Synthese und zytotoxische Eigenschaften neuartiger Doxorubicinderivate

Dissertation zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ im Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von

Marco Lelle
geb. in Speyer

Mainz 2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2009 bis Oktober 2013 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Müllen im Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz durchgeführt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
ABC	ATP-binding cassette
ACN	Acetonitril
αCHCA	α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2-associated X protein
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyl
CD	Circulardichroismus
COSY	correlation spectroscopy
CPP	Zellpenetrierendes Peptid
D	Asparaginsäure
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	*N,N´*-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	*N*,*N*-Diisopropylethylamin
DMF	*N*,*N*-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eq	Äquivalent
Et_2O	Diethylether
EtOAc	Essigsäureethylester
EPR	enhanced permeability and retention
F	Phenylalanin
FD	field desorption
G	Glycin
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

IC_{50}	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
J	Kopplungskonstante
K	Lysin
K_A	Bindungskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Leucin
m	Milli
M	Methionin
mdeg	millidegree
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
MeOH	Methanol
MFI	mean fluorescence intensity
min	Minute
MST	Mikromaßstab-Thermophorese
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCO	molecular weight cut-off
N	Asparagin
NHS	*N*-Hydroxysuccinimid
NLS	Kernlokalisierungssequenz
NMR	kernmagnetische Resonanz
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect spectroscopy
P	Prolin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pH	potentia hydrogenii
PPII	Polyprolin-II
ppm	parts per million
Q	Glutamin
R	Arginin
RP	reversed phase
SAP	sweet arrow peptide
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

T	Threonin
Tat	trans-activator of transcription
TCEP	*Tris*(2-Carboxyethyl)phosphinhydrochlorid
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOCSY	total correlation spectroscopy
TOF	time of flight
TSTU	*N*,*N*,*N´*,*N´*-Tetramethyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uronium-Tetrafluoroborat
V	Valin
W	Tryptophan

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Das Zytostatikum Doxorubicin 1

1.1.1 Zytotoxische Eigenschaften und Wirkmechanismen 2

1.1.2 Anwendungsbereich sowie Nebenwirkungen der Doxorubicin-Therapie . 5

1.2 Die Chemie der Biokonjugation 8

1.2.1 Modifikation der Aminogruppe 8

1.2.2 Modifikation der Thiol-Gruppe 10

1.2.3 Bioorthogonale Modifikationen 11

1.2.4 Vernetzer 14

1.3 Zellpenetrierende Peptide weisen den Weg in die Zelle 15

1.3.1 Ursprung der Proteintransduktionsdomänen 15

1.3.2 Klassifizierung 16

1.3.3 Zellaufnahmemechanismen 19

1.4 Gezielte Arzneistoffabgabe in Tumoren 21

1.4.1 Passive Adressierung 21

1.4.2 Aktive Adressierung 22

1.5 Literatur 24

2 Motivation und Zielsetzung 29

2.1 Literatur 33

3 Dimere des Zytostatikum Doxorubicin 34

3.1 Neuartige dimere Doxorubicin-Moleküle 36

3.1.1 Synthese und Charakterisierung 36

3.1.2 Bestimmung der DNA-Bindungsaffinität 44

3.1.3 Untersuchung der intrazellulären Arzneistoffverteilung durch Fluoreszenzmikroskopie 50

3.2 Funktionale Doxorubicin-Dimere 52

3.2.1 Synthese und Charakterisierung 52

3.2.2 Biokonjugation von Immunglobulin G 62

3.3 Literatur 66

4 Doxorubicinderivate für die zielgerichtete Wirkstoffabgabe in Tumoren 69
4.1 Doxorubicin-Octreotid-Hybrid 71
4.1.1 Synthese und Charakterisierung 71
4.1.2 Bewertung der *In-vitro*-Zytotoxizität 82
4.2 Literatur 86
5 Peptid-vermittelte Zellaufnahme von Doxorubicin 88
5.1 Spaltbare zellpenetrierende Peptid-Doxorubicin-Strukturen 88
5.1.1 Synthese und Charakterisierung 88
5.1.2 Glutathion-vermittelte Wirkstofffreisetzung 96
5.1.3 Sekundärstrukturuntersuchungen durch Circulardichroismus-Spektroskopie 99
5.1.4 Fluoreszenzeigenschaften der Doxorubicin-CPP-Konjugate 100
5.1.5 Bestimmung der Zellaufnahme und -viabilität mittels Durchflusszytometrie 102
5.1.6 Untersuchung der *In-vitro*-Zytotoxizität mittels MTT-Test 106
5.1.7 Konfokalmikroskopische Analyse der intrazellulären Arzneistoffverteilung 107
5.2 Multivalente zellpenetrierende Peptid-Doxorubicin-Konjugate 110
5.2.1 Synthese und Charakterisierung 110
5.3 Funktionale zellpenetrierende Peptid-Doxorubicin-Abkömmlinge 115
5.3.1 Synthese und Charakterisierung 115
5.4 Literatur 123
6 Kernlokalisierungssignale für Doxorubicin 126
6.1 Spaltbare Doxorubicin-NLS-Konjugate 127
6.1.1 Synthese und Charakterisierung 127
6.2 Persistente Doxorubicin-NLS-Konjugate 135
6.2.1 Synthese und Charakterisierung 135
6.3 Literatur 139
7 Zusammenfassung und Ausblick 141
8 Experimenteller Teil 148

8.1 Materialien, Methoden und Analytik 148
8.2 Organische Synthesen 151

1 Einleitung

1.1 Das Zytostatikum Doxorubicin

Bereits 1940 erkannten Waksman und Woodruff das große Potential von Actinomycinen als Antibiotikum.[1] Neben der antibakteriellen Wirkung dieser von Actinobakterien produzierten Substanzen wurden für eine Vielzahl solcher Naturstoffe antitumorale Eigenschaften beobachtet.[2] Seither nimmt die Relevanz an Substanzen mit mikrobiellem Ursprung, welche mit antitumor Aktivität ausgestattet sind, stetig zu.
Der Arzneistoff Doxorubicin wird ebenfalls von Actinobakterien gebildet und gehört zur Stoffklasse der Anthracycline, synonym werden auch die Bezeichnungen Adriamycin sowie 14-Hydroxydaunomycin verwendet. Der Begriff Anthracyclin leitet sich im Hinblick auf die Struktur des Doxorubicin aus Anthrachinon und Tetrazyklin ab (Abbildung 1).[3] Tetrazykline sind antibiotisch wirksame Substanzen, die von verschiedenen Streptomyceten, einer Gattung der Actinobakterien, gebildet werden.
Mitte des letzten Jahrhunderts isolierten zwei unabhängige Forschergruppen in Italien und Frankreich aus den roten pigmenterzeugenden Bakterien *Streptomyces peucetius* und *Streptomyces coeruleorubidus* die äußerst potenten Zytostatika Daunomycin sowie Rubidomycin.[4] Durch nachfolgende Strukturaufklärung in den darauffolgenden Jahren hat sich herausgestellt, dass es sich um ein und dieselbe Verbindung handelte. Aufgrund des dualen Ursprungs hat sich daraufhin der Name Daunorubicin etabliert. Weitere Anthracycline, die von Streptomyceten produziert werden, konnten jedoch nicht annähernd an die pharmakologischen Eigenschaften des Daunorubicin heranreichen. Dennoch gelang es Arcamone *et al.* 1969, durch Behandlung des Wildtyps *Streptomyces peucetius* mit *N*-Nitroso-*N*-methylurethan einen Mutanten, den sogenannten *Streptomyces peucetius* Variante *caesius*, zu erzeugen, welcher ein Anthracyclin produziert, das den Antitumoreffekt des Daunorubicin sogar übertraf.[5] Dabei handelte es sich um das 14-Hydroxyderivat des Daunorubicin respektive Doxorubicin.[6]
Auch heute noch zählt Doxorubicin zu den effektivsten Krebsmedikamenten überhaupt, mit einem breiten Anwendungsspektrum gegen eine Vielzahl von Tumoren.[7]

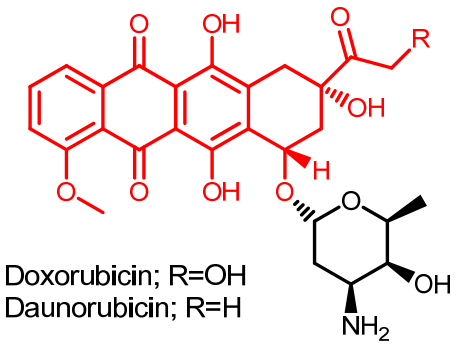


Abbildung 1: Chemische Struktur der Anthracycline Doxorubicin (14-Hydroxydaunomycin) und Daunorubicin; bestehend aus dem tetracyclischen Aglykon (rot), einem substituierten Anthrachinon Chromophor, sowie dem charakteristischen Kohlenhydrat Daunosamin (schwarz)

1.1.1 Zytotoxische Eigenschaften und Wirkmechanismen

Der Arzneistoff Doxorubicin gehört zur Gruppe der Zytostatika. Dabei handelt es sich um Substanzen, welche das Zellwachstum oder vielmehr die Zellteilung inhibieren. Obwohl Doxorubicin seit nunmehr 40 Jahren erfolgreich in der Chemotherapie eingesetzt wird, sind die genauen Wirkmechanismen nach wie vor unklar.[7,8] Nichtsdestotrotz ist eine Vielzahl an Mechanismen bekannt, welche für die zytotoxischen Eigenschaften des Doxorubicin verantwortlich sind. Die bedeutendsten Wirkmechanismen sind in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

1.1.1.1 DNA-Schädigung durch Beeinträchtigung der Topoisomerasen-Funktionalität

DNA-Topoisomerasen sind ubiquitäre Enzyme, welche die räumliche Beschaffenheit der DNA verändern können, ohne dabei die Desoxynukleotidstruktur oder -sequenz zu beeinflussen. Diese Enzyme können vorübergehend Einzelstrang- (Typ-I) sowie Doppelstrangbrüche (Typ-II) der DNA hervorrufen und wirken dadurch unterstützend bei der Replikation und Transkription.[9]

Anthracycline wie Doxorubicin sind sogenannte Topoisomerase-Typ-II-Gifte. Diese stabilisieren den DNA-Topoisomerase-Komplex und blockieren die DNA-Religation, was letztendlich dazu führt, dass die Topologie der DNA mit ihren Strangbrüchen aufrecht erhalten bleibt.[10] Durch einen erhöhten Anteil an DNA-Topoisomerase-Komplexen werden zytotoxische Läsionen verursacht, welche abschließend Apoptose induzieren, da der Zellzyklus in der G_1- und G_2-Phase verharrt.[11] Die Stabilisation der Komplexe durch das Zytostatikum Doxorubicin wird dabei durch zwei Strukturelemente des Arzneistoffs vermittelt. Zum einen interagiert das Aglykon über π-π-

Wechselwirkungen mit den Basenpaaren der DNA und zum anderen wird das Enzym vom Zuckermolekül, welches sich in der kleinen Furche der DNA befindet, beeinflusst.[12] Im Gegensatz zur Funktionalität der Topoisomerase-Typ-II ist die Topoisomerase-Typ-I-Funktionalität von Doxorubicin nur geringfügig gestört und spielt bei der zytotoxischen Wirkung eine untergeordnete Rolle.[7]

1.1.1.2 Produktion freier Radikale

Die Ein-Elektronen-Reduktion des Chinons von Doxorubicin wird von einer Vielzahl zellulärer Enzyme katalysiert. Diese meist mitochondrial, nuklear oder microsomal lokalisierten Enzyme erzeugen ein Semichinon, welches rasch wieder oxidiert wird und dabei Sauerstoff reduziert.[13] Dadurch werden leicht reaktive Sauerstoffspezies wie das Superoxidradikalanion sowie Wasserstoffperoxid gebildet. In zellfreien Systemen haben Lown *et al.* bereits Ende der 70er Jahre gezeigt, dass diese hoch reaktiven Radikalspezies umgehend DNA-Brüche induzieren und somit zum Zelltod führen können.[14] In Zellen ist die toxische Wirkung meist verstärkt, da in Gegenwart von Eisen, welches aus dem Speicherprotein Ferritin stammt, die noch potenteren Hydroxylradikale gebildet werden.[7]

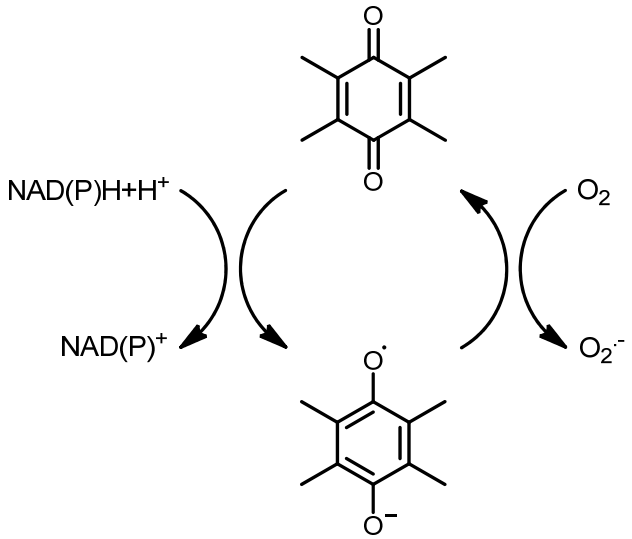


Abbildung 2: Ein-Elektronen-Redoxzyklus des chinoiden Systems von Doxorubicin

Während des Redoxzyklus (Abbildung 2) kann es auch zur reduktiven Deglykosilierung von Doxorubicin kommen. Das dabei freiwerdende Aglykon hat aufgrund seines erhöhten lipophilen Charakters eine gesteigerte Tendenz zur Membranakkumulation und kann dort weitere reaktive Spezies generieren. Durch den so entstehenden oxidativen Stress kann aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren Malondialdehyd entstehen. Dieser hochreaktive und mutagen wirkende Aldehyd reagiert mit den

exozyklischen Aminen von Desoxyguanosin, -adenosin und -cytidin.[15] Dadurch kommt es zu Misspaarungen in der DNA-Sequenz, was dementsprechend eine Erbgutveränderung zur Folge hat.

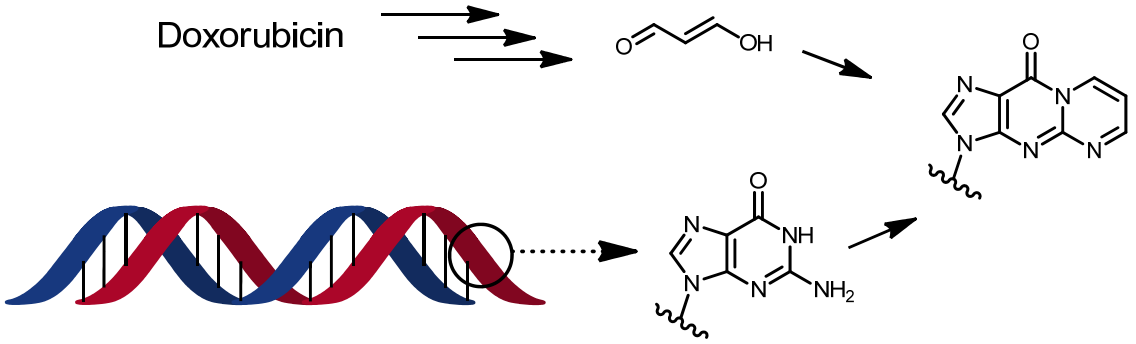


Abbildung 3: Doxorubicin induzierte DNA-Schädigung durch Bildung eines Malondialdehyd-Desoxyguanosin-Addukts

Obwohl der toxische Effekt der gebildeten freien Radikale und die damit verbundenen Zellschäden unbestritten sind, haben Studien erwiesen, dass dieser Effekt erst bei erhöhten, aber dennoch klinisch relevanten, Konzentrationen vermehrt auftritt.[7]

1.1.1.3 Kovalent verknüpfte Doxorubicin-DNA-Addukte

Anthracycline wie Doxorubicin können über eine Methylenbrücke kovalent mit DNA verknüpft werden, um ihre toxische Wirkung zu entfalten respektive zu erhöhen. Dabei spielt der in Tumorzellen erhöhte Formaldehydgehalt eine wichtige Rolle.[16] Die Bildung der Methylenbrücke zwischen der 3-Aminogruppe des Daunosamin-Zuckers von Doxorubicin und der 2-Aminogruppe des Guanosin wird durch ein Molekül Formaldehyd über eine Schiff´sche Base vermittelt.[17] Diese hoch komplexe Struktur des Anthracyclin-DNA-Adduktes wurde von Wang *et al.* mittels Röntgenbeugung analysiert und aufgeklärt.[18]

Der durch Doxorubicin verursachte oxidative Stress kann in Verbindung mit Eisenionen in einer Fenton-Oxidation die Produktion von intrazellulärem Formaldehyd weiter begünstigen.[19] Als Kohlenstoffquelle dient dabei Spermin, ein aliphatisches Polyamin, welches in der Umgebung von DNA in erhöhten Konzentrationen vorliegt.

Die Bedeutung von Formaldehyd für die zytotoxischen Eigenschaften des Doxorubicin hat sich die Gruppe von Tad Koch durch die Verwendung synthetischer Formaldehydkonjugate der Anthracycline zunutze gemacht (Abbildung 4). Dabei handelt es sich um die sogenannten Substanzen Doxazolidin sowie Doxoform.[20] Diese Derivate besitzen einen Oxazolidinring am Zuckerrest des Arzneistoffes, der durch Reaktion von Doxorubicin mit Formaldehyd gebildet wird.

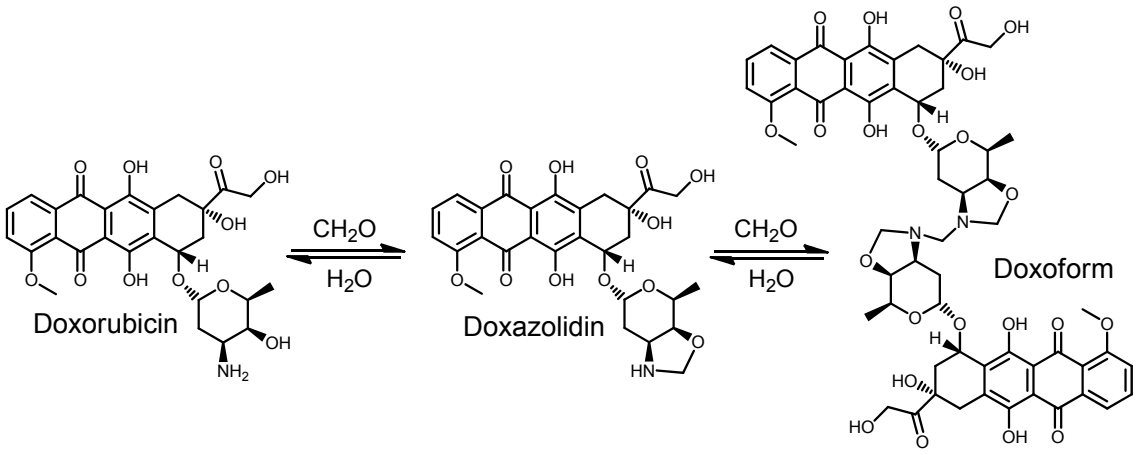


Abbildung 4: Synthetische Formaldehydkonjugate des Doxorubicin

Obwohl diese Verbindungen, insbesondere die Doxoform, äußerst hydrolyseempfindlich sind, zeigen sie im Vergleich zu Doxorubicin eine weitaus höhere Toxizität in *In-vitro*-Experimenten.[20]

1.1.2 Anwendungsbereich sowie Nebenwirkungen der Doxorubicin-Therapie

Der Arzneistoff Doxorubicin wird in der Chemotherapie bei der Bekämpfung einer Vielzahl von Tumoren wie beispielsweise Brustkrebs, Bronchialkarzinomen oder bösartigen Lymphomen eingesetzt.[7] Dabei wird das Zytostatikum in Verbindung mit anderen Chemotherapeutika (Cyclophosphamid, Bleomycin, Vinblastin etc.) intravenös appliziert. Die verabreichte Dosis richtet sich nach der Körperoberfläche des Patienten, in der Regel sind das 450-600 mg/m^2.[10]

Um den therapeutischen Quotient des Doxorubicin zu erhöhen, wird es verkapselt in pegylierten Liposomen appliziert. Auf dem pharmazeutischen Weltmarkt sind diese Präparate unter dem Namen Doxil® und Caelyx® bekannt. Die Verkapselung hat verglichen mit der Anwendung des freien Arzneistoffes mehrere Vorteile. Somit wird nicht nur die Halbwertszeit und damit die Verweildauer des Doxorubicin im Blutstrom erhöht, sondern auch das Tumorgewebe gezielt adressiert.[21] Die Akkumulation im Tumorgewebe wird durch den sogenannten EPR(**e**nhanced **p**ermeability and **r**etention)-Effekt erzielt.[22] Dieser Effekt ermöglicht Makromolekülen, wie den Liposomen, sich in den Tumoren anzureichern, da deren Gewebe weitaus durchlässiger als gesundes ist.

Eine weitere Verbesserung dieses Ansatzes sind Liposomen, welche in saurer Umgebung zerfallen und somit die toxische Fracht, das Doxorubicin, freisetzen.[23]

Dabei macht man sich für die gezielte Abgabe des Arzneistoffes ins Tumorgewebe deren verminderten pH-Wert zu Nutze.[24]

Obwohl Doxorubicin seit mehr als 40 Jahren erfolgreich in der Chemotherapie eingesetzt wird, kommt es bei anhaltender Behandlungsdauer oftmals zu Kardiomyopathien sowie kongestiven Herzinsuffizienzen.[7] Es ist unstrittig, dass die Produktion freier Radikale durch das Anthracyclin Doxorubicin dabei von außerordentlicher Bedeutung ist. Die schädigende Wirkung der entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies wird durch die verminderte Fähigkeit zur Detoxifizierung freier Radikale in Herzmuskelzellen erheblich verstärkt.[25] Des Weiteren zeigen Kardiomyozyten eine ausgesprochen hohe Apoptoserate, welche besonders nach der Doxorubicinbehandlung weiter gesteigert wird und somit zu einem vermehrten Zellsterben führt.[26] Darüber hinaus wird die Herzschädigung durch Doxorubicin von exogenen Einflüssen weiter negativ beeinflusst. Die Kombination von Paclitaxel und Doxorubicin stellt eine überaus potente Therapiemethode bei der Bekämpfung von Brustkrebs dar, erhöht jedoch erheblich das Auftreten von Herzinsuffizienzen im Vergleich zur Chemotherapie ausschließlich mit Doxorubicin.[27]

Nichtsdestotrotz kann die Beeinträchtigung der Herzfunktionalität bei der Doxorubicin-Therapie durch eine Vielzahl von Faktoren vermindert werden. So kann beispielsweise die intravenöse Verabreichung des Arzneistoffes in geringen Konzentrationen kontinuierlich über einen längeren Zeitraum erfolgen, ohne dabei die pharmakologischen Eigenschaften von hohen Dosen Doxorubicin appliziert in kürzerer Zeit zu beeinflussen. Jedoch werden dadurch Blutplasmaspitzen des Zytostatikums vermieden, was zu einer signifikanten Reduktion der Kardiotoxizität führt.[28] Der Einsatz von Additiven bei der Doxorubicin-Therapie kann ebenfalls Herzschädigungen entgegenwirken. Es handelt sich dabei um Substanzen, welche das Auftreten freier Radikalspezies verringern. Hierbei werden zwei grundlegend verschiedene Ansätze verfolgt, um die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies zu minimieren. Zum einen kann durch Zugabe von Antioxidantien wie Probucol oder Vitamin E die Konzentration freier Radikale verringert werden, und zum anderen kann der Einsatz von Eisenchelatoren die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies abschwächen.[13,29]

Neben der Kardiotoxizität besteht bei der Doxorubicin-Therapie eine weitere unbestrittene Anwendungslimitierung, die sogenannte Arzneistoffresistenz. Dabei wird der in Tumorzellen aufgenommene Wirkstoff von Transmembranproteinen, den ABC (engl. „**A**TP-**b**inding **c**assette)-Transportern, unter Verbrauch von ATP wieder aus der Zelle geschleust (Abbildung 5).[30]

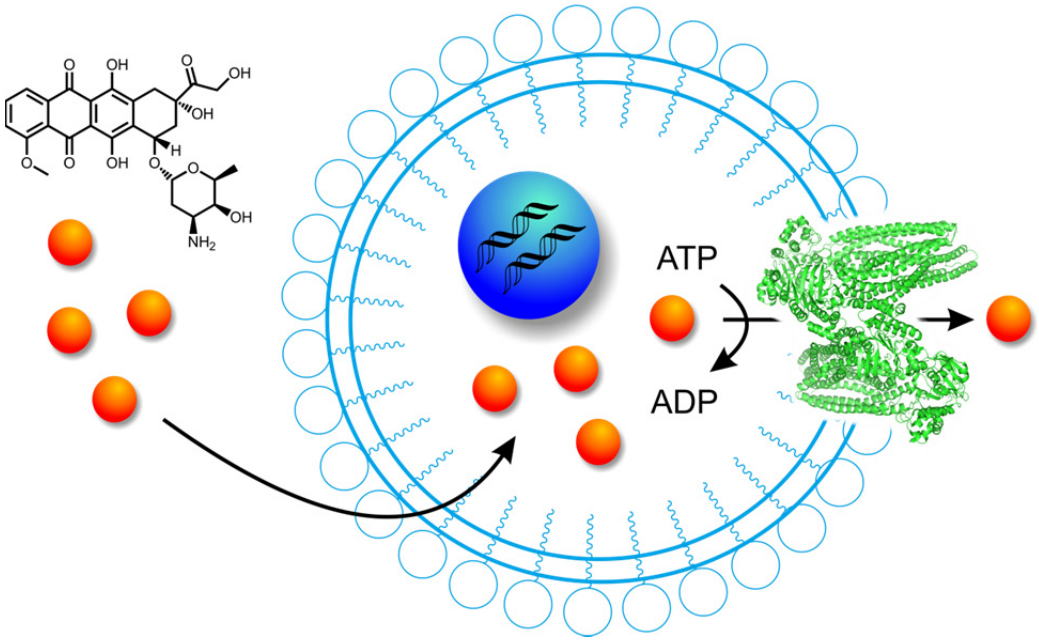


Abbildung 5: Funktionsweise von ABC-Transporter-Membranproteinen in arzneistoffresistenten Tumorzellen

Typischerweise sind diese Membranproteine in arzneistoffresistenten Tumorzellen überexprimiert.[31] Die ABC-Transporter sind in nahezu allen menschlichen Zellen gegenwärtig und spielen eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung im Organismus.[32] Somit werden eine Vielzahl kleiner lipophiler Moleküle höchst effizient aus der Zelle befördert. Fatalerweise stellt nicht nur Doxorubicin ein Substrat dieser Transmembranproteine dar, sondern auch eine Reihe anderer Arzneistoffe, weshalb sich der Begriff „Multi Drug Resistance“ etabliert hat.[33] Dennoch sind die Bestrebungen immens, diesem Phänomen entgegenzuwirken, um die pharmakologische Wirkung des Doxorubicin aufrecht zu erhalten. So hat sich beispielsweise der Einsatz von Inhibitoren der ABC-Transporter, wie Verapamil oder Cyclosporin A, als äußerst probates Mittel erwiesen, auch wenn dadurch in gesunden Zellen die detoxifizierende Wirkung abgeschwächt wird.[30] Ein weiterer Ansatz besteht darin, Doxorubicin zu modifizieren, ohne dabei den Schutzmechanismus gesunder Zellen außer Kraft zu setzen.[34] Da der durch passive Diffusion aufgenommene Arzneistoff besonders leicht für die Transmembranproteine zugänglich ist, stellt ein durch Modifikation veränderter Aufnahmemechanismus einen vielversprechenden Ansatz zur Überwindung der Arzneistoffresistenz dar.[35] Die zelluläre Aufnahme einer Vielzahl von Peptiden und Proteinen wird unabhängig von passiver Diffusion bewerkstelligt, so dass deren Verknüpfung mit Doxorubicin von entscheidender Bedeutung sein könnte. Um derartige Arzneistofffunktionalisierungen durchführen zu

können, spielt die Biokonjugationschemie eine fundamentale Rolle. Die Bedeutsamkeit dieser Modifikationschemie sowie die involvierten funktionellen Gruppen werden im nächsten Teil eingehend dargelegt.

1.2 Die Chemie der Biokonjugation

Der Begriff Biokonjugation bezeichnet die Modifikation und Verknüpfung von Biomolekülen mit einer weiteren Substanz über die Ausbildung einer kovalenten Bindung. Das Produkt dieser Reaktion wird als Biokonjugat bezeichnet und vereint die Eigenschaften beider Moleküle in einer Verbindung.[36] Die verwendeten Biomoleküle können äußerst vielfältig sein und sowohl kleine Moleküle wie Naturstoffe, Peptide, Lipide oder Vitamine als auch Proteine und Polynukleotide umfassen.

Die Modifikation von Biomolekülen findet dabei heutzutage weitreichende Anwendungen. So können unter anderem fluoreszierende Sonden angefügt werden, um Proteine in ihrer natürlichen Umgebung zu studieren, ohne die Funktion des Biomoleküls zu beeinflussen.[37] Aber auch die pharmazeutische Industrie hat sich das große Potential der Biokonjugationschemie zu Nutze gemacht und durch PEGylierungen die therapeutischen Eigenschaften sowie die Stabilität von biologischen Arzneistoffen wie Interferonen verbessert.[38] Darüber hinaus werden Biomoleküle zur gezielten Arzneistoffabgabe immer populärer, da somit unerwünschte Nebenwirkungen erheblich reduziert werden können. Üblicherweise werden hierfür kleine Moleküle, die sogenannten Vernetzer, verwendet, um die Brücke zwischen dem Arzneistoff und beispielsweise einem Antikörper zu schlagen.

Da die Biokonjugationschemie ein nahezu unerschöpfliches Repertoire an Modifikationen bereitstellt, sind jene von höchster Relevanz in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

1.2.1 Modifikation der Aminogruppe

Die natürliche Häufigkeit reaktiver Aminogruppen in Biomolekülen ist ausgesprochen hoch. Die wohl bedeutendste Quelle dieser funktionellen Gruppe stellen die basische Aminosäure Lysin in Proteinen und Peptiden sowie Aminozucker in Polysacchariden dar.[39,40]

Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei der ε-Aminogruppe der Seitenkette der proteinogenen Aminosäure Lysin. Der pK_S-Wert dieses Amins beträgt 9.3-9.5. Im Vergleich dazu liegt der pK_S-Wert des α-Amins bei 7.6-8.0. Diese Aminogruppe ist

jedoch nur am N-Terminus zugänglich, wodurch chemische Modifikationen weitgehend eingeschränkt sind. Typischerweise sind eine Vielzahl der Lysinseitenketten auf der Proteinoberfläche exponiert, wodurch die Derivatisierung erheblich vereinfacht wird.[36]
In einem Medium mit dem pH-Wert oberhalb des pK_S-Wertes der ε-Aminogruppe ist deren Reaktivität am größten, jedoch sind die meisten Biomoleküle unter stark basischen Bedingungen wenig stabil, so dass ein optimaler Mittelweg die Reaktionsdurchführung bei pH 7-9 darstellt. Unter diesen Bedingungen können Amine mit Aktivestern, Isocyanaten, Isothiocyanaten oder Sulfonylchloriden unter Ausbildung von Amiden, Harnstoffderivaten sowie Sulfonamiden selektiv modifiziert werden (Abbildung 6; a-d).[41] Des Weiteren ist die reduktive Aminierung über Aldehyde eine äußerst gängige Methode bei der Funktionalisierung von Aminogruppen in der Biokonjugationschemie (Abbildung 6; e).[42]

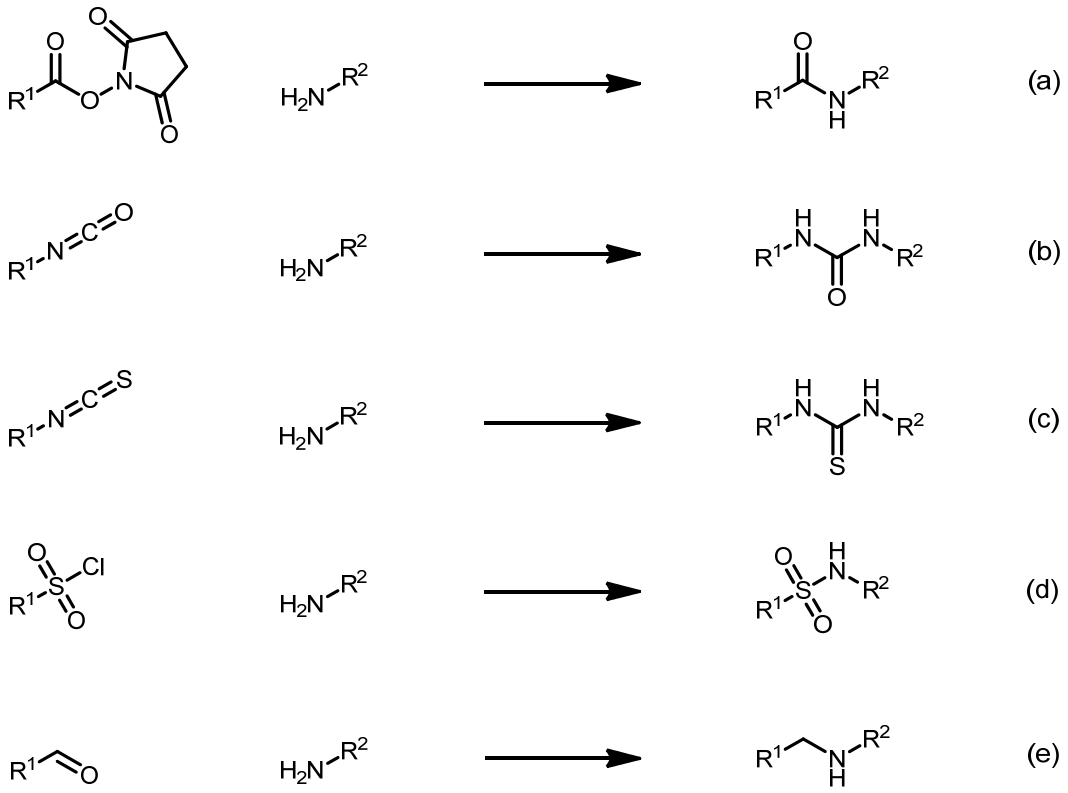


Abbildung 6: Modifizierung der Aminogruppe in Biomolekülen

Obwohl die chemische Modifizierung des primären Amins der Lysinseitenkette etabliert ist, leidet die Biokonjugationschemie dieser Aminosäure unter der extremen Verbreitung dieser Aminosäure. Um ein homogenes Produkt zu erhalten, müssen selektivere Modifikationsansätze gewählt werden.

1.2.2 Modifikation der Thiol-Gruppe

Verglichen mit Lysin ist die natürliche Häufigkeit des Cystein wesentlich geringer, was jedoch der Modifizierung dieser Aminosäure zusätzliche Exklusivität verleiht. Eine Vielzahl dieser Cystein-Thiole liegt in ihrer natürlichen Umgebung oxidiert als Disulfid vor und können erst nach Reduktion für Modifikationen zugänglich gemacht werden.
Cystein ist die einzige proteinogene Aminosäure, welche eine Sulfhydrylgruppe besitzt. Unter physiologischen Bedingungen liegt diese überwiegend protoniert vor (pK_S 8.8-9.1). Nichtsdestotrotz können α-Halogencarbonyle leicht substituiert werden, so dass derartige Ansätze seit nahezu 100 Jahren in der Proteinmodifikation verwendet werden (Abbildung 7; a).[43] Darüber hinaus reagieren Thiole ausgesprochen gut mit Maleimiden, Vinylsulfonen sowie verwandten α,β-ungesättigten Systemen in einer Michael-Addition (Abbildung 7; b, c).[44] Bei diesen Vorgehensweisen kommt es formal zur Alkylierung der Sulfhydrylgruppe. Demgegenüber ermöglicht die Modifikation mit 2- und 4-Pyridyldisulfiden die Ausbildung einer Disulfidbindung (Abbildung 7; d), wobei diese Reaktion irreversibel abläuft, da der Farbstoff Pyridinthion gebildet wird. Die Darstellung einer Disulfidbindung gestattet nach reduktiver Spaltung, das native Protein wieder freizusetzen.[45]
Natürliche Disulfidbrücken in Proteinen und Peptiden sind essentiell für deren Stabilität und Funktion.[46] Dadurch muss bei Modifikationen von Disulfidbrücken die Verbrückung aufrecht erhalten bleiben, da sonst die Proteinfunktion erheblich beeinträchtigt werden kann. Der von Brocchini *et al.* entworfene Modifikationsansatz adressiert genau diese Problematik. Hierbei wird die Verbrückung durch Insertion einer Kohlenstoffbrücke realisiert, ohne dabei die Proteinkonformation nachhaltig zu beeinflussen.[47] Diese Brücke wird durch den Einsatz eines Bissulfonreagenz erzielt, welches in einem Eliminierungs-Additions-Mechanismus mit den beiden freien Thiolen der Disulfidbrücke reagiert (Abbildung 7; f). Dibrommaleimide sind ebenfalls dazu in der Lage, ein reduziertes Disulfid erneut zu verbrücken (Abbildung 7; e). Dabei läuft die Insertionsreaktion nicht wie für Maleimide üblich über eine Michael-Addition ab, sondern die beiden Bromatome werden durch die Sulfhydrylgruppe nukleophil substituiert.[48] Diese Substitutionsreaktion ermöglicht unter Verwendung eines großen Überschusses an Reduktionsmittel, wie beispielsweise 2-Mercaptoethanol, die vollständige Reduktion des Biokonjugates, was mit einem Michael-Additionsprodukt nicht möglich wäre.

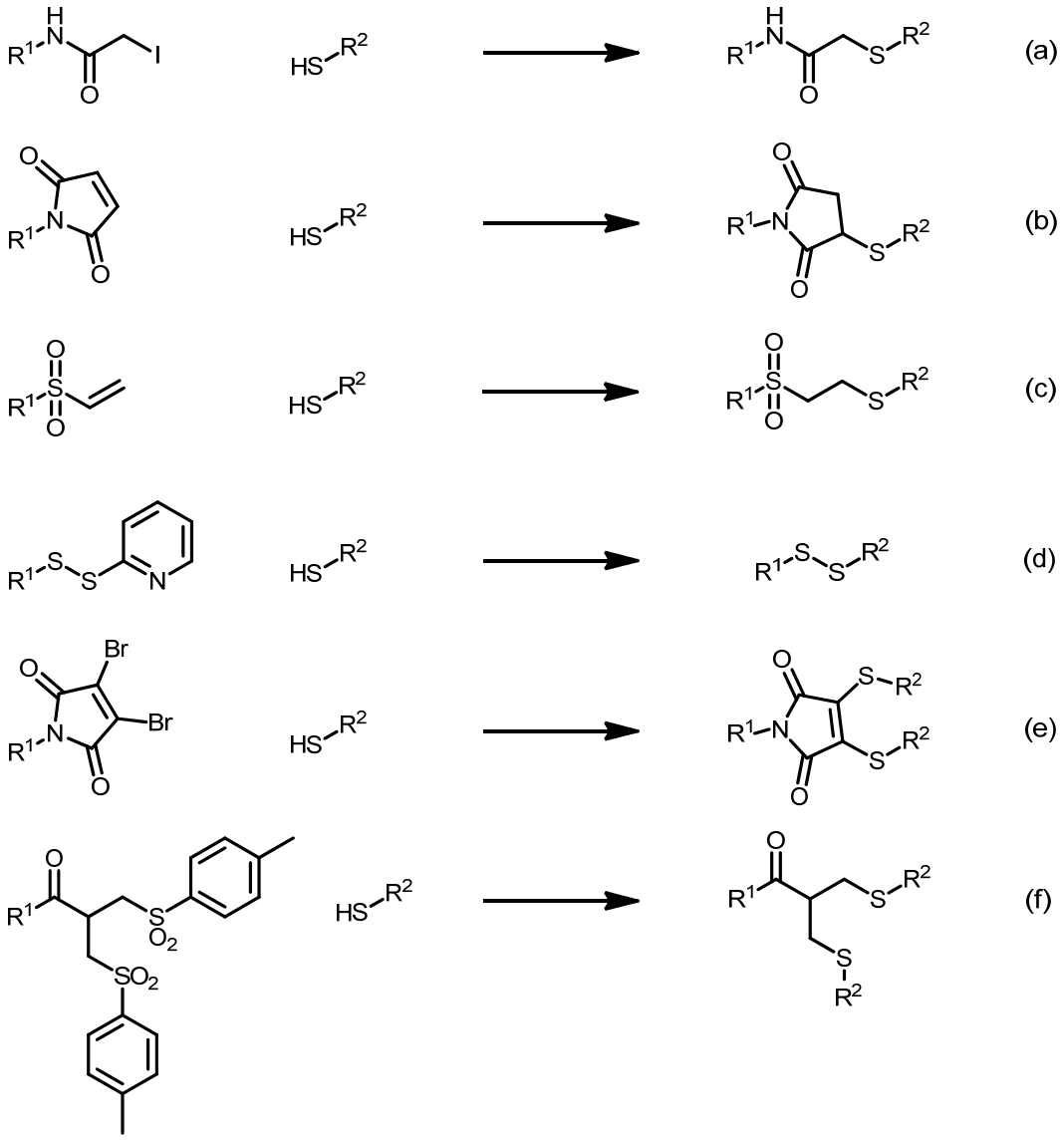


Abbildung 7: Modifizierung der Thiol-Gruppe in Biomolekülen

1.2.3 Bioorthogonale Modifikationen

Im Vergleich zu den beiden vorangegangenen Modifikationsansätzen zeichnet sich die bioorthogonale Chemie durch eine extrem hohe Reaktionsselektivität aus. Diese Selektivität wird durch den Einsatz von Reaktanden erzielt, welche die gängigen funktionellen Gruppen in Biomolekülen tolerieren.

In rekombinanten Proteinen kann Bioorthogonalität durch Einführen kleiner Aminosäuresequenzen erreicht werden. Diese Peptidmotive sind üblicherweise nicht länger als sechs Aminosäuren und reagieren höchst spezifisch mit einer bestimmten funktionellen Gruppe. In der Arbeitsgruppe des Nobelpreisträgers Roger Tsien wurde ein vier Cysteine umfassendes α-helikales Motiv entworfen, welches selektiv mit dem

Fluorophor 4´,5´-*Bis*(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)fluorescein sowie verwandten Arsenverbindungen reagiert.[49]

Da es in einer Vielzahl von Biomolekülen, wie Glykanen, Lipiden oder Nukleinsäuren, jedoch nicht möglich ist, eine derartige Exprimierung durchzuführen, müssen andere bioorthogonale Modifizierungsstrategien angewendet werden. In der Zuckerchemie hat sich die Kondensation von Amin-Nukleophilen, wie Hydraziden und Aminooxyverbindungen, mit Aldehyden und Ketonen etabliert (Abbildung 8). Durch die Oxidation mit Natriumperiodat können in Polysacchariden leicht reaktive Carbonylgruppen generiert werden. Unter Verwendung der Periodatoxidation können sogar Glykoproteine auf der Zelloberfläche im *In-vitro*-Experiment in lebenden Zellen markiert werden.[50] Aber auch ohne vorangegangene chemische Modifizierung der Zelloberflächenglykoproteine können bioorthogonale Modifikationen durchgeführt werden. Durch Inkubation von Ketogruppen tragenden Monosacchariden kann der Metabolismus der Zelle ausgenutzt werden, um diese auf der Oberfläche zu präsentieren und letztendlich zu modifizieren.[51]

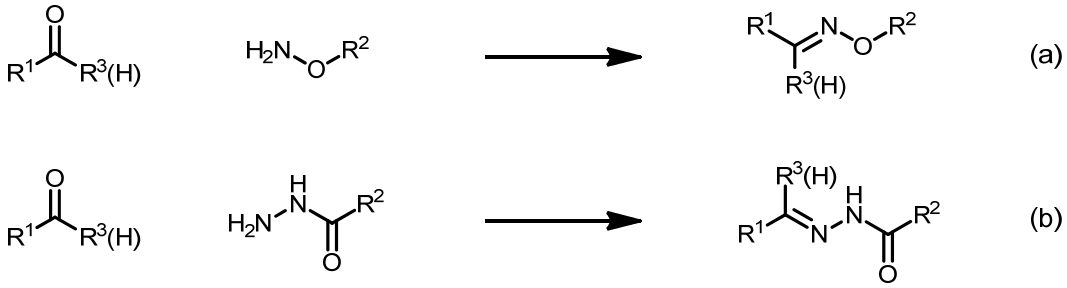


Abbildung 8: Bioorthogonale Kondensationsreaktion von Aminooxyverbindungen und Hydraziden mit Aldehyden und Ketonen

Die Verwendung der metabolischen Maschinerie, welche von den Zellen bereitgestellt wird, ermöglicht ebenfalls die Einführung nicht natürlicher Aminosäuren in Proteine. Auxotrophe Organismen sind nicht dazu in der Lage, bestimmte Aminosäuren eigenständig zu produzieren. Ersatzweise können jedoch andere Aminosäuren, wie Homopropargylglycin oder Azidohomoalanin, metabolisiert werden.[52] Dadurch wird ermöglicht, funktionelle Gruppen in Form von Alkinen und Aziden in Proteine einzuschleusen, welche zur selektiven Modifikation verwendet werden können.

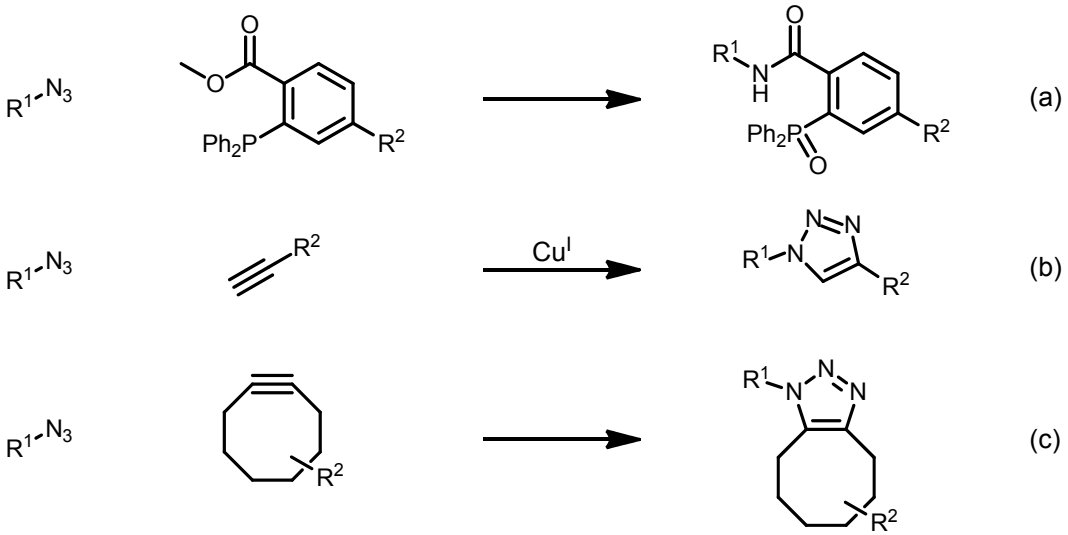


Abbildung 9: Biokonjugationschemie der orthogonalen Azid- und Alkinfunktionalität in biologischen Systemen

Die Staudinger-Ligation von Aziden und Triarylphosphinen erlaubt eine ausgezeichnete Bioorthogalität (Abbildung 9; a). Die Limitierung dieser Biokonjugationsmethode liegt jedoch in der langsamen Reaktionskinetik, was die Verwendung von hohen Reaktandenkonzentrationen notwendig macht.[53]

Die von Sharpless entwickelte Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition von terminalen Alkinen und Aziden zeichnet sich im Vergleich zur Staudinger-Ligation durch eine wesentlich verbesserte Reaktionskinetik aus (Abbildung 9; b).[54] Aber auch dieser Reaktionsansatz, der vereinfacht oft als „Click"-Chemie bezeichnet wird, beinhaltet einen entscheidenden Nachteil. Das bei der Bildung der 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazole eingesetzte Kupfersalz ist hoch zytotoxisch, so dass die Biokonjugation in lebenden Systemen nicht durchgeführt werden kann.[52,55] Um die Biokompatibilität dieser Reaktion zu erhöhen, muss folglich auf den Kupferkatalysator verzichtet werden. Dies kann durch den Einsatz von Cyclooktinen erreicht werden, da diese spontan mit Aziden in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition reagieren können (Abbildung 9; c).[56] Die Triebkraft der Reaktion ist dabei der Verlust der Ringspannung im Cyclooktingerüst.

1.2.4 Vernetzer

Bei den sogenannten Vernetzern handelt es sich um kleine Moleküle, die zwei oder mehr reaktive Gruppen besitzen, welche zur Modifikation von Aminen, Thiolen oder bioorthogonalen Funktionalitäten in Biomolekülen befähigen. Bei der Verbrückung von Biomolekülen spielen diese Reagenzien seit nun fast 50 Jahren eine wichtige Rolle, und deren Bedeutung für die Biokonjugationschemie nimmt stetig zu.[57]

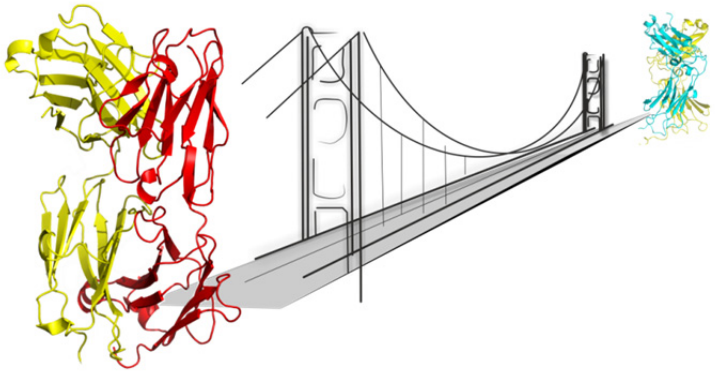


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Vernetzerfunktion in der Biokonjugationschemie

Vernetzer werden nicht nur durch deren vielfältige chemischen Eigenschaften und Längen kategorisiert, sondern darüber hinaus in homo- und heterofunktionale Systeme unterteilt. Zwei repräsentative bifunktionale Vernetzer sind in Abbildung 11 dargestellt. Obwohl homobifunktionale Vernetzermoleküle, wie Bismaleimidohexan (Abbildung 11; A), weit verbreitet sind, hat deren Anwendung durchaus Limitierungen, da die Wahrscheinlichkeit für intra- und intermolekulare Nebenprodukte bei der Biokonjugation erhöht ist.[58] Um dieser Problematik entgegenzuwirken, werden in der Biokonjugationschemie überwiegend heterobifunktionale (Abbildung 11; B) und -trifunktionale Vernetzer (Abbildung 11; C) verwendet. Des Weiteren können dadurch bis zu drei gänzlich verschiedene Biomoleküle einfach miteinander verknüpft werden.[59] Zunehmender Popularität erfreuen sich Vernetzer wie *N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (Abbildung 11; B), da diese erlauben, Disulfidbindungen in das Biokonjugat einzufügen, welche anschließend durch intrazelluläres Glutathion reduziert werden können, um beispielsweise einen Naturstoff gezielt in der Zelle abzugeben.[60]

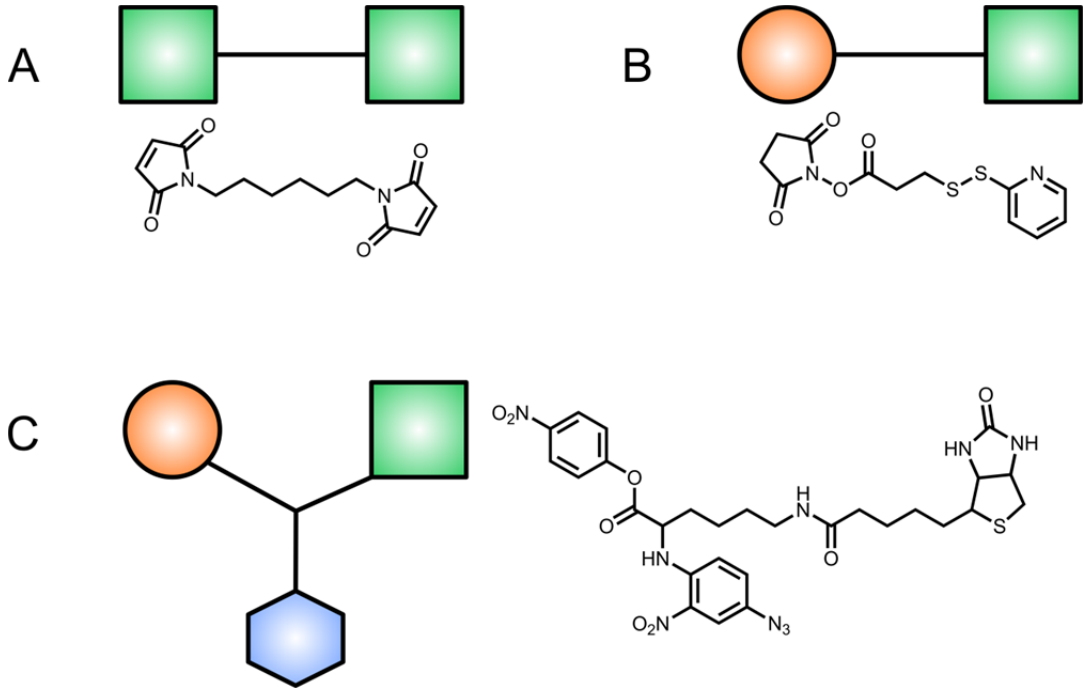


Abbildung 11: Diversität von Vernetzerreagenzien

1.3 Zellpenetrierende Peptide weisen den Weg in die Zelle

1.3.1 Ursprung der Proteintransduktionsdomänen

Für die meisten bioaktiven Moleküle stellt die Plasmamembran lebender Zellen ein unüberwindbares Hindernis dar, jedoch beobachteten Frankel und Pabo 1988, dass das Tat-Protein des humanen Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) höchst effizient die Zellmembran überwinden und sich im Nukleus anreichern kann.[61] Dadurch gelingt es dem HI-Virus, den viralen Promotor und entsprechende Genexpression zu aktivieren. Dieser Effekt der Proteintransduktion wurde ebenfalls bei einer Reihe verwandter Systeme wie der Homöodomäne von Antennapedia oder dem Herpes-simplex-Virus-1 Protein-22 gefunden.[62] Das Tat-Protein hat eine Größe von 86 Aminosäuren und einen in hohem Maße basischen Bereich, in dem zwei Lysine und sechs Arginine lokalisiert sind. Diese Region und die daraus abgeleitete Peptidsequenz bilden den entscheidenden Faktor, welcher letztendlich die Zellaufnahme vermittelt (Abbildung 12).[63]

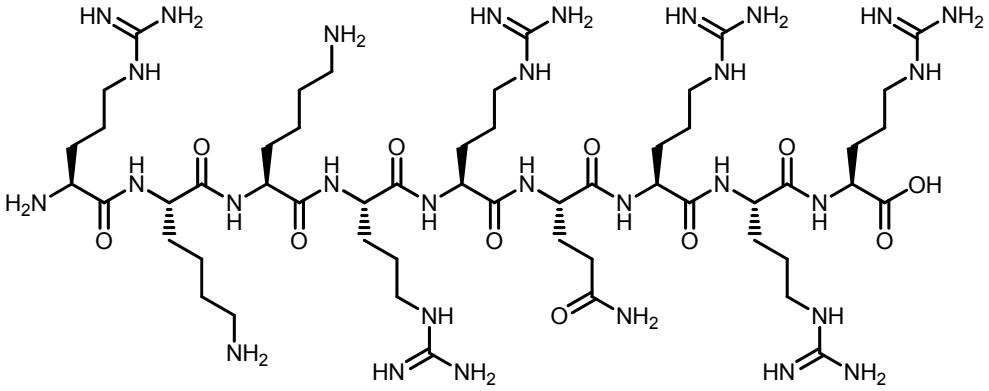


Abbildung 12: Proteintransduktionsdomäne des Tat-Proteins

Zellpenetrierende Peptide (CPPs), auch bekannt als Proteintransduktionsdomänen, erregen zunehmend die Aufmerksamkeit von Naturwissenschaftlern weltweit und sind typischerweise kleine Peptidsequenzen mit einer Länge von 5-30 Aminosäuren.
In den vergangenen 20 Jahren wurden hunderte dieser kurzen Peptidsequenzen mit zellpenetrierenden Eigenschaften entdeckt und erfolgreich für die intrazelluläre Abgabe verschiedenster Cargos sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verwendet.[64] Dabei kann die Verknüpfung mit der Fracht von kovalenter sowie nicht kovalenter Natur sein. Diverse Moleküle wie Polymere,[65] Nukleinsäuren,[66] Proteine,[67] Quantenpunkte[68] oder aber Arzneistoffe[69] konnten so aussichtsreich in das Innere der Zelle transportiert werden.

1.3.2 Klassifizierung

Der Vielfalt von zellpenetrierenden Peptiden sind bezüglich Aminosäurezusammensetzung und 3D-Struktur nahezu keine Grenzen gesetzt. Somit lässt sich auch keine generelle Sequenzhomologie für CPPs bestimmen. Nichtsdestotrotz können die Peptide in drei Hauptgruppen wie folgt eingeteilt werden: kationisch, amphipathisch und hydrophob.

1.3.2.1 Kationische CPPs

Die meisten zellpenetrierenden Peptide besitzen eine positive Nettoladung unter physiologischen Bedingungen, jedoch sind einige dieser CPPs in der Lage, eine Sekundärstruktur auszubilden. In der Regel handelt es sich dabei um eine amphipathische Helix, so dass diese Peptide der nächsten Kategorie zugeordnet werden.

Dennoch gibt es eine Fülle an kationischen CPPs, welche keine Sekundärstruktur ausbilden, wie beispielsweise die vom HIV-1-Tat-Protein abgeleitete Sequenz RKKRRQRRR (Abbildung 12).[63] Bei genauerer Betrachtung dieser Sequenz ist zu

erkennen, dass Lysine und Arginine von besonderer Bedeutung für kationische CPPs sein könnten. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass Oligolysine nahezu keine Transduktionseigenschaften besitzen.[70] Im Gegensatz dazu sind Oligoarginine potente zellpenetrierende Peptide, wobei für eine effiziente Aufnahme die minimale Sequenzlänge von acht Aminosäuren notwendig ist.[63]

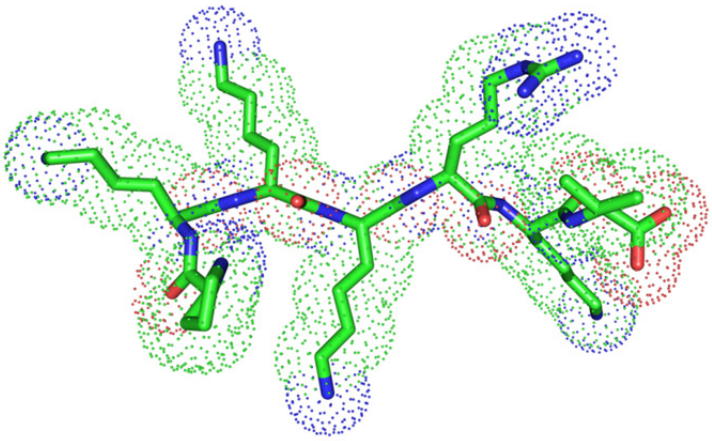


Abbildung 13: Kernlokalisierungssequenz des SV40 large T-Antigen Proteins

Eine spezielle Form der kationischen CPPs stellen die Kernlokalisierungssequenzen (NLSs) dar. Charakteristisch für diese kurzen Peptidsequenzen sind prolin-, lysin- und argininreiche Motive, welche über Proteinkomplexe in der Membran des Zellkern, den sogenannten Kernporen, in den Nukleus transportiert werden können.[71] Die Kernlokalisierungssequenzen können noch weiter in ein- sowie zweiteilige NLSs unterschieden werden. Einer der prominentesten Vertreter der einteiligen NLSs mit der Aminosäuresequenz PKKKRKV (Abbildung 13) hat ähnlich wie das Tat-Peptid einen viralen Ursprung.[72] Zweiteilige NLSs hingegen haben zwei Bereiche mit basischen Aminosäuren, welche durch zehn bis zwölf unspezifische Aminosäuren voneinander getrennt sind.[73]

Obwohl Kernlokalisierungssequenzen effizient in den Nukleus transportiert werden können, sind deren zellpenetrierenden Eigenschaften schwach im Vergleich zu den klassischen kationischen Sequenzen wie Tat oder Polyarginin.[74]

1.3.2.2 Amphipathische CPPs

Die amphipathischen CPPs können sowohl kationischer als auch anionischer Natur sein und vielfältige Sekundärstrukturelemente aufweisen. Primäre amphipathische zellpenetrierende Peptide besitzen einen relativ einfachen Aufbau, wobei es schon ausreichen kann, eine hydrophobe Domäne mit einer NLS zu verknüpfen. Die hydrophobe Aminosäuresequenz ist dabei der entscheidende Faktor, welcher die

Interaktion mit der Zellmembran vermittelt.[75] Weiter verbreitet sind jedoch amphipathische CPPs mit Sekundärstrukturelementen, wie beispielsweise der α-Helix. Dabei wird der amphiphile Charakter der Helix durch spezielle Aminosäureanordnung erzielt, da hydrophobe und polare Aminosäurereste entlang der Helix gegenüber liegen (Abbildung 14). Anhand von Studien der Modellsequenz KLALKLALKALKAALKLA wurde die Bedeutsamkeit dieses Phänomens verdeutlicht, denn minimale Veränderung der Anordnung kann die Zellaufnahme erheblich verringern.[76]

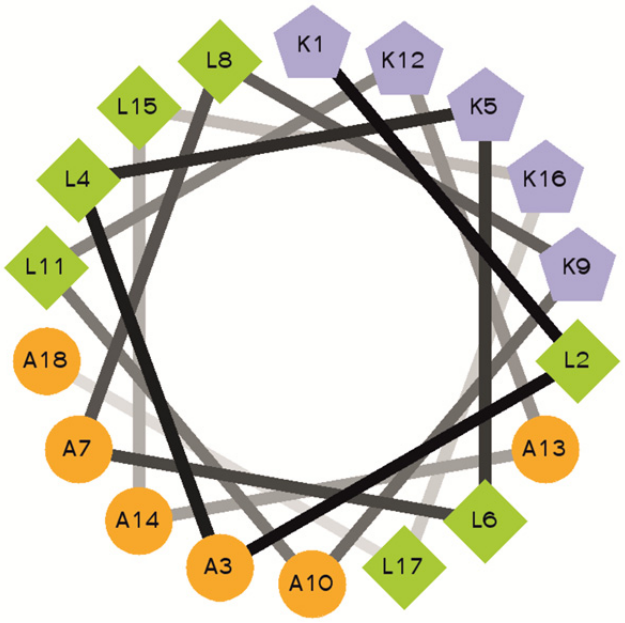


Abbildung 14: Amphiphile Helix der Modellpeptidsequenz KLALKLALKALKAALKLA (hydrophobe Aminosäuren: grün, orange; hydrophile Aminosäuren: violett)

Die folgende Peptidsequenz DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGPKPD, welche aufgrund ihrer Valin-Threonin-Wiederholungseinheit auch als VT5 bezeichnet wird, ist in der Lage, eine β-Faltblattstruktur auszubilden. Dieses amphipathische CPP zeigt gute zellpenetrierende Eigenschaften. Sobald jedoch die L-Aminosäuren Valin oder Threonin durch ihre entsprechenden D-Analoga ersetzt werden, wird keine β-Faltblattstruktur mehr ausgebildet und die somit resultierende Zellaufnahme sinkt auf 5 %.[77] Neben den beiden beschriebenen Sekundärstrukturen ist die Polyprolin-II(PPII)-Helix für prolinreiche Sequenzen ein weit verbreitetes Strukturelement unter den zellpenetrierenden Peptiden. Unter den 20 kanonischen Aminosäuren nimmt Prolin aufgrund seiner Rigidität und der Fähigkeit, keine Wasserstoffbrücken im Peptidrückgrat ausbilden zu können, eine Sonderstellung ein. Bei der PPII-Helix handelt es sich im Vergleich zur α-Helix um eine linksgängige Helix, welche nur drei Aminosäuren pro Windung aufweist. Eine derartige helikale Struktur wird unter

anderem von dem „**s**weet **a**rrow **p**eptide“ (SAP) Peptid mit der Sequenz VELPPPVELPPPVELPPP ausgebildet.[78]

1.3.2.3 Hydrophobe CPPs

Die hydrophoben zellpenetrierenden Peptide bilden prozentual die kleinste Klasse unter den CPPs und besitzen eine Vielzahl an unpolaren Aminosäuren sowie eine extrem geringe Nettoladung. Zu dieser Kategorie gehören unter anderem die folgenden Peptidsequenzen, wie KLPVM, VPMLK, VPTLK und PMLKE. Der Ursprung dieser Sequenzen ist ein Pentapeptid, welches an den Apoptoseregulator Bax binden und somit inhibieren kann.[79] Verglichen mit den amphiphilen Peptiden besitzen die obigen Peptide eine hohe Toleranz gegenüber Aminosäureaustausch, wie auch aus deren Aminosäuresequenzen ersichtlich ist.

Zu den hydrophoben CPPs gehören aber auch Peptidsequenzen, die chemisch weiter modifiziert wurden. Dazu zählt unter anderem die Prenylierung. Durch C-terminale Modifikation mit einem Geranylgeranylrest (C_{20}) können Peptide, welche keine zellpenetrierenden Eigenschaften aufweisen, erfolgreich in die Zelle aufgenommen werden.[80] Für die sogenannten Pepducine wird ein ähnliches Verhalten beobachtet. Diese Peptidsequenzen werden am N-Terminus mit Fettsäuren, wie Palmitinsäure, über eine Amidbindung verknüpft. Nach der Aufnahme in die Zelle ermöglicht der angeknüpfte Alkylrest eine außergewöhnliche Besonderheit unter den zellpenetrierenden Peptiden, die Verankerung in der Zellmembran. Dadurch können Pepducine zur selektiven Adressierung von Rezeptoren, wie beispielsweise G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, und Transmembranproteinen verwendet werden.[81]

1.3.3 Zellaufnahmemechanismen

Aufgrund der großen strukturellen Vielfalt und unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung kann für CPPs kein Mechanismus für die Zellaufnahme pauschalisiert werden.

Zellpenetrierende Peptide können sowohl direkt, in einem energieunabhängigen Prozess, als auch durch Endozytose in das Innere der Zelle gelangen.[82] Bei genauerer Betrachtung des endozytotischen Internalisierungsmechanismus muss sogar noch weiter differenziert werden, da CPPs nicht nur durch Makropinozytose, sondern auch durch Clathrin-abhängige sowie unabhängige Endozytose aufgenommen werden können (Abbildung 15).[83,84] Des Weiteren ist die Lipiddoppelschicht von Biomembranen ein höchst dynamisches und heterogenes Medium und kann von Zelle

zu Zelle verschiedenartig zusammengesetzt sein. Dementsprechend haben die Zusammensetzung und die Beschaffenheit der Membranoberfläche einen signifikanten Einfluss auf die Internalisierung von zellpenetrierenden Peptiden. Von besonderer Bedeutung für die Membranwechselwirkung der CPPs ist dabei das zwitterionische Phosphatidylcholin, was anhand von Vesikelexperimenten verdeutlicht wurde.[85]
Ob die Zellaufnahme einem endozytotischen Prozess unterliegt, hängt ebenfalls stark von der vorliegenden Peptidkonzentration ab.[86] Während bei geringen Konzentrationen Endozytose den dominierenden Vorgang darstellt, wird bei erhöhten Konzentrationen fast ausschließlich direkte Internalisierung der zellpenetrierenden Peptide beobachtet.[84]

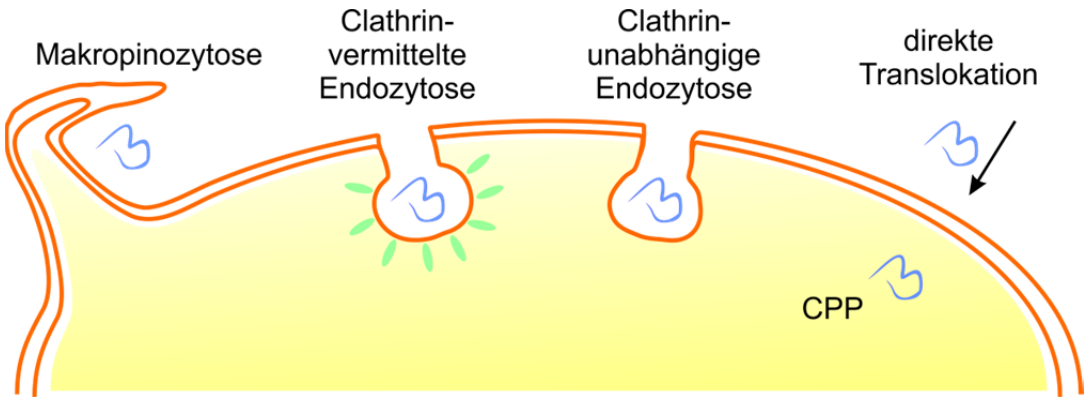


Abbildung 15: Unterschiedliche Zellaufnahmemechanismen der zellpenetrierenden Peptide

Aufgrund ihrer fehlenden Sekundärstruktur nehmen die kationischen CPPs unter den zellpenetrierenden Peptiden eine Sonderstellung ein. Deren Internalisierung geht die elektrostatische Wechselwirkung mit den negativ geladenen Glykosaminoglykanen der Zelloberfläche voraus.[87] Dadurch vermittelt kommt es zur spontanen Zusammenlagerung der Glykosaminoglykanen, bei gleichzeitiger Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, was die Umorganisierung der Aktinfilamente zur Folge hat und somit Makropinozytose induziert.[88] Dennoch können kationische zellpenetrierende Peptide direkt, in einem Endozytose-unabhängigen Prozess, in die Zelle aufgenommen werden. Bei diesem in 2010 entdeckten Phänomen wurde beobachtet, dass das Enzym Sphingomyelinase eine entscheidende Rolle spielt und durch das CPP aktiviert wird.[89] Dabei werden enzymatisch Sphingomyeline, welche zur Klasse der Membranlipide gehören, in Phosphorylcholin und Ceramid abgebaut. Dementsprechend wird die Membranzusammensetzung nachhaltig verändert und die Internalisierung induziert.
Wie schon zuvor beschrieben, besitzen zellpenetrierende Peptide bei geringer Konzentration eine erhöhte Tendenz, endozytotisch in die Zelle aufgenommen zu

werden. Dadurch wird jedoch die Bioverfügbarkeit der CPPs aufgrund des endosomalen Abbaus erheblich verringert. Da unter physiologischen Bedingungen neben verminderter Peptidkonzentration eine erhöhte Proteaseaktivität gegenwärtig ist, wird dadurch die therapeutische Effizienz der Peptide abgeschwächt. Jedoch können CPPs, die im Gegensatz zu den natürlichen Aminosäuren aus D-Aminosäuren aufgebaut sind, nicht von Proteasen verdaut werden. Dennoch besitzen sie wie ihre L-Analoga die Eigenschaft, effektiv in das Innere der Zelle zu gelangen.[70]

1.4 Gezielte Arzneistoffabgabe in Tumoren

Um einen Wirkstoff effizient einsetzen zu können, muss dieser selektiv an das Zielgewebe abgegeben werden. Da sich Tumorgewebe und -zellen erheblich von gesunden unterscheiden, kann deren Beschaffenheit sowie veränderter Metabolismus zur gezielten Adressierung verwendet werden. Dieses leistungsstarke Konzept wurde bereits vor mehr als 100 Jahren von dem Nobelpreisträger Paul Ehrlich erkannt und spielt bei der heutigen Entwicklung von Arzneistoffen immer noch eine überaus bedeutende Rolle.[90] Um die gezielte Adressierung für die Chemotherapie nützlich zu machen, werden hierbei zwei grundlegend verschiedene Ansätze von passiver und aktiver Natur verfolgt.

1.4.1 Passive Adressierung

Bei dieser Form der gezielten Wirkstoffabgabe spielt die Beschaffenheit des Tumorgewebes eine wichtige Rolle. Typischerweise zeichnen sich Tumore durch eine stark erhöhte Angiogenese aus, das bedeutet, dass die Neubildung von Blutgefäßen um das maligne Gewebe zunimmt.[91] Dadurch wird der erhöhte Nährstoffbedarf der Krebszellen von den zusätzlichen Gefäßsystemen gedeckt. Jedoch unterscheiden sich diese Gefäßsysteme erheblich von gesunden, da das Endothel eine Reihe von Defekten aufweist, welche es permeabel machen.[92] Des Weiteren ist der Druck der interstitiellen Gewebeflüssigkeit von Tumoren erhöht, was zur Folge hat, dass die Effizienz von kleinen Wirkstoffmolekülen dramatisch verringert wird, da diese leicht aus dem Tumorgewebe hinaus diffundieren können.[93]

Genau diese beiden Faktoren liefern jedoch den Lösungsansatz für die gezielte Adressierung von Tumoren. Nanotherapeutika bestehend aus Dendrimeren, Mizellen oder Liposomen können als Träger für eine Vielzahl von Wirkstoffen verwendet werden. Aufgrund deren Größe im Bereich von 10 bis 100 nm sind diese Nanoträger

dazu in der Lage, passiv und selektiv im durchlässigen Tumorgewebe zu akkumulieren. Demgegenüber werden kleine Moleküle recht unspezifisch in gesundem und Tumorgewebe angereichert. Darüber hinaus können diese Moleküle nicht vom erhöhten interstitiellen Gewebsflüssigkeitsdruck verdrängt werden und können das Filtersystem in Leber und Niere umgehen.[94] Das Prinzip der passiven Adressierung von Tumoren mit Nanotherapeutika hat sich in unserer Zeit zum Goldstandard entwickelt und wird häufig mit dem von Matsumura und Maeda etablierten Begriff „**e**nhanced **p**ermeability and **r**etention (EPR)“-Effekt aufgeführt.[95]

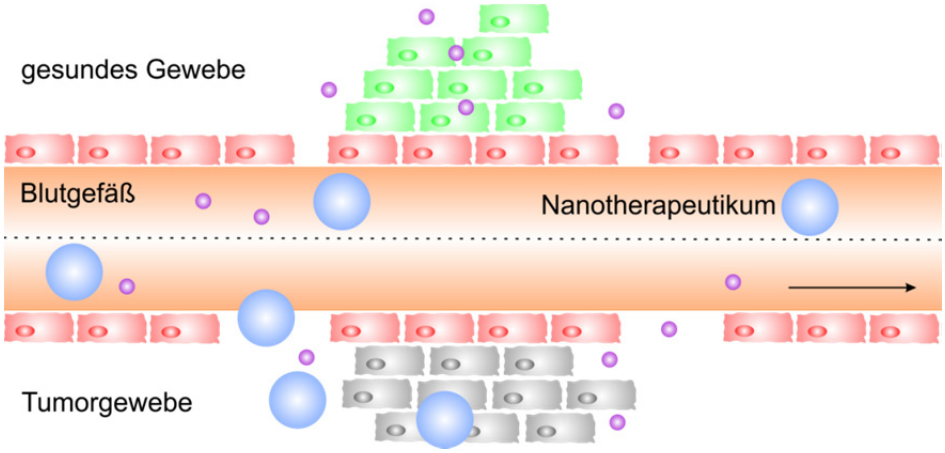


Abbildung 16: Passive Adressierung von Tumoren mittels Nanotherapeutika

1.4.2 Aktive Adressierung

Für die aktive Adressierung von Tumoren mit Arzneistoffen spielt die Beschaffenheit des Gewebes und der Zellen eine eher untergeordnete Rolle. Vielmehr ist der veränderte Metabolismus in Krebszellen der entscheidende Faktor.

