

# Teil I

## Einleitung

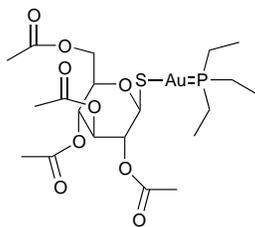


# Kapitel 1

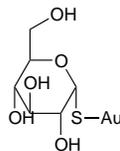
## Metallkomplexe in der Medizin

Medizinische anorganische Chemie wird schon seit mehreren Jahrtausenden praktiziert. Bereits 3000 v.Chr. benutzten die Ägypter Kupfer, um Wasser zu sterilisieren. Ca. 1500 v.Chr. wurden ebenfalls in Ägypten Eisenverbindungen und Kupfer zur Wunddesinfektion verwandt. Der medizinische Einsatz von Gold in arabischen Ländern und in China geht mehr als 3500 Jahre zurück. In der Renaissancezeit wurde in Europa Quecksilberchlorid als Diuretikum eingesetzt. Anfang des 20. Jahrhunderts therapierte man die Tuberkulose mit  $K[Au(CN)_2]$ , Leishmaniose mit Antimonverbindungen und Infektionen mit Goldsalzen.[1]

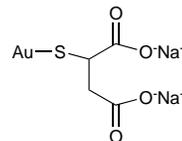
Auch heute noch werden - wenn auch nicht allzu viele - Metallverbindungen



Auranofin



Aurothioglucose



Natriumaurothiomalat

Abbildung 1.1: Goldkomplexe

pharmazeutisch angewandt. Verbindungen mit Kupfer, Silber, Quecksilber, Zinn oder Zink werden vor allem wegen ihrer bakteriziden und desinfizierenden Eigenschaften verwendet. So nutzt man Silbernitratstifte zur Warzenbehandlung oder die Quecksilberverbindung Thiomersal zur Desinfektion. Goldverbindungen finden noch vereinzelt Anwendung in der Therapie der rheumatoiden Arthritis (Auranofin, Aurothioglucose, Natriumaurothioma-

lat, siehe Abbildung 1.1). Fe(II)-Verbindungen werden oral oder parenteral zur Nahrungsergänzung in der Schwangerschaft eingesetzt. Der Eisenkomplex Natriumpentacyanonitrosylferrat (Nitroprussidnatrium,  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ ) findet Anwendung bei Hypertonie. Die Haupteinsatzgebiete von Metallkomplexen in der Medizin sind neben der Behandlung parasitärer Erkrankungen und der Diagnostik (v.a. Radiopharmazie) die Tumorthherapie. [2]

## 1.1 Metallkomplexe als Cytostatika

Mitte der sechziger Jahre wurde von Rosenberg und Mitarbeitern die Antitumorwirksamkeit von Cisplatin ( $\text{cis-PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$ ) beschrieben. Diese Verbindung kann bezüglich ihrer Wirkungsweise mit den alkylierenden Cytostatika verglichen werden, da sie ebenso wie diese kovalente Bindungen zur DNS ausbildet. Cisplatin enthält jedoch nicht einen einzigen Kohlenstoff und ist somit eine 'klassische' anorganische Verbindung. Nur die cis-Form weist Akti-

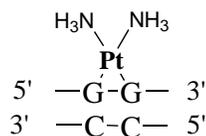


Abbildung 1.2: durch Cisplatin verursachter 'intrastrand crosslink'

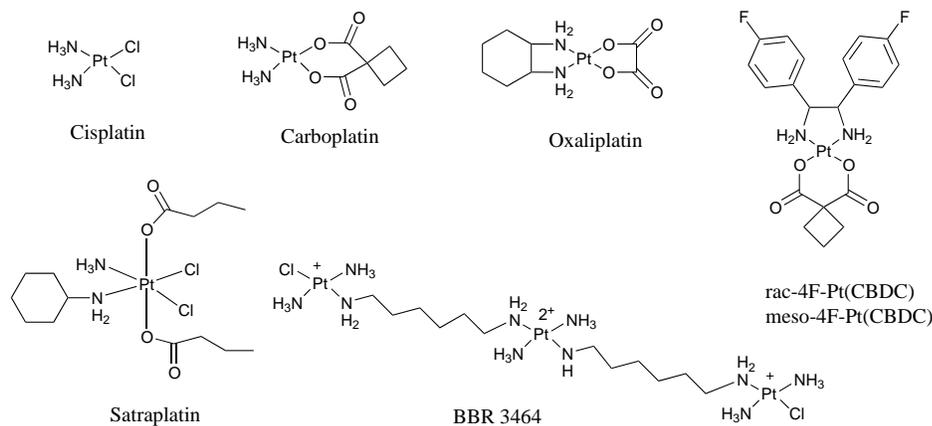


Abbildung 1.3: Platinkomplexe

vität auf. Cisplatin bindet an alle vier DNS-Basen, jedoch bevorzugt an N-7 von Guanin. Der Großteil der Cisplatin-DNS-Addukte besteht aus sogenannten 'intrastrand-crosslinks', bei denen es zu einer Quervernetzung innerhalb

desselben DNS-Stranges kommt (siehe Abbildung 1.2). Dabei werden 65% aller Cisplatin-DNS-Addukte zwischen zwei N-7 von benachbarten Guaninen gebildet und 25% zwischen N-7 eines Guanins und N-7 eines benachbarten Adenins. Nur weniger als 1% der Cisplatin-DNS-Addukte sind Quervernetzungen zwischen zwei verschiedenen DNS-Strängen. [3]

