

Veränderung der spezifischen Phototoxizität und Steigerung der Bindungsaffinität von Bacteriopheophorbiden und Hematoporphyrinen zu Cyclodextrindimeren durch Derivatisierung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Susanne Röhrs
aus Düsseldorf

Düsseldorf 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Moser

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rainer Bayer

Drittgutachter: Prof. Dr. Manfred Braun

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2005

Es ist niemals das Spektakuläre, das eine Leistung zum Werke macht, es ist in erster Linie die Verbindlichkeit, die Ernsthaftigkeit, die Hingabe, die einem Unternehmen, auch wenn es ein kleines ist, Bestand gibt, vor einem selbst, vor der eigenen Vergänglichkeit.

Längle

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Allgemeines	
1.1.1 Was ist die Photodynamische Therapie?.....	1
1.1.2 Bisherige Therapiemöglichkeiten der Photodynamischen Therapie.....	2
1.1.3 Verschiedene Möglichkeiten des Tumortargetings.....	3
1.1.4 Reduktion systemischer Nebenwirkungen durch den Einschluss der Wirkstoffe in ein Carriersystem.....	6
1.2.1 Erste Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	9
1.2.2 Zweite Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Chemie, Spektroskopie und Chromatographie von Pheophorbiden, Bacteriopheophorbiden, Hematoporphyrinen und Etioporphyrinen.....	13
2.1.1 Allgemeines.....	13
2.1.2 Chemische Syntheseverfahren.....	13
<i>Chlorophylle und ihre Derivate:</i>	
Isolierung von Chlorophyll a aus <i>Spirulina geitleri</i>	13
Dioxanfällung.....	14
Darstellung von Pheophytin.....	14
Darstellung von Pheophorbid.....	14
Darstellung von Pheophorbidethylester.....	15
Darstellung von Pheophorbidmethylester.....	15
Darstellung von Pyroethylpheophorbid.....	15
<i>Bacteriochlorophylle und ihre Derivate:</i>	
Isolierung von Bacteriochlorophyll aus <i>Rhodobacter</i> <i>sphaeroides</i>	16
Isolierung von Bacteriochlorophyll aus <i>Rhodospirillum</i> <i>rubrum</i>	16
Darstellung von 13^2 -OH-Bacteriochlorophyll.....	17
Darstellung von Bacteriopheophytin und 13^2 -OH-Bacteriopheophytin.....	17
Darstellung Bacteriopheophorbid.....	17
<i>Hematoporphyrine und ihre Derivate</i>	
Darstellung von 2,4-Di-(α -(Hydroxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-	

-IX-dimethylester.....	18
Darstellung von 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin- -IX-dimethylester).....	18
<i>Etioporphyrine und ihre Derivate</i>	
Darstellung von meso-N,N-Dimethylaminomethyl- Etioporphyrin I	18
2.1.3 Spektroskopische Methoden.....	19
UV/VIS-Absorptionsspektroskopie.....	19
FAB-Massenspektroskopie.....	19
MALDI-Massenspektroskopie.....	19
¹ H-NMR-Spektroskopie.....	20
Fluoreszenzspektroskopie.....	20
2.1.4 Chromatographische Methoden.....	21
Dünnschichtchromatographie:	
Analytische Dünnschichtchromatographie.....	21
Kieselgel-60-HPTLC-Platten.....	21
RP-8-HPTLC-Platten.....	21
Präparative Dünnschichtchromatographie.....	22
Kieselgel-60-Platten.....	22
Kieselgel-60-H-Platten.....	22
Säulenchromatographie:	
HPLC-Analyse.....	23
Kieselgelsäule.....	24
DEAE-Cellulose-Säule.....	25
DEAE-Sepharose-Säule.....	26
CM-Sepharose-Säule.....	27
QAE-Sepharose-Säule.....	28
2.1.5 Sonstige Reinigungsmethoden.....	29
Sublimation.....	29
2.1.6 Verwendete chromatographische und spektroskopische Methoden.....	30
2.2 Methoden zur Charakterisierung der modifizierten Photosensitizer im Hinblick auf die Verwendung in der polyphasischen Tumorthherapie.....	
2.2.1 Allgemeines.....	31
2.2.2 Zellversuche.....	32

Resorptionsstudien an Tumorzellsuspensionen.....	32
Lokalisation der Sensitizer durch Fluoreszenz- mikroskopie.....	33
Bestimmung der Stabilität der Sensitizer im Zellmilieu.....	33
Bestimmung der Phototoxizität.....	34
Resorptionskinetik von 2,4-Di-(α -4-tert-Butylphenoxy-)ethyl- deuteroporphyrin-IX-dimethylester vor bzw. nach Einschluss in ein Cyclodextrin-Dimer [di- β -CD-(2N-A4-C5-A4)]... ..	35
Phototoxizitätsbestimmung nach enzymatischem Abbau des Cyclodextrindimers mit Cyclodextrinase.....	36
2.2.3 Methode zur Bestimmung der Komplexbindungskonstante zwischen Sensitizer und Cyclodextrindimer.....	37
3. Ergebnisse.....	46
3.1 Chemie, Spektroskopie und Chromatographie der synthetisierten Pheophorbid-, Bacteriopheophorbid-, Hematoporphyrin- und Etioporphyrinderivate.....	46
3.1.1 Präparation und Analytik der Pheophorbidderivate.....	46
Ethylpheophorbid [Synthese-UV/VIS-DC-NMR-MS-HPLC].....	46
Darstellung von Pt-Pheophorbidmethylester durch direkte Metallierung.....	49
Pyroethylpheophorbid.....	50
Bromethylpheophorbidethylester.....	51
3 ¹ -tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester.....	53
3 ¹ -tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester.....	57
3 ¹ -tert-Butylphenoxybromethylpheophorbidethylester.....	60
3 ¹ -tert-Butylphenoxybromethylpyropheophorbidethylester.....	62
Zusammenfassung	63
3.1.2 Präparation und Analytik der Pd-Bacteriopheophorbidderivate	
Bacteriopheophytin.....	64
Darstellung von Pd-Bacteriopheophytin durch eine Trans- metallierungsreaktion von Cd-Bacteriopheophytin [Synthese-UV/VIS-DC-NMR-MS].....	66
Darstellung von Pd-Bacteriopheophorbid durch direkte Metallierung von Bacteriopheophorbid.....	66
Darstellung von Pt-Bacteriopheophorbid durch direkte Metallierung von Bacteriopheophorbid.....	67
Pd-Bacteriopheophorbidethylester.....	69

3 ¹ -tert-Butylbenzoyl-ethyl-Pd-Bacteriopheophorbid-ethyl-ester.....	70
13 ² -tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butyl-phenylester.....	74
13 ² -OH-Pd-Bacteriopheophytin.....	75
13 ² -tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophytin.....	76
13 ² -tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butyl-phenylester.....	77
3 ¹ -tert-Butylbenzoyl-ethyl-13 ² -tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester.....	78
Zusammenfassung.....	79
3.1.3 Präparation und Analytik der Porphyrinderivate.....	80
2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester [Synthese, NMR, MS].....	80
meso-N-Methylpiperin-4-oxymethyletioporphyrin I.....	82
meso-N-N-Dimethylpiperidinium-4-oxymethyletioporphyrin I.....	83
2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester.....	84
2,4-Di-(α -Cyclohexyloxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester.....	86
2,4-Di-(α -(Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-diglucosamid.....	88
Zusammenfassung.....	90
3.2 Charakterisierung der modifizierten Photosensitizer im Hinblick auf die Verwendung in der polyphasischen Tumorthherapie.....	91
3.2.1 Zellversuche zu ausgewählten Verbindungen.....	91
<i>Pheophorbidderivate</i>	
Resorptionsstudien, Stabilität, intrazelluläre Lokalisation und Phototoxizität.....	91
Zusammenfassung.....	93
<i>Pd-Bacteriopheophorbidderivate</i>	
Resorptionsstudien, Stabilität, intrazelluläre Lokalisation und Phototoxizität.....	94
Zusammenfassung.....	95
<i>Etioporphyrinderivate</i>	
Resorptionsstudien, Stabilität, intrazelluläre Lokalisation und Phototoxizität.....	96
Zusammenfassung.....	98

	<i>Hematoporphyrinderivate</i>	
	Resorptionsstudien, Stabilität, intrazelluläre Lokalisation und Phototoxizität.....	99
	Zusammenfassung.....	100
3.2.2	Resorptionskinetik von 2,4-Di-(α -4-tert-Butylphenoxy-)ethyl- deuteroporphyrin-IX-dimethylester vor bzw. nach Einschluss in ein Cyclodextrin-Dimer [di- β -CD-(2N-A4-C5-A4)].....	101
	Zusammenfassung.....	102
3.2.3	Phototoxizitätsbestimmung nach Spaltung des Cyclodextrin- dimers mit dem Enzym Cyclodextrinase.....	103
	Zusammenfassung.....	103
3.2.4	Bestimmung der Komplexbindungskonstanten der verschie- denen Porphyrinoide mit Cyclodextrinmono- und dimeren.....	104
	<i>Pheophorbidderivate</i>	104
	<i>Pd-Bacteriopheophorbidderivate</i>	106
	<i>Hematoporphyrinderivate</i>	108
	Zusammenfassung.....	117
4.	Abschließende Diskussion und Bewertung	118
4.1	Allgemeines.....	118
4.1.1	Direkte Metallierung von Bacteriopheophorbiden und Pheo- phorbiden mit Palladium und Platin.....	120
4.1.2	Einführung voluminöser Ankergruppen mit anschließender Berechnung der Komplexbindungskonstante mit Cyclodextrin- dimeren sowie Bestimmung der Phototoxizitäten und Re- sorptionsgeschwindigkeiten dieser modifizierten Sensitizer im Zellversuch.....	123
	<i>Pheophorbidderivate</i> : Einführung einer voluminösen Anker- Gruppe.....	123
	<i>Mit einer Ankergruppe versehene Pheophorbidderivate</i> : Phototoxizitäten und Resorptionsgeschwindigkeiten im Zellversuch.....	123
	<i>Mit einer Ankergruppe versehene Pheophorbidderivate</i> : Bestimmung der Bindungskonstanten mit Cyclodextrin- dimeren.....	124
	<i>Pd-Bacteriopheophorbidderivate</i> : Einführung einer voluminösen Ankergruppe.....	125
	<i>Mit einer Ankergruppe versehene Pd-Bacteriopheophorbid- derivate</i> : Bestimmung der Bindungskonstanten mit Cyclo-	

dextrindimeren.....	125
<i>Mit mindestens einer Ankergruppe versehene Pd-Bacteriopheophorbidderivate: Phototoxizitäten und Resorptionsgeschwindigkeiten im Zellversuch.....</i>	<i>127</i>
<i>Pd-Bacteriopheophorbidderivate: Möglichkeiten zur Einführung einer zweiten Ankergruppe.....</i>	<i>129</i>
<i>Porphyrinderivate aus der Gruppe der Hemato-bzw. Etio-porphyrine als Modellsubstanzen zur Einführung einer zweiten Ankergruppe.....</i>	<i>130</i>
<i>Mit zwei Ankergruppen versehene Hematoporphyrinderivate: Bestimmung der Bindungskonstanten mit Cyclodextrindimeren.....</i>	<i>132</i>
<i>Wertung der erzielten Bindungskonstanten in Bezug zu den in der Literatur gefundenen Daten.....</i>	<i>134</i>
<i>Porphyrinderivate aus der Gruppe der Etio- bzw. Hemato-Porphyrine: Phototoxizitäten und Resorptionsgeschwindigkeiten im Zellversuch.....</i>	<i>135</i>
<i>Resorptionsgeschwindigkeit von mit zwei Ankergruppen versehenen Hematoporphyrinderivaten vor und nach Einschluss in ein Cyclodextrindimer [di-β-CD-(2N-A4-C5-A4)].....</i>	<i>137</i>
4.1.3 Ausblick.....	138
5. Zusammenfassung.....	146
6. Literaturverzeichnis.....	147

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen:

Teil a: Verbindungsnamen

Chl a	Chlorophyll a
DP	Deuteroporphyrin-IX-dimethylester
Phe	Pheophytin
Etph	Ethylpheophorbid
Hp	Hematoporphyrin
Pyetph	Pyroethylpheophorbid
3 ¹ -tbutph-Etph*	3 ¹ -tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester
3 ¹ -tbutph-Br-Etph	3 ¹ -tert-Butylphenoxy-3 ² -Bromethylpheophorbidethylester
3 ¹ -tbutph-Pyetph	3 ¹ -tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester
3 ¹ -tbutph-Br-Pyetph	3 ¹ -tert-Butylphenoxybromethylpyropheophorbidethylester
Bphe a	Bacteriopheophytin a
13 ² -OH-Bphe	13 ² -Hydroxy-Bacteriopheophytin
Pd-Bphe	Palladium-Bacteriopheophytin
Pd-13 ² -OH-Bphe	Palladium-13 ² -Hydroxy-Bacteriopheophytin
3 ¹ -OH-Pd-Bph-EE	3 ¹ -Hydroxyethyl-Palladium-Bacteriopheophorbidethylester
3 ¹ -tbutbenz-Pd-Bph-EE	3 ¹ -tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester
13 ² -tbutph-Pd-Bph-tbutphE	13 ² -tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester
13 ² -tbutbenz-Pd-Bph-tbutphE	13 ² -tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester

*Die Benennung dieser Verbindungen stellt eine übliche Vereinfachung der IUPAC Terminologie dar (46). Die korrekte Bezeichnung lautet: 3¹-tert-Butylphenoxydevinylethylpheophorbidethylester.

Teil b: Allgemeine Abkürzungen

ADEPT	Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy
AMU	Atomare Masseneinheiten
CD	Cyclodextrin
CM	Carboxymethyl-
COD	Cyclooctadien
COOPc	Tri-tert-Butylphenoxymonocarboxylphthalocyanin
d	Dichte
DEAE	Diethylaminoethyl-
DC	Dünnschichtchromatographie
EGMME	Ethylenglycolmonomethylether
FAB	Fast-Atom-Bombardment
¹ H-NMR	Protonenresonanzspektroskopie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
K _{Porph}	Komplexbindungskonstante des Porphyrins (Sens.)
λ	Wellenlänge
MALDI	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation
MS	Massenspektroskopie
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PDT	Photodynamische Therapie
R _f	Retentionsfaktor
ROESY	Rotational Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
TNS	6-p-(Toluidino-)2-Naphthalensulfonsäure
UV/VIS	ultraviolett / sichtbar, Detektionsbereich der Absorptionsspektroskopie
QAE	Quarternäres Aminoethyl-

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Die Behandlung maligner Tumoren stellt weiterhin eine große Herausforderung in der medizinischen Forschung dar. Aus diesem Grund wird nach Alternativen zu den konventionellen Behandlungsverfahren wie Chemotherapie, Bestrahlung und Operation gesucht.

Die **Photodynamische Therapie** stellt in der Praxis bereits *eine* wichtige Alternative bei Frühformen maligner Tumoren dar, die im Gegensatz zur konventionellen Therapieformen wesentlich weniger Nebenwirkungen zeigt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Grundlagen für die Weiterentwicklung einer selektiveren Tumorthherapie im Rahmen der Photodynamischen Therapie sowie der Chemotherapie.

1.1.1 Was ist die Photodynamische Therapie?

Das Prinzip der **Photodynamische Tumorthherapie** lässt sich wie folgt skizzieren: Die **Photodynamische Tumorthherapie** ist eine **polyphasische Therapie**, bei der ein Photosensitizer (ein porphyrinoides Molekül) zunächst im Tumorgewebe angereichert und dort anschließend mit Hilfe von Licht gezielt aktiviert wird (50). Durch Absorption eines Photons wird der Sensitizer in einen höher angeregten Singulettzustand überführt. Von diesem angeregten Singulettzustand kann der Sensitizer durch Abgabe von Fluoreszenzlicht (wichtig zur Tumorlokalisation) wieder in den Grundzustand zurückkehren. Alternativ kann der Sensitizer durch Elektronenspinumkehr (Intersystem-Crossing) in einen längerlebigen Triplettzustand niedrigerer Energie übergehen. Dabei hängt die photodynamische Aktivität von der Bereitschaft des Sensitizers zum Intersystem-Crossing ab, d. h. sowohl von der Triplettquantenausbeute wie der Triplettlebensdauer des Sensitizers.

Es ist möglich, zwei verschiedene Typen von Photoreaktionen zu unterscheiden, die einzeln, aber auch gemeinsam auftreten können (23). In Abhängigkeit vom Sensitizer und vom Sauerstoffangebot kommen sie mit unterschiedlicher Häufigkeit vor. Die Typ I Photoreaktion zeichnet sich durch einen Elektronen- oder Wasserstofftransfer aus. In Gegenwart von Sauerstoff entstehen Superoxidanionenradikale.

Dieser Reaktionstyp wird z. B. bei Phthalocyaninen in Gegenwart von Ascorbat beobachtet. Ascorbat ist in Zellen mit hohem Metabolismus (z.B. Tumorzellen) in hoher Konzentration vorhanden (39, 40). Die angeregten Sensitizermoleküle bilden mit Ascorbat ein Intermediat, welches in Gegenwart von Sauerstoff zu einem Ascorbatradikal und einem hochreaktiven Superoxidradikalanion reagiert, das über eine Radikalkettenreaktion die Zellstrukturen irreversibel schädigt.

Bei der Typ II Photoreaktion ist aus dem Triplettzustand des angeregten Sensitizers eine Energieübertragung auf Sauerstoff im Grundzustand ($^3\text{O}_2$) möglich, welche eine Spinumkehr zu Singulett-Sauerstoff bewirkt ($^1\text{O}_2$) (91). Singulett-Sauerstoff ist eine hochreaktive Substanz, die durch Photooxidation von Proteinen und Lipiden Membrankompartimente und deren Permeabilität für Ionen und Wasser derart schädigt, dass die Zellkompartimentierung zusammenbricht und der Zelltod eintritt (1a). Für diese Reaktion ist ein hoher Sauerstoffpartialdruck zwingend notwendig.

1.1.2 Bisherige Therapiemöglichkeiten der Photodynamischen Therapie

Gegenwärtig wird die **Photodynamische Therapie** als eigenständige Therapie bei allen endoskopisch gut zugänglichen Tumoren eingesetzt:

Bei oberflächlichen Endobronchialkarzinomen, bei denen noch keine Lymphknotenbeteiligung erkennbar war, konnten mit Hematoporphyrinderivat bzw. Photophrin als Sensitizer der ersten Generation sehr gute Erfolge erzielt werden (3a). Hematoporphyrinderivat wurde dabei mittels eines Bronchoskops aufgetragen oder durch eine bronchial arterielle Infusion verabreicht. Zweiundsiebzig Stunden später erfolgte die Bestrahlung. Für Läsionen kleiner als einen Zentimeter konnte eine achtzig prozentige Remission erzielt werden (3a, 27).

Die **Photodynamische Therapie** erweist sich außerdem als eine sehr erfolgreiche Methode zur Bekämpfung von oberflächlichen Ösophageal- (25a) und Blasenkarzinomen (88). Im Rahmen dieser Therapien war die spezielle Entwicklung von Ballonkathetern sehr hilfreich (19a). Durch die Einbringung der Katheter wird eine gleichmäßige Bestrahlung garantiert, was besonders bei multiplen Läsionen von Bedeutung ist.

Auch bei Hauttumoren können mit der **Photodynamischen Therapie** gute Erfolge erzielt werden (32b).

Bei Gehirntumoren wird die PDT häufig in Kombination mit chirurgischen Eingriffen eingesetzt. Insbesondere bei Glioblastomen wird der Photosensitizer meist präoperativ direkt in den Tumor injiziert. Nach der Eukleation des Tumors erfolgt eine Bestrahlung des verbleibenden Restgewebes (41a).

Bei Patienten mit Tumoren im fortgeschrittenen Stadium hingegen ist der Erfolg der **Photodynamischen Therapie** bisher wegen der mangelnden Eindringtiefe des sichtbaren Lichts nicht abschließend beurteilbar (25b, 42b): In den USA werden zur Zeit Phase III Studien (kontrollierte Therapiestudie an bis zu 300 Probanden zum Wirksamkeits- bzw. Überlegenheitsnachweis) zur Therapie von metastasiertem Brustkrebs, gynäkologischen Tumoren, Hautkrebs, Kaposi Sarkom und Papillomatose durchgeführt (30a, 32a, 101). Zusätzlich laufen derzeit Studien zur intraperitonealen bzw. intrapleuralen **Photodynamischen Therapie** (72a, 85).

Durch die Möglichkeit, den Sensitizer durch Licht zu aktivieren und damit eine Zerstörung der Tumorzelle zu bewirken, ergeben sich entscheidende Vorteile dieser Therapie: Das Wirkprinzip kann sich selektiv am Tumor entfalten. Um therapeutisch ausreichende Konzentrationen des Sensitive am Tumor zu erzielen, ist allerdings ein gezieltes Targeting des Tumors erforderlich.

1.1.3 Verschiedene Möglichkeiten des Tumortargetings

Eine Möglichkeit des Tumortargetings bietet die von Bosslet et al. durchgeführte **Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT)**, die aufgrund der hohen Kosten in Deutschland nicht zum Einsatz kommt (2, 9) (Abb. 1). Bei dieser Therapie wird zuerst ein Antitumorantikörper-Enzym-Komplex intravenös injiziert. Der Antikörper-Enzym-Komplex reichert sich spezifisch am Tumor an. Zuletzt wird das „Prodrug“ (inaktives Vorläufermolekül des Chemotherapeutikums) über mehrere Tage hinweg als Infusion verabreicht. Das „Prodrug“ wird nur am Tumor durch die Enzymaktivität des Antikörper-Enzym-Komplexes in seine aktive Form umgewandelt. Es entfaltet dort seine Wirkung als aktives „Drug“. Ziel ist dabei ein „Drug“ mit so geringer Stabilität zu entwickeln, dass es nicht ins Blut zurückdiffundiert (84a). Handelt es sich um ein sehr stabiles, aktives „Drug“, gibt es noch die Möglichkeit, dieses durch spezifische Enzyme intravasal abzubauen (IVIAD: **Intravascular Inactivation of active Drug**) (2).

Voraussetzungen für diese Form der Therapie sind das Vorhandensein von: tumorspezifischen Antigenen (72b), spezifischen Enzymen mit einem hohen v_{max} (Maximalgeschwindigkeit), hohen K_{kat} (Wechselzahl) und einem niedrigen K_m -Wert (Michaelis-Menten-Konstante), einem großen Toxizitätsunterschied zwischen „Prodrug“ und „Drug“, einer geringen Immunogenität des Antikörper-Enzym-Komplexes und einem hohen Anreicherungsfaktor des „Drugs“ am Tumor.

Eine Variation dieses Verfahrens stellt die ADDAMM (**a**ctive **d**rug **d**eactivation in **a**ntimetabolite / **m**etabolite therapy) dar. Hier wird ein „Drug“ zusammen mit einem schützenden Antimetaboliten verabreicht, der die toxische Wirkung des „Drugs“ neutralisiert. Nur am Tumor wird der schützende Antimetabolit durch das Enzym des

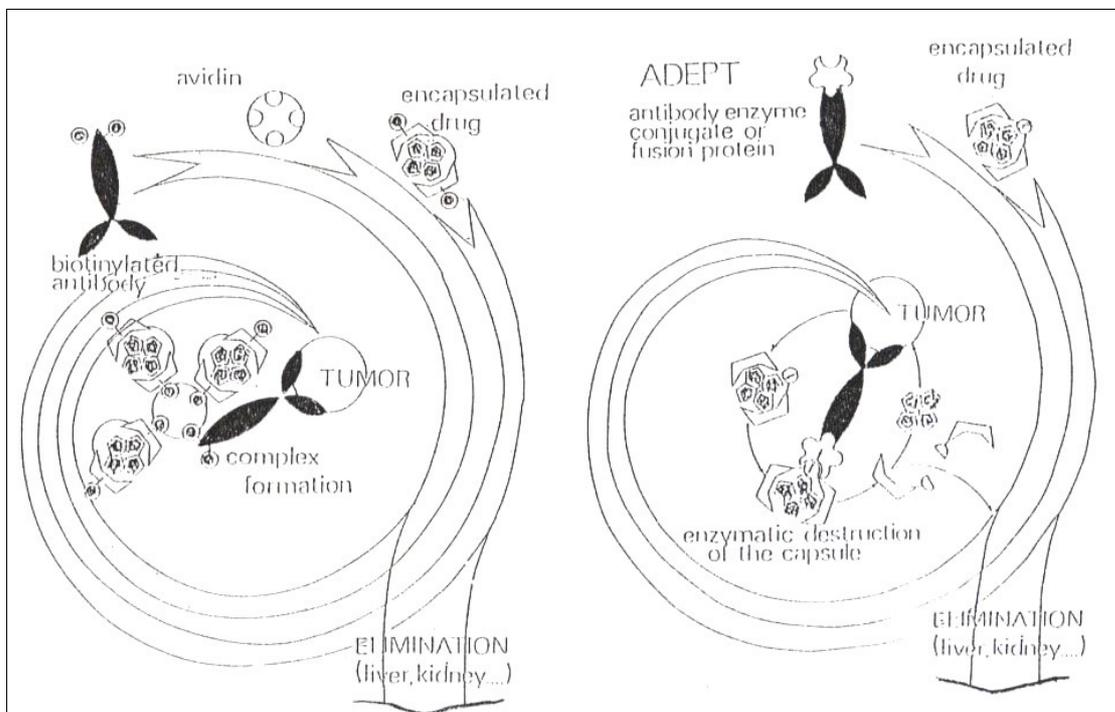


Abb. 1: Prinzipien der Mehrphasen-Chemotherapie im Vergleich [aus (44a)]

Antikörper-Enzym-Komplex deaktiviert, so dass das „Drug“ hier selektiv seine Wirkung entfalten kann. Häufig erweist sich eine Kombinationstherapie aus IVIAD und ADDAMM sinnvoll, um gegen „Drug“-Resistenzen wirkungsvoll vorzugehen (2).

Eine weitere Möglichkeit ein spezifisches Tumortargeting zu erreichen ist mit dem Biotin-Avidin System gegeben (5) (Abb. 2): Dazu werden monoklonalen Antikörper

Polyphasische Photochemotherapie

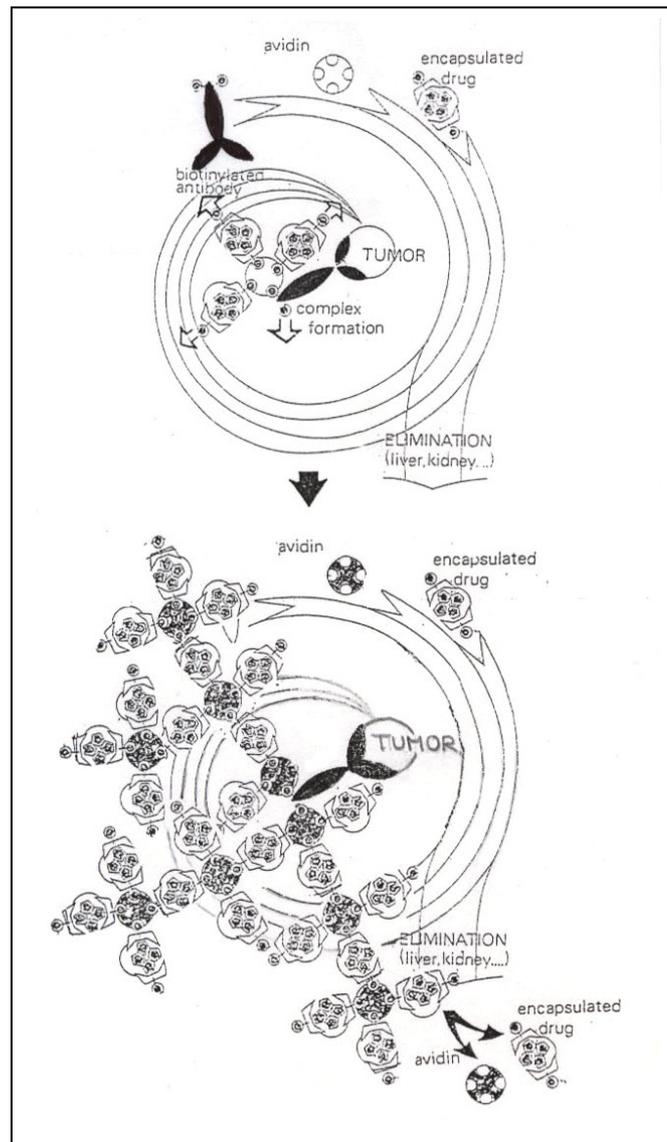


Abb. 2: Akkumulation von Carrier-Sensitizer-Komplexen am Tumor [aus (52)]

und der in ein Carriersystem eingeschlossene Wirkstoff biotinyliert (60). In der ersten Therapiephase werden biotinylierte Antikörper infundiert. Ein großer Teil dieser Antikörper lagert sich am Tumor an. Die nicht spezifisch an das Tumorgewebe gebundenen Antikörper werden nach einigen Tagen abgebaut und ausgeschieden. Dies zeigt, dass nur durch **polyphasische Tumorthherapie** eine ausreichende Selektivität erreicht werden kann. Anschließend wird Avidin zusammen mit dem biotinylierten Carrier injiziert. Aufgrund der hohen Affinität zum Biotin reichen sehr

niedrige Konzentrationen (10^{-12} M) aus, um die biotinylierten Antikörper zu sättigen (80). Da Avidin über vier Bindungsstellen zu Biotin verfügt, und ein Biotin an jeder Seite des Dimers vorhanden ist, sollte dies unter der Annahme, dass jede Tumorzelle über 5×10^4 Antigenbindungsstellen verfügt, zu einer multiplikativen Anreicherung bis zu 10^6 Sensitizermolekülen pro Tumorzelle führen.

Als Wirkstoff in Kombination mit dem Biotin-Avidin-System kann ein in ein Carriersystem eingeschlossener Photosensitizer verwendet werden. Durch die multiplikative Anreicherung sollte es möglich sein, den phototoxischen Konzentrationsbereich, der für eine irreversible Zellschädigung erforderlich ist, zu erreichen (52). Somit lässt sich hier ein Prinzip darstellen, das die **Photodynamische Therapie** mit der Möglichkeit eines Tumortargetings verbindet.

1.1.4 Reduktion systemischer Nebenwirkungen durch den Einschluss der Wirkstoffe in ein Carriersystem

Da der Sensitizer („Wirkstoff“) bei der **Photodynamischen Therapie** systemisch verabreicht wird und es bisher *nicht* gelungen ist, den Sensitizer selektiv im Tumorgewebe anzureichern (7, 19, 61, 62, 65, 66, 68, 72, 76) (Abb. 3), bleibt als Nebenwirkung eine über einen längeren Zeitraum erhöhte Lichtempfindlichkeit zurück, was eine deutliche Reduktion der Lebensqualität des Patienten bedeutet.

Um eine solche systemische Wirkung des Sensitive (Porphyrin) zu umgehen, bietet sich der Einschluss desselben in ein Carriersystem an. Derartige Einschluss-systeme werden als biospezifische Carriersysteme bezeichnet und sollten folgende Eigenschaften besitzen:

- Es müssen stabile Einschlusskomplexe gebildet werden, damit keine Interaktion des Sensitive mit den Plasmaproteinen des Blutes bzw. den Körperzellen stattfindet.
- An diesem Komplex sollen Andockstellen für funktionalisierte monoklonale Antikörper oder Hormone vorhanden sein, die spezifisch an die Tumoroberfläche binden (59, 72b, 77, 86).
- Der Komplex muss am Tumor aufgebrochen werden können (52).
- Nur der Sensitizer soll von den Tumorzellen aufgenommen werden.

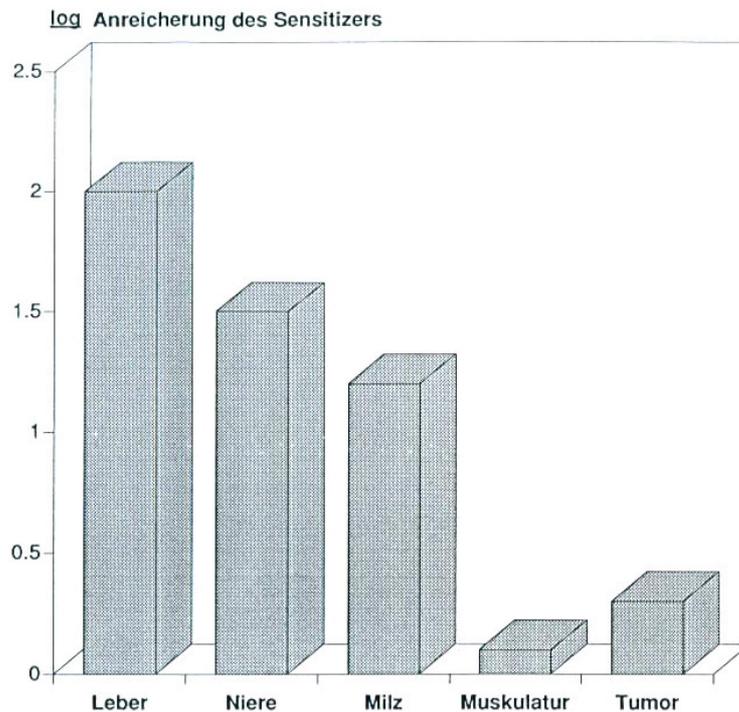


Abb. 3: Anreicherung von Si-Pc IV in Organen der Maus [nach (19)]

Fisher et al. konnten zeigen, dass stark hydrophile Moleküle, wie beispielsweise meso-Tetraphenylporphintetrasulfonat und Phthalocyanintetrasulfonat (23, 31), die negative Ladungen tragen, nicht durch umgebendes Gewebe resorbiert werden. Da stark hydrophile Substanzen bereits ausreichend sind, um diesen Effekt zu erzielen, haben wir in Erwägung gezogen, Cyclodextrine als Carriermoleküle einzusetzen. Cyclodextrine bestehen aus sechs bis acht $\alpha(1-4)$ verknüpften D-Glucoseeinheiten (s. auch Abb. 5). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine hydrophile Hülle besitzen und innen ausreichend hydrophob sind, um einen Sensitizer inkorporieren zu können (42a).

Die von Breslow & Chung (10, 11) synthetisierten Cyclodextrin-Clamshell-Dimere können möglicherweise als Carriersystem eingesetzt werden (Abb. 4). Sie bestehen aus zwei Cyclodextrin-Monomeren, die über zwei Spacermoleküle muschelschalenartig miteinander verknüpft sind. Diese bilden stabile Komplexe mit solchen Mole-

külen, die an ihren exponierten Enden tert-Butylbenzoyl-Substituenten tragen. Diese Substituenten fungieren als Ankergruppen. Der hohe Ordnungsgrad derartiger Komplexe führt zu einer Entropieverminderung. Dadurch wird die Bindungskonstante über den Erwartungswert von 10^8 l/mol auf 10^{10} l/mol erhöht.

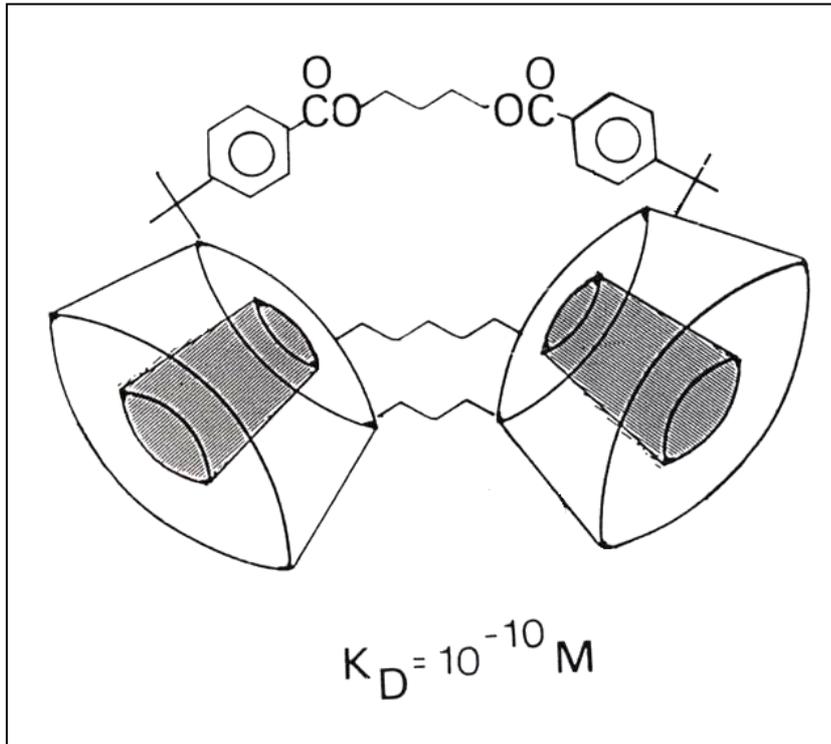


Abb. 4: Bildung eines inerten Komplexes durch Einschluss von 1,3-Di-tert-Butylbenzoylpropan-1,3-diol in ein Cyclodextrindimer [aus (10)]

1.2.1 Erste Zielsetzung der vorliegenden Arbeit:

Aus den allgemeinen Erläuterungen zu den Prinzipien der **Polyphasischen Photochemotherapie** ergeben sich für diese Arbeit bereits zwei zentrale Fragestellungen:

- Eignen sich Cyclodextrindimere als Carriersysteme?
- Kann durch Einführen geeigneter Ankergruppen in das Grundgerüst der folgenden Sensitizer:
 - Pheophorbide
 - Bacteriopheophorbide
 - Etioporphyrine (als Modellphotosensitizer)
 - Hematoporphyrine (als Modellphotosensitizer)

ein stabiler Komplex mit Cyclodextrindimeren gebildet werden, ohne dass sie ihre Polarität bzw. Phototoxizität einbüßen?

In Anlehnung an die von Breslow & Chung durch Einführen voluminöser Ankergruppen erzielten hohen Bindungskonstanten mit Cyclodextrindimeren, wird in dieser Arbeit versucht, bei verschiedenen Photosensitizern an geeigneten Positionen vergleichbare Substituenten einzuführen, mit dem Ziel, ähnlich hohe Bindungskonstanten mit Cyclodextrindimeren zu erreichen wie Breslow & Chung (Abb. 4). Die in dieser Arbeit eingesetzten Dimere bestehen aus zwei Cyclodextrinmonomeren, die über einen variablen Spacer an ihrer sekundären Seite zu einem Dimer verknüpft werden (Abb. 5) (78).

Als Photosensitizer werden Pheophorbid-, Bacteriopheophorbid-, Hematoporphyrin- und Etioporphyrinderivate verwendet. Die Photosensitizer der ersten Generation, zu denen die Hematoporphyrine (100) und die Etioporphyrine zählen, werden in dieser Arbeit in erster Linie als Modellsubstanzen eingesetzt, um geeignete Verkapselungsstrategien zu entwickeln.

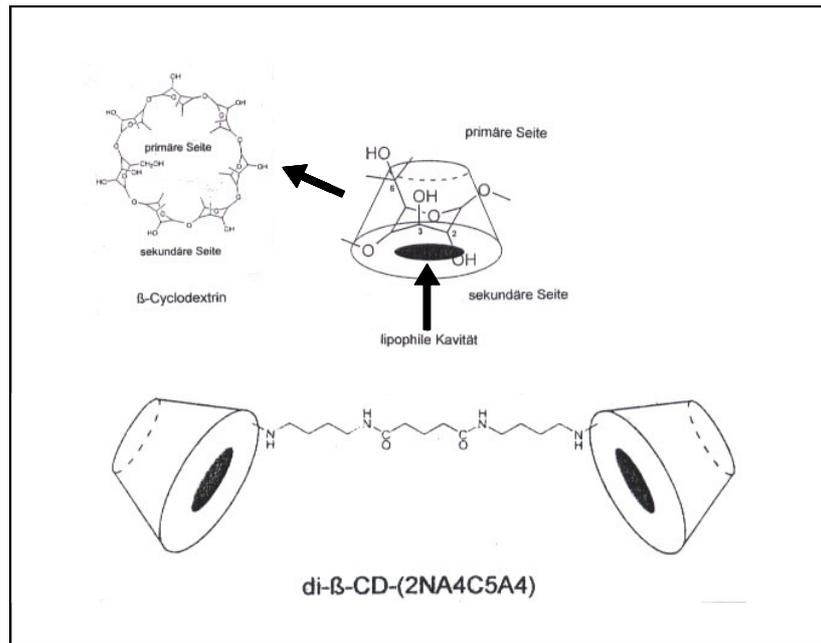


Abb. 5: Aufbau des im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Cyclodextrindimers $\text{di-}\beta\text{-CD-(2N-A4-C5-A4)}$ (78)

Besonders erstrebenswert in der Praxis ist die Verwendung von Photosensitizern der zweiten Generation, wie Bacteriopheophorbide und Pheophorbide, die sich durch eine starke Absorption im roten Bereich des sichtbaren Spektrums auszeichnen (49, 50, 55). Da bei hohen Wellenlängen die Eindringtiefe des Lichtes in das Gewebe erheblich höher ist, kann eine größere Tiefenwirkung erzielt werden (18).

Die Sensitizer der zweiten Generation sind darüber hinaus als natürlich vorkommende Pigmente gut biologisch abbaubar (29), haben eine vernachlässigbare Dunkeltoxizität sowie eine starke Fluoreszenz zur Tumordetektion (44).

Die modifizierten Sensitizer werden im Zellversuch getestet, um ausschließen zu können, dass die Modifikation ihre Phototoxizität negativ beeinträchtigt hat. Dazu werden Resorption, Resorptionskinetik, Phototoxizität und intrazelluläre Lokalisation bestimmt (45, 49, 54).

Bei sich im Zellversuch als geeignet erweisenden Photosensitizern wird die Bindungskonstante der durch Ankergruppen modifizierten Sensitizer mit geeigneten Cyclodextrinen bestimmt (33, 98).

Zur Freisetzung des Sensitizers aus dem Cyclodextrindimer am Tumor gibt es verschiedene Vorüberlegungen: Ein Prinzip beruht auf dem Einbau einer Sollbruch-

stelle in das Dimer, die als Folge der Lichtabsorption gespalten werden kann, ein anderes Prinzip auf der Spaltung des Cyclodextrindimers durch geeignete Enzyme.

Das Aufzeigen von Bedingungen zur Optimierung dieses inerten Einschlusses ohne gleichzeitigen Wirkungsverlust des Sensitizers macht einen wesentlichen Bestandteil der Arbeit aus.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist, die an den Modellsubstanzen gewonnenen Erkenntnisse über geeignete Verkapselungsstrategien und Prinzipien der Photo-toxizitätserhaltung bzw. -steigerung auf andere äußerst potente Chemotherapeutika wie z.B. Taxol, Vinblastin oder Vincristin zu übertragen.

Eine wirkungsvolle Verkapselung solcher Substanzen soll in Zukunft eine gezieltere Therapie von Tumoren erlauben, ohne die bisher massiven Nebenwirkungen (Tab. 1) (50, 52).

	ADRIAMYCIN	ASPARGINASE	CISPLATINUM	CYCLOPHOSPHAMIDE	CYTARABINE	DAUNOMYCIN	5-FLUOROURACIL	UREA DERIVATIVES	METHOTREXATE	MITHRAMYCIN	VINCISTINE
Fever, Allergies	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Nausea, Diarrhoe, Vomitation	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Stomatitis, Oesophagitis	■			■	■	■	■	■			
Skin alterations, loss of hair	■		■	■		■				■	
Cardiotoxicity	■				■	■					
Lung fibrosis, Pneumonitis			■								
Hepatotoxicity	■						■	■	■		
Nephrotoxicity		■					■				
Hemorrhagic cystitis			■								
Blood clotting alterations	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Neurotoxicity		■	■			■		■		■	
Genetic alterations			■	■		■		■		■	

Tab. 1: Die häufigsten Nebenwirkungen der Krebschemotherapie [aus (99)]

1.2.2 Zweite Zielsetzung der vorliegenden Arbeit:

Parallel zu den Modifikationen der Sensitizer mit dem Ziel der Verkapselung, wird der Fokus auf die phototoxischen Eigenschaften der Sensitizer gerichtet und es ergeben sich die folgenden Fragestellungen:

- Lassen sich durch direktes Einbringen verschiedener Edelmetalle in den Tetrapyrrolzyklus der (Bacterio-)Pheophorbide (direkte Metallierung) für die Pharmakotherapie einsetzbare Sensitizer entwickeln?
- Kann man mit diesen Sensitizern zusätzlich zur herkömmlichen **Photodynamischen Therapie** ein neues Therapiefeld der PDT eröffnen?
- Sind diese Verbindungen möglicherweise zusätzlich in der Lage, ähnliche Effekte wie das bereits verwendete Chemotherapeutikum cis-Platin – das über lokale Vernetzung von DNA-Strängen letztlich zur Hemmung der Zellteilung führt – zu erzielen?

Die Idee, die sich hinter diesen Metallierungen der (Bacterio-)Pheophorbide verbirgt, könnte eine Variation der **Polyphasischen Photodynamischen Therapie** darstellen: Zuerst würde der metallierte Sensitizer systemisch verabreicht werden. Geringe Mengen Sensitizer (42d) im Tumor wären ausreichend. Anschließend würde man den Fokus eines Röntgenstrahlbündels direkt auf den Tumor richten. Dadurch würde der Tetrapyrrolcyclus der Sensitizer zerstört und die in ihm enthaltenen Metalle (z.B. Platin) einschließlich ihrer Liganden freigesetzt. Diese könnten nach den gleichen Prinzipien wie cis-Platin, allerdings – im Unterschied zu diesem – mit hoher Ortspräzision am Tumor ihre Phototoxizität entfalten. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode wäre, dass auch endoskopisch nicht erreichbare Tumoren einer solchen Therapieform zugänglich wären, dadurch dass die Einschränkungen durch die zu große Abschwächung des Lichtes im Gewebe mit Hilfe des punktuellen Einsatzes von Röntgenstrahlung überwunden werden könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Chemie, Spektroskopie und Chromatographie von Pheophorbiden, Bacteriopheophorbiden, Hematoporphyrinen und Etioporphyrinen

2.1.1 Allgemeines

Alle Arbeiten mit Pheophorbiden, Bacteriopheophorbiden, Hematoporphyrinen, Etioporphyrinen und ihren Derivaten werden unter Grünlicht ausgeführt. Für alle Reaktionen werden analysenreine Chemikalien verwendet. Diethylether, Dichlormethylen und Chloroform werden zur Reinigung über eine Al₂O₃-Säule gegeben (32).

Chlorophyll a wird aus sprühgetrockneten Zellen von *Spirulina geitleri*, einer in Mexiko vorkommenden Blaualge, gewonnen. Sie enthält ausschließlich Chlorophyll a. Damit entfällt eine Trennung von Chlorophyll a und b, die bei Verwendung von höheren Pflanzen erforderlich ist. (73). Aus diesem Grunde ist nur noch eine Abtrennung der Carotinoide erforderlich.

Der für die Isolierung von Bacteriochlorophyll verwendete *Bakterienstamm R 26*, eine carotinoidfreie Mutante, ist von Frau C. Bubenzer gezogen und geerntet worden (Institut für Biochemie der Pflanzen, Ludwig-Maximilian Universität München, Lehrstuhl Prof. Dr. Scheer). Alternativ kann Bacteriochlorophyll aus der carotinoidhaltigen Blaualge *Rhodospirillum rubrum* gewonnen werden (82a).

2.1.2 Chemische Syntheseverfahren

Chlorophylle und ihre Derivate:

Isolierung von Chlorophyll a aus *Spirulina geitleri*

Zur Extraktion von Chlorophyll a aus *Spirulina geitleri* werden 100 g dieser gefriergetrockneten Blaualgen in zwei Liter Methanol aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Um die Zellfragmente abzutrennen, wird über eine Glasfritte filtriert. Die Extraktion kann wiederholt werden [nach (93)].

Dioxanfällung

Eine Vorreinigung des aus *Spirulina geitleri* extrahierten Chlorophylls erfolgt durch Ausfällen als Komplex mit Dioxan.

Zu einer methanolischen Lösung von Chlorophyll a fügt man soviel von einem Dioxan-Wasser-Gemisch (1 : 2) hinzu, bis der Methanolgehalt auf 70 % gesunken ist [nach (93)]. Zur Vervollständigung der Fällung wird eine Stunde bei 4°C gerührt. Die Chlorophyllaggregate werden über eine Glasfritte filtriert und in Ether aufgenommen. Die Konzentration des Chlorophylls wird spektralphotometrisch über die Absorption bei 666 nm bestimmt. Es wird mit einem Extinktionskoeffizienten (ϵ) von $86500 \text{ mol} \times \text{l}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ gerechnet (41).

$$c = E / (d \times \epsilon) = 0,71167 / (1 \text{ cm} \times 86500 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}) = 8,256 \times 10^{-6} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$$

Bezogen auf den Chlorophyll a Gehalt von *Spirulina*, beträgt die Ausbeute 30 %.

Darstellung von Pheophytin

Die Entmetallierung von Pheophytin (d.h. Verlust des zentralen Mg-Atoms von Chlorophyll) wird durch Zugabe einiger Tropfen Eisessig unter Argonatmosphäre erreicht. Man benötigt so viel Eisessig, bis sich die Farbe von grün nach braun ändert. Um Oxidationen am Pheophytin zu vermeiden, muss der Eisessig sofort mit Hilfe eines Argonstromes verdampft werden (81).

Darstellung von Pheophorbid

Die enzymatische Spaltung des 17^4 -Phytolrestes von Pheophytin mit Chlorophyllase-Aceton Pulver (82b) ergibt die freie Säure von Pheophytin, genannt Pheophorbid.

1g Chlorophyllase-Aceton-Puder wird in 100 ml 0,5 M Phosphatpuffer (pH 7,7) homogenisiert. Zu dieser Lösung gibt man 800 μl Triton-X-100 und 100 mg Pheophytin, sättigt sie mit Argon und inkubiert sie sechs Stunden im Dunkeln bei 37°C auf einem Schüttler. Anschließend wird die Suspension mit Natriumchlorid gesättigt, und die Pigmente werden mit Ether extrahiert. Nach dem Trocknen des Extraktes über Natriumchlorid wird das Lösungsmittel unter Vakuum verdampft und der Rückstand über Nacht lyophilisiert. Anschließend löst man den Rückstand

wieder in Aceton und gibt ihn auf eine in Aceton equilibrierte CM-Sepharose-Säule (S. 27). Bei 4 % Methanol lässt sich das Produkt eluieren, nachdem zuvor bei niedrigeren Methanolkonzentrationen nicht reagiertes Edukt eluiert wurde.

Die Darstellung von Bacteriopheophorbid erfolgt analog.

Darstellung von Pheophorbidethylester

Um den 17⁴-Phytylrest mit Ethanol umzuestern, werden 50 mg Chlorophyll a in 20 ml schwefelsaurem Ethanol (3,5 % H₂SO₄) gelöst. Es wird 45 Minuten bei 78 °C unter Argonspülung am Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wird der Ester im doppelten Volumen Ether aufgenommen. Man wäscht so lange mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung, bis man einen neutralen pH-Wert erreicht. Die organische Phase wird zweimal über Natriumchlorid getrocknet. Danach wird das Lösungsmittel verdampft. Nach Reinigung des Esters über eine Kieselgelsäule mit 6 % Aceton in Toluol als Elutionsmittel, beträgt die Ausbeute der Umesterung 70 % [nach (81)].

Darstellung von Pheophorbidmethylester

Die Synthese und Reinigung des Pheophorbidmethylesters erfolgt analog der Synthese des Ethylesters, allerdings unter Austausch des Lösungsmittel Ethanol gegen Methanol und Erhöhung der Schwefelsäurekonzentration auf 5 %.

Darstellung von Pyroethylpheophorbid

50 mg gereinigter Ethylpheophorbid werden in 12,5 ml Pyridin gelöst und 24 Stunden bei 132 °C unter Argonatmosphäre am Rückfluss erhitzt [nach (94)]. Der Reaktionsverlauf wird auf RP 8-Platten mit Methanol als Laufmittel kontrolliert. Normalerweise ist die Reaktion quantitativ, so dass keine weitere Reinigung erforderlich ist. Eine Trennung ist nur dann notwendig, wenn der eingesetzte Ethylpheophorbid bereits Spuren von 13²-OH-Ethylpheophorbid enthält.

