

1 Einleitung

1.1. Krebserkrankungen und Therapiemöglichkeiten

In der heutigen Zeit stehen Krebserkrankungen in vielen Ländern nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen an zweiter Stelle aller krankheitsbedingten Todesfälle. In Deutschland gibt es zahlreiche Neuerkrankungen pro Jahr. Allein beim Brustkrebs waren 2005 rund 50.000 Frauen betroffen, davon verstarben 18.000 Patientinnen [1]. Diese Entwicklung beruht zum einen auf der deutlich gesteigerten Lebenserwartung der meisten Menschen und dem damit verbundenen Ansteigen altersbedingter Krankheiten und zum anderen am zunehmenden Einfluss von Risikofaktoren wie Rauchen (Lunge- und Kehlkopfkrebs), fett- und kalorienreiche Kost (Dickdarmkrebs), Alkoholkonsum und erhöhte UV-Einwirkung (Hautkrebs).

Das Zellwachstum ist ein sorgfältig regulierter Prozess, der den spezifischen Bedürfnissen eines lebenden Organismus genau angepasst ist. Wird der Kontrollmechanismus, der die Zellteilung steuert, gestört, so beginnt sich eine Zelle zu teilen, obwohl im Körper dafür kein Bedarf besteht. Unkontrollierte, schnelle, mitotische Zellteilungen sind das charakteristische Merkmal aller Neoplasien. Maligne Tumoren besitzen außerdem die Fähigkeit zu invasivem Wachstum, d.h., sie diffundieren in umliegendes gesundes Gewebe. Dringt der Tumor in Blutgefäße ein und kommt es zur Abnabelung von Tumorzellen mit Bildung von Tochtergeschwülsten, so entstehen Metastasen [2,3].

Zur Therapie maligner Tumore stehen im Wesentlichen der chirurgische Eingriff, die Strahlenbehandlung und die Chemotherapie zur Verfügung. Die jeweilige Indikation wird von Art und Ausdehnung des Tumors bestimmt und hat unterschiedliche Zielsetzungen: die Heilung, die Lebensverlängerung sowie eine Steigerung der Lebensqualität oder bessere Verträglichkeit einer onkologischen Therapie.

Der chirurgische Eingriff ist die Methode der Wahl zur Entfernung eines nicht metastasierten, lokal umschriebenen Tumors. Die Strahlentherapie wird zur Zerstörung von Tumorzellen angewendet. Der Angriff erfolgt am Zellkern und hat eine DNA-Schädigung zur Folge, so dass keine Vermehrung mehr möglich ist. Gesunde Zellen besitzen für solche Schäden ein Reparatursystem.

Die systemische Therapie mit Hormon- oder Chemotherapie dagegen ist indiziert zur

Behandlung von primär generalisierten Tumoren oder nach Lokalbehandlung ausgedehnt rezidivierender oder metastasierender Neoplasien.

Zur Chemotherapie kommen Verbindungen aus mehreren antineoplastisch wirksamen Substanzklassen zum Einsatz:

- Alkylanzien → kovalente Basenverknüpfung von DNA-Strängen. Die bei der Mitose notwendige Entspiralisierung und Trennung der Halbstränge der DNA wird unmöglich gemacht. Hierzu zählen Melphalan, Cyclophosphamid sowie N-Lost-Verbindungen und im weiteren Sinne Platinkomplexe.
- Antimetaboliten → chemisch modifizierte Pyrimidin- und Purinbausteine, die nach Einbau in die DNA zu Fehlfunktionen der Nukleinsäuren führen; z.B. Methotrexat, 6-Mercaptopurin und 5-Fluorouracil.
- Naturstoffzytostatika → z.B. Vinca-Alkaloide, Taxane, Anthrazykline und Bleomycin, die als Topoisomerasehemmer und Mikrotubuliaufbauhemmer dienen oder zu Strangbrüchen führen.

Als Hormontherapeutika, v.a. bei Mamma-, Endometrium- und Prostatakarzinom, kommen Antiöstrogene, Aromatasehemmer und Gestagene zum Einsatz [4,5].

1.2. Platinkomplexe in der Tumorthherapie

Bei vielen Krebserkrankungen sind Platinkomplexe die am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika in der Mono- oder Kombinationstherapie. Deren älteste Vertreter Cisplatin und Carboplatin (**Abb.1.1**) sind aufgrund ihres breiten Aktivitätsspektrums und ihrer guten Wirksamkeit immer noch Grundbestandteil mehrerer Therapieschemata. Durch mangelnde Selektivität für Tumorzellen kommt es jedoch häufig zu Nebenwirkungen. Sie sind trotz allem noch immer Leitverbindungen für die Suche nach neuen, verbesserten Zytostatika.

1.2.1. Cisplatin als Platinkomplex der ersten Generation

Die biologische Aktivität von Cisplatin wurde 1965 zufällig entdeckt. B.Rosenberg untersuchte das Verhalten von Escherichia-coli-Bakterien im elektrischen Feld und beobachtete enormes Längenwachstum und starke Filamentbildung. Er erkannte, dass nicht das elektrische Feld für dieses veränderte Verhalten verantwortlich war, sondern die

Produktion von *cis*-Diammindichloroplatin(II), welches sich im Versuchsverlauf aus der vermeintlich inerten Platinelektrode bildete. Später wurde auch dessen Antitumoraktivität nachgewiesen. Heute wird Cisplatin in 50% aller Chemotherapien eingesetzt, u.a. bei der Behandlung von Keimzell- und Ovarialtumoren, außerdem bei Blutkrebs und Zervixkarzinom, Tumoren im Kopf-Hals-Bereich und beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. Besonders bei Hodenkrebs werden Heilungsraten von über 90 Prozent erzielt. Die Anwendung erfolgt intravenös.

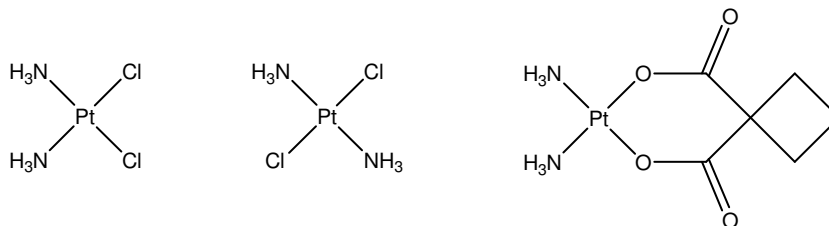


Abb.1.1 Cisplatin (links), Transplatin (Mitte) und Carboplatin (rechts)

1.2.2. Wirkmechanismus und biologische Angriffspunkte

Cisplatin reagiert mit einigen zellulären Komponenten, die nukleophile Stellen aufweisen wie DNA, RNA, Proteine, Membranphospholipide und thiolhaltige Moleküle. Nach passivem Transport der Dichloroverbindung durch die Zellmembran kommt es infolge der niedrigeren intrazellulären Chloridionenkonzentration im Zytoplasma (4mM gegenüber 100mM im extrazellulären Bereich) zur Hydrolyse in Mono- und Diaquaspezies, welche die eigentlichen aktiven Substanzen der Alkylierung darstellen (s. **Abb.1.4**). Das wichtigste Target ist die DNA mit ihren Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin. Die Bindung erfolgt über die N- und O-Atome dieser Basen und hierbei bevorzugt am N7-Atom des Purins des Guanin als Hauptangriffsstelle. Dort am nukleophilsten Zentrum ist die Elektronendichte für das elektrophile, positiv geladene Monoaquaplatin(II)-Molekül am höchsten [10,11,12].

Daraus resultieren ca. 65% aller gebildeten 1,2-Intrastrand-Addukte zwischen zwei N-7 von benachbarten Guaninbasen, weitere 25% zwischen dem N-7 eines Guanins und dem N-7 eines benachbarten Adenins und wenig 1,3-intra- und auch interstrand crosslinks [13]. Zusätzlich sind DNA-Protein-Vernetzungen vorhanden.

Als Folge kommt es zur DNA-Verkürzung, gestörter Basenstapelung, Verzerrung der Sekundärstruktur und durch eine Entwindung der Doppelhelix zum Verlust der thermischen Stabilität [14]. Transkription und Replikation sind nicht mehr möglich. Cisplatin-behandelte Zellen verharren so in der G2-Phase des Zellzyklusses [15,16].

Apoptose und Nekrose als Zellantwort sind besonders durch die 1,2-DNA-Addukte bedingt [17,18,19].

Auch Transplatin (**Abb.1.1**) wurde auf seine DNA-Bindung hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass es aufgrund seiner Stereochemie nur 1,3-intrastrand-Addukte bilden kann.

Abb.1.2 stellt die Angriffspunkte von Cisplatin an der DNA dar; **Abb.1.3** die Bindungsmöglichkeit an Nucleoside, noch einmal verdeutlicht an Guanin.

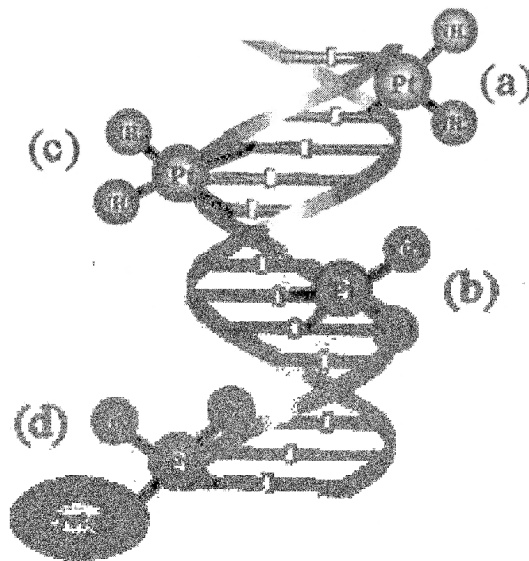


Abb.1.2 Hauptaddukte nach Interaktion von Cisplatin mit doppelsträngiger DNA.