Die beeindruckenden Erfolge von Cisplatin führten zu einer intensivierten Suche nach weiteren Cytostatika auf Metallbasis bzw. Platinbasis (siehe Abbildung 1.3). Die Erfolge waren jedoch eher bescheiden. Ein weiterer in der Therapie eingesetzter Platinkomplex ist Carboplatin. Diese Verbindung hat stärker gebundene Abgangsgruppen als Cisplatin und weist so eine von Cisplatin abweichende Pharmakokinetik auf. Untersuchungen an den Carboplatinderivaten *rac*- bzw. *meso*-4F-Pt(CBDC) zeigten, dass die Cytotoxizität von Carboplatin durch Einführung eines Diamminträgerliganden noch gesteigert werden kann. Dieses Konzept trifft auch für Oxaliplatin zu. [4, 5]

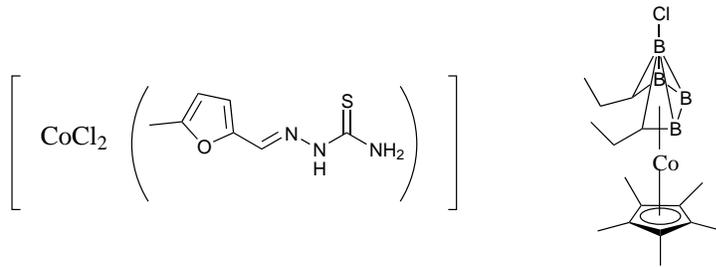
Alle bisher in der Therapie verwendeten Platinverbindungen sind Komplexe mit einem zentralen Pt(II)-Atom. Pt(IV)-Komplexe, wie das derzeit in der klinischen Testung untersuchte Satraplatin, zeigen ebenfalls Aktivität. Sie werden in den Zellen zu Pt(II)-Spezies reduziert und stellen gewissermaßen Prodrugs zu den entsprechenden Pt(II)-Verbindungen dar. Der Vorteil von Pt(IV)-Verbindungen ist in der erhöhten Stabilität in biologischen Medien zu sehen. [6]-[8]

Bei BBR 3464 handelt es sich um einen dreikernigen kationischen Platinkomplex, der sich derzeit in der klinischen Testung befindet [9, 10]. Die Antitumorchemie von Cisplatin hat zweifellos die Suche nach weiteren Cytostatika auf Metallbasis stimuliert. Komplexe von Ru(II) und Ru(III), die ähnliche Ligandenaustauscheigenschaften wie Pt(II) besitzen, liefern vielversprechende Ergebnisse. Der Ru(III)-Komplex NAMI etwa befindet sich derzeit in der klinischen Prüfung [10]-[12].

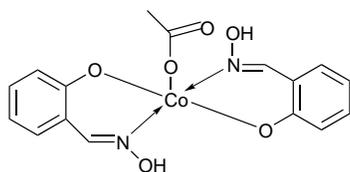
## **Antitumoraktive Cobalt-Komplexe**

Obwohl der Forschung nach neuen Antitumorwirkstoffen breiter Raum eingeräumt wird, ist nur wenig über den Einsatz von Cobalt-Komplexen auf diesem Gebiet bekannt.

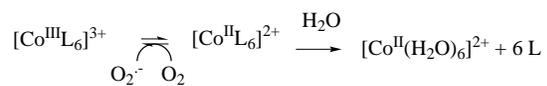
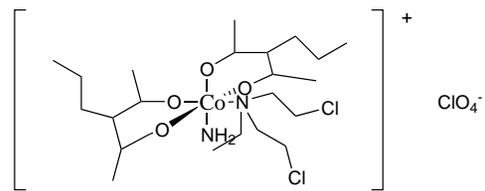
Hall et al. untersuchten die Wirkung von Cobalt-Carboran und Cobalt-Thiosemicarbazon-Komplexen (siehe Abbildung 1.4 und [13, 14]). Die Wirkung der Komplexe war mit ED<sub>50</sub>-Werten unter 1 µg/ml besonders an Leukämie und Lymphom-Zellkulturen ausgeprägt und an Zellkulturen von soliden Tumoren wesentlich schwächer. Die Komplexe beeinflussten in den Nucleinsäurestoffwechsel involvierte Enzyme. Die DNS selbst scheint aber nicht Angriffspunkt für diese Klasse von Wirkstoffen zu sein. Die Aktivität von weiteren



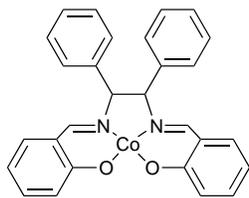
Hall et al.



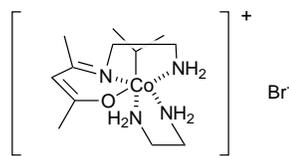
Jayaraju et al.



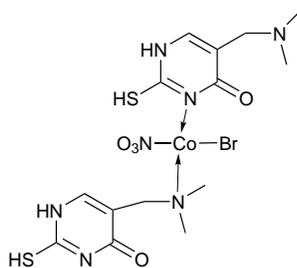
Ware et al.



Sommer et al.



Volpin et al., Osinsky et al.



Kamalakkanan et al.

Abbildung 1.4: antitumoraktive Cobaltkomplexe

Cobalt-Thiosemicarbazon-Komplexen wurde auch an Brustkrebszellen beschrieben, allerdings war hier die Aktivität des Komplexes nur geringfügig besser als die des freien Thiosemicarbazon-Liganden [15].

