

6. Ergebnisse

6.1. Chemie und Aktivierung des Prodrugs

Zunächst wurden die Aktivierungscharakteristika des neuen Prodrugs von Etoposid mittels HPLC bestimmt. ProVP-16 I erwies sich hierbei als sehr stabiles Molekül, welches nur in Gegenwart von Carboxylesterasen bzw. Serum zu VP-16 umgesetzt wird (Tabelle 1) und in PBS über einen weiten pH-Bereich stabil ist. Erst unter basischen Bedingungen ab pH 10.5 ist eine Umsetzung des Prodrugs zu VP-16 zu erkennen [Schroeder et al 2003, eigene Publikationen A, Abbildung 2]. Diese Stabilität läßt sich sowohl auf den hydrophoben Charakter der Seitenkette zurückführen, als auch auf die zwei ortho-methoxy Gruppen, welche die Carbonatgruppe umgeben, und so ein sterisches Hindernis darstellen. Unter physiologischen Bedingungen kommt es zur Umsetzung des ProVP-16 I zu ProVP-16 II im sauren Milieu, welches dann mit Hilfe von Carboxylesterasen zu VP-16 umgewandelt wird. Andererseits kommt es auch direkt zu einer enzymatischen Umwandlung des ProVP-16 I zu Etoposid (Tabelle 1).

Tabelle 1
Halbwertszeiten (HWZ)
für ProVP-16 I

Abgebildet sind die Halbwertszeiten (HWZ) für ProVP-16 I in Minuten unter verschiedenen pH-Bedingungen. Die Tabelle führt die HWZ für ProVP-16 I in verschiedenen Medien (RPMI, SFM), Seren (FCS, HS), pH-Bereichen bzw. in Gegenwart von Cholinesterasen auf.

	HWZ ProVP-16 [min]
RPMI	533.7
SFM	744.7
FCS	394.9
HS	158.3
CHE	56.6
PH 10,5	696.4
PH 11,8	80.02

6.2. Zytotoxizität von ProVP-16 I im Vergleich zu VP-16 auf neoplastischen Zellen

Der Effekt von ProVP-16 I auf unterschiedlichen neoplastischen Zelllinien wurde hinsichtlich zytotoxischer Wirksamkeit und Induktion von Apoptose untersucht. Die IC-50-Werte für die jeweilige Zellreihe wurden zunächst mit Hilfe des XTT-Tests bestimmt [Schroeder et al 2003, eigene Publikationen A, Abbildung 3 A; Lange et al 2003, eigene Publikationen B, Tabelle 1]. Für die Mehrzahl der untersuchten Zellen konnte eine erhöhte Toxizität des Prodrugs im

Vergleich zur Muttersubstanz nachgewiesen werden und dies vor allem in MDR-1-positiven Zellen mit IC₅₀-Konzentrationen bis über 1000fach niedriger für ProVP-16 I als für VP-16 (Tabelle 2 und Abbildung 4). Beobachtungen der zytotoxischen Aktivität über die Zeit auf MOLT-3-Zellen zeigten den für ein Prodrug typischen *slow-release*-Mechanismus. Erst nach 48-72 Stunden erreichte ProVP-16 I seine vollständige Zytotoxizität (IC₅₀ 2.9x10⁻⁸ M) und überstieg damit die von VP-16 (IC₅₀ 3.6x10⁻⁸ M), dessen Wirkung schon nach 24 Stunden abgeschlossen war [Schroeder et al 2003, eigene Publikationen A, Abbildung 3 B]. Als zweiten Marker für die Toxizität der Prodrugs wurde die Expression von Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche gemessen. PS wird erst nach Induktion der Apoptose auf der Zelloberfläche präsentiert und kann dann mittels Annexin detektiert werden. Auch hier läßt sich ein verzögerter Effekt des ProVP-16 I auf MOLT-3-Zellen gegenüber VP-16 erkennen, in Übereinstimmung mit den Daten aus dem XTT-Test (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 2
IC₅₀-Bestimmung für ProVP-16 I im
Vergleich zu VP-16 in verschiedenen Zelllinien