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| a) interstrand crosslink | b) 1,2-intrastrand crosslink |
| c) 1,3-intrastrand crosslink | d) Protein-DNA crosslink |

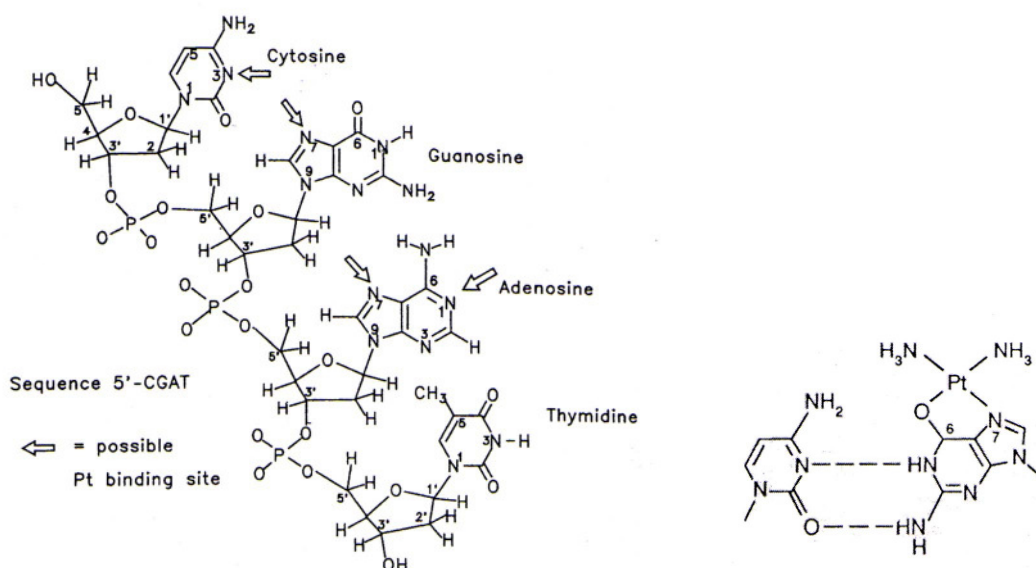


Abb.1.3 Teil von 4 Nucleosiden mit 4 Basen der DNA und mögliche Platinbindung (Pfeile) sowie Bindungsmöglichkeit von Cisplatin an Guanin

Für den Wirkmechanismus auf molekularer Ebene ist es von großer Bedeutung, ob die Bindung an die DNA durch das intakte Molekül erfolgt, durch ein Hydrolyseprodukt oder ein Produkt durch Reaktion mit körpereigenen Bestandteilen wie zum Beispiel Cl^- oder S-haltigen Molekülen als Elektronendonatoren. Toxizität und Aktivitätsunterschiede werden letztendlich der unterschiedlichen Reaktivität der Komplexe zugeschrieben. Da die Hydrolyse gleichzeitig für die Stabilität einer Substanz steht, soll am Beispiel von Cisplatin in **Abb.1.4** diese Reaktion in die aktiven Aquaspezies dargestellt werden.

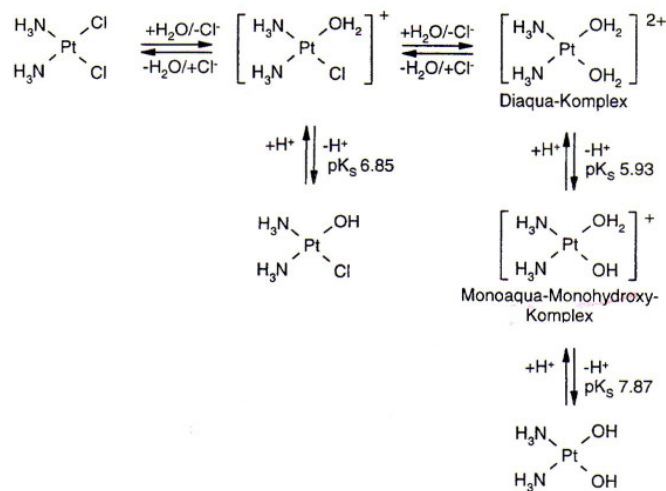


Abb.1.4 Hydrolyse von Cisplatin in Wasser. Der entstehende Diaqua-platinkomplex liegt bei physiologischem pH-Wert als Monoaqua-Monohydroxy-Komplex vor. Der erste Hydrolyseschritt ist *in vivo* am wichtigsten.

Da Platinkomplexe neben der DNA auch mit anderen zellulären Komponenten Reaktionen eingehen, welche unter anderem auch für die Resistenzentwicklung verantwortlich sind, soll im Folgenden auf diese kurz eingegangen werden. Vergleicht man den prozentualen Angriff, wird die Relevanz deutlich: 70-85% des Cisplatins werden an Proteine gebunden und nur ungefähr 1% erreicht die DNA.

1.2.3. Reparaturmechanismen und Resistenzentwicklung

Resistenz gegenüber Cisplatin ist insgesamt multifaktoriell und ergibt sich aus der Effektivität verschiedener Schutzsysteme. Hierbei kommen mehrere Gründe in Betracht: *i*) reduzierte Platinanreicherung durch unterschiedliche Aufnahme oder Ausschleusung in bzw. aus der Zelle; *ii*) erhöhte zytoplasmatische Entgiftung durch Glutathion (GSH) und/ oder Metallothioneine (MT), wobei in Cisplatin-resistenten Zellen besonders hohe GSH-Level

gefunden wurden und *iii*) gesteigerte Reparatur der Pt-DNA-Addukte z.B. durch Herausschneiden falscher DNA-Basenpaare [16,60] und defekter Tumorsuppressorproteine.

Es lässt sich zwischen primärer und sekundärer bzw. erworbener Resistenz unterscheiden. Viele Tumore wie Leber-, Kolorektal-, Prostata-, Mamma- oder Pankreaskarzinom sprechen von Anfang an auf eine Cisplatintherapie nicht an; andere, wie z.B. das Ovarialkarzinom, entwickeln erst mit der Zeit eine Resistenz.

1.2.3.1. NER-Proteine

NER-Proteine (*nucleotide excision repair*) sind u.a. verantwortlich für die Reparatur von Metall-DNA-Addukten. Sie erkennen die DNA-Veränderung, binden spezifisch an hydrophobe Stellen und schleusen die Addukte aus der Zelle [20]. In der mitochondrialen DNA (mtDNA) ist der NER-Weg nicht zu finden, was auch für die Zytotoxizität von Platin(II)-Komplexen wichtig ist [21], da solche DNA-Pt-Addukte die Reparatur überdauern können.

1.2.3.2. MMR-Proteine

MMR-Proteine (*mismatch repair*) erkennen wie NER-Proteine Basenpaar- bzw. DNA-Schäden, wodurch ebenfalls ein Reparaturmechanismus ausgelöst wird. Der MMR-Komplex bindet selektiv an die Platinaddukte, wobei das Carriermolekül wichtig ist [22]. Es werden schließlich Zellzyklusarrest oder Zelltod eingeleitet.

1.2.3.3. HMG-Proteine

Die HMG-Proteine (*high mobility group*) sind kleine chromatin-assoziierte Proteine, die u.a. an der Genregulation beteiligt sind. Sie besitzen zwei DNA-Bindungsdomänen, welche besonders die durch Cisplatin verursachten 1,2-d(GpG)-intrastrand crosslinks erkennen [24]. Für diese Erkennung ist die geknickte DNA-Konformation Voraussetzung [25]. Durch Bindung der HMG's werden die Addukte vor Reparaturmechanismen geschützt und dadurch die Zytotoxizität erhöht.

Reguliert werden diese Proteine z.B. durch das Tumorsuppressorgen p53, welches die Zellproliferation entweder durch Zellzyklusarrest-Induktion oder Apoptose als Zellantwort beeinflusst [26]. Mutationen im Bereich des p53-Genabschnittes führen oftmals zu einer verstärkten Resistenz.

1.2.3.4. Thiolhaltige Moleküle wie Glutathion und Metallothionein

Moleküle wie Glutathion (GSH, s. Formel **Abb.1.5**) und Metallothionein (MT) enthalten Schwefelatome, die als Elektronendonatoren eine hohe Bindungsaffinität zu Platin aufweisen [27] und dadurch zur Detoxifizierung beitragen. GSH (= γ -glutamylcysteinylglycine; Konzentration im Körper 0.5-10mM) bindet Platin entweder bereits im Zytoplasma oder die monofunktionellen Addukte im Zellkern. Die resultierenden Produkte werden durch eine ATP-abhängige GSH-S-Export-Pumpe aus der Zelle ausgeschleust [28].

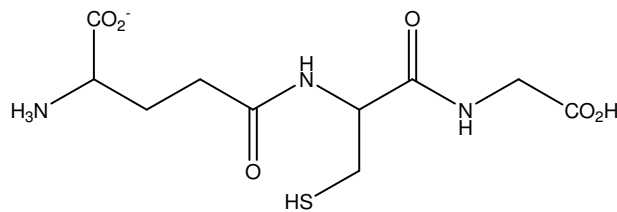


Abb.1.5 Glutathion (GSH)

Metallothionein (MT) besteht aus 61-62 Aminosäuren, 20 davon sind Cystein, und ist ebenfalls verantwortlich für die Entgiftung der Zelle von Metallionen. Der hohe Anteil an SH-Gruppen und dadurch freien Elektronenpaaren führt zur Platinaffinität, welches das in MT enthaltene Zink oder Cadmium austauscht und dabei seinen Aminliganden verliert [29].

1.2.4. Toxizität von Cisplatin

Gravierend ist die Vielzahl von Nebenwirkungen, die auf der Interaktion von Cisplatin mit körpereigenen Nukleophilen beruht und an der eine optimale Anwendung oft scheitert. Die ausgeprägte Nephrotoxizität in der frühen Entwicklungszeit führte nahezu zum Abbruch weiterer klinischer Testung der Substanz. Erst durch den Einsatz der forcierten Hydratisierung und Diurese ließ sich diese Toxizität kontrollieren. Durch Zufuhr von Kochsalz, Mannitol- oder Furosemidinfusion und Gabe von Mg²⁺, Ca²⁺ sowie K⁺ kann eine Nierenschädigung reduziert werden [5].

Außerdem sind Neuro- und Ototoxizität dosislimitierende Effekte. Durch Degeneration äußerer und innerer Haarzellen kann es zu Hörverlust und Tinnitus kommen [30]. Übelkeit und Erbrechen sind häufige Nebenwirkungen, denen durch die Gabe von 5-HT₃-Antagonisten in Kombination mit einem Glukokortikoid entgegengewirkt werden kann.

