

Synthese und biologische Evaluierung von fluoreszenzmarkierten Duocarmycin-Analoga

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
„Doctor rerum naturalium“
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Frank Behrendt
aus Paderborn



Göttingen 2011

D7

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

Korreferent: Prof. Dr. Hartmut Laatsch

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2008 bis September 2011 am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Lutz F. Tietze angefertigt

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Lutz F. Tietze für die interessante Themenstellung, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für die zahlreichen Diskussionen und Anregungen.

MEINER FAMILIE

„Auch aus Steinen, die einem in den Weg gelegt
werden, kann man Schönes bauen.“

Erich Kästner

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
A. ALLGEMEINER TEIL.....	1
1	EINLEITUNG..... 1
2	CANCEROGENESE – VON DER KREBSZELLE ZUM TUMOR 4
3	KONZEPTE ZUR TUMORTHERAPIE..... 6
3.1	Chemotherapie 6
3.2	Immuntherapie 12
3.3	Selektive Krebstherapie mittels reversibel detoxifizierter Prodrugs 15
3.3.1	Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT) 17
3.3.2	Prodrug-Monotherapie (PMT) 21
4	CC-1065, DUOCARMYCIN SA UND YATAKEMYCIN 25
4.1	Analoga von (+)-CC-1065 und (+)-Duocarmycin SA..... 28
4.2	<i>Seco</i> -Verbindungen und Prodrugs einiger Duocarmycin-Analoga 32
4.2.1	Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen 33
4.2.2	Forschungsergebnisse aus dem Arbeitskreis <i>Tietze</i> 34
5	CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY (CLSM) & OPTICAL IMAGING 39
5.1	Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) 39
5.2	Optical Imaging 41
6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT..... 44
7	PLANUNG DER ARBEIT 49
7.1	Synthese des fluoreszenzmarkierten CBI-DMAI-Prodrugs (1 <i>S</i>)- 72 49
7.2	Verkürzte Synthese zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten <i>seco-anti</i> -Methyl-CBI-DMAI-Drugs (1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 71 50
7.3	Synthese neuartiger fluoreszenzmarkierter Duocarmycin-Analoga 53
B. DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE.....	55
1	SYNTHESE DES FLUORESZENZMARKIERTEN <i>ANTI</i> -METHYL- <i>SECO</i> -CBI-DRUGS (1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 71 55
1.1	Synthese des <i>anti</i> -Methyl- <i>seco</i> -CCBI-Grundgerüsts (1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 82 55

1.2	Synthese des <i>anti</i> -Methyl- <i>seco</i> -CCBI-DMAI-Derivates (1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 88	59
1.3	Synthese des <i>anti</i> -Methyl- <i>seco</i> -CBI-DMAI-Derivates mit Spacer-Einheit (1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 106	59
1.4	Synthese des <i>anti</i> -Methyl- <i>seco</i> -CBI-DMAI-Derivates ohne Spacereinheit (1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 87	62
1.5	Synthese des fluoreszenzmarkierten <i>anti</i> -Methyl- <i>seco</i> -CBI-DMAI-Drugs (1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 71	63
1.5.1	Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten des fluorezenzmarkierten <i>anti</i> -Methyl- <i>seco</i> -Drugs (1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)- 71	66
2	CHARAKTERISIERUNG UND UNTERSUCHUNG DER ZELLULÄREN AUFNAHME VON FLUORESENZMARKIERTEN DAPOXYL- <i>ANTI</i> -METHYL- <i>SECO</i> -CBI-DMAI-DERIVATEN	69
2.1	Fluorimetrische Bestimmung der Absorptions- und Emissionsmaxima	69
2.2	Untersuchung der zellulären Aufnahme fluorezenzmarkierter <i>anti</i> -Methyl- <i>seco</i> -CBI-DMAI-Derivate in lebende Zellen durch CLSM	71
3	SYNTHESE DES FLUORESENZMARKIERTEN PRODRUGS (1 <i>S</i>)- 72	74
3.1	Synthese des <i>seco</i> -CCBI-Grundgerüsts (1 <i>S</i>)- 115	74
3.2	Synthese des CBI-DMAI-Prodrugs (1 <i>S</i>)- 118	75
3.3	Synthese des fluorezenzmarkierten CBI-DMAI-Prodrugs (1 <i>S</i>)- 72	77
3.4	<i>In-vitro</i> -Zytotoxizitätsuntersuchungen des fluorezenzmarkierten (1 <i>S</i>)-CBI-DMAI-Galaktosides (1 <i>S</i>)- 72 sowie des Galaktosides (1 <i>S</i>)- 118	78
3.4.1	Der HTCFA-Test zur Bestimmung der Zytotoxizität	78
3.4.2	Ergebnisse zur Untersuchung der <i>In-vitro</i> -Zytotoxizität an humanen Bronchialkarzinomzellen (A549) für das fluorezenzmarkierte (1 <i>S</i>)-CBI-DMAI-Galaktosid (1 <i>S</i>)- 72 sowie das Galaktosid (1 <i>S</i>)- 118	80
4	SYNTHESE DES <i>SECO</i> -CBI-GRUNDGERÜSTES (1 <i>S</i>)- 128	82
5	SYNTHESE NEUARTIGER FLUORESENZMARKIERTER CBI-CUMARIN-DUOCARMYCIN-ANALOGA.....	85
5.1	Synthese der DNA-Binder Indol-Cumarin-2-Carbonsäure (130) sowie DMACA (62)	86
5.2	Synthese der <i>seco</i> -CBI-Cumarin-Drugs (1 <i>S</i>)- 92 , (1 <i>S</i>)- 137 und (1 <i>S</i>)- 138	87

5.2.1	Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten des <i>seco</i> -CBI-DMACA-Drugs (1S)- 137	88
5.3	Synthese der (1S)-CBI-Cumarin-Galaktoside (1S)- 69 , (1S)- 139 und (1S)- 140	91
5.4	Ergebnisse zur Untersuchung der <i>In-vitro</i> -Zytotoxizität an humanen Bronchialkarzinomzellen (A549) für die (1S)-CBI-Cumarin-Derivate	92
6	CHARAKTERISIERUNG UND UNTERSUCHUNG DER ZELLULÄREN AUFNAHME VON FLUORESZENZMARKIERTEN (1S)-CBI-CUMARIN-DERIVATEN	94
6.1	Fluorimetrische Bestimmung der Absorptions- und Emissionsmaxima	94
6.1.1	Bestimmung der Fluoreszenz- und Emissionsmaxima für die dargestellten Cumarin-3-Carbonsäure-Derivate (1S)- 92 , (1S)- 69 sowie 131	94
6.1.2	Bestimmung der Fluoreszenz- und Emissionsmaxima für die dargestellten DMACA-Derivate (1S)- 137 , (1S)- 139 sowie 62	96
6.1.3	Bestimmung der Fluoreszenz- und Emissionsmaxima für die dargestellten Indol-Cumarin-Derivate (1S)- 138 , (1S)- 140 sowie 130 .	97
6.2	Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-Cumarin-Derivate in lebende Zellen durch CLSM	99
6.2.1	Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-Cumarin-3-Carbonsäure-Derivate (1S)- 92 , (1S)- 69 sowie 131 in lebende Zellen	100
6.2.2	Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-DMACA-Derivate (1S)- 137 , (1S)- 139 sowie 62	102
6.2.3	Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-Indol-Cumarin-Derivate (1S)- 138 , (1S)- 140 sowie 130	104
7	SYNTHESE NEUARTIGER FLUORESZENZMARKIERTER (1S)-CBI-BENZOTHAZOL-DUOCARMYCIN-ANALOGA	107
7.1	Synthese der <i>seco</i> -CBI-Benzothiazol-Drugs (1S)- 141 und (1S)- 145	108
7.1.1	Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten des <i>seco</i> -CBI-BO-Drugs (1S)- 141	108

7.2	Synthese der (1S)-CBI-Benzothiazol-Galaktoside (1S)- 70 und (1S)- 147 ... 112
7.2.1	Ergebnisse zur Untersuchung der In-vitro-Zytotoxizität an humanen Bronchialkarzinomzellen (A549) für die <i>seco</i> -CBI-Benzothiazol-Derivate (1S)- 141 und (1S)- 145 sowie den Galaktosiden (1S)- 147 und (1S)- 70 114
7.3	Synthese der Benzothiazol-Methylester 143 und 144 115
8	CHARAKTERISIERUNG UND UNTERSUCHUNG DER ZELLULÄREN AUFNAHME VON FLUORESZENZMARKIERTEN (1S)-CBI-BENZOTHIAZOL-DERIVATEN 117
8.1	Fluorimetrische Bestimmung der Absorptions- und Emissionsmaxima .. 117
8.1.1	Bestimmung der Fluoreszenz- und Emissionsmaxima für die dargestellten BO-Derivate (1S)- 141 , (1S)- 70 sowie 144 117
8.1.2	Bestimmung der Fluoreszenz- und Emissionsmaxima für die dargestellten TO3-Derivate (1S)- 145 , (1S)- 147 sowie 143 119
8.2	Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-Benzothiazol-Derivate in lebende Zellen durch CLSM 121
8.2.1	Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-BO-Derivate (1S)- 141 , (1S)- 70 und 144 in lebende Zellen .. 122
8.2.2	Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-TO3-Derivate (1S)- 145 , (1S)- 147 sowie 143 124
C. ZUSAMMENFASSUNG..... 127	
D. EXPERIMENTELLER TEIL..... 145	
1	ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN 145
1.1	Verwendete Geräte 145
1.2	Chromatographische Methoden 147
1.3	Materialien für die <i>In-vitro</i> -Zytotoxizitätsuntersuchungen 149
2	SYNTHESE DER FLUORESZENZAKTIVEN DNA-BINDER 150
2.1	1-(5-Methoxycarbonyl-pentyl)-4-(3-Methyl-3 <i>H</i> -benzothiazol-2-ylidenmethyl)-pyridinium-chlorid (144) 150
2.2	1-(5-Methoxycarbonyl-pentyl)-4-[3-(3-Methyl-3 <i>H</i> -benzothiazol-2-yliden)-propenyl]-quinolinium-chlorid (143) 151

2.3	(7-Dimethylamino-2-oxo-2 <i>H</i> -chromn-4-yl)-essigsäure (62).....	152
2.4	7-Oxo-3,7-dihydro-pyrano[3,2- <i>e</i>]indol-2-carbonsäure (130).....	153
3	SYNTHESE DES <i>SECO</i> -CCBI-GRUNDGERÜSTES (1 <i>S</i>)- 115	154
3.1	2-Amino-4-benzyloxy-1-iod- <i>N</i> -(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-7-cyano-naphthalin (75).....	154
3.2	(<i>E/Z</i>)-2-Amino-4-benzyloxy- <i>N</i> -(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)- <i>N</i> -(3-chlor-prop-2- enyl)-7-cyano-1-iod-naphthalin (104)	155
3.3	<i>rac</i> -{(1 <i>S</i>)-5-Benzyloxy-3-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1-chlormethyl-8-cyano- 1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol (<i>rac</i> -(1 <i>S</i>)- 74)	156
3.4	Trennung der Enantiomere von <i>rac</i> -{(1 <i>S</i>)-5-Benzyloxy-3-(<i>tert</i> -butyloxy- carbonyl)-1-chlormethyl-8-cyano-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol (<i>rac</i> -(1 <i>S</i>)- 74)	158
3.5	(-)-{(1 <i>S</i>)-5-Benzyloxy-3-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1-chlormethyl-8-cyano- 1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol ((-)-(1 <i>S</i>)- 115).....	159
4	SYNTHESE DES FLUORESZENZMARKIERTEN PRODRUGS (1 <i>S</i>)- 72	161
4.1	(+)-{[(1 <i>S</i>)-1-chlormethyl-8-cyano-3-[(5-(2-(<i>N,N'</i> -dimethyl-amino)-ethoxy)- indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol-5-yl]-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> - acetyl- β -D-Galaktopyranosid} ((+)-(1 <i>S</i>)- 73).....	161
4.2	(+)-{[(1 <i>S</i>)-8-Aminomethyl-1-chlormethyl-3-[(5-(2-(<i>N,N'</i> -dimethylamino)- ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol-5-yl]-2,3,4,6- tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-Galaktopyranosid} ((+)-(1 <i>S</i>)- 117).....	163
4.3	[(1 <i>S</i>)-8-Aminomethyl-1-chlormethyl-3-[(5-(2-(<i>N,N'</i> -dimethylamino)- ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol-5-yl]- <i>O</i> - β -D- Galaktopyranosid-ditrifluoracetat } ((1 <i>S</i>)- 118).....	164
4.4	6-(Fluorescein-5-carboxamido)-Hexansäure-[(1 <i>S</i>)-1-chlormethyl-3-[(5-(2- (<i>N,N'</i> -dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-5- <i>O</i> - β -D-Galakto- pyranosyl-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol-8-ylmethyl]-amid-trifluoracetat ((1 <i>S</i>)- 72)	167
5	SYNTHESE DES <i>ANTI</i> -METHYL- <i>SECO</i> -CCBI-GRUNDGERÜSTES (1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 82	170
5.1	Ethyl-1-benzyloxy-7-brom-3-naphthalincarboxylat (98).....	170

5.2	Ethyl-1-benzyloxy-7-cyano-3-naphthalincarboxylat (99)	171
5.3	1-Benzyloxy-7-cyano-3-naphthalincarbonsäure (100)	172
5.4	3-Amino-1-benzyloxy- <i>N</i> -(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-7-cyano-naphthalin (79)	172
5.5	2-Amino-4-benzyloxy-1-brom- <i>N</i> -(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-6-cyano- naphthalin (101)	173
5.6	(+)-{(2' <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-2-Amino-4-benzyloxy- <i>N</i> -(2,3-epoxybutyl)-1-brom- <i>N</i> -(<i>tert</i> - butyloxycarbonyl)-6-cyano-naphthalin} ((+)-(2' <i>R</i> ,3' <i>R</i>)- 80)	174
5.7	(+)-{(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-5-Benzyloxy-3-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1-(10-Hydroxyethyl)-7- cyano-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol ((+)-(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 81)	175
5.8	(+)-{(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-5-Benzyloxy-3-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1-(10-chlorethyl)-7- cyano-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol ((+)-(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 82)	177
5.9	(<i>E/Z</i>)-2-Amino-4-benzyloxy-1-brom- <i>N</i> -(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)- <i>N</i> -(3-chlor- 2-butenyl)-6-cyano-naphthalin (104)	178
5.10	<i>rac</i> -{(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-5-Benzyloxy-3-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1-(10-chlor-ethyl)-7- cyano-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} (<i>rac</i> -(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 82) und <i>rac</i> -{(1 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-5- Benzyloxy-3-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1-(10-chlor-ethyl)-7-cyano-1,2- dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} (<i>rac</i> -(1 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- 82)	179
5.11	Trennung der Enantiomere von <i>rac</i> -{(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-5-Benzyloxy-3-(<i>tert</i> - butyloxycarbonyl)-1-(10-chlor-ethyl)-7-cyano-1,2-dihydro-3 <i>H</i> - benz[<i>e</i>]indol} (<i>rac</i> -(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 82)	180
5.12	(+)-{(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-3-(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-1-(10-chlor-ethyl)-7-cyano- 5-hydroxy-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} ((+)-(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 149)	181
6	SYNTHESE DER <i>ANTI</i> -METHYL-CBI-DERIVATE MIT DMAI-SEITENKETTE.....	182
6.1	<i>rac</i> -{(1 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-5-Benzyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-7-cyano-3-[(5-(2-(<i>N,N'</i> - dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} (<i>rac</i> -(1 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- 88)	182
6.2	(+)-{(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-5-Benzyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-7-cyano-3-[(5-(2-(<i>N,N'</i> - dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} ((+)-(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 88)	183

6.3	(-)-{(1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-5-Benzoyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-7-cyano-3-[(5-(2-(<i>N,N'</i> -dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} ((-)-(1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)- 88)	185
6.4	<i>rac</i> -{(1 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-7-Aminomethyl-5-benzyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2-(<i>N,N'</i> -dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} (<i>rac</i> -(1 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- 81).....	186
6.5	{(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-7-Aminomethyl-5-benzyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2-(<i>N,N'</i> -dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} ((1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 81)	187
6.6	{(1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-7-Aminomethyl-5-benzyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2-(<i>N,N'</i> -dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} ((1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)- 81)	189
6.7	{(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-({5-Benzoyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2- <i>N,N'</i> -dimethylamino)-ethoxy)-1 <i>H</i> -indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol-7-ylmethyl)-carbamoyl)-ethyl)-carbaminsäure-benzylester ((1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 90).....	190
6.8	{(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-3-Amino- <i>N</i> -2-({1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2- <i>N,N'</i> -dimethylamino)-ethoxy)-1 <i>H</i> -indol-2-yl)carbonyl]-5-hydroxy-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol-7-ylmethyl)-propionamid ((1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 106).....	191
6.9	{(1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-[7-Aminomethyl-1-(1-chlor-ethyl)-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[<i>e</i>]indol-3-yl]-[5-(2-dimethylamino-ethoxy)-1 <i>H</i> -indol-2-yl]-methanon ((1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)- 87)	193
6.10	{(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-[7-Aminomethyl-1-(1-chlor-ethyl)-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[<i>e</i>]indol-3-yl]-[5-(2-dimethylamino-ethoxy)-1 <i>H</i> -indol-2-yl]-methanon (1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 87	196
7	SYNTHESE DER FLUORESZENZMARKIERTEN <i>ANTI</i> -METHYL- <i>SECO</i> -CBI-DMAI-DERIVATE (1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 71 UND (1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)- 71	199
7.1	3-[4-(5-(4-Dimethylaminophenyl)oxazol-2-yl)benzolsulfonylamino]-propionsäure-[(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2-(<i>N,N'</i> -dimethylamino)ethoxy)indol-2-yl)carbonyl]-5-hydroxy-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol-7-ylmethyl]amid ((1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 71)	199

7.2	3-[4-(5-(4-Dimethylaminophenyl)oxazol-2-yl)benzolsulfonylamino]-propionsäure-[(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2-(<i>N,N'</i> -dimethylamino)ethoxy)indol-2-yl)carbonyl]-5-Hydroxy-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol-7-ylmethyl]amid ((1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)- 71).....	202
7.3	3-[4-(5-(4-Dimethylaminophenyl)oxazol-2-yl)benzolsulfonylamino]-propionsäure-[(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2-(<i>N,N'</i> -dimethylamino)ethoxy)indol-2-yl)carbonyl]-5-hydroxy-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol-7-ylmethyl]amid ((1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 71).....	203
8	SYNTHESE DES <i>SECO</i> -CBI-GRUNDGERÜSTES (1 <i>S</i>)- 128	205
8.1	<i>tert</i> -Butyl-(<i>E</i>)-3-(ethoxycarbonyl)-4-phenyl-3-butenolat (121).....	205
8.2	(<i>E</i>)-3-Ethoxycarbonyl-4-phenyl-3-butencarbonsäure (96).....	206
8.3	Ethyl-1-acetoxy-3-naphthalincarboxylat (122).....	207
8.4	Ethyl-1-Hydroxy-3-naphthalincarboxylat (123).....	208
8.5	Ethyl-1-benzyloxy-3-naphthalincarboxylat (124).....	209
8.6	1-Benzyloxy-3-naphthalincarbonsäure (125).....	210
8.7	3-Amino-1-benzyloxy- <i>N</i> -(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-naphthalin (126).....	211
8.8	2-Amino-4-benzyloxy- <i>N</i> -(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1-iod-naphthalin (95) .	212
8.9	(+)-{(2' <i>R</i>)-2-Amino-4-benzyloxy- <i>N</i> -(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)- <i>N</i> -(2,3-epoxypropyl)-1-iod-naphthalin} ((+)-(2' <i>R</i>)- 94)	213
8.10	(+)-{(1 <i>S</i>)-5-Benzyloxy-3-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1-hydroxymethyl-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} ((+)-(1 <i>S</i>)- 127).....	214
8.11	(-)-{(1 <i>S</i>)-5-Benzyloxy-3-(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-1-chlormethyl-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} ((-)-(1 <i>S</i>)- 93).....	216
8.12	(-)-{(1 <i>S</i>)-3-(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-1-chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} ((-)-(1 <i>S</i>)- 128)	217
8.13	Anreicherung von {(1 <i>S</i>)-3-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1-(chlormethyl)-1,2-dihydro-5-hydroxy-3 <i>H</i> -benz[<i>e</i>]indol} ((1 <i>S</i>)- 128) durch präp. HPLC	217
9	SYNTHESE NEUARTIGER FLUORESZENZMARKIERTER CBI-PRODRUGS, SOWIE DER ENTSPRECHENDEN <i>SECO</i> -CBI-DERIVATE.....	219

- 9.1 (-)-(1S)-1-[6-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-6-oxo-hexyl]-4-(3-Methyl-3*H*-benzothiazol-2-ylidenmethyl)-pyridinium-chlorid ((-)-(1S)-**141**) 219
- 9.2 (-)-{(1S)-[1-[6-(1-Chlormethyl-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-6-oxo-hexyl]-4-(3-Methyl-3*H*-benzothiazol-2-ylidenmethyl)-pyridinium-chlorid-5-yl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-Galaktopyranosid} ((-)-(1S)-**146**) 221
- 9.3 (-)-{(1S)-[1-[6-(1-Chlormethyl-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-6-oxo-hexyl]-4-(3-Methyl-3*H*-benzothiazol-2-ylidenmethyl)-pyridinium-chlorid-5-yl]-*O*- β -D-Galaktopyranosid} ((-)-(1S)-**70**)..... 224
- 9.4 (1S)-1-[6-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-6-oxo-hexyl]-4-[3-(3-Methyl-3*H*-benzothiazol-2-yliden)-propenyl]-quinolinium-chlorid ((1S)-**145**) 226
- 9.5 {(1S)-[1-[6-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-6-oxo-hexyl]-4-[3-(3-Methyl-3*H*-benzothiazol-2-yliden)-propenyl]-quinolinium-chlorid-5-yl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galatopyranosid} ((1S)-**150**) 229
- 9.6 {(1S)-[1-[6-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-6-oxo-hexyl]-4-[3-(3-Methyl-3*H*-benzothiazol-2-yliden)-propenyl]-quinolinium-chlorid-5-yl]-*O*- β -D-galatopyranosid} ((1S)-**147**) 232
- 9.7 (-)-(1S)-3-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-carbonyl)-chromn-2-on ((-)-(1S)-**92**) 234
- 9.8 {(1S)-[3-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-carbonyl)-chromn-2-on]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-Galaktopyranosid} ((1S)-**151**) 236
- 9.9 {(1S)-[3-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-carbonyl)-chromn-2-on]-*O*- β -D-Galaktopyranosid} ((1S)-**69**)..... 237
- 9.10 {(-)-(1S)-[4-[2-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-2-oxo-ethyl]-7-dimethylamino-chromn-2-on]} ((-)-(1S)-**137**)..... 239
- 9.11 {[(1S)-[4-[2-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-2-oxo-ethyl]-7-dimethylamino-chromn-2-on]-5-yl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-Galaktopyranosid} ((1S)-**151**)..... 242

9.12	{{(-)-(1S)-[4-[2-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-2-oxo-ethyl]-7-dimethylamino-chromn-2-on]-5-yl]-O- β -D-Galaktopyranosid} ((-)-(1S)- 139).....	243
9.13	(1S)-2-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-carbonyl)-3H-pyrano[3,2-e]indol-7-on ((1S)- 138)	245
9.14	{{(1S)-[2-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-carbonyl)-3H-pyrano[3,2-e]indol-7-on-5-yl]-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-Galaktopyranosid} ((1S)- 152)	248
9.15	{{(1S)-[2-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-carbonyl)-3H-pyrano[3,2-e]indol-7-on-5-yl]-O- β -D-Galaktopyranosid} ((1S)- 140) ..	250
10	UNTERSUCHUNG DER FLUORESZENZEIGENSCHAFTEN UND DER ZELLULÄREN AUFNAHME DER DARGESTELLTEN CBI-DERIVATE.....	253
10.1	Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften der synthetisierten CBI-Derivate.....	253
10.1.1	AAV 10.1.1. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei festgelegter Wellenlänge in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge (Absorption-Scan)	253
10.1.2	AAV 10.1.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Messung des Fluoreszenzemissionsspektrums bei festgelegter Anregungswellenlänge (Emission-Scan)	253
10.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme und intrazellulären Verteilung der synthetisierten fluoreszenzmarkierten CBI-Derivate.....	254
10.2.1	AAV 10.2.1. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Vorbereitung der A549-Zellen zur Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter CBI-Derivate am konfokalen Laserscanning-Mikroskop.	254
10.2.2	AAV 10.2.2. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Vorbereitung der HeLa SS6-Zellen zur Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter CBI-Derivate am konfokalen Laserscanning-Mikroskop.....	254

10.2.3	AAV 10.2.2. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter CBI- Derivate inklusive des Waschens der Zellen nach Inkubation	255
10.2.4	AAV 10.2.4. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Anfärbung mit Hoechst 33342 (64), Mitochondrienfarbstoff MitoTracker Deep Red FM (65) oder dem Mitochondrienfarbstoff MitoTracker Grenn FM (148)	255
E. ANHANG	257
1	<i>IN-VITRO</i> -ZYTOTOXIZITÄTSTESTS.....	257
1.1	Ergebnisse für das (1S)-CBI-DMAI-Galaktosid (1S)- 118	257
1.2	Ergebnisse für das fluoreszenten (1S)-CBI-DMAI-Galaktosid (1S)- 72	258
1.3	Ergebnisse für das (1S)-CBI-BO-Galaktosid (1S)- 70	258
1.4	Ergebnisse für das (1S)- <i>seco</i> -CBI-BO-Drug (1S)- 141	259
1.5	Ergebnisse für das (1S)-CBI-TO3-Galaktosid (1S)- 147	259
1.6	Ergebnisse für das (1S)- <i>seco</i> -CBI-TO3-Drug (1S)- 145	260
1.7	Ergebnisse für das (1S)-CBI-Galaktosid (1S)- 69	261
1.8	Ergebnisse für das (1S)- <i>seco</i> -CBI-Drug (1S)- 92	261
1.9	Ergebnisse für das (1S)-CBI-DMACA-Galaktosid (1S)- 139	262
1.10	Ergebnisse für das (1S)- <i>seco</i> -CBI-DMACA-Drug (1S)- 137	262
1.11	Ergebnisse für das (1S)-CBI-Cumarinindol-Galaktosid (1S)- 140	263
1.12	Ergebnisse für das (1S)- <i>seco</i> -CBI-Cumarinindol-Drug (1S)- 138	263
2	ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME.....	265
3	LITERATUR.....	269
4	DANKSAGUNG.....	289
5	LEBENS LAUF	291

A. ALLGEMEINER TEIL

1 Einleitung

Betrachtet man die Entwicklung der Bevölkerung nach Altersgruppen in der Bundesrepublik Deutschland fällt auf, dass der Anteil der über 65-jährigen in den Jahren 2005–2009 von 15.9 Mio auf 16.9 Mio zugenommen hat, während die Gesamtbevölkerungszahl von 82.4 Mio auf 81.8 Mio gesunken ist.¹ Betrachtet man weiterhin den prozentualen Anteil der über 60-jährigen in Deutschland wird der demographische Wandel noch deutlicher. So veränderte sich der Anteil der über 60-jährigen an der Gesamtbevölkerung im Zeitraum von 1950–2009 von 14.6% auf 25.9%, während der Anteil der unter 40-jährigen von 56.8% auf 43.1% sank.

Nimmt man nun die Vohersagen des Bundesministeriums für Wirtschaft und Forschung München hinzu, wird deutlich, dass sich dieser Trend in den nächsten Jahrzehnten auf Grund geringer Geburtenraten und steigender Lebenserwartungen weiter fortsetzt (Abbildung 1).²

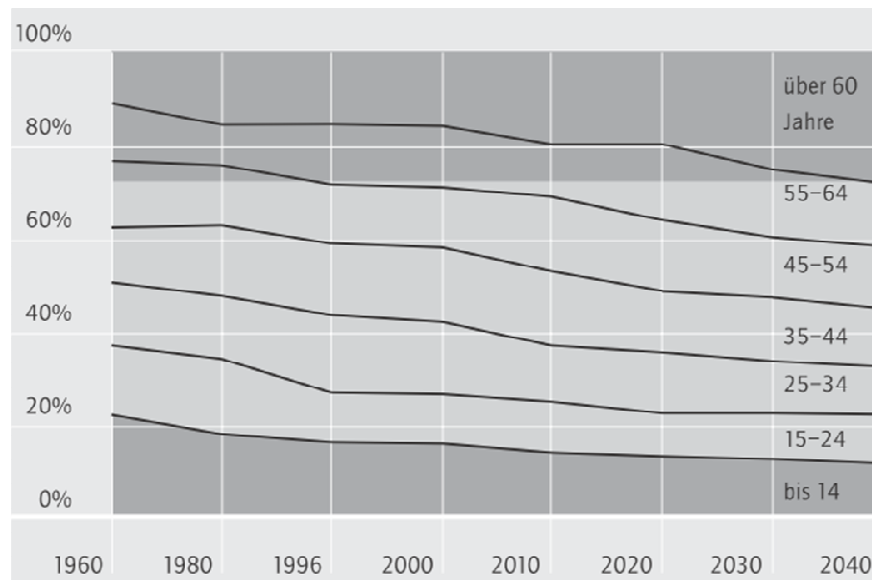


Abbildung 1. Entwicklung der Bevölkerung nach Altersgruppen.

Ebenso zeigen die aktuellen Daten des Deutschen Krebsforschungszentrum,³ dass die Auswirkungen des Demographischen Wandels im Bezug auf Krebs nicht zu verkennen sind. Auf Grund der veränderten Altersstruktur hat die Zahl der neu aufgetretenen Krebserkrankungen bei Männern seit 1980 um 80%, bei Frauen um 35% zugenommen. Betrachtet man die Neuerkrankungen bei Männern seit 1990 fällt auf, dass bei den 55–80-jährigen eine steigende Zahl der Neukrankungen zu beobachten ist, während diese bei den unter 55-jährigen sinkt (Abbildung 2).

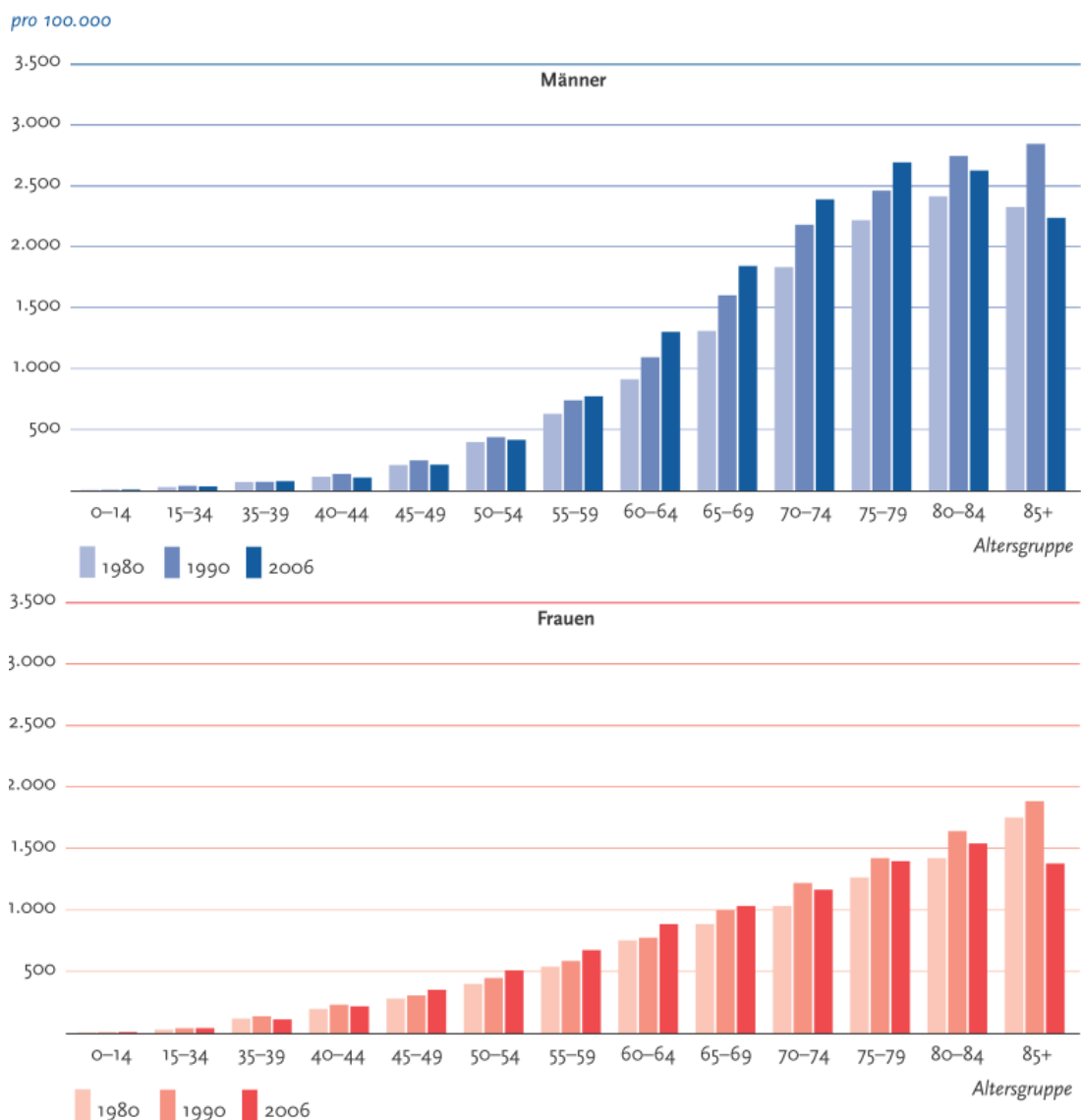


Abbildung 2. Altersspezifische Erkrankungsraten in Deutschland nach Geschlecht für 1980, 1990 und 2006.

Die aus Abbildung 2 abgeleiteten Aussagen unterstützen die aus Abbildung 1 gemachten Beobachtungen in Hinblick auf den Demographischen Wandel und die damit verbundene Wichtigkeit der Intensivierung der Krebsforschung.

Hierbei steht die Weiterentwicklung der Chemotherapie und damit einhergehend die Entwicklung neuer effizienter Wirkstoffe im Mittelpunkt. So ist es von entscheidender Bedeutung Wirkstoffe darzustellen, die in ihrer Anwendung eine möglichst vollständige Unterscheidung zwischen gesunden und malignen Zellen.

Einen Ansatz zur Verringerung der starken Nebenwirkungen der zur Zeit zur Verfügung stehenden Zytostatika beschreibt das Konzept der *Antibody-Directed-Enzyme-Prodrug-Therapy*. Hierbei wird eine Identifizierung der Krebszellen Antikörper-Enzym-Konjugate geschaffen. Der Antikörper bindet selektiv an Immunglobuline der Krebszellen und das an den Antikörper gebundene Enzym kann dort eine weitestgehend untoxische Wirkstoffvorstufe (Prodrug) enzymatisch zum Wirkstoff (Drug) umwandeln. Erste erfolgreiche Analoga des zytotoxischen Naturstoffs Duocarmycin konnten in der Arbeitsgruppe von *Tietze* entwickelt werden.⁴

Zur weiteren Aufklärung des Wirkmechanismus' und des Wirkortes werden in dieser Arbeit neuartige fluoreszenzmarkierte Analoga Duocarmycin synthetisiert und in *Live Cell Imaging* Experimenten untersucht.

2 Cancerogenese – Von der Krebszelle zum Tumor⁵

Ein Tumor entsteht durch eine Veränderung der normalen Regulationsmechanismen zur Proliferation (Vermehrung) von Körperzellen.⁶ Maligne (bösartige) Tumore, die zu unkontrolliertem Wachstum neigen, können aus verschiedenen Gründen entstehen.⁷ Wenn die Signale der Proliferation dauerhaft aktiv sind, der Übergang in einen teilungsfähigen Zellzustand verhindert wird oder die Apoptose (programmierter, nicht nekrotischer Zelltod) nicht eingeleitet werden kann, kommt es zur Ausbildung von Tumoren.⁸

Eine Störung der Regulationsmechanismen zur Proliferation wird durch eine Veränderung der für die Regulation verantwortlichen Gene hervorgerufen.⁹ Dies kann ebenfalls verschiedene Ursachen haben. Zum Einen Mutationen, die spontan, vererbt oder durch chemische Substanzen (z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine, halogenierte Kohlenwasserstoffe, Asbest und aromatische Amine)^{10,11} initiiert werden, zum Anderen Mutationen, die durch physikalische Einflüsse, wie UV-Licht oder radioaktive Strahlung entstehen.¹² Des Weiteren können der Einbau viraler Gene^{13,14} in das menschliche Genom und chronische Entzündungen¹⁵ für das Entstehen von Tumoren verantwortlich sein.

Die betroffenen, meist regulatorischen, Gene sind die Protoonkogene, die das Zellwachstums fördern sowie die Tumorsuppressorgene, deren Aufgaben die Hemmung des Zellwachstums in gesunden Zellen, die Verhinderung der Zellteilung bei DNA-Schäden sowie die Einleitung der Apoptose sind.¹⁶

Ein Tumor entsteht jedoch erst, wenn mehrere Mutationen eingetreten sind, da der Zellstoffwechsel über viele Kontroll- und Steuerungsmechanismen verfügt, die im Stande sind eine einzelne Mutationen zu reparieren.

Werden Protoonkogene, wie im Fall des Ras-Onkogens, durch Mutationen in Onkogene umgewandelt, führt dies zu einem erhöhten Zellwachstum.^{13,17} Für die Entstehung eines Tumors müssen jedoch zusätzlich, wie oben beschrieben, Tumorsuppressorgene durch Mutationen deaktiviert werden, wie im Beispiel des

p53-Gens.^{13,,18} Dieses in mehr als der Hälfte aller menschlichen Tumore gefundene Gen, sorgt für den Eintritt von gesunden Zellen in die S-Phase des Zellzyklus' und ermöglicht hierdurch, z.B. bei DNA-Schädigungen, dessen Reparatur.¹⁹ Ist dieses Gen jedoch deaktiviert, kann die DNA-Schädigung nicht repariert werden und es kommt zum programmierten Zelltod (Apoptose).

Die Entstehung eines Tumors kann in vier Phasen eingeteilt werden: Initiierungsphase, Promotionsphase, Progressionsphase und Implantationsphase. In der Initiierungs-phase (Pathogenese) treten erste Mutationen am Erbgut auf, die an die Tochterzellen weitergegeben werden. Die Promotionsphase tritt nach einer Latenzzeit von bis zu mehreren Jahren ein und wird durch eine ansteigende Zellproliferation sowie das Sichtbarwerden von Kern- und Zellatypien beschrieben. In der folgenden Progressionsphase kann zwischen benigner oder maligner Geschwulst unterschieden werden. In der vierten Phase, der Implantationsphase, verteilen sich maligne Zellen im gesamten Organismus, nachdem sie Blut- und Lymphgefäße infiltriert haben. Auf diese Weise können sie sich an verschiedenen Organen (Lymphknoten, Leber, Lunge, Knochenmark) festsetzen und Metastasen bilden.²⁰ Durch Ausbildung von Blutgefäßen (Angiogenese) und der damit einhergehenden Versorgung der Metastasen wird die Tumorentstehung abgeschlossen.

3 Konzepte zur Tumorthherapie

Auf Grund ihrer vielfältigen Erscheinungsformen und der sich daraus ergebenden notwendigen Einzelbetrachtung erfordern Krebserkrankungen individuell angepasste Therapiekonzepte.²¹ Bei den meisten klinischen Anwendungen handelt es sich um die Kombination aus verschiedenen Methoden. Hierzu zählen: Chemotherapie, Strahlenbehandlung und die chirurgische Entfernung des Tumorgewebes. Bei soliden, gut zugänglichen und klar abgegrenzten Tumoren, kann eine chirurgische Entfernung vorgenommen werden. Hierbei handelt es sich um die Methode mit den geringsten Nebenwirkungen und den besten Heilungschancen. Ist eine derartige Abgrenzung gegenüber gesundem Gewebe nicht gegeben oder betrifft der Tumor lebenswichtige Strukturen, ist eine Strahlenbehandlung (z.B. Radiotherapie mit γ -Strahlung oder radioaktiven Isotopen) unumgänglich. Ist es hingegen bereits zur Bildung von Metastasen gekommen wird die Behandlung der Patienten durch die Anwendung einer Chemotherapie durchgeführt. Neue Therapieansätze, wie zum Beispiel die Behandlung mit Angiogenesehemmern²² und Kinaseinhibitoren²³ oder auch die Behandlung durch Immun-²⁴ und Hormontherapie²⁵ konnten bereits erfolgreich eingesetzt werden.

3.1 Chemotherapie

Wie oben bereits erläutert, wird im Fall einer bereits eingetretenen oder aufkommenden Metastasierung die klassische antineoplastische Chemotherapie gewählt, wenngleich diese meist durch schwere Nebenwirkungen gekennzeichnet ist. Zu diesen, teils drastischen Nebenwirkungen werden Störungen der Hämatopoese sowie des Gastrointestinaltraktes (Übelkeit, Erbrechen), Mucositis (Schleimhautentzündung), Alopezie (Haarausfall), Fieber, Immunschwäche, Infertilität und Teratogenität gezählt. Wird eine klassische Chemotherapie angewendet, werden Medikamente verabreicht, die sich über den Blutkreislauf im gesamten Körper

verteilen. Die Wirkung der Chemotherapeutika auf menschliche Zellen ist entweder *zytostatisch*, im Falle einer Hemmung des Zellwachstum, oder sie ist *zytotoxisch*, wenn sie zum Tod der Zelle führt.

Chemotherapeutika schädigen auf Grund ihres Wirkmechanismus' vorwiegend schnell-proliferierende Zellen. Durch ihren erhöhten Stoffwechsel nehmen diese Zellen die verabreichten Wirkstoffe schneller auf. Das größte Problem dieser Anwendung besteht in der Tatsache, dass auch gesunde Zellen, wie beispielsweise die des Knochenmarks und der Haarwurzels- oder Schleimhautzellen zu den schnell proliferierenden Zellen gehören. Eine Unterscheidung durch die Chemotherapeutika ist hier nicht gegeben und es kommt folglich zu einer Schädigung von gesunden Organismen und damit einhergehend zum Auftreten der oben genannten Nebenwirkungen. Bei der Vermehrung von Zellen, kommt es zu verschiedenen Phasen, die während eines Zellzyklus' durchlaufen werden (Abbildung 3).

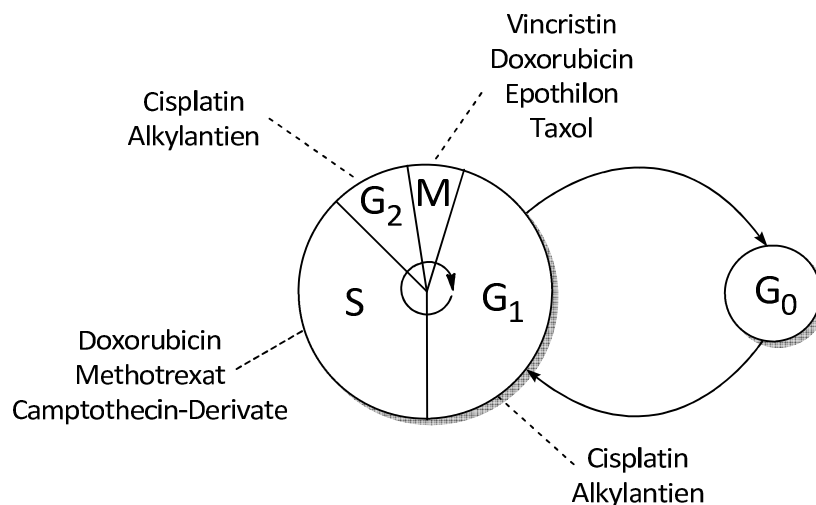


Abbildung 3. Phasen des Zellzyklus' und Angriffspunkte verschiedener Chemotherapeutika.

In der Wachstumsphase (G₁-Phase) der Zelle werden die RNA sowie erste Proteine synthetisiert. Von der G₁-Phase können die Zellen in die Ruhephase (G₀-Phase) übergehen. Die meisten gesunden Zellen befinden sich, im Gegensatz zu den Tumorzellen (nur ca. 10%) in der Ruhephase, in der sie für die meisten Zytostatika nicht zugänglich sind. In der Synthesephase (S-Phase) findet die DNA-Replikation

statt. Eine Überprüfung der Replikation wird in der kurzen Postsynthesephase (G₂-Phase) vorgenommen, um in der anschließenden Mitosephase (M-Phase) den doppelten Chromosomensatz zu trennen und an jede der zwei Tochterzellen zu übergeben. Eine Überprüfung der durchlaufenen Phasen erfolgt an Kontrollpunkten zwischen Wachstumsphase und Synthesephase sowie zwischen Synthesephase und Postsynthesephase. An diesen Kontrollpunkten wird im positiven Fall eine Stimulierung der Wachstumsfaktoren oder im negativen Fall eine Reparatur der DNA-Schäden, ein Zellzyklusstop oder ein programmierter Zelltod (Apoptose) eingeleitet.²⁶ Eine Differenzierung der derzeit eingesetzten Chemotherapeutika kann auf Grund ihrer Wirkmechanismen und ihrer Angriffspunkte im Zellzyklus vorgenommen werden.

Hierbei wird zwischen *Alkylantien*, *Antimetaboliten*, *Mitosehemmstoffen*, *Topoisomerase-Hemmstoffen* und *zytostatischen Antibiotika* unterschieden.

Die Klasse der Alkylantien wirkt hauptsächlich phasenunspezifisch. Das für die Alkylierung häufig bezugte Carbokation des Chemotherapeutikums wird erst im Körper dargestellt, bevor es mit *N*-, *O*- oder *S*-Nucleophilen der Proteine oder Nukleinsäuren reagieren kann und kovalente Bindungen ausbildet. Daraus resultieren Quervernetzungen der DNA-Stränge (*cross links*), abnorme Basenpaarungen oder Strangbrüche, die eine Replikation und somit eine Zellteilung verhindern, wodurch es letztlich zum Zelltod kommt. Wichtige Vertreter dieser Substanzklasse sind Stickstoff-Lost-Derivate, wie etwa das untoxische Cyclophosphamid (**1**),²⁷ das erst durch Bio-transformationen im Körper in den toxischen Wirkstoff **2** überführt wird (Giftung) (Abbildung 4).

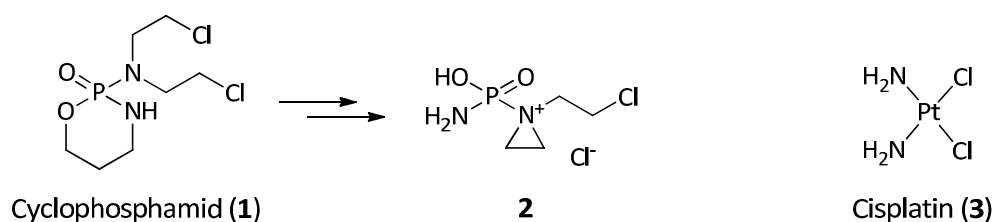
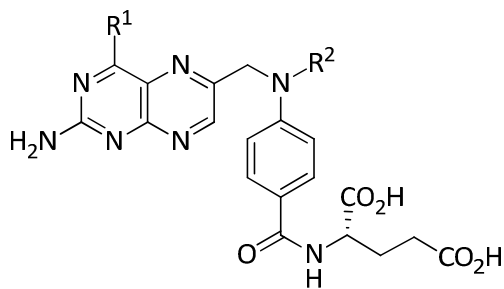


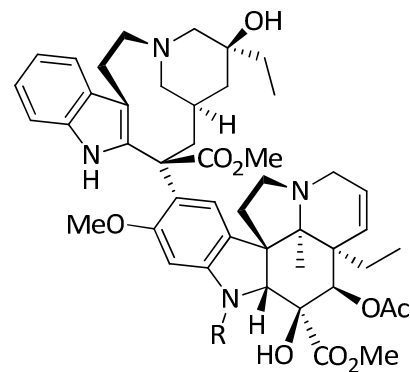
Abbildung 4. Cyclophosphamid (**1**) als ein Beispiel für die Gruppe der Alkylantien.

Zu der Klasse der Alkylantien gehören vor allem auch die Platinkomplexe des Cisplatin (**3**). Der Wirkmechanismus dieser Verbindungen wird mit Intra- oder Interstrang-Quervernetzungen der DNA beschrieben.²⁸ Darüber hinaus zählten das in dieser Arbeit als Leitstruktur verwendete natürliche Antibiotikum CC-1065 sowie die Duocarmycine, Yatakemycin und deren Derivate (Kapitel 4) zur Klasse der Alkylantien.

Antimetabolite sind, wie aus der Namensgebung zu erkennen ist, Strukturanaloga körpereigener Stoffwechselbausteine, die als Antagonisten die eigentlichen Metabolite ersetzen. Im Gegensatz zu den phasenunspezifischen Alkylantien wirken Antimetabolite bevorzugt in der Synthesephase. Hier hemmen sie wichtige Enzyme oder führen zur Entstehung funktionsuntüchtiger Makromoleküle.^{8,26} Der Folsäureantagonist Methotrexat (**4**) ist ein wichtiges Beispiel für die Klasse der Antimetabolite. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Inhibition der Dihydrofolat-Reduktase und einer damit einhergehenden Verhinderung der Bildung von Tetrahydrofolsäure (Abbildung 5). Tetrahydrofolsäure ist ein wichtiger Bestandteil im Aminosäure- und Purinstoffwechsel und damit essentiell für die Zellproliferation.²⁹



Methotrexat (**4**): $R^1 = \text{NH}_2$, $R^2 = \text{CH}_3$
 Folsäure (**5**): $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = \text{H}$



Vincristin (**6**): $R = \text{CHO}$
 Vinblastin (**7**): $R = \text{CH}_3$

Abbildung 5. Methotrexat (**4**) als Beispiel für die Wirkstoffklasse der Antimetabolite sowie Vincristin (**6**) und Vinblastin (**7**) als Beispiele für die Gruppe der Mitosehemmstoffe.

Vincristin (**6**) und Vinblastin (**7**) greifen als Mitosehemmstoffe (Spindelgifte) in die Mitosephase des Zellzyklus' ein, indem sie an die β -Einheit des Tubulindimers binden und so den Aufbau der Kernspindeln³⁰ hemmen oder im Fall von Taxol und Epothilon

dessen Abbau verhindern.³¹ Auf Grund der Blockierung des Auf- und Abbaus des Spindelapparates kann eine Kern- und Zellteilung nicht mehr stattfinden.

Die zytotoxische Wirkung der Topoisomerase-Hemmstoffe, wie Etoposid, Irinotecan und Derivate des Alkaloids Camptothecin (**8**) beruht auf der Störung der Topoisomerasen I und II. Ihre Aufgaben sind die Entwindung der verdrehten Stränge während der DNA-Replikation, deren Unterbrechung und der anschließende Zusammenschluss der Stränge. Eine Hemmung dieser Enzyme durch die beschriebenen Wirkstoffe, führt zu einem Verlust der Fähigkeit von der DNA zu dissoziieren. Hierdurch werden Strangbrüche hervorgerufen, die schließlich den Zelltod auslösen (Abbildung 6).

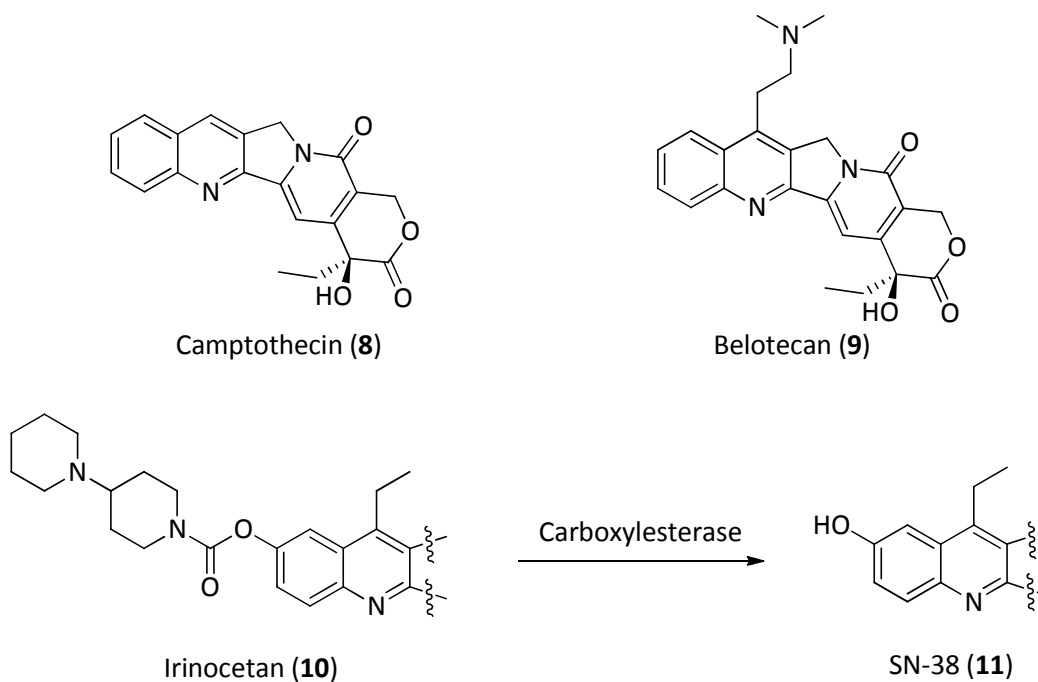


Abbildung 6. Beispiele für die Gruppe der Topoisomerasehemmstoffe (**8,9** und **11**)

Zu den *zytostatischen Antibiotika* zählen in erster Linie die aus *Streptomyces*-Arten isolierten Anthracycline Daunorubicin (**12**) und Doxorubicin (**13**) (Abbildung 6), die bevorzugt in der S-Phase des Zellzyklus' wirken. Sie interkalieren in die DNA und stören dadurch die DNA- und RNA-Synthese. Des Weiteren können sie durch Radikalbildung und Hemmung der Topoisomerase II Strangbrüche induzieren.³²

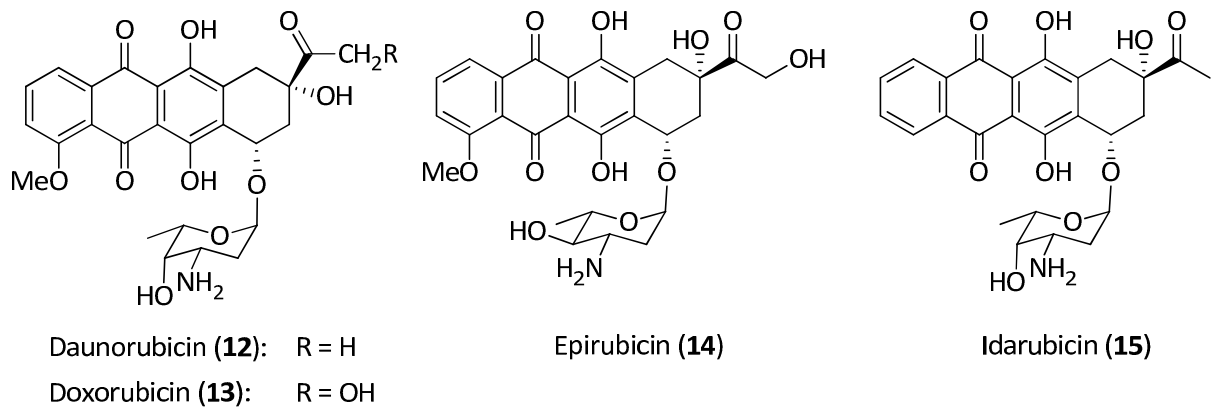


Abbildung 7. Beispiele für die Wirkstoffklasse der zytostatischen Antibiotika: Daunorubicin (12), Doxorubicin (13), Epirubicin (14) und Idarubicin (15).

Der Vorteil der Chemotherapeutika gegenüber der Strahlentherapie und der chirurgischen Entfernung von Tumoren bei der Bekämpfung von Krebszellen ist insbesondere in Fällen chirurgisch schwer zugänglicher Tumoren oder bei Metastasenbildung von Bedeutung. Allerdings treten, wie bereits beschrieben, schwere Nebenwirkungen auf, die unter Umständen eine weitere Behandlung des Patienten nicht zulassen. Außerdem bringt eine Chemotherapie häufig Spätfolgen mit sich, wozu die Induktion von Sekundärtumoren, Schädigungen des Knochenmarks, Lungenfibrosen oder Immundefekte zählen. Ebenso stellt die Resistenzentwicklung von Tumoren gegen einzelne angewendete Zytostatika eine Limitation in der Behandlung dar.³³

Trotz der beschriebenen schweren Sekundäreffekte und Resistenzen konnte sich die Chemotherapie als unentbehrliche Behandlungsmethode durchsetzen. Auf Grund dieser Notwendigkeit ist eine stetige Weiterentwicklung der vorhandenen Therapieansätze und eine Verbesserung der Wirkstoffe unumgänglich.

3.2 Immuntherapie

Neben den bereits erwähnten Therapiemaßnahmen, hat sich die Immuntherapie in den letzten Jahren stetig weiter entwickelt. Bei der Anwendung der Immuntherapie werden zum Beispiel Cytokine oder Antikörper verwendet. Diese haben die Eigenschaft immunmodulierend oder direkt antiproliferierend zu wirken.²⁶ Von entscheidender Bedeutung sind hierbei die charakteristischen Zelloberflächen, die sich im Falle von gesunden Zellen und Tumorzellen stark unterscheiden.

Jede Zellmembran weist auf ihrer extrazellulären Seite die Glykokalyx auf, die aus Glykolipiden, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen besteht und unter anderem der Zellerkennung, der Kommunikation und der Signalaufnahme dient.^x Eine Unterscheidung zwischen gesunden Zellen und Krebszellen und damit einhergehend der Einsatz der Immuntherapie kann auf Grundlage der Andersartigkeit der Antigene erfolgen.³⁴ Bestimmte tumorassoziierte Antigene sind spezifisch für Tumorzellen oder sie sind im Vergleich zu gesunden Zellen überexprimiert.³⁵

Eine Bindung dieser tumorspezifischen Antigene mit monoklonalen Antikörpern und damit eine selektive Markierung der Krebszellen ermöglicht eine selektive Zerstörung des Gewebes.³⁶ Köhler und Milstein entwickelten 1975 die ersten Immunoglobuline, die heute durch die Hybridomtechnik darstellbar sind.³⁷

Zu den bekanntesten Vertretern der Antikörper gehören Trastuzumab³⁸ gegen HER2/*neu*-positive Mammakarzinome³⁹ sowie Bevacizumab⁴⁰ als Angiogeneseinhibitor. So kann das Immunglobulin mit Zytokinen (z.B. Interleukin-2, IL-2) gekuppelt werden, wobei das resultierende Immunzytokin die körpereigene Immunabwehr am Tumor auslöst (A).^{41,42} Außerdem können Antikörper mit T-Lymphozyten gekuppelt werden, was eine direkte Zytolyse der Tumorzelle hervorruft (B).⁴³ Um die körpereigene Immunabwehr zur Bekämpfung von Tumoren einzusetzen, wird mit der Verschmelzung von Krebszellen und Antigen-präsentierenden Zellen ein weiterer Ansatz verfolgt. Die auf diese Weise erhaltenen Hybride aktivieren durch ihre Überexprimierung an tumorassoziierten Antigenen zytotoxische Lymphozyten (CTL),

die wiederum Krebszellen mit identischen Antigenen zerstören.⁴⁴ Eine Beladung dendritischer Zellen (DZ) mit Tumorproteinen, Tumorpeptiden oder Tumor-DNA, kann einen vergleichbaren Effekt hervorrufen (C).⁴⁵

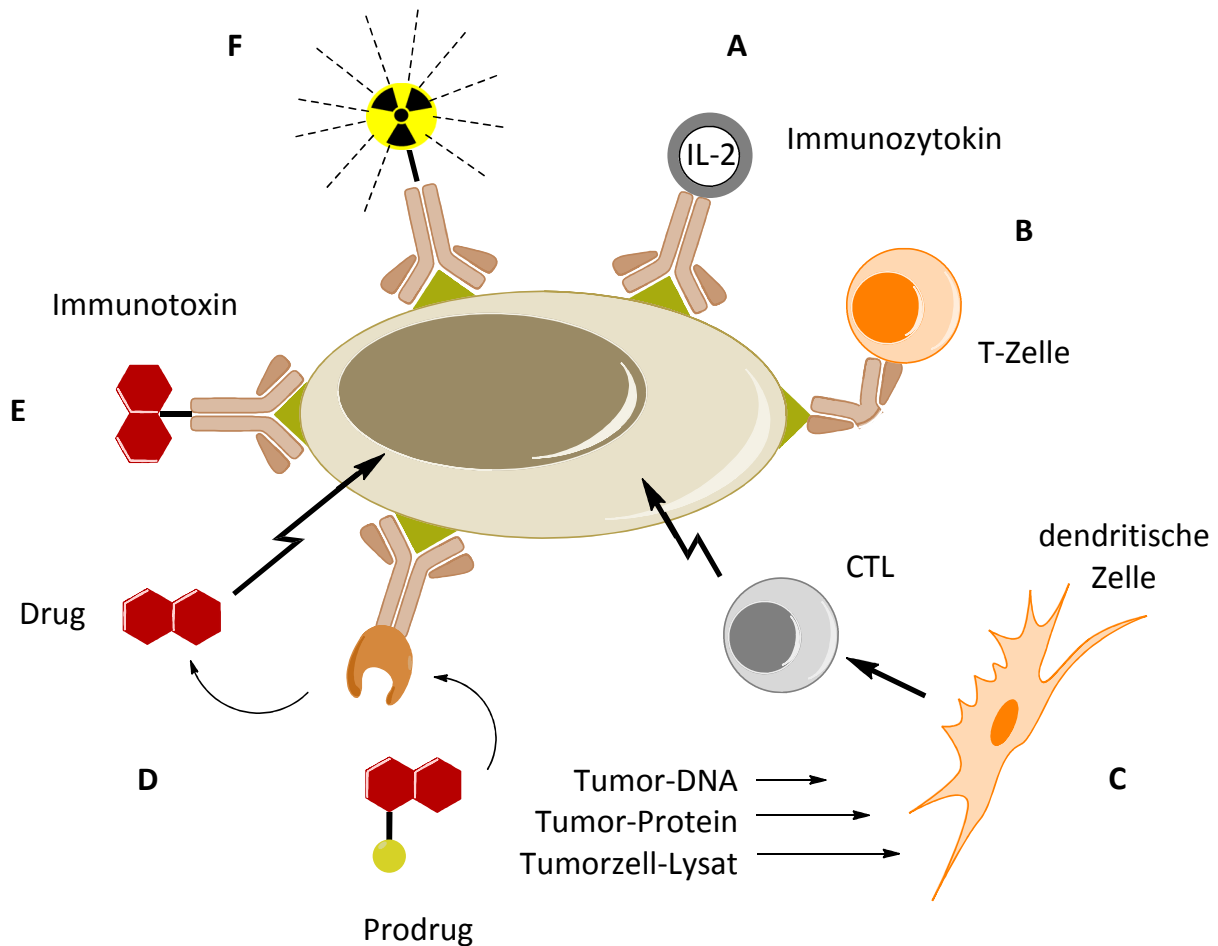


Abbildung 8. Beispiele für die Bekämpfung maligner Tumore durch Anwendung der Immuntherapie. **A:** Immunzytokine, **B:** Antikörper-vermittelte Tumorzytolyse, **C:** Aktivierung von zytotoxischen Lymphozyten (CTL) durch dendritische Zellen, **D:** Enzym-vermittelte Umwandlung von Prodrugs in Drugs, **E:** Immunotoxin, **F:** Antikörper-Radioisotopen-Konjugat.⁴⁶

Über die bereits erwähnten Therapiemöglichkeiten hinaus ist eine Verwendung von Toxin-Immunkonjugaten möglich (E).⁴⁷ Hierbei wird die Antikörperspezifität der Tumorzellen ausgenutzt um Toxine direkt zum Tumor zu leiten, während gesunde Zellen nicht beschädigt werden. Der erste Vertreter dieser Immunotoxine war Gemtuzumab-Ozogamicin (Mylotarg[®], Konjugat aus Antikörper gegen CD-33 und einem Calicheamicin-Derivat)⁴⁸. Dessen Marktzulassung für die USA wurde allerdings im Herbst 2010 wegen schwerwiegender Nebenwirkungen wie Myelosuppression

aufgehoben. Neuere Präparate wie T-DM1 (Konjugat aus Trastuzumab und einem Maytansinoid-Derivat)⁴⁹ sowie CMD-193 (Konjugat aus G193-Antikörper und einem Calicheamicin-Derivat)⁵⁰ befinden sich derzeit in klinischen Phasen.

Ein neues Konzept verwendet die tumorassoziierten Antigene um selektiv Antikörper-Enzym-Konjugate an Krebszellen zu kupplern. Das ADEPT-Konzept (*Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy*) ermöglicht die Umwandlung eines detoxifizierten Wirkstoffes (Prodrugs)⁵¹ ausschließlich an der Krebszelle in ein zytotoxisches Drug (D).⁵² Neben den erwähnten Methoden verwendet die Radioimmuntherapie Antikörper, die mit radioaktiven Isotopen (¹³¹I, ⁹⁰Y) gekuppelt wurden (F). Neben der Verwendung dieses Therapieansatzes in der Tumorbekämpfung wird er ebenso in der Diagnostik angewandt, wo er unter anderem die Lokalisation von Metastasen ermöglicht.⁵³

Mit Ausnahme von Ansatz C nutzen alle Ansätze die Möglichkeit der Identifikation von Krebszellen durch Antikörper, die an tumorassoziierte Antigene binden. Auch dieser vielversprechende Ansatz der Immunotherapie weist zwei Probleme auf, die als Immunogenität beschrieben werden. Behandelt man die Patienten mit Antikörpern murinen Ursprungs, wird eine Immunantwort auf körperfremde Immunglobuline ausgelöst.³⁶ Werden humane Antigene verwendet, verbessert man die Verträglichkeit dieser, mindert aber die Selektivität.^{52b} Ähnlich problematisch ist auch hier die große Individualität der Zellen in Bezug auf verschiedene Krebsarten und die damit verbundene Andersartigkeit der Antigene. Eine optimale Therapie wäre nur durch die individuelle Anpassung der Antikörper an die Antigene des Patienten möglich.

3.3 Selektive Krebstherapie mittels reversibel detoxifizierter Prodrugs

Auf Grund der starken Nebenwirkungen vieler Chemotherapeutika ist eine selektive Krebsbehandlung von entscheidender Bedeutung. Ein vielversprechender Ansatz nutzt die Möglichkeit untoxische Prodrugs gezielt am Tumor in das entsprechende toxische Drug zu überführen (Abbildung 9).⁵⁴ Um eine bessere Abgrenzung zwischen gesunden Zellen und Krebszellen zu erreichen, lassen sie sich anhand von genotypischen und phänotypischen Eigenschaften unterscheiden.

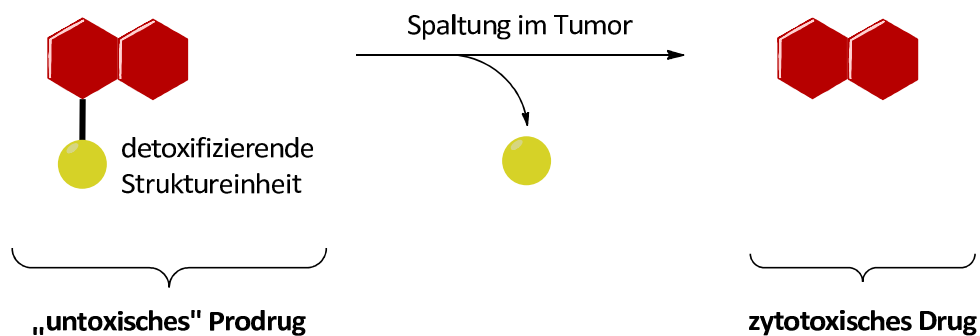


Abbildung 9. Überführung des „untoxischen“ Prodrugs in das zytotoxische Drug durch Spaltung am Tumor.

So unterscheiden sich gesunde Zellen von Tumorzellen zum Beispiel durch eine Abweichung des pH-Wertes im extrazellulären Raum. Dieser ist bei Tumoren, hervorgerufen durch eine erhöhte anaerobe Glykolyserate, signifikant niedriger als bei gesundem Gewebe.⁵⁵ Dieser Unterschied geht einher mit der gesteigerten anabolischen und mitotischen Aktivität der Tumorzelle⁵⁶ und führt durch die nicht vorhandene Möglichkeit zum Abtransport der gebildeten Milchsäure zum Absinken des pH-Wertes im Tumorgewebe.⁵⁷ Des Weiteren ist die Glykolyserate der Krebszellen von der extrazellulären Glucosekonzentration abhängig, da diese nicht in der Lage sind, die Kontrollmechanismen zur Glucosezufuhr zu steuern.⁵⁸ Eine exogene Glucosezufuhr führt aus diesen Gründen zu einer Absenkung des pH-Wertes um 1.2 Einheiten.⁵⁹ Dieser Unterschied kann für therapeutische Zwecke genutzt werden und

ist für eine Dauer von 24 h stabil. Angelehnt an diese Untersuchungen entwickelte *L.F. Tietze* 1981 das Prinzip der säurelabilen acetalischen Prodrugs. Eine Überführung des Prodrugs durch eine säurekatalysierte Hydrolyse in das deutlich toxischere Drug geschieht erst im Tumorgewebe, wodurch das gesunde Gewebe nicht geschädigt wird.^{4d,60} Versuche hierzu wurden unter anderem mit Acetalglykosiden von Ketonen durchgeführt.⁶¹ Das Ketophosphamid BE-1 (**16**) wird unter säurekatalysierter Hydrolyse in das Keton **18** umgewandelt und spaltet dabei D-Glucose (**17**) und Methanol ab. Im Anschluss kann **18** wie auch das Cyclophosphamid (**1**) über die Friedmannsäure **19** zum Aziridiniumion **2** als aktives Drug umgewandelt werden. Bei Untersuchungen von BE-1 (**16**) an Mammakarzinomzellen der Marshallrate (M1R) unter physiologischen Bedingungen und bei pH 6.2 konnte gezeigt werden, dass BE-1 (**16**) unter physiologischen Bedingungen 17-fach weniger toxisch ist.

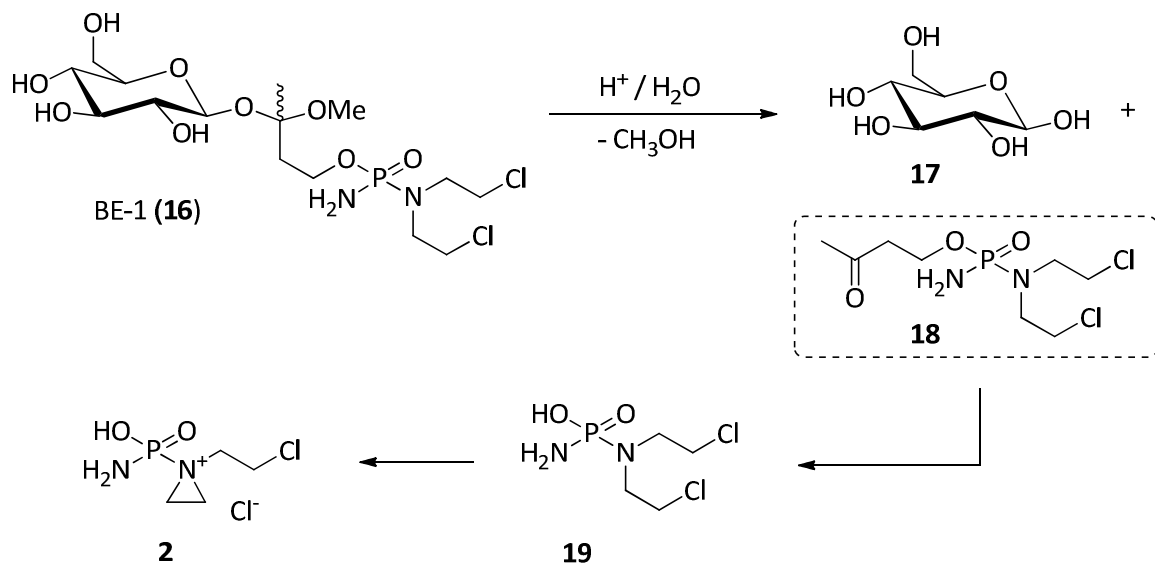


Abbildung 10. Darstellung von Drug **2** durch säurekatalysierte Aktivierung des acetalischen Prodrugs BE-1 (**11**).

3.3.1 Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT)

Wie in Kapitel 3.2 erwähnt, kann die Tumorzelloberfläche als Ziel für Marker genutzt werden. Ein binäres Therapiekonzept beschreibt *Bagshawe* 1987 als *Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy*. Hierbei bindet ein systemisch verabreichtes Antikörper-Enzym-Konjugat (AEC) selektiv an tumorassoziierte Antigene. Dieses AEC ist nun in der Lage, in direkter Nähe zum Tumor, das ebenfalls systemische untoxische Prodrug durch das entsprechende Enzym in das toxische Drug zu überführen.^{52,62} Ein wichtiger Bestandteil der Therapie ist die Clearance-Zeit.^{63,64} Das verabreichte AEC muss vor der Gabe des Prodrugs aus dem Blutkreislauf verschwunden sein, um eine unselektive Freisetzung des Drugs zu verhindern. Eine Umsetzung des Prodrugs in das entsprechende Drug ist hierdurch auf das Tumorgewebe beschränkt und die gewünschte Differenzierung zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe ist erfolgreich. Das Drug penetriert die Zellmembran und entfaltet seine toxische Wirkung innerhalb der Zelle. Das AEC ist weiterhin in der Lage, die außerhalb der Zelle befindlichen Prodrugs in die Drugs zu überführen und einen Zelleintritt zu ermöglichen.

Auf Grund der Unterscheidung zwischen untoxischem Prodrug und toxischem Drug kann eine weitaus höhere Wirkstoffdosis verabreicht und somit eine effizientere Behandlung ermöglicht werden. Ein weiterer Vorteil des ADEPT-Konzeptes besteht in der Möglichkeit der Drugs, durch solide Tumoren zu diffundieren und Krebszellen zu töten, die nicht über die vom AEC benötigten Antigene verfügen (*Bystander-Effekt*).⁶⁵ Zur Abschätzung einer möglichen Therapie im Rahmen von ADEPT durch ein Prodrug wurden folgende Kriterien erarbeitet:⁶⁶ „Das Prodrug sollte ein adäquates Substrat für das Enzym im AEC, jedoch nicht für andere Enzyme im Organismus sein. Außerdem sollte es eine möglichst geringe Zytotoxizität aufweisen und nicht zellgängig sein. Darüber hinaus ist eine große therapeutische Breite des Prodrugs anzustreben, die *in vitro* durch den Quotienten der IC_{50} -Werte in Ab- und Anwesenheit des spaltenden Enzyms widerspiegelt wird ($QIC_{50} = IC_{50} \{\text{Prodrug}\} / IC_{50} \{\text{Prodrug in Anwesenheit des Enzyms}\}$). Als Richtlinie gilt, dass der

QIC₅₀ > 1000 sein sollte und das zytotoxische Drug einen IC₅₀ < 10 nM besitzen sollte.^{4d,67} Das Drug sollte ferner die Zellmembran sehr leicht penetrieren können und eine Halbwertszeit aufweisen, die lang genug ist, um einen *Bystander-Effekt* zu bewirken, und ausreichend kurz, um eine Rückdiffusion des Drugs vom Tumor in das umliegende Gewebe zu verhindern.“ Das Enzym sollte eine hohe katalytische Aktivität haben und entweder nicht-humanen oder humanen Ursprungs sein. Im letzten Fall darf das Enzym allerdings gar nicht oder nur marginal in Normalgewebe und Körperflüssigkeiten exprimiert sein, um eine unselektive Prodrug-Aktivierung und damit systemische Toxizität zu vermeiden.

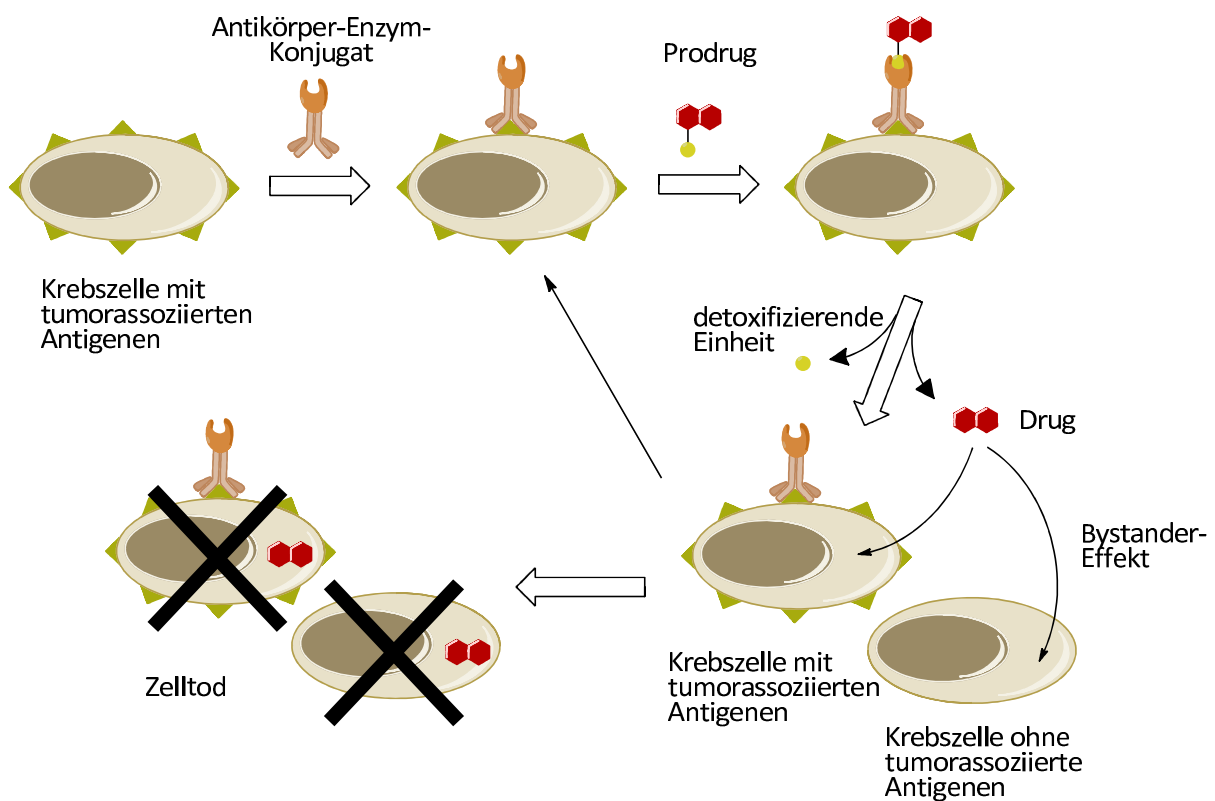


Abbildung 11. Vereinfachte Darstellung des ADEPT-Konzeptes.

Wie im Fall der bereits vorgestellten Antikörper und einer damit einhergehenden Immunogenität tritt diese Problematik auch beim ADEPT-Konzept auf. Um sie zu vermeiden, wurde das ADAPT-Konzept (*Antibody-Directed Abzyme Prodrug Therapy*) entwickelt, das humanisierte, katalytisch wirksame Antikörper (Abzyme) nutzt.⁶⁸

Seit den 1980er Jahren konnten zahlreiche Prodrugs für eine Anwendung im ADEPT-Konzept entwickelt werden. Besonders erwähnenswert sind hier „untoxische“ Derivate der Wirkstoffe *Los*,⁶⁹ *Methotrexat*,⁷⁰ *Doxorubicin* und *Daunorubicin*,⁷¹ *5-Fluoruracil*,⁷² *Etoposid*,⁷³ *Vinblastin*,⁷⁴ *Paclitaxel*⁷⁵ und *Camptothecin*.⁷⁶ Eine Aktivierung der Prodrugs erfolgt durch Antikörper-Enzym-Konjugate oder Fusionsproteine aus Single-chain-Antikörpern. Eine weitere Möglichkeit liegt in der Aktivierung durch die Enzyme Carboxypeptidase G2 und A (CPG2, CPA),⁷⁷ β -Lactamase,⁷⁸ Nitroreduktase,⁷⁹ Cytosin-Deaminase⁸⁰ oder β -D-Galaktosidase⁸¹. Allerdings konnten auch hier die typischen Nachteile der bisher bekannten Prodrugs in zu kleinen therapeutischen Fenstern sowie zu geringen Zytotoxizitäten des gebildeten Drugs gefunden werden.

Erste klinische Studien im Rahmen des ADEPT-Konzeptes folgten 1995 durch *Bagshawe* und *Sharma*.^{52b52d} Ein geeignetes Prodrug wurde in CMDA (**20**) gefunden und wurde durch Umsetzung mit dem A5B7-CPG2-Konjugat in das toxische *N*-*Los*-Drug **21** überführt.

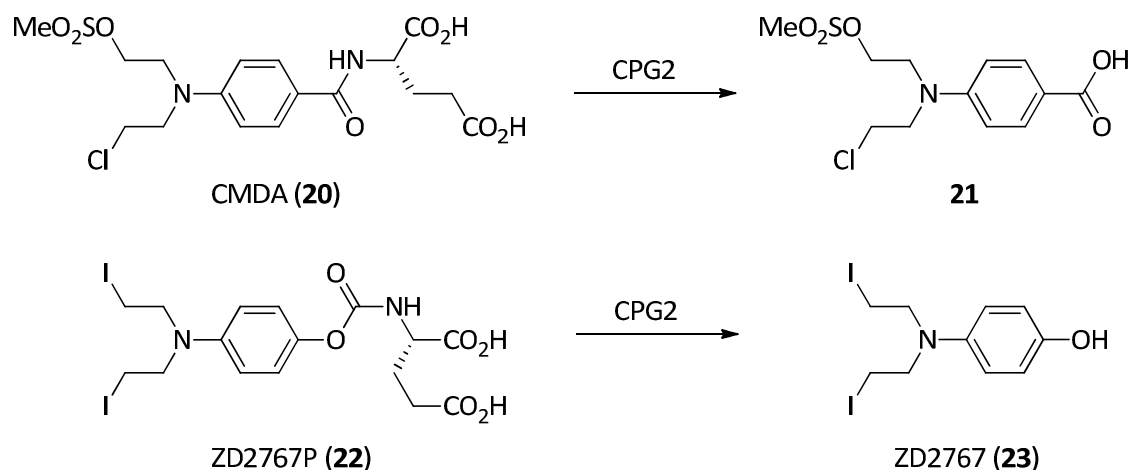


Abbildung 12. Aktivierung der Prodrugs CMDA (**20**) und ZD2767P (**22**) zu den entsprechenden Drugs **21** und **23** durch Carboxypeptidase G2 (CPG2).

Mit einer therapeutischen Breite von $QIC_{50} = 100$ und einer relativ langen Plasmahalbwertszeit für **21** von $t_{1/2} = 30$ min sowie der Eigenschaft, aus dem

Tumorgewebe zu diffundieren und eine Myelosuppression hervorzurufen, konnte kein erfolgreiches Ergebnis erzielt werden.

2002 folgte eine weitere Studie, in der das Glutamat-Prodrug ZD2767P⁸² (**22**) eingesetzt wurde, das im Gegensatz zu CMDA (**20**) über eine geringere Plasmahalbwertszeit verfügt. Wie bei **20** erfolgt eine Umsetzung durch das Enzym CPG2 zu dem entsprechenden Drug ZD2767 (**23**). Glutamat-Prodrug ZD2767P⁸³ (**22**) zeigte mit einer therapeutischen Breite von $QIC_{50} = 100-200$ einen akzeptablen Wert. Im Falle von **22** wurde im Gegensatz zur Anwendung von **20** kein AEC verwendet, sondern auf ein mannosyliertes Fusionsprotein aus Single-Chain-Antikörper und Enzym zurückgegriffen.⁶⁴ Der Vorteil dieses Proteins liegt in der deutlich geringeren Clearance-Zeit, da es über Mannose-Rezeptoren in die Leber aufgenommen wird.⁸⁴ Bei der Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom konnte nach 2-3 Therapiezyklen eine signifikante Anti-Tumor-Response festgestellt werden.^{52c}

Neben den beschriebenen klinischen Studien konnte auch ein von *Tietze et al.* synthetisiertes Galaktosyl-Prodrug⁸⁵ in einer präklinischen Studie in einem Mammakarzinommodell (MDA-MB-231) untersucht werden.⁸⁶ Auch hier konnte nach 2 Therapiezyklen eine signifikante Anti-Tumor-Response festgestellt werden. Im direkten Vergleich mit Kontrolltieren wurde ein um den Faktor 1.7 geringeres Tumorwachstum festgestellt. Untersuchungen mit dem Lymphommodell (A20) zeigte sogar ein um den Faktor 3.6 kleineres Tumorwachstum.^{134b}

Neben den bereits beschriebenen Konzepten ADEPT und ADAPT haben sich weitere Therapiekonzepte herauskristallisiert. Unter anderem wurden die Konzepte GDEPT (*gene-directed*),⁸⁷ PDEPT (*polymer-directed*), PELT (*polymer-enzyme liposome therapy*),⁸⁸ CDEPT (*clostridial-directed*),⁸⁹ BDEPT (*bacteria-directed*),⁹⁰ FDEPT (*folate-directed*)⁹¹ und LEAPT (*lectin-directed enzyme activated prodrug therapy*)⁹² weiterentwickelt und zeigen teils vielversprechende Ansätze.

Weitere Studien untersuchen selbstauflösende Dendrimer-Systeme, die terminal mit Wirkstoffen wie Doxorubicin, Camptothecin, Paclitaxel oder Etoposid beladen sind.

Unter Verwendung des ADAPT-Konzeptes können die Zytostatika mit Hilfe eines Abzyms kaskadenartig und somit hocheffizient freigesetzt werden.^{54a,71a,93}

3.3.2 Prodrug-Monotherapie (PMT)

Neben den bereits beschriebenen Konzepten der Immuntherapie und der Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy wurde mit der Prodrug-Monotherapie (PMT)⁹⁴ ein weiteres vielversprechendes Konzept entwickelt. Im Gegensatz zum ADEPT-Konzept, bei dem zusätzliche AEC verabreicht werden müssen, um das Prodrug in das Drug umzuwandeln, werden im Fall der PMT die Abnormitäten des Tumorgewebes genutzt. Auf diese Weise können sowohl metabolische als auch physiologische Eigenschaften des Tumorgewebes genutzt werden, um gezielt Prodrugs in toxische Drugs umzuwandeln. Hierbei stellen zum Beispiel der Unterschied im pH-Wert, Hypoxie oder tumorassoziierte Rezeptoren und Enzyme mögliche Angriffspunkte dar.⁹⁵

Besonders das Enzym β -D-Glucuronidase, das in Zellen bei akuten und chronischen Entzündungsprozessen in den Extrazellulärbereich von nekrotischen Tumoren freigesetzt wird, eignet sich für eine Anwendung im Rahmen der Prodrug-Monotherapie.⁹⁶ Des Weiteren handelt es sich bei β -D-Glucuronidase um ein humanes Enzym und ruft somit keine Immunantwort hervor und es besitzt bei niedrigem pH-Wert, wie es im Tumorgewebe der Fall ist, eine höhere Aktivität.⁹⁷ Das Acetal-Glucoronid **24** konnte im Arbeitskreis von *Tietze et al.* entwickelt werden und wird in Anwesenheit von β -D-Glucuronidase nach erfolgreicher Esterase zu Butyraldehyd (**26**) umgesetzt, wobei D-Glucuronsäure (**27**) und Methanol abgespalten werden (Abbildung 13).⁹⁸ Leider konnten weitere *In-vivo*-Studien nicht die gewünschten Ergebnisse liefern, was auf die geringe Toxizität des Butyraldehydes zurückzuführen ist.

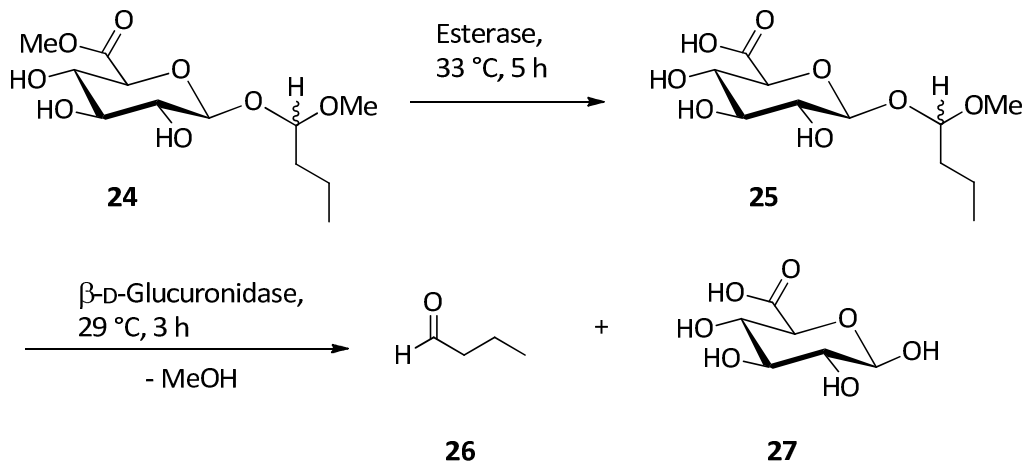


Abbildung 13. Aktivierung des Acetal-Glucuronids **24** durch Esterase und β -D-Glucuronidase.

Zahlreiche Glucuronsäure-Prodrugs folgten auf die Arbeiten von *Tietze et al.*⁹⁹ Bei der Verwendung einer selbstauflösenden Spacer-Einheit zeigte sich an dem Glucuronsäurerest eine Erhöhung der Enzymaktivität. Mit steigender Entfernung des Pharmakophors von der Glucuronsäure konnte der sterische Anspruch verringert und die Aktivität des Enzyms verbessert werden. Häufig wurden Pharmakophoren der Typen Doxorubicin, Paclitaxel, Docetaxel und Camptothecin verwendet. Zunächst wurden Glucuronsäure-Prodrugs für die Prodrug-Mono-Therapie entwickelt. Eine Anwendung in Bezug auf GDEPT und ADEPT ist aber ebenso denkbar. Hierzu könnten Gen-kontrollierte Erhöhungen der Glucuronidase-Konzentration im Tumorgewebe (GDEPT) oder Antikörper-Glucuronidase-Konjugate (ADEPT) verwendet werden.¹⁰⁰

Ein prominentes Beispiel für die Anwendung der PMT in Zusammenhang mit einer Spacer-Einheit wurde von *Boven et al.* entwickelt. Der Wirkstoff DOX-GA3 (**29**) zeigte eine verbesserte Wachstumshemmung in Ovarialkarzinom-Modellen an Nacktmäusen. Auch dessen entsprechendes Derivat, der Methylester **28**, zeigte *in vitro* eine ebenso große Zytotoxizität wie Doxorubicin, was auf eine vollständige Umsetzung des Prodrugs schließen lässt. DOX-GA3 (**29**) ist über einen *p*-Aminobenzyl-oxycarbonyl-Spacer an die Glucuronsäureeinheit gekuppelt und kann durch β -D-Glucuronidase und anschließende 1,6-Eliminierung des Spacers in Doxorubicin (**13**), *p*-Aminobenzylalkohol (**30**) und CO₂ überführt werden (Abbildung 14).¹⁰¹

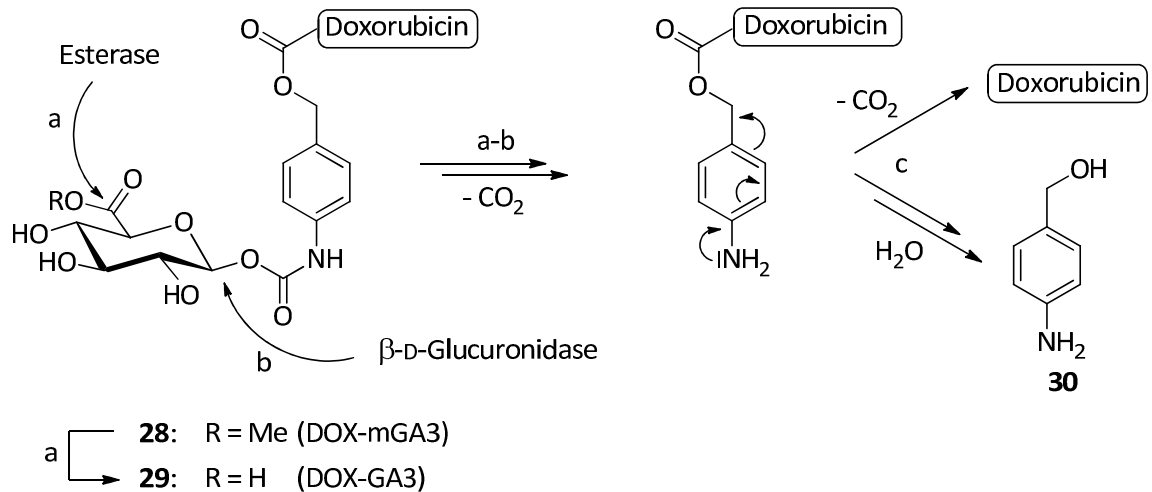


Abbildung 14. Aktivierung des Prodrugs DOX-GA3 (**29**) durch Hydrolyse des Methylglucuronats DOX-mGA3 (**28**) durch Serumesterase (a) sowie anschließende Spaltung der Zuckereinheit durch β -D-Glucuronidase unter Freisetzung von CO_2 (b) und spontane 1,6-Eliminierung des Spacers unter Freisetzung von Doxorubicin (**13**), *p*-Aminobenzylalkohol (**30**) und CO_2 (c).

Weitere Untersuchungen wurden von *Monneret et al.* zu Glucuronidase-Prodrugs angestellt. Sie synthetisierten ein Paclitaxel-Prodrug mit einem kurzen Spacer und erzielten *in vitro* einen QIC_{50} -Wert von 700. Dieses Ergebnis konnte *in vivo* jedoch nicht wiederholt werden, was auf eine unvollständige Umsetzung des Prodrugs zum Drug schließen lässt.¹⁰² Weitere Untersuchungen mit einem doppelten Spacersystem, das zu einer quantitativen enzymatischen Spaltung, jedoch auch zum Absinken des QIC_{50} -wertes führte, konnten nicht die gewünschten Ergebnisse liefern.^{103,104} Natürlich wurden auch die Spacer-Einheiten auf ihre Toxizität untersucht, konnten aber als vernachlässigbar angesehen werden, da die Toxizität des Drugs die des Spacers bei Weitem übersteigt.

Außer den bereits erwähnten Untersuchungen zu den β -D-Glucuronidase-Prodrugs folgten weitere Untersuchungen zu Enzymen, die in Tumoren überexprimiert sind. Hierzu zählen Enzyme wie Plasmin, Prolidase, Tyrosinase uvm., die aber in der Forschung auf weniger Interesse stoßen.^{54a,105}

Neben der erwähnten Überexprimierung von Enzymen und den physiologischen Bedingungen im Tumorgewebe kann auch die Hypoxie als wichtiges Merkmal von Tumorzellen angesehen werden und stellt einen wichtigen Ansatzpunkt in der

Prodrug-Mono-Therapie dar. Wie bereits beschrieben, neigen Tumorzellen zu einer abnormen und ausgeprägten Vaskularisierung, was eine schlechte Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr der betroffenen Zellen zur Folge hat. Des Weiteren können hieraus Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika und Radiotherapie entstehen. Im Rahmen einer selektiven Krebstherapie wird das Vorliegen hypoxischer Areale ausgenutzt, um gezielt Prodrugs zu toxifizieren.¹⁰⁶

4 CC-1065, Duocarmycin SA und Yatakemycin

1978 wurde das natürliche Antibiotikum (+)-CC-1065 (**31**) erstmals von Mitarbeitern der *Upjohn Company* aus Kulturen von *Streptomyces zelensis* isoliert.¹⁰⁷ (+)-CC-1065 (**31**) zeigte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine sehr hohe Zytotoxizität sowie ein breites Spektrum der antibiotischen Wirksamkeit und eine starke Antitumoraktivität.¹⁰⁸

31 ist aus drei substituierten Pyrrolo[2,3-*e*]-indol-Einheiten aufgebaut, die jeweils durch eine Amidbindung miteinander verknüpft sind (Abbildung 15). Eine wichtige Rolle übernehmen die 1,2-Dihydro-3*H*-pyrrolo-[3,2-*e*]-indol-Systeme (PDE I und PDE II), da sie auf Grund ihrer hohen Affinität zu Doppelstrang-DNA, als DNA-bindende Einheiten fungieren. Die mit CPI (Cyclopropapyrroloindol) gekennzeichnete Einheit ist verantwortlich für die Alkylierung der DNA und damit ein entscheidendes Strukturmerkmal für (+)-CC-1065 (**31**), Duocarmycin SA (**32**) und Yatakemycin (**33**).

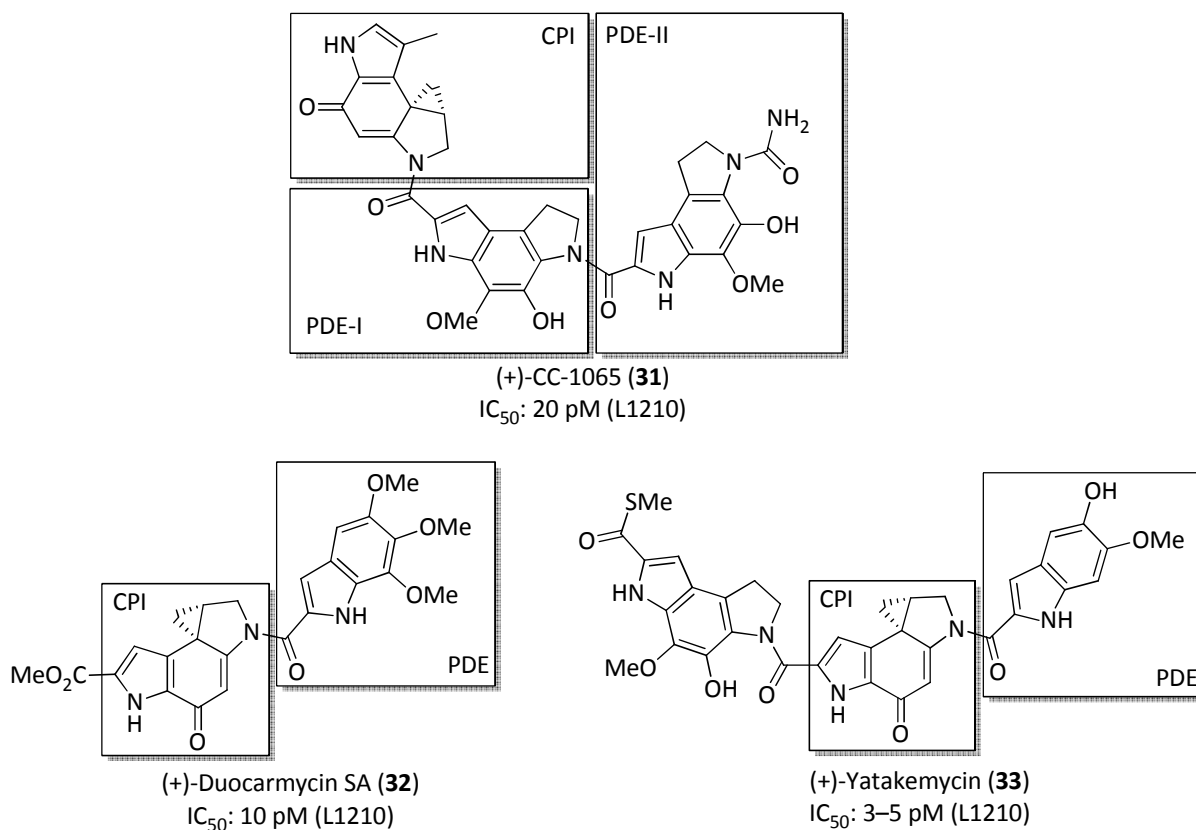


Abbildung 15. (+)-CC-1065 (**25**), (+)-Duocarmycin SA (**26**) und (+)-Yatakemycin (**27**) als Beispiele für zytotoxische Antibiotika.

Verwandte Verbindungen von **31** konnten aus anderen Streptomycetenstämmen isoliert werden. Hierzu gehören insbesondere (+)-Duocarmycin SA (**32**) (aus *Streptomyces DO-113*)¹⁰⁹ sowie Yatakemycin (**33**) (aus *Streptomyces TP-A0356*),¹¹⁰ das mit einem IC₅₀-Wert von 3 pM eines der potentesten Zytostatika darstellt.

