

1 Einleitung

1.1 Die Herausforderung Krebs

Krebs als Überbegriff für viele verschiedene tumorale Erkrankungen hat große Bedeutung in der Medizin. Zurzeit erkranken in Deutschland jährlich ca. 340 000 Menschen neu und ca. 210 000 Menschen versterben an den Folgen tumoraler Erkrankungen. Damit ist dieses Erkrankungsbild für 25% aller Todesfälle verantwortlich und nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache (Todesfallstatistik Stand 2001).

Tumore entstehen aus entartet wachsenden Zellen, die sich über das Normale hinaus teilen. Diese Geschwülste verdrängen dabei gesundes Gewebe und im bösartigen Fall dringen sie sogar in das umliegende Gewebe ein (Tumorinvasion). Stößt der Tumor in Blutgefäße vor, so kann es zur Absiedelung einzelner Tumorzellen kommen, die dann Tochtergeschwülste (Metastasen) in anderen Körperregionen begründen können.^{[1][2]}

Klare Ursache-Wirkungs-Beziehungen lassen sich bei Krebserkrankungen nur schwer treffen, da die Krebsentstehung ein komplexes und zeitlich langwieriges Geschehen darstellt. In den Tumorzellen findet man gravierende Veränderungen am Erbgut. Deren Ursachen werden zwar kontrovers diskutiert, aber einige epidemiologische Zusammenhänge sind allgemein akzeptiert. So werden verschiedene Viren (Hepatitis B und C/Papillomviren) und Bakterien (*Helicobacter pylori*) in Verbindung mit unterschiedlichen Krebserkrankungen gebracht. Chemikalien spielen auch eine große Rolle. Während viele Chemikalien als kanzerogen erkannt wurden und aus der industriellen Fertigung verbannt wurden, haben Kontaminanten in der Nahrung (Schimmelpilzgifte etc.), Alkohol und Tabakrauch ungebrochen eine große Bedeutung. Auch physikalische Einflüsse insbesondere die UV-Strahlung der Sonne spielen eine Rolle. Neben diesen externen Einflüssen haben individuelle Faktoren immense Bedeutung. So kann aus genetischen Veranlagungen eine große Disposition für

bestimmte Krebsarten resultieren.^[3] Allgemein beobachtet man mit steigendem Alter eine zunehmende Instabilität und Fehleranfälligkeit des Erbguts, so dass externe Einflüsse stärker wirken können. So treten tumorale Erkrankungen in der Regel erst mit höherem Alter auf.^[4]

45% aller Erkrankten können geheilt werden. Hierbei führt ein chirurgischer Eingriff bei 22% der Patienten zum Erfolg. Geringeren Erfolg haben die Strahlen- und die Chemotherapie, die als Monotherapie bei 12 bzw. 5% der Patienten zur totalen Remission führen. Der Rest der Heilungserfolge (6%) resultiert aus Kombinationstherapien.^[5]

Bei der palliativen Therapie, die zur Reduktion der Tumorlast bzw. zur Verlängerung der Überlebenszeit eingesetzt wird, werden vornehmlich Strahlen- und Chemotherapie eingesetzt.^[5]

Bei der Chemotherapie werden bevorzugt Vertreter folgender Zytostatikaklassen eingesetzt:

- Antimetaboliten (Methotrexat/ Fluoruracil)
- Mitosespindelgifte (Vincristin/ Paclitaxel/ Docetaxel)
- Topoisomerasehemmstoffe (Anthrazycline z.B. Doxorubicin/ Camptothecine)
- Alkylantien und anorganische Analoga (Cyclophosphamid/ Melphalan/ Cis-, Carbo- und Oxaliplatin)

1.2 Platinverbindungen als Zytostatika

1.2.1 Substitutionsreaktionen und Reaktionskinetik von Cisplatin

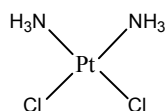


Abb. 1.1 Cisplatin

Cisplatin (siehe Abb.1.1) und verwandte Platin(II)verbindungen sind quadratisch planare low spin d^8 -Komplexe. Es wird allgemein ein bimolekularer Verdrängungsmechanismus

(S_N2-Mechanismus) unter Einhaltung der Konfiguration akzeptiert.^[6] Hierbei kann ein Nukleophil sowohl von unterhalb als auch von oberhalb der Koordinationsebene in den Komplex eintreten. Nach Eintritt des Nukleophils wird eine Umlagerung zu einer trigonalen Bipyramide als Übergangszustand angenommen (siehe Abb.1.2).^[7,8]

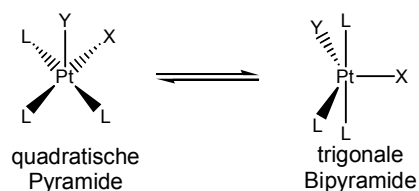


Abb. 1.2 Übergangszustände bei der Substitutionsreaktion quadratisch planarer Platin(II)-Komplexe. (X=Abgangsgruppe des Komplexes oder Solvensmolekül, Y=eintretendes Nukleophil)

In den hier untersuchten wässrigen Lösungen sind zwei Substitutionswege für Nukleophile bekannt. Nach dem HSAB-Konzept verdrängen weiche Nukleophile wie Thiole, Thioether und Iodid bevorzugt direkt die Abgangsgruppe aus dem Komplex. Härtere Nukleophile wie Amine gelangen überwiegend über den sogenannten Solvensweg in den Komplex. Hierbei wird die Abgangsgruppe zuerst durch das Solvens Wasser ersetzt (auch als Hydrolyse bezeichnet). Im nächsten Schritt kann das Wassermolekül schnell durch das Nukleophil ersetzt werden (siehe Abb.1.3).^[6]

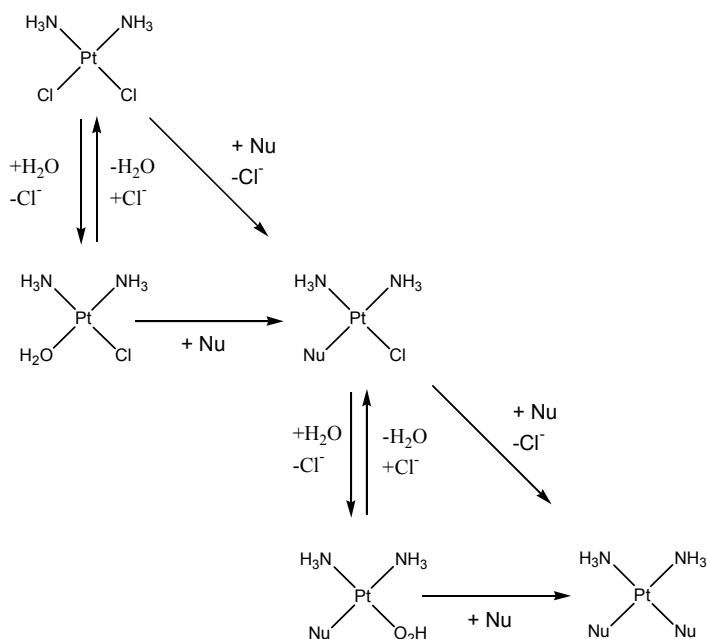


Abb. 1.3 Reaktionswege für die nukleophile Substitution an Cisplatin

Bei Überschuss an Nukleophil und Wasser als Solvenz wird eine Reaktionskinetik pseudo-erster Ordnung beobachtet. Unter der Voraussetzung, dass der Eintritt des Nukleophils irreversibel ist, resultiert eine exponentielle Abnahme des Edukts über die Zeit, durch deren logarithmische Auftragung eine Gerade erhalten wird. Aus der Steigung dieser Geraden erhält man die Geschwindigkeitskonstante des Abbaus des Edukts durch nukleophile Substitution.^[9]

1.2.2 Einsatz von Cisplatin

Seit Mitte der 60iger Jahre das zytostatische Potential der damals schon lange bekannten Verbindung Cisplatin (siehe Abb. 1.1) durch Zufall entdeckt wurde^[10,11], hat es bis heute große Bedeutung in der Chemotherapie u.a. von Blasen-, Speiseröhren-, Cervix- und kleinzelligem Bronchialkarzinomen sowie von Tumoren im Hals- und Kopfbereich erlangt. Teilweise werden sehr gute Remissionsraten erreicht, wie im Falle des juvenilen Hodenkarzinoms und des Eierstockkrebses. Dem breiten therapeutischen Nutzen stehen aber auch beträchtliche Nebenwirkungen gegenüber. So wird neben starker Übelkeit häufig auch eine starke Nephrotoxizität und Neurotoxizität beobachtet.^[12,13] Diese Nebenwirkungen können durch Gabe von Antagonisten des Serotoninrezeptors gegen die Übelkeit, durch intravenöse Hydratisierung und Diurese gegen die Nephrotoxizität sowie durch schwefelhaltige Abfangreagenzien gegen die Neurotoxizität gemildert werden. Trotzdem limitieren diese Nebenwirkungen weiterhin in der Praxis die applizierbare Dosis.^[14,15]

