

Diplomarbeit

Titel der Diplomarbeit

Beiträge zur Synthese von iodierten Elacridar-Derivaten

Verfasser

Iskratsch Klaus

Matrikel Nummer: 9900632

Angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag. Pharm.)

Wien am 20.08.2009

Studienkennzahl (lt. Studienblatt): A449

Studienrichtung (lt. Studienblatt): Pharmazie

Betreuer: Univ.- Prof. Mag. Dr. Thomas Erker

Vorwort

Diese Diplomarbeit wurde am Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien im Zeitraum von März 2007 bis Jänner 2008 durchgeführt.

Danksagung:

Ich möchte allen danken, ohne die diese Diplomarbeit nicht zustande gekommen wäre:

Herrn Univ.- Prof. Mag. Dr. Christian Noe

Herrn Univ.- Prof. Mag. Dr. Thomas Erker

Herrn Mag. Dr. Norbert Handler

Und meiner Familie

Beiträge zur Synthese von iodierten Elacridar-Derivaten

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Allgemein	Seite 5
1.2	Die Blut-Hirnschranke	Seite 6 – 7
1.3	Aufbau der Blut-Hirnschranke	Seite 7 – 11
1.4	Transportprozesse durch die Blut-Hirnschranke	Seite 12 – 14
1.5	Drug Efflux Transporter in der Blut-Hirnschranke	Seite 15
1.6	Multi-Drug-Resistance (MDR)	Seite 16
1.7	Die ABC Transporter (ATP binding cassette)	Seite 17 – 18
1.8	P-Glykoprotein	Seite 19 – 21
1.9	Die Transportmechanismen des P-Glykoprotein	Seite 21
1.10	Die P-Glykoprotein binding site	Seite 21
1.11	Die Rolle des P-Glykoproteins in der Tumorthherapie	Seite 22
1.12	Modulatoren des P-Glykoprotein und anderer MDR Proteine	Seite 23 – 27
2.	Problemstellung	Seite 28 – 29
3.	Eigene Untersuchungen	Seite 30 – 33
4.	Zusammenfassung/Abstract	Seite 34 – 35
5.	Experimenteller Teil	Seite 36 – 47
6.	Spektren	Seite 48 - 63
7.	Quellenverzeichnis/Literaturliste	Seite 64 – 69
8.	Lebenslauf	Seite 70

1. Einleitung

1.1 Allgemein

Das Auftreten von Resistenzen gegenüber Arzneistoffen stellt eines der Hauptprobleme in der Therapie bei Krankheiten wie Krebs dar, da aufgrund dessen oft die therapeutische Wirkung nicht erreicht werden kann.

Eine mögliche Ursache ist die Überexpression von sogenannten Multi-Drug-Resistance-Proteinen (MDR) die zu den Efflux-Transportern gehören. Das wichtigste dieser Proteine ist das P-Glykoprotein.

Da diese Proteine außer in Tumorzellen vor allem sehr zahlreich in der Blut-Hirnschranke vorkommen und dort ihre Funktionen als erstes aufgeklärt wurden, sind in den ersten zwei Kapiteln der Aufbau der Blut-Hirnschranke, deren Funktionen und die Transportmechanismen in dieser erklärt. [1]

1.2 Die Blut-Hirn Schranke

Die Blut-Hirn Schranke kommt bei allen Säugern vor und stellt eine physiologisch-chemische Barriere zwischen Blutkreislauf und zentralen Nervensystem dar.

Sie besteht vor allem aus Endothelzellen, die über Tight Junctions sehr eng miteinander verbunden sind und an den Innenwänden der Blutkapillaren liegen. Die Blut-Hirnschranke dient dem Schutz des Gehirns vor im Blut zirkulierenden Giftstoffen, aus der Peripherie stammenden Neurotransmittern und anderen Botenstoffen sowie Krankheitserregern wie Viren u. Bakterien. Sie stellt eine hochselektive Barriere dar, über welche dem Gehirn wichtige Nährstoffe zugeführt und Metaboliten wieder abgeleitet werden. Eine Reihe von Transportprozessen ist dafür verantwortlich, daß diese Funktionen ermöglicht werden. [2]

Doch durch diese spezifische Filterfunktion der Blut-Hirnschranke wird auch das Penetrieren von einigen Arzneistoffen in das Gehirn verhindert, was vor allem bei Medikamenten die gegen ZNS-Erkrankungen (z.B. M. Alzheimer, Schizophrenie, etc.) sowie bei anderen Erkrankungen und Tumoren des Gehirns angewendet werden, unerwünscht ist. [2]

Funktionen der Blut-Hirnschranke:

1. Abgrenzung des Gehirns vom umgebenden extrazellulären Raum und Schutz des empfindlichen neuronalen Gewebes. [3]
2. Ständige Versorgung des Gehirns mit sauerstoffreichen Blut: Eine Unterbrechung der Blutzufuhr des Gehirns für 10 Sekunden führt zu Bewußtlosigkeit und eine Unterbrechung für wenige Minuten führt bereits zum Absterben der Nervenzellen. [3]
3. Die Regulation des unterschiedlichen Sauerstoffsbedarfs in den verschiedensten Gehirnregionen. [3]
4. Beibehaltung eines konstanten inneren Milieus: Schwankungen des Blut pH dürfen nicht an das Gehirn weitergeleitet werden. Veränderungen der Kaliumkonzentration würden das Membranpotential der Nervenzellen verändern. Neurotransmitter, die in der Peripherie im Blut zirkulieren, dürfen die Blut-Hirnschranke nicht passieren, weil sie sonst die Funktionen der dort vorhandenen Synapsen stören würden. [2]

5. Schutz des Gehirns vor körperfremden Stoffen wie Toxinen und Krankheitserregern. [2]
6. Es entstehen im Gehirn aufgrund des außerordentlichen Energiebedarfs auch zahlreiche Stoffwechselprodukte, die durch die Blut-Hirnschranke wieder abtransportiert werden müssen. [4]
7. Veränderungen der Funktionen der Blut-Hirnschranke führen in der Folge zu Zustandsänderungen des ZNS, was zu ZNS Erkrankungen und Störungen der Funktion führen kann. [4]

1.3 Der Aufbau der Blut-Hirnschranke

Der Hauptbestandteil der Blut-Hirnschranke sind die Endothelzellen mit den dazwischen liegenden Tight Junctions. Außerdem sind noch die Perizyten und die Astrozyten für den Aufbau der humanen Blut-Hirnschranke verantwortlich. [3]

Die Endothelzellen

Sie bilden die KapillargefäÙe. Die Endothelzellen bei den Gehirnkapillaren haben im Gegensatz zu den Endothelien in der Peripherie keine Fenestrierungen und keine Interzellularspalten. Deshalb bezeichnet man es auch als kontinuierliches Endothel. [5]

Wegen des hohen Stoffwechselbedarfs der Endothelzellen ist die Anzahl an Mitochondrien 5 bis 10 mal höher als in den Blutkapillaren der Peripherie. Dafür ist aber die Zahl der Pinozyten, welche in der Lage sind gelöste Substanzen aufzunehmen, in den Endothelzellen des Gehirns sehr gering. [5]

Weil die Blut-Hirnschranke nicht nur eine physikalische, sondern auch eine metabolisch-enzymatische Barriere darstellt, befinden sich in den Endothelzellen eine Reihe von Enzymen die mengenmäßig häufiger vorkommen als z.B. in Parenchymzellen. Diese sind unter anderem GGT, alkalische Phosphatase und Glukose-6-Phosphatase. Außerdem sind Enzyme wie COMT, MAO, Cytochrom P450 ebenfalls erhöht. [6]

Auf der Zellmembran der Endothelzellen ermöglichen bestimmte Kanalproteine, die Aquaporine, eine Wasserdiffusion in Richtung Blut sowie in Richtung Gehirn. Das Fehlen von Fenestrierungen und das seltene Auftreten von pinozytischen Vesikeln bilden die passive Barriere Funktion der Blut-Hirnschranke. [7]

Die Tight Junctions

Sind feste Zell-Zell Verbindungen, die Endothelzellen miteinander verbinden. Sie liefern einen wichtigen Beitrag für die Barriere Funktion der Blut-Hirn Schranke. Sie sind für Stoffe mit einem Molekulargewicht über 200 g/mol nicht passierbar, deshalb sollte der Stofftransport ins Gehirn durch die Zellmembran der Endothelzellen stattfinden. [8]

Die Tight Junctions bestehen aus mehreren Transmembranproteinen wie verschiedenen Claudinen, Junctional Adhesion Molecules und Occludin, die zwischen den Endothelzellen liegen und den Stofftransport verhindern. Von den Claudinen ist das Claudine 5 das wichtigste. Bei Knockout Mäusen des Cldn5 Gens wurde gezeigt, daß die Blut-Hirnschranke auch permeabel für höher molekulare Verbindungen wurde und die Mäuse innerhalb von wenigen Stunden starben. [9]

Tight Junctions gewähren aufgrund der Fixierung der Endothelzellen deren Ausrichtung zu beiden Seiten: luminal (dem Blut entgegengerichtet) und transluminal (dem Gehirn zugewandt). [10]

Basallamina

Besteht aus einer 50 - 100 nm dicken Proteinschicht aus u.a. Kollagen Typ 4, Heparinsulfat, Proteoglykanen, Laminin und anderen Matrixproteinen die die Endothelzellen umgeben. Sie ist eine spezialisierte extrazelluläre Matrix, welche als stabilisierende Schicht dafür zuständig ist, daß die Endothelzellen nicht auseinander gleiten. Die Basallamina kann man im Elektronenmikroskop erkennen.

Die im Lichtmikroskop sichtbare Basalmembran besteht aus der Basallamina und der Lamina fibroreticularis. Sie untergliedert sich elektronenmikroskopisch weiter in die direkt an die Endothelzellen anliegende Lamina rara externa, welche den oberen 10 bis 50 nm breiten Bereich der Basallamina darstellt. Dieser Schicht folgt als mittlere Schicht die ca. 50 nm dicke Lamina densa. Darunter liegend befindet sich die helle 10 nm breite Lamina rara interna, die den unteren Abschnitt der Basallamina ausmacht.

Anschließend befindet sich die Lamina fibroreticularis, die 200-300 nm dick ist. [11]

Die Astrozyten

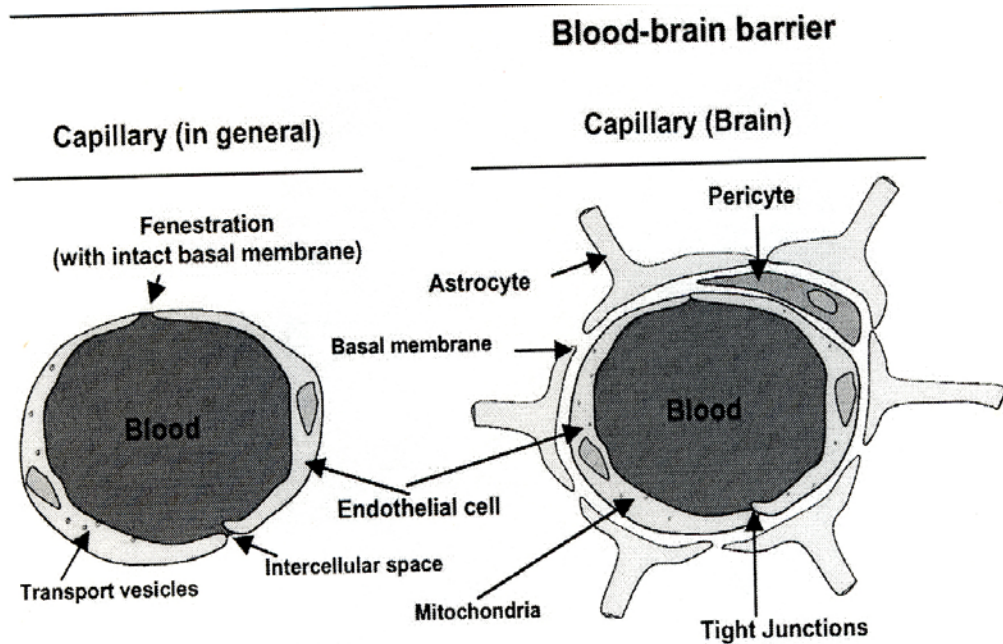
Sind sternförmige und verzweigte Zellen, die wesentlich größer wie Endothelzellen sind und zum ZNS gezählt werden. Aber im Gegensatz zu den Neuronen sind sie auch postnatal noch teilungsfähig. Sie haben keine direkte Barrierefunktion aber eine direkte Wirkung auf die Endothelzellen, die wesentlich für die Funktion der Blut-Hirnschranke ist. Die Astrozyten setzen eine Reihe von Transmittern frei, welche die Permeabilität der Blut-Hirnschranke innerhalb kürzester Zeit verändern können.

Die wichtigste Funktion der Astrozyten ist es aber die Nährstoffversorgung der Neuronen, sowie die extrazelluläre Konzentration der Ionen zu regulieren. Außerdem sind die Astrozyten für die Cholesterinproduktion im Gehirn verantwortlich, da Cholesterin nicht dazu befähigt ist die Blut-Hirnschranke zu passieren. Im Gehirn befinden sich 20% des Gesamtcholesterins.

Der filigrane rosettenartige Bau der Endfüßchen der Astrozyten ist für die einwandfreie Kommunikation mit den Endothelzellen verantwortlich. [10]

Die Perizyten

Die Hauptaufgaben sind die Regulation der Endothelien, die Fähigkeit zur Kontraktion und die Makrophagen-Aktivität. Die Perizyten sind auf 3 verschiedenen Arten mit den Endothelien verankert. [12]



In dieser Abbildung [13] ist eine periphere Blutkapillare (links) im Vergleich zu einer Gehirnkapillare dargestellt. Hier kann man erkennen, daß die Endothelzellen in der Peripherie fenestriert sind und eine interzelluläre Lücke zwischen den Zellen vorhanden ist, während bei der Blut-Hirnschranke die Endothelien durch Tight Junctions miteinander verknüpft sind und Astrozyten und Perizyten sowie die Basallamina an den Endothelien anliegen .

1.4 Transportmechanismen durch die Blut-Hirnschranke

Parazellulärer Transport

Bei diesem Transport werden Stoffe durch Zellzwischenräume transportiert. Bei den Kapillaren der Peripherie findet dieser Weg des Stofftransports über Fenestrierungen und Interzellularspalten statt. Da Tight Junctions den parazellulären Transport verhindern, kommt dieser Transportmechanismus nur bei Molekülen unter $200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Größe in der Blut-Hirnschranke vor. [14]

Kanalvermittelte Permeabilität

Polare Moleküle wie z.B. Wasser können nur beschränkt durch das Endothel diffundieren. Aber dennoch ist die Permeabilität für Wasser relativ hoch, da es durch die Aquaporine eindringen kann. Die Aquaporine regulieren den Wasserhaushalt im Gehirn. [15]

Der Molekültransport über Kanäle erfolgt viel schneller als über Transporter. Kanäle können über Spannungsimpulse oder interagierende Hormone aktiviert und wieder inaktiviert werden. [16]

Freie Diffusion

oder passive Diffusion ist die einfachste Form eines Stofftransportes. Sie folgt einem Konzentrationsgradienten und kann sowohl durch die Membran der Endothelien als auch durch die Tight Junctions erfolgen. Hierbei wird für den Materialtransport keine Energie aus der Zelle benötigt. [17]

Ob ein Molekül die Blut-Hirnschranke passieren kann hängt von seiner Größe und Fettlöslichkeit ab. Je kleiner und lipophiler eine Verbindung ist, umso besser kann sie durch die Endothelzellen der Blut-Hirnschranke diffundieren. Bis zu einem Molekulargewicht von $400 \text{ bis } 500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ sind Moleküle noch in der Lage mit freier Diffusion durch die Blut-Hirnschranke zu gelangen.

Die Lipophilie wird durch den Verteilungskoeffizienten in Octanol/Wasser charakterisiert, der logarithmisch als log P Wert dargestellt ist. Ein log P von 0 bedeutet eine gleichmäßige Verteilung der Substanz in Octanol/Wasser, während ein

positiver $\log p$ auf eine lipophile und ein negativer auf eine hydrophile Substanz weist. Ab $\log P$ von 1 ist die Membrangängigkeit erhöht doch nimmt diese ab 3 wieder ab, so daß Verbindungen mit einem $\log p$ Größer 5 die Membranen wieder nicht so gut passieren können. [18]

Erleichterte Diffusion

Sehr viele notwendige Nährstoffe (wie u.a. Aminosäuren und Kohlenhydrate) sind zu polar und zu groß um frei durch die Membran zu diffundieren.

Für diese Stoffe gibt es in der Zellmembran Transportproteine. So wird z.B. der Transport von Glucose durch den Carrier Glut1 ermöglicht. [19]

Wenn ein Carrier an die zu transportierende Substanz bindet, wird seine Konformation geändert. Durch diese Konformationsänderung ist er nun in der Lage mit dem gebundenen Substrat durch die Zellmembran zu diffundieren. Nach erfolgter Diffusion trennt sich der Carrier wieder von dem Substrat.

Die Transporter können nur in eine Richtung, in zwei Richtungen (Symport), und in entgegengesetzte Richtung (Antiport) arbeiten. [20]

Aktiver Transport

Bei den passiven Diffusionsmethoden gelangen Stoffe ohne zusätzlichen Energieverbrauch in bzw. aus dem Gehirn. Die Stoffe folgen hierbei einem Diffusionsgradienten. Mit aktiven Transportern (Pumpen) wird es ermöglicht, gegen ein Konzentrationsgefälle zu transportieren. Dabei wird Energie in Form von ATP benötigt. [16]

Der Stofftransport ins Gehirn wird Influx, der aus dem Gehirn als Efflux bezeichnet. Beispiele für Influxtransporter sind der Leucin-Enkephalin und der Arginin-Vasopressin Transporter. Beispiele für Effluxtransporter sind das P-Glykoprotein (Pgp), das Multi-Drug-Resistance-Related-Protein (MRP) und das Breastcancer-Resistance-Protein (BCRP). Einige Influx und Efflux Transporter können stereoselektiv arbeiten, d.h. sie transportieren nur ein bestimmtes Enantiomer während das andere unberührt bleibt. (21)

Vesikulärer Transport

Der vesikuläre Transport wird in die rezeptorvermittelte Transzytose und den adsorptionsvermittelten Transport geteilt. [22]

Rezeptorvermittelte Transzytose

Hier sind spezielle Rezeptoren für die Erkennung und Aufnahme bestimmter Stoffe verantwortlich. So können große Verbindungen wie zum Beispiel Transferrin aus dem Blut in die extrazelluläre Flüssigkeit des Gehirns übertreten. [22]

Adsorptionsvermittelte Transzytose

Hier bewirken elektrostatische Wechselwirkungen zwischen negativer Oberfläche der Glykoproteine und positiv geladenen Molekülen einen Transport durch die Membran. Positiv geladene Moleküle sind unter anderem Peptide deren isoelektrischer Punkt im schwach basischen Bereich liegt. [23]

1.5 Drug-Efflux-Transporter in der Blut-Hirnschranke

Der Drug uptake ins Gehirn hängt von verschiedenen Faktoren, wie der physikalischen Barriere der Blut-Hirnschranke, die der Blut-Liquorschranke und der Affinität des Substrates für spezifische Transportsysteme die an der Blut-Hirnschranke und Blut-Liquorschranke lokalisiert sind, ab. [20]

Je lipophiler Verbindungen sind um so besser können sie normalerweise die Blut-Hirnschranke passieren. Aber einige sehr lipophile Verbindungen haben eine geringere Gehirngängigkeit, als man aufgrund der Lipophilie des Moleküls annehmen würde. Diese Substanzen sind Substrate für Drug-Efflux Transporter die in der Blut-Hirnschranke und in der Blut-Liquorschranke sitzen.