(+)-CC-1065 (**31**) entfaltet seine zytotoxische Wirkung auf Grund einer sequenzspezifischen Alkylierung der DNA, bei der ein nucleophiler Angriff des Adenin-*N*-3 aus der kleinen Furche AT-reicher Regionen von doppelsträngiger DNA auf das niedrigst substituierte Kohlenstoffatom der Spirocyclopropyleinheit (CPI) erfolgt (Abbildung 16). Die lipophile Innenseite der gekrümmten Struktur des CC-1065 und seiner Analoga begünstigt dabei eine Wechselwirkung mit den Nucleobasen, während die hydrophile Außenseite die Einlagerung in die kleine Furche durch Wechselwirkungen mit den polaren Funktionalitäten des DNA-Rückgrates stabilisiert.

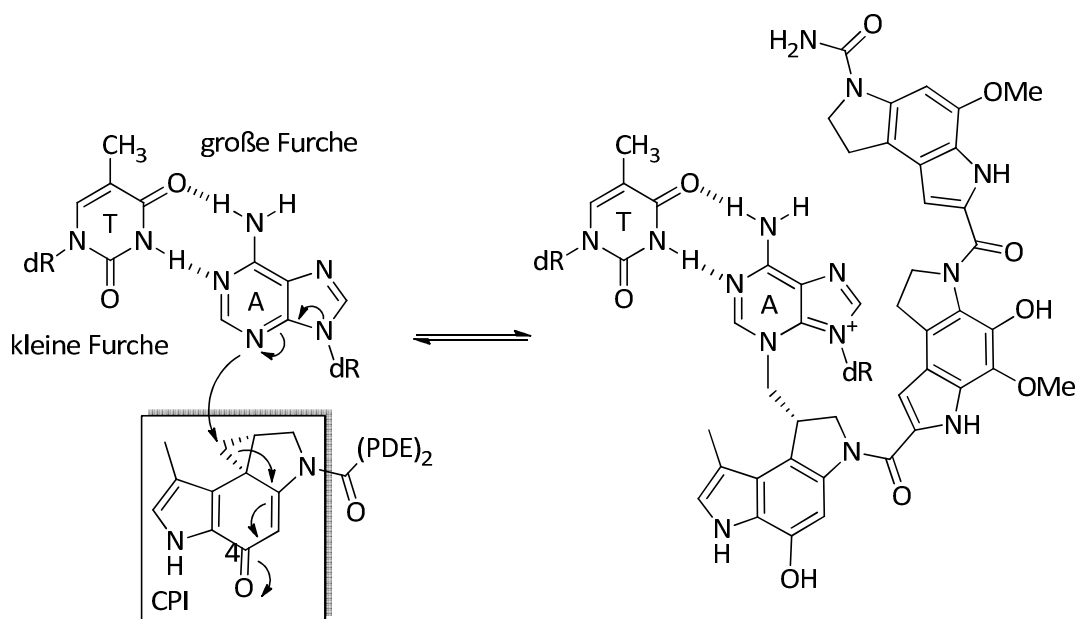


Abbildung 16. DNA-Alkylierung CC-1065 (**31**) durch Adenin-*N*-3 in der kleinen Furche.

Zu der beobachteten Alkylierungselektivität wurden verschiedenste Hypothesen aufgestellt. *Hurley* vertritt das Modell einer Protonierung der Carbonylfunktion an C-4, die aus einer günstig angeordneten Phosphatgruppe im flexiblen DNA-Rückgrat resultiert, wodurch sich die Konformation der DNA ändert. Hieraus resultiert ein günstigerer Abstand des Adenin-*N*-3-Atoms zu dem Brückenkopfatom der CPI-

Einheit.¹¹¹ Auf Grund der Tatsache, dass Strukturanaloga auch ohne die von *Hurleys* Modell benötigte Carbonylfunktion an C-4 alkylierende Eigenschaften aufweisen, reicht dieses Modell zur Beschreibung des Wirkmechanismus' nicht aus. Weitere Studien haben zusätzlich gezeigt, dass die von *Hurley* postulierte Änderung der DNA-Konformation bei der Bindung des Drugs nicht signifikant eintritt.¹¹²

Einen weiteren Ansatz beschreibt *Boger* als das Modell der konformativen Aktivierung. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei der DNA-bindenden Einheit (PDE) zu, die über eine formspezifische Erkennung tief in die kleine Furche der DNA eindringt (*shape-selective recognition*) und dort Wasserstoffbrückenbindungen mit AT-reichen Sequenzen ausbildet.¹¹³ Eine daraus resultierende Verdrillung der Amidbindung führt zu einer Aufhebung der vinylogenen Amidstabilisierung des Enons (*shape-dependent catalysis*) und einer Erhöhung der Reaktivität der CPI-Einheit in Hinblick auf einen Angriff des Adenin-N-3-Atoms (*target-based activation*). Diese von *Boger* postulierte These konnte durch die Untersuchung von **34** und **35** gestärkt werden (Abbildung 17).¹¹⁴ **34** zeigt auf Grund des Fehlens der Amidbindung und dem damit einhergehenden Verlust der vinylogenen Konjugation keinerlei DNA-alkylierende Eigenschaften. Das Indol **35** wurde über eine alternative Spirozyklisierung, die die vinyloge Stabilisierung ausschaltet, synthetisiert und ist 420-fach weniger stabil sowie 500-fach weniger potent als Duocarmycin SA (**32**).

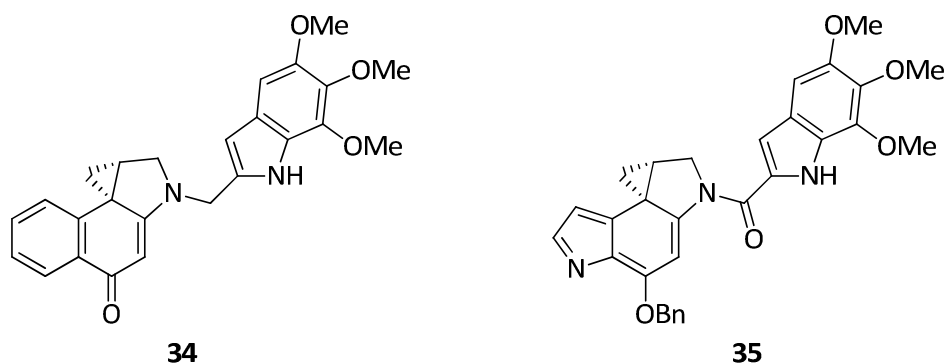


Abbildung 17. Verbindungen **34** ohne Amidfunktion und **35** aus einer alternativen Spirozyklisierung.

Wie neueste DFT-Berechnungen zeigen konnten, ist eine Aufhebung der vinylogenen Amidstabilisierung nicht allein entscheidend für die Alkylierungsselektivität der

beschriebenen Verbindungen.¹¹⁵ Untersuchungen zu Verbindungen mit unterschiedlichsten Reaktivitäten gegenüber Duplex-DNA haben eine ähnliche Verdrillung der Amidbindung gezeigt. Das Modell des Proximitätseffektes geht davon aus, dass nicht kovalente Bindungen mit den funktionellen Gruppen in der kleinen Furche der DNA für die Selektivität der Wirkstoffe verantwortlich sind. Hierdurch wird die Aktivierungsenergie im Vergleich zu einer nucleophilen Reaktion in Lösung vermindert und die Reaktivität somit erhöht.¹¹⁶

4.1 Analoga von (+)-CC-1065 und (+)-Duocarmycin SA

Obwohl sich (+)-CC-1065 (**31**) ($IC_{50} = 20 \text{ pM}$) und (+)-Duocarmycin SA (**32**) ($IC_{50} = 10 \text{ pM}$) durch enorm hohe Zytotoxizitäten auszeichnen, sind sie für eine klinische Anwendung ungeeignet. Verantwortlich hierfür sind die starken Nebenwirkungen, die sich im Fall von (+)-CC-1065 (**31**) bei Tierversuchen durch eine verzögerte letale Hepatoxizität gezeigt haben.¹¹⁷ Gleiches gilt für die Duocarmycine, die in therapeutisch wirksamen Dosen zu einer hohen Myelotoxizität geführt haben. Auf Grund dieser unerwünschten starken Nebenwirkungen wurden natürliche und synthetische Analoga der Duocarmycine untersucht, die eine vergleichbare Zytotoxizität zeigten. Bei den angestellten Untersuchungen konnten Nebenwirkungen wie die Myelo-suppression nachgewiesen werden, während das Phänomen der Hepatoxizität ausgeschlossen werden konnte.¹¹⁸ Auf Grund dieser Untersuchungen lässt sich festhalten, dass die beschriebene Hepatoxizität ein spezifisches Charakteristikum des Wirkstoffs (+)-CC-1065 (**31**), jedoch vom Wirkmechanismus unabhängig ist.¹¹⁹

Wie bereits erwähnt kommt, der Spirocyclopropylcyclohexadienon Struktur (CI) eine besondere Bedeutung zu, da sie in allen natürlich vorkommenden (CPI, DA, DSA) und den synthetisierten (z.B. CI, CBI, CBIQ, CPyl, MCBI und MCCPI) Analoga des (+)-CC-1065 (**31**) als pharmakophore Einheit vorliegt (Abbildung 18).¹²⁰

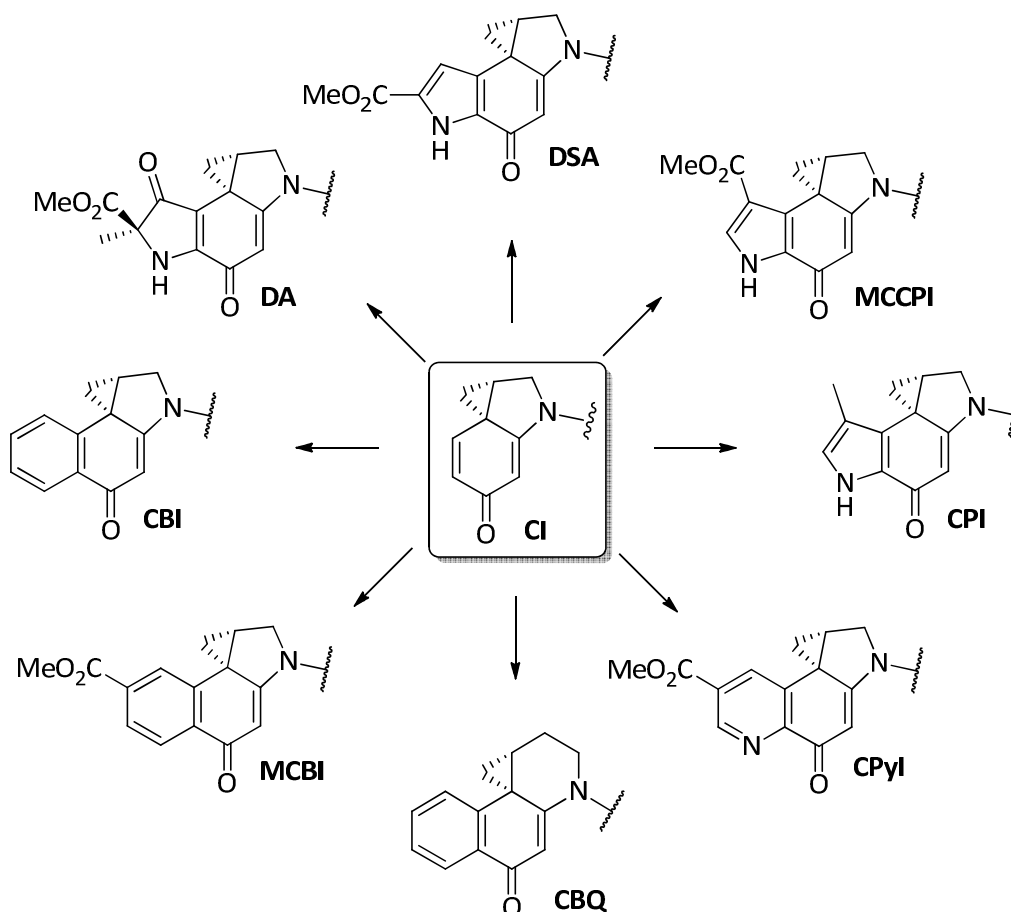


Abbildung 18. Analoga der aus Duocarmycin bekannten pharmakophoren Cyclopropylindol-Einheit.

Untersuchungen zur Struktur-Wirkbeziehung haben eine parabolische Beziehung zwischen der Zytotoxizität und der Solvolyseseinstabilität der pharmakophoren Einheit gezeigt.^{114,121} So sind chemisch stabile Verbindungen zytotoxischer, wobei gesagt werden muss, dass eine zu hohe Stabilität gegenüber einem nucleophilen Angriff wiederum zum Abfall der Zytotoxizität führt. Eine Ausgewogenheit zwischen der beschriebenen Solvolyseseinstabilität sowie der DNA-Alkylierung ist hierbei von entscheidender Bedeutung.

Neben der beschriebenen Variation des Pharmakophors wurde eine Variation der DNA-bindenden Einheit untersucht.^{119,122} Tabelle 1 zeigt die untersuchten DNA-bindenden Einheiten (TMI, MMI, Ind, (PDE)₂, (Ind)₂ und Boc) in Bezug auf ihre Zytotoxizität bei gleichzeitiger Variation des Pharmakophors (DSA, CPI und CBI).

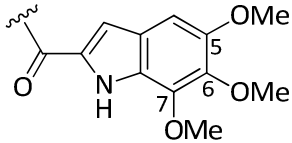
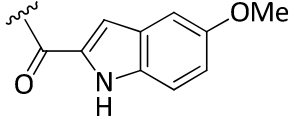
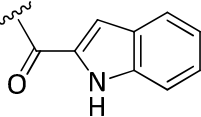
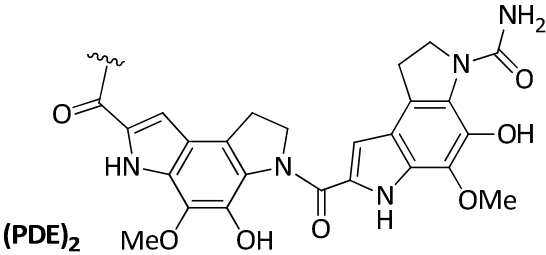
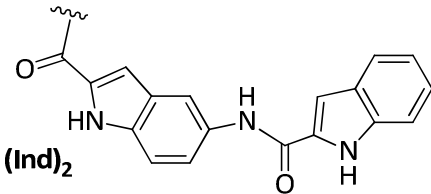
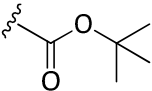
	DNA-bindende Einheit	IC ₅₀ (L1210) [pM]		
		DSA	CPI	CBI
1	TMI 	10	–	30
2	MMI 	12	–	–
3		65	200	5000
4	(PDE)₂ 	–	20	–
5	(Ind)₂ 	3	20–40	5–10
6		6×10^3	3.3×10^5	8×10^4

Tabelle 1. Einfluss der DNA-Binder auf die Zytotoxizität von DSA-, CPI- und CBI-Analoga.

Eine genaue Beobachtung der Ergebnisse aus Tabelle 1 zeigt, dass die Einführung eines Methoxysubstituenten in C-6- und C-7-Position des TMI nur zu einer sehr geringen Steigerung der Zytotoxizität führt, wohingegen eine Methoxygruppe an C-5 für eine hohe Zytotoxizität von entscheidender Bedeutung ist (Einträge 1–3).

Außerdem kann festgehalten werden, dass Bisindolderivate (Eintrag 4 und 5) eine um den Faktor drei bis sechs höhere Toxizität aufweisen, während Verbindungen ohne DNA-bindende Einheit (Eintrag 6) 1000- bis 10000-fach weniger zytotoxisch sind.

Sowohl der Austausch der DNA-bindenden Einheit als auch der Austausch des Pharmakophors hat einen Einfluss auf die Aktivität des Wirkstoffes. So zeigt der Austausch von CPI durch CBI eine Erhöhung der Zytotoxizität, was durch die geringere Ringspannung und die damit einhergehende höhere Stabilität erklärt werden kann (Eintrag 5).^{119b,123}

Ein weiteres wichtiges Merkmal für die Einstufung der Zytotoxizität ist im Vergleich der Konfigurationen verschiedener Wirkstoffe zu finden.¹²⁴ Dementsprechend zeigen die natürlichen Konfigurationen höhere (z.B. Duocarmycin A Faktor 110) oder ähnliche (z.B. CC-1065) Aktivitäten, als die entsprechenden nicht natürlichen Enantiomere (Abbildung 19).

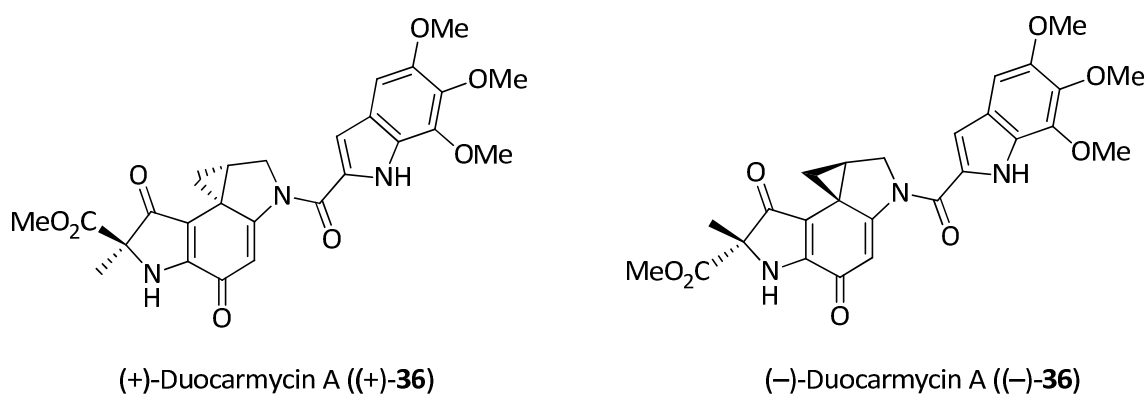


Abbildung 19. (+)-Duocarmycin A ((+)-**36**) und (-)-Duocarmycin A ((-)-**36**).

Während die natürlichen vorkommenden Enantiomere die Duplex-DNA durch das Adenin-N-3 am 3'-Ende einer AT-reichen Region alkyliert werden, zeigen die entsprechenden unnatürlichen Enantiomere eine Alkylierung am 3'-Ende des komplementären Strangs, da es auf Grund der andersartigen Konfiguration des Wirkstoffes zu einer entgegengesetzten Orientierung des Drugs in der AT-reichen Region kommt.¹¹⁹

Zu den bekanntesten Vertretern der synthetischen Duocarmycin-Analoga gehören auf Grund ihrer ausgezeichneten *In-vitro*-Ergebnisse Adozelesin (**37**),¹²⁵ Carzelesin (**38**),¹²⁶ Bizelesin (**39**)¹²⁷ und KW-2189 (**40**)¹²⁸ (Abbildung 20). Obwohl bei allen Wirkstoffen eine signifikante Anti-Tumor-Response beobachtet werden konnte, mussten die Studien für alle Kandidaten mit Ausnahme von Bizelesin (**39**) eingestellt

werden, da die Wirkstoffe bei Applikation therapeutischer Dosen eine ausgeprägte Myelotoxizität zeigten.¹²⁵⁻¹²⁸

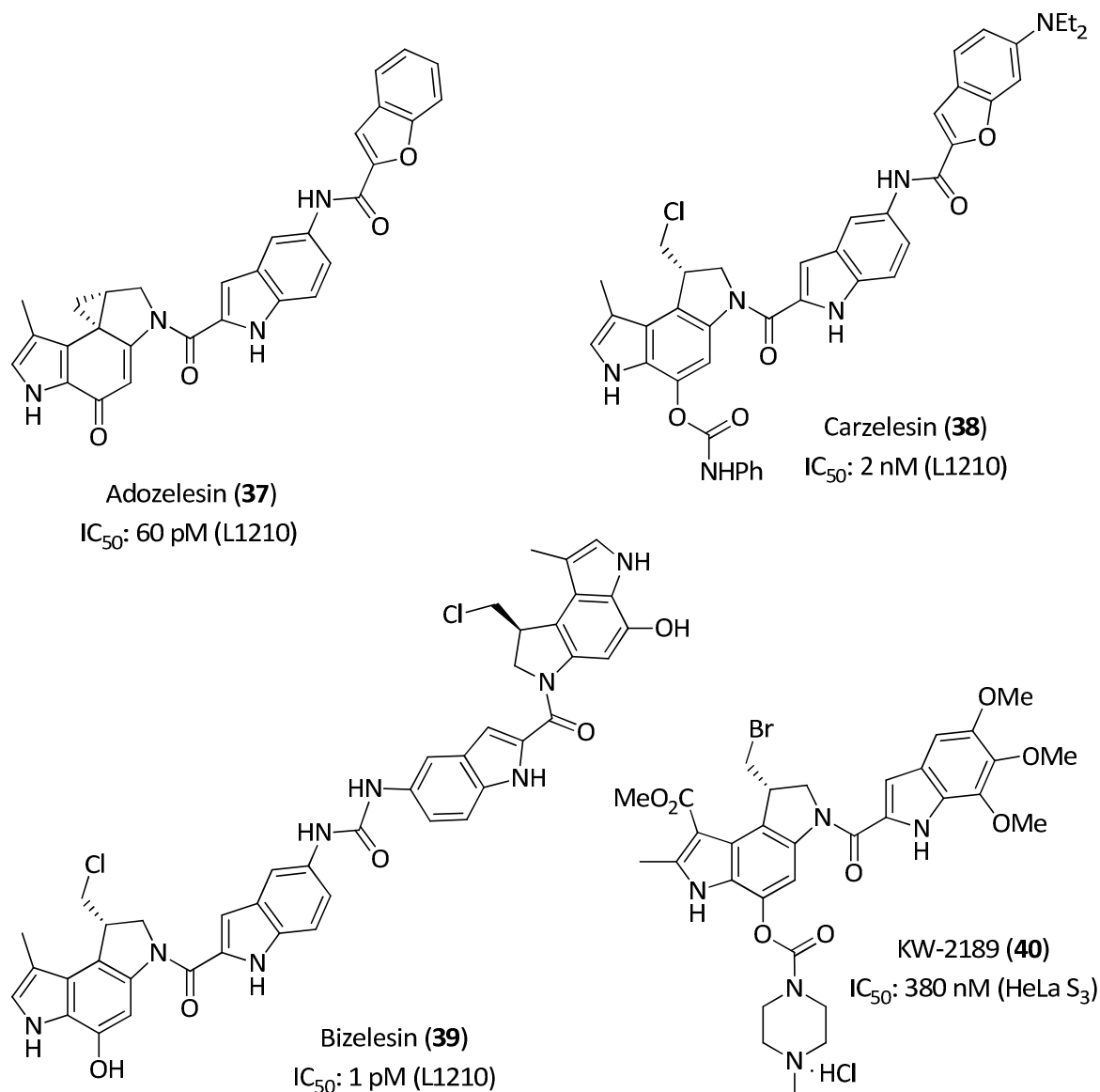


Abbildung 20. Duocarmycin-Analoga aus klinischen Phasen: Adozelesin (**37**), Carzelesin (**38**), Bizelesin (**39**) und KW-2189 (**40**).

4.2 *Seco*-Verbindungen und Prodrugs einiger Duocarmycin-Analoga

Obwohl die strukturverwandten Verbindungen **41** und **43** keine Spirocyclopropyl-einheit aufweisen, haben sie dennoch eine ähnliche Zytotoxizität gezeigt wie CC-1065 (**31**) und die Duocarmycine (**32** und **36**).^{4d,119} Auf Grund dieser Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass der für die Aktivität verantwortliche Cyclopropanring *in situ*

aus den *seco*-Verbindungen über eine *Winstein*-Aryl-3'-Spirozyklisierung gebildet wird (Abbildung 21).¹²⁹ Im Anschluss daran erfolgt die wirkstofftypische Alkylierung der DNA durch das CBI-Drug **42**. Von entscheidender Bedeutung ist die phenolische Hydroxyfunktion, da sie für die Zyklisierung unabdinglich ist und eine Blockade dieser Funktion zu einem Verlust der Toxizität führen sollte. Diese Blockade führt zur Ausbildung sogenannter detoxifizierter Prodrugs.¹³⁰

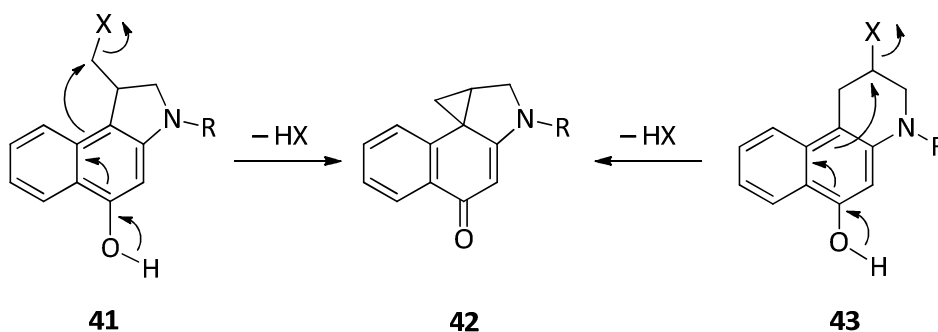


Abbildung 21. *Winstein*-Aryl-3'-Spirozyklisierung der *seco*-CBI-Derivate **41** und **43** unter Abspaltung von HX.

4.2.1 Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen

Denny et al. konnten Analoga der Duocarmycine darstellen, die im Rahmen der GDEP-Therapie angewendet wurden. Sie nutzten eine genetische Veränderung der Krebszellen durch eine Transfizierung mit einem Vektor, der dazu führt, dass das Enzym Nitroreduktase überexprimiert wurde. So können die applizierten Prodrugs selektiv im Krebsgewebe zu den entsprechenden *seco*-Drugs umgesetzt werden.¹³¹

Bei dem von *Denny et al.* verfolgten Ansatz wird ein durch Carbamat blockiertes Amino-*seco*-CBI-Derivat **44** in Kombination mit TMI als DNA-bindende Einheit verwendet. Nach Abspaltung der detoxifizierenden Einheit durch Nitroreduktase zu **45** und anschließender Hydrolyse wird das *seco*-Drug **46** gebildet, welches im Anschluss eine zum CBI analoge *Winstein*-Spirocyklisierung eingehen kann (Abbildung 22).

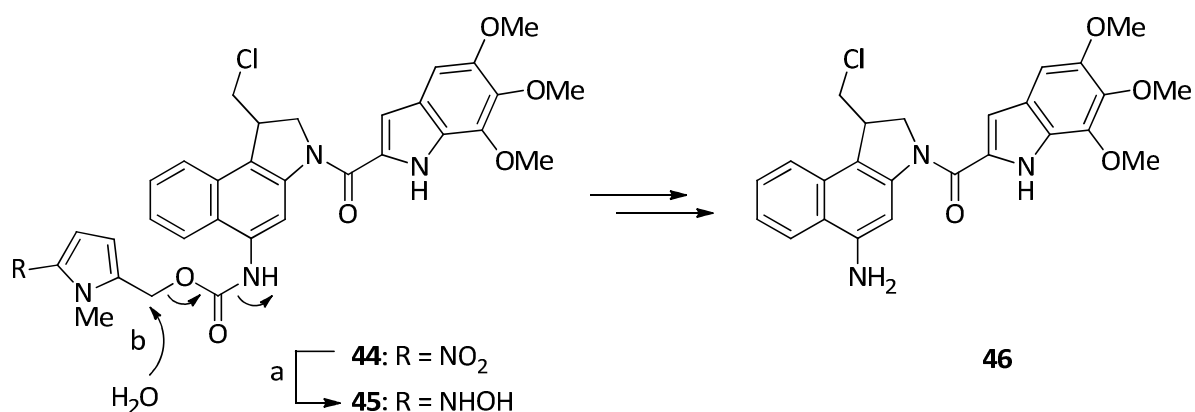


Abbildung 22. Reduktion des Prodrugs **44** durch Nitroreduktase (a) zu **45** und folgender Hydrolyse zum *seco*-Drug **46** (b).

Leider lieferte dieser vielversprechende Ansatz nicht die gewünschten Ergebnisse. Das Prodrug **44** zeigt bei Nitroreduktase-transfizierten Ovarialkarzinomzellen (SKOV-3) nur eine etwa 20-fach höhere Zytotoxizität als bei entsprechenden nicht-transfizierten Zellen. Man kann daher von einer unvollständigen Aktivierung des Prodrugs durch Nitroreduktase ausgehen, woraufhin *Denny et al.* neue 4-Nitrobenzyl-Carbamat-Prodrugs entwickelten, die jedoch nur eine therapeutische Breite von bis zu 87 zeigten.¹³²

Wie *Denny et al.* synthetisierten auch *Boger et al.* CBI-Prodrugs, die durch eine Carbamat-Funktion blockiert sind. Im Gegensatz zu *Denny* nutzte *Boger* jedoch die phenolische OH-Gruppe statt der Aminfunktion. Eine Freisetzung und damit Aktivierung der OH-Funktion sollte durch reduzierende Nucleophile erfolgen, die die schwache N-O-Bindung spalten.¹³³ Eine nicht ausreichende Differenzierung zwischen Prodrug und *seco*-Drug zeigte sich *in vitro* durch eine nur 37-fach stärkere zytotoxische Wirkung des entsprechenden *seco*-Drugs.

4.2.2 Forschungsergebnisse aus dem Arbeitskreis *Tietze*

In den letzten Jahren konnten verschiedene Analoga des Duocarmycins und CC-1065 synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität hin untersucht werden.^{4,134,135} Dabei haben sich eine Anwendung in Bereichen des ADEPT- sowie des PMT-Konzeptes

herauskristallisiert. Im Gegensatz zu vielen anderen Ansätzen werden in diesen Fällen Glykoside als detoxifizierende Einheit genutzt. Prodrugs wie **47a-g** und **48-50** können im Rahmen von ADEPT durch Antikörper-Glycohydrolase-Konjugate sowie im Rahmen von PMT zum Beispiel durch tumorassoziierte β -D-Glucuronidase zu den entsprechenden *seco*-Drugs **51-54** umgesetzt werden, die im Anschluss *in situ* die bereits beschriebene *Winstein*-Zyklisierung zu **55-58** eingehen (Abbildung 23).

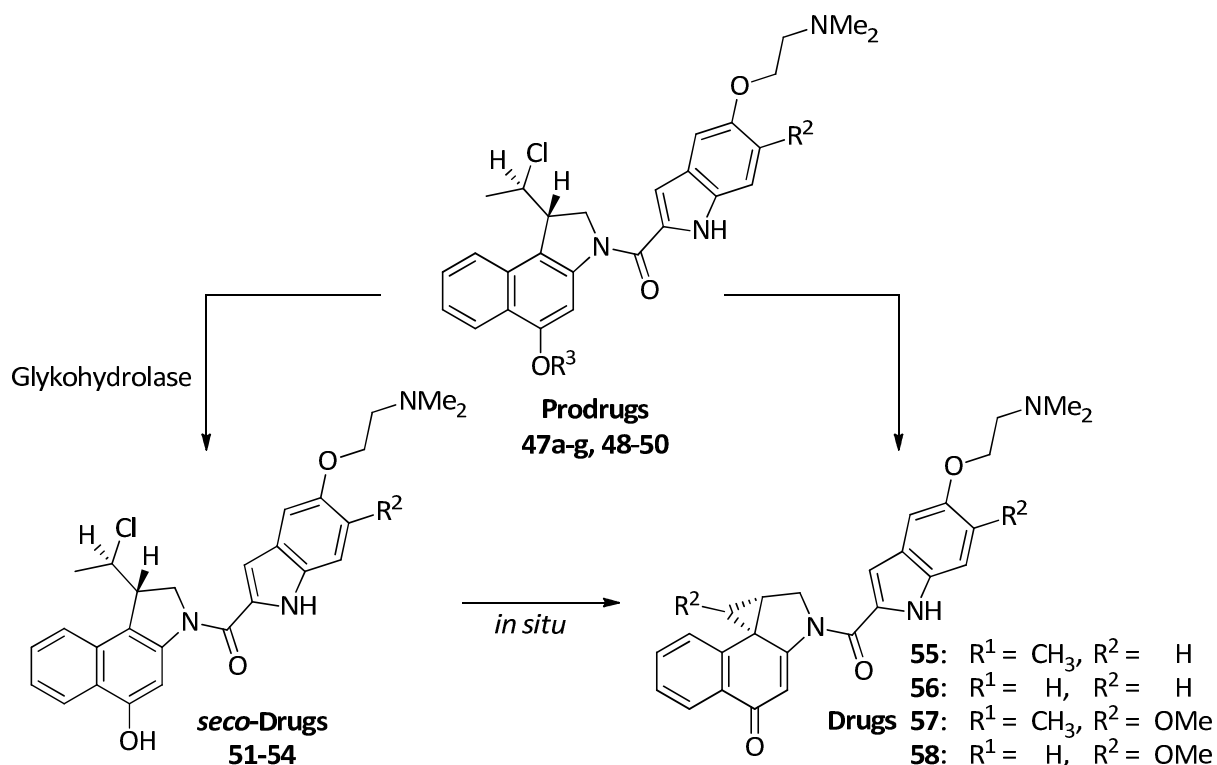


Abbildung 23. Glykosidische Prodrugs als Analoga des zytotoxischen Duocarmycin (**32**) aus dem Arbeitskreis Tietze.

Im Mittelpunkt der Forschung der Arbeitsgruppe Tietze steht eine hohe therapeutische Breite mit $QIC_{50} > 1000$ sowie eine hohe biologische Aktivität der entsprechenden *seco*-Drugs ($IC_{50} < 10$ nM). Neueste Untersuchungen erfolgten an CBI- und *anti-Methyl*-CBI als Pharmakophor sowie verschiedenen DNA-bindenden Einheiten in Kombination mit einer Variation von verschiedenen Glykosiden (Abbildung 23).

Unterschieden werden kann hier vor allem zwischen CBI- und *anti-methy*-CBI-Derivaten, da die Einführung einer Methylgruppe die sterische Hinderung am

Spirocyclopropylsystem erhöht und damit eine geringere Zytotoxizität der entsprechenden Verbindungen begründet.

Tabelle 2 zeigt die ermittelten *In-vitro*-Zytotoxizitäten ausgewählter Prodrugs und *seco*-Drugs an der humanen Bronchialkarzinomzelllinie A549.

	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ o.E. [nM] ^[a]	IC ₅₀ m.E. [nM] ^[a]	QIC ₅₀ ^[b]
PRODRUGS						
47a	CH ₃	H	β -D-Galaktosyl	3600	0.75	4800
47b	CH ₃	H	α -D-Mannosyl	2700	0.60	4500
47c	CH ₃	H	β -D-Glucosyl	2000	1.90	1050
47d	CH ₃	H	β -D-Cellobiosyl	2400	2.60	920
47e	CH ₃	H	β -D-Lactosyl	2700	2.10	1290
47f	CH ₃	H	β -D-Glucuronyl	610	0.90	700
47g	CH ₃	H	β -D-Methyl-glucuronyl	3300	2.10	1600
48	H	H	β -D-Galaktosyl	56.0	0.016	3500
49	CH ₃	OMe	β -D-Galaktosyl	940	0.22	4300
50	H	OMe	β -D-Galaktosyl	9.5	0.005	2100
SECO-DRUGS						
51	CH ₃	H	H	–	0.75	–
52	H	H	H	–	0.026	–
53	CH ₃	OMe	H	–	0.20	–
54	H	OMe	H	–	0.009	–

Tabelle 2. Ergebnisse der *In-vitro*-Zytotoxizitätstests der glykosidischen Prodrugs (**47a-g** und **48-50**) und *seco*-Drugs (**51-54**). [a] Bestimmung der IC₅₀-Werte mittels Klonogenitätsassays an der Lungenkrebszelllinie A549; [b] QIC₅₀ = IC₅₀ des Prodrugs / IC₅₀ des Prodrugs in Anwesenheit des spaltenden Enzyms. o.E. = ohne Enzym, m.E. = mit Enzym.

Auffällig sind hierbei vor allem die direkten Einflüsse der DNA-bindenden Einheit sowie des Glykosides auf die Zytotoxizität der *seco*-Drugs und die therapeutische Breite der Prodrugs. Bei der Betrachtung der DNA-bindenden Einheit fällt auf, dass die besten Ergebnisse mit DMAI (R² = H) sowie DMMI (R² = OMe) erzielt werden

konnte. Ein entscheidender Vorteil der genannten DNA-Binder liegt in der Möglichkeit durch Anwesenheit eines tertiären Amins eine Salzbildung zu formulieren, die die Wasserlöslichkeit der Verbindung erhöht.

Vergleicht man das *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI- β -D-Galaktosid **47a** und das *seco*-CBI-DMAI- β -D-Galaktosid **48**, fällt auf, dass beide einen hervorragenden QIC₅₀-Wert liefern (**47a**: 4800, **48**: 3500), wobei das zu **48** entsprechende *seco*-Drug **52** mit einem IC₅₀-Wert von 26 pM den des *anti*-Methyl-*seco*-Drugs **51** um den Faktor 29 übersteigt.¹³⁶

Des Weiteren wurden Derivate synthetisiert, bei denen die Variation des Glykosides im Vordergrund stand. Hierdurch konnten sehr gute Resultate mit dem α -D-Mannosid **47b** (QIC₅₀ von 4500) erzielt werden, während Disaccharid-Prodrugs (**47d** und **47e**) auf Grund einer unvollständigen enzymatischen Aktivierung nur moderate bis gute QIC₅₀-Werte lieferten. Für den Einsatz in einer Prodrug-Mono-Therapie (PMT) wurden das Glucuronid **47f** (QIC₅₀ = 700) und dessen Methylester **47g** (QIC₅₀ = 1600) entwickelt.¹³⁷

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus' der im Arbeitskreis *Tietze* synthetisierten Analoga des Duocarmycin wurden ESI-FTICR-MS-Experimente (*electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*), CD-Spektroskopie sowie HPLC-Untersuchen durchgeführt.¹³⁸

Hierbei wurde bestätigt, dass die *seco*-Drugs **51** und **52** als Analoga der Duocarmycine sowie die daraus resultierenden Drugs **55** und **56** AT-reiche Regionen in synthetischen Doppelstrang-DNA-Oligonucleotiden selektiv alkylieren. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Glutathion (Modellpeptid), RNA-Oligonucleotide sowie Einzelstrang-DNA kein Ziel für die Duocarmycine darstellt.

Auffällig war vor allem der Unterschied in der Alkylierungseffizienz von Duplex-DNA durch Methyl-CBI **55** und CBI **56**. So weist das bioaktivere **56** eine deutlich geringere Alkylierungseffizienz auf als **55**, was darauf schließen lässt, dass Zytotoxizität und DNA-Alkylierungseffizienz nicht in direktem Zusammenhang stehen.

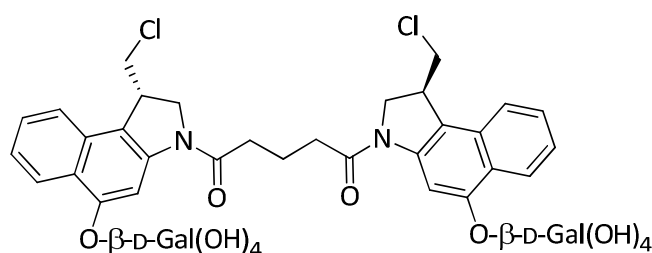
Es konnte gezeigt werden, dass das aktive CBI-Drug **56** langsamer aus **52** gebildet wird als das entsprechende Methyl-CBI-Drug **55** aus **51**. Begründet wird dies mit einer

Stabilisierung des *seco*-CBI-Drugs **52** durch nicht kovalente Wechselwirkungen mit der DNA, was eine verzögerte Zyklisierung und eine damit einhergehende geringere Alkylierungseffizienz zur Folge hat. Somit kann eine direkte Korrelation zwischen der Zytotoxizität und der Stabilisierung des *seco*-Drugs bestätigt werden.

Die höhere Zytotoxizität kann durch eine „Überstabilisierung“ des Doppelstranges und einer daraus resultierenden Verhinderung von Reparaturmechanismen, Replikation und Transkription erklärt werden.

Die beobachtete Selektivität der synthetisierten Analoga der Duocarmycine ist in erster Linie durch Proximitätseffekte zu erklären. So können die dargestellten *seco*-Drugs besonders gut in AT-reiche Regionen der kleinen Furche einlagern, wobei die Alkylierung der DNA lediglich einer irreversiblen Fixierung dient.^{138e}

Neueste Untersuchungen zu bifunktionalen Prodrugs vom Typ **59** zeigen extrem hohe QIC₅₀-Werte von bis zu einer Million und eine sehr hohe Zytotoxizität der *seco*-Drugs bis in den femtomolaren Bereich (Abbildung 24).¹³⁹ Diese extrem hohen Zytotoxizitäten wurden zunächst mit DNA-Inter- oder Intrastrangvernetzung begründet.¹⁴⁰ Untersuchungen der *seco*-Drugs durch ESI-FTICR-MS- und CD-Spektroskopie konnten allerdings keine Alkylierung der DNA nachweisen. ABPP-Studien (activity based protein profiling) konnten den Wirkmechanismus aufklären und zeigten das in Krebszellen überexprimierte Protein ADH-A1 als spezifisches Target.

**59**

IC₅₀ o.E. = 146 nM (A549)

IC₅₀ m.E. = 0.15 pM (A549)

QIC₅₀ = 970 000

Abbildung 24. Bifunktionales Galaktosyl-Prodrug **59** mit einem QIC₅₀-Wert von 970000.

5 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) & Optical Imaging

5.1 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

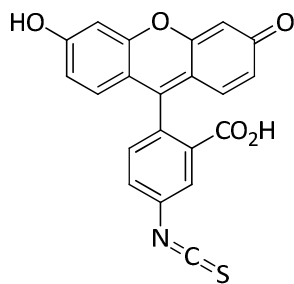
Das seit mehreren hundert Jahren bekannte Phänomen der Fluoreszenz konnte vor allem in den letzten Jahrzehnten auf Grund der Weiterentwicklung von Lasern und hochsensitiven Sensoren zur Aufklärung von Wirkmechanismen beitragen. Neben der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie erfreut sich die *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM) steigender Beliebtheit. Fluoreszenzmikroskopie im Allgemeinen nutzt die Eigenschaft organischer Moleküle (Fluorochrom), mit Licht bestimmter Wellenlänge in einen angeregten Zustand angehoben zu werden.¹⁴¹ Beim Relaxieren aus eben diesem angeregtem Zustand wird unter Abgabe eines Lichtquants der Grundzustand erreicht.

So können von Natur aus fluoreszierende (autofluoreszierende) Verbindungen (z.B. GFP und Chlorophylle¹⁴²), synthetisch hergestellte Konjugate (z.B. FITC-Derivate **60**, Dapoxyl-Derivate **61**, Cumarin-Derivate **62** und Benzothiazol-Derivate **63**) oder durch Gentransfektion mit einem Fluorochrom markierte Verbindungen¹⁴³ in Zellen sichtbar gemacht werden, um die Aufnahme der Substanz *in vitro* an lebenden Zellen zu untersuchen.

Eine genaue Aussage der Zuordnung bestimmter Zellregionen kann erst nach einer erfolgten Kolo-kalisation erfolgen. Hierbei wird die bereits mit der fluoreszierenden Substanz behandelte Zelle zusätzlich mit sogenannten Markern behandelt. Auf Grund der bereits gemachten Untersuchungen kann eine Auswahl an zelltypischen Markern erstellt werden. Häufig werden Zellkernmarker (z.B. Hoechst 33342 **64**)¹⁴⁴ und Mitochondrienmarker (z.B. MitoTracker Deep Red 633 FM **65**)^{145,146} verwendet (Abbildung 25).

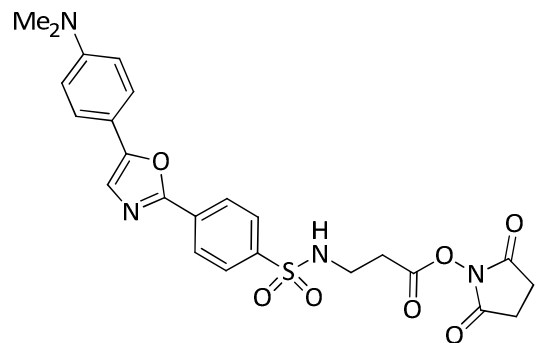
Die Wahl des verwendeten Fluorochroms gestaltet sich hierbei allerdings deutlich schwieriger. Hierbei müssen zum Einen die Eigenschaften der Fluoreszenz (Anregungs- und Emissionswellenlänge sowie Quantenausbeute) und zum Anderen

die chemischen Eigenschaften im Hinblick auf Ladung und Hydrophilität beachtet werden. Ebenso wichtig ist eine Anpassung des Markers an den verwendeten Fluorochrom. Hierbei muss eine Überschneidung der Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen vermieden werden, da sonst keine klare Aussage über die Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Substanz gemacht werden kann. Auf Grund der Vielzahl der heute erhältlichen Fluorochrom ist eine derartige Unterscheidung häufig zu realisieren.¹⁴⁷



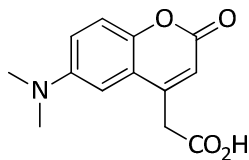
FITC (60)

$\lambda_{\text{max, Abs.}} = 490 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{max, Em.}} = 520 \text{ nm}$



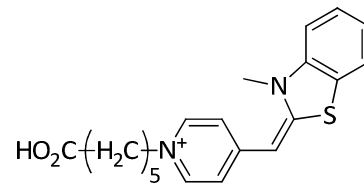
D10162 (61)

$\lambda_{\text{max, Abs.}} = 373 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{max, Em.}} = 574 \text{ nm}$



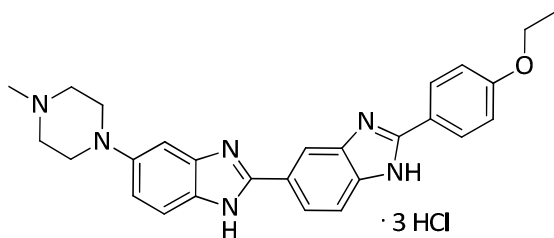
DMACA (62)

$\lambda_{\text{max, Abs.}} = 346 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{max, Em.}} = 460 \text{ nm}$



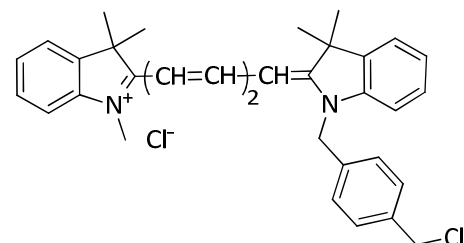
BO (63)

$\lambda_{\text{max, Abs.}} = 346 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{max, Em.}} = 460 \text{ nm}$



Hoechst 33342 (64)

$\lambda_{\text{max, Abs.}} = 346 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{max, Em.}} = 460 \text{ nm}$



MitoTracker Deep Red 633 FM (65)

$\lambda_{\text{max, Abs.}} = 644 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{max, Em.}} = 665 \text{ nm}$

Abbildung 25. Die Fluoreszenzfarbstoffe FITC (60), D10162 (61), DMACA (62) und BO (63) sowie die Colokalisationsfarbstoffe Hoechst 33342 (64) zur Zellkernfärbung und der Mitochondrienfarbstoff MitoTracker® Deep Red 633 FM (63).

Untersuchungen zur Bindungskinetik von fluoreszenzmarkierten Antikörper- β -D-Galaktosidase-Konjugaten konnten im Arbeitskreis von *F. Alves* erfolgreich durchgeführt werden. So konnte das FITC-markierte *anti-uPAR- β -D-Galaktosidase-Konjugat* die Theorie des ADEPT-Konzeptes *in vitro* bestätigen.¹⁴⁸

Das applizierte Konjugat bindet nach 0.5 h spezifisch an das in Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231) überexprimierte Antigen uPAR und erreicht nach 65 Stunden eine stabile Bindung (Abbildung 26). Da eine Internalisierung des Konjugates nicht beobachtet wurde und die behandelten Zellen bis zu einer Inkubationszeit von 65 h vital blieben, konnte bestätigt werden, dass sich das *anti-uPAR- β -D-Galaktosidase-Konjugat* für einen Einsatz im Rahmen des ADEPT-Konzeptes für *In-vitro*-Untersuchungen sehr gut eignet.

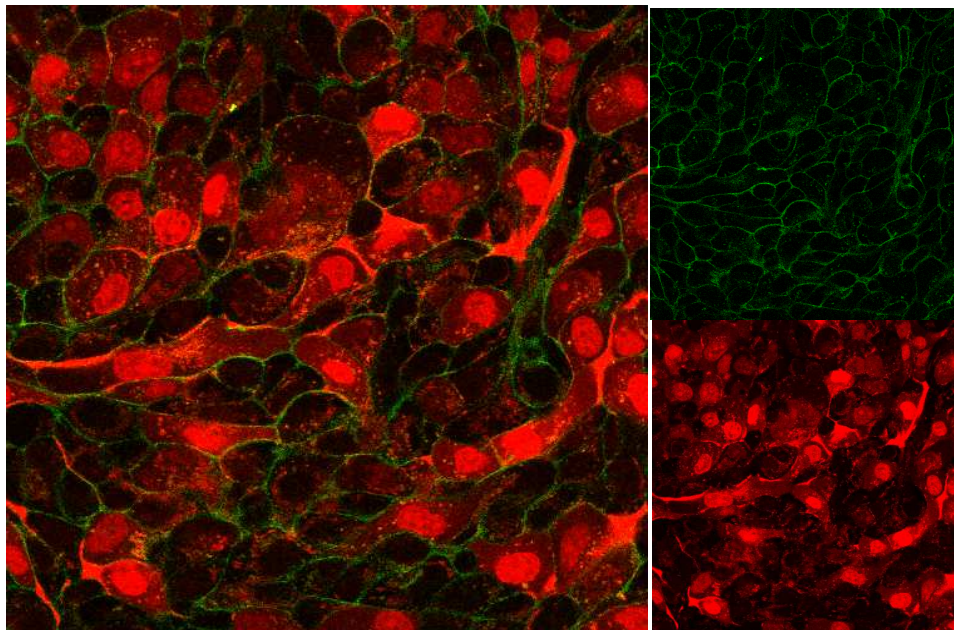


Abbildung 26. Fluoreszenzmikroskopische *In-vitro*-Untersuchung zur Bindung des FITC-markierten *anti-uPAR- β -D-Galaktosidase-Konjugates* (grün) an die Zellmembranen von MDA-MB-231-Zellen. Die DNA der Zellkerne und die RNA im Zytosol wurden mit Syto 61 (rot) angefärbt.

5.2 Optical Imaging

Um die *in vitro* durch CLSM gemachten Untersuchungen auch *in vivo* zu bestätigen, kann das Verfahren des *Optical Imaging* eingesetzt werden, um die applizierte

fluoreszenzmarkierte Verbindung so zu untersuchen, dass neue Einblicke über den Wirkort und -mechanismus in lebenden Zellen, Geweben und Organismen erhalten werden.^{149,150,151}

Eine Auswahl des Fluorochroms ist auch hier von entscheidender Bedeutung, da das Gewebe des Tieres ein besonderes Hindernis darstellt. Bis zu einer Absorptionswellenlänge von $\lambda_{\max, \text{Abs.}} = 650 \text{ nm}$ kommt es zu einer starken Absorption des Laserstrahls durch das Gewebe und zu einer unerwünschten Autofluoreszenz.¹⁵²

Die angesprochenen Limitierungen der Fluorochrome können durch die richtige Wahl der Absorptions- und Emissionswellenlängen im roten bzw. infraroten Bereich (650–900 nm) ausgeschlossen werden. Häufig eingesetzte Fluorochrome sind Derivate von Cy5.5 (**66**), das mit $\lambda_{\max, \text{Abs.}} = 675 \text{ nm}$ und $\lambda_{\max, \text{Em.}} = 694 \text{ nm}$ die notwendigen Eigenschaften mitbringt (Abbildung 27).

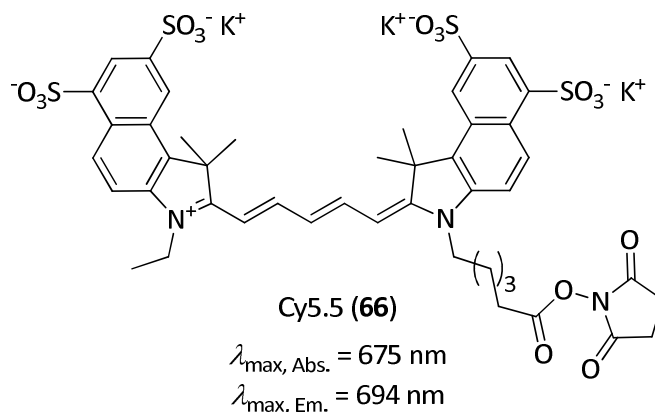


Abbildung 27. Der Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5 (**66**) für Anwendungen im *Optical Imaging*.

Neben der angesprochenen Möglichkeit, Fluoreszenz als bildgebende Eigenschaft der zu untersuchenden Substanzen zu nutzen, kann auch das Phänomen der Lumineszenz genutzt werden. Beim *Bioluminescence Imaging* wird ein spezielles Luziferin-Substrat enzymatisch durch das lichtgenerierende Enzym Luziferase aktiviert. Als Vorteil dieser Messmethode gilt die hohe Spezifität (schwaches Hintergrundsignal), während die geringe Intensität und die damit verbundene lange Messzeit als Nachteil angesehen werden können. Nach der erfolgten Transfizierung eines Gens des Luziferase-Enzyms in das Tumorgewebe kann eine Konjugation der Farbstoffe mit kleinen Molekülen,

Antikörpern oder AEC genutzt werden, um neue Erkenntnisse in Bezug die Wirkweise von Antikörper-Enzym-Konjugaten und Prodrugs des ADEPT-Konzeptes zu erhalten.

Durch Anwendung dieser *Optical-Imaging*-Methode konnten *Alves et al.* Cy5.5-markierte Antikörper-Enzym-Konjugate *in vivo* untersuchen.¹⁴⁸

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, konnten nach der Applikation des AEC starke Fluoreszenzsignale im Tumorbereich (rechte Brustdrüse) gemessen werden (B-J), während die gemessene Fluoreszenz im Darmbereich (A) als Hintergrundfluoreszenz betrachtet werden kann. Da die Messungen gezeigt haben, dass eine Bindung des AEC nach 3-7 Tagen maximal ist und bis zum 11. Tag wieder abnimmt, wird eine Gabe des Prodrugs 7 Tage nach der Applikation des AEC empfohlen.

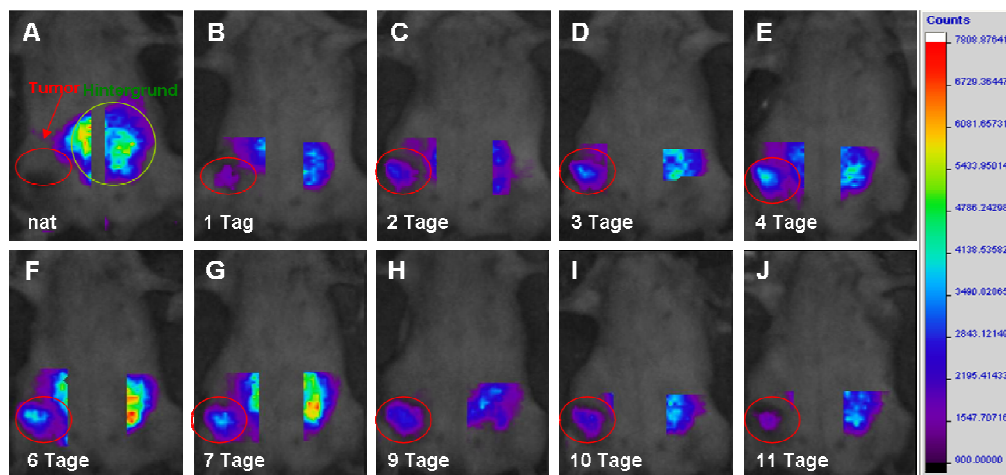


Abbildung 28. Zeitabhängige Bindung des Cy5.5-markierten anti-uPAR-β-D-Galaktosidase-Konjugates an MDA-MB-231-Tumorzellen in SCID-Mäusen. A: nativer Scan vor der Verabreichung des Cy5.5-markierten anti-uPAR-β-D-Galaktosidase-Konjugates, B–J: Scans zu den angegebenen Zeitpunkten nach Applikation des anti-uPAR-β-D-Galaktosidase-Konjugats

6 Zielsetzung der Arbeit

Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits erläutert, stellt eine selektive Behandlung maligner Zellen mit nur geringer Beeinträchtigung gesunder Zellen eine der größten Herausforderungen für die moderne Wirkstoffforschung dar. So werden Wirkstoffe, die auf das Merkmal der schnelleren Proliferation von Tumorzellen zurückgreifen, häufig nicht mehr weiter entwickelt, sondern eine Anwendung dieser Zytostatika z.B. im Rahmen der Konzepte ADEPT und PMT vorangetrieben. Hierdurch wird vor allem versucht, die starken Nebenwirkungen zu unterbinden, die häufig einen Abbruch der Therapie erforderlich machen.

Im Rahmen von ADEPT (Antibody-Directed Prodrug Therapy) und PMT (Prodrug Mono Therapy) können relativ untoxische Substanzen (sogenannte Prodrugs) selektiv im Krebsgewebe in den eigentlichen Wirkstoff und damit das toxische Drug überführt werden. In diesem Zusammenhang ist eine Erwähnung der therapeutischen Breite von besonderer Bedeutung. So kann zwischen der detoxifizierten Variante des Drugs und dem daraus resultierenden toxischen Drug unterschieden werden. Der hierfür gebräuchliche Index wird als QIC_{50} beschrieben und ist der Quotient aus dem IC_{50} in Abwesenheit des spaltenden Enzyms und dem IC_{50} in Anwesenheit des Enzyms definiert. Auf Grund dieser Möglichkeit zur Klassifizierung wird ein Wirkstoff mit einem $QIC_{50} > 1000$ für das Prodrug (therapeutische Breite) und einem $IC_{50} < 10$ nM des resultierenden Drugs (systemische Toxizität) als möglicher Kandidat für eine Anwendung im Rahmen der Konzepte ADEPT und PMT betrachtet.^{4,52,95} Während bei der Anwendung des ADEPT-Konzeptes Antikörper-Enzym-Konjugate (AEC) genutzt werden, um die „detoxifizierten“ Prodrugs selektiv im Tumorgewebe zu den entsprechenden Drugs umzusetzen, werden im Rahmen der Prodrug-Mono-Therapie tumorspezifische Eigenschaften, wie z.B. ein erniedrigter pH-Wert oder überexprimierte Enzyme wie β -D-Glucuronidase genutzt, um das Prodrug in das Drug zu überführen.

Im Arbeitskreis *Tietze* konnten in den letzten Jahren hervorragende Ergebnisse mit glykosidierten *seco*-CBI- und *anti*-Methyl-*seco*-CBI-Analoga (1*S*)-**48** und (1*S*,10*R*)-**47a** (Abbildung 29) des zytotoxischen Duocarmycins (**32**) erreicht werden.

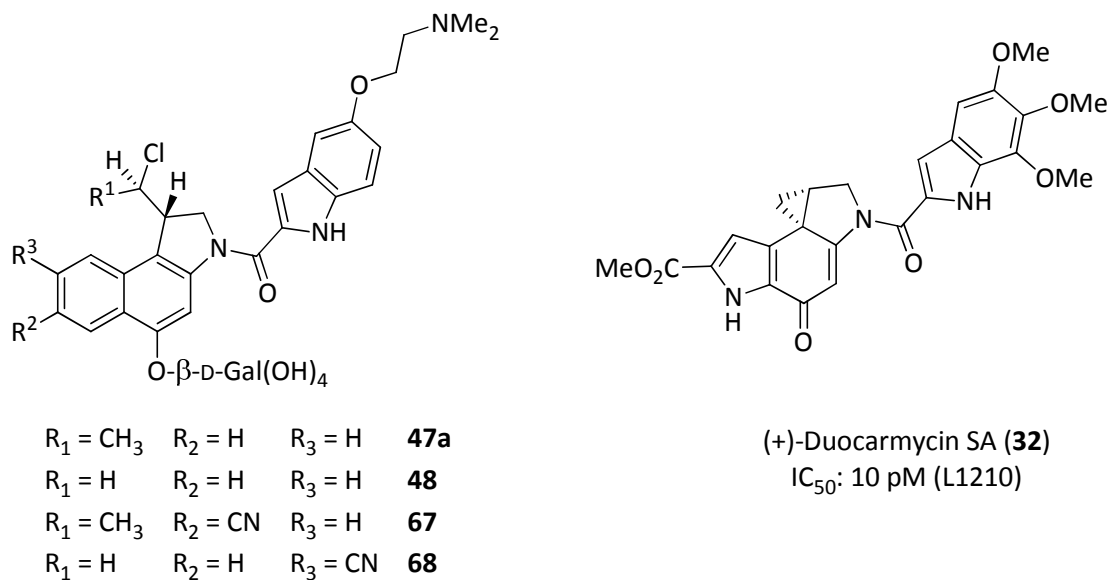


Abbildung 29. Im Arbeitskreis *Tietze* entwickelte *seco*-CBI-Analoga **48** und **68** sowie die *anti*-Methyl-*seco*-CBI-Analoga **47a** und **67** des zytotoxischen Antibiotikums (+)-Duocarmycin SA (**32**).

Ziel der Arbeit war es, neue fluoreszenzmarkierte *seco*-CBI- sowie *anti*-Methyl-*seco*-CBI-Analoga für Untersuchungen im Rahmen von *Live Cell Imaging* darzustellen, um weitere Aufschlüsse über den Wirkort der Duocarmycin-Analoga innerhalb des ADEPT-Konzeptes zu erhalten.

In Anlehnung an Arbeiten von *F. Major*^{5c} und *B. Krewer*^{5a} sollten *seco*-CCBI- und *anti*-Methyl-*seco*-CCBI-Analoga **68** und **67** als Vorläufer für eine Fluoreszenzmarkierung durch FITC (**60**) und Dapoxyl-Derivat **61** an der eingeführten Aminofunktion synthetisiert werden.

Ebenso sollten neuartige fluoreszenzmarkierte *seco*-CBI-Analoga des (+)-Duocarmycins SA (**32**) synthetisiert werden, die als Substrate für das Enzym β -D-Galaktosidase dienen können. Bei diesem neuen Ansatz sollte der bis dahin verwendete DNA-Binder DMAI (**104**) durch einen fluoreszenzaktiven DNA-Binder aus der Klasse der Cumarine, wie DMACA (**62**), und der Klasse der Benzothiazole, wie BO (Benzothiazole Orange) (**63**), ersetzt werden.

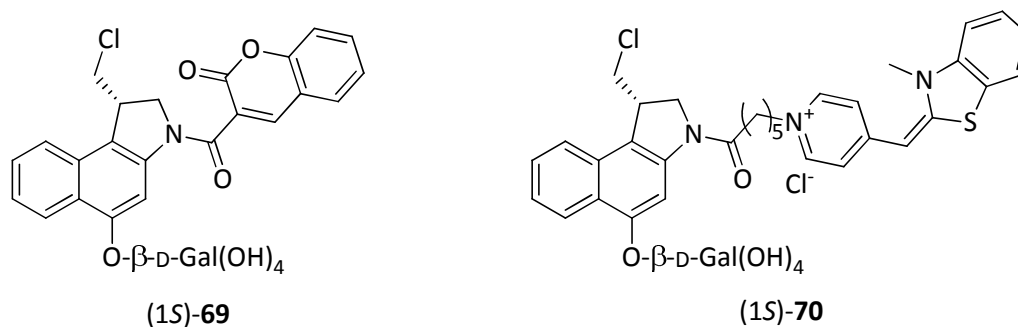


Abbildung 30. Neuartige fluoreszenzmarkierte *seco*-CBI-Galaktoside (1S)-69 und (1S)-70 als Analoga des zytotoxischen Antibiotikums Duocarmycin (32) durch Verwendung von Cumarin-3-Carbonsäure (131) und BO (63) als DNA-Binder.

Die Farbstoffe sollten eine langwellige Fluoreszenz-Absorption besitzen, um ein *Optical Imaging* im Tier zu ermöglichen. Eine weitere Herausforderung bestand in der richtigen Auswahl der möglichen Fluoreszenzmarker in Hinblick auf ihre DNA-bindenden Eigenschaften in AT-reichen Regionen. Ein Ziel war die Synthese der Verbindungen (1S)-69 und (1S)-70 (Abbildung 30).

Neben der Synthese der fluoreszenzmarkierten Prodrugs, wie (1S)-69 und (1S)-70 sowie der entsprechenden fluoreszenzmarkierten *seco*-Drugs sollte eine verkürzte Synthese des fluoreszenzmarkierten *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Drugs (1S,10R)-71 aus der Arbeit von B. Krewer^{5a} durchgeführt werden.

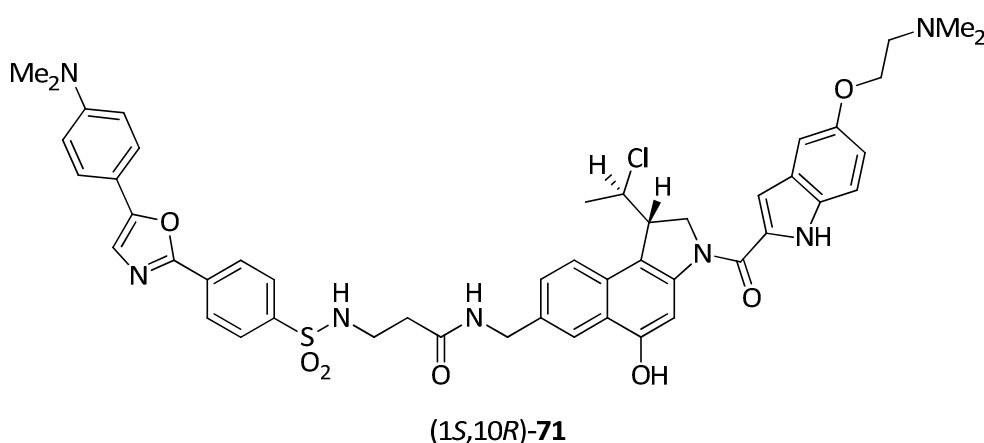


Abbildung 31. Dapoxylmarkiertes *anti*-Methyl-*seco*-CBI-Drug (1S,10R)-71.

Ebenso sollte das FITC-markierte Prodrug (1S)-**72** (Abbildung 32) synthetisiert werden, um dessen Aufnahme in lebende Zellen durch *Live Cell Imaging* zu untersuchen.

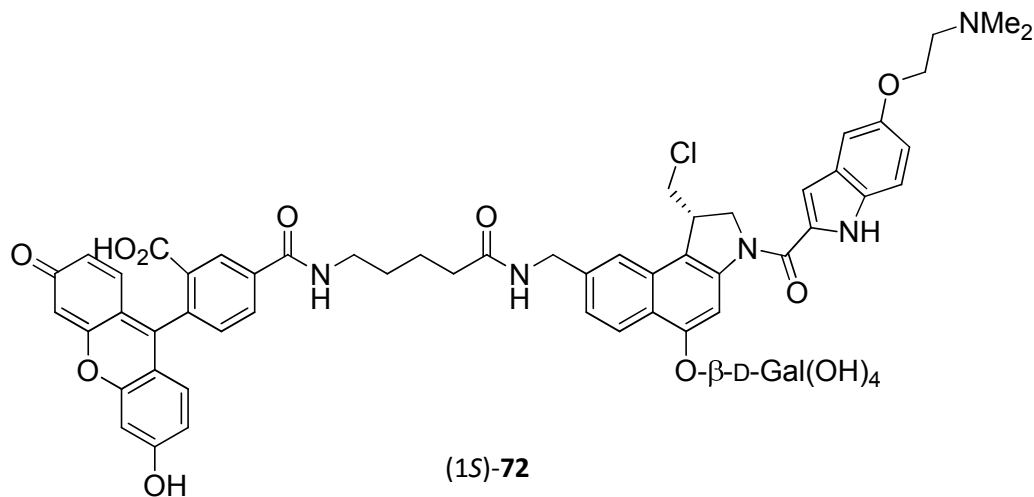


Abbildung 32. Struktur des FITC-markierten Galaktosides (1S)-**72**.

Alle synthetisierten Prodrugs, *seco*-Drugs und die dargestellten fluoreszenzmarkierten DNA-Binder waren in Kooperation mit *Dr. Mišo Mitkovski* am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen auf ihre zelluläre Aufnahme zu untersuchen. Hierzu sollten zunächst die Absorptions- und Emissionsspektren der dargestellten Verbindungen am Fluorimeter bestimmt werden, um die anschließenden *Live Cell Imaging* Experimente durchzuführen.

Ein weiteres Ziel war die Bestimmung der therapeutischen Breite (QIC₅₀) der dargestellten Prodrugs und der Zelltoxizität (IC₅₀) der synthetisierten *seco*-Drugs in Kollaboration mit *Dr. Ingrid Schuberth* durch *In-vitro*-Assays.

Hieraus ergaben sich zusammenfassend folgende Aufgaben:

- Synthese des enantiomerenreinen FITC-markierten CBI-DMAI-Prodrugs (1S)-**72**
- Verkürzte Synthese des enantiomerenreinen Dapoxyl-markierten *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Drugs (1S,10R)-**71**

-
- Synthese der enantiomerenreinen CBI-Prodrugs (1S)-**69** und (1S)-**70** sowie der entsprechenden *seco*-CBI-Drugs
 - *In-vitro*-Untersuchungen zur Toxizität der neuen Verbindungen an Krebszellen der Linie A549
 - Messung der Fluoreszenzspektren der dargestellten Verbindungen sowohl in Lösung als auch in Puffer
 - *In-vitro*-Untersuchungen der dargestellten Verbindungen durch *Confocal Laser Scanning Microscopy (Live Cell Imaging)*

7 Planung der Arbeit

7.1 Synthese des fluoreszenzmarkierten CBI-DMAI-Prodrugs (1S)-72

In Anlehnung an Arbeiten von *F. Major*^{5c} sollte das fluoreszenzmarkierte *seco*-CBI-DMAI Prodrug (1S)-72 ausgehend vom iodierten Naphthalinderivat **75** dargestellt werden (Abbildung 33).

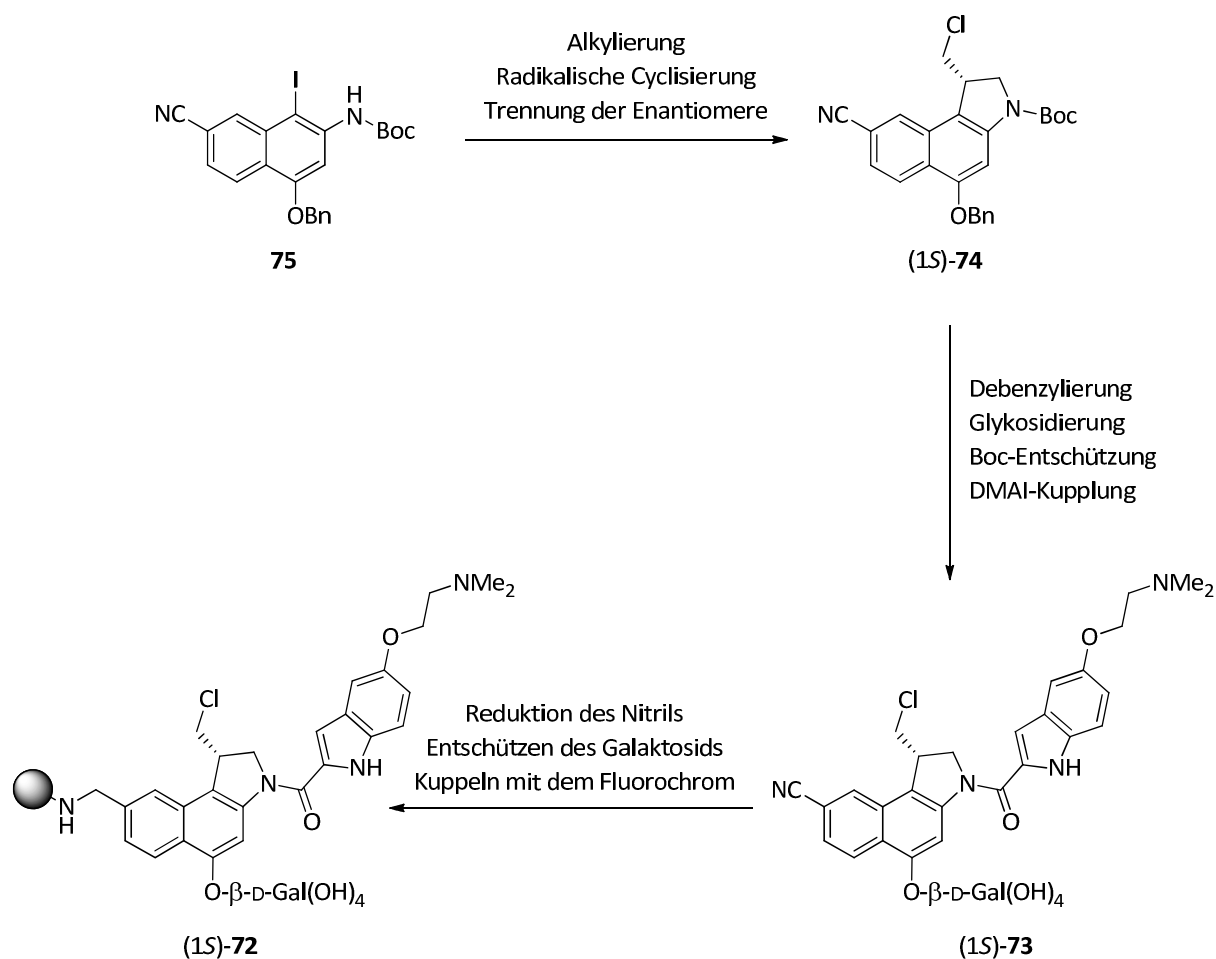


Abbildung 33. Synthese des fluoreszenzmarkierten *seco*-CBI-DMAI-Prodrugs (1S)-72 ausgehend von Naphthalinderivat **75**.

Hierzu war das Iodnaphthalinderivat **75**, das in der Abteilung *Tietze* verfügbar war^{5e} erhältlich war, mit (*E/Z*)-1,3-Dichlorpropen zu alkylieren, um nach anschließender radikalischer Cyclisierung und Trennung der entstandenen Enantiomere das *seco*-CBI-

Derivat (1S)-**74** zu erhalten. Dieses sollte daraufhin debenzyliert und mit tetraacetyliertem Galaktose-Trichloracetimidat (**116**) gekuppelt werden. Anschließend *N*-Boc-Entschützung und Bindungsknüpfung mit DMAI-CO₂H (**104**) liefert den Vorläufer (1S)-**73**. Abschließend sollte die Nitrilfunktion reduziert, das Galaktosid entschützt und mit dem FITC-Derivat **119** gekuppelt werden, um das fluoreszenzmarkierte CBI-DMAI-Prodrug (1S)-**72** zu erhalten.

7.2 Verkürzte Synthese zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten *seco-anti*-Methyl-CBI-DMAI-Drugs (1S,10R)-**71**

In Anlehnung an Arbeiten von *B. Krewer*^{5a} sollte das fluoreszenzmarkierte *seco-anti*-Methyl-CBI-DMAI-Drug (1S,10R)-**71** in einer um fünf Stufen verkürzten Synthese dargestellt werden, bei der auf eine Glykosidierung des Phenols verzichtet wurde, um die Bedingungen der Zuckerabspaltung zu umgehen (Abbildung 34).

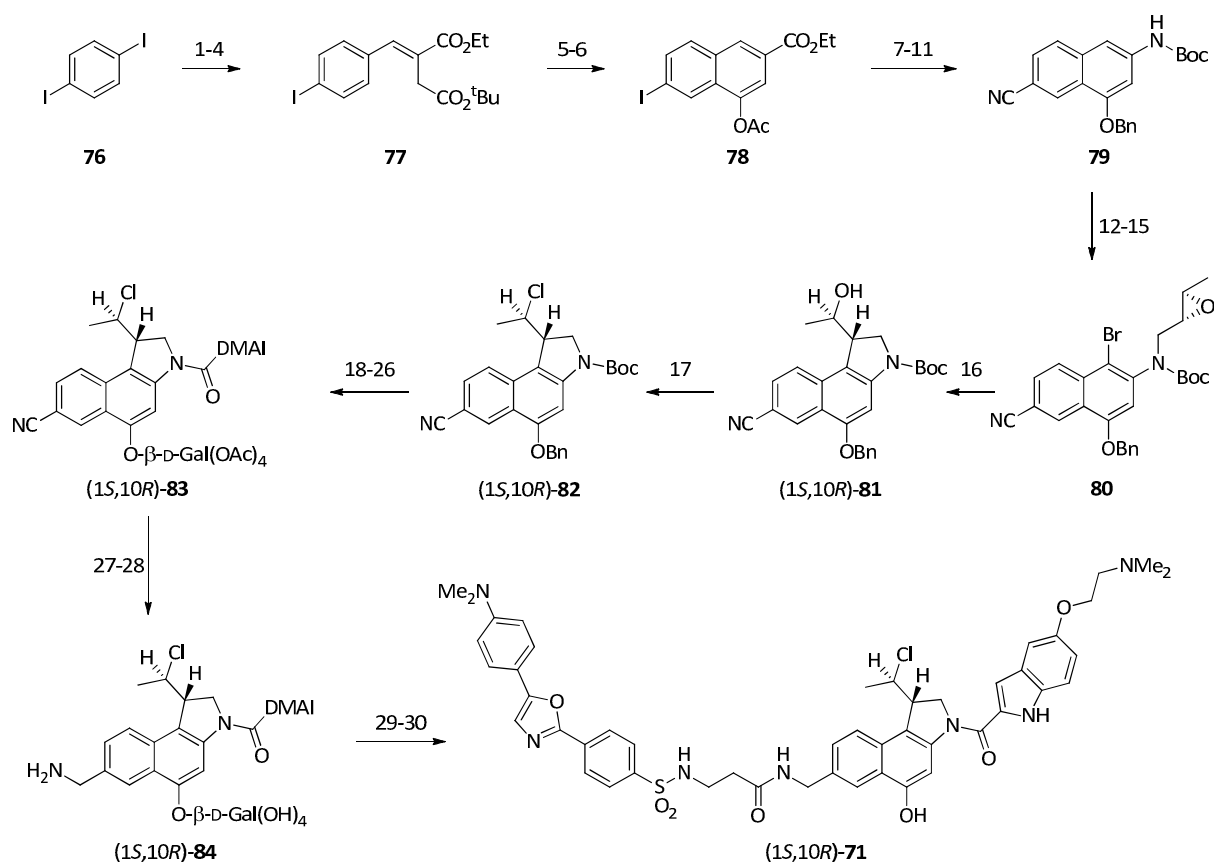


Abbildung 34. Syntheschema zur Darstellung von (1S,10R)-**71** nach dem von *B. Krewer* verwendeten Verfahren über eine Gesamtzahl von 30 Stufen.

Unter Bezug auf Vorarbeiten von *J. M. von Hof*^{5b} war das Bromnaphthalin **86**, nach Halogen-Nitril-Austausch, Verseifung, *Curtius*-Umlagerung und Bromierung zu **85** umzusetzen. Nachfolgend sollte eine Alkylierung mit enantiomerenreinem Epoxynosylat **102**, Zyklisierung zu enantiomerenreinem Alkohol (1*S*,10*R*)-**81** und *Appel*-Reaktion zum *seco*-CBI-Grundgerüst (1*S*,10*R*)-**82** folgen. Alternativ sollte eine Alkylierung von **85** mit (*E/Z*)-1,3-Dichlor-2-buten (**103**) und anschließende radikalische Zyklisierung erfolgen. Trennung der gebildeten Diastereomere und chromatographische Racematspaltung sollte zu den Enantiomeren (+)-(1*S*,10*R*)-**82** und (-)-(1*R*,10*S*)-**82** führen (Abbildung 35).

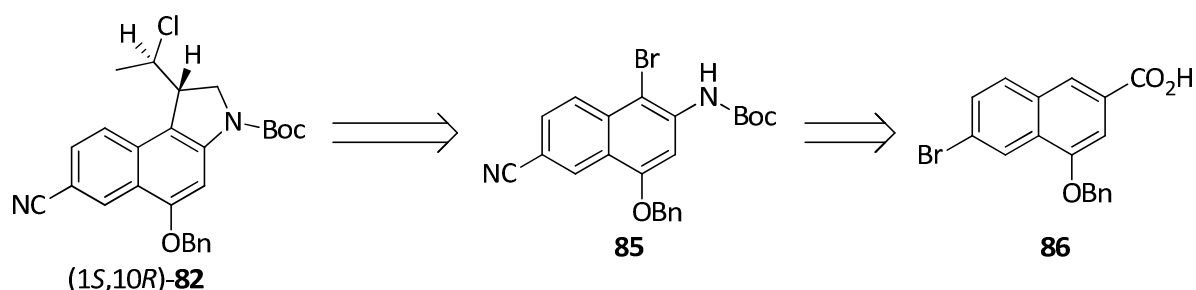


Abbildung 35. Retrosynthetische Analyse zur Darstellung von (1*S*,10*R*)-**82** ausgehend von Bromnaphthalin **85**.

Im Gegensatz zu der Synthese von *B. Krewer*^{5a} soll im Anschluss keine Debenzylierungs-Glykosidierungs-Kaskade erfolgen, sondern das Nitril nach erfolgter *N*-Boc-Entschützung und DMAI-Kupplung durch Verwendung von Palladium oder Platin sowie Wasserstoffgas reduziert werden.

Anschließende Kupplung des primären Amins (1*S*,10*R*)-**87** mit dem Dapoxyl-Derivat **61** sollte das gewünschte fluoreszenzmarkierte *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Drug (1*S*,10*R*)-**71** liefern (Abbildung 36).

Auf Grund der enormen Kosten von 5265 € / 25 mg für das Dapoxyl-Derivat **61** sollte ein analoges Verfahren zur Darstellung von (1*S*,10*R*)-**71** durch das Dapoxyl-Sulfonylchlorid **89** entwickelt werden.

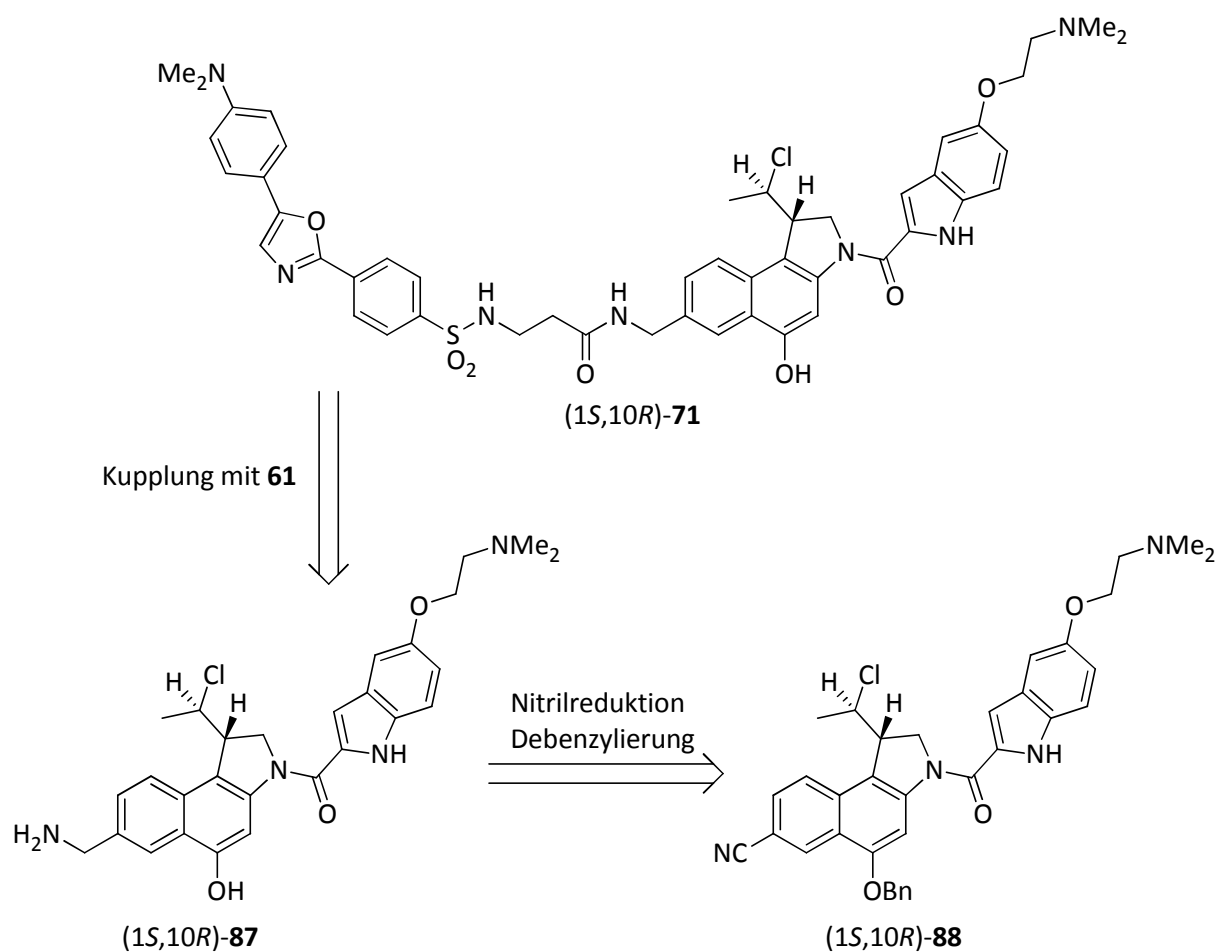


Abbildung 36. Retrosynthetische Analyse zur Darstellung von (1S,10R)-71 ausgehend von (1S,10R)-88 durch Kupplung mit dem Dapoxylderivat 61.

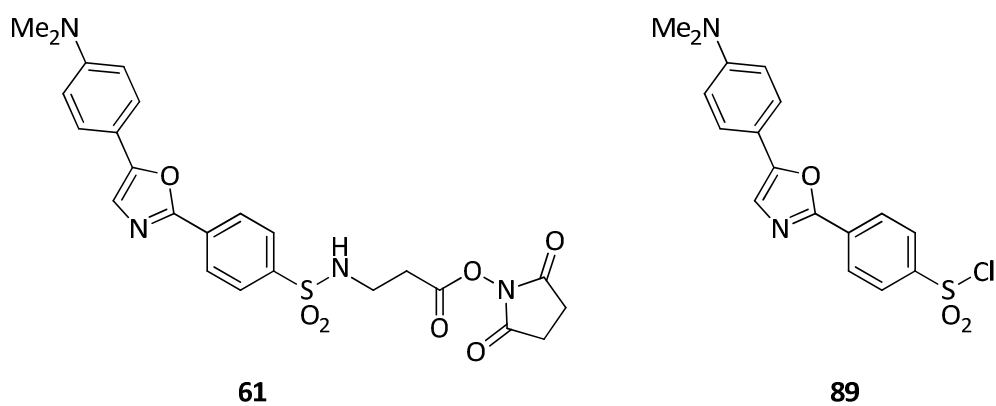


Abbildung 37. Strukturen der verwendeten Dapoxy-Derivate 61 und 89.

Hierzu sollte das primäre Amin des benzylgeschützten Naphthalinderivates (1*S*,10*R*)-**91** mit Cbz-geschütztem β -Alanin (**105**) alkyliert werden. Anschließende simultane Entschützung der Benzyl- und Cbz-Schutzgruppe und Kupplung mit Dapoxyl-Sulfonylchlorid (**89**) soll das gewünschte fluoreszenzmarkierte *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Drug (1*S*,10*R*)-**71** liefern (Abbildung 38).

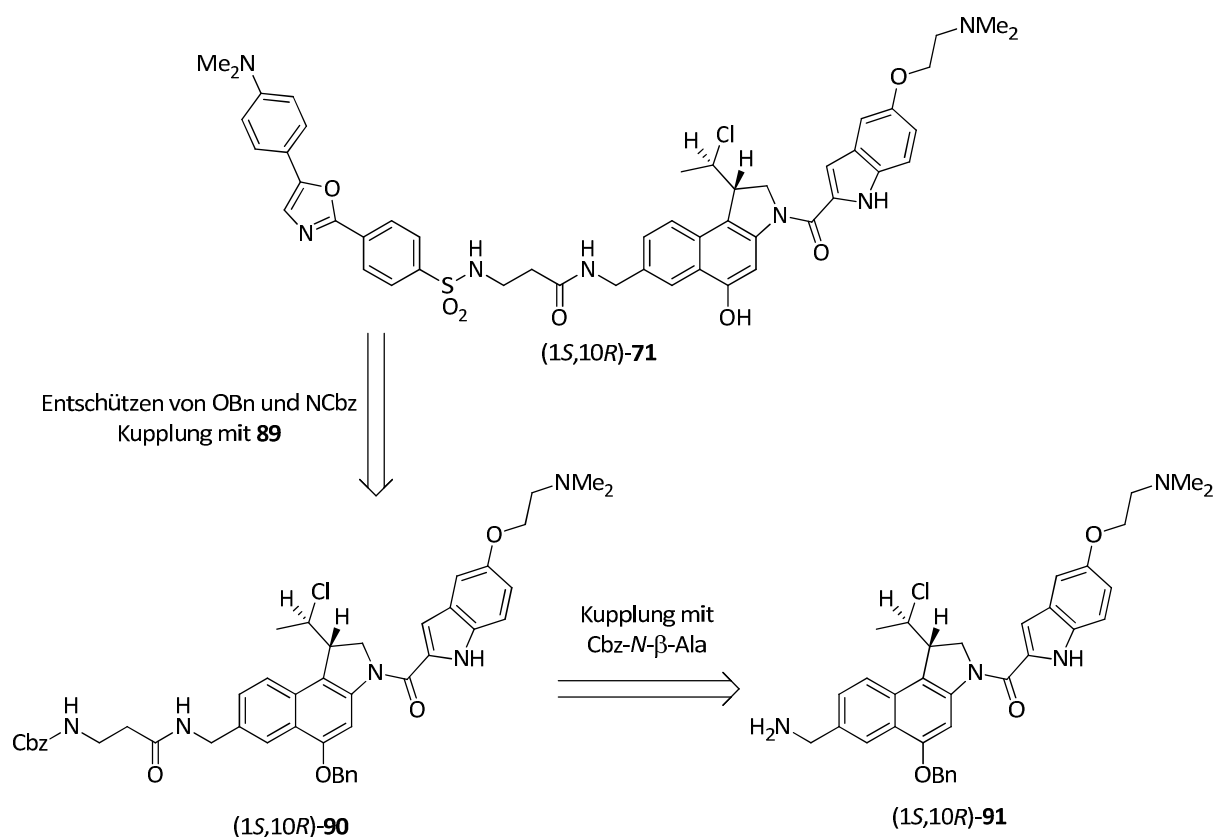


Abbildung 38 Retrosynthetische Analyse zur Darstellung von (1*S*,10*R*)-**71** unter Verwendung des Dapoxyl-Sulfonylchlorides **89**.

7.3 Synthese neuartiger fluoreszenzmarkierter Duocarmycin-Analoga

Um eine bessere Vergleichbarkeit der fluoreszenzmarkierten Wirkstoffe zu den bereits synthetisierten Verbindungen, wie (1*S*,10*R*)-**47a** und (1*S*)-**48** zu haben, sollten sowohl *seco*-Drugs als auch Prodrugs entwickelt werden, die in ihrer räumlichen und chemischen Struktur den CBI-DMAI-Analoga nahe kommen. Daher sollte der bisher genutzte DNA-Binder DMAI durch einen fluoreszenzmarkierten DNA-Binder

B. DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

1 Synthese des fluoreszenzmarkierten *anti*-Methyl-*seco*-CBI-Drugs (1*S*,10*R*)-71

1.1 Synthese des *anti*-Methyl-*seco*-CCBI-Grundgerüsts (1*S*,10*R*)-82

In Anlehnung an die von *Tietze* und *Boger* entwickelten Verfahren konnte das *anti*-Methyl-*seco*-CCBI-Grundgerüst (1*S*,10*R*)-82 über 8 Stufen ausgehend von der Naphthalincarbonsäure **85** dargestellt werden.¹⁵³

Durch Veresterung der Carbonsäure **85** via Bildung des Säurechlorides und anschließender Umsetzung mit Ethanol unter Rückfluss für 19 h konnte der Ethylester **98** erhalten werden. Der Ethylester **98** konnte nun zunächst in DMF unter Rückfluss für 20 h bei Verwendung von Kupfercyanid einem Halogen-Nitril-Austausch zu **99** unterzogen und anschließend in einem Lösungsmittelgemisch von THF/MeOH/H₂O (3:1:1) unter Zugabe von LiOH·H₂O bei Raumtemperatur und Rühren für 20 h zur Carbonsäure **100** verseift werden (Abbildung 40).

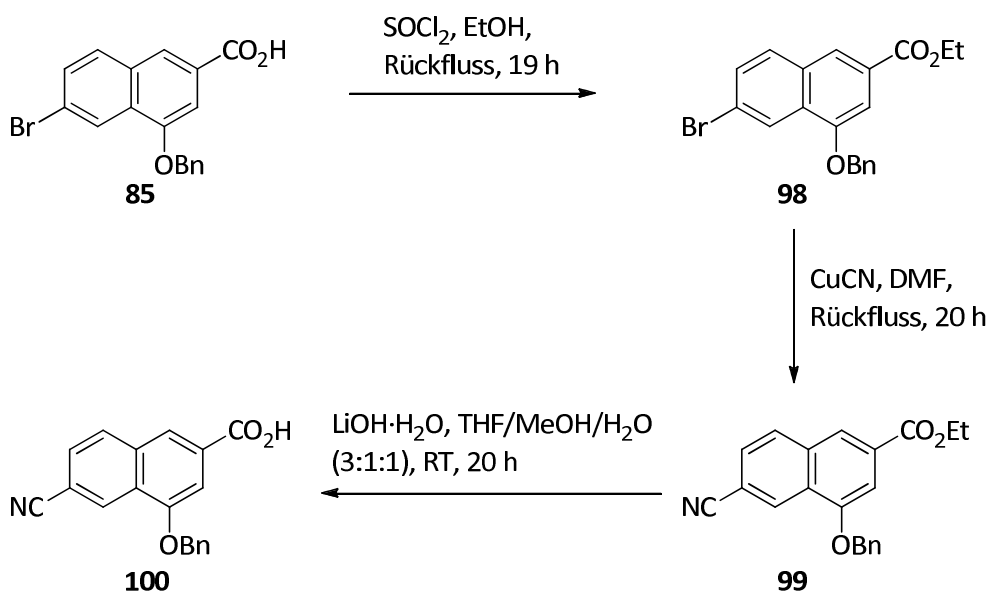


Abbildung 40. Synthese der Carbonsäure **100** ausgehend von Bromnaphthalin **85** über 3 Stufen.

Die Synthese des *N*-Boc-geschützten Bromnaphthailinderivates **101** erfolgte durch eine *Curtius*-Umlagerung unter Verwendung von Diphenylphosphorylazid (DPPA) und Triethylamin in *tert*-Butanol und Erhitzen auf Rückfluss für 22 h, gefolgt von einer säurekatalysierten Bromierung des Aromaten **79** durch *N*-Bromsuccinimid in THF bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 4 h sowie 1 h bei Raumtemperatur lieferte die gewünschte Verbindung **101** (Abbildung 41).

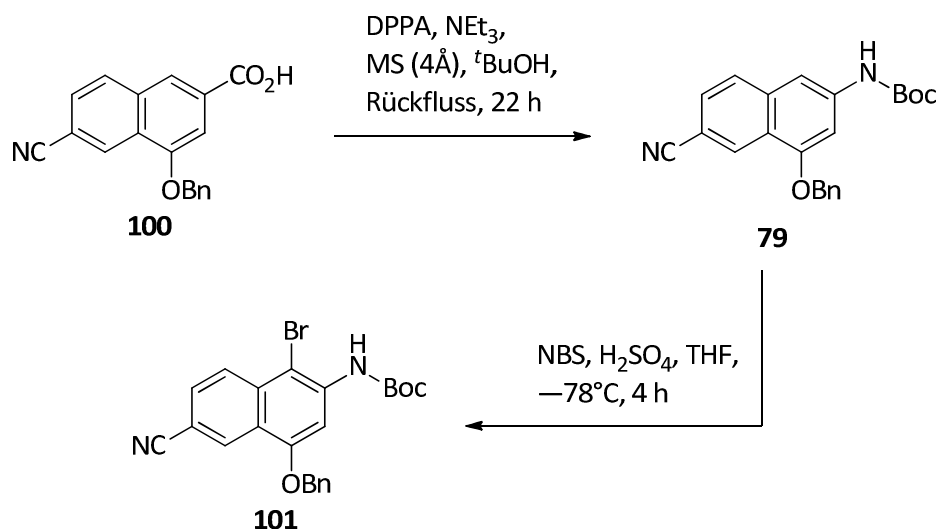


Abbildung 41. Syntheschema für die Darstellung des *N*-Boc-geschützten Bromnaphthalins **101** ausgehend von **100** über *Curtius*-Umlagerung und Bromierung.

Um das gewünschte *anti*-Methyl-*seco*-CCBI Grundgerüst (1*S*,10*R*)-**82** darzustellen, gibt es zwei mögliche Reaktionswege. Zum Einen die Alkylierung von **101** durch das enantiomerenreine Epoxynosylat **102** sowie anschließende enantioselective Zinkatvermittelte Zyklisierung zum gewünschten Produkt (1*S*,10*R*)-**81** (Abbildung 42).¹⁵⁴ Zum Anderen eine Alkylierung von **101** durch (*E/Z*)-1,3-Dichlor-2-buten (**103**) und anschließende AIBN-vermittelte radikalische Zyklisierung zu den Diastereomeren *rac*-(1*S*,10*R*)-**82** und *rac*-(1*S*,10*S*)-**82** (Abbildung 43). Auf Grund der besseren Gesamtausbeute bei der Anwendung der radikalischen Methode und der damit verbundenen größeren Menge an Substanz für folgende Untersuchungen wurde diese zunächst gewählt. Anschließend wurde auch die enantioselective Variante verwendet, da diese keine Reinigung durch HPLC an chiraler stationärer Phase erfordert.

Nach der Alkylierung des Bromnaphthalins **101** durch das Epoxynosylat **102** unter Verwendung von Natriumhydrid als Base und DMF als Lösungsmittel konnte das Derivat **80** mit einer hervorragenden Ausbeute von 95% isoliert werden. Die Umsetzung von **80** mit dem Zinkat $\text{Li}_2\text{Zn}(\text{SCN})\text{Me}_3$, welches aus Zinkchlorid (ZnCl_2), Methyllithium (MeLi) und Trimethylsilylisothiocyanat (TMS-SCN) *in situ* hergestellt wurde, liefert den gewünschten Alkohol ($1\text{S},10\text{R}$)-**81** mit einer sehr guten Ausbeute von 69%. Anschließende Chlorierung mit Thionylchlorid und Pyridin bei Raumtemperatur in Dichlormethan für 4 h liefert das *anti*-Methyl-*seco*-CCBI-Grundgerüst ($1\text{S},10\text{R}$)-**82** in einer moderaten Ausbeute von 34%. Leider führte die Anwendung der *Appel* Reaktion, wie sie bei der Darstellung von (1S)-**93** benutzt wird, nicht zum gewünschten Produkt.

