



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Synthese eines zytostatisch wirksamen isomeren
Calothrixin B-Derivats“

Verfasser

Anton Kreuzer

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, im Mai 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Mag. pharm. Dr. rer. nat.

Helmut Spreitzer

Vorwort

Die experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden am Department für Arznei- und Naturstoffsynthese der Universität Wien im Zeitraum von Februar 2011 bis Juni 2011 unter der Aufsicht von ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Spreitzer durchgeführt.

Ich möchte mich an dieser Stelle beim Leiter des Departments, ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Spreitzer für die interessante Themenstellung und die ausgezeichnete Betreuung herzlichst bedanken.

Außerdem danke ich meinen beiden Co-Betreuern Mag. Thomas Nagel und Mag. Dr. Karem Shanab für die zahllosen Hilfestellungen und die unerschütterliche Geduld.

Meine Hochachtung gilt des Weiteren PhD. Theerachart Leepasert, der mir den neuartigen Syntheseweg vorschlug und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterer Dank gebührt:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Holzer für die Aufnahme und Interpretation der NMR-Spektren.

Dr. Leo Jirovetz für die Aufnahme der Massenspektren.

Ing. Peter Unteregger für die Aufnahme der hochauflösenden Massenspektren.

Mein besonderer Dank gilt insbesondere Mag. Birgit Bornatowicz für ihre Unterstützung und Opferbereitschaft.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern sowie bei meiner Schwester für das immerwährende Engagement bedanken.

ABKÜRZUNGEN

abs.	absolutiert
bp	Basenpaare
br s	breites Singulett
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
comp	Verbindung (<i>Compound</i>)
COSY	Correlated Spectroscopy
Cq	quartärer Kohlenstoff
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatogramm
DCM	Dichlormethan
dd	dublettisches Dublett
DMF	Dimethylformamid
d ₆ -DMSO	deuteriertes Dimethylsulfoxid
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FP	Schmelzpunkt
FM	Fließmittel
H-arom	aromatischer Wasserstoff
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HTMP	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
<i>J</i>	Kopplungskonstante
m	Multiplett
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
Me	Methyl
MeOH	Methanol
NaH	Natriumhydrid

n-BuLi	n-Butyllithium
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PhSeCl	Phenylselenenylchlorid
PPA	Polyphosphorsäure
ppm	part per million
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
t	Triplett
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	Allgemeines.....	1
1.1.1	Der Zellzyklus.....	1
1.1.2	Die Apoptose	3
1.1.3	Tumorigenese und Karzinogenese	5
1.1.4	Charakteristika neoplastischer Zellen	7
1.2	Chemotherapie maligner Neoplasmen.....	10
1.2.1	Topoisomerase-Inhibitoren.....	11
1.2.2	Interkalierende Zytostatika	15
1.2.3	Calothrixine	23
2	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	26
2.1	Aufgabenstellung	26
2.2	Reaktionsschema	27
2.3	Darstellung von 8-(Dimethylaminoethyl)-8,12b-dihydro-7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(7aH)-dion (26).....	29
2.3.1	Reaktionsweg A.....	31
2.3.2	Reaktionsweg B	36
3	EXPERIMENTELLER TEIL	44
3.1	Allgemeines.....	44
3.1.1	Chemikalien	44
3.1.2	Analysen	44
3.1.3	Reaktionen unter Inertgas	45
3.2	Synthesen.....	45
3.2.1	Reaktionsweg B	45
4	LITERATUR	51
5	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	55

6	ANHANG	56
---	--------------	----

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeines

Krebs zählt heute zu den gravierendsten gesundheitlichen Problemen unserer Gesellschaft. Man geht davon aus, dass bösartige neoplastische Zellveränderungen nach Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache von Menschen in westlichen Industrienationen darstellen. ^[1] Durch die laufend steigende Lebenserwartung erreichen immer mehr Menschen ein Alter, bei dem die Inzidenz von Krebs zunimmt. Weltweit starben im Jahr 2008 7.564.800 Menschen an Krebs, in Österreich waren es pro 100.000 Einwohner 249 Menschen. Alleine die Zahl der weltweit neudiagnostizierten Krebsfälle betrug 12.662.600. ^[2, 3]

Aus diesem Anlass wurde viel in Forschung und Entwicklung neuartiger Therapien investiert, die heute eine Multimilliarden-Dollar-Industrie ausmachen. Im Jahr 2003 betrug der weltweite Markt für Onkologie-assoziierte Produkte US \$ 36.8 Milliarden, das sind beinahe 10% des weltweiten Marktes an Pharmaka. ^[4]

Doch obgleich vieles über die molekularen Ursachen und Abläufe im Zusammenhang mit Krebs bekannt wurde, spielen Zytostatika, viele davon aus natürlicher Herkunft, nach wie vor eine essentielle Rolle in der Therapie dieser Erkrankung. ^[5]

1.1.1 Der Zellzyklus

Die Zeitspanne zwischen Entstehung einer Zelle und ihrer Teilung durch Mitose wird als Zellzyklus bezeichnet. Der Mensch, als vielzelliges Lebewesen, setzt sich aus ca. 10^{13} Zellen zusammen. Im Gegensatz zu einzelligen Organismen ist bei adulten Mehrzellern eine exponentielle Vermehrung der Zellen nicht vorgesehen. Vielmehr besteht ein konstantes Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zelluntergang. Aus diesem Grund besteht die Notwendigkeit für Möglichkeiten, die Zellvermehrung zu kontrollieren, den Zellzyklus zu unterbrechen oder auch in Körperzellen gezielt den programmierten Zelltod (Apoptose) zu veranlassen. So gibt es im Körper Gewebe, deren Zellen sich nach ihrer Differenzierung nicht mehr teilen (z.B. Nervenzellen und Muskelzellen), Zellen, die sich unter normalen Umständen nicht teilen (z.B. Leberzellen) oder Zellen, die sich ständig teilen (z.B. Hautzellen, Epithelialzellen, Knochenmarkszellen). ^[6]

1 EINLEITUNG

Der Zellzyklus kann grob in zwei grundlegende Phasen, die Interphase und die Mitose (M-Phase), eingeteilt werden. Die Interphase kann ihrerseits wiederum in G_1 -Phase, S-Phase, sowie G_2 -Phase gegliedert werden - die Mitose in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase.^[7]

Während der Interphase liegen die Chromosomen dekondensiert und verteilt im gesamten Kern vor, wodurch dieser morphologisch einheitlich erscheint. Auf molekularer Ebene finden in diesem Zeitraum das Zellwachstum und die DNA-Replikation statt. Sich teilende Zellen wachsen im Verlauf der Interphase kontinuierlich auf das doppelte ihrer Größe an, bevor sie in die Mitose eintreten.

Auf die M-Phase folgt die G_1 -Phase, die in Vorbereitung auf die kommende DNA-Replikation durch metabolische Aktivität der Zelle gekennzeichnet ist. So werden vermehrt Proteine exprimiert, die für einen korrekten Ablauf des kommenden Abschnitts benötigt werden. In der S-Phase werden die DNA verdoppelt und RNA sowie Enzyme synthetisiert. Auf die Reproduktion der DNA folgt die G_2 -Phase, welche durch Vorbereitung auf die bevorstehende Mitose und Zytokinese charakterisiert ist.

Ruhende, nicht vollständig differenzierte Zellen, die sich in ihrem Lebenszyklus nicht mehr teilen, verlassen die G_1 -Phase und gehen in eine Ruheform über. In diesem, als G_0 -Phase bezeichneten Zustand, bleiben die Zellen zwar metabolisch aktiv, teilen sich aber nicht bzw. erst auf ein externes Signal hin. Auch der Entzug von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen führt zum Übergang in die G_0 -Phase.^[6, 8]

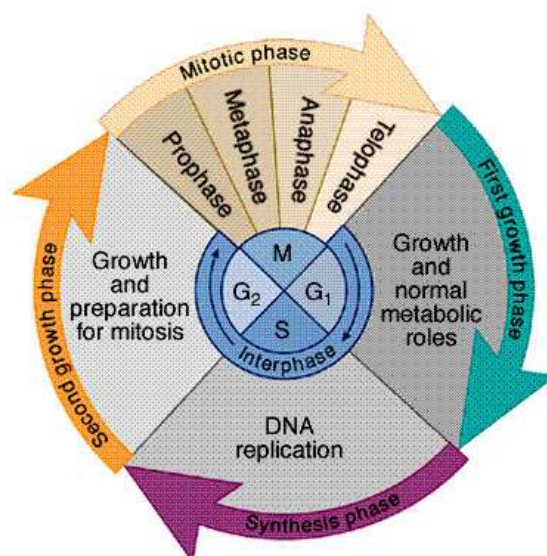


Abb. 1: Der Zellzyklus

1 EINLEITUNG

Der korrekt aufeinanderfolgende Ablauf der einzelnen Abschnitte wird dabei durch eine Reihe von Kontrollpunkten genau überprüft. Der erste Kontrollpunkt ist gegen Ende der G₁-Phase zu finden, ein weiterer in der G₂-Phase und ein dritter am Ende der M-Phase. Sollte an diesen Punkten ein Fehler erkannt werden, wird der Zellzyklus gestoppt und die Zelle versucht den Defekt zu beheben. Gelingt dies nicht, so treten Mechanismen in Kraft, die die Zelle zum programmierten Zelltod veranlassen. ^[6]

Durch extrazelluläre Signale der Umgebung, wie z.B. Wachstumsfaktoren, aber auch durch interne Signale, wie z.B. Cycline, wird das Fortschreiten der Zelle durch den Zellzyklus überwacht und koordiniert. Cycline sind eine Gruppe homogener Proteine, die spezifisch in der jeweiligen Phase des Zellzyklus auftreten und die auf Cyclin-abhängige Proteinkinasen (*cyclin-dependent kinases*, cdk) als Aktivatoren wirken. Der Komplex aus Cyclin und cdk kann dabei durch eine Reihe inhibitorisch wirkender Proteine in ihrer Funktion gestört werden. Als Beispiele sind p21^{WAF1}, p57^{KIP2}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} oder p19^{INK4D} zu nennen. ^[6]

An jenem Kontrollpunkt gegen Ende der G₁-Phase, bei dem überprüft wird, ob die nötige Zellgröße erreicht wurde und ob es etwaige Schäden an der DNA gibt, spielt das Protein p53 eine bedeutende Rolle: Dieses bei Stress oder DNA-Schäden auftretende Tumorsuppressorprotein veranlasst als Transkriptionsfaktor die Expression von p21^{WAF1}, einem cdk-Inhibitor-Protein. Der dadurch blockierte Komplex aus Cyclin D und cdk4 kann das nötige Signal zum Übergang in die S-Phase nicht geben und die Zelle wird in der G₁-Phase arretiert. ^[6]

Maligne Zellveränderungen basieren in den allermeisten Fällen auf einer Fehlfunktion im Zellzyklus und den zugrundeliegenden Mechanismen, wodurch unkontrolliertes Wachstum die Folge ist. So liegt in etwa der Hälfte aller Tumore eine Mutation des Gens vor, welches für p53 kodiert. ^[6]

1.1.2 Die Apoptose

Im Gegensatz zur Nekrose, einer Form des Zelltods, die auf ein Trauma zurückgeht, stellt die Apoptose einen programmierten und zielgerichteten Untergang der Zelle dar. Die

1 EINLEITUNG

Mechanismen dafür sind im Erbgut jeder Zelle verankert und können durch interne oder externe Signale ausgelöst werden. ^[6]

Zellen, die durch Apoptose zu Grunde gehen, unterliegen charakteristischen morphologischen Veränderungen: Das Zytoskelett bricht zusammen, das Chromatin im Kern kondensiert, die Zelle schrumpft und zieht sich zusammen. Die Hülle verändert sich in einem Vorgang, der als „blebbing“ bezeichnet wird. Dabei teilt sie sich in kleine Membran umschlossene Bläschen, sogenannte apoptotische Körper. Diese sind nun an ihrer Oberfläche dahingehend verändert, dass sie von benachbarten Zellen oder Makrophagen schnell aufgenommen werden können. Das geschieht rasch, ohne Schaden für das umliegende Gewebe und ohne eine Antwort des Immunsystems durch freigelegte Zellbestandteile zu erzeugen. Auf molekularer Ebene wird die Apoptose von Caspasen, einer Gruppe von Cysteinproteasen, vermittelt. Diese liegen normalerweise als inaktive Procaspasen intrazellulär vor und werden erst durch proteolytische Freisetzung aktiviert. Eine aktivierte Initiator-Caspase aktiviert eine Reihe von Effektor-Caspasen, die letztendlich weitere biologisch bedeutsame Proteine abbauen und somit zum Zelluntergang führen. ^[9]

Man unterscheidet prinzipiell zwei Wege die Apoptose einzuleiten:

Beim extrinsischen Weg wird durch Bindung von Liganden (Fas-Ligand) an transmembranäre Todesrezeptoren (Fas-Rezeptor) an der Oberfläche der Zelle in weiterer Folge intrazellulär die Initiator-Procaspase 8 aktiviert.

Beim intrinsischen Weg erfolgt die Aktivierung unter anderem durch die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien als Folge von DNA-Schäden oder anderen intrazellulären Defekten. Dadurch werden wiederum Procaspasen aktiviert und der programmierte Zelltod tritt ein. ^[9]

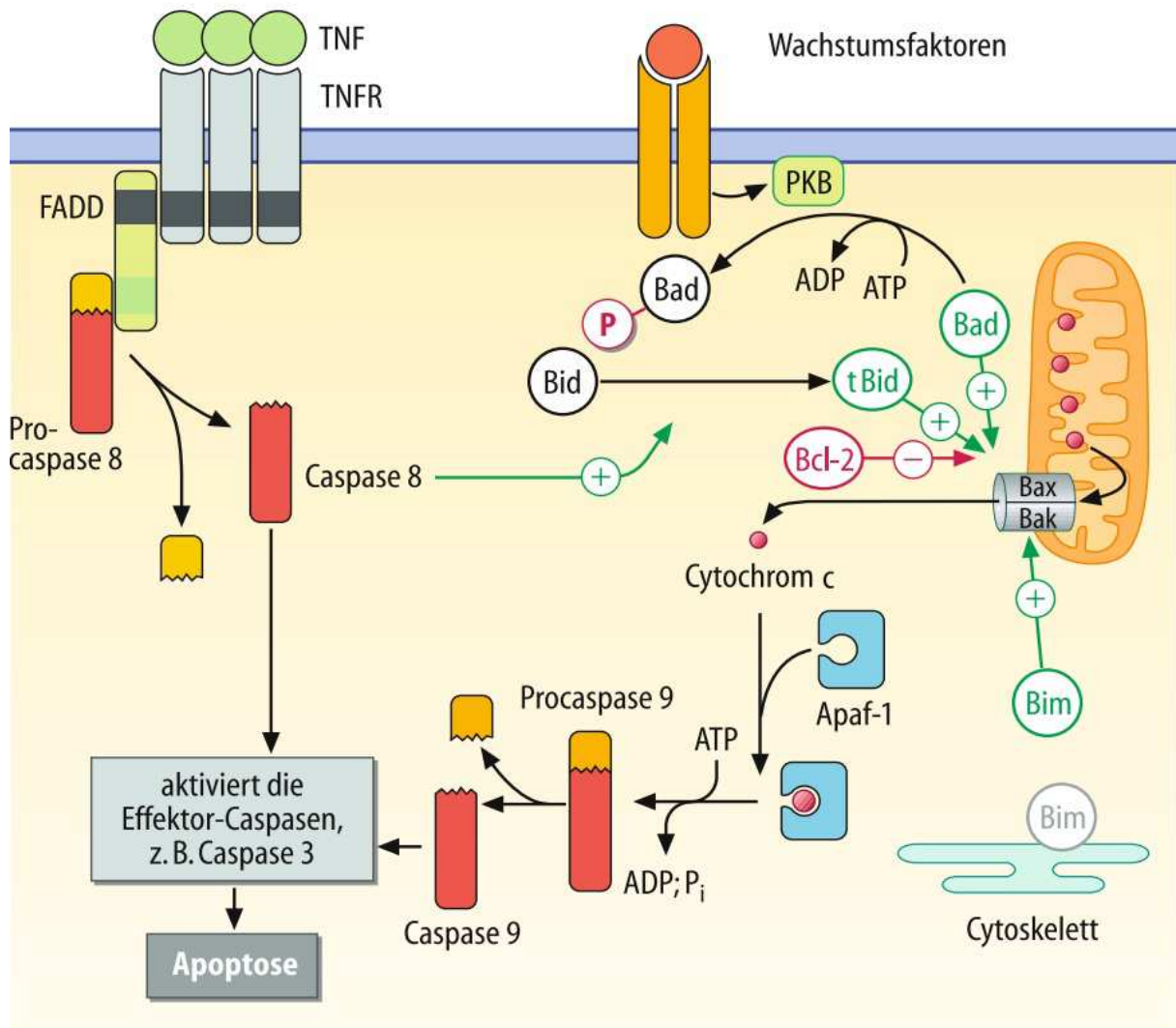


Abb. 2: Apoptosewege

1.1.3 Tumorigenese und Karzinogenese

In vielzelligen Organismen arbeiten somatische Zellen für das Wohl des gesamten Systems und sind bestimmt von Zusammenarbeit. Ihre Entstehung oder ihr Untergang werden je nach Bedarf geregelt. Kommt es allerdings zu einer Mutation in bestimmten Abschnitten der DNA, können die betroffenen Zellen den Signalen ihrer Umgebung nicht mehr folgen und werden zu Individuen. Die Mutation kann den Zellen darüberhinaus Selektionsvorteile verschaffen und sicherstellen, dass ihre Nachkommen besser gedeihen und eine wachsende Zahl mutierter Klone hervorbringen.^[9] Eine Zelle, die sich außerhalb der Kontrollen für Wachstum und Zellteilung vermehrt, wird in weiterer Folge zum Tumor. Man unterscheidet benign, wenn es sich um einen nicht invasiven Neoplasma handelt, und malign (Krebs), falls er die Eigenschaft besitzt in anderes Gewebe einzuwachsen, sich auszubreiten und

1 EINLEITUNG

Tochterkolonien zu gründen (Metastasen). Krebs wird je nach Ursprung des Gewebe- oder Zelltyps unterschieden, z.B.: Karzinome entspringen aus epithelialem Gewebe, Sarkome aus mesenchymalem Gewebe, Leukämie aus blutbildenden Zellen.^[9]

Die Tumorigenese kann generell in 3 Stufen unterschieden werden: Bei der Initiation kommt es zu initialen genetischen Veränderungen. Die Promotion wird durch zunehmende Vermehrung der mutierten Zelle charakterisiert, und bei der Progression häufen sich weitere genetische oder epigenetische Veränderungen an. Die Zellen werden dadurch aggressiver und vermögen in fremdes Gewebe einzuwachsen.

Im Normalfall reicht eine einzige Punktmutation nicht aus um einen Tumor zu erzeugen. Erst die langjährige Anhäufung mehrerer Veränderungen an wichtigen regulierenden DNA-Abschnitten führt zur Tumorigenese.^[9]

1.1.3.1 Onkogene und Antionkogene

Als Onkogen bezeichnet man ein Gen, welches das Potenzial besitzt, Krebs zu verursachen. Es handelt sich dabei um Genprodukte, die an Signaltransduktionswegen des Zellwachstums beteiligt sind und die durch Mutation aus Protoonkogenen hervorgehen. Im Gegensatz dazu unterdrücken Proteine von Antionkogenen die Tumorentstehung und erst nach ihrem Funktionsverlust tritt die Tumorbildung ein. In beiden Fällen kann die Entstehung durch Punktmutationen, chromosomale Translokation, Infektion mit onkogenen Viren oder durch Karzinogene verursacht werden.^[6]

1.1.3.2 Karzinogene

Mutationen in bestimmten DNA-Abschnitten können nach Exposition mit DNA-schädigenden Stoffen, Umweltbedingungen oder auch spontan entstehen. Die Veränderungen im Genom treten dabei nicht statistisch homogen verteilt auf, sondern vermehrt in charakteristischen Bereichen der DNA. In den meisten Fällen handelt es sich bei Karzinogenen um organische Verbindungen mit weniger als 500 kDa Molekulargewicht. In Anbetracht ihrer Struktur oder ihrer Herkunft können sie in folgende Gruppen eingeteilt werden:

- Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe: 3,4-Benzpyren, 7,12-Dimethylbenzanthren, etc.
- Aromatische Amine: β -Naphthylamin, etc.

1 EINLEITUNG

- Nitrosamine: *N*-Nitrosodiethylamin, *N*-Nitrosoornicotin, etc.
- Kanzerogene biologischer Herkunft: Aflatoxine
- Anorganische Kanzerogene: Cadmium, Beryllium, Arsen, Chrom (VI), Kobalt, Blei; Asbest, etc.
- Alkylierende Substanzen: Epoxide, Epichlorhydrin, Mechlorethamin, etc.
- Physikalische Kanzerogene: z. B. ionisierende Strahlung.^[6]

1.1.4 Charakteristika neoplastischer Zellen

Tumorzellen unterscheiden sich von herkömmlichen somatischen Zellen durch eine Reihe von Eigenschaften, deren Verständnis von großer Bedeutung für eine zielgerichtete Therapie ist. Aus diesem Grund sollen die wichtigsten Merkmale an dieser Stelle genannt werden:

1.1.4.1 Immortalität

Somatische Zellen können sich vor ihrem Tod etwa 50-mal teilen, wobei die Telomeren am Ende der Chromosomen bei jeder Replikation verkürzt werden. Dies führt zur Seneszenz der Zelle, die Zellteilung kommt zum Erliegen oder Apoptose tritt ein. Tumorzellen verfügen über erhöhte Aktivität des Enzyms Telomerase, welche die Länge der Telomeren nach jeder Zellteilung konstant hält. Auf diesem Weg können sich neoplastische Zellen unbegrenzt vermehren.^[10]

1.1.4.2 Unabhängigkeit externer Wachstumsfaktoren

Während das Wachstum somatischer Zellen von externen Faktoren abhängig ist, haben Tumorzellen zum Teil die Fähigkeit, die benötigten Faktoren selbst zu produzieren, oder es kommt durch Mutationen in der Signaltransduktionskaskade auch ohne Wachstumsfaktoren zu einer Dauerstimulation.^[9]

1 EINLEITUNG

1.1.4.3 Verlust kontrollierender Mechanismen des Zellzyklus

Wie bereits erwähnt sind Tumorzellen beispielsweise durch vermehrte Expression von Cyclinen nicht mehr an Kontrollpunkte des Zellzyklus gebunden. ^[6]

1.1.4.4 Angiogenese

Um den steigenden Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen decken zu können sind Tumorzellen auf die Ausbildung versorgender Gefäße angewiesen. Hierzu sind die Zellen in der Lage durch vermehrte Expression von HIF-1 (*Hypoxie-induzierter Faktor - 1*) und in weiterer Folge des Wachstumsfaktors vEGF, die Vaskularisierung ihrer Umgebung sicherzustellen. ^[6]

1.1.4.5 Unterdrückung der Apoptose

Dies erfolgt beispielsweise durch den Funktionsverlust des p53 Gen oder durch Überexpression des Bcl2-Proteins. ^[6]

1.1.4.6 Genetische Instabilität

Eine Vielzahl menschlicher Krebszellen häufen genetische Veränderungen mit abnormaler Geschwindigkeit an. Die Ursache hierfür kann der Verlust der Funktion DNA-reparierender Mechanismen sowie der Verlust der Integrität von Chromosomen sein. ^[9]

1.1.4.7 Invasion und Metastasierung

Die wohl tödlichste Eigenschaft von Tumorzellen ist die Fähigkeit ihren Ursprungsort zu verlassen und sich im Körper zu verteilen. Man geht davon aus, dass 90 % der krebsassoziierten Todesfälle auf Folgen der Metastasierung zurückzuführen sind. Bleibt ein Tumor an einem Ort begrenzt, kann dieser, sofern die Stelle zugänglich ist, operativ entfernt werden. Hat er sich bereits auf weitere Bereiche ausgebreitet, ist dies nicht mehr ohne Weiteres möglich.

Um die Fähigkeit zur Invasion zu erhalten sind zusätzliche genetische Veränderungen notwendig. Die Metastasierung ist zunächst gekennzeichnet durch das Ablösen von Zellen

1 EINLEITUNG

des Primärtumors, die wiederum durch die Basalmembran penetrieren und in das dahinterliegende Stroma eindringen, von wo sie in den Lymph- oder Blutkreislauf gelangen. Sobald sie sich in der systemischen Zirkulation befinden, können sie weiter entfernte Orte erreichen, wo sie sich als Tochterkolonie niedersetzen. ^[6, 9, 11]

1.2 Chemotherapie maligner Neoplasmen

Dem Patienten steht heute eine Reihe von Optionen zum Krebsmanagement zur Verfügung. Zu den bedeutendsten zählen die chirurgische Entfernung, Strahlentherapie sowie Chemotherapie. Welche Behandlungsstrategie tatsächlich zur Anwendung kommt, hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, insbesondere auch von der Gesundheit und den Erwartungen des Patienten. Oftmals ist trotz beachtlicher Fortschritte der Forschung nur eine kurative oder gar palliative Therapie möglich oder sinnvoll. Der Chemotherapie kommt bei Krebs insbesondere nach erfolgreicher operativer Entfernung des Tumors oder nach Bestrahlung eine wichtige Rolle zu, um eventuell verbleibende Zellen zu zerstören.^[11]

Zytostatika wirken in erster Linie auf proliferierende Zellen. Da davon nicht nur Krebszellen betroffen sind, sondern auch sich schnell teilende gesunde Körperzellen, erklärt sich das zum Teil erhebliche Muster an Nebenwirkungen. Besonders betroffen sind Zellen der Darmschleimhaut, des Knochenmarks oder der Haarfollikel mit den bekannten Symptomen wie Mucositis, Myelosuppression bzw. Immunsuppression oder Alopezie.

Ein weiteres Problem bedeutet die Resistenzentwicklung von Krebszellen, die auf vielfältige Weise erfolgen kann. Eine Möglichkeit stellt beispielsweise das *mdr1*-Gen („*multidrug resistance*“ gene) dar. Nach Auslösen der Transkription kommt es zur Expression des Glykoproteins P-170, einem ATP-abhängigem Transportprotein, das imstande ist unterschiedliche Fremdstoffe aus der Zelle zu befördern. Andere Mechanismen der Resistenzentwicklung beruhen auf strukturellen Veränderungen am Zielprotein, der Überexpression des Zielproteins oder einer verminderten Aktivierung von Chemotherapeutika mit Prodrug-Charakter. Aus diesem Grund empfiehlt sich oftmals eine Kombinationstherapie verschiedener Substanzen, einerseits um die Toxizität in Grenzen zu halten, andererseits um Resistenzen zu umgehen.^[11]

Aus historischer Sicht ging die Chemotherapie aus der chemischen Kriegsführung hervor: Gefallene Soldaten des Ersten Weltkrieges, die durch Senfgas (S-Lost) zu Tode kamen, wiesen eine erniedrigte Zahl an Leukozyten auf. Die beobachteten Eigenschaften sollten auf die Behandlung von Lymph Tumoren angewendet werden, und so wurde intensiv nach weiteren, für die Therapie besser geeigneten Verbindungen gesucht. Diese führte zur Entwicklung von N-Lost und den alkylierenden Cytostatika. Etwa zur gleichen Zeit wurde die erste erfolgreiche Behandlung des Prostatakarzinoms mit dem synthetischen Estrogenderivat Diethylstilbestrol durchgeführt.

