

## **Teil VI**

# **Zusammenfassende Diskussion**



Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden physikochemische und biochemische Eigenschaften antitumoraktiver Cobalt-Alkin-Komplexe, sowie das Verhalten dieser Verbindungen unter Zellkulturbedingungen untersucht. Die Versuche wurden im Hinblick auf eine Aufklärung des bisher unbekanntem Wirkungsmechanismus dieser Substanzklasse durchgeführt.

Die Herstellung der Cobalt-Alkin-Komplexe erfolgte in zwei Schritten: Zuerst wurden die Säuren mit Propargylalkohol zu den Estern umgesetzt. Diese reagierten mit Dicobaltoctacarbonyl zu den entsprechenden Cobalt-Alkin-Komplexen, welche durch IR, NMR und MS charakterisiert wurden. Die Strukturen sind in Abbildung A.2 (Seite 164) dargestellt. Um die Verbindungen bei den nachfolgenden Experimenten in geringen Konzentrationen erfassen zu können, wurde eine Graphitrohr-AAS-Methode entwickelt. Diese erlaubt die Quantifizierung geringster Substanzmengen auch in kompliziert zusammengesetzten Medien mit einer charakteristischen Konzentration von  $0.06\mu\text{M}$ . (siehe Abschnitte 5 und 6)

Die cytotoxische Aktivität von Cobalt-Alkin-Komplexen wurde bereits beschrieben. Unter den bisher untersuchten Tumorzellen waren Brustkrebszellen am sensitivsten gegenüber der Substanzeinwirkung [42]-[44]. Zur weiteren Beschreibung der Cytotoxizität der Verbindungen wurde zuerst der  $\text{IC}_{50}$ -Wert an den humanen Brustkrebszellen MCF-7 und MDA-MB-231 ermittelt. Aus den Vorarbeiten ist bekannt, dass Cobalt-Alkin-Komplexe an diesen Zellen besonders wirksam sind. Als Testsubstanzen wurden vorerst die Leitverbindung Co-ASS, deren potentielle Hydrolyseprodukte, eine Reihe strukturell nahestehender Derivate und in der Therapie etablierte Cytostatika herangezogen. Co-ASS wies  $\text{IC}_{50}$ -Werte von  $1.4\mu\text{M}$  (MCF-7) und  $1.9\mu\text{M}$  (MDA-MB-231) auf. Bekannte Cytostatika (wie Cisplatin, 5-Fluorouracil etc.) waren mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten zwischen  $2.0\mu\text{M}$  und  $10.6\mu\text{M}$  weniger wirksam. Die Hydrolyseprodukte (Co-SAL, Co-Prop), die Derivate ohne Acetoxyfunktion (Co-Benz) oder mit Acetoxyfunktion in Position 3 des Aromaten (Co-3-Acetbenz), das Fluorderivat (Co-2F-Benz) sowie die Amid- und Phthalimidderivate (Co-ASSAM und Co-Phthal) waren allesamt mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von mindestens  $3.9\mu\text{M}$  geringer cytotoxisch als Co-ASS. Dicobaltoctacarbonyl und der freie Alkinligand von Co-ASS (Prop-ASS) waren inaktiv. Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die antiproliferative Wirksamkeit stark von der Struktur des komplexierten Alkinliganden sowie von der Intaktheit der Komplexe abhängt. Um den Einfluß der Alkinliganden weiter zu untersuchen, wurden Indolderivate und Nucleosidderivate getestet. Unter diesen konnten Komplexe gefunden werden, die hohe cytotoxische Aktivität aufweisen. Doch führten hier die zugehörigen freien Alkinliganden ebenfalls zu einer deutlichen Hemmung des Zellwachstums. Deshalb kann bei diesen Verbindungen die Wirksamkeit nicht zwingendermaßen auf die intakten Komplexe alleine

zurückgeführt werden. (siehe Abschnitt 13.1)