Bacteriochlorophylle und ihre Derivate:

Isolierung von Bacteriochlorophyll aus *Rhodobacter sphaeroides*

100 g *Rhodobacter sphaeroides* R 26 werden in 600 ml Methanol aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dadurch werden die Zellen aufgeschlossen. Die Extraktion des Bacteriochlorophylls erfolgt portionsweise in 200 ml Schritten durch Ausschütteln in einem Gemisch aus Ether und Petrolether (Verhältnis 4:1). Die Phasentrennung lässt sich durch Zugabe von Natriumchlorid, Ether, Petrolether, Wasser oder Methanol verbessern. Die Etherphasen werden 20 Minuten über Natriumchlorid getrocknet, vereinigt und in einem 500 ml Rundkolben (große Oberfläche) am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Verbleibende Wasserreste werden azeotrop durch Zugabe von 100 ml Toluol entfernt. Eine zusätzliche Trocknung erfolgt über Nacht im Exsikkator. Zur Abtrennung von Lipidresten wird der Kolbeninhalt fünfmal mit je 100 ml Methanol gewaschen. Die Lipidreste verbleiben im Kolben. Die Methanollösungen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeeengt [nach (94)].

Isolierung von Bacteriochlorophyll aus *Rhodospirillum rubrum*

Bacteriochlorophyll a wird aus lyophyllisierten Zellen von *Rhodospirillum rubrum* nach der Methode von Scherz et al. (82a) extrahiert. Die Algen werden im Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben. Zur Entfernung eines großen Teils der Carotinoide wird dreimal mit Aceton extrahiert. Anschließend wird das Extrakt über eine Glasfritte filtriert und der Überstand verworfen. Das Bacteriochlorophyll wird nun mit Hilfe von Methanol aus dem Rückstand extrahiert, in dem man es 10 Minuten unter Rühren in Methanol resuspendiert. Nach erneuter Filtration und Verwerfen des Rückstands wird das Lösungsmittel unter Vakuum evaporiert. Der Rückstand wird in Aceton gelöst und über eine mit Aceton equilibrierte DEAE-Sepharose-Säule gegeben (S. 26). Bei ansteigenden Methanolkonzentrationen werden zunächst die verbliebenen Carotinoide und Pheophytine entfernt. Als letztes wird Bacteriochlorophyll mit einer Mischung von Methanol/Aceton [1 : 3 (v / v)] von der Säule eluiert, im Exsikkator vakuumgetrocknet und bei -20 °C unter Argonatmosphäre gelagert. Das Reaktions-

produkt wird spektrophotometrisch und mit Hilfe von HPTLC auf Reinheit geprüft. Auch Chlorophyll aus sprühgetrockneten Zellen von *Spirulina geitleri* kann auf diese Art und Weise gewonnen werden (S. 13 f.)

Darstellung von 13²-OH-Bacteriochlorophyll

Das aus *Rhodobacter sphaeroides* R 26 isolierte Bacteriochlorophyll wird in Methanol gelöst und bei guter Belüftung eine Woche stehengelassen. Dabei bildet sich 13²-OH-Bacteriochlorophyll. Die Aufarbeitung erfolgt über eine DEAE-Cellulose-Säule (Laufmittel: Methanol, $R_f = 0,6$) (94). Alternativ können zur Reinigung des 13²-OH-Bacteriochlorophylls auch ascorbathaltige (Oxidationsschutz) Kieselgelplatten benutzt werden. Als Laufmittel wird ein Gemisch aus Toluol und Aceton (S. 21) verwendet. Um eine Oxidation des 13²-OH-Bacteriochlorophylls zu vermeiden, muss die Chromatographie unter ständiger Argonspülung durchgeführt werden.

Darstellung von Bacteriopheophytin und 13²-OH-Bacteriopheophytin

Die Entmetallierung von Bacteriochlorophyll und 13²-OH-Bacteriochlorophyll wird durch Zugabe einiger Tropfen Eisessig erreicht. Man benötigt so viel Eisessig, dass das Pigment gerade benetzt wird. Um Oxidationen am Bacteriochloringerüst zu vermeiden, muss der Eisessig sofort mit Hilfe eines Argonstromes verdampft werden (81).

Darstellung von Bacteriopheophorbid

Die Darstellung von Bacteriopheophorbid folgt der Synthese von Pheophorbid, die auf S. 14 f. beschrieben wird.

Hematoporphyrine und ihre Derivate:

Darstellung von 2,4-Di-(α -(Hydroxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester

2,4-Diacetyldeuteroporphyrin-IX-dimethylester wird durch Acetylierung des Kupferkomplexes von Deuteroporphyrin-IX-dimethylesters erhalten [nach (89)].

Anschließend werden 600 mg dieser Substanz mit Natriumborhydrid in Dichlormethan bei einer Temperatur von unter 5 °C zum 2,4-Di-(α -(Hydroxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester (Hematoporphyrindimethylester) reduziert [nach (62)]. Die Reinigung erfolgt über eine Al₂O₃-Säule. Zuerst wird mit Dichlormethan, dann mit Chloroform als Laufmittel eluiert.

Darstellung von 2,4-Di-(α -(Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester

Die Synthese von 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester wird entsprechend der von Moan et al. angegebenen Synthesemethode durchgeführt. [nach (21a)]. Die Reaktion erfolgt zunächst über eine Reaktion von 2,4-Di-(α -(Hydroxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester (Hematoporphyrindimethylester) mit HBr gelöst in Eisessig (32%). Anschließend wird der erhaltene 2,4-Di-(α -Brom-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester durch Zugabe von Methanol in den 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester überführt.

Etioporphyrine und ihre Derivate:

Darstellung von meso-N,N-Dimethylaminomethyl-Etioporphyrin I

meso-N,N-Dimethylaminomethyl-Etioporphyrin I wurde mir freundlicherweise von Prof. G.V. Ponomarev aus Moskau zur Verfügung gestellt (72c).

2.1.3 Spektroskopische Methoden

UV/VIS-Absorptionsspektroskopie

Die UV/VIS-Absorptionsspektren wurden an einem Lambda 2 Spektralphotometer (Perkin-Elmer, Überlingen) aufgenommen. Die Datenaufnahme fand über einen IBM-kompatiblen PC mit firmeneigener Software (PECSS, Vers. 3.2) statt. Die Auswertung der Spektren erfolgte nach Umwandlung der Daten in den ASCII-Code mit dem Programm Origin (Version 3.0, MicroCal).

Fast-Atom-Bombardment-Massenspektroskopie (FAB-MS)

Die FAB-Massenspektren wurden von Herrn Prof. Dr. W. Schäfer (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) an einem CH 7a-SS 100 Massenspektrometer (Varian MAT, Bremen) angefertigt. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren, das sich speziell zur Bestimmung der hohen Molekulargewichte von Chlorophyllen und Bacteriochlorophyllen eignet.

Matrix-Assistent-Laserdesorption-Ionisation-Massenspektroskopie (MALDI-MS)

Bei der MALDI-MS wurden die Pigmente auf Aluminium-Trägern in eine Matrix aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) eingebettet und mit einem gepulsten N₂-Laser (337 nm, $\tau = 3$ ns) desorbiert. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch thermisch labile Moleküle ohne eine unmittelbare Absorption der Laserstrahlung mit Hilfe der Matrix in die Gasphase überführt werden können. Zusätzlich ermöglicht die Matrix durch Protonentransfer auf die Probe eine hohe Ausbeute an elektrisch geladenen Probenmolekülen (3, 35, 36).

Die Massenspektren wurden mit einem nicht kommerziell erhältlichen linearen Flugzeitspektrometer von Herrn Dr. D. Kirsch (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) aufgenommen.

¹H-NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Spektren wurden an einem 360-MHz-Gerät (Bruker) aufgenommen. Als Lösungsmittel wird D₆-Aceton (99,6% deuteriertes Aceton) verwendet, in dem sich die Pheophorbide und Bacteriopheophorbide weitgehend als Monomere lösen. Die chemische Verschiebung wird gegen Tetramethylsilan als inneren Standard angegeben. Die Aufnahme der im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Spektren wurde von Herrn Dr. Cmiel (Technische Universität München-Garching) vorgenommen.

Fluoreszenzspektroskopie

Die im Rahmen der Zellversuche durchgeführten Fluoreszenzmessungen wurden auf einem Luminescence Spectrometer LS 50 der Firma Perkin-Elmer durchgeführt (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Moser). Es werden 1 ml Fluoreszenzküvetten benutzt. Die Emissions- und Anregungsschlitzbreiten werden auf 10 nm eingestellt. Zusätzlich werden Abschwächungsfiler benutzt. Die Datenverarbeitung und Auswertung wurde mit Hilfe des Programms Grapher für Windows durchgeführt.

Die zur Bestimmung der Komplexbindungskonstanten durchgeführten Fluoreszenzmessungen wurden in einem Shimadzu RF-1501 Spektrofluorometer mit einem temperierten Küvettenhalter durchgeführt (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Moser).

2.1.4 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie:

Analytische Dünnschichtchromatographie

Diese Methode wird zur Auftrennung, Identifizierung und Reinheitsbestimmung der Pigmente angewendet.

Kieselgel-60-HPTLC-Platten

Für die Kieselgel-60-HPTLC-Fertigplatten (Merck) werden drei verschiedene Laufmittelgemische verwendet, die sich wie folgt zusammensetzen:

<u>Laufmittelgemisch 1</u>	<u>Laufmittelgemisch 2</u>	<u>Laufmittelgemisch 3</u>
92 % Toluol	71,3 % Toluol	68 % Dichlormethan
8 % Aceton	14,3 % Methanol	25 % Hexan
	14,3 % Aceton	5 % Propanol
		2 % Methanol

Diese Systeme eignen sich sowohl für die Pheophorbid- als auch für die Bacteriopheophorbidanalytik. Bedingt durch die unterschiedliche Polarität der Laufmittelsysteme kommt es bei den verschiedenen Systemen zu einer unterschiedlichen Entzerrung der zu trennenden Einzelpigmente.

RP-8-HPTLC-Platten

Alternativ können RP-8-HPTLC-Fertigplatten (Merck) verwendet werden. Als Laufmittel wird technisches Methanol eingesetzt.

Dieses System dient vor allem der Unterscheidung von Pheophorbiden und Pyropheophorbiden bzw. deren Derivaten.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Diese Methode wird zur Trennung von Pigmenten in präparativem Maßstab eingesetzt.

Kieselgel-60-Platten

Isolierung von 3¹-tert-Butylphenoxyethyl(pyro)pheophorbidethylester

Zur Trennung aller bei der Synthese von 3¹-tert-Butylphenoxyethyl(pyro)pheophorbidethylester entstehenden Produkte werden Kieselgel-60-Platten (20 x 20 cm) der Firma Merck verwendet.

Als Laufmittel wird ein Gemisch aus Toluol / Methanol / Aceton im Verhältnis [5 : 1 : 1 (v / v)] [modifiziert nach (21)] verwendet. Das zu reinigende Pigment wird in Aceton gelöst und ca. 2 cm über dem unteren Plattenrand als breite Linie aufgetragen. Die Probe wird kurz angetrocknet. Nun wird die Platte so lange in das Laufmittel eingetaucht, bis man eine schmale Bande erhält. Diese wird erneut trocken gefönt. Jetzt beginnt die eigentliche Trennung, die beendet ist, wenn die Laufmittelfront den oberen Plattenrand erreicht. Zur Entwicklung der Banden wird das Laufmittel mit Warmluft verdampft. Die Banden werden abgekratzt, jeweils in verschiedenen Säulen gesammelt und mit Aceton unter Druck eluiert. Die Eluate werden über Natriumchlorid getrocknet.

Eine Trennung der Produkte gelingt nur, wenn die Lösung kein freies tert-Butylphenol enthält. Die Vorschrift muss äußerst genau eingehalten werden, weil sonst keine Trennung der ersten beiden Banden erfolgt.

Kieselgel-60-H-Platten

Reinigung aller Pd-Bacteriopheophorbidderivate

Zur Trennung aller Pd-Bacteriopheophorbidderivate ist die Verwendung von selbstgestrichenen 1 mm dicken ascorbathaltigen (2 %) Kieselgel-60-H-Platten (Merck) ausreichend. Vor Gebrauch werden die Platten eine Stunde bei 100°C im Trockenschrank aktiviert. Um eine Oxidation der Pd-Bacteriopheophorbidderivate zu

verhindern, werden die Kieselgelplatten unter Argonatmosphäre entwickelt. Als Laufmittel wird ein Gemisch aus Toluol und Aceton verwendet. Der Acetonanteil kann je nach zu trennendem Gemisch zwischen 6 und 10 % variieren. Die Auftragung erfolgt in Toluol und muss äußerst zügig geschehen, da bei den Pd-Bacterio-pheophorbibidderivaten im Gegensatz zu den Pheophorbiden bei zu starker Antrocknung leicht Oxidationen auftreten können. Aus diesem Grund werden die Banden nass abgekratzt und sofort in Aceton eluiert. Das Eluat wird mit Ether ausgeschüttelt. Die Weiterverarbeitung erfolgt wie bei den Pheophorbiden. Um sicherzugehen, dass alles Wasser entfernt wird, werden die Pigmente über Nacht im Exsikkator über CaCl_2 getrocknet.

Säulenchromatographie:

HPLC-Analyse

Es wird eine HPLC-Anlage der Firma Abimed, bestehend aus Dynamic Mixer 811 B, Manometric Module 805, Pumpen 305 / 306 verwendet. Die Messproben werden in eine 50 μl Schleife eingespritzt und über einen 7125 Injektor der Firma Rheodyne auf die Säule gebracht. Die Messung der Einzelspektren (300 bis 818 nm, Taktfrequenz = 3 s) erfolgt durch ein HP 8451 A Diodenarrayphotometer (Hewlett-Packard) mit einer 30 μl Durchflussskivette.

Die Aufnahme und Auswertung der Spektren werden mit den Computerprogrammen HPLC1-HP (A. Pazur, 1991/92) und 3 D-Plott (Vers. 4.0, A. Pazur, 1993) über einen IBM kompatiblen PC mit einem Intel-80386-Prozessor durchgeführt.

Laufmittel:

A) Toluol/MeOH/2-Propanol = 100 : 0,25 : 0,25 (v / v / v)

B) Toluol/MeOH/2-Propanol = 100 : 4,0 : 0,25 (v / v / v)

Flussrate : 2,5 ml / min

Säule : Econosphere Silica 5 μl Cartridge

Temperatur : 4°

Zeit (min.)	B (%)
0	0
3	5
10	15
13	30
15	100
19	100
20	30
23	0

Tab. 2: Lösungsmittelgradient, der direkt an der Pumpeinheit programmiert wird
(Die Übergänge sind jeweils linear, 0 min: 100 % A)

Der Gradient wird speziell für die Trennung der bei der Synthese des 3¹-tert-Butylphenoxyethyl(pyro)pheophorbidethylesters entstehenden Produkte optimiert. Mit den auf diese Weise erhaltenen äußerst sauberen Proben lassen sich direkt Massen- bzw. ¹H-NMR-Spektren aufnehmen (41, 81a, 95).

Zur quantitativen Analyse der eluierten Banden werden die Integrale der korrespondierenden Signale im Chromatogramm bestimmt.

Kieselgelsäule

Reinigung von Ethylpheophorbid

Für die Präparation von Ethylpheophorbid im großen Maßstab, eignet sich die Säulenchromatographie besser als die präparative Dünnschichtchromatographie mit Kieselgelplatten.

Als Säulenmaterial wird Kieselgel 60 (Merck, 40-60 µm Porengröße) verwendet. Es wird in einem Gemisch aus Toluol und Aceton (4 %) aufgeschlämmt und anschließend zu einer luftblasenfreien Säule gepackt. Das Pigment wird als konzentrierte Lösung in Toluol aufgetragen. Die Elution erfolgt isocratisch mit einem Gemisch aus Toluol (94 %) und Aceton (6 %). Da auf der Säule eine Trennung in

einzelne Banden sehr schwer zu erkennen ist, wird von jeder Fraktion zusammen mit der Referenzsubstanz eine Dünnschichtchromatographie gemacht. Die Ethylpheophorbid enthaltenden Fraktionen werden vereinigt.

Isolierung von 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester

Die Produkte der 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester-Synthese können auch über eine Kieselgeltrockensäule aufgetrennt werden. Das trockene Kieselgelpulver (Merck, 15-40 µm Porengröße) wird in eine lange dünne Glassäule (50 x 3 cm) gegeben und durch kontinuierliches Rütteln so lange verdichtet, bis sich das Volumen des Säulenmaterials nicht mehr verkleinert. Als Laufmittel wird ein Gemisch aus Toluol (95 %) und Aceton (5 %) verwendet. Das Pigmentgemisch wird als konzentrierte Lösung in Toluol auf die Säule aufgetragen. Sobald diese in das Kieselgel eingedrungen ist, wird auf die Säule ein konstanter Druck gegeben. Alle 100 Tropfen wird automatisch die Vorlage gewechselt. Die einzelnen Fraktionen werden durch Dünnschichtchromatographie und UV/VIS-Absorptionsspektroskopie charakterisiert und gegebenenfalls vereinigt. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Trennqualität sehr stark von dem Aktivierungsgrad des Säulenmaterials abhängt.

DEAE-Cellulose-Säule

Reinigung von Bacteriochlorophyllderivaten

Zur präparativen Trennung von palladiumfreien Bacteriochlorophyllderivaten eignet sich DEAE-Cellulose (Serva) neben der DEAE-Sepharose (Serva) am besten. Das präparierte DEAE-Material wird in Methanol aufgeschlämmt. Mit der Suspension wird eine Glassäule gefüllt. Bei einer Tropfgeschwindigkeit von zwei Tropfen pro Sekunde soll sich das Material allmählich verdichten. Anschließend wird das Methanol in 25 % Schritten durch Chloroform ersetzt. Auf die equilibrierte Säule werden die in Chloroform gelösten Pigmente aufgetragen. Carotinoide und Pheophytine werden nicht adsorbiert und können im Vorlauf aufgefangen werden. Adsorbierte Pigmente werden mit in 0,1 % Schritten ansteigender Methanolkonzentration von der Säule eluiert. Das Eluat wird fraktioniert aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen werden durch Absorptionsspektroskopie und Dünnschichtchromatographie charakterisiert.

Identische Fraktionen werden vereinigt. Sie werden am Rotationsverdampfer bis zur Lösungsmittelfreiheit eingengt und über Nacht im Exsikkator getrocknet. Zur Aufbewahrung werden sie mit Argon überschichtet und bei -20°C gelagert.

Die Regeneration der DEAE-Cellulose erfolgt in einer Porzellannutsche. Die in Methanol aufgeschlämmte DEAE-Cellulose wird mit folgenden Lösungen gewaschen:

- 1,0 l Methanol / konz. Salzsäure (12 : 1)
- 1,0 l Methanol
- 1,0 l Methanol mit 5 % Wasser und 5,61 g KOH
- 0,5 l Methanol
- 1,0 l Wasser / konz. Salzsäure (12 : 1)
- 1,0 l 0,5 M wässrige KOH-Lösung
- 1,0 l Wasser
- 0,5 l Eisessig
- 1,0 l Methanol

Die gereinigte DEAE-Cellulose wird bei 40°C über Nacht im Trockenschrank gelagert, anschließend in Methanol aufgeschlämmt und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt (58).

DEAE-Sepharose-Säule

Reinigung von Bacteriochlorophyll und Chlorophyll

DEAE-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals CL-6B) kann alternativ zu DEAE-Cellulose zur Aufreinigung von Bacteriochlorophyll und Chlorophyll eingesetzt werden. Ihr Vorteil ist die einfachere und schnellere Handhabbarkeit. Das DEAE-Säulenmaterial wird in Aceton aufgeschlämmt, zu einer 1 x 8 cm Säule gepackt und mit Aceton equilibriert. Auf die equilibrierte Säule werden die in Aceton gelösten Pigmente aufgetragen. Anschließend werden mit ansteigenden Konzentrationen von Methanol zunächst Carotinoide und Pheophytine eluiert bis bei einem Verhältnis von Methanol/Aceton [1 : 3 (v / v)] Bacteriochlorophyll bzw. Chlorophyll fraktioniert aufgefangen werden können. Die einzelnen Fraktionen werden durch Absorptionsspektroskopie und Dünnschichtchromatographie charakterisiert. Identische Fraktio-

nen werden vereinigt. Sie werden am Rotationsverdampfer bis zur Lösungsmittelfreiheit eingengt und über Nacht im Exsikkator getrocknet. Zur Aufbewahrung werden sie mit Argon überschichtet und bei -20°C gelagert. Die Regeneration der DEAE-Sepharose erfolgt analog der Regeneration von DEAE-Cellulose (S. 26)

CM-Sepharose-Säule

Reinigung von Bacteriopheophorbid und Pheophorbid

CM-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals CL-6B) wird zur Reinigung von Bacteriopheophorbiden und Pheophorbiden eingesetzt. Das CM-Säulenmaterial wird in Aceton aufgeschlämmt, zu einer 1 x 8 cm Säule gepackt und mit Aceton equilibriert. Auf die equilibrierte Säule werden die in Aceton gelösten Pigmente aufgetragen. Anschließend wird mit ansteigenden Konzentrationen von Methanol zunächst nicht reagiertes Material eluiert bis bei einer Konzentration von 4 % Methanol in Aceton Bacteriopheophorbide und Pheophorbide fraktioniert aufgefangen werden können. Die einzelnen Fraktionen werden durch Absorptionsspektroskopie und Dünnschichtchromatographie charakterisiert. Identische Fraktionen werden vereinigt. Sie werden am Rotationsverdampfer bis zur Lösungsmittelfreiheit eingengt und über Nacht im Exsikkator getrocknet. Zur Aufbewahrung werden sie mit Argon überschichtet und bei -20°C gelagert.

Die Regeneration der CM-Sepharose erfolgt in einer Porzellannutsche. Die in Methanol aufgeschlämmte CM-Sepharose wird mit folgenden Lösungen gewaschen:

- 1,0 l Methanol mit 5 % Wasser und 5,61 g KOH
- 1,0 l Methanol
- 1,0 l Methanol / konz. Salzsäure (12 : 1)
- 0,5 l Methanol
- 1,0 l Methanol mit 5 % Wasser und 5,61 g KOH
- 1,0 l 0,5 M wässrige HCl-Lösung
- 1,0 l Wasser
- 0,5 l 0,1 M wässrige KOH-Lösung
- 1,0 l Methanol

- langsam ansteigende Acetonkonzentration bis 100 %
Aceton

Die gereinigte CM-Sepharose wird bei 40 °C über Nacht im Trockenschrank gelagert, anschließend in Aceton aufgeschlämmt und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt (58).

QAE-Sepharose-Säule

Entfernen von tert-Butylphenol

Das für die Pigmentchromatographie präparierte QAE-Sepharose-Material (Serva) wird in Methanol aufgeschlämmt und möglichst blasenfrei zu einer Säule gepackt. Nach Absetzen des QAE-Sepharose-Materials werden die in Methanol gelösten Pigmente zusammen mit einem Tropfen 0,2 N NaOH auf die Säule aufgetragen. Anschließend wird mit Methanol eluiert. Das Eluat wird fraktioniert aufgefangen und über seine Absorption bei 277 und 296 nm auf die Anwesenheit von tert-Butylphenol untersucht. Ist noch freies tert-Butylphenol vorhanden, so verschiebt sich das Absorptionsmaximum bei Zugabe eines Tropfens 0,2 N NaOH von 277 nach 296 nm. Alle Fraktionen, die kein tert-Butylphenol enthalten, werden vereinigt.

Tert-Butylphenol und einige geladene Chlorine werden erst durch den Regenerationsprozess von der Säule eluiert.

Die Regeneration erfolgt durch Waschen des Säulenmaterials mit:

- 2 l Aqua bidest.
- 200 ml 0,1 N Natronlauge
- 2 l Aqua bidest.
- 1 l 50 % Ethanol
- 1 l 70 % Ethanol
- 1 l 100 % Ethanol
- 300 ml Methanol

Das regenerierte QAE-Sepharose-Material wird in Methanol bei 4 °C aufbewahrt. Um eine sterile Lagerung zu gewährleisten, wird Natriumazid zugesetzt.

Wichtig bei dieser Methode ist der Zusatz eines Tropfens 0,2 N Natronlauge zu der Pigmentlösung. Dadurch wird freies tert-Butylphenol in das korrespondierende Phenolat überführt. Dieses wird aufgrund seiner negativen Ladung auf der Säule zurückgehalten.

2.1.5 Sonstige Reinigungsmethoden

Sublimation

Entfernen von tert-Butylphenol

Überschüssiges tert-Butylphenol lässt sich durch Sublimation bei 110°C in der Trockenpistole unter Ölpumpenvakuum entfernen. Für eine quantitative Abtrennung des tert-Butylphenols ist es wichtig, eine möglichst große Oberfläche zu haben. Aus diesem Grund ist es günstig, das ungereinigte Pigment auf mehrere kleine Gläschen zu verteilen.

2.1.6 VERWENDETE CHROMATOGRAPHISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE

METHODEN

SÄULENCHROMATOGRAPHIE

PRÄPARATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE
(DC)

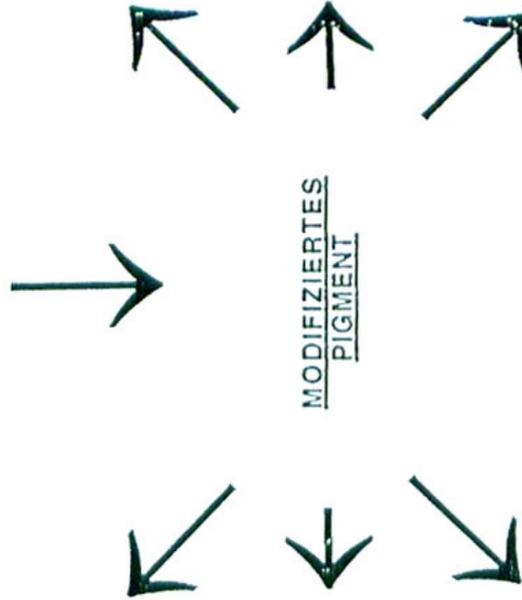
HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITS-
CHROMATOGRAPHIE (HPLC)

ABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE
(UV-VIS)

FAST-ATOM-BOMBARDMENT-MASSEN-
SPEKTROSKOPIE (FAB-MS)

MATRIX-ASSISTANT-LASER-DESORPTION
IONISATION - MASSENSPEKTROSKOPIE
(MALDI-MS)

PROTONENRESONANZSPEKTROSKOPIE
(¹H-NMR)



2.2 Methoden zur Charakterisierung der modifizierten Photosensitizer im Hinblick auf die Verwendung in der polyphasischen Tumorthherapie

2.2.1 Allgemeines

Im folgenden Kapitel werden Methoden zur Untersuchung der neu synthetisierten Photosensitizer vorgestellt, die eine Prognose über einen möglichen späteren Einsatz dieser Sensitizer im Rahmen einer **polyphasischen Tumorthherapie** erlauben (48).

Zellversuche mit Tumorzellkulturen ermöglichen gültige Aussagen über die Auswirkungen der Phototoxizität unter kontrollierten Bedingungen. Sie nehmen eine Vermittlerfunktion zwischen biophysikalischen / biochemischen Untersuchungen und dem vorklinischen Tierexperiment ein. Dabei wird versucht *in vitro* eine möglichst authentische Tumorsituation zu simulieren:

Trypsinisierte Zellen können beispielsweise mit Zellen in nekrotischen Arealen eines Tumors verglichen werden. "Geheilte" Zellen – das sind Zellen, die 24 Stunden nach der Trypsinisierung in Suspension gehalten werden, um dort ihre Oberflächenantigene wieder komplett zu restituieren – verhalten sich dagegen ähnlich wie unbeschädigte Zellen an der Tumoroberfläche.

Die durch die Zellkultur erreichte hohe Authentizität soll ermöglichen, dass nur noch wenige Tierversuche, die zur Klärung bestimmter Fragestellungen unumgänglich sind, benötigt werden.

Alle anderen Experimente können somit unter Zuhilfenahme von Zellkulturen gemacht werden.

Die Tumorzellkulturen werden in dieser Arbeit in zwei verschiedenen Funktionen eingesetzt: Einerseits dienen sie als Modell für die Zellen des Tumors, die möglichst zum Absterben gebracht werden sollen. Andererseits stehen sie für Zellen des menschlichen Körpers, die das Photochemotherapeutikum nicht aufnehmen und damit von diesem nicht beeinträchtigt werden sollen.

2.2.2 Zellversuche

Resorptionsstudien an Tumorzellsuspensionen

Für einige der synthetisierten Verbindungen (s. Kapitel 3.1) werden Versuche zur Aufnahme dieser modifizierten Sensitizer in Tumorzell-Suspensionen vorgenommen. Als Vergleich wird jeweils die nicht substituierte Ausgangssubstanz in ihrer Wirkung auf verschiedene Zelllinien untersucht.

Für die Anzucht der Zellen werden je drei Millionen Zellen der Tumorzellstämme

OAT-SCLC	(kleinzelliges Humanbronchialkarzinom)
A 375	(amelanotisches Humanhautmelanom)
SkAMel	(amelanotische Sublinie eines Human-Hautmelanoms)
M2R	(melanotisches Mäusemelanom)

in 175 cm² Kulturflaschen in DMEM-Medium unter Zusatz von 5 % fetalem Kälberserum, 5 mM Glutamin und Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) im Brutschrank mit konstantem CO₂-Gehalt bei 37 °C und pH 7,35 über drei Tage auf ca. 40 Millionen Zellen vermehrt. Die Zellen werden mit Trypsin-EDTA geerntet, gezählt und im Kulturmedium auf 5 Millionen Zellen pro ml eingestellt.

Je 60 Millionen Zellen werden in 12 ml Medium zu einer Lösung des Sensitizers in 0,2 ml 0,2 M Methyl- β -Cyclodextrin (als Lösungsvermittler) gegeben, so dass die Ausgangskonzentration des Sensitizers 10 μ M beträgt. Diese Suspensionen werden eine Stunde bei 37 °C langsam bewegt und 2 ml dieser Suspension auf 2 ml einer Dichtestufe (25 % Percoll in Kulturmedium) aufpipettiert. Die Zellen werden durch die Dichtestufe hindurch zentrifugiert (400 g, 5 Minuten) und als Sediment nach Abnehmen des Überstandes bei -20 °C eingefroren. Die anschließende Zerstörung der Zellen wird mit Hilfe eines Ultraschallstabes erreicht. Die Extrahierung des resorbierten Sensitizers erfolgt mit Methanol-Aceton (1 : 1). Dieses Extrakt wird in der Q_X-Bande (s. S. 47, Abb. 12) des Sensitizers photometriert. Variiert man jeweils die Inkubationszeit des Sensitizers mit den Zellen, indem man nach unterschiedlichen Zeitintervallen (in der Regel nach 2, 5, 30 und 60 Minuten) durch Zentrifugation im Dichtegradienten den weiteren Kontakt der Zellen mit dem Sensitizer unterbricht, so lässt sich daraus eine Aufnahmekinetik berechnen. Aus

den photometrisch gemessenen Extinktionen der Extrakte lassen sich folgende Größen ableiten:

$$m_i^t = \frac{E \times \text{Extraktvolumen}}{\text{Ext.koeff.} \times 1000 \times \text{Zellzahl}} \text{ (Mol / Zelle)}$$

$$n_i^t = m_i^t \times 6,02 \times 10^{23} \text{ (Moleküle / Zelle)}$$

$$c_i^t = m_i^t / \text{Zellvolumen } V_z \text{ (mittlere Konzentration, mol / l)}$$

$$c_a^t = c_a^o - (m_i^t \times \text{Zellzahl / ml Ansatz} \times 1000) \text{ (mol / l)}$$

$$\text{Anreicherungsfaktor } f_{i/a} = c_i^t / c_a^t$$

Das Zellvolumen ist für die einzelnen Tumorzelllinien unterschiedlich. Die Bestimmung erfolgt durch mikroskopische Messung der Durchmesser abgekugelter frisch geernteter Zellen oder aus Messungen des Volumens von Zellsedimenten unter Annahme dichtester Kugelpackung.

Lokalisation der Sensitizer durch Fluoreszenzmikroskopie

Sofern die Photosensitizer fluoreszieren, kann durch Fluoreszenzanregung bei 540 nm im LEITZ-Auflichtfluoreszenzmikroskop die Rotfluoreszenz über eine rotempfindliche CCD-Kamera beobachtet werden (FK 6990 IQ). Dies erlaubt eine Aussage über eine Verteilung der Photosensitizer auf verschiedene Kompartimente der Zelle (46).

Bestimmung der Stabilität der Sensitizer im Zellmilieu

Um sicherzustellen, dass die Photosensitizer durch die Resorption in die Zellen nicht verändert werden, ist die Aufnahme eines Massen- bzw. eines Absorptionsspektrums der mit Methanol/Aceton aus den Zellen extrahierten Sensitizer erforderlich.

Bestimmung der Phototoxizität

Zur Aktivierung der Sensitizer muss die Zellsuspension nach Resorption der modifizierten Sensitizer bzw. deren Ausgangssubstanzen zunächst bestrahlt werden. Dies geschieht wegen der unterschiedlichen Absorptionsmaxima der verschiedenen Sensitizer mit einer Halogen-Lichtquelle (große Spektralbreite). Der kurzwellige Anteil der Strahlung wird bei den Pheophorbid- und Bacteriopheophorbidderivaten durch Kantenfilter (K 645, K 695) ausgeblendet. Der verbleibende Rotlichtanteil kann durch Vergleich der mit den beiden Kantenfiltern erhaltenen Leistungsdichten quantifiziert werden:

$$\frac{I_{K645} - I_{K695}}{I_{K645}} = f \text{ (Korrekturfaktor)}$$

Die Korrekturfaktoren werden zu 0,103 / 50 nm bzw. 0,206 / 100 nm bestimmt. Hieraus ergibt sich die je nach Rotabsorption des Sensitizers absorbierte Leistungsdichte ($W / cm^2 \times 50$ bzw. 100 nm) und durch Multiplikation mit der Bestrahlungsdauer (sec.) die absorbierte Energiedichte für den Ansatz ($J / cm^2 \times 50$ bzw. 100 nm).

Die Phototoxizität der Hematoporphyrinderivate wird bestimmt, indem ein Kantenfilter $K > 530$ über einer Halogen-Lichtquelle mit annähernd konstantem Energiespektrum verwendet wird.

Als Kontrollen werden unbestrahlte und mit mehr als $3 J / cm^2 \times 50$ nm bestrahlte abgestorbene Zellen eingesetzt. Als Maß für die Überlebensrate F / F_0 dient die Laktatproduktion der Zellen (45a, 102), die für die unbestrahlte Kontrolle gleich eins, für die überbestrahlte Kontrolle gleich null gesetzt wird. Für die Zwischenwerte des Versuchs ergibt sich eine abfallende Exponentialfunktion:

$$F = F_0 e^{-kE}$$

$E = \text{aufgenommene Energiedichte}$

Die halblogarithmische Auftragung liefert eine Gerade:

$$\log \frac{F}{F_0} = -k' E$$

k' wird als Phototoxizitätskonstante (cm^2 / J) bezeichnet.

Der negative reziproke Anstieg dieser Geraden liefert (54):

$$\frac{1}{k} = LD_{90} \text{ [J / cm}^2\text{]}$$

als Maß für die Phototoxizität, ausgedrückt in (J / cm²) für die Reduktion der Stoffwechselaktivität auf 10 % des Ausgangswertes.

Die Milchsäureproduktion wird durch die pH-Änderung im Kulturmedium während 12 bis 17 Stunden Inkubationszeit unter vorsichtigem Bewegen auf dem Schüttler aus der Extinktionsänderung des Indikators Phenolrot bei 546 nm berechnet.

Resorptionskinetik von 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy)-ethyl)-deuteroporphyrin-IX-dimethylester vor bzw. nach Einschluss in ein Cyclodextrin-dimer [di- β -CD-(2N-A4-C5-A4)]

Um die Stabilität des Einschlusskomplexes aus Cyclodextrindimer und Sensitizer zu testen, soll das Resorptionsverhalten des in ein Carriersystem (Cyclodextrindimer) eingeschlossenen Sensitizers in Gegenwart von Zellen einer Tumorzellkultur untersucht werden. Die Tumorzellen werden in diesem Fall als Modell für die Zellen des menschlichen Körpers eingesetzt.

Optimalerweise ist die Stabilität des Einschlusskomplexes aus Sensitizer und Cyclodextrindimer so hoch, dass nur noch eine vernachlässigbare Aufnahme des Sensitizers in die Zellen erfolgt. Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit dieses biospezifischen Carriersystems ist allerdings, dass dieser Einschlusskomplex nach Targeting des Tumors an dieser Stelle aufgebrochen werden kann. Dieser Versuch hat somit die Funktion, Rückschlüsse auf das Verhalten des Photochemotherapeutikums auf dem Weg zum Tumor zu ziehen und damit verbleibende systemische Nebenwirkungen einschätzen zu können.

2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy)-ethyl)-deuteroporphyrin-IX-dimethylester wird in ein Cyclodextrindimer [(di- β -CD-(2N-A4-C5-A4) (78)] eingeschlossen. Die Reaktionsbedingungen zur Aufnahme des 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy)-ethyl)-deuteroporphyrin-IX-dimethylester in das Cyclodextrindimer sind den Angaben in Kapitel 2.2.3 zu entnehmen. Dieser Einschlusskomplex aus Cyclodextrindimer und Sensitizer wird in einer Konzentration von 10 μ Mol zu einem serumhaltigen mit einer OAT-SCLC-Tumorzellsuspension versetztem Kulturmedium gegeben. Anschließend wird die Resorptionskinetik des Sensitizers über 20 Stunden bestimmt (s. 32 f.).

Zur Kontrolle werden 10 μmol Sensitizer ohne Cyclodextrindimer in ein serumhaltiges Kulturmedium gegeben und einer OAT-SCLC-Tumorzellsuspension über den gleichen Zeitraum angeboten.

Um zu überprüfen, ob durch das Cyclodextrindimer (1, 5a, 87) selbst eine Beeinflussung der Resorptionskinetik der OAT-SCLC-Tumorzellen erfolgt, wird parallel eine Tumorzellsuspension mit Cyclodextrindimer über den gleichen Zeitraum inkubiert und anschließend eine Resorptionsstudie mit freiem Sensitizer durchgeführt.

Phototoxizitätsbestimmung nach enzymatischem Abbau des Cyclodextrindimers mit Cyclodextrinase

Nach Bildung eines Einschlusskomplexes aus Sensitizer und Cyclodextrindimer wird das Cyclodextrindimer mit Hilfe des Enzyms Cyclodextrinase aus dem Bakterium *Klebsiella oxytoca* abgebaut, um zu sehen, ob der Sensitizer auch nach dem Einschluss seine photodynamische Aktivität behält.

Die Michaelis-Menten-Konstante dieses Enzyms liegt in einer Größenordnung von 1-3 mM bei einem pH von 7,23 und einer Temperatur von 23°C (21b).

Der Einschlusskomplex aus Dimer und Sensitizer wird in einer Konzentration von 10 μM einer OAT-SCLC-Tumorzellkultur angeboten. Zur vollständigen Verdauung des Dimers wird der Komplex aus Dimer und Sensitizer 18 Stunden mit einer 1mM Lösung des Enzyms Cyclodextrinase inkubiert. Um die Intaktheit des freigesetzten Sensitive zu überprüfen, werden nach Bestrahlung der Tumorzellen die üblichen Phototoxizitätsbestimmungen (s. S. 34 f.) durchgeführt.

Um festzustellen, ob das Enzym Cyclodextrinase oder das Cyclodextrindimer (1, 5a, 87) selbst für die Tumorzellen in den oben genannten Konzentrationen toxisch sind, werden die OAT-SCLC-Tumorzellen als Kontrolle über den gleichen Zeitraum jeweils mit diesen beiden Substanzen inkubiert.

2.2.3 Methode zur Bestimmung der Komplexbindungskonstante zwischen Sensitizer und Cyclodextrindimer

Das Prinzip dieser Methode ist exemplarisch in Abbildung 6 dargestellt. TNS [6-(p-Toluidino)-2-Naphthalensulphonsäure, Fluka] bildet 1 : 1 Komplexe mit einem Cyclodextrindimer in wässriger Lösung. Es kann durch einen Photosensitizer aus diesem Komplex verdrängt werden. Die Reaktion lässt sich fluoreszenzspektrometrisch (Luminescence Spectrometer LS 50 Perkin Elmer) verfolgen, da TNS in einer hydrophoben Umgebung, wie sie z. B. im Innern eines Cyclodextrindimerhohlraumes gegeben ist, stark fluoresziert; in Wasser hingegen tritt nur eine vernachlässigbare Fluoreszenz auf (33, 98). Die Fluoreszenz von TNS wird durch Anregen mit einer Wellenlänge von 322 nm bei 442 nm gemessen.

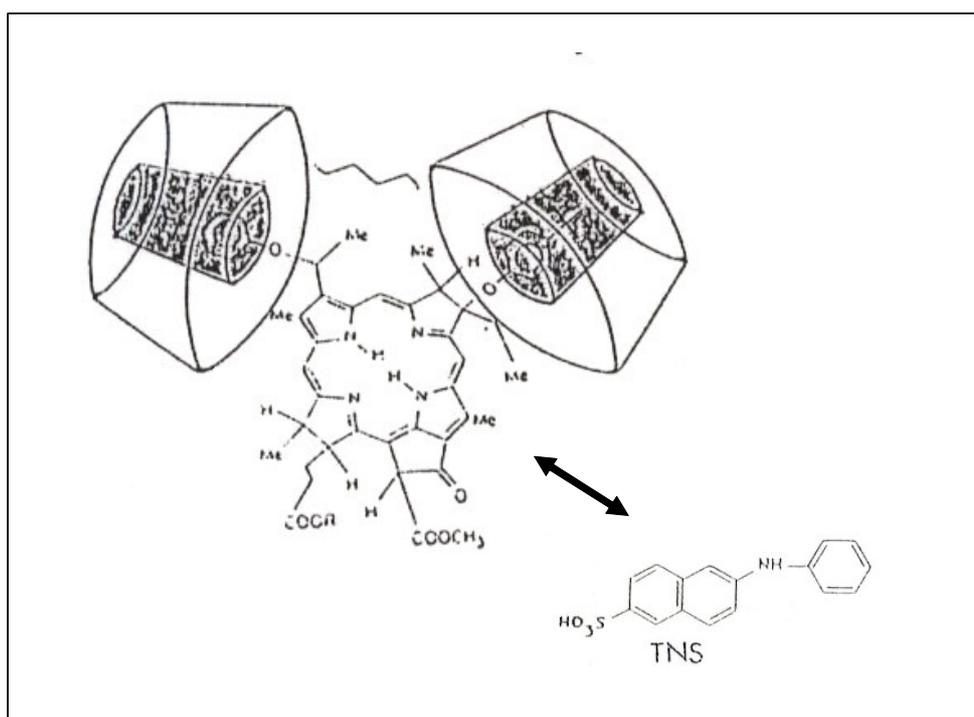


Abb. 6: Konkurrenz von TNS und einem hypothetischen durch zwei tert-Butylphenylgruppen substituierten Bacteriochlorins um den Einschluss in ein Cyclodextrindimer (78)

Entsprechend den Ergebnissen von Reinsborough et al. (33) misst man zunächst mit steigenden Cyclodextrindimerkonzentrationen ($5,7 \times 10^{-5}$ bis $1,3 \times 10^{-4}$ M) eine Zunahme der Fluoreszenz von TNS ($2,6 \times 10^{-5}$ M). Durch Zugabe einer konstanten Sensitizerkonzentration (1×10^{-6} M) nimmt die Fluoreszenz wieder ab. Diese Abnahme kann gemessen werden. Aus ihr lässt sich der Anteil des durch den Sensitizer verdrängten TNS berechnen. Alle Fluoreszenzmessungen werden in 0,1 molarer Natriumhydrogencarbonatlösung durchgeführt.

Tri-tert-Butylphenoxymonocarboxyphthalocyanin (COOPc), ein Sensitizer mit bekannter Komplexbindungskonstante, wird bei jedem Versuch als Standard mitgemessen.

Um eine Aussage über die Zunahme der Komplexbindungskonstante mit einem Cyclodextrindimer in Abhängigkeit von der Zahl der tert-Butylphenyl-Substituenten des Sensitizers machen zu können, wählt man den nicht modifizierten Photosensitizer als Referenz.

Die Auswertung wird mit Hilfe der doppeltreziproken Auftragung von Connors vorgenommen (17), der die Michaelis-Menten-Kinetik zugrunde liegt:

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{\max}} + \frac{K_{\text{TNS}}}{I_{\max}} \times \frac{1}{[\text{TNS}]}$$

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{\max}} + \frac{K_{\text{TNS}}}{I_{\max}} \times \left(1 + \frac{[\text{Porph}]}{K_{\text{Porph}}}\right) \times \frac{1}{[\text{TNS}]}$$

Der Kehrwert der Fluoreszenzintensität wird gegen den Kehrwert der Cyclodextrinkonzentration aufgetragen ($1 / I$ gegen $1 / [\text{CD}]$). Aus dem Schnittpunkt der erhaltenen Geraden mit der X-Achse [$1 / K_{\text{TNS}}$ bzw. $1 / K_{\text{TNS}} \times i$; $i = 1 + [\text{Porph}] / K_{\text{Porph}}$] ergeben sich die Komplexbindungskonstante (K_{TNS}) für TNS und die Inhibitorkonstante (K_{Porph}) für den Sensitizer.

Die doppeltreziproke Auftragung von Connors entspricht der allgemeinen Geradengleichung:

$$Y(1 / I) = b(1 / I_{\max}) + m(K_{\text{TNS}} / I_{\max}) \times X(1 / \text{TNS})$$

Die Auswertung der Messpunkte wird mit Hilfe des Computerprogramms Origin 6.0 für Windows XP durchgeführt. Es berechnet $1/K_{TNS}$ nicht aus dem X-Achsenabschnitt sondern aus dem Quotienten von Y-Achsenabschnitt und Steigung der Geraden:

Allgemeine Geradengleichung: $Y = b + m X$

$$1 / K_{TNS} = b / m$$

Die Berechnungen für $1 / (K_{TNS} \times i)$ erfolgen analog. Bei bekannter Inhibitorkonzentration [Porph] lässt sich die Inhibitorkonstante K_{Porph} berechnen. Die Cyclodextrindimere stellte Frau Dr. Rübner-Heuermann her (78).

Spätere Versuchsreihen haben gezeigt, dass die Variation der Cyclodextrindimerkonzentration gemäß der Vorgehensweise von Reinsborough et al. (33) nur sinnvoll ist, um den optimalen Konzentrationsbereich der Bindung von TNS bzw. Sensitizer an das Cyclodextrindimer herauszufinden.

Folgende Überlegungen haben zur Änderung des Versuchsaufbaus beigetragen: Eine Competition im Sinne der Michaelis-Menten-Kinetik zwischen Sensitizer und TNS um den Einschluss in ein Cyclodextrindimer kann nur durch Variation der Konzentration von TNS erzielt werden. Analog zur Michaelis-Menten-Kinetik fungiert TNS als zu variierendes Substrat, das Cyclodextrindimer als in der Konzentration konstant zu haltendes „Enzym“ und der Sensitizer als Inhibitor. Folglich kann durch eine ausreichend hohe Substratkonzentration (TNS) der Inhibitor (Sensitizer) aus der Bindung zum Dimer („Enzym“) verdrängt werden. Damit ist die entscheidende Bedingung zur kompetitiven Hemmung erfüllt.

Die exakte Berücksichtigung dieses Analogieschlusses zur Michaelis-Menten-Kinetik macht eine genaue Bestimmung des K_{TNS} bzw. K_{Porph} mit Hilfe des doppelt reziproken Plots nach Connors möglich (s. auch S. 44 f.) (17).

Die Konzentrationsabhängigkeit der TNS Fluoreszenz zeigt sowohl in Cyclodextrinmonomeren als auch in Cyclodextrindimeren (Abb. 7) ein biphasisches Profil. Dabei fällt auf, dass es offenbar zwei Sättigungskurven mit unterschiedlich starker Fluoreszenz gibt, eine im Bereich bis 10^{-7} molar, die andere bis in den Bereich millimolarer Konzentrationen von TNS (Abb. 8). Aus den Sättigungskurven lassen sich zwei lineare Reziproke für TNS ableiten (Abb. 9), deren Bindungskonstante sich um den Faktor 1000 unterscheidet. Bei der folgenden Bestimmung der Fluoreszenzinhibition durch substituierte Porphyrinoide (Sensitizer) wird im nanomolaren Konzentrationsbereich von TNS gearbeitet, so dass nur die Sättigungs-

kurve (bzw. Reziproke) mit der wesentlich geringeren Fluoreszenz-intensität berücksichtigt wird.

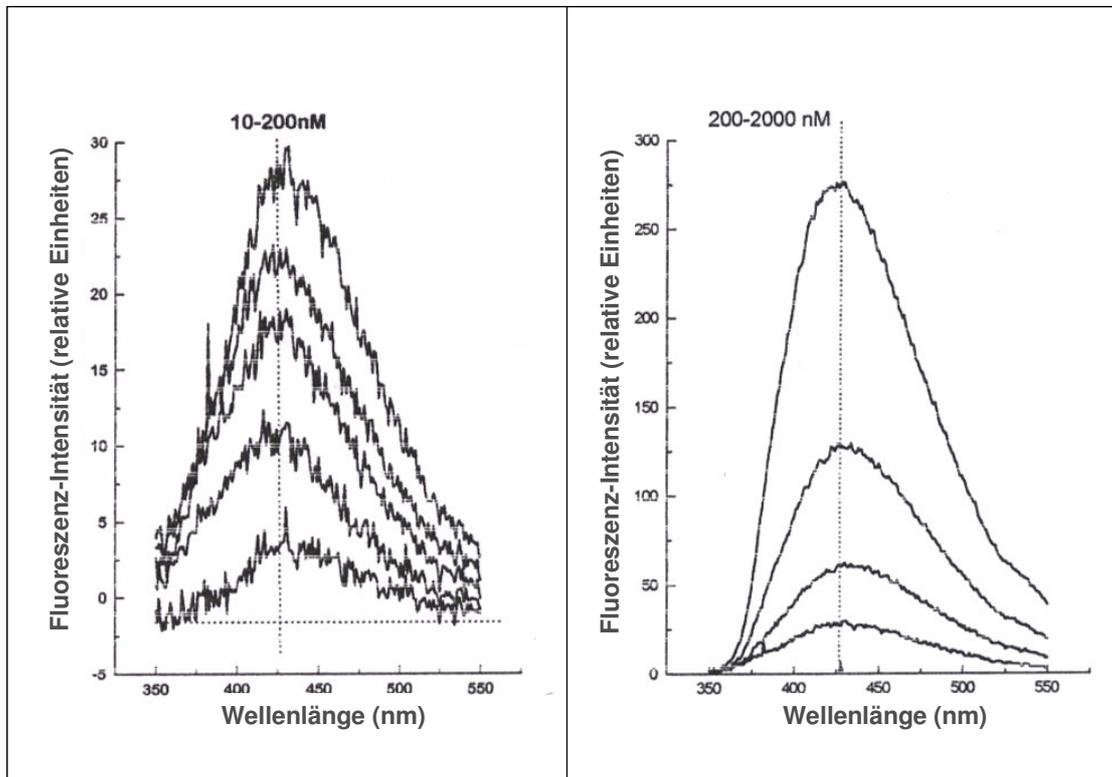


Abb. 7: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität im 2N-A4-C5-A4-Cyclodextrindimer (78) von der Konzentration des TNS

Das Versuchsprinzip wird im folgenden dargestellt: Als erstes wird das Cyclodextrindimer (bzw. *Monomer*) mit steigenden Konzentrationen von TNS inkubiert und die Fluoreszenz gemessen. Aus diesen Messungen lässt sich die Bindungskonstante von TNS mit dem Cyclodextrindimer (bzw. *Monomer*) berechnen (K_{TNS} : s. S. 38 f.). Auf die mit TNS erzielten Fluoreszenzwerte kann anschließend die durch die Konkurrenz des Sensizers mit TNS um die Bindung zum Cyclodextrindimer (bzw. *Monomer*) hervorgerufene Abnahme der Fluoreszenz bezogen werden. Aus der Fluoreszenzabnahme lässt sich indirekt die Bindungskonstante des Sensizers (K_{Porph}) zum Cyclodextrindimer (bzw. *Monomer*) ableiten (K_{Porph} : s. S. 44) .