1 EINLEITUNG

Kurz nach dem Zweiten Weltkrieg entstand ein weiterer Ansatz durch die Entwicklung der Antimetabolite, allen voran Methotrexat, welches sich bis heute im Einsatz befindet. Bald darauf folgten die Entdeckung der zytostatischen Vincaalkaloide, sowie von Taxol im Jahr 1967. Durch das steigende Verständnis zellbiologischer Vorgänge bei Krebs wurde mit Imatinib zur Jahrtausendwende ein Paradigmenwechsel in der Chemotherapie eingeleitet. Daraufhin hielt das Zeitalter der Krebsimmuntherapie mit Entwicklung der „*Biologicals*“ Einzug in die Krebsbehandlung. ^[4, 11, 12]

Aufgrund der Bedeutung für die vorliegende Arbeit soll an dieser Stelle besonders auf Topoisomerase I- und II-Inhibitoren, sowie auf interkalierende Zytostatika eingegangen werden.

1.2.1 Topoisomerase-Inhibitoren

1.2.1.1 Topoisomerase I und II

Topoisomerasen spielen eine wichtige Rolle während der DNA-Replikation. Um ein anfallendes Supercoiling vor der Replikationsgabel auszugleichen, binden Topoisomerasen an das DNA-Rückgrat und öffnen die Phosphodiester-Bindung des DNA-Strangs. Nach erfolgter Entwindung wird der Strang wieder zusammengefügt und das Enzym dissoziiert. Man unterscheidet bei Eukaryoten prinzipiell zwei unterschiedliche Formen des Enzyms: Die monomere Topoisomerase I bindet reversibel an die DNA und verursacht einen vorübergehenden Einzelstrangbruch. Nach dem Entwinden des Gegenstrangs wird die Phosphodiesterbindung wieder geschlossen. Die dimere Topoisomerase II bindet kovalent an beide Stränge der DNA und führt zu deren einstweiligen Bruch. Nach erfolgter Rotation werden die Stränge verknüpft und das Enzym dissoziiert. Im Gegensatz zum prokaryotischen Pendant können eukaryotische Topoisomerasen sowohl positives, als auch negatives Supercoiling beseitigen. ^[9, 13, 14]

Topoisomerase I aber vor allem die Topoisomerase II haben sich als vielversprechende Targets in der Krebstherapie erwiesen, an denen eine Reihe von Verbindungen wirken. Zu ihnen zählen beispielsweise Camptothecin, Irinotecan, Topotecan, die Podophyllotoxinderivate, aber auch eine Reihe interkalierender Verbindungen wie Anthracycline, Anthrachinone, Acridine, oder Ellipticine.

1 EINLEITUNG

Die Wirkung kommt daher zustande, dass ein ternärer Komplex aus Wirkstoff, Enzym und DNA gebildet wird. Dieser intermediäre Zustand, auch „*cleavable complex*“ genannt, wird soweit stabilisiert, dass die Fähigkeit des Enzyms die Strangbrüche zu schließen, gestört ist. Im Fall der Topoisomerase I steht die DNA nach dem irreversiblen Einzelstrangbruch nicht mehr zur Verfügung und der Zellzyklus bleibt in der S-Phase stehen. Im Fall der Topoisomerase II wird die Integrität der DNA nach dem Doppel-Strangbruch folglich soweit beeinträchtigt, dass die Zelle den Schaden ebenfalls nicht zu reparieren vermag. In beiden Fällen tritt im weiteren Verlauf die Apoptose ein. Da die Topoisomerase I vermehrt in Tumorgewebe exprimiert wird, kann mit Topoisomerase-I-Hemmern auch ein gewisses „Drug Targeting“ erreicht werden. Topoisomerase II-Inhibitoren zeigen im Gegensatz dazu die Tendenz sekundäre Tumore - insbesondere Lymphome - zu verursachen. ^[9, 11, 13]

1.2.1.2 Topoisomerase-I-Inhibitoren

Etwa zur Zeit der Entdeckung von Taxol wurde der Naturstoff Camptothecin (**1**) aus *Camptotheca acuminata*, einem in Asien heimischen Baum, isoliert. Camptothecin kommt des Weiteren in großen Mengen in den Extrakten von *Mappia foetida*, einer westindischen Pflanze, vor. Trotz guter anfänglicher Ergebnisse in der Präklinik waren die Resultate der klinischen Untersuchungen aufgrund des ungünstigen Nebenwirkungsprofils und der hohen Toxizität enttäuschend. Camptothecin ist schlecht wasserlöslich, was eine intravenöse Verabreichung besonders erschwert. Es ist zudem in vivo in höchstem Maße instabil: bei der Öffnung des Lactonrings unter physiologischen Bedingungen entsteht ein toxischer Säuremetabolit, der eine besonders hohe Plasmaproteinbindung aufweist. Für die Testung wurde das besser wasserlösliche Natriumsalz, zu welchem man nach Esterverseifung des Lactons gelangt, verwendet. Doch dieses führte wiederum zu hämorrhagischer Zystitis, was den weiteren Einsatz unmöglich machte. Erst nach Bekanntwerden der Topoisomerase I-hemmenden Wirkung, einem damals grundlegend neuartigen Wirkmechanismus, wurde Jahre später das Augenmerk erneut auf Camptothecin gerichtet. Anhand röntgenkristallographischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Camptothecin sowohl zum Enzym, als auch zur DNA Wasserstoffbrücken ausbilden kann. In Hinsicht auf Struktur-Wirkungsbeziehungen haben sich die S-konfigurierte Hydroxyl-Gruppe an Position

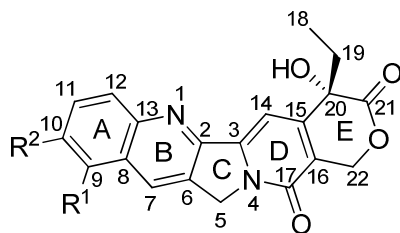
1 EINLEITUNG

20, die Ketogruppe an der Position 17, die Lactonstruktur, sowie ein weitgehend planares Ringsystem als essenziell erwiesen. [5, 13, 15, 16]

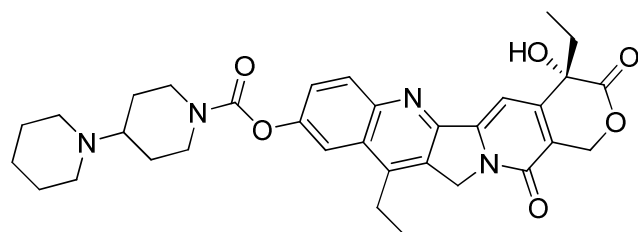
Ausgehend von Camptothecin wurde intensiv nach Derivaten mit günstigeren Eigenschaften hinsichtlich der Wasserlöslichkeit, Plasmaproteinbindung und Toxizität gesucht.

Das semisynthetische Camptothecinderivat Topotecan (**2**) unterscheidet sich durch eine Dimethylaminomethylgruppe an der Position 9, sowie einer Hydroxylgruppe an 10 von der Ursprungsverbindung. Es besitzt eine bessere Wasserlöslichkeit und ist mit 30-40% Bioverfügbarkeit auch oral verabreichbar. Zur Anwendung gelangt es bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms und des kleinzelligen Bronchialkarzinoms.

Das zweite therapeutisch eingesetzte Derivat Irinotecan (**3**) stellt durch die Einführung eines Carbaminsäureesters ein Prodrug dar, dessen wirksamer Metabolit SN-38 1000-fach wirksamer ist. Sowohl **3** als auch SN-38 zeigen eine geringere Plasmaproteinbindung und längere Plasmahalbwertszeit als Topotecan. Irinotecan kommt häufig intravenös in Kombination mit 5-Fluoruracil und Leucovorin bei der Therapie des metastasierenden Kolonkarzinoms zum Einsatz. [5, 11]



Comp	R ¹	R ²
1	H	H
2	CH ₂ N(CH ₃) ₂	OH



3

1.2.1.3 Topoisomerase-II-Inhibitoren

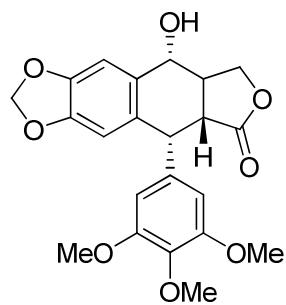
Ausgehend von dem Lignan Podophyllotoxin (**4**) aus *Podophyllum peltatum*, dem Fußblatt, einem altbekannten Volksheilmittel, gelangte man zu einer Reihe von semisynthetischen isomeren Derivaten, allen voran Etoposid (**5**) und Teniposid (**6**). Sie sind durch säurekatalysierte Reaktion mit entsprechend geschützten Zuckern aus Podophyllotoxin zugänglich. Trotz großer struktureller Ähnlichkeit mit dem Tubulin-bindenden Podophyllotoxin erzielen die beiden Analoga ihre Wirkung durch Interaktion mit der Topoisomerase-II. Im Gegensatz zu beispielsweise den Anthracyclinen interkalieren oder binden sie allerdings nicht in Abwesenheit des Enzyms an die DNA. Es kommt zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen, die Zellen werden vom Eintritt in die M-Phase abgehalten und verbleiben in der späten S-Phase bzw. frühen G₂-Phase.

Auch wenn noch nicht alle Details über den Wirkmechanismus bekannt sind, so weiß man, dass die Topoisomerase-II für das Entwinden der DNA Energie benötigt, die aus der Hydrolyse von ATP bereitgestellt wird. Bei einem solchen katalytischen Zyklus werden zwei Moleküle ATP verbraucht. Die Epipodophyllotoxinderivate verhindern offenbar die Freisetzung des ersten entstandenen ADPs und blockieren so die ATPase-Aktivität des Enzyms.

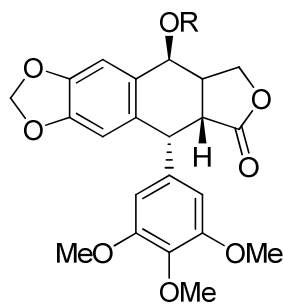
Etoposid, eine schlecht wasserlösliche Verbindung, wird bei der Behandlung von Bronchial-, Hoden- und Ovarialkarzinomen sowie bei Lymphomen verwendet.

Teniposid, welches 10-mal wirksamer ist als Etoposid, kommt bei der Therapie der akuten Leukämien und Lymphomen, bei Tumoren des ZNS, sowie bei Harnblasenkarzinom zum Einsatz. ^[5, 11]

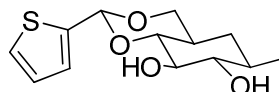
1 EINLEITUNG



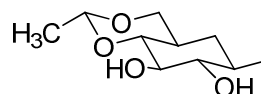
4



5: R =



6: R =



1.2.2 Interkalierende Zytostatika

1.2.2.1 Interkalation

Die Interkalation erfolgt durch Einlagerung eines planaren Chromophors zwischen benachbarte Basenpaare der DNA. Das Prinzip wurde erstmals von *Lermann et al.* ^[17] 1961 für Proflavin (**7**) beschrieben und aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde eine Hand von Charakteristika erarbeitet, die ein Molekül erfüllen muss, um zur Interkalation befähigt zu sein: So muss es aromatischen Charakter besitzen (bestehend aus 3-4 Ringen), koplanar sein und eine Länge von 3-4 Å bei einer Breite von 6-8 Å aufweisen.^[18] Die Bindung wird hauptsächlich durch Charge-Transfer-Komplexe, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und elektrostatische Interaktionen - infolge eines Entropiegewinns - angetrieben.^[5] Auch eine para-konfigurierte Chinon-Teilstruktur zeigt gute Interkalations-Eigenschaften, da die Möglichkeit besteht zusätzlich Wasserstoffbrücken auszubilden.^[19] Die Einlagerung kann dabei parallel (wie bei Proflavin) oder senkrecht (wie bei Daunomycin) zur Längsachse der DNA erfolgen.^[18]

Durch die Interkalation des Moleküls erfolgt eine vertikale Aufweitung der DNA mit Entspiralisierung. Dies wurde beispielsweise von *Canals et al.* ^[20] für Ellipticin anhand eines 6-bp Oligonukleotids nachgewiesen: Der entstandene Komplex ist gegenüber herkömmlicher DNA um einen Winkel von 14° entwunden, von ursprünglich 3.4 Å auf 6.9 Å erweitert und es kommt außerdem zu einer Verzerrung des Zucker-Phosphat-Rückgrats (siehe Abb. 3).

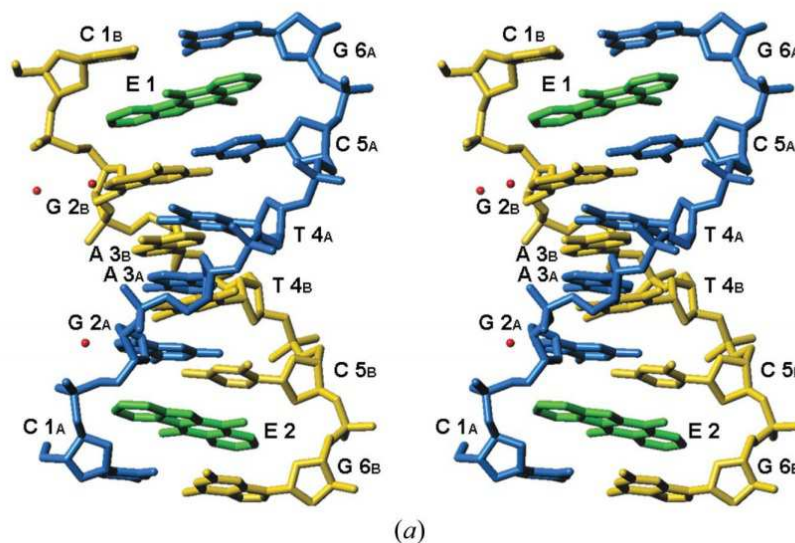


Abb. 3: Ellipticin-Oligonukleotid-Komplex

Eine große Zahl interkalierender Verbindungen besitzt zytotoxisches Potential. Im Verlauf der 1980er Jahre konnte gezeigt werden, dass diese Wirkung in erster Linie auf die Bildung eines ternären Komplexes zwischen Interkalator, DNA und dem Enzym Topoisomerase II zurückzuführen ist. ^[5] Dabei führt ihre Bindung zur Stabilisierung einer Zwischenstufe, dem „cleavable complex“, wodurch der erfolgte Strangbruch nicht mehr geschlossen werden kann und letztendlich der Zelltod durch Apoptose eintritt. ^[11]

1.2.2.2 Interkalierende Cytostatika aus der Anthrachinon-Reihe

1.2.2.2.1 Anthracyclinantibiotika

Anthracycline zählen zu einer wichtigen Klasse zytostatisch wirksamer Verbindungen. Wegen ihrer großen Toxizität werden sie nicht als Antibiotika eingesetzt. Der erste klinisch bedeutsame Vertreter war Daunorubicin (**8**), ein Metabolit aus *Streptomyces peuceticus*, gefolgt von dessen hydroxylierten Analogon Doxorubicin (**9**), aus *S. peuceticus* var. *caesius*. Das Grundgerüst ist durch ein planares tetrazyklisches System mit Chinon-Teilstruktur gekennzeichnet, an Position 7 ist α -glykosidisch der Aminosucker Daunosamin gebunden. Durch die Anwendung chemisch-synthetischer Untersuchungen wurde eine Reihe von Verbindungen zur Marktreife gebracht: Nennenswerte Vertreter sind Epirubicin (**10**), das

1 EINLEITUNG

Diastereomer von Doxorubicin; sowie Idarubicin (**11**), ein desmethoxyliertes Derivat von Daunorubicin.

Anthracycline entfalten ihre Wirkung wohl durch mehrere Mechanismen, die nach wie vor diskutiert werden. Gesichert erscheint ihre Interkalation mit der DNA, sie inhibieren des Weiteren die Topoisomerase II, sowie die DNA- und RNA-Polymerase und führen zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen der DNA. Bei der Interkalation wird der Aglykon-Chromophor bevorzugt im rechten Winkel zur größten Längsausrichtung der Basenpaare eingelagert, der Cyclohexenring verbleibt in der „*minor groove*“ (kleinen Furche). Die Substituenten entlang des Tetrazyklus bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu den Basenpaaren über und unter der Interkalationsstelle aus. Der Aminozucker ruht in der „*minor groove*“, ohne mit dem Phosphatrückgrat zu interagieren.

Da die Chinon-Teilstruktur Eigenschaften eines Redoxsystems aufweist, sind Anthracycline in der Lage, unter Bildung eines Semichinonradikals nach Reduktion durch Cytochrom-P₄₅₀-Enzyme NADPH-abhängig die Konzentration freier Sauerstoffradikale (*radical oxygen species*, ROS) stark zu erhöhen. Aufgrund der hohen Lipidlöslichkeit ist das Aglykon befähigt, in biologische Membranen zu diffundieren und somit ROS in unmittelbarer Nachbarschaft von sensiblen Zellstrukturen zu bilden. Dies führt zu großen Schäden an den Membranen und trägt nicht nur zur antikarzinogenen Wirkung bei, sondern ist auch Ursache für eine große Zahl schwerwiegender Nebenwirkungen, allen voran die Kardiotoxizität. Aufgrund der Eigenschaft des Herzmuskels, nur geringe Mengen des Peroxid-abbauenden Enzyms Katalase zu exprimieren, ist er besonders anfällig für oxidative Schäden. Hierbei kann zwischen dem kurz nach der Behandlung eintretenden, reversiblen Soforttyp und dem dosisabhängigen irreversiblen Spättyp unterschieden werden. Außerdem wird zusätzlich die Wirkung der Glutathionreduktase, die ebenfalls zum Abbau beiträgt, abgeschwächt. Ferner besitzen Anthracycline die Eigenschaften, mit Eisen Chelatkomplexe zu bilden, was offenbar ebenfalls zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beiträgt. Da diese Wirkung nicht auf Tumorzellen begrenzt ist, zeigen Anthracycline per se mutagene Eigenschaften und können Jahre nach der initialen Behandlung zur Ausbildung von sekundären Neoplasmen führen. Als weitere Nebenwirkungen treten, abgesehen von der bereits erwähnten Kardiomyopathie, noch die dosislimitierende Knochenmarkdepression, Infertilität, Nephrotoxizität, etc. auf. [5, 11, 21-23]

Zurzeit sind folgende Vertreter von besonderer klinischer Bedeutung:

1 EINLEITUNG

Daunorubicin (**8**), eines der beiden ersten isolierten Anthracycline, wird aufgrund seiner stark knochenmarksupprimierenden Wirkung lediglich zur Behandlung der akuten myeloischen und lymphatischen Leukämie eingesetzt.

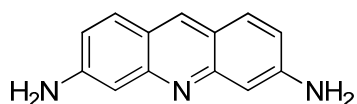
Doxorubicin (**9**), welches einen primären Alkohol in der Acetyl-Seitenkette trägt, besitzt ein weitreichenderes Anwendungsgebiet. So ist es wichtiger Bestandteil bei der Therapie von Brustkrebs, soliden Tumoren bei Kindern, Weichteilsarkomen und aggressiven Formen von Leukämie.

Das semisynthetische Derivat Epirubicin (**10**) zeigt trotz minimaler konformeller Veränderungen pharmakokinetische und metabolische Besonderheiten, wie zum Beispiel ein erhöhtes Verteilungsvolumen oder Gesamtkörperclearance. Dadurch ist bei anhaltender Wirksamkeit nur die halbe kumulative Dosis für die Therapie nötig, wobei die Kardiotoxizität nicht erhöht wird. Das Einsatzgebiet entspricht weitestgehend dem von Doxorubicin.

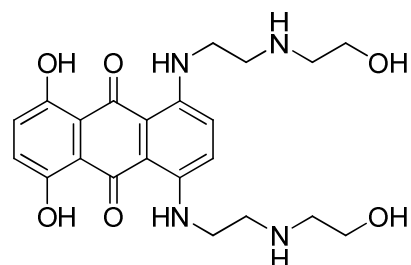
Das aus Daunorubicin zugängliche Idarubicin (**9**) wird vor allem bei akuter myeloischer Leukämie eingesetzt und ist der erste Vertreter, der auch bei oraler Applikation wirksam ist.

[23]

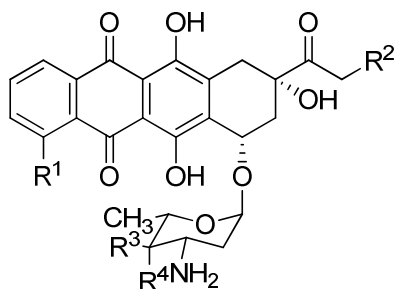
1 EINLEITUNG



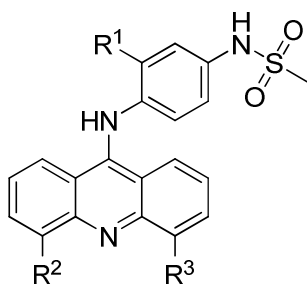
7



11



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
8	OCH ₃	H	H	OH
9	OCH ₃	OH	H	OH
10	OCH ₃	OH	OH	H



	R ¹	R ²	R ³
12	H	H	H
13	OCH ₃	H	H
14	OCH ₃	CH ₃	CONHCH ₃

1.2.2.2 Mitoxanthron (11)

Das beim Screening von industriellen Farbstoffen entdeckte Anthrachinon-Derivat Mitoxanthron zeigt geringere Radikalbildung über den Chinonring als die Anthracycline und besitzt eine geringere Kardiotoxizität. Es findet Anwendung bei der Therapie des Mammakarzinoms, Non-Hodgkin-Lymphom, der akuten myeloischen Leukämie sowie beim Prostatakarzinom und ist gegenwärtig der häufigste therapeutisch eingesetzte synthetische Interkalator. [5, 11]

1.2.2.3 Amsacrin (13)

Ausgehend von Chinolin-abgeleiteten Verbindungen wurde eine Reihe von Acridin-Analoga entwickelt, die gute Interkalationseigenschaften besitzen. Im Zuge der Herstellung simplerer

1 EINLEITUNG

Verbindungen gelangte man schließlich zum 4'-Methansulfonamid (**12**), welches sich durch erhöhte Wasserlöslichkeit, Stabilität und biologische Aktivität auszeichnet. Durch Einführung einer Methoxygruppe an der 3'-Position gelangte man zu Amsacrin (**13**), das zytotoxisch noch aktiver ist und den ersten klinisch relevanten synthetischen Interkalator darstellt. Er wird bei akuter myeloischer Leukämie eingesetzt. Aufgrund des hohen pKa-Wertes (8.02) vermutete man eine Begrenzung der Bioverfügbarkeit, was durch Einführung von Carboxamidfunktionen an den Positionen 4 oder 5 verbessert werden sollte. Somit gelangte man zu Asulacrin (**14**), welches zurzeit Gegenstand klinischer Testung ist.^[5, 11]

1.2.2.4 Ellipticin und Analoga

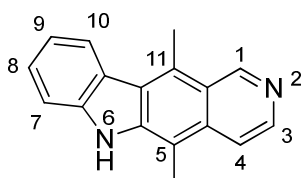
1959 wurde Ellipticin, 5,11-Dimethyl-6H-pyrido[4,3-*b*]carbazol (**15**) von *Goodwin et.al.*^[24] erstmal aus *Ochrosia elliptica* Labill., einem tropischen immergrünen Baum, isoliert, gleichzeitig mit 9-Methoxyellipticin (**16**), Elliptin und Elliptinin. Später folgte die Isolierung auch aus anderen *Ochrosia*-Arten. Das zu Ellipticin isomere Olivacin (**18**) konnte bereits im Jahr zuvor aus *Aspidosperma olivaceum* Müll. extrahiert werden.^[25]

Die erste Totalsynthese von Ellipticin gelang *Woodward*^[26] ebenfalls bereits 1959. Nach Bekanntwerden der zytostatischen Eigenschaften wurde zur Bereitung von Derivaten ein ökonomischerer Syntheseweg benötigt, der 1985 von *Ketcha* und *Gribble*^[27] beschrieben wurde. Weitere Gruppen veröffentlichten in den darauffolgenden Jahren neue Synthesewege.^[28-30]

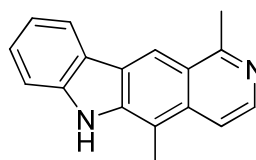
Ellipticin und seine besser wasserlöslichen Derivate, allen voran 9-Hydroxyellipticin (**17**), zeigen vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von osteolytischen Brustkrebsmetastasen, Nierenkrebs, Gehirntumoren und akuter myeloblastischer Leukämie.

[31]

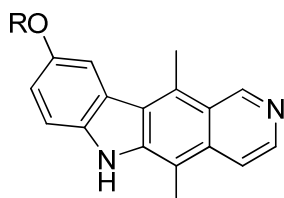
1 EINLEITUNG



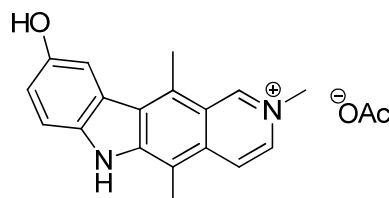
15



18



16 R = CH₃
17 R = H



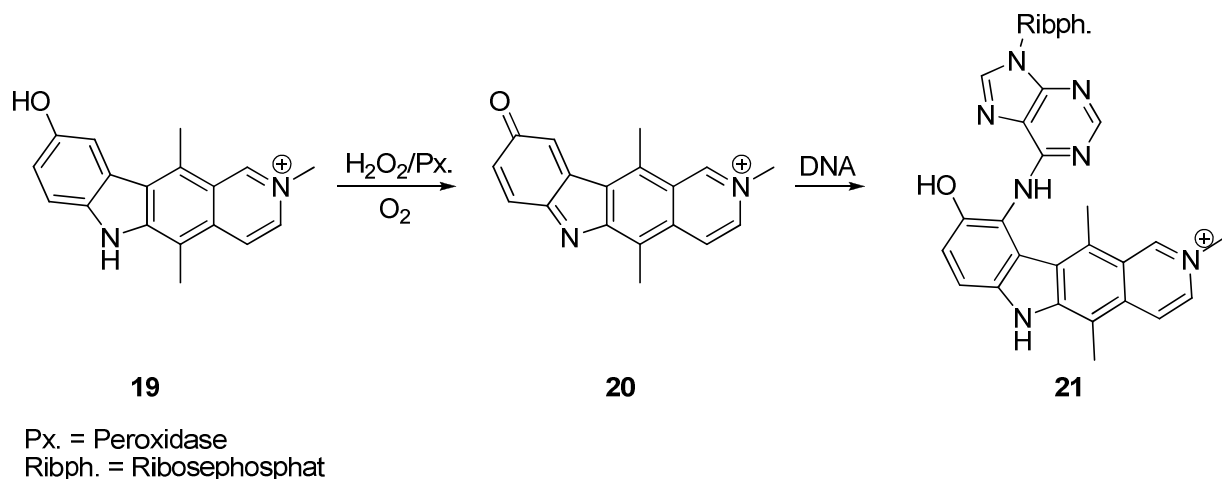
19

Die Wirkung kommt wohl durch mehrere Mechanismen zustande, wobei noch nicht alle Einzelheiten bekannt sind. So wurde die Eigenschaft der Ellipticine, in die DNA zu interkalieren (siehe Abb. 3) schon an mehreren Stellen beschrieben.^[20, 32] Vieles deutet darauf hin, dass erneut die Topoisomerase II das zelluläre Target darstellt, wobei noch nicht geklärt werden konnte, ob der Chromophor am bereits gebildeten DNA-Enzymkomplex bindet, ob er erst nach DNA-Interkalation den ternären Komplex ausbildet oder ob der Chromophor zuerst mit dem Enzym in Wechselwirkung tritt. Nach den Ergebnissen von *Froelich-Ammon*^[33] scheint die letztgenannte Möglichkeit wohl am ehesten zuzutreffen.