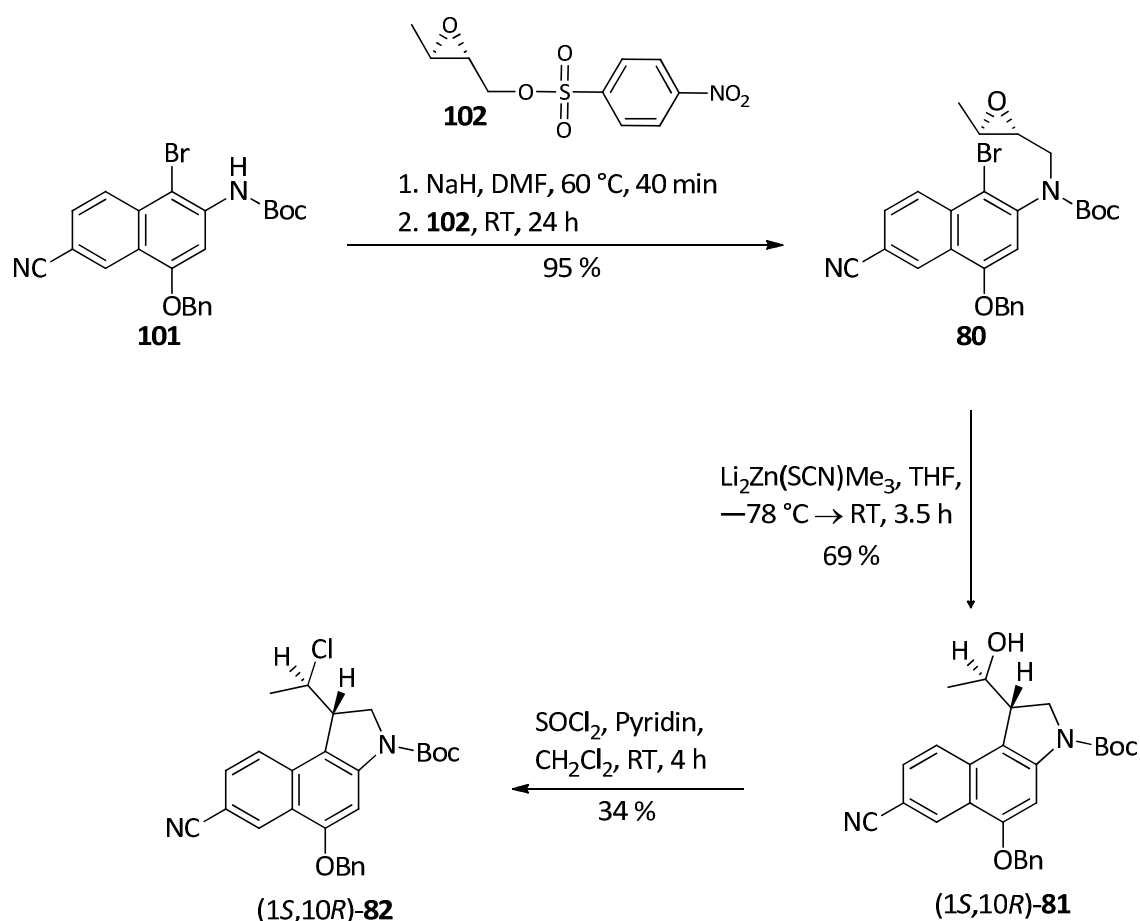


Abbildung 42. Syntheschema zur enantioselektiven Darstellung des *anti*-Methyl-*seco*-CCBI-Grundgerüsts ($1\text{S},10\text{R}$)-**82** ausgehend vom Bromnaphthalin **101**.

Als Alternative zur enantioselektiven Synthese von (1*S*,10*R*)-**82** wurde auch eine radikalische racemische Syntheseroute auf Grund der bereits beschriebenen Vorteile verfolgt. Hierbei wurde das Bromnaphtalin **101** durch (*E/Z*)-1,3-Dichlor-2-buten (**103**) alkyliert und anschließend unter Verwendung von Tris-Tri-Methyl-Silyl-Silan (TTMSS) und Azoisobutyronitril (AIBN) in Toluol zyklisiert. (1*S*,10*R*)-**82** konnte in einer hervorragenden Ausbeute von 90% isoliert werden, wobei das gewünschte *anti*-Diastereomer *rac*-(1*S*,10*R*)-**82** mit einer Ausbeute von 46% dargestellt werden konnte. Nach Trennung der Diastereomere *rac*-(1*S*,10*R*)-**82** und *rac*-(1*S*,10*S*)-**82** durch Säulenchromatographie an Kieselgel konnte eine Trennung der Enantiomere von *rac*-(1*S*,10*R*)-**82** an chiraler stationärer Phase (Chiralpak IA) erfolgen und das reine Enantiomer (+)-(1*S*,10*R*)-**82** erhalten werden (Abbildung 43).

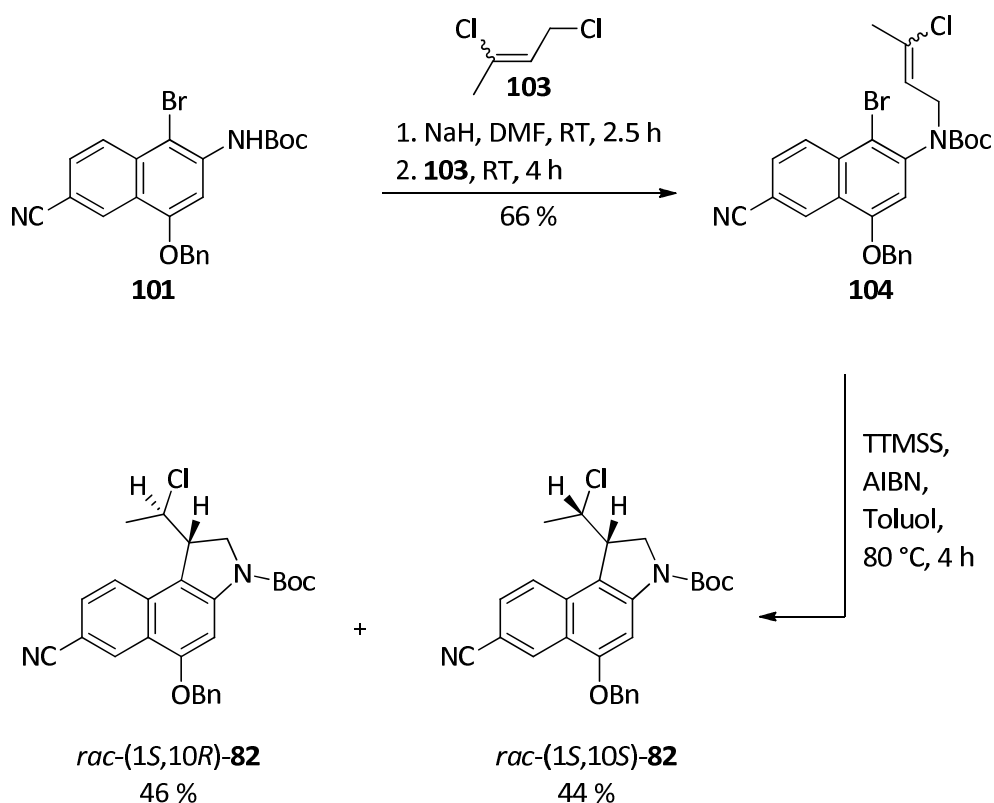


Abbildung 43. Darstellung des *anti*-Methyl-*seco*-CCBI-Grundgerüsts (1*S*,10*R*)-**82** unter Verwendung der radikalischen Syntheseroute.

1.2 Synthese des *anti*-Methyl-*seco*-CCBI-DMAI-Derivates (1*S*,10*R*)-88

Zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten *anti*-Methyl-*seco*-CBI-Drugs (1*S*,10*R*)-71 unter Verwendung des Dapoxylsulfonylchlorides (61) wurde zunächst das *anti*-Methyl-*seco*-CCBI-Grundgerüst (+)-(1*S*,10*R*)-82 in Anlehnung an Arbeiten von F. Major^{5c} zu *anti*-Methyl-*seco*-CCBI-DMAI (1*S*,10*R*)-88 umgesetzt. Hierzu wurde zunächst die säurelabile *N*-Boc-Schutzgruppe aus (1*S*,10*R*)-82 durch Anwendung einer 4 M HCl/Essigester Lösung bei Raumtemperatur entfernt, um das entstandene sekundäre Amin mit dem DNA-Binder DMAI-CO₂H (104) zu koppeln. Hierbei wurde EDAC·HCl, das als Kupplungsreagenz von Aminen mit Carbonsäure bekannt ist, eingesetzt. (1*S*,10*R*)-88 und (1*R*,10*S*)-88 sowie *rac*-(1*S*,10*S*)-88 konnten in sehr guten Ausbeuten dargestellt werden (Abbildung 44).

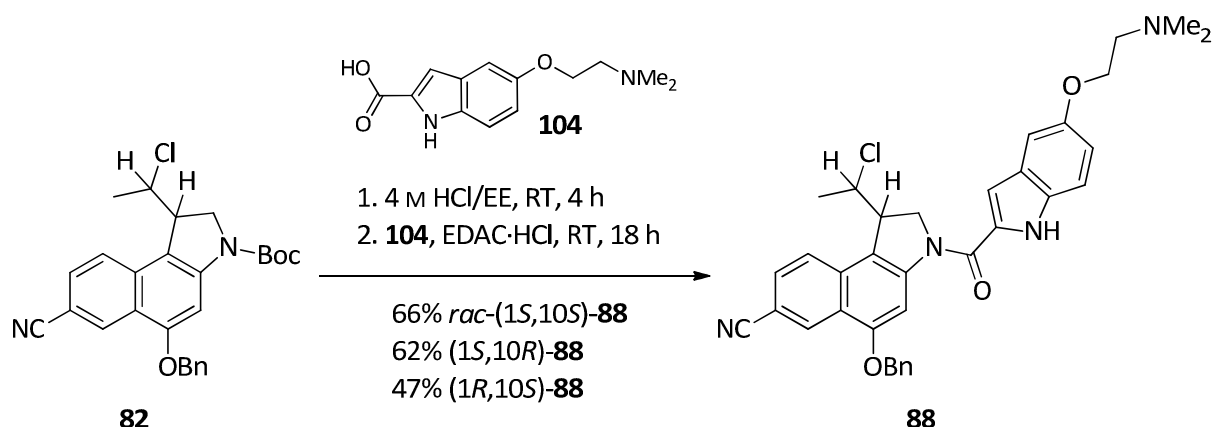


Abbildung 44. Syntheschema zur Darstellung der *seco*-CCBI-DMAI-Derivate.

1.3 Synthese des *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Derivates mit Spacer-Einheit (1*S*,10*R*)-106

Zur verkürzten Darstellung des fluoreszenzmarkierten *anti*-Methyl-*seco*-CBI-Drugs (1*S*,10*R*)-71 sollte eine β -Alanin-Einheit eingeführt werden, um den kostengünstigeren Dapoxylfarbstoff als Sulfonylchlorid (89) nutzen zu können. Hierzu wurde zunächst versucht, die Nitrilfunktion in (1*S*,10*R*)-88 unter Verwendung

verschiedener Pd- und Pt-Verbindungen zum primären Amin zu reduzieren (Abbildung 45 und Tabelle 3).

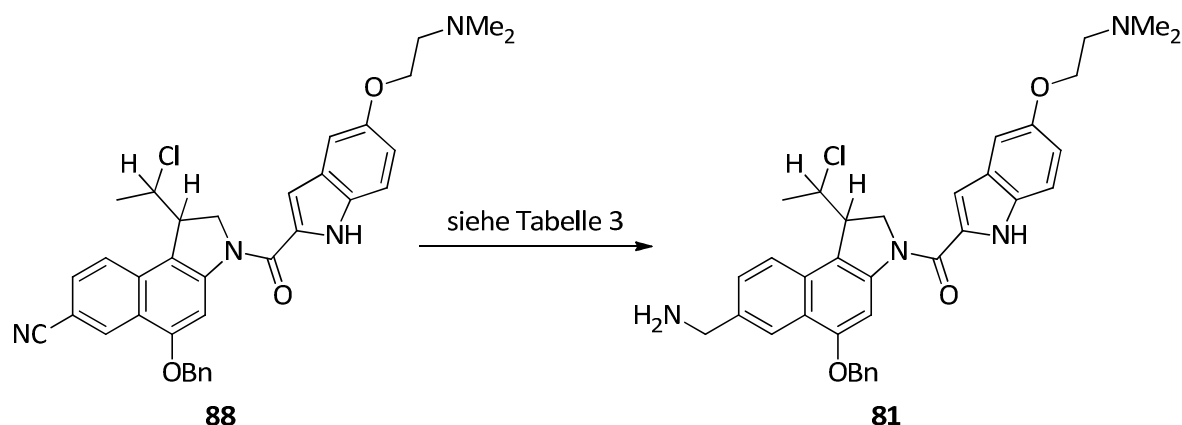


Abbildung 45. Versuche zur Darstellung des primärenamins **81** durch Reduktion der Nitrilfunktion in **88**.

Bedingungen	Ausbeute (Verwendetes Substrat)
PtO ₂ ·H ₂ O, H ₂ (1 atm), EtOH/H ₂ O (96:4), 1.25 M HCl/EtOH (2 Äq.), RT, 48 h	Edukt (<i>rac</i> -(1 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- 88)
PtO ₂ ·H ₂ O, H ₂ (1 atm), MeOH/H ₂ O (96:4), 1.25 M HCl/EtOH (2 Äq.), RT, 48 h	Edukt (<i>rac</i> -(1 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- 88)
LiAlH ₄ (2.0 Äq.), THF, RT, 15 min	Zersetzung (<i>rac</i> -(1 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- 88)
1. 4 M HCl/EE, RT, 1.5 h 2. Pd/C, H ₂ (1 atm), THF/MeOH (2:1), 40°C, NH ₄ CO ₂	Debenzylierung (<i>rac</i> -(1 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- 88)
PtO ₂ ·H ₂ O, H ₂ (1 atm), THF/EtOH/H ₂ O (2:4:1), 1.25 M HCl/EtOH (2 Äq.), RT, 8 h	54% (<i>rac</i> -(1 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)- 81) 58% (1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 81 53% (1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)- 81

Tabelle 3. Versuche zur Reduktion des Nitrils in **88**.

Erste Versuche erfolgten in Anlehnung an Arbeiten von *F. Major*,^{5c} in denen statt der Benzylschutzgruppe an C-4 tetraacetylierte Galaktose gebunden war. Hierzu wurde das Edukt in EtOH/H₂O (96:4) oder MeOH/H₂O (96:4) suspendiert und mit 1.25 M HCl in EtOH versetzt, wobei sich das Edukt löste. Anschließend Zugabe von PtO₂·H₂O und

Rühren unter H₂-Atmosphäre lieferte jedoch keine Umsetzung des Eduktes (Eintrag 1 und 2). Versuche mit LiAlH₄¹⁵⁵ als Hydridquelle in THF bei Raumtemperatur führten im Fall von *rac*-(1*S*,10*S*)-**88** zur Zersetzung des Eduktes (Eintrag 3). Überführung von *rac*-(1*S*,10*S*)-**88** in dessen Hydrochlorid und anschließende Versetzung mit Pd auf Aktivkohle, sowie Ammoniumformiat als H₂-Quelle^{4c} führte, wie erwartet zur Debenzylierung des Eduktes (Eintrag 4). Die erfolgreich Nitrilreduktion konnte in einem Lösungsmittelgemisch aus THF/EtOH/H₂O (2:4:1) beobachtet werden. Das gebildete Hydrochlorid von **88** ist gut wasserlöslich und konnte durch die Wahl des genannten Lösungsmittels über die gesamte Reaktionsdauer in Lösung gehalten werden. Eine Reduktion des Nitrils konnte somit in guten Ausbeuten ermöglicht werden (Eintrag 5).

Nach der erfolgreichen Reduktion des Nitrils (1*S*,10*R*)-**88** zum primären Amin (1*S*,10*R*)-**81** konnte nun das *N*-Cbz geschützte β -Alanin (**105**) unter Verwendung von PyBOP als Kupplungsreagenz und Hünigbase in DMF nach einem Standardprotokoll in einer sehr guten Ausbeute von 82% zu (1*S*,10*R*)-**90** umgesetzt werden (Abbildung 46).¹⁵⁶

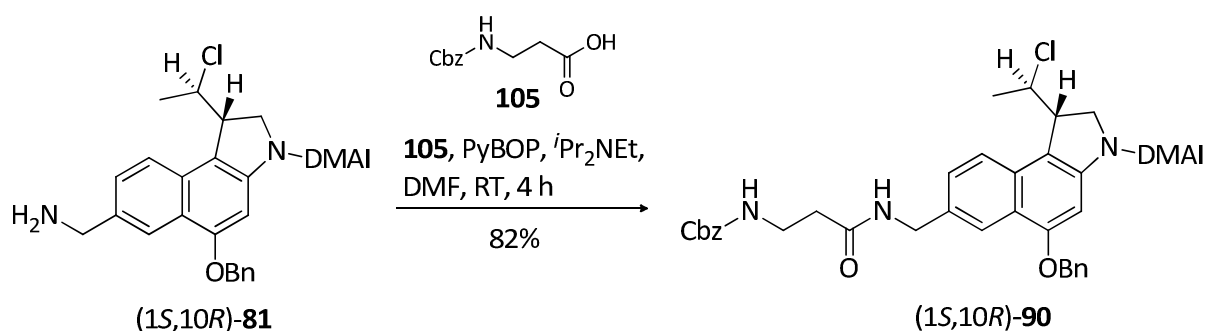


Abbildung 46. Einführung der Spacer-Einheit in (1*S*,10*R*)-**81** durch Verwendung von Cbz-geschütztem β -Alanin (**105**).

Anschließende simultane Entfernung der Cbz- und Benzylschutzgruppe in (1*S*,10*R*)-**90** unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus MeOH/AcOH/H₂O (3:1:1) und Pd auf Aktivkohle in einer H₂-Atmosphäre lieferte den Vorläufer (1*S*,10*R*)-**106** des

fluoreszenzmarkierten *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Drugs (1*S*,10*R*)-**106** in einer guten Ausbeute von 57% (Abbildung 47).

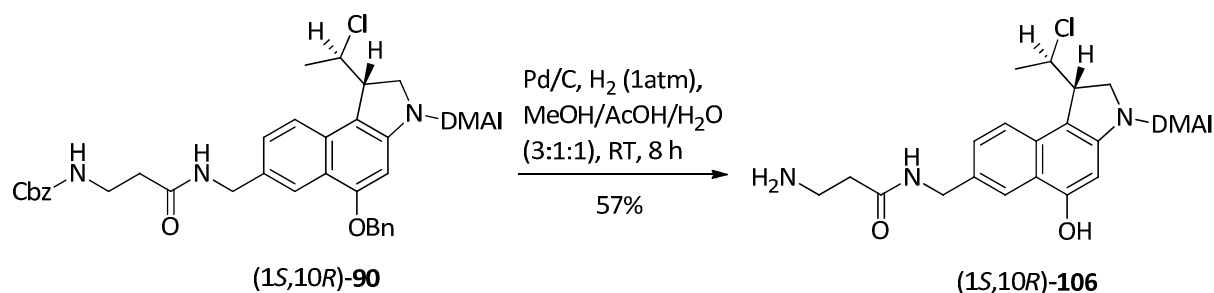


Abbildung 47. Synthese des freien Phenols (1*S*,10*R*)-**106** durch simultane hydrogenolytische Spaltung der Cbz- und Benzylschutzgruppe in (1*S*,10*R*)-**90**.

1.4 Synthese des *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Derivates ohne Spacereinheit (1*S*,10*R*)-**87**

Neben der Synthese des *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Derivates (1*S*,10*R*)-**106** mit der Spacereinheit zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten *anti*-Methyl-*seco*-CBI-Drugs (1*S*,10*R*)-**71** durch Dapoxylsulfonylchlorid (**89**) konnte ebenso eine Synthese zur Darstellung von (1*S*,10*R*)-**71** über das *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Derivat (1*S*,10*R*)-**87** ohne Spacereinheit unter Verwendung des Dapoxyl-derivates **61** durchgeführt werden. Hierzu konnte in Analogie zur Synthese von (1*S*,10*R*)-**106** das Phenol (1*S*,10*R*)-**87** in guten Ausbeuten von 51% für (1*R*,10*S*)-**87** bis 67% für (1*S*,10*R*)-**87** dargestellt werden (Abbildung 48).

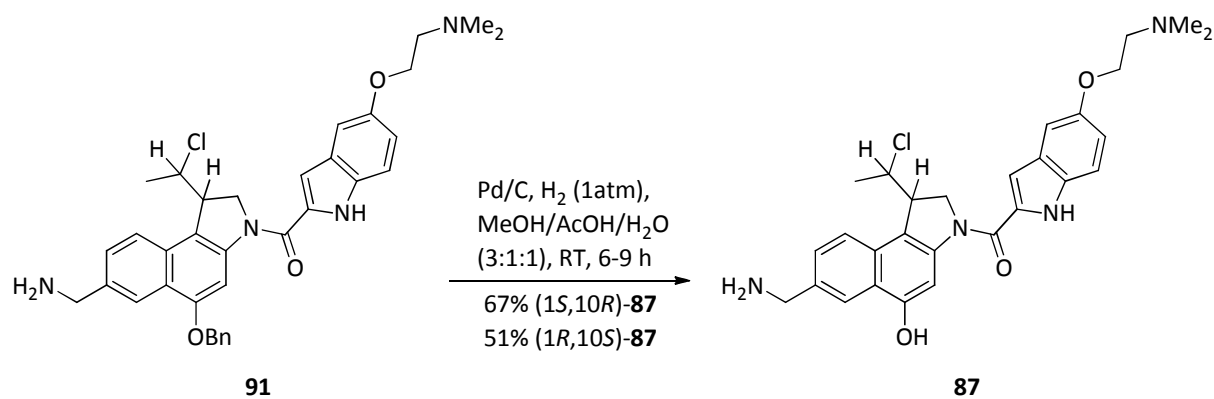


Abbildung 48. Synthese des freien Phenols **87** durch hydrogenolytische Debenzylierung von **81**.

1.5 Synthese des fluoreszenzmarkierten *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Drugs (**1S,10R**)-**71**

Ausgehend von den primären Aminen (**1S,10R**)-**87** und (**1S,10R**)-**106** konnte das gewünschte Produkt (**1S,10R**)-**71** durch die Verwendung der Dapoxylderivate **61** und **89** dargestellt werden. In Anlehnung an Arbeiten von *B. Krewer*^{5a} wurde das Amin mit *Hünig*-Base deprotoniert, um es im Anschluss daran mit dem entsprechenden Dapoxylderivat zu kuppeln. Auf Grund der freien Phenolfunktion und der damit verbundenen *Winstein*-Zyklisierung unter basischen Bedingungen wurden neben dem gewünschten Produkt auch dessen Substitutionsprodukte erhalten (Abbildung 49).

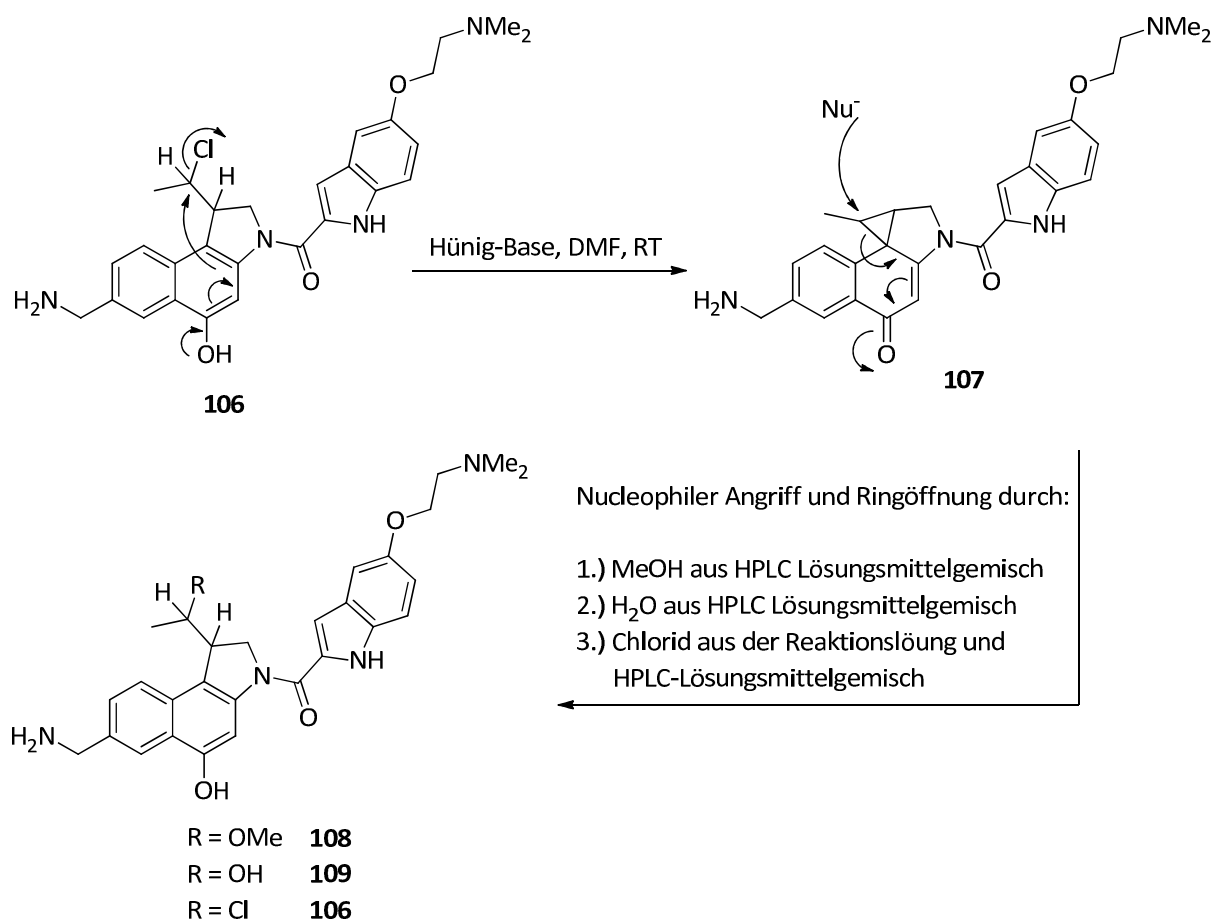


Abbildung 49. Durch *Hünig*-Base vermittelte *Winstein*-Zyklisierung zu **107** und anschließende Ringöffnung bei Versetzen mit Lösungsmittelgemisch für präparative HPLC (H₂O (0.06% HCl) und MeOH) zu **108**, **109** und **106**.

Eine mögliche Debenzylierung im Produkt unter Verwendung eines *O*-benzylierten Derivates und einer damit einhergehenden Verhinderung der Winstein-Zyklisierung wurde nicht durchgeführt, da es bei der Debenzylierung zu einer Dechlorierung kommt und eine Abtrennung des dechlorierten Nebenproduktes vom gewünschten Produkt nicht möglich ist. Auf Grund der beschriebenen Problematik wurde nach ersten Versuchen mit der Hünigbase und einer damit einhergehenden Winstein-Zyklisierung erfolgreich versucht, eben diese durch den Einsatz einer schwächeren Base (Pyridin) zu umgehen. Auf diese Weise konnte das gewünschte Produkt (1*S*,10*R*)-**71** sowie dessen Enantiomer (1*R*,10*S*)-**71** in mäßigen bis guten Ausbeuten erhalten werden (Abbildung 50).

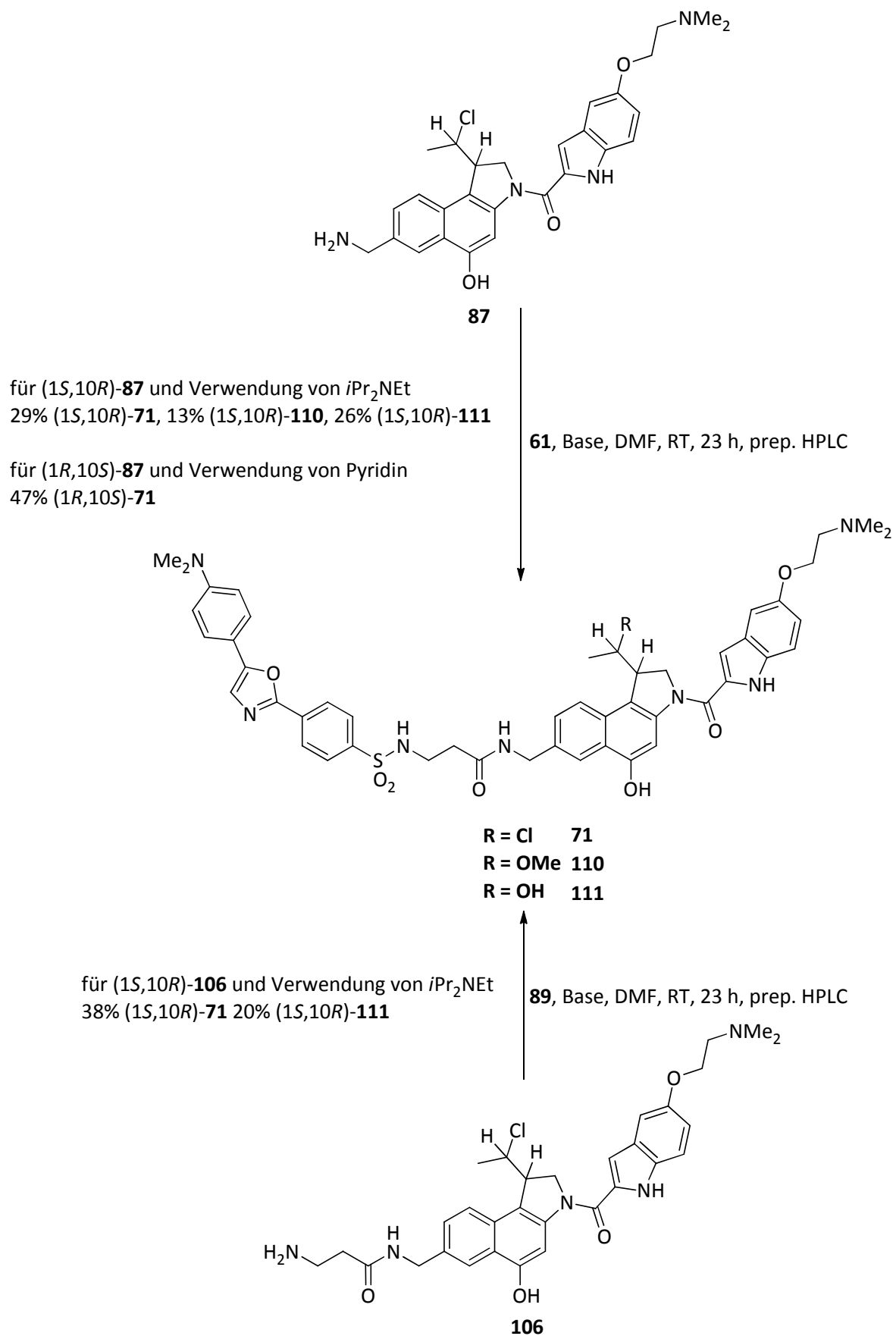


Abbildung 50. Synthese von **71** durch Verwendung von **87** und Dapoxylderivat **61** sowie **106** und Dapoxylderivat **89**.

1.5.1 Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten des fluoreszenzmarkierten *anti*-Methyl-*seco*-Drugs (1*R*,10*S*)-71

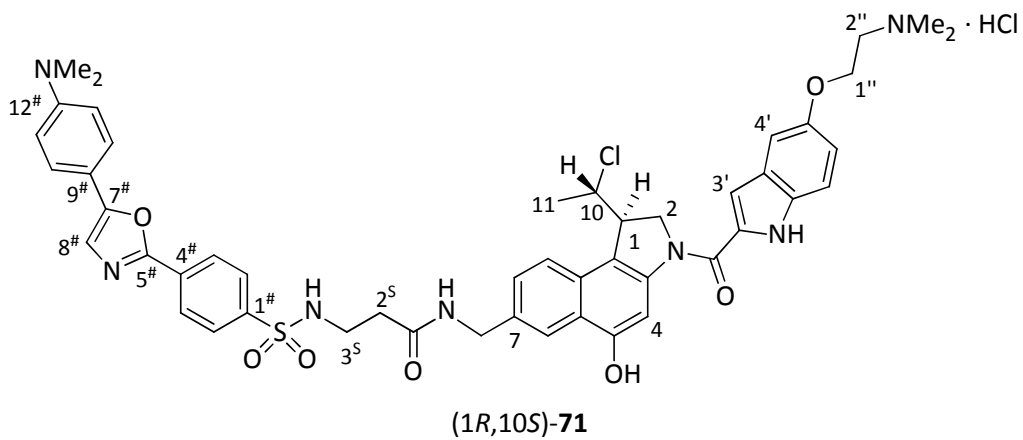


Abbildung 51. Struktur des fluoreszenzmarkierten (1*R*,10*S*)-*anti*-Methyl-*seco*-Drugs (1*R*,10*S*)-71.

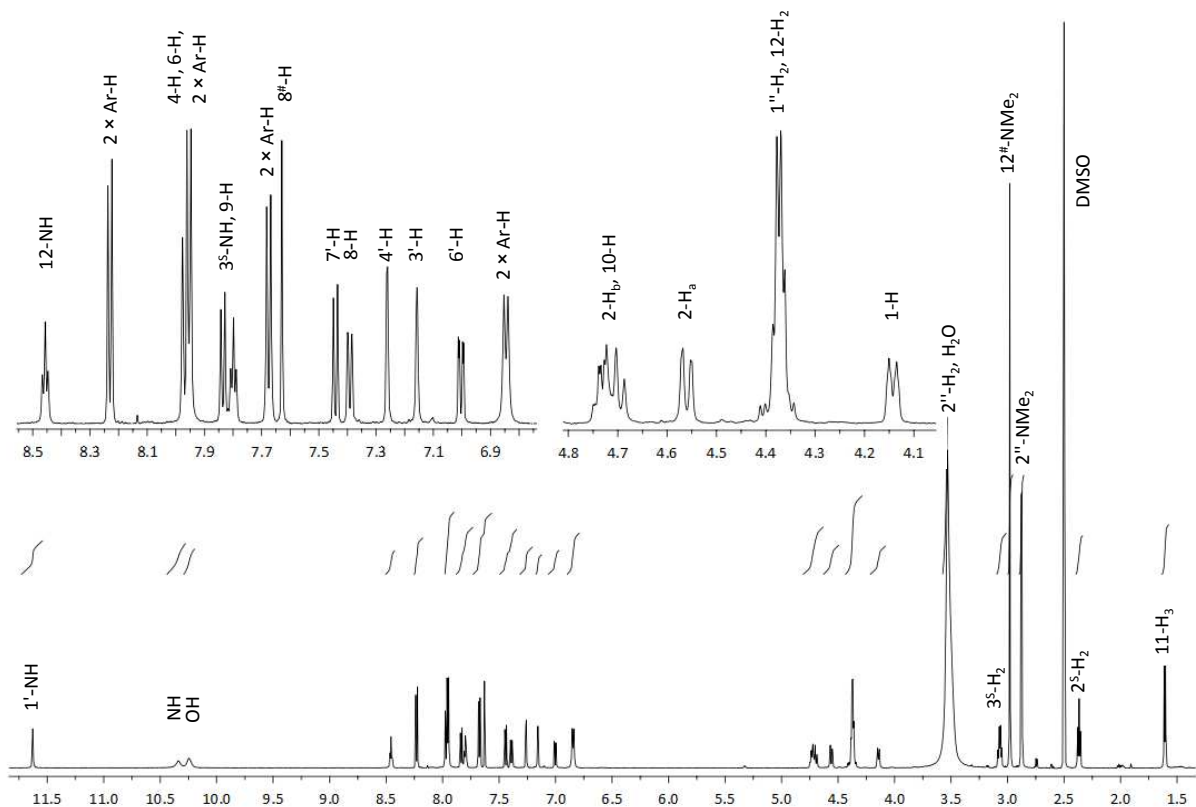


Abbildung 52. ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, DMSO-d_6) des fluoreszenzmarkierten (1*R*,10*S*)-*anti*-Methyl-*seco*-Drugs (1*R*,10*S*)-71.

Im ^1H -NMR-Spektrum von (1*R*,10*S*)-71 findet man bei $\delta = 1.61$ ppm ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von $J = 6.6$ Hz, das charakteristisch für die Methylgruppe

der *anti*-Methyl-Verbindungen ist. Bei $\delta = 2.37$ ppm resonieren als Triplet mit einer Kopplungskonstante von $J = 7.4$ Hz die Methylenprotonen an C-2^S. Bei $\delta = 2.88$ ppm ist das Signal für die sechs Protonen der NMe₂-Funktionalität des DNA-Binders DMAI als Dublett zu beobachten, während das Resonanzsignal für die Protonen der NMe₂-Gruppe des Fluorochroms bei $\delta = 2.97$ ppm zu sehen ist. Es folgt das Signal für die Methylenprotonen an C-3^S bei $\delta = 3.07$ ppm als Doppeldublett sowie ein Multiplett für die Protonen der Methyleinheit an C-2'' bei $\delta = 3.43$ – 3.59 . Die weiteren Signale für die CBI-Einheit findet man bei $\delta = 4.14$ ppm resoniert ein Dublett für 1-H mit einer Kopplungskonstante von $J = 9.2$ Hz, was durch eine Kopplung mit dem Proton an C-10 erklärt werden kann, dessen Resonanz im Multiplett bei $\delta = 4.67$ – 4.77 ppm zu sehen ist. Bei $\delta = 4.32$ – 4.42 ppm ist ein Multiplett zu beobachten, das den Protonen an C-1'' sowie den beiden Methylenprotonen an C-12 zugewiesen werden kann. Weiter im Tieffeld folgt die beschriebene Resonanz für das Proton an C-1, sowie die Signale für die diastereotopen Protonen an C-2. Zunächst findet man bei $\delta = 4.56$ ppm ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von $J = 9.2$ Hz für die geminale Kopplung von 2-H_a zu 1-H sowie bei $\delta = 4.67$ – 4.77 ppm die Resonanz für 2-H_b zusammen mit 10-H als Multiplett. Im typischen Bereich der Aromaten findet man bei $\delta = 6.85$ ppm ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von $J = 8.4$ Hz und einer Intensität von 2 Protonen, was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei um zwei chemisch identische Protonen mit einer *ortho*-Kopplung handelt. Hierbei muss es sich also um zwei aromatische Protonen des Fluorochroms handeln. Es folgt bei $\delta = 7.00$ ppm ein Dublett vom Dublett mit $J = 8.9$ und 2.3 Hz, das auf Grund seiner chemischen Verschiebung, Kopplungskonstanten und der Kopplungspartner aus dem Korrelationspektrum COSY eindeutig dem 6'-H zugewiesen werden kann. Bei $\delta = 7.16$ ppm folgt ein Singulett, das dem Proton an C-3' des DNA-Binders DMAI zugeordnet werden kann. Bei $\delta = 7.26$ ppm etwas weiter im Tieffeld folgt das Resonanzsignal für 4'-H als Dublett mit $J = 2.0$ Hz, das durch eine *meta*-Kopplung mit 6'-H hervorgerufen wird. Mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = 7.39$ ppm ist das Signal für das 8-H Proton des CBI-Grundkörpers als Dublett mit $J = 8.8$ Hz zu

beobachten. Bei $\delta = 7.44$ ppm ist das Resonanzsignal für 7'-H zu beobachten, welches durch *ortho*-Kopplung mit 6'-H als Dublett mit $J = 8.9$ Hz entsteht. Es folgen die Signale für die Protonen des Fluorochroms bei $\delta = 7.63$ ppm für 8[#]-H als Singulett sowie als Dublett mit $J = 8.7$ Hz bei $\delta = 7.68$ ppm für zwei weitere aromatische Protonen. Ein Multiplett bei $\delta = 7.77$ – 7.85 ppm mit einem Integral für zwei Protonen steht für das Proton an C-9 sowie dem Amin an C-3^S. Ein weiteres Multiplett bei $\delta = 7.93$ – 7.99 ppm mit einem Integral für vier Protonen steht für die Protonen an C-4 und C-6 sowie zwei weiteren Arylprotonen des Fluorochroms, gefolgt von zwei aromatische Protonen des Fluorochroms bei $\delta = 8.23$ ppm mit einer typischen Kopplungskonstante für *ortho*-Kopplungen mit $J = 8.4$ Hz. Es folgt bei $\delta = 8.46$ ppm ein Triplet mit $J = 5.8$ Hz als Signal für die Aminprotonen an C-12. Bei $\delta = 10.25$, 10.34 und 11.63 ppm folgen die Resonanzen für die phenolische Hydroxyfunktion, das Proton an der NMe₂-Gruppierung des DNA-Binders DMAI sowie für das Indol-Aminproton.

2 Charakterisierung und Untersuchung der zellulären Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Dapoxyl-*anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Derivaten

2.1 Fluorimetrische Bestimmung der Absorptions- und Emissionsmaxima

Zunächst wurden die Absorptions- und Emissionsspektren der zu untersuchenden Verbindungen (1*S*,10*R*)-**71**, (1*R*,10*S*)-**71**, (1*S*,10*R*)-**110** sowie (1*S*,10*R*)-**111** (Abbildung 53) sowohl in Methanol als auch in PBS gemessen.

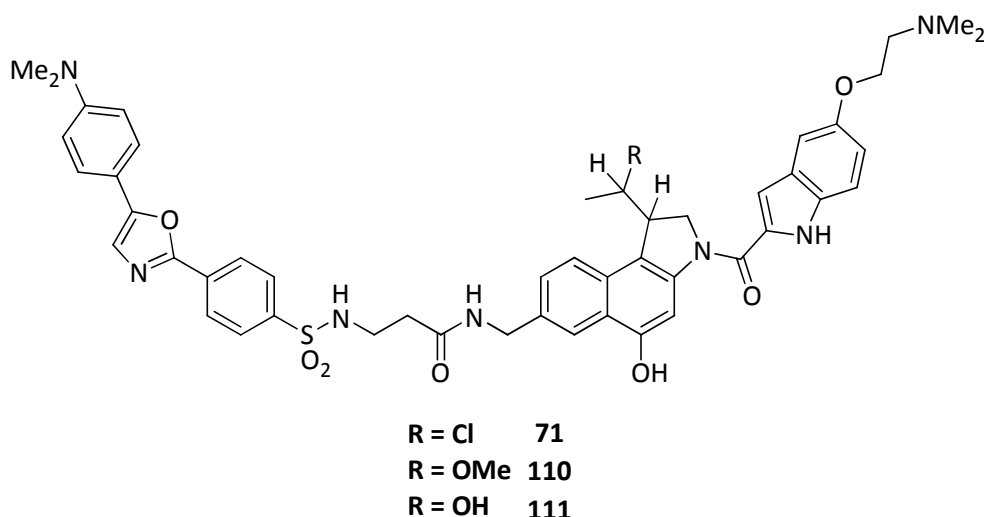


Abbildung 53. Struktur der untersuchten fluoreszenzmarkierten Derivate.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die synthetisierten Verbindungen in ihren Absorptions- und Emissionsmaxima kaum unterscheiden. In Abbildung 54 sind stellvertretend die Absorptions- und Emissionsspektren für die Verbindung (1*S*,10*R*)-**71** zu sehen. In Methanol findet man das Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{max,Abs}} = 376 \text{ nm}$, während es in wässrigem Puffer bei $\lambda_{\text{max,Abs}} = 366 \text{ nm}$ zu finden ist. Außerdem fällt auf, dass das Emissionsmaximum in Methanol mit $\lambda_{\text{max,Em}} = 564 \text{ nm}$ gegenüber dem in wässrigem Bildgebungspuffer mit $\lambda_{\text{max,Em}} = 534 \text{ nm}$ um 32 nm verschoben ist, was gleichzeitig zu einer Verringerung des Stokes-Shifts um 50 nm auf 138 nm führt.

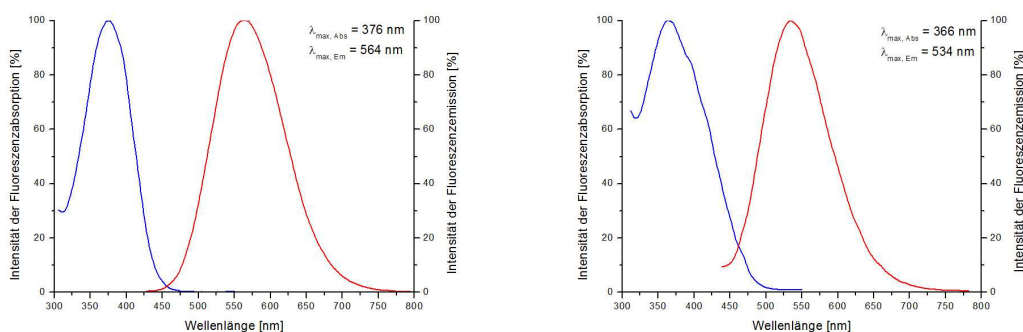


Abbildung 54. Fluoreszenzspektren von (1S,10R)-71 in MeOH (links) und wässrigem Bildgebungspuffer (rechts).

Betrachtet man eine Überlagerung der Spektren, der synthetisierten Verbindungen (1S,10R)-71, (1R,10S)-71, (1S,10R)-110, (1S,10R)-111 sowie der von *B. Krewer* synthetisierten Verbindung (1S,10R)-71, fällt auf, dass die Spektren sehr gut übereinstimmen. Eine Ausnahme bildet hier jedoch die Probe aus (1S,10R)-71 und einem unbekanntem Nebenprodukt von *B. Krewer*, die über ein anderes Verfahren synthetisiert wurde (s. Kapitel 7.2) und neben den normalen Maxima ein weiteres Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{max, Abs}} = 525 \text{ nm}$ (Abbildung 55) besitzt.

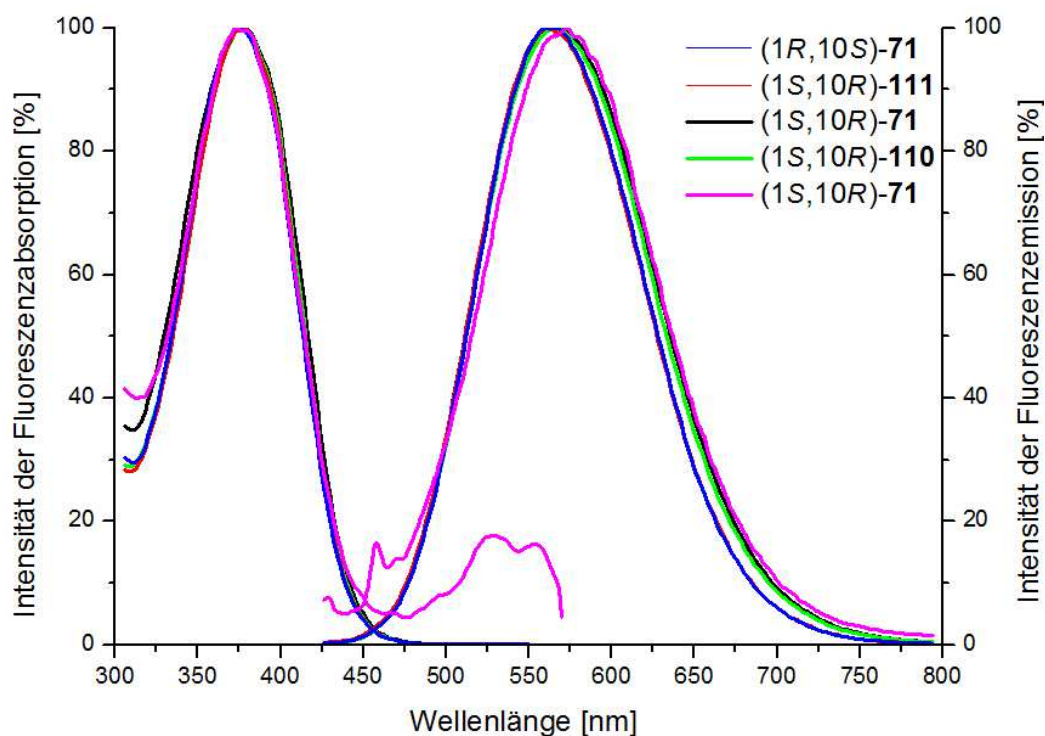


Abbildung 55. Fluorimetrische Bestimmung der Absorptions- und Emissionsspektren in MeOH für die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen (blaue, rote, schwarze und grüne Linie) sowie der von *B. Krewer* synthetisierten Verbindung (magentafarbene Linie).

Auf Grund der fluorimetrischen sowie der LC-MS-spektroskopischen Untersuchungen der Proben lässt sich festhalten, dass es bei der Synthese von (1*S*,10*R*)-**71** über das Galaktosid und dessen Abspaltung unter harschen Bedingungen (MeOH, konzentrierte HCl für 6 Tage) zur Bildung eines unerwünschten Nebenproduktes kommt, dem die zusätzliche Absorptionsbande zugeschrieben werden muss.

2.2 Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Derivate in lebende Zellen durch CLSM

B. Krewer konnte mit der von ihr entwickelten Synthese zur Darstellung von fluoreszenzmarkiertem *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Derivat **71** eine bis dahin unbekannte Zweifachfärbung untersuchen. Die verunreinigte Probe zeigte zum Einen Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{max,Abs}} = 405 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max,Em}} = 500 \text{ nm}$ sowie zum Anderen bei $\lambda_{\text{max,Abs}} = 514 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max,Em}} = 560 \text{ nm}$. Während die erste erwähnte Fluoreszenz in Zellregionen wie Endosomen und Lysosomen beobachtet werden konnte, wurde die zweite Fluoreszenz in Mitochondrien beobachtet (Abbildung 56).

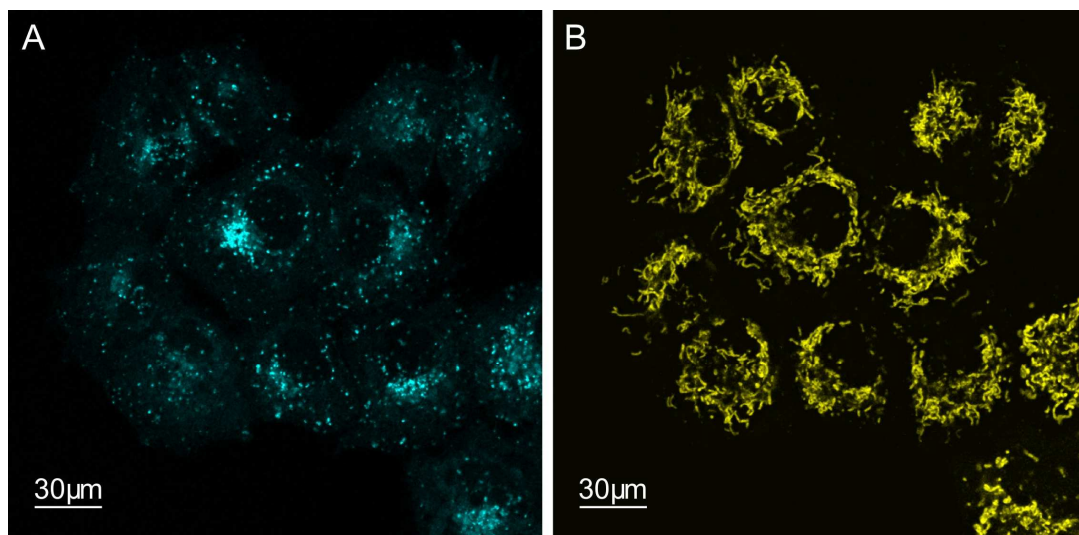


Abbildung 56. Intrazelluläre Verteilung des Gemisches aus Zwei-Farb-Fluoreszenzmarkers (1*S*,10*R*)-**71** und eines nicht identifizierbaren Nebenproduktes in A549 Zellen. Endosomale Vesikel werden sichtbar bei $\lambda_{\text{abs}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ (A) während bei $\lambda_{\text{abs}} = 514 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$ Mitochondrien sichtbar werden (B).

Die durch das neue Synthesekonzept hergestellten Derivate (1*S*,10*R*)-**71**, (1*R*,10*S*)-**71**, (1*S*,10*R*)-**110** und (1*S*,10*R*)-**111**, sowie die von *B. Krewer* synthetisierte verunreinigte Probe von (1*S*,10*R*)-**71** und einem Nebenprodukt wurden mit einem Konfokal-Mikroskop untersucht. Obwohl intrazelluläre Vesikel bei den, in dieser Arbeit synthetisierten Substanzen bei $\lambda_{\text{abs}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ sichtbar werden (linke Spalte), sind, mit Ausnahme von Autofluoreszenz keine fluoreszierenden Spezies bei $\lambda_{\text{abs}} = 514 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$ vorhanden (rechte Spalte Abbildungen 57 und 58). Auf Grund der in dieser Arbeit durchgeführten synthetischen, wie auch fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass es sich bei (1*S*,10*R*)-**71** nicht um einen Zweifarb-Fluoreszenzmarker handelt, da die zweite Zellfärbung durch ein nicht indentifizierbares Nebenprodukt hervorgerufen wird.

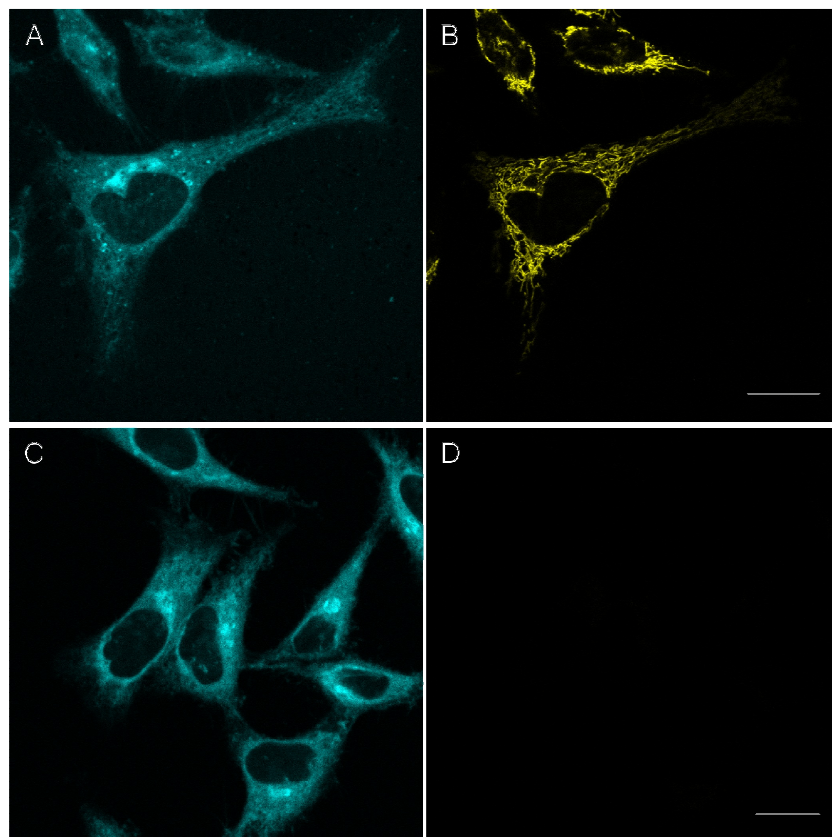


Abbildung 57. Untersuchung der zellulären Aufnahme von einem Gemisch aus (1*S*,10*R*)-**71** und nicht identifizierbarem Nebenprodukt (A und B) sowie von (1*S*,10*R*)-**71** (C und D). Maßstab 20 μm .

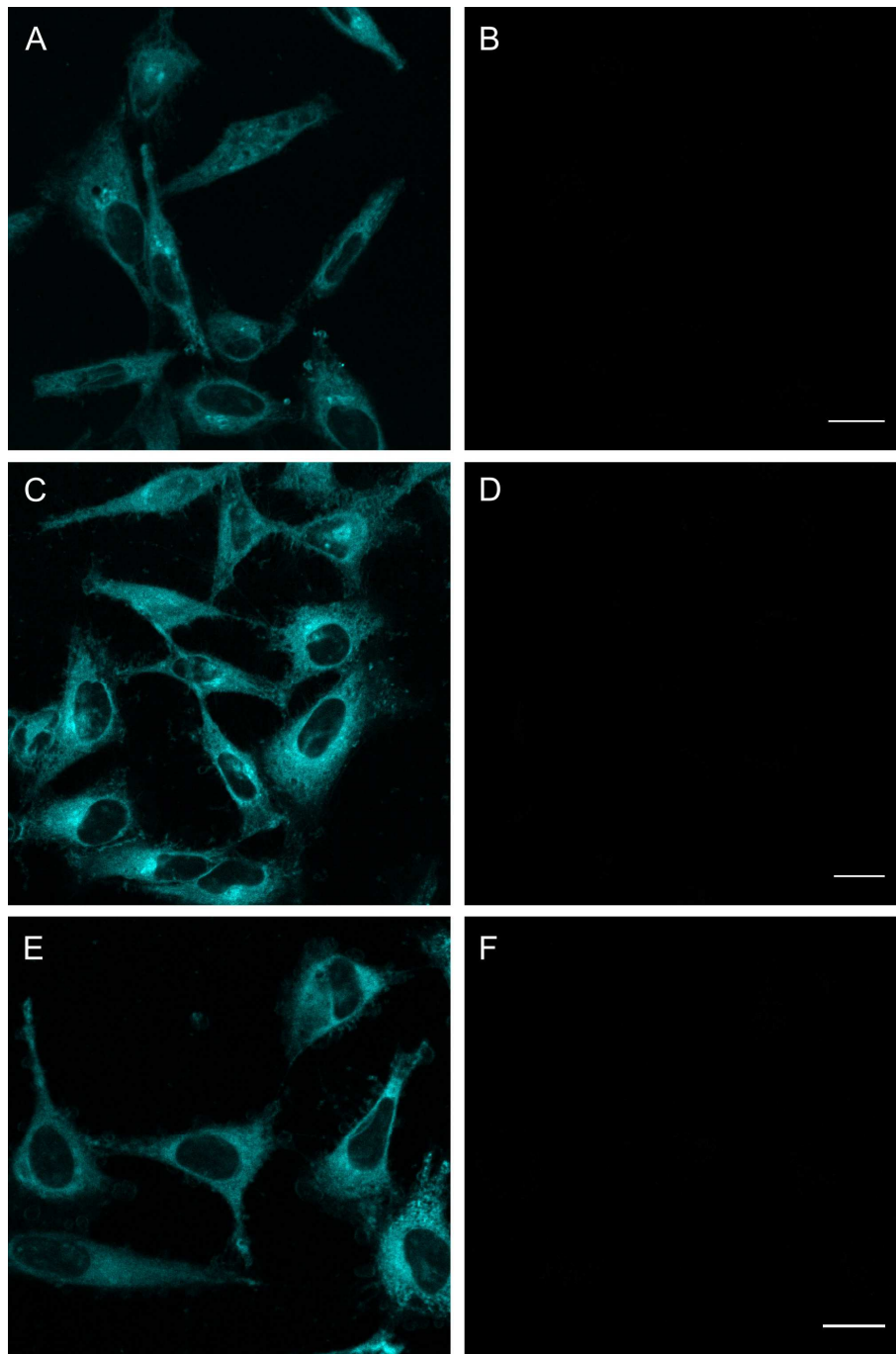


Abbildung 58. Untersuchung der zellulären Aufnahme der synthetisierten Substanzen (1*S*,10*R*)-**110** (A und B), (1*S*,10*R*)-**111** (C und D) sowie (1*R*,10*S*)-**71** (E und F). Maßstab 20 μm .

3 Synthese des fluoreszenzmarkierten Prodrugs (1S)-72

3.1 Synthese des *seco*-CCBI-Grundgerüsts (1S)-115

Ausgehend vom *N*-Boc geschützten Naphthalin-Derivat **112** konnte das *seco*-CCBI-Grundgerüst (1S)-**115** in Anlehnung an Arbeiten aus den Arbeitskreisen *Tietze* und *Boger* dargestellt werden.^{134f,153}

Hierzu musste **112** zunächst regioselektiv an C-1 iodiert werden. Lösen des Naphthalins **112** in einem 1:1 Gemisch aus MeOH und THF, sowie Versetzen bei Raumtemperatur mit *N*-Iod-Succinimid und katalytischen Mengen Toluolsulfonsäure lieferte das Produkt **75** (Abbildung 59). Da es sich hierbei um eine literaturbekannte Stufe handelte, wurde auf Grund der großen Ansatzmenge auf eine Aufreinigung durch Säulenchromatographie verzichtet.

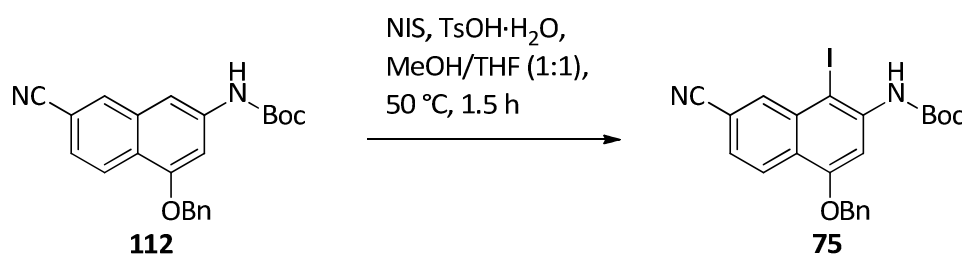


Abbildung 59. Iodierung des *N*-Boc geschützten Naphthalins **112**.

Da anschließende Versuche zur enantiomerenreinen Darstellung fehlschlagen^{4e}, musste auf die Kupplung mit (*E/Z*)-1,3-Dichlorpropen (**113**) und anschließende radikalische Zyklisierung zum gewünschten *seco*-CCBI-Grundgerüst (1S)-**74** zurückgegriffen werden (Abbildung 60).

Hierzu wurde der Iodaromat **75** bei Raumtemperatur in DMF mit NaH versetzt und anschließend mit (*E/Z*)-1,3-Dichlorpropen (**103**) alkyliert. Das resultierende Alken **104** konnte unter radikalischen Bedingungen mit AIBN (Azobisisobutyronitril) und TTMSS (Tetra-Tri-Methyl-Silyl-Silan) in Toluol bei 80 °C zum gewünschten *rac*-*seco*-CBI-

Grundgerüst *rac*-(1S)-**74** cyclisiert werden. Anschließende Trennung der Enantiomere durch HPLC an chiraler stationärer Phase (Chiralpak IA) und Debenzylierung durch hydrogenolytische Spaltung durch H₂ und Palladium auf Aktivkohle bei Raumtemperatur in Essigester lieferte das gewünschte Produkt (1S)-**115**.

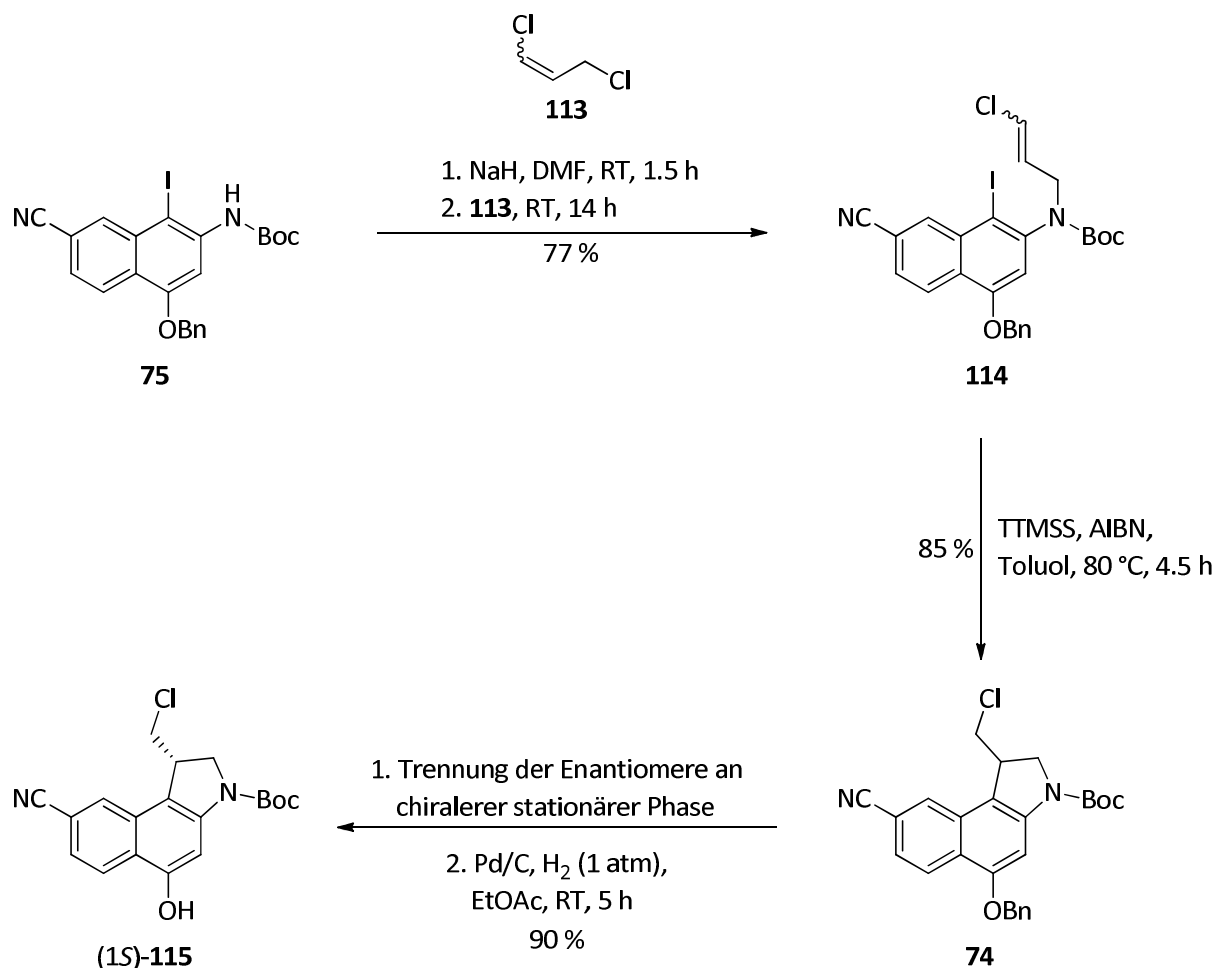


Abbildung 60. Syntheschema zur Darstellung des enantiomerenreinen *seco*-CCBI-Grundgerüsts (1S)-**115**.

3.2 Synthese des CBI-DMAI-Prodrugs (1S)-**118**

Das freie Phenol (1S)-**115** wurde durch BF₃·OEt₂ vermittelte Abspaltung der *N*-Boc-Schutzgruppe in dessen sekundäres Amin überführt, das im Anschluss mit DMAI-CO₂H (**104**) und EDAC·HCl als Kupplungsreagenzien sowie Glykosidierung nach der Trichloracetimidatmethode nach Schmidt¹⁵⁷ mit **116** das tetraacetylierte Galaktosid (1S)-**73** in einer Ausbeute von 53% lieferte (Abbildung 61).

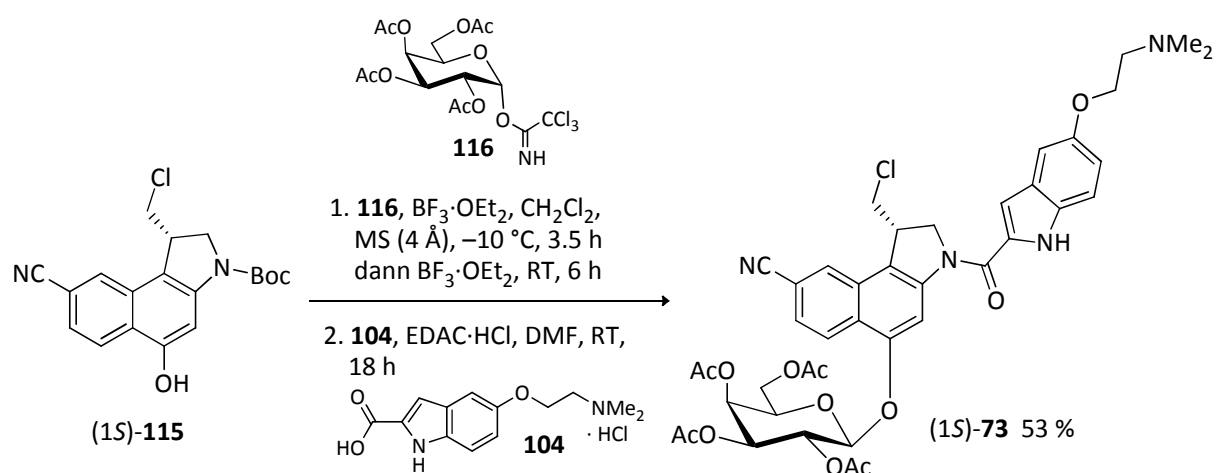


Abbildung 61. Syntheschema zur Darstellung des tetraacetylierten Galaktosids (1S)-**73** ausgehend vom Phenol (1S)-**115**.

Anschließende Reduktion des Nitrils in (1S)-**73** unter Verwendung von $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und H_2 in Ethanol für 48 h bei Raumtemperatur sowie basische Spaltung der Acetyl-schutzgruppen in (1S)-**117** durch Natriummethanolat in Methanol lieferte das Galaktosid (1S)-**118** mit einer Ausbeute von 84% (Abbildung 62). Hierdurch konnte die primäre Aminofunktion dargestellt werden, die zur Kupplung mit dem gewählten Fluorochrom **119** essentiell ist.

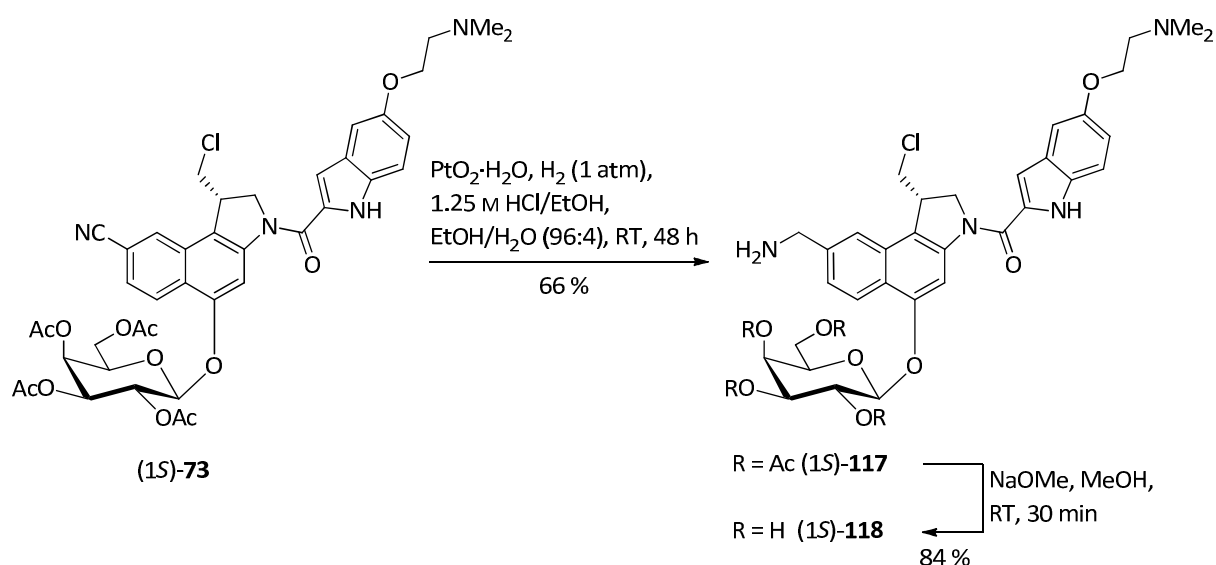


Abbildung 62. Syntheschema zur Darstellung des Galaktosides (1S)-**118**.

3.3 Synthese des fluoreszenzmarkierten CBI-DMAI-Prodrugs (1S)-72

Zur Darstellung des gewünschten fluoreszenzmarkierten (1S)-CBI-DMAI-Galaktosides (1S)-72 wurde das Amin (1S)-118 mit dem Fluorescein-Derivat 119 umgesetzt. Deprotonierung desamins mit Hünig-Basis in DMF bei Raumtemperatur und Versetzen mit einer Lösung des *N*-Hydroxy-Succinimid-Esters 119 in DMF für 18 h lieferte das gewünschte Galaktosid (1S)-72 in einer Ausbeute von 46% nach präparativer HPLC.

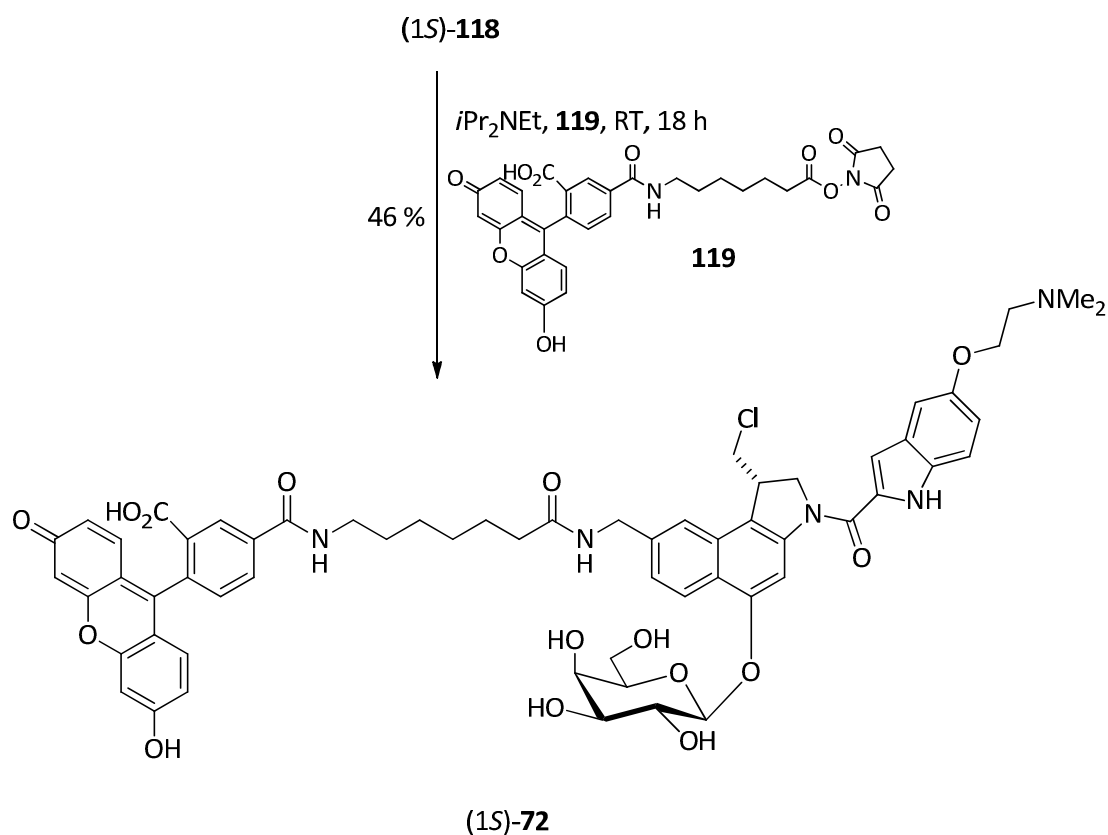


Abbildung 63. Synthese des fluoreszenzmarkierten(1S)-CBI-DMAI-Galaktosides (1S)-72.

3.4 ***In-vitro*-Zytotoxizitätsuntersuchungen des fluoreszenzmarkierten (1S)-CBI-DMAI-Galaktosides (1S)-72 sowie des Galaktosides (1S)-118**

Die *In-vitro*-Zytotoxizität der dargestellten Verbindungen wurde von *Dr. Ingrid Schuberth, Angela Rübeling* und *Anja Herdlitschke* in der Abteilung für Zellbiologie am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie unter Verwendung eines modifizierten HTCFA-Tests (Human Tumor Colony Forming Ability-Test) bestimmt.

3.4.1 **Der HTCFA-Test zur Bestimmung der Zytotoxizität**

Für den Klonogenitätstest, der sich an den HTCFA-Test anlehnt und die Proliferationsfähigkeit von einzelnen Zellen wiedergibt (Abbildung 64) wurde das adhärent wachsende humane Bronchialkarzinom der Linie A549 verwendet. Die Aussaat der Tumorzellen erfolgte aus einer Stammkultur, in der sie in einem Kulturmedium (DMEM mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum, 44 mM NaHCO₃ und 4 mM Glutamin) bei 37 °C und 7.5% CO₂-Begasung in Luft permanent gehalten wurden, in Konzentrationen von 10² bis 10⁴ Zellen in 6-well Multischalen. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen einmal mit dem serumfreien Inkubationsmedium *UltraCulture* gewaschen und die Zellen anschließend in diesem Medium 24 Stunden mit zehn bis zwölf verschiedenen Konzentrationen (drei dekadische Größenordnungen) der zu testenden Substanz inkubiert. Diese wurde vorher frisch in einer DMSO-Stammlösung angesetzt und mit dem Inkubationsmedium verdünnt, so dass in den Näpfen letztlich eine DMSO-Konzentration von 1% vorlag. Nach Entfernen der Testsubstanz und einem weiteren Waschgang mit dem Kulturmedium wurden die verbliebenen Zellen 12 Tage in normalem Kulturmedium kultiviert. Anschließend wurde dieses entfernt, die gebildeten Klone wurden getrocknet, mit *Löffler's* Methylenblau angefärbt und ab einer Klongröße von ca. 500 µm makroskopisch ausgezählt. Die Bestimmung der relativen Klonbildungsraten erfolgte anhand der in Abbildung 64 angegebenen Formel, wobei sich die Klonzahl

des Kontrollversuches aus unbehandelten Zellen ergab und gleich 100% gesetzt wurde. Die Freisetzung der zytotoxischen Verbindungen aus den Prodrugs erfolgte durch Zugabe von 4.0 U/mL β -D-Galaktosidase. Jede Versuchsreihe wurde in der Regel mindestens dreimal als Duplikat durchgeführt, um reproduzierbare Testergebnisse zu erhalten.

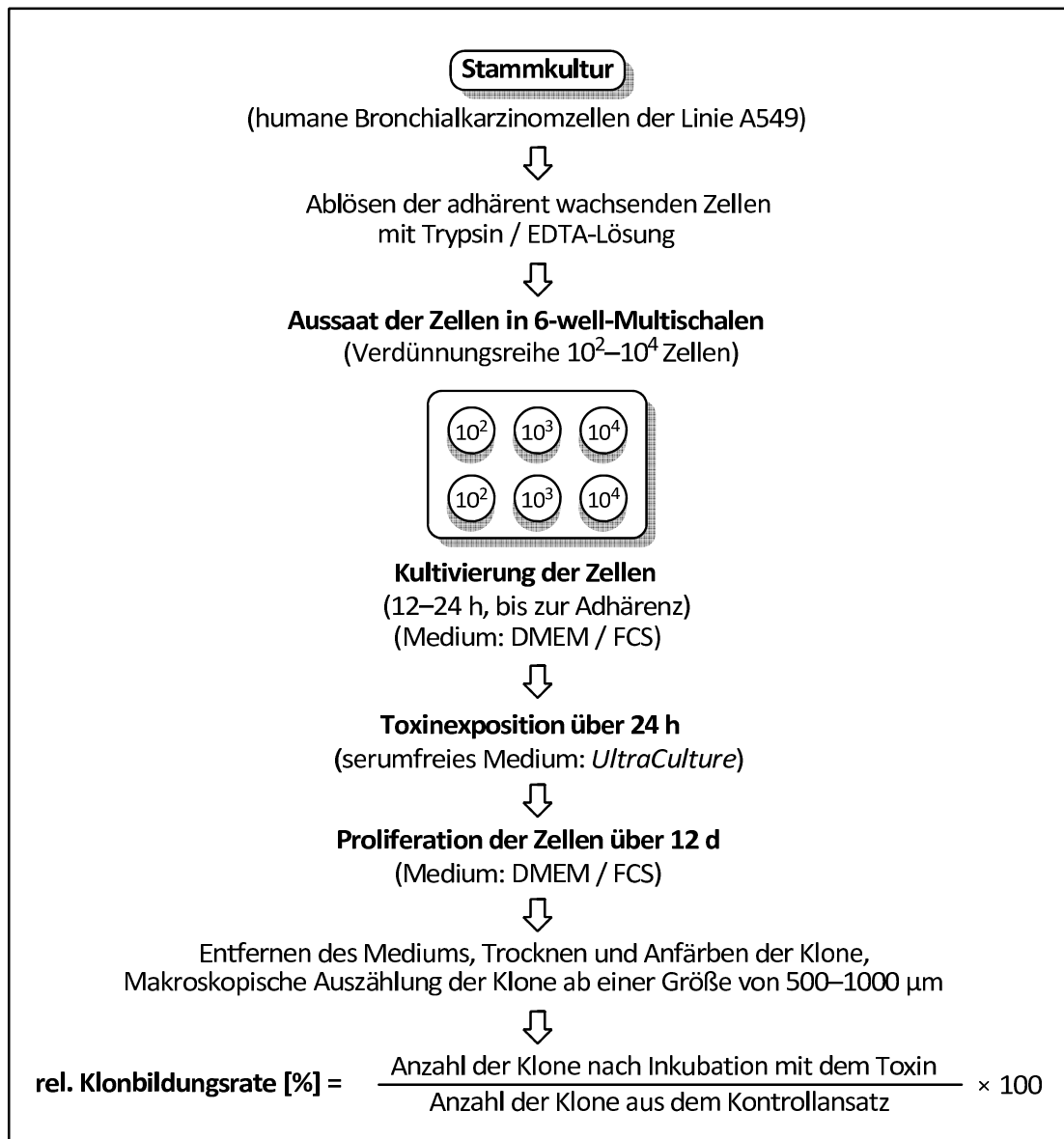


Abbildung 64. Schematische Darstellung des nach Dr. *Ingrid Schuberth* modifizierten HTCA-Tests.

3.4.2 Ergebnisse zur Untersuchung der *In-vitro*-Zytotoxizität an humanen Bronchialkarzinomzellen (A549) für das fluoreszenzmarkierte (1S)-CBI-DMAI-Galaktosid (1S)-72 sowie das Galaktosid (1S)-118

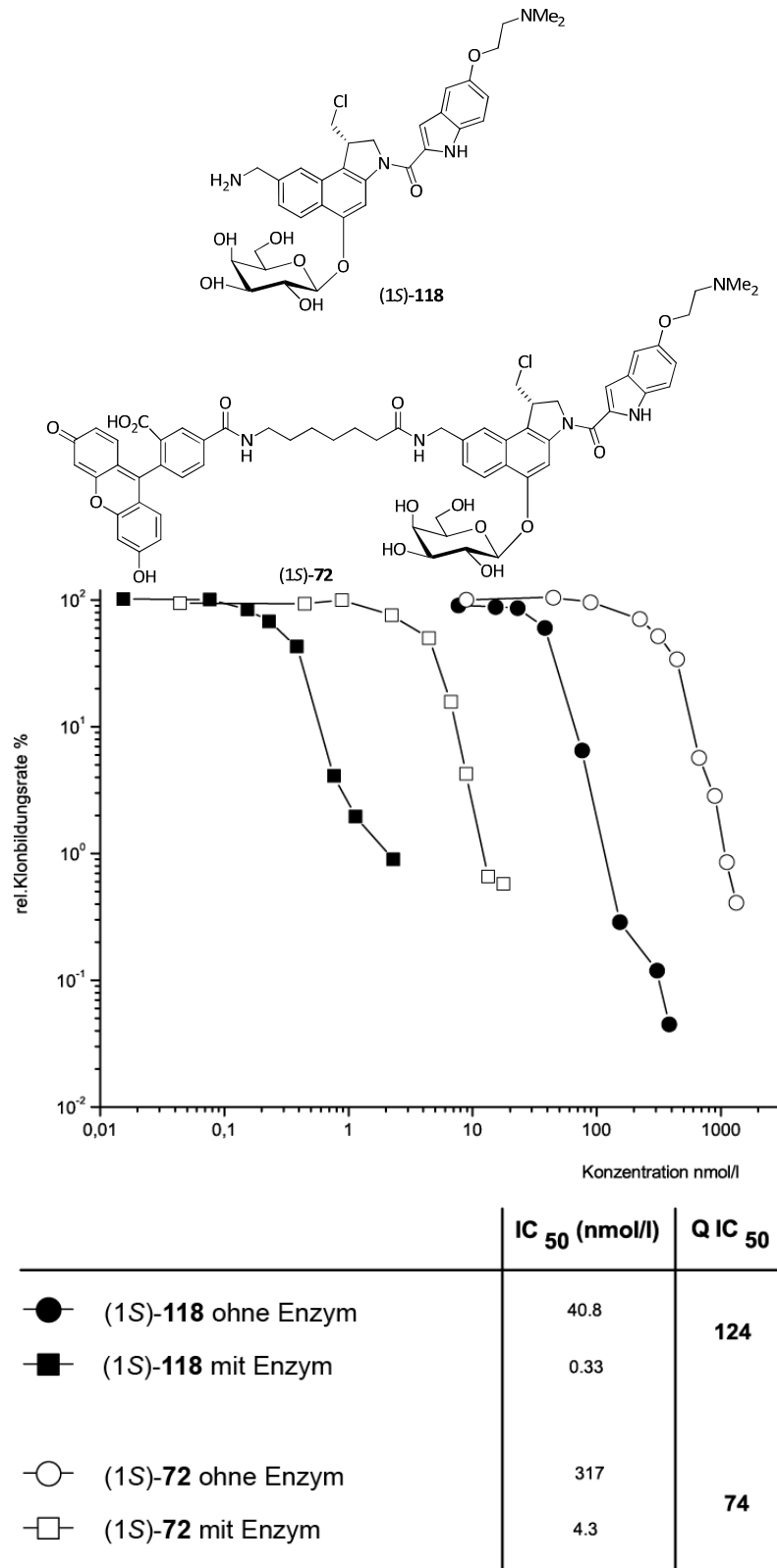


Abbildung 65. *In-vitro*-Zytotoxizitäten (A549) des fluoreszenzmarkierten (1S)-CBI-DMAI-Galaktosides (1S)-72 sowie des nicht markierten Galaktosides (1S)-118.

Abbildung 65 zeigt die Ergebnisse der *In vitro*-Untersuchungen an humanen Bronchialkarzinomzellen (A549) für das fluoreszenzmarkierte (1S)-CBI-DMAI-Galaktosid (1S)-**72** sowie das nicht markierte Galaktosid (1S)-**118**.

Betrachtet man die IC_{50} -Werte für das Aminomethyl-Galaktosid (1S)-**118**, so fällt auf, dass es in Abwesenheit des Enzyms β -D-Galaktosidase, wie erwartet mit $IC_{50} = 40.8$ nM um einem Faktor 7.8 toxischer ist, als das fluoreszenzmarkierte Galaktosid (1S)-**72** ($IC_{50} = 317$ nM). Die Galaktoside (1S)-**118** und (1S)-**72** zeigen in Anwesenheit des Enzyms IC_{50} -Werte von $IC_{50} = 0.33$ nM ((1S)-**118**) bzw. $IC_{50} = 4.3$ nM ((1S)-**72**) und damit QIC_{50} -Werte von $QIC_{50} = 124$ für das (1S)-**118** Galaktosid sowie $QIC_{50} = 74$ für das fluoreszenzmarkierte Galaktosid (1S)-**72**. Auf Grund der Kriterien für Wirkstoffe, die im Rahmen von ADEPT eingesetzt werden können ($QIC_{50} > 1000$, $IC_{50} < 10$ nM) kann festgestellt werden, dass sich die synthetisierten Verbindungen auf Grund der nur geringen QIC_{50} -Werte nicht für eine Anwendung eignen.

4 Synthese des *seco*-CBI-Grundgerüsts (1S)-128

Ausgehend von Benzaldehyd (**97**) sollte das *seco*-CBI-Grundgerüst (1S)-**128** in Anlehnung an Arbeiten von *Tietze* und *Boger* dargestellt werden.^{134f,153} Auf Grund der großen Anzahl von Stufen bis zur Darstellung neuartiger fluoreszenzmarkierter CBI-Duocarmycin-Analoga wurde die Synthese mit einer Ansatzgröße von 20 g Benzaldehyd (**97**) begonnen. Da es sich hierbei zum größten Teil um literaturbekannte Stufen handelte, wurde auf eine Aufreinigung durch Säulenchromatographie zur Einsparung von Zeit und Kosten verzichtet, wenn möglich aber eine Umkristallisation vorgenommen.

Das Alken **121** konnte in einer *Wittig-Horner*-Reaktion mit Benzaldehyd (**97**) *E*-selektiv dargestellt werden. Hierzu wurde das Phosphonat **120** mit Natriumhydrid in THF deprotoniert und Benzaldehyd (**97**) zugegeben. Anschließende Hydrolyse des *tert*-Butylesters **121** in einem Lösungsmittelgemisch aus Trifluoressigsäure und Wasser (9:1) für 20 h bei Raumtemperatur lieferte die Carbonsäure **96**, die nach einer intramolekularen *Friedel-Crafts*-Acylierung durch Verwendung von Kaliumacetat in Essigsäureanhydrid das acetylgeschützte Naphthol **122** lieferte. Die Schutzgruppe in **122** wurde durch Kaliumcarbonat in EtOH und Rühren für 1 h unter Rückfluss entfernt und das erhaltene freie Phenol **123** mit Benzylbromid, katalytischen Mengen Tetrabutylammoniumiodid (TBAI) und Kaliumcarbonat in DMF zum benzylgeschütztem Naphthol **124** umgesetzt. Anschließende Verseifung des Ethylesters **124** durch LiOH·H₂O in einem Lösungsmittelgemisch aus THF/MeOH/H₂O (3:1:1) lieferte nach 2 Tagen die Carbonsäure **125**, welche nach Umkristallisation aus Essigester und *n*-Hexan mit einer Ausbeute von 53% über 6 Stufen erhalten wurde (Abbildung 66).

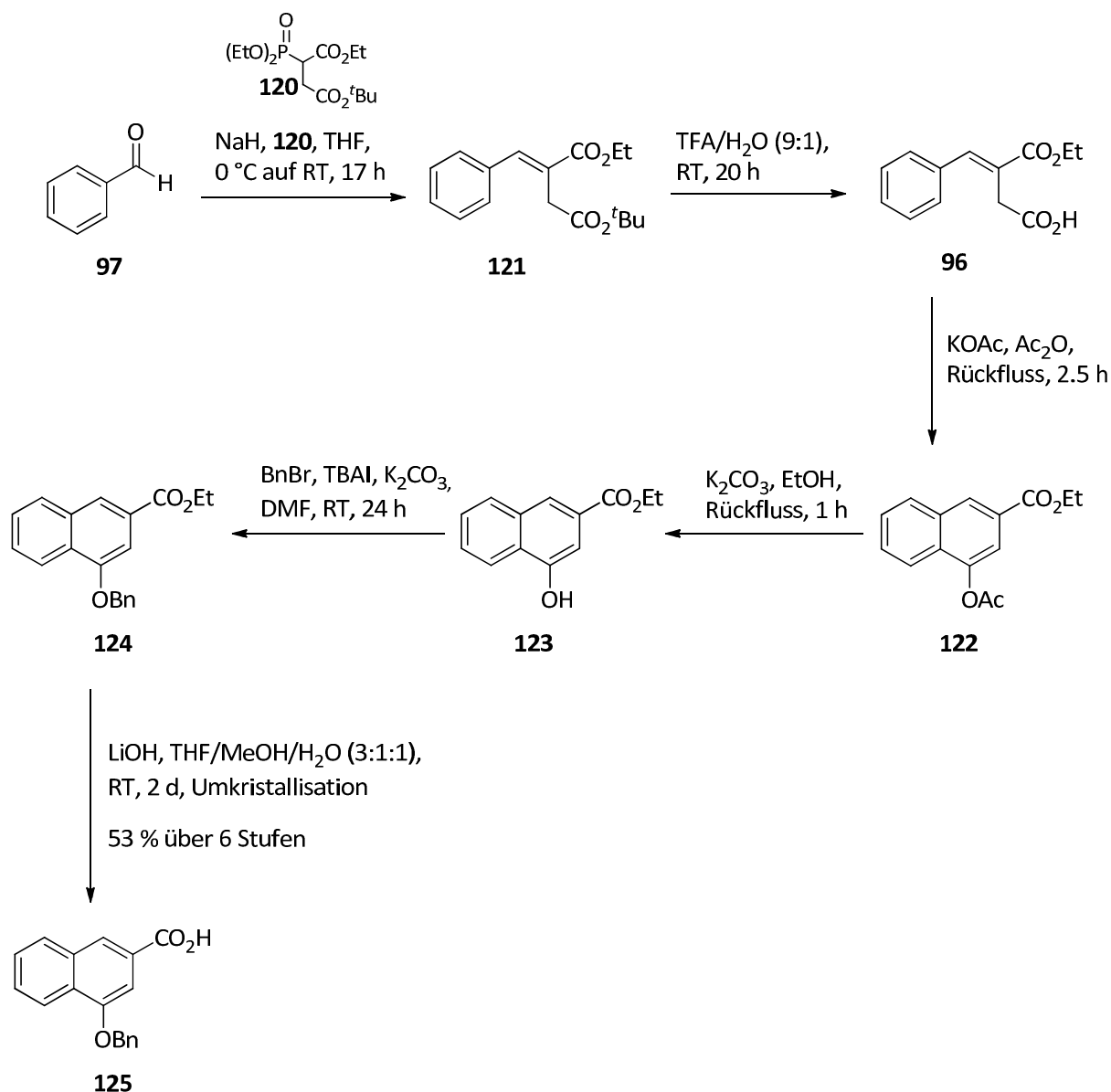


Abbildung 66. Syntheschema zur Darstellung der Carbonsäure **125** ausgehend von Benzaldehyd (**97**) über 6 Stufen.

Die Überführung der Carbonsäure **125** in das *N*-Boc geschützte Naphthalin **126** wurde in einer *Curtius*-Umlagerung ermöglicht. Hierzu wurde Diphenylphosphorylazid (DPPA) als Azidquelle genutzt und mit der Carbonsäure **125**, *tert*-Butanol sowie Molsieb (4 Å) und Triethylamin für 3 Tage unter Rückfluss gerührt. Das Produkt **126** wurde nach *Königstein*¹⁵⁸ durch Einsatz von Iod und Iodsäure in einem Lösungsmittelgemisch aus MeOH und H₂O (4:1) regioselektiv an C-4 zu **95** iodiert (Abbildung 67).

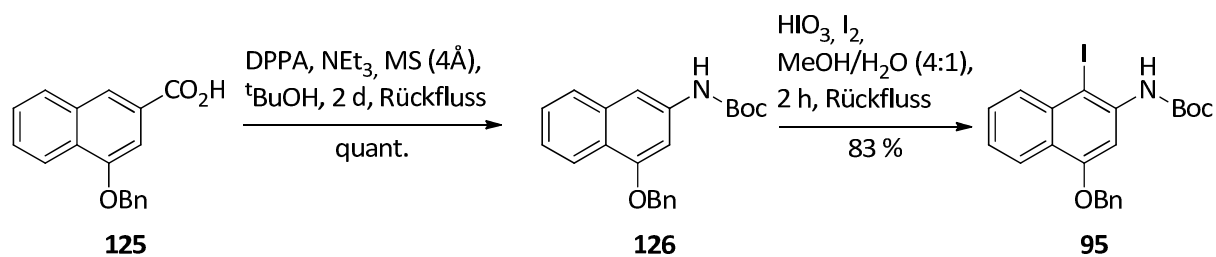


Abbildung 67. Synthese des Aryliodids **95** durch *Curtius*-Umlagerung und anschließende Iodierung nach *Königstein*.

Um den Zyklisierungsvorläufer **94** darzustellen, wurde das *N*-Boc geschützte Naphthalinderivat **95** durch Natriumhydrid in DMF deprotoniert und mit enantiomerenreinem Epoxynosylat **126** alkyliert. Anschließende Zinkat-vermittelte Zyklisierung zu (1S)-**127** sowie Chlorierung durch Verwendung einer *Appel*-Reaktion zu (1S)-**93** und abschließende Debenzylierung durch Palladium auf Aktivkohle und H₂-Atmosphäre der naphtholischen Schutzgruppe lieferte das *seco*-CBI-Grundgerüst (–)-(1S)-**128** (Abbildung 68). Anreicherung des enantiomeren Überschusses sowie Abtrennung des dechlorierten Produktes wurde durch HPLC an chiraler stationärer Phase erreicht.

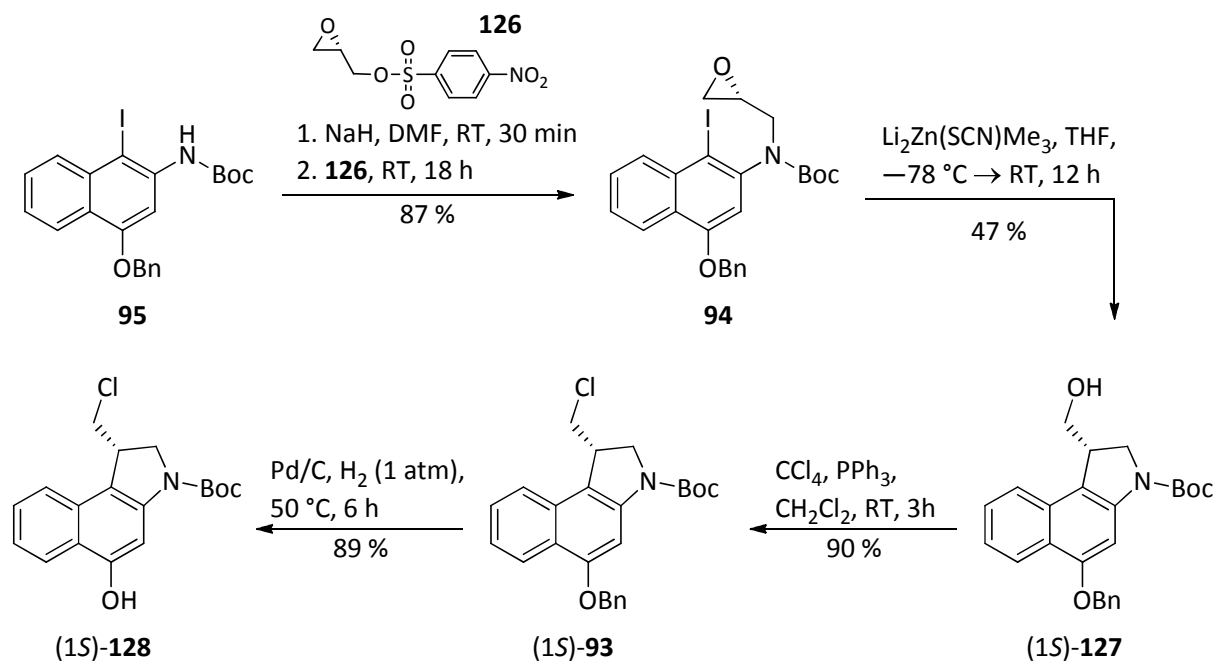


Abbildung 68. Syntheschema zur Darstellung des *seco*-CBI-Grundgerüsts (1S)-**128** ausgehend von Aryliodid **95**.

5 Synthese neuartiger fluoreszenzmarkierter CBI-Cumarin-Duocarmycin-Analoga

Zur Untersuchung der Zellaufnahme von synthetischen Analoga der Duocarmycine, wurde der DNA-Binder DMAI-CO₂H durch einen fluoreszenzaktiven DNA-Binder aus der Klasse der Cumarine ersetzt (Abbildung 69). Hierzu wurden drei verschiedene Cumarine ausgewählt. Zum einen die käuflich erwerbliche Cumarin-3-Carbonsäure (**131**) auf Grund des einfach Zugangs, das Dimethylaminocumarinsäure-Derivat DMACA (**62**), dass in vielen CLSM zur Aufklärung der zellulären Aufnahme von Naturstoffen¹⁵⁹ sowie in Multiphotonenapplikationen¹⁶⁰ eingesetzt wurde und auf Grund der Aminofunktion zu einer erhöhten Wasserlöslichkeit beitragen sollte. Außerdem wurde die in Abbildung 69 gezeigte Indol-Cumarin-2-Carbonsäure (**130**), die in seiner chemischen Struktur nur sehr gering von der, des DNA-Binders DMAI abweicht, eingesetzt, um die entsprechenden *seco*-Drugs sowie Galaktoside zu synthetisieren.

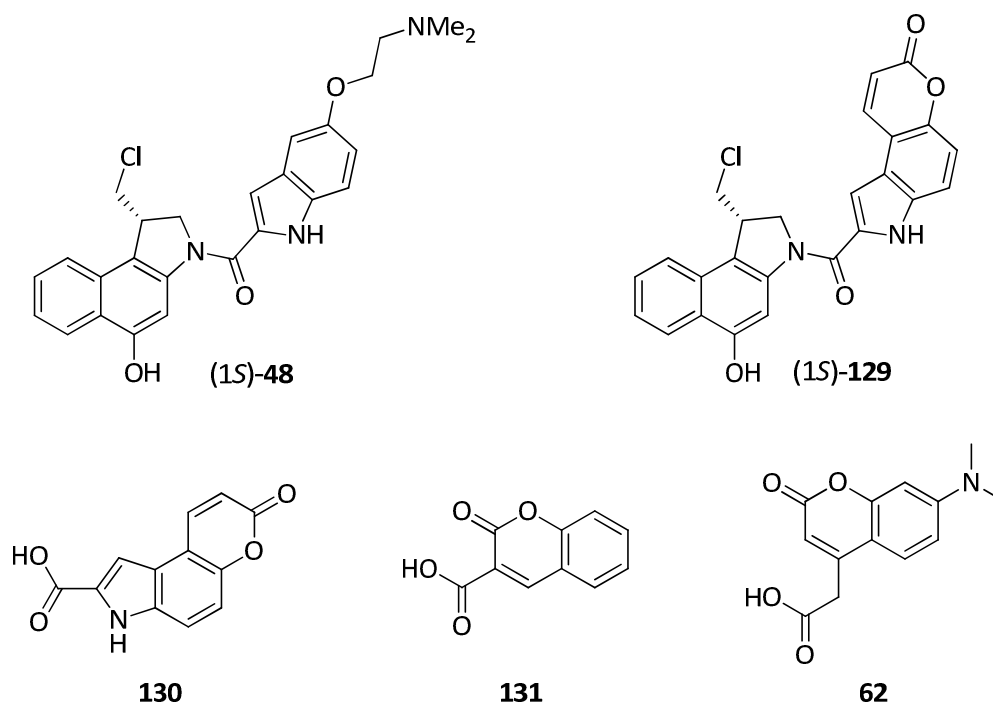


Abbildung 69. Strukturvergleich der *seco*-CBI-Analoga mit DMAI (15)-48 oder Cumarin (15)-129 als DNA-bindende Einheit sowie die Darstellung der verwendeten Cumarine: IndolCumarin-2-Carbonsäure (**130**), Cumarin-3-Carbonsäure (**131**) und DMACA (DimethylaminoCumarinicacid) (**62**).

