

7 Testung an humanen Zelllinien

Die synthetisierten Verbindungen wurden mit verschiedenen Testsystemen auf ihre pharmakologische Wirkung hin untersucht. Für diese *in vitro*-Tests wurde neben dem, in der Arbeitsgruppe Gust etablierten, zeitabhängigen Chemosensitivitätstest die Zytotoxizität mithilfe der IC_{50} -Wertbestimmung sowie des MTT-Tests ermittelt.

Als humane Zelllinien dienten hierbei zwei verschiedene Mammakarzinomzelllinien: die estrogenabhängige MCF-7- und die hormonunabhängige MDA-MB-231-Zelllinie. Die [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Komplexe wurden zusätzlich an den androgenpositiven, metastasierenden LNCaP/FGC-Prostatakarzinomzellen getestet. Für einige Verbindungen wurde außerdem die Wirksamkeit an primären, humanen Fibroblasten und Keratinozyten untersucht.

Eine Zusammenstellung der Zeit-Wirkungs-Kurven der Chemosensitivitätstests sowie der Viabilitätsdaten der untersuchten Verbindungen findet sich im Anhang (Kap.10).

7.1. Allgemeine Grundlagen

Um das Ausmaß einer Hemmung des Tumorzellwachstums nach Zugabe einer Substanz feststellen zu können, wird die Bestimmung der Zellmasse in Monolayerkulturen durchgeführt. Hierzu eignen sich kolorimetrische, computergestützte Verfahren, die seit den 80er Jahren ausführlich beschrieben sind [195]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dafür der MTT-Test sowie der Kristallviolettassay verwendet.

7.1.1. MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Wachstumsassay, der bereits 1983 erwähnt wurde [196,197], und im Rahmen dieser Arbeit für Untersuchungen an Keratinozyten und Fibroblasten zur Anwendung kam. Basierend auf der Messung der metabolischen Aktivität lebender Zellen sollte der Einfluss der Testverbindungen auf die Viabilität der Zellen ermittelt werden [198,199]. Hierbei erfolgt in den Mitochondrien eine Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen zu reduziertem Formazan, welches violette Kristalle ausbildet (**Abb.7.1**). Die Menge an gebildetem Formazan wird über die optische Dichte bei

540 nm bestimmt und korreliert mit der Gesamtaktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen und daraus abgeleitet der Biomasse der überlebenden Zellen.

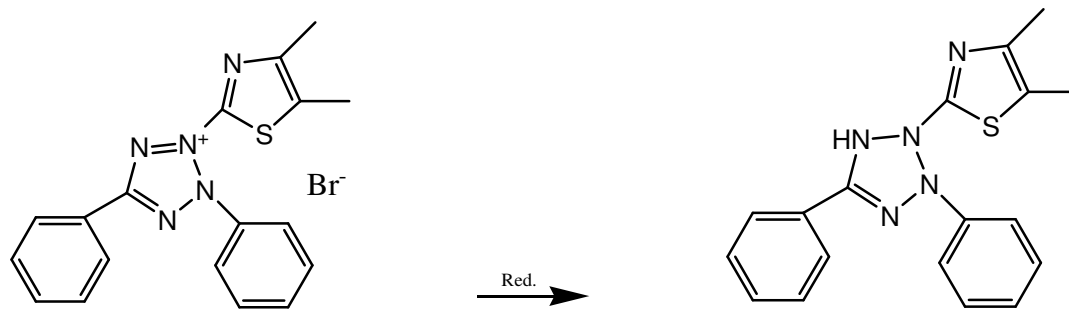


Abb. 7.1 Reduzierung des gelben MTT zu violetterm Formazan

7.1.2. Kristallviolettassay

Wie der MTT-Test ist auch der Kristallviolettassay ein computergestütztes, kolorimetrisches Verfahren, das die veränderte Zellmasse nach Zugabe einer jeweiligen Substanz erfasst.

Gemessen wird die optische Dichte bei 590 nm bzw. das chromatingebundene Kristallviolett, das sich mit 70% igem Ethanol extrahieren lässt.

Bereits 1986 wurde die Zellzahl in Monolayerkulturen durch Dichtemessung bestimmt [195]. Das Verfahren wurde später modifiziert [202], um solche Zellproliferationskinetiken auch in Mikrotiterplatten anwenden zu können. Die Vorgehensweise ist bei den einzelnen Zelllinien weitgehend gleich und soll hier kurz erläutert werden.

Um eine Aussage zur Antitumoraktivität treffen zu können, wird die Änderung der Zellmasse nach Substanzzugabe in Bezug auf die Ausgangszellmasse ermittelt bzw. die totale Farbstoffbindung der Zellen bestimmt, welche direkt proportional zur Tumormasse ist.

Wichtig ist die Aussaatdichte, die für jede Zelllinie genau festgelegt ist (vgl.Kap.9). Die Zellen werden in definierter Dichte in 96-Loch-Platten ausgesät und 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach dieser so genannten Anwachszeit werden die zu untersuchenden Verbindungen, Cisplatin als Positivkontrolle sowie reines Lösungsmittel (DMF, DMSO oder Wasser) zugegeben und weiter inkubiert. Zu fünf verschiedenen Zeitpunkten werden die Mikrotiterplatten mit Glutardialdehyd abgestoppt. Zur Bestimmung der Ausgangszellmasse wird eine t₀-Platte bereits bei der Substanzzugabe fixiert.

Zur Auswertung werden die Mikrotiterplatten einheitlich mit Kristallviolett gefärbt. Dieser Farbstoff färbt vor allem Nukleoproteine an. Überschüssiges Kristallviolett wird durch Waschen mit Wasser entfernt. Der an den Zellen haftende Farbstoff wird durch Ethanol 70%

gelöst und photometrisch vermessen. Daraus kann nun die zytotoxische Wirkung als relative prozentuale Wachstumshemmung T/C_{corr} der Substanzen berechnet werden:

$$T/C_{\text{corr}} = [(T^* - C_0) / (C^* - C_0)] \cdot 100 [\%] \quad (\text{Gl. 7.1})$$

T^* : Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der behandelten Kulturen

C^* : Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der Kontrollkulturen (reines Lösungsmittel)

C_0 : Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der Kulturen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe

Wirkt eine Substanz allerdings zytozid, ist der Wert der behandelten Zellkulturen geringer als der Ausgangswert, d.h. $T^* < C_0$ und eine andere Gleichung gilt:

$$\tau = [(T^* - C_0) / (C_0)] \cdot 100 [\%] \quad (\text{Gl. 7.2})$$

T^* : Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der behandelten Kulturen

C_0 : Mittelwert der optischen Dichte der Kristallviolettlösung der Kulturen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe

Je nach Zelllinie werden die Ergebnisse von Schwankungen begleitet, die am größten für die LNCaP/FGC-Linie sind. Bedeutend weniger anfällig sind die MCF-7- und die MDA-MB-231-Zelllinien.

Eine grobe Einteilung für die Antitumoraktivität geben folgende Werte:

$T/C_{\text{corr}} > 80\%$ keine antiproliferative Wirkung

$T/C_{\text{corr}} < 80\%$ antiproliferative Wirkung

T/C_{corr} ca. 0-20% zytostatisch

T/C_{corr} bzw. $\tau < 0\%$ zytozid

7.1.3. Zytotoxizitätsbestimmung mittels IC_{50} -Wertbestimmung

Der IC_{50} -Wert (engl.: *inhibitory concentration*) entspricht derjenigen Wirkstoffkonzentration, bei der eine Hemmung des Zellwachstums um 50% hervorgerufen wird. Neben dem Chemosensitivitätstest wird auch hierbei die Wirksamkeit der zu untersuchenden Substanzen quantifiziert. Die Zellen werden in Mikrotiterplatten mit 0.1 bis 50 μM Substanz versetzt und im Brutschrank bei 37°C je nach Verbindung eine bestimmte Zeit inkubiert. Anschließend

wird nach Entfernen des Mediums die Zellmasse durch Färbung mit Kristallviolett bestimmt und bei 590 nm im Mikroplattenreader vermessen.

Zur Berechnung der IC_{50} -Werte werden zuerst die Absorptionsmittelwerte aus den jeweiligen Wells ermittelt. Die T/C_{corr} -Werte erhält man nach folgender Gleichung:

$$T/C_{corr} [\%] = (S-I) \cdot 100 / (B-I) \quad (\text{Gl. 7.3})$$

S= Absorptionsmittelwert der Substanz in der jeweiligen Konzentration

I= Absorptionsmittelwert der Ausgangszellmenge (t_0)

B= Absorptionsmittelwert des Blindwertes

Das prozentuale Verhältnis zum Kontrollwert bzw. die erhaltenen T/C_{corr} -Werte wird gegen den Logarithmus der Substanzkonzentration in einem Diagramm aufgetragen und eine sigmoide Kurve mit Hilfe der Boltzmann-Funktion ermittelt (Software: Origin 7.0). Die Konzentration, die das Zellwachstum auf 50% des Kontrollwertes herabsetzt, wird an dieser Kurve abgelesen (**Abb.7.2**). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte von 2-3 unabhängigen Messungen angegeben.

Eine ausführliche Versuchsdurchführung findet sich im Experimentellen Teil (Kap.9)

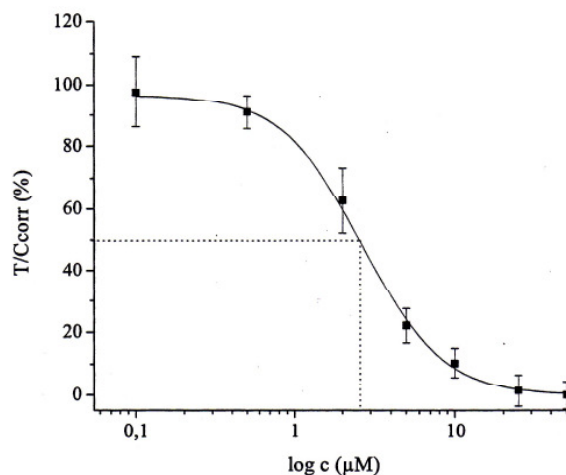


Abb.7.2 Sigmoide Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungskurve und IC_{50} -Wertbestimmung

7.2. Die humane, hormonsensitive Mammakarzinomzelllinie MCF-7

Die menschliche, hormonsensitive MCF-7-Zelllinie (=Michigan Cancer Foundation) wurde 1970 aus einem malignen Pleuraerguß einer postmenopausalen Patientin gewonnen, die an einem metastasierten, duktalem Mammakarzinom erkrankt war [200]. MCF-7-Zellen sind gut charakterisiert, besitzen einen hohen Differenzierungsgrad und haben unter anderem Rezeptoren für Estrogene, Androgene und Progesteron [201].

Die Antitumoraktivität der zu untersuchenden Platin(II)-Komplexe wurde in Konzentrationen von 0.5µM, 1.0µM und 5.0µM im Chemosensitivitätstest *in vitro* über einen Inkubationszeitraum von 220 Stunden getestet. Um die Proliferationshemmung vergleichen zu können, wurde in jeder Versuchsreihe Cisplatin als Referenzsubstanz mitgeführt. Bei der Bestimmung des IC₅₀-Wertes betrug die Inkubationszeit nach Zugabe der jeweiligen Verbindung zu den Zellen zwischen 96 und 120 Stunden. Es erfolgte nur ein Abstopzeitpunkt.

7.2.1. Chemosensitivitätstestung

Cisplatin als Positivkontrolle zeigt im eingesetzten Konzentrationsbereich eine klare Konzentrations-Wirkungsabhängigkeit. In den Konzentrationen 0.5µM und 1.0µM sind deutlich wachstumshemmende, also zytotoxische Effekte zu beobachten (s. T/C_{corr}-Werte), während bei der Zugabe von 5.0µM zu den Zellen eine annähernd zytozide Wirkung eintritt.

7.2.1.1. Testergebnisse der [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe

Die Ergebnisse der Testung sind in **Abb.7.3** und **7.4** dargestellt. Als Vergleichssubstanzen zur Untersuchung an den symmetrischen Platin(II)-Komplexen wurden neben Cisplatin **m-** und **D,L-4F-PtCl₂** sowie Carboplatin als Verbindung mit chelatgebundener Dicarbonsäure als Abgangsgruppe eingesetzt.

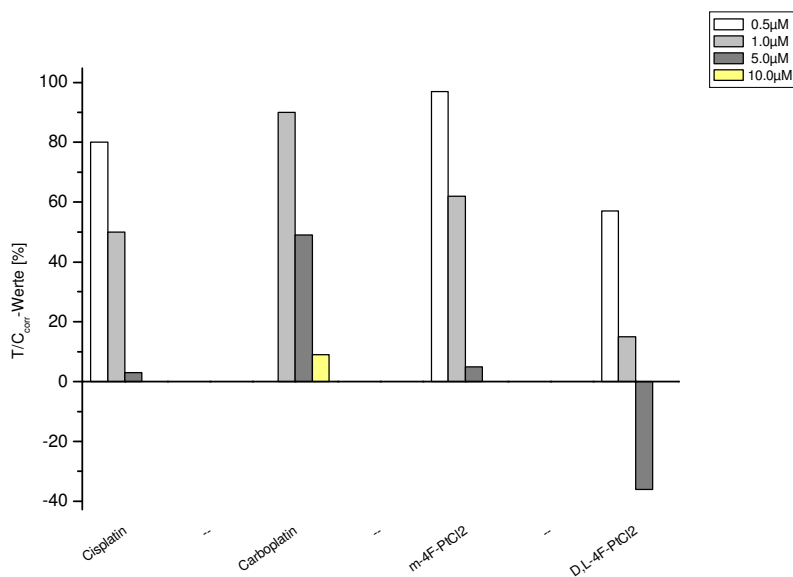


Abb.7.3 Darstellung der Antitumoraktivität der Vergleichssubstanzen Cisplatin, Carboplatin, **m-** und **D,L-4F-PtCl₂** an MCF-7-Zellen

Substanz	0.5 μM	1.0 μM	5.0 μM	10.0 μM
Cisplatin	80 (72h)	50 (166h)	3 (237h)	
Carboplatin		90 (145h)	49 (145h)	9 (238h)
m-4F-PtCl ₂	97 (117h)	62 (117h)	5 (261h)	
D,L-4F-PtCl ₂	57 (165h)	15 (144h)	-36 (261h)	

Tab.7.1 Minimale T/C_{con}-Werte [%] nach jeweiliger Inkubationszeit von Cisplatin, Carboplatin, **m-** und **D,L-4F-PtCl₂**

Die meso-konfigurierte Verbindung **m-4F-PtCl₂** ist deutlich weniger aktiv als sein racemisches Isomer. Die starke Wirksamkeit von **D,L-4F-PtCl₂** wurde bereits in früheren Studien untersucht [44]. Bei 0.5 μM Substanzzugabe erreichte es im Gegensatz zu Cisplatin bereits deutlich antiproliferative Wirkung..

Carboplatin ist in einer Konzentration von 1.0 μM unwirksam; erst ab 5.0 μM sind zytotoxische Effekte zu beobachten. Die geringere Aktivität lässt sich auf die verminderte Reaktivität, bedingt durch die reaktionsträgere Abgangsgruppe CBDC gegenüber Chlorid von Cisplatin zurückführen (vgl. Kap.2 und 6).