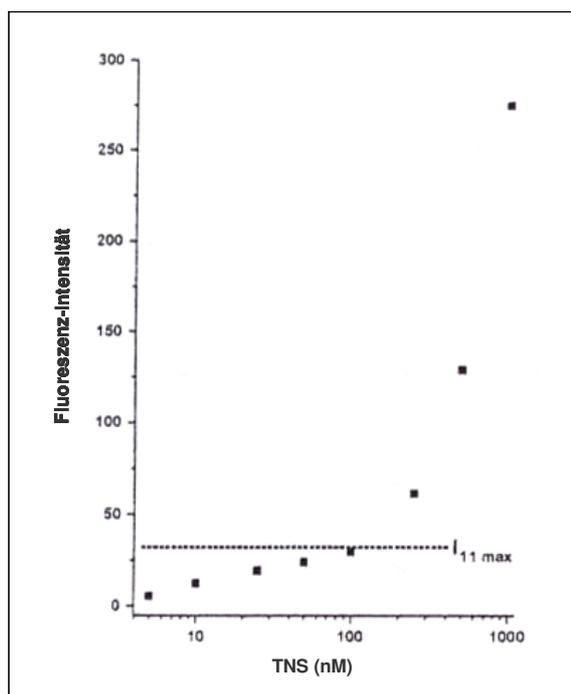


Abb. 8: Biphasische Komplexierung von TNS mit 2N-A4-C5-A4-Dimer

Das Cyclodextrin*dimer* (78) wird mit unterschiedlich substituierten Sensitizern (s. Kap. 3.1) inkubiert. Cyclodextrin*monomer* (Methyl- β -Cyclodextrin, Wacker Chemie Burghausen) wird als Referenzsubstanz eingesetzt. Da die Aggregation der Cyclodextrine in Wasser bei Raumtemperatur beträchtlich ist, ist eine Erwärmung der Lösung aus Cyclodextrin und Sensitizer sinnvoll, um eine Monomerisierung der Cyclodextrine mit anschließender Aufnahme des Sensitive zu erreichen. Um stabile und reproduzierbare Komplexe mit den Sensitizern zu erreichen, wird das Cyclodextrin*monomer* mit dem Sensitizer 1 min auf 70 °C und das Cyclodextrin*dimer* mit dem Sensitizer 4 Stunden auf 50 °C erhitzt (Abb. 10).

Höhere Temperaturen führen zur Zerstörung der Sensitizer. Anschließend werden die sich bildenden Komplexe über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Bestimmung der Bindungskonstanten erfolgt am folgenden Tag nach Konkurrenzreaktion mit TNS durch Fluoreszenz-messung bei Raumtemperatur.

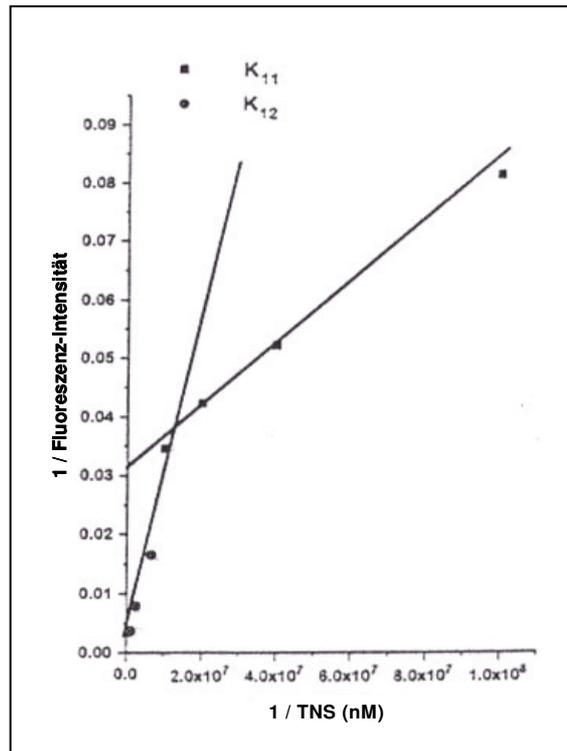


Abb. 9: Doppelt reziproker Plot der Komplexbildung von TNS mit 2N-A4-C5-A4-Dimer

Methyl- β -Cyclodextrin (Monomer) wird in einer Konzentration von 1 mM in HEPES-Puffer (pH 7,4) eingesetzt. Die Konzentrationen von TNS betragen 20, 30, 80, 180, 280 nM. Dabei wird jeweils von einer 1 mMol Lösung von TNS in DMSO als Stammlösung ausgegangen, die mit Wasser auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt wird. Die Konzentration des Cyclodextrindimers (78) wird zu 100 μ M in HEPES-Puffer (pH 7,4) gewählt. Die Konzentrationsbestimmung des Cyclodextrindimers erfolgt mit Hilfe der Anthron-sulfonsäure-Reaktion mit Glucose und Methyl- β -Cyclodextrinmonomer als Standard. Bei Verwendung des Cyclodextrindimers betragen die TNS-Konzentrationen 20, 40, 100, 200, 400 nM. Es werden Versuchsreihen mit jeweils entweder 5 μ M oder 10 μ M Sensitizer durchgeführt. Dazu wird eine Stammlösung von 2 mM des Sensitive in DMSO hergestellt, die mit Hilfe der Cyclodextrinlösung eingestellt wird. Die Fluoreszenzmessungen erfolgen im Shimadzu RF-1501 Spektrofluorometer mit einem Küvettenhalter, der jeweils auf 20°C, 50°C oder 70°C temperiert wird. Die

Fluoreszenz von TNS wird bei 308 nm angeregt und die Fluoreszenzemission zwischen 350 und 550 nm gemessen. Die Spektren der Sensitizer werden bei Wellenlängen zwischen 350 und 650 nm angeregt und je nach Exzitationspeak werden die entsprechenden Emissionsspektren zwischen 400 und 700 nm gemessen. Es ist darauf zu achten, dass in der Emission keine Überlagerung mit den Spektren von TNS erfolgt (freies Fenster zwischen 500 und 550 nm, gegebenenfalls Extrapolation auf das Maximum der TNS Emission mittels Eichkurve).

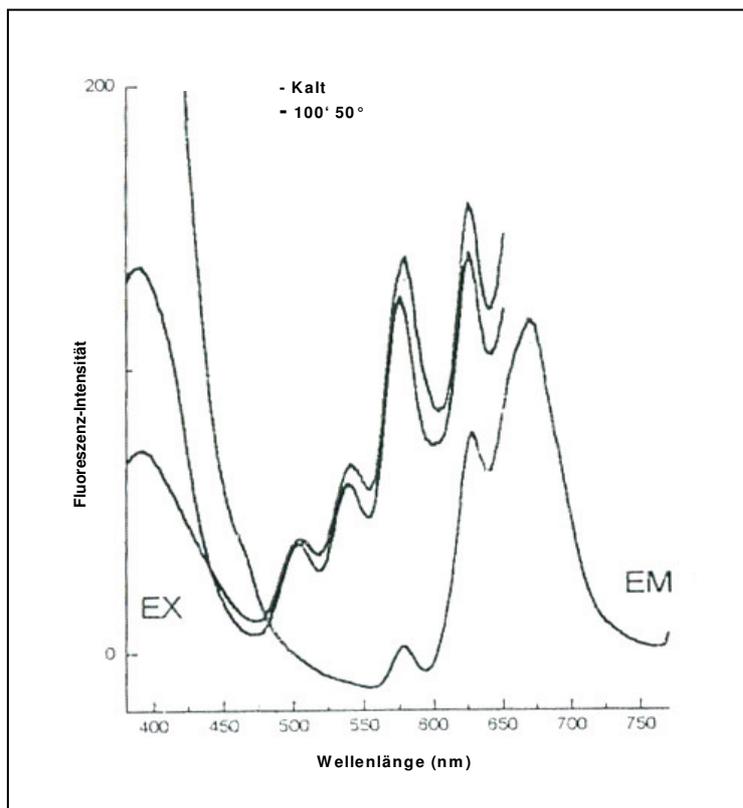


Abb. 10: Monomerisierung der Lösung von 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl)-deuteroporphyrin-IX-dimethylester (5 μ M) in 100 μ M Cyclodextrindimer in Abhängigkeit von der Temperatur

Auf diese Weise werden Sättigungskinetiken im Sinne der Langmuirschen Adsorptionsisotherme erhalten, die durch die Reziprokendarstellung von Benesi & Hildebrand für die Darstellung der Bindungshemmung verwendbar sind (5b).

Im doppelt reziproken Plot nach Connors (17) ist die reziproke Fluoreszenzintensität von TNS für eine vorgegebene Konzentration des Wirtsmoleküls (Cyclodextrindimer oder -monomer):

$$(1) \quad 1/I = K_{\text{TNS}} / I_{\text{max}} \times 1/[TNS] + 1/I_{\text{max}}$$

so wird in Gegenwart eines inkorporierten Porphyrinoids

$$(2) \quad 1/I = K_{\text{TNS}} \times i / I_{\text{max}} \times 1/[TNS] + 1/I_{\text{max}}$$

wobei i

(3) die Steigung der Gerade (2) / die Steigung der Gerade (1) = $1 + [\text{Porph}] / K_{\text{Porph}}$
oder

$$(4) \quad K_{\text{Porph}} = [\text{Porph}] / i - 1$$

Mit diesem Verfahren lassen sich indirekt die Bindungskonstante K_{TNS} (Inhibitor-konstante: K_{Porph}) mit Cyclodextrinmono- bzw. dimer berechnen.

Durch diese Berechnungsmethode konnten geeignete Korrekturen für die Instabilität der Fluoreszenzen erhalten werden (5b). Hierbei wird 360 nm als willkürlicher Nullpunkt gesetzt, da nur von den Relationen der Steigungen ausgegangen wird und nicht von den maximalen Werten der Fluoreszenzen in den Einzelmessungen (Abb. 11).

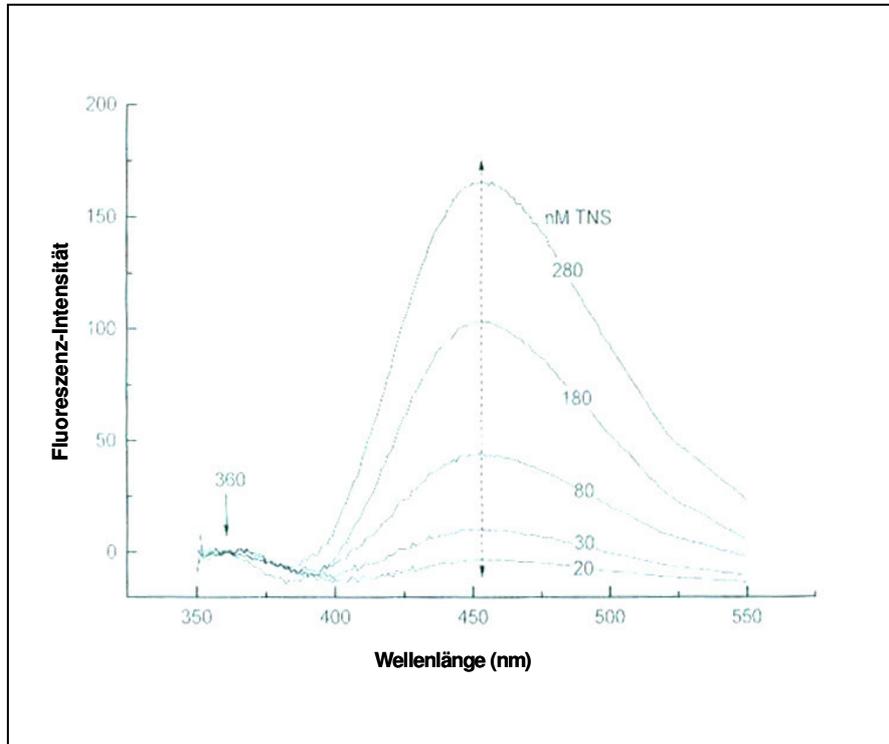


Abb. 11: Fluoreszenzmessung von 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy)-ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester in Methyl- β -Cyclodextrin: Normierung der Fluoreszenz auf 0 bei 360 nm

3. Ergebnisse:

3.1 Chemie, Spektroskopie und Chromatographie der synthetisierten Pheophorbid-, Bacteriopheophorbid-, Hematoporphyrin- und Etio-porphyrinderivate

3.1.1 Präparation und Analytik der Pheophorbidderivate

Ethylpheophorbid

Absorptionsspektrum

Die Spektren aller Porphyrinmoleküle zeigen drei unterschiedliche Arten von Banden. Dies sind Soret-, Q_X - und Q_Y -Banden (Abb. 12).

Abbildung 12 zeigt die Absorptionsspektren von Chlorophyll a und Ethylpheophorbid in Diethylether. Das Spektrum von Chlorophyll a zeigt eine Q_Y -Bande bei 660 nm (Q_{Y1}), die von einer Schwingungsseitenbanden bei 614 nm begleitet ist (Q_{Y2}) (81a). Weiterhin gibt es eine sehr schwach ausgeprägte Q_X -Bande bei 576 nm. Das Maximum der Soret-Bande liegt bei 427 nm. Der steile Anstieg der Soret-Bande bei 450 nm zeigt, dass das Chlorophyll a nicht durch Carotinoide verunreinigt ist. Der Ersatz des Phtylrestes von Chlorophyll a durch einen Ethylrest in Ethylpheophorbid macht sich spektral nicht bemerkbar. Die Maxima der Soret- und Q_{Y1} -Banden von Ethylpheophorbid sind im Vergleich zu Chlorophyll a leicht verschoben. Durch den Verlust des zentralen Magnesiumions bei der Umesterung entstehen zwei Q_X -Banden bei 504 und 532 nm.

Dünnschichtchromatographie

Durch die im Vergleich zum Chlorophyll a ($R_f = 0.78$ für 1; $R_f = 0.98$ für 2) erhöhte Polarität von Ethylpheophorbid ($R_f = 0.46$ für 1; $R_f = 0.89$ für 2) erniedrigt sich die Laufgeschwindigkeit auf HPTLC-Kieselgel 60 Platten in beiden Laufmittelsystemen (S. 21).

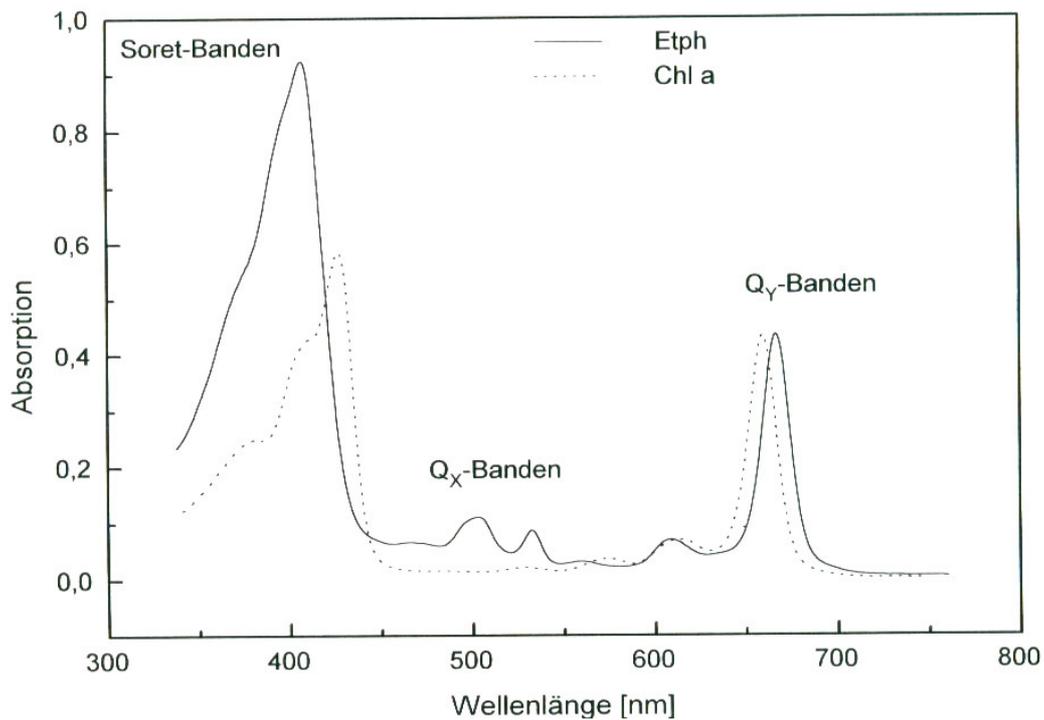


Abb. 12: Absorptionsspektren von Chlorophyll a und Ethylpheophorbid in Diethylether

¹H-NMR-Spektrum

Abb. 13 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum (81a) von Ethylpheophorbid in deuteriertem Aceton (99,7 %). Dieses Lösungsmittel wurde gewählt, da alle dargestellten Pigmente bis zu einer Konzentration von $3,2 \times 10^{-5}$ mol/l als Monomere vorliegen. Durch Kopplung mit den Deuteriumatomen erhält man für das verbleibende Proton von Aceton ein aufgespaltenes Signal, dessen Feinstrukturlinien bei 2,03 ppm und 2,8 ppm zu finden sind. Im Gegensatz zu D₆-Pyridin und CDCl₃ zeigt es im Bereich von 7-8 ppm keine Signale. Dies ist von entscheidender Bedeutung, da in diesem Bereich aromatische Ringe absorbieren. So ist eine Substitution durch den Aromaten tert-Butylphenol eindeutig zu erkennen.

Zwischen 6 und 8 ppm ist das ABX-System für die Vinylgruppe zu sehen. Vier der acht theoretisch zu erwartenden Signale des AB-Teils und alle vier theoretisch zu erwartenden Signale des X-Teils sind vorhanden. Die Kopplungskonstanten des Doppeldoublets von H_X betragen 7 und 14 Hz. Die Kopplungskonstanten des AB-Teils betragen 18 Hz für die Kopplung J_{AX} und 12 Hz für die Kopplung J_{BX} (89c).

Auffällig ist, dass die Dublette von H_A und H_B nochmal aufgespalten sind. Gleiches gilt für die Signale der 17-H, 18-H und 8- CH_2 -Gruppen. Die äußerst symmetrische Aufspaltung spricht für eine Komplexbildung mit dem Lösungsmittel Aceton, die von zwei Seiten mit gleicher Wahrscheinlichkeit möglich sein sollte.

Die 17- CH_2 -Gruppen zeigen eine nicht auflösbare multiple Kopplung. Die Zuordnung der Signale ist wie folgt (81b): 9.45, 9.13, 8.85 (5-H, 10-H, 20-H); 7.95, 6.25, 6.10 (H_X , dd, $J_1 = 7$ Hz, $J_2 = 14$ Hz; H_A , d, $J = 18$ Hz; H_B , $J = 12$ Hz); 6.32 (13^2 -H); 4.64 (18-H); 4.21 (17 H); 3.95 (17^4 - CH_2); 3.90 (13^2 - CH_3); 3.42 (8- CH_2); 3.57 (12- CH_3); 3.37 (2- CH_3); 2.92 (7- CH_3); 2.48 (17^1 - CH_2); 2.30 (17^2 - CH_2); 1.84 (18- CH_3 , $J = 7$ Hz); 1.52 (8- CH_3); 1 (17^4 - CH_3).

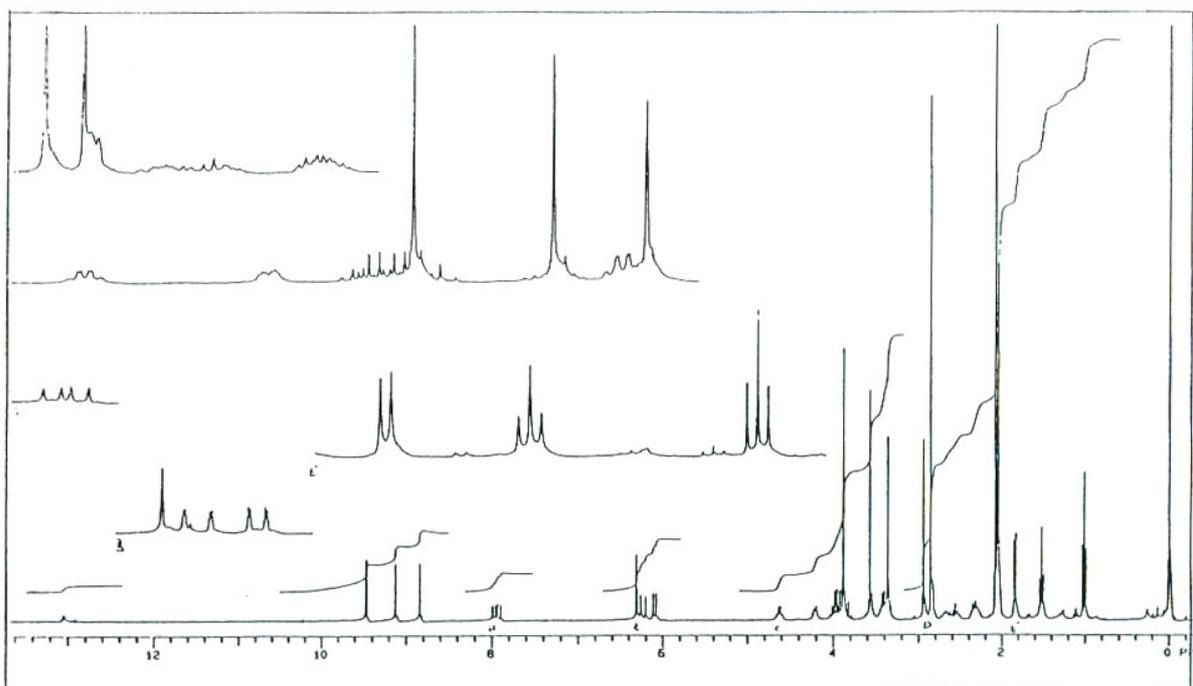


Abb. 13: 1H -NMR-Spektrum von Ethylpheophorbid in d_6 -Aceton

MALDI-Massenspektrum

Für die Summenformel von Ethylpheophorbid $C_{37}H_{41}N_4O_5$ ($M+H^+$) errechnet sich eine Masse von 621. Das Massenspektrum zeigt den erwarteten Peak. Der Peak bei 635 liegt genau um die Masse eines Sauerstoffatoms höher. Er entspricht der Masse von 13^2 -OH-Ethylpheophorbid. Das Signal bei 563 Masseneinheiten entsteht durch

Pyrolyse der Carboxymethylgruppe in Position C-13². Es ist nicht klar, ob dieser Peak durch Fragmentierung des höchsten Massenpeaks bei der Messung entsteht oder eine Verunreinigung darstellt.

Darstellung von Pt-Pheophorbidmethylester durch direkte Metallierung

Platin kann durch eine direkte Metallierungsreaktion via PtCl_2 unter Ausschluss von Wasser in den Tetrapyrrolzyklus von Pheophorbidmethylester eingeführt werden. Dazu werden alle verwendeten Lösungsmittel über Molekularsieb getrocknet und der eingesetzte Photosensitizer über Nacht lyophilisiert. Alle Lösungsmittel sollten frei von Peroxiden und anderen Oxidantien sein. Zur Entfernung dieser Verunreinigungen werden alle eingesetzten Lösungsmittel über eine Al_2O_3 -Säule gegeben.

0,2 mg PtCl_2 (75 μM) (Merck) wird in 2 ml gereinigtem, getrocknetem und mit Molekularsieb versetztem Benzonnitril gelöst und unter Argonatmosphäre erhitzt. Anschließend werden 0,2 mg (32,7 μM) getrocknetes Methylpheophorbid hinzugegeben. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,3 ml Essigsäure gestartet und das Reaktionsgemisch wird eine Stunde lang unter Rückflusskühlung erhitzt. Der Reaktionsverlauf wird spektroskopisch oder alternativ über analytische Dünnschichtchromatographie verfolgt. Vor Aufnahme des Spektrums wird überschüssiges Metall durch Extraktion mit Ether entfernt. Als Laufmittel wird ein Gemisch aus Dichlormethan / N-Hexan / Propanol / Methanol [68 / 25 / 5 / 2 (v / v)] (S. 21) verwendet. Der R_f -Wert des metallierten Produktes beträgt 0,35. Der R_f -Wert von Pheophorbidmethylester ist 0,43. Ein Shift der Q_Y -Bande von 650 nm nach 634 nm zeigt an, dass die Reaktion beendet ist. Die Reinigung erfolgt auf präparativen Kieselgel 60 Platten (Merck) unter Einsatz des oben erwähnten Laufmittelgemisches 3 (S. 21). Der R_f -Wert beträgt 0,3. Der R_f -Wert der Ausgangssubstanz beträgt 0,37. Das metallierte Produkt wird von der Platte vorsichtig abgetragen und mit einem Aceton / Methanol-Gemisch [3 : 1 (v / v)] extrahiert. Anschließend wird es im Vakuum getrocknet, unter Argonatmosphäre luftdicht verschlossen und bei -20°C aufbewahrt. Die Verbindungen mit geänderter Peripherie können unter identischen Bedingungen mit leicht variierten Reaktionszeiten erhalten werden.

Die Ergebnisse der direkten Metallierung von Pheophorbiden sind exemplarisch für die direkte Metallierung von Bacteriopheophorbiden zu werten.

Pyroethylpheophorbid

Absorptionsspektrum

Die Absorptionsspektren von Pyroethylpheophorbid und Ethylpheophorbid in Diethylether lassen sich nur durch die Lage ihrer Q_X -Banden unterscheiden. Beim Pyroethylpheophorbid sind sie um 2 nm rotverschoben.

Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographisch lassen sich Ethylpheophorbid ($R_f = 0.65$) und Pyroethylpheophorbid ($R_f = 0.30$) am besten auf RP-8-Platten mit Methanol als Laufmittel unterscheiden. Pyroethylpheophorbid ist unpolarer als Ethylpheophorbid. Er wird daher stärker von der apolaren stationären Phase (RP-8) zurückgehalten (S. 21).

$^1\text{H-NMR}$

In dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Pyroethylpheophorbid in deuteriertem Aceton fällt die symmetrische Aufspaltung mehrerer Signalgruppen (5-H, 10-H, H_X) auf. Da für Pyroethylpheophorbid eine Diastereomerenbildung auszuschließen ist, spricht dies wieder für den bereits für Ethylpheophorbid beschriebenen Lösungsmittelleffekt. Das Signal für die $^{13}\text{C}^2\text{-CH}_3$ -Gruppe ist vollständig verschwunden. Stattdessen ist ein Doppeldublett für die beiden $^{13}\text{C}^2\text{-H}$ -Atome bei 5,1 und 5,25 ppm zu erkennen. Die Kopplungskonstanten dieser beiden Dublette betragen jeweils 20 Hz.

Durch die Pyrolyse werden alle Signale mit Ausnahme der 18- CH_3 -Gruppe tieffeldverschoben. Dies deutet auf eine Verstärkung des aromatischen Ringstromes hin. Die Entfernung der $^{13}\text{C}^2$ -Carboxymethylgruppe könnte eine Entspannung des aromatischen Ringsystems bewirken, die zu einer erhöhten Planarität des Chlorinsystems führt (16, 30).

Die Bildung von $^{13}\text{C}^2\text{-OH-Pyroethylpheophorbid}$ kann aufgrund dieses Spektrums ausgeschlossen werden.

Die Zuordnung der Signale ist wie folgt (90): 9.70, 9.45, 8.90 (5-H, 10-H, 20-H); 8.20, 6.40, 6.20 (H_x, dd, J₁ = -- , J₂ = 15,4 Hz; H_A, d, J = 18,6 Hz; H_B J = 11,7 Hz); 5.25 (13²-H₁, J = 20 Hz); 5.10 (13²-H₂, J = 20 Hz); 4.65 (18-H); 4.40 (17 H); 4.05 (17⁴-CH₂); 3.70 (8-CH₂); 3.60 (12-CH₃); 3.45 (2-CH₃); 3.20 (7-CH₃); 2.70 (17¹-CH₂); 1.80 (18-CH₃, J₁ = 4,6 Hz; J₂ = 2,8 Hz); 1.65 (8-CH₃); 1.10 (17⁴-CH₃); 0.01, -1.85 (NH).

MALDI-Massenspektrum

Das Massenspektrum zeigt bei 563 Masseneinheiten einen Peak, der für die Summenformel: (M + H⁺) C₃₅H₃₉N₄O₃ erwartet wird.

Bromethylpheophorbidethylester

Darstellung

3¹-Bromethylpheophorbidethylester wird durch Hydrobromierung der Vinylgruppe von Ethylpheophorbid synthetisiert. Als Konkurrenzreaktion beobachtet man eine syn-Addition von Brom, da der in Eisessig gelöste Bromwasserstoff immer Spuren von Brom enthält.

50 mg Ethylpheophorbid werden mit 17 ml in Eisessig gelöstem Bromwasserstoff (40 %) versetzt. Durch Spülen der erhaltenen Lösung mit Argon werden Reste von Sauerstoff entfernt. Anschließend erwärmt man das Gemisch vorsichtig (Dämpfe von Bromwasserstoff!) auf eine Temperatur von 55°C. Bei dieser Temperatur muss die Reaktionsmischung 2,5 Stunden gerührt werden. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wird der Eisessig bei einem Vakuum von 20 mbar abdestilliert. Um sicherzugehen, dass das erhaltene Bromderivat keine Lösungsmittelrückstände mehr enthält, wird es 45 Minuten über CaCl₂ im Exsikkator getrocknet [nach (12, 32, 63, 64, 71, 89a, 89b)].

Absorptionsspektrum

Abb. 14 zeigt das Absorptionsspektrum eines Gemisches aus 3¹-Bromethylpheophorbidethylester und 3¹-3²-Dibromethylpheophorbidethylester in Ether. Eine Trennung der beiden Bromderivate konnte mit Hilfe der **H**igh **P**ressure **L**iquid **C**hromatography (HPLC) nicht erreicht werden (S. 23 f.) (41). Im Vergleich zum Ethylpheophorbid sind alle Banden rotverschoben. Dies fällt besonders bei den Q_Y-Banden auf, bei denen die Verschiebung jeweils 5 nm beträgt. Einen Hinweis, dass das zweite Bromatom trotz der beobachteten Rotverschiebung nicht an das C-20-Atom gebunden ist, erhält man aus den relativen Intensitäten der Q_Y-Banden (81b). Durch einen Halogensubstituenten in C-20 müsste die Intensität der Q_{X2}-Bande gegenüber der Q_{X1}-Bande erhöht sein.

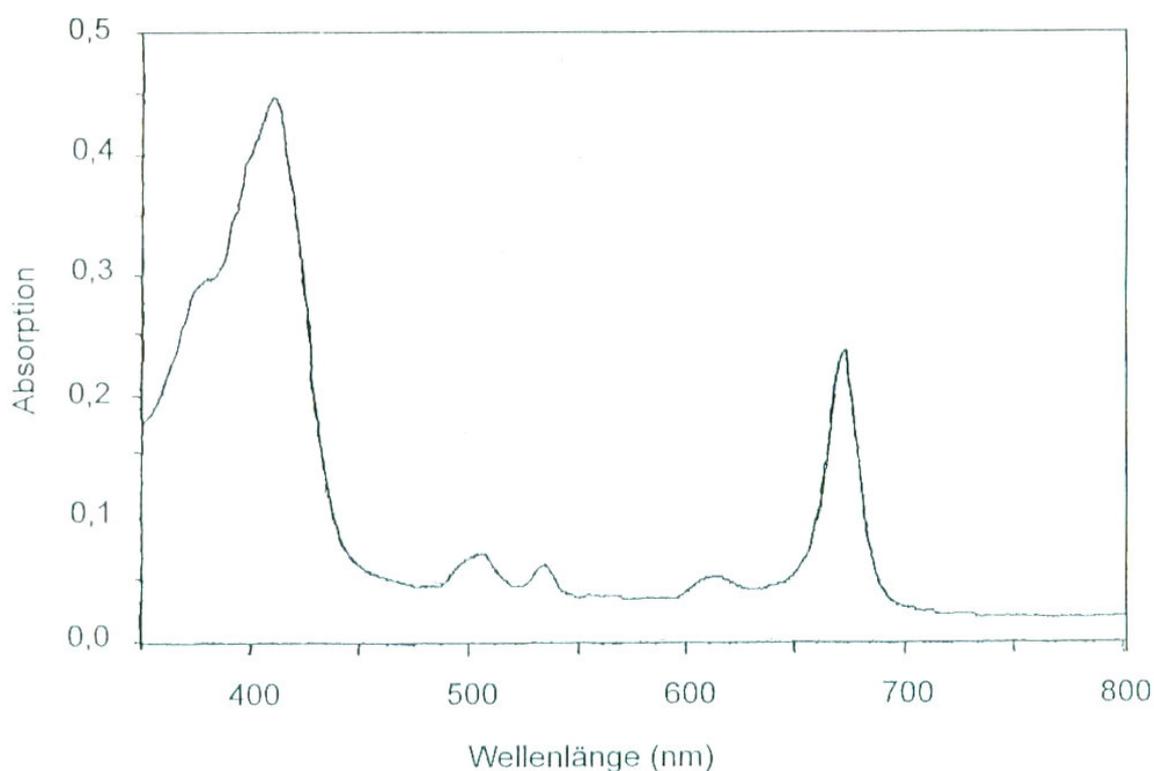


Abb. 14: Absorptionsspektrum eines Gemisches aus 3¹-Bromethylpheophorbidethylester und 3¹-3²-Dibromethylpheophorbidethylester in Diethylether

3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester

Darstellung

Durch Substitution des Bromatoms vom 3¹-Bromethylpheophorbidethylester durch tert-Butylphenol erhält man 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester. Auch bei dem 3¹-3²-Dibromethylpheophorbidethylester wird nur das 3¹-Bromatom substituiert (Abb. 15). Die entsprechenden MALDI-Spektren zeigen, dass Disubstitutionsprodukte nur in vernachlässigbaren Mengen entstehen.

Bei der Synthese von 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester muss wasserfrei gearbeitet werden, um eine Hydrolyse des 3¹-Bromethylpheophorbidethylesters zu vermeiden.

50 mg Bromethylpheophorbidethylester werden mit 10 ml Dichlormethylen, das einen 900-fach molaren Überschuss an tert-Butylphenol enthält, versetzt. Die Reaktionsmischung wird 45 Minuten bei 55 °C unter leichtem Argonstrom gerührt.

Nach Abkühlen wird sie im fünffachen Volumen Ether aufgenommen und mehrfach mit Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird zweimal je zehn Minuten über Natriumchlorid getrocknet. Danach wird der Ether abdestilliert. Das Reaktionsprodukt wird über Nacht im Exsikkator getrocknet und anschließend bei -20 °C gelagert.

Für diese Synthese muss das eingesetzte Dichlormethylen mit Hilfe einer Al₂O₃-Säule gereinigt und getrocknet werden. Das in Dichlormethylen gelöste tert-Butylphenol sollte mindestens zwei Stunden über Natriumsulfat getrocknet werden.

Zur Trennung der bei der Synthese von 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester anfallenden Produkte muss zuerst das im Überschuss eingesetzte tert-Butylphenol quantitativ entfernt werden. Dies kann entweder mit Hilfe einer QAE-Sepharose-Säule oder durch Sublimation geschehen.

Durch Sublimation bei 110 °C lässt sich überschüssiges tert-Butylphenol in der Trockenpistole unter Ölpumpenvakuum entfernen. Für eine quantitative Abtrennung des tert-Butylphenols ist es wichtig, eine möglichst große Oberfläche zu haben. Aus diesem Grund ist es günstig, das ungereinigte Pigment auf mehrere kleine Gläschen zu verteilen.

Erst dann können die bei dieser Synthese entstehenden Produkte (s. HPLC-Chromatogramm, S. 56 f.):

- 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester
- 3¹-tert-Butylphenoxybromomethylpheophorbidethylester
- Pheophorbidethylester

mit Hilfe von Kieselgelplatten (S. 22) oder auch über eine Kieselgeltrockensäule (S. 25) gereinigt werden.

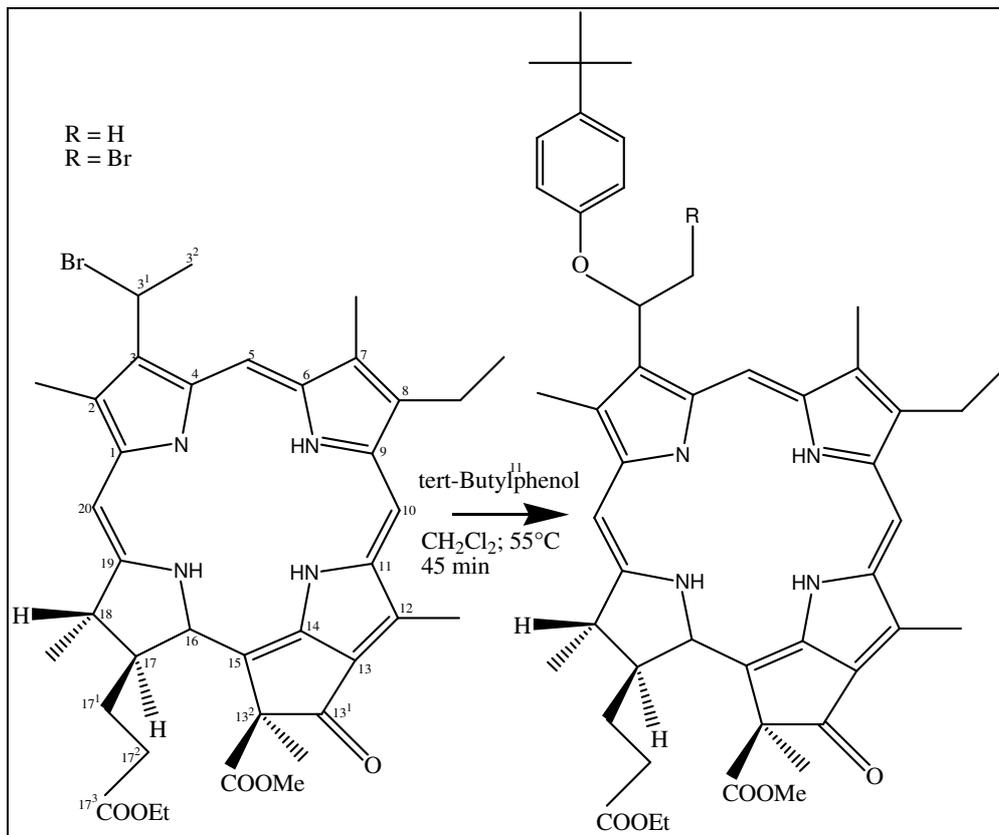


Abb. 15: Umsetzung vom 3¹-Bromethylpheophorbidethylester zum 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester

Absorptionsspektrum

Abb. 16 zeigt die Absorptionsspektren von 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester und Ethylpheophorbid in Diethylether. Auffällig ist die Blauverschiebung der Banden des 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylesters im Vergleich zum

Ethylpheophorbid. Die Q_Y -Banden werden um 3 nm bzw. 4 nm, die restlichen Banden jeweils um 2 nm verschoben.

Dünnschichtchromatographie

Auffällig ist, dass 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester in den beiden Laufmittelsystemen (S. 21) ein anderes Laufverhalten zeigt. Auf den Kieselgel-60 HPTLC-Platten für das Laufmittelgemisch 1 liegt die 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester-Bande ($R_f = 0.53$) direkt hinter der 3¹-tert-Butylphenoxyethylbrompheophorbidethylester-Bande ($R_f = 0.55$). Ethylpheophorbid hat einen R_f -Wert von 0.46. Im zweiten Laufmittelsystem hingegen läuft 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester ($R_f = 0.80$) mit einigem Abstand zu den anderen beiden Substanzen an letzter Stelle. Dieses Laufverhalten lässt sich nicht nur über die unterschiedlichen Polaritäten der eingesetzten Verbindungen erklären.

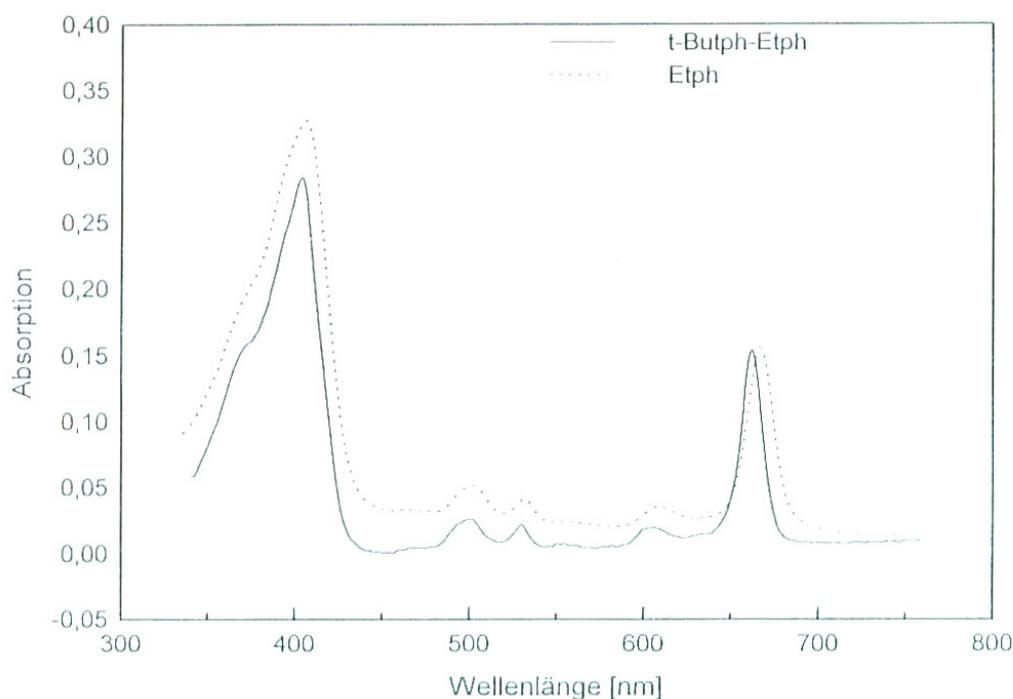


Abb. 16: Absorptionsspektren von Ethylpheophorbid und 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester in Diethylether

¹H-NMR

Das ¹H-NMR-Spektrum von 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester zeigt deutliche Verunreinigungen im Bereich von 0 bis 3 ppm.

Aus dem Vergleich mit anderen Spektren lässt sich jedoch sagen, dass diese Verbindung eine tert-Butylphenylgruppe enthält (Signal der 4 Protonen zwischen 7,1 und 7,3 ppm, Signal der 9 Protonen bei 1,05 ppm). Eine Zuordnung der restlichen Signale erfolgt im Anschluss: 9.90, 9.85, 8.86 (5-H, 10-H, 20-H); 7.07-7.11 (Aromat); 3.85 (13²-H); 3.85 (13²-CH₃); 3.78 (8-CH₂); 3.68 (12-CH₃); 3.53 (2-CH₃); 3.33 (7-CH₃); 2.68 (17¹-CH₂); 2.50 (17²-CH₂); 7.05 (3¹-CHOR); 2.30 (3¹-CH₃); 1.95 (18-CH₃); 1.80 (8-CH₃); 0.95 (17⁴-CH₃); 1.05 (C(CH₃)₃); 0.13 (NH).

FAB-Massenspektrum

Das Massenspektrum zeigt den höchsten Massenpeak bei 771, welcher genau der erwarteten Summenformel C₄₇H₅₅N₄O₆ (M+H⁺) entspricht. Zusätzlich erkennt man einen Peak bei 621, der Molekülmasse von Ethylpheophorbid. Die hohe Intensität dieses Peaks ist etwas überraschend. Da es sich um eine durch HPLC gereinigte Probe handelt, die nur einen Peak mit einer von Ethylpheophorbid verschiedenen Retentionszeit zeigt, ist anzunehmen, dass der Ethylpheophorbidpeak durch Fragmentierung des höchsten Massenpeaks bei der Messung entsteht.

HPLC-Analyse

Das HPLC-Chromatogramm (Abb. 17) der bei der Synthese des 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylesters erhaltenen Reaktionsmischung zeigt drei Peaks mit Retentionszeiten von 237 s, 273 s und 445 s. Es handelt sich um folgende Substanzen:

- /1/ 3¹-tert-Butylphenoxyethylbrompheophorbidethylester
- /2/ 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester (Gemisch der Stereoisomeren)
- /3/ Pheophorbidethylester (Gemisch der Stereoisomeren)

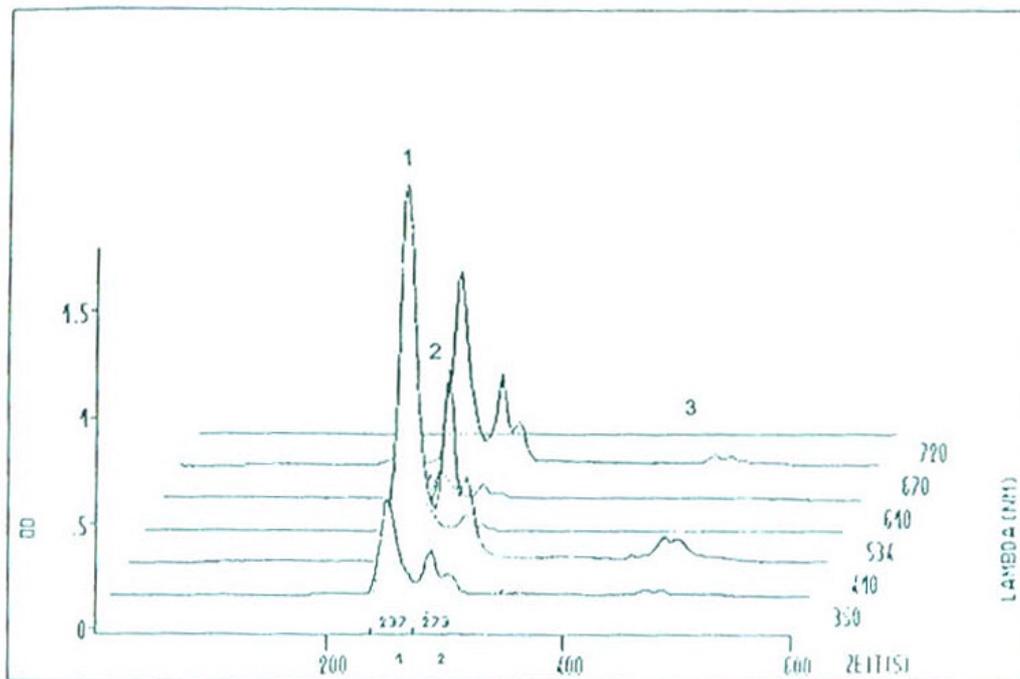


Abb. 17: HPLC-Chromatogramm der Reaktionsprodukte der Synthese von 3^1 -tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester

3^1 -tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester

Darstellung

Die Darstellung des 3^1 -tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylesters erfolgt wie auf S. 53 f. beschrieben auf Basis von Pyroethylpheophorbid

Absorptionsspektrum

Das Absorptionsspektrum wurde in einer Methanol/Aceton-Lösung [1 : 1 (v / v)] aufgenommen, da die Pyropheophorbidderivate sich verhältnismäßig schlecht in Ether lösen. Im Vergleich zum Pyroethylpheophorbid sind die Q_Y -Banden und die Q_{X2} -Bande um jeweils 3 nm blauverschoben. Das Soret/ Q_{Y2} -Verhältnis ändert sich durch den tert-Butylphenylsubstituenten nur geringfügig.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie in den beiden Laufmittelsystemen (S. 21) gilt ähnliches wie für die Pheophorbidderivate. Im ersten Laufmittelsystem liegt 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester von den drei synthetisierten Pyropheophorbidderivaten an zweiter Stelle direkt hinter 3¹-tert-Butylphenoxybromethylpheophorbidethylester ($R_f = 0,53$). Im zweiten Laufmittelsystem läuft es an letzter Stelle ($R_f = 0,8$).

¹H-NMR

Das ¹H-NMR-Spektrum des 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylesters enthält durch die Pyrolyse nur noch ein Asymmetriezentrum in Position C-3¹. An der Aufspaltung der Methinprotonen sieht man, dass die beiden Stereoisomeren nicht im Verhältnis 1 : 1 vorliegen. Die Signale der vier aromatischen Protonen zwischen 7,1 ppm und 7,25 ppm und die der neun Protonen der tert-Butylgruppe bei 1,05 ppm zeigen, dass das Einführen eines tert-Butylphenyl-Substituenten gelungen ist. Die für pyrolysierte Verbindungen typischen ¹³C-H₂-Signale bei 5,1 ppm und 5,25 ppm mit einer Kopplungskonstanten J_{AB} von 20 Hz sind vorhanden. Damit liegt dieselbe Kopplungskonstante wie bei der unsubstituierten Verbindung vor. Anstelle der Signale für die Vinylgruppe erhält man ein Signal bei 2,3 ppm, dessen Integral den drei Protonen der 3¹-CH₃-Gruppe entspricht. Es zeigt die erwartete Aufspaltung in ein Dublett.

Probleme der Zuordnung: Die Zuordnung des Signals für das 3¹-Proton ist schwierig. Durch die mehrfache Aufspaltung und geringe Intensität lässt sich diese Signalgruppe nur schwer vom Grundrauschen des Spektrums unterscheiden. Das Signal könnte bei 7,05 ppm liegen. Ein weiteres Problem ist, dass in diesem Bereich auch die aromatischen Protonen absorbieren. Um eine endgültige Aussage treffen zu können, müsste das gleiche Spektrum mit doppelter Probenmenge aufgenommen werden.

Vergleicht man die Aufspaltung der 18-CH₃-Gruppe mit der von Pyroethylpheophorbid, so fällt auf, dass das Dublett der 18-CH₃-Gruppe in diesem Spektrum nochmal aufgespalten ist. Das gleiche Phänomen lässt sich bei der 3¹-CH₃-Gruppe

beobachten. Es ist anzunehmen, dass diese Aufspaltung durch Wechselwirkung mit dem aromatischen Substituenten entsteht. Ein NOESY-Spektrum könnte hier weiteren Aufschluss geben (89c).

Die Zuordnung der Signale ist wie folgt (70): 9.97, 9.80, 8.87 (5-H, 10-H, 20-H); 7.08-7.20 (Aromat); 5.30 (13^2 -H₁, J = 20 Hz); 5.10 (13^2 -H₂, J = 20 Hz); 4.65 (18-H); 4.40 (17 H); 4.0 (17^4 -CH₂); 3.80 (8-CH₂); 3.65 (12-CH₃); 3.50 (2-CH₃); 3.35 (7-CH₃); 2.65 (17^1 -CH₂); 2.40 (17^2 -CH₂); 7.04 (3^1 -CHOR); (3^1 -CH₃, dd, J₁ = 1.5 Hz, J₂ = 3.1 Hz); 1.80 (18-CH₃, dd, J₁ = 1.4 Hz; J₂ = 7.7 Hz); 1.70 (8-CH₃); 1.05 (17^4 -CH₃); 0.10, -1.90 (NH).

FAB- und MALDI-Massenspektren

Das FAB-Massenspektrum zeigt den höchsten Massenpeak bei 713. Dieser stimmt mit der Masse für die Summenformel C₄₅H₅₃N₄O₄ (M+H⁺) überein. Es liegt die für Kohlenstoff und Wasserstoff typische Isotopenverteilung vor. Bei dem Peak mit der Molekülmasse von 563 handelt es sich um ein Fragmentierungsprodukt des höchsten Massenpeaks: Pyroethylpheophorbid. Die Intensität dieses Peaks beträgt 50 % des Hauptpeaks. Bei den Pheophorbidderivaten liegt die Intensität des Fragmentierungspeaks bei 82 %. Daraus folgt, dass das in 3^1 -Stellung substituierte Pyroderivat wesentlich stabiler als das entsprechende nicht pyrolierte Derivat ist. Bei der MALDI-Massenspektrometrie entstehen durch Anlagerung von einem bzw. zwei Natriumionen an den Ester zwei zusätzliche Peaks.

HPLC

Das HPLC-Chromatogramm zeigt vier Peaks bei folgenden Retentionszeiten: 160 s, 210 s, 380 s und 500 s. Dabei handelt es sich um die Substanzen:

- /1/ 3^1 -tert-Butylphenoxybromethylpyropheophorbidethylester
- /2/ 3^1 -tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester
- /3/ Degradationsprodukte des Pyroethylpheophorbids
- /4/ Pyroethylpheophorbid.

