

Teil III

Physikochemische und biochemische Untersuchungen

Kapitel 7

Lipophilie ($\log k_w$ -Wert)

Um an ihren Wirkort zu gelangen, müssen Arzneistoffe meist die Zellmembran überwinden und in das Cytosol gelangen. Da die Zellmembran aufgrund ihrer Phospholipidstruktur eine stark hydrophobe Barriere mit polaren Enden und das Cytosol wiederum eine hydrophile Umgebung darstellt, ist die Lipophilie von Wirkstoffen ein bestimmender pharmakodynamischer Faktor. Collander zeigte, dass die Durchquerung von Zellmaterial bei einer Vielzahl von organischen Verbindungen annähernd proportional dem Logarithmus ihrer Verteilungskoeffizienten zwischen organischer und wässriger Phase ($\log P$) ist. Der Zusammenhang zwischen Lipophilie und biologischer Aktivität kann einer Parabel folgen und wird - nach weiterer Berücksichtigung elektronischer Substituenteneinflüsse - in der als Hansch-Gleichung bekannten Beziehung wiedergegeben:

$$\log 1/C = -x(\log P)^2 + x'(\log P) + pS + x''$$

C entspricht hier der molaren Konzentration, die einen bestimmten biologischen Effekt (z.B. IC_{50}) hervorruft, x, x', x'' und p sind Regressionskoeffizienten aus der statistischen Kurvenanpassung und S die elektronischen Einflüsse. [3]

7.1 Bestimmung des $\log k_w$ -Wertes

Ziel der durchgeführten Experimente war es, einen Zusammenhang zwischen der Lipophilie der Komplexe und dem Ausmaß ihrer Anreicherung in den Zellen bzw. ihrer Antitumoraktivität zu finden. Zur experimentellen Bestimmung der Lipophilie wurde der sogenannte $\log k_w$ -Wert mittels RP-HPLC bestimmt. Dieser Wert besitzt eine sehr gute Korrelation zum eben erwähnten $\log P$ -Wert [82]. Dabei werden die Substanzen mit Methanol/Wasser als

mobiler Phase von einer RP-Säule eluiert und der jeweilige k -Wert ermittelt. Es wird jeweils die Zusammensetzung der mobilen Phase variiert, die übrigen Geräteparameter bleiben gleich. Anschließend werden die erhaltenen k -Werte logarithmisch gegen den Methanolanteil der mobilen Phase in einem Diagramm aufgetragen. Der $\log k_w$ ergibt sich aus linearer Extrapolation auf 0% Methanol (entsprechend 100% Wasser). Dieser Wert kann nur in seltenen Fällen ohne Extrapolationsmethode direkt ermittelt werden, da die meisten Substanzen ohne Methanolanteil im Fließmittel nicht eluiert werden. Eine detaillierte Versuchsanleitung findet sich in Abschnitt 17.4 und eine Tabelle mit den Retentionsdaten in Abschnitt A.3.

7.2 Ergebnisse

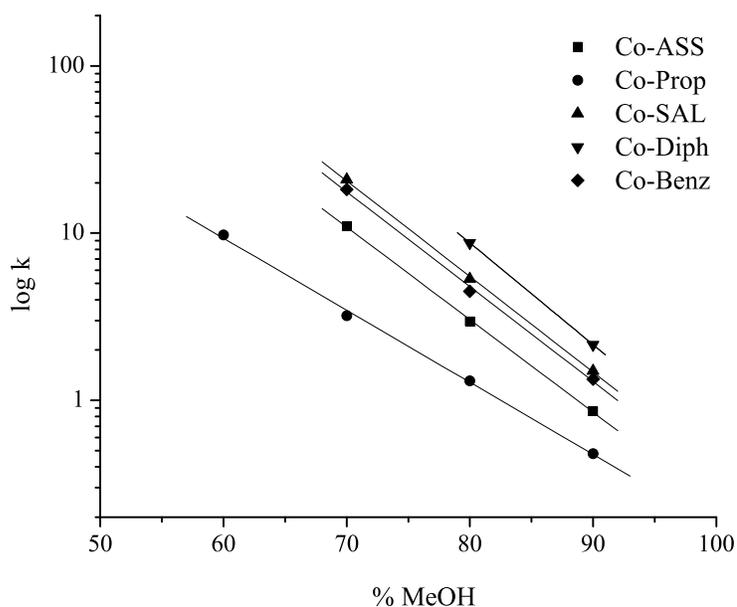


Abbildung 7.1: Lineare Regression zur Ermittlung der $\log k_w$ -Werte

Abbildung 7.1 zeigt die Korrelation der ermittelten $\log k$ -Werte einiger Komplexe mit dem Methanolanteil der mobilen Phase. In Tabelle 7.1 sind die daraus durch Extrapolation berechneten $\log k_w$ -Werte sowie die mit 'Chem-Draw Ultra' errechneten $\log P$ -Werte der zugehörigen Alkinliganden dargestellt. Wie daraus ersichtlich weisen die Cobalt-Alkin-Komplexe ein brei-

Substanz	log k_w Komplex (experimentell)	logP Ligand (berechnet)	Δ Lipophilie
Co-Diph	5.81	3.98	1.83
Co-SAL	5.32	2.43	2.89
Co-Benz	5.22	2.21	3.01
Co-2-F-Benz	5.05	1.91	3.14
Co-3-Acetbenz	4.93	1.82	3.11
Co-ASS	4.91	1.58	3.33
Co-Phthal	4.42	1.61	2.81
Co-ASSAM	3.81	1.02	2.79
Co-Prop	3.55	0.16	3.71

Substanz	log k_w Ligand (experimentell)	logP Ligand (berechnet)
Diphenylacetylen	3.82	3.98
Prop-ASS	1.98	1.58

Tabelle 7.1: log k_w -Werte bzw. logP-Werte und Änderung der Lipophilie bei der Koordination

tes Spektrum an Lipophilie auf (log k_w 5.81-3.55). Die hydrophilsten Komplexe sind das Propargylalkoholderivat Co-Prop sowie die Amidderivate Co-ASSAM und Co-Phthal. Der lipophilste Komplex ist der des Diphenylacetylenliganden Co-Diph. Die meisten Benzoesäurderivate liegen in einem relativ engen Bereich (4.91-5.32). Co-ASS und die strukturisomere Verbindung Co-3-Acetbenz zeigten erwartungsgemäß dasselbe Verhalten. In Tabelle 7.1 sind die Verbindungen nach sinkender Lipophilie der Komplexe geordnet. Mit 'ChemDraw Ultra' berechnete logP-Werte der freien Alkinliganden ergeben dieselbe Reihenfolge (ausgenommen Liganden von Co-ASS und Co-Phthal). Die computerunterstützt berechneten logP-Werte wurden exemplarisch mit experimentell ermittelten log k_w -Werten von Prop-ASS und Diphenylacetylen verglichen und zeigten einigermaßen gute Übereinstimmung (1.98 bzw. 3.82 experimentell und 1.58 bzw. 3.98 durch 'ChemDraw Ultra'). Die Zunahme der Lipophilie bei Komplexbildung der Liganden ist sehr hoch (siehe Tabelle 7.1). Sie liegt - nicht berücksichtigt wurden die strukturell stark abweichenden Co-Prop und Co-Diph - bei 3.01 ± 0.20 .

Shuyuan und Mitarbeiter bestimmten die log k_w -Werte einer Reihe von substituierten Diphenylacetylen-Cobalt-Komplexen im Bereich von 5.44 bis 6.65 [83]. Der log k_w -Wert des Diphenylacetylenkomplexes Co-Diph von 5.81 steht damit in gutem Einklang.

Um den Einfluß der Lipophilie der Cobalt-Alkin-Komplexe auf die Cy-

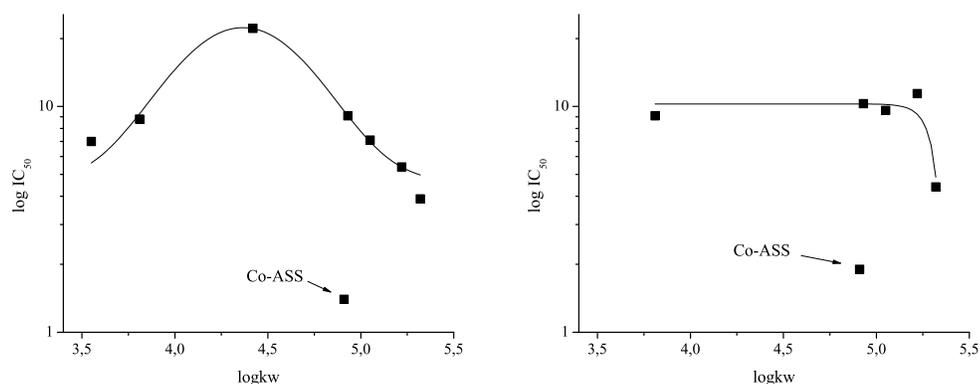


Abbildung 7.2: IC_{50} versus $\log k_w$ an MCF-7 (links) und MDA-MB-231 (rechts); berücksichtigt wurden jeweils nur Verbindungen, deren IC_{50} unter $50\mu\text{M}$ liegen

totoxizität zu beurteilen, wurden die $\log k_w$ -Werte den logarithmischen IC_{50} -Werten an den beiden Brustkrebszellkulturen gegenübergestellt (siehe Abbildung 7.2). Ähnliche Untersuchungen an Goldkomplexen zeigten, dass mathematische Zusammenhänge zwischen Lipophilie und Aktivität metallorganischer Komplexe bestehen können [84].

