5$ $[M-H^+]^-$ (berechnet für $[C_{48}H_{68}N_9O_{12}S]^-$: 994,47).

c-[-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys-Arg(Pbf)-Gly-] (**23**)



23

66,4 mg Peptid c-[-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys(Alloc)-Arg(Pbf)-Gly-] (**22**; 66,7 μmol , 1 Äquiv.) wird in 7 ml DMF und 13 ml DCM unter Argonatmosphäre gelöst. 356 μl Phenylsilan (313 mg, 2,89 mmol, 43 Äquiv.) und 33,3 mg $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (28,8 μmol , 0,43 Äquiv.) werden zugegeben und bei RT für 2-3 h gerührt. Anschließend wird DCM am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) und DMF am HV-Rotationsverdampfer (40 °C Badtemperatur) entfernt. Der Rückstand wird in wenig DCM/MeOH-Lösung (1:1) gelöst und in eiskaltem Diethylether gefällt. Die Suspension wird zentrifugiert (18 500 \times g, 10 min, 4 °C) und der Überstand abdekantiert. Der Feststoff wird in einer Mischung aus ACN und H_2O aufgenommen und lyophilisiert. Das Rohprodukt (75,6 mg) wird mittels RP-HPLC (Methode 5; Hitachi) aufgereinigt. Es wurden 42,5 mg (46,6 μmol ; 70 %) farbloses Peptid **23** isoliert.

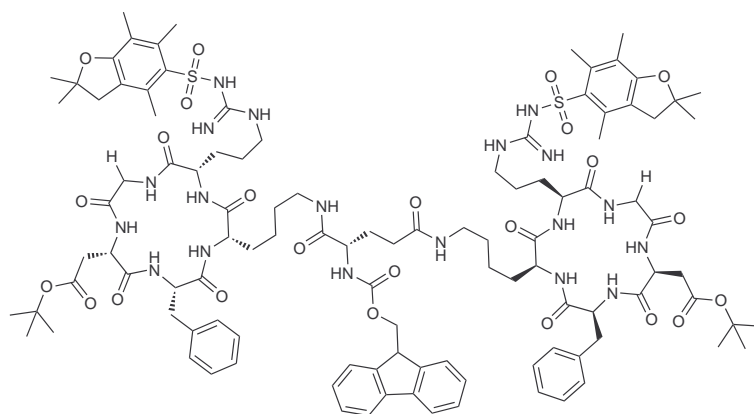
Summenformel: $\text{C}_{44}\text{H}_{65}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{S}$ (912,11 g mol^{-1}).

t_R (Methode 3; Accela) = 3,4 min.

6.2. Synthese einer Targetinggruppe für ein Prodrug

MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): $m/z = 660,2$ $[M-Pbf+H]^+$ (berechnet für $[C_{31}H_{50}N_9O_7]^+$: 660,4); $911,9$ $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{44}H_{66}N_9O_{10}S]^+$: 9); $934,0$ $[M+Na]^+$ (berechnet für $[C_{44}H_{65}N_9NaO_{10}S]^+$: 934,5).

Fmoc-Glu(c-[-Arg(Pbf)-Gly-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys-])-c-[-Arg(Pbf)-Gly-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys-] (24)



24

42,5 mg c-[-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys-Arg(Pbf)-Gly-] (**23**; 46,6 μ mol, 2 Äquiv.) werden in 2 ml DMF/DCM (1:1) gelöst. Ebenso werden 8,61 mg Fmoc-Glu (23,3 μ mol; 1 Äquiv.) und 44,9 mg TBTU (139,8 μ mol; 3 Äquiv.) in DMF/DCM-Lösung (1:1) suspendiert. Nach 3 minütiger Voraktivierung durch Zugabe von 47,9 μ l DIPEA (36,1 mg; 280,3 μ mol; 12 Äquiv.) wird die Lösung zum gelösten Peptid gegeben, mit 0,5 ml DMF/DCM-Lösung (1:1) das Gefäß nachgespült und die Lösung bei RT über Nacht gerührt. Da noch monomeres RGD-Peptid bei der Reaktionskontrolle (MALDI-ToF MS) festgestellt wurde, wird zur Vervollständigung der Reaktion 53,2 mg HATU (139,8 μ mol; 3 Äquiv.) und 47,9 μ l DIPEA (36,1 mg; 280,3 μ mol; 12 Äquiv.) zugegeben. Es bildet sich ein farbloser Niederschlag. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen bzw. suspendiert und das Produkt mit eiskaltem Diethylether gefällt. Die Suspension wird bei $4600 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Das farblose Produkt **24** wird ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

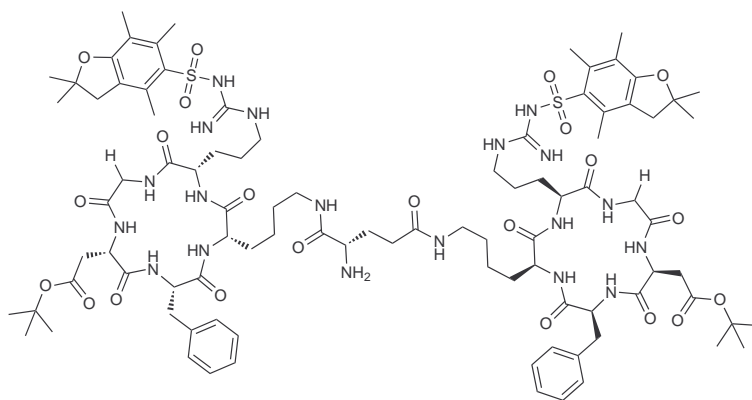
6. Experimenteller Teil

Summenformel: C₁₀₈H₁₄₅N₁₉O₂₄S₂ (2157,55 g mol⁻¹).

t_R (Methode 2; SpectraSYSTEM) = 35,5 min.

MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): $m/z = 1902,59$ [M-Pbf+H]⁺ (berechnet für [C₉₅H₁₂₉N₁₉O₂₁S]⁺: 1903,93); $2155,91$ [M+H]⁺ (berechnet für [C₁₀₈H₁₄₆N₁₉O₂₄S₂]⁺: 2157,02); $2179,2$ [M+Na]⁺ (berechnet für [C₁₀₈H₁₄₅N₁₉NaO₂₄S₂]⁺: 2179,00).

H-Glu(c-[-Arg(Pbf)-Gly-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys-])-c-[-Arg(Pbf)-Gly-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys-] (25)



25

Die Fmoc-Abspaltung erfolgt nach einer Methode von J. E. SHEPPECK II, H. KAR, H. HONG.^[77] Das bizyklische Peptid Fmoc-Glu(c-[-Arg(Pbf)-Gly-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys-])-c-[-Arg(Pbf)-Gly-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys-] (**24**; 23,3 μmol; 1 Äquiv.) wird in 500 μl DMSO gelöst. 182 mg N-(2-Mercaptoethyl)aminomethylpolystyrolharz werden hinzugegeben und anschließend 1,75 μl 1,5-Diazabicyclo[5.4.0]-5-undecen (DBU) (17,8 mg; 11,7 μmol, 0,5 Äquiv.) hinzugefügt. Die Suspension wird 2 h bei RT geschüttelt. Die Reaktionskontrolle (HPLC) zeigt eine 50 %ige Umsetzung, daher werden nochmals 0,5 Äquiv. DBU (1,75 μl, 17,8 mg, 11,7 μmol) zugegeben und über Nacht geschüttelt. Das DMSO wird im Hochvakuum (50 °C Badtemperatur) entfernt, wobei die Vorlage mit flüssigen Stickstoff gekühlt wird. Der ölige Rückstand wird mit Wasser versetzt und dekantiert.

6.2. Synthese einer Targetinggruppe für ein Prodrug

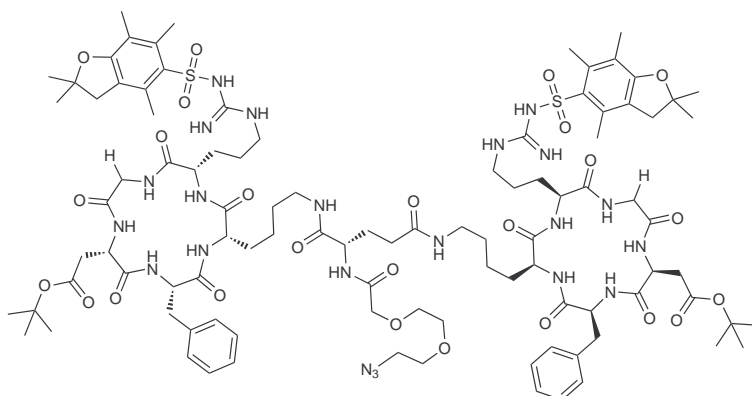
Der Feststoff wird nochmals in Wasser suspendiert und gefriergetrocknet. Es werden 11,1 mg farblosen Peptids **25** erhalten.

Summenformel: C₉₃H₁₃₅N₁₉O₂₂S₂ (1939,34 g mol⁻¹).

t_R (Methode 2; SpectraSYSTEM) = 30,43 min.

MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): *m/z* = 1956,04 [M+Na]⁺ (berechnet für [C₉₃H₁₃₅N₁₉NaO₂₂S₂]⁺: 1956,94); 1971,80 [M+K]⁺ (berechnet für [C₉₃H₁₃₅KN₁₉O₂₂S₂]⁺: 1972,91).

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)acetyl-Glu(c-[-Arg(Pbf)-Gly-Asp(tBu)-D-Phe-Lys-])-c-[-Arg(Pbf)-Gly-Asp(tBu)-D-Phe-Lys-] (**26**)



26

11,1 mg H-Glu(c-[-Arg(Pbf)-Gly-Asp(tBu)-D-Phe-Lys-])-c-[-Arg(Pbf)-Gly-Asp(tBu)-D-Phe-Lys-] (**25**; 5,7 μmol, 1 Äquiv.) werden in 1,5 ml abs. DMSO aufgenommen. 5,3 mg 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)essigsäure (28,0 μmol, 5 Äquiv.), 9,00 mg HATU (23,7 μmol, 4 Äquiv.), 3,12 mg HOAt (22,9 μmol, 4 Äquiv.) und 5,9 μl DIPEA (4,47 mg; 34,6 μmol, 6 Äquiv.) werden in 0,75 ml abs. DMSO gelöst und nach 3 minütiger Voraktivierung zur Peptidlösung gegeben. Die Lösung wird 21 h bei RT geschüttelt. Anschlie-

6. Experimenteller Teil

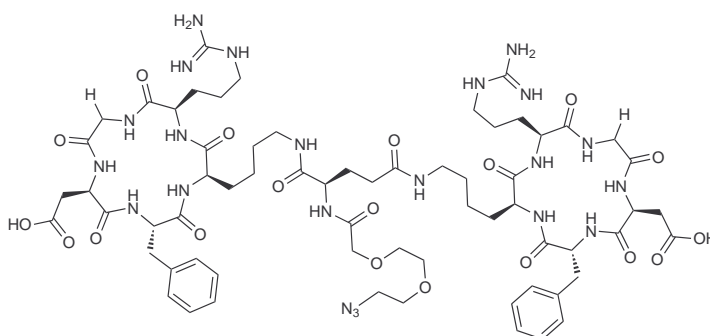
ßend wird Wasser hinzugefügt und die Lösung gefriergetrocknet. Der Rückstand wird wiederum in Wasser aufgenommen und nochmals gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird ohne weitere Aufarbeitung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Summenformel: $C_{99}H_{144}N_{22}O_{25}S_2$ (2106,47 g mol⁻¹).

t_R (Methode 2; SpectraSYSTEM) = 32,6 min.

MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): $m/z = 2104,80 [M+H]^+$ (berechnet für $[C_{99}H_{145}N_{22}O_{25}S_2]^+$: 2106,02); $2127,13 [M+Na]^+$ (berechnet für $[C_{99}H_{144}N_{22}NaO_{25}S_2]^+$: 2128,00).

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)acetyl-Glu(c-[-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys-])-c-[-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys-] (27)



27

Das Konjugat **26** wird in 5 ml einer Lösung aus 95 % TFA, 2,5 % H₂O und 2,5 % Triisopropylsilan (TIS) unter Wasserkühlung aufgenommen. Die Lösung färbt sich rot. Nach 2 h wird am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) und anschließend am HV-Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in MeOH gelöst und mittels HPLC aufgereinigt (Methode 5; Hitachi). 2,50 mg (1,7 µmol; 29 % über 2 Stufen) farbloses Konjugat werden isoliert.

Summenformel: C₆₅H₉₆N₂₂O₁₉ (1489,59 g mol⁻¹).

t_R (Methode 5; Hitachi) = 13,5 min.

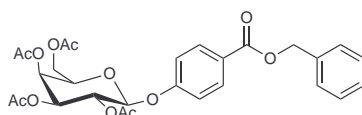
MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): $m/z = 1489,59 [M+H]^+$ (berechnet für [C₆₅H₉₇N₂₂O₁₉]⁺: 1489,73).

MS (MALDI-ToF, Anionen-Modus): $m/z = 1488,85 [M-H]^+$ (berechnet für [C₆₅H₉₅N₂₂O₁₉]⁻: 1487,71).

6.3. Synthese des „Auslösers“ eines Prodrugs

Ausgehend von Galaktose erfolgt die Peracetylierung nach einer Vorschrift von C. PLATTNER.^[78] Das 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galaktopyranosylbromid für die Glykosylierung nach der KOENIGS-KNORR Methode wird durch Behandlung der acetatgeschützten Galaktose mit HBr in Essigsäure (33 %) dargestellt.^[79]

4-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galaktopyranosyloxy)-benzoesäurebenzylester (28)



28

1,13 g Silberoxid (4,86 mmol; 2 Äquiv.) werden zum Trocknen 10 min im Ultraschallbad behandelt und danach vorsichtig im HV erhitzt (Zersetzungstemperatur: 200 °C). Nachdem das Silberoxid auf RT abgekühlt ist, wird es unter Schutzatmosphäre in 20 ml abs. ACN aufgenommen. 1,00 g α -D-2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galaktopyranosylbromid (2,43 mmol; 1 Äquiv) wird ebenfalls in den 20 ml ACN suspendiert. 611 mg 4-Hydroxybenzoesäurebenzylester (2,68 mmol; 1,1 Äquiv.) werden in 4 ml ACN gelöst und mittels

6. Experimenteller Teil

Spritzenpumpe (1 ml/h) zu der Suspension zugetropft. Die Suspension wird bei RT über Nacht gerührt. Dann wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) entfernt. Der Rückstand wird in EtOAc aufgenommen und mittels Flashchromatographie aufgereinigt (EtOAc/*n*-Hexan 1:1). Es werden 922 mg (1,65 mmol; 68 %) farbloser kristalliner 4-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galaktopyranosyloxy)-benzoesäurebenzylester (**28**) isoliert.

Summenformel: C₂₈H₃₀O₁₂ (558,53 g mol⁻¹).

R_f (EtOAc/*n*-Hexan 1:1) = 0,12.

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 581,1$ [M+Na]⁺ (berechnet für [C₂₈H₃₀NaO₁₂]⁺: 581,16).

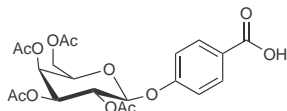
MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): $m/z = 581,53$ [M+Na]⁺ (berechnet für [C₂₈H₃₀NaO₁₂]⁺: 581,16); 597,86 [M+K]⁺ (berechnet für [C₂₈H₃₀KO₁₂]⁺: 597,14).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8,03 (d, 2H, ³*J* = 8,8 Hz, C^{*aryl, Benzoes.*}H), 7,45-7,31 (m, 5H, C^{*aryl, Benzyl*}H), 7,01 (d, 2H, ³*J* = 8,9 Hz, C^{*aryl, Benzoes.*}H), 5,51 (dd, 1H, ³*J* = 10,4 Hz, 7,9 Hz, C²H), 5,46 (d, 1H, ³*J* = 3,0 Hz, C⁴H), 5,34 (s, 2H, C^{*Benzyl*}H₂), 5,14-5,11 (m, 2H, C¹H, C³H), 4,21 (dd, 1H, ³*J* = 11,3 Hz, 7,1 Hz, C⁶H), 4,16 (dd, 1H, ³*J* = 11,3 Hz, 5,9 Hz, C⁶H), 4,10 (mt, 1H, ³*J* = 6,4 Hz, C⁵H), 2,18 (s, 3H, C^{*Acetyl*}H₃), 2,06 (s, 3H, C^{*Acetyl*}H₃), 2,05 (s, 3H, C^{*Acetyl*}H₃), 2,01 (s, 3H, C^{*Acetyl*}H₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20,6 (CH₃^{*Acetyl*}), 20,7 (3 × CH₃^{*Acetyl*}), 61,4 (C⁶), 66,6 (C⁴), 66,8 (C^{*Benzyl*}), 68,5 (C²), 70,7 (C³), 71,3 (C⁵), 98,8 (C¹), 116,2 (2 × C^{*aryl, Benzoes.*}), 125,0 (C^{*aryl, Benzoes.*}), 128,2 (2 × C^{*aryl, Benzyl*}), 128,3 (C^{*aryl, Benzyl*}), 128,6 (2 × C^{*aryl, Benzyl*}), 131,7 (2 × C^{*aryl, Benzoes.*}), 136,1 (C^{*aryl, Benzyl*}), 160,3 (C^{*aryl, Benzoes.*}), 165,8 (C^{*Benzoes.*}OO), 169,4 (C^{*Acetyl*}O), 170,1 (C^{*Acetyl*}O), 170,2 (C^{*Acetyl*}O), 170,4 (C^{*Acetyl*}O).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2362 s, 2172 s, 1743 s, 1712 s, 1605 s, 1508 s, 1367 s, 1272 s, 1210 m, 1162 s, 1099 s, 1041 w, 951 s, 897 s, 913 s, 768 s, 737 s, 696 s, 668 s, 587 s, 509 s, 494 s, 457 s.

4-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galaktopyranosyloxy)-benzoesäure (29)



29

102 mg 4-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galaktopyranosyloxy)-benzoesäurebenzylester (**28**; 0,18 mmol; 1 Äquiv.) werden in abs. ACN unter Schutzatmosphäre gelöst. 21,2 mg Pd/C (10 %) werden unter Schutzatmosphäre zur Lösung zugegeben und suspendiert. Eventuell vorhandene Sauerstoffreste werden durch 20 minütiges Hindurchleiten von Argon entfernt, anschließend wird die Lösung 2 h lang mit H₂ gesättigt. Unter statischer H₂-Atmosphäre wird über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wird die H₂-Atmosphäre durch Hindurchleiten von Argon entfernt. Nachdem das Pd/C mittels einer Fritte entfernt wurde, wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) entfernt und es wird die freie 4-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galaktopyranosyloxy)-benzoesäure **29** quantitativ als farbloser Feststoff erhalten.

Summenformel: C₂₁H₂₄O₁₂ (468,41 g mol⁻¹).

MS (ESI-MS, Kationen-Modus): $m/z = 491,1$ [M+Na]⁺ (berechnet für [C₂₁H₂₄NaO₁₂]⁺: 491,12).

MS (ESI-MS, Anionen-Modus): $m/z = 467,2$ [M-H]⁻ (berechnet für [C₂₁H₂₃NaO₁₂]⁻: 467,12).

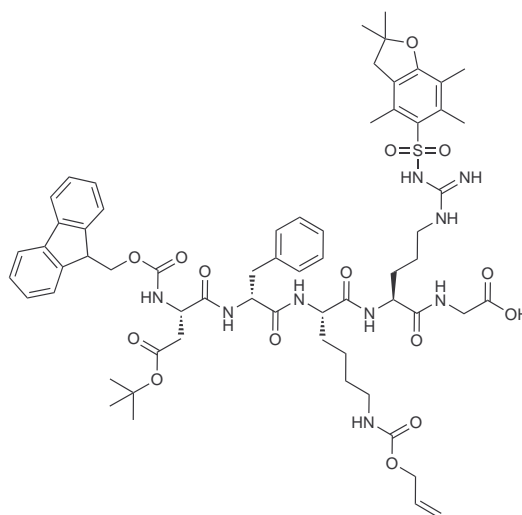
6. Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8,05 (d, 2H, $^3J = 8,1$ Hz, $\text{C}^{\text{aryl}}\text{H}$), 7,02 (d, 2H, $^3J = 8,4$ Hz, $\text{C}^{\text{aryl}}\text{H}$), 5,52 (dd, 1H, $^3J = 10,4$ Hz, 7,9 Hz, C^2H), 5,48 (d, 1H, $^3J = 3,3$ Hz, C^4H), 5,15-5,12 (m, 2H, C^1H , C^3H), 4,23 (dd, 1H, $^3J = 11,3$ Hz, 7,2 Hz, C^6H), 4,17 (dd, 1H, $^3J = 11,3$ Hz, 6,0 Hz, C^6H), 4,12 (t, 1H, $^3J = 6,6$ Hz, C^5H), 2,19 (s, 3H, $\text{C}^{\text{Acetyl}}\text{H}_3$), 2,07 (s, 3H, $\text{C}^{\text{Acetyl}}\text{H}_3$), 2,02 (s, 3H, $\text{C}^{\text{Acetyl}}\text{H}_3$), 2,01 (s, 3H, $\text{C}^{\text{Acetyl}}\text{H}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 20,5 ($\text{CH}_3^{\text{Acetyl}}$), 20,6 ($2 \times \text{CH}_3^{\text{Acetyl}}$), 20,7 ($\text{CH}_3^{\text{Acetyl}}$), 61,3 (C^6), 66,7 (C^4), 68,4 (C^2), 70,7 (C^3), 71,1 (C^5), 98,8 (C^1), 115,9 ($2 \times \text{C}^{\text{aryl}}$), 127,4 (C^{aryl}), 131,8 ($2 \times \text{C}^{\text{aryl}}$), 159,9 (C^{aryl}), 169,3 ($\text{C}^{\text{Acetyl}}\text{O}$), 170,1 ($\text{C}^{\text{Acetyl}}\text{O}$), 170,2 ($\text{C}^{\text{Acetyl}}\text{O}$), 170,3 ($\text{C}^{\text{Acetyl}}\text{O}$), 170,7 (C^{aryl}).

6.4. Synthese eines Targeting-Konjugates für die Fluoreszenzmikroskopie

Automatisierte Festphasensynthese des Targetingpeptids Fmoc-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys(Alloc)-Arg(Pbf)-Gly- (30)



30

Das Peptid wird als lineares Peptid Fmoc-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys(Alloc)-Arg(Pbf)-Gly-OH

Tabelle 6.1.: Aminosäureeinwaagen für die Synthese des Peptids H-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys(Alloc)-Arg(Pbf)-Gly-OH.

Aminosäure	Einwaage	Volumen DMF
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	2,7 g	21 ml
Fmoc-Lys(Alloc)-OH	1,0 g	11 ml
Fmoc-D-Phe-OH	0,9 g	11 ml
Fmoc-Asp(<i>t</i> Bu)-OH	0,9 g	11 ml

am Peptidsynthesizer synthetisiert. 1 g 2-Chlortritylchloridharz wird manuell mit Fmoc-Gly-OH, wie in Abschnitt 6.2 beschrieben, beladen. Die nach Abschnitt 6.2 (Gleichung 6.1) durchgeführte Beladungsbestimmung ergab eine Beladung von 0,6 mmol/g. Daher werden für einen 0,5 mmol Ansatz der Peptidsynthesizer mit 0,83 g Fmoc-Gly-Harz befüllt. Von allen weiteren Aminosäuren werden 0,2 M Lösungen in DMF angesetzt (s. Tabelle 6.1). Als Abspaltreagenz wird 20 Vol.-%ige Piperidinlösung (DMF), versetzt mit 0,1 M 1-Hydroxybenzotriazolhydrat (HOBT), verwendet. Als Kupplungsreagenz dient eine 0,5 M TBTU Lösung in DMF. Eine 2 M DIPEA-Lösung in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) fungiert bei den Kupplungen als Base. An das mit Fmoc-Gly-OH beladene Harz werden die Aminosäure in folgender Reihenfolge gekuppelt:

1. Fmoc-Arg(Pbf)-OH
2. Fmoc-Lys(Alloc)-OH
3. Fmoc-D-Phe-OH
4. Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH

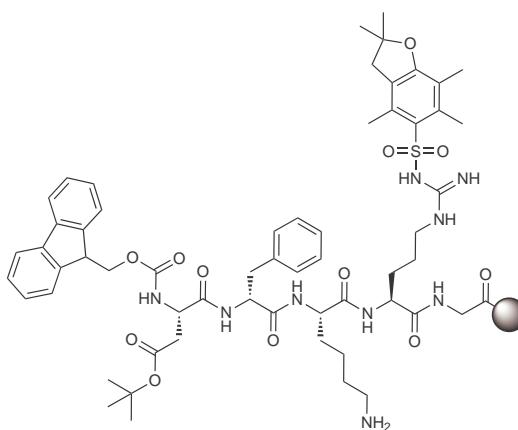
Die Kupplungen und das Abspalten der Schutzgruppen erfolgt nach dem Programm in Tabelle 6.2. Nach Abschluß der letzten Kupplung wird die Fmoc-Schutzgruppe der letzten Aminosäure (Asp) nicht abgespalten, auch wird das Peptid nicht vom Harz abgespalten, sondern nur zurück in das Gefäß gespült.

Summenformel: C₆₃H₈₁N₉O₁₅S (1236,43 g mol⁻¹).

6. Experimenteller Teil

MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): $m/z = 983,83$ $[M-Pbf+H]^+$ (berechnet für $[C_{50}H_{66}N_9O_{12}]^+$: 984,5); 1235,8 $[M+H]^+$ (berechnet für $[C_{63}H_{82}N_9O_{15}S]^+$: 1236,6); 1257,9 $[M+Na]^+$ (berechnet für $[C_{63}H_{81}N_9NaO_{15}S]^+$: 1258,6); 1280,0 $[M+K]^+$ (berechnet für $[C_{63}H_{81}KN_9O_{15}S]^+$: 1274,5).