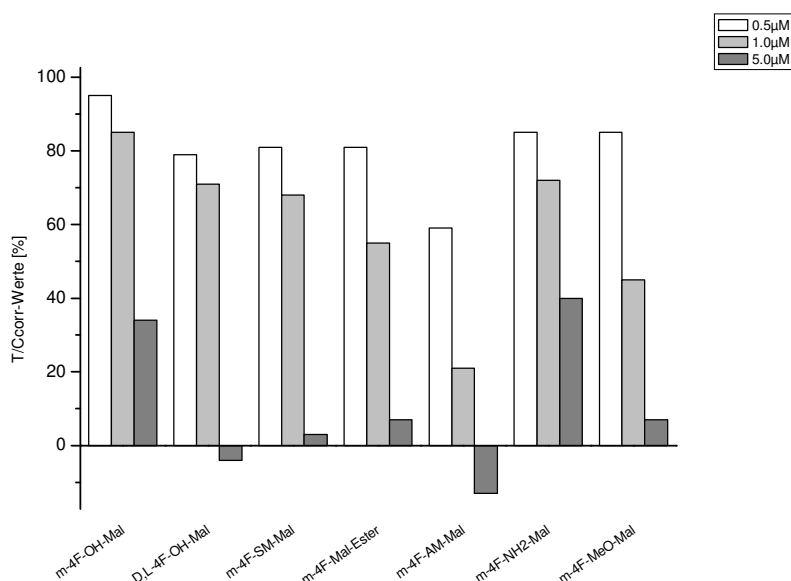


Abb.7.4 Aktivität verschiedener Malonsäurederivate als Abgangsgruppen an MCF-7-Zellen

Substanz	0.5 μM	1.0 μM	5.0 μM
m-4F-OH-Mal	95 (143h)	85 (143h)	34 (226h)
D,L-4F-OH-Mal	79 (72h)	71 (72h)	-4 (144h)
m-4F-SM-Mal	81 (118h)	68 (143h)	3 (170h)
m-4F-Mal-Ester	81 (72h)	55 (72h)	7 (144h)
m-4F-AM -Mal	59 (144h)	21 (123h)	-13 (144h)
m-4F-NH ₂ -Mal	85 (217h)	72 (120h)	40 (143h)
m-4F-MeO-Mal	85 (138h)	45 (218h)	7 (218h)

Tab.7.2 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] nach jeweiliger Inkubationszeit verschiedener Malonsäurederivate als Abgangsgruppen

Die Einführung eines Malonatrestes in das [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II) wies in Studien in der meso-Konfiguration des Neutralliganden nur geringe Effekte auf. Als D,L-konfigurierte Verbindung hemmte es mit 5.0 μM das Zellwachstum beinahe vollständig ($T/C_{\text{corr}} = 1\%$) [46]. Allerdings war die Wirkung noch geringer als die von **D,L-4F-PtCl₂**. Durch Einführung der Hydroxymalonsäure anstelle des Malonatrestes in den Komplex ließ sich die Reaktivität zwar geringfügig erhöhen, allerdings sank die Wirkung an den MCF-7-Zellen. Die zytotoxischen Effekte verstärkten sich, sobald statt des meso- der D,L-konfigurierte Komplex verwendet wurde. Der Austausch durch Aminomalonsäure brachte mit **m-4F-NH₂-Mal** keine Wirksteigerung mit sich.

In einer Konzentration von $0.5\mu\text{M}$ ließ sich ebenso bei keinem der weiteren untersuchten Malonsäurederivate als Abgangsgruppe ein Einfluss auf das Zellwachstum feststellen. Bei einer Substanzkonzentration von $1.0\mu\text{M}$ war die Aktivität im Vergleich zu Carboplatin in allen Fällen erhöht, wobei die stärkste Proliferationshemmung von **m-4F-Mal-Ester**, **m-4F-MeO-Mal** und besonders von **m-4F-AM-Mal** ausging. **M-4F-AM-Mal** wirkte in $1.0\mu\text{M}$ bereits bei $T/C_{\text{corr}} = 21\%$ nach 123 Stunden Einwirkzeit zytostatisch. Der Acetamidomalonsäurerest bewirkte außerdem die höchste Hemmwirkung bei Zugabe von $5.0\mu\text{M}$ mit $T/C_{\text{corr}} = -13\%$ (144h), gefolgt von **D,L-4F-OH-Mal** mit $T/C_{\text{corr}} = -4\%$ (144h).

Die Einführung sowohl einer lipophileren Gruppe als auch einer längeren Kette am Malonsäurerest schien ebenfalls von Vorteil zu sein, da neben der Amidbildung, Veresterung sowie Veretherung der OH-Gruppe der Malonsäure zu **m-4F-MeO-Mal** auch mit **m-4F-SM-Mal** eine Wirkungssteigerung hervorgerufen wurde. Diese Daten lassen sich gut mit den Reaktivitätsuntersuchungen in Einklang bringen (s. Kap.6). Dort zeigten sich **m-4F-Mal-Ester** und **m-4F-MeO-Mal** der reaktionsträgeren **m-4F-OH-Mal** hinsichtlich der Umsetzung mit einem Nukleophil überlegen.

7.2.1.2. Testergebnisse der enantiomerenreinen [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Komplexe

Wie bereits in Kapitel 1 einleitend dargestellt, sollte durch Austausch eines aromatischen Restes am C2 des symmetrischen Platin(II)-Komplexes **4F-PtCl₂** durch eine Alkylkette eine Optimierung der Antitumorwirkung erfolgen.

Bei diesen am C2 des Neutralliganden alkylierten Verbindungen wurde die Proliferationshemmung in Abhängigkeit von der jeweiligen Konfiguration untersucht. Der Einfluss der Art der Alkylgruppe sowie der Phenylringsubstitution war außerdem ein wichtiger Aspekt.

Im Folgenden werden nur noch die jeweiligen Dichloroverbindungen berücksichtigt, da sie sich gegenüber ihren Partnern mit Iodid und Sulfat als Abgangsgruppe als die wirkungsvollsten Komponenten herausstellten (**Abb.7.3**).

Am Beispiel von **RR-** und **SS-F-Ph/iProp-I₂** ließ sich eine Antitumoraktivität erkennen, die der von Cisplatin nahe kommt. In einer Konzentration von $5.0\mu\text{M}$ war der antiproliferative Einfluss allerdings stärker und bewegte sich bereits im zytoziden Bereich. Ging man nun vom Diiodo- zum Sulfatoplatin(II)-Komplex über, zeigte sich eine wesentliche Wirksteigerung, welche bereits bei $0.5\mu\text{M}$ Zugabe einen zytostatischen Effekt beobachten ließ. Die Einführung zweier Chloride führte letztendlich bereits bei $1.0\mu\text{M}$ zu T/C_{corr} -Werten von -27% und -7% (**RR-** und **SS-4F-Ph/iProp-Cl₂**).

Chlorid gilt nach Cleare als optimale Abgangsgruppe [162].

In einer Konzentration von $5.0\mu\text{M}$ waren **RR-4F-Ph/iProp-SO₄** und **RR-4F-Ph/iProp-Cl₂** zwar annähernd vergleichbar aktiv, bei $1.0\mu\text{M}$ rief jedoch die Dichloroverbindung bereits zytozide Effekte hervor. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass der Aquasulfatoplatin(II)-Komplex im FCS-haltigen Medium durch enthaltenes NaCl zu einem großen Teil schnell in den korrespondierenden Chlorokomplex umgewandelt wurde und daraus abgeleitet dann nahezu identische Effekte beobachtet werden konnten.

Abschließend ist anzumerken, dass zwischen den jeweiligen Enantiomerenpaaren keine allzu deutlichen Unterschiede auf das Zellwachstum der MCF-7-Zellen erkennbar waren.

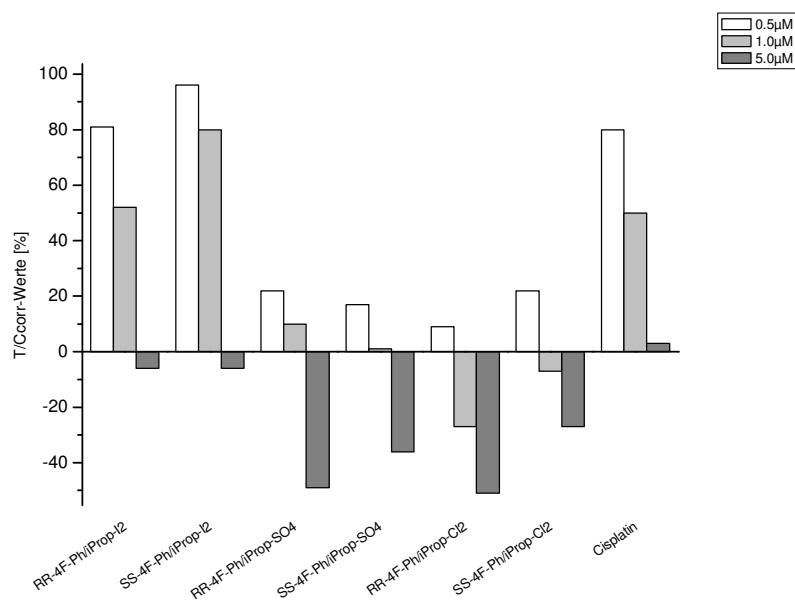


Abb.7.5 Der Einfluss der Abgangsgruppen auf das Zellwachstum von MCF-7-Zellen am Beispiel von [1-(4-Fluorphenyl)-2-isopropylethylendiamin]platin(II)-Komplexen

Substanz	0.5μM	1.0μM	5.0μM
RR-4F-Ph/iProp-I ₂	81 (67h)	52 (67)	-6 (139)
SS-4F-Ph/iProp-I ₂	96 (139h)	80 (139h)	-6 (67h)
RR-4F-Ph/iProp-SO ₄	22 (120h)	10 (164h)	-4 (212h)
SS-4F-Ph/iProp-SO ₄	17 (110h)	1 (163h)	-36 (214h)
RR-4F-Ph/iProp-Cl ₂	9 (72h)	-27 (161h)	-51 (215h)
SS-4F-Ph/iProp-Cl ₂	22 (72h)	-7 (134h)	-27 (161h)

Substanz	0.5µM	1.0µM	5.0µM
Cisplatin	80 (72h)	50 (166h)	3 (237h)

Tab.7.3 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] nach jeweiliger Inkubationszeit [h] von [1-(4-Fluorphenyl)-2-isopropyl-ethylendiamin]platin(II)-Komplexen

Bereits in früheren Studien wurde untersucht, ob die Enantioselektivität von RR/SS-konfigurierten Komplexen durch Trennung in ihre reinen Enantiomere zu einer weiteren Steigerung der Wirkung führen kann [44,54,55]. Bei **RR/SS-4F-PtCl₂** war dies leider nicht der Fall; hier zeigten **RR-** und **SS-4F-PtCl₂** identische Effekte an MCF-7- sowie P388-Leukämiezellen.

Im Falle der neu synthetisierten Substanzen mit einem Ethyl- bzw. Isopropylrest am C2 des Neutralliganden waren bei den RS- und SR-konfigurierten Komplexen deutliche Unterschiede auf das Zellwachstum zu erkennen, wie aus **Abb.7.6** ersichtlich wird. Eine Trennung in die reinen Enantiomere ist hierbei von Vorteil. Im Folgenden sind die erythro-konfigurierten Verbindungen aufgeführt, da bereits bei diesen Cisplatin-ähnliche Effekte auftraten.

Beim **4F-Ph/Et-Cl₂** besaß die RS-konfigurierte Verbindung im Vergleich zum **SR-4F-Ph/Et-Cl₂** den stärkeren Effekt auf das Zellwachstum; im Fall von **4F-Ph/iProp-Cl₂** überwog der SR-konfigurierte Komplex.

Diese stereochemischen Unterschiede sollen zum Wirkvergleich ebenso jeweils an den weiteren verwendeten Zelllinien dargestellt werden.

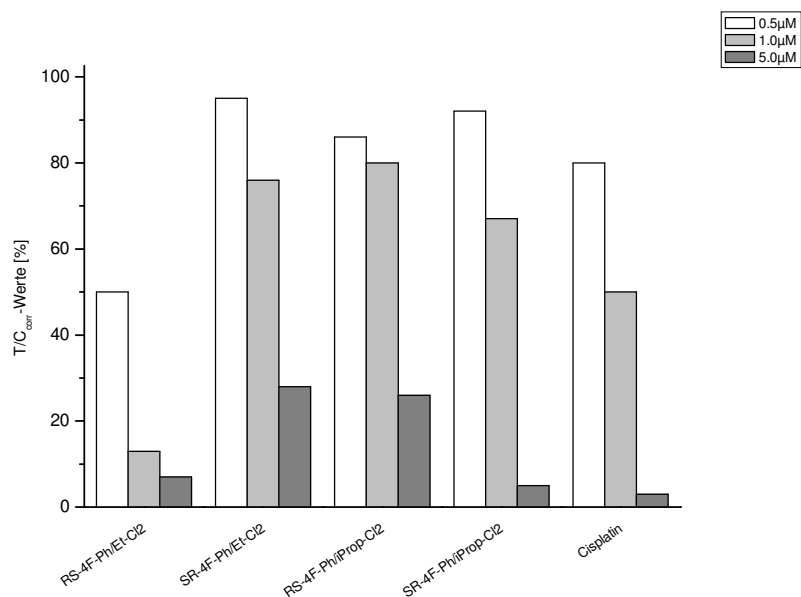


Abb.7.6 Wirkung der enantiomerenreinen [1-(4-Fluorphenyl)-2-alkylethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe auf das Wachstum von MCF-7-Zellen

Substanz	0.5 μM	1.0 μM	5.0 μM
RS-4F-Ph/Et-Cl ₂	50 (151h)	13 (151h)	7 (217h)
SR-4F-Ph/Et-Cl ₂	95 (122h)	76 (122h)	28 (217h)
RS-4F-Ph/iProp-Cl ₂	86 (134h)	80 (215h)	26 (215h)
SR-4F-Ph/iProp-Cl ₂	92 (134h)	67 (72h)	5 (161h)
Cisplatin	80 (72h)	50 (166h)	3 (237h)

Tab.7.4 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] nach jeweiliger Inkubationszeit [h] von [1-(4-Fluorphenyl)-2-alkylethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexen

In den nachfolgenden Diskussionen sollen nur noch die RR- und SS-Komplexe berücksichtigt werden, da sie, wie zu erwarten war, die stärkere Wirkung aufwiesen (vgl. 7.2.1.2.1.).

Zudem standen nicht alle Verbindungen in der erythro-Form zur Verfügung, so dass zum besseren Vergleich untereinander nur die threo-Verbindungen dienen sollen.

7.2.1.2.1. Einfluss der Alkylkette am C2 auf das Zellwachstum

Ein 4-Fluorphenyl-Rest besaß bereits in früheren Untersuchungen am Dichloroplatin(II)-Komplex eine bessere Wirksamkeit als 2- und 3-Fluorphenyl-Reste (s. Kap.1). Wie einleitend dargestellt, ermöglichte der Austausch eines aromatischen Restes gegen eine CH₃-Gruppe eine Erhöhung der Antitumoraktivität [59]. Unsere Testungen wurden anschließend an diese C2-Methyl-Verbindung mit einer Ethylkette fortgesetzt. Verlängerung um weitere CH₂-Gruppen zu jeweils Propyl- und Butylresten brachte keine weitere Wirkoptimierung [56]. Auf antiproliferative Effekte wurden nun sowohl C2-Isopropyl- als auch C2-tertiär Butyl-Komplexe untersucht.

Wie aus **Abb.7.7** ersichtlich wird, zeigten diese neu synthetisierten Platin(II)-Komplexe bereits in der geringsten Konzentration von 0.5µM einen stärkeren Einfluss auf das Zellwachstum als Cisplatin. Hierbei stellte sich **RR-4F-Ph/iProp-Cl₂** mit einer Hemmung von T/C_{corr} = 9% nach 72 Stunden Inkubationszeit als aktivste Verbindung heraus (s.**Tab.7.5**). Bei Zugabe von 1.0µM Substanz besaßen alle eingesetzten Verbindungen mit Ausnahme von **SS-** und **RR-4F-Ph/iProp-Cl₂** zytozide Eigenschaften. Den stärksten Effekt erreichte hierbei wieder **RR-4F-Ph/iProp-Cl₂**. In einer Konzentration von 5.0µM blieb die Aktivitätsreihenfolge weitgehend identisch; am wirksamsten erwies sich erneut **RR-4F-Ph/iProp-Cl₂**. **SS-4F-Ph/iProp-Cl₂** und **RR-4F-Ph/Et-Cl₂** zeigten eine vergleichbare Wirksamkeit. Der tertiäre Butylrest am C2 ließ beim **RR-4F-Ph/tBut-Cl₂** zwar einen geringeren aber trotzdem deutlichen antiproliferativen Einfluss erkennen.

Bei allen eingesetzten Komplexen war demnach ein Vorteil der RR-Konfiguration hinsichtlich der Antitumorwirkung zu beobachten.

Die Einführung einer C2-Ethylgruppe brachte im Vergleich zur methylierten Komponente eine Wirkungssteigerung mit sich. Der Austausch zu einem Isopropylrest erhöhte abermals die Aktivität an den MCF-7-Zellen. Ein tertiärer Butylrest führte jedoch zu keiner weiteren Optimierung im Hinblick auf eine Hemmung des Zellwachstums.