Abbildung 4
Resistenzfaktor

Zelllinie	VP-16	ProVP-16 I	MDR-Expression	Resistenzfaktor
LS	2,0x10 ⁻⁶ M	1,6x10 ⁻⁶ M	-	1,25
NXS 2	2,5x10 ⁻⁷ M	6,0x10 ⁻⁷ M	-	0,41
SK-N-SH	1,0x10 ⁻⁷ M	3,0x10 ⁻⁹ M	+	33,3
Kelly	1,01x10 ⁻⁴ M	1,02x10 ⁻⁵ M	+	9,90
HT-29	1,76x10 ⁻⁶ M	3,5x10 ⁻⁹ M	+	503
SW 480	1,5x10 ⁻⁴ M	6x10 ⁻⁸ M	+	2500
CEM	4,0x10 ⁻⁷ M	2x10 ⁻⁷ M	+	2,00
VCR100	1,1x10 ⁻⁵ M	2x10 ⁻⁶ M	+	5,50
A2780	3,2x10 ⁻⁵ M	1,7x10 ⁻⁷ M	?	188

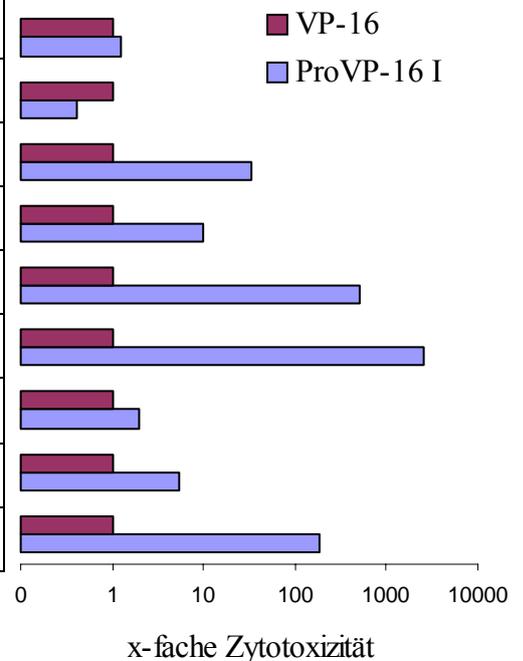


Tabelle 2 zeigt die IC₅₀-Konzentrationen für VP-16 bzw. ProVP-16 in verschiedenen Zelllinien. Die MDR-Expression jeder einzelnen Zellreihe wurde unter Zuhilfenahme der RT-PCR ermittelt. Die Bestimmung des Resistenzfaktors erfolgte nach der Formel IC₅₀ VP-16 / IC₅₀-ProVP-16 I. In der Abbildung 4 erfolgte dessen graphische Darstellung.

6.3. Effekt von ProVP-16 I auf MDR-1-exprimierenden Zellen

Basierend auf den Daten der Zellzytotoxizitätstests, in denen eine vermehrte Aktivität des Prodrugs besonders auf MDR-1-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde eine MDR-1-positive Zelllinie MOVP-3 generiert. Molt-3-Zellen wurden hierzu einer sukzessiv gesteigerten Dosis an VP-16 ausgesetzt, bis zu einer Endkonzentration von 5×10^{-6} M. MDR-1-Genexpression wurde mittels PCR nachgewiesen, während die Proteinexpression von P-gp auf der Zelloberfläche mittels UIC-2, einem P-gp spezifischen monoklonalen Antikörper, durch FACS-Analysen verifiziert werden konnte.