Aufgrund des insgesamt interessanten Aktivitätsprofils von Cisplatin wurden viele Versuche unternommen, um neue Verbindungen mit verbesserten pharmakologischen Profilen zu entwickeln. Neben der Suche nach Substanzen mit verminderter Reaktivität gegenüber Bionukleophilen und somit geringeren Nebenwirkungen wird große Hoffnung in die Therapieverbesserung durch Variation der chemischen Struktur gesetzt. Das Wirkspektrum soll erweitert und das Nebenwirkungsspektrum reduziert werden. Ebenso sind eine orale Gabe und ein breiteres Einsatzgebiet im Hinblick auf den Tumortyp wünschenswert. Ferner sind Löslichkeitsverbesserungen für eine optimale Applikation von Interesse.

Solche strukturellen Weiterentwicklungen können sowohl über Variation der Abgangsgruppe als auch des Neutralliganden stattfinden, da hier Einflüsse auf Struktur und somit zelluläre Erkennung der DNA-Addukte vorhanden sind. Es zeigte sich, dass der Austausch der Chloridliganden gegen andere Abgangsgruppen das Aktivitäts-, aber auch das Nebenwirkungsprofil des Cisplatins deutlich veränderte.

In den letzten dreißig Jahren sind mehrere tausend Platinkomplexe auf Wirksamkeit getestet worden. Ungefähr 30 Verbindungen erreichten präklinische und klinische Studien, von denen über die Hälfte wegen mangelnder Wirksamkeit oder nicht vertretbarer Toxizität wieder aufgegeben wurden. Weniger als 1% der Komplexe sind klinisch weiter verfolgt worden [21]. Wichtige Vertreter dieser neueren Derivate mit etablierten Indikationen sind Carboplatin und Oxaliplatin.

1.2.5. Platinkomplexe der zweiten Generation

Ständige Weiterentwicklungen führten zu *Carboplatin* (**Abb.1.1**), das 1986 in Deutschland zugelassen wurde und besonders aktiv beim Ovarialkarzinom ist. Die aktivitäts- und toxizitätsbestimmende chemische Modifizierung ist der Austausch der Chloridliganden des Cisplatins durch Cyclobutan-1,1-dicarboxylat (CBDCA). Hierdurch wurden die Stabilität und die Wasserlöslichkeit erhöht. Die Nephrotoxizität ist deutlich reduziert, während die Aktivität erhalten bleibt. Intrazellulär erfolgt die Aktivierung durch Reaktion mit Thioethern wie dem Methionin. Die sich bildenden Komplexe mit ringoffener CBDCA und einzähnig gebundenem Thioether können dann durch Guanin angegriffen werden und den Thioether vom Platin verdrängen. Anschließend erfolgt ein intrastrand crosslinking wie beim Cisplatin. Wie Cisplatin wird Carboplatin intravenös verabreicht. Es besitzt vergleichbare Aktivität, wofür aufgrund der geringeren Reaktivität jedoch eine *in vivo* 4 x höhere Dosis und eine 7.5 x längere Inkubationszeit als für Cisplatin notwendig sind [6].

Durch den Malonsäurechelatingring ist Carboplatin relativ inert gegenüber einem Angriff von Nukleophilen, was im Einklang mit den geringeren Nebenwirkungen steht. Bei vergleichbarer Dosierung tritt deutlich weniger Neuro- und Nephrotoxizität sowie Übelkeit und Erbrechen auf. Dosislimitierend ist allerdings die Myelosuppression mit vordergründiger Thrombozytopenie.

Hauptindikationen für Carboplatin sind derzeit neben dem Ovarialkarzinom Bronchialkarzinome, Kopf-Hals-Tumore und Zervixkarzinome.

Aufgrund der schnellen Resistenzentwicklung (s. Abschnitt 1.2.3.) werden Cisplatin und Carboplatin oft in Kombinationstherapien eingesetzt, um bessere Ansprechraten (RR=Response Rate) zu erzielen [7]. Dies geschieht meist mit Etoposid, Taxanen (z.B. Paclitaxel) oder Vinorelbin, womit Ansprechraten von 60% gegenüber der Monotherapie von RR 50% und 32% erzielt werden können [8]. Am vielversprechendsten sind beide Platinkomplexe zusammen mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (=Herceptin®) [9].

Ebenfalls als Platinkomplexe der zweiten Generation gilt *Nedaplatin*, das auch in der Klinik Eingang gefunden hat. Es zeigt geeignete Antitumorwirksamkeit und ist nur in Japan zugelassen. *Nedaplatin* (*cis*-Diamminglycolatoplatin(II)) kommt bei der Therapie des klein- und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms, Kopf-Hals-Tumoren und gynäkologischen Tumorerkrankungen zum Einsatz. Das Nebenwirkungsprofil weist Übereinstimmungen mit dem von Carboplatin auf. Eine Myelosuppression mit Leukopenie und Thrombozytopenie ist dosislimitierend.

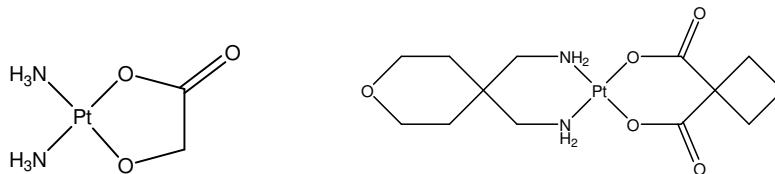


Abb.1.6 Nedaplatin (links) und Enloplatin

Als Carboplatin-Analogon wurde u.a. *Enloplatin* entwickelt, das aber bereits in Phase I aufgrund von starker Nephrotoxizität aufgegeben wurde (s. **Abb.1.6**). Es zählt zu den Platinkomplexen der folgenden dritten Generation.

1.2.6. Oxaliplatin als Platinkomplex der dritten Generation

Eine Änderung der Struktur der Abgangsgruppen beeinflusst die Gewebe- und intrazelluläre Verteilung von Platinkomplexen. Dagegen bestimmt der Aminligand die Struktur der Platin-DNA-Addukte.

Bei *Oxaliplatin* (*[trans-R,R-1,2-Diaminocyclohexan]oxalatoplatin(II)*) sind im Vergleich zu Cisplatin sowohl die Abgangsgruppe als auch die NH_3 -Liganden ausgetauscht worden. Als Neutralligand fungiert das 1,2-Diaminocyclohexan (DACH), wodurch sich ein etwas verändertes Aktivitäts- und Resistenzspektrum zeigt. Die resultierenden DACH-Pt-DNA-Addukte werden mit höherer Zytotoxizität und Hemmung der DNA-Synthese assoziiert. Oxaliplatin ist in Cisplatin-resistenten Zellen wirksam und wurde 1999 in Deutschland zugelassen. Es kommt besonders beim Kolorektalkarzinom zum Einsatz.

Der sterisch anspruchsvolle 1,2-Diaminocyclohexan-Ligand verhindert einen DNA-Reparaturmechanismus durch Reduktion der Bindung von NER- und MMR-Proteinen. Die entstehenden DNA-Addukte werden z.B. durch den MMR-Proteinkomplex nicht erkannt [23]. Diese Platin-DNA-Addukte bilden zwar den gleichen Addukttyp wie Cisplatin, führen jedoch zu unterschiedlicher Proteinerkennung, da sie an der DNA andere konformative Effekte durch andere Aufwindung der Stränge hervorrufen. Die Adduktformung geschieht schneller und führt im Vergleich zu Cisplatin zu stärkerer Zytotoxizität. Es kommt zu einer verminderten Ausschleusung der Addukte aus der Zelle [22,31-33].

Oxaliplatin zeigt keine Kreuzresistenz zu Cisplatin und auch keine Oto- und Nephrotoxizität [34]. Als dosislimitierend ist die sensorische Neuropathie anzusehen, die durch Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltige Infusionen reduziert werden kann. Eine Prophylaxe von Nausea und Emesis erfolgt mit 5-HT₃-Antagonisten.

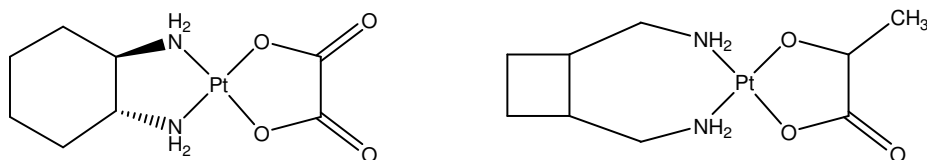


Abb.1.7 Strukturformeln von Oxaliplatin (links) und Lobaplatin (rechts)

Als weiterer Platinkomplex der dritten Generation wird *Lobaplatin* eingesetzt, jedoch nur in China (**Abb.1.7.**). *Lobaplatin* (*cis-Cyclobutan-1,2-bis(methylenamin)lactatoplatin(II)*) besitzt eine mit Cisplatin und Carboplatin vergleichbare Wirksamkeit. Es kommt als racemisches Gemisch bei Brust- und Lungenkrebs sowie chronisch myeloischer Leukämie zum Einsatz.

Milde gastrointestinale Effekte wie Erbrechen treten neben dosislimitierender hämatologischer Toxizität wie Thrombozytopenie auf [35].

1.2.7. Weitere Entwicklungen aktiver Platinkomplexe

Diese erkannten Struktur-Aktivitätsbeziehungen dienten als Grundlage für diverse Weiterentwicklungen des klassischen Cisplatin. Vielfältige Ziele waren dabei die Steigerung der Wirkeffizienz, Verbesserung des Toxizitätsprofils aber auch die Überwindung von Resistenzmechanismen.

Als sechster und letzter Platinkomplex, der zurzeit in der Klinik Anwendung findet, ist *Satraplatin* (Bis(Acetato)amminodichloro(cyclohexylamin)platin(IV); JM 216) zu nennen. Es ist der erste Platin(IV)-Komplex, der in der Tumortherapie verfügbar ist. Die genannte geringe Bioverfügbarkeit der vorangegangenen Komplexe und gastrointestinale Effekte wie Übelkeit und Erbrechen vom Cisplatin machten die Entwicklung von oral anzuwendenden Verbindungen interessant. Daher wurden sechsfach koordinierte Platin(IV)-Komplexe entwickelt, die gegenüber hydrolytischen Prozessen beständiger und inert gegenüber nukleophilen Angriffen sind. Ihre Lipophilie macht eine orale Anwendung möglich. Vor der Bindung an die DNA müssen diese Substanzen jedoch zu Platin(II) reduziert werden. Dies kann durch SH-haltige Proteine wie Metallothionein und GSH geschehen [29]. Nach Gabe von Satraplatin bildet sich ein Metabolitengemisch aus mindestens sechs Komponenten. Aus der oktaedrischen Geometrie des Komplexes resultiert eine retardierte Substitutionskinetik, was die geringe Inaktivierung durch z.B. Proteine beweist.