Die Lipophilie der Verbindungen wurde als  $\log k_w$ -Wert mit einer HPLC-Methode ermittelt. Dieser Wert gilt als wichtiger Parameter für die Bewertung der Verteilung von Wirkstoffen. Es zeigte sich, dass es bei der Koordination der Liganden an  $\text{Co}_2(\text{CO})_6$  zu einer drastischer Erhöhung der Lipophilie kommt und die Dicobalt-Teilstruktur der dafür entscheidende Faktor ist. Bei vielen Wirkstoffen bestehen Zusammenhänge zwischen Lipophilie und Substanzwirkung. Folglich wurden die  $\log k_w$ -Werte mit den  $\text{IC}_{50}$ -Werten aus den Cytotoxizitätsuntersuchungen verglichen. Dabei konnten für die meisten Verbindungen mathematische Zusammenhänge erkannt werden, jedoch nur unter Nichtberücksichtigung der Leitsubstanz Co-ASS. Dies wird als erster Hinweis für das Vorliegen eines spezifischen Wirkungsmechanismus für diese Verbindung gewertet. (siehe Abschnitt 7)

UV-Vis-Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass es in einer hohen Konzentration von  $250\mu\text{M}$  unter in-vitro Bedingungen (Inkubation in Zellkulturmedium) innerhalb von acht Stunden Inkubation zu einer deutlichen Abnahme (teilweise  $> 40\%$ ) der Absorptionswerte kommt. Bei im Anschluß daran durchgeführten HPLC-Untersuchungen mit Co-ASS konnten innerhalb der untersuchten Zeit keine Abbauprodukte detektiert werden. Somit kann geschlußfolgert werden, dass die Gründe für die Abnahme der Absorptionswerte in unterschiedlicher Substanzlöslichkeit und in einer Anlagerung an die Proteine des Mediums liegen. Bei Inkubation einer  $1.0\mu\text{M}$  Lösung über mehrere Tage konnte mit AAS kein Verlust an Wiederfindung festgestellt werden. Die Löslichkeit ist also in geringen Konzentrationen über längere Zeiträume gewährleistet. Im Anschluß daran durchgeführte Proteinbindungsstudien mit Humanserumalbumin zeigten, dass die Komplexe innerhalb von zwei Stunden zu 20-35% gebunden werden. Diese initiale Proteinbindung steigt bei weiterer Inkubation kontinuierlich an. Bei Versuchen mit serumhaltigem Zellkulturmedium wurden initiale Werte zwischen 11 und 34% registriert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die beobachtete Abnahme der Konzentration der Komplexe unter in-vitro Bedingungen zumindest teilweise auf Reaktion mit den Proteinkomponenten des Mediums beruht. (siehe Abschnitte 8 und 9)

Da die untersuchten Substanzen Metallatome beinhalten, muß eine Interaktion mit der DNS als Wirkungsmechanismus in Betracht gezogen werden. Kovalente Bindungen zwischen Metallatomen und der DNS können deren Funktion empfindlich beeinträchtigen. DNS-Bindungsstudien der Cobalt-Alkin-Komplexe zeigten, dass diese effizient an die DNS zu binden vermögen. Das Nucleosid/Substanz-Verhältnis liegt für die meisten Verbindungen unter 700. Diese Werte sind von besonderem Interesse, da die Platinverbindungen Cisplatin und Carboplatin unter vergleichbaren Versuchsbedingungen Nucleosid/Substanz-Verhältnisse von über 3000 aufweisen und somit in deut-

lich geringerem Ausmaß an die DNS binden. Das kleinste Nucleosid/Substanz-Verhältnis (31) konnte für Dicobaltoctacarbonyl ermittelt werden. Dadurch wird deutlich, dass die Dicobalt-Teilstruktur der wesentliche Faktor für die Bindung ist. Die Leitsubstanz Co-ASS weist jedoch im Vergleich mit den weniger cytotoxisch aktiven Cobalt-Alkin-Komplexen nur ein 'durchschnittliches' DNS-Bindungsvermögen mit einem Nucleosid/Substanz-Verhältnis von 331 auf. Weiterhin konnte keine Korrelation der DNS-Bindungswerte mit den IC<sub>50</sub>-Werten aus den Cytotoxizitätsuntersuchungen festgestellt werden. (siehe Abschnitt 10.1)