Fmoc-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys-Arg(Pbf)-Gly- (31)



31

Das Harz wird in eine Spritze mit Fritte transferiert und mehrmals alternierend mit DCM, DMF und Isopropanol gewaschen. 1 ml DCM werden zum Harz gegeben und 5 min quellen gelassen. Danach wird das Harz 5 \times mit DCM (10 ml) gewaschen. Unter Schutzgasatmosphäre werden 740 μ l Phenylsilan (650 mg; 6,0 mmol; 12 Äquiv.) in 1 ml DCM gelöst. Als Katalysator werden 57,8 mg Palladiumtetrakis(triphenylphosphin) (0,05 mmol; 0,1 Äquiv.) unter Schutzgasatmosphäre in 2 ml DCM gelöst. Die Katalysatorlösung wird zur Phenylsilanlösung gegeben. Das Harz wird unter Schutzgasatmosphäre 10 min geschüttelt. Anschließend wird bis zu acht mal mit 10 ml DCM gewaschen, bis das Harz seine bräunliche Färbung verliert. Nach einer Wiederholung der Abspaltung wird zur Kontrolle ein MALDI-ToF Massenspektrum aufgenommen.

Summenformel: $C_{59}H_{77}N_9O_{13}S$ (1152,36 g mol⁻¹).

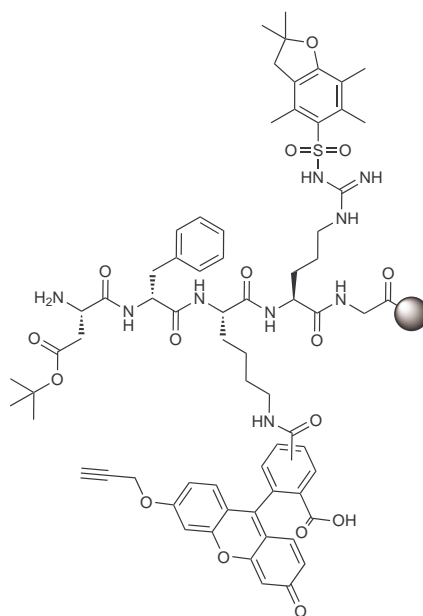
Tabelle 6.2.: Protokoll für die Peptidsynthese mittels Synthesizer.

- Transfer in Reaktor (Fmoc-Gly-Harz)
 1. Transfer des Harzes in den Reaktor (3×; 8 ml DMF/DCM (1:1))
 2. Harz quellen in 5 ml DMF/DCM (1:1); (900 s)
- Programm: „0,5-Double-Arg“ (benutzt für: Fmoc-Arg(Pbf)-OH)
 1. waschen mit DMF (20 ml)
 2. 15 ml Abspaltlösung
 3. Mikrowelle: 35 W, 75 °C, 30 s
 4. waschen mit DMF (5 ml)
 5. 15 ml Abspaltlösung
 6. Mikrowelle: 35 W, 75 °C, 180 s
 7. waschen mit DMF (80 ml)
 8. 10 ml Aminosäurelösung
 9. 4 ml Kupplungsreagenz
 10. 2 ml Base
 11. Mikrowelle: 0 W, 75 °C, 1500 s
 12. Mikrowelle: 20 W, 75 °C, 300 s
 13. Lösungen entfernen
 14. 10 ml Aminosäurelösung
 15. 4 ml Kupplungsreagenz
 16. 2 ml Base
 17. Mikrowelle: 20 W, 75 °C, 300 s
 18. waschen mit DMF (60 ml)
- Programm: „0,5-Single“ (benutzt für: Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH)
 1. waschen mit DMF (20 ml)
 2. 15 ml Abspaltlösung
 3. Mikrowelle: 35 W, 75 °C, 30 s
 4. waschen mit DMF (5 ml)
 5. 15 ml Abspaltlösung
 6. Mikrowelle: 35 W, 75 °C, 180 s
 7. waschen mit DMF (80 ml)
 8. 10 ml Aminosäurelösung
 9. 4 ml Kupplungsreagenz
 10. 2 ml Base
 11. Mikrowelle: 20 W, 75 °C, 300 s
 12. waschen mit DMF (60 ml)
- Transfer in Röhrchen
 1. Transfer des Harzes zurück in das Gefäß (10 ml DMF)

6. Experimenteller Teil

MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): $m/z = 900,0$ [M-Pbf+H]⁺ (berechnet für [C₄₆H₆₁N₉O₁₀]⁺: 899,5); 1152,1 [M+H]⁺ (berechnet für [C₅₉H₇₈N₉O₁₃S]⁺: 1152,5); 1174,2 [M+Na]⁺ (berechnet für [C₅₉H₇₇N₉NaO₁₃S]⁺: 1174,5); 1190,0 [M+K]⁺ (berechnet für [C₅₉H₇₇KN₉O₁₃S]⁺: 1190,5).

Fmoc-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys(6'-Propargyloxy-5(6)-fluorescein-carbonyl)-Arg(Pbf)-Gly- (32)



32

An 2-Chlortritylchloridharz immobilisiertes Peptid **31** wird in einer Spritze mit Fritze vorgelegt. Das Harz wird 5 min in DMF quellen gelassen. Das DMF wird entfernt und 50 mg Propargyl-5(6)-carboxyfluorescein (121 μ mol, 2,5 Äquiv.) werden mit 3 ml DMF in die Spritze zum Harz gespült. Unter Schutzgasatmosphäre werden 16 mg HOBt (121 μ mol, 2,5 Äquiv.) zu der Suspension gegeben und anschließend werden 19 μ l Diisopropylcarbodiimid (DIC) (15,2 mg; 121 μ mol, 2,5 Äquiv.) zupipettiert. Die Harzsuspension wird 18 h unter Schutzatmosphäre geschüttelt. Reaktionskontrolle erfolgt mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie. Bei erfolgreicher Kupplung wird ohne Unterbrechung mit der Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe fortgesetzt, dazu wird das Harz in

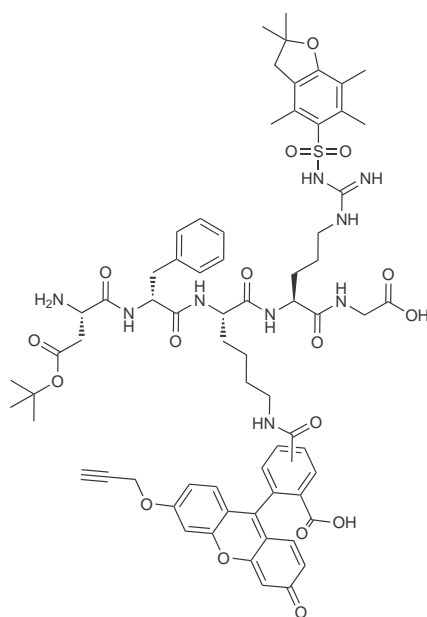
6.4. Synthese eines Targeting-Konjugates für die Fluoreszenzmikroskopie

einer 20 Vol.-%igen Piperidinlösung (DMF) suspendiert und für 5 min geschüttelt. Die Lösung wird entfernt und erneut frische zugegeben. Dieser Vorgang wird ca. 45 min lang wiederholt bis kein freies Propargyl-5(6)-carboxyfluorescein mehr zu erkennen ist.

Summenformel: $C_{69}H_{83}N_9O_{17}S$ ($1342,51 \text{ g mol}^{-1}$).

MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): $m/z = 1075,0 [M-Pbf+H]^+$ (berechnet für $[C_{55}H_{64}N_9O_{14}]^+$: 1074,5); $1327,8 [M+H]^+$ (berechnet für $[C_{68}H_{80}N_9O_{17}S]^+$: 1326,5); $1349,6 [M+Na]^+$ (berechnet für $[C_{68}H_{79}N_9NaO_{17}S]^+$: 1348,5).

H-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys(6'-Propargyloxy-5(6)-fluoresceincarboxyl)-Arg(Pbf)-Gly-OH (33)



33

Das gequollene Harz wird in einer 25 Vol.-%igen HFIP-Lösung (DCM) suspendiert und für 45 min geschüttelt. Die Lösung wird in einen Rundkolben überführt und das Harz

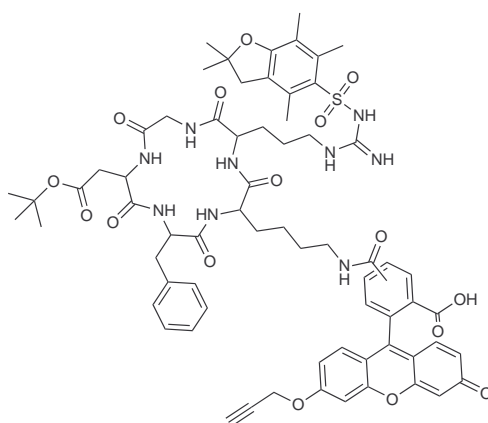
6. Experimenteller Teil

mehrfach alternierend mit DMF, DCM und Isopropanol gewaschen. Die Waschlösungen werden mit der Abspalllösung vereinigt und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es werden 42,3 mg (31,8 μmol ; 6% [seit Beladung]) gelblich-oranges Konjugat **33** isoliert. Das Konjugat wird ohne weitere Aufarbeitung zyklisiert.

Summenformel: $\text{C}_{68}\text{H}_{79}\text{N}_9\text{O}_{17}\text{S}$ (1326,47 g mol^{-1}).

MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): $m/z = 1075,0$ [M-Pbf+H]⁺ (berechnet für [C₅₅H₆₄N₉O₁₄]⁺: 1074,5); 1327,8 [M+H]⁺ (berechnet für [C₆₈H₈₀N₉O₁₇S]⁺: 1326,5); 1349,6 [M+Na]⁺ (berechnet für [C₆₈H₇₉N₉NaO₁₇S]⁺: 1348,5).

c-[-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys(6'-Propargyloxy-5(6)-fluoresceincarbo- nyl)-Arg(Pbf)-Gly-] (**34**)



34

Die Zyklisierung erfolgt anlehnend an die Vorschrift von K. JENSSEN.^[76] Eine Lösung aus 9 ml DMF (275 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ Peptid) und 16 μl DIPEA (3 Äquiv.) werden in einem Rundkolben vorgelegt. Über eine Zweikanalspritzenpumpe werden eine Lösung aus 12 mg HATU, 4 mg HOAt in 5 ml DMF und eine Lösung des linearem Peptids **33** (42 mg) in 5 ml DMF mit einer Geschwindigkeit von 0,32 ml/h zugegeben. Anschließend wird noch weitere 2 h gerührt. DIPEA und DMF werden im Hochvakuum entfernt. Das

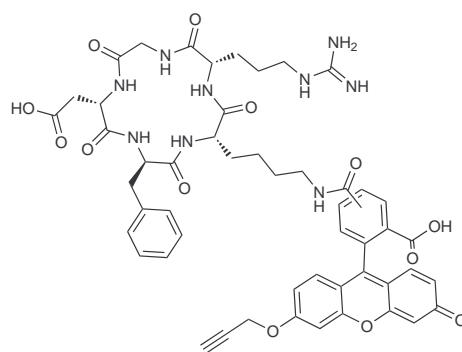
6.4. Synthese eines Targeting-Konjugates für die Fluoreszenzmikroskopie

Peptid in H₂O und ACN aufgenommen und gefriergetrocknet.

Summenformel: C₆₈H₇N₉O₁₆S (1308,45 g mol⁻¹).

MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): $m/z = 1056,0$ [M-Pbf+H]⁺ (berechnet für [C₅₅H₆₂N₉O₁₃]⁺: 1056,5); 1309,5 [M+H]⁺ (berechnet für [C₆₈H₇₈N₉O₁₆S]⁺: 1308,5); 1331,0 [M+Na]⁺ (berechnet für [C₆₈H₇₇N₉NaO₁₆S]⁺: 1330,5);

c-[Asp-D-Phe-Lys(6'-Propargyloxy-5(6)-fluoresceincarbonyl)-Arg-Gly-] (4)



4

Das Peptid wird in 5 ml 95 %iger TFA-Lösung (2,5 % H₂O, 2,5 % Triisopropylsilan [TIS]) gelöst und 3 h bei RT gerührt. Der Lösung wird Isopropanol zugesetzt und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer i.V. (40 °C Badtemperatur) entfernt. Der Rückstand wird in einer H₂O/MeOH/ACN Mischung aufgenommen und das Peptid in eiskaltem Diethylether gefällt. Die Suspension wird bei 4 °C für 10 min bei 13 000 × g zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und der Rückstand nach nochmaligen Waschen mit Diethylether getrocknet. Nach Aufreinigung des Rohpeptides mittels RP-HPLC (Methode 5, Hitachi) werden 20,9 mg des gelben Peptids 4 (20,9 μmol; 66 % seit der Harzabsplattung) isoliert.

6. Experimenteller Teil

Summenformel: $C_{51}H_{53}N_9O_{13}$ (1000,02 g mol⁻¹).

t_R (Methode) = 22,9 min.

MS (MALDI-ToF, Kationen-Modus): $m/z = 1001,5 [M+H]^+$ (berechnet für $[C_{51}H_{54}N_9O_{13}]^+$: 1000,4); $1023,29 [M+Na]^+$ (berechnet für $[C_{51}H_{53}N_9NaO_{13}]^+$: 1022,4).

6.5. Zytotoxizitäts-Assay

Zellkultur

Sämtliche Arbeiten zur Kultivierung der Zellen werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination der Zellkulturen zu verhindern. Hierzu wird eine Sterilwerkbank vom Typ Hera HS-12 verwendet. Alle Medien und Lösungen werden nur steril verwendet, dazu werden sie autoklaviert oder sterilfiltriert. Arbeitsflächen werden regelmäßig mit 3 %iger Kohrsolinlösung desinfiziert. Werkzeuge und Arbeitsmaterialien für die Verwendung innerhalb der Sterilwerkbank werden vor dem Einbringen mit 70 %iger Ethanollösung desinfiziert. Die Zellen werden im Inkubator bei 37 °C, 5,3 % CO₂ und 100 % Luftfeuchte kultiviert. Die Zelldichte in den Zellkulturflaschen wird so eingestellt, dass stets logarithmisches Wachstum erfolgt. Bevor die Zellen konfluent sind werden sie passagiert. Dazu wird das Medium abgesaugt und durch 5 ml Trypsinlösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA, in Phosphatpuffer (PBS)) ersetzt und bei 37 °C inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst haben werden sie in Röhren überführt und zentrifugiert (15 ml Röhren: 60 × g, 6 min; 50 ml Röhren: 259 × g, 7 min). Der Überstand wird entfernt und die Zellen werden in 10 ml entsprechendem Medium resuspendiert. Die Zellen werden je nach Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit 1:2 oder 1:3 geteilt. Dazu werden die Zellen in die doppelte oder dreifache Anzahl Zellkulturflaschen ausgesät, oder die Hälfte bzw. zwei Drittel der Zellen werden verworfen. Nachdem die Zellen in die Zellkulturflaschen überführt wurden, wird mit Medium auf 20 ml aufgefüllt.

Sollen die Zellen über einen längeren Zeitraum gelagert werden, werden sie eingefroren

und in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor dem Einfrieren wird die Zellsuspension zentrifugiert (15 ml Röhren: $60 \times \text{g}$, 6 min; 50 ml Röhren: $259 \times \text{g}$, 7 min), der Überstand entfernt und gegen entsprechendes Medium ersetzt, dem 10 % DMSO zugesetzt ist. Das DMSO verhindert das Eiskristalle die Zellen zerstören. Die Zellen werden resuspendiert und in spezielle Röhren für die Lagerung in flüssigem Stickstoff, sogenannte Kryoröhren überführt. Unmittelbar danach sollte mit dem Abkühlen begonnen werden, da DMSO zytotoxisch auf die Zellen wirkt. Die Temperatur sollte während des Abkühlens um ungefähr $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Minute fallen. Die Geschwindigkeit der Abkühlung ist wichtig, da beim Abkühlen verschiedene Prozesse ablaufen, z.B. die Bildung von Eiskristallen, die Dehydrierung der Zelle und dadurch ein Konzentrationsanstieg der gelösten Stoffe innerhalb der Zelle. Die Kühlrate beeinflusst welcher dieser Prozesse überwiegt. Zum Abkühlen werden die Kryoröhren in einer Styroporbox über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und am nächsten Tag in den Stickstoff-Dewar verbracht. Die mögliche Lagerzeit im flüssigen Stickstoff ist fast unbegrenzt.

Beim Auftauen der Zellen ist auf ein rasches Erwärmen zu achten, da es z.B. bei Temperaturen unter $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu migratorischen Wachstum von Eiskristallen kommen kann. Dabei lagern sich Wassermoleküle von kleinen zu großen Kristallen um, so dass diese immer größer werden, wodurch die Zelle gefährdet ist. Das Kryoröhren wird daher aus dem Stickstoff-Dewar entnommen und sofort im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen Wasserbad aufgetaut. Nachdem die Zellsuspension flüssig ist, wird sie aus dem Kryoröhren pipettiert und in ein Röhren mit $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmten Medium überführt. Die Zellen werden abzentrifugiert (15 ml Röhren: $60 \times \text{g}$, 6 min; 50 ml Röhren: $259 \times \text{g}$, 7 min) und anschließend wird der Überstand abgesaugt. Die Zellen werden im entsprechenden Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen gefüllt. Am nächsten Tag wird die Zellzahl und die Vitalität im Mikroskop überprüft.

KB-3-1

KB-3-1 ist eine humane, adhärent wachsende Gebärmutterhalskrebs Zelllinie. Sie stammt von der bekannten HeLa Zelllinie ab, die die erste *in vitro* kultivierbare Zelllinie ist. Für die Zytotoxizitätsassays wird sie dauerhaft ohne Zusatz von Antibiotika kultiviert, da es sonst zur Ausbildung von Resistenzen kommen kann, die die Ergebnisse verfälschen. Als Medium kommt DMEM (PAA) zum Einsatz, dem 10 % FBS GOLD (PAA) zugesetzt sind. Als Kulturgefäß werden 75 cm^2 Zellkulturflaschen

6. Experimenteller Teil

(SARSTEDT) mit Zellkulturoberfläche verwendet. Die spezielle Zellkulturoberfläche erleichtert die Adhäsion der Zellen.

KB-V1

KB-V1 ist eine Mutante der KB-3-1 Zelllinie. Sie ist durch stetige Selektion der KB-3-1 Zelllinie mit Vinblastin entstanden. Aufgrund des Selektionsdrucks exprimieren die Zellen P-Glycoprotein (MDR1) und sind daher *multidrug*-resistent. Die KB-V1 Zellen werden in DMEM (PAA) mit 15 % FBS GOLD (PAA) kultiviert. Es werden 75 cm² Zellkulturflaschen mit einer speziellen Zellkulturoberfläche verwendet. Der Selektionsdruck wird durch die dauerhafte Zugabe von 500 µg/ml Vinblastin aufrecht erhalten. Während der Durchführung der Assays wird Medium verwendet, das frei von Vinblastin ist. Beim Auftauen wird dem Medium kein Vinblastin zugesetzt, dies geschieht erst nach dem ersten Passagieren.

K562

K562 ist eine humane Leukämiezelllinie. Sie stammen von einer 53 jährigen Frau mit chronisch myeloider Leukämie. Es sind Suspensionszellen, daher unterscheiden sich die Kultivierungsbedingungen von den KB-Zelllinien. Als Kulturmedium wird RPMI 1640 (mit L-Glutamin) mit 10 % FBS GOLD (PAA) verwendet. Die Zellkulturflaschen für Suspensionszellen besitzen keine Zellkulturoberfläche, sondern eine hydrophobe Oberfläche um Zellverluste durch Mikroadhäsion zu verhindern. Zum Passagieren, oder dem Aussäen, müssen sie nicht erst mit Trypsinlösung abgelöst werden, sondern die Zellsuspension wird direkt in die Röhren pipettiert und zentrifugiert (15 ml Röhren: 60 × g, 6 min; 50 ml Röhren: 259 × g, 7 min), die weitere Behandlung bleibt gleich.

HL60

Die HL60 Zelllinie ist eine Suspensionszelllinie und stammt ebenfalls von einer Patientin mit chronisch myeloider Leukämie. Sie werden wie die K562 Zelllinie kultiviert und im Zytotoxizitätsassay verwendet. Eine Besonderheit der HL60 Zellen ist ihre Fähigkeit sich spontan zu Differenzieren. Ausgelöst werden kann eine Differenzierung durch verschiedene Chemikalien wie z.B. Retinolsäure und DMSO. Beim Passagieren und Einfrieren entfällt nur der Ablösevorgang mit Trypsinlösung und entspricht ansonsten der Behandlung der adhären Zellen.

HL60-Vinc

Die HL60/Vinc Zelllinie ist eine *multidrug*-resistente Tochterzelllinie der HL60 Zelllinie. Sie wird ebenfalls wie die K562 Zelllinie kultiviert. Als Selektionsmittel kommt Vincristin zum Einsatz, das auch zur Etablierung dieser Zelllinie verwendet wurde. Alle 4-6 Wochen wird mit Medium selektiert, das 1 μM Vincristin enthält. In der Woche vor einem Zytotoxizitätsassay wird nicht selektiert, um keine Beeinflussung des Assays durch Effekte des Vincristins zu haben.

WM-115

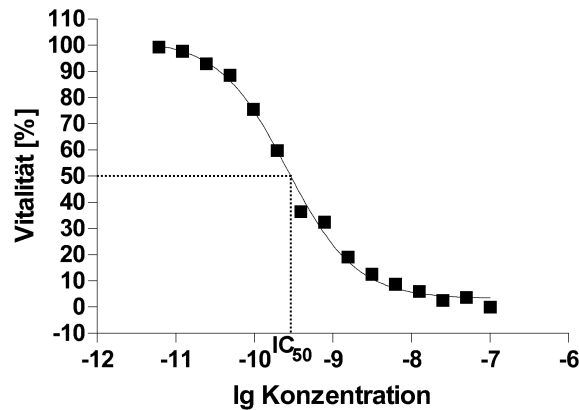
Die WM-115 Zelllinie ist eine humane, adhärent wachsende Melanomzelllinie. Die Expression des Integrins $\alpha_v\beta_3$ wurde bei dieser Zelllinie nachgewiesen.^[80] Die Kultivierungsbedingungen entsprechen denen der KB-3-1 Zelllinie (s. o.), allerdings wird dem Medium Gentamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) als Antibiotikum zugesetzt.

Durchführung des Zytotoxizitätsassays

Haben die Zellen eine 70 %ige Konfluenz erreicht, wird das Medium abgesaugt und durch 5 ml auf 37 °C vorgewärmte Trypsinlösung ersetzt. Es wird bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen sich vom Zellkulturflaschenboden lösen, bzw. durch leichtes „Klopfen“ mit der Zellkulturflasche auf die Arbeitsfläche gelöst werden können. Die Zellsuspension wird aufgenommen und in ein Röhrchen überführt. Zur Inaktivierung des EDTAs und des Trypsins werden einige Milliliter Medium hinzugegeben. Die Suspension wird bei Raumtemperatur zentrifugiert (15 ml Röhrchen: 60 \times g, 6 min; 50 ml Röhrchen: 259 \times g, 7 min). Der Überstand wird entfernt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellkonzentration werden 10 μl der gut durchmischten Suspension entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 10 μl Trypanblau-Lösung wird die Suspension auf das Hämocytometer (BRAND) überführt, wobei auf eine gute Durchmischung der Probe zu achten ist. Das Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, der nach der Farbausschlußmethode arbeitet, d.h. er ist nicht membrangängig und färbt daher nur tote Zellen mit defekter Membran an. Dadurch ist es einfach möglich bei der Bestimmung der Zellkonzentration tote Zellen nicht mit zu berücksichtigen. Die Zellkonzentration wird nach Anleitung der jeweiligen Zählkammer ermittelt, danach wird noch die Verdünnung durch die Zugabe der Trypanblau-Lösung

6. Experimenteller Teil

berücksichtigt, um die Zellkonzentration im Röhrchen zu erhalten. Für die Aussaat der Zellen auf die 96-well Mikrotiterplatte wird eine entsprechende Menge Zellsuspension mit einer Konzentration von 100 000 Zellen/ml hergestellt. Jeweils 100 μ l dieser Zellsuspension werden mittels 12-Kanal-Pipette in jedes well der Platte pipettiert (10 000 Zellen je well). Hierbei muss wieder auf eine hohe Homogenität der Zellsuspension und schnelles Arbeiten geachtet werden, um eine möglichst gleichmäßige Aussaat zu erreichen. Die Zellen auf der 96-well Mikrotiterplatte werden über Nacht im Inkubator gelagert, um ein Adhärenz zu ermöglichen. Von der zu untersuchenden Substanz wird in Medium oder DMSO eine Stammlösung angelegt. Die Konzentration sollte möglichst hoch sein, da es dann auch möglich ist sehr hohe Konzentrationen dieses Stoffes zu vermessen. Ab einer Konzentration von 1 % DMSO ist bei vielen Zelllinien eine zytotoxische Wirkung festzustellen, weshalb die DMSO Konzentration in den wells immer kleiner sein muss. Von dieser Stammlösung aus wird eine Verdünnung in Medium hergestellt. Bewährt hat sich die sechsfache Durchführung eines Versuches auf einer Mikrotiterplatte, dazu wird diese Verdünnung in die wells H7-H12 pipettiert, wobei die durch das schon in den wells vorhandene Medium erfolgende Verdünnung berücksichtigt werden muss. Aus diesen wells wird nach gründlicher Durchmischung mittels einer Mehrkanalpipette ein Teil der Lösung entnommen und in die nächsten wells (G7-G12) pipettiert, wobei es durch in den wells schon vorhandenes Medium wiederum zu einer Verdünnung kommt. Es wird gründlich durchmischt und wiederum ein Teil der Lösung in die nächsten wells übertragen. Dies wird fortgesetzt bis zu den wells B1-B6, auch hier wird gemischt bis eine homogene Lösung entstanden ist. Es wird wiederum ein Teil der Lösung mit der Pipette aufgenommen, dann allerdings nicht in die nächsten wells übertragen, sondern verworfen. Die wells A1-A6 bleiben als Kontrolle frei von der zu untersuchenden Substanz. Trotzdem ist es wichtig aus den wells B1-B6 den gleichen Teil an Lösung abzapfen, wie in den anderen wells, da sonst in diesen mehr Medium verbleibt. Dadurch wären die Wachstumsbedingungen in den wells nicht mehr äquivalent, welches einen Einfluß auf das Ergebnis des Assays haben kann. Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 37 °C wird in jedes well 30 μ l Resazurinlösung pipettiert. Es wird weitere 4-6 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Fluoreszenz bei 588 nm (Anregung: 530 nm) gemessen. Mit Hilfe der Software Graph Pad Prism 4.03 wird die Fluoreszenz gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen und der IC₅₀-Wert als Wendepunkt des nicht-linearen Fits bestimmt. Dabei wird folgende Gleichung für

Abbildung 6.1.: Grafische Bestimmung des IC_{50} -Wertes.

den Fit benutzt:

$$y = bottom + \frac{(top - bottom)}{1 + 10^{(\lg IC_{50} - x)}} \quad (6.2)$$

x = Logarithmus der Konzentration; y = Vitalität; $bottom = y_{min}$; $top = y_{max}$

Der IC_{50} -Wert entspricht der Konzentration einer Substanz, bei der noch 50 % der Zellen leben. In Abbildung 6.1 ist der IC_{50} -Wert grafisch bestimmt worden.

