

**Variation von Neutralligand und Abgangsgruppe zur Optimierung von
[1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexen**

**Untersuchungen pharmakologischer Eigenschaften, Stabilität, Reaktivität
und Antitumoraktivität**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anja Dullin

Berlin 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Gust

2. Gutachter: Univ. Doz. Dr. B. Kircher

Datum der Disputation: 27.2.2007

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Ronald Gust

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. R. Gust für die Überlassung des interessanten, vielfältigen Themas, das während der Bearbeitung immer wieder neue Anregungen mit sich brachte, der großen Freiheit in der Bearbeitung sowie den anregenden wissenschaftlichen und auch sonstigen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. B. Kleuser für die Bereitstellung der Fibroblasten- und Keratinozyten-Kulturen sowie Frau H. Gonska für zahlreiche Hilfestellungen.

Herrn Prof. Dr. M. Gelbcke vom Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, für das Bereitstellen der in seinem Arbeitskreis synthetisierten enantiomerenreinen (1-Aryl-2-alkyl)-ethylendiaminkomplexe zur Herstellung und Testung der entsprechenden Platinverbindungen.

Frau Univ. Doz. Dr. B. Kircher von der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Uniklinik Innsbruck für die Durchführung der Testung der pharmakologischen Aktivität der Platin(II)-Alkylamin-Komplexe.

Herrn Dr. Timo Kapp für die gute Zusammenarbeit bei den Untersuchungen der pharmakologischen Eigenschaften der Platin(II)-Alkylaminkomplexe sowie der Dendrimere und den zahlreichen Ideen und Anregungen.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie für die Aufnahme der Spektren und Erfüllung von Sonderwünschen.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises, die mir durch ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft eine wertvolle Unterstützung waren, besonders Frau S. Bergemann für einige Zelltests am Schluss der Arbeit und Frau M. Wenzel für die Synthese mancher Verbindung sowie Hilfe bei der IC₅₀-Durchführung.

Ferner möchte ich mich bei all denjenigen, namentlich nicht erwähnten, bedanken, die mir beim Anfertigen der Arbeit eine große Unterstützung waren und durch manche neu motivierende Ablenkung zum Gelingen beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

Häufig verwendete Abkürzungen.....	8
1 Allgemeiner Teil / Einleitung.....	9
1.1. Krebserkrankungen und Therapiemöglichkeiten.....	9
1.2. Platinkomplexe in der Tumorthherapie.....	10
1.2.1. Cisplatin als Platinkomplex der ersten Generation.....	10
1.2.2. Wirkmechanismus und biologische Angriffspunkte	11
1.2.3. Reperaturmechanismen und Resistenzentwicklung.....	13
1.2.3.1. <i>NER-Proteine</i>	14
1.2.3.2. <i>MMR-Proteine</i>	14
1.2.3.3. <i>HMG-Proteine</i>	14
1.2.3.4. <i>Thiolhaltige Moleküle wie Glutathion und Metallothionin</i>	15
1.2.4. Toxizität von Cisplatin.....	15
1.2.5. Platinkomplexe der zweiten Generation.....	16
1.2.6. Oxaliplatin als Platinkomplex der dritten Generation.....	18
1.2.7. Weitere Entwicklungen aktiver Platinkomplexe.....	19
1.3. Drug Targeting.....	21
1.3.1. Wasserlöslichkeit und stereochemische Betrachtungen.....	21
1.4. Multinukleare Platinkomplexe.....	26
1.5. Polymerkonjugate in der Behandlung von Tumorerkrankungen.....	30
1.5.1. Dendrimere.....	30
1.6. Problemstellung und Zielsetzung.....	35
2 Synthetischer Teil.....	37
2.1. Übersicht der synthetisierten Platin(II)-Komplexe.....	37
2.1.1. Symmetrische und asymmetrische Platin(II)-Komplexe.....	37
2.1.1.1. <i>[1-Aryl-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Komplexe mit Halogeniden als</i> <i>Abgangsgruppen</i>	37
2.1.1.2. <i>[1-Aryl-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Komplexe mit Sulfat als</i> <i>Abgangsgruppe</i>	39
2.1.1.3. <i>Komplexe mit chelatgebundenen Dicarbonsäuren als Abgangsgruppen</i>	40

