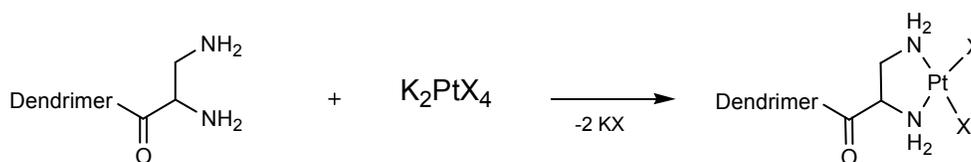


7 Untersuchungen zu Platin-Dendrimer-Konjugaten

Die Anbindung von Platinverbindungen an Dendrimere sollte zum einen Zytostatika mit neuen pharmakologischen Eigenschaften hervorbringen zum anderen kann an das Dendrimer gebundenes Platin als Markierung dienen, um mittels Atomabsorptionsspektroskopie die Biodistribution zuerst in den Zellen und später *in vivo* verfolgen zu können.



Verbindung	Ausgangsdendrimer	X	Platinatome pro Dendrimer
G₀(Dap-Pt-I₂)₂(Dap)₁	G₀(Dap)₃	I	2
G₀(Dap-Pt-Cl₂)₂(Dap)₁	G₀(Dap)₃	Cl	2
G₁(Dan)₃(Dap-Pt-I₂)₂(Dap)₁	G₁(Dan)₃(Dap)₃	I	2
G₁(Dan)₃(Dap-Pt-Cl₂)₂(Dap)₁	G₁(Dan)₃(Dap)₃	Cl	2
SM-G₁(Dap-Pt-I₂)₃	SM-G₁(Dap)₃	I	3
SM-G₁(Dap-Pt-Cl₂)₃	SM-G₁(Dap)₃	Cl	3

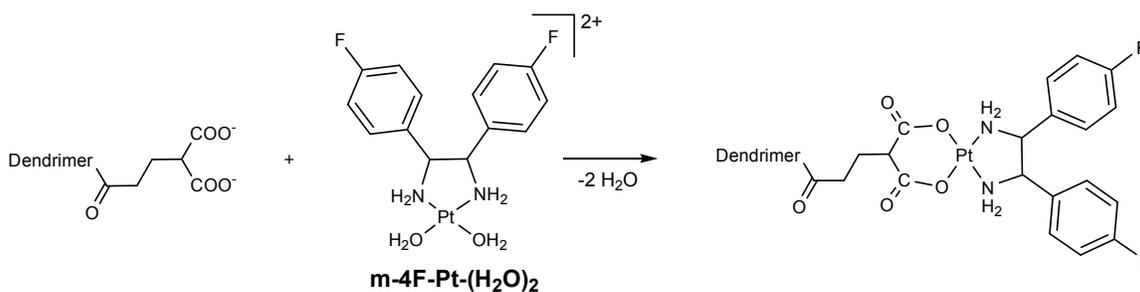
Abb. 7.1 Untersuchte Platin-Dendrimer-Konjugate mit Dendrimeren als Neutralliganden

Die von Fr. Fuchs und von Hr. Müller synthetisierten Dendrimere weisen mit den Ethylendiamin- und Malonsäure-Funktionalitäten an der Oberfläche exzellente Anbindungsstellen für Platinverbindungen auf. Fr. Dullin nutzte die Ethylendiaminoberflächen zur Herstellung von Diiodo- bzw. Dichloroplatinverbindungen (siehe Abb. 7.1), so dass das Dendrimer als Neutralligand und Iodid sowie Chlorid als Abgangsgruppen fungieren.^[78] Aufgrund der Stabilität der Koordination des Ethylendiamin-Liganden am Platin setzten die hierbei entstehenden Konjugate das Platin nur dann frei, wenn eine Hydrolyse im Dendrimerkörper geschieht.

Ansonsten erschien eine antiproliferative Wirkung eher unwahrscheinlich, da das Platin-Dendrimer-Konjugat die endozytotische Route verlassen muss, um in den Kern und zur DNA zu gelangen. Die passive Diffusion durch Membranen steht den Makromolekülen im Gegensatz zu den kleineren Platinwirkstoffen als Übertrittsmöglichkeit kaum zur Verfügung. So sind bisher alle Verbindungen, die Platin nicht freisetzbar am Makromole-

kül tragen, zwar im Tumor lokalisiert, aber üben weder *in vitro* noch *in vivo* eine nennenswerte Wirkung aus.^[95] Sollte bei den kleineren Konjugaten doch ein Übertritt in den Kern möglich sein, so war unklar, inwiefern der sperrige Dendrimer-Neutralligand die Bindung an die DNA behindert.

Es wurde ebenfalls eine Koordination des **m-4F-Pt-(H₂O)₂**-Komplexes an Malonsäure-terminierte Dendrimere vorgenommen.^[78] Hierbei entstehen Konjugate, die das Dendrimer als Abgangsgruppe haben (siehe Abb. 7.2). Aufgrund der Stabilität der Pt-O-Bindung erfolgt die Freisetzung des **m-4F-Pt-(H₂O)₂** langsam und sollte in den sauren Zellkompartimenten wie Endosomen und Lysosomen verstärkt erfolgen. Ein Übertritt des Platinwirkstoffes in den Zellkern kann dann durch passive Diffusion erfolgen, so dass ein Wirkmechanismus analog dem Komplex **m-4F-Pt-SO₄** möglich ist. Dass dieses Konzept für derartig angebundenes Cisplatin funktioniert und *in vitro* und *in vivo* wirksam ist, wurde sowohl an HPMA-Polymeren^[94,95] als auch an PAMAM-Dendrimern^[93] gezeigt.



