

**Reaktivität und zelluläre Aufnahme  
albuminbindender Platinkomplexe und neuer  
Oxaliplatin-Analoga**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
DIRK GARMANN  
aus Mettingen

Bonn 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

im Rahmen des Graduiertenkollegs 677

„Struktur und Molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“

gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Projekt JA 817/2-1)

1. Referent: Prof. Dr. U. Jaehde
2. Referent: Prof. Dr. M.U. Kassack

Tag der Promotion: 20.04.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2007

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. U. Jaehde angefertigt.

Meinem Doktorvater Prof. Jaehde danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas und das in mich gesetzte Vertrauen. Seine jederzeit vorhandene Diskussionsbereitschaft und die mir gewährten Freiräume haben mich während meiner Promotion stets motiviert.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. M.U. Kassack für die Bereitschaft mir als zweiter Betreuer im Graduiertenkolleg zur Seite zu stehen und das Koreferat zu übernehmen. Der konstruktive Gedankenaustausch mit ihm hat ebenfalls zu dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. K. Mohr und dem gesamten Graduiertenkolleg danke ich für die sehr interessante und lehrreiche Zeit und die Möglichkeit, über das eigene Arbeitsgebiet hinaus Erfahrungen sammeln zu können.

Den Kooperationspartnern Dr. F. Kratz und Dr. A. Warnecke aus Freiburg sowie Prof. B.K. Keppler aus Wien danke ich für die gute Kooperation bei den gemeinsamen Projekten.

Udo Fabri und Frau Julia Philip danke ich für die tatkräftige und zuverlässige Unterstützung und die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Dr. Jochen Zisowsky danke ich für die Einarbeitung in die Techniken der Zellkultur. Die von ihm geleisteten Vorarbeiten bildeten in vielen Bereichen die Basis für diese Arbeit.

Irina Buß danke ich für die enge Zusammenarbeit am Ende meiner Arbeit. Ich hoffe, dass ihr die Oxaliplatin-Analoga weiterhin viel Freude bereiten.

Besonders danke ich Dr. Achim Becker für die gute Zusammenarbeit im CE-Labor. Die konstruktiven Diskussionen und sein analytischer Sachverstand haben häufig zur Problemlösung beigetragen.

Meike Eckhardt, Sven Simons, Frederike Lentz, Achim Becker, Jochen Zisowsky, Martina Westfeld, Susanne Roth und Anne Drescher danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises möchte ich herzlich für die gemeinsame Zeit danken. Die gute und freundliche Atmosphäre auch über die Arbeit hinaus wird mir immer in guter Erinnerung bleiben.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Claudia Reicheneder für ihre Geduld in der Endphase der Arbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mir in sehr schwierigen Zeiten Rückhalt gaben und mich immer unterstützt haben.

Meiner Familie  
und  
Gabi Grahs

*„Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft.  
Wer nichts anzweifelt, prüft nichts.  
Wer nichts prüft, entdeckt nichts.  
Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.“*

Teilhard de Chardin



---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1	Entwicklung und klinische Bedeutung der Platinkomplexe	5
1.2	Chemie der Platinkomplexe	9
1.3	Bioaktivierung und Wirkungsmechanismus	13
1.3.1	Bioaktivierung	13
1.3.2	Bindung an DNA	16
1.3.3	Zelluläre Prozesse als Folge der DNA-Platinierung	18
1.4	Grenzen der klinischen Anwendung	24
1.4.1	Toxizität	24
1.4.2	Resistenz	25
1.5	Ansätze zur Optimierung der Platinkomplexe	32
1.5.1	Tumortargeting	34
1.5.2	Strukturoptimierung	38
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>40</b>
2.1	Albuminbindende Platinkomplexe	40
2.2	Oxaliplatin-Analoga	41
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>42</b>
3.1	Material	42
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	42
3.1.2	Albuminbindende Platinkomplexe und PEG-Platinkomplex	44
3.1.3	Oxaliplatin-Analoga	46
3.1.4	Hergestellte Lösungen und Puffer	47
3.1.5	Geräte	54
3.1.6	Zelllinien	55
3.2	CE-Analytik	56
3.2.1	Grundlagen der Kapillarelektrophorese	56
3.2.2	Methode zur Untersuchung der Platin-Nukleotid-Adduktbildung	63
3.2.3	Methode zur Untersuchung der Albuminbindung	71
3.3	AAS-Analytik	74
3.3.1	Grundlagen der Atomabsorptionsspektrometrie	74
3.3.2	Methode zur Platinbestimmung	77
3.4	Gleichgewichtsmikrodialysekammer	81
3.4.1	Modellbeschreibung	81
3.4.2	Vorversuche zur Einstellung des pH-Wertes	82
3.4.3	Untersuchung der Aktivierung durch unspezifische und saure Hydrolyse	82
3.4.4	Untersuchung der Aktivierung durch Butyrylcholinesterase	85
3.4.5	Untersuchung zur Stabilität des PEG-Platinkomplexes	88
3.5	Zellkultur	88
3.5.1	Lagerung der Zellen	88
3.5.2	Auftauen der Zellen	89
3.5.3	Kultivierung der Zellen	89

3.5.4	Bestimmung der Zellzahl	90
<b>3.6</b>	<b>Zytotoxizitätstest (MTT-Assay)</b>	<b>90</b>
3.6.1	Grundlagen	90
3.6.2	Versuchsbedingungen	92
3.6.3	Bestimmung des Resistenzgrades	92
<b>3.7</b>	<b>Quantifizierung der DNA-Platinierung</b>	<b>93</b>
<b>3.8</b>	<b>Proteinbestimmung</b>	<b>95</b>
3.8.1	Grundlagen	95
3.8.2	Messbedingungen	96
<b>3.9</b>	<b>Fluoreszenzassay</b>	<b>97</b>
3.9.1	Messbedingungen	98
<b>3.10</b>	<b>Lipophiliebestimmung</b>	<b>99</b>
<b>3.11</b>	<b>Zellinkubationsversuche mit Platinkomplexen</b>	<b>100</b>
3.11.1	Ermittlung der intrazellulären Platinkonzentration	100
3.11.2	Messung der zellulären Aufnahme niedermolekularer und makromolekularer Platinkomplexe	100
3.11.3	Charakterisierung der Aufnahmemechanismen makromolekularer Platinkomplexe	101
3.11.4	Membranpräparation	105
<b>3.12</b>	<b>Statistische Datenanalyse</b>	<b>105</b>
3.12.1	Deskriptive Statistik	105
3.12.2	Statistische Tests zur Überprüfung von Unterschiedshypothesen	106
3.12.3	Korrelationsanalyse	107
3.12.4	Regressionsanalyse	108
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE DER METHODENENTWICKLUNG UND -VALIDIERUNG</b>	<b>110</b>
<b>4.1</b>	<b>CE-Methode zur Untersuchung der Platin-Nukleotid- Adduktbildung</b>	<b>110</b>
4.1.1	Optimierung der Trennung der Platin-Nukleotid-Addukte	110
4.1.2	Validierung	114
<b>4.2</b>	<b>CE-Methode zur Untersuchung der Albuminbindung</b>	<b>119</b>
4.2.1	Trennung	119
4.2.2	Validierung	120
4.2.3	Stabilitätsuntersuchungen albuminbindender Platinkomplexe	121
<b>4.3</b>	<b>BCA-Methode zur Proteinbestimmung</b>	<b>124</b>
4.3.1	Teilvalidierung	124
<b>4.4</b>	<b>Fluoreszenzassay zur Bestimmung von FITC-Rinderserumalbumin</b>	<b>127</b>
4.4.1	Teilvalidierung	128
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE ZUR UNTERSUCHUNG MAKROMOLEKULARER PLATINKOMPLEXE</b>	<b>131</b>
<b>5.1</b>	<b>Bindung an Albumin</b>	<b>131</b>
5.1.1	Kinetik der Albuminbindung	131
5.1.2	Spezifität der Albuminbindung	132
<b>5.2</b>	<b>Platin-Nukleotid-Adduktbildung</b>	<b>133</b>
5.2.1	Identifizierung der Addukte albuminbindender Platinkomplexe	134

---

5.2.2	Reaktivitätsvergleich verschiedener Platinkomplexe	136
<b>5.3</b>	<b>Bioaktivierung</b>	<b>137</b>
5.3.1	Vorversuch zur Einstellung des pH-Wertes	139
5.3.2	Untersuchung der Aktivierung durch unspezifische Hydrolyse	139
5.3.3	Untersuchung der Aktivierung durch saure Hydrolyse	143
5.3.4	Untersuchung der Aktivierung durch Butyrylcholinesterase	145
5.3.5	Aktivierung eines PEG-Platinkomplexes	147
5.3.6	Untersuchungen zur Stabilität des PEG-Platinkomplexes	148
<b>5.4</b>	<b>Zelluläre Aufnahme</b>	<b>150</b>
5.4.1	Charakterisierung der Zelllinien	151
5.4.2	Quantifizierung der intrazellulären Platinkonzentration	153
5.4.3	Charakterisierung der Aufnahmemechanismen	158
<b>5.5</b>	<b>Zytotoxizität</b>	<b>165</b>
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE ZUR UNTERSUCHUNG NEUER OXALIPLATIN-ANALOGA</b>	<b>168</b>
<b>6.1</b>	<b>Reaktivität gegenüber Nukleotiden</b>	<b>169</b>
<b>6.2</b>	<b>Zelluläre Aufnahme</b>	<b>170</b>
6.2.1	Etablierung eines Kontrollversuchs	170
6.2.2	Quantifizierung der intrazellulären Platinkonzentration	171
<b>6.3</b>	<b>Zytotoxizität</b>	<b>174</b>
<b>6.4</b>	<b>Korrelationsanalysen</b>	<b>176</b>
6.4.1	Beziehung zwischen Lipophilie und zellulärer Aufnahme	176
6.4.2	Beziehungen zwischen Struktur, Lipophilie und Zytotoxizität	184
6.4.3	Weiterführende Untersuchungen mit der Substanz KP1480	187
6.4.4	Einfluss der Lipophilie auf den Resistenzgrad	190
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>192</b>
<b>7.1</b>	<b>Methodenoptimierung und –validierung</b>	<b>192</b>
7.1.1	CE-Methoden	192
7.1.2	Proteinbestimmung und Fluoreszenzassay	197
7.1.3	Abschließende Bemerkung zur Validierung analytischer Methoden	198
<b>7.2</b>	<b>Makromolekulare Platinkomplexe</b>	<b>198</b>
7.2.1	Bindung an Albumin	198
7.2.2	Platin-Nukleotid-Adduktbildung	201
7.2.3	Bioaktivierung	202
7.2.4	Zelluläre Aufnahme und Zytotoxizität	215
7.2.5	Diskussion der Tierversuche	223
7.2.6	Abschließende Beurteilung des Konzepts der makromolekularen Platinkomplexe	226
<b>7.3</b>	<b>Oxaliplatin-Analoga</b>	<b>231</b>
7.3.1	Vergleich der Reaktivität	232
7.3.2	Beziehungen zwischen Lipophilie und zellulärer Aufnahme	233
7.3.3	Beziehungen zwischen Lipophilie, Zytotoxizität und Resistenz	236
7.3.4	Abschließende Beurteilung des Konzepts der Strukturoptimierung durch Veränderung der Lipophilie	239
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>242</b>

<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>245</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>267</b>

## Abkürzungen

A	Absorption
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
AE	Elutionspuffer
AL	Arbeitslösung
Akt	Proteinkinase B
AW	Waschpuffer
ATP7A	Adenosintriphosphat Alpha-Polypeptid
ATP7B	Adenosintriphosphat Beta-Polypeptid
A2780	Ovarialkarzinomzelllinie
A2780cis	Cisplatinresistente Ovarialkarzinomzelllinie
BafA <sub>1</sub>	Bafilomycin A <sub>1</sub>
Bad	Bcl-xL/Bcl-2 associated death promotor
Bax	Bcl-2 associated x-protein
BCA	Bichinolin-4-carbonsäure
BChE	Butyrylcholinesterase (= Pseudocholinesterase)
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2
Bcl-x <sub>L</sub>	Bcl-2-like
Caspase	cysteinyll aspartate-specific proteinase
CBDCA	Cyclobutan-1,1-dicarboxylat
CE	Kapillarelektrophorese
Cis	Cisplatin
cMOAT	Canicular Multispecific Organic Anion Transporter
CTR1	Copper Transporter 1
Cu	Kupfer
DACH	Diaminocyclohexan
D-MEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
dAMP	2-Desoxyadenosin-5`-monophosphat
dGMP	2-Desoxyguanosin-5`-monophosphat

---

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
E. coli	Escherichia coli
EC <sub>50</sub>	Halbmaximale, effektive Konzentration
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOF	Elektroendosmotischer Fluss
EPR	Enhanced Permeability and Retention
Fas	Fibroblast associated
FasL	Fas Ligand
FITC	Fluorescein isothiocyanate conjugate
FKS	Fetales Kälberserum
Gadd45	Growth arrest DNA damage induced gene 45
GF-AAS	Graphitrohrfen-Atomabsorptionsspektrometrie
Gl.	Gleichung
GSH	Reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTA	Graphite Tube Atomizer
H-Ras	Harvey-Ras (rat sarcoma virus)
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HMG	High Mobility Group
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HSA	Humanes Serumalbumin
ID	Innendurchmesser
LAF	Laminar Air Flow
LIF	Laserinduzierte Fluoreszenz
LLOQ	Lower Limit of Quantification
LOD	Limit of Detection

---

MAPK	Mitogen activated protein kinase
M <sub>r</sub>	Molare Masse
β-MCD	β-Methylcyclodextrin
MDR	Multi Drug Resistance
MMR	Mismatch-Reparatur
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRP2	MDR-assoziiertes Protein
MS	Massenspektrometrie
MT	Metallothionein
MTD	Maximale tolerierbare Dosis
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
n.d.	Nicht detektierbar
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
OD	Außendurchmesser
Oxa	Oxaliplatin
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
PP	Polypropylen
Pt-AG	Pt-Addukt mit benachbarten Guanin- und Adeninbasen
Pt-GG	Pt-Addukt mit zwei benachbarten Guaninbasen
G-Pt-G	Pt-Addukt mit zwei nicht benachbarten Guaninbasen
p53	Tumorsuppressorprotein 53
P13K	Phospho-Inositol-3-Kinase
p21	Protein 21: Cyclinabhängiger Kinaseinhibitor
p73	Protein 73: Tumor(suppressor)protein 73
QC	Quality Control
PROMT	Precision Optimized Measurement Time
Pt	Platin
q.s.	Quantum satis

---

r	Korrelationskoeffizient
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSA	Rinderserumalbumin
RSD	Relative Standardabweichung
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
SL	Stammlösung
SOD	Superoxyd-Dismutase
Tab.	Tabelle
TMP	Thymidin-5`-monophosphat
U	Unit (Einheit für die Enzymaktivität)
UBF	Upstream Binding Faktor
ULOQ	Upper limit of quantification
UV / VIS	Ultraviolettes / sichtbares Licht
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VK	Variationskoeffizient
5-FU	Fluorouracil

# 1 Einleitung

## 1.1 Entwicklung und klinische Bedeutung der Platinkomplexe

Der erste Vertreter der Platinkomplexe, das **Cisplatin** [cis-Diammindichloroplatin(II)], wurde bereits 1844 durch Peyrone in Liebigs Annalen der Chemie beschrieben<sup>1</sup>. Die Entdeckung des zytotoxischen Effekts der Platinkomplexe erfolgte erst 1965 und geht auf eine zufällige Beobachtung Barnett Rosenbergs zurück. Rosenberg untersuchte das Verhalten von E. coli Bakterien im elektrischen Feld. Er vermutete, dass aufgrund der Ähnlichkeit zwischen den Feldlinien zweier Pole und der Mitosespindel, die sich bei der Teilung des Chromosomensatzes herausbildet, ein Einfluss des elektrischen Felds auf die Zellteilung besteht. Rosenberg beobachtete ein enormes filamentartiges Längenwachstum. Seine eigentliche wissenschaftliche Leistung bestand darin, durch systematische Untersuchungen gezeigt zu haben, dass für dieses veränderte Wachstumsverhalten nicht das elektrische Feld sondern Diammintetrachloroplatin(IV), das sich im Versuchsverlauf aus Ammoniumchlorid in der Kulturlösung und der vermeintlich inerten Platinelektrode bildete, verantwortlich war. Der entstandene Platin(IV)-Komplex wurde im reduktiven Milieu der Bakterien zu Cisplatin [cis-Diammindichloroplatin(II)] (Abb. 1-1) reduziert, welches sich in weiteren Untersuchungen als eigentlich wirksame Substanz erwies<sup>2</sup>.

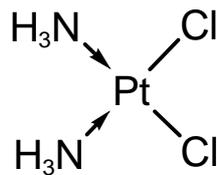


Abb. 1-1: Chemische Struktur von Cisplatin.

Nachdem Tierversuche und die folgenden klinischen Studien eine gute Antitumor-Aktivität zeigten, erhielt Cisplatin ab 1971 schnell Einzug in viele Chemotherapieregime und kann als ein Meilenstein der Onkologie betrachtet werden<sup>2</sup>. Auch heute noch wird Cisplatin in Kombination mit anderen Zytostatika in kurativer Absicht bei Hodentumoren und beim Ovarialkarzinom eingesetzt und findet weitere Verwendung in der Behandlung von Bronchial-, Plattenepithel-, Prostata-

Endometrium- und Zervixkarzinom<sup>3</sup>. Durch Cisplatin gelang es, die Heilungsrate bei Hodentumoren enorm zu verbessern. Lag vor der Einführung von Cisplatin die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 45 %, so konnte durch eine Kombination von Bleomycin, Etoposid und Cisplatin (BEP-Schema) eine Steigerung auf über 90 % erreicht werden<sup>4,5</sup>. Die Anwendung von Cisplatin in der Therapie des Ovarialkarzinoms in Kombination mit Paclitaxel führte ebenfalls zu einer signifikanten Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate<sup>3</sup>.

Leider wird der Einsatz von Cisplatin durch zum Teil schwere unerwünschte Wirkungen und dem Auftreten von primärer oder erworbener Resistenz limitiert<sup>6</sup>. Deshalb begann sehr bald die Suche nach weiteren Platinkomplexen, die durch eine geringere Toxizität oder fehlende Resistenzentwicklung die Chemotherapie mit Platinkomplexen verbessern sollten. Von vielen seitdem synthetisierten und untersuchten Platinkomplexen gelangten nur wenige zur Zulassung.

**Carboplatin** [cis-Diammin(1,1-cyclobutandicarboxylato)platin(II)] (Abb. 1-2) wurde schon bald (1986) nach der Einführung von Cisplatin mit dem Ziel entwickelt, die Toxizität zu minimieren sowie Stabilität und Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Carboplatin besitzt einen, im Vergleich zu den Chloridliganden von Cisplatin, wesentlich stabileren Cyclobutandicarboxylat-Chelatliganden, wodurch Carboplatin eine geringere Reaktivität aufweist.

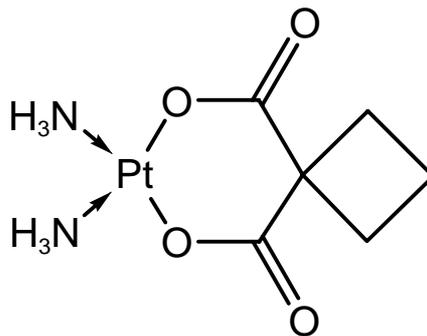


Abb. 1-2: Chemische Struktur von Carboplatin.

Die geringere Reaktivität ist auch Ursache für eine höhere Dosierung bei äquieffektiver Wirkung. Trotzdem zeigt Carboplatin klinisch eine im Vergleich zu Cisplatin bessere Verträglichkeit, eine leichtere Handhabung und ein anderes Toxizitätsprofil. Dies hat dazu geführt, dass Carboplatin Cisplatin aus vielen

Therapieregimen zur Behandlung platinsensibler Tumore verdrängte. Carboplatin (in Kombination mit Paclitaxel) gilt als Goldstandard beim Ovarialkarzinom<sup>3,7,8,9</sup>. Hauptindikationen für Carboplatin sind derzeit neben den Ovarialkarzinomen Kopf-Hals Tumoren sowie Bronchial- und Zervixkarzinome. Weiterhin ist Carboplatin der einzige Platinkomplex, der in der Hochdosis-Chemotherapie mit Stammzelltransplantation einsetzbar ist<sup>3,8</sup>. Allerdings konnte Carboplatin das Wirkspektrum der Platinkomplexe nicht erweitern und weist eine Kreuzresistenz zu Cisplatin auf. Beide Platinkomplexe haben z.B. keine Wirkung gegen das kolorektale Karzinom.

Dies konnte mit der Entwicklung des **Oxaliplatin** [[(1R,2R)-1,2-Cyclohexandiamin-N,N']][oxalato(2-)-O,O']platin(II)] geändert werden. Bei dieser Substanz wurden die Amminliganden durch 1,2 **Diaminocyclohexan** (DACH) als Neutralliganden und die Chloridliganden durch einen Oxalatliganden ersetzt (Abb. 1-3).

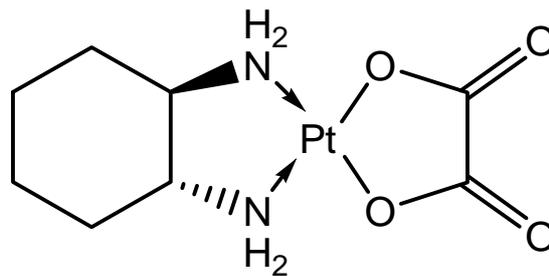


Abb. 1-3: Chemische Struktur von Oxaliplatin.

Oxaliplatin zeigt ein etwas anderes Spektrum an Aktivität und Resistenz bei verbesserter Wasserlöslichkeit und anderem Toxizitätsprofil. Der DACH-Ligand wird dabei für die häufig fehlende Kreuzresistenz zu Cisplatin und Carboplatin verantwortlich gemacht. Oxaliplatin ist seit 1999 zur Therapie des kolorektalen Karzinoms in Kombination mit Fluorouracil (5-FU) zugelassen<sup>10</sup>.

Auf drei weitere Platinkomplexe, die (noch) keine große klinische Bedeutung haben, soll hier nur kurz eingegangen werden.

**Nedaplatin** [cis-Diammin(glycolato-O,O')platin(II)] ist in Japan zur Therapie verschiedener gynäkologischer Tumorerkrankungen zugelassen. Nedaplatin besitzt eine geringere Reaktivität als Cisplatin, aber eine höhere als Carboplatin. Nedaplatin soll ein etwas günstigeres Toxizitätsprofil als Cisplatin besitzen. Hinsichtlich

Therapieansprechen und Überlebensrate scheinen keine Vorteile zu bestehen<sup>11</sup>. Für einen bewertenden Vergleich mit Carboplatin liegen keine Studien vor.

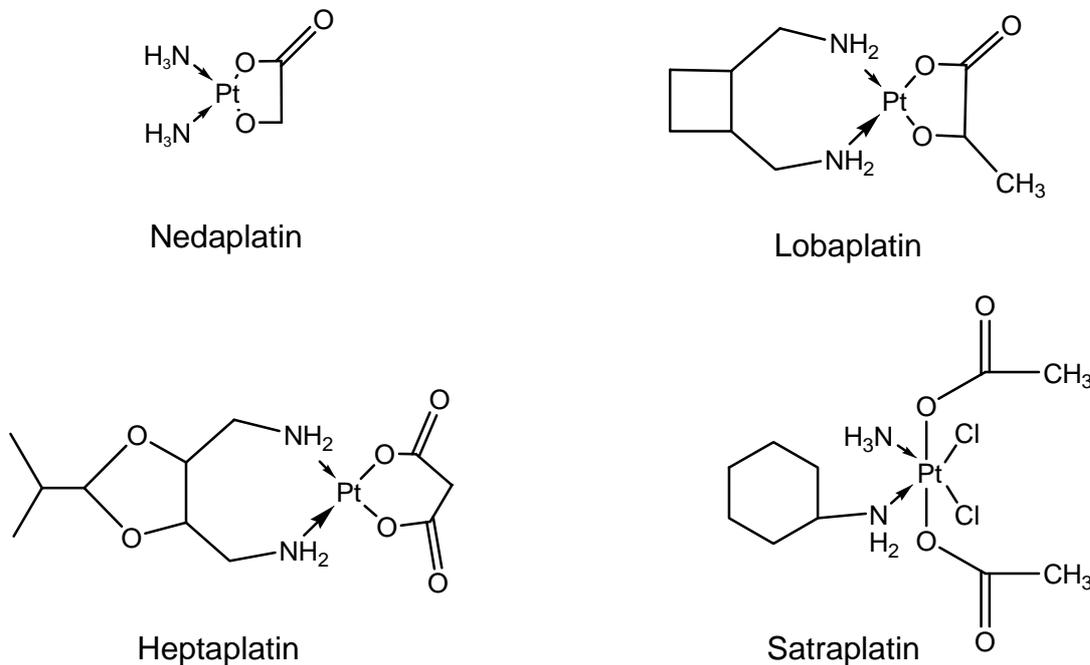


Abb. 1-4: Chemische Strukturen von Nedaplatin, Lobaplatin, Heptaplatin und Satraplatin.