2.1.2.	Mono-, Di- und Tetranukleare Platin(II)-Alkylamin-Komplexe.....	41
2.1.3.	Platin(II)-Dendrimer-Konjugate.....	41
2.2.	Synthese der Platin(II)-Verbindungen.....	43
2.2.1.	Symmetrische und asymmetrische Neutralliganden.....	43
2.2.1.1.	<i>Koordination an Platin.....</i>	<i>43</i>
2.2.1.2.	<i>Herstellung der Aquasulfatoplatin(II)-Komplexe aus Diiodoplatin(II)-Komplexen.....</i>	<i>44</i>
2.2.1.3.	<i>Herstellung der Dichloroplatin(II)-Komplexe aus der Aquasulfatoplatin(II)-Verbindung.....</i>	<i>45</i>
2.2.1.4.	<i>Herstellung der Platin(II)-Komplexe mit chelatgebundenen Abgangsgruppen.....</i>	<i>46</i>
2.3.	Platin(II)-Alkylamin-Komplexe.....	48
2.4.	Umsetzung der Dendrimere.....	49
2.4.1.	Komplexierung mit Platin(II)-Salzen.....	49
2.4.2.	Umsetzung der carbonsäureterminierten Dendrimere.....	49
3	Untersuchungen zu mono-, di- und tetranuklearen Platin(II)-Alkylamin-Komplexen.....	51
3.1.	Stabilität <i>in vitro</i> und Proteinbindung.....	53
3.2.	Zellanreicherung und Kernakkumulation der mono-, di- und tetranuklearen Komplexe.....	55
3.3.	Bindung an zelluläre DNA.....	57
3.4.	Zytotoxizität.....	58
3.4.1.	Zytotoxizität an der MCF-7-Zelllinie.....	58
3.4.2.	Zytotoxizität an humanen Lymphom-Zelllinien.....	59
3.4.3.	IC ₅₀ -Bestimmung an MCF-7-Zellen und an Fibroblasten.....	62
3.4.3.1.	<i>MCF-7-Zellen.....</i>	<i>62</i>
3.4.3.2.	<i>Fibroblasten.....</i>	<i>64</i>
3.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen an Platin(II)-Alkylamin-Komplexen.....	65
4	Untersuchungen zu Platin(II)-Dendrimer-Konjugaten.....	67
4.1.	Zellaufnahme.....	69
4.2.	Kernakkumulation, DNA- und Proteinbindung.....	70

4.3.	Zytotoxizität.....	73
4.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen an Platin(II)- Dendrimer-Konjugaten.....	77
5	Untersuchungen von Carboplatin-Infusionslösungen.....	78
5.1.	Allgemeiner Hintergrund.....	78
5.1.2.	Verwendung einer geeigneten Messmethode zur Bestimmung des Neben- produktes.....	80
5.1.2.1.	<i>Reversed-Phase Chromatographie.....</i>	81
5.1.2.2.	<i>Die stationäre Phase.....</i>	81
5.1.2.3.	<i>Die mobile Phase.....</i>	82
5.1.2.4.	<i>Identifizierung der Peaks.....</i>	82
5.2.	Identifizierung der unbekanntem Verunreinigung NP in Carboplatin- Infusionslösungen.....	83
5.2.1.	Isolierung des Nebenproduktes.....	83
5.2.2.	Spektroskopische Charakterisierung des Nebenproduktes.....	88
5.2.2.1.	<i>Atomabsorptionsspektroskopie, AAS.....</i>	88
5.2.2.2.	<i>Massenspektrometrie.....</i>	88
5.2.2.3.	<i>Infrarot-Spektroskopie.....</i>	88
5.2.3.	Strukturvorschlag für das Nebenprodukt NP.....	89
5.3.	Messergebnisse mit einem Phosphat/Sulfonsäure-Puffer.....	94
5.3.1.	Isolierung des Nebenproduktes NP und Charakterisierung mit einem KH_2PO_4 - Puffer/NaHeptansulfonsäure-Fließmittel.....	96
5.4.	Zusammenfassung	101
6	Untersuchungen zur Reaktivität von Platin(II)-Komplexen mittels HPLC.....	103
6.1.	Reaktivitätsuntersuchungen.....	103
6.1.1.	Allgemeine Grundlagen zur Substitution quadratisch planarer Platin(II)- Komplexe und deren Reaktionskinetik.....	104
6.1.1.1.	<i>Berechnung von Geschwindigkeitskonstanten irreversibler Konsektiv- reaktionen.....</i>	107
6.2.	Messergebnisse und Diskussion.....	111

