

**Teil VII**  
**Anhang**



# Anhang A

## Verschiedenes

### A.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

In den folgenden Seiten sind die allgemeinen Kulturbedingungen für die untersuchten adhärennten Zellkulturen (MCF-7, MDA-MB-231 und HT-29) beschrieben. Bezüglich der Behandlung der Lymphom- und Leuämiezellen sei auf Abschnitt 17.15 und die Literatur verwiesen [139].

#### Kulturbedingungen und Passagieren

Die verwendeten Zelllinien werden als Monolayer in 250ml Gewebekulturflaschen mit 75cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche in wasserdampfgesättigter, 5% CO<sub>2</sub>-haltiger Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Alle Arbeitsgänge erfolgen unter einer sterilen Werkbank. Das Passagieren der Kulturen erfolgt bei ca. 70-90%iger Konfluenz. Dazu wird das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Nach dem Absaugen werden die Zellen durch Zusatz von 2-3ml Trypsinreagenz unter mehrmaligem (15-20 mal) Schwenken angelöst. Das Trypsinreagenz wird wieder entfernt. Die Zellkulturflasche wird sofort für 2 Minuten bei 37°C in wasserdampfgesättigter, 5% CO<sub>2</sub>-haltiger Atmosphäre inkubiert, damit sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden lösen. Sie werden in 10ml frischem Medium aufgenommen, zur Trennung mehrmals auf- und ab pipettiert und zur Weiterzucht verdünnt in neue Zellkulturflaschen überführt.

#### MCF-7 Zelllinie

Die MCF-7 Zelllinie wird in phenolrothaltigem EMEM kultiviert. Zur Herstellung des Mediums wird Eagle's MEM Pulvermedium sowie NaHCO<sub>3</sub>

(2.2g/l), Natriumpyruvat (110 mg/l) und Gentamycinsulfat (50 mg/l) in Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit 1N NaOH oder 1N HCl auf 7.4-7.5 eingestellt. Danach wird das Medium über einen 0.2 $\mu$ m Membranfilter mit Vorfilter sterilfiltriert und bei 2-8°C gelagert. Vor Gebrauch wird 10% (V/V) FCS unter aseptischen Bedingungen zugegeben. Die Zellen werden einmal pro Woche passagiert, wobei die Zellsuspension zur Weiterzucht ca. 1:10 verdünnt wird.

### **MDA-MB-231 Zelllinie**

Für die MDA-MB-231 Zelllinie dient phenolrothaltiges McKoy's 5A Medium als Kulturmedium. Das Medium wird analog EMEM aus dem entsprechenden Pulvermedium inklusive Zusätze hergestellt. Nach Versetzen mit 5% (V/V) FCS unter aseptischen Bedingungen ist das Medium gebrauchsfertig. Die Zellen werden einmal pro Woche passagiert und die Zellsuspension 1:100 zur Weiterkultivierung verdünnt.

### **HT-29 Zelllinie**

Die HT-29 Zelllinie wird genauso wie die MCF-7 Zelllinie in EMEM (+10% FCS) kultiviert. Die Zellen werden 1-2 mal pro Woche passagiert und die Zellsuspension 1:100 zur Weiterkultivierung verdünnt.

### **Zellzahlbestimmung**

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Neubauerzählkammer verwendet. Die Zählkammer hat acht quadratische Vertiefungen, die 0.100mm x 0.01mm<sup>2</sup> groß sind, also ein Volumen von je 1x10<sup>-3</sup> mm<sup>3</sup> aufweisen. Zur Zählung drückt man ein Deckgläschen bis zur Ausbildung von Newtonschen Ringen auf die Zählkammer und gibt einen kleinen Tropfen der homogenen Zellsuspension zwischen Zählkammer und Deckgläschen. Die Zellzahl/ml wird bestimmt, indem man acht Quadrate unter dem Mikroskop auszählt, den Mittelwert bildet und die so ermittelte Zellzahl mit 1x10<sup>4</sup> multipliziert.