5.1 Synthese der DNA-Binder Indol-Cumarin-2-Carbonsäure (**130**) sowie DMACA (**62**)

Zur Darstellung des Cumarin-Derivates DMACA (**62**) wurde *N,N*-Dimethylaminophenol (**132**) in einer *Pechmann*-Kondensation mit 1,3-Aceton-Dicarboxylate (**133**) sowie ZnCl_2 für 18 h unter Rückfluss gerührt und der entstandene Ethylester **134** im Anschluss durch $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ in einem Lösungsmittelgemisch aus THF/ H_2O (3:1) zur Carbonsäure DMACA (**62**) mit einer Ausbeute von 12% über 2 Stufen verseift (Abbildung 70).^{159a}

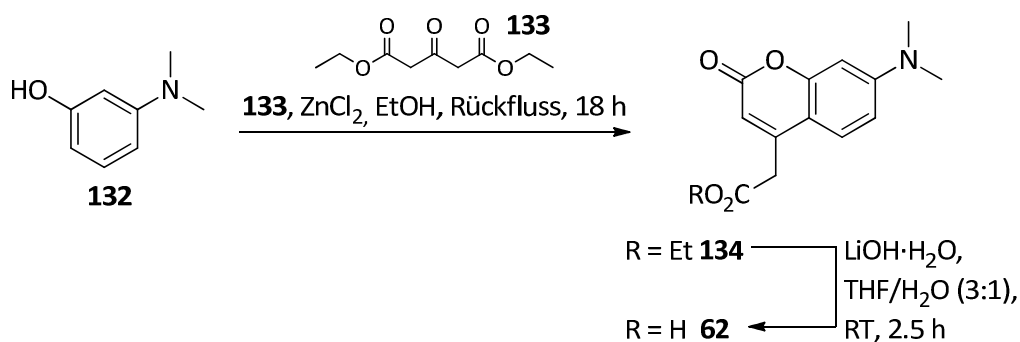


Abbildung 70. Synthese von DMACA (**62**) ausgehend von *m*-*N,N*-Dimethylaminophenol (**132**) über 2 Stufen mit einer Ausbeute von 12%.

Indol-Cumarin-2-Carbonsäure (**130**) konnte in Schwefelsäure aus 5-Hydroxy-Indol-2-Carbonsäure (**135**) und Äpfelsäure (**136**) in einer Mikrowellenapparatur dargestellt werden (Abbildung 71).¹⁶¹

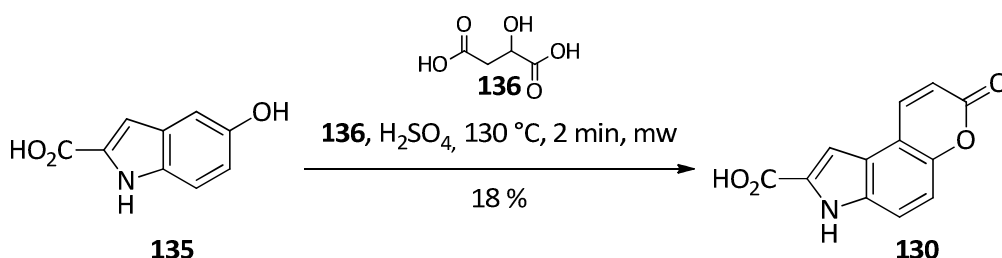


Abbildung 71. Synthese von Indol-Cumarin-2-Carbonsäure (**130**) ausgehend von **135** unter Verwendung einer Mikrowellenapparatur.

5.2 Synthese der *seco*-CBI-Cumarin-Drugs (15)-92, (15)-137 und (15)-138

Ausgehend vom Phenol (15)-128 konnten die *seco*-CBI-Cumarin-Drugs (15)-92, (15)-137 und (15)-138 über 2 Stufen hergestellt werden. So wurde zunächst die *N*-Boc-Schutzgruppe durch Suspendieren des Phenols (15)-128 in 4 M HCl/Essigester-Lösung entfernt, um das freie sekundäre Amin im Anschluss unter Verwendung von EDAC·HCl als Kupplungsreagenz mit der Carbonsäure des Cumarins (131, 130 oder 62) zu koppeln. Abschließend wurden alle erhaltenen *seco*-CBI-Drugs durch präparative HPLC (Kromasil 100 C-18) gereinigt (Abbildung 72).

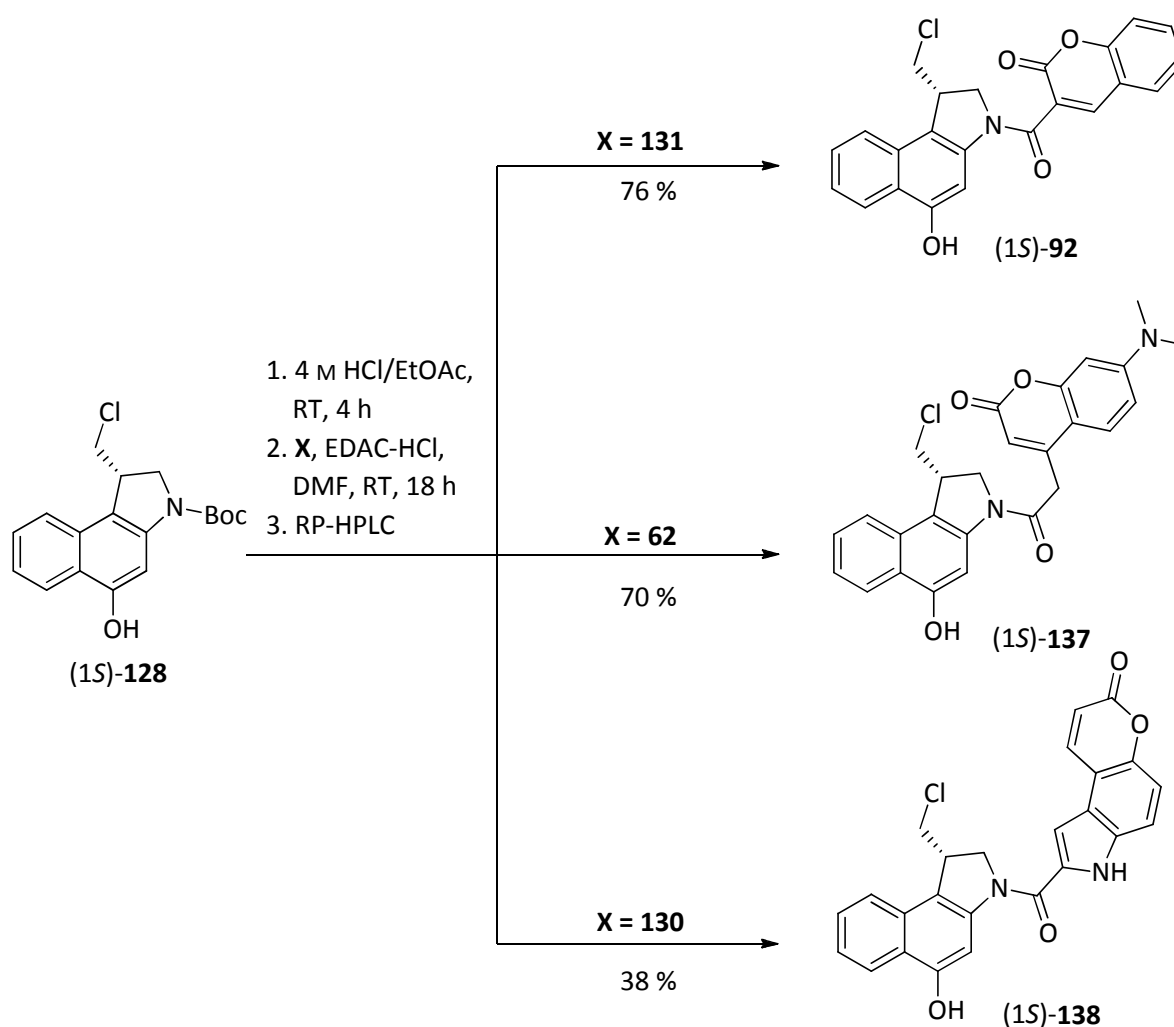


Abbildung 72. Synthese neuartiger fluoreszenzmarkierter *seco*-CBI-Cumarin-Drugs (15)-92, (15)-137 und (15)-138 ausgehend von Phenol (15)-128.

5.2.1 Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten des *seco*-CBI-DMACA-Drugs (1S)-137

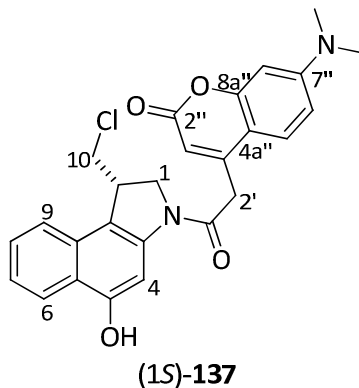


Abbildung 73. Struktur des *seco*-CBI-DMACA-Drugs (1S)-137.

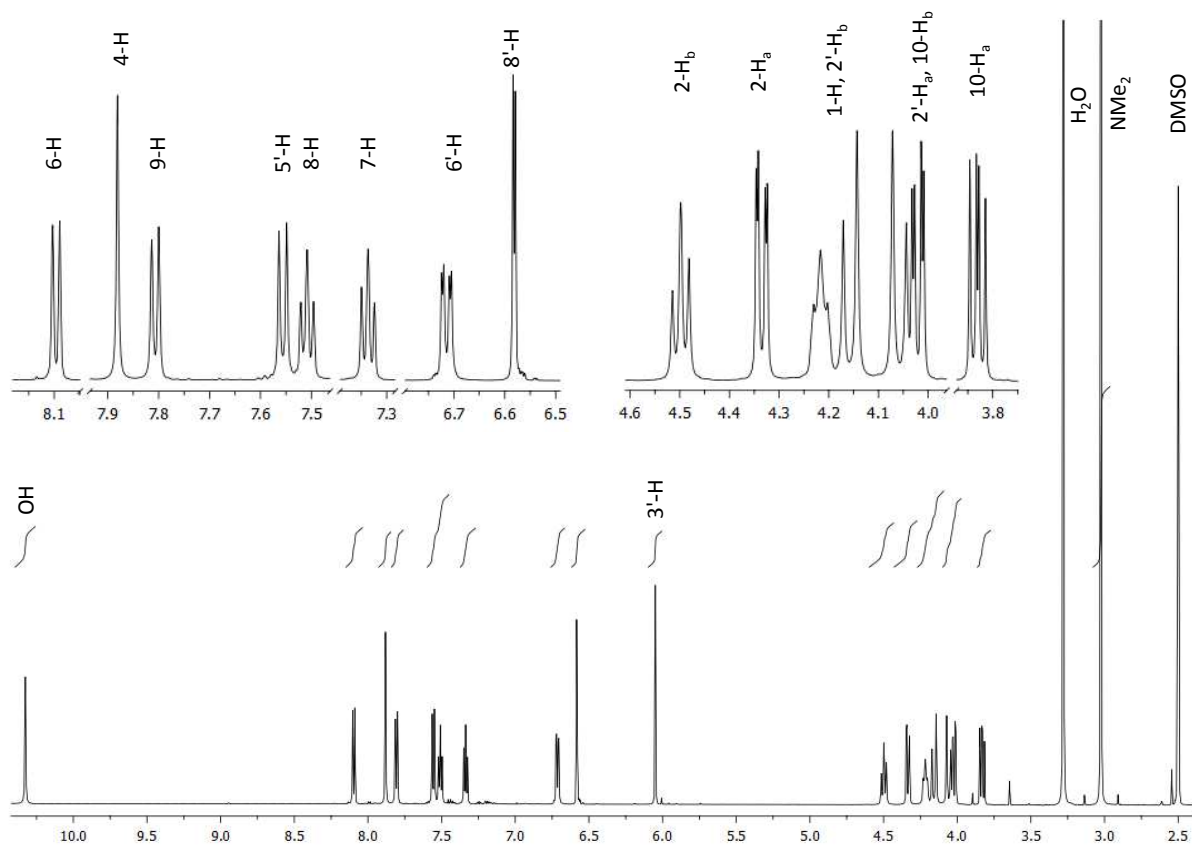


Abbildung 74. ^1H -NMR Spektrum (600 Mhz, DMSO-d_6) des *seco*-CBI-DMACA-Drugs (1S)-137.

Abbildung 74 zeigt das ^1H -NMR Spektrum sowie die Zuordnung der Signale des *seco*-CBI-DMACA-Drugs (1S)-137, das in DMSO-d_6 bei 600 MHz aufgenommen wurde.

Das Resonanzsignal für die Protonen der Dimethylaminfunktionalität des Cumarins findet man als Singulett bei $\delta = 3.02$ ppm. Es folgt ein Multiplett bei $\delta = 3.76$ – 3.88 ppm für das 10-H_a -Proton sowie ein Multiplett bei $\delta = 3.97$ – 4.00 ppm für das 10-H_b -Proton und eines der beiden Methylenprotonen an C-2'. Das zweite Proton von C-2' folgt im Multiplett bei $\delta = 4.12$ – 4.27 ppm. In diesem Multiplett befindet sich auch das Resonanzsignal für das Proton an C-1. Die Signale für die diastereotopen Protonen an C-2 resonieren zum einen bei $\delta = 4.34$ ppm als Dublett vom Dublett mit $J = 10.9$ Hz für die geminale und $J = 2.4$ Hz für die vicinale Kopplung zum Anderen bei $\delta = 4.50$ ppm als Triplet mit einer Kopplungskonstante von $J = 10.1$ Hz. Bei $\delta = 6.05$ ppm findet man das Signal für das $3''\text{-H}$ Proton als Singulett sowie bei $\delta = 6.58$ ppm ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von $J = 2.5$ Hz für $8''\text{-H}$, welches aus einer *meta*-Kopplung mit $6''\text{-H}$ resultiert. Das entsprechende Signal für $6''\text{-H}$ findet man bei $\delta = 6.71$ ppm als Dublett vom Dublett mit $J = 9.1$ Hz für die *ortho*-Kopplung zu $5''\text{-H}$ und $J = 2.5$ Hz für die *meta*-Kopplung zu $8''\text{-H}$. Bei $\delta = 7.34$ ppm und $\delta = 7.51$ ppm folgen die Resonanzsignale für die Protonen des CBI-Grundgerüsts an C-7 und C-8. Hierbei zeigt 7-H ein Triplet mit $J = 7.3$ Hz, das aus zwei *ortho*-Kopplungen, nämlich zu 6-H und 8-H, resultiert. Bei $\delta = 7.51$ ppm findet man ein Triplet mit $J = 7.6$ Hz, das durch Kopplungen des 8-H mit 9-H und 7-H entsteht. Es folgt bei $\delta = 7.56$ ppm ein Dublett mit einer typischen Kopplungskonstante für *ortho*-Kopplungen im Aromaten von $J = 9.0$ Hz. Diese Resonanz kann $5''\text{-H}$ zugeordnet werden und resultiert aus einer Kopplung mit $6''\text{-H}$. Bei $\delta = 7.81$ ppm beobachtet man das Resonanzsignal für 9-H, das mit einer Kopplungskonstante von $J = 8.4$ Hz für eine *ortho*-Kopplung zu 8-H steht. Bei $\delta = 7.88$ ppm findet man das Signal für das 4-H als Singulett sowie bei $\delta = 8.10$ ppm das Signal für 6-H als Dublett mit $J = 8.3$ Hz. Abschließend findet man bei $\delta = 10.32$ ppm das Resonanzsignal für die phenolische Hydroxyfunktion als breites Singulett.

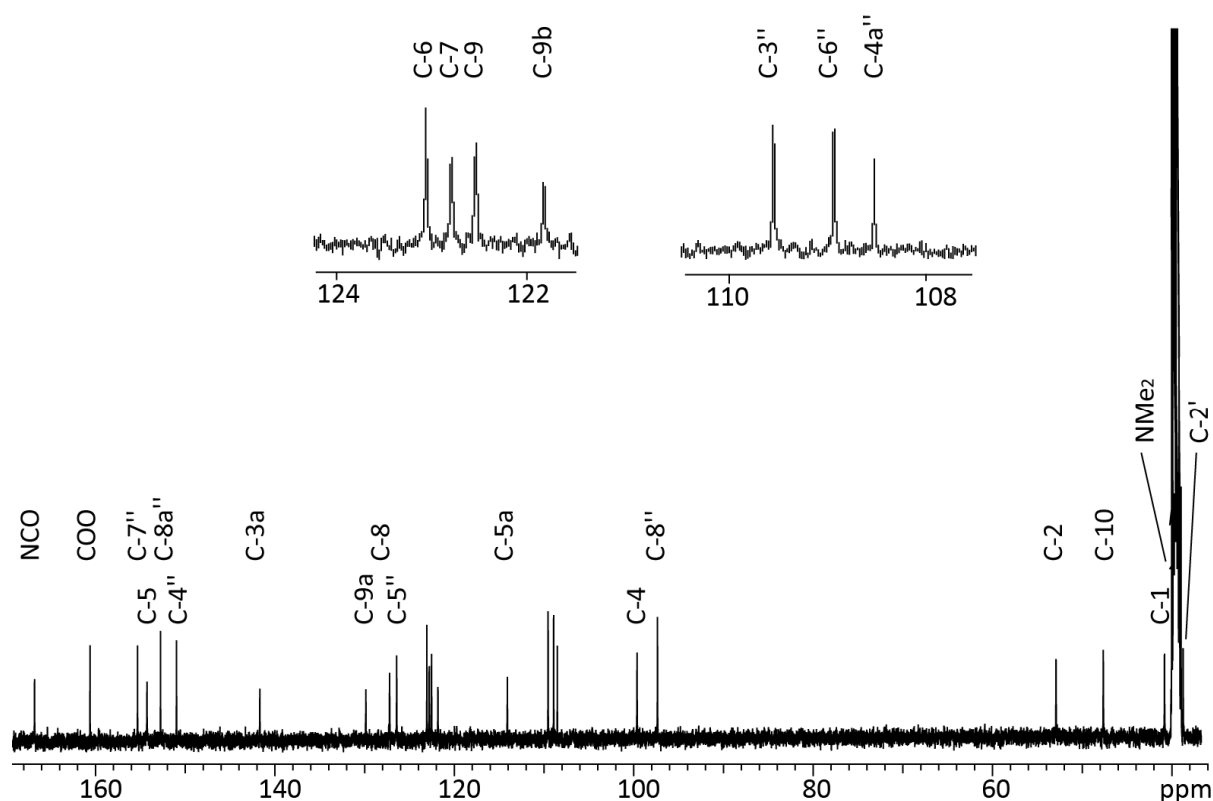


Abbildung 75. ^{13}C -NMR Spektrum (125 Mhz, DMSO-d_6) des *seco*-CBI-DMACA-Drugs (1S)-**137**.

Abbildung 75 zeigt das ^{13}C -NMR Spektrum (125 MHz, DMSO-d_6) sowie die Zuordnung der Signale für (1S)-**137**.

Bei $\delta = 38.7$ ppm resoniert die Methylengruppe des Cumarins, gefolgt von dem Signal für die Kohlenstoffatome der Dimethylaminofunktionalität bei $\delta = 39.6$ ppm. Es folgen die Signale für die aliphatischen Kohlenstoffatome des CBI-Grundgerüsts bei $\delta = 40.8$ (C-1), 47.6 (C-10) und 52.9 ppm (C-2). Es folgen die Resonanzen für die aromatischen Kohlenstoffatome. Zunächst die Signale für C-8'' und C-4 bei $\delta = 97.3$ und 99.6 ppm. Es folgt das Brückenkopfatom C-4a'' bei $\delta = 108.5$ ppm. Die Signale für den aromatischen Cumarinkern findet man bei $\delta = 108.9$ (C-6''), 109.5 (C-3''), 126.4 (C-5''), 151.0 (C-4''), 152.7 (C-8a'') und 155.3 ppm (C-7''). Die Signale für die aromatischen Kohlenstoffatome des CBI-Grundgerüsts werden bei $\delta = 114.1$ (C-5a), 121.8 (C-9b), 122.5 (C-9), 122.8 (C-7), 123.0 (C-6), 127.2 (C-8), 129.8 (C-9a), 141.7 (C-3a), 154.2 (C-5) ppm detektiert. Abschließend findet man die Signale für die Carbonylkohlenstoffatome bei $\delta = 160.6$ ppm für das Cumarin-Carbonyl sowie bei $\delta = 166.8$ ppm für das Amidcarbonyl.

5.3 Synthese der (1S)-CBI-Cumarin-Galaktoside (1S)-69, (1S)-139 und (1S)-140

Ausgehend vom Phenol (1S)-128 konnten die CBI-Cumarin-Galaktoside (1S)-69, (1S)-139 und (1S)-140 über 4 Stufen hergestellt werden. Zunächst wurde das freie Phenol (1S)-128 nach der Trichloracetimidatmethode nach Schmidt¹⁵⁷ unter $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ -Katalyse mit tetraacetyliertem D-Galaktose-Trichloracetimidat **116** gekuppelt und anschließend die säurelabile N-Boc-Schutzgruppe $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ -vermittelt abgespalten (Abbildung 76).

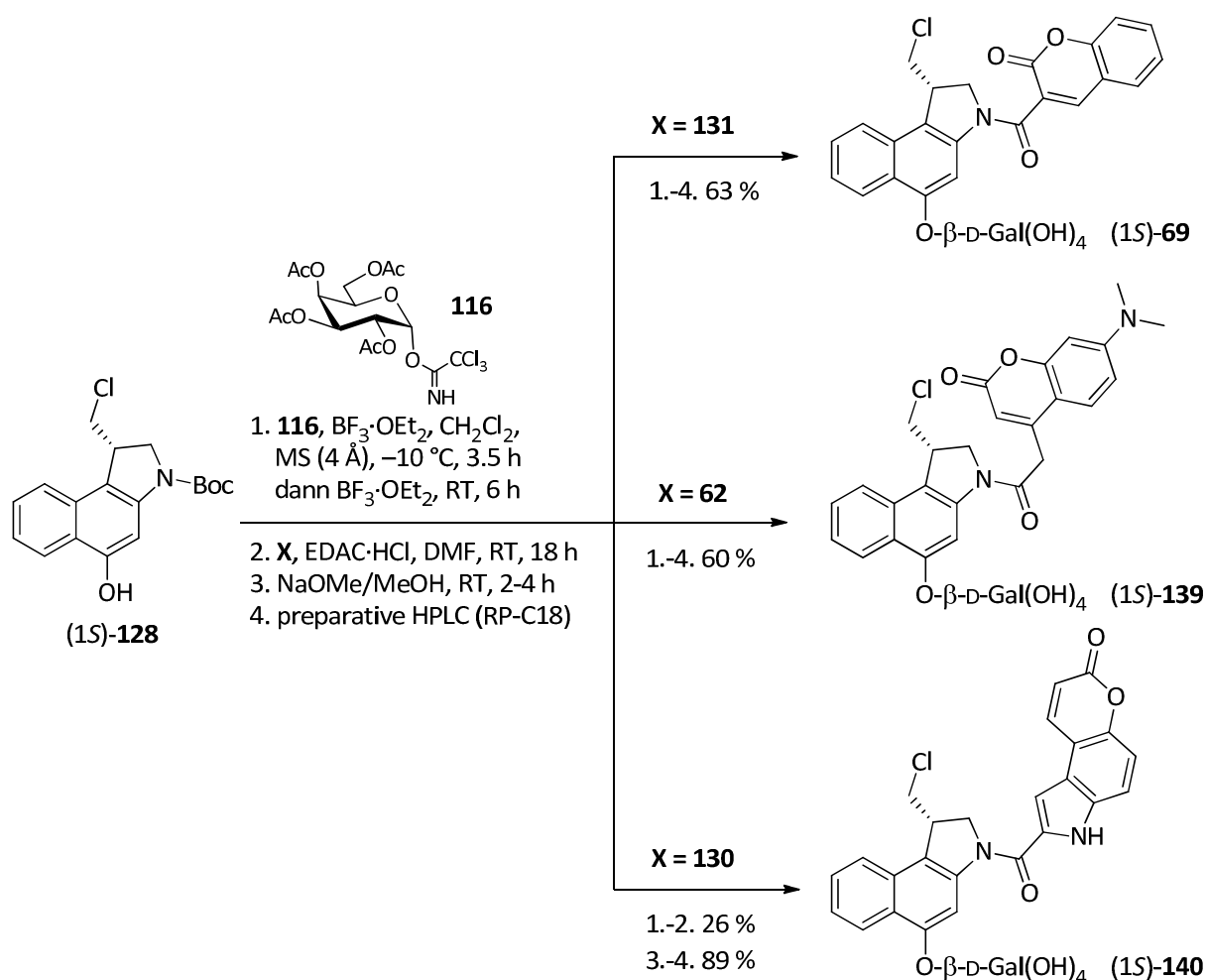


Abbildung 76. Synthese der (1S)-CBI-Cumarin-Galaktoside ausgehend von Phenol (1S)-128.

Das freie sekundäre Amin wurde dann mit EDAC·HCl als Kupplungsreagenz in DMF mit der Carbonsäure des entsprechenden Cumarins (**62**, **130** oder **131**) gekuppelt um

die tetraacetylierten CBI-Cumarin-Galaktoside zu erhalten. Anschließende Deacetylierung nach *Zemplén* durch Natriummethanolat in Methanol bei Raumtemperatur lieferte die entsprechenden (1*S*)-CBI-Cumarin-Galaktoside (1*S*)-**69**, (1*S*)-**139** und (1*S*)-**140** in guten bis sehr guten Ausbeuten. Abschließend wurden alle erhaltenen Prodrugs durch präparative HPLC (Kromasil 100 C-18) gereinigt.

5.4 Ergebnisse zur Untersuchung der *In-vitro*-Zytotoxizität an humanen Bronchialkarzinomzellen (A549) für die (1*S*)-CBI-Cumarin-Derivate

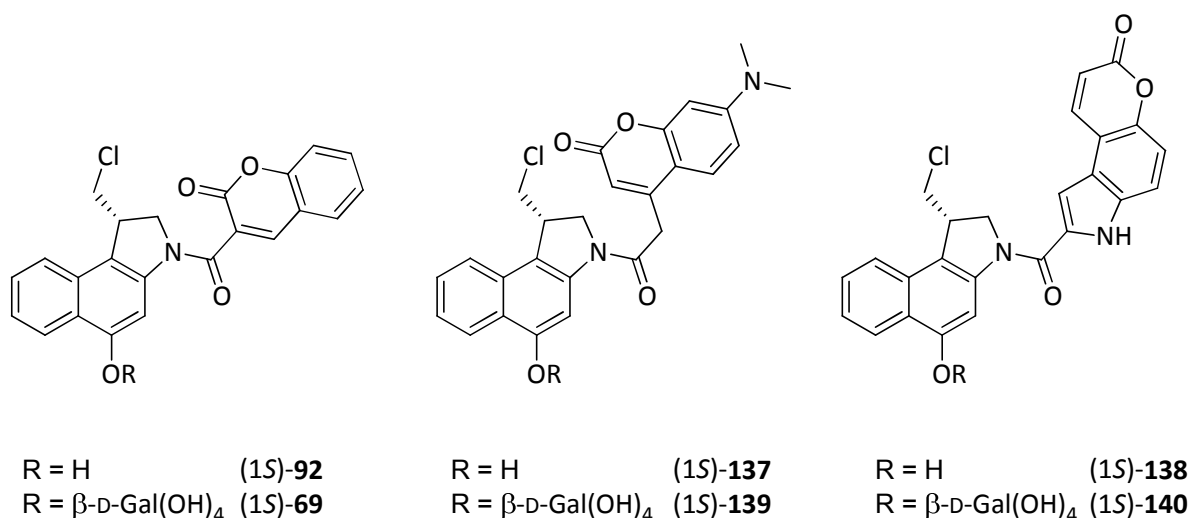
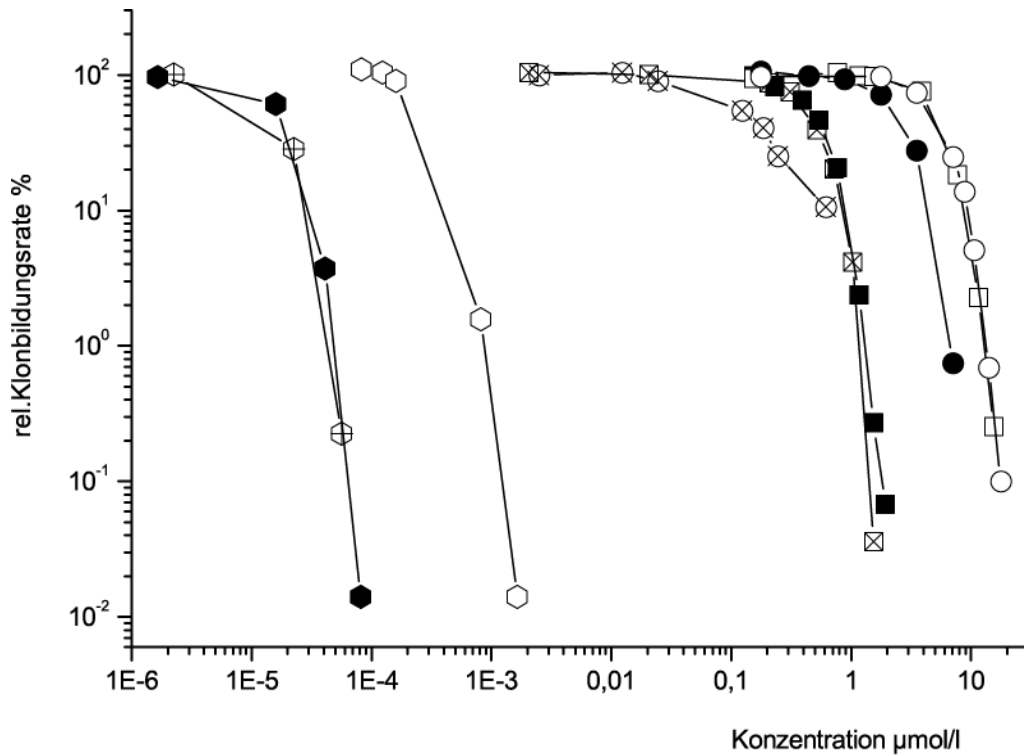


Abbildung 77. Untersuchte (1*S*)-CBI-Cumarine: Galaktoside (1*S*)-**69**, (1*S*)-**139** und (1*S*)-**140** sowie *seco*-CBI-Cumarin-Drugs (1*S*)-**92**, (1*S*)-**137** und (1*S*)-**138**.

Abbildung 78 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen zur *In-vitro*-Zytotoxizität der in dieser Arbeit synthetisierten (1*S*)-CBI-Cumarin-Derivate. Hierbei ist vor allem auffällig, dass das (1*S*)-CBI-Cumarinindol-Derivat (1*S*)-**138** deutlich zytotoxischer ist als die (1*S*)-CBI-Cumarin-Derivate (1*S*)-**92** und (1*S*)-**137**. So erreicht das (1*S*)-CBI-Cumarinindol-Drug (1*S*)-**138** mit $IC_{50} = 0.014$ nM einen hervorragenden Wert, der den des Cumarin-Drugs (1*S*)-**137** ($IC_{50} = 0.38$ μ M) um den Faktor 27143 übersteigt. Allerdings haben die Prodrugs aller Cumarin-Derivate nur eine geringe therapeutische Breite mit QIC_{50} -Werten von 2-14. Auffällig ist außerdem, dass die ermittelte *In-vitro*-Zytotoxizität von (1*S*)-**138** ($IC_{50} = 0.014$ nM) annähernd identisch ist mit der des Strukturanalogen

(1S)-CBI-DMAI-Drugs (1S)-**52** ($IC_{50} = 0.026$ nM). Eine Erklärung für die vom Struktur-analogon abweichende hohe Zytotoxizität des Galaktosides (1S)-**140** könnte auf eine schnelle Aufnahme in Mitochondrien und damit einer Einleitung der Apoptose zurückzuführen sein.



	IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	Q IC_{50}
⊠ (1S)-137	0.38	
■ (1S)-139 mit Enzym	0.43	12
□ (1S)-139 ohne Enzym	5.0	
⊗ (1S)-92	0.11	
● (1S)-69 mit Enzym	2.4	2
○ (1S)-69 ohne Enzym	4.8	
⬡ (1S)-138	0.000014	
● (1S)-140 mit Enzym	0.000018	14
⬡ (1S)-140 ohne Enzym	0.00026	

Abbildung 78. Darstellung der Ergebnisse der *In vitro*-Zytotoxizitätsuntersuchungen für die (1S)-Cumarin-Derivate (1S)-**137** und (1S)-**139**, (1S)-**92** und (1S)-**69** sowie (1S)-**138** und (1S)-**140**.

6 Charakterisierung und Untersuchung der zellulären Aufnahme von fluoreszenzmarkierten (1S)-CBI-Cumarin-Derivaten

6.1 Fluorimetrische Bestimmung der Absorptions- und Emissionsmaxima

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme der in dieser Arbeit synthetisierten CBI-Cumarin-Derivate (1S)-**92**, (1S)-**69**, (1S)-**137**, (1S)-**139**, (1S)-**138** und (1S)-**140** sowie **62**, **130** und **131** mussten zunächst die Absorptions- und Emissionsspektren bestimmt werden. Hierzu wurden entsprechende Lösung der Substanzen in Methanol und wässrigem Bildgebungspuffer am Fluorimeter untersucht, um die benötigten Maxima zu ermitteln.

6.1.1 Bestimmung der Fluoreszenz- und Emissionsmaxima für die dargestellten Cumarin-3-Carbonsäure-Derivate (1S)-**92**, (1S)-**69** sowie **131**

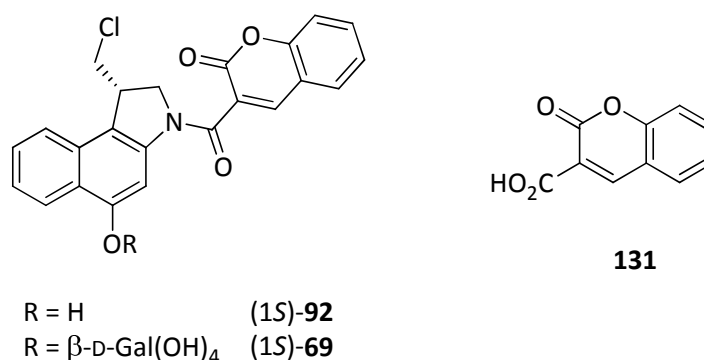


Abbildung 79. Untersuchte Verbindungen mit Cumarin-3-Carbonsäure (**131**) als DNA-Binder.

Wie in den abgebildeten Spektren zu sehen ist, liegt das Absorptionsmaximum, wie es für Coumarine charakteristisch ist, sowohl in Methanol als auch in wässrigem Puffer im Bereich von $\lambda_{\text{max,Abs}} = 314\text{--}352$ nm. Ebenso kann der für Coumarine typische geringe Stokes-Shift beobachtet werden, der sich im Fall der hier dargestellten Verbindungen

im Bereich von 30–79 nm bewegt und damit zu einem Emissionsmaximum im Bereich von $\lambda_{\max,Em} = 380\text{--}414\text{ nm}$ führt (Abbildungen 80–82).

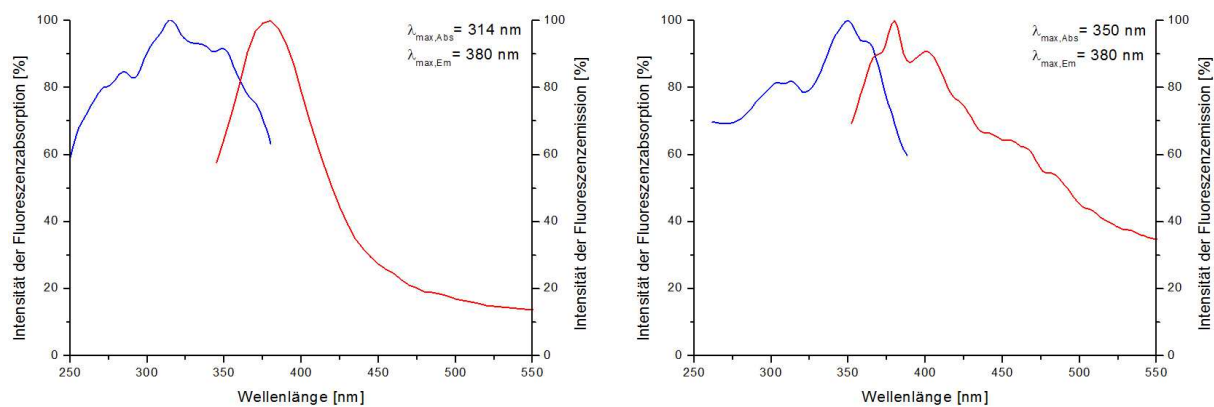


Abbildung 80. Absorptions- und Emissionsspektren von (1S)-92 in Methanol (links) und wässrigem Bildgebungspuffer (rechts).

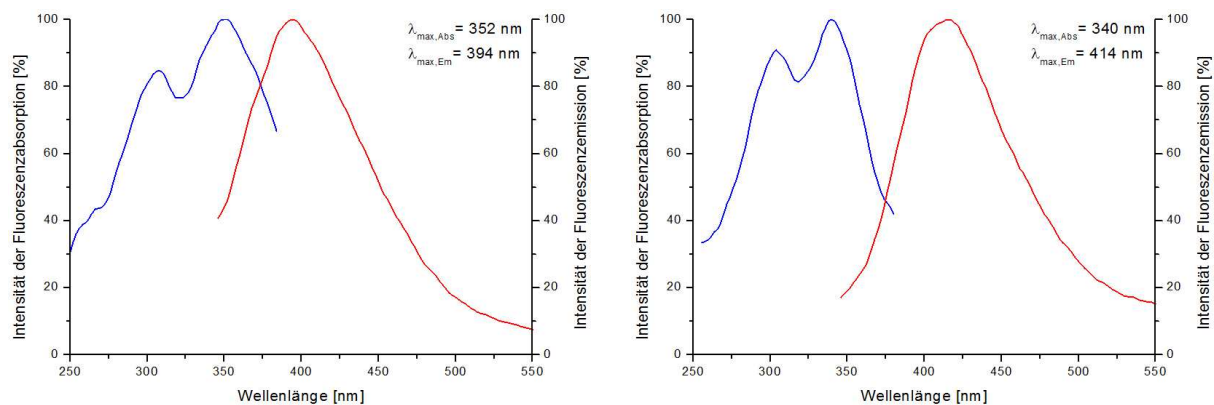


Abbildung 81. Absorptions- und Emissionsspektren von (1S)-69 in Methanol (links) und wässrigem Bildgebungspuffer (rechts).

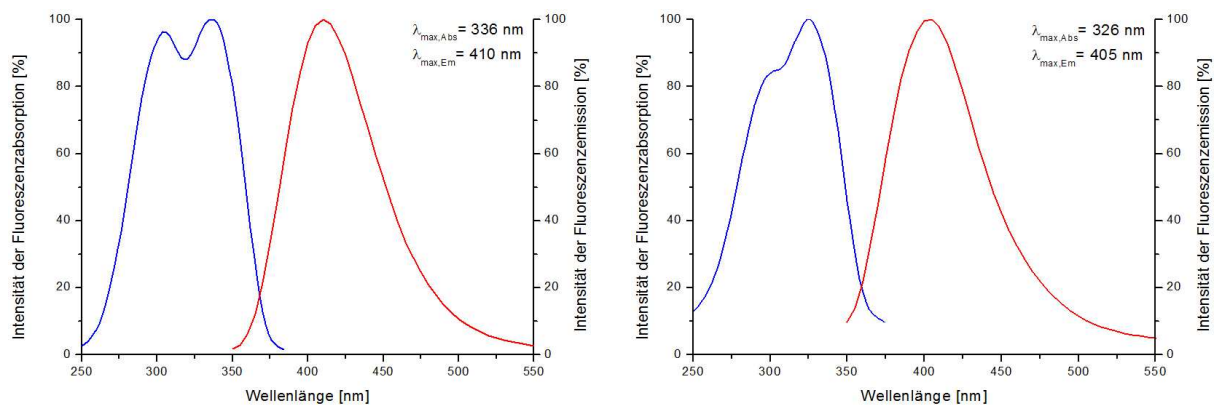


Abbildung 82. Absorptions- und Emissionsspektren von 131 in Methanol (links) und wässrigem Bildgebungspuffer (rechts).

6.1.2 Bestimmung der Fluoreszenz- und Emissionsmaxima für die dargestellten DMACA-Derivate (1S)-137, (1S)-139 sowie 62

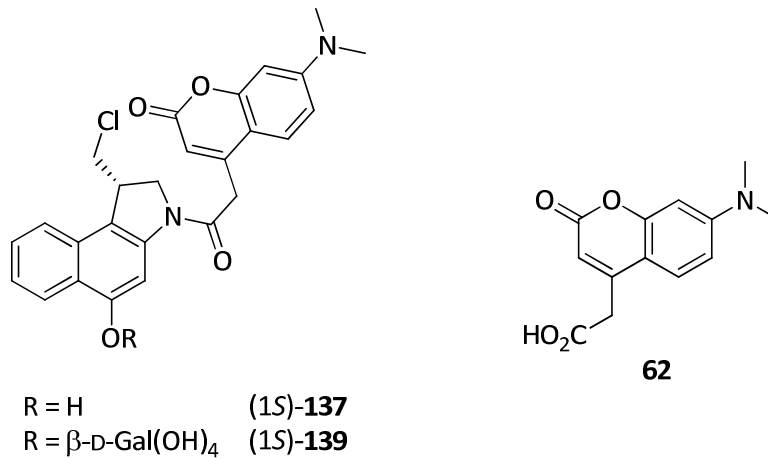


Abbildung 83. Untersuchte Verbindungen mit DMACA (62) als DNA-Binder.

Bei den DMACA-Derivaten (Abbildung 83) liegt das Absorptionsmaximum sowohl in Methanol als auch in wässrigem Puffer im Bereich von $\lambda_{\text{max,Abs}} = 370\text{--}390$ nm und damit im Vergleich zu den Cumarin-3-Carbonsäure-Derivaten etwas rotverschoben. Auch hier kann der für Cumarine typische kleine *Stokes-Shift* beobachtet werden, der sich über einen Bereich von 80–87 nm erstreckt und damit zu einem Emissionsmaximum von $\lambda_{\text{max,Em}} = 450\text{--}478$ nm führt (Abbildungen 84–86).

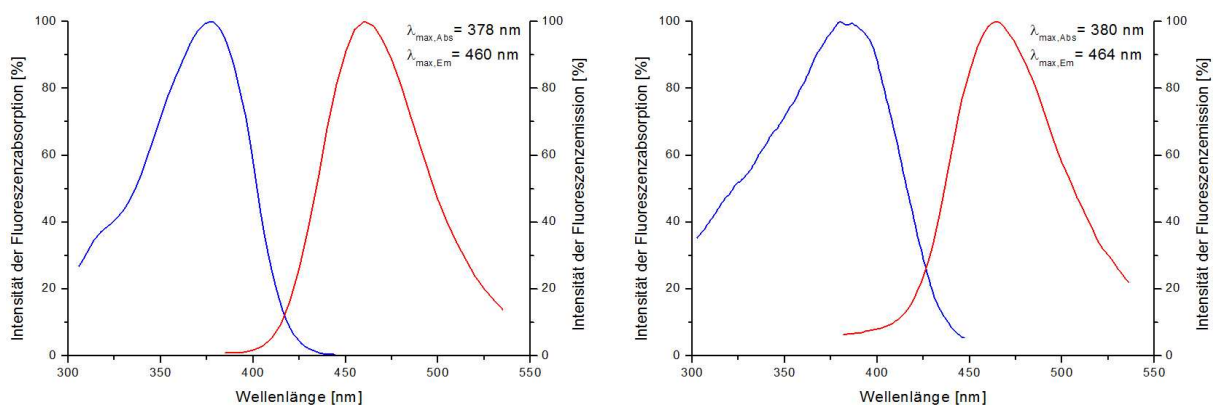


Abbildung 84. Absorptions- und Emissionsspektren von (1S)-137 in Methanol (links) und wässrigem Bildungspuffer (rechts).

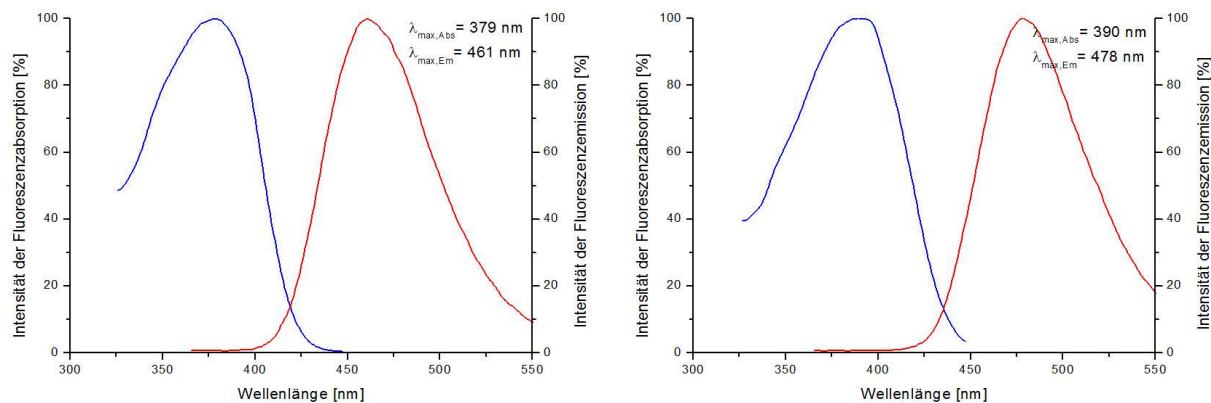


Abbildung 85. Absorptions- und Emissionsspektren von (1S)-139 in Methanol (links) und wässrigem Bildungspuffer (rechts).

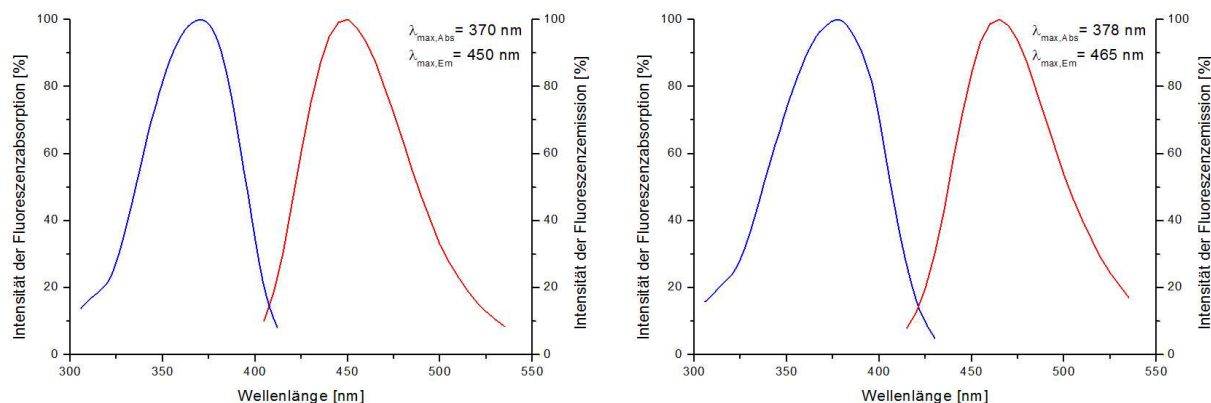


Abbildung 86. Absorptions- und Emissionsspektren von 62 in Methanol (links) und wässrigem Bildungspuffer (rechts).

6.1.3 Bestimmung der Fluoreszenz- und Emissionsmaxima für die dargestellten Indol-Cumarin-Derivate (1S)-138, (1S)-140 sowie 130

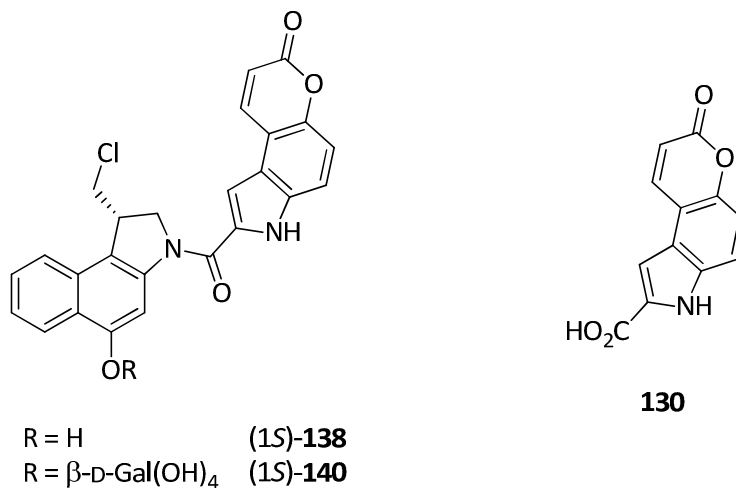


Abbildung 87. Untersuchte Verbindungen mit Cumarin-Indol-2-Carbonsäure 130 als DNA-Binder.

Bei den Cumarinindol-Derivaten (Abbildung 87) liegt das Absorptionsmaximum sowohl in Methanol als auch in wässrigem Puffer im Bereich von $\lambda_{\text{max,Abs}} = 346\text{--}370\text{ nm}$ und damit im Vergleich zu den Cumarin-3-Carbonsäure-Derivaten nur leicht rotverschoben. Der im Gegensatz zu den vorherigen Cumarin-Derivaten große Stokes-Shift beträgt in den unten abgebildeten Spektren $106\text{--}146\text{ nm}$ und führt zu einem Emissionsmaximum von $\lambda_{\text{max,Em}} = 452\text{--}498\text{ nm}$. Auffällig ist hierbei vor allem der deutlich größere Stokes-Shift in wässrigem Puffer im Vergleich zu Methanol (Abbildungen 88–90).

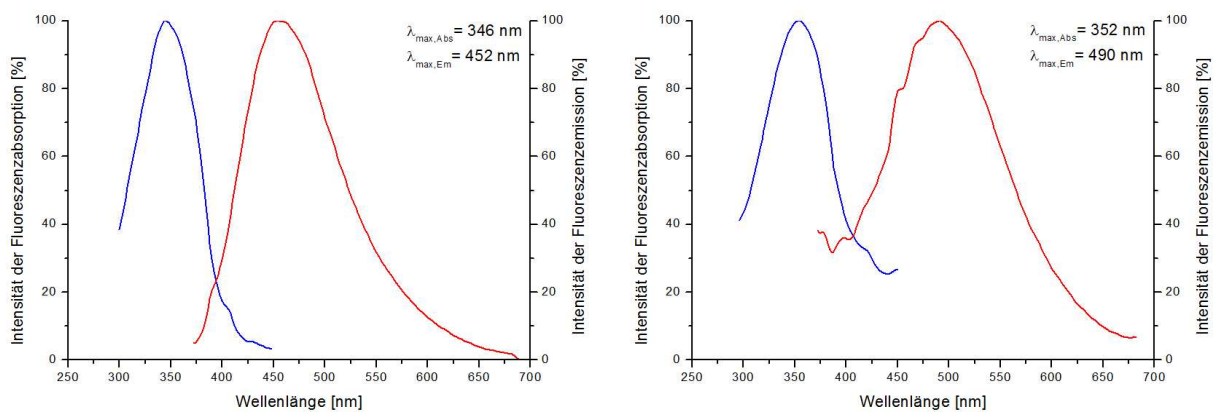


Abbildung 88. Absorptions- und Emissionsspektren von (1S)-138 in Methanol (links) und wässrigem Bildungspuffer (rechts).

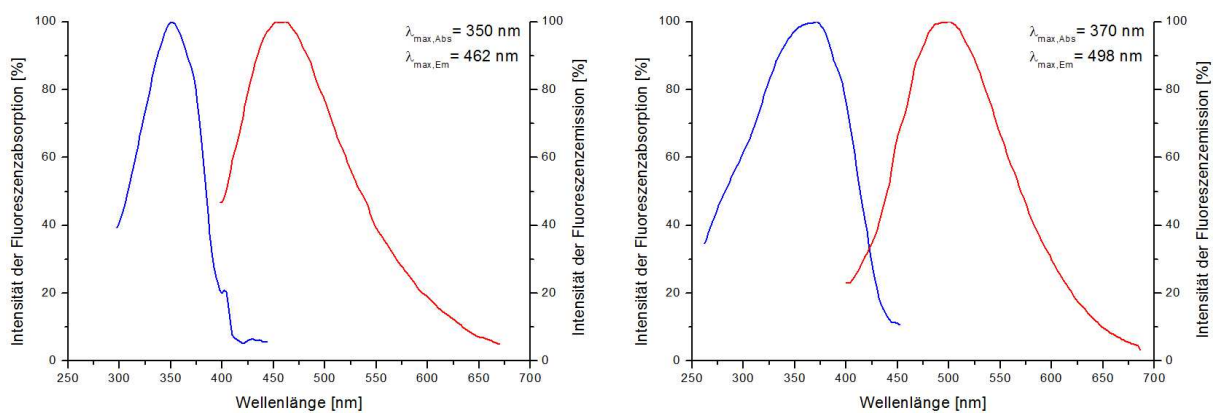


Abbildung 89. Absorptions- und Emissionsspektren von (1S)-140 in Methanol (links) und wässrigem Bildungspuffer (rechts).

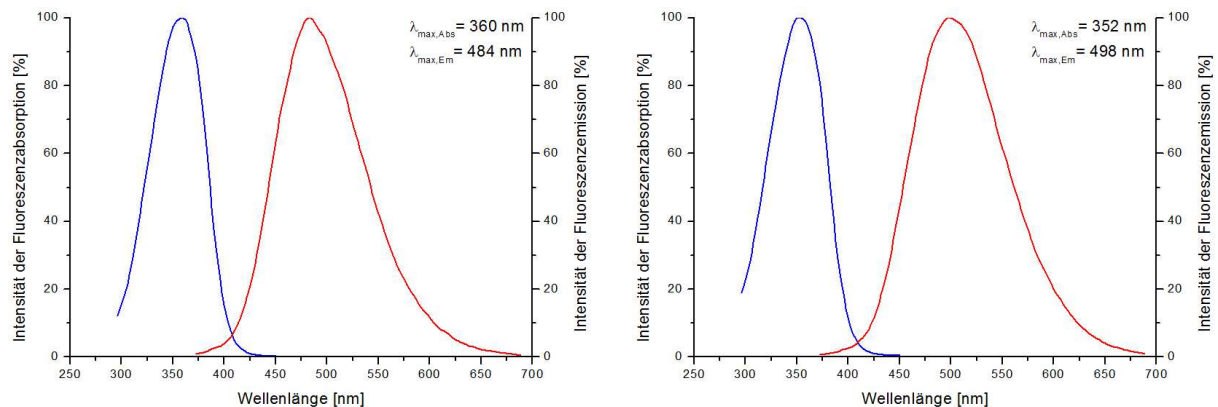


Abbildung 90. Absorptions- und Emissionsspektren von **130** in Methanol (links) und wässrigem Bildgebungspuffer (rechts).

6.2 Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-Cumarin-Derivate in lebende Zellen durch CLSM

Zu einem besseren Verständnis des Wirkmechanismus der CBI-Derivate wurden die in dieser Arbeit synthetisierten fluoreszenzmarkierten Analoga in *Live Cell Imaging* Experimenten untersucht. Hierzu wurden adhärent wachsende Zelllinien vom Typ A549 sowie HeLa SS6 für kurze Zeit mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert (5–15 min) und die Verteilung der Substanz mit Hilfe eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops beobachtet und einer CCD-Kamera aufgenommen. Zur Identifikation der angefärbten Zellregion wurde auf das Prinzip der Kolkalisation zurückgegriffen, um eine Unterscheidung zwischen Organellen, wie dem Zellkern (durch Hoechst 33342 (**64**)) oder mitochondrialen Strukturen (durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**)) zu treffen (Abbildung 91).

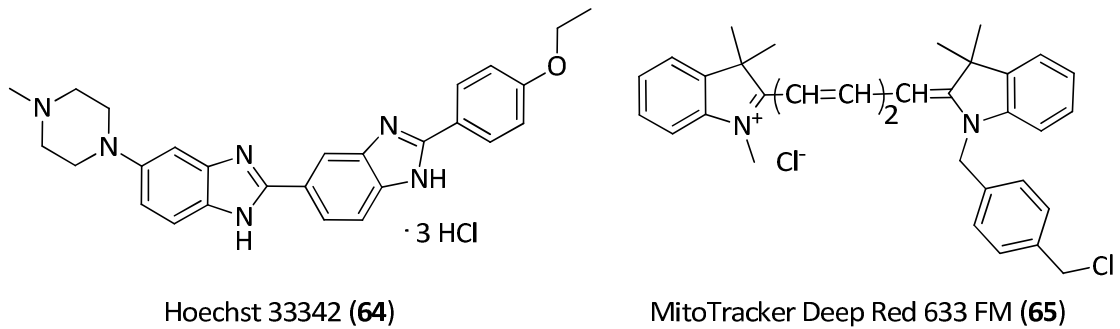


Abbildung 91. Strukturen der für die Kollokalisationsexperimente eingesetzten Anfärbe-reagenzien: **64**: Anfärbung des Zellkerns sowie **65**: Anfärbung der Mitochondrien.

6.2.1 Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-Cumarin-3-Carbonsäure-Derivate (1S)-92, (1S)-69 sowie 131 in lebende Zellen

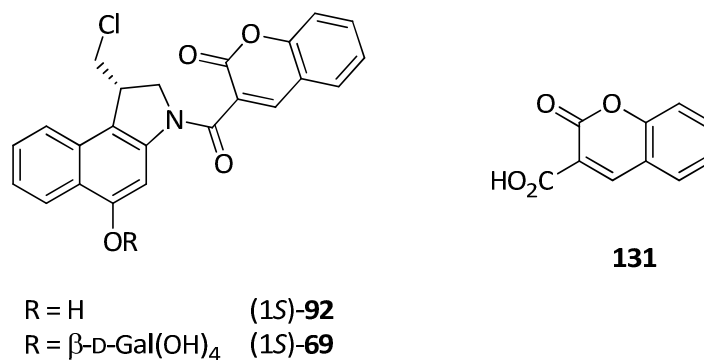


Abbildung 92. Untersuchte Verbindungen mit Cumarin-3-Carbonsäure (**131**) als DNA-Binder.

Abbildung 93 zeigt die Aufnahme des DNA Binders Cumarin-3-Carbonsäure (**131**) in lebende Zellen. Bereits nach wenigen Minuten penetriert der Fluorochrom die Zellmembran und akkumuliert innerhalb der Zelle (B). Auf Grund der Kollokalisationsexperimente mit Hoechst 33342 (**64**) (A) sowie MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**) (C) kann man eindeutig erkennen, dass es sich bei der von **131** populierte Zellregion um Mitochondrien handelt. Die auftretende Färbung außerhalb der mitochondrialen Strukturen lässt sich durch eine zu hohe Konzentration des Fluorochroms erklären.

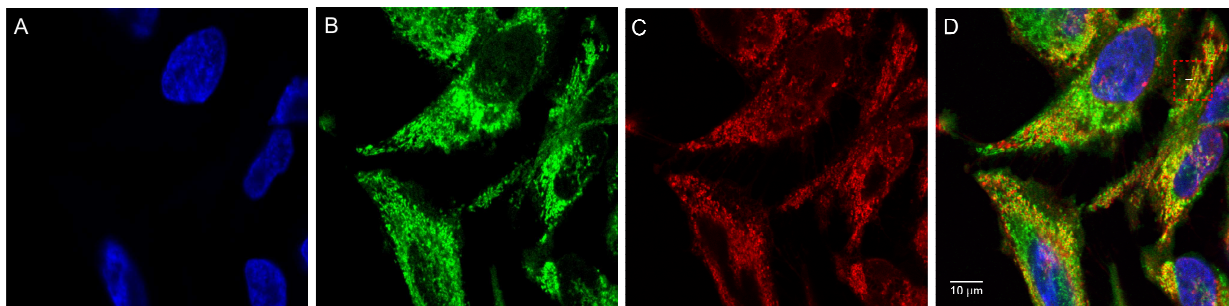


Abbildung 93. Kolokalisationsexperimente zur Aufnahme des Fluorochroms Cumarin-3-Carbonsäure (**131**) in lebende Zellen. A: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410\text{--}429 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); B: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}520 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch Cumarin-3-Carbonsäure (**131**); C: $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650\text{--}800 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**); D: Überlagerung von A–C.

Das aus Cumarin-3-Carbonsäure (**131**) dargestellte *seco*-Drug (1S)-**92** zeigt dieselben Eigenschaften wie **131** bei der Untersuchung zur Aufnahme des *seco*-Drugs (1S)-**92** in lebende Zellen. (1S)-**92** akkumuliert in Organellen, die durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**) als Mitochondrien identifiziert wurden und nicht, wie es von einem *seco*-Drug erwartet würde, im Zellkern (Abbildung 94). Die Toxizität des *seco*-Drugs (1S)-**92** mit $\text{IC}_{50} = 0.14 \mu\text{M}$ resultiert daher nicht aus einer Alkylierung der Zellkern-DNA sondern höchstwahrscheinlich aus einer Alkylierung der doppelsträngigen mitochondrialen DNA (*mtDNA*).

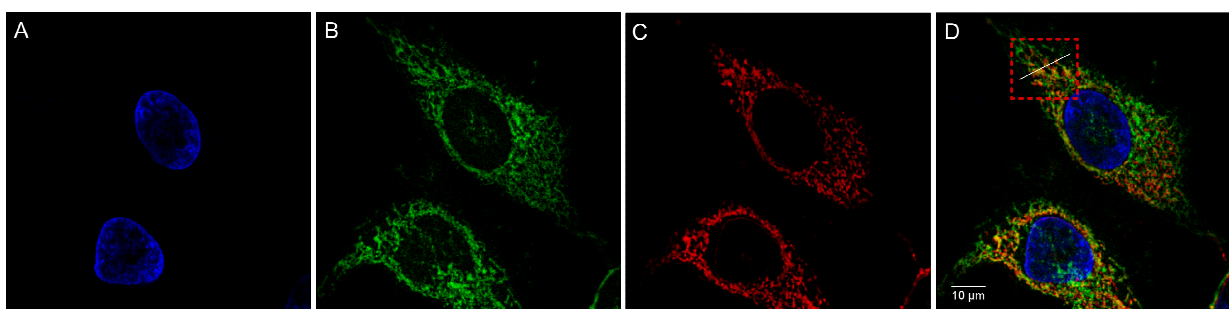


Abbildung 94. Kolokalisationsexperimente zur Aufnahme des *seco*-Drugs (1S)-**92** in lebende Zellen. A: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}520 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); B: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}520 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch *seco*-Drug (1S)-**92**; C: $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650\text{--}800 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**); D: Überlagerung von A–C.

Anders als man es für Verbindungen erwartet, die im Rahmen von ADEPT entwickelt wurden, akkumuliert auch das aus **131** resultierende Galaktosid (1S)-**69** bereits nach

wenigen Minuten innerhalb der Zelle und verweilt nicht, wie angenommen, bis zur enzymatischen Spaltung durch β -D-Galaktosidase zum *seco*-Drug (1S)-**92** außerhalb der Zelle. Wie bereits bei der Untersuchung des Fluorochroms **131** und des *seco*-Drugs (1S)-**92** zeigt sich auch hier eine Akkumulation in mitochondrialen Organellen (Abbildung 95).

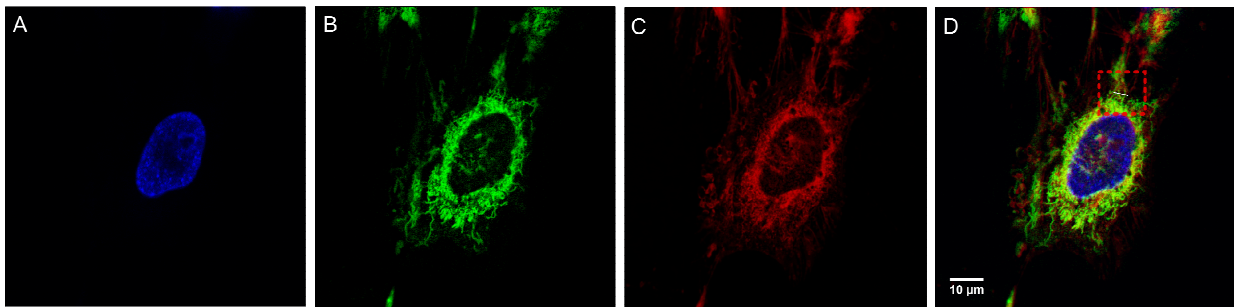


Abbildung 95. Kolokalisationsexperimente zur Aufnahme des Galaktosides (1S)-**69** in lebende Zellen. A: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410\text{--}429 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); B: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}520 \text{ nm}$ Anfärbung der Mitochondrien durch Galaktosid (1S)-**69**; C: $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650\text{--}800 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**); D: Überlagerung von A–C.

6.2.2 Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-DMACA-Derivate (1S)-**137**, (1S)-**139** sowie **62**

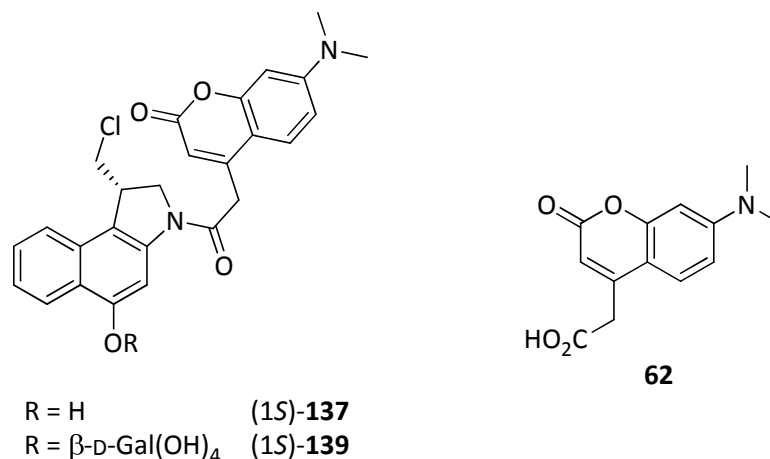


Abbildung 96. Untersuchte Verbindungen mit DMACA (**62**) als DNA-Binder.

Abbildung 97 zeigt die Aufnahme des DNA Binders DMACA (**62**) in lebende Zellen. Wie schon im Fall der Cumarin-3-Carbonsäure (**131**) penetriert **62** bereits nach wenigen Minuten die Zellmembran und akkumuliert innerhalb der Zelle (B). Durch

Kolokalisationsexperimente mit Hoechst 33342 (**64**) (A) sowie MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**) (C) kann darauf geschlossen werden, dass es sich bei den von **62** populierte Organellen zum einen um Mitochondrien handelt, zum anderen aber auch eine diffuse Verteilung des Fluorochroms auftritt.

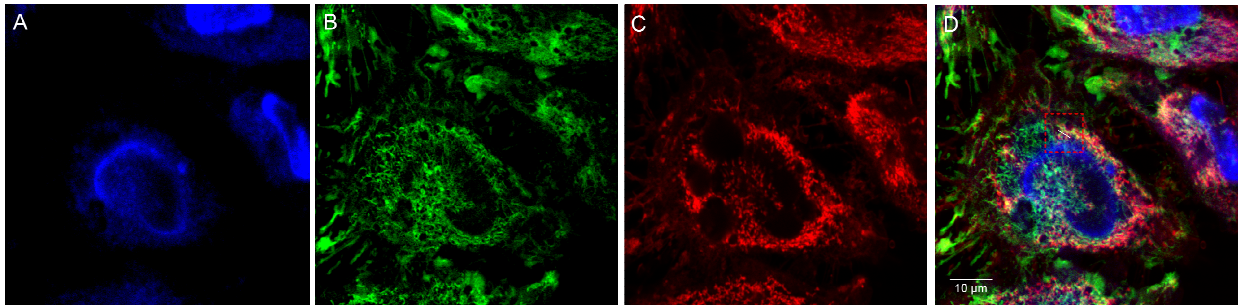


Abbildung 97. Kolokalisationsexperimente zur Aufnahme des Fluorochroms DMACA (**62**) in lebende Zellen. A: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410\text{--}429 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); B: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}520 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien sowie diffuse Verteilung des Fluorochroms DMACA (**62**); C: $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650\text{--}800 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**); D: Überlagerung von A–C.

Das *seco*-Drug (1S)-**137** zeigt bereits nach wenigen Minuten eine Akkumulation innerhalb des Zellkerns sowie der Mitochondrien (Abbildung 98). Möglicherweise führt eine zu hohe Konzentration des Fluorochroms zu einer Überpopulation des Zellkerns, so dass auch Mitochondrien, populierte werden, die bei geringeren Konzentrationen nicht vom *seco*-Drug (1S)-**137** markiert würden.

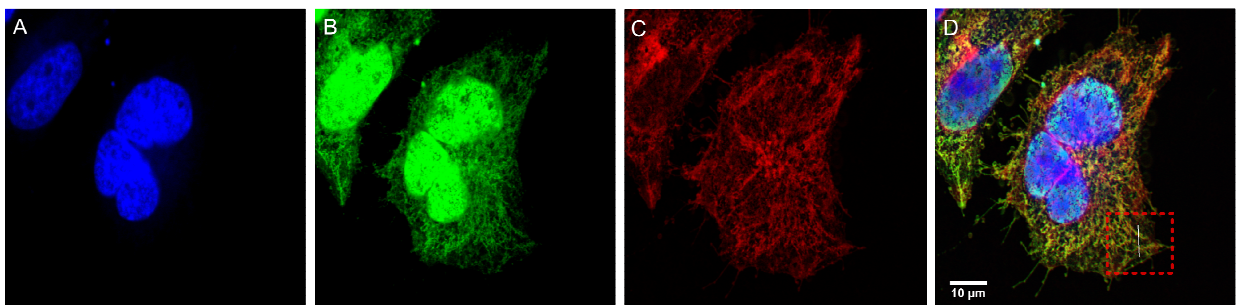


Abbildung 98. Kolokalisationsexperimente zur Aufnahme des *seco*-Drugs (1S)-**137** in lebende Zellen. A: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410\text{--}429 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); B: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}520 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch *seco*-Drug (1S)-**137**; C: $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650\text{--}800 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**); D: Überlagerung von A–C.

Wie schon im Falle des CBI-Cumarin-3-Carbonsäure-Galaktosides (1S)-**131** akkumuliert auch das aus DMACA (**62**) resultierende Galaktosid (1S)-**139** bereits nach wenigen Minuten innerhalb der Zelle (Abbildung 99 (B)). Im Gegensatz zum *seco*-Drug (1S)-**137** akkumuliert (1S)-**139** jedoch nicht im Zellkern, sondern wie auch das Galaktosid (1S)-**69** in den Mitochondrien. So zeigt auch (1S)-**139** kein Verweilen außerhalb der Zelle, wie es für das ADEPT-Konzept erforderlich wäre.

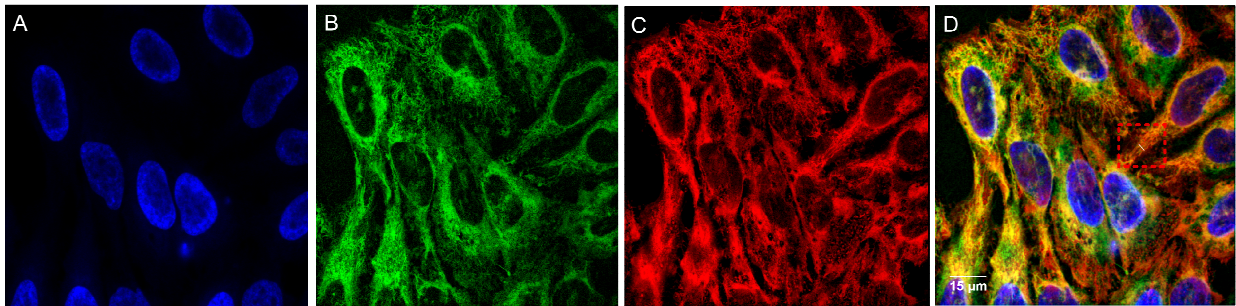


Abbildung 99. Kolokalisationsexperimente zur Aufnahme des Galaktosides (1S)-**139** in lebende Zellen. A: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410\text{--}429 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); B: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}520 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch Galaktosid (1S)-**139**; C: $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650\text{--}800 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**); D: Überlagerung von A–C.

6.2.3 Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-Indol-Cumarin-Derivate (1S)-**138**, (1S)-**140** sowie **130**

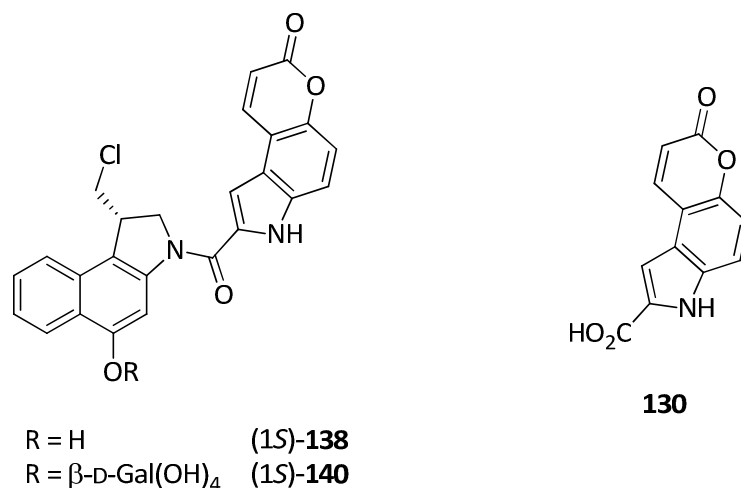


Abbildung 100. Untersuchte Verbindungen mit Cumarin-Indol-2-Carbonsäure (**130**) als DNA-Binder.

Auf Grund seiner starken chemischen Ähnlichkeit zu dem im Arbeitskreis *Tietze* verwendeten DNA-Binder DMAI (**104**) sollte Cumarin-Indol-2-Carbonsäure (**130**) gute Aufschlüsse über die Aufnahme der *seco*-CBI-DMAI-Analoga wie (1S)-**48** liefern.

Wie auch die beiden vorherigen Cumarine **62** und **131** akkumuliert **130** bereits nach wenigen Minuten innerhalb der Zelle (Abbildung 101(B)). Auf Grund der Kolo-kalisationsexperimente mit Hoechst 33342 (**64**) (A) sowie MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**) (C) konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei den von **130** populierte(n) Organellen um Mitochondrien handelt

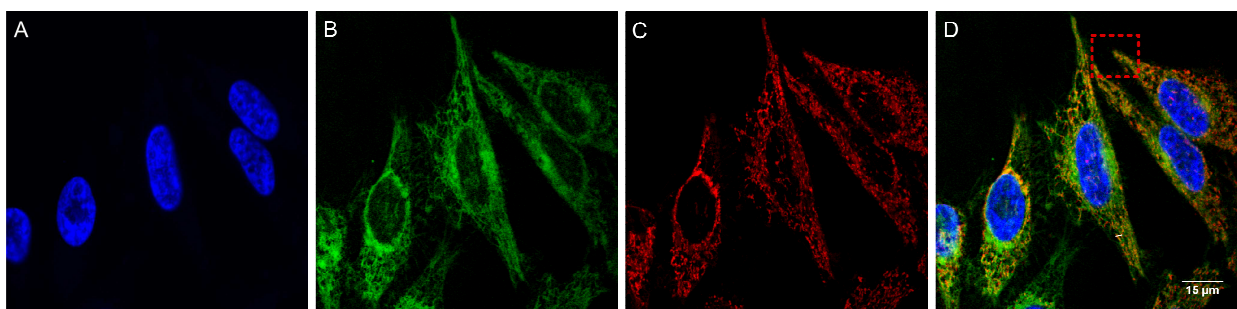


Abbildung 101. Kolo-kalisationsexperimente zur Aufnahme des Fluorochroms Cumarin-Indol-2-Carbonsäure (**130**) in lebende Zellen. A: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410\text{--}429 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); B: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}520 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch Cumarin-Indol-2-Carbonsäure (**130**); C: $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650\text{--}800 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**); D: Überlagerung von A–C.

Abbildung 102 zeigt die Verteilung des aus Cumarin-Indol-2-Carbonsäure (**130**) resultierenden *seco*-Drugs (1S)-**138**. Wie das *seco*-CBI-Cumarin-3-Carbonsäure-Drug (1S)-**92** akkumuliert (1S)-**138** innerhalb der Mitochondrien und damit nicht wie das *seco*-CBI-DMACA-Drug (1S)-**137** innerhalb des Zellkerns.

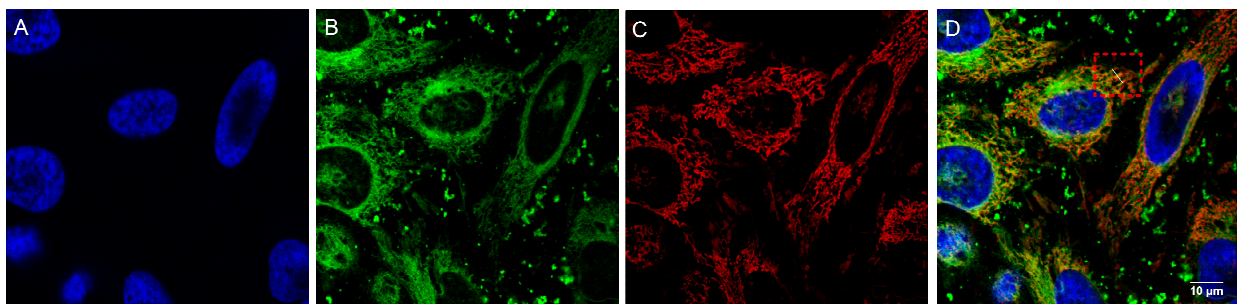


Abbildung 102. Kolo-kalisationsexperimente zur Aufnahme des *seco*-Drugs (1S)-**138** in lebende Zellen. A: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410\text{--}429 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); B: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}520 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien

durch *seco*-Drug (1S)-**138**; C: $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650\text{--}800 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**); D: Überlagerung von A–C.

Eine abschließende Betrachtung des Cumarin-Indol-2-Carbonsäure-Galaktosides (1S)-**140** zeigt auch hier, anders als im Rahmen von ADEPT erwartet, eine Aufnahme des Galaktosides in lebende Zellen bereits nach wenigen Minuten. Es konnte gezeigt werden, dass (1S)-**140** wie auch die bisher untersuchten Galaktoside (1S)-**131** und (1S)-**62** in den Mitochondrien akkumuliert. Zusätzlich kommt es im Fall von (1S)-**140** zu einer diffusen Verteilung innerhalb der Zelle (Abbildung 103 (B)).

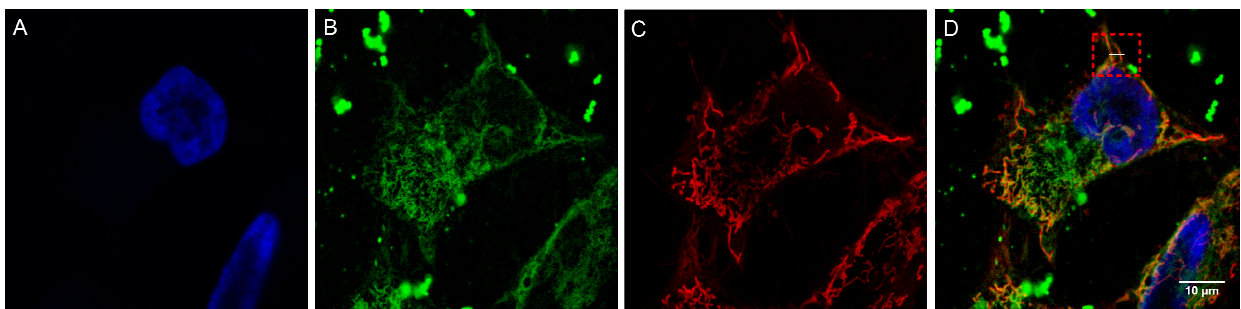


Abbildung 103. Kolokalisationsexperimente zur Aufnahme des Galaktosides (1S)-**140** in lebende Zellen. A: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 410\text{--}429 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); B: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}520 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch Galaktosid (1S)-**140**; C: $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650\text{--}800 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**); D: Überlagerung von A–C.

Abschließend kann festgestellt werden, dass keine der dargestellten CBI-Cumarin-Derivate die von ADEPT postulierten Bedingungen erfüllt.

So konnte für die Galaktoside (1S)-**69**, (1S)-**139** und (1S)-**140** keine Akkumulation außerhalb der Zelle beobachtet werden. Stattdessen wurden die untersuchten Galaktoside bereits nach wenigen Minuten in die Zellen aufgenommen und wurden in allen Fällen in den Mitochondrien sichtbar.

Etwas anders verhält es sich bei der Betrachtung der *seco*-Drugs (1S)-**92**, (1S)-**137** und (1S)-**138**. Zunächst erfüllen alle untersuchten *seco*-Drugs die Bedingungen rasch in die Zellen zu gelangen, jedoch unterscheidet sich auch hier die anschließende Akkumulierung in verschiedenen Organellen. Lediglich das aus DMACA (**62**) resultierende *seco*-Drug (1S)-**137** akkumuliert innerhalb des Zellkerns, während die *seco*-Drugs (1S)-**92** und (1S)-**138** in den Mitochondrien zu finden sind.

7 Synthese neuartiger fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-Benzothiazol-Duocarmycin-Analoga

Benzothiazole sind als fluoreszente DNA-Binder mit einer Neigung zur Bindung in AT-reichen Regionen der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bekannt und eignen sich daher hervorragend für den Einsatz als Fluorochrom.¹⁶² Aus diesem Grund wurden verschiedene Benzothiazole **63** und **142** genutzt, um neuartige *seco*-Drugs wie (1S)-**141** und den entsprechenden Prodrugs als fluoreszenzmarkierte Analoga von (1S)-**48** darzustellen (Abbildung 104). Desweiteren wurden die Methylester der Benzothiazole **144** und **143** dargestellt (Abbildung 105), um die Aufnahme der Fluorochrom in Zellen zu beobachten, da bekannt war, dass die Carbonsäuren **63** und **142** nicht in lebende Zelle aufgenommen werden.¹⁶²

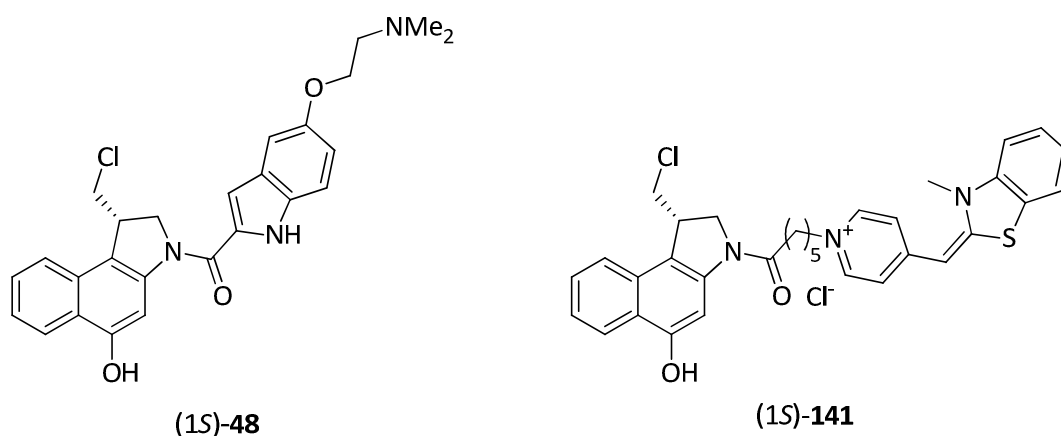


Abbildung 104. Strukturvergleich der *seco*-CBI-Analoga mit DMAI (1S)-**48** oder Benzothiazol (1S)-**141** als DNA-bindende Einheit.

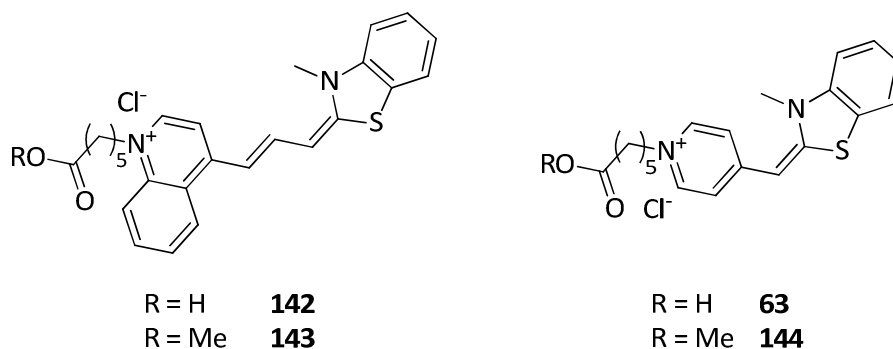


Abbildung 105. Verwendete Benzothiazole TO3 (Thiazol Orange 3) **142** und **143** sowie BO (Benzothiazole Orange) **63** und **144**.

7.1 Synthese der *seco*-CBI-Benzothiazol-Drugs (1S)-141 und (1S)-145

Ausgehend vom Phenol (1S)-128 konnten die *seco*-CBI-Benzothiazol-Drugs (1S)-141 und (1S)-145 über 2 Stufen hergestellt werden. So wurde zunächst die *N*-Boc-Schutzgruppe durch Suspendieren des Phenols (1S)-128 in 4 M HCl/Essigester-Lösung entfernt, um das freie sekundäre Amin im Anschluss unter Verwendung von EDAC·HCl als Kupplungsreagenz mit der Carbonsäure der Benzothiazole **63** oder **142** zu koppeln. Abschließend wurden die erhaltenen *seco*-CBI-Drugs (1S)-141 und (1S)-145 durch präparative HPLC (Kromasil 100 C-18) gereinigt (Abbildung 106).

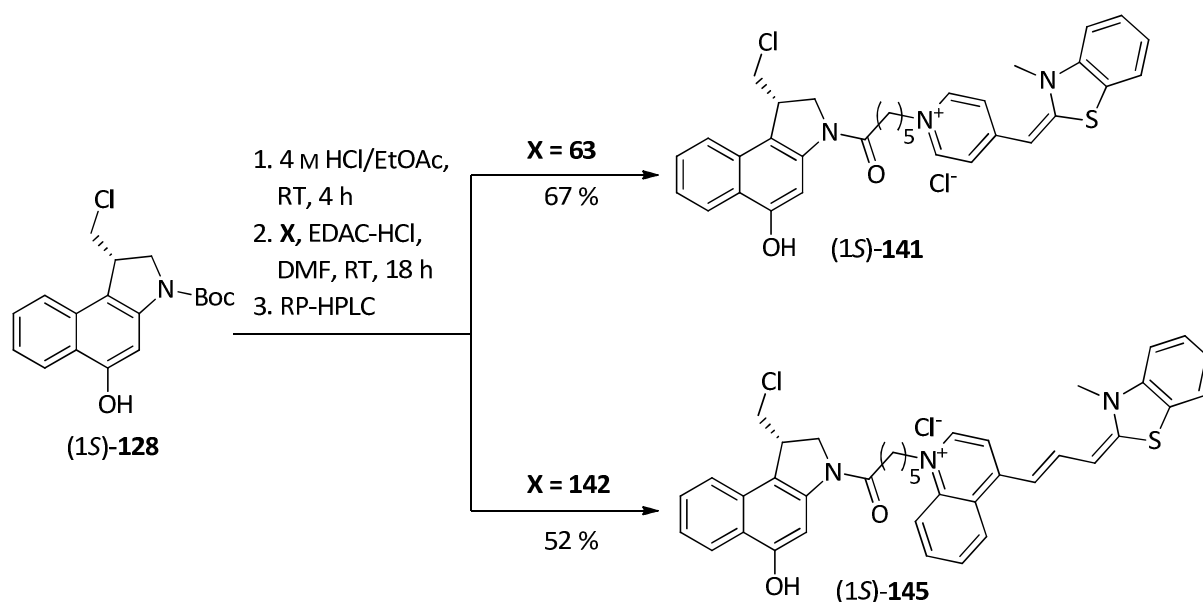


Abbildung 106. Syntheschema zur Darstellung neuartiger fluoreszenzmarkierter *seco*-CBI-Benzothiazol-Drugs (1S)-141 und (1S)-145.

7.1.1 Diskussion ausgewählter spektroskopischer Daten des *seco*-CBI-BO-Drugs (1S)-141

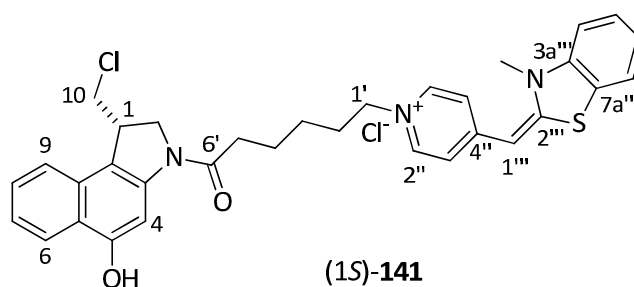


Abbildung 107. Struktur des *seco*-CBI-BO-Drugs (1S)-141.

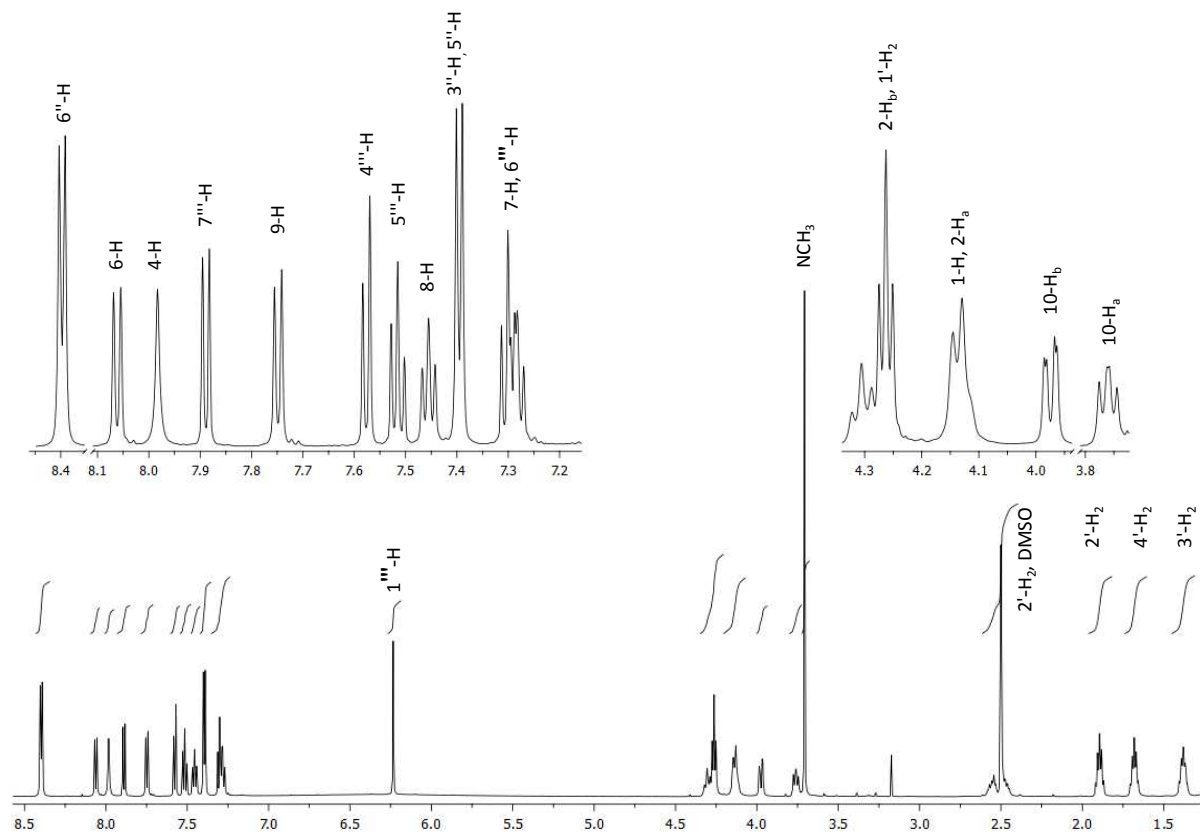


Abbildung 108. ^1H -NMR Spektrum (600 Mhz, DMSO-d_6) des *seco*-CBI-BO-Drugs (1S)-**141**.

Abbildung 108 zeigt das ^1H -NMR Spektrum sowie die Zuordnung der Signale des *seco*-CBI-BO-Drugs (1S)-**141**, das in DMSO-d_6 bei 600 MHz aufgenommen wurde.

Bei $\delta = 1.33\text{--}1.44$ ppm resoniert die Methylengruppe der Spacereinheit als Multipllett für die Protonen an C-3'. Gefolgt von den benachbarten Protonen an C-4' bei $\delta = 1.64\text{--}1.73$ ppm und an C-2' bei $\delta = 1.85\text{--}1.94$ ppm. Das Resonanzsignal für die 5'-Protonen findet man bei $\delta = 2.43\text{--}2.62$ ppm, die sich in α -Position zur Carbonylfunktion befinden. Die Protonen der Methylaminofunktion findet man bei $\delta = 3.71$ ppm als Singulett. Es folgen die Resonanzsignale für das CBI-Grundgerüst. Bei $\delta = 3.76$ ppm ein Dublett vom Dublett mit $J = 10.4$ und 8.3 Hz, zunächst das Signal für das Proton 10- H_a sowie bei $\delta = 3.97$ ppm dessen geminaler Resonanzpartner 10- H_b ebenfalls als Dublett vom Dublett mit $J = 10.9$ und 2.6 Hz. Ein Multipllett bei $\delta = 4.10\text{--}4.17$ ppm zeigt die Resonanzen für ein Proton an C-2 sowie 1-H. Ein Multipllett bei $\delta = 4.23\text{--}4.35$ ppm zeigt die Resonanzen für das zweite Proton an C-2, sowie die Methylenprotonen an C-1', die auf Grund ihrer Nähe zum Pyridiniumion, die am

weitesten ins Tieffeld verschobene Gruppe der Spacereinheit darstellt. Bei $\delta = 6.24$ ppm resoniert das Doppelbindungsproton an C-1''' als Singulett. Der aromatische Bereich des Spektrums beginnt mit dem Resonanzsignal für die Protonen an C-6''' sowie an C-7 bei $\delta = 7.26\text{--}7.32$ ppm. Bei $\delta = 7.40$ ppm findet man das Signal für die chemisch äquivalenten Protonen an C-3'' sowie an C-5'' als Dublett mit einer typischen *ortho*-Kopplungskonstante von $J = 7.0$ Hz. Das Signal für das Proton an C-8 beobachtet man bei $\delta = 7.45$ ppm als Triplett mit $J = 7.5$ Hz, das durch zwei identische Kopplungen mit H-9 und H-7 entsteht. Bei $\delta = 7.52$ ppm und $\delta = 7.58$ ppm folgen die Signale für die aromatischen Protonen an C-4''' und C-5''' als Triplett bzw. als Dublett. Es folgen die Signale für 9-H bei $\delta = 7.75$ ppm als Dublett durch Kopplung mit 8-H sowie bei $\delta = 7.89$ ppm das Resonanzsignal für 7'''-H als Dublett mit $J = 7.8$ Hz, das durch *ortho*-Kopplung mit 6'''-H erklärt werden kann. Bei $\delta = 7.98$ ppm folgt ein Singulett für 4-H sowie bei $\delta = 8.06$ ppm ein Dublett für das Proton an C-6 der CBI-Einheit als Dublett mit $J = 8.4$ Hz. Am weitesten ins Tieffeld verschoben sind die chemisch äquivalenten Protonen an C-2'' und C-6'' bei $\delta = 8.40$ ppm als Dublett sowie die phenolische Hydroxyfunktion als breites Singulett bei $\delta = 10.34$ ppm.

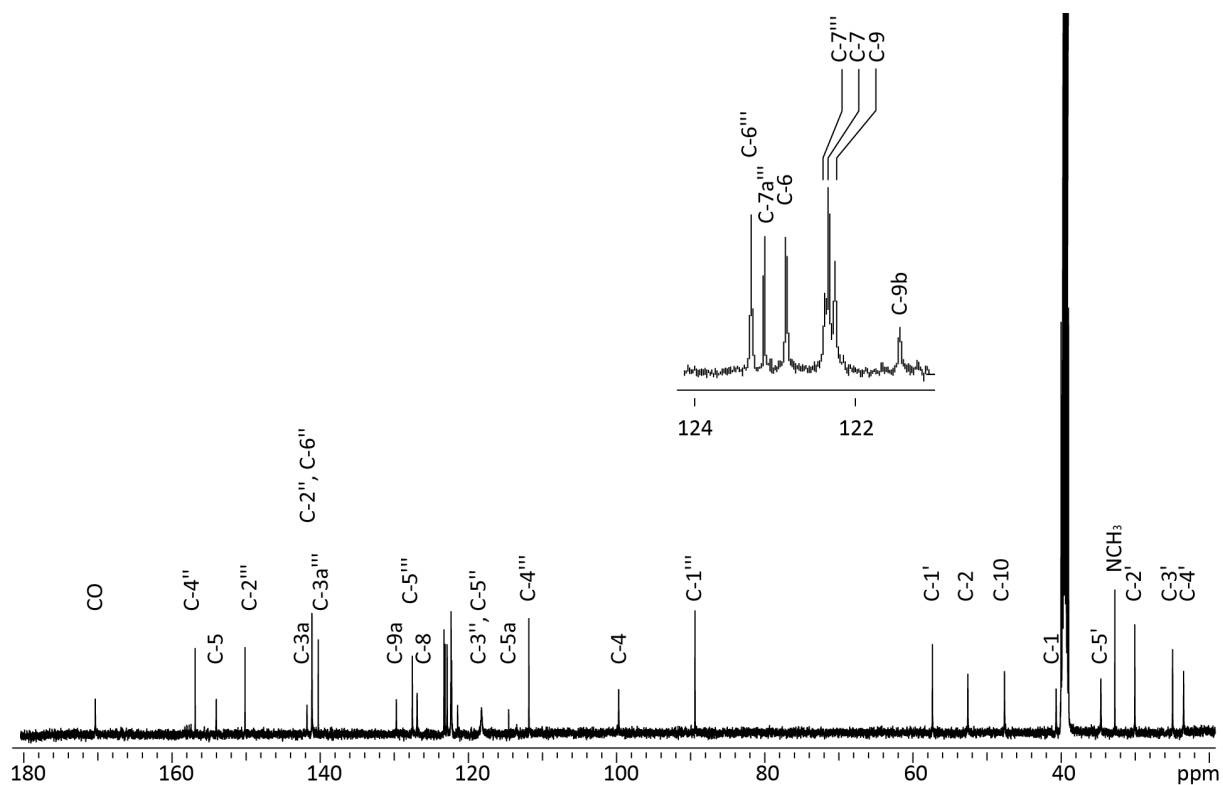


Abbildung 109. ^{13}C -NMR Spektrum (125 Mhz, DMSO-d_6) des *seco*-CBI-BO-Drugs (15)-**141**.