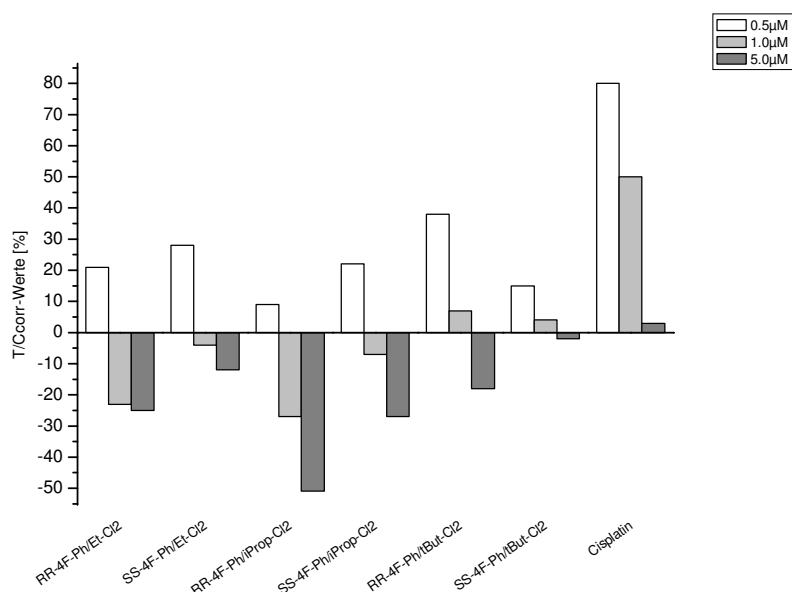


Abb.7.7 Testergebnisse der enantiomerenreinen [1-(4-Fluorphenyl)-2-alkylethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe mit verschiedenen Alkylresten am C2 an MCF-7-Zellen

Substanz	0.5 μM	1.0 μM	5.0 μM
RR-4F-Ph/Et-Cl ₂	21 (121h)	-23 (224h)	-25 (171h)
SS-4F-Ph/Et-Cl ₂	28 (145h)	-4 (224h)	-12 (224h)
RR-4F-Ph/iProp-Cl ₂	9 (72h)	-27 (161h)	-51 (215h)
SS-4F-Ph/iProp-Cl ₂	22 (72h)	-7 (134h)	-27 (161h)
RR-4F-Ph/tBut-Cl ₂	38 (142h)	7 (142h)	-18 (142h)
SS-4F-Ph/tBut-Cl ₂	15 (120h)	4 (120h)	-2 (120h)
Cisplatin	80 (72h)	50 (166h)	3 (237h)

Tab.7.5 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] und jeweilige Inkubationszeit der [1-(4-Fluorphenyl)-2-alkylethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe mit verschiedenen Alkylresten am C2

7.2.1.2.2. Einfluss des Phenylrings am C1 auf das Zellwachstum

Die Einführung eines tertiären Butylrestes anstelle der C2-Isopropylgruppe führte an MCF-7-Zellen nicht zu einer Steigerung der antiproliferativen Effekte, sondern gegenteilig ließ sich sogar ein Wirkverlust beobachten. Um zu untersuchen, ob die Antitumoraktivität durch Variation der Phenylringsubstitution am C1 erhöht werden könnte, wurden statt des 4-Fluor-Phenylrestes ein unsubstituierter Aromat sowie eine Hydroxyl- und Methoxygruppe in ortho-Position gewählt. Der Alkylrest am C2 blieb mit einer tertiären Butylgruppe identisch.

In der geringsten Substanzkonzentration von $0.5\mu\text{M}$ zeigte sich eine klare Bevorzugung von **SS-** und **RR-4F-Ph/tBut-Cl₂**. Vergleichbar zytotoxisch war sonst nur noch **RR-Ph/tBut-Cl₂**. Die weiteren Verbindungen besaßen äquivalent zu Cisplatin geringen bis keinen Einfluss auf die Proliferation (**Abb.7.8**).

Betrug die Konzentration $1.0\mu\text{M}$, blieb die Aktivitätsfolge **SS-4F-Ph/tBut-Cl₂** > **RR-4F-Ph/tBut-Cl₂** bestehen. Besonders die SS-konfigurierte Komponente mit einem T/C_{corr} -Wert von 4% nach 120 Stunden war deutlich aktiv. Außerdem erwies sich die hydroxylierte Verbindung **RR-OH-Ph/tBut-Cl₂** sowie **RR-Ph/tBut-Cl₂** als stark wachstumshemmend. Eine geringere Wirkung auf das Zellwachstum besaßen **SS-Ph/tBut-Cl₂** und **SS-MeO-Ph/tBut-Cl₂**, die mit T/C-Werten von 42% und 43% nur wenig den Einfluss von Cisplatin ($T/C_{\text{corr}} = 50\%$) überstiegen.

In einer Konzentration von $5.0\mu\text{M}$ zeigte sich eine besonders potente Wirkung von **RR-4F-Ph/tBut-Cl₂** ($T/C_{\text{corr}} = -18\%$) und vor allem **RR-OH-Ph/tBut-Cl₂** ($T/C_{\text{corr}} = -32\%$). Die Verbindung **SS-OH-Ph/tBut-Cl₂** erwies sich hinsichtlich der Aktivität ungefähr vergleichbar mit dem unsubstituierten Phenyl-Komplex **RR-Ph/tBut-Cl₂** (T/C_{corr} -Werte = -9% und -6%). Schwach zytozide Effekte auf das Zellwachstum waren bei den methoxylierten Substanzen zu beobachten. Trotz allem zeigten sie sich dennoch geringfügig potenter als Cisplatin.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich wie bei der Untersuchung des Einflusses der C2-Alkylkette eine stärkere Antitumorwirksamkeit der RR-konfigurierten Komplexe gegenüber ihren SS-Isomeren ableiten.

Der 4-Fluor-Substituent erwies sich abschließend als am günstigsten im Hinblick auf eine Proliferationshemmung, da eine Wirksteigerung durch Variation der Phenylringsubstitution bei gleich bleibendem Alkylrest nicht zu erreichen war. Der unsubstituierte aromatische Rest sowie eine im Arylring enthaltene Methoxygruppe reduzierten die Antitumoraktivität an den MCF-7-Zellen. Eine Hydroxylgruppe brachte nur in der höchsten Konzentration von $5.0\mu\text{M}$ einen Wirkvorteil.

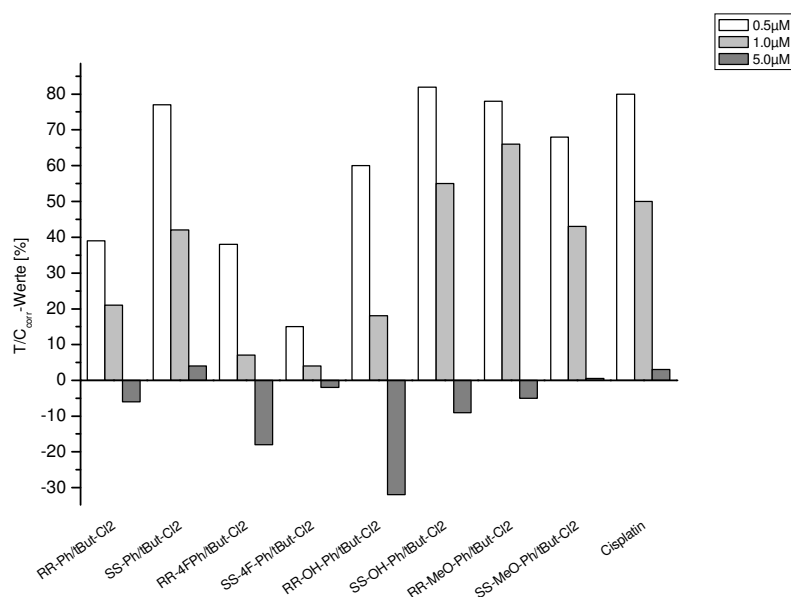


Abb.7.8 Testergebnisse der enantiomerenreinen [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe mit unterschiedlich substituierten Phenylresten und tertiärem Butylrest am C2 an MCF-7-Zellen

Substanz	0.5 μM	1.0 μM	5.0 μM
RR-Ph/tBut-Cl ₂	39 (72h)	21 (167h)	-6 (120h)
SS-Ph/tBut-Cl ₂	77 (72h)	42 (120h)	4 (220h)
RR-4F-Ph/tBut-Cl ₂	38 (142h)	7 (142h)	-18 (142h)
SS-4F-Ph/tBut-Cl ₂	15 (120h)	4 (120h)	-2 (120h)
RR-OH-Ph/tBut-Cl ₂	60 (144h)	18 (144h)	-32 (226h)
SS-OH-Ph/tBut-Cl ₂	82 (144h)	55 (144h)	-9 (144h)
RR-MeO-Ph/tBut-Cl ₂	78 (120h)	66 (120h)	-5 (166h)
SS-MeO-Ph/tBut-Cl ₂	68 (72h)	43 (72h)	0.5 (120h)
Cisplatin	80 (72h)	50 (166h)	3 (237h)

Tab.7.6 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] nach jeweiliger Inkubationszeit [h] der verschiedenen substituierten C1-Phenylreste mit tertiärem Butylrest am C2

7.2.2. IC₅₀-Wert-Bestimmung ausgewählter Verbindungen

Von einigen ausgewählten Verbindungen wurde der IC₅₀-Wert bestimmt. Eine ausführliche Diskussion dieser Ergebnisse findet sich in Kapitel 3.

7.3. Die humane, hormonunabhängige Mammakarzinomzelllinie

MDA-MB-231

Die MDA-MB-231-Mammakarzinomzelllinie stammt ebenso wie die MCF-7-Zelllinie aus einem malignen Pleuraerguss einer Patientin mit metastasiertem, duktalem Mammakarzinom, die zuvor 3 Wochen lang mit Chemotherapeutika behandelt wurde. Diese Zellen sind seit 1974 etabliert [204]. Sie gelten als hormonunabhängig, da nahezu keine Progesteron- und nur sehr geringe Mengen an Estrogenrezeptoren nachweisbar sind [204].

7.3.1. Chemosensitivitätstestung

Wie bei der Testung an der MCF-7-Brustkrebszelllinie wurde Cisplatin als Vergleich mitgeführt. Bezugnehmend auf die Zeit-Wirkungskurve ließ sich eine ähnliche Aktivität wie an MCF-7-Zellen ableiten. Cisplatin wirkt erst in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ zytotoxisch, bei $5\mu\text{M}$ zeigt sich nach 120 Stunden Inkubationszeit annähernd Zytozidität mit einem T/C_{corr} -Wert von 1%.

Die Generationszeit der MDA-MB-231-Zellen ist kürzer, daher erfolgte die Inkubation der Substanzen nur über einen Zeitraum von bis zu 195 Stunden.

Nach einer Substanzzugabe war des Öfteren eine Erholung der Zellen erkennbar.

7.3.1.1. Testergebnisse der [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe

Zur Untersuchung des Einflusses symmetrischer Platin(II)-Komplexe auf das Zellwachstum von MDA-MB-231-Zellen dienten neben den Vergleichssubstanzen Cisplatin und Carboplatin **m-** und **D,L-4F-PtCl₂** sowie **m-** und **D,L-4F-OH-Mal**. Als Vertreter mit lipophilerer chelatgebundener Dicarbonsäure als Abgangsgruppe wurde zusätzlich **m-4F-MeO-Mal** verwendet, da dieser Komplex bei den Reaktivitätsuntersuchungen (Kap.6) den stärksten Effekt aufwies. Die Ergebnisse zeigt **Abb. 7.9**.

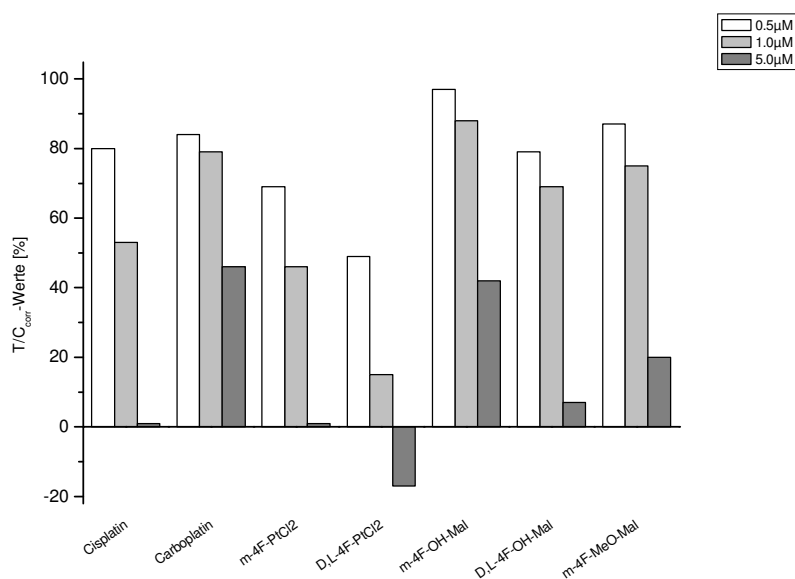


Abb.7.9 Antitumoraktivität verschiedener symmetrischer Platin(II)-Komplexe an MDA-MB-231-Zellen

Substanz	0.5 μM	1.0 μM	5.0 μM
Cisplatin	80 (69h)	53 (100h)	1 (120h)
Carboplatin	84 (93h)	79 (93h)	46 (120h)
m-4F-Pt-Cl ₂	69 (147h)	46 (75h)	1 (169h)
D,L-4F-PtCl ₂	49 (75h)	15 (147h)	-17 (169h)
m-4F-OH-Mal	97 (46h)	88 (165h)	42 (117h)
D,L-4F-OH-Mal	79 (46h)	69 (46h)	7 (165h)
m-4F-MeO-Mal	87 (95h)	75 (60h)	20 (95h)

Tab.7.7 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] nach jeweiliger Inkubationszeit ausgewählter symmetrischer Platin(II)-Komplexe

Cisplatin und Carboplatin sind an MDA-MB-231-Zellen etwa in gleichem Maße aktiv wie an den MCF-7-Zellen, allerdings lässt sich aus den Zeit-Wirkungs-Kurven (Kap.10) eine leichte Resistenzentwicklung der MDA-MB-231-Zellen gegenüber diesen Verbindungen beobachten. Aus den Daten war erneut eine Überlegenheit der D,L-Komplexe gegenüber den meso-konfigurierten Verbindungen in Bezug auf die Aktivität ableitbar. Dies wurde deutlich sowohl an **4F-PtCl₂** als auch an **4F-OH-Mal**.

Die Wirksamkeit von **D,L-4F-PtCl₂** war hier im Vergleich zu den Effekten an MCF-7-Zellen allerdings etwas abgeschwächt: T/C_{corr}-Werte [%] an MCF-7-Zellen bei Zugabe von 5.0 μM: -36 (261h) und an der MDA-MB-231-Linie: -17 (169h).

Dasselbe galt für die Malonsäurederivate. Der Unterschied war besonders in einer Konzentration von 5.0µM vorhanden. **D,L-4F-OH-Mal** erreichte hier nicht mehr den zytotoxischen Bereich, sondern blieb nach 165 Stunden Inkubationszeit bei einem T/C_{corr}-Wert von 7% (MCF-7 = -4%). **M-4F-MeO-Mal** besaß an beiden verwendeten Zelllinien ähnliche Wirkung. So zeigte sich in einer Konzentration von 5.0µM ein zytostatischer Effekt, der im Vergleich zur MCF-7-Zelllinie nur wenig abwich.

Die bereits erwähnte Resistenzentwicklung der Zellen gegenüber Platin(II)-Komplexen schien besonders nach einer längeren Einwirkzeit der Verbindungen eine Rolle zu spielen. Da eine Resistenzüberwindung durch neu entwickelte Substanzen für eine therapeutische Anwendung wünschenswert wäre, schienen die getesteten Komponenten im Hinblick darauf noch kein Optimum erreicht zu haben.