3¹-tert-Butylphenoxybromethylpheophorbidethylester

Darstellung

3¹-tert-Butylphenoxybromethylpheophorbidethylester entsteht als Nebenprodukt der auf Seite 53 f. beschriebenen Synthese.

Absorptionsspektrum

Beim Absorptionsspektrum des 3¹-tert-Butylphenoxybromethylpheophorbidethylesters fällt im Vergleich zu dem Spektrum des 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylesters die Rotverschiebung der beiden Q_Y-Banden um 4 nm auf. Die Spektren von 3¹-tert-Butylphenoxybromethylpheophorbidethylester und Ethylpheophorbid zeigen keine nennenswerten Unterschiede. Interessant wäre ein Vergleich mit dem Spektrum von 3¹-3²-Dibromethylpheophorbidethylester. Dieser Ester konnte bisher noch nicht als Reinsubstanz isoliert werden.

Dünnschichtchromatographie

3¹-tert-Butylphenoxybromethylpheophorbidethylester läuft in beiden verwendeten Laufmittelsystemen an erster Stelle ($R_f = 0.55$ in 1, $R_f = 0.94$ in 2)

¹H-NMR

Das ¹H-NMR des 3¹-tert-Butylphenoxybromethylpheophorbidethylesters zeigt alle Signale des aromatischen Substituenten. Auffällig ist auch hier die Aufspaltung der Signale der 18-CH₃ Gruppe in ein Doppeldublett. Mit Ausnahme der Signale für 10-H, 17⁴-CH₂ und 8-CH₂ unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen der restlichen Signale nicht wesentlich von Ethylpheophorbid.

Probleme der Zuordnung: Aus dem Massenspektrum sieht man, dass die Verbindung genau ein Bromatom enthält. Als mögliche Positionen kommen nur die Kohlenstoffatome C-3¹ oder C-3² in Frage. Die Position C-13² kann durch Vergleich mit dem Spektrum der entsprechenden Pyroverbindung ausgeschlossen werden.

Befindet sich das Bromatom in Stellung C-3², so liegt ein ABX-System vor. Dies bedeutet, dass das Signal des H_X-Atoms in Stellung C-3¹ in ein Doppeldublett aufgespalten wird. Gleichzeitig werden für die beiden diastereomeren H-Atome (H_A, H_B) in Stellung C-3² acht Signale erwartet. Da für die Aufnahme des Spektrums nur wenig Probensubstanz (Reinigung durch analytische HPLC) zur Verfügung stand, bereitet die Unterscheidung von mehrfach aufgespaltenen Signalen vom Grundrauschen des Spektrums einige Schwierigkeiten. Vergleicht man dieses Spektrum mit den Spektren von Ethylpheophorbid und 3¹-tert-Butylphenoxyethylpheophorbidethylester, so fallen zwei Signalgruppen bei 4,5 und 7,2 ppm auf, die sich wahrscheinlich den H_X- bzw. den H_A- und H_B-Protonen zuordnen lassen. Sie sollten durch das Bromatom zu tieferem Feld verschoben werden. Die gefundene chemische Verschiebung entspricht exakt den in der Literatur angegebenen Werten (30, 103).

Für ein Bromatom in Stellung C-3¹ würde man für die 3¹-CH₃-Gruppe ein Singulett oder maximal ein Dublett mit der Intensität von drei Protonen erwarten. Selbst bei einem schlechten Signal/Rausch-Verhältnis sollte ein solches Signal nicht zu übersehen sein.

Die Messergebnisse sprechen dafür, dass Brom an C-3¹ gebunden vorliegt.

Eine vorläufige Zuordnung der restlichen Signale erfolgt im Anschluss: 10.0, 9.90, 8.95 (5-H, 10-H, 20-H); 7.10-7.30 (Aromat); 6.35 (13²-H); 4.65 (18-H); 4.55 (17-H); 4.25 (17⁴-CH₂); 3.85 (13²-CH₃); 3.75 (8-CH₂); 3.65 (12-CH₃); 3.55 (2-CH₃); 3.35 (7-CH₃); 2.70 (17¹-CH₂); 2.50 (17²-CH₂); 7.11 (3¹-CHOR); 4.55 (3¹-CH₃); 1.80 (18-CH₃, J₁ = 2.5, J₂ = 7.7); 1.70 (8-CH₃); 0.95 (17⁴-CH₃); 1.05 (C(CH₃)₃); 0.10 (NH).

FAB-Massenspektrum

Das Massenspektrum zeigt den höchsten Massenpeak bei 851. Dieser entspricht der Masse für die Summenformel C₄₇H₅₅N₄O₆Br (M+H⁺). Der Bromsubstituent lässt sich an seinem charakteristischen Isotopenmuster erkennen. Der Peak bei 621 mit der hohen Intensität hat die Masse von Ethylpheophorbid. Er entsteht durch Fragmentierung des 3¹-Butylphenoxybromethylpheophorbidethylesters im Spektrometer.

3¹-tert-Butylphenoxybromethylpyropheophorbidethylester

Darstellung

Die Darstellung von 3¹-tert-Butylphenoxybromethylpyropheophorbidethylester erfolgt wie auf Seite 53 f. beschrieben. Das Ausgangsprodukt ist Pyroethylpheophorbid.

Absorptionsspektrum

Die Soret-Bande und die Q_{Y2}-Bande von 3¹-tert-Butylphenoxybromethylpyropheophorbidethylester sind im Vergleich zu Pyroethylpheophorbid kurzweilig verschoben. Das Soret/Q_{Y2}-Verhältnis ist ebenfalls erheblich kleiner als beim Pyroethylpheophorbid.

Der Unterschied zum 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester zeigt sich hauptsächlich in der Lage der Soret-Bande.

Dünnschichtchromatographie

3¹-tert-Butylphenoxybromethylpyropheophorbidethylester läuft in den Laufmittelsystemen 1 und 2 (S. 21) an erster Stelle. Die R_f-Werte betragen 0,73 für das erste Laufmittel und 0,89 für das zweite Laufmittel.

¹H-NMR

In dem ¹H-NMR-Spektrum von 3¹-tert-Butylphenoxybromethylpyropheophorbidethylester lässt sich die Abspaltung der Carboxymethylgruppe in Position C-13² sofort erkennen. Die Kopplungskonstanten für die 13²-H-Atome betragen 20 Hz. Durch die Pyrolyse werden die Signale für 5-H und 20-H tieffeldverschoben. Dies spricht für eine Verstärkung des aromatischen Ringstroms. Die Position des Bromatoms wurde bereits für die nicht-pyrolisierte Verbindung diskutiert. Eine Zuordnung der restlichen Signale erfolgt im Anschluss: 10.0, 9.85, 8.96 (5-H, 10-H, 20-H); 7.12-7.28 (Aromat); 5.30 (13²-H₁, 20 Hz); 5.15 (13²-H₂, 20 Hz); 4.65 (18-H); 4.45 (17-H); 4.0 (17⁴-CH₂); 3.80 (8-CH₂); 3.70 (12-CH₃); 3.60 (2-CH₃); 3.35 (7-CH₃); 2.65 (17¹-CH₂); 2.40 (17²-

CH₂); 7.11 (3¹-CHOR); 4.55 (3¹-CH₃); 1.85 (18-CH₃, dd, J₁ = 1,5 Hz, J₂ = 5,6); 1.70 (8-CH₃); 1.05 (17⁴-CH₃); 1.05 (C(CH₃)₃); 0.10, -1,95 (NH).

FAB-Massenspektrum

Das Massenspektrum zeigt einen Peak bei 793 für die erwartete Summenformel C₄₅H₅₃N₄O₄Br (M+H⁺). Der Peak bei 563 entspricht der Masse von Pyroethylpheophorbid.

Zusammenfassung

3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester konnte synthetisiert und isoliert werden. Die ¹H-NMR Spektren dieser Verbindung deuten darauf hin, dass der tert-Butylphenylsubstituent so orientiert ist, dass er mit der 18-CH₃- und der 3¹-CH₃-Gruppe des Porphyringerüsts in Wechselwirkung treten kann. Berechnet man mit Hilfe des Computerprogramms PC-Model für DOS die energetisch günstigste Konformation, so kommt man zum gleichen Ergebnis.

Durch Hydrobromierung konnte zusätzlich noch das 3²-Brom-Derivat dieser Verbindung isoliert werden, um ergänzende Strukturdaten zu gewinnen.

3.1.2 Präparation und Analytik der Pd-Bacteriopheophorbide

Bacteriopheophytin

Absorptionsspektrum

Abb. 18 zeigt das Absorptionsspektrum von Bacteriopheophytin a in Diethylether. Bei dem Vergleich des Spektrums mit Pheophytin a (S. 47, Abb. 12) fällt auf, dass die Q_Y -Bande von Bacteriopheophytin um 83 nm ins Langwellige verschoben ist. Auch die Soret-Bande von Bacteriopheophytin ist verändert. Man misst zwei Absorptionsmaxima bei 357 (B_Y) und 384 nm (B_X). Die Q_X -Bande von Bacteriopheophytin liegt bei 525 nm.

Darstellung von Pd-Bacteriopheophytin durch eine Transmetallierungsreaktion via Cd-Bacteriopheophytin

Die Darstellung von Pd-Bacteriopheophytin erfolgt durch Einbau eines Cadmiumions als Zentralatom in Bacteriopheophytin. Durch Austausch des Cadmiumions gegen ein Palladiumion erhält man Pd-Bacteriopheophytin. Dieses wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. G. Hartwich (Technische Universität München) zur Verfügung gestellt (26).

Absorptionsspektrum

Abb. 18 zeigt die Absorptionsspektren von Pd-Bacteriopheophytin und Bacteriopheophytin in Diethylether. Auffällig ist, dass die Soret-Bande von Pd-Bacteriopheophytin zwei deutlich voneinander unterscheidbare Absorptionsmaxima zeigt. Eine Deformation des Bacteriochlorinorbitalsystems durch Palladium könnte hierfür die Ursache sein. Die Bande bei 357 nm entsteht durch Verunreinigung des Pd-Bacteriopheophytins mit Bacteriopheophytin. Bei den Absorptionsmaxima zwischen 600 und 700 nm handelt es sich um Schwingungsseitenbanden der Q_Y -Bande. Sie können durch Banden, die durch Oxidation des Bacteriochloringerüsts zum Chloringerüst (P 680er-Pigment) entstehen, überlagert sein. Die geringe Absorption bei 420 nm deutet auf eine Verunreinigung durch Lipide hin. Charakteristisch für Pd-

Bacteriopheophytin ist die plateauartige Verbreiterung der Q_X -Bande bei 527 nm. Die Q_Y -Bande von Pd-Bacteriopheophytin ist im Vergleich zu Bacteriopheophytin um 6 nm rotverschoben. Das Soret B_Y/Q_Y -Verhältnis aller Pd-Komplexe ist mit ca. 0,46 deutlich kleiner als das von Bacteriopheophytin (1,4).

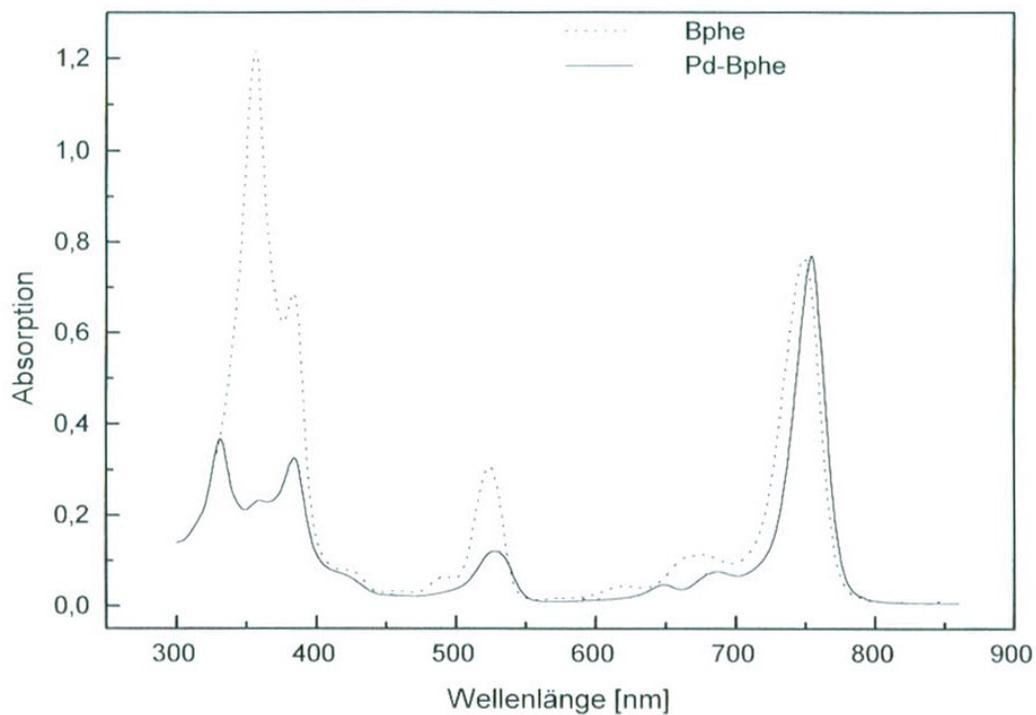


Abb. 18: Absorptionsspektren von Bacteriopheophytin und Pd-Bacteriopheophytin in Diethylether

Dünnschichtchromatographie

Pd-Bacteriopheophytin ($R_f = 0.53$ für 1; $R_f = 0.75$ für 2) wird von der polaren stationären Phase (Kieselgel 60-Platten) stärker zurückgehalten als Bacteriopheophytin ($R_f = 0.63$ für 1; $R_f = 0.80$ für 2). Dies gilt für beide Laufmittelsysteme.

¹H-NMR

Das ¹H-NMR-Spektrum von Pd-Bacteriopheophytin wurde in Deuteroaceton aufgenommen, weil es alle Palladium-Komplexe als Monomere löst. Substitutionen des Bacteriochloringerüsts durch Aromaten (7-8 ppm) sind sofort zu erkennen, da das Proton von Aceton in einem völlig anderem Bereich des Spektrums absorbiert (Feinstrukturlinien des aufgespaltenen Signals bei 2,03 ppm und 2,8 ppm). Die durch Aceton möglicherweise bewirkten Isomerisierungsreaktionen spielen eine untergeordnete Rolle.

Die Werte für die chemische Verschiebung aller Protonensignale in Deuteroaceton sind wie folgt: 9.25, 9.80, 8.70 (5-H, 10-H, 20-H); 4.55 (18-H); 4.45 (17-H); 4.25 (17⁴-CH₂); 4.10 (8-CH₂); 3.85 (13²-CH₃); 3.50 (12-CH₃); 3.30 (2-CH₃); 3.10 (7-CH₃); 3.72 (7-H); 3.30 (8-H, d, J = 4.6 Hz); 2.65 (17¹-CH₂); 2.45 (17²-CH₂); 1.75 (18-CH₃, J = 7.7 Hz); 1.65 (8-CH₃).

Darstellung von Pd-Bacteriopheophorbid durch direkte Metallierung von Bacteriopheophorbid

Palladium kann durch eine direkte Metallierungsreaktion via PdCl₂ unter Ausschluss von Wasser in den Tetrapyrrolzyklus von Bacteriopheophorbid eingeführt werden. Dazu werden alle verwendeten Lösungsmittel über Molekularsieb getrocknet. Das gut gereinigte Bacteriopheophorbid wird über Nacht lyophilisiert. Alle Lösungsmittel sollten frei von Peroxiden und anderen Oxidantien sein. Zur Entfernung dieser Verunreinigungen werden alle eingesetzten Lösungsmittel über eine Al₂O₃-Säule gegeben.

0,5 mg (82 µM) Bacteriopheophorbid werden in 3 ml mit Molekularsieb versetztem Methanol gelöst. Anschließend werden 0,3 mg (17 µM) PdCl₂ (Merck) hinzugefügt und mindestens fünfundvierzig Minuten unter Argonatmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Das Fortschreiten der Reaktion ist sowohl spektroskopisch als auch dünnschichtchromatographisch verfolgbar. Vor Aufnahme des Spektrums wird überschüssiges Metall durch Extraktion mit Ether entfernt. Als Laufmittel für die analytische Dünnschichtchromatographie wird ein Gemisch aus Dichlormethan / N-Hexan / Propanol / Methanol [68 : 25 : 5 : 2 (v / v)] (S.21) verwendet. Die Reaktion

ist beendet, wenn sich die Q_{γ} -Bande von Bacteriopheophorbid von 749 nach 755 nm und die Soret- B_{γ} -Bande von 357 nach 329 nm verschoben hat (s. auch Abb. 20). Der R_f -Wert von Pd-Bacteriopheophorbid beträgt auf analytischen Kieselgel 60 HPTLC-Platten (Merck) 0,50 wohingegen der R_f -Wert von Bacteriopheophorbid 0,56 beträgt. Zum Produkt wird ein Gemisch aus Diethylether / Trichlormethan [argon-gesättigt: 50 : 50 (v / v)] und Wasser (NaHCO_3 gesättigt) gegeben. Eine unvollständige Phasentrennung kann durch Zugabe von NaCl behoben werden. Die Diethylether / Trichlormethanphase wird zwei bis dreimal mit NaHCO_3 gesättigtem Wasser gewaschen, abgetrennt, über NaCl getrocknet (ca. 15 min rühren), filtriert und am Rotationsverdampfer bis zur Lösungsmittelfreiheit eingengt. Eine Aufreinigung erfolgt, sofern notwendig, auf präparativen Kieselgel 60 Platten (Merck). Die schwach violette Bande mit einem R_f -Wert von 0,40 entspricht dem erwarteten Produkt. (Der R_f -Wert des Edukts liegt bei 0,50). Die Bande mit dem gewünschten Produkt wird von der Platte mit einem Spatel vorsichtig abgetragen und mit einem Aceton / Methanol Gemisch [3 : 1 (v / v)] extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Durch die Auftrennung auf Kieselgelplatten ist eine Auftrennung der 13^2 -Stereoisomere möglich. Die Ausbeute ist 15 % höher als bei der Transmetallierungsreaktion via Cadmium (70 %) (26).

Die entsprechenden Verbindungen mit geänderter Peripherie können unter identischen Bedingungen mit variierten Reaktionszeiten erhalten werden.

Diese Synthesemethode hat größtenteils Eingang in ein Patent gefunden (82, Patent, Yeda Research, Weizmann Institute of Science).

Darstellung von Pt-Bacteriopheophorbid durch direkte Metallierung von Bacteriopheophorbid

Die Insertion von Platin in Bacteriopheophorbid kann durch zwei Methoden erreicht werden: Die erste Methode benutzt das Komplexsalz Platindimethylcyclooctadien $[\text{Pt}(\text{Me})_2\text{COD}]$ und die zweite benutzt Platindiacetylacetonat $\text{Pt}(\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3)_2$ (43a). Für die Arbeitsbedingungen und die Lösungsmittelreinheit gelten die gleichen Bedingungen wie sie bereits für die direkte Metallierung von Bacteriopheophorbid mit Palladium erwähnt wurden.

Bei Einsatz der ersten Methode werden 0,5 mg (1,5 μM) $\text{Pt}(\text{Me})_2\text{COD}$ in 3 ml mit Molekularsieb versetztem trockenem Dioxan zum Rückfluss erhitzt. Anschließend

werden 0,5 mg (82 μ M) Bacteriopheophorbid unter kontinuierlichem Argonstrom hinzugefügt. Um die Reaktion zu starten, gibt man 0,5 ml Essigsäure zu diesem Ansatz und erhitzt die Reaktionsmischung für drei bis vier Stunden zum Rückfluss. Das Fortschreiten der Reaktion ist sowohl spektroskopisch als auch dünnschichtchromatographisch verfolgbar. Vor Aufnahme des Spektrums wird überschüssiges Metall durch Extraktion mit Ether entfernt. Als Laufmittel für die analytische Dünnschichtchromatographie wird ein Gemisch aus Dichlormethan / N-Hexan / Propanol / Methanol [68 : 25 : 5 : 2 (v / v)] verwendet. Pt-Bacteriopheophorbid hat auf den analytischen Kieselgel 60 HPTLC Platten (Merck) einen R_f -Wert von 0,4. Die Ausgangssubstanz hingegen hat einen R_f -Wert von 0,47. Das Ende der Reaktion ist an einer Verschiebung der Q_Y -Bande von 749 nach 746 nm sowie an einer Annäherung der Intensitäten von Q_Y -Bande zur Soret-Bande erkennbar (Abb. 19).

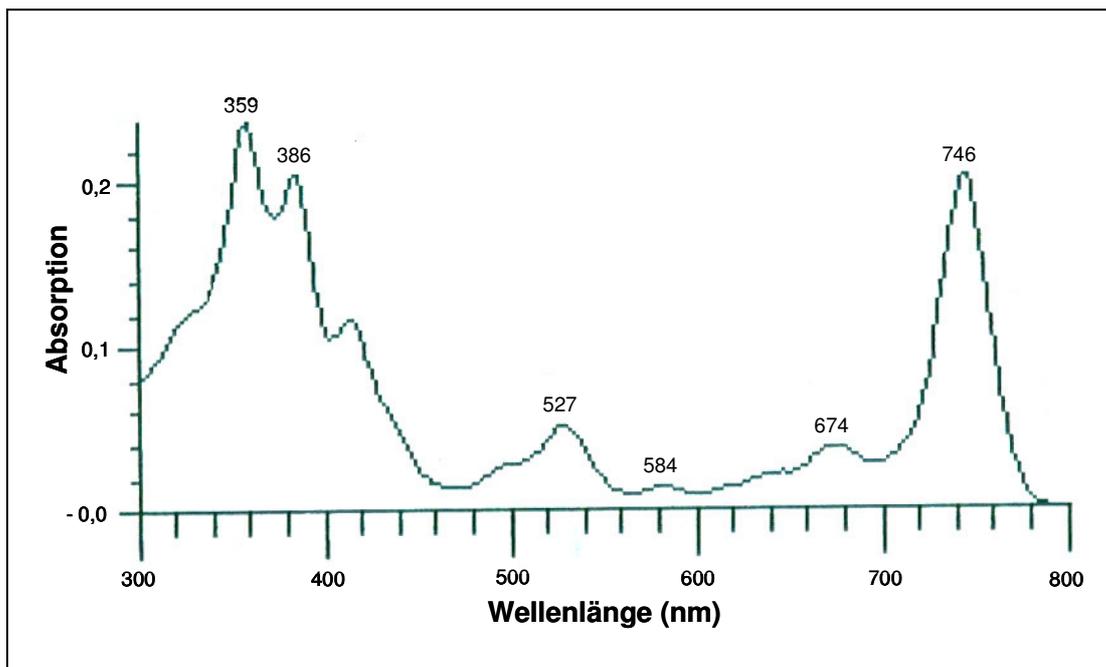


Abb. 19: Absorptionsspektren von Pt-Bacteriopheophorbid in Diethylether

Falls notwendig wird Pt-Bacteriopheophorbid analog zum Pd-Bacteriopheophorbid auf präparativen Kieselgel 60 Platten (Merck) gereinigt. Es hat einen R_f -Wert von 0,35. Der R_f -Wert des Edukts beträgt 0,4. Die Ausbeute liegt bei 80 %.

Die zweite Methode benutzt $\text{Pt}(\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3)_2$ anstelle von $\text{Pt}(\text{Me})_2\text{COD}$ und 1,2,4-Trichlorbenzol als Lösungsmittel. Die restlichen Reaktionsbedingungen, sowie die Konzentrationsverhältnisse sind identisch. Die Ausbeute ist um 20 % niedriger als bei der ersten Metallierungsmethode.

Die Verbindungen mit geänderter Peripherie können unter identischen Bedingungen mit leicht variierten Reaktionszeiten erhalten werden.

Auch diese Synthesen haben zu großen Teilen Eingang in ein Patent gefunden (79, Patent, Yeda Research, Weizmann Institute of Science).

Absorptionsspektrum

Das Absorptionsspektrum (Abb. 19) von Pt-Bacteriopheophorbid in Diethylether zeigt bei 420 nm eine geringe Verunreinigung durch Lipide. Die Q_Y -Bande ist im Verhältnis zum Bacteriopheophorbid (bzw. Bacteriopheophytin) um 3 nm blauverschoben. Die Q_X -Bande dagegen ist um 2 nm rotverschoben. Auffällig ist, dass die Soret-Bande von Pt-Bacteriopheophorbid zwei deutlich voneinander unterscheidbare Maxima zeigt. Eine Deformation des Bacteriochlorinorbitalsystems durch Platin könnte hierfür die Ursache sein. Die beiden Soret-Banden sind jeweils um 2 nm rotverschoben. Bei der Absorption um 674 nm handelt es sich um eine Schwingungsseitenbande der Q_Y -Bande. Das Soret B_Y/Q_Y Verhältnis beträgt 1,2.

Pd-Bacteriopheophorbidethylester

Darstellung

100 mg Pd-Bacteriopheophytin werden in 50 ml einer schwefelsauren (5 % H_2SO_4) Chloroform / Ethanol-Lösung (Verhältnis 1 : 1) suspendiert und 2,5 Stunden unter kontinuierlicher Argonspülung bei 78 °C zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wird der Ester in doppeltem Volumen Ether aufgenommen und solange mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, bis das Waschwasser einen neutralen pH-Wert hat. Die präparative Dünnschicht-

chromatographie mit Kieselgelplatten stellt ein geeignetes Reinigungsverfahren dar (S. 22). Die Bande mit einem R_f von 0,40 ist das gesuchte Reaktionsprodukt. Die Umsetzung erfolgt zu 80 % [nach (81)].

Absorptionsspektrum

Das Absorptionsspektrum von Pd-Bacteriopheophorbidethylester unterscheidet sich nicht von dem Absorptionsspektrum für Pd-Bacteriopheophytin. Umesterungen in Position 17⁴ lassen sich mit Hilfe der UV/VIS-Absorptionsspektroskopie nicht erkennen.

3¹-tert-Butylbenzoyl-ethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester

Darstellung

Die Synthese von 3¹-tert-Butylbenzoyl-ethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester erfolgt in zwei Schritten. Zuerst wird die 3¹-Acetylgruppe von Pd-Bacteriopheophorbidethylester mit Natriumborhydrid zur 3¹-Hydroxyethylgruppe reduziert [nach (94)]. Anschließend wird diese mit tert-Butylbenzoylchlorid verestert (Abb. 20).

Zu 2 mg in 50 ml Ethanol gelöstem Pd-Bacteriopheophorbidethylester wird so lange frisches Natriumborhydrid zugesetzt, bis der gesamte Pd-Bacteriopheophorbidethylester zum 3¹-Hydroxyethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester umgesetzt ist. Das Ende der Reaktion lässt sich an der Verschiebung der Absorptionsmaxima in einem UV/VIS-Spektrum erkennen. Das Zwischenprodukt kann durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten gereinigt werden (S. 22 f.).

Im zweiten Teil der Reaktion wird der 3¹-Hydroxyethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester in Dimethylformamid gelöst und unter Rühren mit dem hundertfachen molaren Überschuss an tert-Butylbenzoylchlorid versetzt. Der Reaktionsverlauf lässt sich spektroskopisch verfolgen. In der Regel ist die Reaktion nach zehn bis fünfzehn Minuten beendet. Überschüssiges tert-Butylbenzoylchlorid kann durch Ausschütteln mit 2 % NaOH-Lösung als Benzoat abgetrennt werden. Die Reinigung erfolgt durch

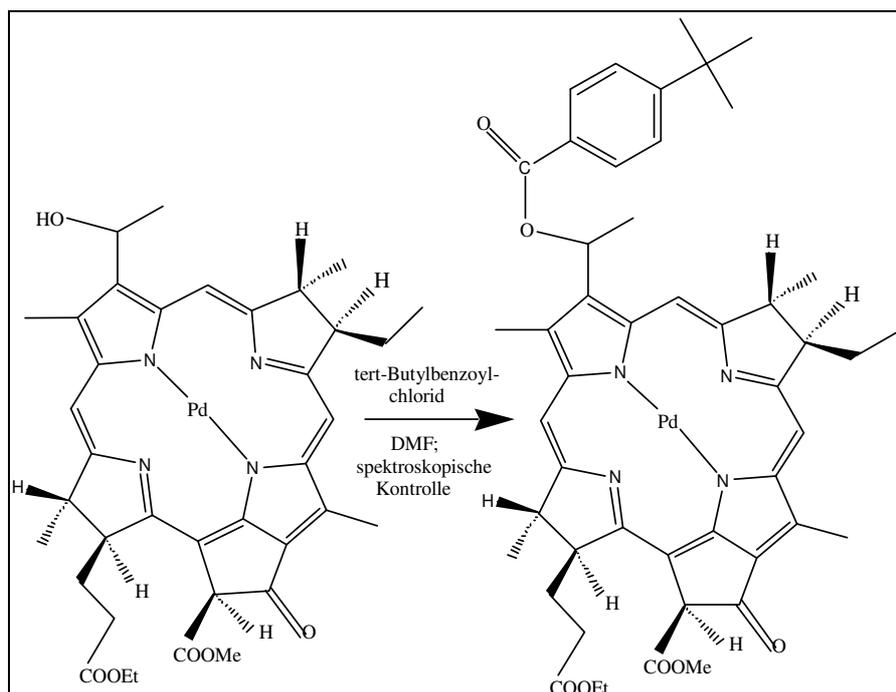


Abb. 20: Umsetzung des 3¹-Hydroxyethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylesters zu 3¹-tert-Butylbenzoyl ethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester

präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (S. 22). Das gewünschte Produkt hat einen R_f-Wert von 0,60.

Gelingt es das im Überschuss eingesetzte tert-Butylbenzoylchlorid quantitativ mit Pyridin zu fällen, kann diese Reaktion mit einer erheblich besseren Ausbeute verlaufen (27).

Absorptionsspektrum

Abb. 21 zeigt die Absorptionsspektren von 3¹-Hydroxyethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester und 3¹-tert-Butylbenzoyl ethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester in Ether. Im Vergleich zum Pd-Bacteriopheophytin (Abb. 18) ist das Absorptionsmaximum der Q_Y-Bande von 3¹-tert-Butylbenzoyl ethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester um 30 nm kurzwellig verschoben. Die Reduktion der 3¹-Acetylgruppe des Pd-Bacteriopheophorbidethylesters zur 3¹-Hydroxyethylgruppe ist für diesen Shift verantwortlich. Sie bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaxi-

mums der Q_Y -Bande um 44 nm ins Kurzwellige. Die Veresterung der 3¹-Hydroxyethylgruppe mit tert-Butylbenzoesäurechlorid kann diesen Shift nur teilweise wieder rückgängig machen. Man erreicht durch diese Reaktion eine Verschiebung der Q_Y -Absorptionsbande um 14 nm ins Langwellige.

Dünnschichtchromatographie

Das unterschiedliche Laufverhalten von Pd-Bacteriopheophorbidethylester ($R_f = 0.75$ für 1; $R_f = 0.90$ für 2) 3¹-Hydroxyethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester ($R_f = 0.70$ für 1; $R_f = 0.85$ für 2) und 3¹-tert-Butylbenzoyl-ethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester ($R_f = 0.90$ für 1; $R_f = 0.98$ für 2) lässt sich aus den unterschiedlichen R_f -Werten für beide Laufmittelsysteme ersehen.

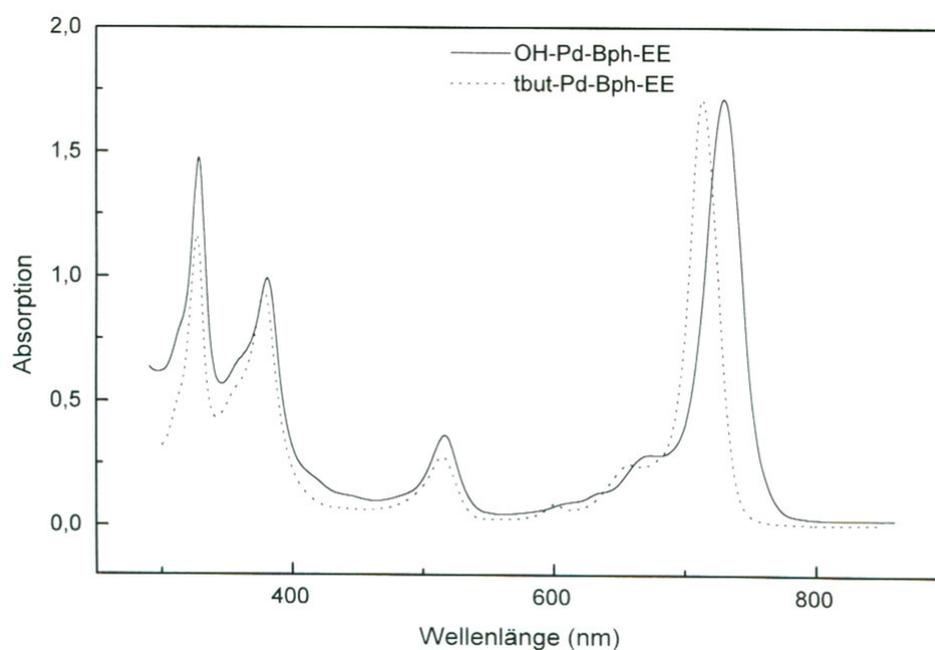


Abb. 21: Absorptionsspektren von 3¹-Hydroxyethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester und 3¹-tert-Butylbenzoyl-ethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester in Ether

FAB-Massenspektrum

Für 3^1 -tert-Butylbenzoylethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester [Pd-C₄₈H₅₄N₄O₇ (M+H⁺)] wird eine Masse von 904 erwartet. Die Messung ergibt ein Signal bei 994 (Abb. 22). Die Differenz von 90 Masseneinheiten zu der erwarteten Masse ist durch das Vorhandensein zweier weiterer Ethoxygruppen zu erklären. Berechnet man für dieses Molekül die Isotopenverteilung, so stimmt diese nicht genau mit der gemessenen überein. Die Verschiebung der Signalintensität ist dadurch zu erklären, dass der Analog-Digital-Wandler Signale und Rauschen nicht genau genug zu trennen vermag. Die Positionen der beiden Ethoxygruppen konnten nicht bestimmt werden. Ein ¹H-NMR-Spektrum kann aussagekräftigere Ergebnisse liefern.

Der Peak bei 746 (nicht dargestellt) entspricht der freien Säure von Pyro-13²-OH-Pd-Bacteriopheophorbid. Das Signal bei 663 (nicht dargestellt) hat eine hohe Intensität. Es handelt sich hierbei um die freie Säure von 13²-OH-Bacteriopheophorbid, an die noch zwei Wassermoleküle angelagert sind.

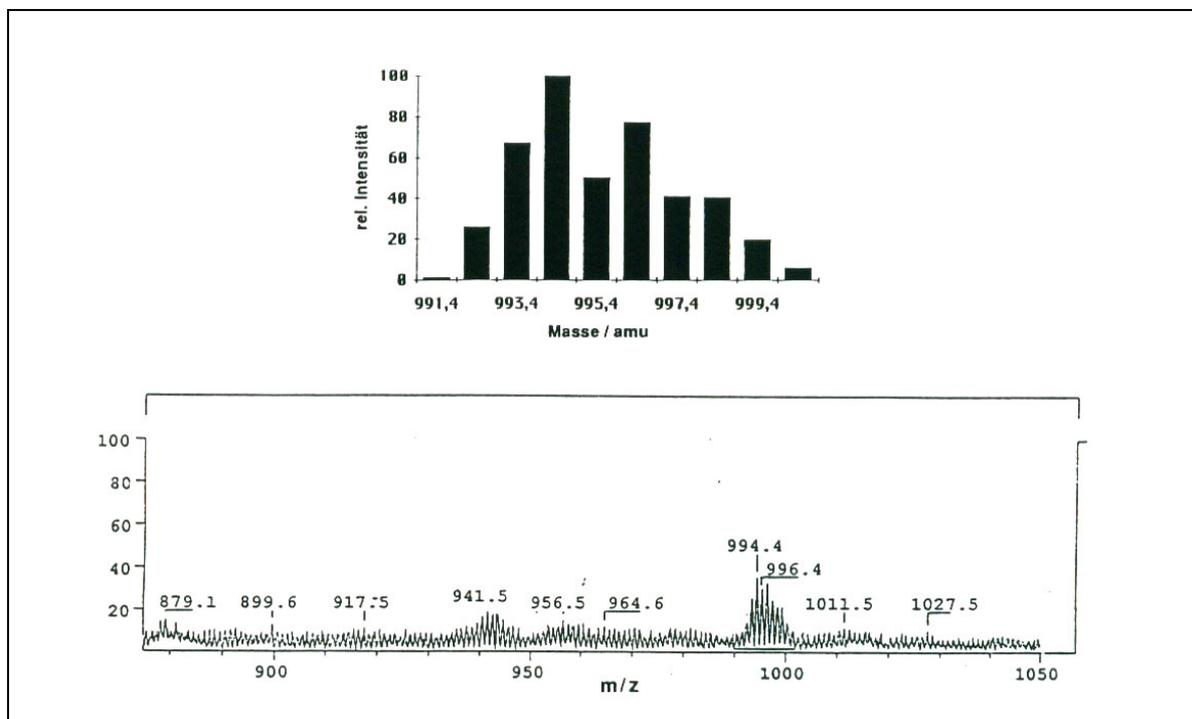


Abb. 22: FAB-MS von 3^1 -tert-Butylbenzoylethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester

13²-tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester

Darstellung

13²-tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester entsteht in einer sauren Umesterungsreaktion von Pd-Bacteriopheophytin mit tert-Butylphenol.

10 g tert-Butylphenol werden in 20 ml schwefelsaurem Aceton (10 % H₂SO₄) gelöst. Gleichzeitig werden 2 mg Pd-Bacteriopheophytin in 20 ml Aceton suspendiert. Bei Vereinigung dieser beiden Lösungen erfolgt die Umesterung spontan. Sie lässt sich am Farbumschlag von braun nach tiefblau erkennen. Zur Reinigung des Produktes muss zuerst das im Überschuss eingesetzte tert-Butylphenol quantitativ entfernt werden. Dies geschieht durch Sublimation (S. 30). Erst danach kann eine Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie mit Kieselgelplatten erfolgen (S. 22). Der synthetisierte Ester hat einen R_f-Wert von 0,40. Die Ausbeute der Reaktion liegt bei ca. 70 %. Alle Reaktionen müssen unter Argonatmosphäre durchgeführt werden.

Absorptionsspektrum

Das Absorptionsspektrum von 13²-tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester in Ether zeigt die gleichen Wellenlängen für die Absorptionsmaxima der Soret (B_X, B_Y)-, der Q_X- und Q_Y-Banden wie die von Pd-Bacteriopheophytin. Die Bande bei 365 nm deutet auf eine Verunreinigung durch Bacteriopheophytin hin. Die Schwingungsseitenbanden der Q_Y-Bande sind von Absorptionsbanden oxidativer Verunreinigungen überlagert.

Dünnschichtchromatographie

Im Vergleich zu Pd-Bacteriopheophytin (R_f= 0.53) wird 13²-tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester (R_f= 0.39) stärker von der polaren stationären Phase (Kieselgel) zurückgehalten.

¹H-NMR

Das Spektrum zeigt Verunreinigungen durch freies tert-Butylphenol. Es ist deshalb nur sehr schwer auswertbar. Die Werte für die chemische Verschiebung aller Protonensignale in Deuteroacetone sind wie folgt: 10.10, 9.10, 9.0 (5-H, 10-H, 20-H); 7.0-8.0 (Aromat); 4.50 (18-H); 4.30 (17-H); 4.20 (17⁴-CH₂); 4.10 (8-CH₂); 3.90 (13²-CH₃); 3.85 (12-CH₃); 3.60 (2-CH₃); 3.55 (7-CH₃); 3.85 (7-H); 3.60 (8-H); 2.80 (17¹-CH₂); 2.60 (17²-CH₂); 4.30 (3²-CH₃); 1.80 (18-CH₃, d, J= 7.7 Hz); 1.65 (8-CH₃); 0.90 (C(CH₃)₃).

FAB-Massenspektrum

Das Massenspektrum zeigt den höchsten Massenpeak bei 992. Dieser stimmt mit der Masse für die Summenformel Pd-C₅₅H₅₈N₄O₇ (M+H⁺) überein. Die gemessene Isotopenverteilung entspricht der berechneten. Die Differenz von 59 Masseneinheiten zum nächsten Peak lässt sich durch Pyrolyse der Carboxymethylgruppe in Position 13² erklären. Der Peak bei 663 kann der freien Säure von 13²-OH-Bacteriopheophorbid zugeordnet werden.

13²-OH-Pd-Bacteriopheophytin

Absorptionsspektrum

Die Hydroxylierung von Pd-Bacteriopheophytin in Position 13² bewirkt eine Blauverschiebung des Absorptionsmaximums der Q_Y-Bande um 3 nm. Die Soret B_Y-Bande ist im Vergleich zum Pd-Bacteriopheophytin um 3 nm rotverschoben.

Dünnschichtchromatographie

13²-OH-Pd-Bacteriopheophytin hat folgende R_f-Werte:

Laufmittelsystem 1: R_f = 0,44

Laufmittelsystem 2: R_f = 0,63

Sie werden für die folgenden Umsetzungen als Referenz benötigt.

FAB-Massenspektrum

Das Spektrum zeigt ein Signal bei 1008, das der Summenformel Pd-C₅₅H₇₄N₄O₇ entspricht (M+H⁺).

13²-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophytin

Darstellung

Die 13²-Hydroxygruppe von 13²-OH-Pd-Bacteriopheophytin lässt sich in ähnlicher Weise wie die 3¹-Hydroxyethylgruppe von 3¹-Hydroxyethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester mit tert-Butylbenzoylchlorid verestern. 2 mg 13²-OH-Pd-Bacteriopheophytin werden in 20 ml Dimethylformamid suspendiert und unter Rühren mit dem ca. fünfzigfachen molaren Überschuss an tert-Butylbenzoylchlorid versetzt. Im Abstand von zehn Minuten wird eine Dünnschichtchromatographie auf HPTLC-Kieselgel-60-Platten gemacht (S. 21, Laufmittel 1). Man gibt so lange weiteres tert-Butylbenzoylchlorid hinzu bis die Intensität der Bande mit einem R_f-Wert von 0,65 nicht weiter zunimmt. Die Reinigung des Produktes erfolgt wie auf S. 70 f. beschrieben. Die Ausbeute der Reaktion liegt bei 70 % (27).

Absorptionsspektrum

Aus dem UV/VIS-Spektrum lässt sich nicht erkennen, ob die 13²-Hydroxygruppe mit tert-Butylbenzoylchlorid verestert ist.

FAB-Massenspektrum

Das Massenspektrum zeigt einen Peak höchster Molekülmasse bei 1168. Er entspricht exakt der Masse für die Summenformel Pd-C₆₆H₈₆N₄O₈ (M+H⁺). Auch die gemessene Isotopenverteilung stimmt mit der berechneten überein.

13²-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester

Darstellung

Bei blockierter Position C-13² (Hydroxylgruppe) führt die auf S. 74 beschriebene Umesterungsreaktion zum 13²-Hydroxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester. Wird die 13²-Hydroxy-Gruppe dieses Moleküls anschließend mit tert-Butylbenzoylchlorid verestert (S. 76), so erhält man folgende Verbindung: 13²-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-Butylphenylester.

Absorptionsspektrum

Das Absorptionsspektrum der Lösung von 13²-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester in Diethylether zeigt so gut wie keine Verunreinigungen durch Bacteriopheophytin. Die durchgeführten Substitutionen in den Positionen C-13² und 17⁴ lassen sich im UV/VIS-Spektrum nicht erkennen.

Dünnschichtchromatographie

Im Vergleich zu 13²-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophytin ($R_f = 0.65$ für 1, $R_f = 0.80$ für 2) hat 13²-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester in beiden Laufmittelsystemen einen kleineren R_f -Wert ($R_f = 0.3$ für 1, $R_f = 0.44$ für 2).

FAB-Massenspektrum

Berechnet wird eine Molekülmasse von 1024. Das Massenspektrum von 13²-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester zeigt die erwartete Molekülmasse und Isotopenverteilung. Der Peak bei 1008 entspricht der Summenformel: Pd-C₅₅H₇₄N₄O₇. Das bedeutet, dass die Probe durch das Ausgangsprodukt verunreinigt ist. Bei dem Massenpeak mit der größten relativen Intensität handelt es sich um die freie Säure von 13²-OH-Bacteriopheophorbid.

3¹-tert-Butylbenzoyl-ethyl-13²-tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester

Darstellung

Führt man die auf S. 74 f. und S. 70 f. beschriebenen Reaktionen nacheinander mit Pd-Bacteriopheophytin durch, so erhält man ein Molekül, das drei aromatische Substituenten trägt (Abb. 23) (27).

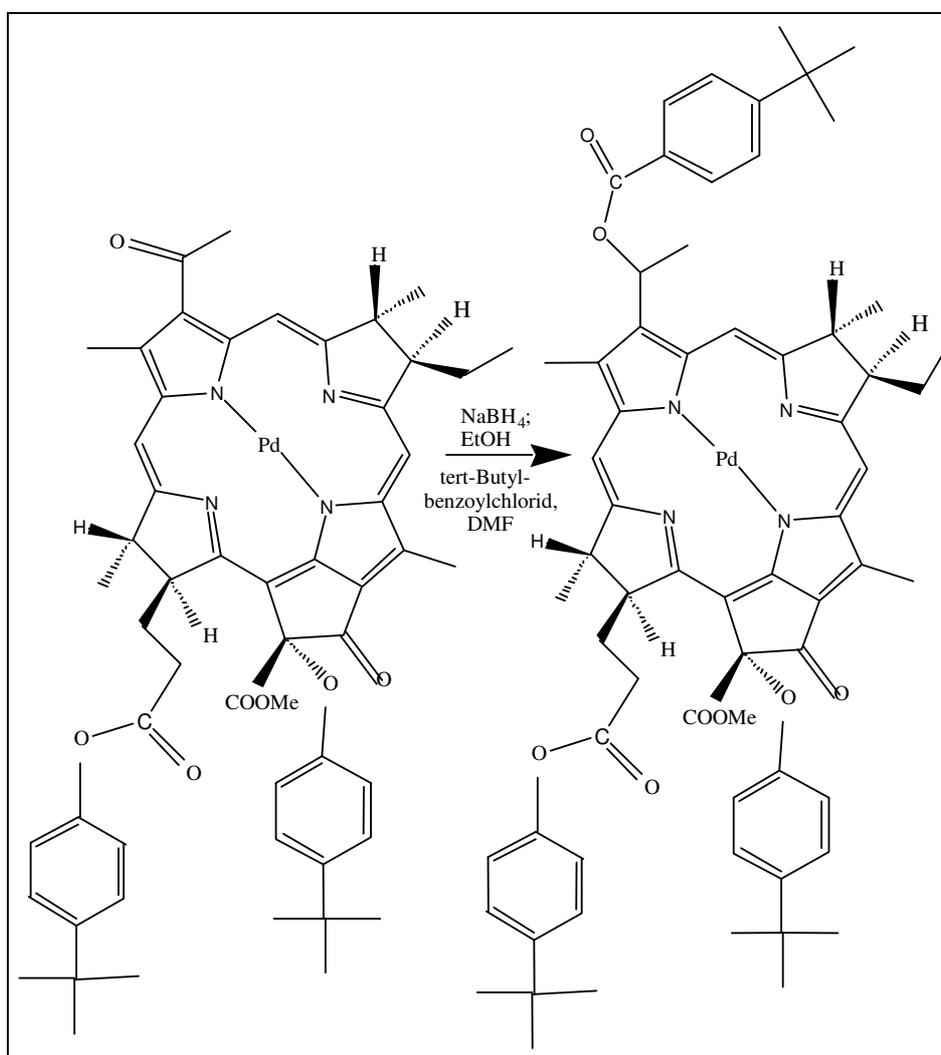


Abb. 23: Umsetzung von 13²-tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester zu 3¹-tert-Butylbenzoyl-ethyl-13²-tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester

FAB-Massenspektrum

Das Massenspektrum zeigt einen Peak größter Masse bei 1152. Er entspricht der erwarteten Summenformel Pd-C₆₆H₇₅N₄O₈ (M+H⁺). Die Isotopenverteilung bestätigt die Summenformel. Der Peak bei 1094 unterscheidet sich von dem höchsten Massenpeak durch das Fehlen von 59 Masseneinheiten. Die Differenz kann auf die Abspaltung der Carboxymethylgruppe in Position C-13² zurückgeführt werden. Die Peaks bei 994 und 978 zeigen eine Massendifferenz von 161 bzw. 171 zum höchsten Massenpeak. Die Differenzen sind durch den Verlust des tert-Butylbenzoyl-Substituenten (mit und ohne Sauerstoff) in Position C-3¹ zu erklären.

Zusammenfassung

Folgende neue Verbindungen konnten synthetisiert und durch Massenspektroskopie charakterisiert werden:

- 3¹-tert-Butylbenzoylethyl-Pd-(OEt)₂-Bacteriopheophorbidethylester,
- 13²-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophytin
- 13²-tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester,
- 13²-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester,
- 3¹-tert-Butylbenzoylethyl-13²-tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester.

Trotz größerer Empfindlichkeit dieser Verbindungen gegenüber Oxidationen ist die Synthese der Pd-Bacteriopheophorbidderivate wesentlich einfacher als die der modifizierten Pheophorbide. Die Ausbeuten der Pd-Verbindungen lagen mit durchschnittlich 70 % erheblich höher als bei den Pheophorbiden mit ca. 45 %.

3.1.3 Präparation und Analytik der Porphyrinderivate

2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester

Darstellung

Die Darstellung von 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester erfolgt über die Erzeugung eines konjugierten Carbokations des 2,4-Di-(α -(Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester nach Abgang der Methoxygruppen in Gegenwart von Zinkacetat, gefolgt von einem nukleophilen Angriff durch t-Butylphenol (Abb. 24).

100 mg (0,159 mM) 2,4-(α -(Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester, 200 mg Zinkacetat (0,911 mM) und 150 mg (1 mM) tert-Butylphenol werden in einer Mischung aus 2 ml Chloroform und 6 ml Tetrachlorkohlenstoff für 3 Stunden am Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser gestoppt. Das Reaktionsgemisch wird mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird mit 15 % HCl-Lösung gewaschen, um den Zink-Komplex in die freie Base zu überführen. Anschließend wird die organische Phase mit wässriger Ammoniaklösung und Wasser neutralisiert. Die neutrale Lösung wird durch eine kleine Kieselgelsäule filtriert und unter Vakuum konzentriert, bis sich Kristalle bilden. Die erhaltenen Kristalle werden mit Methanol gewaschen. Hierdurch erhält man 116 mg (82 %) 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester.

Für Präparationen im Gramm-Maßstab ist es vorteilhafter, vom 2,4-Di-(α -(Methoxy-)ethyl-)derivat des Deuteroporphyrin-IX-dimethylester auszugehen anstatt vom 2,4-Di-(α -(Hydroxy-)ethyl-)derivat.

