

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin der Charité
Campus Virchow
Der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Charakterisierung eines neuen hydrolytisch aktivierbaren Prodrugs von Etoposid und
seine Wirksamkeit bei „Multidrug“ Resistenz und beim Neuroblastom**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Björn Sönke Lange
aus Düsseldorf

Gutachter: 1. PD Dr. med. H. N. Lode
2. Prof. Dr. med. H. Kabisch
3. Prof. Dr. med. A. Kulozik

Datum der Promotion: 07. Juli 2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Abstract.....	1
2.	Vorwort.....	2
3.	Einleitung.....	3
4.	Zielsetzung.....	8
5.	Methodik.....	9
	5.1. Synthese des VP-16-Prodrugs.....	9
	5.2. Zellen.....	9
	5.3. RNA-Isolierung, Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion.....	9
	5.4. Zytotoxizitätstests.....	10
	5.4.1. Vitalitätsbestimmung mittels XTT-Test.....	10
	5.4.2. Bestimmung der Apoptose-Induktion mittels Annexin-Färbung....	10
	5.5. Tubulin-Depolymerisation.....	11
	5.6. Topoisomerase-Aktivität.....	11
	5.7. JC-1 <i>assay</i>	12
	5.8. Zellzyklusanalyse.....	12
	5.9. Neuroblastom-Xenograft-Modell in SCID Mäusen.....	13
6.	Ergebnis.....	14
	6.1. Chemie und Aktivierung des Prodrugs.....	14
	6.2. Zytotoxizität von ProVP-16 I im Vergleich zu VP-16 auf neoplastischen Zellen.....	14
	6.3. Effekt von ProVP-16 I auf MDR-1-exprimierenden Zellen.....	16
	6.4. Molekularer Wirkungsmechanismus des neuen Prodrugs.....	17
	6.4.1. Effekt von ProVP-16 I auf die Topoisomerase.....	17
	6.4.2. Effekt von ProVP-16 I auf den Zellzyklus.....	18
	6.4.3. Effekt von ProVP-16 I auf den Spindelapparat.....	18
	6.4.4. Effekt von ProVP-16 I auf die P-gp-Pumpe.....	19
	6.5. Toxizität des Prodrugs <i>in vivo</i> und Wirksamkeit von ProVP-16 II in einem nicht resistenten NXS2 Neuroblastom-Modell.....	20
5.	Diskussion.....	22
6.	Literaturverzeichnis.....	27

Inhaltsverzeichnis

7.	Anhang.....	31
	Lebenslauf.....	31
	Anteilerklärung.....	34
	Eidstattliche Erklärung.....	35
	Danksagung.....	36
	Eigene Publikationen.....	37

Abkürzungsverzeichnis

A2780	humane Ovarialkarzinomzelllinie
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AraC	Cytarabin
Bax	<i>Bcl-2-analogous protein</i> (BCL-2-analogon)
Bcl2	<i>B-cell-lymphoma 2</i>
bp	Basenpaar(e)
CaCl ₂	Calcium-2-Chlorid
CCRF-CEM	periphere T-Lymphoblasten
cDNA	<i>copy Desoxyribonucleic acid</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary cells</i>
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Exp	Experiment
FACS	<i>fluorescence activated cell scanning</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
GAPDH	Glycerol-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
Hela	humane Cervixkarzinomzelllinie
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
HL-60	Humane Zelllinie der akuten myeloischen Leukämie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HS	Humanserum
HT-29	humane Kolonadenokarzinomzelllinie
HWZ	Halbwertszeit
IC50	halbmaximale Hemmkonzentration
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolcarbocyanine
K562	humane Zelllinie der akuten myeloischen Leukämie
kDa	Kilodalton
Kelly	humane Neuroblastomzelllinie
KG	Körpergewicht
LRP	<i>lung resistance-related protein</i>
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesium-2-Chlorid
Molt-3	humane T-Zell Leukämiezelllinie
MOV-3	MDR-1-exprimierende Variante der Molt-3 Zelllinie
mRNA	<i>messenger-ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i>
NaCl	Natriumchlorid
Nalm-6	humane B-Zell precursor Leukämiezelllinie
NXS2	murine Neuroblastomzelllinie
OD	optische Dichte
pBR-322	E. coli Plasmid

Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PI	Propidiumiodid
PMS	Phenazine Methosulfate
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
Primer	aus 15-25 bp bestehende Oligonukleotide
Reh	humane B-Zell precursor Leukämiezelllinie
RNA	<i>ribonukleicacid</i>
RNAse	Ribonuklease
RPMI 1640	Zellkulturmedium (ursprünglich für humane Leukämiezellen)
RT	Reverse Transkription
SFM	serumfreies Medium
SK-N-SH	humane Neuroblastomzelllinie
stock	Stammlösung
SW480	humane Kolonadenokarzinomzelllinie
Taq-Pol	DNA-Polymerase, aus <i>Thermus aquaticus</i> gewonnenes Enzym
Topo	Topoisomerase
UIC-2	monoklonaler Antikörper gegen P-gp
VCR100	humane T-Zell Leukämiezelllinie (lymphoblastoid)
VP-16	Etoposid
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide

1. Abstract

Effektive Chemotherapie maligner Entartungen ist begrenzt durch einen geringen Antitumoreffekt, Toxizität und Induktion von Resistenzmechanismen. In dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob ein hydrolytisch aktivierbares Prodrug von Etoposid (VP-16) diese Probleme umgehen kann. Zu diesem Zweck wurde VP-16 durch zwei unterschiedliche hydrolytisch abspaltbare Carbonat-Seitengruppen funktionell blockiert und somit zwei neue Prodrugs von Etoposid hergestellt (ProVP-16 I und II).

Diese Arbeit befasst sich vorwiegend mit der *in vitro* Charakterisierung von ProVP-16 I und schließt mit ergänzenden *in vivo*-Untersuchungen von ProVP-16 II ab.

ProVP-16 I zeigte eine bis zu 3 Zehnerpotenzen gesteigerte Effektivität *in vitro* im Vergleich zur Ausgangssubstanz VP-16 vor allem auf MDR-1-exprimierenden Zellen. Auch auf einer von uns neu etablierten MDR-1-exprimierenden T-Zell-Leukämiezelllinie MOV-3 konnte die überlegene Wirkung von ProVP-16 I bestätigt werden. Untersuchungen des molekularen Wirkungsmechanismus ergaben eine durch ProVP-16 I hervorgerufene G2M-Phasen-Synchronisierung in Zellzyklusanalysen im Gegensatz zur Muttersubstanz VP-16, die sowohl in resistenten als auch in nicht-resistenten Zellen festzustellen war. Darüber hinaus konnte der durch P-gp hervorgerufene Substratefflux durch ProVP-16 I blockiert werden.

Aufgrund der besseren Wasserlöslichkeit und keinen fundamentalen Unterschiede zwischen ProVP-16 I und II *in vitro* wurde zunächst ProVP-16 II *in vivo* untersucht. Hier ergab sich eine 3-fach niedrigere Toxizität des Prodrugs *in vivo* im Vergleich zu VP-16. Abschließend konnte in einem nicht-resistenten Maus-Neuroblastom-Modell gezeigt werden, daß mit ProVP-16 II auch bei Einsatz nur eines Drittels der maximal tolerierten Dosis (MTD) die gleichen Antitumor-Effekte auf die Lebermetastasierung erzielt werden konnten wie mit VP-16 bei Einsatz der vollen MTD. Zusammenfassend bewiesen die hydrolytischen Prodrugs von Etoposid eine neue vielversprechende Möglichkeit, maligne Erkrankungen wirksam zu behandeln. Dieses hydrolytisch aktivierte Prodrug-Prinzip läßt sich möglicherweise auch auf andere Chemotherapeutika ausdehnen.

2. Vorwort

Die vorliegende kumulative Promotionschrift beschreibt den gegenwärtigen präklinischen Kenntnisstand einer neuen experimentellen Therapie bei malignen Erkrankungen mit hydrolytischen Prodrugs von Etoposid (VP 16). Die eigenen Beiträge zu dieser Thematik sind in 3 Originalarbeiten dokumentiert. Aus Gründen der Verständlichkeit werden wichtige ergänzende Erkenntnisse, die zum Teil auch in den eigenen Arbeiten ausgeführt sind, in der folgenden Abhandlung kurz zusammengefasst.