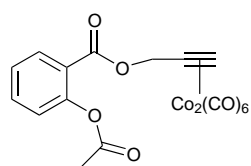
### **Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren werden die kurz vor der Konfluenz stehenden Zellen trypsiniert (siehe oben) und in 5 ml Medium pro 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche aufgenommen. Die Zellsuspension wird in konischen Zentrifugenröhrchen 5 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 2000 U/min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Anschließend nimmt

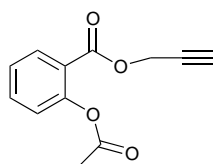
man das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (90% Kulturmedium, 10% DMSO) pro Kulturflasche auf. Man füllt jeweils 0.5 ml der entstandenen Zellsuspension in sterile Kryoröhrchen und wickelt diese dicht in Zellstoff ein. Die Zellen werden nun in Zellstoffpäckchen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einer Tiefkühltruhe eingefroren und anschließend bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen der Zellen werden die Kryoröhrchen in 70% Isopropanol gelegt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad schnell aufgetaut. Der Inhalt wird anschließend mit einer Pipette entnommen und in ein konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 10 ml Kulturmedium wird die Zellsuspension in einer Tischzentrifuge bei 2000U/min 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird wiederum in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, in eine  $75\text{cm}^2$  Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank inkubiert.

## A.2 Übersicht - Strukturen

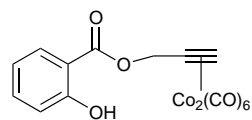
Übersicht über die zur Testung herangezogenen Strukturen. Die Nucleosid- und Indolderivate sind in Abschnitt 13.1 abgebildet.



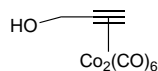
Co-ASS



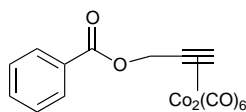
Prop-ASS



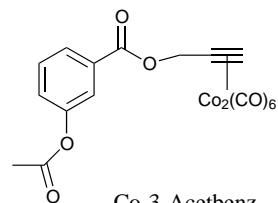
Co-SAL



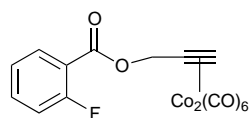
Co-Prop



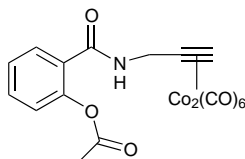
Co-Benz



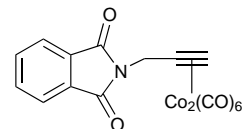
Co-3-Acetbenz



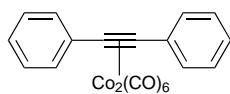
Co-2F-Benz



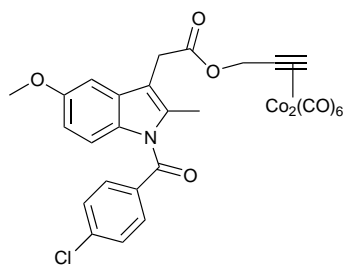
Co-ASSAM



Co-Phthal



Co-Diph



Co-Indo

### A.3 Daten zu Abschnitt 7

Messwertetabelle Lipophilie ( $\log k_w$ -Wert)

Substanz	50%	60%	70%	80%	90%	$r^2$
Co-Diph			n.e.	8.74	2.15	-
Co-SAL		n.e.	20.91	5.32	1.50	0.9997
CoBenz		n.e.	18.27	4.48	1.34	0.9990
Co-2-F-Benz		n.e.	13.74	3.61	1.04	0.9998
Co-3-Acetbenz		n.e.	11.36	2.54	0.87	0.9954
Co-ASS		n.e.	11.02	2.96	0.86	0.9998
Co-Phthal		n.e.	8.37	2.21	0.82	0.9964
Co-ASSAM			3.80	1.13	0.45	0.9969
Co-Prop		9.74	3.21	1.31	0.48	0.9992
Diphenylacetylen			8.01	2.70	1.16	0.9974
Prop-ASS	3.04	1.37	0.75			0.9966

Tabelle A.1: Übersicht über die Retentionsdaten und lineare Regression. Die Retentionszeiten sind als Mittelwert der in 2 Experimenten ermittelten  $k$ -Werte bei verschiedenen Methanolanteilen (%) angegeben; n.e.: nicht eluiert

## A.4 Daten zu Abschnitt 13.4

Übersicht über die durchgeführten Versuche bei der Glutathionreduktaseaktivitätsbestimmung