¹H-NMR

Die Charakterisierung dieser Substanz erfolgt durch ¹H-NMR in CDCl₃ als Lösungsmittel. Die Signale konnten folgendermaßen zugeordnet werden: 10.59, 10.58, 10.57 (Singulette, 2 H, α,β -meso-H); 10.10, 10.06 (Singulette, 2 H, γ,δ -Meso-

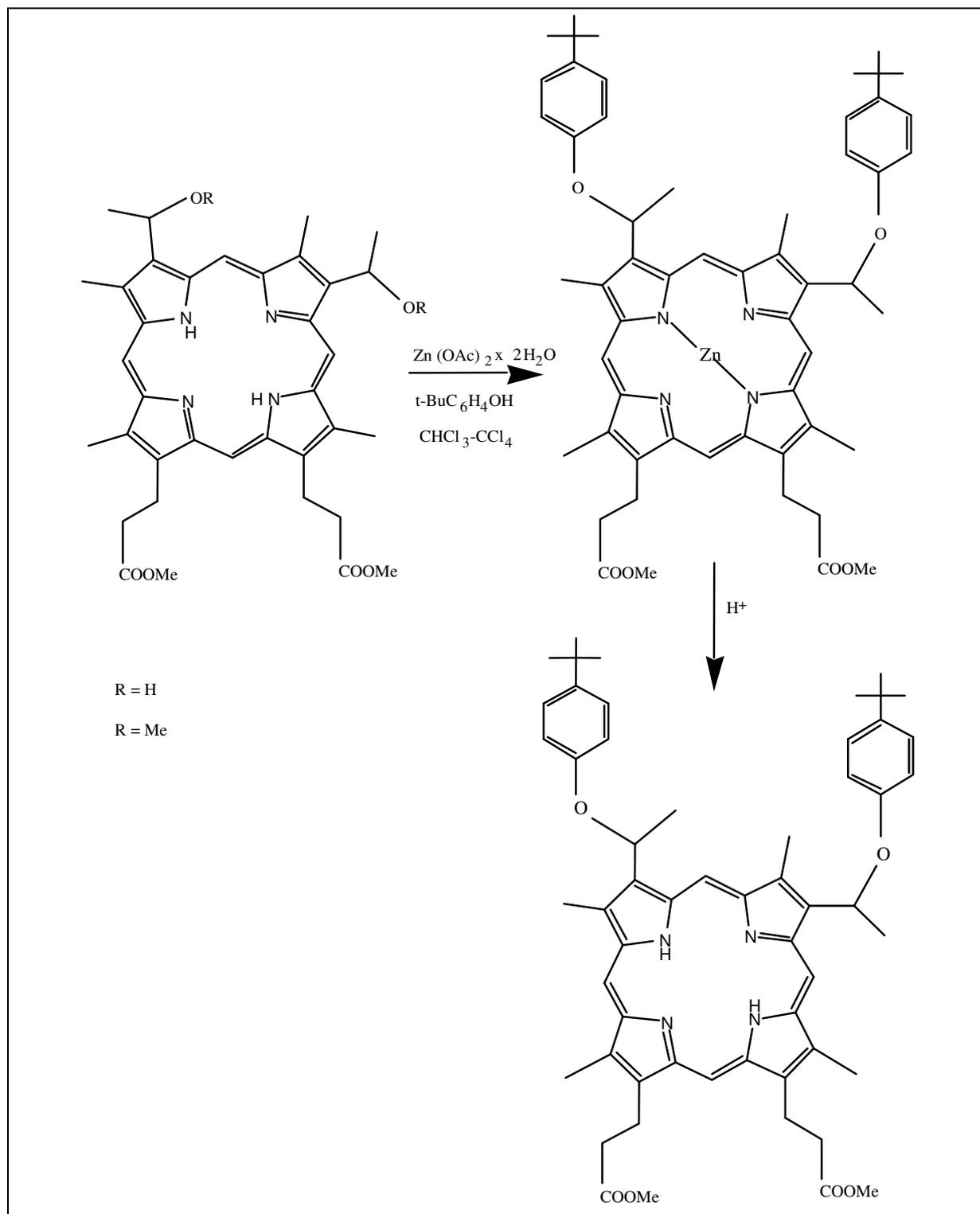


Abb. 24: Reaktion von 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester bzw. 2,4-Di-(α -Hydroxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester mit tert-Butylphenol in Gegenwart von Zinkacetat

H); 7.25 - 6.90 (Multipllett, 2 H, $CHCH_3OtBuPh$); 4.50 - 4.30 (überlappende Triplette, 4 H, CH_2CH_2COOMe); 3.80, 3.76, 3.69, 3.68, und 3.64 (Singulette, 18 H, Por-*Me*, $COOMe$); 3.35 - 3.20 (überlappende Triplette, 4 H, CH_2CH_2COOMe); 2.43 (Dublette, 6 H, $J = 6.3$ Hz, $MeCH$); 1.06 (Singulette, 18 H, tert-Bu); -2.62 (Singulette, 2H, NH).

MALDI-Massenspektrum

Das Massenspektrum zeigt den höchsten Massenpeak bei 891 Masseneinheiten. Dieser entspricht der Summenformel $C_{56}H_{66}N_4O_6$ ($M+H^+$). Es werden zwei weitere Peaks bei 740 und 590 gefunden. Sie entsprechen der Abspaltung von jeweils einer tert-Butylphenolgruppe.

meso-N-Methylpiperidin-4-oxymethyletioporphyrin I

Darstellung

Die Darstellung von meso-N-Methylpiperidin-4-oxymethyletioporphyrin I erfolgt ausgehend von meso-N,N-Dimethylaminomethyletioporphyrin I über die Erzeugung eines konjugierten Carbokations nach Abgang der Dimethylaminogruppe in Gegenwart von Zinkacetat, gefolgt von einer nukleophilen Substitution mit N-Methyl-4-hydroxypiperidin. Hierbei fungiert das Sauerstoffatom der Hydroxygruppe als angreifendes Nukleophil (Abb. 25).

40 mg (61 μ M) meso-N,N-Dimethylaminomethyletioporphyrin I, 100 mg (868 μ M) N-Methyl-4-hydroxypiperidin und 200 mg (911 μ M) Zinkacetat werden in 5 ml destilliertem Chloroform gelöst und 4 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Danach wird die Lösung mit 10 ml Chloroform verdünnt, mit 20 ml 2 N HCl-Lösung gewaschen und mit Wasser und 5 % wässriger Ammoniumlösung neutralisiert. Die Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet, im Rotationsverdampfer konzentriert und über eine Kieselgelsäule gereinigt. Bei Verwendung von Chloroform-Ether (9 : 1) als Laufmittel erhält man 28 mg (70 %) gereinigtes Produkt. Bei Einsatz von Chloroform-Methanol (5 : 1) erhält man 6 mg (16 %) des Produkts.

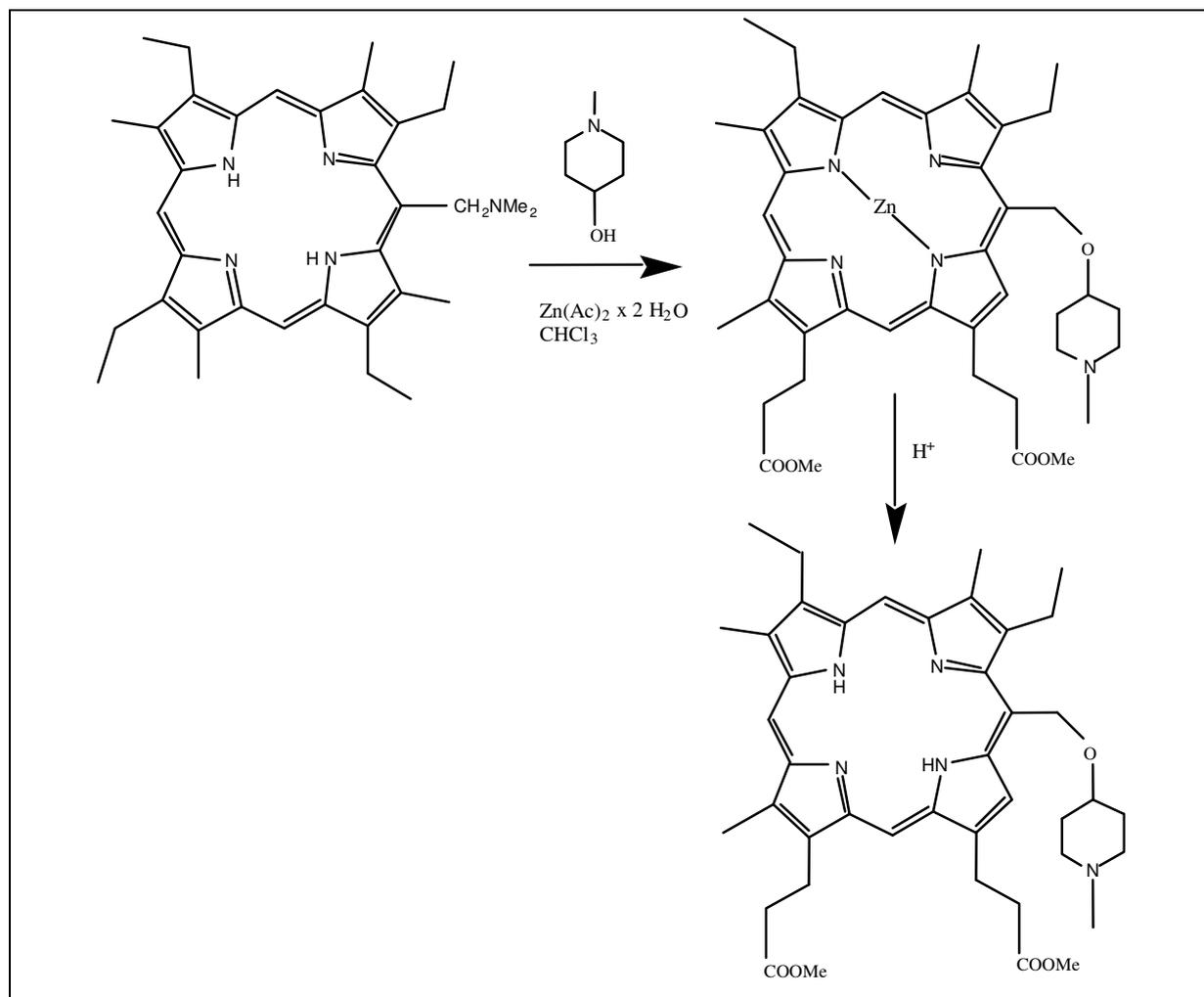


Abb. 25: Darstellung von meso-N-Methylpiperidin-4-oxymethyletioporphyrin I

meso-N,N-Dimethylpiperidinium-4-oxymethyletioporphyrin I

Die Darstellung von meso-N,N-Dimethylpiperidinium-4-oxymethyletioporphyrin I erfolgt über eine nukleophile Addition von Methyljodid an meso-N-Methylpiperidin-4-oxymethyletioporphyrin I (Abb. 26).

4 mg (6,6 μ M) meso-N-Methylpiperidin-4-oxymethyletioporphyrin I werden in 3 ml Methylenchlorid gelöst. Zu dieser Lösung wird 0,1 ml Methyljodid (1,6 mM) hinzugefügt. Die Lösung wird eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt, im Rotationsverdampfer eingeeengt, mit 2 ml Ethanol verdünnt und filtriert. Das Filtrat wird erneut im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und ergibt 4,2 mg (85 %) meso-N,N-Dimethylpiperidinium-4-oxymethyletioporphyrin I.

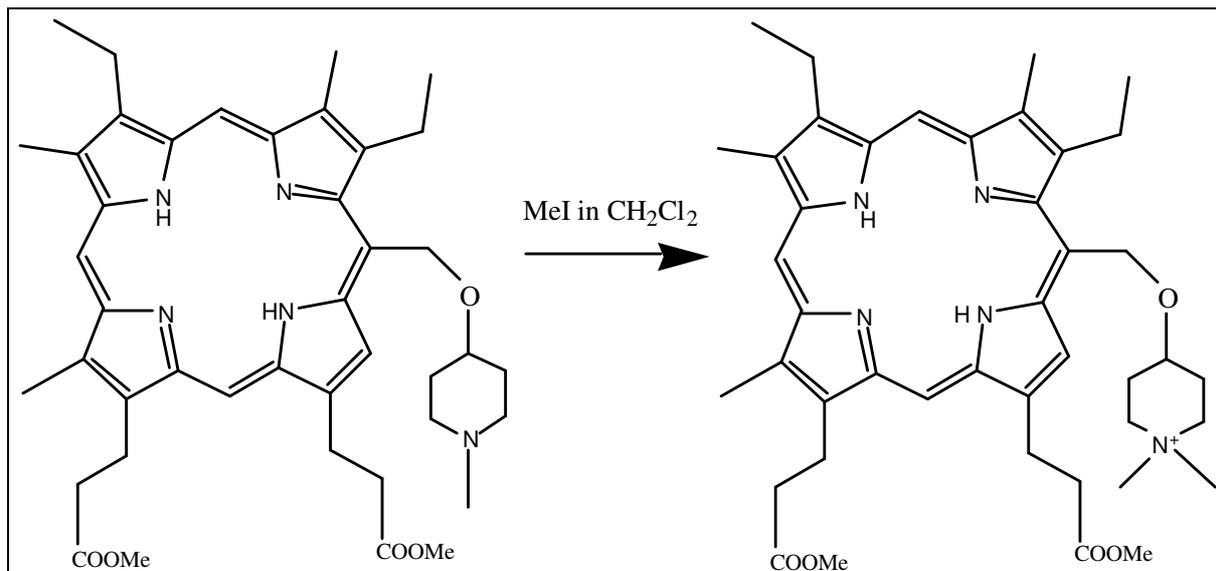


Abb. 26: Darstellung von meso-N,N-Dimethylpiperidinium-4-oxymethyletioporphyrin I

2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester

Darstellung

Die Darstellung des Salzes von 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester erfolgt über den 2,4-Di-(α -Brom-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester als Intermediat. Die Bromatome können anschließend durch N-Methyl-4-hydroxypiperidin substituiert werden (Abb. 27).

245 mg (0,37 mM) 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester und 6 ml HBr, gelöst in Eisessig ($d = 1,4$), werden bei Raumtemperatur 20 h gerührt und anschließend bei 30°C bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 10 ml getrocknetem Methylenchlorid aufgenommen, welches zuvor über Al_2O_3 getrocknet wurde. Zu dieser Lösung fügt man 1,38 g N-Methyl-4-hydroxypiperidin (11,98 mM),

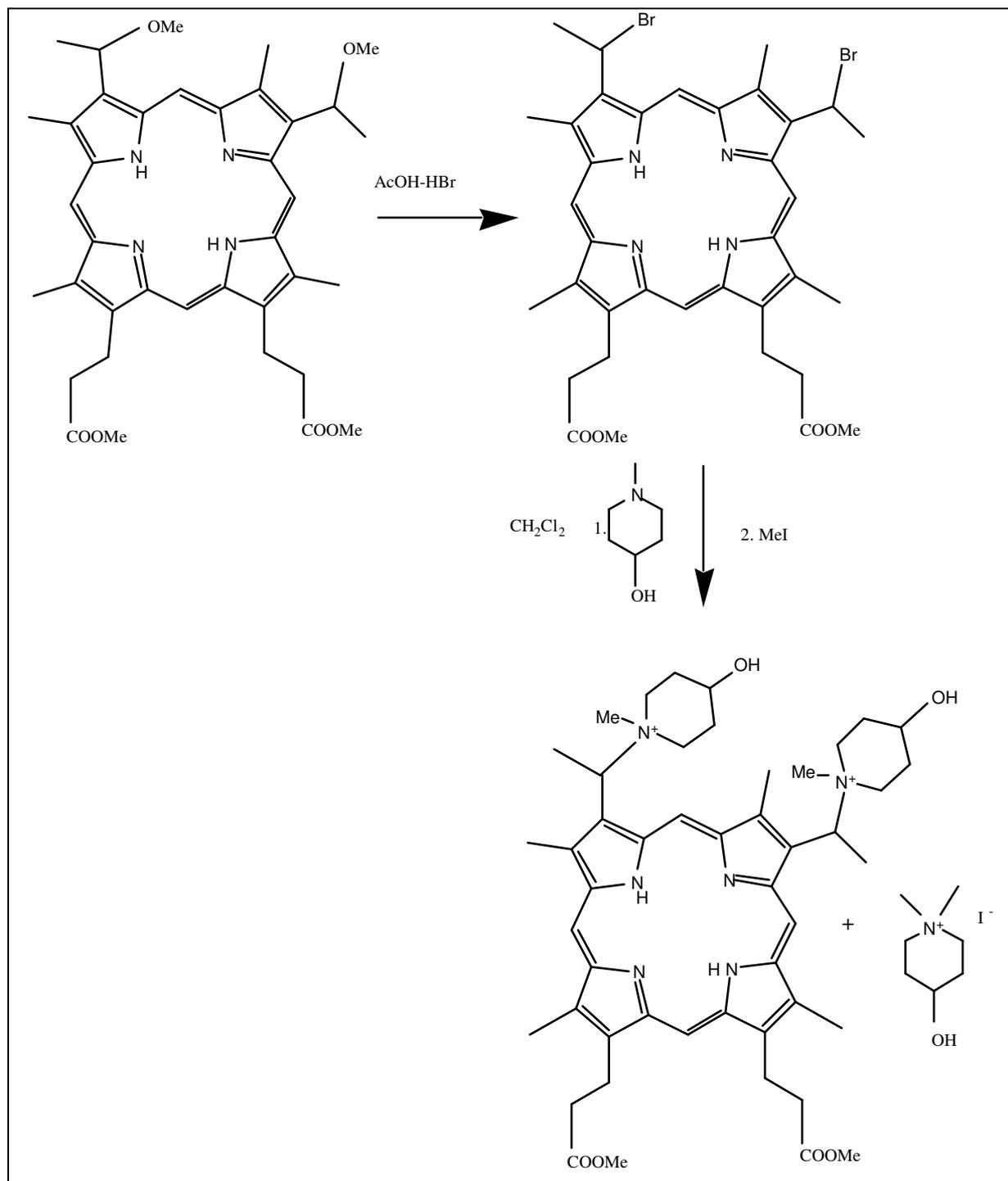


Abb. 27: Reaktion von 2,4-Di-(α -(Methoxy-)ethyl)-deuterioporphyrin-IX-dimethylester mit N-Methyl-4-hydroxypiperidin via 2,4-Di-(α -Brom-)ethyl)-deuterioporphyrin-IX-dimethylester als Intermediat

das zuvor in 10 ml getrocknetem Methylenchlorid gelöst wurde. Die Lösung wird 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden unter Rühren 0,75 ml Methyljodid (12,01 mM) zu der Lösung hinzugefügt. Entstehendes kristallines

N,N-Dimethyl-4-hydroxypiperidiniumiodid wird durch Filtrieren abgetrennt. Das Filtrat wird unter Vakuum bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand in Wasser aufgenommen, abfiltriert und getrocknet. Man erhält 233 mg (63 %) 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester.

MALDI-Massenspektrum

Das MALDI-Massenspektrum zeigt bei dem erwarteten Molekulargewicht von 824,5 Masseneinheiten ($M+H^+=C_{48}H_{67}N_6O_6$) keinen höchsten Massenpeak. Stattdessen gibt es zwei Hauptpeaks bei 590,3 ($C_{36}H_{38}N_4O_4$) und bei 654,3 Masseneinheiten ($C_{38}H_{46}N_4O_6$), die dem Dimethylester von Protoporphyrin IX und dem Dimethylester von Dimethoxyhematoporphyrin entsprechen. Ersteres entsteht durch Elimination von zwei N-Methylpiperidol-Einheiten unter Bildung zweier Vinylgruppen. Letzteres wird durch Reaktion des 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester mit Methanol während der Probenpräparation gebildet.

2,4-Di-(α -Cyclohexyloxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester

Die Darstellung von 2,4-Di-(α -Cyclohexyloxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester erfolgt über 2,4-Di-(α -Brom-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester als Intermediat gefolgt von einer nukleophilen Substitution der Bromatome mit Cyclohexanol. Da durch den Bromierungsschritt ein Teil des Deuteroporphyrin-IX-dimethylesters in die freie Säure umgewandelt wird, wird eine erneute Veresterung mit Methanol in Gegenwart von 4 % H_2SO_4 -Lösung angeschlossen (Abb. 28).

Eine Mischung aus 141 mg (0,216 mM) 2,4-Di-(α -(Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester und 3 ml HBr in Eisessig ($d = 1,40$) werden bei Raumtemperatur 7 Stunden gerührt und am Rotationsverdampfer bei 30 - 35 °C bis zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wird in 3 ml trockenem Methylenchlorid gelöst. Zu dieser Lösung werden 5 ml Cyclohexanol (46,92 mM) hinzugefügt. Die Mischung wird erneut bei Raumtemperatur für 2 Stunden gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wird 12 Stunden bei Raumtem-

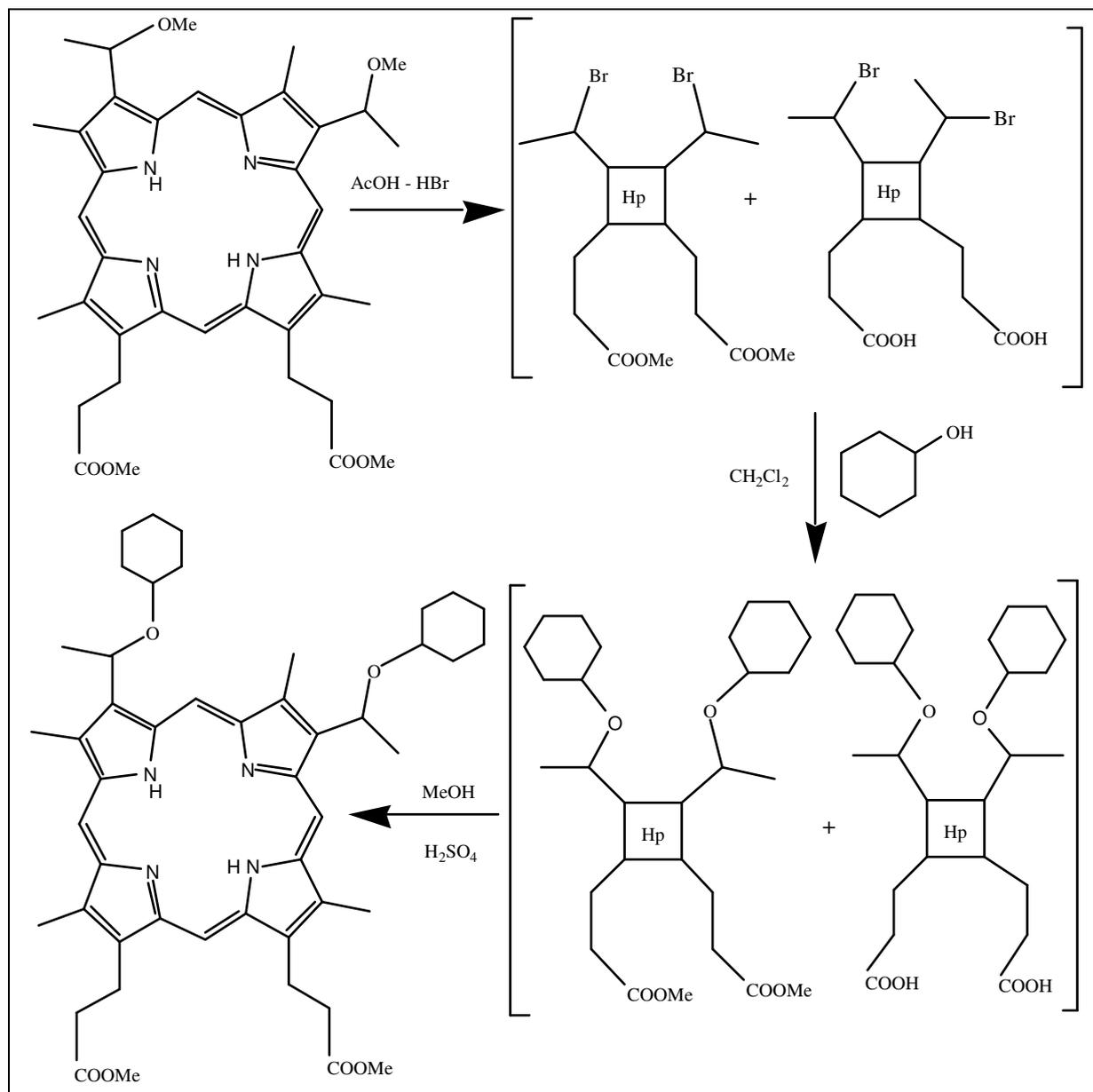


Abb. 28: Darstellung von 2,4-Di-(α -Cyclohexyl)ethyl-deuterioporphyrin-IX-dimethylester über den 2,4-Di-(α -Brom-)ethyl-deuterioporphyrin-IX-dimethylester als Intermediat aus 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-deuterioporphyrin-IX-dimethylester

peratur stehengelassen und anschließend mit Chloroform verdünnt. Die Reaktion wird mit Wasser gestoppt. Die organische Phase wird so lange mit wässriger Ammoniaklösung gewaschen, bis ein pH-Wert zwischen 6-7 erreicht wird. Dies geschieht, um Spuren von HBr zu entfernen. Anschließend wird die Lösung im Vakuum bei maximal 60-70°C bis zur Trockene eingedunstet. Der Rückstand wird in

20 ml 4 % H_2SO_4 -Lösung in Methanol aufgenommen, 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen und danach mit 20 ml Chloroform verdünnt. Die Reaktion wird mit 50 ml Wasser gestoppt. Die organische Phase wird mit Ammoniakwasser gewaschen bis ein pH-Wert zwischen 6-7 erreicht ist, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird auf einer Kieselgelsäule (Merck, 0,04-0,063 mm Porengröße) gereinigt. Als Laufmittel wird Chloroform eingesetzt. Man erhält 132 mg (78 %) 2,4-di-(α -Cyclohexyloxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester.

$^1\text{H-NMR}$

Die Charakterisierung dieser Substanz erfolgt durch $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 als Lösungsmittel. Die Signale konnten folgendermaßen zugeordnet werden: 10.74, 10.71, 10.70 (Singulette, 2 H, α,β -meso-H); 10.05, 10.01 (Singulette, 2 H, γ,δ -Meso-H); 6.40 - 6.20 (überlappendes Quartett, 2 H, $\text{CHCH}_3\text{OCyclohexyl}$); 4.44 - 4.35 (überlappende Triplette, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$); 3.69, 3.67, 3.665, 3.66, 3.65, 3.64, 3.635 (Singulette, 18 H, Por-Me, COOMe); 3.30 - 3.25 (überlappende Triplette, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$); 2.24 and 2.23 (Dublette, 6 H, $J = 6.8 \text{ Hz}$, MeCH); 1.9 - 1.8, 1.65 - 1.55, 1.25 - 1.10 and 0.95 - 0.85 (Multiplette, 10 H, Cyclohexyl-); -2.72 (Singulette, 2H, NH).

2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-diglucosamid

Darstellung

Die Darstellung von 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-diglucosamid erfolgt über den 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dipentafluorphenylester, der anschließend in das Diglucosamid überführt wird (Abb. 29).

Zu einem Gemisch aus 40 mg (64 μMol) 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester und 100 μl (0,72 mM) Triethylamin in 3 ml Methylenchlorid werden 100 μl (0,03 mM) $\text{CF}_3\text{COOC}_6\text{F}_5$ gegeben. Die Reaktionslösung wird 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und zu einer Mischung aus 100 mg (0,463

mM) Glucosaminhydrochlorid und 100 μ l (0,72 mM) Triethylamin in 5 ml DMF gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

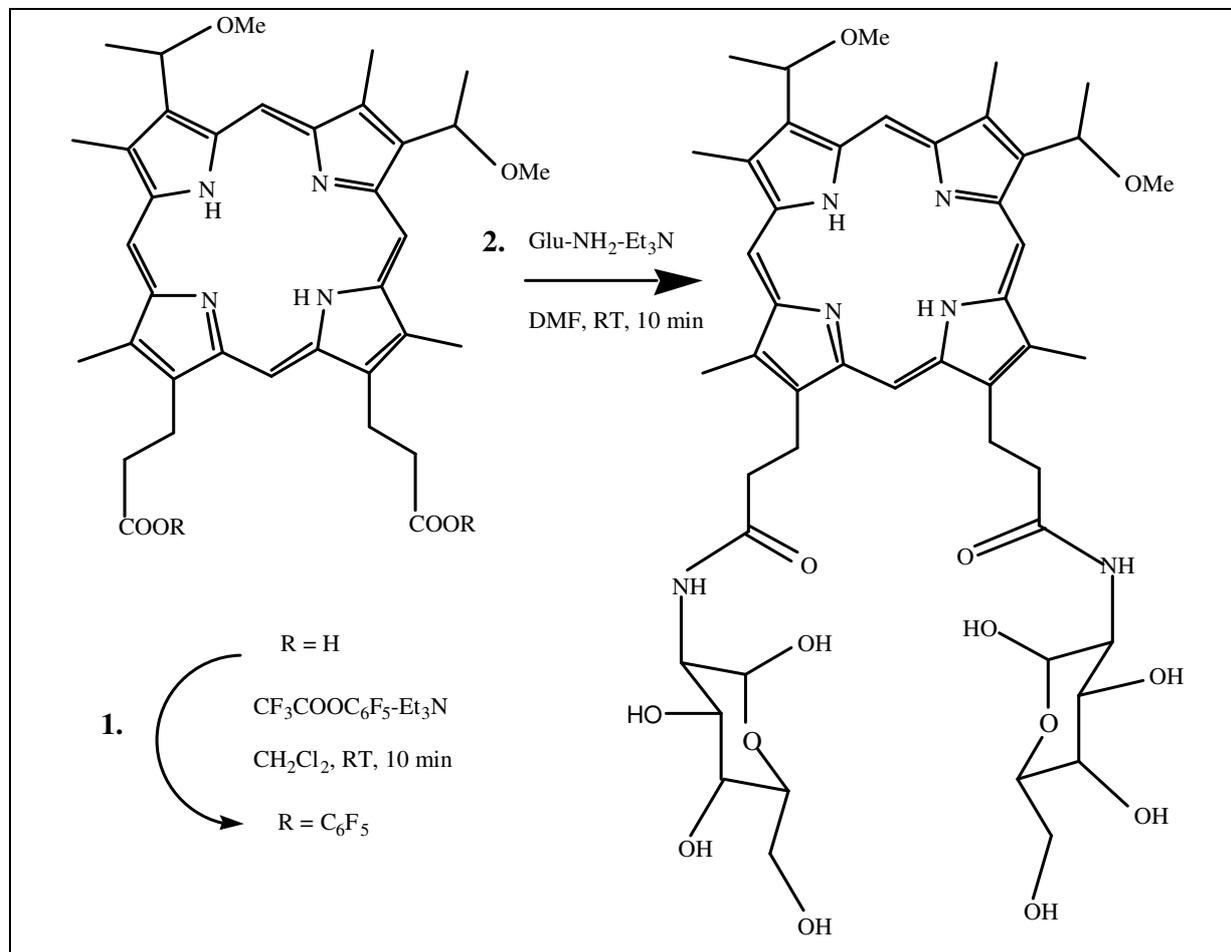


Abb. 29: Darstellung von 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-diglucosamid über den Pentafluorphenylester als Intermediat aus 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-di-methylester

Anschließend wird die Reaktion mit 0,5 ml Wasser gestoppt und die Reaktionslösung im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird mit heißem Wasser versetzt. Der sich bildende Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser und Ether gewaschen und in Chloroform / Methanol [50 : 50 (v / v)] gelöst. Das Lösungsmittel wird im Rotationsverdampfer eingedampft. Man erhält 42 mg (69 %) reines 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-diglucosamid.

Zusammenfassung

Folgende neue Verbindungen wurden synthetisiert:

- 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester
- meso-N,N-Dimethylpiperidinium-4-oxymethyletioporphyrin I
- 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester
- 2,4-Di-(α -Cyclohexyloxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester
- 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-diglucosamid

Außer meso-N,N-Dimethylpiperidinium-4-oxymethyletioporphyrin I und 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-diglucosamid sind alle Verbindungen durch Massenspektroskopie und / oder $^1\text{H-NMR}$ charakterisiert worden.

Die Verfahren dieses Kapitels wurden in Zusammenarbeit mit Prof. G. V. Ponomarev aus Moskau entwickelt.

3.2 Charakterisierung der modifizierten Photosensitizer im Hinblick auf die Verwendung in der polyphasischen Tumorthherapie

3.2.1 Zellversuche zu ausgewählten Verbindungen des präparativen Teils

Pheophorbidderivate

Resorptionsstudien, Stabilität, intrazelluläre Lokalisation und Phototoxizität

Die Aufnahme von 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester in verschiedene Tumorzellstämme wird mit Hilfe der auf S. 32 f. dargestellten Methode bestimmt. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Der Extinktionskoeffizient von 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester in Methanol/Aceton wurde nicht bestimmt. Deswegen wird mit einem Schätzwert von 50000 l / (mol·cm) gerechnet.

Zellstamm	OAT	A375	SkAMel	M2R
m_i^{\dagger} (10^{-16} Mol/Zelle)	1,36	2,04	0	2,20
n_i (10^8 Moleküle/Zelle)	0,82	1,23	-	1,32
c_i^{\dagger} (10^{-5} Mol/intrazellulär)	14,0	8,90	-	9,20
v_z (10^{-12} l/Zelle)	0,99	2,30	2,30	2,40
c_a^{\dagger} (μ mol/ l Medium)	9,32	8,98	10,0	8,90
$F_{i/a}$ = Anreicherung	14,7	10,0	-	10,30

Tabelle 3: Aufnahme von 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester in Krebszellsuspension; E_{659} in Methanol-Aceton (1:1) Extrakten aus 10^7 Zellen; Inkubationszeit $t = 1$ h

Von der zur Verfügung stehenden Sensitizermenge werden in einer Stunde ca. 10 % aufgenommen. Dies entspricht den für die Pheophorbide in der Literatur angegebenen Werten (6, 45a, 97). Die SkAMel-Zellen zeigen jedoch keine Resorption. Die Anreicherungsfaktoren betragen für die anderen geprüften Zellstämme:

14,7 (OAT)

10,0 (A375)

10,3 (M2R)

Im Rahmen der Versuche mit der Maus-Melanom M2R-Zellreihe ($1,32 \times 10^8$ Moleküle Sensitizer/Zelle) wurden die höchsten Absolutwerte erzielt.

Für die M2R und die A375-Zellen wird zusätzlich eine Aufnahmekinetik mit 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheoporbidethylester und Pyroethylpheophorbid berechnet. Die Werte in Tabelle 4 zeigen, dass 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheoporbidethylester schneller als Pyroethylpheophorbid resorbiert wird (52, 84). Nach Einstellung des Gleichgewichts ist auch die Absolutkonzentration von 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheoporbidethylester in den Zellen größer.

	m_i^t	n_i	c_i^t	c_a^t	F i/a	$t_{1/2}$ / min	E^t	E_{sat}
<i>Py-Etph</i>								
M2R	9,7E-17	5,9E7	40,5	9,5	4,2	4,9	0,024	0,023
A375	1,4E-16	8,4E7	60,9	9,3	6,5	(8,1)	0,035	0,040
<i>3¹-Py-Et</i>								
M2R	1,44E-16	8,7E7	60,0	9,3	6,5	5,5	0,036	0,041
A375	2,56E-16	14,2E7	103,0	8,8	11,6	(25,1)	0,059	0,083

Tabelle 4: Kinetik von Pyropheoporbidethylester vs. 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheoporbidethylester; 10 Millionen Zellen, t = 1 h mit Zwischenwerten: Berechnung der Sättigungsfunktion

Die Absorptions- und Massenspektren der aus den Zellen extrahierten Sensitizer unterscheiden sich nicht von den Spektren der Reinsubstanzen (74). Dies lässt den Schluss zu, dass die Sensitizer durch die Aufnahme in die Zellen keinerlei Veränderungen erfahren.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie kann gezeigt werden, dass bei den M2R Zellen der 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheoporbidethylester vermehrt in den peripheren Vesikeln zu finden ist, während Pyroethylpheophorbid im Golgi-Apparat angereichert

wird (74). Die Lokalisation von 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester ist relativ schwierig, da durch den tert-Butylphenyl-Substituenten in Stellung C-3¹ des Pyroethylpheophorbids die Eigenfluoreszenz stark vermindert wird (75).

Zuletzt wird die Phototoxizität von 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester und Pyroethylpheophorbid nach Resorption durch OAT-Zellen und anschließender Bestrahlung gemessen. Dabei zeigt der substituierte Sensitizer eine geringfügig höhere Phototoxizität als die Ausgangssubstanz.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Resorptionsgeschwindigkeit durch Einführen eines tert-Butylphenyl-Substituenten in Position C-3¹ von Pyroethylpheophorbid verbessert. Die Phototoxizität erhöht sich geringfügig. Die gleichzeitige Abnahme der Fluoreszenz erschwert die Lokalisierung des Sensitive in den Zellkompartimenten.

Pd-Bacteriopheophorbidderivate

Resorptionsstudien, Stabilität, intrazelluläre Lokalisation und Phototoxizität

Im Folgenden wird die Aufnahmekinetik von verschiedenen Pd-Bacteriopheophorbidderivaten in OAT-Tumorzellen bestimmt.

Für die Berechnung der Konzentration musste der Extinktionskoeffizient abgeschätzt werden. Da er kleiner als bei den Pheophorbidderivaten ist, wird er für alle Pd-Bacteriopheophorbidderivate auf $40000 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ gesetzt.

Die Resorption in die OAT-Zellen nimmt vom 13^2 -tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester über 3^1 -tert-Butylbenzoylethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester zum 13^2 -tert-Butylphenoxy-Pd-Bacteriopheophorbid-tert-butylphenylester zu.

Im nächsten Schritt wird die Phototoxizität bestimmt, wobei festgestellt wird, dass nur der in 3^1 -Stellung substituierte Pd-Bacteriopheophorbidethylester seine Phototoxizität behält. Daher wird nur für diese Verbindung im Vergleich mit dem nicht-substituierten Pd-Bacteriopheophorbidethylester eine weitere Aufnahmekinetik mit A375-Tumorzellen berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass der 3^1 -tert-Butylbenzoylethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester signifikant langsamer resorbiert wird als sein nicht substituiertes Ausgangsprodukt und im Gleichgewicht in niedrigeren Konzentrationen in den Zellen vorliegt (55).

Die Massenspektren belegen die leichte Oxidierbarkeit aller drei Palladium-Verbindungen (28, 29, 74). Die Bandenverbreiterung in den UV/VIS-Absorptionsspektren der disubstituierten Sensitizer weist auf Aggregationseffekte hin.

Da Palladium die Fluoreszenz quencht, sind Pd-Bacteriopheophorbidderivate mit Hilfe der Fluoreszenzauflichtmikroskopie nicht in den Zellkompartimenten zu lokalisieren. Sie lassen sich jedoch über ihre Phosphoreszenz den einzelnen Zellkompartimenten zuordnen. Leider war eine Messung der Phosphoreszenz aus technischen Gründen nicht möglich.

Im Vergleich zum nicht-substituierten Pd-Bacteriopheophorbidethylester zeigt allein der 3¹-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester eine höhere Phototoxizität (11, 55).

Im Gegensatz zu den Substitutionen mit apolaren Ankergruppen an der apolaren Seite der Pd-Bacteriopheophorbidethylester (beispielsweise in Position C-3¹ oder C-8¹) führt die Substitution mit apolaren Ankergruppen am polaren Ende (beispielsweise 17⁴ oder 13²) zu einer vollständigen Auslöschung der Phototoxizität bei den OAT-Tumorzellen. Ein Beispiel hierfür ist der 17⁴-tert-Butylphenylester von Pd-Bacteriopheophorbid (Abb. 30).

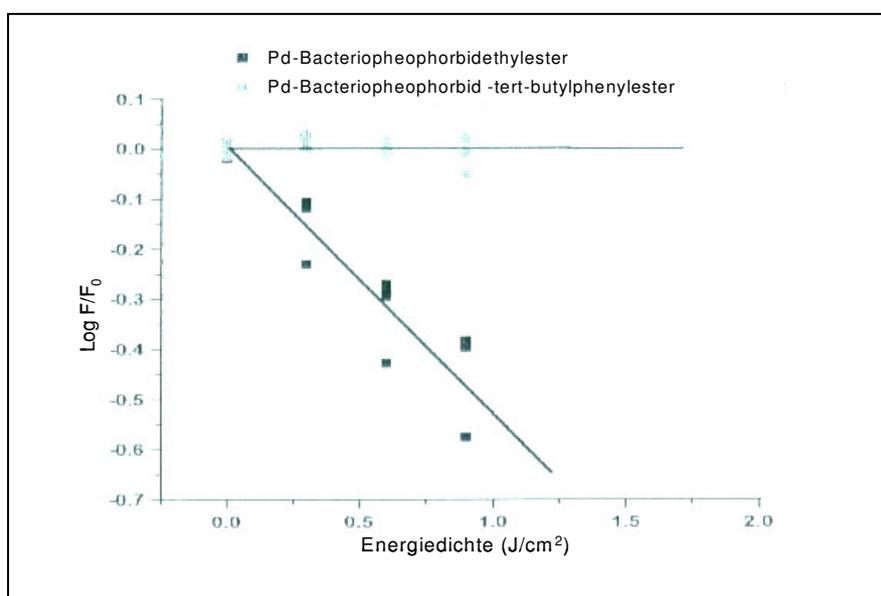


Abb. 30: Verlust der Phototoxizität nach Einführen eines tert-Butylphenylsubstituenten in Position 17⁴ von Pd-Bacteriopheophorbid

Zusammenfassung

Das Einbringen eines tert-Butylbenzoyl-Substituenten in Stellung C-3¹ von Pd-Bacteriopheophorbidethylester steigert die Phototoxizität. Die Resorptionsgeschwindigkeit und die im Gleichgewicht vorhandene Absolutkonzentration dagegen nehmen im Vergleich zum unsubstituierten Pd-Bacteriopheophorbidethylester ab. Das Einführen eines tert-Butylphenyl-Substituenten in Position 17⁴ von Pd-Bacteriopheophorbid hebt die Phototoxizität auf.

Etioporphyrinderivate

Resorptionsstudien, Stabilität, intrazelluläre Lokalisation und Phototoxizität

Für die in Abbildung 31 gezeigten meso-substituierten Etioporphyrine wird die Resorptionsgeschwindigkeit und Phototoxizität in OAT-SCLC-Zellen bestimmt. Die Photosensitizer werden in der folgenden Reihenfolge A>B>C (Abb. 31) von den Zellen resorbiert, während die Phototoxizitäten eine umgekehrte Reihenfolge zeigen. Die quantitativen Daten sind Abb. 32 bzw. Tabelle 5 zu entnehmen.

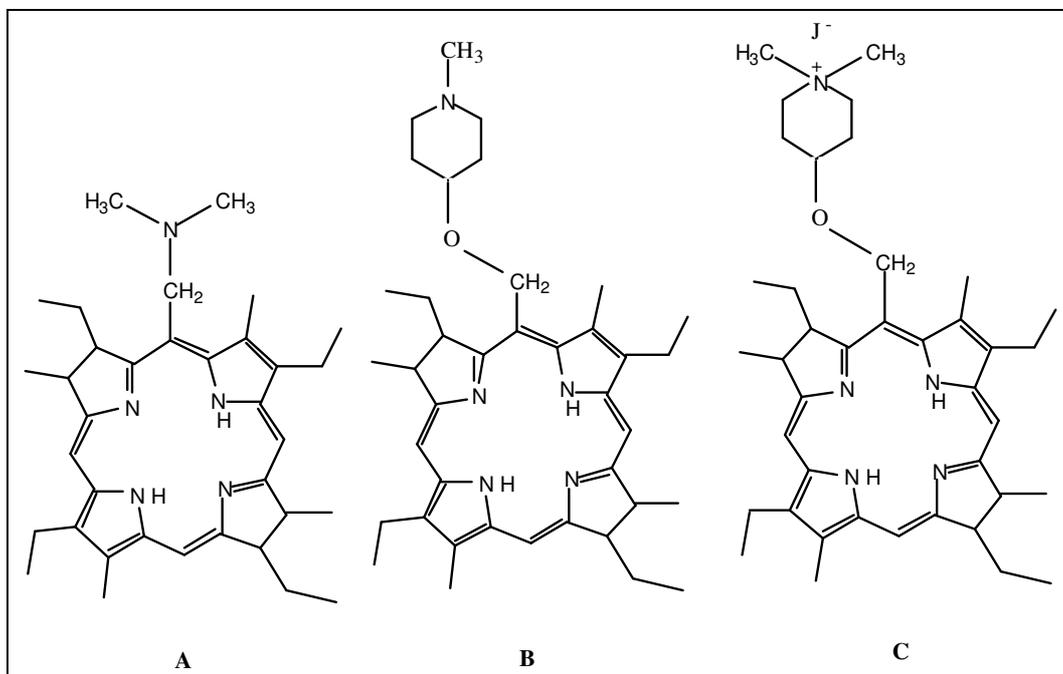


Abb. 31: meso-substituierte Etioporphyrine

Trotz ihrer relativ hohen Resorption (Tab. 5) ist es sehr schwierig Photo- oder Videoaufnahmen über die subzelluläre Verteilung dieser Sensitizer zu erhalten, da die Etioporphyrinderivate unter der Bestrahlung schnell ausbleichen. Eine Stunde nach Aufnahme beobachtet man, dass Sensitizer A und B vornehmlich im Zytoplasma bzw. im Golgi-Apparat verteilt sind, wohingegen Sensitizer C hauptsächlich an der Zellmembran bzw. eine geringe Menge auch im Zytoplasma zu finden ist. Intrazelluläre Fluoreszenzspektren zeigen eine vollständige Monomerisation der Sensitizer B und C, hingegen eine nur teilweise Monomerisation des Sensitizers A. Die Tatsache, dass sich Photosensitizer A in photodynamisch

inaktiven Zellkompartimenten anreichert, würde seine geringe Phototoxizität im Gegensatz zu Sensitizer C, der sich an der Zellmembran anlagert, erklären.

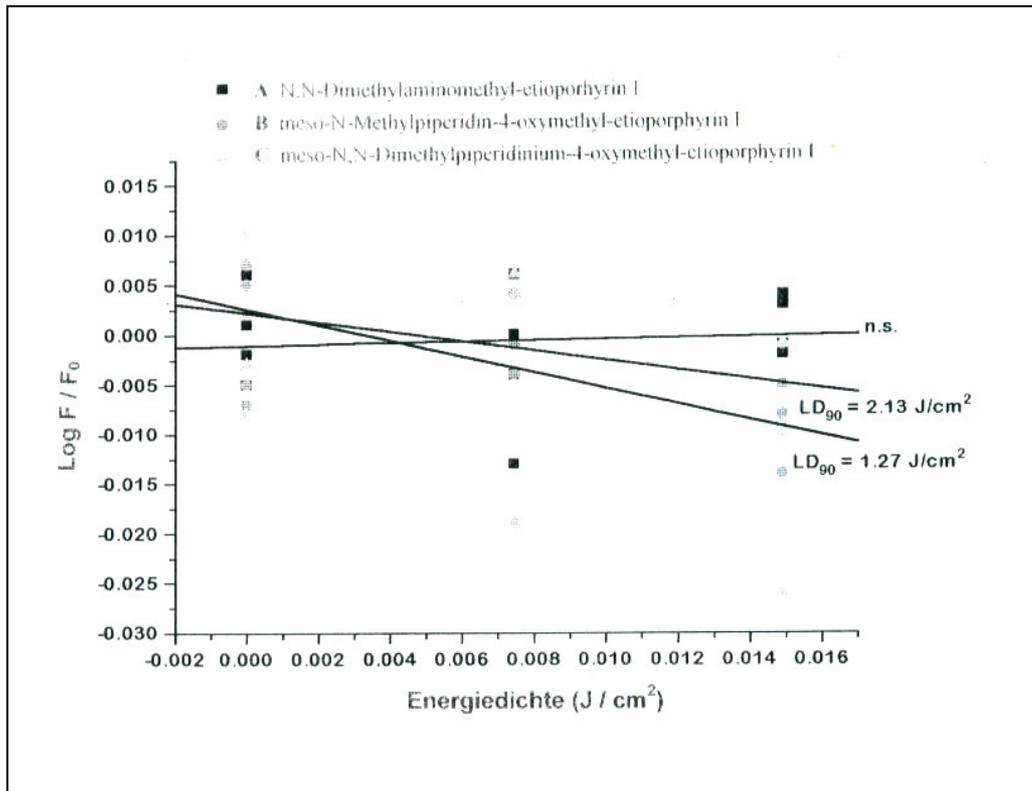


Abb. 32: Phototoxizitäten der meso-substituierten Etioporphyrinderivate

Meso-substituierte-Etioporphyrin I – Derivate (EP)	Resorption [x 10 ⁸ Moleküle/ Zelle]	LD ₉₀ [J / cm ²]
A: N,N-Dimethylaminomethyl-EP	100	nicht signifikant
B: meso-N-Methylpiperidin-4-oxymethyl-EP	28	2,1
C: meso-N,N-Dimethylpiperidinium-4-oxymethyl-EP	5,1	1,3

Tabelle 5: Resorption und Phototoxizität von meso-substituierten Etioporphyrinen

Während wasserlösliche negativ geladene Photosensitizer wie Tetrasulfo-phthalocyanine außerhalb der Zelle bleiben, akkumuliert das positiv geladene meso-N,N-Dimethylpiperidinium-4-oxy-methyletioporphyrin I an der Zellmembran und wird teilweise ins Zytoplasma aufgenommen. Einige dieser positiv geladenen Sensitizer, die bereits von Oseroff (59) untersucht wurden, haben den Nachteil einer beträchtlichen Dunkeltoxizität. Bei den hier untersuchten Etioporphyrinen jedoch wird bis zu einer Inkubationszeit von 20 Stunden keine Dunkeltoxizität gefunden.

Eine Zellvermehrung nach Aktivierung der Sensitizer kann auch bei den hier benutzten sehr geringen Energiedichten von maximal $1,5 \text{ J / cm}^2$ nicht beobachtet werden.

Zusammenfassung

Die Untersuchungen zeigen, dass durch Einführen verschiedener Substituenten in die Peripherie von Etioporphyrinderivaten die Phototoxizität mit steigender intramolekularer Polarität zunimmt. Die Resorption hingegen nimmt mit steigender intramolekularer Polarität ab.

Hematoporphyrinderivate

Resorptionsstudien, Stabilität, intrazelluläre Lokalisation und Phototoxizität

Die Daten in Tabelle 6 zeigen, dass die Resorption des Sensitizers in die OAT-Zellen vom Hematoporphyrindimethylester (Abb. 33: A) über 2,4-Di-(α -Cyclohexyloxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester (DP) (B), 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)DP (C) zum 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)DP (D) zunimmt.

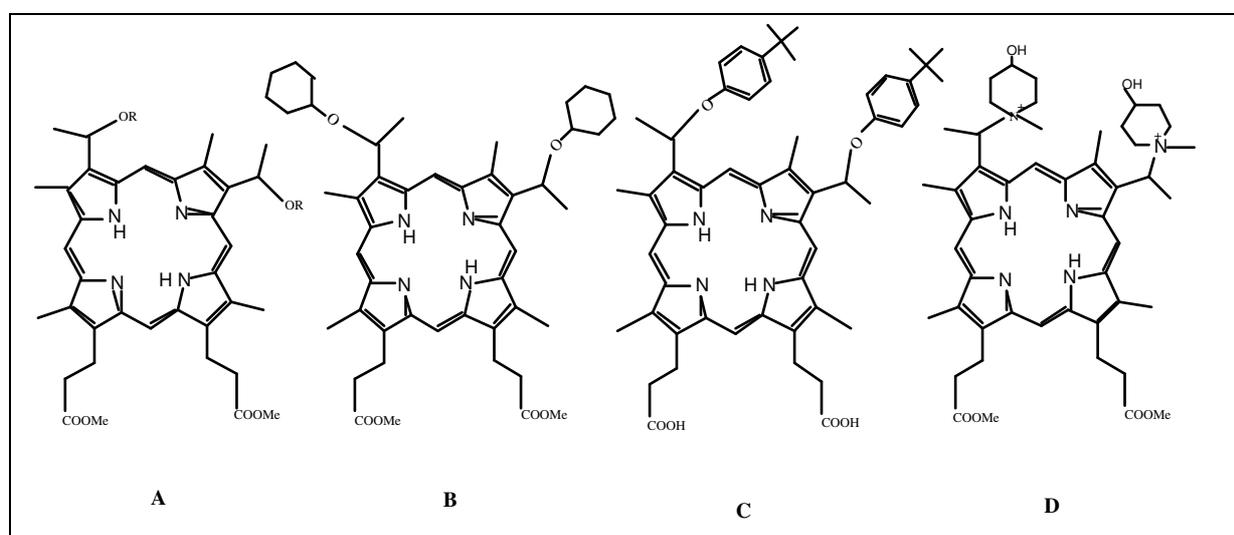


Abb. 33: Asymmetrische Substitution der Hematoporphyrinderivate

2,4-disubstituierte Hematoporphyrinderivate	Resorption [$\times 10^8$ Moleküle/ Zelle]	LD ₉₀ [J / cm ²]
A: 2,4-Di-(α -Hydroxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester (DP)	25	2,6
B: 2,4-Di-(α -Cyclohexyloxy-)ethyl-)DP	40	2,2
C : 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)DP	50	1,9
D : 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)DP	100	1,2

Tabelle 6: Resorption und Phototoxizität der Hematoporphyrinderivate für OAT-Tumorzellen

Außerdem lässt sich aus Tabelle 6 entnehmen, dass auch die Phototoxizität in der folgenden Reihenfolge $A > B > C > D$ zunimmt (Abb. 33). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die in der Reihenfolge von $A > B > C > D$ zunehmende intramolekulare Polarisierung zur bevorzugten Einlagerung der Sensitizer in die Zellmembran führt. Dies schädigt letztlich die Zelle.