Trotz seines breiten Gebrauchs gibt es viele Tumore, die von vorneherein gegen Cisplatin resistent sind. So zeigen Brust-, Prostata-, Dickdarm- oder nichtkleinzelliger Lungenkrebs teilweise eine solche intrinsische Resistenz schon vor der Behandlung. Andere weisen bei der Behandlung einen schnellen Erwerb einer Resistenz gegenüber Cisplatin auf, wie z.B. einige Tumore des Eierstocks und der kleinzellige Lungenkrebs.^[12]

Weitere Nachteile des Cisplatins sind seine begrenzte Wasserlöslichkeit und die Bioverfügbarkeit, die für eine orale Gabe zu gering ist. Gegen eine orale Gabe sprechen auch die ausgeprägten Nebenwirkungen im Magen-Darm-Trakt. Daher muss Cisplatin

intravenös appliziert werden, was die Akzeptanz der Therapie durch die Patienten zusätzlich verringert.^[12]

Diese Limitierungen des Cisplatineinsatzes haben die Entwicklung neuer platinhaltiger Wirkstoffe vorangetrieben.

1.2.3 Wirkmechanismus und Pharmakodynamik von Cisplatin

Nach der intravenösen Applikation muss das Cisplatin in das Tumorgewebe und dann in die Tumorzellen aufgenommen werden. Der Mechanismus der Aufnahme ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Eine passive Diffusion über die Zellmembranen erscheint als am wahrscheinlichsten. Hierfür sprechen unter anderem die lineare Abhängigkeit des Zellgehalts an Cisplatin von der Konzentration des umgebenden Mediums (Fick'sches Gesetz)^[16], die Nichtinhibierbarkeit der Substanzaufnahme in die Zelle durch Strukturanaloga^[17] als auch elektronenmikroskopische Untersuchungen^[18], die eine gleichmäßige Verteilung des aufgenommenen Cisplatins in Zellmembran und Zytoplasma zeigten. Bei einigen Untersuchungen hingegen konnte aber auch eine energieabhängige und eine rezeptorabhängige Zellaufnahme beobachtet werden.^[17]

Aufgrund des hohen Chloridgehalts außerhalb der Zellen (100mM) zeigt der Komplex eine relativ hohe Stabilität und damit niedrige Reaktivität. Nach dem Übertritt in das Zytosol mit einer deutlich niedrigeren Chloridkonzentration (4mM) findet aber relativ leicht ein Ligandenaustausch statt, so dass der Monoaquamonochloro-Komplex entsteht (siehe Abb. 1.2), der sehr reaktiv ist. Als Bindungssubstrat stehen in der Zelle verschiedene Schwefel- und Stickstoffnukleophile zur Verfügung. So weisen Proteine eine Fülle solcher Bindungsstellen auf. Daneben enthalten Zellen hohe Konzentrationen (0,5-10mM) des Tripeptides Glutathion, das u.a. Xenobiotika wie Cisplatin detoxifizieren kann. Die Bindung an Proteine gilt als eine Ursache für viele unerwünschte Nebenwirkungen.^[15,19-21] Als eigentlicher Wirkort ist weithin die DNA akzeptiert. Es sind verschiedene Cisplatin-DNA-Basen Addukte isoliert worden, wobei der Mechanismus, der nach Bindung an die DNA zum Zelltod führt, noch bei weitem nicht vollständig verstanden ist.

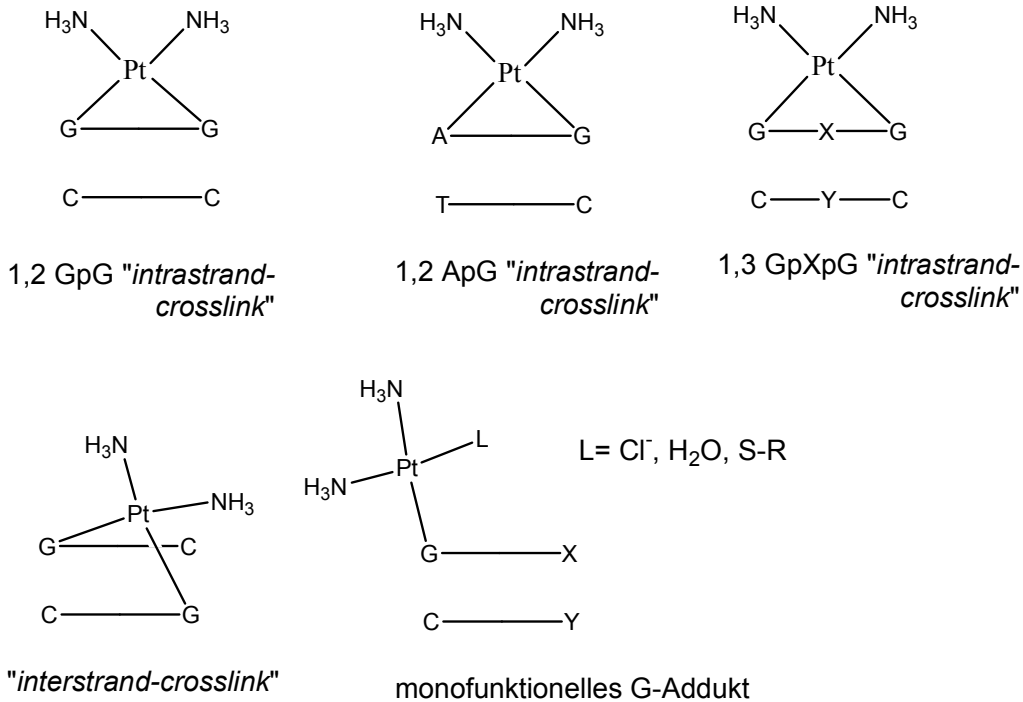


Abb. 1.4 Gebildete Cisplatin-Addukte innerhalb eines DNA-Stranges („*intrastrand-crosslink*“) und zwischen zwei verschiedenen Strängen („*interstrand-crosslink*“). (Adenosin =A/ Guanosin =G/ X,Y beliebiges Nucleosid/ p =Phosphatrest)

Allgemein anerkannt ist als erster Schritt die Bindung des Komplexes an das N7 einer Guaninbase. Dieses monofunktionale Addukt reagiert dann in der Folge mit benachbarten Nucleobasen, bevorzugt Guanosin und im geringeren Maße mit Adenosin (siehe Abb. 1.4). So bestehen 60-65% der Addukte aus 1,2GpG „*intrastrand-crosslinks*“ und 20-25% aus 1,2ApG „*intrastrand-crosslinks*“. Jeweils 1-2%, die aber möglicherweise nicht unbedeutend sind, stellen die 1,3GpXpG „*intrastrand-crosslinks*“ und die „*interstrand-crosslinks*“ dar. Die meisten Autoren vermuten, dass die zytotoxische Wirkung von den 1,2 GpG „*intrastrand-crosslinks*“ herrührt. Diese schwer reparablen Läsionen erzeugen in der DNA eine lokale Beugung und Entwindung der Stränge.^[22-24] Diese Strukturänderungen der DNA werden von mehreren Proteinsystemen erkannt. Zum einen von Reparatursystemen, die über Ausschneiden der fehlerhaften Stelle den Schaden beheben, zum anderen von einer Gruppe von Proteinen, den so genannten HMG-Proteinen (von High Mobility Group). Deren Bindung scheint eine wichtige Rolle für die zytotoxische Wirkung von Cisplatin zu haben. Hierdurch wird die Anlagerung der Reparaturproteine behindert und so eine Reparatur erschwert. Ein weiterer Aspekt dieser Bindung könnte

darin begründet sein, dass diese Proteine als wichtige Transkriptionsfaktoren an anderer Stelle fehlen und die Zellbiologie so an dieser Stelle empfindlich gestört wird.^[13,23]

