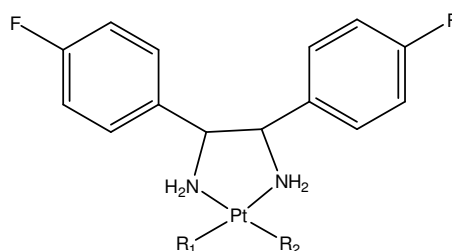


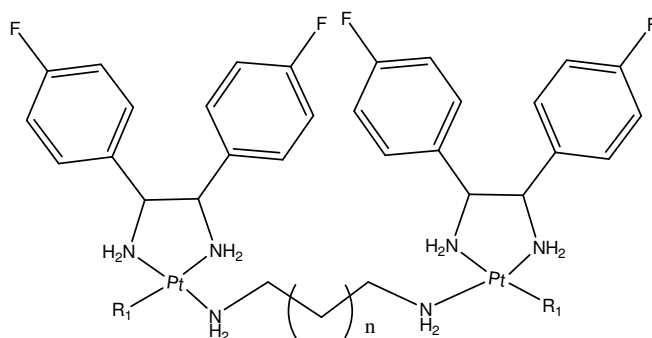
3 Untersuchungen zu mono-, di- und tetranuklearen Platin(II)-Alkylamin-Komplexen

Für diese Untersuchungen wurde eine Reihe von Substanzen synthetisiert, die in einer kurzen Übersicht in den **Tab.3.1** bis **3.3** zum besseren Verständnis dargestellt sind. Diese Verbindungen wurden analog der Darstellung 2.3. in Abschnitt 2 erhalten.



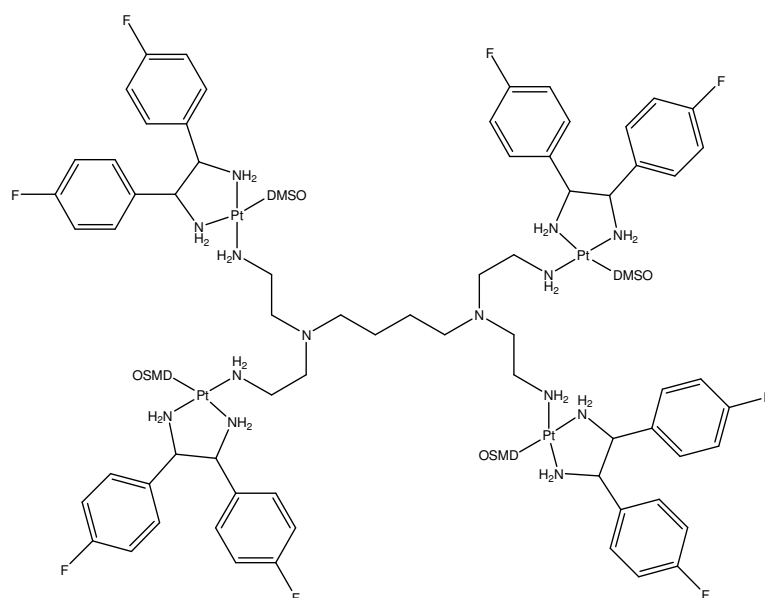
<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>Konfiguration</u>	<u>Verbindung</u>
SO(CH ₃) ₂	-NH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	meso	m-4F-Pt-PA-DMSO
SO(CH ₃) ₂	-NH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	meso	m-4F-Pt-BA-DMSO
SO(CH ₃) ₂	-NH ₂ (CH ₂) ₅ CH ₃	meso	m-4F-Pt-HA-DMSO
Cl	-NH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	meso	m-4F-Pt-PA-Cl
Cl	-NH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	meso	m-4F-Pt-BA-Cl
Cl	-NH ₂ (CH ₂) ₅ CH ₃	meso	m-4F-Pt-HA-Cl

Tab.3.1 Synthetisierte kationische mononukleare Platin(II)-Alkylamin-Komplexe



<u>R₁</u>	<u>n</u>	<u>Konfiguration</u>	<u>Verbindung</u>
SO(CH ₃) ₂	4	meso	m-4F-Pt-DAH-DMSO
SO(CH ₃) ₂	4	D,L	D,L-4F-Pt-DAH-DMSO
SO(CH ₃) ₂	7	meso	m-4F-Pt-DAN-DMSO
SO(CH ₃) ₂	10	meso	m-4F-Pt-DAD-DMSO
Cl	4	meso	m-4F-Pt-DAH-Cl
Cl	7	meso	m-4F-Pt-DAN-Cl
Cl	10	meso	m-4F-Pt-DAD-Cl

Tab.3.2 Synthetisierte kationische dinukleare Platin(II)-Alkylamin-Komplexe



<u>R₁</u>	<u>Konfiguration</u>	<u>Verbindung</u>
m-4F-PtDMSO	meso	m-4F-Pt-DAB(PA) ₄ -DMSO

Tab.3.3 Synthetisierter tetranuklearer Platin(II)-Alkylamin-Komplex

Als Abgangsgruppe wurde neben Chlorid ein Dimethylsulfoxidrest gewählt. In der Literatur finden sich einige Beispiele von Verbindungen, die ebenfalls Sulfoxidderivate als Austrittsgruppe aufweisen. DMSO-Komplexe sollen zum einen resistenter gegen Nukleophilattaken wie z.B. von inaktivierenden Proteinen sein, aber auch Stabilität in physiologischer Lösung zeigen [119]. Im Vergleich zu Chlorid eignet sich DMSO daher aufgrund der langsameren Hydrolyse gut für Reaktivitätsstudien mit Nukleotiden [120]. Die sterische Kontrolle durch Verwendung von DMSO-Resten ist bedingt durch den *cis*-Effekt des Schwefelatoms. Interaktionen zwischen 5'-GMP-Resten und DMSO labilisieren den S-Liganden [121,122]. Bei bisherigen Untersuchungen von Diaminohexanen mit DMSO-Cl-Resten kam es zusätzlich durch die +4- Ladung zu mehr elektrostatischen Wechselwirkungen mit der DNA und somit zu mehr Interstrand cross-links [123].