Kopien dieser Arbeiten sind in der gleichen Reihenfolge als Anlage angefügt und werden in alphabetischer Reihenfolge zitiert. Für diese Abhandlung wichtige Publikationen anderer Autoren sind in numerischer Reihenfolge zitiert. Dieser Zusammenfassung sind 8 Abbildungen und 5 Tabellen mit Legenden beigelegt, die wesentliche Ergebnisse und Mechanismen der Therapie mit hydrolytischen Prodrugs anschaulich machen sollen.

9. Anhang

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum:

Geburtsort:

SCHULISCHE AUSBILDUNG

ZIVILDIENST

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

KLINISCHE AUSBILDUNG

Famulaturen

Praktisches Jahr

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

Anhang

12/2003

Postervorstellung auf dem 45th Annual Meeting and Exposition
der American Society of Hematology, San Diego, USA

PUBLIKATIONEN

WEITERE TÄTIGKEITEN

SPRACHKENNTNISSE

Berlin, August 2006

Anteilerklärung

Sehr geehrte Damen und Herren,

Zu Beginn der Promotionsarbeit von Herrn Lange mit dem Thema „Charakterisierung eines neuen hydrolytisch aktivierbaren Prodrugs von Etoposid und seine Wirksamkeit bei „Multidrug“ Resistenz und beim Neuroblastom“ war er zusammen mit Frau Schröder an der Untersuchung der Wirkung des Prodrugs von Etoposid bei MDR-1-vermittelter Zytostatikaresistenz verantwortlich. Diese Arbeiten wurden als „shared first authorship“ in Blood publiziert.

1. Schroeder,U.; Bernt,K.M.; Lange,B.; Wenkel,J.; Jikai,J.; Shabat,D.; Amir,R.; Huebener,N.; Niethammer,A.G.; Hagemeyer,C.; Wiebusch,L.; Gaedicke,G.; Wrasidlo,W.; Reisfeld,R.A.; Lode,H.N.(2003): Hydrolytically activated etoposide prodrugs inhibit MDR-1 function and eradicate established MDR-1 multidrug-resistant T-cell leukemia, Blood 102 [1], Seite 246-253.

Sein Anteil an der dazu veröffentlichten Arbeit betrug 20%.

Herr Björn Lange hat darüber hinaus die Wirksamkeit dieses neuen Prodrugs beim Neuroblastom untersucht. Das überraschende Ergebnis einer Wirksamkeit auch bei nicht MDR-1-vermittelter Zytostatikaresistenz wurde in Cancer Letters publiziert.

2. Lange,B.; Schroeder,U.; Huebener,N.; Jikai,J.; Wenkel,J.; Strandsby,A.; Wrasidlo,W.; Gaedicke,G.; Lode,H.N. (2003): Rationally designed hydrolytically activated etoposide prodrugs, a novel strategy for the treatment of neuroblastoma, Cancer Lett. 197 [1-2], Seite 225-30.

An dieser Arbeit hat Herr Lange einen Eigenanteil von 90%.

Weiterhin war er an der Entwicklung eines enzymatisch aktivierbaren Prodrugs von Etoposid zur Behandlung des Neuroblastoms beteiligt.

3. Jikai,J.; Shamis,M.; Huebener,N.; Schroeder,U.; Wrasidlo,W.; Wenkel,J.; Lange,B.; Gaedicke,G.; Shabat,D.; Lode,H.N.(2003): Neuroblastoma directed therapy by a rational prodrug design of etoposide as a substrate for tyrosine hydroxylase, Cancer Lett. 197 [1-2], Seite 219-224.

An dieser Arbeit hat Herr Lange einen Eigenanteil von 10%.