Werden Suspensionszellen für den Assay verwendet, wird zuerst die Verdünnungsreihe in der leeren 96-well Platte hergestellt bevor die Zellen in die wells pipettiert werden. Dazu wird erst eine bestimmte Menge Medium in jedes well vorgelegt und dann die 1. Verdünnung aus der Stammlösung in die wells H7-H12 pipettiert. Dann wird weiter pipettiert wie oben beschrieben. Aus dem Verhältnis von vorgelegten Volumen Medium in dem well zu dem zupipettierten Volumen ergibt sich der Verdünnungsfaktor. Im letzten Schritt werden dann wieder jeweils 10 000 Zellen in jedes well pipettiert, wobei wieder die Verdünnung durch das zusätzlich eingebrachte Medium zu berücksichtigen ist. Der weitere Verlauf folgt dem Versuchsablauf der für die adhärennten Zellen weiter oben beschrieben wurde.

Wichtig für eine erfolgreiche Durchführung des Assays ist, dass die zu untersuchende Substanz vollständig gelöst sein muss. Ist dies nicht der Fall, stimmen die berechneten Konzentration nicht und daher auch nicht der darauf beruhende IC_{50} -Wert. Gelangen Feststoffpartikel in die wells, könnten sie sich dort im schon vorhandenen Medium lösen, die Konzentration würde in diesem well erhöht. Dadurch sind die Replikate des

6. Experimenteller Teil

Versuches inhomogen und der Assay liefert kein genaues Ergebnis. Die Bestimmung eines IC_{50} -Wertes mit dem hier beschriebenen Assay ist bei Substanzen nicht möglich, wenn diese selber bei der Anregungswellenlänge des Resorufin (530 nm) fluoreszieren. Es kommt zur Interferenz der Fluoreszenz des Resorufins mit der Autofluoreszenz der zu untersuchenden Substanz, weshalb eine Auswertung nicht möglich ist. Daher sollte bei jeder neu zu untersuchenden Substanz bei ersten Messungen eine Kontrolle zur Autofluoreszenz durchgeführt werden. Dazu wird in das *well* nur die zu untersuchende Substanz in Medium gegeben und in eine zweites *well* die Substanz und Zellen. Bei beiden *wells* wird auf die Zugabe von Resazurin-Lösung verzichtet. Die Inkubationszeit ist abhängig von den Zellen und auch der zu untersuchenden Substanz. Die ideale Inkubationszeit muss daher empirisch bestimmt werden. Ist die Inkubationsdauer zu kurz gewählt, kann die zu untersuchende Substanz seine Wirkung möglicherweise nicht entfalten, oder die Zellen können nicht schnell genug z.B. durch Einleiten der Apoptose reagieren. Ist die Inkubationszeit zu lang gewählt sterben die Zellen unter Umständen am verbrauchten Medium. Auch teilen sich die Zellen weiter, allerdings nur bis zur Konfluenz. Daher ist es möglich das bei einigen Konzentrationen und langer Inkubationszeit die Zellen vollständige Konfluenz erreichen und sich nicht weiter teilen, während bei höheren Konzentration zuerst viele Zellen sterben, die Überlebenden sich weiter teilen ohne die Konfluenz zu erreichen, so dass das Ergebnis dadurch verfälscht werden kann. Bei einigen sehr stoffwechselaktiven Zelllinien kann es bei längerer Inkubationsdauer auch zu einer Reduktion des Resorufins zu Hydroresorufin kommen, wodurch es zu Verfälschungen des Messergebnisses kommen kann.^[65] Wichtig ist ebenfalls das Durchführen einer Negativkontrolle, um die Intensität der Fluoreszenz in den *wells* mit der Intensität der unbehandelten Zellen vergleichen zu können.

6.6. High Content Screening

WM-115 und KB-3-1 Zellen werden wie in Abschnitt 6.5 beschrieben kultiviert. Die Zellen werden vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 100 000 Zellen/ml erstellt (s. 6.5). Je 100 μ l dieser Suspension wird in jedes *well* der 96 *well* Glasbodenplatte pipettiert, so dass sich 10 000 Zellen in jedem *well* befinden. Die Adhäsion der Zellen auf dem Glasboden erfolgt über Nacht. Von der zu untersuchenden Substanz wird aus einer Stammlösung (in DMSO) eine Lösung in DMEM mit maximal 1 % DMSO hergestellt. Ausgehend von dieser Lösung

Tabelle 6.3.: Konzentrationen und Volumina der eingesetzten Farbstoffe im HCS.

Farbstoff	Konzentration [μM]	Volumen [μl]
Bisbenzimid (H33342)	17,8	12,25
Propidiumiodid	6,0	9,80
Calcein-AM	1,0	12,00
Annexin V-Cy5	- ^a	500,00

^aDie Konzentration der kommerziell erhältlichen Lösung ist nicht angegeben.

wird eine serielle Verdünnungsreihe in Medium angelegt. 24 h vor der Färbung werden je 100 μl dieser Lösungen in die vorgesehenen *wells* der Glasbodenplatte pipettiert, dabei ist zu beachten, dass es durch das Medium, das bereits in den *wells* vorhanden ist, zu einer 1:1 Verdünnung kommt. Dieser Vorgang wird für die 6-stündige und 4-stündige Inkubation 6 h, bzw. 4 h vor der Färbung wiederholt, wobei immer Lösung aus der gleichen Verdünnungsreihe verwendet wird. Direkt vor der Färbung wird der Überstand sehr vorsichtig entfernt und durch die Färbelösung ersetzt (s. Tabelle 6.3). Es wird nochmal 2 h inkubiert. Um eine Austrocknung der Zellen während der Messung im HCS-System zu verhindern, werden vor der Messung 200 μl Medium in jedes *well* zugegeben.

Die Glasbodenplatte wird ohne Abdeckung in das HCS-System eingesetzt. Die Messung erfolgt unter Verwendung der Software scan[^]R Aquisition 2.2.0.8 von OLYMPUS. Anschließend wird die Objekterkennung und die statistische Auswertung der Daten mit scan[^]R Analysis 1.2.0.5, ebenfalls von OLYMPUS, durchgeführt.

6.7. Fluoreszenzmikroskopie

Zellkultur

Für die Internalisierungsstudien und Kolo-kalisierungsexperimente wurde die WM-115 Zelllinie verwendet, da sie das Integrin $\alpha_v\beta_3$ exprimiert.^[80] In die *wells* einer 12-*well* Schale wird jeweils ein Deckgläschen platziert. Die WM-115 Zellen werden mit 5 ml Trypsinlösung vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst, nachdem das Medium abgesaugt wurde. Es werden 5 ml DMEM zugegeben, die Zellsuspension wird in Röhren

6. Experimenteller Teil

überführt und zentrifugiert (15 ml Rörchen, $60 \times g$, 6 min; 50 ml Rörchen, $259 \times g$, 7 min). Der Überstand wird entfernt und die Zellen in Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellkonzentration werden $10 \mu\text{l}$ Zellsuspension entnommen und mit $10 \mu\text{l}$ Trypanblaulösung in einem Reaktionsgefäß gemischt. $10 \mu\text{l}$ dieser Suspension werden auf ein Neubauer Hämocytometer aufgetragen und ausgezählt. Die Zellkonzentration wird auf 50 000 Zellen/ml mit Medium eingestellt und in jedes *well* der 12-*well* Schale 1 ml, also 50 000 Zellen, pipettiert. Die Zellen werden über Nacht inkubiert, um eine gute Adhäsion zwischen Deckgläschen und den Zellen zu erreichen. Dies verringert die Ablösung der Zellen während der Kolokalisierungsexperimente.

Kolokalisierung

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden im Medium gelöst, wobei das RGD-Fluorescein-Cryptophycin-Konjugat in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ und der LysoTracker® Red DND-99 (INVITROGEN) von 1 nM gelöst werden. Das Medium wird vorsichtig entfernt und die Zellen auf Eis abgekühlt. Es werden jeweils das RGD-Fluorescein-Cryptophycin-Konjugat und der LysoTracker® Red einzeln, sowie beide Farbstoffe zusammen untersucht. In die *wells* wird jeweils 1 ml der entsprechenden Farbstofflösung pipettiert, wobei eine abgeschnittene Pipettenspitze verwendet wird, um möglichst eine Schädigung der Zellen zu verhindern. Als Kontrolle wird für jede Inkubationszeit ein *well* nur mit Medium behandelt. Die Zellen werden für 30 min auf Eis inkubiert. Durch die tiefen Temperaturen ist es den Zellen nicht möglich Substanzen zu endozytieren, trotzdem binden die Integrine an die RGD-Peptide.^[81] Die Lösungen werden vorsichtig abgesaugt, durch auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmtes Medium ersetzt und die Zellen im Inkubator inkubiert. Durch die höheren Temperaturen ist es den Zellen nun möglich gebundene RGD-Peptide zu endozytieren, während gleichzeitig keine RGD-Peptide mehr im Medium vorhanden sein sollten, die erneut an Integrine binden könnten. Dadurch wird erreicht, dass es einen definierten Startzeitpunkt der Endozytose gibt und nicht zeitlich verschiedene Endozytosestadien in einer Probe vorliegen. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt, durch Paraformaldehyd (3,7 % in PBS) ersetzt und für 10 min fixiert. Die Fixierlösung wird entfernt und Millipore Wasser (MPW) in das *well* pipettiert, das gleich wieder entfernt wird. Die Deckgläschen werden aus den *wells* genommen mit dem Rand auf ein saugfähiges Papier gesetzt, um größere Mengen Wasser zu entfernen und dann mit der zellenbehafteten Seite nach unten auf einen

Objektträger montiert. Als Montierflüssigkeit wird vorher jeweils 1 Tropfen ProLong[®] Gold (Invitrogen) auf die Objektträger aufgetragen. ProLong[®] Gold verhindert das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe und konserviert die Proben. Die Proben werden über Nacht an einem dunklen, belüfteten Ort waagrecht gelagert, damit die Montierflüssigkeit aushärten kann. Danach werden die Proben bei 4 °C gelagert. Die Messungen wurden von RALF PALMISANO am Universitätsklinikum Erlangen durchgeführt.

6. Experimenteller Teil

Teil IV.

Ergebnisse und Diskussion

7. Ergebnisse und Diskussion

7.1. Synthese des ^{13}C -markierten Cryptophycins-52

Die ^{13}C -Markierung des Cryptophycins-52 in Benzylstellung des Fragmentes A (s. Abb. 7.1) sollte die Untersuchung, ob Cryptophycin-52 über das Epoxid des Fragmentes A an β -Tubulin kovalent bindet ermöglichen. In diesem Fall käme es wahrscheinlich zur Ringöffnung des Epoxides durch ein Nukleophil des β -Tubulins. Dies hätte eine Verschiebung der ^{13}C -NMR-Signale der Kohlenstoffatome des Epoxids zur Folge. Aufgrund der ^{13}C -Markierung an dieser Stelle sollte die Detektion des Signals auch bei sehr geringen Mengen Cryptophycin-52, die an β -Tubulin binden, möglich sein. Ebenfalls sollte die Zuordnung der Signale nach einer Öffnung des Epoxids durch die Isotopenmarkierung erleichtert sein.

Die ^{13}C -Markierung wurde durch die Verwendung von ^{13}C -isotopenmarkierter Benzoesäure als Ausgangspunkt für die Fragment A-Synthese eingeführt. Erste Versuche einer Reduktion der Benzoesäure zum Benzaldehyd unter Pd-Katalyse waren nicht erfolgreich.^[82] Dazu wird die Benzoesäure mit Pivalinsäureanhydrid in das gemischte Anhydrid überführt und dann von wässriger Natriumhypophosphit-Lösung reduziert, wobei $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ und Trizyklohexylphosphin die Reduktion katalysieren. Um die direkte Reduktion zu umgehen, wurde die Benzoesäure zum Benzylalkohol reduziert und dann mittels Pyridiniumchlorochromat (PCC) zum ^{13}C -markierten Benzaldehyd oxidiert.

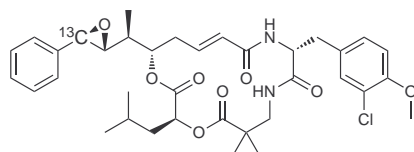


Abbildung 7.1.: Cryptophycin-52 mit ^{13}C -Isotopenmarkierung.

7. Ergebnisse und Diskussion

Zur Vermeidung des toxischen und umweltbelastenden PCC wurde die Oxidation vom Benzylalkohol zum Benzaldehyd nach SWERN versucht. Die Oxidation mittels PCC erzielte jedoch höhere Ausbeuten und reineres Produkt, so dass auch aufgrund des hohen Preises der ^{13}C -markierten Benzoesäure die Oxidation unter Verwendung von PCC durchgeführt wurde. Vom Benzaldehyd ausgehend wurde das Fragment A der Synthesestrategie von STEFAN EISSLER folgend synthetisiert.^[83]

Der Benzaldehyd wurde mit Propansäuretriphenylphosphoniumbromid (**8**) in einer Wittig-Reaktion zum entsprechenden β , γ -ungesättigten Ester umgesetzt. Dieser wurde über eine asymmetrischen Dihydroxylierung nach SHARPLESS in das entsprechende Lacton überführt.^[84] Nach einer Methylierung in α -Position, wurde das Lacton zum Methylester geöffnet und das Diol in das Acetonid überführt.^[85] Die Reduktion des Methylesters zum korrespondierenden Aldehyd ermöglichte die unter Substratkontrolle diastereoselektive Allylierung mit Allyl-tri-*n*-butylzinn zum Fragment A (**14**), wobei $\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ als Lewis-Säure eingesetzt wurde.

Das Fragment B wurde nach einer von STEFAN EISSLER und MARKUS NAHRWOLD modifizierten Synthese von J. ADAM MCCUBBIN, MATTHEW L. MADDESS und MARK LAUTENS dargestellt.^[83,86] Die ebenfalls von STEFAN EISSLER entwickelte Fragment D Synthese eröffnete den Zugang zu diesem Fragment.^[83] Analog zu einer Strategie von AIKINS *et al.* wurde das Fragment C aufgebaut.^[87] Das Fragment C und das Fragment D wurden miteinander verestert, wobei *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) als Kupplungsreagenz eingesetzt wurde. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde das Fragment B mit den Fragmenten C und D gekuppelt. Als Kupplungsreagenzien für die Ausbildung der Amidbindung kamen dabei EDC und 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) zum Einsatz. Die Veresterung des Fragmentes A mit dem Fragment B-D erfolgte unter Yamaguchi-Bedingungen.^[88] Zuletzt erfolgte die Entschützung des Acetonids und die Diol-Epoxid Transformation.^[83]

Das so erhaltene ^{13}C -markierte Cryptophycin-52 (**5**) wurde in NMR spektroskopischen Untersuchungen zur Interaktion zwischen Cryptophycin-52 und Tubulin (rPEPTIDE) eingesetzt. Das markierte Kohlenstoffatom tritt bei 59,1 ppm (CDCl_3) in Resonanz. Das vicinale Wasserstoffatom erzeugt im ^1H -NMR ein Signal bei 3,69 ppm (CDCl_3). Die geringe Wasserlöslichkeit des markierten Cryptophycins verhinderte weiterführende Untersuchungen, da das β -Tubulin nur in wässrigen Puffersystemen eingesetzt werden kann. Erwartet wurde, dass die geringe Wasserlöslichkeit durch den hohen ^{13}C -

Anteil (Isotopenmarkierung) kompensiert wird und dadurch die Aufnahme von NMR-Spektren möglich sein sollte. Verschiedenste NMR-Techniken wurden angewandt, um den Signal-Rauschabstand zu verbessern, beispielsweise *water presaturation* (BRUKER, zgpr) und *gradient-based watergate* (BRUKER, zggpw5) um das starke Wassersignal zu unterdrücken. Die Löslichkeit mit $<1 \mu\text{M}$ im Puffersystem (10 mM Pipes (pH 6,9), 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 ; $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1) reichte jedoch nicht für auswertbare Spektren. Denkbar wäre ein weiterer Einsatz des ^{13}C -markierten Cryptophycins zur Bestimmung kinetischer Daten bei der Linkerspaltung von Konjugaten, die auf Cryptophycin-55 basieren.

7.2. Synthese von Cryptophycin-Prodrugs

Neben den Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen (s. Abschnitt 1.1 und 7.4) sollte die Effizienz und Verträglichkeit von Cryptophycin-52 auch durch die Konstruktion eines Prodrugs gesteigert werden. Die Erkennungseinheit ist dabei ein wichtiger Bestandteil, der maßgeblich zu den pharmakologischen Eigenschaften des Prodrugs beiträgt. Als Erkennungseinheit fiel die Wahl auf ein RGD-Peptid, welche an Integrine binden.^[68] Da einige Krebszelllinien Integrine überexprimieren, ist die direkte Erkennung dieser Zellen über RGD-Peptide möglich. Integrine, vor allem das Integrin $\alpha_V\beta_3$, sind auch an der Angiogenese beteiligt.^[45,89,90] Das Erkennen des aktivierten Endothels in der Nachbarschaft wachsender Tumore ist dadurch möglich (s. Abschnitt 1.2). c-[RGDfK-], das ausgewählte Peptid, bindet an das Integrin $\alpha_V\beta_3$,^[48] welches eine wichtige Rolle bei der Ausbildung neuer Gefäße spielt.^[45] Dadurch ist der gezielte Transport zu vielen Tumoren möglich, insbesondere zu soliden Tumoren, da diese ab einer gewissen Größe auf die Angiogenese zur Nährstoff- und Sauerstoffversorgung angewiesen sind.^[91] Die RGD-Peptide sind sehr gut wasserlöslich, wodurch die Prodrugs eine wesentlich bessere Wasserlöslichkeit als Cryptophycine aufweisen. Dies vereinfacht den Einsatz in Assays und später auch die medizinische Applikation. Bisher wurde zur Steigerung der Wasserlöslichkeit CremophorTM als Lösungsvermittler in Formulierungen zur intravenösen Injektion von Cryptophycinen eingesetzt. Die Verwendung von CremophorTM kann zur Hypersensibilisierung führen, weshalb möglichst auf dessen Einsatz verzichtet wird.^[20,92] Patienten mit bekannter Überempfindlichkeit gegenüber CremophorTM wurden bei klinischen Phase I Studien von Cryptophycin-52 ausgeschlossen.^[93]

7. Ergebnisse und Diskussion

Die Erkennungseinheit soll über einen selbsteliminiierenden Linker mit dem Cryptophycin verbunden werden. Die Aktivierungseinheit (Glukuronsäure) wurde an den Vorläufer des selbsteliminiierenden Linkers gekuppelt. Wird später diese Aktivierungseinheit abgespalten, spaltet sich der Linker vom Cryptophycin ab und soll dadurch dieses als aktiven Wirkstoff freisetzen. Die Erkennungseinheit (RGD–Peptid) soll über einen azidmodifizierten Triethylenglycollinker^[69] mit dem selbsteliminiierenden Linker unter Verwendung einer 1,3–dipolaren Zykoaddition nach HUISGEN verbunden werden. Das RGD–Peptid soll die $\alpha_V\beta_3$ Integrine auf den Tumorzellen, oder dem aktivierten Endothel in der Umgebung des Tumors erkennen und daran binden. In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass RGD–Konjugate von Zellen endozytiert werden.^[69] Nach der Endozytose ist ein weiterer Transport in das Lysosom wahrscheinlich. Die Freisetzung des Cryptophycins aus dem Prodrug soll im Lysosom geschehen. Der Nachweis dieses Transports wird in Abschnitt 7.3 thematisiert.

Die Wahl für die Aktivierung fiel auf zwei Systeme. Das erste System basiert auf der in Lysosomen vorhandenen β –Glukuronidase (s. Abb. 7.2 **A**). Bei diesem System ist der selbsteliminiierende Linker mit einer Glukuronsäureeinheit verbunden, diese wird von der β –Glukuronidase abgespalten und so die Freisetzung initiiert. Eine vorzeitige Freisetzung ist unwahrscheinlich, da dieses Enzym extrazellulär nicht vorhanden ist.^[94,95] Aufgrund seiner geringen Polarität kann das Cryptophycin durch die, das Lysosom umgebende, Membran in das Zytosol diffundieren, die Zelle und weitere Zellen in der Umgebung töten. Das zweite System zur Aktivierung basiert auf Cathepsin B (s. Abb. 7.2 **B**). Cathepsin B ist eine lysosomale Protease, die aber auch häufig in soliden Tumoren extrazellulär lokalisiert ist.^[54,96,97] Die Freisetzung wird bei diesem System durch die Abspaltung eines Peptids durch Cathepsin B eingeleitet. Häufig wird die Spaltsequenz –Val–Cit– verwendet, aber auch andere Spaltsequenzen sind möglich.^[54] Nach der Freisetzung kann das Cryptophycin in die Zelle diffundieren.

Die Ergebnisse der Synthese der Erkennungs- und der Aktivierungseinheit sind in den folgenden Abschnitten beschrieben. Erste Versuche zur Synthese des selbsteliminiierenden Linkers sind von BENEDIKT SAMMET durchgeführt worden, abgeschlossen ist sie aber noch nicht. Der Syntheseweg für die Kupplung des Cryptophycin über das korrespondierende Chlorhydrin ist bereits literaturbekannt.^[16]

7.2. Synthese von Cryptophycin-Prodrugs

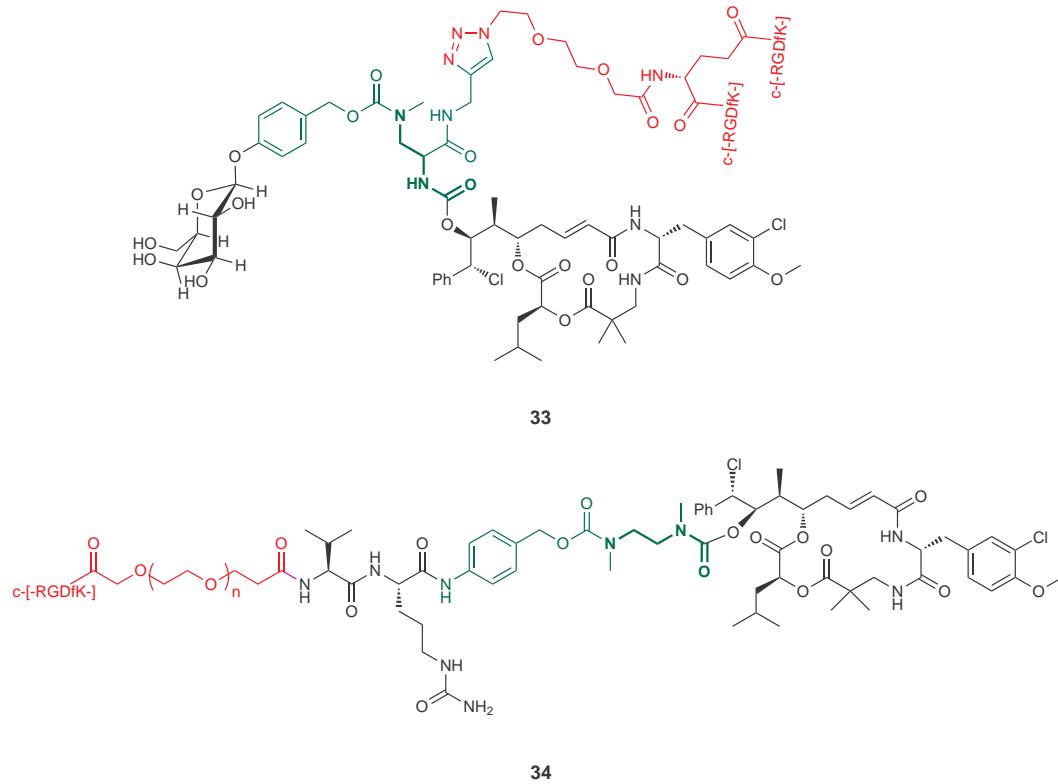


Abbildung 7.2.: **A:** Cryptophycin Prodrug mit Glukuronsäureeinheit als Auslöser; **B:** Cryptophycin Prodrug mit Cathepsin Spaltsequenz –Val–Cit– als Auslöser; die Erkennungseinheit ist rot markiert, der selbsteliminiierende Linker in grün.