**Lobaplatin** [cis-[trans-1,2-Cyclobutanbis(methylamin)][(S)-lactato-O,O']platin(II)] wurde ähnlich wie Oxaliplatin entwickelt, um das Wirkspektrum der Platinkomplexe zu erweitern. Lobaplatin soll vergleichbar effektiv wie Cisplatin und Carboplatin bei fehlender Kreuzresistenz sein und ist in China zur Therapie verschiedener Tumoren zugelassen. Der Nachweis einer Wirksamkeit bei Cisplatinresistenten Tumoren in Form einer größeren Phase III Studie fehlt allerdings bisher<sup>11</sup>.

**Heptaplatin** [cis-Malonato[(4R,5R)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1,3-dioxolan]-platin(II)] ist in Korea zur Behandlung fortgeschrittener gastrointestinaler Tumoren zugelassen. Berichtet wird von einem günstigeren Toxizitätsprofil und etwas geringerer Kreuzresistenz im Vergleich zu Cisplatin<sup>12</sup>. Zurzeit gibt es einige präklinische und klinische Untersuchungen, die die Eigenschaften dieser Substanz evaluieren<sup>13,14,15</sup>.

Ob diese drei Substanzen allerdings wirklich Vorteile gegenüber Cisplatin, Carboplatin oder Oxaliplatin besitzen, ist noch offen.

Interessanter ist **Satraplatin** [Bis-Aceto-ammindichloro-cyclohexylaminplatin(IV)]. Satraplatin besitzt ein Zentralatom der Oxidationsstufe +4 und ist der erste Platinkomplex, der peroral eingesetzt werden kann. Satraplatin ist als Pt(IV)-Komplex metabolisch sehr stabil und wird erst durch intrazelluläre Reduktion zu Pt(II) aktiviert<sup>11,16,17</sup>. Eine große Pivotal-Studie (SPARC – Satraplatin and Prednisone Against Refractory Cancer) zur Zweitlinientherapie des hormonresistenten Prostatakarzinoms läuft zurzeit, erste Zulassungsunterlagen sind in den USA eingereicht worden. Zusätzlich werden Studien zur Behandlung des cisplatinresistenten Bronchialkarzinoms durchgeführt<sup>18,19,20</sup>. Die klinische Relevanz wird sich zeigen, die Aussicht auf eine Zulassung scheint aufgrund des Vorteils der peroralen Applikation gut zu sein.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass die Platinkomplexe auch heute noch essentieller Bestandteil der modernen antineoplastischen Kombinationschemotherapie vieler Tumoren sind und die Entwicklung trotz vieler fehlgeschlagener Versuche nicht beendet ist. In den folgenden Kapiteln soll Chemie, Bioaktivierung, Wirkmechanismus und Grenzen der zurzeit in Europa zugelassenen und klinisch relevanten Platinkomplexe Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin erläutert werden. Anschließend werden neue Ansätze zur Optimierung der Platinkomplexe vorgestellt.

## 1.2 Chemie der Platinkomplexe

**Cisplatin** stellt eine Metallkoordinationsverbindung dar und enthält Platin als Zentralatom in der Oxidationsstufe +2. Als  $d^8$ -Pt(II) – low-spin-Komplex (Besetzung der Orbitale entgegen der Hundschen Regel) (Abb. 1-5) weist er eine quadratisch planare Geometrie auf.

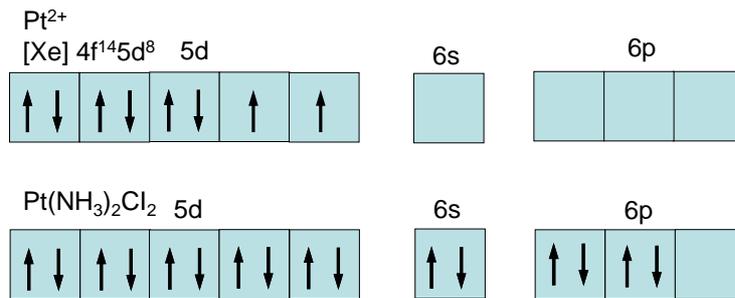


Abb. 1-5: Elektronenanordnung Platin und Cisplatin.

In wässriger Lösung ist Cisplatin aufgrund der Bildung von Kolumnarstrukturen trotz geringer Lipophilie relativ schlecht löslich (2,53 mg/ml bei 24 °C). Cisplatin ist in der Lage, Reaktionen mit Nucleophilen einzugehen und kovalente Bindungen auszubilden. Ein Ligandenaustausch kann in wässrigem Milieu auf zwei verschiedene Weisen erfolgen. Eine Möglichkeit ist der direkte Angriff des Nucleophils am Zentralatom, eine weitere eine Reaktion nach vorheriger Hydrolyse, durch die sehr reaktive Komplexe entstehen (diese Hydrolyse ist streng genommen ebenfalls als nucleophile Substitution mit Wasser als Nucleophil anzusehen). Der eingeschlagene Weg, über den der Ligand ausgetauscht wird, ist konzentrations- und nucleophilieabhängig. Bei der Reaktion mit starken Nucleophilen wird eine direkte Reaktion angenommen, mit schwachen der Umweg über die Hydrolyse postuliert. Die Reaktion folgt fast ausschließlich einem  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus (Abb. 1-6). Hierbei kann ein Nucleophil sowohl von unterhalb als auch von oberhalb der Koordinationsebene in den Komplex eintreten und wird über den Übergangszustand einer trigonalen Pyramide in der eintretender und austretender Ligand in einer Ebene angeordnet sind, fixiert. Danach erfolgt unter Freisetzung des austretenden Liganden (im Folgenden auch Abgangsgruppe genannt) die Reorganisation – über den Übergangszustand einer tetragonalen Pyramide – zu einem quadratisch planaren Komplex<sup>11</sup>.

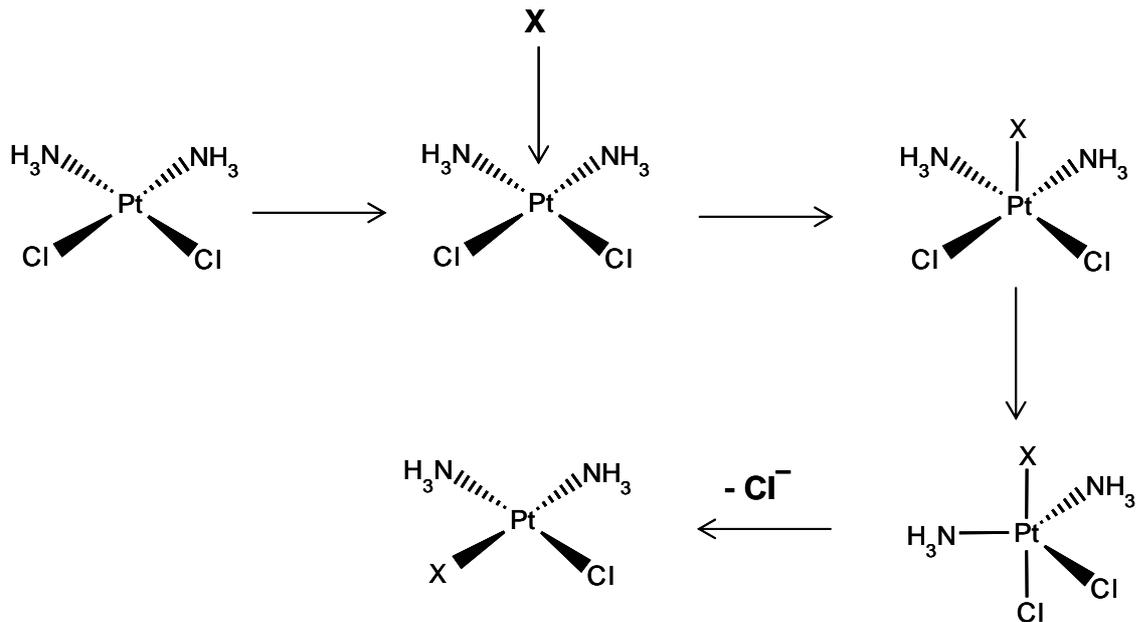


Abb. 1-6: Substitutionsmechanismus an quadratisch planaren Platinkomplexen.

Um unterscheiden zu können, welcher Ligand als Abgangsgruppe fungiert, bedarf es einer genaueren Betrachtung des Komplexes. Sowohl die Chloridionen wie auch die Ammoniakmoleküle sind über koordinative Bindungen an das Platin gebunden. Bei einer koordinativen Bindung kommen beide Elektronen von einem Bindungspartner, dem zu Folge muss einer der Partner ein freies Elektronenpaar besitzen, der andere eine Elektronenlücke. Die Elektronen werden sämtlich von den Liganden zur Verfügung gestellt (s. Abb. 1-5). Da Platin in der Oxidationsstufe +2 vorliegt, resultiert daraus ein ungeladener Komplex. Die Abgangsgruppe wird durch sterische Bedingungen und den so genannten trans-Effekt festgelegt. Der trans-Effekt ist ein reaktionskinetisch kontrollierter Prozess, der den elektronischen Effekt eines nicht reagierenden Liganden auf die Geschwindigkeit des Austauschs des trans zu ihm stehenden Liganden beschreibt. Abb. 1-7 zeigt eine nach abnehmendem trans-Effekt geordnete Ligandenreihe.

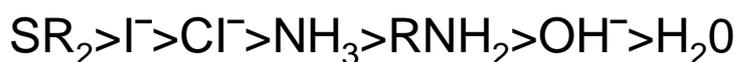


Abb. 1-7 Stärke des trans-Effektes in absteigender Reihenfolge.

Zur Erklärung des trans-Effektes existieren verschiedene Modelle. Das Polarisierungsmodell nach Grinberg geht von der Annahme aus, dass das positiv geladene Zentralatom Dipolmomente bei den umgebenden Liganden induziert, welche sich nivellieren, wenn alle Liganden gleich sind. Ein besonders gut zu polarisierender Ligand hat auch Einfluss auf das Zentralatom und lockert durch eine entstehende unsymmetrische Ladungsverteilung die Bindung zum trans-ständigen Liganden. Nach der Theorie der  $\sigma$ -Bindung von Langford treten trans-ständige Liganden in Wettbewerb um ein Metallatom-Orbital des Zentralatoms. Der Ligand, der die stärkere  $\sigma$ -Bindung eingeht, zieht das Orbital in seine Richtung, sodass dieses Orbital nur noch eingeschränkt zur Bindung des anderen trans-ständigen Liganden zur Verfügung steht.

Die Theorie des Übergangszustandes von Chatt und Orgel nimmt an, dass trans-dirigierende Liganden im pentakoordinierten Übergangszustand fester gebunden sind und diesen stabilisieren. Gute  $\sigma$ -Donoren und gute  $\pi$ -Akzeptoren üben einen starken trans-Einfluss aus<sup>11,21</sup>.

Neben dem trans-Effekt sind aber auch sterische Faktoren für die Reaktionskinetik von Bedeutung. Dies erklärt, warum beim Cisplatin die voluminösen Chloridionen trotz leicht höherem trans-Effekt die Abgangsgruppen darstellen und nicht die  $\text{NH}_3$ -Neutralliganden. Ein zusätzlicher Faktor, der eine Rolle spielt, ist der eintretende Ligand. Insbesondere S-haltige Nucleophile weisen eine hohe Affinität zu Platinkomplexen auf.

**Carboplatin** besitzt einen fester gebundenen Cyclobutandicarboxylato-Chelatliganden anstelle der Chloridliganden als Abgangsgruppe. Der Komplex ist entropisch durch den Malonsäure-Chelatring am Platin stabilisiert, der bevorzugt in Wannen-Konformation vorliegt. Dadurch ergibt sich die Lokalisation des Cyclobutanrings über der Platinebene. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt einer Substitution ist die Ringöffnung durch ein Nucleophil. Die besondere räumliche Anordnung hat zur Folge, dass der Angriff von Nucleophilen und die Ausbildung des trigonal planaren Übergangszustands sterisch behindert werden. Ein weiterer Effekt, der mit dieser räumlichen Anordnung einhergeht, ist eine drastische Verbesserung der Wasserlöslichkeit, die sich dadurch erklären lässt, dass die Bildung von Kolumnarstrukturen zwischen den Platinkomplexen unterbunden wird.

Beim **Oxaliplatin** wurden die Abgangsgruppen wie auch die Neutralliganden ausgetauscht. Bei dieser Substanz wurden die Amminliganden durch 1,2 **Diaminocyclohexan** (DACH) als Neutralliganden und die Chloridliganden durch einen Oxalatliganden ersetzt (Abb. 1-3). Der Oxalatligand als Abgangsgruppe führt nur zu einer geringfügig geringeren Reaktivität verglichen mit Cisplatin, die auf die entropische Stabilisierung zurückzuführen ist. Der raumerfüllende DACH Ligand wird sowohl für die bessere Wasserlöslichkeit im Vergleich zu Cisplatin (durch Unterbindung der Kolumnarstrukturbildung) wie auch für ein anderes Wirkprofil verantwortlich gemacht.

## 1.3 Bioaktivierung und Wirkungsmechanismus

### 1.3.1 Bioaktivierung

**Cisplatin** wird ausschließlich intravenös verabreicht und zeigt eine hohe Proteinbindung (>65 %). Es wird vermutet, dass diese Proteinbindung zu einer vollständigen Inaktivierung des Cisplatins führt. Postuliert wird eine direkte Reaktion mit den stark nukleophilen Methionin- und Cysteinresten im Albumin und nachfolgender Inaktivierung durch  $\text{NH}_3$ -Freisetzung aufgrund des starken trans-Effekts<sup>11</sup>. Freies Cisplatin selbst ist relativ unreaktiv und reagiert nicht direkt mit anderen, weniger nukleophilen Molekülen in biologischen Systemen. In wässriger Lösung bilden sich jedoch durch Hydrolyse reaktive Mono- und Diaquakomplexe<sup>22</sup>. Diese Hydrolyse ist abhängig von der Chloridionenkonzentration der Lösung. Extrazellulär ist die Chloridionenkonzentration relativ hoch [ca. 100 mM], sodass Cisplatin hauptsächlich in der wenig reaktiven Dichloro-Form vorliegt. Als Beginn der Bioaktivierung wird daher die Aufnahme in die Zelle angenommen. Intrazellulär ist die Chloridionenkonzentration deutlich geringer [4 mM]. Durch Ligandenaustausch (Hydrolyse) entsteht ein komplexes, pH-abhängiges Gleichgewicht reaktiver kationischer und neutraler Aqua- und Hydroxokomplexe, die dann leicht mit verschiedenen Nukleophilen reagieren können (Abb. 1-8).

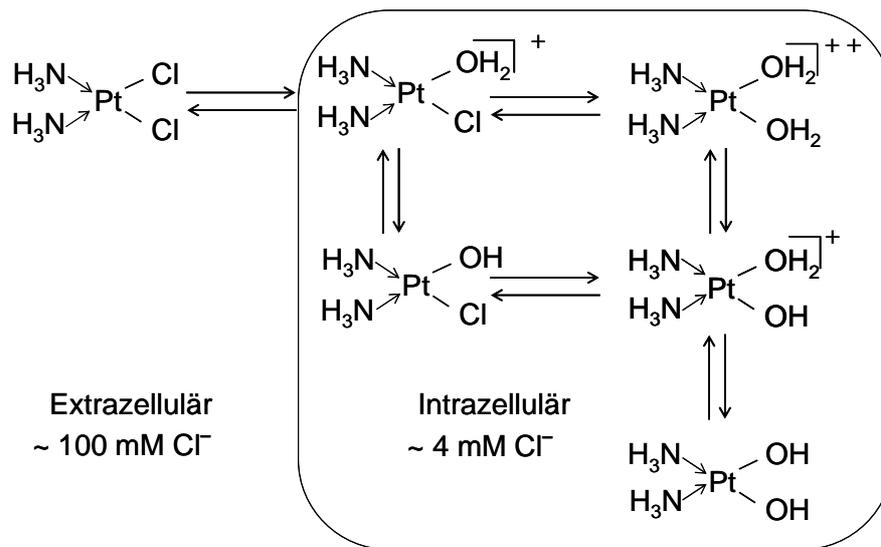


Abb. 1-8: Aktivierung von Cisplatin innerhalb der Zelle.

Angemerkt sei, dass dieses Konzept nicht unumstritten ist. Jennerwein et al. konnten zeigen, dass die Chloridkonzentration in manchen Tumorzellen deutlich erhöht ist<sup>23</sup>. Auch reagiert Cisplatin mit Phosphat, was ebenfalls zur Bildung weniger reaktiver Komplexe führt<sup>24</sup>. Potentiell existieren intrazellulär verschiedene Reaktionspartner, wie z.B. Nukleinsäuren, schwefelhaltige Aminosäuren, Peptide und Proteine. Als Hauptursache der zytotoxischen Wirkung wird bis heute die Bildung von Platin-DNA-Addukten gesehen, die Rolle weiterer Bindungspartner ist noch nicht vollständig geklärt<sup>25,26,27</sup>.

Für **Carboplatin** werden verschiedene Hypothesen der Aktivierung diskutiert. Ein geringer Teil von Carboplatin wird physiologisch zu Cisplatin umgesetzt. Dieser Anteil ist aber zu gering, um für die zytotoxische Wirkung verantwortlich zu sein. Als entscheidender Schritt der Bioaktivierung wird deshalb ebenfalls eine intrazelluläre Abspaltung der Cyclobutandicarboxylat-Abgangsgruppe (CBDCA) gesehen. Gesichert ist eine deutlich geringere DNA-Addukt- und Proteinbindung im Vergleich zu Cisplatin. Eine Ursache liegt in der bereits in Abschnitt 1.2 beschriebenen höheren Stabilität des Platinkomplexes, welche durch den Cyclobutandicarboxylat-Chelatliganden bedingt ist. Durch diesen Liganden wird sowohl ein direkter nukleophiler Angriff als auch die Hydrolyse sterisch behindert. Ein weiterer Aspekt ist im Mechanismus der Hydrolyse zu sehen. Nach Protonierung des platinegebundenen Sauerstoffs erfolgt der Angriff des Nukleophils unter Öffnung des Chelatringes. Diese

Ringöffnung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Substitutionsreaktion<sup>28,29</sup>. Für Carboplatin wurde eine schnelle Rückbildung des Chelatringes beobachtet, sodass die zweite Hydrolysestufe unter Abspaltung des CBDCA-Chelatliganden deutlich – in etwa 100-fach – langsamer verläuft. Diese sehr langsame Aktivierung macht es schwierig, die zytotoxischen Effekte des Carboplatins zu erklären. Sadler et al. generierten eine weitere Hypothese<sup>(22)</sup>. Sie konnten zeigen, dass Carboplatin eine hohe Reaktivität gegenüber Thioethern wie Methionin aufweist und durch diese aktiviert wird. Postuliert wird, dass dieser intrazellulär gebildete Komplex mit ringoffenem Chelatligand und gebundenem Thioether durch die Nukleotidbase Guanin unter Abspaltung des Thioethers angegriffen werden kann (Abb. 1-9).

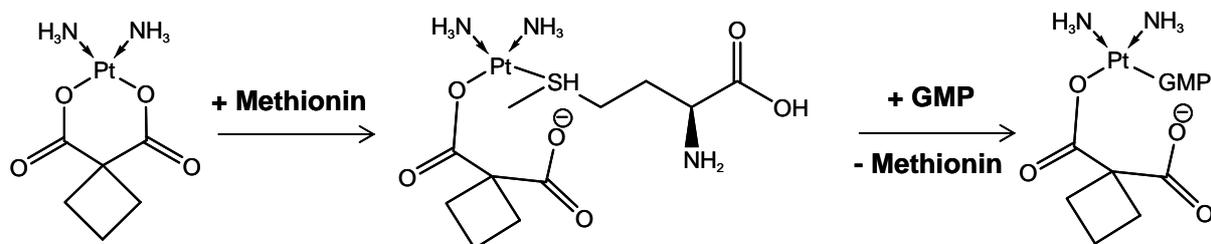


Abb. 1-9: Aktivierung von Carboplatin durch Methionin.

Die Bioaktivierung von **Oxaliplatin** soll mehr Ähnlichkeit mit der Bioaktivierung von Cisplatin aufweisen. Der Oxalatligand fungiert als Abgangsgruppe. Die hydrolytische Ringöffnung verläuft schneller als beim CBDCA-Liganden von Carboplatin. Der zweite Reaktionsschritt, die Abspaltung des Oxalats, verläuft so schnell, dass eine Rückreaktion nicht eintritt. Die Reaktivität (und auch Proteinbindung) ist daher nur unwesentlich geringer als die von Cisplatin. Schon im Plasma entstehen reaktive Metaboliten, wobei angenommen wird, dass es zunächst zu einer Abspaltung der Oxalatgruppe und deren Ersatz durch Chloridionen nach dem Mechanismus einer S<sub>N</sub>2-Reaktion kommt. Der DACH-Ligand bleibt dabei unverändert an Platin gebunden<sup>30</sup>. Der Dichlorokomplex als DACH-Analogon von Cisplatin wird dann in das Zellinnere aufgenommen und soll analog dem Cisplatin aktiviert werden<sup>31</sup>.

### 1.3.2 Bindung an DNA

Nach der Bioaktivierung wird die Platinierung der Nukleotide der DNA als entscheidender Schritt zur zytotoxischen Wirkung der Platinkomplexe angesehen. Eine Bindung ist generell an allen vier Basen der DNA denkbar, aber aufgrund der hohen Nukleophilie des Imidazolrings wird eine Reaktion am N7 des Guanins oder Adenins bevorzugt. Ebenfalls möglich ist eine Reaktion an N1 von Adenin oder N3 von Cytosin (Abb. 1-10). Reaktionen mit Thymin finden kaum statt<sup>32,33,34</sup>.

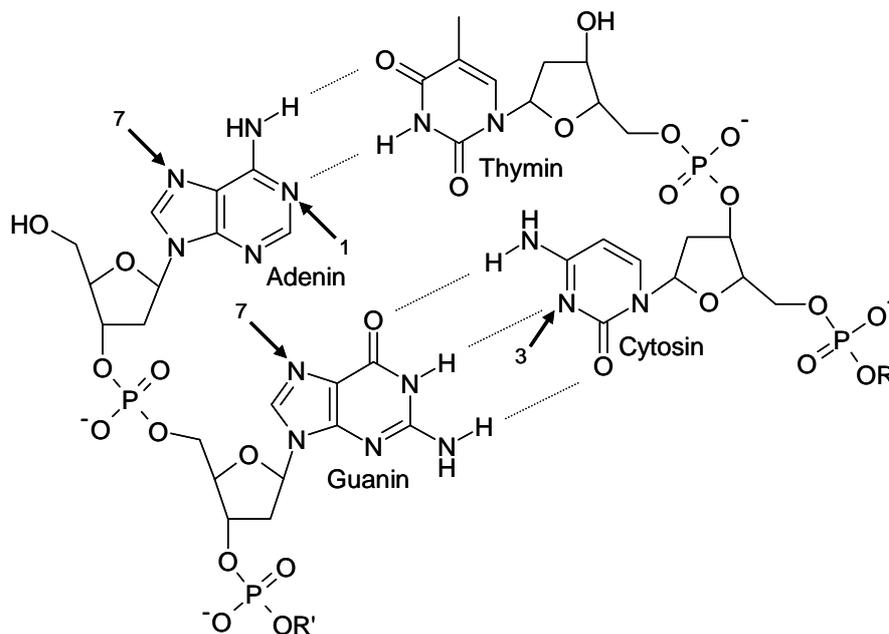


Abb. 1-10: Bevorzugte Angriffspunkte der Platinkomplexe an der DNA.