In jedem Fall führt es in vivo zu einer Vielzahl von Strangbrüchen.^[34, 35] Bei Behandlung der menschlichen Brustkrebszelllinie MCF-7 kommt es nach Einstellen des Wachstums und Arrest in der G2/M-Phase zur Einleitung der Apoptose. Es wurde dabei eine erhöhte Expression von p53, p21^{WAF1} und anderen Apoptosemarkern, allen voran FAS/FAS-Ligand, festgestellt.^[36]

Als essenziell für die biologische Aktivität hat sich dabei eine Hydroxylgruppe an der Position 9 des Tetrazyklus erwiesen. Nähere Untersuchungen lassen vermuten, dass Ellipticin ein Prodrug darstellt und erst nach Bioaktivierung durch Hydroxylierung am C-9 in der Lage ist mit der DNA zu interkalieren. 9-Hydroxyellipticin (**17**) kann in weiterer Folge durch zelluläre Oxidasen zum p-Chinonimin oxidiert werden und dadurch Additionsreaktionen mit der DNA eingehen.^[37] Als nukleophile Angreifer kommen dabei die primären Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin in Frage, oder aber auch die Pentosen des DNA-Rückgrats.^[38]

1 EINLEITUNG



Schema 1: kovalente Bindung an die DNA am Beispiel von Elliptinium (**19**)

Des Weiteren scheint die Induktion von Stressreaktionen des endoplasmatischen Retikulums ebenfalls zur Apoptoseauslösung beizutragen.^[39]

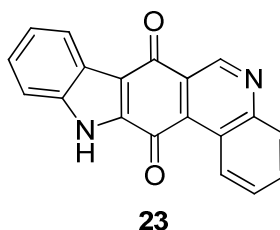
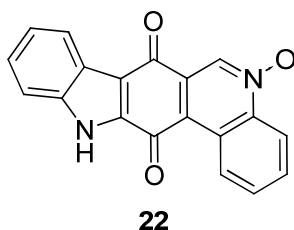
Es wurde eine Reihe von Derivaten realisiert, die sich von der Grundstruktur durch verbesserte Eigenschaften hinsichtlich der Wasserlöslichkeit und Toxizität unterscheiden sollten. Wie bereits erwähnt, hat sich die Hydroxylfunktion als unabdingbar für die Wirksamkeit herausgestellt. Außerdem erhöht die Methylierung des Stickstoffs an der Position 2 die Fähigkeit an die DNA zu binden und antitumoral zu wirken.^[40, 41] Bei den 9-Methoxyderivaten spielt die enzymatische Demethylierung hin zum wirksamen 9-Hydroxyellipticin eine entscheidende Rolle.^[42, 43] Aufgrund intensiver Struktur-Wirkungsbeziehungsanalysen haben sich der Stickstoff des Carbazols, sowie die Methylgruppe an Position 5 als essenziell erwiesen. Wird die Carbazolteilstruktur beispielsweise gegen Dibenzo[b,d]furan oder Dibenzo[b,d]thiophen ausgetauscht, kommt es zum Wirkungsverlust.^[44]

Elliptinium (**19**) war das erste Derivat, welches zu klinischen Studien der Phasen I und II bei fortgeschrittenem Brustkrebs zugelassen wurde. Allerdings erlangte es aufgrund starker Nebenwirkungen wie Nausea, Emesis, Hypertension, Spasmen und Mucositis im Mund und Rachenraum niemals Marktreife.^[41, 45]

1.2.3 Calothrixine

1.2.3.1 Allgemeines

Bei den Calothrixinen handelt es sich um pentazyklische Naturstoffe mit hoher Aktivität gegen Chloroquin-resistente Malariastämme und humane HeLa-Krebszellen. Die Calothrixine wurden erstmals 1999 von *Rickards et al.* ^[46] aus Stickstoff-fixierenden Cyanobakterien der Gattung *Calothrix* isoliert und ihre Struktur anhand von NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Die dosisabhängige wachstumshemmende Wirkung erfolgt dabei bereits im nanomolaren Bereich. Calothrixin A (**22**) zeigt ein neuartiges Indolo[3,2-j]phenanthridin Grundgerüst mit p-Benzochinon-Teilstruktur. Calothrixin B (**23**) unterscheidet sich von Calothrixin A durch die fehlende Oxidation des Chinolin-Stickstoffs.



1.2.3.2 Synthesen

Die natürlich vorkommenden Calothrixine wurden erstmal 2000 von *Kelly et al.* ^[47] vollsynthetisch dargestellt. Die Synthese beruht dabei auf einer ortho-Lithiierungsreaktion. Weitere Forschungsgruppen veröffentlichten andere Synthesewege in den darauffolgenden Jahren: *Bernado et al.* ^[48] folgten 2002 mit einer neuen Strategie, basierend auf einer intramolekularen Acylierungsreaktion. Drei Jahre später beschrieben *Tohyama et al.* ^[49] eine neue Totalsynthese, deren Schlüsselschritt auf einer Allen-vermittelten elektrozyklischen Reaktion beruht. Im selben Jahr stellten *Bennasar et al.* ^[50] Calothrixin B mit Hilfe einer radikal-vermittelten homolytischen Acylierungsreaktion dar. 2006 erschien schließlich die Synthese von *Sissouma et al.* ^[51], aufbauend auf einer Hetero-Diels-Alder-Reaktion.

1.2.3.3 Wirkmechanismen

Die genauen Mechanismen, durch welche die Calothrixine ihre Wirkung entfalten, sind momentan Gegenstand der Forschung. Calothrixin A besitzt zwei funktionelle Gruppen, die

1 EINLEITUNG

Chinon-Teilstruktur und die N-Oxid-Gruppe, die womöglich von besonderer Bedeutung für die toxische Wirksamkeit sind. Es sei zu erwähnen, dass Calothrixin B auch ohne die N-Oxid-Gruppe ähnlich hohe zytostatische Aktivität gegenüber HeLa-Zellen aufweist. ^[52]

Chinone zeigen eine Vielzahl deletärer Effekte auf lebende Organismen, unter anderem akute Zytotoxizität, Immunotoxizität und Karzinogenese. Die Hauptgründe hierfür sind das aktive Redoxsystem und die Fähigkeit Reaktionen mit nukleophilen Angreifern - allen voran Amino- oder Hydroxylgruppen von Makromolekülen - einzugehen und somit deren Funktion zu beeinträchtigen. ^[53]

Aufgrund der zytostatischen Aktivität der Calothrixine und ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem Topoisomerase-I-Hemmer Camptothecin (**1**) lag die Vermutung nahe, die Wirkung komme zumindest zum Teil durch mögliche Interaktion mit der Topoisomerase zustande. *Khan et al.* konnten erstmals die reversible Topoisomerase I-inhibierende Aktivität von Calothrixin A und B feststellen. Bei Untersuchungen hinsichtlich der Effekte auf den Zellzyklus konnte beobachtet werden, dass Calothrixin B bei einer Konzentration von 0.1 µM Arrest in der G₁-Phase bewirkt; bei höherer Konzentration von Calothrixin A verbleiben die Zellen hingegen sowohl in S und G₂/M-Phase des Zellzyklus. Die Calothrixine stabilisieren dabei den kovalenten binären Komplex von DNA und Enzym und führen so zum Zelluntergang. ^[54]

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Calothrixin A die RNA-Synthese und folglich die Proteinsynthese in intakten Zellen von *Bacillus subtilis* hemmt und des Weiteren Einfluss auf die DNA-Replikation hat. Das Ausmaß der Hemmung findet dabei unabhängig vom Gehalt an DNA und abhängig von der Konzentration der RNA-Polymerase statt. ^[55] *Doan et al.*, die außerdem ähnliche Ergebnisse an *Escherichia coli* beobachteten, vermuten daher, dass die Wirkung nicht nur auf die Interaktion mit der DNA alleine, sondern auch über eine direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase zustande kommt. ^[56]

In menschlichen Jurkat-Krebszellen führt Calothrixin A zu apoptotischem Zelltod in einer zeit- und dosisabhängigen Weise. Der dabei auftretende Arrest des Zellzyklus in der G₂/M-Phase deutet auf eine Schädigung der DNA hin. Außerdem konnte, wie auch schon bei anderen Zytostatika mit Chinon-Teilstruktur, eine Redox-Aktivität festgestellt werden. Diese scheint die intrazelluläre Bildung von reaktiver Sauerstoff Spezies zu erhöhen. ^[52]

1 EINLEITUNG

Es ist zu vermuten, dass die Aktivität der Calothrixine auf ihrem Grundkörper beruht, der Eigenschaften eines klassischen Interkalators aufweist und somit die Möglichkeit besitzt zwischen die Basenpaare der DNA zu interkalieren. ^[52]

Owen et al. konnten erstmals zeigen, dass das große, planare Elektronenmangel-Ringsystem auch externe Bindung mit dem DNA-Quadruplex des c-myc Onkogens eingeht. DNA-Quadruplexe sind besondere Strukturen Guanin-reicher DNA-Abschnitte, die auf dem gestaffelten Quartett von Guanin-Basen beruhen, welche untereinander Wasserstoffbrücken ausbilden. Sie sind von besonderem Interesse, da sie mit der Kontrolle der Expression verschiedener Zellzyklus-regulierender Gene und Proto-Onkogene assoziiert werden. ^[57, 58]

Eine neue Vorgehensweise bei der Krebstherapie ist die Stabilisierung dieser DNA-Quadruplexe durch niedermolekulare Verbindungen und das dadurch bedingte Unterbinden der Expression am Ort des Genpromotors.

Die meisten Quadruplex-stabilisierenden Liganden weisen kationischen Charakter auf. Dieser Umstand ist durch die Bindung an das negativ geladene Phosphatrückgrats der DNA erklärbar. Es ist daher anzunehmen, dass bei einer Modifikation des Calothrixgrundkörpers durch die Einführung kationischer Gruppen, die Stabilisierung des Quadruplexes noch erhöht werden könnte. Auch die unterschiedliche Anordnung der einzelnen Ringe des Pentazyklus könnte ebenfalls weitere Bindungsmöglichkeiten ergeben. ^[59]

2 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

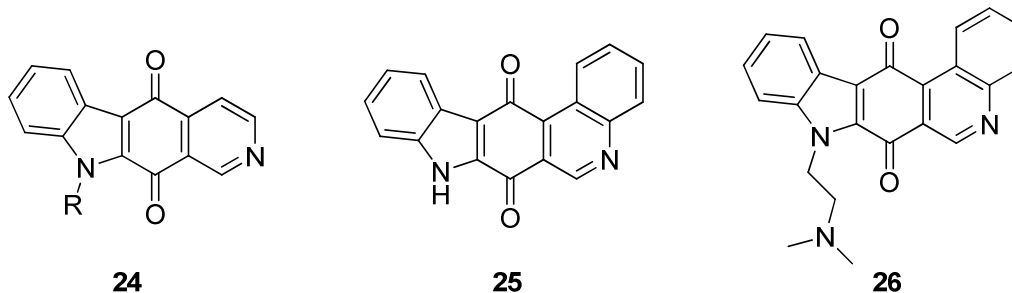
2.1 Aufgabenstellung

Die Untersuchungen von *Leber* haben bereits das zytostatische Potenzial von Derivaten des 5H-Pyrido[3,4-b]carbazol-5,11(10H)-dion (**24**), einem 4-Ringsystem, an verschiedenen Zelllinien gezeigt.^[60] Durch Erweiterung des Grundsystems um einen Benzolring zu einem Pentazyklus gelangt man zur Naturstoffklasse der Calothrixine.

Calothrixin A und B (**22** und **23**) zeigen außerordentliches zytotoxisches Potenzial an HeLa-Zellen und Plasmodien. Der Grundkörper des indolo[3,2-j]phenanthridin ist daher als Leitsubstanz für die Entwicklung neuer zytostatisch wirksamer Verbindungen von besonderer Bedeutung. Insbesondere unterschiedlich angeordnete 5-Ringsysteme stellen womöglich ähnlich gute Ergebnisse in Aussicht wie die untersuchten Naturstoffe.

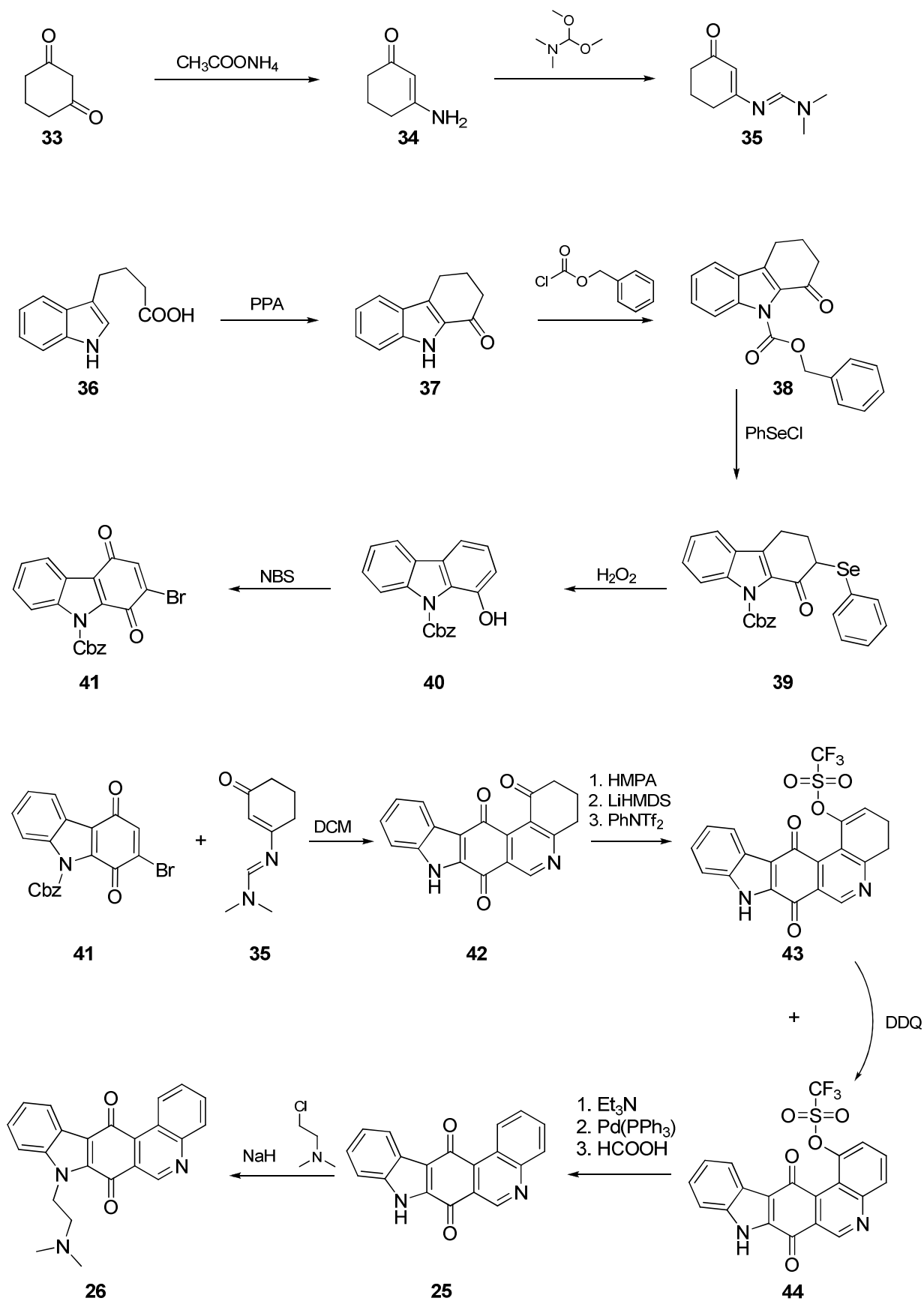
Als Ziel der vorliegenden Arbeit sollte daher nun zunächst das in der Literatur^[61] bekannte Calothrixin B-Isomer (**25**) zugänglich gemacht werden. Anschließend sollte ein neues Derivat (**26**) dieses Isomers synthetisiert und zu weiteren antiproliferativen Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien bereitgestellt werden.

In Zuge dessen gelang es, neben der Darstellung eines neuen N-geschützten Derivates (**32**), einen neuen, äußerst ökonomischen Syntheseweg für das in der Literatur^[61] bekannte 7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(8H)-dion, (**25**), („Isocalothrixin B“) aufzustellen.



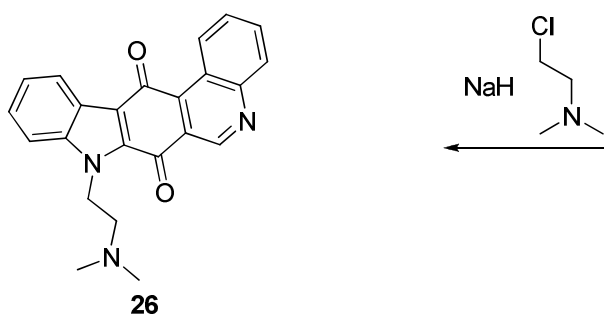
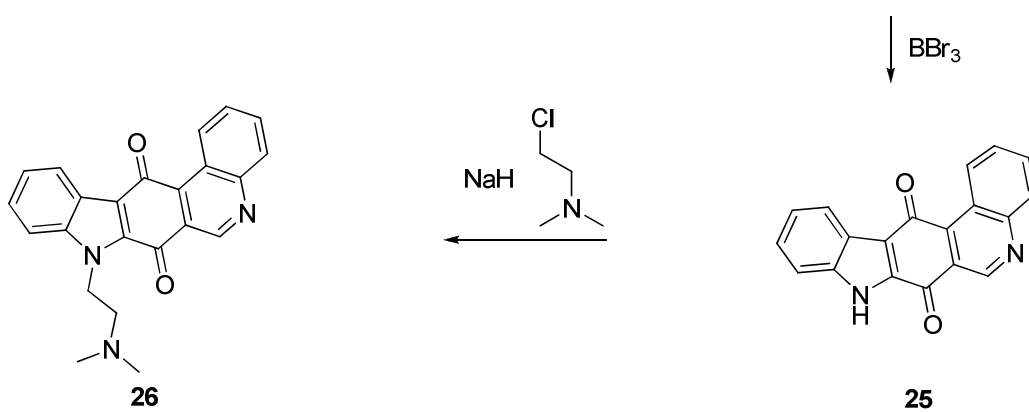
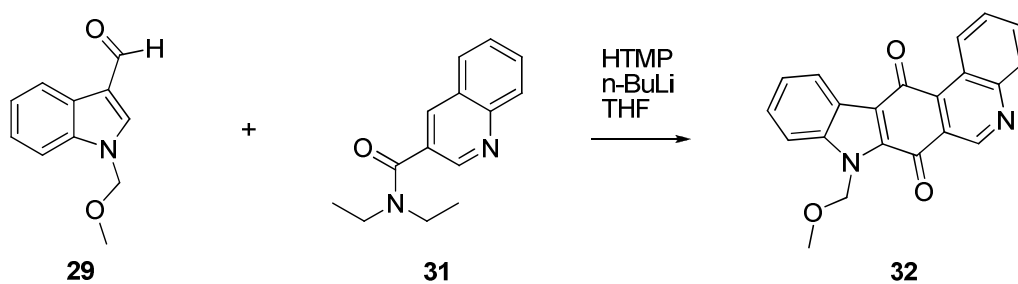
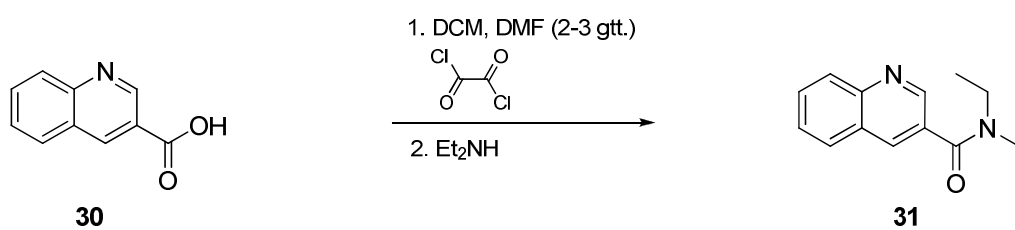
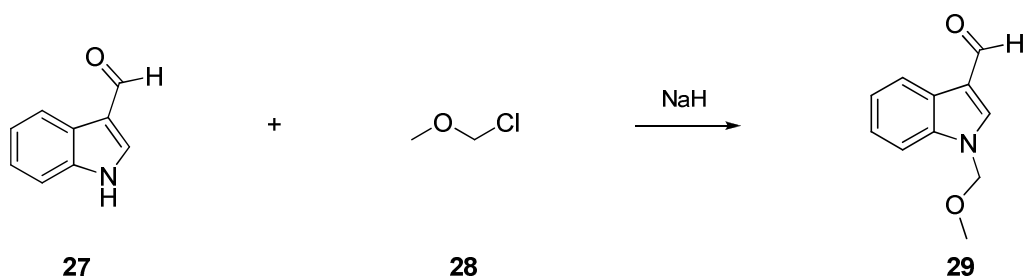
2.2 Reaktionsschema

Reaktionsweg A:



3 EXPERIMENTELLER TEIL

Reaktionsweg B:



2.3 Darstellung von 8-(Dimethylaminoethyl)-8,12b-dihydro-7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(7aH)-dion (26)

Der Grundkörper des vorliegenden isomeren Calothrixin B (**25**) wurde erstmals von *Maingot et al.* 2008 ^[61] beschrieben. Für die Realisierung der fünfgliedrigen 7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(8H)-dion-Grundstruktur standen nun zwei Möglichkeiten zur Auswahl:

Zum einen die in der Literatur ^[61] bereits beschriebene konvergente elfstufige Synthese (siehe Reaktionsweg A), deren Schlüsselschritt zum Erreichen des Fünfringsystems auf einer prominenten Hetero-Diels-Alder-Cycloaddition beruht. Das Prinzip dieser Umsetzung konnte bereits zuvor für die Darstellung von Calothrixin B, sowie der ersten Angucyclinone und Analoga erfolgreich genutzt werden. ^[51, 62]

Zum anderen eine in der Literatur bis dato unbekannte Route, die auf einer ortho-Lithiierungsreaktion beruht, wie sie schon von *Kelly et al.* analog für Calothrixin B beschrieben wurde (siehe Reaktionsweg B). ^[47]

Beide Syntheseoptionen wurden gleichzeitig untersucht, wobei sich schon bald der zweite, nur vierstufige, ebenfalls konvergente Syntheseweg aufgrund seines geringeren Aufwandes als wesentlich überlegen herausstellte. So gelang es in nur vier Schritten den Grundkörper zu synthetisieren, wobei der längste lineare Weg der hochkonvergenten Route wiederum nur zwei Schritte beträgt. Die totale Ausbeute, gerechnet von der teureren, kommerziell erhältlichen Chinolin-3-Carbonsäure, betrug zwar nur 3,8 %, allerdings wird dieser Nachteil durch das äußerst effiziente, saubere und vergleichsweise kostengünstige Verfahren mehr als ausgeglichen.

Der in der Literatur bereits bekannte Weg wurde daher nach der erfolgreichen Darstellung von Benzyl 1-hydroxy-9H-carbazol-9-carboxylat (**40**) abgebrochen. Obgleich die Totalausbeute des Reaktionsweges A laut Literaturangaben der zweiten Route überlegen ist, rechtfertigt dieser Umstand nicht eine aufwendige elfstufige Synthese einer nur vierstufigen vorzuziehen.

Nach erfolgreicher Darstellung des Grundgerüsts sollte zur Erhöhung der zytotoxischen Aktivität an der Position N-8 schließlich eine Aminoalkylseitenkette substituiert werden um zur Verbindung **26** zu gelangen. Als Seitenkette fiel die Wahl dabei auf die in Arzneistoffen prominent vertretene basische Dimethylaminoethyl-Gruppe, die auch schon bei dem von *Leber* synthetisierten Derivat **24** gute zytostatische Ergebnisse erzielte: ^[60]

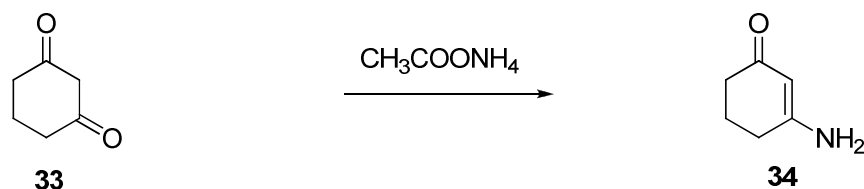
3 EXPERIMENTELLER TEIL

Einerseits wird eine Verbesserung der Wasserlöslichkeit durch die basische Aminogruppe erwartet. Andererseits kann die unter physiologischen Bedingungen positiv geladene Verbindung nun besser mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA interagieren. Auch die Ergebnisse von *Owens et al.* ^[59], die die Bindung von Calothrixin A an den G-Quadruplex des c-myc Oncogen Promotors untersuchten, lassen vermuten, dass die Einführung von positiv geladenen Gruppen die Stabilisierung der G-Quadruplexes verbessert und somit die antitumorale Aktivität erhöht.

2.3.1 Reaktionsweg A

Der auf einer von *Maingot* beschriebene Methode basierende Reaktionsweg beinhaltet eine konvergente Synthese, die sich aus insgesamt zwölf Stufen zusammensetzt. Das erste Teilprodukt **35** ist in 2 Schritten aus einer kommerziell erhältlichen Vorstufe, dem 1,3-Cyclohexadion (**33**), zugänglich. Das zweite Teilprodukt **41** kann in 5 Schritten aus Indolbuttersäure (**36**) dargestellt werden. Im Schlüsselschritt, eine regioselektiven Hetero-Diels-Alder-Reaktion, kann erstmals ein Pentazyklus (**46**) erhalten werden, der in weiteren vier Schritten zum Endprodukt **26** umgesetzt wird.

2.3.1.1 Darstellung von 3-Aminocyclo-2-hexenon (**34**)

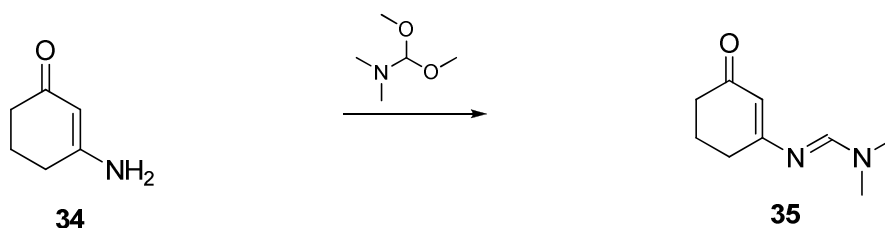


Die Umsetzung des 1,3-Cyclohexadions zum erwünschten zyklischen Enamid **34** erfolgte nach der bekannten Methode nach *Huang und Hartmann*.^[63]

33 wird in Anwesenheit von Ammoniumacetat in Toluol am Wasserabscheider erhitzt. Der Rückstand wird am Rotavapor eingedunstet, bis eine braune zähe Masse erhalten wird. Diese wird anschließend mit Ethylacetat umkristallisiert und die erhaltenen gelben Kristalle unter Vakuum getrocknet.

Die Reaktion verlief ohne Schwierigkeiten, allerdings empfiehlt sich bei der Aufarbeitung den zähen Rückstand mehrmals mit frischem Ethylacetat zu erhitzen, abzudekantieren und zum Kristallwachstum stehen zu lassen.