Substanz	c( $\mu$ M)	Inkub. (Std.)	Messung nach	EA Kontr.	EA Subst.	rel. Akt.(%)
SAL	8	6	120 Min.	1.86 (5%)	2.02 (9%)	109
ASS	8	6	240 Min.	0.62 (17%)	0.54 (12%)	87
ASS	8	6	120 Min.	2.20 (18%)	2.52 (11%)	115
Prop-ASS	8	6	120 Min.	1.86 (5%)	1.78 (11%)	96
Prop-ASS	8	6	240 Min.	0.91 (14%)	0.89 (12%)	98
Prop-ASS	8	24	120 Min.	0.93 (40%)	0.95 (30%)	102
Co-Prop	8	6	240 Min.	0.91 (14%)	0.82 (13%)	91
Co-Prop	8	6	120 Min.	2.20 (18%)	2.60 (14%)	118
Co-Prop	8	24	120 Min.	0.93 (40%)	0.79 (19%)	85
Co-SAL	8	6	240 Min.	0.62 (17%)	0.52(20%)	84
Co-ASS	2	6	180 Min.	1.42 (15%)	1.86 (52%)	131
Co-ASS	4	6	180 Min.	1.42 (15%)	1.55 (43%)	109
Co-ASS	8	6	180 Min.	1.42 (15%)	1.28 (9%)	90
Co-ASS	8	6	240 Min.	0.91 (14%)	0.90 (13%)	99
Co-ASS	8	6	120 Min.	1.86 (5%)	1.67 (10%)	90
Co-ASS	8	24	120 Min.	0.93 (40%)	1.13 (26%)	122
Co-Diph	8	6	240 Min.	0.62 (17%)	0.53 (18%)	86
Co-Diph	8	6	120 Min.	2.20 (18%)	2.34 (12%)	106

Tabelle A.2: Übersicht über die Versuche zur Glutathionreduktaseaktivitätsbestimmung; EA: Enzymaktivität in nmol/(Minute\* $\mu$ g); (MW (Stabw. in %), n=6)



## A.5 Daten zu Abschnitt 14

Dosiswirkungskurven an Leukämie- und Lymphomzellen [139]

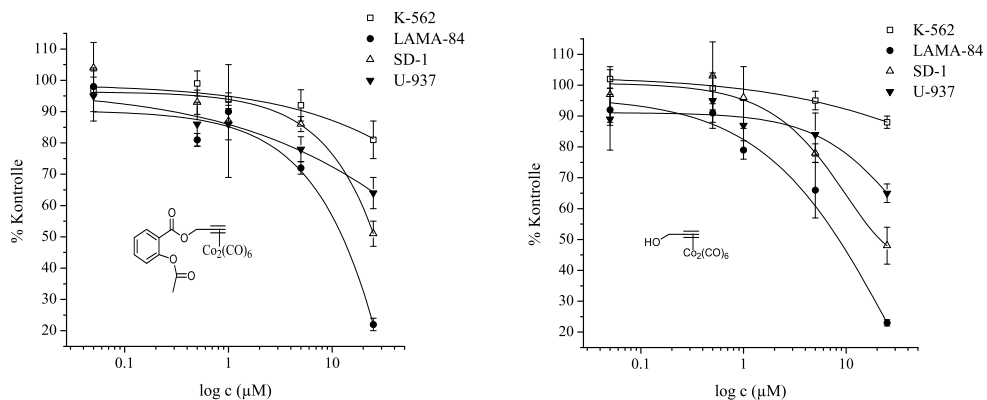


Abbildung A.1: Dosiswirkungskurven für (links) Co-ASS und (rechts) Co-Prop (MW( $\pm$  Stabw.), n=6)

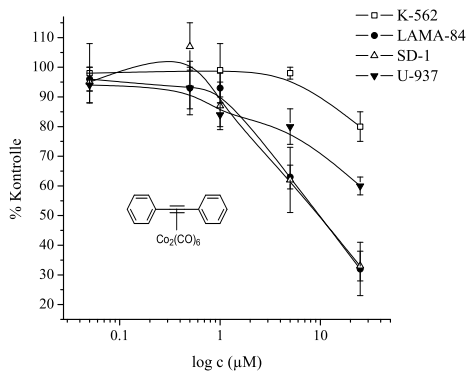


Abbildung A.2: Dosiswirkungskurve für Co-Diph (MW( $\pm$  Stabw.), n=6)