7.2.1. Synthese der Erkennungseinheit

Aufgrund neuerer Erkenntnisse, dass multimere RGD–Peptide eine höhere Effizienz als Monomere aufweisen, wurde für das Prodrug mit Glukuronsäureeinheit als Auslöser (s. Abb. 7.2 A) eine bivalente Erkennungseinheit aus zwei zyklischen RGDfK–Peptiden, verbrückt über ein Glutamat, vorgesehen.^[98]

Das lineare Peptid D(*t*-Bu)fK(Alloc)R(Pbf)G, für die RGD-Erkennungseinheit des Glukuronsäure–basierten Prodrugs, wurde mittels Fmoc/*t*-Bu–Strategie an 2-Chlortritylchloridharz in manueller Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Nachdem die terminale Fmoc–Schutzgruppe zur Vermeidung möglicher Aspartimidbildung manuell mit gesättigter Piperazinslösung abgespalten wurde, wurde das lineare Peptid mit 1 %iger TFA (DCM) vom Harz abgespalten. Das Peptid wurde ohne weitere Aufarbeitung unter Pseudohochverdünnung zyklisiert. In Lösung wurde die Alloc Schutzgruppe am Lysin palladiumkatalysiert ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) entfernt. Das Peptid wurde durch Fällen mit eiskaltem Diethylether und RP–HPLC aufgereinigt. Fmoc geschütztes Glutamat wurde mit 2 Äquivalenten *c*-[–RGDfK–] umgesetzt, wodurch das Produkt der doppelten Addition erhalten wurde. Die Reaktion wurde über MALDI–ToF–MS verfolgt. Eine vollständige Umsetzung konnte dabei nicht beobachtet werden, bei allen Messungen waren Spuren des unkonjugierten Peptides nachzuweisen. Das Produkt fiel zum Teil während der Reaktion als farbloser Feststoff aus. Die Reinigung mittels Ausfällen mit eiskaltem Diethylether aus DCM entfernte alle Nebenprodukte und das Produkt wurde in hervorragender Reinheit erhalten. Problematisch war das erneute Lösen, dies gelang nur in DMSO. Bei einer erneuten Synthese könnte die Verwendung des Triethylenglycolazids als Schutzgruppe anstatt Fmoc das Löslichkeitsproblem verringern. Die Fmoc–Schutzgruppe wurde vor der Kupplung mit dem Triethylenglycolazid abgespalten. Zur Erleichterung der Aufarbeitung wurde zur Abspaltung der Fmoc–Schutzgruppe ein Scavenger–Harz eingesetzt.^[77] Das DBU spaltet die Fmoc–Gruppe ab und das entstehende Dibenzofulven wird von am Polystyrol immobilisierten *N*-(2-mercaptoethyl)aminomethyl–Gruppen abgefangen. Dadurch ist es möglich die Base (DBU) in katalytischen Mengen einzusetzen. Die allgemeine Arbeitsvorschrift nach SHEPPECK, KAR und HONG verwendet 50 mol% DBU.^[77] Nach dieser Vorschrift wurde die Abspaltung der Fmoc–Schutzgruppe durchgeführt. Die Reaktionskontrolle mittels RP–HPLC zeigte nach 2 h allerdings nur einen 50 %igen Umsatz. Nach erneuter Zugabe von 50 mol% DBU und mehrstündigem Schütteln war der Umsatz vollständig. Es ist daher wahrscheinlich, dass das Abfangen

7.2. Synthese von Cryptophycin-Prodrugs

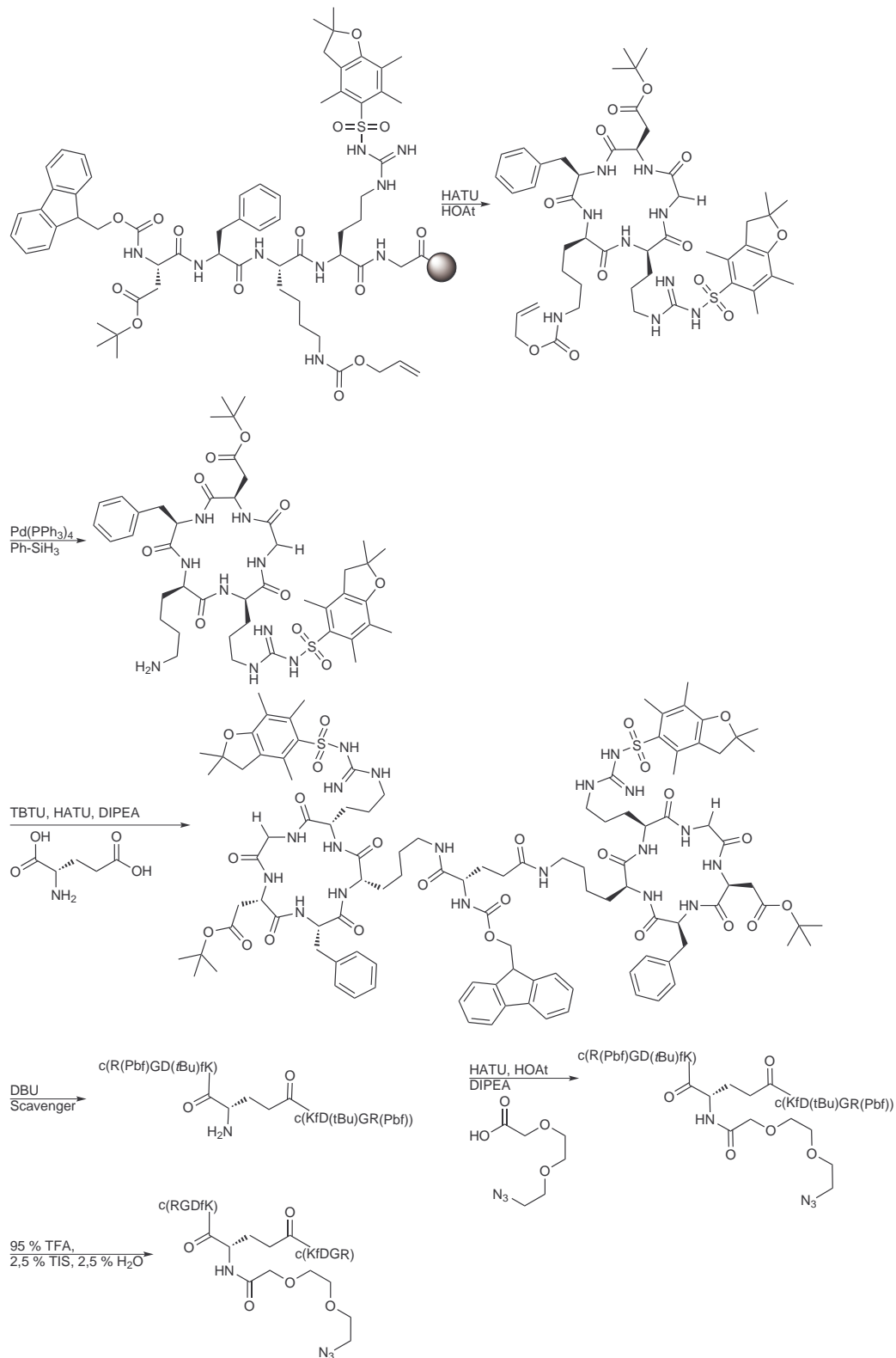


Abbildung 7.3.: Synthese der bivalenten Erkennungseinheit für ein Prodrug basierend auf zwei c-[RGDFK]-Peptiden.

7. Ergebnisse und Diskussion

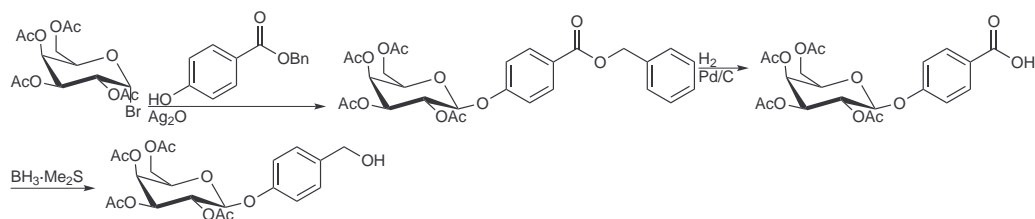


Abbildung 7.4.: Synthese des „Auslösers“ des Prodrugs; Glukuronsäurebaustein der durch eine Glukuronidase abgespalten werden soll und so die Selbstelimination des Linkers initiiert, wodurch das Cryptophycin freigesetzt wird. In Vorversuchen wurde diese Synthese mit Glaktose als Ausgangsverbindung durchgeführt.

des Dibenzofulvens an die feste Phase nicht gelungen ist. Freies Dibenzofulven reagiert mit DBU in einer Michael–Addition, weshalb dann stöchiometrische Mengen DBU für einen kompletten Umsatz erforderlich sind. Im letzten Schritt vor der Konjugation der Erkennungseinheit mit dem übrigen Prodrug wurden alle permanenten Schutzgruppen der Zyklopeptide entfernt.

7.2.2. Synthese der Aktivierungseinheit

Der nächste Baustein für das Prodrug ist die Glukuronsäureeinheit, deren enzymatische Abspaltung vom Prodrug als molekularer „Auslöser“ die Selbstelimination und damit die Freisetzung des Cryptophycins auslösen soll. Um den Reaktionsweg und die Schutzgruppenstrategie zu testen wurde die gesamte Synthese der Glukuronsäureeinheit beispielhaft mit Galaktose statt Glukuronsäure durchgeführt. Im ersten Schritt der Synthese dieses Bausteins wurde Galaktose vollständig acetylgeschützt. Wird später Glukuronsäure statt Galaktose eingesetzt, so wird die Carboxylgruppe an C⁶ während der Acetylierung der Alkoholfunktionen ebenfalls acetyliert. Das nicht anomerreine Galaktosepentaacetat wurde anschließend mit Bromwasserstoff selektiv zu α -Galaktosylbromid umgesetzt. Unter KOENIGS–KNORR–Bedingungen erfolgte die Glykosylierung von 4-Hydroxybenzoesäurebenzylester. Im nächsten Schritt wurde selektiv der Benzylester gespalten. Im nächsten Schritt soll die freie Carboxylgruppe zum primären Alkohol reduziert werden und später dem Verbinden der Glukuronsäureeinheit mit dem selbsteliminierenden Linker über eine Veretherung dienen. Leider war

der Versuch mit $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ selektiv nur die Carboxylgruppe zu reduzieren auch unter verschiedenen Reaktionsbedingungen nicht erfolgreich. Immer wurden auch die Acetylschutzgruppen der Alkoholfunktionen entfernt, so dass eine Kupplung selektiv über den Alkohol in Benzylstellung nicht möglich ist.

7.3. Synthese und biol. Studien zur Aufnahme eines Targeting–Fluoreszenz–Cryptophycin–Konjugates

Die bisherigen Überlegungen zu den Abspaltungsstrategien gehen von einer Lokalisierung des Prodrugs in den Lysosomen der Zelle aus. In der Literatur ist die Endozytose von RGD–Konjugaten beschrieben.^[46,70] Für das Integrin $\alpha_V\beta_3$ wurde die Endozytose von fluoreszenz–markierten RGD–Peptiden bereits mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.^[48] V. PIJUAN-THOMPSON und C. L. GLADSON zeigten 1997 das [¹²⁵I]Vitronectin nach der Endozytose über $\alpha_V\beta_3$ in das Lysosom transportiert wird und dort abgebaut wird.^[99] Zum Nachweis inhibierten sie den lysosomalen Abbau durch Zugabe von Chloroquin. Chloroquin hebt den intralysosomalen pH–Wert an und inhibiert dadurch die lysosomalen Enzyme, die ein saures pH–Optimum besitzen.^[100] Für einzelne Enzyme konnte zusätzlich eine direkte Inhibition nachgewiesen werden.^[100,101] Für RGD–Cryptophycin–Konjugate soll gezeigt werden, dass der Endozytose über $\alpha_V\beta_3$ ein Transport in das Lysosom folgt. Dazu wurde das RGD–Cryptophycin–Konjugat mit Fluorescein markiert, dies ermöglicht die Verfolgung des Konjugates innerhalb der Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie. Durch die gleichzeitige selektive Färbung der Lysosomen ist es möglich, falls vorhanden, eine Lokalisierung in den Lysosomen nachzuweisen.

Die Erkennungseinheit besteht auch bei diesem Konjugat aus dem RGD–Peptid c-[RGDfK-]. Das Konjugat soll als erstes Modellprodrug Aufschluß über die Aufnahme in die Zelle eines späteren RGD–Peptid–Cryptophycin Konjugates geben. Neben der Aufnahme sollen auch Informationen über die Lokalisation des Konjugates innerhalb der Zellen gewonnen werden. Diese Informationen sind wichtig für das Design späterer Prodrugs. Voraussetzung ist, dass der Linker gespalten werden kann. Daher muss er so entwickelt werden, dass es durch die am Ort der Lokalisation herrschenden Bedingungen

7. Ergebnisse und Diskussion

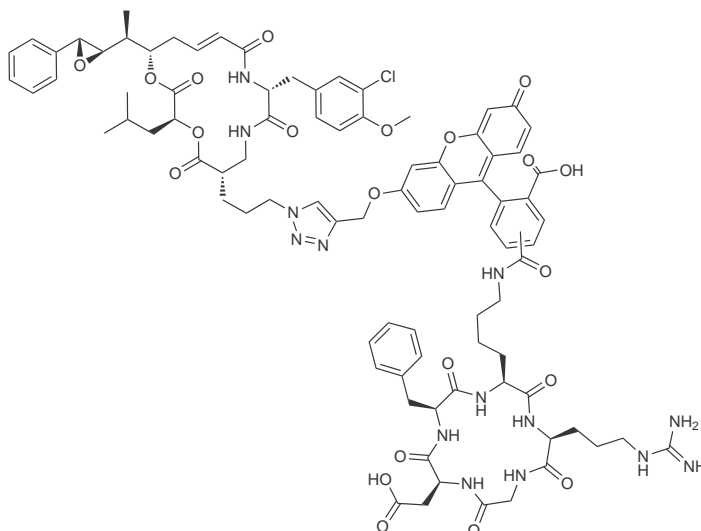


Abbildung 7.5.: Konjugat zur Studie der Aufnahme von Cryptophycin–Prodrugs aus Cryptophycin, RGD–Peptid und Fluorescein.

zu einer Abspaltung entweder spontan oder katalysiert durch dort lokalisierte Enzyme kommt. Wenn bekannt ist in welcher Umgebung sich ein RGD–Peptid–Cryptophycin–Konjugat in der Zelle befindet, so kann durch diese Informationen beispielsweise der richtige Linker ausgewählt werden.

Der Fluoreszenzfarbstoff für das Konjugat wird an die ϵ –Aminogruppe des Lysins des c-[RGDFK]–Peptid gekuppelt. Im letzten Schritt wird dieses Konjugat an ein Azid–funktionalisiertes Cryptophycin–Derivat mittels der schon erwähnten kupferkatalysierten Azid–Alkin Zykloaddition (CuAAC) nach HUISGEN gekuppelt. Indem das Cryptophycin im letzten Schritt an das Konjugat gekuppelt wird und durch die Verwendung der CuAAC als Kupplungsmethode ist das Cryptophycin möglichst wenigen Synthese- und Aufreinigungsschritten ausgesetzt. Aufgrund der großen Anzahl an funktionellen Gruppen und der komplexen Struktur sind Cryptophycine nur mit wenigen Reaktionsbedingungen kompatibel. Die Darstellung der Cryptophycine ist ebenfalls aufwendig, weshalb nur geringe Mengen verfügbar sind. Als Fluoreszenzfarbstoff fiel die Wahl auf Carboxyfluorescein. Es ist günstig in größeren Mengen kommerziell erhältlich. Seine Fluoreszenzeigenschaften sind sehr gut und es gibt literaturbekannte Vorschriften, um die für die CuAAC (HUISGEN Zykloaddition) notwendige Alkinfunktion einzuführen.^[102]

Die Synthese des linearen Peptides Fmoc–D(tBu)fKR(Pbf)G–OH erfolgt in automa-

tisierter Festphasenpeptidsynthese. Die Kupplung des von CHRISTINE WEISS synthetisierten Alkin-funktionalisierten Carboxyfluorescein-Derivats erfolgt nach einem Protokoll von BROCK *et al.* (Methode: „with Low Excess of Carboxyfluorescein“; 2,5 Äquiv.).^[103] BECK-SICKINGER *et al.* beschreiben in^[104], dass bei der Verwendung von DIC und HOBt als Kupplungsreagenzien selektiv die Carboxylgruppe in 5(6)-Position angegriffen wird. Die Carboxylgruppe in Position 2 ist durch sterische Hinderung und durch die Lactonbildung geschützt. Durch die Verwendung eines Gemisches von 5(6)-Carboxyfluorescein zur Synthese des Alkin-Derivates ist das Derivat, als auch das Prodrug ein Gemisch beider Isomeren. Nach Abschluß der Kupplungsreaktion wird sofort mit 25 %iger Piperidinlösung (DMF) nachgespült, dies entfernt mögliche Nebenprodukte (zwei- und dreifach Konjugate),^[103] gleichzeitig wird die terminale N^α-Schutzgruppe entfernt. Das lineare Peptid wird unter Beibehaltung der permanenten Schutzgruppen abgespalten und zyklisiert. Die permanenten Schutzgruppen werden mittels TFA abgespalten und das Konjugat per RP-HPLC aufgereinigt. CHRISTINE WEISS hat den letzten Schritt, die Click-Reaktion mit dem Azid-Cryptophycin, das von MARKUS NAHRWOLD dargestellt wurde, durchgeführt.

Dieses Konjugat aus einer Erkennungseinheit, einem Fluorophor und einem Cryptophycin wurde in fluoreszenzmikroskopischen Studien eingesetzt. Die adhärent wachsenden Hautkrebszellen (WM-115), wurden bei 0°C 30 min mit diesem Konjugat inkubiert. Dabei sind die Zellen auf Deckgläschen aufgebracht, die in 12-well Schalen liegen. In dieser Zeit binden die RGD-Peptide an die von den Zellen exprimierte $\alpha_v\beta_3$ Integrine, können aber aufgrund der niedrigen Temperatur nicht endozytiert werden. Die Konjugatlösung wird entfernt, gegen Medium ersetzt und die Temperatur auf 37°C erhöht. Die höhere Temperatur steigert die Fluidität der Zellmembran und ermöglicht so die Endozytose der Konjugatmoleküle. Durch dieses Vorgehen wird die Endozytose der einzelnen Moleküle synchronisiert. Dies ermöglicht es, Inkubationszeiten im Bezug zum Start der Endozytose anzugeben. Ohne eine Synchronisation der vielen gleichzeitig stattfindenden Endozytose-Ereignisse, könnte ein Konjugatmolekül zu Beginn der Zugabe der Konjugatlösung endozytiert werden und ein anderes am Ende der 30 min Inkubation mit der Konjugatlösung. Als Folge, wären alle Stadien der Endozytose nebeneinander sichtbar und könnten nicht den einzelnen Inkubationszeiten zugeordnet werden. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit bei 37°C wird jeweils ein Deckgläschen aus dem Medium genommen, fixiert und mit Einbettmedium auf Objektträgern montiert. Die Zellen sind dabei zwischen Objektträger und Deckgläschen von einer

7. Ergebnisse und Diskussion

Schicht Einbettmedium, das ein Ausbleichen der Fluoreszenz verhindert, umgeben.

In Abbildung 7.6 sind einige Fluoreszenzmikroskopiebilder exemplarisch gezeigt. Nach 15 min (Abbildung 7.6; A) ist im grünen Kanal zu erkennen, dass das Konjugat bereits von den Zellen endozytiert wurde. Der Overlay mit dem Fluoreszenzbild des LysoTrackerTM red zeigt deutlich eine Kolo-kalisierung des LysoTrackerTM und des Konjugates. Das Konjugat ist bereits nach 15 min hauptsächlich in den Lysosomen lokalisiert. Vereinzelt sind einige Vesikel zu erkennen, die das Konjugat enthalten, aber nicht durch den LysoTrackerTM angefärbt wurden, dabei handelt es sich wahrscheinlich um Endosomen. Diese haben keinen sauren pH-Wert und werden daher nicht vom LysoTrackerTM markiert. Häufig fusionieren Endosomen mit Lysosomen, sie transportieren so Moleküle von der Außenseite der Zellmembran in die Lysosomen, wo sie weiter verdaut werden. Nach 40 min Inkubation ist das Konjugat zu fast 100 % mit dem LysoTrackerTM kolo-kalisiert, die Anzahl der Lysosomen, die kein Konjugat enthalten, ist im Vergleich zur 15 minütigen Inkubation zurück gegangen. Auch sind kaum Endosomen zu erkennen, die das Konjugat enthalten und daher grün fluoreszieren.

Das Konjugat ist nach einer Inkubationszeit von 4 h immer noch in der Zelle lokalisiert, wobei es nur noch in den Lysosomen zu finden ist. Mit Konjugat beladene Endosomen sind nicht zu erkennen. Lysosomen, die kein Konjugat enthalten, sind ebenfalls nicht zu erkennen. Das Konjugat und der LysoTrackerTM sind zu 100 % kolo-kalisiert. Da eine Spaltstelle für die Freisetzung des Cryptophycins vom RGD-Peptid fehlt, kann das Cryptophycin nicht freigesetzt werden und in größerem Umfang in das Zytosol eindringen. Ein nächster Schritt ist die Synthese eines Konjugates, das das Cryptophycin freisetzt. Dabei sollte es so markiert sein, dass die Diffusion über die Membran möglichst wenig beeinträchtigt wird, eine Verfolgung aber dennoch möglich ist. Dies würde eine lückenlose Aufklärung des innerzellulären Transports des Cryptophycins ermöglichen und eine finale Lokalisation an den Mikrotubuli würde erwartet werden.

Beachtet werden muss, dass es aufgrund der Ansäuerung durch Protonenpumpen der Endosomen und der späteren Fusion mit den Lysosomen zur Hydrolyse des Konjugates kommen kann. Die Lysosomen enthalten zudem eine Reihe von unspezifischen Hydrolasen, die dem Verdau von endogenen und exogenen Material dienen. Vor allem das Epoxid und die Esterbindungen des Cryptophycins könnten in diesem Milieu leicht hydrolysiert werden. Aber auch das RGD-Peptid, die Amidbindung zwischen Fragment B und Fragment C könnten durch vorhandene Proteasen gespalten werden. Die Fluo-

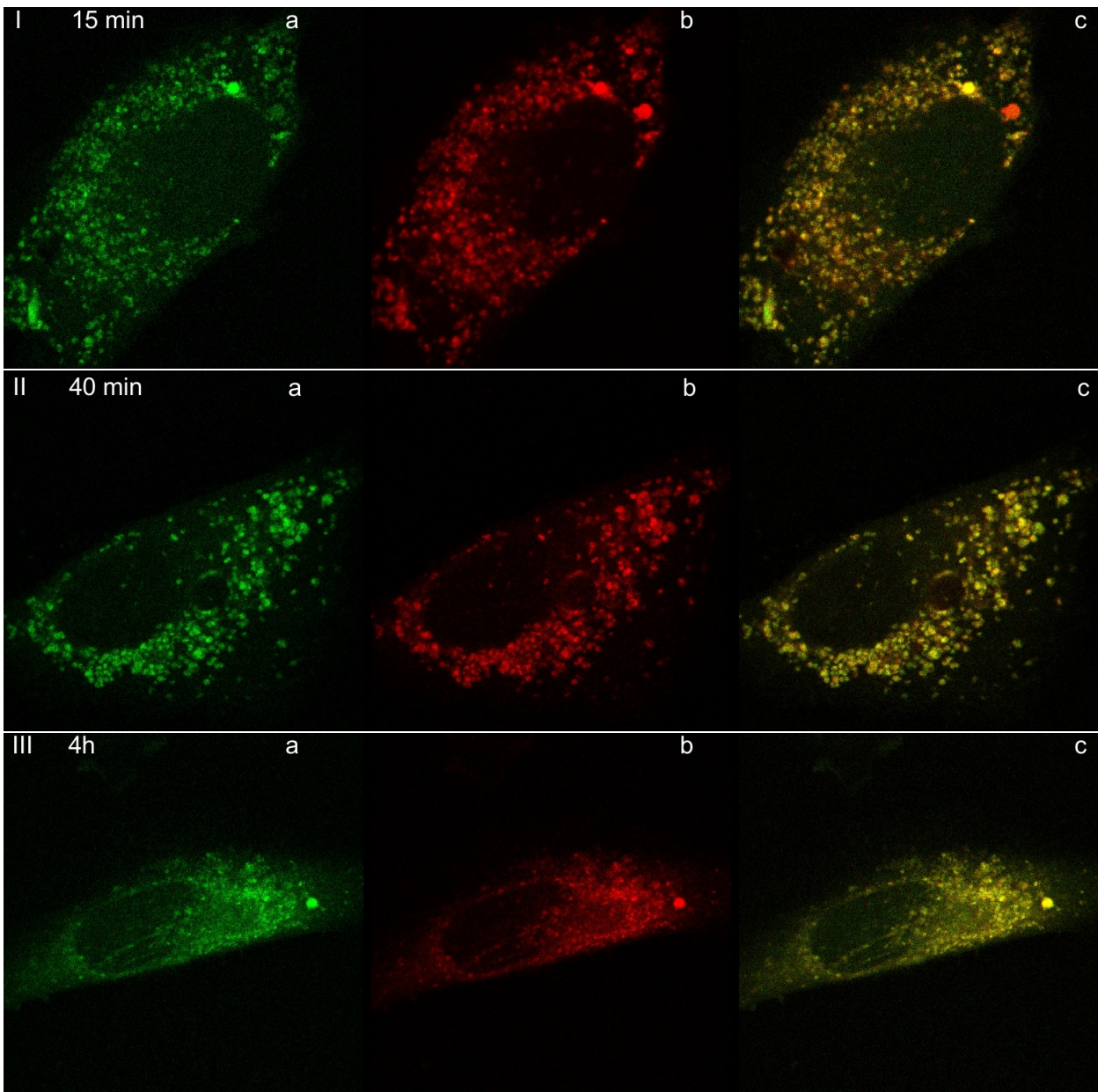


Abbildung 7.6.: I: 15 min Inkubation, II: 40 min Inkubation, III: 4 h Inkubation;
a) Fluorescein (Anregung 458 nm) b) LysoTracker red (Anregung:
561 nm) c) *Overlay*.

7. Ergebnisse und Diskussion

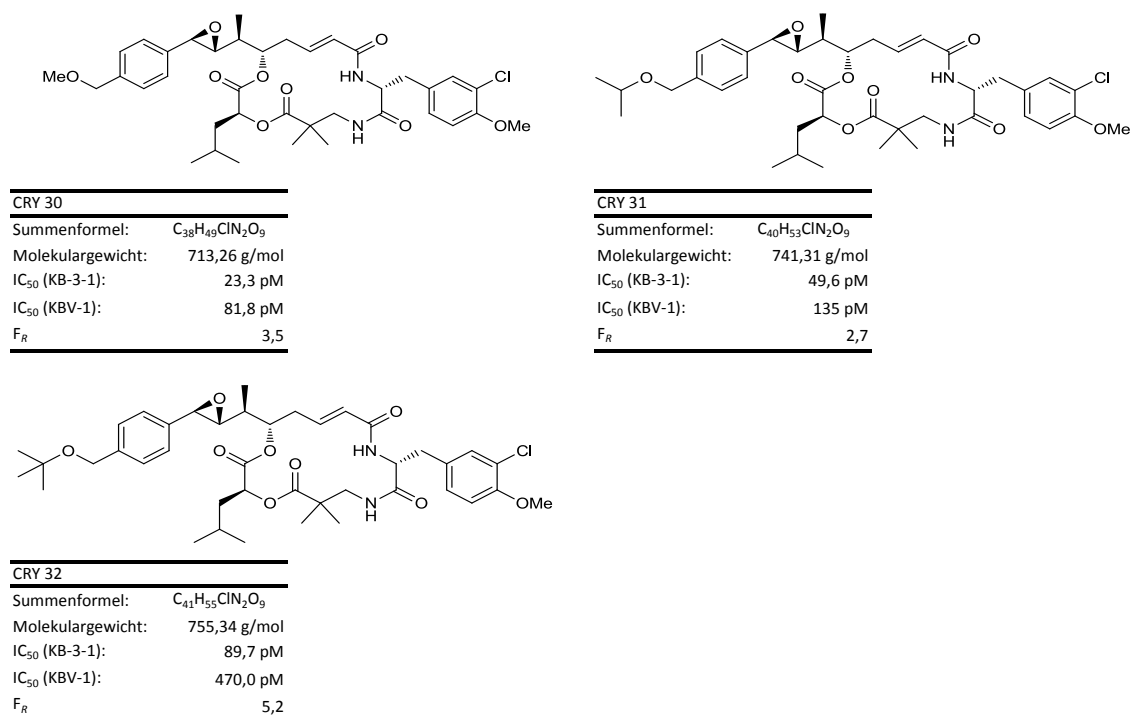


Abbildung 7.7.: Fragment A Analoga.

reszenz des Fluoresceins würde davon nicht beeinflusst. Daher ist die Fluoreszenz und die Kolo-kalisation kein Beweis für das Vorhandensein eines funktionierenden Cryptophycins, sondern gibt nur den Transportweg bei Benutzung eines RGD-Peptides als Erkennungseinheit wieder.

