

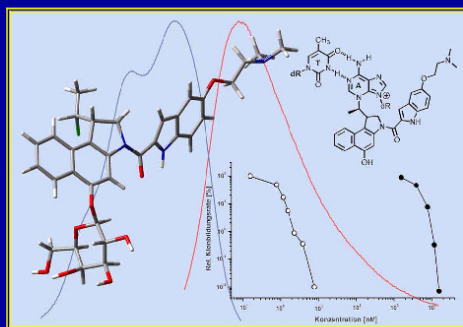


Felix Major (Autor)

# Synthese, biologische Untersuchung und Fluoreszenzmarkierung neuartiger Analoga des Antibiotikums (+)-CC-1065 und der Duocarmycine für eine selektive Krebstherapie

Felix Major

Synthese, biologische Untersuchung und Fluoreszenzmarkierung neuartiger Analoga des Antibiotikums (+)-CC-1065 und der Duocarmycine für eine selektive Krebstherapie



 Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1982>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# ALLGEMEINER TEIL

## 1 Einleitung

Im Jahr 1928 stellte der britische Bakteriologe *Sir Alexander Fleming* bei einer mit *Staphylococce*n bewachsenen Kulturplatte eine Verunreinigung durch einen Schimmelpilz fest. Obwohl dieses zu der damaligen Zeit sicherlich nichts Außergewöhnliches war, bemerkte er, dass vom Ort des Schimmelpilzes ausgehend eine Zone entstanden war, in der es keinerlei *Staphylococce*n gab. Diese Beobachtung faszinierte *Fleming* so sehr, dass er den Schimmelpilz, der später als *Penicillium notatum* identifiziert wurde, isolierte und seine Eigenschaften näher untersuchte. Als wichtigstes Ergebnis dieser Untersuchungen ist zu nennen, dass der von diesem Pilz produzierte Wirkstoff, der in der Folgezeit als Penicillin G weltbekannt werden sollte, zwar gegen eine Reihe von Bakterien toxisch wirkt, jedoch den Stoffwechsel höherer Organismen nicht beeinflusst. Obwohl *Fleming* seine Beobachtungen bereits im Mai 1929 im *British Journal of Experimental Pathology* veröffentlichte,<sup>1</sup> fanden seine Arbeiten zunächst kaum Beachtung. Erst zehn Jahre später, als mit der Einführung der Sulfonamide die Chemotherapie zur Behandlung bakterieller Erkrankungen in Deutschland etabliert wurde und sich die weltpolitische Lage durch den Ausbruch des Zweiten Weltkrieges stark verändert hatte, wurden *Fleming*'s Arbeiten von *Howard Florey* und *Ernst B. Chain* weitergeführt. So gelangen in den folgenden Jahren die Isolierung des Penicillin G in Reinform, die Strukturklärung sowie die großtechnische Produktion durch Kultivierung des ergiebigeren Stammes *Penicillium chrysogenum*.



Abbildung 1. A. Fleming (1881–1955)

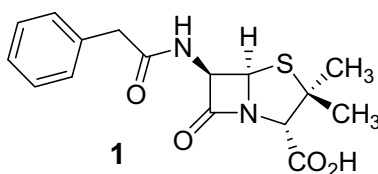


Abbildung 2. Das Antibiotikum Penicillin G (1).

Mit der Entdeckung des Penicillins wurde somit das Zeitalter der Antibiotikaforschung und der Chemotherapie eingeleitet. Hierfür erhielt *Alexander Fleming* im Jahr 1945 gemeinsam mit *Howard Florey* und *Ernst B. Chain* den Nobelpreis für Medizin. Während des anlässlich der Preisverleihung gehaltenen Festvortrages schilderte *Fleming* seine Geschichte von der Entdeckung des Penicillins und sagte hinsichtlich der weiteren Entwicklung der Antibiotika:<sup>2</sup>

*"And we are not at the end of the penicillin story. Perhaps we are only just at the beginning. We are in a chemical age and penicillin may be changed by the chemists so that all its disadvantages may be removed and a newer and a better derivative may be produced."*

Mit diesen Worten beschreibt *Fleming* sehr präzise die Aufgaben, die sich den im medizinischen Bereich tätigen Chemikern damals wie heute stellen: Durch gezielte Veränderungen der chemischen Struktur eines medizinisch relevanten Naturstoffs, der sogenannten Leitstruktur, sollen die unerwünschten Eigenschaften eliminiert werden, während die positiven Eigenschaften beibehalten oder sogar noch verstärkt werden sollen.