Um zu überprüfen, ob die Interaktion mit der DNS auch in den Zellen stattfinden kann, wurden die Zellkerne von MCF-7 und MDA-MB-231 Brustkrebszellen isoliert und mit AAS auf ihren Cobaltgehalt untersucht. Überraschenderweise wurden nur äußerst geringe Substanzmengen in den Nuclei der Zellen quantifiziert. Die ermittelten Werte entsprechen nur wenigen Prozent der gesamten in die Zellen aufgenommenen Menge. Somit kann trotz des hohen DNS-Bindungsvermögens ein 'genomischer' Wirkungsmechanismus praktisch ausgeschlossen werden. (siehe Abschnitt 13.3)

Das Auftreten apoptotischer Ereignisse wurde an MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen exemplarisch bei Inkubation mit Co-ASS gemessen. Dabei wurde zwischen schnell (3 Stunden Inkubation) und langsam (5 Tage Inkubation) eintretender Apoptose unterschieden. Die schnell einsetzende Apoptose wurde durch Bestimmung von Veränderungen an der Zelloberfläche mittels 'Annexin'-Färbung untersucht. Zur Ermittlung der später auftretenden apoptotischen Erscheinungen, wurde auf ein Verfahren zurückgegriffen, das durch Formamid selektiv in apoptotischen Zellen hervorgerufene DNS-Fragmentierung detektiert. Co-ASS wurde in Konzentrationen von 1-50  $\mu$ M eingesetzt, da es in diesem Konzentrationsbereich deutliche Zellwachstumshemmbarkeit besitzt. Dennoch konnte bei keiner der untersuchten Konzentrationen weder früh noch spät auftretende Apoptose festgestellt werden. (siehe Abschnitt 13.5)

Zellaufnahmestudien an den beiden Brustkrebszelllinien sollten klären, ob die beobachteten Unterschiede in der Cytotoxizität der Komplexe auf unterschiedlichen intrazellulären Konzentrationen beruhen. Dazu wurden MCF-7 bzw. MDA-MB-231 Zellen mit den Komplexen inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt und mit AAS auf ihren Cobaltgehalt untersucht. Konzentrationsabhängige Zellaufnahmestudien mit Co-ASS an MCF-7 zeigten, dass die Anreicherung im Konzentrationsbereich von 1-10  $\mu$ M keine Sättigung zeigt. Dabei wurde ein 150-facher Anreicherungsgrad vorgefunden. Dies hat zur Folge, dass in den Zellen Wirkstoffkonzentrationen von mehreren hundert Mikromol pro Liter leicht erreicht werden können. In Abhängigkeit von der Zeit durchgeführte Zellaufnahmeexperimente mehre-