Jayaraju et al. berichteten über einen antitumoraktiven Cobalt-Salicylaldoxim-Komplex mit Topoisomerase-Hemmwirkung. Die Aktivität an HL-60 Leukämiezellen war aber mit einer  $IC_{50}$  im  $60\mu\text{M}$ -Bereich gering [16]. Ware et al. verfolgten mit der Entwicklung von Cobalt-Komplexen mit Senfgasderivaten einen interessanten Gedankenansatz. Basierend auf der Tatsache, dass vor allem Tumorzellen, die sich unter anaeroben Bedingungen vermehren, resistent gegen herkömmliche Chemotherapeutika sind, sollten die Cobalt(III)-Komplexe nach Einelektronenreduktion unter hypoxischen Bedingungen instabile Co(II)-Komplexe ausbilden. Diese setzen sodann das Senfgasderivat gezielt in schwer therapierbaren Gewebeabschnitten frei (siehe Abbildung 1.4). [17]

Osinsky und Mitarbeiter machten sich den erniedrigten pH-Wert von Tumoren zunutze. Cobalt-Komplexe mit Schiffischen Basen können unter milden sauren Bedingungen Alkylradikale und reaktive Sauerstoffspezies freisetzen. Somit können diese äußerst reaktiven Verbindungen gezielt in Tumorzellen aus den Komplexen gebildet werden und zu einer nachfolgenden Fragmentierung der DNS führen. Der in Abbildung 1.4 gezeigte Komplex führte in Kombination mit Cisplatin, Bestrahlung oder Wärmeeinwirkung zu einer deutlichen Steigerung der Effizienz einer Tumorbehandlung bei Ratten [18, 19]. Cobalt-Salen-Komplexe beinhalten ebenfalls Schiffische Basen. Diese Verbindungen wurden als antitumoraktive Substanzen an MCF-7, MDA-MB-231 und LNCaP Zellen getestet. Die wirksamsten Vertreter zeigten schon bei 5 bis  $10\mu\text{M}$  deutliche antiproliferative Wirksamkeit. Die Verbindungen binden effizient an die DNS und sind in der Lage Sauerstoff reversibel zu binden. Sie wirken also vermutlich ebenso durch DNS-Fragmentierung. [20]

Cobalt-Komplexe mit Derivaten des Adeninmetaboliten Thiouracil waren in-vitro und in-vivo an Leukämien und Lymphomen aktiv [21].

Die eben beschriebenen antitumoraktiven Cobalt-Komplexe weisen unterschiedlichste Liganden auf (siehe Abbildung 1.4). Als Wirkungsmechanismen werden wie erwähnt vor allem Interaktionen mit der DNS oder dem Redoxsystem der Zellen diskutiert. Die Antitumoraktivität der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, strukturell völlig andersartigen, Cobalt-Alkin-Komplexe ist in Abschnitt 2.4 näher beschrieben.

## 1.2 Metallkomplexe als Diagnostika

Die Grundanforderungen an Diagnostika umfassen Unschädlichkeit für den menschlichen Körper, leichte Eliminierung oder Abbaubarkeit, geeignete physikalische Eigenschaften zur Detektion (z.B. Radioaktivität oder Fluoreszenz) und Bindung an die gewünschten biologischen Zielstrukturen. Oftmals können hier Metallverbindungen eingesetzt werden, wobei das Metall das Detektionssignal liefert und der Ligand für die Bindung verantwortlich ist. Anwendung finden diese Diagnostika vielfach in Form von Radiopharmazeutika.

$^{57}\text{Co}$ -Cyanocobalaminlösung wird zur Diagnose der perniziösen Anämie angewandt, Natrium( $^{131}\text{I}$ )Iodidlösung zur Diagnose und Therapie von Schilddrüsenerkrankungen [2].  $^{99m}\text{Tc}$  ist ein metastabiles Isotop des langlebigen Technetium  $^{99}\text{Tc}$ . In Radiopharmaka ist es das am häufigsten verwendete Isotop, da es sich durch ausgezeichnete bildgebende Eigenschaften und die kurze Halbwertszeit von nur 6 Stunden auszeichnet. Einen besonders interessanten Komplex stellt  $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  dar, welcher unter basischen und reduzierenden Bedingungen leicht aus Technetat hergestellt werden kann [10, 22]. Welch wertvolle Dienste dieser Carbonylkomplex als Markierungsreagenz für Biomoleküle zu leisten vermag, konnte von Amann und Mitarbeitern anhand der Markierungsreaktion für Surfactant Protein B eindrucksvoll gezeigt werden (siehe Abbildung 1.5 und [23]). Der Entwicklung bildgeben-

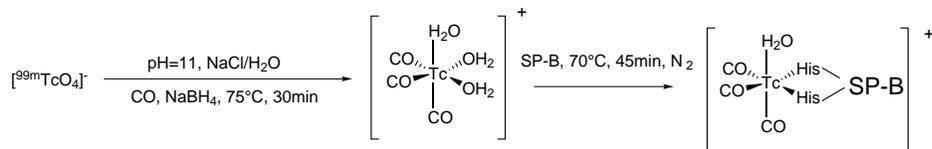


Abbildung 1.5: Herstellung von  $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  und Markierungsreaktion für Surfactant-Protein B (SP-B).

der, nichtradioaktiver Verfahren wurde ebenso große Beachtung geschenkt. Das Gd(III)-Ion kann in der Magnetresonanzspektroskopie (MRI) als Kontrastmittel verwendet werden. Die bildgebenden Eigenschaften beruhen darauf, dass bei Bindung an Wasser dessen Relaxationseigenschaften deutlich geändert werden [10]. Metallcarbonylverbindungen sollen aufgrund der leichten Detektierbarkeit der Carbonylgruppen durch IR bei biologischen Assays zum Einsatz kommen. Die Anwendung dieses Verfahrens (z.B. für Steroidhormone oder Antiepileptika) wurde von Jaouen und Mitarbeitern entwickelt und der Name Carbonyl-Metallo-Immuno-Assay (CMIA) vorgeschlagen (siehe Abschnitt 2.5 und [22]).

### 1.3 Metallkomplexe als antiparasitäre, antivirale und antibakterielle Wirkstoffe

Der Einsatz anorganischer Verbindungen in der Therapie antiparasitärer Erkrankungen hat lange Tradition. Bereits 1909 wurde die von Paul Ehrlich entwickelte Arsanilsäure (siehe Abbildung 1.6) zur Therapie von Trypanosomenerkrankungen (Schlafkrankheit und Chagaskrankheit) eingeführt. Antimonverbindungen (z.B. Na-Stibogluconat) werden zur Therapie von Leishmaniosenerkrankungen oder Bilharziose verwendet. [2]

Neuere Arbeiten beschäftigen sich mit Platin-, Ruthenium- und Rhodium-Komplexen als Antimalariamittel oder Bismut-Verbindungen als Wirkstoffe gegen SARS-Coronaviren [24]-[26].