Die bifunktionale Struktur der Mono- und Diaquakomplexe ermöglicht nach einer ersten monofunktionalen Bindung die Reaktion mit einem weiteren Nukleotid. Dieses Nukleotid kann entweder auf dem gleichen DNA-Strang (*intrastrand crosslinks*) oder dem komplementären DNA-Strang (*interstrand crosslinks*) liegen. Überwiegend werden Vernetzungen zwischen zwei benachbarten Guaninbasen innerhalb eines Stranges (~65 % Pt-GG) induziert. Ein geringerer Teil der DNA-Platinierung entfällt auf Addukte zwischen Guanin und Adenin (~25 % Pt-AG). Noch weniger häufig werden Guaninbasen, die durch ein oder mehrere Nukleotide voneinander getrennt auf einem Strang (G-Pt-G) oder auf komplementären Strängen liegen (~1 %), miteinander verknüpft<sup>35,36</sup>.

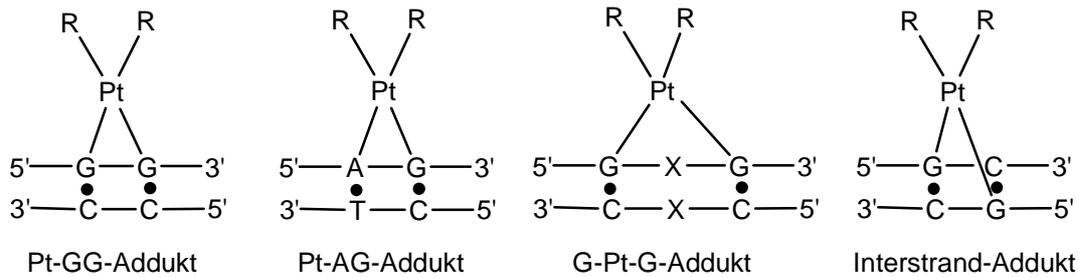


Abb. 1-11: Schematische Darstellung der verschiedenen Platin-DNA-Addukte.

Inzwischen werden die *intrastrand crosslinks* und eine damit verbundene Konformationsänderung der DNA als Hauptursache der zytotoxischen Wirkung angesehen. Die DNA entwindet sich um 76-80° und knickt dabei um 20-40° in Richtung der großen Furche ab (Abb. 1-12)<sup>37,38</sup>. Dies führt zu einer Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen, die thermische Stabilität der DNA verringert sich. Es kommt infolge der Adduktbildung zur Induktion von DNA-Strangbrüchen. Außerdem wird durch die Veränderung der natürlichen Erkennungsstruktur die Replikation und Transkription gehemmt. Letztendlich führen diese Veränderungen zu Zellzyklusarrest und zu Apoptose.

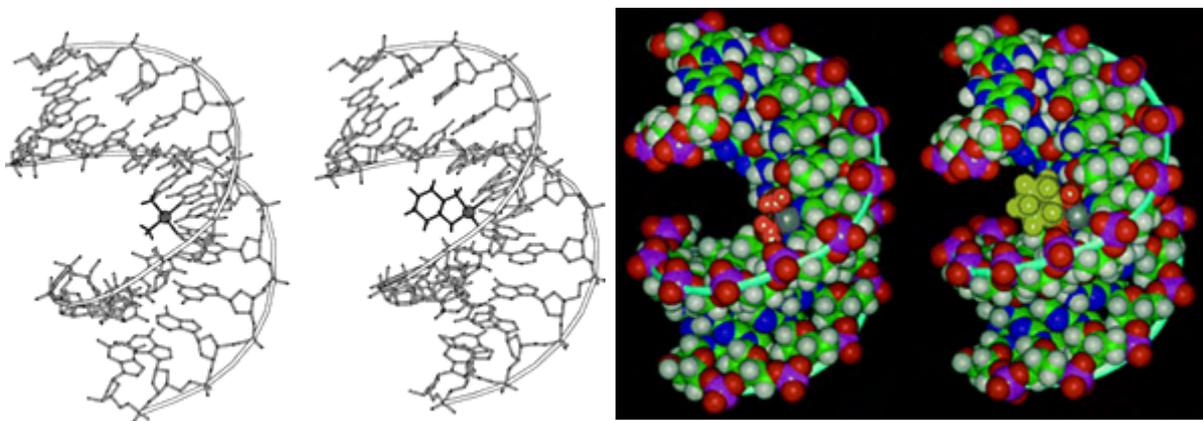


Abb. 1-12: Modelle von Cisplatin- und Oxaliplatin-GG-Addukten (Cisplatin: jeweils links, Oxaliplatin: jeweils rechts) [Grün: Kohlenstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, weiß: Wasserstoff, magenta: Phosphor, grau: Platin, orange: Amin- bzw. Amin-Stickstoffe mit den zugehörigen Wasserstoffen, gelbgrün: Cyclohexanring von Oxaliplatin]<sup>38</sup>.

**Carboplatin** bildet die gleichen Addukte wie Cisplatin. Die Reaktionen verlaufen allerdings deutlich langsamer und benötigen höhere Konzentrationen. In einigen Untersuchungen wurde eine andere Adduktverteilung gefunden<sup>39</sup>.

Die Bindungsstellen an der DNA sind für **Oxaliplatin** ebenfalls identisch<sup>40</sup>. Auch die sterischen Veränderungen an der DNA nach der Adduktbildung sind ähnlich; Unterschiede bestehen lediglich in einer stärkeren Verengung der großen DNA-Furche durch den in der Sesselkonformation vorliegenden Diaminocyclohexanring<sup>38,40,41</sup>. In verschiedenen Experimenten mit nackter sowie zellulärer DNA, in denen sowohl äquimolare als auch äquitoxische Mengen beider Komplexe eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der DNA-Platinierung bei Oxaliplatin wesentlich geringer ist als bei Cisplatin. Dagegen war der Anteil an Einzelstrangbrüchen im Vergleich zu Cisplatin deutlich höher<sup>42,43</sup>.

### 1.3.3 Zelluläre Prozesse als Folge der DNA-Platinierung

Die strukturelle Schädigung der DNA zieht verschiedene Prozesse nach sich, die für die zytotoxische Wirkung aber auch für die Resistenzentwicklung eine wichtige Rolle spielen. Folgende Aspekte sind inzwischen bekannt und sollen kurz erläutert werden:

- Hemmung der DNA-Synthese
- Reparaturmechanismen
- Bindung von HMG-Proteinen und Transkriptionsfaktoren
- Zellzyklusarrest und Apoptose

Die Untersuchung dieser Effekte erfolgte in der Regel unter Verwendung von **Cisplatin**. Auf bekannte Unterschiede von Carboplatin und Oxaliplatin im Vergleich zu Cisplatin wird am Ende dieses Abschnittes eingegangen.

#### **Hemmung der DNA-Synthese**

Die strukturelle Veränderung der DNA-Helix durch Platin-DNA-Addukte verhindert, dass sich DNA-Polymerasen ausreichend an die DNA anlagern können. Daraus resultiert eine Hemmung der DNA-Synthese im Zellkern<sup>44</sup>.

## Reparaturmechanismen

Platin-DNA-Addukte werden hauptsächlich durch das Nukleotid-Exzisions-Reparatur-System (NER) repariert<sup>45</sup>. Dieses Reparatursystem ist normalerweise verantwortlich für die Beseitigung UV-induzierter Schäden und besteht aus sechs Faktoren, die Schäden der DNA erkennen und diese durch Herausschneiden von Oligonukleotidsträngen von 22 - 32 Nukleotiden Länge entfernen. Anschließend werden die Lücken durch Neusynthese der DNA gefüllt und die Enden durch Ligasen verbunden. Das NER-System besitzt eine geringe Substratspezifität und kann wahrscheinlich nicht zwischen Platin-DNA-Addukten strukturell unterschiedlicher Platinkomplexe differenzieren<sup>46,47</sup>. Die Kapazität des NER-Systems reicht allerdings nicht aus, um alle Schäden zu beseitigen.

Neben der bereits angesprochenen Hemmung der DNA-Synthese werden einige Platin-DNA-Addukte durch die DNA-Polymerasen umgangen. Diese translasionale DNA-Synthese – auch replikativer Bypass genannt – ist kein Reparaturmechanismus im engeren Sinn, sondern ermöglicht es den Zellen auch in Anwesenheit von DNA-Schäden eine DNA-Replikation ohne "Lücken" im neuen DNA-Strang durchzuführen oder eventuell aufgetretene Lücken zu schließen, indem zufällig Nukleotide gegenüber einem platinieren Nukleotid eingebaut werden. Zellen mit ausgeprägtem replikativen Bypass besitzen einen Überlebensvorteil, da fehlende Basen im DNA-Strang zu Strangbrüchen führen können, welche häufig Apoptose zu Folge haben.

Allerdings ist der replikative Bypass über Platin-DNA-Addukte hinweg auch ein wesentlicher Faktor für die zytotoxische Wirkung von Cisplatin. Befindet sich ein Platin-DNA-Addukt auf dem als Matrize verwendeten codogenen Strang, so kann es bei der DNA-Synthese durch den replikativen Bypass zu einer Basenfehlpaarung kommen. Diese Fehlpaarung kann direkt nach der Replikation durch Mismatch-Reparatur-Proteine (MMR) erkannt und repariert werden. Die MMR-Proteine binden an die Basenfehlpaarung und der neu synthetisierte DNA-Strang wird herausgeschnitten, während der Schaden auf dem codogenen DNA-Strang erhalten bleibt. Das DNA-Addukt wird dann erneut „überrepliziert“, die Lücke wird wieder geschlossen, und der Kreislauf beginnt von vorn. Die Reparaturversuche sind somit nutzlos und generieren durch den fortlaufenden Prozess DNA-Lücken und Strangbrüche, die schließlich zur Apoptose führen. Diese Hypothese einer nutzlosen Reparatur ist als Teufelskreismodell nach Goldmacher bekannt<sup>46,47</sup>. Weiterhin ist

inzwischen beschrieben, dass das MMR-Protein nach der Bindung an die Basenfehlpaarungen der DNA selbst als Transkriptionsfaktor fungiert und Apoptoseprozesse induzieren kann. Zusätzlich soll die Anlagerung des NER-Reparatursystems behindert werden<sup>48,49</sup>.

### **Bindung von HMG-Proteinen und Transkriptionsfaktoren**

Einige zelluläre Proteine binden an Platin-DNA-Addukte mit gleicher oder höherer Affinität als zu ihren natürlichen Bindungspartnern. Für diese Proteine wird auch der Begriff „Damage Recognition Proteins“ verwendet. Eine Gruppe dieser Proteine sind die HMG-Proteine (HMG = high mobility group – dieser Name entstand auf Grund der elektrophoretischen Mobilität in Polyacrylamidgelen). Bei den HMG-Proteinen handelt es sich um eine Gruppe strukturell ähnlicher, DNA-bindender Proteine, die häufig Bestandteil der Chromosomen sind. Sie sind zum Teil strukturelle Komponenten des Chromatins und am Aufbau der Nukleinsäureketten beteiligt<sup>50</sup>. Zusätzlich sind viele HMG-Proteine Transkriptionsfaktoren. Es gibt zwei Modelle, die den Beitrag der HMG-Proteine an der zytotoxischen Wirkung der Platinkomplexe erklären sollen. Ein Modell macht die Inhibition der Reparatur der Platin-DNA-Addukte verantwortlich, ein weiteres die Bindung von HMG-Proteinen mit transkriptionsregulierenden Eigenschaften. Im ersten Fall verhindert die Bindung der HMG-Proteine, dass Reparatur-Systeme, insbesondere das NER-System, die DNA-Schäden erkennen und reparieren können. Im zweiten Fall wird davon ausgegangen, dass ein regulatorisches HMG-Protein an das Platin-DNA-Addukt bindet und so seiner normalen Funktion entzogen wird, wodurch eine Gen-Transkription unterbunden wird. Man spricht in diesem Zusammenhang auch vom „transcription factor hijacking“<sup>44,46,47</sup>.

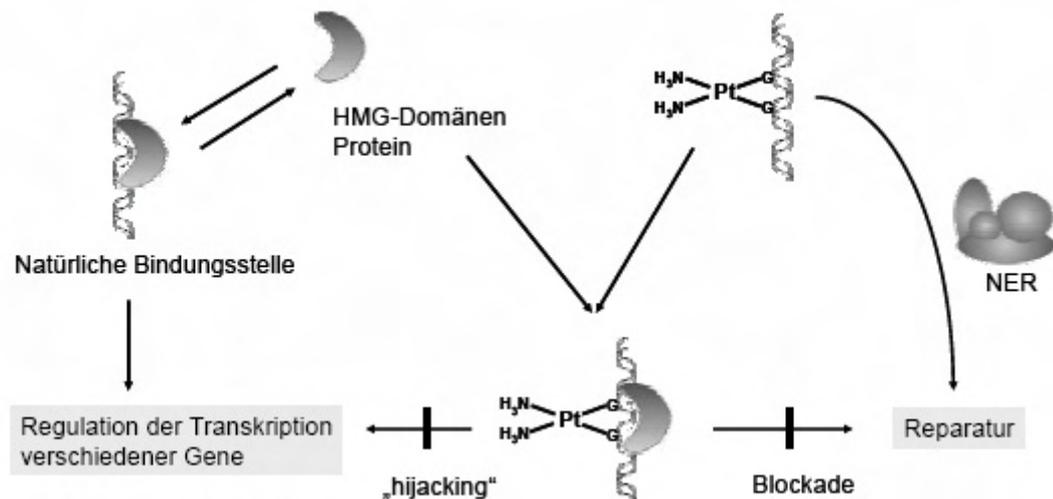


Abb. 1-13: Modelle zum Beitrag der HMG-Proteine an der zytotoxischen Wirkung der Platinkomplexe.

Neben der Gruppe der HMG-Proteine binden auch weitere Transkriptionsfaktoren an Platin-DNA-Addukte<sup>46,51,52</sup>.

Möglicherweise ist die platininduzierte Zytotoxizität auch darauf zurückzuführen, dass viele der Proteine, die an Platin-DNA-Addukte binden Transkriptionsfaktoren für RNA-Polymerasen, insbesondere für RNA-Polymerase1, sind.

Die RNA-Polymerase1 katalysiert die Bildung der rRNA durch Transkription der rDNA. Unter ribosomaler DNA (rDNA) versteht man DNA-Abschnitte im Zellkern oder in den Mitochondrien die für rRNA, den Bausteinen der Ribosomen, kodieren. Im Zusammenspiel mit der Tatsache, dass Schäden an der rDNA wesentlich schlechter repariert werden als andere Abschnitte der DNA, ergibt sich eine starke Hemmung der Transkription von ribosomaler RNA<sup>53</sup>. Dies könnte der Grund dafür sein, warum Cisplatin insbesondere bei sich schnell teilenden Tumorzellen mit hoher Proteinsyntheserate zytotoxisch wirkt, da gerade diese Zellen eine gesteigerte rRNA-Synthese aufweisen.

### Zellzyklusarrest und Apoptose

Letztlich führt der durch die Platinierung verursachte DNA-Schaden zum Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>-Phase oder zum programmierten Zelltod (Apoptose). Der genaue Induktionsweg ist noch nicht vollends entschlüsselt, obwohl die Kenntnisse über diese komplexen Signalkaskaden rasch zunehmen. Abb. 1-14 soll eine stark

vereinfachte Übersicht über zurzeit diskutierte grundsätzliche Wege der Signalweiterleitung geben, die zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose führen.

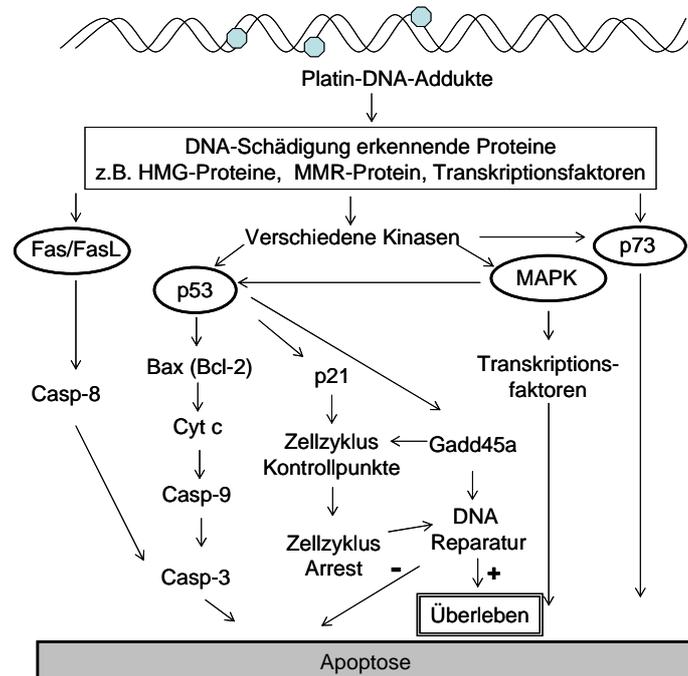


Abb. 1-14: Vereinfachte Übersicht über Wege der Signalweiterleitung nach Bildung von Platin-DNA-Addukten<sup>48</sup>.

Diskutiert werden momentan vier parallele Apoptosewege, die auch untereinander komplex verknüpft zu sein scheinen. Ein Weg, dem eine zentrale Bedeutung beigemessen werden kann, ist die Aktivierung von p53. Die ausgelösten Effekte sind abhängig vom Ausmaß der Platinierung. Ein niedriger Platinierungsgrad führt über die Aktivierung von p21 und Gadd45a zum Zellzyklusarrest. Eine Arretierung des Zellzyklus ermöglicht der Zelle eine Reparatur der Schäden, wobei die Aktivität des NER-Systems durch Gadd45a gesteigert ist<sup>54,55</sup>. Ab einer kritischen Platinkonzentration wird über p53 der Caspase-9 – Caspase-3-Apoptoseweg eingeleitet. Dieser Apoptoseweg ist mitochondrienabhängig und beginnt mit der Umverteilung von cisplatininduziertem Bax aus dem Cytosol in die Mitochondrien. In den Mitochondrien ist die Einleitung der Apoptose dann abhängig vom Bax/Bcl<sub>2</sub> Verhältnis (Bcl-2=antiapoptotisches Gegenstück zu Bax)<sup>56,57</sup>. Ein weiterer Weg, der auch mitochondrienunabhängig verlaufen kann, ist die Aktivierung von Fas, einem Protein aus der TNF-Rezeptorfamilie (auch als „death receptors“ bekannt)<sup>58</sup>. Diese

Aktivierung führt zur Apoptose über den Caspase-8 – Caspase-3-Apoptoseweg. Eine Aktivierung von p73<sup>59,60</sup> und MAPK<sup>61,62</sup> schließlich führt zu alternativen Apoptosewegen. Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass diese Apoptosewege vielfältig miteinander in Verbindung stehen<sup>63,48,27</sup>.

### **Unterschiede von Carboplatin und Oxaliplatin im Vergleich zu Cisplatin**

Die zelluläre Antwort auf eine Exposition mit Carboplatin soll prinzipiell ähnlich sein, da sich dosisabhängig die gleichen Addukte bilden. Dies erklärt auch die häufig beschriebene Kreuzresistenz zwischen Cisplatin und Carboplatin. Allerdings wurde festgestellt, dass das relative Verhältnis der induzierten Addukte initial unterschiedlich ist. Während nach Cisplatin-Exposition ca. 62 – 75 % der DNA-Läsionen als Pt-GG identifiziert wurden<sup>64,65,66</sup>, konnte diese Struktur in Carboplatin-behandelten Zelllinien und in vivo initial nur mit einer Häufigkeit von 30 % nachgewiesen werden. G-Pt-G *interstrand*-Addukte waren dagegen mit bis zu 4 %igem Anteil fast doppelt so häufig wie nach Cisplatinexposition, auch wurden hier deutlich mehr G-Pt-G *intrastrand*-Addukte gefunden<sup>39</sup>. Da das MMR-Reparatur-System eine gewisse Spezifität für Pt-GG und Pt-AG Intrastrang-Addukte aufweist und nur geringe Affinität zu G-Pt-G Komplexen zeigt könnte hier ein Grund für eine unterschiedliche Wirksamkeit liegen<sup>67,68</sup>.

Für **Oxaliplatin** wird angenommen, dass die häufig fehlende Kreuzresistenz zu Cisplatin in den Reparaturmechanismen bzw. in einer unterschiedlichen Toleranz gegenüber den gebildeten Addukten liegt. Zwar werden die Addukte durch das NER-System gut erkannt und repariert, für andere Mechanismen trifft das aber nicht zu. Der replikative Bypass über die Oxaliplatin-DNA-Addukte hinweg ist, vermutlich aufgrund des sperrigen DACH-Liganden, deutlich eingeschränkt<sup>47</sup>. Dies liefert auch eine Erklärung für die höhere Inzidenz von Einzelstrangbrüchen und der geringeren benötigten Adduktmenge für eine vergleichbare Zytotoxizität. Der DACH-Ligand wird ebenfalls dafür verantwortlich gemacht, dass der MMR-Proteinkomplex nicht an Oxaliplatin-Addukte bindet<sup>69</sup>. Im Gegensatz zu Cisplatin hängt die zytotoxische Wirkung von Oxaliplatin demzufolge nicht von einem intakten MMR-System ab. In-vitro- und präklinische Untersuchungen zeigten, dass MMR-defekte Zellen gegenüber Oxaliplatin empfindlich sind<sup>70</sup>.

## 1.4 Grenzen der klinischen Anwendung

Limitiert werden die Einsatzmöglichkeiten der Platinkomplexe durch ihre substanzspezifische, meist dosislimitierende Toxizität sowie durch primäre oder erworbene Resistenzen.

### 1.4.1 Toxizität

Eine Ursache für die systemische Toxizität wird in der fehlenden Selektivität der Platinkomplexe für das Tumorgewebe gesehen. Die Platinkomplexe gelangen auch in gesundes Gewebe und reagieren dort mit nukleophilen Strukturen, da hier prinzipiell die gleichen Angriffspunkte vorhanden sind. Eine gewisse Spezifität für Tumorzellen kommt nur dadurch zustande, dass diese ein unkontrolliertes Wachstum zeigen und deshalb häufig empfindlich auf alkylierende Zytostatika reagieren. Die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Platinkomplexe werden dabei für ein differenziertes Toxizitätsprofil verantwortlich gemacht.

Als dosislimitierende Toxizität von **Cisplatin** sind vor allem die Nephrotoxizität und Neurotoxizität hervorzuheben, aber auch Ototoxizität und das hohe emetogene Potential können limitierende Faktoren sein. Die dosisabhängige, nierenschädigende Wirkung von Cisplatin tritt meist in der zweiten Woche nach Therapiebeginn auf und kann zu irreversiblen Schädigungen der Nierenfunktion durch Tubulusnekrosen führen. Durch eine Hydratationstherapie vor und nach der Chemotherapie wird das Risiko einer Nierenschädigung vermindert, ein Restrisiko bleibt jedoch bestehen. Die zum Teil irreversible Ototoxizität kommt durch eine Schädigung von Zellen in der Innenohrschnecke zustande. Symptome sind Tinnitus oder Hörverlust, die besonders für junge Patienten belastend sind. Cisplatin ist hoch emetogen, daher ist eine adäquate Supportivtherapie nach evidenzbasierten Leitlinien unbedingt erforderlich. Als Maßstab gilt zurzeit die Leitlinie der MASCC (Multinational Association for Supportive Care in Cancer) aus dem Jahr 2005. Die cisplatininduzierte Neurotoxizität tritt nach Applikation von kumulativer Dosen von 300 - 400 mg/m<sup>2</sup> auf; die Symptome, wie z.B. Dys- und Parästhesien (Fehl- und Missempfinden) und Verlust von Reflexen, bessern sich häufig erst nach Jahren und sind in der Regel nicht komplett reversibel<sup>8,71,72,73</sup>. Bei Cisplatin ist diese

unerwünschte Wirkung aufgrund der guten Kontrolle renaler Toxizität und einer verbesserten Supportivtherapie zur dosislimitierenden Toxizität geworden. Als Ursache wird die beobachtete Anreicherung in verschiedenen Nervengeweben diskutiert, die mit der Lipophilie und Reaktivität von Cisplatin in Zusammenhang stehen könnte<sup>74-77</sup>.

Dosislimitierende Nebenwirkung von **Carboplatin** ist insbesondere die Myelosuppression mit vordergründiger Thrombozytopenie. Da sowohl für Wirkung als auch Toxizität ein klarer Zusammenhang zur Exposition festgestellt wurde, kann diese Nebenwirkung durch die Dosierung nach einer Ziel-AUC gut kontrolliert werden<sup>78,79</sup>.

