

Olaf Panknin

---

**Entwicklung neuer peptidischer CC-1065-Analoga  
für die CCK-B/Gastrinrezeptor-vermittelte  
Krebstherapie**

---



Cuvillier Verlag Göttingen

**Entwicklung neuer peptidischer CC-1065-Analoga  
für die CCK-B/Gastrinrezeptor-vermittelte  
Krebstherapie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Olaf Panknin**  
aus Teterow

Göttingen 2004

## **Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2004

Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2004

ISBN 3-86537-207-4

D 7

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. L. F. Tietze

Korreferent: Prof. Dr. U. Diederichsen

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2004

⊕ CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2004

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2004

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-207-4

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2001 bis Februar 2004 im Institut für Organische Chemie der Universität Göttingen unter Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. L. F. Tietze angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. L. F. Tietze, für die interessante Themenstellung, das stete Interesse am Fortgang der Arbeit, die zahlreichen Diskussionen und Anregungen sowie seine Unterstützung und Förderung während dieser Arbeit.

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

## Allgemeiner Teil

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Medizinische Grundlagen der Cancerogenese</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Konzepte der Therapie maligner Entartungen</b> .....	<b>5</b>
3.1	Chemotherapie .....	6
3.2	Angiogenese-Inhibitoren.....	10
3.3	Immuntherapie .....	13
3.4	Das Konzept der reversibel detoxifizierten Prodrugs für eine selektive Krebstherapie .....	17
<b>4</b>	<b>CC-1065 und Duocarmycine</b> .....	<b>22</b>
4.1	Analoga von CC-1065 und Struktur-Wirkungsbeziehungen .....	24
4.2	<i>Seco</i> -Verbindungen und Prodrugs von CC-1065-Analoga.....	27
<b>5</b>	<b>CCK-B/Gastrinrezeptor-vermittelte Krebstherapie</b> .....	<b>30</b>
5.1	CCK-B/Gastrin.....	31
<b>6</b>	<b>Zielsetzung und Planung der Arbeit</b> .....	<b>33</b>
6.1	Synthese neuartiger <i>seco</i> -CCBI-Analoga von CC-1065.....	33
6.2	Synthese von <i>seco</i> -CCBI-TMI und <i>seco</i> -CCBI-DMAI .....	35
6.3	Synthese der <i>seco</i> -CCBI-TMI-Peptid-Derivate .....	35
6.4	Synthese carbamat-geschützter Prodrugs von <i>seco</i> -CCBI-TMI .....	36
6.5	Synthese von Tetragastrin .....	37
<b>7</b>	<b>Synthese der <i>seco</i>-CCBI-Derivate</b> .....	<b>38</b>
7.1	Retrosynthetische Analyse .....	38

---

7.2	Literaturbekannte Synthesen von CBI-Systemen mit zusätzlicher Carboxyl-funktionalität .....	39
7.3	Synthese der geschützten <i>seco</i> -CCBI-Grundgerüste <b>83</b> und <b>90</b> .....	42
7.3.1	Synthese der Brom-naphtholcarbonsäure <b>61</b> und des Brom-naphtholamins <b>62</b> ..	42
7.3.2	Synthese des benzylgeschützten <i>seco</i> -CCBI-Grundgerüsts <b>83</b> .....	44
7.3.3	Synthese des silylgeschützten <i>seco</i> -CCBI-Grundgerüsts <b>90</b> .....	55
7.3.4	Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten von <b>83</b> und <b>90</b> .....	59
7.4	Synthese der <i>seco</i> -CCBI-TMI-Derivate.....	61
7.4.1	Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten von <b>91</b> , <b>92</b> und <b>93</b> .....	63
7.5	Synthese der <i>seco</i> -CCBI-DMAI-Derivate .....	66
7.5.1	Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten von <b>98</b> , <b>99</b> und <b>100</b> .....	68
<b>8</b>	<b>Synthese von Tetragastrin</b> .....	<b>71</b>
8.1	Literaturbekannte Tetra- und Pentagastrinsynthesen.....	71
8.2	Lineare Synthese von Tetragastrin über die allyl- bzw. methylgeschützte Asparaginsäureseitenkette.....	74
8.3	Lineare Synthese von allylgeschütztem Tetragastrin.....	77
8.4	Lineare Synthese von ungeschütztem Tetragastrin.....	78
8.5	"2 + 2"-Synthese von ungeschütztem Tetragastrin .....	80
8.5.1	Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten von Tetragastrin ( <b>107</b> ) .....	83
<b>9</b>	<b>Synthese der <i>seco</i>-CCBI-TMI-Pentagastrin-Derivate</b> .....	<b>86</b>
9.1	Synthese des benzylgeschützten <i>seco</i> -CCBI-TMI-Pentagastrin-Derivates <b>140</b> ..	86
9.1.1	Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten von <b>140</b> .....	90
9.2	Synthese des ungeschützten <i>seco</i> -CCBI-TMI-Pentagastrin-Derivates <b>141</b> .....	94
9.2.1	Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten von <b>141</b> .....	97
<b>10</b>	<b>Synthese des <i>seco</i>-CCBI-TMI-Pentagastrin-Carbamates <b>155</b></b> .....	<b>100</b>
10.1	Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten von <b>155</b> .....	106
<b>11</b>	<b><i>In vitro</i>-Zytotoxizitätsuntersuchungen</b> .....	<b>110</b>
11.1	Der HTCFA-Test zur Bestimmung der Zytotoxizitäten .....	110

11.2 <i>In vitro</i> -Zytotoxizitäten der <i>seco</i> -CCBI-TMI-Derivate <b>92</b> und <b>146</b> .....	112
<b>12 Zusammenfassung</b> .....	<b>113</b>

## Experimenteller Teil

<b>1 Allgemeine Methoden</b> .....	<b>124</b>
1.1 Präparative Methoden .....	124
1.2 Instrumentelle Analytik und verwendete Geräte .....	124
1.3 Chromatographische Methoden .....	126
1.4 Materialien für die <i>in vitro</i> -Zytotoxizitätstests .....	126
<b>2 Synthese der Brom-Naphtholderivate <b>61</b> und <b>62</b></b> .....	<b>128</b>
2.1 Bromessigsäure- <i>tert</i> -butylester ( <b>52</b> ).....	128
2.2 <i>tert</i> -Butyl-3-carboxyethyl-3-(diethylphosphono)-propionat ( <b>54</b> ).....	129
2.3 <i>tert</i> -Butyl-( <i>E</i> )-3-(ethoxycarbonyl)-4-(4-bromphenyl)-3-butenolat ( <b>56</b> ).....	130
2.4 ( <i>E</i> )-3-Ethoxycarbonyl-4-(4-bromphenyl)-3-butencarbonsäure ( <b>57</b> ).....	131
2.5 Ethyl-1-acetoxy-7-brom-3-naphthalincarboxylat ( <b>58</b> ).....	132
2.6 Ethyl-7-brom-1-hydroxy-3-naphthalincarboxylat ( <b>59</b> ).....	133
2.7 Ethyl-1-benzyloxy-7-brom-3-naphthalincarboxylat ( <b>60</b> ) .....	134
2.8 1-Benzyloxy-7-brom-3-naphthalincarbonsäure ( <b>61</b> ) .....	135
2.9 3-Amino-1-benzyloxy-7-brom- <i>N</i> -( <i>tert</i> -butoxycarbonyl)-naphthalin ( <b>62</b> ).....	136
<b>3 Synthese des benzylgeschützten <i>seco</i>-CCBI-Grundgerüsts <b>83</b></b> .....	<b>137</b>
3.1 1-Benzyloxy-7-benzyloxycarbonyl-3-naphthalincarbonsäure ( <b>63</b> ).....	137
3.2 3-Amino-1-benzyloxy-7-benzyloxycarbonyl- <i>N</i> -( <i>tert</i> -butoxycarbonyl)-naphthalin ( <b>80</b> ) .....	138
3.3 2-Amino-4-benzyloxy-6-benzyloxycarbonyl- <i>N</i> -( <i>tert</i> -butoxycarbonyl)-1-iod- naphthalin ( <b>81</b> ) .....	139

3.4	( <i>E/Z</i> )-2-Amino-4-benzyloxy-6-benzyloxycarbonyl- <i>N</i> -( <i>tert</i> -butoxycarbonyl)- <i>N</i> -(3-chlor-2-propenyl)-1-iod-naphthalin ( <b>82</b> ).....	140
3.5	(1 <i>R/S</i> )-5-Benzyloxy-3-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1-chlormethyl-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäurebenzylester ( <b>83</b> ).....	141
<b>4</b>	<b>Synthese des silylgeschützten <i>seco</i>-CCBI-Grundgerüsts <b>90</b>.....</b>	<b>143</b>
4.1	2-(Trimethylsilyl)-ethanol ( <b>85</b> ).....	143
4.2	3-Amino-1-benzyloxy- <i>N</i> -( <i>tert</i> -butoxycarbonyl)-7-[2-(trimethylsilyl)-ethoxycarbonyl]-naphthalin ( <b>87</b> ).....	144
4.3	2-Amino-4-benzyloxy- <i>N</i> -( <i>tert</i> -butoxycarbonyl)-1-iod-6-[2-(trimethylsilyl)-ethoxycarbonyl]-naphthalin ( <b>88</b> ).....	145
4.4	( <i>E/Z</i> )-2-Amino-4-benzyloxy- <i>N</i> -( <i>tert</i> -butoxycarbonyl)- <i>N</i> -(3-chlor-2-propenyl)-1-iod-6-[2-(trimethylsilyl)-ethoxycarbonyl]-naphthalin ( <b>89</b> ).....	146
4.5	(1 <i>R/S</i> )-5-Benzyloxy-3-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1-chlormethyl-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-[2-(trimethylsilyl)-ethyl]-ester ( <b>90</b> ).....	147
<b>5</b>	<b>Synthese der <i>seco</i>-CCBI-TMI-Derivate <b>91</b> und <b>93</b> .....</b>	<b>149</b>
5.1	(1 <i>R/S</i> )-5-Benzyloxy-1-chlormethyl-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäurebenzylester ( <b>91</b> ).....	149
5.2	(1 <i>R/S</i> )-5-Benzyloxy-1-chlormethyl-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-[2-(trimethylsilyl)-ethyl]-ester ( <b>93</b> )..	150
<b>6</b>	<b>Lineare Synthese von Tetragastrin über die allyl- bzw. methylgeschützte Asparaginsäureseitenkette .....</b>	<b>152</b>
6.1	L-Asparaginsäure- -allylester-hydrochlorid ( <b>117</b> ) .....	152
6.2	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-asparaginsäure- -allylester ( <b>118</b> ).....	153
6.3	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-aspartyl-( -O-allyl)-L-phenylalaninamid ( <b>119</b> ) ..	154
6.4	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-methionyl-L-aspartyl-( -O-allyl)-L-phenylalaninamid ( <b>121</b> ) .....	155
6.5	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-( -O-methyl)-L-phenylalaninamid ( <b>123</b> ) .....	156

6.6	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-L-phenylalaninamid ( <b>107</b> ) .....	158
<b>7</b>	<b>Lineare Synthese von allylgeschütztem Tetragastrin .....</b>	<b>160</b>
7.1	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-aspartyl-L-phenylalaninamid ( <b>124</b> ).....	160
7.2	L-Aspartyl-( -O-allyl)-L-phenylalaninamid-hydrochlorid ( <b>125</b> ).....	161
7.3	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-methionyl-L-aspartyl-( -O-allyl)-L-phenylalaninamid ( <b>121</b> ) .....	162
7.4	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-( -O-allyl)-L-phenylalaninamid ( <b>126</b> ) .....	163
<b>8</b>	<b>Lineare Synthese von ungeschütztem Tetragastrin.....</b>	<b>165</b>
8.1	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-methionin-( <i>N</i> -hydroxysuccinimid)-ester ( <b>127</b> )...	165
8.2	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-methionyl-L-aspartyl-L-phenylalaninamid ( <b>105</b> )	165
8.3	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-tryptophan-( <i>N</i> -hydroxysuccinimid)-ester ( <b>128</b> )..	167
8.4	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-L-phenylalaninamid ( <b>107</b> ) .....	167
<b>9</b>	<b>"2 + 2" - Synthese von ungeschütztem Tetragastrin .....</b>	<b>169</b>
9.1	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-tryptophyl-L-methionin ( <b>114</b> ) .....	169
9.2	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-tryptophyl-L-methionin-( <i>N</i> -hydroxysuccinimid)-ester ( <b>132</b> ).....	170
9.3	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-aspartyl-( -O- <i>tert</i> -butyl)-L-phenylalaninamid ( <b>130</b> ) .....	171
9.4	L-Aspartyl-L-phenylalaninamid-trifluoracetat ( <b>131</b> ).....	172
9.5	<i>N</i> -( <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-L-phenylalaninamid ( <b>107</b> ) .....	173
9.6	L-Tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-L-phenylalaninamid-trifluoracetat ( <b>133</b> )	174
<b>10</b>	<b>Synthese des benzylgeschützten <i>seco</i>-CCBI-TMI-Pentagastrin-Derivates .....</b>	<b>176</b>