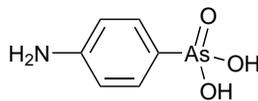


Abbildung 1.6: Arsanilsäure



# Kapitel 2

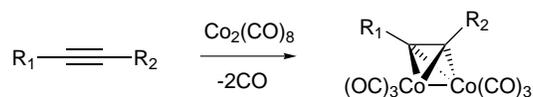
## Cobalt-Alkin-Komplexe

Cobalt-Alkin-Komplexe (oder Hexacarbonyldicobalt-Komplexe, siehe Abbildung 2.1a) wurden erstmals von Greenfield und Mitarbeitern beschrieben [27]. Es handelt sich dabei um stark rotbraun gefärbte Verbindungen, bei denen zwei Cobaltatome jeweils an beide Enden einer Alkingruppierung des Liganden gebunden sind. Die beiden Cobaltatome sind wiederum untereinander verbunden, wobei die Cobalt-Cobalt-Achse rechtwinklig zu der Dreifachbindung steht. An jedes der beiden Cobaltatome sind wiederum jeweils drei Kohlenmonoxidmoleküle gebunden. Diese Komplexe können leicht aus der Umsetzung von Dicobaltoctacarbonyl mit einem entsprechendem Alkin erhalten werden (siehe Abbildung 2.1a). Es handelt sich dabei um eine Ligandenaustauschreaktion von zwei Äquivalenten Kohlenmonoxid gegen die Dreifachbindung des Liganden. Das Alkin fungiert hier als Vierelektronenbrückenligand. Die Koordination der Dreifachbindung an den zweikernigen Metallkomplex ändert die Eigenschaften der Alkingruppe drastisch. Die C-C-Bindungslänge steigt von 1.20 auf ca 1.35 Angström und die Linearität der Bindung geht verloren. Die Substituenten bewegen sich in Richtung der metallabgewandten Seite und nehmen einen Winkel von ca. 140 Grad ein. Somit wird die Alkingeometrie in Richtung eines Z-Olefins geändert (siehe Abbildung 2.1a). [28]

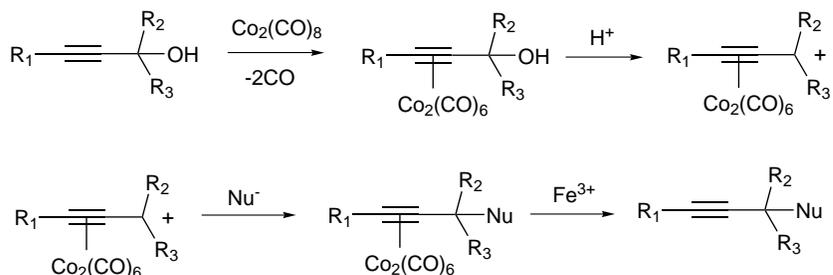
### 2.1 Nicholas-Reaktion

Die  $\text{Co}_2(\text{CO})_6$ -Komplexierung von Alkinen bewirkt ferner eine Stabilisierung positiver Ladung in Propargylposition. Dieses Prinzip wird in der Nicholas-Reaktion zu Synthesezwecken genutzt. Werden Propargylderivate mit Säuren behandelt kommt es zur Bildung von stabilen Carbokationen, welche mit Nukleophilen weiter umgesetzt werden. Die Alkine können dann unter milden

a) Synthese



b) Nicholas-Reaktion



c) Pauson-Khand-Reaktion

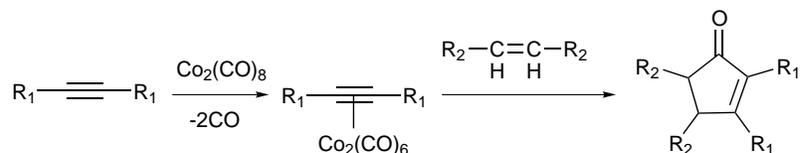


Abbildung 2.1: Synthese und Reaktionen von Cobalt-Alkin-Komplexen; R und R<sub>1-3</sub> = Alkyl-, Aryl- etc.

oxidierenden Bedingungen wieder freigesetzt werden (siehe Abbildung 2.1b). [29]-[32]

Die Elektrophilie der intermediär gebildeten Kationen hängt dabei weniger von den Substituenten an der Dreifachbindung ab als von der Anwesenheit der CO-Liganden. Die Anwesenheit von Phenylsubstituenten etwa senkt die Elektrophilie nur schwach. Der Austausch eines CO-Liganden gegen PPh<sub>3</sub> jedoch führt zu einer drastischen Abnahme. [33]

## 2.2 Pauson-Khand-Reaktion

Größere Bedeutung haben Hexacarbonyldicobalt-Komplexe in der Pauson-Khand-Reaktion erhalten (siehe Abbildung 2.1c). Dabei wird formal in einem

(2+2+1)Cycloadditionsprozeß ein Alkin mit einem Alken und Kohlenmonoxid zu einem Cyclopentenon umgesetzt. Im ersten Schritt reagiert das Alkin mit Dicobaltoctacarbonyl zum Hexacarbonyldicobalt-Komplex. Durch Einbau eines CO aus diesem Komplex in ein Ringsystem entsteht bei Umsetzung mit dem Alken dann das Cyclopentenon. Primäre Amine als Lewis-Basen können die Reaktion bedeutend begünstigen. Polare Gruppen in unmittelbarer Nachbarschaft des Alkins andererseits können die Umsetzung wiederum verhindern. Bei Reaktion mit Alkenen, die stark elektronenziehende Substituenten (z.B. -CN) tragen, kommt es zur Bildung konjugierter Diene. [34]-[36]