In Tumorgeweben und -zellen ist eine Reihe von Rezeptoren überexprimiert. Auf diese Rezeptoren kann mit äußerst vielfältigen Liganden, wie beispielsweise Antikörpern, abgezielt werden.[96] Dabei kann zum einen der Wirkstoff mit dem Antikörper verknüpft sein, und zum anderen kann der Antikörper selbst das Therapeutikum darstellen.[94]

Der monoklonale Antikörper Trastuzumab wird unter anderem erfolgreich bei der Bekämpfung von Brustkrebs eingesetzt. Dieser kann an den überexprimierten epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2/neu binden und dadurch die Tumorzellproliferation hemmen, indem der Zellzyklus in der G_1-Phase unterbrochen wird.[97] Hierbei werden durch die Bindung an den Rezeptor intrazelluläre Signalkaskaden induziert, welche letztendlich zum Zelltod führen. Eine Vielzahl von Liganden besitzt jedoch nicht die Fähigkeit, diese Signaltransduktionspfade zu

erschließen. Nichtsdestotrotz können Substanzen, die nach Bindung an Zelloberflächenrezeptoren eine Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes hervorrufen, effektiv Wirkstoffe in Krebszellen anreichern.[98]

Bei der Rezeptor-vermittelten aktiven Adressierung von Tumoren können formal zwei verschiedene Ansätze verfolgt werden, da von den Liganden sowohl Tumorzellen als auch tumoröses Endothel angesteuert werden kann.

Neben den Antikörpern gibt es bei der Adressierung von Tumorzellen noch eine Reihe anderer klassischer Liganden. In Bezug auf deren Größe sowie chemische Struktur zeichnen sich diese Moleküle durch eine ausgesprochen hohe Heterogenität aus. Wirkstoffkonjugate der Glykoproteine Transferrin und Lektin ermöglichen eine effiziente Akkumulierung von Arzneistoffen, wie Doxorubicin, in Krebszellen.[99,100] Aber auch recht kleine Aminosäuresequenzen wie das Peptidhormon Somatostatin und seine Analogen können ausreichend sein, um Rezeptoren selektiv zu adressieren.[101] Der Folsäurerezeptor ist in einer Vielzahl von malignen Zellen überexprimiert.[102] Das Vitamin Folsäure vermag mit einer hohen Affinität (K_D = 10^{-9} M) an diesen Rezeptor zu binden und macht diesen somit zu einem attraktiven Ziel für die gezielte Arzneistoffabgabe in Tumoren.[103]

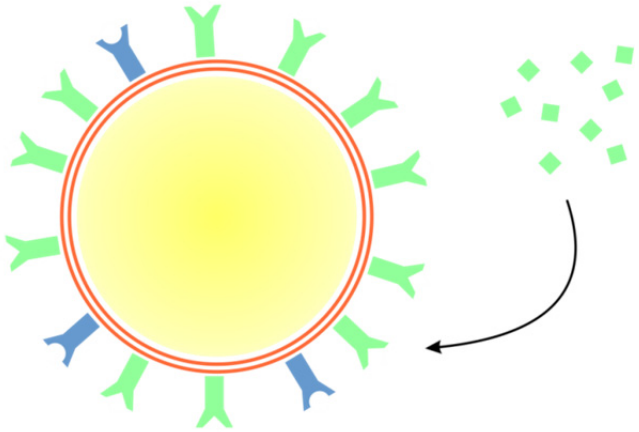


Abbildung 17: Gezielte Arzneistoffabgabe in Tumorzellen, vermittelt durch aktive Adressierung überexprimierter Rezeptoren

Demgegenüber sind bei der Adressierung von tumoralen Endothelzellen diverse andere Faktoren von entscheidendem Vorteil. Durch Hemmung der Endothelzellproliferation mittels Unterdrückung von Wachstumsfaktoren können für den Tumor lebenswichtige Nährstoffe sowie Sauerstoff aus dem tumoralen Blutgefäßsystem nicht mehr ausreichend bereitgestellt werden.[104] Demzufolge werden das Tumorwachstum und die Ausbildung von Metastasen erheblich unterdrückt. Für die Adressierung der Endothelzellen wird ebenfalls das Prinzip der Überexprimierung

von Membranproteinen und Rezeptoren, wie beispielsweise den Integrinen mit cyclischen und linearen RGD Peptidsequenzen, ausgenutzt.[105] In ähnlicher Weise kann auch auf Metalloproteinasen, die eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und Metastasierung von Tumoren spielen, abgezielt werden.

Zunehmender Popularität erfreuen sich jedoch Systeme, die beide Konzepte der aktiven und passiven Adressierung von Tumoren kombinieren, um den Krebs zu besiegen.

Derartige Kombinationsansätze spielen in der folgenden Arbeit ebenfalls eine wichtige Rolle. Hierbei wurden mit Hilfe der Biokonjugationschemie neuartige Doxorubicinderivate dargestellt, welche nicht nur Tumorzelladressierung, sondern auch eine Anreicherung des Arzneistoffs im Cytosol oder Zellkern ermöglichen sollen.

1.5 Literatur

[1] S. A. Waksman, H. B. Woodruff, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1940**, *45*, 609

[2] Hollstei.U, *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 625

[3] R. B. Weiss, *Semin. Oncol.* **1992**, *19*, 670

[4] A. Di Marco, G. Cassinelli, F. Arcamone, *Cancer Treat. Rep.* **1981**, *65*, 3

[5] F. Arcamone, G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, C. Spalla, *Biotechnol. Bioeng.* **1969**, *11*, 1101

[6] F. Arcamone, G. Francesc, S. Penco, A. Selva, *Tetrahedron Lett.* **1969**, 1007

[7] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 185

[8] D. A. Gewirtz, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727

[9] J. J. Champoux, *Annu. Rev. Biochem* **2001**, *70*, 369

[10] J. Nadas, D. X. Sun, *Expert Opin. Drug Discovery* **2006**, *1*, 549

[11] J. C. Wang, *Annu. Rev. Biochem* **1996**, *65*, 635

[12] G. Capranico, M. Binaschi, M. E. Borgnetto, F. Zunino, M. Palumbo, *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 323

[13] G. Minotti, G. Cairo, E. Monti, *FASEB J.* **1999**, *13*, 199

[14] J. W. Lown, S. K. Sim, K. C. Majumdar, R. Y. Chang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *76*, 705

[15] L. J. Marnett, J. N. Riggins, J. D. West, *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 583

[16] J. Thorndike, W. S. Beck, *Cancer Res.* **1977**, *37*, 1125

[17] D. J. Taatjes, G. Gaudiano, K. Resing, T. H. Koch, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1276

[18] A. H. J. Wang, Y. G. Gao, Y. C. Liaw, Y. K. Li, *Biochemistry* **1991**, *30*, 3812

[19] D. J. Taatjes, G. Gaudiano, T. H. Koch, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 953

[20] D. J. Fenick, D. J. Taatjes, T. H. Koch, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2452

[21] A. Gabizon, H. Shmeeda, Y. Barenholz, *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 419

[22] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 271

[23] T. Ishida, Y. Okada, T. Kobayashi, H. Kiwada, *Int. J. Pharm.* **2006**, *309*, 94

[24] I. F. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4373

[25] J. H. Doroshow, *Cancer Res.* **1983**, *43*, 460

[26] M. Yamaoka, S. Yamaguchi, T. Suzuki, M. Okuyama, J. Nitobe, N. Nakamura, Y. Mitsui, H. Tomoike, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2000**, *32*, 881

[27] L. Gianni, E. Munzone, G. Capri, F. Fulfaro, E. Tarenzi, F. Villani, C. Spreafico, A. Laffranchi, A. Caraceni, C. Martini, M. Stefanelli, P. Valagussa, G. Bonadonna, *J. Clin. Oncol.* **1995**, *13*, 2688

[28] S. S. Legha, R. S. Benjamin, B. Mackay, M. Ewer, S. Wallace, M. Valdivieso, S. L. Rasmussen, G. R. Blumenschein, E. J. Freireich, *Ann. Intern. Med.* **1982**, *96*, 133

[29] P. Singal, T. M. Li, D. Kumar, I. Danelisen, N. Iliskovic, *Mol. Cell. Biochem.* **2000**, *207*, 77

[30] M. M. Gottesman, T. Fojo, S. E. Bates, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 48

[31] E. M. Leslie, R. G. Deeley, S. P. C. Cole, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *204*, 216

[32] M. Dean, Y. Hamon, G. Chimini, *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 1007

[33] S. V. Ambudkar, S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, M. M. Gottesman, *Annu. Rev. Pharmacool. Toxicol.* **1999**, *39*, 361

[34] M. Ripamonti, L. Capolongo, G. Melegaro, C. Gornati, A. Bargiotti, M. Caruso, M. Grandi, A. Suarato, *Invest. New Drugs* **1996**, *14*, 139

[35] J. M. Siegfried, T. G. Burke, T. R. Tritton, *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 593

[36] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Academic Press, **2008**

[37] M. Gudmand, S. Rocha, N. S. Hatzakis, K. Peneva, K. Müllen, D. Stamou, H. Uji-I, J. Hofkens, T. Bjornholm, T. Heimburg, *Biophys. J.* **2010**, *98*, 1873

[38] S. M. Ryan, G. Mantovani, X. X. Wang, D. M. Haddleton, D. J. Brayden, *Expert Opinion on Drug Delivery* **2008**, *5*, 371

[39] N. Stephanopoulos, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 876

[40] C. K. S. Pillai, W. Paul, C. P. Sharma, *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 641

[41] S. D. Tilley, N. S. Joshi, M. B. Francis, T. P. Begley, *Proteins: Chemistry and Chemical Reactivity*, John Wiley & Sons, Inc., **2007**

[42] A. N. Glazer, *Annu. Rev. Biochem* **1970**, *39*, 101

[43] D. R. Goddard, L. Michaelis, *J. Biol. Chem.* **1935**, *112*, 361

[44] J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 630

[45] C. Woghiren, B. Sharma, S. Stein, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 314

[46] S. Shaunak, A. Godwin, J. W. Choi, S. Balan, E. Pedone, D. Vijayarangam, S. Heidelberger, I. Teo, M. Zloh, S. Brocchini, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 312

[47] S. Brocchini, S. Balan, A. Godwin, J. W. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Nature Protocols* **2006**, *1*, 2241

[48] M. E. B. Smith, F. F. Schumacher, C. P. Ryan, L. M. Tedaldi, D. Papaioannou, G. Waksman, S. Caddick, J. R. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1960

[49] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269

[50] Y. Zeng, T. N. C. Ramya, A. Dirksen, P. E. Dawson, J. C. Paulson, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 207

[51] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125

[52] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974

[53] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686

[54] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596

[55] F. Wolbers, P. ter Braak, S. Le Gac, R. Luttge, H. Andersson, I. Vermes, A. van den Berg, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 5073

[56] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber. Recl.* **1961**, *94*, 3260

[57] F. C. Hartman, F. Wold, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3890

[58] J. Carlsson, H. Drevin, R. Axen, *Biochem. J* **1978**, *173*, 723

[59] D. Willner, P. A. Trail, S. J. Hofstead, H. D. King, S. J. Lasch, G. R. Braslawsky, R. S. Greenfield, T. Kaneko, R. A. Firestone, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 521

[60] R. S. Navath, Y. E. Kurtoglu, B. Wang, S. Kannan, R. Romero, R. M. Kannan, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2446

[61] A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* **1988**, *55*, 1189

[62] K. G. Ford, B. E. Souberbiele, D. Darling, F. Farzaneh, *Gene Ther.* **2001**, *8*, 1

[63] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5836

[64] I. Mager, E. Eiriksdottir, K. Langel, S. E. L. Andaloussi, U. Langel, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2010**, *1798*, 338

[65] J. Nguyen, X. L. Xie, M. Neu, R. Dumitrascu, R. Reul, J. Sitterberg, U. Bakowsky, R. Schermuly, L. Fink, T. Schmehl, T. Gessler, W. Seeger, T. Kissel, *J. Gene Med.* **2008**, *10*, 1236

[66] A. Muratovska, M. R. Eccles, *FEBS Lett.* **2004**, *558*, 63

[67] S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S. F. Dowdy, *Science* **1999**, *285*, 1569

[68] Y. Xu, B. R. Liu, H. J. Lee, K. B. Shannon, J. G. Winiarz, T. C. Wang, H. J. Chiang, Y. W. Huang, *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**,

[69] E. A. Dubikovskaya, S. H. Thorne, T. H. Pillow, C. H. Contag, P. A. Wender, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 12128

[70] G. Tünnemann, G. Ter-Avetisyan, R. M. Martin, M. Stoockl, A. Herrmann, C. Cardoso, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 469

[71] J. E. Hinshaw, B. O. Carragher, R. A. Milligan, *Cell* **1992**, *69*, 1133

[72] D. Kalderon, B. L. Roberts, W. D. Richardson, A. E. Smith, *Cell* **1984**, *39*, 499

[73] M. R. M. Fontes, T. Teh, D. Jans, R. I. Brinkworth, B. Kobe, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 27981

[74] J. Mueller, I. Kretzschmar, R. Volkmer, P. Boisguerin, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2363

[75] F. Milletti, *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 850

[76] A. Scheller, J. Oehlke, B. Wiesner, M. Dathe, E. Krause, M. Beyermann, M. Melzig, M. Bienert, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 185

[77] J. Oehlke, E. Krause, B. Wiesner, M. Beyermann, M. Bienert, *FEBS Lett.* **1997**, *415*, 196

[78] I. Martin, M. Teixido, E. Giralt, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 896

[79] J. A. Gomez, V. Gama, T. Yoshida, W. Sun, P. Hayes, K. Leskovll, D. Boothman, S. Matsuyama, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 797

[80] J. D. Ochocki, D. G. Mullen, E. V. Wattenberg, M. D. Distefano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4998

[81] L. Covic, A. L. Gresser, J. Talavera, S. Swift, A. Kuliopulos, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 643

[82] P. Guterstam, F. Madani, H. Hirose, T. Takeuchi, S. Futaki, S. El Andaloussi, A. Graslund, U. Langel, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, *1788*, 2509

[83] S. Trabulo, A. L. Cardoso, M. Mano, M. C. P. De Lima, *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 961

[84] R. Brasseur, G. Divita, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2010**, *1798*, 2177

[85] P. E. G. Thoren, D. Persson, E. K. Esbjorner, M. Goksor, P. Lincoln, B. Norden, *Biochemistry* **2004**, *43*, 3471

[86] A. T. Jones, E. J. Sayers, *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 582

[87] A. Ziegler, J. Seelig, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 2142

[88] I. Nakase, A. Tadokoro, N. Kawabata, T. Takeuchi, H. Katoh, K. Hiramoto, M. Negishi, M. Nomizu, Y. Sugiura, S. Futaki, *Biochemistry* **2007**, *46*, 492

[89] W. P. R. Verdurmen, M. Thanos, I. R. Ruttekolk, E. Gulbins, R. Brock, *J. Controlled Release* **2010**, *147*, 171

[90] K. Strebhardt, A. Ullrich, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 473

[91] G. Bergers, L. E. Benjamin, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 401

[92] R. K. Jain, *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, *81*, 570

[93] C. H. Heldin, K. Rubin, K. Pietras, A. Ostman, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 806

[94] F. Danhier, O. Feron, V. Preat, *J. Controlled Release* **2010**, *148*, 135

[95] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387

[96] J. M. Reichert, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 423

[97] C. A. Hudis, *New Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 39

[98] D. B. Kirpotin, D. C. Drummond, Y. Shao, M. R. Shalaby, K. L. Hong, U. B. Nielsen, J. D. Marks, C. C. Benz, J. W. Park, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6732

[99] T. Minko, *Adv. Drug Del. Rev.* **2004**, *56*, 491

[100] T. R. Daniels, T. Delgado, G. Helguera, M. L. Penichet, *Clin. Immunol.* **2006**, *121*, 159

[101] C. M. Huang, Y. T. Wu, S. T. Chen, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 453

[102] S. D. Weitman, A. G. Weinberg, L. R. Coney, V. R. Zurawski, D. S. Jennings, B. A. Kamen, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 6708

[103] P. S. Low, S. A. Kularatne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 256

[104] T. Lammers, W. E. Hennink, G. Storm, *Br. J. Cancer* **2008**, *99*, 392

[105] J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresh, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 9

2 Motivation und Zielsetzung

Bei der sogenannten „Multi Drug Resistance“ kommt es zu einer signifikant verringerten Zellakkumulation von Arzneistoffen. Dadurch werden deren eigentliche Bestimmungsorte nur noch unzureichend adressiert. Formal betrachtet wäre die Applikation höherer Dosen die einfachste Lösung für dieses Problem. Da jedoch eine Vielzahl an Tumortherapeutika bereits am Rande einer letalen Dosis verabreicht wird, kann dieser Ansatz keine dauerhafte Maßnahme darstellen. Vielmehr werden heutzutage immer erfolgreicher Arzneistoffderivate oder Formulierungen in der Krebstherapie eingesetzt. Des Weiteren besitzen die applizierten Zytostatika eine äußerst geringe Tumorselektivität, so dass gesundes Gewebe oftmals erheblich in Mitleidenschaft gezogen wird.
Gerade deswegen ist das weltweite Bestreben von Naturwissenschaftlern und Medizinern sehr groß, neue Methoden und Chemotherapeutika zu entwickeln, um den Krebs zu besiegen.

Dieses Ziel wird ebenfalls in der vorliegenden Arbeit verfolgt. Dabei stehen Design, Synthese sowie zytotoxische Eigenschaften neuartiger Derivate des Anthracyclins Doxorubicin, unter Verwendung verschiedener homo- sowie heterobi- und trifunktionaler Vernetzer, im Vordergrund. Hierbei wurden die Modifikationen des Arzneistoffs so gewählt, dass dessen Tumorselektivität, Zell- und Nukleusakkumulation sowie DNA-Bindungsaffinität durch Funktionalisierung mit Peptiden und Proteinen erhöht werden können (Abbildung 18).

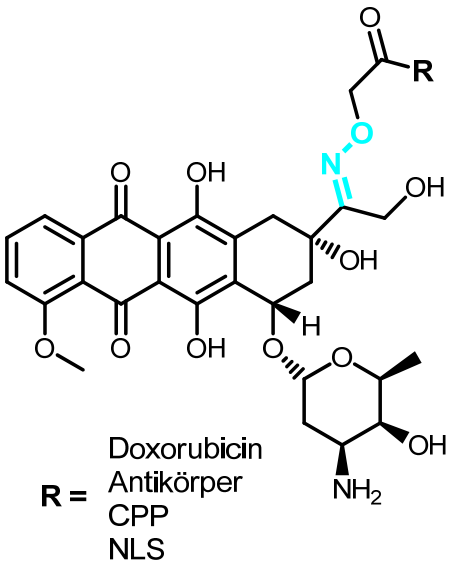


Abbildung 18: Neuartige Derivate des Anthracyclins Doxorubicin zur Verbesserung der Tumorselektivität, Zellaufnahme, Nukleusakkumulation und DNA-Bindungsaffinität – vermittelt durch Modifikation des Arzneistoffs mit Peptiden und Proteinen

Das Zytostatikum Doxorubicin eignet sich aufgrund seiner zahlreichen unterschiedlichen funktionellen Gruppen sowie seiner intrinsischen Fluoreszenz hervorragend für chemische Modifikationen und Charakterisierungsmethoden. Als Arzneistoff wird es gegen eine Vielzahl solider Tumoren verwendet. Allerdings geht das breite Anwendungsspektrum abermals mit einer sich entwickelnden Arzneistoffresistenz einher. Des Weiteren wird die Anwendung des Zytostatikums durch die geringe Selektivität für Tumorzellen ergänzend limitiert. Die in den folgenden Kapiteln synthetisierten Doxorubicin-Abkömmlinge sollen auf die Überwindung der besagten Arzneistoffresistenz abzielen und es ermöglichen, den Krebs selektiv zu adressieren.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese und Charakterisierung modifizierter Doxorubicin-Moleküle, welche verbesserte DNA-Bindungseigenschaften aufweisen. Dadurch sollen die zytotoxischen Eigenschaften des Arzneistoffs erhöht werden, indem die verbesserte Bindungsaffinität zu einem stärkeren Topoisomerase-Typ-II-Gift führt. Der dabei zu Grunde liegende Modifikationsansatz beruht auf der Darstellung dimerer Doxorubicin-Moleküle mit unterschiedlichem Verbrückungscharakter, welche die DNA-Interkalation verbessern und verstärken sollen. Die Verknüpfung der beiden Anthracycline erfolgt hierbei über deren aliphatisches Keton, unter Ausbildung von Oximen. Eine derartige Verbindung beider

Arzneistoff-Moleküle wurde bisher noch nicht durchgeführt und soll dem Molekül im Vergleich zu den bereits bekannten Hydrazon-basierenden Dimeren zusätzliche Hydrolysestabilität verleihen.
Darüber hinaus wurde ein neuer spaltbarer heterotrifunktionaler Vernetzer entwickelt, der es ermöglicht, mit Doxorubicin-Dimer-Antikörperkonjugaten Tumorzellen zu adressieren, ohne dabei durch passive Diffusion von den Zellen aufgenommen zu werden.
Um die Anthracyclin-Dimer-DNA-Wechselwirkungen der dargestellten Derivate zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal das leistungsstarke Prinzip der Mikromaßstab-Thermophorese verwendet.

Im darauffolgenden Kapitel spielt die Adressierung von Tumorzellen unter Berücksichtigung des sogenannten „magic bullet“ Konzepts von Paul Ehrlich eine wichtige Rolle. Dabei soll als „magic bullet“ ein Doxorubicinderivat dienen, welches auf überexprimierte Oberflächenrezeptoren in Krebszellen abzielen kann, um somit unerwünschte Nebenwirkungen in gesundem Gewebe weitestgehend zu minimieren. Dafür muss das Somatostatin-Analogon Octreotid mit einem neuartigen Disulfid-interkalierenden Vernetzerreagenz, unter Erhalt der wichtigen zyklischen Struktur und des Rezeptorbindungsmotives, mit Doxorubicin modifiziert werden. Dieser Doxorubicin-Octreotid-Hybrid besitzt aufgrund der größeren Halbwertszeit des Octreotid im Vergleich zu Somatostatin ein großes Potential für zukünftige *In-vivo*-Anwendungen. Des Weiteren könnte der Hybrid bei der Bekämpfung von Pankreas- und Hypophysentumoren, welche oftmals mit einer intrinsischen Arzneistoffresistenz einhergehen, eine wichtige Rolle spielen, da diese beiden Tumortypen eine außerordentlich hohe Expression des Somatostatin-Rezeptors aufweisen. Die Anwendung einer Verbindung aus Doxorubicin und Octreotid kann ebenfalls als Kombinationstherapie verstanden werden, da Octreotid nicht nur Tumoradressierung vermittelt, sondern durch anschalten intrazellulärer Signalkaskaden ebenso Apoptose induzieren kann. Nichtsdestotrotz ist diese antiproliferative Wirkung des Peptides schwach, so dass es erst durch die Verknüpfung mit einem Zytostatikum, wie Doxorubicin, von hoher klinischer Relevanz wäre.

Obwohl der Arzneistoff Doxorubicin in die Zelle aufgenommen werden kann, stellt sich natürlich die Frage, ob dahingehend weitere Verbesserungsansätze bestehen. Zellpenetrierende Peptide nehmen aufgrund ihrer Eigenschaft, eine Vielzahl von

Substanzen in Zellen transportieren zu können, eine Sonderstellung in der Biochemie ein. Diese Eigenschaft soll in dieser Arbeit ebenfalls ausgenutzt werden. Nicht nur um Doxorubicin in die Zelle einzuschleusen, sondern auch um die ABC-Transporter-Membranproteine zu umgehen. Dafür soll ein 2-Pyridyldisulfid-tragendes Doxorubicinderivat synthetisiert werden, welches unter Ausbildung einer Disulfidbindung mit terminalen Cysteinen verschiedener zellpenetrierender Peptide reagieren kann, ohne dabei die Sekundärstruktur der Aminosäuresequenz zu beeinflussen. Die in Tumorzellen erhöhte Glutathion-Konzentration soll anschließend zur intrazellulären Freisetzung des Arzneistoffs ausgenutzt werden. Um einen noch tieferen Einblick in die Funktionsweise und Bedeutsamkeit der zellpenetrierenden Peptide für die Arzneistoffabgabe zu erlangen, wird der Einfluss der Peptidanzahl in Abhängigkeit von der Biokonjugationschemie ebenfalls untersucht. Da *in vivo* Peptidspezies besonders anfällig für enzymatischen Abbau sind, sollen darüber hinaus funktionale Doxorubicin-Peptidkonjugate dargestellt werden, welche Polyethylenglykol tragen, um somit den Proteasenverdau zu minimieren.

Die zytotoxische Wirkung des Anthracyclins Doxorubicin kann sich auf vielfältige Art und Weise entfalten. Um jedoch in die DNA interkalieren und die Topoisomerasen-Funktionalität hemmen zu können, muss der Wirkstoff in den Zellkern transportiert werden. Eine spezielle Form der zellpenetrierenden Peptide, die Kernlokalisierungssequenzen, vermag den Transport von Substanzen in den Nukleus zu bewerkstelligen. Im letzten Kapitel dieser Arbeit soll das Zusammenspiel einer NLS mit Doxorubicin in Abhängigkeit von der Biokonjugationschemie untersucht werden. Hierbei soll die verwendete Vernetzer-Technologie über den Erfolg des Modifikationsansatzes Rückschlüsse ermöglichen. Inwieweit dadurch toxische Eigenschaften sowie intrazelluläre Wirkstoffverteilung beeinflusst werden, gilt es ebenso zu überprüfen. Die Verknüpfung der NLS mit dem Arzneistoff und die anschließende Abspaltung in der Zelle sind dabei von entscheidender Bedeutung, besonders da bisher noch keine kovalent verknüpften Doxorubicin-NLS-Konjugate synthetisiert wurden. Ein Ansatz soll den durch Glutathion spaltbaren Vernetzer des vorangegangenen Kapitels verwenden. Bei den beiden weiteren Modifikationsansätzen tragen die Kernlokalisierungssequenzen reaktive Gruppen, welche wie der Vernetzer ebenfalls in der Lage sind, mit dem aliphatischen Keton des Doxorubicin zu reagieren. Dabei soll die neu entstandene Bindung in Abhängigkeit von der Modifizierung sowohl hydrolysierbar als auch beständig sein.

Wie in der vorangegangenen Einleitung bereits erläutert, ist seit der Entdeckung der zytostatischen Eigenschaften des Anthracyclins Daunorubicin nur ein Abkömmling von Arcamone *et al.* mit besseren pharmakologischen Eigenschaften entdeckt worden, das Doxorubicin.[1] Die in den folgenden Kapiteln dargestellten und charakterisierten Doxorubicinderivate sollen ebenfalls zur Aufklärung der von Raymond B. Weiss gestellten Frage „The Anthracyclines: Will We Ever Find a Better Doxorubicin?“ beitragen.[2] Auf die Antwort dieser Frage und die Zukunftsaussichten modifizierter Anthracycline wird in der abschließenden Zusammenfassung eingehend eingegangen.

2.1 Literatur

[1] F. Arcamone, G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, C. Spalla, *Biotechnol. Bioeng.* **1969**, *11*, 1101

[2] R. B. Weiss, *Semin. Oncol.* **1992**, *19*, 670

3 Dimere des Zytostatikum Doxorubicin

Obwohl das Anthracyclin Doxorubicin seine zytotoxische Wirkung auf vielfältige Art und Weise entfalten kann, werden DNA-Interkalation und damit verbundene Beeinträchtigung der Topoisomerase-Typ-II-Funktionalität dennoch als primärer Wirkmechanismus angesehen.[1,2] Dabei sind π-π-Wechselwirkungen des Aglykon mit den Basenpaaren der DNA für die interkalierende Wirkung von fundamentaler Bedeutung (Abbildung 19). Allerdings vermag der Arzneistoff auch wieder von der DNA zu dissoziieren und kann somit das Enzym nicht mehr adressieren. Eine erhöhte DNA-Bindungsaffinität des Zytostatikums stellt somit einen nützlichen Ansatz dar, um die zytotoxischen Eigenschaften zu erhöhen.[3,4]

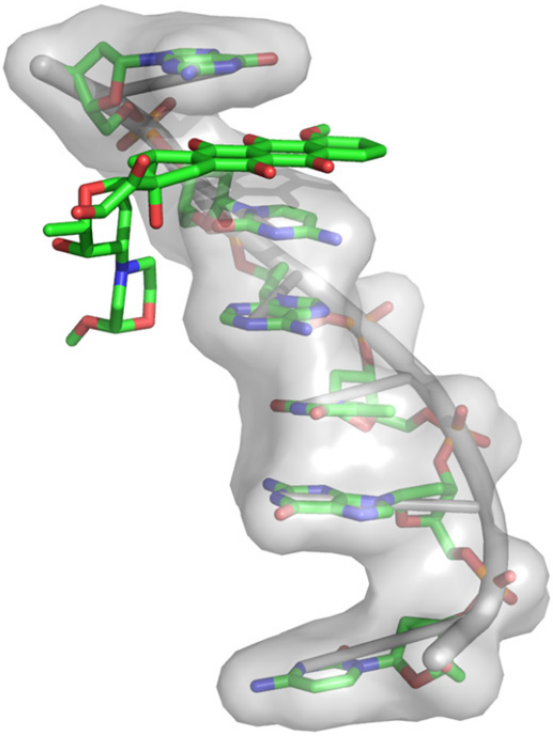


Abbildung 19: Interkalation von Doxorubicin mit DNA vermittelt durch π-π-Wechselwirkungen des Aglykon mit den Basenpaaren

Bisinterkalierende Anthracyclin-Dimere weisen eine derartige erhöhte DNA-Bindungsaffinität auf (Abbildung 20). Dennoch besitzen die bereits dargestellten Derivate entscheidende Limitierungen. Das Dimer **1** ist durch Umsetzung von Daunorubicin mit 1,4-*Bis*(brommethyl)-benzol in moderaten Ausbeuten leicht zugänglich. Die Bindungskonstante von **1** (K_A = 2.7 x 10^{11} M^{-1}) ist verglichen mit dem synthetischen Vorläufer Daunorubicin (K_A = 1.6 x 10^7 M^{-1}) extrem hoch.[5] Jedoch ist

das für die Topoisomerase-Interaktion notwendige primäre Amin des Daunosamin irreversibel blockiert.[6] Des Weiteren beschränkt sich die Modifikation mit 1,4-*Bis*(brommethyl)-benzol auf Daunorubicin, da der primäre Alkohol des Doxorubicin ebenfalls leicht mit dem Benzylbromidderivat reagieren könnte, was das Maß an Nebenprodukten erheblich erhöhen würde. Im Gegensatz zu **1** ist das primäre Amin des bisinterkalierenden Dimers **2** nach wie vor frei. Allerdings erfolgt die Verknüpfung der beiden Anthracycline durch die Ausbildung zweier Hydrazone mit dem aliphatischen Keton des Arzneistoffes.[7] Unter physiologischen Bedingungen weisen jedoch Hydrazone des Daunorubicin eine unzureichende Stabilität auf, was dazu führt, dass das Dimer bereits hydrolysiert, bevor es seinen Zielort erreicht.[8]

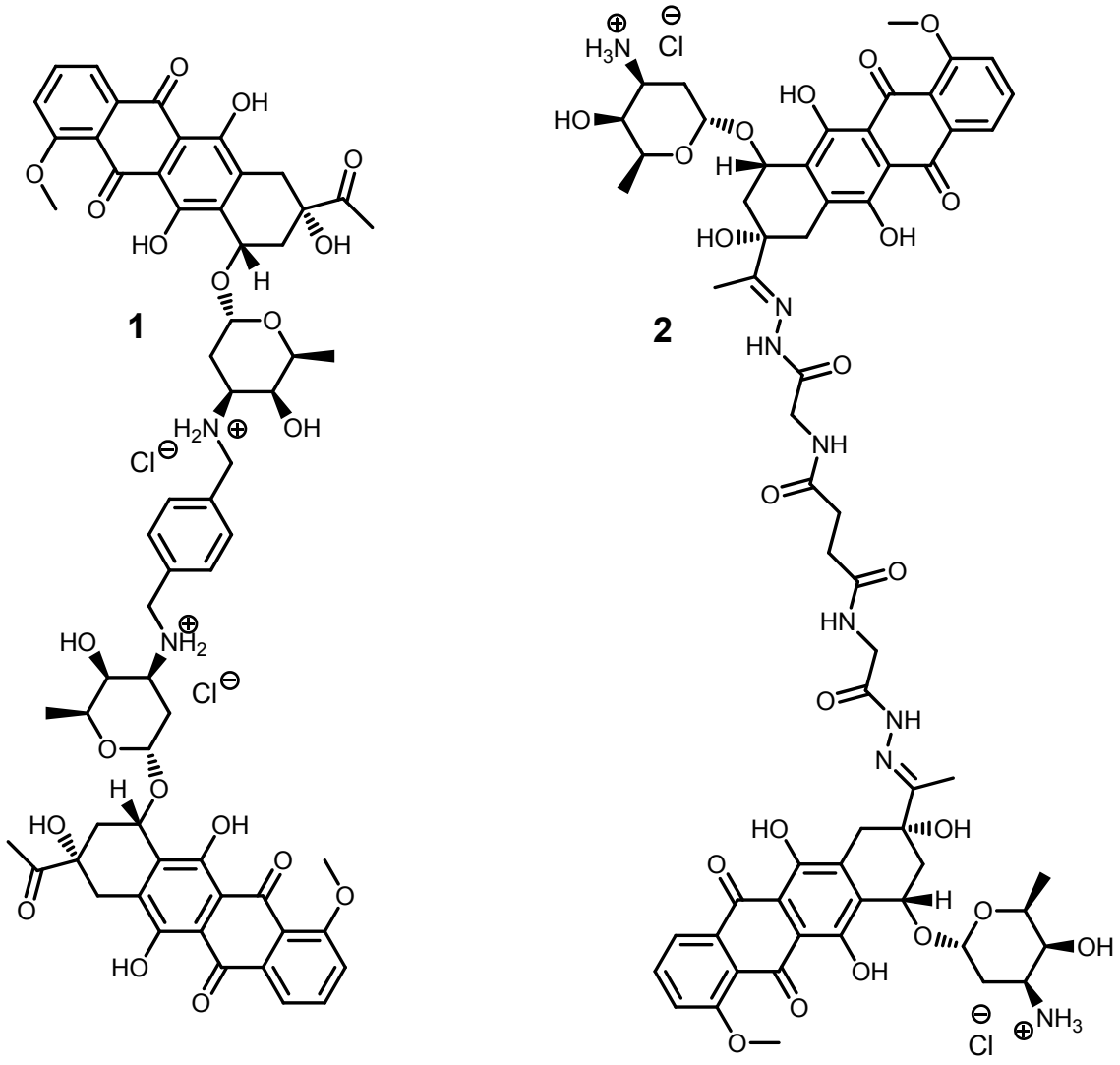


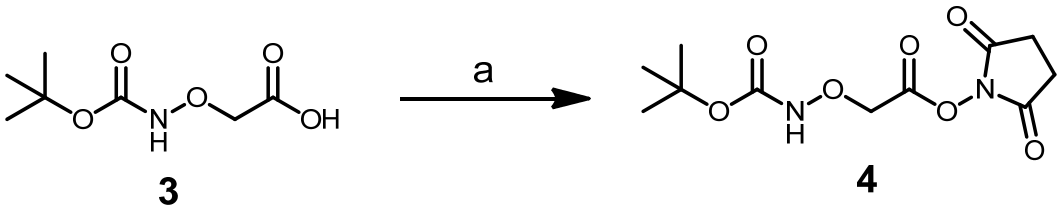
Abbildung 20: Bisinterkalierende Anthracyclin-Dimere[5,7]

Die in diesem Kapitel dargestellten Doxorubicin-Dimere sollen die vorangegangen Limitierungen überwinden. Dabei wurden Modifikationsansätze gewählt, welche die Synthese stabiler Doxorubicinderivate erlauben, ohne dabei auf das primäre Amin des Zuckerrestes zurückzugreifen.

3.1 Neuartige dimere Doxorubicin-Moleküle

3.1.1 Synthese und Charakterisierung

Der primäre Alkohol, das Amin des Zuckers sowie das aliphatische Keton des Anthracyclin Doxorubicin können leicht chemisch modifiziert werden. Allerdings führen Modifikationen des primären Amins in der Regel zu verringerter Zytotoxizität; und eine selektive Adressierung des Alkohols ist aufgrund der zahlreichen Hydroxylgruppen des Doxorubicin nur bedingt durchführbar.[9] Im Gegensatz dazu kann das aliphatische Keton bioorthogonal mit α-Effekt-Nukleophilen, wie Hydraziden oder Aminooxyverbindungen, selektiv unter Ausbildung von Hydrazonen und Oximen umgesetzt werden.[10] Während das Kondensationsprodukt bei der Reaktion mit Hydraziden typischerweise reduziert werden muss, um eine stabile Verbindung zu generieren, sind Oxime unter physiologischen Bedingungen beständig.[11]
Deshalb wurden die folgenden persistenten Doxorubicin-Dimere durch Anwendung von homobifunktionalen Vernetzern synthetisiert. Um die reaktiven Aminooxy-Funktionalitäten dem Vernetzerreagenz hinzuzufügen, wurde zunächst der NHS-Ester der kommerziell erhältlichen *Boc*-Aminooxyessigsäure (**3**) dargestellt.



3 **4**

Abbildung 21: Darstellung des NHS-Esters der geschützten Aminooxyessigsäure; (a) NHS (1.05 eq), DIC (1.15 eq), DCM, Argon, 4 h, r.t., 92 %

Dies gelang durch Umsetzung der freien Säure mit *N*-Hydroxysuccinimid in Gegenwart von *N,N´*-Diisopropylcarbodiimid in hervorragenden Ausbeuten gemäß der Literatur.[12] Der bei der Kondensation entstehende Harnstoff wurde nach beendeter Reaktion abfiltriert und das Filtrat gewaschen. Dabei erhielt man das Produkt (**4**) in hoher Reinheit, ohne weitere Aufreinigungsschritte durchführen zu müssen. Dennoch wurde

4 innerhalb weniger Wochen umgesetzt, da die Substanz nicht ausreichend stabil ist und Überacylierung der Aminooxy-Gruppe rasch auftreten kann.[13]

Die homobifunktionalen Vernetzersysteme sind durch Umsetzung des Aktivesters (**4**) mit Diaminen unter Ausbildung zweier Amidbindungen leicht zugänglich (Abbildung 22). Um den Einfluss der Vernetzerbeschaffenheit auf das dimere Doxorubicin-Molekül zu untersuchen, wurde sowohl ein rigides als auch ein flexibles Diamin eingesetzt.

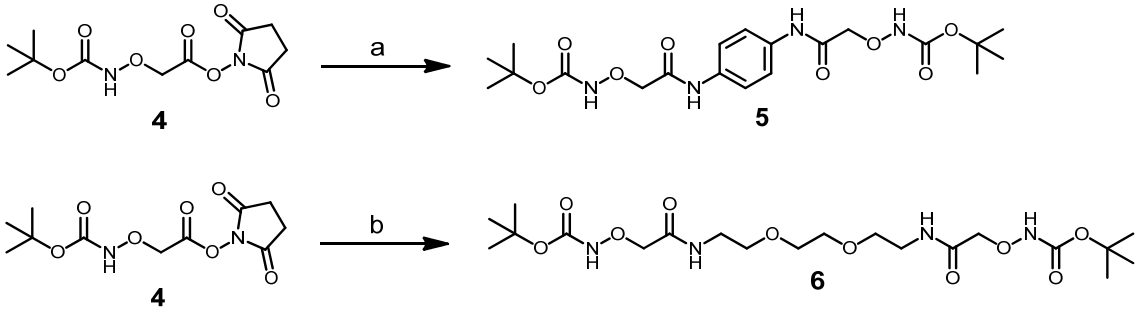


Abbildung 22: Synthese der homobifunktionalen Vernetzer; (a) 1,4-Phenylendiamin (0.5 eq), THF, Argon, 24 h, r.t., 83 %; (b) 2,2´-(Ethylendioxy)*bis*(ethylamin) (0.5 eq), THF, Argon, 2 h, r.t., 79 %

Um das rigide Rückgrat des Vernetzers darzustellen, wurde zunächst die Reaktion des NHS-Esters mit 1,4-Phenylendiamin in THF bei Raumtemperatur durchgeführt. Vollständiger Umsatz des Diamins konnte mittels DC aufgrund der geringeren Reaktivität der aromatischen Amine erst nach 24 Stunden beobachtet werden. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der farblose Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Dabei ging das bei der Ausbildung der Amidbindung frei werdende *N*-Hydroxysuccinimid erneut in Lösung, und das Produkt (**5**) konnte durch Filtration isoliert werden. Eine ähnliche Reaktionsführung erwies sich bei der Darstellung des Vernetzer-Moleküls mit flexiblem Charakter ebenfalls als praktikabel. Dafür wurde **4** mit 2,2´(Ethylendioxy)*bis*(ethylamin) in THF umgesetzt, wobei die Reaktion verglichen mit 1,4-Phenylendiamin weitaus schneller ablief. Da für die Zielverbindung **6** ein Öl zu erwarten war, wurde die Kupplung mit dem NHS-Ester in hoher Konzentration durchgeführt, so dass *N*-Hydroxysuccinimid während der Reaktion ausfiel. Durch anschließende Extraktion mit gesättigter Natriumcarbonatlösung konnten noch vorhandene Spuren von NHS entfernt werden. Das Produkt konnte in guter Ausbeute als farbloses Öl aus der organischen Phase gewonnen werden.

Die Charakterisierung der beiden isolierten Vernetzerreagenzien erfolgte durch NMR-Spektroskopie sowie MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Ein repräsentatives ^{1}H-NMR-Spektrum von **5** in DMSO-d^{6} (300 MHz) ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

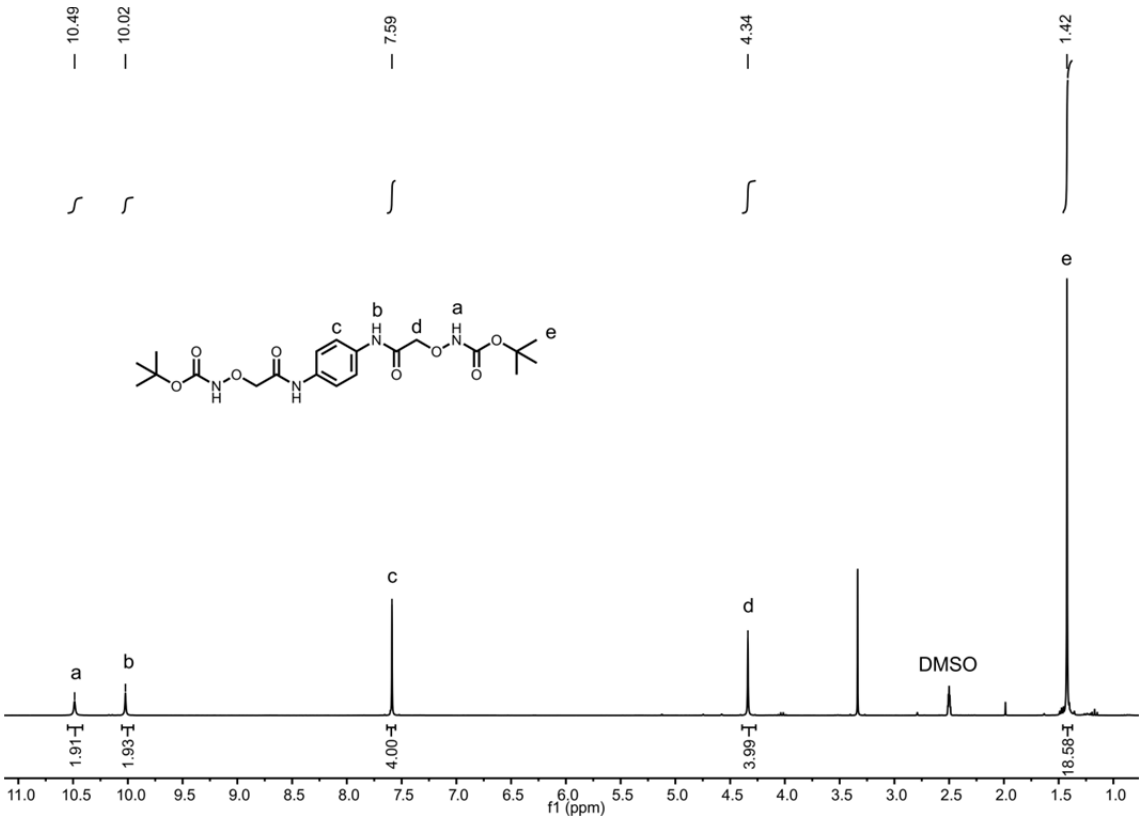


Abbildung 23: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **5** in DMSO-*d*^{6} (300 MHz)

Die symmetrische Verbindung weist im Protonenspektrum ausschließlich Singuletts auf. Das bei der Reaktion entstehende *N*-Hydroxysuccinimid kann nach erfolgreicher Aufarbeitung nicht mehr detektiert werden, da andernfalls ein Signal mit der chemischen Verschiebung von 2.59 ppm relativ zu dem Lösungsmittelsignal (2.50 ppm) von DMSO gegenwärtig wäre.[14] Die aromatischen Amide und die Carbamate der α-Effekt-Nukleophile weisen eine chemische Verschiebung von 10.02 und 10.49 ppm auf. Das Signal des Protons der geschützten Aminooxy-Gruppe von **6** wurde ebenfalls in diesem Bereich beobachtet. Der charakteristische Peak der Methylenkomponente beider dargestellten Vernetzersysteme liegt wie zu erwarten zwischen 4 und 4.5 ppm.

Da die Struktur der heterobifunktionalen Vernetzer-Substanzen mit geeigneten Charakterisierungmethoden bestätigt werden konnte, wurde anschließend die Dimerisierung des Arzneistoffes durchgeführt (Abbildung 24). Obwohl die reaktiven Aminooxy-Funktionalitäten der Verbindungen **5** und **6** mit einer Schutzgruppe versehen sind, werden diese aufgrund der einfachen Entfernung der Schutzgruppe als eigentliches Vernetzerreagenz betrachtet.

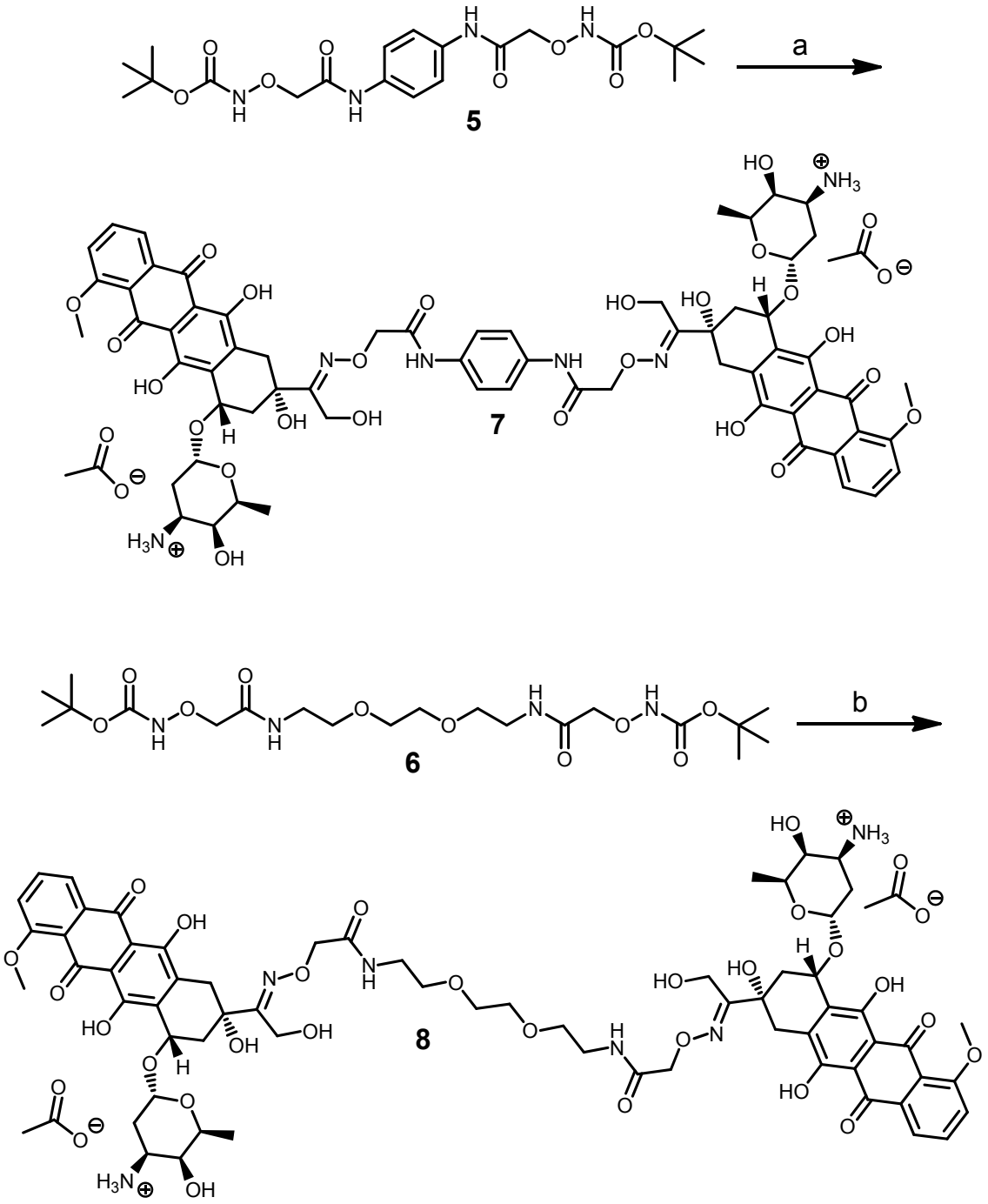


Abbildung 24: Synthese neuartiger Doxorubicin-Dimere; (a) 1. DCM/TFA (1:1), 1 h, r.t., quant. 2. Doxorubicin-Hydrochlorid (2 eq), 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8), DMF, 48 h, r.t., 73 %; (b) 1. DCM/TFA (1:1), 1 h, r.t., quant. 2. Doxorubicin-Hydrochlorid (2 eq), 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8), DMF, 24 h, r.t., 77 %

Die heterobifunktionalen Vernetzer sind mit einer *tert*-Butyloxycarbonyl-Funktionalität, der sogenannten *Boc*-Schutzgruppe, versehen. Diese *tert*-Butylcarbamate sind typischerweise äußerst stabil gegen eine Vielzahl von Nukleophilen, Basen sowie

Oxidations- und Reduktionsmitteln, können jedoch leicht unter stark sauren Reaktionsbedingungen in kurzer Zeit quantitativ abgespalten werden.[15] Das bei der Entschützung freiwerdende Kohlenstoffdioxid und Isobutylen entweichen rasch als Gas und können somit keine Nebenreaktionen eingehen.

Um die *Boc*-Gruppe in **5** und **6** zu entfernen, wurden die Substanzen zunächst in trockenem DCM gelöst und anschließend mit der gleichen Menge an TFA versetzt. Die Zugabe der Säure führte zu einer sofortigen starken Gasentwicklung, welche nach einigen Minuten allmählich schwächer wurde. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur konnte mit DC kein Edukt mehr detektiert werden. Daraufhin wurden das Lösungsmittel und das Reagenz im Vakuum entfernt, wobei für beide Vernetzer ein farbloses Öl erhalten wurde. Diese Substanzen wurden ohne eingehende Charakterisierung mit dem Hydrochlorid des Doxorubicin umgesetzt. Da für die folgende Dimerisierung der pH-Wert von entscheidender Bedeutung ist, wurden die öligen Rückstände der reaktiven Aminooxyverbindungen weiter im Hochvakuum getrocknet. Nach vollständiger Entfernung letzter TFA-Spuren erfolgte die bioorthogonale Modifikation des Arzneistoffs unter Ausbildung zweier Oxime mit dem aliphatischen Keton des Doxorubicin.

Die Ausbildung der Oximbindung von Aminooxyverbindungen mit Anthracylinen ist eine gängige Synthese, welche in der Literatur schon mehrfach beschrieben wurde.[16-18] Bei äquimolarer Reaktandenkonzentration gelingt die Kondensation in Natriumacetatpuffer mit einem pH-Wert von 4.8 innerhalb von 24 Stunden mit hohen Ausbeuten.[19] Aus diesem Grund wurde die Umsetzung der beiden aktiven Aminooxy-Gruppen in ähnlicher Weise durchgeführt. Dafür wurde das jeweilige reaktive Vernetzerreagenz zur verbesserten Löslichkeit in DMF aufgenommen und zwei Äquivalente Doxorubicin-Hydrochlorid gelöst in 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8) dazugegeben. Der Umsatz der Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt (Abbildung 25). Nach wenigen Stunden war bereits eine deutliche Abnahme des Doxorubicin-Peaks (25.01 min) zu erkennen, und zwei weitere Peaks konnten im Chromatogramm beobachtet werden. Diese beiden Spezies entsprechen dem jeweiligen Dimer **7** (21.73 min) respektive **8** sowie der Vernetzerverbindung mit nur einem Doxorubicin-Molekül (20.63 min). Mit zunehmender Reaktionsdauer verschwand der Peak des Vernetzer-Moleküls mit einem Äquivalent Doxorubicin, wobei der Produktpeak demzufolge zunahm. Gemäß HPLC war die Umsetzung zu **8** nach 24 h vollständig abgeschlossen. Dies war allerdings für das Doxorubicin-Dimer **7** nicht der Fall, so dass die Aufreinigung erst nach 48 h durchgeführt wurde. Für die Aufreinigung der Konjugate wurde neben Acetonitril

neutraler 25 mM Triethylammoniumacetatpuffer (pH 7) unter Verwendung eines linearen Gradienten gebraucht. Die typischerweise gängigen Eluenten mit 0.1 % TFA waren bei der Aufreinigung von **7** und **8** nicht praktikabel, da die äußerst sauren Bedingungen das entstandene Oxim teilweise schon wieder hydrolysierten.

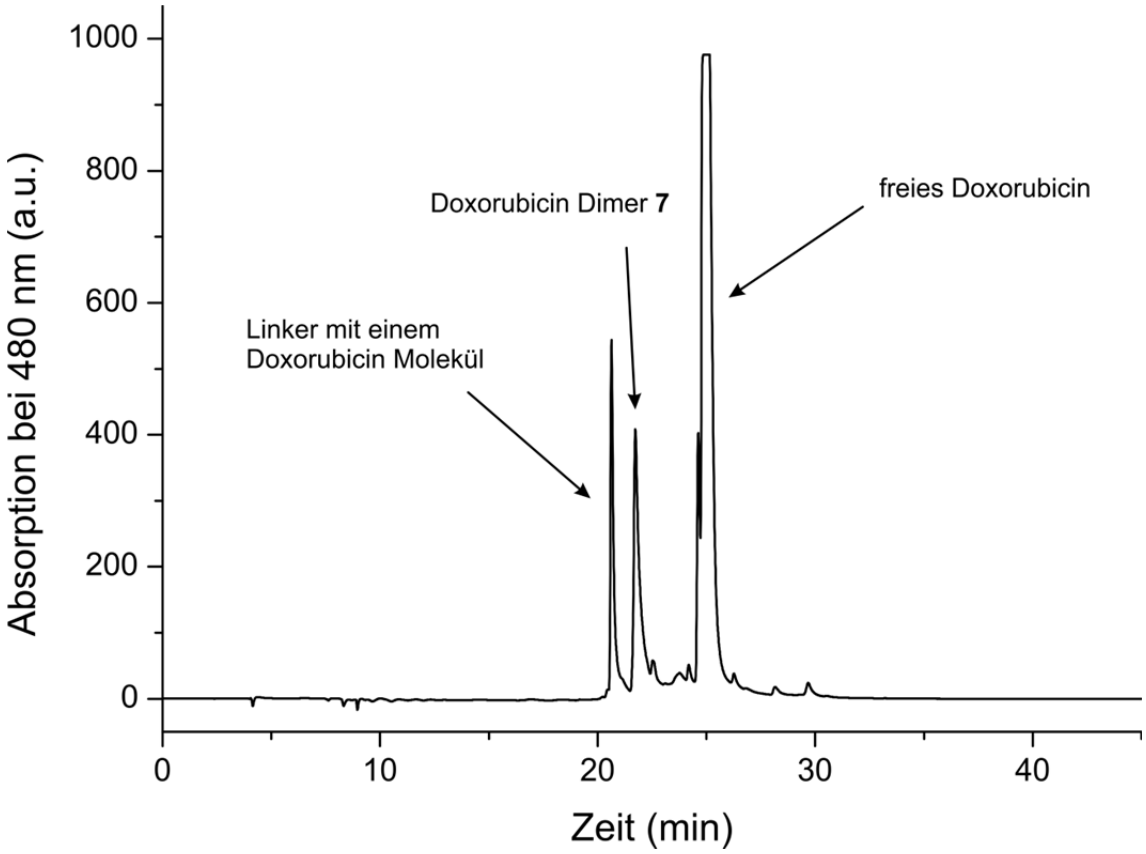


Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm einer Probe der Reaktionsmischung zur Darstellung des Doxorubicin-Dimers **7** – aufgenommen nach 1 h Reaktionszeit

Die durch HPLC isolierten Produktfraktionen wurden nach erfolgter Aufreinigung unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und darauffolgend im Hochvakuum getrocknet. Um überschüssiges Triethylammoniumacetat zu entfernen, wurde der Rückstand in Methanol gelöst, in Diethylether ausgefällt und anschließend das rote Produkt abfiltriert.

Neben NMR-Spektroskopie wurden die beiden isolierten Doxorubicin-Dimere mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Das Massenspektrum des Dimers mit dem flexiblen Rückgrat ist in Abbildung 26 dargestellt. In dem Spektrum ist eindeutig ersichtlich, dass sowohl kein freies Doxorubicin (M = 543.52 g/mol) als auch kein Vernetzermolekül mit nur einem Äquivalent Arzneistoff (M = 819.81 g/mol) vorhanden sind. Im vergrößerten Teil des Massenspektrums von **8** ist lediglich zu erkennen, dass

der Zucker Daunosamin des Anthracyclins zu einem geringen Anteil nicht mehr gegenwärtig ist.

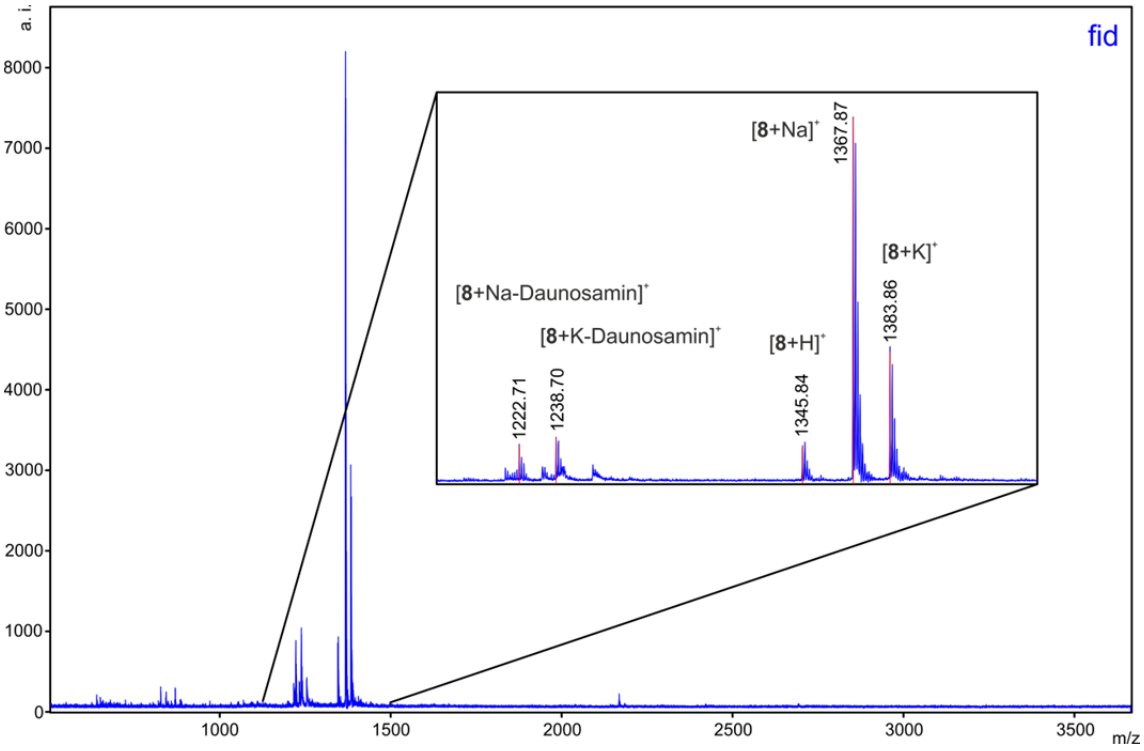


Abbildung 26: MALDI-TOF-Massenspektrum des isolierten Doxorubicin-Dimers **8** (Matrix: DHB)

Das dimere Doxorubicin-Molekül mit rigidem Vernetzerrückgrat zeigte bei der massenspektrometrischen Analyse durch MALDI-TOF in ähnlicher Weise ein Fehlen des Zuckerrestes. Nach eingehenden Untersuchungen von **7** durch NMR-Spektroskopie konnte jedoch gezeigt werden, dass Daunosamin noch vollständig vorhanden war. Eine plausible Erklärung für dieses Phänomen beruht auf der massenspektrometrischen Messmethode, da es durch die verwendete Laserintensität höchst wahrscheinlich zu einer Fragmentierung des Produktes kam. Anhand von 2D-NMR-Experimenten (H,H-COSY; H,H-NOESY) konnte darüber hinaus die Struktur von **7** vollständig aufgeklärt werden (Abbildung 27).

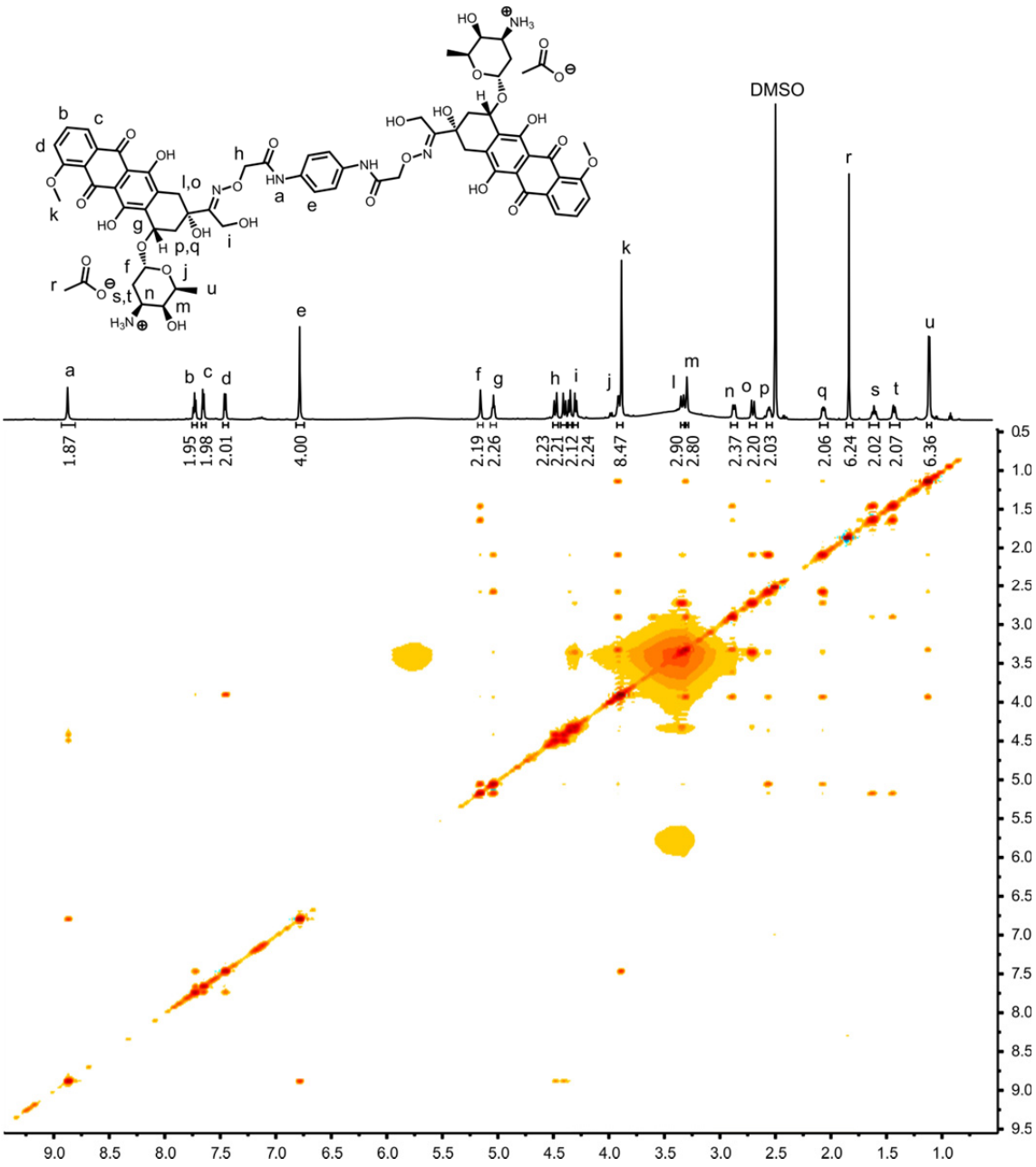


Abbildung 27: H,H-NOESY-Spektrum von Verbindung **7** in DMSO-d^6 (700 MHz)

In dem dargestellten Spektrum des dimeren Doxorubicin-Moleküls ist eindeutig zu erkennen, dass die Integrale des Zuckers Daunosamin mit denen des Anthrachinongerüstes übereinstimmen. Die Methylgruppe des Zuckers (**u**) liefert genau wie die aromatischen Signale des Anthracyclin (**b**-**d**) ein Integral von sechs Protonen, somit ist der Zucker vollständig vorhanden. Des Weiteren weisen die aromatischen Protonen der Vernetzerbrücke (**e**) das zu erwartende Integral von vier auf. Obwohl das ^{1}H-NMR-Spektrum von **7** in deuteriertem DMSO aufgenommen wurde, können keine scharfen Signale für die Hydroxygruppen des Doxorubicin detektiert werden. Im

Gegensatz dazu sind die aciden Protonen der Amide des Vernetzers (**a**) im Tieffeld eindeutig zu erkennen. Das Fehlen von Signalen bei 0.93 sowie 2.43 ppm zeigt, dass unerwünschtes Triethylamin aus Pufferrückständen durch das Ausfällen ausnahmslos entfernt werden konnte. Das Singulett bei 1.84 ppm entspricht nicht etwa der Essigsäure des Puffers, sondern stellt die Methylgruppen der beiden Acetatgegenionen von Daunosamin dar. Daher gehen von diesem Signal auch keine Kopplungen zu anderen Protonen von **7** aus.
Die Acetatgegenionen spielen in den folgenden Anwendungen eine wichtige Rolle, da diese die Wasserlöslichkeit der Doxorubicin-Dimere **7** und **8** vermitteln, was die Substanzen für biologische und medizinische Forschungsgebiete äußerst interessant macht.

3.1.2 Bestimmung der DNA-Bindungsaffinität

3.1.2.1 Allgemeiner Hintergrund

Wie in dem vorangegangen Abschnitt bereits erläutert können dimere Doxorubicin-Moleküle durch ihre erhöhte DNA-Bindungsaffinität verstärkte zytotoxische Eigenschaften aufweisen. Um diese Hypothese anhand der dargestellten Verbindungen **7** und **8** zu überprüfen, wurden zunächst deren Bindungskonstanten bestimmt.
Aufgrund einfacher thermodynamischer Prinzipien ist die DNA-Bindungsaffinität von bisinterkalierenden Substanzen, wie dimeren Doxorubicin-Spezies, verglichen mit der monomeren Einheit typischerweise um ein Vielfaches höher.[5] Um derartige Affinitätskonstanten zu bestimmen, sind traditionelle spektrophotometrische Methoden weitgehend ungeeignet.[4] Dennoch kann unter Berücksichtigung einer komplexen Gleichung, die von Mc Ghee entwickelt wurde, die Bindungskonstante für große Liganden, welche mit DNA wechselwirken, berechnet werden.[20] Dafür muss zunächst unter enormem Aufwand die DNA-Schmelztemperatur alleine sowie in Gegenwart sättigender Konzentrationen des Liganden bestimmt werden. Darüber hinaus muss die Bindungsenergie durch dynamische Differenzkalorimetrie zusätzlich ermittelt werden.[3] Mit Hilfe dieser Parameter kann anschließend die Bindungskonstante bestimmt werden.
Weitere Methoden, wie Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, dynamische Lichtstreuung oder isotherme Titrationskalorimetrie, die zur Bestimmung von ähnlich hohen Bindungsaffinitäten eingesetzt werden, sind jedoch bei der Untersuchung der

hier verwendeten Doxorubicin-DNA-Systeme ebenso unbrauchbar, da unter anderem hohe Konzentrationen sowie eine Oberflächenimmobilisierung angewendet werden muss.[21,22]

3.1.2.2 Mikromaßstab-Thermophorese

Die kürzlich von Nano Temper Technologies GmbH in München entwickelte Mikromaßstab-Thermophorese ermöglicht es, die vorangegangenen Probleme zu überwinden.[23] Mit Hilfe dieser neuen Technologie können Bindungsaffinitäten bis hin zu Picomol-Bereichen innerhalb kürzester Zeit bei äußerst geringem Probenverbrauch in Lösung gemessen werden.[24] Diese kostengünstige und hoch sensitive Methode beruht auf dem Prinzip der Thermophorese, der gerichteten Bewegung von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten.[25] Die Mikromaßstab-Thermophorese ist eine rein optische Methode, bei der lediglich Fluoreszenzunterschiede in Abhängigkeit von Temperaturänderungen in einem Volumen von weniger als 1 µl bestimmt werden. Um solch kleine Volumina zu untersuchen, wird die MST-Messung in Glaskapillaren durchgeführt. Dabei kann sowohl die Emission von mit Fluorophoren markierten Biomolekülen als auch die intrinsische Fluoreszenz von Biomolekülen, wie beispielsweise Tryptophan, detektiert werden.[21] Der experimentelle Aufbau der MST ist denkbar einfach und entspricht annähernd dem eines Fluoreszenzmikroskops, wobei die Detektion der emittierten Photonen sowohl über einen Photomultiplier als auch eine CCD-Kamera erfolgen kann.[21,26,27] Um den Temperaturanstieg von 1-6 K ausgehend von Raumtemperatur zu initiieren, welcher die Thermophorese in den Glaskapillaren induziert, werden üblicherweise Infrarotlaser eingesetzt.[22,28] Dabei wird der Temperatursprung für einen gewissen Zeitraum (circa 30 Sekunden) konstant gehalten. Bevor jedoch die Thermophorese in Gang gesetzt wird, muss zunächst die Fluoreszenz der in der Kapillare befindlichen Lösung bestimmt werden. Dieser Prozess dauert wenige Sekunden, und die detektierte Fluoreszenz wird anschließend normiert. Im Anschluss daran wird mit dem Laser der notwendige Temperaturgradient erzeugt, wobei innerhalb weniger Millisekunden eine deutliche Verminderung der Fluoreszenz beobachtet wird. Dieser sehr schnelle Vorgang ist allerdings Thermophorese-unabhängig und wird durch die temperaturabhängigen Fluoreszenzeigenschaften des Chromophors bestimmt.[26,29] Dennoch wird durch den Temperaturanstieg die thermophoretische Molekülbewegung in den Glaskapillaren induziert, wobei die Fluoreszenz sowohl weiter abnehmen (positive Thermophorese) als auch zunehmen kann (negative Thermophorese). Nach dem Erwärmen der Lösung für ungefähr 30 Sekunden wird bei der Fluoreszenzdetektion ein Plateau beobachtet. In diesem

stationären Zustand gleichen sich Thermodiffusion und Massendiffusion aus (Abbildung 28; D).[22] Daraufhin wird der Infrarotlaser abgeschaltet, und ein Großteil der ursprünglichen Fluoreszenz wird aufgrund der Fluorophoreigenschaften rasch wieder hergestellt. Die vollständige Ursprungsfluoreszenz wird anschließend durch Zurückdiffusion der Fluorophor-markierten Moleküle erzeugt (Abbildung 28; F).[29]

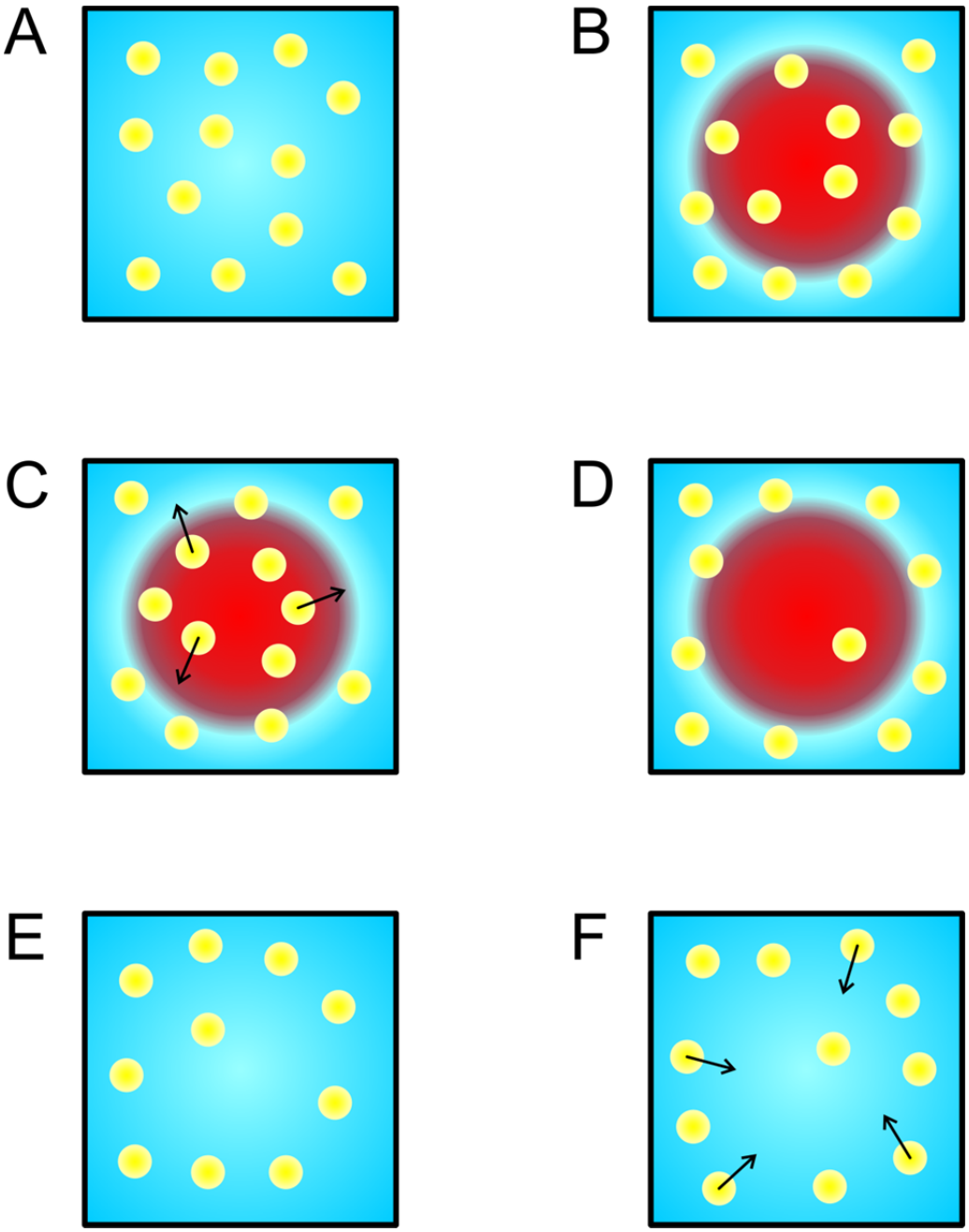


Abbildung 28: Schematische Darstellung der molekularen Vorgänge beim MST-Experiment; (A) Ausgangszustand (B) Anschalten des Infrarotlaser (C) positive Thermophorese (D) Stationärer Zustand (E) Ausschalten des Infrarotlaser (F) Zurückdiffusion

Die Änderung der Fluoreszenz während einer MST-Messung steht in direktem Zusammenhang mit den thermophoretischen Eigenschaften des verwendeten Moleküls. Hierbei wird die Thermophorese von Größe, Ladung, Solvatationshülle und -entropie bestimmt.[26,28] Diese molekülspezifischen Eigenschaften können zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten herangezogen werden, und über deren reziproken Wert kann die Bindungsaffinität respektive Bindungskonstante ermittelt werden. Dafür wird zunächst einer der beiden Bindungspartner mit einem Fluorophor markiert und dessen thermophoretischen Eigenschaften untersucht. Danach wird eine Lösung mit konstanter Konzentration der fluoreszierenden Substanz mit verschiedenen Konzentrationen des anderen Bindungspartners titriert. Dadurch werden für den ungebundenen sowie die verschiedenen Bindungszustände bis hin zu einer Sättigung entsprechend unterschiedliche Fluoreszenzsignale bei der MST detektiert. Die erhaltene Fluoreszenz wird im Anschluss daran gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration aufgetragen, wobei durch Hinzufügen einer Trendlinie der charakteristische sigmoidale Kurvenverlauf erhalten wird. Die Funktion der Trendlinie kann durch Berücksichtigung des Massenwirkungsgesetzes ausgedrückt werden und somit die Dissoziationskonstante liefern.[22,28,29]

3.1.2.3 Untersuchung von Anthracyclin-DNA-Interaktionen durch MST

Obwohl das Prinzip der Mikromaßstab-Thermophorese erst seit wenigen Jahren eine praktische Anwendung findet, wurden mit Hilfe dieser Methode schon eine Reihe von Protein-Protein, Protein-Nukleinsäure, Antikörper-Antigen sowie Ligand-Rezeptor-Interaktionen untersucht.[30] Nichtsdestotrotz, bis zum heutigen Tag ist keine Literatur bekannt, die sich mit der Erforschung von Anthracyclin-DNA-Wechselwirkungen beschäftigt, sodass vorab die Interaktion von Doxorubicin mit einer doppelsträngigen Modell-DNA untersucht wurde.