Der Einsatz von **Oxaliplatin** wird durch eine periphere sensorische Neuropathie begrenzt. Hier werden eine Akutform und eine Spätform unterschieden. Von der akuten, reversiblen Neurotoxizität sind 85-95 % der behandelten Patienten betroffen. Symptome sind Dys- und Parästhesien, die durch Kälteeinwirkung verschlimmert werden. Diese Form der Toxizität entsteht vermutlich durch freigesetzte Oxalationen, welche zweiwertige Metallionen komplexieren. Dadurch kann es zu einer Verringerung der Calciumionen-Konzentration in den Nervenzellen kommen, was mit einer Übererregbarkeit spannungsabhängiger Natriumkanäle einhergeht. Zur Reduktion dieser Nebenwirkung wird deshalb die Gabe von Calcium- und Magnesiumionen unmittelbar vor und nach Oxaliplatin-Infusion eingesetzt<sup>72,80-82</sup>. Die chronische, kumulative Form der Neurotoxizität limitiert die Therapie mit Oxaliplatin. Sie ist vor allem durch fein- und grobmotorische Beeinträchtigungen gekennzeichnet, in der Regel aber vollständig reversibel. Auch hier werden, ähnlich wie bei Cisplatin, erhöhte Konzentrationen in verschiedenen Nervengeweben gefunden und ein Einfluss der Lipophilie und chemischer Eigenschaften der Substanz angenommen<sup>76,77</sup>.

### 1.4.2 Resistenz

Eine weitere Einschränkung der Therapie mit Platinkomplexen stellt primäre oder sekundäre Chemoresistenz dar. Unter einem primär (oder auch intrinsisch) resistenten malignen Tumor wird ein Tumor verstanden, der a priori nicht auf eine zytostatische Therapie anspricht. Nur ca. 50 % der malignen Tumore sind überhaupt

einer Chemotherapie zugänglich<sup>83,84</sup>. Viele der Tumoren, die zunächst auf die Therapie ansprechen, also sensitiv sind, entwickeln unter der Therapie eine sekundäre Resistenz. Im Sinne einer natürlichen Auslese, die unter Druck des Zytostatikums steht, setzen sich solche Zellen in ihrem Wachstum durch, die in der Lage waren, die Wirkung des Zytostatikums abzuschwächen oder ihr zu entgehen. Problematisch an der sekundären Resistenz ist die häufig multifaktorielle Beschaffenheit. In der Regel ist nicht nur ein Faktor verändert und verantwortlich, sondern die sekundäre Resistenz als Folge eines komplexen Zusammenspiels verschiedener veränderter Faktoren anzusehen. Dies erklärt auch, warum häufig eine Kreuzresistenz zu anderen, noch nicht verwendeten Zytostatika besteht. Eine Übersicht über bis heute gefundene Mechanismen, die an einer Resistenz gegenüber Cisplatin beteiligt sein können, gibt Abb. 1-15.

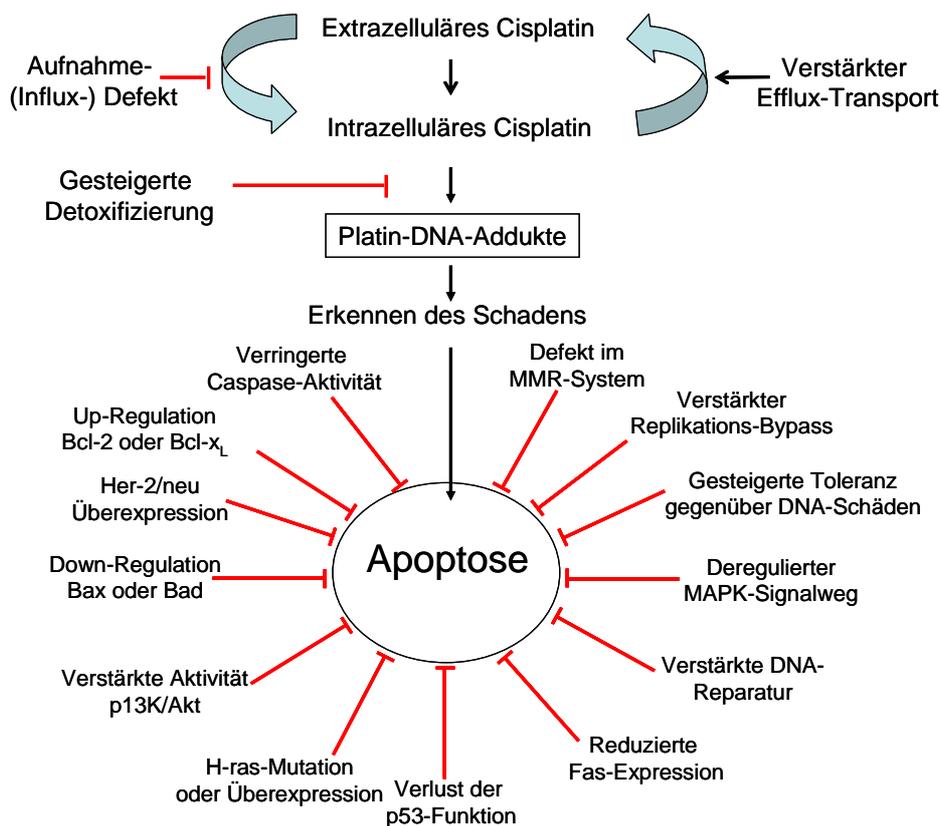


Abb. 1-15: Übersicht über wesentliche Cisplatin-Resistenzmechanismen<sup>48</sup>.

Vereinfacht kann eine Einteilung in Mechanismen vorgenommen werden, die vor oder nach der Bildung der Platin-DNA-Addukte greifen (Tab. 1-1).

Tab. 1-1: Einteilung der Resistenzmechanismen.

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Mechanismus</b>
Vor Platin-DNA-Adduktbildung	Veränderung der zellulären Kumulation Gesteigerte Detoxifizierung
Nach Platin-DNA-Adduktbildung	Gesteigerte oder veränderte Reparatur der DNA Veränderung der Apoptosekaskaden

Die zugrunde liegenden Mechanismen sollen kurz erläutert werden.

Ein besonderer Schwerpunkt wird auf Veränderungen in der zellulären Kumulation gelegt, da dieser Aspekt für die eigene Arbeit die größte Relevanz besitzt. Zisowsky konnte zeigen, dass ein Defekt in der Aufnahme von Cisplatin ein wesentlicher Resistenzmechanismus der in dieser Arbeit verwendeten Cisplatin resistenten Zelllinie A2780cis ist<sup>85</sup>.

### **Veränderungen in der zellulären Kumulation**

Eine der häufigsten Veränderungen, die in verschiedenen resistenten Tumorzellen beobachtet wurde, ist eine signifikante Reduktion der intrazellulären Platinmenge nach Exposition mit Platinkomplexen. Prinzipiell kann dafür eine verminderte Aufnahme (Influx), eine verstärkte Ausschleusung (Efflux) oder eine Kombination beider Effekte verantwortlich sein.

Bis vor kurzem wurde noch die Meinung vertreten, dass Platinkomplexe hauptsächlich durch passive Diffusion in die Tumorzelle gelangen. In den letzten Jahren wurden vermehrt weitere Mechanismen wie Carrier, Kanäle oder verschiedene endozytotische Wege diskutiert<sup>86-93</sup>. Die vorliegende Arbeit soll auch einen Beitrag zur Klärung der Aufnahme der Platinkomplexe leisten.

Nach vielen Untersuchungen kristallisiert sich nun immer mehr heraus, dass Kupfertransporter auch Platinkomplexe transportieren und somit einen entscheidenden Einfluss auf die intrazelluläre Platinkonzentration haben<sup>88,94,95</sup>. Neue Ergebnisse lassen vermuten, dass weitere Transporter, wie z.B. der organische Kationentransporter OCT1 (vor allem für Verbindungen mit DACH-Liganden) involviert sind<sup>96,97,98</sup>. Eine Up- bzw. Downregulation der beteiligten Transportproteine kann somit wesentlich an der Platinresistenz beteiligt sein.

Abb. 1-16 A gibt einen Überblick über die Kupferhomöostase und beteiligte Transporter, die Abb. 1-16 B fasst die Hypothesen über Platinaufnahme und -ausschleusung zusammen.

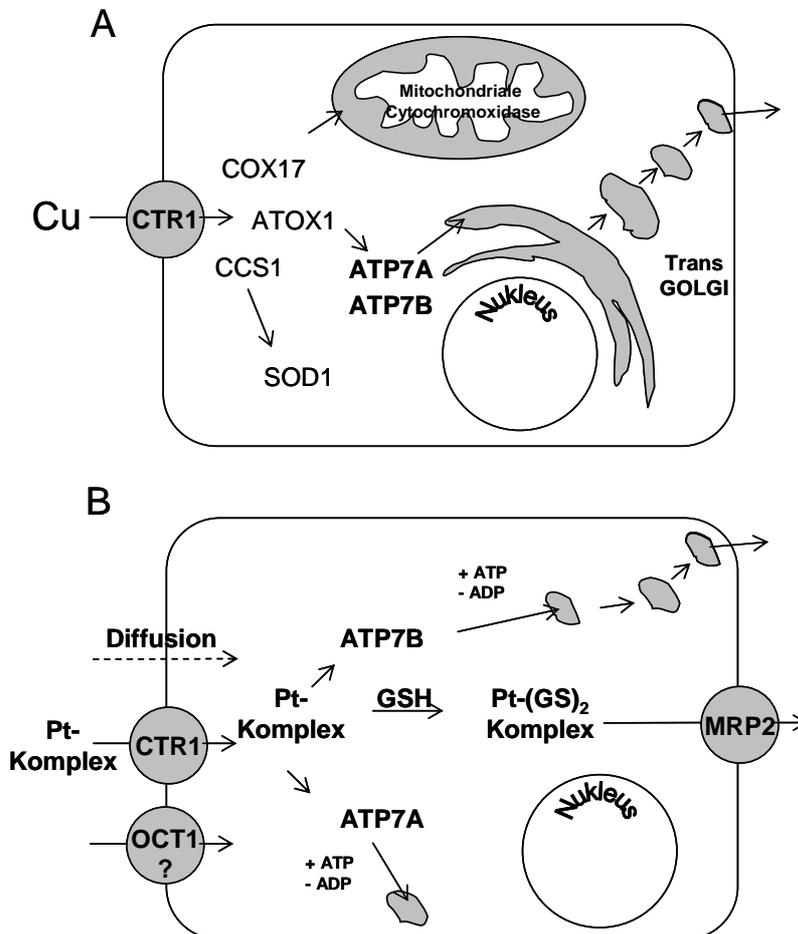


Abb. 1-16: Kupferhomöostase (A) und Mechanismen der Platinaufnahme und Ausschleusung (B).

Kupfer ist wegen seines Potenzials reaktive Sauerstoffspezies zu erzeugen toxisch für die Zelle. Deswegen wird die Konzentration an freien Kupferionen durch ein System an Transportproteinen möglichst niedrig gehalten ( $<10^{-18}$  M)<sup>88,99,100,101,102</sup>. Kupfer wird hauptsächlich über den Kupfertransporter CTR1 in die Zelle aufgenommen. Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieser Transport durch einen Ionenkanal erfolgt, der sich durch Trimerisierung von drei CTR1 Einheiten bildet<sup>103,104,105</sup>. Danach wird Kupfer über drei verschiedene Chaperone zu den Mitochondrien, zum Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) oder zum Trans-Golgi-Apparat transportiert<sup>106,107</sup>. Dort befinden sich die ATP-abhängigen Kupfertransporter ATP7A und ATP7B, die Kupferionen unter Energieverbrauch in den Golgi-Apparat

transportieren, wo sie an spezifische Proteine gebunden und über Vesikel aus der Zelle entfernt werden<sup>108,109,110</sup>.

Eine erhöhte oder erniedrigte Expression des Aufnahmetransporters CTR1 zeigte in vielen Untersuchungen deutlichen Einfluss auf die Platin-aufnahme<sup>111-117</sup>. Bemerkenswert ist, dass hier keine Spezifität für unterschiedliche Platinkomplexe gefunden wurde.

Der Mechanismus, wie der CTR1 Platinkomplexe transportiert, wird kontrovers diskutiert. CTR1 ist ein Protein, das aus 190 Aminosäuren mit drei transmembranären Helices besteht. Es besitzt extrazellulär eine methioninreiche Domäne (Met-Motiv), die essentiell für den Kupfer-Transport ist, an die aber auch Platinkomplexe binden können. Holzer et al. gehen davon aus, dass der CTR1-Transporter endozytotisch in die Zelle aufgenommen wird und das an den Transporter gebundene Platin auf diesem Weg in die Zelle gelangt<sup>88,118,119</sup>. Nach einer weiteren Theorie kommt es durch die Bindung der Platinkomplexe am Met-Motiv zu einem *Crosslinking* von drei Untereinheiten, wobei in Analogie zum physiologischen Kupfertransport das Homotrimer, welches einen Ionenkanal bilden soll, stabilisiert wird<sup>120</sup> (Abb. 1-17).

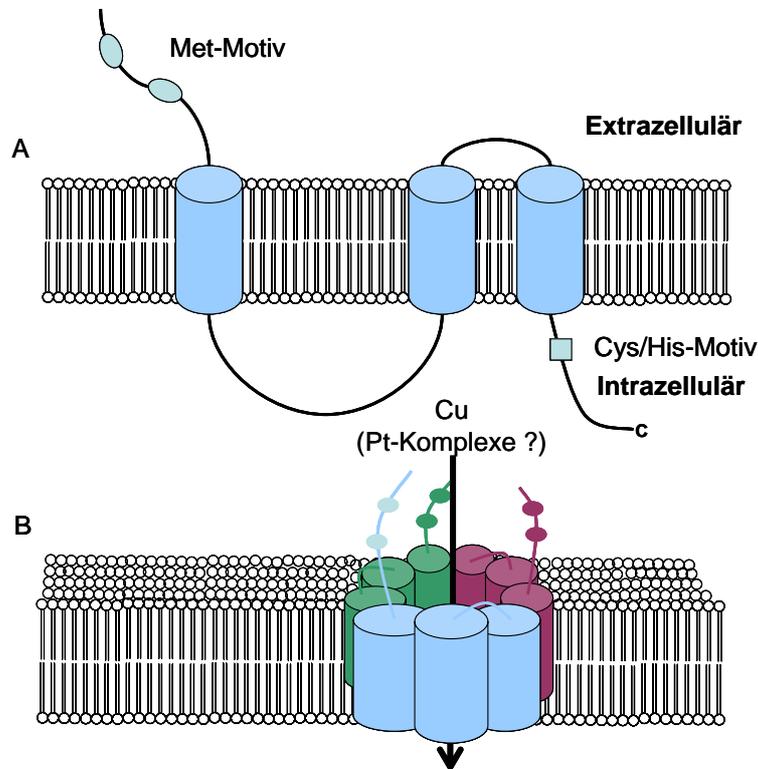


Abb. 1-17: Modell des CTR1 (A) und hypothetischer Ionenkanal (B) zum Transport von Kupfer und Platinkomplexen (Homotrimer).

Nach einer dritten Hypothese schließlich werden nur die gebildeten Aqua- oder Hydroxokomplexe transportiert<sup>121</sup>.

Der endgültige Beweis für die Richtigkeit einer dieser Hypothesen ist noch nicht erbracht.

Weiterhin konnte eine erhöhte Expression von ATP7A und ATP7B konnte *in vitro* und *in vivo* mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber Platinkomplexen in Verbindung gebracht werden<sup>122-125</sup>. Die Funktion, die diese beiden Kupfertransporter für den Platintransport besitzen, scheint sich deutlich zu unterscheiden. Eine Überexpression von ATP7B äußerte sich in einem erhöhten Efflux und einer verminderten Fähigkeit, verschiedene Platinkomplexe zu kumulieren<sup>126,127</sup>. ATP7B scheint für einen Transport in Vesikel mit anschließender Ausschleusung aus der Zelle verantwortlich zu sein.

Eine Überexpression von ATP7A führte hingegen zu einer erhöhten (!) Konzentration der Platinkomplexe in der Zelle. Trotzdem steigt der Resistenzgrad dieser Zellen<sup>128</sup>. Safaei et al. konnten eine gesteigerte Verteilung der Platinkomplexe in vesikuläre Kompartimente nachweisen. Als Erklärungsansatz wird von dieser Arbeitsgruppe angenommen, dass die Platinkomplexe eine Umverteilung der ATP7A enthaltenden Vesikel auf die Zelloberfläche verhindern und die damit verbundene Ausschleusung unterbinden<sup>129</sup>. Die erhöhte intrazelluläre Konzentration führt somit nicht zu einer gesteigerten Bindung an die DNA.

### **Gesteigerte Detoxifizierung**

Ein weiterer Resistenzmechanismus, der häufig für cisplatinresistente Zellen beschrieben wird und auch bei den Ovarialkarzinomzellen A2780cis gefunden wurde, ist eine gesteigerte Detoxifizierung durch Glutathion oder Metallothioneine<sup>85</sup>. Diese Detoxifizierung beruht darauf, dass die Platinkomplexe intrazellulär nicht nur mit der DNA, sondern auch mit anderen nukleophilen Strukturen reagieren. Aufgrund der hohen Nukleophilie sind Proteine oder Aminosäuren mit SH-Gruppe bevorzugte Reaktionspartner und fangen Platinkomplexe ab, bevor diese an die DNA binden können.

Glutathion ist ein Tripeptid (aufgebaut aus Cystein, Glutamin und Glycin), das eine wichtige Funktion bei Entgiftungsprozessen in der Zelle einnimmt. Glutathion kann viele Schwermetalle chelatieren und reaktive Sauerstoffspezies abfangen. Mit

Platinkomplexen reagiert Glutathion aufgrund der Sulfhydrylfunktion direkt oder enzymatisch katalysiert durch das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST). Der gebildete Platin-GS-Komplex kann durch den Transporter MRP2 aus der Zelle ausgeschleust werden (Abb. 1-16). Zusätzlich ist eine Reaktion mit Platin-DNA-Monoaddukten möglich, wodurch die Bildung von *crosslinks* verhindert wird. Weitere Mechanismen wie eine direkte Beteiligung an gesteigerter DNA-Reparatur<sup>130,131</sup>, oder die Beseitigung des von Platinkomplexen induzierten oxidativen Stresses<sup>132</sup> werden diskutiert. Neben einer erhöhten Konzentration von Glutathion wurde auch eine gesteigerte Expression von GST,  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ( $\gamma$ -GCS) und  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) *in vitro* und zum Teil *in vivo* gefunden<sup>48,133-138</sup>.  $\gamma$ -GCS ist ein Schlüsselenzym der Glutathionsynthese,  $\gamma$ -GT katalysiert den Abbau von Glutathion zu Cysteinylglycin, welches eine 10-fach höhere Affinität zu Cisplatin aufweist als Glutathion<sup>138</sup>.

Metallothioneine sind eine Gruppe niedermolekularer, cysteinreicher intrazellulärer Proteine, die als Schwermetalle komplexierende Proteine gelten. Durch die Cystein-Reste ist, vergleichbar mit Glutathion, theoretisch eine Bindung mehrerer Moleküle Cisplatin möglich. Die Relevanz für eine auftretende Resistenz ist allerdings umstritten, da viele der untersuchten resistenten Tumore keine Änderung der Metallothionein-Konzentration aufwiesen<sup>139,140,141</sup>.

### **Gesteigerte oder veränderte Reparatur der DNA**

Die Bildung von Platin-DNA-Addukten ist ein entscheidender Faktor für nachfolgende Apoptoseprozesse. Deshalb ist leicht verständlich, dass eine Steigerung der Reparaturrate zu einer erhöhten Resistenz führt. Wie bereits beschrieben, werden Platin-DNA-Addukte hauptsächlich durch das Nukleotid-Exzisions-Reparatur-System (NER) repariert, welches vermutlich nicht zwischen den verschiedenen Platin-DNA-Addukten zu differenzieren vermag, sodass eine verstärkte Reparatur als ein genereller Resistenzmechanismus gegenüber Platinkomplexen angesehen werden kann. Die Kapazität dieser Art der Resistenz scheint allerdings begrenzt zu sein und nur einen niedrigen Resistenzgrad zu erlauben<sup>46,48,142,143</sup>.

Auch eine veränderte Reparatur kann einen Resistenzmechanismus darstellen. Die Rolle des MMR-Systems wurde ebenfalls bereits beschrieben. Ein defektes MMR-System trägt auf mehrere Arten zur Resistenz bei. Zum einen wird keine nutzlose

Reparatur eingeleitet („Teufelskreis“), zum anderen verhindert, dass falsche, durch den replikativen Bypass ergänzte Basenpaare entfernt werden. Dies führt zu einem hohen Mutationsstatus – man spricht auch von mutagener Toleranz – wodurch Veränderungen, die zu Folgeresistenz führen, begünstigt sind. Als ein weiterer Aspekt fehlt die Anlagerung der MMR-Proteine als ein einleitendes Apoptosesignal.

### **Veränderungen der Apoptosekaskaden**

Wie aus Abb. 1-15 ersichtlich, können viele Faktoren der Apoptosekaskaden verändert sein. Am häufigsten werden Veränderungen der Expression von p53 beschrieben. Das kann dadurch begründet sein, dass das p53-Protein einen Hauptkontrollpunkt im Zellzyklus darstellt, auf den viele andere Proteine und Transkriptionsfaktoren Einfluss nehmen. Häufig ist eine Veränderung der p53-Expression also Folge der Mutation von Genen, die für andere Apoptosewege (z.B. MAPK, Ras) codieren<sup>27,48</sup>. Je nach Ausmaß der DNA-Schädigung wird entweder ein Zellzyklusarrest und Reparatur oder Apoptose eingeleitet (vgl. Abb. 1-14).

Aus diesem kurzen Überblick soll deutlich werden, wie vielfältig die Veränderungen sein können, die schließlich zu resistenten Tumoren führen. Es sind in der Regel mehrere Mechanismen, die in einem komplexen Zusammenspiel eine Resistenzentwicklung bewirken. Welche Mechanismen im Vordergrund stehen, kann von Zelllinie zu Zelllinie, von Tumor zu Tumor unterschiedlich sein. Allerdings gibt es auch Hinweise, dass bestimmte Resistenzmechanismen je nach Tumorentität bevorzugt ausgebildet werden. So zeigen Tumorzelllinien aus Ovarialkarzinomen häufig Veränderungen in der Aufnahme und Detoxifizierung der Platinkomplexe.

## **1.5 Ansätze zur Optimierung der Platinkomplexe**

Wie in Kapitel 1.4 dargestellt, ist der Einsatz der Platinkomplexe durch ihre Toxizität und primäre oder sekundäre Resistenz limitiert. Die klinischen Erfolge der Platinkomplexe führten zu vielen Versuchen, diese Beschränkungen aufzuheben. Prinzipiell wurden zwei Ansätze verfolgt. Durch strukturelle Modifikationen sollte die Toxizität gesenkt und Resistenz überwunden werden. Als Erfolg ist die Entwicklung von Carboplatin (Senkung der Toxizität) und Oxaliplatin (Resistenzüberwindung) anzusehen. Satraplatin als peroral applizierbarer Platinkomplex mit zusätzlicher

Wirkung in cisplatinresistenten Tumoren könnte folgen. Multinukleare Platinverbindungen mit 2-4 Platinzentren befinden sich zurzeit in der klinischen Prüfung<sup>144,145</sup>. Ein Beispiel ist BBR3464. Dieser Platinkomplex soll durch bevorzugte Ausbildung von langkettigen *interstrand* Quervernetzungen Resistenz überwinden, da diese Vernetzungen nicht durch das NER-Reparatursystem und HMG-Proteine erkannt werden. Zusätzlich zeigte sich eine zytotoxische Wirkung in humanen Tumorenograftmodellen mit mutiertem p53-Protein<sup>146</sup>.

Als ein zweiter Ansatz wird versucht, Platinkomplexe so zu modifizieren, dass eine tumorspezifische Anreicherung oder Aktivierung erfolgt. Dies hat den Vorteil, dass gesundes Gewebe geschont wird und somit weniger Toxizität zu erwarten ist. Zusätzlich kann eine Erhöhung der Konzentration am Wirkort auch zur Überwindung vorhandener Resistenz führen. In der Regel ist eine Resistenz nicht absolut, sondern resultiert in einer erhöhten Konzentration, die für einen therapeutischen Effekt benötigt wird und die wegen der dosislimitierenden Toxizität nicht erreicht werden kann. Eine Strategie für ein solches „Tumor-Targeting“ liegt in der Verwendung organ- oder tumorspezifischer Liganden oder makromolekularer Substanzen als Carrier für die Platinkomplexe. Organ- oder tumorspezifischer Liganden, die untersucht werden, sind Gallensäuren zum Lebertargeting (Bamet UD2<sup>146</sup>), Östrogene und Antiöstrogene für hormonabhängige Tumoren und Aminophosphonsäuren für Knochentumoren<sup>144,147</sup>. Ein liposomal verkapselter Platinkomplex befindet sich zurzeit in Phase II der klinischen Prüfung<sup>148</sup>, mit einem HPMA-Polymer ist eine Dosisfindungsstudie durchgeführt worden<sup>149</sup>. Zurzeit gibt es allerdings noch keine Substanz, die es bis zur Zulassung geschafft hätte, oder sich in der klinischen Prüfung der Phase III befindet.