Diese Effluxtransporter haben die Aufgabe, Substrate aus dem zentralen Nervensystem zu entfernen. [20]

Efflux-Transportproteine schleusen fremde Stoffe, zum Beispiel Zytostatika, aus einer Zelle aus und bestimmen deshalb wesentlich den Erfolg oder Mißerfolg einer Tumorthherapie.

Das P-Glykoprotein welches ein phosphoryliertes Glykoprotein ist, war der erste beschriebene Drug-Efflux-Transporter. Danach kamen diverse MRPs (Multi-Drug-Resistance-Proteine) und BCRP (Breast-Cancer-Resistance-Protein). Alle sind in der Blut-Hirnschranke und in der Blut-Liquorschranke lokalisiert und arbeiten zusammen, um die Penetration von vielen Arzneistoffen zu verhindern. Außerdem wird vermutet, daß sie beim Transport von Mineralstoffen eine wichtige Rolle spielen. [24]

Diese Erkenntnisse sind der Ansatz in der modernen Arzneistoffentwicklung. Deshalb werden spezifische Wirkstoffe hergestellt, die keine Substrate für diese Efflux-Transporter sind. Außerdem ist die Entwicklung von Hemmstoffen der Transporter mittlerweile ein wichtiges Forschungsgebiet in der Tumorbekämpfung. [25]

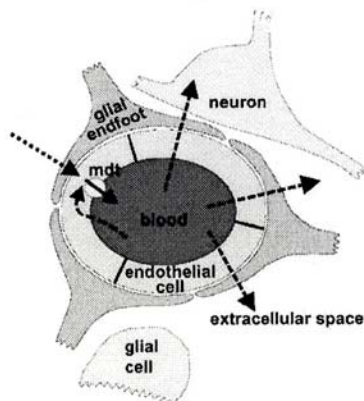
1.6 Multi-Drug-Resistance (MDR)

Die Multi-Drug-Resistance (MDR) beschreibt die Eigenschaft von Zellen (unter anderem Endothelzellen der Blut-Hirnschranke, Bakterienzellen, Tumorzellen, ...) eine Resistenz gegenüber von Arzneistoffen zu entwickeln. Hierfür sind unter anderem die Efflux-Transporter verantwortlich. [26]

Die als klassische Multi-Drug-Resistance (MDR) bezeichnete (mehrfach) Resistenz wird durch die Überexpression von einem hochmolekularen Plasmamembranprotein, dem P-Glykoprotein (Pgp), hervorgerufen welches zu den ATP binding cassette (ABC) Transportern gehört. Die Überexpression von P-Glykoprotein erfolgt durch eine erhöhte Synthese mittels Aktivierung der Gentranskription. [27]

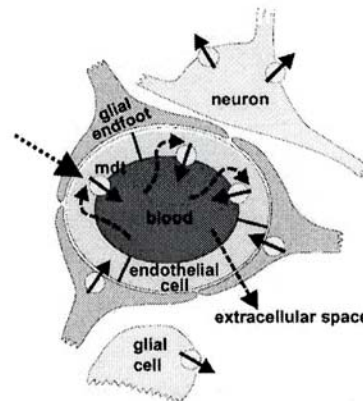
Multidrug transporters in the blood-brain barrier

A. Normal expression of multidrug transporters



--->
Drug penetration and extrusion

B. Overexpression of multidrug transporters in epileptic tissue



In endothelial cells ↑ } Drug uptake ↓
 In perivascular astrocytes ↑ } Drug extrusion ↑
 In parenchymal astrocytes ↑ } Protection from apoptosis?
 In neurons ↑

In dieser Abbildung [54] ist die normale Expression von MDR Transportern (links) der erhöhten Expression in epileptischen Nervenzellen gegenübergestellt.

1.7 Die ABC-Transporter (ATP binding cassette)

Die ABC-Transporter (ATP binding cassette) sind eine der größten Genfamilien und sie kodieren für über 50 Verwandte aus Multidomänen bestehende integrale transmembranäre Effluxproteine, die Energie durch die Hydrolyse von ATP gewinnen, um Stoffe durch die Membran zu transportieren. Das wichtigste Merkmal ist die hoch konservierte ATP-Bindungsdomäne, die essentiell für die Transportfunktion ist. Diese 50 Proteine sind aufgrund der für sie kodierenden Gene in 7 Unterfamilien (ABCA bis ABCG) eingeteilt. Wichtig für die Strukturierung in Unterfamilien ist die Anzahl an ATP Bindungsdomänen und eine vorgeschriebene Zahl an Transmembrandomänen. Die meisten bei Säugern vorhandenen ABC-Proteine besitzen zwei ATP Bindungsdomänen und 6 transmembranäre Domänen.

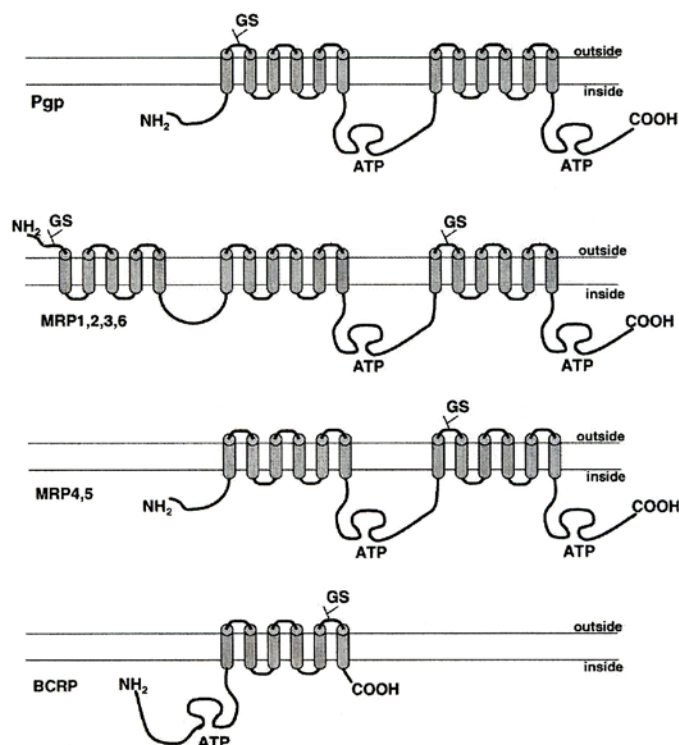
Nach ihrer Funktion und Aufbau kann man die ABC-Proteine in Transporter, Regulatoren und Kanäle einteilen.

Transportproteine, die nur aus einer ATP-Bindungs- und Transmembrandomäne bestehen werden Halbtransporter bezeichnet. [28]

Transportproteine werden weitestgehend in allen Geweben und Zelltypen in unterschiedlicher Menge und in bestimmten Fällen an unterschiedlichen Membranen exprimiert. Daraus kann man schließen, daß sie eine wichtige Komponente der körpereigenen Abwehr gegenüber Fremdstoffen darstellen und sowohl von gesundem Gewebe als auch von Tumorzellen genutzt werden. Darüber hinaus weisen neuere Untersuchungen darauf hin, daß auch körpereigene Substanzen durch diese Transportproteine ausgeschleust und somit offensichtlich auch physiologische Vorgänge beeinflusst werden. [29]

Einige wichtige ABC-Proteine sind:

1. **das P-Glykoprotein (Pgp)**, welches vom MDR1 bzw. ABCB1 Gen codiert wird und einen Schutz vor Giften und Xenobiotika darstellt. Es ist der wichtigste Faktor der die Multi-Drug-Resistance (MDR) auslöst. [30]
2. **das MRP1**, welches vom ABCC1 Gen codiert wird und als Schutz vor Xenobiotika dient. [30]
3. **das MRP2**, welches vom ABCC1 gen codiert wird und dessen Hauptaufgabe der organische Efflux darstellt. [30]
4. **das BCRP**, (Breast-Cancer-Resistance Protein) wird vom ABCG2 Gen codiert und gewährt einen Schutz vor Xenobiotika und stellt so einen Faktor der Multi-Drug-Resistance dar. [30]
5. **Das Oatp1**, welches vom SCLO1A2 Gen codiert wird und einen Gallensäuretransporter darstellt. [30]
6. **Das OAT3**, welches vom SLC22A8 Gen codiert wird und auch als Transporter für Gallensäuren seine Funktion erfüllt. [30]



In dieser Abbildung [53] sind der Aufbau und die unterschiedliche Anzahl an Transmembrandomänen einiger MDR-Proteine dargestellt.

1.8 P-Glykoprotein (Pgp)

Das P-Glykoprotein ist der am besten untersuchte ABC-Transporter und wurde 1970 als Multi-Drug-Resistance-Transporter in Tumorzellen und später in Endothelzellen entdeckt. [31]

Es hat ein Molekulargewicht von 170 kDa und ist in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran eingebettet. [32]

Es ist ein aus 128 Aminosäuren bestehendes Protein, daß aus 12 helikalen Transmembrandomänen und 2 Nukleotid bindenden Domänen aufgebaut ist. [33]

Das P-Glykoprotein ist mit zwei hydrophoben Molekülteilen in der Zellmembran verankert, während zwei hydrophile auf der Zytoplasmaseite gelegene Molekülbereiche ATP binden. Bindet ein Substrat an seine Bindungsstelle, die man sich als hydrophobe Stelle vorstellen kann, so wird die Hydrolyse von ATP ausgelöst. Durch diesen Schritt wird die Konformation des P-Glykoproteins so verändert, daß ein Kanal gebildet wird, durch den das Substrat wieder in Richtung Extrazellularraum geschleust wird. [34]

Das P-Glykoprotein ist in der Lage innerhalb kürzester Zeit phosphoryliert und wieder dephosphoryliert zu werden. Diese Prozesse werden durch die sich im Cytosol befindliche Proteinkinase C geregelt und somit ist die Transportaktivität von P-Glykoprotein von ihr abhängig. [35]

Da das P-Glykoprotein außer beim Menschen noch in der Blut-Hirnschranke von vielen anderen Säugern entdeckt wurde, nimmt man an, daß das P-Glykoprotein einen sehr wichtigen Schutzmechanismus vor vielen lipophilen Giften und Xenobiotika darstellt, die ansonsten durch die Blut-Hirnschranke mittels einfacher Diffusion penetrieren würden. [36]

Eine weitere Theorie über die Funktion des P-Glykoproteins besagt, daß es auch am Transport von wichtigen Nährstoffen und Salzen in Niere, Leber sowie in Teilen des Magen-Darmtraktes beteiligt ist. [37]

Ein klassisches Beispiel für ein P-Glykoprotein Substrat ist das Opiat Loperamid. Durch seine Bindung an das P-Glykoprotein ist es nicht in der Lage ins Gehirn zu penetrieren und dort eine zentrale bzw. toxische Wirkung auszulösen, sondern verbleibt in der Peripherie und entfacht eine antidiarrhoische Wirkung durch Bindung an Opiat-Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt.

Außerdem sind sehr viele Zytostatika wie Daunorubicin, Doxorubicin, Doxetaxel, Mitomycin und Paclitaxel ebenfalls Substrate. Da das P-Glykoprotein auch in Tumorzellen vorkommt stellt es einen problematischen Faktor in der Krebstherapie dar.

Weitere wichtige Arzneistoffe die an P-Glykoprotein binden sind u.a.: Antibiotika (Cefazolin, Erythromycin, Levofloxacin, ...), Antiemetika (Ondansetron, ...), Herzpharmaka (Amiodaron, Digitoxin, Digoxin, Chinidin, ...), Ca-Kanalblocker (Verapamil, Diltiazem, Nicardipin, ...), Beta-Blocker (Bunitrolol, Celiprolol, ...) [38]

Gewebe und Organe mit physiologischer Pgp-Aktivität [39]

Leber:	luminale Oberfläche der Gallenwege
Niere:	luminale Oberfläche der proximalen Tubuli
Dünndarm und Colon:	Mukosa auskleidendes Lumen
Nebennierenrinde:	Nebennierenrinde
Pankreas:	Pankreasgänge
Kapillarendothelien:	ZNS (Blut-Hirn-Schranke)
Plazenta:	Blut- Plazenta- Schranke)
Testes:	Blut-Hoden-Schranke)
Hämatopoetische Zellen:	Makrophagen
aktivierte T-Zellen	
Pluripotente Stammzellen (CD34)	
Tumorzellen	

1.9 Die Transportmechanismen des P-Glykoproteins

Es gibt verschiedene Annahmen über die Transportmechanismen des P-Glykoproteins, aber der exakte Transportmechanismus bleibt unklar.

Die erste ist, daß das P-Glykoprotein einen Kanal durch die Zellmembran bildet, der durch die Transmembrandomänen geformt wird (Hydrophobic Vacuumcleaner Modell). Das Substrat wird von der Innenseite zur Außenseite der Lipid Doppelschicht befördert, wo es zur extrazellulären Matrix transportiert wird. [42]

Das zweite und auch am meisten anerkannte Modell besagt, daß die zwei monomeren Hälften des P-Glykoproteins einen Transportkanal bilden, durch den das Substrat während der Diffusion durch die Zellmembran wieder aus der Zelle ausgeschleust werden kann (Flippase Modell). Diese Theorie besagt, daß das Substrat niemals das Zytosol erreicht. [43]

1.10 Die P-Glykoprotein binding site

Um den Vorgang vom Drug-Efflux des P-Glykoproteins besser verstehen zu können, gab es zahlreiche Studien, um mögliche P-Glykoprotein binding sites mittels Röntgenstrukturanalyse zu identifizieren. [44]

Shapiro und Ling konnten mit den fluoreszierenden Proben Hoechst 33342 und Rhodamine 123, die beide Substrate für das P-Glykoprotein sind, zeigen, daß sie an verschiedenen Stellen des Proteins binden und so einen additiven Effekt erzielen. Während Rhodamin sowie auch Daunorubicin und Doxorubicin und andere Anthracycline an der R-Seite des Proteins binden, ist die Bindungsstelle für Hoechst 33342 sowie für Colchicin und Quercetin die H-Seite. [44]

Es konnte bewiesen werden, daß durch die Bindung von Rhodamin an der H-Seite von Pgp, die Substratspezifität der R-Seite um einiges erhöht wird. Daraus folgt, daß die H-Seite nicht nur eine Transportfunktion besitzt, sondern auch eine regulatorische Aufgabe hat. [44]

Shapiro und Ling konnten auch noch eine dritte Bindungsstelle finden, welche für die Bindung von Prazosin und Progesteron verantwortlich ist. Hierbei handelt es sich um eine allosterische Bindungsstelle. [44]

1.11 Die Rolle des P-Glykoproteins in der Tumortherapie

Daß die Expression von P-Glykoprotein einen wichtigen klinischen Faktor für den Erfolg einer Chemotherapie darstellt wurde in zahlreichen Studien deutlich. Zum Beispiel weisen zwischen 17 und 75 Prozent der Patienten mit erstmals diagnostizierter akuter myeloischer Leukämie (AML) Pgp positive Leukämiezellen auf. Gerade bei diesen Patienten war trotz medikamentöser Therapie das Nachlassen von Symptomen verringert und die Überlebenschancen reduziert. [45]

In einer Studie der European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) an nicht vorbehandelten erwachsenen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie konnte man zeigen, daß eine starke Expression von Pgp eine sehr große Auswirkung auf ein Therapieversagen hat.

Deshalb erwartet man, daß diese Patientengruppe von einer Hemmung der Pgp Aktivität bzw. einer Minderung der Pgp Expression sehr stark profitiert. [46]

1.12 Modulatoren des P-Glykoproteins und anderer MDR-Proteine

Die Pgp-Modulation wird angewendet, um den Effekt von zytostatischen Therapeutika und anderen Substraten von Pgp zu erhöhen und um eine Dosisminimierung und zugleich eine Reduktion der Nebenwirkungen zu erreichen. [47]

Um dies zu erreichen werden Arzneistoffe (zum Beispiel Zytostatika), die Substrate für MDR Proteine sind, mit Modulatoren dieser Proteine kombiniert. Dadurch soll ein Efflux des Arzneistoffs verhindert werden.

Mit dieser Methode lassen sich viel höhere Konzentrationen von Zytostatika in malignen Zellen erreichen, was vor allem bei Hirntumoren und auch bei der akuten myeloischen Leukämie zu sehr guten therapeutischen Erfolgen führt.