7.4. Zytotoxizitätstests

Ziel der am Cryptophycin-52 durchgeführten SAR-Studien ist die Verringerung der Nebenwirkungen bei gleichzeitiger Beibehaltung oder Steigerung der zytotoxischen Wirksamkeit. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden Fragment A, Fragment C und Fragment D Analoga synthetisiert.^[67,71,105–107]

7.4.1. Fragment A Analoga

In vorhergehenden SAR-Studien wurden schon viele Fragment A Derivate untersucht, wobei besonders der Einfluss von Veränderungen an den sterogenen Zentren aufgeklärt

wurde.^[16,17,20,22,23,25–27,108–110] Dabei standen die stereogenen Zentren meist im Mittelpunkt. Aber auch viele Fragment A Derivate mit verändertem Substitutionsmuster am Phenylrest sind untersucht worden.^[16,20,22,111] Ein Ergebnis war, dass die Einführung eines Hydroxymethyl-Substituenten in *para*-Position am Phenylrest eine 5,5-fach höhere Zytotoxizität (humane CCRF-CEM Zellen; *in vitro*) als Cryptophycin-52 zur Folge hat.^[16,20] In den gleichen Studien wurden diese Analoga beispielsweise mit Aminosäuren verestert. Auch diese Derivate zeigten eine hohe Aktivität, der Boc-geschützte Glycinester z.B. eine 4-fach höhere als Cryptophycin-52. Die Zytotoxizität gegen *multidrug*-resistente Zelllinien nimmt dabei ab, z.B. beim ungeschützten Glycinester um das 25-fache (HL-60/Vinc zu HL-60/S), so dass die Zytotoxizität im Vergleich mit Cryptophycin-52 um den Faktor 2 geringer ist.^[20] Bisher nicht untersucht wurden die Auswirkungen einer Veretherung des Hydroxymethyl-Substituenten. Zur Bestimmung der Aktivität solcher Verbindungen hat STEFAN EISSLER im Rahmen seiner Promotion drei *para*-Hydroxymethylether von Cryptophycin-52 synthetisiert. Die Strukturen des Methyl-, Isopropyl- und *tert*-Butylethers sind in Abbildung 7.7 abgebildet.

Die Ether zeigen bei *in vitro* Zytotoxizitätstests eine vergleichbare Aktivität wie der freie Alkohol. Die IC₅₀-Werte der Ether als auch des Alkohols liegen im niedrigen picomolaren Bereich und damit auch im Bereich der Aktivität von Cryptophycin-52. Allerdings sind sie nicht absolut vergleichbar, da der IC₅₀-Wert des freien Alkohols mit HL-60-Zellen bestimmt wurde und die IC₅₀-Werte der Ether und Cryptophycin-52 mit KB-3-1-Zellen. Trotzdem ist ein qualitativer Vergleich möglich. Allerdings zeigt sich beim Vergleich der Ether untereinander, dass der zunehmende sterische Anspruch der Gruppen vom Methylether über den Isopropylether zum *tert*-Butylether mit Abnahme der Aktivität einhergeht. Diese Abnahme ist allerdings recht gering, so hat der *tert*-Butylether noch ein Viertel der Aktivität des Methylethers, und ist nicht mit der später diskutierten Abnahme der Aktivität bei höherem sterischen Anspruch im Fragment C vergleichbar.

Die Aktivität der Ether gegenüber der *multidrug*-resistenten Zelllinie KB-V1 sinkt ebenfalls mit dem sterischen Anspruch. Aber auch hier sind alle Ether im Vergleich zu Cryptophycin-52 sehr aktiv. Der Methylether und der Isopropylether zeigen sogar eine höhere Aktivität als Cryptophycin-52, der Methylether besitzt eine 3-fach und der Isopropylether eine 2-fach höhere Aktivität. In der Literatur wurde das Hydroxymethyl-Derivat mit freier Alkoholfunktion als weniger aktiv (214 pM; HL-60/Vinc) im Vergleich zu Cryptophycin-52 (138 pM; HL-60/Vinc) beschrieben.^[20] Da diese Werte aller-

dings wiederum mit einer anderen Zelllinie bestimmt wurden und sehr dicht beieinander liegen ist nur der qualitative Vergleich möglich, dass die Veretherung zu einer Erhöhung der Aktivität gegen *multidrug*-resistente Zellen gegenüber dem freien Alkohol führt. Die HL-60/Vinc als auch die KB-V1 Zellen exprimieren beide das *Multidrug-Resistance-Protein 1* (MDR1).^[112,113] Durch die Maskierung der Hydroxylgruppe als Ether und die damit verbundene Verringerung der Polarität scheint das Cryptophycin ein schlechteres Substrat für diese Effluxpumpe zu sein. Neben der Polarität scheint aber auch die Größe des Rests die Effektivität der Effluxpumpe zu beeinflussen. Die höchste Aktivität gegen die *multidrug*-resistente Zelllinie KB-V1 zeigt der Methylether, dessen Polarität zwar geringer ist als die des Alkohols, aber doch größer als die Polarität des Isopropyl- und des *tert*-Butylethers. Mit zunehmender Größe nimmt auch die Aktivität gegen die *multidrug*-resistenten Zellen ab, ähnlich wie schon bei den nicht *multidrug*-resistenten Zellen. Die Abnahme ist jedoch deutlich geringer als beim freien Alkohol.

Die Resistenzfaktoren (Def. s. Gleichung 1.1; s. Tabelle 7.5) der Ether sind vergleichbar groß; mit 5,2 ist der Resistenzfaktor des *tert*-Butylether aber am größten. Zum Vergleich, der Resistenzfaktor des freien Alkohols ist mit 27 ungefähr eine Größenordnung größer.^[20]

Daher scheint eine Veretherung des Hydroxymethylrests eine Möglichkeit zu sein, um bei annähernd gleicher Aktivität, die auf dem MDR1 basierende *multidrug*-Resistenz, zu umgehen.

7.4.2. Fragment C Analoga

Die von MARKUS NAHRWOLD und CHRISTINE WEISS dargestellten Fragment C Analoga (s. Abb. 7.8 und 7.9) sind unterschiedlich funktionalisiert. Dadurch ist es möglich zu untersuchen welchen Einfluss die Polarität auf die Aktivität hat. Aber auch die Bedeutung der Konfiguration des C^α des Fragmentes C konnte studiert werden, da häufig beide Epimere der Fragment C Analoga synthetisiert wurden. Auch die Möglichkeit der Konjugation des Cryptophycins über das Fragment C mit möglichen Tumor-Erkennungseinheiten wurde betrachtet. Aus synthetischer Sicht ist die einfachste mögliche Konjugation eine Konjugation mittels einer kupferkatalysierten Azid-Alkin HUISGEN Zykladdition. Daher wurden mehrere Azid-Analoga synthetisiert, wobei die Kettenlänge als auch die Konfiguration variiert wurde. Erfolgt eine solche Konjugati-

on, wird ein 1,4-Triazol gebildet. Zur Untersuchung wie ein großer, polarer Triazolrest die Aktivität beeinflusst, wurden die Azid-Analoga CRY 15 und CRY 26 mit dem Alkin 2-Methyl-3-butin-2-ol zu CRY 28 und CRY 29, sowie mit Prop-2-inol zu CRY 25 umgesetzt.

Die Ergebnisse (s. Tabellen 7.6 u. 7.7) zeigen, dass eine geringe Polarität günstig für eine hohe Aktivität ist. Apolare symmetrische Fragment C Analoga wurden bereits früher untersucht und zeigten ebenfalls eine hohe Aktivität.^[18] CRY 11 zeigt mit einem IC₅₀-Wert von 8,3 pM (KB-3-1) sogar eine höhere Aktivität als Cryptophycin-52 (15,5 pM; KB-3-1) und ist damit das aktivste Cryptophycin aller vermessenen Cryptophycine. Der IC₅₀-Wert des polareren, konfigurationsgleichen Allylethers CRY 16 (52,7 pM; KB-3-1) ist ungefähr eine Zehnerpotenz größer, während der IC₅₀-Wert des sehr polaren Triazol-Derivat CRY 29 (312,4 pM; KB-3-1) sechsmal so hoch ist wie der des Allylethers. Der IC₅₀-Wert des Azid-Derivates CRY 26 (11,4 nM; KB-3-1) ist wiederum 3,5 mal so groß wie der des Triazol-Derivates CRY 29.

Die Konfiguration des Fragmentes C hat ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivität. Interessanterweise ist bei den Allylestern (CRY 10, CRY 11) und bei den Allylethern (CRY 16, CRY 22) das *S*-konfigurierte Isomer aktiver als das *R*-konfigurierte. Bislang waren alle 28 von MOORE und Mitarbeitern aus Cyanobakterien (*Nostoc* sp.) isolierten „natürlichen“ Cryptophycine am Fragment C *R*-konfiguriert.^[17,108,114] Der *S*-konfigurierte Allylester ist 11,5-fach aktiver und der *S*-konfigurierte Allylether 2,8-fach aktiver als die *R*-konfigurierten Stereoisomere. Bei den Aziden (CRY 15, CRY 26) und Triazolen (CRY 28, CRY 29) ist das „natürliche“, *R*-konfigurierte Isomer aktiver. Der Unterschied in der Aktivität ist bei den Aziden mit einem Faktor von 101 wesentlich größer als bei den beiden Allyl- und auch bei den Triazol-Derivaten. So unterscheiden sich die Stereoisomere des Triazol-Derivates in der Aktivität nur um den Faktor 3,1.

Auch die Länge der Seitenkette wurde bei den Untersuchungen berücksichtigt, so wurde das Azid-Derivat CRY 14 mit zwei Methylen-Gruppen zwischen dem *S*-konfigurierten C^α des Fragmentes C und der Azidgruppe synthetisiert, aber auch dessen Homovarianten CRY 26 (*S*) und CRY 15 (*R*). Die Aktivität nahm mit der Kettenverlängerung dramatisch um den Faktor 208 ab, so dass das Homo-Derivat (CRY 26) nur noch 0,5 % der Aktivität des Azids (CRY 14) mit kurzer Alkylkette besitzt. Wie oben bereits beschrieben haben bei den Aziden die *R*-konfigurierten Isomere eine wesentlich höhere

7. Ergebnisse und Diskussion

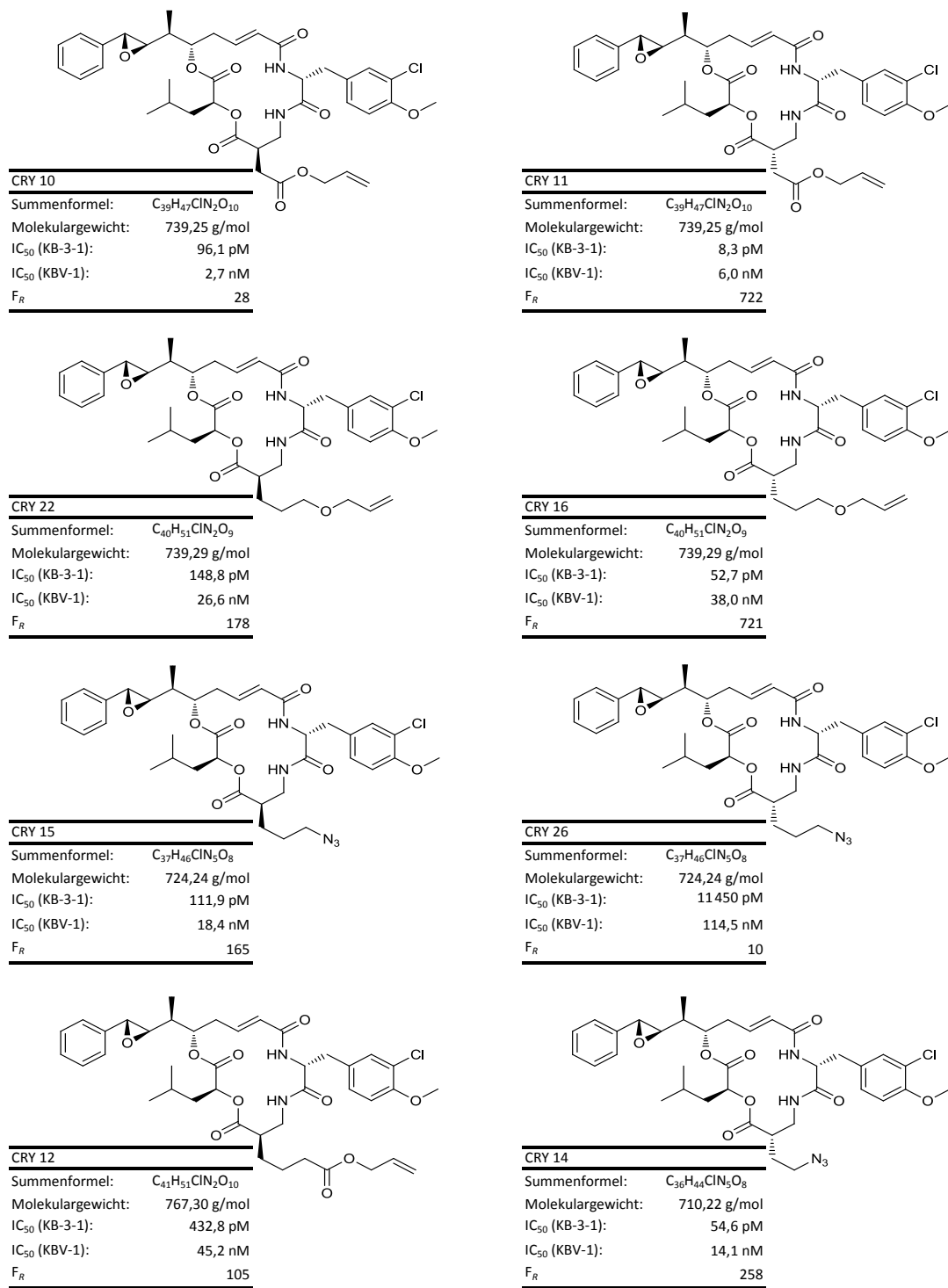


Abbildung 7.8.: Fragment C Analoga.

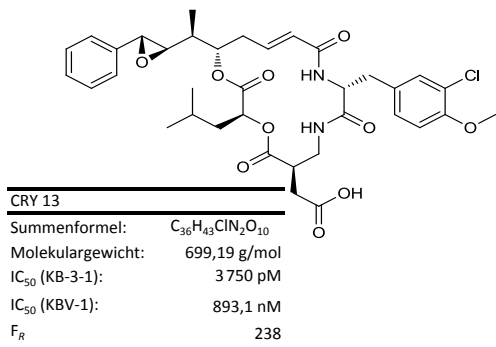
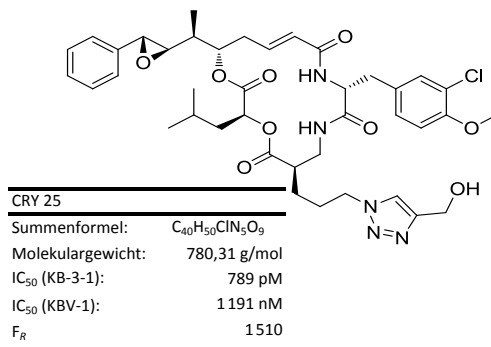
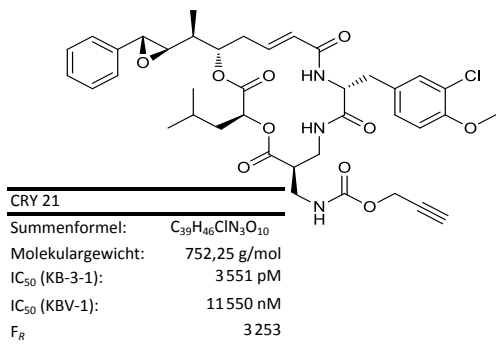
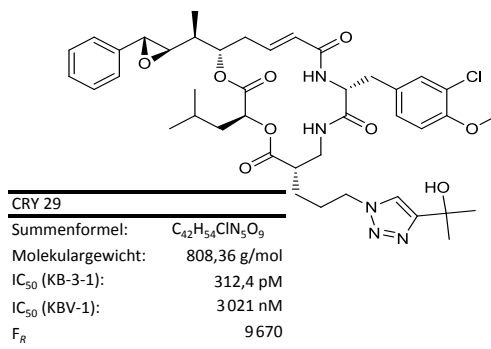
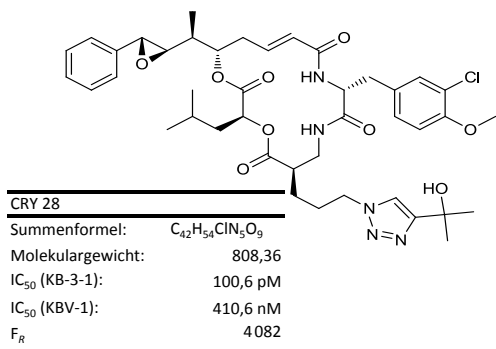


Abbildung 7.9.: Fragment C Analoga.

7. Ergebnisse und Diskussion

Aktivität, der Einfluss der Kettenlänge überwiegt jedoch den Einfluss der Konfiguration. So ist das *R*-konfigurierte Homo-Azid (CRY 15) wesentlich stärker biologisch aktiv als das *S*-konfigurierte (CRY 26), das Azid mit der kürzeren Kette (CRY 14) ist aber trotz seiner *S*-Konfiguration um den Faktor 2 aktiver als das *R*-konfigurierte Homo-Azid.

Betrachtet man die Aktivität aller Fragment C Analoga gegenüber den *multidrug*-resistenten KB-V1 Zellen, ergibt sich folgendes Bild. Bei allen Analoga von denen beide Epimere synthetisiert wurden, ist das *R*-konfigurierte Epimer aktiver gegen die *multi-drug*-resistenten KB-V1 Zellen. Dabei zeigt das aktivste Cryptophycin CRY 11 einen Resistenzfaktor von 722, d.h. gegen die KB-V1 Zellen ist es nur im nanomolaren Bereich aktiv. CRY 10, das Epimer zu CRY 11, hat dagegen mit $F_R = 28$ einen viel kleineren Resistenzfaktor und damit weniger Aktivitätsverlust gegenüber den KB-V1 Zellen. CRY 10 ist dadurch mit einem IC_{50} -Wert von 2,7 nM sogar aktiver gegen KB-V1 Zellen als CRY 11 mit 6,0 nM. Bei den Allylestern CRY 16 und CRY 22 ist es ähnlich, der *S*-konfigurierte Allylester CRY 16 hat einen Resistenzfaktor von 721 und das *R*-konfigurierte Epimer von 178. Das gegen die KB-3-1 Zellen weniger aktive CRY 22 ist also gegen die KB-V1 Zellen aktiver verglichen mit seinem Epimer CRY 16. Bei den Stereoisomeren CRY 29 ($F_R = 9670$; *S*-konfiguriert) und CRY 28 ($F_R = 4082$; *R*-konfiguriert) ist ebenfalls der Resistenzfaktor des *R*-konfigurierten Isomers geringer. Daher ist das *R*-Isomer (CRY 28) wie bei den KB-3-1 Zellen aktiver gegen die KB-V1 Zellen als das *S*-Isomer (CRY 29). Bei den Aziden ist der Aktivitätsverlust gegen die KB-V1 Zellen im Vergleich zu KB-3-1 Zellen bei dem *S*-Isomer (CRY 26; $F_R = 10$) kleiner. Die *R*-Isomere CRY 15 und das um eine Methyleneinheit kürzere CRY 14 haben wesentlich größere Resistenzfaktoren. Beide liegen in derselben Größenordnung (CRY 15 $F_R = 165$; CRY 14 $F_R = 258$). Aufgrund der viel geringeren Aktivität des *S*-Isomers CRY 26 ist trotz des größeren Resistenzfaktors das *R*-konfigurierte Isomer CRY 15 aktiver gegen KB-V1 Zellen. Der steigende Verlust der Aktivität gegenüber den *multidrug*-resistenten Zellen von den Allylestern, über die Allylether zu den Triazol-Derivaten legt den Schluß nahe, dass möglicherweise die steigende Polarität dieser Derivate eine Rolle bei der Abnahme der Aktivität spielt. Auch das sehr polare Carbamat-Derivat CRY 21 hat einen hohen Resistenzfaktor ($F_R = 3253$). Durch die Zunahme der Polarität könnten die Cryptophycin-Derivate bessere Substrate für die *multidrug*-Resistenz induzierenden Effluxpumpen wie das MDR1 werden, wodurch sie wesentlich schneller aus der Zelle entfernt werden, bzw. die „aktive“ Konzentration

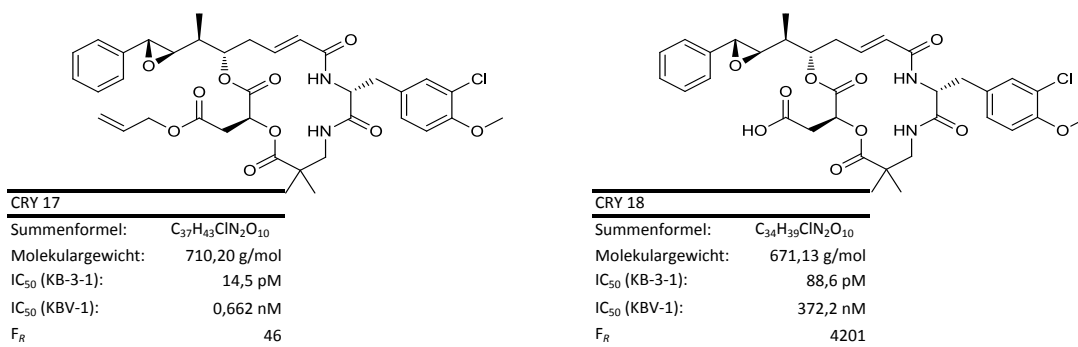


Abbildung 7.10.: Fragment D Analoga.

kleiner ist. Auch die Größe der Reste hat einen Einfluß auf die Eignung als Substrat für die Effluxpumpen, so steigt mit steigender Größe der Reste auch der Resistenzfaktor. Bei den Allylestern hat z.B. CRY 10 einen Resistenzfaktor von 28 und das um zwei Methylenheiten größere Derivat CRY 12 hat einen Resistenzfaktor von 105. Eine Ausnahme bildet nur CRY 26 ($F_R = 10$), das einen kleineren Resistenzfaktor hat als CRY 14 ($F_R = 258$), obwohl dieses einen kleineren Rest besitzt. Dies beruht wahrscheinlich auf der bereits gegen KB-3-1 Zellen sehr schlechten Aktivität von $IC_{50} = 11,5$ nM. Bei der Analyse des Einflusses der Konfiguration des C $^{\alpha}$ des Fragmentes C zeigt sich eindeutig, dass ein *R*-konfiguriertes C $^{\alpha}$ zu einer geringeren Abnahme der Aktivität gegen die KB-V1 Zellen führt und damit auch zu einem kleineren Resistenzfaktor. Die Ausnahme bilden hier wiederum das Azid CRY 26 (*S*-Isomer), das aufgrund seiner sehr geringen Aktivität gegen KB-3-1 Zellen einen nur noch geringen Verlust der Aktivität gegen KB-V1 Zellen zeigt. Im Vergleich mit Cryptophycin-52 ($F_R = 17$) haben der *R*-Allylester CRY 10 ($F_R = 28$) und das *S*-Azid CRY 26 ($F_R = 10$) vergleichbare Resistenzfaktoren, wobei die Aktivität des Allylester (96,1 pM) verglichen mit Cryptophycin-52 (15,5 pM) etwa eine Größenordnung kleiner ist, während die Aktivität des CRY 26 (11 450 pM) rund drei Größenordnungen kleiner ist.

7.4.3. Fragment D Analoga

Die Fragment D Analoga zeichnen sich durch eine hohe Zytotoxizität aus. Das CRY 17 ist mit einem IC_{50} -Wert von 14,5 pM (KB-3-1) genauso aktiv wie Cryptophycin-52 (15,5 pM; KB-3-1). Das CRY 18 mit freier Carboxylgruppe im Fragment D ist mit

88,6 pM (KB-3-1) weniger aktiv, trotzdem gehört es mit zu den aktivsten Cryptophycin-Derivaten überhaupt. Bei der Aktivität gegen die *multidrug*-resistenten KB-V1 Zellen scheint, wie bei den Fragment C Analoga, die Polarität der Derivate eine Rolle zu spielen. Das wesentlich polarere CRY 18 hat bei den KB-V1 Zellen einen IC_{50} -Wert von 372,2 nM und ist damit gegen die *multidrug*-resistenten Zellen um den Faktor 4201 schwächer als gegen die nicht *multidrug*-resistenten KB-3-1 Zellen. Das CRY 17 ist mit einem IC_{50} -Wert von 662 pM weiterhin hochaktiv, trotzdem ist das noch unpolare Cryptophycin-52 mit 260,9 pM 3,4-fach aktiver.

Der Resistenzfaktor, also der Faktor des Aktivitätsverlustes durch *multidrug*-Resistenz, beträgt beim CRY 17 $F_R = 46$ und beim Cryptophycin-52 $F_R = 17$. Das CRY 18 hat neben einer geringeren Aktivität auch einen hohen Resistenzfaktor von 4201.