Bei MCF-7 läßt sich eine gauß-artige Verteilung der Werte vermuten, bei MDA-MB-231 kann eine sigmoide Funktion ermittelt werden. Zur Berechnung wurde jeweils auf die Werte von Co-ASS verzichtet, da sich diese nicht sinnvoll in die mathematischen Funktionen einordnen lassen. Dies unterstreicht die besondere Stellung der Leitstruktur Co-ASS und ist ein starkes Indiz für das Vorliegen eines spezifischen Wirkmechanismus für diese Verbindung.

7.3 Zusammenfassung

Die Lipophilie der Komplexe wurde als $\log k_w$ -Wert durch HPLC bestimmt. Durch die Koordination von Alkinen an $\text{Co}_2(\text{CO})_6$ wird die Lipophilie drastisch erhöht. Mit Ausnahme von Co-ASS scheint die Lipophilie in Zusammenhang mit der cytotoxischen Aktivität der Komplexe zu stehen. Dies weist auf das Vorliegen eines spezifischen Wirkmechanismus für diese Verbindung hin.

Kapitel 8

Stabilitätsuntersuchungen

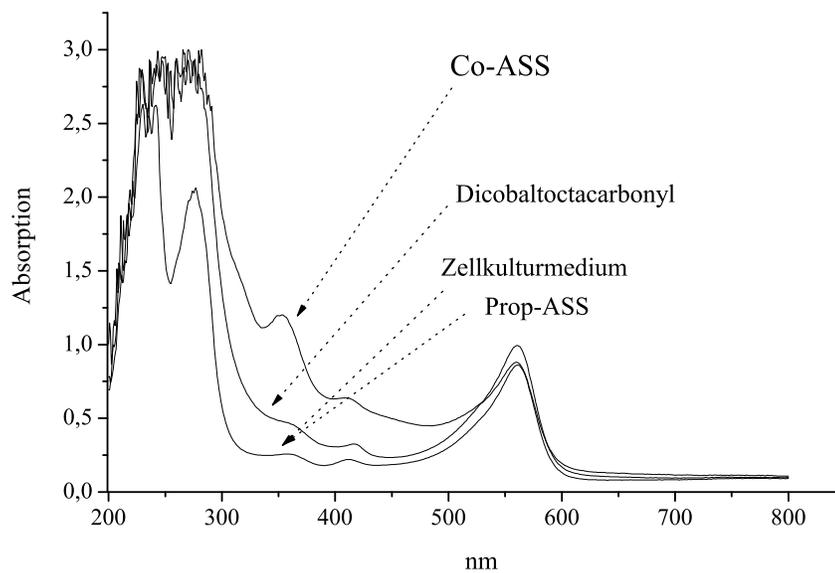


Abbildung 8.1: UV-Vis Spektren der Substanzen in Zellkulturmedium; Substanzkonzentration $200\mu\text{M}$

8.1 UV-Vis Voruntersuchungen

Um einen Eindruck darüber zu erhalten, wie sich die Komplexe unter den Bedingungen von in-vitro Zellkulturversuchen bezüglich ihrer Stabilität in

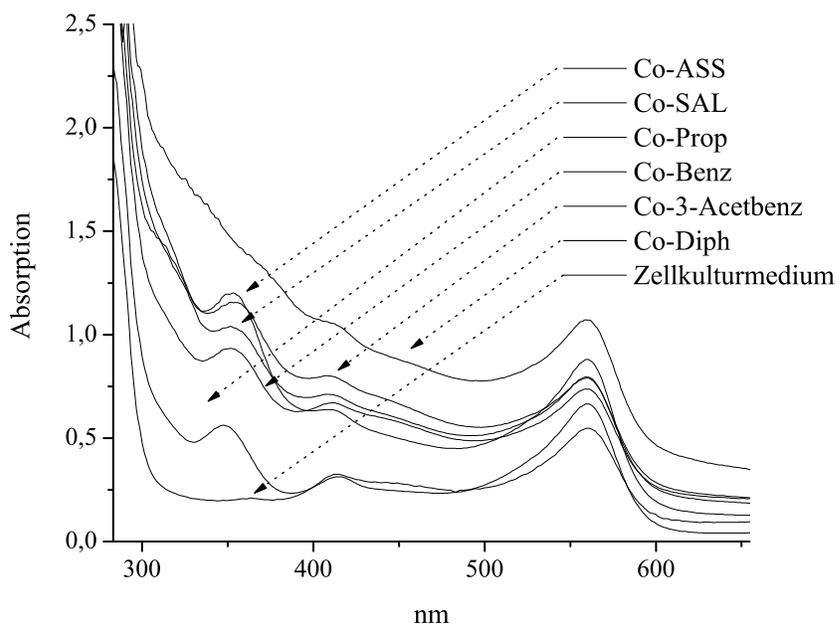


Abbildung 8.2: UV-Vis Bereich zwischen 300 und 600nm

Lösung verhalten, wurden UV-Vis-Messungen in mit FCS versetztem EMEM vorgenommen. Diese Experimente wurden exemplarisch durch HPLC-Analytik und AAS-Messungen ergänzt. Die experimentelle Durchführung ist in Abschnitt 17.5 beschrieben.

Abbildung 8.1 zeigt die Absorptionen von Co-ASS, sowie seinen Synthesestufen Prop-ASS und Dicobaltoctacarbonyl im Bereich von 200-800nm in einer Konzentration von $200\mu\text{M}$ in Medium. Während Co-ASS einen deutlich von der Matrix zu unterscheidenden Absorptionsbereich zwischen 300 und 400nm aufweist, ist die Absorption von Dicobaltoctacarbonyl deutlich schlechter von der des Mediums zu unterscheiden. Prop-ASS kann nicht von der Matrix unterschieden werden. Abbildung 8.2 zeigt die Absorptionen verschiedener Cobalt-Alkin-Komplexe ($200\mu\text{M}$) im 'interessanten' Bereich von 300-600nm. Mit Ausnahme des Diphenylacetylenderivates Co-Diph weisen alle Verbindungen ein deutliches Maximum bei ca. 350nm auf. Co-ASS und der strukturisomere Komplex Co-3-Acetbenz können erwartungsgemäß fast gar nicht voneinander unterschieden werden. Co-SAL und Co-Benz weisen leicht niedrigere Maxima auf, während Co-Prop deutlich niedriger absorbiert. Somit können UV-Vis-Messungen nur begrenzt dazu herangezogen struktu-

rell verwandte Cobalt-Alkin-Komplexe voneinander zu unterscheiden. Jedoch können aufgrund der deutlich unterschiedlichen Absorptionen des Komplexes und seiner Synthesestufen (siehe Abbildung 8.1) Abschätzungen der Stabilität der Cobalt-Alkin-Teilstruktur der einzelnen Substanzen gewonnen werden.