Ein weiterer Bindungsort von Cisplatin ist die mitochondriale DNA. Da den Mitochondrien die Reparatur über Ausschneiden der betroffenen Basen nicht möglich ist, lässt sich die Cisplatin-Bindung an mitochondriale DNA als Wirkmechanismus nicht ausschließen.^[23,25]

Die letzte Konsequenz der Cisplatineinwirkung auf Tumorzellen ist die Auslösung der Apoptose, dem programmierten Zelltod.^[13,14,16,25-27]

Bei der bei einigen Zelltypen natürlich vorkommenden bzw. nach Cisplatinbehandlung auftretenden Resistenz handelt es sich um ein Ereignis, bei dem häufig viele biochemische Parameter verändert worden sind.^[28]

- *Reduktion der Zellakkumulation* z.B. durch Überexpression von Ausschleusungsproteinen.^[29-32]
- *Erhöhter Zellgehalt an Glutathion*, dessen Thiolgruppe mit dem Platinzentralatom eine stabile Bindung ausbilden kann. Dieses Addukt wird dann aktiv ausgeschleust.^[33-35]
- *Überexpression von Metallothioneinen*, die evolutiv als Schwermetalle wie Kadmium komplexierende Proteine entstanden sind. Sie komplexieren Cisplatin ebenfalls mit hoher Effizienz.^[36-38]
- *Gesteigerte Reparatur bzw. Toleranz von Platin-DNA-Addukten*^[14,25,26,34,39,40]

1.2.4 Strukturelle Weiterentwicklungen an Neutralliganden und Abgangsgruppen

Zur Verringerung der Nebenwirkungen und zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurden Anstrengungen unternommen, die letztendlich den Wirkstoff Carboplatin hervorbrachten. Carboplatin (siehe Abb. 1.5) hat mit der 1,1-Cyclobutandicarbonsäure eine deutlich stärker gebundene Abgangsgruppe als Cisplatin. Durch die reduzierte Reaktivität zeigt Carboplatin ein anderes Nebenwirkungsspektrum. So werden die von Cisplatin bekannten unerwünschten Effekte nur selten beobachtet. Stattdessen ist bei Carboplatin die Myelosuppression dosislimitierend. Die Nebenwirkungen treten bei

deutlich höheren Dosierungen als bei Cisplatin auf. Allerdings werden für dieselbe Antitumoraktivität auch höhere Dosierungen benötigt, so dass letztendlich nur eine ähnliche Effizienz wie für Cisplatin erreicht wird. Durch die verbesserte Wasserlöslichkeit und die deutlich höhere Stabilität wird die Applikation jedoch wesentlich erleichtert, so dass es bis heute einen immer breiteren Einsatz im klinischen Bereich erfahren hat. Bezüglich der Resistenzentwicklung und des Anwendungsspektrums teilt es wesentliche Nachteile des Cisplatins.^[12-14]

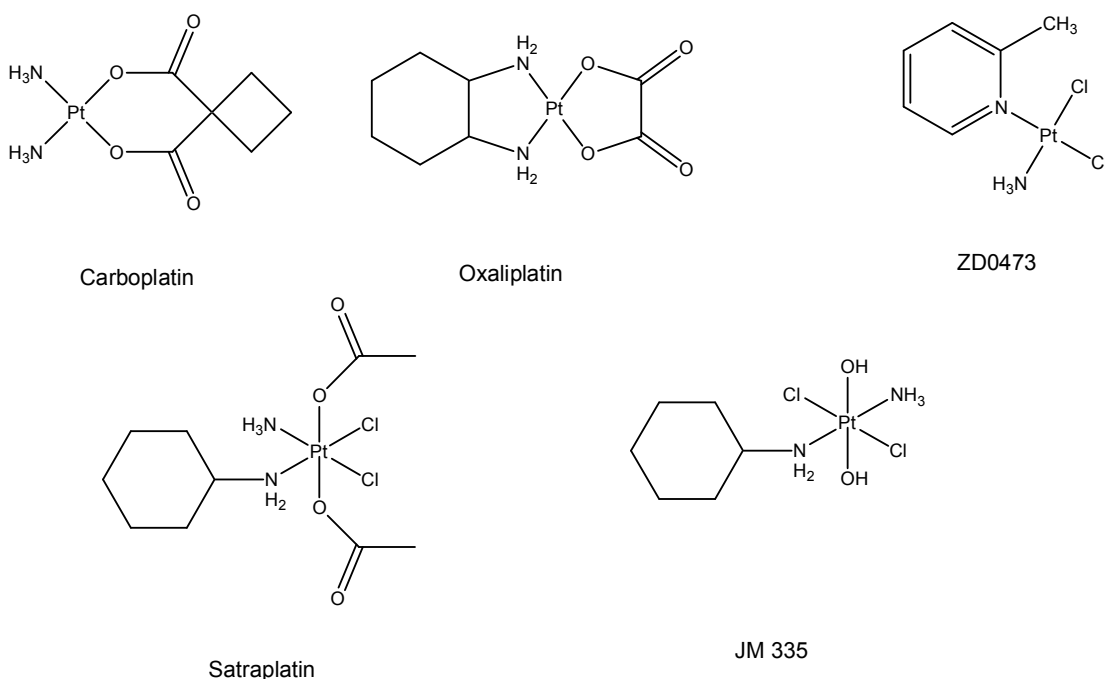


Abb. 1.5 Strukturen von Platinkomplexen der 2. und 3. Generation

So gewannen neben Veränderungen der Abgangsgruppe auch Veränderungen des Neutralliganden am Platin großes Interesse. Eine höhere Lipophilie des Neutralliganden sollte zu einer verstärkten Zellaufnahme führen, da dadurch eine passive Diffusion durch Membranen erleichtert wird. Zudem hat der Neutralligand Einfluss auf Struktur und zelluläre Erkennung der DNA-Addukte^[41], so dass die Hoffnung besteht, hierdurch das Anwendungsspektrum zu erweitern und auftretende Resistenzen gegenüber Cisplatin zu umgehen. Prominentester Vertreter dieser Bemühungen ist Oxaliplatin (siehe Abb. 1.5), das 1999 zugelassen wurde. Es ist aktiv gegen einige Cis- und Carboplatin-resistente Ovarialkarzinome und kollektorale Karzinome.^[12]

Ein weiterer Ansatz neben dem Einführen eines lipophilen Liganden ist das Abschirmen der axialen Positionen des Komplexes. Das kann zum einen geschehen durch Verwendung eines sterischen anspruchsvollen Liganden wie beim ZD0473 (siehe Abb. 1.5), wo die Methylgruppe des 2-Methylpyridin-Liganden eine axiale Position blockiert. Das erschwert den Angriff von Nucleophilen. So wird eine antiproliferative Wirkung an Cisplatin-resistenten Zellen beobachtet, deren Resistenz auf der Hochregulierung des Glutathionspiegels beruht.^[14,42] Zum anderen können die axialen Positionen durch Liganden besetzt werden, wenn als Zentralatom Platin in der Oxidationsstufe IV eingesetzt wird. Diese Komplexe haben eine hohe Inertheit gegenüber einem nucleophilen Angriff, so dass sie sogar oral appliziert werden können. Sie zeigen bei vielen Cisplatin-resistenten Zelllinien eine antiproliferative Wirkung. Man nimmt an, dass eine Reduktion des Pt(IV) zum Pt(II) als erster Schritt erforderlich ist, um die wirksame Komponente zu erlangen. Als vielversprechende Vertreter befinden sich die Komplexe Satraplatin (ehemals JM216) und JM335 (siehe Abb. 1.5) in klinischen Studien.^[12,14,42]

