

## 4 Untersuchungen zu Platin(II)-Dendrimer-Konjugaten

Dendrimere besitzen Eigenschaften, die sie als hervorragende Trägermoleküle für Zytostatika ausweisen. Zum einen verbessern sie die Wasserlöslichkeit von Tumorthapeutika und damit deren leichtere Anwendbarkeit, und zum anderen sind die längere Zirkulationsdauer im Blutkreislauf und die selektive Tumoranreicherung aufgrund des EPR-Effektes von Bedeutung (s.1.5.1). Dadurch sollen solche Konjugate neuartige Eigenschaften in Bezug auf die Tumorthherapie mit sich bringen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Dendrimere verwendet, die von Frau Sabine Fuchs und Herrn Stephan Müller [254,255] synthetisiert und freundlicherweise für die Umsetzung mit Platin zur Verfügung gestellt wurden. Hierbei handelt es sich um Dendrimere der nullten bzw. der ersten Generation. Aufgrund von endständigen Ethylendiamin- und Malonsäurefunktionalitäten sind sie in der Lage, Metalle zu komplexieren.

Die Ethylendiaminoberflächen wurden im wässrigen analog Darstellung 2.4.1. (Kap.2) mit Kaliumtetraiodo- und Kaliumtetrachloroplatinat belegt. Diese Herstellungsweise wird des Öfteren in der makromolekularen Chemie angewendet, um z.B. square-planare *cis*-dihaloethylendiaminplatin(II)-Komplexe zu erhalten [91,141].

Als Neutralliganden dürfen die Dendrimere die Wirkung des Zytostatikums nicht beeinflussen. Die Halogene fungieren in diesem Fall als Abgangsgruppe.

Als Vergleich zu den Dendrimeren mit terminalen Ethylendiamingruppen wurden Makromoleküle gewählt, deren Oberflächen Dicarbonsäuren zur Koordination mit Platin tragen. Hierbei sollte die Wirkweise des Carboplatin im weiteren Sinne nachgeahmt werden. Nach einer pH-abhängigen Öffnung an der Verknüpfungsstelle wird das freie Platin erhalten, und das Dendrimer dient als Abgangsgruppe.

Es existieren hierzu bereits einige Studien wie z.B. die Kopplung von Cisplatin an PAMAM-Dendrimere, die kontrolliert das aktive Diaquaplatin(II) freisetzen [85,142] oder die Platinanbindung an HPMa-Polymere mit Peptidylseitenketten, die das Platin über thiolabhängige Proteasen in den Lysosomen zur Verfügung stellen [83]. Zusätzlich wurde Platin an HPMa mit terminalen Malonat- und Aspartatgruppen gekoppelt, welche das Platin durch Austausch der COOH-Gruppen durch Pufferliganden zur Wirkung bringen [84]. Ferner wurden solche spezifischen Abspaltungen mit dem gut wirksamen Diaminocyclohexanplatin(II) an Dextranderivaten [143] und anderen Polymeren untersucht [144].

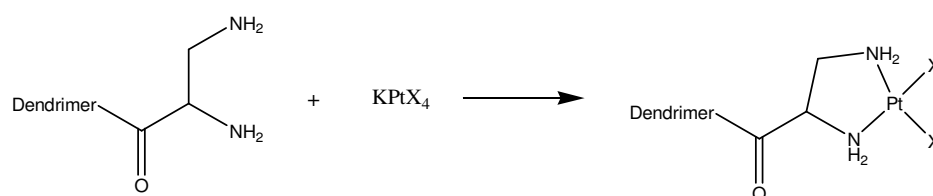
In diesen Beispielen war das Diaquaplatin(II) die aktive Form.

Zur Kopplung der Dicarbonsäuren tragenden Dendrimere diente in unseren Untersuchungen der Aqua[meso-1,2-Bis(4-fluor-phenyl)ethylendiamin]sulfatoplatin(II)-Komplex **m-4F-PtSO<sub>4</sub>**. Zur Trennung von Zytostatikum und Trägermolekül soll es in sauren Zellkompartimenten wie den Lysosomen und Endosomen bei einem pH zwischen 5.5-6.5 kommen. Ein Übertritt des Platinwirkstoffes in den Zellkern kann durch passive Diffusion erfolgen.

Eine kurze Übersicht der Konjugate geben **Tab.4.1** und **4.2** (vgl. auch Kap.2).