8.2 Ergebnisse

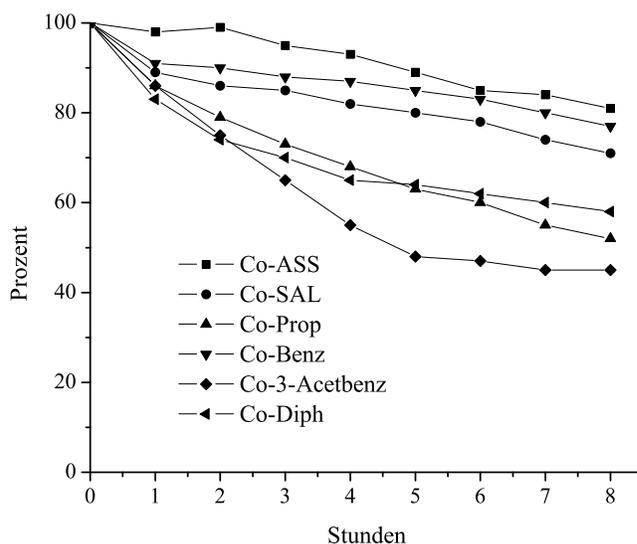


Abbildung 8.3: Stabilität von $250\mu\text{M}$ Komplex unter in-vitro Bedingungen (MW, $n=6$)

Die Stabilität von jeweils $250\mu\text{M}$ der Komplexe wurde über einen Zeitraum von acht Stunden unter in-vitro-Bedingungen (Brutschrank) verfolgt. Während dieses Zeitraums ist die Aufnahme in die Zellen abgeschlossen (siehe Abschnitt 13.2). Wie aus Abbildung 8.3 ersichtlich, weisen die Substanzen durchaus unterschiedliche Stabilität auf. Während Co-ASS, Co-SAL und Co-Benz zu über 70% der eingesetzten Menge wiedergefunden werden, sinkt die Konzentration bei Co-Prop, Co-3-Acetbenz und Co-Diph auf unter 60%. Die Gründe dafür können neben unterschiedlicher chemischer Stabilität der Cobalt-Alkin-Gruppierung auch in unterschiedlicher Reaktionsfähigkeit mit Komponenten des Mediums (z.B. mit Proteinen, siehe Abschnitt 17.1) ge-

sehen werden. Da aus Gründen der Detektierbarkeit mit der äußerst hohen Konzentration von $250\mu\text{M}$ gearbeitet werden mußte, sollte auch Sedimentation oder Anlagerung der Verbindungen an den Gefäßwänden in Betracht gezogen werden. Bei allen untersuchten Substanzen bleiben aber große Teile der Ausgangsmenge in Lösung erhalten, was hinreichende Konzentrationen bei Zellkulturexperimenten gewährt.

Die Stabilität wurde exemplarisch für Co-ASS ($200\mu\text{M}$) auch in Phosphatpufferlösung pH 7.0 bei 37°C mit HPLC bestimmt (siehe Abbildung 8.4). Nach 6 Stunden Inkubation können 83% der Ausgangsmenge wiedergefunden werden. Dies korreliert sehr gut mit der UV-Vis-Bestimmung im Zellkulturmedium. Dort wurden nach 6 Stunden 85% wiedergefunden. Nach 24 bzw. 27 Stunden können jedoch nur mehr 63% detektiert werden. Da innerhalb der untersuchten Zeit weder Abbauprodukte aus einer Hydrolyse (entsprechen Co-Prop und Co-SAL) oder der freie Alkinligand (Zerfall des Cobalt-Alkin-Komplexes) detektiert werden konnten, kann geschlußfolgert werden, dass die Verringerung der Substanzmenge in Lösung auf Sedimentation oder Ablagerung an den Gefäßwänden beruht.

Um zu überprüfen, ob es in den für die Cytotoxizitätsuntersuchungen interessanten geringen Konzentrationsbereichen und längeren Zeiträumen zu einem Substanzverlust durch Sedimentation oder Adsorption kommt, wurde eine $1.0\mu\text{M}$ Lösung von Co-ASS in Zellkulturmedium über acht Tage im Brutschrank inkubiert und mit AAS auf ihren Cobalt-Gehalt untersucht. Die Wiederfindung betrug hier über die untersuchten acht Tage 99 bis 102%.

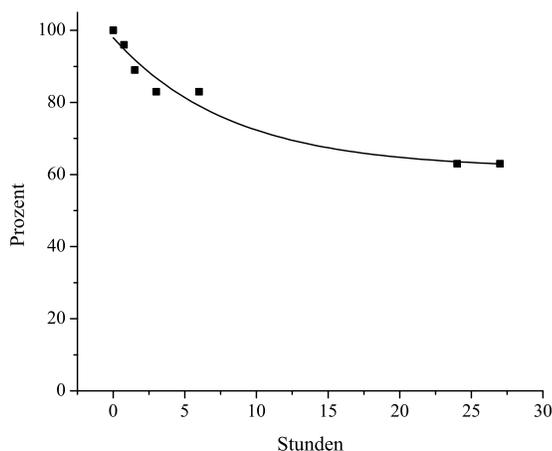


Abbildung 8.4: Stabilität von Co-ASS in Phosphatpuffer pH 7.0 (n=1)

8.3 Zusammenfassung

Lösungen von Cobalt-Alkin-Komplexen weisen in hohen Konzentrationen (z.B. $250\mu\text{M}$) unter in-vitro-Bedingungen unterschiedliche Stabilität auf. Die Gründe dafür sind weniger in unterschiedlicher chemischer Instabilität als mehr in Unterschieden in der Substanzlöslichkeit und Bindung an Proteine (siehe Abschnitt 17.1) zu sehen. In der geringen Konzentrationen von $1.0\mu\text{M}$ bleibt die Löslichkeit hingegen über mehrere Tage erhalten.

Kapitel 9

Untersuchung der Proteinbindung

Im Plasma des Menschen kommen etwa 100 verschiedene Proteine vor. Man teilt sie in Albumine und Globuline (Alpha-1-, Alpha-2-, Beta,- und Gammaglobuline) ein. Das häufigste Protein im Plasma ist das Albumin. Seine Funktion ist im wesentlichen die eines Transportproteins (u.a. für Fettsäuren, Thyroxin, Steroidhormone und Arzneistoffe). Durch seine hohe Konzentration leistet es einen wesentlichen Beitrag zum Aufbau des kolloidosmotischen Druckes. Eine hohe Plasmaproteinbindung von Wirkstoffen führt meist zu einer Wirkungsverminderung oder Retardierung. Somit ist die Kenntniss der Plasmaproteinbindung von neuen Wirkstoffen ein wesentlicher pharmakokinetischer Parameter. [85, 86]

Bindung an Humanserumalbumin (HSA)

Die Experimente wurden mit Humanserumalbumin (ca. 40mg/ml) in serumfreiem Zellkulturmedium durchgeführt. Nach Inkubation mit den Komplexen wurde das Protein durch Ethanolpräzipitation ausgefällt und die überstehende Lösung auf ihren Cobaltgehalt untersucht. Als weiteres analytisches Verfahren zur Bestimmung der Proteinbindung wurde die Größenausschlußchromatographie (mit Sephadex als stationärer Phase) genutzt. Detaillierte Methodenbeschreibungen finden sich in Abschnitt 17.6.

Abbildung 9.1 zeigt die Proteinbindung von Co-ASS an HSA in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt mit der Präzipitationsmethode. Die Bindung erfolgt relativ rasch (innerhalb der ersten Stunde der Inkubation) in einem Ausmaß von ca. 20-30%. Danach ist ein stetiger Anstieg zu beobachten. Nach 48 Stunden sind schon mehr als 50% des Komplexes an HSA gebunden. Dieser Kurvenverlauf deutet auf eine rasch erfolgende unspezifische Bindung hin,

die von einer kovalenten Bindung durch Reaktion mit Nukleophilen des Serumalbumins gefolgt wird. Bei zweifach phenylsubstituierten Ethylendiamin-Platin(II)-Komplexen wurde vergleichbares Verhalten beschrieben [87].

Um die Bindung an HSA besser zu visualisieren, wurden der gebundene und ungebundene Anteil Co-ASS durch Größenausschlußchromatographie aufgetrennt. Dazu wurde quellfähiges Sephadex als stationäre Phase verwendet. Die gesammelten Fraktionen wurden auf den Gehalt an Cobalt bzw. Protein untersucht. Bei dieser Art der Chromatographie werden große Moleküle (hier HSA) wesentlich schneller eluiert als kleine (hier Co-ASS). Abbildung 9.2a zeigt ein Chromatogramm direkt bei Start der Inkubation. Die Proteinbestimmung zeigt, dass HSA in den ersten Fraktionen eluiert, während die später gesammelten Fraktionen proteinfrei sind. Die Cobalt-Messungen durch AAS zeigen einen kleinen Peak, der mit dem HSA-Peak identisch ist. Der Großteil eluiert aber getrennt von HSA. Bei weiterer Inkubation wird der erste Cobalt-Peak größer, während der zweite abnimmt. Durch Integration können die Flächeneinheiten dieser Kurven und daraus die prozentuelle Proteinbindung berechnet werden. Wie in Abbildung 9.2 zu sehen, korrelieren die Ergebnisse aus den chromatographischen Untersuchungen weitgehend mit denen der Fällungsmethode.

Die HSA-Proteinbindung weiterer Komplexe wurde nach 2 Stunden Inkubation mittels Ethanolpräzipitation untersucht. Co-Prop und Dicobaltoctacarbonyl werden mit 33 bzw. 32% etwa im selben Ausmaß wie Co-ASS gebunden. Die Bindung des lipophileren Co-Diph ist mit 52% deutlich höher. Die Proteinbindung der Cobalt-Alkin-Komplexe nimmt also durchaus beträchtliche Ausmaße an. Bei einer zukünftigen intravenösen Applikation der Substanzen sollte dieser teilweisen Inaktivierung unbedingt Rechnung getragen werden. Um einen Eindruck zu erhalten, ob Bindung an Makromoleküle auch bei in-vitro-Zellkulturversuchen Bedeutung hat, wurden analoge Versuche mit serumhaltigem (10% FCS V/V) EMEM durchgeführt. Die Bindung war hier - in Einklang mit dem niedrigeren Proteingehalt der Reaktionslösung - deutlich niedriger : Co-ASS: 13%, Co-Prop: 17%, Dicobaltoctacarbonyl: 11% und Co-Diph: 34%. Folglich können hier (mit Ausnahme des stark lipophilen Co-Diph) mehr als 80% der Komplexe frei in Lösung gehalten werden. Die Konkurrenz der Proteinbindung zur Aufnahme der Komplexe in die Zellen ist also als eher gering einzustufen.