Nach Zeitpunkt der Entdeckung und chemischen Aufbau der MDR-Modulatoren unterteilt man diese in drei Generationen. [48]

Die MDR-Modulatoren der ersten Generation

Die Modulatoren der ersten Generation sind Arzneistoffe, die bereits schon auf anderen Gebieten angewendet worden sind und deren P-Glykoprotein modulierende Wirkung erst später entdeckt wurde. Die meisten dieser Verbindungen sind selbst Substrate für das P-Glykoprotein und deshalb konkurrieren sie mit der verabreichten zytostatischen Substanz um die Bindungsstelle am Protein. [49]

Der ersten Generation gehören unter anderem folgende Arzneistoffe an:

Calciumantagonisten: Verapamil, Nifedipin, Bepridil, Nicardipin, Niguldipin

Estrogenrezeptormodulatoren: Tamoxifen, N-Demethyltamoxifen

Gestagene: Progesteron

Antimalariamittel: Chinin, Chloroquin

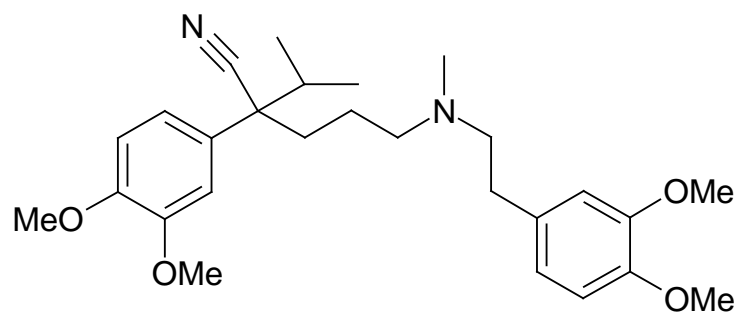
Andere kardiovaskulär wirksame Verbindungen: Amiodaron, Dipyridamol

Phenothiazine: Trifluoperazin, Prochlorperazin, Fluphenazin, trans- Flupenthixol

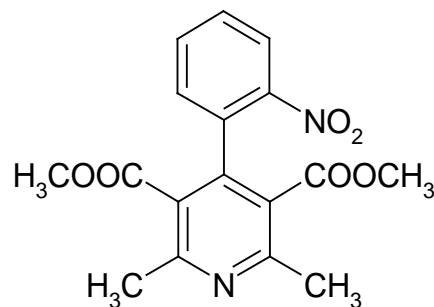
Antibiotika: Cefoperazon, Ceftriaxon, Erythromycin, Tetracyclin

Immunsuppressiva: Cyclosporin A [50]

Da die Verbindungen der ersten Generation eine relativ schwache Affinität zum Pgp haben, müssen sie in hohen Dosen verabreicht werden um einen klinischen Effekt zu erzielen. Da es dadurch zu schweren Nebenwirkungen kommt ist ihre klinische Anwendung von geringer Relevanz. [50]



Verapamil



Nifedipin

Die MDR Modulatoren der 2. Generation

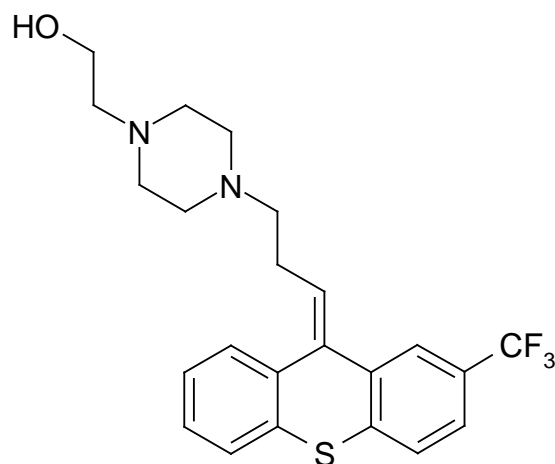
Die Modulatoren der zweiten Generation sind strukturell optimierte Abwandlungen der Verbindungen aus der ersten Generation. Aufgrund ihrer chemischen Modifizierung haben sie geringere Nebenwirkungen und sind effektivere Pgp-Hemmer als die der ersten Generation. [51]

Das Hauptproblem der Modulatoren der ersten und zweiten Generation ist das Fehlen der Spezifität auf bestimmte Organe, wie zum Beispiel eine gezielte Wirkung auf die Blut-Hirnschranke oder auf die Leber etc. [52]

Als Beispiel sei hier Valspodar angeführt, welches ein Cyclosporin D Analogon ist. Es hemmt *in vitro* das P-Glykoprotein 10 -20 mal stärker als Cyclosporin A. Doch die hemmende Wirkung beschränkt sich nicht nur auf Krebszellen und die Blut-Hirnschranke, sondern ist auch in Zellen der Leber und Niere gegeben, was zu einer Störung des Arzneistoffmetabolismus und dadurch zu einer verminderten Ausscheidung von Giftstoffen führt. Außerdem hemmt Valspodar Cytochrom P450 3A4 und dadurch den Metabolismus von Zytostatika wie Paclitaxel und Vinblastin.

Als anderes Beispiel sei hier Dexverapamil zu nennen, welches das R-Enantiomer des Verapamils ist und im Vergleich zu diesem einen um das 200-fache reduzierten Ca-Kanal blockierenden Effekt aufweist. [52]

Zusätzlich zu den zwei oben genannten Verbindungen gehören noch folgende Verbindungen der zweiten Generation an: *trans*- Flupentixol, und Rapamycin. [52]



trans-Flupentixol

MDR-Modulatoren der dritten Generation

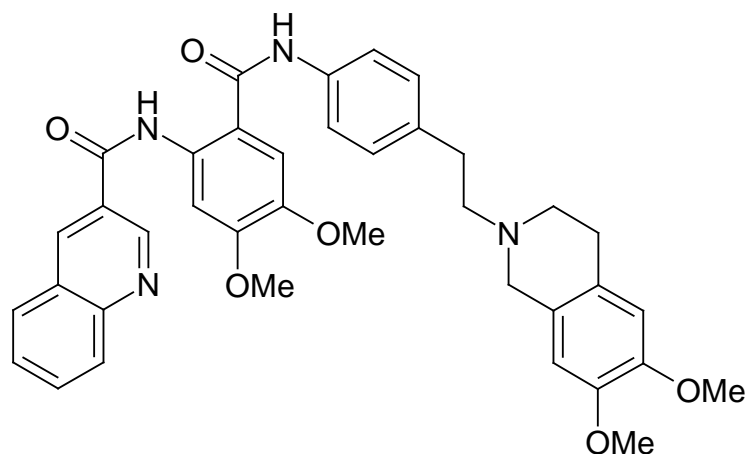
Die MDR-Modulatoren der 3. Generation wurden hergestellt um einen spezifischeren Effekt zu erzielen, um so die Nebenwirkungen zu reduzieren und zugleich die Wirkung zu verstärken.

Diese Verbindungen wurden durch kombinatorische Chemie hergestellt und mittels großer Screenings gefunden. [50]

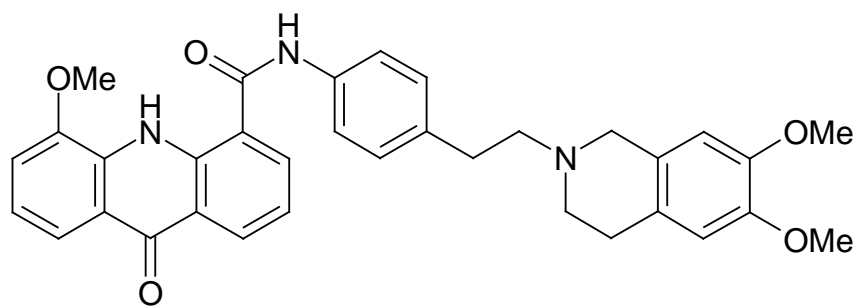
Zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe gehören Elacridar, Laniquidar, Zosuquidar und Tariquidar.

Die Vertreter haben einen gewissen einheitlichen Aufbau. Eine basische Aminogruppe wird benötigt, welche bei physiologischen pH-Wert positiv geladen ist. Mit tertiären Aminen erreicht man bessere Ergebnisse als mit sekundären, aber in den meisten Fällen ist der Stickstoff ein Teil eines heterocyclischen Ringes. Die Amino-Teilstruktur ist über einen sogenannten Linker peptidartig mit einer aromatischen hydrophoben Teilstruktur verbunden. [55]

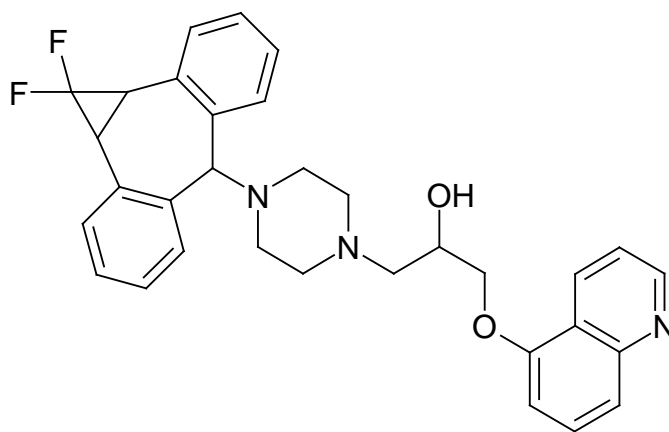
In einem Versuch mit Mäusen, denen Paclitaxel gleichzeitig mit Valspodar, Elacridar oder Tariquidar gegeben wurde, konnte gezeigt werden, daß die Modulatoren der 3. Generation Elacridar und Tariquidar ungefähr 80-mal effektiver sind wie Valspodar. Dafür ist die systemische Toxizität von Zytostatika in Kombination mit Elacridar oder Tariquidar wesentlich geringer als in Kombination mit Valspodar. [55]



Tariquidar



Elacridar



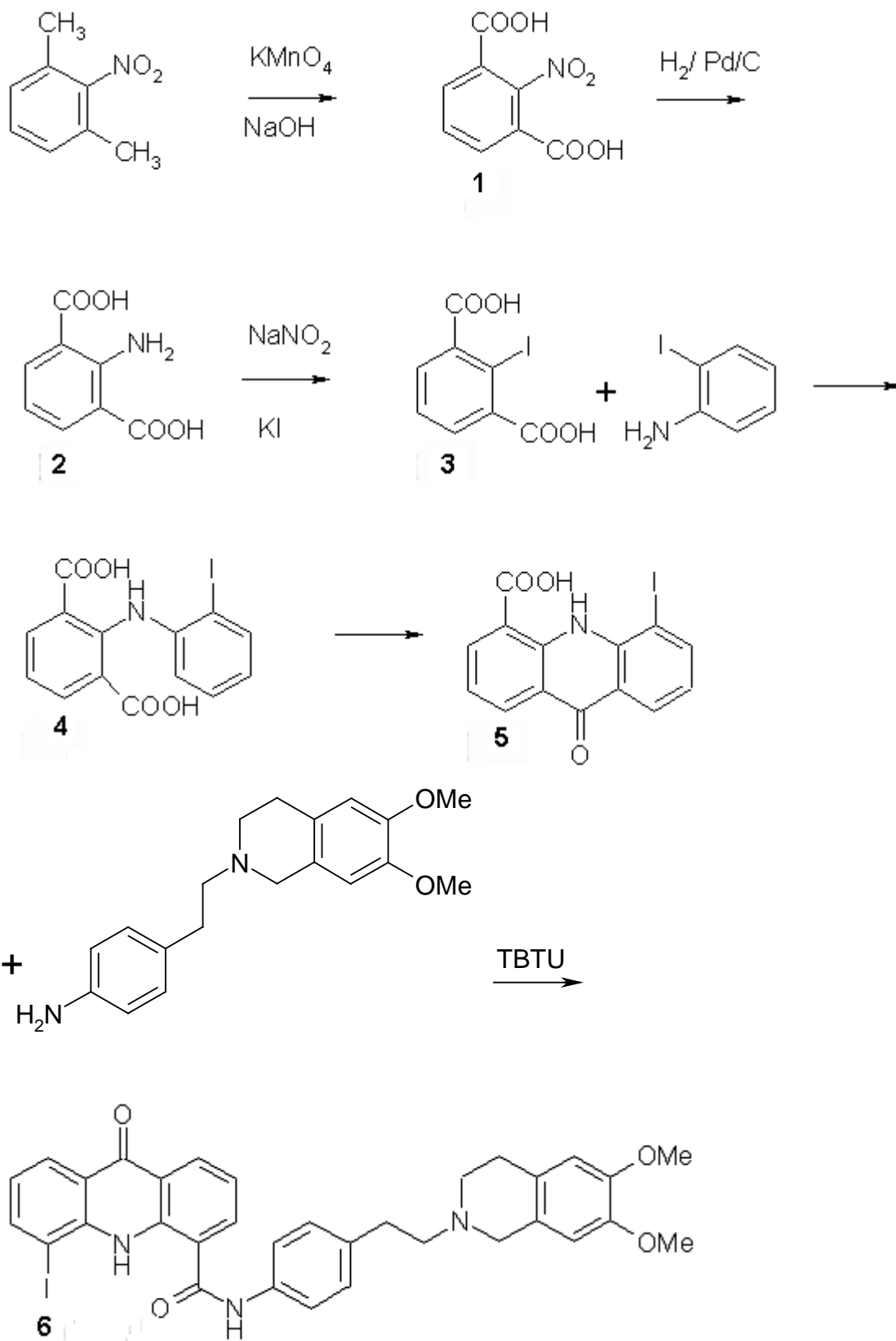
Zosuquidar

2. Problemstellung

Das Ziel der praktischen Arbeit war die Herstellung von 5-Iod-9(10H)-acridon-carbonsäure und die anschließende Kupplung an 4-[2-(6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-ethyl]-phenylamin zum iodierten Derivat von Desmethoxy-Elacridar.

Ausgangsstoff für die Synthese war 1,3-Dimethyl-2-nitrobenzol von dem die beiden Methylgruppen zu Säuren oxidiert werden sollten. Danach sollte die Nitrogruppe zur Aminogruppe reduziert werden. Durch Abspaltung der Aminogruppe und Austausch durch eine Iodgruppe sollte die Kupplung mit 4-Iod-anilin ermöglicht werden. Nun sollte ein Ringschluß erfolgen, durch den das tricyclische Acridin-Grundgerüst erhalten werden sollte. Durch anschließende Anknüpfung an das entsprechende Isochinolin-Derivat sollte das iodierte Elacridar-Derivat gewonnen werden.

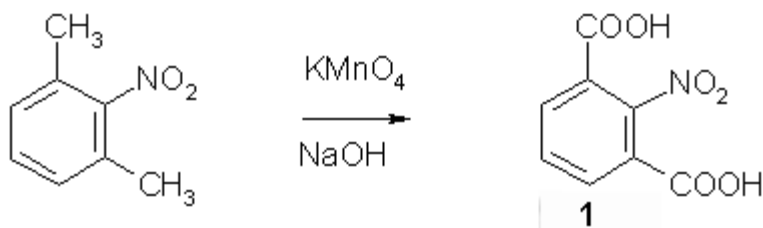
Reaktionsschema:



3. Eigene Untersuchungen

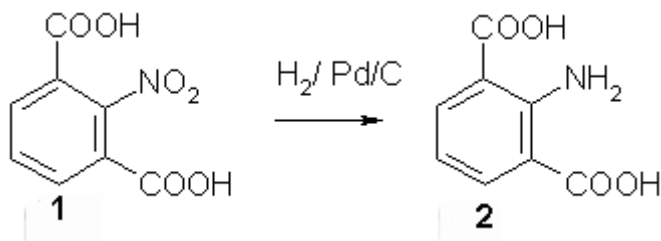
2- Nitroisophthalsäure (1) [56]

1,3 Dimethyl-2-nitrobenzol wurde mit Kaliumpermanganat zu 2-Nitroisophthalsäure (1) umgesetzt.



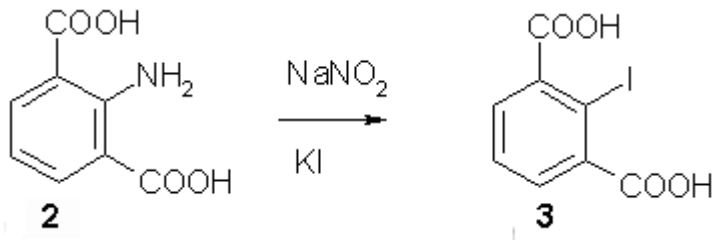
2-Aminoisophthalsäure (2) [57]

2- Nitroisophthalsäure (1) wurde mit Wasserstoff und Palladium/Kohlenstoff als Katalysator zur 2-Aminoisophthalsäure (2) reduziert



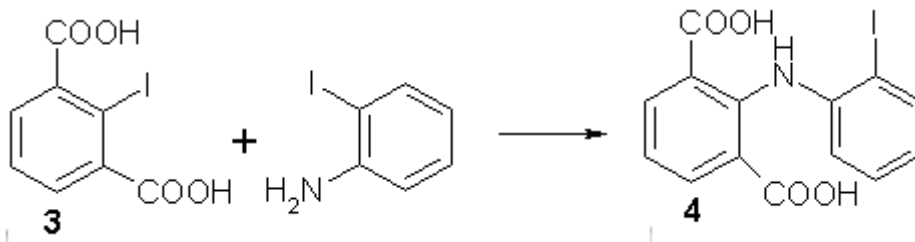
2-Iodisophthalsäure (3) [57]

2-Aminoisophthalsäure (2) wurde mit Natriumnitrit zum entsprechenden Diazoniumsalz umgesetzt. Nach anschließender Abspaltung der Diazoniumgruppe wird mittels KI die 2-Iodisophthalsäure (3) hergestellt.



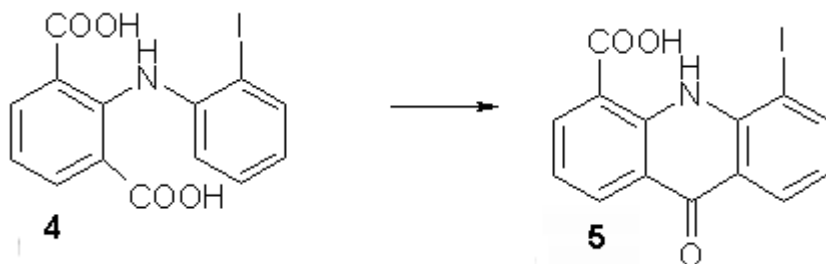
2-(2-Iodanilino)-isophthalsäure (4) [57]

2-Iodisophthalsäure (3) wurde mit 2-Iodanillin unter Erhitzen mit Kupfer(I)-chlorid, 2,3-Butandiol, *N*-Ethylmorpholin und Toluol zur 2-(2-Iodanilino)-isophthalsäure (4) umgesetzt. Diese Kupplung passiert auf dem Prinzip einer Jordan-Ullman-Reaktion.

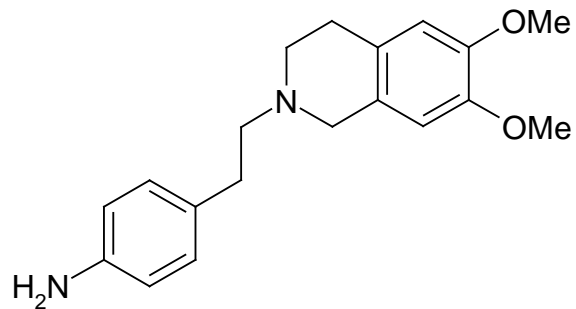


5-Iod-9(10H)-acridoncarbonsäure (5) [57]

2-(2-Iodanilino)isophthalsäure wurde durch Zugabe von Polyphosphorsäure mittels Ringschluß zu 5-Iod-9(10H)-acridoncarbonsäure (5) umgesetzt

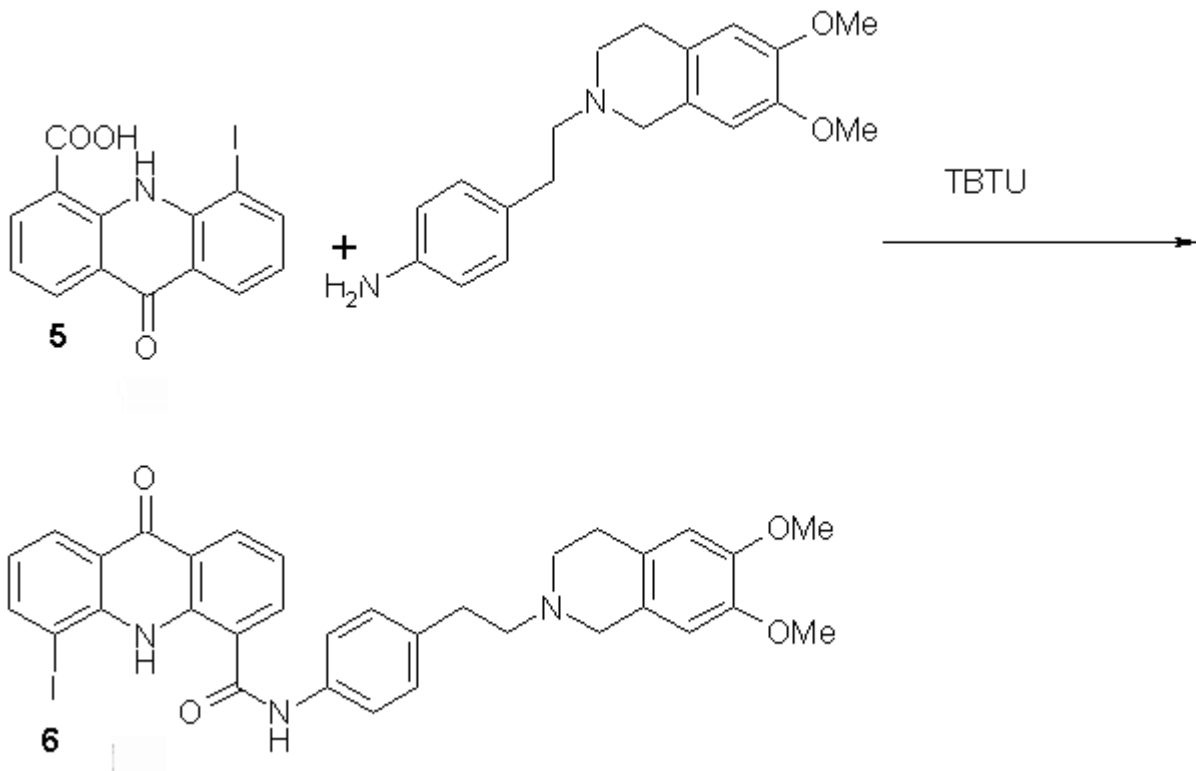


4-[2-(6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)- ethyl]- phenylamin



Diese Verbindung wird durch Kupplung von 4-Nitrophenylethylbromid mit 6,7 Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin Hydrochlorid und anschließender Hydrierung hergestellt.