Es tritt keine Kreuzresistenz zu Cisplatin und Carboplatin auf. Satraplatin findet Anwendung in der *Second-Line*-Therapie beim hormonresistenten Prostatakarzinom sowie beim Bronchialkarzinom. Hämatologische Toxizität wie Neutropenie, Thrombozyto- und Leukopenie sowie Myelosuppression stellen die dosislimitierenden Nebenwirkungen dar. Nephro- oder Ototoxizität wurden nicht beobachtet.

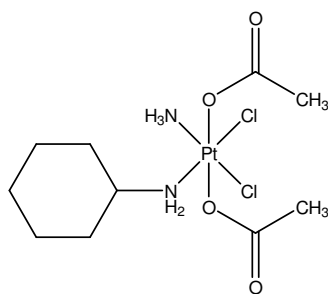


Abb.1.8 Satraplatin

Weitere Entwicklungen aktiver Platinverbindungen mussten bereits in der frühen klinischen Testung wegen ungenügender Bioverfügbarkeit vorzeitig abgebrochen werden oder befinden sich derzeit noch in Phase-I- oder Phase-II-Studien.

Zu den Platin(IV)-Verbindungen als sogenannte Prodrugs zählen neben Satraplatin *Iproplatin* und *Tetraplatin* (Ormaplatin) (s. **Abb.1.9**) [35], welche allerdings aufgrund nicht zu vernachlässigender Neurotoxizität und des Mangels an Wirküberlegenheit nicht weiter verfolgt wurden.

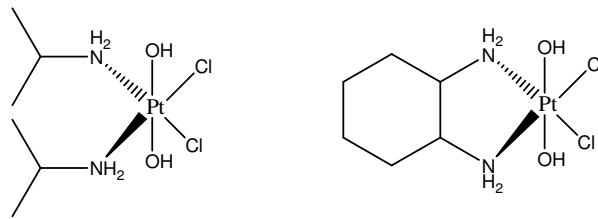


Abb.1.9 Strukturformeln von Iproplatin und Tetraplatin (von links nach rechts)

Weitere Untersuchungen mit dem Ziel der Resistenzüberwindung und einer Erweiterung des Wirkspektrums führten unter anderem zu *ZD0473*. Der veränderte Wirkmechanismus beruht auf einer reduzierten Thiol-vermittelten Detoxifikation aufgrund der sterischen Abschirmung des Platinatoms durch den methylsubstituierten Pyridinring. Diese Abnahme der Empfindlichkeit des Platins gegenüber einer Substitution durch GSH und andere zelluläre Thiole bedingt eine hohe Effizienz der Verbindung und die Umgehung eines für Cisplatin wichtigen Resistenzprozesses [36]. Zusätzlich wird die Hydrolyse, Plasmaeiweißbindung, DNA-Adduktbildung sowie die Reaktivität gegenüber 5'-GMP verlangsamt. Trotz allem wurden ausreichende Zytotoxizitäten beobachtet. An humanen Ovarialkarzinomzelllinien konnte eine Überwindung der Cisplatinresistenz nachgewiesen werden. Eine auftretende Myelosuppression neben Thrombozyto- und Neutropenie stellt die dosislimitierende Nebenwirkung dar [37].

Die *trans*-konfigurierten Platin(II)-Verbindungen galten lange als unwirksam. Inzwischen sind jedoch einige effektive Komponenten bekannt, welche sich noch in der klinischen Testung befinden. Aufgrund ihrer Geometrie können sie keine 1,2-Intrastrand-Addukte ausbilden. *JM335* (*trans*-Ammin(cyclohexylamindichloro-dihydroxo)platin(IV) als sechsfach-koodinierte Platin(IV)-Verbindung zeigt Antitumoraktivität mit einem anderen Adduktspektrum als Cisplatin [37]. Dadurch wird eine Erkennung und resultierende zelluläre Inaktivierung durch SH-haltige Proteine vermindert.

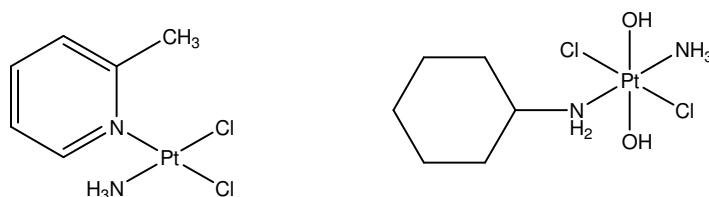


Abb.1.10 Strukturformeln von ZD0473 (links) und JM335 (rechts)

1.3. Drug Targeting

Alle bisher in die Klinik aufgenommenen Platinkomplexe wirken nicht selektiv. Daher sind neue Entwicklungen von großem Interesse.

1.3.1. Wasserlöslichkeit und stereochemische Betrachtungen

Bei der Suche nach Leitstrukturen für Platin(II)-Komplexe, welche möglichst selektiv Tumorgewebe schädigen, wurden bereits einige Neutralliganden als Carrierliganden entwickelt, um hormonabhängige Tumore, wie z.B. das Mammakarzinom im Sinne eines *drug targeting* bevorzugt erreichen zu können. Durch Verwendung eben solcher speziellen Liganden, die sich in bestimmten Geweben anreichern, soll die Konzentration im Tumor erhöht und gesundes Gewebe geschont werden. So wurden an der Universität Regensburg verschiedene Platinkomplexe synthetisiert und hinsichtlich ihrer Wirkung auf estrogenrezeptorpositive (=ER-positive) Prostata- und Mammakarzinome untersucht [39]. Hierzu gehört der [meso-1,2-Bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]-dichloroplatin(II)-Komplex, s. auch **Abb.1.11** [40], welcher estrogene Eigenschaften aufweist. Er ist wie das im Folgenden beschriebene [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]-dichloroplatin(II), **4F-PtCl₂**, symmetrisch aufgebaut, da am C1 und C2 des Ethylendiamins identische Reste vorhanden sind.

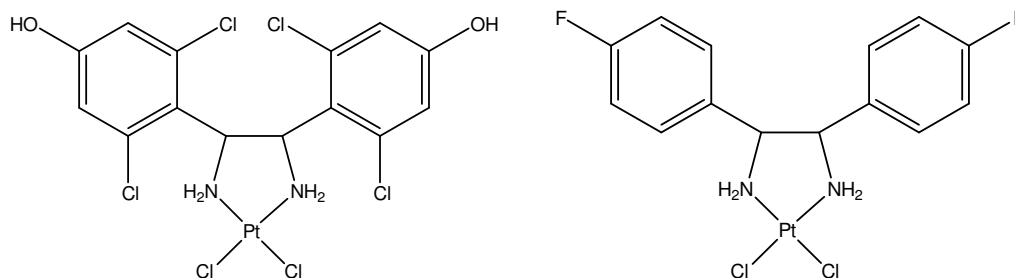


Abb.1.11 Strukturformeln des ER-positiven Pt(II)-Komplexes und des **4F-PtCl₂**

Das Ende der achtziger Jahre entwickelte **4F-PtCl₂** wurde unter anderem an MCF-7, MDA-MB-231-Brustkrebszellen sowie an P 388- Leukämiezellen untersucht, wobei starke Antitumoraktivität gezeigt werden konnte (s. auch Kap.7) . Man verwendete sowohl die meso- als auch die D,L-konfigurierten Verbindungen und beobachtete eine gesteigerte Aktivität besonders der racemischen Komplexe, die z.T. sogar höher als die von Cisplatin war [41-44]. Solche D,L-Verbindungen werden durch stereospezifischen Transport schneller in die Zellen aufgenommen [45] und finden sich vermehrt im Kern.

Am hormonabhängigen MXT-Mammakarzinom der Maus zeigte sich *in vivo* nach den guten Ergebnissen mit dem **D,L-4F-PtCl₂** *in vitro* aufgrund von Löslichkeitsproblemen und dadurch erschwerter Applikation keine zufrieden stellende Wirkung [47].

In einer Röntgenstrukturanalyse [46] ließ sich feststellen, dass der Komplex **D,L-4F-PtCl₂** im Gegensatz zur meso-konfigurierten Verbindung dimere Einheiten ausbildet, die durch intermolekulare Wasserstoffbindungen zwischen den Aminprotonen des Neutralliganden und den Halogenen stabilisiert werden. Durch zusätzliche van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den beiden äquatorialständigen Aromaten des **D,L-4F-PtCl₂** entsteht eine strukturelle Anordnung, die durch Solvation nur schwer zerstörbar ist. Diese entstehenden Kolumnarstrukturen vermitteln daher eine schlechte Wasserlöslichkeit. Beim **m-4F-PtCl₂** ist ein Phenylring dagegen axialständig. Die daraus resultierende größere Entfernung verhindert weitgehend eine Dimerassoziation. Die stärkere Asymmetrie besitzt ein größeres Dipolmoment. Eine Solvatisierung wird somit begünstigt.

Es wurden Studien zur Umgehung der ungenügenden Löslichkeit durchgeführt. Ein viel versprechender Versuch war die Entwicklung von Hydrosolen. Es handelt sich hierbei um disperse Systeme, die aus einem wässrigen Dispersionsmittel und kolloidal dispergierten und in diesem Zustand stabilisierten Teilchen fester Stoffe bestehen. Hydrosole ermöglichen hohe Wirkstoffkonzentrationen ohne organische Lösungsmittel und ohne stark oberflächenaktive Lösungsvermittler [46].

Die Wasserlöslichkeit sollte außerdem durch Variation der Abgangsgruppe unter Beibehaltung des 4-Fluorphenyls am C1 und C2 [48], erhöht werden.