Die Abnahme der Proteinbindung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration ist auch von Platinkomplexen wie Cisplatin bekannt. Es ist dabei anzumerken, dass die Plasmaproteinbindung von Cisplatin viel stärker ist als die hier an den Cobalt-Komplexen beobachtete. Nach 30 Stunden Inkubation (bei mit den HSA-Experimenten vergleichbaren Versuchsbedingungen) liegen weniger als 5% Cisplatin frei vor. [87, 88]

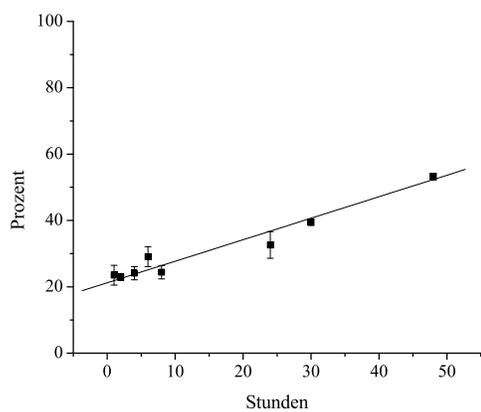


Abbildung 9.1: Proteinbindung von Co-ASS (MW(\pm Stabw.), n=3)

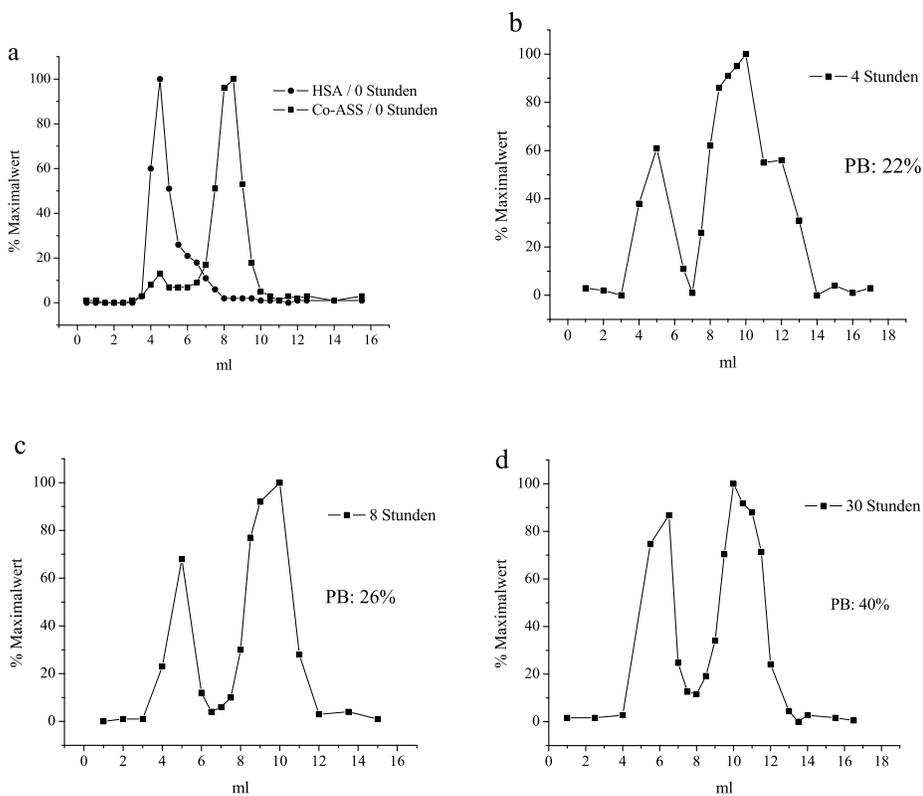


Abbildung 9.2: Proteinbindung (PB) von Co-ASS; Chromatogramme der Sephadex-Größenausschlußchromatographie

Kapitel 10

DNS-Bindung

Da die untersuchten Substanzen Metallatome beinhalten, muß die DNS als möglicher Angriffspunkt in Betracht gezogen werden. Aus Untersuchungen am Platin enthaltenden Cytostatikum Cisplatin ist bekannt, dass kovalente Bindungen zwischen Metallatomen und der DNS möglich sind. Bindungen dieser Art können die DNS in ihrer Funktion beeinträchtigen und so in weiterer Folge den Zelltod herbeiführen. Bei Cisplatin stellen 65% der Cisplatin-DNS-Addukte Verknüpfungen zweier benachbarter Guanine im selben DNS-Strang über die Stickstoffe an Position 7 der Guanine dar (siehe Abbildung 10.1).

Neben kovalenter Bindung an die DNS kommen generell noch zwei weitere DNS-Interaktionsmechanismen in Frage: Interkalation und DNS-Fragmentierung. Unter Interkalation versteht man die Einlagerung von planaren Substanzen in die DNS-Doppelhelix ohne Ausbildung kovalenter Bindungen. Dabei wird die räumliche Struktur der DNS ebenfalls stark beeinträchtigt. DNS-Fragmentierung wird von Verbindungen ausgelöst, die vorerst in die DNS interkalieren und in weiterer Folge freie Radikale generieren, welche mit der DNS weiter reagieren und diese fragmentieren.[3]

Zieht man die Reaktivität der Cobalt-Alkin-Komplexe in Betracht, ist von den drei wesentlichen DNS-Interaktionsmechanismen die Ausbildung kovalenter Bindungen plausibel. Eine nukleophile Reaktion mit einem intermediär gebildeten Carbokation oder Ligandbindung an einem der beiden Cobalt-Atome erscheinen möglich (siehe Abschnitt 2.1 und [89]). Für Interkalation ist die Struktur vom Raumbedarf her nicht geeignet, da die Cobalt-Cobalt-Achse im Molekül rechtwinklig zur Dreifachbindung steht und somit nur schwer die für Interkalation wichtige plane Raumgestalt eingenommen werden kann. DNS-Fragmentierung beruht wie erwähnt auf einer Bildung reaktiver Metabolite durch oxidierende Substanzen. Wie in der Einleitung beschrieben, zeigen die Cobalt-Alkin-Komplexe oxidierende Eigenschaften, welche aber für

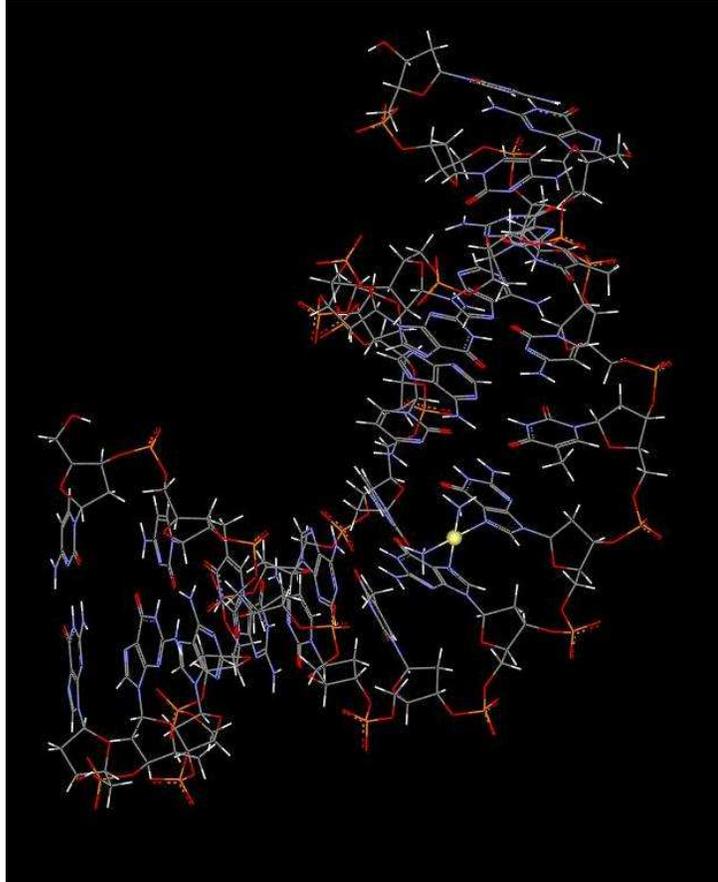


Abbildung 10.1: Ausbildung von 'intrastrand crosslinks' durch Cisplatin. Das Platin-Zentralatom ist gelb hervorgehoben. [90]

diesen Wirkungsmechanismus als nicht ausreichend stark betrachtet werden müssen.