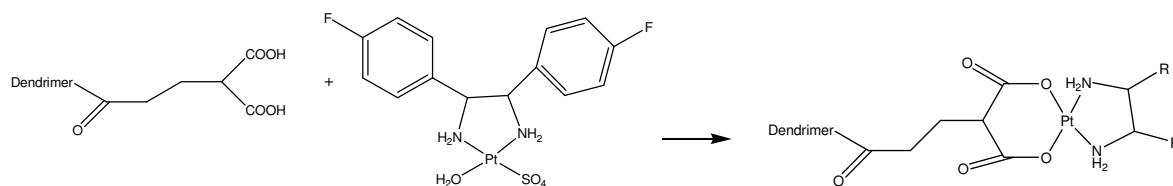
Mit diesen neu synthetisierten Verbindungen wurde die Wirksamkeit an verschiedenen humanen Zelllinien getestet, wofür die MCF-7-Brustkrebszelllinie und weiterhin Fibroblasten und Keratinozyten zur Verfügung standen.

Es wurden Untersuchungen hinsichtlich der Zellaufnahme und DNA-Bindung durchgeführt, auf die hier kurz zusammenfassend eingegangen werden soll.



<u>Dendrimer</u>	<u>Platinatome</u>	<u>X</u>	<u>Verbindung</u>
G <sub>0</sub> (DAP) <sub>3</sub>	2	I	G <sub>0</sub> (DAP-PtI <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (DAP)
G <sub>0</sub> (DAP) <sub>3</sub>	2	Cl	G <sub>0</sub> (DAP-PtCl <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (DAP)
G <sub>1</sub> (DAN) <sub>3</sub> (DAP) <sub>3</sub>	2	I	G <sub>1</sub> (DAN) <sub>3</sub> (DAP-PtI <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (DAP)
G <sub>1</sub> (DAN) <sub>3</sub> (DAP) <sub>3</sub>	2	Cl	G <sub>1</sub> (DAN) <sub>3</sub> (DAP-PtCl <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (DAP)
SM-G <sub>2</sub> (DAP) <sub>3</sub>	3	I	PEG(DAP-PtI <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>
SM-G <sub>2</sub> (DAP) <sub>3</sub>	3	Cl	PEG(DAP-PtCl <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>
SM-G <sub>2</sub> (DAN) <sub>3</sub> (DAP) <sub>3</sub>	3	I	PEG(DAN) <sub>3</sub> (DAP-PtI <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>
SM-G <sub>2</sub> (DAN) <sub>3</sub> (DAP) <sub>3</sub>	3	Cl	PEG(DAN) <sub>3</sub> (DAP-PtCl <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>

**Tab.4.1** Platin(II)-Dendrimer-Konjugate mit Halogen-Abgangsgruppen

**Dendrimer**SM-G<sub>1</sub>-(Mal)<sub>3</sub>SM-G<sub>2</sub>-(DAN)<sub>3</sub>(Mal)<sub>3</sub>**Platinatome**

3

3

**Verbindung**SM-G<sub>1</sub>(Mal-m-4F-Pt)<sub>3</sub>SM-G<sub>2</sub>(DAN)<sub>3</sub>(Mal-m-4F-Pt)<sub>3</sub>**Tab.4.2** Platin(II)-Dendrimer-Konjugate mit Dendrimer als Abgangsgruppe**4.1. Zellaufnahme**

Um das Ausmaß der Zellaufnahme in den MCF-7-Brustkrebszellen zu bestimmen, wurden die Zellen mit 5  $\mu$ M des jeweiligen Platin(II)-Dendrimer-Konjugates inkubiert und der Anreicherungsgrad bestimmt (Durchführung siehe [124]). Es zeigten sich interessante Unterschiede. Die Verbindungen **G<sub>0</sub>(DAP-PtI<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(DAP)** und **G<sub>0</sub>(DAP-PtCl<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(DAP)** wurden verstärkt in die Zelle aufgenommen, wobei die iodierter Verbindung den höheren Anreicherungsgrad aufwies. Die Konjugate, die eine Dansylgruppe als Fluoreszenzmarker tragen, **G<sub>1</sub>(DAN)<sub>3</sub>(DAP-PtI<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(DAP)** und **G<sub>1</sub>(DAN)<sub>3</sub>(DAP-PtCl<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(DAP)**, akkumulierten deutlich langsamer, und das jeweilige Halogen hatte keinen Einfluss auf die Zellaufnahme. Während bei den beiden erstgenannten Verbindungen bereits nach einigen Stunden eine gewisse Sättigung eintrat, war bei den dansylierten Partnern nach 24 Stunden noch immer kein Plateau ersichtlich. Die Einführung der PEG-Gruppen reduzierte abermals die Aufnahme. **PEG(DAP-PtI<sub>2</sub>)<sub>3</sub>** und **PEG(DAP-PtCl<sub>2</sub>)<sub>3</sub>** erreichten nur geringe Anreicherungsgrade (s. **Abb.4.1**).

Bei den Dendrimeren mit malonsäureterminierten Gruppen wurde ein fast linearer Anstieg des Platingehaltes in den MCF-7-Zellen beobachtet. Die Anreicherungsgrade von **SM-G<sub>1</sub>(Mal-m-4F-Pt)<sub>3</sub>** und **SM-G<sub>2</sub>(DAN)<sub>3</sub>(Mal-m-4F-Pt)<sub>3</sub>** waren zwar ähnlich mit denen von **PEG(DAP-Hal<sub>2</sub>)<sub>3</sub>** und **G<sub>1</sub>(DAN)<sub>3</sub>(DAP-PtHal<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(DAP)**, jedoch ließ sich bei letzteren keine vergleichbare Linearität erkennen. Bezogen auf die antiproliferativen Ergebnisse, auf die im Folgenden eingegangen werden soll, scheint bei den Polymeren mit Säurefunktionalitäten

eine schnelle Freisetzung des reaktiven Platin(II)-Komplexes aus den Konjugaten zu erfolgen, welcher sich dann in den Zellen anreichern kann.

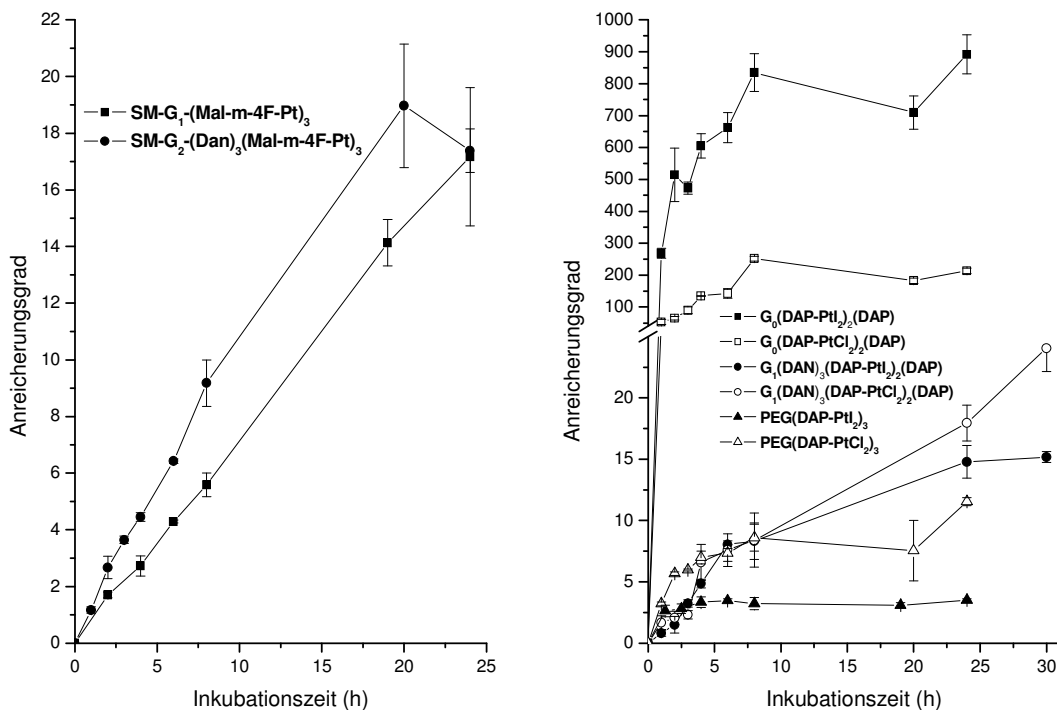


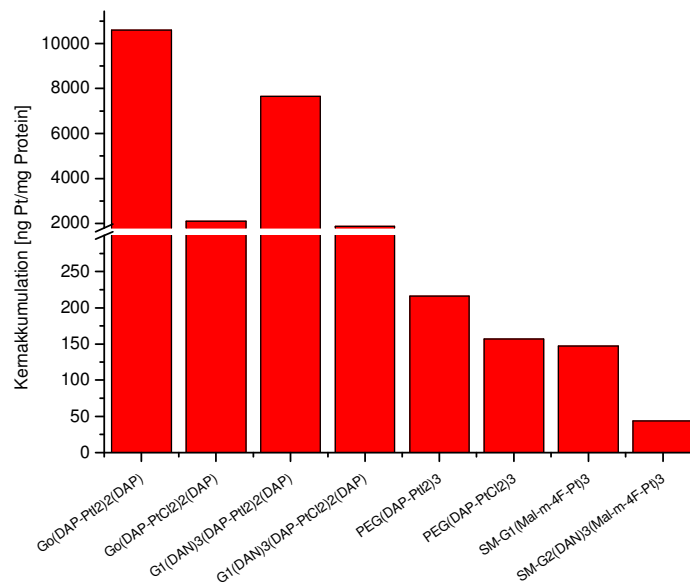
Abb.4.1 Zellanreicherung der Platin(II)-Dendrimer-Konjugate [Quelle: T.Kapp [124]]

## 4.2. Kernakkumulation, DNA- und Proteinbindung

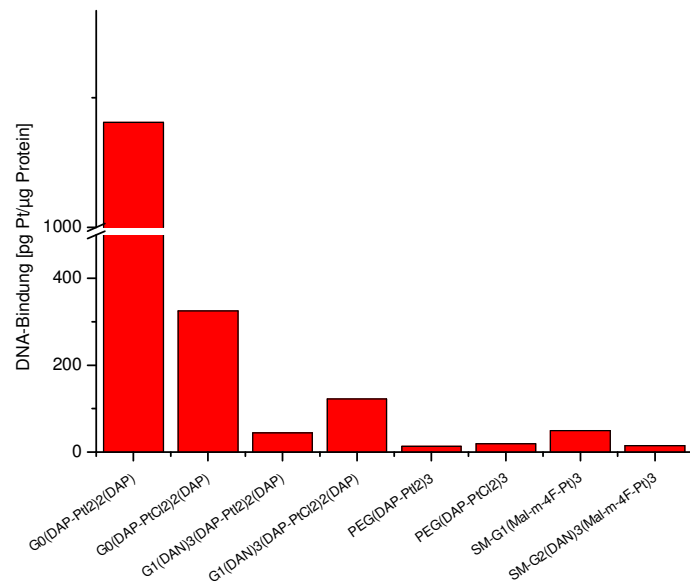
Um eine zytotoxische Wirkung entfalten zu können, müssen die Konjugate nach dem Zelleintritt ebenso in den Kern gelangen, wo dann die spezifische Reaktion mit der DNA stattfinden kann. Bei der Untersuchung der Kernakkumulation wurde festgestellt, dass sich die Dendrimere mit chelatisierenden Ethylendiamineinheiten,  $G_0(\text{DAP-PtHal}_2)_2(\text{DAP})$  und  $G_1(\text{DAN})_3(\text{DAP-PtHal}_2)_2(\text{DAP})$ , stärker als Cisplatin im Kernkompartiment anreicherten. Dabei interagierte der iodidierte Komplex  $G_0(\text{DAP-PtI}_2)_2(\text{DAP})$  am stärksten mit der DNA, was mit den Ergebnissen der Zellaufnahmestudien in Abschnitt 4.1. korreliert.

Die pegylierten Konjugate besaßen ebenfalls eine erhöhte Kernakkumulation, zeigten jedoch nur eine geringe DNA-Bindung. Einzig die Verbindung  $\text{SM-G}_1(\text{Mal-m-4F-Pt})_3$  dieser Gruppe wies eine höhere Interaktion auf.

Die Abbildungen 4.2 und 4.3 veranschaulichen diese Effekte.



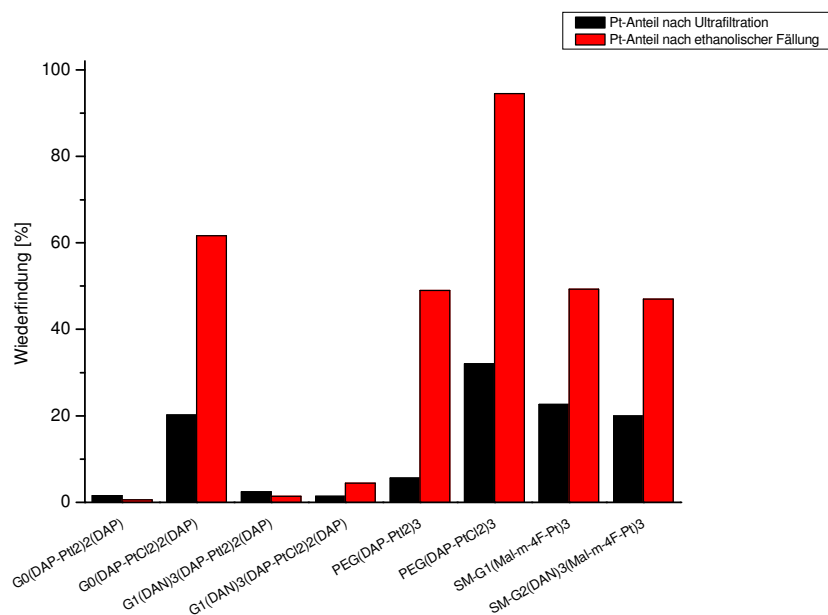
**Abb.4.2** Kernakkumulation der Platin(II)-Dendrimer-Konjugate in MCF-7-Zellen [Quelle: T.Kapp [124]]



**Abb.4.3** DNA-Bindung der Platin(II)-Dendrimer-Konjugate in MCF-7-Zellen [Quelle: T.Kapp [124]]

Da die Proteinbindung eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung von Platin(II)-Verbindungen spielt und oben genannte Untersuchungen in FCS-freiem Medium durchgeführt wurden, stellte sich die Frage, inwiefern die Bindung an Serumalbumine die Verfügbarkeit der Konjugate reduziert. Dazu wurde die Wiederfindung im Ultrafiltrat und die ethanolische

Präzipitation genutzt, die zwischen freier und reversibel gebundener Komponente unterscheidet (s. **Abb.4.4**).



**Abb.4.4** Proteinbindungscharakteristika der Platin(II)-Dendrimer-Konjugate [Quelle: T.Kapp [124]]

Alle synthetisierten Verbindungen zeigten starke Wechselwirkung mit Humanem Serumalbumin (HSA). Lediglich die Komplexe **G<sub>0</sub>(DAP-PtCl<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(DAP)**, **PEG(DAP-PtCl<sub>2</sub>)<sub>3</sub>** sowie **SM-G<sub>1</sub>(Mal-m-4F-Pt)<sub>3</sub>** und **SM-G<sub>2</sub>(DAN)<sub>3</sub>(Mal-m-4F-Pt)<sub>3</sub>** wiesen einen höheren Platingehalte nach Ultrafiltration und ethanolischer Präzipitation auf. Hierbei fällt die tendenziell höhere Wiederfindung für die PEG-Gruppen-tragenden Dendrimere auf. Besonders die Platingehalte nach ethanolischer Präzipitation zeigten deutliche Unterschiede zwischen der Stärke der Interaktion der jeweiligen Verbindungen.

Interessanterweise wiesen die Malonsäureterminierten Dendrimere eine geringere Stabilität gegenüber Proteinen auf. Diese Konjugate binden die aktive Platinverbindung vergleichbar mit Carboplatin über eine Dicarbonsäure. Daher sollte vergleichbar dazu eine Interaktion mit Proteinen geringer als für Cisplatin sein. Die Entkopplung der Trägermoleküle von **SM-G<sub>1</sub>(Mal-m-4F-Pt)<sub>3</sub>** und **SM-G<sub>2</sub>(DAN)<sub>3</sub>(Mal-m-4F-Pt)<sub>3</sub>** vom gebundenen Platin war im Gegensatz zu **G<sub>1</sub>(DAN)<sub>3</sub>(DAP-PtHal<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(DAP)** kontinuierlich.

Diese Wechselwirkungen scheinen für die Untersuchung der antiproliferativen Wirksamkeit wichtig zu sein. Eine starke Bindung an Serumalbumin kann für Wirkstoffe durchaus von Vorteil sein, wenn sie reversibel ist. Durch eine hohe Bindung an HSA wird die renale Ausscheidung erniedrigt, und die Verfügbarkeit der Konjugate bzw. die tumorale

Anreicherung kann verlängert werden. Für die Verbindungen  $G_0(\text{DAP-PtI}_2)_2(\text{DAP})$  und  $G_1(\text{DAN})_3(\text{DAP-PtHal}_2)_2(\text{DAP})$  wurde ein sehr niedriger Platinanteil und somit eine hohe Proteinbindung gefunden, so dass eine Freisetzung aus HSA eher unwahrscheinlich erscheint.

### 4.3. Zytotoxizität

Die Platin(II)-Dendrimer-Konjugate wurden in ihrer Wirkung auf das Zellwachstum an der hormonabhängigen Brustkrebszelllinie MCF-7 untersucht. Die Verbindungen  $G_0(\text{DAP-PtHal}_2)_2(\text{DAP})$  und  $G_1(\text{DAN})_3(\text{DAP-PtHal}_2)_2(\text{DAP})$  wurden in den Konzentrationen 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt und die besser wasserlöslichen pegylierten Konjugate in 2.5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$ .

Bei den ethyldiaminterminierten Dendrimeren, die mit Iodid als Abgangsgruppe belegt waren, ließ sich kein antiproliferativer Effekt beobachten. Mit den chlorierten Verbindungen  $G_0(\text{DAP-PtCl}_2)_2(\text{DAP})$  und  $\text{PEG}(\text{DAP-PtCl}_2)_3$  wurde dagegen das Zellwachstum bereits nach 72 Stunden auf die Hälfte reduziert, was die in Abbildung 4.5 dargestellten Zeit-Wirkungskurven belegen. Bei längerer Inkubationsdauer war eine leichte Erholung der Zellen zu erkennen. Diese Konjugate scheinen noch eine geeignete Größe zu besitzen, um durch Membranpassage an den Wirkort zu gelangen.

Die Unwirksamkeit der Diiodoverbindungen überrascht weniger, da aus früheren Arbeiten bekannt ist, dass bei Ersatz der Abgangsgruppe Chlorid durch Iodid eine starke Abnahme der Aktivität zu beobachten ist (vgl. auch Kap.7).

Auch machte die Einführung einer Dansylgruppe zur Fluoreszenzmarkierung leider keinen Effekt aus. Außerdem ist hier keine Bevorzugung der chlorierten Verbindung zu erkennen, was Abb.4.6 an den Beispielen  $G_1(\text{DAN})_3(\text{DAP-PtI}_2)_2(\text{DAP})$  sowie  $G_1(\text{DAN})_3(\text{DAP-PtCl}_2)_2(\text{DAP})$  verdeutlicht. Eventuell spielt hier die Molekülgröße eine Rolle.

Ein gravierender Unterschied war bei den pegylierten Dendrimeren der ersten Generation zu beobachten. So besaß  $\text{PEG}(\text{DAP-PtCl}_2)_3$  gegenüber dem iodierten Komplex einen deutlich stärkeren antiproliferativen Effekt (Abb.4.7).

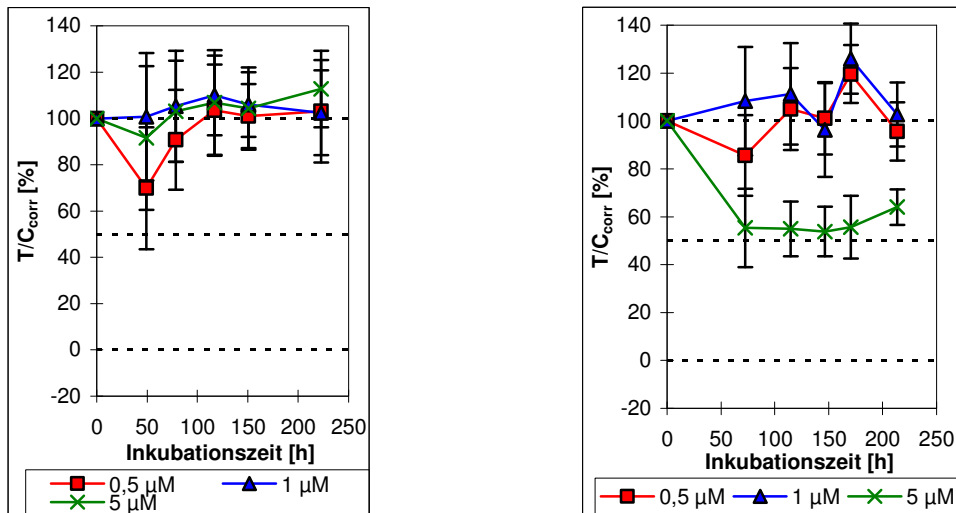


Abb.4.5 Vergleich der Antitumoraktivität von  $G_0(\text{DAP-PtI}_2)_2(\text{DAP})$  (links) und  $G_0(\text{DAP-PtCl}_2)_2(\text{DAP})$  (rechts)

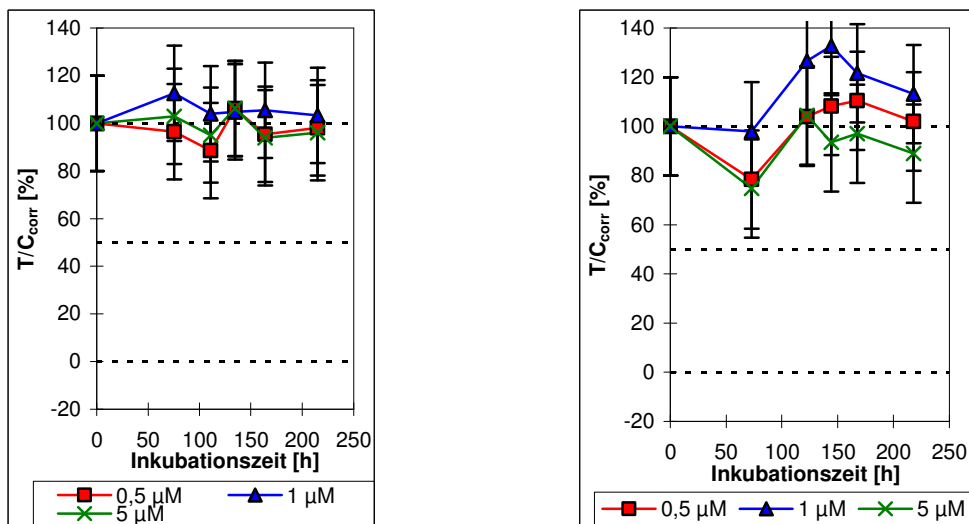


Abb.4.6 Vergleich der Antitumoraktivität von  $G_1(\text{DAN})_3(\text{DAP-PtI}_2)_2(\text{DAP})$  (links) und  $G_1(\text{DAN})_3(\text{DAP-PtCl}_2)_2(\text{DAP})$  (rechts)

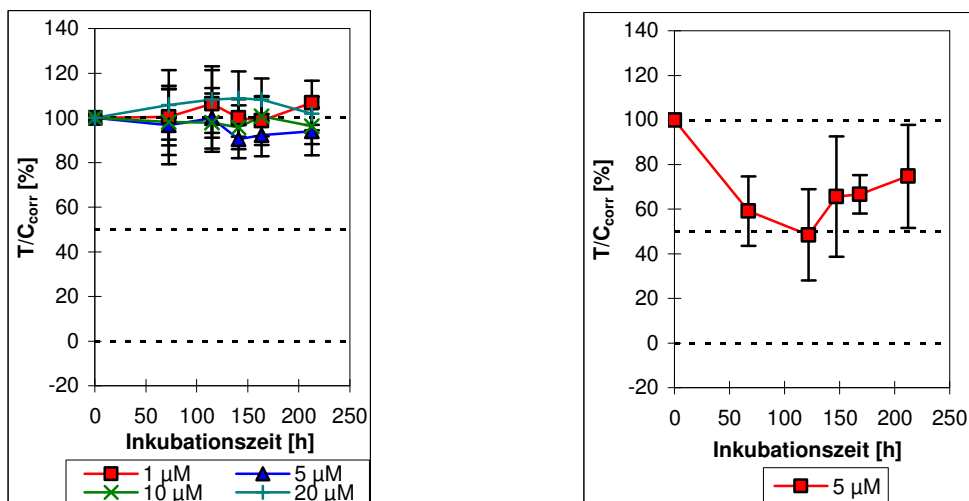
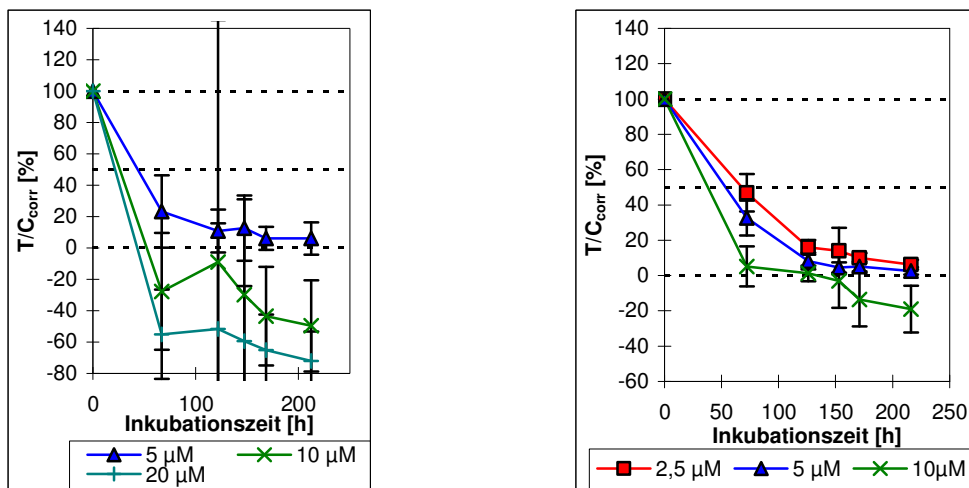


Abb.4.7 Vergleich der Antitumoraktivität von  $\text{PEG}(\text{DAP-PtI}_2)_3$  (links) und  $\text{PEG}(\text{DAP-PtCl}_2)_3$  (rechts)

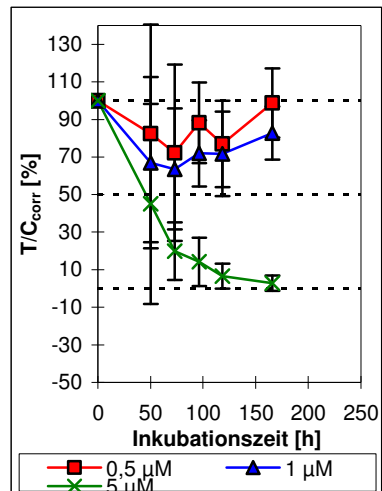


Bei den Verbindungen  $\text{SM-G}_1(\text{Mal-m-4F-Pt})_3$  und  $\text{SM-G}_2(\text{DAN})_3(\text{Mal-m-4F-Pt})_3$ , welche an allen drei terminalen Carbonsäureeinheiten mit Platin koordiniert sind, scheint eine Freisetzung von reaktivem Diaquaplatin(II),  $\text{m-4F-Pt}(\text{H}_2\text{O})_2$ , zu erfolgen. Es wurde eine starke Hemmwirkung auf das Zellwachstum beobachtet, die bereits bei Zugabe von  $5\mu\text{M}$  Substanz einen mit Cisplatin vergleichbaren antiproliferativen Effekt hervorrief. Höhere Konzentrationen führten sogar zu zytozider Wirkung. Für  $\text{SM-G}_1(\text{Mal-m-4F-Pt})_3$  gelang dies in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  bereits nach 72 Stunden, während für das dansylierte Konjugat eine Inkubationszeit von mindestens 150 Stunden erforderlich war. Eine Erholung der MCF-7-Zellen konnte nicht festgestellt werden.



**Abb.4.8** Antiproliferativer Effekt von  $\text{SM-G}_1(\text{Mal-m-4F-Pt})_3$  (links) und  $\text{SM-G}_2(\text{DAN})_3(\text{Mal-m-4F-Pt})_3$  (rechts)

An der hormonunabhängigen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 konnte letztendlich ebenfalls ein antiproliferativer Effekt von  $\text{SM-G}_1(\text{Mal-m-4F-Pt})_3$  nachgewiesen werden, was das Beispiel in **Abb.4.9** darstellt. Bei einer Konzentration von  $5\mu\text{M}$  war die Wirkung mit der an der MCF-7-Zelllinie beobachteten vergleichbar.



**Abb.4.9** Antiproliferativer Effekt von SM-G<sub>1</sub>(Mal-m-4F-Pt)<sub>3</sub> an MDA-MB-231-Zellen.

Die Untersuchungen an Keratinozyten sowie Fibroblasten im MTT-Test werden ausführlich in Kap.7 diskutiert und dort mit verschiedenen Platin(II)-Verbindungen verglichen.

#### 4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen an Platin(II)-Dendrimer-Konjugaten

- Es wurden Dendrimere mit Halogeniden als Abgangsgruppen und solche mit Dicarbonsäuren als Oberflächenfunktionalitäten zur Koordination mit Platin synthetisiert und deren biologische Aktivität untersucht.
- Bei der Zellaufnahme wurde eine verstärkte Anreicherung der Dendrimere **G<sub>0</sub>(DAP-PtHal<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(DAP)** beobachtet, wobei das iodierte Konjugat den höchsten Anreicherungsgrad erreichte. Pegylierung sowie Dansylierung reduzierte die Zellaufnahme. Die malonsäureterminierten Komplexe **SM-G<sub>1</sub>(Mal-m-4F-Pt)<sub>3</sub>** sowie **SM-G<sub>2</sub>(DAN)<sub>3</sub>(Mal-m-4F-Pt)<sub>3</sub>** zeigten einen linearen Anstieg des Platingehaltes in MCF-7-Brustkrebszellen.
- Konjugate mit chelatisierenden Ethylendiamineinheiten wie **G<sub>0</sub>(DAP-PtHal<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(DAP)** und deren dansylierte Verbindungen besaßen höhere Kernakkumulation als Cisplatin, wobei Iodid als Abgangsgruppe ebenfalls wieder am effektivsten war. Alle Konjugate interagierten stark mit Humanem Serumalbumin (HSA), wobei die pegylierten Substanzen einen geringeren Einfluss auf die Proteinbindung hatten.
- Bei der Testung auf Zytotoxizität zeigte Chlorid als Austrittsgruppe einen Vorteil gegenüber Iodid, was bei den Konjugaten **G<sub>0</sub>(DAP-PtCl<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(DAP)** und **PEG(DAP-PtCl<sub>2</sub>)<sub>3</sub>** deutlich wurde. Dansylgruppen hatten keinen Einfluss auf das Zellwachstum. Die malonsäureterminierten Dendrimere waren dagegen stark zytotoxisch, was eventuell durch Freisetzung von reaktivem **m-4F-Pt(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>** bewirkt wurde. Bei einer Konzentration von 5µM zeigten diese Substanzen eine mit Cisplatin vergleichbare Wirkung. Bei Zugabe von 10 und 20µM ließen sich sogar starke zytozide Effekte beobachten.