Für die synthetisierten Platin(II)-Alkylamin-Verbindungen sollte nun der Einfluss der variablen Aminkettenlänge sowie der verschiedenen Abgangsgruppen und der dadurch bedingten unterschiedlichen Ladung im Hinblick auf die biologische Aktivität untersucht werden. Neben der pharmakologischen Testung an verschiedenen Krebszelllinien wie den MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkrebszellen wurde die Selektivität im Hinblick auf die Wirkung an Tumorzellen an Fibroblasten analysiert. Ferner wurden Studien zur Kern- und Zellaufnahme sowie zur DNA-Bindung durchgeführt, was kurz zusammenfassend dargestellt wird.

3.1. Stabilität *in vitro* und Proteinbindung

Zur Untersuchung der Stabilität wurden die Komplexe in Wasser, physiologischer Kochsalzlösung und Dulbecco's Puffer mit der Kapillarelektrophorese vermessen. Dies ist aufgrund des kationischen Charakters der Verbindungen möglich, da bei der Kapillarelektrophorese durch Anlegen einer definierten Spannung ein Stromfluss erfolgt, wodurch die Ionen jeweils zur entgegengesetzt geladenen Elektrode wandern. Genaue Versuchsbedingungen sind unter [124] beschrieben.

Die Stabilität von Komplexen steht in direkter Beziehung zur biologischen Aktivität. Je weniger stabil eine Substanz ist, desto schneller reagiert sie aufgrund von Hydrolyse zwar mit der DNA, aber auch mit anderen Bionukleophilen, was z.T. unerwünschte Wirkungen bedingt (s. Kap.1). Durchgeführt wurden diese Versuche mit **m-4F-Pt-HA-DMSO** sowie dem dinuklearen Komplex **m-4F-Pt-DAH-DMSO**.

Beide Verbindungen reagierten sehr schnell zum korrespondierenden Chlorokomplex, wobei die Umsetzung beim **m-4F-Pt-DAH-DMSO** durch dessen zwei reaktive Zentren bereits nach 90 Minuten abgeschlossen war. **Abb.3.1** zeigt die dazugehörigen Elektropherogramme.

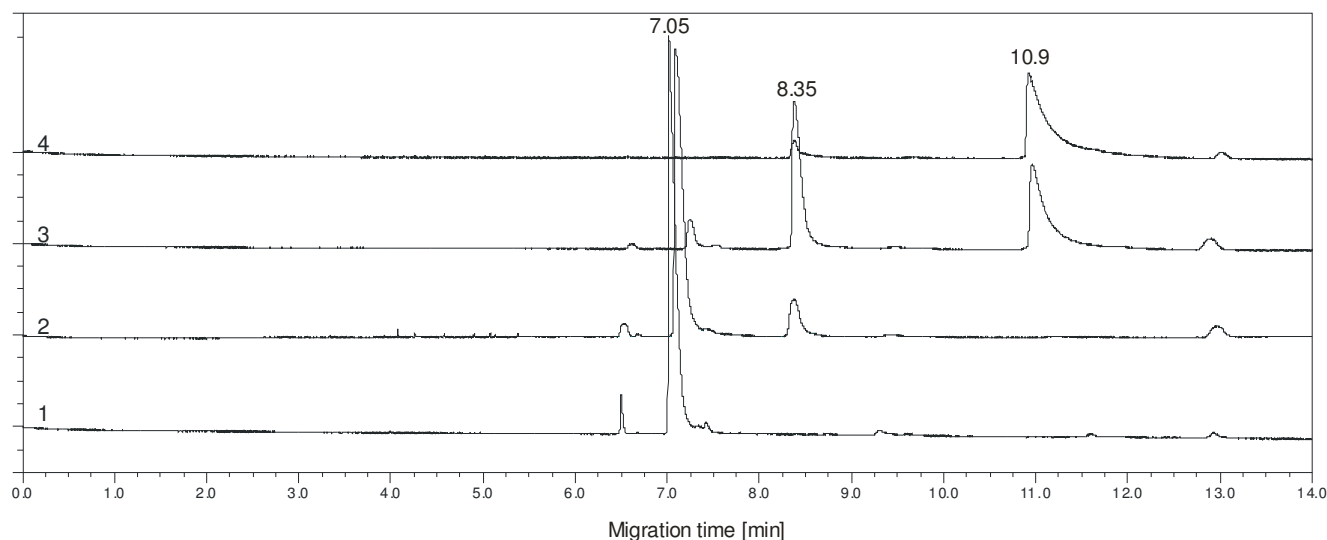


Abb.3.1 Elektropherogramme zur Umsetzung von **m-4F-Pt-DAH-DMSO** in Dulbecco's Puffer

- 1 **m-4F-Pt-DAH-DMSO** Standard
- 2 **m-4F-Pt-DAH-DMSO** nach 12 Minuten Inkubation
- 3 **m-4F-Pt-DAH-DMSO** nach einer Stunde Inkubation
- 4 **m-4F-Pt-DAH-Cl** Standard

[Quelle: T.Kapp [124]]

Daneben wurde auch die Bindung an Proteine bzw. Humanes Serumalbumin (HSA) untersucht. Tripeptide wie z.B. Glutathion (GSH) sind in einer Konzentration von 5-10mM im intrazellulären Raum vorhanden. Studien mit den multinuklearen Verbindungen BBR3005, BBR3464 und BBR3571 sowie *trans*-Platin haben gezeigt, dass zwei Platin-Atome durch das Schwefel-Atom des GSH verbrückt sind [125], wobei der Schwefel gegenüber dem Platin als weiche Base agiert.