5-Iod-5-Desmethoxy-elacridar (6)



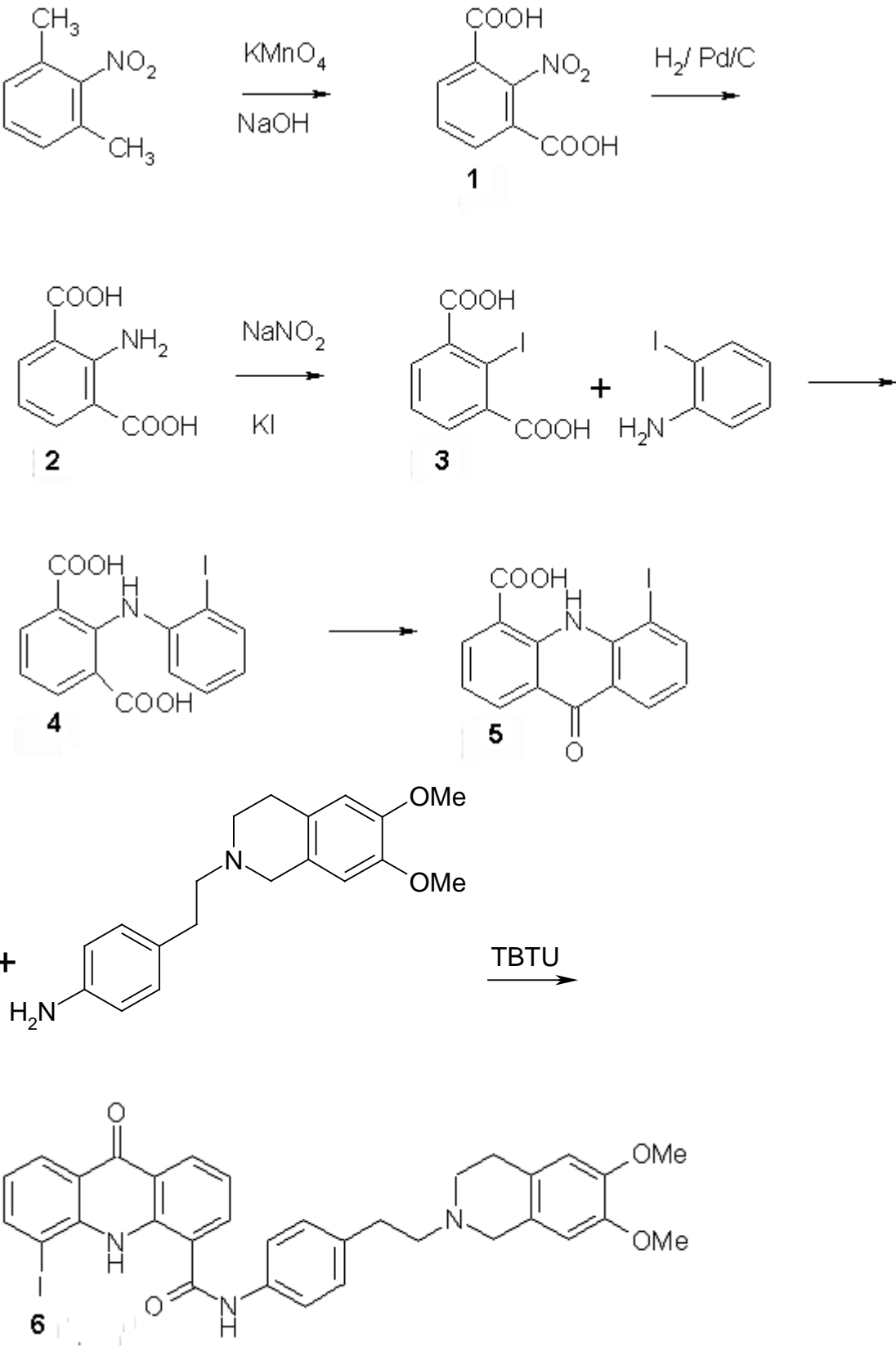
Die Kupplung von 5-Iod-9(10H)-acridoncarbonsäure (**5**) und 4-[2-(6,7- Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)- ethyl]-phenylamin sollte durch Zugabe von TBTU, einem Kupplungsreagens, erfolgen. Durch die Zugabe von TBTU wird die Carboxylgruppe aktiviert und so die Kupplung unter milden Bedingungen ermöglicht. Dann sollte Triethylamin als basische Komponente hinzugefügt werden und im Anschluß mit Wasser ausgefällt werden. Der Niederschlag sollte mit Zuhilfenahme einer Säule und Ethylacetat/Methanol (8/2) als Laufmittel aufgetrennt werden. Durch Abrotieren der gewünschten Fraktion sollte 5-Iod-5-Desmethoxy-elacridar (**6**) erhalten werden. [58]

4. Zusammenfassung/Abstract

Als erstes erfolgte die Oxidation der zwei Methylgruppen von 1,3-Dimethyl-2-nitrobenzol mit Kaliumpermanganat als Oxidans. Die so erhaltene 2-Nitroisophthalsäure wurde mit Wasserstoff und Pd/C als Katalysator zur 2-Aminoisophthalsäure **(2)** hydriert.

Nun erfolgte eine Diazotierung mit Natriumnitrit und eine anschließende Abspaltung der Stickstoffgruppe, welche durch eine Iodgruppe ersetzt wurde. So konnte die 2-Iodisophthalsäure **(3)** gewonnen werden. Anschließend wurde 2-Iodanillin im Zuge einer Jordan-Ullman-Reaktion angehängt und so 2-(2-Iodanilino)-isophthalsäure **(4)** erhalten. Darauf folgte ein Ringschluß der zur 5-Iod-9(10H)-acridoncarbonsäure **(5)** führte. Zum Abschluß hätte noch die Kupplung mit 4-[2-(6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-ethyl]-phenylamin zu 5-Iod-5-Desmethoxy-elacridar **(6)** erfolgen sollen. Diese Verbindung konnte aber nicht gewonnen werden.

Reaktionsschema:



5. Experimenteller Teil

5.1 Verwendete Analysegeräte

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Kofler Heizmikroskop bestimmt.

Zur Aufnahme der $^1\text{H-NMR}$ Spektren diente das Bruker Avance DPx200.

Alle Messungen wurden mit Tetramethylsilan als internen Standard durchgeführt.

Die Massenspektren wurden mit Shimadzu GC/MS QP 1000 bei einer Ionisierungsspannung von 70 eV bzw. mit dem HP-5890 aufgenommen.

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden DC – Alufolien, Kieselgel 60 F254 (Fa. Merck) verwendet.

Die Lösungsmittel wurden mittels Rotovapor unter vermindertem Druck abdestilliert.

2-Nitroisophthalsäure (1) [56]

Die erste Reaktion war die Oxidation von 1,3-Dimethyl-2-nitrobenzol mit Kaliumpermanganat und Natronlauge zu 2-Nitroisophthalsäure. [56]

Arbeitsvorschrift:

6,09 g (152,25 mmol) Natronlauge werden in 360 ml Wasser gelöst und mit 15,1 g (100 mmol) 1,3-Dimethyl-2-nitrobenzol vermischt.

Nun wird gerührt und auf 95°C erhitzt. Dann werden 62,9 g (398 mmol) Kaliumpermanganat in 400 ml Wasser gelöst und portionsweise über 3 Stunden hinweg zugesetzt. [56]

Die sich daraus ergebende Mischung wird für 20 h unter Rückfluß erhitzt. Für die DC Kontrolle wird Toluol/Ethylacetat (8/2) als Laufmittel verwendet. Anschließend wird auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert.

Das Filtrat wird in einem Becherglas gesammelt, auf Eiswasser gestellt und unter Rührung mit Salzsäure angesäuert.

Als Resultat erhält man einen schaumig weißen Niederschlag.

Der Niederschlag wird abgenutscht und mit 40% Ethanol umkristallisiert. [56]

Man erhält 13,5 g (64,0 mmol) gelblich weiße Kristalle.

Ausbeute : 13,5 g (64%)

FP: 312° C

¹H NMR: (DMSO-d₆)

OH ist nicht sichtbar

CH	d, $\delta = 8,20$ ppm	(J = 7,8 Hz)	(2 H)
CH	t, $\delta = 7,82$ ppm	(J = 7,8 Hz)	(1 H)

¹³C NMR: (DMSO-d₆)

COOH	$\delta = 164,2$ ppm
CH	$\delta = 134,6$ ppm
CH	$\delta = 131,2$ ppm
C _{quartär} :	$\delta = 124,8$ ppm

MS

m/z =

211	M ⁺ ; 11,0%
167	49,1%
149	65,9%
135	20,8%
119	51,5%
107	22,2%
91	Benzyl; 100%
74	81,1%
63	75,6%
45	58,0%

2-Aminoisophthalsäure (2) [57]

Der zweite Schritt der Synthese bestand aus der Hydrierung von 2-Nitroisophthalsäure zu 2-Aminoisophthalsäure.

Als Katalysator wurden 10% Pd/C verwendet. [57]

Arbeitsvorschrift:

11 g 2-Nitroisophthalsäure (52,1 mmol) werden in einem Einhalskolben langsam mit Methanol versetzt sodaß sie gerade gelöst sind. Vor der Hydrierung werden 1,1 g Pd/C als Katalysator beigelegt.

Dann wird an die Apparatur angeschlossen und unter Sauerstoffausschluß wird Wasserstoff eingeleitet. [57]

Während der Hydrierung, die ungefähr 24 Stunden dauert, fällt ein hoher Prozentsatz aus und bindet an den Katalysator.

Es wird eine DC Kontrolle mit Toluol//Ethylacetat als Laufmittel (6/4) durchgeführt.

Nach der Hydrierung wird abfiltriert und das Methanol wird abrotiert.

Nun wird der im Filter verbleibende Katalysator in DMF gelöst. Es wird filtriert, die Lösung mit großen Mengen Wasser versetzt und 2-Aminoisophthalsäure als gelbe Substanz ausgefällt. [57]

Die Produkte werden vereint und mit 70% Alkohol umkristallisiert. Man erhält 9,0 g (49,7 mmol) gelbe pulvrige Kristalle.

Ausbeute	= 9,0 g	(95%)
FP	= 270° C	

¹H -NMR: (DMSO-d₆)

COOH:	breit s, $\delta =$	12,63 ppm	2H	
CH:	d, $\delta =$	8,01 ppm	2H	(J = 7,8 Hz)
CH:	t, $\delta =$	6,59 ppm	1H	(J = 7,8 Hz)
NH ₂	breit, s, $\delta =$	3,44 ppm	2H	

¹³C -NMR: (DMSO- d₆)

COOH:	$\delta =$	169,3 ppm
C _{quartär} :	$\delta =$	152,9 ppm
CH	$\delta =$	137,4 ppm
CH	$\delta =$	113,4 ppm
C _{quartär}	$\delta =$	111,7 ppm

MS:

m/z =

181	M+ ; 21,4%
163	M+ -H ₂ O; 8,2%
119	100%
91	Benzyl ; 54,3%
63	26,3%
45	19,8%

2-Iodisophthalsäure (3) [57]

Beim dritten Schritt wurde die Aminogruppe von 2-Aminoisophthalsäure in eine Diazoniumgruppe umgewandelt. Anschließend wurde die Diazogruppe abgespalten und durch eine Iodgruppe ersetzt. [57]

Arbeitsvorschrift:

In einem Dreihalskolben wird zu einer Lösung von 8 Gramm (44,2 mmol) 2-Aminoisophthalsäure in 40 ml konzentrierter Schwefelsäure bei 0-5°C, unter Kühlung mit Eiswasser und ständiger Rührung eine Lösung von 4,5 g (65,3 mmol) Natriumnitrit in 40 ml Schwefelsäure zugegeben (wobei auch bei der Zugabe die Temperatur ständig kontrolliert wird). [57]

Die sich daraus ergebende Lösung wird gerührt und weiterhin gekühlt. Zu dieser Lösung werden 80 ml 85 % Polyphosphorsäure unter ständiger Kontrolle ganz langsam zugetropft, sodass die Reaktionstemperatur 10°C nicht überschreitet. Nach Vollendung der Zugabe wird weitere 2 Stunden gerührt.

Anschließend werden 4,8 g (80 mmol) Harnstoff zugesetzt und es wird weitere 5 Minuten gerührt.

Dann wird auf 145 g Eis gegossen und 14,4 g (86,7 mmol) Kaliumiodid werden langsam zugesetzt. Es wird weitere 10 Minuten unter Kühlung gerührt.

Nun wird auf 100°C für 30 Minuten erwärmt und anschließend wieder auf 5°C heruntergekühlt.

Der Feststoff wird durch abnutschen gesammelt. Im Anschluß wird mit 10% Natriumpyrosulfitlösung und Wasser gewaschen. Es wird mit 20% EtOH umkristallisiert, abgenutscht und im Exsikkator getrocknet. [57]

Man erhält 4,2 g (14,4 mmol) gelbe Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 241°C.

Ausbeute: 4,2 g (33%)

FP: 241°C

¹H -NMR: (DMSO- d₆)COOH : breit s, δ = 12,63 ppm 2 HCH : m, δ = 7,79 – 7,51 ppm 3 H**¹³C -NMR: (DMSO-d₆)**COOH : δ = 169,3 ppmC_{quartär}: δ = 141,2 ppmCH : δ = 129,6 ppmCH : δ = 128,2 ppmC_{quartär}: δ = 91,1 ppm**MS:**

m/z =

292	M+ 100,0%
275	62,9%
147	14,2%
127	19,8%
119	18,7%
92	42,5%
74	45,0%
63	38,2%
50	29,1%

2-(2-Iodanilino)-isophthalsäure (4) [57]

Bei diesem Schritt wird die 2-Iodisophthalsäure mittels Aktivierung durch Kupferbromid an 2-Iodanilin angeknüpft sodaß man 2-(2-Iodanilino)-isophthalsäure erhält. [57]

Arbeitsvorschrift

In einem Dreihalskolben wird eine Mischung von 1,5g 2-Iodisophthalsäure (5.1 mmol), 1,69 g (7.7 mmol) 2-Iodanilin, 0,75 g Kupfer(I)bromid (5,2 mmol), 6 ml 2,3-Butanediol und 5 ml Toluol unter Rückfluß auf 100° C erhitzt. [57]

Sobald die Temperatur erreicht ist werden 3 ml *N*-Ethylmorpholin zugesetzt. Danach wird eine weitere Stunde bei 120° C unter Rückfluß gekocht.

Es wird abgekühlt und mit 25 ml 0,5 molarer Ammoniaklösung verdünnt. Im Anschluß wird filtriert und die dunkelfarbige Lösung wird mit 2 N HCl angesäuert. Danach wird mit Ethylacetat ausgeschüttelt.

Die organische Phase wird mit 50 ml einer 0,5 molaren Ammoniaklösung ausgeschüttelt.

Nun wird die wäßrige Phase mit konzentrierter Salzsäure angesäuert. Man erhält ein braunes Öl, welches über Nacht im Kühlschrank dunkle Kristalle bildet.

Das Produkt wird abfiltriert, mit heißem Wasser gewaschen und getrocknet.

Danach wird es mit 20% Ethanol umkristallisiert. [57]

Man erhält 1,6 g (4,2 mmol) 2-(2-Iodanilino)-isophthalsäure in Form von braunen Kristallen die bei 243° Celsius schmelzen.

Ausbeute: 1,6 g (81%)

FP: 243

¹H NMR: (DMSO-d6)

COOH: breit	s, δ =	13,1 ppm	2H
NH:	s, δ =	9,6 ppm	1H
CH :	d, δ =	8,0 ppm	3H
CH:	m, δ =	7,1 ppm	2H
CH	m, δ =	6,8 ppm	2H

¹³C- NMR: (DMSO-d6)

COOH:	δ =	168,4 ppm
C _{quartär}	δ =	144,7 ppm
C _{quartär}	δ =	143,7 ppm
CH	δ =	142,3 ppm
CH	δ =	135,2 ppm
CH	δ =	128,6 ppm
CH	δ =	123,6 ppm
C _{quartär}	δ =	120,9 ppm
CH	δ =	119,7 ppm
C-H	δ =	115,9 ppm

MS:

383	M+; 51%
256	38%
238	30%
194	100%
166	45%
139	34%
119	26%

5-Iod-9(10H)-acridoncarbonsäure (5) [57]

Bei dieser Reaktion wurde 2-(2-Iodanilino)-isophthalsäure durch einen Ringschluß zu 5-Iod-9(10H)-acridoncarbonsäure (5)

Durch Zugabe von Polyphosphorsäure und anschließendem kochen kommt es hier zur Abspaltung von Wasser.

Arbeitsvorschrift:

1,6 g (4,2 mmol) 2-(2-Iodanilino)-isophthalsäure werden in 31,5 g Polyphosphorsäure bei 120° C gelöst und weitere 1-2 Stunden unter Rühren bei selbiger Temperatur erhitzt.

Im Anschluß wird in 100ml kochendes Wasser gegossen. Der gelbe Niederschlag wird mittels Vakuum-Filtration gesammelt und in einer Mischung aus gleichen Teilen Methanol und 1 normaler Natronlauge gelöst.