In dieser Arbeit wurden Substanzen untersucht, die das Prinzip eines makromolekularen Carriers ausnutzen. Der Hintergrund für den Einsatz von Makromolekülen liegt in einer veränderten Physiologie des Tumorgewebes und wird im nächsten Abschnitt näher erläutert. Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Untersuchung strukturell abgewandelter Oxaliplatin-Analoga zur Charakterisierung der Zusammenhänge zwischen physikochemischen Eigenschaften und der Aufnahme in Tumorzellen sowie dem Einfluss struktureller Variationen auf Resistenzgrad und Zytotoxizität. Durch diese Untersuchungen sollen Erkenntnisse gewonnen werden, die in Zukunft strukturelle Optimierungen niedermolekularer und

makromolekularer Platinkomplexe zur Überwindung von Resistenz und dosislimitierender Toxizität erlauben sollen.

### 1.5.1 Tumortargeting

#### Ausnutzung des EPR-Effektes

Die Anreicherung makromolekularer Substanzen im Tumorgewebe wurde schon 1955 von Busch et al. anhand radioaktiv markierter Plasmaproteine beschrieben<sup>150</sup>. Mit der Arbeit des Polymerchemikers Ringsdorf, der Mitte der siebziger Jahre das Konzept makromolekularer Wirkstoffträgersysteme vorstellte, begann eine intensive Forschung auf diesem Gebiet<sup>151</sup>. Maeda et al. gelang es, den Mechanismus für die Kumulation makromolekularer Substanzen mit einem Molekulargewicht > 30-40 kDa aufzuklären und als passiven Effekt zu charakterisieren, der auf anatomischen Unterschieden zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe beruht<sup>152-156</sup>. Abb. 1-18 zeigt schematisch die Unterschiede zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe.

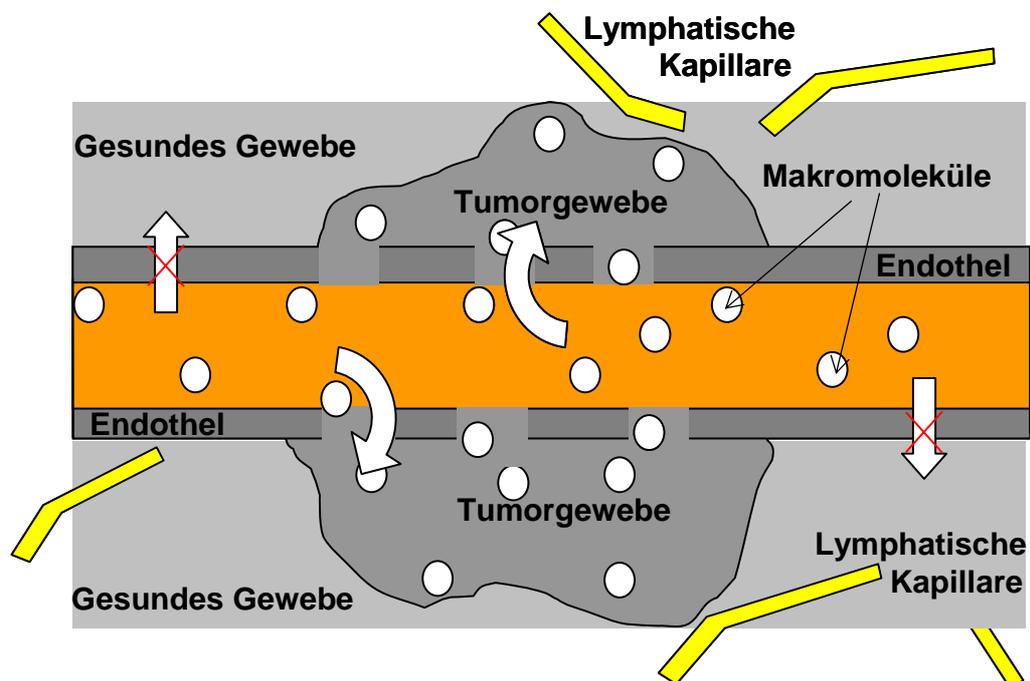


Abb. 1-18: Schematische Darstellung eines Blutgefäßes hinsichtlich der Unterschiede zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe.

Blutgefäße in gesundem Gewebe besitzen in der Regel eine geschlossene Endothelschicht, wodurch das Eindringen makromolekularer Verbindungen verhindert wird. Solide Tumoren benötigen für ihr intensives Wachstum eine verstärkte Ausbildung von Kapillaren zur Versorgung des Tumors mit Nährstoffen. Die intensive Kapillarisation wird durch Ausschüttung verschiedener vaskulärer Mediatoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), Stickstoffmonoxid und Bradykinin erreicht<sup>153,157,158</sup>. Ohne dieses als Tumorangiogenese bezeichnete Phänomen könnte ein Tumor lediglich auf eine Größe von etwa eine Million Zellen – das entspricht einem Durchmesser von etwa 2 mm – anwachsen und Metastasenbildung wäre nicht möglich<sup>159</sup>. Das forcierte, unphysiologische Wachstum der Kapillaren geht mit Veränderungen in der Gefäßanatomie einher. Die neu gebildeten Blutgefäße weisen Lücken in der Endothelschicht auf und zeigen somit eine erhöhte Permeabilität gegenüber makromolekularen Substanzen (Cut-off > 60 kDa), sodass selbst Proteine wie Serumalbumin (~ 67 kDa) das Gefäßendothel überwinden und ins umliegende Gewebe eindringen können. Dabei wird beobachtet, dass kleinere Moleküle zügig zurück diffundieren, während Moleküle mit steigender Größe verstärkt im Gewebe zurückgehalten werden und dort kumulieren. Dies hat seine Ursache in einem vermindert funktionsfähigen Lymphsystem, das nicht (ausreichend) in der Lage ist, derartige Substanzen wieder aus dem Gewebe zu entfernen<sup>160</sup>. Somit kommt es aufgrund des mangelnden Abtransports zu einer Kumulation von Makromolekülen. Dieser Mechanismus der Kumulation von Makromolekülen wird als EPR-Effekt (engl. *enhanced permeability and retention*) bezeichnet<sup>152,153</sup>. Unterstützt wird dieser Effekt durch die pharmakokinetischen Eigenschaften makromolekularer Verbindungen. Moleküle ab einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa werden von der Niere nur noch eingeschränkt glomerulär filtriert und besitzen deshalb eine lange Halbwertszeit, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Anreicherung im Tumorgewebe erhöht ist<sup>161,162</sup>.

Erst vor wenigen Jahren wurde gezeigt, dass die selektive Kumulation von radioaktivem Gallium im Tumorgewebe bei der seit Jahren angewandten Ga<sup>67</sup>-Szintigraphie auf dem EPR-Effekt beruht<sup>163</sup>. Hier bindet Gallium an Transferrin (90 kDa) und wird zusammen mit diesem ins Gewebe aufgenommen. Tumorgewebe unterscheidet sich von entzündetem Gewebe, das ebenfalls einen EPR-Effekt aufweist, da bei diesem das Lymphsystem intakt ist und für einen raschen

Abtransport des Komplexes sorgt<sup>153</sup>. Die Anreicherung makromolekularer Verbindungen in soliden Tumoren wurde inzwischen in zahlreichen Untersuchungen belegt und kann als Charakteristikum der meisten soliden Tumoren angesehen werden<sup>156</sup>.

### **Albuminbindende Platinkomplexe**

Es bietet sich an, den EPR-Effekt der soliden Tumoren für eine gezielte Anreicherung zytotoxischer Substanzen auszunutzen. Notwendig ist eine Erhöhung des Molekulargewichts der Verbindungen auf > 30 kDa. Dies kann durch eine Kopplung an polymere Trägersysteme erreicht werden, wobei prinzipiell unterschiedliche synthetische und biologische Polymere geeignet sind. Synthetische Polymere sollten nicht toxisch, immunologisch inaktiv und biologisch abbaubar sein. Diese Voraussetzungen sind häufig schwer realisierbar. Biopolymere hingegen besitzen diese Eigenschaften von Natur aus. Problematisch für Wirkstoffkonjugate mit Biopolymeren sind die strengen Kriterien der Zulassung als Arzneistoff. Die Anforderungen an Synthese (insbesondere die Gewährleistung einer gleichmäßigen Wirkstoffbeladung und Aufreinigung des Produktes), Analytik und Lagerung sind schwer zu erfüllen. Eine zusätzliche Problematik kann in der Kontamination mit Krankheitserregern und in einer immunologischen Reaktion als Antwort auf körperfremde Proteine gesehen werden. Als Lösungsmöglichkeit bietet sich die In-vivo-Kopplung an körpereigene Proteine an.

Ein solches Prinzip wurde durch Kratz et al. für verschiedene Zytostatika entwickelt und auf Platinkomplexe angewendet<sup>164</sup>. Dabei werden die Platinkomplexe derart derivatisiert, dass sie nach intravenöser Verabreichung schnell und selektiv an die Cystein<sup>34</sup>-Position von endogen zirkulierendem Albumin kovalent binden und makromolekulare Prodrugs bilden. Diese makromolekularen Prodrugs sollen sich dann durch den EPR-Effekt im Tumorgewebe anreichern. Im Tumorgewebe wird als Aktivierungshypothese die hydrolytische Freisetzung einer niedermolekularen, reaktiven Platinspezies im Interstitium angenommen, aber auch die Internalisierung als makromolekularer Komplex und eine anschließende intrazelluläre enzymatische oder hydrolytische Aktivierung ist möglich (Abb. 1-19).

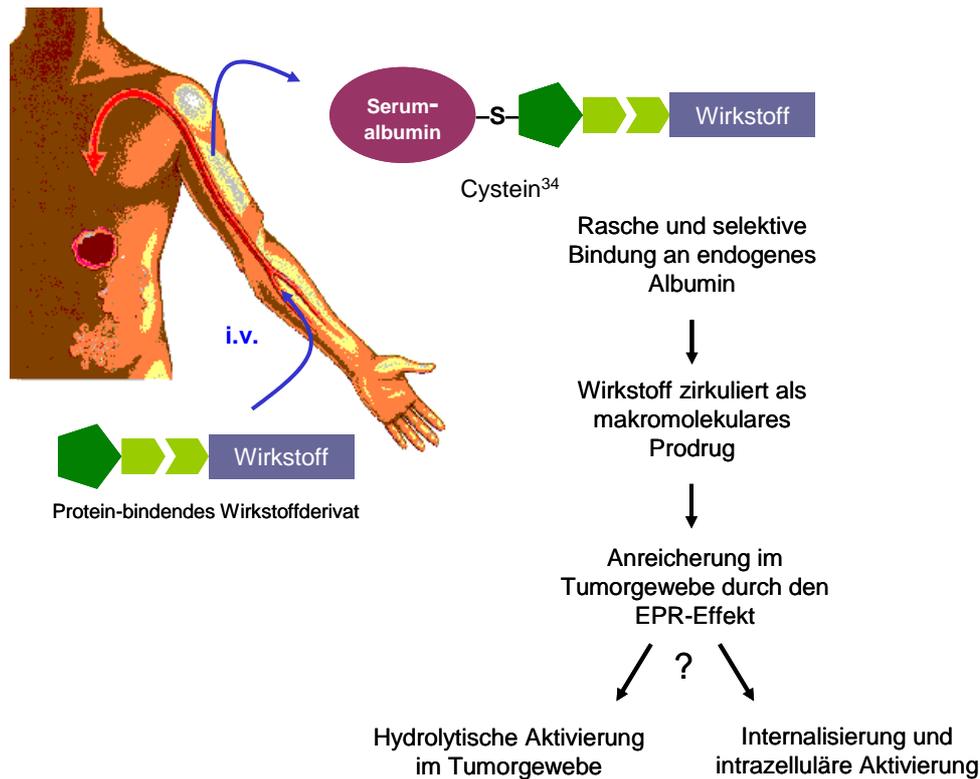


Abb. 1-19: Das makromolekulare Prodrug-Konzept<sup>164</sup>.

Die Anwendbarkeit des Prodrug-Konzepts basiert auf zwei Prinzipien:

- der Fähigkeit von *N*-Alkylmaleinimiden als doppelt aktivierte Michael-Systeme sehr schnell und spezifisch mit Thiol-Gruppen unter Ausbildung von stabilen Thioether-Bindungen zu reagieren (Abb. 1-20)
- den besonderen Eigenschaften von Serumalbumin, das im Blut in hoher Konzentration vorliegt und genau eine freie Thiol-Gruppe aufweist (Cystein<sup>34</sup>)

*N*-Alkylmaleinimide eignen sich besonders gut als proteinbindende Kopplungsgruppe, da die Reaktionsgeschwindigkeit von Maleinimiden mit Thiolen bei physiologischem pH ein Maximum annimmt. Eine mögliche Konkurrenzreaktion mit Aminen ist unter diesen Bedingungen um den Faktor 1000 langsamer und daher vernachlässigbar<sup>165</sup>.

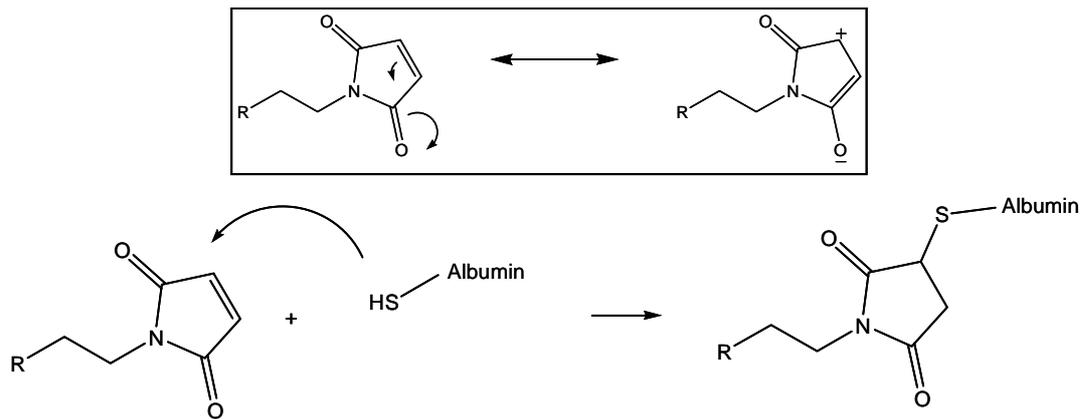


Abb. 1-20: Reaktion von N-Alkylmaleinimiden mit humanem Serumalbumin.

Humanes Serumalbumin, ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 67 kDa, stellt den größten Anteil aller freier Thiolgruppen im Serum und besitzt neben 17 Disulfidgruppen genau eine freie Cysteingruppe in Position 34. Diese Cysteingruppe ist zu 30 % oxidiert und an Glutathion oder Cystein gebunden<sup>166</sup>. Aufgrund des niedrigen pK<sub>a</sub>-Werts von < 7<sup>167</sup> stellt das Cystein im Albumin die reaktivste Thiol-Gruppe im menschlichen Blut (Zum Vergleich pK<sub>a</sub> freies Cystein ~ 8,5, Glutathion ~ 8,9).

## 1.5.2 Strukturoptimierung

### Veränderung der Lipophilie

Bisher wurde davon ausgegangen, dass ein großer Teil der Platinkomplexe durch passive Diffusion in die Tumorzelle gelangt. Die Aufnahme der Platinkomplexe wäre somit hauptsächlich davon abhängig, wie gut die Substanzen die Zellmembran überwinden können. Die Permeabilität der Membran einer Zelle ist durch den Permeabilitätskoeffizienten  $p$  in  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  charakterisiert und ist umgekehrt proportional zu ihrer Schichtdicke  $\Delta x$  sowie direkt abhängig vom Diffusionskoeffizienten  $D$ :

$$p = \frac{D}{\Delta x} \quad \text{Gl. 1-1}$$

Bei der Diffusion durch eine Membran liegt ein Zweiphasensystem vor. Beim Durchtritt einer Substanz durch die Membran kommt es zum Übergang zwischen

einer wässrigen und einer lipophilen Phase. Daher ist die Permeabilität auch vom Membran-Wasser-Verteilungskoeffizienten K abhängig:

$$p = \frac{K \cdot D}{\Delta x} \quad \text{Gl. 1-2}$$

Der Verteilungskoeffizient (K) definiert sich durch den Nernst'schen Verteilungssatz  $K = c_1/c_2$ . Er ist ein Maß für die Lipophilie eines Stoffes und beschreibt das Verhältnis der Stoffkonzentration zwischen Membran ( $c_1$ ) und wässriger Phase ( $c_2$ )<sup>168</sup>. Als einfach messbarer Parameter wird in der Regel der Octanol / Wasser-Koeffizient (P) bestimmt. Der Diffusionskoeffizient D ist abhängig von Molekülgröße und Ladung einer Substanz.

Wie aus Gl. 1–2 gefolgert werden kann, ist bei strukturell ähnlichen Substanzen (vergleichbarer Diffusionskoeffizient), welche hauptsächlich über passive Diffusion in die Zelle gelangen, die Lipophilie ein entscheidender Parameter für deren Aufnahme. Daraus ergibt sich, dass der Einsatz lipophilerer Platinkomplexe eine Steigerung der zellulären Aufnahme durch eine erhöhte passive Diffusion mit sich bringen könnte. Der Einsatz lipophilerer Substanzen wird ebenfalls zur Überwindung der Platinresistenz, insbesondere wenn die Aufnahme der Platinkomplexe in resistenten Zellen eingeschränkt ist, vielfach diskutiert<sup>169-172</sup>.

### **Oxaliplatin-Analoga**

Substanzen mit einem ähnlichen P-Wert (Lipophilie) und vergleichbarer Größe und Ladung, die zu einem Hauptteil durch passive Diffusion in eine Zelle gelangen, sollten nach Gl. 1–2 auch ein vergleichbares Aufnahmeverhalten aufweisen. Wie sich zeigte (vgl. Kapitel 6), ist dies für Carboplatin und Cisplatin (log P -2,30 und -2,53) nicht der Fall. Die beiden ungeladenen Substanzen unterscheiden sich so drastisch im Aufnahmeverhalten, dass eine unterschiedliche Molekülgröße als Erklärung nicht ausreichend erscheint. Allerdings besitzen Cisplatin und Carboplatin verschiedene Neutralliganden. Der Einfluss dieser Neutralliganden ist schwierig zu beurteilen. Zur Untersuchung des Beitrags der passiven Diffusion und der Lipophilie der Platinkomplexe an der Aufnahme in Tumorzellen wurden deshalb strukturell ähnliche Oxaliplatin-Analoga mit unterschiedlicher Lipophilie untersucht.

## 2 Zielsetzung

### 2.1 Albuminbindende Platinkomplexe

Das Konzept albuminbindender Zytostatika wurde für verschiedene Substanzen (Doxorubicin, Camptothecin) untersucht und in Tiermodellen<sup>173,174,175</sup> belegt. Häufig werden allerdings Tierversuche als „proof of principle“ durchgeführt, bevor die zugrunde liegenden Mechanismen genauer untersucht wurden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zu etablieren, die eine Überprüfung der Reaktionshypothesen makromolekularer Prodrugs erlauben. Diese Methoden sollten auf die albuminbindenden Platinkomplexe angewandt werden. Durch die gewonnenen Erkenntnisse können dann Strukturoptimierungen durchgeführt und eine Auswahl vielversprechender Kandidaten getroffen werden. Dies könnte helfen, unnötige Tierversuche zu vermeiden, Kosten zu senken und die Erfolgsaussichten neuer Substanzen zu erhöhen. Um diese Ziele zu erreichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Schwerpunkte gesetzt:

- Optimierung und Validierung einer CE-Trennmethode zur Charakterisierung der Nukleotidbindung verschiedener Platinkomplexe (Reaktivität, Adduktmuster)
- Entwicklung einer CE-Trennmethode zur Bestimmung der Albuminbindung der albuminbindenden Platinkomplexe
- Etablierung eines Testsystems zur In-vitro-Überprüfung verschiedener postulierter Aktivierungsmechanismen makromolekularer Prodrugs
- Optimierung eines biologischen Assays zur Untersuchung der Aufnahmekinetik der makromolekularen Platinkomplexe
- Untersuchung der Aufnahmewege makromolekularer Platinkomplexe in Tumorzellen
- Untersuchung der Zytotoxizität in Zellkulturen
- Charakterisierung der albuminbindenden Platinkomplexe mit den entwickelten Methoden und Vergleich mit einem synthetischen Polymer und klassischen Platinkomplexen

## 2.2 Oxaliplatin-Analoga

Bisher ist nicht eindeutig geklärt, ob es möglich ist, durch Einsatz lipophilerer Platinkomplexe die Aufnahme in Tumorzellen zu steigern. Eine Steigerung der Lipophilie wird auch als Ansatz diskutiert Resistenz, die mit einer erniedrigten Platinaufnahme einhergeht, zu umgehen<sup>169-172</sup>.

Zur Klärung des Beitrags der passiven Diffusion und der Lipophilie der Platinkomplexe an der Aufnahme in Tumorzellen und zur Untersuchung des Einflusses der Lipophilie auf Zytotoxizität und Resistenzgrad wurden deshalb Oxaliplatin-Analoga mit unterschiedlicher Lipophilie untersucht. Da in neueren Veröffentlichungen zur Aufnahme von Platinkomplexen eine Bindung an Transportproteine diskutiert wird (s. Kap.1.4.2), sollte die Reaktivität der Platinkomplexe gegenüber nukleophilen Strukturen als möglicher Einflussfaktor auf die Aufnahme in Tumorzellen in die Untersuchungen einbezogen werden.

Als Zelllinie wurde die A2780 Ovarialkarzinomzelllinie ausgewählt, die von Zisowsky et al. und Kassack et al. bereits gut charakterisiert wurde und deren cisplatinresistente Variante eine Kreuzresistenz zu Oxaliplatin aufweist<sup>203,260</sup>.