## A.6 häufig verwendete Abkürzungen

- 5-FU : 5-Fluorouracil
- AAS : Atomabsorptionsspektroskopie
- COX : Cyclooxygenase
- DMF : Dimethylformamid
- EDTA : Ethylendiamintetraacetat
- EMEM : Nährmedium zur Kultur der MCF-7 und HT-29 Zellen (engl. 'Eagle's minimum essential medium')
- FCS : fetales Kälberserum (engl. 'fetal calf serum')
- HPLC : Hochdruckflüssigchromatographie (engl. 'high pressure liquid chromatography')
- HSA : Humanserumalbumin
- IC<sub>50</sub> : halbmaximale Wirkkonzentration
- McKoy's : Nährmedium zur Kultur der MDA-MB-231 Zellen
- MW : Mittelwert
- NSAR : Nichtsteroidale Antirheumatika
- PBS : phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. 'phosphate buffered saline')
- r<sup>2</sup> : Korrelationskoeffizient
- RSD : Standardabweichung
- Stabw. : Standardabweichung



konzentrationen ermittelt als bei in Suspension kultivierten Leukämie- und Lymphomzellen. Die höhere Zellaufnahme geht dabei einher mit niedrigeren  $IC_{50}$ -Werten. Innerhalb der untersuchten Zellkulturen kann jedoch keine Korrelation zwischen Substanzwirkung und Zellaufnahme festgestellt werden. Ebenso wird deutlich, dass die Konzentration in den Zellen nicht von der Lipophilie der Substanzen allein bestimmt wird. Bei Gegenüberstellung der  $IC_{50}$ -Werte und der  $\log k_w$ -Werte kann ein mathematischer Zusammenhang erkannt werden - allerdings nur unter Nichtberücksichtigung der wirksamsten Verbindung Co-ASS. Diese Ergebnisse sind als starkes Indiz für das Vorliegen eines spezifischen, nicht von pharmakodynamischen Parametern allein bestimmten, Wirkungsmechanismus zu werten.

Untersuchungen zur Reaktivität der Komplexe beinhalteten Protein- und DNS-Bindungsstudien, sowie die Interaktion mit Thiolen. Sowohl die Bindung an Humanserumalbumin und an die DNS kann beträchtliche Ausmaße annehmen. Dies legt ein hohes Reaktionsvermögen mit Biomolekülen nahe. Thiole, wie z.B. das Tripeptid Glutathion, reagierten unter Disulfidbrückenbildung. Aufbauend auf diese Ergebnisse, wurde das Vermögen der Komplexe in die Zellkerne zu gelangen und das Enzym Glutathionreduktase zu hemmen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass nur wenige Prozent der in die Zellen aufgenommenen Substanzmenge in den Nuclei wiedergefunden werden. Folglich kann ein Wirkungsmechanismus basierend auf Interaktion mit der DNS praktisch ausgeschlossen werden. Zellkulturversuche an MCF-7 zeigten, dass das Enzym Glutathionreduktase durch die Verbindungen nicht in seiner Aktivität beeinflusst wird.

Aufgrund der Acetylsalicylsäureteilstruktur von Co-ASS und dem Vermögen von NSAR das Wachstum von Tumoren zu verringern, wurde die Hemmwirksamkeit der Verbindungen an Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Co-ASS ein wesentlich potenterer Hemmstoff beider Isoenzyme ist als die 'Ausgangsverbindung' Acetylsalicylsäure (Aspirin). Die Hemmwirksamkeit weiterer untersuchter strukturell verwandter Komplexe war deutlich geringer, einhergehend mit höheren  $IC_{50}$ -Werten. Bezugnehmend auf diese Ergebnisse, wurden die Cytotoxizitätsuntersuchungen auf COX-2-überexprimierende HT-29 Kolonkarzinomzellen ausgedehnt. Dabei zeigte sich, dass Co-ASS an diesen Zellen zu Cisplatin und 5-Fluorouracil vergleichbare Aktivität zeigt.

Schlußfolgernd kann festgestellt werden, dass die antiproliferative Wirksamkeit der Komplexe nur begrenzt auf unterschiedliche Aufnahme in die Zellen oder Interaktion mit der DNS zurückgeführt werden kann. Die Antitumoraktivität steht vielmehr mit dem Vermögen dieser Verbindungen, Cyclooxygenasen zu hemmen, in Zusammenhang. Diese Enzyme werden als Zielstrukturen einer zukünftigen Therapie einer Vielzahl humaner Tumoren gesehen.

# Anhang C

## English Abstract

This thesis deals with the biochemistry and physicochemistry of antitumor-active cobalt-alkyne complexes as well as their properties under in-vitro conditions. The purpose of the experiments was to study the unknown mode of drug action of this class of substances.