Wasser gilt aus physiologischen Gründen als wichtigstes Lösungsmittel bei der intravenösen Therapie. Carboplatin wurde schon sehr bald nach Cisplatin mit dem Ziel entwickelt, neben der Reduzierung der toxischen Nebenwirkungen auch die Stabilität und Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Die Einführung des Cyclobutan-1,1-dicarbonsäurerestes als Abgangsgruppe führte außerdem zu Unterschieden in der Aktivität. Durch den Malonsäurerest am Platin ist der Komplex entropisch stabilisiert. Der 6-gliedrige Chelatring liegt bevorzugt in der Boot-Konformation vor. Dadurch ist der Cyclobutanring über die Platinebene lokalisiert und unterliegt in wässriger Lösung einer dynamischen Konversion [38]. Diese räumliche Anordnung erleichtert die Solvatisierung, da die Ausbildung von schwerlöslichen Kolumnarstrukturen, wie sie beim **D,L-4F-PtCl₂** und Cisplatin vorliegen, verhindert wird. Zusätzlich ist so das zentrale Platinatom vor einem Angriff durch inaktivierende Bionukleophile besser abgeschirmt. Die Nebenwirkungen sind geringer.

Am Beispiel des Carboplatins konnte demnach gezeigt werden, dass die Einführung einer chelatgebundenen Dicarbonsäure und die damit verbundene Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu besserer Löslichkeit führte. Allerdings ist der Cyclobutandicarboxylatrest noch relativ lipophil und verleiht dem Komplex zudem geringere Reaktivität, was die höhere Dosierung bis zum Erreichen Cisplatin-ähnlicher Wirkung erklärt. Es sollten nun weitere chelatgebundene Dicarbonsäuren als Abgangsgruppen mit optimierter Abgangskinetik für **4F-PtCl₂** gesucht werden. Krauser [46] untersuchte die Aktivität von Oxalat- und Malonatgruppen am symmetrischen 4F- Liganden und beobachtete sowohl eine zunehmende Löslichkeit als auch Wirkungssteigerung. Durch Anbindung von am Carrier enthaltene Ester-, Amid- sowie Etherfunktionen in diesen Dicarbonsäuren sollte zusätzlich eine Aktivierung durch enzymatische Esterhydrolyse erst in der Tumorzelle erfolgen, um normales Gewebe schonen zu können [250, 251]. Die in den Zellen enthaltenen Hydrolasen können diese Reste wieder spalten. Dadurch soll die aktive Wirkform erst in der Tumorzelle zum Einsatz kommen. Lipophilere Carrier sollten außerdem eine bessere Permeabilität und einen gesteigerten passiven Transport ermöglichen.

Beim Oxaliplatin wurden im Vergleich zu Cisplatin und Carboplatin sowohl die Abgangsgruppe als auch die NH₃-Liganden ausgetauscht (vgl. Abschnitt 1.2.6.). Die Stereochemie des 1,2-DACH-Neutralligand beeinflusst die Toxizität entscheidend mit. Kidani et al. [49] konnte zeigen, dass der sterische Charakter abgeleitet wird vom *cis*- und *trans*-

DACH. Der Grad der Destabilisierung der Doppelhelix der DNA ist bei den *trans*-Isomeren größer als bei den *cis*-Isomeren, bei welchen die Amingruppen axial und äquatorial am Cyclohexan angeordnet sind. Konformative und dynamische Unterschiede können als Erklärung für eine veränderte DNA-Bindung herangezogen werden, da die Stereochemie der gebildeten, diastereomeren Pt-DNA-Addukte die Zellantwort mitbestimmt [52]. Bei der Bildung des monofunktionellen Adduktes ändert sich die Konformationsgeometrie der DNA. Diese Geometrie kann die Formierung des hierauf folgenden bifunktionellen Adduktes und den Grad der Rotationsmöglichkeit beeinflussen [53]. Eine ermöglichte Rotation gilt als Voraussetzung des zweiten Bindungsschrittes an die DNA, welcher letztendlich die Zellantwort wie z.B. Apoptose auslöst.

Untersuchungen zeigen, dass die RR- und SS-konfigurierten DACH-Komplexe aktiver waren als ihre RS-Isomere [50,51]. Die Koplanarität der Komplexe mit RR- oder SS-konfiguriertem DACH-Liganden ist der Grund für eine DNA-Bindung ähnlich Cisplatin. Der Cyclohexanring in den RS- und SR-konfigurierten Verbindungen behindert dagegen eine Annäherung an die DNA, weshalb weniger zytotoxische Addukte gebildet werden können. Die RR- und SS-Enantiomere müssten theoretisch eine identische DNA-Bindung besitzen. Jedoch können die entstehenden diastereomeren Monoaddukte durch die Chiralität der DNA mit unterschiedlicher Geschwindigkeit weiterreagieren.

In der Klinik findet aufgrund seiner Überlegenheit gegenüber dem SS-Isomer nur das *trans* *1R2R*-konfigurierte DACH (= Oxaliplatin) Anwendung.

Einige Cisplatin-Analoga mit chiralen Aminliganden wurden aufgrund dieser Erkenntnisse ebenfalls auf ihre biologische Aktivität hin getestet. In analoger Weise wurde der Komplex **4F-PtCl₂** in mehreren weiterführenden Studien untersucht. Es sollten mögliche existierende Zytotoxizitätsunterschiede zwischen den Diastereomeren und den Enantiomeren festgestellt werden.

1,2-disubstituierte Ethylendiaminplatin(II)-Komplexe können allgemein in vier Isomeren auftreten, welche zwei diastereomere Enantiomerenpaare (RR/SS- und RS/SR-Form) darstellen. Die Reste am EthylendiaminGrundgerüst der RR- und SS-Isomere können sowohl axiale als auch äquatoriale Position einnehmen, wobei die bisäquatoriale Anordnung energetisch begünstigt ist. Bei den SR- und RS-Isomeren sind die möglichen Konformationen durch die äquatorial/axial-Anordnung der Reste energetisch gleichwertig. Es kommt zu einer schnellen Ringinversion.

Gute Ergebnisse ließen sich an der MCF-7-Zelllinie beobachten [44,54,55]. *In vitro* waren hier die RR/SS-Verbindungen aktiver als ihre RS/SR-Diastereomere.

Eine Trennung der RR/SS-Enantiomere in ihre reinen Isomere führte jedoch zu keiner Steigerung der Antitumoraktivität.

Deshalb sollte beim **4F-PtCl₂** zur Steigerung der Wirksamkeit einer der beiden aromatischen Reste gegen eine Alkylkette ausgetauscht werden. Erwartet wurden folgende Effekte: *i*) eine verringerte Hydrophobizität durch die daraus resultierende Dynamik, geringere intermolekulare Wechselwirkungen, schwächere Kolumnarstrukturen und daher eine höhere Löslichkeit; *ii*) eine stärkere Antitumorwirksamkeit durch einen erleichterten Angriff an die DNA sowie *iii*) eine Wirkoptimierung durch Trennung der Enantiomere und eine höhere Enantioselektivität durch verschieden substituierte asymmetrische C-Atome.

Erste Versuche bestätigten diese Vermutungen.

Ersetzt man den Phenylrest am C2 durch Methyl- oder Ethylgruppen, bewirkt dies eine Aktivitätssteigerung [56, 57]. Bei den C2-Methyl- Derivaten zeigte sich der 4F-Phenyl-Komplex der unsubstituierten Phenylverbindung überlegen [58,59]. In beiden Fällen waren die RR- und SS-Verbindungen deutlich aktiver als die RS- und SR-Komplexe, wobei bereits [RS- und SR-1-(4-fluorphenyl)-2-methylethylendiamin]dichloroplatin(II), **RS + SR-4F-Ph/Me-Cl₂**, eine mit Cisplatin vergleichbare Aktivität aufwies (s.**Abb.1.12**).

Die gefundenen Sättigungskonzentrationen zeigten, dass RS- und SR-Komplexe eine bessere Wasserlöslichkeit im Vergleich zu ihren Diastereomeren besitzen. Zudem wurde durch den Austausch eines Arylrestes symmetrischer 1,2-Diarylverbindungen wie dem **4F-PtCl₂** durch eine Alkylgruppe die Löslichkeit gesteigert. Es wurden Grenzlöslichkeiten in Wasser beim **m-4F-PtCl₂** von 0.02 mg/ml und bei am C2-Ethyl-Komplexen von 0.1 mg/ml gefunden.

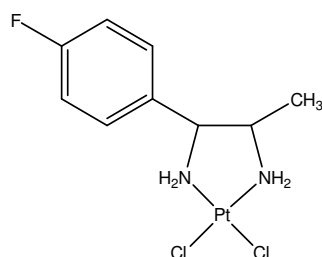


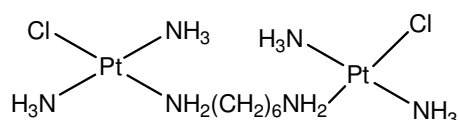
Abb.1.12 Strukturformel von [1-(4-fluorphenyl)-2-methylethylendiamin]dichloroplatin(II), **4F-Ph/Me-Cl₂**

1.4. Multinukleare Platinkomplexe

Der Mechanismus der Tumorresistenz gegenüber Cisplatin ist multifaktoriell (s. 1.2.3.).

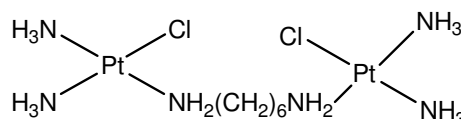
Besonders ausgeprägt ist dieser in Tumoren von Leber, Darm und Pankreas.

Um das Problem der Resistenz zu umgehen, gab es einige Ansätze im Hinblick auf neuartige Substanzen. Besonders interessant sind solche, die andere Platin-DNA-Addukte als Cisplatin ausbilden. Mit diesem Ziel wurden von Farrell und Mitarbeitern verschiedene multinukleare Platinkomplexe mit verbrückten Linkern, z.B. binukleare Platinkomplexe mit der allgemeinen Formel $[\{PtCl_m(NH_3)_{3-m}\}\mu-H_2N-R-NH_2-\{PtCl_n(NH_3)_{3-n}\}]^{[(2-m)+(2-n)]+}$ (m oder n = 0-3 mit R als linearem oder substituiertem aliphatischen Linker) entwickelt (s. **Abb.1.13**).