Aus den Aufnahmekinetiken in Abbildung 34 lässt sich folgendes entnehmen: Während 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)DP die Sättigungsgrenze in OAT-Zellen bereits nach 5 Minuten erreicht, zeigt die 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)DP eine langsame, aber kontinuierliche Inkorporation in die Zellen.

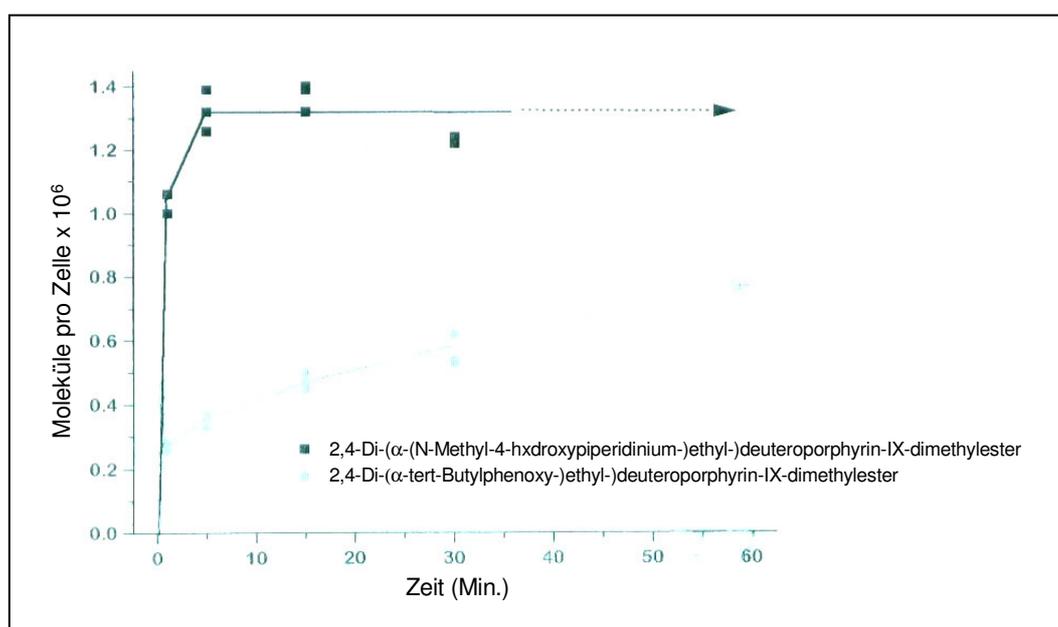


Abb. 34: Aufnahmekinetiken von 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)DP und 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)DP in OAT-Tumorzellen

Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch Einführen verschiedener Substituenten in die Peripherie von Hematoporphyrinderivaten mit steigender intramolekularer Polarität sowohl die Resorptionsgeschwindigkeit als auch die insgesamt aufgenommene Menge an Sensitizer zunimmt. Die Phototoxizität steigt ebenfalls mit zunehmender Polarität der Sensitizer.

3.2.2 Resorptionskinetik von 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester vor bzw. nach Einschluss in ein Cyclodextrindimer [di- β -CD-(2N-A4-C5-A4)]

Das mit zwei Ankergruppen substituierte 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester (DP) wird in ein Cyclodextrindimer [di- β -CD-(2N-A4-C5-A4)] eingeschlossen. Das Fluoreszenzspektrum in Abb. 35 zeigt sowohl in der Exzitation als auch in der Emission eine vollständige Monomerisierung des Sensitizers in Gegenwart des Cyclodextrindimers.

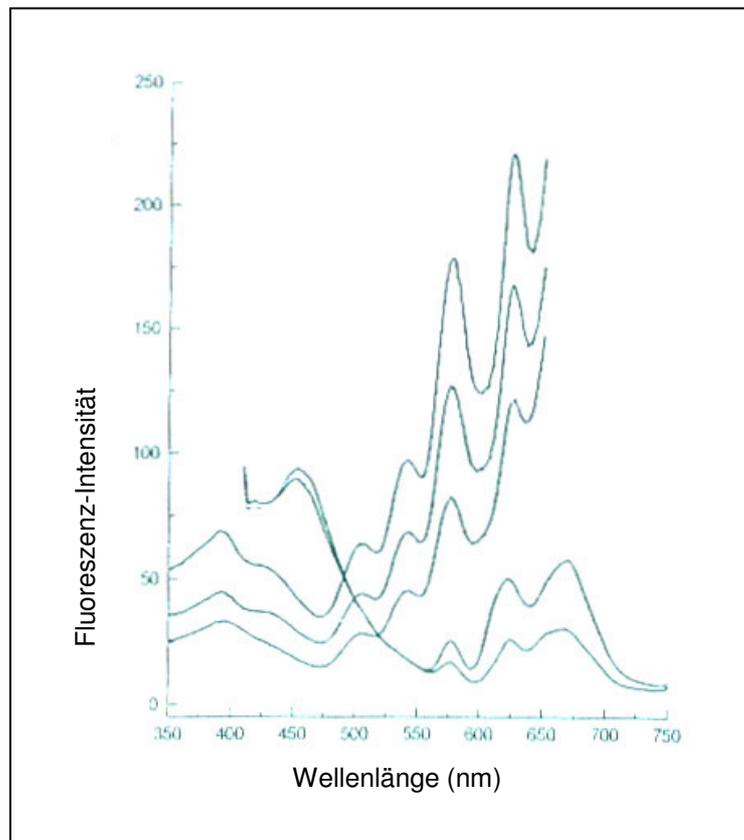


Abb. 35: Monomerisierung des 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylesters in Gegenwart von Cyclodextrindimer

Aus Abb. 36 ist zu entnehmen, dass die Resorptionsgeschwindigkeit von 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)DP in Gegenwart des Cyclodextrindimers nach 20 Stunden nur 15 % der Resorptionsgeschwindigkeit des freien Sensitizers beträgt.

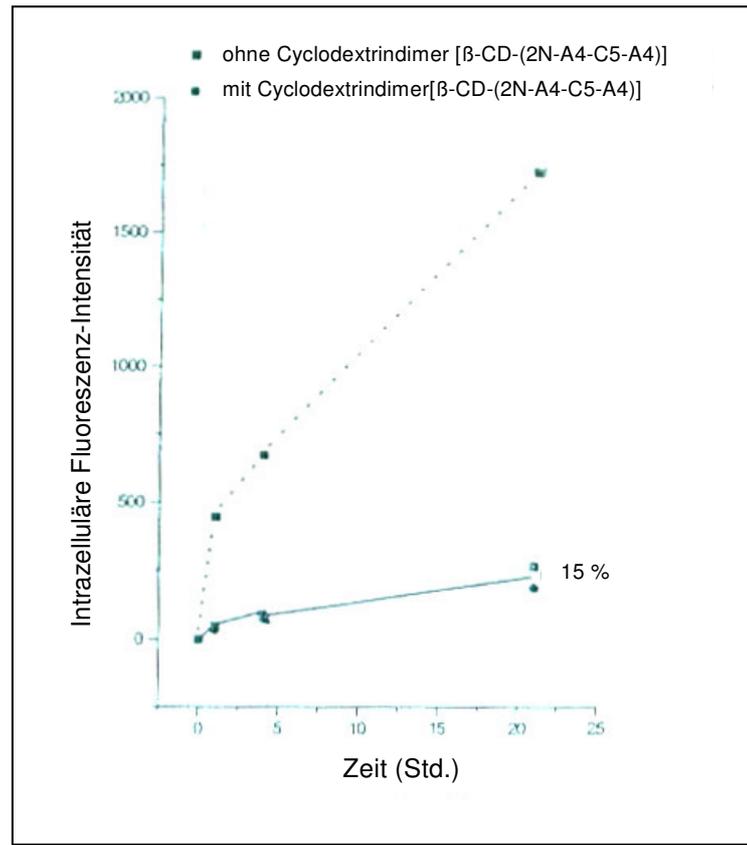


Abb. 36: Aufnahmegeschwindigkeit des 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl)-deuteroporphyrin-IX-dimethylesters durch OAT-SCLC-Tumorzellen mit bzw. ohne Cyclodextrindimer

Eine komplette Aufhebung der Resorption des Sensitizers durch die Tumorzellen kann nicht erreicht werden, da die Bindungskonstante sich vorläufig auf $4,4 \times 10^{-6}$ Mol beläuft (S. 116).

Kontrollversuche zeigen, dass das in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ eingesetzte Dimer die Resorptionskinetik der OAT-SCLC-Tumorzellen nicht beeinträchtigt.

Zusammenfassung

Durch den Einschluss von 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl)-deuteroporphyrin-IX-dimethylester in ein C-13-„gespacertes“-Cyclodextrindimer [di- β -CD-(2N-A4-C5-A4)] kann die Aufnahme des Sensitizers in eine OAT-SCLC-Tumorzellsuspension vorläufig bis auf 15 % reduziert werden.

3.2.3 Phototoxizitätsbestimmung nach Spaltung des Cyclodextrindimers mit dem Enzym Cyclodextrinase

Anhand von Versuchen, bei denen das Sensitizer [2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester] enthaltende Cyclodextrindimer [di- β -CD-(2N-A4-C5-A4)] durch Cyclodextrinase enzymatisch abgebaut wurde, konnte gezeigt werden, dass der Sensitizer nach enzymatischem Abbau des Cyclodextrindimers im Anschluss an die Bestrahlung seine ursprüngliche photodynamische Aktivität in OAT-SCLC-Tumorzellen wieder erreicht. Seine Phototoxizität entspricht dann der Kontrolle ohne Cyclodextrindimer.

Weitere Kontrollversuche zeigen, dass weder das Enzym selbst noch das Dimer in den hier eingesetzten Konzentrationen für die OAT-SCLC-Tumorzellen toxisch sind.

Zusammenfassung

Nach enzymatischem Abbau des Cyclodextrindimers durch Cyclodextrinase unter Freisetzung des Sensitive kann dieselbe photodynamische Aktivität wie bei dem zur Kontrolle eingesetzten freien Sensitizer bestimmt werden.

3.2.4 Bestimmung der Komplexbindungskonstanten der verschiedenen Porphyrinoide mit Cyclodextrinmono- und dimeren

Pheophorbidderivate

Zunächst wird die Komplexbindungskonstante von Pyroethylpheophorbid und 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester durch Variation der Cyclodextrinkonzentration nach der Methode von Reinsborough et al. (33) bestimmt (s. S. 37 f.). Es wird mit einem Cyclodextrindimer gearbeitet, das einen C-13-Spacer trägt: di- β -CD-(2-N-A4-C5-A4) (78) (Abb. 37).

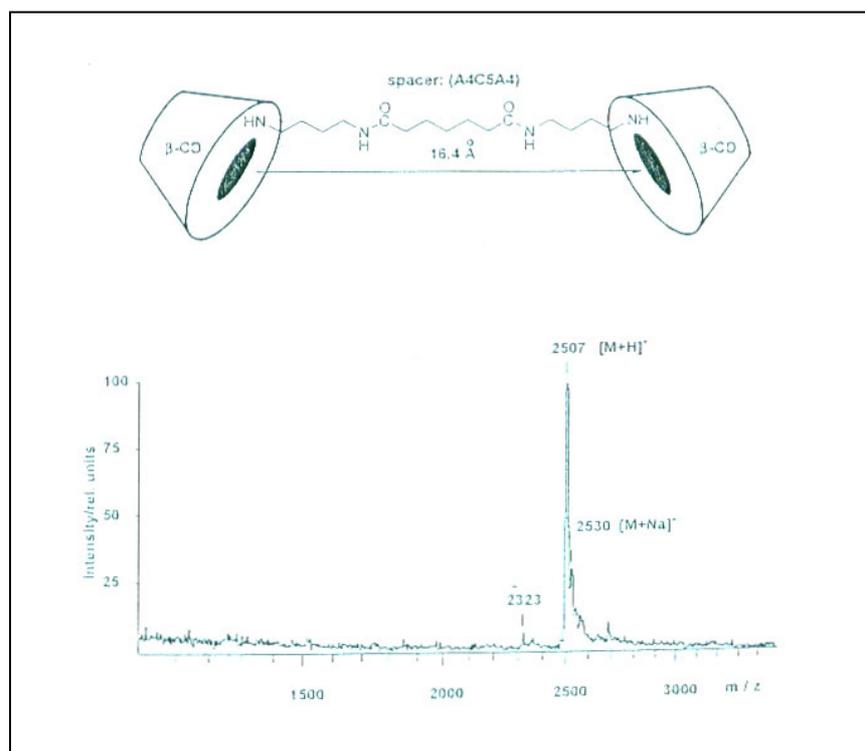


Abb. 37: Massenspektrum (MALDI) des C-13-„gespacertes“-Cyclodextrindimers

Die ermittelten Regressionsgeraden erlauben nur Aussagen über den optimalen Konzentrationsbereich zur Bestimmung der Bindungskonstante von Cyclodextrindimer mit Sensitizer bzw. TNS. Aus Abbildung 38 geht hervor, dass im Konzentrationsbereich um 10000 l/mol Cyclodextrindimer (entspricht einer 100 μ M Lösung) die geringste Streuung der Messwerte zu erwarten sein wird.

Bei dem zunächst verwendeten Versuchsaufbau handelt es sich im Sinne der

Michaelis-Menten-Kinetik per definitionem nicht um eine kompetitive Hemmung: Das Prinzip der kompetitiven Hemmung besteht darin, dass durch ausreichend hohe Substratkonzentrationen der Sensitizer aus seiner Bindung zum Enzym verdrängt werden kann. Da jedoch durch Steigerung der Cyclodextrinkonzentration (in diesem Fall als Substrat eingesetzt) der Sensitizer (Inhibitor) nicht aus der Bindung zum TNS (in diesem Fall als „Enzym“ verwendet) verdrängt werden kann, sind die Bedingungen der kompetitiven Hemmung hier nicht erfüllt. Die aus dieser Versuchsanordnung ermittelten Bindungskonstanten lassen sich aus diesem Grund nicht verwenden.

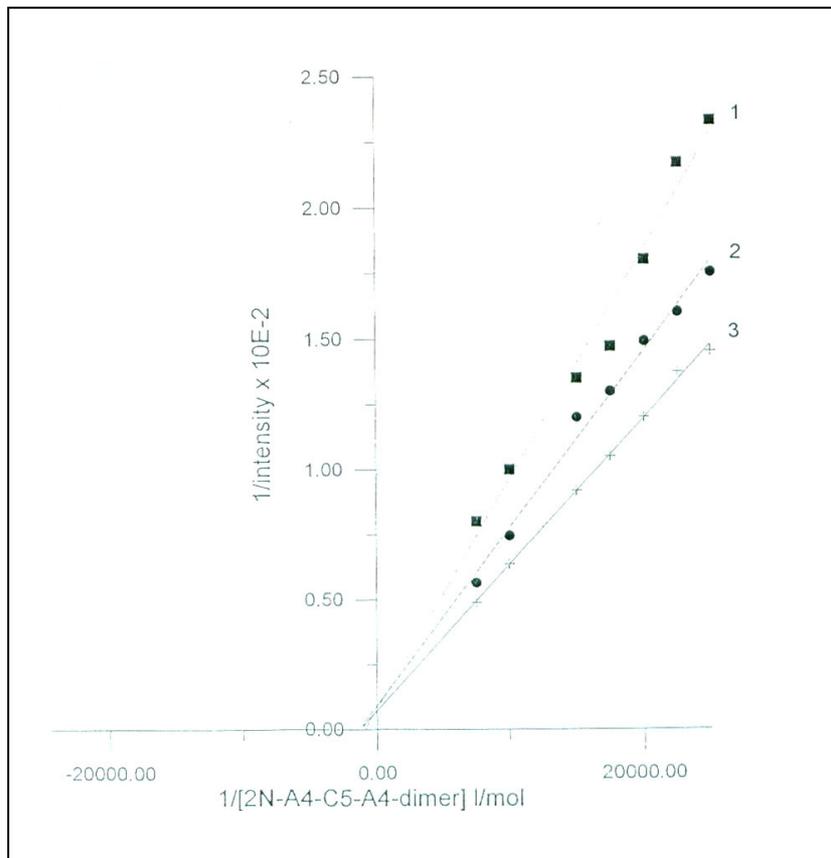


Abb. 38: Doppelt-reziproker Plot: $1/I$ ist als Funktion von $1/[CD]$ aufgetragen

- /1/ 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester
- /2/ Pyropheophorbidethylester
- /3/ TNS

Pd-Bacteriopheophorbidderivate

Nach Wahl der durch das obige Experiment ermittelten optimal auswertbaren Cyclodextrin*dimer*konzentration zu 100 μM („Enzym“) wird im Wettbewerbsversuch entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik unter Variation der TNS-Konzentration (Substrat) die Komplexbindungskonstante von Pd-Bacteriopheophorbidethylester (5 μM) (Inhibitor) bzw. seines in C-3¹ Position mit tert-Butylbenzoylchlorid substituierten Derivats (5 μM) (Inhibitor) bestimmt. Bei dieser Versuchsanordnung sind die Bedingungen der kompetitiven Hemmung erfüllt: Durch Steigerung der TNS-Konzentration (Substrat) lässt sich der Sensitizer (Inhibitor) aus seiner Bindung zum Cyclodextrindimer („Enzym“) verdrängen.

Parallel dazu wird ein Wettbewerbsversuch der oben erwähnten Sensitizer mit TNS um ein Cyclodextrin*monomer* („Enzym“) als Referenz durchgeführt.

Die Versuchsbedingungen für die Reaktion der modifizierten Sensitizer, bzw. ihrer Ausgangsverbindungen, mit dem Cyclodextrinmonomer sowie Cyclodextrindimer im Wettbewerbsversuch mit TNS sind aus den Seiten 39 f. zu entnehmen. Sie entsprechen sich im Wesentlichen bis auf das modifizierte Temperaturprogramm und die leicht variierten TNS Konzentrationen.

Da das Monomer im Gegensatz zum Dimer nur über eine Kavität zur Aufnahme der hydrophoben Anteile des Sensitizers bzw. seiner voluminösen Seitengruppen verfügt, wird die Konzentration des Monomers (Methyl- β -Cyclodextrin) zu 1 mMol gewählt.

Die Komplexbindungskonstanten werden mit Hilfe der beschriebenen Methode des doppelt reziproken Plots nach Connors ermittelt (S. 38 f. bzw. 44).

Die Korrelationskoeffizienten für die gemessenen Fluoreszenzwerte liegen bei $0,9 \pm 0,02$ bei einer Stichprobenzahl von jeweils $N = 15$ (13).

Tabelle 7 zeigt eine Zusammenstellung aller Komplexbindungskonstanten von TNS, Pd-Bacteriopheophorbidethylester und 3¹-tert-Butylbenzoylethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester mit Cyclodextrinmonomer bzw. Dimer.

Substanz	K_{TNS} (M)	K_{Porph} (M)
Pd-Bacteriopheophorbidethylester		
Methyl- β -Cyclodextrin (1 mM)	1.2×10^{-6}	4.9×10^{-6}
di- β -CD-(2N-A4-C5-A4) (100 μ M)	1.3×10^{-6}	2.83×10^{-6}
3¹-tert-Butylbenzoyl-ethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester	K_{TNS} (M)	K_{Porph} (M)
Methyl- β -Cyclodextrin (1 mM)	1.16×10^{-6}	2.4×10^{-6}
di- β -CD-(2N-A4-C5-A4) (100 μ M)	1.25×10^{-6}	0.943×10^{-6}

Tabelle 7: Messergebnisse zur Bestimmung der Komplexbindungskonstanten von Pd-Bacteriopheophorbidethylester und 3¹-tert-Butylbenzoylethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester mit Cyclodextrinmonomer bzw. Dimer

Durch die Einführung eines tert-Butylbenzoylsubstituenten in Position C-3¹ von Bacteriopheophorbidethylester lässt sich die Bindungsaffinität mit dem C-13-„gespacerten“-Cyclodextrindimer [di- β -CD-(2N-A4-C5-A4)] um den Faktor drei im Vergleich zum nicht substituierten Pd-Bacteriopheophorbidethylester erhöhen. Dies lässt sich an der um den Faktor drei abnehmenden Bindungskonstante erkennen. Die Bindungsaffinität von Pd-Bacteriopheophorbidethylester mit Cyclodextrinmonomer (Methyl- β -Cyclodextrin) erhöht sich durch Einführung eines tert-Butylbenzoylsubstituenten in Position C-3¹ um den Faktor zwei im Vergleich zur Ausgangssubstanz.

Die Bindungskonstanten von TNS zu Cyclodextrinmonomer und Dimer unterscheiden sich nicht signifikant.

Hematoporphyrinderivate

Da die Einführung eines zweiten tert-Butylbenzoylsubstituenten in Position C-8¹ von 3¹-tert-Butylbenzoylethyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester bisher nicht gelungen ist, werden aufgrund ihrer einfachen Synthese die Komplexbindungskonstanten von in Position C-2 (entspricht C-3¹) und Position C-4 (entspricht C-8¹) mit tert-Butylphenol bzw. N-Methyl-4-hydroxypiperidin disubstituierten Hematoporphyrin-dimethylestern bestimmt. Diese Verbindungen werden als Modellsubstanzen für in Position C-3¹ und C-8¹ disubstituierte Sensitizer eingesetzt. Aufgrund ihrer nur reversiblen Zytotoxizität finden sie jedoch nur begrenzte Verwendung in der **Photodynamischen Therapie**.

Zunächst wird die Bindungskonstante von Hematoporphyrindimethylester bzw. seinem mit zwei Molekülen tert-Butylphenol substituiertem Derivat [2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester] mit Cyclodextrin *monomer* (1 mMol) bestimmt.

Nach Erhitzen der Lösung aus Methyl- β -Cyclodextrin und 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester für 1 Minute auf 70 °C wird nach 100 bzw. 270 Minuten über eine Deaggregation des Cyclodextrins eine Monomerisierung des Sensitizers erreicht (Abb. 39), erkennbar an den schlanken Absorptionsbanden. Auch Hematoporphyrindimethylester lässt sich unter diesen Bedingungen monomerisieren und in das Monomer einschließen.

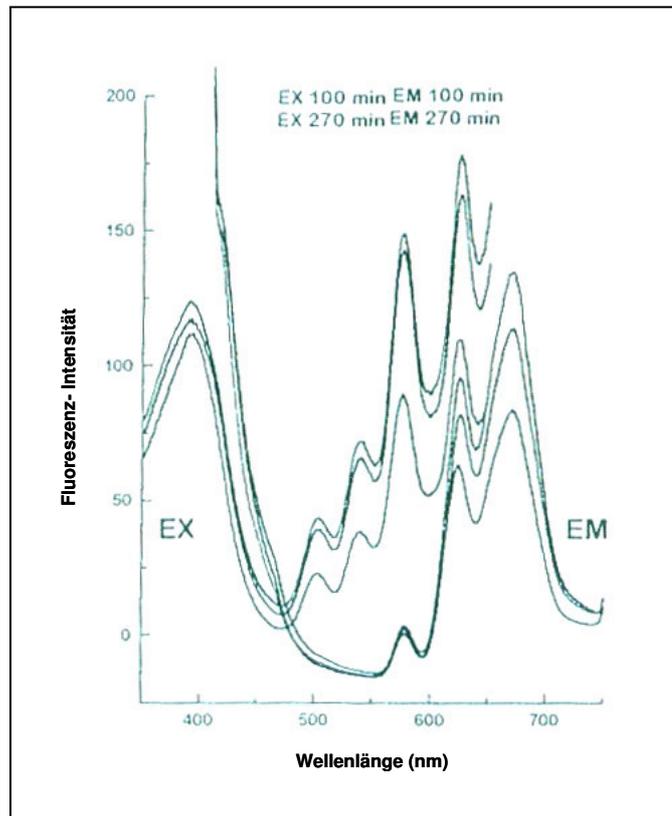


Abb. 39: Monomerisierung des 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylesters ($5 \mu\text{M}$) in 1 mM Methyl- β -Cyclodextrinlösung

Nach Zugabe von TNS ergeben sich durch die Kompetition des Inhibitors 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester ($5 \mu\text{M}$) mit TNS um die Komplexbildung mit Methyl- β -Cyclodextrin (1 mM) im Vergleich zur Komplexbildung von Methyl- β -Cyclodextrin mit TNS ohne Sensitizer signifikant geringere Fluoreszenzen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass der Sensitizer durch seine Affinität zum Cyclodextrin nicht die maximal mögliche Komplexbildung zwischen TNS und Cyclodextrin erlaubt, TNS aber nur bei Einschluss in das Cyclodextrin signifikante Fluoreszenz zeigt. Besonders gut kann man dies in Abb. 40 im doppelt reziproken Plot erkennen, in dem die Kehrwerte der erhaltenen Fluoreszenzen gegen die Kehrwerte der Konzentrationen von TNS aufgetragen sind.

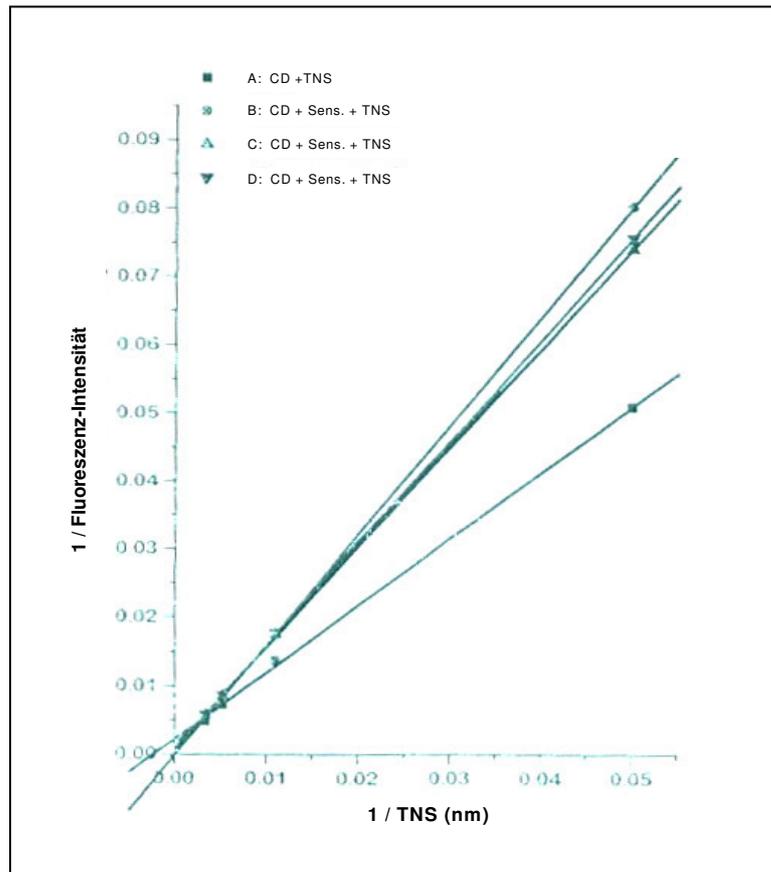


Abb. 40: Doppelt-reziproker Plot: $1 / I$ ist als Funktion von $1 / [TNS]$ aufgetragen

A TNS mit Methyl- β -Cyclodextrin (1 mM)

B/C/D di-(tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester (5 μ M) mit Methyl- β -Cyclodextrin (1 mM)

Eine Verringerung der Fluoreszenzen durch den Sensitizer zeigt sich in der Reziproken als vergrößerter Wert. Die Zunahme der Steigungen der Geraden B/C/D (mit Sensitizer) im Vergleich zur Gerade A (ohne Sensitizer) sind somit ein Maß dafür, wie hoch die Affinität des kompetitiven Inhibitors 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester im Vergleich zum TNS in der Konkurrenzreaktion um das Cyclodextrinmonomer ist. Aus den Steigungen dieser Geraden lassen sich anschließend die Bindungskonstanten K_{Porph} und K_{TNS} (S. 38 f. bzw. S. 44) berechnen.

Die Korrelationskoeffizienten der Inhibitionsgeraden (mit Sensitizer) sowie der Basis-

geraden (nur TNS und Monomer) gruppieren sich um den Wert von $0,9 \pm 0,02$ bei einer Stichprobenzahl von jeweils $N = 15$ bzw. $N = 12$ (13).

Anschließend wird die Bindungskonstante von Hematoporphyrindimethylester bzw. seinem disubstituierten Derivat 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester mit Cyclodextrindimer (100 μM) [di- β -CD-(2N-A4-C5-A4)] (78) bestimmt. Aus den langen schlanken Banden im Exzitations- wie auch im Emissionsspektrum in Abb. 41 ist zu erkennen, dass nach vier Stunden Erhitzen auf 50 °C das Cyclodextrindimer weitgehend deaggregiert und eine Aufnahme des 2,4-Di-(α -(4-t-butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester ohne dessen Zerstörung erlaubt. Auch Hematoporphyrindimethylester lässt sich unter diesen Bedingungen monomerisieren und in das Cyclodextrindimer inkorporieren.

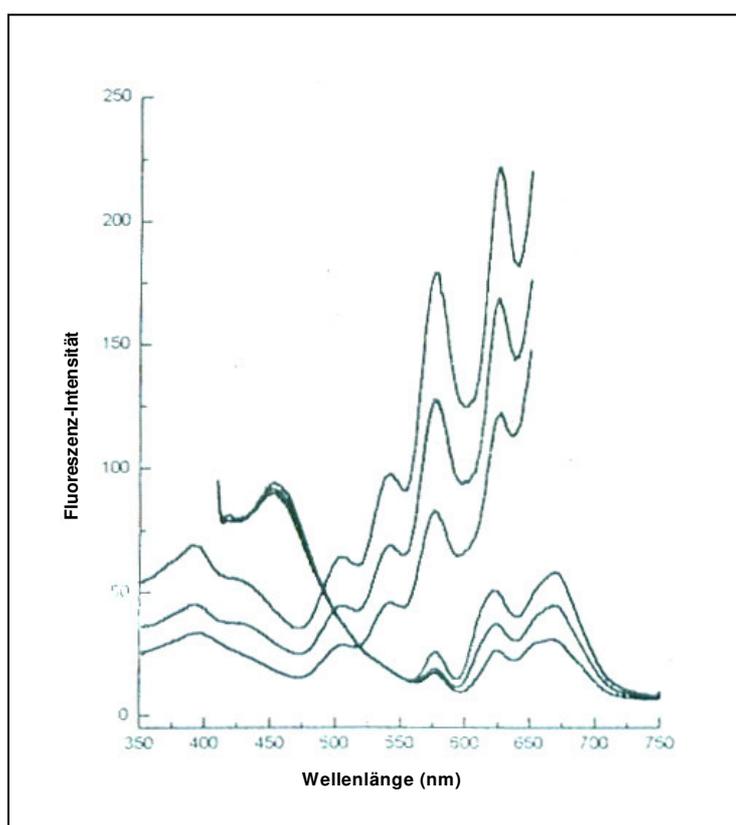


Abb. 41: Monomerisierung des 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylesters (5 μM) in 100 μM Cyclodextrindimerlösung

Die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzen in Abb. 42 mit Sensitizer (Gerade E/F/G) und ohne Sensitizer (Gerade D) im doppelt reziproken Plot erlauben eine Aussage über den Grad der Inhibition bzw. der Affinität des Sensitizers zum Dimer in Relation zur Affinität des TNS zum Dimer. Aus den Steigungen dieser Geraden lassen sich anschließend die Bindungskonstanten K_{Porph} und K_{TNS} berechnen (S. 38 f. und S. 44). Auch hier bewegen sich die Korrelationskoeffizienten der Inhibitionsgeraden sowie der Basisgeraden um den Wert von $0,9 \pm 0,02$ bei einer Stichprobenzahl von jeweils $N = 15$ bzw. $N = 12$ (13).

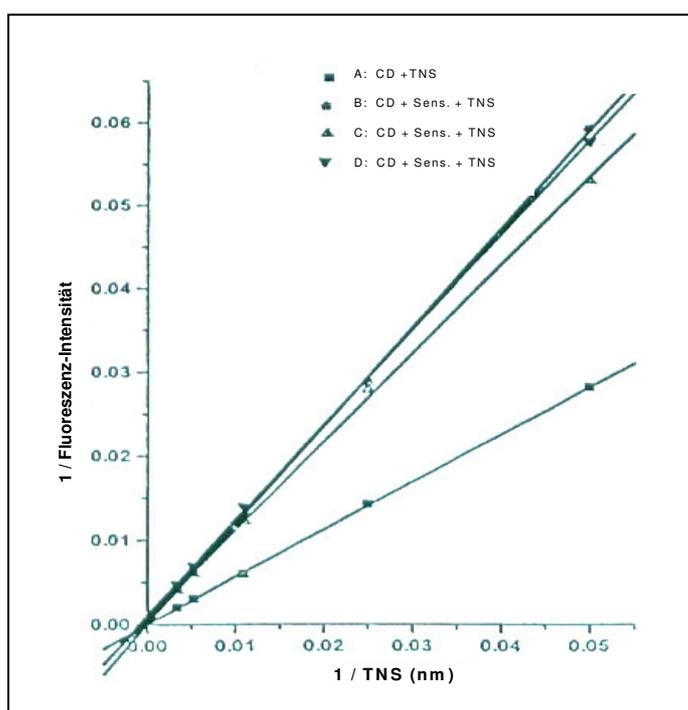


Abb. 42: Doppelt-reziproker Plot: $1 / I$ ist als Funktion von $1 / [\text{TNS}]$ aufgetragen

- A TNS mit Cyclodextrindimer (100 μM)
- B/C/D 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy)-ethyl)-deuteroporphyrin-IX-dimethylester (5 μM) in Cyclodextrindimer (100 μM)

Um zu beweisen, dass sich die Bindungskonstanten durch Steigerung der Sensitizerkonzentration nicht ändern, wird die Bestimmung der Bindungskonstanten von TNS und Sensitizer bei Verdoppelung der Sensitizerkonzentration wiederholt. Nach Anwendung des bereits geschilderten Temperaturprogramms zur Monomerisierung zeigen alle in Abb. 43 dargestellten Proben mit einer Ausnahme eine weitgehende Monomerisierung.

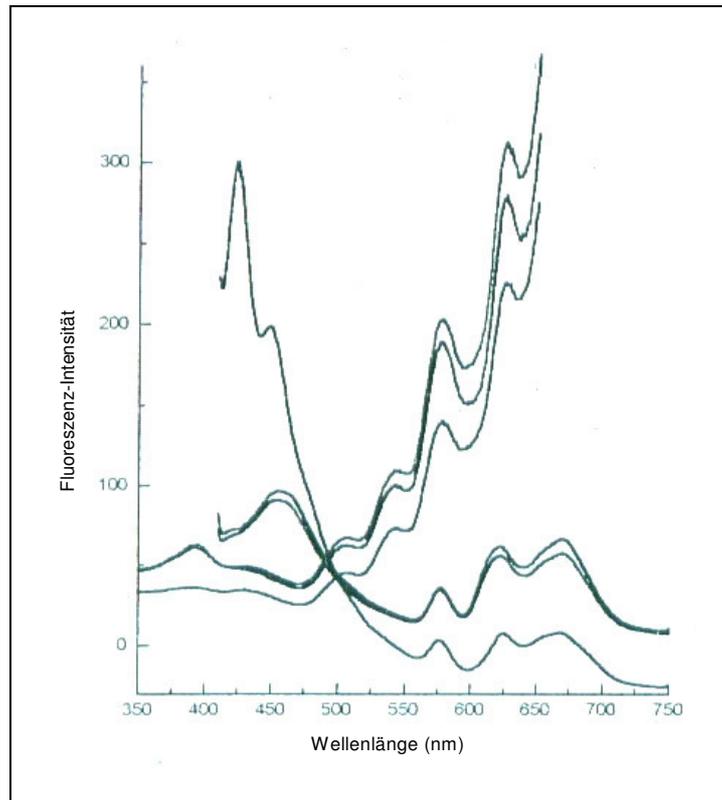


Abb. 43: Monomerisierung des 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl)-deuteroporphyrin-IX-dimethylesters ($10 \mu\text{M}$) in $100 \mu\text{M}$ Cyclodextrindimerlösung

Im doppelt reziproken Plot (Abb. 44) ist eine signifikante Inhibition der Bindung von TNS und Dimer (Gerade A) durch den Sensitizer (Gerade B/C/D) zu sehen, erkennbar an der erheblichen Vergrößerung der Steigung. Die Berechnung der Bindungskonstanten für den Sensitizer in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ ergibt sehr ähnliche Werte wie bei einer Sensitizerkonzentration von $5 \mu\text{M}$. Dies beweist, dass die Bindungskonstante unabhängig von der eingesetzten Sensitizerkonzentration ist. Auch hier liegen die Korrelationskoeffizienten der Inhibitionsgeraden sowie der Basisgeraden um den Wert von $0,9 \pm 0,03$ bei einer Stichprobenzahl von jeweils $N = 15$ bzw. $N = 12$ (13).

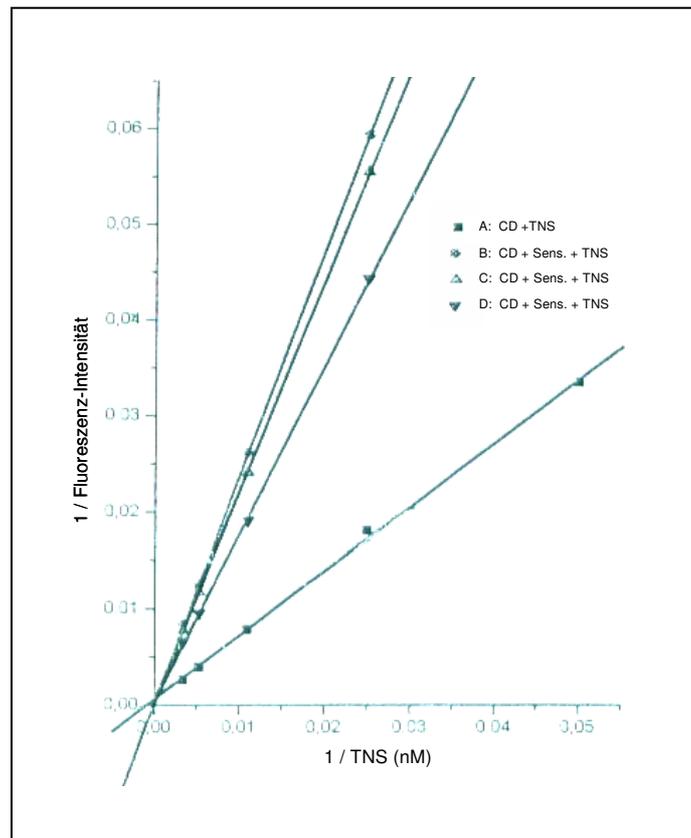


Abb. 44: Doppelt-reziproker Plot: $1 / I$ ist als Funktion von $1 / [TNS]$ aufgetragen

- A TNS mit Cyclodextrindimer ($100 \mu\text{M}$)
 B/C/D 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester ($10 \mu\text{Mol}$) in Cyclodextrindimer ($100 \mu\text{M}$)

Tabelle 8 zeigt eine Zusammenschau aller ermittelten Bindungskonstanten von TNS und dem in Position 2 und 4 mit tert-Butylphenol disubstituierten Hematoporphyrindimethylester einschließlich seiner Ausgangsverbindung mit Cyclodextrin *monomer* und *Dimer*.

Substanz	K_{TNS} (M)	K_{Porph} (M)
Hematoporphyrin-dimethylester (5μM)		
Methyl- β -Cyclodextrin (1 mM)	1.3×10^{-6}	72.01×10^{-6}
di- β -CD-(2N-A4-C5-A4) (100 μ M)	1.1×10^{-6}	46.3×10^{-6}
2,4-Di-(α-(4-tert-Butylphenoxy)ethyl-) DP (5 μM)		
Methyl- β -Cyclodextrin (1 mM)	$0,86 \times 10^{-6}$	$8,8 \times 10^{-6}$
di- β -CD-(2N-A4-C5-A4) (100 μ M)	$0,98 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-6}$
2,4-Di-(α-(4-tert-Butylphenoxy)ethyl-) DP (10μM)		
di- β -CD-(2N-A4-C5-A4) (100 μ M)	$2,8 \times 10^{-6}$	$4,6 \times 10^{-6}$

Tabelle 8: Messergebnisse zur Bestimmung der Komplexbindungskonstanten von Hematoporphyrindimethylester und 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester mit *Cyclodextrinmonomer* und *Cyclodextrindimer*

Aus den unterschiedlichen Steigungen der Geraden B/C/D mit Sensitizer im Vergleich zur Geraden A ohne Sensitizer in den Abbildungen 40, 42 bzw. 44 ist zunächst zu erkennen, dass eine Konkurrenz zwischen TNS und den Sensitizern stattfindet.

Auch die berechneten Korrelationskoeffizienten sprechen für diesen Zusammenhang, auch wenn sie nur eine beschreibende Funktion haben und über die Kausalität

des vermuteten Zusammenhanges nichts aussagen.

Als wichtigstes Ergebnis aus Tabelle 8 lässt sich festhalten, dass durch die zweifache Substitution von Hematoporphyrindimethylester mit tert-Butylphenol in den Positionen C-2 und C-4 die Affinität des Sensitizers zum Cyclodextrindimer im Vergleich zur Ausgangssubstanz um den Faktor 10 zunimmt (Abnahme der Komplexbindungskonstante um den Faktor 10). Die erzielte Komplexbindungskonstante von $4,4 \times 10^{-6}$ M von 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester mit Cyclodextrindimer lässt sich auch bei Verdoppelung der Sensitizerkonzentration weitgehend bestätigen.

Vergleicht man die Bindungskonstanten von 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester bzw. seines Ausgangsproduktes mit Cyclodextrinmonomer, so fällt auf, dass auch beim Cyclodextrinmonomer die zweifache Substitution zu einer Steigerung der Bindungsaffinität um den Faktor acht (Faktor 8,2) führt.

Bei Vergleich der Bindungskonstanten von 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester bzw. seiner Ausgangssubstanz mit Cyclodextrinmonomer bzw. Dimer zeigt sich, dass die Affinität des Sensitizers zum Dimer maximal um den Faktor 2 ausgeprägter ist als zum Monomer.

Für die Bindungskonstanten des TNS zum Monomer bzw. zum Dimer gilt, dass sie sich analog den Pd-Bacteriopheophorbinderivaten nicht signifikant unterscheiden.

Eine Ausnahme bildet die bei verdoppelter Sensitizerkonzentration ermittelte Bindungskonstante des TNS zum Dimer. Hier erscheint die Affinität des TNS zum Dimer verringert, erkennbar an der signifikanten Erhöhung der Bindungskonstante (Faktor 2,8).

Vergleichbare Wettbewerbsversuche mit 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester (5 μ M) als Inhibitor führen, wie aus Tabelle 9 zu entnehmen ist, vorläufig zu keinen verwertbaren Ergebnissen.

Substanz	K_{TNS} (M)	K_{Porph} (M)
2,4-Di-(α-(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)-ethyl)-DP (5μM)		
Methyl- β -Cyclodextrin (1 mM)	nicht signifikant	nicht signifikant
di- β -CD-(2N-A4-C5-A4) (100 μ M)	nicht signifikant	nicht signifikant

Tabelle 9: Messergebnisse zur Bestimmung der Komplexbindungskonstanten von Hematoporphyrindimethylester und 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)-ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester mit Cyclodextrin *monomer* und Cyclodextrin *dimer*

Zusammenfassung

Ein tert-Butylbenzoylsubstituent in Stellung C-3¹ von Pd-Bacteriopheophorbidethylester erhöht die Bindungsaffinität mit einem C-13-„gespacerten“-Cyclodextrin *dimer* um den Faktor 3.

Die Einführung zweier tert-Butylphenoxy substituenten in Position C-2¹ und C-4¹ von Hematoporphyrindimethylester, das aufgrund der einfachen Synthesemethode als Modellsubstanz für in Position C-3¹ und C-8¹ disubstituierte Pd-Bacteriopheophorbidethylester betrachtet werden kann, verzehnfacht die Bindungsaffinität mit einem C-13-„gespacerten“-Cyclodextrin *dimer*.

4. Abschließende Diskussion und Bewertung

4.1 Allgemeines

Massive Forschungsanstrengungen im Bereich der **Photodynamischen Therapie** lassen große Fortschritte in Technik und Methodologie erwarten.

Diese betreffen neben der Weiterentwicklung von Photosensitizern auch die Entwicklung adäquater Carriersysteme und die Optimierung spezialisierter Laser-Systeme (4, 23, 24, 37, 44).

Trotz der erzielten Erfolge bleiben zwei grundsätzliche Aufgabenstellungen in der **Photodynamischen Therapie** bestehen:

Zum einen wird angestrebt die Absorptionsmaxima der Sensitizer in den rotwelligen Bereich des sichtbaren Spektrums zu verschieben, um so eine größere Eindringtiefe des Lichtes zu erreichen. Dies sollte möglichst unter Erhalt bzw. Steigerung der spezifischen Phototoxizität der Sensitizer geschehen.

Zum anderen gilt es die Abstimmung von Sensitizern auf biospezifische Carriersysteme, die eine selektive Anreicherung des Sensitizers im Tumor garantieren, zu optimieren.

Gegenwärtig werden verschiedene Strategien für ein Targeting des Carriers diskutiert (34, 52, 59). Diese Arbeit soll einen Beitrag zu dieser Diskussion leisten und sowohl Wege in der Präparation als auch eine Bewertung verschiedener Substanzklassen von Sensitizern in ihrer Funktion als Photochemotherapeutikum für ein biospezifisches Carriersystem anbieten. Angestrebt wird sowohl eine Verbesserung der mangelnden Selektivität der **Photodynamischen Therapie** im Speziellen als auch eine Steigerung der Selektivität bei der Chemotherapie maligner Tumoren im Allgemeinen.

Voraussetzung dafür ist, dass ein Carriersystem eine stabile Einschlussverbindung mit dem Sensitizer bildet, um dessen systemische Toxizität herabzusetzen. Eine Wechselwirkung des Sensitizers mit den Lipoproteinen des Blutes sowie den Körperzellen sollte ausgeschlossen werden können.

Hinweise auf ein mögliches Prinzip zur Bildung solcher stabiler Einschlusskomplexe geben Versuche von Breslow & Chung (10): Werden die beiden äußeren Hydroxylgruppen eines symmetrischen Alkohols mit zwei tert-Butylbenzoylresten als Ankergruppen substituiert, so bildet dieser Alkohol unerwartet stabile Komplexe mit einem speziell dafür konstruierten Cyclodextrin-dimer ("Clamshell-Dimer" als Carriersystem) (Abb. 2).

Da die im Rahmen dieser Arbeit als Sensitizer verwendeten Porphyrinmoleküle primär jedoch keine entsprechenden Substituenten tragen, die eine Verankerung innerhalb der Hohlräume eines speziell dafür konstruierten Cyclodextrindimers bewirken könnten, müssen zuvor voluminöse Substituenten wie tert-Butylphenol, tert-Butylbenzoylchlorid, N-Methyl-4-hydroxypiperidin und Cyclohexanol in das Porphyringerüst eingeführt werden.

Aus dieser Zielsetzung ergibt sich die Gliederung dieser Arbeit:

Der präparative Teil besteht in der Beschreibung von Methoden zur direkten Metallierung von Bacteriopheophorbiden und Pheophorbiden zur Steigerung der spezifischen Phototoxizität. Die durch die Metallierung erreichte Stabilität eröffnet neue Möglichkeiten zur Modifikation der Peripherie des Tetrapyrrolzyklus.

Anschließend wird die Einführung voluminöser tert-Butylphenyl/benzoyl bzw. homo- oder heterozyklischer Substituenten in das Tetrapyrrolgerüst von Pheophorbiden, Pd-Bacteriopheophorbiden, Hematoporphyrinen und Etioporphyrinen mit dem Ziel der Schaffung eines wirksamen Verankerungsmechanismus in einem Transportsystem, wie z.B. in Cyclodextrindimeren, beschrieben.

Im anwendungsbezogenen Teil wird die Komplexbindungskonstante dieser Verbindungen mit Cyclodextrindimeren bestimmt, sowie die Phototoxizität bzw. die Resorptionskinetik der modifizierten Photosensitizer in Tumorzellkulturen gemessen. Abschließend wird die Stabilität des aus modifiziertem Sensitizer und Cyclodextrindimer gebildeten Einschlusskomplexes unter *in vitro* Bedingungen getestet, indem der Einfluss auf die Resorptionsgeschwindigkeit des eingeschlossenen Sensitizers in Zellen einer Zellkultur bestimmt wird.

4.1.1 Direkte Metallierung von Bacteriopheophorbiden und Pheophorbiden mit Palladium und Platin

Obwohl in der Literatur eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Transmetallierung bzw. direkten Metallierung von Chlorophyllen bzw. Pheophytinen beschrieben worden sind (18a, 90), gibt es nur wenige Methoden, die zur Herstellung von Bacteriochlorophyllen bzw. Bacteriopheophytinen mit geänderten Zentralionen benutzt werden können.

Hartwich hat ein Transmetallierungsverfahren entwickelt, das in einer zweistufigen Reaktion, über das Cd-Bacteriopheophytin als Intermediat, verschiedene zweiwertige Metalle wie Pd, Co, Ni und Mn als Zentralatome in das Tetrapyrrolringssystem von Bacteriopheophytinen einführt (26). Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass durch die in Spuren zurückbleibende Cadmiumverunreinigung eine Verwendung als Medikament aufgrund der hohen Toxizität von Cadmium nicht möglich ist.

Losev et al. hat die Darstellung von Pd-Bacteriopheophytin in einer direkten Metallierungsreaktion mit Pd-Benzonitril in Benzol unter Stickstoffatmosphäre beschrieben (42c). In dieser Publikation sind jedoch weder Details der Präparation angegeben, noch erfolgt eine Charakterisierung des Metall-Komplexes. Außerdem konnte die Darstellung von Pd-Bacteriopheophytin in der von Losev angegebenen Weise nicht nachvollzogen werden. Auch die von Strell und Urumov beschriebenen Methoden der direkten Metallierung für Chlorophylle (92) konnten für Bacteriochlorophylle in leicht modifizierter Form nur für Kupfer und Zink nachvollzogen werden (26).

Aus diesem Grund wurde die Methode der direkten Metallierung zunächst an dem wesentlich billigeren und chemisch leichter zu modifizierenden Methylpheophorbid erprobt. Methylpheophorbid ließ sich mit $\text{Pt}(\text{Cl})_2$ in Benzonitril unter saurer Katalyse in das Platinderivat überführen. Benzonitril monomerisiert dabei das ansonsten unlösliche $\text{Pt}(\text{Cl})_2$, indem es stöchiometrische Komplexe bildet.

Allerdings erwies sich diese Methode für Bacteriopheophorbide als ungeeignet, da das Lösungsmittel Benzonitril bedingt durch massive Oxidationen vor allem das metallierte Chlorin ergab (Oxidation in Position 7 und 8). In wasserfreiem Methanol in Gegenwart von Molekularsieb, das möglicherweise als Festphasenkatalysator fungiert, war es hingegen erstmals möglich Pd-Bacteriopheophorbid über eine

direkte Metallierung zu erhalten. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur direkten Metallierung des Bacteriopheophorbids mit $\text{Pd}(\text{Cl})_2$ in Methanol hat den entscheidenden Vorteil, dass keine Verunreinigungen durch $\text{Cd}(\text{Cl})_2$ vorliegen, die den Einsatz als Medikament verbieten würden. Im Vergleich zur Transmetallierungsreaktion bedeutet die direkte Metallierung überdies eine erhebliche Zeitersparnis bei der Synthese, eine vereinfachte Aufreinigung sowie eine um 15 % gesteigerte Ausbeute.

Durch die *direkte* Metallierung ist es somit erstmalig gelungen, einen in der medizinischen Praxis einsetzbaren Photosensitizer mit exzellenten photodynamischen Eigenschaften zu gewinnen.