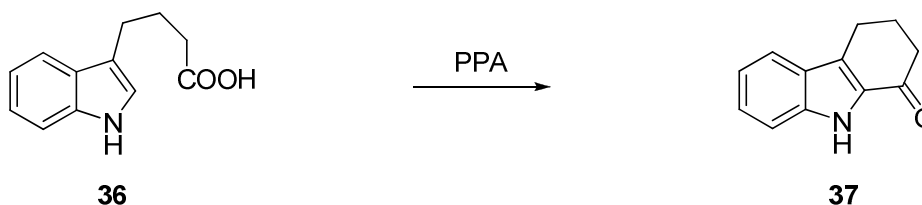
2.3.1.2 Darstellung von (E)-N,N-Dimethyl-N'-(3-oxocyclohex-1-en-1-yl)imidoformamid^[51] (**35**)



Die Synthese des Diens gelang nach dem von *Sissouma et al.* beschriebenen Verfahren, wobei einige Veränderungen durchgeführt werden mussten: Zunächst wurden **34** und N,N-Dimethylformamiddimethylacetal für 4 h in Toluol unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden das Lösungsmittel und der Überschuss des Acetals unter vermindertem Druck entfernt. Der Reaktionsansatz wurde daraufhin mit Toluol versetzt und weitere 1.5 h unter Rückfluss erhitzt. Bezüglich der Ausbeute machte es kaum einen Unterschied, ob 2 oder nur 1 Äq. des Acetals verwendet werden. Gravierender kam allerdings die Methode der Aufarbeitung zum Tragen: Konnte während des Erhitzens unter Rückfluss in THF die Produktbildung dünnschichtchromatographisch sehr gut verfolgt werden (Kieselgel, FM: Dichlormethan/MeOH 9/1), so misslang die säulenchromatographische Aufreinigung, da auf dem Kieselgel eine Rückreaktion zu den Edukten festgestellt wurde. Offenbar war das gebildete Dien **35** nicht stabil genug für eine chromatographische Reinigung mit Kieselgel. Bei der Verwendung von Aluminiumoxid als stationäre Phase, konnten ebenfalls nur Edukte isoliert werden.

Erst die Destillation am Kugelrohr konnte ein sehr reines Produkt liefern.

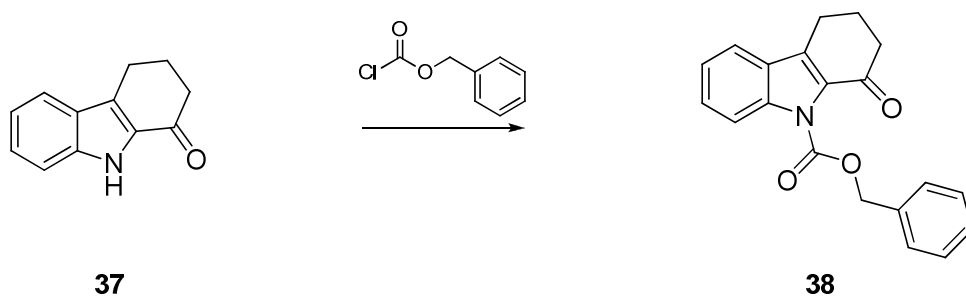
2.3.1.3 Darstellung von 2,3,4,9-Tetrahydro-1H-carbazol-1-on^[64] (**37**)



Für die Synthese des Carbazol-Grundkörpers **37** wurde auf die in der Literatur bekannte Methode zurückgegriffen. 3-Indolbuttersäure wurde mittels Polyphosphorsäure einer intramolekularen Acylierungsreaktion unterworfen. Dazu wurde eine Mischung der beiden Reaktanten für 4 h in Toluol unter Rückfluss erhitzt, der Reaktionsansatz daraufhin auf Eiswasser geschüttet und die wässrige Phase anschließend dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Die Umsetzung verlief problemlos; die Aufreinigung konnte bereits nach der Extraktion beendet werden, da das erhaltene Produkt bereits von ausreichender Reinheit war.

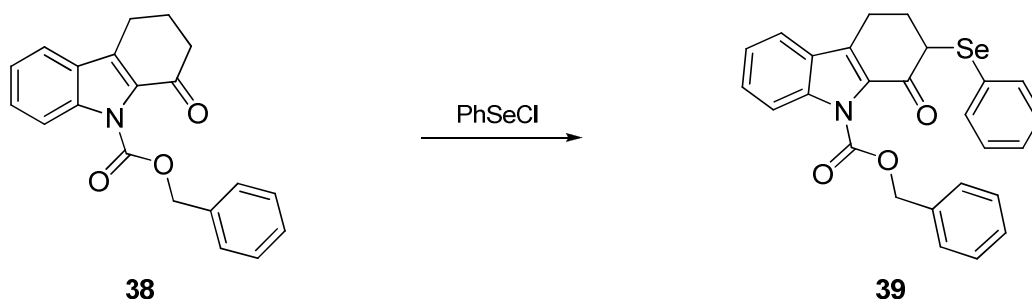
2.3.1.4 Darstellung von Benzyl 1-oxo-3,4-dihydro-1H-carbazol-9(2H)-carboxylat **XX** ^[61] (**38**)



Um die N-9 Position des Carbazols **37** zu schützen, wurde nach *Maingot et al.* auf eine Benzyloxycarbonylgruppe zurückgegriffen. Der Carbazolstickstoff wird dazu mit Natriumhydrid als Base deprotoniert und reagiert gemäß einer $\text{S}_{\text{N}}2\text{T}$ -Reaktion mit dem Benzylkohlenensäurechlorid zu **38**.

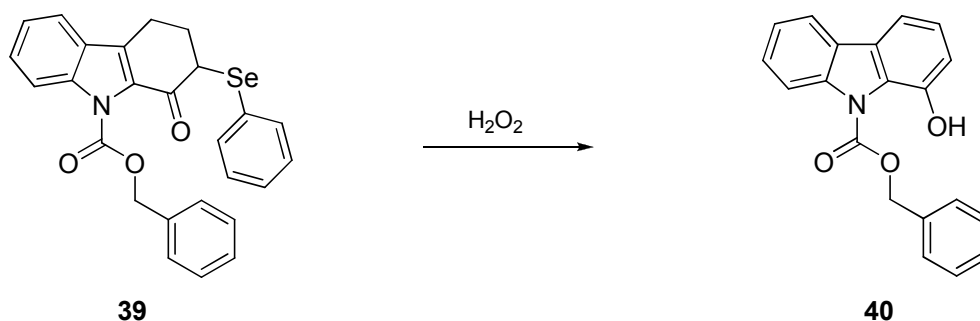
Die Reaktion verlief wie erwartet und in guter Ausbeute. Das Auskristallisieren des Produkts gelang durch Trituration mit Ligroin.

2.3.1.5 Darstellung von Benzyl 1-oxo-2-(phenylselenyl)-3,4-dihydro-1H-carbazol-9(2H)-carboxylat^[61] (**39**)



Die Aromatisierung des dritten Rings gelang in zwei Reaktionsschritten: Zunächst erfolgte die Phenylselenylierung in der α -Position zur Carbonylgruppe durch Umsetzen von **38** mit Phenylselenenylchlorid. Dazu wurde eine Lösung von **38** in abs. THF auf -78°C gekühlt und LiHMDS zugesetzt. Kurz darauf wurde Phenylselenenylchlorid zugegeben und der Ansatz 1 h bei dieser Temperatur weiter gerührt. Nachdem der Kolbeninhalt Raumtemperatur erreichte wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt sogleich weiter umgesetzt.

2.3.1.6 Darstellung von Benzyl 1-hydroxy-9H-carbazol-9-carboxylat^[61] (**40**)



Das Rohprodukt von **39** wurde einer Oxidation mit H_2O_2 unterworfen um zum entsprechenden 1-Hydroxy-Carbazolderivat **40** zu gelangen. Dazu wurde der Kolbeninhalt

3 EXPERIMENTELLER TEIL

mit Dichlormethan versetzt und anschließend H_2O_2 vorsichtig zu getropft. Daraufhin wurde der Ansatz noch weitere 30 Minuten bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und anschließend extrahiert.

Insbesondere bei größeren Ansätzen ist hierbei unbedingt auf die langsame Zugabe des H_2O_2 zu achten. Daher sollte nicht mit einem herkömmlichen Eisbad, sondern mit Trockeneis auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt werden um, falls nötig, auf einen Temperaturanstieg schnell reagieren zu können.

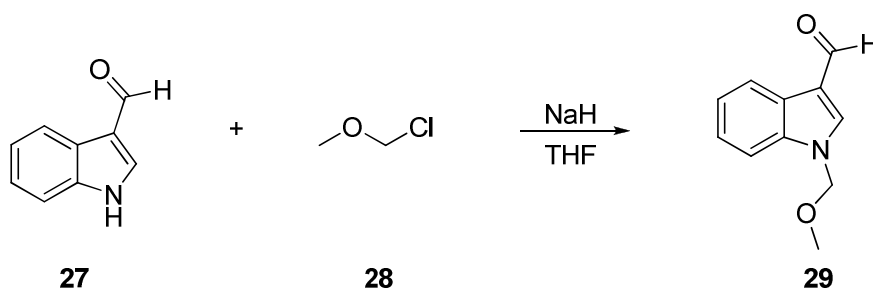
Die Aufreinigung des Ansatzes erfolgte durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Ligroin/Ethylacetat 9/1), wobei die gewünschte Verbindung nur schwer von einer rotgefärbten Verunreinigung zu trennen war.

An dieser Stelle wurde der Reaktionsweg A zugunsten des Reaktionswegs B abgebrochen.

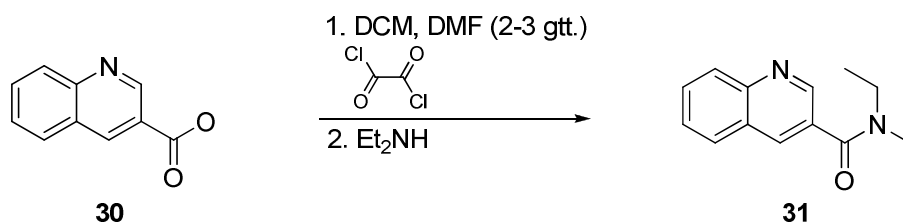
2.3.2 Reaktionsweg B

Diese nur fünfstufige, hoch konvergente Synthesestrategie erfordert zunächst die Darstellung der beiden bizyklischen Vorstufen 1-(Methoxymethyl)-1H-indol-3-carbaldehyd (**29**) und N,N-Diethylchinolin-3-carboxamid (**31**). Diese beiden bekannten Verbindungen konnten in jeweils einem Schritt aus kommerziell verfügbaren Chemikalien in guter Ausbeute synthetisiert werden. Anschließend erfolgte der Schlüsselschritt zur Bildung des gewünschten Pentazyklus durch eine ortho-Lithiierungsreaktion. Im Anschluss daran wurde die Methoxymethyl-(MoM)-Schutzgruppe abgespalten um zum bekannten isomeren Calothrixin B (**25**) zu gelangen. Im fünften und letzten Schritt erfolgte die Bindung der Seitenkette an den Grundkörper.

2.3.2.1 Darstellung von 1-(Methoxymethyl)-1H-indol-3-carbaldehyd^[65] (**29**)



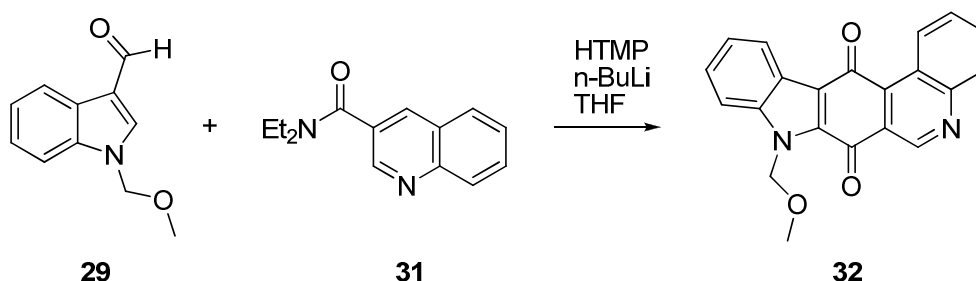
Für die Synthese des N-geschützten Carbaldehyds konnte auf die bekannte Synthese von *Comins* und *Killpack* zurückgegriffen werden. Durch die starke Base Natriumhydrid reagiert Methoxymethylchlorid im Sinne einer S_N2-Reaktion mit dem deprotonierten N-1 des Indol. Zur gekühlten Suspension des NaH in THF wird **27** langsam zugegeben. Da der Carbaldehyd in THF nur schlecht löslich ist, sollte er entweder - in 16-fachem Überschuss des Lösungsmittels gelöst - zugetropft werden, oder als Feststoff zugesetzt werden. Die Reaktion wird weiterhin in THF bei einer Temperatur von -23°C durchgeführt, wobei nach dem vorsichtigen Zutropfen des MoM-chlorids eine Farbänderung von milchig-weiß nach schwach rosa beobachtet werden konnte. Nach erfolgter Extraktion und Trocknung konnte das Produkt durch Kugelrohrdestillation in sehr hoher Reinheit und guter Ausbeute erhalten werden und ist mit den spektroskopischen Angaben der Literatur ident.

2.3.2.2 Darstellung von N,N-Diethylchinolin-3-carboxamid^[66] (31)

Im Gegensatz zur der in der Literatur beschriebenen Synthese des Carboxamids von *Gilman* und *Spatz* erfolgte die Umsetzung der freien Carbonsäure mit Oxalylchlorid statt Phosphoroxychlorid. In Anwesenheit katalytischer Mengen DMF wurde in einer Ein-Topf-Reaktion zunächst das entsprechende Carbonsäurechlorid gebildet. Durch dabei frei werdendes gasförmiges CO, CO₂ und HCl hat die Zugabe dabei langsam und äußerst vorsichtig zu erfolgen. Das hochreaktive Zwischenprodukt reagierte nun mit Diethylamin zum Amid, gemäß einer S_N2t-Reaktion.

Die Umsetzung konnte leicht mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Ethylacetat/Ligroin 4/1; R_f=0.3) beobachtet werden. Nach Extraktion und weiterer chromatographischer Aufreinigung wurde das Produkt als gelblich-oranges Öl in guter Ausbeute isoliert.

2.3.2.3 Darstellung von 8-(Methoxymethyl)-7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(8H)-dion (32)

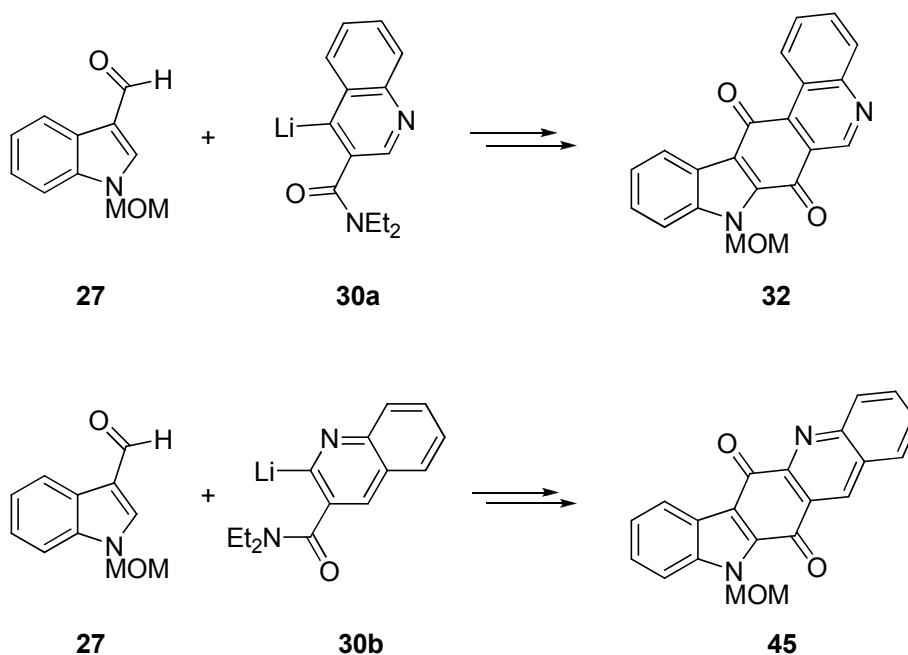


3 EXPERIMENTELLER TEIL

Zur Realisierung des Pentazyklus konnte nun der von *Snieckus et al.*^[67, 68] beschriebene Mechanismus der *Directed ortho Metalation* (DoM) angewendet werden. Dabei dient die Diethylcarboxamid-Funktion des Chinolins als „*directed metalation group*“ (DMG).

Zu Beginn der Synthese stellte sich die Frage, an welcher Position des Chinolins die ortho-Lithiierung am wahrscheinlichsten erfolgen würde: Nach *Snieckus* sollte ähnlich wie beim N,N-Diethylpyridin-3-carboxamid die Position 4 bevorzugt für einen elektrophilen Angriff reagieren. In diesem Fall würde man zum N-methoxylierten Grundkörper des von *Maingot*^[61] beschriebenen Calothrixin B Isomers (**32**) gelangen.

Sollte allerdings entgegen aller Erwartungen die Position 2 lithiiert werden, so gelangte man zu dem Derivat **45**, dem 6*H*-Indolo[2,3-*b*]acridin-6,12(11*H*)-dion, das von *Ashcraft*^[69] bereits 1983 synthetisiert wurde (siehe Schema 2).



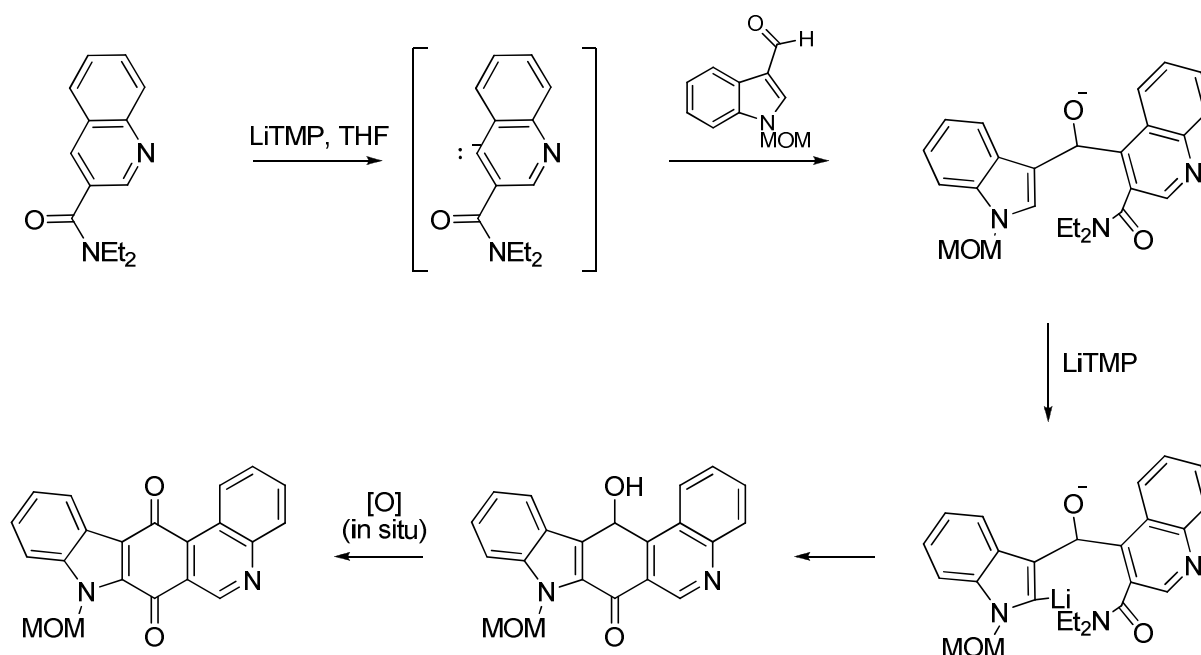
Schema 2: mögliche Reaktionsprodukte

Aufgrund von Überlegungen bezüglich des Reaktionsmechanismus kann an und für sich die Position 2 des Chinolins für die Lithiierung ausgeschlossen werden, da in diesem Falle eine negative Ladung in unmittelbarer Nachbarschaft zum elektronegativeren Stickstoff auftritt, was energetisch ungünstig ist (vergleiche Schema 3).

Durch die starke Base *n*-BuLi wird die Position 4 des Chinolins deprotoniert und steht somit dem elektrophilen Angriff des Indolcarbaldehyds zur Verfügung. Das Alkoholat-

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Zwischenprodukt wird nun seinerseits wieder lithiiert, der Carboxamidkohlenstoff dient als Elektrophil und ermöglicht somit den Ringschluss. Der erhaltene Alkohol wird umgehend zum Chinon oxidiert (siehe Schema 3). Keine der postulierten Zwischenprodukte konnte isoliert und nachgewiesen werden.



Schema 3: Reaktionsmechanismus

Die Lösung von Lithium 2,2,6,6-Tetramethylpiperidid wurde zunächst durch tropfenweise Zugabe des Tetramethylpiperidins zu *n*-BuLi bei -70°C bereitet. Nach Aufwärmen auf -5 bis 0 °C und anschließendem erneuten Kühlen bis auf -83°C erfolgte die weitere Reagenzzugabe. Ob hierbei mit dem Ethylamid zuerst begonnen wird oder sogleich die Mischung des Amids und des Aldehyds - gelöst in THF - zugegeben wird, machte bei wiederholter Durchführung in Anbetracht der Ausbeute keinen Unterschied.

Bereits kurz nach der Zugabe der Lösung des Amids und des Aldehyds zur Lösung von *n*-BuLi und TMP und anschließendem Rühren bei Raumtemperatur konnte die Bildung des pentazyklischen Chromophors dünnschichtchromatographisch als intensiv orange gefärbter Spot beobachtet werden (Kieselgel, FM: Ethylacetat 2/ Ligroin 3; R_f: 0.5).

Auch die Verwendung von 1.0 Äq. anstatt 0.4 Äq. des Carbaldehyds konnte die Ausbeute nicht erhöhen; das nicht umgesetzte Ausgangsmaterial erschwerte allerdings die Aufreinigung.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Zur sicheren Zuordnung insbesondere der quartären Kohlenstoffsignale des 7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(8H)-dion-Grundkörpers waren intensivere spektroskopische Untersuchungen nötig (COSY, NOESY, HSQC, HMBC, siehe Spektren im Anhang und Abb. X).

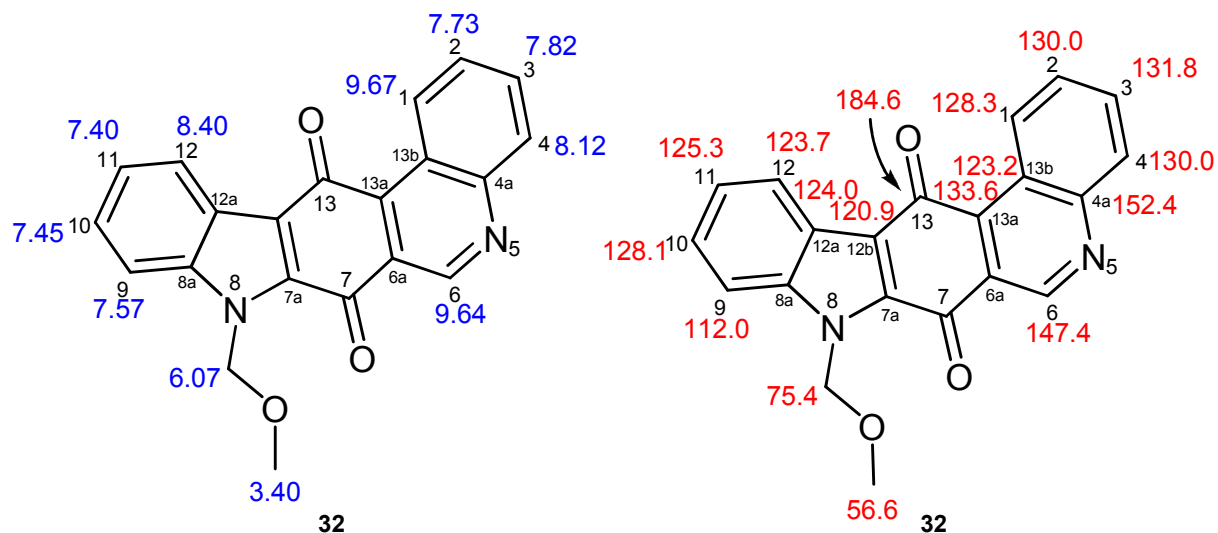
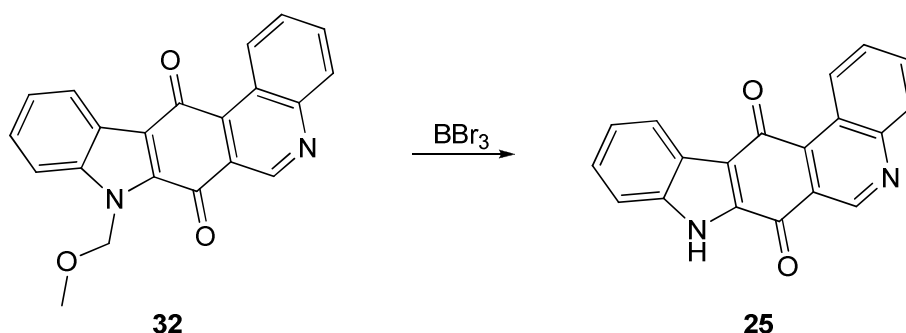


Abb. 4: Zuordnung der ¹H und ¹³C-Signale (in ppm) für **32**

Anhand der Auswertung der NMR-Spektren konnte bei der Aufarbeitung nur die Verbindung **32** erhalten werden. Zwar fiel beim Aufreinigen eine weitere Fraktion an, deren Struktur jedoch aufgrund der zu geringen Menge die nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

2.3.2.4 Darstellung von 7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(8H)-dion (25)

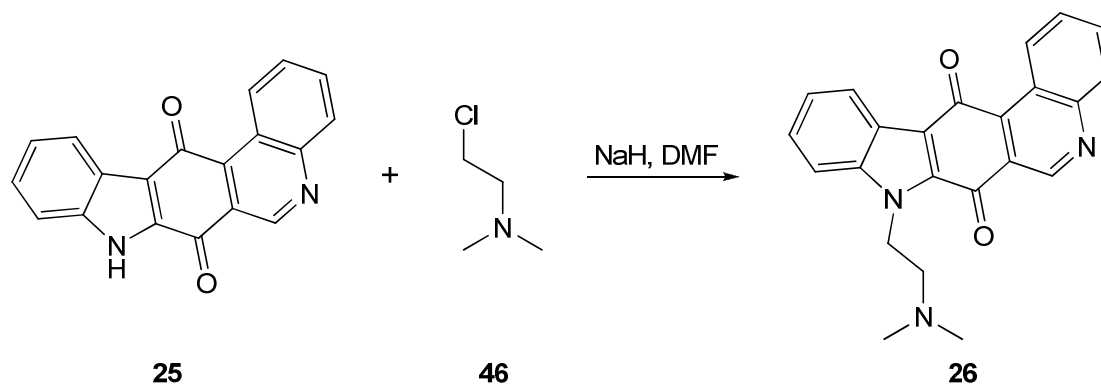


Für die Abspaltung der Methoxymethyl-Schutzgruppe wurde auf die einfache und saubere Methode mit der starken Lewisäure BBr_3 zurückgegriffen. *Bernado* und *Chai* konnten dies bereits für die Synthese von Calothrixin B anwenden, nachdem sich Versuche der Schutzgruppenabspaltung im sauren Milieu als erfolglos erwiesen.^[70]

Bereits nach nur einstündigem Rühren und anschließender Rückflusserhitzung mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung bei 60°C konnte eine quantitative Abspaltung erreicht werden. Nach erfolgter Extraktion mit Dichlormethan wurde das Rohprodukt durch Umkristallisation mit Aceton weiter gereinigt. Allerdings waren dazu vergleichsweise große Mengen Lösungsmittel notwendig.

Die Abspaltung konnte mittels ^1H NMR-Spektroskopie leicht an der Anwesenheit des N-H Signals bei $\delta = 13.1$ ppm und der Abwesenheit des Signale der MoM-Gruppe bei $\delta = 6.07$ und 3.40 ppm beobachtet werden. Die geringfügigen Unterschiede in den Verschiebungen der NMR-Spektren mit den Literaturdaten sind höchstwahrscheinlich auf den unterschiedlichen Wassergehalt von $\text{DMSO}-d_6$ zurückzuführen.

2.3.2.5 Darstellung von 8-[2-(dimethylamino)ethyl]-7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(8H)-dion (26)



Der finale Schritt um zum gewünschten Aminoalkyl-Isocalothrixin-B-Derivat zu gelangen, umfasste die Alkylierung des N-10 mit einer Dimethylaminoethyl-Seitenkette. Natriumhydrid als starke Base diente zur Deprotonierung des Indolstickstoffs, wodurch dieser wiederum im Sinne einer S_N2 -Reaktion mit 2-Chlor-N,N-dimethylethanamin (**46**) reagierte.