## 2.3 Elektrochemie der Cobalt-Alkin-Komplexe

Cobalt-Alkin-Komplexe können elektrochemisch in einer Einelektronenreduktion zu den entsprechenden  $[\text{Co}_2(\text{CO})_6(\text{Alkin})]^-$ -Radikalanionen reduziert werden. Diese Radikalanionen sind sehr instabil und zerfallen unter anderem zu  $\text{Co}(\text{CO})_4^-$ , freiem Alkin und metallischem Cobalt. Der elektrochemische Prozeß ist somit irreversibel. Entsprechende Messungen wurden durch Ablagerungen an den eingesetzten Platinelektroden bedeutend erschwert. [37]-[39]

## 2.4 Cytotoxizität der Cobalt-Alkin-Komplexe

Der erste Bericht über das cytotoxische Potential der Komplexe stammt von Untersuchungen an Leukämiezellen der Maus. Der in Abbildung 2.2 gezeigte Komplex wies einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $3\mu\text{M}$  auf [40].

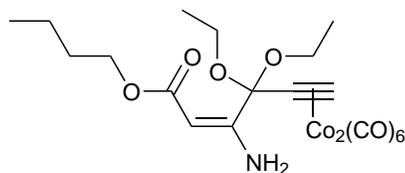


Abbildung 2.2: an Leukämiezellen aktiver Komplex

Untersuchungen weiterer Komplexe an humanen Tumorzellen der Haut, Lunge, Brust und Prostata zeigten, dass diese Verbindungen hohes cytotoxisches Potential besitzen. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte lagen zum Teil unter  $5\mu\text{M}$ . Unter den wenigen getesteten Verbindungen kristallisierte sich der Komplex des Acetylsalicylsäurepropargylesters (Co-ASS, siehe Abbildung 2.3) als Leitverbin-

derung für diese neue Klasse von Antitumorwirkstoffen heraus. Interessanterweise war die entsprechende Salicylsäureverbindung (Co-SAL) weniger wirksam und Ersatz des 2-Propinesters durch einen 2-Butinester (Co-MeASS) führte zu völligem Wirkungsverlust. Unkomplexiertes Dicobaltoctacarbonyl sowie der freie Alkinligand (Acetylsalicylsäurepropargylester) zeigten keine cytotoxische Aktivität. Diese ersten Untersuchungen zeigten somit, dass die

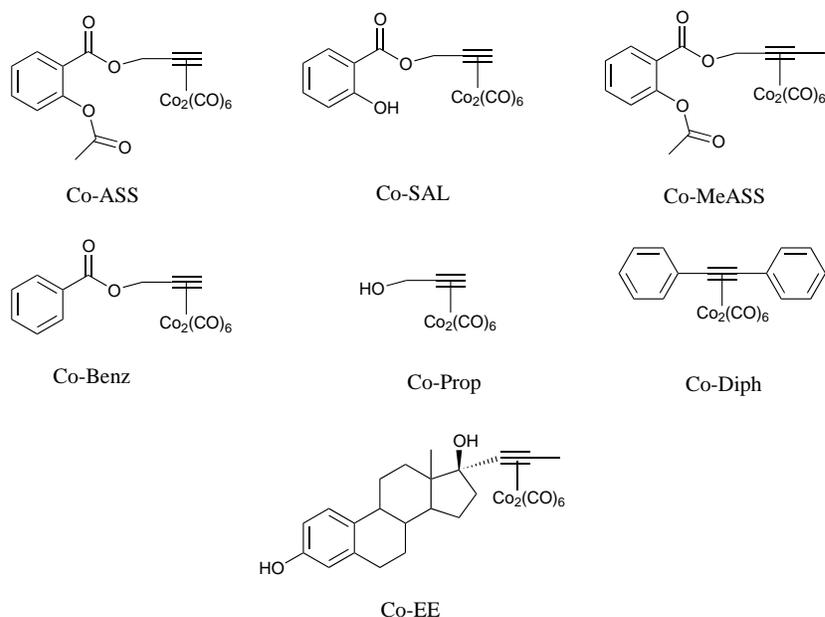


Abbildung 2.3: Cobalt-Alkin-Komplexe

Aktivität der Cobalt-Alkin-Komplexe stark von der chemischen Struktur des Alkinliganden abhängt und die Koordination des Alkins an  $\text{Co}_2(\text{CO})_6$  unbedingt nötig ist, um potente Verbindungen zu erhalten. [41]-[43]

Eingehendere Experimente an humanen Brustkrebszellen sollten zu weiteren, möglicherweise noch aktiveren Komplexen führen. Strukturell sehr einfache Verbindungen wie der Propargylalkohol-Komplex (Co-Prop) führten zu einer schwächeren Hemmwirkung auf das Zellwachstum. Verbindungen des Diarylacetylentyps (z.B. Co-Diph) wurden aufgrund der z-olefinartigen räumlichen Struktur der Cobalt-Komplexe synthetisiert. Diese veränderte Geometrie sollte eine Bindung an Estrogenrezeptoren ermöglichen, wie es von Stilbenderivaten bekannt ist. Die Verbindungen waren jedoch nicht aktiv. Die wirksamsten Verbindungen stellten wiederum Benzoesäureesterderivate dar. Besonders günstig wirkten sich hier die Einführung einer Hydroxidfunktion (Co-SAL) bzw. Acetoxygruppe (CO-ASS) in Position 2 des Aromaten aus.