Folgendes Vorgehen sollte zur Beantwortung der obigen Fragestellung beitragen:

- Bestimmung der Reaktivität der Oxaliplatin-Analoga gegenüber Nukleotiden mittels der entwickelten CE-Trennmethode als *in vitro* Modell für eine Bindung an nukleophile Strukturen
- Untersuchung der Aufnahme der Oxaliplatin-Analoga in sensitive und resistente Tumorzellen
- Ermittlung der Zytotoxizität der Oxaliplatin-Analoga in sensitive und resistente Tumorzellen
- Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Lipophilie der Oxaliplatin-Analoga und der Aufnahme in Tumorzellen
- Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Lipophilie der Oxaliplatin-Analoga und der Zytotoxizität in Tumorzellen
- Untersuchung des Einflusses der Lipophilie der Oxaliplatin-Analoga auf den Resistenzgrad der resistenten Tumorzellen

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

AE-Puffer (Elutions-Puffer)	Qiagen, Hilden
AL-Puffer (Lyse-Puffer)	Qiagen, Hilden
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Argon 4.6	Air Product, Hattingen
AW 1-Puffer (Wasch-Puffer)-Konzentrat	Qiagen, Hilden
AW 2-Puffer (Wasch-Puffer)-Konzentrat	Qiagen, Hilden
Bafilomycin A <sub>1</sub>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
BCA Testkit Lösung A (Bichinolin-4-carbonsäure)	Pierce, Bonn
BCA Testkit Lösung B (4 % CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O)	Pierce, Bonn
BCA Testkit Standard (Rinderserumalbumin 2 mg/ml)	Pierce, Bonn
Borsäure	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Butyrylcholinesterase (Equine-Serum)	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Casy <sup>®</sup> ton, Isotone Salzlösung	Schärfe System, Reutlingen
2-Desoxyadenosin-5`-monophosphat (dAMP)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
2-Desoxyguanosin-5`-monophosphat (dGMP)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Thymidin-5`-monophosphat (TMP)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Promochem GmbH, Wesel
Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Dithionitobenzoesäure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethanol 96-100 % (V/V)	Merck, Darmstadt

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Dinatriumsalz)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
FITC-Rinderserumalbumin (Fluorescein isothiocyanate conjugate)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Helium	Praxair, Oevel
Humanes Serumalbumin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Isopropanol 100 %	Merck, Darmstadt
Kalbsthymus-DNA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm
L-Glutamin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Methylcyclodextrin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
NaOH-Lösung [0,1 M und 1 M]	Riedel de Haën AG, Seelze
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
n-Octanol	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Lösung [10000 I.E./ml, 10 mg/ml]	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Phosphorsäure 85 % (V/V)	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm
Protease, lyophilisiert	Qiagen, Hilden
Ribonuclease A [69 units/mg]	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	USF, Ransbach-Baumbach
RPMI 1640-Medium <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Salpetersäure 65 % (V/V)	Merck, Darmstadt
Salzsäure 37 % (M/V)	Merck, Darmstadt
S-Butyrylthiocholiniodid	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm
Tris-HCl (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiolhydrochlorid)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Triton-X	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Trypsin-EDTA-Lösung

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

**Platinkomplexe**Albuminbindende Platinkomplexe  
(PL04, PL07)

Arbeitsgruppe Dr. Kratz, Freiburg

Cisplatin

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Carboplatin

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Oxaliplatin

Sanofi-Synthelabo, Gentilly, Frankreich

Oxaliplatin-Analoga

Arbeitsgruppe Professor Keppler, Wien

(KP1475, 1476, 1478, 1480, 1481)

Polyethylenglykol-Platinkomplex

Arbeitsgruppe Dr. Kratz, Freiburg

**3.1.2 Albuminbindende Platinkomplexe und PEG-Platinkomplex**

Die Verbindungen PL04 und PL07 (Abb. 3-1) und ein makromolekularer PEG-Platinkomplex (Abb. 3-2) wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Kratz synthetisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Beide Strukturen konnten von Warnecke et al. durch  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie bestätigt werden.<sup>176</sup>

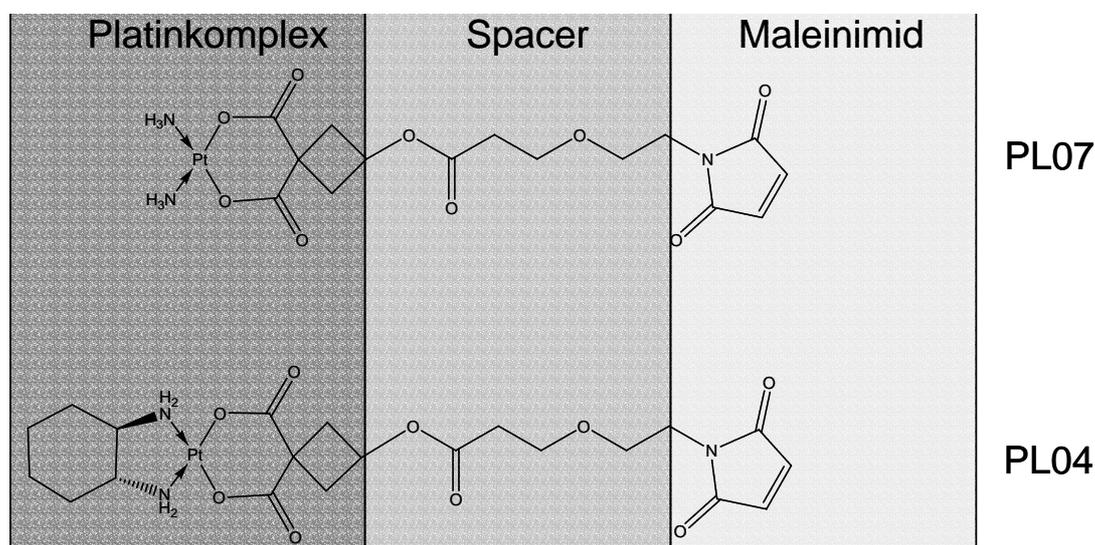


Abb. 3-1: Albuminbindende Platinkomplexe **PL07** (Diammin(1,1-[3-(6-maleinimido-4-oxacaproyl)cyclobutandicarboxylato]platin(II)) und **PL04** ((1R,2R/1S,2S)-1,2-Cyclohexandiamin-N,N'(1,1-[3-(6-maleinimido-4-oxacaproyl)cyclobutandicarboxylato]platin(II))).

Beide Substanzen gehen von Carboplatin als Leitstruktur aus und besitzen den Cyclobutandicarboxylat-Chelatliganden (CBDCA) als Abgangsgruppe, die über einen Ethoxypropionyl-Spacer mit der Maleinimid-Teilstruktur verbunden ist. Der wenig reaktive CBDCA-Ligand wurde gewählt, um eine langsame Freisetzung eines reaktiven niedermolekularen Platinkomplexes durch Hydrolyse (postuliert wird der Aqua- oder Hydroxokomplex) aus dem Makromolekül zu ermöglichen. Albuminbindende oder makromolekulare Platinkomplexe mit dieser Abgangsgruppe wurden vorher noch nicht synthetisiert. Der Ethoxypropionyl-Spacer dient als Abstandhalter zum Zielmolekül Albumin und garantiert eine ausreichende Wasserlöslichkeit zur intravenösen Applikation (s. Tab. 3-1). Verbindungen mit aliphatischen Spacern erwiesen sich als schwer löslich. Die Maleinimid-Teilstruktur ist Bindungskomponente für das Serumalbumin. PL04 besitzt anstelle der Ammin-Liganden den DACH-Liganden als stabilen Neutralliganden.

Abb. 3-2 gibt die Struktur des PEG-Platinkomplexes wieder, der für vergleichende Untersuchungen verwendet wurde. Aufgrund der relativ einfachen und bereits publizierten Synthese wurde ein Malonat-Ligand (2-(3-propionamidopropyl)malonat) als Abgangsgruppe gewählt.

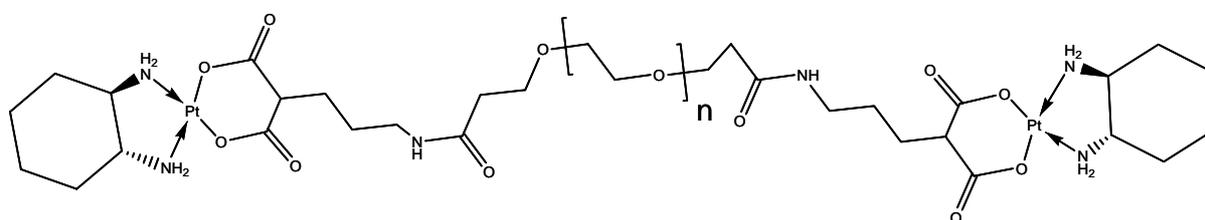


Abb. 3-2: PEG-Platinkomplex.

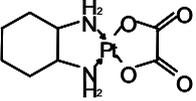
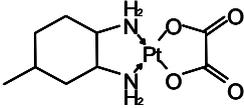
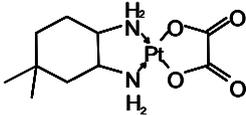
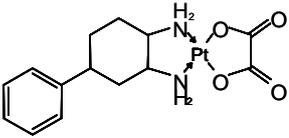
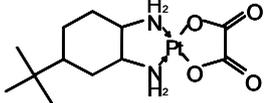
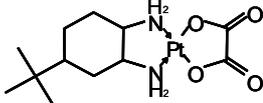
Tab. 3-1: Chemische und physikochemische Daten zu PL04 und PL07.

	PL04	PL07
Wasserlöslichkeit [mg/ml]	> 50	2,7
Reinheit (HPLC) [%]	> 95	> 98
$M_r$ [g/mol]	662,55	582,42

### 3.1.3 Oxaliplatin-Analoga

Die Oxaliplatin-Analoga wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Keppler synthetisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Strukturen der Oxaliplatin-Analoga konnten von Habala et al. durch  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie bestätigt werden<sup>177</sup>. Eine Übersicht über die Substanzen und ihre physikochemischen Eigenschaften gibt Tab. 3-2.

Tab. 3-2: Struktur und physikochemische Eigenschaften der untersuchten Oxaliplatin-Analoga (nach Lipophilie geordnet) L = Löslichkeit O/W = Octanol / Wasser.

Name	Komplex-Nomenklatur	Struktur	M <sub>r</sub> [g/mol]	O/W (P)	Log P	L [mM]
Oxaliplatin	[(1R, 2R)-1,2-Cyclohexandiamin-N,N'] [oxalato(2-)-O,O']platin(II)		397,3	0,02	-1,76	> 10
KP1478 (nur equatorial)	[(1R, 2R, 4R/ 1S, 2S, 4S)-4-Methyl-1,2-Cyclohexandiamin-N,N'] [oxalato(2-)-O,O']platin(II)		411,3	0,05	-1,28	5
KP1481	[(1R, 2R, 4R/ 1S, 2S, 4S)-4-Dimethyl-1,2-Cyclohexandiamin-N,N'] [oxalato(2-)-O,O']platin(II)		425,4	-0,68	0,21	0,8
KP1476 (überwiegend axial)	[(1R, 2R, 4R/ 1S, 2S, 4S)-4-Phenyl-1,2-Cyclohexandiamin-N,N'] [oxalato(2-)-O,O']platin(II)		473,4	0,52	-0,28	2,1
KP1475 (überwiegend axial)	[(1R, 2R, 4R/ 1S, 2S, 4S)-4-tert Butyl-1,2-Cyclohexandiamin-N,N'] [oxalato(2-)-O,O']platin(II)		453,4	2,13	0,33	1,3
KP1480 (nur equatorial)	[(1R, 2R, 4R/ 1S, 2S, 4S)-4-tert Butyl-1,2-Cyclohexandiamin-N,N'] [oxalato(2-)-O,O']platin(II)		453,4	2,63	0,42	1,3

### 3.1.4 Hergestellte Lösungen und Puffer

#### Ammoniumacetatpuffer [16,2 mM, pH 9,8]

Ammoniumacetat [16,2 mM]	124,7 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 100,0 ml
(mit 1 M NaOH auf pH 9,8 eingestellt)	

#### AW 1-Puffer (Wasch-Puffer)

AW 1-Konzentrat*	95 ml
Ethanol 96% (V/V)	ad 220 ml

\* Die genaue Zusammensetzung wird von der Fa. Qiagen nicht mitgeteilt.

#### AW 2-Puffer (Wasch-Puffer)

AW 2-Konzentrat*	66 ml
Ethanol 96% (V/V)	ad 226 ml

\* Die genaue Zusammensetzung wird von der Fa. Qiagen nicht mitgeteilt.

#### Boratpuffer [0,1 M, pH 8,0-10,0]

Borsäure	618,3 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 100,0 ml
(mit 1 M NaOH auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt)	

#### Boratpuffer [0,1 - 0,5 M, pH 9,2]

Borsäure	618,3 mg /0,1 M
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 100,0 ml
(mit 1 M NaOH auf pH 9,2 eingestellt)	

#### Butyrylthiocholin-Stammlösung (SL) [10 mM]

Butyrylthiocholiniodid	6,34 mg
Ellmann-Puffer	2,0 ml

#### Butyrylcholinesterase-Stammlösung (SL1) [100 U/ml]

Butyrylcholinesterase (9,3 U/mg, Herstellerangabe)	10,7 mg
Ellmann-Puffer	1000 µl

---

Butyrylcholinesterase-Stammlösung (SL2) [50 U/ml]		
Butyrylcholinesterase (3,5 U/mg, in Phosphatpuffer ermittelt)		14,3 mg
Ellmann-Puffer		1000 µl
Butyrylcholinesterase-Arbeitslösung (AL) [3,33 U/ml]		
Butyrylcholinesterase-Stammlösung		10 µl
Ellmann-Puffer		290 µl
Cisplatin-Stammlösung (SL) [1 mg/ml Platin]		
Cisplatin		15,4 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser		ad 10,0 ml
Cisplatin-Arbeitslösung 1 (AL-1) [10 µg/ml Platin]		
Cisplatin-Stammlösung		100 µl
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser		ad 10,0 ml
Cisplatin-Arbeitslösung 2 (AL-2) [1 µg/ml Platin]		
Cisplatin-Arbeitslösung 1 (AL-1)		1000 µl
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser		ad 10,0 ml
dAMP-Stammlösung (SL) [3 mM]		
dAMP		13,14 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser		ad 10,0 ml
dGMP-Stammlösung (SL) [3 mM]		
dGMP		13,22 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser		ad 10,0 ml
TMP-Stammlösung (SL) [3 mM]		
TMP		13,22 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser		ad 10,0 ml
DNA-Stammlösung (SL) [1000 µg/ml]		
Kalbsthymus-DNA		1,0 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser		ad 1000 µl

## DTNB-Stammlösung (SL) [7 mM]

DTNB	6,94 mg
Ellmann-Puffer	2,5 ml

## Ellmann-Puffer

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16,6 mg
NaCl	58,5 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 10,0 ml
(mit 1 M NaOH auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt)	

## Humanalbumin-Stammlösung (SL) [20 %]

Humanes Serumalbumin	200,0 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 1000 µl

## Isopropanol / HCl

Isopropanol 100 %	50 ml
Salzsäure 37 % (M/V)	165 µl

## MTT-Lösung

MTT	500,0 mg
PBS-Puffer	ad 100,0 ml

PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*)

Natriumchlorid	8,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H <sub>2</sub> O	1,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,2 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 1000,0 ml

## Phosphatpuffer [0,1 M, pH 5,0-8,0]

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1200 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 100,0 ml
(mit 1 M NaOH auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt)	

**Phosphatpuffer [0,02 M, pH 7,4]**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	240 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 100,0 ml
(mit 1 M NaOH auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt)	

**SDS-Stammlösung [0,1 M]**

SDS	2884 mg
0,1 M Boratpuffer, pH 9,0	ad 100,0 ml

**Triton-PBS-Puffer [0,1 % V/V]**

Triton-X	1,0 ml
PBS-Puffer	ad 1000,0 ml

**Zellkulturmedium**

RPMI 1640-Medium <sup>®</sup>	500 ml
Fetales Kälberserum	50 ml
L-Glutamin (s. Kap. 3.1.1)	7,5 ml
Penicillin-Streptomycin-Lösung (s. Kap. 3.1.1)	5 ml

**Puffer für Mikrodialysekammerversuche**

Bei den Pufferbezeichnungen steht die erste Zahl jeweils für die Phosphat-, die zweite Zahl für die Chloridkonzentration in mM. Der erforderliche pH-Wert wurde jeweils durch potentiometrische Titration mit 0,1 M NaOH eingestellt.

**Puffer 12/300 (pH = 7,4/6,0/5,0)**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	82,8 mg
NaCl	876,6 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 50,0 ml
(mit 1 M NaOH auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt)	

**Puffer 60/300 (pH = 7,4/6,0/5,0)**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	414,0 mg
NaCl	876,6 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 50,0 ml
(mit 1 M NaOH auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt)	

**Puffer 44,1/300 (pH = 6,0)**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	304,3 mg
NaCl	876,6 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 50,0 ml
(mit 1 M NaOH auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt)	

**Puffer 23,7/300 (pH = 5,0)**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	163,5 mg
NaCl	876,6 mg
Purelab <sup>®</sup> Plus-Wasser	ad 50,0 ml
(mit 1 M NaOH auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt)	

**Lösungen zur Inkubation****Albuminbindender Platinkomplex PL04 [2 mM]**

PL04	13,25 mg
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 10,0 ml

**Albuminbindender Platinkomplex PL07 [2 mM]**

PL07	11,65 mg
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 10,0 ml

**Bafilomycin A<sub>1</sub> [100 µM]**

Bafilomycin A <sub>1</sub>	2 µg
DMSO	32 µl

**β-Methylcyclodextrin-PBS [5 mM]**

β-Methylcyclodextrin	6,5 mg
PBS-Puffer	ad 1000 µl

**β-Methylcyclodextrin-PBS [2,5 mM]**

β-Methylcyclodextrin	3,25 mg
PBS-Puffer	ad 1000 µl

**Cisplatin [2 mM]**

Cisplatin	6,0 mg
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 10,0 ml

**Carboplatin [2 mM]**

Carboplatin	7,43 mg
Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 ml

**FITC-Rinderserumalbumin SL [10 mg/ml]**

Rinderalbumin-FITC	10 mg
Tris-HCl [10 mM, pH 7,4]	ad 1000 µl

**Oxaliplatin [2 mM]**

Oxaliplatin	7,95 mg
Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 ml

**Oxaliplatin [800 µM]**

Oxaliplatin	3,18 mg
Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 ml

**Oxaliplatin-Analogon KP1475 [800 µM]**

Oxaliplatin-Analogon KP1475	3,63 mg
Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 ml

**Oxaliplatin-Analogon KP1476 [800 µM]**

Oxaliplatin-Analogon KP1476	3,79 mg
Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 ml

**Oxaliplatin-Analogon KP1478 [800 µM]**

Oxaliplatin-Analogon KP1478	3,29 mg
Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 ml

**Oxaliplatin-Analogon KP1480 [800 µM]**

Oxaliplatin-Analogon KP1480	3,63 mg
Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 ml

**Oxaliplatin-Analogon KP1481 [800 µM]**

Oxaliplatin-Analogon KP1481	3,40 mg
Purelab Plus®-Wasser	ad 10,0 ml

## Polyethylenglykol-Platinkomplex [800 µM]

PEG-Platinkomplex	8,8 mg
Purelab Plus <sup>®</sup> -Wasser	ad 1,0 ml

**Verbrauchsmaterialien**

Cellstar <sup>®</sup> -Gewebekulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Cellstar <sup>®</sup> -Gewebekulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Cellstar <sup>®</sup> -Gewebekulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Cellstar <sup>®</sup> -Röhrchen (15 ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Cellstar <sup>®</sup> -Röhrchen (50 ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Einmalspritzen (10 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Graphitrohre, pyrolytisch beschichtet	Varian, Darmstadt
Gleichgewichtsmikrodialysekammern (DispoEquilibrium Dialyzer <sup>®</sup> )	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Kapillaren ( <i>fused silica</i> , 75 µm ID, 365 µm OD)	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Kryovials	Sarstedt, Nümbrecht
Membran-Filter (0,22 µm, Celluloseacetat)	Macherey-Nagel, Düren
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co., Wertheim
Pipettenspitzen	Brand GmbH & Co., Wertheim
Platin-Hohlkathodenlampe (UltrAA <sup>®</sup> -Lampe)	Varian, Darmstadt
PP-Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Probengefäßdeckel	Sarstedt, Nümbrecht
Probengefäße (2 ml, konisch)	Varian, Darmstadt
QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini-Kit	Qiagen, Hilden
Tissue Culture Plate, 96 Wells	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Tissue Culture Plate, 6 Wells	Greiner Labortechnik, Frickenhausen

### 3.1.5 Geräte

Analysenwaage Kern 770	Gottlieb Kern & Sohn, Albstadt
Begasungsbrutschrank Thermo	Thermo Electron, Dreieich
Biohomogenisator Polytron <sup>®</sup>	Glen Mills Inc., Clifton, USA
Casy <sup>®</sup> 1 Zellzähler	Schärfe System, Reutlingen
Einkanal-Pipetten (10-1000 µl)	Fisher Scientific, Schwerte
Fluoreszenz-Multiwellreader	Thermo Electron, Dreieich
Fluoroscant Ascent <sup>®</sup>	Thermo Electron, Dreieich
Hochleistungszentrifuge Allegra <sup>®</sup> 21 R	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
Inversmikroskop Axiovert <sup>®</sup> 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Laminar-Air-Flow-Werkbank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer RMH71	Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter
pH-Meter inoLab <sup>®</sup> pH level 2	WTW, Weilheim
Präzisionsküvetten Quarzglas Suprasil <sup>®</sup>	Hellme, Mülheim
Probenmixer	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Reinstwasseranlage Purelab <sup>®</sup> Plus	USF, Ransbach–Baumbach
Schüttelinkubator Unimax <sup>®</sup> 1010	Heidolph, Schwabach
Ultraschallbad Sonorex <sup>®</sup> Super RK 103 H	Bandelin, Berlin
UV/VIS-Spektrophotometer	Amersham Pharmacia Biotech, München
Ultrospec <sup>®</sup> 2100 pro	Uppsala, Schweden
UV-Multiwellreader Multiscan <sup>®</sup>	Thermo Electron, Dreieich
UV-Multiwellreader Polarstar <sup>®</sup>	BMG-Lab-Technologies, Offenburg
Wasserbad Büchi 461	Büchi, Schweiz
Wasserbad MGW Lauda RM 6	Werk Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Microfuge <sup>®</sup> Lite	Beckman-Coulter, Fullerton, USA

### Atomabsorptionsspektrometrie

Spektrometer SpectrAA <sup>®</sup> Zeeman 220	Varian, Darmstadt
Graphitrohratomisator GTA 100	Varian, Darmstadt
Autosampler PSD 100	Varian, Darmstadt
Software SpectrAA <sup>®</sup> 220, Version 2.20	Varian, Darmstadt

### Kapillarelektrophorese

P/ACE <sup>®</sup> 5510	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Dioden-Array-Detektor	Beckman Coulter, Fullerton, USA
UV-Absorptionsdetektor	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Software P/ACE <sup>®</sup> Station, Version 1.21	Beckman Coulter, Fullerton, USA

### 3.1.6 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde die humane Ovarialkarzinomzelllinie A2780 verwendet, sowie eine cisplatinresistente Variante A2780cis. A2780 ist eine der am häufigsten untersuchten und charakterisierten Tumorzelllinien, die aus Zellen eines Karzinomes der Eierstöcke einer Patientin stammt, der vor der Therapie Teile des Tumors entnommen wurden. Die cisplatinresistente Variante A2780cis wurde durch chronische Exposition von A2780-Zellen mit steigenden Cisplatinkonzentrationen erhalten und stammt aus der *European Collection of Cell Cultures, Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, UK*. Das Zelllinienpaar wurde von PD Dr. Kassack (Pharmazeutische Chemie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

## 3.2 CE-Analytik

### 3.2.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

#### Aufbau eines Kapillarelektrophorese-Systems

Die Kapillarelektrophorese ist ein elektrophoretisches Trennverfahren, welches auf unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten ( $v$ ) geladener Teilchen innerhalb einer Quarzkapillare unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes ( $E$ ) beruht. Der grundsätzliche Aufbau eines CE-Systems ist in Abb. 3-3 schematisch dargestellt.

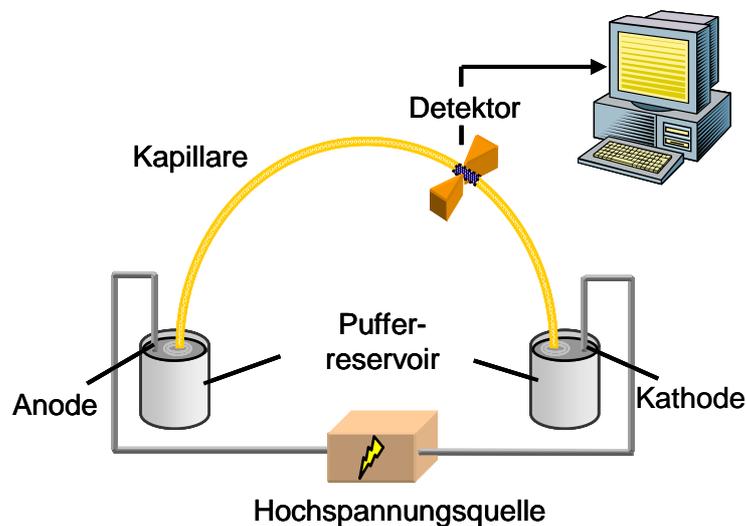


Abb. 3-3: Aufbau eines Kapillarelektrophorese-Systems.

Ein Kapillarelektrophorese-System besteht aus der mit Trennpuffer gefüllten Kapillare, zwei Puffergefäßen, die den Lauf- oder Trennpuffer beherbergen, einer Hochspannungsquelle, die über zwei Platin-Elektroden mit den beiden Puffergefäßen verbunden ist, einem Detektor und einem System zur Datenerfassung.

Üblicherweise ist die Elektrode am Kapillareinlass als Anode, die am Kapillarauslass als Kathode geschaltet. Die Injektion der Probe kann entweder elektrokinetisch oder hydrodynamisch erfolgen. Bei der elektrokinetischen Injektion wird die Probe elektrophoretisch in die Kapillare transportiert. Bei der hydrodynamischen Injektion wird entweder Druck auf das Probengefäß gegeben oder am Kapillarende ein Vakuum angelegt.

Kommerziell erhältliche CE-Systeme arbeiten vollautomatisch; Steuerung und Datengewinnung erfolgen EDV gestützt.