rer Komplexe wiesen alle denselben Verlauf auf: Nach einem raschen Anstieg in den ersten Stunden der Inkubation ist die Aufnahme nach 4-8 Stunden beendet. Die intrazelluläre Konzentration bleibt danach über 24 Stunden weitgehend konstant. Die einzelnen Cobalt-Alkin-Komplexe weisen von der Struktur des Alkinliganden abhängige unterschiedlich hohe Anreicherungsgrade auf. Generell kann an MCF-7 Zellen eine höhere Zellaufnahme als an MDA-MB-231 Zellen beobachtet werden. So wurden für Co-ASS nach 24 Stunden  $2.61 \text{ pmol}/\mu\text{g}$  (148-fache Anreicherung) und bei MDA-MB-231  $1.40 \text{ pmol}/\mu\text{g}$  (76-fache Anreicherung) registriert. Interessanterweise kann Dico-baltoctacarbonyl ohne Alkinligand mit  $0.15 \text{ pmol}/\mu\text{g}$  (9-fache Anreicherung) nach 24 Stunden nur zu geringen Mengen in die Zellen aufgenommen werden. Dies legt nahe, dass der Alkinligand als Träger für die Dicobalt-Teilstruktur dient. Versuche, die quantifizierten intrazellulären Substanzkonzentrationen (24-Stunden-Werte) mit den  $\text{IC}_{50}$ -Werten oder den  $\log_{k_w}$ -Werten zu korrelieren, waren nicht erfolgreich. Somit kann geschlußfolgert werden, dass die Konzentration der Komplexe in den Zellen weder mit der Cytotoxizität noch mit der Lipophilie direkt in Zusammenhang steht. (siehe Abschnitt 13.2)

Bei den bisher behandelten Brustkrebszellen handelt es sich um adhären wachsende Zellen. Weitere Experimente an Suspensionszellkulturen sollten einerseits helfen das Indikationsgebiet für die Cobalt-Alkin-Komplexe zu erweitern und andererseits zu Vergleichszwecken dienen. Folglich wurden Cytotoxizitäts- und Zellaufnahmeexperimente an LAMA-84, K-562, SD-1 und U-937 humanen Lymphom- und Leukämie-Zellen mit drei ausgewählten Verbindungen durchgeführt: Co-ASS, Co-Prop (Propargylalkohol als Ligand) und Co-Diph (Diphenylacetylen als Ligand). Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Cytotoxizitätsexperimente lagen mit mindestens  $7.7 \mu\text{M}$  über den an den Brustkrebszellen registrierten Werten. Die Aktivität des als Referenzsubstanz eingesetzten Cisplatin war mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von  $1.0$  bis  $3.5 \mu\text{M}$  an allen Zellkulturen höher als die der Cobalt-Alkin-Komplexe. Die höheren  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Cobalt-Komplexe gehen einher mit niedrigeren Zellaufnahmewerten. So konnten an den LAMA-84 und K-562 Leukämie-Zellen maximal  $0.32 \text{ pmol}/\mu\text{g}$  Substanz in den Zellen bestimmt werden. Eine Korrelation zwischen Cytotoxizität und Zellaufnahme konnte hier ebenso wie bei den Brustkrebszellen nicht hergestellt werden. Die an Brustkrebszellen beobachtete starke Abhängigkeit der Cytotoxizität von der Struktur des Alkinliganden konnte bei den Suspensionszellkulturen nicht registriert werden. Obwohl die drei untersuchten Komplexe stark unterschiedliche Alkinliganden aufweisen, waren die Unterschiede in den  $\text{IC}_{50}$ -Werten sehr gering. Die Leitsubstanz Co-ASS zeigt an diesen Zellen sogar etwas niedrigere Aktivität als die anderen beiden untersuchten Komplexe. (siehe Abschnitt 14)