Abbildung 109 zeigt das ^{13}C -Spektrum (125 Mhz, DMSO-d_6) des *seco*-Drugs (15)-**141**. Im Hochfeld beginnt das Spektrum mit den Resonanzsignalen für die Kohlenstoffatome der Spacereinheit mit C-4' bei $\delta = 23.3$ ppm, gefolgt von C-3' ($\delta = 24.9$), C-2' ($\delta = 30.0$) und C-5' ($\delta = 34.6$) sowie bei $\delta = 57.4$ ppm für C-1'. Ebenso sind auch die Signale für die Kohlenstoffatome der Mehtylaminofunktion (bei $\delta = 32.7$ ppm) sowie der aliphatischen Kohlenstoffatome des CBI-Grundgerüsts weit ins Hochfeld verschoben. Man findet die Resonanzsignale für C-1 bei $\delta = 40.7$ ppm, für C-10 bei $\delta = 47.6$ ppm und für C-2 bei $\delta = 52.6$ ppm. Das Signal für das C-1'''-Kohlenstoffatom beobachtet man bei $\delta = 89.4$ ppm. Es folgen die Signale für die aromatischen Kohlenstoffatome beginnend mit C-4 bei $\delta = 99.7$ ppm. Es folgen die Resonanzsignale für die Kohlenstoffatome des Benzothiazolgerüsts bei $\delta = 111.8$ (C-4'''), 122.4 (C-7'''), 123.1 (C-7a'''), 123.3 (C-6'''), 127.5 (C-5'''), 140.2 (C-3a''') und 150.1 (C-2''') sowie die Resonanzsignale für die pharmakophore CBI-Einheit bei $\delta = 114.5$ (C-5a), 121.4 (C-9b), 122.2 (C-9), 122.3 (C-7), 122.8 (C-6), 126.9 (C-8), 129.7 (C-9a), 141.8 (C-3a), 154.0 (C-5) und die Signale für den Pyridiniumteil bei $\delta = 118.2$

(C-3'', C-5''), 141.1 (C-2'', C-6''), 156.9 (C-4''). Das Spektrum wird im Tieffeld durch das Resonanzsignal für das Carbonylkohlenstoffatom bei $\delta = 170.3$ ppm abgeschlossen.

7.2 Synthese der (1S)-CBI-Benzothiazol-Galaktoside (1S)-70 und (1S)-147

Ausgehend vom Phenol (1S)-**128** konnten die CBI-Benzothiazol-Galaktoside (1S)-**70** und (1S)-**145** über 4 Stufen hergestellt werden. Zunächst wurde das freie Phenol (1S)-**128** nach der Trichloracetimidatmethode nach *Schmidt*¹⁵⁷ unter $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ -Katalyse mit tetraacetyliertem D-Galaktose-Trichloracetimidat **116** gekuppelt und anschließend die säurelabile *N*-Boc-Schutzgruppe $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ -vermittelt abgespalten. Das freie sekundäre Amin wurde dann mit EDAC·HCl als Kupplungsreagenz in DMF mit der Carbonsäure des entsprechenden Benzothiazols **63** oder **142** gekuppelt um die tetraacetylierten CBI-Benzothiazol-Galaktoside zu erhalten.

Auf Grund der geringen Ausbeuten bei der Entschützung der tetraacetylierten Galaktoside nach *Zémlen* wurde versucht, die Bildung des unerwünschten Nebenproduktes **143** bzw. **144** zu verringern (Abbildung 110 und Tabelle 4). Es wurde angenommen, dass das Pyridin- bzw. Chinolinisalz des Fluorochroms als Lewisäure fungiert und das Carbonyl gegenüber einem Angriff durch Methanolat aktiviert.

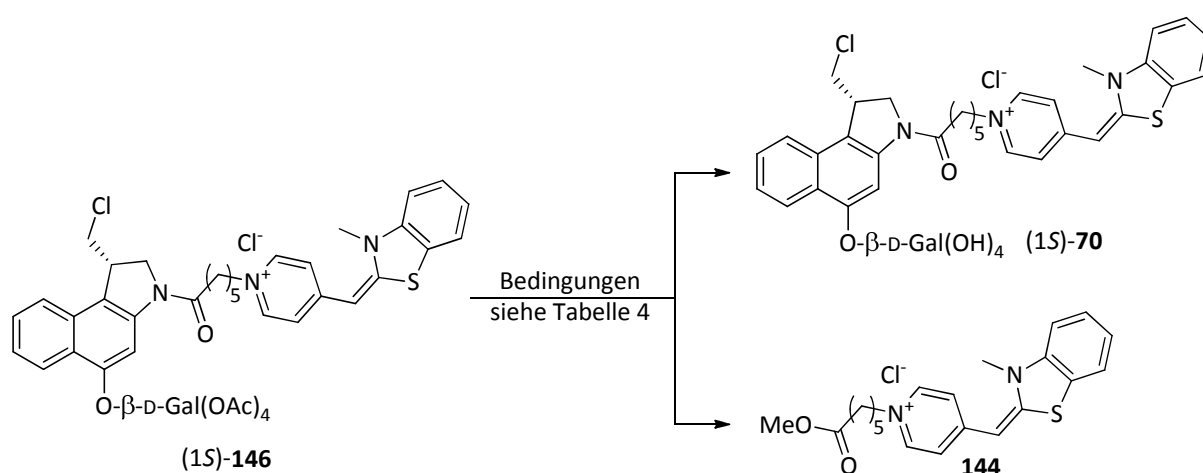


Abbildung 110. Versuche zur Darstellung des CBI-Galaktosides (1S)-**70** bei gleichzeitiger Bildung des Mehtylesters **144** als unerwünschtes Nebenprodukt.

Bedingungen		Zeit	(1S)- 146 [%]	(1S)- 70 [%]	144 [%]
NaOMe (1.0 eq.) in MeOH	-20°C	24 h	31	18	51
NaOMe (1.0 eq.) in MeOH	0°C	60 min	14	14	72
NaOMe (0.5 eq.) in MeOH	RT	60 min	73	9	18
NaOMe (2.0 eq.) in MeOH	-20°C	24 h	0	46	54
NaOMe (2.0 eq.) in MeOH	0°C	60 min	0	17	83
NaOMe (2.0 eq.) in MeOH	RT	60 min	0	29	71
NaOMe (4.0 eq.) in MeOH	-20°C	24 h	0	47	53
NaOMe (4.0 eq.) in MeOH	0°C	90 min	0	63	37
NaOMe (4.0 eq.) in MeOH	RT	120 min	0	17	83
K₂CO₃ (0.5 eq.) in MeOH	RT	160 min	5	73	22
NaOMe (1.0 eq.) in <i>i</i> PrOH	RT	26 h	34	38	28
<i>p</i> -TsOH (4.0 eq.) in MeOH	RT	48 h	32	11	57
<i>Candida antarctica</i> lipase	RT	24 h	100	0	0

Tabelle 4. Versuche zur Darstellung von (1S)-**70**.

Anschließende Deacetylierung durch Kaliumcarbonat in Methanol bei Raumtemperatur lieferte die entsprechenden (1S)-CBI-Cumarin-Galaktoside (1S)-**70** und (1S)-**147** in guten bis mäßigen Ausbeuten. Abschließend wurden die erhaltenen Prodrugs (1S)-**70** und (1S)-**147** durch präparative HPLC (Kromasil 100 C-18) gereinigt.

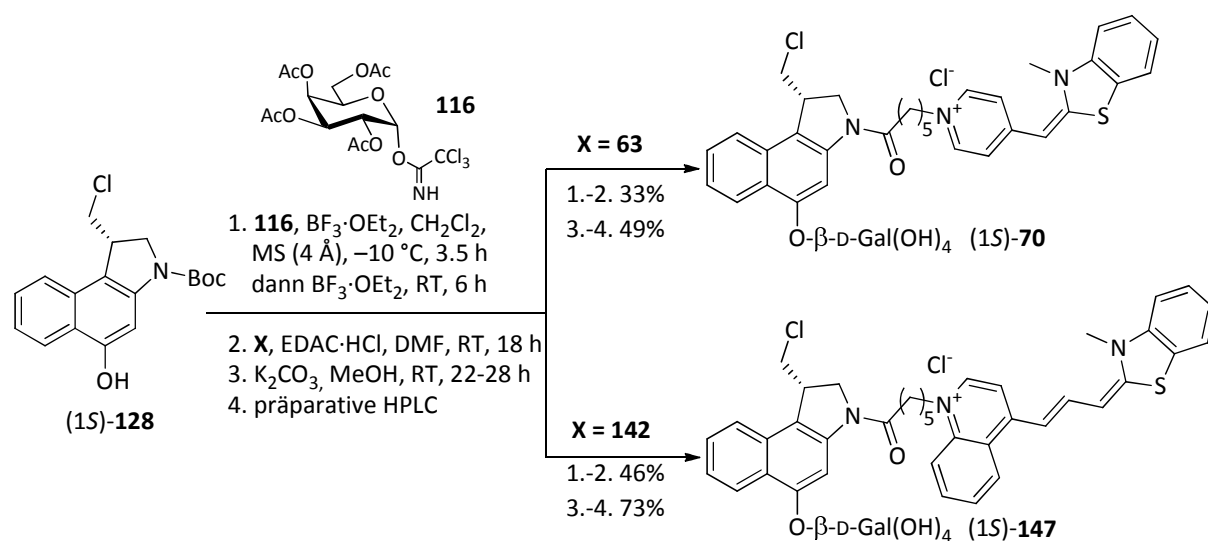


Abbildung 111. Synthese der (1S)-CBI-Benzothiazol-Galaktoside (1S)-**70** und (1S)-**147** ausgehend von Phenol (1S)-**128**.

7.2.1 Ergebnisse zur Untersuchung der In-vitro-Zytotoxizität an humanen Bronchialkarzinomzellen (A549) für die *seco*-CBI-Benzothiazol-Derivate (1S)-141 und (1S)-145 sowie den Galaktosiden (1S)-147 und (1S)-70

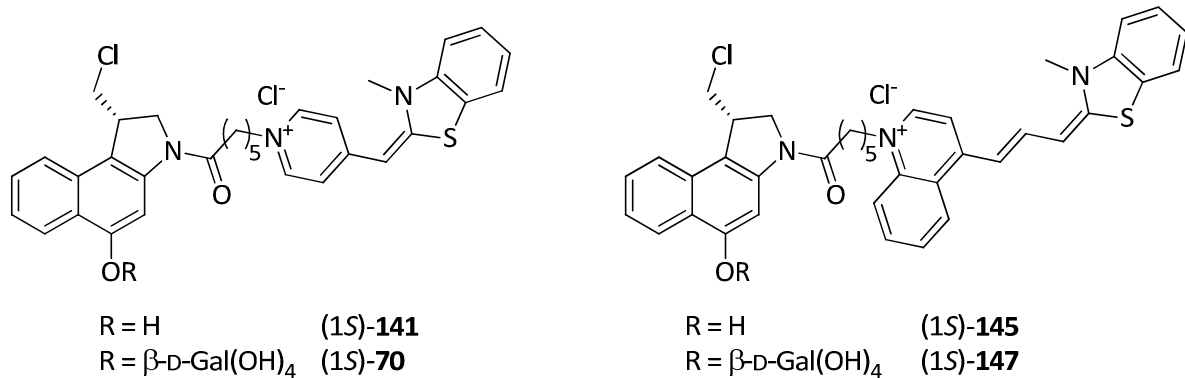
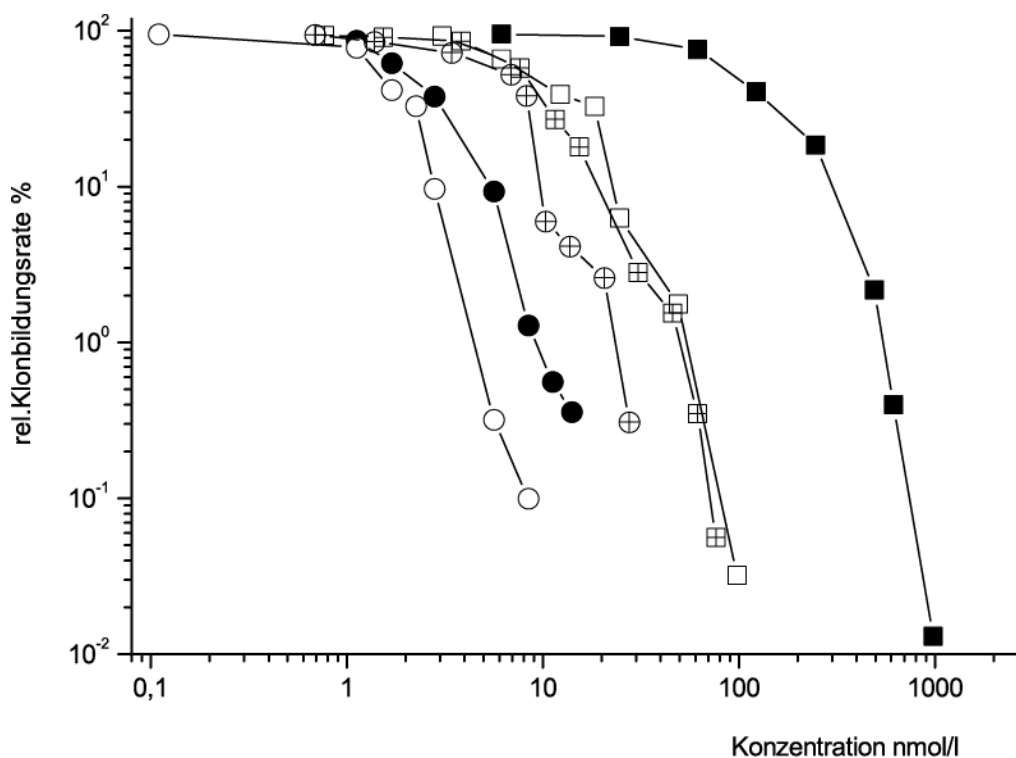


Abbildung 112. Untersuchte (1S)-Benzothiazol Galaktoside (1S)-70 und (1S)-147 sowie *seco*-Benzothiazol-Drugs (1S)-141 und (1S)-145.

Abbildung 112 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen zur In vitro-Zytotoxizität der in dieser Arbeit synthetisierten (1S)-Benzothiazol-Derivate. Die (1S)-Galaktoside (1S)-70 und (1S)-147 zeigen mit $IC_{50} = 106$ nM und $IC_{50} = 2.3$ nM in Abwesenheit des Enzyms große Unterschiede in ihrer Toxizität, während die *seco*-Drugs (1S)-141 und (1S)-145 nur geringe Unterschiede in ihrer Toxizität aufweisen ($IC_{50} = 18.1$ nM für (1S)-141 und $IC_{50} = 7.2$ nM für (1S)-145). Mit $QIC_{50} = 5.6$ kann für das Galaktosid (1S)-141 nur eine geringe therapeutische Breite gefunden werden. Auch das Galaktosid (1S)-147 zeigt in Anwesenheit des Enzyms keine signifikante Toxizitätssteigerung ($QIC_{50} = 1.4$). Vergleicht man die ermittelten Werte mit den Kriterien des ADEPT-Konzeptes kann festgestellt werden, dass sich die synthetisierten Benzothiazol-Derivate trotz ihrer hervorragenden optischen Eigenschaften, besonders im Fall des Galaktosides (1S)-147 nicht für einen Einsatz im Rahmen von ADEPT eignen.



	IC ₅₀ (nmol/l)	Q IC ₅₀
■ (1S)-70 ohne Enzym	106	5.6
□ (1S)-70 mit Enzym	18.8	
⊠ (1S)-141	18.1	
● (1S)-147 ohne Enzym	2.3	1.4
○ (1S)-147 mit Enzym	1.6	
⊕ (1S)-145	7.2	

Abbildung 113. Darstellung der Ergebnisse der *In vitro*-Zytotoxizitätsuntersuchungen für die (1S)-Benzothiazol-Derivate (1S)-70 und (1S)-141 sowie (1S)-147 und (1S)-145.

7.3 Synthese der Benzothiazol-Methylester 143 und 144

Ausgehend von den Benzothiazol-Carbonsäuren **63** und **142**, die dafür bekannt waren, nicht in lebende Zelle aufgenommen zu werden, wurden auch deren Methylester **143** und **144** dargestellt, um die Aufnahme in lebende Zellen zu untersuchen. Hierzu wurde die Carbonsäure in Methanol gelöst und bei 0 °C mit Sulfonylchlorid umgesetzt. Das entstandene Säurechlorid konnte dann durch

Nucleophile Substitution mit Methanol in den entsprechenden Ester überführt werden. Eine Aufreinigung durch präparative HPLC war nicht möglich, da bei Zugabe von Säure unter wässrigen Reverse Phase Bedingungen, die Carbonsäure gebildet wurde. **144** konnte durch Säulenchromatographie an Kieselgel dargestellt werden, während **143** durch präparative Dünnschichtchromatographie aufgereinigt wurde.

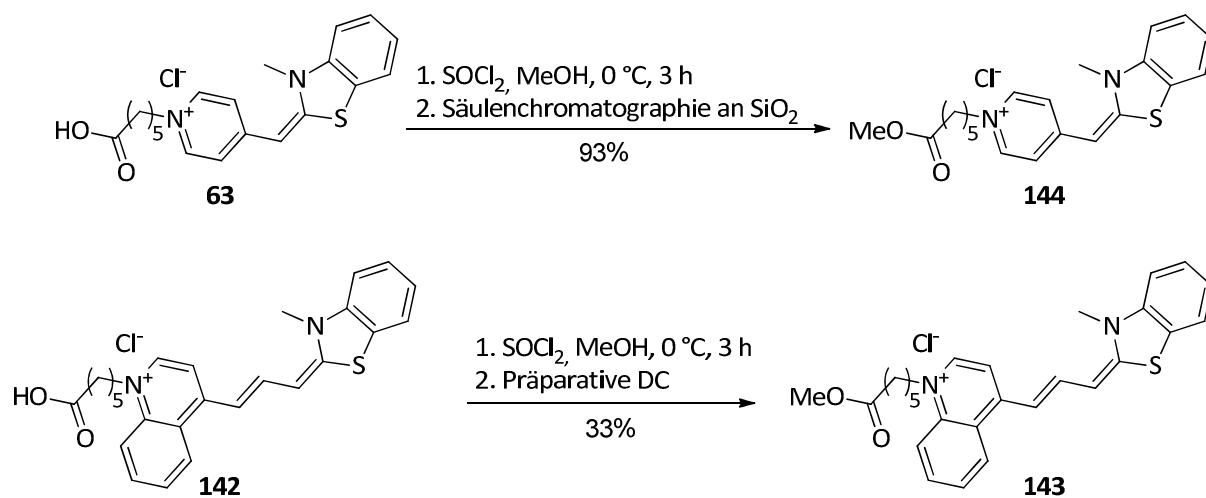


Abbildung 114. Darstellung der Methylester **144** und **143** ausgehend von den entsprechenden Carbonsäuren **63** und **142**.

8 Charakterisierung und Untersuchung der zellulären Aufnahme von fluoreszenzmarkierten (1S)-CBI-Benzothiazol-Derivaten

8.1 Fluorimetrische Bestimmung der Absorptions- und Emissionsmaxima

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme der in dieser Arbeit synthetisierten CBI-Benzothiazol-Derivate (1S)-**141**, (1S)-**70**, (1S)-**145** und (1S)-**147** sowie **143** und **144** mussten zunächst die Absorptions- und Emissionsspektren bestimmt werden. Hierzu wurden entsprechende Lösung der Substanzen in Methanol und wässrigem Bildgebungspuffer am Fluorimeter untersucht, um die benötigten Maxima zu ermitteln.

8.1.1 Bestimmung der Fluoreszenz- und Emissionsmaxima für die dargestellten BO-Derivate (1S)-**141**, (1S)-**70** sowie **144**

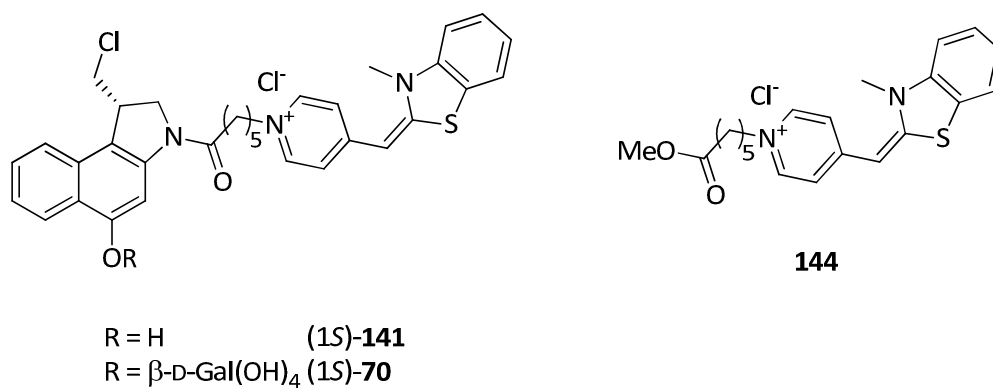


Abbildung 115. Untersuchte Verbindungen mit BO (**144**) als DNA-Binder.

Anders als die in Kapitel 6.1.1–6.1.3 beschriebenen Coumarine unterscheiden sich die verwendeten Benzothiazole aus Kapitel 8.1.1 und 8.1.2 in ihren spektralen Eigenschaften deutlich von einander. So zeigen das in dieser Arbeit synthetisierte *seco*-CBI-BO-Drug (1S)-**141**, das Galaktosid (1S)-**70** sowie der Methylester **144** annähernd identische Eigenschaften.

Die Verbindungen (1S)-**141**, (1S)-**70** und **144** zeigen, wie in den abgebildeten Spektren zu sehen ist ein Absorptionsmaximum von $\lambda_{\text{max,Abs}} = 452\text{--}462\text{ nm}$, während das Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{max,Em}} = 466\text{--}482\text{ nm}$ liegt. Der *Stokes-Shift* ist in den beschriebenen Spektren mit $14\text{--}26\text{ nm}$ sehr gering. Auffällig ist des Weiteren ein zusätzliches Absorptionsmaixmum im Bereich von $\lambda_{\text{max,Abs}} = 290\text{ nm}$, dass mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht weiter untersucht werden konnte, da es keinen Laser mit einer Anregungswellenlänge in diesem spektralen Bereich gibt (Abbildungen 116–118).

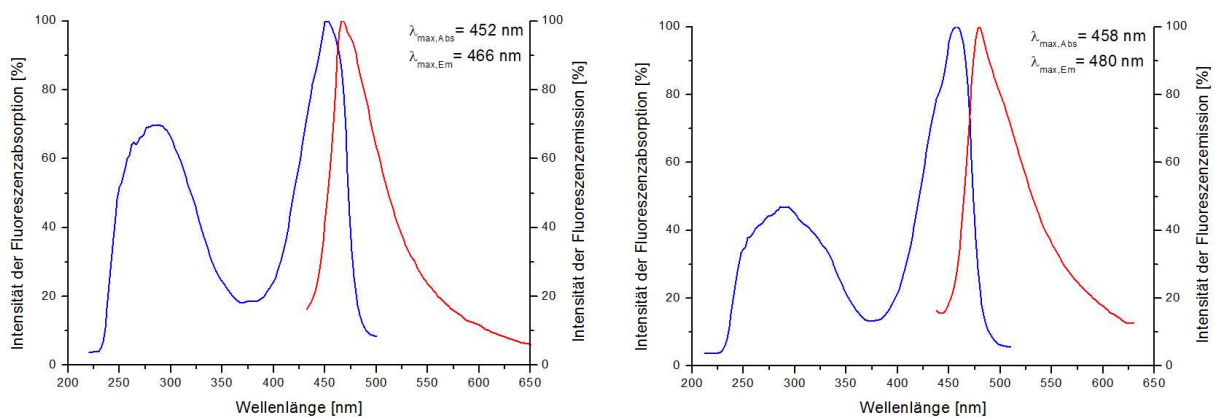


Abbildung 116. Absorptions- und Emissionsspektren von (1S)-**141** in Methanol (links) und wässrigem Bildgebungspuffer (rechts).

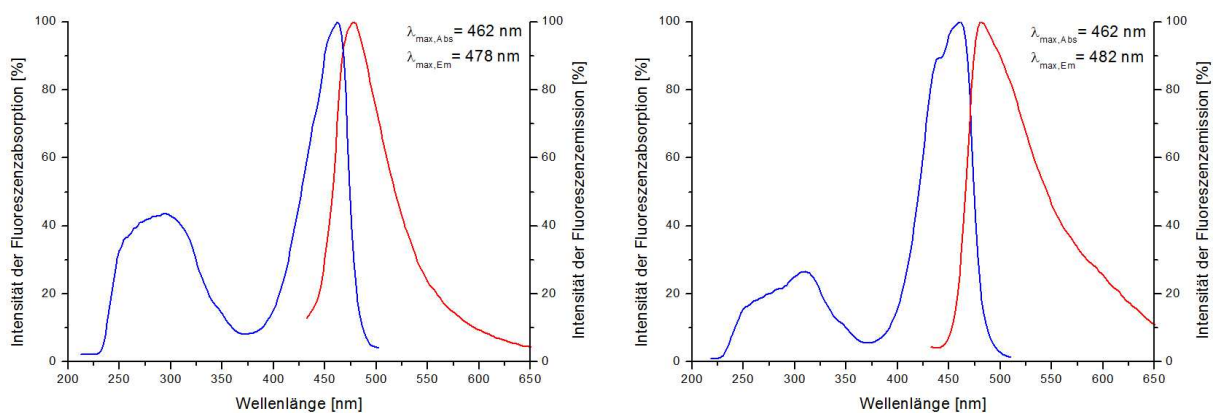


Abbildung 117. Absorptions- und Emissionsspektren von (1S)-**70** in Methanol (links) und wässrigem Bildgebungspuffer (rechts).

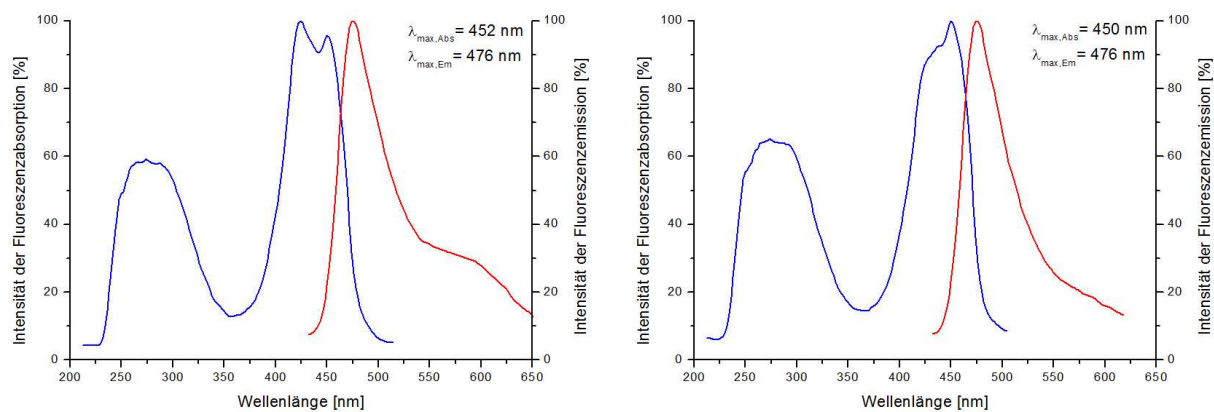


Abbildung 118. Absorptions- und Emissionsspektren von **144** in Methanol (links) und wässrigem Bildgebungspuffer (rechts).

8.1.2 Bestimmung der Fluoreszenz- und Emissionsmaxima für die dargestellten TO3-Derivate (1S)-145, (1S)-147 sowie 143

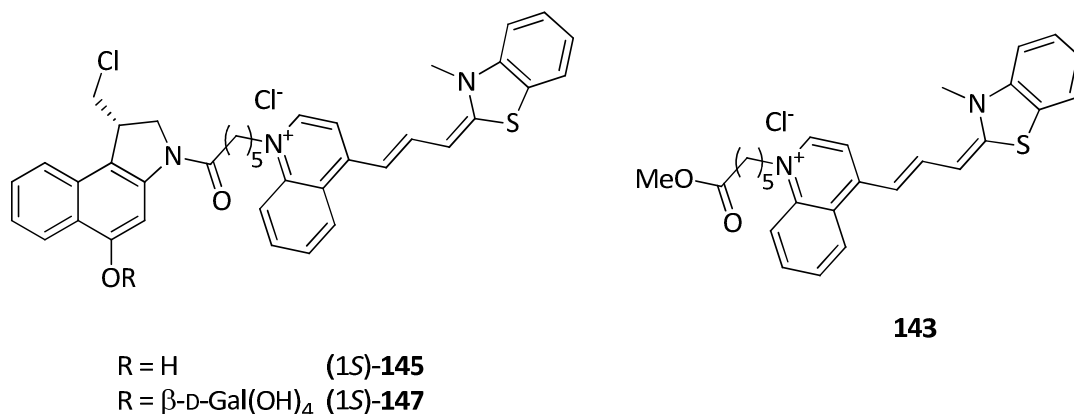


Abbildung 119. Untersuchte Verbindungen mit TO3 (**143**) als DNA-Binder.

Bei den TO3-Derivaten (1S)-**145**, (1S)-**147** sowie **143** ist das Absorptionsspektrum mit $\lambda_{\text{max,Abs}} = 628\text{--}646 \text{ nm}$ von allen in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen am weitesten rotverschoben. Mit $\lambda_{\text{max,Em}} = 647\text{--}651 \text{ nm}$ zeigen die TO3-Derivate einen nur sehr geringen *Stokes-Shift* von 7–19 nm auf (Abbildungen 120–122). Auf Grund ihrer spektralen Eigenschaften, wie ihrer enorm hohen molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), den guten Quantenausbeuten ($\Phi = 0.024\text{--}0.206$)¹⁶³ sowie den sehr großen Absorptionswellenlängen¹⁶² eignen sich diese Verbindungen hervorragend für Versuche im Rahmen von *Optical Imaging*.

Untersuchung der zellulären Aufnahme von (1S)-CBI-Benzothiazol-Derivaten120

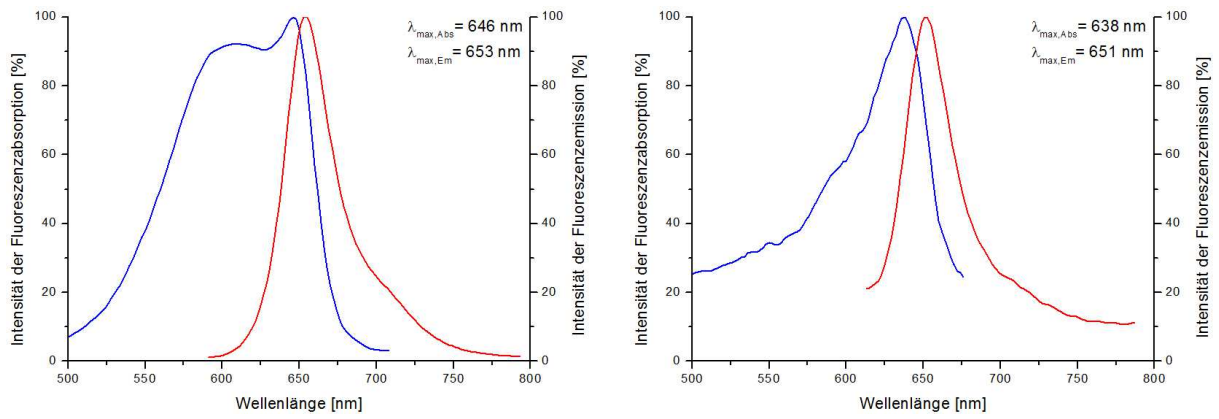


Abbildung 120. Absorptions- und Emissionsspektren von (1S)-145 in Methanol (links) und wässrigem Bildgebungspuffer (rechts).

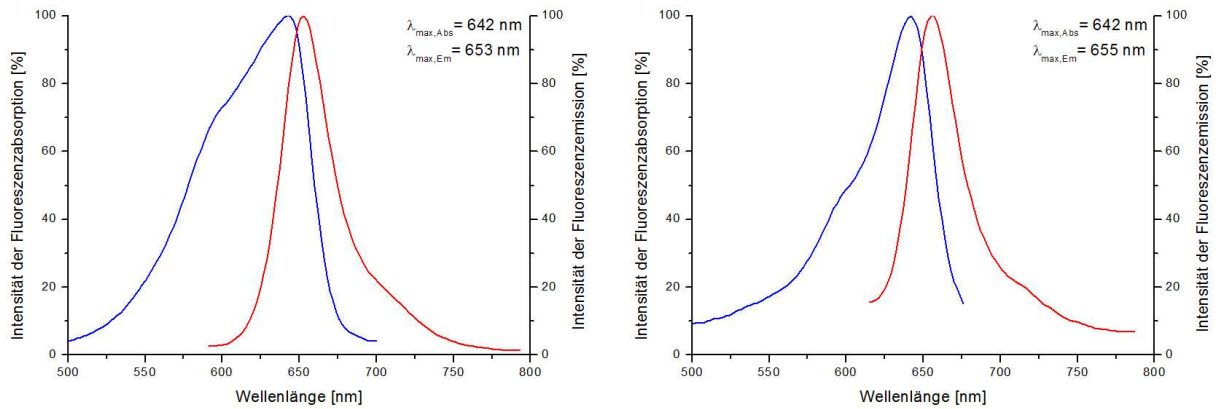


Abbildung 121. Absorptions- und Emissionsspektren von (1S)-147 in Methanol (links) und wässrigem Bildgebungspuffer (rechts).

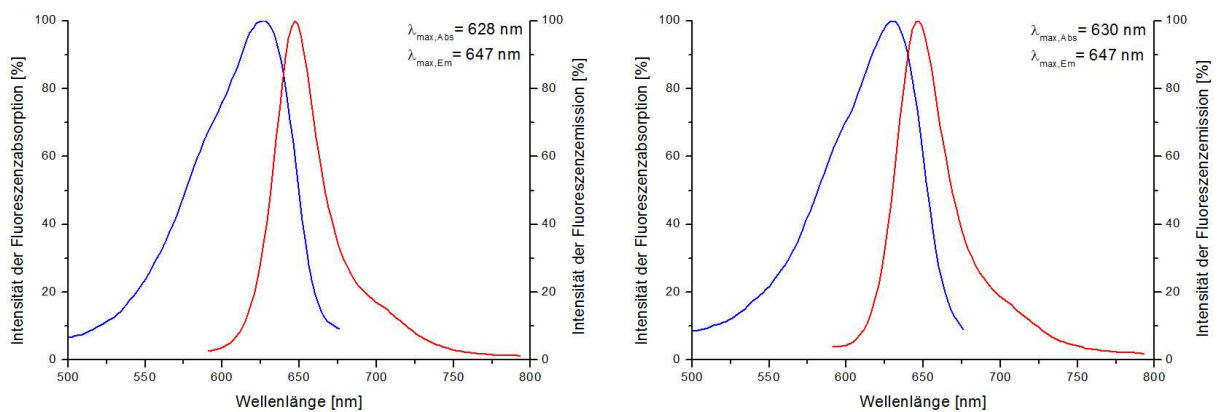


Abbildung 122. Absorptions- und Emissionsspektren von 143 in Methanol (links) und wässrigem Bildgebungspuffer (rechts).

8.2 Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-Benzothiazol-Derivate in lebende Zellen durch CLSM

Zu einem besseren Verständnis des Wirkmechanismus der CBI-Derivate wurden die in dieser Arbeit synthetisierten fluoreszenzmarkierten Analoga in *Live Cell Imaging*-Experimenten untersucht. Hierzu wurden adhärent wachsende Zelllinien vom Typ HeLa SS6 für kurze Zeit mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert (5–15 min) und die Verteilung der Substanz mit Hilfe eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops beobachtet und einer CCD-Kamera aufgenommen.

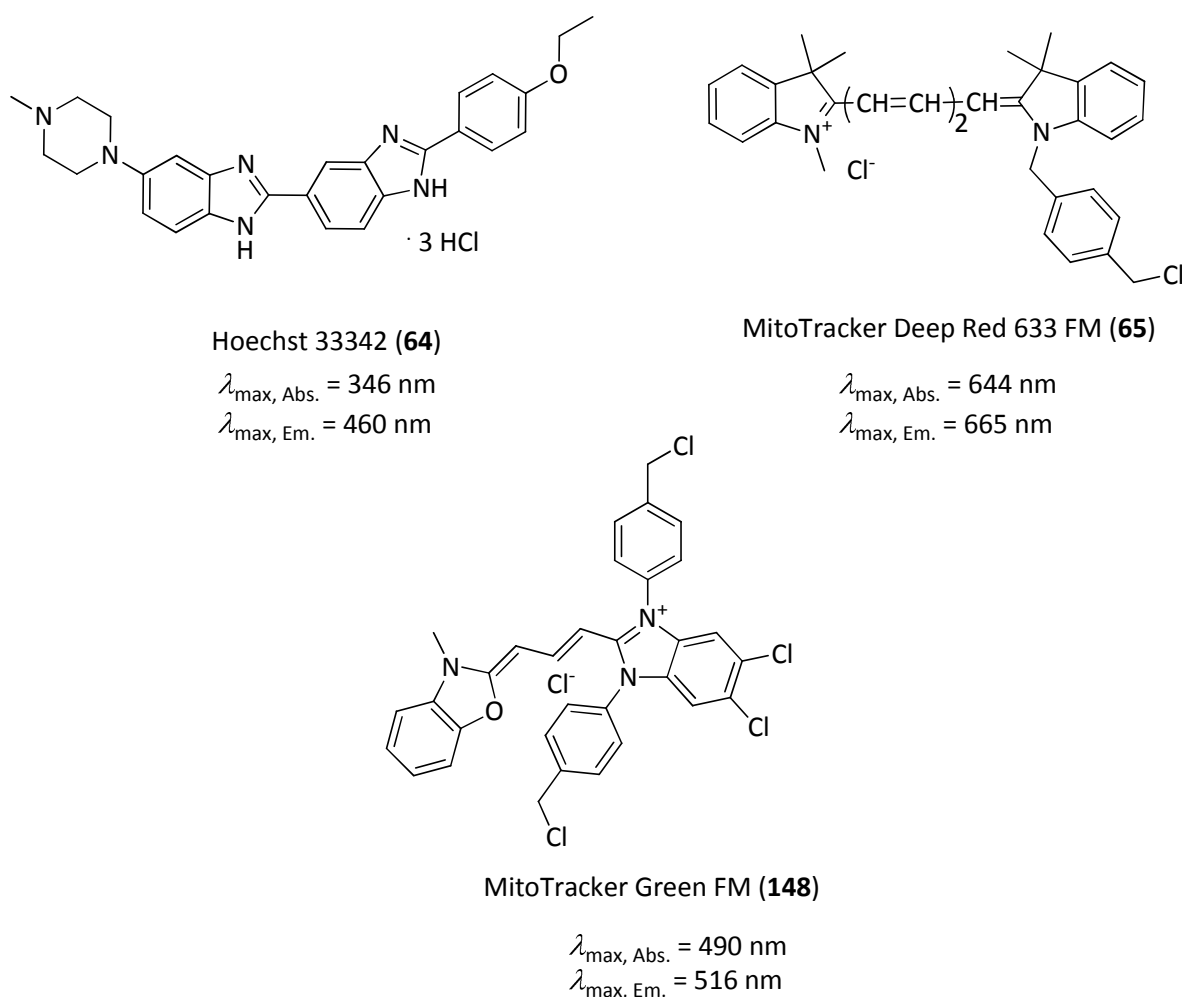


Abbildung 123. Strukturen, der für die Kolokalisationsexperimente eingesetzten Anfärbreagenzien: **64** zur Anfärbung des Zellkerns sowie **65** bzw. **148** zur Anfärbung der Mitochondrien.

Zur Identifikation der angefärbten Zellregion wurde auf das Prinzip der Kolokalisation zurückgegriffen, um eine Unterscheidung zwischen Organellen, wie dem Zellkern

oder mitochondrialen Strukturen zu treffen. Hierzu eignen sich im besonderen der Mitochondrienfarbstoff MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**), der auf Grund seiner optischen Eigenschaften im Fall der BO-Derivate eingesetzt werden konnte, der Mitochondrienfarbstoff MitoTracker Green FM (**148**), der auf Grund seiner optischen Eigenschaften im Fall der TO3-Derivate eingesetzt werden konnte, sowie der Zellkernfarbstoff Hoechst 33342 (**64**) (Abbildung 123).

8.2.1 Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-BO-Derivate (1S)-141, (1S)-70 sowie 144 in lebende Zellen

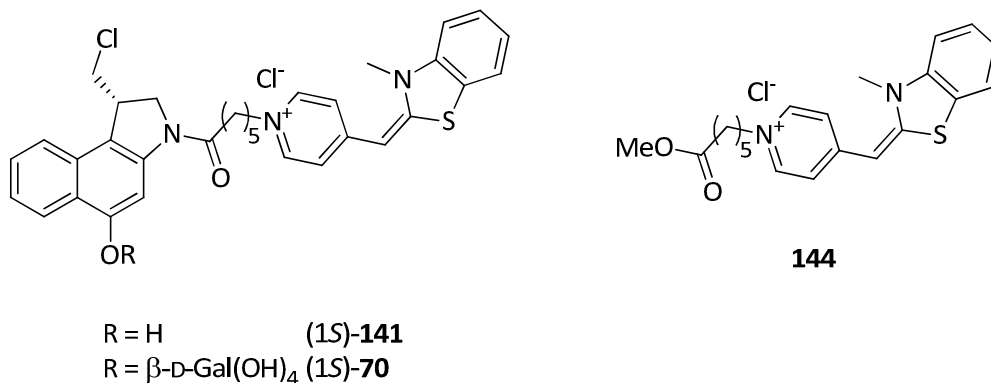


Abbildung 124. Untersuchte Verbindungen mit BO (**144**) als DNA-Binder.

Bei der Untersuchung des *seco*-Drugs (1S)-**141** fällt auf, dass eine sehr selektive Akkumulation des Wirkstoffs innerhalb des Zellkerns auftritt (Abbildung 125). Dieses konnte durch Kolkalisationsexperimente mit Hoechst 33342 (**64**) (A) sowie MitoTracker Green FM (**148**) (C) bestätigt werden. Ein erstes Kriterium im Rahmen der Anwendung des ADEPT-Konzeptes ist hiermit gegeben, da das *seco*-Drug (1S)-**141** die Zellemembran innerhalb von wenigen Minuten penetriert und sich innerhalb der Zelle, genauer dem Zellkern, aufhält.

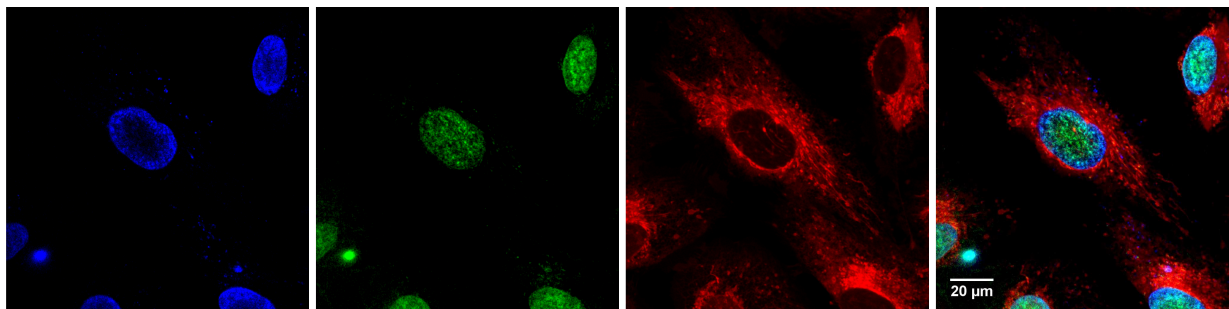


Abbildung 125. Kolokalisationsexperimente zur Aufnahme des *seco*-Drugs (1S)-**141** in lebende Zellen. 1. von links: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}450 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); 2. von links: $\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 463\text{--}471 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch (1S)-**141**; 3. von links: $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 644\text{--}703 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**); 4. von links: Überlagerung von 1.-3.

Ebenso penetriert das aus **144** synthetisierte Galaktosid (1S)-**70** innerhalb weniger Minuten die Zellmembran und verweilt nicht, wie es das ADEPT-Konzept erfordert, bis zur enzymatischen Spaltung und Freisetzung des *seco*-Drugs (1S)-**141** außerhalb der Zelle. Wie in Abbildung 126 zu sehen ist, akkumuliert das Galaktosid (1S)-**70** in den Mitochondrien lebender Zellen. Dieses Ergebniss lässt sich durch Kolokalisationsexperimente durch MitoTracker Green FM (**148**) eindeutig bestätigen.

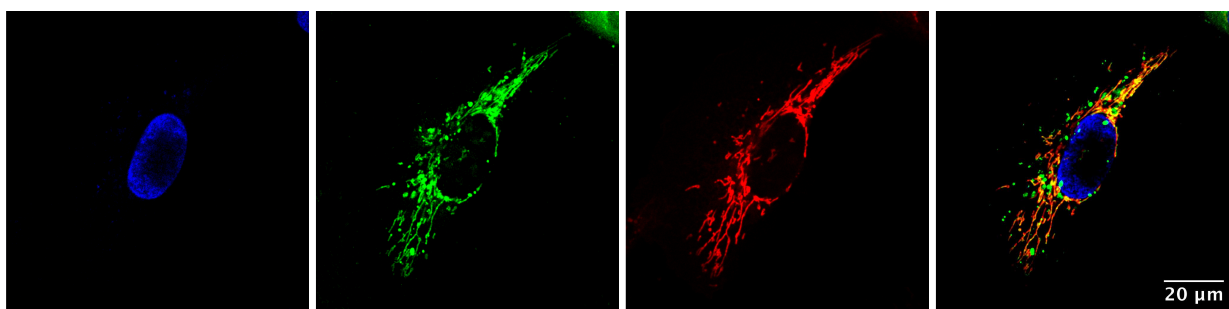


Abbildung 126. Kolokalisationsexperimente zur Aufnahme des Galaktosides (1S)-**70** in lebende Zellen. 1. von links: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}450 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); 2. von links: $\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 475\text{--}520 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch Galaktosid (1S)-**70**; 3. von links: $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 644\text{--}703 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Deep Red 633 FM (**65**); 4. von links: Überlagerung von 1.-3.

Wie in Abbildung 127 zu sehen ist, penetriert der Methylester **144** die Zellmembran und akkumuliert in den Nukleoli sowie an der Zellkernmembran und zeigt damit ein anderes Verhalten als das *seco*-Drug (1S)-**141** oder das Galaktosid (1S)-**70**.

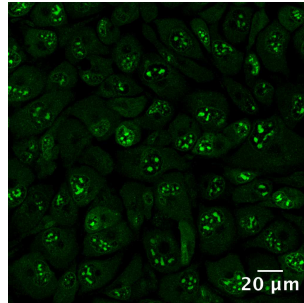


Abbildung 127. Kollokalisationsexperimente zur Aufnahme des Fluorochroms **144** in lebende Zellen ($\lambda_{exc} = 458 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 475\text{--}520 \text{ nm}$, Nukleoli und Zellkernmembran).

8.2.2 Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter (1S)-CBI-TO3-Derivate (1S)-**145**, (1S)-**147** sowie **143**

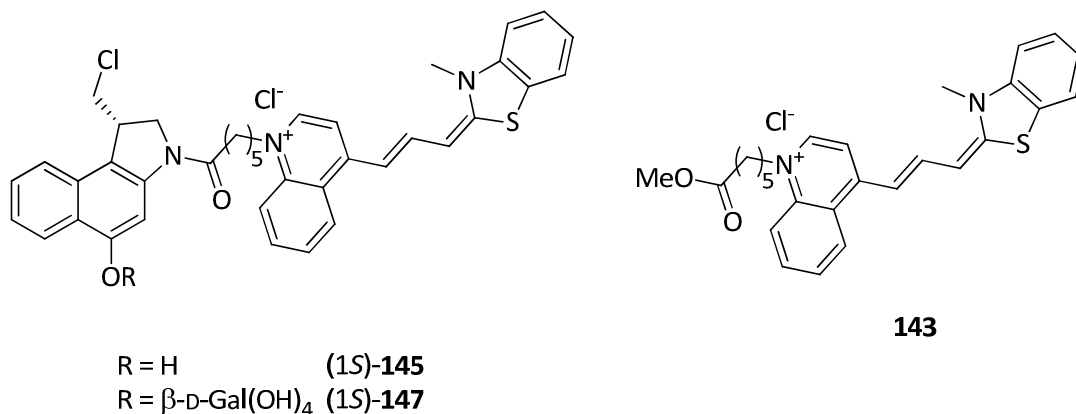


Abbildung 128. Untersuchte Verbindungen mit TO3 (**143**) als DNA-Binder.

Das *seco*-Drug (1S)-**145** zeigt im *Live Cell Imaging* ein zum *seco*-Drug (1S)-**141** sehr ähnliches Verhalten. (1S)-**145** akkumuliert bereits nach wenigen Minuten innerhalb des Zellkerns, jedoch vorwiegend in Nukleoli-artigen Strukturen (Abbildung 129). Die nicht vollständige Färbung des Zellerns durch Kollokalisationsexperimente im Fall von Hoechst 33342 (**64**) ist durch die zu kurze Wartezeit zu erklären. Dennoch ist klar ersichtlich, dass es sich bei der von (1S)-**145** markierten Zellregion um den Zellkern und nicht um mitochondriale Strukturen handelt.

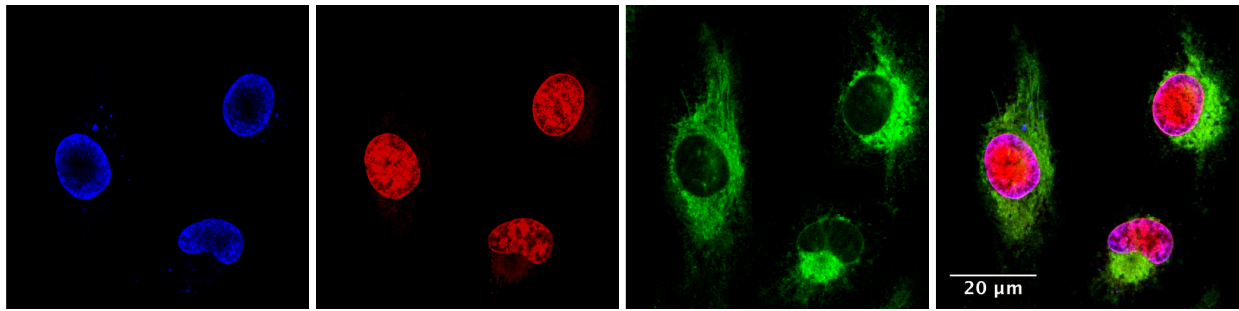


Abbildung 129. Kolokalisationsexperimente zur Aufnahme des *seco*-Drugs (1S)-**145** in lebende Zellen. 1. von links: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}485 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); 2. von links: $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 644\text{--}703 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch *seco*-Drug (1S)-**145**; 3. von links: $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 497\text{--}538 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Green (**148**); 4. von links: Überlagerung von 1.-3.

Eine weitere Analogie lässt sich durch *Live Cell Imaging*-Experimente mit dem aus **143** dargestellten Galaktosid (1S)-**147** finden. So akkumuliert das Galaktosid (1S)-**147** wie auch das Galaktosid (1S)-**70** zuvor innerhalb der Mitochondrien. Eine Akkumulation des Zellkerns kann hier nicht beobachtet werden.

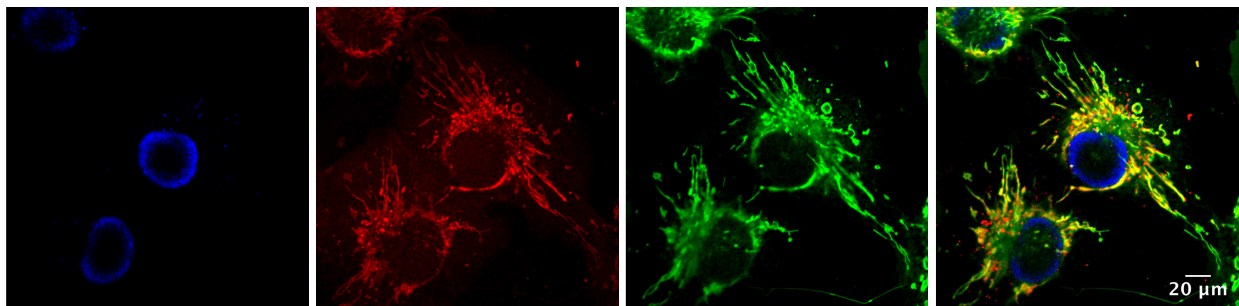


Abbildung 130. Kolokalisationsexperimente zur Aufnahme des Galaktosids (1S)-**147** in lebende Zellen. 1. von links: $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{--}485 \text{ nm}$, Anfärbung des Zellkerns durch Hoechst 33342 (**64**); 2. von links: $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 655\text{--}703 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch Galaktosid (1S)-**147**; 3. von links: $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 497\text{--}538 \text{ nm}$, Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Green (**148**); 4. von links: Überlagerung 1.-3.

Eine weitere Analogie der verwendeten Benzothiazole lässt sich in der Auswertung der Ergebnisse für den Methyllester **143** finden. **143** penetriert, wie auch **144** innerhalb von wenigen Minuten die Zellmembran und akkumuliert in Nukleoli sowie in der Zellkernmembran.

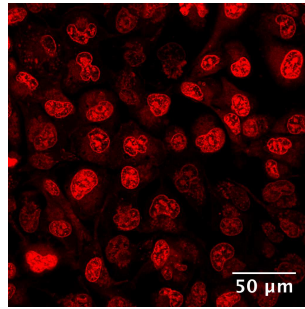


Abbildung 131. Kollokalisationsexperimente zur Aufnahme des Fluorochroms **143** in lebende Zellen ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 644\text{--}703 \text{ nm}$; Nukleoli und Zellkernmembran).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sich die dargestellten Benzothiazol-Derivate in ihren Eigenschaften zur Zellaufnahme sehr stark ähneln. So penetrieren alle untersuchten Verbindungen sehr schnell die Zellmembran. Während die *seco*-Drugs (1S)-**141** und (1S)-**145** im Zellkern bzw. Nukleoli akkumulieren, populieren die Galaktoside (1S)-**70** und (1S)-**147** die Mitochondrien. Genauso verhält es sich bei den Methylestern der Fluorochrome. So akkumulieren **143** und **144** in Nukleoli und der Zellkernmembran. Da die Zuckerderivate der *seco*-Drugs wie auch die *seco*-Drugs selbst sehr schnell die Zellmembranen penetrieren sind sie nicht für das ADEPT-Konzept geeignet, das eine enzymatische Spaltung an der äußeren Zellmembran durch Konjugate aus monoklonalen Antikörpern und Glucohydrolasen vorsieht.

C. ZUSAMMENFASSUNG

Noch immer stellt Krebs einen der größten Teile der tödlichen Erkrankungen in Deutschland dar. So kann jeder vierte Todesfall auf Krebs zurückgeführt werden. Aus diesem Grund und dem in Deutschland herrschenden demographischen Wandel ist eine weitere Entwicklung und eine damit einhergehende Senkung der Mortalitätszahlen, die durch Krebserkrankungen verursacht werden, ein wichtiges Ziel der Krebsforschung.

Die klassische antineoplastische Chemotherapie, die durch starke Nebenwirkungen wie Erbrechen, Immunschwäche, Infertilität oder Haarausfall den Behandlungserfolg stark einschränkt, ist trotz der angesprochenen Nebenwirkungen neben der chirurgischen Entfernung des Tumors und der Strahlentherapie eine der wichtigsten Behandlungsmethoden. Die klassischen Zytostatika beruhen im Allgemeinen auf der erhöhten Proliferationsrate von Tumorzellen. Allerdings gehören auch gesunden Zellen, wie die der Haarfollikel oder des Knochenmarks zu den schnell proliferierenden Zellen und werden somit durch Zytostatika gleichermaßen angegriffen. Eine weitere Untersuchung der Unterschiede zwischen gesunden Zellen und Krebszellen ist daher unabdingbar und moderne Therapieansätze greifen auf phänotypische und genotypische Eigenschaften von Krebszellen zurück um damit eine Selektierung der Krebszellen zu ermöglichen.

Auf der Grundlage dieser Überlegungen konnten im Arbeitskreis *Tietze* neue Konzepte erarbeitet werden. Hierzu zählt im Besonderen das Konzept der Prodrug-Therapie. Hierdurch wird eine hohe Selektivität und Effizienz bei der Behandlung von Krebs erreicht, da weitestgehend untoxische Prodrugs gezielt am Wirkort in die entsprechenden zytotoxischen Drugs durch Nutzung der phänotypischen Eigenschaften der Krebszelle umgewandelt werden.

In besonderem Maß haben sich hierbei die Konzepte der *Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy* (ADEPT) sowie der Prodrug-Mono-Therapie (PMT) hervor getan. So wird bei Anwendung des ADEPT-Konzeptes eine enzymatische Umwandlung des Prodrugs in das Drug durch Antikörper-Enzym-Konjugate erreicht, die selektiv an

tumorassoziierte Antigene binden. Neben diesem binären Ansatz, stellt die PMT einen ähnlichen Ansatz, bei dem allerdings kein Antikörper-Konjugat genutzt wird. Stattdessen werden in Krebszellen überexprimierte Enzyme genutzt, um das Prodrug selektiv am Tumor in das entsprechende Drug umzuwandeln. So stellt zum Beispiel das tumorassoziierte Enzym β -D-Glucuronidase ein Ziel im Rahmen der Prodrug Monotherapy dar.

Entsprechende Prodrugs im Rahmen von ADEPT und PMT konnten im Arbeitskreis *Tietze* synthetisiert werden. Als Leitstruktur für die dargestellten Verbindungen dienten die zytotoxischen Antibiotika (+)-CC-1065 (**31**) und (+)-Duocarmycin SA (**32**). Bei der Betrachtung der Antibiotika fällt auf, dass beide über eine elektrophile Spirocyclopropylcyclohexadienon-Struktur verfügen, die einen Angriffspunkt für die DNA darstellt sowie eine Indolstruktur, die als DNA-bindende Struktureinheit dient. Des Weiteren weisen die gezeigten Antibiotika eine hohe Affinität zu doppelsträngiger DNA auf.

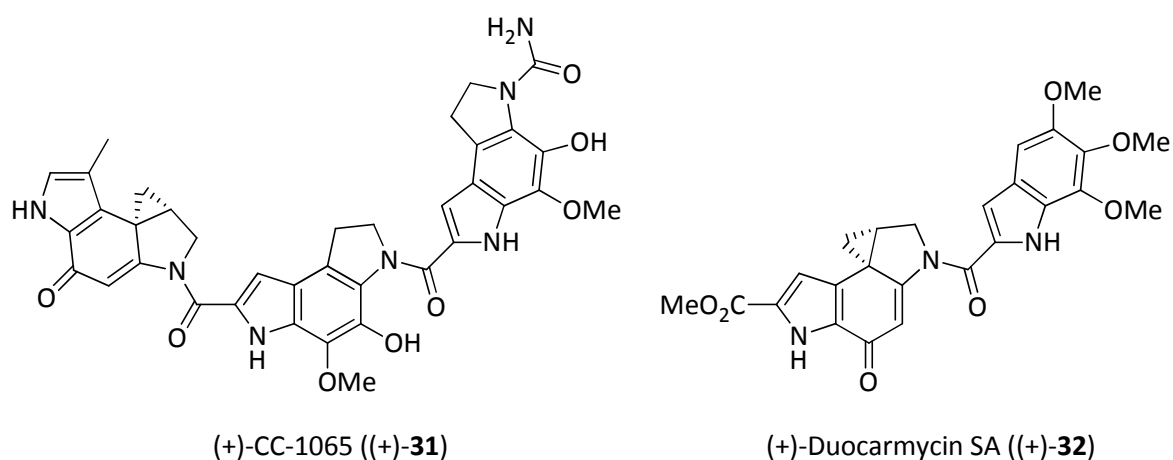


Abbildung 132. Die natürlichen zytotoxischen Antibiotika (+)-CC-1065 (**31**) und Duocarmycin SA (**32**).

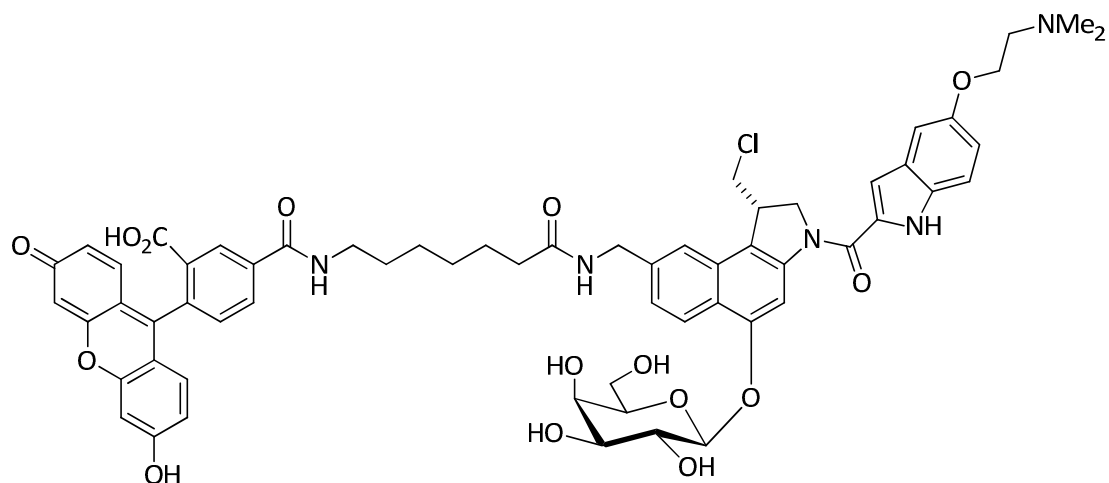
Die im Arbeitskreis *Tietze* entwickelten Analoga weisen keine Cyclopropylcyclohexadienon-Struktur auf, da die Cyclopropyl-Einheit *in situ* aus *seco*-Drugs durch eine Winstein-3'-Arylspirocyclisierung gebildet wird. Auf diese Weise wurden im Hinblick auf eine Anwendung im Rahmen von ADEPT oder PMT Analoga des Duocarmycins (**32**) dargestellt. Hierzu wurden Prodrugs synthetisiert, bei denen die Hydroxyfunktion

durch eine Zuckereinheit als detoxifizierende Einheit genutzt wird. So können untoxische Prodrugs dargestellt werden, die erst am Wirkort, zum Beispiel durch das Enzym β -D-Galaktosidase, in das entsprechende *seco*-Drug enzymatisch überführt werden

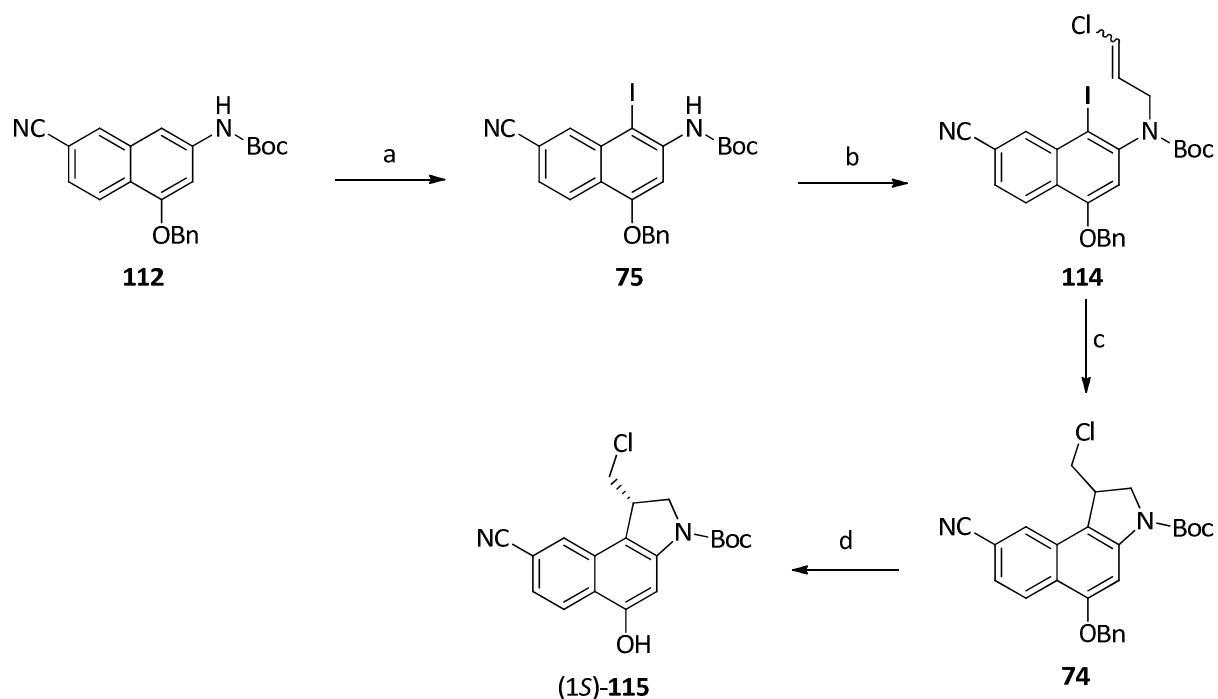
Zur weiteren Aufklärung des Wirkortes sowie des Wirkmechanismus der im Arbeitskreis Tietze synthetisierten Prodrugs und *seco*-Drugs wurden neuartige fluoreszenzmarkierte Analoga dargestellt und in *Live Cell Imaging*-Versuchen analysiert. Hierbei wurde zum ersten Mal auf eine Fluoreszenzmarkierung durch käuflich erwerbliche Marker verzichtet und stattdessen synthetisch zugängige, von sich aus DNA-bindende Fluorochrome eingesetzt. Zur Evaluierung eines Patentes, wurde ein von *B.Krewer*^{4a} synthetisiertes fluoreszenzmarkiertes *seco*-Drug in einer deutlich verkürzten und vielfach günstigeren Synthese dargestellt. Eine Untersuchung der fünf neuartigen fluoreszenzmarkierten Prodrugs, der fünf entsprechenden *seco*-Drugs sowie des fluoreszenzmarkierten *seco*-Drugs, das über eine neue Syntheseroute dargestellt wurde, konnte in Zusammenarbeit mit Herrn *Dr.Miso Mitovski* vom MPI für experimentelle Medizin Göttingen im Rahmen von *Live Cell Imaging*-Experimente am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop durchgeführt werden. Darüber hinaus wurde ein neues fluoreszenzmarkiertes FITC-markiertes Prodrug sowie ein Prodrug mit einer Aminofunktion dargestellt.

Zur Synthese des FITC-markierten Prodrugs (1S)-**72** wurde zunächst das *seco*-CCBI-Grundgerüst (1S)-**115** aus **112** dargestellt.

Hierzu wurde **112** selektiv an C-1 iodiert und im Anschluss das Boc-geschützte Amin mit (*E/Z*)-1,3-Dichlopropen (**113**) zu **114** alykiert. Darauffolgend wurde durch radikalische Zyklisierung durch TTMSS und AIBN das racemische CBI-Analoga *rac*-(1S)-**74** dargestellt, welches an chiraler stationärer Phase getrennt werden konnte, um nach Debenzylierung das gewünschte *seco*-CCBI-Grundgerüst (-)-(1S)-**115** in enantiomerenreiner Form zu erhalten.



(1S)-72

Abbildung 133. Struktur des fluoreszenzmarkierten Galaktosides (1S)-72.**Abbildung 134.** Darstellung des *seco*-CCBI-Grundkörpers (1S)-115 ausgehend von 112 für die Synthese von (1S)-72. a) NIS, TsOH, MeOH/THF 1:1, 50 °C, 1.5 h; b) NaH, DMF, RT, 1.5 h, dann (*E/Z*)-1,3-Dichlor-propen (113), RT, 14 h, 77%; c) TTMSS, AIBN, Toluol, 80 °C, 4.5 h, 85%; d) Trennung der Enantiomere von *rac*-74 an Chiralcel IA; e) Pd/C, H₂, EtOAc, RT, 5 h, 90%.

Die Boc-Schutzgruppe in (1S)-115 wurde durch BF₃·OEt₂ entfernt und im Anschluss mit DMAI-CO₂H (104) und EDAC·HCl alkyliert. Glykosidierung nach der Trichloracetimidat-

methode nach Schmidt¹⁵⁷ mit **116** lieferte das tetraacetylierte Galaktosid (1S)-**73** in einer Ausbeute von 53%.

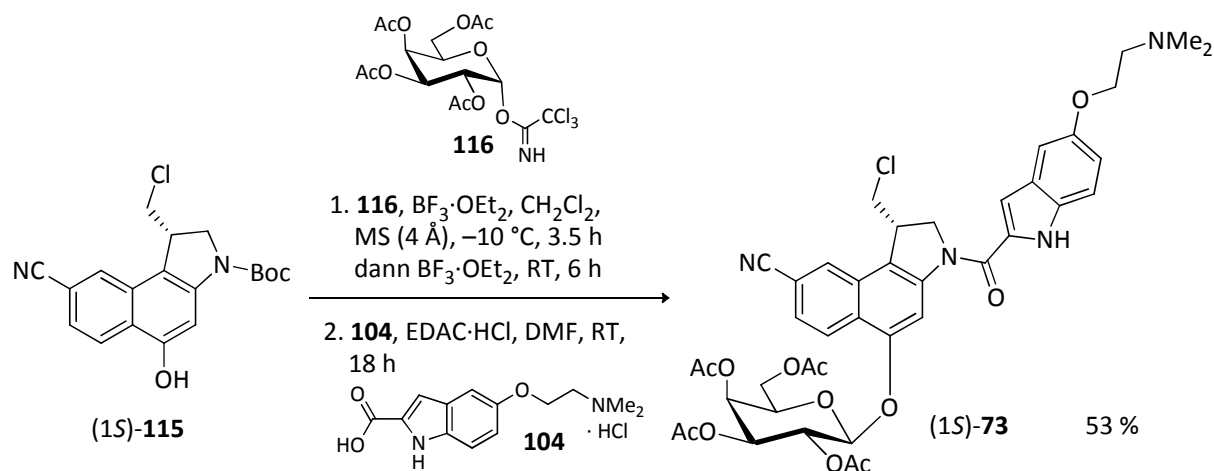


Abbildung 135. Syntheschema zur Darstellung des tetraacetylierten Galaktosids (1S)-**73** ausgehend vom Phenol (1S)-**115**.

Anschließende Reduktion des Nitrils in (1S)-**73** unter Verwendung von $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und H_2 in Ethanol für 48 h bei Raumtemperatur sowie basische Spaltung der Acetyl-schutzgruppen in (1S)-**117** durch Natriummethanolat in Methanol lieferte das Galaktosid (1S)-**118** mit einer Ausbeute von 84% (Abbildung 136).

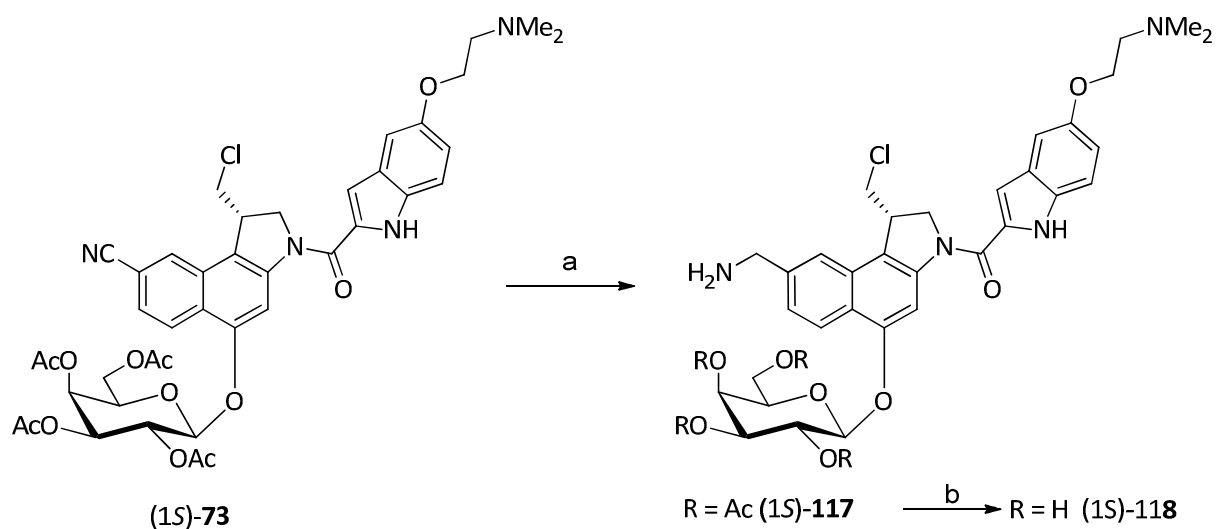


Abbildung 136. Syntheschema zur Darstellung des Galaktosides (1S)-**118**. a) $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, H_2 , 1.25 M HCl/EtOH, EtOH/ H_2O (96:4), RT, 48 h, 66%; b) NaOMe, MeOH, Rt, 30 min, 84%.

Das Prodrug (1S)-**118** wurde durch Hünig-Base deprotoniert und mit einer Lösung des *N*-Hydroxy-Succinimid-Esters **119** in DMF versetzt, um nach präparativer HPLC das fluoreszenzmarkierte Galaktosid (1S)-**72** mit einer Ausbeute von 46% zu erhalten. Leider stellen die dargestellten Prodrugs (1S)-**118** und (1S)-**72** auf Grund ihrer nur geringen QIC_{50} -Werte von $QIC_{50} = 124$ für das Amino-Galaktosid **118** sowie $QIC_{50} = 74$ für das fluoreszenzmarkierte Galaktosid **72** keine geeigneten Verbindungen im Rahmen des ADEPT-Konzeptes dar.

Neben der Darstellung des fluoreszenzmarkierten Prodrugs (1S)-**72** konnte ein fluoreszenzmarkiertes *seco*-Drug in Anlehnung an Arbeiten von *B. Krewer* in einem um fünf Stufen verkürzten Verfahren dargestellt werden. Außerdem wurde eine zweite neuartige Syntheseroute konzipiert, die eine enorme Kostenersparnis mit sich bringt, da auf den Einsatz des teuren Dapoxyl-Succinimid-Esters verzichtet werden konnte.

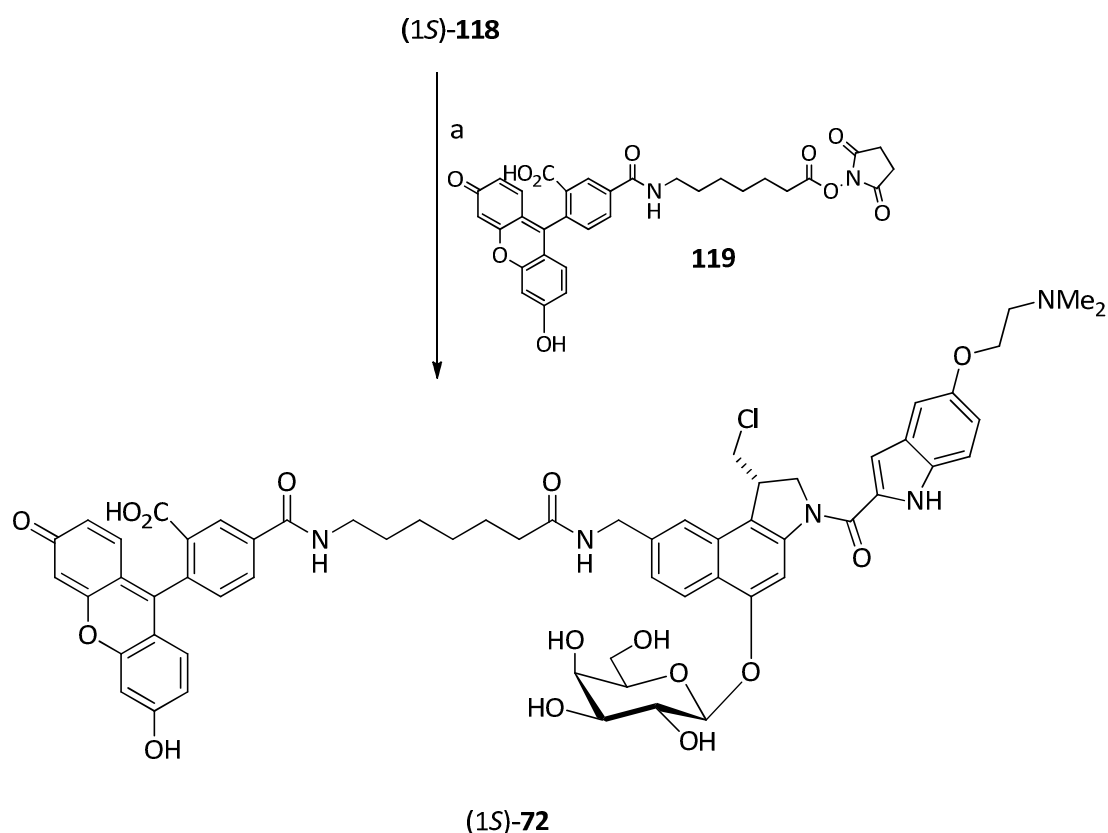


Abbildung 137. Synthese des fluoreszenzmarkierten Galaktosides (1S)-**72**. a) DIPEA, **119**, DMF, RT, 48 h, 46%.

Hierzu wurde das *seco*-CCBI-Grundgerüst (1*S*,10*R*)-**82** in 3 Stufen ausgehend von der Verbindung **101** hergestellt, das aus der Carbonsäure **85** über 5 Stufen zugänglich ist.

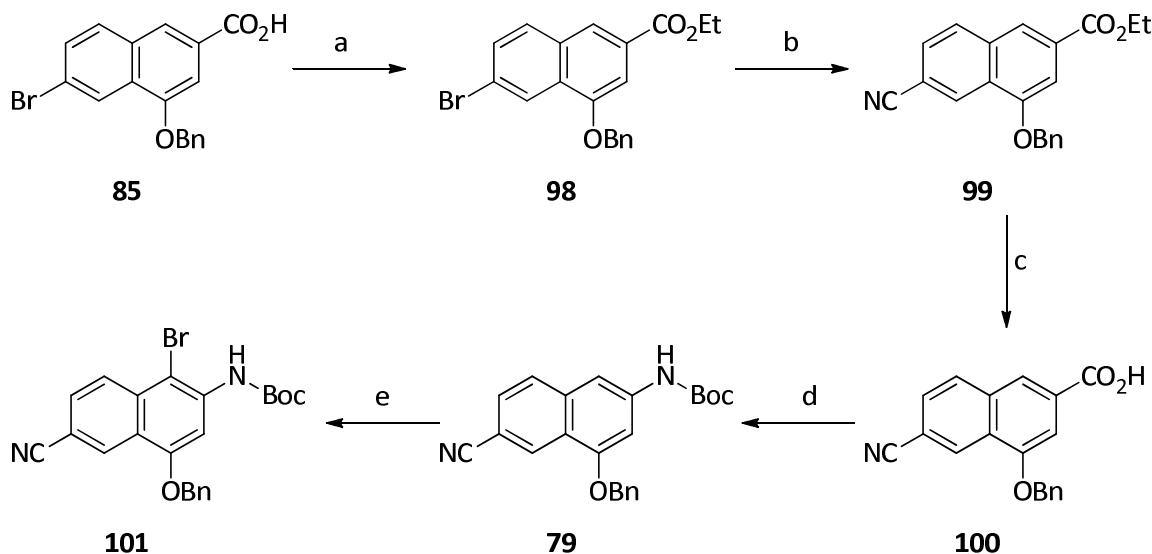


Abbildung 138. Darstellung des Bromnaphthalins **85**. a) SOCl_2 , EtOH, Rückfluss, 19 h; b) CuCN, DMF, Rückfluss, 20 h; c) LiOH, THF/MeOH/H₂O (3:1:1), RT, 20 h.

Für die Umsetzung von **101** zu (1*S*,10*R*)-**82** wurde eine radikalische Syntheseroute zum racemischen Produkt sowie eine enantioselektive Syntheseroute verwendet (Abbildung 139). Im ersten Ansatz wurde **101** mit **102** alkyliert um im Anschluss eine Zinkat-vermittelte enantioselektive Zyklisierung einzugehen. Nachfolgende Appelreaktion lieferte das *seco*-CCBI-Grundgerüst (1*S*,10*R*)-**82**. Zum Anderen wurde **101** mit (*E/Z*)-1,3-Dichlor-2-buten (**103**) alkyliert und anschließend in einer radikalischen Zyklisierung durch TTMSS und AIBN zu den Diastereomeren *rac*-(1*S*,10*R*)-**82** und *rac*-(1*S*,10*S*)-**82** umgesetzt, die an Kieselgel getrennt werden konnte. Anschließende Trennung der Enantiomere durch HPLC an chiraler stationärer Phase lieferte das gewünschte Enantiomer (1*S*,10*R*)-**82**. Der Vorteil der racemischen Synthese liegt in der einfacheren Syntheseführung. Nachteilig ist allerdings, dass auch die ungewünschten Verbindungen (1*R*,10*S*)-**82** und das racemische *syn*-Diastereomer *rac*-(1*S*,10*S*)-**82** gebildet werden. Diese konnten jedoch zu Testzwecken genutzt werden.

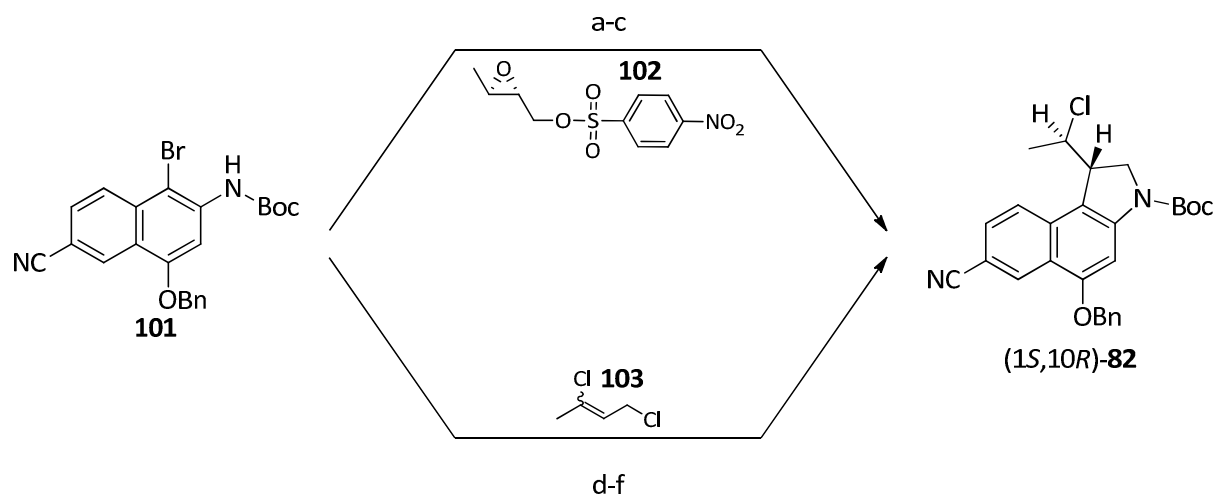


Abbildung 139. Synthese des *seco*-CCBI-Grundgerüsts (1*S*,10*R*)-**82**. Enantioselective Synthese: a) NaH, DMF, 40 °C, 60 min, dann **102**, RT, 24 h, 95%; b) Li₂Zn(SCN)Me₃, THF, -78 °C → RT, 3.5 h, 69%; c) SOCl₂, Pyridin, CH₂Cl₂, RT, 4 h, 34%; Radikalische Synthese: d) NaH, DMF, RT, 4.5 h, dann **103**, RT, 4 h, 66%; e) TTMSS, AIBN, Toluol, 80 °C, 4 h, 90%; f) Trennung der Enantiomere von *rac*-(1*S*,10*R*)-**82** an chiraler stationärer Phase Chiralcal IA.

Nachfolgend wurde **82** mit DMAI-CO₂H (**104**) nach Boc-Abspaltung zu **88** alkyliert. Anschließende Reduktion der Nitrilfunktion unter Verwendung von PtO₂·H₂O und H₂ in einem Lösungsmittelgemisch aus THF/EtOH/H₂O (2:4:1) lieferte das gewünschte Amin **81** in guten Ausbeuten von 53-58% (Abbildung 140).

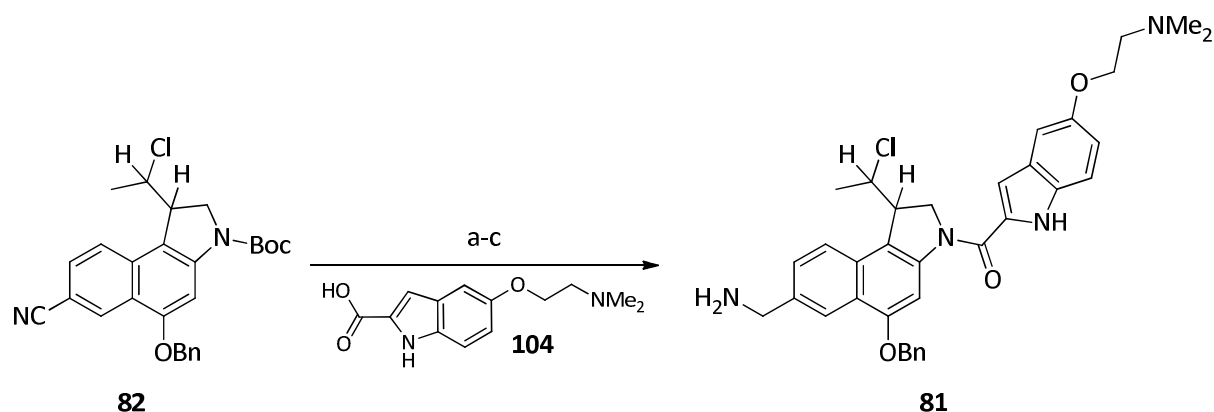


Abbildung 140. Synthese des benzylgeschützten Aminomethyl-CBI-DMAI **81**. a) 4 M HCl/EE, RT, 4 h; b) **104**, EDAC·HCl, RT, 18 h, 47–66%; c) PtO₂·H₂O, H₂ (1 atm), THF/EtOH/H₂O (2:4:1), 1.25 M HCl/EtOH (2 Äq.), RT, 8 h, 53–58%.

Um das weitaus günstigere Dapoxylderivat **89** zu nutzen, wurde eine Spacer-Einheit eingeführt. Hierzu eignete sich *N*-Cbz geschütztes β-Alanin (**105**). Anschließende

simultane Entfernung der Cbz- und der Benzylschutzgruppe durch hydrogenolytische Spaltung durch Pd/C unter H₂-Atmosphäre lieferte das Amin (1*S*,10*R*)-**90** (Abbildung 141), das im Anschluss mit Dapoxyl-Derivat **89** zum gewünschten fluoreszenzmarkierten *seco*-Drug (1*S*,10*R*)-**71** gekuppelt werden konnte.

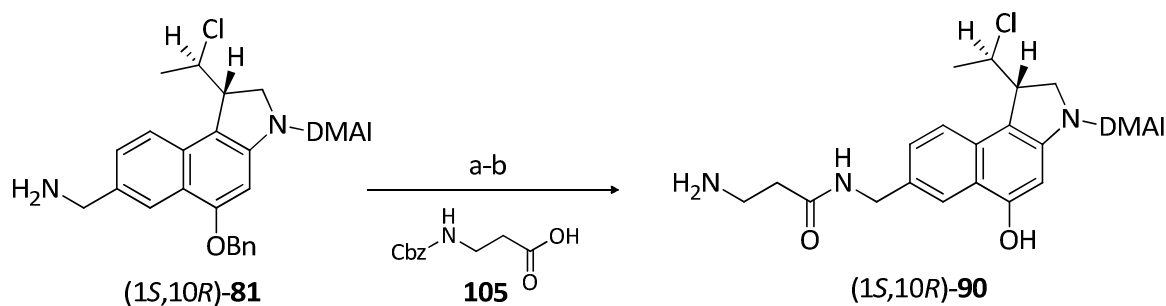


Abbildung 141. Synthese des Amins (1*S*,10*R*)-**90**. a) **105**, PyBOP, DIPEA, DMF, RT, 4 h, 82%; b) Pd/C, H₂, MeOH/AcOH/H₂O (3:1:1), RT, 8 h, 57%.

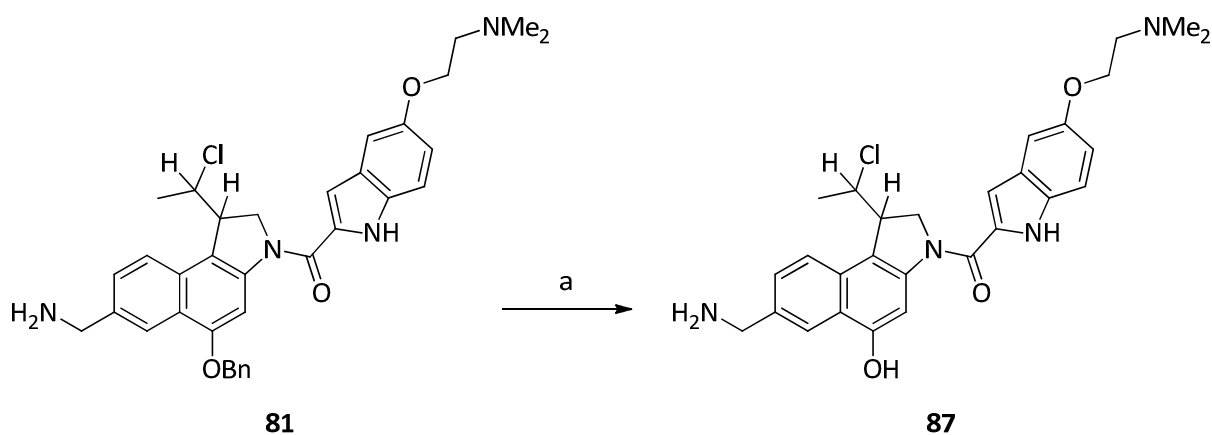


Abbildung 142. Synthese des Amins **87**; a) Pd/C, H₂, MeOH/AcOH/H₂O (3:1:1), RT, 8 h, 51–67%.

Für die Synthese von (1*S*,10*R*)-**71** unter Verwendung des Farbstoffs **61** wurde die Benzylgruppe in **81** unter Bildung von **87** entfernt. Umsetzung von **87** mit DIPEA in DMF und anschließende Zugabe von **61** lieferte die Zielverbindung (1*S*,10*R*)-**71**. Zusätzlich wurden hierbei (1*S*,10*R*)-**110** und (1*S*,10*R*)-**111** erhalten, deren Bildung vermutlich über eine Spirocyclopropylzwischenstufe erfolgt.

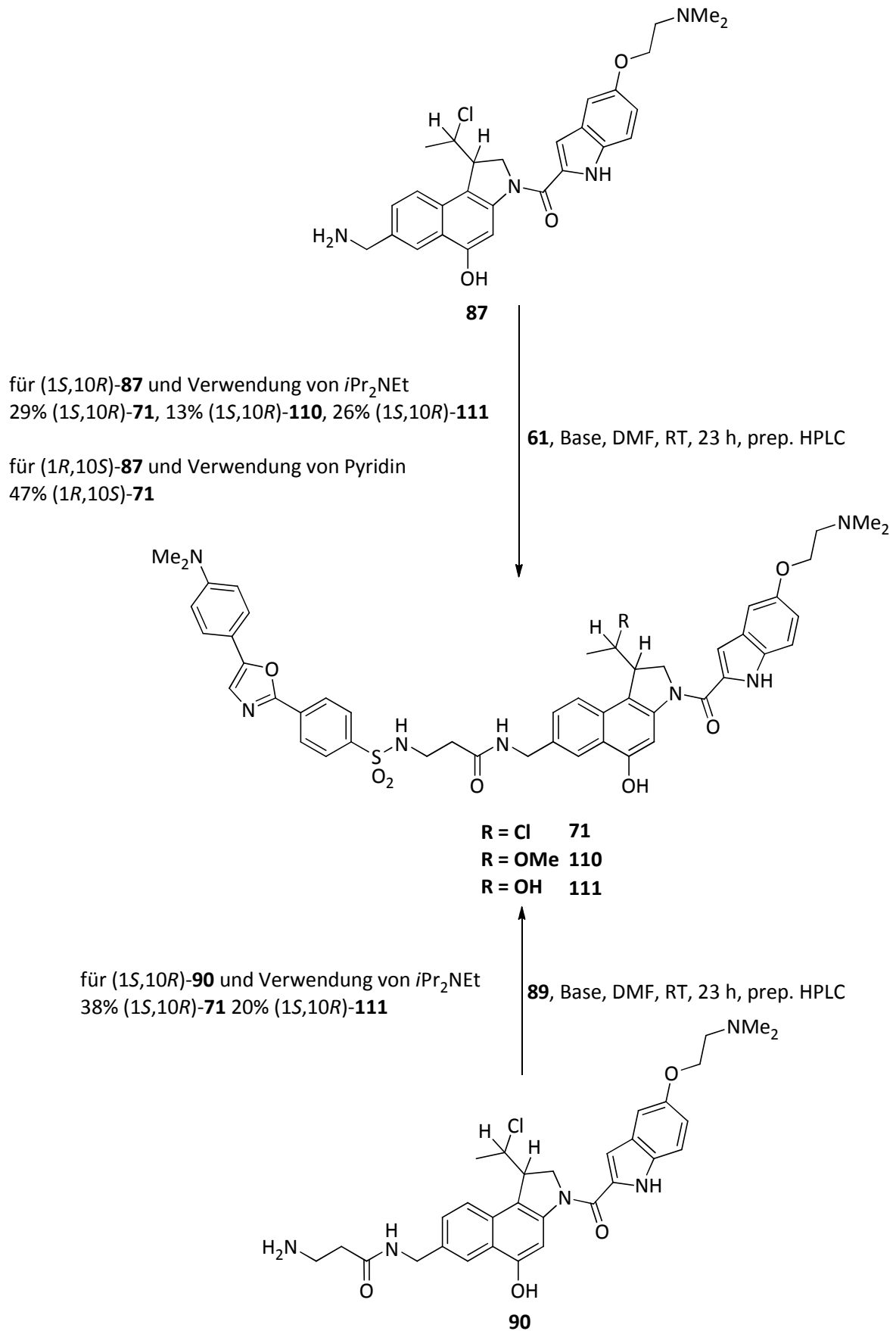


Abbildung 143. Synthese von **71** durch Verwendung von **87** und Dapoxylderivat **61** sowie **106** und Dapoxylderivat **89**.

In Zusammenarbeit mit Dr. *Mišo Mitkovski* vom MPI für experimentelle Medizin in Göttingen wurden die synthetisierten Verbindung durch CLSM untersucht. Die synthetisierten Verbindungen (1*S*,10*R*)-**71**, (1*S*,10*R*)-**110** und (1*S*,10*R*)-**111** verfügen jedoch nicht über eine zweite Absorptionsbande um $\lambda_{\text{max,Abs}} = 525 \text{ nm}$. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass in der Synthese von (1*S*,10*R*)-**71** durch *B. Krewer* in geringen Mengen ein Nebenprodukt entstanden sein muss, das für die zweite Absorptionsbande verantwortlich ist (Abbildung 144 und 145). Leider war es nicht möglich, die Struktur dieses Nebenproduktes aufzuklären.

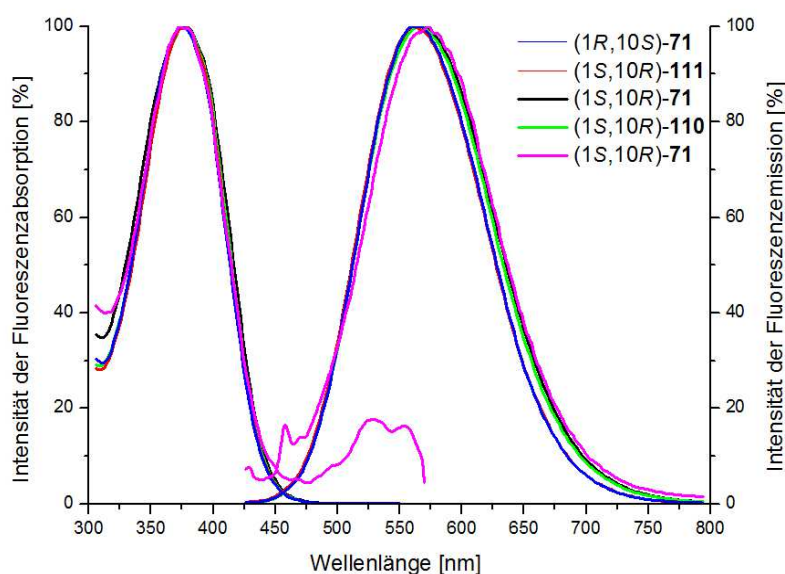


Abbildung 144. Fluorimetrische Bestimmung der Absorptions- und Emissionsspektren in MeOH für die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen (blaue, rote, schwarze und grüne Linie) sowie der von *B. Krewer* synthetisierten Verbindung (magentafarbene Linie).

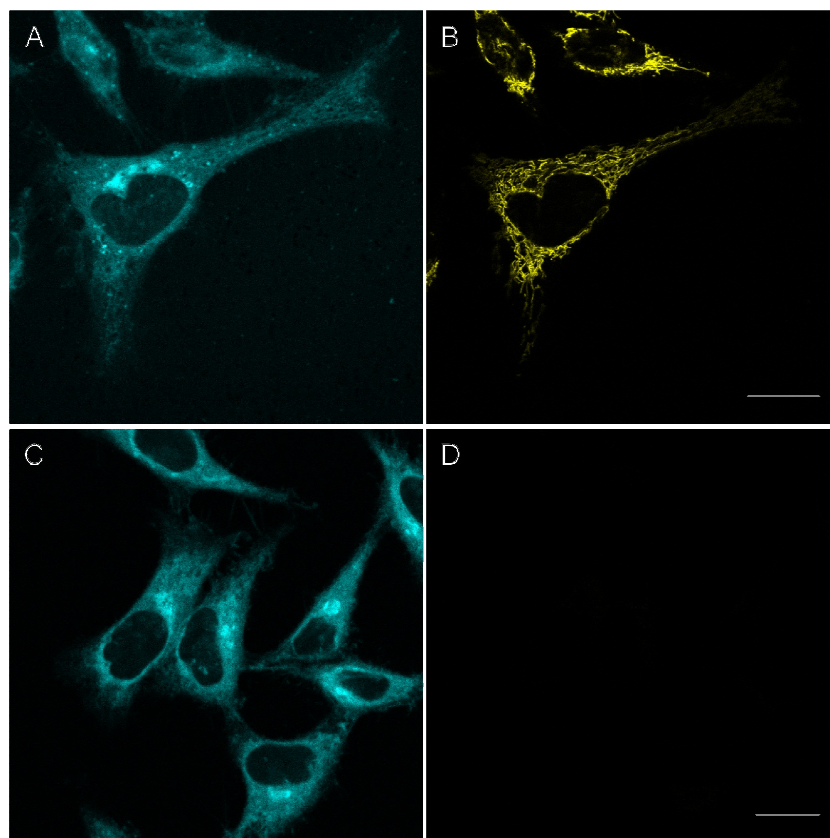


Abbildung 145. Untersuchung der zellulären Aufnahme von einem Gemisch aus (1S,10R)-**71** und nicht identifizierbarem Nebenprodukt (A und B) sowie von (1S,10R)-**71** (C und D). Maßstab 20 μm .

Neben den dargestellten Ergebnissen zur Synthese fluoreszenzmarkierter Prodrugs und *seco*-Drugs, die über das CBI-DMAI-Gerüst verfügen wurden in dieser Arbeit erstmals fluoreszenz CBI-Analoga dargestellt, die über einen bifunktionellen DNA-Binder verfügen, da dieser neben seiner Affinität zu doppelsträngiger DNA auch als Fluorochrom dient. Somit kann die Größe des Wirkstoffs möglichst klein gehalten werden und eine bessere Deutung der erzielten Ergebnisse in Hinblick auf dessen CBI-DMAI-Analoga dargestellt werden.

Hierzu wurde zunächst das *seco*-CBI-Grundgerüst (1S)-**128** ausgehend von Benzaldehyd über 12 Stufen dargestellt. Auf Grund der großen Ansatzmenge wurde auf eine Aufreinigung der ersten Stufen durch Säulenchromatographie verzichtet und die Zwischenprodukte wenn möglich durch Umkristallisation gesäubert.

Benzaldehyd (**97**) wird mit Phosphonat **120** in einer *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktion und anschließender Hydrolyse zu **96** umgesetzt. Es folgte eine intra-

molekulare *Friedel-Crafts*-Acyclierung, Acetatentschützung zu **123**, Benzyl-schützung und Verseifung zu **125** sowie *Curtius*-Umlagerung und abschließende Iodierung nach *Königstein* zum Iodnaphthalin **95**.