Nun wird die heiße Lösung abfiltriert und mit konzentriertem Eisessig angesäuert. Im Anschluß wird die Lösung in den Kühlschrank gestellt, über Nacht stehen gelassen und die Kristalle mittels Vakuumfiltration gesammelt. Es wird mit Methanol umkristallisiert. [57]

Man erhält 950 mg (2,6 mmol) 5-Iodo-9-oxo-9,10-dihydro-4-acridincarbonsäure als leuchtend gelbe Kristalle.

Ausbeute: 950 mg (62%)
FP: >300° C

¹H NMR: (DMSO-d₆)

COOH	: s,	δ = 15,70	ppm	1 H	
CH	: m,	δ = 8,46-8,35	ppm	1 H	
CH	: m,	δ = 8,34-8,20	ppm	3 H	
CH	: t	δ = 8,27	ppm	1 H	(J=7,8Hz)
CH	: t	δ = 8,03	ppm	1 H	(J=7,8Hz)
NH	: breit, s	δ = 3,54	ppm	1 H	

¹³C- NMR:

CO	δ= 172,1	ppm
COOH	δ= 169,0	ppm
C _{quartär}	δ= 143,5	ppm
C _{quartär}	δ= 142,1	ppm
CH	δ= 141,4	ppm
CH	δ= 135,9	ppm
CH	δ = 128,0	ppm
CH	δ = 126,6	ppm
CH	δ = 122,3	ppm
C _{quartär}	δ= 121,2	ppm
C _{quartär}	δ = 120,6	ppm
CH	δ = 120,4	ppm
CH	δ = 87,2	ppm

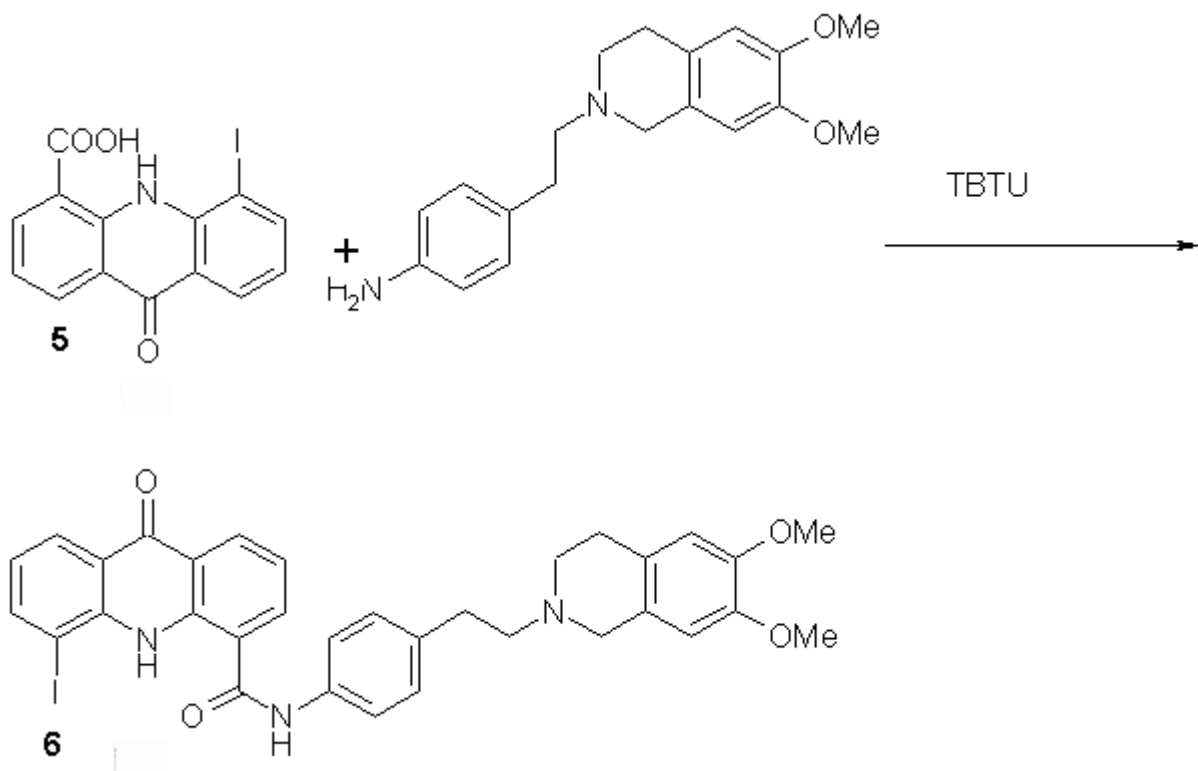
MS:

364,5 M⁺; 100%,

5-Iod-5-Desmethoxy-elacridar (6)

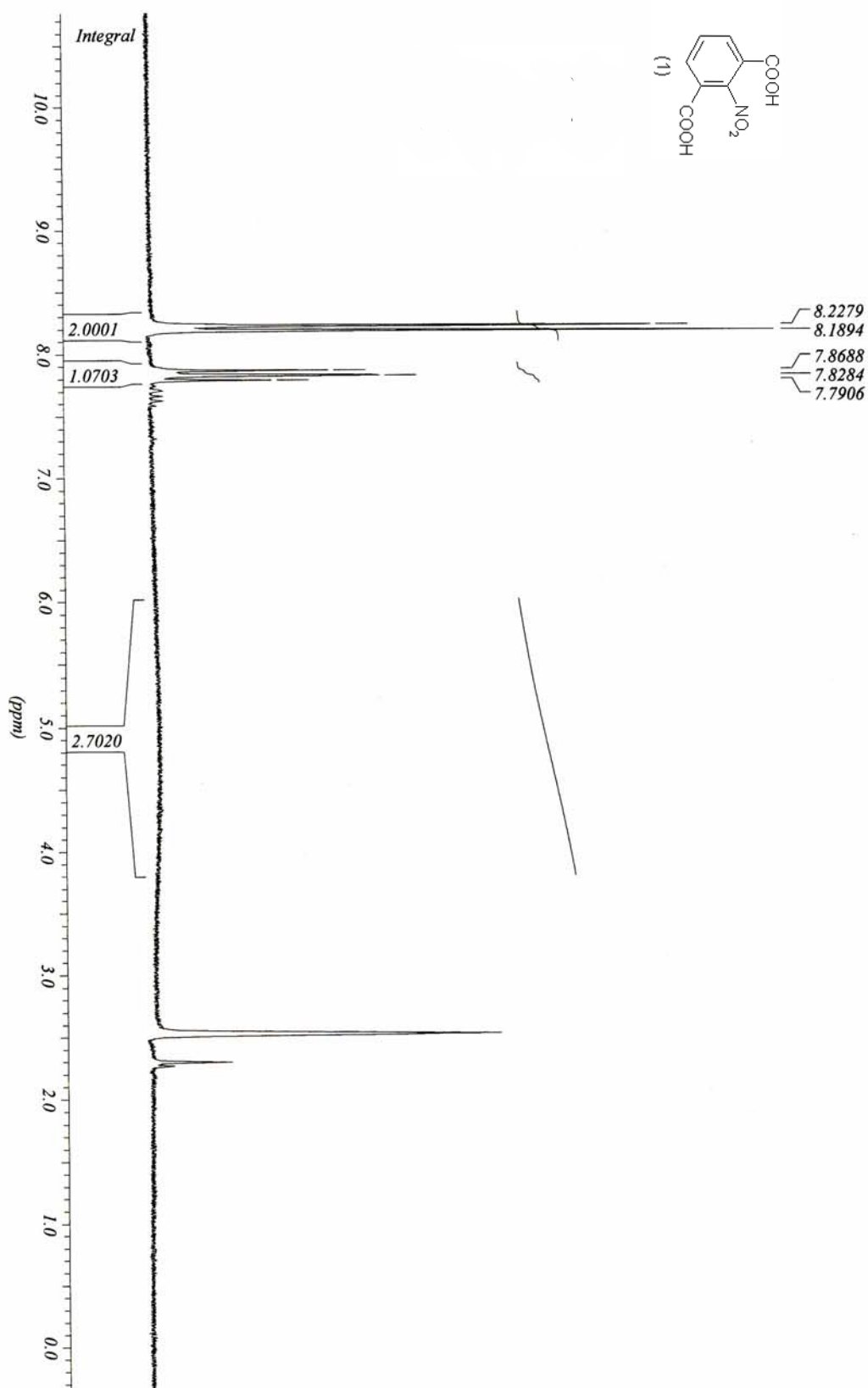
Bei diesem Schritt ging es darum 4-[2-(6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl)-ethyl]-phenylamin an 5-Iod-9(10H)-acridoncarbonsäure (**5**) zu binden. Dabei wurde TBTU als Kupplungsreagens verwendet. [58]

Es war nicht möglich die gewünschte Substanz zu erhalten.