Ohne Palladium als Zentralatom haben Bacteriopheophorbide eine niedrigere Triplettausbeute als das Hematoporphyrinderivat (HPD). Durch die Metallierung mit Palladium jedoch erhält man einen Sensitizer mit hoher Triplettausbeute, einer langen Triplettlebensdauer, einem Zugang zu höher angeregten Zuständen, einer vermehrten Produktion von Singulett-Sauerstoff, einer Absorption innerhalb des photodynamischen Fensters, einer ausgeprägten Phototoxizität, einer Erhöhung der physiologischen Lebenszeit mit anschließender *in vivo* Degeneration sowie der Möglichkeit der Initiation von biologischen Redoxreaktionen. Diese Eigenschaften tragen entscheidend zur Überlegenheit der Pd-Bacteriochlorophylle gegenüber Hematoporphyrinen und Pheophorbiden bei.

Bisher konnte eine Stabilisierung der Bacteriopheophorbide aufgrund fehlender synthetischer Methoden nicht erreicht werden (32). Durch die Einführung eines Metalls wie beispielsweise Palladium als Zentralatom hingegen verlieren Bacteriopheophorbide in Gegenwart von Sauerstoff und Licht bei Raumtemperatur weitgehend ihre Labilität. Diese Tatsache ist eine Grundvoraussetzung, dafür dass weitere Modifikationen am Tetrapyrrolzyklus bzw. seiner Peripherie durchgeführt werden können, und somit entscheidende Vorteile für den Transport, ein gezieltes Targeting sowie die Minimierung toxischer Nebeneffekte zu erwarten sind.

Auch die direkte Einführung von Platin in Bacteriopheophorbid ist nun erstmalig im Rahmen dieser Arbeit mit Platindimethylcyclooctadien $[\text{Pt}(\text{Me})_2\text{COD}]$ unter saurer Katalyse in Gegenwart von Molekularsieb gelungen. Durch die Rigidität des Makrozyklus von Bacteriopheophorbid, die kein Ausscheren von einem der Donor-

Stickstoffatome der Tetrapyrrolringe zur Acceptorseite des Metalls erlaubt, konnte die Metallierungsreaktion nur mit einer sehr labil koordinierten Metallverbindung wie hier z.B. $\text{Pt}(\text{Me})_2\text{COD}$ erfolgreich durchgeführt werden. Die saure Katalyse fördert zusätzlich die Abgangseigenschaften der Methylgruppen und verschiebt somit das Reaktionsgleichgewicht wirkungsvoll in Richtung des gewünschten Produktes. Eine zwanzig Prozent geringere Ausbeute im Vergleich zur Reaktion mit $\text{Pt}(\text{Me})_2\text{COD}$ erhält man bei Verwendung von Platindiacetylacetonat [$\text{Pt}(\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3)_2$].

Eine höhere Ausbeute bei der Synthese von Pt-Bacteriopheophorbid wird noch bei Einsatz von $\text{Pt}(\text{CF}_3)_2\text{COD}$ bzw. $\text{Pt}(\text{CH}_3\text{COO}^-)_2\text{COD}$ anstelle von $\text{Pt}(\text{Me})_2\text{COD}$ erwartet, da die weitaus potenteren Abgangsgruppen eine Verminderung der Koordinationssphäre des Metalls bewirken. Genauere Phototoxizitätsmessungen und Bestimmung der photochemischen bzw. physikalischen Eigenschaften stehen hier noch aus.

Die Ergebnisse der Metallierungsreaktionen haben größtenteils Eingang gefunden in folgende Patente (79, 82, Yeda Research, Weizmann Institute of Science).

4.1.2 Einführung voluminöser Ankergruppen mit anschließender Berechnung der Komplexbindungskonstante mit Cyclodextrindimeren sowie Bestimmung der Phototoxizitäten und Resorptionsgeschwindigkeiten dieser modifizierten Sensitizer im Zellversuch

Pheophorbide: Einführung einer voluminösen Ankergruppe

Über eine Hydrobromierung der C-3¹ Vinylgruppe von Pyropheophorbidethylester mit anschließender Substitution des Broms durch tert-Butylphenol gelang die Darstellung von 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester mit guter Ausbeute (12, 63, 64, 71, 89a, 89b).

Entscheidend ist hierbei wasserfrei und unter Inertgas zu arbeiten. Zur Entfernung überschüssigen tert-Butylphenols hat sich die Sublimation bei 110 °C in der Trockenpistole unter Ölpumpenvakuum bewährt. Bedingt durch die Hydrobromierung entstehen bei diesem Syntheseverfahren mehrere Nebenprodukte, deren chromatographische Abtrennung zeitaufwendig ist.

Eine andere Möglichkeit wäre ein Syntheseweg, bei dem Wasser an die Vinylgruppe des Ethylpheophorbid addiert und die Hydroxylgruppe mit tert-Butylbenzoylchlorid verestert wird (16).

Mit einer Ankergruppe versehene Pheophorbide: Phototoxizitäten und Resorptionsgeschwindigkeiten im Zellversuch

Für M2R und A375-Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass sich die Resorptionsgeschwindigkeit durch die Einführung eines tert-Butylphenylsubstituenten in Position C-3¹ von Pyropheophorbidethylester verbessert. Auch die Phototoxizität wird durch die Substitution geringfügig erhöht.

Vor dem Hintergrund der systematischen Substitutionen bei den Pd-Bacteriopheophorbid-, Etioporphyrin- bzw. Hematoporphyrinderivaten lässt sich die Erhöhung der Phototoxizität in Einklang bringen mit der Erhöhung der intramolekularen Polarität.

Mit einer Ankergruppe versehene Pheophorbidderivate: Bestimmung der Bindungskonstanten mit Cyclodextrindimeren

Die für den 3¹-tert-Butylphenoxyethylpyropheophorbidethylester im anwendungsbezogenen Teil im Vergleich mit seinem Ausgangsprodukt ermittelten Bindungskonstanten mit einem C-13-„gespacerten“-Cyclodextrindimer [di-β-CD-(2N-A4-C5-A4)] (78) lassen sich aufgrund der für eine kompetitive Hemmung im Sinne der Michaelis-Menten-Kinetik ungünstigen Versuchsanordnung [Variation der Cyclodextrinkonzentration nach Reinsborough et al. (33)] nicht verwerten. Eine Grundvoraussetzung für die kompetitive Hemmung ist, dass durch Steigerung der Substratkonzentration der Inhibitor aus seiner Bindung zum Enzym verdrängt werden kann. Da aber durch ansteigende Cyclodextrindimerkonzentrationen (hier als „Substrat“ eingesetzt) eine Verdrängung des Sensitizers (Inhibitor) nicht möglich ist, wird die Versuchsanordnung folgendermaßen variiert: 6-p-(Toluidino-)2-Naphthalensulfonsäure (TNS) wird als zu variierende Substratkonzentration eingesetzt und die Konzentration des Cyclodextrindimers als aufnehmendes „Enzym“ konstant gehalten. Durch steigende TNS Konzentrationen ist es nun möglich, den Sensitizer aus seiner Bindung zum Cyclodextrindimer („Enzym“) zu verdrängen.

Dadurch, dass die Pheophorbide aufgrund ihrer geringen Phototoxizität für die **Photodynamische Therapie** nur sehr begrenzt geeignet sind (6, 51, 45a, 97), wurde auf eine Wiederholung der Bestimmung der Komplexbindungskonstante im Sinne einer kompetitiven Hemmung zwischen TNS (Substrat) und Sensitizer (Inhibitor) verzichtet. Dennoch war es durch die Variation der Cyclodextrinkonzentration, entsprechend den Versuchen von Reinsborough et al. (33) möglich, den optimalen Konzentrationsbereich der Einschlussverbindung zwischen dem Cyclodextrindimer und Substrat bzw. Inhibitor zu bestimmen.

Die erzielten Ergebnisse stellen somit eine Grundlage für weitere Untersuchungen an Pd-Bacteriopheophorbidderivaten dar, von denen bekannt ist, dass sie wesentlich bessere phototoxische Eigenschaften besitzen und bathochromer absorbieren als die Pheophorbidderivate (55).

Pd-Bacteriopheophorbidderivate: Einführung einer voluminösen Ankergruppe

Analog zur Einführung eines tert-Butylphenylsubstituenten in Position C-3¹ von Pyropheophorbidethylester wurde ein tert-Butylbenzoylsubstituent in Position C-3¹ von Pd-Bacteriopheophorbidethylester eingeführt.

Die Einführung dieses Substituenten wird durch die über die Metallierung mit Palladium erreichte weitgehende Oxidationsstabilität wesentlich erleichtert. Um Pd-Bacteriopheophorbidethylester mit tert-Butylbenzoylchlorid zu verestern, ist eine Reduktion der C-3¹-Acetylgruppe des Pd-Bacteriopheophorbidethylesters zu einer Hydroxylgruppe erforderlich. Durch diese Reaktion wird das Absorptionsmaximum zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben. Diese Eigenschaft ist, wie oben erklärt, in der **Photodynamischen Tumortherapie** von Nachteil.

Es bleibt als Option offen, einen elektronegativen Substituenten in die Peripherie des Bacteriochloringerüsts einzuführen, um eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums zu erreichen (14, 69).

Mit einer Ankergruppe versehene Pd-Bacteriopheophorbidderivate:

Bestimmung der Bindungskonstanten mit Cyclodextrindimeren

Die Einführung eines tert-Butylbenzoylsubstituenten in Position C-3¹ von Pd-Bacteriopheophorbidethylester verbessert die Bindungsaffinität zu einem C-13-„gespacerten“-Cyclodextrindimer [di-β-CD-(2N-A4-C5-A4)] (78), die im Kompetitionsversuch mit TNS bestimmt wurde, um den Faktor 3 (d.h. Abnahme der Komplexbindungskonstante um den Faktor 3).

Die Verbesserung der Komplexbindung ist allerdings noch nicht als endgültig zu betrachten, da die Spacerlänge des Cyclodextrindimers nicht exakt auf die Größe des Sensitizers abgestimmt ist: Mit dem Programm Alchemie III Tripos Associates, Moskau (Russland) wurde der Abstand zwischen den terminalen Aminogruppen des C-13-Spacers zu 1,64 nm bestimmt. Der Abstand zwischen dem tert-Butylbenzoylsubstituenten in Position C-3¹ und der Ethylgruppe in Position C-8¹ wurde auf 1,12 nm berechnet. Ein kürzerer Spacer, wie beispielsweise di-β-CD-(2N-A8), dessen Länge auf 1,2 nm berechnet wurde, könnte Erfolg versprechender sein.

Außerdem ist der Spacer nach diesen Berechnungen nicht gestreckt. Diese Tatsache erschwert die Komplexbildung. Es wird ein langes Zeitintervall benötigt, um

den 1:1 Komplex zwischen Sensitizer und Dimer zu bilden. Aus diesem Grund erfordern die Versuchsbedingungen möglicherweise noch eine Änderung der Temperatur bzw. eine Verlängerung der Reaktionszeit zwischen Dimer und Sensitizer. Zudem bleibt abzuwarten, in wieweit die Einführung eines zweiten tert-Butylbenzoylsubstituenten in Position C-8¹, der in der zweiten Kavität des Cyclodextrindimers Platz findet, die Bindungsaffinität erhöht.

Die Bindungsaffinität von Pd-Bacteriopheophorbidethylester mit dem als Referenz eingesetzten Cyclodextrin *monomer* (Methyl- β -CD) erhöhte sich durch Einführung eines tert-Butylbenzoylsubstituenten in Position C-3¹ um den Faktor 2 im Vergleich zum Ausgangsmolekül. Dieser Wert scheint im Vergleich zu der mit dem Dimer erzielten Affinitätssteigerung zu groß zu sein: Auch wenn beim Dimer im Vergleich zum Monomer der durch den zusätzlichen Einschluss der Ethylgruppe in Position C-8¹ des 3¹-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester erreichte Bindungsenergiezuwachs an sich gering ist, sollte er aber dennoch über eine Ausrichtung des Dimers insgesamt zu einem wesentlich stärkeren Bindungsenergiezuwachs führen als beim Monomer. Anzumerken ist hier jedoch, dass die Versuchsbedingungen zur Komplexbildung mit dem Monomer bzw. dem Dimer durch Anwendung verschiedener Temperaturprogramme sowie unterschiedlicher Cyclodextrinkonzentrationen (zehnfach höhere Konzentration des Monomers) direkte Vergleichsmöglichkeiten ausschließen. Der Überschuss an Monomer könnte zusätzlich zum Einschluss der tert-Butylbenzoylgruppe in Position C-3¹ den Einschluss der Ethylgruppe in Position C-8¹ durch ein zweites Monomer in Form eines 1:2 Komplexes (Sensitizer : Monomer) bewirken.

Die Bindungskonstanten von dem als Substrat eingesetzten TNS zu Cyclodextrinmonomer und Dimer unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant. Auch dies entspricht nicht den Erwartungen. Normalerweise sollte die Bindungskonstante des TNS zum Dimer kleiner (d.h. eine geringere TNS-Menge zur Halbsättigung des Dimers entspricht einer größeren Affinität zum Dimer) als zum Monomer sein. Möglicherweise handelt es sich jedoch auch hier um 1:2 Komplexe zwischen TNS und Methyl- β -Cyclodextrin (Monomer), da die gewählte Konzentration des Methyl- β -Cyclodextrin zu hoch lag.

Da aber die zwischen Methyl- β -Cyclodextrin und Sensitizer maximal erzielte Verringerung der Komplexbindungskonstanten für eine zu geringe Affinität zwischen Monomer und Sensitizer spricht, und somit keine wirkungsvolle Entgiftung eines

Chemotherapeutikums erlaubt, ist auf die Wiederholung des Experiments mit geringeren Methyl- β -Cyclodextrinkonzentrationen verzichtet worden.

Außer durch Variation der Anzahl der verknüpften Glucosemoleküle im Cyclodextrinmonomer bietet das Monomer keine weiteren Möglichkeiten der Anpassung an den Sensitizer.

Mit mindestens einer Ankergruppe versehene Pd-Bacteriopheophorbid-derivate: Phototoxizitäten und Resorptionsgeschwindigkeiten im Zellversuch

Wider Erwarten zeigt der 3¹-tert-Butylbenzoyl-ethyl-Pd-Bacteriopheophorbid-ester eine höhere Phototoxizität in OAT-Tumorzellen als sein Ausgangsprodukt, obwohl geringere Mengen von den Tumorzellen resorbiert werden. Diese Eigenschaft ist für die praktische Anwendung eines Sensitive in der **Photodynamischen Therapie** von Vorteil, da bereits bei geringerer Dosierung des Sensitive eine höhere Phototoxizität erreicht werden kann und somit auch die Nebenwirkungen reduziert werden können.

Die Ursache für die erhöhte Phototoxizität ist in der Erhöhung der intramolekularen Polarität zu sehen. Durch Einführen apolarer Substituenten an der apolaren Seite der Bacteriopheophorbide kann offenbar eine Erhöhung der intramolekularen Polarität erreicht werden (Abb. 45). Die intramolekulare Polarität ist von Bedeutung, damit sich die Sensitive-Moleküle senkrecht zur Zellmembran orientieren, um in diese zu inserieren. Eine sichere Positionierung des Sensitive in der Zellmembran ist wichtig, da die Zellmembran der Zielzelle (Tumorzelle) das für die **Photodynamische Therapie** empfindlichste Zellorganell darstellt.

Substituiert man dagegen 13²-Hydroxy-Pd-Bacteriopheophorbid-ester mit tert-Butylphenol in Position 17⁴ sowie mit tert-Butylbenzoylchlorid in Position 13², so nimmt die Phototoxizität stark ab. Bereits einer dieser Substituenten ist ausreichend, um diesen Effekt zu erzielen und die Phototoxizität eines zuvor äußerst potenten Sensitive komplett aufzuheben. Dies hängt im Wesentlichen mit dem Verlust der intramolekularen Polarität zusammen, die durch das Einführen eines apolaren Substituenten an der polaren Seite des Bacteriopheophorbids bewirkt wird.

Die UV/VIS-Spektren der aus den Zellen extrahierten Sensitive deuten zudem auf Aggregationseffekte des in Position 17⁴ bzw. 13² mono- bzw. disubstituierten 13²-Hydroxy-Pd-Bacteriopheophorbid-esters hin. Eine Ursache für die verringerte

Phototoxizität dieser Verbindungen ist somit auch darin zu sehen, dass bedingt durch die Aggregation Singulett-Sauerstoff nur in geringen Konzentrationen gebildet werden kann. Stattdessen wird ein großer Teil des absorbierten Lichts in Wärme umgewandelt. Zudem lassen die Absorptionsspektren erkennen, dass sich die Oxidationsneigung mit der Zahl der Substituenten vergrößert (28, 29).

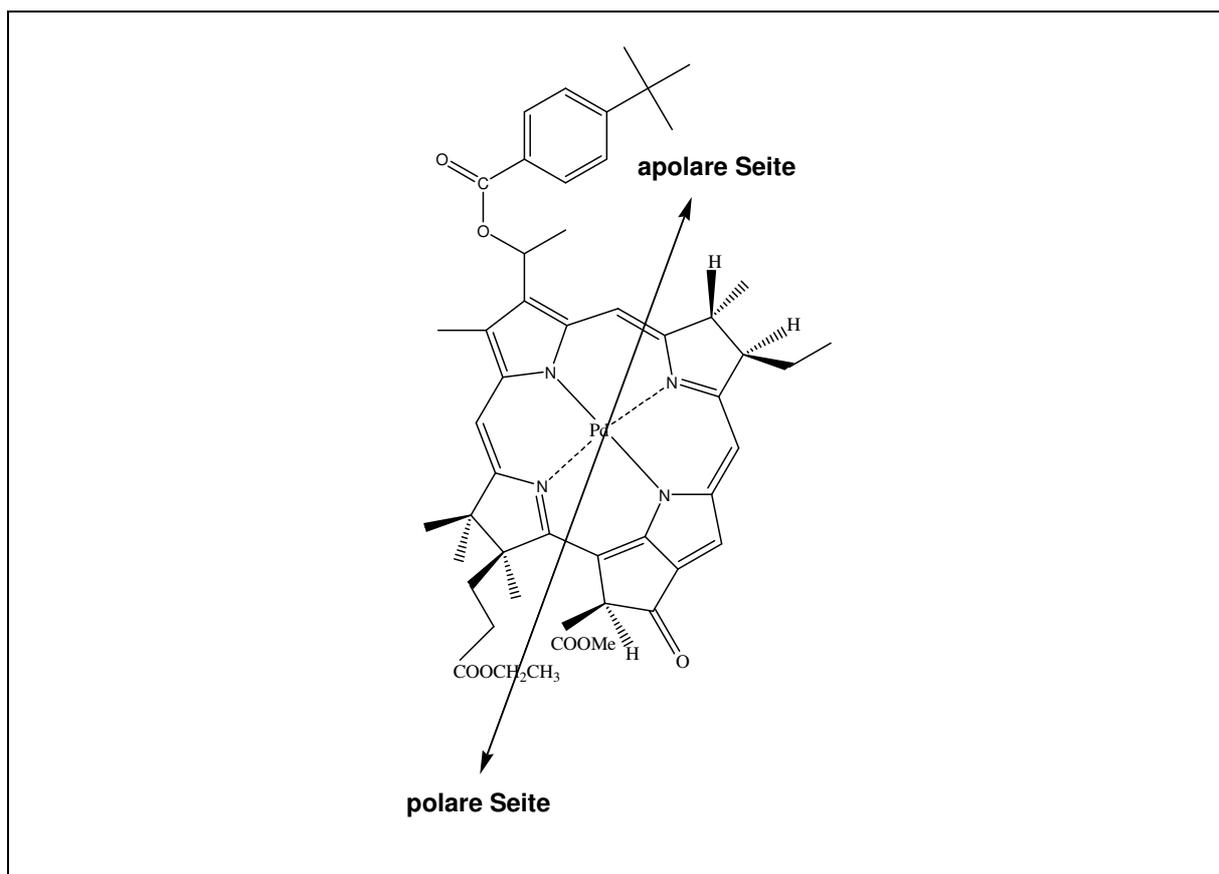


Abb. 45: Richtung des Dipolmomentes bei 3¹-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester [aus (84)]

Demzufolge ist eine zu starke Veränderung des von der Natur gelieferten Sensitizers nicht sinnvoll (22).

Alle Palladium-Bacteriopheophorbide-derivate lassen sich nur über ihre Phosphoreszenz einzelnen Zellkompartimenten zuordnen, da Palladium die Fluoreszenz quencht. Leider war im Rahmen dieser Arbeit eine Messung der Phosphoreszenz aus technischen Gründen nicht möglich. Vermutlich ist eine homogene Verteilung in der Zellmembran und den peripheren Vesikeln der Tumorzellen für die bessere

Phototoxizität des 3¹-tert-Butylbenzoyl-Pd-Bacteriopheophorbidethylester verantwortlich (54, 74).

Pd-Bacteriopheophorbidderivate: Möglichkeiten zur Einführung einer zweiten Ankergruppe

Zusätzlich zur Ankergruppe in Position C-3¹ erscheint das Anbringen einer zweiten Ankergruppe in Position C-8¹ sinnvoll, da für eine Komplexbildung mit einem Cyclodextrindimer mindestens zwei Ankergruppen erforderlich sind (10).

Ein möglicher Reaktionsweg führt über eine syn-Hydroxylierung von Chlorinen in Position 7 und 8 zur Oxidationsstufe der Bacteriochlorine (15, 38, 67, 70, 89a, 89c). Die durch diese Reaktion erhaltene Hydroxylgruppe in Position 8 lässt sich für eine Veresterungsreaktion mit einer geeigneten zweiten Ankergruppe nutzen. Diese Reaktionsfolge bietet eine Möglichkeit, die teuren, aber für die **Photodynamische Tumorthherapie** äußerst geeigneten Bacteriochlorophylle (55) aus den reichlich zur Verfügung stehenden Chlorophyllen zu synthetisieren. Die Rentabilität eines Verfahrens, das so viele Reaktionsschritte umfasst, ist jedoch fragwürdig. Daher wurde diese Möglichkeit in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Es muss somit nach einfacheren Synthesewegen zur Modifikation der C-3¹ und C-8¹-Position von Bacteriopheophorbiden gesucht werden, um den präparativen Aufwand zu reduzieren.

Aus diesem Grunde wurden 2,4-Di-(α -(Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrindimethylester [bzw. 2,4-Di-(α -(Hydroxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester] und Etio-porphyrine als Modellsubstanzen gewählt.

Porphyrinderivate aus der Gruppe der Hemato- und Etioporphyrine als Modellsubstanzen zur Einführung einer zweiten Ankergruppe

2,4-Di-(α -(Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrindimethylester konnte nach einem speziellen Reaktionsverfahren in Gegenwart von Zinkacetat in Position C-2 (entspricht C-3¹ bei Bacteriopheophorbiden) und C-4 (entspricht C-8¹ bei Bacteriopheophorbiden) mit tert-Butylphenol zum 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester (DP) disubstituiert werden. Die Synthese erfolgt über die Erzeugung eines konjugierten Carbokations nach Abspaltung der Methoxygruppen in Gegenwart von Zinkacetat, gefolgt von einem zweifach nukleophilen Angriff durch tert-Butylphenol. Über den herkömmlichen Weg via 2,4-Di-(α -(Brom-)ethyl-)DP als Zwischenprodukt mit anschließender Substitution der Bromatome durch tert-Butylphenol lassen sich nur Ausbeuten unter 20% erzielen, da eine sehr komplexe Mischung verschieden substituierter Bromderivate entsteht, die sich nur äußerst schlecht aufreinigen lässt.

Diese Methode eignet sich nur zur Darstellung des 2,4-Di-(α -Cyclohexyloxy-)ethyl-)DP, dessen Aufreinigung auch äußerst schwierig ist. Allerdings kann nach Reinigung über einer Kieselgelsäule die Bildung bisher unbekannter Monovinylhematoporphyrinderivate beobachtet werden, die wahlweise in Position 2 oder 4 eine Vinylgruppe enthalten. Sie ist durch Eliminierung von Cyclohexanol entstanden. Eine genauere Charakterisierung dieser Substanzen steht noch aus. Englische Forschungsgruppen konnten allerdings zeigen, dass diese Monovinylhematoporphyrinderivate im Vergleich zum Hematoporphyrinderivat eine wesentlich höhere Phototoxizität *in vitro* zeigen (8).

Auch Etioporphyrine können in meso-Position in Gegenwart von Zinkacetat über die Zwischenstufe eines konjugierten Carbokations mit N-Methyl-4-hydroxypiperidol substituiert werden. Dabei erfolgt die Substitution der Dimethylaminogruppe von meso-N,N-Dimethylaminomethyletioporphyrin I aller Wahrscheinlichkeit nach über einen nukleophilen Angriff des Sauerstoffatoms von N-Methyl-4-hydroxypiperidol, so dass eine weitere Methylierung des Substituenten mit Methyljodid unter Einführung einer positiven Ladung möglich ist.

Diese Synthesemethode sollte in erster Linie als Modell für die zweifache Substitution des 2,4-Di-(α -(Methoxy-)ethyl-)DP mit N-Methyl-4-hydroxypiperidol dienen, die sich auf diesem Wege allerdings nicht realisieren ließ.

2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)DP konnte jedoch mit geringerer Ausbeute in einer zweistufigen Reaktion über 2,4-Di-(α -(Brom-)ethyl-)DP als Intermediat synthetisiert werden. Allerdings erfolgt die Substitution mit N-Methyl-4-hydroxypiperidin mit großer Wahrscheinlichkeit nicht, wie gewünscht, über das Sauerstoffatom als angreifendes Nukleophil, sondern über das Stickstoffatom mit gleichzeitiger Einführung einer positiven Ladung am Stickstoffatom pro Substituent.

N-Methyl-4-hydroxypiperidin reagiert als Base mit dem 2,4-Di-(α -(Brom-)ethyl-)DP unter Bildung des Salzes von 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)DP. Dabei ist es von Vorteil, eine über 40 % HBr-Lösung in Eisessig zu verwenden, um einerseits die Reaktionszeiten zu verkürzen und andererseits die Hydrolyse des Dimethylesters zum N-Methylpiperidiniumcarboxylat durch kürzere Reaktionszeiten zu minimieren. Die Trennung beider Substanzen ist durch Zugabe von getrocknetem Methylenchlorid möglich, in dem sich der hydrolysierte Ester nicht löst. Zur Abtrennung von nicht reagiertem N-Methyl-4-hydroxypiperidin wird ein Überschuss an Methyljodid zugesetzt. Durch die Ausfällung des sich bildenden N,N-Dimethyl-4-hydroxypiperidiniumiodid und anschließende Filtrierung wurde reiner 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)DP hergestellt.

Möglicherweise könnte die Synthese von 2,4-Di-(α -(Oxy-4-N-Methylpiperidin-)ethyl-)DP über eine Reaktion des 2,4-Di-(α -(Brom-)ethyl-)DP mit N,N-Dimethyl-4-hydroxypiperidiniumiodid in trockenem Dioxan oder DMSO erfolgen, da nach Absättigung des Stickstoffes mit einer weiteren Methylgruppe das Sauerstoffatom der Hydroxygruppe im wasserfreien Milieu als stärkeres Nukleophil fungieren könnte. Alternativ wäre eine Aktivierung des 2,4-Di-(α -(Brom-)ethyl-)DP mit Triethylamin denkbar, gefolgt von einer Reaktion mit N-Methyl-4-hydroxypiperidin oder N,N-Dimethyl-4-hydroxypiperidiniumiodid. Hier sollte eine Substitution sowohl aus sterischer wie auch ladungsbedingter Abstoßung vorzugsweise über das Sauerstoffatom als angreifendes Nukleophil erfolgen.

Mit zwei Ankergruppen versehene Hematoporphyrinderivate: Bestimmung der Bindungskonstanten mit Cyclodextrindimeren

Die Bestimmung der Komplexbindungskonstante des mit zwei voluminösen Ankergruppen versehenen 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-dimethylester (DP) [2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)hematoporphyrindimethylester)] mit einem C-13-„gespacerten“-Cyclodextrindimer [di- β -CD-(2N-A4-C5-A4) (78)] ergab einen Wert von $4,5 \times 10^{-6}$ M. Das entspricht einer Steigerung der Bindungsaffinität um den Faktor 10 bzw. einer Abnahme der Komplexbindungskonstante um den Faktor 10 im Vergleich zu dem nicht substituierten Hematoporphyrindimethylester. Dies bedeutet, dass durch die Einführung zweier tert-Butylphenylsubstituenten wahrscheinlich ein synergistischer Effekt erzielt werden kann.

Die Steigerung der Bindungsaffinität kann noch nicht als endgültig betrachtet werden. Eine weitere Verringerung der Komplexbindungskonstante von $4,4 \times 10^{-6}$ M wird nach optimaler Anpassung der Spacerlänge an den Abstand der beiden tert-Butylphenoxygruppen im Hematoporphyrindimethylester möglich sein.

Außerdem ist eine vollständigere Monomerisierung der jeweiligen Cyclodextrine durch den Einsatz von geeigneteren Temperaturprogrammen wünschenswert. Dabei erscheint eine Verlängerung der Erwärmungszeit der mit Sensitizer versetzten Cyclodextrindimerlösung von vier auf z.B. zwölf Stunden bei 50°C erfolgversprechend (54a).

Vergleicht man die Bindungskonstanten von 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-) DP bzw. seines Ausgangsproduktes mit Cyclodextrinmonomer (Methyl- β -Cyclodextrin), so fällt auf, dass auch beim Cyclodextrinmonomer die zweifache Substitution zu einer Steigerung der Bindungsaffinität um den Faktor 8 führt. Auch dies lässt im Vergleich zur Verdoppelung der Bindungsaffinität nach Einführung eines tert-Butylbenzoylsubstituenten in Pd-Bacteriopheophorbidethylester einen synergistischen Effekt bei zweifacher Substitution vermuten.

Zudem ist die Affinität des Sensitizers zum Dimer nur maximal um den Faktor 2 ausgeprägter als zum Monomer. Hier findet sich eine ähnliche Tendenz wie bereits bei den Pd-Bacteriopheophorbidderivaten diskutiert. Vor allem die im Vergleich zu den Dimeren zehnfach höhere Monomerkonzentration lässt eine Komplexbildung in unterschiedlichen stöchiometrischen Verhältnissen vermuten.

Bei Verdoppelung der Sensitizerkonzentration erniedrigt sich die Affinität des TNS zum Dimer wider Erwarten um den Faktor 3. Dies lässt sich nur mit einer unvollständigen Reversibilität der Komplexbildung zwischen Dimer und Sensitizer (Inhibitor) bzw. TNS (Substrat) erklären. Erhöht man durch Verdoppelung der Sensitizerkonzentration die Anzahl der Komplexe zwischen Sensitizer und Dimer, so ist nach Zugabe von steigenden Konzentrationen von TNS zur Zeit der Fluoreszenzmessung wahrscheinlich noch keine vollständige Gleichgewichtseinstellung unter Verdrängung des Sensitiveers durch TNS erfolgt. Dies bedeutet, dass bei diesen Experimenten die Einstellung des Gleichgewichtes sehr zeitaufwendig sein kann. Eine Zeitunabhängigkeit besteht somit nicht. Aus diesem Grund ist es erforderlich, die Reihenfolge der Zugabe von Inhibitor (Sensitizer) und Substrat (TNS) genau einzuhalten. Normalerweise würde man zunächst das Substrat TNS mit dem Dimer reagieren lassen, um es anschließend mit dem Sensitizer als Inhibitor aus der Bindung zum Dimer zu verdrängen. Da aber die Aufnahme des Sensitiveers in die Kavitäten des Dimers zeitintensiv und temperaturabhängig ist, erscheint es hier notwendig, zuerst den Sensitizer mit dem Dimer bis zur vollständigen Gleichgewichtseinstellung reagieren zu lassen, und erst anschließend das Substrat TNS hinzuzufügen. Allerdings weist die Versuchsreihe mit doppelter Sensitizerkonzentration darauf hin, dass es insbesondere bei hohen Sensitizerkonzentrationen auch nach Zugabe des TNS noch sinnvoll ist, ein längeres Zeitintervall bis zur vollständigen Gleichgewichtseinstellung der Kompetitionreaktion einzuhalten und erst danach die Fluoreszenzen zu bestimmen.

Vergleichbare Kompetitionversuche mit 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)DP (5 μ M) als Inhibitor haben bisher zu keinen verwertbaren Ergebnissen geführt. Da der Dimethylpiperidiniumsubstituent über das Stickstoffatom anstatt wie gewünscht über das Sauerstoffatom am Hematoporphyrinringsystem befestigt ist, lassen sich über die Qualität dieser Ankerstrukturen gegenwärtig noch keine Aussagen machen.

Solange jede Ankergruppe eine positive Ladung trägt, erscheint eine wirksame Inkorporation in das Hohlraumsystem der verschiedenen Cyclodextrine nicht ohne weiteres möglich zu sein. Durch Steigerung der Lösungsmittelkonzentration von DMSO könnte ein sogenannter „dragging effect“ erzielt werden, über den die positiv geladenen Ankergruppen via Mobilisierung des intrakavitären Wassers durch DMSO

in die Kavitäten des Cyclodextrindimers gezogen würden.

Um über die Qualität dieser Ankerstruktur gültige Aussagen machen zu können, wird es erforderlich sein, die Synthesebedingungen so zu variieren, dass eine Bindung des N-Methyl-4-hydroxypiperidins an die Peripherie des Tetrapyrrolzyklus über das Sauerstoffatom anstatt über das Stickstoffatom erfolgen kann.

Wertung der erzielten Bindungskonstanten in Bezug zu den in der Literatur gefundenen Daten

Den Ergebnissen von Breslow und Chung (10) zufolge wurde durch das Einführen zweier tert-Butylbenzoylsubstituenten eine Steigerung der Komplexbindungskonstante in der Größenordnung von 4 Zehnerpotenzen erwartet.

Das Nichterzielen dieses Wertes kann folgendermaßen erklärt werden: Zwar sind die von Breslow und Chung verwendeten Clamshell-Dimere über zwei Spacer miteinander verbunden, so dass bedingt durch die Starrheit des Moleküls über eine Entropieverringerng eine Steigerung der Bindungsaffinität erwartet werden kann. Jedoch ist über die genaue Methode der Bestimmung der Bindungskonstanten von Breslow und Chung nichts bekannt. Möglicherweise kommt die Abweichung in den ermittelten Bindungskonstanten durch unterschiedliche Bestimmungsmethoden zustande.

Außerdem bleibt noch die exakte Größenabstimmung der Cyclodextrindimere auf die inkorporierten Sensitizer abzuwarten.

Eventuell müsste auch das Temperaturprogramm noch weiter optimiert werden (54a). Hierzu gibt es in der gängigen Literatur bisher keine Angaben.

Für die Zukunft wünschenswert wäre die Messung der Komplexbindungskonstante über die Bestimmung der Hochfeldverschiebung der Wasserstoffprotonen innerhalb der Cyclodextrindimere mit Hilfe von $^1\text{H-NMR}$ und ROESY-Messungen (83). Diese Messungen würden zum einen eine exakte Aussage über den inkorporierten Teil des Moleküls gestatten und sind zum anderen unabhängig von den vorliegenden Inkorporationsgleichgewichten. Leider konnte eine solche Messung aus technischen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Porphyrinderivate aus der Gruppe der Etio- bzw. Hematoporphyrine: Phototoxizitäten und Resorptionsgeschwindigkeiten im Zellversuch

In meso-N,N-Dimethylaminomethyl-Etioporphyrin I wurde die Dimethylaminogruppe durch N-Methyl-4-hydroxypiperidol bzw. N,N-Dimethyl-4-hydroxypiperidinium substituiert. Die dadurch erhaltenen Sensitizer zeigen eine verringerte Aufnahme in die OAT-Zellen gekoppelt mit einer gesteigerten Phototoxizität. Anhand dieser Ergebnisse kann ein bereits bei den substituierten Pd-Bacteriopheophorbinderivaten sich herauskristallisierendes Prinzip bestätigt werden. Während bei den Pd-Bacteriopheophorbinderivaten die bereits im Molekül inhärente Polarität durch Einführen zusätzlicher Substituenten wahlweise verstärkt bzw. aufgehoben werden kann, ist das Etioporphyrin I ein komplett symmetrisches Molekül. Durch gezielte asymmetrische Substitution in meso-Position von Etioporphyrin lässt sich die intramolekulare Polarität schrittweise erhöhen. Während die Ausgangsverbindung in photodynamisch weitgehend inerten Zellkompartimenten wie beispielsweise dem Zytoplasma angereichert wird, erreicht man parallel zur Zunahme der intramolekularen Polarität eine Umverteilung in Richtung Zellmembran mit gleichzeitiger Zunahme der Phototoxizität. Diese Umverteilung kann mit Hilfe der Fluoreszenzauflichtmikroskopie, die Hinweise auf die intrazelluläre Lokalisation gibt, sichtbar gemacht werden.

Diese Substitutionen sind letztlich in der Lage, ubiquitär in der Zelle verteilte Sensitizer in Sensitizer mit spezifischer Ortspräferenz, z.B. zur Zellmembran, zu überführen.

Auch nimmt die Monomerisierung der Moleküle erkennbar an den schmalen Banden der UV-VIS Absorptionsspektren mit ihrer Ladung zu. Dies führt zu einer weiteren Phototoxizitätssteigerung.

Während negativ geladene Moleküle wie beispielsweise Tetrasulfophthalocyanine ihre Phototoxizität immer außerhalb der Zelle entfalten, reichern sich positiv geladene Moleküle im Bereich der negativ geladenen Zellmembran an bzw. werden teilweise ins Zytoplasma aufgenommen. Einige dieser positiv geladenen Sensitizer weisen aus diesem Grund eine unerwünschte Dunkeltoxizität auf (59). Bei den Etioporphyrinderivaten jedoch kann bis zu 20 Stunden nach Zellexposition keine Dunkeltoxizität nachgewiesen werden.

Die Aufnahme in OAT-Zellen nimmt vom Hematoporphyrindimethylester über 2,4-Di-(α -Cyclohexyloxy-)ethyl-)DP bzw. 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)DP zum 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)DP zu. Auch die Phototoxizität steigt entsprechend dieser Reihenfolge. Somit findet sich auch hier das Prinzip bestätigt, dass mit zunehmender intramolekularer Polarität die Phototoxizität stark zunimmt.

Die Aufnahmekinetiken der substituierten Sensitizer sind sehr unterschiedlich: Während 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)DP bereits nach 5 Minuten das Aufnahmemaximum erreicht, zeigt 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)ethyl-)DP eine langsame und kontinuierliche Inkorporation in die OAT-Zellen. Die Unterschiede sind wahrscheinlich auf die positive Ladung von 2,4-Di-(α -(N-Methyl-4-hydroxypiperidinium-)ethyl-)DP zurückzuführen.

Beim Vergleich der Phototoxizitäten lässt sich für die Etioporphyrinderivate in Abgrenzung zu den Hematoporphyrinderivaten folgendes feststellen:

Für die Etioporphyrinderivate konnte gezeigt werden, dass mit steigender intramolekularer Polarität trotz verminderter Sensitizeraufnahme in die Tumorzellen die Phototoxizität zunimmt. Bei den Hematoporphyrinderivaten dagegen geht die bei steigender intramolekularer Polarität nachweisbare Phototoxizität mit einer steigenden Sensitizeraufnahme in die Zellen einher.

Daraus lässt sich wiederum schlussfolgern, dass die aufgenommene Sensitizermenge nicht nur von der intramolekularen Polarität sondern auch von anderen Parametern wie z.B. sterischen Faktoren abzuhängen scheint.

Resorptionsgeschwindigkeit von mit zwei Ankergruppen versehenen Hematoporphyrinderivaten vor und nach Einschluss in ein Cyclodextrindimer [di- β -CD-(2N-A4-C5-A4)]

Zum Schluss wurde das Resorptionsverhalten des in ein Cyclodextrindimer als Carriersystem eingeschlossenen mit zwei Ankergruppen versehenen Sensitizers in Gegenwart von Tumorzellen untersucht. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die Stabilität des Einschlusskomplexes aus Cyclodextrindimer und Sensitizer unter *in vitro* Bedingungen zu testen. Die Tumorzellen werden in diesem Versuch als Modell für die Zellen des menschlichen Körpers eingesetzt. Dieser Versuch soll erste Hinweise für das Verhalten des Chemotherapeutikums *in vivo* liefern, um die auch bei Einsatz eines Carriersystems verbleibenden systemischen Nebenwirkungen besser einschätzen zu können. Optimal wäre eine so stabile Einschlussverbindung, dass kein freier Sensitizer zur Aufnahme in die Zellen der Zellkultur mehr vorliegt.

Das Ergebnis dieses Versuchs erlaubt folgende Schlussfolgerungen: Der Einschluss von mit zwei Ankergruppen versehenen 2,4-Di-(α -(4-tert-Butylphenoxy-)deutero-porphyrin-IX-dimethylester (DP) in das C-13-„gespacertes“-Cyclodextrindimer [di- β -CD-(2N-A4-C5-A4)] (78) bewirkt eine Reduktion der Resorptionsgeschwindigkeit dieses Sensitizers durch die OAT-SCLC-Zellen nach 20 Stunden auf 15 % im Vergleich zum freien Sensitizer.

Nach Zerstörung des Komplexes aus Cyclodextrindimer und Sensitizer durch das Enzym Cyclodextrinase und anschließender Bestrahlung kann zudem durch die nun in der Zellkultur wieder messbar ansteigende Phototoxizität bewiesen werden, dass der Sensitizer, trotz der für den Einschluss in ein Dimer über einen längeren Zeitraum erforderlichen Temperaturerhöhung, seine phototoxischen Eigenschaften beibehalten hat.

Die durch den Einschluss erzielte Verringerung der Resorptionsgeschwindigkeit des freien Sensitizers auf 15 % wird sich richtungsweisend für zukünftige Forschungen in der Pharmakotherapie auswirken. Eine Verbesserung sowohl der **Photochemotherapie** als auch der **Chemotherapie** im Allgemeinen kann nur erwartet werden, wenn die verwendeten Chemotherapeutika in eine passende Hülle (als Carrier) eingeschlossen werden, wie beispielsweise die der Cyclodextrindimere, die eine

Aufnahme dieser eingeschlossenen Chemotherapeutika in Körperzellen wirkungsvoll unterbindet und nur am Tumor aufgebrochen wird. Weitere Verbesserungen können durch genaue Anpassung der Länge des Spacers auf den Abstand der beiden Ankergruppen im Sensitizer erreicht werden. Bei der Bindungskonstante von $4,4 \times 10^{-6}$ Mol handelt es sich somit um einen vorläufigen Wert.

Nachfolgende Experimente mit Taxol geben Hinweise darauf, dass ein nahezu vollständig inerte Transport des Chemotherapeutikums bis an den Tumor möglich scheint: Die exakte Anpassung des Spacers auf die beiden Benzoesäureringe im Taxol bewirkt einen beinahe vollständigen Ausschluss der Zellaufnahme, erkennbar an der auf *weniger als 10 %* verringerten Zelltoxizität (54a). Die Bindungskonstante für Taxol mit dem C-13 „gespacerten“ Dimer liegt bei 2×10^{-7} Mol.

Dies bedeutet, dass durch die exakte Adaptation des Cyclodextrindimers auf das einzuschließende Chemotherapeutikum, verglichen mit den in dieser Arbeit erzielten Bindungskonstanten, eine Steigerung der Bindungsaffinität um den Faktor 20 erwartet werden darf.

Weiterhin lassen die Zellversuche mit den in ein Cyclodextrindimer eingeschlossenem Taxol erzielten Bindungskonstanten vermuten, dass die von Breslow und Chung (10) erreichte vermeintlich sehr hohe Stabilität der Einschlusskomplexe *in vivo* zur Entgiftung der Chemotherapeutika wahrscheinlich gar nicht erforderlich ist.

4.1.3 Ausblick

Die Erkenntnisse über die Prinzipien zur Erhaltung bzw. Steigerung der Polarität und damit Erhöhung der Phototoxizität haben gezeigt, wie ein hypothetisches Sensitizermolekül aussehen sollte, das alle bisher diskutierten Kriterien in sich vereint (Abb. 46): Zur stabilen Verankerung des Sensitive in der Zellmembran werden zwei Moleküle Glucosamin an der polaren Seite des Sensitive benötigt, da Aminozucker nachweislich eine hohe Affinität zur Zellmembran haben (45). Die Synthese von 2,4-Di-(α -Methoxy-)ethyl-)deuteroporphyrin-IX-diglucoamid wurde bereits über eine Aktivierung der Carboxylgruppen via Triethylamin und Einführung des Pentafluorphenylesters als potente Abgangsgruppe im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und die Substanz vorläufig charakterisiert.

Durch diese Modifikation würde eine drastische Reduktion der zur Zerstörung einer Tumorzelle benötigten Sensitizer von 10^8 Molekülen auf 10^6 erzielt werden (44, 53,

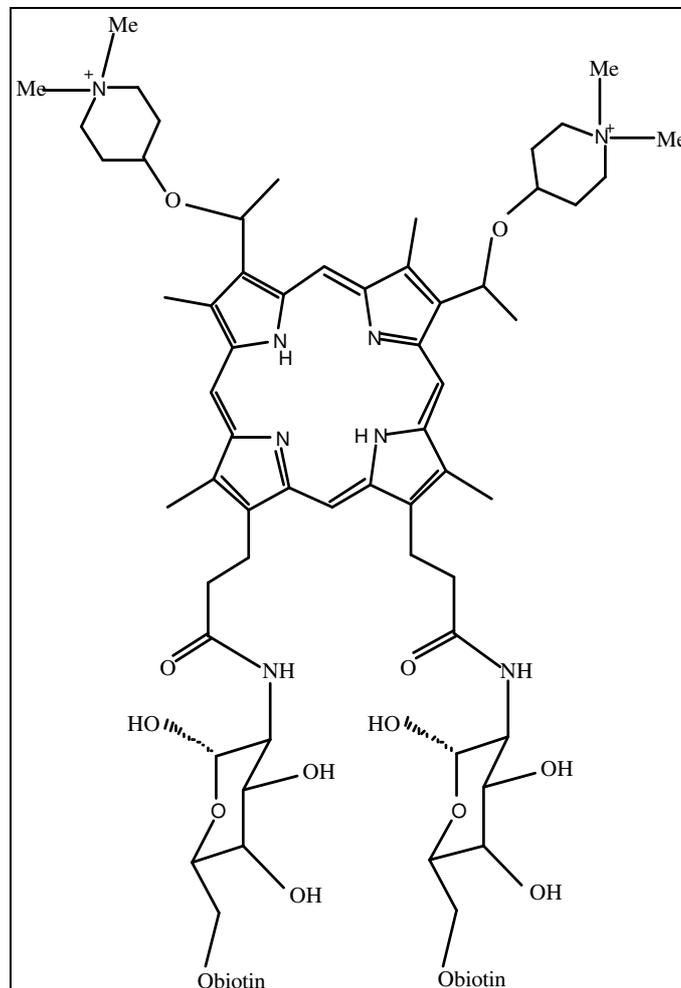


Abb. 46: Modell eines zukünftigen Sensitizers

86). Durch die Einführung von zwei über das Sauerstoffatom gebundene die N-N-Dimethyl-4-hydroxypiperidiniumsubstituenten in Position 2 und 4 von Hematoporphyrindiglucoamin werden zwei wirkungsvolle Ankergruppen zur Verkapselung in Cyclodextrindimeren geschaffen. Gleichzeitig sollte durch die positive Ladung dieser Substituenten eine Erhöhung der intramolekularen Polarität bewirkt werden. Zudem wird die positive Ladung zu einer Anreicherung an der negativ geladenen Zellmembran führen. Zusätzlich wird durch die Biotinylierung des Sensitizers mit Hilfe von Avidin als Brückenstruktur ein gezieltes Andocken an die mit biotinyliertem Antikörper markierten Tumorzellen gewährleistet. Dies hätte den Vorteil, dass die Hüllmoleküle nicht mehr biotinyliert werden müssten, und somit keine Scherkräfte auf

die Hülle wirken würden, die zu einer verringerten Bindungskonstante mit dem Gastmolekül führen könnten. Da zudem jedes Avidin über vier Bindungsstellen zum Biotin verfügt, und jeder Sensitizer über zwei Glucosamin gebundene Biotine, sollte dies zu einer multiplikativen Anreicherung von Sensitizermoleküle in der Größenordnung von 10^8 pro Tumorzelle führen (5, 60). Weiterführende Experimente zur multiplikativen Anreicherung eines biospezifischen Carriersystems am Tumor sind jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Durch die direkten Metallierungen der Bacteriopheophorbide mit Palladium und Platin wurden Sensitizer mit hervorragenden photodynamischen Eigenschaften zum zukünftigen Einsatz in der Pharmakotherapie synthetisiert. Der nächste Schritt wird die Einführung von dreiwertigem Gold in Bacteriopheophorbide sein. Dies sollte mit Hilfe von $\text{Au}(\text{Cl})_3$ bzw. $\text{Au}(\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3)_3$ in Pyridin oder Trichlorbenzol als Lösungsmittel gelingen. Die dazu durchgeführten Vorversuche sprechen für den Erfolg dieser Synthesemethode.

Durch die direkten Metallierungen mit verschiedenen Edelmetallen wird sich möglicherweise eine weitere Option innerhalb der **Photodynamischen Therapie** ergeben (Abb. 47): Mit Hilfe eines auf den Tumor fokussierten Röntgenstrahlbündels könnte die gezielte Zerstörung des zuvor systemisch verabreichten Sensitive unter Metallfreisetzung einschließlich seiner Liganden erfolgen. Diese Verbindungen wären anschließend in der Lage, selektiv im Tumor cis-Platin-analoge Wirkung zu entfalten. Diese neue Variante der **Photodynamischen Therapie** wäre in der Lage die entscheidende Limitierung durch die zu geringe Eindringtiefe des sichtbaren Lichtes zu überwinden.

Weitere Untersuchungen in diese Richtung müssen zukünftigen Forschungsarbeiten vorbehalten bleiben.

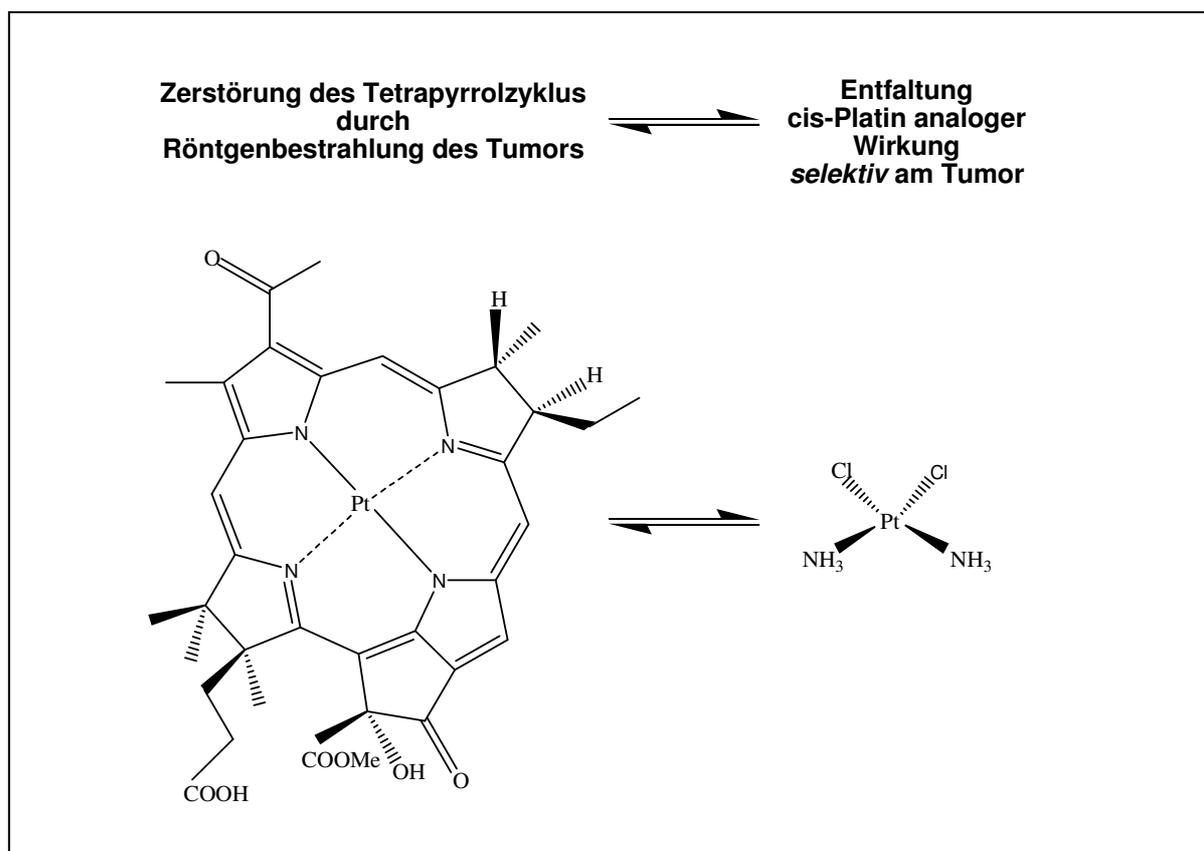


Abb. 47: Prospektive Einsatzmöglichkeit von Pt-Bacteriopheophorbid

Überdies ist die Bedeutung der Ergebnisse dieser Arbeit vor allem darin zu sehen, dass die unter der Zielsetzung der Bildung inerter Einschlussverbindungen mit einem biospezifischen Carriersystem präsentierten präparativen Methoden auch auf andere weitaus toxischere Chemotherapeutika übertragbar sein sollten.