Die Verschiebung dieser funktionellen Gruppen in Position 3 bzw. 4 führte zu weniger aktiven Substanzen. Mit Methoxy- oder Fluorsubstituenten an Position 2, 3 oder 4 erhielt man ebenfalls stark wirksame Verbindungen. Kettenverlängerung des Esters um eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe führt im Falle der unsubstituierten Verbindung (Co-Benz) zu einer Wirkungsverstärkung, im Falle des 2-Acetoxyderivates (Co-ASS) aber zum gegenteiligen Effekt. Durch Austausch der Esterfunktion gegen eine Etherfunktion gelangt man ebenfalls zu wirksamen Verbindungen.

Generell kann festgestellt werden, dass die Aktivität bei den untersuchten Brustkrebszellen an MCF-7 Zellen besser war als an MDA-MB-231 Zellen. Das wirksamste aller untersuchten Derivate war das Acetylsalicylsäurederivat Co-ASS. [42]

Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden durch auf Xenograftmodellen basierende Experimente bekräftigt. Unter einer Reihe von untersuchten Tumormodellen waren wiederum die Brustkrebszellen am empfindlichsten gegenüber der Substanzeinwirkung. [44]

## 2.5 Cobalt-Alkin-Komplexe als Diagnostika

Die Carbonylgruppen der Cobalt-Alkin-Komplexe weisen intensive IR-Banden zwischen  $2000$  und  $2100\text{ cm}^{-1}$  auf. Dort absorbieren nur wenige andere organische Gruppen. Dies ermöglicht eine selektive Detektion mit hoher Empfindlichkeit auch in kompliziert zusammengesetzten Medien. Anwendung findet dieses Verfahren in Form des sogenannten 'Carbonyl-Metallo-Immunoassays' (CMIA). Zur Bestimmung der Serumkonzentration von Antiepileptika wurden Cobalt-Alkin-Derivate dieser Arzneistoffe (z.B. von Carbamazepin) verwendet. Weiterhin kann diese Technik auch bei der Analytik von Steroidhormonen zum Einsatz kommen. Die Komplexierung ändert jedoch auch die Eigenschaften der Ausgangsverbindung. So konnte für Cobalt-Alkin-modifizierte Ethinylestradiole (z.B. Co-EE, siehe Abbildung 2.3) eine irreversible Bindung zum Estrogenrezeptor und dessen teilweise Inaktivierung nachgewiesen werden. [22],[45]-[51]



# Kapitel 3

## Cytostatika / Wirkungsmechanismen

### 3.1 Cytostatika

Als Cytostatika werden Wirkstoffe zur Therapie maligner Tumoren bezeichnet, die das Wachstum von Tumorzellen verringern. Da dabei auch gleichzeitig das Wachstum 'normaler' Nichttumorzellen beeinträchtigt wird, kommt es in der Therapie zu gravierenden Nebenwirkungen, die sich meist auf die Schädigung stark proliferierender Gewebe zurückführen lassen (z.B. Schleimhäute, Knochenmark). Deshalb ist insbesondere die Suche nach gewebe selektiven und tumorselektiven Substanzen ein Hauptziel bei der Entwicklung neuer Antitumorwirkstoffe. Bei der Therapie des Prostatakarzinoms und des Mammakarzinoms etwa wird dies durch Einsatz von Steroidhormonen, Hormonantagonisten und Aromatasehemmern verwirklicht. Der Hormonantagonist Tamoxifen z.B. gilt in der Therapie des hormonabhängigen Mammakarzinoms als 'Goldstandard'. Fast alle übrigen Cytostatika greifen in den Replikationsmechanismus der Zellen ein. Als Hauptangriffsort aller dieser Wirkstoffe gilt die DNS selbst oder in den DNS-Metabolismus involvierte Enzyme. Im folgenden sind die wichtigsten Klassen von Antitumorwirkstoffen aufgeführt:

- Mitosehemmstoffe (z.B. Vincristin)
- Alkylierende Cytostatika (z.B. Melphalan, Cisplatin)
- Antimetabolite (z.B. Fluorouracil, Methotrexat)
- cytostatisch wirkende Antibiotika (z.B. Doxorubicin, Bleomycin)

## 3.2 NSAR als neue Wirkstoffklasse in der Tumorthherapie

### (NSAR) Nichtsteroidale Antirheumatika

Nichtsteroidale Antirheumatika (siehe Abbildung 3.1) werden auch als 'schwach wirksame Analgetika' bezeichnet. Ihre Wirkung ist im wesentlichen nicht nur analgetisch, sondern auch antipyretisch und (sofern sie sauren Charakter aufweisen) antiphlogistisch. Die Substanzen können in folgende chemische Gruppen eingeteilt werden:

- Pyrazolderivate (z.B. Metamizol)
- Anilide (z.B. Paracetamol)
- Salicylsäurederivate (z.B. Acetylsalicylsäure)
- Anthranilsäurederivate (z.B. Mefenaminsäure)
- Aryl- und Heteroarylessig- und -propionsäurederivate (z.B. Indomethacin, Diclofenac, Naproxen)
- Oxicame (z.B. Piroxicam)

Mit Ausnahme der Anilide handelt es sich dabei um Hemmstoffe der Cyclooxygenase. Dadurch kommt es zu einer verminderten Bildung von Prostaglandinen, Prostacyclin und Thromboxanen und im Gegenzug zu einer vermehrten Bildung von Leukotrienen. Durch das Fehlen der Schmerz- und Entzündungsmediatoren der Prostaglandine erklären sich im wesentlichen die Wirkungen (siehe oben) und wichtigsten Nebenwirkungen (z.B. gastrointestinale Blutungen, Ulzerogenität) der NSAR. Bei den Aniliden wird ein zentraler Wirkungsmechanismus diskutiert. [2, 52, 53]

Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass die unerwünschten gastrointestinalen Nebenwirkungen Folge der Hemmung des Cyclooxygenase-Subtyps COX-1 sind und die erwünschten Wirkungen Folge der Hemmung des Subtyps COX-2. Dies hat in weiterer Folge zur Entwicklung COX-2 selektiver Hemmstoffe wie Celecoxib, Rofecoxib oder NS398 geführt. [54]-[56]