In den darauffolgenden 60 Jahren wurden eine Fülle von Antibiotika isoliert und weiterentwickelt, die heute nicht nur zur Therapie von Infektionskrankheiten, sondern auch bei der Krebsbehandlung eingesetzt werden. Dennoch ist die Behandlung maligner Tumoren, trotz größter Anstrengungen in der medizinischen Forschung, mit den derzeit zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika mit starken Nebenwirkungen verbunden, da die Selektivität klassischer Zytostatika hauptsächlich auf dem Unterschied der Proliferationsraten maligner und normaler Zellen beruht. Daher müssen neue Konzepte entwickelt werden, die basierend auf den genotypischen und phänotypischen Unterschieden von malignen und normalen Zellen eine gezielte Zerstörung der malignen Zellen ohne Beeinträchtigung der Normalzellpopulation ermöglichen.

Hierzu wurde im Arbeitskreis von *L. F. Tietze* ein Konzept entwickelt, bei dem im therapeutischen Bereich untoxische Verbindungen (Prodrugs) gezielt im Krebsgewebe enzymatisch in hochtoxische Zytostatika überführt werden. Bei diesem Ansatz wird die Selektivität durch die Verwendung monoklonaler Antikörper erreicht, die an tumorassoziierte Antigene binden und die kovalent mit dem entsprechenden Enzym verknüpft sind.

---

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Entwicklung einer selektiven Krebstherapie angefertigt und beschäftigt sich mit dem Design, der biologischen Untersuchung und der Fluoreszenzmarkierung neuartiger Prodrugs, die auf der Grundlage natürlicher zytotoxischer Antibiotika hergestellt wurden.

## 2 Medizinische Grundlagen der Krebserkrankung

Die kontrollierte Teilung von Zellen bildet die Existenzgrundlage aller höheren Lebensformen. Der Verlust dieser Kontrolle, infolge dessen es zu einer ungebremsten Zellvermehrung kommt, ist das gemeinsame Merkmal und die wesentliche Ursache aller Krebserkrankungen.

Die Entstehung von Krebs kann durch die verschiedensten Faktoren ausgelöst werden. Als Gründe kommen neben einer genetischen Prädisposition unter anderem Umwelteinflüsse, Lebensgewohnheiten, ionisierende Strahlung und UV-Licht<sup>3</sup> oder auch chemische Stoffe (z. B. Asbest, Benzol, polychlorierte Biphenyle (PCB), Chromsalze)<sup>4,5</sup> in Betracht. Die Cancerogenese ist der Prozess, bei dem es durch Einwirkung von Krebsrisikofaktoren zur unkontrollierten Neubildung von Gewebe (Neoplasie) kommt. Zwischen der Einwirkung von Cancerogenen und dem Auftreten von Tumoren liegt eine Latenzzeit, die beim Menschen Jahre bis Jahrzehnte betragen kann.

Für die Erklärung der molekularbiologischen bzw. genetischen Vorgänge, die bei der Entstehung eines Tumors ablaufen, kann das Modell der Proto-Onkogene und Tumor-Suppressorgene herangezogen werden. Proto-Onkogene fördern das Zellwachstum und Tumor-Suppressorgene hemmen es.<sup>6</sup> Gemeinsam halten sie den natürlichen Fortpflanzungstrieb der Zelle in allgemein akzeptierten Grenzen. Die Umwandlung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen durch Mutationen führt zur verstärkten Aktivität der entsprechenden (Onko)-Proteine.<sup>7</sup> Die derart veränderten Wachstumsfaktoren können im Gegensatz zu den physiologischen Proteinen ein Dauersignal zur Zellteilung bewirken und damit der Apoptose („programmierter Zelltod“) entgegenwirken. Darüber hinaus nimmt man an, dass durch mutagene Substanzen die Tumor-Suppressorgene, zu denen unter anderem das p53-Gen zählt, inaktiviert werden können.<sup>8</sup> Die durch p53 kontrollierten Faktoren hemmen den Eintritt von Zellen in die S-Phase des Zellzyklus (Phase der DNA-Synthese) und ermöglichen dadurch eine DNA-Reparatur. Ein durch Mutation verursachter Funktionsverlust derartiger Tumor-Suppressorgene fördert ebenfalls die Zellproliferation. Die Frage, welche Mutation für die maligne Transformation verantwortlich ist, ist nicht generell zu beantworten. Angesichts der mehrfachen Kontroll- und Steuerungsmechanismen des Zellstoffwechsels muss in einer Zelle mehr als eine Mutation erfolgen, damit sich ein manifester Tumor entwickelt.