Das am häufigsten eingesetzte Kapillarmaterial ist *fused silica* (amorphes Glas), welches mit einer dünnen Polyimidschicht überzogen ist. Diese Schicht bedingt eine relativ hohe mechanische Stabilität der Kapillare. In einem definiertem Abstand zum Ein- bzw. Auslassende wird der Polyimidüberzug mechanisch oder durch Abbrennen entfernt und damit ein Detektionsfenster geschaffen. Durch die optische Transparenz des *fused silica* Materials kann die Kapillare selbst als Messzelle dienen. Die meist verwendete Detektionsmethode ist die Messung der UV-Absorption. Prinzipiell ist dies bei einer fest eingestellten Wellenlänge oder über einen größeren Wellenlängenbereich (Diodenarray-Detektion) möglich. Bedingt durch die kurze optische Weglänge, die durch den Innendurchmesser der Kapillare – normalerweise zwischen 25 und 100  $\mu\text{m}$  – festgelegt wird, ist die Konzentrationsempfindlichkeit relativ gering, die Detektionsgrenze liegt bei ungefähr 1  $\mu\text{M}$ , abhängig vom molaren Absorptionskoeffizienten der untersuchten Substanz. Andere verwendete Detektionsmethoden wie z.B. die elektrochemische Detektion, die direkte Kopplung an ein Massenspektrometer (CE/MS) und die Messung der Laserinduzierten Fluoreszenz (LIF) besitzen häufig eine deutlich höhere Empfindlichkeit, sind aber (z.B. auf Grund notwendiger Derivatisierungen (LIF) oder eingeschränkter Wahl der Trennpuffer (CE/MS) weniger breit einsetzbar.

### Trennprinzip

Entscheidend für eine kapillarelektrophoretische Trennung ist die unterschiedliche Migration geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die Geschwindigkeit der Ionen ( $v$ ) ist gemäß nachstehender Gleichung von der elektrophoretischen Mobilität ( $\mu_e$ ) und der elektrischen Feldstärke ( $E$ ) abhängig:

$$v = \mu_e \cdot E$$

Gl. 3-1

Die elektrische Feldstärke ergibt sich aus dem Quotienten aus angelegter Spannung und Länge der Kapillare.

Die elektrophoretische Mobilität eines Teilchens ist eine umgebungsabhängige Konstante die durch das Gleichgewicht zwischen der elektrischen Kraft ( $F_e$ ) und der Reibungskraft ( $F_r$ ) bestimmt wird:

$$\mu_e = \frac{F_e}{F_r} \quad \text{Gl. 3-2}$$

Die auf ein Ion wirkende elektrische Kraft errechnet sich aus dem Produkt von Ionenladung ( $q$ ) und Feldstärke ( $E$ ):

$$F_e = q \cdot E \quad \text{Gl. 3-3}$$

Die Reibungskraft ergibt sich aus dem Produkt aus Pufferviskosität ( $\eta$ ), Ionenradius ( $r$ ) und der Geschwindigkeit des Teilchens ( $v$ ):

$$F_r = -6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v \quad \text{Gl. 3-4}$$

Die angelegte Trennungsspannung bewirkt nun eine Gleichgewichtseinstellung zwischen den beiden entgegengesetzt wirkenden Kräften:

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v \quad \text{Gl. 3-5}$$

Auflösen nach  $v$  und Einsetzen in Gleichung 3-1 ergibt das Stokes'sche Gesetz, woraus ersichtlich ist, dass die elektrophoretische Mobilität durch den Ladungs-Masse-Quotienten bestimmt wird:

$$\mu_e = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad \text{Gl. 3-6}$$

Dem zufolge haben insbesondere kleine, hochgeladene Teilchen eine hohe Mobilität. Die Wanderungsrichtung hängt von der Ladung ab; Kationen wandern zur Kathode, Anionen zur Anode.

Da die angegebenen Parameter zur Berechnung der Mobilität mittels des Stokes'schen Gesetzes oft nur schwer zu bestimmen sind, lässt sich die effektive Mobilität auch anhand experimenteller Daten gemäß Gleichung 3-7 ermitteln:

$$\mu_{eff} = \frac{L \cdot L_{eff}}{U \cdot t_m} \quad \text{Gl. 3-7}$$

$\mu_{eff}$  = effektive elektrophoretische Mobilität

L = Gesamtlänge der Kapillare

$L_{eff}$  = effektive Kapillarlänge (Länge bis zum Detektionsfenster)

U = angelegte Spannung

$t_m$  = Migrationszeit

### Elektroendosmotischer Fluss

Der elektroendosmotische Fluss (EOF) ist verantwortlich dafür, dass in der Kapillarelektrophorese neben Kationen auch Neutralteilchen und sogar Anionen detektiert werden können, die bei normaler Polung (Anode am Kapillareinlass, Kathode am Kapillarauslass) nicht oder zum Kapillareinlass wandern müssten. Die Silanolgruppen der *fused silica*-Kapillare liegen ab einem pH Wert > 2 partiell im deprotonierten Zustand vor. Diese Deprotonierung führt zu einer negativen Aufladung der Kapillarinnenwand. Das Bestreben zur Herstellung eines Ladungsausgleichs hat die Anlagerung von Kationen und die Bildung einer Ladungsdoppelschicht zur Folge. Die negativen Ladungen werden durch diese fest fixierten Kationen nicht vollständig kompensiert, es lagern sich weitere Kationen an, die eine diffuse Grenzschicht (Sternschicht) bilden.

Beim Anlegen einer Spannung wandern die solvatisierten, beweglichen Kationen der Sternschicht Richtung Kathode und verursachen einen stempelförmigen Fluss der gesamten Pufferlösung zur Kathode (EOF). Dieses flache, stempelförmige Flussprofil stellt wegen der geringen radialen Diffusion einen großen Vorteil gegenüber laminaren Flussprofilen, wie z.B. bei der HPLC üblich, dar.

Die Mobilität des EOF ( $\mu_{EOF}$ ) ist abhängig vom Potential in der Scherebene zwischen der fest fixierten Doppelschicht und der beweglichen Sternschicht (Zetapotential ( $\zeta$ )) sowie der Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ ) und Viskosität ( $\eta$ ) des Puffers:

$$\mu_{EOF} = \frac{\zeta \cdot \epsilon}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad \text{Gl. 3-8}$$

$\mu_{EOF}$  = elektrophoretische Mobilität des EOF

$\zeta$  = Zetapotential

$\epsilon$  = Dielektrizitätskonstante

$\eta$  = Viskosität

Der auftretende EOF überlagert die elektrophoretische Wanderung des Analyten. Die effektive Mobilität eines Analyten ( $\mu_{eff}$ ) ergibt sich aus der vektoriellen Summe von  $\mu_{EOF}$  und  $\mu_e$ :

$$\mu_{eff} = \mu_{EOF} + \mu_e \quad \text{Gl. 3-9}$$

Wie aus der Gleichung ersichtlich, ermöglicht der EOF somit die simultane Analyse von Kationen, Anionen und Neutralteilchen. Neutralteilchen werden allerdings nicht separiert, sondern wandern gemeinsam mit dem EOF. Anionen, die gegen den EOF wandern (Kontramigration) können nur detektiert werden, falls die Mobilität des EOF die Mobilität des Anions übersteigt. Somit werden kleine hochgeladene Kationen als erstes, kleine hochgeladene Anionen als letztes detektiert. Die bei normaler Polung und  $\mu_{EOF} > |\mu_e|$  auftretende Migrationsreihenfolge verschiedener Analyten ist in Abb. 3-4 dargestellt.

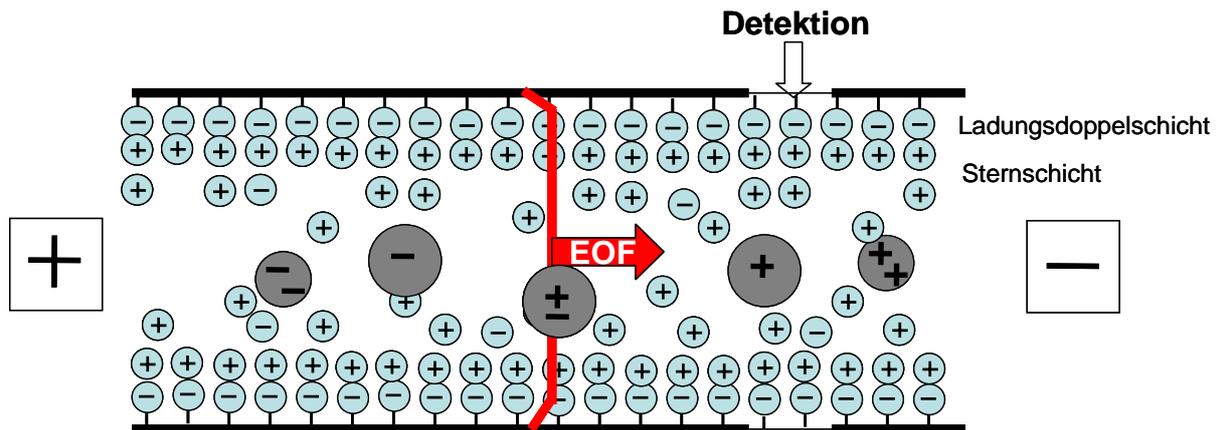


Abb. 3-4: Entstehung des elektroosmotischen Flusses (EOF) in einer fused silica-Kapillare und Migrationsreihenfolge verschiedener Analyten.

Der EOF ist häufig ein entscheidender Faktor bei der Trennung verschiedener Analyten, weshalb seiner Kontrolle eine zentrale Bedeutung beigemessen werden kann. Bei normaler Polung bewirkt eine Erniedrigung des  $\mu_{\text{EOF}}$  eine geringere  $\mu_{\text{eff}}$  der Analyten und somit eine bessere Auflösung. Prinzipiell kann dies durch eine Änderung der Ladungsverhältnisse an der Kapillaroberfläche oder durch eine Veränderung der Pufferviskosität erzielt werden. Eine Übersicht über Beeinflussungsmöglichkeiten des EOF liefert Tab. 3-3.

Tab. 3-3: Möglichkeiten zur Beeinflussung des EOF.

Parameter	Auswirkung auf den EOF	Bemerkungen (Vor- und Nachteile)
Pufferkonzentration (Ionenstärke)	EOF ↓, falls Konzentration ↑	+ Bessere Auflösung, da Zetapotential ↓ – Hohe Konzentrationen = hohe Ströme, stärkere Joule'sche Erwärmung, Veränderung der Peakform möglich
pH-Wert des Laufpuffers	EOF ↓, falls pH ↓	+ Leichte Beeinflussung der Trennung ± Veränderung der Ladung = Veränderung der elektrophoretischen Mobilität
Elektrische Feldstärke (E)	EOF ↑, falls E ↑	+ Höhere elektrische Feldstärke = kürzere Analysenzeiten – geringere Auflösung, stärkere Joule'sche Erwärmung

Parameter	Auswirkung auf den EOF	Bemerkungen (Vor- und Nachteile)
Temperatur	EOF ↓, falls Temperatur ↓	+ Veränderung der Viskosität des Puffers, leicht instrumentell zu steuern – Temperaturkonstanz bei niedrigen Temperaturen schwer zu halten
Organische Lösungsmittel	EOF ↓	+ Veränderung der Viskosität und der Dielektrizitätskonstante des Puffers – Komplexe Analytik
Tenside	EOF ↑ oder ↓ oder Umkehr (je nach Tensid)	+ Lösung verschiedenster Trennprobleme <i>Anionische und neutrale Tenside:</i> zur Erhöhung der Auflösung und Trennung neutraler Analyten (Mizellare elektrokinetische Chromatographie) <i>kationische Tenside:</i> zur EOF Umkehr – Komplexe Analytik
Kapillarbelegungen (Coatings)	EOF ↓ bzw. völlige Ausschaltung des EOF	+ Kapillargelelektrophorese (CGE), reduziert die Adsorption von Proteinen – Trennung von Anionen und Kationen problematisch

Die einfachste und effektivste Modifikation des EOF kann durch Veränderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke des Trennpuffers erreicht werden.

### Aufkonzentrierung der Probe (*electro stacking*)

Das so genannte *electro stacking* ist eine Methode zur Aufkonzentrierung einer Probe, die in der CE-Analytik routinemäßig eingesetzt wird. Die Probe wird in einem Puffer gelöst, der eine geringere Leitfähigkeit als der Trennpuffer besitzt. Da die Feldstärke invers-proportional zur Leitfähigkeit ist, ist diese im Bereich der Probenlösung deutlich erhöht. Die Analyten der Probenlösung werden bis zur Grenzfläche zwischen Lauffläche und Probenlösung beschleunigt und bei Eintritt in den Laufpuffer abgebremst. An der Grenze zum Laufpuffer liegen die Analyten dann aufkonzentriert vor.

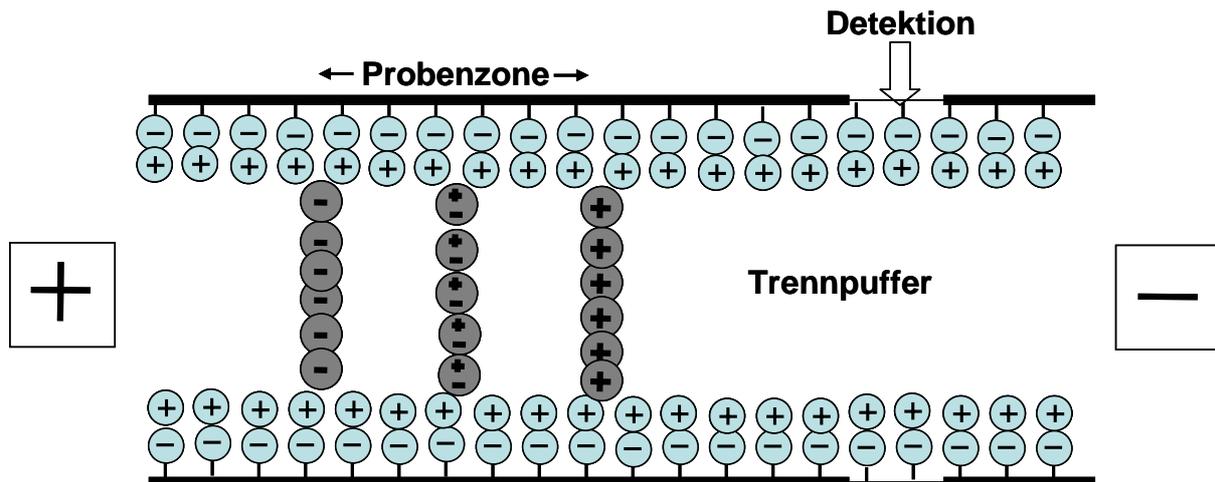


Abb. 3-5: *electro stacking* bei normaler Polung (Kathode detektorseitig). Aufkonzentrierte Banden gegen Ende des stacking; Kationen konzentrieren sich am vorderen Ende der Probzone auf, Anionen am hinteren Ende. Neutrale Teilchen reichern sich in der Mitte der Probzone an.

Die Anwendungsmöglichkeit des *electro stacking* ist begrenzt. Theoretisch sollte das *stacking* umso ausgeprägter sein, je höher der Unterschied der elektrischen Feldstärke ist. Laminare Flüsse, die durch eine Temperaturerhöhung in der Probzone (bedingt durch die hohe Feldstärke) und durch lokal unterschiedliche elektroosmotische Geschwindigkeiten entstehen, wirken der Aufkonzentrierung durch Bandenverbreiterung entgegen. In der Praxis werden gute Aufkonzentrierungseffekte erzielt, wenn die Probe in einem Puffer gelöst wird, dessen Konzentration zehnfach geringer ist als die des Laufpuffers<sup>178</sup>.

### 3.2.2 Methode zur Untersuchung der Platin-Nukleotid-Adduktbildung

Zur Beurteilung der Reaktivität verschiedener Platinkomplexe gegenüber Nukleotiden sowie zur Analyse des Adduktformats wurde eine bestehende Methode von U. Warnke angepasst und optimiert<sup>32,33</sup>.

#### 3.2.2.1 Trennsystem und Detektion

Zur Untersuchung der Platin-Nukleotid-Adduktbildung wurde eine 57 cm lange Kapillare (*fused silica*) mit einem Innendurchmesser von 75  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Analysenlösungen wurden am anodischen Ende hydrodynamisch in die Kapillare einge-

bracht. Hierzu wurde ein Druck von 0,5 psi (= 34,5 mbar) für 5 s angelegt. Das injizierte Volumen ist abhängig von der Temperatur und dem Kapillarinne Durchmesser. Bei einer Temperatur von 19 °C und einem Innendurchmesser von 75 µm werden ca. 23 nL injiziert. Das Probenvolumen betrug somit ca. 1 % des Kapillarvolumens bis zum Detektionsfenster (2209 nL). Zur Trennung der mehrfach negativ geladenen Platin-Nukleotid-Addukte und Nukleotide wurden nur solche Laufpuffer verwendet, die zu einem starken EOF führen. Die angelegte Trennungsspannung betrug 20 kV. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 254 nm.

### 3.2.2.2 Optimierung der Trennung

Eine unzureichende Trennung der Analyten (s. Kapitel 4.1) erforderte eine Optimierung der Methode von U. Warnke. Wie aus Tab. 3-3 ersichtlich, kann eine Optimierung der Trennung in der Kapillarelektrophorese vor allem durch eine Kontrolle des EOF erfolgen. Zusätzliche Möglichkeiten bieten Ladungsveränderungen des Analyten durch Änderungen des pH-Wertes sowie ein micellares Trennsystem.

Ausgehend von einem Trennpuffer bestehend aus Ammoniumacetat 16,2 mM mit einem pH von 9,8 und einer Trennung bei 20 kV und 25 °C wurden folgende Einflussfaktoren systematisch variiert und untersucht:

- Einfluss des pH-Wertes
- Einfluss der Pufferadditiva SDS und Methanol
- Einfluss der Ionenstärke des Trennpuffers
- Einfluss der Temperatur

Die Tab. 3-4 zeigt die im Rahmen der Trennungsoptimierung verwendeten Laufpuffer.

Tab. 3-4: Verwendete Puffersysteme im Rahmen der Methodenoptimierung.

Puffer	Puffersystem	Additive (Konzentration)	Strom [ $\mu\text{A}$ ]
A	0,1 M Borat, pH 9,0	-	54,0
B	0,1 M Borat, pH 9,1	-	53,5
C	0,1 M Borat, pH 9,2	-	64,0
D	0,1 M Borat, pH 9,3	-	70,0
E	0,1 M Borat, pH 10,0	-	116,0
G	0,15 M Borat, pH 9,1	-	78,0
H	0,2 M Borat, pH 9,1	-	103,0
I	0,3 M Borat, pH 9,1	-	143,0
J	0,4 M Borat, pH 9,1	-	186,0
K	0,1 M Borat, pH 9,1	SDS [5 mM]	90,0
L	0,1 M Borat, pH 9,1	SDS [10 mM]	95,0
M	0,1 M Borat, pH 9,1	SDS [15 mM]	97,0
N	0,1 M Borat, pH 9,1	SDS [20 mM]	100,0
O	0,1 M Borat, pH 9,1	Methanol [5 % V/V] SDS [20 mM]	75,0

Zusätzlich wurde zur Verbesserung der Auflösung die Kapillartemperatur von 25 °C schrittweise reduziert und ebenfalls der Effekt auf die Trennung verfolgt. Für diese Versuche wurde der Puffer verwendet, der die beste Auflösung gewährleistete (Puffer J).

### 3.2.2.3 Methodvalidierung

Die weitreichenden Änderungen der Methode und der geplante Einsatz als Routinemessmethode zur Beurteilung der In-vitro-Reaktivität verschiedener Platinkomplexe erforderten eine vollständige Validierung. Verzichtet wurde auf die Untersuchung der Stabilität der eingesetzten Nukleotide (unter Ausnahme der Untersuchung der Stabilität im Autosampler), da diese bereits von U. Warnke gezeigt wurde. Die Validierung der entwickelten Methode folgte den Richtlinien der Food and Drug Administration (Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation)<sup>179</sup>. Zur Auswertung der Validierungsdaten wurde die Software „Method Validation in Analytics“ (MVA<sup>®</sup>), Version 2.0 (Novia GmbH Saarbrücken) benutzt.

### Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Die Bestimmungsgrenze (*lower limit of quantification*, LLOQ) eines Analyseverfahrens ist die Menge eines Analyten, die mit ausreichender Präzision und Richtigkeit quantifiziert werden kann. Für die LLOQ wird hinsichtlich der Präzision ein Variationskoeffizient  $\leq 20\%$ , hinsichtlich der Richtigkeit ein relativer Fehler bis  $20\%$  gefordert<sup>179</sup>.

Die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) ist die geringste Analytmenge, die detektiert, aber nicht exakt quantitativ bestimmt werden kann. Sie wurde basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*) von 3:1 ermittelt.

### Linearität und Arbeitsbereich

Die Linearität der Methode, die den Zusammenhang zwischen Konzentration und gemessenem Signal des Analyten zeigt, wurde mittels linearer Regression bestimmt. Der Arbeitsbereich ergab sich aus den experimentellen Anforderungen. Für jede Kalibrierfunktion wurden jeweils sechs Standards (S) vermessen, die aus den Nukleotidstammlösungen hergestellt wurden (dAMP-SL und dGMP-SL) (s. Tab. 3-5).

Tab. 3-5: Herstellung der Standards für die Kalibrierfunktion (angegeben ist das eingesetzte Volumen in  $\mu\text{l}$ ).

Lösung (Volumen in $\mu\text{l}$ )	S1 [5 $\mu\text{M}$ ]	S2 [10 $\mu\text{M}$ ]	S3 [25 $\mu\text{M}$ ]	S4 [50 $\mu\text{M}$ ]	S5 [100 $\mu\text{M}$ ]	S6 [150 $\mu\text{M}$ ]
dGMP SL [3 mM]	4,2	8,3	20,8	41,7	83,3	125
dAMP SL [3 mM]	4,2	8,3	20,8	41,7	83,3	125
Borat/NaCl [40 mM] pH 7,4	250	250	250	250	250	250
Wasser	2241,7	2233,3	2208,3	2166,7	2083,3	2000,0

Zur Beurteilung der Regression wurden folgende Kriterien herangezogen:

- Korrelationskoeffizient  $r \geq 0,99$
- Abweichung der Residuen  $\leq 15\%$ , am LLOQ  $\leq 20\%$

Unter Residuen werden die prozentualen Abweichungen der experimentellen von den mittels Regressionsgerade berechneten Werten verstanden. Dabei sollten die Konzentrationen nicht mehr als 15 %, im Bereich der Bestimmungsgrenze (LLOQ) 20 % von ihren Nominalwerten abweichen. Gefordert wurde, dass vier von insgesamt sechs Kalibratoren diese Kriterien erfüllten; dazu sollten in jedem Fall die Kalibratoren mit der niedrigsten (LLOQ) und der höchsten (*upper limit of quantification*, ULOQ) Konzentration gehören.

Ferner wurde getestet, ob eine gewichtete lineare Regression ( $1/x$  und  $1/x^2$ ) sowie die Verwendung eines internen Standards zu einer besseren Anpassung führt.

Eine Wichtung empfiehlt sich immer dann, wenn der Arbeitsbereich relativ groß ist (> Faktor 10). Durch die Wichtung wird eine zu starke Beeinflussung der Regression, bedingt durch die relativ größeren Abweichungen der hohen Messwerte, vermieden<sup>180</sup>.

### **Präzision und Richtigkeit**

*Präzision* und *Richtigkeit* sind die entscheidenden Kriterien zur Beurteilung der Qualität einer analytischen Methode.

Zur Ermittlung der Präzision und Richtigkeit wurden Lösungen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen der Nukleotide hergestellt, die den gesamten Arbeitsbereich abdeckten (niedrige, mittlere und hohe Konzentration). Diese Qualitätskontrollproben (QC-Proben) wurden unabhängig von den Standards für die Kalibrierung aus separat hergestellten Stammlösungen (dAMP-SL/dGMP-SL) durch entsprechende Verdünnung mit NaCl haltigem Phosphatpuffer (pH 7,4, 4 mM NaCl = Reaktionspuffer) und Purelab Plus<sup>®</sup>-Wasser hergestellt und nach Aliquotierung bei -20 °C gelagert.