Mit freundlichen Grüßen,

PD Dr. Holger N. Lode

Björn Sönke Lange

Erklärung an Eides Statt

„Ich, Björn Sönke Lange, erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Charakterisierung eines neuen hydrolytisch aktivierbaren Prodrugs von Etoposid und seine Wirksamkeit bei „Multidrug“ Resistenz und beim Neuroblastom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 21. Dezember 2005

Björn Sönke Lange

Danksagung

Diese Danksagung beschreibt den holprigen, geschlungenen Weg meiner Dissertation von den Anfängen des mühsam erlernten Pipettierens an der Bench, über durchgemachte Nächte an der HPLC und vor dem FACS-Gerät und Tagen am Strand von La Jolla getarnt als Kongress im fernen San Diego. Dem Kopf des „Reiseunternehmens“, Professor Dr. med. Gerhard Geadicke, gebührt mein erster Dank. Direkt folgend möchte ich meinem „Reiseleiter“ dieser Expedition in die unergründlichen Weiten der Zellkultur PD Dr.med. Holger Nikolaus Lode danken. Er bestätigte mir, daß ein Genie das Chaos beherrscht und versuchte unermüdlich den in mir schlummernden Forschergeist zu entfachen. Fortführend gilt der Dank vor allem seiner rechten (und linken) Hand aus dem fernen Norden Diplom-Biologin Nicole Hübener für die Organisation des Chaos oder zumindest für den Versuch. Danken möchte ich natürlich der gesamten „Reisegruppe“: Wolf Wrasidlo, immer für eine Überraschung gut, Jens Wenkel für unbändige Energie, Anne Strandsby für die Zigarette danach, Jikai Jiang und Yan Zeng, the chinese connection, Stefan Fest, für die Entdeckung der Schleiz'schen Volumenformel, Silke Weixler, it's just gossip baby, Anja Wöhler und Stefanie Heinrich, the new arrivals und Doron Shabat für geteilte Leidenschaften.

Natürlich danke ich an dieser Stelle auch meinen Eltern und meiner gesamten Familie. Schön daß man auch bei langen Reisen immer weiß wo man zu Hause sein darf.

Schließlich möchte ich erwähnen, daß sämtliche Strapazen, sämtliche Unwegsamkeiten sich allein schon deswegen gelohnt haben, da ich ohne diese niemals auf diesen kostbarsten aller Schätze gestoßen wäre, den ich nun mein Eigen nennen darf. Denn schaut man mal über den Tellerrand des Mikrokosmos Labor hinaus, so erstreckt sich dort ein Paradies, welches man zu zweit so viel besser erkunden kann.

Natürlich danke ich auch allen Menschen, denen ich auf diesem Weg begegnen durfte, denen ich aber namentlich hier nicht gedankt habe. Erinnerungen sagen mehr als geschriebene Worte.

Berlin, 21. Dezember 2005

Björn Lange

Seite 36-43 [A]Schroeder,U.; Bernt,K.M.; Lange,B.; Wenkel,J.; Jikai,J.; Shabat,D.; Amir,R.; Huebener,N.; Niethammer,A.G.; Hagemeyer,C.; Wiebusch,L.; Gaedicke,G.; Wrasidlo,W.; Reisfeld,R.A.; Lode,H.N.(2003): Hydrolytically activated etoposide prodrugs inhibit MDR-1 function and eradicate established MDR-1 multidrug-resistant T-cell leukemia, Blood 102 [1], Seite 246-253.

Seite 44-49 [B] Lange,B.; Schroeder,U.; Huebener,N.; Jikai,J.; Wenkel,J.; Strandsby,A.; Wrasidlo,W.; Gaedicke,G.; Lode,H.N. (2003): Rationally designed hydrolytically activated etoposide prodrugs, a novel strategy for the treatment of neuroblastoma, Cancer Lett. 197 [1-2], Seite 225-30.

Seite 50-55 [C]Jikai,J.; Shamis,M.; Huebener,N.; Schroeder,U.; Wrasidlo,W.; Wenkel,J.; Lange,B.; Gaedicke,G.; Shabat,D.; Lode,H.N.(2003): Neuroblastoma directed therapy by a rational prodrug design of etoposide as a substrate for tyrosine hydroxylase, Cancer Lett. 197 [1-2], Seite 219-224.