Die funktionelle Charakterisierung der neuen Zelllinie MOVP-3 erbrachte eine 100fach erhöhte Resistenz gegenüber VP-16, während ProVP-16 I nahezu gleich toxisch auf beide Zelllinien wirkte (Tabelle 4 und Abbildung 5). Um zu kontrollieren, ob in MOVP-3 Zellen allein die Überexpression von MDR-1 für die VP-16 Resistenz verantwortlich ist, wurde die Genexpression anderer für Resistenzentstehung in Tumorzellen verantwortlicher Proteine (MRP, LRP, Bax, Topo I, Topo II α und β) überprüft und hier kein Unterschied in den Expressionsmustern für Molt-3 und MOVP-3 für die ausgewählten Gene gefunden (Tabelle 3). Die weitere Charakterisierung der neuen Zelllinie deckte ein Kreuzresistenz von MOVP-3 gegen MDR-1-sensitive Substanzen wie Doxorubicin, Paclitaxel oder Vinblastin auf, während die Toxizität von MDR-1-nicht-sensitiven Substanzen wie Methotrexat, Genistein oder Calicheamicin voll erhalten blieb [Schroeder et al 2003, eigene Publikationen A, Abbildung 6].

Tabelle 3 Genexpression verschiedener Resistenzmarker

Zelllinie	2 GAPDH	3 MDR-1	4 MRP	5 LRP	6 Bax	7 Topo I	8 Topo II α	9 Topo II β
Molt-3	+	-	+	-	+	-	+	-
MOVP-3	+	+	+	-	+	-	+	-

Tabelle 3 zeigt die unterschiedlichen Expressionsmuster verschiedener für die Entstehung einer Resistenz verantwortlicher Gene in den Zelllinien Molt-3 und MOVP-3

Tabelle 4
IC-50-Bestimmung für ProVP-16 I im Vergleich zu VP-16 in Molt-3- und MOVP-3-Zellen

Zelllinie	VP-16	ProVP-16 I	Resistenzfaktor
Molt-3	$3,6 \times 10^{-8}$ M	$2,8 \times 10^{-8}$ M	1,3
MOVP-3	$3,8 \times 10^{-6}$ M	$1,8 \times 10^{-8}$ M	211,1

Abbildung 5
Resistenzfaktor

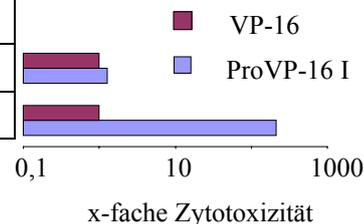


Tabelle 4 zeigt die IC₅₀-Konzentrationen für VP-16 bzw. ProVP-16 in Molt-3 bzw. MOVP-3 Zellen. Die Bestimmung des Resistenzfaktors erfolgte nach der Formel IC₅₀ VP-16 / IC₅₀-ProVP-16 I. In der Abbildung 5 erfolgte dessen graphische Darstellung.

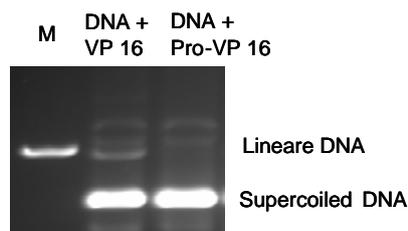
6.4. Molekularer Wirkungsmechanismus des neuen Prodrugs

6.4.1. Effekt von ProVP-16 I auf die Topoisomerase

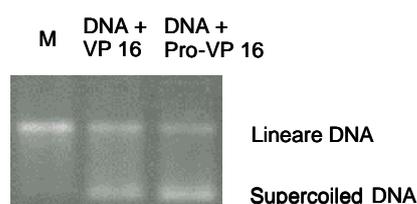
Die Untersuchung des molekularen Wirkungsmechanismus des ProVP-16 I fokussierte sich zunächst auf den Angriffsort der Muttersubstanz VP-16, die Topoisomerase II α . Der Effekt des neuen Prodrugs wurde unter physiologischen als auch unter basischen Bedingungen überprüft (Abbildung 6A und B und Tabelle 5). Es stellte sich heraus, daß erst nach Umsetzung des Prodrugs zu VP-16 unter basischen Bedingungen DNA-Stangbrüche auftreten (Abbildung 6B und Tabelle 5). Im physiologischen pH-Bereich hingegen, zeigt ProVP-16 I keinen Effekt auf die Topoisomerase (Abbildung 6A). Zur Kontrolle wurde ebenfalls der Effekt auf die Topoisomerase II β untersucht. Auch hier konnte keine Inhibition des Enzyms beobachtet werden (Tabelle 5).