Ferner sollten sich die Prinzipien, die für die Polaritätserhaltung der Porphyrinoide aufgestellt und untersucht worden sind, auch auf andere häufig zur Tumorthherapie eingesetzte Chemotherapeutika anwenden lassen.

Bei der Analyse der chemischen Strukturen solcher zur Zeit verwendeten Chemotherapeutika, gibt es einige vielversprechende Substanzen. Es besteht die Hoffnung, dass sie unter Erhalt ihrer cytotoxischen Eigenschaften derart modifiziert werden können, dass eine wirkungsvolle Verkapselung erzielt wird.

Beispiele für solche gegenwärtig eingesetzten Substanzen sind Taxol (Abb. 48), Vinblastin, Vincristin und Vindesin (s. auch Abb. 50).

Diese Chemotherapeutika beeinflussen die Polymerisation von Mikrotubuli und greifen auf diese Weise in den Mitosezyklus ein. Ein besonderer Vorteil dieser Substanzen ist, dass sie in der Lage sind, Chemoresistenzen in zuvor behandelten malignen Tumoren aufzuheben. Als Nebenwirkung weisen sie jedoch eine hohe Toxizität gegenüber Knochenmark, Nervengewebe, Leber und Magen-Darmepithel auf.

Aus diesem Grund erscheint es von unschätzbarem Wert, gezielte Mechanismen zur selektiven Aufnahme in Tumorzellen zu entwickeln

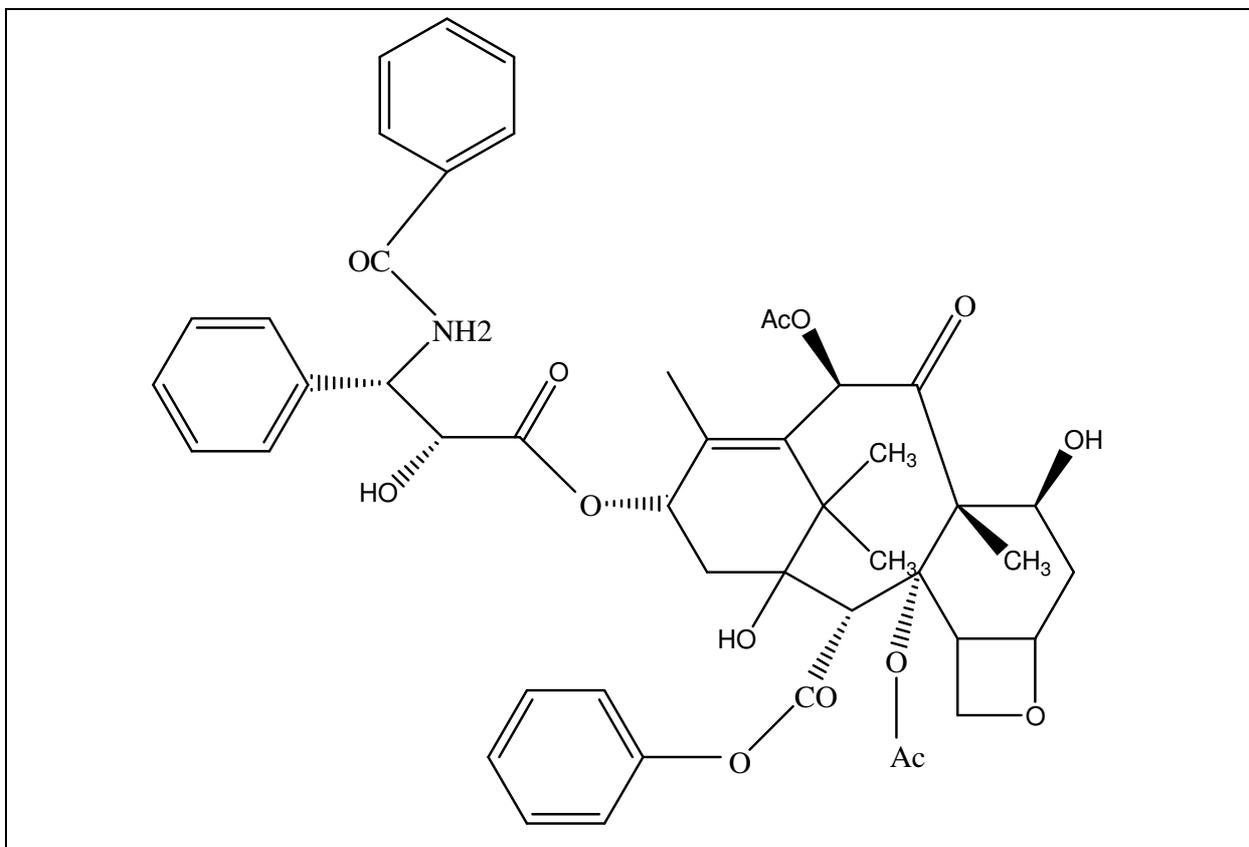


Abb. 48: Natürliches Chemotherapeutikum: Taxol

Von Taxol ist inzwischen bekannt, dass es weitgehend inerte Komplexe mit einem C13-„gespacerten“-Cyclodextrindimer bildet. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit erreichten Reduktion des freien Sensitizers auf 15 % in der Zellkultur (Abb. 49), konnte durch den zwischen Taxol und Cyclodextrindimer gebildeten Einschlusskomplex eine Reduktion der Menge an nicht gebundenem Taxol auf *kleiner* 10 % erzielt werden (54a). Diese Tatsache weist darauf hin, dass auch im menschlichen Körper mit Hilfe der durch die Cyclodextrindimere gebildeten stabilen Einschluss-

verbindungen ein weitgehend inerten Transport zum Tumor möglich sein wird. Die Bildung stabiler Einschlussverbindungen ist damit die erste und entscheidende Voraussetzung für eine **polyphasische Chemotherapie** mit reduzierten systemischen Nebenwirkungen und stellt eine richtungsweisende Innovation im Bereich der Pharmakotherapie dar.

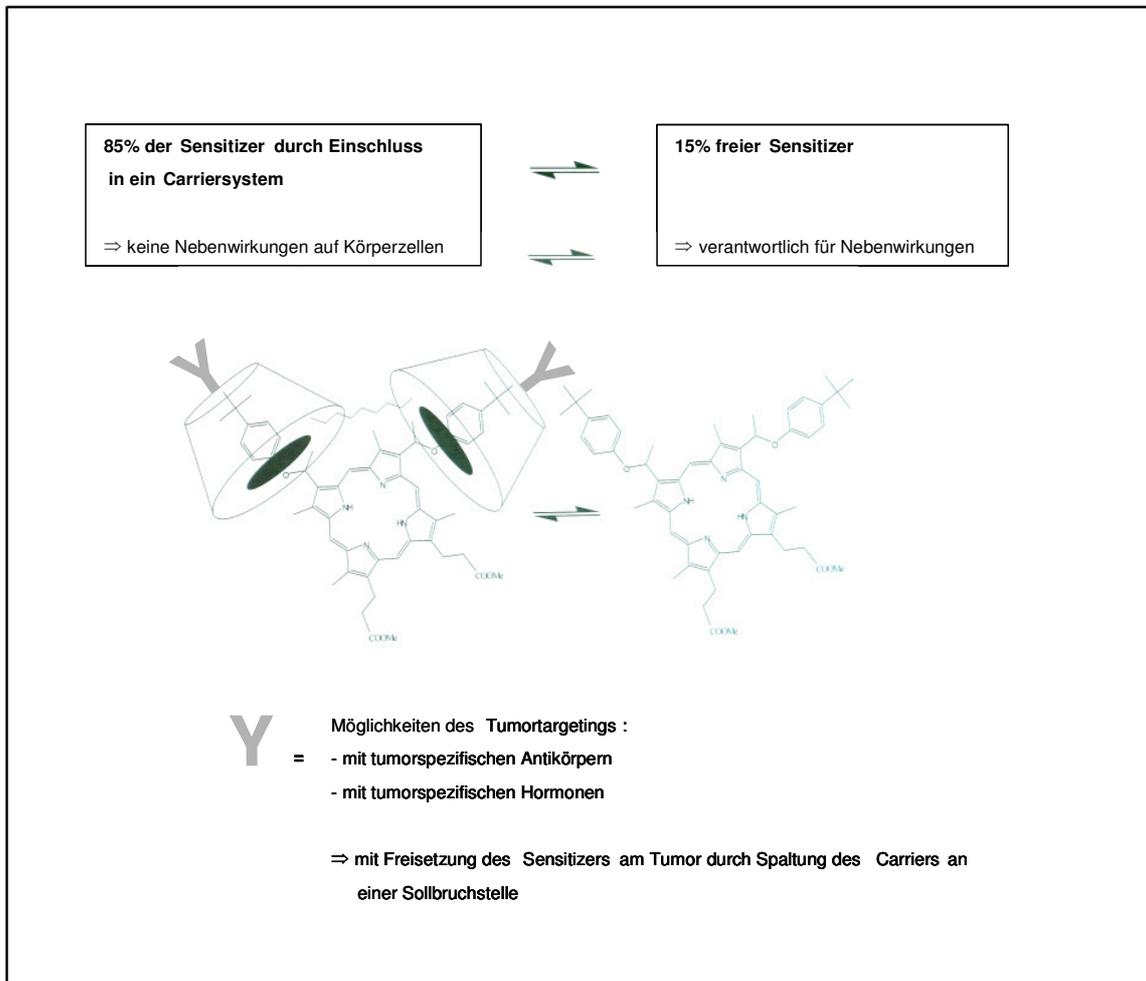


Abb. 49: Prinzipien eines biospezifischen Carriersystems: Verringerung der Menge des freien Sensitive durch Einschluss in ein Cyclodextrindimer auf 15 %

Taxol kann außerdem an den Benzoessäureringen modifiziert werden, ohne dass seine Toxizität verloren geht (96). Somit sollte es über eine Veränderung der intramolekularen Polarität möglich sein, die Zellaufnahme zu beschleunigen und die Dosis zu reduzieren.

Die ersten Versuche Vincaalkaloide (Abb. 50) und Colchicum-Alkaloide (Abb. 51) in Cyclodextrin-Carrier einzuschließen, waren bisher — im Gegensatz zu Taxol — aufgrund der fehlenden Ankerstruktur wenig erfolgreich. Deshalb erscheint es sinnvoll, an chemisch leicht zugänglichen Punkten entsprechende Ankerstrukturen in diesen Verbindungen einzuführen und anschließend ihre biologische Aktivität zu testen.

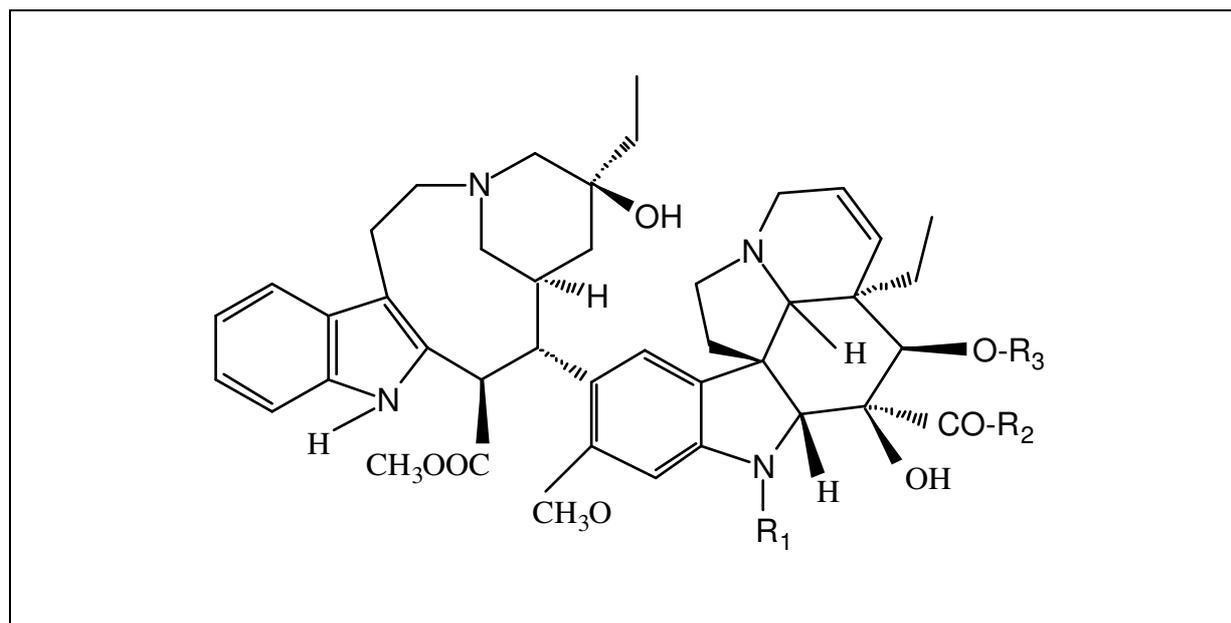


Abb. 50: Natürliche Chemotherapeutika:

Vinblastin:	R ₁ : CH ₃ ;	R ₂ : OCH ₃ ;	R ₃ : COCH ₃
Vincristin:	R ₁ : CHO;	R ₂ : OCH ₃ ;	R ₃ : COCH ₃
Vindesin:	R ₁ : CH ₃ ;	R ₂ : NH ₂ ;	R ₃ : H

Eine völlig neue Option zur Bildung stabilerer Einschlusskomplexe wäre die Synthese von Cyclodextrin*trimeren* anstelle von *Dimeren*. Berechnungen mit Molecular Modelling folgend, wird die Bindungsenergie von Cyclodextrin*trimeren* mit den entsprechenden Gastmolekülen auf 60 kcal/mol berechnet, im Vergleich zu 40 kcal/mol bei entsprechenden Cyclodextrin*dimeren*. Dies liegt unter anderem an der geringeren Flexibilität der Spacer sowie an der zu erwartenden stärkeren Entropieabnahme.

Möglicherweise eignen sich die Vinca- und Colchicumalkaloide von ihrer Stereochemie besser zum Einschluss in ein Cyclodextrintrimer.

Wenn die Bildung solcher inerte Komplexe mit Cyclodextrin oligomeren auch hier gelingen sollte (48, 49, 56), besteht die Hoffnung, dass die Anwendung dieses Verfahrens nicht nur auf die **Photodynamische Tumorthherapie** beschränkt bleibt (52), sondern viele hoch toxische, bisher nicht (z.B. Colchicin) oder nur bedingt (z.B. Taxol) als Zytostatika zugelassenen Chemotherapeutika ihre gezielte Wirksamkeit im Rahmen einer **polyphasischen Tumorthherapie** entfalten können, ohne die bisher in Kauf zu nehmenden Nebenwirkungen.

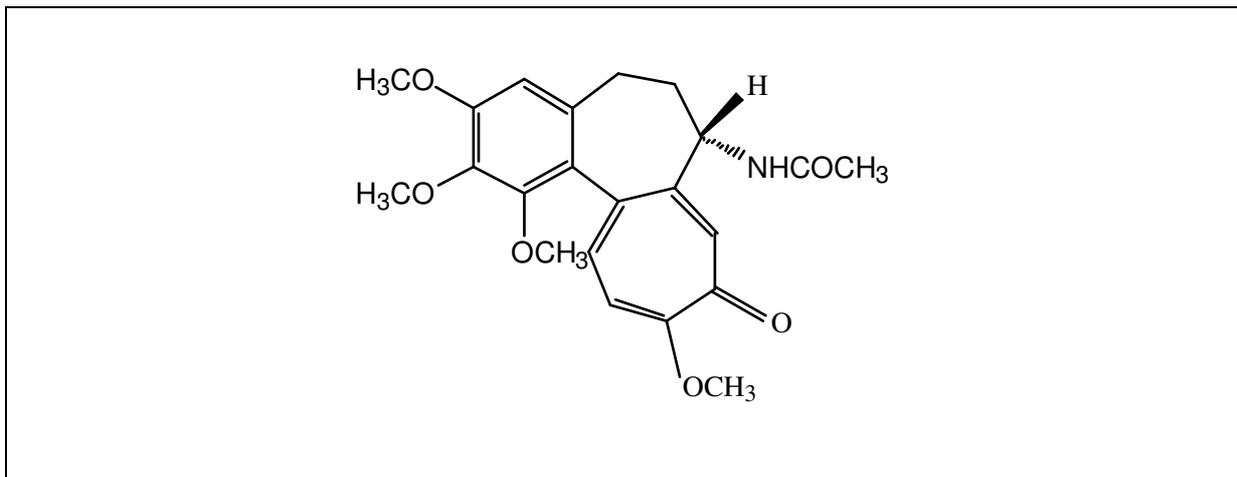


Abb. 51: Colchicin

Auf diese Ergebnisse aufbauende zukünftige Forschungsarbeiten sollten eine optimale Abstimmung eines Chemotherapeutikums auf ein Carriersystem zum Ziel haben, das gleichzeitig ein effektives Tumor-Targeting gewährleistet.

Gelingt dies, so wäre es möglich, die Schädigung des gesamten Organismus durch die derzeit existierende Chemotherapie entscheidend zu verringern und sie in eine tendenziell kurative Therapie umzuwandeln.

5. Zusammenfassung

Folgende Resultate lassen sich als Antworten auf die zu Beginn der Arbeit gestellten Fragen und als richtungsgebende Informationen für weitere Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der **Photodynamischen Therapie** herausstellen:

Um eine Einbindung in ein Cyclodextrindimer als biospezifisches Carriersystem zu erreichen, wurde die Peripherie von Porphyrinphorbiden, Bacteriopheophorbiden, sowie Hematoporphyrinen und Etioporphyrinen als Modellsubstanzen mit tert-Butylphenol, tert-Butylbenzoylchlorid, N-Methyl-4-hydroxypiperidin und Cyclohexanol als Ankerstrukturen substituiert.

Die Reaktionsprodukte wurden durch UV/Vis-, Massen- und NMR-Spektren nach chromatographischer Reinigung charakterisiert und auf Aufnahme und Phototoxizität in der Zellkultur untersucht.

Zugleich wurde bewiesen, dass sowohl die zelluläre Aufnahme als auch ein gezieltes Targeting der Zellmembran – als photodynamisch empfindlichstes Zellkompartiment – von der intramolekularen Polarität der Porphyrinoide abhängen. Ferner wurde erstmalig die *direkte* Metallierung des Tetrapyrrolzyclus von Bacteriopheophorbiden und Pheophorbiden mit Palladium und Platin realisiert und damit potentiell für die Pharmakotherapie einsetzbare Sensitizer entwickelt.

Durch Einführung der oben erwähnten Ankergruppen konnte die Bindungsaffinität zwischen Cyclodextrindimer und Sensitizer erhöht werden: Bereits durch Einführung einer Ankergruppe in Form von tert-Butylbenzoyl in Position C-3¹ von Pd-Bacteriopheophorbidethylester wird die Bindungsaffinität zu einem C-13-„gespacerten“-Cyclodextrindimer [di-β-CD-(2N-A4-C5-A4)] um den Faktor 3 erhöht. Weitere Substitutionen mit tert-Butylphenol in Position C-2 und C-4 von 2,4-Di-(α-(Methoxy)ethyl)deuteroporphyrin-IX-dimethylester (entspricht Position C-3¹ und C-8¹ der Bacteriopheophorbide) erhöhen die Affinität um den Faktor 10. Dies entspricht einer Verringerung der Komplexbindungskonstante auf $K = 4,5 \times 10^{-6}$ M. Dabei ist das Cyclodextrindimer selbst *noch nicht* auf den Substituentenabstand optimiert.

Durch den Einschluss des 2,4-Di-(α-(4-tert-Butylphenoxy)ethyl)deuteroporphyrin-IX-dimethylester in das Cyclodextrindimer konnte dennoch bereits eine Reduktion der Aufnahme des Sensitive in Zellen einer Zellkultur (OAT) auf 15 % im Vergleich zum freien Sensitizer erzielt werden.

Auf Therapiebedingungen übertragen würde dies eine erhebliche Verringerung der Toxizität des Sensitive (bzw. eines Chemotherapeutikums) für die Körperzellen bedeuten. Als Folge davon wäre eine entscheidende Reduktion der Nebenwirkungen für den Patienten zu erwarten.

6. Literaturverzeichnis:

- (1) Antlsperger G.; Schmid G. (1996): Toxocological comparison of cyclodextrins
Proc. 8th International Symposium on Cyclodextrins, Budapest, 149-156
- (1a) Bachowski G.J.; Ben-Hur E.; Girotti A.W. (1991): Phthalocyanine sensitized lipid peroxidation in cell membranes: Use of cholesterol and azide as probes of primary photochemistry
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 9, 307-321
- (2) Bagshawe K. D. (1994): Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT) and related concepts
Cell-Biophysics, 24-25, 83-91
- (3) Bahr U.; Karas M.; (1992): Massenspektrometrische Analyse großer Biomoleküle durch Matrix-unterstützte Laserdesorption
Spektrum der Wissenschaft, 5, 19-20
- (3a) Balchum O.; Doiron D.R.; Huth G.C. (1984): Photoradiation Therapy of endobronchial lung cancers employing the photodynamic action of hematoporphyrin derivative
Laser Med. Surg., 4, 13-30
- (3b) Baxter L.T.; Jain R.K. (1996): Pharmacokinetic analysis of the microscopic distribution of enzyme conjugated antibodies and prodrugs: comparison with experimental data
Br. J. Cancer, 73, 447-456
- (4) Baumgartner R.; Fuchs N.; Jocham D.; Stepp H.; Unsöld E. (1992): Pharmacokinetics of fluorescent Polyporphyrin Photofrin II in normal rat tissue and rat bladder tumors
Photochemistry and Photobiology, 55, (4), 569-574
- (5) Bayer E.A.; Wilchek M. (1980): The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology
Methods of Biochemical Analysis, 26, 2-45

- (5a) Bekers O.; Kijtendaal E.V.; Beijnen J. H.; Buit A.; Underberg W.J.M. (1991): Cyclodextrins in the Pharmaceutical Field
Drug Development a. Industrial Pharmacy, 17 (11); 1503-1549
- (5b) Benesi H.; Hildebrand J.H.(1949): Spectral photometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons
J. Am. Chem. Soc., 71, 2703
- (6) Bellnier D.A.; Henderson B.W.; Pandey R.K.; Potter W.R.; Dougherty T.J. (1993): Murine pharmacokinetics and antitumor efficacy of the photodynamic sensitizer 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinylpyropheophorbide a
Photochem. Photobiol. B: Biol., 20, 55-61
- (7) Bonnett R. (1994): Discussion Remarks, IPA-Congress Amelia Island, USA
- (8) Bonnett R. (1994): New photosensitizers for the photodynamic therapy of tumors
SPIE Conf. Proc., 2078, 74-90
- (9) Bosslet K.; Czech P.L.; Sedlacek H.H.; Schuermann M.; Seemann G. (1992): Molecular and functional characterization of a fusion protein suited for tumour specific prodrug activation
Br. J. Cancer, 65, 234-238
- (10) Breslow R.; Chung S. (1990): Strong binding of ditopic substrates by a doubly linked occlusive C₁ "clamshell" as distinguished from an aversive C₂ "love-seat" cyclodextrin
J. Am. Chem. Soc., 112, 9659-9660
- (11) Breslow R.; Halfon S.; Zhang B. (1995): Molecular recognition by cyclodextrin dimers
Tetrahedron, 51, 377-388
- (12) Brockmann H. (1992): Darstellung von Bacteriopheophorbid-c-methylester ausgehend vom Chlorophyllderivat: Chlorin-e₆-methylester
Diplomarbeit, Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld
- (13) Campbell R.C.; Statistics for biologists
Cambridge University Press, 1974

-
- (14) Chang C. K.; Sotiriou C.; Weishih W. (1990): Synthetic approaches to long-wavelength absorbing photosensitizers: Porphyrinone and Derivatives
SPIE, 1203, 281-286
- (15) Chang K.C.; Sotiriou C.; Weishih W. (1986): Differentiation of bacteriochlorin and isobacteriochlorin formation by metallation. High yield synthesis of porphyrindiones via OsO₄ oxidation
J. Chem. Soc. Chem. Commun., 548, 1213-1215
- (16) Christen H.R.; Vögtle F.; Organische Chemie; Band I
Otto Salle Verlag, Frankfurt am Main, 1988
- (17) Connors K.; Binding Constants
J. Wiley, 1987
- (18) Dougherty T. J.; Potter W. R. (1990): Of what value is a highly absorbing photosensitizer in PDT?
J. Photochem. Photobiol., 8, 223-225
- (18a) Dolphin D.; The porphyrins
Academic Press: New York, 1978
- (19) Dressler C.; Ismail M.S.; Nowak C.; Herter R.; Senz R.G.; Hagemann R. ; Röder B.; Berlien H.P. (1994): On the pharmacokinetics of the far red absorbing octa- α -butyloxy-zinc-phthalocyanine in Lewis lung carcinoma bearing mice
SPIE Conf. Proc., 2325, 220-226
- (19a) Eichenauer R.H.; Hüttmann G.; Wörmer S.; Koop N.; Beyer W.; Jocham D. (1998): New balloon catheter system used for PDT in the human urinary bladder: accuracy of light distribution
SPIE 3247, 138-144
- (20) Ell C.; Gossner L.; Hahn E. G.; Sroka R. (1994): Photodynamische Therapie eines Magenstumpfkarcinoms in kurativer Absicht
Dtsch. med. Wschr., 119, 951-955
- (21) Endo H.; Hosoya H.; Koyama T.; Ichioka M. (1982): Isolation of 10-Hydroxy-pheophorbide a as a photosensitizing pigment from alcohol-treated Chlo-

rella cells

J. Biol. Chem., 46, 2183-2193

- (21a) Evenson J.F.; Sommer S.; Rimington C. ; Moan J. (1987): Photodynamic Therapy of C3H mouse mammary carcinoma with hematoporphyrin diethers as sensitizers
Br. J. Cancer, 55, 483-486
- (21b) Feederle R.; Pajatsch M.; Kremmer E.; Boeck A. (1996):
Arch. Mikrobiol., 165, 206
- (22) Fischer H.; Plädoyer für eine sanfte Chemie
C.S. Müller-Verlag, Braunschweig, 1993
- (23) Fisher A. M. R.; Murphree L.; Gomer C.J. (1995): Clinical and preclinical Photodynamic Therapy
Lasers in Surgery and Medicine, 17, 2-31
- (24) Gomer C. J. (1990): Future directions and applications in Photodynamic Therapy
SPIE Institute Series, IS 6, 235-248
- (25) Gross S.; Brandis A.; Chen L.; Rosenbach-Belkin V.; Röhrs S.; Scherz A.; Salomon Y. (1997): Protein-A-mediated targeting of Bacteriochlorophyll-IgG to *Staphylococcus aureus*: A model for enhanced site-specific phototoxicity
Photochemistry and Photobiology, 66 (6), 872-878
- (25a) Haas T.; Berr F.; Strasser M.; Wenter C.(2004): Photodynamische Therapie von Neoplasien und Karzinomen des Ösophagus und der Gallenwege
Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen, 2, 34-38
- (25b) Harewood G.C.; Baron T.H.; Rumalla A.; Wang K.K; Gores G.J.; Stadheim L.M.; DE Groen P.C. (2005): Pilot study to assess patient outcomes following endoscopic application photodynamic therapy of advanced cholangio-carcinoma
J. Gastroenterol. Hepatol., 20 (3), 415-420
- (26) Hartwich G. (1994): Dynamik des Elektronentransfers in Reaktionszentren photosynthetischer Bakterien: Beeinflussung durch gezielten Pigment-

- austausch;
Dissertation, Institut für Biochemie der Pflanzen; Ludwig-Maximilian-Universität, München
- (27) Häussinger K.; Diaz-Jimenez J.P.; Rodriguez A.N.; Stanzel F.; Huber R.M.; Pichler J.; Baumgartner R. (2000): Photodynamic Therapy: Palliative and Curative Aspects
Interventional Bronchoscopy. Prog. Respir. Res. Basel, 30, 159-170
- (28) Henderson B.W.; Potter W.R.; Sumlin A.; Owczarczak B.; Nowakowski F.S.; Dougherty D.J. (1990): Bacteriochlorophyll a as photosensitizer for photodynamic treatment of transplantable murine tumors
SPIE Conf. Proc., 1203 , 211-222
- (29) Henderson B.W.; Sumlin A.B.; Owczarczak B.L.; Dougherty D.J. (1991): Bacteriochlorophyll a as photosensitizer for photodynamic treatment of transplantable murine tumors
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 10 , 303-313
- (30) Hesse M.; Meier H.; Zeeh B.; Spektroskopische Methoden in der Chemie
Thieme Verlag, Stuttgart, 1979
- (30a) Hillemanns P.; Korell M.; Schmitt-Sody M.; Baumgartner R.; Beyer W.; Kimmig R.; Untch M.; Hepp H. (1999): Photodynamic therapy in women with cervical intraepithelial neoplasia using topically applied 5-aminolaevulinic acid
Int. J. Cancer, 81, 34-38
- (30b) Hirth A.; Bartik B.; Bogdahn-Rai T.; Woehrle D.; Kaul S. (1997): New biotinylated phthalocyanines for the photodynamic therapy of cancer
SPIE Biomed. Optics, 3191, 309-314
- (31) Heuermann A (1993): Polymer gebundene Porphyrine als Sensibilisatoren für die photodynamische Krebstherapie, Synthese, Charakterisierung und Untersuchung der Eigenschaften
Dissertation, Fachbereich Biologie, Chemie der Universität Bremen
- (32) Hynninen P. (1991): Chemistry of chlorophylls: Modifications
The Chlorophylls (Scheer H., ed.), *CRC-Press*: Boca Raton, 145-209

- (32a) Jensen K. (2001): Multizentrische Randomisierte Phase III Studie: Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Urothelcarcinoms der Harnblase und Therapie des Carcinoma in situ mit Photodynamischer Therapie (PDT) versus Bacillus Calmette-Guerin (BCG)
Biometrischer Abschlussbericht, Institut für medizinische Biometrik und Informatik, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- (32b) Jocham D.; Ell C.; Baumgartner R.; Gossner L.; Häußinger K.; Iro H.; Szeimies R.-M.(1997): Photodynamische Therapie
Deutsches Ärzteblatt, 49, A-3337 / B-2804 / C-2489
- (33) Johnson M. D.; Reinsborough V. C. (1992): Binding constants for cyclodextrin inclusions by competitive spectrofluorometry involving 6-(p-toluidino)naphthalene-2-sulfonate
Aust. J. Chem., 45, 1961-1966
- (34) Jori G.; Reddi E. (1993): The role of lipoproteins in the delivery of tumor targeting photosensitizers
Int. J. Biochem., 25, 1369-1375
- (35) Karas M. (1990): Neue Perspektiven der Massenspektrometrie von Biomakromolekülen
Phys. Bl. 46, 5, 149-154
- (36) Kaufmann R. (1994): Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) Mass Spectrometry: A novel analytical tool in molecular biology and biotechnology
Journal of Biotechnology, 1-27
- (37) Kessel D.; Gomer C.; Morstyn G.; Kaye A. (1991): Preclinical Examination of First and Second Generation Photosensitizers used in Photodynamic Therapy
Photochemistry and Photobiology, 54 (6), 1093-1107
- (38) Kessel D.; Smith K.M.; Pandey R.K. (1992): Photosensitization with bacteriochlorins
Photochem. Photobiol., 58, 200-203

-
- (39) Kim H.; Kirschenbaum L. J.; Rosenthal I.; Riesz P. (1993): Photosensitized formation of ascorbate radicals by riboflavin: an ESR study
Photochemistry and Photobiology, 57 (5), 777-784
- (40) Kim H.; Rosenthal I.; Kirschenbaum L.J.; Riesz (1992): Photosensitized formation of ascorbate radicals by Chloroaluminium Phthalocyanine Tetrasulfonate: An electron spin resonance study
Free Radical Biology & Medicine, 13, 231-238
- (41) Köst H. P.; CRC Handbook of Chromatography
CRC Press: Boca Raton, 1986
- (41a) Kostron H.; Obwegeser A.; Jakober R. (1996): Photodynamic Therapy in Neurosurgery: a review
J. Photochem. Photobiol. B.; 36 (2), 157-168
- (42) Kriegmair M.; Baumgartner R.; Lumper W.; Waidelich R.; Hofstetter A. (1996): Early clinical experience with 5-aminolevulinic acid for the Photodynamic Therapy of superficial bladder cancer
British Journal of Urology, 77, 667-671
- (42a) Lichtenthaler F.W.; Immel S. (1996):
Proc. 8th International Symposium on Cyclodextrins, Budapest, 149-156
- (42b) Litle V.R.; Luketich J.D.; Christie N.A.; Buenaventura P.O.; Alvelo-Rivera M.; McCaughan J.S.; Nguyen N.T.; Fernando H.C. (2003): Photodynamic Therapy as palliation for oesophageal cancer: experience in 215 patients
Ann. Thorac. Surg., 76 (5), 1687-1692
- (42c) Losev et al. (1990)
Opt. Spektrosk., 69, 97-101
- (42d) Mattox D.E.; Sternson L.A.; Von Hoff D.D.; Kuhn J.G.; Repta A.J. (1983): Tumor concentrations of Platinum in patients with head and neck cancer
Otolaryngol. Head Neck Surg., 91 (3), 271-275
- (43) Michelsen U. (1993): Synthese und Charakterisierung quarternierter Porphyrine und Phthalocyanine über aktivierte Methoxypolyethylenglycole für den

Einsatz in der PDT

Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Chemie der Universität Bremen

- (43a) Milstein D. et al. (1994); *private Mitteilung*
- (44) Montforts F. P.; Gerlach B.; Haake G.; Höper F.; Kusch D.; Meier A.; Scheurich G.; Brauer H. D.; Schiwon K.; Schermann G. (1994): Selective synthesis and photophysical properties of tailor made Chlorins for Photodynamic Therapy
SPIE, 2325, 29-39
- (44a) Moser J.G. (1992): Forschungsvorhaben „Carriersysteme für die PDT“
BMFT
- (45) Moser J. G. (1996): Peripheral substitution of Porphyrinoids to enhance and to specify photodynamic activity
Porphyrins and related compounds in perspective methods of treatment of oncological diseases, Moskau
- (45a) Moser J.G.; Haller J.C.; Junker R.; Kassner A.; Kaufmann R. (1992): Quantitative studies on uptake and phototoxicity of pheophorbide a derivatives in LoVo Adenocarcinoma cells
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 9, 308-320
- (46) Moser J. G.; Dembeck U.; Hubert M.; Spengler B.; Bayer R.; Wagner B. (1994): Subcellular storage compartments of bacteriopheophorbide sensitizers
SPIE, 2087, 532-538
- (47) Moser J. G.; Demcheva M.; Savitski A.; Ponomarev G.; Luk`yanets E. (1996): Cyclic accumulation strategies for polyphasic photoimmunotherapy using biotin-avidin
SPIE Biomed. Optics, 2924, 145-152
- (48) Moser J. G.; Karmakova T.; Andrees S.; Wagner B. (1997): Photosensitization of tumor cells: Are comparable conditions an irreal dream ?
SPIE, 3191, 114-123

- (49) Moser J.G. (1998): Photodynamic Tumor Therapy, 2nd and 3rd generation photosensitizers
Harwood Academic Press
- (50) Moser J.G. (1992): Ungelöste Probleme der photodynamischen Tumortherapie
Akt. Dermatol., 7, 175-178
- (51) Moser J.G. (1993): Attempts to treat malignant melanoma by PDT using bacteriopheophorbidester as the sensitizer
SPIE (Biomedical Optics), 1881, 116-125
- (52) Moser J.G.; Heuermann A.; Oehr P.; Scheer H.; Vervoorts A.; Andrees S. (1994): Carrier Systems in PDT: On the way to novel anti-tumor drugs
SPIE Conf. Proc., 2325, 92-99
- (53) Moser J.G.; Montforts F. P.; Kusch D.; Vervoorts A.; Kirsch D.; Berghahn M.; Akgün N.; Rueck A.; Andrees S.; Wagner B. (1997): How many molecules of a sensitizer are necessary to photosensitize a tumor cell?
SPIE Biomed Optics, 2924, 22-30
- (54) Moser J.G.; Ostrowsky A.; Gümüşdaglı M.; Kleiber B. (1994): Bacteriopheophorbideesters: Photosensitizers without "threshold dose"? *SPIE Conf. Proc.*, 2078, 193-204
- (54a) Moser J.M.; Rose I.; Wagner B.; Wienecke T.; Vervoorts A.: Taxol Inclusion Complexes with a Cyclodextrin Dimer: Possibilities to detoxify chemotherapeutics and to target drugs specifically to tumors (2001)
Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry, 39, 13-18
Kluwer Academic Publishers
- (55) Moser J.G.; Suchomski R.; Danielowski T.; Wagner B.; Scheer H.; Hartwich G. (1994): Significance of threshold doses for photodynamic therapy of melanotic and amelanotic tumors
5th Biennal Meeting: IPA-Congress Amelia Island, USA

- (56) Moser J.G.; Vervoorts A.; Billen A. (1992): Molecular encapsulation of photosensitizing porphyrins as clathrates in dimeric cyclodextrins
Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers (Spinelli ed.), pp. 760-763
- (57) Moss G. P.(1987): Nomenclature of tetrapyrroles
Pure & Appl. Chem.; 59, 779-832
- (58) Omata T.; Murata N. (1984)
Plant and Cell Physiology, 24,1093-1100
- (59) Oseroff A.R.; Ara G.; Ohuoha D.; Aprille J.; Bommer J.C.; Yarmush M. L.; Foley J. Cincotta L. (19 86): Strategies for selective cancer photochemotherapy: Antibody-targeted and selective carcinoma cell photolysis
Photochemistry and Photobiology; 46, 83-96
- (60) Paganelli G.; Siccardi A.G.; Malcovati M.; Scasselati G.; Fazio F. (1993): Biotinylated monoclonal antibodies: Their potential for diagnosis and therapy of cancer
Current Opinions in Therapeutic Patents, pp. 1465-1474
- (61) Pandey R. K.; Dougherty D. J. (1989): Syntheses and photosensitizing activities of porphyrines joined with ester linkages
Cancer Research, 49, 2042-2047
- (62) Pandey R. K.; Dougherty T. J. (1988): Synthesis and photosensitizing activity of a diporphyrin ether
Photochemistry and Photobiology, 47, 777-796
- (63) Pandey R.K.; Bellnier D.A.; Smith K.M.; Dougherty T.J. (1990): Chlorin and porphyrin derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy
Photochem. Photobiol., 53, 65-72
- (64) Pandey R.K.; Dougherty D.J.; Smith K.M. (1988): Synthesis of hemato-porphyrin dimers and trimers with ether linkages
Tetrahedron Letters, 29, 4657-4660
- (65) Pandey R.K.; Majchrzycki D. F.; Smith K.M.; Dougherty T.J. (1989): Chemistry of Photofrin II and some new photosensitizers
SPIE, 1065, 164-174

- (66) Pandey R.K.; Shiao F.J.; Dougherty T.J.; Smith K.M. (1991): Regioselective syntheses of ether linked porphyrin dimers and trimers related to Photofrin II
Tetrahedron, 47, 9571-9584
- (67) Pandey R.K.; Shiao F.Y.; Isaac M.; Ramaprasad S.; Dougherty T.J.; Smith K.M. (1992): Substituent effects in tetrapyrrole subunit reactivity and pinacol-pinacolone rearrangements: vic-dihydroxychlorins and vic-dihydroxy-bacteriochlorins
Tetrahedron Letters, 33, 7815-7818
- (68) Pandey R.K.; Shiao F.Y.; Medforth C.J.; Dougherty T.J.; Smith K.M. (1990): Efficient synthesis of porphyrin dimers with carbon carbon linkages
Tetrahedron Letters, 31, 789-792
- (69) Pandey R.K.; Shiao F.Y.; Ramachandran K.; Dougherty T. J.; Smith K.M. (1992): Long wavelength photosensitizers related to chlorins and bacteriochlorins for use in photodynamic therapy
J. Chem. Soc. Perkin Trans, 1, 1377-1385
- (70) Pandey R.K.; Shiao F.Y.; Sumlin A.B.; Dougherty D.J. ; Smith K.M. (1994): Synthesis of new bacteriochlorins and their antitumor activity
Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 4, 1263-1267
- (71) Pandey R.K.; Shiao F.Y.; Sumlin A.B.; Dougherty T.J.; Smith K.M. (1992): Structure/activity relationship among photosensitizers related to pheophorbides and bacteriopheophorbides
Bio. Medicinal. Chem. Lett., 2, 491-496
- (72) Pandey R.K.; Smith K.M.; Dougherty T.J. (1990): Porphyrin dimers as photosensitizers in photodynamic therapy
Journal of Medicinal Chemistry, 33, 2033-2038
- (72a) Pass H.I.; Temeck B.K.; Kranada K.; Thomas G.; Russo A.; Smith P.; Friauf W.; Steinberg S.M. (1997): Phase III randomized trial of surgery with or without intraoperative photodynamic therapy and postoperative immunotherapy for malignant pleural mesothelioma
Ann. Surg. Oncol., 4 (8); 628-633

- (72b) Plate K.H.; Breier G.; Risau W. (1994): Molecular mechanism of developmental and tumor angiogenesis
Brain Pathol., 4, 207-218
- (72c) Ponomarev G.V. et al. (1980):
Khim Getercycl. Soed.; 943-950
- (73) Risch N.; Reich H.; Schormann A.; Brockmann H. (1981): Notiz über eine einfache und leistungsfähige Methode zur Trennung von Chlorophyll-derivaten der a- und b-Reihe
Liebigs. Ann. Chem., 13, 1519-1522
- (74) Roberts G.W.; Berns M.W.; (1989): Cell biology and photochemistry of photodynamic sensitizers
SPIE , 1065, 175-181
- (75) Röder B.; Dressler C. Hagemann R.; Fuchs B.; Berlien H.P. ; Nowak C.; Moser J.G. (1994): The pharmacokinetics of $^{13}\text{C}^2$ -Hydroxybacteriopheophorbide a methyl ester studied by fluorescence spectroscopy on Lewis lung carcinoma bearing mice
SPIE Conf. Proc., 2078, 532-538
- (76) Roeder B.; Zimmermann C.; Herter R. (1994): Photophysical characterization of far-red absorbing photosensitizers in cyclodextrin solution
SPIE; 2325; 80-91
- (77) Roehrs S.; Moser J. G.; Salomon Y. (1994): Fluorescence detection of MSH-receptors in melanoma as a target of hormone-directed photosensitization in PDT
SPIE, 2325, 321-325
- (78) Ruebner A.; Moser J. G.; Kirsch D.; Spengler B.; Andrees S.; Roehrs S. (1997): Synthesis of β -Cyclodextrin dimers as carrier systems for Photodynamic Therapy of cancer
Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry, 27, 69-84
- (79) Salomon Y.; Scheer H.; Scherz A.; Brandis A.; Hartwich G. (1997): Synthetic metal-substituted Bacteriochlorophyll derivatives and use thereof

-
- Yeda Research and Development Co. Ltd. (Weizmann Institute of Science),
Eur. Pat. Appl., EP0863903 – WO 97/19081
- (80) Savitsky S.; Meerovich I. G.; Moser J. G.; Yakubovskaya R. I.; Kaliya O. L.;
Luk'yanets E. A. (1997): Avidin-biotin system for targeting delivery of
photosensitizers and other cytotoxic agents
SPIE, 3191, 343-353
- (81) Scheer H. et al. (1994); *private Mitteilung*
- (81a) Scheer H.; Chlorophylls
CRC Press: Boca Raton, 1991
- (81b) Scheer H.; Gross E.; Nitsche B.; Cmiel E.; Schneider S.; Schäfer W.; Schiebel
H.M.; Schulten H.R. (1986): Structure of Methylpheophorbide-Reaction Center
of Photosystem I
Photochemistry and Photobiology, 43, 559-571
- (82) Scherz A.; Yoram S.; Brandis A.; Scheer H. (2001): Palladium substituted
Bacteriochlorophyll derivatives and use thereof
Yeda Research and Development Co. Ltd. (Weizmann Institute of Science),
Eur. Pat. Appl., EP1137411 – WO/33833 (2000)
- (82a) Scherz A.; Parson W.W. (1984): Oligomers of Bacteriochlorophyll and
Bacteriopheophytin with spectroscopic properties resembling those found in
photosynthetic bacteria
Biochimica et Biophysica Acta, 766, 653-655
- (82b) Scherz A.; Salomon Y.; Fiedor L. (1994): Chlorophyll and Bacteriochlorophyll
derivatives, preparation and pharmaceutical compositions comprising them
Yeda Research and Development Co. Ltd. (Weizmann Institute of Science),
Eur. Pat. Appl., EP584552
- (83) Schneider H. J.; Blatter T.; Simova S. (1991): NMR and fluorescence studies
of cyclodextrin complexes with guest molecules containing both phenyl and
naphthyl units
J. Am. Chem. Soc., 113, 1996-2000
- (84) Schnurpfeil G. et al. (1994); *private Mitteilung*

- (84a) Schnurpfeil G; Sobbi A. K.; Michelsen U.; Wöhrle D. (1997): Photooxidative stability of various Tetraazaporphyrin derivatives in solution and correlation with semiempirical MO-calculations
SPIE, 3191, 299-308
- (85) Schouwink H.; Rutgers E.T.; Van Der Sijp J. Oppelaar H.; Van Zandwijk N.; Van Veen R.; Burgers S.; Stewart F. A.; Zoetmulder F.; Baas P. (2001): Intraoperative photodynamic therapy after pleuropneumectomy in patients with malignant pleural mesothelioma: dose finding and toxicity
Chest, 120, 1167-1174
- (86) Schultes B. C.; Spaniol S.; Schmidt S.; Ertmer W.; Biersack H. J.; Krebs D. (1994): Photodynamic Lasertherapy with antibody-coupled Phthalocyanine
SPIE, 2078, 148-157
- (87) Sharma U.S.; Balasubramanian S.V.; Straubinger R.M. (1995): Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (taxol) complexes with cyclodextrins
J. Pharmaceut. Sci., 84, 1223-1230
- (88) Shackley D.C.; Briggs C.; Gilhooley A.; Whitehurst C.; O'Flynn K.J.; Betts C.D.; Moore J.V.; Clarke N.M. (2002): Photodynamic therapy for superficial bladder cancer under local anaesthetic
BJU Int., 89, 665-670
- (89) Smith, K.M. (1985): Chemical manipulation of the vinyl groups in protoporphyrin IX
Adv. Exp. Med. Biol., 193, 277-292
- (89a) Smith K.M.; Bisset G.M.F.; Bushell M.J. (1980): Partial synthesis of optical pure methyl bacteriopheophorbides c and d from methylpheophorbide a
J. Org. Chemistry, 45, 2218-2224
- (89b) Smith K.M.; Goff D.A.; Simpson D.J. (1984): Meso substitution of chlorophyll derivatives: Direct route of transformation of bacteriopheophorbides d into bacteriopheophorbides c
J. Am. Chem. Soc., 107, 4946-4954

-
- (89c) Smith K.M.; Pandey R.K.; Shiao F.Y.; Smith N.W.; Iakovides P.; Dougherty T.J. (1992): Synthesis of new porphyrin-type photosensitizers for photodynamic therapy
SPIE Conf. Proc., 1645, 274-283
- (90) Smith K.M.; Porphyrins and Metalloporphyrins
Elsevier: Amsterdam, 1975
- (91) Spikes D.J.; Bommer J. (1987): Photosensitization Chlorophylls (*Scheer H. ed.*), pp. 1181-1204
- (92) Strell M.; Urumow T. (1977):
Liebigs Ann. Chem., 970-974
- (93) Struck A. (1987): Untersuchungen zu Pigmenten des PS I: Chemische Synthese und Analytik von 20-Cl-Chl a und 13²-OH-20-Cl-Chl a;
Diplomarbeit, Institut für Biochemie der Pflanzen, Ludwig-Maximilian-Universität, München
- (94) Struck A. (1990): Chemisch modifizierte Bakteriochlorophylle und -pheophytine in den Bindungsstellen B_{A,B} und H_{A,B} von photosynthetischen Reaktionszentren aus *Rhodospira rubra* R26: Pigmentsynthese, Pigmenttausch und Spektroskopie
Dissertation, Institut für Biochemie der Pflanzen, Ludwig-Maximilian-Universität, München
- (95) Svec W. (1978): Isolation, preparation, characterization and estimation of the chlorophylls and bacteriochlorophylls
The Porphyrins (Dolphin D. ed.), *Academic Press*: New York, IV, pp. 341-399
- (96) Szente J.; Vikmon M.; Szeman J.; Szejtli J. (1997): Cyclodextrins as chremophor substitutes for taxol formulations
Pharmaceutical applications of cyclodextrin conference, poster abstract
- (97) Tregub I.; German A.A.; Hamblek J.; Rosenbach-Belkin V.; Fiedor L.; Salomon Y. (1994) : Application of chlorophyll derivatives to PDT of malignant melanoma
Lasers in Medical Sciences, 7, 256

- (98) Venema F.; Baselier M.; Dienst v.E.; Ruel B.H.M.; Feiters M.C.; Engbersen J.F.J.; Reinhoudt D.N.; Nolte R.J.M. (1994): Synthesis and binding properties of novel cyclodextrin dimers
Tetrahedron Letters, 35, 1773-1776
- (99) Vervoorts A. (1993): Blutflussmessungen an Hühnerembryonen mittels Laser-Doppler-Spektroskopie
Diplomarbeit, Institut für Lasermedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- (100) Vervoorts A.; Moser J.G.; Ponomarev G.; Rood A. (1996): Specific labeling of microtumors in the hen`s egg test by Dimethoxyhematoporphyrin
SPIE, 2924, S. 132-139
- (101) Wang I.; Bendsoe N.; Klinteberg C.A.; Enejder A.M.; Andersson-Engels S.; Svanberg S.; Svanberg K.(2001): Photodynamic Therapy vs. cryosurgery of basal cell carcinomas: results of a phase III clinical trial
Br. J. Dermatol., 144 (4), 832-840
- (102) Warburg O.; Metabolism of tumors,
Constable London, 1930
- (103) Williams D.H.; Fleming I.; Strukturaufklärung in der organischen Chemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1991

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. J. Moser für die Vergabe des Themas sowie die ständige Unterstützung und das Interesse am Fortgang meiner Arbeit bedanken.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schäfer, Herrn Dipl.-Chem. D. Kirsch, sowie Herrn Dr. Cmiel für die Aufnahme von Massen- und ^1H -NMR-Spektren.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Rübner-Heuermann, die mich in die Methodik der Cyclodextrinbindungsversuche eingeleitet hat.

Für die Bereitstellung eines Fluoreszenzphotometers danke ich auch Herrn Prof. Dr. Mannhold und Herrn Priv.-Doz. Dr. Lemoine vom Biomedizinischen Zentrum Düsseldorf.

Schließlich möchte ich mich bei Herrn Dr. G. Hartwich bedanken, unter dessen Betreuung die Synthese der Pd-Verbindungen durchgeführt wurde.

Allen Institutsangehörigen danke ich für das nette Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft, die mir zuteil wurde.

Auch möchte ich mich noch ganz besonders herzlich bei Prof. A. Scherz (Weizmann Institut, Rehovot, Israel) bedanken, dessen positive Inspiration wesentliche Teile dieser Arbeit begleitet hat.

Ganz besonders möchte ich mich beim Evangelischen Studienwerk Villigst für mein mehrjähriges Stipendium bedanken, in dessen Rahmen es mir möglich war die vorliegenden Arbeit zu beenden.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich gemäß der Prüfungsordnung für den Studiengang Promotion Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vom 01.03.1995, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Düsseldorf, den 5.04.2005

Susanne Röhrig