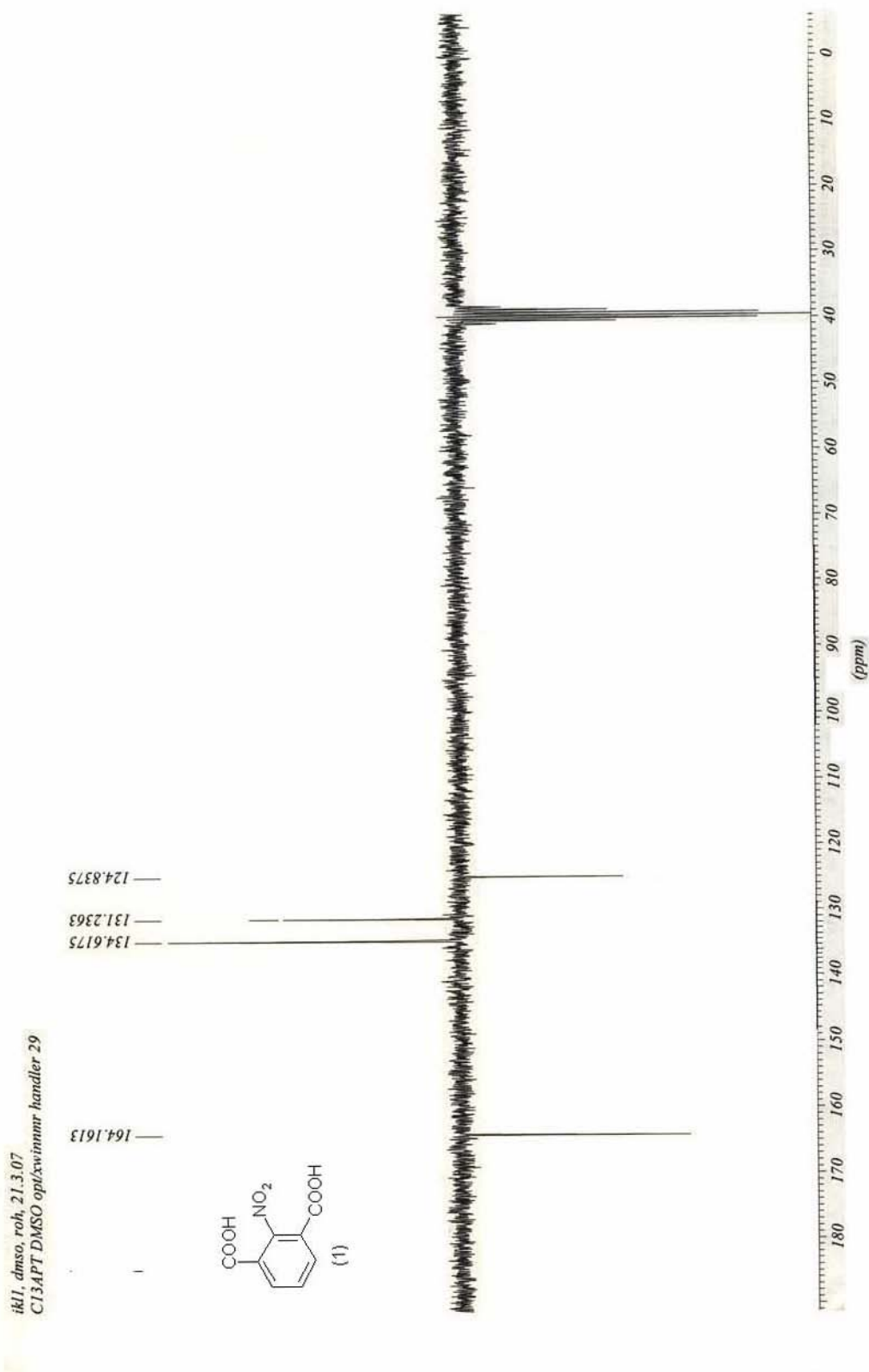


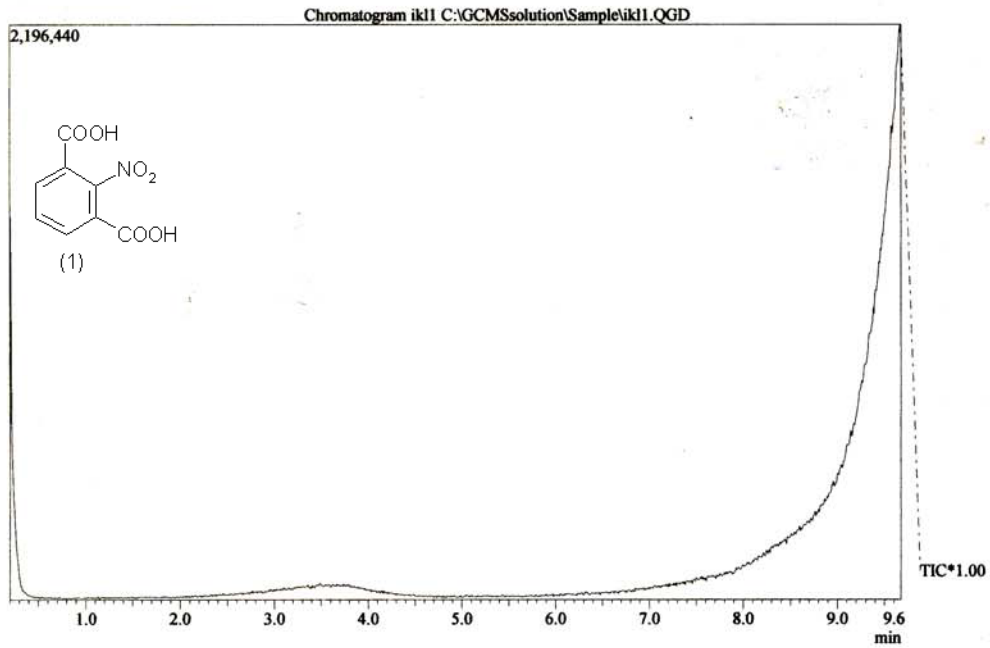
6. Spektren

IKL1: ¹H NMR



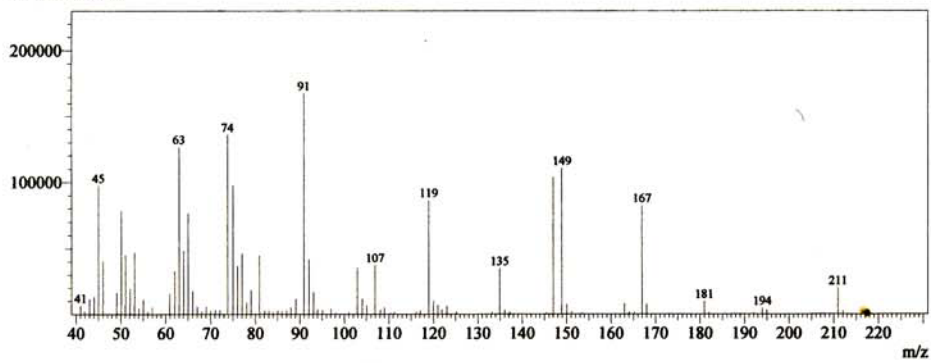
IKL1 ¹³C NMR



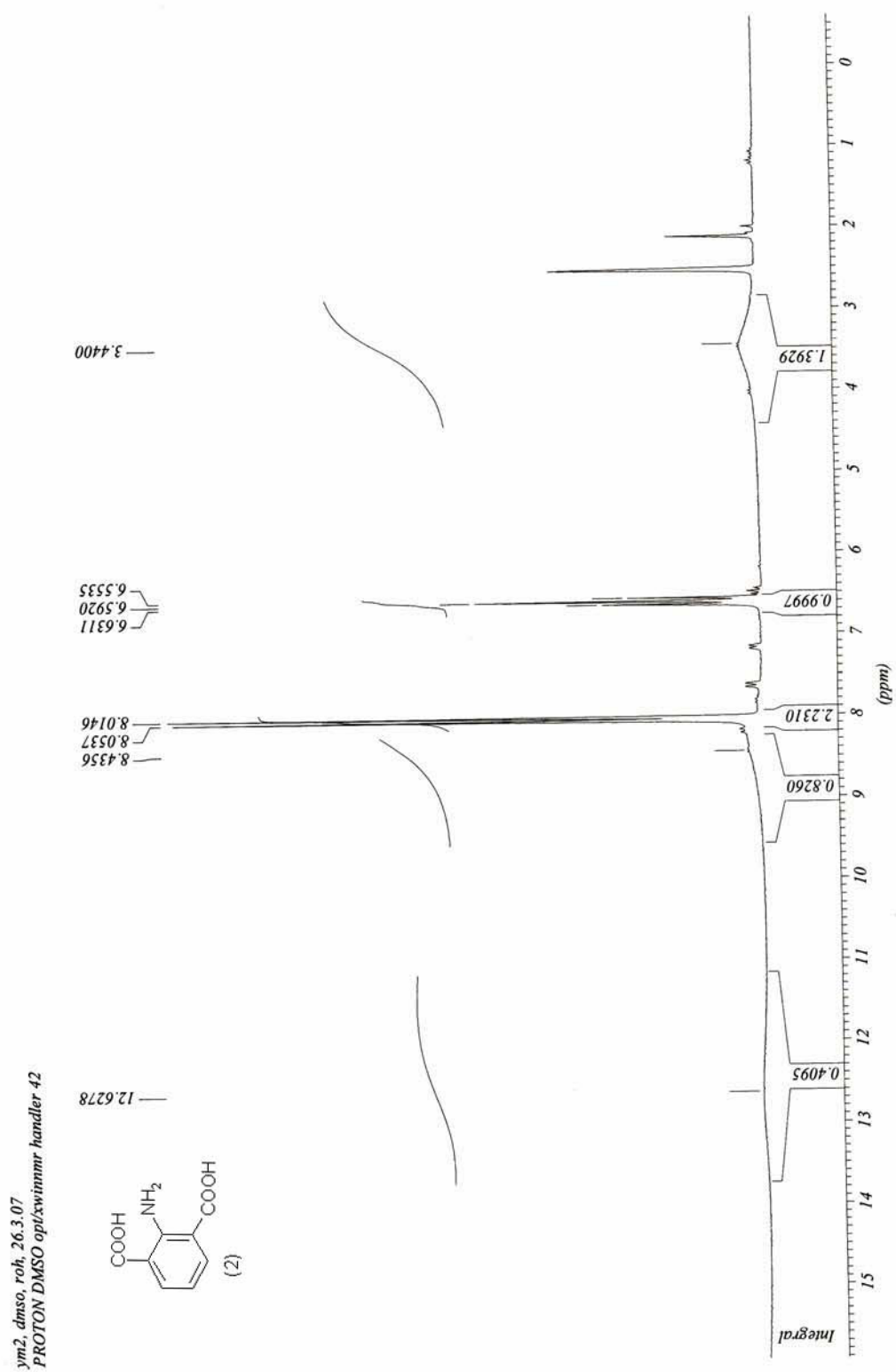


Spectrum

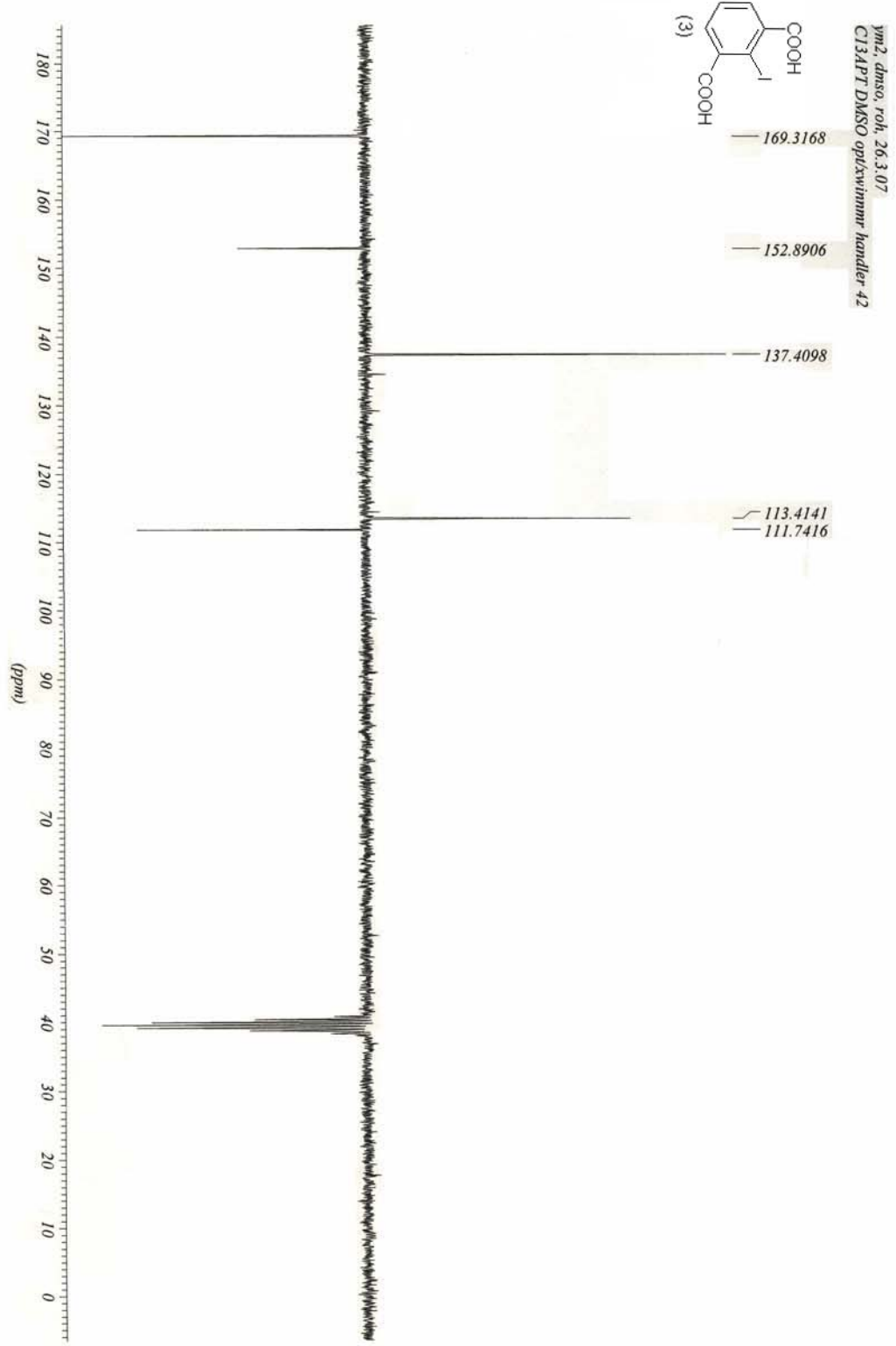
Line#:1 R.Time:9.658(Scan#:1136)
MassPeaks:88 BasePeak:90.95(167597)
RawMode:Single 9.658(1136)
BG Mode:None



IKL2: ¹H NMR



IKL2: ¹³C NMR:

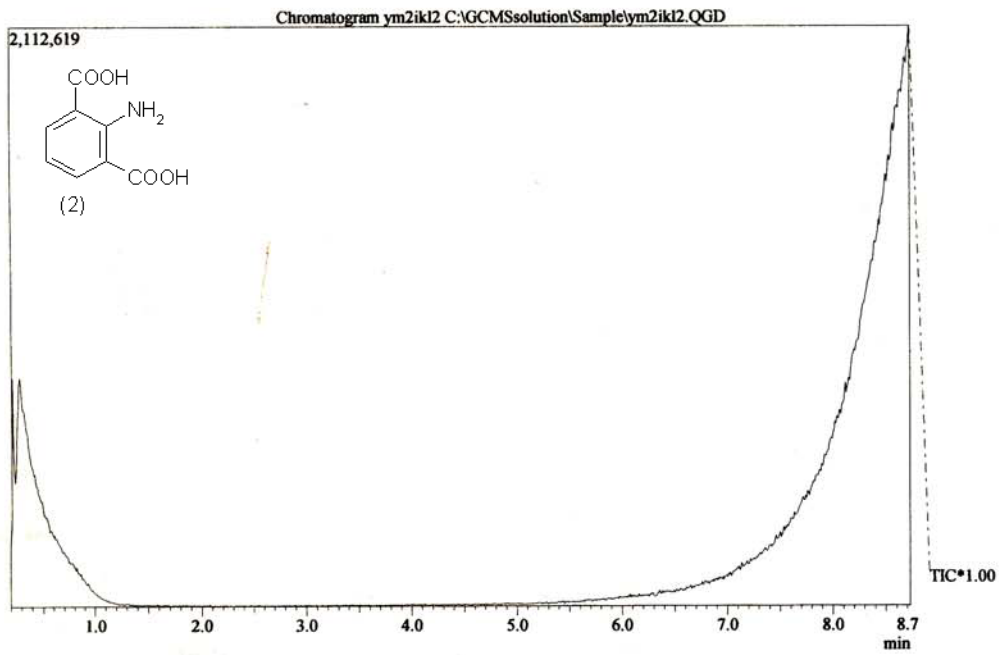


IKL2: MS:

M2/IKL2

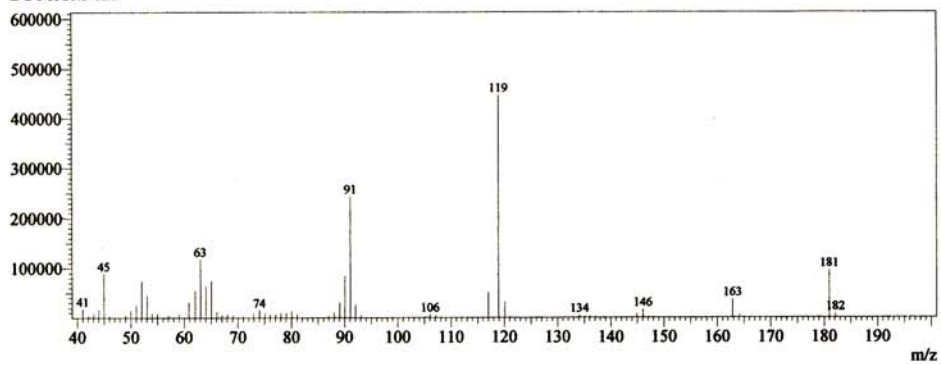
6.11. 2007

Leo, 165°C

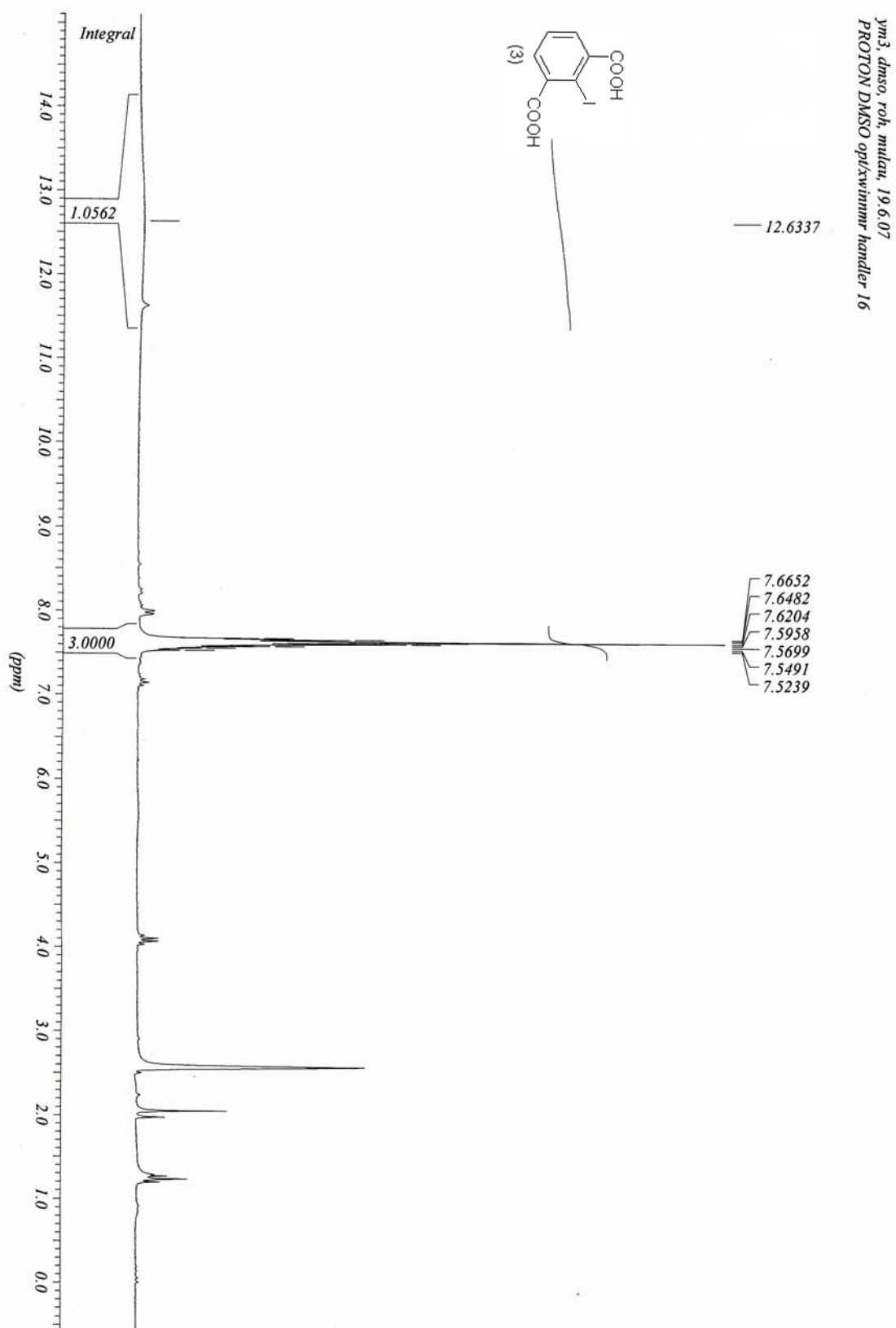


Spectrum

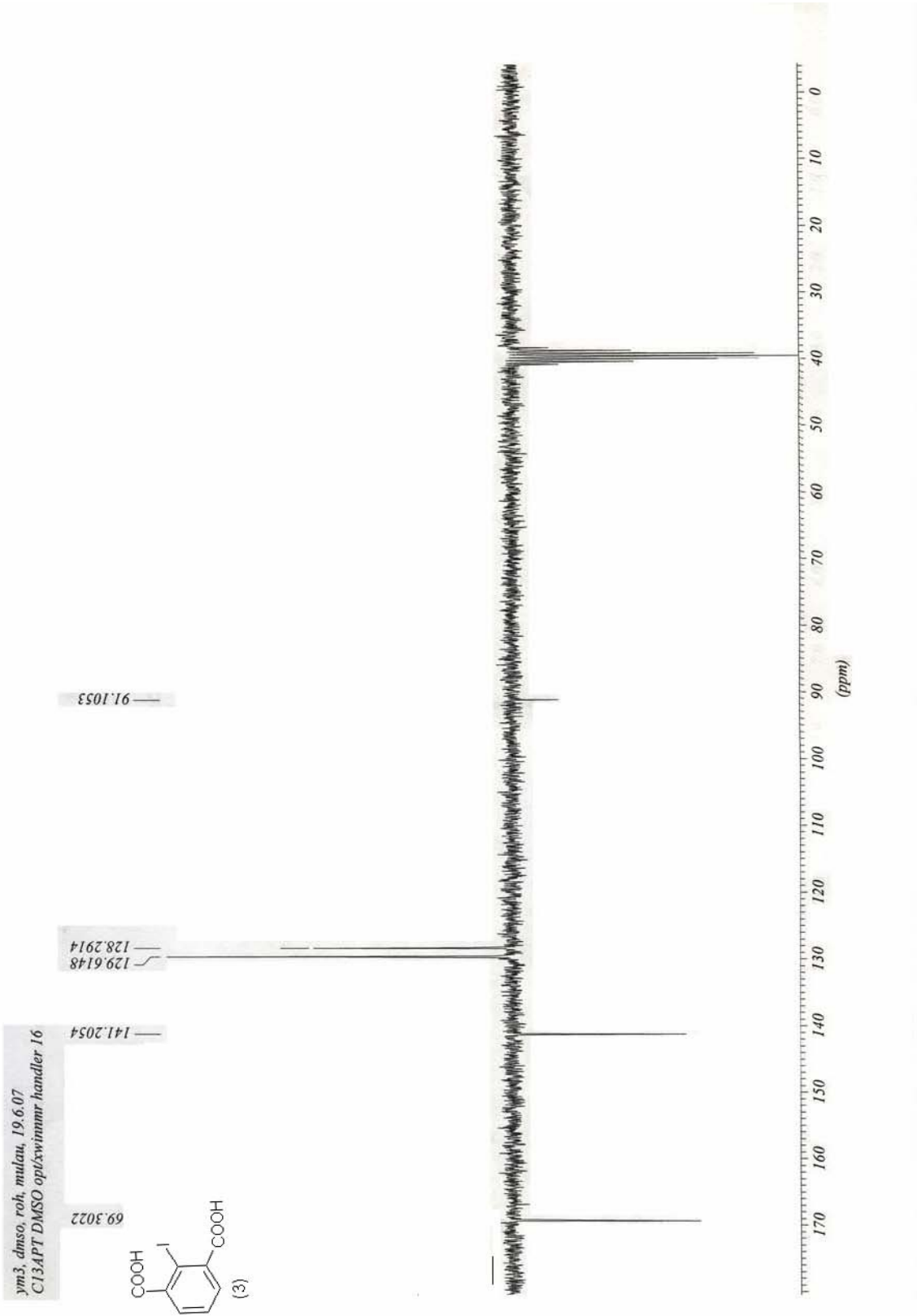
Line#:1 R.Time:8.717(Scan#:1023)
MassPeaks:59 BasePeak:118.90(447480)
RawMode:Single 8.717(1023)
BG Mode:None



IKL3: ¹H NMR:



IKL3: ¹³C NMR

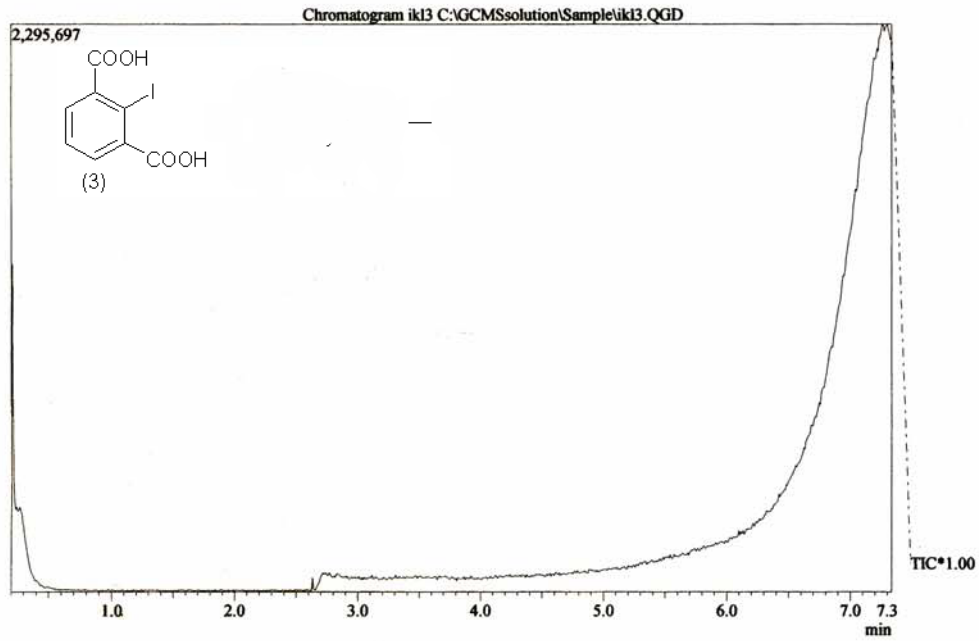


IKL3: MS:

IKL3/YM3

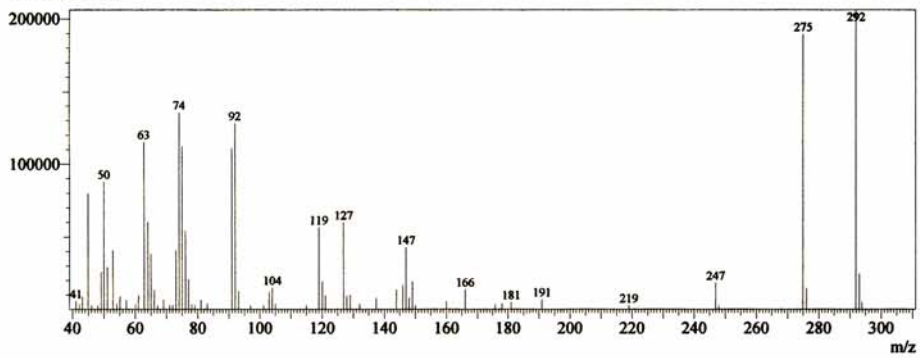
11.10. 2007

Leo, 145°C

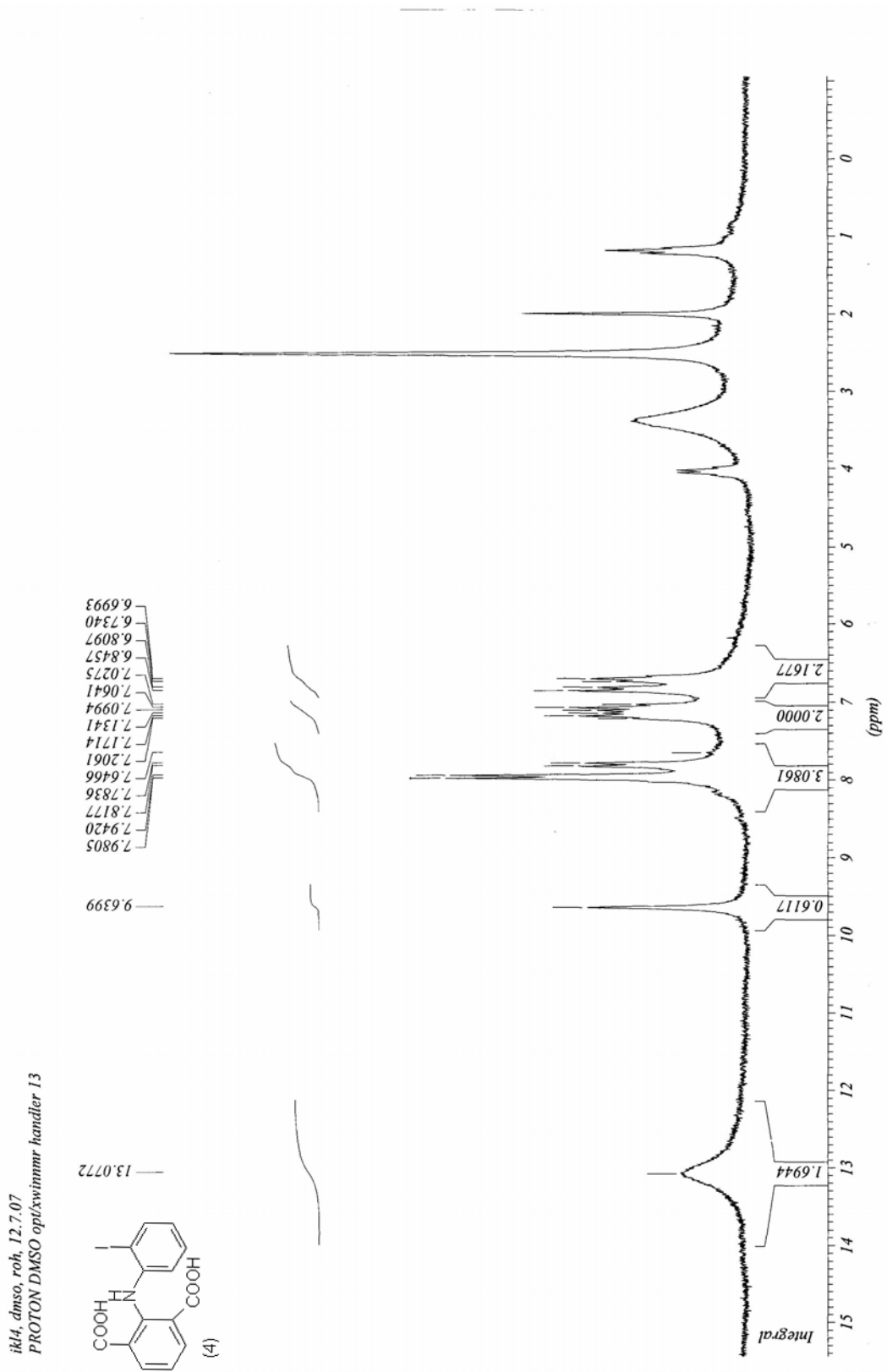


Spectrum

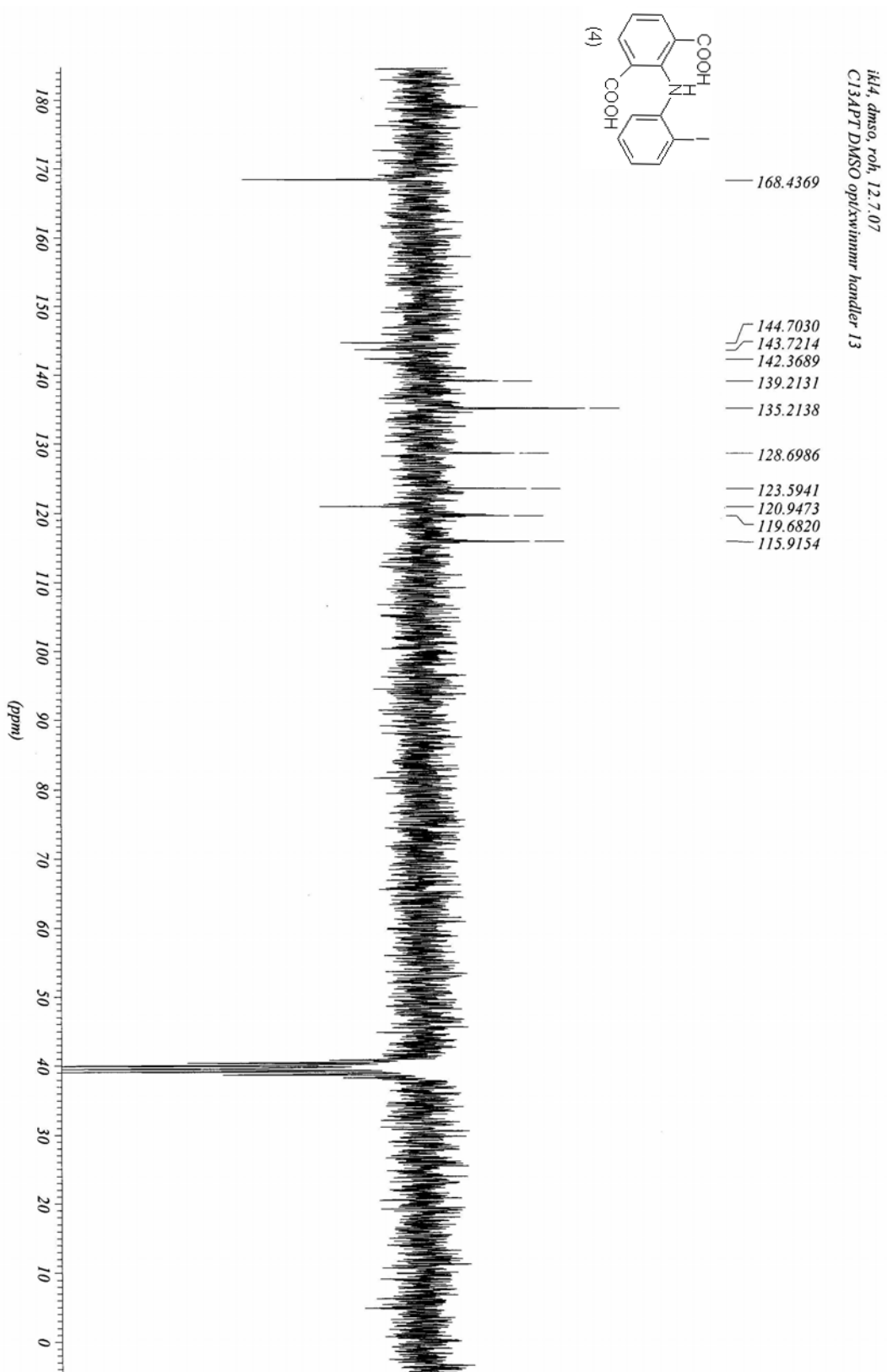
Line#:1 R.Time:7.308(Scan#:854)
MassPeaks:69 BasePeak:291.90(300995)
RawMode:Single 7.308(854)
BG Mode:None



IKL4: ¹H NMR:



IKL4: ^{13}C NMR

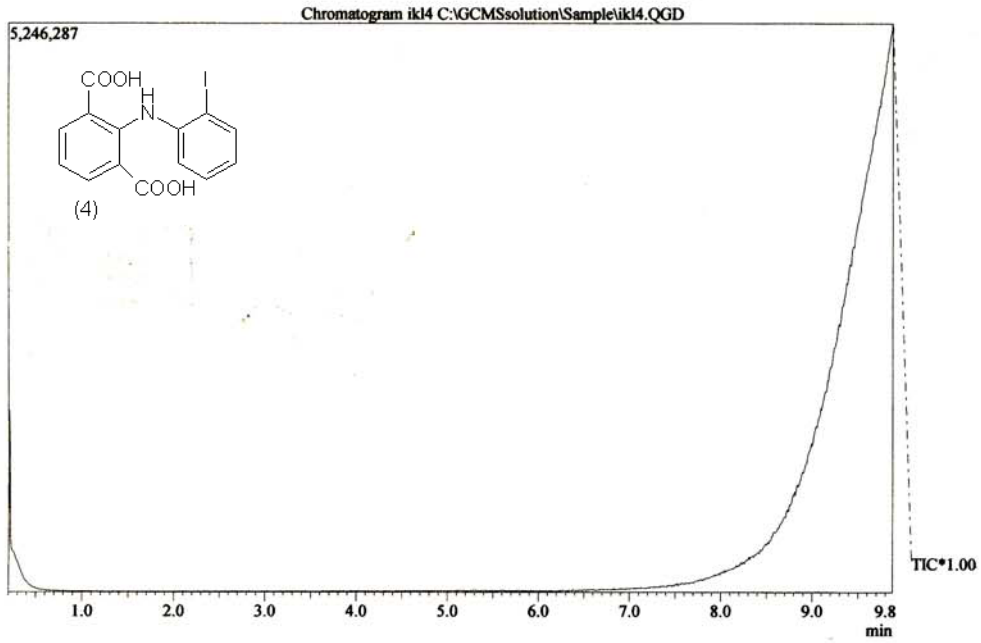


IKL4: MS:

IKL4

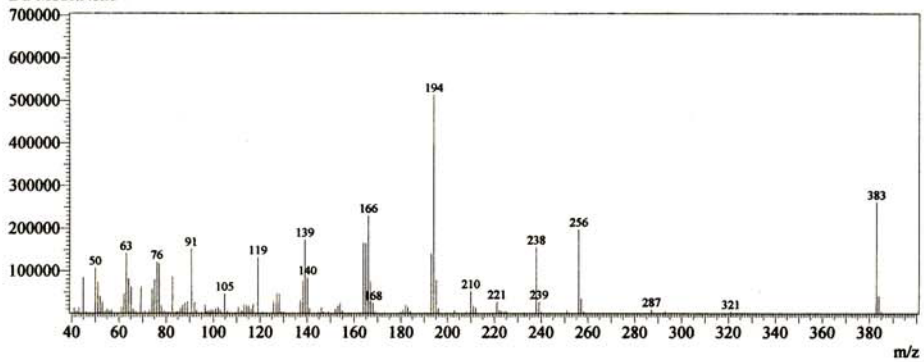
11.10.2007

Leo, 205°C

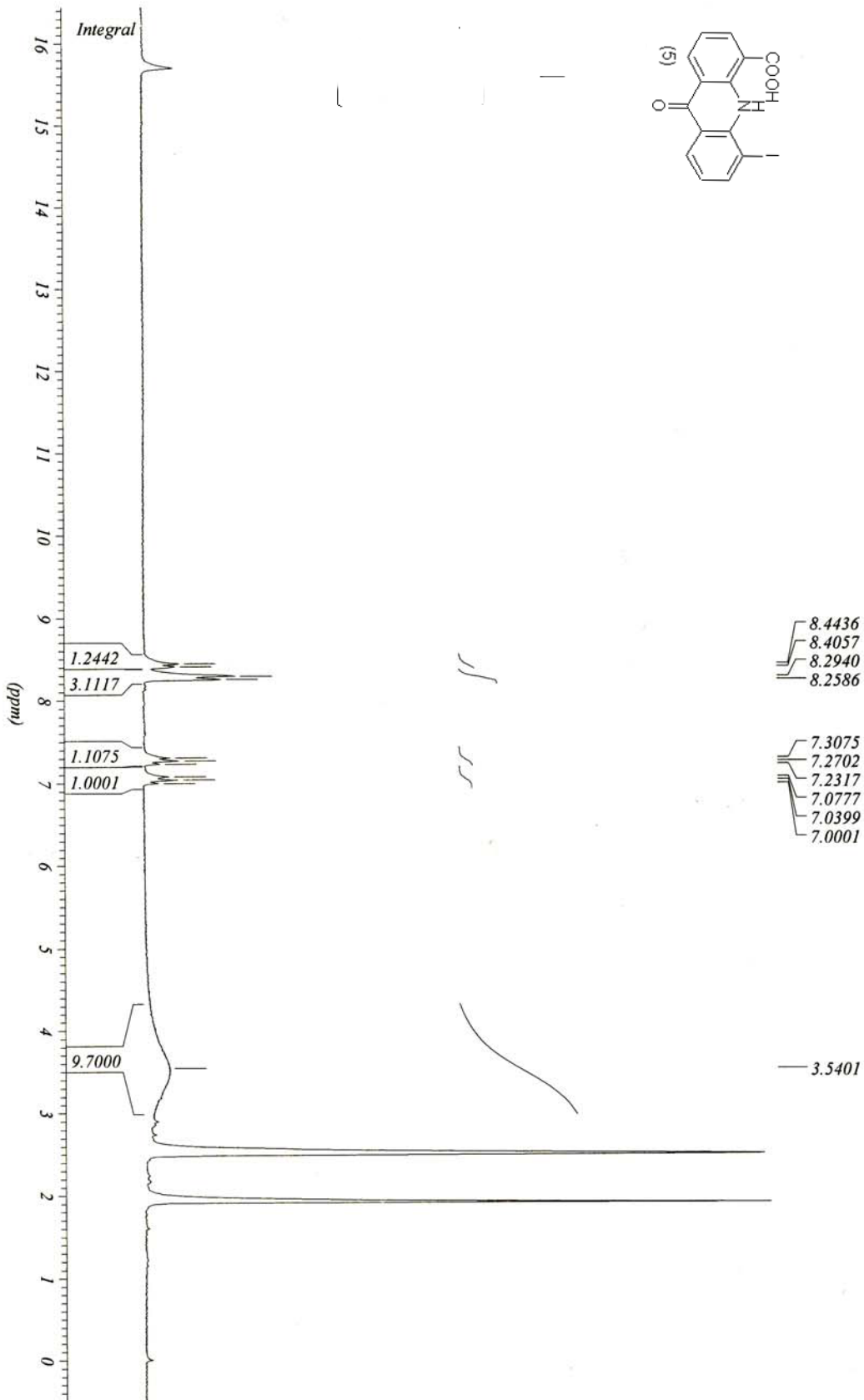


Spectrum

Line#:1 R.Time:9.858(Scan#:1160)
MassPeaks:117 BasePeak:194.05(514400)
RawMode:Single 9.858(1160)
BG Mode:None

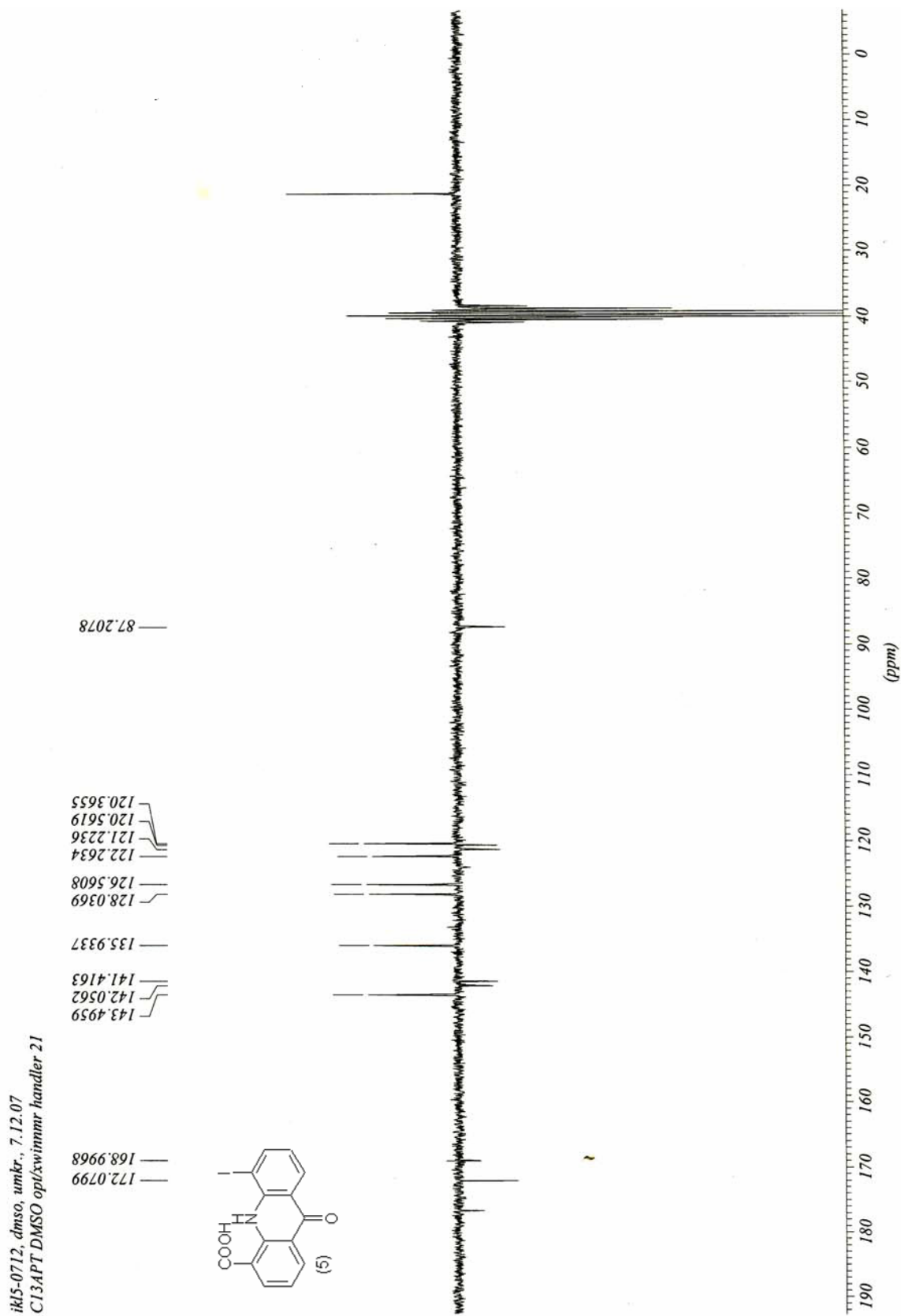


IKL5: ¹H NMR:



IKL5-0712, dmsd, umkr., 7.12.07
PROTON DMSO oploswinnmr handler 3

IKL5: ¹³C NMR:



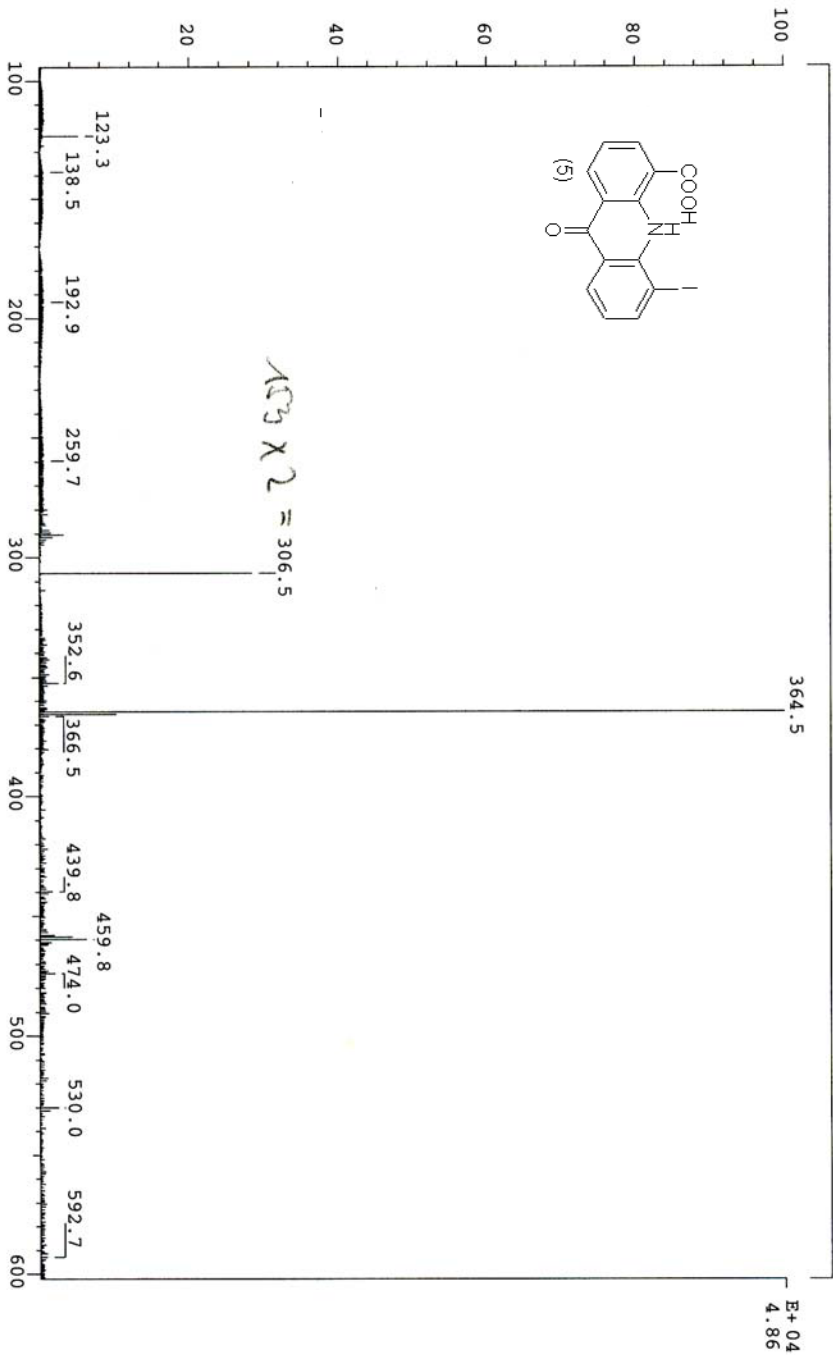
IKL5 MS:

SPEC: 32725_3
Samp: IKL5
Comm: 20KV 2uA NBA
Mode: FAB -VE -LMR BSCAN (EXP) UP LR NRM
Oper: phu Client: Medpharm.Chem/Erker
Base: 364.5 Inlet: 48598
Norm: 364.5 RIC : 475082
Peak: 1000.00 mmu

31-Oct-95 Elapse: 05:03.5 22
Start : 17:06:55 29

Study : FAB neg
Inlet :
Masses: 45 > 800
#peaks: 2138

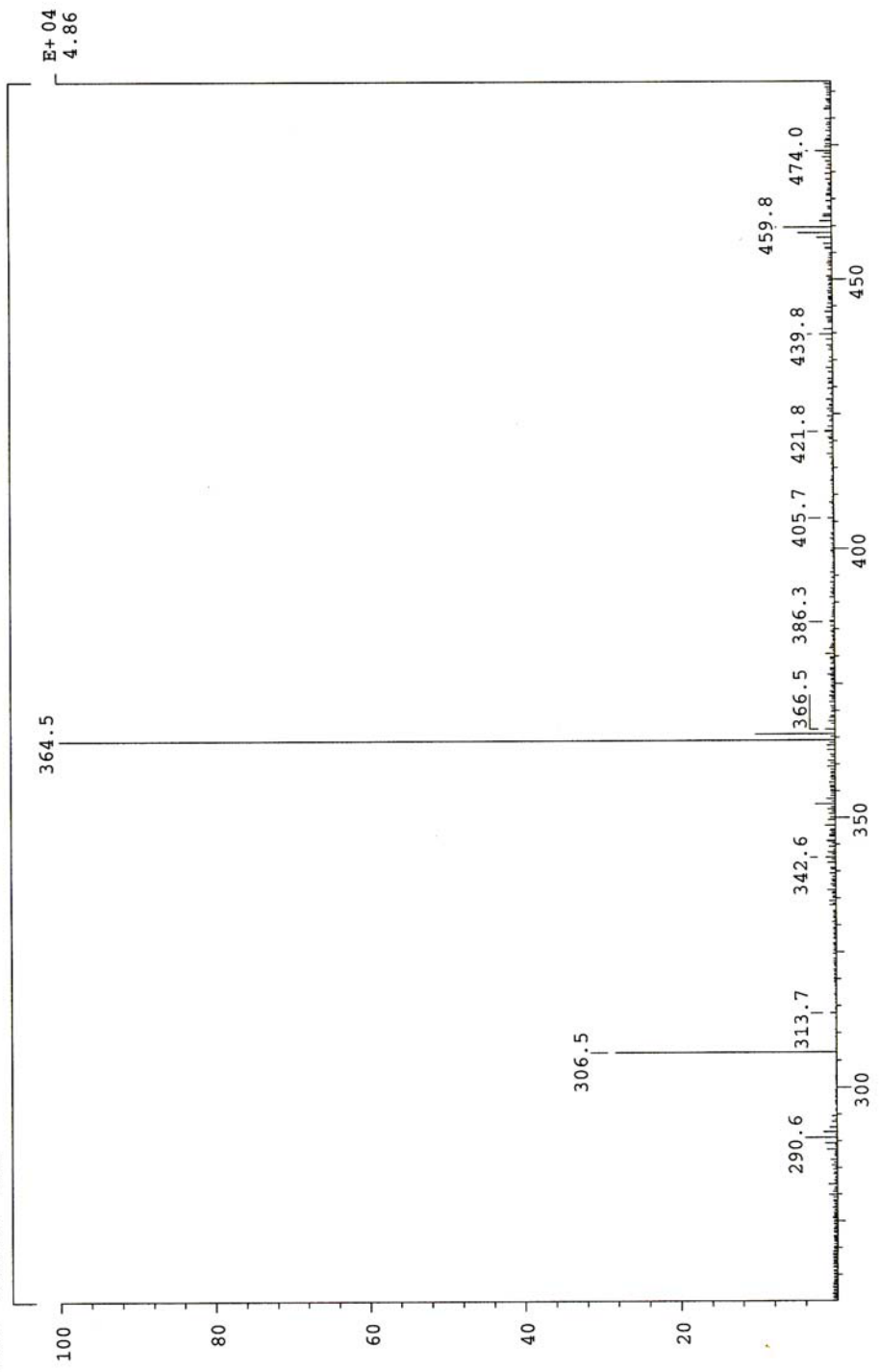
*Matrix: Nitrobenzylalcohol
Mn: KCl*



SPEC: 32725_3
 Samp: IKL5
 Comm: 20KV 2uA NBA
 Mode: FAB -VE -LMR BSCAN (EXP) UP LR NRM
 Oper: phu
 Base: 364.5
 Norm: 364.5
 Peak: 1000.00 mmu

31-Oct-95 Elapse: 05:03.5 22
 Start : 17:06:55 29

Study : FAB neg
 Inlet :
 Masses: 45 > 800
 #peaks: 2138



7. Quellenverzeichnis/ Literaturliste:

- [1] Lee, C. H. Reverting Agents for ATP Binding Casette (ABC) Transporters: Application in Modulating Multi Drug Resistance (MDR). *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, 2004/4, 43 -52
- [2] Werner Risau,* Britta Engelhardt,* and Hartmut Wekerl , Immune Function of the Blood-Brain Barrier: Incomplete Presentation of Protein (Auto-)Antigens by Rat Brain Microvascular Endothelium In Vitro, In: *The Journal of Cell Biology*, 1990/10, 1757–1766
- [3] Sabine Wolf, Bernhard Seehaus, Klaus Minol und Hans Günter Gassen , Zeitschrift: *Naturwissenschaften* , Springer Berlin , 83, Juli 1996/7, 302–311
- [4] S. Ohtsuki: New aspects of the blood-brain barrier transporters, its physiological role in the central nervous system, *Biol. Pharm. Bull.* 2004/27, 1489–1496
- [5] J. C. Lee: Evolution in the concept of the blood-brain barrier phenomenon. *Progress in neuropathology*, Grune und Stratton, 1971/1, 84–145
- [6] B. Bauer: In vitro Zellkulturmodelle der Blut-Hirnschranke zur Untersuchung der Permeation und P- Glykoprotein Interaktion von Arzneistoffen. Dissertation, Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg, 2002/1, 81-84
- [7] R. S. el-Bacha und A. Minn: Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell Mol Biol*, 1999/45, 15–23
- [8] H. Wolburg u. a.: Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cultured astrocytes In: *J Cell Sci*, 1994/107 1347–1357
- [9] T. Nitta u. a.: Size-selective loosening of the blood- brain barrier in claudin–5–deficient mice. *J Cell Biol*, 2003/161, 653–660

- [10] W. M. Pardridge: Molecular biology of the blood–brain barrier, *Mol Biotechnol*, 2005/30, 57–69
- [11] M. Pavelka und J. Roth: Funktionelle Ultrastruktur. Verlag Springer, 2005/1, 234–235
- [12] H.K. Rucker u. a.: Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull*, 2000/51, 363–369
- [13] Kandel. E.R. Schwartz, J-H., Jessel, T.M., 2000. Principles of Neural Science. McGraw Hill, New York, 2004/1
- [14] Bruce Alberts et al. : Molekularbiologie der Zelle. Wiley-VCH, Weinheim, 2003/4, 905-935
- [15] D. Dolman u. a.: Induction of aquaporin 1 but not aquaporin 4 messenger RNA in rat primary brain micro vessel endothelial cells in culture. *J Neurochem*, 2005/93, 825–833
- [16] M. Fromm: Physiologie des Menschen – Transport in Membranen und Epithelien. R. F. Schmidt, F. Lang, Verlag Springer, 41–54
- [17] R. D. Egleton und T. P. Davis: Development of neuropeptide drugs that cross the blood-brain barrier. *NeuroRx*, 2005/2, 44–53
- [18] V. A. Levin: Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J Med Chem*, 1980/23, 682–684
- [19] A. Dahlin u. a.: Expression Profiling of the Solute Carrier (SLC) Gene Family in the Mouse Brain. *J Pharmacol Exp Ther* 2009
- [20] E. M. Cornford und S. Hyman: Blood-brain barrier permeability to small and large molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews* 36, 1999, S. 145–163

- [21] V. V. Rao u.a.: Choroid plexus epithelial expression of MDR1, p- glycoprotein and multidrug resistance associated protein contribute to the blood- cerebrospinal- fluid drug-permeability barrier. PNAS 96, 1999, S. 3900–3905
- [22] R. L. Roberts u. a.: Receptor- mediated endocytosis of transferrin at the blood- brain barrier. J Cell Sci 104, 1993, 521–532
- [23] F. Hervé u. a.: CNS delivery via adsorptive transcytosis. AAPS J 10, 2008, 455–472
- [24] Sun, H., Dai, H., Shaik, N., Elmquist, W.F., 2003. Drug efflux transporters in the CNS. *adv. drug deli. Rev* 55, 83-105
- [25] Begley D.J., 2004. ABC transporters and the blood- brain- barrier. *Curr. Pharm. Des.* 10, 1295-1312
- [26] Kohno K., Sato S., Takano H., Matsuo K., Kuwano M. (1989): The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer agents. *Biochem Biophys Res Commun* 165, 1415-1421
- [27] Gottesman M.M., Pastan I. (1988): The multidrug transporter, a double-edged sword. *J Biol Chem* 263, 12163-12166
- [28] Borst, P. and Elferink, R. O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*, 71: 537-592, 2002
- [29] Hoffmann, U. and Kroemer, 2004, H. K. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug metab rev*, 36: 669-701
- [30] Fricker, G., Miller, D. S., 2004. Modulation of drug transporters at the blood – brain barrier. *Pharmacology* 70, 169-176

[31] Juliano, R.L. Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta* 455. 152-162

[32] Roninson I.B. (1992): The role of *mdr1* (P-glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 43, 95-102

[33] Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., Bertino, J.R. 1989. Multidrug-Resistance gene is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 695-698

[34] Beringer, P. M., et al., Transporters and their impact on drug disposition. *Ann Pharmacother* 39 (2005) 1097-1108

[35] Sachs C.W., Chambers T.c., Fine R.L. (1999): Differential phosphorylation of sites in the linker region of pGP by protein kinase C isozymes alpha, beta1, beta2, gamma, delta, epsilon, eta and zeta. *Biochem Pharmacol* 50, 1673-1683

[36] Schinkel, A.H., 1999. P-Glykoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 3-29

[37] Goldie, J.H.; Goldman, A. J. The genetic origin of Drug Resistance in Neoplasms: Implications for Systemic Therapy. *Cancer Research* 44/9 September 1984, 3643.3653

[38] Liow JS, Kreisl W, Zoghbi SS, Lazarova N, Seneca N, Gladding RL, Taku A, Herscovitch P, Pike VW, Innis RB. *J Nucl Med.* 2009 Jan;50;. Epub (2008 Dec) 108-115

[39] Fisher G.A., Lum B.L., Hausdorff J., Sikic B.I. (1996): Pharmacological considerations in the modulation of multidrug resistance. *Eur J Cancer* 32A, 1082-1088

- [40] Demeule, M., Jodoin, J., Gingras, D., Beliveau, R., 2000. P-Glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells in brain capillars. *FEBS Lett.* 466, 219-224
- [41] Juranka P.F., Zastawny R.L., Ling V. (1989): P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J.* 3, 2583-2592
- [42] Gottesman, MM; Pastan, I; Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multi drug transporter, *Annu Rev Biochem* 62 (1993) 385-427
- [43] Higgins, CF; Gottesman, MM; is the multi drug transporter a flippase? ; *Trends in Biochem Science* 17 (1992) 18-21
- [44] Juranka P.F., Zastawny R.L., Ling V. (1989): P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J.* 3, 2583-2592
- [45] Gros P., Raymond M., Housman D. (1988): Cloning and characterization of mouse *mdr* genes. *Mol Cell Biol* 8, 2770-2778
- [46] Choi K., Chen C.J., Kriegler M., Roninson I.B. (1988): An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene. *Cell* 53, 519-529
- [47] Akiyama S., Cornwell M.M., Kuwano M., Pastan I., Gottesman M.M. (1988): Most drugs that reverse multidrug resistance also inhibit photoaffinity labeling of P-glycoprotein by a vinblastine analog. *Molec Pharmac* 33, 144-147
- [48] Nooter K, Sonneveld P. (1994): Clinical relevance of P-glycoprotein expression in haematological malignancies. *Leuk Res* 18, 233-243
- [49] Fisher G.A., Lum B.L., Hausdorff J., Sikic B.I. (1996): Pharmacological considerations in the modulation of multidrug resistance. *Eur J Cancer* 32 A, 1082-1088

[50] Thomas H., Coley H.M. (2003): Overcoming multi drug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-Glykoprotein. *Cancer Control* 10, 159-156

[51] Sonnerved P. (1996): Reversal of multidrug resistance in acute myeloid leukemia and other haemathological malignancies. *Eur J Cancer* 32 A, 1062-1069

[52] Dantzig A. H., Shepard R. L., Law K. L., Tabas L., Pratt S., Gillespie J. S., Binkley S. N., Kuhfeld M. T., Starling J. J., Wrighton S. A. Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290: 854-862, 1999

[53] Schinkel A.H., Jonker , J. W. , 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 3-29

[54] Löscher W., 2002b. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 113 – 118

[55] Martina Hubensack, Christine Müller, Peter Höcherl, Stephan Fellner, Thilo Spruss, Günther Bernhardt and Armin Buschauer: Effect of the ABCB1 modulators elacridar and tariquidar on the distribution of paclitaxel in nude mice, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, Volume 134, Number 5/ Mai 2008, 597 – 607

[56] Wang, Qiao-Chun; Qu, Da-Hui; Ren, Jun; Chen, Kongchan; Tia, He. A lockable light-driven molecular shuttle with a fluorescent signal. *Angewandte Chemie*, 2004, 43, 2661-2665

[57] Rewcastle, Gordon W.; Denny, William A. The synthesis of substituted 9-Oxoacridan-4-carboxylic acids; Part 2. The use of 2-Iodoisophthalic acid in the Jordan Ullmann Reaction. *Synthesis* 1985, 2, 217-230

[58] Sharp Mader, Strachan. Synthesis of acridine derivative multidrug-resistant inhibitors, PCT – Patent WO 98/52923 1998

8. Lebenslauf

Klaus Iskratsch

Geburtsdatum: 14.11.1979
Geburtsort: Salzburg
Staatsbürgerschaft: Österreich
Volkschule: Leopoldskron/Moos 1986-1990
Mittelschule: Hauptschule Maxglan 1990-1994
Höhere Schule: Bundeshandelsakademie 2/Salzburg
1994-1999 Abschluß: Matura 25.06.1999
Universität: Pharmazie in Wien seit 1999

Diverse Praktika:

In den Jahren 1999 -2001 Sommerpraktika im Landeskrankenhaus Salzburg auf diversen Stationen

In den Jahren 2001-2002 Praktika im AKH Wien/ Stoffwechsel Labor

Im Jahr 2002 Praktikum in der Landesapothek Salzburg

Im Jahr 2003 Praktika in der Leonhardus Apotheke/ Wien

Im Jahr 2004 Praktika bei Herba/Chemosan Wien

Sonstige Tätigkeiten:

Diverse Feriertätigkeiten bei: Mercedes/Pappas Austria, Mozartlikör, Post AG, Weberknecht Wien, diverse Callcenters, MKB Bühnenaufbau, ..

Besondere Kenntnisse:

Fremdsprachen: Englisch/Französisch

PC Kenntnisse: Windows, MS-Office, Internet, ...