Die durch MST ermittelten Bindungsaffinitäten wurden mit einem Nano Temper Monolith NT.115 Gerät bestimmt. Da der Arzneistoff *per se* ein Fluorophor darstellt, wurde zunächst dessen Interaktion mit DNA überprüft. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass aufgrund der geringen Fluoreszenzintensität des Doxorubicin keine verwertbaren Thermophorese-Daten erhalten werden können.

Um dieser Problematik entgegen zu wirken, wurde darauffolgend eine doppelsträngige DNA verwendet, welche aus 36 zufälligen Basenpaaren zusammengesetzt und mit einem Cyanin-Farbstoff (Cy5) markiert ist. Das Absorptions- und Emissionsprofil dieses Farbstoffs erfüllt hervorragend die durch das Gerät gegebenen Anforderungen (Absorption: 600-650 nm; Emission: 670-690 nm), ohne dabei mit den

spektroskopischen Eigenschaften des Arzneistoffs zu konkurrieren.[23] Folglich wurde eine 100 nM Lösung der markierten DNA mit Doxorubicin in einem speziellen Puffergemisch titriert. Dieser Puffer enthält unter anderem Tween 20 als nichtionisches Tensid. Dadurch kann Aggregation verhindert werden, welche die MST-Messung verfälschen würde. Unter diesen Bedingungen lieferte das MST-Experiment die charakteristische sigmoidale Bindungskurve (Abbildung 29), über deren Funktion die Dissoziationskonstante respektive Bindungskonstante bestimmt werden konnte.

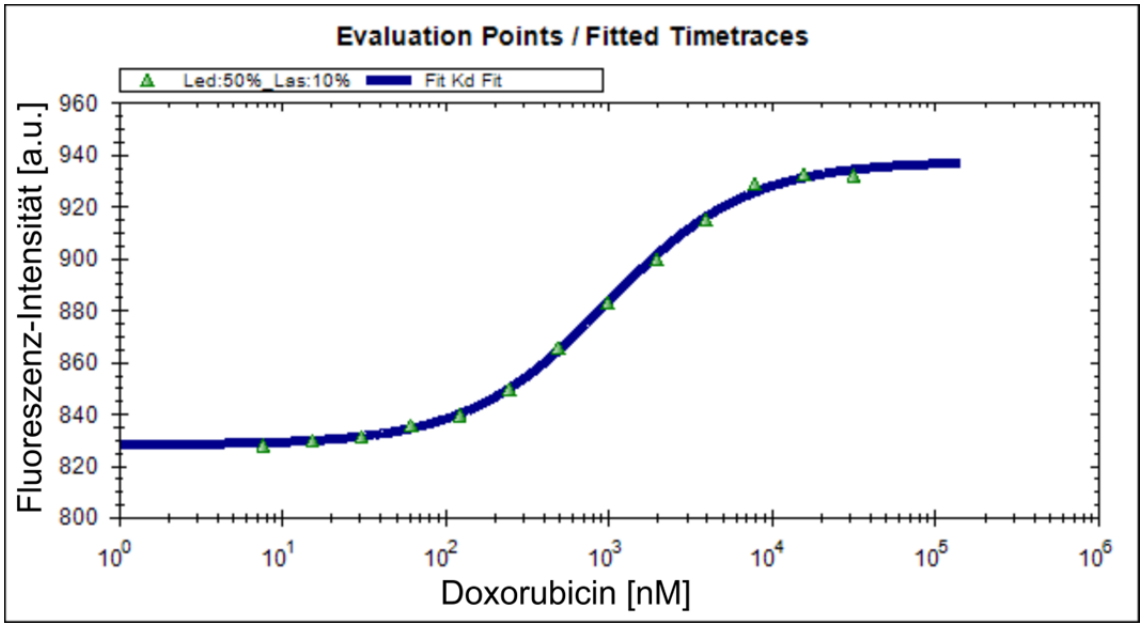


Abbildung 29: Graphische Darstellung der beim MST-Experiment erhaltenen Fluoreszenz-Intensitäten in Abhängigkeit von der Doxorubicin-Konzentration

Die bei der Messung erhaltene Dissoziationskonstante konnte zu 928 nM bestimmt werden. Anhand des erhaltenen charakteristischen sigmoidalen Kurvenverlaufs kann diese sogar mit bloßem Auge erkannt werden, da der Wendepunkt des Graphen dem Wert entspricht. Die Berechnung der Bindungsaffinität von Doxorubicin zu der Modell-DNA ergab somit K_A = 1.1 x 10^6 M^{-1}.

Um sicherzustellen, dass die Bindungsaffinitäten auf Doxorubicin-DNA und nicht etwa auf Doxorubicin-Farbstoff-Wechselwirkungen beruhen, wurde ebenfalls der freie Farbstoff mit dem Anthracyclin titriert. Hierbei konnte jedoch keine Thermophorese detektiert werden. Somit kann schlussgefolgert werden, dass die Bindung ausschließlich auf Doxorubicin-DNA-Wechselwirkungen beruht.

Die durch klassische Methoden bestimmten Bindungsaffinitäten zwischen Anthracylinen und DNA-Molekülen weisen eine extreme Uneinheitlichkeit beziehungsweise signifikante Unterschiede auf. So haben Schneider *et al.* eine

Bindungskonstante für das Daunorubicin-Heringssperma-DNA-System von K_A = 1.0 x 10^5 M^{-1} bestimmt, wohingegen mit dem äquivalenten System von Leng *et al.* K_A = 1.6 x 10^7 M^{-1} ermittelt wurde.[5,31] Dies bedeutet, dass für das gleiche System die Werte um den Faktor 100 variieren können. Dadurch ist ein Vergleich des durch MST erhaltenen Wertes für Doxorubicin mit den Literaturdaten nicht besonders praktikabel. Nichtsdestotrotz kann durch MST-Untersuchung von **7** und **8** bestimmt werden, ob die beiden Dimere über eine stärkere DNA-Bindung als Doxorubicin verfügen.

Bei der MST-Messung des Doxorubicin-Dimers mit dem rigiden Vernetzerrückgrat (**7**) zeigte die Bindungskurve im Vergleich zu Doxorubicin zwei Wendepunkte. Dadurch konnten dementsprechend auch zwei Bindungskonstanten bestimmt werden. Dabei wurde zum einen eine Bindungskonstante von K_A = 4.0 x 10^6 M^{-1} ermittelt, was bereits einem stärkeren DNA-Bindungsvermögen entspricht, und zum anderen K_A = 1.1 x 10^8 M^{-1}, welche eine wesentlich stärkere Bindung zwischen **7** und DNA darstellt.

Unter Berücksichtigung der Struktur von **7** ist das Auftreten verschiedener Bindungskonstanten beziehungsweise Bindungszustände ein realistisches Szenario. Bei genauerer Betrachtung kann sich das Molekül nicht nur wie ein Bisinterkalator (Abbildung 30; A) verhalten, sondern theoretisch auch zwei DNA-Moleküle (Abbildung 30; B) binden sowie ebenso einfach interkalieren (Abbildung 30; C). Für den Fall, dass das Dimer einfach interkaliert, müsste eine Bindungskonstante zu erwarten sein, die der des Doxorubicin entspricht oder sogar möglicherweise geringer ist. Somit kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass der Bindungsmodus C in der folgenden Abbildung beim MST-Experiment beobachtet wurde. Demgegenüber können die beiden anderen Bindungsmodi mit einer größeren Bindungsstärke verknüpft werden. Da der Zustand der Bisinterkalation mit der stärksten Bindung assoziiert werden kann, müsste somit dementsprechend K_A = 1.1 x 10^8 M^{-1} Bindungsmodus A zugeordnet werden. Demzufolge ergibt sich für Bindungszustand B K_A = 4.0 x 10^6 M^{-1}. Dennoch sind beide Bindungskonstanten höher als der von Doxorubicin durch MST bestimmte Wert.

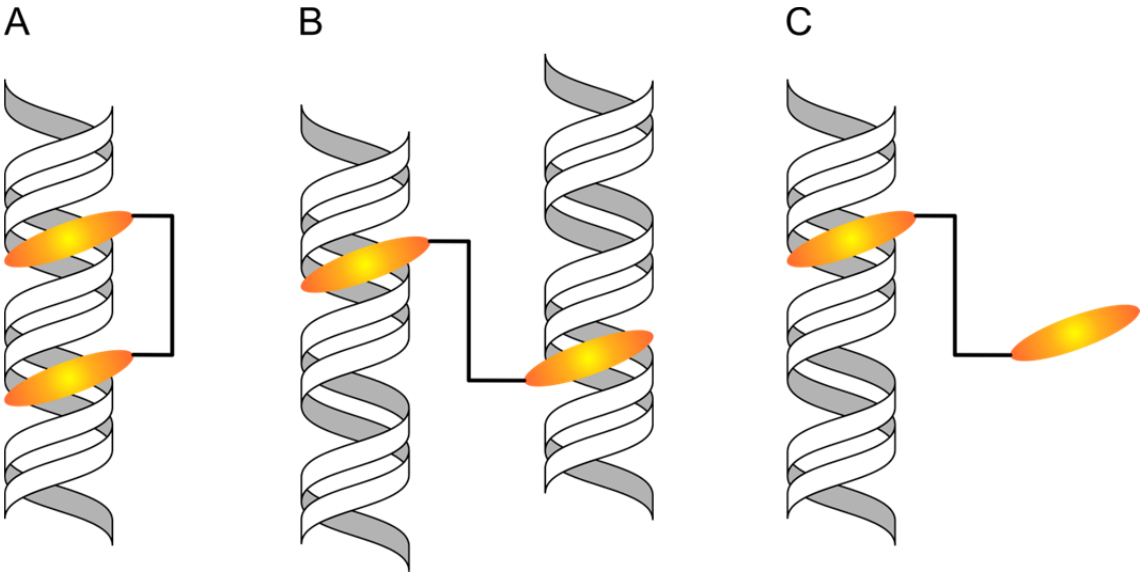


Abbildung 30: Schematische Darstellung der möglichen DNA-Bindungsmodi von **7**; A: Bisinterkalation; B: Interkalation in zwei DNA-Moleküle; C: einfache Interkalation

Um zu überprüfen, ob das oben näher erläuterte Bindungsverhalten auch auf das Doxorubicin-Dimer mit dem flexiblen Ethylenoxid-Rückgrat (**8**) zutrifft, wurde dieses ebenfalls mit MST untersucht. Hierbei war jedoch zu beobachten, dass in Analogie zu Doxorubicin nur eine Bindungskonstante auftrat. Daraus kann abgeleitet werden, dass das Vorhandensein mehrerer Bindungszustände keine generelle Eigenschaft von dimeren Doxorubicin-Molekülen sein muss. Vielmehr könnte die Vernetzerbeschaffenheit einen entscheidenden Einfluss auf dieses Phänomen haben. Das Doxorubicinderivat mit der flexiblen Ethylenoxid-Brücke hat aufgrund der größeren Beweglichkeit des Dimer-Rückgrats wahrscheinlich eine höhere Tendenz zur Bisinterkalation. Demgegenüber könnte diese Fähigkeit für **7** nicht so stark ausgeprägt sein, wodurch verschiedene DNA-Bindungsmodi ermöglicht werden. Ungeachtet dessen wurde durch die MST-Messung die Bindungskonstante von **8** mit K_A = 4.7 x 10^6 M^{-1} bestimmt. Das bedeutet, dass auch dieses Dimer zu der Modell-DNA eine weitaus stärkere Bindung als Doxorubicin aufweist. Dabei liegt der erhaltene Wert zwischen den beiden für **7** beobachteten Bindungskonstanten.

3.1.3 Untersuchung der intrazellulären Arzneistoffverteilung durch Fluoreszenzmikroskopie

Da durch Mikromaßstab-Thermophorese gezeigt werden konnte, dass beide synthetisierten Doxorubicin-Dimere eine höhere Affinität zu DNA-Molekülen aufweisen, gilt es nun zu überprüfen, ob und wie effizient diese ihren Wirkort erreichen können.

Dafür wurden HeLa-Zellen für 24 Stunden mit einer 20 µM Lösung des entsprechenden Dimers inkubiert und anschließend deren intrazelluläre Arzneistoffverteilung mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

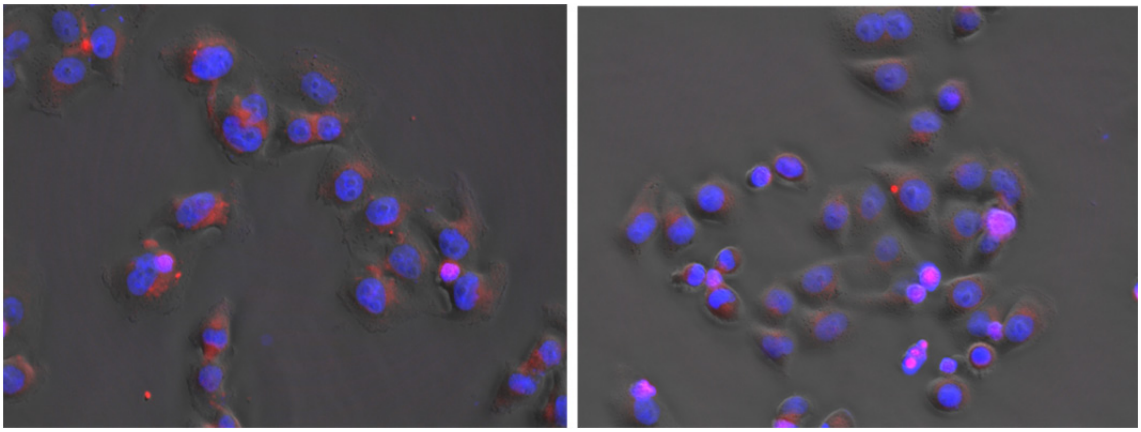


Abbildung 31: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellaufnahme der beiden dimeren Doxorubicin-Moleküle – aufgenommen nach 24-stündiger Inkubation einer 20 µM Lösung von **7** (linke Tafel) und **8** (rechte Tafel) in HeLa-Zellen

Die erhaltenen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 31 zu erkennen. Hierbei ist die mit den Doxorubicinderivaten verbundene Fluoreszenz rot dargestellt. Die Anfärbung des Zellkerns wurde mit dem Hoechst-Farbstoff (Blaufärbung) durchgeführt. Nach 24-stündiger Inkubation zeigen sowohl **7** (linke Tafel) als auch **8** (rechte Tafel) nur eine moderate Zellaufnahme. Des Weiteren können die beiden Dimere nur in geringem Maße im Nukleus beobachtet werden, was anhand der Kolokalisation von Doxorubicin und Hoechst und der daraus resultierenden violetten Färbung erkennbar ist.

Obwohl **7** und **8** eine höhere DNA-Affinität als Doxorubicin zeigen, weisen die beiden Verbindungen nur eine schwache Zellinternalisierung sowie Akkumulation im Nukleus auf, was für eine starke Zytotoxizität unabdinglich ist. Um dieses Problem zu überwinden, müssten die Substanzen weiter funktionalisiert werden. Dabei könnte die Modifikation unter anderem mit einem Antikörper, welcher über Rezeptor-vermittelte Endozytose eine Anreicherung des Arzneistoffs in der Zelle ermöglicht, erfolgen. Darüber hinaus kann mit Antikörperkonjugaten auf überexprimierte Tumorzellantigene abgezielt werden, wodurch die Selektivität des Doxorubicinderivates erhöht wird. Somit stellt die Verknüpfung des toxischen Agens mit einem Antikörper einen vielversprechenden Modifikationsansatz dar. Aus diesem Grund wurde ein weiteres Doxorubicin-Dimer entworfen, welches die einfache Funktionalisierung mit Zellaufnahme-steigernden Biomolekülen gestattet. Die zwischen Dimer und Biomolekül

entstehende Bindung kann durch intrazelluläre Reduktionsmittel wie Glutathion wieder gespalten werden und dadurch die Freisetzung der toxischen Fracht ermöglichen. Auf die Darstellung und das DNA-Bindungsvermögen dieses neuartigen funktionalen Doxorubicinderivates wird in dem folgenden Abschnitt ausführlich eingegangen.

3.2 Funktionale Doxorubicin-Dimere

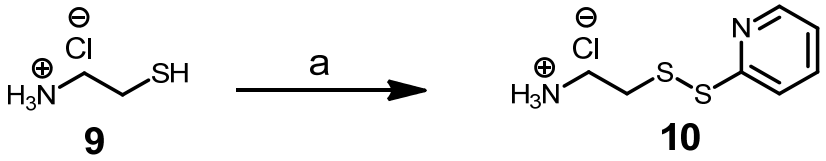
3.2.1 Synthese und Charakterisierung

Doxorubicin-Dimere, welche eine zusätzliche funktionelle Gruppe tragen, die zur Biokonjugation befähigt, sind eine äußerst kleine Molekülklasse. Die bereits dargestellten funktionalen Doxorubicin-Dimere sind zudem überaus hydrolyseempfindlich, wodurch deren Anwendung unter physiologischen Bedingungen limitiert wird.[32] Formal betrachtet besitzen die Verbindungen **7** und **8** mit ihren beiden Aminogruppen weitere funktionelle Gruppen, die zur Modifikation herangezogen werden können. Dieser Modifikationsansatz ist aufgrund der sich verringernden Löslichkeit und Zytotoxizität ungeeignet.

Um diese Problematik zu bewältigen, wurde daher ein neuartiger heterotrifunktionaler Vernetzer entwickelt. Dabei soll der Vernetzer neben zwei Aminooxy-Gruppen, welche zur Ausbildung von hydrolysestabilen Oximen mit Doxorubicin befähigen, eine weitere funktionelle Gruppe tragen, welche bioorthogonale Modifikationen erlaubt. Obwohl eine Vielzahl an funktionellen Gruppen dafür geeignet wäre, ist die Einführung eines 2-Pyridyldisulfides in der Biokonjugationschemie in vielerlei Hinsicht vorteilhaft. Im Vergleich zur „Click“-Chemie kann auf den Einsatz toxischer Kupferkatalysatoren verzichtet werden, da die Reaktion von Pyridyldisulfiden mit freien Thiolen unkatalysiert und in sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden kann.[33] Dabei kommt es zu einem raschen irreversiblen Disulfidaustausch, und der Farbstoff 2-Pyridinthion, welcher keine Nebenreaktionen eingehen kann, wird frei. Der Reaktionsverlauf lässt sich anhand der charakteristische Absorption des Chromophors bei 343 nm verfolgen.[34] Aufgrund des schnellen und irreversiblen Disulfidaustausches in Gegenwart von Sulfhydrylgruppen werden Pyridyldisulfide auch als aktivierte Thiole bezeichnet. Darüber hinaus kann das Pyridyldisulfid als Schutzgruppe fungieren, da es im Gegensatz zum freien Thiol bereits oxidiert vorliegt.

Um das reaktive 2-Pyridyldisulfid in den Vernetzer einzuführen, wurde daher zunächst 2-(2-Pyridyldithio)ethylamin-Hydrochlorid (**10**) dargestellt (Abbildung 32). Gemäß der Literatur wurde **9** mit einem Überschuss an 2,2´-Dipyridyldisulfid in Methanol

umgesetzt.[35] Nach dem Rühren über Nacht wurde das Reaktionsgemisch in Diethylether ausgefällt, der entstandene Niederschlag abfiltriert und zusätzlich mit Diethylether gewaschen. Die dabei erhaltene Substanz enthielt kleine Mengen an Pyridinthion, was an der gelblichen Färbung zu erkennen war, und wurde daher erneut in wenig Methanol gelöst und in Diethylether ausgefällt. Das erneute Ausfällen lieferte das Produkt **10** als farblosen Feststoff in hoher Ausbeute. Die Ausbildung des Disulfides von Cysteamin-Hydrochlorid konnte durch das Arbeiten in frisch entgastem Lösungsmittel unter Argon vermieden werden.



9 **10**

Abbildung 32: Darstellung des reaktiven 2-(2-Pyridyldithio)ethylamin-Hydrochlorid; (a) 2,2´-Dipyridyldisulfid (6 eq), MeOH, Argon, über Nacht, r.t., quantitative Ausbeute

Durch anschließende NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Charakterisierung von **10** konnte gezeigt werden, dass durch mehrfaches Umfällen das Produkt in ausgezeichneter Reinheit erhalten und somit ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden kann.

Das Protonenspektrum von 2-(2-Pyridyldithio)ethylamin-Hydrochlorid ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 33). Anhand der Integrale ist eindeutig zu erkennen, dass die vier aliphatischen Protonen (**f**, **g**) den zu erwartenden vier aromatischen Protonen (**a**, **c**, **d**, **e**) entsprechen. Des Weiteren kann das charakteristische breite Singulett bei 8.30 ppm dem protonierten Amin zugeordnet werden. Die Ethylensignale von **10** werden als Multiplett detektiert, wohingegen die aliphatischen Protonen von **9** zwei Tripletts bei 2.93 und 2.70 ppm ergaben. Mit Hilfe dieser Informationen und des erhaltenen Massenspektrums konnte das Vorhandensein von Edukten sowie eines Disulfides von Cysteamin-Hydrochlorid ausgeschlossen werden.

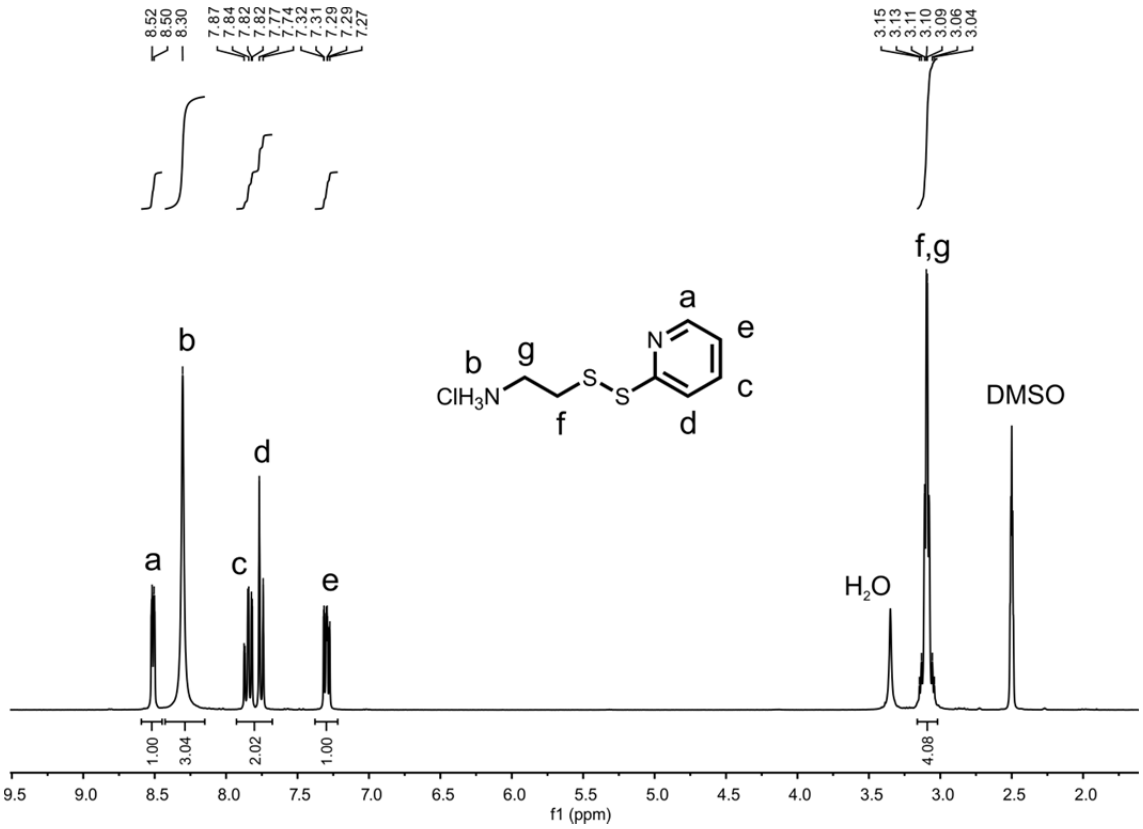


Abbildung 33: ^{1}H-NMR-Spektrum von 2-(2-Pyridyldithio)ethylamin-Hydrochlorid (**10**) in DMSO-d^6 (300 MHz)

Die geringe Größe sowie deren mannigfaltiges Repertoire an funktionellen Gruppen machen natürliche Aminosäuren zu einer potenten Ausgangssubstanz bei der Darstellung von Vernetzer-Systemen.[36] Die Aminosäure Lysin besitzt mit ihren beiden Aminogruppen und der Carbonsäure bereits drei funktionelle Gruppen. Durch Anwendung geeigneter Schutzgruppen können die unterschiedlichen Funktionalitäten selektiv modifiziert werden.

Daher wurde das kommerziell erhältliche N,N´-Di-Boc-L-Lysindicyclohexylammonium-Salz als Grundgerüst für den im Folgenden beschriebenen Vernetzer verwendet. Um das für die Biokonjugation benötigte reaktive Thiol in den Vernetzer einzuführen, wurde die geschützte Aminosäure mit **10** in DMF umgesetzt (Abbildung 34; a). Dabei wurde als Kupplungsreagenz TSTU, welches *in situ* einen NHS-Ester der Carbonsäure erzeugt, sowie die Hilfsbase DIPEA verwendet, um das benötigte unprotonierte Amin von **10** während der Reaktion zu generieren. Obwohl der Großteil des Dicyclohexylamin bei der Amidkupplung als Hydrochlorid ausfiel, wurde ein geringer Teil mit der Aminosäure verknüpft. Durch abschließende Aufreinigung an Kieselgel konnte **12** in 78 % Ausbeute als farbloses Öl erhalten werden. Im Anschluss daran

mussten zur weiteren Modifikation zunächst die *Boc*-Schutzgruppen entfernt werden. Unter den zahlreichen Entschützungsbedingungen hat sich erneut ein Gemisch von äquivalenten Anteilen an DCM und TFA als praktikabel erwiesen.[15] Die Entschützung war nach einer Stunde vollständig abgeschlossen. Gemäß Dünnschichtchromatographie konnte eine Substanz ungleich des Eduktes **12** detektiert werden. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels und des Reagenz wurde daher die entschützte Aminosäure ohne weitere Charakterisierung umgesetzt. Der erhaltene ölige Rückstand wurde im Hochvakuum weiter getrocknet, um das Vorhandensein von TFA weitestgehend zu minimieren. Da trotzdem das TFA-Salz der entschützten Verbindung vorliegt, wurden die Aminooxy-Gruppen mit **4** angefügt, denn eine *In-situ*-Kupplung mit **3** in Gegenwart von TSTU könnte zu Nebenprodukten durch TFA-Ankopplung führen. Um den Einfluss von TFA weiter zu reduzieren, wurde bei der Ausbildung der Amidbindung mit dem NHS-Ester ein Überschuss an DIPEA verwendet. Der vollständige Umsatz zu **13** gelang innerhalb weniger Stunden, und der Vernetzer konnte durch anschließende Aufreinigung an Kieselgel in hoher Reinheit als farbloser Feststoff erhalten werden. Die Gesamtausbeute über alle Stufen lag bei 58 % und ermöglichte somit die Darstellung des heterotrifunktionalen Vernetzers im Gramm-Maßstab aus leicht zugänglichen kommerziell erhältlichen Edukten.

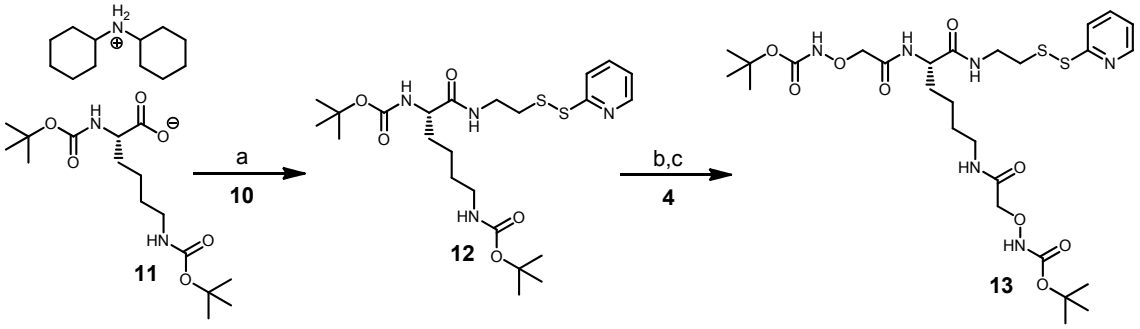


Abbildung 34: Synthese des heterotrifunktionalen Vernetzers **13**; (a) *N*,*N´*-Di-*Boc*-L-Lysindicyclohexylammonium-Salz (1 eq), **10** (1.1 eq), TSTU (1.1 eq), DIPEA (4 eq), DMF, Argon, 4 h, r.t., 78 % (b) DCM/TFA (1:1), 1 h, r.t., quantitative Ausbeute (c) DIPEA (10 eq), **4** (2 eq), DMF, Argon, 3 h, r.t., 81 %

Das Vernetzerreagenz sowie der synthetische Vorläufer **12** wurden eingehend mit NMR-Spektroskopie und MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Anhand der massenspektrometrischen Daten von **13** ist ersichtlich, dass beide Aminogruppen die geschützte Aminooxy-Funktionalität tragen. Darüber hinaus kann die strukturelle Identität der beiden Verbindungen mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Dabei können die amidischen Protonen sowie deren sich verändernde chemische

Verschiebung als ausgezeichneter Anhaltspunkt bei der Charakterisierung verwendet werden. Das Dublett des Amides, welches sich am chiralen C-Atom befindet, weist in **12** eine chemische Verschiebung von 6.83 ppm auf. Im Gegensatz dazu erscheint dieses Proton im Vernetzer hin zu 8.10 ppm tieffeldverschoben. Des Weiteren sind die neu vorhandenen Amide der Aminooxy-Funktionalitäten als Singulett bei 10.32 und 10.29 ppm im Protonenspektrum zu erkennen. Darüber hinaus können mit den ^{13}C-NMR-Spektren von **12** und **13**, welche in der nachfolgenden Abbildung dargestellt sind, zusätzliche Informationen gewonnen werden (Abbildung 35). Dabei wurde das „Attached Proton Test (APT)"-Experiment verwendet, hier sind sekundäre und quaternäre Kohlenstoffatome auf der Lösungsmittelseite sowie primäre und tertiäre auf der gegenüberliegenden Seite zu erkennen. Dadurch können die quaternären Amid-Kohlenstoffatome im Tieffeld leicht von den primären aromatischen Kohlenstoffatomen unterschieden werden. So kann ebenfalls das Auftreten zweier zusätzlicher Peaks bei 167.7 und 167.9 ppm (**b**) für **13** beobachtet werden (Abbildung 35; B). Diese beiden Signale entsprechen den neu formierten Amiden der Aminooxyessigsäure. Die Methylenkomponenten, welche die Aminooxy-Funktionalitäten tragen, liefern zwei Signale bei 74.8 respektive 74.6 ppm (**j**) und werden auf der Lösungsmittelseite detektiert, wie es für das sekundäre Kohlenstoffatom zu erwarten ist. Des Weiteren wird anhand des intensiven Peaks bei 27.9 ppm deutlich, dass die Schutzgruppe (**o**) von **13** nach wie vor vorhanden ist (Abbildung 35; B).

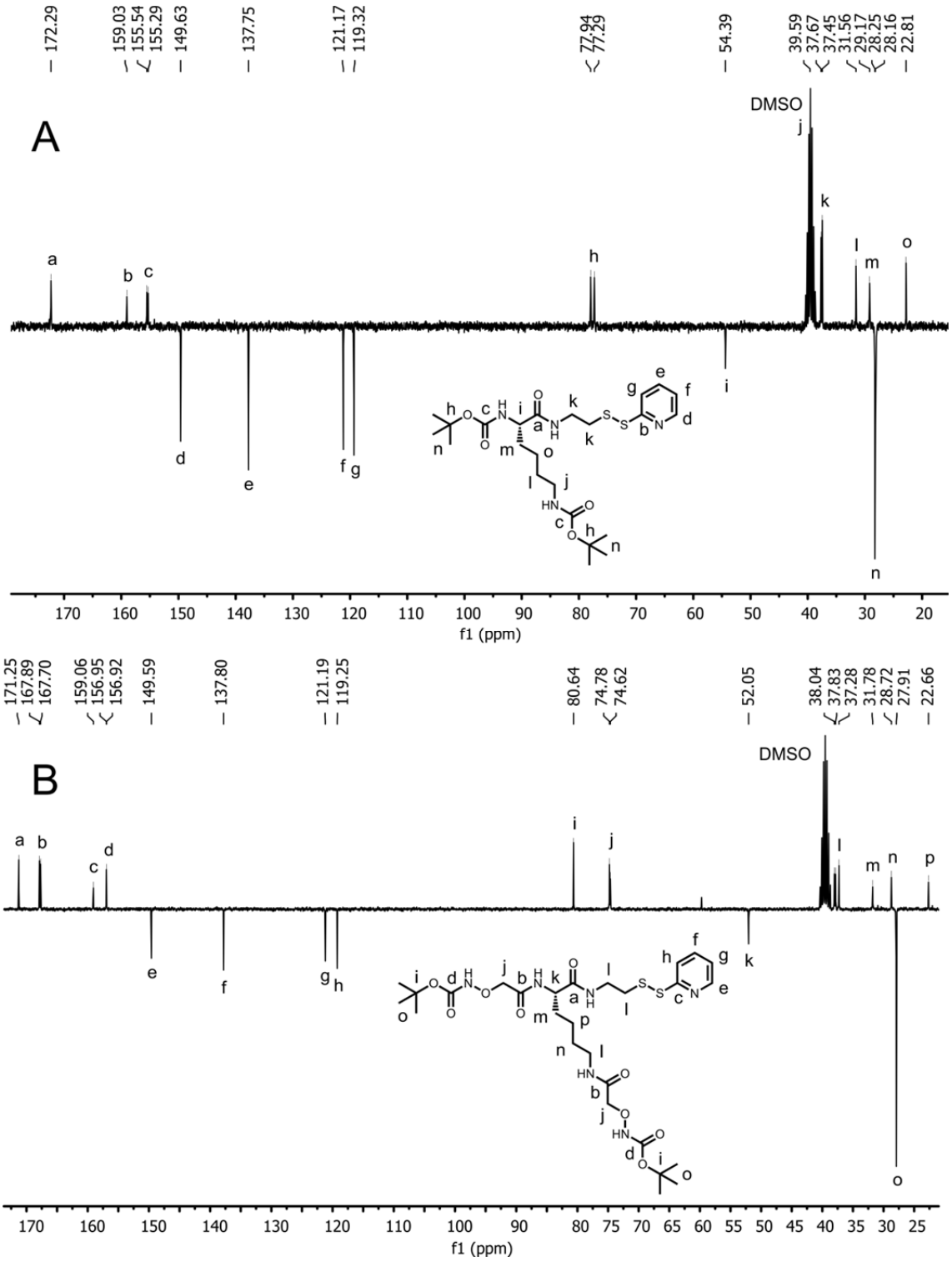


Abbildung 35: (A) ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **12** in DMSO-*d*^{6} (300 MHz, APT-Experiment), (B) ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **13** in DMSO-*d*^{6} (300 MHz, APT-Experiment)

Mit Hilfe der NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Charakterisierung von **13** konnte die Struktur des Vernetzers bestätigt werden, so dass anschließend die

Dimerisierung des Arzneistoffes durchgeführt werden kann. Dabei dient das 2-Pyridyldisulfid des Vernetzer-Moleküls nicht nur der Aktivierung des Thiols, sondern fungiert gleichzeitig als Schutzgruppe während der Ausbildung des Oxims mit Doxorubicin. Dadurch kann das Auftreten von intermolekularer Disulfidbildung vermieden werden.

Um das funktionale Doxorubicin-Dimer **14** darzustellen, wurden zunächst die *Boc*-Schutzgruppen mit einem Gemisch von TFA in DCM entfernt. Nach einer Stunde Reaktionszeit war die Entschützung bereits vollständig abgeschlossen, und nur eine einzige Substanz konnte durch Dünnschichtchromatographie beobachtet werden. Das Lösungsmittel und TFA wurden im Vakuum entfernt, und der ölige Rückstand wurde mit einem Überschuss an Doxorubicin in einem Gemisch aus DMF und Natriumacetatpuffer umgesetzt (pH 4.8). Das Voranschreiten der Reaktion wurde mittels analytischer RP-HPLC überprüft. Dabei war zu beobachten, dass der Produktpeak und der Peak von Doxorubicin nahe beieinander lagen. Nach 24 h konnte keine Weiterentwicklung anhand der erhaltenen Chromatogramme detektiert werden. Aufgrund der Nähe der Peaks von **14** und Doxorubicin wurde die Reaktionsmischung zunächst durch GPC an Bio-Gel P2 unter Verwendung von neutralem Triethylammoniumacetatpuffer als Eluent aufgereinigt. Diese Prozedur führte zur erfolgreichen Entfernung des Überschusses an Doxorubicin. Durch anschließende Aufreinigung mittels präparativer RP-HPLC konnte das Produkt isoliert werden.

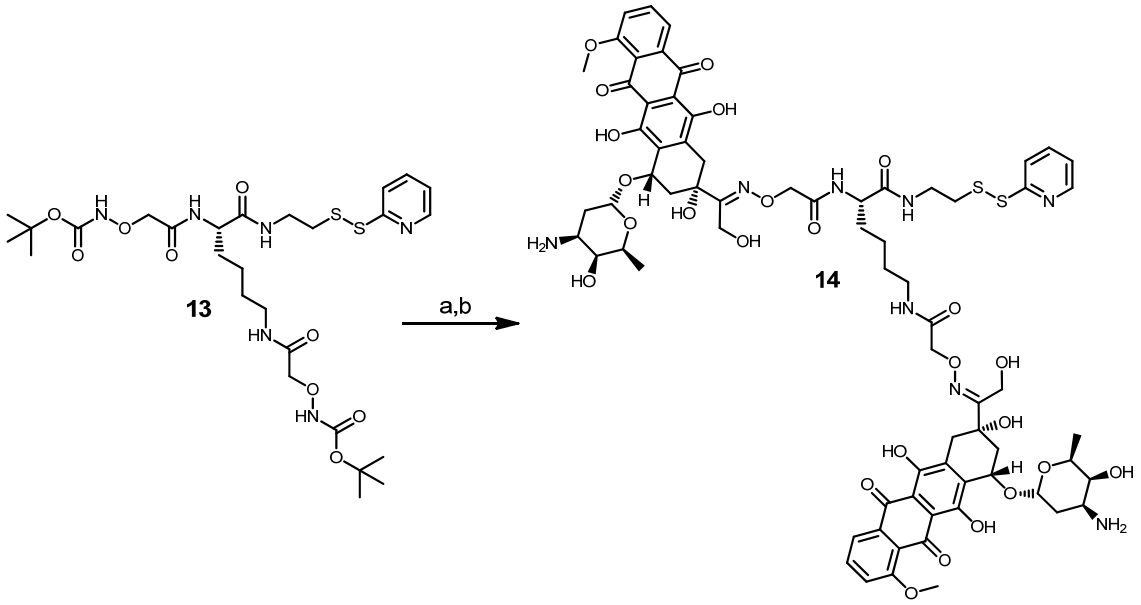


Abbildung 36: Modifikation des Vernetzer **13** mit Doxorubicin; (a) DCM/TFA (1:1), 1 h, r.t., quantitative Ausbeute (b) Doxorubicin-Hydrochlorid (2.2 eq), 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8), DMF, 24 h, r.t., 71 %

Die entsprechende Masse des isolierten funktionalen Doxorubicin Dimers konnte im MALDI-TOF-Spektrum detektiert und die vollständige Sturkturaufklärung von **14** durch geeignete 2D-NMR-Experimente (COSY, NOESY, TOCSY) erreicht werden. Das Protonenspektrum der synthetisierten Verbindung ist in Abbildung 37 dargestellt. Anhand der Aromatensignale der Pyridyl-Gruppe und des Doxorubicin ist das zu erwartende Verhältnis eindeutig zu erkennen, da für Peak **a** genauso wie für die beiden Peaks von **f** ein Integral von 1 erhalten wird. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass noch freies Doxorubicin vorhanden ist. Wie schon bei den vorangegangen Verbindungen beobachtet wurde, können die aliphatischen Hydroxygruppen sowie die phenolischen Protonen des Arzneistoffs kaum ausgemacht werden. Lediglich Peak **i** kann Hydroxygruppen zugeordnet werden. Um welche genau es sich dabei handelt, konnte jedoch auch durch 2D-NMR-Spektroskopie nicht aufgeklärt werden. Durch die COSY-, NOESY- und TOCSY-Experimente wurde aber dennoch gezeigt, dass sich eine Vielzahl von Signalen unter dem Peak von Wasser befindet. Diese Protonen sind durch den Buchstabe **o** der in Abbildung 37 dargestellten Struktur veranschaulicht. Im Vergleich zu den beiden dargestellten Doxorubicinderivaten **7** und **8** kann das Acetatgegenion im NMR-Spektrum nicht detektiert werden, da andernfalls ein scharfes Singulett um 2 ppm wie in Abbildung 27 zu sehen wäre. Dies führt dazu, dass das Diamin von **14**, im Gegensatz zu einem entsprechenden Acetat-Salz, nur eine geringe Wasserlöslichkeit aufweist. Trotzdem kann es aufgrund der Basizität des freien aliphatischen Amins leicht in sauren sowie neutralen Acetat- und Phosphatpuffern protoniert beziehungsweise gelöst werden. Eine ausreichende Wasserlöslichkeit von **14** ist für die folgenden Biokonjugationschritte unabdinglich, da hierbei ausschließlich im wässrigen Medium gearbeitet werden kann.

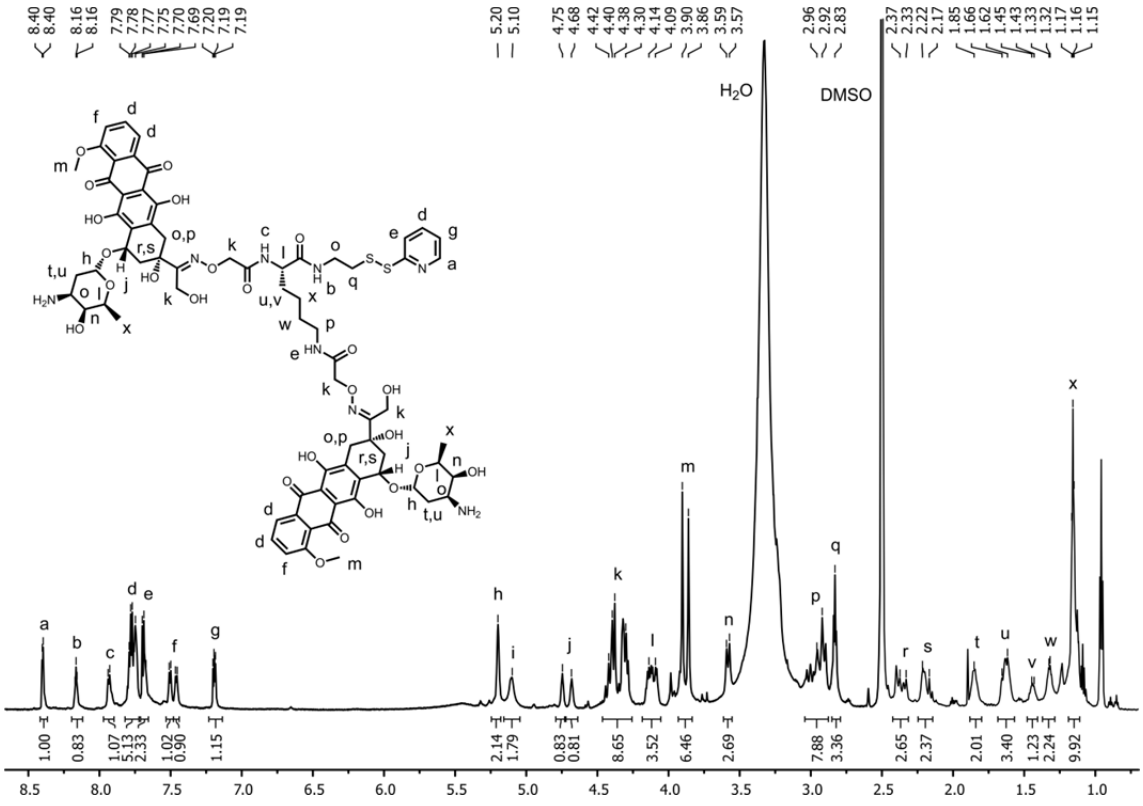


Abbildung 37: ^{1}H-NMR-Spektrum des neuartigen funktionalen Doxorubicin-Dimers in DMSO-d^{6} (700 MHz)

Neben NMR-Spektroskopie und MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde das funktionale Doxorubicin-Dimer mit RP-HPLC charakterisiert. Dadurch konnte die Reinheit der isolierten Substanz bestimmt werden, wobei kein signifikanter Peak für freies Doxorubicin erhalten wurde. Das HPLC-Chromatogramm von **14** ist in Abbildung 38 dargestellt. Dafür wurde eine 1 mM Lösung in phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7.4) angesetzt und 15 µl dieser Lösung in das Gerät injiziert. Das Chromatogramm wurde bei der charakteristischen Absorption von Doxorubicin bei 480 nm aufgenommen und lieferte eine Retentionszeit von 23.23 Minuten für das funktionale Doxorubicin-Dimer. Durch anschließende Peakintegration konnte die Reinheit von **14** mit 95.1 % bestimmt werden.

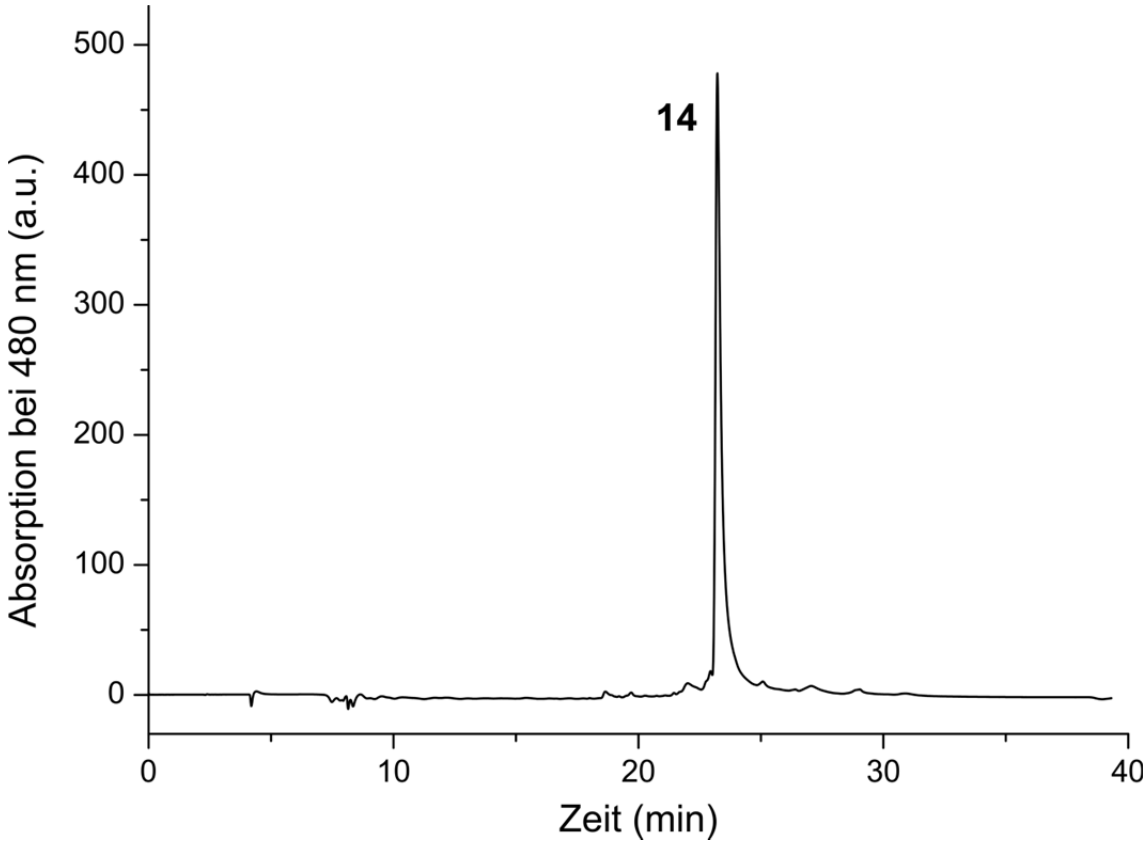


Abbildung 38: HPLC-Chromatogramm des isolierten funktionalen Doxorubicin-Dimers

Das dargestellte Doxorubicin-Dimer **14** ist in seinen Eigenschaften einzigartig, da es neben den beiden hydrolysestabilen Oximen ein 2-Pyridyldisulfid aufweist. Dadurch kann **14** leicht mit Thiol-tragenden Polymeren oder Biomolekülen wie Antikörpern, Kernlokalisierungssequenzen und zellpenetrierenden Peptiden unter Ausbildung von Disulfiden umgesetzt werden. Diese neu generierten Bindungen können durch die reduktiven Bedingungen im Nukleus und Zytosol von Zellen vermittelt durch Glutathion wieder gespalten werden, wodurch der dimere Arzneistoff intrazellulär freigesetzt wird.[37-40] Dieser Modifikationsansatz ist in der Biokonjugationschemie gegenüber der Verwendung von Maleimiden oder α-Haloacetylen, welche stabile Thioether mit Sulfhydrylgruppen ausbilden, weitaus attraktiver.[41]

Des Weiteren vermag das funktionale Doxorubicin-Dimer bei entsprechender Modifikation mit den oben genannten Biomolekülen die Limitierungen der beiden vorangegangenen Dimere **7** und **8** in Form von verringerter Akkumulation des Arzneistoffs im Cytosol sowie Nukleus zu überwinden. Unter Berücksichtigung der verfolgten Idee, dass dimere Doxorubicin-Moleküle aufgrund verbesserter DNA-Affinität zytotoxischer wirken, wurde **14** ebenfalls mit MST untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass **14** genau wie die beiden anderen Dimere eine höhere Bindungsaffinität

als Doxorubicin besitzt. Die durch MST ermittelte Bindungskonstante K_A = 6.4 x 10^6 M^{-1} lag dabei sogar höher als die von **8**.

Da stärkere DNA-Bindung und daraus resultierende erhöhte Toxizität sich negativ auf gesundes Gewebe auswirken könnte, muss für Dimere auch das Konzept der Tumoradressierung berücksichtigt werden. Denn eine selektive Eliminierung von Tumorzellen ermöglicht dementsprechend den Einsatz äußerst zytotoxischer Substanzen. Aus diesem Grund wurde **14** zunächst zur Darstellung eines Antikörperkonjugates verwendet, um den Arzneistoff jedoch nicht nur spezifisch in Tumorzellen abzugeben, sondern auch über Rezeptor-vermittelte Endozytose in Krebszellen anreichern zu können.

3.2.2 Biokonjugation von Immunglobulin G

Antikörper-Arzneistoff-Konjugate spielen bei der gezielten Abgabe von Wirkstoffen in das Tumorgewebe eine wichtige Rolle. Diese rasch anwachsende Klasse von Biokonjugaten vereint dabei die zytotoxischen Eigenschaften des Arzneistoffes mit der gezielten Adressierung von Antigenen auf Tumorzellen vermittelt durch Vernetzerreagenzien.[42] Dabei ermöglicht der Vernetzer durch hydrolytische, enzymatische oder reduktive Spaltung die Abgabe des Arzneistoffes in die Tumorumgebung.[43]

Mit dem dargestellten funktionalen Doxorubicin-Dimer (**14**) wird der Zugang zu derartigen Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten durch das 2-Pyridyldisulfid, welches die Ausbildung von Disulfidbindungen mit Thiolen gestattet, ermöglicht. Allerdings besitzen die meisten Antikörper keine freien Sulfhydrylgruppen in Form von Cysteinen. Diese liegen typischerweise als Disulfidbrücke oxidiert vor und sind für die Struktur und Funktion von fundamentaler Bedeutung.[44] Um diese cystinischen Disulfidbrücken zugänglich zu machen, können Reduktionsmittel wie Dithiothreitol oder Tris(2-Carboxyethyl)phosphine-Hydrochlorid verwendet werden. Jedoch kann dadurch der native Antikörper in seiner Funktionsweise erheblich eingeschränkt werden. Im Gegensatz dazu befinden sich auf der Antikörperoberfläche zahlreiche Aminogruppen der Aminosäure Lysin. Mit Hilfe von 2-Iminithiolan, auch bekannt als Traut´s Reagenz, können diese zur selektiven Darstellung von freien Thiolen auf der Antikörperöberfläche verwendet werden.[36] Diese Form der Konjugatbildung ist in mehrfacher Hinsicht vorteilhaft, da nicht nur homogene Produkte erhalten werden, sondern auch durch intrazelluläre Reduktionsmittel spaltbare Disulfide, welche eine Abgabe der toxischen Fracht in der Zelle ermöglichen.

3.2.2.1 Darstellung des Biokonjugates

Um den Antikörper Immunglobulin G mit **14** umzusetzen, wurden zunächst die freien Sulfhydrylgruppen mit 2-Iminothiolan-Hydrochlorid (**16**) eingeführt (Abbildung 39). Dafür wurde IgG (**15**) mit zehn Äquivalenten von **16** in Phosphatpuffer bei 37°C für 90 Minuten auf einem Orbitalschüttler umgesetzt. Dabei ist die Triebkraft der Reaktion die rasche Öffnung des cyclischen Thioimidate-Esters in Gegenwart von Nukleophilen unter neutralen wässrigen Bedingungen. Diese Modifikation wurde gemäß einer Literaturvorschrift durchgeführt, welche die Generierung von bis zu vier freien Thiolen auf der Antikörperoberfläche ermöglicht.[45] Nach beendeter Reaktionsdauer wurde die Reaktionslösung durch Ultrafiltration eingeengt und mit 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4) gewaschen, um unreagiertes 2-Iminothiolan zu entfernen. Durch Verwendung von geeigneten Molekulargewichts-Ausschlussgrößen konnte das thiolierte IgG (**17**) in quantitativer Ausbeute erhalten werden. Da die Struktur von Antikörpern äußerst sensitiv auf exogene Einflüsse reagiert, wurde **17** immer in phosphatgepufferter Lösung gehalten. Um die Oxidation der generierten Sulfhydrylgruppen von **17** zu vermeiden, wurde der thiolierte Antikörper ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

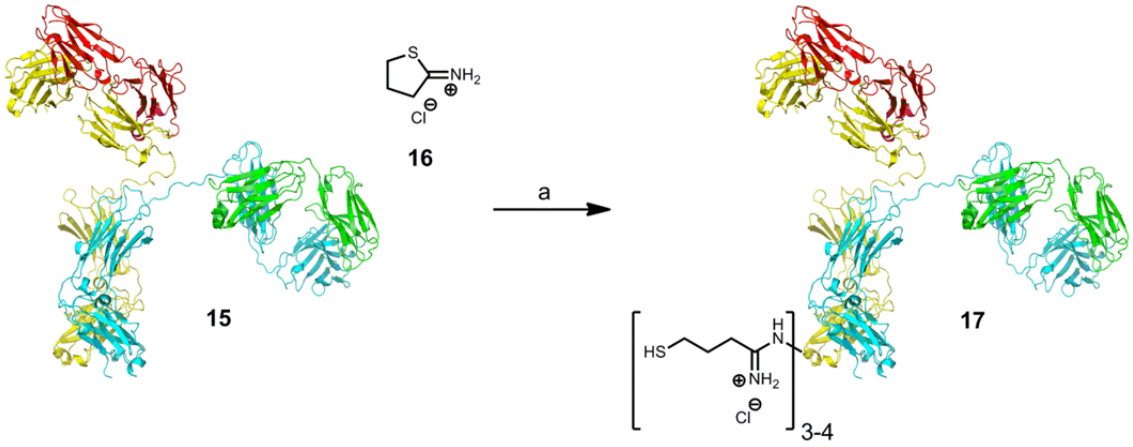


Abbildung 39: Thiolierung von IgG; (a) **16** (10 eq), 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.2 – 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA), 90 min, 37°C, quantitative Ausbeute

Der thiolierte Antikörper wurde in 500 µl Phosphatpuffer (pH 7.4) aufgenommen und mit einem Überschuss (20 eq) von **14** für drei Stunden bei 37°C auf einem Orbitalschüttler umgesetzt. Nach vollständiger Funktionalisierung der Thiole konnte der Überschuss des funktionalen Doxorubicin-Dimers durch GPC an Bio-Gel P2 unter Verwendung von Phosphatpuffer entfernt werden. Die isolierten roten Produktfraktionen von **18** wurden anschließend durch Ultrafiltration aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE untersucht.

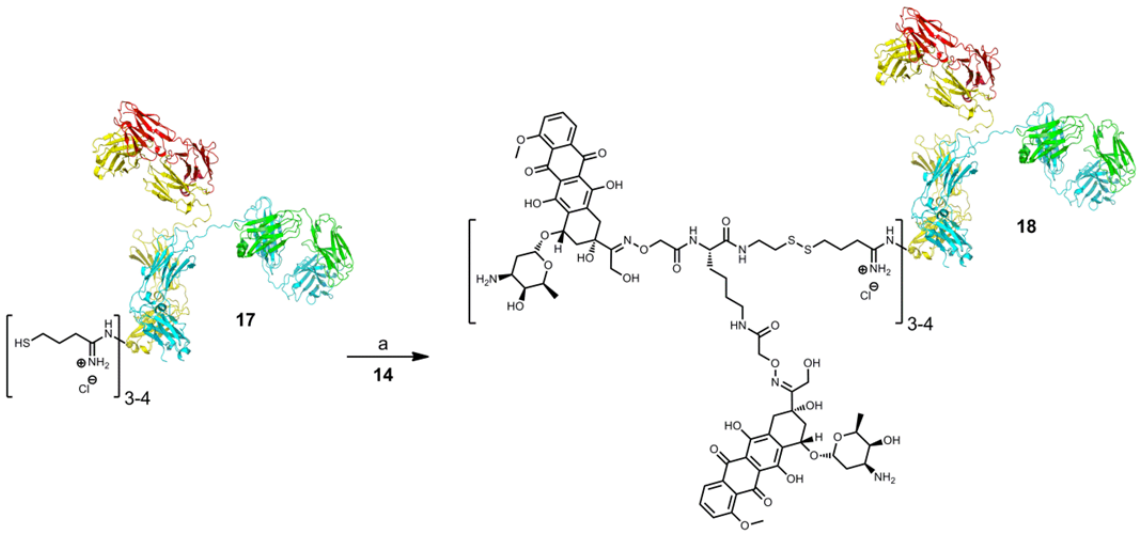


Abbildung 40: Biokonjugation des thiolierten Antikörpers mit dem funktionalen Doxorubicin-Dimer; (a) **14** (20 eq), 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4), 3 h, 37°C, quantitative Ausbeute

3.2.2.2 Gelelektrophoretische Analyse

Die Charakterisierung des dargestellten Doxorubicin-IgG-Konjugates erfolgte durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. In der folgenden Abbildung 41 ist das entsprechende Gel dargestellt. Der linke Teil zeigt die erhaltenen Protein-respektive Antikörperbanden nach Anfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau. Darüber hinaus wurde die intrinsische Fluoreszenz des Arzneistoffes verwendet, um die Doxorubicin zugehörigen Banden nach Anregung mit einer UV-Lampe sichtbar zu machen (rechter Teil). In der zweiten Spur wurde ein Proteinstandard aufgetragen, um die erhaltenen Antikörperbanden einem entsprechenden Molekulargewicht zuordnen zu können.

Spur 1 zeigt die intensive Bande des Doxorubicin-IgG-Konjugates und entspricht annähernd der des nativen Antikörpers (Spur 3, linker Teil). Anhand der rechten Tafel ist eindeutig zu erkennen, dass der native Antikörper wie zu erwarten keine Fluoreszenz aufweist. Jedoch zeigt **18** eine intensive fluoreszierende Bande, welche einem hohen Molekulargewicht zugeordnet werden kann, so dass das Vorhandensein von freiem funktionalen Doxorubicin-Dimer eindeutig ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren ist die zweite Bande des Molekulargewichtsstandards (160 kDa) in guter Übereinstimmung mit dem zu erwartenden Molekulargewicht von IgG (ungefähr 150 kDa). Eine ähnliche Bande wird ebenfalls für **18** erhalten, da drei bis vier Einheiten von **14** das Molekulargewicht des Antikörpers nur geringfügig beeinflussen. Um die Fluoreszenz des Doxorubicin-IgG-Konjugates detektieren zu können, wurde eine entsprechend große Menge von **18** aufgetragen, wodurch auf der linken Tafel oberhalb

der Produktbande eine weitere schwache Bande zu erkennen ist. Dabei handelt es sich aufgrund der fehlenden Fluoreszenz und des hohen Molekulargewichtes wahrscheinlich um einen geringen Anteil an IgG-Disulfid. Um die reduktive Freisetzung des Arzneistoffes näher zu überprüfen, wurden die reduzierten Proben von **15** und **18** ebenfalls untersucht. In Spur 4 ist das reduzierte IgG dargestellt. Hier werden zwei deutliche Banden mit Molekulargewichten um die 50 sowie 20 kDa erhalten. Diese entsprechen den beiden leichten (ungefähr 25 kDa) und schweren Ketten (ungefähr 25 kDa) des Antikörpers, welche typischerweise über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Ein ähnliches Verhalten wird auch für die reduzierte Probe von **18** beobachtet, wobei den beiden Ketten keine Fluoreszenz zugeordnet werden kann. Jedoch ist in Spur 5 auf der rechten Seite eindeutig Fluoreszenz im niedrigen Molekulargewichtsbereich zu erkennen, was für eine hoch effiziente reduktive Abspaltung des dimeren Arzneistoffes spricht.

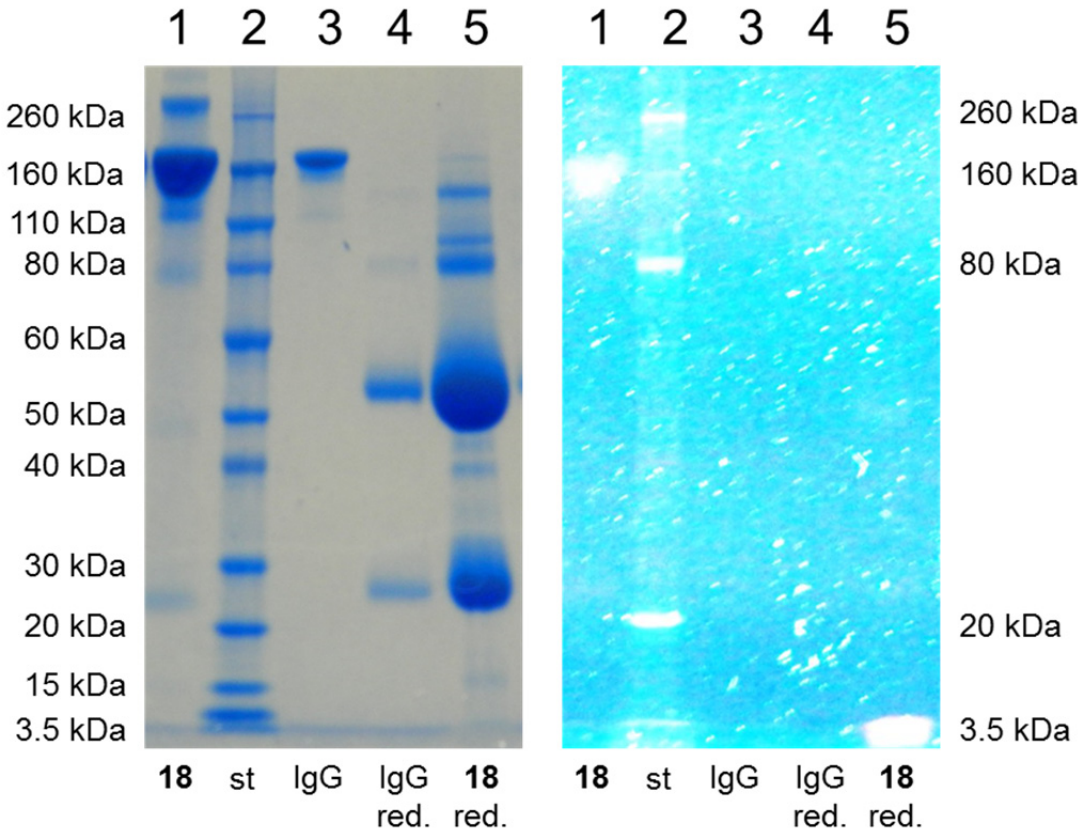


Abbildung 41: SDS-PAGE von **18** und nativem IgG sowie deren reduzierten Spezies; (linke Tafel) Visualisierung der Protein- und Antikörperbanden durch Anfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau; (rechte Tafel) Veranschaulichung der erhaltenen Banden durch Fluoreszenzanregung

Anhand der gelelektrophoretischen Charakterisierung von **18** konnte die Leistungsfähigkeit des Doxorubicin-Dimer-Antikörperkonjugates verdeutlicht werden. Unter reduktiven Bedingungen wurde der dimere Wirkstoff höchst effizient wieder freigesetzt beziehungsweise abgespalten, wodurch das funktionale Doxorubicin-Dimer die Darstellung von Biokonjugaten gestattet, welche die intrazelluläre Arzneistoffabgabe ermöglichen. Aufgrund der Tatsache, dass für die beiden Dimere **7** und **8** nur eine geringe Zellaufnahme beobachtet werden konnte, wurde das funktionale Doxorubicin-Dimer ebenfalls mit einem zellpenetrierenden Peptid modifiziert, da diese sowohl endozytotisch als auch durch direkte Translokation aufgenommen werden können. Die Synthese und Charakterisierung dieses Doxorubicin-Dimer-Peptidkonjugates wird in einem folgenden Abschnitt ausführlich diskutiert.

Das in diesem Kapitel abschließend dargestellte Doxorubicin-Dimer-Antikörperkonjugat besitzt nicht nur die Eigenschaft den Wirkstoff in Gegenwart von Reduktionsmitteln abzugeben, sondern könnte ebenfalls selektiv auf überexprimierte Tumorzellantigene abzielen. Somit stellt dieses Konjugat eine vielversprechende Verbindung für die gezielte Rezeptor-vermittelte Aufnahme von hoch DNA-affinen Doxorubicin-Dimeren in Krebszellen dar. In dem folgenden Teil dieser Arbeit spielt die selektive Adressierung von Tumoren weiterhin eine wichtige Rolle, wobei auf die potenten Fähigkeiten eines kleinen Moleküls, dem Somatostatin-Analogon Octreotid, zurückgegriffen wird.

3.3 Literatur

[1] J. Nadas, D. X. Sun, *Expert Opin. Drug Discovery* **2006**, *1*, 549

[2] D. A. Gewirtz, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727

[3] J. B. Chaires, F. F. Leng, T. Przewloka, I. Fokt, Y. H. Ling, R. Perez Soler, W. Priebe, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 261

[4] J. Portugal, D. J. Cashman, J. O. Trent, N. Ferrer-Miralles, T. Przewloka, I. Fokt, W. Priebe, J. B. Chaires, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 8209

[5] F. F. Leng, W. Priebe, J. B. Chaires, *Biochemistry* **1998**, *37*, 1743

[6] G. Capranico, M. Binaschi, M. E. Borgnetto, F. Zunino, M. Palumbo, *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 323

[7] D. R. Phillips, R. T. C. Brownlee, J. A. Reiss, P. A. Scourides, *Invest. New Drugs* **1992**, *10*, 79

[8] P. Schlage, G. Mezo, E. Orban, S. Bosze, M. Manea, *J. Controlled Release* **2011**, *156*, 170

[9] Z. Miklan, E. Orban, G. Csik, G. Schlosser, A. Magyar, F. Hudecz, *Biopolymers* **2009**, *92*, 489

[10] E. G. Sander, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6154

[11] A. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7581

[12] S. Deroo, E. Defrancq, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, P. Dumy, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8379

[13] I. P. Decostaire, D. Lelievre, H. H. Zhang, A. F. Delmas, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7057

[14] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512

[15] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., **2006**

[16] R. R. Webb, T. Kaneko, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 96

[17] P. Ingallinella, A. Di Marco, M. Taliani, D. Fattori, A. Pessi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1343

[18] E. Orban, G. Mezo, P. Schlage, G. Csik, Z. Kulic, P. Ansorge, E. Fellinger, H. Moller, M. Manea, *Amino Acids* **2011**, *41*, 469

[19] I. Szabo, M. Manea, E. Orban, C. Antal, S. Bosze, R. Szabo, M. Tejeda, D. Gaal, B. Kapuvari, M. Przybylski, F. Hudecz, G. Mezo, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 656

[20] J. D. Mc Ghee, *Biopolymers* **1976**, *15*, 1345

[21] S. A. I. Seidel, C. J. Wienken, S. Geissler, M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr, A. Reiter, D. Trauner, D. Braun, P. Baaske, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10656

[22] S. A. I. Seidel, P. M. Dijkman, W. A. Lea, G. van den Bogaart, M. Jerabek-Willemsen, A. Lazic, J. S. Joseph, P. Srinivasan, P. Baaske, A. Simeonov, I. Katritch, F. A. Melo, J. E. Ladbury, G. Schreiber, A. Watts, D. Braun, S. Duhr, *Methods* **2013**, *59*, 301

[23] http://www.nanotemper-technologies.com//home/

[24] C. J. Wienken, P. Baaske, S. Duhr, D. Braun, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1

[25] S. Duhr, D. Braun, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 19678

[26] P. Baaske, C. J. Wienken, P. Reineck, S. Duhr, D. Braun, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2238

[27] P. Reineck, C. J. Wienken, D. Braun, *Electrophoresis* **2010**, *31*, 279

[28] C. J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer, D. Braun, S. Duhr, *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 1

[29] M. Jerabek-Willemsen, C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, S. Duhr, *Assay Drug Dev. Technol.* **2011**, *9*, 342

[30] M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr, P. Baaske, *Biospektrum* **2012**, *18*, 30

[31] Y. J. Schneider, R. Baurain, A. Zenebergh, A. Trouet, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1979**, *2*, 7

[32] H. D. King, G. M. Dubowchik, H. Mastalerz, D. Willner, S. J. Hofstead, R. A. Firestone, S. J. Lasch, P. A. Trail, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4336

[33] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974

[34] J. Carlsson, H. Drevin, R. Axen, *Biochem. J* **1978**, *173*, 723

[35] A. J. van der Vlies, C. P. O'Neil, U. Hasegawa, N. Hammond, J. A. Hubbell, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 653

[36] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Academic Press, **2008**

[37] A. Meister, M. E. Anderson, *Annu. Rev. Biochem* **1983**, *52*, 711

[38] L. Ducry, B. Stump, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 5

[39] J. Markovic, J. L. Garcia-Gimenez, A. Gimeno, J. Vina, F. V. Pallardo, *Free Radical Res.* **2010**, *44*, 721

[40] J. Markovic, C. Borras, A. Ortega, J. Sastre, J. Vina, F. V. Pallardo, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 20416

[41] J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 630

[42] S. C. Alley, N. M. Okeley, P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 529

[43] G. Casi, D. Neri, *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 422

[44] S. Brocchini, A. Godwin, S. Balan, J. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 3

[45] T. Ji, M. C. Muenker, R. V. L. Papineni, J. W. Harder, D. L. Vizard, W. E. Mclaughlin, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 427

4 Doxorubicinderivate für die zielgerichtete Wirkstoffabgabe in Tumoren

Doxorubicin wird seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt.[1] Jedoch wird die Anwendung durch die geringe Selektivität des Arzneistoffes für tumorales Gewebe limitiert, so dass gesundes Gewebe oftmals in Mitleidenschaft gezogen wird. Um diese Limitierung zu überwinden, wird Doxorubicin unter anderem in Liposomen verkapselt appliziert, wodurch die Akkumulation des Arzneistoffes im Tumorgewebe über den EPR-Effekt erfolgen kann.[2,3] Dabei handelt es sich formal betrachtet um eine passive Adressierung der Krebszellen. Um jedoch Tumorzellen aktiv mit Doxorubicin zu adressieren, müssen deren veränderter Metabolismus und die damit verbundene Überexprimierung von Rezeptoren oder Antigenen genutzt werden. Hierbei spielen Doxorubicin-Antikörper-Konjugate eine nicht zu unterschätzende Rolle.[4] Allerdings sind die zytotoxischen Eigenschaften meist stark vermindert, da die Beladungsdichte der Antikörper gering gehalten werden muss, um deren Antigenbindungsvermögen nach wie vor ausreichend zu gewährleisten.[5] Des Weiteren sind hoch selektive monoklonale Antikörper in der Produktion sehr teuer und können unspezifische Immunreaktionen auslösen. Die gezielte Adressierung überexprimierter Tumorzellrezeptoren mit Peptidhormon-Doxorubicin-Biokonjugaten stellt ebenfalls eine potente Strategie in der Bekämpfung von Krebs dar.[6]

Hierbei sind die kleinen Aminosäuresequenzen von Bombesin, Gonadoliberin, Neurotensin und Somatostatin für die Adressierung hervorragend geeignet.[7] Besonderes Interesse gilt in diesem Zusammenhang dem Neuropeptidhormon Somatostatin, das hoch affin an die entsprechenden fünf Rezeptorsubtypen binden kann.[8] Die Anwendung dieses 14-Aminosäuren umfassenden Peptids wird jedoch durch dessen geringe Halbwertszeit limitiert. Synthetische Somatostatin-Analoga wie Lanreotid, Octreotid oder Vapreotid können durch Einbau von D-Aminosäuren und kürzere Sequenzen deutlich längere Halbwertszeiten erreichen, was diese für therapeutische Anwendungen überaus interessant macht.[9] Damit Somatostatin und seine synthetischen Abkömmlinge hoch affin an Rezeptoren binden können, spielen zwei Strukturelemente eine wichtige Rolle. Zum einen die durch Cysteine vermittelte Disulfidbrücke, welche eine zyklische rigide Form ermöglicht, und zum anderen das tetramere Aminosäuremotiv FWKT, das für Rezeptorinteraktion verantwortlich ist.[10]

Aufgrund der geringen Halbwertszeit des Peptides finden Doxorubicin-Somatostatin-Biokonjugate bislang keine klinische Anwendung. Vielmehr wird Doxorubicin in Verbindung mit Octreotid eingesetzt. Dabei ist die direkte Funktionalisierung unüblich, wobei oftmals die Hülle von Liposomen und Mizellen zur verbesserten Adressierung mit Octreotid modifiziert wird.[11,12] Obwohl das Peptid eine ausgezeichnete Adressierung von Tumoren ermöglicht, sind bis heute nur die von Nagy *et al.* dargestellten Doxorubicin-Somatostatin-Analoge-Hybridstrukturen bekannt.[13,14] Dabei ist der Arzneistoff mit seinem primären Alkohol über Glutarsäure mit dem N-Terminus des Peptides verknüpft. Die beiden wichtigen Strukturelemente (Abbildung 42) bleiben bei dieser Art der Modifizierung vollständig erhalten. Allerdings ist der Ester, welcher Doxorubicin mit dem Peptid verknüpft, hydrolyseempfindlich, was die Applikation unter physiologischen Bedingungen erheblich erschwert.