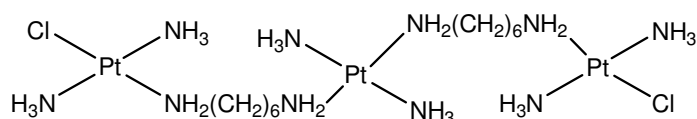
BBR3005

(1,1/ t,t)



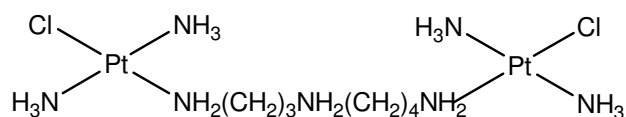
BBR3171

(1,1/ c,c)



BBR3464

(1,0,1/ t,t,t)



BBR3571

(1,1/ t,t)

Abb1.13 Strukturen von di- und trinuklearen Platinkomplexen

Hierbei stehen nun neben der üblichen Komplexierung mit DNA-Basen auch positive Ladungen zur elektrostatischen Wechselwirkung zur Verfügung [61].

In der *trans*-Serie ist zuerst einmal der dinukleare Komplex BBR3005 zu nennen, in dem zwei monofunktionale *trans*-Platineinheiten durch eine Diaminohexankette überbrückt werden.

Durch Inkorporation eines dritten Platinzentrums mit Alkyldiaminkette entstand BBR3464.

Seine 3⁺-Ladung und die Anwesenheit von letztendlich zwei Platin-Koordinierungseinheiten für die Bindung an die DNA machten es zu einem viel versprechenden Antitumormittel. Die zentrale Platintetramineinheit stabilisiert die Effizienz der gebildeten DNA-Addukte durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen.

Die Fähigkeit zur Überwindung der Kreuzresistenz zu Cisplatin wurde in einigen klinischen und präklinischen Studien u.a. in Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinomzelllinien und Melanomen nachgewiesen, wobei bereits ein Zehntel der Dosis für einen antiproliferativen Effekt ausreichend war [62,63]. BBR3464 zeigte sich *in vivo* 15-20 x potenter als Cisplatin [64].

Der DNA-Bindungsmodus der multinuklearen Komplexe unterscheidet sich signifikant von dem des Cisplatins. Eine Untersuchung belegte, dass diese neueren Substanzen zwar schnell an die DNA binden, jedoch durch sterische Effekte unterschiedliche Bindungen vorhanden sind. Dies trifft besonders für das 1,1/c,c-Isomer von BBR3005, dem BBR3171, zu [65].

Diese *trans*-konfigurierte Verbindung zeigt geringere Effekte. Obwohl die DNA-DNA-interstrand Quervernetzungen für beide Komplexe hoch sind, kann nur das 1,1/t,t Derivat einen intrastrand cross-link an benachbarten Guanosinbasen vom d(GpG)-Typ ausführen [66] (s. **Abb.1.14**).

Bindet Cisplatin an die DNA, entstehen durch 1,2-intra- und 1,2-interstrand cross-links zwischen Adenosin und Guanosin bzw. zwischen 2 Guanosinbasen massive Störungen der DNA-Sekundärstruktur, die allerdings durch Reparatursysteme (s.1.2.2.1. bis 1.2.2.4.) schnell erkannt und beseitigt werden können. BBR3464 bindet schneller an die DNA als Cisplatin und besitzt außerdem die Fähigkeit zur Ausbildung von 1,3-, 1,4- und 1,5-interstrand Vernetzungen [67]. Während Cisplatin ca. 6% interstrand cross-links verursacht, sind es bei BBR3005 und BBR3464 bereits um die 80%. Eine variable Linkerlänge, die Flexibilität der Brückenliganden und die räumliche Anordnung der Chlorid-Abgangsgruppen erlauben einen verbesserten Bindungsmodus und somit verstärkten biologischen Effekt [68,69]. Der relativ große Abstand zwischen den Pt-Cl-Einheiten führt zu sogenannten *long-range* Inter- und Intrastrand cross-links [70].

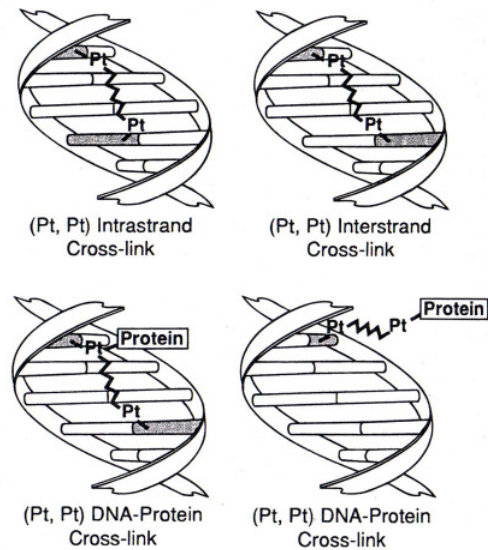


Abb.1.14 Möglichkeiten der verursachten crosslinks von dinuklearen Platinkomplexen

Die zwischen zwei benachbarten Guaninbasen entstehenden 1,2-d(GpG) Intrastrand crosslinks sind zwar äquivalent zu Cisplatin, reduzieren aber die thermische Stabilität des Duplexes weniger [71]. Trinukleare Komplexe wie BBR3464 krümmen außerdem die Helix geringer als Cisplatin, so dass sie von HMG-Proteinen so gut wie nicht wahrgenommen werden [72]. Eine Erkennung durch diese Proteine setzt eine stabile direkte Krümmung der Helixachse durch platinmodifizierte DNA voraus. [24,69]. Auch die Inaktivierung durch Glutathion ist vermindert [73]. Zusätzlich bedingt eine fehlende Erkennung durch NER-Proteine eine Kumulation der DNA-Schädigungen, denen die zytotoxische Wirkung zugeschrieben wird. Außerdem wurde eine deutlich erhöhte Zellaufnahme gegenüber Cisplatin gefunden [252]. BBR3464 befindet sich seit 2003 in der Phase II der klinischen Prüfung. Es zeigt Wirksamkeit bei Magen-, Darm- und Pankreaskarzinom sowie bei Ovarialkarzinomen [21]. Allerdings sind besonders Neutropenie und Diarrhö als unerwünschte Wirkungen zu nennen. Die Nephrotoxizität ist geringer ausgeprägt als bei Cisplatin und kann durch langsame Infusion oder durch verstärkte Hydratation verhindert werden. BBR3005 erreichte nur Phase I der klinischen Studie, da starke Neurotoxizität die weitere Entwicklung unmöglich machte.

Neben den di- und trinuklearen Platinkomplexen gab es weitere Entwicklungen im Bereich dieser kationischen Substanzklasse. Um neue Beziehungen zwischen der chemischen Struktur, der Ladung und der Zytotoxizität zu erhalten, wurden neben den natürlich enthaltenen Polyaminen Spermin und Spermidin als Linker mit einer 3^+ -Ladung [74-76] auch

starre Liganden wie Hydrazine, Azole und 2-Picoline [253] genutzt (**Abb.1.15**). Hier sollte durch sterische Abschirmung des Platinzentrums die Detoxifizierung durch thiolhaltige Moleküle reduziert und durch höhere Coulomb-Interaktionen die Affinität zur geladenen DNA gesteigert werden.

Eine weitere Entwicklung waren tetranukleare Verbindungen, wie die Polypropylenimine (**Abb.1.16**). Hierbei sind 4 *trans*-Diamminchloroplatin-Einheiten miteinander verknüpft worden. Die Ladung bei physiologischem pH beträgt +6; die vier Abgangsgruppen sollen gleichzeitig an vier Nucleobasen binden [77,78]. Führt man die Ketten fort, entstehen Makromoleküle mit wachsenden Generationen, wie sie im Kapitel 4 behandelt werden. Die hohe Dichte aktiver Gruppen wie den Platinzentren und Amineinheiten soll die Zellpermeabilität erhöhen und die Lokalisierung in spezifischen Organen ermöglichen. Durch Anheftung an negative Bindungen an der Zelloberfläche soll die Diffusion in die Zelle stattfinden. Bei der Untersuchung an L1210-Zellen wurde allerdings nur eine geringe Zytotoxizität gefunden, was eventuell durch Transportprobleme zu erklären ist [79].

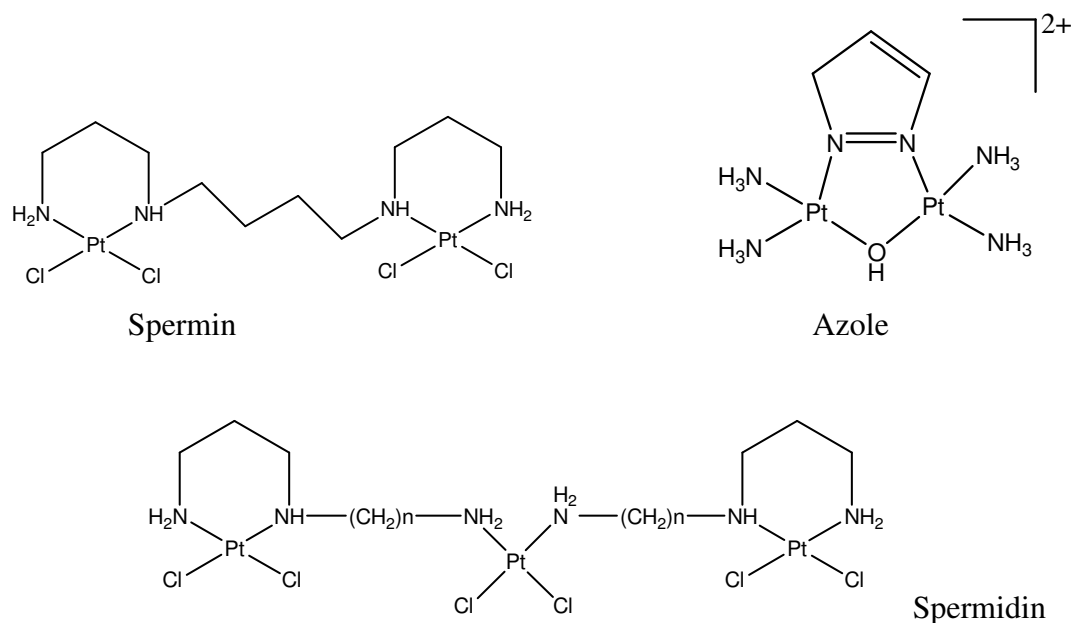


Abb.1.15 Strukturen weiterer kationischer Komplexe

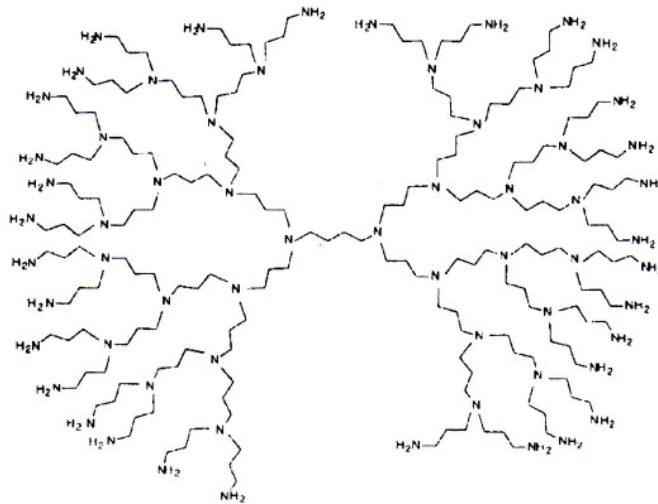


Abb.1.16. Struktur eines Poly(propylenimin)-Moleküls mit primären Amin-Endgruppen

1.5. Polymerkonjugate in der Behandlung von Tumorerkrankungen

Zu den neuesten Entwicklungen im Hinblick auf potentielle Träger für Zytostatika zählen die sogenannten Dendrimere. Sie wurden u.a. mit dem Ziel der Resistenzüberwindung gängiger Metallkomplexe wie den Platinverbindungen in die Untersuchungen eingebracht.