Abbildung 6 **Effekt von VP-16 und ProVP-16 I auf die Topoisomerase II**

A Physiologischer pH-Bereich



B Basischer pH-Bereich



Effekt von VP-16 bzw. ProVP-16 I auf die Topoisomerase II dargestellt. Eine Inhibition des Enzyms führt hierbei zum Auftreten linearer DNA durch ausgelöste Strangbrüche. M=Marker für lineare DNA.

Tabelle 5 Enzymaktivität der Topoisomerase II α bzw. II β in Gegenwart von VP-16 und ProVP-16 I

	units aktiver Enzyme / 10 000 nuclei			
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Mittelwert
pH 8.9 Topoisomerase IIα Aktivität				
Kontrolle pH 8.9	2.43	2.87	2.64	2.65
VP-16 pH 8.9	0.92	1.43	1.24	1.20
ProVP-16 I pH 8.9	0.96	1.56	1.32	1.28
pH 7.9 Topoisomerase IIβ Aktivität				
Kontrolle pH 7.9	1.27	0.67	0.72	0.89
VP-16 pH 7.9	1.12	0.76	0.69	0.86
ProVP-16 I pH 7.9	0.84	0.76	0.74	0.78

Aufgeführt ist die Enzymaktivität der Topoisomerase II α bzw. II β in Gegenwart von VP-16 bzw. ProVP-16 I. Zur Kontrolle, ob ProVP-16 I in nicht umgewandelter Form einen Effekt auf die Topoisomerase II β zeigt, wurde dessen Enzymaktivität zusätzlich bestimmt.

6.4.2. Effekt von ProVP-16 I auf den Zellzyklus

Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich des zytotoxischen Mechanismus von ProVP-16 I fokussierten sich auf die Wirkung des Prodrugs auf den Zellzyklus.

Sowohl VP-16 als auch ProVP-16 I induzierten nach 24 h einen stetigen Anstieg des präG1 Signals. Allerdings ist VP-16 nicht in der Lage diese Wirkung in MOVP-3 Zellen zu erzielen. Folgerichtig könnte dies durch den Efflux des VP-16 aber nicht von ProVP-16 I aus der Zelle durch P-gp erklärt werden. Interessanterweise kommt es zu einem früheren Zeitpunkt durch die Wirkung des ProVP-16 I zu einer Synchronisation der Zellen in der G2M-Phase sowohl in Molt-3- als auch in MOVP-3-Zellen. Eine ähnliche Wirkung konnte für VP-16 nicht beobachtet werden. Mit der Zeit geht dieser Effekt zurück, was auf eine eigenständige Wirkung des Prodrugs vor dessen Konversion zu VP-16 hindeutet [Schroeder et al 2003, eigene Publikationen A, Abbildung 7].

6.4.3. Effekt von ProVp-16 I auf den Spindelapparat

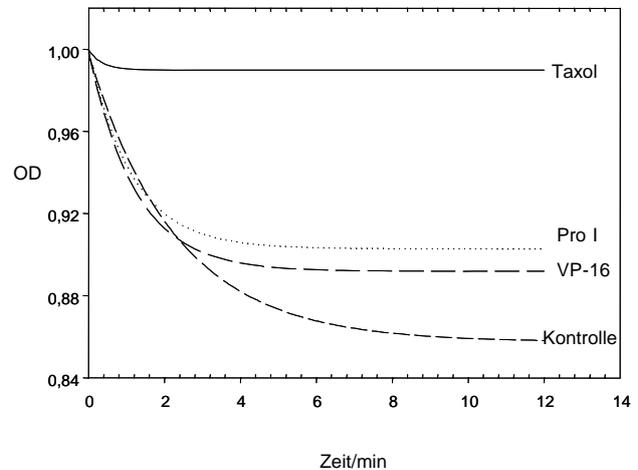
Der beobachtete G2M-Arrest aus den Zellzyklusanalysen sowie die Tatsache, daß Podophyllotoxin als Muttersubstanz von VP-16 auf den Spindelapparat einwirkt, führten zu der Überlegung, daß ProVP-16 I selbst an Tubulin bindet und so dessen Zusammenlagerung und Dissoziation hemmt. Paclitaxel, ein bekanntes Spindelgift, hemmt nach Zusammenlagerung des Tubulins dessen Depolymerisation durch Stabilisierung des Spindelapparates. Damit wird das Auseinanderziehen der Chromosomen in der Metaphase

und Anaphase der Mitose unterbunden. Im Tubulin-Depolymerisations-Assay konnte dieser Effekt aber nicht für ProVP-16 I bestätigt werden.

Abbildung 7

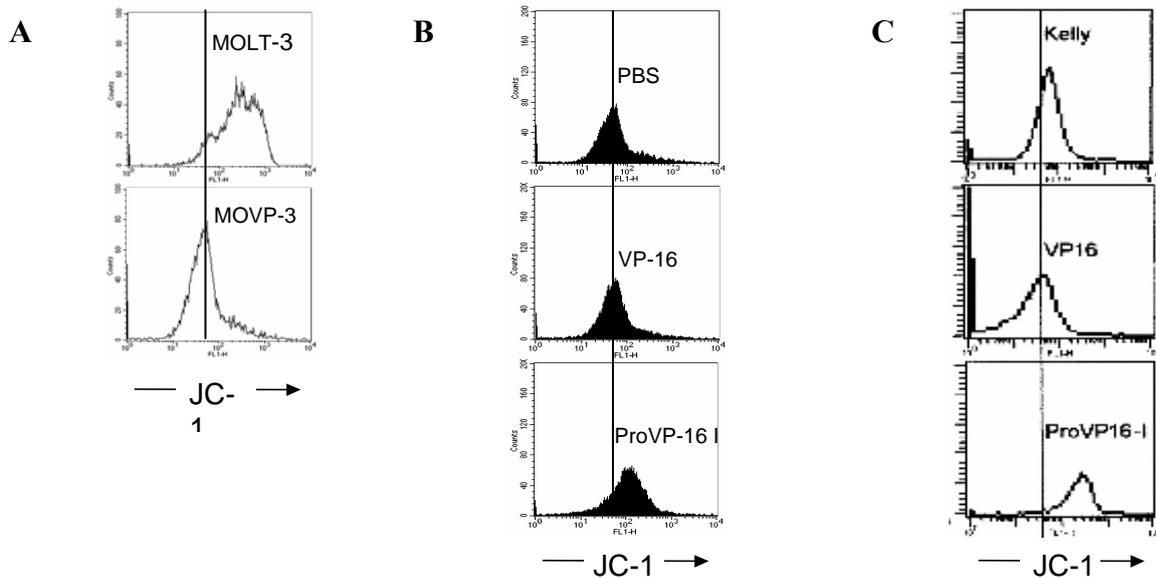
Wirkung von ProVP-16 I auf die Tubulindepolymerisation

Taxol verhindert durch Anlagerung an polymerisiertes Tubulin dessen Depolymerisation nach Zugabe von Calciumchlorid. Als Negativkontrolle wurde PBS (pH 7.4) verwendet.



6.4.4. Effekt von ProVP-16 I auf die P-gp-Pumpe

Der Einfluss von ProVP-16 I auf den durch MDR-1 hervorgerufenen Substratefflux wurde mittels JC-1-*assay* untersucht [A]. Zunächst konnte in einem Vorversuch ein gesteigerter Efflux von JC-1 in MOVP-3 Zellen im Vergleich mit Molt-3 Zellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der gesteigerten MDR-1-Expression in der VP-16 resistenten Zelllinie MOVP-3. Dieser MDR-1-vermittelte Abfall des FL-1-Signals wurde nach Vorabinkubation mit ProVP-16 I über einen Konzentrationsbereich von 10^{-5} M bis 10^{-4} M nicht beobachtet. VP-16 hingegen zeigte keinen Effekt auf den MDR-1-induzierten Efflux: Das JC-1-Signal war hierbei identisch mit Negativkontrollen, in denen PBS eingesetzt wurde (Abbildung 7B). Gleiche Effekte des ProVP-16 I konnten auch in der MDR-1-positiven Neuroblastomzelllinie Kelly nachgewiesen werden (Abbildung 7C). Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß ProVP-16 I vor seiner Konversion in VP-16 einen eigenständigen Effekt auf den MDR-1-vermittelten Substratefflux hat, und so diesen Resistenzmechanismus umgeht. Das Prodrug bleibt in der Tumorzelle und kann nach seiner Konversion wirken.