7.3.1.2. Testergebnisse der enantiomerenreinen [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Komplexe

Auch bei der Testung an MDA-MB-231-Zellen wurden nur die Dichloroverbindungen eingesetzt. Ebenso zeigten sich RR- und SS-Komplexe im Vergleich zu ihren RS- und SR-Isomeren wirkungsüberlegen, weswegen letztere nur zur Überprüfung eines eventuellen Vorteils einer Trennung der erythro-Formen in die reinen Enantiomere dienen (s. **Abb.7.10**) und im Folgenden nicht weiter berücksichtigt werden sollen.

Besonders bei den am C2 des Liganden isopropylierten Komponenten zeigte sich im Gegensatz zu den MCF-7-Zellen ein deutlicher Vorteil einer solchen Trennung.

SR-4F-Ph/iProp-Cl₂ hatte einen bedeutend stärkeren Einfluss auf das Zellwachstum als die RS-konfigurierte Verbindung. Bereits in einer Konzentration von 1.0µM ließ sich ein zytotoxischer Effekt erreichen. Dieser Komplex wirkte demnach an der MDA-MB-231-Linie wesentlich selektiver. Beim ethylierten Komplex war dagegen ein stereochemischer Unterschied nicht nachweisbar.

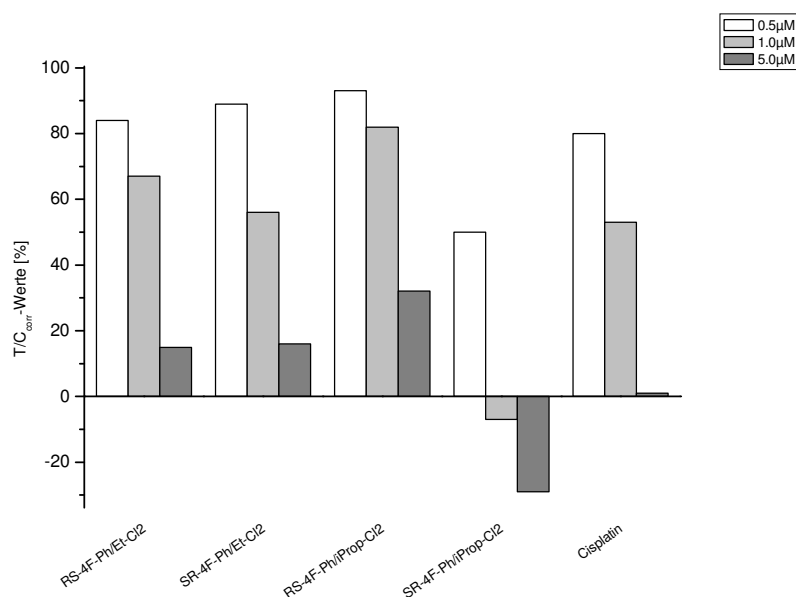


Abb.7.10 Einfluss der getrennten Enantiomere ausgewählter [1-(4-Fluorphenyl)-2-alkylethylendiamin]-platin(II)-Komplexen auf das Zellwachstum von MDA-MB-231-Zellen

Substanz	0.5µM	1.0µM	5.0µM
RS-4F-Ph/Et-Cl ₂	84 (45h)	67 (69h)	15 (163h)
SR-4F-Ph/Et-Cl ₂	89 (45h)	56 (45h)	16 (163h)
RS-4F-Ph/iProp-Cl ₂	93 (47h)	82 (47h)	32 (47h)
SR-4F-Ph/iProp-Cl ₂	50 (47h)	-7 (47h)	-29 (47h)
Cisplatin	80 (69h)	53 (100h)	1 (120h)

Tab.7.8 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] nach jeweiliger Inkubationszeit [h] von [1-(4-Fluorphenyl)-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Komplexen

7.3.1.2.1. Einfluss der Alkylkette am C2 auf das Zellwachstum

In Bezug auf die Untersuchungsergebnisse an den MCF-7-Zellen wurde im ersten Teil der Zytotoxizitätstestung der 4-Fluorphenyl-Rest beibehalten und der Einfluss der C2-Alkylgruppe auf die Antitumoraktivität beobachtet. Ausgehend von der Ethylgruppe wurde die Variation mit Isopropyl- sowie tertiärem Butylrest fortgesetzt.

In einer Konzentration von 0.5µM zeigten sich bereits alle untersuchten Komplexe Cisplatin in ihrer Proliferationshemmung überlegen (**Abb.7.11**). **SS- und RR-4F-Ph/iProp-Cl₂** wirkten zytozid mit T/C_{corr}-Werten von -13% und -23%. Die übrigen Verbindungen erreichten T/C_{corr}-Werte zwischen 22 und 40%. Bei Zugabe von 1.0µM Substanz waren erneut **SS- und RR-4F-**

Ph/iProp-Cl₂ die aktivsten Komplexe, wobei allerdings zwischen den beiden Isomeren kein Unterschied zu erkennen war. Die Verbindungen mit Ethyl- bzw. tertiär Butylgruppe besaßen eine untereinander vergleichbare Zytotoxizität.

In einer Konzentration von 5 µM trat zwischen diesen letztgenannten Komponenten allerdings ein deutlicher Unterschied auf: Die Enantiomere von **4F-Ph/tBut-Cl₂** zeigten sich potenter als solche mit einem C2-Ethylrest. Der beste antiproliferative Effekt ließ sich mit dem **4F-Ph/iProp-Cl₂**-Komplex erreichen, wobei keine Bevorzugung einer bestimmten Konfiguration ersichtlich war.

Es fällt besonders bei der am C2-isopropylierten Verbindung aber auch an den weiteren untersuchten Substanzen auf, dass so gut wie keine Enantioselektivität an der MDA-MB-231-Zelllinie vorhanden war. An den MCF-7-Zellen ließen sich deutlichere Unterschiede zwischen den einzelnen Enantiomeren und ihrer jeweiligen Antitumorwirkung beobachten. Abschließend fällt bei beiden verwendeten Zelllinien die hohe Aktivität von **RR-** und **SS-4F-Ph/iProp-Cl₂** auf. Ein tertiärer Butylrest erwies sich an den MDA-MB-231-Zellen gegenüber einer C2-Ethylgruppe als wirksamer hinsichtlich des Einflusses auf das Zellwachstum.

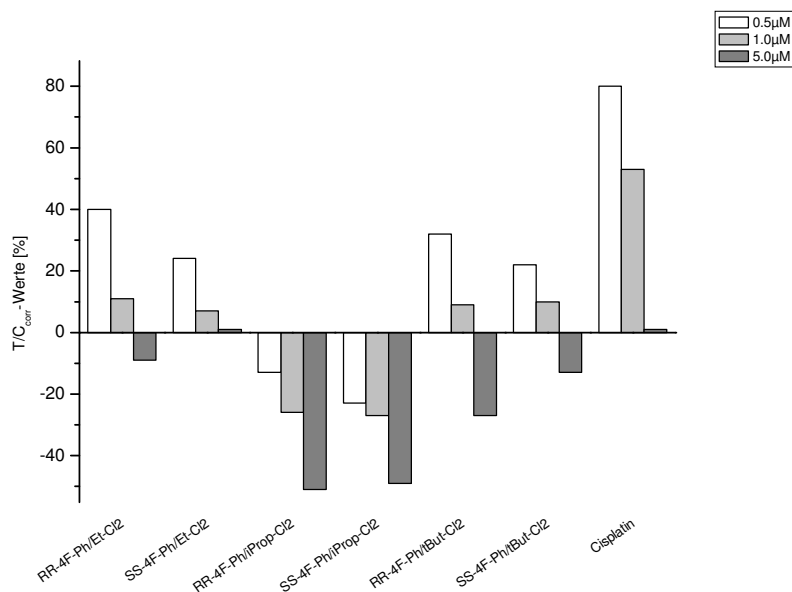


Abb.7.11 Testergebnisse der enantiomerenreinen [1-(4-Fluorphenyl)-2-alkylethylendiamin]-dichloroplatin(II)-Komplexe mit verschiedenen C2-Alkylresten an MDA-MB-231-Zellen

Substanz	0.5µM	1µM	5µM
RR-4F-Ph/Et-Cl ₂	40 (92h)	11 (163h)	-9 (163h)
SS-4F-Ph/Et-Cl ₂	24 (92h)	7 (163h)	1 (163h)
RR-4F-Ph/iProp-Cl ₂	-13 (47h)	-26 (47h)	-51 (165h)
SS-4F-Ph/iProp-Cl ₂	-23 (47h)	-27 (47h)	-49 (47h)
RR-4F-Ph/tBut-Cl ₂	32 (118h)	9 (118h)	-27 (168h)
SS-4F-Ph/tBut-Cl ₂	22 (74h)	10 (118h)	-13 (168h)
Cisplatin	80 (69h)	53 (100h)	1 (120h)

Tab.7.9 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] und jeweilige Inkubationszeit der [1-(4-Fluorphenyl)-2-alkylethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe mit verschiedenen Alkylresten am C2

7.3.1.2.2. Einfluss des Phenylrings am C1 auf das Zellwachstum

Um das Ausmaß der Phenylringsubstitution auf die Antitumoraktivität zu untersuchen, wurden ebenso wie an MCF-7-Zellen neben dem 4-Fluorphenyl- ein unsubstituiertes Phenylrest sowie solche mit Hydroxyl- und Methoxygruppe in ortho-Position gewählt. Der Alkylrest war in allen Fällen ein C2-tertiärer Butylrest, um eine mögliche Wirkungssteigerung durch Variation des Phenylrings beobachten zu können.

In der geringsten Konzentration von 0.5µM wirkten nur die Komplexe **RR-Ph/tBut-Cl₂**, **SS-** sowie **RR-4F-Ph/tBut-Cl₂** und **RR-OH-Ph/tBut-Cl₂** zytotoxisch, wobei bereits T/C_{corr}-Werte von 11% erreicht wurden (**RR-Ph/tBut-Cl₂**) (**Abb.7.12**).

Erhöhte man die Substanzmenge auf 1µM, so zeigte sich nahezu identische Antitumoraktivität von **RR-Ph/tBut-Cl₂**, **SS-4F-Ph/tBut-Cl₂** und **RR-4F-Ph/tBut-Cl₂** (T/C_{corr}-Werte: 7%, 9%, 10%). Die übrigen Verbindungen wirkten schwach bis nicht wachstumshemmend. Einzig **RR-OH-Ph/tBut-Cl₂** und **RR-MeO-Ph/tBut-Cl₂** erwiesen sich potenter als Cisplatin.

In der höchsten Konzentration von 5.0µM zeigte sich eine deutliche Bevorzugung von Verbindungen mit unsubstituiertem sowie fluoriertem Arylring gegenüber solchen mit ortho-OH- oder MeO-Gruppen im aromatischen Rest. Letztere erreichten T/C_{corr}-Werte von 2% (**RR-OH-Ph/tBut-Cl₂**) und 1% (**RR-MeO-Ph/tBut-Cl₂**) im Vergleich zu **RR-4F-Ph/tBut-Cl₂** mit -27%.

Die Enantiomerenpaare von **Ph/tBut-Cl₂** und **4F-Ph/tBut-Cl₂** besaßen somit einen deutlichen Einfluss auf das Zellwachstum, wobei **RR-4F-Ph/tBut-Cl₂** als aktivste Verbindung erschien. Vergleichend mit der MCF-7-Zelllinie war hier eine Übereinstimmung vorhanden. In beiden

Fällen war mit den im aromatischen Rest ein Fluor tragenden Komplexen die stärkste Wirkung zu erreichen. Zusätzlich war eine höhere Selektivität für die unsubstituierten Komplexe **Ph/tBut-Cl₂** an MDA-MB-231-Zellen zu erkennen. Demgegenüber zeigte sich ein Wirkverlust von **RR-OH-Ph/tBut-Cl₂**. Bei 5.0µmolarer Konzentration war diese Verbindung an den MCF-7-Zellen die einflussreichste gewesen ($T(C_{\text{corr}} = -32\%)$). An MDA-MB-231 ließen sich immerhin zytostatische Effekte beobachten. Eine Methoxygruppe in ortho-Position des aromatischen Restes brachte abermals keine Aktivitätserhöhung. Mit Ausnahme von **SS-Ph/tBut-Cl₂** war in allen Fällen eine Wirküberlegenheit der RR-konfigurierten Komplexe vorhanden.

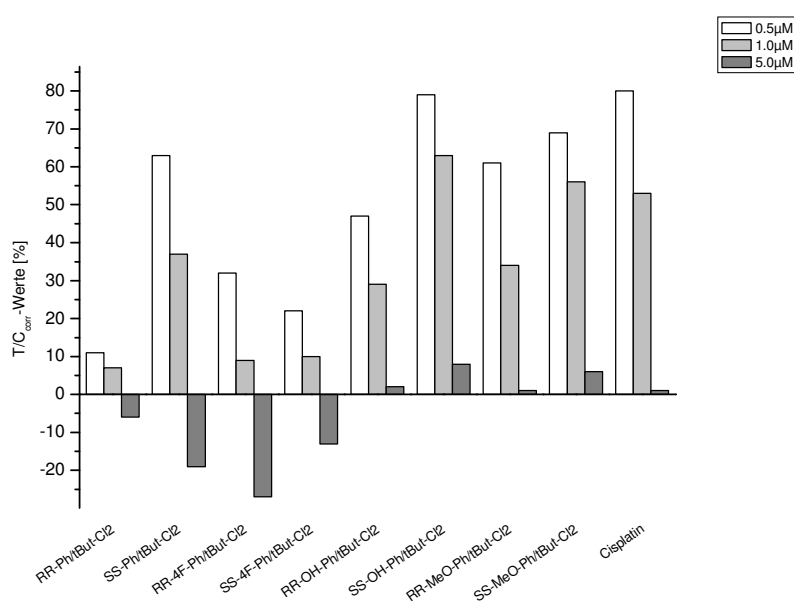


Abb.7.12 Testergebnisse der enantiomerenreinen [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe mit unterschiedlicher Phenylringsubstitution und tertiärem Butylrest am C2 an MDA-MB-231-Zellen

Substanz	0.5µM	1µM	5µM
RR-Ph/tBut-Cl ₂	11 (48h)	7 (48h)	-6 (168h)
SS-Ph/tBut-Cl ₂	63 (74h)	37 (74h)	-19 (168h)
RR-4F-Ph/tBut-Cl ₂	32 (118h)	9 (118h)	-27 (168h)
SS-4F-Ph/tBut-Cl ₂	22 (74h)	10 (118h)	-13 (168h)
RR-OH-Ph/tBut-Cl ₂	47 (48h)	29 (48h)	2 (168h)
SS-OH-Ph/tBut-Cl ₂	79 (130h)	63 (130h)	8 (168h)
RR-MeO-Ph/tBut-Cl ₂	61 (48h)	34 (48h)	1 (48h)

Substanz	0.5µM	1µM	5µM
SS-MeO-Ph/tBut-Cl ₂	69 (74h)	56 (96h)	6 (74h)
Cisplatin	1 (120h)	53 (100h)	80 (69h)

Tab.7.10 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] nach jeweiliger Inkubationszeit [h] der verschieden substiierten C1-Phenylreste mit tertiärem Butylrest am C2

7.4. Die humane, hormonsensitive Prostatakarzinomzelllinie LNCaP/FGC

LNCaP/FGC bedeutet *Lymph Node Carcinoma of Prostate / Fast Growing Colony*. Diese Prostatakarzinomzellen stammen von einem 50jährigen Patienten mit metastasierendem Prostatakrebs in fortgeschrittenem Stadium. Nach Estrogen- und Chemotherapie wurden aus einem Lymphknoten mittels Nadelbiopsie Tumormetastasen entnommen, aus denen die Zelllinie gewonnen werden konnte. Als einziger Hormonrezeptor ließ sich der Androgenrezeptor nachweisen [205].

Die LNCaP/FGC-Zellen neigen stark zur Sphäroidenbildung. Diese Sphäroide müssen bei der Passage gründlich zerstört werden, um eine gleichmäßige Aussaat zu gewährleisten (s.Kap.9). Die Anfärbung im Kristallviolettassay erweist sich als schwieriger, wodurch eventuell die Zellmassenbestimmung beeinflusst werden kann.

Geeignete Maßnahmen bei Aussaat, Anwachszeit und Inkubationsdauer für eine optimale Zelldichte führen jedoch zu guten Ergebnissen (s. Kap.9).