Polymerverbindungen mit Antitumoraktivität, lösliche Polymerkonjugate und Mizellen sowie Polymer-Proteinkonjugate sind seit einigen Jahren bekannt [80]. 1975 schlug Ringsdorf das erste Modell eines wasserlöslichen Polymers mit bioverfügbarem Linker zur Erleichterung einer kontrollierten Arzneistofffreisetzung vor [81]. Diese traditionellen Polymere umfassten eine lineare, hydrophile Kette, welche kovalent an das Zytostatikum gebunden war [82]. Hierzu zählen auch die HPMA-Kopolymere, als Abkürzung für N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid [83,84]. Trotz ihrer geringen Bioverfügbarkeit wurden sie erfolgreich in die Klinik aufgenommen. [85]. Sie resultieren in polydispersen und heterogenen Produkten, d.h. sie besitzen eine breite Molmassenverteilung, die sich unterschiedlich im Körper auswirken kann. Daher war ein Studienziel, neue hochverzweigte Polymere zu entwickeln, die man als Dendrimere oder Kaskadenpolymere bezeichnet.

1.5.1. Dendrimere

Die Bezeichnung „Dendrimer“ lässt sich aus dem Griechischen ableiten und setzt sich aus *dendron* = Baum und *meros* = Teil zusammen. Es beschreibt so anschaulich die Struktur

dieser relativ neuen Klasse von Makromolekülen [86,87]. Diese entstehen aus einem Kernmolekül mit schalenförmig, kovalent gebundenen Verzweigungen (s. **Abb.1.17**), welche man fortlaufend als Generationen bezeichnet. Jede Schale weist ein Vielfaches der Endgruppen des Kernmoleküls auf. Durch ihre hohen Molmassen zwischen 5000-500 000 Da werden sie nur langsam renal eliminiert und zirkulieren länger im Blutkreislauf. So stehen diese Arzneistoffträger dem Organismus dauerhaft zur Verfügung. Gegenüber den linearen Polymeren sind ihre verzweigte Architektur, geringe Polydispersität und die Möglichkeit zur Beeinflussung der Oberflächenfunktionalitäten [88] vorteilhaft.

Diese Oberflächenfunktionalitäten eignen sich für die spezifische Ankopplung von kleinen Molekülen, wie z.B. Cisplatin und anderen Arzneistoffen. Neben dieser chemischen Fixierung ist eine gute Wasserlöslichkeit zu erreichen, da als Endgruppen neben Carboxyl- und Hydroxyl- auch Aminogruppen verwendet werden, wie die unten genannten Beispiele zeigen (**Abb.1.18**).

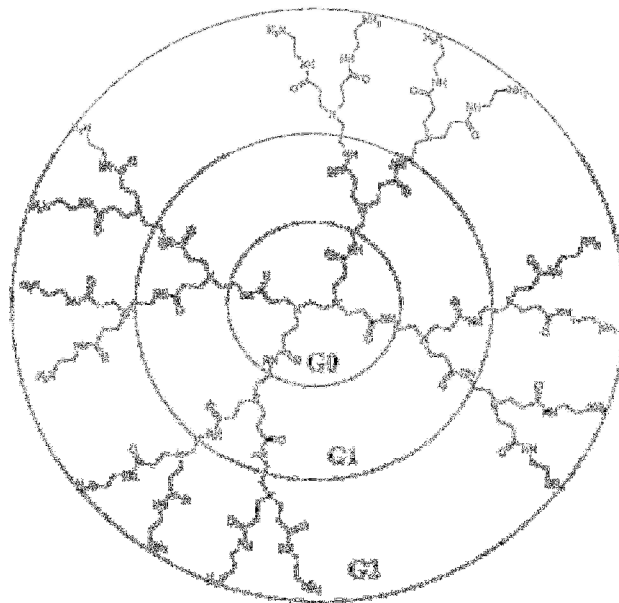


Abb.1.17 Aufbau eines Dendrimers mit Aminendgruppen mit schalenartigen Verzweigungen, den sogenannten Generationen

Dadurch wird die Applikation wesentlich erleichtert. Zudem sind eine spezifische Freisetzung des Zytostatikums aus dem Konjugat, eine relativ geringe Dosis für ausreichend hohe Antitumoraktivität und keine Auslösung von Immunreaktionen im Körper wichtig. Ein weiterer Punkt ist die gezielte Freisetzung am Wirkort und somit die Unterbindung der bereits erwähnten Nebenwirkungen gängiger Tumorthapeutika.

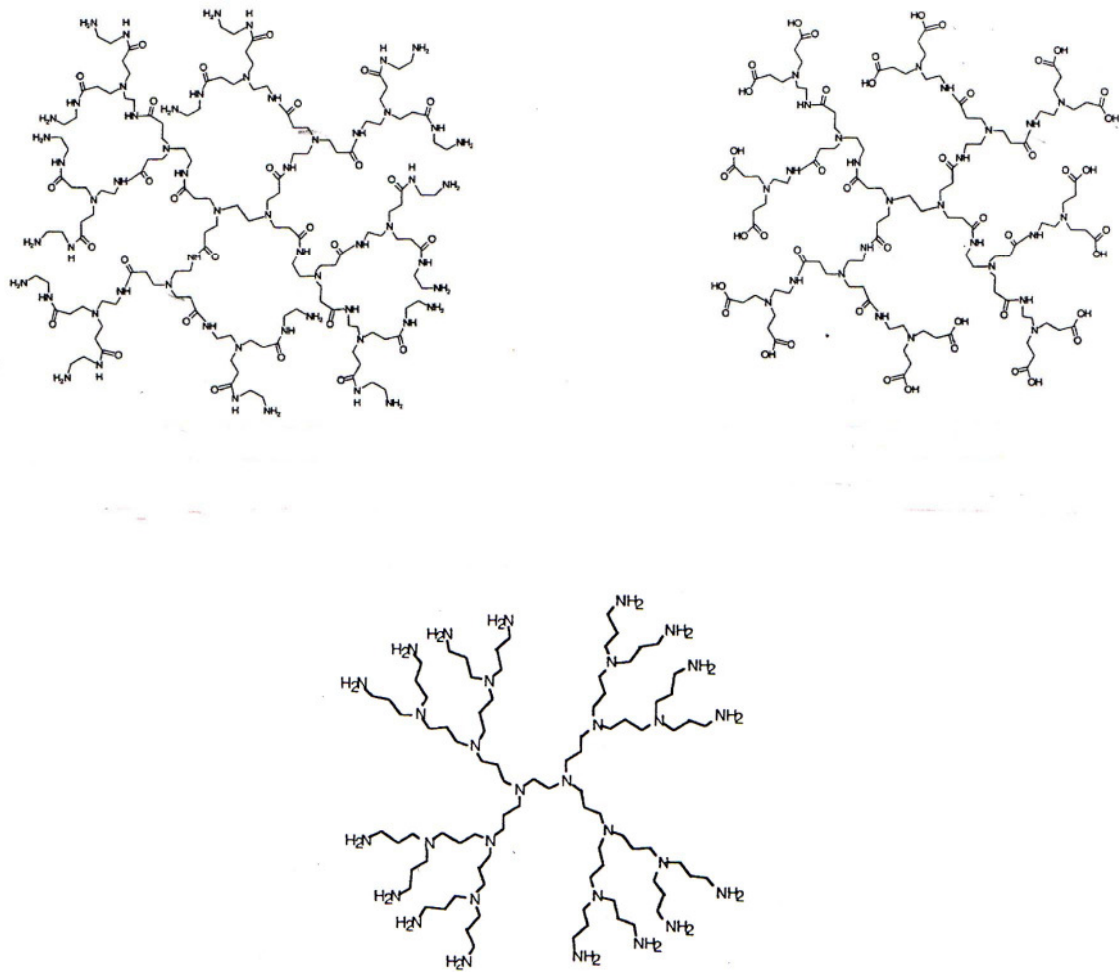


Abb.1.18 Strukturen häufig verwendeter Dendrimertypen. PAMAM (mit Amin- und Carboxylsäureendgruppen) sowie ein Dendrimer vom Poly(propylenimin)-Typ

Alle diese Dendrimertypen sollen über einen speziellen Weg direkt im Tumorgewebe zur Wirkung kommen. Dazu ist zunächst eine Unterscheidung zwischen Blutgefäßen in gesundem Gewebe mit denen von Tumoren wichtig. Im Tumorgewebe findet sich durch übermäßig aktive Angiogenese eine hohe Blutgefäßdichte, die allerdings einige Defekte aufweist [89,90]. Dazu kommen beeinträchtigter lymphatischer Abfluß und eine erhöhte Produktion von Permeabilitätsfaktoren, z.B. Bradykinin, Prostaglandinen, VPF (=VEGF: tumor vascular permeability factor) sowie Stickstoffmonoxid, NO [91]. Das resultierende löchrige Tumorendothel bedingt ein verstärktes Hineingelangen der Makromoleküle in das Tumorgewebe sowie eine lange Verweildauer aufgrund der fehlenden lymphatischen Drainage. Diese Effekte werden als EPR-Effekt zusammengefasst, dem erhöhten Permeation und Rückhalte-Effekt. Dieser Mechanismus der tumoritropen Anreicherung ist ausreichend untersucht worden [92,93]. So können Makromoleküle und Proteine verstärkt ins

Tumorgewebe infundieren ohne schnell wieder eliminiert zu werden [94]. In gesundes Gewebe können Makromoleküle mit einem Gewicht über 50.000 Da nicht eintreten, kleinere Moleküle werden durch das lymphatische System wieder entfernt. **Abb.1.19** zeigt die Unterschiede von normalem und Tumorgewebe.