1.2.5 Entwicklung polynuklearer Platin-Alkylamin-Komplexe zur Änderung der Pharmakologie

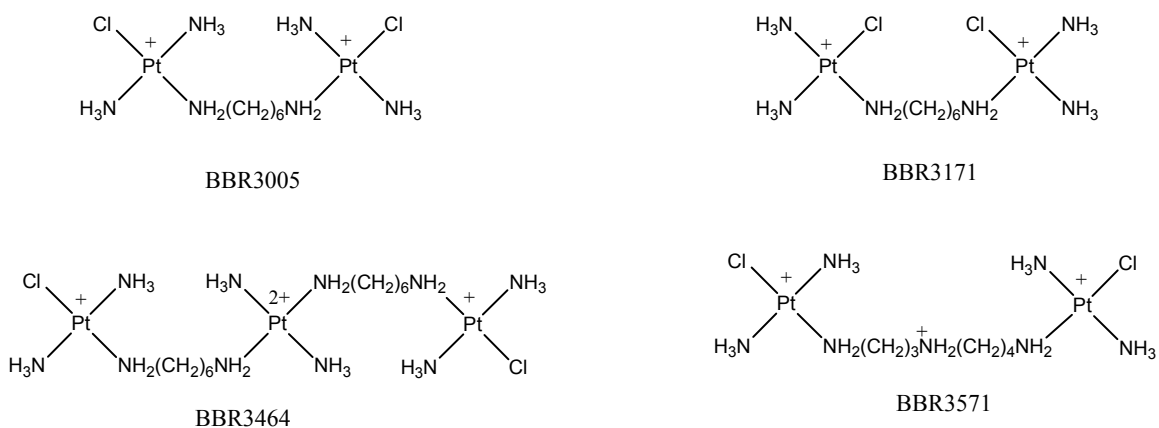


Abb. 1.6 Strukturen polynuklearer Komplexe (Gegenionen nicht aufgeführt)

Die von Cisplatin und anderen mononuklearen bifunktionalen Platinverbindungen verursachten 1→2 GG-, „*intrastrand crosslinks*“ zeichnen sich durch eine massive Störung der DNA-Sekundärstruktur aus. Diese Veränderungen werden u.a. von Reparaturproteinen erkannt, so dass bei Überexpression eine Resistenz gegen beinahe alle konventio-

nellen Platinverbindungen denkbar ist. Um diese Resistenz zu umgehen, wurden polynukleare Platinverbindungen synthetisiert (siehe Abb. 1.6), die DNA-Komplexe mit geringerer Sekundärstrukturstörung bilden.^[43] Die Verbindungen vom Typus der Verbindungen BBR3005 und BBR3171 zeichnen sich durch die Bildung von 1→4GG „*inter-*“ und „*intrastrand crosslinks*“ (siehe Abb. 1.7) aus, wobei an isolierten Oligonukleotiden die „*interstrand crosslink*“ Bildung überwiegt. Währenddessen übersteigt die „*interstrand crosslink*“ Bildung an aus Zellkultur isolierter DNA die von Cisplatin nur bei wenigen Verbindungen (BBR3171), wobei die Eliminierung dieser „*crosslinks*“ jedoch langsamer erfolgt.^[44] Die Kettenlänge des Brückenliganden (C4-C6) spielt hierbei nur eine geringe Rolle sowohl für die DNA-Adduktbildung als auch für die daraus resultierende antiproliferative Aktivität.^[45,46]

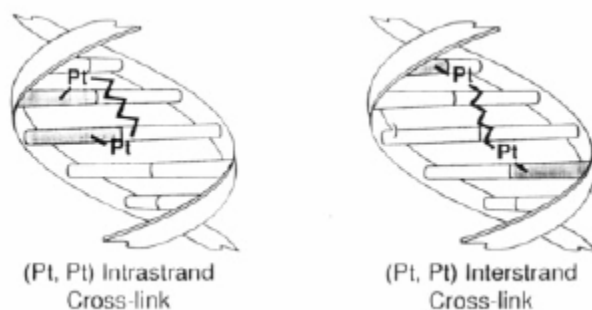


Abb. 1.7 DNA-„*crosslinks*“ von dinuklearen Platinverbindungen (entnommen aus [43])

Die Einführung von positiven Ladungen in die Kette durch sekundäre Stickstoffatome bzw. durch Tetraaminplatin führt zu den Verbindungen BBR3571 bzw. BBR3464. Neben der Komplexierung an die DNA-Basen stehen hier positive Ladungen zur elektrostatischen Bindung an das Phosphat-Rückgrat der DNA zur Verfügung.^[47] Dieser Effekt bewirkt eine teilweise starke Zunahme der antiproliferativen Aktivität.^[44,48,49] Auch bei diesen Verbindungen wird bei unterschiedlichen Kettenlängen kaum eine Änderung des Effekts gefunden.^[50]

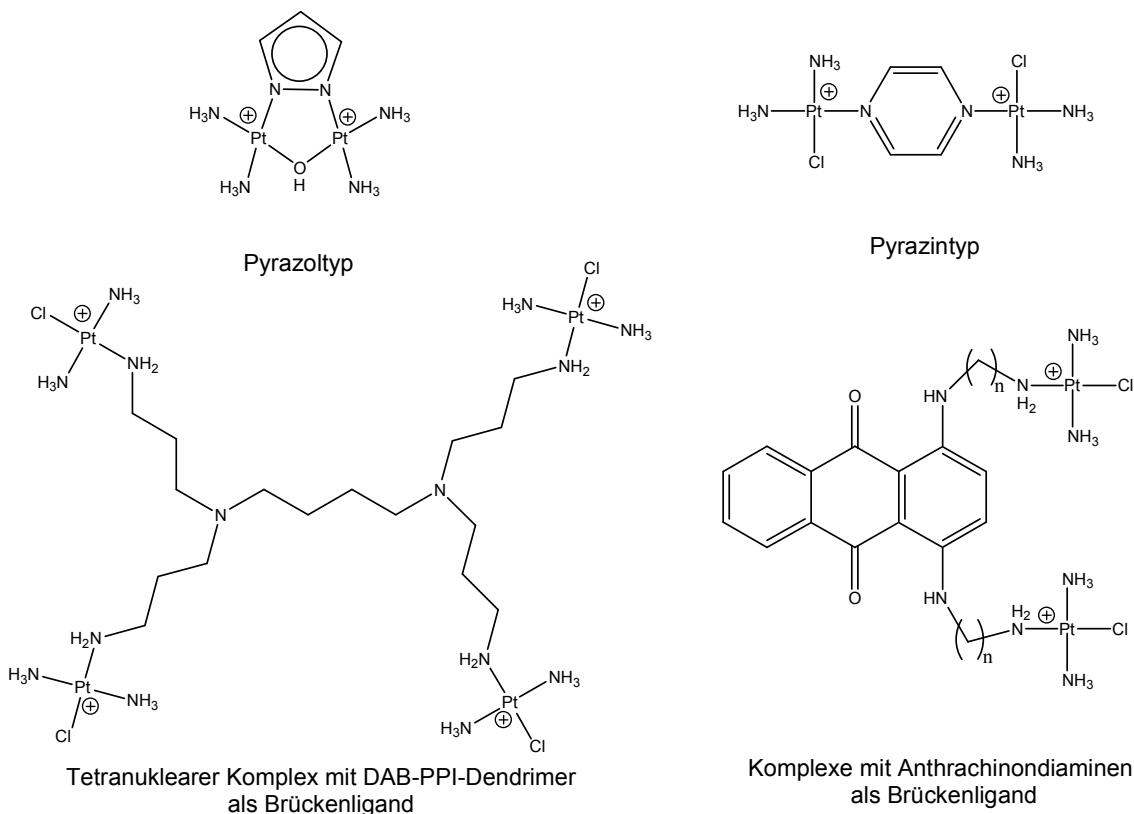


Abb. 1.8 Strukturen neuer polynuklearer Platinkomplexe (Gegenionen nicht aufgeführt)

Die Verwendung eines DAB-PPI-Dendrimers als Brückenligand in einen tetranuklearen Platinkomplex (siehe Abb. 1.8) führt zu einer Verbindung, die eine starke Minderung der antiproliferativen Aktivität an verschiedenen Ziellinien zeigt, obwohl die elektrostatischen Wechselwirkungen mit der DNA stärker sein sollten.^[51]

Neuere Entwicklungen nutzen Pyrazole und Pyrazine als Brückenliganden (siehe Abb. 1.8). Diese Verbindungen erzeugen 1→2 GG „*intrastrand crosslinks*“, die die Sekundärstruktur ebenfalls weniger stören als Cisplatin-Addukte.^[52,53]

Die Variation der Neutralliganden an den Platinatomen führt im Fall von methylsubstituierten Pyridinen teilweise sogar zu aktiveren Verbindungen als die Ausgangskomplexe mit Ammoniak-Neutralliganden.^[54] Der Einfluss chelatisierender Ethylen-diaminliganden auf die Aktivität wurde bisher nicht untersucht.