10.1	(1 <i>R/S</i> )-5-Benzoyloxy-1-chlormethyl-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure ( <b>134</b> ).....	176
10.2	(1 <i>R/S</i> )-5-Benzoyloxy-1-chlormethyl-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-( <i>N</i> -hydroxy-succinimid)-ester ( <b>135</b> ). 177	
10.3	(1 <i>R/S</i> )-5-Benzoyloxy-1-chlormethyl-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure- -alanyl-amid ( <b>137</b> ).....	178
10.4	(1 <i>R/S</i> )-5-Benzoyloxy-1-chlormethyl-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-[2-( <i>N</i> -succinimidyl-oxycarbonyl)-ethyl]-amid ( <b>138</b> ) .....	179
10.5	(1 <i>R/S</i> )-5-Benzoyloxy-1-chlormethyl-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-[ -alanyl-L-tryptophyl-L-methionyl(O)-L-aspartyl-L-phenylalaninamidyl]-amid ( <b>140</b> ).....	180
<b>11</b>	<b>Synthese des ungeschützten <i>seco</i>-CCBI-TMI-Pentagastrin-Derivates</b> <b>141 183</b>	
11.1	(1 <i>R/S</i> )-1-Chlormethyl-5-hydroxy-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure- -alanylamid ( <b>142</b> ) .....	183
11.2	(1 <i>R/S</i> )-1-Chlormethyl-5-hydroxy-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-[2-( <i>N</i> -succinimidyl-oxycarbonyl)-ethyl]-amid ( <b>145</b> ) .....	184
11.3	(1 <i>R/S</i> )-1-Chlormethyl-5-hydroxy-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-[ -alanyl-L-tryptophyl-L-methionyl-L-aspartyl-L-phenylalaninamidyl]-amid ( <b>141</b> ) .....	185
<b>12</b>	<b>Synthese des <i>seco</i>-CCBI-TMI-Pentagastrin-Carbamates</b> <b>155..... 187</b>	
12.1	(1 <i>R/S</i> )-1-Chlormethyl-5-hydroxy-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-[2-(trimethylsilyl)-ethyl]-ester ( <b>146</b> )	187
12.2	-Alanin-benzylester-hydrochlorid ( <b>150</b> ) .....	188
12.3	3-Isocyano-propionsäure-benzylester ( <b>151</b> ) .....	189
12.4	(1 <i>R/S</i> )-5-(2-Benzoyloxycarbonyl-ethylcarbamoyloxy)-1-chlormethyl-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-[2-(trimethylsilyl)-ethyl]-ester ( <b>152</b> ).....	189

12.5	(1 <i>R/S</i> )-5-(2-Carboxy-ethylcarbamoxyloxy)-1-chlormethyl-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-[2-(trimethylsilyl)-ethyl]-ester ( <b>153</b> ).....	191
12.6	(1 <i>R/S</i> )-1-Chlormethyl-5-[2-( <i>N</i> -succinimidylloxycarbonyl)-ethyl-carbamoxyloxy]-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-[2-(trimethylsilyl)-ethyl]-ester ( <b>154</b> ).....	192
12.7	(1 <i>R/S</i> )-1-Chlormethyl-5-(L-phenylalaninamidyl-L-aspartyl-L-methionyl-L-tryptophyl- -alanyl-carbonyloxy)-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-[2-(trimethylsilyl)-ethyl]-ester ( <b>155</b> )	193
<b>13</b>	<b>Synthese des <i>seco</i>-CCBI-TMI-Derivates <b>92</b> zur Toxizitätsbestimmung.....</b>	<b>196</b>
13.1	(1 <i>R/S</i> )-1-Chlormethyl-5-hydroxy-3-(5,6,7-trimethoxyindol-2-carbonyl)-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure ( <b>92</b> ).....	196
<b>14</b>	<b>Synthese der <i>seco</i>-CCBI-DMAI-Derivate.....</b>	<b>198</b>
14.1	(1 <i>R/S</i> )-5-Benzoyloxy-1-chlormethyl-3-{5-[2-( <i>N,N</i> -dimethylamino)-ethoxy]-indol-2-carbonyl}-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-benzylester ( <b>98</b> ) .....	198
14.2	(1 <i>R/S</i> )-5-Benzoyloxy-1-chlormethyl-3-{5-[2-( <i>N,N</i> -dimethylamino)-ethoxy]-indol-2-carbonyl}-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure ( <b>99</b> ).....	199
14.3	(1 <i>R/S</i> )-5-Benzoyloxy-1-chlormethyl-3-{5-[2-( <i>N,N</i> -dimethylamino)-ethoxy]-indol-2-carbonyl}-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benz[ <i>e</i> ]indol-7-carbonsäure-methylester ( <b>100</b> )...	201

## Anhang

<b>1</b>	<b>Abkürzungen und Akronyme .....</b>	<b>203</b>
<b>2</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>206</b>
<b>3</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>219</b>
<b>4</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>221</b>

# Allgemeiner Teil

## 1 Einleitung

Die Krankheit Krebs spielte als Todesursache früherer Generationen nur eine geringe Rolle. In heutiger Zeit tritt sie allerdings als Alterskrankheit aufgrund der verbesserten Lebensbedingungen und medizinischen Versorgung verstärkt in Erscheinung. Im Zuge einer ständig gestiegenen durchschnittlichen Lebenserwartung in den westlichen Industrienationen ist auch die Anzahl von Degenerationserkrankungen, die eine längere Entwicklungsphase benötigen, stetig angewachsen. Hierzu gehören neben anderen die etwa 200 Krebsarten, die bisher beim Menschen bekannt sind. Diese "Vielfalt" hängt damit zusammen, dass im Prinzip jede Körperzelle mutieren und damit den Prozess des ungehemmten Zellwachstums auslösen kann. Wesentliche Risikofaktoren hat die Industrialisierung mit sich gebracht, zu denen cancerogene Chemikalien sowie der Abbau der Ozonschicht und damit verbunden die verstärkte Exposition von UV-Strahlung gehören. Zu den vermeidbaren Risikofaktoren zählen der Tabakrauch und eine ungesunde Ernährungsweise, die zusammen für über die Hälfte aller Krebserkrankungen verantwortlich gemacht werden. Die genetischen Faktoren spielen im Vergleich dazu nur eine untergeordnete Rolle.

Die Konsequenz ist, dass Krebs heute hinter den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache darstellt. Im Jahr 2002 starben in Deutschland 393 778 Menschen an Krankheiten des Kreislaufsystems im Vergleich zu 215 441 Todesfällen aufgrund von malignen Tumoren.<sup>1</sup>

Bei der Behandlung von Krebs gehören regelmäßige Untersuchungen im Rahmen der Frühdiagnostik und die Vermeidung von Risikofaktoren zu den eigenverantwortlichen Beiträgen, während in der wissenschaftlichen Forschung die Entwicklung angemessener Therapien im Vordergrund steht. Dabei spielt die Chemotherapie – neben der Chirurgie und der Strahlentherapie – eine wichtige Rolle, da sie im fortge-

schriftlichen Stadium der Erkrankung häufig die einzig erfolgversprechende Therapieform darstellt und ein hohes Entwicklungspotential beinhaltet. Bei Anwendung der zur Zeit zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika müssen oft allerdings gravierende Nebenwirkungen in Kauf genommen werden. Diese Nebenwirkungen sind auf eine nicht ausreichende Differenzierung zwischen malignem und gesundem Gewebe zurückzuführen, da im Wesentlichen nur die gesteigerte Proliferationsrate von Krebszellen ausgenutzt wird.

Zum Beitrag, den die synthetische organische Chemie zur Krebsbehandlung liefern kann, gehört die chemische Modifikation von beispielsweise antitumorwirksamen Naturstoffen, um ihre Selektivität oder ihre Wirksamkeit zu erhöhen. Hierzu sind im Arbeitskreis von *L. F. Tietze* bereits vielversprechende Therapieansätze entwickelt worden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer Zytostatika, die über niedermolekulare Peptid-Liganden einen selektiven Zugang zu Krebszellen ermöglichen sollen.

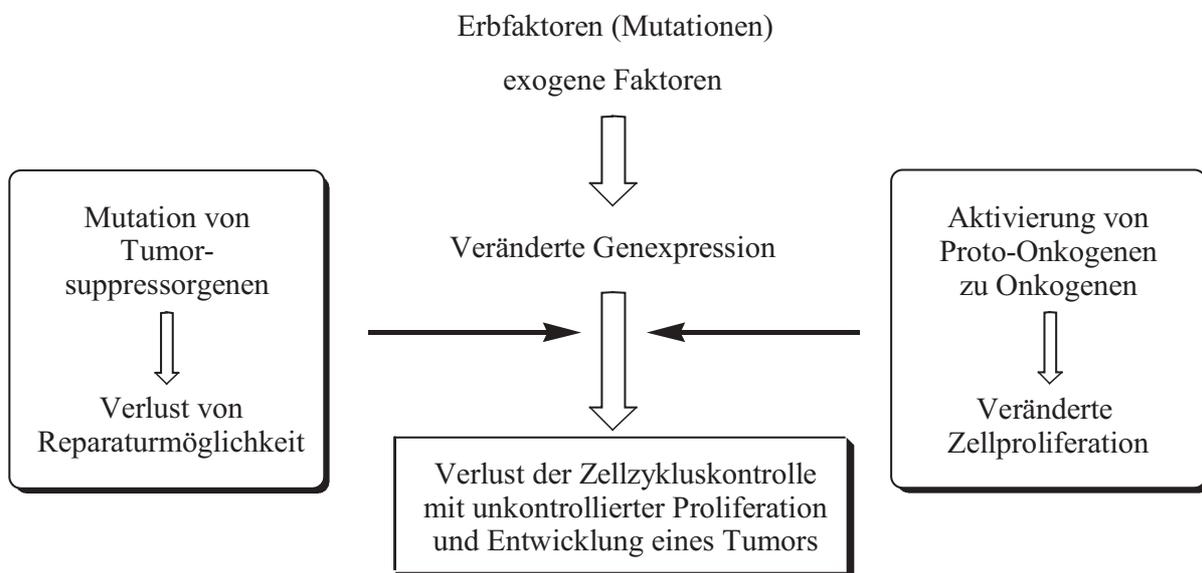
## 2 Medizinische Grundlagen der Cancerogenese

Der exakte molekulare bzw. genetische Mechanismus der Entstehung von Krebs ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Sicher ist, dass der Ausgangspunkt durch Veränderungen in einer einzigen Körperzelle markiert wird. Bevor dies aber zur eigentlichen Cancerogenese, also der unkontrollierten Neubildung von Körperzellen (Neoplasie) führt, müssen in der Folge noch weitere Mutationsereignisse auftreten, die hauptsächlich die Kontrollgene für ungehemmtes Zellwachstum betreffen.<sup>2</sup> Die Ursache solcher Mutationen kann zum einen in der genetischen Prädisposition (endogene Noxen) gesucht werden, die allerdings für nur etwa fünf Prozent der Erkrankungen verantwortlich ist. Den weitaus größeren Teil machen Umwelteinflüsse (exogene Noxen), energiereiche Strahlung,<sup>3</sup> chemische Stoffe (zum Beispiel Asbest, Benzol, Tabakrauch), aber auch eine falsche Ernährungsweise aus. Daneben gelten Krankheitserreger wie Viren (biologische Noxen) für die Entstehung bestimmter Krebsarten als Hauptrisikofaktoren. Zwischen der Einwirkung von Cancerogenen und dem Auftreten einer Krebserkrankung liegt eine Latenzzeit, die beim Menschen Jahre bis Jahrzehnte betragen kann.

Vermehrung, Wachstum, Differenzierung und Tod von Zellen sind genetisch geregelt. Die Funktion der Gene, die diese Vorgänge steuern, wird im Organismus durch übergeordnete, extrazelluläre Kontrollmechanismen reguliert. Über die interzelluläre Kommunikation ist sichergestellt, dass sich gleichartige Zellen in einem Gewebe gleich verhalten und eine funktionelle Einheit bilden. Während die Zellzahl im Entwicklungsstadium stetig zunimmt, bleibt sie nach der Differenzierung auf ihre jeweilige Funktion beim Erwachsenen weitgehend konstant. Untergang und Neubildung (etwa 50 Millionen Zellen pro Sekunde) von Zellen stehen dann im Gleichgewicht. Im Gegensatz zu normalen Zellen erreichen Krebszellen nicht den Endzustand der Differenzierung. Sie vermehren sich unkontrolliert unter Umgehung von körpereigenen Regelmechanismen.

Prinzipiell ist ein Tumor – neben seinem histologischen Erscheinungsbild – durch die Wachstumsgeschwindigkeit und die Wachstumsautonomie charakterisiert. Benigne Tumoren wachsen am Ort ihrer Entstehung als kompakter Zellverband, verdrängen zwar das umliegende Gewebe, zerstören es aber nicht und bilden keine Tochtergeschwülste (Metastasen). Im Gegensatz dazu wachsen maligne Tumoren unkontrolliert, brechen in Organe und Gefäße ein (Invasivität), zerstören diese (Destruktion) und können an anderen Stellen des Organismus Metastasen bilden.<sup>4</sup> Zur makroskopischen Einteilung unterscheidet man Tumoren gemäß der TNM-Klassifizierung<sup>5</sup> (T = Tumor, N = Nodus/Knoten, M = Metastasen) nach ihrer Abstammung vom jeweiligen Muttergewebe, dem Grad ihrer Ausdehnung (Staging) und dem histologisch ermittelten Differenzierungsgrad (Grading). Gutartige Zellwucherungen erhalten allgemein die Endung –om und maligne Entartungen entsprechend –karzinom. Die Endung –sarkom gilt für epitheliale Tumoren, wenn sie dem Bindegewebe entstammen.

Im Normalfall dirigieren Gene den Lebenszyklus einer Zelle, wobei die sog. Proto-Onkogene das Zellwachstum fördern und die Tumorsuppressorgene hemmend wirken.<sup>6</sup>



**Abbildung 1.** Genetische Grundlagen der Cancerogenese.

Die Umwandlung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen durch Mutationen bzw. deren gesteigerte Expression führt zur verstärkten Aktivität der entsprechenden (Onko)-Proteine.<sup>7</sup> Die derart veränderten Wachstumsfaktoren können im Gegensatz zu den

physiologischen Proteinen ein Dauersignal zur Zellteilung bewirken und damit der Apoptose entgegenwirken. Darüber hinaus nimmt man an, dass durch mutagene Substanzen die Tumorsuppressorgene, zu denen unter anderem das p53-Gen zählt, inaktiviert werden können (Abbildung 1).<sup>8</sup> Die durch p53 kontrollierten Faktoren hemmen den Eintritt von Zellen in die S-Phase des Zellzyklus (Phase der DNA-Synthese) und ermöglichen dadurch eine DNA-Reparatur. Außerdem wird im Fall irreparabler DNA-Schäden durch p53 auch der programmierte Zelltod eingeleitet. Ein durch Mutation verursachter Funktionsverlust derartiger Tumorsuppressorgene fördert also ebenfalls die Zellproliferation. Mutierte p53-Gene wurden inzwischen bei der Hälfte aller menschlichen Tumorarten entdeckt. Die Frage, welche Mutation für die maligne Transformation verantwortlich ist, ist nicht generell zu beantworten. Angesichts der mehrfachen Kontroll- und Steuerungsmechanismen des Zellstoffwechsels muss in einer Zelle mehr als eine Mutation erfolgen, damit sich ein manifester Tumor entwickelt.

### 3 Konzepte der Therapie maligner Entartungen

Therapeutische Maßnahmen beim manifesten Krebs beschränken sich auf eine Vernichtung oder Wachstumshemmung von Tumorzellen. Die drei Säulen der klassischen Tumorthherapie sind sinnbildlich durch die drei "S" (Stahl, Strahl und (S)Chemotherapie) repräsentiert. Bei soliden, klar umgrenzten Tumoren stellt eine operative Entfernung des entarteten Gewebes die Methode mit den besten Heilungschancen und geringsten Nebenwirkungen dar. Ist der Tumor schwer zugänglich oder betrifft er lebenswichtige Strukturen wie zum Beispiel Hirnstrukturen, kann eine Strahlenbehandlung angebracht sein, die zudem für den Gesamtorganismus weniger belastend ist als ein operativer Eingriff. In einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, in dem es bereits zu Metastasenbildung gekommen ist, bleibt jedoch meist nur eine Chemotherapie als letzte Möglichkeit, wobei beträchtliche Nebenwirkungen durch mangelnde Differenzierung zwischen benignem und malignem Gewebe in Kauf genommen werden müssen. Da das Ziel von Chemotherapeutika stark

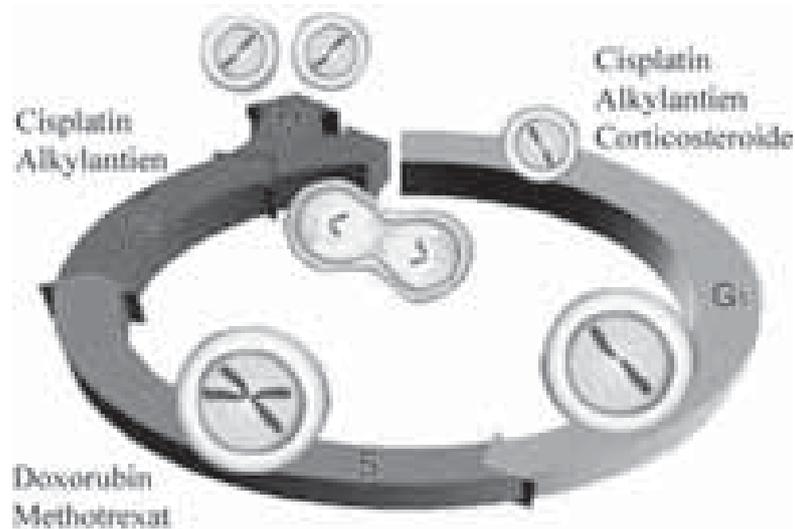
proliferierende Zellen sind, zeigen sich Schäden typischerweise an sich ständig regenerierenden Geweben wie zum Beispiel dem Knochenmark (Aplastie), der Schleimhaut (Mukositis) und Haarzellen (Alopezie). Als Ergänzung dieser drei Ansätze zur Krebsbekämpfung kann heute die Immuntherapie als vierte Säule angesehen werden, die auf der Ausnutzung tumorspezifischer Antigene beruht.<sup>9</sup>

### 3.1 Chemotherapie

Der Begriff Chemotherapie bezeichnet in der Krebsbehandlung die Applikation von toxischen Substanzen (Zytostatika), die in den Stoffwechsel und die Teilung von Zellen eingreifen und dadurch zum Zelltod oder zumindest zu einer Proliferationshemmung führen. Anhand der Wirkmechanismen der in der Tumorthherapie eingesetzten Zytostatika erfolgt eine Einteilung dieser in verschiedene Klassen, je nach deren Angriffspunkt in den Zellzyklus. Man unterscheidet dabei Alkylantien, Antimetabolite, Topoisomerase-Hemmstoffe, Mitose-Hemmstoffe und zytotoxisch wirksame Antibiotika.

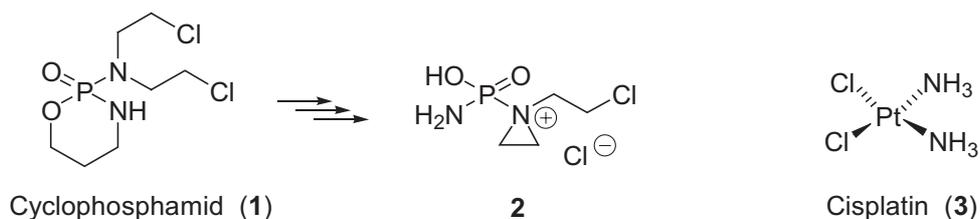
Alle eukaryontischen Zellen durchlaufen einen identischen Zellzyklus (Abbildung 2).<sup>4</sup> Der Teilungszyklus gliedert sich dabei in die eigentliche Mitosephase M und die drei Interphasen  $G_1$ , S und  $G_2$ . In der postmitotischen und präsynthetischen  $G_1$ -Phase (G = gap: Unterbrechung) werden hauptsächlich für die Zellteilung benötigte RNA und Proteine synthetisiert, während in der relativ kurzen S-Phase (Synthesephase) durch Neubildung der DNA der Chromosomensatz verdoppelt und damit die Zellteilung vorbereitet wird. An die S-Phase schließt sich die postsynthetische Wachstumsphase ( $G_2$ -Phase) an. In ihr liegen die Chromosomen bereits in Form von Chromatiden vor. Bei der folgenden Mitosephase (M) werden die Chromatiden mit Hilfe von Mikrotubuli getrennt und auf die Tochterzellen verteilt. Nach Trennung der Tochterzellen ist der Zyklus beendet. Ein Teil der Zellen geht in die stabile Ruhephase ( $G_0$ ) über, während der andere Teil wieder in den Zyklus eintritt. Differenziert sich eine Zelle und wird zur Dauergewebszelle, tritt sie in die stabile Ruhephase ( $G_0$ ) über und teilt sich nicht mehr. In dieser Phase ist die Zelle für Zytostatika in der Regel nicht zugänglich. Der Zellzyklus wird erst wieder aufgenommen, wenn die Zelle externe Signale empfängt, wie zum Beispiel den Kontaktverlust mit der

Nachbarzelle. Da sich maligne Entartungen jedoch durch eine gesteigerte Proliferationsrate auszeichnen, befinden sich teilweise nur 10 % der Tumorzellen in Ruhe. Das macht sie für Chemotherapeutika leichter zugänglich.



**Abbildung 2.** Der Zellzyklus mit Angriffspunkten verschiedener Chemotherapeutika.

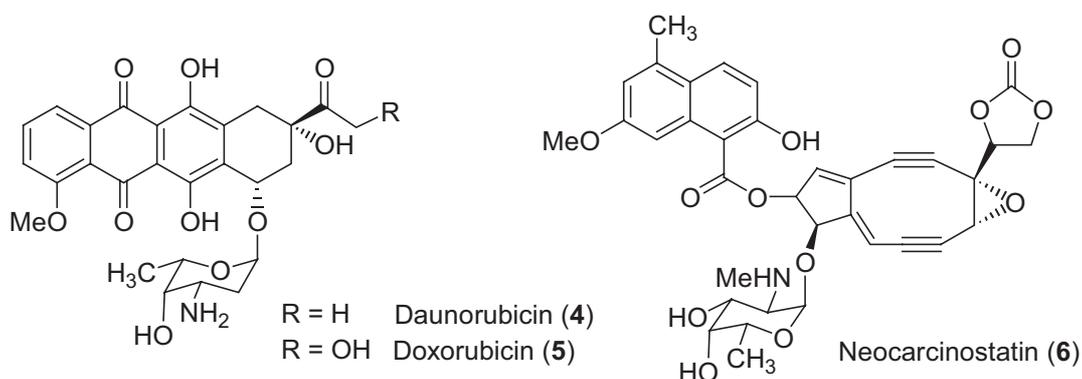
Die bedeutsamste Gruppe der Chemotherapeutika stellen die in der Regel phasenun-spezifisch wirkenden DNA-Alkylantien dar. Hierzu gehören Verbindungen unterschiedlicher chemischer Struktur, deren gemeinsames Kennzeichen hochreaktive elektrophile Alkylgruppen sind. Diese reagieren mit *N*-, *O*- oder *S*-haltigen Nucleophilen in Proteinen und insbesondere in Nucleinsäuren. Die Folge davon sind Quervernetzungen der DNA, abnorme Basenpaarungen und Strangbrüche, die schließlich zum Tod der Zelle führen. Zu dieser Gruppe gehören die schon früh entwickelten Stickstoff-Lost-Derivate wie das Cyclophosphamid (**1**),<sup>10</sup> das als sog. Prodrug erst durch Metabolisierung in den eigentlichen Wirkstoff **2** überführt wird. Ein weiterer wichtiger Vertreter der Alkylantien ist das Cisplatin (**3**) (Abbildung 3).<sup>11</sup>



**Abbildung 3.** Beispiele für DNA-Alkylantien.

Eine weitere Gruppe von hochwirksamen Alkylantien stellen die aus *Streptomyces zelensis* isolierten Antibiotika (+)-CC-1065 (**19**) oder die Duocarmycine dar (siehe Kapitel 4).

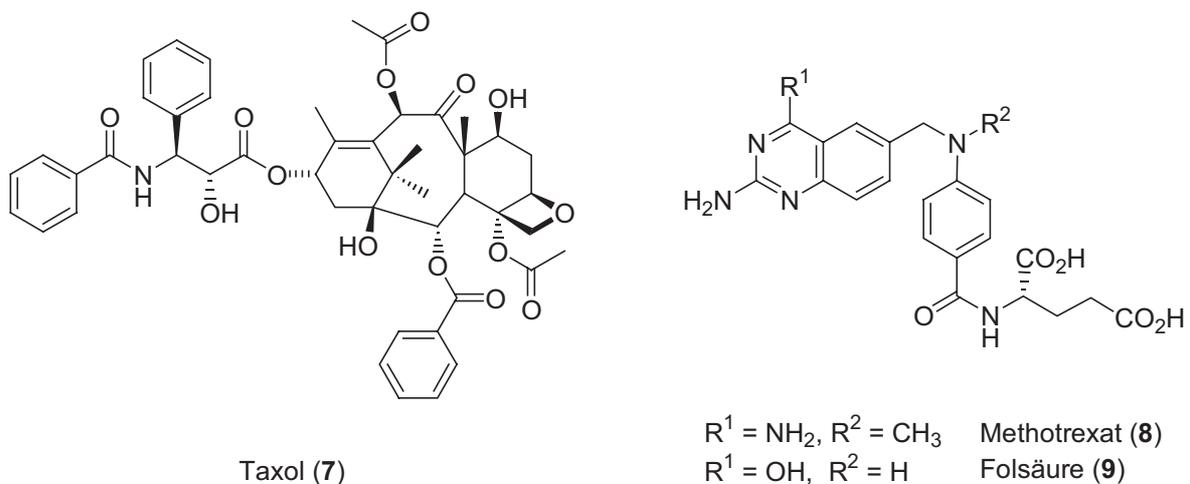
Aus anderen Streptomyceten-Stämmen konnten weitere zytostatisch wirksame Antibiotika isoliert werden, deren Zytotoxizität auf ganz anderen Mechanismen beruht. Hierzu gehören beispielsweise die phasenspezifisch in der S-Phase wirkenden Anthracycline Daunorubicin (**4**) und Doxorubicin (**5**), deren planares aromatisches Grundgerüst gut in die Basenpaare der DNA-Doppelhelix interkalieren kann.<sup>12</sup> Der damit verbundene Anstieg der Ganghöhe und die Verformung des Zuckerphosphatrückgrates machen eine Bindung der Transkriptionenzyme unmöglich, so dass sich die Zelle nicht mehr replizieren kann. Weitere Wirkmechanismen, die meist in Kombination mit der Interkalation auftreten, sind die Hemmung der Topoisomerase II, sowie die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Bildung von Radikalen wie bei den Endiin-Antibiotika, zu denen beispielsweise das Neocarcinostatin (**6**) zählt.<sup>13</sup> Bei diesen kommt es im Verlauf einer radikalischen *Bergman-Cycloaromatisierung* der Endiin-Einheit zu einer H-Abstraktion aus dem DNA-Zuckerphosphatrückgrat und somit schließlich zum Strangbruch (Abbildung 4).<sup>14</sup>