### NSAR als Tumorthapeutika der Zukunft

Aus epidemiologischen Studien an Kolonkarzinompatienten ist bekannt, dass die Einnahme von Acetylsalicylsäure (Aspirin, ASS) und anderen NSAR die

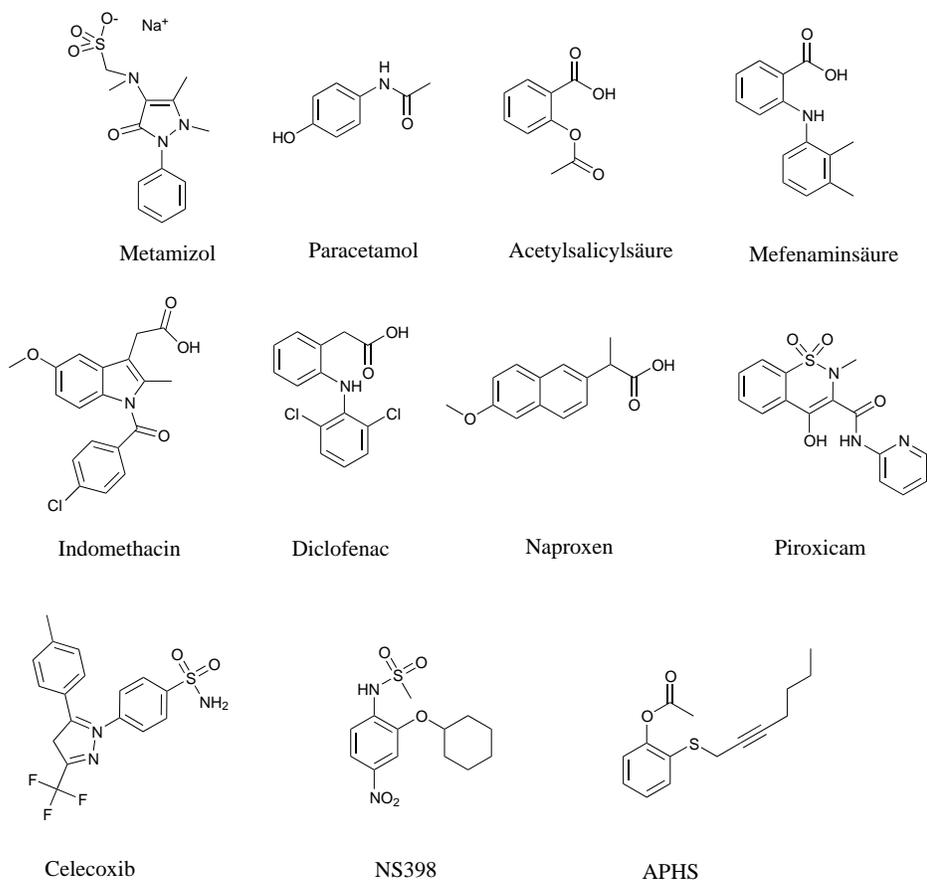


Abbildung 3.1: Beispiele für Nichtsteroidale Antirheumatika

Rezidivhäufigkeit um etwa 50% absenkt. Die Wahrscheinlichkeit eines Tumorausbruchs kann auch bei anderen Tumoren (z.B. Ösophagus, Magen, Kolon, Rektum, Brust) durch Einnahme von NSAR ebenso deutlich verringert werden. Das Prinzip ist aber nicht generell für alle Tumorformen gültig und der exakte Mechanismus der Antitumorstoffe von NSAR ist noch nicht restlos aufgeklärt. Hauptverantwortlich wird dafür aber derzeit vor allem die Hemmung von COX-2 gemacht. Denn die Überexpression von COX-2 in humanen Tumoren beeinflusst wiederum eine Reihe für die Tumorentstehung kritischer Faktoren (z.B. Angiogenese und Apoptose). Bei Brustkrebs wird unter anderem die Hemmung der COX-2-vermittelten aromatasenkatalysierten Estrogenbiosynthese als Wirkungsmechanismus in Betracht gezogen. Die Kombination des COX-2 selektiven Hemmstoffes Celecoxib mit dem Aromatasehemmer Exemestan zeigte einen synergistischen Antitumoreffekt an Ratten. Eine kürzlich veröffentlichte Studie an Brustkrebspatientinnen

belegt, dass die Wirkung von Aspirin auf das Brustkrebsrisiko vom Hormonrezeptorstatus abhängt. Die vielfältigen Wirkungen der Cyclooxygenase-Produkte (Prostaglandine) erschweren aber prinzipiell die Interpretation der NSAR-Antitumorwirkung. Prostaglandin E<sub>2</sub>, das Hauptprodukt der COX-2 -Aktivität, z.B. stimuliert die Angiogenese sowie auch die eben erwähnte Aktivität der Aromatase. [53],[57]-[60]

Bei in-vitro Cytotoxizitätsversuchen mit unselektiven COX-Hemmern (z.B. ASS, Indomethacin) wurden generell sehr hohe IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt bzw. konnten keine IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt werden. Acetylsalicylsäure, Salicylsäure und Paracetamol etwa zeigten an Kolonkarzinomzellen, Brustkrebszellen und Ovaralkarzinomzellen IC<sub>50</sub>-Werte im Bereich 2.0 bis 5.0mM. [61]-[63]

Für Indomethacin konnten meist keine IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt werden bzw. wurde das Zellwachstum teilweise sogar stimuliert [64]-[66].

An Lungenkrebszellen wurden IC<sub>50</sub>-Werte im Bereich 200-400 $\mu$ M bestimmt [67]. Die beste Aktivität wurde mit einer IC<sub>50</sub> von ca. 84 $\mu$ M an MDA-MB-231 Brustkrebszellen gefunden [68]. Flurbiprofen hemmte das Wachstum von Hirntumorzellen. (IC<sub>50</sub> ca. 100-200 $\mu$ M) [69].