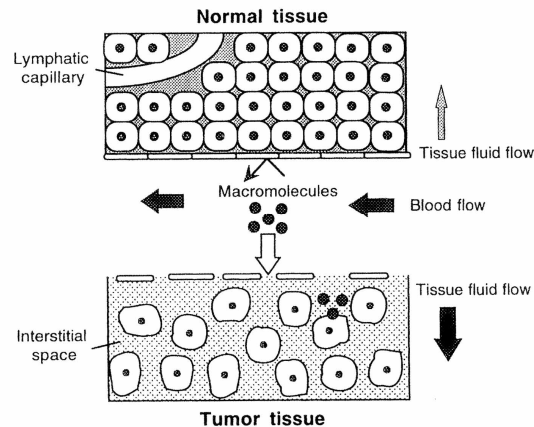


Abb.1.19 Anatomische und physiologische Charakteristika von normalem und Tumorgewebe

Diese Faktoren lassen sich für gezieltes Targeting verwenden. Man unterscheidet aktives und passives Targeting. Aktives Targeting verläuft über rezeptorvermittelte Endozytose, meist mit targetspezifischen Liganden. Das passive wiederum wird über physikochemische Eigenschaften des Carriers vermittelt, wie genannte Molekülgröße, dadurch bedingte hohe Blutzirkulation und lymphatische Drainage [88].

Die zelluläre Aufnahme geschieht meist durch Endozytose, welche durch oben genannte Faktoren in Tumoren stark erhöht ist. Das im Plasma bei pH 6 stabile Konjugat gelangt über die Endosomen in das lysosomale Kompartiment, wo der pH auf 5.5 fällt [80] und es zudem spaltenden Proteasen und Hydrolasen ausgesetzt ist. Es gibt einige Ansätze in der Tumorthherapie, die sich diesen Effekt zunutze machen, indem die Wirkstoffe hydrolyselabil an die jeweiligen Träger gebunden sind. Hier sind neben den erwähnten über Dicarbonsäuren- gebundenen HPMA Kopolymeren säuresensitive Poly(ethylenglykol)-Konjugate mit Paclitaxel [95] und Doxorubicin, gekoppelt über Hydrazonlinker [96], Polyester verknüpft mit Doxorubicin sowie Maleimidderivate mit *cis*-konfigurierten Platin(II)-Komplexen [97] für selektive Aufnahme zu nennen.

Bis heute ist bereits eine große Vielfalt von Dendrimern entwickelt worden. Im Folgenden soll genauer auf solche eingegangen werden, die für biologische Zwecke relevant sind und die im weiteren Sinne für Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit gedient haben.

Für die erforderliche Wasserlöslichkeit stehen vor allem Endgruppen mit zumeist Aminfunktionen, aber auch Carbonsäuren und Alkoholen zur Verfügung. Man unterscheidet als herausragende Gruppen Poly(propylenimin) (PEI)- und Polyamidoamin (PAMAM)-Dendrimere sowie Poly(ethylenoxide) (PEO)-Konjugate (s. **Abb.1.18**). Die NH_2 -terminierten Gruppen bedingen neben der Ausbildung von Wasserstoffbrücken gute thermische und hydrolytische Stabilität [77] als auch Monodispersität [78].

Die PEI-Dendrimere besitzen entweder Diaminobutan oder Diaminoethan als Kern. Die PAMAM-Dendrimere (Starburst[®]-Dendrimere) existieren sowohl mit Amin- als auch mit Carboxylendgruppen [82]. Sie sind *in vitro* weder toxisch noch wirken sie hämolytisch, sind sehr hydrophil [87] und zählen seit 1985 zu den am besten untersuchten Makromolekülsystemen [97,99]. Leider trägt ihr polykationischer Charakter dazu bei, dass *in vivo* geringere Dosen angewendet werden müssten, da sie sehr schnell an negativ geladene Gefäßoberflächen adsorbieren und dadurch die Zytoplasmamembran zerstören, was zu Nebeneffekten führen kann. Diese unerwünschten Wirkungen sind allerdings neben der Dosis auch generationsabhängig. Bei kleinerer Generation tritt dieser Effekt so gut wie nicht auf. PAMAM-Dendrimere dienen u.a. zur Transfektion von Zellen [100].

Des Weiteren existieren Studien von Polyethylenglykolen, die kovalent mit Albumin verknüpft sind, um deren Immunogenität zu untersuchen [101]. Außerdem wurde die Möglichkeit zum Einschluss von Gastmolekülen ins Dendrimerrinnere dokumentiert [81].

1.6. Problemstellung und Zielsetzung

In der klinischen Testung verwendete Platinkomplexe bringen trotz Optimierung des Wirkspektrums noch immer einige Nachteile wie z.B. geringe Tumorselektivität und damit verbundene toxische Nebenwirkungen, Resistenzentwicklung aber auch Kreuzresistenz untereinander mit sich. Eine z.T. ungenügende Löslichkeit in Wasser und physiologischen Lösungsmitteln wie NaCl und Glucose, welche für eine therapeutische Anwendung notwendig ist, ist ebenfalls zu verbessern. Trotz zahlreicher Studien zur Behebung dieser Nachteile und etlicher noch in präklinischen Untersuchungen befindlicher Verbindungen konnte bis heute kein hundertprozentig zufrieden stellender Metallkomplex entwickelt werden.

Die Einführung einer chelatgebundenen Dicarbonsäure anstelle der Chloridliganden des Cisplatin am Beispiel von Carboplatin führte neben gesteigerter Wasserlöslichkeit zu verringerter Reaktivität und einem anderen Nebenwirkungsprofil.

Um diese Erkenntnisse mit den *drug targeting*-Eigenschaften des 4F-Phenylkomplexes zu verbinden, wurde dieser im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen Malonsäurederivaten als Abgangsgruppen koordiniert.

Neben der Stabilität sollte außerdem die resultierende pharmakologische Aktivität *in vitro* an Mammakarzinomzellen untersucht werden. Außerdem wurde die Reaktivität mit Hilfe eines HPLC-Modells betrachtet, welches die Wechselwirkung mit der DNA sowie Inaktivierungsreaktionen durch Bionukleophile abschätzen lässt.

Da durch die Einführung einer chelatgebundenen Dicarbonsäure ähnlich wie bei Carboplatin eine Abhängigkeit der Reaktivität der synthetisierten Verbindungen vom pH-Wert nahe liegt, wurde zusätzlich eine pH-abhängige Messung durchgeführt.

Für diese Untersuchungen diente zur Auswertung das Kinetiksimulationsprogramm KSIM. Die Ergebnisse sollten anschließend im Zusammenhang mit denen der *in vitro*-Testung verglichen und diskutiert werden.

Wie bereits am Platinkomplex der dritten Generation, dem Oxaliplatin, gezeigt werden konnte, ist neben ausreichender Löslichkeit auch ein stereochemischer Einfluss auf die Antitumorwirksamkeit von Interesse.

Um ausgehend von den symmetrischen Platinkomplexen, die am Ethylendiamingerüst zwei identische aromatische Reste tragen, die Hydrophilie und die Enantioselektivität zu erhöhen,

wurden durch Ersatz eines der Arylringe durch eine Alkylkette asymmetrische Verbindungen hergestellt.

Diese Ligandenmodifikation und ihr Einfluss auf die Antitumoraktivität sollten sowohl im Hinblick auf unterschiedlich lange lineare oder verzweigte Alkylreste am C2 als auch auf den am C1 hängenden Arylring bzw. dessen Substitution untersucht werden. Ergänzend zu den carbonsäuretragenden Platinkomplexen sollten die antiproliferativen Effekte an humanen Tumorzelllinien, den MCF-7- und MDA-MB-231-Brustkrebszellen, den LNCaP/FGC-Prostatakrebs- und zwei CML-Zelllinien, sowie die Reaktivität im HPLC-Assay getestet werden.

In neueren klinischen Untersuchungen wurden mit dem Ziel der Umgehung der Resistenzentwicklung sowie einer Erweiterung des Wirkspektrums zukunftsweisende multinukleare Platinverbindungen hergestellt. Diese „nichtklassischen“ Platinkomplexe belegten ein unterschiedliches DNA-Bindungsmuster sowie gesteigerte zytotoxische Aktivität.

Für unsere Untersuchungen sollten daher verschiedene Polyamine mit dem bewährten 4F-Phenylkomplex gekoppelt werden, um die guten antitumoralen Eigenschaften der Polyamine mit den Target-Eigenschaften des Liganden zu kombinieren. Hierdurch ließ sich eine selektive Aufnahme in Tumorzellen und eine Reduzierung von Nebeneffekten erhoffen. Der Einfluss der Brückenliganden von unterschiedlicher Länge sowie der Abgangsgruppe sollten auf ihre pharmakologischen Eigenschaften untersucht werden. Ebenso sollte sich die positive Ladung dieser Verbindungen als günstig auf die Löslichkeit erweisen.

Ein weiterer Ansatz, um weiterhin sowohl Hydrophilie als auch die Tumorselektivität zu steigern, war die Verwendung von makromolekularen Trägersystemen, den Dendrimeren. An diese Substanzklasse mit variierenden Oberflächenfunktionalitäten sollten Platinwirkstoffe koordiniert und auf ihre Antitumoraktivität getestet werden. Um die Reduzierung der toxischen Nebeneffekte abschätzen zu können, wurden zusätzlich humane Fibroblasten und Keratinozyten herangezogen. Durch den Einfluss der verwendeten Substanzen auf die Proliferation sollte die Selektivität für Tumorgewebe diskutiert werden.