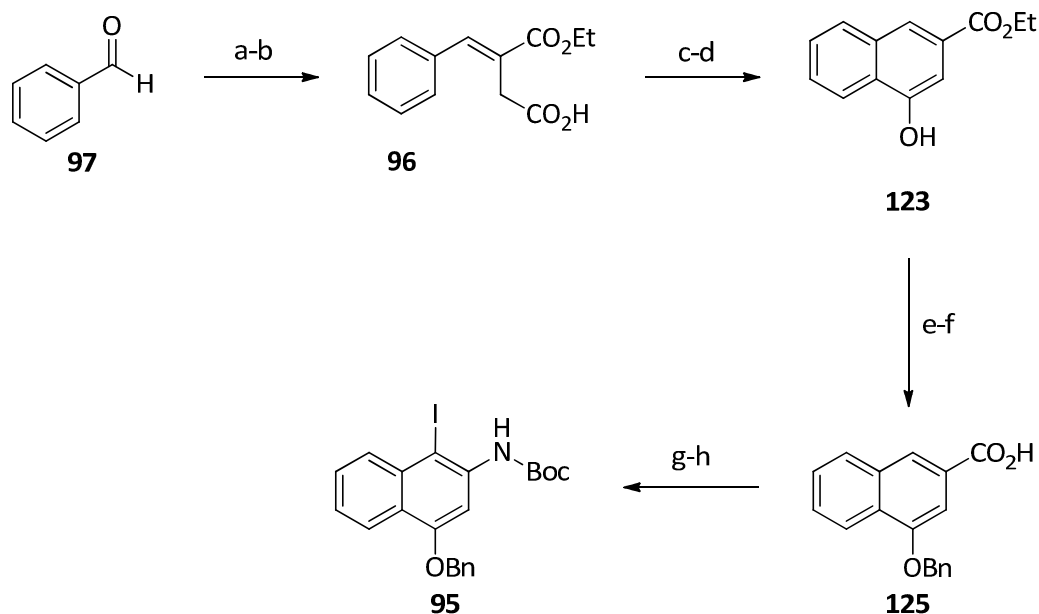


Abbildung 146. Synthese des Iodnaphthalins **95** ausgehend von Benzaldehyd (**97**) über 8 Stufen. a) **120**, NaH, THF, 0°C auf RT, 17 h; b) TFA/H₂O, RT, 20 h; c) KOAc, Ac₂O, Rückfluss, 2.5 h, d) K₂CO₃, EtOH, Rückfluss, 1 h; e) BnBr, TBAI, K₂CO₃, DMF, RT, 24 h; f) LiOH, THF/MeOH/H₂O, (3:1:1), RT, 2 d, umkristallisation, 53% über 6 Stufen; g) DPPA, NEt₃, MS (4Å), ^tBuOH, Rückfluss, 2 d, quant.; h) HIO₃, I₂, MeOH/H₂O (4:1), Rückfluss, 2 h, 83%.

Zur Darstellung des *seco*-CBI-Grundgerüsts (**1S**)-**128** wurde der Iodaromat **95** mit enantiomerenreinem Epoxid **126** alkyliert und einer Zyklisierung durch das Zinkat Li₂Zn(SCN)Me₃ unterzogen. Anschließend erfolgte eine *Appel*-Reaktion zu (**1S**)-**93**, Debenzylierung zu (**1S**)-**128** und eine Reinigung durch Chromatographie an chiraler stationärer Phase.

Es folgte die Synthese der *seco*-Drugs und Prodrugs ausgehend vom *seco*-CBI-Grundgerüst (**1S**)-**128** unter Verwendung der in dieser Arbeit synthetisierten Carbonsäuren wie den Cumarinen **62** und **130**, sowie der kommerziell erwerblichen **131** bzw. den synthetisierten Benzothiazolen **63** und **142**.

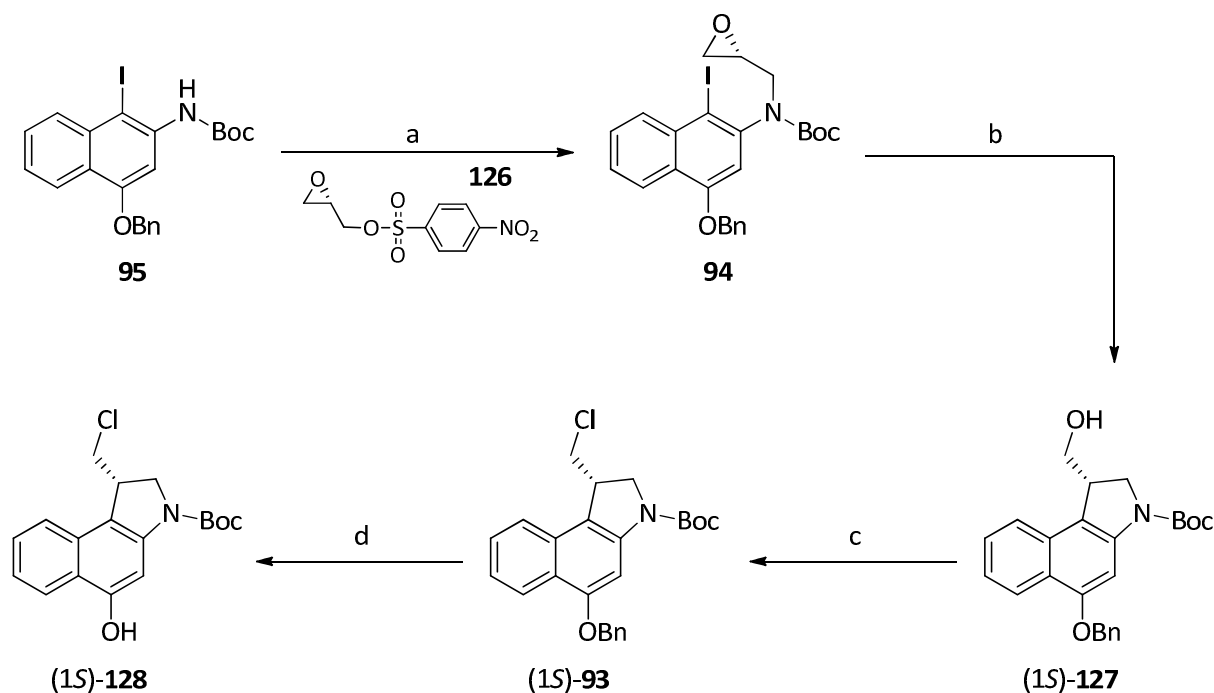


Abbildung 147. Synthese des *seco*-CBI-Grundgerüsts (15)-128. a) NaH, DMF, RT, 30 min., dann **126**, RT, 18 h, 87%; b) $\text{Li}_2\text{Zn}(\text{SCN})\text{Me}_3$, THF, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 12 h, 47%; c) CCl_4 , PPh_3 , CH_2Cl_2 , RT, 3 h, 90%; d) Pd/C, H_2 (1atm), 50°C , 6 h, 89%.

Hierzu wurde die *N*-Boc-Schutzgruppe durch Suspendieren des Phenols (15)-128 in 4 M HCl/Essigester-Lösung entfernt, um das freie sekundäre Amin im Anschluss unter Verwendung von EDAC·HCl als Kupplungsreagenz mit der entsprechenden Carbonsäure zu koppeln. Abschließend wurden die erhaltenen *seco*-CBI-Drugs (15)-92, (15)-137, (15)-138, (15)-141 und (15)-145 durch präparative HPLC (Kromasil 100 C-18) aufgereinigt (Abbildung 148).

Die Galaktoside konnten über 4 Stufen aus (15)-128 hergestellt werden. Zunächst wurde (15)-128 nach der Trichloracetimidatmethode nach Schmidt¹⁵⁷ unter $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ -Katalyse mit tetraacetyliertem D-Galaktose-Trichloracetimidat **116** gekuppelt und anschließend die säurelabile *N*-Boc-Schutzgruppe durch Umsetzung mit $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ abgespalten, um das Amin mit EDAC·HCl in DMF mit der entsprechenden Carbonsäure zu koppeln. Entschützung der tetraacetylierten Galaktoside durch NaOMe in MeOH bei **62**, **130** und **131** bzw. durch K_2CO_3 in MeOH lieferte die gewünschten Galaktoside (15)-69, (15)-70, (15)-139, (15)-140, (15)-147 (Abbildung 149).

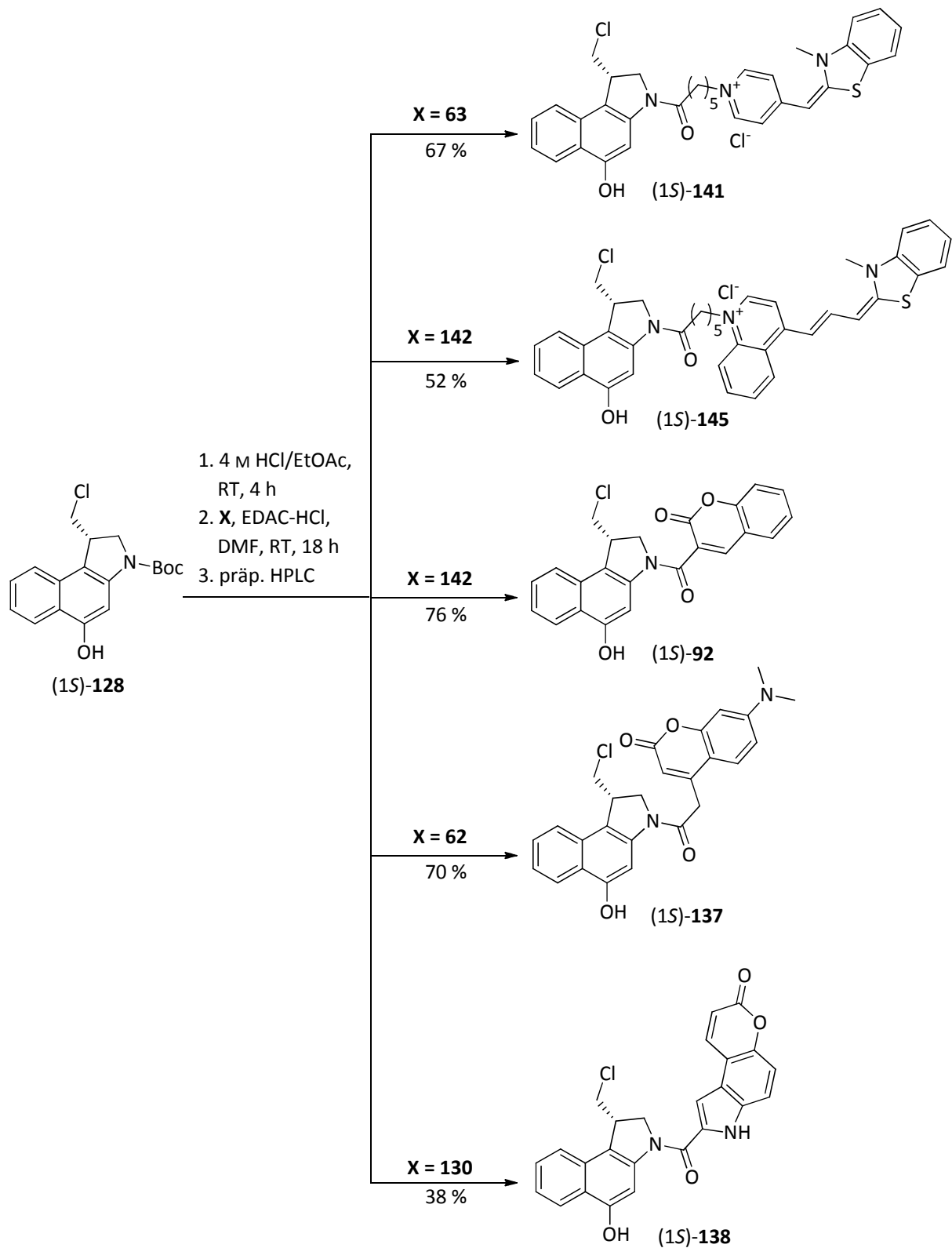


Abbildung 148. Darstellung der *seco*-CBI-Drugs (1S)-92, (1S)-137, (1S)-138, (1S)-141 und (1S)-145.

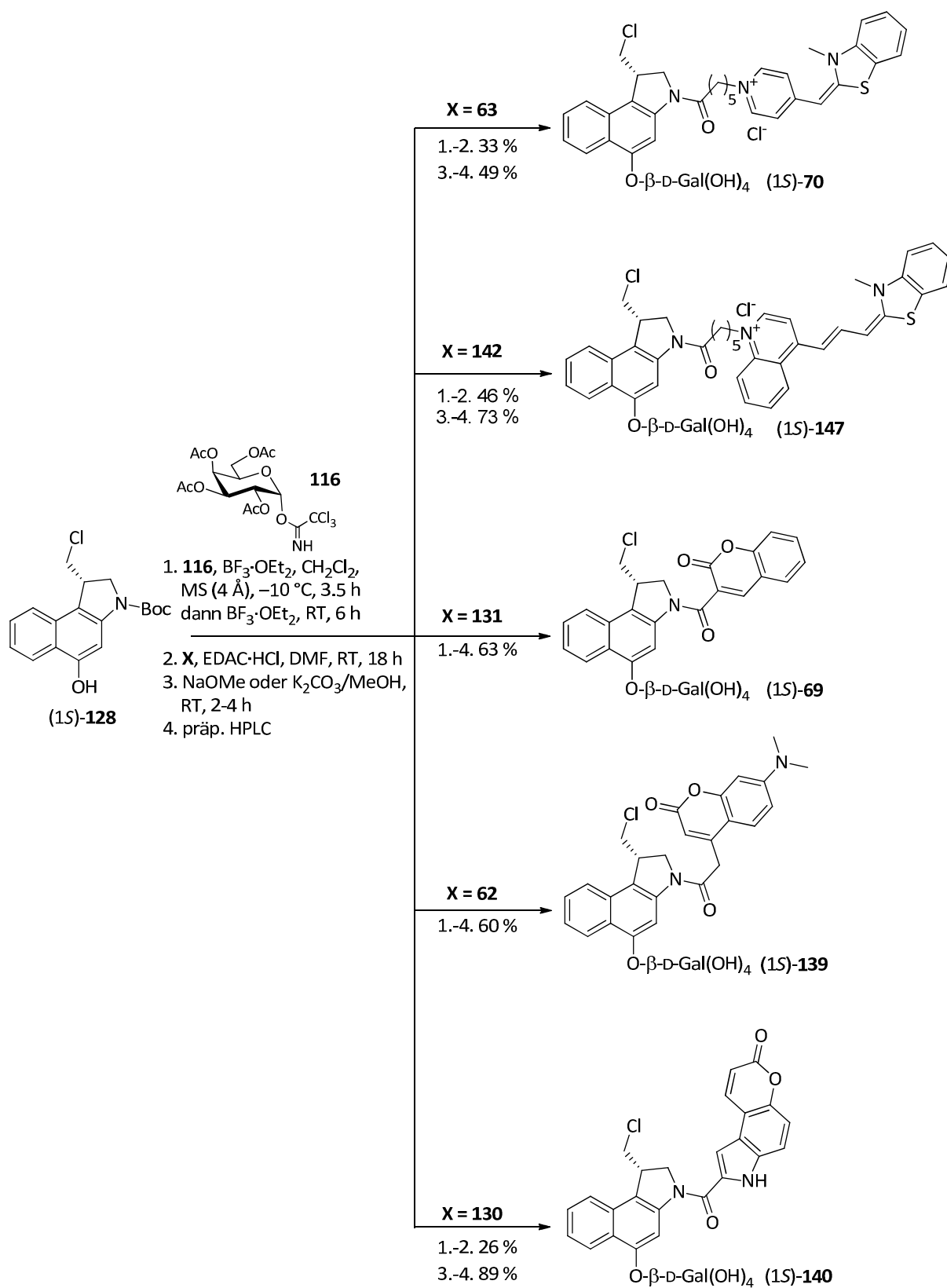
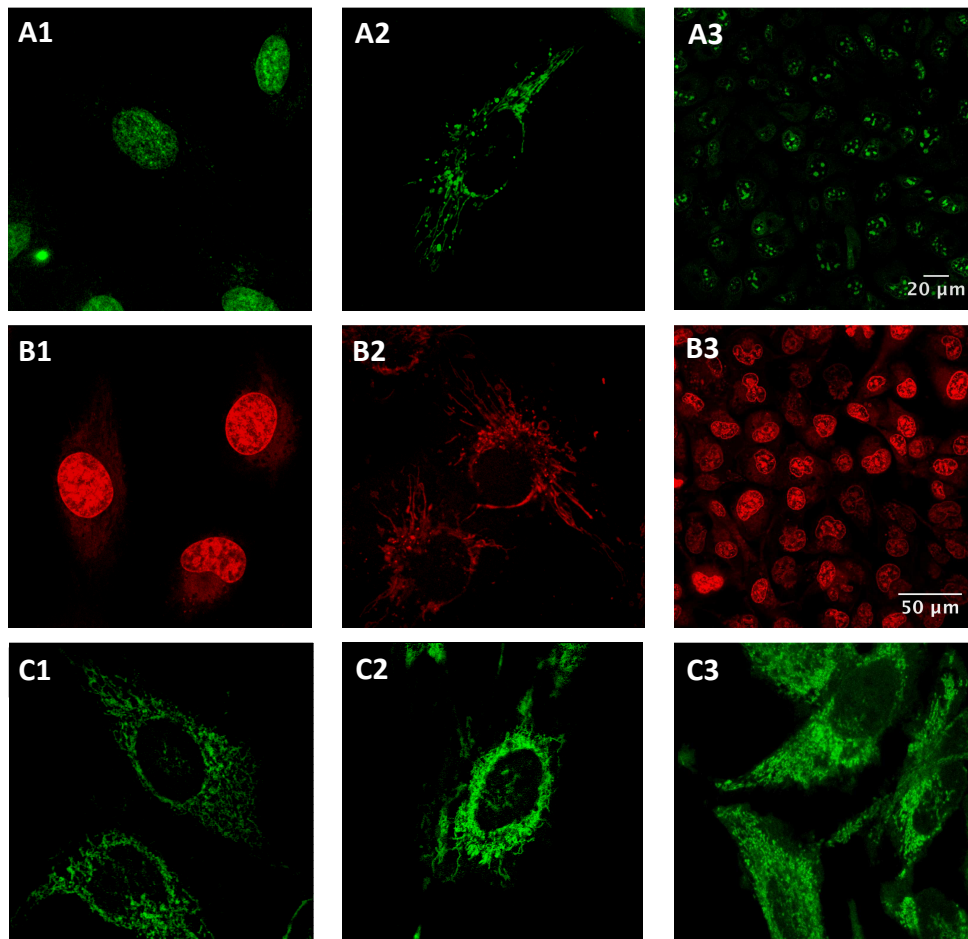


Abbildung 149. Darstellung der Galaktoside (1S)-69, (1S)-70, (1S)-139, (1S)-140, (1S)-147.

Abschließend wurden die neuartigen (1S)-CBI-Derivate zunächst am Fluorimeter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften (Absorptions- und Emissionsmaxima in MeOH und wässrigem Puffer) sowie in *Live Cell Imaging* Experimenten auf ihre zelluläre Aufnahme untersucht. So zeigen die in Tabelle 5 gezeigten Verbindungen folgende Gemeinsamkeiten: Im Fall der Benzothiazole (Spalte A und B) akkumulieren die *seco*-Drugs (1S)-**141** und (1S)-**145** im Zellkern (A1 und B1), während die Galaktoside (1S)-**70** und (1S)-**147** die Mitochondrien (A2 und B2) und die Fluorochrom **144** und **143** die Nukleoli (A3 und B3) populieren. Im Fall der Cumarine populieren mit Ausnahme von *seco*-Drug **137** (D1), das auch im Zellkern zu finden ist, alle Verbindungen ausschließlich die Mitochondrien lebender Zellen.



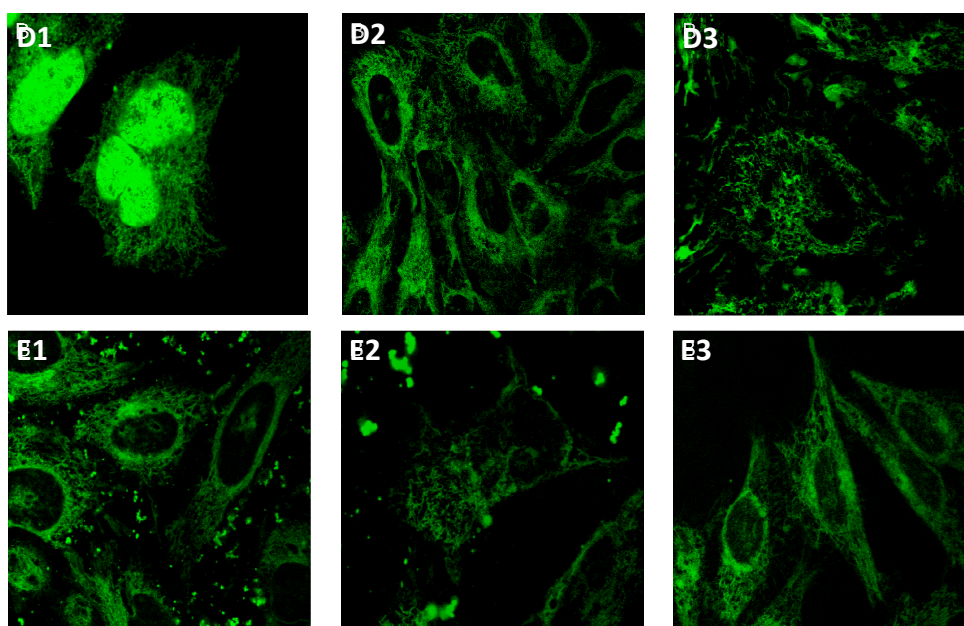


Tabelle 5. Darstellung der *Live Cell Imaging* Experimente zur Untersuchung der zellulären Aufnahme der *seco*-Drugs (1*S*)-**141** (A1), (1*S*)-**145** (B1), (1*S*)-**92** (C1), (1*S*)-**137** (D1) und (1*S*)-**138** (E1), der Galaktoside (1*S*)-**70** (A2), (1*S*)-**147** (B2), (1*S*)-**69** (C2), (1*S*)-**139** (D2) und (1*S*)-**140** (E2) sowie der Fluorochrom **144** (A3), **143** (B3), **131** (C3), **62** (D3) und **130** (E3).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die, in der Zielsetzung der Arbeit, ausgegebenen Punkte erreicht werden konnten. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit konnte eine verkürzte Synthese zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten *anti*-Methyl-*seco*-Drugs (1*S*,10*R*)-**71** dargestellt werden. Zusätzlich wurde eine weitere Syntheseroute, die den Einsatz des kostengünstigeren Fluorochroms **89** zulässt, eingeführt. Außerdem wurde das gewünschte Galaktosid (1*S*)-**72**, welches mit Fluorescein markiert wurde erfolgreich synthetisiert. Des weiteren konnten fünf neuartige *seco*-Drugs sowie fünf Galaktoside einer innovativen Struktur, in der der DNA-Binder DMAI durch einen fluoreszenzaktiven DNA-Binder aus der Klasse der Benzothiazole oder der Cumarine ersetzt wurde, synthetisiert und in *Live Cell Imaging* Experimenten auf ihre zelluläre Aufnahme untersucht werden.

D. EXPERIMENTELLER TEIL

1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Die Umsetzungen wurden, soweit nötig, in ausgeheizten Glasapparaturen unter einem leichten Argon-Überdruck durchgeführt. Die Lösungsmittel wurden entsprechend den üblichen Laboratoriumsmethoden getrocknet und destilliert¹⁶⁴ bzw. als *p.a.*-Ware über Molsieb gelagert. Soweit nicht anders vermerkt, wurden kommerziell erhältliche Produkte ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das Entgasen von Lösungsmitteln geschah durch Einleiten eines Argon-Gasstroms über einen längeren Zeitraum. Konzentrationsangaben beziehen sich, sofern nicht anders erwähnt, auf wässrige Lösungen.

1.1 Verwendete Geräte

Drehwerte: Drehwerte wurden mit einem Polarimeter Modell 241 der Firma *Perkin-Elmer* sowie P-2000 der Firma *Jasco* gemessen.

Infrarotspektren: Sofern „(KBr)“ oder „(Film)“ hinter der Bezeichnung „IR“ vermerkt ist, wurden die Infrarotspektren mit dem Modell Vector 22 der Firma *Bruker* aufgenommen, wobei Feststoffe als KBr-Preßlinge und Flüssigkeiten als Film zwischen KBr-Platten gemessen wurden. Findet sich kein Hinweis hinter der Bezeichnung „IR“, wurden die Infrarotspektren mit dem Modell FT/IR-4100 der Firma *Jasco* ohne KBr-Optik (neat) aufgenommen.

UV/VIS-Spektren: Die Aufnahme der UV/VIS-Spektren erfolgte mit Modell Lambda 2 der Firma *Perkin-Elmer* und V-630 der Firma *Jasco*.

¹H-NMR-Spektren: Die ¹H-NMR-Spektren wurden mit den Modellen Mercury 300, Mercury-vx 300, Unity 300, Vnmrs 300 (jeweils 300 MHz) sowie Inova 600 (600 MHz) der Firma *Varian* von in deuterierten Solventien gelösten Proben aufgenommen. Die

chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ -Skala angegeben und auf das Signal des angegebenen Lösungsmittels referenziert. Zur Kennzeichnung der Multiplizitäten der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), dd (Dublett von Dubletts), dt (Dublett von Triplets) usw. Signale, die durch Überlagerung oder Anteile höherer Ordnung nicht interpretierbar waren, wurden mit m (Multiplet) bzw. m_c (symmetrisches, zentriertes Multiplet) bezeichnet und verbreiterte Signale durch den Zusatz br indiziert. Zur Bezeichnung aromatischer Protonen oder Kohlenstoffatome werden folgende Abkürzungen verwendet: *i* (ipso), *o* (ortho), *m* (meta), *p* (para). Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich alle Kopplungskonstanten auf ^1H - ^1H -Kopplungen.

^{13}C -NMR-Spektren: Die, soweit nicht anders vermerkt, ^1H -breitbandenkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit den Geräten Unity 300 (75 MHz), Inova 500 (125 MHz) und Inova 600 (150 MHz) der Firma *Varian* aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ -Skala angegeben. Als interner Standard diente das angegebene Lösungsmittel. Generell erfolgte die Zuordnung der Signale durch die 2D-NMR-Experimente COSY, HSQC sowie HMBC.

Massenspektren: Zur Aufnahme der EI- und EI-HRMS-Spektren diente ein Time-of-Flight Massenspektrometer AccuTOF der Firma *Jeol*. ESI-Spektren wurden mit einem Ion-Trap-Massenspektrometer LCQ der Firma *Finnigan* sowie einem Time-of-Flight Massenspektrometer micrOTOF der Firma *Bruker* aufgenommen. Die Messung der ESI-HRMS-Spektren erfolgte an einem 7-Tesla-Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonance (FTICR)-Massenspektrometer APEX IV der Firma *Bruker* und am micrOTOF-Gerät. Angegeben werden die Quotienten aus Masse zu Ladung sowie in Klammern die relativen Intensitäten bezogen auf den Basispeak ($I = 100$).

Kältetechnik: Die Reaktionsführung bei konstant tiefen Temperaturen über einen längeren Zeitraum erfolgte unter Einsatz von Kryostaten. Benutzt wurde das Modell EK 90 der Firma *Haake*. Darüber hinaus wurden übliche Kältemischungen wie Eis/Wasser- und Aceton/Trockeneis-Gemische zur temporären Kühlung verwendet.

1.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Es wurden Aluminium-Fertigfolien Si60 F₂₅₄ der Firma *Merck* verwendet. Angegeben sind R_f-Werte (Laufhöhe relativ zur Laufmittelfront). Neben der UV-Detektion dienten eine Vanillin-Schwefelsäure-Lösung (0.5 g Vanillin, 3 mL konz. H₂SO₄, 85 mL MeOH und 10 mL HOAc) sowie eine Ninhydrin-Lösung (0.2% in Ethanol) als Anfärbereagenzien.

Säulenchromatographie: Alle säulenchromatographischen Trennungen wurden mit Kieselgel 60 (Korngröße: 0.032–0.063 mm) der Firma *Merck* durchgeführt.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Analytische HPLC: Analytische Trennungen wurden auf einer HPLC-Anlage der Firma *Jasco*, ausgestattet mit einer Lösungsmittelpumpe PU-2080, einer Mischkammer LG-1590-04, einem Multiwellenlängendetektor MD-2010 Plus und der Steuerung LC-Net II/ADC, vorgenommen. Für die Injektion wurde ein automatischer Probenwechsler (Autosampler AS-2055) derselben Firma verwendet. Zur Bedienung, Datenerfassung und Datenauswertung wurden die Computerprogramme Borwin PDA, HSS 2000 und Borwin Chromatography der Firma *Jasco* eingesetzt. Für die analytischen Messungen wurden die Säulen Chiralcel[®] OD (250 × 4.6 mm, 5 μm, *Daicel Chemical Industries Ltd.*), Chiralpak[®] IA (250 × 4.6 mm, 5 μm, *Daicel Chemical Industries Ltd.*) mit chiraler stationärer Phase sowie Aqua[®] C18 200A (250 × 4.6 mm, 5 μm, *Phenomenex*) mit stationärer RP-Phase verwendet. Angegebene Lösungsmittel waren von HPLC-Qualität und das Wasser bidestilliert. Alle Proben wurden membranfiltriert mit Polytetrafluorethylen-(PTFE)-Filtern der Firma *Roth* (∅ 25 mm, 0.2 μm) bzw. *VWR* (∅ 13 mm, 0.2 μm).

Präparative HPLC: Präparative Trennungen wurden auf einem HPLC-System der Firma *Jasco*, ausgestattet mit zwei Lösungsmittelpumpen Modell PU-2087 PLUS und einem UV-Detektor Modell UV-2075 PLUS, vorgenommen. Verwendet wurden die Säulen Chiralpak[®] IA (250 × 20 mm, 5 μm, *Daicel Chemical Industries Ltd.*) mit chiraler stationärer Phase und Kromasil[®] 100 C18 (7 μm, 250 × 20 mm, *Jasco* und *Dr. Maisch*

GmbH) sowie Aqua[®] C18 200A (250 × 21.2 mm, 5 μm, *Phenomenex*) mit stationärer RP-Phase. Angegebene Lösungsmittel waren von HPLC-Qualität und das Wasser bi-distilliert. Alle Proben wurden vor der Trennung membranfiltriert (siehe analytische HPLC).

HPLC-MS: Die analytischen Trennungen wurden auf einer HPLC-Anlage bestehend aus einer Lösungsmittelpumpe Rheos 4000, einem Entgaser ERC-3415α der Firma *Flux Instruments*, Autosamplern 851-AS und AS-1555 der Firma *Jasco* und einem Diodenarray-Detektor der Firma *Thermo* vorgenommen. Eingesetzt wurde die Säule Synergi Max-RP C12 (150 × 2 mm, 4 μm) der Firma *Phenomenex*. Zur Bedienung, Datenerfassung und Datenauswertung wurden die Computerprogramme Janeiro und Xcalibur verwendet. Als Laufmittelkomponenten dienten Wasser und Methanol der Firma *VWR*. Zur Verbesserung der Peakschärfe enthielten beide Laufmittel 0.05% Ameisensäure der Firma *Roth*. Die Lösungsmittelgemische wurden auf der Niederdruckseite erzeugt. Der Fluß betrug 300 μL min⁻¹ bei folgendem Gradienten:

Zeit [min]	H ₂ O/MeOH (je 0.05% Ameisensäure)
0	70/30
0 – 15	70/30 → 0/100
15 – 22	0/100
22 – 23	0/100 → 70/30
23 – 29	70/30

Die der analytischen Trennung online folgende Aufnahme von ESI-Massenspektren wurde an einem Ion-Trap-Massenspektrometer LCQ der Firma *Finnigan* durchgeführt. Die UV-Detektion erfolgte im Bereich von 200–800 nm und die Massen-Detektion im Bereich von m/z 100–2000. Die Kapillartemperatur betrug 220 bzw. 240 °C, die Sprayspannung 4.5 kV und der Sheath-Gas-Fluß 80 (beliebige Einheit).

1.3 Materialien für die *In-vitro*-Zytotoxizitätsuntersuchungen

Zelllinie: A549, ATCC-CCL 185 (American Type Culture Collection Certified Cell Lines), eine 1972 aus einem kanzerogenen Tumorexplantat der Lunge eines 58-jährigen männlichen Patienten etablierte, epithelähnliche, adhärent in Monolayern wachsende Zelllinie. Herkunft: Institut für Zellbiologie der Universität Essen.

Medien: Alle Pulvermedien wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt, mit HCl auf pH 7.4 titriert und sterilfiltriert.

Kulturmedium für A549: DMEM (*Dulbecco`s Modified Eagles Medium*) mit 4.5 g L^{-1} Glucose (*Biochrom*, T043-10). Das Medium wurde mit 4 mM L-Glutamin und 3.7 g L^{-1} Natriumhydrogencarbonat supplementiert.

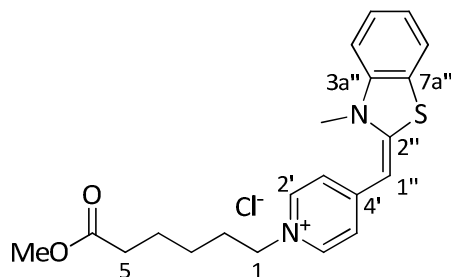
Medium-Zusätze: 10% FKS (Fötales Kälberserum) der Firma *Biochrom*, 30 min inaktiviert bei $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Enzyme: 4.0 U mL^{-1} β -D-Galaktosidase (EC 3.2.1.23) aus *Escherichia coli* G 5635 (*Sigma*), Aktivität: 250-600 Units (U) pro mg Protein bei pH 7.3 und $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $1 \text{ U} = 1 \text{ } \mu\text{mol}$ Substratumsatz pro Minute.

Zellzählkammer: Netzeinteilung nach *Bürker* der Firma *Assistent*.

2 Synthese der fluoreszenzaktiven DNA-Binder

2.1 1-(5-Methoxycarbonyl-pentyl)-4-(3-Methyl-3*H*-benzothiazol-2-ylidenmethyl)-pyridinium-chlorid (**144**)



Zu einer Lösung der Carbonsäure **63** (50.0 mg, 111 μmol , 1.0 Äq.) in absolutem MeOH (10 mL) wird bei 0 °C SOCl_2 (21.9 mg, 13.3 μL , 184 μmol , 1.6 Äq.) gegeben, auf 50 °C erwärmt, für 3 h gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (CH_2Cl_2 / MeOH = 5:1) erhielt man die Zielverbindung **144** als gelben Feststoff (46.5 mg, 104 μmol , 93%).

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 204.0 nm (4.336), 218.0 (4.340), 255.0 (3.891), 341.0 (2.847), 447.0 (4.757).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.16–1.35 (m, 2 H, 3- H_2), 1.51–1.63 (m, 2 H, 4- H_2), 1.77–1.89 (m, 2 H, 2- H_2), 2.32 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, 5- H_2), 3.58 (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.73 (s, 3 H, NCH_3), 4.23 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, 1- H_2), 6.28 (s, 1 H, 1''-H), 7.30 (dt, J = 7.7, 0.9 Hz, 1 H, 6''-H), 7.41 (d, J = 7.2 Hz, 2 H, 3'-H, 5'-H), 7.52 (dt, J = 7.3, 0.9 Hz, 1 H, 5''-H), 7.60 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, 4''-H), 7.92 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, 7''-H), 8.39 (d, J = 7.2 Hz, 2 H, 2'-H, 6'-H) ppm.

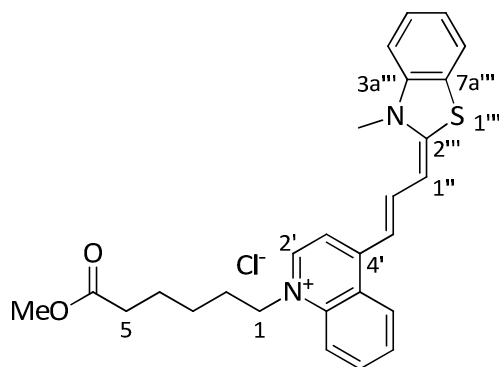
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 23.7 (C-4), 24.8 (C-3), 29.9 (C-2), 32.8 (NCH_3), 32.9 (C-5), 51.1 ($\text{CO}_2\text{C}\underline{\text{H}}_3$), 57.2 (C-1), 89.4 (C-1''), 111.8 (C-4''), 118.2 (C-3', C-5'), 122.4 (C-7''), 123.1 (C-7a''), 123.3 (C-6''), 127.6 (C-5''), 140.3 (C-3a''), 141.1 (C-2', C-6'), 150.2 (C-2''), 156.9 (C-4'), 172.9 ($\text{C}\underline{\text{O}}_2\text{CH}_3$) ppm.

$C_{21}H_{25}ClN_2O_2S$ (404.95)

ber.: 369.1631 $[M-Cl]^{+}$

gef.: 369.1630 (ESI-HRMS).

2.2 1-(5-Methoxycarbonyl-pentyl)-4-[3-(3-Methyl-3H-benzothiazol-2-yliden)-propenyl]-quinolinium-chlorid (**143**)



Zu einer Lösung der Carbonsäure **142** (20.0 mg, 39 μ mol, 1.0 Äq.) in absolutem MeOH (5 mL) wird bei 0 °C $SOCl_2$ (7.5 mg, 4.5 μ L, 63 μ mol, 1.6 Äq.) gegeben, auf 50 °C erwärmt, für 3 h gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (CH_2Cl_2 / MeOH = 10:1) erhielt man die Zielverbindung **143** als blauen Feststoff (6.9 mg, 13 μ mol, 33%).

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 240.0 nm (4.660), 283.0 (4.535), 304.0 (4.501), 629.0 (4.793).

1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 1.32–1.42 (m, 2 H, 3- H_2), 1.52–1.64 (m, 2 H, 4- H_2), 1.77–1.87 (m, 2 H, 2- H_2), 2.32 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, 5- H_2), 3.57 (s, 3 H, CO_2CH_3), 3.74 (s, 3 H, NCH_3), 4.55 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, 1- H_2), 6.51 (d, J = 12.4 Hz, 1 H, 1''-H), 7.12 (d, J = 12.4 Hz, 1 H, 3''-H), 7.32 (dt, J = 7.7, 0.9 Hz, 1 H, 6'''-H), 7.50 (dt, J = 7.3, 0.9 Hz, 1 H, 5'''-H), 7.60 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.71 (t, J = 7.6 Hz, 1 H, 7'-H), 7.85 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, 3''-H), 7.89 (d, J = 8.6 Hz, 1 H, 7'''-H), 7.95 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, 6'-H), 8.08 (d, J = 8.6 Hz, 1 H, 5'-H), 8.16 (t, J = 10.6 Hz, 1 H, 2''-H), 8.43 (d, J = 6.7 Hz, 1 H, 2'-H), 8.47 (d, J = 8.6 Hz, 1 H, 8'-H) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 23.9 (C-4), 25.3 (C-3), 28.4 (C-2), 32.8 (NCH_3), 33.0 (C-5), 51.1 (CO_2CH_3), 53.7 (C-1), 98.7 (C-1''), 109.1 (C-3''), 109.5 (C-3'), 112.3 (C-4'''),

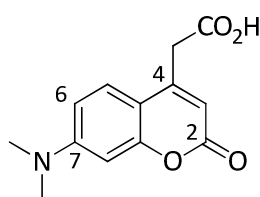
117.7 (C-5'), 122.3 (C-7'''), 124.0 (C-4a', C-7a'''), 124.4 (C-6'''), 125.0 (C-8'), 126.5 (C-5''', C-7'), 133.1 (C-6'), 137.6 (C-3a''), 141.8 (C-2'), 142.3 (C-8a''), 150.1 (C-2'', C-2'''), 161.4 (C-4'), 172.9 (CO_2CH_3) ppm.

$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ (481.04)

ber.: 445.1944 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$

gef.: 445.1941 (ESI-HRMS).

2.3 (7-Dimethylamino-2-oxo-2H-chromn-4-yl)-essigsäure (62)



m-Dimethylaminophenol (**132**) (5.00 g, 36.4 mmol, 1.0 Äq.), Carboxylate **133** (8.11 g, 40.0 mmol, 1.1 Äq.) und ZnCl_2 (5.96 g, 43.7 mmol, 1.2 Äq.) wurden in absolutem EtOH (20 mL) gelöst und für 18 h unter Rückfluss gerührt. Es wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und der entstandene Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wurde auf Eiswasser (500 mL) gegeben und erneut abfiltriert. Das so erhaltene grüne Rohprodukt wurde in einem 3:1 Gemisch aus THF / H_2O (40 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit einer 2 M LiOH-Lösung (36.5 mL, 72.9 mmol, 2.0 Äq.) versetzt. Es wurde 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt, mit H_2O (40 mL) versetzt und mit Et_2O (3 × 30 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 2 N HCl auf $\text{pH} \approx 1$ eingestellt und der entstandene Feststoff abfiltriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (CH_2Cl_2 / MeOH = 19:1, 1% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) wurde die Zielverbindung **62** als grüner Feststoff (1.08 g, 4.35 mmol, 12%) erhalten.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 209.0 nm (4.550), 244.0 (4.261), 372.0 (4.305).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 3.00 (s, 6 H, NMe_2), 3.76 (s, 2 H, CH_2), 6.03 (s, 1 H, 3-H), 6.53 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, 8-H), 6.71 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.46 (d, J = 9.0 Hz, 1 H, 5-H), 12.5 (s_{br} , 1 H, CO_2H) ppm.

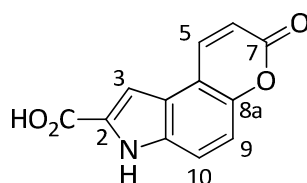
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 37.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}$), 39.5 (NMe_2), 97.3 (C-8), 108.8 (C-6), 109.3 (C-3), 109.5 (C-4a), 125.9 (C-5), 150.2 (C-4), 152.7 (C-8a), 155.1 (C-7), 160.6 (C=O), 170.7 (CO_2H) ppm.

$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (247.24)

ber.: 248.0917 $[\text{M}+\text{H}]^+$

gef.: 248.0923 (ESI-HRMS).

2.4 7-Oxo-3,7-dihydro-pyrano[3,2-e]indol-2-carbonsäure (**130**)



Eine Lösung aus Äpfelsäure (**136**) (0.89 g, 6.67 mmol, 1.0 Äq.) und 5-Hydroxy-indol-2-carbonsäure (**135**) (1.18 g, 6.67 mmol, 1.0 Äq.) in H_2SO_4 (2.0 mL) wurde für 2 min bei 130 °C in einer Mikrowellenapparatur gerührt. Es wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, auf Eis (20 mL) gegeben und der entstandene Feststoff abfiltriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (CH_2Cl_2 / MeOH =5:1) wurde die Zielverbindung **130** als brauner Feststoff (281 mg, 1.23 mmol, 18%) erhalten.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 225.0 nm (4.391), 259.0 (4.108), 280.0 (4.107), 352.0 (3.871).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ = 6.45 (d, J = 9.7 Hz, 1 H, 6-H), 7.18 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, 9-H), 7.30 (s, 1 H, 3-H), 7.69 (d, J = 9.0 Hz, 1 H, 10-H), 8.47 (d, J = 9.7 Hz, 1 H, 5-H), 11.8 (s_{br} , 1 H, NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 102.2 (C-3), 110.7 (C-4), 111.6 (C-9), 114.2 (C-6), 116.7 (C-10), 123.7 (C-3a), 132.3 (C-10a), 136.9 (C-2), 141.9 (C-5), 149.3 (C-8a), 160.7 (C=O), 164.2 (CO_2H) ppm.

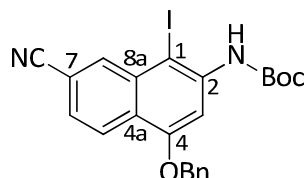
$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{NO}_4$ (229.19)

ber.: 228.0302 $[\text{M}-\text{H}]^-$

gef.: 228.0309 (ESI-HRMS).

3 Synthese des *seco*-CCBI-Grundgerüsts (15)-115

3.1 2-Amino-4-benzyloxy-1-iod-*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-7-cyano-naphthalin (75)



Zu einer Lösung von Naphthalinderivat **112** (7.78 g, 20.8 mmol, 1.0 Äq.) in einem 1:1 Gemisch aus absolutem THF (125 mL) und absolutem MeOH (125 mL) gab man bei Raumtemperatur eine Lösung von TsOH·H₂O (395 mg, 20.8 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem THF (15 mL). Anschließend wurde *N*-Iod-Succinimid (9.35 g, 41.6 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 1.5 h bei 50 °C gerührt. Es wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, gesättigte NaHCO₃-Lösung (150 mL) und H₂O (150 mL) zugegeben und mit EtOAc (300 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1M Na₂SO₃-Lösung (300 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit EtOAc (2 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (800 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und die Zielverbindung **75** als Rohprodukt (10.0 g) erhalten, das ohne weitere Aufreinigung später eingesetzt wurde.

$R_f = 0.46$ (*n*-Pentan / EtOAc = 10:1).

UV (CH₃CN): λ_{\max} (lg ϵ) = 227.0 nm (4.401), 265.0 (4.616), 309.0 (3.652), 320.0 (3.666), 359.5 (3.390).

IR (KBr-Pressling): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3373, 2977, 2228, 2170, 1733, 1600, 1489, 1395, 1358, 1332, 1155.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.59 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 5.27 (s, 2 H, OCH₂Ph), 7.22–7.55 (m, 7 H, 5 × Ph-H, NH, 6-H), 8.21 (s_{br}, 1 H, 3-H), 8.27 (dd, *J* = 0.5, 8.6 Hz, 1 H, 5-H), 8.44 (dd, *J* = 0.5, 1.5 Hz, 1 H, 8-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.28$ ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 70.72 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$), 78.81 (C-1), 81.80 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 102.2 (C-3), 112.2 (C-7), 119.0 (CN), 124.2 (C-5), 125.0, 125.1, 127.9 (2 Signale), 128.4, 128.7 (2 Signale), 134.2, 140.2 (C-4a, C-8a, C-6, C-2, $2 \times \text{Ph-C}_o$, $2 \times \text{Ph-C}_m$, $1 \times \text{Ph-C}_p$), 135.9 (Ph-C_i), 136.9 (C-8), 152.5 (C=O), 155.4 (C-4) ppm.

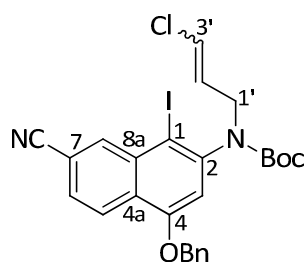
MS (ESI): m/z (%) = 523.1 (15) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{I}$ (500.33)

ber.: 523.04891 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

gef.: 523.04891 (ESI-HRMS).

3.2 (*E/Z*)-2-Amino-4-benzyloxy-*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-*N*-(3-chlorprop-2-enyl)-7-cyano-1-iod-naphthalin (**104**)



Zu einer Lösung des geschützten Amins **75** (2.00 g, 4.00 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem DMF (50 mL) wurde bei Raumtemperatur NaH (399 mg einer 60%-igen Suspension in Mineralöl, 10.0 mmol, 2.5 Äq.) gegeben und 1.5 h gerührt. Anschließend wurde (*E/Z*)-1,3-Dichlorpropen (**113**, 986 mg, 823 μL , 8.00 mmol, 2.0 Äq.) zugetropft und 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit gesättigter NH_4Cl -Lösung auf $\text{pH} \approx 7$ eingestellt und mit EtOAc (3×100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O (3×100 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (3×100 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (*n*-Pentan / EtOAc = 8:1) erhielt man die Zielverbindung **104** als gelben Feststoff (1.76 g, 3.06 mmol, 77%).

$R_f = 0.27$ (*n*-Pentan / EtOAc = 10:1).

UV (CH_3CN): λ_{max} (lg ϵ) = 221.0 nm (4.645), 256.0 (4.509), 320.5 (3.828), 354.4 (3.638).

IR (KBr-Pressling): $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 2976, 2228, 1703, 1593, 1503, 1410, 1368, 1329, 1257, 1163.$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.22\text{--}1.35, 1.49\text{--}1.60$ (2 \times m, zus. 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.69–3.83, 4.17–4.33 (2 \times m, zus. 1 H, 1'-H_a), 4.42–4.61 (m, 1 H, 1'-H_b), 5.10–5.34 (m, 2 H, OCH_2Ph), 5.90–6.12 (m, 1 H, 2'-H), 6.74–6.92 (m, 1 H, 3-H), 7.35–7.69 (m, 5 H, 5 \times Ph-H), 7.58–7.69 (m, 1 H, 6-H), 8.32–8.44 (m, 1 H, 5-H), 8.57–8.64 (m, 1 H, 8-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.12, 28.14$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 46.11, 49.19 (C-1'), 71.01, 71.10 (OCH_2Ph), 81.01, 81.07 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 94.57, 94.66 (C-1), 110.41, 110.82 (C-3), 112.19, 112.26 (C-7), 118.31, 118.35 (CN), 120.57, 121.72 (C-3'), 124.03, 124.07 (C-5), 126.7, 126.8, 127.0, 127.1, 127.2, 128.2, 128.5, 128.6, 129.5, 134.8, 134.9, 135.6, 135.7, 144.8, 145.1 (C-4a, C-8a, C-2, C-2', 6 \times Ph-C), 138.3, 138.4 (C-8), 152.9, 153.1, 155.2 (C-4, C=O) ppm.

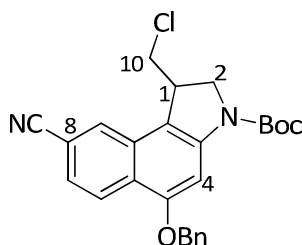
MS (ESI): m/z (%) = 597.0 (22) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 520.0 (100) $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_4\text{Cl}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}$ (574.84)

ber.: 597.04187 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

gef.: 597.04123 (ESI-HRMS).

3.3 *rac*-{(1*S*)-5-Benzyloxy-3-(*tert*-butyloxycarbonyl)-1-chlormethyl-8-cyano-1,2-dihydro-3*H*-benz[*e*]indol (*rac*-(1*S*)-74)



Der Iodaromat **104** (1.42 g, 2.47 mmol, 1.00 Äq) wurde in absolutem Toluol (60 mL) gelöst und die Lösung durch Einleiten eines Argonstroms 10 min entgast. Anschließend versetzte man mit Tris(trimethylsilyl)silan (836 μL , 2.72 mmol, 1.10 Äq.) sowie AIBN (102 mg, 618 μmol , 0.25 Äq.), erwärmte das Reaktionsgemisch mit Hilfe

eines vorgeheizten Ölbadens auf 80 °C und rührte für 4.5 h. Man gab SiO₂ (3 g) hinzu und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Hexan / DCM = 9:1) erhielt man die Zielverbindung *rac*-(1S)-**74** als weißen Feststoff (940 mg, 2.10 mmol, 85%).

R_f = 0.30 (*n*-Pentan / EtOAc = 10:1).

UV (CH₃CN): λ_{\max} (lg ϵ) = 210.0 nm (4.391), 230.0 (4.469), 268.0 (4.786), 311.5 (3.906), 322.5 (3.977), 381.0 (3.475).

IR (KBr-Pressling): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2977, 2230, 1693, 1593, 1455, 1409, 1374, 1336, 1257, 1146.

¹H-NMR (300 MHz, C₂D₂Cl₄): δ = 1.64 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.59 (dd, *J* = 9.1, 11.2 Hz, 1 H, 2-H_a), 3.89 (dd, *J* = 3.51, 11.2 Hz, 1 H, 2-H_b), 4.00 (tt, *J* = 3.2, 8.8 Hz, 1 H, 1-H), 4.21 (dd, *J* = 8.8, 11.7 Hz, 1 H, 10-H_a), 4.30 (dd, *J* = 3.2, 11.8 Hz, 1 H, 10-H_b), 5.32 (s, 2 H, OCH₂Ph), 7.36–7.57 (m, 6 H, 7-H, 5 × Ph-H), 7.93 (s, 1 H, 4-H), 8.02 (dd, *J* = 0.7, 1.5 Hz, 1 H, 9-H), 8.38 (dd, *J* = 0.5, 8.7 Hz, 1 H, 6-H) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, C₂D₂Cl₄): δ = 28.26 (C(CH₃)₃), 41.01 (C-1), 46.37 (C-2), 53.15 (C-10), 70.84 (OCH₂Ph), 81.57 (C(CH₃)₃), 99.71 (C-4), 111.1 (C-8), 114.9 (C-9b), 118.9 (CN), 123.2 (C-7), 123.6 (C-5a), 124.9 (C-6), 127.4 (C-9), 127.4 (2 × Ph-C_o), 128.0 (Ph-C_p), 128.4 (2 × Ph-C_m), 129.4 (C-9a), 136.1 (Ph-C_i), 143.4 (C-3a), 151.9 (C=O), 155.9 (C-5) ppm.

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 448 (5) [M]⁺, 391 (22) [M-C₄H₈]⁺, 91.0 (100) [C₇H₇]⁺.

C₂₆H₂₅ClN₂O₃ (448.94)

ber.: 471.14459 [M+Na]⁺

gef.: 471.14459 (ESI-HRMS).

3.4 Trennung der Enantiomere von *rac*-{(1*S*)-5-Benzyloxy-3-(*tert*-butyloxy-carbonyl)-1-chlormethyl-8-cyano-1,2-dihydro-3*H*-benz[*e*]indol (*rac*-(1*S*)-74)

rac-(1*S*)-74 (500 mg, 1.10 mmol) wurde in einem Gemisch aus *n*-Hexan / CH₂Cl₂ = 1:1 (10 mL) gelöst. Je 0.15 mL dieser Probenlösung (entsprechend 7.5 mg bzw. 167 µmol des racemischen Gemisches) wurden in das präparative HPLC-System (Säule: Chiralpak IA, 250 × 20 mm, Partikelgröße: 5 µm, mobile Phase: *n*-Hexan / CH₂Cl₂ = 85:15, Fluss: 18 mL / min, Druck: 5.9 MPa) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats (UV-Detektor: 269 nm) lieferte die Enantiomere (+)-(1*S*)-74 und (-)-(1*S*)-74.

Analytische Daten für (+)-(1*S*)-74:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +9.5^{\circ} \text{ (} c = 0.5, \text{CHCl}_3 \text{)}.$$

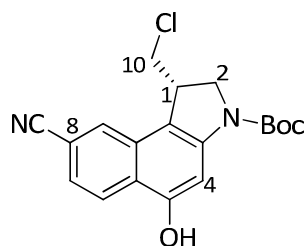
HPLC (präparativ):	<i>t</i> _R :	12.54 min
	Fraktion:	12.2-15.9 min
HPLC (analytisch):	Säule:	Chiralpak OD
	Eluens:	<i>n</i> -Hexan / 2-Propanol = 93:7
	Fluss:	0.8 mL / min
	<i>t</i> _R :	8.35 min, 99.7% ee.

Analytische Daten für (-)-(1*S*)-74:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -11.0^{\circ} \text{ (} c = 0.5, \text{CHCl}_3 \text{)}.$$

HPLC (präparativ):	<i>t</i> _R :	10.87 min
	Fraktion:	10.4-13.8 min
HPLC (analytisch):	Säule:	Chiralpak OD
	Eluens:	<i>n</i> -Hexan / 2-Propanol = 93:7
	Fluss:	0.8 mL / min
	<i>t</i> _R :	6.42 min, 99.2% ee.

3.5 (-)-{(1S)-5-Benzyloxy-3-(*tert*-butyloxycarbonyl)-1-chlormethyl-8-cyano-1,2-dihydro-3*H*-benz[e]indol ((-)-(1S)-115)



Der Benzylether (-)-(1S)-**74** (250 mg, 557 μmol , 1.0 Äq.) wurde in absolutem EtOAc (17 mL) gelöst und die Lösung auf 40 °C erwärmt. Anschließend wurde Palladium auf Aktivkohle (10%-ig, 140 mg, 129 μmol , 0.23 Äq. bezogen auf Pd) zugegeben, die Reaktionslösung kurz entgast, H_2 durch die Lösung geleitet und unter H_2 -Atmosphäre für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde über eine Celite-Schicht abfiltriert und mit Aceton (800 mL) gespült. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (*n*-Pentan / EtOAc 5:1) erhielt man die Zielverbindung (-)-(1S)-**115** als weißen Feststoff (179 mg, 499 μmol , 90%).

$R_f = 0.50$ (*n*-Pentan / EtOAc = 2:1).

UV (CH_3CN): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 210.5 nm (4.221), 229.5 (4.369), 269.0 (4.787), 312.5 (3.826), 323.5 (3.861), 381.0 (3.428).

IR (KBr-Pressling): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3350, 2230, 1676, 1626, 1595, 1513, 1422, 1369, 1223, 1144.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.54 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.77–4.31 (m, 5 H, 1-H, 2-H₂, 10-H₂), 7.50 (dd, $J = 1.5, 8.7$ Hz, 1 H, 7-H), 7.72 (s_{br}, 1 H, 4-H), 8.18 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, 6-H), 8.41 (dd, $J = 0.5, 1.5$ Hz, 1 H, 9-H), 10.88 (s_{br}, 1 H, OH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 27.98 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.86 (C-1), 52.50 (C-2), 61.92 (C-10), 80.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 101.0 (C-4), 109.7 (C-8), 114.1 (C-9b), 119.2 (CN), 122.0 (C-5a), 122.5 (C-7), 124.5 (C-6), 128.8 (C-9), 129.2 (C-9a), 143.2 (C-3a), 151.5 (C=O), 154.6 (C-5) ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 358 (5) $[M]^+$, 57 (100) $[C_4H_9]^+$.

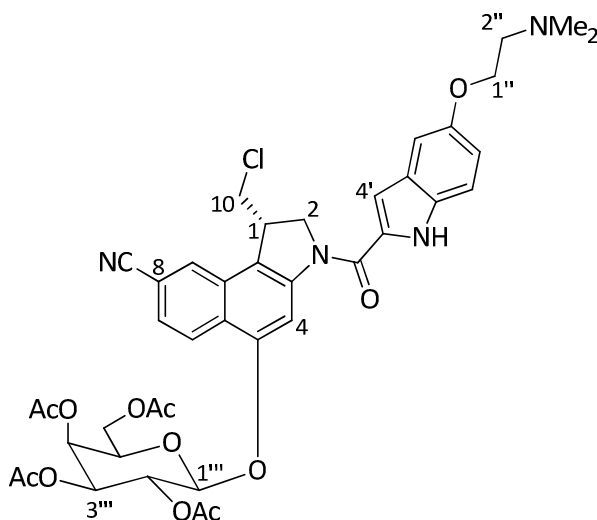
C₁₉H₁₉N₂O₃Cl (358.82)

ber.: 381.09764 $[M+Na]^+$

gef.: 381.09764 (ESI-HRMS).

4 Synthese des fluoreszenzmarkierten Prodrugs (1S)-72

4.1 (+)-{[(1S)-1-chlormethyl-8-cyano-3-[(5-(2-(*N,N'*-dimethyl-amino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3*H*-benz[e]indol-5-yl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-Galaktopyranosid} ((+)-(1S)-73)



Zu einer Lösung des Phenols (–)-**115** (283 mg, 663 μ mol, 1.0 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (20 mL) gab man aktiviertes Molsieb 4 Å (2.00 g) und rührte 30 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe des *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-Galaktopyranosyl)-trichloracetimidats (**116**) (427 mg, 870 μ mol, 1.3 Äq.) kühlte man die Lösung auf -10°C und tropfte langsam eine Lösung von $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (50 μL , 395 μ mol, 0.5 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (4.0 mL) zu. Nach 3.5 h Rühren bei -10°C tropfte man weiteres $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (250 μL , 1.97 mmol, 3.0 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (4.0 mL) hinzu und ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 6 h wurde das Reaktionsgemisch via Transferkanüle in einen zweiten Kolben überführt und so vom Molsieb abgetrennt. Man wusch dieses gründlich mit CH_2Cl_2 (30 mL) und entfernte anschließend das Lösungsmittel im Vakuum. Der erhaltene Rückstand wurde 1.5 h im Vakuum getrocknet und in absolutem DMF (38 mL) aufgenommen. Man kühlte die Lösung auf 0°C und gab EDAC·HCl (450 mg, 1.35 mmol, 3.0 Äq.) sowie DMAI- $\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{HCl}$ (**104**) (336 mg, 1.35 mmol, 1.5 Äq.) hinzu. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (70 mL), H_2O (70 mL) sowie gesättigter NaHCO_3 -Lösung (70 mL) versetzt und anschließend mit EtOAc (4 \times 150 mL) extrahiert. Die vereinigten

organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (4 × 200 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (CH₂Cl₂ / MeOH 6:1) erhielt man die Zielverbindung (+)-(1S)-**73** als weißen Feststoff (340 mg, 416 μmol, 53%).

$R_f = 0.44$ (CH₂Cl₂ / MeOH = 6:1).

$[\alpha]_D^{20} = +6.0^\circ$ (c = 0.3, CHCl₃).

UV (CH₃CN): λ_{\max} (lg ε) = 212.5 (4.712), 261.5 (4.431), 302.0 (4.546), 399.0 (4.519).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3406 (NH), 2942, 2229 (CN), 1754 (C=O), 1626, 1457, 1396, 1226.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 2.01 (s, 6 H, 2 × C(O)CH₃), 2.03 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.16 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.37 (s, 6 H, NMe₂), 2.79 (t, $J = 5.7$ Hz, 2 H, 2''-H₂), 3.55 (dd, $J = 11.5$, 10.0 Hz, 1 H, 10-H_a), 3.78–3.85 (m, 1 H, 1-H), 3.90 (dd, $J = 11.5$, 3.2 Hz, 1 H, 10-H_b), 4.05–4.23 (m, 5 H, 1''-H₂, 5'''-H, 6'''-H₂), 4.69–4.75 (m, 1 H, 2-H_a), 4.84 (dd, $J = 10.6$, 2.0 Hz, 1 H, 2-H_b), 4.99 (dd, $J = 10.5$, 3.2 Hz, 1 H, 3'''-H), 5.27 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, 1'''-H), 5.38 (d, $J = 3.3$ Hz, 1 H, 4'''-H), 5.63 (dd, $J = 10.5$, 7.9 Hz, 1 H, 2'''-H), 7.03–7.06 (m, 2 H, 3'-H, 6'-H), 7.14 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, 4'-H), 7.37 (d, $J = 8.9$ Hz, 1 H, 7'-H), 7.53 (dd, $J = 8.7$, 1.5 Hz, 1 H, 7-H), 8.08 (d, $J = 0.8$ Hz, 1 H, 9-H), 8.21 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, 6-H), 8.51 (s, 1 H, 4-H), 10.05 (s, 1 H, NH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 20.63, 20.69, 20.72, 20.84 (4 × C(O)CH₃), 45.84 (NMe₂), 45.96 (C-10), 54.99 (C-2), 58.35 (C-2''), 61.16 (C-6'''), 66.33 (C-1'''), 66.78 (C-4'''), 68.43 (C-2'''), 70.51 (C-3'''), 71.20 (C-1), 99.02 (C-1'''), 103.52 (C-4'), 103.9 (C-4), 106.4 (C-6'*), 111.6 (C-5a), 112.7 (C-7'), 117.8 (C-3'*), 118.6 (C-8), 118.8, 124.4 (C-5a, C-9b), 124.8 (C-6), 125.0 (C-7), 128.0 (C-9), 128.2, 128.7, 130.0, 131.5 (CN, C-2', C-3a', C-7a'), 143.7 (C-3a), 153.3 (C-5), 153.9 (C-5'), 160.8 (C=O), 169.5, 169.7, 170.0, 170.3 (4 × C(O)CH₃) ppm.

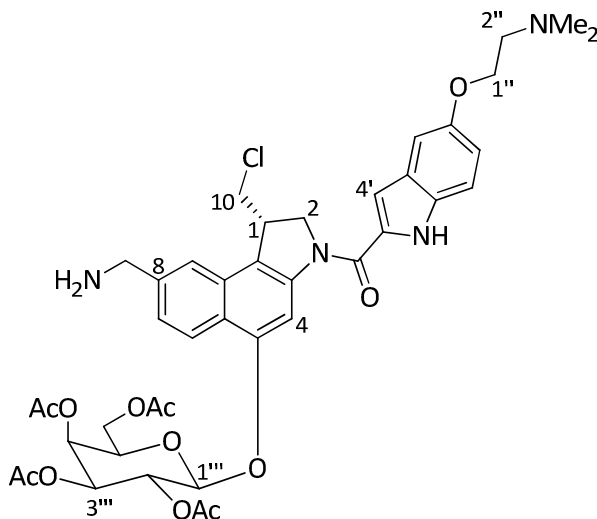
MS (ESI): m/z (%) = 833.3 (100) [M+H]⁺.

C₄₁H₄₃ClN₄O₁₂ (819.25).

ber.: 819.2639 [M+H]⁺

gef.: 819.2651 (ESI-HRMS).

4.2 (+)-{[(1S)-8-Aminomethyl-1-chlormethyl-3-[(5-(2-(*N,N'*-dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3*H*-benz[*e*]indol-5-yl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-Galaktopyranosid} ((+)-(1S)-117)



Das acetylgeschützte Galaktosid (+)-(1S)-**73** (50 mg, 61 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Ethanol (3.0 mL) gelöst und die Lösung unter Rühren mittels eines Argongasstroms kurz entgast. Anschließend wurden eine 1.25 M Lösung von HCl in Ethanol¹⁶⁵ (98 μ L, 122 μ mol, 2.0 Äq.) sowie H₂O (0.15 mL) zugetropft und PtO₂·H₂O (3.0 mg, 12.2 μ mol, 0.20 Äq.) zugegeben. Man leitete kurz einen H₂-Gasstrom durch die Reaktionsmischung und rührte dann für 48 h bei Raumtemperatur unter einer H₂-Atmosphäre. Danach filtrierte man über eine Celite-Schicht vom Feststoff ab, spülte gründlich mit MeOH (200 mL) nach und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂ / MeOH = 5:1) erhielt man die Zielverbindung (+)-(1S)-**117** als weißen Feststoff (33 mg, 40 μ mol, 66%).

$R_f = 0.17$ (CH₂Cl₂ / MeOH = 5:1).

$[\alpha]_D^{20} = +2.0^\circ$ (c = 0.3, DMSO).

UV (CH₃CN): λ_{max} (lg ϵ) = 206.0 (4.461), 300.0 (4.312), 336.0 nm (4.249).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3421 (NH), 1749 (C=O), 1628, 1519, 1404.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.98 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.01 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.18 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.24 (s, 6 H, NMe₂), 2.65 (t, *J* = 5.8 Hz, 2 H,

2''-H₂), 3.89–3.97 (m, 3 H, CH₂NH₂, 10-H_a), 4.07 (t, *J* = 5.9 Hz, 2 H, 1''-H₂), 4.10–4.18 (m, 3 H, 6'''-H₂, 10-H_b), 4.22–4.28 (m, 1 H, 1-H), 4.47–4.52 (m, 1 H, 5'''-H), 4.57–4.62 (m, 1 H, 2-H_a), 4.81–4.86 (m, 1 H, 2-H_b), 5.38–5.46 (m, 3 H, 2'''-H, 3'''-H, 4'''-H), 5.54–5.59 (m, 1 H, 1'''-H), 6.92 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1 H, 6'-H), 7.10 (s, 1 H, 3'-H), 7.17 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, 4'-H), 7.41 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, 7'-H), 7.44 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, 7-H), 7.86 (s, 1 H, 9-H), 7.90 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, 6-H), 8.18 (s, 1 H, 4-H), 11.55 (s, 1 H, NH) ppm.

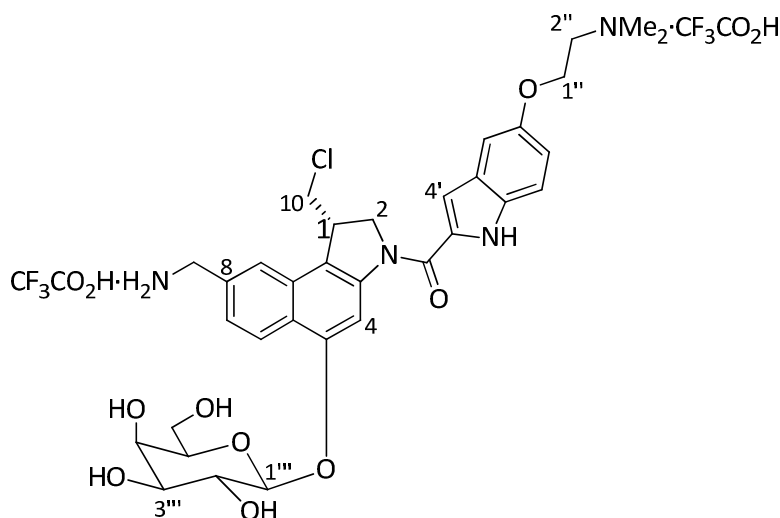
¹³C-NMR (125 MHz): δ = 20.29, 20.34, 20.50 (4 × C(O)CH₃), 40.09 (C-1), 41.14 (C-10), 45.51 (CH₂NH₂), 47.42 (NMe₂), 55.01 (C-2), 57.76 (C-2''), 60.94 (C-1'''), 66.22 (C-6'''), 67.03, 68.49, 69.66, 70.29 (C-2''', C-3''', C-4''', C-5'''), 98.90 (C-1'''), 101.6 (C-4), 103.1 (C-4'), 105.2 (C-3'), 113.1 (C-7'), 115.7 (C-6'), 118.8, 121.2, 127.3, 129.5, 130.7, 131.5 (C-5a, C-9a, C-9b, C-8, C-2', C-3a', C-7a'), 121.6 (C-6), 124.5 (C-7), 141.8 (C-3a), 152.6, 152.8 (C-5, C-5'), 160.1 (C=O), 169.2, 169.3, 169.7, 169.8 (4 × C(O)CH₃) ppm.

C₄₁H₄₇ClN₄O₁₂ (823.28).

ber.: 823.2952 [M+H]⁺

gef.: 823.2941 (ESI-HRMS).

4.3 [(1S)-8-Aminomethyl-1-chlormethyl-3-[(5-(2-(*N,N'*-dimethylamino)ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3*H*-benz[e]indol-5-yl]-O-β-D-Galaktopyranosid-ditrifluoracetat } ((1S)-118)



Das acetylgeschützte Galaktosid (+)-(1S)-**117** (19 mg, 23 μmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem MeOH (3 mL) gelöst und bei 0 °C mit einer Lösung von NaOMe in MeOH

(8.5 μL einer 5.4 M Lösung, 46 μmol , 2.0 Äq.) versetzt. Man rührte 30 min bei Raumtemperatur, verdünnte die Reaktionslösung anschließend mit MeOH (4 mL) sowie H_2O (4 mL) und gab solange sauren Ionentauscher (Amberlite-IR 120) hinzu, bis die Lösung neutral war ($\text{pH} \approx 7$). Es wurde vom Ionentauscher abgetrennt und dieser gründlich mit MeOH (25 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt in einem Gemisch aus bidestilliertem H_2O (0.1% TFA) / $\text{CH}_3\text{CN} = 4:1$ (4 mL) aufgenommen. Je 2 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung von CH_3CN und TFA unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte das Galaktosid (1S)-**118** als weißen Feststoff (12.7 mg, 19.4 μmol , 84%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H_2O (0.1% TFA)/MeOH
	0	90/10
	0–15	90/10 \rightarrow 0/100
	15–22	0/100
	22–30	0/100 \rightarrow 90/10
	30–35	90/10

Fluss: 0.8 mL min^{-1}

t_R : 14.1 min

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.1% TFA)/MeOH
	0	90/10
	0–15	90/10 → 0/100
	15–22	0/100
	22–30	0/100 → 90/10
	30–35	90/10

Fluss: 12 mL min⁻¹*t*_R: 6.89 min

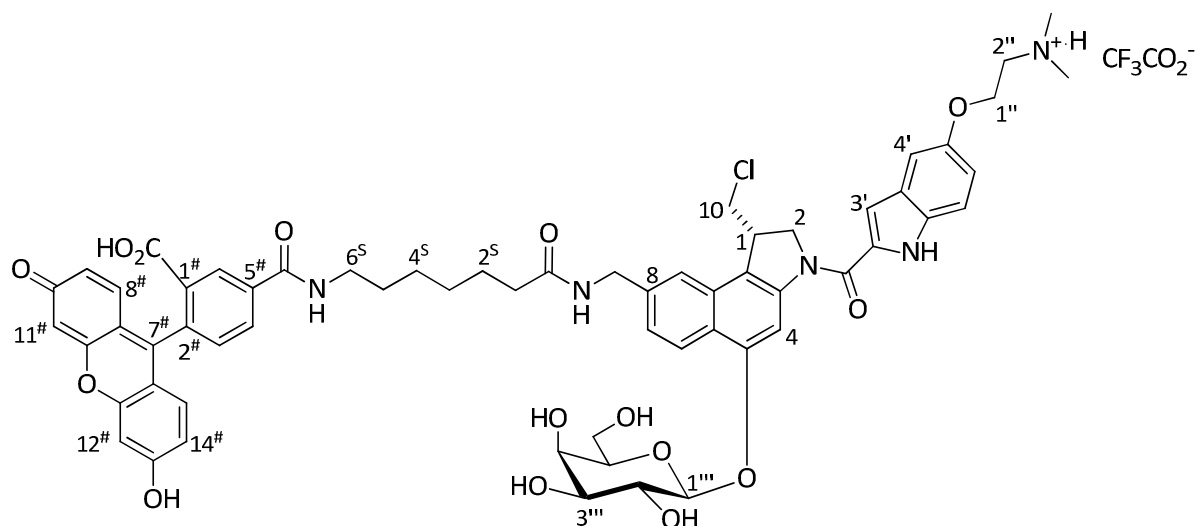
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ = 2.90 (s, 6 H, NMe₂), 3.44–4.21 (m, 7 H, 1''-H, 2'''-H, 3'''-H, 4'''-H, 5'''-H, 6'''-H), 4.20–4.31 (m, 3 H, CH₂NH₂, 1-H), 4.31–4.40 (m, 2 H, 2''-H₂), 4.57–4.66 (m, 2 H, 10-H₂), 4.82–4.93 (m, 3 H, 2-H₂, 1'''-H), 7.01 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1 H, 6'-H), 7.14 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H, 3'-H), 7.26 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, 4'-H), 7.45 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, 7'-H), 7.49 (dd, *J* = 8.8, 1.3 Hz, 1 H, 7-H), 8.01 (s, 1 H, 9-H), 8.37 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, 6-H), 8.42 (s, 1 H, 4-H), 11.74 (s, 1 H, NH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 41.29 (C-1), 42.30 (CH₂NH₂), 42.80 (NMe₂), 47.27 (C-10), 54.89 (C-2), 55.55 (C-1''), 59.45 (C-6'''), 62.72 (C-2''), 67.40, 70.38, 73.02, 75.05 (C-2''', C-3''', C-4''', C-5'''), 102.1 (C-1'''), 103.9 (C-4'), 105.2 (C-3'), 113.2 (C-7'), 115.6 (C-6'), 117.8 (C-4*), 122.3 (C-9b), 122.5 (C-9), 123.7 (C-6), 124.1 (C-7), 127.2, 129.1, 131.0, 131.9, 133.1 (C-5a, C-9a, C-2', C-3a', C-7a', C-8), 142.5 (C-3a), 151.9, 153.6 (C-5, C-5'), 160.1 (C=O) ppm.

C₃₇H₄₁ClF₆N₄O₁₂ (883.18).ber.: 655.2529 [M-2 CF₃CO₂-H]⁺

gef.: 655.2526, (ESI-HRMS).

4.4 6-(Fluorescein-5-carboxamido)-Hexansäure-[(1S)-1-chlormethyl-3-[(5-(2-(*N,N'*-dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-5-*O*- β -D-Galaktopyranosyl-1,2-dihydro-3*H*-benz[*e*]indol-8-ylmethyl]-amid-trifluoracetat ((1S)-72)



Zu einer Lösung des NHS-Esters (**119**) (8.90 mg, 15.2 μ mol, 1.0 Äq.) in absolutem DMF (150 μ L) wurde eine Lösung von Galaktosid (+)-(1S)-**118** (11.9 mg, 18.2 μ mol, 1.3 Äq.) und *i*-Pr₂NEt (11 μ L, 66.6 μ mol, 4.5 Äq.) in absolutem DMF (150 μ L) getropft. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit bidestilliertem H₂O (0.1% TFA; 3.0 mL) und CH₃CN (2.5 mL) verdünnt. Je 2 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung von CH₃CN und TFA unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte das fluoreszenzmarkierte glykosidische Prodrug (1S)-**72** als gelben Feststoff (7.8 mg, 6.9 μ mol, 46%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.1% TFA)/CH ₃ CN
	0	83/17
	0–60	83/17 → 50/50

60–80	50/50
80–90	50/50 → 83/17

Fluss: 0.8 mL min⁻¹

t_R : 30.9 min

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.1% TFA)/CH ₃ CN
	0	83/17
	0–60	83/17 → 50/50
	60–70	50/50 → 83/17

Fluss: 12 mL min⁻¹

t_R : 36.6 min

Fraktion: 36.0–38.0 min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.08–1.70 (m, 6 H, 3^S-H₂, 4^S-H₂, 5^S-H₂), 2.18–2.22 (m, 2 H, 2^S-H), 2.87 (s, 6 H, NMe₂), 3.18–4.26 (m, 13 H, 2^{'''}-H, 3^{'''}-H, 4^{'''}-H, 5^{'''}-H, 6^{'''}-H₂, 10-H₂, 1-H, 6^S-H₂, 1^{''}-H₂), 4.35–4.39 (m, 2 H, 2^{''}-H), 4.43–4.48 (m, 2 H, Ar-CH₂), 4.57–4.53 (m, 1 H, 2-H_a), 4.82–4.88 (m, 1 H, 2-H_b), 4.89–4.93 (m, 1 H, 1^{'''}-H), 6.53–6.60 (m, 4 H, Ar-H), 6.69 (d, J = 2.1 Hz, 1-H, Ar-H), 7.01 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1 H, 6¹-H), 7.15–7.21 (m, 1 H, 3¹-H), 7.27 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, 4¹-H), 7.30–7.38 (m, 2 H, 7¹-H, Ar-H), 7.45 (d, J = 8.9 Hz, 1 H, 7-H), 7.69–7.73 (m, 1 H, Ar-H), 8.22–8.25 (m, 1 H, Ar-H), 8.30 (d, J = 8.8 Hz, 1 H, 6-H), 8.41 (t, J = 6.0 Hz, 1 H, Ar-H), 8.45 (d, J = 9.6 Hz, 1 H, Ar-H),

8.79 (t, $J = 5.4$ Hz, 1 H, Ar-H), 9.75, 10.05 (s, 2 H, OH, CO₂H), 11.70 (s, 1 H, Indol-NH) ppm.

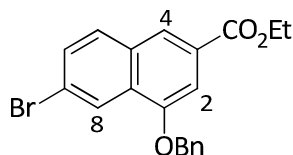
C₆₃H₆₃ClF₃N₅O₁₇ (1254.65).

ber.: 1126.3847 [M-CF₃CO₂]⁺

gef.: 1126.3832, (ESI-HRMS).

5 Synthese des *anti*-Methyl-*seco*-CCBI-Grundgerüsts (1*S*,10*R*)-82

5.1 Ethyl-1-benzyloxy-7-brom-3-naphthalincarboxylat (98)



Die Carbonsäure **85** (10.1 g, 28.3 mmol, 1.0 Äq.), wurde in absolutem Ethanol (350 mL) suspendiert und Thionylchlorid (4.1 mL, 6.66 g, 56.0 mmol, 2.0 Äq.) zugetropft. Das Gemisch wurde für 3 h unter Rückfluß gerührt, nochmals mit Thionylchlorid (1.0 mL, 1.67 g, 14.0 mmol, 0.5 Äq.) versetzt und für weitere 16 h unter Rückfluß gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Zielverbindung **98** als Rohprodukt weiter eingesetzt.

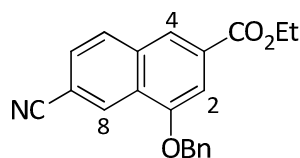
$R_f = 0.59$ (*n*-Pentan / EtOAc = 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.44$ (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, OCH_2CH_3), 4.43 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H, OCH_2CH_3), 5.28 (s, 2 H, OCH_2Ph), 7.34–7.48, 7.51–7.55 (2 × m, 2 × 3 H, 2-H, 5 × Ph-H), 7.61 (dd, $J = 8.7$ Hz, 1 H, 6-H), 7.76 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H, 5-H), 8.17 (s, 1 H, 4-H), 8.47 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H, 8-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.4$ (OCH_2CH_3), 61.3 (OCH_2CH_3), 70.5 (OCH_2Ph), 105.1 (C-2), 122.1, 128.3, 128.8 (C-3, C-4a, C-8a), 123.3, 124.9, 128.2, 130.5 130.6 (C-4, C-5, C-6, C-8, Ph-C_p), 127.7, 128.7 (2 × Ph-C_o, 2 × Ph-C_m), 131.9 (C-7), 136.3 (Ph-C_i), 153.6 (C-1), 166.5 (C=O) ppm.

$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{BrO}_3$ (385.25).

5.2 Ethyl-1-benzyloxy-7-cyano-3-naphthalincarboxylat (**99**)



Der Benzylether **98** (10.7 g, 27.7 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem DMF (15 mL) gelöst und CuCN (2.98 g, 33.2 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben und 20 h bei Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch in eine Suspension von H₂O (250 mL) und FeCl₃ (5.79 g, 33.2 mmol, 1.2 Äq.) gegossen und für 30 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit EtOAc (3 × 200 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung (2 × 300 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Man erhielt die Zielverbindung **99** als Rohprodukt, das weiter eingesetzt werden konnte.

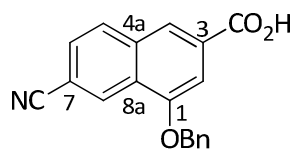
$R_f = 0.27$ (*n*-Pentan / EtOAc = 10:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.46$ (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 4.46 (q, $J = 7.2$ Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 5.32 (s, 2 H, OCH₂Ph), 7.37–7.57 (m, 5 H, 5 × Ph-H), 7.59 (d, $J = 1.2$ Hz, 1 H, 2-H), 7.67 (dd, $J = 8.5, 1.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, 5-H), 8.22 (s_{br}, 1 H, 4-H), 8.71 (m_c, 1 H, 8-H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 14.3$ (OCH₂CH₃), 61.6 (OCH₂CH₃), 70.6 (OCH₂Ph), 105.7 (C-2), 110.6 (C-7), 119.0 (CN), 122.8 (C-4), 126.8 (C-3), 127.6, 128.4, 128.8 (C-6, 2 × Ph-C_o, 2 × Ph-C_m, Ph-C_p), 128.8 (C-8), 130.0 (C-5), 131.1 (C-8a), 134.7, 135.8 (C-4a, Ph-C_i), 154.6 (C-1), 166.1 (C=O) ppm.

C₂₁H₁₇NO₃ (331.36).

5.3 1-Benzyl-7-cyano-3-naphthalincarbonsäure (**100**)



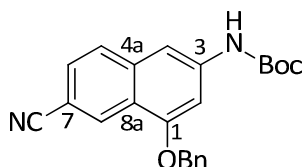
Der Ethylester **99** (8.40 g, 25.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus THF / MeOH / H₂O = 3:1:1 (250 mL) gelöst und nach Zugabe von LiOH·H₂O (5.32 g, 127 mol, 5.0 Äq.) 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt und unter Rühren mit 10%-iger HCl angesäuert (pH ≈ 1), wobei sich ein weißer Niederschlag bildete. Dieser wurde durch Filtration abgetrennt und im Vakuum getrocknet. Man erhielt die Carbonsäure **100** als weißen Feststoff (6.12 g, 20.2 mmol, 80%).

R_f = 0.26 (PE / EtOAc = 1:1, 1% HOAc).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 5.43 (s, 2 H, OCH₂Ph), 7.32–7.50 (m, 3 H, 2-H, 2 × Ph-H), 7.91 (dd, J = 8.5, 1.6 Hz, 1 H, 6-H), 8.28 (s, 1 H, 5-H), 8.31 (s, 1 H, 4-H), 8.65 (d, J = 0.8 Hz, 1 H, 8-H), 13.32 (s_{br}, 1 H, CO₂H) ppm.

C₁₉H₁₃NO₃ (303.31).

5.4 3-Amino-1-benzyl-*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-7-cyano-naphthalin (**79**)



Zu einer Suspension der Carbonsäure **100** (6.12 g, 20.2 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem *tert*-Butylalkohol (1000 mL) gab man aktiviertes Molsieb 4 Å (60.0 g), Triethylamin (3.37 mL, 2.46 g, 24.2 mmol, 1.2 Äq.) und DPPA (5.35 mL, 6.80 g, 24.2 mmol, 1.2 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde 22 h ohne Rühren zum Sieden erhitzt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur vom Molsieb abfiltriert, welches gründlich mit EtOAc

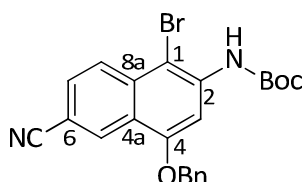
(500 mL) gewaschen wurde. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in EtOAc (300 mL) aufgenommen und die Lösung mit 2 N HCl (2 × 200 mL), gesättigter NaHCO₃-Lösung (200 mL) sowie gesättigter NaCl-Lösung (200 mL) gewaschen. Man trocknete die organische Phase über MgSO₄ und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (PE / EtOAc = 7:1 → 5:1 → 4:1) erhielt man die Zielverbindung **79** als weißen Feststoff (6.06 g, 16.2 mmol, 80%).

$R_f = 0.51$ (PE / EtOAc = 4:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) $\delta = 1.54$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 5.20 (s, 1 H, OCH₂Ph), 6.79 (s_{br}, 1 H, NH), 7.14 (d, $J = 1.6$ Hz, 1 H, 2-H), 7.30–7.55 (m, 7 H, 4-H, 6-H, 5 × Ph-H), 7.67 (s, 1 H, 5-H), 7.68 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, 5-H), 8.50–8.58 (m, 1 H, 8-H) ppm.

C₂₃H₂₂N₂O₃ (374.43).

5.5 2-Amino-4-benzyloxy-1-brom-*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-6-cyano-naphthalin (**101**)



Zu einer Lösung von Naphthalinderivat **79** (6.00 g, 16.0 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem THF (300 mL) wurde bei –78 °C eine Lösung von H₂SO₄ in absolutem THF (435 µL einer Lösung von 1 µL H₂SO₄ in 1.00 mL THF, 8.02 µmol, 0.05 mol-%) getropft. Nach 20 min Rühren bei –78 °C wurde portionsweise *N*-Bromsuccinimid (3.42 g, 19.3 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben und für weitere 4 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend ließ man innerhalb von 1 h auf Raumtemperatur erwärmen und beendete die Reaktion durch Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung (110 mL), H₂O (60 mL) sowie gesättigter NaHCO₃-Lösung (60 mL). Man extrahierte mit EtOAc (3 × 100 mL), wusch die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung (3 × 200 mL) und

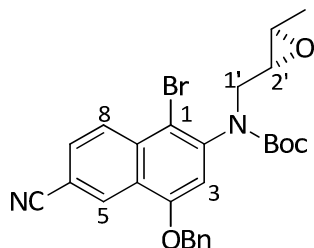
trocknete über MgSO_4 . Man erhielt die Zielverbindung **101** als Rohprodukt (7.56 g), das weiter eingesetzt werden konnte.

$R_f = 0.52$ (PE / EtOAc = 10:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) $\delta = 1.57$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 5.25 (s, 2 H, OCH_2Ph), 7.33–7.56 (m, 6 H, NH, $5 \times \text{Ph-H}$), 7.62 (dd, $J = 8.8, 1.7$ Hz, 1 H, 7-H), 8.09 (dd, $J = 8.8, 0.5$ Hz, 1 H, 8-H), 8.24 (d, $J = 5.3$ Hz, 1 H, 3-H), 8.53–8.59 (m, 1 H, 5-H) ppm.

$\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}_3$ (453.33).

5.6 (+)-{(2'R,3'R)-2-Amino-4-benzyloxy-N-(2,3-epoxybutyl)-1-brom-N-(tert-butyloxycarbonyl)-6-cyano-naphthalin} ((+)-(2'R,3'R)-80)



Eine Lösung des Carbamats **101** (4.98 g, 11.0 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (100 mL) wurde bei 60 °C mit NaH (1.05 g, 44.0 mmol, 4.0 Äq.; 60%ige Suspension in Mineralöl) versetzt und 45 min bei dieser Temperatur gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde weitere 30 min gerührt, anschließend das Nosylat (+)-(2R,3R)-**102** (4.50 g, 16.5 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben und nach weiterem Rühren für 24 h bei dieser Temperatur wurde die Suspension vorsichtig mit gesättigter NH_4Cl -Lösung (300 mL) versetzt. Nach Extraktion des Gemisches mit EtOAc (3×300 mL) wurden die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (PE / EtOAc = 5:1) lieferte die Zielverbindung (+)-(2'R,3'R)-**80** (2.59 g, 4.09 mmol, 45%) als Gemisch von Atropisomeren in Form eines weißen Feststoffes.

$R_f = 0.26$ (PE / EtOAc = 6:1).

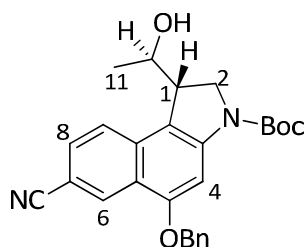
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 ; Gemisch von Rotameren): δ = 1.21–1.38, 1.49–1.63 (2 \times m, zus. 12 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 4'-H₃), 2.56–2.67, 2.73–2.89, 3.00–3.21, 3.23–3.37, 3.49–3.60, 3.68–4.31 (7 \times m, zus. 4 H, 1'-H₂, 2'-H, 3'-H), 5.13–5.33 (m, 2 H, OCH_2Ph), 6.87–7.10 (m, 1 H, 3-H), 7.33–7.55 (m, 5 H, 5 \times Ph-H), 7.64–7.76 (m, 1 H, 7-H), 8.28–8.38 (m, 1 H, 8-H), 8.62–8.72 (m, 1 H, 5-H) ppm.

$\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_4$ (523.42).

ber.: 523.1227 $[\text{M}+\text{H}]^+$

gef.: 523.1217 (ESI-HRMS).

5.7 (+)-{(1*S*,10*R*)-5-Benzyloxy-3-(*tert*-butyloxycarbonyl-1-(10-Hydroxyethyl)-7-cyano-1,2-dihydro-3*H*-benz[*e*]indol ((+)-(1*S*,10*R*)-81)



Eine Lösung von frisch sublimiertem ZnCl_2 (1.42 g, 10.4 mmol, 1.5 Äq.) in absolutem THF (100 mL) wurde auf 0 °C gekühlt, langsam mit Methyllithium (26.1 mL einer 1.6 M Lösung in Et_2O , 41.8 mmol, 6.0 Äq.) versetzt und für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf –78 °C gekühlt, tropfenweise mit TMS-NCS (1.48 μL , 1.37 g, 10.4 mmol, 1.5 Äq.) versetzt, wieder auf 0 °C erwärmt und für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Nach dem erneuten Abkühlen auf –78 °C wurde zu dem Gemisch über eine Transferkanüle eine Lösung des Epoxids (+)-(2'*R*,3'*R*)-**80** (2.93 g, 6.94 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem THF (50 mL) getropft und für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Nach Erwärmen auf 0 °C wurde die Reaktionslösung zunächst für 1 h bei dieser Temperatur gerührt, dann auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 2.5 h gerührt. Anschließend wurde das Gemisch vorsichtig mit gesättigter NH_4Cl -Lösung (400 mL) versetzt, mit CH_2Cl_2 (4 \times 400 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an

Kieselgel (PE / EtOAc = 5:2) lieferte die Zielverbindung (+)-(1*S*,10*R*)-**81** (1.73 g, 3.89 mmol, 69%, 98.8% *ee*) als weißen Feststoff.

Analytische Daten für (-)-(1*R*,10*S*)-**81**:

HPLC (analytisch): Säule: Chiralpak[®] IA, 250 × 4.6 mm, 5 μm
Eluens 5% *iso*-Propanol in *n*-Hexan
Fluss: 0.8 mL/min
 t_R : 21.2 min

Analytische Daten für (+)-(1*S*,10*R*)-**81**:

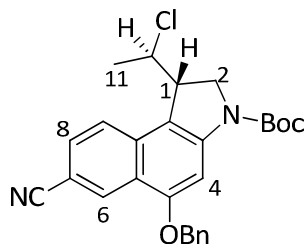
HPLC (analytisch): Säule: Chiralpak[®] IA, 250 × 4.6 mm, 5 μm
Eluens 5% *iso*-Propanol in *n*-Hexan
Fluss: 0.8 mL/min
 t_R : 27.6 min

$R_f = 0.47$ (PE / EtOAc = 2 :1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.27$ (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, 10-CH₃), 1.64 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.70 (dt, $J = 9.9, 3.1$ Hz, 1 H, 1-H), 4.03–4.16 (m, 1 H, 2-H_a), 4.26 (dd, $J = 11.6, 3.4$ Hz, 1 H, 2-H_b), 4.30–4.39 (m, 1 H, 10-H), 5.32 (s, 2 H, OCH₂Ph), 7.35–7.61 (m, 6 H, 8-H, 5 × Ph-H), 7.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, 9-H), 7.89 (s, 1 H, 4-H), 8.64 (d, $J = 1.4$ Hz, 1 H, 6-H) ppm.

C₂₇H₂₈N₂O₄ (444.52).

5.8 (+)-{(1*S*,10*R*)-5-Benzoyloxy-3-(*tert*-butyloxycarbonyl-1-(10-chlorethyl)-7-cyano-1,2-dihydro-3*H*-benz[*e*]indol ((+)-(1*S*,10*R*)-82)



Eine Lösung des Alkohols (+)-(1*S*,10*R*)-**81** (2.00 g, 4.50 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem CH₂Cl₂ (100 mL) wurde bei 0 °C mit Thionylchlorid (3.26 mL, 5.35 g, 45.0 mmol, 10.0 Äq.) sowie Pyridin (9.08 mL, 8.90 g, 113 mmol, 25.0 Äq.) versetzt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 4 h Rühren bei dieser Temperatur wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (PE / EtOAc = 5:1) gereinigt. Das Produkt (+)-(1*S*,10*R*)-**82** (0.70 g, 151 µmol, 34%, 99.0% *ee*) wurde als weißer Feststoff erhalten.

Analytische Daten für (+)-(1*S*,10*R*)-**82**:

HPLC (analytisch): Säule: Chiralpak OD
 Eluens: *n*-Hexan / 2-Propanol = 98:2
 Fluss: 0.8 mL / min
 t_R: 37.6 min.

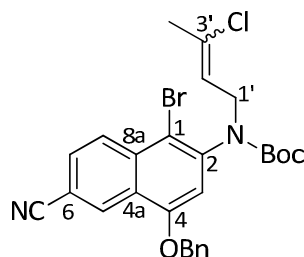
Analytische Daten für (-)-(1*S*,10*R*)-**82**:

HPLC (analytisch): Säule: Chiralpak OD
 Eluens: *n*-Hexan / 2-Propanol = 98:2
 Fluss: 0.8 mL / min
 t_R: 33.9 min, 99.2% *ee*.

R_f = 0.31 (PE / EtOAc = 5:1).

C₂₇H₂₇ClN₂O₃ (462.97).

5.9 (E/Z)-2-Amino-4-benzyloxy-1-brom-N-(tert-butyloxycarbonyl)-N-(3-chlor-2-butenyl)-6-cyano-naphthalin (**104**)

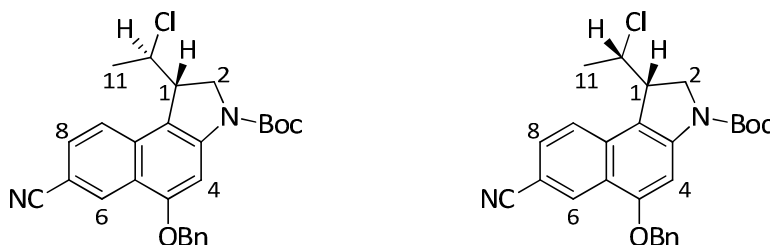


Zu einer Lösung des Naphthalinderivats **101** (2.89 g, 6.38 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem DMF (60 mL) wurde bei Raumtemperatur portionsweise NaH (383 mg, 9.58 mmol, 1.5 Äq. als 60%ige Suspension in Mineralöl) gegeben. Man ließ 2.5 h bei Raumtemperatur rühren, tropfte (*E/Z*)-1,3-Dichlor-2-buten (**103**) (1.40 mL, 1.59 g, 12.8 mmol, 2.0 Äq.) hinzu und rührte für weitere 4 h bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch vorsichtige Zugabe einer gesättigten NH_4Cl -Lösung (100 mL) sowie H_2O (50 mL) beendet und die Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (3×100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O (3×100 mL) sowie gesättigter NaCl-Lösung (3×100 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (PE / EtOAc = 10:1) lieferte die Zielverbindung **104** als weißen Feststoff (2.29 g, 4.22 mmol, 66%).

$R_f = 0.46$ (PE / EtOAc = 5:1).

$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{BrClN}_2\text{O}_3$ (541.86).

5.10 *rac*-{(1*S*,10*R*)-5-Benzyloxy-3-(*tert*-butyloxycarbonyl)-1-(10-chloroethyl)-7-cyano-1,2-dihydro-3*H*-benz[e]indol} (*rac*-(1*S*,10*R*)-**82**) und *rac*-{(1*S*,10*S*)-5-Benzyloxy-3-(*tert*-butyloxycarbonyl)-1-(10-chloroethyl)-7-cyano-1,2-dihydro-3*H*-benz[e]indol} (*rac*-(1*S*,10*S*)-**82**)



Der Iodaromat **104** (2.29 g, 4.23 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Toluol (125 mL) gelöst und die Lösung gründlich durch Einleiten eines lebhaften Argon-Gasstroms entgast. Dann versetzte man mit Tris-(trimethylsilyl)-silan (1.43 mL, 4.63 mmol, 1.1 Äq.) sowie AIBN (173 mg, 1.05 mmol, 0.25 Äq.), erwärmte das Gemisch mittels eines vorgeheizten Ölbades auf 80 °C und rührte bei dieser Temperatur für 4 h. Man ließ auf Raumtemperatur abkühlen und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Waschen des öligen braunen Rohprodukts mit *n*-Pentan sowie Kristallisation aus EtOAc / *n*-Pentan lieferte einen hellbraunen Feststoff, der durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient: PE / EtOAc = 10:1 → 8:1) gereinigt wurde. Man erhielt ein Gemisch aus dem *syn*-Diastereomer *rac*-(1*S*,10*S*)-**82** und dem dehalogenierten Cyclisierungsprodukt als hellgelben Feststoff (853 mg, 1.84 mmol, 44%) und das gewünschte *anti*-Diastereomer *rac*-(1*S*,10*R*)-**82** als weißen Feststoff (902 mg, 1.95 mmol, 46%).

Analytische Daten für *rac*-(1*S*,10*R*)-**82**:

$R_f = 0.28$ (PE / EtOAc = 5:1).

Analytische Daten für *rac*-(1*S*,10*S*)-**82**:

$R_f = 0.52$ (PE / EtOAc = 5:1).

$C_{27}H_{27}ClN_2O_3$ (462.97).

ber.: 485.1602 [M+Na]⁺

gef.: 485.1589 (ESI-HRMS).

5.11 Trennung der Enantiomere von *rac*-{(1*S*,10*R*)-5-Benzoyloxy-3-(*tert*-butyloxycarbonyl)-1-(10-chlor-ethyl)-7-cyano-1,2-dihydro-3*H*-benz[*e*]indol} (*rac*-(1*S*,10*R*)-**82**)

rac-(1*S*,10*R*)-**82** (900 mg, 1.95 mmol) wurde in einem Gemisch aus *n*-Hexan / CH₂Cl₂ = 1:1 (20 mL) gelöst. Je 0.8 mL dieser Probelösung (entsprechend 36 mg bzw. 778 μmol des racemischen Gemisches) wurden in das präparative HPLC-System (Säule: Chiralpak IA, 250 × 20 mm, Partikelgröße: 5 μm, mobile Phase: *n*-Heptan / CH₂Cl₂ = 4:1, Fluss: 18 mL min⁻¹, Druck: 7.4 MPa) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats (UV-Detektor: λ = 250 nm) lieferte die Enantiomere (+)-**82** und (-)-**82**.

Analytische Daten für (+)-(1*R*,10*S*)-**82**:

HPLC (präparativ):	t_R :	8.2 min
	Fraktion:	7.7–9.5 min
HPLC (analytisch):	Säule:	Chiralcel OD
	Eluens:	<i>n</i> -Hexan / <i>i</i> -PrOH = 98:2
	Fluss:	0.8 mL min ⁻¹
	t_R :	37.6 min, 99.9% <i>ee</i> .

$[\alpha]_D^{20} = +21.6^\circ$ (c = 0.5, CHCl₃).

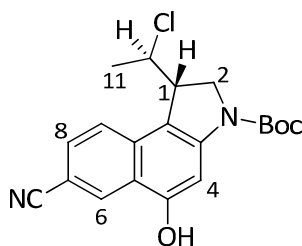
Analytische Daten für (-)-(1*S*,10*R*)-**82**:

HPLC (präparativ):	t_R :	10.8 min
	Fraktion:	10.2–14.0 min
HPLC (analytisch):	Säule:	Chiralcel OD
	Eluens:	<i>n</i> -Hexan / <i>i</i> -PrOH = 98:2

Fluss: 0.8 mL min⁻¹
 t_R: 33.9 min, 98.7% ee.

[α]_D²⁰ = -24.0 ° (c = 0.5, CHCl₃).

5.12 (+)-{(1*S*,10*R*)-3-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-1-(10-chlor-ethyl)-7-cyano-5-hydroxy-1,2-dihydro-3*H*-benz[*e*]indol} ((+)-(1*S*,10*R*)-149)



Benzylether (+)-**82** (700 mg, 1.51 mmol, 1.0 Äq.) wurde in frisch destilliertem THF (50 mL) gelöst und die Lösung wurde auf 40 °C erwärmt. Dann wurde Palladium auf Aktivkohle (10%ig, 162 mg, 151 μmol, 0.1 Äq. bez. Pd) zugegeben und nach kurzem Rühren wurde eine 25%ige Lösung von Ammoniumformiat in H₂O (1.60 mL) langsam zugetropft. Nach 120 min Rühren bei 40 °C (DC-Kontrolle!) wurde über eine Celite-Schicht vom Feststoff abfiltriert, wobei gründlich mit Aceton (1000 mL) nachgespült wurde. Das Filtrat wurde im Vakuum konzentriert, säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE / EtOAc = 5:1) und man erhielt (+)-**149** als weißen Feststoff (477 mg, 1.28 mmol, 85%).

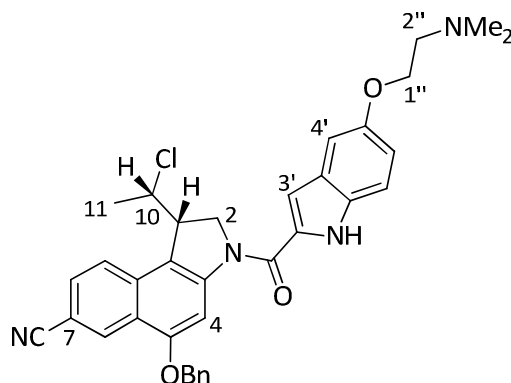
R_f = 0.50 (PE / EtOAc = 2:1).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.54 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.57 (d, J = 6.7 Hz, 3 H, 11-H₃), 4.00–4.16 (m, 3 H, 1-H, 2-H₂), 4.66–4.79 (m_c, 1 H, 10-H), 7.66 (m_c, 2 H, 4-H, 8-H), 7.95 (d, J = 8.8 Hz, 1 H, 9-H), 8.47 (d, J = 1.7 Hz, 1 H, 6-H), 10.89 (s_{br}, 1 H, OH) ppm.

C₂₀H₂₁ClN₂O₃ (372.85).

6 Synthese der *anti*-Methyl-CBI-Derivate mit DMAI-Seitenkette

6.1 *rac*-{(1*S*,10*S*)-5-Benzyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-7-cyano-3-[(5-(2-(*N,N'*-dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3*H*-benz[*e*]indol} (*rac*-(1*S*,10*S*)-88)



rac-(1*S*,10*S*)-**82** (200 mg, 431 μmol , 1.0 Äq.) wurde in 4 M HCl / EtOAc (15 mL) suspendiert und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend engte man die Lösung im Vakuum ein und trocknete 1.5 h im Vakuum. Der grüne Rückstand wurde in DMF (11 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit EDAC·HCl (248 mg, 1.30 mmol, 3.0 Äq.) sowie DMAI-CO₂H·HCl (**104**) (160 mg, 561 μmol , 1.3 Äq.) versetzt. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (70 mL), H₂O (70 mL) sowie gesättigter NaHCO₃-Lösung (70 mL) versetzt und anschließend mit EtOAc (4 × 70 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (4 × 130 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂ / MeOH 10:1) erhielt man die Zielverbindung *rac*-(1*S*,10*S*)-**82** als gelben Feststoff (169 mg, 285 μmol , 66%).

$R_f = 0.53$ (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.14$ (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 11-H₃), 2.36 (s, 6 H, NMe₂), 2.77 (t, $J = 5.7$ Hz, 2 H, 2''-H₂), 4.04–4.16 (m, 3 H, 1-H, 2''-H₂), 4.55–4.72 (m, 2 H, 2-H_a, 10-H), 4.92 (dd, $J = 11.3, 1.9$ Hz, 1 H, 2-H_b), 5.17–5.37 (m, 2 H, OCH₂Ph), 6.92–7.18 (m, 3 H, 3'-H, 4'-H, 6'-H), 7.27–7.53 (m, 6 H, 7'-H, 5 × Ph-H), 7.61 (dd, $J = 8.6, 1.7$ Hz, 1 H,

8-H), 7.75 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, 9-H), 8.29 (s, 1 H, 4-H), 8.66 (d, $J = 1.5$ Hz, 1 H, 6-H), 9.50 (s_{br}, 1 H, NH) ppm.

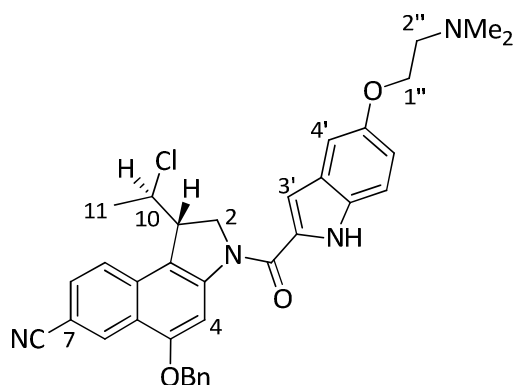
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 18.0$ (C-11), 45.9 (NMe₂), 47.1 (C-1), 52.4 (C-2), 57.5 (C-2''), 58.4 (C-10), 66.6 (C-1''), 70.8 (OCH₂Ph), 99.7 (C-4), 103.6 (C-4'), 106.7, 106.9 (C-7, C-3'), 112.7 (C-7'), 116.3, 118.0 (C-5a, C-6'), 119.4, 122.5 (C-9b, CN), 123.4 (C-9), 127.7, 127.8, 128.2, 128.4, 128.7 (C-8, C-3a, 2 × Ph-C_o, 2 × Ph-C_m, Ph-C_p), 130.2, 130.2, 131.2, 131.5 (C-6, C-9a, C-2', C-7a'), 135.8 (Ph-C_i), 145.7 (C-3a), 154.1 (C-5'), 156.1 (C-5), 160.6 (C=O) ppm.

C₃₅H₃₃ClN₄O₃ (593.11).

ber.: 593.2314 [M+H]⁺

gef.: 593.2317 (ESI-HRMS).

6.2 (+)-{(1*S*,10*R*)-5-Benzyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-7-cyano-3-[(5-(2-(*N,N'*-dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3*H*-benz[e]indol} ((+)-(1*S*,10*R*)-88)



(+)-(1*S*,10*R*)-**82** (400 mg, 862 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in 4 M HCl / EtOAc (30 mL) suspendiert und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend engte man die Lösung im Vakuum ein und trocknete 1.5 h im Vakuum. Der grüne Rückstand wurde in DMF (25 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit EDAC·HCl (496 mg, 2.60 mmol, 3.0 Äq.) sowie DMAI-CO₂H·HCl (**104**) (320 mg, 1.02 mmol, 1.3 Äq.) versetzt. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (140 mL), H₂O (140 mL) sowie gesättigter NaHCO₃-Lösung (140 mL) versetzt und anschließend mit EtOAc (4 × 140 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter

NaCl-Lösung (4 × 250 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂ / MeOH 10:1) erhielt man die Zielverbindung (+)-(1*S*,10*R*)-**88** als gelben Feststoff (317 mg, 534 μmol, 62%).

$R_f = 0.63$ (CH₂Cl₂/MeOH = 5:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.63$ (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H, 11-H₃), 2.37 (s, 6 H, NMe₂), 2.77 (t, $J = 5.8$ Hz, 2 H, 2''-H₂), 3.98 (dd, $J = 6.9, 3.8$ Hz, 1 H, 1-H), 4.11 (t, $J = 5.8$ Hz, 2 H, 1''-H), 4.45–4.67 (m, 2 H, 2-H_a, 10-H), 4.85 (dd, $J = 10.8, 2.1$ Hz, 1 H, 2-H_b), 5.27 (q, $J = 11.3$ Hz, 2 H, OCH₂Ph), 6.99–7.08 (m, 2 H, 3'-H, 6'-H), 7.12 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, 4'-H), 7.29–7.53 (m, 6 H, 7'-H, 5 × Ph-H), 7.61 (dd, $J = 8.7, 1.7$ Hz, 1 H, 8-H), 7.72 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, 9-H), 8.24 (s, 1 H, 4-H), 8.67 (d, $J = 1.6$ Hz, 1 H, 6-H), 9.47 (s_{br}, 1 H, NH) ppm.

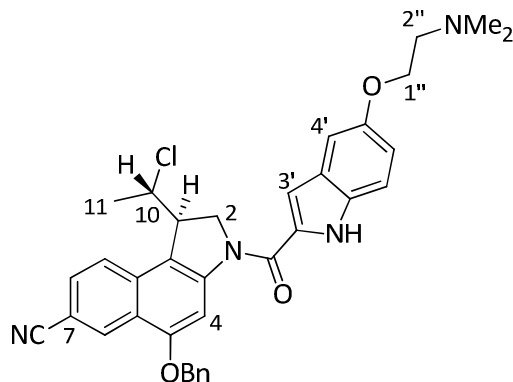
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 23.8$ (C-11), 45.9 (NMe₂), 47.2 (C-1), 53.4 (C-2), 58.4 (C-2''), 59.5 (C-10), 66.6 (C-1''), 70.8 (OCH₂Ph), 99.6 (C-4), 103.6 (C-4'), 106.3, 106.6 (C-7, C-3'), 112.7 (C-7'), 117.0, 117.7 (C-5a, C-6'), 119.6, 122.6 (C-9b, CN), 123.5 (C-9), 127.7, 128.1, 128.2, 128.4, 128.7 (C-8, C-3a, 2 × Ph-C_o, 2 × Ph-C_m, Ph-C_p), 130.2, 130.3, 131.4, 131.5 (C-6, C-9a, C-2', C-7a'), 135.9 (Ph-C_i), 145.7 (C-3a), 154.0 (C-5'), 155.9 (C-5), 160.7 (C=O) ppm.

C₃₅H₃₃ClN₄O₃ (593.11).

ber.: 593.2314 [M+H]⁺

gef.: 593.2320 (ESI-HRMS).

6.3 (–)-{(1*R*,10*S*)-5-Benzoyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-7-cyano-3-[(5-(2-(*N,N'*-dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3*H*-benz[*e*]indol} ((–)-(1*R*,10*S*)-88**)**



(–)-(1*R*,10*S*)-**82** (200 mg, 431 μmol , 1.0 Äq.) wurde in 4 M HCl / EtOAc (15 mL) suspendiert und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend engte man die Lösung im Vakuum ein und trocknete 1.5 h im Vakuum. Der grüne Rückstand wurde in DMF (11 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit EDAC·HCl (248 mg, 1.30 mmol, 3.0 Äq.) sowie DMAI-CO₂H·HCl (**104**) (160 mg, 561 μmol , 1.3 Äq.) versetzt. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (70 mL), H₂O (70 mL) sowie gesättigter NaHCO₃-Lösung (70 mL) versetzt und anschließend mit EtOAc (4 × 70 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (4 × 130 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂ / MeOH 10:1) erhielt man die Zielverbindung (–)-(1*R*,10*S*)-**88** als gelben Feststoff (120 mg, 202 μmol , 47%).

$R_f = 0.67$ (CH₂Cl₂/MeOH = 5:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.64$ (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H, 11-H₃), 2.37 (s, 6 H, NMe₂), 2.78 (t, $J = 5.8$ Hz, 2 H, 2''-H₂), 3.95–4.04 (m, 1 H, 1-H), 4.12 (t, $J = 5.8$ Hz, 2 H, 1''-H), 4.43–4.72 (m, 2 H, 2-H_a, 10-H), 4.86 (d, $J = 10.7$ Hz, 1 H, 2-H_b), 5.27 (q, $J = 11.3$ Hz, 2 H, OCH₂Ph), 6.99–7.10 (m, 2 H, 3'-H, 6'-H), 7.14 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H, 4'-H), 7.31–7.56 (m, 6 H, 7'-H, 5 × Ph-H), 7.62 (dd, $J = 8.7, 1.7$ Hz, 1 H, 8-H), 7.73 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, 9-H), 8.27 (s, 1 H, 4-H), 8.69 (d, $J = 1.6$ Hz, 1 H, 6-H), 9.61 (s_{br}, 1 H, NH) ppm.

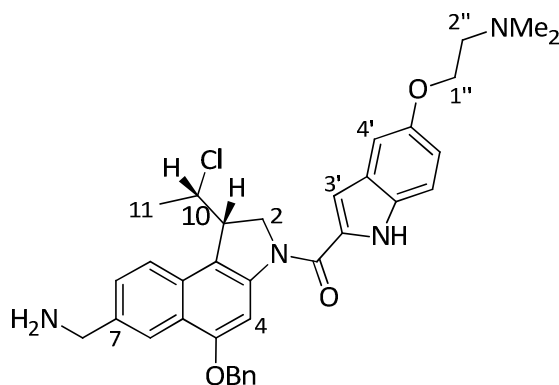
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = 23.8 (C-11), 45.9 (NMe_2), 47.2 (C-1), 53.4 (C-2), 58.4 (C-2''), 59.5 (C-10), 66.6 (C-1''), 70.8 (OCH_2Ph), 99.6 (C-4), 103.6 (C-4'), 106.3, 106.6 (C-7, C-3'), 112.7 (C-7'), 117.0, 117.7 (C-5a, C-6'), 119.6, 122.6 (C-9b, CN), 123.5 (C-9), 127.7, 128.1, 128.2, 128.4, 128.7 (C-8, C-3a, 2 \times Ph-C_o, 2 \times Ph-C_m, Ph-C_p), 130.2, 130.3, 131.4, 131.5 (C-6, C-9a, C-2', C-7a'), 135.9 (Ph-C_i), 145.7 (C-3a), 154.0 (C-5'), 155.9 (C-5), 160.7 (C=O) ppm.

$\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{ClN}_4\text{O}_3$ (593.11).

ber.: 593.2314 $[\text{M}+\text{H}]^+$

gef.: 593.2310 (ESI-HRMS).

6.4 *rac*-{(1*S*,10*S*)-7-Aminomethyl-5-benzyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2-(*N,N'*-dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3*H*-benz[e]indol} (*rac*-(1*S*,10*S*)-81)



Eine Lösung des Nitrils *rac*-(1*S*,10*S*)-**88** (140 mg, 236 μmol , 1.0 Äq.) in einem Lösungsmittelgemisch aus absolutem THF (5 mL) und absolutem Ethanol (10 mL) wurde entgast und 1.25 M Lösung von HCl in Ethanol¹⁶⁵ (378 μL , 472 μmol , 2.0 Äq.) sowie H_2O (2.5 mL) zugetropft und $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (11.8 mg, 47.2 μmol , 0.20 Äq.) zugegeben. Man leitete kurz einen H_2 -Gasstrom durch die Reaktionsmischung und rührte dann für 8 h bei Raumtemperatur unter einer H_2 -Atmosphäre. Danach filtrierte man über eine Celite-Schicht vom Feststoff ab, spülte gründlich mit MeOH (200 mL) nach und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH} = 5:1$) erhielt man die Zielverbindung *rac*-(1*S*,10*S*)-**81** als hell gelben Feststoff (76 mg, 127 μmol , 54%).

$R_f = 0.21$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 5:1$).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 1.08$ (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 11- H_3), 2.24 (s, 6 H, NMe_2), 2.77 (t, $J = 5.8$ Hz, 2 H, 2''- H_2), 3.95 (s, 2 H, 12- H_2), 4.04–4.09, 4.29–4.35, 4.63–4.68, 4.75–4.85 (4 \times m, 6 H, 1-H, 2- H_2 , 10-H, 1''- H_2), 5.32 (q, $J = 11.8$ Hz, 2 H, OCH_2Ph), 6.93 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1 H, 6'-H), 7.10 (d, $J = 4.4$ Hz, 1 H, 3'-H), 7.20 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, 4'-H), 7.32–7.46 (m, 6 H, 7'-H, 5 \times Ph-H), 7.57 (d, $J = 7.4$ Hz, 1 H, 8-H), 7.63 (dd, $J = 8.6, 1.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.90 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, 9-H), 8.18 (s, 1 H, 4-H), 11.65 (s, 1 H, NH) ppm.

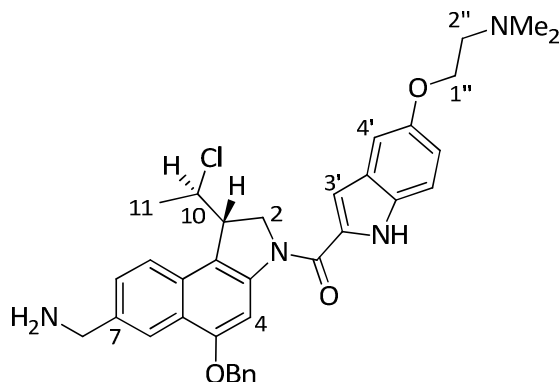
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 18.3$ (C-11), 45.5 (C-12), 45.5 (NMe_2), 46.1 (C-1), 52.6 (C-2), 57.8 (C-2''), 59.0 (C-10), 66.2 (C-1''), 69.7 (OCH_2Ph), 98.5 (C-4), 103.2 (C-4'), 105.3 (C-3'), 113.1 (C-7'), 115.9, 116.5 (C-5a, C-6'), 120.7, 122.5, 123.3, 123.4 (C-7, C-8, C-9, C-9b), 127.8, 128.1, 128.4, 130.7, 136.7 (C-6, C-9a, C-2', C-3a', C-7a'), 141.9 (C-3a), 153.0 (C-5'), 154.4 (C-5), 160.1 (C=O) ppm.

$\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{ClN}_4\text{O}_3$ (598.15).

ber.: 597.2627 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

gef.: 597.2627 (ESI-HRMS).

6.5 **{{(1S,10R)-7-Aminomethyl-5-benzyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2-(N,N'-dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3H-benz[e]indol} ((1S,10R)-81)**



Eine Lösung des Nitrils (+)-(1S,10R)-**88** (175 mg, 295 μmol , 1.0 Äq.) in einem Lösungsmittelgemisch aus absolutem THF (6 mL) und absolutem Ethanol (12 mL) wurde entgast und 1.25 M Lösung von HCl in Ethanol¹⁶⁵ (476 μL , 594 μmol , 2.0 Äq.)

sowie H₂O (3.0 mL) zugetropft und PtO₂·H₂O (14.9 mg, 59.4 μmol, 0.20 Äq.) zugegeben. Man leitete kurz einen H₂-Gasstrom durch die Reaktionsmischung und rührte dann für 8 h bei Raumtemperatur unter einer H₂-Atmosphäre. Danach filtrierte man über eine Celite-Schicht vom Feststoff ab, spülte gründlich mit MeOH (300 mL) nach und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂ / MeOH = 5:1) erhielt man die Zielverbindung (1*S*,10*R*)-**81** als hell gelben Feststoff (87.2 mg, 146 μmol, 50%).

$R_f = 0.14$ (CH₂Cl₂/MeOH = 5:1).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 1.65$ (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 11-H₃), 2.24 (s, 6 H, NMe₂), 2.66 (t, $J = 5.8$ Hz, 2 H, 2''-H₂), 4.01 (s, 2 H, 12-H₂), 4.04–4.09, 4.20–4.30, 4.55–4.84, (3 × m, 6 H, 1-H, 2-H₂, 10-H, 1''-H₂), 5.32 (q, $J = 12.0$ Hz, 2 H, OCH₂Ph), 6.92 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1 H, 6'-H), 7.12–7.19 (m, 2 H, 3'-H, 4'-H), 7.30–7.47 (m, 6 H, 7'-H, 5 × Ph-H), 7.58 (d, $J = 7.4$ Hz, 1 H, 8-H), 7.65 (dd, $J = 8.6, 1.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.97 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H, 9-H), 8.21 (s, 1 H, 4-H), 11.61 (s, 1 H, NH) ppm.

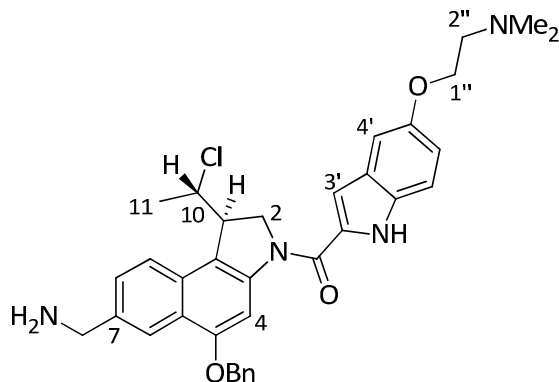
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 23.3$ (C-11), 45.5 (C-12), 45.9 (NMe₂), 46.1 (C-1), 51.9 (C-2), 57.8 (C-2''), 61.4 (C-10), 66.2 (C-1''), 69.6 (OCH₂Ph), 98.6 (C-4), 103.2 (C-4'), 105.4 (C-3'), 113.1 (C-7'), 115.8, 117.6 (C-5a, C-6'), 121.4, 122.4, 123.2, 127.3 (C-7, C-8, C-9, C-9b), 127.9, 128.4, 128.4, 131.6, 136.7 (C-6, C-9a, C-2', C-3a', C-7a'), 142.0 (C-3a), 152.9 (C-5'), 154.1 (C-5), 160.0 (C=O) ppm.

C₃₅H₃₇ClN₄O₃ (598.15).

ber.: 597.2625 [M+H]⁺

gef.: 597.2627 (ESI-HRMS).

6.6 **{(1*R*,10*S*)-7-Aminomethyl-5-benzyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2-(*N,N'*-dimethylamino)-ethoxy)-indol-2-yl)carbonyl]-1,2-dihydro-3*H*-benz[*e*]indol} ((1*R*,10*S*)-**81**)**



Eine Lösung des Nitrils (–)-(1*S*,10*R*)-**88** (110 mg, 185 μ mol, 1.0 Äq.) in einem Lösungsmittelgemisch aus absolutem THF (4 mL) und absolutem Ethanol (8 mL) wurde entgast und 1.25 M Lösung von HCl in Ethanol¹⁶⁵ (299 μ L, 371 μ mol, 2.0 Äq.) sowie H₂O (1.9 mL) zugetropft und PtO₂·H₂O (9.3 mg, 37.1 μ mol, 0.20 Äq.) zugegeben. Man leitete kurz einen H₂-Gasstrom durch die Reaktionsmischung und rührte dann für 8 h bei Raumtemperatur unter einer H₂-Atmosphäre. Danach filtrierte man über eine Celite-Schicht vom Feststoff ab, spülte gründlich mit MeOH (250 mL) nach und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂ / MeOH = 5:1) erhielt man die Zielverbindung (1*S*,10*R*)-**81** als hell gelben Feststoff (58 mg, 97 μ mol, 52%).

R_f = 0.14 (CH₂Cl₂/MeOH = 5:1).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.65 (d, J = 6.6 Hz, 3 H, 11-H₃), 2.25 (s, 6 H, NMe₂), 2.67 (t, J = 5.8 Hz, 2 H, 2''-H₂), 4.02–4.12, 4.20–4.32, 4.56–4.85, (3 \times m, 8 H, 12-H₂, 1-H, 2-H₂, 10-H, 1''-H₂), 5.27–5.38 (m, 2 H, OCH₂Ph), 6.93 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1 H, 6'-H), 7.13–7.19 (m, 2 H, 3'-H, 4'-H), 7.34–7.48 (m, 6 H, 7'-H, 5 \times Ph-H), 7.59 (d, J = 7.5, Hz, 1 H, 8-H), 7.65 (d, J = 8.8 Hz, 1 H, 6-H), 8.01 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, 9-H), 8.25 (s, 1 H, 4-H), 11.59 (s, 1 H, NH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 23.2 (C-11), 45.5 (C-12), 45.9 (NMe₂), 46.1 (C-1), 52.0 (C-2), 57.8 (C-2''), 61.4 (C-10), 66.2 (C-1''), 69.7 (OCH₂Ph), 98.9 (C-4), 103.4 (C-4'),

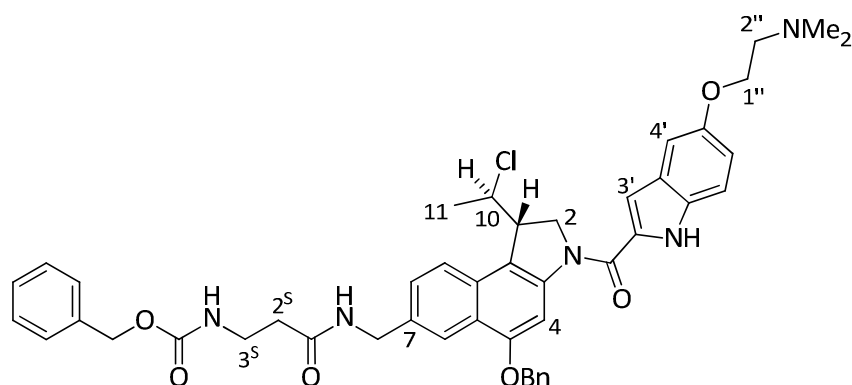
105.4 (C-3'), 113.2 (C-7'), 115.9, 117.7 (C-5a, C-6'), 121.4, 122.4, 123.2, 127.3 (C-7, C-8, C-9, C-9b), 127.6, 128.4, 128.6, 131.7, 136.7 (C-6, C-9a, C-2', C-3a', C-7a'), 142.0 (C-3a), 153.0 (C-5'), 154.4 (C-5), 160.2 (C=O) ppm.

$C_{35}H_{37}ClN_4O_3$ (598.15).

ber.: 597.2606 [M+H]⁺

gef.: 597.2627 (ESI-HRMS).

6.7 **{(1S,10R)-2-({5-Benzoyloxy-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2-N,N'-dimethylamino)-ethoxy)-1H-indol-2-yl]carbonyl]-1,2-dihydro-3H-benz[e]indol-7-ylmethyl}-carbamoyl)-ethyl}-carbaminsäurebenzylester ((1S,10R)-90)**



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung des Amins (1S,10R)-**81** (20.0 mg, 33.5 μ mol, 1.0 Äq.) in absolutem DMF (4.0 mL) wurde *i*Pr₂Net (17 μ L, 101 μ mol, 3.0 Äq.), PyBOP (19.2 mg, 37 μ mol, 1.1 Äq.) und Cbz-geschütztes β -Alanin (**105**) (8.2 mg, 37 μ mol, 1.1 Äq.) gegeben, 30 min bei 0 °C und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und nach Säulenchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂ / MeOH = 7:1) erhielt man die Zielverbindung (1S,10R)-**90** als hell gelben Feststoff (22.1 mg, 27.6 μ mol, 82%).

R_f = 0.60 (CH₂Cl₂/MeOH = 5:1).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.64 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, 11-H₃), 2.25 (s, 6 H, NMe₂), 2.37 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H, 2S-H₂), 2.65–2.70 (m, 2 H, 2''-H₂), 3.22–3.35 (m, 2 H, 3S-H₂), 4.07 (t, *J* = 5.9 Hz, 2 H, 1''-H₂), 4.22 (d, *J* = 9.4 Hz, 1 H, 1-H), 4.37–4.46 (m, 2 H, 12-H₂),

injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefrier-trocknung lieferte die Zielverbindung (1*S*,10*R*)-**106** als blassgelben Feststoff (8.2 mg, 14.2 μmol , 57%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0	70/30
	0–20	70/30 → 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 → 70/30
	26–30	70/30

Fluss: 0.8 mL min⁻¹ t_R : 10.9 min**HPLC (präparativ):**

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0–1	70/30
	1–20	70/30 → 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 → 70/30
	26–30	70/30

Fluss: 18 mL min⁻¹

t_R : 8.0 min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.62 (d, J = 6.6 Hz, 3 H, 11-H₃), 2.57 (t, J = 6.8 Hz, 2 H, 2S-H₂), 2.83 (s, 6 H, NMe₂), 3.04 (t, J = 6.8 Hz, 2 H, 3S-H₂), 3.41–3.52 (m, 2 H, 2''-H₂), 4.17 (d, J = 9.3 Hz, 1 H, 1-H), 4.34 (t, J = 4.9 Hz, 2 H, 1''-H₂), 4.39–4.50 (m, 2 H, 12-H₂), 4.57 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1 H, 2-H_a), 4.70–4.77 (m, 2 H, 2-H_b, 10-H), 7.00 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1 H, 6'-H), 7.17 (s, 1 H, 3'-H), 7.25 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, 4'-H), 7.40–7.47 (m, 2 H, 8-H, 7'-H), 7.82 (s_{br}, 2H, 3S-NH₂), 7.87 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 1 H, 9-H), 7.97–8.03 (m, 2 H, 4-H, 6-H), 8.69 (s, 1 H, 12-NH), 10.37 (s, 1 H, OH), 11.62 (s, 1 H, NH) ppm.

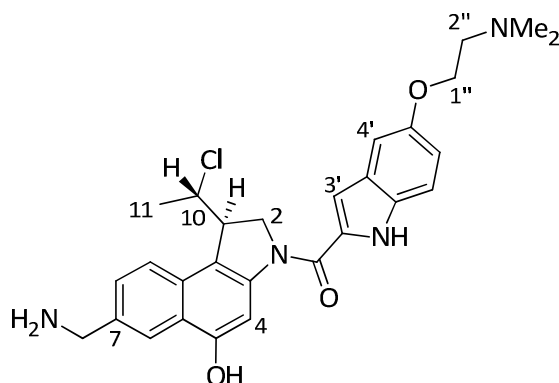
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 23.3 (C-11), 32.0 (C-2S), 35.3 (C-3S), 42.5 (C-12), 43.0 (NMe₂), 45.9 (C-1), 52.1 (C-2), 55.7 (C-2''), 61.5 (C-10), 63.0 (C-1''), 100.5 (C-4), 104.0 (C-4'), 105.2 (C-3'), 113.2 (C-7'), 115.5 (C-6'), 115.8, 121.3 (C-7, C-9b), 123.1 (C-9), 123.7 (C-6), 127.2, 127.4, 128.9, 131.3, 131.8, 133.6 (C-5a, C-8, C-9a, C-2', C-3a', C-7a'), 141.9 (C-3a), 151.9, 153.6 (C-5, C-5'), 159.8 (NC=O), 169.2 (NHC=O) ppm.

C₃₁H₃₆ClN₅O₄ (578.10).

ber.: 578.2529 [M+H]⁺

gef.: 578.2532 (ESI-HRMS).

6.9 {(1*R*,10*S*)-[7-Aminomethyl-1-(1-chlor-ethyl)-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl]-[5-(2-dimethylamino-ethoxy)-1*H*-indol-2-yl]-methanon ((1*R*,10*S*)-87)



Zu einer Lösung des Benzyl-geschützten Naphtols (1*R*,10*S*)-**91** (58.0 mg, 97.1 μmol , 1.0 Äq.) in MeOH/AcOH/H₂O (3:1:1, 40 mL) wird bei Raumtemperatur Pd/C (10%-ig, 20.6 mg, 19.4 μmol , 0.2 Äq.) zugegeben und für 9 h unter H₂-atm gerührt. Es wurde mittels Spritzenfilter vom Pd abgetrennt und mit MeOH (2 \times 5 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in einem 1:2 Gemisch aus H₂O/MeOH (6 mL) aufgenommen und Je 1.0 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1*R*,10*S*)-**87** als blassgelben Feststoff (25.1 mg, 49.5 μmol , 51%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0	70/30
	0–20	70/30 \rightarrow 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 \rightarrow 70/30
	26–30	70/30

Fluss: 0.8 mL min⁻¹ t_R : 9.72 min

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0–1	70/30
	1–20	70/30 → 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 → 70/30
	26–30	70/30

Fluss: 18 mL min⁻¹*t_R*: 7.00 min

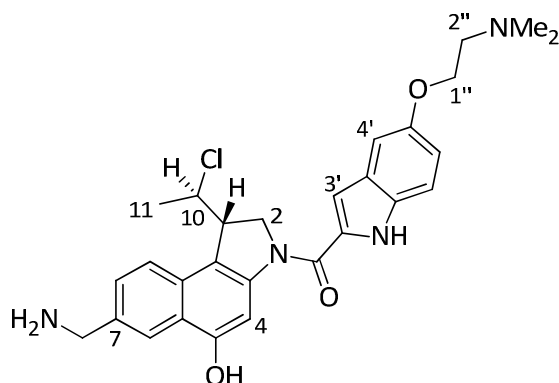
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.63 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, 11-H₃), 2.86 (s, 6 H, NMe₂), 3.52 (t, *J* = 5.0 Hz, 2 H, 2''-H₂), 4.13–4.23 (m, 3 H, 1-H, 12-H₂), 4.38 (t, *J* = 5.0 Hz, 1 H, 1''-H₂), 4.58 (dd, *J* = 10.9, 2.2 Hz, 1 H, 2-H_a), 4.71–4.79 (m, 2 H, 2-H_b, 10-H), 7.01 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1 H, 6'-H), 7.19 (s, 1 H, 3'-H), 7.26 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, 4'-H), 7.45 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, 7'-H), 7.63 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1 H, 8-H), 7.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, 9-H), 8.01 (s, 1 H, 4-H), 8.23 (s, 1 H, 6-H), 10.55 (s, 1 H, OH), 11.65 (s, 1 H, NH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 23.3 (C-11), 42.5 (C-12), 42.8 (NMe₂), 46.0 (C-1), 52.0 (C-2), 55.4 (C-2''), 61.5 (C-10), 62.9 (C-1''), 100.7 (C-4), 104.0 (C-4'), 105.3 (C-3'), 113.2 (C-7'), 115.6 (C-6'), 115.9, 121.7 (C-7, C-9b), 123.4 (C-9), 123.7 (C-6), 127.4, 127.7, 128.3, 129.5, 131.2, 132.0 (C-5a, C-8, C-9a, C-2', C-3a', C-7a'), 142.7 (C-3a), 152.0, 154.0 (C-5, C-5'), 159.9 (C=O) ppm.

C₂₈H₃₁ClN₄O₃ (507.02).ber.: 507.2157[M+H]⁺

gef.: 507.2153 (ESI-HRMS).

6.10 **{{(1*S*,10*R*)-[7-Aminomethyl-1-(1-chlor-ethyl)-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[*e*]indol-3-yl]-[5-(2-dimethylamino-ethoxy)-1*H*-indol-2-yl]-methanon (1*S*,10*R*)-87**



Zu einer Lösung des Benzyl-geschützten Naphtols (1*S*,10*R*)-**91** (20.0 mg, 33.5 μmol , 1.0 Äq.) in MeOH/AcOH/H₂O (3:1:1, 15 mL) wird bei Raumtemperatur Pd/C (10%-ig, 7.1 mg, 6.7 μmol , 0.2 Äq.) zugegeben und für 6 h unter H₂-atm gerührt. Es wurde mittels Spritzenfilter vom Pd abgetrennt und mit MeOH (2 \times 5 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in einem 1:2 Gemisch aus H₂O/MeOH (7.5 mL) aufgenommen und je 1.5 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1*S*,10*R*)-**87** als blassgelben Feststoff (11.4 mg, 22.5 μmol , 67%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0	70/30
	0–20	70/30 \rightarrow 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 \rightarrow 70/30

	26–30	70/30
Fluss:	0.8 mL min ⁻¹	
<i>t_R</i> :	9.40 min	

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0–1	70/30
	1–20	70/30 → 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 → 70/30
	26–30	70/30

Fluss: 18 mL min⁻¹*t_R*: 7.10 min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.63 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, 11-H₃), 2.84 (s, 6 H, NMe₂), 3.47–3.51 (m, 2 H, 2''-H₂), 4.14–4.23 (m, 3 H, 1-H, 12-H₂), 4.35–4.40 (m, 1 H, 1''-H₂), 4.58 (dd, *J* = 10.9, 2.0 Hz, 1 H, 2-H_a), 4.71–4.79 (m, 2 H, 2-H_b, 10-H), 7.01 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1 H, 6'-H), 7.18 (s, 1 H, 3'-H), 7.26 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, 4'-H), 7.45 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, 7'-H), 7.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, 8-H), 7.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, 9-H), 8.01 (s, 1 H, 4-H), 8.23 (s, 1 H, 6-H), 10.55 (s, 1 H, OH), 11.64 (s, 1 H, NH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 23.3 (C-11), 42.5 (C-12), 42.8 (NMe₂), 45.8 (C-1), 52.1 (C-2), 55.5 (C-2''), 61.5 (C-10), 63.0 (C-1''), 100.7 (C-4), 104.0 (C-4'), 105.4 (C-3'), 113.2 (C-7'), 115.6 (C-6'), 115.9, 121.7 (C-7, C-9b), 123.4 (C-9), 123.7 (C-6), 127.4,

127.7, 128.3, 129.5, 131.2, 132.0 (C-5a, C-8, C-9a, C-2', C-3a', C-7a'), 142.7 (C-3a), 152.0, 154.0 (C-5, C-5'), 159.9 (C=O) ppm.

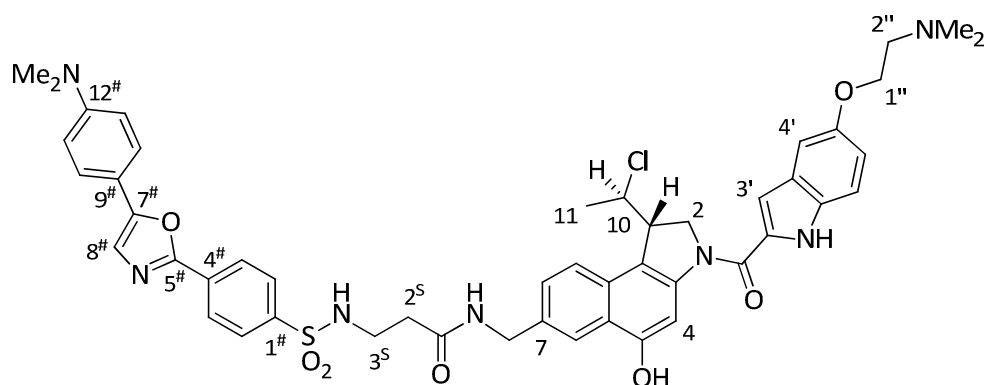
C₂₈H₃₁ClN₄O₃ (507.02).

ber.: 507.2157[M+H]⁺

gef.: 507.2152 (ESI-HRMS).

7 Synthese der fluoreszenzmarkierten *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Derivate (1*S*,10*R*)-**71** und (1*R*,10*S*)-**71**

7.1 3-[4-(5-(4-Dimethylaminophenyl)oxazol-2-yl)benzolsulfonylamino]propionsäure-[(1*S*,10*R*)-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2-(*N,N'*-dimethylamino)ethoxy)indol-2-yl)carbonyl]-5-hydroxy-1,2-dihydro-3*H*-benz[e]indol-7-ylmethyl]amid ((1*S*,10*R*)-**71**)



Zu einer Lösung des NHS-Esters **61** (7.5 mg, 14.6 μmol , 1.0 Äq.) in absolutem DMF (200 μL) wurde eine Lösung des Phenols (1*S*,10*R*)-**87** (9.5 mg, 17.5 μmol , 1.2 Äq.) und *i*-Pr₂NEt (14.0 μL , 98 μmol , 5.8 Äq.) in absolutem DMF (150 μL) getropft. Nach 23 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit bidestilliertem H₂O (0.06% HCl, 3.0 mL) und MeOH (6.0 mL) verdünnt. Je 1.5 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte das Hydroxyderivat (1*S*,10*R*)-**111** (3.6 mg, 4.07 μmol , 28%), sowie eine Mischung der Zielverbindung (1*S*,10*R*)-**71** und des Cl-substituierten Methoxyderivates (1*S*,10*R*)-**110**. Das Gemisch wurde in MeOH (5.0 mL) aufgenommen. Je 1.0 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung als hellgelben Feststoff (1*S*,10*R*)-**71** (4.0 mg, 4.42 μmol , 30%), sowie das Cl-substituierte Methoxyderivat (1*S*,10*R*)-**110** (1.8 mg, 2.00 μmol , 14%).

1. Aufreinigung HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0	50/50
	0–20	50/50 → 0/100
	20–26	0/100
	26–30	0/100 → 50/50

Fluss: 0.8 mL min⁻¹ t_R : 19.1 min **111** 21.3 min. Gemisch aus **110 & 71****1. Aufreinigung HPLC (präparativ):**

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0	50/50
	0–20	50/50 → 25/75
	20–23	25/75 → 0/100
	23–25	0/100 → 50/50
	25–30	50/50

Fluss: 18 mL min⁻¹ t_R : 13.2 min **111** 15.4 min. Gemisch aus **110 & 71**

2. Aufreinigung HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0–30	70/30
	30–31	60/40 → 0/100
	31–35	0/100
	35–36	0/100 → 70/30
	36–40	70/30

Fluss: 0.8 mL min⁻¹ t_R : 24.4 min für **110** 27.5 min. für **71****2. Aufreinigung HPLC (präparativ):**

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0–30	70/30
	30–31	60/40 → 0/100
	31–35	0/100
	35–36	0/100 → 70/30
	36–40	70/30

Fluss: 18 mL min⁻¹ t_R : 20.1 min für **110** 22.7 min. für **71**

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.61 (d, J = 6.3 Hz, 3 H, 11-H₃), 2.37 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, 2S-H₂), 2.88 (d, J = 4.8 Hz, 6 H, 2''-NMe₂), 2.97 (s, 6 H, 12[#]-NMe₂), 3.07 (dd,

Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1*S*,10*R*)-**71** als hellgelben Feststoff (7.9 mg, 8.75 μ mol, 47%).

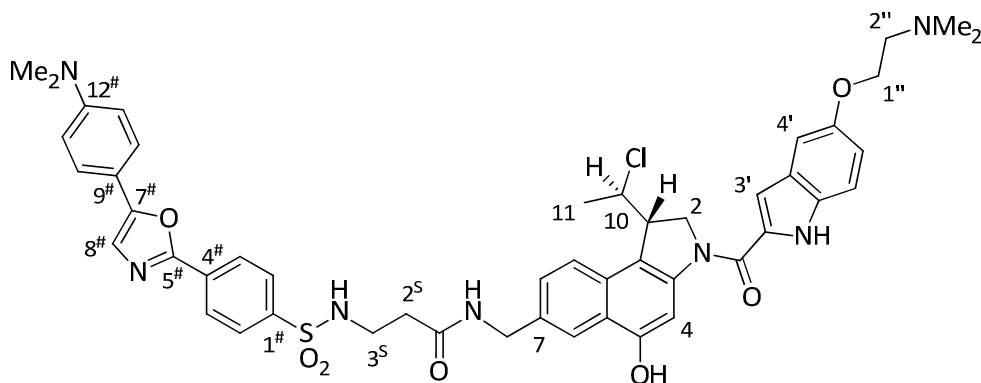
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.61 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, 11-*H*₃), 2.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, 2^{*S*}-*H*₂), 2.88 (d, *J* = 4.8 Hz, 6 H, 2''-NMe₂), 2.97 (d, *J* = 7.5 Hz, 6 H, 12[#]-NMe₂), 3.07 (dd, *J* = 13.4, 7.0 Hz, 2 H, 3^{*S*}-*H*₂), 3.43–3.59 (m, 2 H, 2''-*H*₂), 4.14 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H, 1-*H*), 4.32–4.42 (m, 4 H, 1''-*H*₂, 12-*H*₂), 4.56 (d, *J* = 9.4 Hz, 1 H, 2-*H*_a), 4.67–4.77 (m, 2 H, 2-*H*_b, 10-*H*), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, 2 \times Ar-*H*), 7.00 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1 H, 6'-*H*), 7.16 (s, 1 H, 3'-*H*), 7.26 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, 4'-*H*), 7.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, 8-*H*), 7.44 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, 7'-*H*), 7.63 (s, 1 H, 8[#]-*H*), 7.68 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H, 2 \times Ar-*H*), 7.77–7.85 (m, 2 H, 3^{*S*}-NH, 9-*H*), 7.93–7.99 (m, 4 H, 4-*H*, 6-*H*, 2 \times Ar-*H*), 8.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, 2 \times Ar-*H*), 8.46 (t, *J* = 5.8 Hz, 1 H, 12-NH), 10.25 (*s*_{br}, 1 H, OH), 10.34 (s, 1 H, NH), 11.63 (s, 1 H, 1'-NH) ppm.

C₄₈**H**₅₀**Cl****N**₇**O**₇**S**₆ (904.47).

ber.: 904.3254 [M+H]⁺

gef.: 904.3258 (ESI-HRMS).

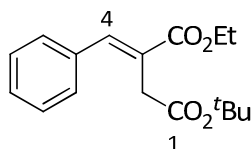
7.3 3-[4-(5-(4-Dimethylaminophenyl)oxazol-2-yl)benzolsulfonylamino]-propionsäure-[(1*S*,10*R*)-1-(10-chlor-ethyl)-3-[(5-(2-(*N,N'*-dimethylamino)ethoxy)indol-2-yl)carbonyl]-5-hydroxy-1,2-dihydro-3*H*-benz[e]indol-7-ylmethyl)amid ((1*S*,10*R*)-**71**)



Zu einer Suspension des Sulfonylchlorids **89** (2.73 mg, 7.52 μmol , 1.0 Äq.) in absolutem DMF (200 μL) wurde eine Lösung des Amins (1*S*,10*R*)-**106** (4.4 mg, 6.77 μmol , 1.0 Äq.) und *i*Pr₂NEt (5.8 μL , 33.9 μmol , 4.5 Äq.) in absolutem DMF (150 μL) getropft. Nach 23 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit bidestilliertem H₂O (0.06% HCl, 0.5 mL) und MeOH (1.5 mL) verdünnt. Je 0.5 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1*S*,10*R*)-**71** als hellgelben Feststoff (2.3 mg, 2.6 μmol , 34%), sowie das Chlorubstituierte Derivat (1*S*,10*R*)-**111** als hellgelben Feststoff (1.2 mg, 1.35 μmol , 18%).

8 Synthese des *seco*-CBI-Grundgerüsts (1S)-128

8.1 *tert*-Butyl-(*E*)-3-(ethoxycarbonyl)-4-phenyl-3-butenolat (121)



Zu einer Suspension aus NaH (8.0 g, 199 mmol, 1.1 Äq. als 60%ige Suspension in Mineralöl) in absolutem THF (240 mL) wurde bei 0 °C das Phosphonat **120** (60.0 g, 177 mmol, 1.0 Äq.) langsam zugetropft und für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und via Transferkanüle zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von frisch destilliertem Benzaldehyd (**97**) (20.8 g, 177 mmol, 1.1 Äq.) in absolutem THF (160 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 17 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der orange Rückstand in CH₂Cl₂ (250 mL) aufgenommen. Man wusch mit H₂O (4 × 200 mL), trocknete über MgSO₄ und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Die Zielverbindung **121** wurde als gelbliches Öl (55.2 g, 190 mmol, 97%) erhalten, welche ohne weitere Aufreinigung später eingesetzt wurde.

$R_f = 0.57$ (PE / EtOAc = 10:1).

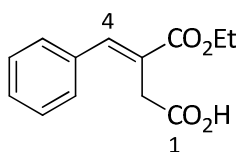
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.32$ (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 1.44 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.43 (s, 2 H, 2-H₂), 4.26 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 7.24–7.40 (m, 5 H, 5 × Ph-H), 7.83 (s, 1 H, 4-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 14.23$ (OCH₂CH₃), 27.98 (C(CH₃)₃), 34.83 (C-2), 60.99 (OCH₂CH₃), 80.91 (C(CH₃)₃), 126.9 (C-3), 128.5, 128.5, 128.7, 129.0, 129.0 (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), 135.2 (C-1'), 141.1 (C-4), 167.5 (CO₂Et), 170.2 (C-1) ppm.

C₁₇H₂₂O₄ (290.35).

ber.: 313.1410 [M+Na]⁺

gef.: 313.1412 (ESI-HRMS).

8.2 (E)-3-Ethoxycarbonyl-4-phenyl-3-butencarbonsäure (96)

Eine Lösung des ^tBu-Esters **121** (62.7 g, 216 mmol) in TFA / H₂O = 9:1 (300 mL) wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zur azeotropen Entfernung von TFA zweimal in Toluol (jeweils 100 mL) aufgenommen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach vorsichtiger Zugabe einer gesättigten NaHCO₃-Lösung (200 mL) versetzte man bis pH ≈ 1 mit 2 N HCl (150 mL) und extrahierte die Lösung mit EtOAc (4 × 125 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung (150 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt die Zielverbindung **96** als gelbes Öl (55.8 g, 238 mmol), welches ohne weitere Aufreinigung später eingesetzt wurde.

R_f = 0.55 (PE / EtOAc = 3:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.33 (t, J = 7.2 Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 3.57 (s, 2 H, 2-H₂), 4.29 (q, J = 7.2 Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 7.30–7.45 (m, 5 H, 5 × Ph-H), 7.91 (s, 1 H, 4-H), 10.70 (s_{br}, 1 H, CO₂H) ppm.

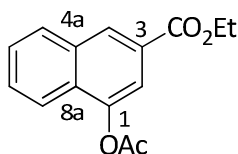
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 14.14 (OCH₂CH₃), 33.58 (C-2), 61.35 (OCH₂CH₃), 125.5 (C-3), 128.7 (C-2', C-6'), 128.8, 128.9 (C-3', C-4', C-5'), 134.8 (C-1'), 142.3 (C-4), 167.4 (CO₂Et), 177.2 (C-1) ppm.

C₁₃H₁₄O₄ (234.25).

ber.: 257.0784 [M+Na]⁺

gef.: 257.0787 (ESI-HRMS).

8.3 Ethyl-1-acetoxy-3-naphthalincarboxylat (**122**)



Zu einer Lösung aus der Carbonsäure **96** (76.0 g, 324 mmol, 1.0 Äq.) in Essigsäureanhydrid (1.7 L) wurde Kaliumacetat (47.7 g, 486 mmol, 1.5 Äq.) gegeben und für 2.5 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurden 1.2 L des Lösungsmittels im Vakuum entfernt und das Reaktionsgemisch auf Eiswasser (2.0 L) gegeben. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeeengt und mit 2 N NaOH auf pH \approx 7 eingestellt. Es wurde mit EtOAc (4 \times 300 mL) extrahiert, die vereinigte organische Phase mit gesättigter NaCl-Lösung (1 L) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Man entfernte das Lösungsmittel im Vakuum und erhielt die Zielverbindung **122** als schwarzes Öl (64.0 g, 248 mmol), das ohne weitere Aufreinigung später eingesetzt wurde.

R_f = 0.35 (PE / EtOAc = 5:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.42 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, OCH₂CH₃), 2.46 (s, 3 H, COCH₃), 4.42 (q, J = 7.1 Hz, 2 H, OCH₂CH₃), 7.57 (m_c, 2 H, 6-H, 7-H), 7.82 (d, J = 1.6 Hz, 1 H, 2-H), 7.84–7.88 (m, 1 H, 5-H), 7.94–7.99 (m, 1 H, 8-H), 8.50 (s, 1 H, 4-H) ppm.

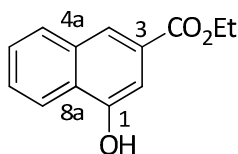
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 14.31 (OCH₂CH₃), 20.87 (COCH₃), 61.26 (OCH₂CH₃), 117.6 (C-2), 121.2 (C-8), 127.2 (C-6), 127.7 (C-3), 128.7, 128.9, 129.5 (C-4, C-6, C-7), 129.0 (C-8a), 133.7 (C-4a), 146.6 (C-1), 165.9 (CO₂Et), 169.2 (COCH₃) ppm.

C₁₅H₁₄O₄ (258.27).

ber.: 281.0784 [M+Na]⁺

gef.: 281.0782, (ESI-HRMS).

8.4 Ethyl-1-Hydroxy-3-naphthalincarboxylat (**123**)



Zu einer Lösung von **122** (64.0 g, 247 mmol, 1.0 Äq.) in Ethanol (1.3 L) gab man K_2CO_3 (81.9 g, 592 mmol, 2.4 Äq.) und rührte 1 h unter Rückfluss. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur goss man auf Eiswasser (1.6 L) und brachte mit halbkonzentrierter HCl auf $pH \approx 1$. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit H_2O (300 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit EtOAc (2×300 mL) extrahiert. Man vereinigte den Feststoff mit den Extrakten und wusch die organische Phase mit gesättigter NaCl-Lösung (2×200 mL), trocknete über $MgSO_4$ und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Man erhielt man die Zielverbindung **123** als braunen Feststoff (50.0 g, 93%), der ohne weitere Aufreinigung später eingesetzt wurde.

$R_f = 0.25$ (PE / EtOAc = 5:1).

1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 1.35$ (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, OCH_2CH_3), 4.35 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H, OCH_2CH_3), 7.40 (d, $J = 1.6$ Hz, 1 H, 2-H), 7.52–7.63 (m, 2 H, 6-H, 7-H), 7.97–8.04 (m, 1 H, 5-H), 8.07 (s, 1 H, 4-H), 8.15–8.22 (m, 1 H, 8-H), 10.47 (s_{br} , 1 H, OH) ppm.

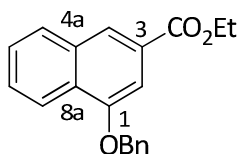
^{13}C -NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 14.13$ (OCH_2CH_3), 60.62 (OCH_2CH_3), 106.5 (C-2), 121.0 (C-8), 121.9 (C-4), 126.7, 127.0, 127.0, 127.6 (C-3, C-6, C-7, C-8a), 129.0 (C-5), 133.4 (C-4a), 153.5 (C-1), 165.9 (C=O) ppm.

$C_{13}H_{12}O_3$ (216.23).

ber.: 239.0679 $[M+Na]^+$

gef.: 239.0685 (ESI-HRMS).

8.5 Ethyl-1-benzyloxy-3-naphthalincarboxylat (**124**)



Zu einer Lösung des Naphtholderivats **123** (50.0 g, 231 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem DMF (800 mL) wurden K_2CO_3 (48.0 g, 347 mmol, 1.5 Äq.) und TBAI (3.46 g, 9.2 mmol, 0.04 Äq.) gegeben. Nach Zutropfen von Benzylbromid (43.5 g, 254 mmol, 1.1 Äq.) wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend versetzte man das Reaktionsgemisch mit H_2O (600 mL), rührte 30 min bei Raumtemperatur und goss das Reaktionsgemisch auf H_2O (1.2 L). Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit H_2O (800 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhielt die Zielverbindung **124** als braunen Feststoff (72.5 g, 237 mmol), der ohne weitere Aufreinigung später eingesetzt wurde.

$R_f = 0.62$ (PE / EtOAc = 3:1).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.44$ (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, OCH_2CH_3), 4.44 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H, OCH_2CH_3), 5.30 (s, 2 H, OCH_2Ph), 7.32–7.60 (m, 8 H, 2-H, 6-H, 7-H, 5 \times Ph-H), 7.86–7.94 (m, 1 H, 5-H), 8.23 (s, 1 H, 4 H), 8.31–8.38 (m, 1 H, 8-H) ppm.

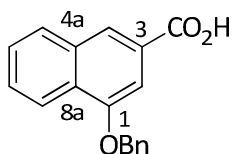
^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 14.41$ (OCH_2CH_3), 61.15 (OCH_2CH_3), 70.29 (OCH_2Ph), 104.1 (C-2), 122.3 (C-8), 123.7 (C-4), 127.1, 128.1, 129.0 (C-5, C-6, C-7, Ph- C_p), 127.6 (2 \times Ph- C_o), 127.9, 127.9 (C-3, C-8a), 128.6 (2 \times Ph- C_m), 133.5 (C-4a), 136.8 (Ph- C_i), 154.6 (C-1), 166.9 (CO_2Et) ppm.

$C_{20}H_{18}O_3$ (306.35).

ber.: 329.1148 $[M+Na]^+$

gef.: 329.1152 (ESI-HRMS).

8.6 1-Benzyl-3-naphthalincarbonsäure (**125**)



Zu einer Lösung des Ethylesters **124** (72.5 g, 237 mmol, 1.0 Äq.) in einem Gemisch aus THF/MeOH/H₂O = 3:1:1 (1.5 L) wurde LiOH·H₂O (39.8 g, 951 mmol, 4.0 Äq.) und für 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit H₂O (500 mL) versetzt und unter Rühren mit halbkonzentrierter HCl auf pH ≈ 1 eingestellt, wobei sich ein Niederschlag bildete. Dieser wurde abfiltriert, mit 0.2 N HCl (1.0 L) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Nach Umkristallisation des Rohprodukts aus EtOAc/*n*-Hexan erhielt man die Zielverbindung **125** als weißen Feststoff (28.9 g, 104 mmol, 53% über 6 Stufen).

$R_f = 0.52$ (EtOAc / MeOH = 10:1).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 5.36$ (s, 2 H, OCH₂Ph), 7.32–7.47 (m, 3 H, 1 × Ph-H, 6-H, 7-H), 7.51 (d, $J = 1.1$ Hz, 1 H, 2-H), 7.55–7.67 (m, 4 H, 4 × Ph-H), 8.03–8.10 (m, 1 H, 5-H), 8.22–8.29 (m, 1 H, 8-H), 8.24 (s, 1 H, 4-H) ppm.

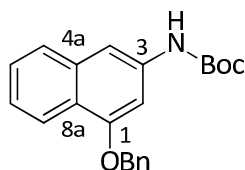
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 69.59$ (OCH₂Ph), 104.4 (C-2), 121.6 (C-8), 123.2 (C-4), 127.0 (C-8a), 127.2, 127.7, 127.8, 129.0 (C-5, C-6, C-7, Ph-C_p), 127.4 (2 × Ph-C_o), 128.4 (C-3, 2 × Ph-C_m), 133.1 (C-4a), 136.8 (Ph-C_i), 153.9 (C-1), 167.4 (C=O) ppm.

C₁₈H₁₄O₃ (278.30).

ber.: 301.0835 [M+Na]⁺

gef.: 301.0835 (ESI-HRMS).

8.7 3-Amino-1-benzyloxy-*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-naphthalin (126)



Zu einer Suspension der Carbonsäure **125** (21.4 g, 76.8 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem *tert*-Butylalkohol (1.5 L) gab man aktiviertes Molsieb 4 Å (150 g), Triethylamin (12.8 mL, 9.3 g, 92.2 mmol, 1.2 Äq.) und DPPA (23.3 mL, 84.5 mmol, 1.1 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde 3 d unter Rückfluss gerührt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur vom Molsieb abgetrennt, welches gründlich mit EtOAc (1.5 L) gewaschen wurde. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in EtOAc (1.0 L) aufgenommen, mit 2 N HCl (2 × 500 mL), gesättigter NaHCO₃-Lösung (2 × 300 mL), H₂O (500 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (500 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Zielverbindung **126** wurde als gelber Feststoff (28.0 g, 80.1 mmol) erhalten, der ohne weitere Aufreinigung später eingesetzt wurde.

$R_f = 0.46$ (PE / EtOAc = 10:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.55$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 5.21 (s, 2 H, OCH₂Ph), 6.64 (s_{br}, 1 H, NH), 7.06 (d, $J = 1.7$ Hz, 1 H, 2-H), 7.29–7.53 (m, 8 H, 4-H, 6-H, 7-H, 5 × Ph-H), 7.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, 5-H), 8.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, 8-H) ppm.

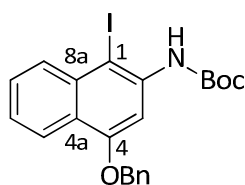
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 28.41$ (C(CH₃)₃), 70.19 (C(CH₃)₃), 80.66 (OCH₂Ph), 99.28 (C-2), 107.0 (C-4), 122.1, 123.8 (C-7, C-8), 122.6 (C-8a), 126.9, 127.1, 128.0 (C-5, C-6, Ph-C_p), 127.5 (2 × Ph-C_o), 128.6 (2 × Ph-C_m), 134.8 (C-4a), 136.2, 136.9 (C-3, Ph-C_i), 152.8 (C=O), 155.2 (C-1) ppm.

C₂₂H₂₃NO₃ (349.42).

ber.: 372.1570 [M+Na]⁺

gef.: 372.1567 (ESI-HRMS).

8.8 2-Amino-4-benzyloxy-*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-1-iod-naphthalin (95)



Zu einer Lösung des Naphthalinderivats **126** (28.0 g, 80.1 mmol, 1.0 Äq.) in einem Lösungsmittelgemisch aus MeOH/H₂O = 4:1 (1500 mL) wurde HIO₃ (2.81 g, 16.0 mmol, 0.2 Äq.) und Iod (8.20 g, 32.3 mmol, 0.4 Äq.) gegeben und 2 h unter Rückfluss gerührt. Man ließ auf Raumtemperatur abkühlen, filtrierte den ausgefallenen Feststoff ab und wusch diesen mit H₂O (2 × 500 mL). Die Zielverbindung **95** wurde als hellbrauner Feststoff (31.5 g, 66.3 mmol, 83%) erhalten, der ohne weitere Aufreinigung später eingesetzt wurde.

R_f = 0.64 (PE / EtOAc = 10:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.59 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 5.27 (s, 2 H, OCH₂Ph), 7.31 (s_{br}, 1 H, NH), 7.33–7.58 (m, 7 H, 6-H, 7-H, 5 × Ph-H), 8.01 (d, J = 7.0 Hz, 1 H, 8-H^{*}), 8.03 (s, 1 H, 3-H), 8.23 (dd, J = 8.5 Hz, 1 H, 5-H^{*}) ppm.

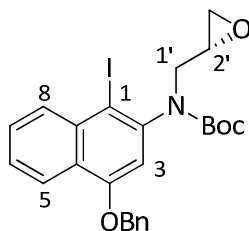
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 28.36 (C(CH₃)₃), 70.38 (C(CH₃)₃), 80.26 (C-1), 81.15 (OCH₂Ph), 99.97 (C-3), 122.7 (C-5), 123.7 (C-4a), 124.5 (C-6), 127.8 (2 × Ph-C_o), 128.1 (Ph-C_p), 128.6 (2 × Ph-C_m), 128.6 (C-7), 131.2 (C-8), 134.8 (C-8a), 136.6 (Ph-C_i), 138.3 (C-2), 152.8 (C=O), 155.7 (C-4) ppm.

C₂₂H₂₂INO₃ (475.32).

ber.: 498.0537 [M+Na]⁺

gef.: 498.0529 (ESI-HRMS).

8.9 (+)-{(2'R)-2-Amino-4-benzyloxy-N-(tert-butyloxycarbonyl)-N-(2,3-epoxypropyl)-1-iod-naphthalin} ((+)-(2'R)-94)



Zu einer Lösung des Amids **95** (3.00 g, 6.31 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem DMF (30 mL) wurde bei Raumtemperatur NaH (1.01 g, 25.2 mmol, 4.0 Äq.; 60%-ige Suspension in Mineralöl) gegeben und 30 min gerührt. Anschließend wurde das Nosylat (+)-(S)-**126** (2.45 g, 9.47 mmol, 1.5 Äq.) portionsweise zugegeben und das Gemisch für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Suspension mit gesättigter NH₄Cl-Lösung (200 mL) versetzt und mit Et₂O (3 × 150 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (3 × 150 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (*n*-Pentan/EtOAc = 5:1) erhielt man die Zielverbindung (+)-(2'R)-**94** als hellgelben Feststoff (2.92 g, 5.49 mmol, 87%).

$R_f = 0.64$ (*n*-Pentan / EtOAc = 5 :1).

¹H-NMR (300 MHz, C₂D₂Cl₄, 100 °C, die Signale der Rotamere sind mit (a) und (b) gekennzeichnet): $\delta = 1.46$ (s, 18 H, 2 × C(CH₃)₃), 2.46 (m_c, 2 H, 3'-H_a(a), 3'-H_a(b)), 2.73 (dt, *J* = 20.5, 8.9, 4.3 Hz, 2 H, 3'-H_b(a), 3'-H_b(b)), 3.12–3.19 (m_c, 1 H, 2'-H(a)), 3.29 (dd, *J* = 14.4, 6.7 Hz, 1 H, 1'-H_a(a)), 3.34–3.42 (m, 1 H, 2'-H(b)), 3.49 (dd, *J* = 14.8, 4.9 Hz, 1 H, 1'-H_a(b)), 4.08–4.17 (m, 2 H, 1'-H_b(a), 1'-H_b(b)), 5.31, 5.33 (2 × s, 4 H, OCH₂Ph(a), OCH₂Ph(b)), 6.89, 6.99 (2 × s, 2 H, 3-H(a), 3-H(b)), 7.34–7.66 (m, 14 H, 6-H(a), 6-H(b), 7-H(a), 7-H(b), 5 × Ph-H(a), 5 × Ph-H(b)), 8.25 (2 × m, 2 H, 8-H(a), 8-H(b)), 8.36 (2 × m, 2 H, 5-H(a), 5-H(b)) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, C₂D₂Cl₄, 100 °C, die Signale der Rotamere sind mit (a) und (b) gekennzeichnet): $\delta = 28.15, 28.18$ (2 Signale) (2 × C(CH₃)₃), 45.71 (C-3'(a)), 45.87 (C-3'(b)), 49.38 (C-2'(a)), 49.93 (C-2'(b)), 51.33 (C-1'(b)), 52.85 (C-1'(a)), 70.61, 70.68

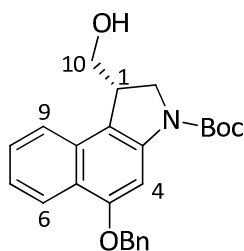
(2 × OCH₂Ph), 80.52 (2 Signale) (2 × C(CH₃)₃), 94.59 (C-1(a)), 94.74 (C-1(b)), 108.0 (C-3(a)), 108.1 (C-3(b)), 122.4 (C-5(a), C-5(b)), 125.6 (C-4a(a), C-4a(b)), 126.1 (2 Signale), 127.0, 127.2, 127.9, 128.2, 128.3, 128.4 (2 Signale) (C-6(a), C-6(b), C-7(a), C-7(b), C-8(a), C-8(b), 2 × Ph-C_o(a), 2 × Ph-C_o(b), 2 × Ph-C_m(a), 2 × Ph-C_m(b), 2 × Ph-C_p(a), 2 × Ph-C_p(b)), 135.3, 135.3 (C-8a(a), C-8a(b)), 136.4, 136.4 (Ph-C_i(a), Ph-C_i(b)), 143.2, 143.7 (C-2(a), C-2(b)), 153.4, 153.6 (C=O(a), C=O(b)), 155.4, 155.5 (C-4(a), C-4(b)) ppm.

C₂₅H₂₆INO₄ (531.38)

ber.: 554.0799 [M+Na]⁺

gef.: 554.0795 (ESI-HRMS).

8.10 (+)-{(1S)-5-Benzyloxy-3-(*tert*-butyloxycarbonyl)-1-hydroxymethyl-1,2-dihydro-3H-benz[e]indol} ((+)-(1S)-127)



Zu einer Lösung aus frisch sublimiertem ZnCl₂ (2.06 g, 15.1 mmol, 2.5 Äq.) in absolutem THF (160 mL) wurde bei 0 °C, langsam Methyllithium (37.8 mL einer 1.6 M Lösung in Et₂O, 60.4 mmol, 10 Äq.) getropft und für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf –78 °C gekühlt und tropfenweise TMS-NCS (1.98 g, 2.12 mL, 15.1 mmol, 2.5 Äq.) zugegeben. Es wurde auf 0 °C erwärmt und für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Nach erneutem Abkühlen auf –78 °C wurde zu dem Reaktionsgemisch eine Lösung des Epoxids ((+)-(2'R)-**94**) (3.21 g, 6.05 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem THF (45 mL) getropft und für 15 min bei –78 °C, für 1 h bei 0 °C und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde mit gesättigter NH₄Cl-Lösung (250 mL) versetzt, mit CH₂Cl₂ (4 × 250 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel

(PE / EtOAc = 4:1) erhielt man die Zielverbindung (+)-(1S)-**127** als weißen Feststoff (2.26 g, 5.57 mmol, 47%).

Analytische Daten für (+)-(1S)-**127**:

HPLC (analytisch):	Säule:	Chiralcel OD
	Eluens:	<i>n</i> -Hexan / <i>i</i> -PrOH = 95:5
	Fluss:	0.8 mL min ⁻¹
	<i>t</i> _R :	14.3 min.

Analytische Daten für (-)-(1R)-**127**:

HPLC (analytisch):	Säule:	Chiralcel OD
	Eluens:	<i>n</i> -Hexan / <i>i</i> -PrOH = 95:5
	Fluss:	0.8 mL min ⁻¹
	<i>t</i> _R :	13.6 min.

*R*_f = 0.14 (PE / EtOAc = 3:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.59 (s_{br}, 9 H, C(CH₃)₃), 3.68–3.86 (m_c, 2 H, 1-H, 10-H_b), 3.89–3.98 (m_c, 1 H, 10-H_a), 4.06–4.15 (m_c, 1 H, 2-H_a), 4.17–4.27 (m_c, 1 H, 2-H_b), 5.25 (s, 2 H, OCH₂Ph), 7.27–7.56 (m, 7 H, 7-H, 8-H, 5 × Ph-H), 7.69 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H, 9-H), 7.89 (s_{br}, 1 H, 4-H), 8.22 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H, 6-H) ppm.

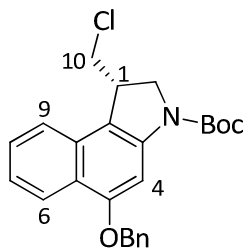
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 28.47 (C(CH₃)₃), 41.30 (C-1), 52.42 (C-2), 64.74 (C-10), 70.24 (OCH₂Ph), 80.74 (C(CH₃)₃), 96.51 (C-4), 114.3 (C-9b), 122.3 (C-5a), 122.4, 122.9, 123.4 (C-6, C-7, C-9), 127.3 (C-8), 127.5, 127.9, 128.5 (5 × Ph-CH), 130.6 (C-9a), 136.9 (Ph-C_i), 142.0 (C-3a), 152.7 (C=O), 155.6 (C-5) ppm.

C₂₅**H**₂₇**NO**₄ (405.49).

ber.: 428.1832 [M+Na]⁺

gef.: 428.1832 (ESI-HRMS).

8.11 (–)-{(1S)-5-Benzyloxy-3-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-1-chlormethyl-1,2-dihydro-3H-benz[e]indol} ((–)-(1S)-93)



Zu einer Lösung von (+)-(1S)-**127** (2.06 g, 5.08 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem CH₂Cl₂ (50 mL) wurde bei Raumtemperatur Triphenylphosphin (3.99 g, 15.2 mmol, 3.0 Äq.) und CCl₄ (4.45 mL, 45.7 mmol, 9.0 Äq.) gegeben und für 3 h gerührt. Es wurde SiO₂ (12 g) zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach anschließender säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (PE / EtOAc = 7:1) erhielt man die Zielverbindung (–)-(1S)-**93** als weißen Feststoff (1.93 g, 4.55 mmol, 90%).

Analytische Daten für (+)-(1R)-93:

HPLC (analytisch):	Säule:	Chiralcel OD
	Eluens:	<i>n</i> -Hexan / <i>i</i> -PrOH = 98:2
	Fluss:	0.8 mL min ⁻¹
	<i>t</i> _R :	9.6 min.

Analytische Daten für (–)-(1S)-93:

HPLC (analytisch):	Säule:	Chiralcel OD
	Eluens:	<i>n</i> -Hexan / <i>i</i> -PrOH = 98:2
	Fluss:	0.8 mL min ⁻¹
	<i>t</i> _R :	13.4 min.

R_f = 0.73 (PE / EtOAc = 3:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 1.60 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.42 (t, *J* = 10.5 Hz, 1 H, 10-H_a), 3.86–4.01 (m, 2 H, 1-H, 10-H_b), 4.05–4.17 (m, 1 H, 2-H_a), 4.26 (d, *J* = 11.7 Hz, 1 H, 2-H_b), 5.25 (s, 2 H, OCH₂Ph), 7.27–7.58 (m, 7 H, 7-H, 8-H, 5 × Ph-H), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, 9-H), 7.85 (s_{br}, 1 H, 4-H), 8.28 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, 6-H) ppm.

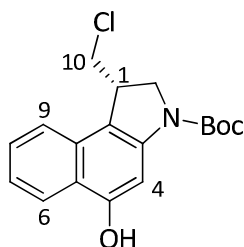
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = 28.6 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 41.8 (C-1), 46.5 (C-10), 53.1 (C-2), 70.3 (OCH_2Ph), 81.2 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 96.4 (C-4), 114.3 (C-9b), 122.4 (C-5a), 121.7, 123.0, 123.5 (C-6, C-7, C-9), 127.5 (Ph-C_o), 127.6 (C-8), 127.9 (Ph-C_p), 128.5 (Ph-C_m), 130.1 (C-9a), 136.7 (Ph-C_i), 141.5 (C-3a), 152.5 (C=O), 156.0 (C-5) ppm.

$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{ClNO}_3$ (423.93).

ber.: 446.1493 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

gef.: 449.1489 (ESI-HRMS).

8.12 (–)-{(1S)-3-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-1-chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-3*H*-benz[e]indol} ((–)-(1S)-128)



Zu einer Lösung von (+)-(1S)-**93** (250 mg, 59.0 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem THF wurde bei Raumtemperatur Pd/C (10%-ig, 125 mg, 117 μmol , 0.2 Äq.) gegeben. Es wurde H_2 durch die Lösung geleitet und für 6h bei 50 °C unter H_2 -atm gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und mit EtOAc (500 mL) gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (PE / EtOAc = 4:1) erhielt man die Zielverbindung (–)-(1S)-**128** als weißen Feststoff (176 mg, 52.7 mmol, 89%).

8.13 Anreicherung von {(1S)-3-(*tert*-butyloxycarbonyl)-1-(chlormethyl)-1,2-di-hydro-5-hydroxy-3*H*-benz[e]indol} ((1S)-128) durch präparative HPLC

(–)-(1S)-**128** (1.76 g, 5.27 mmol) wurde in einem Gemisch aus *n*-Hexan / *i*PrOH= 1:1 (50 mL) gelöst. Je 0.5 mL dieser Probelösung (entsprechend 17 mg bzw. 527 μmol des Gemisches) wurden in das präparative HPLC-System (Säule: Chiralpak IA, 250 × 20 mm, Partikelgröße: 5 μm , mobile Phase: *n*-Hexan / *i*PrOH = 97/3, Fluss:

18 mL min⁻¹, Druck: 7.4 MPa) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats (UV-Detektor: $\lambda = 250$ nm) lieferte das reine Enantiomer (-)-(1S)-**128**.

Analytische Daten für (-)-(1S)-**128**:

HPLC (analytisch):	Säule:	Chiralcel IA
	Eluens:	<i>n</i> -Hexan / <i>i</i> -PrOH = 98:2
	Fluss:	18 mL min ⁻¹
	<i>t</i> _R :	14.0 min.
HPLC (analytisch):	Säule:	Chiralcel IA
	Eluens:	<i>n</i> -Hexan / <i>i</i> -PrOH = 98:2
	Fluss:	0.8 mL min ⁻¹
	<i>t</i> _R :	22.9 min.

R_f = 0.60 (PE / EtOAc = 6:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.62 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.41 (t, *J* = 11.4 Hz, 10-H_a), 3.90–3.98 (m, 2 H, 1-H, 10-H_b), 4.12 (t, *J* = 10.5 Hz, 1 H, 2-H_a), 4.25 (d, *J* = 11.5 Hz, 1 H, 2-H_b), 7.33 (dt, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 1 H, 7-H), 7.49 (dt, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 1 H, 8-H), 7.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, 9-H), 7.82 (s_{br}, 1 H, 4-H), 8.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, 6-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 28.5 (C(CH₃)₃), 41.8 (C-1), 46.5 (C-10), 53.1 (C-2), 81.8 (C(CH₃)₃), 99.1 (C-4), 114.3 (C-9b*), 121.6 (C-5*), 121.7 (C-9), 122.9 (C-7), 123.6 (C-6), 127.6 (C-8), 130.4 (C-9a), 141.1 (C-3a), 153.3 (C=O), 154.1 (C-5) ppm.

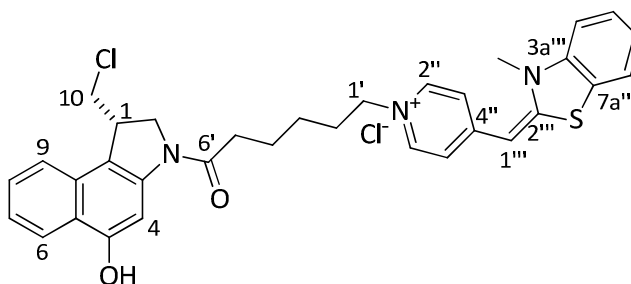
C₁₈H₂₀ClNO₃ (333.81).

ber.: 356.1024 [M+Na]⁺

gef.: 356.1026 (ESI-HRMS).

9 Synthese neuartiger fluoreszenzmarkierter CBI-Prodrugs, sowie der entsprechenden *seco*-CBI-Derivate

9.1 (–)-(1S)-1-[6-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-6-oxo-hexyl]-4-(3-Methyl-3*H*-benzothiazol-2-ylidenmethyl)-pyridinium-chlorid ((–)-(1S)-141)



Phenol (1S)-**128** (50.0 mg, 150 μmol , 1.0 Äq.) wurde bei Raumtemperatur in 4 M HCl/EtOAc (3.75 mL) suspendiert, für 4h gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird 1h im Hochvakuum getrocknet und anschließend in DMF (2.5 mL) gelöst und bei 0 °C mit EDAC·HCl (86.0 mg, 450 μmol , 3.0 Äq.) und **63** (85 mg, 195 μmol , 1.3 Äq.) versetzt und anschließend für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in einem 5:1 Gemisch aus MeOH/CH₃CN (12 mL) aufgenommen. Je 1 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1S)-**141** als gelben Feststoff (65.1 mg, 100 μmol , 67%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0	40/60
	0–20	40/60 → 0/100
	20–25	0/100
	25–27	0/100 → 40/60
	27–30	40/60

Fluss: 0.8 mL min⁻¹ t_R : 18.1 min**HPLC (präparativ):**

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0–2.5	40/60
	2.5–20	40/60 → 0/100
	20–25	0/100
	25–27	0/100 → 40/60
	27–30	40/60

Fluss: 18 mL min⁻¹ t_R : 12.9 min $[\alpha]_D^{20} = -13.3^\circ$ (c = 0.15, MeOH).

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 228.0 (4.490), 257.0 (4.738), 319.0 (4.073), 449.0 nm (4.865).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.33–1.44 (m, 2 H, 3'-H₂), 1.64–1.73 (m, 2 H, 4'-H₂), 1.85–1.94 (m, 2 H, 2'-H₂), 2.43–2.62 (m, 2 H, 5'-H₂), 3.71 (s, 3 H, NCH₃), 3.76 (dd, J = 10.4, 8.3 Hz, 1 H, 10-H_a), 3.97 (dd, J = 10.9, 2.6 Hz, 1 H, 10-H_b), 4.07–4.21 (m, 2 H, 1-H, 2-H_a), 4.23–4.35 (m, 3 H, 2-H_b, 1'-H₂), 6.24 (s, 1 H, 1'''-H), 7.25–7.32 (m, 2 H, 7-H, 6'''-H), 7.40 (d, J = 7.0 Hz, 2 H, 3''-H, 5''-H), 7.45 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.52 (t, J = 7.8 Hz, 1 H, 5'''-H), 7.58 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.75 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, 9-H), 7.89 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, 7'''-H), 7.98 (s_{br}, 1 H, 4-H), 8.06 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, 6-H), 8.40 (d, J = 7.0 Hz, 2 H, 2''-H, 6''-H), 10.34 (s_{br}, 1 H, OH) ppm.

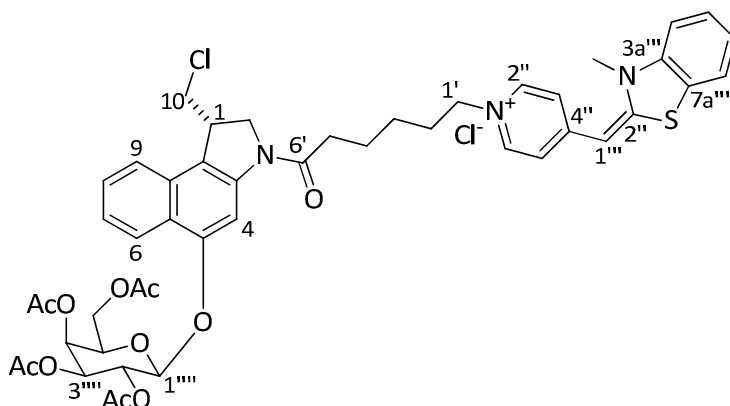
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 23.3 (C-4'), 24.9 (C-3'), 30.0 (C-2'), 32.7 (NCH₃), 34.6 (C-5'), 40.7 (C-1), 47.6 (C-10), 52.6 (C-2), 57.4 (C-1'), 89.4 (C-1'''), 99.7 (C-4), 111.8 (C-4'''), 113.5 (C-5a), 118.2 (C-3'', C-5''), 121.4 (C-9b), 122.2 (C-9), 122.3 (C-7), 122.4 (C-7'''), 122.8 (C-6), 123.1 (C-7a'''), 123.3 (C-6'''), 126.9 (C-8), 127.5 (C-5'''), 129.7 (C-9a), 140.2 (C-3a'''), 141.1 (C-2'', C-6''), 141.8 (C-3a), 150.1 (C-2'''), 154.0 (C-5), 156.9 (C-4''), 170.3 (C=O) ppm.

C₃₃H₃₃Cl₂N₃O₂S (606.61).

ber.: 570.1977 [M-Cl]⁺

gef.: 570.1971 (ESI-HRMS).

9.2 (-)-{(1S)-[1-[6-(1-Chlormethyl-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-6-oxo-hexyl]-4-(3-Methyl-3H-benzothiazol-2-ylidenmethyl)-pyridinium-chlorid-5-yl]-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-Galaktopyranosid} ((-)-(1S)-146)



Zu einer Lösung des Phenols (15)-**128** (100 mg, 300 μmol , 1.0 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (15 mL) gab man aktiviertes Molsieb 4 Å (0.80 g) und rührte 30 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe des *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-Galaktopyranosyl)-trichloracetimidats (**116**) (162 mg, 330 μmol , 1.10 Äq.) kühlte man die Lösung auf $-10\text{ }^\circ\text{C}$ und tropfte langsam eine Lösung von $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (19.0 μL , 150 μmol , 0.5 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (1.5 mL) zu. Nach 3.5 h Rühren bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ tropfte man weiteres $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (113 μL , 900 μmol , 3.0 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (1.5 mL) hinzu und ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 6 h wurde das Reaktionsgemisch via Transferkanüle in einen zweiten Kolben überführt und so vom Molsieb abgetrennt. Dieses wurde gründlich mit CH_2Cl_2 ($2 \times 10\text{ mL}$) gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde 1 h im Hochvakuum getrocknet und in absolutem DMF (15 mL) gelöst. Man kühlte die Lösung auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ und gab EDAC·HCl (126 mg, 660 μmol , 2.2 Äq.) sowie **63** (143 mg, 330 μmol , 1.1 Äq.) hinzu. Nach 17 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in einem 2:1 Gemisch aus MeOH/ CH_3CN (15 mL) aufgenommen. Je 0.5 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (–)-(15)-**146** als gelben Feststoff (97.3 mg, 99.1 μmol , 33%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H_2O (0.06% HCl)/MeOH
	0	40/60
	0–20	40/60 \rightarrow 0/100
	20–25	0/100
	25–27	0/100 \rightarrow 40/60

	27–30	40/60
Fluss:	0.8 mL min ⁻¹	
t_R :	16.5 min	

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0	40/60
	0–20	40/60 → 0/100
	20–25	0/100
	25–27	0/100 → 40/60
	27–30	40/60

Fluss: 18 mL min⁻¹ t_R : 20.1 min $[\alpha]_D^{20} = -49.7^\circ$ ($c = 0.15$, MeOH).**UV** (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 254.5 (4.634), 288.0 (3.923), 313.0 (4.026), 449.0 nm (4.734).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.33–1.44 (m, 2 H, 3'-H₂), 1.62–1.72 (m, 2 H, 4'-H₂), 1.85–1.92 (m, 2 H, 2'-H₂), 1.97, 2.02, 2.06, 2.17 (4 × s, 4 × 3 H, 4 × C(O)CH₃), 2.54–2.64 (m, 2 H, 5'-H₂), 3.71 (s, 3 H, NCH₃), 3.74–3.78 (m, 1 H, 10-H_a), 3.83–3.88 (m, 1 H, 10-H_b), 3.95–4.51 (m, 8 H, 1-H, 2-H₂, 1'-H₂, 5''''-H, 6''''-H₂), 5.36–5.46 (m, 3 H, 2''''-H, 3''''-H, 4''''-H), 5.54 (d, $J = 6.4$ Hz, 1 H, 1''''-H), 6.11–6.32 (m, 1 H, 1''-H), 7.25–7.34 (m, 2 H, 7-H, 6'''-H), 7.40–7.42 (m, 2 H, 3'-H, 5'-H), 7.44–7.48 (m, 1 H, 8-H), 7.54 (dd, $J = 7.8, 6.6$ Hz, 1 H, 5'''-H), 7.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H, 4'''-H), 7.75 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, 9-H),

7.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, 7'''-H), 7.97 (s_{br} , 1 H, 4-H), 8.06 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, 6-H), 8.39 (d, $J = 7.2$ Hz, 2 H, 2'-H, 6'-H) ppm.

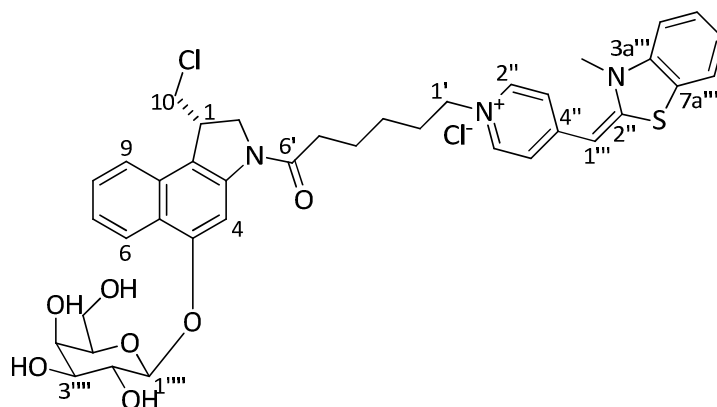
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 20.3$ (C(O)CH₃), 20.3 (C(O)CH₃), 20.5 (C(O)CH₃), 20.5 (C(O)CH₃), 23.4 (C-4'), 25.0 (C-3'), 30.1 (C-2'), 32.7 (NCH₃), 34.7 (C-5'), 40.6 (C-1), 47.5 (C-10), 52.6 (C-2), 57.4 (C-1'), 61.5 (C-6'''), 67.3, 68.5, 69.7, 70.7 (C-2''', C-3''', C-4''', C-5'''), 89.4 (C-1'''), 98.8 (C-1'''), 101.5 (C-4), 111.8 (C-4'''), 115.3 (C-5a), 118.2 (C-3'', C-5''), 121.7 (C-9b), 121.9 (C-9), 122.2 (C-7), 122.3 (C-7'''), 122.7 (C-6), 123.1 (C-7a'''), 123.3 (C-6'''), 127.4 (C-8), 127.6 (C-5'''), 129.3 (C-9a), 140.3 (C-3a'''), 141.1 (C-2'', C-6''), 141.5 (C-3a), 150.1 (C-2'''), 152.7 (C-5), 156.9 (C-4''), 169.2, 169.3, 169.7, 169.9 (4 \times C(O)CH₃), 170.5 (C=O) ppm.

C₄₇H₅₁Cl₂N₃O₁₁S (936.89).

ber.: 900.2927 [M-Cl]⁺

gef.: 900.2932⁺ (ESI-HRMS).

9.3 (–)-{(1S)-[1-[6-(1-Chlormethyl-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-6-oxo-hexyl]-4-(3-Methyl-3H-benzothiazol-2-ylidenmethyl)-pyridinium-chlorid-5-yl]-O-β-D-Galaktopyranosid} ((–)-(1S)-70)



Zu einer Lösung des AC-geschützten Zuckers (–)-(1S)-**146** (40 mg, 40.8 μmol , 1.0 Äq.) in absolutem MeOH (4 mL) gab man K_2CO_3 (2.8 mg, 20 μmol , 0.5 Äq.) und rührte 28 h bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 1 M HCl (22 μL , 22 μmol , 0.55 Äq.) wurde je 0.7 mL dieser Lösung in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie

Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (–)-(1S)-**70** als gelben Feststoff (16.2 mg, 19.9 μmol , 49%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Isokratisch:	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN	60/40
--------------	---	-------

Fluss: 0.8 mL min⁻¹

t_R : 13.2 min

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

Isokratisch:	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN	60/40
--------------	---	-------

Fluss: 18 mL min⁻¹

t_R : 16.8 min

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 205.0 nm (4.613), 256.0 (4.693), 288.0 (4.054), 314.0 (4.122), 450.0 (4.755).

$[\alpha]_D^{20} = -66.7^\circ$ (c = 0.15, MeOH).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.29–1.46 (m, 2 H, 3'-H₂), 1.62–1.72 (m, 2 H, 4'-H₂), 1.84–1.94 (m, 2 H, 2'-H₂), 2.42–2.64 (m, 2 H, 5'-H), 3.14–4.40 (m, 20 H, NCH₃, 4 × OH, 1-H, 2-H₂, 10-H₂, 1'-H₂, 2''''-H, 3''''-H, 4''''-H, 5''''-H, 6''''-H₂), 4.92 (d, J = 7.1 Hz, 1 H, 1''''-H), 6.21 (s, 1 H, 1'''-H), 7.29–7.32 (m, 2 H, 7-H, 6'''-H), 7.32–7.42 (m, 2 H, 3'-H, 5'-H), 7.48–7.53 (m, 2 H, 8-H, 5''-H), 7.57 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, 4''-H), 7.82 (d, J = 8.4 Hz,

1 H, 9-H), 7.90 (dd, $J = 7.8, 0.6$ Hz, 1 H, 7'''-H), 8.24-8.30 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H, 4-H, 6-H), 8.36–8.40 (m, 2 H, 2'-H, 6'-H) ppm.

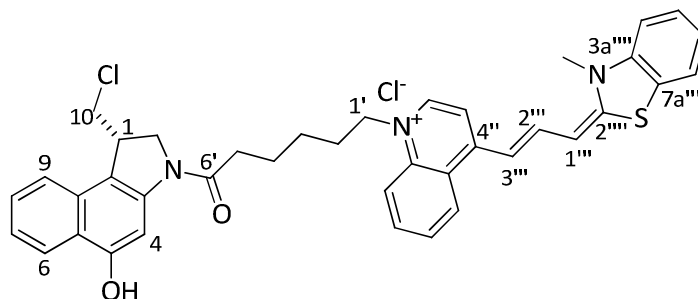
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 23.3$ (C-4'), 24.9 (C-3'), 30.0 (C-2'), 32.7 (NCH₃), 34.7 (C-5'), 40.6 (C-1), 47.5 (C-10), 52.6 (C-2), 57.4 (C-1'), 59.7 (C-6'''), 67.6 (C-4'''), 70.4 (C-2'''), 73.1 (C-3'''), 75.2 (C-5'''), 89.4 (C-1'''), 101.2 (C-1'''), 101.9 (C-4), 111.8 (C-4'''), 116.5 (C-5a), 118.2 (C-3'', C-5''), 122.3, 122.3, 123.1, 123.1, 123.3 (C-7, C-7''', C-9b, C-9, C-6, C-7a''', C-6'''), 127.1 (C-8), 127.6 (C-5'''), 129.4 (C-9a), 140.2 (C-3a'''), 141.1 (C-2'', C-6''), 141.6 (C-3a), 150.1 (C-2'''), 153.6 (C-5), 156.9 (C-4''), 170.6 (C=O) ppm.

$\text{C}_{39}\text{H}_{43}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ (768.75).

ber.: 732.2505 [M-Cl]⁺

gef.: 732.2508(ESI-HRMS).

9.4 (1S)-1-[6-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-6-oxo-hexyl]-4-[3-(3-Methyl-3H-benzothiazol-2-yliden)-propenyl]-quinolinium-chlorid ((1S)-145)



Phenol (1S)-**128** (40.0 mg, 120 μmol , 1.0 Äq.) wurde bei Raumtemperatur in 4 M HCl/EtOAc (3.0 mL) suspendiert, für 3h gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde 1h im Hochvakuum getrocknet und anschließend in DMF (2.0 mL) gelöst und bei 0 °C mit EDAC·HCl (68.8 mg, 360 μmol , 3.0 Äq.) und **142** (80.0 mg, 156 μmol , 1.3 Äq.) versetzt und anschließend für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in einem 5:1 Gemisch aus MeOH/CH₃CN (9.6 mL) aufgenommen. Je 1 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des

restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1S)-**145** als blauen Feststoff (45.3 mg, 62.3 μmol , 52%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0	40/60
	0–20	40/60 → 0/100
	20–25	0/100
	25–27	0/100 → 40/60
	27–30	40/60

Fluss: 0.8 mL min⁻¹

t_R : 19.0 min

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/MeOH
	0–2.5	40/60
	2.5–20	40/60 → 0/100
	20–25	0/100
	25–27	0/100 → 40/60
	27–30	40/60

Fluss: 18 mL min⁻¹

t_R : 15.9 min

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 256.0 (4.563), 307.0 (4.216), 631.0 nm (4.951).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.41–1.53 (m, 2 H, 3'-H₂), 1.61–1.76 (m, 2 H, 4'-H₂), 1.82–1.97 (m, 2 H, 2'-H₂), 2.42–2.60 (m, 2 H, 5'-H₂), 3.72 (s, 3 H, NCH₃), 3.75–3.87 (m, 1 H, 10-H_a), 3.99 (dt, J = 15.9, 8.0 Hz, 1 H, 10-H_b), 4.13–4.24 (m, 2 H, 1-H, 2-H_a), 4.32 (d, J = 8.8 Hz, 1 H, 2-H_b), 4.57 (t, J = 7.2 Hz, 2 H, 1'-H₂), 6.46 (d, J = 12.3 Hz, 1 H, 1'''-H), 7.07 (d, J = 13.3 Hz, 1 H, 3'''-H), 7.28–7.32 (m, 1 H, 6'''-H), 7.34–7.41 (m, 1 H, 7-H), 7.44–7.54 (m, 2 H, 5'''-H, 8-H), 7.56 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, 4'''-H), 7.65–7.72 (m, 1 H, 7''-H), 7.76–7.89 (m, 3 H, 9-H, 3''-H, 7'''-H), 7.94 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, 6''-H), 8.03–8.14 (m, 2 H, 5''-H, 2'''-H), 8.25–8.31 (m, 2 H, 4-H, 6-H), 8.38–8.47 (m, 2 H, 2''-H, 8''-H) ppm.

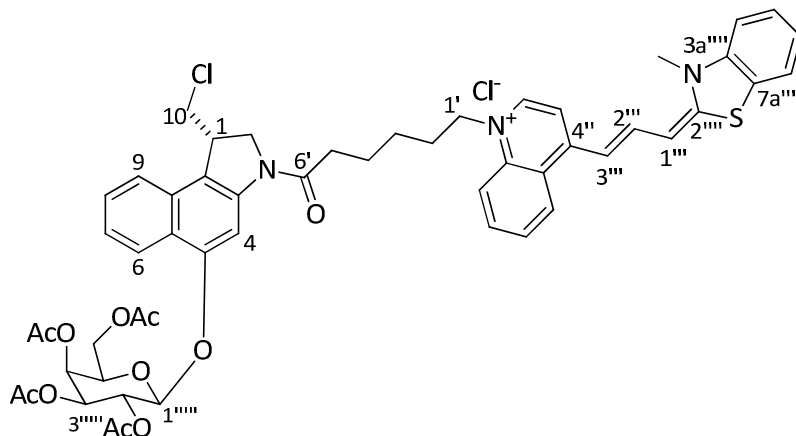
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 23.5 (C-4'), 25.5 (C-3'), 28.6 (C-2'), 32.8 (NCH₃), 34.8 (C-5'), 40.7 (C-1), 47.5 (C-10), 52.6 (C-2), 53.8 (C-1'), 98.6 (C-1'''), 101.1 (C-4), 109.0 (C-3'''), 109.4 (C-3''), 112.3 (C-4'''), 116.5 (C-5a), 117.7 (C-5''), 122.3 (C-7'''), 122.3 (C-9), 122.4 (C-7), 123.1 (C-7a'''), 123.2 (C-6), 123.9 (C-6'''), 124.0 (C-9b), 124.4 (C-4a''), 125.0 (C-8''), 126.4 (C-5'''), 127.2 (C-8), 127.4 (C-7''), 129.4 (C-9a), 133.1 (C-6''), 137.6 (C-3a'''), 141.7 (C-3a), 142.2 (C-2''), 143.5 (C-8a''), 143.8 (C-2'''), 150.1 (C-2'''), 153.6 (C-5), 161.4 (C-4''), 170.6 (C=O) ppm.

C₃₉H₃₇Cl₂N₃O₂S (682.70).

ber.: 646.2290 [M-Cl]⁺

gef.: 646.2292 (ESI-HRMS).

9.5 {(1S)-[1-[6-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-6-oxo-hexyl]-4-[3-(3-Methyl-3H-benzothiazol-2-yliden)-propenyl]-quinolinium-chlorid-5-yl]-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosid} ((1S)-150)



Zu einer Lösung des Phenols (1S)-**128** (100 mg, 300 μ mol, 1.0 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (15 mL) gab man aktiviertes Molsieb 4 Å (0.80 g) und rührte 30 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe des *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-Galaktopyranosyl)-trichloracetimidats (**116**) (162 mg, 330 μ mol, 1.10 Äq.) kühlte man die Lösung auf -10 °C und tropfte langsam eine Lösung von $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (19.0 μ L, 150 μ mol, 0.5 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (1.5 mL) zu. Nach 3.5 h Rühren bei -10 °C tropfte man weiteres $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (113 μ L, 900 μ mol, 3.0 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (1.5 mL) hinzu und ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 6 h wurde das Reaktionsgemisch via Transferkanüle in einen zweiten Kolben überführt und so vom Molsieb abgetrennt. Dieses wurde gründlich mit CH_2Cl_2 (2×10 mL) gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde 1 h im Hochvakuum getrocknet und in absolutem DMF (15 mL) gelöst. Man kühlte die Lösung auf 0 °C und gab EDAC-HCl (172 mg, 900 μ mol, 3.0 Äq.) sowie **142** (230 mg, 450 μ mol, 1.5 Äq.) hinzu. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in einem 2:1 Gemisch aus MeOH/ CH_3CN (15 mL) aufgenommen. Je 0.5 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung

des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1S)-**150** als blauen Feststoff (148 mg, 138 μmol , 46%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0	40/60
	0–25	40/60 → 0/100
	25–27	0/100
	27–30	0/100 → 40/60
	30–40	40/60

Fluss: 0.8 mL min⁻¹

t_R : 22.2 min

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0–2.5	40/60
	2.5–25	40/60 → 0/100
	25–27	0/100
	27–30	0/100 → 40/60
	30–40	40/60

Fluss: 18 mL min⁻¹

t_R : 15.7 min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.43–1.53 (m, 2 H, 3'-H₂), 1.61–1.75 (m, 2 H, 4'-H₂), 1.85–1.94 (m, 2 H, 2'-H₂), 1.97, 2.01, 2.03, 2.17 (4 × s, 4 × 3 H, 4 × C(O)CH₃), 2.43–2.64 (m, 2 H, 5'-H₂), 3.73 (s, 3 H, NCH₃), 3.86 (dd, J = 10.8, 7.3 Hz, 1 H, 10-H_a), 3.93–4.16 (m, 9 H, 10-H_b, 1-H, 2-H₂, 1'-H₂, 5''''-H, 6''''-H₂), 5.36–5.58 (m, 4 H, 1''''-H, 2''''-H, 3''''-H, 4''''-H), 6.48 (d, J = 12.4 Hz, 1 H, 1'''-H), 7.09 (d, J = 13.1 Hz, 1 H, 3'''-H), 7.28–7.32 (m, 1 H, 6'''-H), 7.37–7.44 (m, 1 H, 7-H), 7.44–7.61 (m, 3 H, 4''''-H, 5''''-H, 8-H), 7.65–7.72 (m, 1 H, 7''-H), 7.76–7.94 (m, 4 H, 9-H, 3''-H, 7''''-H, 6''-H), 8.05–8.19 (m, 2 H, 5''-H, 2'''-H), 8.25–8.31 (m, 2 H, 4-H, 6-H), 8.37–8.49 (m, 2 H, 2''-H, 8''-H) ppm.