**Abbildung 4.** Beispiele für zytostatisch wirksame Antibiotika.

Eine weitere wichtige Gruppe von Chemotherapeutika sind die Mitosehemmstoffe, die vornehmlich in die Mitosephase des Zellzyklus eingreifen. Es handelt sich hierbei meist um Naturstoffe wie zum Beispiel die *Vinca*-Alkaloide Vincristin und Vinblastin, die an die  $\beta$ -Einheit des Tubulindimers binden und dadurch den Aufbau des Spindelapparates verhindern.<sup>15</sup> Das aus Eiben isolierte Taxol<sup>®</sup> (**7**)<sup>16</sup> oder auch

Epothilon<sup>17</sup> wirken in umgekehrter Weise, indem sie die Depolymerisation der Mikrotubuli zum Tubulin verhindern und somit den Spindelapparat stabilisieren. Die Substanzklasse der Antimetabolite besteht aus Strukturanaloga natürlicher Stoffwechselbausteine, die diese kompetitiv aus ihren Bindungen verdrängen. Dadurch werden beispielsweise für die Replikation wichtige Enzyme gehemmt oder funktionsuntüchtige Makromoleküle synthetisiert. Als Beispiel sei der Folsäureantagonist Methotrexat (8) genannt, der die Dihydrofolsäure-Reduktase hemmt (Abbildung 5).<sup>18</sup>



**Abbildung 5.** Beispiele für Mitosehemmstoffe und Antimetabolite.

Trotz der Fortschritte auf dem Gebiet der Chemotherapie, die vor allem darauf abzielen, unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren, existieren nach wie vor eine Reihe ungelöster Probleme.

Da Zytostatika eine geringe therapeutische Breite besitzen, ist ihre Anwendung stets mit einer Schädigung von gesunden Zellen verbunden. Durch den Angriff der DNA sind vor allem alkylierende Zytostatika selbst mutagene Stoffe, die Sekundärtumore induzieren können. Dies ist vor allem bei der Behandlung von Kindern relevant, da hier mit einer entsprechend längeren Lebenserwartung zu rechnen ist. Als akute Nebenwirkungen werden insbesondere Störungen des Blutbildes, Haarausfall, Fieber, Übelkeit und Erbrechen beobachtet, die auf eine Schädigung der stark proliferierenden Gewebe, wie zum Beispiel das Knochenmark, die Haarfollikel oder die Magen-Darm-Schleimhaut zurückzuführen sind. Zu den späten, teilweise irreversiblen Nebenwirkungen zählen neben der bereits erwähnten Induktion von Sekundär-

tumoren eine Schädigung des Knochenmarks, Lungenfibrosen oder Sekundärinfektionen aufgrund des geschwächten Immunsystems. Bei einer längeren Anwendung von Zytostatika stellen Resistenzentwicklungen ein erhebliches Problem dar.<sup>19</sup> Die Ursachen sind vielfältig und können sowohl auf eine falsche Anwendung oder auch auf zelluläre Faktoren zurückzuführen sein. Hierzu zählen beispielsweise Mutationen von Krebszellen während der Therapie oder die Selektion von resistenten Tumorzellen. Ein weiterer Grund für die Abnahme der Wirksamkeit eines Zytostatikums kann ein mangelhafter Transport an seinen Wirkort, ein enzymatischer Abbau in der Tumorzelle oder das Auftreten neuer Biosynthesewege sein. Als Ausweg hierfür bietet sich eine Polychemotherapie an, bei der Zytostatika mit verschiedenen Angriffspunkten und unterschiedlichem Nebenwirkungsprofil gleichzeitig oder zeitlich versetzt gegeben werden. Dennoch kann eine durch die vermehrte Synthese des P170-Glycoproteins verursachte *Multi-Drug-Resistenz* auftreten. Dieses Protein sorgt für einen aktiven Transport des Wirkstoffes aus der Tumorzelle heraus, so dass zusätzliche Maßnahmen zu dessen Inaktivierung getroffen werden müssen.

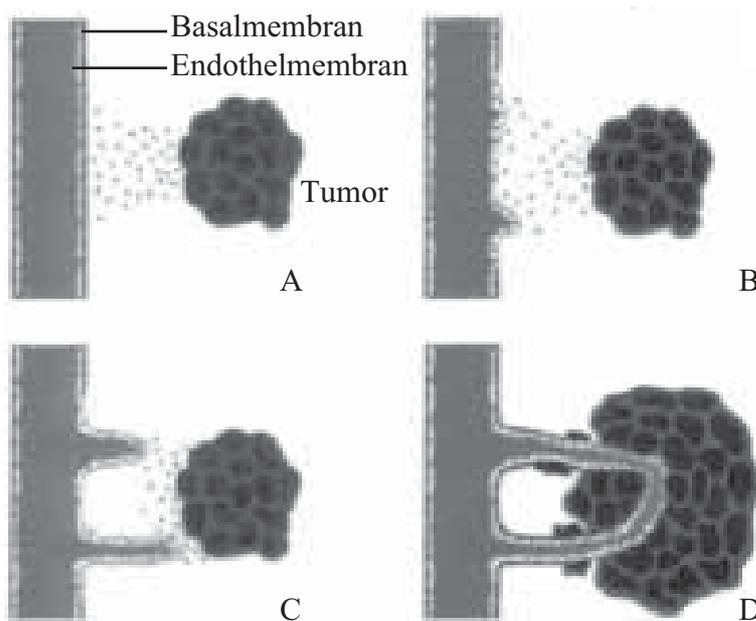
Trotz der beschriebenen Nebenwirkungen und Schwierigkeiten, die mit einer Chemotherapie verbunden sind, kann sie bei operativ schwer zugänglichen oder bereits metastasierenden Tumoren unumgänglich werden. Dies belegt die Wichtigkeit der zukünftigen Entwicklung von selektiven Antitumorwirkstoffen und -therapien.