Viele dieser polynuklearen Verbindungen zeigen tatsächlich eine antiproliferative Aktivität an Zellen mit einer erworbenen Cisplatin-Resistenz, wobei die Konfiguration der Abgangsgruppe (Cl) zu dem Brückenliganden (cis↔trans), die Art der Neutralliganden und die Einführung von positiven Ladungen einen großen Einfluss haben.^[44,48,54,55]

Mit wenigen Ausnahmen wird für diese Verbindungen wie für Cisplatin eher geringe Aktivitäten an Brustkrebszellen gefunden, wo sie in der Regel stellvertretend an der MCF-7-Zelllinie getestet wurden.^[51,56]

Inwiefern die gesteigerte Aktivität auf höhere zelluläre Aufnahme der Wirkstoffe gegenüber Cisplatin zurückzuführen ist, ist bisher nur für die Mäuseleukämiezelllinie L1210 und die Osteosarkomzelllinie U2-OS untersucht worden. Hier haben äquitoxische Mediumkonzentrationen einen ähnlichen Platingehalt in den Zellen zur Folge.^[44,48,49,57] Kinetiken zur Zellaufnahme sind nur mit einer Maximaldauer von 4 Stunden durchgeführt worden. Hier deutet sich für BBR3464 eine schnellere und deutlich stärkere Akkumulation in den L1210-Zellen als für Cisplatin an.^[58] Eine strukturvergleichende Untersuchung wurde bisher nicht durchgeführt.

Die Frage nach dem Aufnahmeweg in die Zellen ist bisher nur ansatzweise untersucht worden. Die lineare Abhängigkeit der Aufnahme in die Zellen von der Konzentration im Medium stellt ein Indiz für die passive Diffusion dar. Hierfür gibt es unterschiedliche Ergebnisse: An der L1210-Zelllinie wird ein linearer Zusammenhang gefunden,^[58] während an der U2-OS-Zelllinie eine Sättigung zu beobachten ist.^[59] Letzteres ist ein Indiz für eine rezeptorvermittelte Aufnahme. Da die untersuchten Moleküle eine positive Ladung tragen und damit sehr hydrophil sind, ist eine direkte Diffusion durch die Membran schwer vorstellbar. Darum wurde vermutet, dass die Aufnahme über zellmembrangebundene Polykationen-Transporterproteine geschieht. Diese sind für die Aufnahme der physiologischen Polykationen Spermin und Spermidin verantwortlich. Durch Zellaufnahmeexperimente an einer für diesen Transporter defizienten Zelllinie konnte aber gezeigt werden, dass diese Trägersysteme bei der Zellaufnahme keine Rolle spielen.^[48]

Bei Versuchen mit dinuklearen Platinverbindungen mit Diaminoanthrachinon als Brückenligand (siehe Abb. 1.8) wird der freie Brückenligand, der über passive Diffusion das Zellinnere erreicht, deutlich schneller (ca. 10mal) als der Platinkomplex aufgenommen. Auch bei der intrazellulären Verteilung zeigt sich ein vollkommen unterschiedliches Bild. Während der freie Brückenligand nach kurzer Zeit (2h) im Zellkern visualisiert werden kann, zeigt sich für die Platinkomplexe eine Lokalisation in den Lysosomen.^[60]

1.2.6 Entwicklung von estrogenen Platinkomplexen

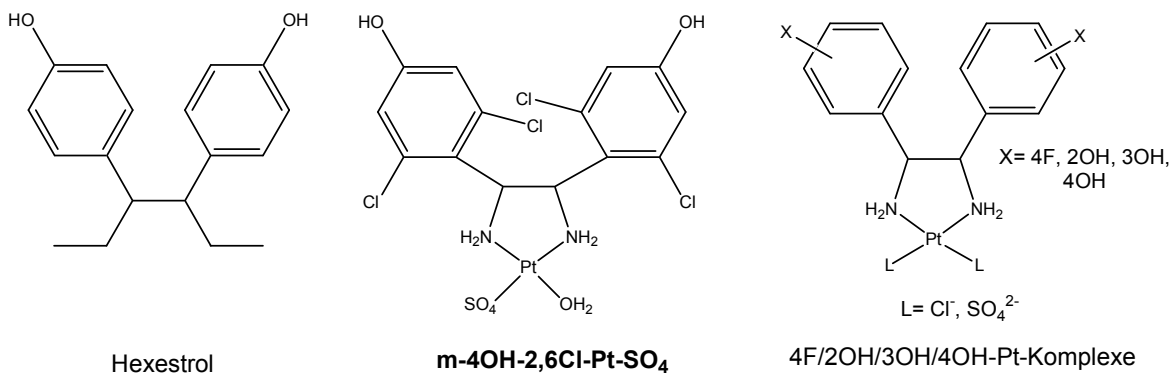


Abb. 1.9 Strukturoptimierungen zur Erweiterung des Anwendungsspektrums von Platinkomplexen auf Mammakarzinome

Ein weiterer Ansatz für die Erweiterung des Anwendungsspektrums von Platinverbindungen ist die Modifikation des Neutralliganden dahingehend, dass eine Bindung an Hormonrezeptoren erfolgt.^[61] In der Folge wird der am Rezeptor gebundene Platin-komplex zusammen mit diesem in den Kern delokalisiert und kann dort antiproliferative Effekte verursachen. Dieses „*drug targeting*“ soll die Therapie des Mammakarzinoms ermöglichen, das der Therapie mit Cisplatin nicht zugänglich ist.

Abgeleitet aus der Struktur des Hexestrols (siehe Abb. 1.9) wurde das 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin-Derivat synthetisiert, das als Neutralligand für Platin-komplexe genutzt wurde. Der 4OH-Pt-Komplex (siehe Abb. 1.9) zeigt nur moderate antiproliferative Effekte, ohne estrogen zu wirken.^[62,63] Daraufhin wurden in die Arylringe des Neutralliganden verschiedene Substituenten in Position 2 und 6 eingeführt. Einige der resultierenden Komplexe agieren als echte Estrogene.^[64,65] Für den Komplex **m-4OH-2,6Cl-Pt-SO₄** (siehe Abb. 1.9) wurde auch die selektive Anreicherung in

estrogenrezeptorhaltigen Tumoren gezeigt. Hierbei wies dieser Komplex an ER-positiven Tumoren eine ausgezeichnete Wirksamkeit auf. Bei ER-negativen war dieser Komplex nicht aktiv, so dass der Verlust des Estrogenrezeptors zu einer Resistenz gegenüber diesem Komplex führt.^[62]

1.2.7 Weiterentwicklungen von Platinkomplexen mit Ethylendiamin-Neutral-liganden

Da der 4OH-Pt-Komplex (siehe Abb. 1.9), ohne estrogenen Wirkung zu zeigen, antiproliferative Wirkung an Mammakarzinomzellen zeigte^[62,63], wurde eine Strukturvariation durchgeführt, um die Wirkung zu optimieren. So zeigte die Verschiebung der OH-Gruppe von Position 4 des Arylrings in die Positionen 3 und 2 eine Erhöhung der antitumoralen Wirkung an verschiedenen Zelllinien.^[66-69]

Der Ersatz der OH-Gruppen durch Fluor führt zu einer Reihe von hochaktiven Zytostatika.^[70-73] Hierbei zeigt sich *in vitro* die große Bedeutung der Konfiguration (rac deutlich stärker wirksam als meso), wobei die Abhängigkeit von der Stellung des Fluor-substituenten in den Arylringen verloren geht. Die Abgangsgruppe (Chlorid oder Sulfat) spielt eher eine untergeordnete Rolle.^[71,72] In den *in vivo* Experimenten hingegen spielt die Bioverfügbarkeit die entscheidende Rolle. Die *in vitro* hoch wirksamen Dichlorokomplexe sind teilweise aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit *in vivo* beinahe unwirksam. Am MXT-M3.2 Mammakarzinom der Maus zeigt lediglich der Komplex **m-4F-Pt-Cl₂** eine moderate Wirkung. Die gut wasserlöslichen Aquasulfatokomplexe hingegen hemmen das Wachstum dieses estrogenabhängigen Modelltumors sehr stark. Im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen wird hier keine Abhängigkeit von der Konfiguration gefunden d.h. die meso konfigurierten Komplexe sind ähnlich wirksam wie die racemischen Komplexe. Als kompensierender Effekt wird neben der verringerten Wasserlöslichkeit vor allem eine verstärkte Bindung der racemischen Komplexe an Bionukleophile wie Serumalbumine vermutet. So wird an einem estrogenunabhängigen Tumormodell, dem MXT-Ovex Mammakarzinom, sogar eine deutlich höhere Hemmung

des Tumorwachstums bei Anwendung des meso-konfigurierten Komplexes als bei Anwendung der racemischen Komplexe gefunden.^[70]

Ein Grund für die verschiedenen antiproliferativen Effekte der Diastereomere in den *in vitro* Versuchen könnte in der unterschiedlichen sterischen Hinderung der Bindung des Komplexes an die DNA liegen. Aus Konformationsstudien wurde geschlossen, dass bei den meso-Komplexen in jeder Konformation immer ein Phenylring axial steht. Dies könnte eine geringere Bindung an die DNA hervorrufen.^[74] Daher wurde im Folgenden eine Strukturoptimierung dahingehend betrieben, dass ein Phenylring durch sterisch weniger anspruchvolle Alkylgruppen ersetzt wurde. Hierbei wurde in verschiedenen Arbeiten ein Arylring mit bewährtem Substitutionsmuster beibehalten (4OH,2,6-Cl^[75]/2OH^[76]/4F^[77,78]) und Strukturoptimierungen für die Substitution des zweiten C-Atoms des Ethylendiamins bezüglich besserer antitumoraler Aktivität vorgenommen.

1.3 Makromolekulare Therapie

1.3.1 Grundlagen

Durch die Anbindung von Zytostatika an wasserlösliche Polymere lassen sich mehrere ihrer negativen Eigenschaften umgehen. So wird zum einen ihre Löslichkeit erhöht, was ihre Applikation deutlich erleichtert. Zum anderen wird die Zirkulationsdauer im Blut verlängert, da Makromoleküle ab einer Molekülgröße von 40kD nur schwer renal ausgeschieden werden.^[79-84] Und nicht zuletzt erreicht man deutlich höhere Tumorselektivität, wodurch die dosislimitierenden Nebenwirkungen erst später einsetzen, was eine höhere Dosierung erlaubt. Grundlegend dazu ist die Erkenntnis, dass sich Blutgefäße in Tumoren von denen im gesunden Gewebe stark unterscheiden. Die Blutgefäßdichte ist deutlich erhöht, und die Blutgefäße weisen viele Defekte auf. Aus den oben genannten Gründen und wegen einer erhöhten Expression von endothelialen Permeabilitätsfaktoren wie Bradykinin und Hyp³-Bradykinin im tumoralen Gewebe kommt es zu einer gesteigerten Permeabilität der Blutgefäße im Tumor. Dadurch gelangen Makromoleküle wie Proteine verstärkt ins Tumorgewebe. In gesundem Gewebe dagegen kommt es zu keinem Übertritt von Makromolekülen mit einer Molekülmasse

größer als 50kD aus der Blutbahn. Während in gesundem Gewebe die lymphatische Drainage unter anderen dafür sorgt, dass aus der Blutbahn übergetretene Makromoleküle wieder aus dem Gewebe entfernt werden, ist dieses System in Tumoren kaum ausgebildet. So treten nicht nur Makromoleküle vermehrt ins Tumorgewebe über, sondern sie werden auch deutlich schlechter aus diesen Geweben eliminiert. Dieser Effekt wird als erhöhter Penetration- und Rückhalte-Effekt bezeichnet (EPR-Effekt).^[79,80,85] Zudem weisen die Tumorzellen aufgrund ihrer erhöhten metabolischen Aktivität eine gesteigerte endozytotische Aufnahme von Makromolekülen auf.^[81] Diese Effekte sind besonders stark im Bereich der Kontaktfläche zu dem gesunden Gewebe ausgeprägt, wo der Tumor besonders aggressiv wächst.^[86]

Als ein wichtiges Kriterium für die makromolekulare Therapie muss der hohe und lang anhaltende Plasmaspiegel angesehen werden, da die Anreicherung im Tumor über den EPR-Effekt deutlich länger (max. Anreicherung 48-72h) als die passive Diffusion der konventionellen Zytostatika dauert. Daher wird die renale Ausscheidung als der kritische Faktor angesehen. Bei Molekularmassen unter 40kD wurde in verschiedenen Arbeiten eine schnelle Ausscheidung über den Urin gefunden.^[79-84] Aber auch Moleküle mit niedrigeren Molekülmassen (<40kD) werden nicht wie zu erwarten ausgeschieden, wenn eine Bindung an Plasmaproteine wie humanes Serumalbumin (HSA) oder Transferrin erfolgt.^[85,87]

Verschiedene Autoren haben versucht, unterschiedliche Zytostatika wie Doxorubicin^[81,86,88-90], Daunomycin^[81,91], Camptothecin^[81,82,92], Paclitaxel^[81] (siehe Abb. 1.10) und Cisplatin^[87,93-100] mit Makromolekülen zu koppeln. Die Kopplung dieser Zytostatika an die Makromoleküle senkt die *in vitro*-Aktivität in der Regel deutlich (Ausnahme Bindung von Cisplatin an Alginate^[87]). Dagegen ist die *in vivo*-Aktivität deutlich gesteigert, so dass die Vorhersage durch *in vitro*-Versuche über die Wirksamkeit *in vivo* für diese Wirkstoffklasse aufgrund ihrer massiv veränderten Pharmakokinetik wenig Gültigkeit haben. So zeigen Konjugate, die das Zytostatikum relativ schnell freisetzen, eine hohe Aktivität *in vitro* im Vergleich zu langsam freisetzenden Konjugaten. Die letzteren zeigen wiederum hohe Aktivität *in vivo*, während die schnell Zytostatikum freisetzenden

Konjugate sich lediglich durch eine mit dem reinen Zytostatikum vergleichbare hohe allgemeine Toxizität auszeichnen.^[94,95]

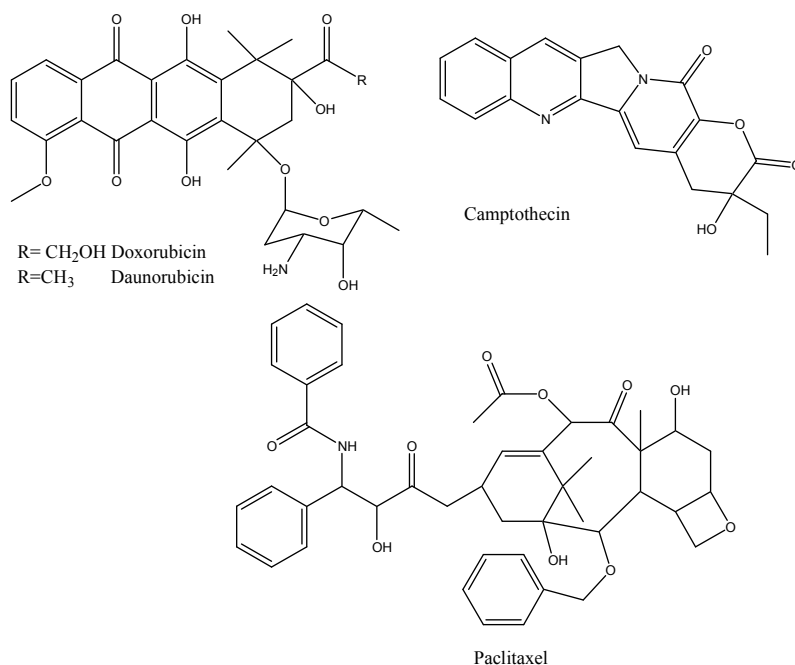


Abb. 1.10 Zytostatika, die an makromolekulare Träger gebunden wurden

Als weiterer essentieller Faktor ist die selektive Freisetzung aus den Konjugaten zu nennen. Denn Konjugate, die keine Freisetzung erlauben, sind trotz Anreicherung im Tumor unwirksam.^[81,95] Zur Freisetzung werden zwei verschiedene Besonderheiten der Tumorbiologie ausgenutzt. Zum einen ist das die verstärkte Aufnahme von Makromolekülen durch Endozytose in Tumorzellen. Der endosomale Aufnahmeweg führt in der Regel in saure Zellkompartimente wie späte Endosomen und Lysosomen. Der pH-Wert kann hier genutzt werden, um Wirkstoffe, die hydrolyselabil gebunden sind, freizusetzen. Das wird ausgenutzt, um über Dicarbonsäuren gebundenes Cisplatin^[93,94,97,100] bzw. um über Ester und Hydrazone gebundene Anthrazykline und Camptothecin^[81,82,90,92] im Tumor freizusetzen. Zum anderen ist eine verstärkte Expression von lysosomalen und extrazellulären Proteasen von großer Bedeutung in der Cancerogenese, da hierdurch die Invasivität des Tumors bedeutend gesteigert wird.^[101] Eine häufig in Tumoren überexprimierte lysosomale Protease ist das Cathepsin B.^[102,103] Daher wurden schon frühzeitig Peptidketten entwickelt, die durch Cathepsin B gespalten werden können.^[104,105] Seither wurden verschiedene Anthrazykline und Platinderivate über diese

Peptidketten an Makromoleküle gebunden, wobei neben sehr guter Wirksamkeit auch die intratumorale Freisetzung gezeigt werden konnte.^[81,86]

Ein Weg, die endozytotische Aufnahme zu verstärken, ist die kovalente Bindung von Antikörpern an diese Macromoleküle, wodurch Oberflächenrezeptoren der Tumorzellen gezielt belegt werden.^[81,88] Hierdurch wird in der Regel auch *in vivo* eine höhere Wirksamkeit beobachtet, obwohl die Tumorspezifität *in vivo* nicht erhöht werden kann.^[106]

Bei den meisten bisher verwendeten polymeren Systemen handelt es sich um lineare Polymere. Diese weisen aufgrund der Bedingungen der Polymerisation in der Regel eine große Polydispersität auf, d.h. diese Moleküle zeigen eine breite Molekularmassenverteilung. Moleküle verschiedener Massen verhalten sich unterschiedlich im menschlichen Körper. Um also eine möglichst einheitliche und reproduzierbare Pharmakokinetik zu gewährleisten, sollten die makromolekularen Träger eine möglichst niedrige Polydispersität aufweisen. Zudem erfolgt eine Wirkstoffanknüpfung in linearen Polymeren statistisch und aufgrund der geknäuelten Struktur werden die gebundenen Wirkstoffe teilweise nicht an der Oberfläche präsentiert, was diese Träger eher uneffizient gestaltet.^[107]

1.3.2 Dendrimere als makromolekulare Träger

Dendrimere sind polymere Makromoleküle mit spezieller Architektur. Ihr Name leitet sich von „dendron“ (*griech.* Baum) und „meros“ (*griech.* Teil) ab und so weisen sie auch eine baumartige, sich regelmäßig verzweigende Struktur auf, die einer Baumkrone nicht unähnlich ist. Prinzipiell bestehen diese Moleküle aus einem polyfunktionalen Kernmolekül, an das schalenförmig die Verzweigungseinheiten kovalent angebunden werden. Jede Schale wird als Generation bezeichnet und vom Kernmolekül beginnend aufwärts gezählt (siehe Abb. 1.11). Je nach Multiplizität der Verzweigungseinheiten weist jede Schale ein Vielfaches der Endgruppen des Kernmoleküles bzw. der Vorgängergeneration auf. So kann je nach Struktur des Kernmoleküles und der Verzweigungseinheiten eine unterschiedliche Endgruppendichte auf der sphärischen Oberfläche erreicht werden.^[108] Da Dendrimere durch eine definierte schrittweise

Synthese erhalten werden, stellen sie hochmonodisperse Systeme dar, die zudem über Kontrolle der Oberflächenfunktionalitäten eine definierte Wirkstoffanknüpfung gewährleisten.^[83,107,109]

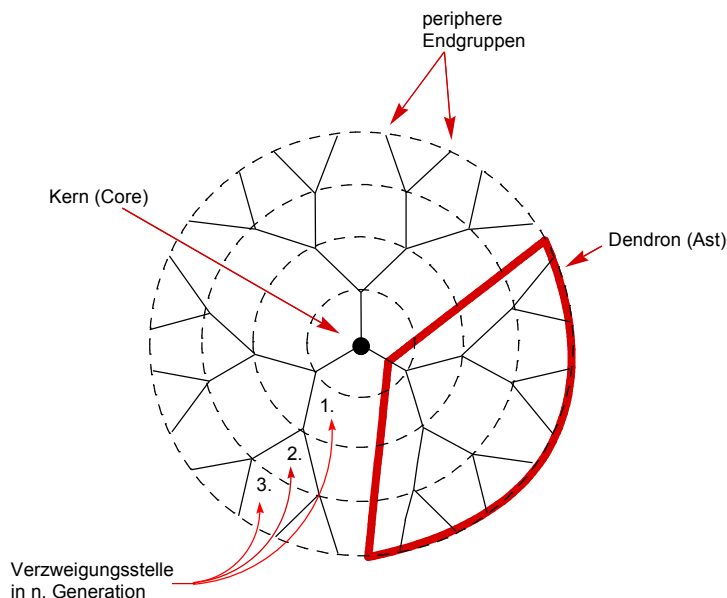


Abb. 1.11 Schematischer Aufbau eines sphärischen Dendrimers der dritten Generation (entnommen aus [109])

Aufgrund der großen Vielfalt an synthetisierten Dendrimern soll hier nur auf die bisher für biologische Zwecke konzipierten Dendrimertypen eingegangen werden. Diese weisen Endgruppen auf, die eine hohe Wasserlöslichkeit bedingen. Hierbei überwiegen Amine gegenüber Carbonsäuren und Alkoholen. Zur Unterscheidung werden die Dendrimertypen in der Regel nach den charakteristischen kovalenten Bindungen zwischen den einzelnen Generationen und teilweise auch nach der Struktur der Verzweigungseinheit bzw. des Kernmoleküls benannt. Die größte Bedeutung für die biologische Anwendung haben Polyamidoamin- (PAMAM), Polyethylenimin- (PEI) bzw. Polypropylendendrimere (PPI) und im geringeren Maße Polyesterdendrimere.

Die PAMAM-Dendrimere haben die Besonderheit, dass sie als Vollgenerationsmolekül Amine und als Halbgenerationsmoleküle Carbonsäuren als Endgruppen aufweisen (siehe Abb. 1.12). Bei den PEI- und PPI-Dendrimern unterscheidet man solche, die ein Diaminobutan (DAB) (siehe Abb. 1.12) bzw. ein Diaminoethan (DAE) Kernmolekül tragen.

PAMAM- und PEI-Dendrimere werden heute kommerziell vertrieben und dienen u.a. zum Einbringen von Fremd-DNA in Zellen (Transfektion).^[110-121] Daneben laufen Bestrebungen, diese Moleküle als Träger für Wirkstoffe überwiegend für Zytostatika zu nutzen.^[90,93,107,122-126]

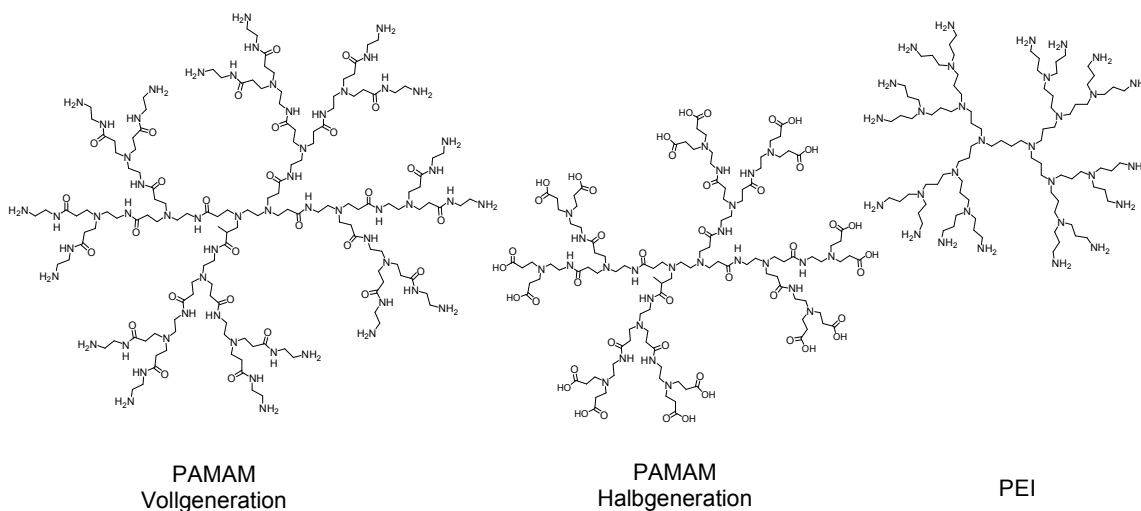


Abb. 1.12 Dendrimertypen mit großer Bedeutung für biologische Anwendungen

Generell kann man die hohe Endgruppendichte der Dendrimere ausnutzen, da sowohl Anbindungsstellen für die Wirkstoffe als auch für Gruppen zur Solubilisierung und zur Adressierung von Zielzellen über Rezeptoren (wie zum Beispiel Antikörper^[123] und Folsäure^[127]) genügend zur Verfügung stehen. Da diese auf einer sphärischen Oberfläche sitzen, werden sie optimal den Zielzellen präsentiert.

Ferner weist die dreidimensionale Struktur im Inneren der Dendrimere auch Kavitäten auf, in denen Moleküle eingelagert werden können und über nichtkovalente Bindungen retendiert werden können. Diese Möglichkeit hat jedoch eine eher geringe Bedeutung.^[128,129]

Ein großes Problem bei der Entwicklung dieser Trägersysteme ist die Gewährleistung der Reinheit. Je nach Synthesestrategie können hier verschiedene Strukturdefekte auftreten, so dass die Monodispersität nicht mehr gegeben ist. Daher ist eine Analysenmethode nötig, die solche kleinen Änderungen in Größe zu trennen vermag. Eine solche Methode ist ebenfalls essentiell um die Wirkstofffreisetzung und den Verlauf des biologischen

Abbaus zu charakterisieren. Mehrere Autoren zeigten den hohen Nutzen elektrophoretischer Methoden insbesondere der Kapillarelektrophorese.^[130,131]

1.4. Anwendung der Kapillarelektrophorese in der Analytik von Dendrimeren und Platinverbindungen

Bei der Kapillarelektrophorese erfolgt die Trennung eines Analytgemisches unter angelegter Spannung in einer mit Puffer gefüllten Kapillare. Hierbei werden nach Injektion der Probe die Enden der Kapillare in Puffergefäße gebracht, in denen sich auch die Elektroden befinden. Nach Anlegen der Spannung erfolgt ein Stromfluss durch die Kapillare, so dass die Ionen des Puffers zur entgegengesetzt geladenen Elektrode wandern. Ladung tragende Analyten bewegen sich ähnlich wie die Pufferionen. Hierbei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit sowohl von der Ionenstärke des Trennpuffers als auch von der elektrophoretischen Mobilität (μ) des Stoffes ab:

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad \text{mit } q: \text{ Ladung des Ions}$$

η : Viskosität der Lösung
 r : Ionenradius

Ab einem Puffer-pH-Wert von 4 setzt langsam eine Deprotonierung der Silanolgruppen der „fused-silica“-Oberfläche der Kapillare ein. Dadurch kommt es zu einer Anlagerung einer Gegenionenschicht aus Pufferkationen. Bei Anlegen einer Spannung bewegt sich diese Gegenionenschicht Richtung Kathode und bewegt dabei den Kapillareninhalt stempelförmig mit. Dieses Phänomen wird als Elektroosmotischer Fluss (EOF) bezeichnet. Dadurch werden auch anionische Analyten zur Kathode bewegt, wenn ihre Wanderungsgeschwindigkeit geringer als die Geschwindigkeit des EOF ist. Visualisieren lässt der EOF sich durch neutrale nicht geladene Moleküle wie Aceton, die mit dem Durchtritt der EOF-Front im Detektionsfenster erscheinen. Positiv geladene Moleküle erscheinen davor und die negativ geladenen Analyten danach. Hierbei gilt: Je mobiler das Anion ist, desto später erscheint es am Detektor (siehe Abb. 1.13).

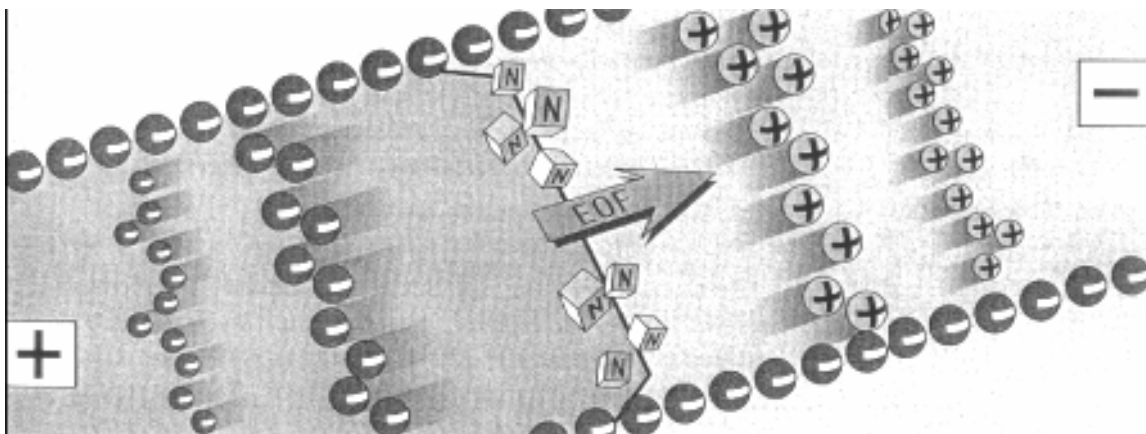


Abb. 1.13 Kapillarelektrophoretische Trennung unter Anwendung des EOF (entnommen aus ^{3D}CE-Handbuch (Fa. Agilent))

Die Detektion kann prinzipiell mit allen aus der HPLC bekannten Detektoren durchgeführt werden. In unserem Fall stand ein Dioden-Array-Detektor (DAD) zur Verfügung. Dieser misst die Lichtabsorption über einen Wellenlängenbereich von 190nm bis 400nm. Dadurch erhält man zu jedem Peak auch das Absorptionsspektrum, das weitere Information zur Identität des Peaks liefert. Die abgebildeten Elektropherogramme sind durch Extraktion einer Wellenlänge entstanden.

In dieser Arbeit wurden vor allem Dendrimere, Platinverbindungen und nachrangig Proteine getrennt. Hierbei tragen die Analyten Ladungen und migrieren daher selbst. Da bei Dendrimeren Fehlstellen im Aufbau kaum eine Veränderung der Polarität aber eine Änderung des hydrodynamischen Radius und damit der Mobilität hervorrufen, wird für die Dendrimerreinheitsanalytik die Kapillarelektrophorese der HPLC vorgezogen. Allerdings wurden hierfür kaum detaillierte Methoden publiziert.^[130,131] Ein weiteres Feld ist die physiko-chemische Charakterisierung der Dendrimere. Es sind verschiedene Untersuchungen zur Mobilität bei verschiedenen Ionenstärken, pH-Werten und elektrischen Feldern publiziert.^[132-135]

Für etablierte Platinverbindungen wie Cisplatin sind Methoden zur Untersuchung der Stabilität unter physiologischen Bedingungen^[136], Reaktivität gegenüber Nukleotiden^[137-142] und der Reaktion gegenüber Serumproteinen^[143,144] publiziert worden. Im Vergleich zu der in der Analytik von Platinverbindungen etablierten HPLC zeigt die Kapillarelekt-

trophorese eine bessere Auflösung gerade bei ionischen Platinspezies. Die Analysenzeit ist in der Regel deutlich kürzer und Störungen durch unerwünschte Wechselwirkungen mit der stationären Phase bleiben aus. Der entscheidende Vorteil ist die Möglichkeit der Messung unter physiologischen Bedingungen, da keine Lösungsmittel benötigt werden. Auch die Injektion von komplexen biologischen Matrices ohne aufwändige Aufreinigung stellt in der Kapillarelektrophorese kein Problem dar.^[145] Der große Nachteil der Kapillarelektrophorese ist, dass wegen der relativen Unempfindlichkeit der UV-Vis-spektroskopischen Detektion hohe Konzentration vorliegen müssen, was eine gute Wasserlöslichkeit (>1mM) voraussetzt.

Für polynukleare Platinverbindungen hat weder die Kapillarelektrophorese noch die HPLC bisher Anwendung gefunden.

Trennungen, bei denen ungeladene Stoffe mit Hilfe von Detergenzmizellen analog einer „*reversed phase*“ (Umkehrphasen)-HPLC getrennt werden, wurden hier nicht durchgeführt. Hierbei fungiert der EOF als sehr akkurate Pumpe und negativ geladene Detergenzmizellen (z.B. aus Natriumlaurylsulfat) dienen als stationäre Phase, die sich entgegen dem EOF bewegt. Dies wird als MEKC-Modus bezeichnet (von „*micellar electrokinetic chromatography*“). Da Dendrimere unimolekulare Mizellen definierter Größe darstellen, wurden sie in letzter Zeit häufig als pseudostationäre Phasen in der MECK angewendet, wobei sie sich häufig den konventionellen Bedingungen überlegen zeigten.^[135]