7.4.4. Cryptophycin-52-Triazol-Analogon „Clicktophycin-52“

In früheren SAR-Studien wurde bisher nicht untersucht, in wie weit sich strukturelle Änderungen an beiden Amidbindungen im Depsipeptidring auf die Aktivität auswirken. Ein gutes Analogon für eine *trans*-Amidbindung ist ein 1,4-disubstituiertes 1,2,3-Triazol.^[115] Das Triazol ist mit 5,1 Å zwischen beiden Substituenten in α -Position des Rings größer als eine *trans*-Amidbindung mit 3,8 Å, aber das Triazol ist genauso wie die *trans*-Amidbindung planar.^[116] Auch ist das Dipolmoment des Triazolrings mit ca. 5,0 Debye^[116] größer als das einer *trans*-Amidbindung (3,7 - 4,0 Debye).^[117] Trotzdem wird das 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazol in vielen Peptidomimetika erfolgreich als *trans*-Amid-Analogon eingesetzt, z.B. bei dem HIV-1-Protease-Inhibitor Amprenavir,^[118] oder dem Tyrosinase-Inhibitor c-[-PT- ψ (Triazol)-PV-].^[119] Der Grund warum Amidbindungen in Peptidomimetika durch Triazole ersetzt werden ist ihre metabolische Stabilität. Triazole werden unter physiologischen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten, oxidiert, oder reduziert.^[120] In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in Cryptophycin-3 die Amid-Bindung zwischen Fragment B und Fragment C sowohl im Festkörper, als auch in Lösung als *trans*-Rotamer vorliegt. Die Amidbindung zwischen dem Fragment A und dem Fragment B liegt dagegen in der *cis*-Konfiguration vor.^[17] Daher sollte die Substitution der *trans*-Amidbindung zwischen Fragment A und Fragment B durch ein Triazol die biologische Aktivität wenig bis gar nicht beeinflussen, die Stabilität des Cryptophycins unter physiologischen Bedingungen aber steigern, so dass insgesamt eine höhere Wirksamkeit erreicht wird. Ein Cryptophycin

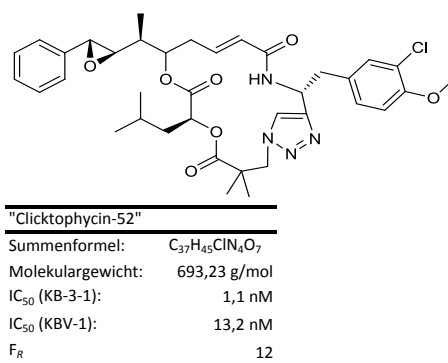


Abbildung 7.11.: „Clicktophycin-52“; Ein Mimetikum der *trans*-Amidbindung.

mit einer solchen Substitution der *trans*-Amidbindung zwischen Fragment B und Fragment C durch ein 1,4-disubstituiertes 1,2,3-Triazol wurde von MARKUS NAHRWOLD synthetisiert und im Rahmen dieser Arbeit auf seine Bioaktivität untersucht.^[71,105]

Die Aktivität des „Clicktophycin-52“ ist mit einem IC₅₀-Wert von 1,2 nM 70-fach geringer als die Aktivität von Cryptophycin-52. Damit entspricht die Aktivität der von Paclitaxel (IC₅₀ = 1,3 nM) und ist für den klinischen Einsatz ausreichend. Der Resistenzfaktor von F_R = 12 drückt den geringen Aktivitätsverlust gegenüber *multi-drug*-resistenten KB-V1 Zellen (IC₅₀ = 13,2 nM) im Vergleich zu nicht *multidrug*-resistenten Zellen (IC₅₀ = 1,2 nM; KB-3-1) aus. Er ist kleiner als der Resistenzfaktor von Cryptophycin-52 (F_R = 17), nur der Resistenzfaktor von CRY 26 ist mit F_R = 10 noch kleiner.

7.4.5. RGD-Konjugat

Die hohe Neurotoxizität ist ein Problem beim Einsatz der Cryptophycine in der Chemotherapie.^[11] Neben SAR-Studien ist die Konjugation mit anderen Molekülen ein Weg um diese Nebenwirkungen zu umgehen. Die Konjugation anderer Moleküle soll das Cryptophycinmolekül selektiv die Krebszellen erkennen lassen, z.B. in dem es an einen Rezeptor bindet, der nur in Krebszellen überexprimiert wird. Dadurch würden sich die Cryptophycinmoleküle in der Nähe der Krebszellen anreichern und es würde lokal eine höhere Cryptophycinkonzentration und damit eine bessere Wirksamkeit erreicht. Dadurch könnte das Cryptophycin systemisch in kleineren Konzentrationen eingesetzt werden, hätte weniger Nebenwirkungen, aber trotzdem die gleiche Cryp-

7. Ergebnisse und Diskussion

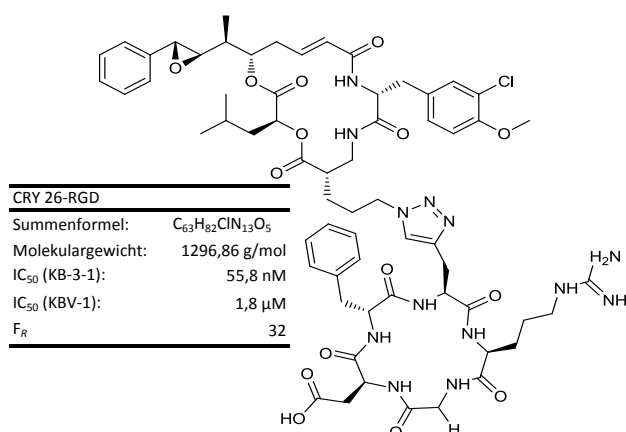


Abbildung 7.12.: Konjugat eines Cryptophycins und eines RGD–Peptids.

tophycinkonzentration und damit Wirksamkeit an der Krebszelle wie bei vorherigen höher konzentrierten Anwendungen. Eine fortgeschrittenere Art von Konjugat wäre ein Cryptophycin–Konjugat, das biologisch inaktiv wäre und erst beim Erreichen der Krebszelle das aktive Cryptophycin freisetzt. Nebenwirkungen könnten so effektiv verhindert werden. In diesem Fall wird das inaktive Konjugat als „Prodrug“ bezeichnet, da der aktive Wirkstoff, das „drug“, erst später bei der Freisetzung gebildet wird.

Das von MARKUS NAHRWOLD synthetisierte Konjugat von CRY 26 und dem von SOLEDAD ROYO synthetisierten RGD–Peptide c-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Propargylglycyl-] kann unter physiologischen Bedingungen nicht gespalten werden, daher wird das Cryptophycin nicht wieder freigesetzt. Die Untersuchung dieses Konjugates soll zeigen, ob eine Konjugation eines großen Moleküls, wie dem RGD–Peptid, am Fragment C eines Cryptophycins die biologische Aktivität wie gewünscht herabsetzt. Im nächsten Schritt könnten dann „echte“ Prodrugs durch Konjugation am Fragment C synthetisiert werden. Dazu müsste die Erkennungseinheit (z.B. RGD–Peptid) so konjugiert werden, z.B. über einen selbsteliminierenden Linker (s. Abschnitt 1.2), dass in oder an der Krebszelle das aktive Cryptophycin freigesetzt wird.

Trotz des großen, permanent gebundenen RGD–Peptides ist das CYR 26–RGD Konjugat zytotoxisch gegen KB–3–1 Zellen (IC₅₀–Wert = 55,8 nM). Im Vergleich mit IC₅₀–Werten von anderen Cryptophycinen ist die Aktivität jedoch gering. Cryptophycin–52 ist beispielsweise um den Faktor 3 600 wirksamer. Der Eintritt des Cryptophycins über die Zellmembran in die Zelle scheint auch mit dem kovalent verbundenen RGD–Peptid

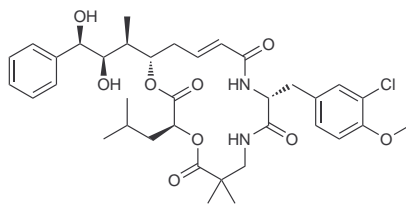


Abbildung 7.13.: Diol des Cryptophycins–52.

im geringen Maße, trotz mehrerer Ladungen, zu gelingen. Möglich ist die direkte Diffusion über die Zellmembran, oder aber erst nach einer Endozytose, vermittelt über Interaktionen zwischen dem RGD–Peptid und einem Integrin, über die das Endosom bzw. Lysosom umgebende Membran ins Zytosol.

Der Resistenzfaktor ist mit $F_R = 32$ eher klein im Vergleich mit anderen Fragment C Analoga (s. Tabelle 7.8), obwohl das Zylopeptid aufgrund der mehrfachen Ladung sehr polar ist. Die Aktivität des Konjugat gegen *multidrug*–resistente KB–V1 Zellen ist mit einem IC_{50} –Wert von $1,8 \mu\text{M}$ rund 6800–fach geringer als von Cryptophycin–52.

7.4.6. Cryptophycin–52–Diol

Durch die Substitution des (*R, R*)–Epoxids in das (*R, R*)–Diol verringert sich die biologische Aktivität um das 326–fache. Ähnlich groß ist der Verlust an Aktivität, wenn das Epoxid zum (*R, S*)–Diol hydrolysiert wird. Der Literaturwert des (*R, S*)–Diols $IC_{50} = 4,2 \text{ nM}$ ^[17] ist sehr gut mit dem IC_{50} –Wert des (*R, R*)–Diols von $IC_{50} = 5,1 \text{ nM}$ vergleichbar.

Ähnlich bei anderen polaren Cryptophycin–Derivaten ist die Aktivität gegen *multi–drug*–resistente Zellen bei diesem (*R, R*)–Diol vermindert. Wahrscheinlich ist das Fehlen der Epoxid–Funktion mitverantwortlich für die geringe Aktivität der Diole. Die Resistenz der Zellen gegen das Diol ist so ausgeprägt, dass es nicht möglich ist den IC_{50} –Wert zu bestimmen. Für die Bestimmung muss eine sigmoidale Dosis–Wirkungs–Kurve aufgenommen werden. Ist der Wirkstoff sehr schwach aktiv, gelingt dies nicht. Es ist nicht möglich so hohe Konzentrationen des Wirkstoffes im Medium der Zellkultur zu lösen, dass alle Zellen sterben. Doch gerade dies ist notwendig, um das für die Auswertung benötigte Plateau zu erhalten. Bei den Cryptophycinen kommt hinzu, dass sie kaum wasserlöslich sind. Daher werden die Stammlösungen in DMSO angelegt.

Die Zellkultur verträgt allerdings nur 1 % DMSO im Medium. Daher ist die Maximalkonzentration der Cryptophycine durch die Konzentration der DMSO-Stammlösung begrenzt. Dies ist allerdings nur bei dem sehr schwach aktiven Diol ein Problem, da alle anderen Cryptophycine eine so hohe Aktivität besitzen, dass die schlechte Wasserlöslichkeit die Messungen nicht behindern.

7.4.7. Fazit

Betrachtet man alle Ergebnisse und fasst diese zusammen, so sind am Fragment A Konjugationen bei mäßigen Aktivitätsverlust möglich, besonders apolare Substituenten zeichnen sich durch eine hohe Retention der Aktivität gegen *multidrug*-resistente Zellen aus. Bei Konjugationen am Fragment C ist bei großen Substituenten mit einem starken Rückgang der Aktivität zu rechnen. Stark apolare Substituenten, z.B. Alkylketten sind literaturbekannt für ihre hohe Bioaktivität.^[18] Allerdings sinkt diese drastisch mit der Kettenlänge. In bisherigen Untersuchungen wurden nur achirale Fragment C Bausteine und proteinogene L- α -Aminosäuren in SAR-Studien untersucht.^[24] Dabei hat auch die Konfiguration des C $^{\alpha}$ einen Einfluss auf die Bioaktivität. Es ist vom Substituenten abhängig, ob das *R*-, oder *S*-konfigurierte Derivat eine höhere Aktivität gegen KB-3-1 Zellen hat. Gegen die *multidrug*-resistente Zelllinie KB-V1 zeigten jedoch immer die *R*-konfigurierten Epimere höhere Aktivitäten als die *S*-konfigurierten. Anzumerken ist, dass bisher alle aus natürlichen Quellen isolierten Cryptophycine *R*-konfiguriert waren.^[17,108,114] Wahrscheinlich ist hier ein Zusammenhang mit der Struktur und dem Mechanismus der Effluxpumpe P-Glycoprotein der Grund dafür, dieses wurde aber nicht weiter im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Daher zeigten bei allen untersuchten Derivaten (außer CRY 26) die *S*-konfigurierten Derivate wesentlich, z.T. mehr als das 20-fach, höhere Resistenzfaktoren gegenüber ihren *R*-Stereoisomere. Die Konjugation mittels Clickchemie scheint nicht erfolgversprechend, da alle Triazol-Fragment C Analoga eine im Vergleich mit Cryptophycin-52 sehr geringe Aktivität und zudem noch besonders hohe Resistenzfaktoren besitzen. Eine Abspaltung der Triazolreste erfolgt unter physiologischen Bedingungen nicht, so dass nur schlecht wirkende und gegen *multidrug*-resistente Zellen fast wirkungslose Cryptophycin Analoga erhalten würden. Das Fragment D scheint gut geeignet für eine Konjugation, allerdings sollte der Substituent wiederum möglichst apolar sein.

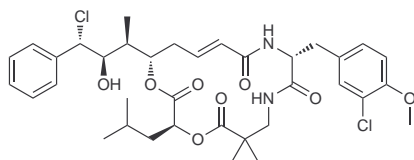


Abbildung 7.14.: Cryptophycin-55.

Tabelle 7.1.: IC₅₀-Werte einiger Mitosehemmmstoffe.

Wirkstoff	IC ₅₀ -Werte [nM] (KB-3-1)	IC ₅₀ -Werte [nM] (KB-V1)	F _R
Paclitaxel	1,3	5 800	4 462
Colchicin	5,7 ^[122]	615	108
Vinblastin	45,2 ^[122]	5 427 ^[122]	120
Vincristin	8,4 ^[122]	-	-

Ist die Synthese eines echten Prodrugs das Ziel; also eines Konjugats, das inaktiv ist und erst in oder in der Nähe der Krebszelle das aktive Cryptophycin freisetzt, so ist eine Konjugation mit großen, polaren Substituenten vorteilhaft. Dadurch sollte das Konjugat relativ inaktiv und auch besser wasserlöslich sein. Das Problem ist die Freisetzung, der Substituent muss vollständig abgespalten werden, ohne das polare Reste wie Alkohole oder Carboxylatreste zurückbleiben. Dies gelingt wahrscheinlich am Besten, in dem das Chlorhydrin (Cryptophycin-55; s. Abb. 7.14) des Cryptophycin verestert wird. Andere Studien haben gezeigt, dass solche Analoga hohe biologische Aktivität besitzen.^[26,27] Wahrscheinlich wird *in vivo* der Chlorhydrin-Ester enzymatisch gespalten, das Chlorhydrin reagiert dann in einer intramolekularen S_N-Reaktion zum Epoxid.^[20] Im Vergleich mit anderen Zytostatika sind die meisten hier untersuchten Cryptophycin-Analoga hochaktive Substanzen. Die häufig medizinisch eingesetzten Wirkstoffe Paclitaxel, Colchicin und Vinblastin sind ebenfalls Mitose-Hemmstoffe wie auch die Cryptophycine. Trotz ihrer hohen IC₅₀-Werte sind Paclitaxel und Vincristin wirksame Arzneimittel in der Krebstherapie (s. Tabelle 7.1).^[121]

In der Wirksamkeit sind die Cryptophycine mit den Auristatinen vergleichbar, so ist

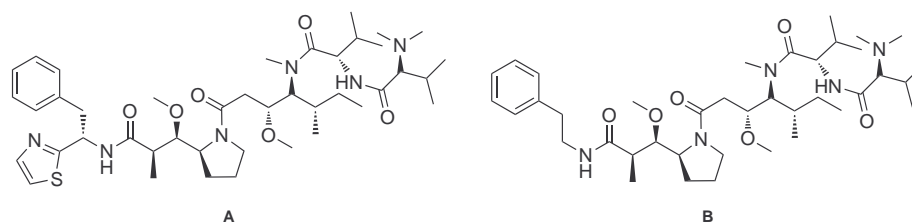


Abbildung 7.15.: **A**: Struktur von Dolstatin 10 und **B**: Auristatin PE.^[123]

das Monomethylauristatin E mit einem IC_{50} -Wert von 100 pM hoch zytotoxisch gegen H3396 Zellen (Brustkarzinom).^[124] Auristatine sind synthetische Analoga des Dolstatin 10 (s. Abb. 7.15) und inhibieren ähnlich der Cryptophycine die Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli.^[125] Aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit bei schon geringen Konzentrationen sind die Auristatine bereits mehrfach als Wirkstoff für Prodrugs verwendet worden. Das Tumor Targeting erfolgt bei diesen Prodrugs durch Antikörper gegen spezielle Antigene einzelner Krebsarten.^[124,126–128] Einige dieser Konjugate haben bereits in klinischen Studien ihre Wirksamkeit und Effektivität gezeigt.^[129–131] Für Brentuximab vedotin der Firma SEATTLE GENETICS sind alle klinischen Studien abgeschlossen und die FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) hat im August 2011 die Zulassung erteilt. Daher ist der Einsatz der hochaktiven Cryptophycine in der Synthese von Prodrugs ähnlich erfolgversprechend.

7.5. High Content Screening (HCS)

Die Aktivität der Cryptophycine wird im Rahmen dieser Arbeit mittels eines Zytotoxizitäts-Assays bestimmt. Die Ergebnisse dieses Assays dienen zum Einordnen und dem Vergleich der Cryptophycine untereinander, aber auch mit anderen bekannten zytotoxischen Substanzen bzw. Antikrebsmedikamenten. So ermöglicht der Resazurin-Assay die Bewertung struktureller Änderungen an den Cryptophycinen in Bezug auf die Aktivität gegen Krebszellen (SAR-Untersuchungen; s.a. Kapitel 1.1). Allerdings wird in allen Zytotoxizitäts-Assays und so auch beim Resazurin-Assay die Quantität eines Ereignisses bestimmt, dass auf mehreren, verschiedenen Wegen eintreten kann. Es wird die Anzahl bzw. der Anteil toter Zellen in Bezug zur Gesamtzellanzahl gemessen, jedoch nicht, wie der Prozess des Sterbens verlaufen ist, also wie die Zellen den Zustand zum Zeitpunkt der Messung erreicht haben. Die Zellen könnten direkt bei

der Zugabe der zu untersuchenden Substanz, oder aber auch erst viel später gestorben sein. Auch wird nicht erfasst, ob es sich bei dem Zelltod um einen nekrotischen oder apoptotischen Vorgang gehandelt hat, oder ob ein spezieller Signaltransduktionsweg aktiviert wurde. Diese Vielzahl an Informationen kann mittels des *High-content screening* (HCS) in einer Messung erfasst werden.^[132] Es basiert auf der Fluoreszenzmikroskopie und der Verwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe zur gleichen Zeit. Insgesamt werden vier Fluoreszenzfarbstoffe in diesem Assay eingesetzt, Bisbenzimid, Calcein-AM, Propidiumiodid und Annexin V-Cy5. Das im UV-Bereich absorbierende Bisbenzimid (Hoechst 33342) dient als Farbstoff für die DNA. Dadurch ist es möglich, den DNA-Gehalt der Zellen miteinander zu vergleichen (z.B. 2 n, 4 n). Auch die Objekterkennung der Software nutzt diesen Farbstoff. Da nur die DNA angefärbt wird und diese sich im Kern befindet, der vom Zytosol umgeben ist, sind die Kerne aneinander grenzender Zellen leicht als Einzelobjekte zu identifizieren. Die Zellviabilität wird mittels Calcein-AM-Färbung gemessen. Das nichtfluoreszierende Calcein-AM (Calcein O,O'-diacetattetrakis(acetoxymethyl)ester) ist der Acetoxymethylester (AM) des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein. Calcein-AM kann in Zellen eindringen und wird in lebenden Zellen durch Esterasen zu Calcein hydrolysiert.^[133] Das fluoreszierende Calcein kann aufgrund seiner hohen Ladung die Zelle nicht verlassen und markiert so Zellen mit intaktem Stoffwechsel. Bereits tote Zellen werden von Propidiumiodid angefärbt. Die Zellmembran gesunder Zellen ist nicht permeabel für Propidiumiodid, daher wird deren DNA nicht angefärbt. Es dringt in tote Zellen ein und interkaliert in dort vorhandene DNA, da tote Zellen keine intakte Membran mehr besitzen. Die Zellmembran lebender Zellen ist asymmetrisch, d.h. die Zusammensetzung der Membran ist auf der Zellaussenseite verschieden von der der Zellinnenseite.^[134] Das Phospholipid Phosphatidylserin ist z.B. nur auf der Innenseite der Membran lokalisiert. Leitet die Zelle die Apoptose ein, wird diese strenge Asymmetrie gebrochen und Phosphatidylserin wird auch auf der Aussenseite der Zellmembran gefunden.^[135] Annexin V ist ein intrazelluläres Protein, das eine hohe Affinität für Phosphatidylserin besitzt. Diese Eigenschaft wird für die Erkennung der Einleitung einer Apoptose eingesetzt. Annexin V ist im vorliegenden Fall mit Cyanin 5 (Cy5), einem Fluoreszenzfarbstoff, gekuppelt. Dieses Konjugat wird als Färbelösung zu den Zellen gegeben. Da das Annexin die Zellmembran nicht überwinden kann, bindet es nur an den Zellen die Phosphatidylserin auf ihrer Aussenseite präsentieren, also den apoptotischen Zellen.^[136] Die Bindung ist Ca^{2+} -Ionen abhängig, daher muss der verwendete Puffer bzw. Medium diese enthalten. Beim HCS sind die

7. Ergebnisse und Diskussion

Bildaufnahme und Bildauswertung automatisiert. Die Steuerung der Bildaufnahme erfolgt mit der Software *scan^R Aquisition* von OLYMPUS. Die eigentliche Auswertung erfolgt mit dem Programm *scan^R Analysis* von OLYMPUS. Einzelne Zellen werden von dieser Software erkannt. Dafür müssen die Einstellungen, vor allem der Schwellenwert (*Threshold*), so eingestellt werden, dass möglichst alle Zellen als einzelne Objekte erkannt werden, ohne aber eine Zelle als mehrere Objekte zu erkennen. Die zu bestimmenden Parameter werden aus einer Liste ausgewählt und jedem ein Farbkanal zugewiesen. Diese Parameter wie beispielsweise die Intensität der Fluoreszenz, Form und Größe werden dann automatisch von der Software aus den Bildern des zugewiesenen Farbkanals bestimmt. Aus den bestimmten Parametern können bei Bedarf weitere Parameter berechnet werden. Diese abgeleiteten (*derived*) Parameter können beispielsweise Summen, Differenzen usw. von gemessenen Parametern sein. *scan^R Analysis* erfasst alle bestimmten Parameter in allen aufgenommenen Bildern. In Form von Histogrammen können alle gemessenen Parameter gegeneinander aufgetragen werden. Für die Auswertung werden sogenannte *Regions* und *Gates* vom Benutzer definiert. Eine *Region* ist dabei eine Selektion von Zellen in Form eines Polygons in einem Histogramm. *Gates* bestehen aus einer solchen *Region* oder aber auch mehrerer *Regions*, die über Boolesche Variablen (z.B. *AND*, *OR*, *AND NOT*) miteinander verknüpft sein können. Sie dienen daher der Gruppierung der Zellen nach ihren Eigenschaften. Das *Gate* für lebendige Zellen würde die *Regions* enthalten, die eine hohe Intensität der Fluoreszenz für Calcein und Bisbenzimid widerspiegeln. Zusätzlich könnten auch die *Regions* die eine niedrige Intensität für Propidiumiodid und Annexin V–Cy5 widerspiegeln (s. Tabelle 7.2) für die Definition des *Gates* für lebendige Zellen herangezogen werden. Die von der Software bestimmten Parameter dazu sind die Intensität der Fluoreszenz der einzelnen Objekte für den Calcein–Farbkanal, den Bisbenzimid–Farbkanal, den Propidiumiodid–Farbkanal und den Annexin V–Cy5–Farbkanal. Der Vorteil des HCS ist allerdings, dass bei der Auswertung die einzelnen Messpunkte immer mit der Original–Fluoreszenzmikroskopieaufnahme verlinkt bleiben, so dass das korrekte Setzen der *Gates* durch Betrachten der Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen beispielhafter Zellen kontrolliert werden kann. Das Setzen der *Gates* ist bei der Auswertung der wichtigste Schritt, der maßgeblich das Ergebnis mitbestimmt. Daher ist die Möglichkeit einer optischen Kontrolle und damit das Einbringen der Erfahrung des Operators zur Definition der *Gates* die Stärke des HCS. Für den erfahrenen Nutzer ist es häufig aufgrund seiner täglichen Arbeit einfacher optisch zu bestimmen, wann z.B. eine Zelle

tot ist, als durch bloßes Einstellen eines Grenzwertes für die Fluoreszenz-Intensität. Die Entwicklung und Etablierung eines HCS Assays mit humanen Krebszellen, speziell für die WM-115 und KB-3-1 Zellen, ist ein Ziel dieser Arbeit. Anhand dieses Assays soll die Unterscheidung möglich sein, ob zytotoxische Eigenschaften verschiedener Substanzen auf nekrotischen, oder apoptotischen Effekten beruhen. Zu Beginn müssen die Parameter für die Zellkultur bestimmt werden, beispielsweise die Anzahl der Zellen pro *well*, Inkubationszeiten, geeignete Fluoreszenzfarbstoffe und Färbeprotokolle. Als Basis dient das Protokoll zur lebend/tot Diskriminierung von RUBACH.^[137] Als Fluoreszenzfarbstoffe werden Bisbenzimid, Calcein-AM und Propidiumiodid gewählt. Das Bisbenzimid soll hauptsächlich der Objekterkennung dienen. Calcein-AM soll selektiv die lebenden Zellen und Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose anfärben. Zellen in einem sehr späten Stadium der Apoptose oder bereits tote Zellen sollen durch eine Färbung mit Propidiumiodid erkannt werden. Die Unterscheidung zwischen apoptotischen und lebenden Zellen soll über ihre Form gelingen. Insgesamt sollen mit diesem Versuchsaufbau vier Zustände unterscheidbar sein: lebend, tot, apoptotisch und nekrotisch, wobei unter tot auch Zellen in einem sehr späten Stadium der Apoptose fallen (s. Tabelle 7.2). Der erste Schritt ist die Anpassung vorhandener Protokolle für die Aussaat, Inkubation, Färbung und Messung.^[137] Die Protokolle werden für humane Krebszelllinien und die Untersuchung der im Allgemeinen langsam wirkenden Cryptophycine optimiert. WM-115 Zellen werden aufgrund ihrer Verfügbarkeit und Robustheit als Zelllinie zur Etablierung dieses Assays gewählt. Die Kultivierung der WM-115 Zellen in den 96-*well* Platten mit Glasboden ist ohne eine vorherige Beschichtung dieser möglich. In jedem *well* werden 10 000 Zellen kultiviert. Für die Cryptophycine erwiesen sich die Inkubationszeiten 24 h, 6 h und 4 h als erfolgreich. Staurosporin wurde als Positivkontrolle für apoptotische Effekte verwendet. Beide verwendeten Konzentrationen (500 nM, 200 nM) induzierten bei den verwendeten WM-115 Zellen die Apoptose. Die Inkubationszeiten waren mit 24 h und 6 h zu lang. Bereits nach 6 h waren viele spätapoptotische Zellen erkennbar, während nach 24 h fast ausschließlich spätapoptotische Zellen vorhanden waren. Vor der Färbung wird der Überstand vorsichtig entfernt. Dies stellt eine beträchtliche Fehlerquelle dieses Assays dar, denn es können Zellen, vor allem abgelöste, aus den *wells* mit abgesaugt werden. Das Absaugen muss daher mit besonderer Vorsicht geschehen. Alternativ wäre das Färben des gesamten Volumens (200 μ l) jeden *wells* möglich, dies würde aber erhebliche Mengen der Fluoreszenzfarbstoffe verbrauchen. Für die Cryptophycine wurden drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gewählt. Aufgrund