Kommt es dann schließlich zur irreversiblen Umwandlung von normalen Körperzellen zu Krebszellen, ist die erste Phase der Pathogenese, die sog. *Initiierungsphase*, abgeschlossen. Nach einer längeren Latenzzeit, die mehrere Jahre betragen kann, beginnt die *Promotionsphase*, die durch Zellproliferation und somit Tumorwachstum gekennzeichnet ist. Diese geht anschließend in die *Progressionsphase* über, in der sich manifeste Tumoren aus Verbänden autonomer Krebszellen bilden. Hierbei unterscheidet man zwischen zwei Arten von Tumoren, den benignen und den malignen Tumoren. Benigne Tumoren wachsen am Ort ihrer Entstehung als kompakter Zellverband, verdrängen zwar das umliegende Gewebe, zerstören es aber nicht und bilden keine Tochtergeschwülste (Metastasen). Im Gegensatz dazu wachsen maligne Tumoren unkontrolliert, brechen in Organe und Gefäße ein und zerstören diese. Durch Infiltration in Blut- und Lymphgefäße breiten sich maligne Zellen außerdem im gesamten Körper aus und können sich an verschiedenen Stellen (z. B. Lymphknoten, Leber, Knochenmark) festsetzen und Metastasen bilden.<sup>9</sup> Diese *Implantationsphase* wird durch die Versorgung der Metastasen mit Blutgefäßen (Vaskularisierung) abgeschlossen.

### 3 Konzepte der Tumorthherapie

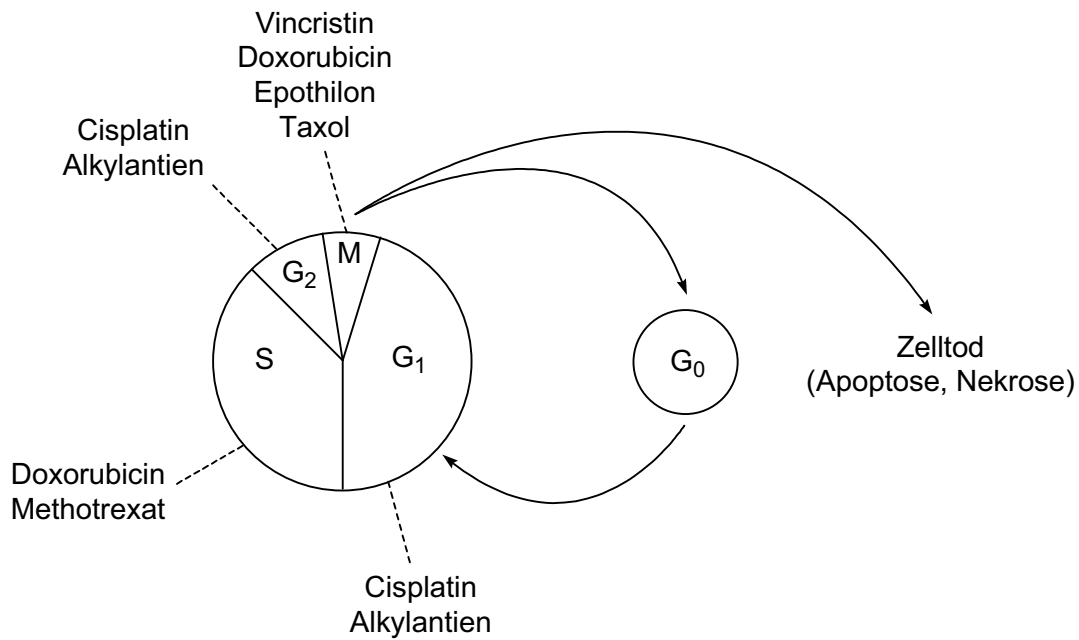
Eine so komplexe und vielschichtige Krankheit wie der Krebs erschwert die Entwicklung einer effizienten Therapieform. Als Konsequenz daraus sind die meisten heutzutage angewandten klinischen Behandlungsmethoden Kombinationen verschiedener Ansätze. Bei soliden, gut zugänglichen und klar umgrenzten Tumoren stellt eine operative Entfernung des entarteten Gewebes die Methode mit den besten Heilungschancen und geringsten Nebenwirkungen dar. Ist der Tumor jedoch schwer zugänglich oder betrifft lebenswichtige Strukturen, kann eine Strahlenbehandlung (z. B. Radiotherapie mit  $\gamma$ -Strahlung) angebracht sein, die zudem für den Gesamtorganismus weniger belastend ist als ein operativer Eingriff. Dennoch werden in der Regel umliegende Areale bei der Strahlentherapie erfasst und daher wird auch gesundes Gewebe geschädigt. In einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, in dem es bereits zu Metastasenbildung gekommen ist, bleibt meist nur eine Chemotherapie als letzte Möglichkeit der Behandlung, wobei beträchtliche Nebenwirkungen in Kauf genommen werden müssen. Sämtliche Chemotherapeutika wirken bevorzugt auf alle schnell-proliferierenden Zellen und zeigen daher typische Nebenwirkungen an sich