Verbindung	Ausgangsdendrimer	Platinatome pro Dendrimer
SM-G₁-(Mal-Pt-m-4F)₃	SM-G₁-(Mal)₃	3
SM-G₂-(Dan)₃(Mal-Pt-m-4F)₃	SM-G₂-(Dan)₃(Mal)₃	3

Abb. 7.2 Untersuchte Platin-Dendrimer-Konjugate mit dem Dendrimer als Abgangsgruppe

7.1 Zytotoxizität der Platin-Dendrimer-Konjugate an MCF-7-Zellen

Es wurde der antiproliferative Effekt dieser Komplexe an MCF-7-Zellen im Chemosensitivitätstest untersucht. Dabei wurde für die Platin-Dendrimer-Konjugate ein überraschendes Ergebnis erhalten. Während alle Diiodoverbindungen und die Verbindungen **G₁(Dan)₃(Dap-Pt-Cl₂)₂(Dap)₁** keinen Effekt auf das Zellwachstum der MCF-7-

Brustkrebszellen hatten (Diagramme nicht dargestellt), zeigten die Verbindungen $G_0(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_2(\text{Dap})_1$ und $\text{SM-G}_1(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_3$ in einer Konzentration von $5\mu\text{M}$ einen deutlichen antiproliferativen Effekt (siehe Abb. 7.3). So wurde das Zellwachstum schon nach 72 Stunden auf 50% reduziert. Diese Reduktion setzte sich fast über die gesamte Inkubationszeit fort, so dass erst nach 200 Stunden ein leichter Trend zur Erholung zu erkennen war. Möglicherweise sind diese Moleküle noch klein genug für eine ungehinderte Passage der Membranen.

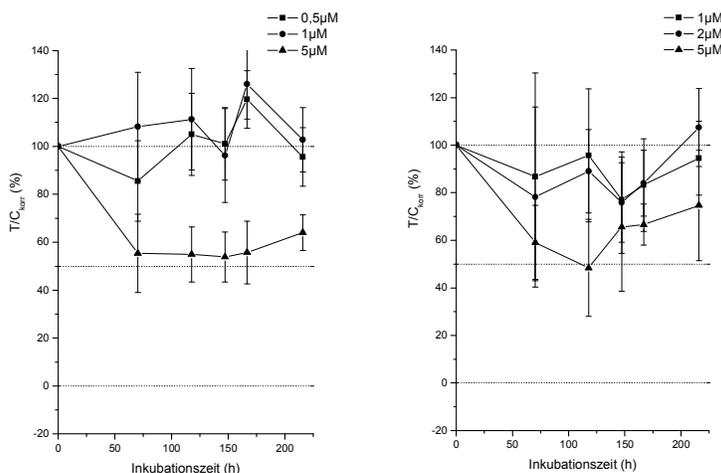


Abb. 7.3 Antiproliferativer Effekt von $G_0(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_2(\text{Dap})_1$ und $\text{SM-G}_1(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_3$ auf MCF-7-Zellen (n=16)

Es wurden größere polynukleare Platinverbindungen ähnlicher Molekülmasse synthetisiert (siehe Abb. 7.4).^[293-295] Diese Verbindungen sind teilweise gut wirksam, obwohl ihre Zellaufnahmen kaum besser als die von Cisplatin sind.^[293] Unter den beschriebenen Komplexen sticht ein dinuklearer Komplex hervor, der neben den Platinliganden auch protonierbare Amine trägt (siehe Abb. 7.4 rechte Struktur). Dieser Komplex zeigt eine kaum schwächere Aktivität an MCF-7-Zellen als die oben beschriebenen Komplexe $G_0(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_2(\text{Dap})_1$ und $\text{SM-G}_1(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_3$.^[295]

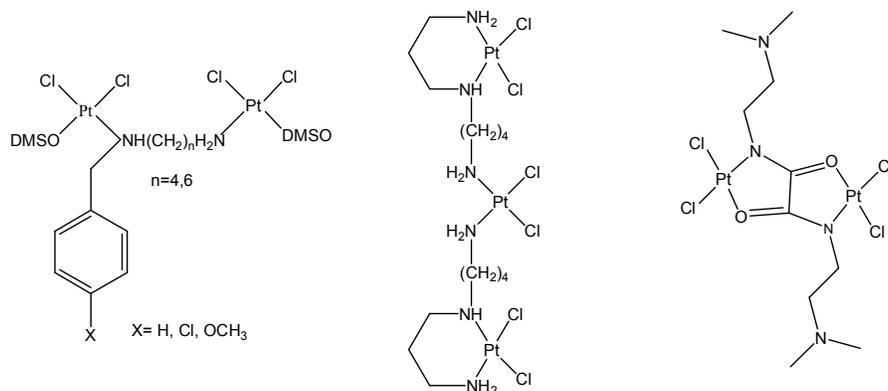


Abb. 7.4 Literaturbekannte polynukleare Platinkomplexe nach den Literaturstellen [293] (links), [294] (Mitte) und [295] (rechts)

Bei der Verwendung von Dendrimeren, die die zytostatische Platinverbindung **m-4F-Pt-(H₂O)₂** freisetzen können, wurden deutlich stärkere antiproliferative Effekte gesehen (siehe Abb. 7.5). Beide Komplexe hemmten das Zellwachstum ähnlich der Verbindung **m-4F-Pt-SO₄** (siehe Abb. 4.5) in einer Konzentration von 5 μM fast vollständig. Höhere Konzentrationen führten teilweise zu stark zytoziden Effekten. Eine Erholung der Zellpopulation konnte nicht beobachtet werden.

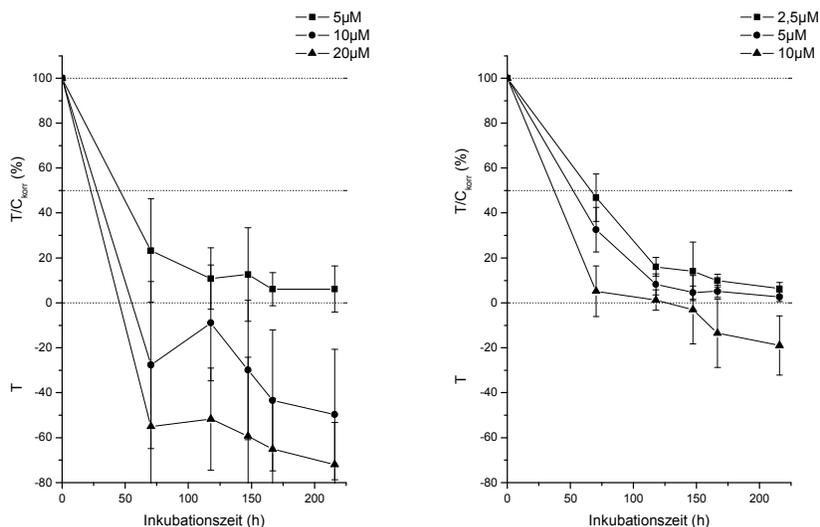


Abb. 7.5 Antiproliferativer Effekt von **SM-G₁-(Mal-Pt-m-4F)₃** und **SM-G₂-(Dan)₃(Mal-Pt-m-4F)₃** auf MCF-7-Zellen

7.2 Zellaufnahme in MCF-7-Zellen

Um die Unterschiede in den antiproliferativen Effekten weiter zu untersuchen, wurden die Zellaufnahmen atomabsorptionsspektroskopisch bestimmt. Hierbei wurden deutliche Unterschiede gefunden (siehe Abb. 7.6): Die Verbindungen $G_0(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_2(\text{Dap})_1$ und $G_0(\text{Dap-Pt-I}_2)_2(\text{Dap})_1$ zeigten eine sehr starke Zellaufnahme, die in ein Plateau nach sechs bis acht Stunden mündete. Hierbei wies die unwirksame Diiodo-Verbindung einen deutlich höheren Anreicherungsgrad (ca. 850 zwischen 8-25h) als die wirksame Dichloro-Verbindung auf, die aber immer noch 200fach (zwischen 8-25h) gegenüber dem Außenmedium angereichert war. Diese Werte lagen bei weitem über denen von dinuklearen Komplexen mit ähnlicher Molekülmasse, die keine protonierbaren Amine enthielten (siehe Abb. 7.3 linke Struktur).^[293] Ferner zeigten sich starke Parallelen zu den Versuchen mit den fluoreszenzmarkierten Dendrimeren (siehe Kap 6.3.4.2). Auch hier wurden sehr hohe Zellanreicherungen für die Verbindungen gefunden, die sowohl sehr lipophile Endgruppierungen als auch protonierbare Amine trugen. Daran kann man die Bedeutung solcher Funktionalitäten für die Zellaufnahme erkennen, die daher möglicherweise analog der Zellakkumulation der Alkylamin-Platinverbindungen (siehe Kap. 5) ebenfalls über adsorptive Endozytose erfolgte.

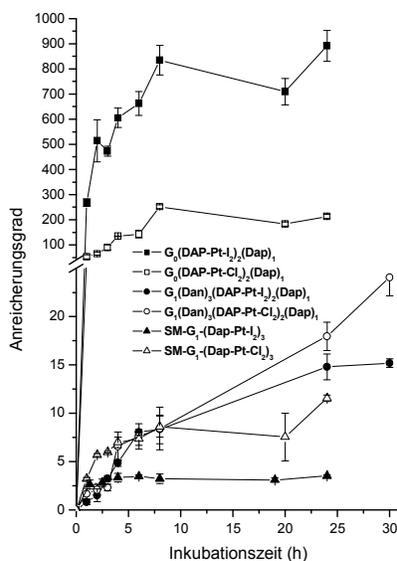


Abb. 7.6 Zellanreicherung der Dendrimer-Platin-Konjugate mit Dendrimer-Neutralliganden (n=3)

Dagegen wiesen die Verbindungen $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap-Pt-I}_2)_2(\text{Dap})_1$ und $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_2(\text{Dap})_1$ keine Abhängigkeit von der Abgangsgruppe auf. Die Zellaufnahme verlief langsam und erreichte auch nach 24 Stunden kein Plateau (siehe Abb. 7.6). Mit einem maximalen Anreicherungsgrad von 24 lag die Zellaufnahme deutlich niedriger als die der Generation-0-Verbindungen.

Die Einführung von PEG-Gruppen führte zu einer deutlichen Reduzierung der Zellaufnahme in die MCF-7-Zellen, wie schon bei den Zellaufnahmebestimmungen für die dansylierten Verbindungen gefunden wurde (siehe Kap. 6.3.4.2). So zeigten die Verbindungen $SM-G_1(\text{Dap-Pt-I}_2)_3$ und $SM-G_1(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_3$ deutlich schwächere Anreicherungen in den Zellen als die nicht PEG-Gruppen enthaltenden Dendrimere (siehe Abb. 7.6). Hierbei erreichte die Diiodo-Verbindung schnell ihren maximalen Anreicherungsgrad von 3,5 nach vier Stunden und erfuhr danach kaum Veränderung. Für die antiproliferativ wirksame Dichloro-Verbindung wurde dagegen eine späte Ausbildung eines Plateaus (6-8h) gefunden, das mit einem AG=11 deutlich höher als das des Diiodokomplexes lag. Trotz der im Verhältnis zum Komplex $G_0(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_2(\text{Dap})_1$ geringen Zellakkumulation ($1/20$) wurde ein ähnlicher antiproliferativer Effekt auf MCF-7-Zellen beobachtet.

Die Komplexe $SM-G_1(\text{Mal-Pt-m-4F})_3$ und $SM-G_2(\text{Dan})_3(\text{Mal-Pt-m-4F})_3$ zeigten eine beinahe lineare Zunahme des Platingehalts in den Zellen (siehe Abb. 7.7). Eine solche Kinetik erschien ungewöhnlich, da bei fluoreszenzmarkierten Dendrimeren dieser Reihe ein solches Verhalten nicht beobachtet wurde. Da sich diese Kinetiken auch stark von den Kinetiken der Verbindungen $SM-G_1(\text{DAP-Pt-I}_2)_3$ und $SM-G_1(\text{DAP-Pt-Cl}_2)_3$ unterschieden, lag hier die Vermutung einer Platinfreisetzung aus den Dendrimeren nahe. Auch die außerordentlich hohe antiproliferative Wirksamkeit bei einem maximalen Anreicherungsgrad von 17 (nach 24h) bzw. 19 (nach 19h) deutete ebenfalls auf eine Trennung von Platinverbindung und Dendrimerkörper. Diese Anreicherungsgrade lagen deutlich unter denen für $m\text{-4F-Pt-SO}_4$ (AG=28 nach 20h) beobachteten. Da aber diese Dendrimerplatinate 3 Platinkomplexe pro Molekül enthalten, war der absolute Platingehalt in den Zellen höher als nach Inkubation mit der Referenzsubstanz.

Im Vergleich zu den Platin-Dendrimer-Konjugaten des „Fuchs-Typs“ zeigte bei den PEG-gruppentragenden Molekülen die Fluoreszenzmarkierung weder auf die Zytotoxizität noch auf die Zellaufnahme einen gravierenden Effekt.

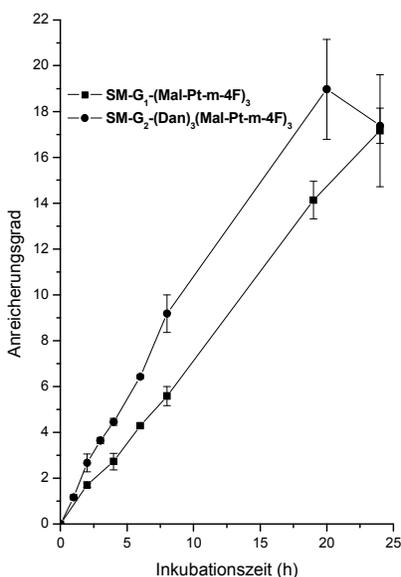


Abb. 7.7 Zellaufnahme der Platin-Dendrimer-Konjugate mit dem Dendrimer als Abgangsgruppe in MCF-7-Zellen (n=3)

7.3 Platingehalt in den Zellkernen und in der zellulären DNA

Da die Lokalisationsstudien der untersuchten fluoreszenzmarkierten Dendrimere (siehe Kap. 6.3.3) in Übereinstimmung mit der bekannten Literatur eine zytosolische Verteilung nahelegten, stellte sich die Frage, ob die Platin-Dendrimer-Konjugate die endosomale Route verlassen können. Dies ist wichtig, um im Kernkompartiment an der DNA zytotoxische Wirkung entfalten zu können. Daher wurde der Gehalt in den Zellkernen und Bindung an der DNA in MCF-7-Zellen mittels AAS untersucht.

Bei der Betrachtung der Werte der Platingehalte in den Kernen (siehe Tab. 7.1.) fallen die sehr hohen Werte für die Platin-Konjugate mit Dendrimern des „Fuchs-Typs“ auf. Dieses gilt insbesondere für die schwach in Zellen angereicherten Komplexe $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap-Pt-I}_2)_2(\text{Dap})_1$ (7647ng Pt/mg Protein) und $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_2(\text{Dap})_1$ (1866ng Pt/mg Protein), wie die Komplexe $G_0(\text{Dap-Pt-I}_2)_2(\text{Dap})_1$ (10594ng Pt/mg Protein) und $G_0(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_2(\text{Dap})_1$ (2107ng Pt/mg Protein) sehr hohe Werte aufwiesen.

Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine kernassoziierte Ablagerung von der Substanz handelte. Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden zumindest bei den fixierten Objekten solche Zelllokalisationen gesehen. Diese wurden entweder durch die Kernisolationsmethode nicht ausreichend von der Kernmembran abgetrennt oder verhielten sich im Sucrose-Dichtegradienten ähnlich wie die Kerne (siehe Kap. 3.4.). Für die Verbindungen **G₁(Dan)₃(Dap-Pt-I₂)₂(Dap)₁** und **G₁(Dan)₃(Dap-Pt-Cl₂)₂(Dap)₁** wurde diese Vermutung durch die verhältnismäßig geringen DNA-Bindungen gestützt (44 bzw. 122pg Pt/μg DNA), obwohl auch diese immer noch höher als die von Cisplatin waren (17,6pg Pt/μg DNA). Wenn allerdings solche Substanzaggregate in die enzymatische Isolation der DNA geraten, ist es nicht ausgeschlossen, dass in der Inkubationszeit ein Teil der Platinverbindungen an die DNA gebunden wurde.

Verbindung	Kerngehalt [ng Pt/mg Protein]	DNA-Bindung [pg Pt/μg DNA]
G₀(Dap-Pt-I₂)₂(Dap)₁	10594±346	1081±258
G₀(Dap-Pt-Cl₂)₂(Dap)₁	2107±267	325±34
G₁(Dan)₃(Dap-Pt-I₂)₂(Dap)₁	7647±676	44±6
G₁(Dan)₃(Dap-Pt-Cl₂)₂(Dap)₁	1866±298	122±25
SM-G₁(Dap-Pt-I₂)₃	216±25	12,5±2,2
SM-G₁(Dap-Pt-Cl₂)₃	157±5	19±3
SM-G₁-(Mal-Pt-m-4F)₃	147±7	49±2
SM-G₂-(Dan)₃(Mal-Pt-m-4F)₃	43,7±0,7	14,5±0,4
m-4F-Pt-Cl₂	165±8	35,0±7,2
Cisplatin	10±1	17,6±1,0

Tab. 7.1 Kernakkumulation und Bindung an der DNA der Platin-Dendrimer-Konjugate in MCF-7-Zellen (n=3)

Für die Verbindungen **G₀(Dap-Pt-I₂)₂(Dap)₁** und **G₀(Dap-Pt-Cl₂)₂(Dap)₁** wurden in den Kernen sehr hohe Platingehalte gemessen (10594 bzw. 2107ng Pt/mg Protein). An der DNA band der Diiodo-Komplex ebenfalls deutlich stärker als der wirksame Dichloro-Komplex (1081 bzw. 325pg Pt/μg DNA). Das korrelierte nicht mit dem antiproliferativen

Effekt. Es lässt sich jedoch über diese Versuche keine Aussage über die Art der Bindung an die DNA machen.

Die PEGilierten Komplexe **SM-G₁(Dap-Pt-I₂)₃**, **SM-G₁(Dap-Pt-Cl₂)₃** und **SM-G₁-(Mal-Pt-m-4F)₃** riefen einen Platingehalt im Kern hervor, der im Bereich des **m-4F-Pt-Cl₂** lag (216, 157 bzw. 147 vs. 165ng Pt/mg Protein)(siehe Tab. 7.1.). Aber die Bindung des Platins aus **SM-G₁(Dap-Pt-I₂)₃** und **SM-G₁(Dap-Pt-Cl₂)₃** an die DNA war stark gehindert. Obwohl deutlich höhere Gehalte in den Kernen für diese Verbindungen als für Cisplatin (10ng Pt/mg Protein) gefunden wurden, lagen die Werte der DNA-Bindung nur im Bereich der des Cisplatins (12,5 bzw. 19 vs. 17,6pg Pt/μg DNA).

Im Gegensatz dazu rief der Komplex **SM-G₁-(Mal-Pt-m-4F)₃** eine deutlich höhere Platinbindung an der DNA hervor, die sogar deutlich höher als die von dem Komplex **m-4F-Pt-Cl₂** war (49 vs. 35pg Pt/μg DNA).

Interessant bei **SM-G₁-(Mal-Pt-m-4F)₃** war die hohe Effizienz der DNA-Bindung im Vergleich zum Komplex **m-4F-Pt-Cl₂**, der einen höheren Platingehalt in den Kernen aber einen deutlich niedrigeren an der DNA als **SM-G₁-(Mal-Pt-m-4F)₃** hervorrief. Dabei stach besonders die geringe DNA gebundene Platinmenge nach Inkubation mit **SM-G₂-(Dan)₃(Mal-Pt-m-4F)₃** besonders hervor, die sogar geringer als nach Inkubation mit Cisplatin war, und dabei aber eine vergleichbare antiproliferative Aktivität zeigte. Diese hohe Effizienz der DNA-Bindung war ein Indiz dafür, dass die aus Dicarbonsäuren freigesetzten m-4F-Pt-Komplexe aktiviert gewesen sein könnten, wie dies für Carboplatin beschrieben ist.^[188,209]

Auffallend war der große Unterschied bei der Platinmenge in den Kernen und an der DNA, die nach Inkubation mit dem Komplex **SM-G₂-(Dan)₃(Mal-Pt-m-4F)₃** im Vergleich zu **SM-G₁-(Mal-Pt-m-4F)₃** beobachtet wurde (147 vs. 43,7ng Pt/mg Protein bzw. 49 vs. 14,5pg Pt/μg DNA). Trotzdem zeigten beide Verbindungen einen ähnlichen antiproliferativen Effekt.

Ebenfalls erstaunlich war die geringe DNA-Bindung, die durch den Komplex **SM-G₁(Dap-Pt-Cl₂)₃** hervorgerufen wurde. Wie bei der Zellaufnahme war diese deutlich

schwächer als nach Inkubation mit dem Komplex $G_0(\text{Dap-Pt-Cl}_2)(\text{Dap})_1$ (19 vs. 325pg Pt/ μg DNA), obwohl der antiproliferative Effekt ähnlich war.

7.4 Proteinbindung

Da die Untersuchungen zur Zellaufnahme, zum Gehalt in den Zellkernen und zur DNA-Bindung im Gegensatz zum Chemosensitivitätstest mit FCS-freien Medium durchgeführt wurden, stellte sich die Frage, inwiefern die Bindung an Serumalbumine zur Reduktion der freien Platinverbindung im *in vitro* Zytotoxizitätstest führte. Die Minderung der freien Platinverbindung kann durch hohe Initialbindung (elektrostatisch/lipophil) und durch Inaktivierung über nukleophile Substitution hervorgerufen werden. Untersuchungen zum Verhalten von makromolekular gebundenem Platin sind bisher kaum durchgeführt worden.

Verbindung	Freier Pt-Anteil nach Ultrafiltration [%]	Freier Pt-Anteil nach ethanolischer Fällung [%]	Konstante der irreversiblen Bindung k [h ⁻¹]
$G_0(\text{Dap-Pt-I}_2)_2(\text{Dap})_1$	1,6±0,9	0,6±0,3	n.b.
$G_0(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_2(\text{Dap})_1$	20±1	62±1	-0,628
$G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap-Pt-I}_2)_2(\text{Dap})_1$	1,5±0,3	1,5±0,2	n.b.
$G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_2(\text{Dap})_1$	1,4±0,8	4,0±0,1	n.b.
SM- $G_1(\text{Dap-Pt-I}_2)_3$	6±1	49±1	n.b.
SM- $G_1(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_3$	32±4	95±1	-1,001
SM- $G_1(\text{Mal-Pt-m-4F})_3$	23±1	49±1	-0,204
SM- $G_2(\text{Dan})_3(\text{Mal-Pt-m-4F})_3$	20±2	47±2	-0,113
Cisplatin	76±4	100±6	-0,321
Carboplatin	77±1	101±5	-0,013

n.b. nicht bestimmbar

Tab. 7.2 Proteinbindungscharakteristika der Platin-Dendrimer-Konjugate

In Tab. 7.2 sind die Proteinbindungskennwerte der Platin-Dendrimer-Konjugate aufgeführt: Auffällig war die starke Interaktion der Platinverbindungen mit dem HSA.

Lediglich die wirksamen Komplexe $\mathbf{G_0(Dap-Pt-Cl_2)_2(Dap)_1}$, $\mathbf{SM-G_1(Dap-Pt-Cl_2)_3}$, $\mathbf{SM-G_1-(Mal-Pt-m-4F)_3}$ und $\mathbf{SM-G_2-(Dan)_3(Mal-Pt-m-4F)_3}$ wiesen eine größere Menge Platin im Ultrafiltrat auf (Wiederfindung $\geq 20\%$). Die Stärke der Wechselwirkungen mit dem Protein trat noch deutlicher zutage, wenn man die Platingehalte im Überstand der ethanolischen Präzipitation betrachtete. Hier wiesen die mit PEG-Gruppen funktionalisierten Dendrimere eine Wiederfindung von mindestens 47% auf, während von den anderen Komplexen nur für den Komplex $\mathbf{G_0(Dap-Pt-Cl_2)_2(Dap)_1}$ eine Wiederfindung von 62% erhalten wurde. Bei den anderen Konjugaten mit den „Fuchs-Typ“-Basisdendrimeren wurden auch nach ethanolischer Präzipitation keine nennenswerten Platin-Gehalte im Überstand gefunden. Daher war eine Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die irreversible Bindung an das HSA auch nicht möglich.

Für den Komplex $\mathbf{G_0(Dap-Pt-Cl_2)_2(Dap)_1}$ hatte die Geschwindigkeitskonstante ungefähr den doppelten Wert wie für Cisplatin (-0,628 vs. -0,321h⁻¹). Da diese Verbindung zwei cisplatinanaloge Bindungsstellen aufweist, war dieses Verhalten zu erwarten, wenn keine besondere Abschirmung durch den „Dendrimer-Neutralliganden“ vorliegt. Eine solche Abschirmung konnte auch für den Komplex $\mathbf{SM-G_1(Dap-Pt-Cl_2)_3}$ nicht gefunden werden. Dieser wies mit 3 cisplatinanalogen Bindungsstellen ungefähr die dreifache Geschwindigkeitskonstante für die irreversible Bindung am Protein wie Cisplatin auf (-1,001 vs -0,321h⁻¹). Für den korrespondierenden Diiodokomplex konnte diese nicht bestimmt werden, da hier nach deutlich schnellerer Anfangsgeschwindigkeit eine stete Abflachung der Geschwindigkeit stattfand, so dass jede Linearisierung fehlschlug.

Für die Komplexe $\mathbf{SM-G_1-(Mal-Pt-m-4F)_3}$ und $\mathbf{SM-G_2-(Dan)_3(Mal-Pt-m-4F)_3}$, an die die aktive Platinverbindung über eine Dicarbonsäure gebunden war, wurden niedrigere Reaktivitäten gefunden (-0,204 bzw. -0,113h⁻¹). Diese Werte lagen aber immer noch über denen der Vergleichssubstanz Carboplatin (-0,013h⁻¹). Hierbei war der Komplex $\mathbf{SM-G_1-(Mal-Pt-m-4F)_3}$ deutlich reaktiver als der Komplex $\mathbf{SM-G_2-(Dan)_3(Mal-Pt-m-4F)_3}$. Somit schien hier tatsächlich eine Abschirmung der Platinzentren durch das Dendrimer vorzuliegen. Die verschiedenen Reaktivitäten der beiden Komplexe korrelierten auch mit den unterschiedlichen Platinmengen in DNA und Kernen, d.h. der weniger reaktive Komplex bedingte jeweils einen niedrigeren Platingehalt. Diese Beobachtung stand im

Einklang mit der Annahme, dass der überwiegende Anteil von über Dicarbonsäuren gebundenen Platinverbindungen in den Zellen durch den Angriff eines Schwefelnukleophils freigesetzt bzw. aktiviert wird.^[188,209,296]

Die Interaktion mit den Serumproteinen schien eine große Rolle für die antiproliferative Wirkung dieser Substanzklasse zu spielen. So waren Verbindungen unwirksam, wenn für sie nur geringe Mengen Platin im Ultrafiltrat und im Überstand der ethanolischen Präzipitation gefunden wurden.

Eine starke Bindung an Serumalbumine kann für Wirkstoffe durchaus vorteilhaft sein, wenn diese nur einigermaßen reversibel ist. So wird durch die hohe Masse des Serumalbumins die renale Ausscheidung vermindert und die tumorale Anreicherung über den EPR-Effekt erst ermöglicht.^[85] Allerdings wurden für die Verbindungen **G₀(Dap-Pt-I₂)₂(Dap)₁**, **G₁(Dan)₃(Dap-Pt-I₂)₂(Dap)₁**, **G₁(Dan)₃(Dap-Pt-Cl₂)₂(Dap)₁** und **SM-G₁(Dap-Pt-I₂)₃** so starke Proteinbindungen gefunden, dass hier eine Freisetzung von dem HSA unwahrscheinlich erscheint.

Zusammen mit den vorher beobachteten Tendenzen zur Präzipitation auf zellulärer Ebene zeigte sich das schon früher beobachtete Grundproblem der Belegung von Dendrimeren mit lipophilen Oberflächenmodifikationen. Dabei weisen die Konjugate häufig die Lösungseigenschaften der Endgruppen auf (hierzu siehe auch Kap. 6.3.2).^[107,285,286,288] Daher wird heute vermehrt die löslichkeitsvermittelnde Wirkung von kovalent gebundenen PEG-Gruppen eingesetzt, um sehr gut wasserlösliche Verbindungen zu erhalten.^[82,116,117,297] In den Versuchen mit Platin-Dendrimer-Konjugaten mit PEG-Ketten in der Peripherie konnten dann auch weder direkt Präzipitation noch Effekte beobachtet werden, die auf Löslichkeitsprobleme dieser Verbindungen hindeuteten. Hierbei wurden diese Verbindungen teilweise in sehr hohen Konzentrationen (bis 20µM) für die Zellversuche eingesetzt.

7.5 Einfluss der Platinierung der Dendrimere auf die Fluoreszenz der Dansylgruppe

Die zweifach funktionalisierten Dendrimere wurden synthetisiert, um die zelluläre Distribution von Zytostatika-Dendrimer-Konjugaten verfolgen zu können. Da das Dansylfluorophor, wie in Kapitel 6.3.1 diskutiert, sehr empfindlich auf Änderungen in seiner Mikroumgebung reagiert, sollte auch der Effekt von in der Nähe gebundenem Platin untersucht werden. Eine Anbindung von Fluorophoren in der Nähe eines Platinatoms wurde schon von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt. Dabei sind in den Neutralliganden als Fluorophore Fluorescein bzw. Anthrachinone enthalten, deren Fluoreszenz nicht beeinträchtigt ist, so dass diese Komplexe zur Visualisierung der zellulären Distribution geeignet sind.^[60,211,298] Für das Dansylfluorophor hingegen ist bekannt, dass ein Nickelatom nach Komplexierung in dem Dendrimer in der Lage ist, die Fluoreszenz von bis zu neun Dansyleinheiten in der Dendrimerperipherie zu löschen.^[285] Da Nickel und Platin im Periodensystem in derselben Gruppe stehen, könnte die Koordination von Platin zu Problemen bei der Fluoreszenzintensität führen.

Bei der Betrachtung der Lösungen der Komplexe $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap-Pt-I}_2)_2(\text{Dap})_1$ und $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_2(\text{Dap})_1$ unter UV-Licht wurde schon eine stark reduzierte Fluoreszenz beobachtet, so dass die Spektren (siehe Abb. 7.8) mit 2 μM Lösungen angefertigt wurden. Im Vergleich zu der Ausgangsverbindung $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$ wurde ein starker Intensitätsverlust bei beiden Komplexen gefunden. Wenn man die unterschiedlichen Verdünnungen berücksichtigt, erhielt man einen Intensitätsverlust von rund 95% der Intensität der Ausgangsverbindung $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$. Hierbei war die Reduktion bei dem Dichloro-Komplex geringfügig geringer als bei der Diiodo-Verbindung. Beide Verbindungen zeigten eine hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums. Hierbei zeigte der Diiodo-Komplex eine Verschiebung nach 526nm, während der Dichloro-Komplex eine deutliche Verschiebung nach 514nm erfuhr. Insgesamt war das Emissionsmaximum dieser Verbindungen noch breiter als das sowieso sehr breite Maximum der Ausgangsverbindung.

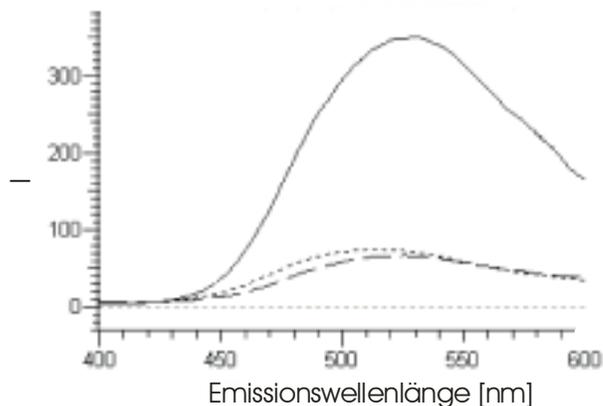


Abb.7.8 Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 340nm in Ethanol für: — $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap})_3$ ($0,5\mu\text{M}$), - - - $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap-Pt-Cl}_2)_2(\text{Dap})_1$ ($2\mu\text{M}$), — — $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap-Pt-I}_2)_2(\text{Dap})_1$ ($2\mu\text{M}$) (nach abfallender Fluoreszenzintensität geordnet)

In frischen Zellpräparaten wurde daher bei der Fluoreszenzmikroskopie auch keine Abweichung der Fluoreszenzverteilung im Vergleich zu den Kontrollzellen gefunden.

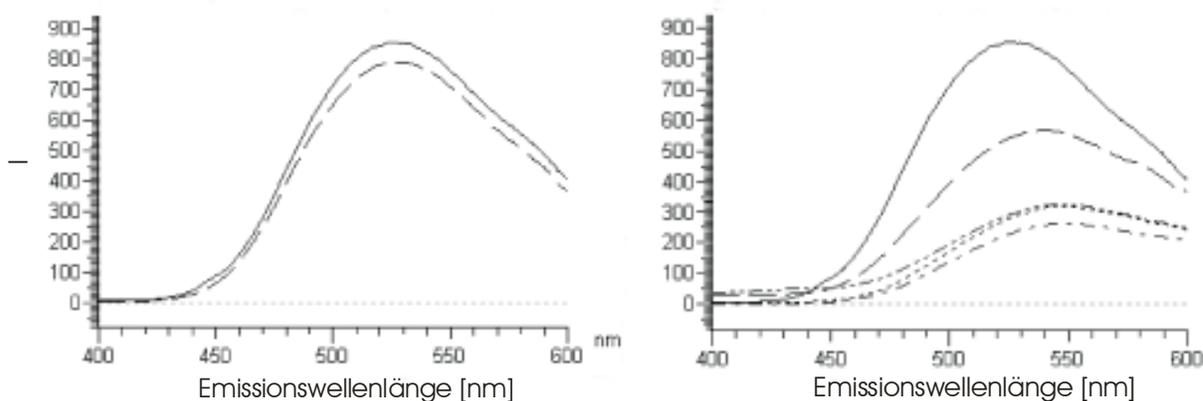


Abb. 7.9 links: Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 340nm in Ethanol für: — $\text{SM-G}_2(\text{Dan})_3(\text{Mal})_3$, — — $\text{SM-G}_2(\text{Dan})_3(\text{Mal-Pt-m-4F})_3$ (alle $0,5\mu\text{M}$) rechts: Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 340nm für $\text{SM-G}_2(\text{Dan})_3(\text{Mal-Pt-m-4F})_3$ ($0,5\mu\text{M}$) in verschiedenen Lösungen: — Ethanol, — — TET-Puffer, - - - DNA-Lösung, — — — HSA-Lösung, — — — Wasser (nach abfallender Fluoreszenzintensität geordnet)

Nach der Platinierung des $\text{SM-G}_2(\text{Dan})_3(\text{Mal})_3$ zum $\text{SM-G}_2(\text{Dan})_3(\text{Mal-Pt-m-4F})_3$ Komplex hingegen resultierten nur geringe Änderungen im Verhalten des Fluorophors (siehe Abb. 7.9). So wurde keine Verschiebung des Emissionsmaximums und nur eine geringe Reduktion der Emissionsintensität beobachtet. Hier schien die PEG-Gruppen die Löschung der Dansylfluoreszenz durch das Platin zu verhindern. Auch das Verhalten des

Konjugats in verschiedenen Lösungen zeigte die gleichen Eigenschaften wie das nicht platinerte Molekül **SM-G₂-(Dan)₃(Mal)₃** (siehe Kap. 6.3.1 Abb. 6.27). Ebenso wurde ein rapider Abfall der Intensität in einer wässrigen Lösung gefunden. Eine Interaktion mit Protein (HSA) oder DNA konnte ebenfalls nicht beobachtet werden, d.h. es wurde kein Unterschied zum Verhalten im Wässrigen gefunden.

7.6 Vergleich der Zellaufnahme (fluorimetrisch bzw. mittels AAS bestimmt) von dansylmarkierten Platin-Dendrimer-Konjugaten

Bei den Stabilitätsuntersuchungen der Dendrimere (siehe Kap. 6.1) konnte gezeigt werden, dass die Diaminopropionsäure hydrolytisch und enzymatisch unter physiologischen Bedingungen nicht abgespalten werden konnte. Aufgrund ihrer geringen elektrophoretischen Mobilität und der teilweise zu erwartenden geringen Löslichkeit konnten für die Platin-Dendrimer-Konjugate ähnliche Untersuchungen nicht durchgeführt werden. Daher boten sich die zweifach markierten Verbindungen **G₁(Dan)₃(Dap-Pt-I₂)₂(Dap)₁** und **SM-G₂-(Dan)₃(Mal-Pt-m-4F)₃** zur Überprüfung der Stabilität auf zellulärer Ebene an. Die Bindung des Dansylfluorophors an das Dendrimergerüst war (siehe Kap. 6.1) stabil und war daher für die zuverlässige Quantifizierung des Dendrimers geeignet. Eine parallele Bestimmung des Platingehalts sollte zeigen, ob das über die Diaminopropionsäure gebundene Platin ein zuverlässiger Marker für die Platindendrimer-Konjugate darstellt. Da beim Komplex **SM-G₂-(Dan)₃(Mal-Pt-m-4F)₃** eine Freisetzung des Platins beabsichtigt war und die Zytotoxizität und die Zellaufnahme Indizien dafür lieferten (siehe Kap. 7.1 und 7.2), sollte hier die Entkopplung des zellulären Dendrimer- und Platingehalts gezeigt werden. Es wurde daher eine zeitabhängige Zellaufnahme dieser Komplexe durchgeführt, wobei sowohl der Fluorophorgehalt als auch der Platingehalt in den Zelllysaten bestimmt wurde.

Für den Komplex **G₁(Dan)₃(Dap-Pt-I₂)₂(Dap)₁** wurden dieselben Kinetiken für den Fluorophor- und den Platingehalt gefunden. Bei der Korrelation der Messwerte fand man, dass zumindest die hohen Messwerte auf der Y=X-Geraden lagen (siehe Abb. 7.10), was für eine starke Korrelation sprach. Die niedrigeren Werte waren vor allem durch die geringen Fluoreszenzintensitäten (siehe Kap. 7.5) relativ stark fehlerbehaftet, was eine

Quantifizierung über die Fluorimetrie bei den frühen Zeitpunkten nahezu unmöglich machte. Bei den späteren Zeitpunkten wurden höhere Werte gefunden, so dass die Quantifizierung zuverlässiger wurde. Gerade bei späteren Zeitpunkten müsste eine Entkopplung von Platin- und Fluorophorgehalt aber besonders ins Gewicht fallen, so dass man davon ausgehen kann, dass keine Abspaltung des Platins aus diesen Komplexen geschah.

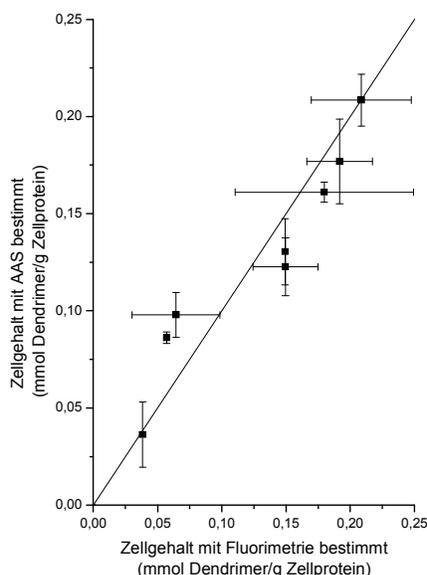


Abb. 7.10 Korrelation der fluorimetrischen mit der atomabsorptionsspektroskopischen Bestimmung für den zellulären Substanzgehalt nach Inkubation mit $G_1(\text{Dan})_3(\text{Dap-Pt-I}_2)_2(\text{Dap})_1$ in MCF-7-Zellen

Bei den Versuchen mit dem $\text{SM-G}_2(\text{Dan})_3(\text{Mal-Pt-m-4F})_3$ wurde hingegen ein vollkommen anderes Bild gefunden (Abb. 7.11). Die Bestimmung der Zellaufnahme über den Dansylmarker führte zu Kinetiken, wie sie für nicht platinerte Verbindungen erhalten wurden (Kap. 6.3.3.2). Es wurde ein schnelles Erreichen eines Plateaus beobachtet, das höher ($\text{AG}=1,2$ nach 1h) als bei der nicht platinerten Verbindung lag ($\text{AG}=0,2$). Für die Bestimmung der Zellaufnahme über den Platinmarker hingegen beobachtete man eine lineare Zunahme über die Zeit. Dieses zeigte die kontinuierliche Freisetzung der Platinverbindung von dem Dendrimer. Hierbei bleibt noch zu untersuchen, ob das vornehmlich in oder außerhalb der Zelle geschah.

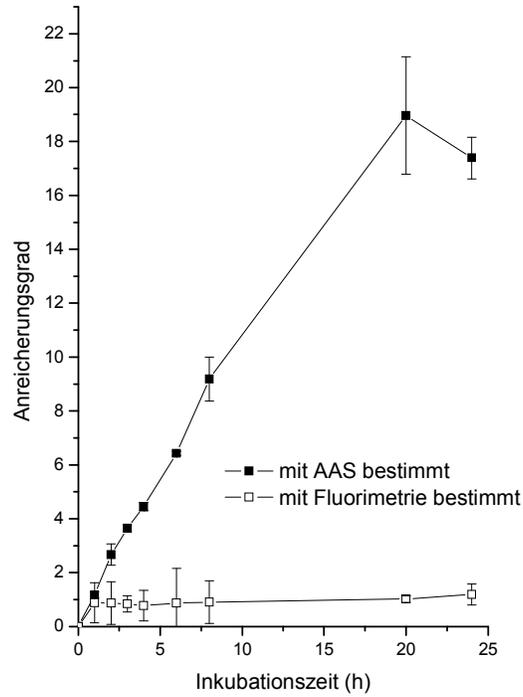


Abb. 7.11 Bestimmung der Zellanreicherung von $\text{SM-G}_2\text{-(Dan)}_3\text{(Mal-Pt-m-4F)}_3$ in MCF-7-Zellen über das Dansylfluorophor und das konjugierte Platin