Die Reaktionsfähigkeit von Metallkomplexen mit Bionukleophilen ist ein ent-

scheidender Parameter für die Wirksamkeit dieser Verbindungen. Deshalb sollten durch Umsetzung von Co-ASS mit S-Nukleophilen (Ethandithiol, Cystein und GSH) biologisch relevante Mechanismen erkannt werden. Die erwarteten Reaktionsprodukte aus einem nukleophilen Angriff oder einer Ligandenaustauschreaktion konnten jedoch nicht gefunden werden. Die Thiole wurden zu den entsprechenden Disulfiden oxidiert, einhergehend mit einem Zerfall von Co-ASS und Freisetzung des Alkinliganden. (siehe Abschnitt 12) Aufbauend auf diese Ergebnisse wurde das Vermögen ausgewählter Komplexe das Enzym Glutathionreduktase zu beeinflussen an MCF-7 Zellen bestimmt. Erhöhte Glutathionspiegel und Hochregulierung des Glutathionstoffwechsels werden für das Entstehen von Resistenz bei Tumoren der Brust verantwortlich gemacht. Die Zellen wurden mit jeweils  $8.0\mu\text{M}$  Cobalt-Alkin-Komplex für 6 Stunden inkubiert. Unter diesen Bedingungen können äußerst hohe intrazelluläre Konzentrationen erwartet werden, da die Zellaufnahme zu diesem Zeitpunkt bereits ihr Maximum erreicht hat. Die Konzentration in den Zellen ist durch Inkubation mit  $8.0\mu\text{M}$  aber dabei noch nicht gesättigt (siehe oben). Die Fähigkeit von Zellysaten, zugesetztes NADPH und GSSG unter NADPH-Verbrauch zu verstoffwechseln, wurde photometrisch bestimmt. Die Enzymaktivität konnte von keinem der untersuchten Cobalt-Alkin-Komplexe (Co-ASS, Co-SAL, Co-Prop und Co-Diph) signifikant beeinflusst werden. Folglich kann die Hemmung der Glutathionreduktase als Wirkungsmechanismus praktisch ausgeschlossen werden. (siehe Abschnitt 13.4)

Die Leitverbindung Co-ASS enthält als Teilstruktur das nichtsteroidale Antirheumatikum (NSAR) Acetylsalicylsäure (ASS). Die meisten NSAR wirken über die Hemmung von Cyclooxygenasen. Aus Patientenstudien ist bekannt, dass durch die regelmäßige Einnahme von ASS und anderen NSAR die Gefahr, an Brustkrebs oder Kolonkarzinomen zu erkranken, deutlich gesenkt werden kann. Hemmstoffe der Cyclooxygenasen gelten somit als Antitumorwirkstoffe der Zukunft (siehe Abschnitt 3.2). Tumoren der Brust überexprimieren Cyclooxygenasen. Bei MDA-MB-231 Zellen werden erhöhte Spiegel des Isoenzym COX-2 gemessen und bei MCF-7 Zellen wird das Isoenzym COX-1 erhöht exprimiert [143]-[146]. Folglich wurde die Hemmwirksamkeit der Cobalt-Alkin-Komplexe an COX-1 und COX-2 mit ELISA ermittelt. Es zeigte sich, dass die Leitverbindung Co-ASS ein potenter Hemmstoff beider Isoenzyme ist (ca. 50% Hemmung von COX-1 und COX-2 in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$ ). Dabei wird die Enzymhemmwirksamkeit der 'Ausgangsverbindung' ASS sowie des freien Alkinliganden deutlich übertroffen. Bei der Testung zu Co-ASS strukturell verwandter Komplexe (Co-Prop, Co-SAL, Co-Benz) wurden niedrigere Wirksamkeiten erzielt (siehe Abbildung 11.5). Da es sich im Falle von Co-Prop, Co-SAL, ASS und Prop-ASS um Abbauprodukte von Co-ASS handelt, wird deutlich, dass nur intaktes Co-ASS

die Cyclooxygenasen stark zu hemmen vermag. In einer Konzentration von  $200\mu\text{M}$  hemmten die an Brustkrebszellen stark cytotoxisch aktiven ( $\text{IC}_{50} = 1.4 - 4.4\mu\text{M}$ ) Co-ASS und Co-SAL die Enzymaktivität komplett, während die schwächer cytotoxisch aktiven ( $\text{IC}_{50} = 5.4\mu\text{M}$  bis inaktiv) Co-Benz und Co-Prop die Aktivität in etwa halbierten. Die Zunahme der Enzymhemmwirksamkeit korreliert in allen Fällen mit einer Abnahme der  $\text{IC}_{50}$ -Werte bei den Cytotoxizitätsuntersuchungen. Es ist dabei anzumerken, dass aus den Zellaufnahmestudien bekannt ist, dass die zur COX-Testung verwendeten Konzentrationen ( $10\mu\text{M}$  und  $200\mu\text{M}$ ) leicht in den Zellen erreicht werden können.