### 3.2 Angiogenese-Inhibitoren

Entscheidend für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren ist die Neubildung von Blutgefäßen, die sog. Angiogenese. Die immer detailliertere Kenntnis der dabei ablaufenden Prozesse eröffnet Möglichkeiten zur Behandlung von Krebs, die um einiges vielseitiger als die Standard-Chemotherapie sind.

Im Anfangsstadium liegen alle soliden Tumoren als kleine Ansammlung transformierter Zellen vor, deren Wachstum durch ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose gesteuert wird.<sup>20</sup> Die Tumoren sind in diesem frühen Entwicklungsstadium noch nicht an das Blutgefäßsystem angeschlossen, d.h. sie liegen avaskular

vor. Daher kann die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung nur über Diffusionsprozesse stattfinden. Da hierbei die Versorgung der Zellen mit wachsendem Abstand zum Gefäß schlechter wird, nimmt auch die Teilungsfähigkeit dieser Zellen ab. Somit kann der Tumor in dieser frühen Phase eine Größe von maximal  $2 \text{ mm}^3$  erreichen. Erst durch den Anschluß an das Blutgefäßsystem ist eine ausreichende Versorgung und damit auch ein ungehindertes Wachstum gewährleistet. Wenn ein Tumor eine eigene Blutversorgung aufgebaut hat, kann er zudem metastasieren. Krebszellen lösen sich vom Tumor ab, gelangen in das angrenzende Blutgefäß und werden vom Blutstrom in andere Körperregionen transportiert, in denen sie das Blutgefäßsystem wieder verlassen und Metastasen bilden. Für das Größenwachstum und die Metastasierung eines Tumors ist also dessen Versorgung mit Blut von grundlegender Bedeutung.

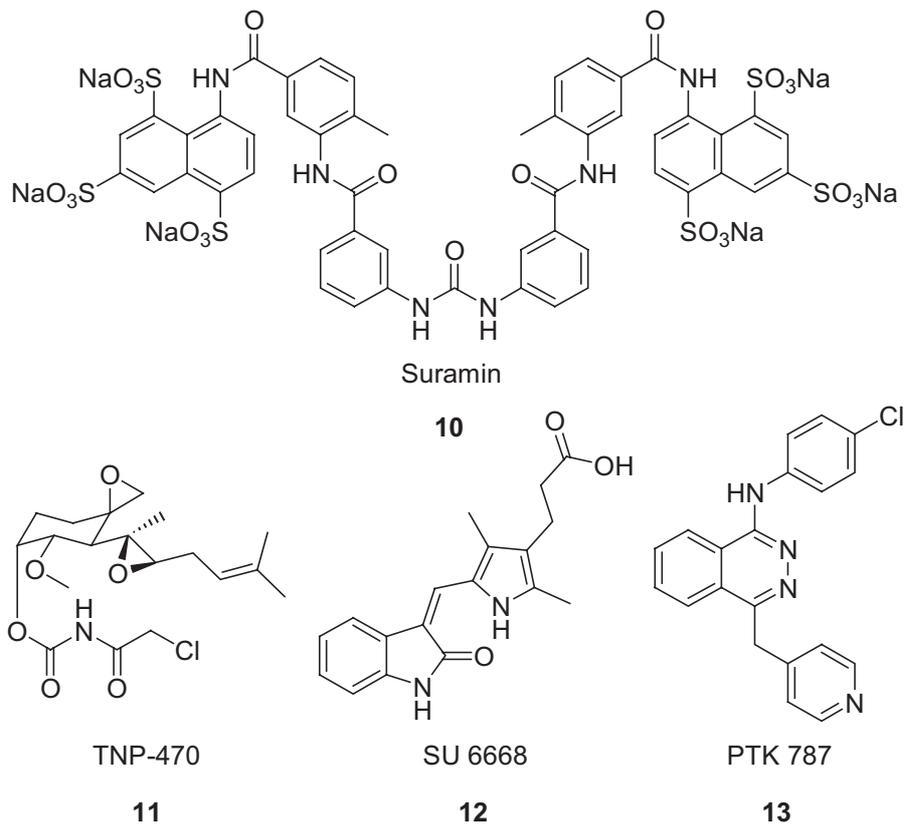


**Abbildung 6.** Die tumorinduzierte Angiogenese beinhaltet vier Phasen: **A)** Aktivierung von Endothelzellen durch Wachstumsfaktoren, **B)** Abbau der Basalmembran des Blutgefäßes und der extrazellulären Matrix durch Proteinase, **C)** Proliferation und Migration von Endothelzellen in Richtung des angiogenen Stimulus, **D)** Bildung einer neuen Basalmembran rund um das unreife Gefäß und Vereinigung der vorderen Enden der neu entstandenen Gefäße (Anastomose).

Ausgehend von dieser Beobachtung postulierte *J. Folkman* daher, dass in der Angiogenesehemmung ein möglicher Ansatz für die Krebstherapie liegt.<sup>21</sup> Das Konzept der Angiogeneseinhibition richtet sich ausschließlich gegen die proliferierenden Endothelzellen. Der Vorteil gegenüber herkömmlichen Behandlungsmethoden ist neben den möglicherweise geringeren Nebenwirkungen auch die verminderte Gefahr der Resistenzentwicklung gegenüber angiostatischen Medikamenten, da die

Endothelzellen ein stabiles Genom aufweisen und somit nicht die hohe Mutationsrate der Tumorzellen zeigen.<sup>22</sup>

Die biochemischen Vorgänge der Angiogenese sind in Abbildung 6 dargestellt. Unter der malignen Zelltransformation kommt es zu einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen und einer verstärkten Onkogen-Aktivierung. Dies führt zu einer verminderten Produktion endogener Angiogeneseinhibitoren. Auf der anderen Seite werden pro-angiogene Wachstumsfaktoren, unter anderem auch Hypoxie-bedingt, vermehrt produziert. Auf diese Weise kommt es zu einem schrittweisen Umschalten auf den angiogenen Phänotyp.<sup>23</sup> Der Tumor kann jetzt mit exponentiell zunehmender Geschwindigkeit wachsen und in das umliegende Gewebe eindringen.



**Abbildung 7.** Angiogeneseinhibitoren in der klinischen Prüfung.

*J. Folkman* entdeckte als erste Angiogenese-inhibierende Substanz Interferon-2. TNP-470 (11), der erste selektive Angiogeneseinhibitor, kam 1992 in die klinische Versuchsphase. Er bewirkt zwar ein geringeres Tumorwachstum, zeigt aber bei höherer Dosierung eine neurotoxische Wirkung.<sup>24</sup> TNP-470 ist ein um den Faktor 50