10.1 Bestimmung der DNS-Bindung

Zur Bestimmung des DNS-Bindungsvermögens der Komplexe wurde auf eine von Natarajan und Mitarbeitern beschriebene, leicht modifizierte Methode zurückgegriffen [91]. Dabei wird Lachsspermien-DNS mit den Komplexen in einem Nukleosid/Substanz-Verhältnis von 20 bei 37°C inkubiert, die DNS anschließend präzipitiert, gewaschen und mittels GF-AAS auf den Cobalt-Gehalt untersucht. Die Menge der gefällten DNS kann photometrisch bei 260nm im UV-Mikroplattenreader bestimmt werden. (siehe Abbildung 10.2)

Unter Berücksichtigung des mittleren Molekulargewichts für Nucleoside kann dadurch das Verhältnis von gebundener Substanz zur Anzahl der Nucleoside berechnet werden. Diese Methode erfasst im wesentlichen kovalente DNS-Interaktionen. Eine detaillierte Methodenbeschreibung findet sich im Anhang (Abschnitt 17.7).

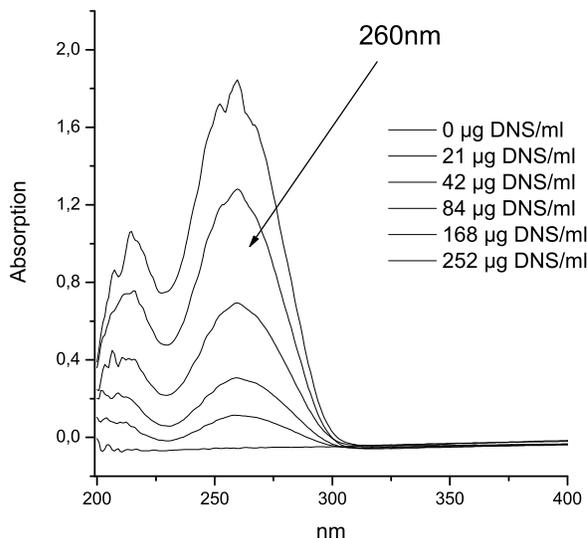


Abbildung 10.2: Spektren verschieden konzentrierter DNS-Lösungen im Bereich von 200-400nm

10.2 Ergebnisse

Tabelle 10.1 zeigt die Ergebnisse der DNS-Bindungsstudien. Die Resultate wurden jeweils als pmol gebundene Substanz pro μg DNS, sowie als Nucleosid/ Substanz-Verhältnis angegeben. Die untersuchten Komplexe zeigen alle eine hohe Tendenz, an die DNS zu binden (Nucleosid/Substanz <800). Die DNS-Bindung von Cisplatin bzw. Carboplatin liegt unter ähnlichen Versuchsbedingungen deutlich niedriger (Nucleosid/Substanz $\gg 3000$ [91]). Das Ausmaß der Bindung korreliert aber keineswegs mit der cytotoxischen Aktivität der Verbindungen (vgl. Abschnitt 13.1). Die Korrelationskoeffizienten aus IC_{50} -Wert und DNS-Bindung liegen unter 0.5 ($r^2 = 0.42$ bei MCF-7 und $r^2 = 0.28$ bei MDA-MB-231). Die Leitverbindung Co-ASS weist innerhalb

der untersuchten Komplexe sogar eine geringe DNS-Bindung auf. Unkomplexiertes Dicobaltoctacarbonyl zeigt extrem starkes Vermögen an die DNS zu binden. Dies weist darauf hin, dass die Bindung der Cobalt-Alkin-Komplexe direkt an der Dicobalt-Teilstruktur stattfindet.

Substanz	pmol/ μ g	Nucleosid/Substanz
Dicobalt	105.6(\pm 18.3)	31
Co-SAL	36.97(\pm 3.75)	88
Co-Prop	33.94(\pm 9.29)	96
Co-ASSAM	22.63(\pm 2.25)	144
Co-Indo	19.56(\pm 0.39)	166
Co-Benz	15.19(\pm 0.07)	214
Co-ASS	9.82(\pm 0.20)	331
Co-2F-Benz	9.22(\pm 0.28)	352
Co-3-Acetbenz	9.18(\pm 2.44)	354
Co-Diph	6.74(\pm 0.40)	482
Co-Phthal	4.57(\pm 0.96)	711

Tabelle 10.1: DNS-Bindung von Cobaltcarbonylkomplexen (MW(\pm Stabw.), n=4)

10.3 Zusammenfassung

Das DNS-Bindungsvermögen der Komplexe wurde mit einer Präzipitationsmethode untersucht. Alle untersuchten Verbindungen vermögen effizient an die DNS zu binden. Das Ausmaß der DNS-Bindung korreliert nicht mit der cytotoxischen Aktivität der Substanzen.

Kapitel 11

Hemmung von Cyclooxygenasen

Wie in der Einleitung (Abschnitt 3.2) erwähnt, gelten Hemmstoffe der Cyclooxygenasen als Tumorthérapeutika der Zukunft. Cyclooxygenasen (oder Prostaglandin Endoperoxid H Synthasen (PGHSs)) katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäure und O_2 zu Prostaglandin H_2 (PGH_2). Dies stellt den entscheidenden Schritt in der Prostaglandin-Biosynthese dar (siehe Abbildung 11.1).

Man unterscheidet generell zwischen zwei Isoformen der Cyclooxygenase: COX-1 und COX-2. Es handelt sich dabei um homodimere, hämhaltige, glykosylierte Proteine mit zwei aktiven Zentren. Cyclooxygenase-1 (COX-1) wird in den meisten Geweben permanent gebildet. Ihre Aktivität wird für die Produktion cytoprotektiver Prostaglandine (z.B. Prostacyclin, PGE_2) und den Erhalt physiologischer Funktionen verantwortlich gemacht.

Im Gegensatz dazu wird Cyclooxygenase-2 (COX-2) in den meisten Geweben nicht permanent exprimiert, ihre Bildung kann aber durch eine Vielzahl extra- und intrazellulärer Stimuli sehr rasch induziert werden (z.B. durch Wachstumsfaktoren, Hormone, Arachidonsäure, Serum etc.). Ihre Expression kann wiederum durch antiinflammatorische Steroide (z.B. Cortison) verhindert werden.

In vereinfachter Form kann COX-1 als die 'konstitutive' und COX-2 als die 'induzierbare' Cyclooxygenase-Form gesehen werden. Das Ausmaß der Induzierbarkeit von COX-2 ist durchaus beträchtlich. So können bei optimaler Stimulierung 10 bis 1000-fach höhere Induktionslevel als bei maximal induzierter COX-1 beobachtet werden. Für die Antitumorwirkung von NSAR wird im wesentlichen die Hemmung der Cyclooxygenase-2 verantwortlich gemacht, da diese in vielen humanen Tumoren überexprimiert wird (siehe Abschnitt 3.2). Die beiden Isoformen unterscheiden sich auch in ihrer intrazellulären Loka-

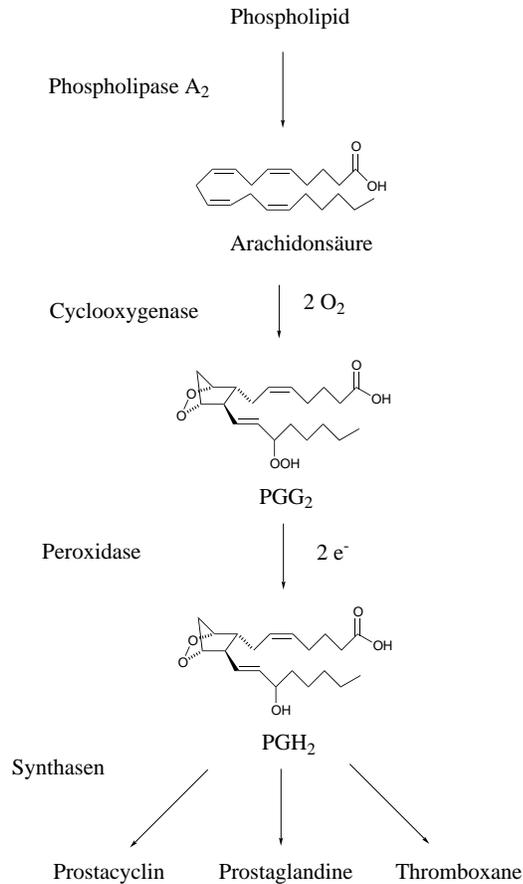


Abbildung 11.1: Arachidonsäurekaskade

lisation. COX-1 befindet sich im Endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran. COX-2 ist fast nur in der Kernmembran zu finden. [53, 92, 93] Bei dem kürzlich entdeckten Subtyp COX-3 handelt es sich um eine COX-1-Variante, die ähnlich wie COX-1 konstitutiv exprimiert wird. Dieses Enzym wird unter anderem im Gehirn vermehrt gebildet und kann durch Paracetamol gehemmt werden. COX-3 wird somit als biologische Zielstruktur für zentral wirksame Anilid-NSAR betrachtet. Die genaue physiologische Funktion ist bisher noch nicht bekannt. [52, 94, 95]

11.1 Mechanismus der Enzymhemmung und Enzymkatalyse

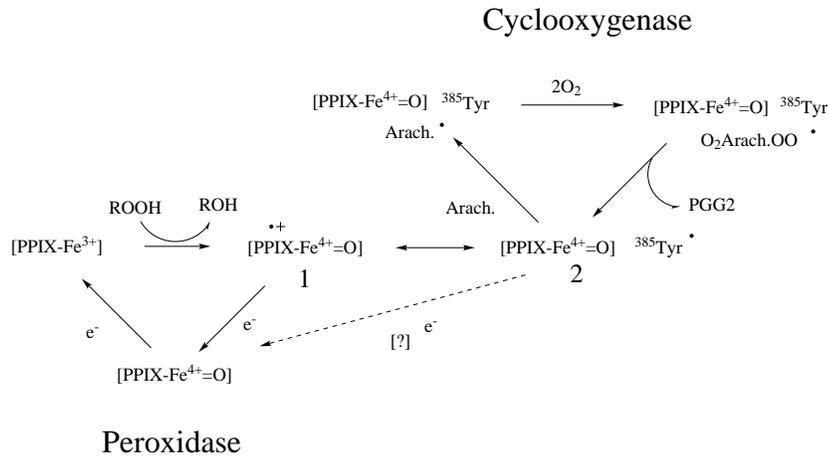


Abbildung 11.2: mechanistischer Ablauf der Enzymkatalyse [92]

Sowohl COX-1 als auch COX-2 katalysieren die Zweischnittreaktion von Arachidonsäure zu Prostaglandin H_2 . Der erste Schritt findet dabei im aktiven Zentrum der Cyclooxygenase statt, wo unter Verbrauch von zwei Äquivalenten O_2 ein cyclisches Peroxidderivat gebildet wird (Prostaglandin G_2). Dieses diffundiert anschließend zum Peroxidasezentrum, welches an der gegenüberliegenden Seite des Enzyms liegt. Dort findet die Reduktion zu Prostaglandin H_2 statt. NSAR binden im aktiven Zentrum der Cyclooxygenase ohne die Peroxidaseaktivität wesentlich zu beeinflussen. Selektive Hemmstoffe der COX-2 bilden stabile, nur langsam wieder dissoziierende Komplexe mit diesem Isoenzym aus, während die Bindung an COX-1 meist kompetitiv und leicht reversibel ist. Der feste Bindungsmodus wird auch als zeitabhängiger Bindungsmodus bezeichnet. Unselektive Hemmstoffe der Cyclooxygenasen binden meist beide Isoenzyme in diesem zeitabhängigen Modus.

Beide Isoenzyme sind integrale Membranproteine, verfügen jedoch über keine Transmembraneinheiten. Eine membranbindende Domäne aus vier amphipatischen Helices ist in die Membran (Endoplasmatisches Reticulum, Kernmembran) eingebettet. Die Helices bilden einen hydrophoben Eingangskanal zum aktiven Zentrum. NSAR müssen also die Lipidschicht der Membran passieren, um dorthin zu gelangen. Am Eingang zum aktiven Zentrum befindet sich neben Glu524 Arg120, welches eine Salzbrücke zur Säurefunktion der Arachidonsäure bildet (siehe Abbildung 11.3). Arg120 ist auch wichtig für

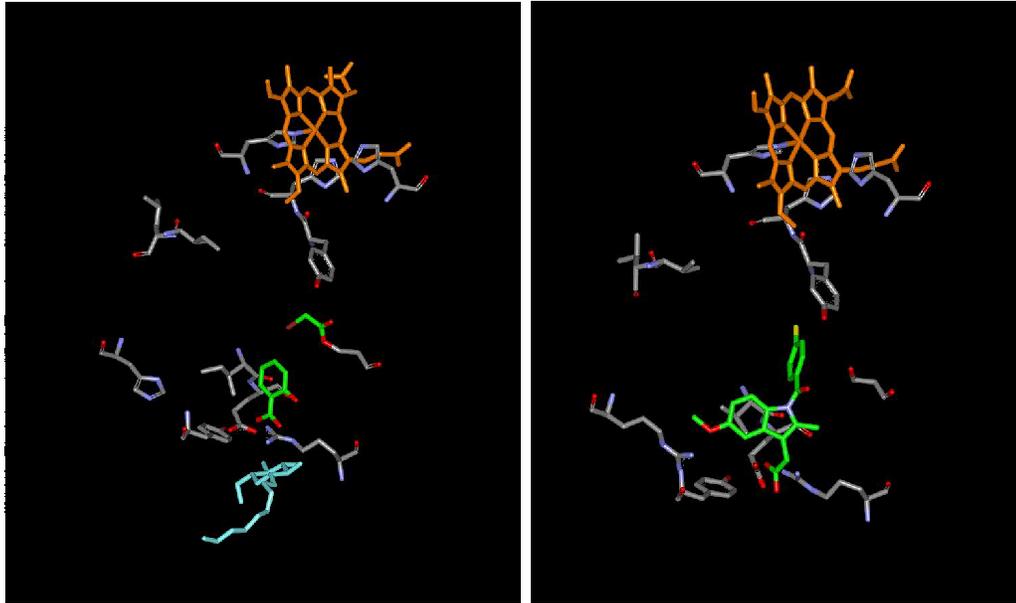


Abbildung 11.3: oben links: aktives Zentrum COX-1 (Interaktion mit Brom-Aspirin und Arachidonsäure) [96]; oben rechts: aktives Zentrum COX-2 (Interaktion mit Indomethacin) [97]

die Bindung saurer NSAR, die immerhin den Großteil dieser Substanzklasse ausmachen. Die Interaktion mit Arg120 ist vor allem für die Hemmung von COX-1 wichtig und spielt bei COX-2 eine untergeordnete Rolle. Dies wird damit erklärt, dass der Eingangskanal bei COX-2 wesentlich breiter ist als bei COX-1. Die Diskriminierung nichtsaurer NSAR bei der Bindung an COX-1 trägt somit indirekt einen wesentlichen Beitrag zur COX-2-Selektivität dieser Substanzen bei. Die Selektivität für COX-2 wird weiterhin dadurch gesteigert, dass bei diesem Isoenzym die gesamte Bindungstasche breiter ist als bei COX-1. Dies ermöglicht auch raumerfüllenderen Molekülen dort zu binden (siehe Abbildung 11.3). Grund für diese Bindungstaschenverbreiterung und Existenz selektiv bindender NSAR ist der Austausch von Isoleucin 509, 523 und 434 bei COX-1 gegen Valin bei COX-2, sowie von Histidin 513 bei COX-1 gegen Arginin bei COX-2. Eine weitere wichtige Aminosäure des aktiven Zentrums der Cyclooxygenase stellt Tyr385 dar, welches für die Stereoselektivität von NSAR verantwortlich gemacht wird.

Bei normaler physiologischer Funktion des Enzyms wird ein in der Peroxidaseeinheit befindliches Häm durch ein Hydroperoxid oxidiert, wobei ein Protoporphyrinradikalkation mit Fe(IV) entsteht (Spezies 1, Abbildung 11.2). Dieses oxidierte Häm oxidiert wiederum Tyr385, wobei sich ein Tyrosin-

radikal bildet (Spezies 2, Abbildung 11.2). Dieses Tyrosinradikal entfernt den pro-(13S)H der Arachidonsäure und leitet somit den ersten Schritt der Cyclooxygenase-Enzymkatalyse ein.

Ser530 ist Ort der Wirkung von Acetylsalicylsäure. Dieses NSAR stellt gewissermaßen einen pharmakologischen Extremfall dar, da es Ser530 acetyliert und das Enzym somit irreversibel inaktiviert. Die Acetylgruppe ragt in diesem Fall in die Bindungstasche hinein und verhindert die Bindung des Substrates Arachidonsäure (siehe Abbildung 11.3). So ist es auch zu erklären, dass Salicylsäure die Cyclooxygenaseaktivität nur unwesentlich hemmt. Der NSAR-Charakter von Salicylsäure beruht vermutlich auf einer Unterdrückung der Expression im Entzündungsgeschehen involvierter Gene. [54, 92],[98]-[103]

11.2 Bestimmung der COX-Hemmung

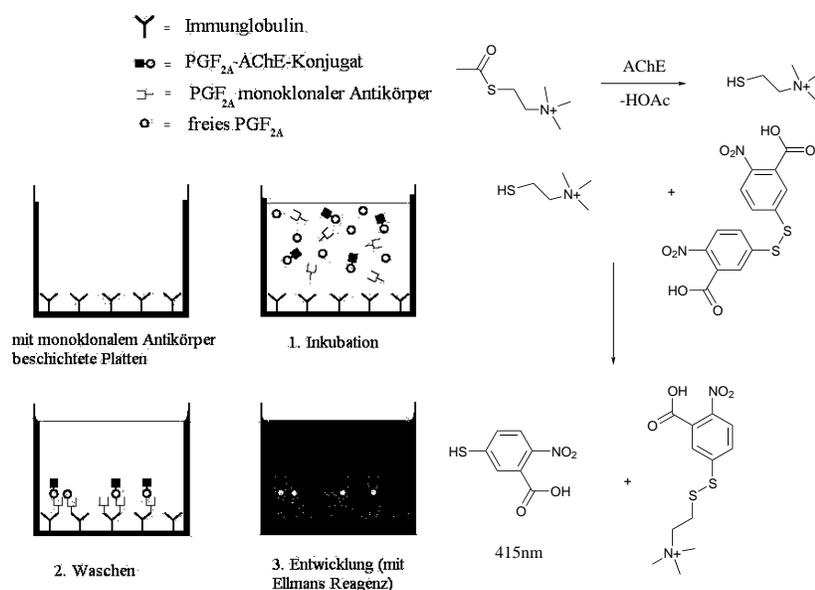


Abbildung 11.4: links: schematischer Ablauf des ELISA; rechts: Bildung der 5-Thio-2-nitrobenzoesäure

Zur Bestimmung der COX-1 und COX-2 Hemmwirkung wurde der 'COX-Inhibitor-Screening-Assay' ELISA der Fa. Cayman Chemicals verwendet (sie-

he Abschnitt 17.8). Der Test beruht auf der Konkurrenz von $\text{PGF}_{2\alpha}$ und eines $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Acetylcholinesterase (AChE)-Konjugates um eine begrenzte Menge $\text{PGF}_{2\alpha}$ monoklonalen Antikörpers. $\text{PGF}_{2\alpha}$ wird dabei durch SnCl_2 -Reduktion des COX-Produktes PGH_2 gebildet. Da die Menge an Konjugat konstant gehalten wird, während die Menge an $\text{PGF}_{2\alpha}$ variiert, ist die Menge des gebundenen Konjugates indirekt proportional zur Menge an $\text{PGF}_{2\alpha}$. Der Antikörper- $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Komplex bindet an ein am Boden der Löcher einer 96-Lochplatte fixiertes Immunglobulin. Nach dem Waschen der Platte wird Ellmans Reagenz zugesetzt, welches das AChE Substrat Acetylthiocholin enthält. Das Produkt der enzymatischen Reaktion, Thiocholin, reagiert mit 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure zu 5-Thio-2-nitrobenzoesäure, die photometrisch bei 415nm detektiert wird (siehe Abbildung 11.4).[104, 105]

11.3 Ergebnisse der COX-Inhibitortests

Zur Untersuchung des COX-inhibitorischen Potentials wurden die Cobalt-Komplexe Co-ASS, Co-SAL, Co-Benz, Co-Prop, Co-Indo sowie als Vergleichsubstanzen Indomethacin, ASS und der ASS-Propargylester Prop-ASS in Konzentrationen von $10\mu\text{M}$ und $200\mu\text{M}$ herangezogen (Strukturen siehe Abschnitt A.2). Dabei ist anzumerken, dass aus Zellaufnahmestudien bekannt ist, dass die Komplexe diese Konzentrationen in den Zellen leicht erreichen können (siehe Abschnitt 13.2). Abbildung 11.5 zeigt die Resultate der COX-Inhibitortests.

Acetylsalicylsäure, sowie ihr Propargylesterderivat (Prop-ASS) zeigen in den untersuchten Konzentrationen nur mäßige Hemmwirkung auf beide Enzyme. Die Enzymaktivität wurde nur in einer Konzentration von $200\mu\text{M}$ bei COX-1 wesentlich beeinflusst (91% Hemmung durch ASS, 48% Hemmung durch Prop-ASS). Dies steht in gutem Einklang mit Ergebnissen aus der Literatur. Die Selektivität von ASS für COX-1 gegenüber COX-2 ist als 10-100fach beschrieben [52, 72, 73]. Der ASS-Ester Prop-ASS zeigt geringere COX-1-Wirksamkeit. Dies kann auf den Verlust der Säurefunktion zurückgeführt werden (siehe Abschnitt 11.1). Etwas deutlichere Hemmwirkung wurde durch die beiden Cobalt-Komplexe Co-Prop und Co-Benz hervorgerufen, die in der $200\mu\text{M}$ Konzentration die Enzymaktivität etwa halbierten. Co-Benz zeigte zudem schon in einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ deutliche Hemmung der COX-1 Enzymaktivität (40% Hemmung). Bei dem Salicylsäurederivat Co-SAL und beim ASS-Derivat Co-ASS wurde in der Konzentration von $200\mu\text{M}$ die Aktivität beider COX-Subtypen nahezu komplett aufgehoben (mindestens 85% Hemmung). Co-ASS zeigte dazu auch schon bei $10\mu\text{M}$ an COX-1 und COX-2 starke Aktivität (COX-1: 37% Hemmung, COX-2: 59% Hemmung). Somit

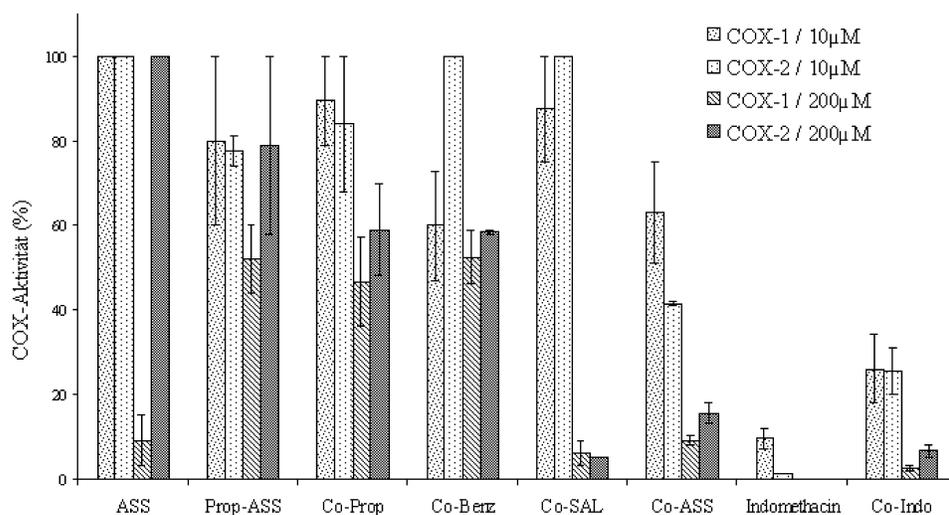


Abbildung 11.5: Hemmung von COX-1 und COX-2 (MW(\pm Stabw.), n=2)

wurde die Aktivität der Ausgangsverbindung ASS deutlich übertroffen. Der Vergleich der Ergebnisse von ASS, Prop-ASS und Co-ASS zeigt, dass die Enzymhemmwirkung nicht alleine durch Veresterung mit Propargylalkohol gesteigert werden kann, sondern die Komplexierung an Dicobalt unbedingt notwendig ist. Die Reihenfolge der COX-inhibitorischen Aktivität der Cobalt-Komplexe (Co-Prop < Co-Benz < Co-SAL < Co-ASS) korreliert mit der bei den Cytotoxizitätsuntersuchungen beobachteten Reihenfolge (siehe Abschnitt 13.1). Die IC_{50} -Werte der Cytotoxizitätstests von Co-ASS (siehe Tabellen 13.1, 14.1, 15.1) liegen zudem in einem Bereich, in dem auch COX deutlich gehemmt wird ($10\mu\text{M}$). Dieses Ergebnis ist insbesondere von großem Interesse, da bei NSAR üblicherweise die zur Beeinflussung des Zellwachstums oder Apoptoseeinleitung benötigte Konzentration 3-4 Größenordnungen höher ist als die zur Hemmung der Prostaglandinbiosynthese.