Experiments were done on the lead compound Co-ASS (see figure C.1) and structurally related less active drugs. Thus, properties responsible for the pharmacological profile of the complexes should be discovered.

The lipophilicity of the complexes was determined as  $\log k_w$ -value by HPLC

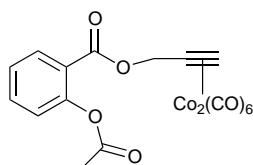


Abbildung C.1: lead compound Co-ASS

and the cellular uptake was quantified by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. The cytotoxicity was measured as  $IC_{50}$ -value. Comparative studies revealed that adherent growing MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells were more sensitive to the cytotoxic action than leukemia and lymphoma cells cultured in suspension. This correlated with a lower cellular uptake in lymphoma and leukemia cells compared to the breast cancer cells. The intracellular concentration could neither be directly correlated to the lipophilicity nor to the cytotoxic activity. Mathematical functions could be estimated by correlating the  $IC_{50}$ - with the  $\log k_w$ -value, but only if Co-ASS was excluded from the calculations. Therefore, a specific mode of drug action had to be taken into account for this compound.

DNA- and protein-binding studies showed that cobalt-alkyne complexes can react readily with biomolecules. The reaction with thiols resulted in disulfide-bond formation. Based on these results the nuclei of the cells were investigated for their cobalt content and the compounds were examined for their ability to inhibit the enzyme glutathione reductase. The enzymatic activity of glutathione reductase was not influenced and the cobalt amounts recovered from the nuclear lysates were comparably low. Therefore, the inhibition of glutathione reductase as well as a genomic mode of drug action could be excluded.

The lead compound Co-ASS contains an acetylsalicylic acid substructure. As nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are considered as cytostatics of the future, studies on the ability of the cobalt-alkyne complexes to inhibit the target enzymes of the NSAIDs were performed. ELISA experiments on cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) showed that Co-ASS is a potent inhibitor of both COX-1 and COX-2 and is by far more active than the 'parent' compound aspirin. Other structurally related cobalt-alkyne complexes were weaker enzyme inhibitors, correlating with higher IC<sub>50</sub>-values in cytotoxicity experiments. Further cytotoxicity studies on COX-2 overexpressing HT-29 human colon carcinoma cells revealed that Co-ASS is nearly as potent as Cisplatin or 5-FU at these cells.

In conclusion it can be stated that the antitumor activity of cobalt-alkyne complexes can neither be correlated to different cellular uptake nor to interaction with the DNA. The cytotoxic activity depends on the inhibition of cyclooxygenase enzymes.

# Anhang D

## Lebenslauf / Publikationsliste

### Lebenslauf

- 20.05.1973: geboren in Salzburg
- 07.1991: Matura am Bundesrealgymnasium II in Salzburg
- 10.1991-05.1992 Wehrdienst beim Österreichischen Bundesheer
- 10.1992-07.1999: Studium der Pharmazie an der Universität Innsbruck

Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Chemie (Betreuer Prof. Dr. G. Heinisch) mit dem Thema 'Substituierte Pyridazino[3,4-b][1,5]benzoxazepin-5(6H)one: Synthese und biologische Aktivität neuer MDR-Modulatoren'

- 04-10.1998: Leonardo-EU-Mobilitätsprojekt am 'Molnar-Institut für Angewandte Chromatographie' in Berlin
- 07-10.1999: Forschungskurzprojekt 'Technetium-Markierung von Surfactant Protein B' am Institut für Nuklearmedizin Universitätsklinik Innsbruck
- 09.1999: Prämierung der Diplomarbeit durch die Österreichische Pharmazeutische Gesellschaft (ÖPhG)
- 10.1999-10.2000: Aspirantenjahr in der Engel-Apotheke in Telfs
- 09.2000: Approbation zum Apotheker
- seit 10.2000: Promotion und Lehrtätigkeit am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Gust