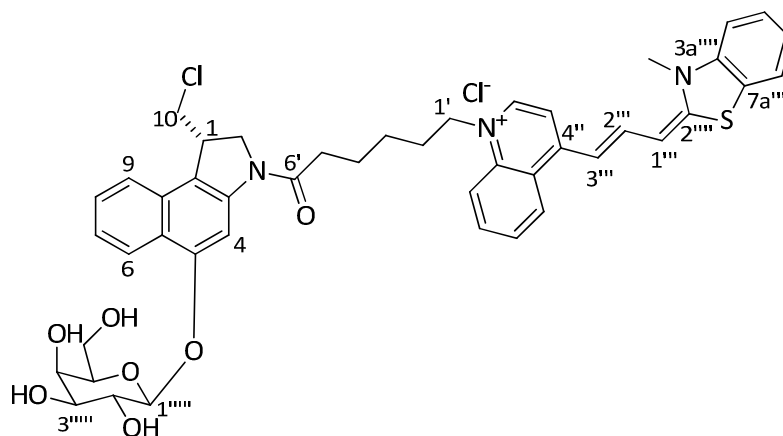
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 20.3 (C(O)C̄H₃), 20.3 (C(O)C̄H₃), 20.5 (C(O)C̄H₃), 20.5 (C(O)C̄H₃), 23.5 (C-4'), 25.5 (C-3'), 28.7 (C-2'), 32.8 (NCH₃), 34.8 (C-5'), 40.7 (C-1), 47.6 (C-10), 52.6 (C-2), 53.8 (C-1'), 61.5 (C-6'''''), 67.3, 68.4, 69.7, 70.7 (C-2''''', C-3''''', C-4''''', C-5'''''), 98.7 (C-1'''''), 98.8 (C-1'''), 101.5 (C-4), 109.1 (C-3'''), 109.4 (C-3''), 112.3 (C-4'''''), 117.7 (C-5a), 117.8 (C-5''), 121.7 (C-7'''''), 121.9 (C-9), 122.3 (C-7), 122.7 (C-7a'''''), 123.8 (C-6), 123.9 (C-6'''''), 124.1 (C-9b), 124.4 (C-4a''), 125.0 (C-8''), 126.4 (C-5'''''), 127.4 (C-8), 127.4 (C-7''), 129.4 (C-9a), 133.1 (C-6''), 137.6 (C-3a'''''), 141.5 (C-3a), 142.2 (C-2''), 143.6 (C-8a''), 143.7 (C-2'''), 150.1 (C-2'''''), 152.7 (C-5), 161.4 (C-4''), 169.2, 169.3, 169.7, 169.9 (4 × C̄(O)CH₃), 170.5 (C=O) ppm.

C₅₃H₅₅Cl₂N₃O₁₁S (1012.99).

ber.: 976.3240 [M-Cl]⁺

gef.: 976.3242 (ESI-HRMS).

9.6 **{(1S)-[1-[6-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-6-oxo-hexyl]-4-[3-(3-Methyl-3H-benzothiazol-2-yliden)-propenyl]-quinolinium-chlorid-5-yl]-O- β -D-galatopyranosid} ((1S)-147)**



Zu einer Lösung des AC-geschützten Zuckers (1S)-**150** (50 mg, 46.7 μmol , 1.0 Äq.) in absolutem MeOH (5 mL) gab man K_2CO_3 (12.8 mg, 94 μmol , 2.0 Äq.) und rührte 22 h bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 1 M HCl (100 μL , 100 μmol , 2.0 Äq.) wurde je 0.7 mL dieser Lösung in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1S)-**147** als gelben Feststoff (30.3 mg, 34.1 μmol , 73%).

HPLC (analytisch):

Säule:	Kromasil 100 C18	
Isokratisch:	H_2O (0.06% HCl)/ CH_3CN	50/50
Fluss:	0.8 mL min^{-1}	
t_R :	12.5 min	

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

Isokratisch:	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN	40/60
--------------	---	-------

Fluss: 18 mL min⁻¹ t_R : 12.0 min**UV** (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 254.0 nm (4.882), 289.0 (4.656), 302.0 (4.656), 632.0 (4.970).

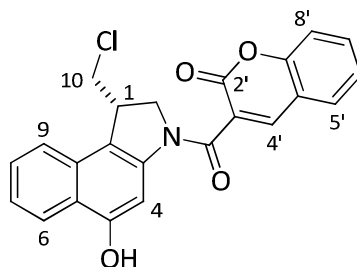
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.42–1.52 (m, 2 H, 3'-H₂), 1.62–1.74 (m, 2 H, 4'-H₂), 1.84–1.96 (m, 2 H, 2'-H₂), 2.41–2.61 (m, 2 H, 5'-H₂), 3.46–4.62 (m, 20 H, NCH₃, 4 × OH, 1-H, 2-H₂, 10-H₂, 1'-H₂, 2''''-H, 3''''-H, 4''''-H, 5''''-H, 6''''-H₂), 4.92 (d, J = 7.0 Hz, 1 H, 1''''-H), 6.46 (d, J = 12.3 Hz, 1 H, 1'''-H), 7.07 (d, J = 13.3 Hz, 1 H, 3'''-H), 7.28–7.32 (m, 1 H, 6''''-H), 7.34–7.39 (m, 1 H, 7-H), 7.46–7.58 (m, 3 H, 4''''-H, 5''''-H, 8-H), 7.66–7.70 (m, 1 H, 7''-H), 7.77–7.97 (m, 4 H, 9-H, 3''-H, 7''''-H, 6''-H), 8.04–8.15 (m, 2 H, 5''-H, 2'''-H), 8.23–8.32 (m, 2 H, 4-H, 6-H), 8.39–8.47 (m, 2 H, 2''-H, 8''-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 23.5 (C-4'), 25.5 (C-3'), 28.6 (C-2'), 32.8 (NCH₃), 34.8 (C-5'), 40.7 (C-1), 47.5 (C-10), 52.6 (C-2), 53.8 (C-1'), 59.7 (C-6'''''), 67.6, 70.4, 73.1, 75.1 (C-2''''', C-3''''', C-4''''', C-5'''''), 98.6 (C-1'''), 101.1 (C-4), 101.8 (C-1'''''), 109.0 (C-3'''), 109.4 (C-3''), 112.3 (C-4'''''), 117.7 (C-5a), 117.8 (C-5''), 121.7 (C-7'''''), 122.3 (C-9), 122.3 (C-7), 123.1 (C-7a'''''), 123.9 (C-6), 124.0 (C-6'''''), 124.4 (C-9b), 125.0 (C-4a''), 125.0 (C-8''), 126.4 (C-5'''''), 127.2 (C-8), 127.4 (C-7''), 129.4 (C-9a), 133.1 (C-6''), 137.6 (C-3a'''''), 141.6 (C-3a), 142.2 (C-2''), 143.5 (C-8a''), 143.8 (C-2'''), 150.1 (C-2'''''), 153.6 (C-5), 161.4 (C-4''), 170.6 (C=O) ppm.

C₄₅H₄₇Cl₂N₃O₇S (844.84).ber.: 808.2818 [M-Cl]⁺

gef.: 808.2819 (ESI-HRMS).

9.7 (–)-(1S)-3-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-carbonyl)-chromn-2-on ((–)-(1S)-92)



Phenol (1S)-**92** (100.0 mg, 300 μ mol, 1.0 Äq.) wurde bei Raumtemperatur in 4 M HCl/EtOAc (7.5 mL) suspendiert, für 4h gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde 1h im Hochvakuum getrocknet und anschließend in DMF (10 mL) gelöst und bei 0 °C mit EDAC·HCl (173 mg, 900 μ mol, 3.0 Äq.) und **131** (74.1 mg, 390 μ mol, 1.3 Äq.) versetzt und anschließend für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in DMF (3.0 mL) aufgenommen. Je 0.5 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1S)-**92** als gelben Feststoff (92.7 mg, 228 μ mol, 76%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0	60/40
	0–40	60/40 → 30/70
	40–41	30/70 → 0/100
	41–45	0/100
	45–46	0/100 → 60/40

	46–60	60/40
Fluss:	0.8 mL min ⁻¹	
t_R :	22.9 min	

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0–1	60/40
	1–40	60/40 → 30/70
	40–41	30/70 → 0/100
	41–45	0/100
	45–46	0/100 → 60/40
	46–50	60/40

Fluss: 18 mL min⁻¹

t_R : 26.8 min

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 258.0 nm (4.514), 297.0 (4.318), 315.0 (4.299)..

$[\alpha]_D^{20}$ = -4.25 ° (c = 0.15, DMSO).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.76–3.85 (m, 1 H, 10-H_a), 3.94 (d, J = 10.1 Hz, 1 H, 10-H_b), 4.05–4.19 (m, 2 H, 1-H, 2-H_a), 4.32 (t, J = 9.9 Hz, 1 H, 2-H_b), 7.38 (t, J = 7.3 Hz, 1 H, 7-H), 7.45 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, 6'-H), 7.49–7.57 (m, 2 H, 8'-H, 8-H), 7.74 (t, J = 7.8 Hz, 1 H, 7'-H), 7.80–7.88 (m, 2 H, 5'-H, 9-H), 7.97 (s, 1 H, 4-H), 8.14 (d, J = 8.1 Hz, 1 H, 6-H), 8.44 (s, 1 H, 4'-H), 10.48 (s, 1 H, OH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 40.7 (C-1), 47.3 (C-10), 53.4 (C-2), 99.5 (C-4), 115.3 (C-5a), 116.3 (C-8'), 118.1 (C-3'), 122.3 (C-9b), 122.7 (C-9), 123.1 (C-6), 123.2 (C-7),

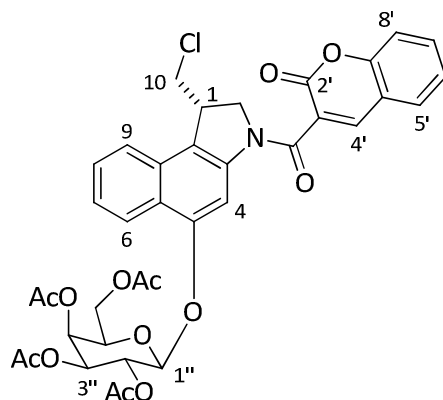
124.9 (C-6'), 125.1 (C-4a'), 127.3 (C-8), 129.3 (C-5'), 129.8 (C-9a), 133.1 (C-7'), 140.9 (C-3a), 143.1 (C-4'), 153.6 (C-5), 154.3 (C-8a'), 157.3 (COO), 162.0 (NCO) ppm.

$C_{23}H_{16}ClNO_4$ (405.83).

ber.: 428.0657 [M+Na]⁺

gef.: 428.0660 (ESI-HRMS).

9.8 {(1S)-[3-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-carbonyl)-chromn-2-on]-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-Galaktopyranosid} ((1S)-151)

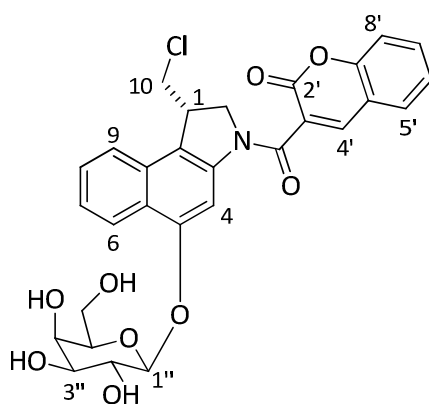


Zu einer Lösung des Phenols (1S)-**128** (100 mg, 300 μmol, 1.0 Äq.) in absolutem CH₂Cl₂ (15 mL) gab man aktiviertes Molsieb 4 Å (0.80 g) und rührte 30 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe des *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-D-Galaktopyranosyl)-trichloracetimidats (**116**) (162 mg, 330 μmol, 1.10 Äq.) kühlte man die Lösung auf –10 °C und tropfte langsam eine Lösung von BF₃·OEt₂ (19.0 μL, 150 μmol, 0.5 Äq.) in absolutem CH₂Cl₂ (1.5 mL) zu. Nach 3.5 h Rühren bei –10 °C tropfte man weiteres BF₃·OEt₂ (113 μL, 900 μmol, 3.0 Äq.) in absolutem CH₂Cl₂ (1.5 mL) hinzu und ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 6 h wurde das Reaktionsgemisch via Transferkanüle in einen zweiten Kolben überführt und so vom Molsieb abgetrennt. Dieses wurde gründlich mit CH₂Cl₂ (2 × 10 mL) gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde 1 h im Hochvakuum getrocknet und in absolutem DMF (15 mL) gelöst. Man kühlte die Lösung auf 0 °C und gab EDAC·HCl (172 mg, 900 μmol, 3.0 Äq.) sowie **131** (86 mg, 450 μmol, 1.5 Äq.) hinzu. Nach 18 h

Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Filtration an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 50:1) erhielt man die leicht verunreinigte Zielverbindung (1S)-**151** als braunen Feststoff (249 mg).

$\text{C}_{37}\text{H}_{34}\text{ClNO}_{13}$ (736.12).

9.9 {(1S)-[3-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-carbonyl)-chromn-2-on]-O- β -D-Galaktopyranosid} ((1S)-**69**)



Zu einer Suspension des AC-geschützten Zuckers (1S)-**151** (249 mg) in absolutem MeOH (50 mL) wurde bei 0°C eine Lösung von NaOMe in MeOH (111 μL einer 5.4 M Lösung) zugegeben und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit H_2O (5 mL) verdünnt und mit saurem Ionentauscher (Amberlite-IR 120) auf $\text{pH} \approx 7$ eingestellt. Es wurde vom Ionentauscher abfiltriert, mit MeOH (20 mL) gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in DMF (6 mL) gelöst und es wurde je 0.5 mL dieser Lösung in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1S)-**69** als gelben Feststoff (108 mg, 190 μmol , 63% ausgehend von (1S)-**128**).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0	70/30
	0–20	70/30 → 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 → 70/30
	26–30	70/30

Fluss: 0.8 mL min⁻¹ t_R : 9.7 min**HPLC (präparativ):**

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0–1	70/30
	1–20	70/30 → 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 → 70/30
	26–30	70/30

Fluss: 18 mL min⁻¹ t_R : 9.5 min**UV (MeOH):** λ_{\max} (lg ϵ) = 204.0 nm (4.542), 256.0 (4.506), 298.0 (4.344).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.44–3.69, 3.74–3.93 (2 × m, 7 H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 6''-H₂, 10-H_a), 3.97 (d, J = 10.1 Hz, 1 H, 10-H_b), 4.13 (d, J = 10.5 Hz, 1 H, 2-H_a), 4.18–4.27 (m, 1 H, 1-H), 4.36 (t, J = 9.9 Hz, 1 H, 2-H_b), 4.49–4.59 (m, 2 H, OH), 4.84 (d, J = 3.9 Hz, 1 H, OH), 4.96 (d, J = 7.1 Hz, 1 H, 1''-H), 5.31 (d, J = 5.4 Hz, 1 H, OH), 7.43–7.49 (m, 2 H, 6'-H, 7-H), 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, 8'-H), 7.56–7.61 (m, 1 H, 8-H), 7.72–7.77 (m, 1 H, 7'-H), 7.84–7.88 (m, 1 H, 5'-H), 7.90 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, 9-H), 8.27 (s, 1 H, 4-H), 8.37 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 6-H), 8.46 (s, 1 H, 4'-H) ppm.

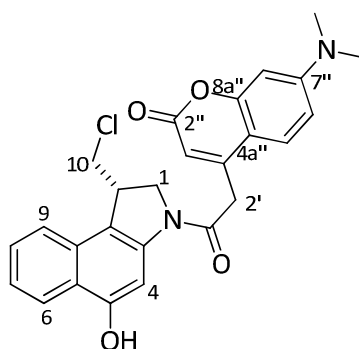
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 40.7 (C-1), 47.2 (C-10), 53.4 (C-2), 59.5 (C-6''), 67.5, 70.4, 73.1, 75.2 (C-2'', C-3'', C-4'', C-5''), 101.3 (C-4), 102.3 (C-1''), 116.3 (C-8'), 118.2 (C-3'), 118.4 (C-5a), 122.8 (C-9b), 123.2 (C-9), 123.3 (C-6), 124.0 (C-7), 124.8 (C-6'), 125.0 (C-4a'), 127.5 (C-8), 129.4 (C-5'), 129.4 (C-9a), 133.1 (C-7'), 140.8 (C-3a), 143.4 (C-4'), 153.6 (C-5), 153.9 (C-8a'), 157.3 (COO), 162.2 (NCO) ppm.

C₂₉H₂₆ClNO₉ (567.97).

ber.: 590.1187 [M+Na]⁺

gef.: 590.1188 (ESI-HRMS).

9.10 {(-)-(1S)-[4-[2-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-2-oxo-ethyl]-7-dimethylamino-chromn-2-on]} ((-)-(1S)-137)



Phenol (1S)-**128** (100.0 mg, 300 μ mol, 1.0 Äq.) wurde bei Raumtemperatur in 4 M HCl/EtOAc (7.5 mL) suspendiert, für 4h gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde 1h im Hochvakuum getrocknet und anschließend in DMF (10 mL) gelöst und bei 0 °C mit EDAC·HCl (173 mg, 900 μ mol, 3.0 Äq.) und **62** (96.4 mg, 390 μ mol, 1.3 Äq.) versetzt und anschließend für 18 h bei Raumtemperatur

gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in DMF (3.0 mL) aufgenommen. Je 0.5 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1S)-**137** als gelben Feststoff (96.7 mg, 209 μmol , 70%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0	60/40
	0–40	60/40 → 30/70
	40–41	30/70 → 0/100
	41–45	0/100
	45–46	0/100 → 60/40
	46–60	60/40

Fluss: 0.8 mL min⁻¹ t_R : 25.2 min**HPLC (präparativ):**

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0–1	60/40
	1–40	60/40 → 30/70

40–41	30/70 → 0/100
41–45	0/100
45–46	0/100 → 60/40
46–50	60/40

Fluss: 18 mL min⁻¹

t_R : 28.7 min

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 209.0 nm (4.665), 259.0 (4.758), 319.0 (4.161), 375.0 (4.297).

$[\alpha]_D^{20} = -55.06^\circ$ ($c = 0.15$, DMSO).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 3.02$ (s, 6 H, NMe₂), 3.76–3.88 (m, 1 H, 10-H_a), 3.97–4.00 (m, 2 H, 10-H_b, 2'-H_a), 4.12–4.27 (m, 2 H, 1-H, 2'-H_b), 4.34 (dd, $J = 10.9$, 2.4 Hz, 1 H, 2-H_a), 4.50 (t, $J = 10.1$ Hz, 1 H, 2-H_b), 6.05 (s, 1 H, 3'-H), 6.58 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 8'-H), 6.71 (dd, $J = 9.1$, 2.5 Hz, 1 H, 6'-H), 7.34 (t, $J = 7.3$ Hz, 1 H, 7-H), 7.51 (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H, 8-H), 7.56 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, 5'-H), 7.81 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, 9-H), 7.88 (s, 1 H, 4-H), 8.10 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, 6-H), 10.32 (s, 1 H, OH) ppm.

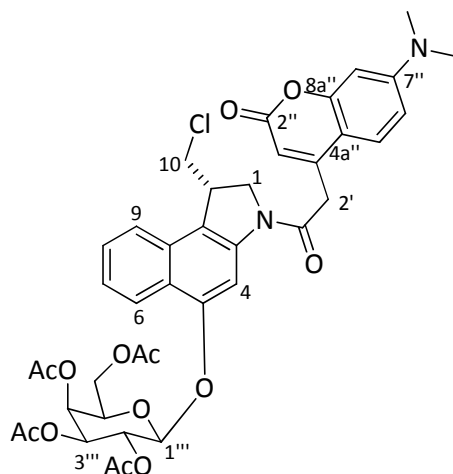
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 38.7$ (C-2'), 39.6 (NMe₂), 40.8 (C-1), 47.6 (C-10), 52.9 (C-2), 97.3 (C-8''), 99.6 (C-4), 108.5 (C-4a''), 108.9 (C-6''), 109.5 (C-3''), 114.1 (C-5a), 121.8 (C-9b), 122.5 (C-9), 122.8 (C-7), 123.0 (C-6), 126.4 (C-5''), 127.2 (C-8), 129.8 (C-9a), 141.7 (C-3a), 151.0 (C-4''), 152.7 (C-8a''), 154.2 (C-5), 155.3 (C-7''), 160.6 (COO), 166.8 (NCO) ppm.

C₂₆H₂₃ClN₂O₄ (462.92).

ber.: 461.1265 [M-H]⁻

gef.: 461.1274 (ESI-HRMS).

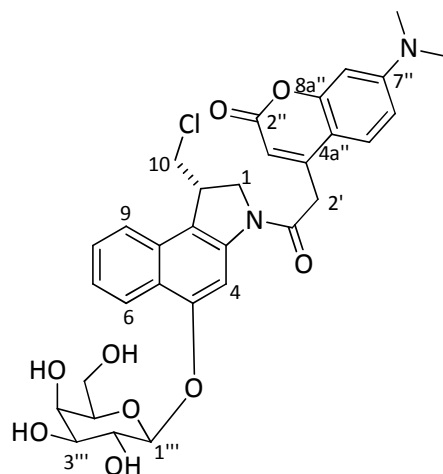
9.11 {[(1S)-[4-[2-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-2-oxo-ethyl]-7-dimethylamino-chromn-2-on]-5-yl]-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-Galaktopyranosid} ((1S)-151)



Zu einer Lösung des Phenols (1S)-**128** (100 mg, 300 μ mol, 1.0 Äq.) in absolutem CH₂Cl₂ (15 mL) gab man aktiviertes Molsieb 4 Å (0.80 g) und rührte 30 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe des *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-Galaktopyranosyl)-trichloracetimidats (**116**) (162 mg, 330 μ mol, 1.10 Äq.) kühlte man die Lösung auf –10 °C und tropfte langsam eine Lösung von BF₃·OEt₂ (19.0 μ L, 150 μ mol, 0.5 Äq.) in absolutem CH₂Cl₂ (1.5 mL) zu. Nach 3.5 h Rühren bei –10 °C tropfte man weiteres BF₃·OEt₂ (113 μ L, 900 μ mol, 3.0 Äq.) in absolutem CH₂Cl₂ (1.5 mL) hinzu und ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 6 h wurde das Reaktionsgemisch via Transferkanüle in einen zweiten Kolben überführt und so vom Molsieb abgetrennt. Dieses wurde gründlich mit CH₂Cl₂ (2 \times 10 mL) gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde 1 h im Hochvakuum getrocknet und in absolutem DMF (15 mL) gelöst. Man kühlte die Lösung auf 0 °C und gab EDAC·HCl (172 mg, 900 μ mol, 3.0 Äq.) sowie **62** (111 mg, 450 μ mol, 1.5 Äq.) hinzu. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Filtration an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 50:1) erhielt man die leicht verunreinigte Zielverbindung (1S)-**151** als braunen Feststoff (226 mg).

C₄₀H₄₁ClN₂O₁₃ (793.21).

9.12 {[(–)-(1S)-[4-[2-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-yl)-2-oxo-ethyl]-7-dimethylamino-chromn-2-on]-5-yl]-O-β-D-Galaktopyranosid} [(–)-(1S)-139]



Zu einer Suspension des AC-geschützten Zuckers (1S)-**151** (226 mg) in absolutem MeOH (50 mL) wurde bei 0°C eine Lösung von NaOMe in MeOH (111 µL einer 5.4 M Lösung) zugegeben und für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit H₂O (5 mL) verdünnt und mit saurem Ionentauscher (Amberlite-IR 120) auf pH ≈ 7 eingestellt. Es wurde vom Ionentauscher abfiltriert, mit MeOH (20 mL) gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in DMF (6 mL) gelöst und es wurde je 0.5 mL dieser Lösung in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1S)-**139** als gelben Feststoff (113 mg, 181 µmol, 60% ausgehend von (1S)-**128**).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0	70/30
	0–20	70/30 → 0/100

20–25	0/100
25–26	0/100 → 70/30
26–30	70/30

Fluss: 0.8 mL min⁻¹

t_R : 10.2 min

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0–1	70/30
	1–20	70/30 → 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 → 70/30
	26–30	70/30

Fluss: 18 mL min⁻¹

t_R : 10.1 min

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 256.0 nm (4.898), 280.0 (4.470), 310.0 (4.504), 375.0 (4.232).

$[\alpha]_D^{20}$ = -52.98 ° (c = 0.15, DMSO).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ = 3.02 (s, 6 H, NMe₂), 3.38–3.58 (m, 4 H, 3'''-H, 5'''-H, 6'''-H₂), 3.72–3.76 (m, 2 H, 2'''-H, 4'''-H), 3.90 (dd, J = 11.1, 7.8 Hz, 1 H, 10-H_a), 4.04–4.11 (m, 2 H, 10-H_b, 2'-H_a), 4.18 (d, J = 16.5 Hz, 1 H, 2'-H_b), 4.28–4.33 (m, 1 H, 1-H), 4.38 (d, J = 10.7 Hz, 1 H, 2-H_a), 4.56 (t, J = 10.0 Hz, 1 H, 2-H_b), 4.94 (t, J = 11.1 Hz, 1 H, 1'''-H), 6.06 (s, 1 H, 3'-H), 6.58 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, 8'-H), 6.72 (d, J = 8.9 Hz, 1 H, 6'-H),

7.38–7.44 (m, 1 H, 7-H), 7.54–7.59 (m, 2 H, 8-H, 5'-H), 7.88 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, 9-H), 8.16 (s, 1 H, 4-H), 8.29 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, 6-H) ppm.

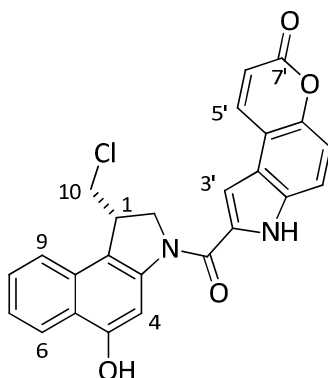
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 38.6$ (C-2'), 40.1 (NMe $_2$), 40.9 (C-1), 47.6 (C-10), 52.9 (C-2), 59.5 (C-6'''), 67.5, 70.4, 73.0, 75.1 (C-2''', C-3''', C-4''', C-5'''), 97.3 (C-8''), 100.6 (C-4), 101.6 (C-1'''), 108.6 (C-4a''), 109.0 (C-6''), 109.7 (C-3''), 117.0 (C-5a), 122.6 (C-9b), 122.7 (C-9), 123.3 (C-7), 123.5 (C-6), 126.4 (C-5''), 127.5 (C-8), 129.5 (C-9a), 141.5 (C-3a), 150.9 (C-4''), 152.7 (C-8a''), 153.8 (C-5), 155.3 (C-7''), 160.6 (COO), 167.0 (NCO) ppm.

$\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_9$ (625.07).

ber.: 647.1766 [M+Na] $^+$

gef.: 647.1767 (ESI-HRMS).

9.13 (1S)-2-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-carbonyl)-3H-pyrano[3,2-e]indol-7-on ((1S)-138)



Phenol (1S)-**128** (20.0 mg, 60.0 μmol , 1.0 Äq.) wurde bei Raumtemperatur in 4 M HCl/EtOAc (3.0 mL) suspendiert, für 4h gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde 1h im Hochvakuum getrocknet und anschließend in DMF (3 mL) gelöst und bei 0 °C mit EDAC·HCl (35 mg, 180 μmol , 3.0 Äq.) und **130** (17.9 mg, 78 μmol , 1.3 Äq.) versetzt und anschließend für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in DMF (2.0 mL) aufgenommen. Je 0.5 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels

Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1S)-**138** als gelben Feststoff (10.1 mg, 22.7 μmol , 38%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0	60/40
	0–40	60/40 → 30/70
	40–41	30/70 → 0/100
	41–45	0/100
	45–46	0/100 → 60/40
	46–50	60/40

Fluss: 0.8 mL min⁻¹

t_R : 20.5 min

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0–1	60/40
	1–40	60/40 → 30/70
	40–41	30/70 → 0/100
	41–45	0/100
	45–46	0/100 → 60/40

	46–50	60/40
Fluss:	18 mL min ⁻¹	
<i>t_R</i> :	25.6 min	

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 228.0 nm (4.663), 245.0 (4.641), 283.0 (4.520), 325.0 (4.423), 357.0 (4.418).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.90 (dd, J = 11.1, 7.2 Hz, 1 H, 10-H_a), 4.01 (dd, J = 11.1, 2.7 Hz, 1 H, 10-H_b), 4.25–4.32 (m, 1 H, 1-H), 4.60 (d, J = 10.7 Hz, 1 H, 2-H_a), 4.83 (t, J = 9.9 Hz, 1 H, 2-H_b), 6.57 (d, J = 9.5 Hz, 1 H, 6'-H), 7.32 (d, J = 9.0 Hz, 1 H, 9'-H), 7.37 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, 7-H), 7.54 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.73–7.78 (m, 2 H, 3'-H, 10'-H), 7.87 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, 9-H), 7.97 (s, 1 H, 4-H), 8.14 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, 6-H), 8.63 (dd, J = 9.5 Hz, 1 H, 5'-H), 10.41 (s, 1 H, OH), 12.16 (s, 1 H, NH) ppm.

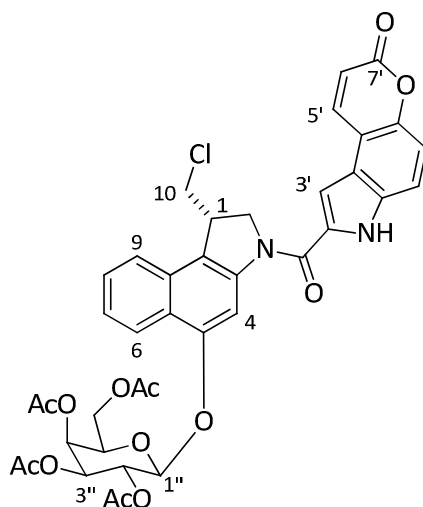
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 41.1 (C-1), 47.5 (C-10), 55.0 (C-2), 100.2 (C-4), 103.8 (C-3'), 111.1 (C-4'), 113.5 (C-9'), 114.9 (C-6'), 115.1 (C-5a), 116.7 (C-10'), 122.2 (C-9b), 122.7 (C-9), 123.1 (C-6), 123.1 (C-7), 123.4 (C-3a'), 127.2 (C-8), 129.8 (C-9a), 132.4 (C-10a'), 132.7 (C-2'), 141.6 (C-5'), 142.0 (C-3a), 149.6 (C-8'), 154.1 (C-5), 159.6 (COO), 160.5 (NCO) ppm.

C₂₅H₁₇ClN₂O₄ (444.87).

ber.: 467.0769 [M+Na]⁺

gef.: 467.0769 (ESI-HRMS).

9.14 {(1*S*)-[2-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[*e*]indol-3-carbonyl)-3*H*-pyrano[3,2-*e*]indol-7-on-5-yl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-Galaktopyranosid} ((1*S*)-152)



Zu einer Lösung des Phenols (1*S*)-**128** (20.0 mg, 60.0 μ mol, 1.0 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (3.0 mL) gab man aktiviertes Molsieb 4 Å (0.15 g) und rührte 30 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe des *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-Galaktopyranosyl)-trichloracetimidats (**116**) (31.2 mg, 63 μ mol, 1.05 Äq.) kühlte man die Lösung auf -10°C und tropfte langsam eine Lösung von $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (3.8 μ L, 30.0 μ mol, 0.5 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (1.5 mL) zu. Nach 3.5 h Rühren bei -10°C tropfte man weiteres $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (23 μ L, 180 μ mol, 3.0 Äq.) in absolutem CH_2Cl_2 (1.5 mL) hinzu und ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 6 h wurde das Reaktionsgemisch via Transferkanüle in einen zweiten Kolben überführt und so vom Molsieb abgetrennt. Dieses wurde gründlich mit CH_2Cl_2 (2×10 mL) gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde 1 h im Hochvakuum getrocknet und in absolutem DMF (3.0 mL) gelöst. Man kühlte die Lösung auf 0°C und gab EDAC·HCl (34.6 mg, 180 μ mol, 3.0 Äq.) sowie **130** (18.0 mg, 90 μ mol, 1.5 Äq.) hinzu. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in DMF (2.0 mL) aufgenommen. Je 0.5 mL dieser Lösung wurden in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen

Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1S)-**152** als gelben Feststoff (12.0 mg, 15.5 μmol , 26%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0	70/30
	0–20	70/30 → 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 → 70/30
	26–30	70/30

Fluss: 0.8 mL min⁻¹

t_R : 18.0 min

HPLC (präparativ):

Säule: Kromasil 100 C18

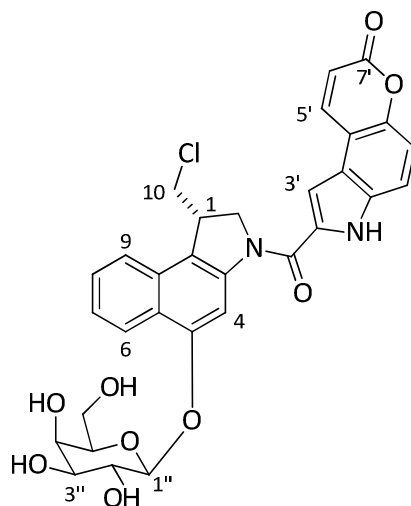
Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0–1	70/30
	1–20	70/30 → 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 → 70/30
	26–30	70/30

Fluss: 18 mL min⁻¹

t_R : 17.3 min

$C_{39}H_{35}ClN_2O_{13}$ (775.15).

9.15 **{(1S)-[2-(1-Chlormethyl-5-hydroxy-1,2-dihydro-benz[e]indol-3-carbonyl)-3H-pyrano[3,2-e]indol-7-on-5-yl]-O-β-D-Galaktopyranosid}**
((1S)-140)



Zu einer Lösung des AC-geschützten Zuckers (1S)-**152** (12 mg, 15.5 μmol , 1.0 Äq.) in absolutem MeOH (5.0 mL) wurde bei 0°C eine Lösung von NaOMe in MeOH (6 μL einer 5.4 M Lösung, 31 μmol , 2.0 Äq.) zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit H₂O (1 mL) und MeOH (1 mL) verdünnt und mit saurem Ionentauscher (Amberlite-IR 120) auf pH \approx 7 eingestellt. Es wurde vom Ionentauscher abfiltriert, mit MeOH (20 mL) gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in DMF (2 mL) gelöst und es wurde je 0.5 mL dieser Lösung in das präparative HPLC-System (s. u.) injiziert. Fraktioniertes Auffangen des Eluats, Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck sowie Entfernung des restlichen Lösungsmittels mittels Gefriertrocknung lieferte die Zielverbindung (1S)-**140** als gelben Feststoff (8.4 mg, 13.8 μmol , 89%).

HPLC (analytisch):

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0	70/30
	0–20	70/30 → 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 → 70/30
	26–30	70/30

Fluss: 0.8 mL min⁻¹ t_R : 8.7 min**HPLC (präparativ):**

Säule: Kromasil 100 C18

Gradient:	Zeit [min]	H ₂ O (0.06% HCl)/CH ₃ CN
	0–1	70/30
	1–20	70/30 → 0/100
	20–25	0/100
	25–26	0/100 → 70/30
	26–30	70/30

Fluss: 18 mL min⁻¹ t_R : 8.9 min

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 206.0 nm (4.403), 228.0 (4.364), 288.0 (4.139), 355.0 (4.243).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ = 3.41–4.10 (m, 8 H, 3''-H, 5''-H, 6''-H₂, 4''-H, 2''-H, 10-H₂), 4.34–4.38 (m, 1 H, 1-H), 4.50–4.68 (m, 4 H, OH, 2-H_a), 4.81–4.98 (m, 4 H, OH, 2-H_b, 1''-H), 5.30 (d, J = 5.4 Hz, 1 H, OH), 6.58 (d, J = 9.5 Hz, 1 H, 6'-H), 7.32 (d, J = 8.9 Hz, 1 H, 9'-H), 7.43–7.48 (m, 1 H, 7-H), 7.59 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, 8-H), 7.72–7.80 (m, 2 H, 3'-H, 10'-H), 7.95 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, 9-H), 8.25 (s, 1 H, 4-H), 8.36 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, 6-H), 8.64 (d, J = 9.5 Hz, 1 H, 5'-H), 12.24 (s, 1 H, NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ = 41.2 (C-1), 47.4 (C-10), 55.0 (C-2), 59.5 (C-6''), 67.5, 70.4, 73.1, 75.1 (C-2'', C-3'', C-4'', C-5''), 101.7 (C-4), 102.1 (C-1''), 103.9 (C-3'), 111.2 (C-4'), 113.6 (C-9'), 114.9 (C-6'), 116.7 (C-5a), 118.2 (C-10'), 122.8 (C-9b), 123.0 (C-9), 123.3 (C-6), 123.4 (C-7), 123.9 (C-3a'), 127.5 (C-8), 129.4 (C-9a), 132.5 (C-2'), 132.5 (C-10a'), 141.5 (C-5'), 141.9 (C-3a), 149.6 (C-8a'), 153.7 (C-5), 159.7 (COO), 160.5 (NCO) ppm.

C₃₁H₂₇ClN₂O₉ (607.01).

ber.: 629.1293 [M+Na]⁺

gef.: 629.1297 (ESI-HRMS).

10 Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften und der zellulären Aufnahme der dargestellten CBI-Derivate

Untersuchungen zur zellulären Aufnahme sowie der Extinktions- und Emissionsspektren am Fluorimeter wurden in Zusammenarbeit mit Herrn *Dr. Mišo Mitkovski* am Max-Planck-Institutes für experimentelle Medizin in Göttingen untersucht.

10.1 Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften der synthetisierten CBI-Derivate

10.1.1 AAV 10.1.1. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei festgelegter Wellenlänge in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge (Absorption-Scan)

1-5 Aliquots der Stammlösung ($c = 1 \text{ mM}$) der zu untersuchenden Substanz in DMSO (entsprechend 2-10 μL , 2-10 nmol) wurden im gewählten Lösungsmittel (200 μL , Lösungsmittel: Methanol oder Bildgebungspuffer) gelöst. Nach anschließender Durchmischung mit Hilfe eines Vortexgerät wurde diese Lösung in eine Quarz-Küvette pipettiert. Mit einem Fluorimeter wurde die Fluoreszenzintensität der Emissionen bei verschiedenen Anregungswellenlängen gemessen.

10.1.2 AAV 10.1.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Messung des Fluoreszenzemissionsspektrums bei festgelegter Anregungswellenlänge (Emission-Scan)

1-5 Aliquots der Stammlösung ($c = 1 \text{ mM}$) der zu untersuchenden Substanz in DMSO (entsprechend 2-10 μL , 2-10 nmol) wurden im gewählten Lösungsmittel (200 μL ,

Lösungsmittel: Methanol oder Bildgebungspuffer) gelöst. Nach anschließender Durchmischung mit Hilfe eines Vortexgerät wurde diese Lösung in eine Quarz-Küvette pipettiert. Mit einem Fluorimeter wurde die Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Anregungen mit Laserlicht gemessen.

10.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme und intrazellulären Verteilung der synthetisierten fluoreszenzmarkierten CBI-Derivate

10.2.1 AAV 10.2.1. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Vorbereitung der A549-Zellen zur Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter CBI-Derivate am konfokalen Laserscanning-Mikroskop

Als Zelllinie dienten das adhärent wachsende humane Bronchialkarzinom der Linie A549. Die Aussaat der Tumorzellen erfolgte in D10F (DMEM mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum, 44 mM NaHCO₃ und 4 mM Glutamin) in einer Konzentrationen von 25×10^3 Zellen in 500 μ L Medium pro Kammer des Deckgläschens (Nunc[®] Lab-Tek[®] Chamber Slide mit 4 wells auf Permanox). Die Zellen wurden für 24 h bei 37 °C und 7.5% CO₂ adheriert. Alternativ wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^3 Zellen in 500 μ L Medium pro Kammer des Deckgläschens ausgesät und für 3 Tage bei 37 °C und 7.5% CO₂ adheriert.

10.2.2 AAV 10.2.2. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Vorbereitung der HeLa SS6-Zellen zur Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter CBI-Derivate am konfokalen Laserscanning-Mikroskop

Als Zelllinie dienten adhärent wachsende Zervixkarzinomzellen der Linie HeLa SS6. Die Aussaat der Tumorzellen erfolgte in D10F (DMEM mit Zusatz von 10% fötalem

Kälberserum, 0.4 mM Glutamin und 0.2 mM Natriumpyruvat) in einer Konzentration von 25×10^3 Zellen in 500 μL Medium pro Kammer des Deckgläschens (Nunc[®] Lab-Tek[®] Chamber Slide mit 4 wells auf Permanox). Die Zellen wurden für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ adheriert.

10.2.3 AAV 10.2.2. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Untersuchung der zellulären Aufnahme fluoreszenzmarkierter CBI- Derivate inklusive des Waschens der Zellen nach Inkubation

Die nach AAV 10.2.1. und AAV 10.2.2. vorbereiteten Zellen wurden mit serumfreiem *UltraCulture*[®] Medium (2 \times 1 mL) gewaschen und mit einer Lösung der zu untersuchenden Substanz in DMSO und *UltraCulture*[®] Medium (500 μL , 1% DMSO) oder mit einer Lösung aus DMSO in *UltraCulture*[®] Medium (500 μL , 1% DMSO) versetzt. Die Konzentration der Verbindungen in der Inkubationslösung betrug 1-100 μM . Nach einer bestimmten Inkubationszeit (5 min – 0.5 h) bei 37 °C und 7.5% CO₂ wurden die Zellen mit *UltraCulture*[®] Medium (1 mL) sowie mit dem Bildgebungspuffer (2 \times 1 mL) gewaschen und im Bildgebungspuffer mittels eines konfokalen Fluoreszenzmikroskopes untersucht.

10.2.4 AAV 10.2.4. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Anfärbung mit Hoechst 33342 (64), Mitochondrienfarbstoff MitoTracker Deep Red FM (65) oder dem Mitochondrienfarbstoff MitoTracker Green FM (148)

Zur Anfärbung der Zellkerne wurde eine Lösung des Farbstoffs Hoechst 33342 (64) in Puffer (1 μL , Konzentration der Stammlösung: 36 mM, 36 nmol) mit dem Bildgebungspuffer in den Kammern vermischt ($c_{\text{final}} = 72 \mu\text{M}$) und die Zellen vor der Beobachtung einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Co-Lokalisation der mitochondrialen Strukturen wurde mit den Mitochondrienfarbstoffen **65** oder **148** angefärbt. Hierzu wurde eine Lösung von **65** oder **148** in DMSO (0.5–1.5 μL , Konzentration der Stammlösung: 10 μM) mit dem Bildgebungspuffer in den Kammern vermischt ($c_{\text{final}} = 10\text{--}30 \text{ nM}$) und die Zellen vor der Beobachtung bei Raumtemperatur 5 min–0.5 h inkubiert.

E. ANHANG

1 *In-vitro*-Zytotoxizitätstests

Die Zytotoxizität der in dieser Arbeit dargestellten *seco*-Drugs und Galaktoside wurde mit Hilfe des HTCFA-Assays an humanen Bronchialkarzinomzellen der Linie A549 bestimmt. Angegeben sind die aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten gemittelten relativen Klonbildungsraten (Kapitel B.3.4). Die Untersuchungen wurden von *Dr. Ingrid Schuberth, Angela Rübeling* und *Anja Herdlitschke* in der Abteilung für Zellkultur des Instituts für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt.

1.1 Ergebnisse für das (1S)-CBI-DMAI-Galaktosid (1S)-118

ohne β -D-Galaktosidase		mit β -D-Galaktosidase (4 U mL ⁻¹)	
Konzentration	rel. Klonbildungsrate	Konzentration	rel. Klonbildungsrate
[μ M]	[%]	[μ M]	[%]
0	100	0	100
7.63	91.46	0.0153	101.67
15.26	88.3	0.076	101.34
22.9	86.56	0.153	84.3
38.16	60.4	0.229	67.77
76.32	6.52	0.382	42.93
152.64	0.29	0.763	4.11
305.28	0.12	1.144	1.96
IC ₅₀ = 40.8 nM		IC ₅₀ = 0.33 nM	
QIC₅₀ = 124			

1.2 Ergebnisse für das fluoreszenzmarkierte (1S)-CBI-DMAI-Galaktosid (1S)-72

ohne β -D-Galaktosidase		mit β -D-Galaktosidase (4 U mL ⁻¹)	
Konzentration	rel. Klonbildungsrate	Konzentration	rel. Klonbildungsrate
[μ M]	[%]	[μ M]	[%]
0	100	0	100
8.88	101.17	0.044	94.66
44.38	104.68	0.444	94.16
88.76	96.47	0.888	100.31
221.9	71.33	2.22	75.93
310.67	52.04	4.44	49.97
443.81	34.34	6.66	15.78
665.72	5.74	8.88	4.27
IC ₅₀ = 317 nM		IC ₅₀ = 4.3 nM	
QIC₅₀ = 74			

1.3 Ergebnisse für das (1S)-CBI-BO-Galaktosid (1S)-70

ohne β -D-Galaktosidase		mit β -D-Galaktosidase (4 U mL ⁻¹)	
Konzentration	rel. Klonbildungsrate	Konzentration	rel. Klonbildungsrate
[nM]	[%]	[nM]	[%]
0	100	0	100
3.07	93.01	6.15	95.65
6.15	66.22	24.59	92.07
12.3	39.19	61.49	76.01

18.45	32.8	122.97	40.59
24.59	6.28	245.94	18.55
49.19	1.77	491.88	2.17
98.38	0.032	614.85	0.4
IC ₅₀ = 106 nM		IC ₅₀ = 18.8 nM	
QIC ₅₀ = 5.6			

1.4 Ergebnisse für das (1S)-seco-CBI-BO-Drug (1S)-141

Konzentration [nM]	rel. Klonbildungsrate [%]
0	100
0.77	94.19
1.54	91.13
3.84	85.95
7.68	57.61
11.52	27.18
15.36	18.04
30.72	2.81
IC ₅₀ = 18.1 nM	

1.5 Ergebnisse für das (1S)-CBI-TO3-Galaktosid (1S)-147

ohne β -D-Galaktosidase		mit β -D-Galaktosidase (4 U mL ⁻¹)	
Konzentration [nM]	rel. Klonbildungsrate [%]	Konzentration [nM]	rel. Klonbildungsrate [%]

0	100	0	100
1.12	87.09	0.11	95.82
1.69	62.14	1.12	78.48
2.81	38.14	1.69	41.81
5.62	9.4	2.25	33.1
8.43	1.29	2.81	9.74
11.24	0.56	5.62	0.32
14.06	0.36	8.43	0.1
IC ₅₀ = 2.3 nM		IC ₅₀ = 1.6 nM	
QIC₅₀ = 1.4			

1.6 Ergebnisse für das (1S)-seco-CBI-TO3-Drug (1S)-145

Konzentration [nM]	rel. Klonbildungsrate [%]
0	100
0.69	94.66
1.38	85.58
3.44	72.59
6.88	52.8
8.25	38.33
10.31	6.03
13.75	4.13
IC₅₀ = 7.2 nM	

1.7 Ergebnisse für das (1S)-CBI-Galaktosid (1S)-69

ohne β -D-Galaktosidase		mit β -D-Galaktosidase (4 U mL ⁻¹)	
Konzentration	rel. Klonbildungsrate	Konzentration	rel. Klonbildungsrate
[μ M]	[%]	[μ M]	[%]
0	100	0	100
0.176	97.21	0.176	105.8
1.76	97.27	0.44	98.22
3.52	73.83	0.88	93.39
7.04	25	1.76	71.9
8.8	13.8	3.52	27.79
10.56	5.11	7.04	0.75
14.09	0.69		
IC ₅₀ = 4.8 μ M		IC ₅₀ = 2.4 μ M	
QIC ₅₀ = 2			

1.8 Ergebnisse für das (1S)-seco-CBI-Drug (1S)-92

Konzentration	rel. Klonbildungsrate
[μ M]	[%]
0	100
0.0025	99.56
0.0123	103.52
0.0246	90.61
0.123	54.7
0.185	40.78

0.246 25.24
 0.616 10.6

$IC_{50} = 0.11 \mu M$

1.9 Ergebnisse für das (1S)-CBI-DMACA-Galaktosid (1S)-139

ohne β -D-Galaktosidase		mit β -D-Galaktosidase (4 U mL ⁻¹)	
Konzentration	rel. Klonbildungsrate	Konzentration	rel. Klonbildungsrate
[μM]	[%]	[μM]	[%]
0	100	0	100
0.154	94.32	0.154	97.98
0.77	104.43	0.23	81.85
1.16	98.17	0.39	65.26
1.54	97.24	0.54	46.19
3.86	75.82	0.77	20.63
7.72	18.4	1.16	2.38
11.58	2.28	1.54	0.27
$IC_{50} = 5.0 \mu M$		$IC_{50} = 0.43 \mu M$	
$QIC_{50} = 12$			

1.10 Ergebnisse für das (1S)-seco-CBI-DMACA-Drug (1S)-137

Konzentration	rel. Klonbildungsrate
[μM]	[%]
0	100
0.00206	104.16

0.0206	100.68
0.206	87.53
0.309	75.15
0.515	39.17
0.721	20.19
1.03	4.17

$$IC_{50} = 0.38 \mu\text{M}$$

1.11 Ergebnisse für das (1S)-CBI-Cumarinindol-Galaktosid (1S)-140

ohne β -D-Galaktosidase		mit β -D-Galaktosidase (4 U mL ⁻¹)	
Konzentration	rel. Klonbildungsrate	Konzentration	rel. Klonbildungsrate
[nM]	[%]	[nM]	[%]
0	100	0	100
0.0824	109.8	0.00165	96.3
0.124	104.2	0.016	61.01
0.16	90.19	0.041	3.74
0.82	1.57	0.082	0.014
1.65	0.014		
IC ₅₀ = 0.26 nM		IC ₅₀ = 0.018 nM	
QIC₅₀ = 14			

1.12 Ergebnisse für das (1S)-seco-CBI-Cumarinindol-Drug (1S)-138

Konzentration	rel. Klonbildungsrate
[nM]	[%]

0	100
0.00225	100.9
0.0225	28.5
0.0562	0.225

IC ₅₀ = 0.014 nM	
-----------------------------	--

2 Abkürzungen und Akronyme

A	Adenin
ABPP	<i>activity-based protein profiling</i>
Ac	Acetyl
ADEPT	<i>antibody-directed enzyme prodrug therapy</i>
Äq.	Äquivalente
APT	<i>attached proton test</i>
aq.	wässrig
atm	Atmosphäre
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bu	Butyl
BuLi	Butyllithium
CBI	Cyclopropabenzindol
CBIQ	Cyclopropabenzochinolin
CI	Cyclopropaindol
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CPI	Cyclopropapyrroloindol
CPyl	7-Methoxycarbonyl-cyclopropapyridoindol
CT	Computertomographie
Cys	Cystein
DA	Duocarmycin A
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAI	5-[2-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)-ethoxy]-1 <i>H</i> -indol
DMBI	5-[2-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)-ethoxy]-6-benzyloxy-1 <i>H</i> -indol
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMMI	5-(2- <i>N,N</i> -Dimethylaminoethoxy)-6-methoxy-1 <i>H</i> -indol
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPPA	Diphenylphosphorylazid
DSA	Duocarmycin SA
EDAC·HCl	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid-Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuß
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
EtOAc	Essigsäureethylester
Gal	Galaktosyl
GDEPT	<i>gene-directed enzyme prodrug therapy</i>
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GlcA	Glucuronyl
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HMBC	<i>heteronuclear multiple-bond correlation</i>
HOAc	Eisessig
HPLC	<i>high performance (pressure) liquid chromatography</i>
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum correlation</i>
HTCFA	<i>human tumor colony forming ability</i>
Hz	Hertz
<i>i</i>	<i>ipso</i>
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration</i> ; Toxinkonzentration, bei der das Zellwachstum um 50% unterbunden wird
Ind ₂	Bisindol-
Inj.	Injektion
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös
<i>in vitro</i>	außerhalb lebender Organismen; hier: Versuche an lebenden Zellen in Zellkultur
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
IR	Infrarot-Spektroskopie

<i>m</i>	<i>meta</i>
kat.	katalytische Mengen
konz.	konzentriert
Man	Mannosyl
MCBI	7-Methoxy-CBI
MCCPI	Methoxycarbonyl-CPI
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MMI	5-Methoxy-1 <i>H</i> -indol
MPMI	5-[2-(<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -propargylamino)ethoxy]-6-methoxy-1 <i>H</i> -indol
MS	Molsieb
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Ns	Nosyl (Nitrophenylsulfonyl)
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PDE	Pyrrolidihydroindol
PET	Positronenemissionstomographie
Ph	Phenyl
QIC ₅₀	IC ₅₀ (Prodrug) / IC ₅₀ (Prodrug in Anwesenheit des aktivierenden Enzyms)
RAS	<i>rat sarcoma</i>
R _f	Retentionswert für DC
t _R	Retentionszeit für HPLC
RNA	Ribonucleinsäure
RP	<i>reversed-phase</i> (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<i>seco</i>	Präfix zur Bezeichnung von Vorstufen zyklischer Verbindungen (Ringöffnung)

siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
Std.	Standard
T	Thymin
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
TBAI	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumiodid
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydro-2-pyranyl
TMI	5,6,7-Trimethoxy-1 <i>H</i> -indol
TMS	Trimethylsilyl
TMS-NCS	Trimethylsilylisothiocyanat
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
Tr	Triphenylmethyl (trityl)
Ts	Tosyl (Toluolsulfonyl)
UV	Ultraviolett-Spektroskopie

3 Literatur

- ¹ <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Zeitreihen/LangeReihen/Bevoelkerung/Content100/lrbev01ga,templateId=renderPrint.psml>, 29.08.2011.
- ² <http://www.isf-muenchen.de/pdf/Zukunft-dt.pdf>, 29.08.2001.
- ³ http://www.rki.de/cln_160/nn_205770/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2010,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/KID2010.pdf, 29.08.2011.
- ⁴ a) L. F. Tietze, K. Schmuck, *Curr. Pharm. Des.* **2011**, zur Publikation angenommen; b) L. F. Tietze, B. Krewer, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 304–325; c) L. F. Tietze, B. Krewer, *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 205–211; d) L. F. Tietze, T. Feuerstein *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2155–2175; e) L. F. Tietze, T. Feuerstein, *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 841–854.
- ⁵ Der Allgemeine Teil wurde in weiten Teilen übernommen aus: a) B. Krewer, *Dissertation*, Göttingen **2008**; b) J. M. von Hof, *Dissertation*, Göttingen **2009**; c) F. Major, *Dissertation*, Göttingen **2006**; d) K. Schmuck. *Dissertation*, Göttingen **2011**, e) F. Behrendt. *Diplomarbeit*, Göttingen **2008**.
- ⁶ a) S. Grimm, *Chem. Unserer Zeit* **2003**, *37*, 172–178; b) A. Lawen, *Bioassays* **2003**, *25*, 888–896; c) A. Gewies, *ApoReview* **2003**, 1–26.
- ⁷ W. Pschyrembel, *Pschyrembel*, de Gruyter, 261. Auflage, Berlin **2007**, S. 714, 1315.
- ⁸ E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting, *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 9. Auflage, Stuttgart **2008**, S. 907, 919, 923.
- ⁹ C. Lengauer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Nature* **1998**, *396*, 643–649.
- ¹⁰ H.-G. Neumann, *Chemie in unserer Zeit* **1991**, *25*, 102–107.

- ¹¹ D. M. Prescott, A. S. Flexer, *Krebs*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg, **1990**.
- ¹² W. Burkart, *Spektrum der Wissenschaft* **1994**, *12*, 112–120.
- ¹³ G. Löffler, *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, Springer Verlag, Berlin, **2000**.
- ¹⁴ P. Tiollais, M. Buendia in *Krebs – Forschung, Diagnostik, Therapie, Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, **1992**.
- ¹⁵ L. M. Coussens, Z. Werb, *Nature* **2002**, *420*, 860–867.
- ¹⁶ a) R. A. Weinberg in *Spektrum der Wissenschaft Spezial: Krebsmedizin*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg, **1996**; b) W. W. Gibbs in *Spektrum der Wissenschaft Spezial: Krebsmedizin II*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg, **2003**.
- ¹⁷ H. Varmus, R. A. Weinberg, *Gene und Krebs – Biologische Wurzeln der Tumorentstehung*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1996**.
- ¹⁸ a) R. A. Weinberg, *Science* **1985**, *230*, 770–776; b) L. Römer, C. Klein, A. Dehner, H. Kessler, J. Buchner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6590–6611.
- ¹⁹ O. D. Schärer, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3052–3082.
- ²⁰ K. E. Hellström, I. Hellström, *Tumor Antigens*, in J. R. Bertino, *Encyclopedia of Cancer*, 1. Auflage, Academic Press, San Diego **1997**.
- ²¹ L. J. van't Veer, R. Bernards, *Nature* **2008**, *452*, 564–570.
- ²² a) C. Nieder, N. Wieden Andratschke, M. Molls, *Cancer Treatment Rev.* **2003**, *32*, 348–364; b) C. Verhoef, J. H. W. de Wilt, H. M. W. Verheul, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 2623–2630; c) F. Hillen, A. W. Griffioen, *Cancer Metast. Rev.* **2007**, *26*, 489–502.
- ²³ a) S. P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen, *Biochem. J.* **2000**, *351*, 95–105; b) M. Deininger, E. Buchdunger, B. J. Druker, *Blood* **2005**, *105*, 2640–2653; c) V. Gandhi, J. M. Kilpatrick, W. Plunkett, M. Ayres, L. Harman, M. Du, S. Bantia, J.

- Davisson, W. G. Wierda, S. Faderl, H. Kantarjian, D. Thomas, *Blood* **2005**, *106*, 4253–4260.
- ²⁴ a) *Spektrum der Wissenschaft Spezial 5: Krebsmedizin*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1996**; b) E. Jäger, D. Jäger, A. Knuth, *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 817–820; c) L. Gattinoni, D. J. Powell Jr.; S. A. Rosenberg, N. P. Restifo, *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 383–393.
- ²⁵ a) S. Kumar, M. Shelley, C. Harrison, B. Coles, T. J. Wilt, M. D. Mason, *Cochrane database Syst. Rev.* **2006**, *4*, CD006019; b) C.-H. Lai, H.-J. Huang, *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **2006**, *18*, 29–34; c) S. B. Decruze, J. A. Green, *Int. J. Gynecol. Canc.* **2007**, *17*, 964–978; d) R. E. Greene, *J. Pharmacy Practice* **2008**, *21*, 36–45.
- ²⁶ K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Urban & Fischer, 10. Auflage, München **2009**, S. 233 f., 948, 970.
- ²⁷ a) O. M. Friedman, A. M. Seligman, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 655–658; b) H. Arnold, F. Bourseaux, *Angew. Chem.* **1958**, *70*, 539–544; c) H. Arnold, F. Bourseaux, N. Brock, *Nature* **1958**, *181*, 931.
- ²⁸ a) A. I. Pinto, S. J. Lippard, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *780*, 167–180; b) S. E. Sherman, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1153–1181; c) J. P. Caradonna, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 1454–1466.
- ²⁹ C. Bystroff, S. J. Oatley, J. Kraut, *Biochemistry* **1990**, *29*, 3263–3277.
- ³⁰ E. K. Rowinsky, R. C. Donehower, *Pharmac. Ther.* **1991**, *52*, 35–84.
- ³¹ a) J. Rohr, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2284–2289; b) K. C. Nicolaou, R. K. Guy, P. Potier, *Sci. Am.* **1996**, *272*, 84–88; c) M. E. Wall, M. C. Wani, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 753–760; d) K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, R. K. Guy, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 38–69; e) A. G. Chaudhary, M. M. Gharpure, J. M. Rimoldi, M. D. Chordia, A. A. L. Gunatilaka, D. G. I. Kingston, S. Grover, C. M. Lin, E. Hamel, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4097–4098; f) K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, R. K. Guy, *Angew. Chem.*

- 1994**, 106, 38–69; g) D. G. I. Kingston, *Pharmac. Ther.* **1991**, 52, 1–34; h) S. B. Horwitz, I. Ringel, *J. Nat. Cancer Inst.* **1991**, 83, 288–291; i) M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2325–2327.
- ³² R. C. Young, R. F. Ozols, C. E. Myers, *New Eng. J. Med.* **1981**, 305, 139–153.
- ³³ H. ZurHausen, *Krebs – Forschung, Diagnostik, Therapie*, Spektrum Akad, Vlg., Heidelberg **1992**.
- ³⁴ a) P. C. Cander, *Nutr. Rev.* **1998**, 56, 70–83; b) T. Boon, P. G. Coulie, B. Van den Eynde, *Immunology Today* **1997**, 18, 267–268.
- ³⁵ a) M. Frank, A. Ihan, *Radiol. Oncol.* **2006**, 40, 219–229; b) J. Stanley, *Essentials of Immunology & Serology*, Delmar, 1. Auflage, Albany **2002**, S. 440.
- ³⁶ J. S. Ross, K. Gray, D. Schenkein, B. Greene, Gary S. Gray, J. Shulok, P. J. Worland, A. Celniker, M. Rolfe, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2003**, 3, 107–121.
- ³⁷ G. Köhler, C. Milstein, *Nature* **1975**, 256, 495–497.
- ³⁸ A. Brufsky, *Am. J. Clin. Oncol.* **2010**, 33, 186–195; b) D. J. Slamon, G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ulrich, W. L. McGuire, *Science* **1987**, 235, 177–182.
- ³⁹ D. J. Slamon, G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ulrich, W. L. McGuire, *Science* **1987**, 235, 177–182.
- ⁴⁰ H. Cortes-Funes, *Clin. Transl. Oncol.* **2009**, 11, 349–355.
- ⁴¹ H. Kirchner, A. Kruse, P. Neustock, L. Rink, *Cytokine und Interferone*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1994**.
- ⁴² D. Ockert, M. Schmitz, M. Hampl, E. P. Rieber, *Immunology Today* **1999**, 20, 63–65.
- ⁴³ R. T. Costello, L.-A. Gastaut, D. Olive, *Immunology Today* **1999**, 20, 488–493.
- ⁴⁴ P. Sanderson, G. G. MacPherson, C. H. Jenkins, P. C. Calder, *J. Leuk. Biol.* **1997**, 62, 771–777.
- ⁴⁵ A. Kugler, G. Stuhler, *Nature Medicine* **2000**, 6, 332–336.

- ⁴⁶ Abbildung in Anlehnung an: a) Literaturstelle 42; b) P. Carter, *Nature Rev. Cancer* **2001**, *1*, 118–129.
- ⁴⁷ a) L. Ducry, B. Stump, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 5–13; b) J. M. Lambert, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 543–549; c) B. Hughes, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 665–667; d) P. R. Hamann, *Expert Opin. Ther. Patents* **2005**, *15*, 1087–1103.
- ⁴⁸ J. K. McGavin, C. M. Spencer, *Drugs* **2001**, *61*, 1317–1322.
- ⁴⁹ I. E. Krop, M. Beeram, S. Modi, S. F. Jones, S. N. Holden, W. Yu, S. Girish, J. Tibbitts, J.-H. Yi, M. X. Sliwkowski, F. Jacobson, S. G. Lutzker, H. A. Burris, *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2698–2704.
- ⁵⁰ R. A. Herbertson, N. C. Tebbutt, F.-T. Lee, D. J. MacFarlane, B. Chappell, N. Micallef, S.-T. Lee, T. Saunder, W. Hopkins, F. E. Smyth, D. K. Wyld, J. Bellen, D. S. Sonnichsen, M. W. Brechbiel, C. Murone, A. M. Scott, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 6709–6715.
- ⁵¹ A. Albert, *Nature* **1958**, *182*, 421–423.
- ⁵² a) K. D. Bagshawe, *Br. J. Cancer* **1987**, *56*, 531–532; b) K. D. Bagshawe, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2006**, *6*, 1421–1431; c) K. D. Bagshawe, *Curr. Drug Targets* **2009**, *10*, 152–157; d) K. D. Bagshawe, S. K. Sharma, R. H. J. Begent, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2004**, *4*, 1777–1789; e) T. W. Doyle, *Pharmacology & Therapeutics* **1999**, *83*, 67–123; f) P. D. Senter, C. J. Springer, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *53*, 247–264.
- ⁵³ a) J. C. Reubi, H. R. Mäcke, E. P. Krenning, *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 67S–75S; b) M. Dyba, N. I. Tarasova, C. J. Michejda, *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 2311–2334; c) J. C. Reubi, *Endocrine Reviews* **2003**, *24*, 389–427; d) J. C. Reubi, B. Waser, *Eur. J. Nucl. Med.* **2003**, *30*, 781–793; e) M. Langer, A. G. Beck-Sickinger, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *1*, 71–93; f) W. A. P. Breeman, M. de Jong, D. J. Kwekkeboom, R. Valkema, W. H. Bakker, P. P. M. Kooij, T. J. Visser, E. P. Krenning, *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28*, 1421–1429; g) A. Heppeler, S.

- Froidevaux, A. N. Eberle, H. R. Maecke, *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 971–994; h) A. V. Schally, A. Nagy, *Eur. J. Endocrin.* **1999**, *141*, 1–14; h) G. S. Baldwin, A. Shulkes, *Gut* **1998**, *42*, 581–584.
- ⁵⁴ a) F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 20–53; b) Y. Singh, M. Palombo, P. J. Sinko, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1802–1826; c) G. S. Shukla, D. N. Krag, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2006**, *6*, 39–54; d) R. V. J. Chari, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *31*, 89–104; e) A. T. de Albuquerque Silva, M. C. Chung, L. F. Castro, R. V. Carvalho Güido, E. I. Ferriera, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 893–914; f) H. Fuchs, C. Bachran, *Curr. Drug Targets* **2009**, *10*, 89–93.
- ⁵⁵ O. Warburg, *The Metabolism of Tumors*, Constable, London, **1930**.
- ⁵⁶ a) X. Zhang, Y. Lin, R. J. Gillies, *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 1167–1170; b) R. J. Gillies, I. Robey, R. A. Gatenby, *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 24S–42S.
- ⁵⁷ a) R. K. Jain, *Spektrum der Wissenschaft* **1994**, *9*, 48–55; b) P. Vaupel, F. Kallinowski, P. Okunieff, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 6449–6465.
- ⁵⁸ M. von Ardenne, P. G. Reitnauer, *Acta Biol. Med. Germ.* **1970**, *25*, 483–493.
- ⁵⁹ a) S. P. Osinsky, L. N. Bubnovskaja, T. Sergienko, *Anticancer Res.* **1987**, *7*, 199–201; b) S. P. Osinsky, L. N. Bubnovskaja, *Arch. Geschwulstforschung* **1984**, *54*, 463–469; c) E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 1505–1512; d) M. von Ardenne, P. G. Reitnauer, *Arch. Geschwulstforschung* **1975**, *45*, 135–145.
- ⁶⁰ L. F. Tietze, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1988**, *36*, 728–737.
- ⁶¹ a) L. F. Tietze, M. Beller, R. Fischer, M. Lögers, E. Jähde, K. H. Glüsenkamp, M. F. Rajewsky, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 812–813; b) L. F. Tietze, R. Fischer, M. Beller, R. Seele, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 151–157; c) L. F. Tietze, R. Fischer, H. J. Guder, M. Neumann, *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 847–856; d) L. F. Tietze, R. Fischer, H. J. Guder, A. Goerlach, M. Neumann, T. Krach, *Carbohydr. Res.* **1987**, *164*, 177–194; e) L. F. Tietze, R. Fischer, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 1002.
- ⁶² a) M. Jung, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 399–407; b) K. N. Syrigos, A. A. Epenetos, *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 605–613; c) G. M. Dubowchik, M. A.

- Walker, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *83*, 67–123; d) L. N. Jungheim, T. A. Shepherd, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 1553–1566.
- ⁶³ M. P. Napier, S. K. Sharma, C. J. Springer, K. D. Bagshawe, A. J. Green, J. Martin, S. M. Stribbling, N. Cushen, D. O'Malley, R. H. J. Begent, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 765–772.
- ⁶⁴ S. K. Sharma, R. B. Pedley, J. Bhatia, G. M. Boxer, E. El-Emir, U. Qureshi, B. Tolner, H. Lowe, N. P. Michael, N. Minton, R. H. J. Begent, K. A. Chester, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 814–825.
- ⁶⁵ T. L. Cheng, S. L. Wei, B. M. Chen, J. W. Chern, M. F. Wu, P. W. Liu, S. R. Roffler, *Br. J. Cancer* **1999**, *79*, 1378–1385.
- ⁶⁶ a) G. Xu, H. L. McLeod, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3314–3324; b) I. Niculescu-Duvaz, C. J. Springer, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *26*, 151–172.
- ⁶⁷ L. F. Tietze, T. Herzig, T. Feuerstein, I. Schuberth, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002*, 1634–1645.
- ⁶⁸ a) P. Wentworth, A. Datta, D. Blakey, T. Boyle, L. J. Partridge, G. M. Blackburn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 799–803; b) D. Shabat, C. Rader, B. List, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 6925–6930; c) T. A. Houston, *Curr. Drug Delivery* **2007**, *4*, 264–268.
- ⁶⁹ a) P. M. Wallace, P. D. Senter, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 349–352; b) H. P. Svensson, J. F. Kadow, V. M. Vrudhula, P. M. Wallace, P. D. Senter, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 176–181.
- ⁷⁰ a) M. A. Smal, Z. Dong, H. T. Cheung, Y. Asano, L. Escoffier, M. Costello, M. H. N. Tattersall, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 567–574; b) P. M. Deckert, W. G. Bornmann, G. Ritter, C. Williams Jr, J. Franke, U. Keilholz, E. Thiel, L. J. Old, J. R. Bertino, S. Welt, *Int. J. Oncol.* **2004**, *24*, 1289–1295.
- ⁷¹ a) J. C. Florent, C. Monneret, *Top. Curr. Chem.* **2008**, *283*, 99–140; b) J. C. Florent, X. Dong, G. Gaudel, S. Mitaku, C. Monneret, J. P. Gesson, J.-C. Jacquesy, M. Mondon, B. Renoux, S. Andrianomenjanahary, S. Michel, M.

- Koch, F. Tillequin, M. Gerken, J. Czech, R. Straub, K. Bosslet *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3572–3581.
- ⁷² P. D. Senter, P. C. D. Su, T. Katsuragi, T. Sakai, W. L. Cosand, I. Hellström, K. E. Hellström, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 447–451.
- ⁷³ P. D. Senter, M. G. Saulnier, G. J. Schreiber, D. L. Hirschberg, J. P. Brown, I. Hellström, K. E. Hellström, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 4842–4846.
- ⁷⁴ L. N. Jungheim, T. A. Shepherd, D. L. Meyer, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2334–2240.
- ⁷⁵ M. L. Rodrigues, P. Carter, C. Wirth, S. Mullins, A. Lee, B. K. Blackburn, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 223–227.
- ⁷⁶ N. Pessah, M. Reznik, M. Shamis, F. Yantiri, H. Xin, K. Bowdish, N. Shomron, G. Ast, D. Shabat, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1859–1866.
- ⁷⁷ a) C. J. Springer, P. Antoniw, K. D. Bagshawe, F. Searle, G. M. F. Bisset, M. Jarman, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 677–681; b) D. C. Blakey, B. E. Valcaccia, S. East, A. F. Wright, F. T. Boyle, C. J. Springer, P. J. Burke, R. G. Melton, K. D. Bagshawe, *Cell Biophys.* **1993**, *22*, 1–8; c) K. D. Bagshawe, *Adv. Pharmacol.* **1993**, *24*, 99–121; d) I. Niculescu-Duvaz, F. Friedlos, D. Niculescu-Duvaz, L. Davies, C. J. Springer, *Anticancer Drug Des.* **1999**, *19*, 517–538; e) L. A. Wolfe, R. J. Mullin, R. Laethem, T. A. Blumenkopf, M. Cory, J. F. Miller, B. R. Keith, J. Humphreys, G. K. Smith, *Bioconj. Chem.* **1999**, *10*, 38–48.
- ⁷⁸ a) M. L. Rodrigues, P. Carter, C. Wirth, S. Mullins, A. Lee, B. K. Blackburn, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 223–227; b) U. M. Vrudhula, H. P. Svensson, K. A. Kennedy, P. M. Senter, P. M. Wallace, *Bioconj. Chem.* **1993**, *4*, 334–340.
- ⁷⁹ W. A. Denny, *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 577–595.
- ⁸⁰ P. M. Deckert, C. Renner, L. S. Cohen, A. Jungbluth, G. Ritter, J. R. Bertino, L. J. Old, S. Welt, *British Journal of Cancer* **2003**, *88*, 937–939.
- ⁸¹ a) H. B. Bosmann, T. C. Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, *71*, 1833–1837; b) M. Y. Torgov, S. C. Alley, C. G. Cervený, D. Farquhar, P. D. Senter,

- Bioconjugate Chem. **2005**, *16*, 717–721; c) L. Fang, R. F. Battisti, H. Cheng, P. Reigan, Y. Xin, J. Shen, D. Ross, K. K. Chan, E. W. Martin Jr., P. G. Wang, D. Sun, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6290–6297; d) H. Devalapally, R. S. Navath, V. Yenamandra, R. R. Akkinapally, R. K. Devarakonda, *Ach. Pharm. Res.* **2007**, *6*, 723–732.
- ⁸² N. R. Monks, D. C. Blakey, S. J. East, R. I. Dowell, J. A. Calvete, N. J. Curtin, *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 1543–1552.
- ⁸³ N. R. Monks, D. C. Blakey, S. J. East, R. I. Dowell, J. A. Calvete, N. J. Curtin, *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 1543–1552.
- ⁸⁴ A. Mayer, R. J. Francis, S. K. Sharma, B. Tolner, C. J. Springer, J. Martin, G. M. Boxer, J. Bell, A. J. Green, J. A. Hartley, C. Cruickshank, J. Wren, K. A. Chester, R. H. J. Begent, *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 6509–6516.
- ⁸⁵ a) L. F. Tietze, F. Major, I. Schuberth, D. A. Spiegl, B. Krewer, K. Maksimenka, G. Bringmann, J. Magull, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4396–4409; b) L. F. Tietze, F. Major, I. Schuberth, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6724–6727; c) L. F. Tietze, B. Krewer, H. Frauendorf, F. Major, I. Schuberth, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6720–6724.
- ⁸⁶ M. Zientkowska, *Dissertation*, Göttingen, **2007**.
- ⁸⁷ a) S. Schepelmann, I. Niculescu-Duvaz, C. J. Springer, *Suicide Gene Therapy*. In: M. H. Bronchud, M. A. Foote, G. Giaccone, O. Olopade, P. Workman, *Principles of Molecular Oncology*, Humana Press Inc., Totowa **2008**, 367–382; b) C. Altaner, *Cancer Lett.* **2008**, *270*, 191–201; c) G. U. Dachs, J. Tupper, G. M. Tozer, *Anti-Cancer Drugs* **2005**, *16*, 349–359; d) I. Niculescu-Duvaz, C. J. Springer, *Mol. Biotechnol.* **2005**, *30*, 71–88; e) D. Niculescu-Duvaz, I. Niculescu-Duvaz, C. J. Springer, *Methods Mol. Med.* **2004**, *90*, 161–202; f) D. S. Riddick, C. Lee, S. Ramji, E. C. Chinje, R. L. Cowen, K. J. Williams, A. V. Patterson, I. J. Stratford, C. S. Morrow, A. J. Townsend, Y. Jounaidi, C.-S. Chen, T. Su, H. Lu, P. S. Schwartz, D. J. Waxman, *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 1083–

- 1096; g) D. Portsmouth, J. Hlavaty, M. Renner, *Mol. Aspects Med.* **2007**, *28*, 4–41.
- ⁸⁸ R. Duncan, S. Gac-Breton, R. Keane, R. Musila, Y. N. Sat, R. Satchi, F. Searle, *J. Control. Release* **2001**, *74*, 135–146.
- ⁸⁹ N. P. Minton, *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 237–42.
- ⁹⁰ S. Patyar, R. Joshi, D. S. Prasad Byrav, A. Prakash, B. Medhi, B. K. Das, *J. Biomed. Sci.* **2010**, *17*, 21.
- ⁹¹ Q. Zhang, G. Xiang, Y. Zhang, K. Yang, W. Fan, J. Lin, F. Zeng, J. Wu, *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 2266–2275.
- ⁹² M. A. Robinson, S. T. Charlton, P. Garnier, X. Wang, S. S. Davis, A. C. Perkins, M. Frier, R. Duncan, T. J. Savage, D. A. Wyatt, S. A. Watson, B. G. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 14527–14532.
- ⁹³ D. Shabat, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 1569–1578.
- ⁹⁴ K. Bosslet, J. Czech, D. Hoffmann, *Tumor Target.* **1995**, *1*, 45–50.
- ⁹⁵ a) F. M. H. De Groot, E. W. P. Damen, H. W. Scheeren, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1093–1122; b) W. A. Denny, *Cancer Invest.* **2004**, *22*, 604–619.
- ⁹⁶ a) T. A. Connors, M. E. Whisson, *Nature* **1966**, *210*, 866–867; b) K. Bosslet, R. Straub, M. Blumrich, J. Czech, M. Gerken, B. Sperker, H. K. Kroemer, J.-P. Gesson, M. Koch, C. Monneret, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1195–1201; c) A. Sinhababu, D. Thakker, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *19*, 241–273.
- ⁹⁷ T. E. Mürdter, G. Friedel, J. T. Backmann, M. McClellan, M. Schick, M. Gerken, K. Bosslet, P. Fritz, H. Toomes, H. K. Kroemer, B. Sperker, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 223–228.
- ⁹⁸ L. F. Tietze, R. Seele, B. Leiting, T. Krach, *Carbohydr. Res.* **1988**, *180*, 253–262.
- ⁹⁹ a) M. de Graaf, E. Boven, H. W. Scheeren, H. J. Haisma, H. M. Pinedo, *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 1391–1403; b) X. Chen, B. Wu, P. G. Wang, *Curr. Med. Chem. Anti Canc. Agents* **2003**, *3*, 139–150.

- 100 a) S. Brüsselbach, *Methods Mol. Med.* **2004**, *90*, 303–330; b) D. Weyel, H.-H. Sedlacek, R. Müller, S. Brüsselbach, *Gene Ther.* **2000**, *7*, 224–231.
- 101 P. H. J. Houba, E. Boven, I. H. van der Meulen-Muileman, R. G. G. Leenders, J. W. Scheeren, H. M. Pinedo, H. J. Haisma, *Int. J. Cancer* **2001**, *91*, 550–554.
- 102 F. Schmidt, I. Ungureanu, R. Duval, A. Pompon, C. Monneret, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 2129–2134.
- 103 a) E. Bouvier, S. Thiroit, F. Schmidt, C. Monneret, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3343–3352; b) A. El Alaoui, N. Saha, F. Schmidt, C. Monneret, J. C. Florent, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5012–2019.
- 104 E. Bouvier, S. Thiroit, F. Schmidt, C. Monneret, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 969–977.
- 105 a) L. Devy, F. M. H. de Groot, S. Blacher, A. Hajitou, P. H. Beusker, H. W. Scheeren, J.-M. Foidart, A. Noël, *FASEB J.* **2004**, *18*, 565–567; b) F. M. H. de Groot, A. C. W. de Bart, J. H. Verheijen, H. W. Scheeren, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5277–5283; c) K. Bielawski, A. Bielawska, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 536–542; d) M. Rooseboom, J. N. M. Commandeur, N. P. E. Vermeulen, *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 53–102.
- 106 a) J. M. Brown, W. R. Wilson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 437–447; b) Y. Chen, L. Hu, *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 29–64; c) K. Binley, Z. Askham, L. Martin, H. Spearman, D. Day, S. Kingsman, S. Naylor, *Gene Ther.* **2003**, *10*, 540–549.
- 107 a) L. J. Hanka, A. Dietz, S. A. Gerpheide, S. L. Kuentzel, D. G. Martin, *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 1211–1217; b) D. G. Martin, C. Biles, S. A. Gerpheide, L. J. Hanka, W. C. Krueger, J. P. McGovern, S. A. Mizesak, G. L. Neil, J. C. Stewart, J. Visser, *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 1119–1125.
- 108 J. P. McGovern, G. L. Clarke, E. A. Pratt, T. F. DeKoning, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 63–70.
- 109 M. Ichimura, T. Ogawa, K. Takahashi, E. Kobayashi, I. Kawamoto, T. Yasuzawa, I. Takahashi, H. Nakano, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1037–1038.

- ¹¹⁰ a) Y. Igarashi, K. Futamata, T. Fujita, A. Sekine, H. Senda, H. Naoki, T. Furumai, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 107; b) M. S. Tichenor, D. B. Kastrinsky, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8396–8398.
- ¹¹¹ a) L. H. Hurley, C.-S. Lee, J. P. McGovren, M. A. Warpehoski, M. A. Mitchell, R. C. Kelly, P. A. Aristoff, *Biochemistry* **1988**, *27*, 3886–3892; b) L. H. Hurley, M. A. Warpehoski, C.-S. Lee, J. P. McGovren, T. A. Scahill, R. C. Kelly, M. A. Mitchell, N. A. Wicnienski, I. Gebhard, P. D. Johnson, V. S. Bradford, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4633–4649.
- ¹¹² a) Y. Ambroise, D. L. Boger, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *12*, 303–306; b) K. Spiegel, *Dissertation*, Triest **2004**; c) K. Spiegel, U. Rothlisberger, P. Carloni, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 3647–3660.
- ¹¹³ a) W. C. Tse, D. L. Boger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1607–1617; b) D. L. Boger, D. L. Hertzog, B. Bollinger, D. S. Johnson, H. Cai, J. Goldberg, P. Turnbull, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4977–4986; c) D. L. Boger, B. Bollinger, D. L. Hertzog, D. S. Johnson, H. Cai, P. Mésini, R. M. Garbaccio, Q. Jin, P. A. Kitos, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4987–4998; d) D. L. Boger, R. M. Garbaccio, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 1043–1052.
- ¹¹⁴ K. S. MacMillan, D. L. Boger, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5771–5780.
- ¹¹⁵ a) K. N. Kirschner, M. Lee, R. C. Stanley, J. P. Bowen, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 329–335; b) P. Cimino, G. Bifulco, R. Riccio, L. Gomez-Paloma, V. Barone, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1242–1251.
- ¹¹⁶ A. V. Vargiu, P. Ruggerone, A. Magistrato, P. Carloni, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 550–561.
- ¹¹⁷ J. P. McGovren, G. L. Clarke, E. A. Pratt, T. F. DeKoning, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 63–70.
- ¹¹⁸ a) J. P. McGovern, G. L. Clarke, E. A. Pratte, T. F. deKoning, *J. Antibiot.* **1983**, *37*, 63–70; b) S. Nagamura, A. Asai, E. Kobayashi, K. Gomi, H. Saito, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 623–630; c) B. Cacciari, R. Romagnoli, P. G. Baraldi, T. Da Ros,

- G. Spalluto, *Exp. Opin. Ther. Pat.* **2000**, *10*, 1853–1871; d) A. Sato, L. McNulty, K. Cox, S. Kim, A. Scott, K. Daniell, K. Summerville, C. Price, S. Hudson, K. Kiakos, L. A. Hartley, T. Asao, M. Lee, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3903–3918; e) P. G. Baraldi, A. Bovero, F. Fruttarolo, D. Preti, M. A. Tabrizi, M. G. Pavani, R. Romagnoli, *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 475–528; f) W. A. Denny, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 533–544; g) B. S. P. Reddy, S. K. Sharma, J. P. W. Lown, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 475–508.
- ¹¹⁹ a) D. L. Boger, C. W. Boyce, R. M. Garbaccio, J. A. Goldberg, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 787–828; b) D. L. Boger, D. S. Johnson, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1542–1580; c) S. E. Wolkenberg, D. L. Boger, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2477–2496.
- ¹²⁰ N. Ghosh, H. M. Sheldrake, M. Searcey, K. Pors, *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1494–1524.
- ¹²¹ a) J. P. Parrish, T. V. Hughes, I. Hwang, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 80–81; b) M. S. Tichenor, K. S. MacMillen, J. S. Stover, S. E. Wolkenberg, M. G. Pavani, L. Zanella, A. N. Zaid, G. Spalluto, T. J. Rayl, I. Hwang, P. G. Baraldi, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14092–14099.
- ¹²² a) P. G. Baraldi, G. Balboni, M. G. Pavani, G. Spalluto, M. A. Tabrizi, E. De Clercq, J. Balzarini, T. Bando, H. S., R. Romagnoli, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2536–2543; b) J. P. Parrish, D. B. Kastrinsky, F. Stauffer, M. P. Hedrick, I. Hwang, D. L. Boger, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3815–3838; c) Y. Wang, L. Li, W. Ye, Z. Tian, W. Jiang, H. Wang, S. C. Wright, J. W. Larrick, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 634–637.
- ¹²³ a) D. L. Boger, T. Ishizaki, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 793–796; b) D. B. Kastrinsky, D. L. Boger, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2284–2289.
- ¹²⁴ a) R. I. Pinto, S. J. Lippard, *Biochem. Biophys. Acta* **1985**, *780*, 167–180; b) S. E. Sherman, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1153–1181; c) J. P. Caradonna, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 1454, –1466.

- ¹²⁵ a) R. D. Hightower, B. U. Sevin, J. P. Pevrás, M. Untch, R. Angioli, H. Averette, *Gynecol. Oncol.* **1992**, *42*, 186–190; b) B. J. Foster, P. M. Larusso, E. Poplin, M. Zalupski, M. Valdivieso, A. Wozniak, L. Flaherty, D. A. Kasunic, R. H. Earhart, L. H. Baker, *Invest. New Drugs* **1996**, *13*, 321–326; c) H. A. Burris, V. C. Dleras, M. Tunca, R. H. Earhart, J. R. Echardt, G. I. Rodriguez, D. S. Shaffer, S. M. Fields, E. Campbell, L. Scaaf, D. Kasunic, D. D. Von Hoff, *Anticancer Drugs* **1997**, *8*, 588–596.
- ¹²⁶ a) L. H. Li, T. F. deKoning, R. C. Kelly, W. C. Krueger, J. P. McGovren, G. E. Padbury, G. L. Petzold, T. L. Wallace, R. J. Ouding, M. D. Prairie, I. Gebhard, *Canc. Res.* **1992**, *52*, 4904–4913; b) I. Wolff, K. Bench, J. S. Beijnen, U. Brunsch, F. Cavalli, J. de Jong, Y. Groot, O. van Tellingen, J. Wanders, C. Sessa, *Clin. Canc. Res.* **1996**, *2*, 1717–1723; c) O. van Tellingen, C. J. A. Punt, A. Awada, D. J. T. Wagener, M. J. Piccart, Y. Groot, L. J. Scaaf, R. E. C. Henrar, W. J. Nooijen, J. H. Beijnen, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1998**, *41*, 377–384.
- ¹²⁷ a) H. C. Pitot, C. Erlichman, J. M. Reid, J. A. Sloan, M. M. Ames, P. G. Bagniewski, P. Atherton-Skaff, A. A. Adjei, J. Rubin, D. Rayson, R. M. Goldberg, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1999**, *40*, 91; b) H. C. Pitot, J. M. Reid, J. A. Sloan, M. M. Ames, A. A. Adjei, J. Rubin, P. G. Bagniewski, P. Atherton, D. Rayson, R. M. Goldberg, C. Ehrlichman, *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 712–717; c) G. H. Schwartz, A. Patnaik, L. A. Hammond, J. Rizzo, K. Berg, D. D. Von Hoff, E. K. Rowinsky, *Ann. Oncol.* **2003**, *14*, 775–782.
- ¹²⁸ a) S. R. Alberts, C. Ehrlichman, J. M. Reid, J. A. Sloan, M. M. Ames, R. L. Richardson, R. M. Goldberg, *Clin. Canc. Res.* **1998**, *4*, 2111–2117; b) A. Asai, S. Nagamura, E. Kobayashi, K. Gomi, H. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2995–2998; c) J. Rubin, S. Alberts, V. Suman, H. Pitot, M. Greene, J. Camoriano, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2000**, *19*, abstr. 1198; d) S. N. Markovic, V. J. Suman, A. M. Vokov, T. R. Fitch, D. W. Hillman, A. A. Adjei, S. R. Alberts, J. S. Kaur, T. A. Braich, J. M. Leitch, E. T. Creagan, *Am. J. Clin. Oncol.* **2002**, *25*, 308–312.

- ¹²⁹ R. Baird, S. Winstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 567–578.
- ¹³⁰ a) L. F. Tietze, M. Lieb, T. Herzig, F. Hauernert, I. Schuberth, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1929–1939; b) M. P. Hay, R. F. Anderson, D. M. Ferry, W. R. Wilson, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5533–5545; c) S. C. Jeffrey, M. Y. Torgov, J. B. Andreyka, L. Boddington, C. G. Cervený, W. A. Denny, K. A. Gordon, D. Gustin, J. Haugen, T. Kline, M. T. Nguyen, P. D. Senter, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1344–1358.
- ¹³¹ a) M. P. Hay, B. M. Sykes, W. A. Denny, W. R. Wilson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2237–2242; b) W. A. Denny, *J. Biomed. Biotech.* **2003**, *1*, 48–70.
- ¹³² M. P. Hay, G. J. Atwell, W. R. Wilson, S. M. Pullen, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2456–2466.
- ¹³³ a) W. Jin, J. D. Trzupsek, T. J. Rayl, M. A. Broward, G. A. Vielhauer, S. J. Weir, I. Hwang, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15391–15397; b) J. P. Lajiness, W. R. Robertson, I. Dunwiddie, M. A. Broward, G. A. Vielhauer, S. J. Weir, D. L. Boger, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7731–7738.
- ¹³⁴ a) J. M. von Hof, *Dissertation*, Göttingen **2009**; b) B. Krewer, *Dissertation*, Göttingen **2008**; c) H. Schuster, *Dissertation*, Göttingen, **2008**; d) F. Major, *Dissertation*, Göttingen, **2006**; e) O. Panknin, *Dissertation*, Göttingen **2004**; f) T. Feuerstein, *Dissertation*, Göttingen **2003**; g) F. Colunga, *Dissertation*, Göttingen **2007**; h) A. Fecher, *Dissertation*, Göttingen **2000**; i) T. Herzig, *Dissertation*, Göttingen **2000**.
- ¹³⁵ a) L. F. Tietze, T. Herzig, A. Fecher, F. Hauernert, I. Schuberth, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 758–765; b) L. F. Tietze, T. Feuerstein, A. Fecher, F. Hauernert, O. Panknin, U. Borchers, I. Schuberth, F. Alves, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 785–787; c) L. F. Tietze, T. Herzig, T. Feuerstein, I. Schuberth, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1634–1645.
- ¹³⁶ L. F. Tietze, J. M. von Hof, B. Krewer, M. Müller, F. Major, H. J. Schuster, I. Schuberth, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1946–1955.

- ¹³⁷ L. F. Tietze, H. J. Schuster, K. Schmuck, I. Schuberth, F. Alves, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6312–6318.
- ¹³⁸ a) L. F. Tietze, B. Krewer, H. Frauendorf, F. Major, I. Schuberth, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6720–6724; b) L. F. Tietze, B. Krewer, H. Frauendorf, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 437–448; c) L. F. Tietze, B. Krewer, F. Major, I. Schuberth, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13031–13036; d) L. F. Tietze, B. Krewer, H. Frauendorf, *Eur. J. Mass Spectrom.* **2009**, *15*, 661–672; e) L. F. Tietze, B. Krewer, J. M. von Hof, H. Frauendorf, I. Schuberth, *Toxins* **2009**, *1*, 134–150.
- ¹³⁹ L. F. Tietze, J. M. von Hof, M. Müller, B. Krewer, I. Schuberth, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7494–7497.
- ¹⁴⁰ a) S. K. Sharma, G. Jia, J. W. Lown, *Curr. Med. Chem. Anti Canc. Agents* **2001**, *1*, 27–45; b) K. M. Rahman, A. S. Thompson, C. H. James, M. Narayanaswamy, D. E. Thurston, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13756–13766.
- ¹⁴¹ Informationen zur Fluoreszenzmikroskopie: <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenzmikroskopie>.
- ¹⁴² a) O. Shimomura, F. H. Johnson und Y. Saiga. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **1962**, *59*, 223–239; b) O. Shimomura. *Journal of Microscopy* **2005**, *217*, 1–15.
- ¹⁴³ B. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* **2006**, *312*, 217–224.
- ¹⁴⁴ a) <http://probes.invitrogen.com/handbook/sections/0806.html>; b) S. A. Latt, G. Stetten, *J. Histochem. and Cytochem.* **1976**, *24*, 24–33; c) G. A. Daxhelet, M. M. Coene, P.P. Hoet, G. C. Cocito, *Anal Biochem.* **1989**, *179*, 401–403; c) F. G. Loontjens, P. Regenfuss, A. Zechel, L. Dumortier, R. M. Clegg, *Biochemistry* **1990**, *29*, 9029–9039.
- ¹⁴⁵ a) <http://probes.invitrogen.com/handbook/sections/1202.html>;
b) <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07510.pdf>.

- 146 a) A. Macho, D. Decaudin, M. Castedo, T. Hirsch, S. A. Susin, N. Zamzami, G. Kroemer, *Cytometry* **1996**, *25*, 333–340; b) M. Castedo, T. Hirsch, S. A. Susin, N. Zamzami, P. Marchetti, A. Macho, G. Kroemer. *J. of Immunol.* **1996**, 512–521.
- 147 <http://products.invitrogen.com/ivgn/en/US/adirect/invitrogen?cmd=IVGNcatDisplayCategory&catKey=72201>.
- 148 F. Alves, M. Zientkowska, unveröffentlichte Ergebnisse.
- 149 <http://www.mpin-koeln.mpg.de/index.php?id=77>.
- 150 a) J. Krneta, J. Kroll, F. Alves, C. Prahst, F. Sananbenesi, C. Dullin, S. Kimmina, D. J. Phillips, H. G. Augustin, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5686–5694; b) N. V. Evgenov, Z. Medarova, G. Dai, S. Bonner-Weir, A. Moore, *Nat. Med.* **2006**, *12*, 144–148; c) S. H. Thorne, R. S. Negrin, C. H. Contag, *Science* **2006**, *311*, 1780–1784; d) L. A. Pardo, C. Contreras-Jurado, M. Zientkowska, F. Alves, W. Stühmer, *J. Membrane Biol.* **2005**, *205*, 115–124; e) X. Chen, P. S. Conti, R. A. Moats, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 8009–8014; f) C.-H. Tung, Q. Zeng, K. Shah, D.-E. Kim, D. Schellingerhout, R. Weissleder, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1579–1583.
- 151 a) R. M. Hoffman, *Nature* **2005**, *5*, 796–806; b) G. Seitz, S. W. Warmann, J. Fuchs, H. Heitmann, J. Mahrt, A.-C. Busse, P. Ruck, R. M. Hoffman, J. T. Wessels. *Cell Prolif.* **2008**, *41*, 365–374; c) M. Yang, G. Luiken, E. Baranov, R. M. Hofman, *BioTechniques* **2005**, *39*, 170–172.
- 152 F. F. Jobsis, *Science* **1977**, *198*, 1264–1267.
- 153 D. L. Boger, J. A. McKie, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1271–1275.
- 154 a) L. F. Tietze, H. J. Schuster, S. M. Hampel, S. Rühl, R. Pfohl, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 895–901.
- 155 H. Tecle, *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 547–559.
- 156 a) J. Scherkenbeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 38–47; b) O. Buchardt et al., *J. Org. Chem.* **1994**, *19*, 5767–5773.

- 157 a) R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213–236; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 212–235; b) W. Dullenkopf, J. C. Castro-Palomino, L. Manzoni, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **1996**, *296*, 135–147.
- 158 H. O. Wirth, O. Königstein, W. Kern, *Ann. Chem.* **1960**, *643*, 84–104.
- 159 a) P. Portonovo, M. Joullie, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3687–3690; b) G. Wells et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2147–2151; c) M. D. Burkart, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5443–5445; d) L. Desaubry, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5176–5187; e) E. A. Theodorakis, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4886–4894.
- 160 K. MacMillan, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1428–1437.
- 161 T. Symeonidis et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1139–1142.
- 162 S. O. Kelley, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* **2007**, *17*, 5182–5185.
- 163 S. M. Yarmoluk et al., *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2000**, *10*, 2201–2204.
- 164 D. D. Perrin, W. L. F. Arnarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd Ed., Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- 165 Es wurde eine kommerziell erhältliche 1.25 M Lösung von HCl in Ethanol (*Fluka*, CAS: 123864-74-4) verwendet.

4 Danksagung

Die wichtigste und schönste Unterstützung habe ich während der letzten drei Jahre von meiner Familie erhalten, für die ich ihr unendlich dankbar bin. Hierzu zählen neben meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern die gesamte Familie Jakobi. Ein besonderer Dank gilt hierbei Dir, liebe Vera. Du hast es geschafft, mich stets zu motivieren, mir auch in schwierigen Situationen bei zu stehen aber natürlich auch die schönen Stunden des Lebens miteinander zu verbringen.

Meinen „Göttinger Jungs“, Arne, Timo, Julian, Johannes, Jan und Miggen danke ich für die entspannten Fussballabende, das ein oder andere Weizen im Thanners und am Willi sowie dem guten Zusammenhalt und der gegenseitigen Unterstützung während unserer Promotionszeit.

Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der analytischen Abteilungen bedanken. Denn ohne ihre tatkräftige Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Dr. Holm Frauendorf für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei der Bearbeitung von Sonderwünschen und dem Messen der zahlreichen HPLC-MS-Spektren danken. Gleiches gilt natürlich für Herrn Frank Hambloch, Frau Györgyi Sommer-Udvarnoki und Frau Gabriele Krökel, die mir bei der Messung der ESI-Spektren stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ebenso wichtig war für mich der Kontakt mit der NMR-Abteilung, die während der letzten drei Jahre immer wieder hilfreich waren und mir die benötigten Kernresonanzspektren schnellst möglich gemessen und für diese Arbeit bestmöglich dargestellt haben. Hierfür bedanke ich mich bei Herrn R. Machinek, Frau C. Siebert, Herrn M. Weitemeyer, Frau C. Zolke und Frau E. Pfeil.

Für die Auswertung und Durchführung der *In-vitro*-Zytotoxizitätsuntersuchungen danke ich Frau Dr. Ingrid Schuberth, Frau Anja Herdlitschke und Frau Angela Rübeling.

So konnte ich jederzeit vorbeikommen, wenn einmal das Wasser knapp war oder die neuesten Toxizitätswerte vorlagen. Vielen Dank für die spannenden und angenehmen Gespräche.

Für das schnelle und sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Michael Müller, Christoph Eichhorst, Stefan Jackenkroll, Galina Pestel und Julian Strohmeier.

Herrn Dr. Miso Mitkovski danke ich für die zahlreichen Abende und Nächte gemeinsamer Messzeit am Fluoreszenzmikroskop sowie der Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse der Fluorimeterexperimente.

Desweiteren möchte ich mich bei Merck KGaA für die Unterstützung während meiner Dissertation bedanken. Ein besonderer Dank gilt hierbei meinem ehemaligen Praktikumstutor Herrn Dr. Achim Schwämmle, der mir spannende Einblicke in die Arbeitswelt eines Chemikers verschafft hat.

Bei allen Mitstreitern und Weggefährten aus dem Arbeitskreis Tietze sowie Frau Sabine Schacht und Frau Martjan Pretor danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Diskussionen und Ratschläge.

Meine akademischen Lehrer waren u.a. die folgenden Professoren und Dozenten:

G. Beuermann, P. Botschwina, A. de Meijere, U. Diederichsen, C. Ducho, L. Fitjer, H. Frauendorf, C. Griesinger, S. Grond, W. Hack, U. Klingebiel, H. Laatsch, T. Lenzer, R. Machinek, J. Magull, F. Meyer, C. Mösch-Zanetti, H. W. Roesky, J. Schroeder, C. Schulzke, G. M. Sheldrick, D. Stalke, C. Steinem, J. Stülke, M. Suhm, L. F. Tietze, J. Troe, S. Tsogoeva, D. B. Werz, A. Zeeck und P. von Zezschwitz.

5 Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name:	Frank Behrendt
Geburtsdatum:	29.11.1982
Geburtsort:	Paderborn
Eltern:	Heinz-Otto und Albertine Behrendt
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Schulbildung und Zivildienst:	
1989 – 1993	Grundschule Elisabethschule, Paderborn
1993 – 2002	Gymnasium Theodorianum, Paderborn
29.06.2002	Allgemeine Hochschulreife
Hochschulausbildung	
10/2003–07/2008	Chemiestudium an der Universität Göttingen
09/2007–04/2008	Diplomarbeit am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Lutz F. Tietze über das Thema: „ <i>Synthese von seco-CBI-Derivaten als Analoga des zytotoxischen Antibiotikums CC-1065</i> “
17.07.2008	Diplomprüfung an der Georg-August Universität Göttingen
09/2008 – 09/2011	Dissertation am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Lutz F. Tietze über das Thema „ <i>Synthese und biologische Evaluierung von fluoreszenzmarkierten Duocarmycin-Analoga</i> “.