Das im folgenden Kapitel beschriebene neuartige Doxorubicin-Octreotid-Konjugat ermöglicht die Darstellung einer hydrolysestabilen Verbindung, wobei für die Modifikation auf das Disulfid als Strukturelement in vielerlei Hinsicht zurückgegriffen wird. Dafür wurde ein Disulfid-interkalierendes Vernetzerreagenz entwickelt, welches den Arzneistoff mit dem Peptid verknüpft, ohne die Struktur von Octreotid signifikant zu verändern.

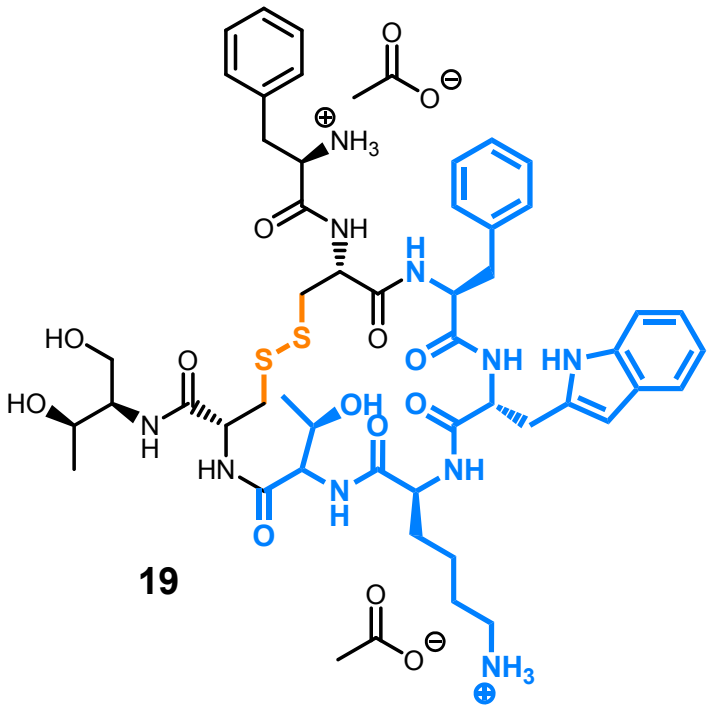


Abbildung 42: Struktur von Octreotid-Diacetat; (orange) strukturgebendes Disulfid; (blau) Rezeptorinteraktion vermittelndes tetrameres Aminosäuremotiv FWKT

4.1 Doxorubicin-Octreotid-Hybrid

4.1.1 Synthese und Charakterisierung

Disulfid-interkalierende Reagenzien gehören zu einer jungen Substanzklasse, welche in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung in der Biokonjugationschemie gewonnen hat. Mit Hilfe dieser Modifikationsstrategie können komplexe Proteine selektiv funktionalisiert werden, ohne dabei deren Struktur und Funktion zu beeinträchtigen.[15,16] Das von Brocchini *et al.* synthetisierte Reagenz setzt jedoch eine aufwendige Darstellung voraus, und die abschließende Proteinmarkierung benötigt lange Reaktionszeiten, bei oftmals unbefriedigenden Ausbeuten.[17,18] Im Gegensatz dazu sind funktionale *bis*-Bromomaleimide synthetisch leicht zugänglich, und ermöglichen die Verbrückung reduzierter Disulfide in guten Ausbeuten innerhalb weniger Stunden.[19]

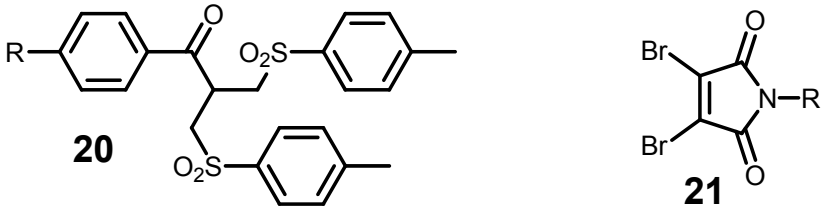


Abbildung 43: Disulfid-interkalierende Reagenzien[17,19]

Bei beiden Modifikationsansätzen werden mit den Sulfhydrylgruppen der Cysteine stabile Thioether ausgebildet, die praktisch nicht reduzierbar sind. Das in der folgenden Abbildung dargestellte neuartige Disulfid-interkalierende Reagenz gestattet die Ausbildung zweier leicht reduzierbarer Disulfide vermittelt durch 2-Pyridyldisulfide. Dadurch wird ermöglicht Substanzen intrazellulär durch erhöhtes Glutathion wieder abzuspalten.[20]

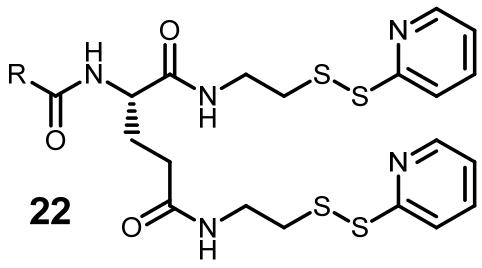


Abbildung 44: Neuartiger spaltbarer Disulfid-Interkalator

Somit stellt das neu entwickelte Interkalatorreagenz eine leistungsstarke Verbindung für die Synthese des Doxorubicin-Octreotid-Biokonjugates dar. Dabei wird durch

Verwendung des Aminosäuregerüstes von Glutaminsäure die Einführung einer weiteren funktionellen Gruppe gestattet, welche die Verknüpfung mit Doxorubicin ermöglicht. Um die Darstellung des Doxorubicin-Octreotid-Hybrides zu bewerkstelligen, wurde daher die *Boc*-geschützte Aminosäure (**23**) zunächst mit 2-(2-Pyridyldithio)ethylamin-Hydrochlorid (**10**) in Gegenwart von TSTU als Kupplungsreagenz und DIPEA als Hilfsbase umgesetzt (Abbildung 45). Nach wenigen Stunden war die Amidkupplung gemäß Dünnschichtchromatographie vollständig abgeschlossen. Anschließend konnten durch Waschen mit gesättigter Natriumchloridlösung Rückstände des Kupplungsreagenzes entfernt werden. Kieselgelchromatographie des erhaltenen Rohproduktes lieferte die reine Verbindung **24** als gelbliches Öl in hoher Ausbeute.

Neben dem Disulfid-interkalierenden Strukturelement wurde eine Aminooxy-Funktionalität in das Reagenz eingeführt, um die Ausbildung eines Oxims mit Doxorubicin zu erlauben. Dafür wurde zu Beginn die Schutzgruppe der Aminosäure unter den bereits beschriebenen sauren Bedingungen entfernt.[21] Dabei wies die Verbindung eine hervorragende Stabilität auf, so dass das erhaltene freie Amin des Aminosäurederivates anschließend mit einem kleinen Überschuss des Aktivesters der *Boc*-Aminooxyessigsäure umgesetzt wurde. Die Ausbildung der neu formierten Amidbindung war innerhalb kürzester abgeschlossen, und der leichte Überschuss des Aktivesters konnte durch Chromatographie an Kieselgel entfernt werden. Dabei wurde das Produkt **25** als schwach gelbes Öl in guter Ausbeute erhalten. Die Gesamtausbeute von 67 % über beide Stufen ermöglichte die Darstellung des neuartigen Disulfid-interkalierenden Vernetzers (**25**) in, für biologische Anwendungen, ausgezeichneten Mengen.

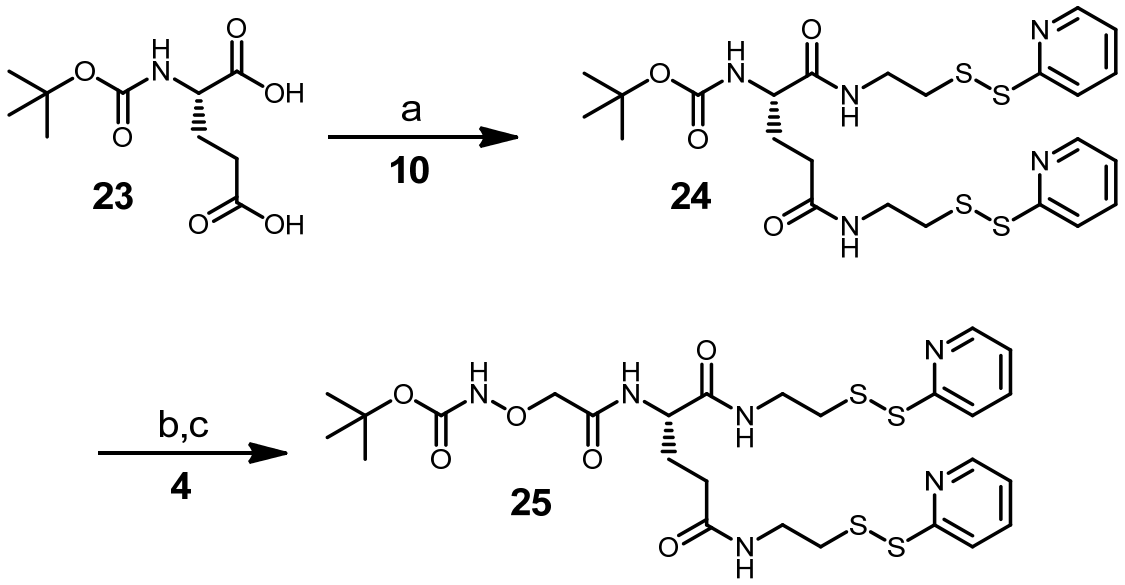


Abbildung 45: Synthese des Disulfid-interkalierenden Reagenz; (a) *Boc*-Glutaminsäure, 2-(2-Pyridyldithio)ethylamin-Hydrochlorid (2 eq), TSTU (2 eq), DIPEA (5 eq), DMF, Argon, 5 h, r.t., 86 %; (b) DCM/TFA (1:1), 1 h, r.t., quantitative Ausbeute; (c) *Boc*-Aminooxyessigsäure-NHS-Ester (1.1 eq), DIPEA (7 eq), DMF, Argon, 3 h, r.t., 78 %

Die beiden isolierten Disulfid-interkalierenden Spezies **24** und **25** wurden abschließend durch NMR-Spektroskopie, sowie MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert. Das erhaltene MALDI-TOF-Massenspektrum von **24** ist in Abbildung 46 dargestellt. Hierbei ist neben dem Produktpeak und dem Peak des entsprechenden Natriumsalzes ein weiteres Signal zu erkennen, welches einem Disulfid von **24** entspricht. Durch NMR-Spektroskopie konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses Nebenprodukt auf die massenspektrometrische Messung zurückzuführen ist. Anhand des ^{1}H-NMR-Spektrums konnte die Struktur von (*S*)-*tert*-Butyl(1,5-dioxo-1,5-*bis*((2-(2-pyridinyldithio)ethyl)amino)pentan-2-yl)carbamat (**24**), aufgrund der gegebenen Integrale der 2-Pyridylgruppen (8 Protonen) und der Amide (3 Protonen), eindeutig identifiziert werden.

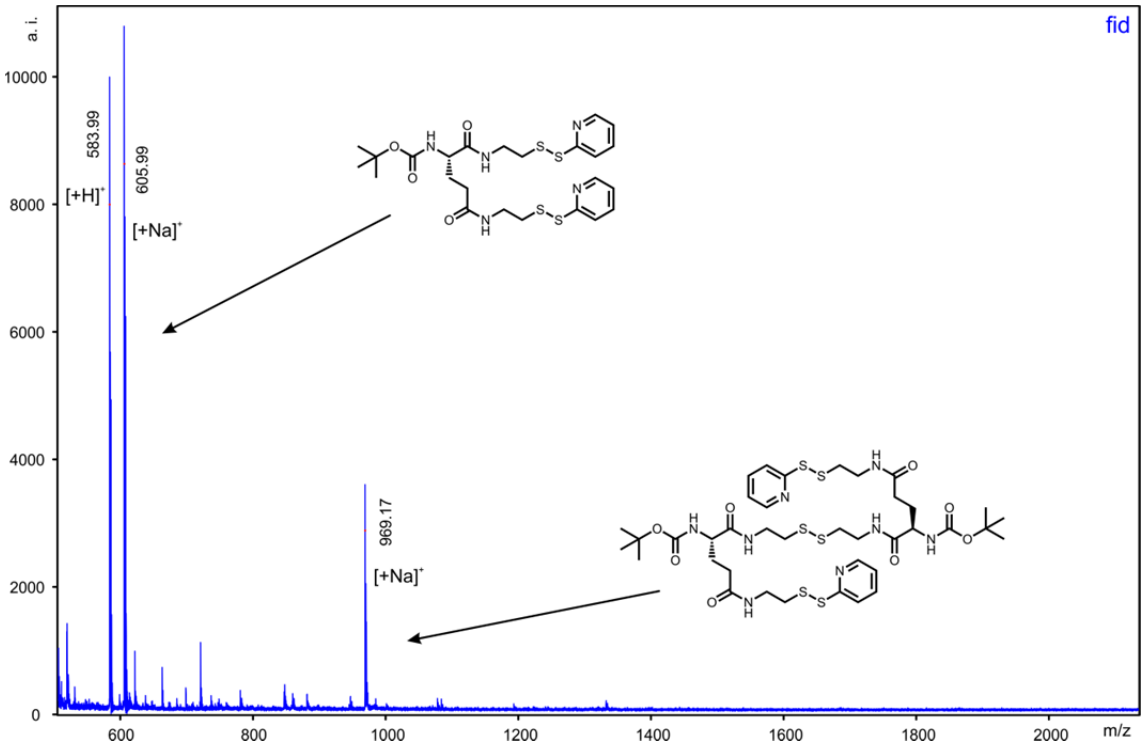


Abbildung 46: MALDI-TOF-Massenspektrum der Disulfid-interkalierenden Verbindung **24** (Matrix: DHB)

Um die Gegenwart der beiden für die Disulfid-Interkalation wichtigen 2-Pyridyldisulfide zu überprüfen, wurde **25** ebenfalls mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Das charakteristische Protonenspektrum ist in Abbildung 47 veranschaulicht. Auch in diesem Fall kann mit Hilfe der entsprechenden 2-Pyridyldisulfid- und Amid-Integrale die Struktur eindeutig bestätigt werden. Das Vorhandensein der geschützten Aminooxy-Funktionalität ist an den beiden Singuletts bei 10.31 und 1.39 ppm gut zu erkennen. Aufgrund der ähnlichen chemischen Umgebung werden für die beiden Ethylen- und Pyridylgruppen annähernd äquivalente chemische Verschiebungen beobachtet. Die Lösungsmittelsignale des bei der chromatographischen Aufreinigung verwendeten Ethylacetats waren selbst nach intensiver Trocknung der Substanz im Hochvakuum zu beobachten. Dieser Umstand ist höchst wahrscheinlich auf den öligen Charakter der isolierten Verbindung zurückzuführen.

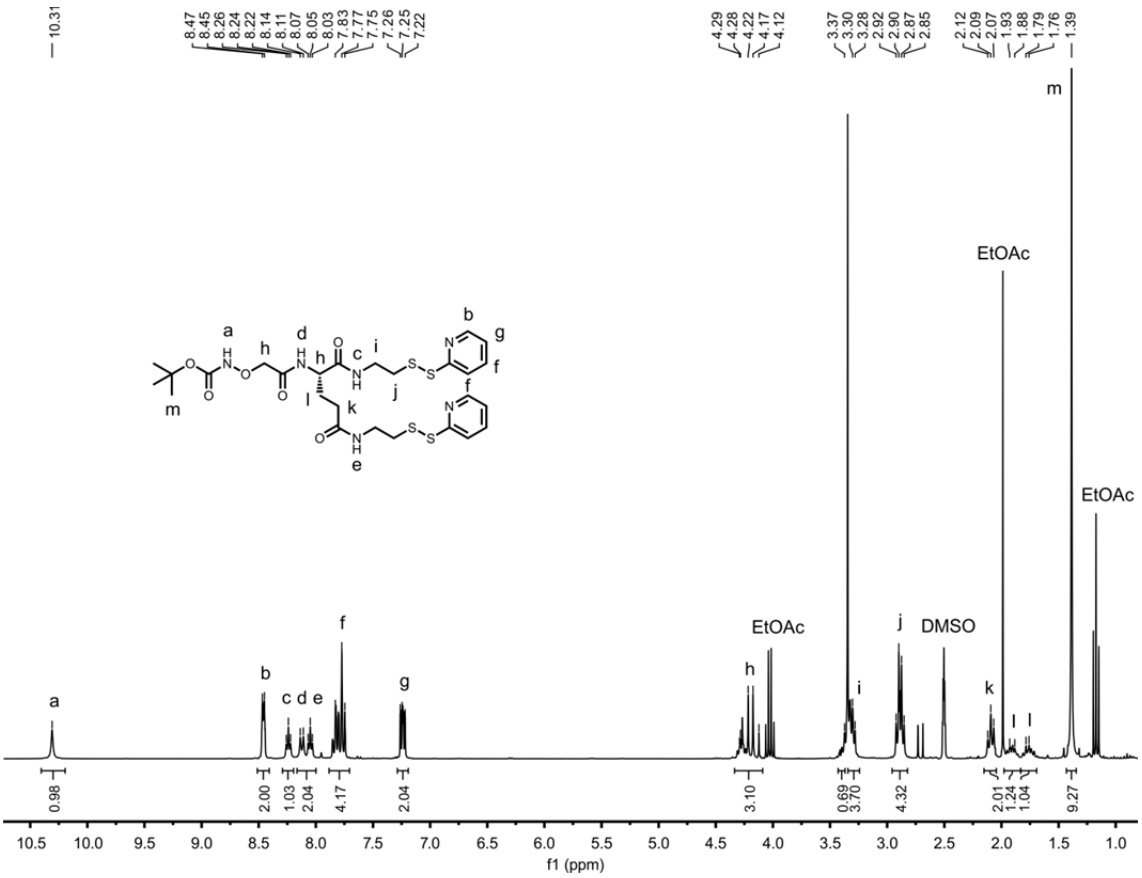


Abbildung 47: ^{1}H-NMR-Spektrum von (*S*)-*tert*-Butyl((1,5-dioxo-1,5-*bis*((2-(2-pyridinyldithio)ethyl)amino)pentan-2-yl)amino)-2-oxoethoxycarbamat (**25**) in DMSO-d^6 (300 MHz)

Da die strukturelle Identität von **25** anhand geeigneter Charakterisierungsmethoden bestätigt werden konnte, wurde darauffolgend die Kondensation mit Doxorubicin durchgeführt. Nach dem erfolgreichen Entfernen der Schutzgruppe wurde der Rückstand im Hochvakuum getrocknet, um störende Einflüsse durch TFA bei der anschließenden Reaktion mit dem Arzneistoff in leicht saurem Puffer zu minimieren. Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt, wobei nach wenigen Stunden schon ein Peak mit längerer Retentionszeit beobachtet werden konnte. Dieser Peak zeigte sich nach zwei Tagen Reaktionszeit unverändert, so dass im Anschluss daran durch präparative RP-HPLC unter neutralen Bedingungen aufgereinigt wurde. Die erhaltenen roten Produktfraktionen wurden anschließend vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen. Durch Ausfällen der methanolischen Lösung in Diethylether konnte das Produkt **26** als roter Feststoff in hoher Reinheit und Ausbeute gewonnen werden.

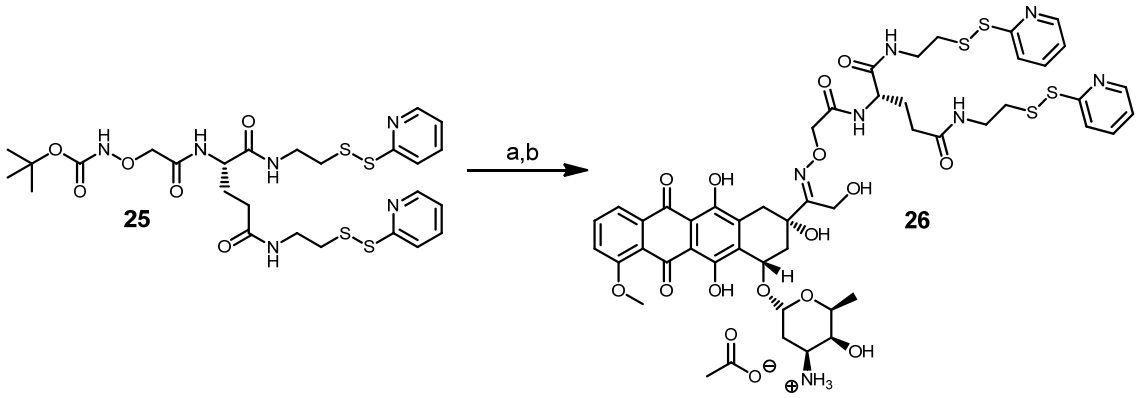


Abbildung 48: Darstellung des Disulfid-interkalierenden Doxorubicinderivates; (a) DCM/TFA (1:1), 1 h, r.t., quantitative Ausbeute; (b) Doxorubicin-Hydrochlorid (1 eq), 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8), DMF, 40 h, r.t., 74 %

Die längere Retentionszeit des Disulfid-interkalierenden Doxorubicin-Abkömmlings war aufgrund des unpolaren Charakters von **26** verglichen mit unmodifiziertem Doxorubicin bereits ein Indiz für das Vorhandensein des Produktes. Die entsprechende Masse konnte im MALDI-TOF-Spektrum ebenfalls detektiert werden. Darüber hinaus wurde **26** zur vollständigen Strukturaufklärung mit NMR-Spektroskopie untersucht. Durch geeignete 2D-Experimente (COSY, NOESY, TOCSY) konnte dies erfolgreich durchgeführt werden. Das H,H-NOESY-Spektrum ist in Abbildung 49 dargestellt. Rückstände der Base des Triethylammoniumacetatpuffer sind im oberen Protonenspektrum nicht zu erkennen, jedoch kann eindeutig ausgemacht werden, dass das Acetatgegenion des Daunosamin zu 35 % vorhanden ist. Dies konnte durch Integration des Singuletts bei 1.84 ppm (**v**) ermittelt werden. Obwohl **26** nicht vollständig als Acetat-Salz vorliegt, weist die Substanz eine für biologische Anwendungen ausreichende Wasserlöslichkeit auf. Da bei der Funktionalisierung von Proteinen und Peptiden wie Octreotid typischerweise im wässrigen Medium gearbeitet werden muss, ist diese Eigenschaft von besonderer Bedeutung für die anschließende Biokonjugation. Durch Integration der Aromatensignale von Doxorubicin und der 2-Pyridylgruppen ist zu sehen, dass beide Disulfid-interkalierenden-Gruppen von **26** gegenwärtig sind, wobei das zur Methoxygruppe *ortho*-ständige Proton (**g**) des Arzneistoffes zusammen mit Pyridylsignalen detektiert wird. Anhand des NOE von **g** zur Methoxygruppe kann dieses aber eindeutig unterschieden werden. Mit Hilfe des NOE können ebenfalls die Triplett-aufweisenden Amide (**b** und **d**) und deren entsprechenden Ethylreste charakterisiert werden, da **b** einen starken NOE zu den Protonen am chiralen Kohlenstoffatom (**m**) sowie **v** und **w** aufweist. Im Gegensatz dazu zeigt **d** einen starken NOE zu **u**. Die Hydroxygruppen dieses

Doxorubicinderivates sind ebenso nur teilweise auszumachen. Des Weiteren sind einige Signale wie die des Daunosamin von Wasser überlagert.

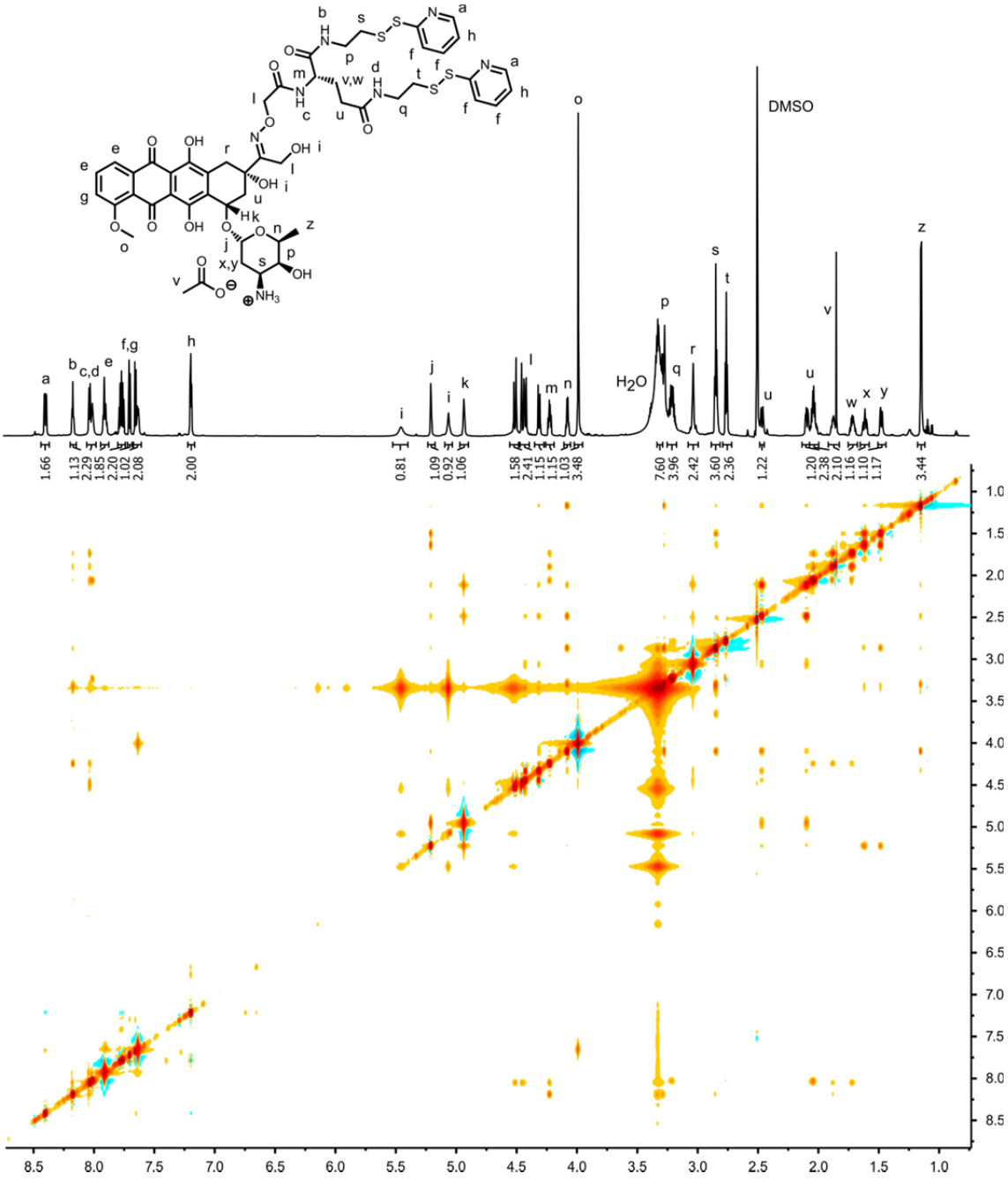


Abbildung 49: H,H-NOESY-Spektrum von Verbindung **26** in DMSO-d^6 (850 MHz)

Dennoch konnte die Struktur des Disulfid-interkalierenden Doxorubicin-Moleküls durch NMR-Spektroskopie hinlänglich aufgeklärt werden, so dass anschließend die Funktionalisierung von Octreotid durchgeführt werden konnte. Da jedoch die beiden Cysteine des Peptides als Disulfid oxidiert vorliegen, mussten die freien Thiole zunächst generiert werden (Abbildung 50).

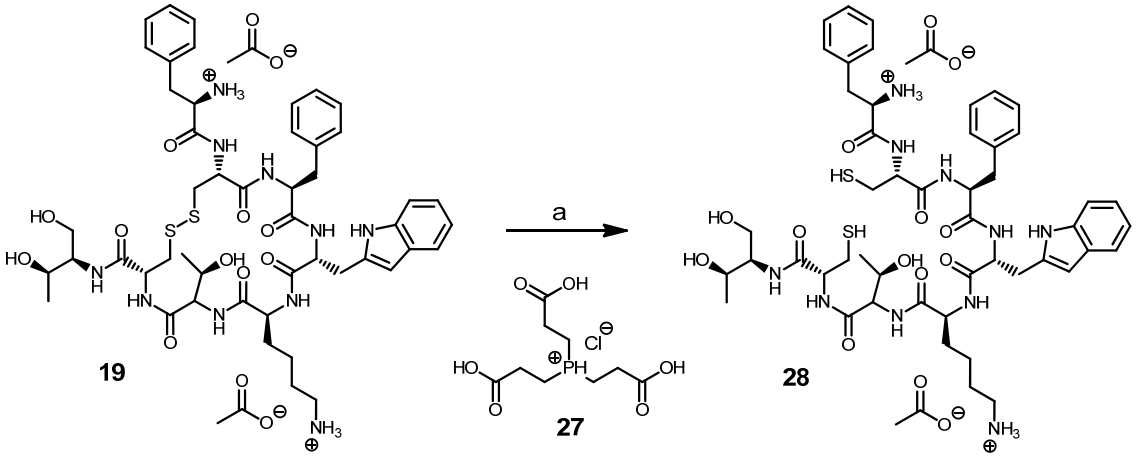


Abbildung 50: Octreotidreduktion; (a) TCEP (10 eq), 25 mM TEAA-Puffer (pH 7), Argon, 90 min, r.t., quantitative Ausbeute

Die Reduktion von Somatostatin ist literaturbekannt und erfolgt typischerweise in Gegenwart von äquimolaren Mengen an Dithiothreitol oder *Tris*(2-Carboxyethyl)phosphine-Hydrochlorid (**27**) innerhalb einer Stunde.[15,18,19] Da TCEP im Gegensatz zu Dithiothreitol keine freien Sulfhydrylgruppen aufweist, wurde für die Reduktion des Peptides TCEP verwendet. Aufgrund der Analogie von Octreotid und Somatostatin wurden zunächst die Literaturbedingungen angewendet. Allerdings konnte unter diesen Umständen Octreotid nicht vollständig reduziert werden. Dies konnte mittels RP-HPLC überprüft werden, da die reduzierte Verbindung eine längere Retentionszeit zeigt. Aus diesem Grund wurden die Reduktionsbedingungen für Octreotid optimiert. Letztendlich konnte nahezu quantitative Reduktion von Octreotid mit zehn Äquivalenten von **27** in 90 Minuten erreicht werden.

In der folgenden Abbildung ist ein repräsentatives Chromatogramm der Octreotidreduktion unter optimierten Bedingungen dargestellt (Abbildung 51). Das Vorhandensein aromatischer Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan) und die damit verbundene charakteristische Absorption bei 280 nm kann zur Detektion verwendet werden.[22] Anhand des Chromatogrammes ist zu erkennen, dass selbst ein Überschuss an Reduktionsmittel nach 30 Minuten Reaktionszeit keine vollständige Reduktion ermöglicht.

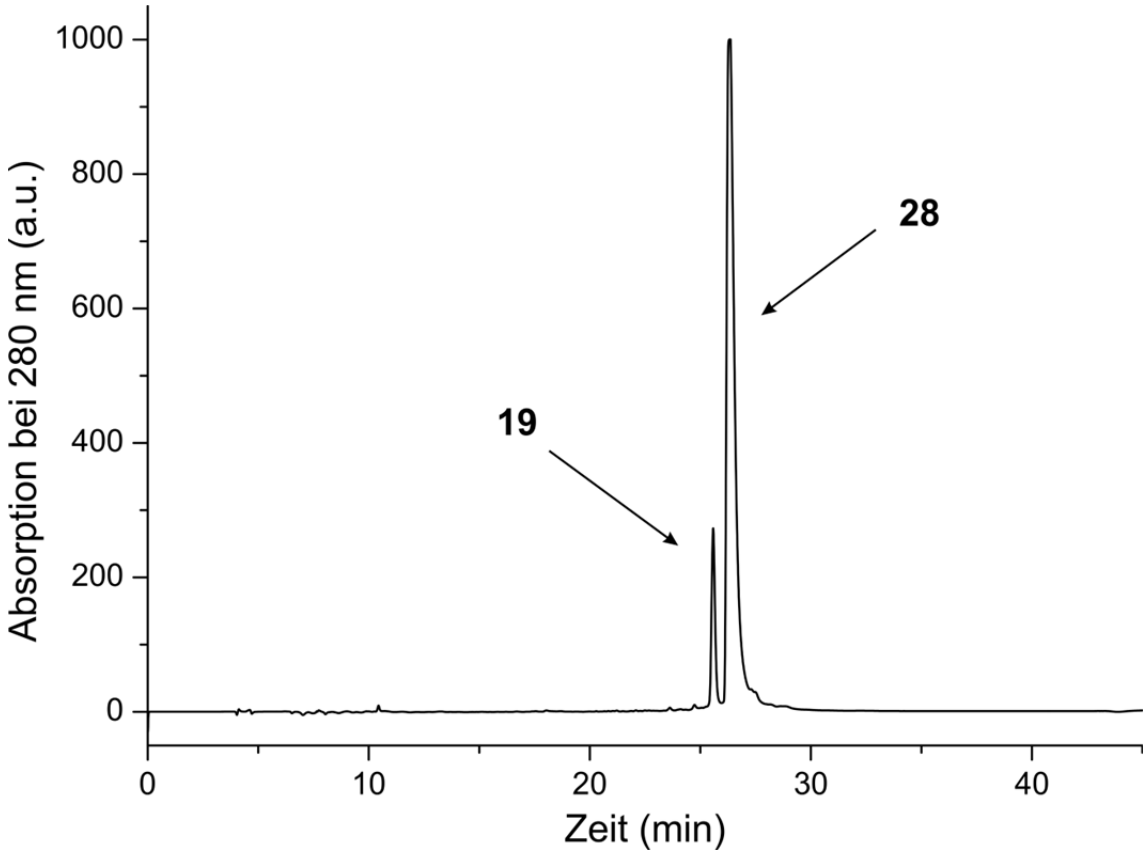


Abbildung 51: HPLC-Chromatogramm einer Probe der Reduktion von Octreotid (**19**) in Gegenwart von zehn äquivalenten TCEP – aufgenommen nach 30 Minuten Reaktionszeit

Eine vollständige Reduktion des Peptides war auch nach 90 Minuten nicht zu erkennen. Obwohl die Reaktion unter Argon durchgeführt wurde, ist wahrscheinlich ein geringer Teil des Octreotid stetig erneut oxidiert worden. Um überschüssiges Reduktionsmittel, welches die darauffolgende Reaktion mit den beiden 2-Pyridylgruppen erheblich stören könnte, zu entfernen, wurde **28** nach 90 Minuten durch präparative RP-HPLC aufgereinigt. Das isolierte sowie reduzierte Octreotid wurde im Anschluss daran direkt mit dem Disulfid-interkalierenden Doxorubicinderivat ohne weitere Charakterisierung umgesetzt (Abbildung 52). Dadurch kann erneute Oxidation des Peptides weitgehend vermieden werden. Die unter Argon durchgeführte Umsetzung mit **26** war nach einer Stunde bereits vollständig abgeschlossen. Dies konnte im HPLC-Chromatogramm durch das Verschwinden des Peaks von **26** sowie durch die Ausbildung des Peaks von 2-Pyridinthion (Absorptionsmaximum bei 343 nm) beobachtet werden.[23] Bei der Ausbildung des Produktes findet vermittelt durch die beiden Pyridyldisulfide des Doxorubicinderivates eine Reoxidation zu einem Bisdisulfid statt, wobei eine zyklische Struktur ausgebildet wird. Diese ist notwendig, um das Peptidrückgrat vor einem raschen enzymatischen Abbau zu schützen.

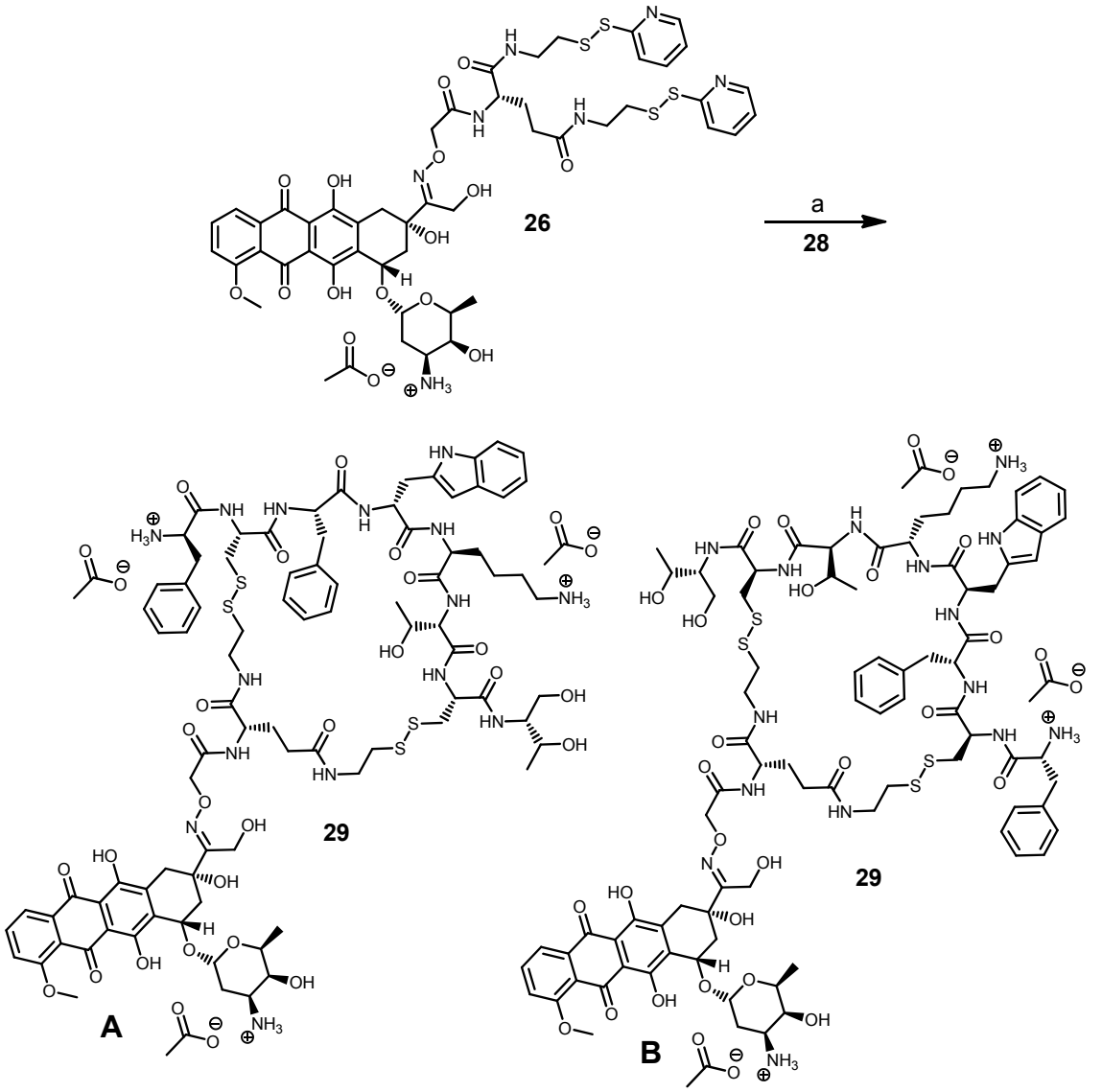


Abbildung 52: Darstellung des Doxorubicin-Octreotid-Hybrids; (a) **26** (1.2 eq), **28**, DMF, DPBS, Argon, 1 h, r.t., 83 %

Nach abgeschlossener Zyklisierung wurde das Reaktionsgemisch durch präparative RP-HPLC aufgereinigt. Es wurden hierbei zwei Peaks isoliert, die extrem nahe beieinander lagen, sodass diese zunächst gemeinsam als eine Fraktion gesammelt wurden. Nachdem das Lösungsmittel der isolierten Fraktionen entfernt worden war, wurde der Rückstand in einem geringen Volumen Methanol gelöst und das Produkt in Diethylether als roter Feststoff ausgefällt.

Obwohl bei der präparativen Aufreinigung formal zwei Peaks isoliert wurden, zeigte die Substanz bei der darauffolgenden Analyse durch HPLC nur einen homogenen Peak. Der Grund für dieses Verhalten liegt in der Natur der durchgeführten Zyklisierungsreaktion. Bei der Reaktion von **26** mit dem reduzierten Octreotid muss

berücksichtigt werden, dass zwei Isomere gebildet werden können (Abbildung 52; **29** A und B), da beide Pyridyldisulfide aufgrund der hohen Reaktivität und geringen sterischen Hinderung des reduzierten Octreotidrückgrats sowohl mit dem N-Terminus als auch C-Terminus reagieren können. Um dies zu belegen, wurde die isolierte Verbindung mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht (Abbildung 53). Anhand des Massenspektrums ist eindeutig zu erkennen, dass nur ein Peak detektiert werden kann. Somit liegt **29** höchst wahrscheinlich in den beiden isomeren Formen vor, die jedoch aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften durch präparative RP-HPLC nicht separierbar sind. Darüber hinaus können im MALDI-TOF-Spektrum keine Edukte (**26** und **28**) beobachtet werden.

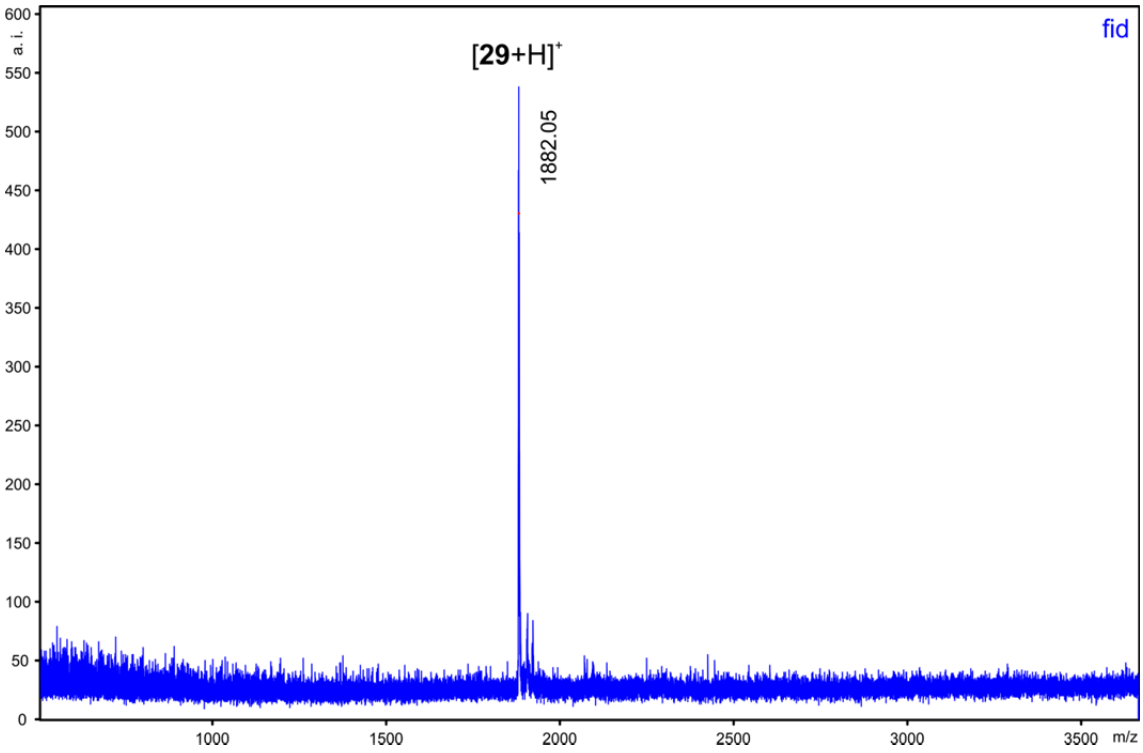


Abbildung 53: MALDI-TOF-Massenspektrum des Doxorubicin-Octreotid-Hybrides **29** (Matrix: αCHCA)

Das dargestellte Biokonjugat **29** ist das bislang einzige Doxorubicin-Octreotid-Derivat, welches für die Arzneistoffmodifikation das Disulfid des Peptides als Strukturelement verwendet. Dadurch soll ermöglicht werden, die toxische Fracht innerhalb der Zelle vermittelt durch intrazellulär erhöhtes Glutathion wieder abspalten zu können. Diese außergewöhnliche Eigenschaft wäre mit einer wie von Brocchini *et al.* durchgeführten Modifikation nicht möglich, da die hierbei erhaltenen Thioether reduktiv nicht spaltbar sind.

4.1.2 Bewertung der *In-vitro*-Zytotoxizität

Nach erfolgter Charakterisierung von **29** wurden anschließend die antitumoralen Eigenschaften des Hybrides mittels WST-1-Test bestimmt. Bei diesem Test wird von lebenden Zellen durch Reduktion ein Formazan gebildet und dessen Absorption gemessen. Diese kann darauffolgend in direkter Relation zur Viabilität der Zellen gesetzt werden.[24] Die im folgenden Teil beschriebenen *In-vitro*-Tests wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Günter Stalla vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München durchgeführt.

Um die *In-vitro*-Zytotoxizität zu beurteilen, wurde eine Zelllinie verwendet, die den Somatostatin-Rezeptor-Typ2 überexprimiert, da das Somatostatin-Analogon Octreotid hoch affin an diesen Rezeptortyp binden kann.[8] Anhand des Western Blots in der folgenden Abbildung ist zu erkennen, dass die Hypophysentumorzellen AtT-20 den entsprechenden Rezeptor-Typ2 überexprimieren. Demgegenüber zeigen die beiden anderen dargestellten Zelllinien nahezu keine Expression des Rezeptors.

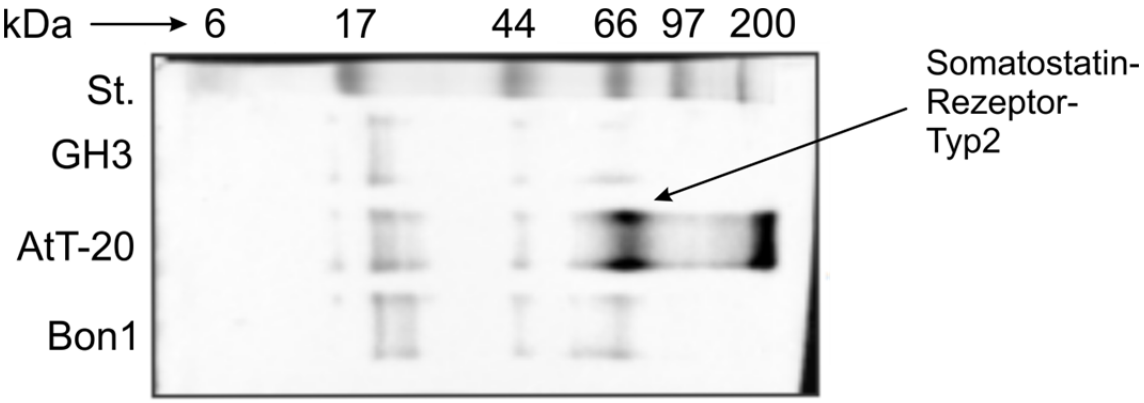


Abbildung 54: Western Blot zur Bestimmung des überexprimierten Somatostatin-Rezeptor-Typ2 in AtT-20-Zellen

Da das Prinzip des Western Blots auf hoch spezifischen Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen beruht, kann dadurch sogar auf zellulärer Ebene mittels Fluoreszenzmikroskopie die Gegenwart des Somatostatin-Rezeptor-Typ2 in AtT-20-Zellen belegt werden (Abbildung 55). Um dies durchzuführen, werden die Zellen zunächst mit einem rezeptorspezifischen Antikörper, welcher jedoch kein Fluorophor trägt, inkubiert. Dieser Schritt wird in einem weiteren Experiment als Negativkontrolle ausgelassen. Im Anschluss daran wird ein fluoreszierender Antikörper zur Markierung des vorangegangenen Antikörpers eingesetzt, so dass der Somatostatin-Rezeptor-Typ2 anhand der nun auftretenden Fluoreszenz beobachtet werden kann. Dies ist

durch die roten Bereiche in der folgenden Abbildung 55 zu erkennen (linke Tafel). Da bei dem auf der rechten Tafel dargestellten Zellexperiment kein rezeptorspezifischer Antikörper verwendet wurde, ist dementsprechend keine rote Färbung zu erkennen. Die Zellkerne der AtT-20-Zellen wurden mit DAPI angefärbt und sind in beiden Bildern durch die entsprechende Blaufärbung auszumachen.

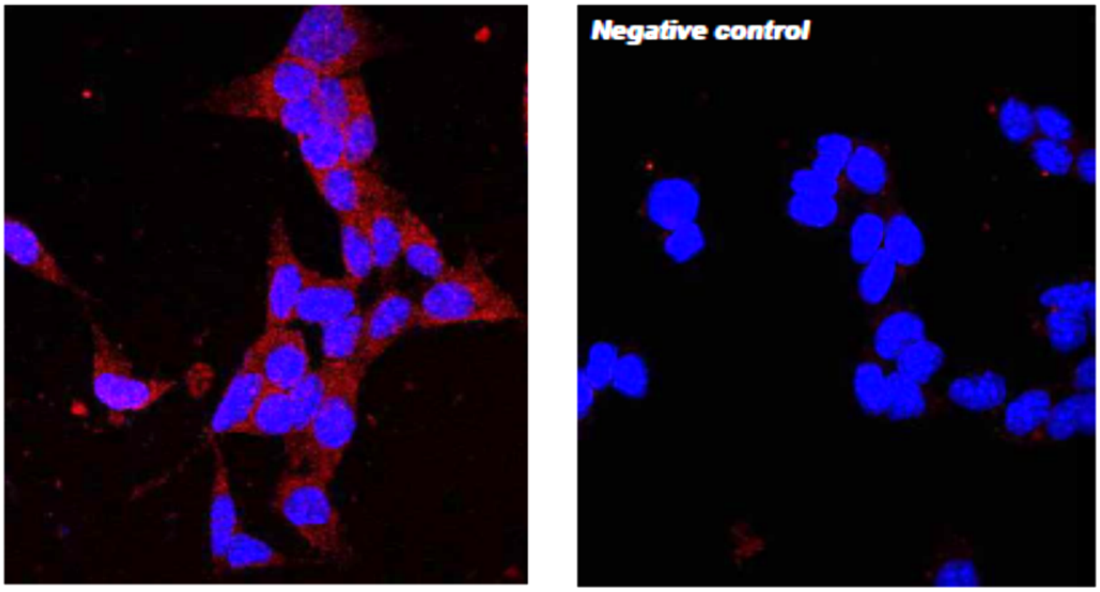


Abbildung 55: Fluoreszenzmikroskopische Detektion des überexprimierten Somatostatin-Rezeptor-Typ2 in AtT-20-Zellen durch Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern

Da das Auftreten des Somatostatin-Rezeptor-Typ2 in AtT-20-Zellen eingehend überprüft werden konnte, wurden darauffolgend die zytotoxischen Eigenschaften von **29**, Doxorubicin sowie dem Peptid mittels WST-1-Test untersucht. Hierbei wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden Substanz im Bereich von 0.001 bis 1 µM inkubiert. Die erhaltene konzentrationsabhängige Zellviabilität ist in Abbildung 56 dargestellt. Bis zu einer Konzentration von 0.01 µM zeigen alle Substanzen keinerlei zytotoxischen Eigenschaften. Der Effekt von Octreotid ist auch bei der höchsten verwendeten Konzentration schwach ausgeprägt, da nur annähernd 10 % der Zellen apoptotisch vorliegen. Diese geringe antiproliferative Eigenschaft des Octreotid in Form von induzierter Apoptose wird durch Phosphatidylinosityl-3-Kinase-abhängige Signalwege vermittelt, wie in der Arbeitsgruppe von Prof. Stalla bereits gezeigt werden konnte.[25] Im Gegensatz dazu zeigt der freie Arzneistoff eine ausgesprochen hohe zytotoxische Aktivität gegenüber der Hypophysentumorzelllinie. Bei einer Konzentration von 0.1 µM sind bereits mehr als 50% der Zellen tot, und eine Konzentration von 1 µM führt zum vollständigen Absterben der AtT-20-Zellen. Diese

Konzentration ist ebenfalls erforderlich, um eine zytotoxische Wirkung des Doxorubicin-Octreotid-Hydrides zu beobachten, wohingegen bei 0.1 µM annähernd kein Effekt zu erkennen war. Nichtsdestotrotz vermag **29** die Viabilität der AtT-20-Zellen bei der höchsten verwendeten Konzentration um nahezu 40% einzuschränken.

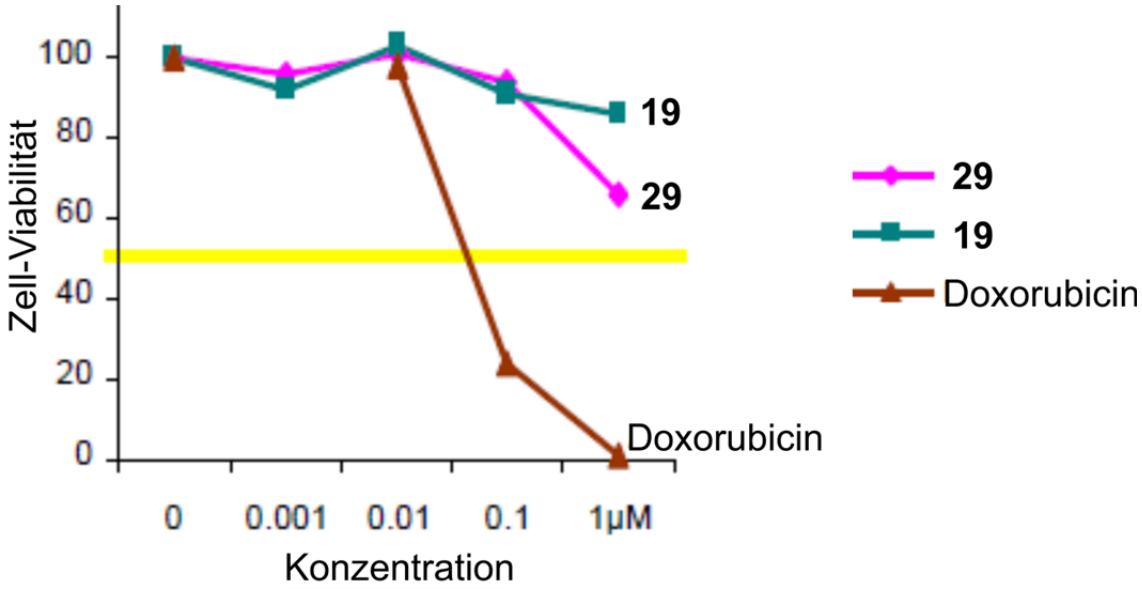


Abbildung 56: Konzentrationsabhängige Viabilität von AtT-20-Zellen nach Inkubation mit Doxorubicin sowie dem Hybrid **29** und Octreotid

Die stärkere Zytotoxizität des freien Arzneistoffs im Vergleich zu **29** in dem angewendeten Konzentrationsbereich kann mit deren unterschiedlichen Zellaufnahmemechanismen erklärt werden. Der Arzneistoff Doxorubicin wird von Zellen typischerweise energieunabhängig und rasch durch passive Diffusion aufgenommen.[26] Demgegenüber werden Somatostatin und seine Analogen durch Clathrin-vermittelte Endozytose des Ligand-Rezeptor-Komplexes internalisiert.[27] Obwohl dieser biochemische Vorgang schnell ablaufen kann, wird durch passive Diffusion dennoch eine größere Arzneistoffakkumulation in Zellen ermöglicht. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass der Doxorubicin-Octreotid-Hybrid aufgrund seiner Tumor-adressierenden Eigenschaften in höheren Dosen als der freie Arzneistoff eingesetzt werden kann, so dass sich die zytotoxische Wirkung bei entsprechender Konzentration relativieren könnte.

Natives Somatostatin kann die Sekretion des Hormones Adrenocorticotropin in AtT-20-Zellen nach erfolgter Rezeptorbindung inhibieren.[28] Dieses Reduktion der Hormonsekretion kann somit zur Bestimmung der intakten Funktionalität sowie des Rezeptorbindungsvermögen von **29** genutzt werden.

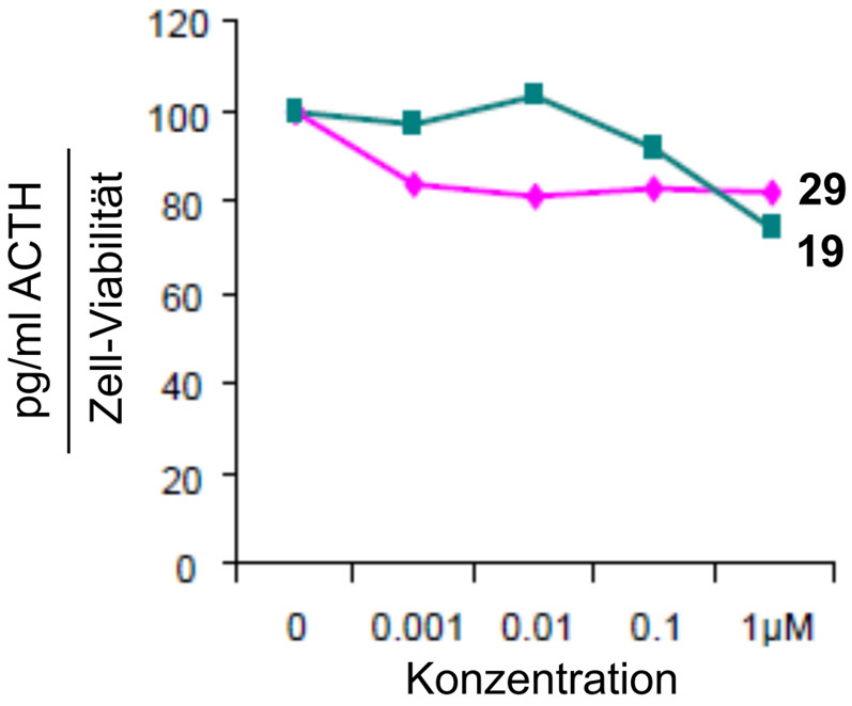


Abbildung 57: Konzentrationsabhängige Inhibition der Adrenocorticotropin-Sekretion in AtT-20-Zellen nach Inkubation mit **29** und Octreotid

Um dies durchzuführen, wurde zunächst das sekretierte Adrenocorticotropin im Zellüberstand mittels Radioimmunoassay bestimmt. Dabei zeigten sowohl Octreotid als auch **29** die zu erwartende reduzierte Hormonsekretion. Da das Peptid *per se* eine geringe Zytotoxizität aufweist, ist das Ligand-Rezeptor-System vollständig intakt. Demgegenüber zeigt **29** starke zytotoxische Eigenschaften bei einer Konzentration von 1 µM, die bei der Bestimmung des sekretierten Adrenocorticotropin berücksichtigt werden müssen, da durch toxische Doxorubicinderivate getötete Zellen ebenfalls kein Hormon sekretieren können. Um diese Problematik zu überwinden, wurde das nach der Inkubation von **29** detektierte Hormon gegen die zuvor erhaltene Zellviabilität normalisiert. Somit kann eine reduzierte Hormonsekretion durch abgestorbene Zellen ausgeschlossen werden. Das Ergebnis dieser Normierung ist in Abbildung 57 dargestellt. Daraus kann gefolgert werden, dass nicht nur Octreotid, sondern auch der entsprechende Doxorubicin-Hybrid die Sekretion des Hormones Adrenocorticotropin in AtT-20-Zellen inhibieren können. Des Weiteren ist der Effekt von **29** bei geringeren Konzentrationen sogar stärker als der des Vorläuferpeptides ausgeprägt. Anhand dieses Experimentes wird verdeutlicht, dass die Funktionalisierung von Octreotid mit dem Disulfid-interkalierenden Vernetzerreagenz zu keiner Einschränkung der Funktionalität des Peptides führt.

Der hier dargestellte Doxorubicin-Octreotid-Hybrid ist in seinen Eigenschaften in vielerlei Hinsicht einzigartig. Die Anforderungen für die sogenannte Kombinationstherapie werden hinlänglich erfüllt, da durch das Anbringen des Doxorubicin die zytotoxischen Eigenschaften des Peptides weiter verstärkt und zugleich die Tumoradressierung des Octreotid ausgenutzt werden kann. Der für die Darstellung des Hybrides verwendete Modifikationsansatz gestattet nicht nur das Rezeptorbindungsvermögen der Aminosäuresequenz aufrecht zu erhalten, sondern erlaubt weiter die toxische Fracht durch Reduktion der beiden neu gebildeten Disulfide intrazellulär freizusetzen. Allerdings erfolgt die Internalisierung dieses Octreotidderivates durch Rezeptor-vermittelte Endozytose, wodurch keine rasche Zellaufnahme ermöglicht wird.

Im folgenden Kapitel spielen mit Peptidsequenzen modifizierte Doxorubicinderivate ebenfalls eine wichtige Rolle. Hierbei soll jedoch die Aufnahme des Arzneistoffkonjugates in die Zelle durch direkte Translokation der Biomembran bewerkstelligt werden, so dass eine schnelle Internalisierung und Anreicherung der toxischen Substanz gewährleistet werden kann. Um dies zu erzielen, wurde Doxorubicin mit zellpenetrierenden Peptiden unter Verwendung eines neuartigen spaltbaren Vernetzers verknüpft, was im anschließenden Teil ausführlich beschrieben wird.

4.2 Literatur

[1] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 185

[2] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 271

[3] F. Danhier, O. Feron, V. Preat, *J. Controlled Release* **2010**, *148*, 135

[4] L. Ducry, B. Stump, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 5

[5] S. C. Alley, N. M. Okeley, P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 529

[6] I. Szabo, M. Manea, E. Orban, C. Antal, S. Bosze, R. Szabo, M. Tejeda, D. Gaal, B. Kapuvari, M. Przybylski, F. Hudecz, G. Mezo, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 656

[7] P. Schlage, G. Mezo, E. Orban, S. Bosze, M. Manea, *J. Controlled Release* **2011**, *156*, 170

[8] M. C. De Martino, L. J. Hofland, S. W. J. Lamberts, *Neuroendocrinology: Pathological Situations and Diseases* **2010**, *182*, 255

[9] L. C. Sun, D. H. Coy, *Curr. Drug Del.* **2011**, *8*, 2

[10] L. N. Moller, C. E. Stidsen, B. Hartmann, J. J. Holst, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2003**, *1616*, 1

[11] M. R. Huo, A. F. Zou, C. L. Yao, Y. Zhang, J. P. Zhou, J. Wang, Q. N. Zhu, J. Li, Q. Zhang, *Biomaterials* **2012**, *33*, 6393

[12] J. L. Zhang, W. Jin, X. Q. Wang, J. C. Wang, X. A. Zhang, Q. A. Zhang, *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 1159

[13] A. Nagy, A. V. Schally, G. Halmos, P. Armatis, R. Z. Cai, V. Csernus, M. Kovacs, M. Koppan, K. Szepeshazi, Z. Kahan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 1794

[14] K. Szepeshazi, A. V. Schally, G. Halmos, P. Armatis, F. Hebert, B. Sun, A. Feil, H. Kiaris, A. Nagy, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 781

[15] S. Balan, J. W. Choi, A. Godwin, I. Teo, C. M. Laborde, S. Heidelberger, M. Zloh, S. Shaunak, S. Brocchini, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 61

[16] S. Shaunak, A. Godwin, J. W. Choi, S. Balan, E. Pedone, D. Vijayarangam, S. Heidelberger, I. Teo, M. Zloh, S. Brocchini, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 312

[17] S. Brocchini, S. Balan, A. Godwin, J. W. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Nature Protocols* **2006**, *1*, 2241

[18] S. Brocchini, A. Godwin, S. Balan, J. W. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Adv. Drug Del. Rev.* **2008**, *60*, 3

[19] M. E. B. Smith, F. F. Schumacher, C. P. Ryan, L. M. Tedaldi, D. Papaioannou, G. Waksman, S. Caddick, J. R. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1960

[20] S. M. Deneke, B. L. Fanburg, *Am. J. Physiol.* **1989**, *257*, L163

[21] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Academic Press, **2008**

[22] F. Nyberg, C. Pernow, U. Moberg, R. B. Eriksson, *J. Chromatogr.* **1986**, *359*, 541

[23] J. Carlsson, H. Drevin, R. Axen, *Biochem. J* **1978**, *173*, 723

[24] M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan, *Biotechnol. Ann. Rev.* **2005**, *11*, 127

[25] M. Theodoropoulou, J. Zhang, S. Laupheimer, M. Paez-Pereda, C. Erneux, T. Florio, U. Pagotto, G. K. Stalla, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 1576

[26] J. M. Siegfried, T. G. Burke, T. R. Tritton, *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 593

[27] Z. Csaba, P. Dournaud, *Neuropeptides* **2001**, *35*, 1

[28] A. Luini, D. Lewis, S. Guild, G. Schofield, F. Weight, *J. Neurosci.* **1986**, *6*, 3128

5 Peptid-vermittelte Zellaufnahme von Doxorubicin

Zellpenetrierende Peptide nehmen unter den Biomolekülen eine Sonderstellung ein, da sie eine Reihe von Molekülen biologischen oder synthetischen Ursprungs über die Plasmamembran hinweg in die Zelle transportieren können.[1-4] Mit Hilfe dieser molekularen Transporter können unter anderem auch Arzneistoffe höchst effizient in das Zellinnere befördert werden, wodurch sogar Arzneistoffresistenz in Tumorzellen überwunden werden kann.[5] Arzneistoff-Konjugate von Doxorubicin und zellpenetrierenden Peptiden sind ebenfalls weit verbreitet, wobei die Verknüpfung sowohl von kovalenter als auch nicht kovalenter Natur sein kann.[6,7] Die kovalente Verknüpfung findet dabei eine weitaus größere praktische Anwendung. Hierbei werden üblicherweise Vernetzer verwendet, welche nicht nur stabile, sondern auch spaltbare und hydrolysierbare Bindungen erzeugen, die eine Arzneistoffabgabe nach erfolgter Zellaufnahme gestatten.[8,9] Die Modifikation von Doxorubicin erfolgt dabei typischerweise am freien Amin des Zuckers, dem primären Alkohol oder am aliphatischen Keton.[10-12]

Die hier dargestellten Doxorubicin-CPP-Biokonjugate unterscheiden sich jedoch erheblich von den bereits bekannten Verbindungen. Dies wird durch die Verwendung neuartiger Vernetzer ermöglicht, welche das aliphatische Keton des Arzneistoffes mit einem terminalen Cystein des Peptides verbinden. Bei diesem Modifikationsansatz werden ein Oxim sowie ein Disulfid ausgebildet. Diese nicht hydrolysierbaren Bindungen erlauben eine exklusive reduktive Arzneistoffabgabe im Cytosol. Darüber hinaus bleibt das Daunosamin für die Topoisomerase-Interaktion weiterhin intakt.[13]

5.1 Spaltbare zellpenetrierende Peptid-Doxorubicin-Strukturen

5.1.1 Synthese und Charakterisierung

Um die Arzneistoff-CPP-Verknüpfung durchführen zu können, wurde zunächst ein homobifunktionaler Vernetzer (**30**) synthetisiert. Mit Hilfe der bereits dargestellten Verbindungen **4** und **10**, konnte das Vernetzerreagenz in guter Ausbeute erhalten werden. Die alternative *In-situ*-Amidkupplung vermittelt durch TSTU führte zu ähnlichen Ergebnissen, wobei ein Syntheseschritt eingespart werden konnte.

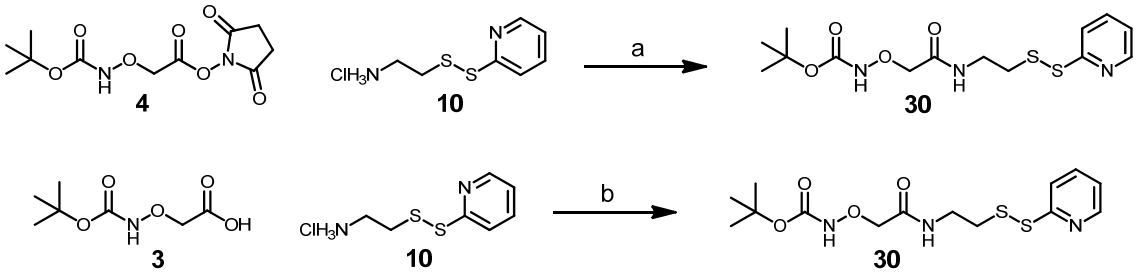


Abbildung 58: Darstellung des homobifunktionalen Vernetzers; (a) *Boc*-Aminooxyessigsäure-NHS-Ester (1 eq), 2-(2-Pyridyldithio)ethylamin-Hydrochlorid (1 eq), DIPEA (4 eq), DMF, Argon, 3 h, r.t., 73 %; (b) *Boc*-Aminooxyessigsäure (1 eq), 2-(2-Pyridyldithio)ethylamin-Hydrochlorid (1 eq), TSTU (1 eq), DIPEA (3.5 eq), DMF, Argon, 5 h, r.t., 78 %

Das über Kieselgelchromatographie aufgereinigte Vernetzerreagenz wurde anschließend durch NMR-Spektroskopie sowie FD-Massenspektrometrie charakterisiert. Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 2-((*tert*-Butoxycarbonylaminooxy)-*N*-(2-(2-pyridyldithio)))ethylacetamid (**30**) ist in Abbildung 59 dargestellt. Anhand der Integrale des Amides der Aminooxy-Gruppe (**a**) und der aromatischen Protonen des 2-Pyridyldisulfides (**b**, **d**, **e**) ist zu erkennen, dass die für die Doxorubicin-CPP-Verknüpfung notwendigen Gruppen vorhanden sind. Wie schon bei den vorherigen als Öl isolierten Substanzen zu sehen war, konnten die Lösungsmittelspuren auch nach intensiver Trocknung im Vakuum nicht entfernt werden.

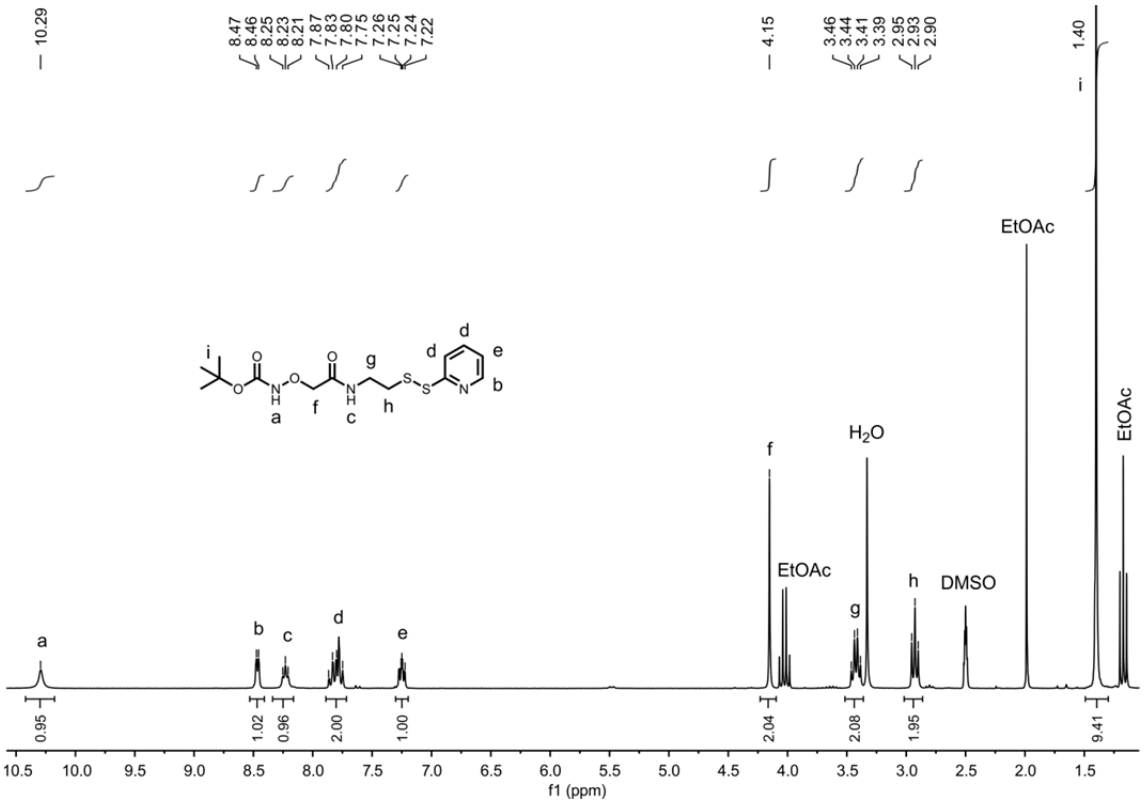


Abbildung 59: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **30** in DMSO-d^{6} (250 MHz)

Auf die darauffolgende Modifikation des Arzneistoffs mit dem homobifunktionalen Vernetzer haben die Ethylacetatreste keinen Einfluss. Um die Kondensation von Doxorubicin mit **30** durchführen zu können, wurde erneut die Schutzgruppe entfernt (Abbildung 60). Dies konnte mit dem bereits beschriebenen DCM/TFA Gemisch innerhalb einer Stunde erreicht werden. Nach anschließendem Trocknen des öligen Rückstandes im Hochvakuum wurde die entschützte Verbindung in DMF aufgenommen und mit Doxorubicin-Hydrochlorid gelöst in Natriumacetatpuffer (pH 4.8) versetzt. Da das Produkt (**31**) und Doxorubicin sich in ihrer Retentionszeit nur um eine Minute unterschieden, wurde **30** im Überschuss eingesetzt. Somit konnte die vollständige Funktionalisierung des Arzneistoffes ermöglicht und die Aufreinigung durch HPLC erheblich vereinfacht werden. Das isolierte und aktivierte Thiol-tragende Doxorubicinderivat wurde durch Ausfällen von Pufferrückständen befreit und im Anschluss daran charakterisiert.