6.2.1.	Einfluss der Alkylgruppe am C2 von unsymmetrischen Platin(II)-Komplexen auf die Reaktivität.....	111
6.2.2.	Einfluss der Abgangsgruppe auf die Reaktivität.....	117
6.2.3.	pH-Abhängigkeit der Reaktivität ausgewählter Platin(II)-Komplexe.....	123
6.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Reaktivitätsuntersuchungen.....	129
7	Testung an humanen Zelllinien.....	131
7.1.	Allgemeine Grundlagen	131
7.1.1.	MTT-Test.....	131
7.1.2.	Kristallviolettassay.....	132
7.1.3.	Zytotoxizitätsbestimmung mittels IC ₅₀ -Wertbestimmung.....	133
7.2.	Die humane, hormonsensitive Mammakarzinomzelllinie MCF-7.....	135
7.2.1.	Chemosensitivitätstestung.....	135
7.2.1.1.	Testergebnisse der [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe.....	135
7.2.1.2.	Testergebnisse der enantiomerenreinen [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Komplexe.....	138
7.2.1.2.1.	Einfluss der Alkylkette am C2 auf das Zellwachstum.....	142
7.2.1.2.2.	Einfluss des Phenylrings am C1 auf das Zellwachstum.....	143
7.2.2.	IC ₅₀ -Wert-Bestimmung ausgewählter Verbindungen.....	145
7.3.	Die humane, hormonunabhängige Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231.....	146
7.3.1.	Chemosensitivitätstestung.....	146
7.3.1.1.	Testergebnisse der [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe....	146
7.3.1.2.	Testergebnisse der enantiomerenreinen [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Komplexe.....	148
7.3.1.2.1.	Einfluss der Alkylkette am C2 auf das Zellwachstum.....	149
7.3.1.2.2.	Einfluss des Phenylrings am C1 auf das Zellwachstum.....	151
7.4.	Die humane, hormonsensitive Prostatakarzinomzelllinie LNCaP/FGC.....	153
7.4.1.	Chemosensitivitätstestung.....	153
7.4.1.1.	Testergebnisse der [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe...	154
7.4.1.2.	Testergebnisse der enantiomerenreinen [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Komplexe.....	155
7.4.1.2.1.	Einfluss der Alkylkette am C2 auf das Zellwachstum.....	156
7.4.1.2.2.	Einfluss des Phenylrings am C1 auf das Zellwachstum.....	158
7.5.	Untersuchungen an Fibroblasten und Keratinozyten.....	160

7.5.1.	Vorversuche an Fibroblasten zur optimalen Aussaatdichte.....	160
7.5.2.	MTT-Test an Fibroblasten und Keratinozyten.....	162
7.6.	Diskussion der Ergebnisse der pharmakologischen Testung.....	166
7.6.1.	Zytotoxische Untersuchungen an humanen Krebszelllinien.....	166
7.6.2.	Untersuchungen an humanen Fibroblasten und Keratinozyten.....	172
7.7.	Zusammenfassung der Ergebnisse der pharmakologischen Testung.....	174
8	Zusammenfassung und Ausblick.....	176
8a	Zusammenfassung Englisch.....	180
9	Experimenteller Teil.....	184
9.1.	Allgemeine Angaben.....	184
9.1.1.	Synthetischer und analytischer Teil.....	184
9.1.1.1.	<i>Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>184</i>
9.1.2.	Pharmakologische Testung.....	186
9.1.2.1.	<i>Verwendete Geräte.....</i>	<i>186</i>
9.1.2.2.	<i>Chemikalien.....</i>	<i>187</i>
9.1.2.3.	<i>Zelllinien.....</i>	<i>187</i>
9.1.2.4.	<i>Zellkulturmedien.....</i>	<i>187</i>
9.2.	Synthesvorschriften.....	189
9.2.1.	Synthese der Platinverbindungen.....	189
9.2.1.1.	<i>Symmetrische und asymmetrische Platin(II)-Komplexe.....</i>	<i>189</i>
9.2.1.1.1.	<i>Komplexierung der symmetrischen und asymmetrischen, am C2 alkylierten Liganden mit Kaliumtetraiodoplatinat, K_2PtI_4.....</i>	<i>189</i>
9.2.1.1.2.	<i>Synthese von Aquasulfatokomplexen aus Diiodoplatin(II)-Komplexen.....</i>	<i>194</i>
9.2.1.1.3.	<i>Synthese der Dichloroplatin(II)-Komplexe aus Aquasulfatoplatin(II)-Komplexen.....</i>	<i>199</i>
9.2.1.1.4.	<i>Platin(II)-Komplexe mit chelatgebundenen Malonsäurederivaten als Abgangsgruppen.....</i>	<i>204</i>
9.2.2.	Polynukleare Alkylaminplatin(II)-Komplexe.....	207
9.2.2.1.	<i>Kationische Alkylaminplatin(II)-Addukte mit DMSO als Abgangsgruppe.....</i>	<i>207</i>
9.2.2.2.	<i>Kationische Alkylaminplatin(II)-Addukte mit Chlorid als Abgangsgruppe.....</i>	<i>209</i>
9.2.3.	Platin(II)-Dendrimer-Konjugate.....	212