7. Ergebnisse und Diskussion

der verschiedenen Färbungen und der Form der Zellen ist es möglich die Zellen als tot, lebend, apoptotisch, oder nekrotisch zu identifizieren. Die optimale Inkubationsdauer für die Fluoreszenzfärbung beträgt 2 h, danach nimmt die Fluoreszenz der Zellen nicht mehr zu. Eine frühere Messung mit Zunahme der Fluoreszenzen während der Messung würde zu Fehlern in der Auswertung führen, da Zellen mit gleichen Eigenschaften verschiedene Intensitäten der Fluoreszenz besäßen und dadurch unterschiedlich eingeordnet werden könnten. Eine wesentlich längere Inkubationszeit hat den Nachteil, dass einige Fluoreszenzfarbstoffe selbst zytotoxisch sind und daher bei langer Inkubation das Ergebnis verfälschen. Nachdem der instrumentelle Aufbau und die Fluoreszenzfärbung etabliert waren, wurde auf KB-3-1 Zellen gewechselt. Durch die Verwendung dieser Zelllinie sollte später ein Vergleich der Ergebnisse mit den *multidrug*-resistenten KB-V1, einem Subklon der KB-3-1 Zellen, möglich sein. Die Kultivierung der KB-3-1 Zellen auf den Glasboden-Platten ist nicht unproblematisch. So waren in den *wells* der Negativkontrolle (nur Medium) viele lebende, aber abgelöste Zellen zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass für eine ausreichende Adhäsion der KB-3-1 Zellen eine Beschichtung des Glasbodens nötig ist (z.B. Poly(L)Lysin, Gelatine). Ein anderer Grund für das Ablösen könnte auch das Fehlen einer Inkubationskammer während der fluoreszenzmikroskopischen Messung sein. Aufgrund der hohen Anzahl an Aufnahmen, pro *well* werden 45 Fotos (4×Farbkanäle, 1×Hellfeldaufnahme, 9 unterschiedliche Positionen je *well*) aufgenommen, dauert die Messung einer Platte rund 3 h. In dieser Zeit kühlen die Zellen auf RT ab, der pH-Wert des Mediums ändert sich aufgrund der fehlenden CO₂-Atmosphäre (5,3 %) und es kommt, da ohne Abdeckplatte gemessen wird, zur Verdunstung von Medium, wodurch sich die Salzkonzentrationen erhöhen. Diese Streßfaktoren könnten ebenfalls zu der hohen Anzahl an abgelösten Zellen führen. Daher ist für weitere Messungen der Einsatz der WM-115 Zellen dem der KB-3-1 Zellen vorzuziehen. Dadurch ist der Vergleich der Ergebnisse der KB-3-1 Zellen mit den Ergebnissen der *multidrug*-resistenten KB-V1 Zellen nicht möglich. Außerdem können die KB-V1 Zellen aus einem weiteren Grund in diesem Assay nicht eingesetzt werden. Die von den KB-V1 Zellen exprimierte MDR1 Effluxpumpe transportiert auch den für die Färbung benötigten Fluoreszenzfarbstoff Calcein aus dem Zytosol,^[138] dies konnte auch empirisch in eigenen Versuchen gezeigt werden. Vermutlich betrifft dies auch andere Farbstoffe, so dass das Ersetzen von Calcein-AM durch einen ähnlichen Farbstoff nicht ausreichen wird, um den Assay erfolgreich bei KB-V1 Zellen einzusetzen.

Tabelle 7.2.: Färbemuster abhängig vom Zustand der Zellen; +: Farbstoff färbt Zellen in diesem Zustand, –: Farbstoff färbt die Zellen in diesem Zustand nicht.

	Calcein	Propidiumiodid	Bisbenzimid	Annexin V–Cy5	Form
tot	-	+	(+)	+	rund
lebend	+	-	+	-	normal
apoptotisch	+	-	+	+	rund
nekrotisch	-	+	+	-	rund

Im zweiten Schritt wird die Auswertung mit dem Programm *scan^R Analysis* von OLYMPUS erstellt. Dazu werden *Gates* für lebende, tote, apoptotische und nekrotische Zellen erstellt. Die *Gates* werden so definiert, dass Zellen mit einer Fluoreszenz der Wellenlänge 617 nm von Propidiumiodid als tot definiert werden. Als lebende Zellen werden alle Zellen gewertet, die nicht der Definition von toten Zellen entsprechen. Beim Definieren der *Gates* werden stichprobenartig Hellfeldmikroskopieaufnahmen betrachtet und kontrolliert, ob die Zelle dem Zustand des definierten Gate entspricht. Die Objekterkennung wird mittels der Bilder des Bisbenzimid–Kanals durchgeführt. Dies ist besonders vorteilhaft, da durch Bisbenzimid alle Zelle gefärbt werden. Zudem sind die Objekte meist sehr gut voneinander getrennt, denn das Bisbenzimid färbt die DNA im Zellkern an, der vom nicht abgefärbten Zytoplasma umgeben wird. Bei Verwendung eines anderen Farbkanals würde nur eine Subpopulation erfasst werden, da die anderen Farbstoffe nicht die Zellen in allen Stadien anfärben. Die Folge wäre, dass mehrere Objekterkennungen auf verschiedenen Farbkanälen durchgeführt werden müssen, diese müssten dann zusammengefügt werden um die Gesamtpopulation zu erhalten. Die Objekterkennung arbeitet aber nicht fehlerfrei, daher wären viele Objekte des einen Farbkanals nicht als Objekte des anderen Farbkanals erkannt worden, weshalb eine Auswertung kaum möglich wäre. Wird nur eine Objekterkennung durchgeführt, kommt es dabei ebenfalls zu Fehlern. Dies führt aber nur zum Auslassen, oder dem doppelt Berücksichtigen einzelner Zellen. Da die Fehlerwahrscheinlichkeit in allen *wells* gleich ist kommt es zu keiner Verfälschung der Ergebnisse. Die Form der Zelle kann ebenfalls durch die Software berücksichtigt werden, allerdings kann die Bestimmung der Form nur bei Objekten des Farbkanals erfolgen der auch zur Objekterkennung dient. Da die

7. Ergebnisse und Diskussion

Objekterkennung sinnvollerweise über die Bisbenzimid-Färbung erfolgen muss, kann leider nur die Form der gefärbten DNA bestimmt werden. Diese ändert sich allerdings in den verschiedenen Stadien zu wenig, um sie als Marker zu gebrauchen. Die Form sollte bei der automatischen Unterscheidung zwischen lebenden und apoptotischen Zellen als Parameter eingesetzt werden. Da dies nicht möglich war wurde der ursprüngliche Versuchsaufbau mit drei Fluoreszenzfarbstoffen mit Annexin V-Cy5 auf vier Fluoreszenzfarbstoffe erweitert (s. Tabelle 7.2). Mit Annexin V-Cy5 ist eine direkte Färbung nur der apoptotischen Zellen möglich und damit die Unterscheidung zwischen lebenden und apoptotischen Zellen. Wird eine entsprechend hohe Intensität der Fluoreszenz mit den Wellenlängen von Calcein, Annexin V-Cy5 und Bisbenzimid detektiert, werden sie als apoptotische Zellen betrachtet. Als nekrotische Zellen werden Zellen gezählt die eine bestimmte Intensität von Fluoreszenz der Wellenlänge von Propidiumiodid und Bisbenzimid aufweisen. Insgesamt ähnelt das Auswertungsverfahren der Auswertung bei der Durchflusszytometrie.

Teil V.
Anhang

7.6. Zytotoxizitätstabellen

Fragment A Analoga

Tabelle 7.3.: Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Fragment A Analoga mit den KB-3-1 Zellen; für die Struktur s. Abb. 7.7

Cryptophycin	IC ₅₀ -Werte [pM] (KB-3-1)	95 % Konfidenzintervall [pM]
CRY 30	23,3	15 - 36
CRY 31	49,6	32 - 77
CRY 32	89,7	71 - 114
Cryptophycin-52	15,5	13 - 18

Tabelle 7.4.: Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Fragment A Analoga mit den KB-V1 Zellen; für die Struktur s. Abb. 7.7

Cryptophycin	IC ₅₀ -Werte [pM] (KB-V1)	95 % Konfidenzintervall [nM]
CRY 30	81,8	33 - 202
CRY 31	135,0	99 - 185
CRY 32	470,0	285 - 776
Cryptophycin-52	260,9	239 - 285

Tabelle 7.5.: Resistenzfaktoren der Fragment A Analoga

Cryptophycin	Resistenzfaktor F_R
CRY 30	3,5
CRY 31	2,7
CRY 32	5,2
uA-C ^{4'} -Hydroxymethyl-Cryptophycin-52 ^[20]	27
Cryptophycin-52	17

Fragment C Analoga

Tabelle 7.6.: Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Fragment C Analoga mit den KB-3-1 Zellen; für die Struktur s. Abb. 7.8

Cryptophycin	IC ₅₀ -Werte [pM] (KB-3-1)	95 % Konfidenzintervall [pM]
CRY 10	96,1	85 - 109
CRY 11	8,3	67 - 94
CRY 16	52,7	48 - 58
CRY 22	148,8	122 - 181
CRY 15	111,9	93 - 135
CRY 26	11 450	10 240 - 12 800
CRY 28	100,6	75 - 135
CRY 29	312,4	255 - 383
CRY 12	432,8	343 - 546
CRY 21	3 551	2 912-4 329
CRY 25	789	684 - 910
CRY 14	54,6	39 - 76
CRY 13	3 750	3 133-4 488

Tabelle 7.7.: Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Fragment C Analoga mit den KB-V1 Zellen; für die Struktur s. Abb. 7.8

Cryptophycin	IC ₅₀ -Werte [nM] (KB-V1)	95 % Konfidenzintervall [nM]
CRY 10	2,7	2 - 3
CRY 11	6,0	5 - 7
CRY 16	38,0	27 - 53
CRY 22	26,6	24 - 30
CRY 15	18,4	14 - 24
CRY 26	114,5	102 - 128
CRY 28	410,6	345 - 488
CRY 29	3 021	1 636 - 5 578
CRY 12	45,2	40 - 51
CRY 21	11 550	9409 - 14 190
CRY 25	1 191	0,9 - 2
CRY 14	14,1	13 - 15
CRY 13	893,1	753-1 059

Tabelle 7.8.: Resistenzfaktoren der Fragment C Analoga

Cryptophycin	Resistenzfaktor F_R
CRY 10	28
CRY 11	722
CRY 16	721
CRY 22	178
CRY 15	165
CRY 26	10
CRY 28	4082
CRY 29	9670
CRY 12	105
CRY21	3253
CRY 25	1510
CRY 14	258
CRY 13	238

Fragment D Analoga

Tabelle 7.9.: Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Fragment D Analoga mit den KB-3-1 Zellen; für die Struktur s. Abb. 7.10

Cryptophycin	IC ₅₀ -Werte [pM] (KB-3-1)	95 % Konfidenzintervall [pM]
CRY 17	14,5	11 - 19
CRY 18	88,6	63 - 124

Tabelle 7.10.: Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Fragment D Analoga mit den KB-V1 Zellen; für die Struktur s. Abb. 7.10

Cryptophycin	IC ₅₀ -Werte [nM] (KB-V1)	95 % Konfidenzintervall [nM]
CRY 17	0,662	0,7 - 1
CRY 18	372,2	255 - 543

Tabelle 7.11.: Resistenzfaktoren der Fragment D Analoga

Cryptophycin	Resistenzfaktor F_R
CRY 17	46
CRY 18	4201
Cryptophycin-52	17

Cryptophycin-52-Triazol-Analogen „Clicktophycin-52“

Tabelle 7.12.: Ergebnis des Zytotoxizitätstests des „Clicktophycin-52“ mit den KB-3-1 Zellen; für die Struktur s. Abb. 7.11

Cryptophycin	IC ₅₀ -Werte [nM] (KB-3-1)	95 % Konfidenzintervall [nM]
„Clicktophycin-52“	1,1	1,0 - 1,2

7. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7.13.: Ergebnisse des Zytotoxizitätstests des „Clicktophycin-52“ mit den KB-V1 Zellen; für die Struktur s. Abb. 7.11

Cryptophycin	IC ₅₀ -Werte [nM] (KB-V1)	95 % Konfidenzintervall [nM]
„Clicktophycin-52“	13,2	12 - 15

RGD-Konjugat

Tabelle 7.14.: Ergebnis des Zytotoxizitätstests des CRY 26-RGD Konjugat mit den KB-3-1 Zellen; für die Struktur s. Abb. 7.11

Cryptophycin	IC ₅₀ -Werte [nM] (KB-3-1)	95 % Konfidenzintervall [nM]
CRY 26-RGD	55,8	47 - 67

Tabelle 7.15.: Ergebnisse des Zytotoxizitätstests des CRY 26-RGD Konjugat mit den KB-V1 Zellen; für die Struktur s. Abb. 7.11

Cryptophycin	IC ₅₀ -Werte [μ M] (KB-V1)	95 % Konfidenzintervall [μ M]
CRY 26-RGD	1,8	1 - 2

Cryptophycin-52-Diol

Tabelle 7.16.: Ergebnis des Zytotoxizitätstests des Cryptophycin-52-Diol mit den KB-3-1 Zellen; für die Struktur s. Abb. 7.11

Cryptophycin	IC ₅₀ -Werte [nM] (KB-3-1)	95 % Konfidenzintervall [nM]
Cryptophycin-52-Diol	5,1	4 - 7

Tabelle 7.17.: Ergebnisse des Zytotoxizitätstests des Cryptophycin-52-Diol mit den KB-V1 Zellen; für die Struktur s. Abb. 7.11

Cryptophycin	IC ₅₀ -Werte [μ M] (KB-V1)	95 % Konfidenzintervall [μ M]
Cryptophycin-52-Diol	inaktiv	-

7.7. Veröffentlichungen im Rahmen dieser Dissertation

Eissler, S.; Bogner, T.; Nahrwold, M., Sewald, N. Efficient synthesis of cryptophycin-52 and novel *para*-alkoxymethyl unit A analogues, *Chemistry* **2009**, *15*, 11273-11287.

Nahrwold, M.; Bogner, T.; Eissler, S.; Verma, S., Sewald, N. "Clicktophycin-52": a bioactive cryptophycin-52 triazole analogue, *Organic Letters* **2010**, *12*, 1064-1067.

Sammet, B.; Bogner, T.; Nahrwold, M.; Weiss, C., Sewald, N. Approaches for the synthesis of functionalized cryptophycins, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 6953-6960.

7. *Ergebnisse und Diskussion*

Abkürzungsverzeichnis

R_f	Retentionsfaktor
t_R	Retentionszeit (HPLC)
abs.	absolutiert
ACN	Acetonitril
ADMIDAS	benachbarte MIDAS; <i>adjacent site MIDAS</i>
Alloc	Allyloxycarbonyl-
BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
ca.	circa
ca.	circa
CCRF-CEM ...	humane Krebszelllinie; T-Lymphoblasten eines Kindes mit akuter lymphatischer Leukämie; Zellen wachsen in Suspension können aber auch adhäreren
CHCA	<i>4-Chloro-α-Cyanocinnamic Acid</i> ; α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure
CI	<i>Confidence interval</i> ; Konfidenzintervall
CSLM	<i>confocal laser scanning microscope</i> ; konfokales Laser-Scanning Mikroskop
CuAAC	<i>Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition</i> ; kupferkatalysierten Azid-Alkin Zykladdition
Cy5	Cyanin 5, ein Fluoreszenzfarbstoff
DBU	1,5-Diazabicyclo[5.4.0]-5-undecen
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
Def.	Definition
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
Dimethylether ..	DME

7. Ergebnisse und Diskussion

DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPSS	<i>diode pumped solid state</i> ; diodengepumpter Festkörper(laser)
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-Glykol-bis(2-aminoethylether)- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> ', <i>N</i> '-tetraacetat
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; fötales Rinderserum
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
Fmoc-OSu	Fmoc- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester
GC3	humane Krebszelllinie; Adenokarzinom des Darmes
ges.	gesättigt(er)
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphat
HCS	<i>High-content screening</i>
HFIP	Hexafluorisopropanol
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazolhydrat
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HV	Hochvakuum
i.V.	im Vakuum
LoVo	humane Krebszelllinie; Adenokarzinom des Darmes
MALDI-ToF	<i>matrix-assisted laser desorption ionisation - time of flight</i>
MDR	Mehrfachresistenz; <i>multi-drug resistance</i>
MeI	Methyliodid
MeOH	Methanol
MIDAS	metallionen-abhängige Bindungsstelle; <i>metal-ion-dependent adhesion site</i>
Millipore Wasser	MPW
MS	Massenspektrometrie
NMP	1-Methyl-2-pyrrolidon
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphatpuffer

7.7. Veröffentlichungen im Rahmen dieser Dissertation

PCC	Pyridiniumchlorochromat
PE	Petrolether
Pipes	1,4-Piperazindiethansulfonat
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
PSI	Plexin–Semaphorin–Integrin
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruckflüssigchromatographie
RT	Raumtemperatur
s.a.	siehe auch
SAR	<i>structure activity relationship</i>
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> ; Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
u.	und
u.a.	und andere(r)
u.v.m.	und vieles mehr
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation

7. *Ergebnisse und Diskussion*

Abbildungsverzeichnis

1.1. Cryptophycin-1; Fragmente.	10
1.2. schematischer Aufbau der Mikrotubuli. ^[13]	11
1.3. Veröffentlichte SAR-Studien.	12
1.4. schematische Abbildung der Prodrug-Aktivierung.	14
1.5. schematischer Aufbau der Integrine.	15
1.6. Kristallstruktur des RGD-Peptid-Integrin-Komplexes.	17
1.7. Funktionsweise des Resazurin-Assays.	23
3.1. Cryptophycin-1; Fragmente.	29
3.2. Geplante mögliche Prodrugs.	30
3.3. Cryptophycin-Prodrug.	31
3.4. Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Internalisierung.	32
3.5. Cryptophycin-52 mit ¹³ C-Isotopenmarkierung	33
4.1. Cryptophycin-1; Fragmente.	35
4.2. Geplante mögliche Prodrugs.	36
4.3. Cryptophycin-Prodrug.	37
4.4. Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Internalisierung.	37
4.5. ¹³ C-labelled cryptophycin-52	38
6.1. Grafische Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes.	97
7.1. Cryptophycin-52 mit ¹³ C-Isotopenmarkierung.	105
7.2. Geplante mögliche Prodrugs.	109
7.3. Synthese der bivalenten Erkennungseinheit.	111
7.4. Synthese des „Auslösers“ des Prodrugs.	112
7.5. Cryptophycin-Prodrug.	114
7.6. Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der Internalisierung.	117

Abbildungsverzeichnis

7.7. Fragment A Analoga.	118
7.8. Fragment C Analoga.	122
7.9. Fragment C Analoga.	123
7.10. Fragment D Analoga.	125
7.11. „Clicktophycin-52“.	127
7.12. Konjugat eines Cryptophycins und eines RGD-Peptids.	128
7.13. Diol des Cryptophycins-52.	129
7.14. Cryptophycin-55.	131
7.15. A : Struktur von Dolstatin 10 und B : Auristatin PE. ^[123]	132

Tabellenverzeichnis

6.1. Aminosäureeinwaagen für die Synthese des Peptids 30	85
6.2. Protokoll für die Peptidsynthese mittels Synthesizer.	87
6.3. Konzentrationen und Volumina der eingesetzten Farbstoffe im HCS. . .	99
7.1. IC ₅₀ -Werte einiger Mitosehemmmstoffe.	131
7.2. Färbemuster.	137
7.3. Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Fragment A Analoga (KB-3-1) .	141
7.4. Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Fragment A Analoga (KB-V1) .	141
7.5. Resistenzfaktoren der Fragment A Analoga	142
7.6. Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Fragment C Analoga (KB-3-1) .	142
7.7. Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Fragment C Analoga (KB-V1) .	143
7.8. Resistenzfaktoren der Fragment C Analoga	144
7.9. Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Fragment D Analoga (KB-3-1) .	144
7.10. Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der Fragment D Analoga (KB-V1) .	145
7.11. Resistenzfaktoren der Fragment D Analoga	145
7.12. Ergebnisse der Zytotoxizitätstests des „Clicktophycin-52“ (KB-3-1) . .	145
7.13. Ergebnisse der Zytotoxizitätstests des „Clicktophycin-52“ (KB-V1) . .	146
7.14. Ergebnisse der Zytotoxizitätstests des Cryptophycin-RGD-Konjugates (KB-3-1)	146
7.15. Ergebnisse der Zytotoxizitätstests des Cryptophycin-RGD-Konjugates (KB-V1)	146
7.16. Ergebnisse der Zytotoxizitätstests des Cryptophycin-iol (KB-3-1) . .	146
7.17. Ergebnisse der Zytotoxizitätstests des Cryptophycin-Diol (KB-V1) . .	147

Literaturverzeichnis

- [1] *Todesursachenstatistik 2002*, Statistisches Bundesamt, **2002**.
- [2] WHO, *The World Health Organization's Fight Against Cancer: Strategies That Prevent, Cure and Care.*, World Health Organization **2007**.
- [3] R. E. Schwartz, C. F. Hirsch, D. F. Segin, J. E. Flor, M. Chartrain, R. E. Fromtling, G. H. Harris, M. J. Salvatore, J. M. Liesch, K. Yudin, Pharmaceuticals from cultured algae, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **1990**, *V5*(2), 113–123.
- [4] A. M. Burja, B. Banaigs, E. Abou-Mansour, J. G. Burgess, P. C. Wright, Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9347–9377.
- [5] S. Eissler, A. Stoncius, M. Nahrwold, N. Sewald, The synthesis of cryptophycins, *Synthesis* **2006**, *22*, 3747–3789.
- [6] G. Trimurtulu, I. Ohtani, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, T. H. Corbett, F. A. Valeriotte, L. Demchik, Total structures of cryptophycins, potent antitumor depsipeptides from the blue-green algae *Nostoc* sp. strain GSV 224, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*(11), 4729–4737.
- [7] R. Bai, R. E. Schwartz, J. A. Kepler, G. R. Pettit, E. Hamel, Characterization of the interaction of cryptophycin-1 with tubulin: Binding in the vinca domain, competitive inhibition of dolastatin 10 binding, and an unusual aggregation reaction, *Cancer Research* **1996**, *56*, 4398–4406.
- [8] D. Panda, K. DeLuca, D. Williams, M. A. Jordan, L. Wilson, Antiproliferative mechanism of action of cryptophycin-52: Kinetic stabilization of microtubule dynamics by high-affinity binding to microtubule ends, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9313–9318.
- [9] J. Liang, E. D. Moher, R. E. Moore, D. W. Hoard, Synthesis of cryptophycin-52 using the sharpless asymmetric dihydroxylation: Diol to epoxide transformation optimized for a base-sensitive substrate, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3143–3147.
- [10] J. P. Stevenson, W. Sun, M. Gallagher, R. Johnson, D. Vaughn, L. Schuchter, K. Algazy, S. Hahn, N. Enas, D. Ellis, D. Thornton, P. J. O'Dwyer, Phase I trial of the cryptophycin analogue LY355703 administered as an intravenous infusion on a day 1 and 8 schedule every 21 days, *Clinical Cancer Research* **2002**, *8*(8), 2524–2529.

- [11] G. D'Agostino, J. D. Campo, B. Mellado, M. Izquierdo, T. Minarik, L. Cirri, L. Marini, J. Perez-Gracia, G. Scambia, A multicenter phase II study of the cryptophycin analog LY355703 in patients with platinum-resistant ovarian cancer, *International Journal of Gynecological Cancer* **2006**, *16*(1), 71–76.
- [12] D. Panda, V. Ananthnarayan, G. Larson, C. Shih, M. Jordan, L. Wilson, Interaction of the antitumor compound cryptophycin-52 with tubulin, *Biochemistry* **2000**, *39*(46), 14121–14127.
- [13] D. Voet, J. Voet, *Biochemie*, VCH-Weinheim **1994**.
- [14] Q.-X. Yue, X. Liu, D.-A. Guo, Microtubule-binding natural products for cancer therapy, *Planta Medica* **2010**, *76*, 1037–1043.
- [15] A. Mitra, D. Sept, Localization of the antimitotic peptide and depsipeptide binding site on β -tubulin, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13955–13962.
- [16] R. S. Al-Awar, J. E. Ray, R. M. Schultz, S. L. Andis, J. H. Kennedy, R. E. Moore, J. Liang, T. Golakoti, G. V. Subbaraju, T. H. Corbett, A convergent approach to cryptophycin-52 analogues: Synthesis and biological evaluation of a novel series of fragment A epoxides and chlorohydrins, *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 2985–3007.
- [17] T. Golakoti, J. Ogino, C. Heltzel, T. Husebo, C. Jensen, L. Larsen, G. Patterson, R. Moore, S. Mooberry, T. Corbett, F. Valeriote, Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from *Nostoc* sp. strain GSV 224, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 12030–12049.
- [18] D. L. Varie, C. Shih, D. A. Hay, S. L. Andis, T. H. Corbett, L. S. Gossett, S. K. Janisse, M. J. Martinelli, D. M. Eric, R. M. Schultz, J. E. Toth, Synthesis and biological evaluation of cryptophycin analogs with substitution at C-6 (fragment C region), *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1999**, *9*, 369–374.
- [19] S. B. Buckand, J. K. Huff, R. H. Himes, G. I. Georg, Total synthesis and antitubulin activity of C10 analogues of cryptophycin-24, *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 696–702.
- [20] R. S. Al-Awar, T. H. Corbett, J. E. Ray, L. Polin, J. H. Kennedy, M. M. Wagner, D. C. Williams, Biological evaluation of cryptophycin-52 fragment A analogues: Effect of the multidrug resistance ATP binding cassette transporters on antitumor activity, *Molecular Cancer Therapeutics* **2004**, *3* (9), 1061–1067.
- [21] R. S. Al-Awar, W. J. Ehlhardt, S. V. Gottumukkala, M. J. Martinelli, E. D. Moher, R. E. Moore, J. E. Munroe, B. H. Norman, V. F. Patel, J. E. Ray, C. Shih, J. E. Toth, V. Vasudevan, Cryptophycin compounds **2004**.

- [22] M. Eggen, G. I. Georg, The cryptophycins: Their synthesis and anticancer activity, *Medicinal Research Reviews* **2002**, *22*(2), 85–101.
- [23] V. F. Patel, S. L. Andis, J. H. Kennedy, J. E. Ray, R. M. Schultzvoet, Novel cryptophycin antitumor agents: Synthesis and cytotoxicity of fragment “B” analogues, *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 2588–2603.
- [24] C. Shih, L. S. Gossett, J. M. Gruber, C. S. Grossman, S. L. Andis, R. M. Schultz, J. F. Worzalla, T. H. Corbett, J. T. Metz, Synthesis and biological evaluation of novel cryptophycin analoga with modification in the β -alanine region, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1999**, *9*, 69–74.
- [25] M. Kobayashi, W. Wang, N. Ohyabu, M. Kurosu, I. Kitagawa, Improved total synthesis and structure–activity relationship of arenastatin A, a potent cytotoxic spongean depsipeptide, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1995**, *43*, 1598–1600.
- [26] G. I. Georg, S. M. Ali, V. J. Stella, W. N. Waugh, R. H. Himes, Halohydrin analogues of cryptophycin-1: Synthesis and biological activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 1959–1962.
- [27] J. Liang, R. E. Moore, E. D. Moher, J. E. Munroe, R. S. Al-awar, D. A. Hay, D. L. Varie, T. Y. Zhang, J. A. Aikins, M. J. Martinelli, C. Shih, J. E. Ray, L. L. Gibson, V. Vasudevan, L. Polin, K. White, J. Kushner, C. Simpson, S. Pugh, T. H. Corbett, Cryptophycins-309, -249 and other cryptophycin analogs: Preclinical efficacy studies with mouse and human tumors, *Investigational New Drugs* **2005**, *23*, 213–224.
- [28] R. E. Notari, Prodrug design, *Pharmacy and Therapeutics Journal* **1981**, *14*, 25–53.
- [29] M. Shimaoka, T. A. Springer, Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function, *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*(9), 703–716.
- [30] A. R. Hilgenbrink, P. S. Low, Folate receptor-mediated drug targeting: From therapeutics to diagnostics, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, *94*, 2135–2146.
- [31] Z. Jin, J. Razkin, V. Jossierand, D. Boturyn, A. Grichine, I. Texier, M. Favrot, P. Dumy, J. Coll, *In Vivo* noninvasive optical imaging of receptor-mediated RGD internalization using self-quenched Cy5-labeled RAFT-c(-RGDFK-)₄, *Molecular Imaging* **2007**, *6*(1), 43–55.
- [32] M. Millard, S. Odde, N. Neamati, Integrin targeted therapeutics, *Theranostics* **2011**, *1*, 154–188.
- [33] M. Barczyk, S. Carracedo, D. Gullberg, Integrins, *Cell Tissue Research* **2010**, *339*, 269–280.
- [34] E. Ruoslahti, Rgd and other recognition sequences for integrins, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697–715.

- [35] A. L. Dunehoo, M. Anderson, S. Majumdar, N. Kobayashi, C. Berkland, T. J. Siahaan, Cell adhesion molecules for targeted drug delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, *95*(9), 1856–1872.
- [36] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, Stereoisomere Peptid-Bibliotheken und Peptidmimetika zum Design von selektiven Inhibitoren des $\alpha_V\beta_3$ -Integrins für eine neuartige Krebstherapie, *Angewandte Chemie* **1997**, *109*, 1440–1456.
- [37] M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides, *European Journal of Biochemistry* **1992**, *210*, 911–921.
- [38] M. Pierschbacher, E. Ruoslahti, Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion, *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*(36), 17294–17298.
- [39] L. Marinelli, A. Lavecchia, K. Gottschalk, E. Novellino, H. Kessler, Docking studies on $\alpha_V\beta_3$ integrin ligands: Pharmacophore refinement and implications for drug design, *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*(21), 4393–4404.
- [40] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, Pharmacophore refinement of gpIIb/IIIa antagonists based on comparative studies of antiadhesive cyclic and acyclic RGD peptides, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1994**, *V8*(6), 709–730.
- [41] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Matha, E. Lohof, G. Holzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, N-methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha_V\beta_3$ integrin antagonists, *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 3033–3040.
- [42] J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_V\beta_3$ in complex with an arg-gly-asp ligand, *Science* **2002**, *296*, 151–155, crystal structure 1L5G.
- [43] C. L. Gladson, D. A. Cheresh, Glioblastoma expression of vitronectin and the $\alpha_V\beta_3$ integrin., *Journal of Clinical Investigation* **1991**, *88*, 1924–1932.
- [44] P. C. Brooks, R. A. F. Clark, D. A. Cheresh, Requirement of vascular integrin $\alpha_V\beta_3$ for angiogenesis, *Science* **1994**, *264*, 569–571.
- [45] C. C. Kumar, Integrin $\alpha_V\beta_3$ as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis, *Current Drug Targets* **2003**, *4*, 123–131.
- [46] M. Colin, R. Harbottle, A. Knight, M. Kornprobst, R. Cooper, A. Miller, G. Trugnan, J. Capeau, C. Coutelle, M. Brahimi-Horn, Liposomes enhance delivery and expression of an RGD-oligolysine gene transfer vector in human tracheal cells, *Gene Therapy* **1998**, *5*, 1488–1498.

- [47] S. Castel, R. Pagan, F. Mitjans, J. Piulats, S. Goodman, A. Jonczyk, F. Huber, S. Vilaró, M. Reina, RGD peptides and monoclonal antibodies, antagonists of α_v -integrin, enter the cells by independent endocytic pathways, *Laboratory Investigation* **2001**, *81,12*, 1615–1626.
- [48] S. Cressman, Y. Sun, E. J. Maxwell, N. Fang, D. D. Y. Chen, P. R. Cullis, Binding and uptake of RGD-containing ligands to cellular $\alpha_v\beta_3$ integrins, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2009**, *15*, 49–59.
- [49] F. Mitjans, D. Sander, J. Adán, A. Sutter, J. M. Martinez, C.-S. Jäggle, J. M. Moyano, H.-G. Kreysch, J. Piulats, S. L. Goodman, An anti- α_v -integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice, *Journal of Cell Science* **1995**, *108*, 2825–2838.
- [50] I. Dijkgraaf, J. A. W. Kruijtzter, S. Liu, A. C. Soede, W. J. G. Oyen, F. H. M. Corstens, R. M. J. Liskamp, O. C. Boerman, Improved targeting of the $\alpha_v\beta_3$ integrin by multimerisation of RGD peptides, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2007**, *34*, 267–273.
- [51] G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman, H. Kessler, Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: Solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation, *Chemistry - A European Journal* **2003**, *9*, 2717–2725.
- [52] M. N. J. Seaman, Endosome protein sorting: motifs and machinery, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2008**, *65*, 2842–2858.
- [53] L. Zhou, R. Cheng, H. Tao, S. Ma, W. Guo, F. Meng, H. Liu, Z. Liu, Z. Zhong, Endosomal pH-activatable poly(ethylene oxide)-graft-doxorubicin prodrugs: Synthesis, drug release, and biodistribution in tumor-bearing mice, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1460–1467.
- [54] G. M. Dubowchik, R. A. Firestone, L. Padilla, D. Willner, S. J. Hofstead, K. Mosure, J. O. Knipe, S. J. Lasch, P. A. Trail, Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: Model studies of enzymatic drug release and antigen-specific *In Vitro* anticancer activity, *Bioconjugate Chemistry* **2002**, *13*, 855–869.
- [55] S. Jayant, J. J. Khandare, Y. Wang, A. P. Singh, N. Vorsa, T. Minko, Targeted sialic acid–doxorubicin prodrugs for intracellular delivery and cancer treatment, *Pharmaceutical Research* **2007**, *24*, 2120–2130.
- [56] M. Roderfeld, S. Matern, E. Roeb, Konfokale laserscanning-mikroskopie: Der blick in die zelle, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **2003**, *128*, 2539–2542.
- [57] N. S. Claxton, T. J. Fellers, M. W. Davidson, Laser scanning confocal microscopy **2005**.
- [58] R. Bacallao, S. Sohrab, C. Phillips, *Handbook of biological confocal microscopy*, 3. Edition **2006**.
- [59] H. Yuan, X. Li, J. Wu, J. Li, X. Qu, W. Xu, W. Tang, Strategies to overcome or circumvent P-glycoprotein mediated multidrug resistance, *Current Medicinal Chemistry* **2008**, *15*, 470–476.

- [60] T. Gerloff, Die Bedeutung der ABC-Transportsysteme ABCB1 und Abcb11 in der Arzneimitteltherapie und bei cholestatischen Lebererkrankungen **2004**, Habilitationsschrift Humboldt-Universität zu Berlin.
- [61] S. G. Aller, J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhou, P. M. Harrel, Y. T. Trinh, Q. Zhang, I. L. Urbatsch, G. Chang, Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding, *Science* **2009**, *323*, 1718–1722.
- [62] P. Borst, R. O. Elferink, Mammalian ABC transporters and disease in health, *Annual Review of Biochemistry* **2002**, *71*, 537–592.
- [63] C. D. Smith, X. Zhang, S. L. Mooberry, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, Cryptophycin: A new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells, *Cancer Research* **1994**, *14*, 3779–3784.
- [64] B. D. Chen, A. Nakeff, F. Valeriote, Cellular uptake of a novel cytotoxic agent, cryptophycin-52, by human THP-1 leukemia cells and H-125 lung tumor cells, *International Journal of Cancer* **1998**, *77*(6), 869–873.
- [65] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognande, Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *European Journal of Biochemistry* **2000**, *267*, 5421–5426.
- [66] R. Erb, M. Ehlers, Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen fertilizing capacity, *Journal of Dairy Science* **1950**, *33*(12), 853–864.
- [67] S. Eissler, T. Bogner, M. Nahrwold, N. Sewald, Efficient synthesis of cryptophycin-52 and novel *para*-alkoxymethyl unit analogues, *Chemistry* **2009**, *15*(42), 11273–11287, PMID: 19760734.
- [68] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, Structural and functional aspects of RGD-containing cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin $\alpha_V\beta_3$ antagonists, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 7461–7472.
- [69] T. Bogner, *Synthese von Fluoreszenzsonden für Untersuchungen zur Endocytose*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld **2007**.
- [70] Y. Ye, S. Bloch, B. Xu, S. Achilefu, Design, synthesis, and evaluation of near infrared fluorescent multimeric RGD peptides for targeting tumors, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 2268–2275.
- [71] M. Nahrwold, β^2 -Aminosäuren als Bausteine funktionalisierter Cryptophycin-Analoga, PhD thesis, Universität Bielefeld **2009**.
- [72] D. Panda, R. H. Himes, R. E. Moore, L. Wilson, M. A. Jordan, Mechanism of action of the unusually potent microtubule inhibitor cryptophycin 1, *Biochemistry* **1997**, *36*, 12948–12953.

- [73] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities, *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [74] B. A. Cheskis, N. A. Shpiro, A. M. Moiseenkov, Effective synthesis of ferrulactone II based on the use of 2-carboxyethyltriphenylphosphonium bromide, *Russian Chemical Bulletin* **1993**, *42*, 760–763.
- [75] C. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. D. Haug, Preparation and properties of N α -9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing *tert*-butyl side chain protection, *International Journal of Peptide and Protein Research* **2009**, *15*(1), 59–66.
- [76] K. Jenssen, *Peptide und peptidomimetische Verbindungen als Werkzeuge in der Proteomanalyse*, Dissertation, Universität Bielefeld **2004**.
- [77] J. E. Shepcock II, H. Kar, H. Hong, A convenient and scalable procedure for removing the Fmoc group in solution, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5329–5333.
- [78] C. Heggemann, *Synthese von Antigefrierglykopeptiden*, Diplomarbeit, Universität Bielefeld **2004**.
- [79] S. A. Mitchell, M. R. Pratt, V. J. Hruby, R. Polt, Solid-phase synthesis of o-linked glycopeptide analogues of enkephalin, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2327–2342.
- [80] S. Urman, *Wechselwirkung der Integrine mit chemisch modifizierten Peptiden*, Dissertation, Universität Bielefeld **2007**.
- [81] T. J. Wickham, P. Mathias, D. A. Cheresh, G. R. Nemerow, Integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment, *Cell* **1993**, *73*, 309–319.
- [82] L. J. Gooßen, K. Ghosh, New Pd-catalyzed selective reduction of carboxylic acids to aldehydes, *Chemical Communications* **2002**, 836–837.
- [83] S. Eissler, *Synthese von Cryptophycinen für SAR-Studien*, PhD thesis, Universität Bielefeld **2008**.
- [84] Z.-M. Wang, X.-L. Zhang, K. Sharpless, A general approach to γ -lactones via osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation. synthesis of (–)- and (+)-muricatacin, *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 6407–6410.
- [85] C. Harcken, R. Brückner, A four-step route from aldehydes to C₂ elongated enantiomerically pure α , β -unsaturated γ -hydroxy esters, *Synlett* **2001**, *5*, 718–721.
- [86] J. A. McCubbin, M. L. Maddess, M. Lautens, Total synthesis of cryptophycin analogues via a scaffold approach, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2993–2996.
- [87] J. A. Aikins, B. S. Briggs, T. Y. Zhang, M. Joseph, J. C. Zmijewski, Stereoselective process for producing intermediates of cryptophycins **2002**.

- [88] J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, A rapid esterification by means of mixed anhydrides and its application to large-ring lactonization, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1979**, *52*, 1989–1993.
- [89] P. Brooks, R. Clark, D. Cheresh, Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis, *Science* **1994**, *264* (5158), 569–571.
- [90] F. M. H. de Groot, E. W. P. Damen, H. W. Scheeren, Anticancer prodrugs for application in monotherapy targeting hypoxia, tumor-associated enzymes, and receptors, *Current Medicinal Chemistry* **2001**, *8*(9), 1093–1121.
- [91] P. Vaupel, F. Kallinowski, P. Okunieff, Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: A review, *Cancer Research* **1989**, *49*(23), 6449–6465.
- [92] L. M. Greenberger, F. Loganzo, *The role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology*, Cancer Drug Discovery and Development **2008**.
- [93] C. Sessa, K. Weigang-Köhler, G. G. O. Pagani, O. Mor, T. D. Pas, M. Burgess, I. Weimer, R. Johnson, Phase I and pharmacological studies of the cryptophycin analogue LY355703 administered on a single intermittent or weekly schedule, *European Journal of Cancer* **2002**, *38*, 2388–2396.
- [94] S. C. Jeffrey, J. B. Andreyka, S. X. Bernhardt, K. M. Kissler, T. Kline, J. S. Lenox, R. F. Moser, M. T. Nguyen, N. M. Okeley, X. Z. Ivan J. Stone, P. D. Senter, Development and properties of β -glucuronide linkers for monoclonal antibody-drug conjugates, *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 831–840.
- [95] T.-Y. Juan, S. R. Roffler, H.-S. Hou, S.-M. Huang, K.-C. Chen, Y.-L. Leu, Z. M. Prijovich, Cheng-Ping Yu, C.-C. Wu, G.-H. Sun, T.-L. Cha, Antiangiogenesis targeting tumor microenvironment synergizes glucuronide prodrug antitumor activity, *Clinical Cancer Research* **2009**, *15*, 4600–4611.
- [96] A. Klose, *Tumor-Matrix Interaktionen: Ihre Bedeutung für die Regulation der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin B am Beispiel des malignen Melanoms*, Dissertation, Universität Köln **2005**.
- [97] B. E. Toki, C. G. Cervený, A. F. Wahl, P. D. Senter, Protease-mediated fragmentation of *p*-amidobenzyl ethers: A new strategy for the activation of anticancer prodrugs, *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 1866–1872.
- [98] Z. Cheng, Y. Wu, Z. Xiong, S. S. Gambhir, X. Chen, Near-infrared fluorescent RGD peptides for optical imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression in living mice, *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 1433–1441.

- [99] V. Pijuan-Thompson, C. L. Gladson, Ligation of integrin $\alpha_V\beta_5$ is required for internalization of vitronectin by integrin $\alpha_V\beta_3$, *The Journal of Biological Chemistry* **1997**, *5*, 2736–2743.
- [100] J. Blok, A. Mulder-Stapel, L. Ginsel, W. Daems, The effect of chloroquine on lysosomal function and cell-coat glycoprotein transport in the absorptive cells of cultured human small-intestinal tissue, *Cell Tissue Research* **1981**, *218*, 227–251.
- [101] M. Wibo, B. Poole, Protein degradation in cultured cells. II. the uptake of chloroquine by rat fibroblasts and the inhibition of cellular protein degradation and cathepsin b1, *The Journal of Cell Biology* **1974**, *63*, 430–440.
- [102] L. Chen, T.-S. Hu, J. Zhu, H. Wu, Z.-J. Yao, Application of a regioselective mannich reaction on naringenin and its use in fluorescent labeling, *Synlett* **2006**, *8*, 1225–1229.
- [103] R. Fischer, O. Mader, G. Jung, R. Brock, Extending the applicability of carboxyfluorescein in solid-phase synthesis, *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14*, 653–660.
- [104] P. J. A. Weber, J. E. Bader, G. Folkers, A. G. Beck-Sickinger, A fast and inexpensive method for N-terminal fluorescein-labeling of peptides, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 597–600.
- [105] M. Nahrwold, T. Bogner, S. Eissler, S. Verma, N. Sewald, "Clicktophycin-52": a bioactive cryptophycin-52 triazole analogue, *Organic Letters* **2010**, *12*(5), 1064–1067.
- [106] B. Sammet, T. Bogner, M. Nahrwold, C. Weiss, N. Sewald, Approaches for the synthesis of functionalized cryptophycins, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 6953–6960.
- [107] S. Eissler, *Synthese von Cryptophycinen für SAR-Studien*, Dissertation, Universität Bielefeld **2008**.
- [108] S. Chaganty, T. Golakoti, C. Heltzel, R. Moore, W. Yoshida, Isolation and structure determination of cryptophycins-38, -326, and -327 from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. GSV 224, *Journal of Natural Products* **2004**, *67*, 1403–1406.
- [109] J.-M. de Muys, R. Rej, D. Nguyen, B. Go, S. Fortin, J.-F.-Lavallée, Synthesis and *in vitro* cytotoxicity of cryptophycins and related analogs, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1996**, *6*, 1111–1116.
- [110] A. S. Rima, E. J. William, G. V. Subbaraju, M. J. Michael, M. D. Eric, M. E. Richard, M. E. John, N. H. Bryan, P. F. Vinod, S. Chuan, T. E. John, V. Venkatraghavan, R. E. James, Neue Cryptophycin-Derivate als Antineoplastika **1997**.
- [111] N. Kotoku, T. Kato, F. Narumi, E. Ohtani, S. Kamada, S. Aoki, N. Okada, S. Nakagawa, M. Kobayashia, Synthesis of 15, 20-triamide analogue with polar substituent on the phenyl ring of arenastatin A, an extremely potent cytotoxic spongean depsipeptide, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14*, 7446–7457.

- [112] D. Marquardt, S. McCrone, M. S. Center, Mechanisms of multidrug resistance in HL-60 cells: Detection of resistance-associated proteins with antibodies against synthetic peptides that correspond to the deduced sequence of P-glycoprotein, *Cancer Research* **1990**, *50*, 1426–1430.
- [113] D. W. Shen, C. Cardarelli, J. Hwang, M. Cornwell, N. Richert, S. Ishii, I. Pastan, M. M. Gottesman, Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins, *The Journal of Biological Chemistry* **1986**, *17* (15), 7762–7770.
- [114] G. Subbaraju, T. Golakoti, G. Patterson, R. Moore, Three new cryptophycins from *Nostoc* sp. GSV 224, *Journal of Natural Products* **1997**, *60*, 302–305.
- [115] K. B. Yu L. Angell, Peptidomimetics via copper-catalyzed azide–alkyne cycloadditions, *Chemical Society Reviews* **2007**, *36*, 1674–1689.
- [116] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, The growing impact of click chemistry on drug discovery, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128–1137.
- [117] W. P. Purcell, J. A. Singer, Electronic and molecular structure of selected unsubstituted and dimethyl amides from measurements of electric moments and nuclear magnetic resonance, *The Journal of Physical Chemistry* **1967**, *71*, 4316–4319.
- [118] A. Brik, J. Muldoon, Y.-C. Lin, J. H. Elder, D. S. Goodsell, A. J. Olson, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, Rapid diversity-oriented synthesis in microtiter plates for *In Situ* screening of HIV protease inhibitors, *ChemBioChem - A European Journal of Chemical Biology* **2003**, *4*(11), 1246–1248.
- [119] V. D. Bock, D. Speijer, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, 1,2,3-Triazoles as peptide bond isosteres: synthesis and biological evaluation of cyclotetrapeptide mimics, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, *5*, 971–975.
- [120] O. Mesenzani, A. Massarotti, M. Giustiniano, T. Pirali, V. Bevilacqua, A. Caldarelli, P. Canonico, G. Sorba, E. Novellino, A. A. Genazzani, G. C. Tron, Replacement of the double bond of antitubulin chalcones with triazoles and tetrazoles: Synthesis and biological evaluation, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 764–768.
- [121] J. M. Pezzuto, Plant-derived anticancer agents, *Biochemical Pharmacology* **1996**, *53*, 121–133.
- [122] Z. Shi, S. Jain, I.-W. Kim, X.-X. Peng, I. Abraham, D. T. Youssef, L.-W. Fu, K. E. Sayed, S. V. Ambudkar, Z.-S. Chen, Sipholenol A, a marine-derived sipholane triterpene, potently reverses P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance in cancer cells, *Cancer Science* **2007**, *98*, 1373–1380.
- [123] S. Banerjee, Z. Wang, M. Mohammad, F. H. Sarkar, R. M. Mohammad, Efficacy of selected natural products as therapeutic agents against cancer, *Journal of Natural Products* **2008**, *71*, 492–496.

- [124] S. O. Doronina, B. A. Mendelsohn, T. D. Bovee, C. G. Cervený, S. C. Alley, D. L. Meyer, E. Oflazoglu, B. E. Toki, R. J. Sanderson, R. F. Zabinski, A. F. Wahl, P. D. Senter, Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: Effects of linker technology on efficacy and toxicity, *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 114–124.
- [125] J. Watanabe, T. Natsume, N. Fujio, K. Miyasaka, M. Kobayashi, Induction of apoptosis in human cancer cells by TZT-1027, an antimicrotubule agent, *Apoptosis* **2000**, *5*, 345–353.
- [126] M. S. K. Sutherland, R. J. Sanderson, K. A. Gordon, J. Andreyka, C. G. Cervený, C. Yu, T. S. Lewis, D. L. Meyer, R. F. Zabinski, S. O. Doronina, P. D. Senter, C.-L. Law, A. F. Wahl, Lysosomal trafficking and cysteine protease metabolism confer target-specific cytotoxicity by peptide-linked anti-CD30-auristatin conjugates, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 10540–10547.
- [127] E. Oflazoglu, I. J. Stone, K. Gordon, C. G. Wood, E. A. Repasky, I. S. Grewal, C.-L. Law, H.-P. Gerber, Potent anticarcinoma activity of the humanized anti-CD70 antibody h1F6 conjugated to the tubulin inhibitor auristatin via an uncleavable linker, *Clinical Cancer Research* **2008**, *14*, 6171–6180.
- [128] J. A. Francisco, C. G. Cervený, D. L. Meyer, B. J. Mixan, K. Klussman, D. F. Chace, S. X. Rejniak, K. A. Gordon, R. DeBlanc, B. E. Toki, C.-L. Law, S. O. Doronina, C. B. Siegall, P. D. Senter, A. F. Wahl, cAC10-vcMMAE, an anti-CD30–monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity, *Blood* **2003**, *102*, 1458–1465.
- [129] L. Naumovski, J. Junutula, Glembatumumab vedotin, a conjugate of an anti-glycoprotein non-metastatic melanoma protein B mAb and monomethyl auristatin e for the treatment of melanoma and breast cancer, *Curr Opin Mol Ther.* **2010**, *12*, 248–257.
- [130] A. Younes, N. L. Bartlett, J. P. Leonard, D. A. Kennedy, C. M. Lynch, E. L. Sievers, A. Forero-Torres, Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas, *New England Journal of Medicine* **2010**, *363*, 1812–1821.
- [131] K. Foyil, N. Bartlett, Brentuximab vedotin for the treatment of CD30+ lymphomas, *Immunotherapy* **2011**, *3*, 475–485.
- [132] K. A. Giuliano, R. L. DeBiasio, R. T. Dunlay, A. Gough, J. M. Volosky, J. Zock, G. N. Pavlakis, D. L. Taylor, High-content screening: A new approach to easing key bottlenecks in the drug discovery process, *Journal of Biomolecular Screening* **1997**, *2*, 249–259.
- [133] M. Wartenberg, H. Acker, Quantitative recording of vitality patterns in living multicellular spheroids by confocal microscopy, *Micron* **1995**, *26*, 395–404.
- [134] A. Zachowski, Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement, *Biochemical Journal* **1993**, *294*, 1–14.

- [135] J. Tait, Imaging of apoptosis, *Journal of Nuclear Medicine* **2008**, *49*, 1573–1576.
- [136] S. J. Martin, C. E. M. . Reutelingsperger, A. J. McGahon, J. A. Rader, R. C. A. A. van Schie, D. M. LaFace, D. R. Green, Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, *Journal of Experimental Medicine* **1995**, *182*, 1545–1556.
- [137] M. Rubach, *Etablierung mehrdimensionaler “High Content Assays” zur Identifizierung apoptotischer Effekte von potentiellen pharmakologischen Wirkstoffen*, Masterarbeit, Universität Bielefeld **2009**.
- [138] *MultiDrugQuantTM Assay Kit*, Chemicon International **2011**.