Die Gehaltsbestimmung des gebundenen und freien Platins erfolgte durch Ultrafiltration und ethanolische Fällung (s. auch Kap.4). Alle Verbindungen wurden stärker als Cisplatin an HSA gebunden. Je höher die Ladung der jeweiligen Komplexe war und je länger die verbrückende Alkylkette, desto deutlichere Unterschiede traten auf. So war die Wiederfindungsrate der tetranuklearen Verbindung **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** nur gering. Die vierfach positiv geladenen Chlorokomplexe hatten im Vergleich zu dem achtfach geladenen DMSO-Komplex eine bessere Wiederfindung von freiem Platin, was auf stärkere elektrostatische Interaktionen der DMSO-Verbindung mit HSA zurückzuführen sein kann. Allerdings war kein bedeutender

Unterschied zwischen mono- und dinuklearen Komplexen zu erkennen. Je länger die Alkylaminkette war, desto weniger freies Platin wurde im Ultrafiltrat gefunden.

3.2. Zellanreicherung und Kernakkumulation der mono-, di- und tetranuklearen Komplexe

Zunächst stellte sich die Frage, auf welchem Weg die Verbindungen überhaupt in die Zelle aufgenommen werden. Für Cisplatin ist die passive Diffusion möglich; dies setzt einen linearen Zusammenhang zwischen Substanzkonzentration im Außenmedium und der intrazellulären Konzentration voraus. Überraschenderweise ließ sich für alle untersuchten Komplexe solch ein linearer Zusammenhang feststellen. Allerdings müsste auch ein energieabhängiger Transportweg für geladene Verbindungen zu finden sein [126]. In diesem Sinne wird als natriumabhängiger Prozess die Makropinozytose beschrieben [127]. Hierbei ist neben der Ladung ebenso die Größe lipophiler Molekülteile für die Interaktion mit der Zellmembran essentiell. Durch Zusatz von Hemmstoffen konnte gezeigt werden, dass sich der Platingehalt in den Zellen verringert. Somit ist auch der Weg über Makropinozytose involviert.

Um den Grad der Zellanreicherung zu bestimmen, wurden MCF-7-Zellen mit 5 μ M des jeweiligen Komplexes versetzt. Für die mononuklearen Verbindungen zeigte sich eine klare Abhängigkeit von der Alkylkettenlänge und der jeweiligen Ladung (s. **Abb.3.2**). Je länger die Kette und je höher die Ladung, desto stärker erfolgte eine Aufnahme in die Zellen. So hatten **m-4F-Pt-HA-DMSO** und **m-4F-Pt-HA-Cl** sogar eine bis zu 20-fach höhere Anreicherung als Cisplatin.

Für die dinuklearen Komplexe ließ sich dieselbe Abhängigkeit der Zellaufnahme von der Alkylkettenlänge nachweisen. Die tetranukleare Verbindung **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** besaß letztendlich die höchste zelluläre Akkumulation.

Bei der untersuchten Aufnahme in den Zellkern war die gleiche Regelmäßigkeit von Kettenlänge und Ladung des Komplexes zu beobachten (**Abb.3.3**). Wie bei der Zellaufnahme stieg die Akkumulation mit steigender Kettenlänge der verbrückenden Alkylkette. Bei den mononuklearen Verbindungen lagen **m-4F-Pt-PA-DMSO** (6.17 ng Pt/mg Protein) und **m-4F-Pt-BA-DMSO** (13.7 ng Pt/mg Protein) im Bereich der Kernanreicherung von Cisplatin (10 ng Pt/mg Protein). Die dinuklearen DMSO-Komplexe zeigten deutlich höhere Werte und überstiegen sogar jene der wirksamen Substanz **m-4F-PtCl₂**. Wie auch bei der Aufnahme in

die Zelle besaß bei den DMSO-Komplexen **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** den höchsten Akkumulationswert. Die korrespondierenden Chloroverbindungen zeigten durchweg eine deutlich größere Aufnahme in den Zellkern. Hierbei erreichte **m-4F-Pt-DAD-Cl** den höchsten Wert.

In der Literatur finden sich einige Beispiele mit ähnlichen Ergebnissen. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurden Untersuchungen durchgeführt, welche dinukleare Platin(II)-Komplexe im Golgi-Apparat nachweisen konnten [128]. Die positive Ladung bewirkte eine hohe Affinität zur DNA. In weiteren Studien konnte eine ebensolche Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der Aminkettenlänge gezeigt werden; je lipophiler, desto aktiver war die Verbindung [129-131].