9.3.	HPLC-Untersuchungen.....	216
9.3.1.	Untersuchung von Carboplatin-Infusionslösungen und Bestimmung eines auftretenden Nebenproduktes NP.....	216
9.3.1.1.	<i>Verwendete Lösungen und Standards.....</i>	216
9.3.1.2.	<i>Verwendete Puffer in der mobilen Phase.....</i>	216
9.3.1.3.	<i>Messbedingungen.....</i>	217
9.3.2.	Untersuchungen zur Reaktivität von Platin(II)-Komplexen.....	217
9.3.2.1.	<i>Mobile Phase.....</i>	217
9.3.2.2.	<i>Kaliumiodid-Stammlösungen.....</i>	218
9.3.2.3.	<i>Probenvorbereitung.....</i>	218
9.3.2.4.	<i>Versuchsbedingungen.....</i>	218
9.3.2.5.	<i>Auswertung mit dem Kinetiksimulationsprogramm KSIM.....</i>	220
9.4.	Pharmakologischer Teil, <i>in vitro</i>-Modelle.....	221
9.4.1.	Krebszelllinien.....	221
9.4.1.1.	<i>Kulturbedingungen und Passagieren.....</i>	221
9.4.1.2.	<i>Aussaat für Zytotoxizitätstests und IC₅₀-Wert-Bestimmung.....</i>	221
9.4.1.3.	<i>Substanzzugabe.....</i>	222
9.4.1.4.	<i>Messpunktabnahme (Abstoppen).....</i>	223
9.4.1.5.	<i>Kristallviolettassay zur Bestimmung der Zellmasse.....</i>	223
9.4.2.	Fibroblasten und Keratinozyten.....	224
9.4.2.1.	<i>Kulturbedingungen und Passagieren.....</i>	224
9.4.2.1.1.	<i>Fibroblasten.....</i>	224
9.4.2.1.2.	<i>Keratinozyten.....</i>	224
9.4.2.2.	<i>Aussaat.....</i>	225
9.4.2.2.1.	<i>MTT-Test.....</i>	225
9.4.2.3.	<i>Substanzzugabe.....</i>	225
9.4.2.4.	<i>Messpunktabnahme (Abstoppen).....</i>	225
10	Anhang.....	227
10.1.	Zeit-Wirkungs-Kurven der Zytotoxizitätstests.....	227
10.1.1.	Testung an der MCF-7-Zelllinie.....	227
10.1.2.	Testung an der MDA-MB-231-Zelllinie.....	233
10.1.3.	Testung an der LNCaP/FGC-Zelllinie.....	238

10.2.	Zytotoxizität der Platin(II)-Alkylaminkomplexe an humanen Lymphomzelllinien.....	242
10.3.	Daten zur MTT-Testung an Fibroblasten und Keratinozyten.....	245
10.3.1.	MTT-Test an Fibroblasten.....	245
10.3.2.	MTT-Test an Keratinozyten.....	246
10.3.3.	Formeln der im MTT-Test verwendeten Dendrimere D-25 und SF-G ₂	247
10.4.	Daten zu den Reaktivitätsuntersuchungen.....	248
10.4.1.	Variation der Kaliumiodid-Konzentration.....	248
10.4.2.	Variation des pH-Wertes.....	250
11	Literaturverzeichnis.....	251

Häufig verwendete Abkürzungen und Definitionen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
CBDC	Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMEM	Nährmedium zur Kultur der MCF-7- Zellen, <i>Eagle's minimum essential medium</i>
FAM	Fertigarzneimittel
FCS	Fetales Kälberserum
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie, <i>High Pressure Liquid Chromatographie</i>
HSA	Humanes Serumalbumin
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration</i> , halbmaximale Wirkkonzentration
KSIM	Kinetiksimulationsprogramm
LNCaP/FGC	humane Prostatakarzinomzelllinie <i>Lymph Node Carcinoma of Prostate / Fast Growing Colony</i>
MCF-7	humane, hormonabhängige Mammakarzinomzelllinie <i>Michigan Cancer Foundation</i>
McCoy's	Nährmedium zur Kultur der der MDA-MB-231-Zellen
MDA-MB-231	humane, hormonunabhängige Mammakarzinomzelllinie
MPLC	Mitteldruckflüssigchromatographie <i>Middle Pressure Liquid Chromatographie</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RPMI	Nährmedium zur Kultur der LNCaP/FGC-Zellen