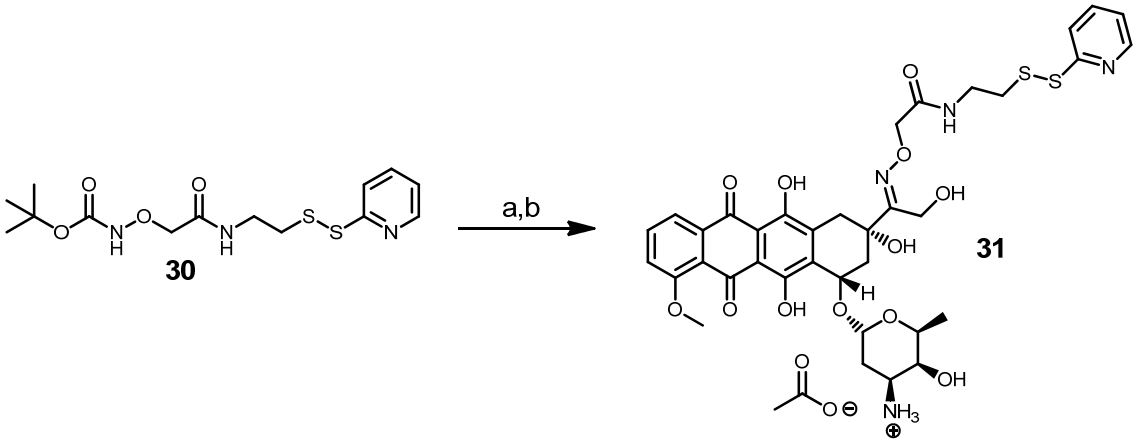


Abbildung 60: Vernetzerkondensation mit Doxorubicin; (a) DCM/TFA (1:1), 1 h, r.t., quantitative Ausbeute; (b) Doxorubicin-Hydrochlorid (0.5 eq), 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8), DMF, 30 h, r.t., 81 %

Im MALDI-TOF-Massenspektrum konnte neben **31** kein freies Doxorubicin sowie unreagiertes Vernetzerreagenz detektiert werden. Darüber hinaus wurde die isolierte Verbindung zur vollständigen Sturkturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Anhand der COSY- und NOESY-Spektren konnten die entsprechenden Protonen zweifellos zugeordnet werden.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum von **31** zeigt, dass alle Strukturkomponenten des aktivierten Thiol-tragenden Doxorubicinderivates vorhanden sind. Die aromatischen Signale von Doxorubicin und des 2-Pyridyldisulfides können eindeutig voneinander unterschieden werden, zumal Proton **a** des Pyridylringes die charakteristische Tieffeldverschiebung aufweist. Des Weiteren sind die typischen Peaks der Daunosaminkomponente, wie das Proton des Vollacetals (**h**) oder die Methylgruppe (**v**) unverkennlich.

Aufgrund der geringen Vernetzergröße und der Gegenwart des Acetatgegenions (Abbildung 61; **s**) besitzt **31** eine ausgezeichnete Wasserlöslichkeit, was die Kupplung mit polaren Substanzen wie Peptiden in geeigneten wässrigen Puffergemischen ermöglicht.

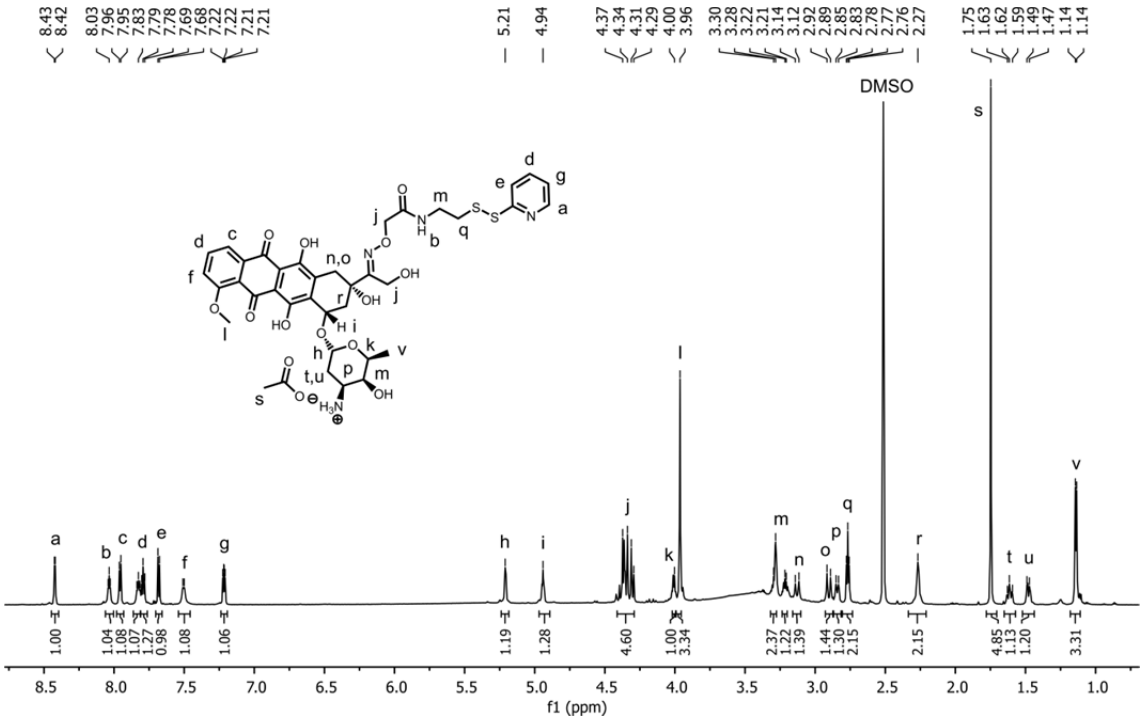


Abbildung 61: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **31** in DMSO-d^6 (700 MHz)

Daraufhin wurde der aktivierte Thiol-tragende Doxorubicin-Abkömmling mit den N-terminalen Cysteinen zweier gänzlich verschiedenen zellpenetrierenden Peptide verknüpft. Dabei unterscheiden sich die beiden verwendeten Peptide in vielerlei Hinsicht (Abbildung 62). **32** ist ein Polyarginin, das unter physiologischen Bedingungen eine positive Nettoladung sowie keine Sekundärstruktur aufweist.[14] Im Gegensatz zu diesem kationischen CPP ist **33** den amphipathischen zellpenetrierenden Peptiden zuzuordnen und besitzt als Sekundärstrukturelement eine Polyprolin-II-Helix.[15] Ferner besitzt es eine negative Nettoladung und hat verglichen mit **32** einen natürlichen Ursprung.[16-18]

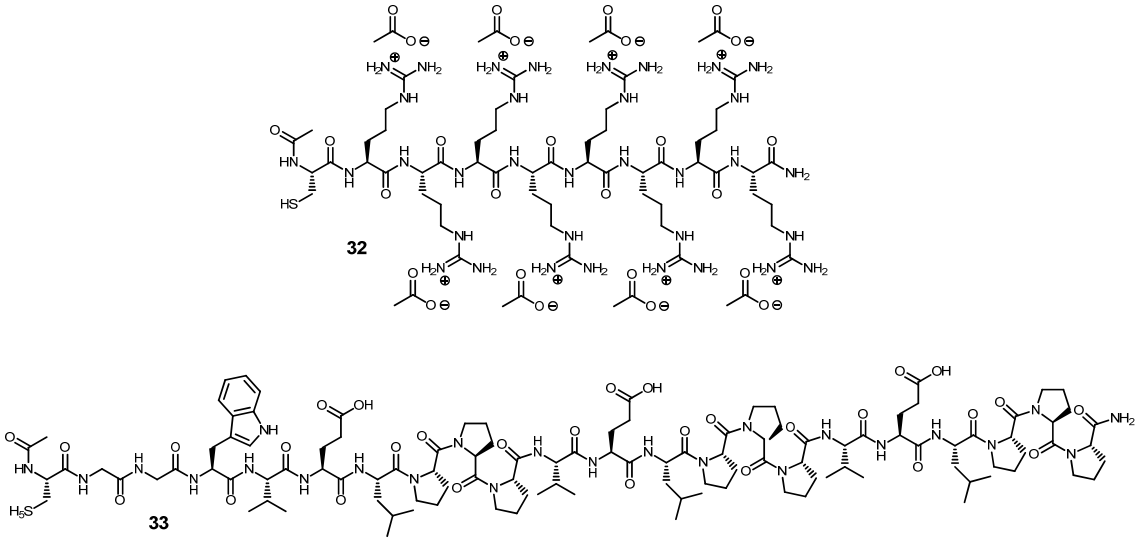


Abbildung 62: Verwendte zellpenetrierende Peptide für die Disulfidausbildung mit **31**

Die Ausbildung der Disulfidbindung von **31** mit den beiden entsprechenden zellpenetrierenden Peptiden wurde in neutraler phosphatgepufferter Lösung durchgeführt (Abbildung 63). Das zusätzlich zugesetzte DMF stellte sicher, dass die Kupplungen in hoher Konzentration ausgeführt werden konnten. Die verwendeten Peptide wurden in einem leichten Überschuss eingesetzt, um somit die vollständige Umsetzung von **31** zu ermöglichen. Anhand des HPLC-Chromatogrammes war ersichtlich, dass **34** innerhalb von zwei Stunden gebildet worden war, wobei eine Retentionszeit des Produktes von 15.21 Minuten gemäß dem äußerst polaren Charakter der Verbindung beobachtet wurde. Demgegenüber eluierte das amphipathische CPP-Doxorubicin-Konjugat (**35**) erst deutlich später (23.36 min). Des Weiteren dauerte die vollständige Umsetzung zum Produkt im Vergleich zu **34** erheblich länger. Eine plausible Erklärung für dieses Phänomen ist die hohe Aggregationstendenz von **33**, wobei Aggregate bereits im niedrigen µM-Bereich ausgebildet werden.[16,19] Ungeachtet dessen konnten nach abgeschlossener Reaktionszeit durch präparative RP-HPLC die Peptidüberschüsse entfernt und die spaltbaren Doxorubicin-Peptid-Konjugate in guter Ausbeute isoliert werden.

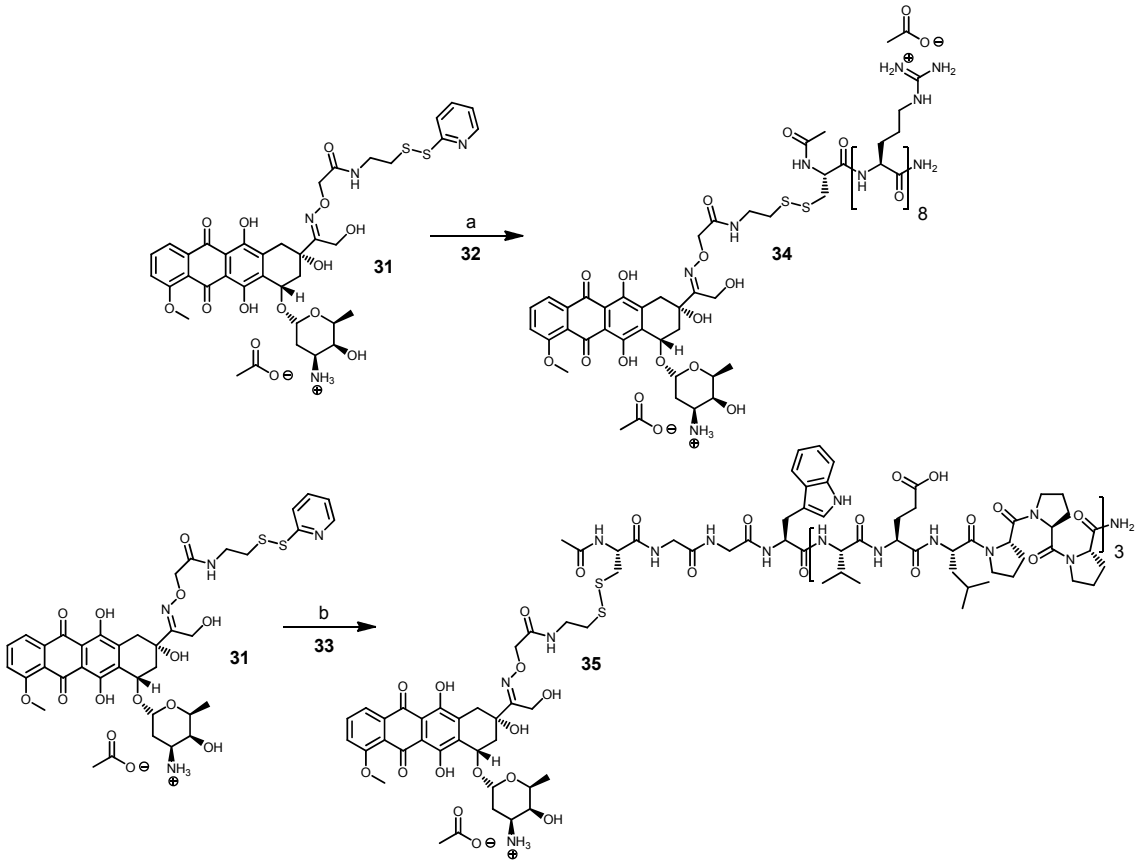


Abbildung 63: Synthese der Doxorubicin-CPP-Konjugate; (a) **32** (1.4 eq), DPBS, DMF, Argon, 2 h, r.t., 73 %; (b) **33** (1.5 eq), DPBS, DMF, Argon, 18 h, r.t., 67 %

Aufgrund der starken Aggregationstendenz des amphipathischen Peptides war die NMR-spektroskopische Analyse des entsprechenden Doxorubicin-Konjugates (**35**) nicht befriedigend. Unabhängig von verwendeter Konzentration oder Lösungsmittel (Wasser, Methanol, Dimethylsulfoxid) konnten keine scharfen Signale erhalten werden. Dennoch wurde die zu erwartende Masse des Natriumadduktes im MALDI-TOF-Spektrum detektiert. Ebenso gelang die Detektion von **34** im erhaltenen Massenspektrum. Im Gegensatz zu **35** konnte jedoch das Polyarginin-Doxorubicin-Konjugat mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden.

In der folgenden Abbildung ist das entsprechende ^{1}H-NMR-Spektrum gemessen in D_2O dargestellt (Abbildung 64). Bei der Verwendung von D_2O als Lösungsmittel können die aciden Protonen nicht mehr beobachtet werden, da diese von Deuterium ausgetauscht werden. Dementsprechend sind die Hydroxygruppen von Doxorubicin, die Amide des Vernetzers und Peptidrückgrates sowie die Guanidiniumgruppen nicht sichtbar. Dennoch ist es möglich, eine Reihe von Informationen anhand des aufgenommenen Spektrums zu gewinnen. Da die aciden Amidprotonen gegen

Deuterium ausgetauscht sind, werden wie zu erwarten nur die drei aromatischen Protonen des Arzneistoff (**a**-**c**) in Form von zwei Dubletts und einem Triplett im Tieffeld beobachtet. Aufgrund der gleichen Wiederholungseinheiten sind die Seitenkettensignale (**m**, **t**, **u**) und das Proton am asymmetrischen Kohlenstoffatom (**h**) des Arginin leicht ersichtlich. Darüber hinaus kann unter Verwendung des COSY-Spektrums von **34** die Aminosäure Cystein von den übrigen des Peptidrückgrates einfach unterschieden werden. Da Proton **h** des Polyarginins eine Kopplung zu **t** zeigt, wohingegen Cystein eine Kopplung zwischen **g** und der entsprechenden Methylengruppe (**n**, **o**) aufweist.

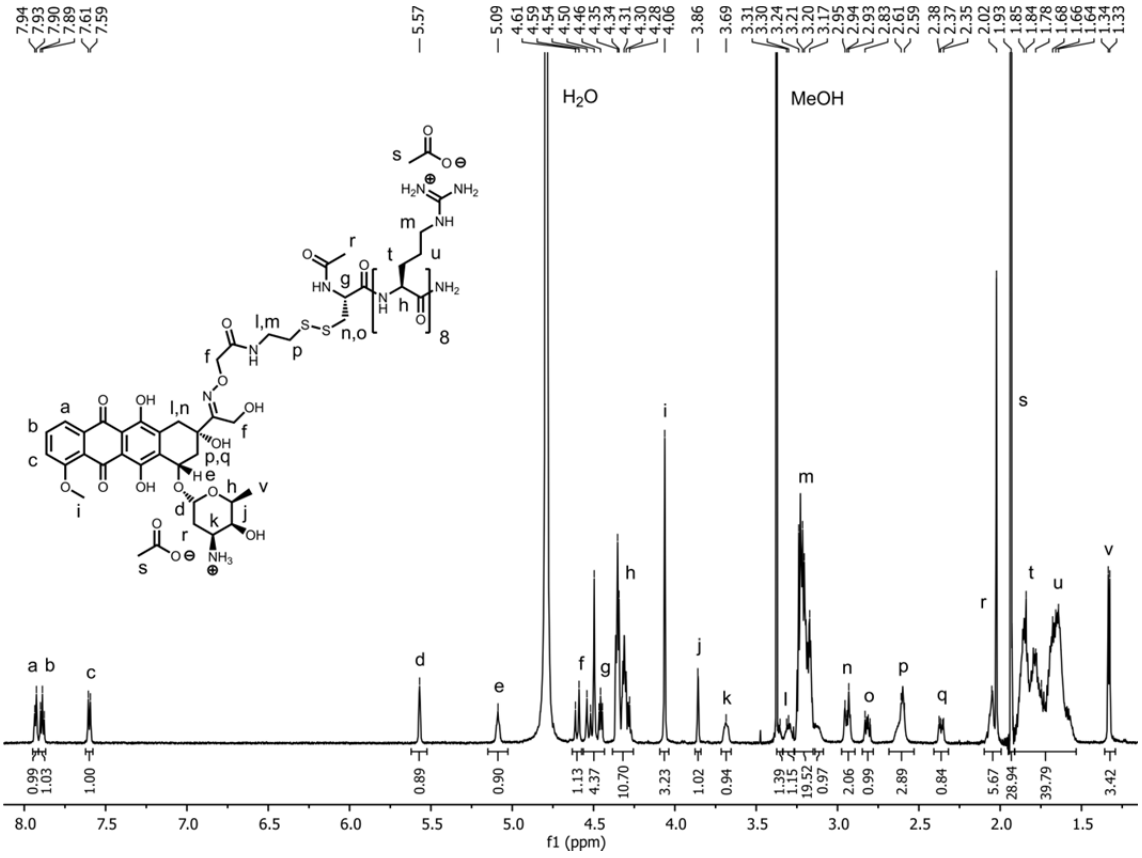


Abbildung 64: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **34** in D_2O (700 MHz)

Nach erfolgter NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Analyse der beiden isolierten Doxorubicin-CPP-Konjugate wurde deren Potential zur gezielten intrazellulären Arzneistoffabgabe durch Glutathion-vermittelte Disulfidspaltung untersucht.

5.1.2 Glutathion-vermittelte Wirkstofffreisetzung

Das Tripeptid Glutathion ist eines der häufigsten vorkommenden natürlichen Peptide, das nicht nur als Antioxidans, sondern auch als Reduktionsmittel für Disulfide fungiert.[20] Diese kleine Aminosäuresequenz ist in nahezu allen Säugerzellen in Konzentrationen von 1 bis 10 mM gegenwärtig.[21] Demgegenüber liegt die Blutplasmakonzentration von Glutathion im Micromol-Bereich.[20] Darüber hinaus werden in einer Vielzahl von Tumoren (Knochenmark, Darm, Brust, Lunge) erhöhte Glutathionspiegel beobachtet.[21] Dadurch stellen reduktiv spaltbare Doxorubicin-CPP-Konjugate einen vielversprechenden Ansatz zur intrazellulären Arzneistoffabgabe dar.
Um dies zu überprüfen, wurde eine 1 mM Lösung von **34** in Gegenwart von 10 mM Glutathion bei 37°C in DPBS (pH 7.4) inkubiert. Der Abbau respektive Disulfidspaltung des Doxorubicin-CPP-Konjugates wurde über 24 Stunden mit analytischer RP-HPLC verfolgt, wobei die charakteristische Absorption des Arzneistoffs bei 480 zur Detektion verwendet wurde (Abbildung 65). Die Reduktion des Konjugates erfolgte dabei innerhalb kürzester Zeit, da bereits nach dem Mischen des Reduktionsmittels mit **34** ein weiterer Peak (B) im Chromatogramm beobachtet werden konnte (Abbildung 66). Dieser Peak entspricht einem Disulfid verknüpften Doxorubicin-Glutathion-Derivat. Unter den verwendeten Bedingungen konnte das Edukt (A) aufgrund der zahlreichen Ladungen und der Präsenz von verschiedenen Gegenionen in Form von Phosphat, Acetat sowie Carboxylat des Glutathion nicht scharf eluieren. Nichtsdestotrotz konnte nach einer Stunde kein Signal für **34** mehr detektiert werden. Darüber hinaus war ein weiterer Peak (C) nun ersichtlich, welcher dem freien Thiol von B entspricht (Abbildung 66). Dennoch war nach einer Stunde B die dominierende Spezies mit einer Intensität vergleichbar mit der 1 mM Lösung von Doxorubicin (Abbildung 65; unteres Chromatogramm). Da jedoch die Inkubation mit einem Überschuss an Glutathion durchgeführt wurde, war nach wenigen Stunden der Thiol-tragende Doxorubicin-Abkömmling (Abbildung 66; C) das Hauptprodukt, was sich nach 24 Stunden auch nicht mehr änderte, weil der Großteil an Glutathion bereits abreagiert war. Unter physiologischen Bedingungen müsste jedoch der vollständige Abbau von **34** zu Verbindung C erfolgen, da ständig ein konstanter Glutathionspiegel durch enzymatische Vorgänge bereitgestellt wird.[22]
Aufgrund der hohen Hydrolysestabilität der Oximbindung war die Ausbildung von freiem Doxorubicin (D) während des Glutathion-vermittelten Abbaus kaum zu beobachten. Auch in Abwesenheit von Glutathion, bei der Inkubation von **34** in saurem

Acetatpuffer (pH 4.5), konnte keine signifikante Entwicklung von Doxorubicin im Chromatogramm detektiert werden.

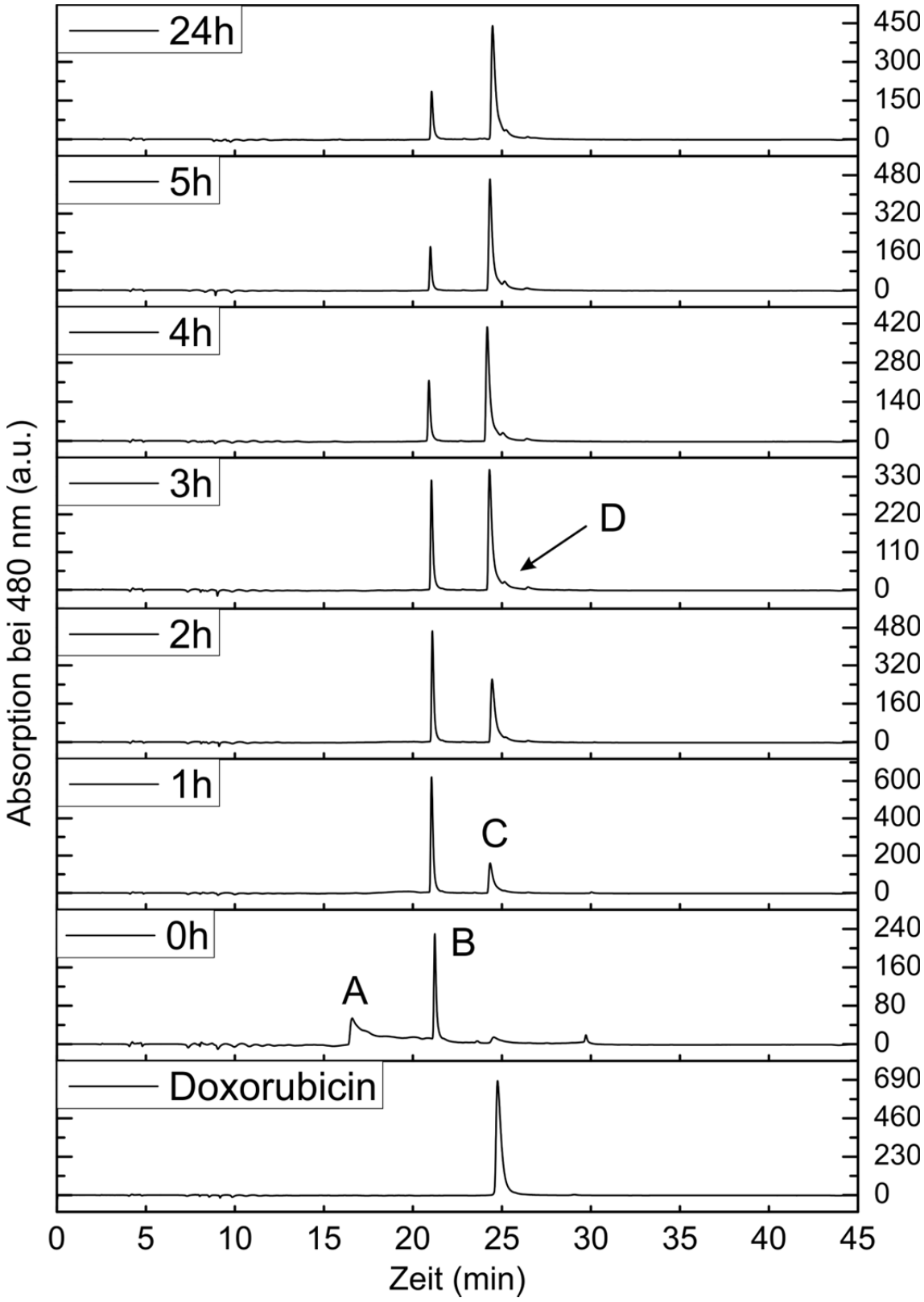


Abbildung 65: Glutathion-abhängige Abbaustudie von **34** untersucht mit RP-HPLC

Um die Identität der bei der Abbaustudie des Doxorubicin-Polyarginin-Konjugates entstehenden Verbindungen B und C zu überprüfen, wurde zum einen **31** mit einem Äquivalent Glutathion umgesetzt und zum anderen mit fünf Äquivalenten TCEP reduziert. Bei der Umsetzung mit dem Tripeptid wurde dabei ausschließlich ein Peak mit dem von B übereinstimmend beobachtet. Demgegenüber lieferte die Reduktion von **31** mit TCEP ein Produkt dessen Retentionszeit der von C entsprach.

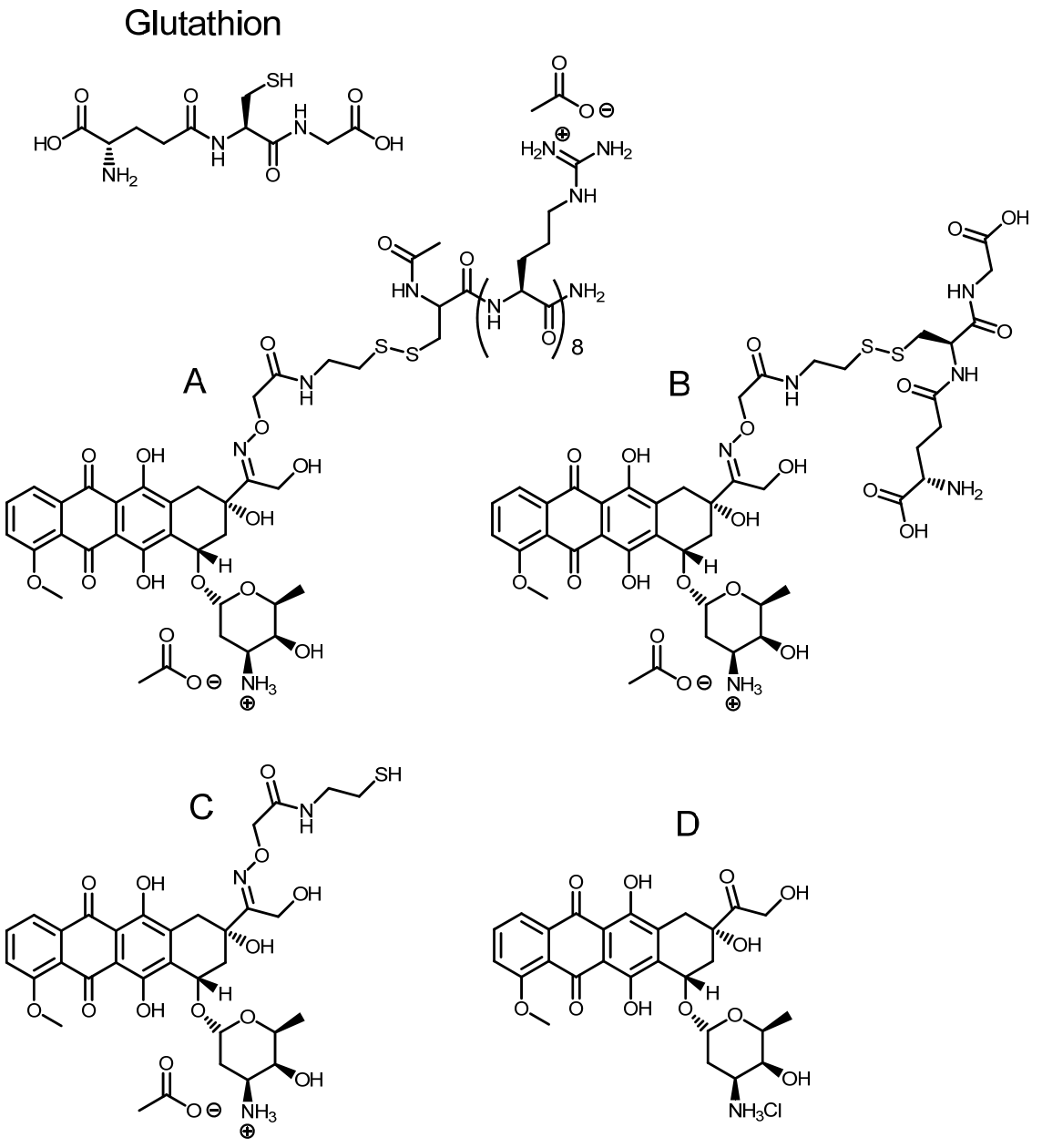


Abbildung 66: Chemische Strukturen von Glutathion, Doxorubicin (D), **34** (A) und dessen Abbauprodukte in Gegenwart von Glutathion

Obwohl das bei dem Glutathion-vermittelten Abbau entstehende Hauptprodukt Verbindung C in Abbildung 66 entspricht und nicht etwa Doxorubicin, kann diese

Verbindung als zytotoxisches Agens berücksichtigt werden. Orban *et al.* haben bereits gezeigt, dass derartige toxische Anthracyclin-Metabolite an DNA binden können und ebenso zytotoxische Eigenschaften aufweisen, auch wenn in einem geringeren Ausmaß.[23] Um diese Hypothese zu stützen, wurden die zytotoxischen Eigenschaften der dargestellten Doxorubicin-CPP-Konjugate in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Steinbrink der Universitäts-Hautklinik in Mainz ebenfalls untersucht, was in den folgenden Abschnitten bearbeitet wurde.

5.1.3 Sekundärstrukturuntersuchungen durch Circulardichroismus-Spektroskopie

Für amphipathische Peptide wie **33** ist das Vorhandensein einer Sekundärstruktur im Vergleich zu kationischen zellpenetrierenden Peptiden unabdingbar, um eine effiziente Aufnahme in die Zelle zu gewährleisten.[19] Aus diesem Grund wurden die verwendeten Peptide sowie deren entsprechende Doxorubicin-Konjugate mittels CD-Spektroskopie untersucht (Abbildung 67). Polyarginine wie **32** weisen gemäß der folgenden Abbildung keine Sekundärstruktur auf. Auch die Biokonjugation über einen Vernetzer mit Doxorubicin führt wie zu erwarten zu keiner Ausbildung eines Strukturelementes. Demgegenüber zeigen prolinreiche Sequenzen in wässrigen Lösungen eine starke Tendenz zur Ausbildung der sogenannten PPII-Helix.[16] Das amphipathische Peptid **33** weist ein derartiges Strukturelement auf, und das entsprechende CD-Spektrum zeigt die charakteristische negative Bande bei 205 nm.[16,24] Das Doxorubicin-Konjugat des amphipathischen CPP (**35**) offenbart ein äquivalentes CD-Spektrum.

Als Schlussfolgerung kann somit gezogen werden, dass die Biokonjugation von **33** mit Doxorubicin zu keiner Veränderung der Sekundärstruktur führt, sodass die Voraussetzungen für eine effiziente Zellaufnahme nach wie vor gegeben sind. Um diese Aussage zu untermauern, wurde anschließend die intrazelluläre Aufnahme durch geeignete Methoden eingehend untersucht.

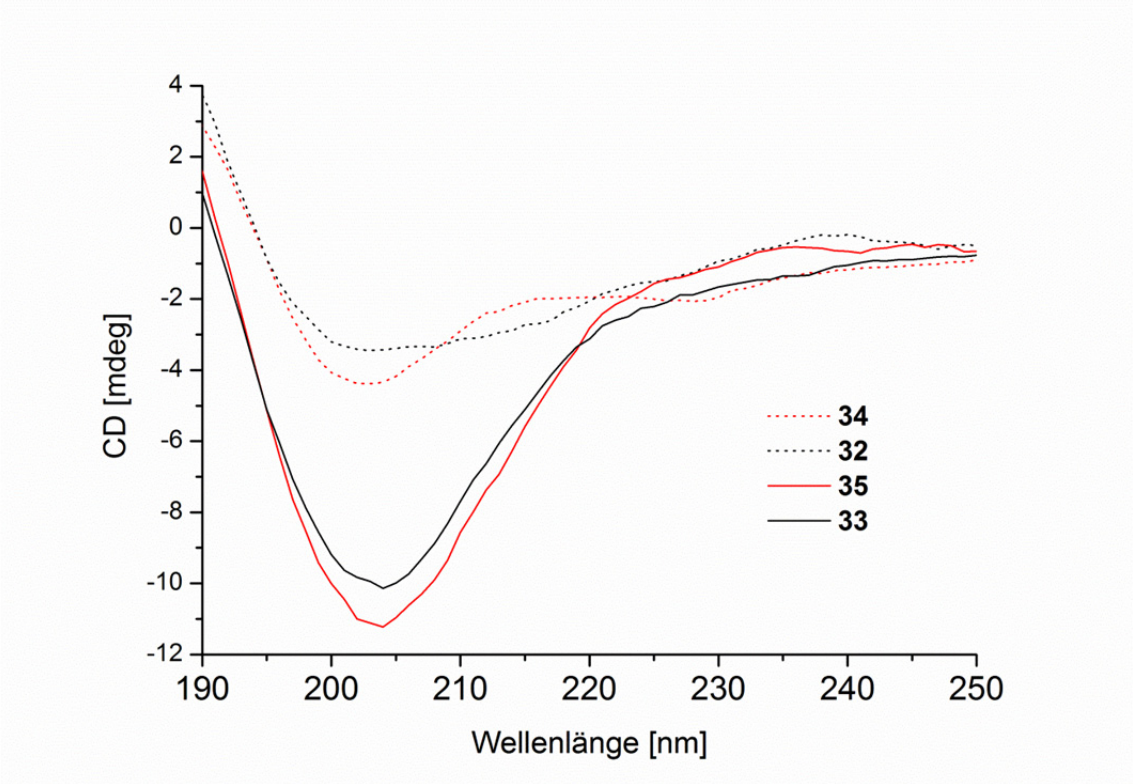


Abbildung 67: CD-Spektren der zellpenetrierenden Peptide und deren entsprechendem Doxorubicinderivat in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) bei 25°C und einer Konzentration von 1 mg/ml

5.1.4 Fluoreszenzeigenschaften der Doxorubicin-CPP-Konjugate

Die intrinsische Fluoreszenz der Anthracycline bildet die Grundlage für eine Reihe von Zellaufnahme- und Zytotoxizitäts-Experimenten. Um einen tieferen Einblick in die Fluoreszenzeigenschaften von Doxorubicin und den entsprechenden CPP-Konjugaten (**34** und **35**) für derartige Experimente zu erlangen, wurde deren Emissionsverhalten bei verschiedenen Konzentrationen (0.1, 1, 10, 50 µM) und pH-Werten untersucht (Abbildung 68). Hierbei wurde zum einen pH 7.4 (100 mM Phosphatpuffer) und zum anderen pH 5 (100 mM Acetatpuffer) gewählt, um die Bedingungen in Endosomen weitgehend zu simulieren.[25] Dieser Versuch ist erforderlich, da für die hier verwendeten zellpenetrierenden Peptide endozytotische Aufnahmemechanismen bereits beschrieben wurden.[16,26]

Wie anhand der folgenden Abbildung ersichtlich ist, werden die Fluoreszenzeigenschaften von Doxorubicin und den Peptid-Konjugaten von den entsprechenden pH-Werten nicht beeinflusst (Abbildung 68). Somit müssten die Fluoreszenzintensitäten der Substanzen sowohl im Zytosol als auch in den

Endosomen äquivalent sein. Alle untersuchten Verbindungen weisen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität auf. Die Emissionseigenschaften von Doxorubicin und **34** sind bei hohen Konzentrationen (10, 50 µM) nahezu identisch. Allerdings ist bei niedrigeren Konzentrationen eine deutlich geringere Fluoreszenz für das Peptid-Konjugat zu erkennen. Bei der kleinsten verwendeten Konzentration ist die Fluoreszenzintensität von **34** und **35** gleichwertig. Nichtsdestotrotz zeigt das Doxorubicinderivat des amphipathischen zellpenetrierenden Peptides über den gesamten Konzentrationsbereich eine stark verminderte Fluoreszenz verglichen mit Doxorubicin. Eine plausible Erklärung für dieses Phänomen ist die hohe Aggregationstendenz des CPP, welche bereits im niedrigen µM-Bereich vornehmlich auftritt, wie zuvor von Martin *et al.* beschrieben.[16]

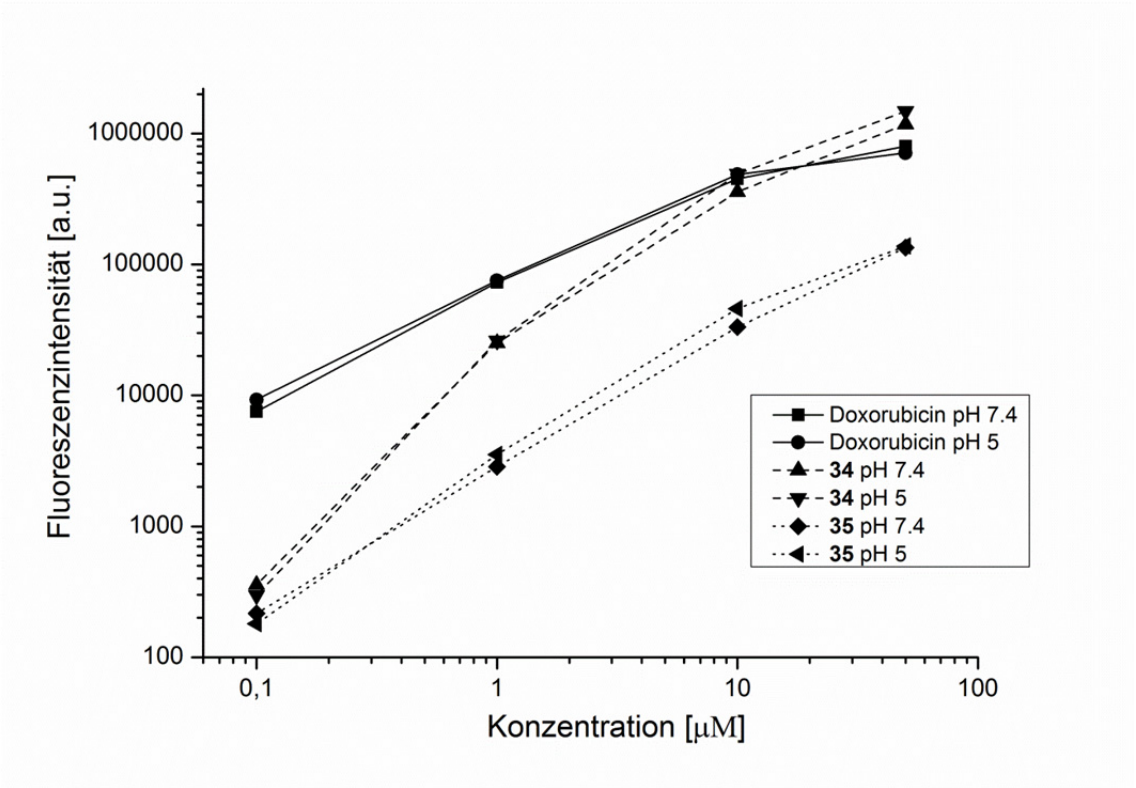


Abbildung 68: Konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensitäten von Doxorubicin und den Doxorubicin-CPP-Konjugaten – aufgenommen in wässrigen Puffern mit pH 5 und 7.4

Für die im Anschluss durchgeführte Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie ermöglichen die Auskünfte der Fluoreszenzmessungen von Doxorubicin und den entsprechenden CPP-Konjugaten weitreichendere Interpretationsmöglichkeiten, da bei diesen Methoden die Emissionsintensität des Fluorophors respektive Doxorubicin quantifiziert wird.

5.1.5 Bestimmung der Zellaufnahme und -viabilität mittels Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie ermöglicht nicht nur das Sammeln von Informationen über die Struktur, den Zustand und die Funktion eines heterogenen Zellgemischs, sondern auch die genaue Quantifizierung von Fluorophoren in der Zellumgebung.[27] Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Doxorubicin kann somit bestimmt werden, ob und wie viel Arzneistoff in die Zelle aufgenommen wird.

Da die zytotoxischen Eigenschaften von Doxorubicin bereits an einer Vielzahl von Darm- und Brustkrebszelllinien untersucht worden sind und der Arzneistoff gegen diese Tumore klinische Anwendung findet, wurden für die folgenden Experimente MCF-7- (Brustkrebs) und HT-29-Zelllinien (Darmkrebs) verwendet.[28] Um die Zellaufnahme zu untersuchen, wurden die beiden Zelllinien zunächst mit verschiedenen Konzentrationen (0.1, 1, 10, 50 µM) von Doxorubicin und den beiden CPP-Konjugaten in Serum-enthaltendem Medium inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Zellinternalisierung des freien Arzneistoffes sowie dessen verwandter Peptid-Verbindungen mittels Durchflusszytometrie untersucht. In Abbildung 69 A sind die repräsentativen Histogramme für die Zellaufnahme der MCF-7-Zelllinie demonstriert. Dabei ist die konstante Zellzahl gegen die Fluorophor- respektive Doxorubicin-Aufnahme aufgetragen. Die unbehandelten Zellen, welche keine Fluoreszenz aufweisen, sind als graue Füllung dargestellt. Anhand der Histogramme ist zu erkennen, dass die Zellaufnahme für alle Substanzen mit steigender Konzentration stetig zunimmt. Für das Polyarginin-Doxorubicin-Konjugat (**34**) wird bei einer Konzentration von 10 µM beobachtet, dass bereits mehr als 50 % der Zellen Doxorubicin-Fluoreszenz aufweisen. Die höchste angewendete Konzentration führt zur Aufnahme von **34** in nahezu allen Zellen. Im Gegensatz dazu ist die Aufnahme von **35** selbst bei 50 µM nur annähernd 80 %. Demgegenüber wird der freie Arzneistoff bei einer Konzentration von 1 µM bereits von nahezu allen Zellen aufgenommen.

Die dargestellten MFI-Daten geben Auskunft über die Menge an aufgenommenem Arzneistoff. Dabei ist zu erkennen, dass die beiden Doxorubicin-CPP-Konjugate in geringerem Maße Zellaufnahme zeigen. Die Menge an internalisiertem **34** bei 10 und 50 µM ist jedoch verglichen mit dem anderen Konjugat nahezu verdoppelt. Aufgrund der ermittelten Fluoreszenzeigenschaften von **34** und **35** besteht jedoch die Möglichkeit, dass die tatsächliche Zellaufnahme wegen der reduzierten Fluoreszenz in Wirklichkeit höher ist. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die genaue Bestimmung der intrazellularen Arzneistoffkonzentration ohne eine aufwendige

Analyse des Zelllysats nicht möglich ist. Des Weiteren ist die Menge an bereits reduziertem Doxorubicin-CPP-Konjugat ebenfalls schwer zu ermitteln.

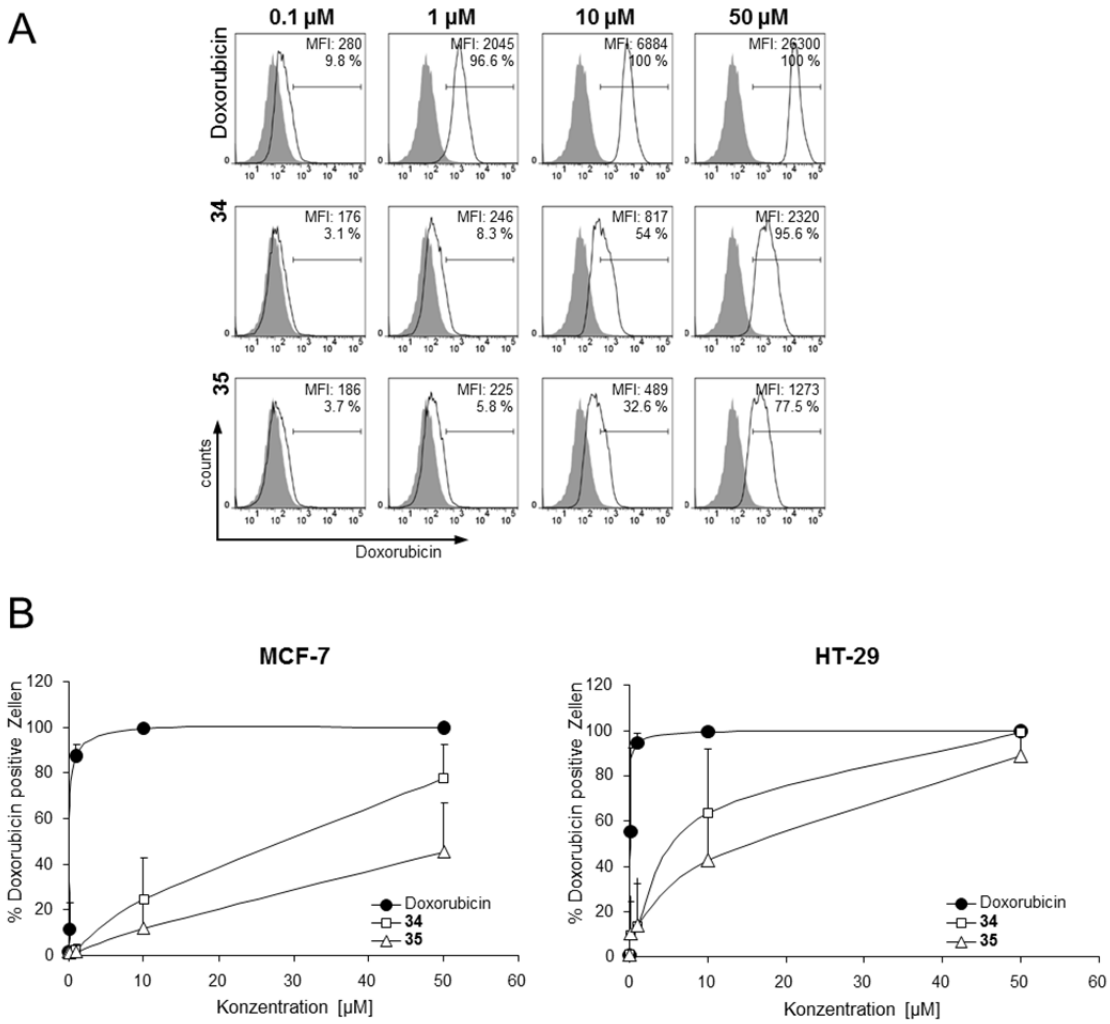


Abbildung 69: Untersuchung der Zellaufnahme von Doxorubicin und den entsprechenden CPP-Konjugaten mittels Durchflusszytometrie in MCF-7- und HT-29-Zellen – (A) Repräsentative Histogramme für MCF-7-Zellen; (B) Konzentrationsabhängige Aufnahme der beiden Zelllinien von drei unabhängig durchgeführten Experimenten

Die angesammelten Daten der Histogramme für die Aufnahme in MCF-7- und HT-29-Zellen von drei unabhängigen Durchflusszytometrie-Experimenten sind in Abbildung 69 B graphisch dargestellt. Die erhaltenen Werte der Aufnahme für MCF-7-Zellen sind dabei in guter Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Werten von Abbildung 69 A. Im Vergleich zur Brustkrebszelllinie ist die Zellinternalisierung der beiden Doxorubicin-CPP-Konjugate in HT-29-Zellen sogar weiter erhöht. Demgegenüber ist das Aufnahmeverhalten von Doxorubicin in beiden Zelllinien äquivalent. **34** weist in beiden Zelllinien einen abrupten Anstieg der Zellaufnahme im niedrigen micromolaren

Bereich auf. Dies entspricht den Beobachtungen der Literatur, da über einer Schwellenkonzentration im niederen micromolaren Bereich kationische zellpenetrierende Peptide, wie das verwendete Polyarginin, rasch in einem Endozytose-unabhängigen Prozess aufgenommen werden können.[26] Dabei handelt es sich um direkte Translokation, was dazu führt, dass die Aminosäuresequenz schnell und hoch effizient im Cytosol angereichert wird. Dieser Vorgang ist für eine effektive Arzneistoffabgabe in der Zelle notwendig und ist in seiner Effizienz der Internalisierung durch passive Diffusion gleichzusetzen. In Analogie zu den Brustkrebszellen ist die Aufnahme von **35**, im Vergleich zu **34**, in HT-29-Zellen geringer, da das amphipathische CPP ausschließlich über einen zeit- und energieaufwändigen Endozytoseweg aufgenommen wird. Dabei handelt es sich um eine Lipid-Raft-Caveolae-vermittelte Form der Endozytose, bei der das Membranprotein Caveolin involviert ist.[16,29] Endozytose ist ein aktiver Transport entlang der Zellmembran und kann somit eine mögliche Erklärung für die geringere Zellinternalisierung der Doxorubicin-CPP-Konjugate verglichen mit dem freien Arzneistoff sein. Doxorubicin hingegen ist ein kleines Molekül, welches rasch von Zellen energieunabhängig durch passive Diffusion aufgenommen wird.[30] Das bedeutet, dass lediglich hohe Anwendungskonzentrationen des Doxorubicin-Polyarginin-Konjugates ermöglichen mit der Internalisierung von Doxorubicin zu konkurrieren.

Mittels Durchflusszytometrie kann neben der Zellaufnahme von Doxorubicin auch die Viabilität von Zellen bestimmt werden. Dafür müssen die Zellen nach erfolgter Inkubation (72 h) mit Doxorubicin und den Peptid-Konjugaten mit einem weiteren fluoreszierenden Farbstoff angefärbt werden. Dieser sogenannte Viabilitäts-Farbstoff ist in der Lage tote Zellen zu markieren, indem das Fluorophor die geschädigten Membranen penetriert und im Anschluss daran mit Aminogruppen im Cytosol reagiert.[31] Anhand des in der folgenden Abbildung dargestellten Kontur-Diagrammes kann die Zellviabilität ermittelt werden (Abbildung 70). Dabei wird die mit Doxorubicin verknüpfte Fluoreszenz der MCF-7- und HT-29-Zellen mit der Fluoreszenzintensität des Viabilitäts-Farbstoffes assoziiert. Dies bedeutet, dass Zellen, welche das Fluoreszenzsignal beider Chromophore aufweisen, durch toxische Doxorubicinderivate abgestorben sind.

Um die entsprechenden Kontur-Diagramme zu erhalten, wurden die beiden Zelllinien zunächst ausschließlich mit 50 µM Doxorubicin sowie **34** und **35** für 72 h inkubiert. Der Viabilitäts-Farbstoff wurde kurz vor der durchflusszytometrischen Analyse dazugegeben. Die Inkubation der MCF-7-Zellen mit Doxorubicin zeigt, dass in allen

Zellen der Arzneistoff detektiert werden kann. Von diesen Zellen sind jedoch nur 21 % tot. Demgegenüber ist **34** in nahezu 80 % und **35** in fast der Hälfte der Zellen zu finden. Dennoch weist **34** 40 % tote MCF-7-Zellen auf, was ungefähr der doppelten Anzahl verglichen mit Doxorubicin entspricht. Daraus lässt sich folgern, dass bei der angewendeten Konzentration von 50 µM das Polyarginin-Doxorubicin-Konjugat eine stärkere Zytotoxizität bei geringerer Zellaufnahme zeigt. Wie bereits zuvor beobachtet, ist die Zellaufnahme von **35** (50 %) im Vergleich zu Doxorubicin (100 %) und **34** (80%) in MCF-7-Zellen niedriger. Das Verhältnis Zellaufnahme/Toxizität des amphipathischen CPP-Doxorubicin-Konjugates (4.7) ist jedoch dem von Doxorubicin (4.8) sehr ähnlich. Das bedeutet, dass **35** genau wie der ursprüngliche Arzneistoff seine zytotoxische Wirkung entfalten kann. In guter Übereinstimmung mit den Daten von Abbildung 69 B ist die Aufnahme der beiden Doxorubicin-CPP-Konjugate in HT-29-Zellen verglichen mit MCF-7-Zellen größer. Demgegenüber zeigt sich Doxorubicin unverändert. Dennoch wird **34** ebenfalls von allen HT-29-Zellen aufgenommen. Allerdings ist die Toxizität, verglichen mit der Wirkung auf MCF-7-Zellen, verringert und nur minimal größer als die von Doxorubicin. Die erhöhte zelluläre Aufnahme in HT-29-Zellen wird auch für **35** beobachtet und ist im Vergleich zu MCF-7-Zellen anders als **34** mit einer höheren Toxizität assoziiert. Wobei sich der zytotoxische Effekt von **35** (17.9 %) nur geringfügig von dem des Doxorubicin (19.4 %) unterscheidet.

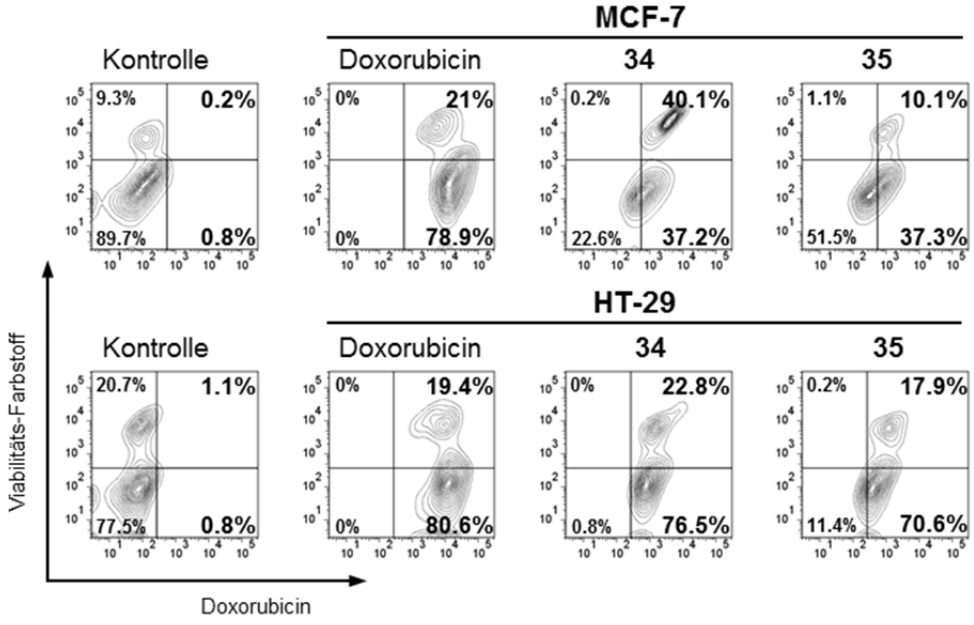


Abbildung 70: Bestimmung der Zellviabilität von MCF-7- und HT-29-Zellen mittels Durchflusszytometrie - nach Inkubation von 50 µM Doxorubicin und den entsprechenden Doxorubicin-CPP-Konjugaten für 72 h

Wie bei der durchflusszytometrischen Zellaufnahmestudie müssen auch hier die Fluoreszenzeigenschaften der Verbindungen berücksichtigt werden, so dass die reale Zellaufnahme wohlmöglich höher ist. Daraus kann ebenso gefolgert werden, dass wohlmöglich ein geringer Teil an Zellen die Doxorubicin-CPP-Konjugate aufgenommen hat, aber aufgrund der entsprechenden Fluoreszenzintensität bei niedrigen Konzentrationen nicht detektiert wurde. Somit besteht die Möglichkeit, dass nicht nur Doxorubicin, sondern auch **34** in allen Zellen gegenwärtig ist.
Um mehr Informationen über die zytotoxischen Eigenschaften der beiden Doxorubicin-CPP-Konjugate zu erlangen, wurden die Verbindungen anschließend mit einem MTT-Test untersucht.

5.1.6 Untersuchung der *In-vitro*-Zytotoxizität mittels MTT-Test

Im Gegensatz zur durchflusszytometrische Toxizitätsstudie verwendet der MTT-Test keine Quantifizierung der Fluoreszenz, um die *In-vitro*-Zytotoxizität zu bestimmen. Dieser Test beruht auf der Reduktion des gelben Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid zu einem Formazan in lebenden Zellen.[32] Die gemessene Absorption des neu gebildeten violetten Farbstoffs steht in direkter Relation zur Viabilität der Zellen.
Um den MTT-Test durchführen zu können, wurden die MCF-7- und HT-29-Zellen vorab erneut mit Doxorubicin und den beiden Konjugaten in Serum enthaltendem Medium für 72 Stunden inkubiert. Hierbei wurde eine Konzentrationsreihe von 0.1 bis 50 µM angewendet. Im Anschluss daran wurde das MTT-Reagenz dazugegeben und die Absorption des Formazans bei 570 nm gemessen. Die dabei erhaltenen Werte des MTT-Tests wurden anschließend als IC_{50}-Wert dargestellt, was der Konzentration an Arzneistoff entspricht, bei der 50 % der Zellen tot vorliegen (Tabelle 1).

Tabelle 1: IC_{50}-Werte von Doxorubicin und den CPP-Konjugaten in MCF-7- und HT-29-Zellen

	MCF-7 IC_{50} (µM)	HT-29 IC_{50} (µM)
Doxorubicin	0.4	1.2
34	11.4	19.0
35	27.0	24.7

Der zytostatische Effekt des freien Arzneistoffs ist in beiden Zelllinien mit Werten im niedrigen micromolaren Bereich sehr hoch. Das Polyarginin-Doxorubicin-Konjugat (**34**)

hat in HT-29-Zellen einen IC_{50}-Wert von 19.0 µM, während der IC_{50}-Wert in der Brustkrebszelllinie deutlich niedriger ist (11.4 µM). Diese Daten sind in guter Übereinstimmung mit den zytotoxischen Eigenschaften, welche bei der Durchflusszytometrie erhalten wurden. Die *In-vitro*-Zytotoxizität von **35** ist in beiden Zelllinien im Vergleich zu **34** geringer, wobei der zytostatische Effekt von **35** in MCF-7- (IC_{50}: 27.0 µM) stärker als in HT-29-Zellen (IC_{50}: 24.7 µM) ausgeprägt ist. In Analogie zu **34** wurde dieses Verhalten ebenfalls bei der Durchflusszytometrie beobachtet.

Dennoch muss beim MTT-Test die verwendete Konzentrationsreihe berücksichtigt werden, da die darüber ermittelten IC_{50}-Werte niedrigeren Konzentrationen als der 50 µM des durchflusszytometrischen Viabilitätstest entsprechen. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass Doxorubicin im Vergleich zu **34** bei geringen Konzentrationen eine höhere Aktivität aufweist, wobei **34** erst bei größeren Konzentrationen zunehmend zytotoxischer wirkt. Eine plausible Erklärung für dieses Phänomen ist die bei erhöhter Konzentration gesteigerte Endozytose-unabhängige Aufnahme in Form von direkter Translokation der Polyarginine, welche die effiziente Anreicherung des Arzneistoffes in der Zelle ermöglicht.[26]

Um den Einfluss der zellpenetrierenden Peptide auf die zytotoxischen Eigenschaften der Konjugate zu untersuchen, wurde abschließend ein MTT-Test für das Polyarginin (**32**) und das amphipathische CPP (**33**) durchgeführt. Wie in der Literatur bereits beschrieben, konnte auch hier keine signifikante *In-vitro*-Zytotoxizität für die beiden Peptide beobachtet werden.[16,33] Deshalb kann abschließend zusammengefasst werden, dass die zytotoxischen Eigenschaften der Konjugate **34** und **35** ausschließlich auf dem Anthracyclin beziehungsweise den mit Doxorubicin-assoziierten Abbauprodukten (Abbildung 66; B und C) beruhen. Um zu überprüfen, ob diese zytotoxischen Substanzen auch an ihrem eigentlichen Wirkort, dem Nukleus, aktiv sind, wurde im Anschluss mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie die intrazelluläre Arzneistoffverteilung untersucht.

5.1.7 Konfokalmikroskopische Analyse der intrazellulären Arzneistoffverteilung

Der hauptsächliche Wirkmechanismus, welcher für das Anthracyclin Doxorubicin angenommen wird, besteht in DNA-Interkalation und darauffolgender Hemmung der Topoisomerasen-Funktionalität.[34] Deswegen muss der Arzneistoff genau betrachtet im Nukleus angereichert werden, um seine zytotoxischen Eigenschaften zu entfalten. Aufgrund der intrinsischen Fluoreszenz des Doxorubicin und entsprechender

Gegenfärbung des Zellkerns kann dies leicht durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden.

Um die intrazelluläre Arzneistoffverteilung mit Konfokalmikroskopie zu untersuchen, wurden die beiden bereits verwendeten Zelllinien zunächst für 5 Stunden mit 50 µM Doxorubicin und den entsprechenden CPP-Konjugaten inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Hoechst-Farbstoff dazugegeben, für weitere 30 Minuten inkubiert und die Fluoreszenz mit dem Konfokalmikroskop beobachtet. Diese *bis*-Benzimidazol-Farbstoffe können hoch spezifisch an Adenin und Thymin reiche DNA-Sequenzen binden.[35] Anhand der Kolokalisation von Hoechst und Doxorubicin kann somit gezeigt werden, ob der Arzneistoff an seinem Wirkort angekommen ist.

Die in der folgenden Abbildung dargestellten Tafeln des detektierten Fluoreszenzsignals verdeutlichen, dass freies Doxorubicin (rote Farbgebung) in den Zellkernen beider Zelllinien gefunden werden kann (Abbildung 71). Wobei in HT-29-Zellen das Zytostatikum ebenfalls im Cytosol beobachtet wird. Anhand der Bilder ist zu erkennen, dass der Arzneistoff in nahezu allen Zellen gegenwärtig ist. Demgegenüber scheint die Aufnahme der Doxorubicin-CPP-Konjugate verringert zu sein, wie bereits bei der mittels Durchflusszytometrie bestimmten Zellaufnahme zu sehen war. Dabei besteht wiederum die Möglichkeit, dass die tatsächliche Aufnahme aufgrund der verringerten Fluoreszenz höher ist. Ungeachtet dessen kann **34** in beiden Zelllinien ebenfalls sowohl im Zellkern als auch zu einem großen Anteil im Cytosol detektiert werden. Dadurch können zwei Schlussfolgerungen gezogen werden. Zum einen ist nach 5 Stunden die Glutathion-vermittelte Disulfidspaltung wohl noch nicht vollständig abgeschlossen, auch wenn die Abbaustudie ein anderes Resultat offenbarte, und zum anderen wird verdeutlicht, dass das reduzierte Doxorubicin-CPP-Konjugat toxische Metabolite in den Zellkern liefern kann. Ein ähnliches Verhalten wird auch für **35** beobachtet, wobei Doxorubicin-assoziierte Fluoreszenz nahezu ausschließlich im Zellkern detektiert wird. Dies ist anhand intensiver violetter Färbung durch die simultane Farbgebung mit Hoechst ersichtlich. Allerdings muss auch hier berücksichtigt werden, dass die Fluoreszenz des ungespaltenen Doxorubicin-CPP-Konjugates verringert sein kann. Dies bedeutet, dass sowohl **34** als auch **35** von MCF-7- und HT-29-Zellen aufgenommen wurde, jedoch aufgrund der geringen Konzentration durch Konfokalmikroskopie in den Tumorzellen nicht beobachtet werden kann.

Prolinreiche zellpenetrierende Peptide wie **33** werden durch Lipid-Raft-Caveolae-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen.[36] Bei dieser Form der Internalisierung sind keine Lysosomen involviert.[37] Dadurch kann das Doxorubicin-

CPP-Konjugat **35** intakt das Cytosol erreichen, dort von Glutathion gespalten werden und somit den Arzneistoff in den Zellkern abgeben. Da derartige amphipathische zellpenetrierende Peptide typischerweise nicht in den Zellkern aufgenommen werden können, wird hierdurch das leistungsfähige Prinzip der Glutathion-vermittelten Wirkstofffreisetzung erneut verdeutlicht.[16,38]

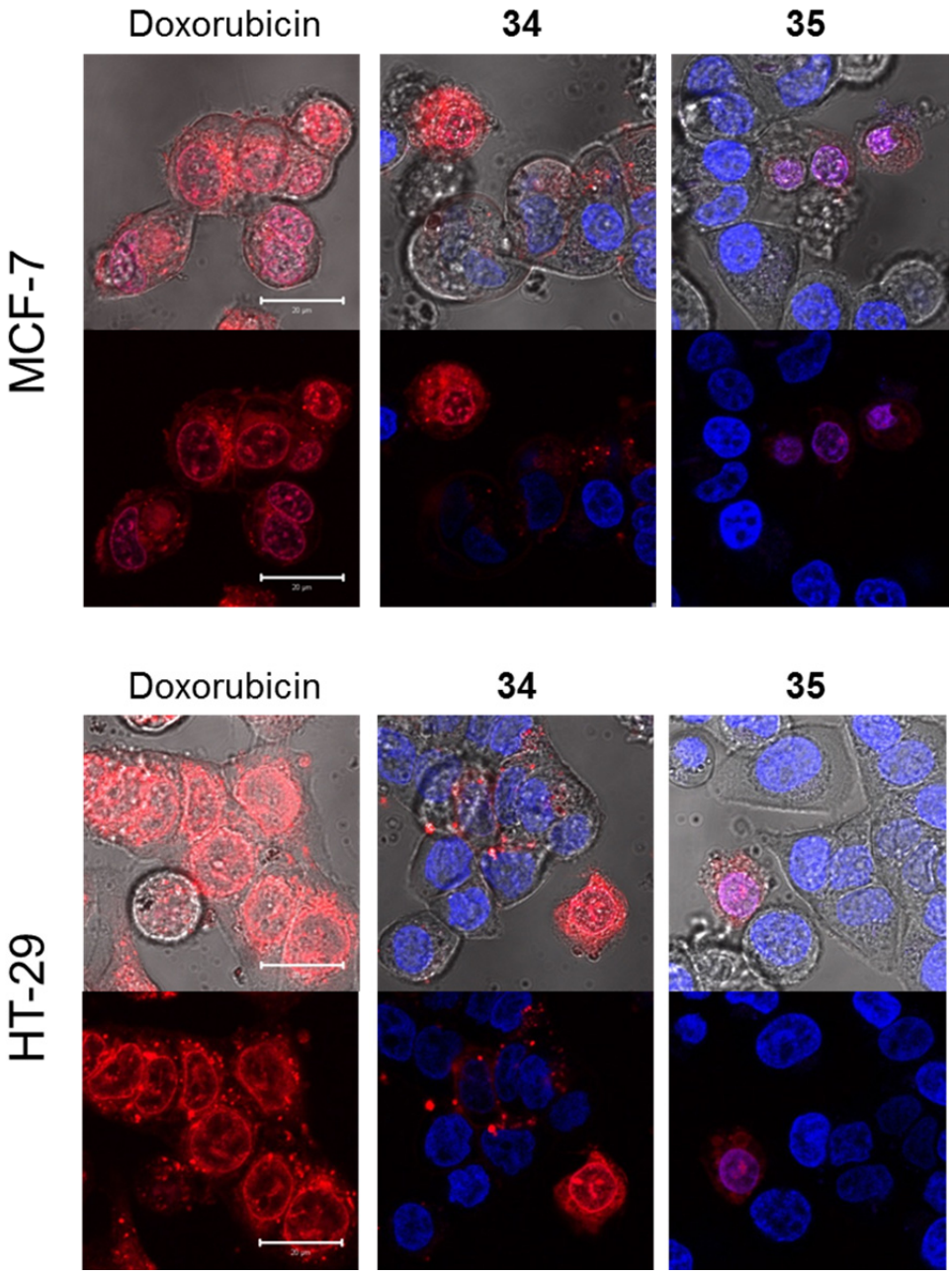


Abbildung 71: Untersuchung der intrazellulären Wirkstoffverteilung von Doxorubicin und den entsprechenden CPP-Konjugaten in MCF-7- und HT-29-Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Maßstabsbalken: 20 µm)

Mit Hilfe der bisher erzielten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Funktionalisierung mit nur einem zellpenetrierenden Peptid zu keiner verbesserten Zellinternalisierung des Arzneistoffs führt. Daher wurde eine multivalente Doxorubicin-CPP-Struktur entwickelt, welche die Modifikation mit zwei Thiol-tragenden Aminosäuresequenzen gestattet, um die Aufnahme der toxischen Substanz weiter zu erhöhen. Die Synthese dieses neuartigen sowie spaltbaren Biokonjugates wird im folgenden Teil beschrieben.

5.2 Multivalente zellpenetrierende Peptid-Doxorubicin-Konjugate

5.2.1 Synthese und Charakterisierung

Multivalenz spielt in biologischen Systemen und bei biochemischen Vorgängen eine wichtige Rolle,[39] da sich multivalente Strukturen gegenüber monovalenten Systemen durch eine erhebliche Verstärkung des Effektes der einzelnen Einheit auszeichnen.[40] Dieses Phänomen wurde ebenso für zellpenetrierende Peptide beobachtet. Eggimann *et al.* gelang die Synthese einer Reihe von multivalenten zellpenetrierenden Peptiden, basierend auf dem dendritischen Kern der Aminosäure Lysin.[41] Dabei wurde gezeigt, dass bivalente kationische zellpenetrierende Peptide eine deutlich verbesserte Zellaufnahme aufweisen. Dieser Effekt war jedoch bei bivalenten amphipathischen Peptiden vernachlässigbar klein.

Das im vorangegangen Kapitel bereits dargestellte Doxorubicinderivat **26** erfüllt die benötigten Anforderungen, um CPP-basierte bivalente Strukturen aufzubauen. Aufgrund der beiden aktivierten Thiole von **26** kann dieses leicht mit terminalen Sulfhydrylgruppen von Cysteinen in Peptiden umgesetzt werden.

Um das zwei kationische zellpenetrierende Peptide-tragende Doxorubicin Derivat **36** darzustellen, wurde deshalb zunächst **26** in einem Gemisch aus DMF und DPBS gelöst. Anschließend wurden zwei Äquivalente von **32** dazugegeben und das Reaktionsgemisch unter Argon gerührt, um die Ausbildung von Disulfiden von **32** zu vermeiden. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und zeigte bereits nach zwei Stunden vollständigen Umsatz. Nach erfolgter Aufreinigung wurde das Lösungsmittel der Produktfraktionen entfernt, der Rückstand in Methanol gelöst und das Produkt als roter Feststoff in Diethylether ausgefällt.

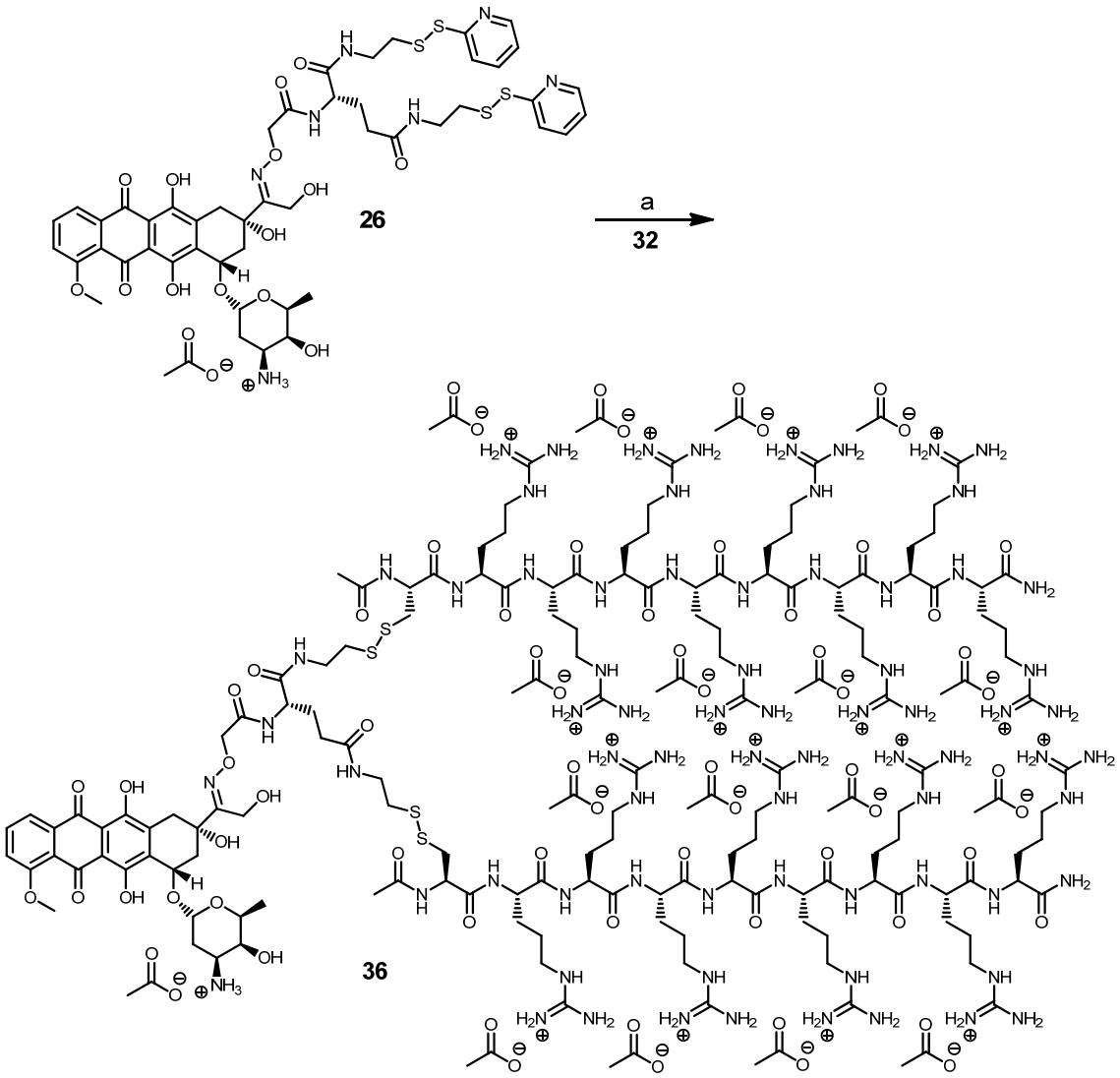


Abbildung 72: Darstellung des zwei kationische zellpenetrierende Peptide-tragenden Doxorubicin-Abkömmlings; (a) **32** (2 eq), DPBS, DMF, Argon, 3 h, r.t., 69 %

Die durch abschließende Filtration erhaltene Zielverbindung zeigte im MALDI-TOF-Massenspektrum kein Signal für die monosubstituierte Verbindung. Um dies weiter eingehend zu überprüfen wurde **36** mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Dabei konnte die Struktur anhand der COSY-, NOESY- und TOCSY-Spektren vollständig aufgeklärt werden. Das charakteristische ^{1}H-NMR-Spektrum von **36** in D_2O ist in Abbildung 73 dargestellt. Da die Amidprotonen von Wasser ausgetauscht werden, sind im Tieffeld ausschließlich die Peaks des Aromaten zu erkennen. In diesem Bereich werden nur die drei aromatischen Protonen des Anthracyclins (**a**, **b**, **c**) beobachtet und keine der 2-Pyridyldisulfid-Funktion. Dadurch wird bereits eine gute Indikation für das Vorhandensein der beiden zellpenetrierenden Peptide gegeben. Darüber hinaus ist die Gegenwart der Peptide an den zwei Singuletts bei 2.04 und 2.03 ppm zu erkennen.

Diese entsprechen den acetylierten Aminogruppen der Cysteine. Aufgrund der großen Anzahl gleicher Wiederholungseinheiten sind die Argininseitenketten ungeeignet, um eine definitive Aussage zum Vorhandensein der beiden zellpenetrierenden Peptide zu machen. Des Weiteren befinden sich unter den großen Seitenkettenpeaks auch eine Vielzahl nicht Arginin-verwandter Protonen (**q**, **l**), welche nur anhand der 2D-Experimente ermittelt werden konnten. Obwohl das isolierte Produkt zusätzlich im Vakuum getrocknet wurde, konnten Lösungsmittelspuren detektiert werden, wobei das für biologische Anwendungen schädliche Triethylamin im ^{1}H-NMR-Spektrum nicht zu beobachten war.