Um einen ersten Eindruck zu erhalten, ob Cobalt-Alkin-Derivate anderer NSAR ähnliche Eigenschaften aufweisen könnten, wurde das Indomethacin-derivat Co-Indo synthetisiert und getestet. Co-Indo zeigte noch wesentlich stärkere COX-Hemmwirkung an beiden COX-Subtypen (mindestens 74% Hemmung). Die Referenzsubstanz Indomethacin wurde in einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ getestet und hemmte die Enzymaktivität komplett (mindestens 91% Hemmung). Dies steht in gutem Einklang mit Daten aus der Literatur, wo ED_{50} -Werte bei beiden Enzymen unter $1.0\mu\text{M}$ bestimmt wurden. Laut Kalgutkar et al führt Veresterung von Indomethacin zu einer deut-

lichen Erhöhung der COX-2-Selektivität mit drastischer Herabsenkung der Aktivität an COX-1. Der Effekt ist besonders bei raumerfüllenden Substituenten ausgeprägt. Es wurde gezeigt, dass die Interaktion mit Arg120 im Eingangsbereich zur Bindungstasche für die Hemmung von COX-2 nicht essentiell ist. Dieses Postulat kann somit durch Co-Indo (Verlust der COX-1 Selektivität) tendenziell bestätigt werden. [106, 107]

Co-Indo zeigte bei den Cytotoxizitätsuntersuchungen an MCF-7 deutliche Aktivität ($IC_{50}=6.9\mu M$, siehe Abschnitt 13.1), war aber an MDA-MB-231 unwirksam ($IC_{50}>50\mu M$). Interessanterweise zeigt Indomethacin in-vitro Stimulation des Tumorzellwachstums einhergehend mit Hemmung der Prostaglandin E Synthese, während in-vivo das Wachstum von Tumoren gebremst wird (siehe Abschnitt 3.2 und [64]).

11.4 Zusammenfassung

Die Cytotoxizität von NSAR (Acetylsalicylsäure und Indomethacin) kann durch Veresterung mit Propargylalkohol und nachfolgende Komplexierung mit Dicobalthexacarbonyl deutlich erhöht werden. Dies geht einher mit dem Vermögen, COX-Enzyme zu hemmen. Mit Co-ASS liegt ein Wirkstoff vor, der sowohl in der Cyclooxygenase-Enzymhemmwirkung als auch in der cytotoxischen Aktivität die 'Ausgangsverbindung' ASS deutlich übertrifft. Strukturell von Co-ASS abgeleitete Verbindungen zeigten geringeres Vermögen COX-Enzyme zu hemmen. Die Selektivität von ASS für COX-1 geht bei Co-ASS verloren. Dies kann auf den Austausch der Säure- durch eine Esterfunktion zurückgeführt werden.

Kapitel 12

Reaktion mit Thiolen

Aus Untersuchungen an Platinkomplexen ist bekannt, dass diese mit Thiolen (wie Cystein) und anderen Nucleophilen Addukte ausbilden können. Die Reaktionsfähigkeit der Komplexe mit Bionucleophilen ist ein wichtiger physikochemischer Parameter. So werden erhöhte intrazelluläre Konzentrationen des Thiols Glutathion (GSH) mit der Entwicklung von Resistenz bei humanen Tumoren in Zusammenhang gebracht. In Tumorzellen können Konzentrationen im Bereich von 3-11 mM GSH bestimmt werden.[108]-[111]

Cobalt-Alkin-Komplexe sind ebenfalls in der Lage mit Nucleophilen zu reagieren (sog. Nicholas-Reaktion, siehe Abschnitt 2.1). Daneben sind auch Ligandenaustauschreaktionen an der Dicobalt-Teilstruktur beschrieben worden [89].

Thiol	Co-ASS	Überschuß Thiol	Produkt
Ethandithiol	0.01mmol	678-fach	0.04 mmol $[\text{C}_2\text{H}_4\text{S}_2]_n$
Cystein	0.01mmol	134-fach	0.24 mmol S_8
GSH	0.01mmol	18-fach	0.006 mmol GSSG

Tabelle 12.1: Versuchsübersicht für die Umsetzung mit Thiolen

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, Angriffsmöglichkeiten für S-Bionucleophile an der Leitstruktur Co-ASS zu identifizieren. Die Reaktionsbedingungen sollten dabei möglichst schonend (Raumtemperatur) mit hohem molarem Überschuß des Nucleophils gehalten werden. Als Reaktionspartner wurden Ethandithiol, Cystein und Gluthathion gewählt.

Die Umsetzung erfolgte in Methanol bzw. Methanol-Wasser-Gemischen (abhängig von den Löslichkeitseigenschaften der Reaktionspartner) und wurde mit HPLC verfolgt. Die detaillierten Versuchsbeschreibungen finden sich in

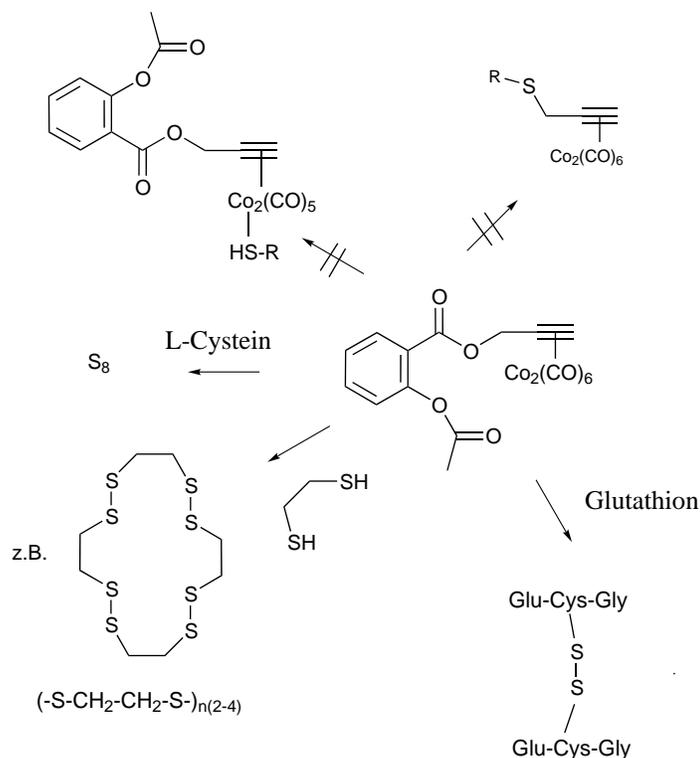


Abbildung 12.1: Reaktion von Co-ASS mit Thiolen

Abschnitt 17.9. Tabelle 12.1 und Abbildung 12.1 zeigen eine Übersicht über die durchgeführten Versuche.

Die erwarteten Reaktionsprodukte aus Ligandenaustausch an der Dicobalt-Teilstruktur oder einem nukleophilen Angriff auf ein intermediär gebildetes Carbokation (siehe Nicholas-Reaktion, Abschnitt 2.1) konnten nicht beobachtet werden. Vielmehr wurden die Thiole zu den entsprechenden Disulfiden oxidiert. Dies kann auf die Reduzierbarkeit der Cobalt-Alkin-Komplexe zurückgeführt werden (siehe Abschnitt 2.3). Der damit einhergehende Zerfall des Cobalt-Komplexes unter Freisetzung des Alkinliganden und Bildung von $\text{Co}(\text{CO})_4^-$ und metallischem Cobalt konnte mit der HPLC verfolgt werden (Detektion des Alkinliganden und des intakten Komplexes). Die Wiederfindungsrate für Co-ASS ist 74% bei der Reaktion mit Ethandithiol, 17% mit Glutathion und weniger als 1% mit Cystein. Die großen Unterschiede sind mit den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen und Umsetzungen zu begründen. Da es bei den langen Reaktionszeiten (mehrere Tage) zu Autooxidation der Thiole kommen kann, wurden entsprechende 'Blindreaktionen' durchgeführt und die beobachteten Mengen (sofern vorhanden) vom Messer-

gebnis abgezogen (siehe Abschnitt 17.9).

Die beobachtete Bildung cyclischer Disulfide aus Ethandithiol (und Thiiran) unter Metallkatalyse wurde schon in der Literatur beschrieben [112]-[116]. Neben einer 'direkten' Oxidation durch Co-ASS sollte eine 'indirekte' durch reaktive Sauerstoffspezies ('ROS', engl.: 'reactive oxygen species') weiter katalysierte Oxidationsreaktion als Mechanismus unbedingt in Betracht gezogen werden. Metallisches Cobalt kann in wässriger Lösung die Bildung von Hydroxidradikalen hervorrufen. Die Bildung dieser wird durch die Anwesenheit von GSH verstärkt. Das als 'Antioxidans' bekannte Glutathion kann somit in Anwesenheit von Metallen als 'Pro-Oxidans' fungieren.[117, 118]

Zusammenfassung

Co-ASS bewirkt die oxidative Disulfidbrückenbildung von Thiolen. Produkte aus einer Ligandenaustauschreaktion oder Nicholas-Reaktion wurden nicht gebildet. Die bei Umsetzung mit Glutathion erhaltenen Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf Interaktion mit zellulären Redox-Systemen zu.