Um das Konzept 'Cobalt-Alkin-modifizierte NSAR als Antitumorwirkstoffe' einer ersten Prüfung zu unterziehen, wurde das entsprechende Indomethacinderivat Co-Indo synthetisiert und getestet. Die Enzymhemmwirksamkeit von Co-Indo war dabei mit der von Indomethacin vergleichbar. An MCF-7-Zellen konnte mit einer  $\text{IC}_{50}$  von  $6.9\mu\text{M}$  ein vielversprechendes Ergebnis erzielt werden, die Verbindung war jedoch an MDA-MB-231-Zellen unwirksam. Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass die Antitumoraktivität der Komplexe unter Umständen nicht nur von einer NSAR-Teilstruktur alleine, sondern konkreter von einer 'Aspirin-Teilstruktur' abhängt. (siehe Abschnitt 11)

Die zellwachstumshemmende Aktivität von NSAR wird vielfach vor allem mit der selektiven Hemmung des Isoenzym COX-2 in Zusammenhang gebracht. Dies könnte die verringerte Wirksamkeit von Co-ASS an Leukämie- und Lymphomzellen erklären. Diese exprimieren COX-2 nur in geringem Ausmaß. Der Zusammenhang zwischen einer selektiven COX-2-Hemmung und antiproliferativer Wirksamkeit wird aber inzwischen von mehreren Autoren angezweifelt. So weist der selektive COX-2-Hemmstoff Celecoxib, der als der am intensivsten beforschte cytotoxische ( $\text{IC}_{50} = 35-65\mu\text{M}$ ) COX-Hemmstoff gilt, an COX-2 positiven und COX-2 negativen Zellen vergleichbare antiproliferative Aktivität auf [66].

Um den Wirkungsmechanismus der COX-Hemmung weiter zu überprüfen, wurden COX-2 überexprimierende HT-29 Kolonkarzinomzellen zur Testung herangezogen. Die  $\text{IC}_{50}$ -Cytotoxizitätswerte der Cobalt-Alkin-Komplexe waren hier höher als die an Brustkrebszellen bestimmten. Mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $9.8\mu\text{M}$  war Co-ASS aber genauso potent wie Cisplatin ( $\text{IC}_{50} = 8.0\mu\text{M}$ ) oder das in der Therapie des Kolonkarzinoms etablierte 5-Fluorouracil ( $\text{IC}_{50} = 7.3\mu\text{M}$ ). (siehe Abschnitt 15)

## Schlußfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Leistruktur der Cobalt-Alkin-Komplexe Co-ASS ein cytotoxischer Wirkstoff mit ausgeprägter COX-Hemmwirksamkeit ist. Die Aktivität hängt dabei deutlich von einer intakten 'Aspirin-Teilstruktur' im Alkinliganden ab. Dies wird auch dadurch bekräftigt, dass Co-ASS keine Apoptose auslöst. Denn auch Acetylsalicylsäure führt erst in millimolaren Konzentrationen zu apoptotischen Veränderungen [61]. Ob die Cyclooxygenasehemmung durch Co-ASS direkt zum Zelltod führt oder über 'zwischen geschaltete' Mechanismen muß durch weitergehende Versuche festgestellt werden. Bei den hormonrezeptorpositiven MCF-7 Zellen kann eine durch COX-Hemmung bewirkte erniedrigte Estrogenbiosynthese in Betracht gezogen werden (siehe Abschnitt 3.2).

Erste Daten mit einem Cobalt-Alkin-Derivat des NSAR Indomethacin lassen auf weitere aktive Verbindungen aus dieser Substanzklasse hoffen.