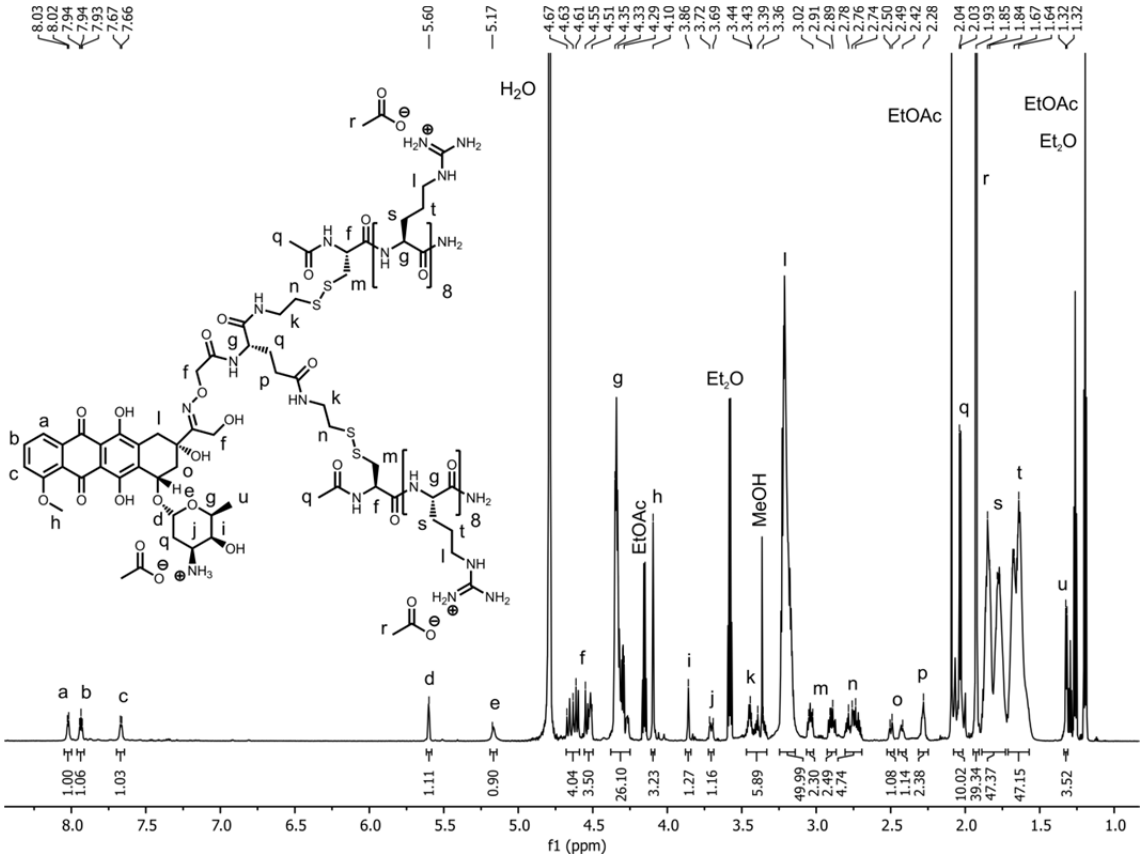


Abbildung 73: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **36** in D_2O (850 MHz)

Das ergänzende Gegenstück zu **36** würde ein Doxorubicin-CPP-Konjugat darstellen, welches demgegenüber zwei Arzneistoffmoleküle und nur ein zellpenetrierendes Peptid aufweist. Hierbei würde jedoch nicht die verbesserte Zellaufnahme der Verbindung im Vordergrund stehen, sondern die intrazelluläre Freisetzung eines hoch DNA-affinen Doxorubicinderivates. Um ein derartiges Molekül zu synthetisieren, kann ebenfalls ein bereits dargestellter Doxorubicin-Abkömmling verwendet werden. Da das funktionale Doxorubicin-Dimer **14** neben den beiden Anthracylinen ein aktiviertes Thiol besitzt, kann dieses leicht mit zellpenetrierenden Peptiden umgesetzt werden.

Um dies durchzuführen, wurde zunächst **14** in einem Gemisch aus DMF und 25 mM TEAA-Puffer (pH 7) gelöst und anschließend mit einem Überschuss an **32** versetzt. Nach beendeter Reaktion wurde mittels HPLC aufgereinigt, um das Produkt von unreagiertem Peptid abzutrennen. Die Produktfraktionen wurden im Vakuum eingeengt und der Rückstand in Diethylether ausgefällt.

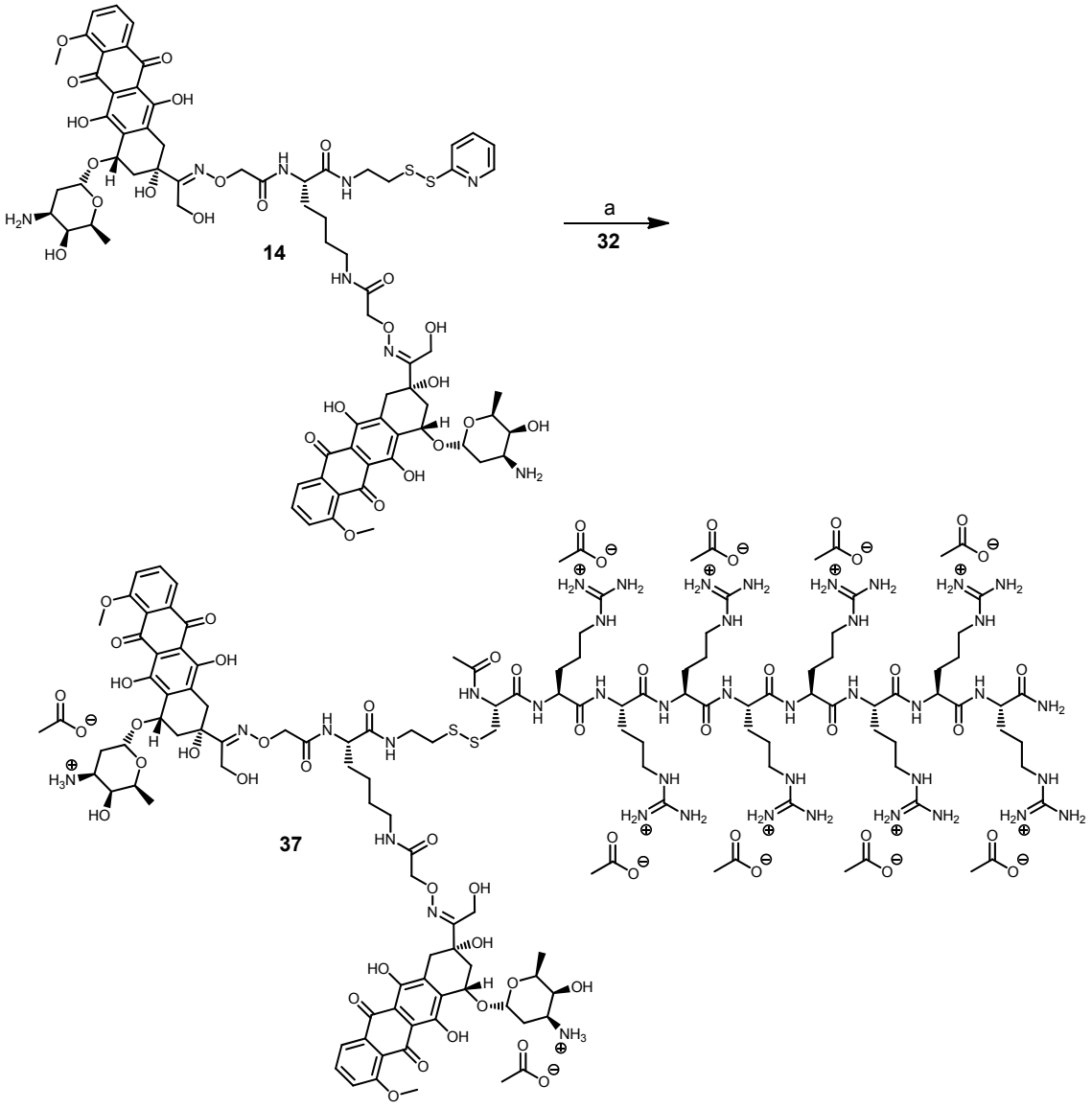


Abbildung 74: Synthese des Doxorubicin-Dimer-CPP-Konjugates; (a) **32** (1.5 eq), 25 mM TEAA-Puffer (pH 7), DMF, Argon, 3 h, r.t., 72 %

Das durch Filtration isolierte Produkt wurde darauffolgend mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht (Abbildung 75). Obwohl bei der Aufreinigung durch präparative RP-HPLC das Eluat eines Peaks eingesammelt wurde, konnten im Massenspektrum eine Vielzahl von Signalen detektiert werden. Neben dem Produktpeak sowie den entsprechenden Natrium- und Kaliumsalzen waren jedoch

keine Nebenprodukte vorhanden, da bei genauerer Betrachtung zu erkennen ist, dass es sich überwiegend um Fragmentierung der eigentlichen Substanz handelt. Die beiden Peaks bei 2667.99 und 2684.97 m/z entsprechen beispielsweise der Produktmasse ohne das Zuckermolekül, wobei der Abstand beider Peaks mit der Masse von Sauerstoff übereinstimmt. Dieses Verhalten ist durch zwei unterschiedliche Fragmentierungswege der Etherbrücke des Acetals von Daunosamin zu erklären. Ungeachtet dessen zeigte die Charakterisierung durch NMR-Spektroskopie, dass beide Zucker des Biokonjugates vollständig vorhanden sind, da die sechs Protonen der Methylgruppe von Daunosamin sowie die charakteristischen sechs aromatischen Protonen des Anthracyclins beobachtet werden konnten. Die übrigen Fragmentierungsprodukte des erhaltenen MALDI-TOF-Massenspektrums lassen sich in ähnlicher Weise erklären beziehungsweise deren Koexistenz durch NMR Spektroskopie widerlegen.

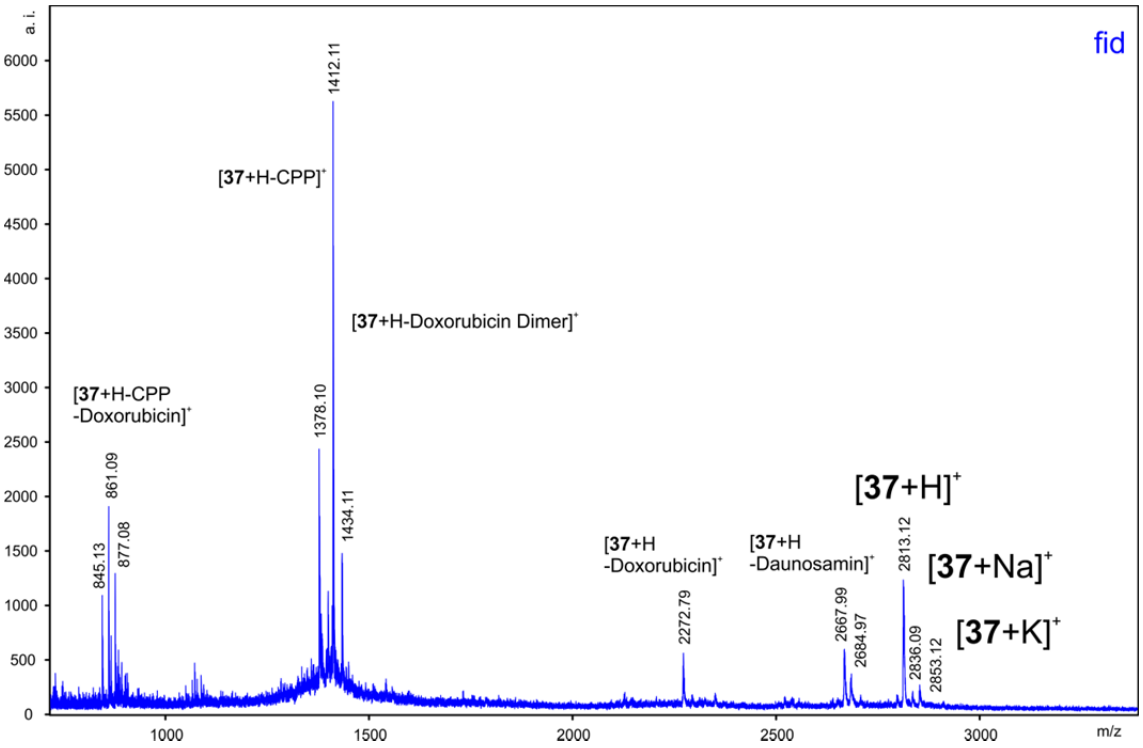


Abbildung 75: MALDI-TOF-Massenspektrum von **37** (Matrix: αCHCA)

Anhand der beiden dargestellten multivalenten Doxorubicin-CPP-Konjugate lässt sich nun weiter untersuchen, ob und inwieweit sich die zelluläre Aufnahme sowie die zytotoxischen Eigenschaften im Vergleich zu Verbindung **34** ändern. Für **36** wäre eine höhere Zellaufnahme zu erwarten, wohingegen **37** die zytotoxischere Verbindung darstellen müsste. Allerdings haben die in dieser Arbeit bisher beschriebenen Biokonjugate keinerlei Schutzfunktion, so dass die Peptide im menschlichen

Organismus von Enzymen angegriffen werden können. Dadurch wird deren Potential für mögliche *In-vivo*-Anwendungen verringert. Die Funktionalisierung mit einem Polyethylenglykol-Polymer könnte jedoch die „Stabilität“ der Peptidverbindung verbessern. Dieses Ziel wurde ebenfalls bei der Darstellung der folgenden Doxorubicinderivate verfolgt.

5.3 Funktionale zellpenetrierende Peptid-Doxorubicin-Abkömmlinge

5.3.1 Synthese und Charakterisierung

Die Verknüpfung von Peptiden und Proteinen mit Polyethylenglykol ist für deren therapeutische und biotechnologische Anwendungen von zunehmendem Interesse.[42] Durch die Funktionalisierung mit dem Polymer wird nicht nur die Verweildauer des Biomoleküls durch Verminderung der renalen Ausscheidung erhöht, sondern auch die Anfälligkeit für einen etwaigen enzymatischen Verdau minimiert.[43] Des Weiteren zeichnet sich Polyethylenglykol durch seine hohe Wasserlöslichkeit und Biokompatibilität aus.[44] Da sowohl zellpenetrierende Peptide als auch Anthracycline eine hohe Affinität für Serumproteine besitzen, welche folglich deren Effektivität erheblich abschwächt, kann die Funktionalisierung mit einem ungeladenen Polyethylenglykol-Polymer diesen Effekt reduzieren.

Um die klinische Relevanz von Doxorubicin-CPP-Konjugaten zu erhöhen, wurde daher eine entsprechende mit Polyethylenglykol funktionalisierte Verbindung dargestellt, wobei erneut auf die Chemie der 2-Pyridyldisulfide zurückgegriffen wurde. Dadurch kann das Polymer nach erfolgter CPP-vermittelter Aufnahme durch die reduktive intrazelluläre Umgebung wieder gespalten werden.

Da die einfachste chemisch zugängliche funktionelle Gruppe des bereits synthetisierten Doxorubicin-CPP-Konjugates **34** das Amin des Zuckers ist, wurde die Verbindung zunächst mit *N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat umgesetzt. Dabei wurde die Reaktion in einem Gemisch aus Wasser und DMF mit einem zweifachen Überschuss an Vernetzer durchgeführt. Der Überschuss des Vernetzers ist hierbei unbedingt notwendig, da andernfalls durch Hydrolyse des NHS-Ester von *N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat kein vollständiger Umsatz zu **38** möglich ist. Aufgrund der hohen Basizität der Guanidinium-Gruppen des Polyarginin ist hier keine Nebenreaktion mit dem Vernetzerreagenz zu erwarten. Nach vier Stunden

Reaktionszeit war der Peak des Eduktes (**32**) gemäß HPLC vollständig verschwunden, so dass das Rohprodukt im Anschluss präparativ aufgereinigt werden konnte.
Die NMR-spektroskopische Untersuchung der isolierten Verbindung zeigte allerdings, dass ein Teil der Guanidinium-Gruppen 3-(2-Pyridyldithio)-propionsäure als Gegenion besitzen und nicht etwa wie zu vermuten die Essigsäure des HPLC-Puffers. Das Hydrolyseprodukt des Vernetzers konnte durch erneute Aufreinigung mittels HPLC unter veränderten Gradienten-Bedingungen ebenfalls nur zu einem kleinen Teil entfernt werden, da die Wechselwirkungen mit den Argininseitenketten scheinbar besonders stark sind. Die Entfernung des Propionsäurederivates ist jedoch für weitere Reaktionen unabdingbar, da andernfalls leicht eine Reihe von Nebenreaktionen stattfinden können.
Aufgrund des großen Unterschiedenes bezüglich des hydrodynamischen Radius von **38** und der 3-(2-Pyridyldithio)-propionsäure konnte dennoch das ungewünschte Gegenion durch GPC an Bio-Gel® P-2 mit 25 mM Triethylammoniumacetatpuffer (pH 7) als Laufmittel chromatographisch abgetrennt werden.

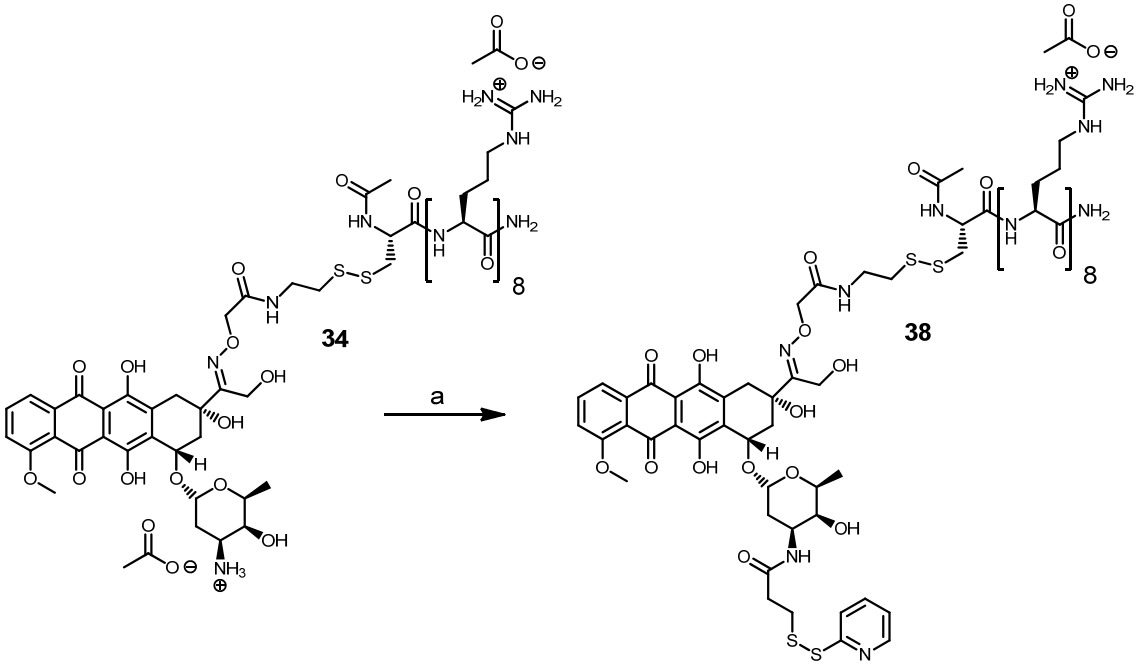


Abbildung 76: Modifikation des Polyarginin-Doxorubicin-Konjugates; (a) *N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (2 eq), Wasser, DMF, 4 h, r.t., 71 %

Um die strukturelle Identität von **38** zu belegen, zeigte sich MALDI-TOF-Massenspektrometrie als keine geeignete Charakterisierungsmethode, da hierbei die Gegenionen der Guanidinium-Gruppen typischerweise nicht detektiert werden können. Demgegenüber kann **38** umso leichter durch NMR-Spektroskopie charakterisiert

werden (Abbildung 77). Anhand des entsprechenden COSY-Kopplungsmuster können die aromatischen Protonen des Doxorubicin (**b**, **c**, **e**) und des 2-Pyridyldisulfid (**a**, **d**, **f**) voneinander unterschieden werden, wobei das charakteristische Proton (**a**) in direkter Nähe zum Pyridyl-Stickstoff als guter Anhaltspunkt dient. Bei genauerer Betrachtung der zugehörigen Integrale ist zu erkennen, dass alle dem zu erwartenden Wert von eins entsprechen. Des Weiteren werden die acht Acetatgegenionen bei 1.92 ppm beobachtet. Mit Hilfe dieser Informationen und des Massenspektrums kann schlussgefolgert werden, dass ausschließlich Verbindung **38** mit den relevanten Gegenionen isoliert wurde.

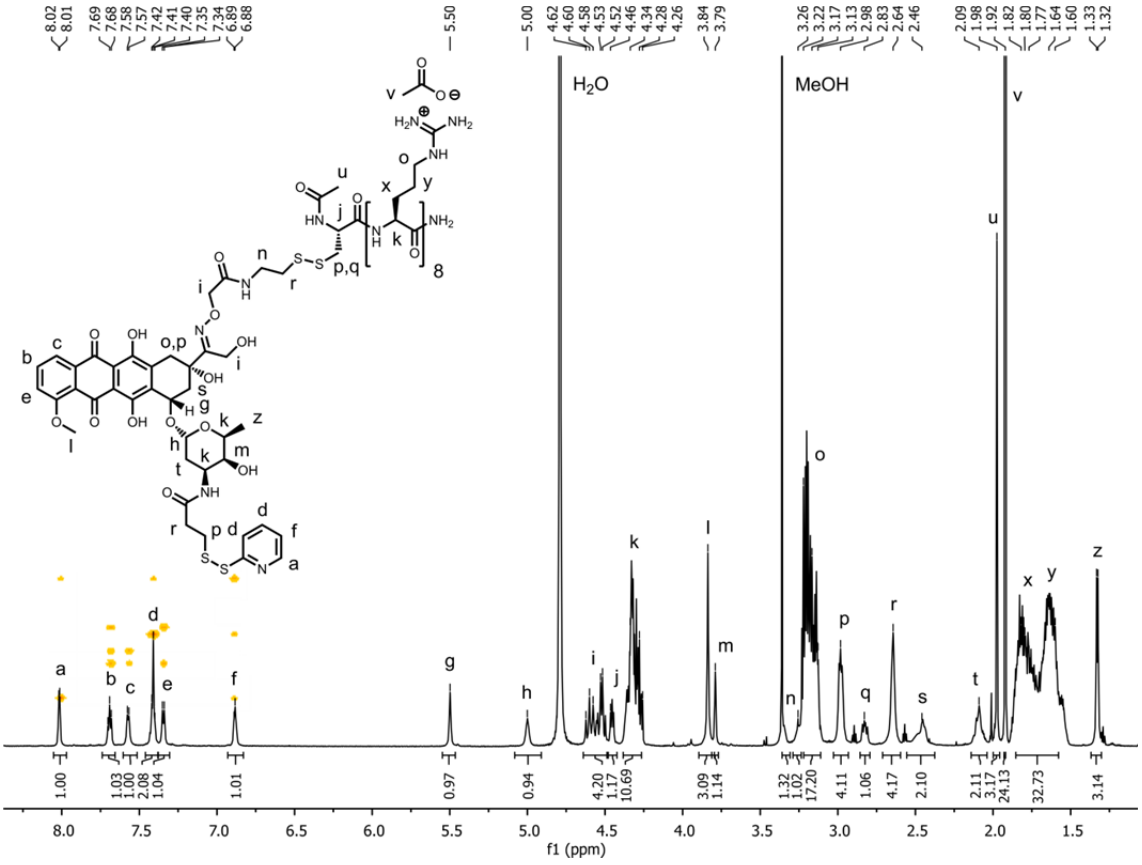


Abbildung 77: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **38** in D_2O (700 MHz) – inklusive COSY-Kopplungamuster der aromatischen Protonen

Der dargestellte Doxorubicin-Abkömmling **38** kann nun mit Thiol-funktionalisiertem Polyethylenglykol umgesetzt werden. Dafür wurde **38** zunächst in einer neutralen methanolischen Pufferlösung vorgelegt und anschließend mit einem geringen Überschuss (1.1 eq) des Ethylenglykol-Polymers (M_R = 2000 g/mol) gelöst in dem gleichen Lösungsmittelgemsich unter Argon langsam dazugegeben. Dadurch konnte die Ausbildung von Nebenprodukten vermieden und der unreagierte Überschuss des Polymers durch GPC an Bio-Gel® P-2 mit 25 mM Triethylammoniumacetatpuffer (pH

7) als Laufmittel chromatographisch abgetrennt werden. Das Lösungsmittel der isolierten Fraktionen wurde im Anschluss daran entfernt, der Rückstand in Methanol gelöst und das Produkt als roter Feststoff in Diethylether ausgefällt.

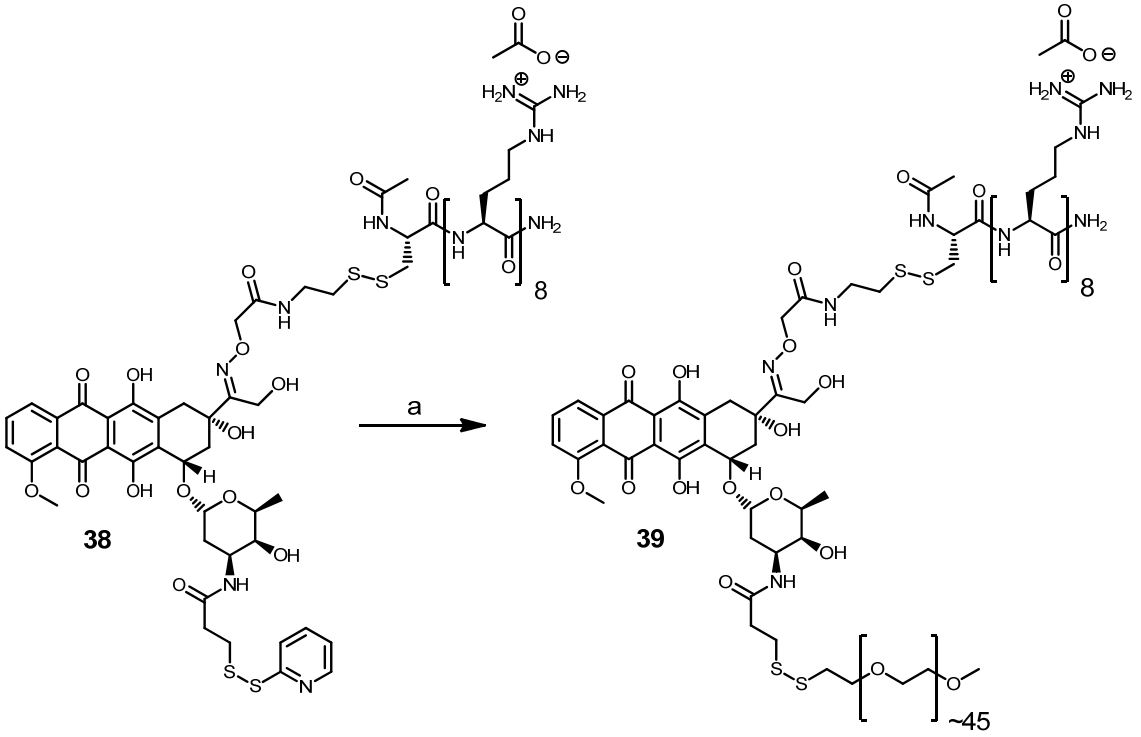


Abbildung 78: Darstellung des neuartigen spaltbaren Polyethylenglykol-Doxorubicin-CPP-Konjugates; (a) Thiol-funktionalisiertes Polyethylenglykol (1.1 eq), 25 mM TEAA-Puffer (pH 7), MeOH, Argon, über Nacht, r.t., 82 %

Die Charakterisierung des Polyethylenglykol-Doxorubicin-CPP-Konjugates erwies sich als nicht trivial. NMR-spektroskopische Analyse der isolierten Verbindung führte unabhängig vom verwendeten deuterierten Lösungsmittel (MeOH, DMSO, DMF, Wasser) zu keinen für die Sturkturaufklärung verwertbaren Signalen. Das erhaltene MALDI-TOF-Massenspektrum von **39** war ebenfalls nicht aussagekräftig, da erneut erhebliche Fragmentierung der vermessenen Substanz zu beobachten war und die Molekulargewichtsverteilung des Polymers (PDI = 1.15) eine eindeutige Peakzuordnung zusätzlich erschwerte.

Ungeachtet dessen konnte die Zusammensetzung der Struktur von **39** durch gelektrophoretische Analyse identifiziert werden. Dabei spielen die intrinsischen Parameter der Substanz eine entscheidende Rolle. Die erhaltenen Ergebnisse der SDS-PAGE sind in Abbildung 79 dargestellt. Hierbei wurden in Spur 1 und 5 zwei verschiedene Peptidstandards aufgetragen, um mehr Informationen über das entsprechende Molekulargewicht der verwendeten Verbindungen zu gelangen. Das

Polyethylenglykol-Doxorubicin-CPP-Konjugat (**39**) sowie der synthetische Vorläufer (**34**) sind in der dritten und zweiten Spur zu beobachten. Das Thiol-funktionalisierte Ethylenglykol-Polymer befindet sich in Spur 4.

Da sowohl **34** als auch **39** eine Vielzahl von basischen Aminosäuren aufweisen, werden die Verbindungen effizient von Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt, was an der intensiven blauen Farbe zu erkennen ist (linke Tafel). Demgegenüber zeigt das untersuchte Polymer, wie zu erwarten, keine Färbung. Obwohl das Molekulargewicht von **39** größer als das des synthetischen Vorläufers ist, liegt dessen Bande minimal unter der von **34**, entspricht aber gemäß der beiden Standards dennoch dem erwarteten Molekulargewichtsbereich (oberhalb 3.5 kDa). Des Weiteren zeigten auch nur **34** und **39** Fluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht, welche mit dem Vorhandensein von Doxorubicin assoziiert werden kann (mittlere Tafel).

Anhand dieser Beobachtungen kann jedoch die Gegenwart eines Ethylenglykol-Polymers in **39** nicht belegt werden. Um dies zu überprüfen, wurde die von Skoog erstmals beschriebene Methode zur Ausbildung von Polyethylenglykol-vermittelten Bariumiodid-Komplexen angewendet.[45] Diese hoch selektive Methode zur Ethylenglykol-Polymer-Bestimmung findet ebenfalls praktische Anwendung in der SDS-PAGE.[46,47] Die dabei entstehenden Komplexe zeigen eine starke Absorption im sichtbaren Bereich des Lichtes. Dies ist anhand der intensiven orangenen Färbung der Banden in der rechten Tafel der folgenden Abbildung zu erkennen (Abbildung 79). Da **34** kein Ethylenglykol-Polymer trägt, ist hierfür entsprechend keine Komplexbildung zu erkennen. Demgegenüber zeigt **39** genau wie das Thiol-funktionalisierte Polyethylenglykol die charakteristische Bande. Aufgrund des höheren Molekulargewichtes von **39** liegt die Bande wie zu erwarten oberhalb des unmodifizierten Polymers. Da Standard 2 eine kaleidoskopische Referenz darstellt, sind die Peptidbanden auch ohne Coomassie-Färbung in der rechten Tafel eindeutlich ersichtlich. Dadurch kann beobachtet werden, dass das Thiol-funktionalisierte Ethylenglykol-Polymer mit seinem Molekulargewicht von 2000 g/mol erwartungsgemäß unterhalb der Standardbande bei 3.5 kDa liegt. Im Vergleich dazu ist die Bande von **39** oberhalb der des Standards zu erkennen.

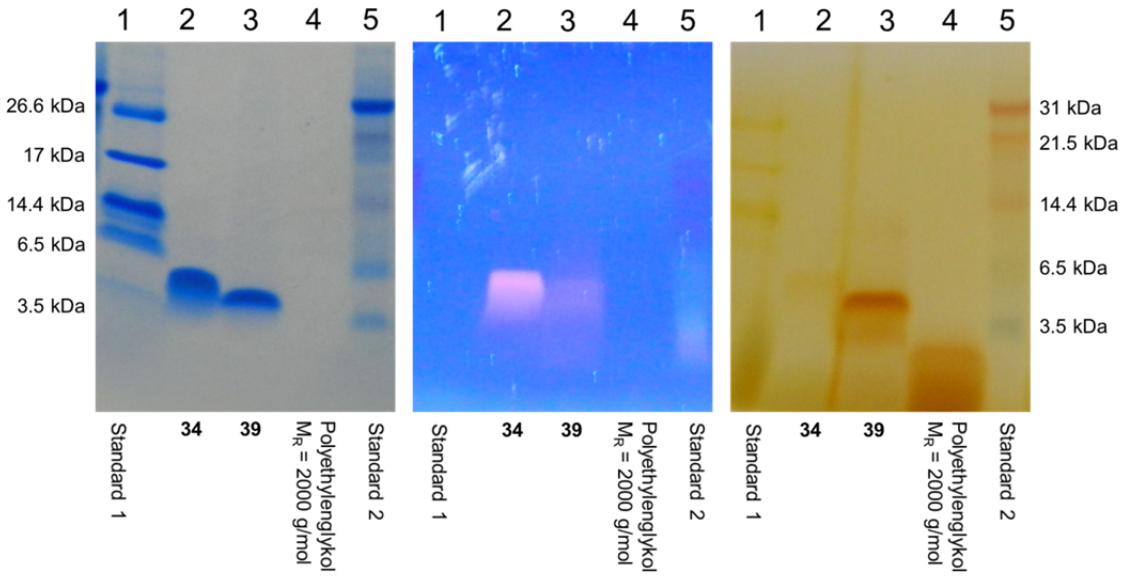


Abbildung 79: SDS-PAGE des Polyethylenglykol-Doxorubicin-CPP-Konjugates, verglichen mit dem synthetischen Vorläufer **34** sowie dem Thiol-funktionalisierten Ethylenglykol-Polymer; linke Tafel: Visualisierung der Peptidbanden durch Anfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau; mittlere Tafel: Detektion der Doxorubicin-Fluoreszenz; rechte Tafel: Veranschaulichung der erhaltenen Polyethylenglykolbanden durch Ausbildung von Bariumiodid-Komplexen

Anhand der durch SDS-PAGE erhaltenen Parameter kann schlussgefolgert werden, dass es sich bei **39** um eine Substanz (eine Bande) handelt, welche die zu erwartenden Charakteristika des Peptides, Arzneistoffs und Polymers eindeutig erfüllt. Nichtsdestotrotz wird bei der Darstellung von **39** auf das primäre Amin des Zuckers zurückgegriffen. Da bei allen vorangegangenen Modifikationen ausschließlich auf das aliphatische Keton des Doxorubicin zurückgegriffen wurde, soll ein weiteres Derivat genaue Rückschlüsse über die verwendete Funktionalisierungsmethode und deren Auswirkungen auf die Zytotoxizität ermöglichen.

Aus diesem Grund wurde darüber hinaus **40** synthetisiert. Bei dieser Verbindung bleibt das Daunosamin unmodifiert. Dennoch ermöglicht dieses funktionale Doxorubicinderivat, genau wie **38**, die Verknüpfung mit Thiol-tragenden Ethylenglykol-Polymeren. Um **40** darzustellen, kann wiederum auf das bereits vorhandene Repertoire an Arzneistoffabkömmlingen zurückgegriffen werden. Die für die Rezyklisierung von Octreotid verwendete Substanz entspricht bei genauerer Betrachtung den benötigten Anforderungen. Diese Verbindung besitzt im Gegensatz zu **38** bereits zwei 2-Pyridyldisulfide, jedoch kein zellpenetrierendes Peptid. Daher wurde **26** im Vergleich zur Darstellung von **36** mit nur einem Äquivalent des CPP umgesetzt. Durch Untersuchung der Reaktionsmischung mittels RP-HPLC konnte die Ausbildung der

zweifach substituierten Spezies **36** nur zu einem äußerst geringen Anteil beobachtet werden. Jedoch war bereits nach einer Stunde ein weiterer intensiver Peak mit geringerer Retentionszeit verglichen mit **26** im erhaltenen Chromatogramm zu detektieren. Nach vollständiger Umsetzung wurde dieser Peak durch präparative HPLC isoliert. Im Anschluss daran wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in Methanol gelöst und die rote Substanz in Diethylether ausgefällt.

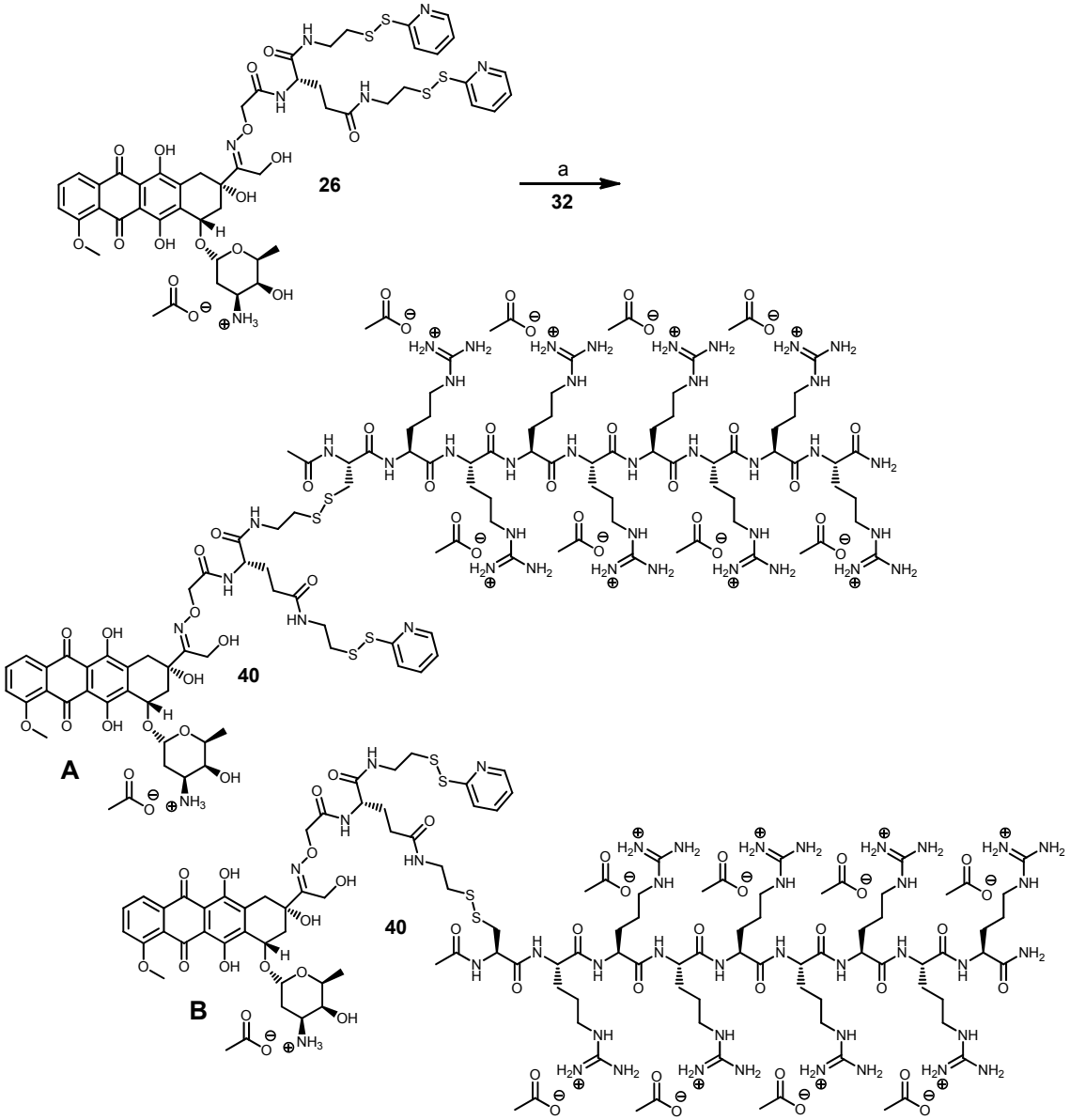


Abbildung 80: Darstellung der beiden Isomere des funktionalen Doxorubicin-Konjugates **40**; (a) **32** (1.1 eq), DPBS, DMF, Argon, 3 h, r.t., 67 %

Die anschließende Charakterisierung zeigte im MALDI-TOF-Massenspektrum die zu erwartende Masse von **40** sowie das entsprechende Natrium- und Kaliumsalz, wobei erneut Fragmentierung und dadurch freies Peptid zu beobachten war. Das

Vorhandensein von freiem Peptid konnte jedoch durch NMR-Spektroskopie ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde im ^{1}H-NMR-Spektrum analog zum Doxorubicin-Octreotid-Konjugat die Existenz zweier Isomere (Abbildung 80; A und B) beobachtet, da beide 2-Pyridyldisulfide eine ähnliche Reaktivität gegenüber dem verwendeten CPP aufweisen. Diese Reaktivität wird unter anderem durch die chemische Struktur des verwendeten Vernetzers, welcher die aktivierten Thiole an zwei frei drehbaren Ketten trägt, bedingt. Somit kommt es zu keiner sterischen Hinderung bei der Ausbildung der Disulfide mit der Aminosäure Cystein, was dazu führt, dass kein Disulfid bevorzugt gebildet wird. Aufgrund der geringen sterischen Anforderung des Vernetzers können sogar Moleküle, welche zwei Sulfhydrylgruppen besitzen, zyklisiert werden, wie bereits anhand des reduzierten Octreotides erfolgreich demonstriert werden konnte.

Der charakteristische Bereich der aromatischen Protonen von **40** ist zur Veranschaulichung der Gegenwart beider Isomere in der folgenden Abbildung dargestellt.

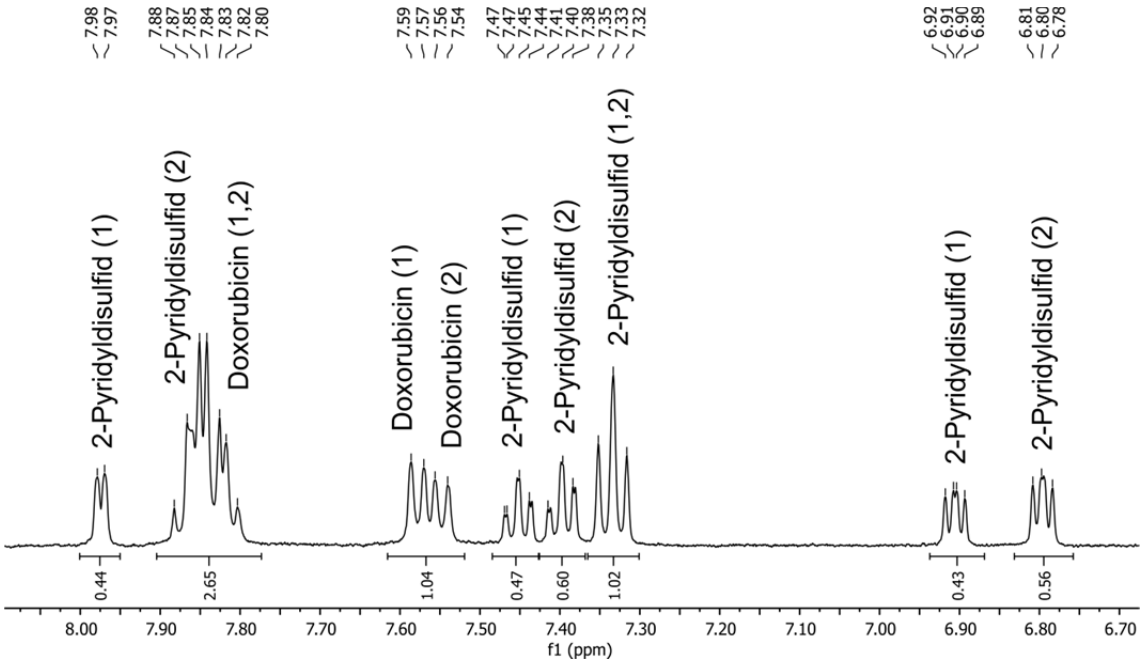


Abbildung 81: Ausschnitt aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **40** (A und B) in D_2O (500 MHz)

Anhand des Ausschnittes des ^{1}H-NMR-Spektrum von **40** können zwar zwei verschiedene Sätze an 2-Pyridyldisulfiden leicht ausgemacht werden, jedoch ist eine entsprechende Zuordnung zu einem der beiden Isomere nicht möglich. Auch unter Zuhilfenahme von 2D-NMR-Experimenten konnten keine aufschlussreichen Kopplungen zwischen der Pyridylgruppe, der Ethylenbrücke und dem Aminosäurekern

beobachtet werden, da die Protonen der Ethylenbrücken eine ähnliche chemische Verschiebung aufweisen. Den Weg über die NOE der Methylengruppe des Cystein zu gehen führte zu demselben Ergebnis.

Obwohl die beiden 2-Pyridyldisulfide in keiner räumlichen Nähe zu den aromatischen Protonen des Doxorubicin stehen, wird deren chemische Verschiebung beeinflusst. Dadurch liefert das zur Methoxygruppe *ortho*-ständige Proton zwei Dubletts bei 7.58 und 7.55 ppm. Aufgrund der annähernd gleichen chemischen Verschiebung können die beiden Peaks jedoch nicht separat integriert werden. Bei den übrigen aromatischen Protonen des Arzneistoffs ist eine derartige Differenzierung nicht möglich. Allerdings weist beispielsweise die Methylgruppe des Daunosamin für beide Isomere ebenfalls eine unterschiedliche chemische Verschiebung auf.

Dennoch ist es mit Hilfe des Auszuges des Protonenspektrums von **40** möglich, das Verhältnis der beiden Isomere zu bestimmen. Durch das COSY-Spektrum konnten die 2-Pyridyldisulfide in zwei Gruppen unterteilt werden. Anhand der Integrale der Peaks bei 6.90 und 6.80 ppm ist ein Verhältnis von 43 zu 56 zu erkennen. Die übrigen Signale der 2-Pyridyldisulfide weisen ein ähnliches Verhältnis auf, so dass schlussgefolgert werden kann, dass beide Isomere mit der nahezu selben Häufigkeit vorliegen. Dieses Verhalten wird durch die bereits zuvor erläuterte analoge Reaktivität der beiden aktivierten Thiole ermöglicht, so dass die Isomere zu äquivalenten Anteilen gebildet werden können, wie auch mit Hilfe des ^{1}H-NMR-Spektrums zu sehen ist.

Wie **38** besitzt nun **40** ebenfalls ein CPP und ein 2-Pyridyldisulfid, welches die Funktionalisierung mit dem Ethylenglykol-Polymer ermöglicht. Aber auch andere Thiol-tragende Moleküle könnten leicht mit **40** unter Ausbildung eines Disulfides verknüpft werden. Beispielgebend wäre es ebenso denkbar eine Kernlokalisierungssequenz einzuführen, um nicht nur Zellinternalisierung, sondern auch Nukleusakkumulation zu ermöglichen. Dieser Modifikationsansatz soll auch Gegenstand des folgenden Kapitels sein.

5.4 Literatur

[1] J. Nguyen, X. L. Xie, M. Neu, R. Dumitrascu, R. Reul, J. Sitterberg, U. Bakowsky, R. Schermuly, L. Fink, T. Schmehl, T. Gessler, W. Seeger, T. Kissel, *J. Gene Med.* **2008**, *10*, 1236

[2] A. Muratovska, M. R. Eccles, *FEBS Lett.* **2004**, *558*, 63

[3] S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S. F. Dowdy, *Science* **1999**, *285*, 1569

[4] Y. Xu, B. R. Liu, H. J. Lee, K. B. Shannon, J. G. Winiarz, T. C. Wang, H. J. Chiang, Y. W. Huang, *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**,

[5] E. A. Dubikovskaya, S. H. Thorne, T. H. Pillow, C. H. Contag, P. A. Wender, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 12128

[6] Z. H. Zheng, H. Aojula, D. Clarke, *J. Drug Targeting* **2010**, *18*, 477

[7] N. Q. Shi, W. Gao, B. Xiang, X. R. Qi, *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 1613

[8] J. F. Liang, V. C. Yang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5071

[9] I. Nakase, Y. Konishi, M. Ueda, H. Saji, S. Futaki, *J. Controlled Release* **2012**, *159*, 181

[10] M. Mazel, P. Clair, C. Rousselle, P. Vidal, J. M. Scherrmann, D. Mathieu, J. Temsamani, *Anti-Cancer Drugs* **2001**, *12*, 107

[11] F. Meyer-Losic, J. Quinonero, V. Dubois, B. Alluis, M. Dechambre, M. Michel, F. Cailler, A. M. Fernandez, A. Trouet, J. Kearsey, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6908

[12] Z. Miklan, E. Orban, G. Csik, G. Schlosser, A. Magyar, F. Hudecz, *Biopolymers* **2009**, *92*, 489

[13] G. Capranico, M. Binaschi, M. E. Borgnetto, F. Zunino, M. Palumbo, *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 323

[14] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5836

[15] F. Milletti, *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 850

[16] I. Martin, M. Teixido, E. Giralt, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 896

[17] M. I. Geli, M. Torrent, D. Ludevid, *Plant Cell* **1994**, *6*, 1911

[18] M. Zorko, U. Langel, *Adv. Drug Del. Rev.* **2005**, *57*, 529

[19] J. Fernandez-Carneado, M. J. Kogan, S. Pujals, E. Giralt, *Biopolymers* **2004**, *76*, 196

[20] A. Meister, M. E. Anderson, *Annu. Rev. Biochem* **1983**, *52*, 711

[21] G. K. Balendiran, R. Dabur, D. Fraser, *Cell Biochem. Funct.* **2004**, *22*, 343

[22] S. M. Deneke, B. L. Fanburg, *Am. J. Physiol.* **1989**, *257*, L163

[23] E. Orban, G. Mezo, P. Schlage, G. Csik, Z. Kulic, P. Ansorge, E. Fellinger, H. Moller, M. Manea, *Amino Acids* **2011**, *41*, 469

[24] A. L. Rucker, T. P. Creamer, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 980

[25] A. Sorkin, M. von Zastrow, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2002**, *3*, 600

[26] F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer, R. Brock, *Traffic* **2007**, *8*, 848

[27] K. A. Muirhead, P. K. Horan, G. Poste, *Bio-Technol.* **1985**, *3*, 337

[28] D. A. Gewirtz, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727

[29] P. Lajoie, I. R. Nabi, *Int. Rev. Cel. Mol. Bio.* **2010**, *282*, 135

[30] J. M. Siegfried, T. G. Burke, T. R. Tritton, *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 593

[31] S. P. Perfetto, P. K. Chattopadhyay, L. Lamoreaux, R. Nguyen, D. Ambrozak, R. A. Koup, M. Roederer, *J. Immunol. Methods* **2006**, *313*, 199

[32] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55

[33] G. Tünnemann, G. Ter-Avetisyan, R. M. Martin, M. Stoockl, A. Herrmann, C. Cardoso, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 469

[34] J. Nadas, D. X. Sun, *Expert Opin. Drug Discovery* **2006**, *1*, 549

[35] S. A. Latt, G. Stetten, *J. Histochem. Cytochem.* **1976**, *24*, 24

[36] S. Pujals, E. Giralt, *Adv. Drug Del. Rev.* **2008**, *60*, 473

[37] L. Pelkmans, A. Helenius, *Traffic* **2002**, *3*, 311

[38] S. Pujals, J. Fernandez-Carneado, M. D. Ludevid, E. Giralt, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 296

[39] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksch, J. Dernedde, C. Graf, E. W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472

[40] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755

[41] G. A. Eggimann, S. Buschor, T. Darbre, J.-L. Reymond, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6717

[42] F. M. Veronese, *Biomaterials* **2001**, *22*, 405

[43] M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, *Adv. Drug Del. Rev.* **2002**, *54*, 459

[44] F. M. Veronese, G. Pasut, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1451

[45] B. Skoog, *Vox Sang.* **1979**, *37*, 345

[46] M. M. Kurfürst, *Anal. Biochem.* **1992**, *200*, 244

[47] G. Zhang, X. H. Wang, Z. L. Wang, J. Y. Zhang, L. Suggs, *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 9

6 Kernlokalisierungssignale für Doxorubicin

Das Anthracyclin Doxorubicin entfaltet seine zytotoxischen Eigenschaften nach erfolgter Aufnahme in den Zellkern unter anderem durch DNA-Bindung und darauffolgende Topoisomerasen-Inhibition.[1,2] Dies bedeutet, dass durch eine erhöhte Anreicherung im Nukleus die Antitumor-Eigenschaften des Arzneistoffs signifikant verbessert werden können.[3] Die Applikation von Doxorubicin über Mizellen oder mit Dextran ummantelten Gold-Nanopartikeln hat bereits gezeigt, dass dadurch die Aufnahme von Doxorubicin über die Kernporen in den Nukleus gesteigert werden kann.[4,5] Daraus resultierte auch eine erhöhte Zytotoxizität, welche durch die Anwendung von mit Kernlokalisierungssequenzen konjugierten Mizellen sowie Nanopartikeln weiter erhöht wurde.[3,6]

Das Prinzip der Zellkernanreicherung des Arzneistoffs spielt bei der Bekämpfung von arzneistoffresistenten Tumorzellen ebenfalls eine wichtige Rolle, da die in den Tumorzellen überexprimierten Transmembranproteine, welche den Arzneistoff wieder aus der Zelle transportieren, bevor er seinen Wirkort erreicht, nicht nur in der Plasmamembran, sondern auch in der Kernhülle gegenwärtig sind.[7,8]

Aufgrund der zahlreichen positiven Ladungen der NLS sind diese Peptide ebenfalls dazu in der Lage die Plasmamembran zu überwinden, auch wenn das Maß an Zellinternalisierung verglichen mit zellpenetrierenden Peptiden geringer ist.[9-11] Ein Kernlokalisierungssignal mit einer derartigen Vielzahl an basischen Aminosäuren hat seinen Ursprung im Simian-Virus 40.[12] Aufgrund der dualen Aufnahme der Aminosäuresequenz PKKKRKV über Plasmamembran und Kernhülle hinweg könnte dieses Peptid die Abgabe von im Zellkern wirksamen Arzneistoffen wie Doxorubicin ermöglichen. Obwohl diese Sequenz bei der Funktionalisierung von Mizellen und Nanopartikeln für die verbesserte Wirkstoffabgabe bereits eine breite praktische Anwendung fand, wurden bislang keine direkt verknüpften Doxorubicin-NLS-Konjugate dargestellt, um somit Arzneistoffresistenz zu überwinden.

Die hier synthetisierten Biokonjugate sollen auf derartige Strukturen abzielen, wobei die eigentliche Verknüpfung der NLS mit dem Arzneistoff im Vordergrund steht. Die unterschiedlichen Konjugationsansätze finden dabei erneut am aliphatischen Keton des Doxorubicin statt und gestatten die Darstellung reduktiv sowie hydrolysierbar spaltbarer und persistenter Verbindungen. In Abhängigkeit von der verwendeten Modifikationsmethode kann so überprüft, welche Funktionalisierung die effiziente Abgabe in den Zellkern vermag oder ob dies sogar keine Notwendigkeit für das

Konjugat dargestellt. Zusätzlich könnten die hier gewonnen Informationen für die vorangegangenen Doxorubicinderivate eine wichtige Rolle spielen. Denn nicht nur die dimeren Doxorubicin-Spezies, sondern ebenso die CPP-Konjugate zeigten im Vergleich zum freien Arzneistoff eine geringere Anreicherung im Nukleus. Schlussendlich könnte der vielversprechendste NLS-Modifikationsansatz auf die vorherigen Abkömmlinge übertragen werden, um somit die bisherigen Probleme zu überwinden.

6.1 Spaltbare Doxorubicin-NLS-Konjugate

6.1.1 Synthese und Charakterisierung

Um die Abgabe toxischer Spezies im Nukleus zu realisieren, wurden zunächst zwei spaltbare respektive hydrolysierbare Doxorubicin-NLS-Konjugate dargestellt. Dabei kann wiederum auf die reaktive Plattform an bereits synthetisierten Doxorubicinderivaten zurückgegriffen werden, da durch Umsetzung des 2-Pyridyldisulfid funktionalisierten Arzneistoff-Abkömmlings mit einer am N-Terminus Cystein tragenden NLS (Ac-CPKKKRKV-NH_2) ein reduktiv spaltbares Konjugat entsteht (Abbildung 82). Dieses kann vermittelt durch Glutathion, das nicht nur im Cytosol, sondern auch im Zellkern zum Schutz der DNA vor oxidativem Stress, gegenwärtig ist, die zytotoxische Substanz freisetzen.[13,14]

Für die Darstellung von **41** wurde **31** in Analogie zu den zellpenetrierenden Peptiden mit einem geringen Überschuss an NLS umgesetzt, um die vollständige Ausbildung des Produktes zu ermöglichen.

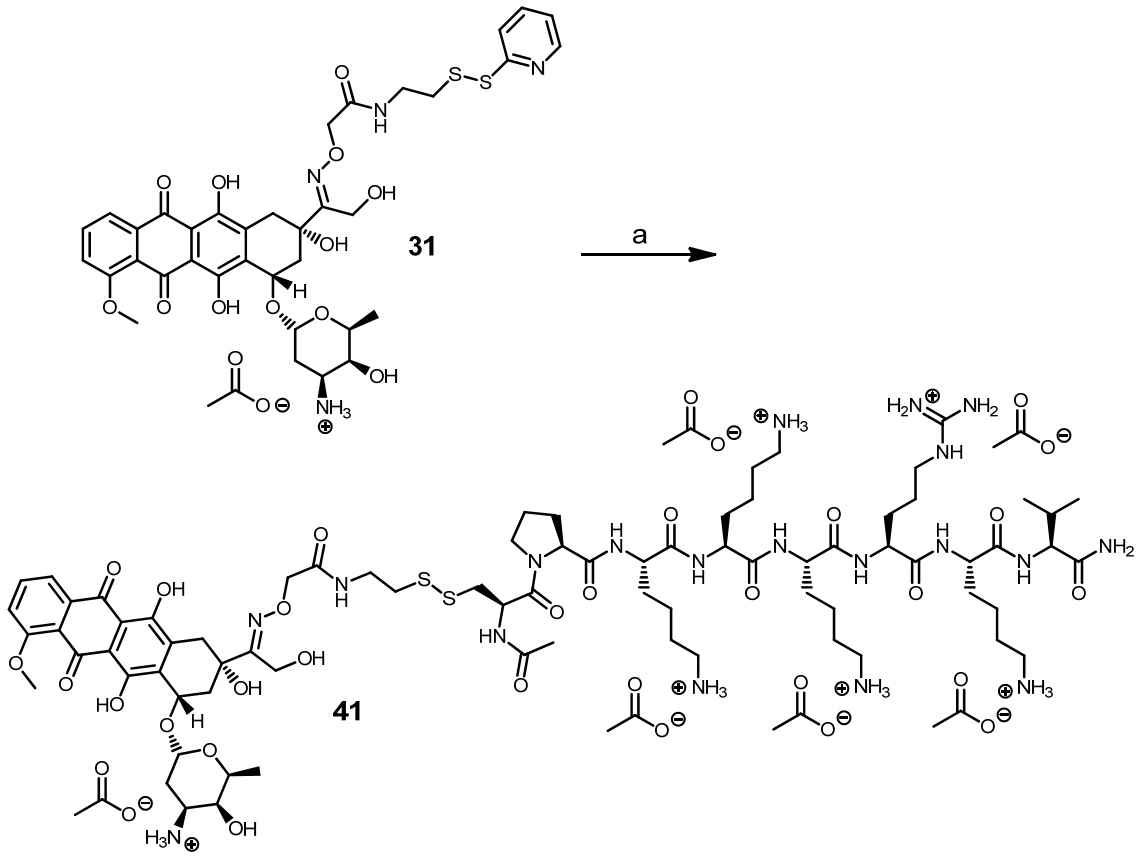


Abbildung 82: Darstellung des reduktiv spaltbaren Doxorubicin-NLS-Konjugates; (a) Ac-CPKKKRKV-NH_2 (1.3 eq), DPBS, DMF, Argon, 2 h, r.t., 67 %

Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels analytischer HPLC überprüft (Abbildung 83). Dabei war bereits nach fünf Minuten Reaktionszeit neben der Ausgangssubstanz **31** die Entwicklung eines weiteren Peaks mit deutlich geringerer Retentionszeit zu erkennen. Nach zwei Stunden Rühren unter Argon war der Peak des Eduktes verschwunden und das Hauptprodukt **41** wurde durch präparative HPLC isoliert.

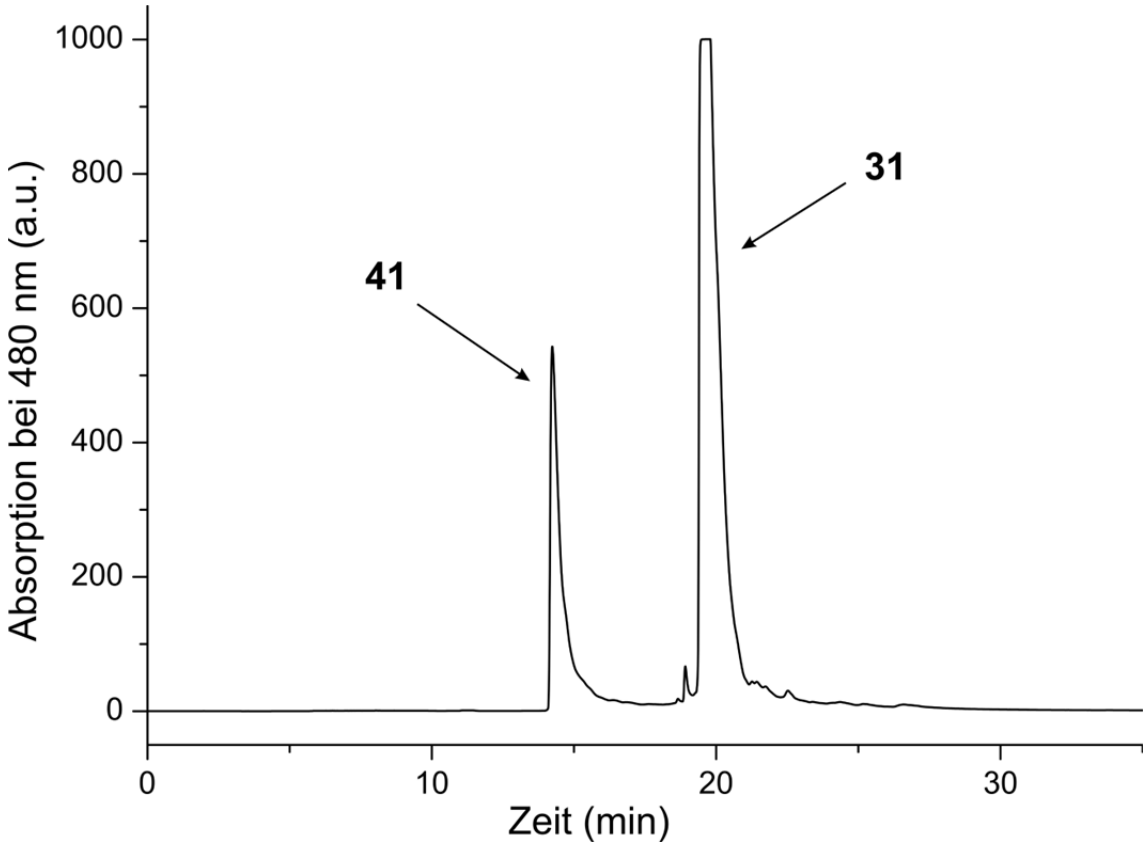


Abbildung 83: HPLC-Chromatogramm einer Probe der Reaktionsmischung zur Darstellung von **41** – aufgenommen nach 5 Minuten Reaktionszeit

Da die Vielzahl an basischen Aminosäuren beziehungsweise deren Acetat-Salzen die Polarität des Produktes erheblich erhöht, war die verringerte Retentionszeit bereits ein gutes Indiz für die zu erwartende Verbindung **41**. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels der isolierten Fraktionen und Ausfällen der methanolischen Lösung in Diethylether wurde der rote Feststoff mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. In dem erhaltenen Spektrum konnte gemäß den HPLC-Daten die Masse von **41** sowie den entsprechenden Natrium- und Kaliumsalzen beobachtet werden.

Zur vollständigen Strukturaufklärung wurde das reduzierbare Doxorubicin-NLS-Konjugat mittels NMR-Spektroskopie und geeigneter 2D-Experimente (COSY, NOESY, TOCSY) untersucht (Abbildung 84). Das Protonenspektrum von **41** in D_2O zeigte im Tieffeld ausschließlich die zu erwartenden drei Protonen des Anthrachinongerüstes. Darüber hinaus konnte die Gegenwart des Arzneistoffs durch das charakteristische Singulett der Methoxygruppe (**j**) sowie das Dublett der Methylgruppe des Daunosamin (**w**) belegt werden.

Des Weiteren kann mit Hilfe des in der folgenden Abbildung dargestellten TOCSY-Spektrums von **41** das Peptidrückgrat vollständig charakterisiert werden (Abbildung

84). Aufgrund der annähernd gleichen chemischen Umgebung der vier Lysine sind deren chemische Verschiebungen der Seitenkettenprotonen (**o**, **u**, **v**) sowie des Protons (**h**) am asymmetrischen Kohlenstoffatom nahezu äquivalent. Die Protonen am Stereozentrum der Aminosäuren Prolin und Arginin weisen eine ähnliche chemische Verschiebung wie die der Lysine auf. Diese können jedoch anhand des erhaltenen Kopplungsmusters des TOCSY-Spektrums eindeutig von denen des Lysins unterschieden werden, was in der dargestellten Abbildung durch den Einbuchstabencode (blau) der entsprechenden Aminosäuren veranschaulicht ist. Demgegenüber sind die Signale des Valins von denen der anderen Aminosäuren gänzlich verschieden und daher leicht im ^{1}H-NMR-Spektrum auszumachen. Das Proton am asymmetrischen Kohlenstoffatom dieser Aminosäure zeigt wie zu erwarten als einziges die Multiplizität eines Dubletts. Darüber können durch das erhaltene Kopplungsmuster die entsprechenden Peaks der CH- und CH_3-Gruppen der Isopropylseitenkette eindeutig identifiziert werden. Als letzte Aminosäure des Peptidrückgrates von **41** kann Cystein ebenfalls von den übrigen unterschieden werden, da diese die einzige Aminosäure ist, welche im TOCSY-Spektrum ausschließlich eine Kopplung zwischen den Protonen am α- (**e**) und β-Kohlenstoffatom (**o**, **p**) aufweist.

Bei genauerer Betrachtung ist zu erkennen, dass für die Darstellung des reduzierbaren Disulfid-tragenden Doxorubicin-NLS-Konjugates ein Vernetzer verwendet wurde. Die folgenden Modifikationsansätze verzichten jedoch darauf und ermöglichen die Synthese der Biokonjugate durch reaktive Gruppen, welche sich bereits an der Aminosäuresequenz befinden.

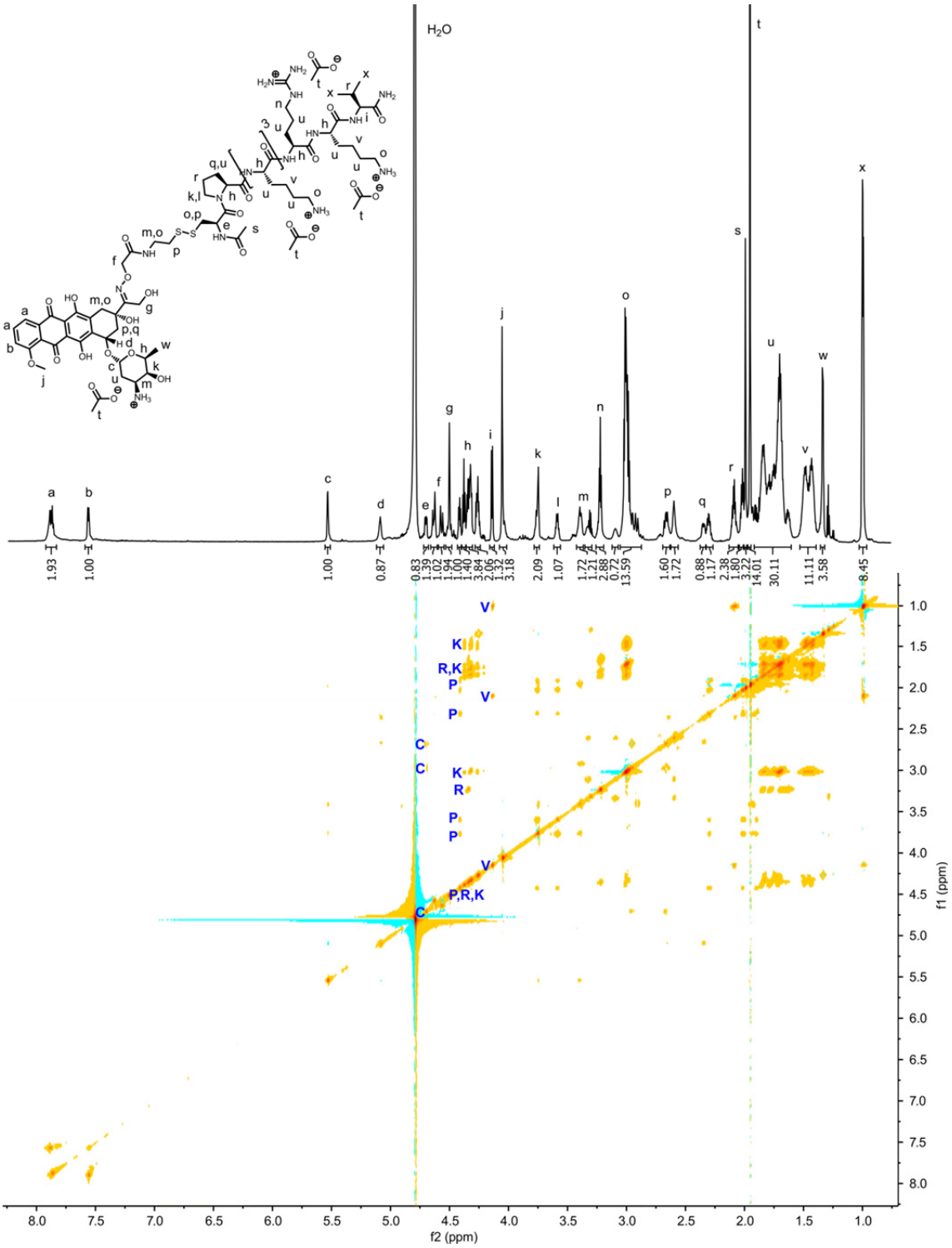


Abbildung 84: H,H-TOCSY-Spektrum von Verbindung **41** in D_2O (850 MHz)

Verglichen mit dem durch Glutathion spaltbaren Doxorubicinderivat wird bei Molekül **43** eine andere Strategie zur Freisetzung des Arzneistoffes im Zellkern verfolgt. Durch die Umsetzung von Doxorubicin mit dem Hydrazid der NLS (Ac-PKKKRKVG-$NHNH_2$) wird ein hydrolyselabiles Hydrazon ausgebildet. Unter neutralen Bedingungen werden diese

im Vergleich zu Oximen hundertfach schneller hydrolysiert, so dass auf ein reduzierbares Disulfid verzichtet werden kann, um die toxische Fracht abzugeben.[15] Nach erfolgter Aufnahme des Konjugates in den Nukleus und anschließender Verweildauer wird somit die Abgabe des freien Arzneistoffs durch Hydrolyse im Zellkern ermöglicht.

Das Hydrazid der NLS kann mit Hilfe von in der Peptidsynthese etablierten Festphasenmethoden leicht am C-Terminus eingefügt werden.[16,17] Die Einführung am N-Terminus ist allerdings mit erheblichem synthetischem Aufwand verbunden und ausschließlich unter der Verwendung zusätzlicher Aminosäuren möglich.[18]

Für die Darstellung des hydrolysierbaren Doxorubicin-NLS-Konjugates **43** wurde daher das entsprechend N-terminal modifizierte Peptid **42** verwendet (Abbildung 85). Dabei wurde der Kernsequenz der NLS zusätzlich die Aminosäure Glycin angefügt, um die sonst sterisch anspruchsvolle Kondensation mit dem Arzneistoff zu vereinfachen. Unter Verwendung von äquimolaren Mengen an Doxorubicin und **42** konnte die Kondensation katalysiert durch sauren Natriumacetatpuffer (pH 4.8) in Analogie zur Ausbildung der Oxime in guter Ausbeute durchgeführt werden. Gemäß HPLC war zu beobachten, dass unter diesen Bedingungen die Reaktion in einem ähnlichen Zeitrahmen wie die vorangegangen Kondensationen mit Doxorubicin ablief.

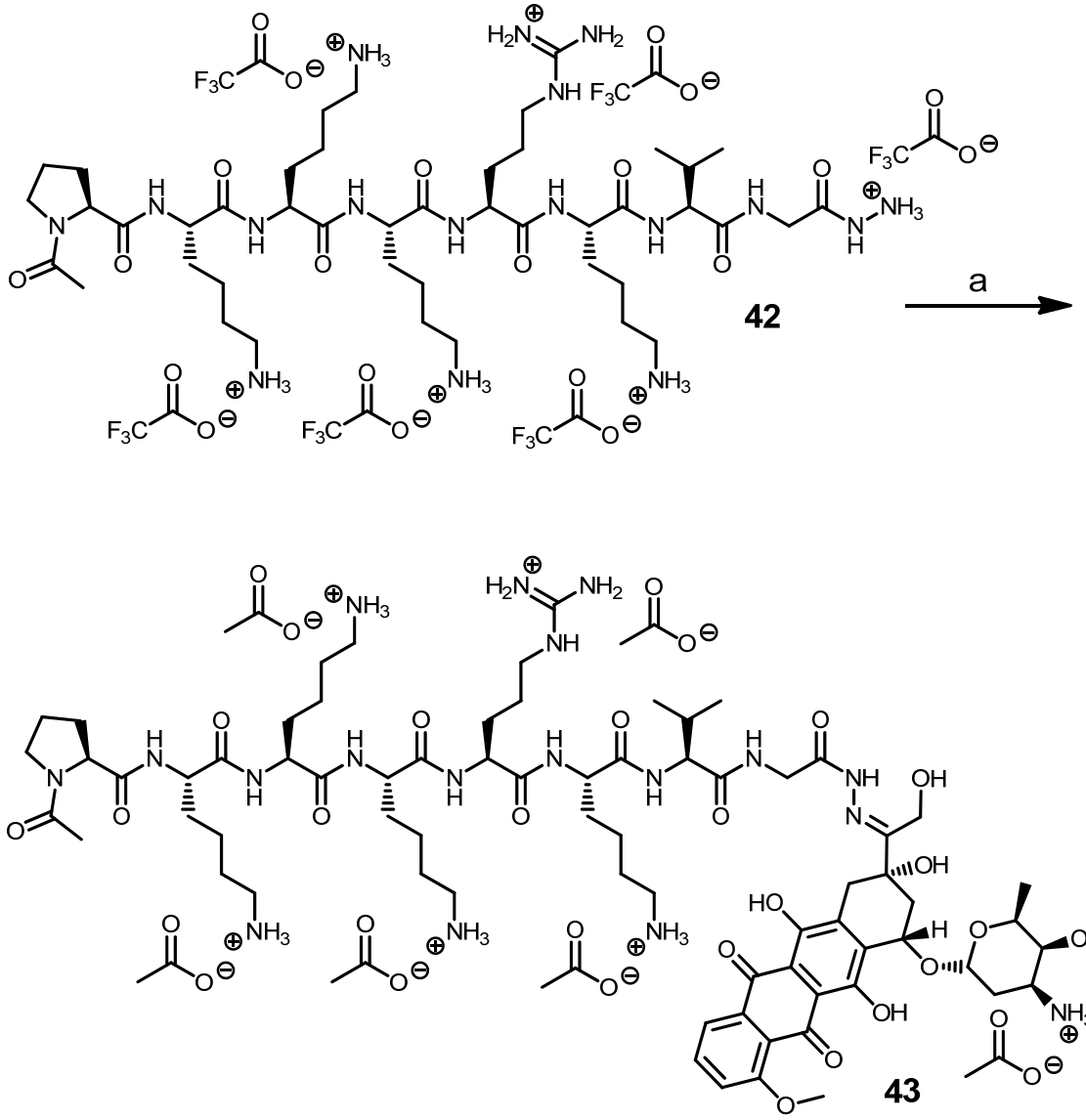


Abbildung 85: Synthese des hydrolysierbaren Doxorubicin-NLS-Konjugates; (a) Doxorubicin-Hydrochlorid (1 eq), 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8), DMF, 48 h, r.t., 63 %

Bei der Aufreinigung von **43** wurde mittels präparativer HPLC ein einzelner Peak mit geringerer Retentionszeit im Vergleich zu Doxorubicin isoliert. Die erhaltene Retentionszeit war dabei annähernd äquivalent zu der von **41**.