7.4.1. Chemosensitivitätstestung

Im LNCaP/FGC-Modell wurden einige ausgewählte Verbindungen untersucht.

Als Referenz diente erneut Cisplatin, obwohl es als Monotherapie beim Prostatakarzinom leider nur schwache Wirkung aufweist. In den geringen Konzentration 0.5µM und 1.0µM wirkt es im Gegensatz zu den parallel verwendeten Brustkrebszelllinien nur schwach bis gar nicht zytostatisch. Bei 5.0µM sind T/C_{corr}-Werte von 10% zu erreichen (s. **Tab.7.11**).

Die Inkubationsdauer betrug 220 Stunden.

7.4.1.1. Testergebnisse der [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]platin(II)-Komplexe

Wie in den vorangegangenen Testungen wurden zum Vergleich die Komplexe **m-** und **D,L-4F-PtCl₂** sowie als Komplex mit Dicarbonsäure als Abgangsgruppe Carboplatin herangezogen. Die ermittelten Ergebnisse zeigen **Abb.7.13** und **Tab.7.11**.

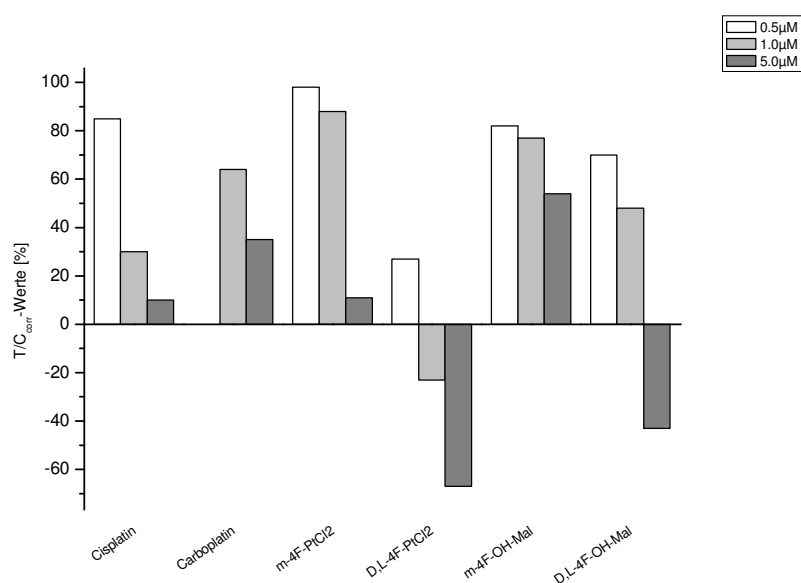


Abb.7.13 Antitumoraktivität ausgewählter, symmetrischer Platin(II)-Komplexe an LNCaP/FGC-Zellen

Substanz	0.5μM	1.0μM	5.0μM
Cisplatin	85 (48h)	30 (60h)	10 (60h)
Carboplatin		64 (176h)	35 (176h)
m-4F-PtCl ₂	98 (170h)	88 (170h)	11 (48h)
D,L-4F-PtCl ₂	27 (46h)	-23 (46h)	-67 (46h)
m-4F-OH-Mal	82 (193h)	77 (193h)	54 (193h)
D,L-4F-OH-Mal	70 (67h)	48 (67h)	-43 (140h)

Tab.7.11 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] nach jeweiliger Inkubationszeit ausgewählter, symmetrischer Platin(II)-Komplexe

Carboplatin weist an den LNCaP/FGC-Zellen eine stärkere Antitumoraktivität auf als an den Brustkrebszelllinien und erreicht in einer Konzentration von 5.0μM einen T/C_{corr}-Wert von 35% nach 176 Stunden Inkubationszeit. Cisplatin zeigt geringere Wirksamkeit, was an erhöhter Toleranz der Prostatakarzinomzellen gegenüber dieser Substanz liegt.

Ein besonders großer Unterschied existierte zwischen den meso- und D,L-konfigurierten Komplexen, was vor allem deutlich beim Chlorokomplex **4F-PtCl₂** wurde. Bereits bei Zugabe von 0.5µM Substanz war ein antiproliferativer Einfluss von **D,L-4F-PtCl₂** erkennbar. Bei 5.0µM war mit einem T/C_{corr}-Wert von -67% nach nur 46 Stunden eine sehr starke Wachstumshemmung vorhanden, welche für einen therapeutischen Einsatz aufgrund zu hoher Toxizität durch vermehrte Wechselwirkung mit Bionukleophilen nicht mehr vertretbar wäre. Auch bei dem Komplex mit Hydroxymalonsäure als Abgangsgruppe ließ sich dieser deutliche Unterschied zwischen meso- und D,L-konfigurierter Verbindung besonders in 5µmolarer Konzentration beobachten. **D,L-4F-OH-Mal** wirkte hier stark zytozid. Dieser Einfluss auf das Zellwachstum überstieg sogar den an den MCF-7- sowie MDA-MB-231-Zelllinien gefundenen.

Die LNCaP/FGC-Zellen zeigten keine signifikante Erholung der Zellen, wie es besonders an der MDA-MB-231-Linie der Fall war. Eine Resistenzentwicklung, wie sie bei Cisplatin vorhanden ist, scheint bei Verwendung des 4-Fluorphenyl-Komplexes zurückgedrängt worden zu sein. **M-4F-OH-Mal** zeigte sich hier allerdings schwächer wirksam als an den Brustkrebszelllinien. Daher wurde auf eine weitere Testung meso-konfigurierter Verbindungen mit Malonsäurederivaten als Abgangsgruppen an den LNCaP/FGC-Zellen verzichtet.

7.4.1.2. Testergebnisse der enantiomerenreinen [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Komplexe

Wie in den vorangegangenen Untersuchungen wurden die enantiomerenreinen, asymmetrischen Platin(II)-Verbindungen auf ihre Wirksamkeit getestet. Hierbei standen wieder der Einfluss der Alkylgruppe am C2 sowie die Substitution am Phenylring des C1 im Vordergrund. Ausgewählte Verbindungen wurden neben den bisher verwendeten Konzentrationen von 0.5µM, 1µM und 5µM zusätzlich in 0.05µM und 0.1µM eingesetzt.

Zunächst sollte auf eine mögliche Wirkoptimierung der jeweiligen Enantiomere eingegangen werden, um zu untersuchen, ob sich auch an Prostatakarzinomzellen durch eine Trennung der erythro-Form in die reinen Isomere ein Vorteil im Hinblick auf die Aktivität ergibt.

Ein deutlicher Wirkungsunterschied ist im Gegensatz zu den C2-Ethyl-Derivaten bei solchen mit einem C2-Isopropylrest erkennbar. **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** war in einer Konzentration von 5µM bereits stark zytozid (T/C_{corr} = -24%), während **RS-4F-Ph/iProp-Cl₂** nur einen T/C_{corr}-

Wert von 57% aufweisen konnte. Ein Wirkungsunterschied der enantiomerenreinen **4F-Ph/Et-Cl₂**-Verbindungen war an den LNCaP/FGC-Zellen allerdings nur schwach ausgeprägt.

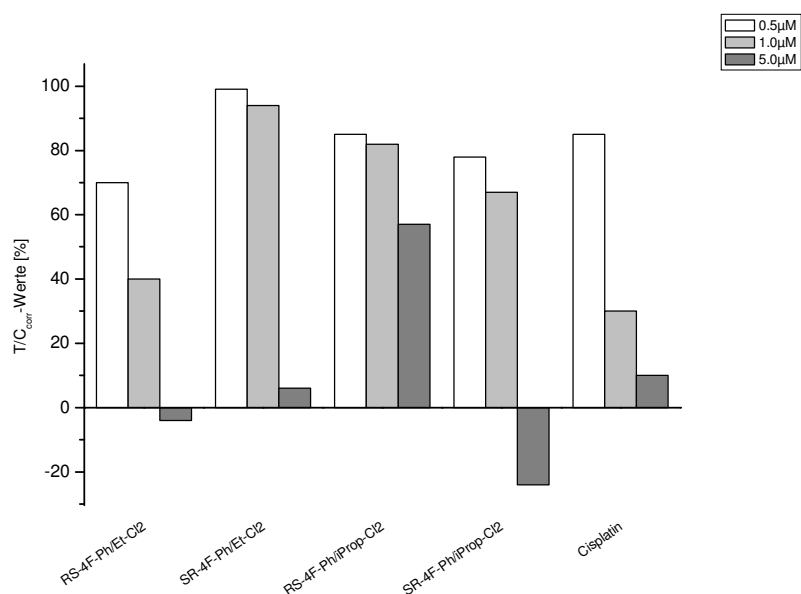


Abb.7.14 Einfluss der getrennten Enantiomere ausgewählter [1-(4-Fluorphenyl)-2-alkylethylenediamin]-dichloroplatin(II)-Komplexe auf das Zellwachstum von LNCaP/FGC-Zellen]

Substanz	0.5µM	1.0µM	5.0µM
RS-4F-Ph/Et-Cl ₂	70 (172h)	40 (68h)	-4 (45h)
SR-4F-Ph/Et-Cl ₂	99 (45h)	94 (172h)	6 (45h)
RS-4F-Ph/iProp-Cl ₂	85 (171h)	82 (171h)	57 (77h)
SR-4F-Ph/iProp-Cl ₂	78 (77h)	67 (77h)	-24 (77h)
Cisplatin	85 (48h)	30 (60h)	10 (60h)

Tab.7.12 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] nach jeweiliger Inkubationszeit [h] von [1-(4-Fluorphenyl)-2-alkylethylenediamin]dichloroplatin(II)-Komplexen

7.4.1.2.1. Einfluss der Alkylkette am C2 auf das Zellwachstum

Die Untersuchungen an der LNCaP/FGC-Linie ergaben ein von den MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen abweichendes Ergebnis. Der Komplex **4F-Ph/iProp-Cl₂** wies in der RR- und in der SS-Konfiguration starke zytozide Effekte auf. Sogar in den geringen Konzentrationen von sowohl 0.05µM als auch 0.1µM war mit **RR-4F-Ph/iProp-Cl₂** eine zytozide Wirksamkeit zu erreichen. Damit genügte weniger als ein Zehntel der Konzentration, welche für Cisplatin für eine zytotoxische Aktivität notwendig war.

Allerdings war auch die Aktivität der eine C2-Ethylkette tragenden Verbindungen deutlich gestiegen und erreichte eine vergleichbar starke Wirkung wie mit **4F-Ph/iProp-Cl₂**. Bereits in der geringsten Konzentration von 0.5µM ließ sich besonders bei **SS-4F-Ph/Et-Cl₂** ein hoher Einfluss auf das Zellwachstum erkennen ($T/C_{\text{corr}} = -35\%$).

Dies unterstreicht eine gelungene Umgehung einer Resistenzentwicklung der LNCaP/FGC-Zellen wie sie gegenüber den früheren Platin(II)-Verbindungen wie Cisplatin und Carboplatin noch vorhanden ist. Überraschenderweise zeigten **RR-** sowie **SS-4F-Ph/tBut-Cl₂** nur überaus schwache antiproliferative Effekte. Für eine erkennbare Wirkung wurden 5µM Substanz benötigt. Hierbei wurden T/C_{corr} -Werte von 0.5% (**SS-4F-Ph/tBut-Cl₂**) und -11% (**RR-4F-Ph/tBut-Cl₂**) gefunden. An der MCF-7- sowie MDA-MB-231-Linie ließ sich eine vergleichbare Aktivität bereits bei Zugabe von 1µM Substanz beobachten.

Abschließend ist zusammenzufassen, dass an den LNCaP/FGC-Zellen die geringste Enantioselektivität aller verwendeten Zelllinien gegeben war. So war keine Bevorzugung einer bestimmten Konfiguration hinsichtlich der Antitumoraktivität nachweisbar. Eine Enantiomerentrennung erbrachte demnach leider keine Optimierung.

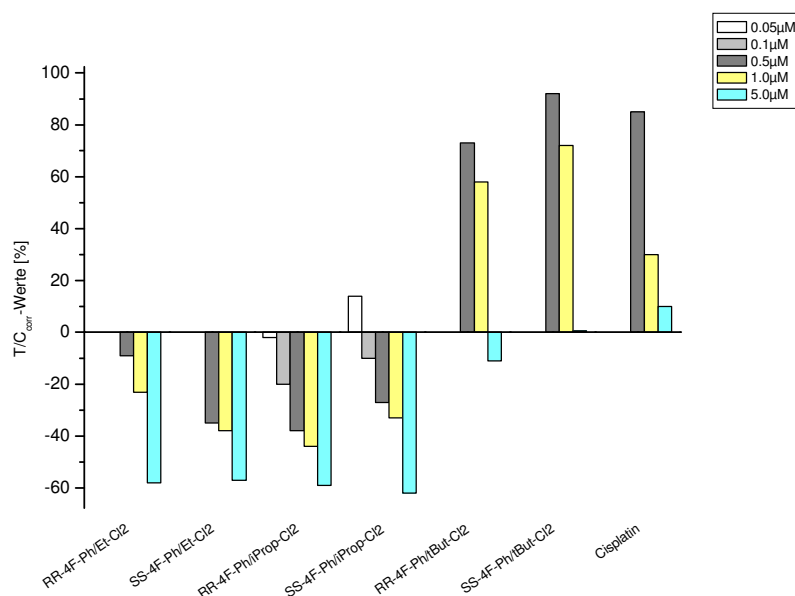


Abb.7.15 Testergebnisse der enantiomerenreinen [1-(4-Fluorphenyl)-2-alkylethylendiamin]-dichloroplatin(II)-Komplexe mit verschiedenen Alkylresten am C2 an LNCaP/FGC-Zellen

Substanz	0.05µM	0.1µM	0.5µM	1.0µM	5.0µM
RR-4F-Ph/Et-Cl ₂			-9 (45h)	-23 (139h)	-58 (172h)

Substanz	0.05µM	0.1µM	0.5µM	1.0µM	5.0µM
SS-4F-Ph/Et-Cl ₂			-35 (45h)	-38 (172h)	-57 (172h)
RR-4F-Ph/iProp-Cl ₂	-2 (58h)	-20 (58h)	-38 (77h)	-44 (77h)	-59 (77h)
SS-4F-Ph/iProp-Cl ₂	14 (58h)	-10 (58h)	-27 (77h)	-33 (77h)	-62 (77h)
RR-4F-Ph/tBut-Cl ₂			73 (50h)	58 (68h)	-11 (68h)
SS-4F-Ph/tBut-Cl ₂			92 (193h)	72 (50h)	0.5 (164h)
Cisplatin			85 (48h)	30 (60h)	10 (60h)

Tab.7.13 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] und jeweilige Inkubationszeit der [1-(4-Fluorphenyl)-2-alkylethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe mit verschiedenen Alkylresten am C2

7.4.1.2.2. Einfluss des Phenylrings am C1 auf das Zellwachstum

Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Testung an MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkrebszellen zeigte weitere interessante Unterschiede.

Auffällig war die gesteigerte Antitumoraktivität von **SS-** und **RR-Ph/tBut-Cl₂**. Bereits in einer 0.5 molaren Konzentration zeigte sich eine zytozide Wirkung von **RR-Ph/tBut-Cl₂** mit einem T/C_{corr}-Wert von -2%. An MCF-7- wie auch an MDA-MB-231-Zellen gelang dies erst nach Zugabe von 5µM Substanz. Überraschenderweise ließ der Effekt auf das Zellwachstum bei Verwendung des 4-Fluorphenyl-Liganden deutlich nach. So zeigte nur **RR-4F-Ph/tBut-Cl₂** bei 5µM einen T/C_{corr}-Wert von -11%. Die 2-OH- sowie 2-MeO-Phenyl-Verbindungen erreichten an LNCaP/FGC-Zellen im Gegensatz zu den Brustkrebszelllinien die stärkste Proliferationshemmung. Es wurden vergleichbar gute zytozide Effekte wie für **Ph/tBut-Cl₂** erhalten. Nur an den MCF-7-Zellen konnte mit **RR-OH-Ph/tBut-Cl₂** eine ausreichende Wirkung erzielt werden (T/C_{corr} = -32%). Mit **MeO-Ph/tBut-Cl₂** konnte nur an den LNCaP/FGC-Zellen eine Hemmung des Zellwachstums erreicht werden.

Eine erhöhte Aktivität im Vergleich zu Cisplatin konnte mit allen eingesetzten Komplexen erhalten werden. Bei **4F-Ph/tBut-Cl₂** waren hierfür allerdings Konzentrationen von 5µM notwendig. Diese Wirkminderung der 4F-substituierten aromatischen Reste war umso erstaunlicher, da an früheren Testungen mit symmetrischen Platin(II)-Verbindungen wie dem **D,L-4F-Pt-Cl₂** an LNCaP/FGC-Zellen eine antiproliferative Wirkung beobachtet werden konnte.

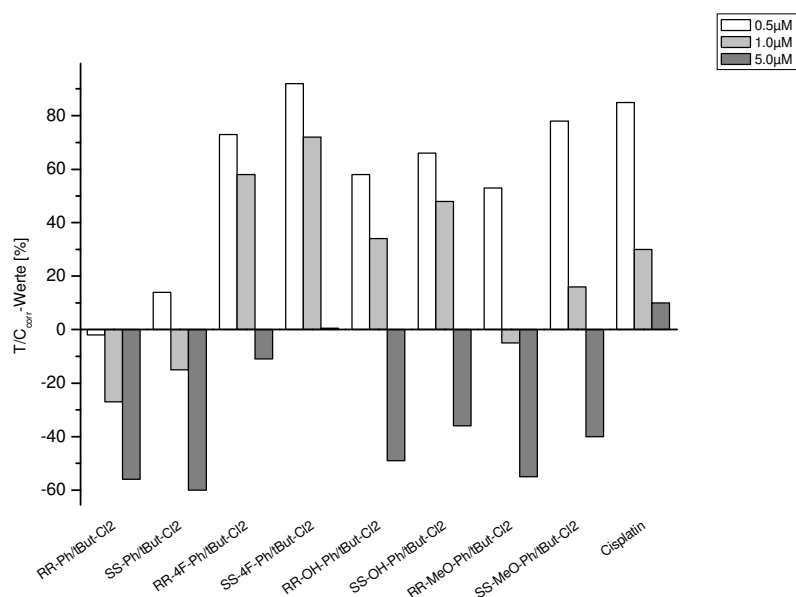


Abb.7.16 Testergebnisse der enantiomerenreinen [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe mit unterschiedlicher Phenylringsubstitution und tertiärem Butylrest am C2 an LNCaP/FGC-Zellen

Substanz	0.5 μM	1.0 μM	5.0 μM
RR-Ph/tBut-Cl ₂	-2 (50h)	-27 (193h)	-56 (193h)
SS-Ph/tBut-Cl ₂	14 (50h)	-15 (68h)	-60 (183h)
RR-4F-Ph/tBut-Cl ₂	73 (50h)	58 (68h)	-11 (68h)
SS-4F-Ph/tBut-Cl ₂	92 (193h)	72 (50h)	0.5 (164h)
RR-OH-Ph/tBut-Cl ₂	58 (50h)	34 (68h)	-49 (68h)
SS-OH-Ph/tBut-Cl ₂	66 (68h)	48 (50h)	-36 (50h)
RR-MeO-Ph/tBut-Cl ₂	53 (67h)	-5 (67h)	-55 (67h)
SS-MeO-Ph/tBut-Cl ₂	78 (67h)	16 (67h)	-40 (67h)
Cisplatin	85 (48h)	30 (60h)	10 (60h)

Tab.7.14 Minimale T/C_{corr}-Werte [%] nach jeweiliger Inkubationszeit [h] der verschieden substituierten C1-Phenylreste mit tertiärem Butylrest am C2

7.5. Untersuchungen an Fibroblasten und Keratinozyten

Zur Untersuchung, ob eine Selektivität der synthetisierten Verbindungen für Tumorzellen besteht oder ob auch verstärkt gesundes Gewebe angegriffen wird, wurden sowohl die IC₅₀-Wert-Bestimmung als auch der MTT-Test an humanen Fibroblasten und auch Keratinozyten durchgeführt. Besonders für den IC₅₀-Test war nicht klar, welche Zelldichte für ein mit dem gängigen IC₅₀-Test an den humanen Brustkrebszellen MCF-7 und MDA-MB-231 zum Vergleich notwendig war. Daher musste in Vorversuchen zuerst die optimale Aussaatdichte für Fibroblasten bestimmt werden.

7.5.1. Vorversuche an Fibroblasten zur optimalen Aussaatdichte

Zur Untersuchung auf Zytotoxizität wird im Allgemeinen folgende Vorgehensweise angewendet:

- Aussaat einer bestimmten Menge an Zellen in einer 96-Lochplatte
- Eine definierte Vorinkubationszeit
- Substanzzugabe
- Abstoppen und Auswertung mit verschiedenen Messverfahren, z.B. Kristallviolettassay

Die Menge der bei der Aussaat verwendeten Zellen sowie die Länge der Vorinkubationszeit können einen wesentlichen Einfluss auf das Testergebnis nehmen, da diese Parameter die bei der Substanzzugabe vorhandene Zellzahl zum Zeitpunkt t_0 mitbestimmen.

Da Fibroblasten bisher nur für den MTT-Test verwendet wurden, war nicht bekannt, welche Menge an Zellen zur Bestimmung der Zytotoxizität über den IC₅₀-Wert notwendig ist. Daher waren Vorversuche hinsichtlich der oben genannten Parameter wichtig. Zusätzlich sollte ein Vergleich der ermittelten Werte mit denen von einer IC₅₀-Wert-Bestimmung an MCF-7-Zellen möglich sein.

Für MCF-7-Zellen werden für die Aussaat 1000 Zellen pro Well, d.h. pro 100µl, benötigt, für MDA-MB-231 aufgrund des schnelleren Wachstums 500 Zellen.

Wichtig ist ein während der gesamten Testdauer fortlaufendes exponentielles Zellwachstum. Ist dieses beendet, erreichen die Zellen eine stationäre Phase bzw. werden konfluent, was das Ergebnis beeinträchtigen würde. Daher ist ein linearer Wachstumsbereich Voraussetzung. Zur Ermittlung der geeigneten Zellmenge wurden verschiedene Konzentrationen pro Well ausgesät, zu bestimmten Zeitpunkten abgestoppt und mithilfe des Kristallviolettassays ausgewertet. Die jeweiligen Absorptionswerte der unterschiedlichen Aussaatmengen wurden gegen die erfolgte Inkubationszeit aufgetragen.

Die Absorption des Lösungsmittels (Blindwert) beträgt ungefähr 0.2. Aufgrund von sogenannten „Platzproblemen“ existiert ein Gleichgewicht zwischen absterbenden und neu wachsenden Zellen. Nicht optimal wären daher ein hoher Absorptionsanfangswert, der mit zu hoher Zelldichte einhergehen würde und eine damit verbundene sehr kurze exponentielle Wachstumsphase.

Zur Bestimmung der richtigen Aussaatmenge wurden verschiedene Passagen der Fibroblastenkulturen verwendet. Als am besten geeignet erwies sich die zweite Passage, da sich bereits nach der vierten Passage ein Ausdifferenzieren der Zellen beobachten ließ. Fibroblasten als Bindegewebszellen sind teilungsaktiv. Sie wachsen solitär und sind somit leicht in Kultur zu halten.

Keratinocyten sind stabiler als Fibroblasten, jedoch aufwendiger für die Kultur und die Zellzusätze bedeutend kostspieliger, weswegen sie nur für den MTT-Test (s.7.6.3.) zur Anwendung kamen.

Die Aussaatdichte der humanen Fibroblasten betrug zwischen 1000 und 5000 Zellen pro Well. Es wurde bis zu einem Zeitraum von fünf Tagen inkubiert und alle 24 Stunden abgestoppt, so dass sich fünf Messzeitpunkte ergaben.

In **Abb.7.17** sind diese Messergebnisse dargestellt.

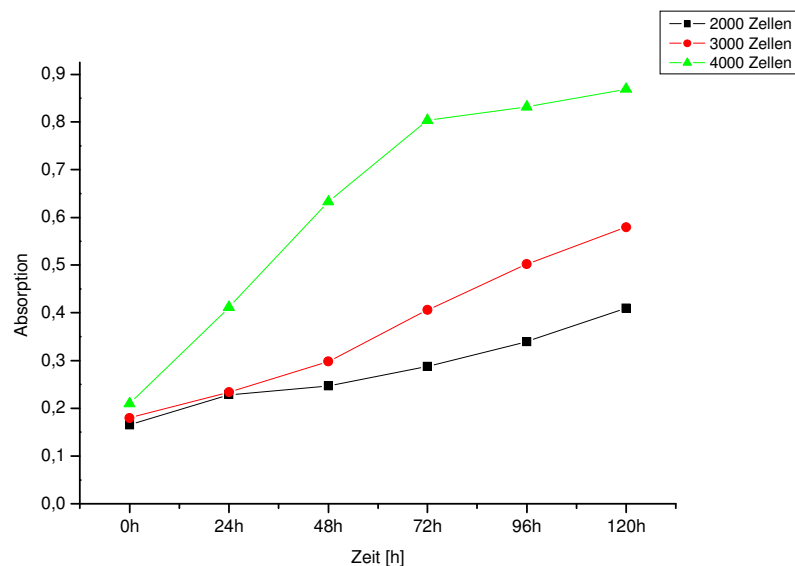


Abb.7.17 Aussaat von humanen Fibroblasten mit verschiedenen Zellzahlen pro Well und daraus resultierende Absorption

Es wird deutlich, dass bei einer Aussaatdichte von 4000 Zellen pro Well bereits nach 72 Stunden kein exponentielles Wachstum mehr vorlag und die Zellen eine stationäre Phase erreichten. Bei 3000 Zellen pro 100µl war ein nahezu linearer Bereich gegeben, so dass diese Zellzahl für die Aussaat zur IC₅₀-Wert-Bestimmung ausgewählt wurde.

Die Inkubationszeit bis zur Substanzzugabe wurde auf 48 Stunden festgelegt. Um danach eventuell auftretende Konfluenz ausschließen zu können, wurde der Test nach weiteren drei Tagen durch Zugabe von Glutardialdehyd beendet (vgl.Kap.9) und auf dem üblichen Weg ausgewertet.

Die IC₅₀-Wert-Bestimmung erfolgte aus 2-3 unabhängigen Messungen durch Bildung des Mittelwertes. Die Auswertung erfolgte mittels Gleichung 7.3. Nach erfolgter Substanzzugabe wurde nach 72 Stunden abgestoppt. Die Ergebnisse der Platin(II)-Alkylaminkomplexe finden sich in Kapitel 3.

7.5.2. MTT-Test an Fibroblasten und Keratinozyten

Neben der Bestimmung des IC₅₀-Wertes wurde der MTT-Test angewandt, um den Einfluss ausgewählter Verbindungen auf die Viabilität der Zellen zu ermitteln. Hierzu wurden sowohl Fibroblasten als auch Keratinozyten verwendet. Die Auswertung erfolgte über die Bildung des roten Formazan-Salzes, welches nur in lebenden, intakten Mitochondrien gebildet werden kann (s.7.1.1.). Je wirksamer eine Substanz ist, desto mehr wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen gehemmt und desto weniger Farbbildung tritt auf, welche wiederum über die Absorption ermittelbar ist. Über diese Absorption kann die Proliferation bzw. Viabilität erhalten werden, indem das prozentuale Wachstum bezogen auf die Substanz-unbehandelten Zellen graphisch aufgetragen wird. Die Ergebnisse sind ab **Abb.7.18** dargestellt. Die Daten finden sich im Anhang, Kap.10.

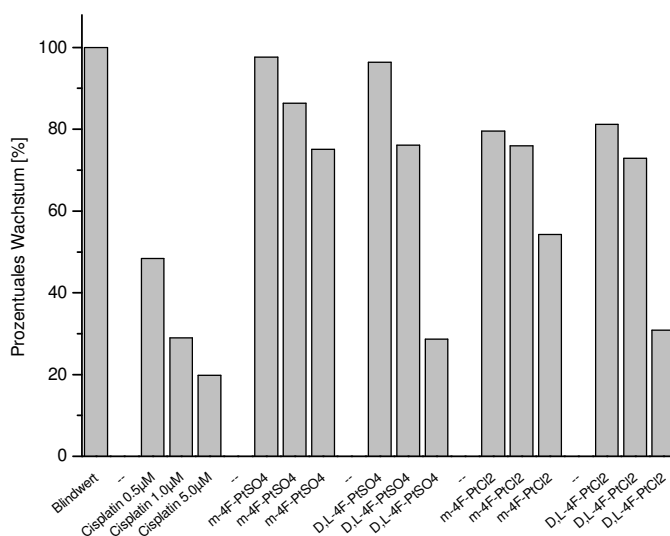


Abb.7.18a Einfluss ausgewählter Platin(II)-Komplexe auf die Viabilität von Fibroblasten

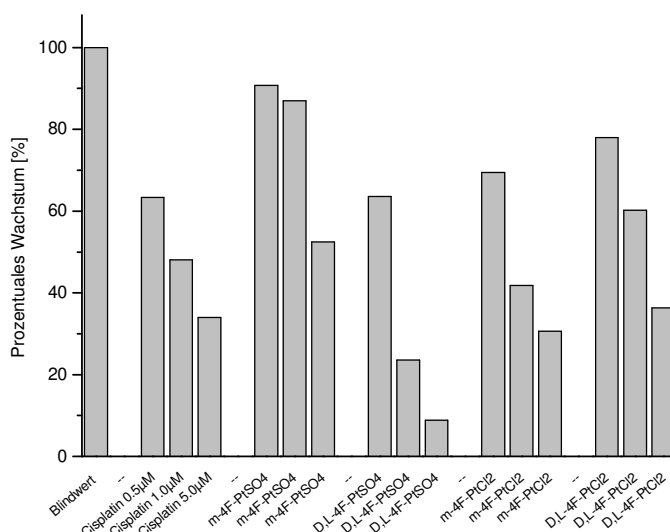


Abb.7.18b Einfluss ausgewählter Platin(II)-Komplexe auf die Viabilität von Keratinozyten

Als Leitsubstanzen dienten verschiedene symmetrische Platin(II)-Verbindungen.

Cisplatin schränkte die Viabilität besonders an den Fibroblasten ein. Mit $0.5\mu\text{M}$ der Substanz wurde bereits eine Minderung um 50% hervorgerufen. An Keratinozyten wurde für ein vergleichbares Ergebnis eine Konzentration von $1.0\mu\text{M}$ benötigt.

Die Komplexe **4F-PtSO₄** und **4F-PtCl₂** zeigten an Fibroblasten erst bei Zugabe von $5\mu\text{M}$ eine Überlegenheit der D,L- gegenüber der meso-Konfiguration im Hinblick auf die Aktivität. Bei geringerer Substanzzugabe von 0.5 und $1.0\mu\text{M}$ war zwischen den Isomeren kein großer

Unterschied mehr ersichtlich. Ebenso gab es keinen Vorteil eines Chlorids als Abgangsgruppe, wie es bei der Zytotoxizitätsuntersuchung der Fall war. Die Aktivität von Cisplatin wurde nicht erreicht.

Betrachtet man im Folgenden nun die Wirksamkeit derselben Verbindungen an humanen Keratinozyten, ließ sich ein größerer Unterschied der Konfiguration im Hinblick auf eine Viabilitätsbeeinflussung beobachten. Besonders **D,L-4F-PtSO₄** übte einen deutlichen Effekt aus. In Konzentrationen von 0.5 und 1.0µM wurde ein stärkerer Einfluss als durch Cisplatin auf das Zellwachstum sichtbar. Bei Zugabe von 5.0µM Substanz war letztendlich nur noch ein sehr geringes Zellwachstum vorhanden.

Interessanterweise war solch ein herausragender Unterschied beim Chlorokomplex **4F-PtCl₂** nicht gegeben. Die Wirkung blieb mit der von Cisplatin vergleichbar.

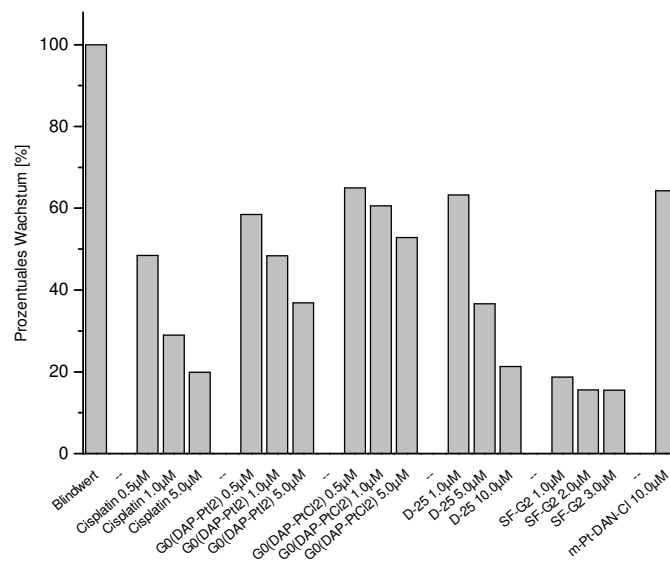


Abb.7.19a Einfluss von Dendrimern und **m-4F-Pt-DAN-Cl** auf die Viabilität von Fibroblasten

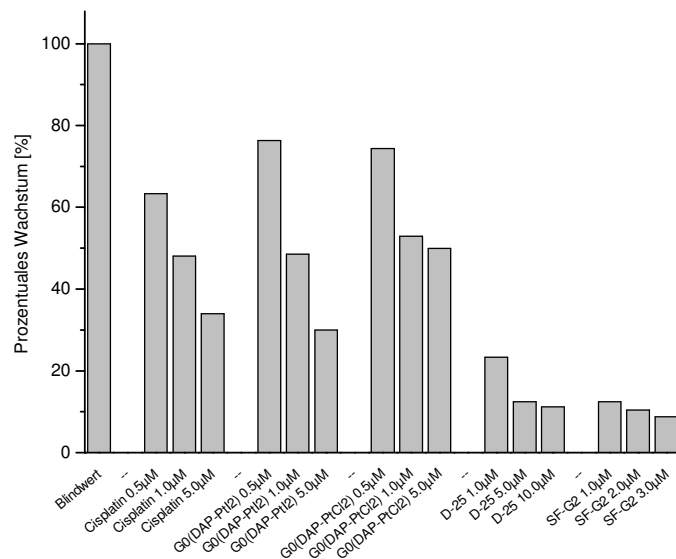


Abb.7.19b Einfluss von Dendrimeren auf die Viabilität von Keratinozyten

Schließlich sollte der Einfluss ausgewählter Dendrimeren auf die Viabilität von humanen Fibroblasten und Keratinozyten untersucht werden. Die deutlichste Hemmung auf das Zellwachstum war mit D-25 und SF-G2 zu erreichen. D-25 und SF-G2 sind Dendrimergrundkörper der zweiten Generation, an die noch keine Platinanbindung erfolgt war. Sie wurden als sogenannte „neutrale“ Verbindung für eine Abschätzung auf Tumorzellselektivität eingesetzt. Hierdurch sollte getestet werden, inwiefern die Grundkörper selbst proliferationshemmende Eigenschaften besitzen. Interessanterweise war ein stärkerer Einfluss gegenüber den Platin-gekoppelten Verbindungen vorhanden. Besonders an Keratinozyten ließ sich eine Reduktion zu mehr als 80% beobachten. Es zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit der Literatur, in der Zytotoxizität auf humane Zellen mit wachsender Generation nachgewiesen werden konnte (vgl. Kap.1). Fibroblasten schienen geringfügig stabiler gegenüber einer Einwirkung von D-25 zu sein; bei 1µM war immerhin zu 63% ein Zellwachstum möglich. Der Einfluss von SF-G2 ist vergleichbar mit dem an Keratinozyten und erwies sich in beiden Fällen toxischer als D-25, obwohl nur geringere Konzentrationen zur Anwendung kamen. Betrachtet man schließlich die Platin-gekoppelten Dendrimeren $G_0(\text{DAP-PtI}_2)$ und $G_0(\text{DAP-PtCl}_2)$, zeigte sich eine geringfügig stärkere Beeinflussung der Viabilität von Fibroblasten als von Keratinozyten. Interessanterweise wirkte sich die iodidierte Verbindung an beiden Zelllinien deutlicher aus als sein chlorierter Partner.

7.6. Diskussion der Ergebnisse der pharmakologischen Testung

7.6.1. Zytotoxische Untersuchungen an humanen Krebszelllinien

An allen verwendeten Zelllinien ließ sich beobachten, dass die D,L-konfigurierten Verbindungen stärker wirksam waren als die jeweiligen meso-Komplexe. Dieses Ergebnis ist bereits aus früheren Studien bekannt [208,241]. Die Chemosensitivität von MCF-7-Zellen gegenüber D,L-konfigurierten Substanzen war im Vergleich zur meso-Konfiguration erhöht. Außerdem nahm die Platinakkumulation aufgrund höherer Zellaufnahme zu [206]. Am Beispiel von **D,L-4F-PtSO₄** konnte gezeigt werden, dass dieser Komplex selektiver und schneller als sein meso-konfiguriertes Isomer in die Zelle und den Zellkern aufgenommen werden kann [207].

Dieselben Beobachtungen ließen sich auch bei den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Untersuchungsergebnissen von **4F-PtSO₄**, **4F-PtCl₂** sowie **4F-OH-Mal** machen.

Zur Optimierung der Reaktionskinetik wurden verschiedene Malonsäurederivate synthetisiert. Mit Ausnahme von **m-4F-SM-Mal** wurde von der Hydroxymalonsäure als Abgangsgruppe ausgegangen und dort anknüpfend einige Variationen durchgeführt. Frühere Vergleiche der Toxizität von Cisplatin und Hydroxymalonsäure-Diamminplatin(II)-Komplexen zeigten bei letztgenanntem höhere Selektivität bei Auslösung der Apoptose sowie langsamere Freisetzung des reaktiven Platins aus den Komponenten mit chelatgebundener Dicarbonsäure [207]. *In vivo* ließ sich eine stärkere Aktivität als *in vitro* erreichen [209].

Die Einführung einer NH₂-Gruppe anstelle des OH-Restes brachte im Chemosensitivitätsassay keine Wirkungssteigerung. Mit **m-4F-NH₂-Mal** waren vergleichbar zytostatische Effekte zu erzielen wie mit **m-4F-OH-Mal**. In der Literatur finden sich Beispiele von 1,2-Diaminocyclohexankomplexen, die ebenfalls mit Aminomalonsäure umgesetzt wurden [175]. Neben guter chemischer Stabilität war die Wasserlöslichkeit deutlich erhöht. Der NH₂-Rest sollte eine kovalente Bindung zu Carriermolekülen ermöglichen. Diese Verbindung besaß antiproliferative Effekte [210]. Durch Einführung einer Ester-, Ether- aber auch einer Amidgruppe anstelle des Hydroxylrestes ließ sich die Aktivität an MCF-7-Zellen steigern. Am potentesten erwies sich hierbei **m-4F-AM-Mal** mit einem T/C_{corr}-Wert von 21% bei einer Konzentration von 1.0µM sowie -13% bei 5.0µM. Damit übertraf dieser Komplex sogar die Wirksamkeit von **D,L-4F-OH-Mal**.

M-4F-Mal-Ester und **m-4F-MeO-Mal** reduzierten das Zellwachstum auf 7% bei 5.0µmolarer Substanzeinwirkung. In vorangegangenen Studien lassen sich vergleichbare

Umsetzungen von Platin(II)-Verbindungen mit Dicarbonsäurederivaten als Abgangsgruppe finden. Mit einem Esterrest war eine erhöhte Permeabilität aufgrund gesteigerter Lipophilie durch Zellmembranen gegeben [211]. Bei Untersuchungen zu Interaktionen mit GMP und DNA zeigte sich, dass der Esterrest während der Reaktion mit 5'-GMP hydrolysiert und die DNA auf andere Weise als Cisplatin angegriffen wird [212].

Die Zytotoxizitätstestung an L1210-Zellen von Cisplatin und Malonatfunktionen als Abgangsgruppe wies zwar eine stärkere Toxizität von Cisplatin auf, aber auch eine schnellere Inaktivierung. Malonsäuregruppen wirkten durch langsamere Freisetzung der aktiven Platin(II)-Spezies erst nach längerer Inkubationszeit und zeigten weniger Nebenwirkungen, wie z.B. eine verminderte Nierenschädigung [116,213]. Im Gegensatz zu Cisplatin verläuft die Zellaufnahme linear und erreicht nicht so schnell ein Plateau.

Durch Anbindung von Carriern an Ester-, Amid- und Etherfunktionen können sogenannte Prodrugs erhalten werden. Die lipophileren Reste im Vergleich zur OH-Gruppe des ursprünglichen Malonsäurerestes könnten die Membranpermeabilität der Verbindungen erhöhen und damit auch deren Zytotoxizität. Durch einen solchen Schutz der OH-Gruppe werden die Nebenwirkungen noch weiter zurückgedrängt [214].

Der pH-Wert scheint dabei ebenfalls eine Rolle zu spielen, wie sich bereits bei den pH-abhängigen Reaktivitätsuntersuchungen (Kap.6) zeigte. Der Zusammenhang zwischen der Aktivität der jeweiligen Malonsäurederivate sowie einer pH-Änderung wurde dort ausführlich diskutiert.

Unter den getesteten [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]platin(II)-Komplexen stellte **RR-4F-Ph/iProp-Cl₂** die Verbindung mit der stärksten antiproliferativen Wirksamkeit dar. Bei den LNCaP/FGC-Zellen waren bereits in Konzentrationen von 0.05µM und 0.1µM zytozide Effekte erreichbar.

Die jeweilige Aktivität der untersuchten Substanzen war neben der Konfiguration am Ethylendiamin-Neutralligand auch von der Zelllinie abhängig. Beim **4F-Ph/iProp-Cl₂** stellte sich die RR-konfigurierte Verbindung in allen Fällen als die wirksamste heraus. An den MDA-MB-231 Zellen war die höchste Enantioselektivität für die einzelnen Enantiomerenpaare im Vergleich zu den anderen verwendeten Zelllinien festzustellen. Hier ließ sich eine deutliche Bevorzugung der SR-Konfiguration von **4F-Ph/iProp-Cl₂** sowie der RS-Form der ethylierten Verbindung **4F-Ph/Et-Cl₂** erkennen.

Durch Einführung eines C2-tertiären Butylrestes war keine weitere Wirkungssteigerung zu erreichen; an der LNCaP/FGC-Zelllinie trat sogar eine Wirkminderung gegenüber den

übrigen alkylierten Komplexen auf. Einzig an den MDA-MB-231-Zellen war der butylierte Komplex **4F-Ph/tBut-Cl₂** der ethylierten Komponente **4F-Ph/Et-Cl₂** überlegen, erreichte jedoch nicht die Wirkung von **4F-Ph/iProp-Cl₂**.

Um zu untersuchen, ob eine Variation des C1- Arylrestes zu einer Optimierung des Einflusses auf das Zellwachstum trotz einer tertiären Butylgruppe am C2 führt, wurde der 4-Fluor-Phenylrest ausgetauscht. An den MCF-7- sowie an den MDA-MB-231-Zellen war dies nicht von Vorteil. Anders sah es bei den LNCaP/FGC-Zellen aus. Hier überwog die Verbindung mit unsubstituiertem Arylring deutlich. So zeigte **RR-Ph/tBut-Cl₂** bereits bei 0.5µM Konzentration eine starke zytozide Wirkung, wobei überraschenderweise **RR-** und **SS-4F-Ph/tBut-Cl₂** den geringsten Effekt aller getesteten Substanzen besaßen. Die Einführung einer Hydroxy- oder Methoxygruppe schien nur bedingt von Vorteil zu sein, was früheren Untersuchungen entspricht [109,239]. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Brustkrebszelllinien waren an MDA-MB-231-Zellen nur geringe Wirkungen auf das Zellwachstum festzustellen. An MCF-7-Zellen besaßen nur **RR-** und **SS-OH-Ph/tBut-Cl₂** einen Effekt. Einen unerwartet hohen Einfluss hatten diese Verbindungen an den LNCaP/FGC-Zellen, wobei sogar **RR-MeO-Ph/tBut-Cl₂** annähernd dieselbe starke Proliferationshemmung ausübte wie der unsubstituierte Komplex **Ph/tBut-Cl₂**. Die LNCaP/FGC-Zellen schienen demnach sensitiver gegenüber hydroxylierten Substanzen zu sein.

In früheren Studien wurden ebenfalls die Substituenteneinflüsse von F- und OH-Gruppen tragenden Arylresten an MCF-7-Brustkrebszellen verglichen [46]. Der 4F-Ligand war in der Aktivität überlegen.

Die Abhängigkeit der *in vitro*-Aktivität von den Resten am C1 und C2 sowie von der Konfiguration des Ethylendiaminliganden lässt sich stereochemisch erklären.

Nach Koordination des Neutralliganden an Platin ist dessen Flexibilität weitgehend eingeschränkt. Der entstehende Fünfringchelate ist gewellt und kann in zwei Formen vorliegen, der δ- und der λ-Form. Diese beiden Formen können durch Ringinversion ineinander übergehen. Eine solche Gleichgewichtseinstellung ist in **Abb.7.20** am allgemeinen Beispiel eines Komplexes mit C1-Aryl- und C2-Alkyl-Substitution dargestellt.

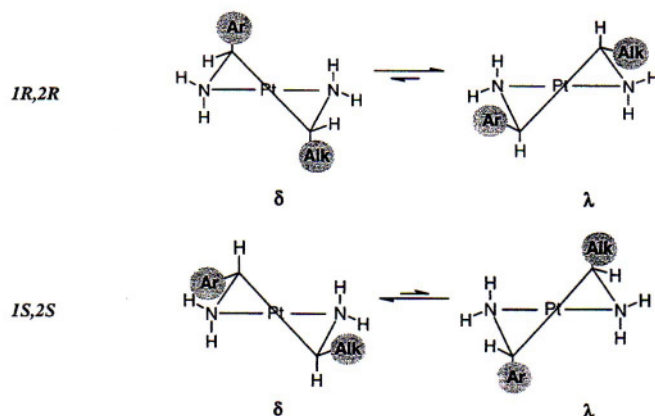


Abb.7.20a δ - λ -Übergang von RR- und SS-konfigurierten Verbindungen

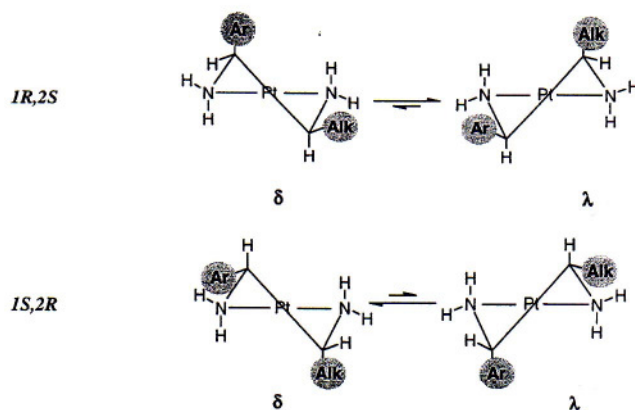


Abb.7.20b δ - λ -Übergang von RS- und SR-konfigurierten Verbindungen

Zwei Konformere unterscheiden sich in der Anordnung der Substituenten am C1 und C2. Bei den im Liganden D,L- bzw. threo-konfigurierten Verbindungen können die Substituenten bisaxial oder bisäquatorial orientiert sein (s. **Abb.7.20a**). Bei den meso- bzw. erythro-konfigurierten Komplexen dagegen ist eine dieser Gruppen axial, die andere äquatorial angeordnet (s. **Abb.7.20b**) [215].

Im Falle der threo-Komplexe tritt so gut wie kein λ - δ -Übergang auf. Bei erythro-Verbindungen sind λ - und δ -Form gleichwertig bzw. liegen im selben Verhältnis vor, wenn die Reste sowohl an C1 als auch C2 identisch sind. Verschiedene Substituenten können demnach eine Ringinversion einschränken.