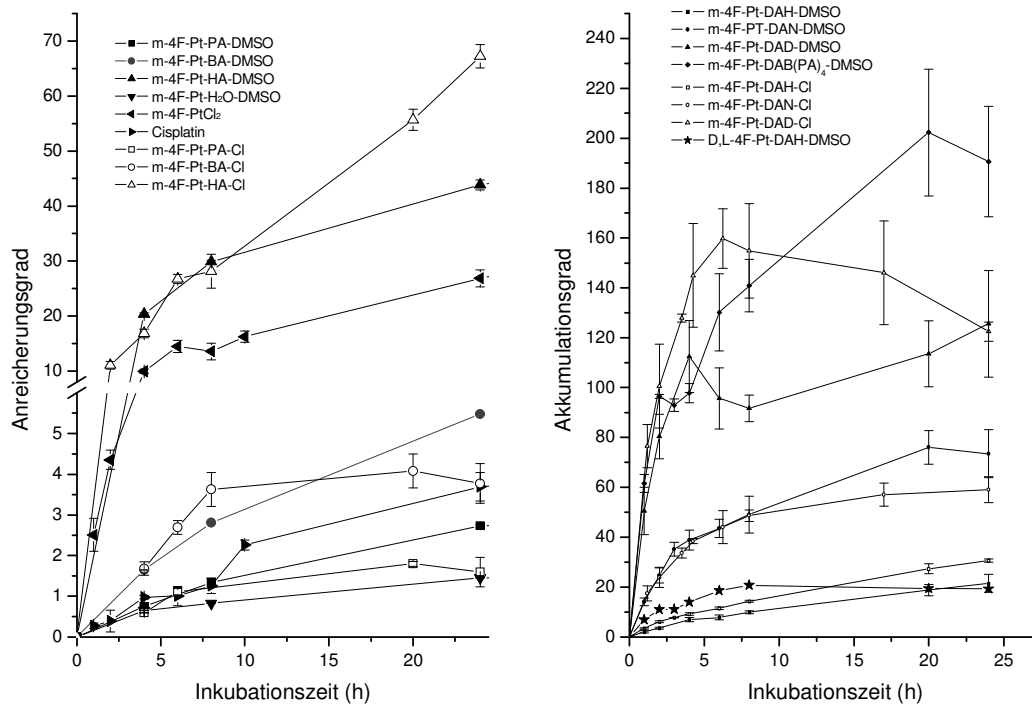


Abb.3.2 Zellanreicherung der mono-, di- und tetranuklearen Platin(II)-Alkylaminkomplexe

[Quelle: T.Kapp [124]]

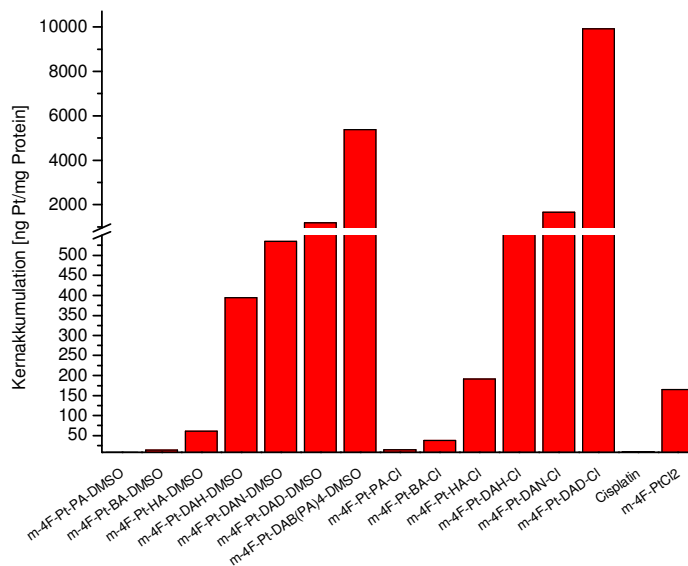


Abb.3.3 Kernakkumulation der Platin(II)-Alkylaminkomplexe [Quelle: T.Kapp [124]]

3.3. Bindung an zelluläre DNA

Um herauszufinden, ob die Substanzen neben der hohen Zellaufnahme auch in ausreichendem Maß an die DNA binden, wurden MCF-7-Zellen mit 5 μ M des jeweiligen Komplexes versetzt. Nach 24 Stunden wurde die DNA extrahiert (Methoden s. [124]) und der Platingehalt mittels Atomabsorptionsspektroskopie gemessen. Es waren einige Unterschiede festzustellen. Bei den mononuklearen Verbindungen fanden sich nur etwa 10% des Wertes von Cisplatin, wobei auch die Kettenlänge vernachlässigbar war. In diesen Komplexen existiert nur ein aktives Platinzentrum zur Bindung an die DNA. Dies führt zu monofunktionellen Addukten, die keinen biologischen Effekt ausüben können.

Die dinuklearen Verbindungen zeigten demgegenüber deutlich erhöhte DNA-Bindungen, die vergleichbar bzw. sogar höher als Cisplatin waren. Es ließ sich abermals ein Zusammenhang zwischen Alkylkettenlänge und Ladung der Komplexe aufstellen, allerdings nicht so ausgeprägt wie bei der Zellaufnahme (**Abb.3.4**). Die Interaktion zwischen der DNA und den getesteten Substanzen ist neben der Ladung mitbestimmt von der Flexibilität des Brückenliganden und der Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen [132]. Die NH_2 -Gruppen können elektrostatisch mit der DNA Wechselwirken [133].

Vergleicht man anhand von **m-4F-Pt-DAH-DMSO** und dem racemischen Komplex **D,L-4F-Pt-DAH-DMSO** den Einfluss der Konfiguration auf diese Interaktion, so wurde die Bindung an die DNA deutlich reduziert, was eventuell auch auf die stärkere Proteinbindung von racemischen Komponenten zurückgeführt werden kann.

Da die DNA-Bindung und die daraus resultierende konformative Änderung neben der Alkylkettenlänge zur begünstigten Ausbildung von inter- und intrastrand cross-links auch von der Zahl der Abgangsgruppen und der Geometrie im Vergleich zum Brückenliganden abhängt [134-136], war zu erwarten, dass die tetranukleare Verbindung **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** die höchste Bindung an die DNA aufwies.

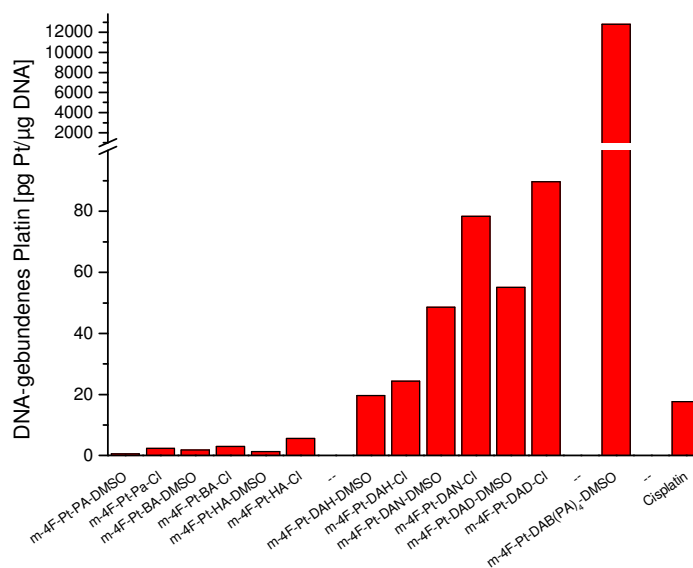


Abb.3.4 DNA-Bindung mono-, di- und tetranuklearer Platin(II)-Alkylamin Komplexe [Quelle: T.Kapp [124]]

3.4. Zytotoxizität

3.4.1. Zytotoxizität an der MCF-7-Zelllinie

Um den Einfluss der synthetisierten Komplexe auf das Zellwachstum der humanen, hormonsensitiven MCF-7-Mammakarzinomzelllinie festzustellen, wurden Konzentrationen zwischen 0.5 und 5µM gewählt. Die mononuklearen Verbindungen zeigten im Chemosensitivitätstest keinen Effekt auf die Proliferation, was aufgrund ihres monofunktionellen Charakters nicht weiter verwunderlich ist.

Die dinuklearen Komplexe stellen zwei Bindungsstellen für die DNA zur Ausbildung von cross-links zur Verfügung, was die Antitumoraktivität in bereits veröffentlichten Studien an

MCF-7-Zellen belegte [137]. Der Großteil der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substanzen ließ nach Ende der Einwirkzeit keinen deutlichen Einfluss auf das Zellwachstum erkennen. Lediglich der dinukleare Komplex **m-4F-Pt-DAN-Cl** sowie die tetranukleare Komponente **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** zeigten nach ungefähr 150 Stunden eine 50% ige Proliferationshemmung bei einer Konzentration von 5 μ M. (s.**Abb.3.5**).

Eine Erklärung für die fehlende Zytotoxizität der übrigen Verbindungen könnte in der starken Wechselwirkung mit Proteinen zu finden sein. Wie gezeigt werden konnte, ging eine Substanzzugabe in FCS-freiem Medium mit einer deutlichen Wirkungserhöhung einher. **M-4F-Pt-DAN-DMSO** besaß hierbei einen IC₅₀-Wert von knapp 12 μ M an MCF-7-Zellen.

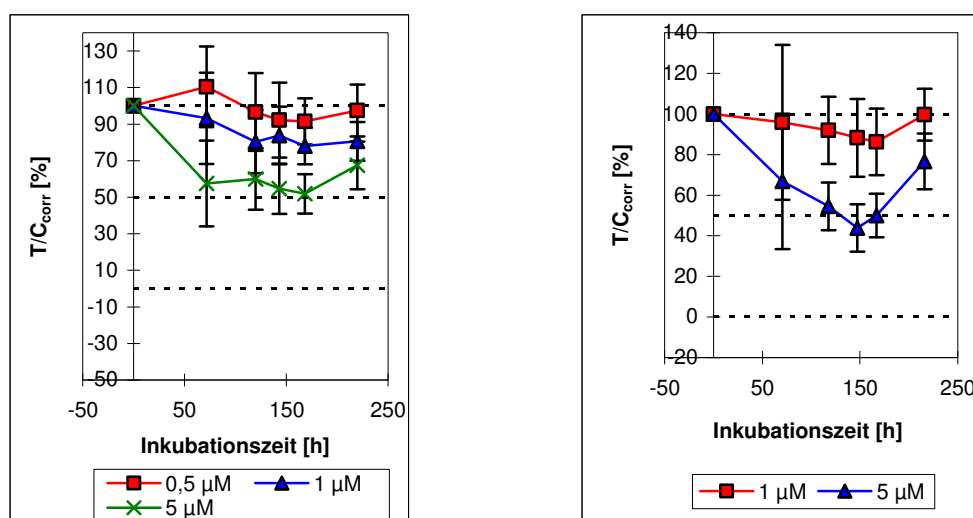


Abb.3.5 Zytotoxizität von **m-4F-Pt-DAN-Cl** (links) und **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** (rechts) an MCF-7-Zellen

3.4.2. Zytotoxizität an humanen Lymphom-Zelllinien

Die Untersuchung der Zytotoxizität an humanen Lymphomzelllinien wurde in Zusammenarbeit mit Frau Brigitte Kircher, Labor für Tumor- und Immunbiologie, Medizinische Universität Innsbruck, durchgeführt. Getestet wurden die mononukleare Verbindung **m-4F-Pt-HA-Cl** sowie die dinuklearen Verbindungen **m-4F-Pt-DAH-Cl**, **m-4F-Pt-DAN-Cl** und **m-4F-Pt-DAD-Cl** an Non-Hodgkin-Lymphom (NHL)- und Chronisch-myeloische-Leukämie (CML)-Zelllinien. Hierbei wurde die Proliferationshemmung und der Einfluss auf die Apoptose mithilfe eines modifizierten MTT-Testes, dem EZ4U kit (Biomedica, Wien) und dem ssDNA Apoptosekit (Chemicon International, Hofheim) untersucht (Bedingungen s.[138]).

Die verwendete CML-Lymphomlinie gehört zu den Leukämien.

Dies sind bösartige Erkrankungen der weißen Blutkörperchen durch klonale Proliferation hämatopoetischer Stammzellen.

Die chronisch lymphatische Leukämie beruht auf einer gesteigerten Vermehrung der kleinen Lymphozyten auf 60-99% und hat eine Lymphknotenschwellung zur Folge. Die Therapiemöglichkeiten sind zurzeit noch immer unzureichend [139].

Das Non-Hodgkin-Lymphom betrifft das lymphatische System und hier die B- oder T-Zellen. Die entarteten Zellen, die B-Lymphozyten, zeigen sich durch stark vergrößerte Lymphknoten. Die Behandlung erfolgt mit Alkylantien oder Nukleosidanaloga, wie z.B. Cyclophosphamid, Vincristin, aber auch in Kombination mit Cisplatin sowie einer Stammzelltransplantation [139].

Bei bisherigen Untersuchungen der Antitumoraktivität von mono-, di- und trinuklearen Verbindungen wie BBR3464 sowie von [1,2-bis(4-fluorphenyl)ethylendiaminen]platin(II)-Komplexen an L1210-Leukämiezellen aber auch an P388-Zelllinien ließen sich bereits gute Effekte erzielen [134,62,140].

Diese Ergebnisse und die zahlreichen Nebenwirkungen der Cisplatin-Therapie an NHL-Zellen führten uns nun zu den folgenden Untersuchungen, da zu den verwendeten Zelllinien noch keine Studienergebnisse vorlagen.

Die zu testenden Substanzen wurden in Konzentrationen von 1-20 μ M zu den jeweiligen Zellen gegeben. Im Proliferationsassay geschah dies nach sieben Tagen Vorinkubation bei 37°C, bei der Apoptose nach zwei und 24 Stunden.

An den NHL-Linien U-937 und RAJI zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation aller Komplexe. Dabei grenzen sich die Ergebnisse des **m-4F-Pt-DAN-Cl** an U937 von den anderen Verbindungen auffällig ab. Mit einer 60% igen Proliferationshemmung erwies sich die 1 μ molare Lösung dieser Substanz mehr als doppelt so aktiv wie gleichkonzentriertes Cisplatin. Zusätzlich führte **m-4F-Pt-DAN-Cl** im Apoptoseassay zur höchsten Apoptoserate. **M-4F-Pt-DAH-Cl** und **m-4F-Pt-DAD-Cl** zeigten eine konzentrationsabhängige Wirkung (s. **Abb.3.6** und **3.7**).

Die Aktivitätsreihe Cisplatin>**m-4F-Pt-DAN-Cl**>**m-4F-Pt-DAD-Cl**>**m-4F-Pt-HA-Cl**>**m-4F-Pt-DAH-Cl** zeigte sich so auch an der RAJI-Zelllinie.

Bei der Untersuchung von Proliferation und Apoptose auf CML-Zellen wies nur Cisplatin eine deutliche Hemmung bzw. Induktion auf. LAMA-84, K-562, BV-173 und CML-T1 erfuhren keinerlei Beeinflussung durch die mono- und dinuklearen Platin(II)-Verbindungen. Einen schwachen Effekt auf die Proliferation erreichte man durch Zugabe von 20 μ M von **m-4F-Pt-DAH-Cl** und **m-4F-Pt-DAN-Cl** an LAMA-84 sowie von **m-4F-Pt-DAN-Cl** und **m-4F-Pt-DAD-Cl** an BV-173 (s. **Abb.3.8** und Kap.10).

Die getesteten Platin(II)-Alkylamin-Komplexe besitzen demnach eine spezifische Aktivität an NHL-Zelllinien ähnlich Cisplatin, sind aber inaktiv gegenüber CML-Zelllinien. Die antiproliferative Wirkung war abhängig von der Alkylkettenlänge des Brückenliganden. Am effektivsten erwies sich **m-4F-Pt-DAN-Cl**. Durch das um drei C-Atome längere **m-4F-Pt-DAD-Cl** war keine Wirkungssteigerung mehr zu erreichen. Vermutlich hat diese Kettenlänge einen ungünstigen Einfluss auf die Quervernetzung der DNA. **M-4F-Pt-DAN-Cl** induziert weniger Apoptose als Cisplatin, obwohl es ungefähr gleich potent das Zellwachstum hemmt.

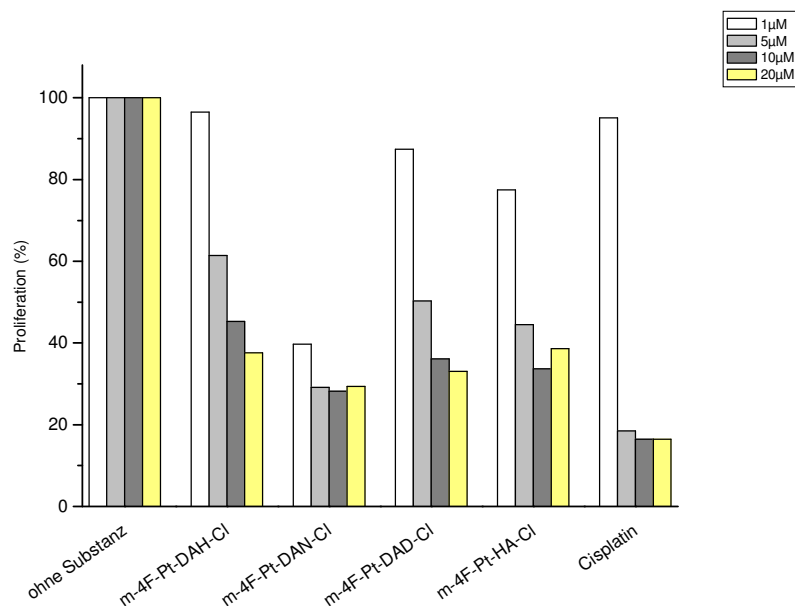


Abb.3.6 Proliferationshemmung an der U-937 NHL-Zelllinie [Quelle: B.Kircher]

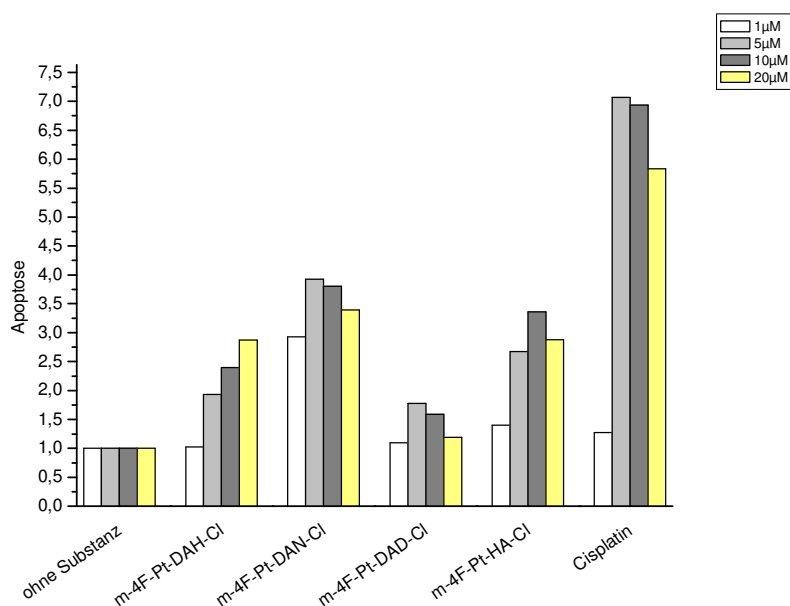


Abb.3.7 Apoptose der mono- und dinuklearen Komplexe an der U-937 NHL-Zelllinie [Quelle: B.Kircher]

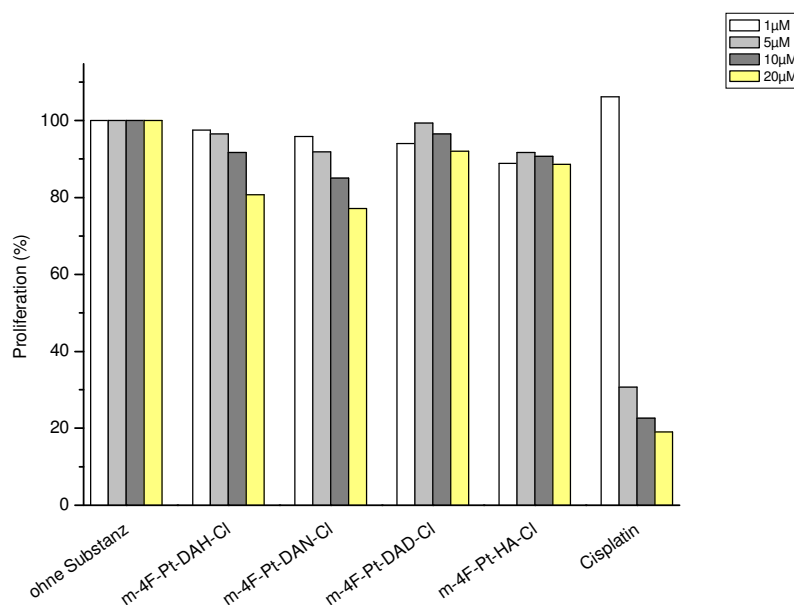


Abb.3.8 Proliferationshemmung an der LAMA-84 CML-Zelllinie [Quelle: B.Kircher]

3.4.3. IC₅₀-Bestimmung an MCF-7-Zellen und an Fibroblasten

3.4.3.1. MCF-7-Zellen

Aufgrund der viel versprechenden Ergebnisse der Zellaufnahmestudien und der größtenteils geringen Wirksamkeit im Zytotoxizitätsassay war es nun von Interesse, welche

Konzentrationen der Platin(II)-Alkylamin-Komplexe notwendig sind, um das Wachstum der MCF-7-Zellen hemmen zu können. Von einigen ausgewählten Verbindungen wurde daher der IC₅₀-Wert bestimmt. Dies erfolgte aus 2-3 unabhängigen Messungen durch Bildung eines Mittelwertes. Als Vergleich dienten die gut untersuchten Platin(II)-Komplexe Cisplatin, **m**- und **D,L-4F-PtSO₄** sowie **m**- und **D,L-4F-PtCl₂**. Um das Optimum der Proliferationshemmung feststellen zu können, wurde eine längere als die übliche Einwirkzeit gewählt, nämlich 120 Stunden. Normalerweise beträgt die Inkubationszeit nach Zugabe einer Substanz bei MCF-7-Zellen 96 Stunden bis zum ersten Abstopzeitpunkt.

Cisplatin	2μM *		
m-4F-PtSO₄	3.27μM	D,L-4F-PtSO₄	1.74μM
m-4F-PtCl₂	2.61μM	D,L-4F-PtCl₂	1.17μM
m-4F-Pt-PA-DMSO	>50μM	m-4F-Pt-PA-Cl	>50μM
m-4F-Pt-BA-DMSO	>50μM	m-4F-Pt-BA-Cl	>50μM
m-4F-Pt-HA-DMSO	>50μM	m-4F-Pt-HA-Cl	>50μM
m-4F-Pt-DAH-DMSO	>50μM	m-4F-Pt-DAH-Cl	40.38μM
m-4F-Pt-DAN-DMSO	41.97μM	m-4F-Pt-DAN-Cl	25.24μM
m-4F-Pt-DAD-DMSO	43.69μM	m-4F-Pt-DAD-Cl	33.45μM

Tab.3.4 IC₅₀-Werte ausgewählter Platin(II)-Komplexe nach 120 Stunden Inkubationszeit an MCF-7-Zellen

* (Werte zwischen 0.5-5μM in Literatur)

Wie erwartet, zeigten die symmetrischen Platin(II)-Komplexe **4F-PtCl₂** sowie **4F-PtSO₄** eine starke Wirksamkeit, die vergleichbar mit der Referenz Cisplatin war. Hierbei besaßen die racemischen D,L-Verbindungen einen stärkeren Einfluss auf das Zellwachstum als ihre meso-konfigurierten Partner. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Studien (s. auch Kap.7). Bei den Platin(II)-Alkylamin-Komplexen ließ sich ebenfalls ein nicht allzu überraschendes Bild beobachten. Die mononuklearen Substanzen wie **m-4F-Pt-HA-DMSO** hatten erneut keinen deutlichen Einfluss auf die Proliferation. Für eine Wachstumshemmung wären Konzentrationen von über 50μM nötig, was trotz ausreichender Wasserlöslichkeit für einen therapeutischen Einsatz zu hoch dosiert wäre.

Bei den dinuklearen Verbindungen stellte sich wie bei der Chemosensitivitätstestung **m-4F-Pt-DAN-Cl** als die wirksamste Substanz heraus. Bereits mit DMSO als Abgangsgruppe war sie den übrigen Komponenten mit gleicher Austrittsgruppe überlegen. Durch Umwandlung in

den korrespondierenden Chlorokomplex ließ sich die Antitumoraktivität in dem Maß erhöhen, dass für eine vergleichbare Wirkung bereits knapp die Hälfte der Konzentration ausreichend war (**m-4F-Pt-DAN-Cl**: 25.24 μ M). Dies steht ebenfalls in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Untersuchungen an humanen Lymphomzelllinien, wo mit **m-4F-Pt-DAN-Cl** der höchste Effekt auf Proliferationshemmung und Apoptose zu erreichen war.

Bei den restlichen dinuklearen Verbindungen ließ sich durch Austausch des DMSO-Restes gegen ein Chlorid ebenso eine Wirkungssteigerung erzielen.

3.4.3.2. Fibroblasten

Um die Selektivität für Tumorzellen ermitteln zu können, wurde auf eine humane Fibroblastenzelllinie zurückgegriffen. Bei der IC₅₀-Wert-Bestimmung an den MCF-7-Zellen wurden Inkubationszeiten von 120 Stunden gewählt, um das Wirkoptimum zu erhalten. Ein Vergleich an Fibroblasten brachte in dieser Hinsicht keine Änderung mit sich. Die Einwirkzeit betrug daher nur 72 Stunden. Nach einer Gesamtzeit von bis zu 170 Stunden erreichen Fibroblasten Konfluenz, so dass kein weiterer Einfluss der Testsubstanz mehr gegeben wäre. Cisplatin wurde als Referenz mitgeführt.

Da sich an den MCF-7-Zellen bereits die Unwirksamkeit der mononuklearen Platin(II)-Alkylamin-Komplexe zeigte, wurde das Hauptaugenmerk auf die dinuklearen Verbindungen gelegt. Verbindungen mit DMSO als Abgangsgruppe waren gegenüber Chlorid erneut weniger reaktiv, obwohl für **m-4F-Pt-DAN-DMSO** eine Wirksteigerung an Fibroblasten beobachtet werden konnte (IC₅₀ = 36.92 μ M gegenüber 41.97 μ M an MCF-7).

Die korrespondierenden Chlorokomplexe besaßen ebenfalls einen etwas stärkeren Einfluss auf die Proliferation der Fibroblasten als auf die der Brustkrebszelllinie. **M-4F-Pt-DAN-Cl** erwies sich als wirksamste Komponente. Eine längere Alkylkette von bis zu 12 C-Atomen schien von Nachteil zu sein, was am Beispiel von **m-4F-Pt-DAD-Cl** ersichtlich war.

Cisplatin	0.844 μ M		
m-4F-Pt-HA-Cl	>50 μ M	m-4F-Pt-DAH-Cl	>50 μ M
m-4F-Pt-DAH-DMSO	>50 μ M	m-4F-Pt-DAN-Cl	22.76 μ M
m-4F-Pt-DAN-DMSO	36.92 μ M	m-4F-Pt-DAD-Cl	25.77 μ M

Tab.3.5 IC₅₀-Werte ausgewählter Platin(II)-Komplexe an Fibroblasten nach 72 Stunden Inkubationszeit

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen an Platin(II)-Alkylamin-Komplexen

- Es wurden mono- und polynukleare Platin(II)-Alkylamin-Komplexe mit variabler Aminkettenlänge und mit zwei verschiedenen Abgangsgruppen, Chlorid und DMSO, synthetisiert.
- Es findet eine schnelle Umwandlung vom DMSO- in den korrespondierenden Chlorokomplex in chloridhaltiger Lösung statt, was die Beispiele **m-4F-Pt-HA-DMSO** und **m-4F-Pt-DAH-DMSO** verdeutlichen.
- Je höher die Ladung der jeweiligen Komplexe und je länger die verbrückende Alkylkette, desto stärker war die Bindung an Humanes Serum Albumin (HSA). Der tetranukleare Komplex **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** erreichte hierbei die höchsten Werte.
- Bei der Zellanreicherung sowie bei der Bindung an zelluläre DNA zeigte sich eine klare Abhängigkeit der Kettenlänge und der Ladung vom Effekt. **M-4F-Pt-HA-DMSO** hatte bereits eine 20fach höhere Anreicherung als Cisplatin. In beiden Fällen war der Komplex **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** am reaktivsten. Ein Konfigurationswechsel von meso zu D,L am Beispiel von **4F-Pt-DAH-DMSO** reduzierte die DNA-Bindung. Auch bei der Kernakkumulation waren hohe Werte von **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** zu finden. Am stärksten war allerdings **m-4F-Pt-DAD-Cl** im Kern vertreten. Es war sowohl bei den DMSO- als auch bei den Chlorokomplexen ein Zusammenhang zwischen Aufnahme und Länge der verbrückenden Alkylkette vorhanden.
- Bei der Testung auf Zytotoxizität war an der MCF-7-Zelllinie eine 50%ige Hemmung der Proliferation durch **m-4F-Pt-DAN-Cl** sowie **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO** zu erreichen. An den Lymphomzelllinien (NHL und CML) ließ sich an den CML-Linien nur durch Cisplatin ein Effekt auf Proliferation und Apoptose erreichen. Eine spezifische Aktivität an den NHL-Zellen besaß besonders **m-4F-Pt-DAN-Cl**. Diese war vergleichbar mit Cisplatin.
- Die IC₅₀-Wert-Bestimmung an MCF-7-Brustkrebszellen und humanen Fibroblasten belegte ebenfalls die beste Wirksamkeit des dinuklearen Komplexes **m-4F-Pt-DAN-Cl**. An den Fibroblasten ließ sich eine geringfügig gesteigerte Aktivität gegenüber

MCF-7-Zellen erkennen. Eine Selektivität für Tumorzellen war daher nicht nachweisbar.