Die darauffolgende Charakterisierung durch NMR-Spektroskopie stellte sich als nicht trivial heraus. Zum einen konnten in deuteriertem DMF, DMSO und MeOH aufgrund der starken Peak-Verbreiterung, welche auf eine mögliche Aggregatbildung zurückzuführen ist, keine verwertbaren Signale erhalten werden und zum anderen führte die Messung in Deuteriumoxid bereits zur Hydrolyse, was die vollständige Strukturaufklärung anhand des ^{1}H-NMR-Spektrums nicht ermöglichte.

Bei der Untersuchung von **43** mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnte die Hydrolyse ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 86). Neben dem eigentlichen Produkt sowie den entsprechende Kaliumsalzen wurde ebenso das freie Peptid detektiert. Da bei der Probenvorbereitung typischerweise auf eine saure wässrige Lösung zurückgegriffen werden muss, kann der Abbau des Hydrazons sogar noch weiter beschleunigt sein. Ungeachtet dessen zeigte die isolierte Substanz nach erneuter HPLC-Injektion nach wie vor einen Peak, so dass das Auftreten von **42** im Massenspektrum auch mit einer etwaigen Fragmentierung des Produktes assoziiert werden kann.

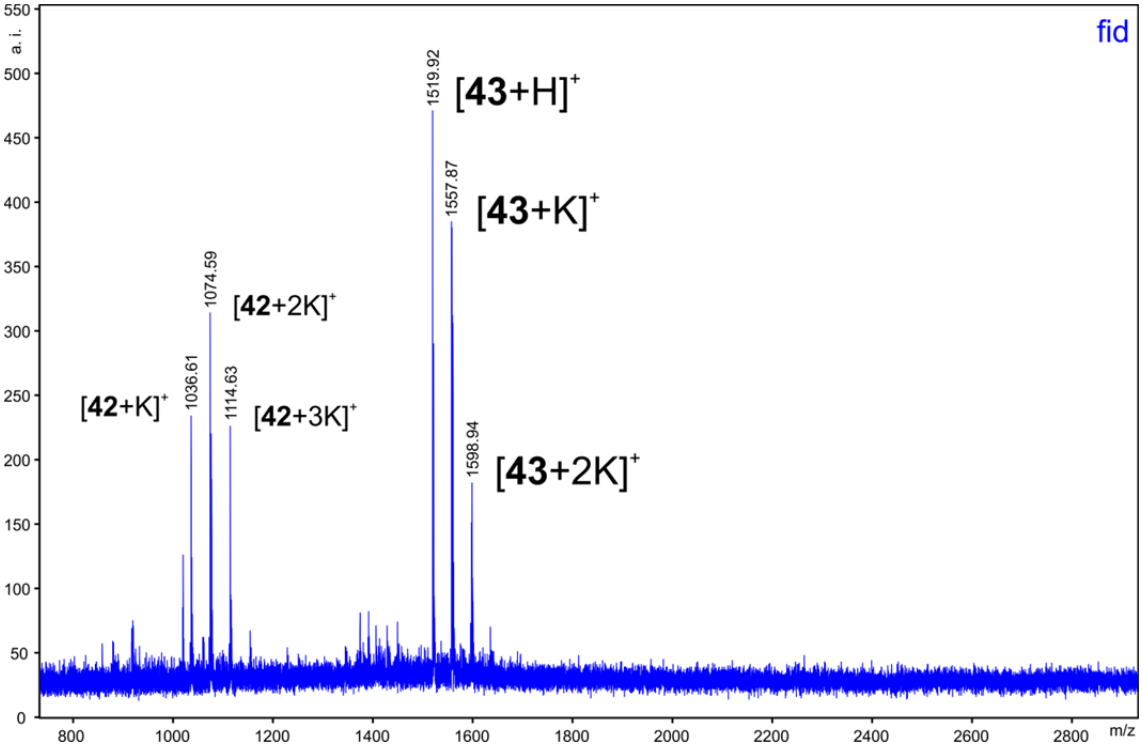


Abbildung 86: MALDI-TOF-Massenspektrum von **43** (Matrix: αCHCA)

Im Gegensatz zum Abbau von **41** wird bei der hydrolytischen Spaltung von **43** Doxorubicin freigesetzt. Dieses Verhalten kann für therapeutische Anwendungen von großem Vorteil sein, geht jedoch gleichzeitig mit der Limitierung einher, dass das Doxorubicin-NLS-Konjugat bereits vor seinem eigentlichen Wirkort, dem Zellkern, unspezifisch hydrolysiert werden kann. Bei dem folgenden NLS-Biokonjugat kann diese Spaltung jedoch nicht erfolgen, wobei für die Darstellung erneut kein Vernetzer verwendet wurde.

6.2 Persistente Doxorubicin-NLS-Konjugate

6.2.1 Synthese und Charakterisierung

Das in dem folgenden Abschnitt dargestellte persistente Doxorubicin-NLS-Konjugat vermag die vorangegangene Problematik der Hydrolyselabilität zu überwinden. Hierbei sind die beiden Biomoleküle erneut über ein Oxim miteinander verknüpft, jedoch wird auf die Verwendung eines reduktiv spaltbaren Disulfides bei diesem Modifikationsansatz gänzlich verzichtet (Abbildung 87). Somit bleibt das NLS-Biokonjugat in der Zelle vollständig intakt.

Die Tatsache, dass der Arzneistoff im Nukleus nicht freigesetzt werden kann, muss nicht zwangsläufig zu einer Verschlechterung der zytotoxischen Eigenschaften führen. Kernlokalisierungssequenzen haben in einer Vielzahl von Anwendungen bereits gezeigt, dass deren basische Aminosäuren stabile Komplexe mit dem Polyphosphatrückgrat von DNA-Molekülen ausbilden können.[19] Diese Eigenschaft muss ebenfalls für das stabile Doxorubicin-NLS-Konjugat (**45**) berücksichtigt werden, sodass rein hypothetisch betrachtet die DNA-Bindungsaffinität und somit auch die zytotoxischen Eigenschaften des Arzneistoff-Konjugates sogar höher als die des Doxorubicin sein können.

Um die Darstellung von **45** durchführen zu können, wurde Doxorubicin mit einer am N-Terminus Aminooxyessigsäure-tragenenden NLS (**44**) umgesetzt. Dieses Essigsäurederivat kann bei der Festphasensynthese des Peptides einfach an die Aminosäuresequenz angefügt werden. Die Reaktionsbedingungen für die Kondensation mit dem Arzneistoff sind hierbei äquivalent zur Synthese von **43**. Eine solche Art der Modifikation wurde in der Literatur bereits mehrfach zur Darstellung von verschiedenen Doxorubicin-Peptid-Konjugaten erfolgreich angewendet.[20-23]

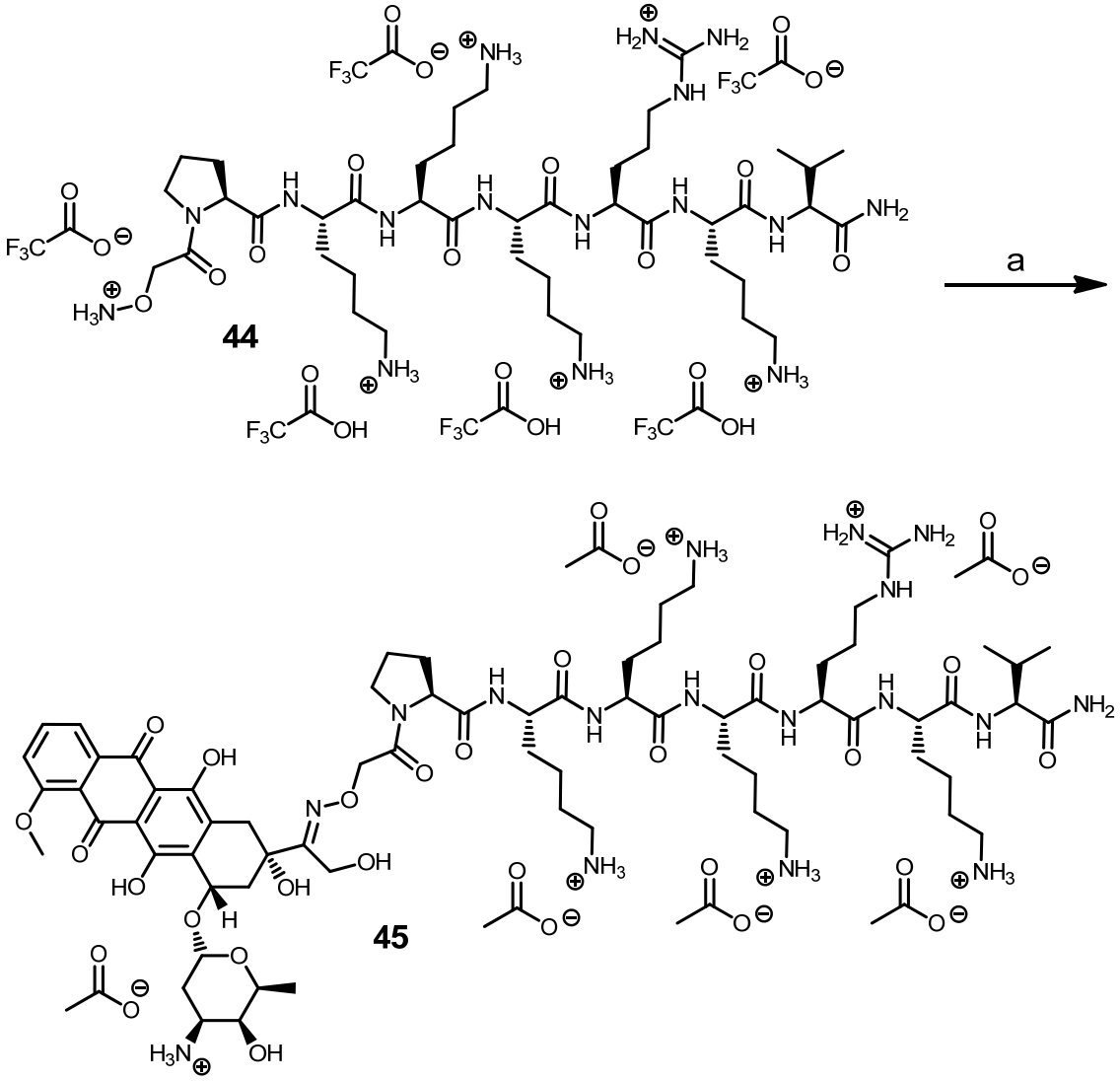


Abbildung 87: Synthese des persistenten Doxorubicin-NLS-Konjugates; (a) Doxorubicin-Hydrochlorid (1.1 eq), 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8), DMF, 48 h, r.t., 69 %

Die sauer gepufferte Reaktionslösung wurde nach 20 Stunden Reaktionszeit mittels HPLC analysiert (Abbildung 88). Aufgrund der verwandten chemischen Struktur der verschiedenen Doxorubicin-NLS-Konjugate ist auch deren Polarität nahezu äquivalent. Dies ist anhand der ähnlichen Retentionszeiten von **41** und **45** in Abbildung 83 und Abbildung 88 gut ersichtlich. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass unter den verwendeten HPLC-Bedingungen der freie Arzneistoff sowie dessen Derivat **31**, welches die 2-Pyridyldisulfid-Funktionalität trägt, ebenso ein ähnliches Elutionsprofil aufweisen. Nach zwei Tagen Reaktionszeit war die Kondensation vollständig abgeschlossen, und das Reaktionsgemisch wurde im Anschluss daran durch präparative HPLC aufgereinigt.

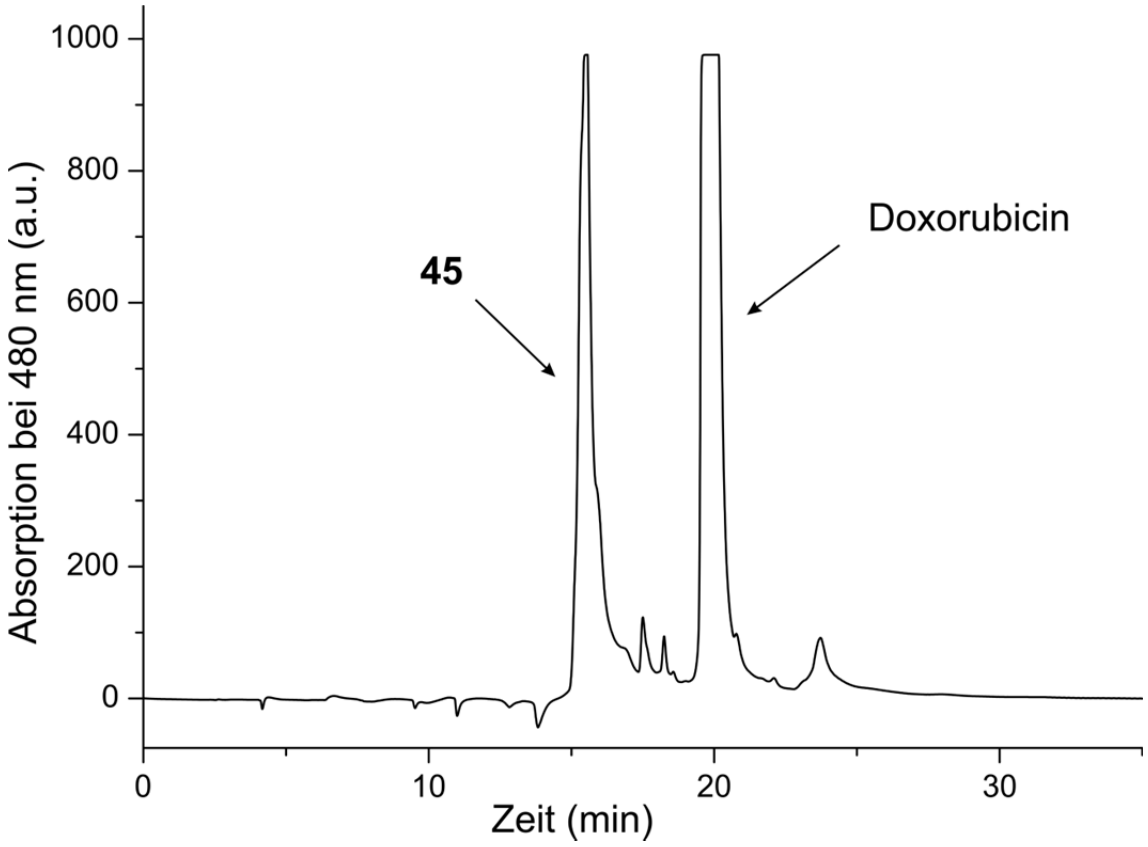


Abbildung 88: HPLC-Chromatogramm einer Probe der Reaktionsmischung zur Darstellung von **45** – aufgenommen nach 20 h Reaktionszeit

Das durch Ausfällen in Diethylether erhaltene rote Produkt wurde darauffolgend massenspektrometrisch untersucht. In dem in Abbildung 89 dargestellten MALDI-TOF-Massenspektrum können der intensive Produktpeak sowie die entsprechenden Salze beobachtet werden. Es ist ebenfalls erkennbar, dass ein Teil des Daunosamin erneut abgespalten wurde, wobei für das Spaltprodukt zwei Peaks mit einem Unterschied der molaren Masse von Sauerstoff detektiert werden, da die Etherbrücke zwischen dem Aglykon und dem Zucker, wie bereits erläutert, zwei theoretische Spaltstellen aufweist. Anhand des Signals bei 940.45 m/z wäre es denkbar, dass freies Peptid gegenwärtig ist. Dessen molare Masse beträgt jedoch 955.20 g/mol, sodass diese Vermutung ausgeschlossen werden kann. Bei genauerer Betrachtung ist jedoch zu erkennen, dass es sich dabei ebenso um Fragmentierung handelte, da die Oximbindung des Doxorubicin-NLS-Konjugates bedingt durch die hohe Laserintensität zwischen dem Sauerstoff- und Stickstoffatom gespalten wurde. Dieses Fragmentierungsprodukt hat die Masse von 939.63, was dem beobachteten einfach geladenen Molekülion (940.45 m/z) entspricht.

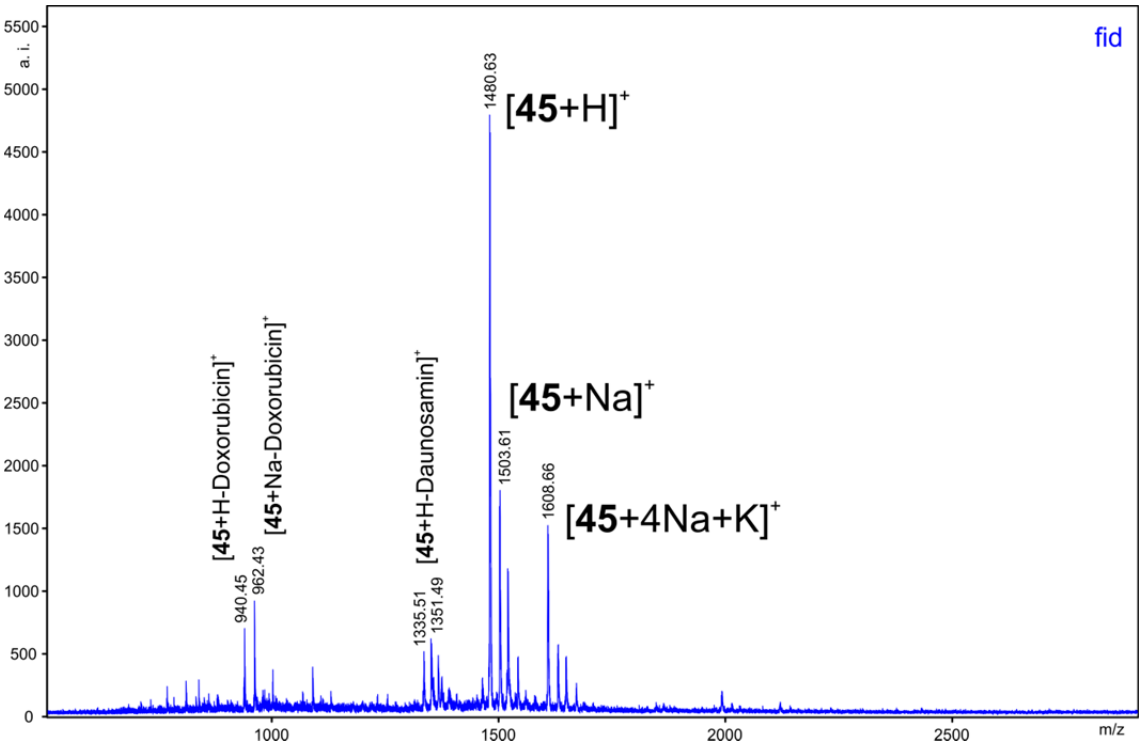


Abbildung 89: MALDI-TOF-Massenspektrum von **45** (Matrix: αCHCA)

Durch abschließende NMR-spektroskopische Charakterisierung von **45** konnte gezeigt werden, dass sowohl das Aglykon als auch der Zucker vollständig zugegen sind. Darüber hinaus ermöglichte die NMR-Untersuchung einen Vergleich mit dem reduktiv spaltbaren Doxorubicin-NLS-Konjugat. Bedingt durch die andersartige Modifikationschemie weisen die beiden ^{1}H-NMR-Spektren signifikante Unterschiede auf, was anhand des folgenden Beispiels veranschaulicht wird. Dadurch dass sich am N-Terminus von **45** die Aminooxyessigsäure befindet, kann das charakteristische Signal des acetylierten Amins nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigt **41** das zu erwartende Singulett bei 1.99 ppm (Abbildung 84; Peak s). Des Weiteren ist bei genauerer Betrachtung der Protonen des Peptidrückgrates mittels 2D-Experimenten zu erkennen, dass **45** keine Kopplung von Cystein-relevanten Protonen aufweist.

Wie bereits erläutert könnte die DNA-Bindungsaffinität des persistenten NLS-Biokonjugates größer als die von Doxorubicin sein. Die gesteigerte Affinität kann zu einer stärkeren DNA-Topoisomerase-Inhibition führen und somit eine erhöhte Zytotoxizität ermöglichen. In Analogie zu den dimeren Doxorubicin-Molekülen könnte daher das DNA-Bindungsvermögen des Doxorubicin-NLS-Konjugates zunächst mit Hilfe eines MST-Experimentes untersucht werden.

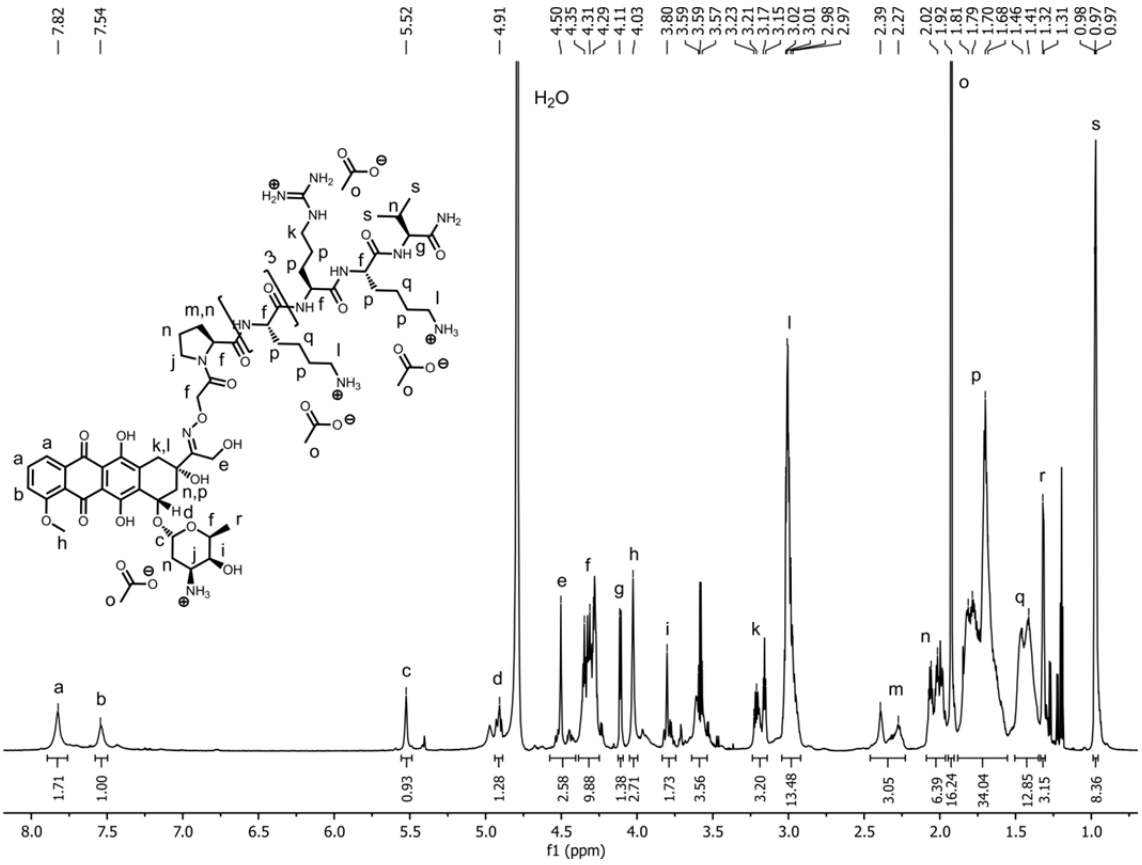


Abbildung 90: ^{1}H-NMR-Spektrum von Verbindung **45** in D_2O (850 MHz)

Nach erfolgter chemischer Charakterisierung der verschiedenen Doxorubicin-NLS-Konjugate gilt es nun zu überprüfen, wie effizient der Arzneistoff in Abhängigkeit von der verwendeten Modifikationschemie in den Nukleus transportiert beziehungsweise dort wieder freigesetzt werden kann. Dies soll in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Natalia Soshnikova vom Institut für Molekulare Biologie in Mainz durch durchflusszytometrische und fluoreszenzmikroskopische Studien sowie *In-vitro*-Zytotoxizitäts-Experimente untersucht werden.

6.3 Literatur

[1] D. A. Gewirtz, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727

[2] J. Nadas, D. X. Sun, *Expert Opin. Drug Discovery* **2006**, *1*, 549

[3] R. Misra, S. K. Sahoo, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *39*, 152

[4] J. You, F. Q. Hu, Y. Z. Du, H. Yuan, *Nanotechnology* **2008**, *19*,

[5] H. Jang, S.-R. Ryoo, K. Kostarelos, S. W. Han, D.-H. Min, *Biomaterials* **2013**, *34*, 3503

[6] J. M. Yu, X. Xie, M. R. Zheng, L. Yu, L. Zhang, J. G. Zhao, D. Z. Jiang, X. X. Che, *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 5079

[7] M. M. Gottesman, T. Fojo, S. E. Bates, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 48

[8] W. Szaflarski, P. Sujka-Kordowska, R. Januchowski, K. Wojtowicz, M. Andrzejewska, M. Nowicki, M. Zabel, *Biomed. Pharmacother.* **2013**, *67*, 497

[9] F. Milletti, *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 850

[10] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5836

[11] J. Mueller, I. Kretzschmar, R. Volkmer, P. Boisguerin, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2363

[12] D. Kalderon, B. L. Roberts, W. D. Richardson, A. E. Smith, *Cell* **1984**, *39*, 499

[13] J. Markovic, C. Borras, A. Ortega, J. Sastre, J. Vina, F. V. Pallardo, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 20416

[14] J. Markovic, J. L. Garcia-Gimenez, A. Gimeno, J. Vina, F. V. Pallardo, *Free Radical Res.* **2010**, *44*, 721

[15] J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523

[16] S. S. Wang, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1235

[17] S. S. Wang, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6488

[18] Z. Miklan, E. Orban, G. Csik, G. Schlosser, A. Magyar, F. Hudecz, *Biopolymers* **2009**, *92*, 489

[19] T. Merdan, J. Kopecek, T. Kissel, *Adv. Drug Del. Rev.* **2002**, *54*, 715

[20] I. Szabo, M. Manea, E. Orban, C. Antal, S. Bosze, R. Szabo, M. Tejeda, D. Gaal, B. Kapuvari, M. Przybylski, F. Hudecz, G. Mezo, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 656

[21] P. Ingallinella, A. Di Marco, M. Taliani, D. Fattori, A. Pessi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1343

[22] E. Orban, G. Mezo, P. Schlage, G. Csik, Z. Kulic, P. Ansorge, E. Fellinger, H. Moller, M. Manea, *Amino Acids* **2011**, *41*, 469

[23] P. Schlage, G. Mezo, E. Orban, S. Bosze, M. Manea, *J. Controlled Release* **2011**, *156*, 170

7 Zusammenfassung und Ausblick

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Darstellung modifizierter Doxorubicin-Moleküle, um die mit der therapeutischen Anwendung verbundenen Hindernisse wie DNA-Bindungsaffinität, Tumorselektivität, Zell- sowie Nukleusakkumulation, Arzneistoffaufnahme und -resistenz zu überwinden. Hierbei wurde zur Modifikation das aliphatische Keton des Arzneistoffs, unter Ausbildung von hydrolysestabilen Oximen, als Hauptstrukturelement verwendet (Abbildung 91).

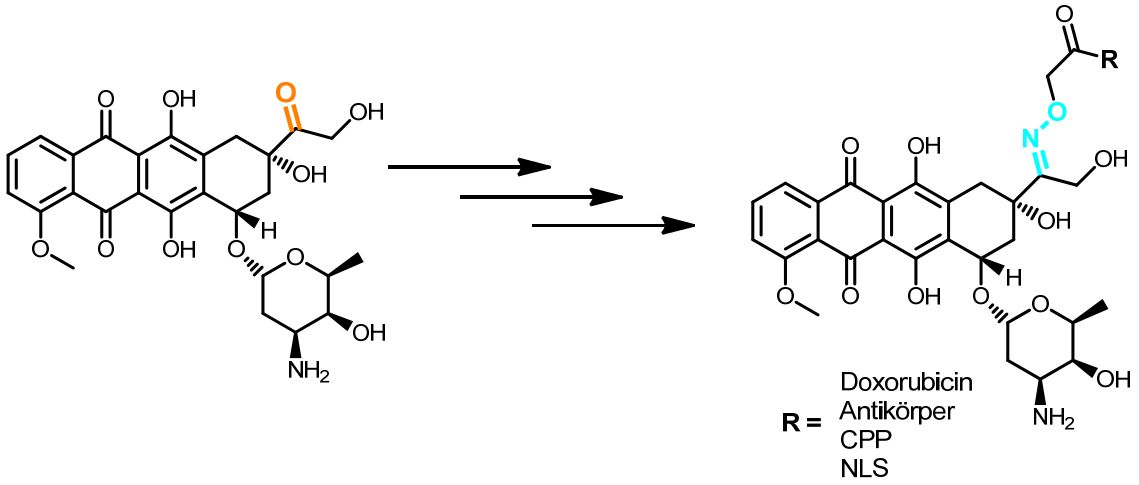


Abbildung 91: Oxim-vermittelte Modifikation des Doxorubicin mit Biomolekülen

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass dimere Doxorubicin-Moleküle, welche unter Verwendung von neuartigen homo- und heterofunktionalen Vernetzern dargestellt wurden, eine erhöhte DNA-Bindungsaffinität aufweisen. Die Affinitätsbestimmung für das Anthracyclin-DNA-System wurde hierbei zum ersten Mal mit Mikromaßstab-Thermophorese aussichtsreich durchgeführt. Dennoch zeigten die unfunktionalisierten Doxorubicin-Dimere nur eine unzureichende Aufnahme in die Zelle beziehungsweise den Nukleus. Das synthetisierte funktionale Doxorubicin-Dimer ermöglichte jedoch die Modifikation mit Antikörpern sowie zellpenetrierenden Peptiden, um diese Limitierungen zu bewältigen. Das bei der Darstellung der Biokonjugate gebildete Disulfid erwies sich als hoch potente Funktionalität für eine mögliche intrazelluläre durch Glutathion-vermittelte Arzneistoffabgabe. Dies konnte anhand der gelelektrophoretischen Charakterisierung des Antikörperderivates, welche obendrein unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde, verdeutlicht werden.

Da die Zellversuche der unfunktionalisierten Dimere vorab nur mit HeLa-Zellen durchgeführt wurden, gilt es des Weiteren zu überprüfen, ob die verringerte Zellinternalisierung in Zusammenhang mit der verwendeten Zelllinie stehen könnte. Darüber hinaus könnten noch vielfältige Ansätze verfolgt werden, um die DNA-Affinität und somit die zytotoxischen Eigenschaften des Doxorubicin weiter zu erhöhen. Hierbei könnten kleine Furche-Binder-Hybridstrukturen eine wichtige Rolle spielen (Abbildung 92). Bei diesem Modifikationsansatz kann auf die Strukturelemente der zur DNA-Markierung eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe DAPI und Hoechst zurückgegriffen werden. Dabei könnte eine für die Topoisomerase-Interaktion benötigte Aminogruppe weiterhin erhalten bleiben.

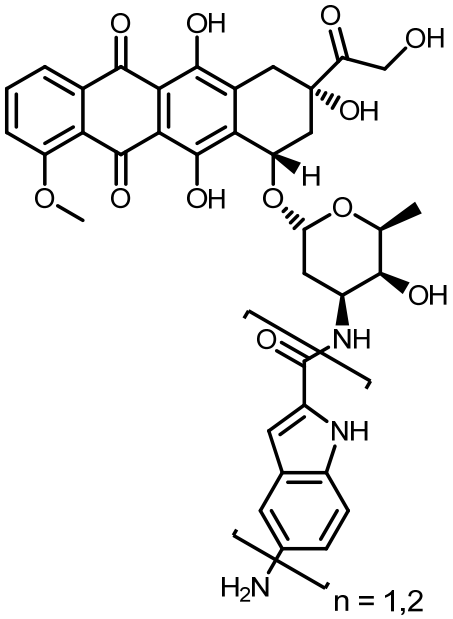


Abbildung 92: Doxorubicin kleine Furche-Binder-Hybridstrukturen

Die selektive Adressierung von Tumorzellen könnte nicht nur mit Doxorubicin-Antikörper-Konjugaten, sondern auch durch Nutzen überexprimierter Rezeptoren, wie dem Somatostatin-Rezeptor, bewerkstelligt werden. Deshalb wurde der Doxorubicin-Octreotid-Hybrid mit Hilfe eines neuartigen Disulfid-interkalierenden Reagenzes dargestellt. Der entscheidende Vorteil dieses Reagenzes besteht darin, dass im Gegensatz zu den von Brocchini oder Smith *et al.* beschriebenen Verbindungen keine stabilen Thioether, sondern reduzierbare Disulfide ausgebildet werden. Die Verwendung dieser Modifikationschemie ermöglicht somit die intrazelluläre Doxorubicin-Freisetzung. Obwohl bei genauerer Betrachtung die neu gebildete Verbrückung des Somatostatin Analogons sogar 13 Atome umfasst, konnte gezeigt werden, dass die Rezeptorinteraktionen, vermittelt durch das Aminosäuremotiv FWKT,

und die damit verbundene reduzierte Hormonsekretion intakt bleiben (Abbildung 93). Eine derartige Adressierung der Rezeptoren auf Tumorzellen durch das dargestellte Doxorubicin-Octreotidderivat erfüllt die Anforderungen des von Paul Ehrlich beschriebenen „magic bullet“ Konzepts.

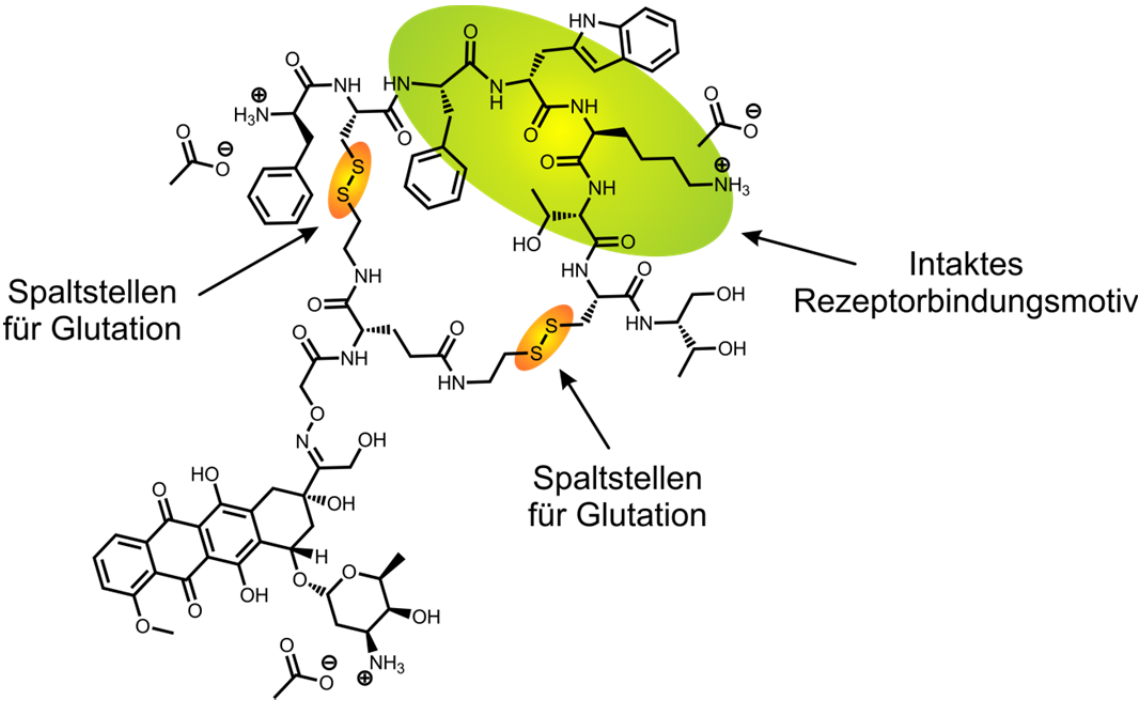


Abbildung 93: Schematische Darstellung des synthetisierten Doxorubicin-Octreotid-Hybrides; mit seinen Spaltstellen für Glutathion (orange) sowie dem intakten Rezeptorbindungsmotiv (grün)

Obwohl der Tumor-adressierende Hybrid im *In-vitro*-Test eine geringere Toxizität als Doxorubicin zeigte, muss dies für therapeutische Anwendungen nicht von Nachteil sein. Bedingt durch die Tumorselektivität können entsprechend höhere Dosen appliziert werden, was durch das Vorliegen des Tri-Acetates und die damit verbundene Wasserlöslichkeit uneingeschränkt möglich ist. Ungeachtet dessen muss jedoch noch weiter untersucht werden, wie sich dieses Doxorubicinderivat auf Zellen mit verminderter Somatostatin-Rezeptor-Expression auswirkt. Dies könnte anhand der erhaltenen Western Blot-Resultate mit der GH3- oder Bon1-Zelllinie erfolgen.

Darüber hinaus könnte der neuartige Disulfid-interkalierende Vernetzer für weitere Anwendungen, wie die selektive PEGylierung von therapeutisch wirksamen Proteinen (Interferone, Interleukine) genutzt werden. Da für derartige Anwendungen die Länge der Disulfid-Verbrückung noch entscheidender ist, um die komplexe Tertiärstruktur der Proteine so wenig wie möglich zu beeinflussen, könnte das Vernetzerreagenz auch auf Basis der Aminosäure Cystein synthetisiert werden (Abbildung 94).

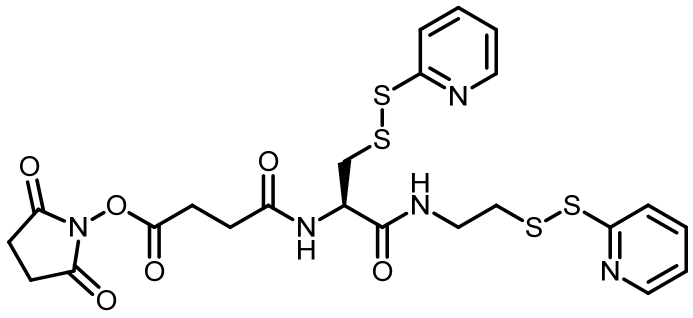


Abbildung 94: Disulfid-interkalierender Vernetzer basierend auf der Aminosäure Cystein

Im darauffolgenden Teil dieser Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf die Überwindung der Zellmembran gelegt. Mit Hilfe eines bifunktionalen Vernetzers konnte zunächst ein aktiviertes Thiol-tragendes Doxorubicinderivat synthetisiert werden, welches die einfache Modifikation mit terminalen Cysteinen von Peptiden ermöglichte. Hierbei wurde die Funktionalisierung des Arzneistoffs mit zwei gänzlich verschiedenen zellpenetrierenden Peptiden durchgeführt.

Es konnte verdeutlicht werden, dass beide Peptide, unabhängig von deren Sekundärstruktur und Nettoladung unter physiologischen Bedingungen, den Arzneistoff effizient in die Zelle befördern können. Nichtsdestotrotz zeigte Doxorubicin eine stärkere Zellaufnahme, da es im Gegensatz zu den Aminosäuresequenzen konzentrationsunabhängig durch passive Diffusion aufgenommen werden kann. Zur Verbesserung der Zellinternalisierung der Doxorubicin-Peptid-Konjugate wurde daher ein multivalentes Doxorubicinderivat dargestellt, welches zwei zellpenetrierende Peptide trägt.

Darüber hinaus konnte die Leistungsfähigkeit der Disulfidverknüpfung von Doxorubicin und CPPs für die intrazelluläre Arzneistoffabgabe eingehend belegt werden. Innerhalb weniger Stunden wurde vermittelt durch Glutathion die Bindung vollständig gespalten, wohingegen das Oxim über einen weiten pH-Bereich außerordentlich stabil war. Somit konnten durch die reduktive Spaltung des Arzneistoff-CPP-Konjugates toxische Doxorubicin-Spezies erfolgreich in den Nukleus der Zelle abgegeben werden (Abbildung 95). Obwohl letztendlich die zytotoxischen Eigenschaften beider Doxorubicin-CPP-Konjugate im Vergleich zum freien Arzneistoff verringert waren, muss für das Polyarginin-Doxorubicinderivat berücksichtigt werden, dass dieses mit Tumor-adressierenden Eigenschaften ausgestattet ist, da Futaki *et al.* jüngst beobachtet haben, dass kationische zellpenetrierende Peptide eine hohe Affinität zu auf Tumorzellen überexprimierten Glykosaminoglykanen haben.

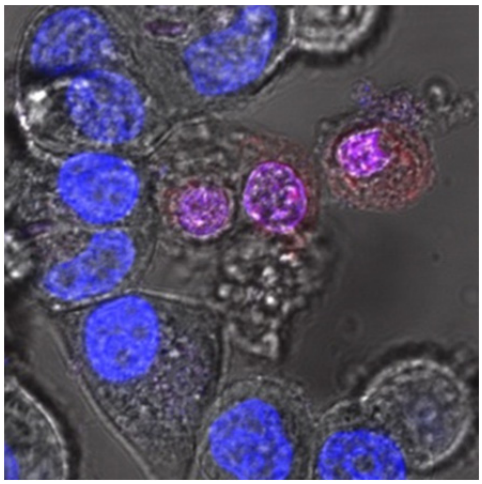


Abbildung 95: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Glutathion-vermittelten Arzneistoffabgabe in Zellen

Um die geringe Zellakkumulation hoch DNA-affiner Doxorubicin-Dimere zu überwinden, wurde des Weiteren ein mit einem zellpenetrierenden Peptid funktionalisiertes Dimer dargestellt. Hierbei wurde erneut auf das Disulfid als Strukturelement zurückgegriffen, um die toxische Fracht in der Zelle freizusetzen.
Da jedoch Peptidtherapeutika anfällig für einen etwaigen enzymatischen Verdau sind, wurden funktionale Doxorubicin-CPP-Abkömmlinge synthetisiert, welche erfolgreich mit einem Polyethylenglykol-Polymer modifiziert werden konnten, um die durch Enzyme vermittelte Zersetzung zu verringern.
Die hier dargestellten CPP-Arzneistoffderivate sind in ihren Eigenschaften einzigartig, da die literaturbekannten Verbindungen, welche Glutathion-vermittelte Reduktion der Biokonjugate ermöglichen, aufgrund der Hydrazone nur eine unzureichende Hydrolysestabilität aufweisen, wodurch deren Potential für *In-vivo*-Anwendungen verringert wird. Bei genauerer Betrachtung kann jedoch erkannt werden, dass das ursprüngliche Arzneistoffmolekül nach erfolgter reduktiver Spaltung nicht vollständig freigesetzt wird. Folgerichtig werden die zytotoxischen Eigenschaften bei geringerer Zellaufnahme nicht mit denen des Doxorubicin konkurrieren können. Dieser Problemstellung könnte das in der folgenden Abbildung dargestellte Doxorubicinderivat (Abbildung 96), welches ebenfalls die Ausbildung von Disulfiden mit den terminalen Cysteinen der zellpenetrierenden Peptide vermag, entgegenwirken. In diesem Fall könnte das verwendete Vernetzermolekül nach Reduktion durch Glutathion wieder abspalten werden, wobei intramolekular ein cyclischer Thioester gebildet und Doxorubicin freigesetzt wird.

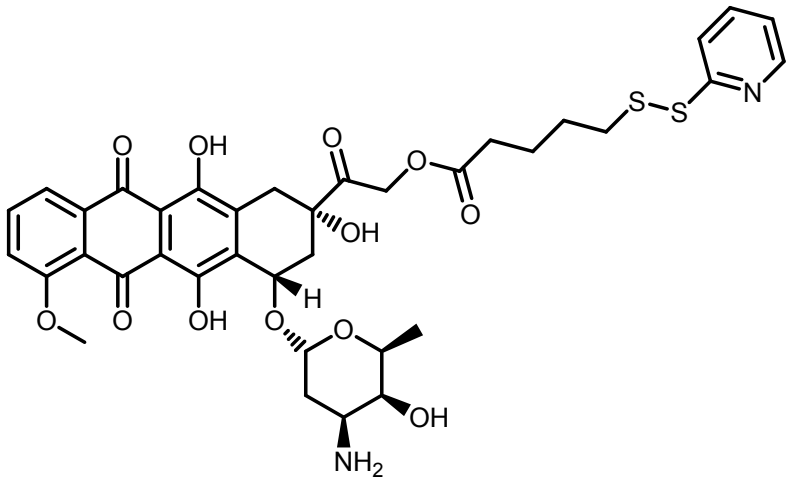


Abbildung 96: Neuartige reaktive Plattform für die Darstellung von Doxorubicin-Biomolekül-Konjugaten

Einer speziellen Form der zellpenetrierenden Peptide, den Kernlokalisierungssequenzen, kam im letzten Kapitel dieser Arbeit eine Schlüsselrolle zu. Hierfür wurde die NLS unter Berücksichtigung verschiedenartiger Modifikationsansätze mit dem Arzneistoff funktionalisiert, wobei zum ersten Mal kovalent verknüpfte Doxorubicin-NLS-Konjugate erhalten wurden. Dadurch konnten sowohl spaltbare als auch persistente NLS-Biokonjugate dargestellt werden. Da die spaltbaren Konjugate zum einen auf das in dieser Arbeit neu entwickelte Vernetzersystem und zum anderen auf die bereits etablierte Hydrazonchemie zurückgreifen, kann dadurch das hier vorgestellte Konzept der exklusiven reduktiven Spaltung als neuartiger Ansatz zur Arzneistofffreisetzung weiter kritisch bewertet werden.

Aufgrund der hinlänglich bekannten Affinität von DNA-Molekülen zu Kernlokalisierungssequenzen besteht die Möglichkeit, dass das stabile Doxorubicin-NLS-Konjugat stärkere zytotoxische Eigenschaften im Vergleich zu seinen spaltbaren Derivaten aufweist. Um diese Hypothese zu stützen, könnte der persistente Abkömmling zunächst eingehend durch Mikromaßstab-Thermophorese untersucht werden.

Da bei den in dieser Arbeit dargestellten unfunktionalisierten Doxorubicin-Dimeren nicht nur geringe Zellinternalisierung, sondern auch eine unzureichende Anreicherung im Nukleus beobachtet werden konnte, würde die Funktionalisierung des aktivierten Thiol-tragenden Doxorubicin-Dimers mit einer NLS einen überaus potenten Modifikationsansatz darstellen, den es zu verfolgen gilt.

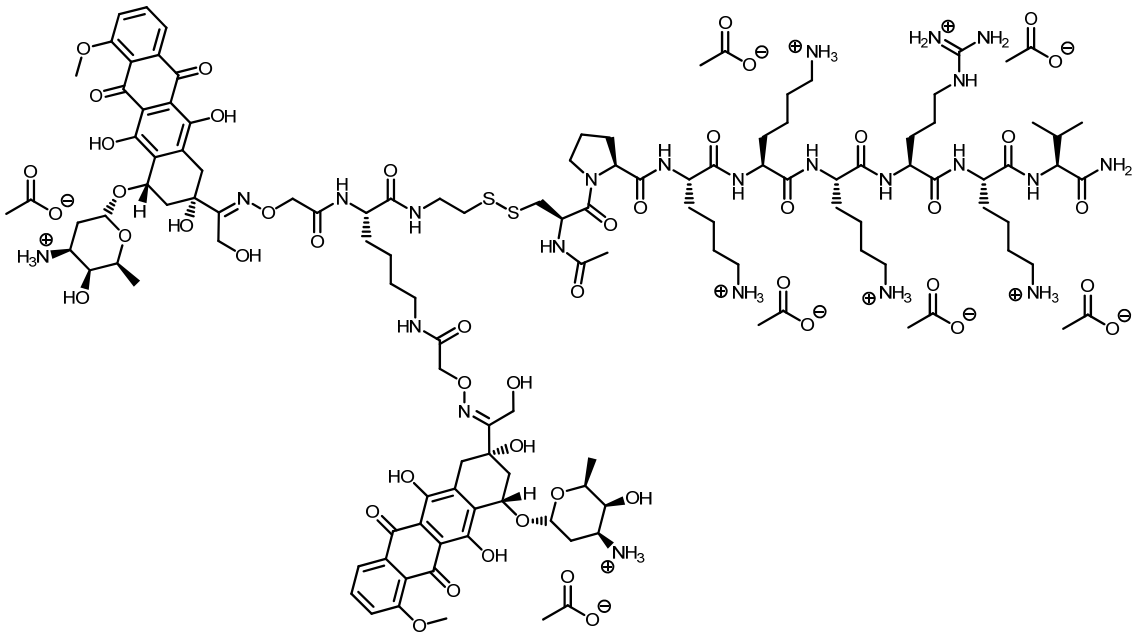


Abbildung 97: Modifikationsansatz zur Kernlokalisierung eines Doxorubicin-Dimers

Wie Raymond B. Weiss bereits vor mehr als 20 Jahren erkannt hat, ist die Suche nach Anthracylinen mit besseren pharmakologischen Eigenschaften als die des Doxorubicin ein äußerst schwieriges Unterfangen. Die in dieser Arbeit dargestellten Doxorubicinderivate haben diverse Ansätze verfolgt, um dem „perfekten“ Anthracyclin ein Stück näher zu kommen. Auch wenn dieses Ziel mit den bisher untersuchten Arzneistoffabkömmlingen noch nicht vollständig erreicht werden konnte, haben derartige Verbindungen ein außerordentlich großes Potential das sogenannte „bessere Doxorubicin“ in naher Zukunft ausfindig zu machen.

8 Experimenteller Teil

8.1 Materialien, Methoden und Analytik

Chemikalien und Lösungsmittel:

Die verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien wurden von den Firmen Acros Organics, Alfa Aesar, AppliChem, Bio-Rad Laboratories, Deutero, Fisher Scientific, Fluka, Merck, Rapp Polymere sowie Sigma Aldrich bezogen und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt. Die Reinheitsgrade der eingesetzten Solventien waren „zur Analyse (p.A.)“ beziehungsweise „Chromasolv“. Doxorubicin-Hydrochlorid wurde bei Ontario Chemicals, Inc. (Guelph, Ontario, Kanada) bestellt. Immunglobulin G (100 mg/ml; Reinheit ≥ 98%; enthält Prolin und Immunglobulin A) wurde von der Universitäts-Hautklinik zur Verfügung gestellt.

Kundenspezifische Peptidsynthese:

Die zur Modifikation eingesetzten Peptidsequenzen wurden bei den Firmen Genosphere Biotechnologies (Paris, Frankreich) und Severn Biotech Ltd. (Kidderminster, Worcestershire, Großbritannien) mit einer Reinheit von 90 % in Auftrag gegeben.

Dünnschichtchromatographie:

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden kieselgelbeschichtete Aluminiumfolien der Firma Macherey Nagel verwendet (ALUGRAM® SIL G/UV_{254}). Detektion der Chromatographiezonen erfolgte durch Eigenfarbe, Eigenfluoreszenz bei 365 nm, Fluoreszenzlöschung bei 254 nm sowie Anfärbung mit Kaliumpermanganatlösung oder Ninhydrin Reagenz.

Präparative Säulenchromatographie:

Als stationäre Phase zur säulenchromatographischen Aufreinigung wurde Kieselgel der Firma Macherey Nagel mit einer Korngröße von 0.063-0.200 mm benutzt. Die jeweilige mobile Phase, und die entsprechende Mischungsverhältnisse sind im Syntheseteil angegeben.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie:

Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde mit einem Jasco LC-2000Plus System mit geeignetem Dioden-Array-Detektor (MD-2015) und adäquaten Lösungsmittelpumpen (PU-2086) durchgeführt. Zur analytischen HPLC wurden ReproSil 100 C18 (250 x 4.6 mm) Säulen mit 5 µm Partikelgröße als stationäre Phase bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Aufreinigung der gewünschten Substanzen wurde mittels ReproSil 100 C18 (250 x 20 mm) Säulen und einer Flussrate von 15 ml/min bewerkstelligt, dabei diente 5 µm Silica ebenfalls als stationäre Phase. Die entsprechend eingesetzten Eluenten waren 25 mM Triethylammoniumacetatpuffer (pH 7) [A] sowie Acetonitril [B]; angemessene Laufmittelgradienten sind dem folgenden Syntheseteil zu entnehmen.

Proteininkubation und -aufarbeitung:

Die Inkubation der Antikörperproben wurde in einem Eppendorf Thermomixer® compact ausgeführt. Zur Ultrafiltration wurden Amicon Ultra (500 µl; MWCO 10 kDa) Bauelemente der Firma Millipore, in Verbindung mit einer Eppendorf MiniSpin® Plus Zentrifuge verwendet.

Schutzgas:

Arbeiten unter Inertgasatmosphäre wurden mit Argon der Firma Linde durchgeführt, welches davor durch Hydro- und Oxisorbfilter der Firma Messer Griesheim von Sauerstoff- und Feuchtigkeitsspuren befreit wurde.

^{1}H und ^{13}C-Kernspinresonanzspektroskopie:

- Bruker DPX 250
- Bruker AMX 300
- Bruker DRX 500 (Bruker Avance III)
- Bruker WS 700 (Bruker Avance III)
- Bruker WB 850 (Bruker Avance III)

Massenspektrometrie:

- FD: VG Instruments ZAB 2-SE-FPD (8 kV)
- MALDI-TOF: Bruker Reflex II-TOF (337 nm Sickstofflaser); als Matrix wurde entweder 2,5-Dihydroxybenzoesäure oder für die Peptidproben α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure verwendet

Mikromaßstab-Thermophorese:

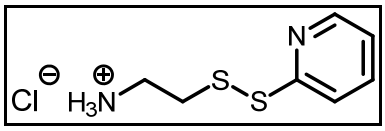
MST-Messungen wurden mit einem Nano Temper Monolith NT.115 Gerät durchgeführt. Die benötigte Anregung der Cy5 markierten DNA wurde mit 50 % LED Leistung erreicht und die Emission im Bereich von 670-690 nm detektiert. Thermophorese wurde ausgehend von Raumtemperatur mit einer Infrarotlaser-Intensität von 10 % induziert. Die 100 nM Lösung der 36 basenpaarigen DNA wurde mit Doxorubicin oder dem entsprechenden Dimer in 50 mM TRIS Puffer (pH 6.5), mit 15 mM Natriumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid sowie 0.05 % Tween 20, titriert.

SDS-Gelelektrophorese:

Zur gelelektrophoretischen Untersuchung der isolierten Peptidderivate wurden Novex® 16% Tricine Gele sowie die entsprechenden Tricine Lauf- und Probenpuffer der Firma Invitrogen verwendet. Als Molekulargewichtsstandard dienten „Polypeptide SDS-PAGE Standards“ und „Kaleidoscope Polypeptide Standards“ der Firma Bio-Rad. Gelelektrophorese der modifizierten Proteinderivate wurde unter Verwendung von NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Gelen, samt NuPAGE® MOPS SDS Buffer Kit der Firma Invitrogen durchgeführt. Zum Vergleich wurden als Referenz „Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard“ (Invitrogen) und „Prestained SDS-PAGE Standards #161-0318“ (Bio-Rad) Molekulargewichtsstandards verwendet.
Anfärbung der Peptid- und Proteinbanden erfolgte durch Inkubation mit Coomassie-Brilliant-Blau. Die Polyethylenglykol spezifische Anfärbung wurde mittels 5%iger Bariumchlorid- sowie 0.1 M Iodlösung durchgeführt.

8.2 Organische Synthesen

2-(2-Pyridyldithio)ethylamin-Hydrochlorid (10):



2,2´-Bispyridyldisulfid (25 g, 113.47 mmol) wird in 150 ml Methanol gelöst und die Lösung anschließend im Ultraschallbad entgast. Zu dieser Lösung wird danach ß-Mercaptoethylaminhydrochlorid (2.15 g, 18.91 mmol) langsam dazugegeben, der Kolben mit einem Septum verschlossen und über Nacht unter Argon gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Reaktionsgemisch in einen Liter Diethylether gegeben, wobei ein schwach gelber Feststoff ausfällt, welcher anschließend abgesaugt wird. Der erhaltene Feststoff wird erneut in wenig Methanol gelöst, in Diethylether ausgefällt und abgesaugt; dabei erhält man das Produkt als farblosen Feststoff.

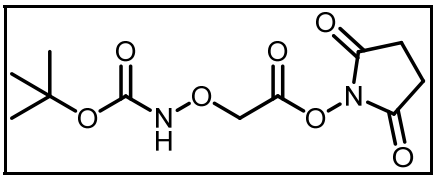
Ausbeute: 3.92 g (17.59 mmol, 93 %)

MS (MALDI-TOF):
m/z (rel. Int.) = 187.00 (100%) $[M+H]^+$

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):
δ (ppm) = 8.56-8.46 (m, 1H), 8.30 (s, br, 3H), 7.88-7.80 (m, 1H), 7.76 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.34-7.25 (m, 1H), 3.17-3.01 (m, 4H)

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):
δ (ppm) = 158.09, 149.80, 137.89, 121.59, 120.00, 37.65, 34.74

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-2-(*tert*-butoxycarbonyl)aminooxyacetat (4):



In 55 ml wasserfreiem Dichlormethan werden *N*-Hydroxysuccinimid (2.79 g, 24.28 mmol) und 2-((*tert*-Butoxycarbonyl)aminooxyessigsäure (4.42 g, 23.12 mmol) suspendiert und der Reaktionskolben mit Argon geflutet. Anschließend wird *N,N´*-Diisopropylcarbodiimid (3.06 g, 3.76 ml, 24.88 mmol) dazugegeben, wobei sich eine klare Lösung bildet, und zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Danach wird erneut *N,N´*-Diisopropylcarbodiimid (244 mg, 300 µl, 1.99 mmol) hinzugefügt und für weitere zwei Stunden gerührt. Bei beendeter Reaktionszeit wird von ausgefallenem Harnstoff abfiltriert und mit wenig Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird mit 200 ml Dichlormethan verdünnt und viermal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei sich ein farbloser Feststoff bildet.

Ausbeute: 6.13 g (21.27 mmol, 92 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 357.04 (100%) $[M+3Na]^+$

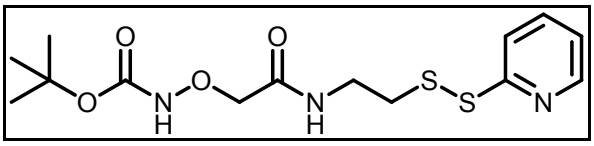
^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 10.36 (s, 1H), 4.82 (s, 2H), 2.84 (s, 4H), 1.42 (s, 9H)

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 169.95, 165.14, 156.57, 80.60, 69.90, 27.93, 25.47

2-((*tert*-Butoxycarbonylaminooxy)-*N*-(2-(2-pyridyldithio)))ethylacetamid (30):



Der NHS-Ester (**4**) (3.88 g, 13.47 mmol) und das aktivierte Thiol (**10**) (3.00 g, 13.47 mmol) werden in 60 ml trockenem DMF gelöst, mit Diisopropylethylamin (6.96 g, 9.16 ml, 53.87 mmol) versetzt und unter Argon bei Raumtemperatur für drei Stunden gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch mit 250 ml Ethylacetat verdünnt und die organische Phase dreimal mit Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der so gewonnene Rückstand wird an Kieselgel mit Ethylacetat/Hexan (2:1) aufgereinigt, wobei das Produkt als schwach gelbes Öl erhalten wird.

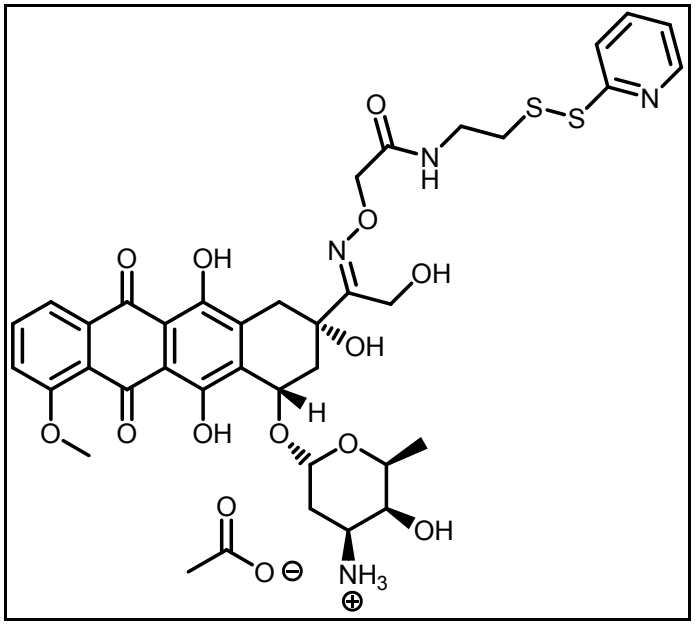
Ausbeute: 3.53 g (9.83 mmol, 73 %)

MS (FD, 8 kV):
m/z (rel. Int.) = 357.8 (100%) $[M]^+$

^{1}H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):
δ (ppm) = 10.29 (s, 1H), 8.47 (d, 1H, J = 5.4 Hz), 8.23 (t, 1H, J = 6.6 Hz), 7.89-7.72 (m, 2H), 7.30-7.20 (m, 1H), 4.15 (s, 2H), 3.43 (q, 2H, J = 7.8 Hz), 2.93 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 1.40 (s, 9H)

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):
δ (ppm) = 168.05, 158.98, 156.78, 149.62, 137.77, 121.20, 119.31, 80.60, 74.68, 37.37, 37.25, 27.92

(2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-(2-hydroxy)-1-(2-oxo-2-(2-pyridyldithio))ethylamino)iminoethyl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminiumacetat (31):



Die *Boc*-geschützte Substanz **30** (1.87 g, 5.14 mmol) wird in 30 ml trockenem Dichlormethan gelöst, die Lösung mit 30 ml TFA versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden Lösungsmittel und Reagenz im Vakuum entfernt und der Rückstand für weitere 2 Stunden im Hochvakuum getrocknet. Dieser wird 175 ml DMF aufgenommen und Doxorubicin (1.49 g, 2.57 mmol) gelöst in 175 ml 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8) dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wird zwei Tage gerührt und danach mittels HPLC aufgereinigt. Danach wird das Lösungsmittel der gesammelten Fraktionen im Hochvakuum entfernt und der rote Rückstand in Methanol gelöst, in Diethylether ausgefällt und das Produkt abgesaugt.

Ausbeute: 1.76 g (2.08 mmol, 81 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 807.98 (100%) $[M+Na]^+$

HPLC:

t_R = 15.56 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

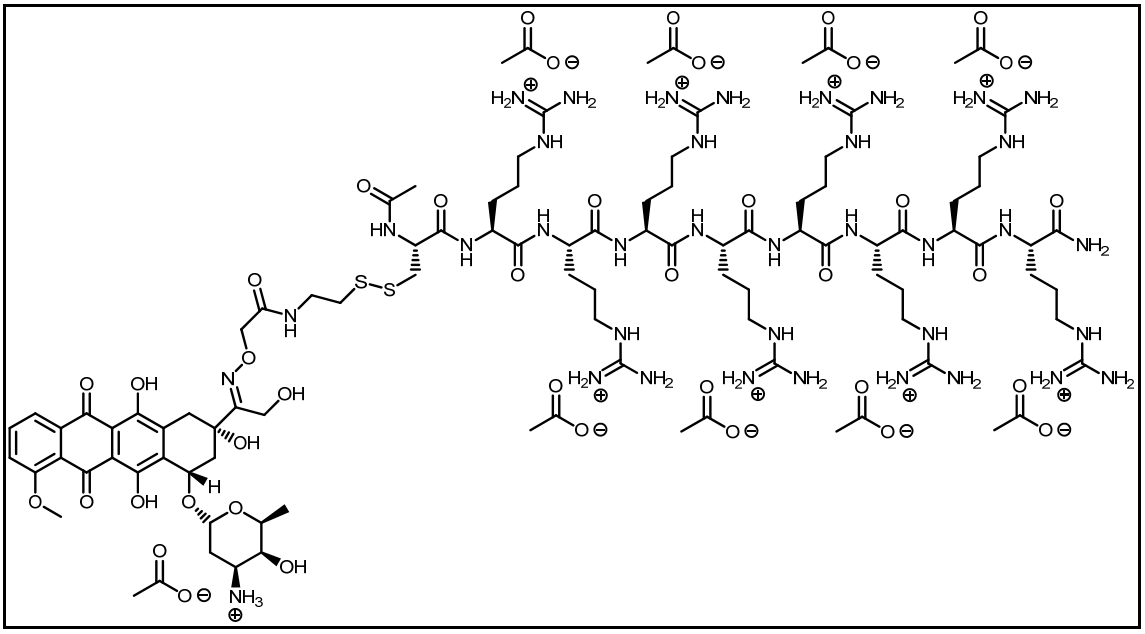
B: ACN

0 Min. 75% A – 45 Min. 30% A

^{1}H-NMR (700 MHz, D_2O, 298 K):

δ (ppm) = 8.21 (d, 1H, J = 4.2 Hz), 7.67-7.58 (m, 2H), 7.50 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.46 (d, 1H, J = 7 Hz), 7.32 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 7.13 (t, 1H, J = 5.6 Hz), 5.41 (s, 1H), 4.83 (s, 1H), 4.61 (dd, 2H, J = 16.1 Hz, J = 20.6 Hz), 4.51 (dd, 2H, J = 12.6 Hz, J = 37.7 Hz), 4.23 (q, 1H, J = 6.5 Hz), 3.86 (s, 3H), 3.77 (s, 1H), 3.60 (t, 1H, J = 8.5 Hz), 3.42-3.31 (m, 2H), 3.13-3.02 (m, 1H), 2.94-2.79 (m, 3H), 2.40-2.25 (m, 2H), 1.99 (d, 2H, J = 7.9 Hz), 1.90 (s, 3H), 1.31 (d, 3H, J = 6.5 Hz)

(2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-(2-hydroxy)-1-(2-oxo-2-(dithio[Ac-Cys-S$^{\beta}$-ArgArgArgArgArgArgArg-NH_2]octaacetat))ethylamino)iminoethyl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminiumacetat (34):



Das Doxorubicinderivat **31** (299.3 mg, 354.2 µmol) und Cysteinyloctaarginin-CPP (1.15 g, 495.9 µmol) werden im Rundkolben vorgelegt und mit 40 ml Dulbecco´s Phosphate

Buffered Saline versetzt. Anschließend werden 20 ml DMF und weitere 40 ml Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline dazugegeben, und es wird zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Danach wird die Lösung mit HPLC aufgereinigt und die erhaltenen Produktfraktionen werden im Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in Methanol gelöst, in Diethylether ausgefällt und über eine Glasfritte abfiltriert. Das rote Produkt wird mit Methanol erneut aus der Filterfritte herausgelöst und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

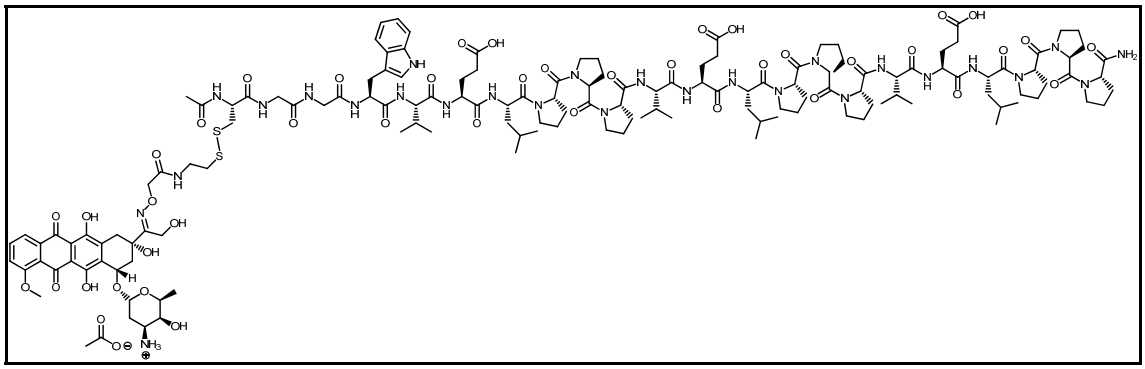
Ausbeute: 678.9 mg (258.5 µmol, 73 %)

MS (MALDI-TOF):
m/z (rel. Int.) = 2086.18 (100%) $[M+H]^+$

HPLC:
t_R = 15.21 Min. (480 nm)
A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7
B: ACN
0 Min. 100% A – 35 Min. 35% A

^{1}H-NMR (700 MHz, D_2O, 298 K):
δ (ppm) = 7.98 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.90 (t, 1H, J = 7.9 Hz), 7.62 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 5.59-5.55 (m, 1H), 5.14 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 4.53 (dd, 2H, J = 15.9 Hz, J = 49.0 Hz), 4.46 (s, 2H), 4.41 (t, 1H, J = 6.3 Hz), 4.35-4.24 (m, 9H), 4.26 (q, 1H, J = 6.6 Hz), 4.06 (s, 3H), 3.85-3.83 (m, 1H), 3.70-3.64 (m, 1H), 3.50-3.41 (m, 1H), 3.29-3.23 (m, 1H), 3.23-3.10 (m, 16H), 3.09-3.00 (m, 1H), 2.97-2.91 (m, 1H), 2.90-2.85 (m, 1H), 2.80-2.74 (m, 1H), 2.72-2.65 (m, 1H), 2.58-2.49 (m, 2H), 2.36-2.30 (m, 1H), 2.08-2.02 (m, 2H), 2.01 (s, 3H),1.91 (s, 24H), 1.87-1.51 (m, 32H), 1.30 (d, 3H, J = 6.6 Hz)

(2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-(2-hydroxy)-1-(2-oxo-2-(dithio[Ac-Cys-S$^{\beta}$-GlyGlyTrpValGluLeuProProProValGluLeuProProProValGluLeuProProPro-NH_2]))ethylamino)iminoethyl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminiumacetat (35):



Doxorubicinderivat **31** (21.5 mg, 25.4 µmol) und das Peptid (90 mg, 38.1 µmol) werden in einem Einhalsrundkolben eingewogen. Anschließend werden 2.5 ml Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline, 5 ml DMF und erneut 2.5 ml DPBS dazugegeben. Danach wird die rote Lösung für 18 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt und nachfolgend mittels HPLC aufgereinigt. Das Lösungsmittel der gesammelten Produktfraktionen wird im Hochvakuum entfernt, der zurückgebliebene Feststoff in Methanol gelöst und das orangerote Produkt in Diethylether ausgefällt und abgesaugt.

Ausbeute: 52.7 mg (14.4 µmol, 67 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 3057.13 (100%) $[M+Na]^+$

HPLC:

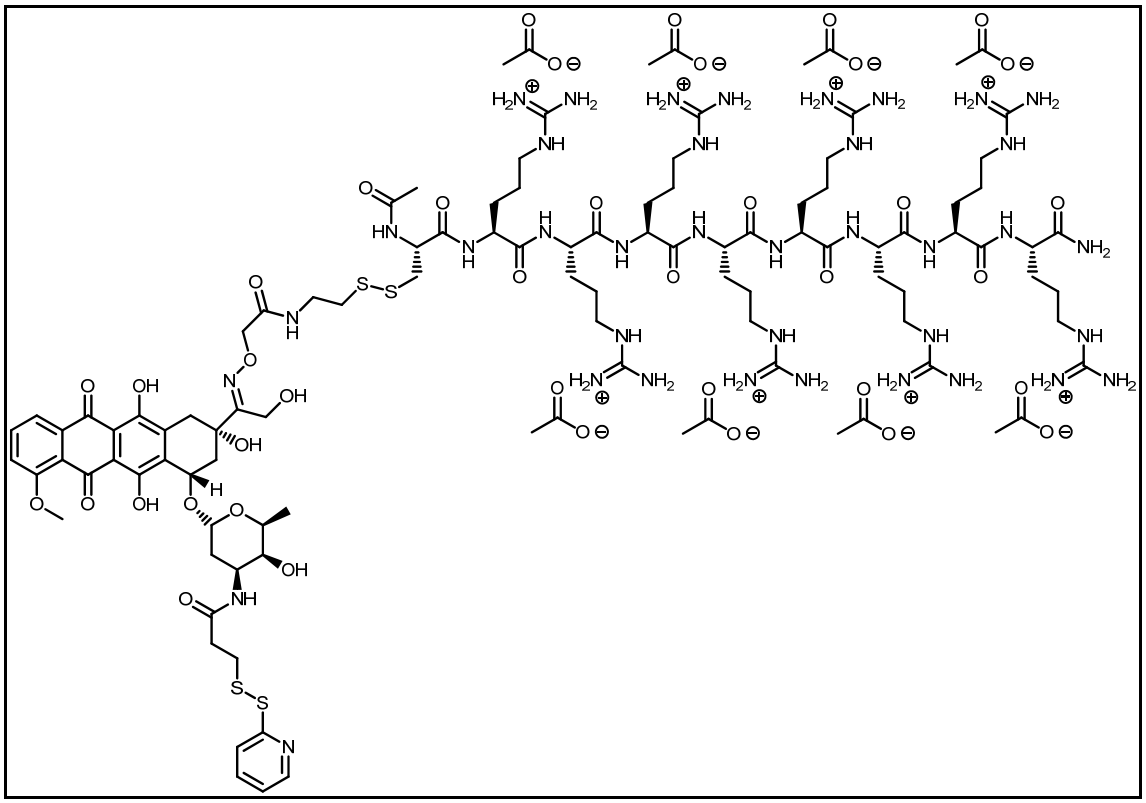
t_R = 23.36 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

B: ACN

0 Min. 100% A – 35 Min. 35% A

***N*-((2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-(2-hydroxy)-1-(2-oxo-2-(dithio[Ac-Cys-S$^{\beta}$-ArgArgArgArgArgArgArgArg-NH_2]octaacetat))ethylamino)iminoethyl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyranyl)-3-(2-pyridyldithio)propanamid (38):**



In 20 ml dest. Wasser wird das Doxorubicin-Peptid-Konjugat **34** (251.8 mg, 95.9 µmol) gelöst und anschließend unter Rühren mit *N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (59.9 mg, 191.8 µmol) gelöst in 20 ml DMF versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und zunächst mittels HPLC aufgereinigt. Die erhaltenen Produktfraktionen werden im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 10 ml Triethylammoniumacetatpuffer aufgenommen und an Bio-Gel® P-2 mit Triethylammoniumacetatpuffer als Laufmittel chromatographisch aufgetrennt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der rote Feststoff in wenig Methanol gelöst und in Diethylether ausgefällt. Das Produkt wird abfiltriert, aus der Glasfilterfritte erneut mit Methanol herausgelöst und das Lösungsmittel entfernt.