Abbildung 8 **Effekt von VP-16 und ProVP-16 I auf die P-gp-Pumpe**

Dargestellt ist die Aufnahme bzw. der Efflux von JC-1 unter verschiedenen Bedingungen. In Abbildung 7A wird der Efflux von JC-1 in nicht MDR-1-exprimierenden Molt-3 Zellen im Vergleich zu MDR-1-exprimierenden MOVP-3 Zellen dargestellt. Abbildung 7B zeigt den Effekt von VP-16 bzw. ProVP-16 I auf den JC-1-Efflux in MOVP-3 Zellen. Abbildung 7C zeigt gleiches in der MDR-1-exprimierenden Neuroblastomzelllinie Kelly.

6.5. Toxizität des Prodrugs *in vivo* und Wirksamkeit von ProVP-16 II in einem nicht resistenten NXS2 Neuroblastom-Modell

Basierend auf den *in vitro* Daten, die keine größeren Unterschiede zwischen ProVP-16 I und II ergaben, wurde ProVP-16 II aufgrund seiner besseren Wasserlöslichkeit für erste *in vivo* Experimente ausgewählt. In einem resistenten Xenograft-Modell konnte außerdem vorab nachgewiesen werden, daß ProVP-16 II die Rückbildung bereits etablierter MDR-1-exprimierender Tumore initiieren kann. Für eine klinische Anwendung der Prodrugs ist es wichtig, den Effekt auch in einem nicht-resistenten Modell zu überprüfen, da es nicht in allen vorbehandelten Tumoren zu einer Hochregulation von MDR-1 kommt. Zu diesem Zweck wurde die nicht-resistente Zelllinie NXS2 ausgewählt.

Die systemische Toxizität des ProVP-16 II wurde in A/J Mäusen (n=6) ermittelt. Hierzu wurden den Mäusen intraperitoneal 20 bzw. 60 mg/kg Körpergewicht (KG) VP-16 bzw. ProVP-16 II an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 verabreicht. Zur Kontrolle der Toxizität wurde das Gewicht der Mäuse über einen Zeitraum von 23 Tagen beobachtet und ein Gewichtsverlust von größer 20 % des Ausgangsgewichtes am Tag 0 als Ereignis im Kaplan-Maier-Diagramm gekennzeichnet. Es zeigte sich eine Reduktion der Toxizität für ProVP-16 II

um mindestens Faktor 3. Die MTD für ProVP-16 II lag hierbei bei 60 mg/kg KG im Vergleich zu VP-16 mit einer MTD bei 20 mg/kg KG [Lange et al 2003, eigene Publikationen B, Abbildung 2 A].

Der Anti-Tumor-Effekt wurde dann im NXS2-Neuroblastom-Modell untersucht. Die Behandlung mit 20 mg/kg KG VP-16 bzw. ProVP-16 II erfolgte an den Tagen 1, 4, 6, 11, 15 und 18 nach Tumorzellinokulation. Am Tag 24 wurde der Versuch beendet, die Leber entnommen und das Lebergewicht sowie Anzahl der Metastasen auf der Leberoberfläche bestimmt. Sowohl Mäuse, die mit VP-16 bzw. ProVP-16 II behandelt wurden, zeigten eine Reduktion der Metastasen und des Lebergewichtes im Vergleich zur Positiv-Kontrolle. Anzumerken ist hierbei, daß ProVP-16 II ähnliche Ergebnisse erzielte wie VP-16 bei MTD, obwohl nur ein Drittel der für das Prodrug ermittelten MTD eingesetzt wurde [Lange et al 2003, Abbildung 2 B und C].