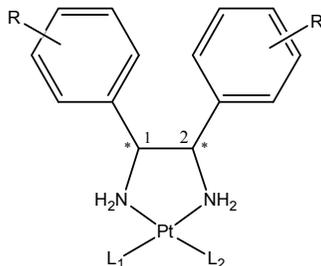


4 Untersuchungen an mononuklearen Platinverbindungen

4.1 Untersuchte [1,2-Diarylethylendiamin]platin(II)-Komplexe



Verbindung	L ₁	L ₂	R
m-4F-Pt-Cl₂	Cl ⁻	Cl ⁻	4F
r-4F-Pt-Cl₂	Cl ⁻	Cl ⁻	4F
m-4F-Pt-H₂O-SO₄	H ₂ O	SO ₄ ²⁻	4F
r-4F-Pt-H₂O-SO₄	H ₂ O	SO ₄ ²⁻	4F
m-2OH-Pt-Cl₂	Cl ⁻	Cl ⁻	2OH
r-2OH-Pt-Cl₂	Cl ⁻	Cl ⁻	2OH

Abb. 4.1 Strukturen der untersuchten [1,2-Diarylethylendiamin]platin(II)-Komplexen

In diesem Kapitel sollen die Eigenschaften verschiedener zytotoxischer Platinverbindungen untersucht werden, die zur Kopplung an Dendrimere oder zur Einbindung in polynukleare Komplexe in Frage kommen. Dabei wurden die Platin-Komplexe mit 1,2-Bis(4-fluorphenyl- bzw. 2-hydroxyphenyl)ethylen-diamin-Neutral-liganden untersucht (siehe Abb. 4.1). Diese tragen jeweils Aromaten mit identischen Substitutionsmuster an den C₁- und C₂-Atomen des Ethylen-diamins. Da diese C-Atome chiral sind, gibt es vier verschiedene Strukturisomere. Hierbei sind die Verbindungen mit entgegengesetzter Chiralität an den zwei C-Atomen (RS und SR) identisch und werden als meso bezeichnet. Die Verbindungen, bei denen die C-Atome die gleiche Chiralität (RR und SS) aufweisen, sind chemisch nicht unterscheidbar aber können getrennt werden. Da die Trennung aufwändig ist und teilweise kein Unterschied in der Wirkung festgestellt werden konnte^[197], wurde auf eine Trennung verzichtet und das Racemat

eingesetzt. Die Platinkomplexe mit symmetrischen Neutralliganden sind durch ihre relativ leichte synthetische Zugänglichkeit von Interesse.

4.1.1 Proteinbindung von [1,2-Diarylethylendiamin]platin(II)-Komplexen

Die Reaktivität der 4F-Pt-Cl₂-Komplexe, deren in Wasser, DMSO und DMF vorgelösten Aquasulfatokomplexe sowie der 2OH-Pt-Cl₂-Komplexe gegenüber humanem Serumalbumin (HSA) wurde bestimmt. Hierbei sollte der Einfluss des Neutralliganden, der Konfiguration des Neutralliganden und des Lösungsmittels auf die Reaktivität gegenüber Bionukleophilen untersucht werden

Verbindung	Geschwindigkeitskonstante [h ⁻¹]	Wiederfindung Ultrafiltration [%]	Wiederfindung ethanolische Präzipitation [%]
m-4F-Pt-Cl₂	-0,409	51±6	92±5
r-4F-Pt-Cl₂	-0,220	20±4	98±6
m-4F-Pt-H₂O-SO₄ in H ₂ O	-0,383	19±1	37±1
m-4F-Pt-H₂O-SO₄ in DMF	-0,661	28±1	41±1
m-4F-Pt-H₂O-SO₄ in DMSO	-1,59	58±2	52±2
r-4F-Pt-H₂O-SO₄ in H ₂ O	-0,305	31±1	41±1
r-4F-Pt-H₂O-SO₄ in DMF	-0,396	12±1	30±1
r-4F-Pt-H₂O-SO₄ in DMSO	-2,26	37±1	64±2
m-2OH-Pt-Cl₂	-0,257	90±2	57±1
r-2OH-Pt-Cl₂	-0,508	37±1	51±5
Cisplatin	-0,321	76±4	100±6

Tab. 4.1 Proteinbindungscharakteristika von [1,2-Diarylethylendiamin]platin(II)-Komplexen an HSA (n=3 für die Wiederfindungsexperimente)

Für die Komplexe mit 4F-Neutralliganden wurden folgende Abhängigkeiten der Reaktivität gegenüber HSA gefunden (siehe Tab. 4.1):

Abgangsgruppen: meso: SO₄(H₂O)≈Cl<SO₄(DMF)<SO₄(DMSO)



Konfiguration: $\text{rac} < \text{meso}$ für $\text{Cl}/\text{SO}_4(\text{DMF})$

$\text{rac} \approx \text{meso}$ für $\text{SO}_4(\text{H}_2\text{O})$

$\text{rac} > \text{meso}$ für $\text{SO}_4(\text{DMSO})$

Überraschend ist die schwache Reaktivität des in Wasser vorgelösten Aquasulfatokomplexes **m-4F-Pt-H₂O-SO₄**, die der Reaktivität des korrespondierenden Dichlorokomplexes ähnelte (-0,383 vs. -0,4709h⁻¹). Die aquatisierten Formen gelten als hochreaktive Spezies, während den Chlorokomplexen eine geringere Reaktivität zugeordnet wird.^[23] Da der Dulbecco's Puffer hohe Chloridgehalte aufweist, wäre eine Reaktion zu den korrespondierenden Chlorokomplexen denkbar.

Ein ebenso nicht erwartetes Ergebnis war die hohe Reaktivität der in DMF vorgelösten Aquasulfatokomplexe (rac und meso -konfiguriert). Diese Komplexe sind deutlich reaktiver als die im Wasser vorgelösten (für meso : -0,661 vs. 0,383h⁻¹ bzw. für rac : 0,396 vs. 0,305h⁻¹). DMF galt bisher als inertes Lösungsmittel für Aquasulfatokomplexe, aber die erhöhte Reaktivität deutete auf eine Veränderung des Ausgangskomplexes hin. Dass eine stabile Koordinierung des Lösungsmittels die Reaktivität stark beeinflusst, konnte an den in DMSO vorgelösten Komplexen erkannt werden. Hier ist die schnelle quantitativ ablaufende Reaktion mit dem Lösungsmittel bekannt^[78,198-200] und der resultierende DMSO-Komplex zeigte eine stark erhöhte Reaktivität gegenüber dem HSA (für meso : -1,59 vs. 0,409h⁻¹ bzw. für rac : -2,26 vs. 0,22h⁻¹) verglichen mit dem in Wasser vorgelösten Komplex. Hier dürfte der destabilisierende Effekt der DMSO-Koordinierung auf den cisständigen Liganden eine Rolle spielen.

Das Substitutionsmuster der Neutralliganden hatte ebenfalls großen Einfluss auf die Inaktivierung durch das HSA. So wurde bei den 2OH-Pt-Cl₂-Komplexen eine Umkehr der Reaktivität der Diastereomere beobachtet, so dass der racemische Komplex deutlich schneller als der meso -konfigurierte irreversibel durch HSA gebunden wurde (-0,508 vs. -0,257h⁻¹). Hierfür kann eine Abschirmung des Pt-Atoms durch die OH-Gruppe des

axialständigen Arylrings verantwortlich sein. Dadurch wird der Angriff als auch die Einnahme des Übergangszustandes erschwert.^[201]

Für die Wiederfindungen der 4F-Verbindungen, die Auskunft über Art und Stärke der Interaktion mit HSA geben, wurde folgendes gefunden (siehe Tab. 4.1): Mit Ausnahme der in Wasser vorgelösten Aquasulfatokomplexe wurden für die meso-konfigurierten Komplexe deutlich höhere Wiederfindungen aus den Ultrafiltraten im Vergleich zu den Racematen beobachtet. Für die Dichlorokomplexe war der Unterschied auf verschieden hoch reversibel lipophil gebundene Anteile zurückzuführen. Denn im Überstand der ethanolischen Präzipitation wurde bei beiden Diastereomeren fast eine vollständige Wiederfindung erreicht (51% (meso) bzw. 20% (rac) im Ultrafiltrat vs. 92% (meso) bzw. 98% (rac) im Überstand der ethanolischen Präzipitation).

Für die Aquasulfatokomplexe konnte keine klare Abhängigkeit von den Abgangsgruppen bzw. dem zum Vorlösen benutzten Lösungsmittel erkannt werden. Der geringe Unterschied zwischen den Wiederfindungen (bestimmt durch Ultrafiltration und ethanolische Präzipitation) ließ die Beteiligung anderer Bindungsmechanismen wie kovalente oder elektrostatische Bindung vermuten. Hierfür sprachen auch die generell recht niedrigen Wiederfindungen.

4.1.2 Untersuchungen zur Umsetzung von Aquasulfatokomplexen mit Chlorid und DMF

Die ähnliche Reaktivität von **m-4F-Pt-Cl₂** und in H₂O vorgelösten **m-4F-Pt-H₂O-SO₄** und die damit verglichen hohe Reaktivität des in DMF vorgelösten Aquasulfatokomplexes sollten nun näher untersucht werden. Für das DMF konnte eine Koordination an den Aquasulfatokomplex mittels NMR-Spektroskopie gezeigt werden. Diese ist jedoch nicht quantitativ (max. 50%) und die Art der Koordination blieb noch zu klären.^[78] Um die Art der Koordination, die Stabilität und Reaktivität des Aquasulfatokomplexes sowie die daraus resultierenden DMF-haltigen Spezies zu bestimmen, wurde die Kapillarelektrophorese eingesetzt. Die Hydrolyse von Cisplatin im physiologischen Bereich wurde bereits kapillarelektrophoretisch untersucht.^[145] Aufgrund der Möglichkeit

des Entstehens der Hydroxokomplexe durch Deprotonierung des Aqua-Liganden und der Interaktion der Platinkationen mit den deprotonierten Silanolgruppen der „fused silica“-Oberfläche der Trennkapillaren im physiologischen pH-Bereich^[202] wurde ein saurer Puffer-pH-Wert von 2,7 gewählt. Dieses System ermöglichte die Detektion der Diaquakomplexe.

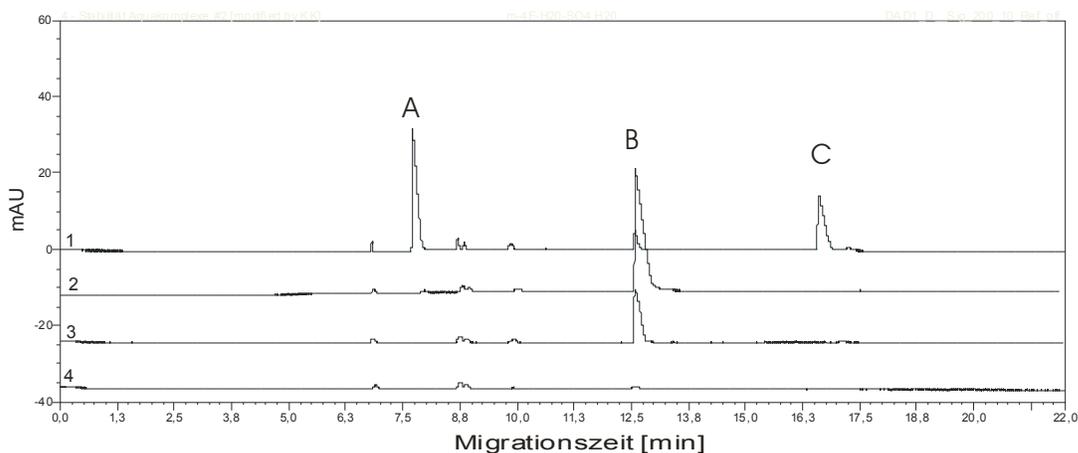


Abb. 4.2 Reaktion von **m-4F-Pt-H₂O-SO₄** in physiologischer Kochsalzlösung. Peak A: m-4F-Pt-(H₂O)₂, Peak B: m-4F-Pt-H₂O-Cl und Peak C: Reaktionsprodukt mit Puffer (H₂PO₄⁻)

Elektropherogramm 1 **m-4F-Pt-H₂O-SO₄** Standard in Elektrophoresepuffer (Phosphatpuffer pH2,7)

2 nach fünf Minuten Inkubation in physiologischer Kochsalz-Lsg.

3 nach 30 Minuten Inkubation in physiologischer Kochsalz-Lsg.

4 nach 90 Minuten Inkubation in physiologischer Kochsalz-Lsg.

Das Vorlösen im DMF reduzierte die Peakfläche beträchtlich (35%ige Reduktion), jedoch konnte kein zweiter Peak detektiert werden. Eine Vorinkubation mit physiologischer Kochsalzlösung bewirkte bei beiden zum Vorlösen genutzten Lösungsmitteln eine schnelle Reduktion der Peakfläche des Diaquakomplexes (siehe Abb. 4.2 Peak A). So konnte nach einer fünfminütigen Vorinkubation kein Diaquakomplex gefunden werden. Dafür trat ein neuer Peak mit größerer Migrationszeit (siehe Abb. 4.2 Peak B) auf. Dieser Peak konnte als der Monochloromonoaquakomplex gewertet werden, da durch den Austausch des Wassers durch Chlorid die Ladung des Moleküls und damit dessen elektrophoretische Mobilität reduziert war. Bei weiterer Inkubation reduzierte sich auch die Peakfläche dieses Peaks, so dass nach einer Stunde kein

Peak mehr zu detektieren war. Das vermutliche Endprodukt, der Dichlorokomplex, konnte nicht detektiert werden, da er keine elektrophoretische Mobilität aufweist. Bei den Vergleichsstandards, bei denen der Aquasulfatokomplex lediglich mit Wasser anstelle der Kochsalzlösung verdünnt war, zeigte sich ein langsamer Abbau des Diaquakomplexes, sobald er mit dem Elektrophoresepuffer inkubiert wurde. Dafür trat ein Peak deutlich niedrigerer Mobilität auf (siehe Abb. 4.2 Peak C). Da der Elektrophoresepuffer als einziges Anion Dihydrogenphosphat enthielt, war eine Koordination des Dihydrogenphosphats an den Komplex zu vermuten.^[203]

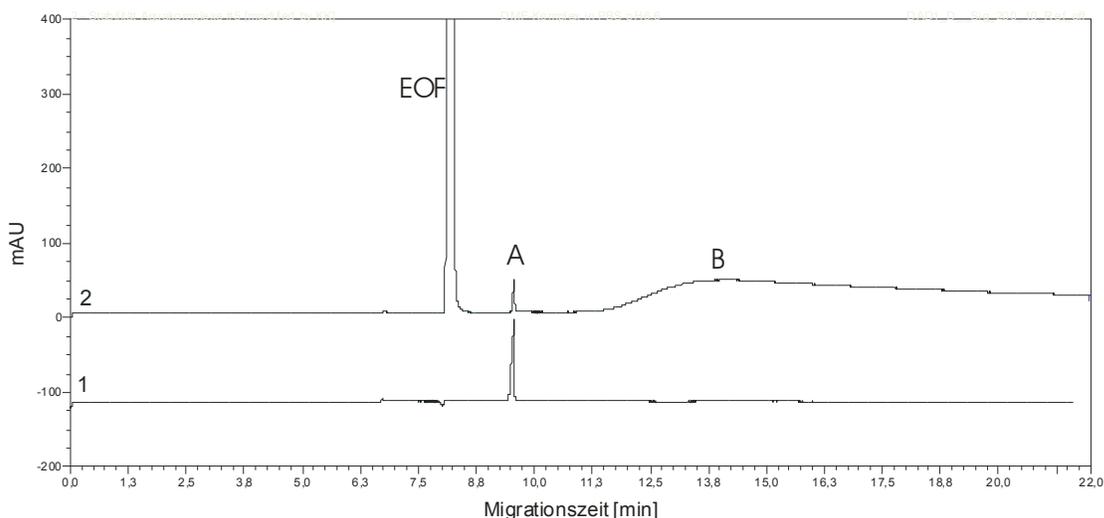


Abb. 4.3 Vergleich von $m\text{-}4\text{F-Pt-H}_2\text{O-SO}_4$ nach dem Vorlösen in Wasser (Elektropherogramm 1) und DMF (Elektropherogramm 2) kapillarelektrophoretisch in Phosphatpuffer pH6,6 als Trennpuffer analysiert

Die Instabilität des Diaquakomplexes im Elektrophoresepuffer behinderte auch das Arbeiten bei höheren pH-Werten ($>\text{pH}5$), bei denen durch das Auftreten des elektroosmotischen Flusses (EOF) auch die Detektion neutraler und anionischer Spezies ermöglicht wird. So sollten alle in der Probe vorhandenen Platinspezies wie der Dichlorokomplex und eventuelle Reaktionsprodukte detektiert werden. Nach Einbringen des Komplexes in einen Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,6 wurde ein Peak beobachtet, der kurz nach dem EOF migrierte. Dies deutet auf eine sehr schnelle Komplexierung des Diaquakomplexes zu einem anionischen Komplex geringer Mobilität hin (siehe Abb. 4.3 Peak A). Das konnte auf die Eigenschaft zurückgeführt werden, dass Diaquakomplexe mit Phosphat polynukleare Komplexe bilden können.^[203] Bei dem

Vorlösen im DMF wurde zusätzlich eine zweite anionische Spezies mit höherer Migrationszeit und somit höherer Mobilität detektiert (siehe Abb. 4.3 Peak B). Ihr elektro-phoretisches Verhalten war durch einen extrem breiten Peak gekennzeichnet.

Ein Wechsel zu Citrat-Ionen als Gegenionen bei einem pH-Wert von 6,1 führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Der Einsatz von Borat bei einem pH-Wert von 6,8 brachte keine auswertbaren Peaks. Lediglich in einem Acetatpuffer wurde der Diaquakomplex detektiert, der aber schnell zu einem weniger mobilen Kation, vermutlich dem Monoacetatomonoaqua-Komplex, weiterreagierte. Daneben wurde ein langsames Entstehen einer neutralen Verbindung, vermutlich des Diacetatokomplexes, beobachtet, die mit dem EOF migrierte. Es stand somit in der Nähe des physiologischen Bereichs kein Puffer zur Verfügung, um weitergehende Studien durchzuführen. Die hohe Reaktivität des Diaquakomplexes überraschte etwas, da eine Detektion eines Diaquakomplexes des Cisplatins unter physiologischen Bedingungen publiziert ist. Das kann durch die niedrigeren Phosphatkonzentrationen bedingt sein, die dort eingesetzt worden sind.^[141] Andere Autoren unterbanden die Reaktion durch die Verwendung der MEKC. Hierbei wird über die Ionenpaarbildung des Aquakomplexes mit Natriumlaurylsulfat die Reaktion mit dem Phosphat verhindert.^[204]

Zusammenfassend konnte der NMR-Befund einer teilweisen Reaktion des Aquasulfatkomplexes mit DMF bestätigt werden. Eine Aussage zur Struktur des gebildeten Komplexes war, dass im Puffer bei einem pH-Wert von 2,7 keine weitere kationische Spezies zu detektieren war.

4.1.3 Zytotoxizität und Zellaufnahme von [1,2-Diarylethylendiamin]platin(II)-Komplexen

Es sollten im Folgenden die Zellaufnahme der Verbindungen bestimmt werden, um den Einfluss des Neutralliganden und der Konfiguration am Neutralliganden sowie des Lösungsmittels zu untersuchen. Dabei war auch die Frage, inwiefern die Zellaufnahme mit der Zytotoxizität der Verbindungen korrelierte.

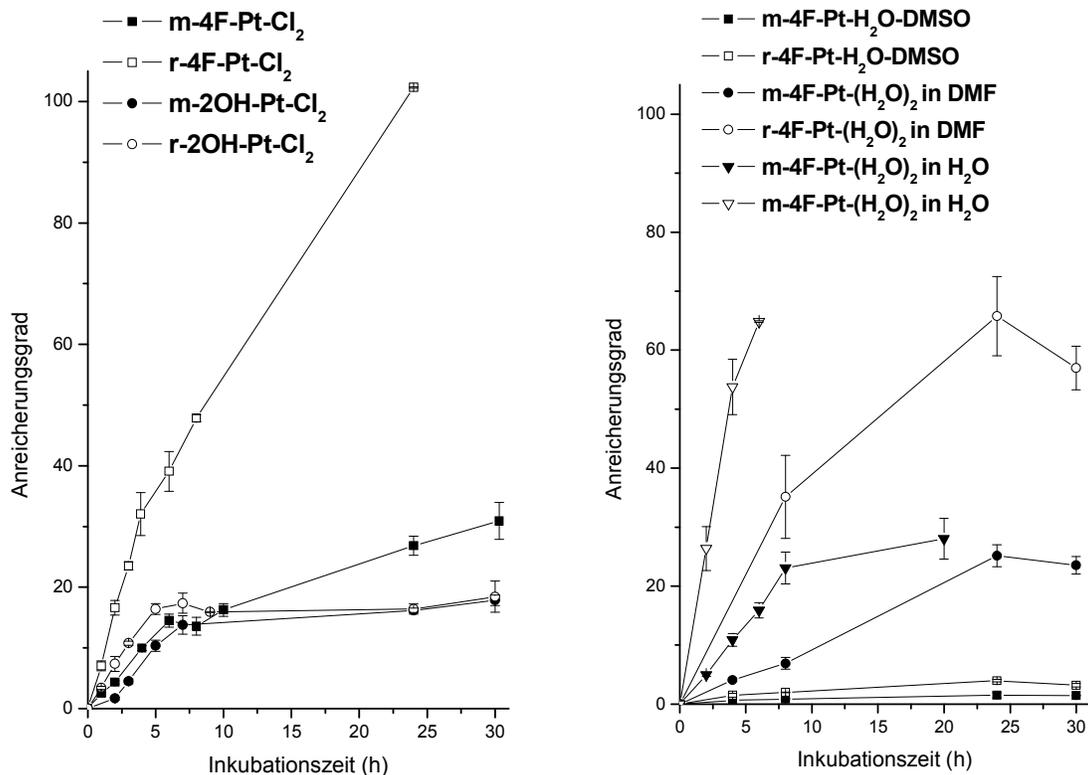


Abb. 4.4 Zellaufnahme der [1,2-Diarylethylendiamin]platin(II)-Komplexen in MCF-7-Zellen (n=3)

Während der racemische Komplex **r-4F-Pt-Cl₂** mit einem Anreicherungsgrad von 102 eine starke Akkumulation erfuhr, wurde der meso-Komplex **m-4F-Pt-Cl₂** nur etwa ein Drittel davon angereichert (siehe Abb. 4.4). Dieser Trend wurde auch für die hydrophileren Komplexe nach Austausch des Chlorids durch Wasser beobachtet. Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit vom Lösungsmittel: Während beim Vorlösen in DMSO nur ein Anreicherungsgrad von 1,5 (t=24h)(**m-4F-Pt-H₂O-SO₄**) und 3,6 (24h)(**r-4F-Pt-H₂O-SO₄**) erreicht wurde, wurden durch das Vorlösen in DMF mit 24 (t=24h) bzw. 60 (t=24h) deutlich höhere Anreicherungsgrade erzielt. Das Lösen in Wasser hingegen brachte Anreicherungsgrade, die denen der korrespondierenden Chlorokomplexe entsprachen bzw. teilweise sogar höher als diese waren.

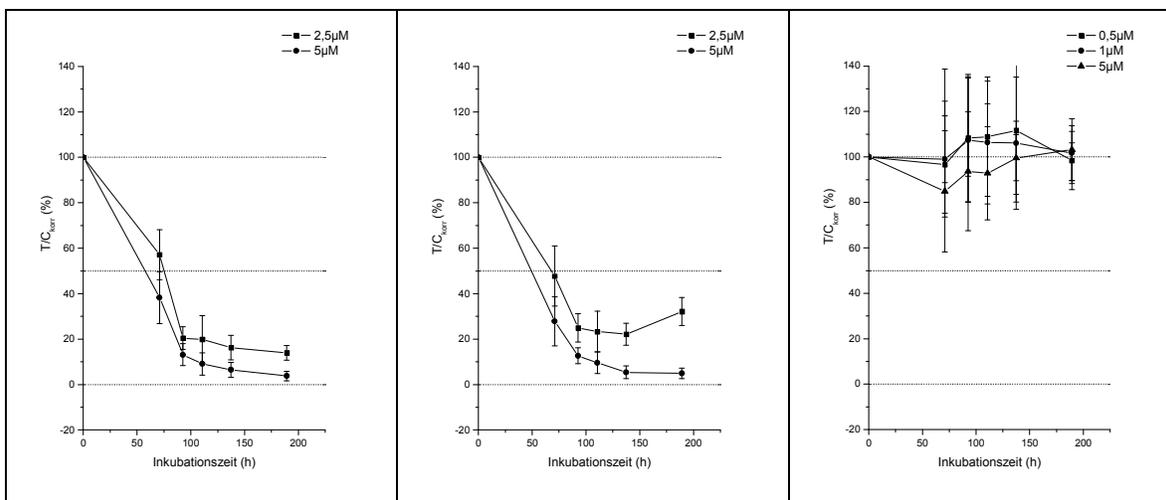


Abb. 4.5 Effekt auf das Zellwachstum der MCF-7-Zellen von $m\text{-4F-Pt-H}_2\text{O-SO}_4$ in Wasser (links) und in DMF (Mitte) vorgelöst und von $m\text{-4F-Pt-H}_2\text{O-DMSO}$ (rechts)

Die ähnliche Zellakkumulation der in Wasser vorgelösten Aquasulfatokomplexe und der Chlorokomplexe steht im Einklang mit einer ähnlicher Wirkung im Chemosensitivitätstest.^[71,73,150,157] Dieses stellt ebenfalls ein starkes Indiz für einen schnellen Austausch des Wassers durch Chlorid dar. Durch die quantitative Koordination von DMSO an das Platinzentralatom entstehen unwirksame Komplexe.^[78] Dieses korrelierte zumindest mit der stark verringerten Zellaufnahme. Hinzu kam die sehr hohe Reaktivität gegenüber Proteinen wie Serumalbumin, die die Zellaufnahme und das Erreichen des Zellkerns erschweren. Trotz einer deutlich geringeren Zellaufnahme führte die oben untersuchte Koordination des DMF's zu kaum geringerer antiproliferativer Aktivität (siehe Abb. 4.5). Somit schien die teilweise Koordination des DMF's deutliche Effekte auf die Zellaufnahme, aber nur einen geringfügigen Einfluss auf die antiproliferative Aktivität zu haben, obwohl die Reaktivität gegenüber Proteinen ebenfalls deutlich erhöht war (siehe Kap. 4.1.1).

Im Gegensatz zu den Aquasulfatokomplexen sind die Chlorokomplexe in Wasser kaum löslich^[205], so dass insbesondere viele racemische Dichlorokomplexe nur schwer *in vivo* evaluiert werden konnten.^[72,73,205] Daher wurde entweder auf die deutlich besser löslichen meso-konfigurierten Komplexe oder auf Komplexe mit hydrophilere Abgangsgruppen wie 1,1-Cyclobutandicarbonsäure ausgewichen. Die über die Abgangsgruppen vermittelte erhöhte Hydrophilie führt ebenfalls zur Senkung der Anreicherung in den MCF-7-

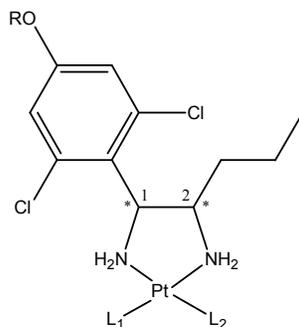
Zellen.^[157] Eine weitere Maßnahme war die Einführung von hydrophileren Substituenten in die Arylringe des Neutralliganden. Neben einer erhöhten Wasserlöslichkeit^[77] wurde für die 2OH-Pt-Cl₂-Komplexe aber auch eine deutliche Reduktion der Zellaufnahme gegenüber den 4F-Pt-Cl₂-Komplexen gefunden (siehe Abb. 4.4). Die racemisch- und meso-konfigurierten 2OH-Pt-Cl₂ Komplexe zeigten ähnliche Zellakkumulationscharakteristika. Für beide Verbindungen wurde eine Ausbildung eines Plateaus nach 4-6h beobachtet, wonach sich die Konzentration in der Zelle (AG=18) nicht mehr änderte. Für die 4F-Pt-Komplexe hingegen zeichnete sich nach 4-6h lediglich eine Abflachung der Anreicherungsgeschwindigkeit ab.

Die erhöhte Zellaufnahme des Komplexes **r-4F-Pt-Cl₂** gegenüber dem meso-konfigurierten Komplex geht auch mit einer deutlich erhöhten antiproliferativen Aktivität an MCF-7-Zellen einher (Daten siehe [57]). Die 2-OH-Komplexe zeigen einen leichten Unterschied zwischen rac- und meso-Konfiguration im Chemosensitivitätstest^[199], ohne dass hier ein Unterschied bei der Zellaufnahme gesehen wurde. Hierbei müssen sterische Einflüsse bei der Bindung an die DNA eine Rolle spielen.^[62] Beim Vergleich zwischen den 4F- und 2OH-Neutralliganden waren die antiproliferativen Aktivitäten^[77,199] trotz deutlich unterschiedlicher aufgenommenen Platinmengen nicht verschieden.

4.2 Untersuchungen zu [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexen

Durch Strukturvariationen ausgehend vom Komplex **m-4OH-2,6Cl-Pt-SO₄** (siehe Abb. 1.9) wurden hochaktive Verbindungen erhalten, die am C₁-Atom des Ethylendiamins einen Arylrest und am C₂-Atom einen Alkylrest tragen.^[77,206] Hierbei entsprechen die beiden Enantiomere mit gleicher Chiralität an den C-Atomen den hier „threo“ genannten Racematen. Die beiden Enantiomere mit verschiedener Chiralität, den meso-konfigurierten Komplexen entsprechend, sind bei verschiedener Substitution chemisch nicht unterscheidbar aber theoretisch trennbar, werden jedoch wegen aufwändiger Trennung als erythro-konfiguriert zusammengefasst und als Gemisch untersucht. Fr. Shihada hat Reihen dieser Verbindungsklasse synthetisiert und auf ihre Zytotoxizität hin getestet. Dabei zeigt der Komplex [erythro-1,2-Diamin-1-(2,6-dichloro-4-methoxyphenyl)pentan]diiodoplatin(II) **e-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂** eine außergewöhnlich starke anti-

proliferative Aktivität gegenüber MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen. Nach Änderung der Konfiguration zum threo-konfigurierten Komplex und der Variation der Abgangsgruppen zu den Aquasulfatokomplexen und den Hydroxymalonatkomplexen sowie der Entfernung der Methylschutzgruppe am Arylring des Neutralliganden wird eine rapide Abnahme der Aktivität beobachtet.^[75] Daher sollte für die in Abb. 4.6 dargestellte Reihe geklärt werden, inwiefern die beschriebene antiproliferative Aktivität mit der Zellaufnahme bzw. Kernaufnahme, der DNA-Bindung und der Proteinbindung korrelieren.



Verbindung	L ₁	L ₂	R
t-4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂	I ⁻	I ⁻	H
e-4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂	I ⁻	I ⁻	H
t-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂	I ⁻	I ⁻	CH ₃
e-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂	I ⁻	I ⁻	CH ₃
t-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-H₂O-SO₄	H ₂ O	SO ₄ ²⁻	CH ₃
e-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-H₂O-SO₄	H ₂ O	SO ₄ ²⁻	CH ₃
t-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-MalOH			CH ₃
e-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-MalOH			CH ₃

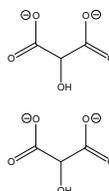


Abb. 4.6 Struktur der untersuchten [1,2-Diamino-1-aryl]platin(II)-Komplexe

4.2.1 Zytotoxizität und Zellaufnahme von [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexen

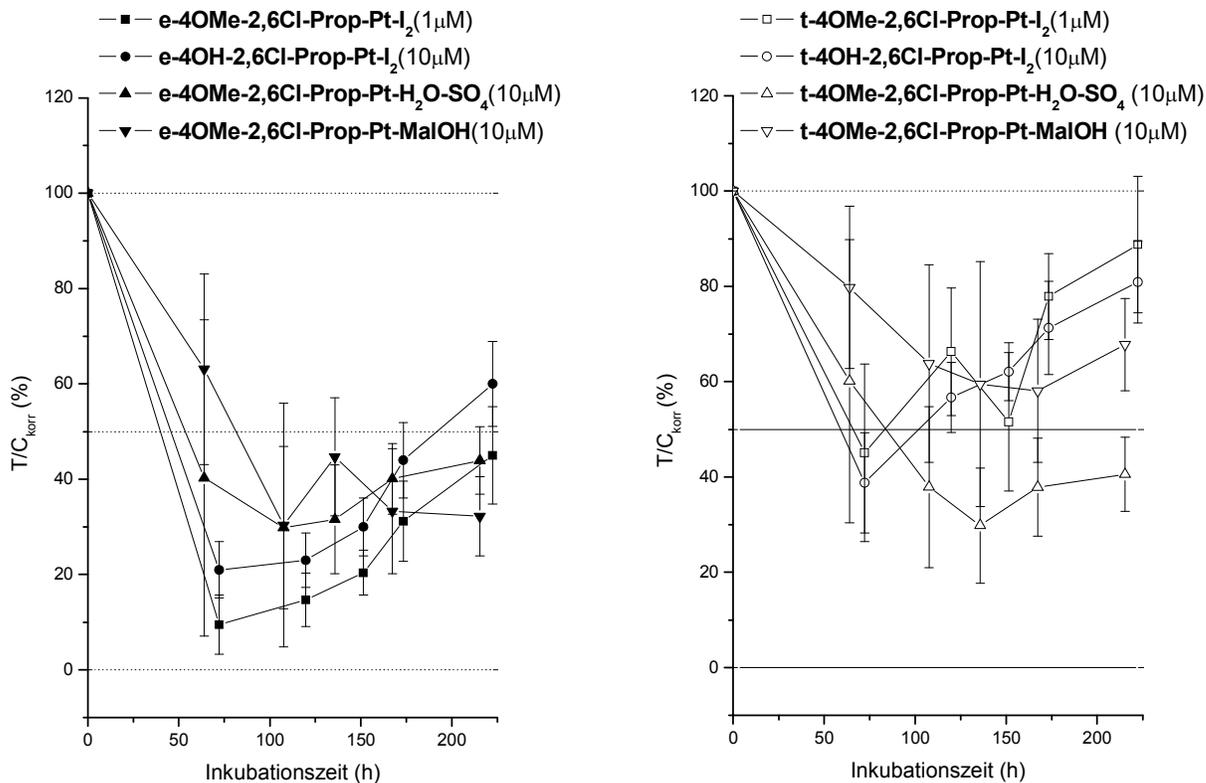


Abb. 4.7 Effekt von erythro- (links) und threo-konfigurierten (rechts) [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexen auf das Zellwachstum von MCF-7-Zellen (hier nur ausgesuchte Konzentrationen dargestellt, vollständige Darstellung siehe [75])

In dieser Reihe waren die 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂-Komplexe der Ausgangspunkt der Strukturvariationen. Diese Komplexe zeigten in einer Konzentration von 1 μM einen starken Effekt auf das Zellwachstum von MCF-7- (für **e-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂** T/C=10% bzw. für **t-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂** T/C=45% (beide t=72h)) (siehe Abb. 4.7) und MDA-MB-231-Zellen (T/C=-30% (t=52h) bzw. 60% (t=72)) (siehe Abb. 4.8). Ihre Pendanten ohne Methyl-Schutzgruppe, die 4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂-Komplexe, zeigten eine deutlich geringere Wirksamkeit. So musste für einen annähernd ähnlichen antiproliferativen Effekt etwa die zehnfache (MCF-7) bzw. etwa fünffache (MDA-MB-231) Konzentration eingesetzt werden. Im ähnlichen Maß wurde der antiproliferative Effekt durch den Austausch der Iodidabgangsgruppen durch Wasser und Sulfat (4OMe-

2,6Cl-Prop-Pt-H₂O-SO₄) gesenkt, wobei die maximale Wirkung (T/C=30-40% nach 100-225h) später eintrat. Eine den Aquasulfatokomplexen vergleichbare antiproliferative Aktivität wurde für den **e-OMe-2,6Cl-Prop-Pt-MalOH** Komplex beobachtet.

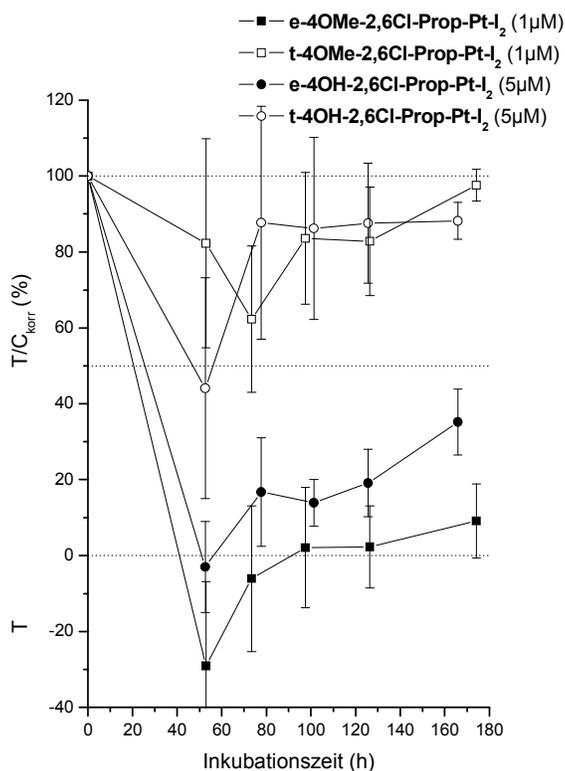


Abb. 4.8 Effekt von [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexen auf das Zellwachstum von MDA-MB-231-Zellen (hier nur ausgesuchte Konzentrationen dargestellt, vollständige Darstellung siehe [75])

Die erythro-konfigurierten Komplexe mit den Abgangsgruppen Iodid und Hydroxymalonsäure bewirkten stärkere Wachstumshemmung als ihre threo-konfigurierten Pendanten. Für die Aquasulfatokomplexe wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Diastereomeren gefunden.

In der Zellaufnahme zeigten die 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂-Komplexe dem antiproliferativen Effekt entsprechend die eindeutig höchsten Anreicherungen in den Zellen (siehe Abb. 4.9). Hierbei erreichte der erythro-Komplex einen etwas höheren maximalen Anreicherungsgrad (AG= 200 (t=24-29h) in MCF-7- bzw. 750 (t=24h) in MDA-MB-231-Zellen) als der threo-Komplex (AG=180 (t=4-8h) in MCF-7- bzw. 370

($t=4-25h$) in MDA-MB-231-Zellen). Der zeitliche Verlauf der Plattingehalte der Zellen hingegen war vollständig verschieden: Während die Aufnahmekinetik des threo-Komplexes durch einen schnellen Anstieg gekennzeichnet war, der in ein Plateau (MDA-MB-231) bzw. in einen Abfall (MCF-7) der Platinkonzentration mündete, wurde beim erythro-Komplex nach anfangs schneller Aufnahme eine immer langsamer weiter ansteigende Platinkonzentration gefunden (beide Zelllinien). Bei der Inkubation mit dem threo-Komplex ging die Abnahme der Plattingehalte der MCF-7-Zellen mit einer massiven Reduzierung der vorhandenen Zellmasse einher, so dass zum Inkubationsende hin kaum mehr Zellen zu detektieren waren. Es schien daher, dass die stärker anreichernden Zellen relativ schnell starben und die weniger anreichernden Zellen bis zum Ende des Tests überlebten.

Für die Komplexe mit entschütztem Neutralliganden, den 4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂-Komplexen, wurde eine deutliche Reduktion der Aufnahme in die Zellen beobachtet (siehe Abb. 4.9). Auch hier erreichte der erythro-Komplex (AG=32 (2-24) in MCF-7- bzw. AG=24 ($t=2-8h$) in MDA-MB-231-Zellen) ein eindeutig höheres Anreicherungs-niveau als der threo-Komplex (AG=21 ($t=4-24h$) in MCF-7- bzw. 14 ($t=2-8h$) in MDA-MB-231-Zellen). Unabhängig von der Zelllinie erreichten diese Verbindungen schnell nach vier Stunden ihr Anreicherungsmaximum, wobei sie bei der MCF-7-Zelllinie ein stabiles Plateau ausbildeten. Bei der MDA-MB-231-Zelllinie hingegen war nach Erreichen des Maximums der Zellaufnahme ein Abfall der Platinkonzentration zu beobachten. Für die erythro-Verbindung konnte das noch auf einen Selektionseffekt aufgrund des schnellen Sterbens der sensitiveren Zellen zurückgeführt werden. Für die threo-Verbindung jedoch konnte dieser Effekt nicht verantwortlich für starken Rückgang der intrazellulären Platinkonzentration gemacht werden, da hier die Zellmasse unter Substanzeinwirkung tendenziell sogar noch zunahm. Hierbei musste ein Detoxifikationsmechanismus der Zellen angesprochen worden sein, wie zum Beispiel die Ausschleusung nach Kopplung an Glutathion^[12,207] oder über P-Glycoprotein^[25,208].

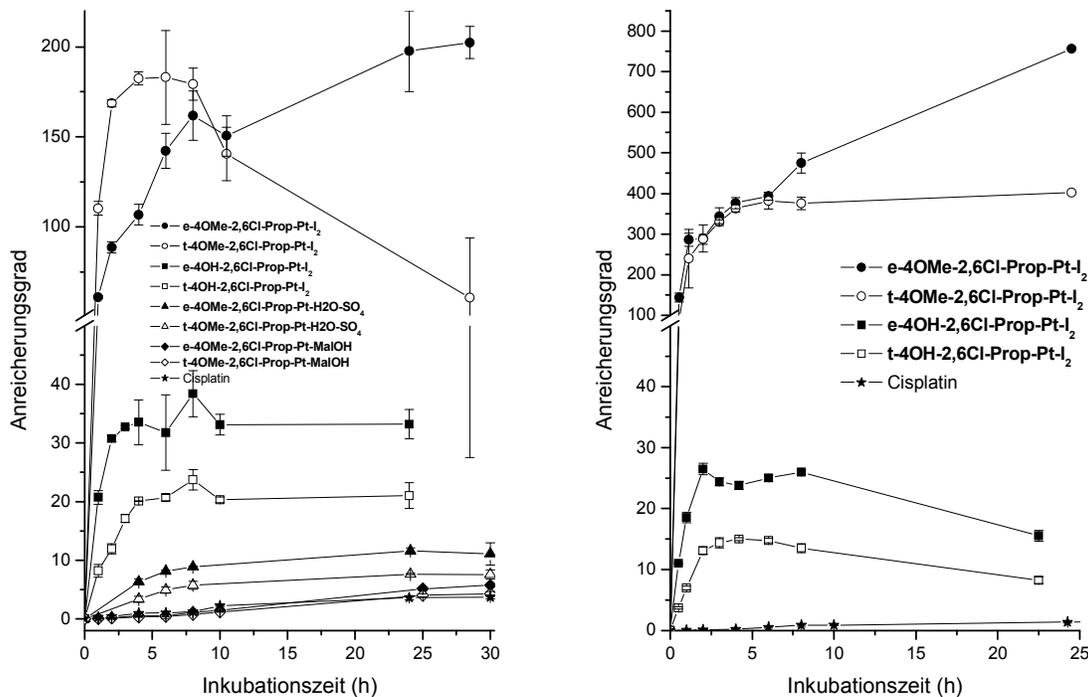


Abb. 4.9 Zellaufnahme von [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexen in MCF-7- (links) und MDA-MB-231-Zellen (rechts) (n=3)

Die Aquasulfatokomplexe 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-H₂O-SO₄ zeigten eine deutlich langsamere Akkumulationsgeschwindigkeit (siehe Abb. 4.9). So hatten die Komplexe nach acht Stunden ihr Anreicherungsmaximum noch nicht erreicht. Dieses war für die erythro-Verbindung etwas höher als für die threo-Verbindung (AG=11 vs. AG=8 nach 24-30h). Die Koordination der Hydroxymalonsäure an das Platin resultierte in von den MCF-7-Zellen deutlich schlechter aufgenommenen 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-MalOH-Komplexen. Bei diesen Komplexen erreichte die Zellaufnahme auch nach 30h kein Anreicherungsplateau. Dabei wurde die erythro-Verbindung immer noch leicht besser aufgenommen (AG=5,7 vs. AG=4,1 nach 30h). Alle Verbindungen wurden besser als Cisplatin in MCF-7-Zellen aufgenommen (AG=3 nach 24-30h).

Alles in allem, zeigte sich eine geringe Korrelation zwischen Zellanreicherung und Zytotoxizität. Zwar zeigten die 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂-Komplexe entsprechend ihrer höheren Wirksamkeit deutlich höhere Gehalte in den Zellen. Die tendenziell wirksameren erythro-Verbindungen wiesen ebenfalls höhere Zellgehalte als die threo-Verbindungen

auf. Aber zwischen den ähnlich antiproliferativ wirksamen 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-Mal-, 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-H₂O-SO₄- und 4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂-Komplexen wurden deutliche Unterschiede (bis zu Faktor 6) gefunden.

4.2.2 Proteinbindung von [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexen

Da die Zellaufnahmeversuche zur Vermeidung der Bindung an Protein ohne FCS durchgeführt wurden, wurde in der Proteinbindung ein Grund für ähnliche antiproliferative Effekte bei unterschiedlich hoher Zellaufnahme vermutet. Daher wurde sowohl die irreversible Bindung der Komplexe an HSA als auch die Wiederfindung bestimmt.

Auch bei den [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexen zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Proteinbindungscharakteristika von der Konfiguration (siehe Tab. 4.2). So waren die erythro-konfigurierten Komplexe deutlich reaktiver gegenüber HSA als die korrespondierenden threo-Komplexe mit Ausnahme der Aquasulfatokomplexe, bei denen kaum ein Unterschied festgestellt werden konnte. Der Unterschied war bei den Iodokomplexen am größten. Bei diesen hochreaktiven Komplexen reagierten die erythro-Komplexe mehr als doppelt so schnell wie die threo-Komplexe (für 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂ -1,17 (erythro) vs. -0,354h⁻¹ (threo) und für 4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂ -1,69 (erythro) vs. -0,744h⁻¹ (threo)). Hierbei wies der reaktivste (**e-OH-Prop-Pt-I₂**) eine fünfmal schnellere Inaktivierung als Cisplatin auf (-1,69 vs. -0,321h⁻¹). Die relativ geringe Reaktivität der Aquasulfatokomplexe (-0,424 (erythro) und -0,478h⁻¹ (threo)) deutet wieder auf eine Koordination des verwendeten Lösungsmittels DMF an die Komplexe bzw. die Umsetzung zu den deutlich unreaktiveren Chlorokomplexen hin.

Die Hydroxymalonsäure-Komplexe (-0,182 (erythro) und -0,140h⁻¹ (threo)) wiesen verglichen mit Carboplatin (-0,013h⁻¹) eine relativ starke Inaktivierung durch das HSA auf. So lag die Reaktionsgeschwindigkeit bei ungefähr der Hälfte der des Cisplatins (-0,321h⁻¹) aber mindestens zehnmal höher als die des Carboplatins (siehe Tab. 4.2).

Die Hydroxymalonsäurekomplexe wiesen durch die hydrophilisierende Abgangsgruppe die höchste Wiederfindung der [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexe im Ultra-

filtrat auf (siehe Tab. 4.2). Die Differenz zur Wiederfindung im Überstand der ethanolischen Präzipitation und damit der reversibel lipophil gebundene Anteil war bei diesen Komplexen am geringsten (11-14%). Für die Iodo-Komplexe war diese Differenz am ausgeprägtesten (35-53%). Bei diesen Komplexen war die gesamte Platinmenge am Protein gebunden, so dass man nur marginale Mengen im Ultrafiltrat fand. Bei allen Verbindungen fand sich ein leichter Trend für eine höhere Wiederfindung des threo-Komplexes im Überstand der ethanolischen Präzipitation gegenüber dem korrespondierenden erythro-Komplex.

Verbindung	Geschwindigkeitskonstante der irreversiblen Proteinbindung [h ⁻¹]	Wiederfindung Ultrafiltration [%]	Wiederfindung ethanolische Präzipitation [%]
e-4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂	-1,69	4±1	39±1
t-4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂	-0,744	3±1	49±4
e-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂	-1,17	4±1	39±1
t-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂	-0,354	3±1	56±1
e-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-H₂O-SO₄	-0,424	11±1	55±1
t-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-H₂O-SO₄	-0,478	13±1	64±2
e-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-MalOH	-0,182	61±1	75±2
t-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-MalOH	-0,140	65±1	76±2
Cisplatin	-0,321	76±4	100±6
Carboplatin	-0,013	77±1	101±5

Tab. 4.2 Proteinbindungscharakteristika der [1,2-Diamin-1-arylpentan]platin(II)-Komplexen an HSA (n=3 für Wiederfindungsversuche)

Die schnelle Inaktivierung der Iodokomplexe durch Serumalbumin könnte für die Unterschiede bei der Zellaufnahme und dem antiproliferativen Effekt verantwortlich sein. So fand die irreversible Bindung an das Protein von den 4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂-Komplexen ca. zwei- bis viermal schneller als für die 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-H₂O-SO₄-Komplexe bzw. fünf- bis neunmal schneller als die für 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-MalOH-Komplexe statt. Das könnte für die Unterschiede in der Zellaufnahme zwischen diesen drei ähnlich

antiproliferativ wirksamen Komplexen verantwortlich sein, indem durch die stärkere Proteinbindung an das FCS die effektive Wirkstoffkonzentration im Chemosensitivitätstest unterschiedlich stark gemindert wurde. Eine solche Minderung müsste man allerdings auch für die erythro-Komplexe gegenüber den threo-Komplexen erwarten. Die deutlich schneller inaktivierten erythro-Iodokomplexe wirkten allerdings stärker antiproliferativ als die threo-Iodokomplexe, obwohl die Zellaufnahme im Verhältnis weniger differierte.

4.2.3 Gehalte in den Zellkernen und DNA-Bindung von [1,2-Diamin-1-aryl-pentan]platin(II)-Komplexen

Da möglicherweise die Interaktion mit der DNA durch die Konfiguration der Neutral-liganden unterschiedlich stark beeinträchtigt wird, war es interessant, den Plattingehalt in den Zellkernen und der DNA zu bestimmen.

Für die Anreicherung im Kern zeigte sich ein ähnliches Bild wie für die Zellaufnahme. Auch hier wurden die erythro-Verbindungen stärker im Kern angereichert als die threo-Verbindungen. Die Ausnahme waren hier die Hydroxymalonsäurekomplexe, bei denen kein Unterschied mehr zwischen den Diastereomeren zu sehen war. Zwischen dem 4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂- und dem 4OMe-Prop-Pt-H₂O-SO₄-Komplexen reduzierte sich der Unterschied, den man bei der Zellakkumulation sehr deutlich sehen konnte.

Bei der Bindung an die DNA zeigte sich, dass zwar die Unterschiede zwischen den Diastereomeren erhalten geblieben waren, aber dass zwischen den 4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂-, den 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-H₂O-SO₄- und den 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-MalOH-Komplexen so gut wie keine Unterschiede zu beobachten waren. Dieses korrelierte stark mit den ähnlichen antiproliferativen Effekten dieser Verbindungen. Lediglich die 4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂-Komplexe zeigten eine etwa zehnfach erhöhte DNA-Bindung gegenüber den anderen Komplexen, was sich in einem deutlich erhöhten antiproliferativen Effekt manifestierte. Für Platinverbindungen wurde schon früher eine Korrelation der DNA-Bindung mit dem antiproliferativen Effekt gefunden.^[150] Dies ist als starkes Indiz zu

werten, dass auch die hier untersuchten Verbindungen über die Bindung an die DNA ihre antiproliferative Wirkung ausübten.

Eine leichte Hinderung durch den Neutralliganden kann man auch aus den Geschwindigkeitskonstanten für die Bindung an isolierter DNA ableiten. Hier zeigte Cisplatin die eindeutig schnellste Bindung an die DNA. Im Gegensatz zur Proteinbindung banden die erythro-konfigurierten Komplexe nur leicht schneller an die DNA als die threo-Komplexe. Die Abschwächung des Reaktivitätsunterschiedes im Hinblick auf die Proteinbindung mag daran liegen, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die DNA-Bindung die Aquatisierung ist. Der sterische Anspruch für den Angriff eines Wassermoleküls ist deutlich niedriger zu bewerten als derjenige eines Schwefelatoms in einem Makromolekül wie dem HSA.

Substanz	Gehalt in den Kernen [ng Pt/mg Protein]	DNA-Bindung [pg Pt/ μ g DNA]	Geschwindigkeitskonstante für Bindung an isolierter DNA k [h ⁻¹]	
			pH6,8	pH7,3
e-4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂	162±18	20,0±2,9	-0,176	-0,154
t-4OH-2,6Cl-Prop-Pt-I₂	81,3±3,7	13,7±2,3	-0,168	-0,143
e-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂	1081±82	211±27	-0,160	-0,147
t-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-I₂	779±42	155±8	-0,127	-0,103
e-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-H₂O-SO₄	134±23	20,1±0,2	n.d.	n.d.
t-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-H₂O-SO₄	110±11	15,1±1,9	n.d.	n.d.
e-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-MalOH	38,9±0,3	21,2±0,2	k.Ä.	-0,0099
t-4OMe-2,6Cl-Prop-Pt-MalOH	39,4±0,5	9,4±0,9	-0,0797	k.Ä.
Cisplatin	10,2±1,1	17,6±1,0	-0,206	-0,183

n.d. nicht durchgeführt; k.Ä. keine Änderung zum Startwert

Tab. 4.3 Gehalte in den Kernen und DNA-Bindung von [1,2-Diamin-1-aryl-pentan]platin(II)-Komplexen in MCF-7-Zellen (n=3)

Die Komplexe mit der Hydroxymalonsäure hingegen zeigten eine enorm hohe DNA-Bindung verglichen mit den anderen Komplexen. Hier musste es zu einer ähnlichen Aktivierung auf zellulärer Ebene kommen, wie für Carboplatin beschrieben.^[188,209] Das

wird noch dadurch unterstrichen, dass eine Bindung an isolierter DNA nur unter schwach sauren Bedingungen im nennenswerten Rahmen geschah. Auffällig bei den Hydroxymalonsäurekomplexen war, dass trotz ähnlicher Gehalte im Kernkompartiment für den threo-Komplex nur halb soviel Platin in der DNA wie für den erythro-Komplex gefunden wurde. Aus der Proteinbindung war hingegen ein dermaßen starker Reaktivitätsunterschied nicht zu ersehen.