Ausbeute: 188.1 mg (68.1 µmol, 71 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 2283.65 (100%) $[M+H]^+$

HPLC:

t_R = 19.23 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

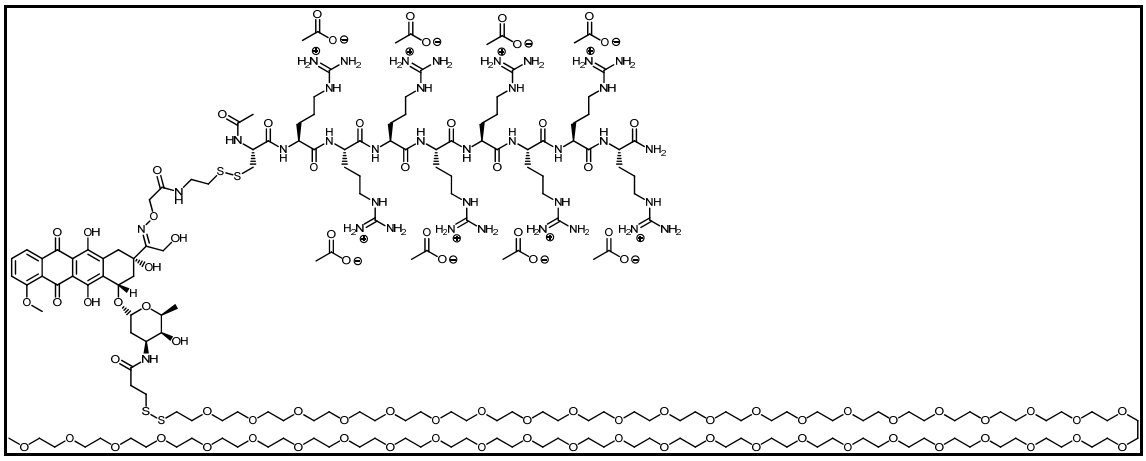
B: ACN

0 Min. 100% A – 35 Min. 35% A

^{1}H-NMR (700 MHz, D_2O, 298 K):

δ (ppm) = 8.02 (d, 1H, J = 4.3 Hz), 7.69 (t, 1H, J = 7.9 Hz), 7.58 (d, 1H, J = 6.8 Hz), 7.45-7.38 (m, 2H), 7.35 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 6.89 (t, 1H, J = 4.3 Hz), 5.50 (s, 1H), 5.00 (s, 1H), 4.65-4.49 (m, 4H), 4.45 (t, 1H, J = 7.0 Hz), 4.40-4.24 (m, 10H), 3.84 (s, 3H), 3.79 (s, 1H), 3.38-3.33 (m, 1H), 3.30-3.23 (m, 1H), 3.23-3.10 (m, 1H), 3.02-2.94 (m, 4H), 2.85-2.80 (m, 1H), 2.69-2.60 (m, 4H), 2.52-2.42 (m, 2H), 2.14-2.05 (m, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.92 (s, 24H), 1.89-1.51 (m, 32H), 1.33 (d, 3H, J = 6.5 Hz)

_N_-((2_S_,3_S_,4_S_,6_R_)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1_S_,3_S_)-3,5,12-trihydroxy-3-(2-hydroxy)-1-(2-oxo-2-(dithio[Ac-Cys-S$^{\beta}$-ArgArgArgArgArgArgArgArg-NH_2]octaacetat))ethylamino)iminoethyl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2_H_-pyranyl)-3-(dithio(ω-methoxy-_poly_(ethylenglykolyl)[M_R=2000]))propanamid (39):



Das Doxorubicinderivat **38** (98.1 mg, 35.5 µmol) wird in 7 ml frisch entgastem 15 %igen methanolischen Triethylammoniumacetatpuffer (25 mM) gelöst und bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Danach wird das Ethylenglykol-Polymer (79.3 mg, 39.0 µmol, M_R = 2000 g/mol) in 7 ml des obigen Lösungsmittels gelöst und zu der Doxorubicinlösung getropft. Nach beendeter Zugabe wird über Nacht bei Raumtemperatur unter Argon gerührt und anschließend mittels GPC an Bio-Gel® P-2 unter Verwendung desselben Lösungsmittelgemisches aufgereinigt. Das Produkt wird getrocknet und der rote Rückstand aus Methanol in Diethylether ausgefällt und abgesaugt. Danach wird die Substanz mit Methanol aus der Fritte gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 136.3 mg (29.1 µmol, 82 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 4229.95 (100%) $[M+H]^+$

HPLC:

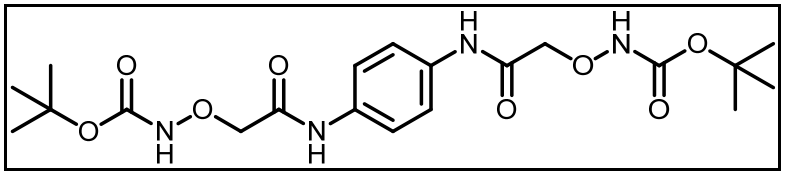
t_R = 23.95 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

B: ACN

0 Min. 100% A – 35 Min. 15% A

***N,N´*-(1,4-Phenylen)*bis*(2-(*tert*-butoxycarbonylaminooxy)acetamid) (5):**



In 20 ml frisch destilliertem THF wird **4** (680 mg, 2.36 mmol) gelöst und mit 1,4-Phenylendiamin (127.55 mg, 1.18 mmol) gelöst in 5 ml frisch destilliertem THF versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 24 Stunden unter Argon bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Danach wird der Rückstand in 50 ml Ethylacetat aufgenommen, 30 Minuten im Ultraschallbad dispergiert und das Produkt als farbloser Feststoff abfiltriert.

Ausbeute: 444.9 mg (0.98 mmol, 83 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 492.99 (100%) $[M+K]^+$

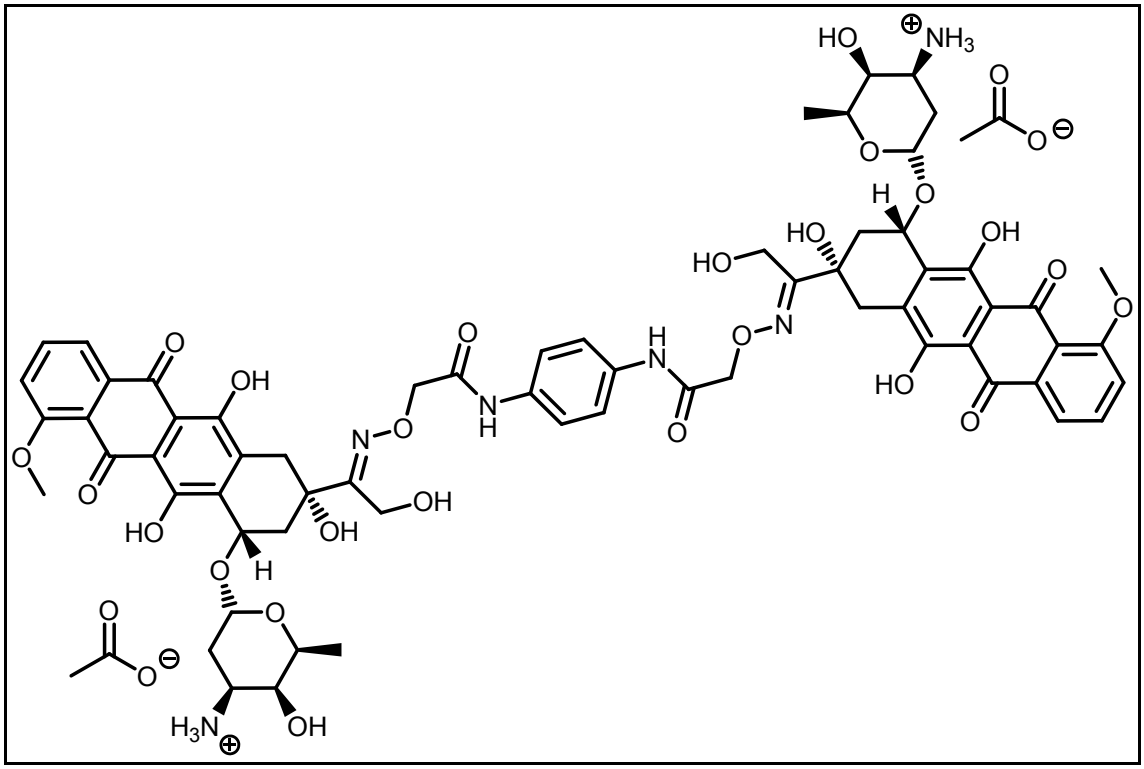
^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 10.49 (s, 2H), 10.02 (s, 2H), 7.59 (s, 4H), 4.34 (s, 4H), 1.42 (s, 18H)

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 166.62, 157.22, 134.07, 119.72, 80.84, 75.09, 27.92

_N,N´_-(1,4-Phenylen)_bis_(2-((_E_)-(1-((2_S_,4_S_)-4-(((2_R_,4_S_,5_S_,6_S_)-4-amino-5-hydroxy-6-methyltetrahydro-2_H_-pyran-2-yl)oxy)-2,5,12-trihydroxy-7-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-2-yl)-2-hydroxyethyliden)aminooxy)acetamid)diacetat (7):



Das Phenylendiaminderivat **5** (100 mg, 220.0 µmol) wird mit je 5 ml trockenem DCM und TFA versetzt, und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden Lösungsmittel und Reagenz im Vakuum entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird das verbliebene Öl in 25 ml DMF aufgenommen und Doxorubicin-Hydrochlorid (255.2 mg, 440.1 µmol), gelöst in 25 ml 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8), dazugegeben. Die Reaktionsmischung wird 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach mit HPLC aufgereinigt. Das Lösungsmittel der isolierten Fraktionen wird entfernt, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und das Produkt als roter Feststoff in Diethylether ausgefällt und abfiltriert.

Ausbeute: 229.0 mg (160.6 µmol, 73 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 1328.69 (100%) $[M+Na]^+$

HPLC:

t_R = 26.79 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

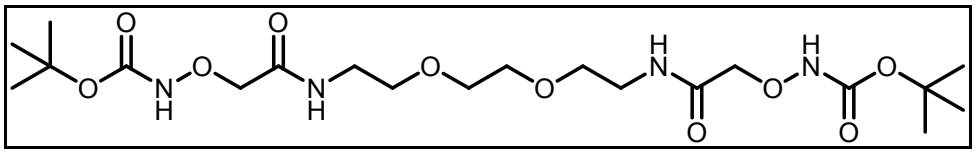
B: ACN

0 Min. 100% A – 40 Min. 40% A

^{1}H-NMR (700 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 8.86 (s, 2H), 7.72 (t, 2H, J = 8.2 Hz), 7.65 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 7.45 (d, 2H, J = 8.2 Hz), 6.78 (s, 4H), 5.17-5.14 (m, 2H), 5.03 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 4.50-4.38 (m, 4H), 4.36-4.28 (m, 4H), 3.91 (q, 2H, J = 6.5 Hz), 3.88 (s, 6H), 3.34 (d, 2H, J = 16.9 Hz), 3.30 (s, 2H), 2.90-2.84 (m, 2H), 2.70 (d, 2H, J = 16.9 Hz), 2.58-2.53 (m, 2H), 2.10-2.03 (m, 2H), 1.84 (s, 6H), 1.66-1.57 (m, 2H), 1.47-1.38 (m, 2H), 1.12 (d, 6H, J = 6.5 Hz)

***N*,*N*´-((Ethan-1,2-diyl*bis*(oxy))*bis*(ethan-2,1-diyl))*bis*(2-(*tert*-butoxycarbonylaminooxy)acetamid) (6):**



In 15 ml frisch destilliertem THF wird **4** (630 mg, 2.19 mmol) gelöst und mit 2,2'-(Ethylendioxy)*bis*(ethylamin) (161.95 mg, 1.09 mmol) gelöst in 5 ml frisch destilliertem THF versetzt. Die Reaktionsmischung wird unter Argon für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird der entstandene farblose Niederschlag abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 300 ml Ethylacetat aufgenommen und jeweils zweimal mit gesättigter Natriumcarbonat- und Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel entfernt, wobei man das Produkt als farbloses Öl erhält.

Ausbeute: 426.9 mg (0.86 mmol, 79 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 517.11 (100%) $[M+Na]^+$

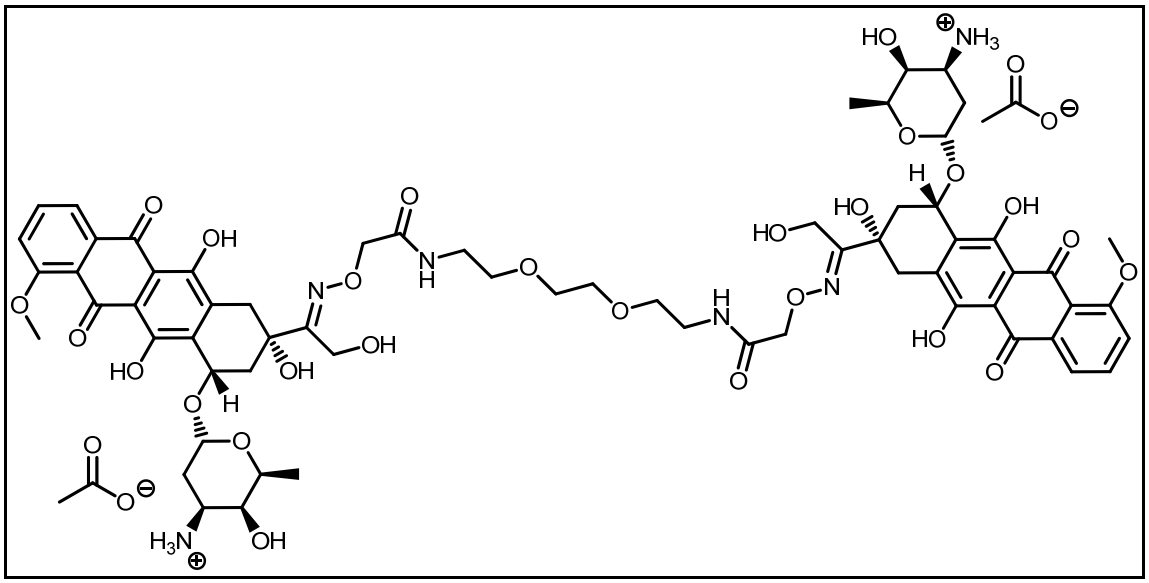
^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 10.27 (s, 2H), 8.02 (t, 2H, J = 5.3 Hz), 4.15 (s, 4H), 3.52 (s, 4H), 3.44 (t, 4H, J = 5.9 Hz), 3.28 (q, 4H, J = 5.9 Hz), 1.41 (s, 18H)

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 167.98, 156.81, 80.58, 74.73, 69.49, 68.86, 38.19, 27.91

<u>*N*,*N*´-((Ethan-1,2-diyl-*bis*(oxy))*bis*(ethan-2,1-diyl))*bis*(2-((*E*)-(1-((2*S*,4*S*)-4-(((2*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-4-amino-5-hydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-2,5,12-trihydroxy-7-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-2-yl)-2-hydroxyethyliden)aminooxy)acetamid)diacetat (8):</u>



Die *Boc*-geschützte Substanz **8** (235 mg, 475.2 µmol) wird in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst, die Lösung mit 10 ml TFA versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Anschließend werden Lösungsmittel und Reagenz im Vakuum entfernt und der Rückstand im Hochvakuum für drei Stunden getrocknet. Das verbliebene Öl wird in 55 ml DMF aufgenommen und Doxorubicin-Hydrochlorid (551.2 mg, 950.4 µmol), gelöst in 55 ml 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8), dazugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach mittels HPLC aufgereinigt. Das Lösungsmittel der gesammelten HPLC-Fraktionen wird entfernt, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und das rote Produkt in Diethylether ausgefällt und abfiltriert.

Ausbeute: 536.2 mg (365.9 µmol, 77 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 1367.87 (100%) $[M+Na]^+$

HPLC:

t_R = 26.77 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

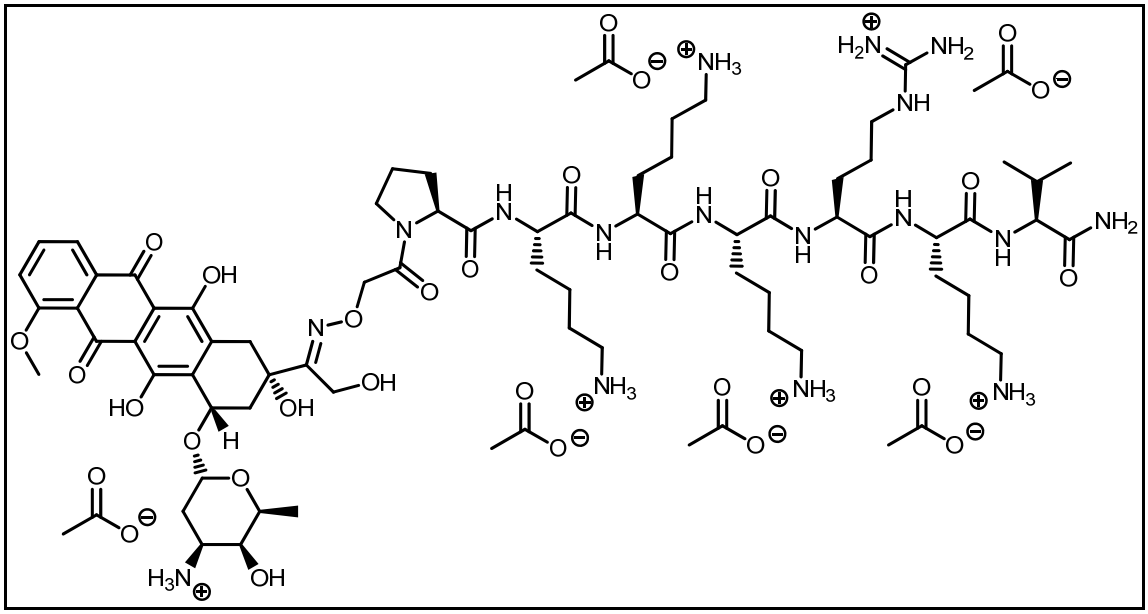
B: ACN

0 Min. 100% A – 40 Min. 40% A

^{1}H-NMR (700 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 7.86-7.79 (m, 4H), 7.76 (t, 2H, J = 5.6 Hz), 7.56 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 5.18-5.14 (m, 2H), 4.83 (t, 2H, J = 5.4 Hz), 4.40-4.32 (m, 6H), 4.30-4.25 (m, 2H), 4.02 (q, 2H, J = 6.5 Hz), 3.93 (s, 6H), 3.33 (s, 4H), 3.32-3.30 (m, 2H), 3.24 (t, 4H, J = 6.2 Hz), 3.10-3.02 (m, 6H), 2.94-2.89 (m, 2H), 2.88-2.83 (m, 2H), 2.31-2.24 (m, 4H), 1.84 (s, 6H), 1.67-1.60 (m, 2H), 1.55-1.48 (m, 2H), 1.14 (d, 6H, J = 6.5 Hz)

(2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-(2-hydroxyethyl)-1-(2-oxo-2-([ProLysLysLysArgLysVal-NH_2]pentaacetat)iminoethyl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminiumacetat (45):



Doxorubicin-Hydrochlorid (40.1 mg, 69.1 µmol) und das Peptid (100 mg, 62.8 µmol) werden in je 4 ml DMF und 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8) gelöst und anschließend 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch durch HPLC aufgereinigt und die isolierten Produktfraktionen vom Lösungsmittel befreit. Der rote Rückstand wird in Methanol gelöst und das Produkt in Diethylether ausgefällt und abfiltriert.

Ausbeute: 79.7 mg (43.3 µmol, 69 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 1480.63 (100%) $[M+H]^+$

HPLC:

t_R = 16.64 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

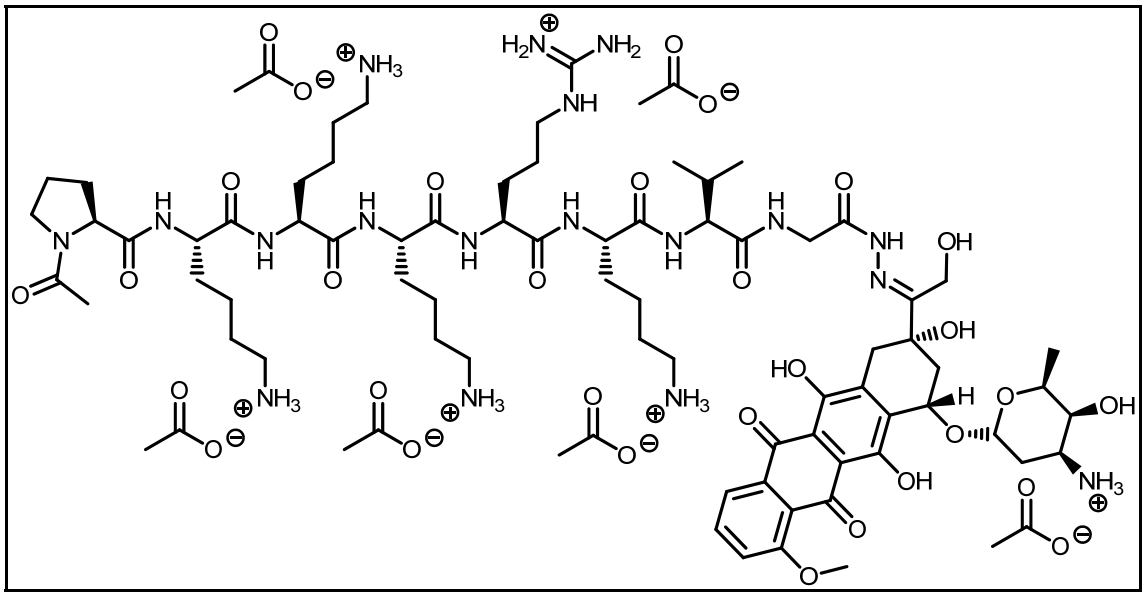
B: ACN

0 Min. 100% A – 35 Min. 35% A

^{1}H-NMR (850 MHz, D_2O, 298 K):

δ (ppm) = 7.81-7.68 (m, 2H), 7.50-7.41 (m, 1H), 5.47-5.40 (m, 1H), 4.85-4.80 (m, 1H), 4.49-4.32 (m, 4H), 4.30-4.17 (m, 7H), 4.03 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 3.97 (s, 3H), 3.75-3.66 (m, 1H), 3.56-3.45 (m, 3H), 3.15-3.06 (m, 2H), 2.96-2.84 (m, 10H), 2.38-2.15 (m, 1H), 2.00-1.88 (m, 6H), 1.84 (s, 18H), 1.80-1.47 (m, 22H), 1.42-1.27 (m, 8H), 1.24 (d, 3H, J = 6.5 Hz), 0.90 (d, 3H, J = 7.5 Hz), 0.89 (d, 3H, J = 7.5 Hz)

(2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-((2-hydroxyethyl)-1-hydrazonyl-([Ac-ProLysLysLysArgLysVal]pentaacetat)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminiumacetat (43):



In jeweils 3.5 ml DMF und 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8) werden Doxorubicin-Hydrochlorid (34.9 mg, 60.2 µmol) und das Peptid (100 mg, 60.2 µmol) gelöst. Danach wird zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die Reaktionsmischung mittels HPLC aufgereinigt. Das Lösungsmittel der isolierten HPLC-Fraktionen wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und das Produkt als roter Feststoff in Diethylether ausgefällt und abfiltriert.

Ausbeute: 70.3 mg (37.3 µmol, 53 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 1519.92 (100%) $[M+H]^+$

HPLC:

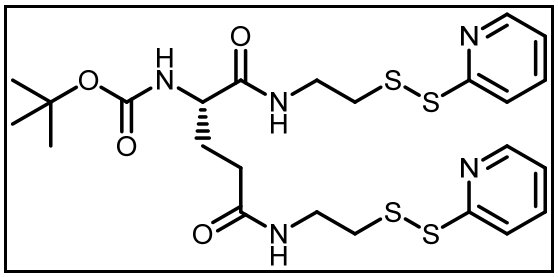
t_R = 17.03 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

B: ACN

0 Min. 100% A – 35 Min. 35% A

(*S*)-*tert*-Butyl(1,5-dioxo-1,5-*bis*((2-(2-pyridinyldithio)ethyl)amino)pentan-2-yl)carbamat (24):



Das geschützte Glutaminsäurederivat (500 mg, 2.02 mmol), TSTU (1.22 g, 4.04 mmol) sowie **10** (901 mg, 4.04 mmol) werden im Kolben vorgelegt und in 20 ml trockenem DMF gelöst. Anschließend wird DIPEA (1.31 g, 1.72 ml, 10.11 mmol) hinzugefügt und fünf Stunden unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktionszeit wird die Reaktionsmischung mit 350 ml Ethylacetat verdünnt und dreimal mit jeweils 250 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wird an Kieselgel mit Ethylacetat/Methanol (15:1) aufgereinigt, wobei das Produkt als gelbes Öl erhalten wird.

Ausbeute: 1.02 g (1.73 mmol, 86 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 605.99 (100%) $[M+Na]^+$

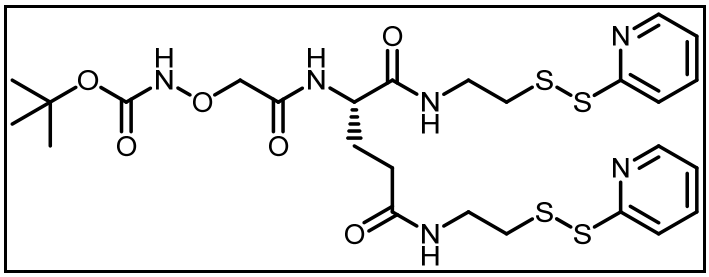
^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 8.51-8.43 (m, 2H), 8.07 (t, 1H, J = 6.3 Hz), 8.04 (t, 1H, J = 6.3 Hz), 7.87-7.72 (m, 4H), 7.28-7.20 (m, 2H), 6.88 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 3.92-3.74 (m, 1H), 3.44-3.24 (m, 4H), 2.88 (t, 4H, J = 6.3 Hz), 2.10 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 1.92-1.61 (m, 2H), 1.36 (s, 9H)

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 171.85, 171.66, 159.09, 159.01, 155.20, 149.63, 149.57, 137.76, 121.16, 119.33, 119.23, 78.06, 54.07, 37.78, 37.67, 37.45, 31.82, 28.15, 27.79

(*S*)-*tert*-Butyl((1,5-dioxo-1,5-*bis*((2-(2-pyridinyldithio)ethyl)amino)pentan-2-yl)amino)-2-oxoethoxycarbamat (25):



Die *Boc*-geschützte Substanz **24** (250 mg, 428.2 µmol) wird in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst, die Lösung mit 10 ml TFA versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Anschließend werden Lösungsmittel und Reagenz im Vakuum entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das verbliebene Öl wird in 5 ml trockenem DMF gelöst und nacheinander mit DIPEA (387.4 mg, 509.8 µl, 3 mmol) und **4** (135.8 mg, 471 µmol) versetzt. Danach wird das Reaktionsgemisch drei Stunden unter Argon bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss daran mit 250 ml Ethylacetat verdünnt. Die organische Phase wird dreimal mit 150 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird durch Kieselgelchromatographie mit Ethylacetat/Methanol (15:1) aufgereinigt und liefert das Produkt als schwach gelbes Öl.

Ausbeute: 187.2 mg (284.9 µmol, 78 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 695.22 (100%) $[M+K]^{+}$

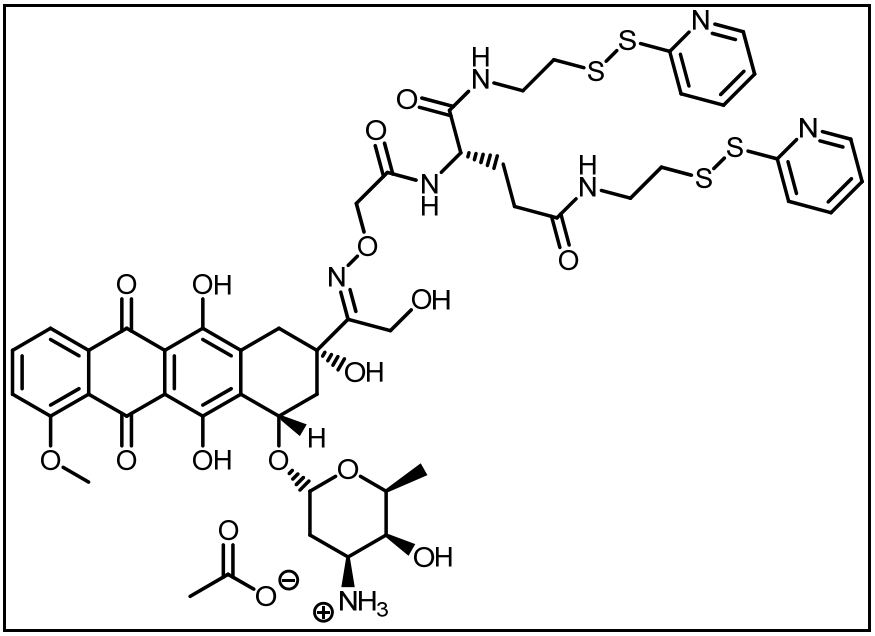
^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 10.30 (s, 1H), 8.51-8.40 (m, 2H), 8.24 (t, 1H, J = 5.7 Hz), 8.12 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 8.05 (t, 1H, J = 5.7 Hz), 7.88-7.70 (m, 4H), 7.28-7.19 (m, 2H), 4.33-4.09 (m, 1H), 3.43-3.24 (m, 4H), 2.89 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.87 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.09 (t, 2H, J = 8.0 Hz), 1.97-1.69 (m, 2H), 1.38 (s, 9H)

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 171.40, 170.88, 167.91, 159.08, 159.04, 156.86, 149.58, 137.76, 121.17, 119.25, 80.61, 74.64, 51.80, 37.84, 37.78, 37.43, 37.27, 31.59, 28.04, 27.91

(2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-((*S*,*E*)-1-hydroxy-6,11-dioxo-14-(2-pyridyldithio)-8-((2-pyridyldithio)ethyl)carbamoyl)-4-oxa-3,7,12-triazatetradec-2-en-2-yl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminiumacetat (26):



In 10 ml trockenem Dichlormethan wird **25** (450 mg, 685.1 µmol) gelöst und mit 10 ml TFA versetzt. Die Reaktionsmischung wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wird für weitere 2 Stunden im Hochvakuum getrocknet und in 40 ml DMF gelöst. Danach wird Doxorubicin-Hydrochlorid (397.3 mg, 685.1 µmol) gelöst in 40 ml 0.4 M

Natriumacetatpuffer (pH 4.8) dazugegeben und zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mittels HPLC aufgereinigt und das Lösungsmittel der Produktfraktionen im Vakuum abdestilliert. Der rote Rückstand wird in Methanol gelöst und das Produkt in Diethylether ausgefällt und abfiltriert.

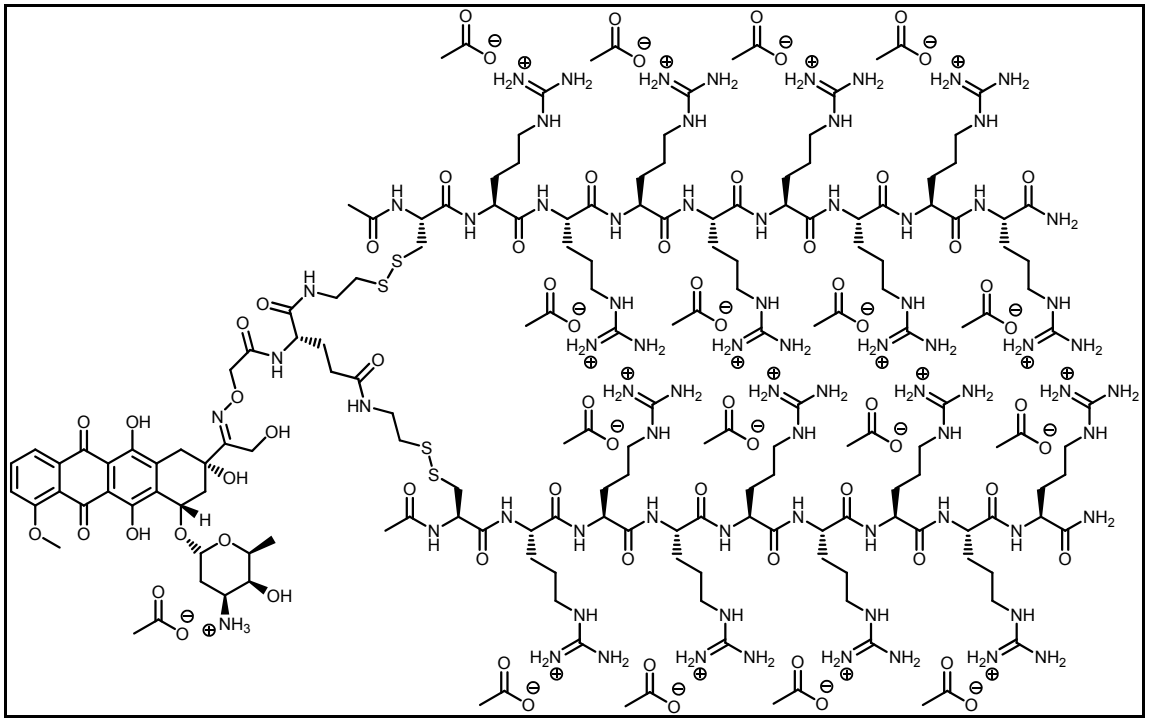
Ausbeute: 579.1 mg (507.0 µmol, 74 %)

MS (MALDI-TOF):
m/z (rel. Int.) = 1104.09 (100%) $[M+Na]^+$

HPLC:
t_R = 28.88 Min. (480 nm)
A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7
B: ACN
0 Min. 100% A – 40 Min. 30% A

^{1}H-NMR (850 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):
δ (ppm) = 8.42-8.37 (m, 2H), 8.24 (t, 1H, J = 5.7 Hz), 8.03 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 8.00 (t, 1H, J = 5.7 Hz), 7.93-7.87 (m, 2H), 7.79-7.47 (m, 2H), 7.70 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.65 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.63 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.21-7.16 (m, 2H), 5.26-5.38 (m, 1H), 5.23-5.17 (m, 1H), 5.10-5.02 (m, 1H), 4.95-4.90 (m, 1H), 4.57-4.27 (m, 5H), 4.25-4.18 (m, 1H), 4.07 (q, 1H, J = 6.6 Hz), 3.98 (s, 3H), 3.35-3.30 (m, 2H), 3.30-3.27 (m, 1H), 3.23-3.17 (m, 2H), 3.07-2.99 (m, 2H), 2.87-2.81 (m, 1H), 2.84 (t, 2H, J = 6.7 Hz), 2.76 (t, 2H, J = 6.8 Hz), 2.48-2.43 (m, 1H), 2.12-2.07 (m, 1H), 2.06-1.99 (m, 2H), 1.91-1.82 (m, 1H), 1.84 (s, 3H), 1.75-1.67 (m, 1H), 1.63-1.58 (m, 1H), 1.49-1.44 (m, 1H), 1.15 (d, 3H, J = 6.6 Hz)

(2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-((*S*,*E*)-1-hydroxy-6,11-dioxo-14-(dithio[Ac-Cys-S$^{\beta}$-ArgArgArgArgArgArgArgArg-NH_2]octaacetat)-8-((dithio[Ac-Cys-S$^{\beta}$-ArgArgArgArgArgArgArgArg-NH_2]octaacetat)ethyl)carbamoyl)-4-oxa-3,7,12-triazatetradec-2-en-2-yl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminiumacetat (36):



Das Doxorubicinderivat **26** (52.8 mg, 46.2 µmol) wird in jeweils 5 ml DMF und DPBS gelöst und anschließend mit dem Peptid (225.5 mg, 97 µmol) gelöst in 10 ml DPBS versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt und danach mittels HPLC aufgereinigt. Das Lösungsmittel der isolierten Produktfraktionen wird im Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet. Anschließend wird der erhaltene rote Feststoff in wenig Methanol gelöst, in Diethylether ausgefällt und das Produkt abgesaugt.

Ausbeute: 134.6 mg (31.9 µmol, 69 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 3683.79 (100%) $[M+H]^+$

HPLC:

t_R = 18.57 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

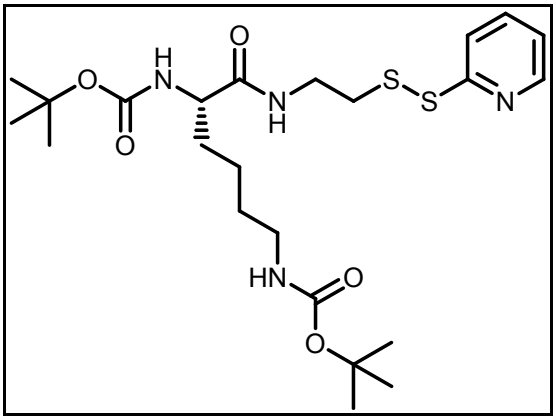
B: ACN

0 Min. 100% A – 40 Min. 30% A

^{1}H-NMR (850 MHz, D_2O, 298 K):

δ (ppm) = 7.94 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 7.85 (t, 1H, J = 7.7 Hz), 7.59 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 5.53-5.50 (m, 1H), 5.11-5.06 (m, 1H), 4.60-4.51 (m, 3H), 4.47-4.42 (m, 3H), 4.30-4.17 (m, 18H), 4.01 (s, 3H), 3.80-3.76 (m, 1H), 3.64-3.61 (m, 1H), 3.39-3.25 (m, 4H), 3.16-3.06 (m, 34H), 2.98-2.94 (m, 2H), 2.84-2.78 (m, 2H), 2.72-2.61 (m, 4H), 2.44-2.39 (m, 1H), 2.37-2.31 (m, 1H), 2.23-2.17 (m, 2H), 2.02-1.93 (m, 9H), 1.86-1.82 (m, 1H), 1.84 (s, 51H), 1.81-1.65 (m, 32H), 1.63-1.49 (m, 32H), 1.24 (d, 3H, J = 6.5 Hz)

(*S*)-Di-*tert*-butyl(6-oxo-6-((2-(2-pyridinyldithio)ethyl)amino)hexan-1,5-diyl)dicarbamat (12):



In 35 ml trockenem DMF werden das *N*,*N´*-Di-*Boc*-L-Lysin Dicyclohexylammoniumsalz (1.52 g, 2.89 mmol), TSTU (955.9 mg, 3.18 mmol), sowie **10** (707.3 mg, 3.18 mmol) gelöst und anschließend mit DIPEA (1.49 g, 1.96 ml, 11.55 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 4 Stunden unter Argon bei Raumtemperatur gerührt und danach mit 250 ml Ethylacetat verdünnt. Die organische Phase wir dreimal mit 0.2 M Salzsäure gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wird an Kieselgel mit Ethylacetat/Hexan (3:1) aufgereinigt, wobei das Produkt als farbloses Öl erhalten wird.

Ausbeute: 1.16 g (2.25 mmol, 78 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 536.93 (100%) $[M+Na]^+$

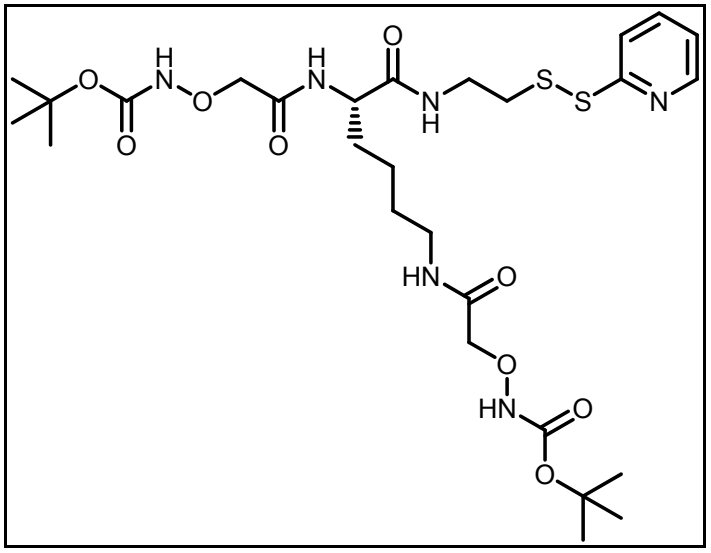
^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 8.52-8.43 (m, 1H), 8.05 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 7.88-7.79 (m, 1H), 7.76 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.31-7.18 (m, 1H), 6.82 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 6.75 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 3.89-3.73 (m, 1H), 3.47-3.19 (m, 2H), 2.98-2.77 (m, 4H), 1.58-1.17 (m, 6H), 1.36 (s, 18H)

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) = 172.29, 159.03, 155.54, 155.29, 149.63, 137.75, 121.17, 119.32, 77.94, 77.29, 54.39, 39.59, 37.67, 37.45, 31.56, 29.17, 28.25, 28.16, 22.81

(*S*)-Di-*tert*-butyl((6-oxo-6-((2-(2-pyridinyldithio)ethyl)amino)hexan-1,5-diyl)diamino)-2-oxoethoxydicarbamat (13):



Das Lysinderivat **12** (1.10 g, 2.14 mmol) wird in 15 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Anschließend werden 15 ml TFA hinzugefügt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktionszeit werden TFA und das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das verbliebene Öl wird in 25 ml trockenem DMF gelöst, nacheinander mit DIPEA (2.76 g, 3.63 ml, 21.37 mmol) sowie **4**

(1.23 g, 4.27 mmol) versetzt und daraufhin 3 Stunden unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Reaktionsmischung mit 300 ml Ethylacetat verdünnt und jeweils zweimal mit 0.2 M Salzsäure und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel mit Ethylacetat/Methanol (15:1) aufgereinigt, wobei das Produkt als farbloser Feststoff erhalten wird.

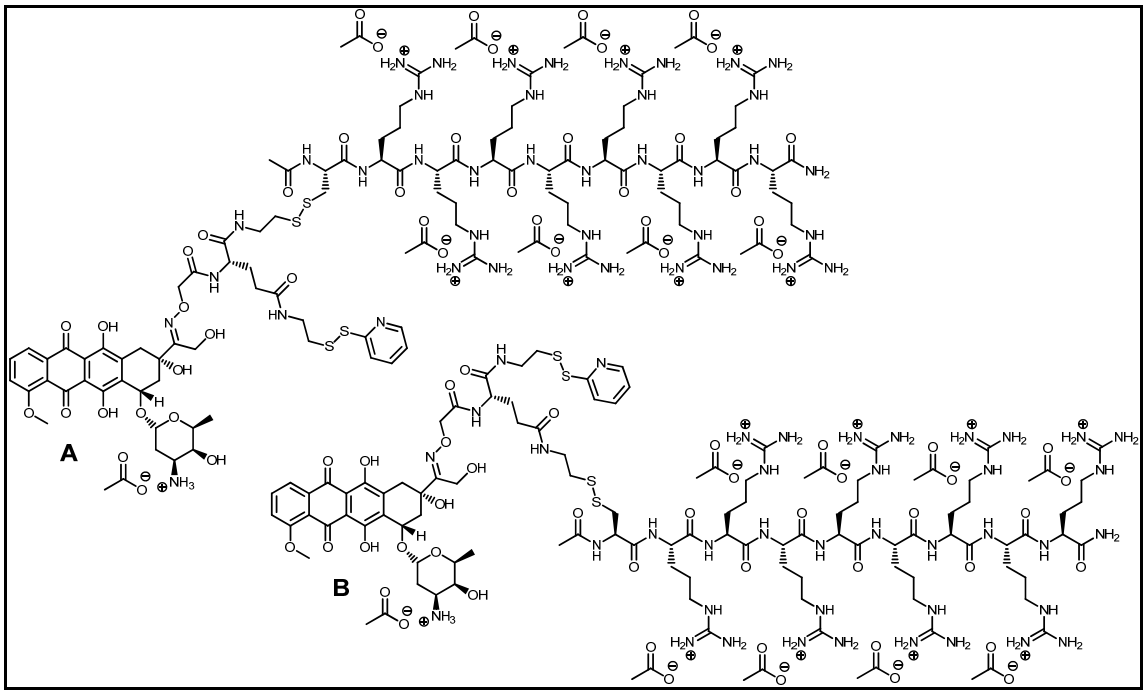
Ausbeute: 1.14 g (1.73 mmol, 81 %)

MS (MALDI-TOF):
m/z (rel. Int.) = 661.11 (100%) $[M+H]^+$

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):
δ (ppm) = 10.32 (s, 1H), 10.29 (s, 1H), 8.50-8.41 (m, 1H), 8.24 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 8.10 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.98 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 7.89-7.70 (m, 2H), 7.29-7.18 (m, 1H), 4.38-4.08 (m, 5H), 3.49-3.19 (m, 2H), 3.08 (q, 2H, J = 6.6 Hz), 2.89 (t, 2H, J = 6.6 Hz), 1.71-1.48 (m, 2H), 1.46-1.34 (m, 2H), 1.40 (s, 18H), 1.32-1.21 (m, 2H)

^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):
δ (ppm) = 171.25, 167.89, 167.70, 159.06, 156.95, 156.92, 149.59, 137.80, 121.19, 119.25, 80.64, 74.78, 74.62, 52.05, 38.04, 37.83, 37.28, 31.78, 28.72, 27.91, 22.66

(2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-((*S*,*E*)-1-hydroxy-6,11-dioxo-14-(2-pyridyldithio)-8-((dithio[Ac-Cys-S$^{\beta}$-ArgArgArgArgArgArgArgArg-NH_2]octaacetat)ethyl)carbamoyl)-4-oxa-3,7,12-triazatetradec-2-en-2-yl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminiumacetat (40-A), (2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-((*S*,*E*)-1-hydroxy-6,11-dioxo-14-(dithio[Ac-Cys-S$^{\beta}$-ArgArgArgArgArgArgArgArg-NH_2]octaacetat)-8-((2-pyridyldithio)ethyl)carbamoyl)-4-oxa-3,7,12-triazatetradec-2-en-2-yl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminiumacetat (40-B):



In jeweils 2.5 ml DMF und DPBS wird **26** (25 mg, 21.9 µmol) gelöst und danach das Peptid (55.9 mg, 24.1 µmol), gelöst in 5 ml DPBS, langsam dazugegeben. Die Reaktionsmischung wird 3 Stunden unter Argon bei Raumtemperatur gerührt und darauffolgend mittels HPLC aufgereinigt. Das Lösungsmittel der isolierten Produktfraktionen wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand getrocknet. Der dabei erhaltene rote Feststoff wird in wenig Methanol gelöst, in Diethylether ausgefällt und die beiden äquimolaren Produkte abgesaugt.

Ausbeute: 42.9 mg (14.7 µmol, 67 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 2381.87 (100%) $[M+H]^+$

HPLC:

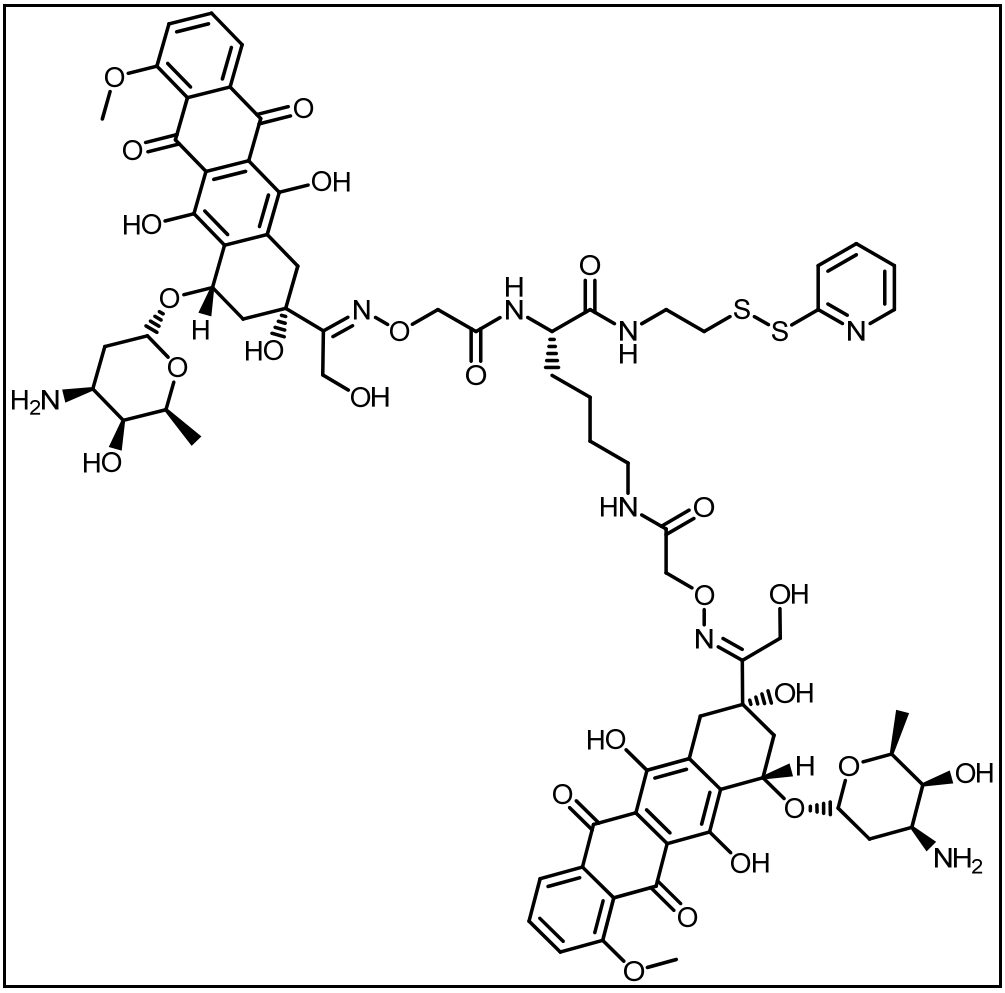
t_R = 23.28 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

B: ACN

0 Min. 100% A – 40 Min. 30% A

***N*,*N*'-((*S*)-6-Oxo-6-((2-(2-pyridyldithio)ethyl)amino)hexan-1,5-diyl)*bis*(2-((*E*)-(1-((2*S*,4*S*)-4-(((2*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-4-amino-5-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,12-trihydroxy-7-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-2-yl)-2-hydroxyethylidene)aminoxy)acetamid (14):**



Das geschützte Lysinderivat **13** (217.5 mg, 330 µmol) wird in 10 ml trockenem DCM gelöst und anschließend mit 10 ml TFA versetzt. Danach wird die Reaktionsmischung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und nachfolgend das Lösungsmittel, sowie das Reagenz im Vakuum entfernt. Daraufhin wird das erhaltene Öl mehrere Stunden im Hochvakuum getrocknet und der Rückstand in 40 ml DMF gelöst. Zu dieser Lösung wird Doxorubicin-Hydrochlorid (421.1 mg, 726 µmol) gelöst in 40 ml 0.4 M Natriumacetatpuffer (pH 4.8) hinzugefügt und zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss daran wird das Reaktionsgemisch an Bio-Gel® P-2 GPC-Gel mit Triethylammoniumacetat Puffer (25 mM) als Laufmittel chromatographisch aufgereinigt

und das Lösungsmittel der gesammelten Fraktionen im Vakuum abdestilliert. Der rote Rückstand wird in wenig TEAA-Puffer (25 mM) aufgenommen und mittels HPLC weiter aufgereinigt. Anschließend wird das Lösungsmittel der Produktfraktionen im Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und das Produkt als roter Feststoff in Diethylether ausgefällt und abfiltriert.

Ausbeute: 354.2 mg (234.3 µmol, 71 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 1533.07 (100%) $[M+Na]^+$

HPLC:

t_R = 29.33 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

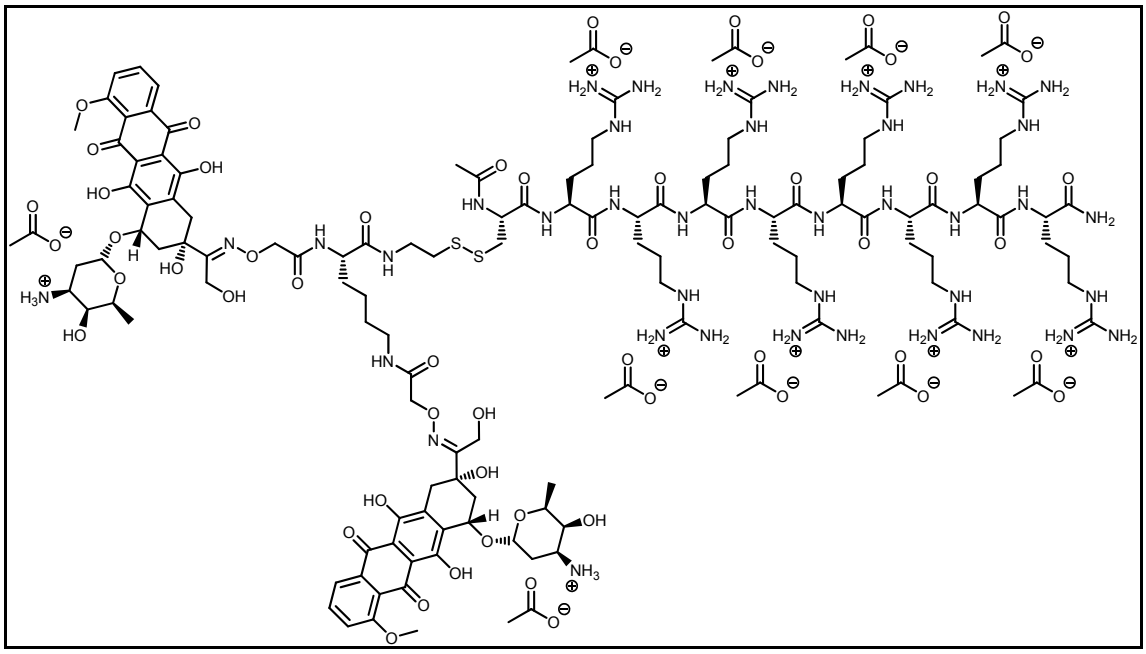
B: ACN

0 Min. 100% A – 45 Min. 35% A

^{1}H-NMR (700 MHz, DMSO-*d*^{6}, 298 K):

δ (ppm) =) 8.40 (d,1H, J = 4.8 Hz), 8.16 (t, 1H, J = 4.9 Hz), 7.94 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 7.82-7.72 (m, 5H), 7.71-7.66 (m, 2H), 7.51 (d, 1H, J = 7.0 Hz), 7.46 (d, 1H, J = 7.0 Hz), 7.22-7.15 (m, 1H), 5.22-5.17 (m, 2H), 5.14-5.05 (m, 2H), 4.78-4.72 (m, 1H), 4.71-4.64 (m, 1H), 4.46-4.36 (m, 4H), 4.35-4.27 (m, 4H), 4.17-4.05 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.61-3.56 (m, 2H), 3.35-3.20 (m, 4H), 3.04-2.88 (m, 6H), 2.83 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.42-2.31 (m, 2H), 2.25-2.14 (m, 2H), 1.89-1.80 (m, 2H), 1.69-1.58 (m, 3H), 1.49-1.40 (m, 1H), 1.36-1.29 (m, 2H), 1.22-1.11 (m, 8H)

_N_,_N_'-((_S_)-6-Oxo-6-((2-(dithio[Ac-Cys-S$^{\beta}$-ArgArgArgArgArgArgArgArg-NH_2]octaacetat)ethyl)amino)hexan-1,5-diyl)_bis_(2-((_E_)-(1-((2_S_,4_S_)-4-(((2_R_,4_S_,5_S_,6_S_)-4-aminiumacetat-5-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,12-trihydroxy-7-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-2-yl)-2-hydroxyethylidene)aminoxy)acetamid (37):



Das aktivierte Thiol **14** (24 mg, 15.9 µmol) wird in je 2 ml TEAA-Puffer pH 7 (25 mM), sowie DMF gelöst und anschließend mit dem Peptid (55.3 mg, 23.8 µmol) gelöst in 4 ml TEAA Puffer (25 mM) versetzt. Die Lösung wird 3 Stunden unter Argon bei Raumtemperatur gerührt und danach mit HPLC aufgereinigt. Darauffolgend wird das Lösungsmittel der isolierten Produktfraktionen im Vakuum abdestilliert und der Rückstand getrocknet. Anschließend wird der Feststoff in wenig Methanol gelöst, in Diethylether ausgefällt und das rote Produkt abgesaugt.

Ausbeute: 39.0 mg (11.4 µmol, 72 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 2813.12 (100%) $[M+H]^+$

HPLC:

t_R = 21.20 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

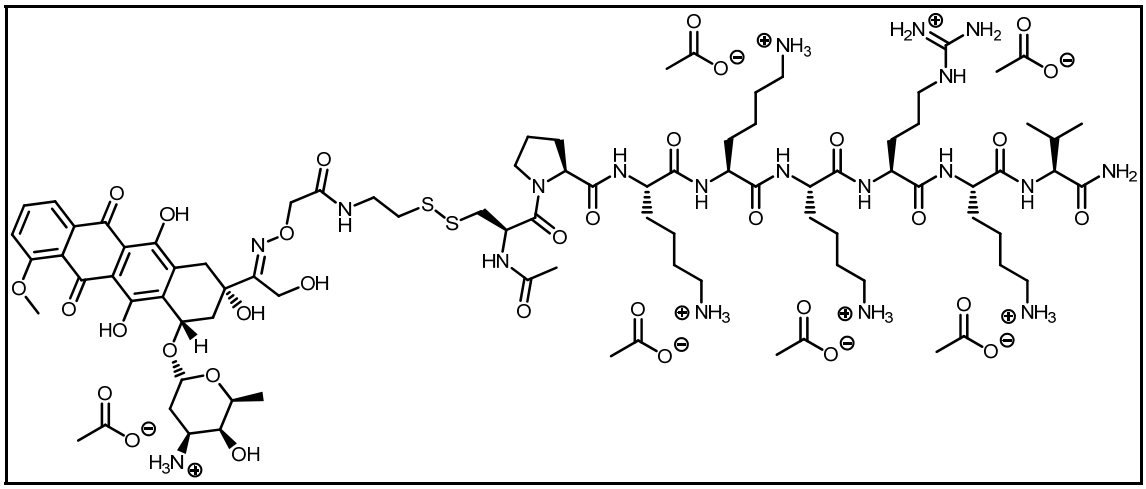
B: ACN

0 Min. 100% A – 45 Min. 35% A

^{1}H-NMR (850 MHz, D_2O, 298 K):

δ (ppm) = 7.79-7.26 (m, 6H), 5.37-5.19 (m, 2H), 4.65-4.35 (m, 10H), 4.28-4.15 (m, 10H), 3.89 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.72-3.65 (m, 2H), 3.54-3.31 (m, 4H), 3.25-3.18 (m, 2H), 3.17-3.04 (m, 16H), 3.03-2.97 (m, 2H), 2.90-2.83 (m, 2H), 2.79-2.69 (m, 2H), 2.44-2.30 (m, 2H), 1.94 (s, 3H), 1.84 (s, 30H), 1.89-1.82 (m, 4H), 1.80-1.64 (m, 18H), 1.62-1.46 (m, 18H), 1.41-1.33 (m, 2H), 1.25 (d, 3H, J = 7.1 Hz), 1.24 (d, 3H, J = 7.1 Hz)

(2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-(2-hydroxy)-1-(2-oxo-2-(dithio[Ac-Cys-S$^{\beta}$-ProLysLysLysArgLysVal-NH_2]pentaacetat))ethylamino)iminoethyl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminiumacetat (41):



Das Doxorubicinderivat **31** (35.8 mg, 42.4 µmol) wird zunächst in 5 ml DPBS, sowie 10 ml DMF gelöst. Im Anschluss daran wird das Peptid (88.1 mg, 55.2 µmol) in 17 ml DPBS gelöst und zu der Lösung hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird nun 2 Stunden unter Argon bei Raumtemperatur gerührt und danach mittels HPLC aufgereinigt. Die isolierten Produktfraktionen werden vom Lösungsmittel befreit und der

Rückstand im Vakuum getrocknet. Anschließend wird der so erhaltene rote Feststoff in wenig Methanol gelöst und das Produkt in Diethylether ausgefällt.

Ausbeute: 58.6 mg (28.4 µmol, 67 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 1699.99 (100%) $[M+H]^+$

HPLC:

t_R = 17.19 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

B: ACN

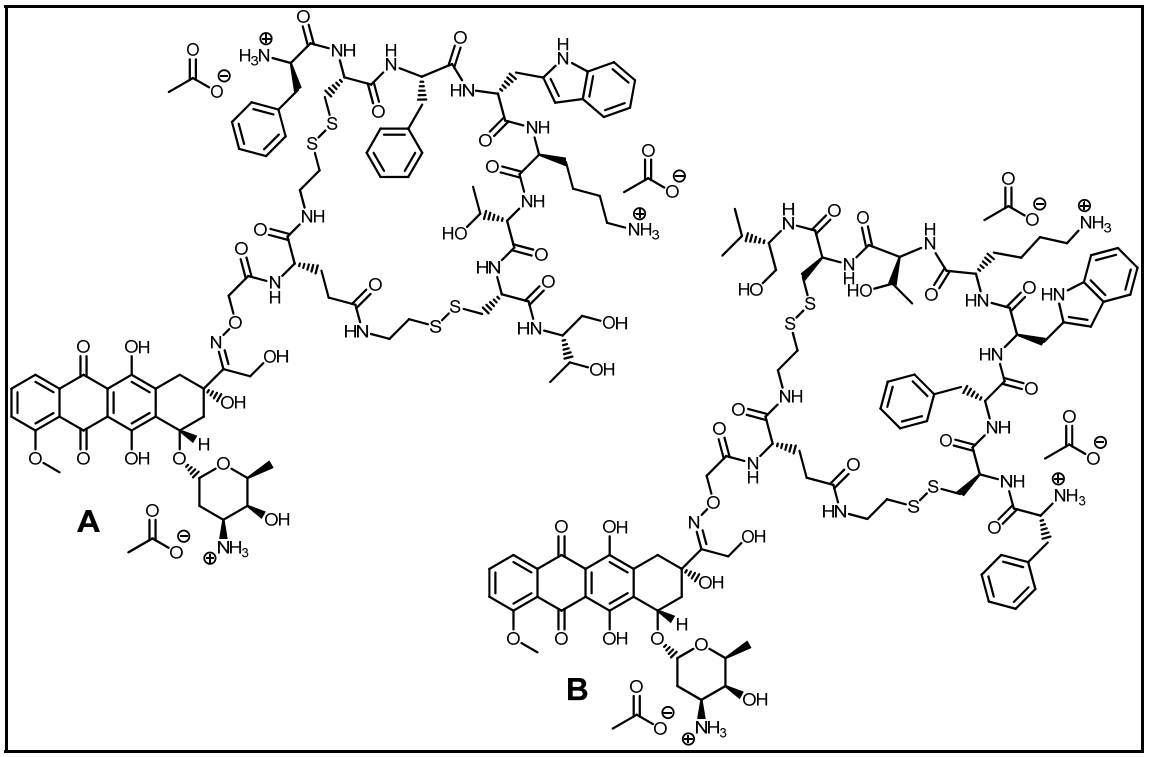
0 Min. 100% A – 35 Min. 35% A

^{1}H-NMR (850 MHz, D_2O, 298 K):

δ (ppm) = 7.83-7.75 (m, 2H), 7.48 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 5.46-5.42 (m, 1H), 5.03-4.97 (m, 1H), 4.63-4.59 (m, 1H), 4.57-4.52 (m, 1H), 4.50-4.46 (m, 1H), 4.44-4.39 (m, 2H), 4.35-4.31 (m, 1H), 4.30-4.27 (m, 1H), 4.26-4.21 (m, 4H), 4.20-4.15 (m, 2H), 4.07-4.03 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 3.97 (s, 3H), 3.70-3.65 (m, 2H), 3.53-3.47 (m, 1H), 3.34-3.28 (m, 1H), 3.27-3.21 (m, 1H), 3.17-3.11 (m, 2H), 3.04-2.98 (m, 1H), 2.97-2.79 (m, 11H), 2.61-2.55 (m 2H), 2.54-2.48 (m, 2H), 2.29-2.24 (m, 1H), 2.23-2.18 (m, 1H), 2.04-1.97 (m, 1H), 1.96-1.92 (m, 2H), 1.91 (s, 3H), 1.87 (s, 18H), 1.83-1.52 (m, 23H), 1.44-1.31 (m, 8H), 1.25 (d, 3H, J = 6.5 Hz), 0.92 (d, 3H, J = 6.8 Hz), 0.91 (d, 3H, J = 6.8 Hz)

(2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-((*S*,*E*)-1-hydroxy-6,11-dioxo-14,8-*bis*-dithioethyl[D-Phe-cyclo(Cys-S$^{\beta}$-Phe-D-TrpLysThrCys-S$^{\beta}$-)Thr(ol)]diacetat)carbamoyl)-4-oxa-3,7,12-triazatetradec-2-en-2-yl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminiumacetat (29-A),

(2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-3-Hydroxy-2-methyl-6-((((1*S*,3*S*)-3,5,12-trihydroxy-3-((*S*,*E*)-1-hydroxy-6,11-dioxo-14,8-*bis*-dithioethyl[Thr(ol)-cyclo(Cys-S$^{\beta}$-ThrLys-D-TrpPheCys-S$^{\beta}$)-D-Phe]diacetat)carbamoyl)-4-oxa-3,7,12-triazatetradec-2-en-2-yl)-10-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracenyl-1-oxy)tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminiumacetat (29-B):



In 5 ml frisch entgastem TEAA Puffer (pH 7, 25 mM) werden Octreotid (31.6 mg, 27.7 µmol) wie auch TCEP (79.5 mg, 277.2 µmol) gelöst und anschließend 90 Minuten unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das reduzierte Peptid mittels HPLC aufgereinigt und die isolierte Produktfraktion sowie **26** (26.4 mg, 23.4 µmol), gelöst in jeweils 5 ml DMF und DPBS, langsam ineinander getropft. Darauffolgend wird die Reaktionsmischung 1 Stunden unter Argon bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss daran durch HPLC aufgereinigt. Das Lösungsmittel der gesammelten

Fraktionen wird im Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet. Dieser wird in Methanol aufgenommen und das Produkt als roter Feststoff in Diethylether ausgefällt.

Ausbeute: 39.5 mg (19.2 µmol, 83 %)

MS (MALDI-TOF):

m/z (rel. Int.) = 1882.05 (100%) $[M+H]^+$

HPLC:

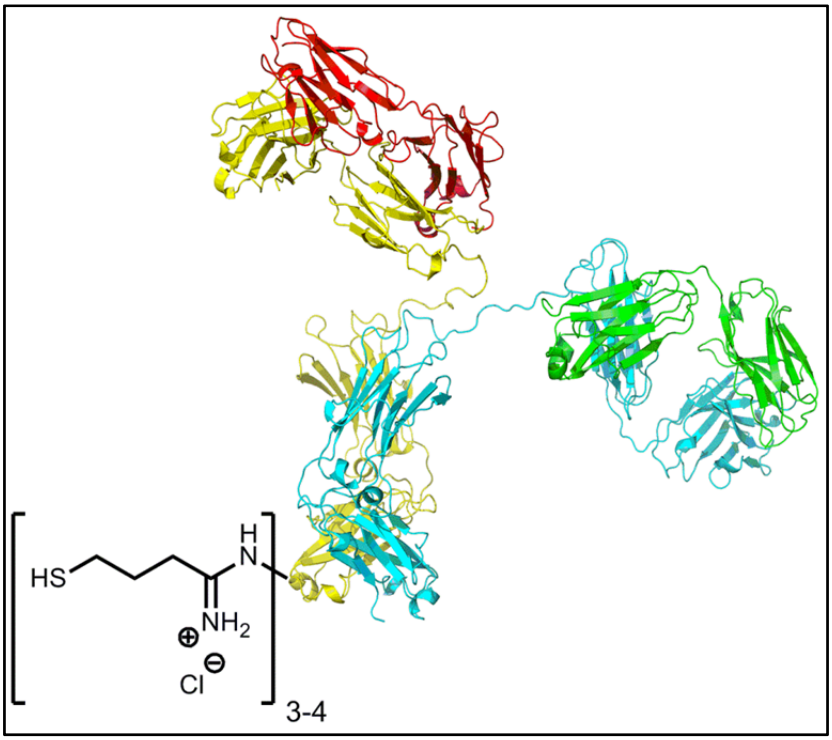
t_R = 26.96 Min. (480 nm)

A: 25 mM TEAA-Puffer; pH 7

B: ACN

0 Min. 100% A – 40 Min. 30% A

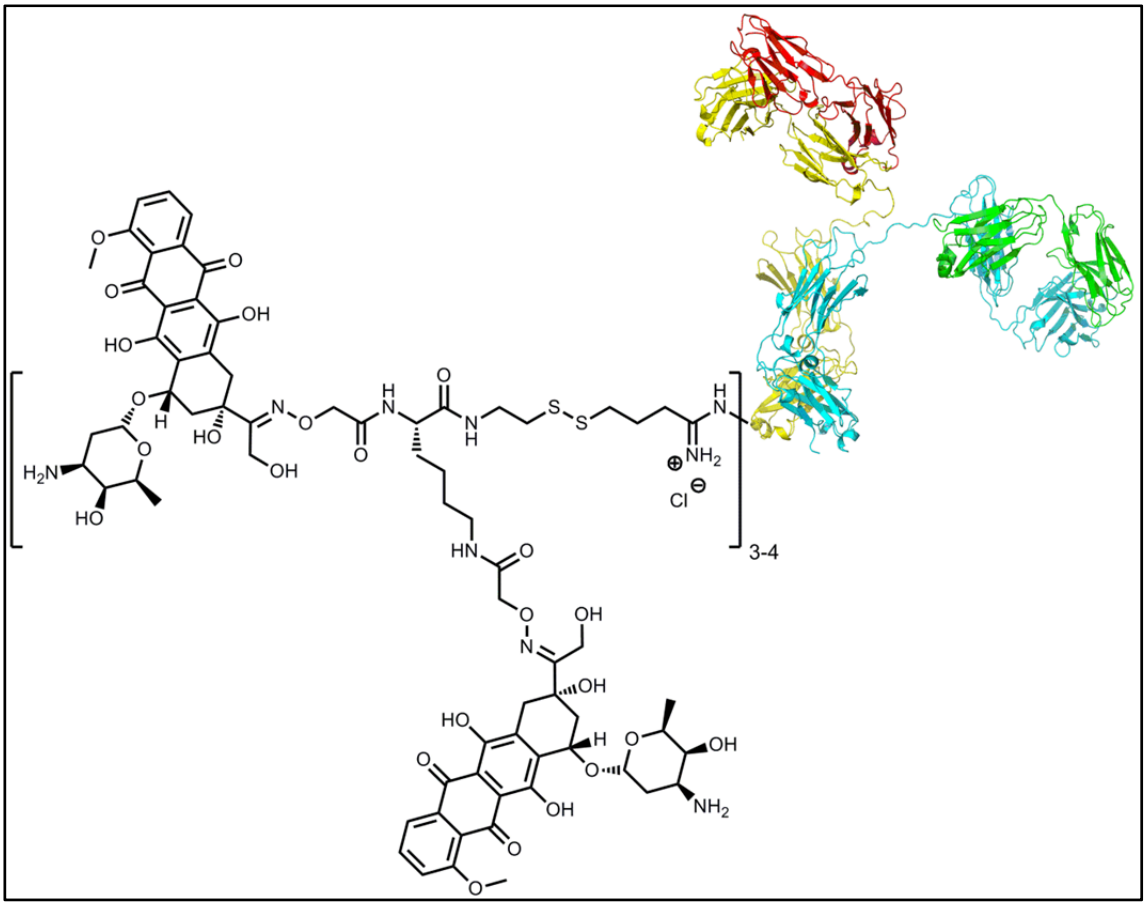
Thioliertes Immunglobulin G (17):



Immunglobulin G (5 mg, 50 µl, 0.035 µmol) wird in 500 µl 0.1 M PBS Puffer (pH 7.2, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA) aufgenommen. Anschließend wird 2-Iminothiolan (0.96 mg, 6.96 µmol) in 1 ml des identischen Puffers gelöst und 50 µl (0.348 µmol) dieser Lösung zu der IgG Lösung hinzugefügt. Danach wird die Reaktionsmischung für 90 Minuten bei 37°C in einem Eppendorf Thermomixer (300 rpm) inkubiert. Nach beendeter Inkubation wird die Lösung in ein Amicon Ultra (MWCO 10 kDa) Ultrafiltrationselement überführt und in einer Eppendorf MiniSpin Plus Zentrifuge (5 min, 10.000 rpm) auf 100 µl konzentriert. Zu dieser Lösung werden 400 µl 0.1 M PBS Puffer (pH 7.4) gegeben und die Ultrafiltration erneut durchgeführt. Diese Prozedur wird ein weiteres Mal wiederholt, wobei der aufgereinigte thiolierte Antikörper als klare viskose Lösung erhalten wird.

Ausbeute: 5 mg (0.035 µmol, quantitativ)

Doxorubicin-IgG-Biokonjugat (18):



In 500 µl 0.1 M PBS Puffer (pH 7.4) wird **14** (1.05 mg, 0.695 µmol) sukzessive gelöst und zu 100 µl des thiolierten Immunglobulin G (5 mg, 0.035 µmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 3 Stunden bei 37°C in einem Eppendorf Thermomixer (300 rpm) inkubiert und darauffolgend mittels GPC an Bio-Gel® P-2 unter Verwendung von DPBS als Laufmittel aufgereinigt. Die erhaltene rote Produktfraktion wird in einer Eppendorf MiniSpin Plus Zentrifuge (10.000 rpm) auf 100 µl konzentriert.

Ausbeute: 5 mg (0.035 µmol, quantitativ)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Klaus Müllen, der es mir ermöglicht hat, diese faszinierende Arbeit in seiner Gruppe am Max-Planck-Institut für Polymerforschung durchführen zu können.

Ein herzlicher Dank gebührt ebenso meiner Betreuerin Dr. Kalina Peneva, die mir immerzu die nötigen Freiräume gewährt hat, um die in dieser Dissertation vorliegenden Ergebnisse zu verwirklichen. Eine Vielzahl der hier erreichten Resultate wäre ohne ihre stets motivierenden und ermutigenden Einstellung sowie konstruktive Kritik nicht möglich gewesen.

Allen Kooperationspartnern des Instituts für Molekulare Biologie, der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, dem Institut für Allgemeine Botanik der Johannes Gutenberg-Universität, der Arbeitsgruppe von Dr. Anela Ivanova und dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, aus Mainz, Sofia und München bin ich aufgrund der ertragreichen Zusammenarbeit ebenfalls zu Dank verpflichtet.

Des Weiteren gilt mein Dank all jenen, die mich bei der Analyse und Charakterisierung der isolierten Substanzen unterstützt haben. Hierbei sind besonders zu nennen: Jutta Schnee, für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren; Dr. Hans-Joachim Räder und Stefan Türk der Massenspektrometrie-Abteilung; Stefan Spang, Petra Kindervater und Dr. Manfred Wagner, der neben den zahlreichen NMR-Messungen auch einige schöne Stunden beim Fußball ermöglichte.

Zuletzt möchte ich mich bei allen übrigen Mitarbeitern des Arbeitskreis Müllen für die tolle Atmosphäre sowie die schöne Zeit am Max-Planck-Institut bedanken.

Publikationen

M. Lelle, K. Peneva, *An amino acid-based heterofunctional cross-linking reagent*, angenommen in *Amino Acids*

M. Lelle, S. Frick, K. Steinbrink, K. Peneva, *Novel cleavable cell penetrating peptide drug conjugates: synthesis and characterization*, angenommen in *Journal of Peptide Science*

Y. Tsoneva, A. Tadjer, M. Lelle, K. Peneva, A. Ivanova, *Molecular dynamics structural study of a drug-peptide complex*, eingereicht in *Biomacromolecules*

A. Hameed, M. Lelle, L. Ackermann, M. Wagner, K. Müllen, K. Peneva, *Synthesis of 2-pyridyl disulfide non-nucleoside adenylyl cyclase inhibitors for melanoma-targeted drug delivery*, in Bearbeitung

Lebenslauf

Name: Marco Lelle
Geburtsdatum: 1. Juni 1984
Geburtsort: Speyer

Schulbildung:

08/1990-06/1994	Zeppelinschule Speyer – Grundschule
08/1994-06/1996	Georg-Friedrich-Kolb Schulzentrum Speyer – Realschule
08/1996-04/2003	Nikolaus-von-Weis-Gymnasium Speyer
04/2003	Abitur

Praktikum:

06/2003-08/2003	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer

Hochschulbildung:

10/2003	Studium der Biomedizinischen Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
04/2006	Mündliche Diplom-Vorprüfung
09/2008	Mündliche Diplom-Hauptprüfung
10/2008-07/2009	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Klaus Müllen am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz – *Neuartige PDI-Chromophore für die selektive Reaktion mit Disulfidbrücken in Proteinen*
Seit 12/2009	Dissertation unter der Leitung von Prof. Klaus Müllen und Dr. Kalina Peneva am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz