

9 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei Ansätze zur pharmakologischen Optimierung der zytostatischen Platinverbindungen **m-4F-Pt-Cl₂** verfolgt. Der erste Ansatz hatte die Einbindung des 4F-Neutralliganden in kationische polynukleare Alkylaminplatinverbindungen als Ziel. Die Pharmakologie dieser Verbindungsklasse ist bisher nur in Ansätzen aufgeklärt worden. Hier konnte durch den Einsatz verschiedener Hemmstoffe die endozytotische Aufnahme in die Krebszellen nach Adsorption an die Zellmembranen gezeigt werden. Der Aufnahmeweg ist dabei vornehmlich die Makropinozytose, ein Endozytoseweg, der außer bei Krebszellen nur bei wenigen anderen Zelltypen aktiviert ist. Für die Adsorption an die Zellmembran ist sowohl die Ladung als auch die Alkylkette des Brückenliganden wichtig. So wurde mit steigender positiver Ladung und steigender Alkylkettenlänge eine Zunahme der Zellaufnahme beobachtet. Das Verlassen der endozytotischen Route konnte durch die Bestimmung der Platingehalte in den Zellkernen und in der DNA gezeigt werden. Hier zeigte sich auch eine Abhängigkeit von der Abgangsgruppe am Platin. Obwohl bei kapillarelektrophoretischen Untersuchungen ein schneller Austausch von DMSO durch Chlorid innerhalb von zwei Stunden beobachtet werden konnte, wurde beim Einsatz der Chloroverbindung ein höherer Kerngehalt als für den korrespondierenden DMSO-Komplex gefunden.

Der zur Zellaufnahme verfügbare Platingehalt wurde allerdings durch eine ebenfalls ausgeprägte Proteinbindung gemindert. Wurden in serumhaltigen Kulturmedium durch 10µM Substanz keine antiproliferativen Effekte an MCF-7-Zellen hervorgerufen, so zeigte dieselbe Konzentration nach sechsstündiger Inkubation in serumfreien Medium eine nachhaltige (<200h) nahezu 50%ige Hemmung des Zellwachstums.

Besonders herausragend war bei diesen Versuchen der tetranuklearer Komplex **m-4F-Pt-DAB(PA)₄-DMSO**, der als Brückenligand ein DAB-PPI-Dendrimer aufwies. Dieser Komplex zeigte ein ausgeprägtes DNA-Targeting. Daher wurde besonderes Augenmerk auf die Anbindung der Leitverbindung **m-4F-Pt-Cl₂** an Makromoleküle, insbesondere den Dendrimeren, gelegt. Hierbei sollte über das Design der Dendrimere die Selektivität für Tumorzellen erhöht werden. Die hohe Zytotoxizität der Basisdendrimere konnte

durch Modifikation der Endgruppen (z.B. durch Asparaginsäure- und Diaminopropionsäure-Reste) deutlich reduziert werden. Einige dieser Endgruppen (Methionin und Phenylalanin) konnten in Modellversuchen teilweise durch enzymatische Spaltung freigesetzt werden. Die in den Modellen gefundene enzymatische Hydrolyse fand in den intakten MCF-7-Zellen sehr schnell statt, so dass bei Zellaufnahmeexperimenten kaum Zwischenprodukte detektiert werden konnten. Für die Verbindungen wurde die Zellaufnahme in Abhängigkeit von der Oberflächenmodifikation gezeigt. Ein höherer zellulärer Gehalt korrelierte innerhalb einer Dendrimergeneration mit höherer Zytotoxizität. Mit steigender Generation hingegen sank der zelluläre Gehalt bei steigender Zytotoxizität.

Die subzelluläre Verteilung der mit der Dansylgruppe fluoreszenzmarkierten Dendrimere wurde untersucht. Hier bewirkten unterschiedliche Oberflächenfunktionalitäten starke Unterschiede im Verteilungsmuster und im zellulären Gehalt in den Zellen. Bei Inkubation mit den apolaren volldansylierten Dendrimeren wurde ein linearer Anstieg des Gehalts in den Zellen über die Zeit gefunden. Nach 24h wurden auch lichtmikroskopisch sichtbare Substanzablagerungen in den Zellen beobachtet. Diese Ablagerungen bewirkten allerdings keine nachteiligen Effekte auf das Zellwachstum von MCF-7-Zellen. Die partiell dansylierten Dendrimere zeichneten sich durch eine starke Zellaufnahme in die MCF-7-Zellen aus, die innerhalb von 6h abgeschlossen war. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte eine perinukleare Verteilung in den Zellen gefunden werden. Hier korrelierte die ausgeprägte Anreicherung in den Zellen mit der Zytotoxizität. Die sehr gut wasserlöslichen PEGilierten dansylierten Dendrimere riefen eine punktuelle Färbung des Zytoplasmas hervor. Der zelluläre Gehalt war dabei im Vergleich zu den anderen fluoreszenzmarkierten Dendrimeren sehr niedrig, so dass diese Verbindungen mit einer Ausnahme (**SM-G₂-(Dan)₃(NH₂)₃**) das Zellwachstum kaum beeinträchtigten.

Die Anbindung von Platin über chelatisierende Endgruppen an die Dendrimere führte zu einer deutlichen Erhöhung der Aufnahme der Dendrimere in MCF-7-Zellen. Zumindest kleine Platin-Dendrimer-Konjugate, bei denen das Platin über Diaminopropionsäure angebunden war, waren in der Lage, die endozytotische Route zu verlassen. So wurden sie in das Kernkompartiment aufgenommen und an die DNA gebunden. Hierbei musste das intakte Platin-Dendrimer-Konjugat in den Kern aufgenommen worden sein, da

Korrelationsversuche mit einem fluoreszenz- und platinmarkierten Konjugat keine Entkopplung des Fluorophor- und Platingehalts in der Zelle gezeigt haben. So riefen diese Verbindungen in einer Konzentration von 5 μ M eine bis zu 50%ige Hemmung des Zellwachstums von MCF-7-Zellen hervor.

Einen deutlich stärkeren antiproliferativen Effekt hatten größere Dendrimere, an die der Wirkstoff (**m-4F-Pt-(H₂O)₂**) über Dicarbonsäuren gebunden war. Die Freisetzung des Wirkstoffes aus diesen Komplexen konnte anhand eines zusätzlich fluoreszenzmarkierten Dendrimers gezeigt werden. Hier trat eine deutliche Entkopplung des Fluorophor- und des Platingehalts auf.

Der kritische Parameter für die Wirksamkeit von Platin-Dendrimer-Konjugaten stellte die Bindung an Serumalbumine dar. Gegenüber wirksamen Verbindungen zeigten Verbindungen ohne antiproliferative Wirkung teilweise größere Anreicherungen in den Zellen und höhere DNA-gebundene Platingehalte. Die Bindung der unwirksamen Verbindungen an das HSA war jedoch dermaßen stark, dass nur ein geringer Anteil (<5%) der Ausgangsmenge in einer HSA-Lösung frei vorlag und somit für die Zellen verfügbar war.