ständig regenerierenden Geweben wie z. B. Knochenmark (Aplasie), Schleimhaut (Mukositis) und Haarzellen (Alopezie). Als Ergänzung dieser drei Ansätze zur Krebsbekämpfung kann heute die Immuntherapie als vierte Säule angesehen werden, die auf der Ausnutzung tumorspezifischer Antigene beruht.<sup>10</sup>

### 3.1 Chemotherapie

Die Chemotherapie maligner Tumoren ist im Moment die einzige erfolgsversprechende Möglichkeit zur Behandlung von Krebsformen mit verstärkter Metastasierung. Unter Chemotherapie versteht man im engeren Sinne die Verabreichung von Medikamenten, die sich über die Blutbahn im gesamten Körper verteilen. Zahlreiche Chemotherapeutika wirken auf menschliche Zellen zytostatisch, d. h. sie hindern die Zellen an der Vermehrung, indem sie die Verdopplung ihrer DNA vor der Zellteilung stören. Darüber hinaus wirken andere Medikamente zytotoxisch, indem sie in Krebszellen Apoptose auslösen.

Alle Zellen, ob normale oder maligne, durchlaufen einen Zellzyklus (Abbildung 3).<sup>11</sup> Dieser beginnt bei eukaryontischen Zellen aus der  $G_0$ -Phase (Ruhephase) heraus. Der eigentliche Teilungszyklus gliedert sich in die Mitosephase M und die drei Interphasen  $G_1$ , S und  $G_2$ . In der präsynthetischen  $G_1$ -Phase (Wachstumsphase) werden hauptsächlich RNA und Proteine synthetisiert, während in der relativ kurzen S-Phase (Synthesephase) durch Neubildung der DNA der Chromosomensatz verdoppelt und damit die Zellteilung vorbereitet wird. Daran schließt sich die postsynthetische Wachstumsphase ( $G_2$ -Phase) an, in der die darauf folgende Mitosephase (M) durch die Synthese der notwendigen Proteine vorbereitet wird. Nach Trennung der doppelten Chromosomen und Abschnüren der Tochterzelle ist der Zyklus beendet und ein Teil der Zellen geht in die Ruhephase über, während der andere Teil erneut den Zyklus durchläuft. Von den insgesamt vorhandenen Zellen ist nur ein geringer Teil in diesem Teilungszyklus, der Rest befindet sich in der  $G_0$ -Phase (Ruhephase), d. h. von der Zellteilung her gesehen in Ruhe. Zellen, die sich in diesem Ruhezustand befinden, sind für Zytostatika in der Regel nicht zugänglich. Da sich maligne Entartungen jedoch durch eine gesteigerte Proliferationsrate auszeichnen, befinden sich in Abhängigkeit von der Art des Tumors häufig nur 10 % der Tumorzellen in Ruhe.

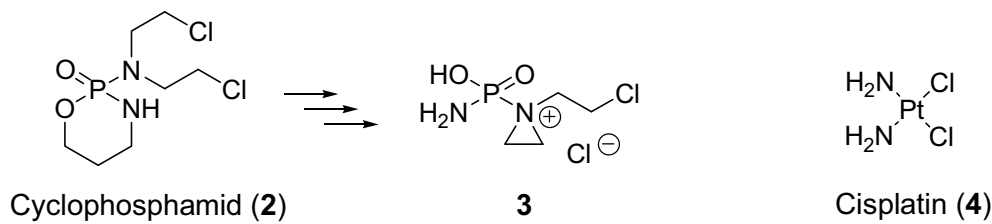


**Abbildung 3.** Der Zellzyklus mit Beispielen für Chemotherapeutika und deren Angriffspunkten.

Die bisher bekannten und in der Tumorthherapie eingesetzten Zytostatika werden gemäß ihrer Wirkmechanismen in verschiedene Klassen eingeteilt, die an unterschiedlichen Punkten des Zellzyklus angreifen. Man unterscheidet hier *Alkylantien*, *Antimetabolite*, *Mitosehemmstoffe*, *zytostatische Antibiotika* und *Topoisomerase-Hemmstoffe*.