Für eine qualitative Abschätzung, ob ein λ - δ -Übergang stattfindet oder welche Form in Lösung bevorzugt vorliegt, können Kopplungskonstanten und chemische Verschiebungen aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren herangezogen werden. Wichtig sind hierbei die Kopplungskonstanten ^3J der Kopplung von ^{195}Pt und den Methinprotonen. Bei threo-konfigurierten Verbindungen

sind diese bei bevorzugter äquatorialer Anordnung ${}^3J_{\text{CH-CH}} = 11\text{-}12\text{Hz}$ und ${}^3J_{\text{CH-Pt}} \approx 0\text{Hz}$. Letzteres ist ein theoretischer Wert, da die Kopplungskonstanten meist zu gering für eine Bestimmung sind. Bei erythro-konfigurierten Substanzen betragen die Kopplungskonstanten ${}^3J_{\text{CH-Pt}}$ maximal 80Hz, sobald die Methinprotonen äquatorialständig sind und erreichen ein Minimum von 0Hz, wenn axiale Orientierung vorliegt. Hierbei besteht demnach eine Abhängigkeit zwischen der Kopplungskonstante und einem λ - δ -Übergang. Die CH-Resonanzen mit Platin-Satelliten liegen um ${}^3J_{\text{CH-Pt}} = 80\text{Hz}$ [216-218]. Existiert ein Gleichgewicht zwischen der λ - und δ -Form, ist ${}^3J_{\text{CH-CH}}$ ungefähr 5-7.5Hz [218,219]. Dieses axial-äquatoriale Gleichgewicht ist abhängig von Interaktionen zwischen den Atomen des Chelatrings sowie von Interaktionen mit weiteren Liganden, welche am Platin gebunden sind [220].

Im ${}^1\text{H-NMR}$ -Spektrum findet sich durch einen Wechsel von einer λ - zur δ -Form im Falle einer meso-Konfiguration nur ein Signal für die NH-Protonen sowie ein Signal für Methinprotonen. Bei threo-konfigurierten Verbindungen treten für NH zwei Signale auf. Es existiert daher nur ein Konformer mit bevorzugt äquatorial angeordneten Ringen [221]. Vergleicht man die Kopplungskonstanten der am C2 ethylierten sowie isopropylierten Platin(II)-Komplexe, lassen sich strukturelle Unterschiede erkennen, welche die höhere Aktivität und stärkere Enantioselektivität besonders der RS/SR-Enantiomere von **4F-Ph/iProp-Cl₂** erklären. Die Kopplungskonstanten betragen hier ${}^3J_{\text{CH-CH}} = 4.8\text{Hz}$ und ${}^3J_{\text{CH-Pt}} = 81\text{Hz}$, d.h., das Konformer hat einen axialständigen Aromaten und eine äquatorialständige Alkylgruppe. Diese Form liegt nahezu quantitativ vor. Bei steigender Temperatur kommt es zu einer langsamen Konversion, die in reduzierten Konstanten von ${}^3J_{\text{CH-CH}}$ und ${}^3J_{\text{CH-Pt}}$ resultiert. Diese langsame Interkonversion ist häufig bei Amininen, die mit sperrigen Resten, sogenannten Bulkliganden, substituiert sind.

Die Rotation um die Pt-N(7)-Bindung an der DNA sowie die Konversion sind mit kleinen Aminliganden schneller möglich [222].

Für die RS- und SR-Isomere von **4F-Ph/Et-Cl₂** liegt deshalb eine axiale Orientierung des Arylrings nur noch zu ungefähr 75% vor (${}^3J_{\text{CH-CH}} = 4.5\text{Hz}$; ${}^3J_{\text{CH-Pt}} = 60\text{Hz}$), da eine bessere Rotation als beim sterisch anspruchsvolleren **4F-Ph/iProp-Cl₂** gewährleistet ist.

Die Konformation des Chelatrings ist also mitentscheidend für die Bindung an die DNA. Da die DNA ein chirales Molekül darstellt, reagieren auch chirale Verbindungen enantioselektiv mit den Basenpaaren [223]. Die Hydrolyse geschieht mit derselben Reaktionskinetik, die

resultierenden diastereomeren Addukte reagieren allerdings im zweiten Schritt verschieden (s. auch Kap.6).

Threo-konfigurierte Verbindungen können aufgrund einer flacheren Konformation leichter als erythro-Formen mit Nucleobasen interagieren. Die bisäquatoriale Orientierung wäre bevorzugt, ein axialständiger Ligand scheint eine Annäherung zu behindern [54,140]. Das erklärt die allgemein höhere Antitumoraktivität der RR- und SS-Enantiomere gegenüber der von RS- und SR-konfigurierten Komplexen.

Bei den untersuchten Verbindungen zeigten die RR-konfigurierten Verbindungen im Vergleich zu ihren SS-Isomeren eine stärkere Wirksamkeit an den verwendeten Karzinomzelllinien mit Ausnahme von **SS-Ph/tBut-Cl₂** an den LNCaP/FGC-Prostatakarzinomzellen.

Es scheint eine stereochemische Spezifität von Platin beim Membrantransport sowie der DNA-Erkennung zu existieren. An Untersuchungen von Komplexen, die einen 1,2-Diaminocyclohexan-Liganden trugen, zeigte sich das RR-Isomer am aktivsten beim Transport und bei der Interaktion mit Zielmolekülen wie der DNA, Membranproteinen und Plasmakomponenten [224,225]. So besaß es z.B. eine höhere Affinität zu HMG-Proteinen im Vergleich zur SS-konfigurierten Verbindung [240]. Beim RR-Isomer ließ sich eine höhere Zellaufnahme durch Wechselwirkung mit den Phospholipidbilayern der Membran beobachten, welche ebenfalls R-konfiguriert sind und daher als Kanäle für die chiralen Komplexe den Transport erleichtern können. Auch in weiteren Arbeiten erwiesen sich RR-Enantiomere als die aktiveren Komponenten [226-228]. Mit ihnen scheinen mehr monofunktionelle Addukte gebildet zu werden, während das SS-Enantiomer allerdings einen schnelleren Angriff an der DNA ausüben kann [229]. Zusätzlich existieren Unterschiede zwischen den Isomeren in der thermodynamischen Destabilisierung und konformativen Verzerrung, die in der DNA durch 1,2-d(GpG) intrastrand cross-links induziert werden [230].

Die Aktivität ist außerdem abhängig von der Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindung. Diese H-Brücken sind wichtig für Bindungen zwischen dem exozyklischen O(6) des Guanosins und der NH₂-Gruppe des Platin(II)-Liganden sowie dem 5'-endständigen PO-Atom [231,232]. Zudem sind sie in der Lage, die geformten Addukte zu stabilisieren [233,234].

Im Neutralliganden enthaltene Alkylgruppen beeinflussen die Kinetik der bifunktionellen Addukte. Durch sterische Hinderung, geringe H-Bindungsfähigkeit und eingeschränkte Rotation der Pt-N(7)-Bindung bleiben die Addukte länger im monofunktionellen Zustand und besitzen eine höhere Reaktivität gegenüber Nucleophilen [235,236]. Dies wäre eine mögliche

Erklärung für die höhere Antitumoraktivität des **4F-Ph/iProp-Cl₂** im Vergleich zum **4F-Ph/Et-Cl₂**. Eine hohe sterische Hinderung, wie sie beim Komplex **4F-Ph/tBut-Cl₂** vorhanden ist, könnte eine geringere Geschwindigkeit der Interaktion mit Bionukleophilen bedingen. Es könnte aufgrund von besserer Stabilisierung des Übergangszustandes während der Substitutionsreaktion zu einem Wechsel vom assoziativen SN₂- zum dissoziativen SN₁-Mechanismus kommen [237].

Die hier untersuchten Komplexe mit Ethyl- und Isopropylresten am C2 des Neutralliganden zwingen den Arylring in hohem Maße in eine axiale Position. Dies führt zu einer eingeschränkten Bindung an das Zielmolekül. Allerdings ist die Konformationsänderung an der DNA nach bifunktioneller Bindung deutlicher ausgeprägt. Sperrigere Liganden ändern die Interaktion mit Proteinen und Enzymen der DNA-Addukte und beeinflussen die Lebenszeit der Konformation der Pt-d(GpG)-Bindungsseite. Der Carrierligand ist daher mitentscheidend für Aktivität, Tumorzellselektivität und eventuelle Kreuzresistenz zu Cisplatin [238].

Die neu synthetisierten Verbindungen zeigten demnach alle eine gesteigerte Sensitivität der Tumorzelllinien im Vergleich zu Cisplatin. An den LNCaP/FGC-Zellen wurde die Resistenzentwicklung gegenüber Platinkomplexe zurückgedrängt und eine deutliche, antiproliferative Wirkung erzielt.

7.6.2. Untersuchungen an humanen Fibroblasten und Keratinozyten

Bei den Untersuchungen der an Brustkrebs- sowie Prostatakarzinomzellen aktiven symmetrischen Platin(II)-Komplexe an humanen Fibroblasten und Keratinozyten konnte keine reine Selektivität für Tumorzellen nachgewiesen werden. Besonders die Komplexe **4F-PtSO₄** und **4F-PtCl₂** zeigten eine nicht zu unterschätzende Aktivität. Das wurde sowohl an den Ergebnissen der IC₅₀-Wert-Bestimmung an Fibroblasten als auch an der Untersuchung der Messung der Viabilität mittels MTT-Test deutlich.

Bereits in früheren Studien zum Einfluss von Cisplatin auf das Zellwachstum von humanen Fibroblasten wurde erhöhte Zytotoxizität im MTT-Test festgestellt [243]. Mit dem MTT-Test soll ein zelluläres Wachstum sowie ein Überleben der Zellen nach Substanzeinwirkung gut mit Chemosensitivitätsmessungen verglichen werden können, da die erhaltene Absorption proportional zur Anzahl der Zellen ist. Außerdem zeigte sich der MTT-Test als geeignet zur Untersuchung der Proliferation von Mammakarzinomzellen [244].

In der Literatur lassen sich Beispiele zu Metallioneneinfluss auf die Transkription und Genexpression an Fibroblastenlinien finden [245,246]. Durch Cisplatin kommt es zur Zelldegeneration durch Blockade der Mitose in der G2-Phase des Zellzyklus. Bei Einwirkung

von 10µg/ml Cisplatin war bereits nach 5-10 Stunden eine abnorme Zellstruktur der Fibroblasten zu erkennen [247]. Andererseits soll die Ausschleusung von Cisplatin-DNA-Addukten in normalen Fibroblastenzellen erhöht sein, und nach andauernder Repairzeit soll die Zahl der Addukte sinken [248]. Die Sensitivität scheint von den verschiedenen Zelllinien abhängig zu sein. Viele Untersuchungen basieren auf Hühner-Fibroblastenlinien. Im Gegensatz zu Cisplatin soll Oxaliplatin an Fibroblasten nicht mutagen wirken. Dies steht im Zusammenhang mit Resistenz und Zweittumoren [249].

Es überraschte allerdings, dass die Dendrimergrundkörper SF-G2 und D25 ohne Platinbelegung so stark wirksam waren. Die Zytotoxizität scheint abhängig von der Generation des Dendrimer-grundkörpers sowie der Einwirkzeit der Substanz zu sein.

7.7. Zusammenfassung der Ergebnisse der pharmakologischen Testung

- An allen drei verwendeten Karzinomzelllinien war eine deutliche höhere Wirkung der D,L-konfigurierten Komplexe gegenüber ihrer meso-Form zu erkennen. Den größten Unterschied in der Aktivität zeigten die Ergebnisse an LNCaP/FGC-Zellen. Im Gegensatz zu den Brustkrebszellen zeigte Carboplatin dort seine potenteste Wirkung.
- An den MCF-7-Zellen war eine Steigerung der antiproliferativen Wirksamkeit durch Austausch der OH-Gruppe der Hydroxymalonsäure gegen lipophilere Rest zu erreichen. Dies geschah durch Veresterung, Amid- und Etherbildung. Alle diese Komponenten zeigten sich aktiver als Carboplatin. Am stärksten hemmend auf das Zellwachstum wirkte **m-4F-AM-Mal** und war somit noch effektiver als **D,L-4F-OH-Mal** ($T/C_{\text{corr}} = -13\%$ bei $5.0\mu\text{M}$). In einer Konzentration von $1.0\mu\text{M}$ wirkten **m-4F-Mal-Ester**, **m-4F-MeO-Mal** sowie **m-4F-AM-Mal** bereits zytotoxisch. Ein Ersatz der OH-Gruppe durch NH_2 ließ keine Wirkungssteigerung an den MCF-7-Zellen erkennen.
- An den MDA-MB-231-Zellen war eine schwächere Antitumoraktivität der symmetrischen Platin(II)-Komplexe mit chelatgebundener Dicarbonsäure im Vergleich zu den MCF-7-Zellen zu beobachten. **D,L-4F-OH-Mal** sowie **m-4F-MeO-Mal** wirkten zytostatisch bei $5.0\mu\text{M}$ mit T/C_{corr} -Werten von 7% und 20% nach 164 Std. bzw. 95 Std. Inkubationszeit.
- Bei der Untersuchung der asymmetrischen [1-Aryl-2-alkylethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe ließ sich nur zum Teil eine Wirkungssteigerung durch Enantiomertrennung von threo- und erythro-Form verzeichnen. Die deutlichsten Unterschiede zwischen den Isomerenpaaren waren hier an der LNCaP/FGC-Zelllinie zu beobachten. **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** und **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** erwiesen sich als die aktivsten Verbindungen. Diese beiden Komplexe erreichten bereits eine mit Cisplatin vergleichbare Wirksamkeit. So übte **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** in einer Konzentration von $5\mu\text{M}$ an LNCaP/FGC einen deutlich zytoziden Effekt aus: ($T/C_{\text{corr}} = -24\%$).
- Bei der Untersuchung des Einflusses der Alkylgruppe am C2 auf die Zellproliferation zeigte sich ausgehend von der methylierten Verbindung eine Wirkungssteigerung von der C2-Ethyl- zur Isopropylgruppe. An den verwendeten Karzinomzellen erwies sich **RR-4F-Ph/iProp-Cl₂** als Komplex mit der höchsten Antitumoraktivität. An den LNCaP/FGC-Zellen war bereits in einer Konzentration von $0.05\mu\text{M}$ ein T/C_{corr} -Wert

von -2% zu erreichen. An der MCF-7-Linie war 0.5µM des Komplexes für zytostatische Wirkung (T/Ccorr = 9%) notwendig. Zugabe von 1µM Substanz brachte zytoziden Einfluss. Die Einführung eines C2-tertiären Butylrestes belegte eine Wirkminderung mit Ausnahme an den MDA-MB-231-Zellen. Dort überstieg **RR-4F-Ph/tBut-Cl₂** die Aktivität von **4F-Ph/Et-Cl₂**. Bei allen eingesetzten Verbindungen war eine Überlegenheit der RR-Konfiguration gegenüber der SS-Form vorhanden.

- Um zu untersuchen, ob sich bei Erhalt eines C2-tertiären Butylrestes trotzdem eine Proliferationshemmung erreichen lassen kann, wurde anschließend der Arylrest am C1 variiert. An MCF-7- und MDA-MB-231-Zelllinien besaßen die Verbindungen mit einem 4F-Phenylring die stärkste Wirkung. An LNCaP/FGC-Zellen zeigten neben dem unsubstituierten **Ph/tBut-Cl₂** die Komplexe mit ortho-OH- sowie MeO-Arylring die besten Effekte. An den Brustkrebszelllinien ließ sich ein Vorteil der RR-Konfiguration erkennen. An der LNCaP/FGC-Kultur zeigte sich bei einer Isomerentrennung nur geringfügig ein enantioselektiver Einfluss im Hinblick auf eine Proliferationshemmung.
- Im MTT-Test ließ sich keine Selektivität für Tumorzellen nachweisen. Die Viabilität sowohl von humanen Fibroblasten als auch von Keratinozyten wurde z.T. stark beeinflusst. Getestet wurden die symmetrischen Platin(II)-Komplexe **4F-PtSO₄** und **4F-PtCl₂**. Es existierten Unterschiede im Hinblick auf Konfiguration und Wachstumshemmung. Die D,L-konfigurierten Komplexe besaßen stärkere Aktivität als ihre meso-konfigurierten Partner.
- Beim Einsatz der Dendrimere zeigte sich eine stärkere Toxizität der Dendrimergrundkörper D-25 und SF-G2 gegenüber solchen, die mit Platin gekoppelt waren.