COX-2 selektive Hemmstoffe (z.B. Celecoxib, NS398, SC-58125) zeigten teilweise deutlich bessere Ergebnisse als die unselektiven Inhibitoren. Celecoxib und SC-58125 waren an Kolonkarzinomzellkulturen mit IC<sub>50</sub> -Werten im Bereich 35-65 $\mu$ M aktiv, während die ebenfalls COX-2 selektiven Rofecoxib und NS-398 viel schwächer wirksam waren. [66, 67, 70, 71]

Die hoffnungsvollsten Ergebnisse in dieser Hinsicht lieferte interessanterweise APHS, eine zu ASS strukturell verwandte Verbindung (siehe Abbildung 3.1). An COX-2 positiven HCA-7 Kolonkarzinomzellen war diese Substanz mit IC<sub>50</sub> von 2-5 $\mu$ M deutlich aktiv, während an COX-2 negativen bis 10 $\mu$ M keine Aktivität festgestellt werden konnte. APHS zeigt deutliche COX-2-Selektivität und acetyliert zudem denselben Serinrest im aktiven Zentrum der COX wie ASS. [72, 73]

Der direkte Zusammenhang zwischen Hemmung der COX-2 und Antitumorwirkung von NSAR wird aber vielfach angezweifelt, da oftmals COX-2-negative Tumorzellkulturen im gleichen Ausmaß wie COX-2 positive im Wachstum beeinflusst werden. Andere, vielleicht bisher noch nicht eindeutig identifizierte Wirkungen der NSAR könnten hier eine wesentlich Rolle spielen (z.B. Hemmung von Lipxygenasen, Apoptoseeinleitung etc.). [61],[66]-[68],[71]

# Kapitel 4

## Problemstellung / Zielsetzung

Das Ausmaß der Antitumoraktivität der bisher untersuchten Cobalt-Alkin-Komplexe ist stark von der Struktur der jeweiligen Alkinliganden abhängig. Der Wirkungsmechanismus der Verbindungen ist aber bisher ungeklärt.

Um zukünftig weitere aktive Verbindungen dieser Substanzklasse entwickeln zu können, sollen im Rahmen dieser Arbeit die biochemischen und physikochemischen Eigenschaften und das Verhalten der Komplexe unter Zellkulturbedingungen eingehender untersucht werden. Die Experimente werden dabei im Hinblick auf die Aufklärung des unbekanntem Wirkungsmechanismus durchgeführt. Dazu wird die folgende Vorgangsweise gewählt:

### **Synthese und Analytik**

Ausgewählte Cobalt-Alkin-Komplexe sollen synthetisiert und charakterisiert werden. Für quantitative Bestimmungen in geringen Konzentrationen in kompliziert zusammengesetzten Proben wird eine atomabsorptionsspektrometrische Methode entwickelt.

### **Physikochemische und biochemische Untersuchungen**

Die Lipophilie der Verbindungen soll mit HPLC als  $\log k_w$ -Wert bestimmt werden. Diese ist bedeutend für die Zellaufnahme und Verteilung von Wirkstoffen. Die Stabilität der Leitverbindung Co-ASS und ausgewählter Verbindungen wird unter in-vitro-Bedingungen gemessen. Dadurch soll erkannt werden, ob die Wirksamkeit von intakten Substanzen oder Abbauprodukten abhängt. Protein- und DNS-Bindungsstudien sollen die Reaktivität der Komplexe mit Biomolekülen beschreiben und die DNS als potentielle Zielstruktur charakterisieren. Da die wirksamste Verbindung Co-ASS ein Derivat der Acetylsalicylsäure ist und NSAR als neuartige Antitumorwirkstoffe gelten, wird

das Vermögen der Substanzen, Cyclooxygenase-Enzyme zu hemmen, ermittelt. Durch Umsetzung von Co-ASS mit Thiolen (z.B. Glutathion) sollen die Reaktionsprodukte mit S-Nukleophilen aufgeklärt werden und ein möglicher Einfluß dieser Verbindung auf Redox- und Entgiftungs-Systeme der Zellen untersucht werden .

### **Untersuchungen an humanen Zelllinien**

Die meisten Zellkulturexperimente werden an MCF-7 und MDA-MB-231 humanen Brustkrebszellen durchgeführt, da aus den Voruntersuchungen bekannt ist, dass die Cobalt-Alkin-Komplexe an diesen besonders antiproliferativ wirksam sind. Zur Beschreibung der Antitumoraktivität wird der  $IC_{50}$ -Wert ermittelt. Zellaufnahmestudien sollen abklären, ob die Aktivität von unterschiedlichen intrazellulären Konzentrationen bestimmt wird. Die Ergebnisse der  $IC_{50}$ -Wertbestimmungen und der Zellaufnahmen sollen mit der Lipophilie ( $\log k_w$ -Wert) korreliert werden. Die Aufnahme in die Zellkerne wird quantifiziert und zusammen mit den Ergebnissen aus den DNS-Bindungsstudien im Hinblick auf einen die DNS betreffenden Wirkungsmechanismus diskutiert. Weiterhin soll die Beeinflussung des Enzyms Glutathionreduktase an Zelllysaten ermittelt werden und in Zusammenhang mit den Daten aus der Umsetzung mit Thiolen gebracht werden. Apoptoseuntersuchungen an der Leitverbindung Co-ASS sollen zeigen, ob und in welchem Ausmaß die Antitumoraktivität auf apoptotischen Ereignissen basiert. Die Untersuchungen an den Brustkrebszellen werden schließlich mit Experimenten an weiteren Zellkulturen (Lymphom-, Leukämie-, und Kolonkarzinomzellen) ergänzt.