*Alkylierende Zytostatika* sind äußerst reaktive Substanzen, die in der Regel phasenunspezifisch Nucleinsäuren alkylieren. Nach Aktivierung zu Carbokationen reagieren diese Stoffe mit N-, O- oder S-haltigen Nucleophilen in Proteinen und insbesondere in Nucleinsäuren unter Ausbildung kovalenter Bindungen. Die Folge davon sind Quervernetzungen der DNA, abnorme Basenpaarungen und Strangbrüche, die schließlich zum Tod der Zelle führen. Wichtige Vertreter dieser Substanzklasse sind z. B. das Cyclophosphamid (**2**),<sup>12</sup> das zu den Stickstoff-Lost-Derivaten zählt, oder auch Metallkomplexe wie das Cisplatin (**4**).<sup>13</sup> Ersteres stellt eine *in vitro* nahezu untoxische Verbindung, ein sog. Prodrug dar, das erst in der Leber in den eigentlichen Wirkstoff (**3**) überführt wird (Abbildung 4). Eine neue Gruppe von hoch wirksamen Alkylantien stellen auch die Antibiotika CC-1065, Duocarmycin SA und das Yatakemycin sowie deren Derivate dar (siehe Kapitel 4).

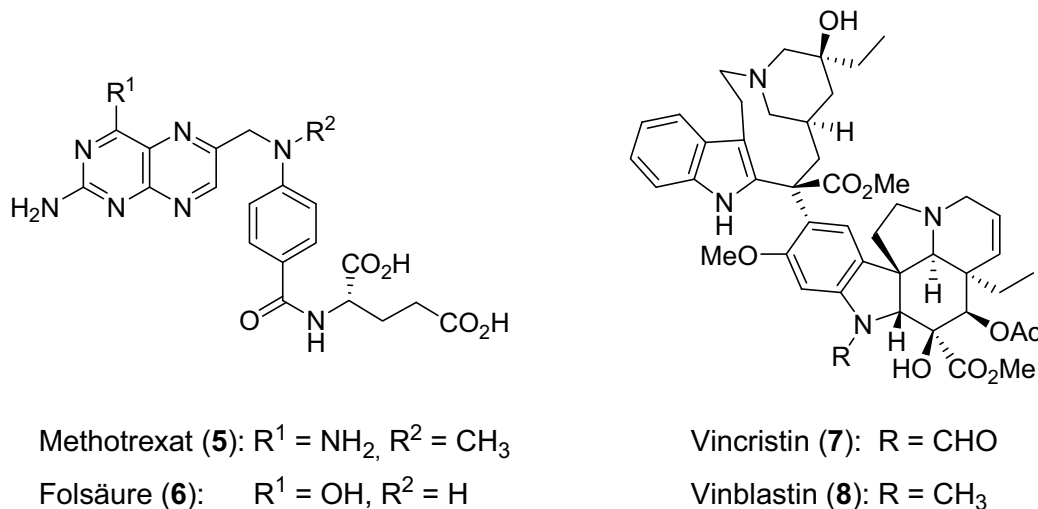




**Abbildung 4.** Beispiele für DNA-alkylierende Zytostatika.

Die Substanzklasse der *Antimetabolite* besteht aus Strukturanaloga natürlicher Stoffwechselbausteine, die diese aus ihren Bindungen verdrängen. Dadurch werden beispielsweise für die Replikation wichtige Enzyme gehemmt oder funktionsuntüchtige Makromoleküle synthetisiert. Als Beispiel sei der Folsäureantagonist Methotrexat (5) genannt.<sup>14</sup>

Eine Hemmung des Zellzyklus ist auch durch Blockade der Mitose möglich (*Mitosehemmstoffe*). Dies gelingt durch eine Störung des Spindelapparates, der für die Mitose einer Zelle essentiell ist. Entsprechende Chemotherapeutika binden an die  $\beta$ -Einheit des Tubulindimers und hemmen dadurch entweder den Aufbau der Kernspindeln (z. B. Colchicin, Vincristin (7), Vinblastin (8))<sup>15</sup> oder blockieren ihren Abbau (Taxane, Epothilone).<sup>16</sup>



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

Zu den *zytostatischen Antibiotika* zählen in erster Linie die aus *Streptomyces*-Arten isolierten Anthracycline Daunorubicin (9) und Doxorubicin (10) (Abbildung 6). Ihre zytostatische Wirkung ist besonders ausgeprägt in der S-Phase. Sie inhibieren die