## Publikationen

### Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

- Gust R., Ott I., Posselt D., Sommer K., Development of cobalt(3,4-diarylsalen)complexes as tumor therapeutics., *J. Med. Chem.*, angenommen.
- Ott I., Kircher B., Gust R., Investigations on the effects of cobalt-alkyne complexes on leukemia and lymphoma cells: cytotoxicity and cellular uptake, *J. Inorg. Biochem.* (2004), 98, 485-489.
- Ott I., Kircher B., Heinisch G., Matuszczak B., Substituted pyridazino[3,4-b][1,5]benzoxazepin-5(6H)ones as multidrug resistance modulating agents, *J. Med. Chem.* (2004), 47, 4627-4630.
- Amann A., Decristoforo C., Ott I., Wenger M., Bader D., Alberto R., Putz G., Surfactant protein B labelled with  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  retains biological activity in vitro., *Nucl. Med. Biol.* (2001), 28, 243-250.
- Ott I., Kircher B., Schumacher P., Schmidt K., Gust R., Antitumor active cobalt-alkyne complexes derived from acetylsalicylic acid: studies on the mode of drug action., *J. Med. Chem.*, eingereicht
- Ott I., Gust. R., Stability, protein binding and thiol interaction studies on [2-acetoxy-(2-proynyl)benzoate]hexacarbonyldicobalt., *Biometals*, eingereicht

### Vorträge

- Ott I., Kircher B., Schumacher P., Gust R., A Cobalt-alkyne complex of aspirin as cytotoxic COX-inhibitor., The Eighth International Symposium on Applied Bioinorganic chemistry, Hong Kong 2004.
- Ott I., Gust R., Cellular studies on cytotoxic cobalt-alkyne complexes., Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Krakau 2003.



## Posterpräsentationen

- Ott I., Kircher B., Schumacher P., Gust R., 'Cobalt-Aspirin' as cytotoxic COX-inhibitor. 26<sup>th</sup> German Cancer Congress, Berlin 2004, J. Cancer Res. Clin. Oncol. (2004), 130(Suppl.1), 153.
- Ott I., Kircher B., Schumacher P., Gust R., A cobalt-alkyne complex of aspirin as cytotoxic COX-inhibitor., GDCh/DPhG-Fachgruppentagung 'Frontiers in Medicinal Chemistry', Erlangen 2004.
- Sergeant C.D., Ott I., Gust R., Dembinski R., Synthesis of hexacarbonyl dicobalt 5-alkynyl-2'-deoxyuridines and their activity against MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. 227<sup>th</sup> ACS National Meeting, Anaheim 2004
- Ott I., Kircher B., Schmidt K., Gust R., Cobalt-acetylene complexes: a new class of cytostatics with high activity against human breast cancer cells., XVII<sup>th</sup> International Symposium on Medicinal Chemistry, Barcelona 2002, Drugs Fut. (2002), 27(Suppl.A), 389. und 25<sup>th</sup> German Cancer Congress, Berlin 2002, J. Cancer Res. Clin. Oncol. (2002), 128(Suppl.1), 141.
- Ott I., Gust R., Cellular accumulation of hexacarbonyldicobalt- complexes in human breast cancer cells., DPhG-Jahrestagung, Berlin 2002, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. (2002), 335 (Suppl.1), 93.
- Ott I., Gust R., Zelluläre Anreicherung von Hexacarbonyldicobalt-Komplexen in humanen Brustkrebszellen: AAS-Messmethodik und Ergebnisse., GDCh/DPhG-Fachgruppentagung 'Moderne Aspekte der Medizinischen Chemie', Travemünde 2002. und 'Tag der Chemie', Berlin 2002.
- Ott I., Gust R., Interaction of an antitumor active cobalt-complex with thiols of biological interest., DPhG-Jahrestagung, Halle 2001, Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. (2001), 334 (Suppl.2), 44.
- Ott I., Gust R., Interaktion eines antitumoraktiven Cobalt-Komplexes mit biologisch relevanten Thiolen. GDCh-Fachgruppentagung 'Moderne Aspekte der Medizinischen Chemie', Titisee 2001 und DPhG-Landesgruppentagung 'Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor', Berlin 2001.

- Ott I., Amann A., Decristoforo C., Wenger M., Alberto R., Riccabona G., Putz G., Direct  $^{99m}\text{Tc}$ -labelling of surfactant protein B, a lipophilic protein, using the Tc(I) organometallic  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -core. Peptide Radiopharmaceuticals in Diagnosis and Therapy, Rome 2000, Nucl. Med. Communic. (2000), 21(6), 593.
- Eibl B., Matuszczak B., Ott I., Substituierte Pyridazino[3,4-b][1,5]benzoxazepin-5(6H)one: Synthese und biologische Aktivität neuer MDR-Modulatoren., 15. Wissenschaftliche Tagung der ÖPhG, Innsbruck 1999., Sci. Pharm. (1999), 67(3,Suppl.1)