Die Reaktion verlief wie erwartet, bei der Extraktion kann Ethylacetat aber auch Dichlormethan als organische Phase verwendet werden. Aufgrund der besseren Handhabbarkeit und der geringen Toxizität empfiehlt es sich allerdings mit Ethylacetat zu arbeiten. In beiden Fällen ist jedoch auf ein genügend großes Volumen der organischen Phase zu achten. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Ethylacetat/Ligroin), wodurch das Produkt in hoher Reinheit gewonnen werden konnte.

Die erfolgreiche Umsetzung wurde anhand der NMR-Spektroskopischen Daten bestätigt: Die Anwesenheit der Signale der Seitenkette beginnend bei den sechs Protonen der beiden Methylgruppen bei $\delta = 2.39$, den insgesamt vier Protonen der Ethylgruppe bei $\delta = 2.75$ und 4.74 , sowie die Abwesenheit des N_8 -H Protons bei $\delta = 13.10$ bestätigen die erfolgte Bindung der Seitenkette. Desweiteren konnte aufgrund der Auswertung von COSY und NOESY Experimenten die unmittelbare Nachbarschaft der beiden ersten Protonen der Ethylgruppe an N-8 bei $\delta = 4.74$ zum C-9-Proton bei $\delta = 7.40$ gezeigt werden. Daher kann die Bindung der Seitenkette an N-5 eindeutig ausgeschlossen werden. Darüberhinaus wurde, wie auch schon bei der Verbindung **32**, die genaue Struktur mittels intensiverer spektroskopischer

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Untersuchen (HSQC, HMBC, ^{15}N -HMBC, siehe Spektren im Anhang und Abb. 5 und 6) festgestellt.

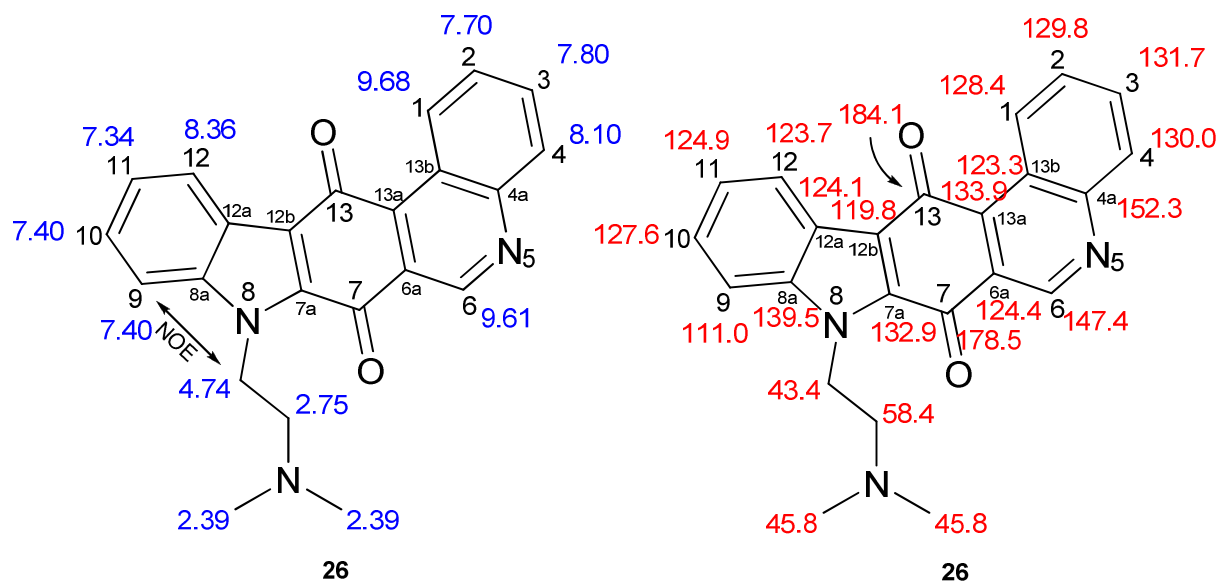


Abb. 5: Zuordnung der ^1H und ^{13}C -Signale (in ppm für **26**)

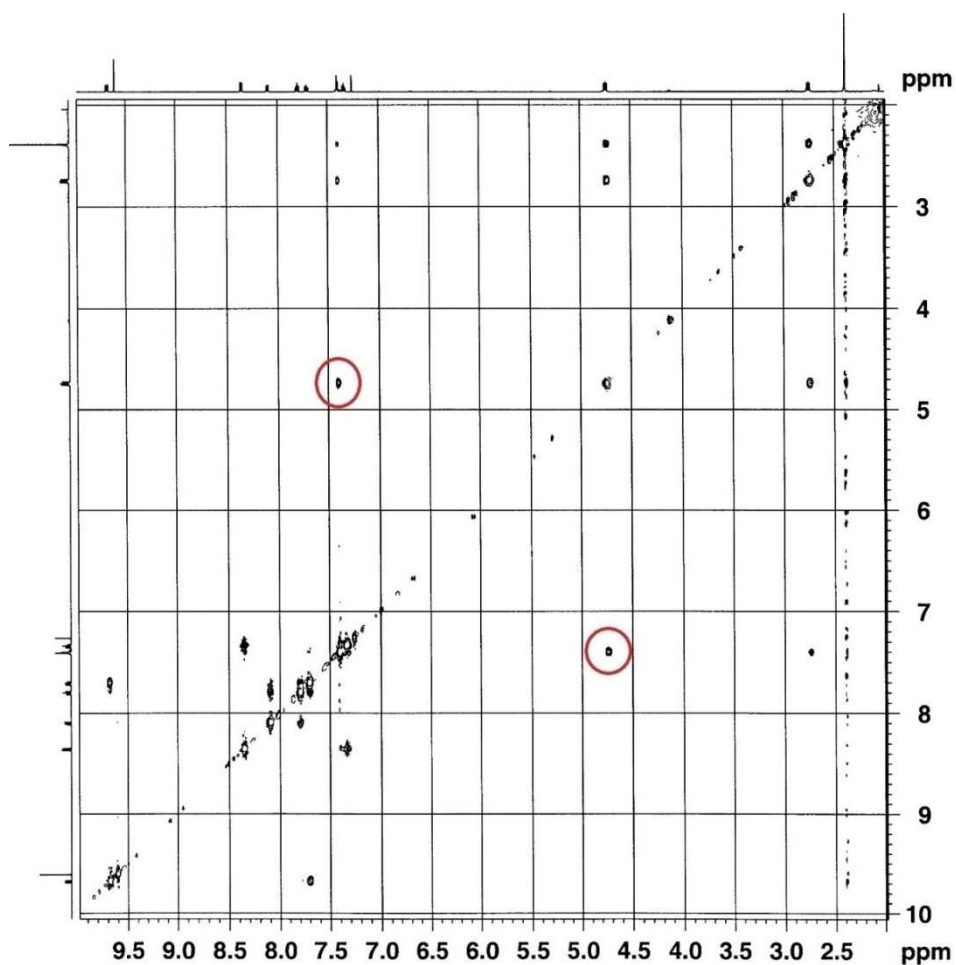


Abb. 6: NOESY-Spektrum von **26**

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Allgemeines

3.1.1 Chemikalien

Bezugsquellen: Sigma Aldrich (www.sigma-aldrich.com), Acros (www.acros.com) oder VWR (www.vwr.com)

3.1.2 Analysen

Spektrenaufnahme:

^1H - und ^{13}C -NMR Spektren: Bruker Avance DPX-200 Spektrometer bei 300 K (200.13 MHz für ^1H , 50.32 MHz für ^{13}C) oder Bruker Avance 500 Spektrometer bei 293 K (500.13 MHz für ^1H , 125.77 MHz für ^{13}C). Interne Standards: Nichtdeuterierte Rückstände von Lösungsmittel wurden beziehend auf TMS (Tetramethylsilan) herangezogen: CDCl_3 : 7.26 ppm für ^1H - und 77.00 ppm für ^{13}C -Spektren; $\text{DMSO}-d_6$: 2.49 ppm für ^1H - und 39.5 ppm für ^{13}C -Spektren.

Massenspektren: Shimadzu GC/MS-Q95050A GC-17A

Hochauflösende MS-Spektren: Finnigan MAT 8230 (EI, 70eV)

Chromatographische Trennung:

Dünnschichtchromatographie: Merck TLC Silica Gel 60 F254 DC-Alufolien, 0.2 mm x 20 cm x 20 cm; Merck Aluminiumoxid neutral 60 F254, 0.2 mm x 20 cm x 20 cm

Präperative Dünnschichtchromatographie: Merck PSC-Platten

Säulenchromatographie: Merck Kieselgel 60 F254 (70-230 mesh ASTM, Nr. 1.07734)

Anderes Zubehör:

Schmelzpunktbestimmung: Reichert Kofler-Heiztischmikroskop

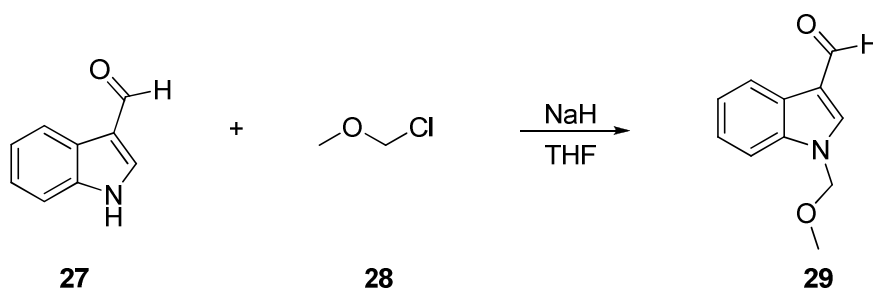
3.1.3 Reaktionen unter Inertgas

Für 2 h bei 120 °C im Trockenschrank erhitzte Glasgeräte wurden heiß zusammengesetzt und während der gesamten Reaktion kontinuierlich mit trockenem Argon begast. Verwendete Lösungsmittel wurden frisch absolutiert oder über Molekularsieb gelagert. Die Zugabe von Reagenzien erfolgte über ein Septum mit Spritze.

3.2 Synthesen

3.2.1 Reaktionsweg B

3.2.1.1 1-(Methoxymethyl)-1H-indol-3-carbaldehyd^[65] (**29**)



In einem 250 ml Dreihalskolben wird Natriumhydrid (1.47g, 60%ige Dispersion in Öl; 36,8440 mmol, 1.05 Äq.) dreimal mit trockenem Hexan (ca. 8 ml) gewaschen und anschließend in trockenem THF (20 ml) suspendiert. Der Reaktionsansatz wird auf -23°C gekühlt und eine Lösung von Indol-3-carboxaldehyd (**27**) (5.09 g, 35.0896 mmol, 1 Äq.) in THF (80 ml) wird portionsweise zugesetzt. Man lässt die Mischung Raumtemperatur erreichen und rührt weitere 30 Minuten. Anschließend wird erneut auf -23°C gekühlt und Chlormethylmethylether (**28**) (2.9 ml, 38.5985 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben. Das Kühlbad wird entfernt und der Ansatz wird nach Erreichen von Raumtemperatur weitere 45 Minuten gerührt. Das Rohprodukt wird in eine stark gerührte, kalte 5%ige NaHCO₃-Lösung (50 ml) gelehrt und dreimal mit Diethylether (je 30 ml) extrahiert. Die vereinigten Etherphasen werden einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird hierauf mittels Kugelrohrdestillation weiter gereinigt (170 °C, 3.5*10⁻² torr).

Ausbeute: 5.58 g eines weißlichen Feststoffes (84%).

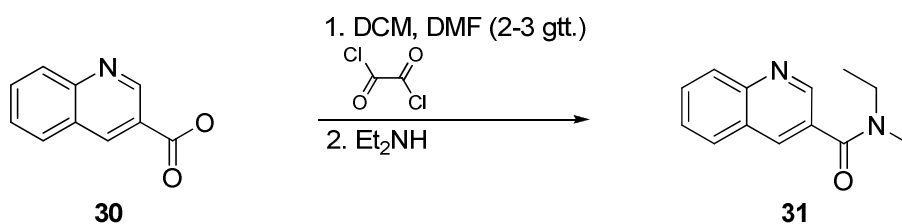
3 EXPERIMENTELLER TEIL

Charakterisierung: ^[65]

Schmelzpunkt: 77.5-78.5 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 9.93 (s, 1 H), 8.16-8.31 (m, 1 H), 7.69 (s, 1 H), 7.13-7.55 (m, 3 H), 5.35 (s, 2 H), 3.19 (s, 3 H).

3.2.1.2 N,N-Diethylchinolin-3-carboxamid ^[66] (31)



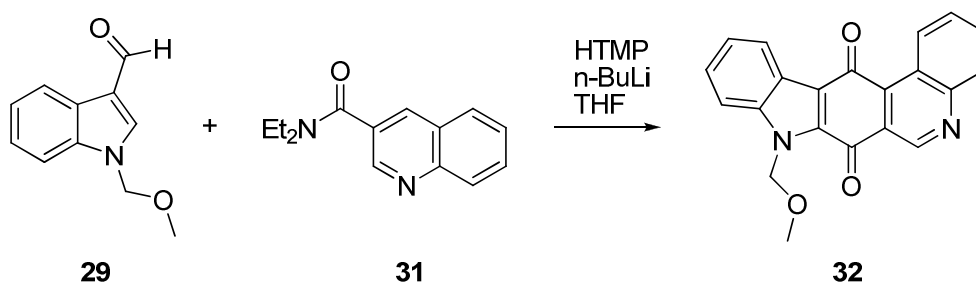
Einer Lösung von Chinolin-3-carbonsäure (**30**) (1.00 g, 5.7750 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan (30 ml) werden 3 Tropfen DMF zugegeben. Nach 2 minütigem Rühren wird Oxalylchlorid (0.65 ml, 6.93 mmol, 1.2 Äq.) über 10 Minuten hinweg vorsichtig zugetropft und im Anschluss 1 h gerührt. Daraufhin wird die Mischung auf 0 °C gekühlt und N,N-Diethylamin (5.0 ml, 47.9325 mmol, 8.3 Äq.) tropfenweise zugesetzt. Die nunmehr orange Lösung wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und daraufhin einmal mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung (50 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mit Hilfe von Säulenchromatographie weiter gereinigt (Kieselgel, EtOAc/Petrolether 4/ 1).

Ausbeute: 1.05 g eines gelblich- orangen Öls (85%).

Charakterisierung:

¹H-NMR (CDCl₃): δ 8.94-8.93 (d, 1 H), 8.21 (s, 1 H), 8.15-8.11 (d, 1 H), 7.87-7.73 (m, 2 H), 3.60-3.34 (d, 4 H), 1.29-1.21 (m, 6 H)

3.2.1.3 8-(Methoxymethyl)-7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(8H)-dion (32)



In einem 250 ml Dreihalskolben werden unter Argonatmosphäre absolutes THF (65 ml) auf 70 °C gekühlt und eine Lösung von n-Butyllithium in THF (2.5 M, 7.2 ml, 17.8878 mmol, 4.0 Äq.) zugegeben, gefolgt von 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (3.2 ml, 2.53 g, 17.8878 mmol, 4.0 Äq.) weniger als einer Minute darauf. Nach Rühren für 5 Minuten wird der Kolben im Eisbad für 1 h bei -3 bis 0°C weiter gerührt. Die dunkelgelbe Lösung wird nun auf -83°C gekühlt (durch Austausch des Eisbades mit einer Ether/Trockeneismischung) und eine Lösung von N,N-Diethylchinolin-3-carboxamid (**31**) (1.02 g, 4.4719 mmol, 1.0 Äq.) und 1-(Methoxymethyl)-1H-indol-3-carbaldehyd (**29**) (0.35 g, 1.8335 mmol, 0.41 Äq.) in trockenem THF (30 ml) werden über 10 Minuten zugetropft. Die Lösung verfärbt sich umgehend rot, wobei die Farbintensität innerhalb weniger Minuten stark zunimmt. Nach weiterem Rühren für 40 Minuten bei -83°C lässt man die Lösung über einen Zeitraum von 2 h Raumtemperatur erreichen, währenddessen schlägt die Farbe von rot nach olivgrün und schließlich nach schwarz um. Die dunkle Lösung wird anschließend für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und hierauf die Reaktion durch Zugabe von Wasser (50 ml) beendet. Das Rohprodukt wird dreimal mit EtOAc (ca. 100 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie gereinigt (Kieselgel, EtOAc/Petrolether 2/3). Ausbeute: 304.7 mg eines orange-roten Feststoffes (20 %).

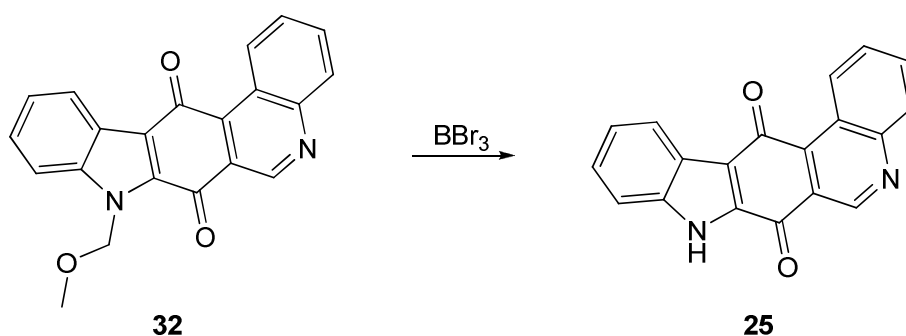
Charakterisierung:

FP: 228°C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 9.67 (H-1, dd, $^3J \approx 8.75$ Hz, 1 H), 9.64 (H-6, s, 1 H), 8.40 (H-12, d, $J \approx 8.0$ Hz, 1 H), 8.12 (H-4, dd, $^3J \approx 8.3$ Hz, 1 H), 7.82 (H-3, dt, $^3J \approx 7.6$ Hz, 1 H), 7.73 (H-2, dt, $^3J \approx 7.7$ Hz, 1 H), 7.57 (H-9, dd, $^3J \approx 8.4$ Hz, 1 H), 7.45 (H-10, dt, $^3J \approx 7.7$ Hz, 1 H), 7.40 (H-11, dt, $^3J \approx 7.3$ Hz, 1 H), 6.08 (H-MoM-1, s, 2 H), 3.40 (H-MoM-2, s, 3 H).

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 184.57 (C-13), 178.78 (C-7), 152.38 (C-4a), 147.44 (C-6), 139.82 (C-8a), 133.58 (C-13a), 133.13 (C-7a), 131.84 (C-3), 130.06 (C-2), 130.03 (C-4), 128.12 (C-10), 125.27 (C-11), 124.41 (C-6a), 124.04 (C-12a), 123.69 (C-12), 123.15 (C-13b), 120.87 (C-12b), 111.99 (C-9), 75.35 (C-MoM-1), 56.60 (C-MoM-2).

MS (EI): m/z 342 (23%), 259 (27%), 197 (40%), 135 (100%), 71 (21%), 57 (41%), 45 (53%), 43 (24%).

3.2.1.4 7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(8H)-dion^[61] (25)

In einem 100 ml Dreihalskolben werden 8-(Methoxymethyl)-7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(8H)-dion (**32**) (0.1239 g, 0.3619 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan (25 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von BBr_3 (1 M Lösung in Dichlormethan, 0.44 ml, 0.4343 mmol, 1.2 Äq.) lässt man die Mischung unter Rühren Raumtemperatur erreichen und rührt anschließend für 1 h weiter. Anschließend wird eine gesättigte NaHCO_3 -Lösung (25 ml) hinzugefügt und die Mischung wird 60 Minuten bei ca. 60 °C Heizbadtemperatur unter starkem Rühren rückflusserhitzt. Die Emulsion wird in einen Scheidetrichter überführt und nach Zugabe von weiterem Dichlormethan (25 ml) wird die wässrige Phase dreimal mit

3 EXPERIMENTELLER TEIL

Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird durch Umkristallisation mit Aceton weiter aufgereinigt.

Für die folgende Reaktion wird allerdings mit dem nicht umkristallisierten Rohprodukt (0.1250 g) weiter gearbeitet.

Ausbeute des Produkts: 0.0756 g eines roten Feststoffs (70%).

Charakterisierung: ^[61]

FP >350 °C

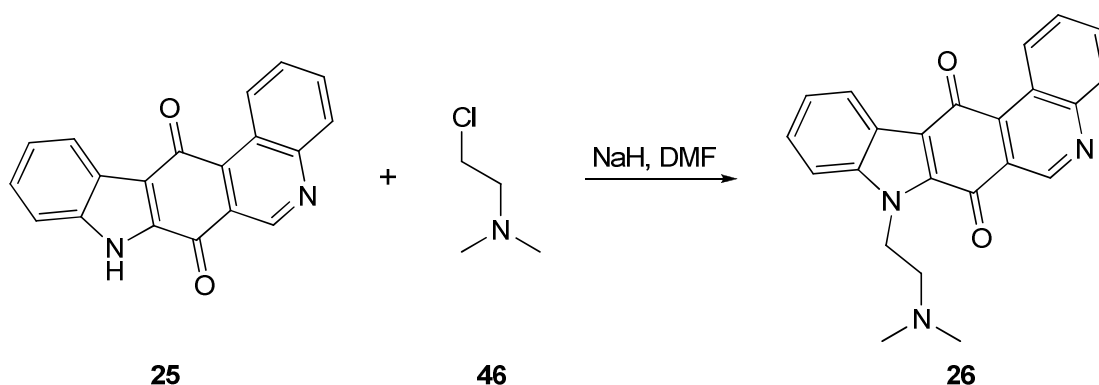
¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 13.10 (br s, 1 H, NH), 9.65 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H_{Ar}), 9.50 (s, 1 H, H-6), 8.20 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, H_{Ar}), 8.10 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H_{Ar}), 7.91 (t, J = 7.6 Hz, 1 H, H_{Ar}), 7.81 (t, J = 7.6 Hz, 1 H, H_{Ar}), 7.56 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H_{Ar}), 7.43 (t, J = 7.2 Hz, 1 H, H_{Ar}), 7.35 (t, J = 7.2 Hz, 1 H, H_{Ar}).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 186.7 (C-13), 177.6 (C-7), 151.8 (quartärer C), 146.9 (CH_{Ar}), 138.4 (quartärer C), 135.4 (quartärer C), 134.1 (quartärer C), 131.8 (CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 124.3 (CH_{Ar}), 124.0 (2 x quartärer C), 123.0 (quartärer C), 122.3 (CH_{Ar}), 118.5 (quartärer C), 114.0 (CH_{Ar}).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 298 (100) [M^+], 270 (55), 242 (26), 241 (38).

HRMS (EI): m/z berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$: 298.0742; gefunden: 298.0743.

3.2.1.5 8-[2-(dimethylamino)ethyl]-7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(8H)-dion (26)



3 EXPERIMENTELLER TEIL

In einem 250 ml Dreihalskolben wird unter Argonatmosphäre Natriumhydrid (0.43 g, 60%ige Dispersion in Öl, 10.7560 mmol, 4.0 Äq.) zweimal mit trockenem Hexan (10 ml) gewaschen und in trockenem DMF (20 ml) suspendiert. Der Ansatz wird daraufhin auf -10 bis 0 °C gekühlt und eine Lösung von 8-(Methoxymethyl)-7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(8H)-dion (**25**) (0.80 g, 2.6890 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (50 ml) über 20 Minuten hinweg zugesetzt. Die Lösung wird für 30 Minuten gerührt, anschließend wird eine Lösung von N,N-Dimethylchlorethanamin hydrochlorid (**46**) (0.58 g, 4.0335 mmol, 1.5 Äq.) in trockenem DMF (30 ml) zugegeben und die Mischung bei 67 °C für 5 h unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wird die Reaktion durch Zugabe von Wasser (150 ml) beendet und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat (200 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie gereinigt (Kieselgel, EtOAc/MeOH 95/5 → EtOAc/MeOH 95/5 mit 2% Triethylamin).

Ausbeute: 0.32 g eines roten amorphen Feststoffes (32 %).

Charakterisierung:

FP: 168-172°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 9.68 (H-1, ddd, ³J ≈ 8.75 Hz, 1 H), 9.61 (H-6, s, 1 H), 8.36 (H-12, m, ³J ≈ 8 Hz, 1 H), 8.10 (H-4, dd, ³J ≈ 8.5 Hz, 1 H), 7.80 (H-3, m, ³J ≈ 7.6, 1 H), 7.70 (H-2, m, ³J ≈ 7.7 Hz, 1 H), 7.40 (H-9, H-10, m, 2 H), 7.34 (H-11, m, 1 H), 4.74 (H-Ethyl-1, m, 2 H), 2.75 (H-Ethyl-2, m, 2H), 2.39 (H-Methyl, s, 6 H).

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 184.07 (C-13), 178.53 (C-7), 152.29 (C-4a), 147.44 (C-6), 139.51 (C-8a), 133.90 (C-13a), 132.91 (C-7a), 131.69 (C-3), 129.98 (C-4), 129.82 (C-2), 128.43 (C-1), 127.60 (C-10), 124.92 (C-11), 124.44 (C-6a), 124.09 (C-12a), 123.72 (C-12), 123.28 (C-13b), 119.83 (C-12b), 111.04 (C-9), 58.44 (C-Ethyl-2), 45.79 (C-Methyl), 43.37 (C-Ethyl-1).

¹H-¹⁵N NMR: δ 323.7 (N-5), 142.2 (N-8), 23.2 (N-Seitenkette)

MS (EI): m/z 372.2, 371.2, 370.2, 325.2, 317.1, 302.1

HRMS (EI): m/z berechnet für C₂₃H₁₉N₃O₂H⁺ [M+H]⁺: 370.1550, gefunden: 370.1559

4 LITERATUR

1. Who. "Annex Table 2: Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2002", *The world health report - changing history*, Retrieved 7/5/2012. 2004; Available from: http://www.who.int/whr/2004/annex/topic/en/annex_2_en.pdf.
2. Globocan. (IARC), *Section of Cancer Information*. 2008 7/5/2012 7/5/2012]; Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>.
3. Who, *Global Health Observatory Data Repository, Mortality, Cancer, deaths per 100,000*, 2008.
4. Chabner B. A. und Roberts T. G., *Chemotherapy and the war on cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(1): p. 65-72.
5. Abraham D. J., *Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery*. 6th Edition. Vol. 5: Chemotherapeutic Agents. 2003: Wiley Interscience. 2-72, 124-136 und 1141-1162.
6. Löffler G., Petrides P. E., und Heinrich P. C., *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage, 2007: Springer Verlag. 220-227 und 1141-1162.
7. Maton A., Hopkins J. J., Lahart S., Quon W. D., Wright M., und Jill D., *Cells: Building Blocks of Life*. New Jersey: Prentice Hall. pp. 70–41997.
8. Cooper G. M., *The Cell, A Molecular Approach*. 2. Auflage, 2000.
9. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., und Walter P., *Molecular Biology of the Cell*. 5th Edition, 2007: Garland Science.
10. Aubert G. und Lansdorp P. M., *Telomeres and Aging*. Physiological Reviews, 2008. **88**(2): p. 557-579.
11. Aktories K., Förstermann U., Hofmann F. B., und Starke K., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 10. Auflage, 2009: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. S. 930-984.
12. Papac R. J., *Origins of cancer therapy*. Yale J Biol Med., 2001. **74**(6): p. 391-398.
13. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., und Schäfer-Korting M., *Mutschler Arzneimittelwirkungen* 2001: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. S. 873-884, 893-895 und 897-899.
14. Shaffer R. und Traktman P., *Vaccinia virus encapsidates a novel topoisomerase with the properties of a eucaryotic type I enzyme*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(19): p. 9309-9315.
15. Zunino F., Dallavalle S., Laccabuea D., Beretta G., Merlini L., und Pratesi G., *Current status and perspectives in the development of camptothecins*. Curr Pharm Des., 2002. **8**(27): p. 2505-2520.
16. Verma R. P. und Hansch C., *Camptothecins: A SAR/QSAR Study*. Chemical Reviews, 2008. **109**(1): p. 213-235.
17. Luzzati V., Masson F., und Lerman L. S., *Interaction of DNA and proflavine: A small-angle X-ray scattering study*. Journal of Molecular Biology, 1961. **3**(5): p. 634-639.
18. Moore M. H., Hunter W. N., D'estaintot B. L., und Kennard O., *DNA-drug interactions: The crystal structure of d(CGATCG) complexed with daunomycin*. Journal of Molecular Biology, 1989. **206**(4): p. 693-705.
19. Bolognese A., Correale G., Manfra M., Lavecchia A., Mazzoni O., Novellino E., Colla P. L., Sanna G., und Loddo R., *Antitumor Agents. 3. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Pyridoisoquinolindione and Dihydrothienoquinolindione Derivatives with Potent Cytotoxic Activity*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(4): p. 849-858.
20. Canals A., Purciolas M., Aymami J., und Coll M., *The anticancer agent ellipticine unwinds DNA by intercalative binding in an orientation parallel to base pairs*. Acta Crystallographica Section D, 2005. **61**(7): p. 1009-1012.

4 LITERATUR

21. Quigley G. J., Wang A. H., Ughetto G., Marel G. V. D., Boom J. H. V., und Rich A., *Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: daunomycin plus d(CpGpTpApCpG)*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1980. **77**(12): p. 7204-7208.
22. Foye W. O., *Cancer Chemotherapeutic Agents* 1995, American Chemical Society.
23. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., und Gianni L., *Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity*. Pharmacological Reviews, 2004. **56**(2): p. 185-229.
24. Goodwin S., Smith A. F., und Horning E. C., *Alkaloids of Ochrosia elliptica Labill.* 1. Journal of the American Chemical Society, 1959. **81**(8): p. 1903-1908.
25. Schmutz J. und Hunziker F., Pharm. Acta Helv., 1958. **33**: p. 341-347.
26. Woodward R. B., Iacobucci G. A., und Hochstein F. A., *The Synthesis of Ellipticine*. J. Am. Chem. Soc., 1959. **81**: p. 4434-4435.
27. Ketcha D. M. und Gribble G. W., *A convenient synthesis of 3-acylindoles via Friedel Crafts acylation of 1-(phenylsulfonyl)indole. A new route to pyridocarbazole-5,11-quinones and ellipticine*. The Journal of Organic Chemistry, 1985. **50**(26): p. 5451-5457.
28. Differding E. und Ghosez L., *Intramolecular diels-alder cycloadditions of vinylketenimines. A convergent route to carbazoles and pyridocarbazole alkaloids*. Tetrahedron Letters, 1985. **26**(13): p. 1647-1650.
29. May C. und Moody C. J., *A new precursor to 3,4-didehydropyridine, and its use in the synthesis of the antitumour alkaloid ellipticine*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1988(2): p. 247-250.
30. Zee S. H. und Su H. P., *A Convenient Method for the Preparation of Ellipticine*. J. Chin. Chem. Soc., 1987. **34**(2): p. 135-139.
31. Acton E. M., Risbood V. L., Shoemaker P. H., Vistica D. T., und Boyd M. R., *Anticancer specificity of some ellipticinium salts against human brain tumors in vitro*. J. Med. Chem., 1994. **37**: p. 2185-2189.
32. Pindur U., Haber M., und Sattler K., *Antitumor active drugs as intercalators of deoxyribonucleic acid: Molecular models of intercalation complexes*. Journal of Chemical Education, 1993. **70**(4): p. 263.
33. Froelich-Ammon S. J., Patchan M. W., Osheroff N., und Thompson R. B., *Topoisomerase II Binds to Ellipticine in the Absence or Presence of DNA*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(25): p. 14998-15004.
34. Ross W. E., Glaubiger D. L., und Kohn K. W., *Protein-associated DNA breaks in cells treated with adriamycin or ellipticine*. Biochimica et Biophysica Acta, 1978. **519**(1): p. 23-30.
35. Zwelling L. A., Michaels S., Kerrigan D., Pommier Y., und Kohn K. W., *Protein-associated deoxyribonucleic acid strand breaks produced in mouse leukemia L1210 cells by ellipticine and 2-methyl-9-hydroxyellipticinium*. Biochemical Pharmacology, 1982. **31**(20): p. 3261-3267.
36. Kuo P.-L., Hsu Y.-L., Chang C.-H., und Lin C.-C., *The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells*. Cancer Letters, 2005. **223**(2): p. 293-301.
37. Bernadou J., Meunier G., Paoletti C., und Meunier B., *o-Quinone formation in the biochemical oxidation of the antitumor drug N2-methyl-9-hydroxyellipticinium acetate*. Journal of Medicinal Chemistry, 1983. **26**(4): p. 574-579.
38. Auclair C., Dugue B., Meunier B., und Paoletti C., *Peroxidase-catalyzed covalent binding of the antitumor drug N2-methyl-9-hydroxyellipticinium to DNA in vitro*. Biochemistry, 1986. **25**(6): p. 1240-1245.
39. Hägg M., Berndtsson M., Mandic A., Zhou R., Shoshan M. C., und Linder S., *Induction of endoplasmic reticulum stress by ellipticine plant alkaloids*. Molecular Cancer Therapeutics, 2004. **3**(4): p. 489-497.
40. Fossé P., René B., Charra M., Paoletti C., und Saucier J. M., *Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by ellipticine derivatives: structure-activity relationship*. Molecular Pharmacology, 1992. **42**(4): p. 590-595.

4 LITERATUR

41. Paoletti C., Pecq J. B. L., Dat-Xuong N., Juret P., Garnier H., Amiel J. L., und Rouesse J., *Antitumor activity, pharmacology, and toxicity of ellipticines, ellipticinium, and 9-hydroxy derivatives: preliminary clinical trials of 2-methyl-9-hydroxy ellipticinium (NSC 264-137)*. Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer, 1980. **74**: p. 107-123.
42. Lesca P., Lecoite P., Paoletti C., und Mansuy D., *The hydroxylation of the antitumor agent, ellipticine, by liver microsomes from differently pretreated rats*. Biochemical Pharmacology, 1977. **26**(22): p. 2169-2173.
43. Meunier G. und Meunier B., *Peroxidase-catalyzed O-demethylation reactions. Quinone-imine formation from 9-methoxyellipticine derivatives*. Journal of Biological Chemistry, 1985. **260**(19): p. 10576-10582.
44. Brana M. F., Cacho M., Gradillas A., Pascual-Teresa B., und Ramos A., *Intercalators as Anticancer Drugs*. Current Pharmaceutical Design, 2001. **7**(17): p. 1745-1780.
45. Gribble G. W., *Chapter 7 Synthesis and Antitumor Activity of Ellipticine Alkaloids and Related Compounds*, in *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, B. Arnold, Editor 1991, Academic Press. p. 239-352.
46. Rickards R. W., Rothschild J. M., Willis A. C., Chazal N. M. D., Kirk J., Kirk K., Saliba K. J., und Smith G. D., *Calothrixins A and B, novel pentacyclic metabolites from Calothrix cyanobacteria with potent activity against malaria parasites and human cancer cells*. Tetrahedron, 1999. **55**(47): p. 13513-13520.
47. Kelly T. R., Zhao Y., Cavero M., und Torneiro M., *Synthesis of the Potent Antimalarials Calothrixin A and B*. Organic Letters, 2000. **2**(23): p. 3735-3737.
48. Bernardo P. H., Chai C. L. L., und Elix J. A., *A simple and concise route to calothrixin B*. Tetrahedron Letters, 2002. **43**(16): p. 2939-2940.
49. Tohyama S., Choshi T., Matsumoto K., Yamabuki A., Ikegata K., Nobuhiro J., und Hibino S., *A new total synthesis of an indolo[3,2-j]phenanthridine alkaloid calothrixin B*. Tetrahedron Letters, 2005. **46**(32): p. 5263-5264.
50. Bannasar M. L., Roca T., und Ferrando F., *A New Radical-Based Route to Calothrixin B*. Organic Letters, 2006. **8**(4): p. 561-564.
51. Sissouma D., Maingot L., Collet S., und Guingant A., *Concise and Efficient Synthesis of Calothrixin B*. The Journal of Organic Chemistry, 2006. **71**(22): p. 8384-8389.
52. Chen X., Smith G. D., und Waring P., *Human cancer cell (Jurkat) killing by the cyanobacterial metabolite calothrixin A*. Journal of Applied Phycology, 2003. **15**(4): p. 269-277.
53. Bolton J. L., Trush M. A., Penning T. M., Dryhurst G., und Monks T. J., *Role of Quinones in Toxicology†*. Chemical Research in Toxicology, 2000. **13**(3): p. 135-160.
54. Khan Q. A., Lu J., und Hecht S. M., *Calothrixins, a New Class of Human DNA Topoisomerase I Poisons*. Journal of Natural Products, 2009. **72**(3): p. 438-442.
55. Doan N. T., Rickards R. W., Rothschild J. M., und Smith G. D., *Allelopathic actions of the alkaloid 12-epi-hapalindole E isonitrile and calothrixin A from cyanobacteria of the genera Fischerella and Calothrix*. Journal of Applied Phycology, 2000. **12**(3): p. 409-416.
56. Doan N. T., Stewart P. R., und D. Smith G., *Inhibition of bacterial RNA polymerase by the cyanobacterial metabolites 12-epi-hapalindole E isonitrile and calothrixin A*. FEMS Microbiology Letters, 2001. **196**(2): p. 135-139.
57. Eddy J. und Maizels N., *Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome*. Nucleic Acids Research, 2006. **34**(14): p. 3887-3896.
58. Huppert J. L. und Balasubramanian S., *G-quadruplexes in promoters throughout the human genome*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**(6): p. 2105.
59. Owen E. A. und Keniry M. A., *Exploring the Binding of Calothrixin A to the G-Quadruplex from the c-myc Oncogene Promotor**. Australian Journal of Chemistry, 2009. **62**(11): p. 1544-1549.
60. Leber S., *Synthese neuer Azanaphthochinon-anellierter Pyrrole und Indole als Zytostatika*, in *Department of Drug and Natural Product Synthesis* 2007, University of Vienna p. S. 57-58.

4 LITERATUR

61. Maingot L., Thuaud F., Sissouma D., Collet S., Guingant A., und Evain M., *Synthesis of a Calothrixin B Isomer with a Novel 7H-Indolo[2,3-j]phenanthridine-7,13(8H)-dione Structure*. Synlett, 2008. **2008**(EFirst): p. 263,267.
62. Collet S. C., Rémi J.-F., Cariou C., Laiß S., Guingant A. Y., Quang Vu N., und Dujardin G., *A hetero Diels–Alder approach to the synthesis of the first angucyclinone and angucycline 5-aza-analogues*. Tetrahedron Letters, 2004. **45**(25): p. 4911-4915.
63. Huang Y. und Hartmann R. W., *The Improved Preparation of 7,8-Dihydro-Quinoline-5(6H)-One and 6,7-Dihydro-5H-1-Pyridin-5-one*. Synthetic Communications, 1998. **28**(7): p. 1197-1200.
64. Maertens F., Bogaert A. V. D., Compennolle F., und Hoornaert G. J., *Intramolecular Ritter reactions of 2-(2-cyanoethyl)tetrahydrocyclopenta[b]indole and -carbazole derivatives*. European Journal of Organic Chemistry, 2004. **2004**(22): p. 4648-4656.
65. Comins D. L. und Killpack M. O., *Lithiation of heterocycles directed by .alpha.-amino alkoxides*. The Journal of Organic Chemistry, 1987. **52**(1): p. 104-109.
66. Gilman H. und Spatz S. M., *Organometallic Derivatives of Carbazole and Quinoline. Amides of 3-Quinoline-carboxylic Acid*. Journal of the American Chemical Society, 1941. **63**(6): p. 1553-1557.
67. Snieckus V., *Directed ortho metalation. Tertiary amide and O-carbamate directors in synthetic strategies for polysubstituted aromatics*. Chemical Reviews, 1990. **90**(6): p. 879-933.
68. Miah M. a. J. und Snieckus V., *Directed ortho metalation of O-pyridyl carbamates. Regiospecific entries into polysubstituted pyridines*. The Journal of Organic Chemistry, 1985. **50**(25): p. 5436-5438.
69. Ashcroft W. R., Dalton L., Beal M. G., Humphrey G. L., und Joule J. A., *Indole β -nucleophilic substitution. Part 5. Synthesis of the four isomeric 5H-pyrido[x,y-b]carbazole-5,11-diones and benzo analogs*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1983(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 2409-2412.
70. Bernardo P. H. und Chai C. L. L., *Friedel–Crafts Acylation and Metalation Strategies in the Synthesis of Calothrixins A and B*. The Journal of Organic Chemistry, 2003. **68**(23): p. 8906-8909.

5 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: http://www.biologycorner.com/resources/cell_cycle.jpg

Abb. 2: Literaturstelle ^[6]

Abb. 3: Literaturstelle ^[20]

Abb. 4: Zuordnung der ¹H und ¹³C-Signale (in ppm) für **32**

Abb. 5: Zuordnung der ¹H und ¹³C-Signale (in ppm) für **26**

Abb. 6: NOESY-Spektrum von **26**

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

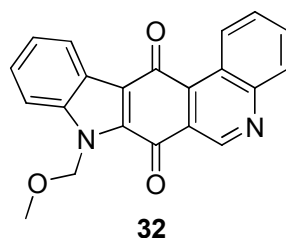
6 ANHANG

Spektren

AK018/ CDC13 / 1H

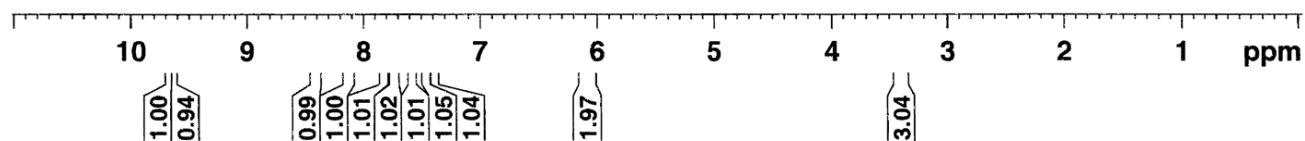


8.114
8.112
7.840
7.837
7.827
7.824
7.821
7.810
7.807
7.751
7.748
7.737
7.734
7.731
7.720
7.717
7.580
7.563
7.470
7.467
7.456
7.453
7.451
7.439
7.436
7.411
7.409
7.395
7.381
7.379
7.260
6.079
3.401

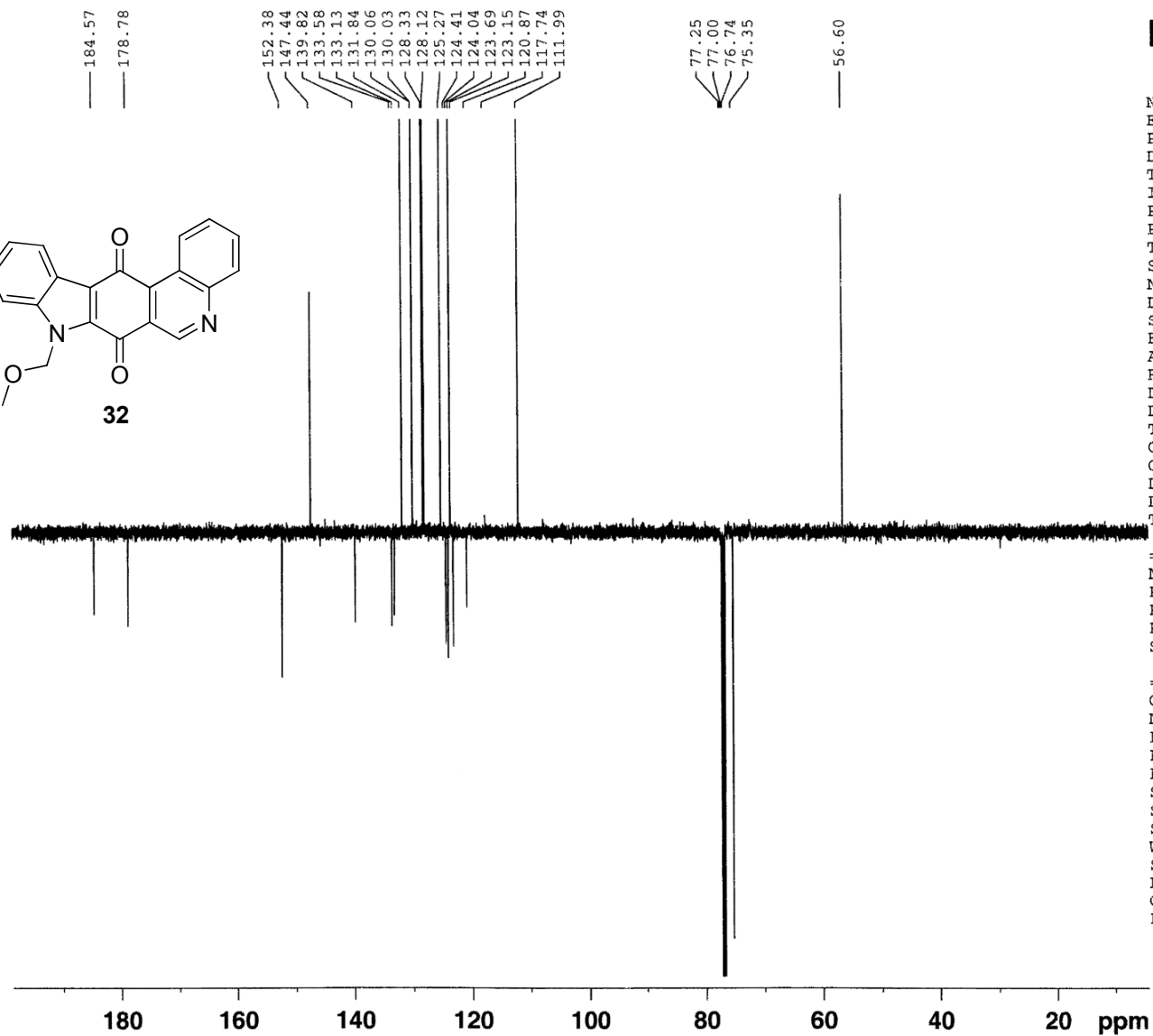
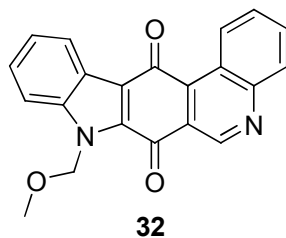


NAME AK018
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20110412
Time 18.27
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg30
TD 89926
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 8992.806 Hz
FIDRES 0.100002 Hz
AQ 4.9999914 sec
RG 181
DW 55.600 usec
DE 6.00 usec
TE 293.4 K
D1 4.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 13.50 usec
PL1 0.30 dB
SFO1 500.1337510 MHz
SI 65536
SF 500.1300133 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00



AK018/ CDC13 / APT

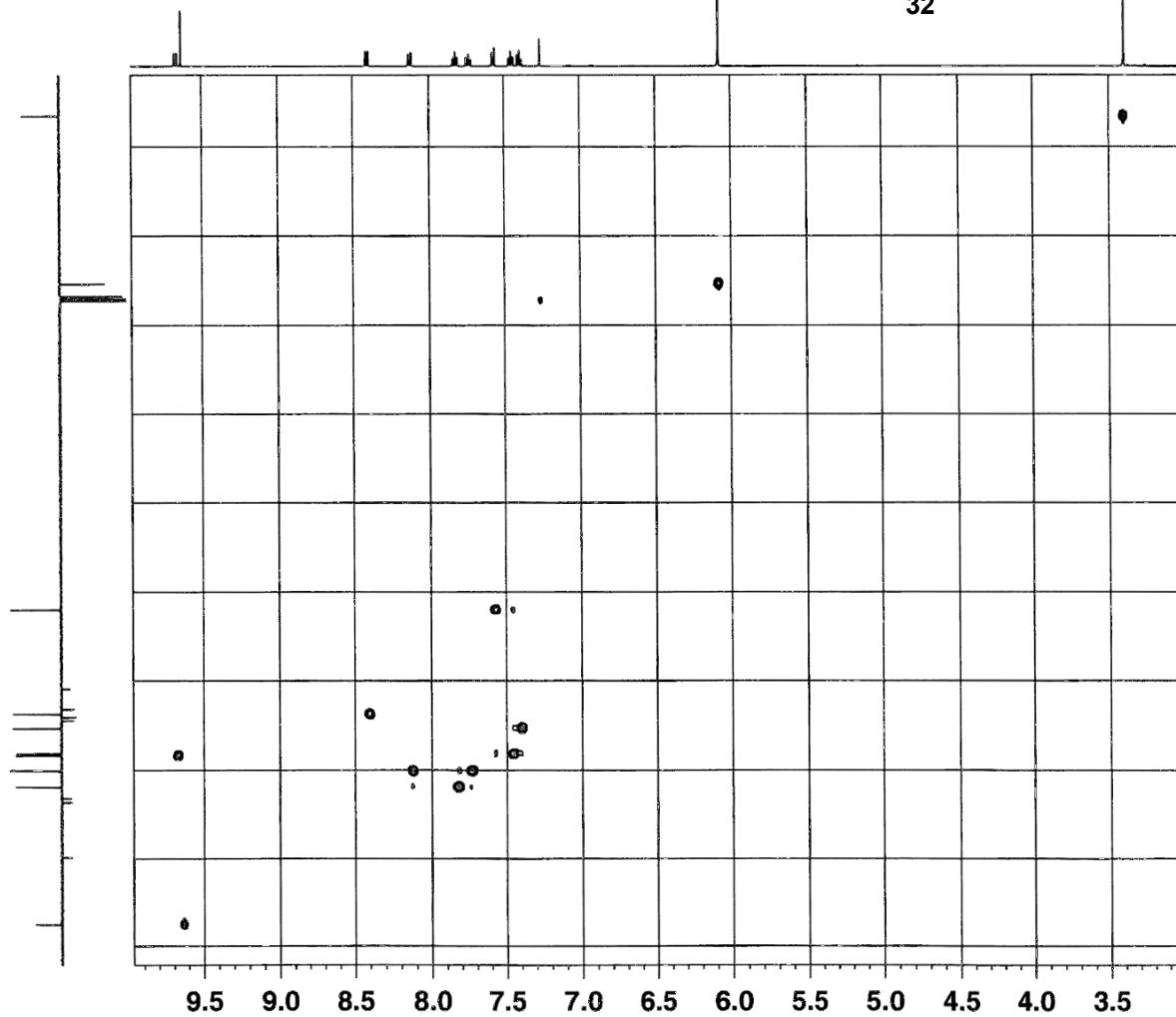
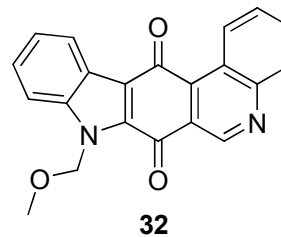


NAME AK018
 EXPNO 2
 PROCNO 1
 Date_ 20110412
 Time 18.32
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB-
 PULPROG jmod
 TD 111106
 SOLVENT CDC13
 NS 1024
 DS 4
 SWH 25062.656 Hz
 FIDRES 0.225574 Hz
 AQ 2.2166348 sec
 RG 14596.5
 DW 19.950 usec
 DE 12.00 usec
 TE 294.2 K
 CNST2 145.0000000
 CNST11 1.0000000
 D1 2.00000000 sec
 D20 0.00689655 sec
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 9.50 usec
 P2 19.00 usec
 PL1 3.80 dB
 SFO1 125.7702390 MHz

===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 90.00 usec
 PL2 0.30 dB
 PL12 16.78 dB
 SFO2 500.1335009 MHz
 SI 32768
 SF 125.7577942 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

AK018/ CDCl3 / HSQC



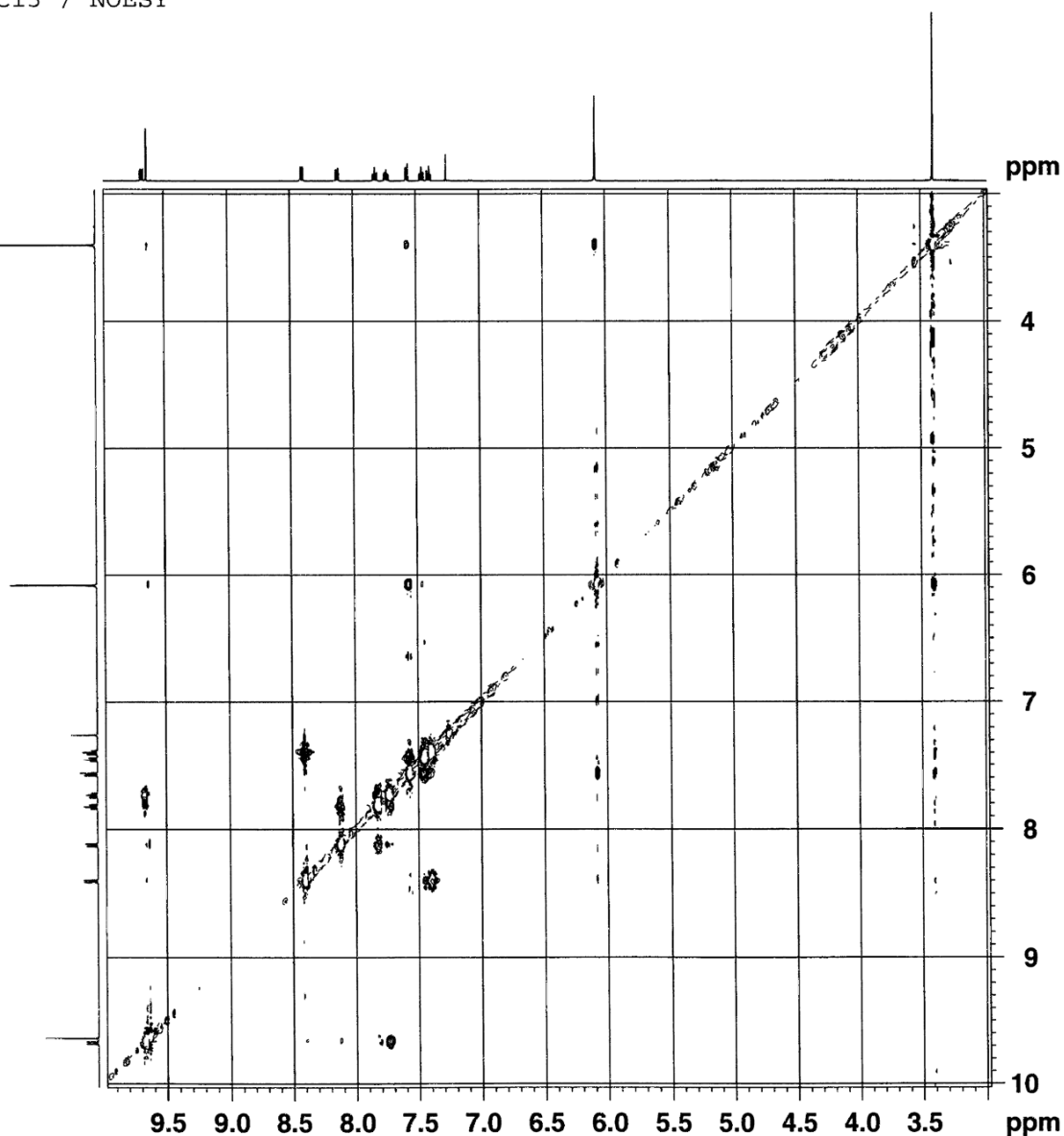
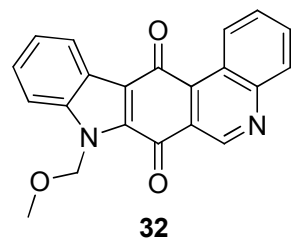
NAME AK018
 EXPNO 3
 PROCNO 1
 Date_ 20110412
 Time 19.46
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB-
 FULPROG hsqcetgpsi2
 TD 1024
 SOLVENT CDCl3
 NS 2
 DS 16
 SWH 5000.000 Hz
 FIDRES 4.882812 Hz
 AQ 0.1025500 sec
 RG 26008
 DW 100.000 usec
 DE 6.00 usec
 TE 294.0 K
 CNST2 145.0000000
 D0 0.00000300 sec
 D1 1.50000000 sec
 D4 0.00172414 sec
 D11 0.03000000 sec
 D13 0.00000400 sec
 D16 0.00002000 sec
 D24 0.00086000 sec
 INO 0.00002480 sec
 ZGPTNS

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 13.50 usec
 P2 27.00 usec
 P28 1000.00 usec
 PL1 0.30 dB
 SFO1 500.1325006 MHz

===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 garp
 NUC2 13C
 P3 9.50 usec
 P4 19.00 usec
 PCPD2 70.00 usec
 PL2 3.00 dB
 PL12 20.35 dB
 SFO2 125.7678496 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
 GPNAM1 SINE.100
 GPNAM2 SINE.100
 GPNAM3 SINE.100
 GPNAM4 SINE.100
 GP21 80.00 %
 GP22 20.10 %
 GP23 11.00 %
 GP24 -5.00 %
 PL6 1000.00 usec
 PL9 600.00 usec
 ND0 2
 TD 256
 SFO1 125.7678 MHz
 FIDRES 78.755043 Hz
 SW 160.306 ppm
 FMODE Echo-Antiecho
 SI 1024
 SF 500.1300133 MHz
 WDW QSINE
 SSB 2
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00
 SI 1024
 MC2 echo-antiecho
 SF 125.7577942 MHz
 WDW QSINE
 SSB 2
 LB 0.00 Hz
 GB 0

AK018/ CDC13 / NOESY

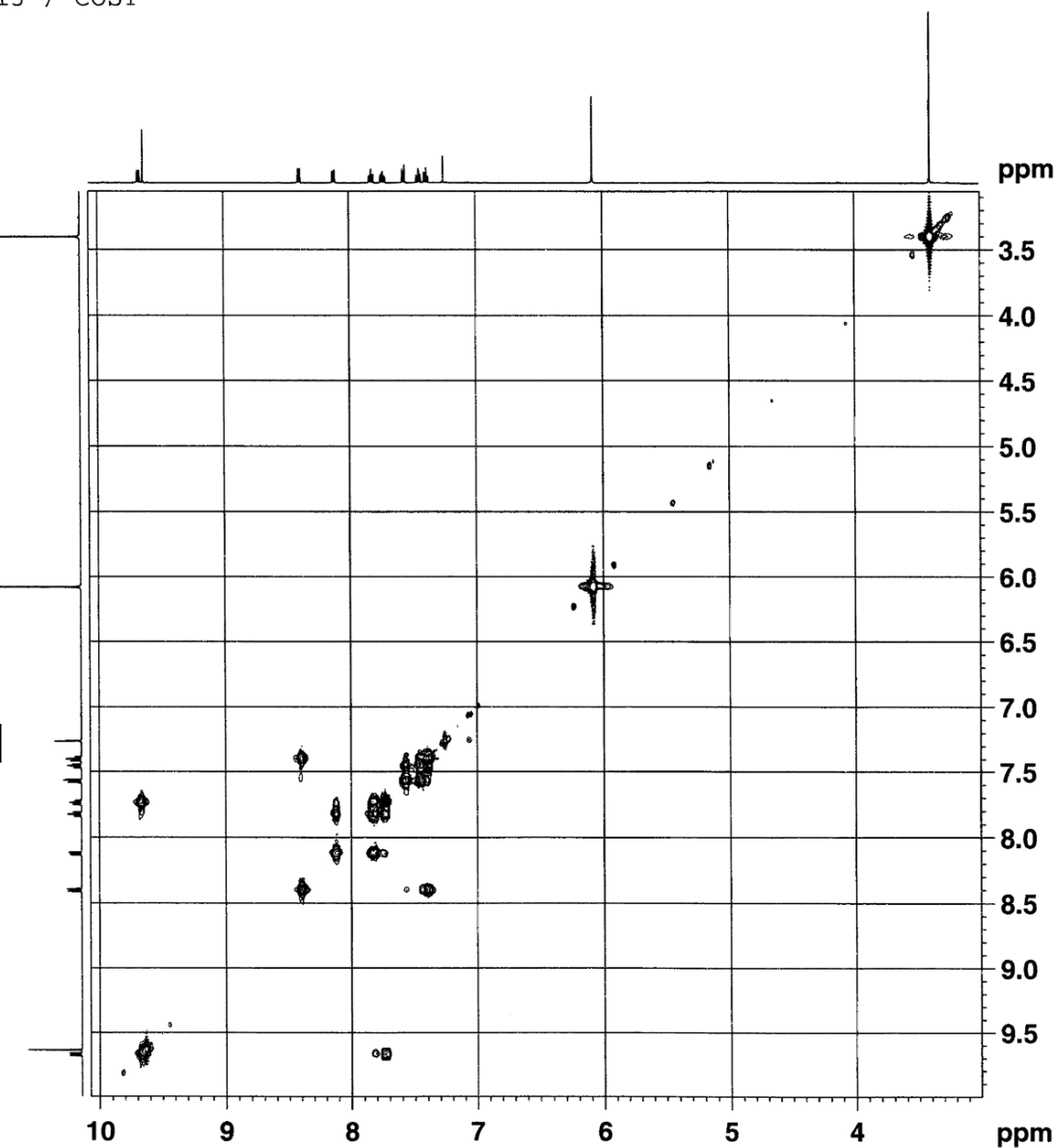
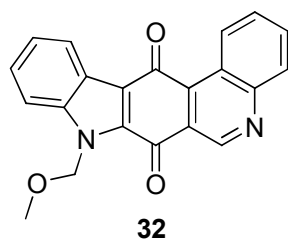


NAME AK018
 EXPNO 6
 PROCNO 1
 Date_ 20110413
 Time 0.15
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB-
 PULPROG noesygpph
 TD 2048
 SOLVENT CDCl3
 NS 8
 DS 8
 SWH 6127.451 Hz
 FIDRES 2.991920 Hz
 AQ 0.1672484 sec
 RG 181
 DW 81.600 usec
 DE 6.00 usec
 TE 293.6 K
 D0 0.00006441 sec
 D1 3.00000000 sec
 D8 1.00000000 sec
 D16 0.00002000 sec
 IN0 0.00016320 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 13.50 usec
 P2 27.00 usec
 PL1 0.30 dB
 SFO1 500.1327797 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
 GPNAM1 SINE.100
 GPNAM2 SINE.100
 GPZ1 40.00 %
 GPZ2 -40.00 %
 P16 1000.00 usec
 ND0 1
 TD 256
 SFO1 500.1328 MHz
 FIDRES 23.935356 Hz
 SW 12.252 ppm
 FhMODE States-TPPI
 SI 1024
 SF 500.1300133 MHz
 WDW QSINE
 SSB 2
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00
 SI 1024
 MC2 States-TPPI
 SF 500.1300133 MHz
 WDW QSINE
 SSB 2
 LB 0.00 Hz
 GB 0

AK018/ CDCl3 / COSY

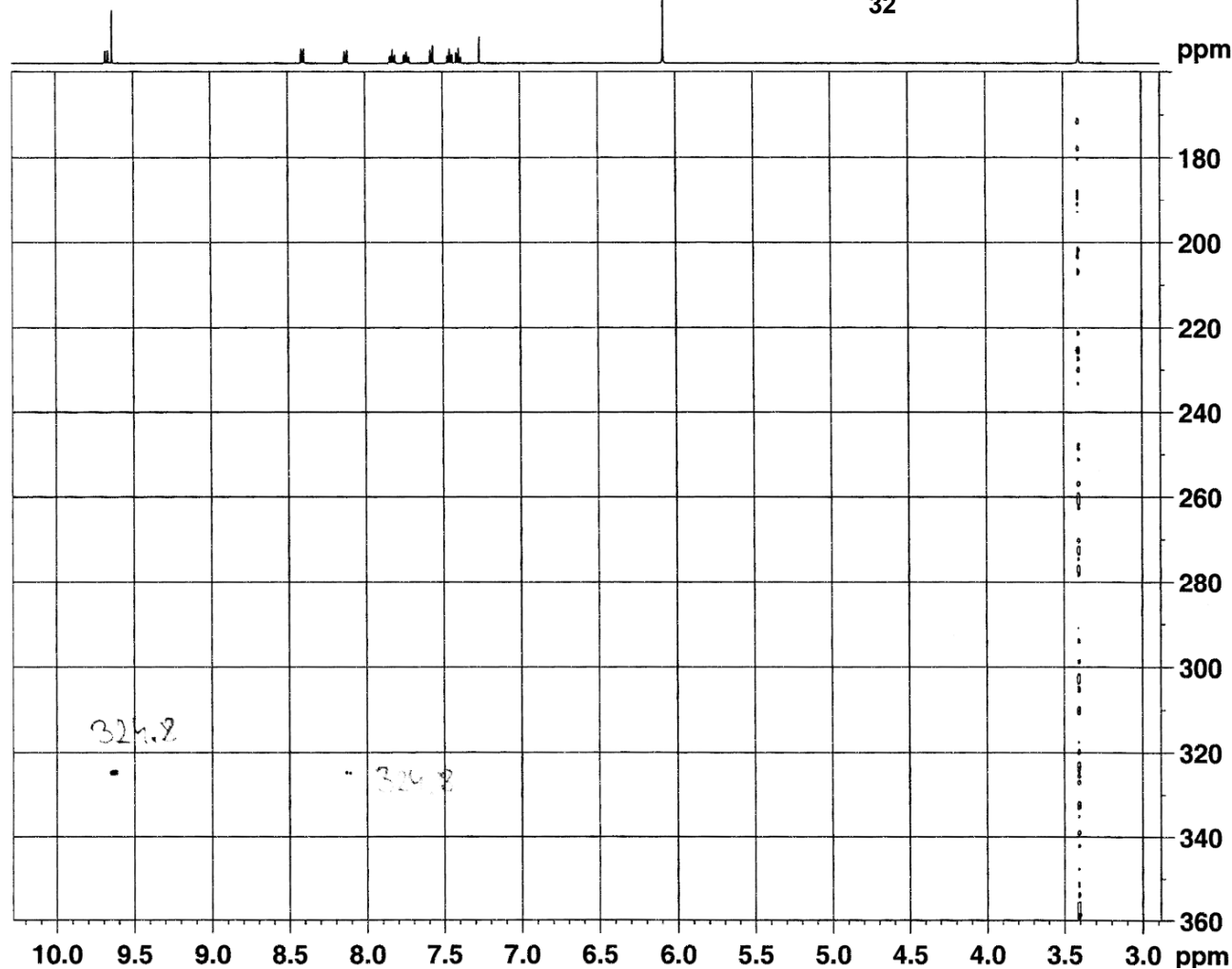
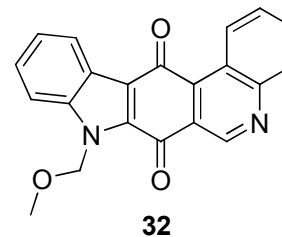


NAME AK018
EXPNO 7
PROCNO 1
Date_ 20110413
Time 2.39
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG cosygpgf
TD 2048
SOLVENT CDCl3
NS 4
DS 4
SWH 6127.451 Hz
FIDRES 2.991920 Hz
AQ 0.1672484 sec
RG 456.1
DW 81.600 usec
DE 6.00 usec
TE 293.3 K
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00002000 sec
IN0 0.00016320 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P0 13.50 usec
P1 13.50 usec
PL1 0.30 dB
SFO1 500.1327797 MHz

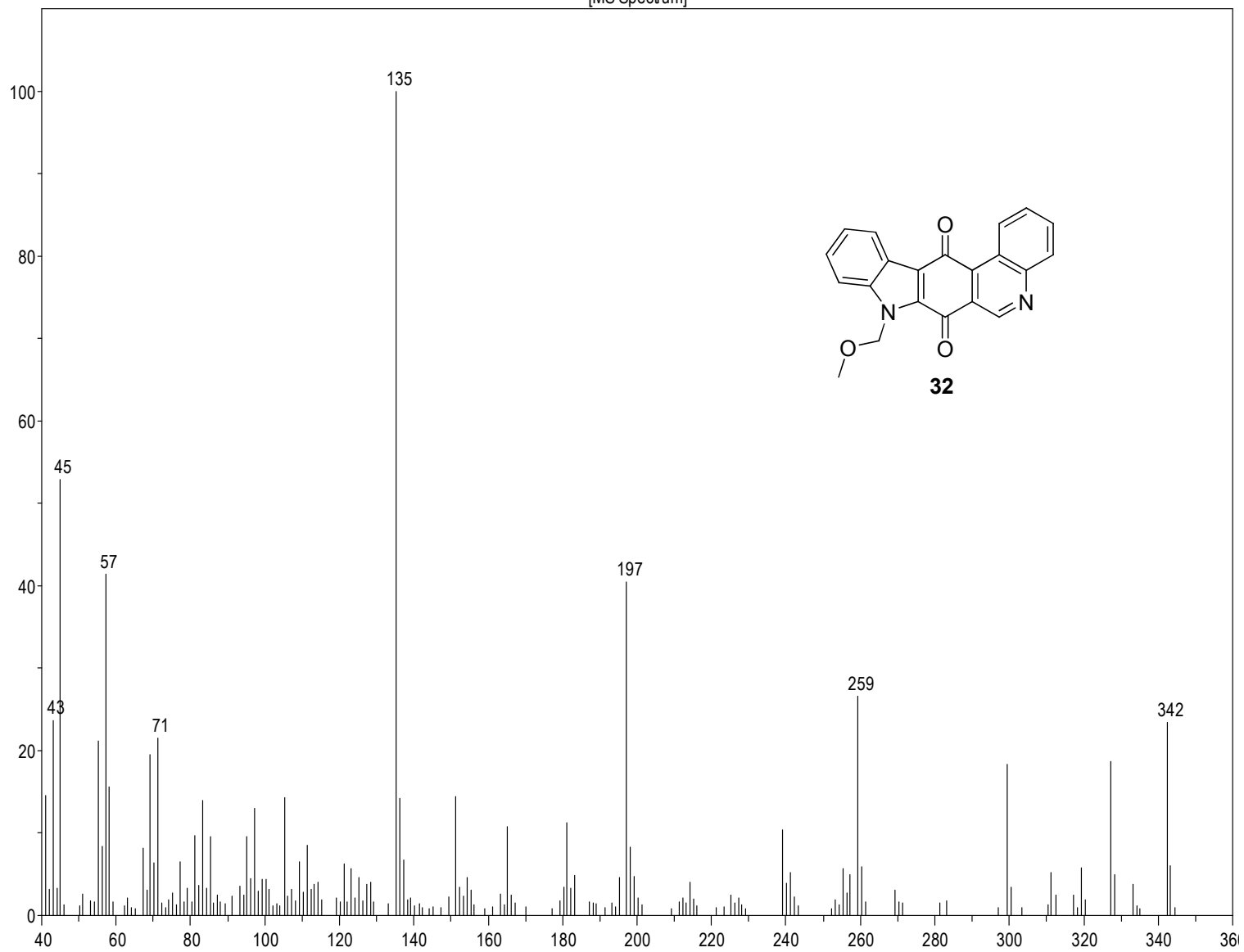
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1 SINE.100
GPZ1 20.00 %
P16 1000.00 usec
ND0 1
TD 256
SFO1 500.1328 MHz
FIDRES 23.935356 Hz
SW 12.252 ppm
FnMODE QF
SI 1024
SF 500.1300133 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00
SI 1024
MC2 QF
SF 500.1300133 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0

AK018/ CDC13 / 15N HMBC

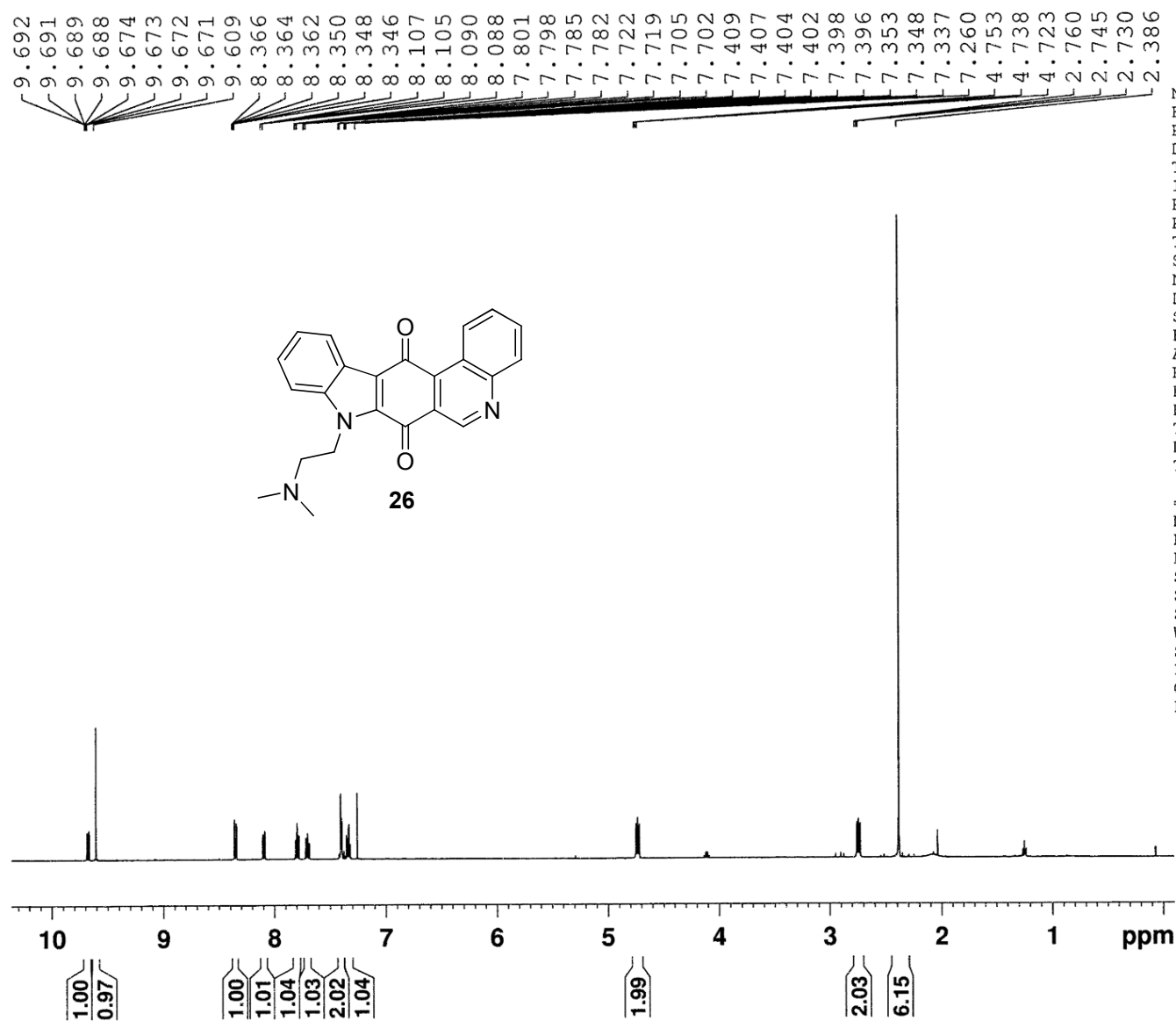


NAME AK018
EXPNO 8
PROCNO 1
Date_ 20110413
Time 3.20
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG hmbcgp1pndqf
TD 2048
SOLVENT CDC13
NS 40
DS 16
SWH 5482.456 Hz
FIDRES 2.676980 Hz
AQ 0.1869188 sec
RG 26008
DW 91.200 usec
DE 6.00 usec
TE 293.3 K
200 CNST2 90.0000000
CNST13 8.0000000
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D2 0.00555556 sec
D6 0.06250000 sec
D16 0.00002000 sec
IN0 0.00004930 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 13.50 usec
P2 27.00 usec
PL1 0.30 dB
SFO1 500.1325006 MHz
===== CHANNEL f2 =====
NUC2 15N
P3 15.00 usec
PL2 1.50 dB
SFO2 50.6909092 MHz
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1 SINE.100
GPNAM2 SINE.100
GPNAM3 SINE.100
GPZ1 70.00 %
GPZ2 30.00 %
GPZ3 50.10 %
P16 1000.00 usec
ND0 2
TD 256
SFO1 50.69091 MHz
FIDRES 39.602272 Hz
SW 200.000 ppm
320 FMODE QF
SI 2048
SF 500.1300133 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
FC 1.00
SI 1024
MC2 QF
SF 50.6777330 MHz
360 WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0

[MS Spectrum]



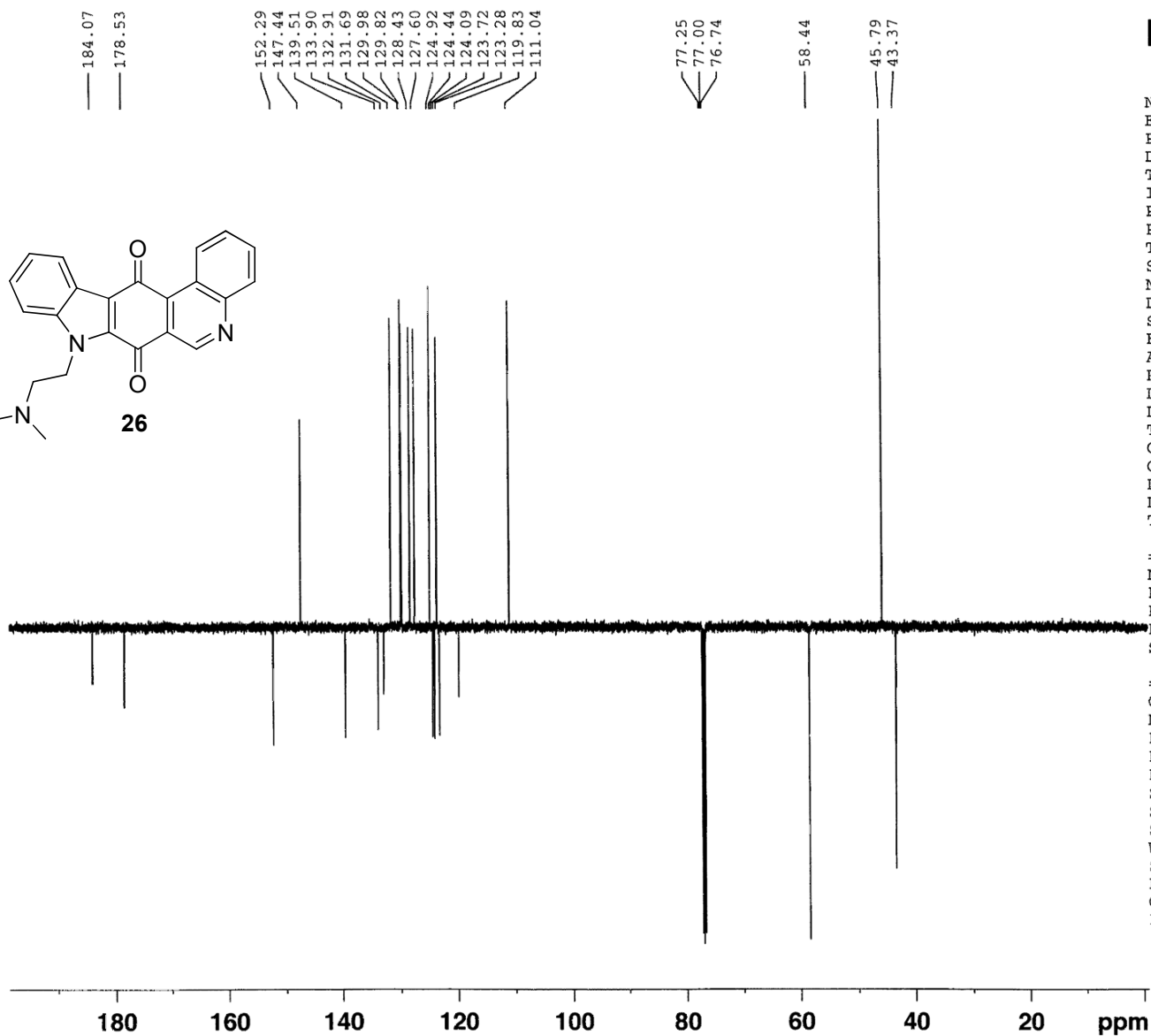
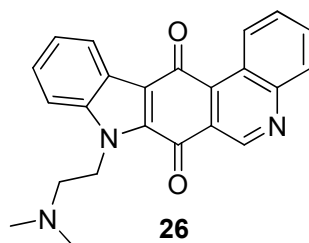
AK024/ CDC13 / 1H



NAME AK024
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20110607
Time 14.34
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zg30
TD 89926
SOLVENT CDC13
NS 16
DS 2
SWH 8992.806 Hz
FIDRES 0.100002 Hz
AQ 4.9999914 sec
RG 181
DW 55.600 usec
DE 6.00 usec
TE 292.9 K
D1 4.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 13.50 usec
PL1 0.30 dB
SFO1 500.1337510 MHz
SI 65536
SF 500.1300133 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

AK024/ CDC13 / APT

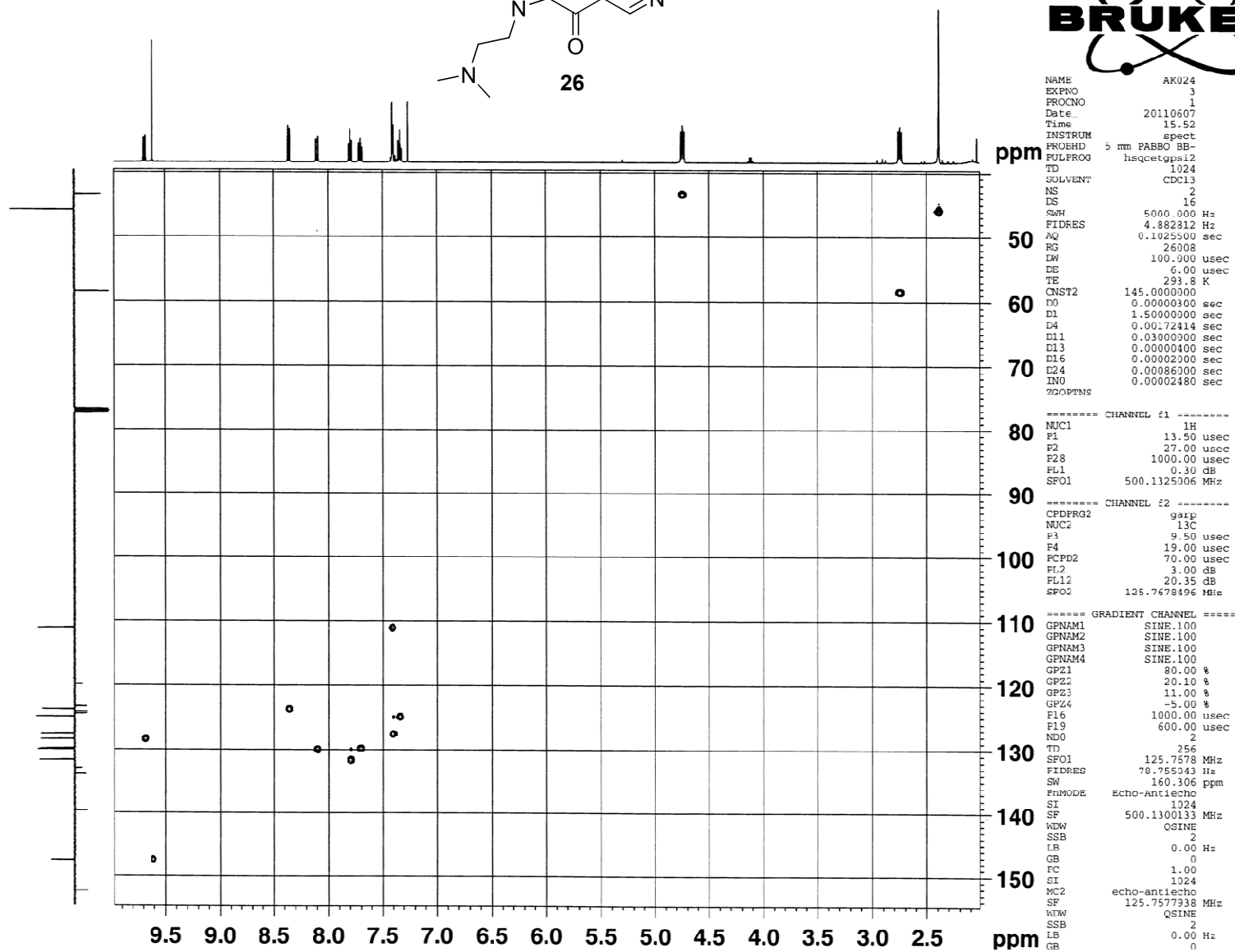
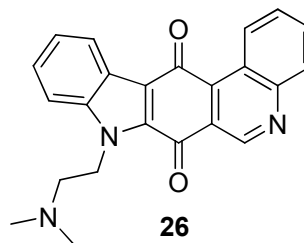


NAME AK024
 EXPNO 2
 PROCNO 1
 Date_ 20110607
 Time 14.42
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB-
 PULPROG jmod
 TD 111106
 SOLVENT CDC13
 NS 1024
 DS 4
 SWH 25062.656 Hz
 FIDRES 0.225574 Hz
 AQ 2.2166348 sec
 RG 14596.5
 DW 19.950 usec
 DE 12.00 usec
 TE 294.3 K
 CNST2 145.0000000
 CNST11 1.0000000
 D1 2.00000000 sec
 D20 0.00689655 sec
 TD0 1

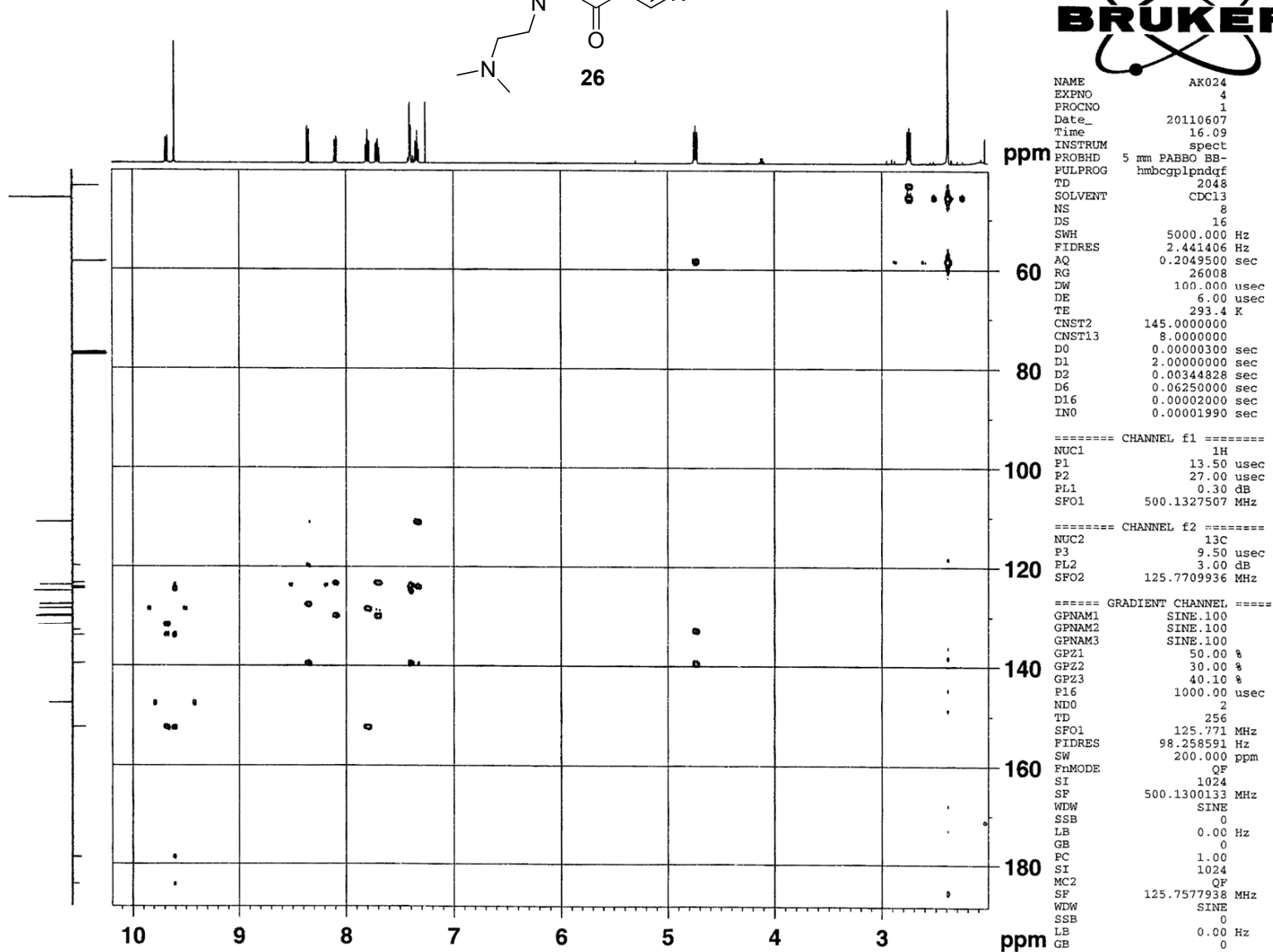
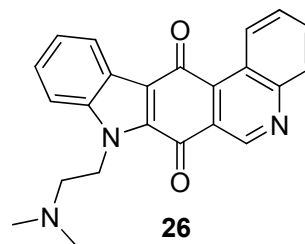
===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 9.50 usec
 P2 19.00 usec
 PL1 3.80 dB
 SFO1 125.7702390 MHz

===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 90.00 usec
 PL2 0.30 dB
 PL12 16.78 dB
 SFO2 500.1335009 MHz
 SI 32768
 SF 125.7577938 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

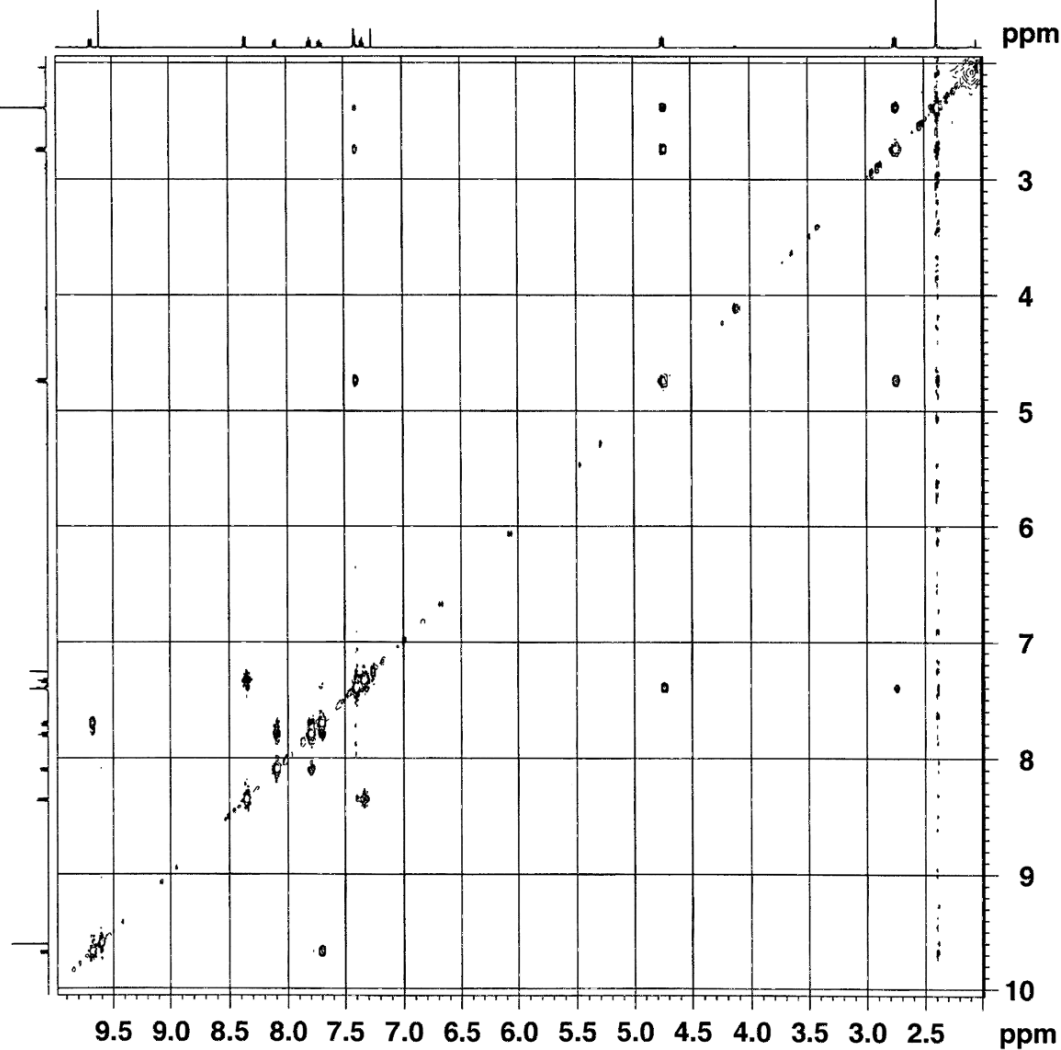
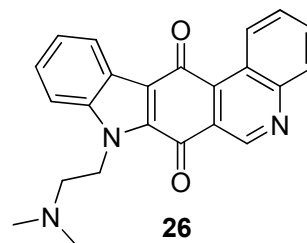
AK024/ CDC13 / HSQC



AK024/ CDC13 / HMBC



AK024/ CDC13 / NOESY

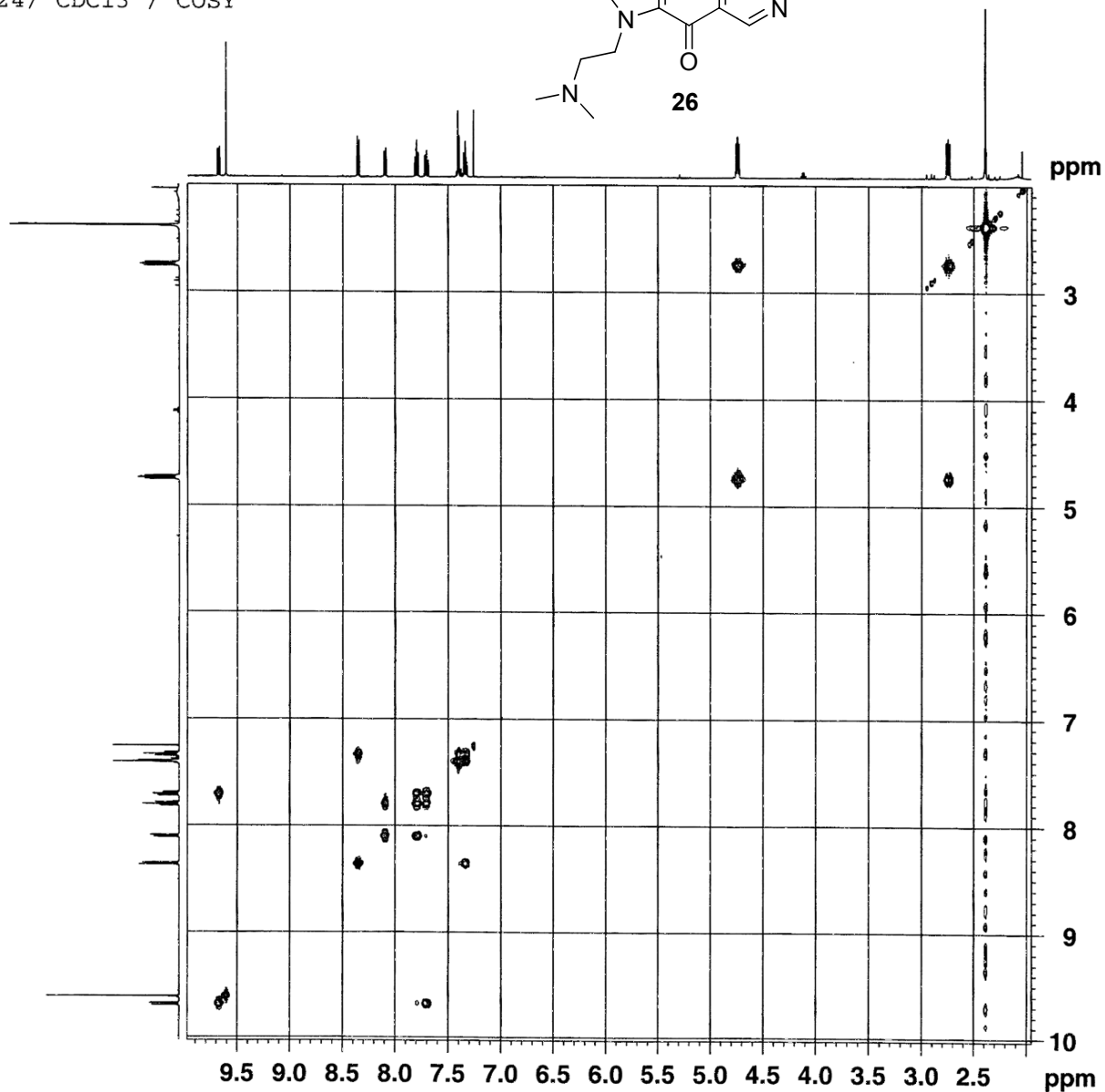
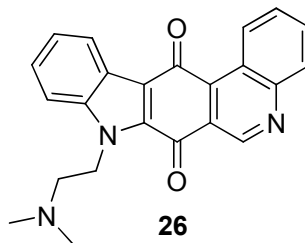


NAME AK024
 EXPNO 5
 PROCNO 1
 Date_ 20110607
 Time 17.29
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB-
 PULPROG noesygpph
 TD 2048
 SOLVENT CDC13
 NS 8
 DS 8
 SWH 6127.451 Hz
 FIDRES 2.991920 Hz
 AQ 0.1672484 sec
 RG 362
 DW 81.600 usec
 DE 6.00 usec
 TE 293.0 K
 D0 0.00006441 sec
 D1 3.00000000 sec
 D8 1.00000000 sec
 D16 0.00002000 sec
 IN0 0.00016320 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 13.50 usec
 P2 27.00 usec
 PL1 0.30 dB
 SFO1 500.1327797 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
 GPNAM1 SINE.100
 GPNAM2 SINE.100
 GPZ1 40.00 %
 GPZ2 -40.00 %
 P16 1000.00 usec
 ND0 1
 TD 256
 SFO1 500.1328 MHz
 FIDRES 23.935356 Hz
 SW 12.252 ppm
 FrMODE States-TPPI
 SI 1024
 SF 500.1300133 MHz
 WDW QSINE
 SSB 2
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00
 SI 1024
 MC2 States-TPPI
 SF 500.1300133 MHz
 WDW QSINE
 SSB 2
 LB 0.00 Hz
 GB 0

AK024/ CDC13 / COSY



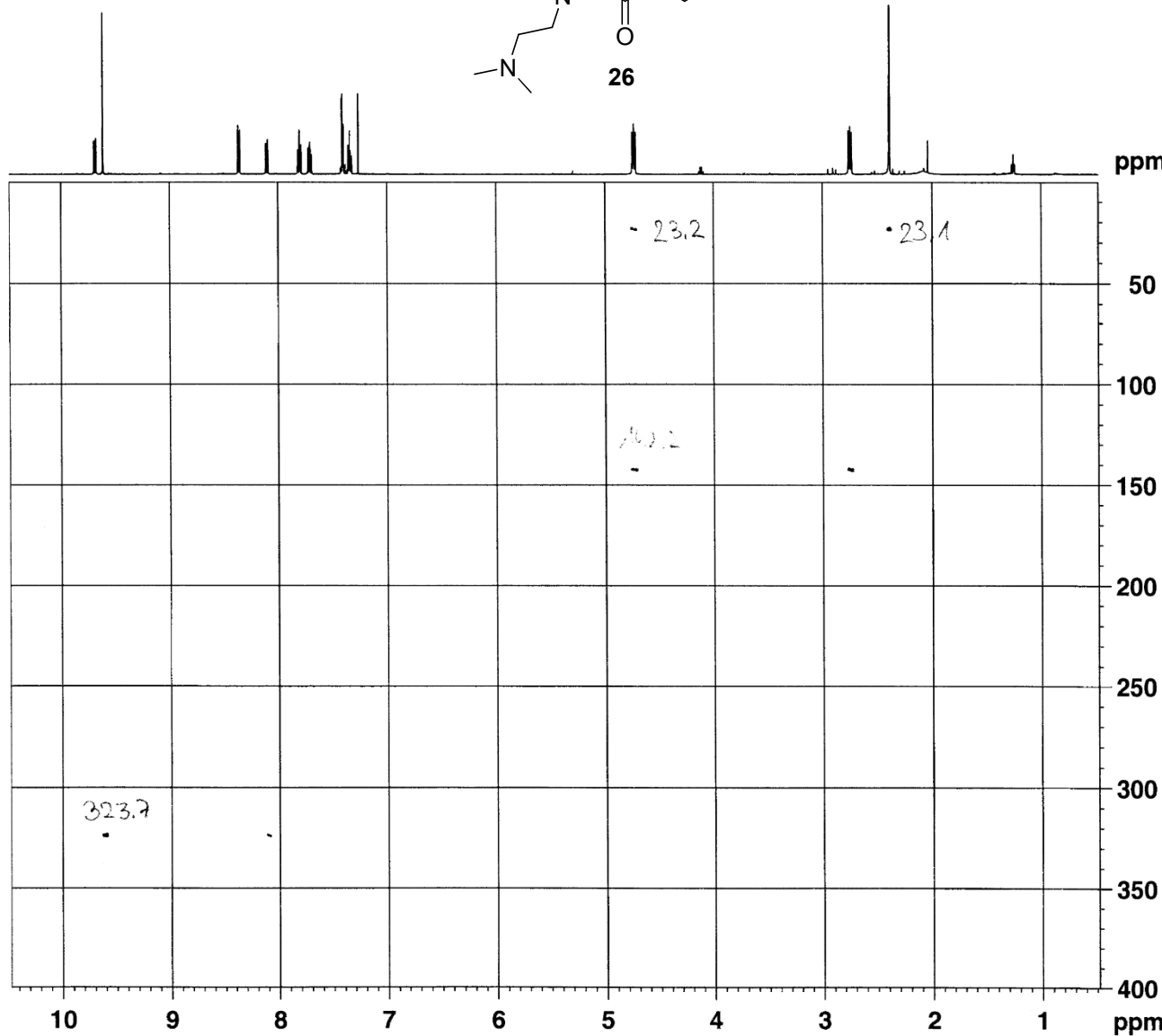
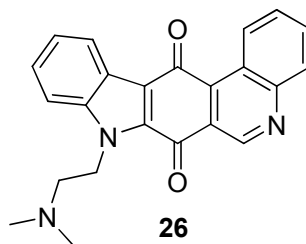
```

NAME          AK024
EXPNO         6
PROCNO        1
Date_         20110607
Time          19.52
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO BB-
PULPROG       cosygpgf
TD            2048
SOLVENT       CDC13
NS            4
DS            4
SWH           6127.451 Hz
FIDRES        2.991920 Hz
AQ            0.1672484 sec
RG            362
DW            81.600 usec
DE            6.00 usec
TE            292.9 K
D0            0.00000300 sec
D1            2.00000000 sec
D13           0.00000400 sec
D16           0.00002000 sec
INO           0.00016320 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1           1H
P0             13.50 usec
P1             13.50 usec
PL1            0.30 dB
SFO1           500.1327797 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1        SINE.100
GPZ1          20.00 %
P16           1000.00 usec
ND0            1
TD            256
SFO1           500.1328 MHz
FIDRES        23.935356 Hz
SW            12.252 ppm
FnMODE        QF
SI            1024
SF            500.1300133 MHz
WDW           SINE
SSB            0
LB            0.00 Hz
GB            0
PC            1.00
SI            1024
MC2           QF
SF            500.1300133 MHz
WDW           SINE
SSB            0
LB            0.00 Hz
GB            0
  
```

AK024/ CDC13 / 15N HMBC



NAME AK024
EXPNO 7
PROCNO 1
Date_ 20110607
Time 20.33
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG hmbcgp1pndqf
TD 2048
SOLVENT CDC13
NS 40
DS 16
SWH 5000.000 Hz
FIDRES 2.441406 Hz
AQ 0.2049500 sec
RG 26008
DW 100.000 usec
DE 6.00 usec
TE 292.9 K
CNST2 90.0000000
CNST13 8.0000000
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D2 0.00555556 sec
D6 0.06250000 sec
D16 0.00002000 sec
IN0 0.00002465 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 13.50 usec
P2 27.00 usec
PL1 0.30 dB
SFO1 500.1327507 MHz

===== CHANNEL f2 =====
NUC2 15N
P3 15.00 usec
PL2 1.50 dB
SFO2 50.6878685 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1 SINE.100
GPNAM2 SINE.100
GPNAM3 SINE.100
GPZ1 70.00 %
GPZ2 30.00 %
GPZ3 50.10 %
P16 1000.00 usec
ND0 2
TD 400
SFO1 50.68787 MHz
FIDRES 50.687870 Hz
SW 400.000 ppm
FnMODE QF
SI 2048
SF 500.1300133 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00
SI 1024
MC2 QF
SF 50.6777330 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0

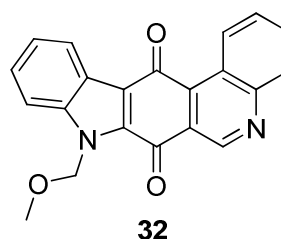
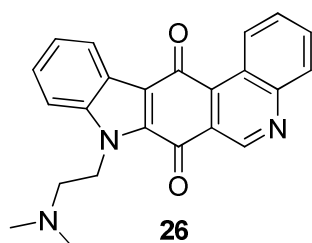
50
100
150
200
250
300
350
400
ppm

EXPOSÉ

Zytostatika zählen neben der chirurgischen Entfernung und der Strahlentherapie nach wie vor zu den bedeutendsten Maßnahmen bei der Behandlung von Krebs. Bei vielen der heute eingesetzten Zytostatika handelt es sich um Stoffe aus natürlichen Quellen oder Derivaten von diesen. Die beiden pentacyclischen Naturstoffe Calothrixin A und B (**22** und **23**), Metaboliten aus *Cyanobacter calothrix*, zeigen außerordentliches zytotoxisches Potenzial an humanen HeLa-Zellen und Chloroquin-resistenten *Plasmodium falciparum* Stämmen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese eines neuen Zytostatikums mit enger Verwandtschaft zu den Naturstoffen der Calothrixine dargelegt. Es handelt sich dabei um das auf dem Grundkörper eines bekannten isomeren Calothrixin B (**25**) basierende Derivat 8-(Dimethylaminoethyl)-8,12b-dihydro-7H-indolo[2,3-j]phenanthridin-7,13(7aH)-dion (**26**). Des Weiteren wird ein neuartiger, äußerst ökonomischer Syntheseweg für den genannten Grundkörper beschrieben. Die fünfstufige, hochkonvergente Synthesestrategie erforderte zunächst die Darstellung der beiden bicyclischen Vorstufen 1-(Methoxymethyl)-1H-indol-3-carbaldehyd (**29**) und N,N-Diethylchinolin-3-carboxamid (**31**). Anschließend erfolgte der Schlüsselschritt zur Bildung des gewünschten Pentacyclus durch eine ortho-Lithiierungsreaktion. Nach Abspaltung der MoM-Schutzgruppe und Alkylierung am Indol-Stickstoff mit einer Dimethylaminoethyl-Seitenkette gelangte man zu **26**.

Im Zuge dessen wurde auch ein weiteres neues Derivat (**32**) der Grundverbindung zugänglich gemacht. Die beiden neuen Verbindungen **26** und **32** werden zu weiteren Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien bereitgestellt und dienen als Grundlage für die Entwicklung neuer Forschungskonzepte.

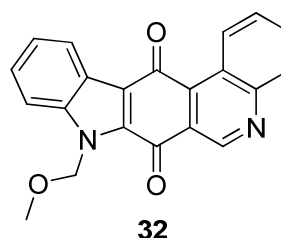
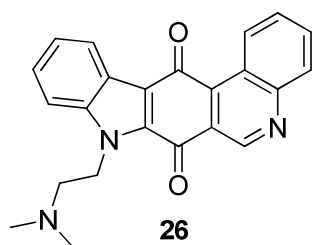


ENGLISH SUMMARY

Cytostatics, beside of surgical removal and radiation therapy, are among the most important measures in the treatment of cancer. Many of the cytostatics currently in use originate from natural sources or are derived from natural products. The two pentacyclic compounds Calothrixin A and B (**22** and **23**), metabolites of *Cyanobacter calothrix*, show exceptional cytotoxic behavior against human HeLa-cancercells and chloroquin-resistant *Plasmodium falciparum* strains.

In the current work the synthesis of a new cytostatic in close relation to the natural products of the Calothrixines is demonstrated. The compound concerned is 8-(Dimethylaminoethyl)-8,12b-dihydro-7H-indolo[2,3-j]phenanthridine-7,13(7aH)-dione (**26**), which is based on the core structure of a known Calothrixin B isomer (**25**). In addition a novel path for the synthesis of **25** is described. The highly convergent five-step synthetic strategy depends on the preparation of the two bicyclic precursors 1-(Methoxymethyl)-1H-indole-3-carbaldehyde (**29**) und N,N-Diethylquinoline-3-carboxamide (**31**). Hereon the key step includes the formation of the desired pentacycle by an ortho-lithiation reaction. Upon the cleavage of the MoM-protecting group, **25** is alkylated at the indole-nitrogen with a dimethylaminoethyl-side-chain.

In the course of the process a new derivate (**32**) of the core structure could be achieved. The two novel compounds (**26**) and (**32**) are provided for further testing on a diverse range of cell lines and should serve as guidance for the development of new strategies in cytostatic research.



CURRICULUM VITAE

Vorname: Anton
Familiennamen: Kreuzer
Geburtsdatum: 12. November 1985
Geburtsort: Korneuburg
Nationalität: Österreich
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1992 – 1996 Volksschule Breitenfurt
1996 – 2004 Bundesgymnasium Perchtoldsdorf
2004 – 2012 Diplomstudium der Pharmazie an der Universität Wien
2005 Präsenzdienst beim Österreichischen Bundesheer
2010 – 2012 Tutordienst im Rahmen des Praktikums für Arzneistoffsynthese am Department für Arznei- und Naturstoffsynthese der Universität Wien
2011-2012 Diplomarbeit am Department für Arznei- und Naturstoffsynthese der Universität Wien

Sprachkenntnisse: Deutsch
Englisch
Französisch

Hobbies: E-Gitarre, Musikproduktion, Sport

Kontakt: Anton Kreuzer
Sonnengasse 10
2384 Breitenfurt
anton.kreuzer@gmail.com