Die *Präzision* ist ein Maß für die Übereinstimmung (Streuung) der Messergebnisse bei wiederholter Bestimmung einer Probe und gibt somit Hinweise auf zufällige Fehler. Die statistische Größe der Präzision ist die relative Standardabweichung (RSD), oder synonym der Variationskoeffizient (VK), der wie folgt berechnet wird:

$$VK = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} \cdot 100 \text{ [\%]} \quad \text{Gl. 3-10}$$

$VK$	=	Variationskoeffizient
$\bar{x}$	=	Mittelwert aus n Einzelmessungen
$x_i$	=	Einzelmesswert
$n$	=	Anzahl der Messungen

Die relative Standardabweichung sollte 15 % nicht übersteigen; im Bereich der Bestimmungsgrenze wurden bis zu 20 % toleriert.

Die *Richtigkeit* einer analytischen Methode beschreibt die Übereinstimmung einer gemessenen Konzentration ( $C_{gem}$ ) mit der nominalen oder als richtig akzeptierten Konzentration ( $C_{nom}$ ). Die Richtigkeit gibt einen Hinweis auf systematische Fehler. Als Maß für die Abweichung dient der prozentuale relative Fehler (*relative error*, RE), der wie folgt berechnet wird:

$$RE = \frac{(C_{gem} - C_{nom}) \cdot 100}{C_{nom}} \text{ [\%]} \quad \text{Gl. 3-11}$$

$RE$	=	Relativer Fehler
$C_{gem}$	=	Gemessene Konzentration
$C_{nom}$	=	Nominalkonzentration

Die Richtigkeit lässt sich folglich nach folgender Gleichung bestimmen:

$$\text{Richtigkeit} = RE + 100 \text{ [\%]} \quad \text{Gl. 3-12}$$

Der relative Fehler des Mittelwerts sollte 15 % (bzw. 20 % im Bereich der Bestimmungsgrenze) nicht überschreiten.

Im Rahmen der Validierung wurden die Wiederholpräzision, Methodenpräzision, Vergleichspräzision und Richtigkeit ermittelt:

- Zur Bestimmung der Wiederholpräzision (Präzision des analytischen Systems) wurde eine stabile Probe fünfmal unter denselben Operationsbedingungen innerhalb eines kurzen Zeitraums analysiert.
- Für die Bestimmung der Methodenpräzision (*Within-day-Präzision*) wurden drei QC-Proben mit unterschiedlicher Konzentration fünfmal jeweils unabhängig voneinander hergestellt und vermessen. Die Methodenpräzision beschreibt die Variabilität, die durch alle Schritte der Methode verursacht wird.
- Zur Bestimmung der Präzision über einen längeren Zeitraum (Vergleichspräzision, *Between-day-Präzision*) wurden drei QC-Proben unterschiedlicher Konzentration an fünf aufeinander folgenden Tagen vermessen. Die Vergleichspräzision dient dazu, zufällige Fehler, die z.B. durch den Faktor Zeit, verschiedene Bearbeiter und Reagenzien entstehen, abzuschätzen.
- Die Richtigkeit wurde mittels der über die Kalibrierfunktion errechneten Konzentration der eingesetzten Qualitätskontrollproben sowohl an einem Tag (*Within-day-Richtigkeit*) als auch an fünf aufeinander folgenden Tagen (*Between-day-Richtigkeit*) bestimmt.

### **Stabilität im Autosampler**

Auf eine Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen wurde im Allgemeinen verzichtet, da die Einfrier-Auftau- und Langzeitstabilität der Nukleotide durch U. Warnke hinreichend belegt wurde<sup>32</sup>. Die Stabilität der Nukleotide im Autosampler war mit der Methode von U. Warnke für die geplanten Experimente nicht ausreichend, die Proben konnten nicht länger als sechs Stunden im Autosampler verbleiben. Die durchgeführten Veränderungen der Methode (vgl. Kapitel 4.1.1) ermöglichten eine längere Verweildauer der Proben im Autosampler, die durch eine erneute Stabilitätsuntersuchung festgelegt werden sollte. Weiterhin musste untersucht werden, in welchem Ausmaß die Reaktion von Platinkomplexen und Nukleotiden im Autosampler erfolgt und Einfluss auf die Konzentration der Nukleotide hat. Dieser Aspekt wurde bei der Validierung durch U. Warnke nicht berücksichtigt. Zur Untersuchung der Stabilität im Autosampler wurde die Konzentration der Nukleotide über zwölf Stunden ohne Platinkomplex (zur Kalibrierung) sowie über 6 Stunden in Anwesenheit von Oxaliplatin vermessen. Auf Untersuchungen mit Cisplatin wurde

verzichtet, da die Reaktivität dieses Platinkomplexes so hoch ist, dass die Analyse von Proben, die Cisplatin enthielten, grundsätzlich direkt erfolgte.

### 3.2.2.4 Anwendung der Methode

#### Identifizierung der Addukte

Jeweils 500  $\mu\text{M}$  der albuminbindenden Platinkomplexe wurden mit 500  $\mu\text{M}$  dAMP und 500  $\mu\text{M}$  dGMP inkubiert (4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 4 mM NaCl, pH 7.4, 37 °C) und nach 24 Stunden analysiert. Da aufgrund der strukturellen Voraussetzungen die albuminbindenden Platinkomplexe die gleichen Addukte bilden sollten wie Cisplatin bzw. Oxaliplatin (s. Kap. 5.2) wurden diese beiden Platinkomplexe separat mit dAMP und dGMP inkubiert. Dadurch wurden die bekannten und durch U. Warnke identifizierten<sup>32,33</sup> Addukte erzeugt, die anschließend zur Identifikation der Addukte der albuminbindenden Platinkomplexe koinjiziert wurden.

#### Quantifizierung der Reaktivität

Jeweils 150  $\mu\text{M}$  der Platinkomplexe wurden unter annähernd physiologischen Bedingungen mit 150  $\mu\text{M}$  dAMP und 150  $\mu\text{M}$  dGMP inkubiert (4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 4 mM NaCl, pH 7,4, 37 °C). Nach jeweils 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurden Proben entnommen und untersucht. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt.

#### Kalibrierung

Vor jeder Messserie wurde eine Kalibrierung (s. Kap. 3.2.2.3) durchgeführt. Zur Verbesserung der Präzision wurden zu 100  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Lösungen 4  $\mu\text{l}$  TMP [3 mM] als interner Standard zugefügt. Die Kalibrierung wurde akzeptiert, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Abweichung der Residuen  $\leq 15 \%$ , am LLOQ:  $\leq 20 \%$   
Mindestens vier von sechs Standards, inklusive des LLOQ- und des ULOQ-Standards mussten vorangehende Kriterien erfüllen.
- Korrelationskoeffizient  $r \geq 0,99$  (lineare Regression, gewichtet  $1/x^2$ )

### **Qualitätssicherung während der Messung**

Zur Qualitätssicherung der Probenmessung dienten die Qualitätskontrollproben (QC-Proben), die auch im Rahmen der Validierung verwendet wurden (s. Kap. 3.2.2.3). Es wurde gefordert, dass mindestens 67 % der berechneten Konzentrationen innerhalb von  $\pm 15$  % des nominalen Wertes liegen und dass mindestens 5 % der Proben einer Messreihe aus QC-Proben bestehen.

## **3.2.3 Methode zur Untersuchung der Albuminbindung**

### **3.2.3.1 Trennsystem und Detektion**

Zur Untersuchung der Albuminbindungskinetik wurde eine 37 cm lange Kapillare (*fused silica*) mit einem Innendurchmesser von 75  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Injektion erfolgte analog der Methode zur Bestimmung der Platin-Nukleotid-Adduktbildung hydrodynamisch. Die angelegte Trennungsspannung betrug 20 kV. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 214 nm. Der verwendete Trennpuffer sollte einen physiologischen pH-Wert besitzen, um Bindungseigenschaften nicht zu beeinflussen.

### **3.2.3.2 Optimierung der Trennung**

Eine ausreichende Trennung gelang auf Antrieb mit einem Trennpuffer bestehend aus 0,02 M Phosphat (pH 7,4) bei 7 kV und 25 °C.

### **3.2.3.3 Methodvalidierung**

Da diese Methode nicht in der Routine eingesetzt und keine absoluten quantitativen Aussagen gemacht werden sollten, wurde eine komplette Validierung für nicht notwendig erachtet. Es wurde als ausreichend befunden, den linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Signal der Analyten zu belegen. Bei den Stabilitätsuntersuchungen wurden die Proben im direkten Vergleich gemessen und die Signale gegenübergestellt.

### Linearität

Die Linearität wurde analog Kap. 3.2.2.3 bestimmt. Eine Übersicht über die Konzentrationen der eingesetzten Standards gibt Tab. 3-6. Die verwendete Arbeitslösung wurde unmittelbar vor Verwendung durch Verdünnung der Stammlösung mit Wasser hergestellt.

Tab. 3-6: Herstellung der Standards für die Kalibrierung.

Lösung (Volumen in $\mu\text{l}$ )	S1 [5 $\mu\text{M}$ ]	S2 [20 $\mu\text{M}$ ]	S3 [50 $\mu\text{M}$ ]	S4 [100 $\mu\text{M}$ ]	S5 [150 $\mu\text{M}$ ]
PL04/07-SL [2 mM]			5	10	15
PL04/07-AL [0,2 mM]	5	20			
Wasser	195	180	195	190	185

### Stabilitätsuntersuchungen

Bei den durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen wurde von den Richtlinien der FDA abgewichen. Die FDA fordert jeweils den Vergleich mit einer frisch hergestellten Probe. Der hierzu notwendige Substanzbedarf ist beträchtlich, sodass alternativ wie folgt verfahren wurde: Die hergestellte Stammlösung der Platinkomplexe wurde aliquotiert und nach dem ersten Einfrier-Auftau-Vorgang mit frisch hergestellter Probe verglichen, womit die Stabilität nach einem Einfrier-Auftau-Vorgang gezeigt werden konnte. Für die folgenden Untersuchungen wurde als Referenz jeweils ein noch nicht verwendetes Aliquot aufgetaut.

Folgende Aspekte wurden untersucht:

- Der Einfluss mehrerer Einfrier-Auftau-Vorgänge auf die Stabilität der albuminbindenden Platinkomplexe in der Stammlösung („Einfrier-Auftau-Stabilität“)
- Die Stabilität der Platinkomplexe im Reaktionsansatz zur Bindung an Albumin (pH 7,4, 37°C)
- Die Stabilität der Platinkomplexe in der Stammlösung, gelagert im Kühlschrank

- Die Stabilität der Platinkomplexe in der Stammlösung, gelagert bei Raumtemperatur

Zur Berechnung der Stabilität wurden jeweils die korrigierten Peakflächen (KPF) der Platinkomplexe zugrunde gelegt:

$$\text{Stabilität} = \frac{KPF_{\text{Pro}}}{KPF_{\text{Ref}}} \cdot 100 [\%] \quad \text{Gl 3-13}$$

$KPF_{\text{Pro}}$  = korrigierte Peakfläche der Probe

$KPF_{\text{Ref}}$  = korrigierte Peakfläche der Referenz

### 3.2.3.4 Anwendung der Methode

#### Untersuchung der Bindungskinetik

150  $\mu\text{M}$  Lösungen von PL04 bzw. PL07 wurden mit einer 600  $\mu\text{M}$  Albuminlösung unter annähernd physiologischen Bedingungen inkubiert (4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 4 mM NaCl, pH 7.4, 37 °C). Nach jeweils 2, 5, 10, 15, 20 und 25 Minuten wurden Proben entnommen und auf ungebundene Substanz untersucht. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt.

#### Untersuchung der Bindungsspezifität

Zur Untersuchung der Spezifität der Albuminbindung wurde ein Inhibitionsversuch mit EMC-blockiertem Albumin durchgeführt (EMC = 6-Maleinimidocaprinsäure, Abb. 3-6). Hierzu erfolgte eine 10-minütige Vorinkubation von 1,2 mM Albumin mit einem Überschuss an EMC [2,0 mM]. Nach Vorinkubation mit diesem Maleinimid-Derivat sollten alle Sulfhydrylgruppen des Albumins mit dieser Substanz reagiert haben (vgl. Abb. 1-20) und somit eine Bindung der Platinkomplexe an das Albumin verhindert werden.

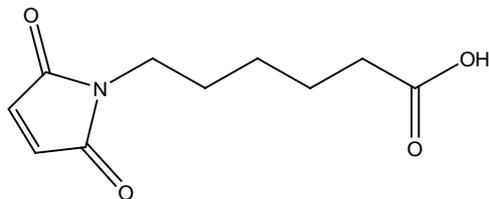


Abb. 3-6: Chemische Struktur von 6-Maleinimidocaprinsäure (EMC).

Danach wurden 600  $\mu\text{M}$  der EMC-Albuminlösung mit 150  $\mu\text{M}$  Lösungen von PL04 bzw. PL07 über 10 Minuten umgesetzt (4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 4 mM NaCl, pH 7,4, 37 °C). Jeder Inhibitionsversuch wurde dreimal durchgeführt.

### 3.3 AAS-Analytik

Die Quantifizierung der Platinkonzentration im Rahmen der Zellkultur und Mikrodialysekammerversuche wurde mittels einer flammenlosen Atomabsorptionsspektrometrie-Methode mit Graphitrohrfentechnik (GF-AAS) durchgeführt. Bei einem Experiment, bei dem die Empfindlichkeit dieser Methode nicht ausreichte, wurden die Proben mittels adsorptiver Voltammetrie (AV) analysiert<sup>181</sup>. Die AAS-Technik ist aufgrund ihrer Spezifität, vergleichsweise geringer Kosten, kurzer Analysenzeiten und für die meisten bioanalytischen Fragestellungen ausreichend niedriger Bestimmungsgrenzen die Methode der Wahl zur Quantifizierung von Platinspezies. In dieser Arbeit wurde eine, ursprünglich von Kloft et al entwickelte<sup>182</sup> und von Pieck modifizierte, validierte Methode angewandt<sup>183</sup>. Da die Validierung mit dem auch in dieser Arbeit verwendeten Gerät erfolgte, war eine neuerliche Validierung bzw. Teilvalidierung nicht erforderlich.

#### 3.3.1 Grundlagen der Atomabsorptionsspektrometrie

Bei der Atomabsorptionsspektrometrie handelt es sich um ein spektralanalytisches Verfahren, mit dem sowohl der qualitative Nachweis als auch die quantitative Bestimmung von Metallatomen, wie z.B. Platin, durchgeführt werden kann. Bei dieser Methode werden Metallatome in den gasförmigen Zustand überführt. Hier liegen sie im energetischen Grundzustand vor, in dem sie in der Lage sind, bestimmte Energiebeiträge in Form von Licht einer bestimmten, metallcharakteristischen Wellenlänge aufzunehmen und nach einer kurzen Anregungszeit wieder zu emittieren. Der grundsätzliche Aufbau ist in Abb. 3-7 schematisch dargestellt.

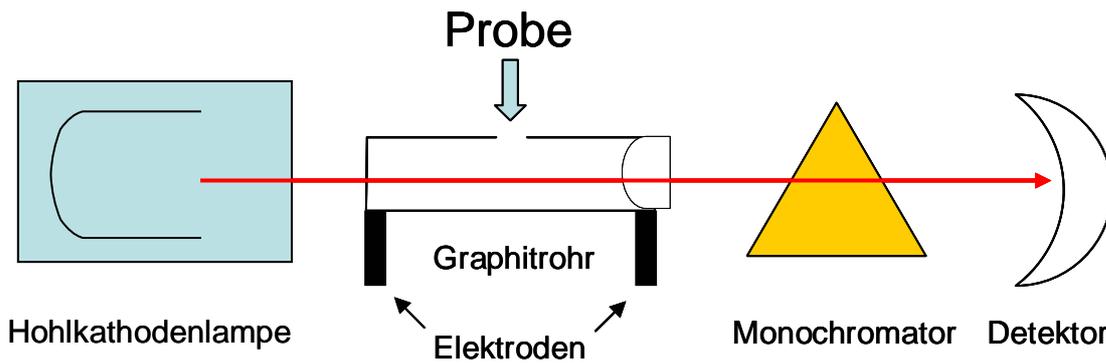


Abb. 3-7: Aufbau eines Atomabsorptionsspektrometrie-Systems mit Graphitrohrfentechnik.

Metallatome absorbieren im Grundzustand eingestrahktes Licht derselben Wellenlänge, wie das Licht, das von den so angeregten Metallatomen bei ihrer Rückkehr in den Grundzustand wieder abgegeben wird. Daher wird zur Anregung die von einer Hohlkathodenlampe des zu analysierenden Elements erzeugte Emissionswellenlänge eingesetzt. Der Zusammenhang zwischen der Absorption des Lichts durch die Metallatome der Probe und deren Konzentration wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben, wonach die Abnahme der Lichtintensität durch Absorption der Konzentration der zu bestimmenden Substanz proportional ist.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = k \cdot d \cdot c \quad \text{Gl. 3-14}$$

- A = Absorption
- $I_0$  = Lichtintensität des eingestrahkten Lichtes
- I = Lichtintensität nach Durchgang durch die Probe
- k = Absorptionskoeffizient
- d = Schichtdicke
- c = Konzentration in der Probe

Da dieser Zusammenhang nur für Messungen im linearen Bereich und bei definierter Schichtdicke – die bei der AAS-Technik der Länge der Atomwolke entspricht und somit kaum zu realisieren ist – gilt, werden zur Quantifizierung grundsätzlich die Kalibrierfunktionsmethode oder das Standardadditionsverfahren eingesetzt.

## Lichtquelle

Als Lichtquelle wurde eine UltrAA®-Lampe (s. Abb. 3-8) verwendet, die neben dem in allen Hohlkathodenlampen vorhandenen Elektrodenpaar aus Hohlkathode plus zugehöriger Anode ein weiteres Elektrodenpaar enthielt. Mit Hilfe dieser so genannten „Boost“-Elektroden wird die Eigenabsorption der in der Hohlkathode entstehenden Platin-Atome vermindert. Dadurch resultierten eine höhere Intensität des emittierten Lichts und gleichzeitig ein geringeres Grundrauschen. Auf dieser Weise werden Bestimmungen im unteren Konzentrationsbereich erleichtert. Die Messwellenlänge beträgt bei der Platinbestimmung 265,9 nm. Die Lampe wird mit einem Lampenstrom von 10 mA betrieben.

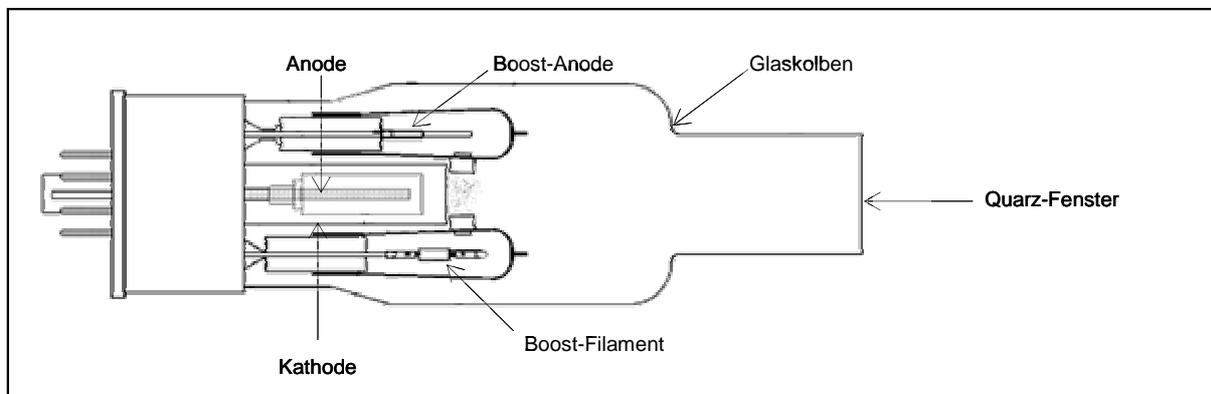


Abb. 3-8: Aufbau der UltrAA®-Lampe.

## Graphitrohrofentechnik

Für die Erzeugung von Platinatomen im energetischen Grundzustand wurde in dieser Arbeit die Graphitrohrofentechnik (GF-AAS), die 1961 von L'vov entwickelt wurde, verwendet<sup>184</sup>. Dabei wird die Probe in ein elektrisch beheizbares Graphitrohr injiziert und dieses durch Anlegen hoher Stromstärken nach einem bestimmten Temperaturprogramm aufgeheizt. Vorteilhaft gegenüber der älteren Flammentechnik ist die deutlich niedrigere Bestimmungsgrenze, die dadurch erreicht wird, dass die Metallionen in der Probe nahezu quantitativ atomisiert werden und die Atome für einen längeren Zeitraum im Strahlengang verweilen.

### **Aufkonzentrierung durch Mehrfachinjektion**

Eine gängige Möglichkeit, die Empfindlichkeit der AAS weiter zu erhöhen ist die Mehrfachinjektion einer Probe. Dabei wird eine Probe mehrfach injiziert und nach jeder Probenaufgabe vorverascht. Anschließend wird die Veraschung und Atomisierung durchgeführt. Aufgrund steigender Matrixbelastung sollten nicht mehr als drei Injektionsschritte durchgeführt werden.

### **Untergrundkorrektur**

Emissionslinien von Atomen können unter den Einfluss eines Magnetfeldes aufgespalten werden, wohingegen der Untergrund keine Aufspaltung aufweist. Dieses von P. Zeeman entdeckte Phänomen kann zur Korrektur der Untergrundabsorption, die durch Streuung an Partikeln und Absorption durch organische Moleküle verursacht wird, ausgenutzt werden<sup>185</sup>. Sämtliche Messungen werden sowohl bei eingeschaltetem (0,8 Tesla) als auch bei abgeschaltetem Magnetfeld durchgeführt; zwischen diesen beiden Zuständen liegen wenige Millisekunden. Bei abgeschaltetem Magnetfeld werden die Absorptionen des Elements und die des Hintergrunds gemessen, bei eingeschaltetem Magnetfeld nur die Absorption des Hintergrunds, da die Elementlinie durch das angelegte Magnetfeld verschoben wird. Die Differenz aus diesen beiden Messungen ergibt dann die Intensität des Elementsignals.

## **3.3.2 Methode zur Platinbestimmung**

### **Temperaturprogramm**

Zur Atomisierung eines Metalls mittels der Graphitrohrofentechnik ist ein spezielles, auf das Metall abgestimmtes, Temperaturprogramm notwendig (s. Tab. 3-7). Ein Temperaturprogramm durchläuft fünf Phasen und kann aufgeteilt werden in Trocknung, Vorveraschung, Veraschung, Atomisierung und Reinigung. Die Trocknung dient der Verdampfung des Lösungsmittels der Probe und sollte möglichst lange und mit langsamem Temperaturanstieg erfolgen, um Siedeverzüge zu vermeiden. In der Vorveraschungs- und Veraschungsphase werden Matrixbestandteile, wie zum Beispiel Proteine, entfernt. Es schließt sich die Atomisierungsphase an, in der das Metall in die Gasphase und damit in den atomaren Zustand überführt wird. Während der Atomisierungsphase findet die Signalaufzeichnung statt. In der abschließenden Rei-

nigungsphase werden mögliche Probenreste entfernt und der Graphitrohrföfen gekühlt. Das Graphitrohr wird während der Messung kontinuierlich mit Argon durchströmt. Argon als Inertgas verhindert die Selbstentzündung des Graphitrohrs und unterstützt den Trocknungs- und Veraschungsprozess. Dieser Argonstrom wird nur während der Atomisierungsphase unterbrochen, um Störungen während der Signalaufnahme zu vermeiden.

Tab. 3-7: Temperaturprogramm der GF-AAS zur Platinbestimmung.

Schritt	Phase	Temperatur [°C]	Dauer* [s]	Argonstrom [l/min]	Signalaufnahme
1	Trocknung	95	5	3	nein
2		110	60	3	nein
3		120	10	3	nein
4	Vorveraschung	650	15	3	nein
5		650	20	3	nein
6	Veraschung	1300	10	3	nein
7		1300	4	3	nein
8		1300	2	0	nein
9	Atomisierung	2700	0,7	0	ja
10		2700	2	0	ja
11		2700	2	3	nein

\*Unter "Dauer" wurden die Zeitspannen angegeben, nach deren Ablauf die zugehörige Temperatur erreicht war. Wiederholung einer Temperaturstufe (z.B. 650 °C) bedeutet, dass diese Temperatur für die angegebene Dauer gehalten wurde.

### Probenaufarbeitung

Das Eluat, welches aus der DNA-Isolierung (s. Kap 3.7) gewonnen wurde, konnte direkt oder mit Wasser verdünnt verwendet werden. Die Probenaufarbeitung zur Bestimmung intrazellulärer Platinkonzentrationen erfolgte analog zu der Methode von Kloft et al. durch Aufarbeitung mit konzentrierter Salpetersäure und anschließender Verdünnung mit Wasser<sup>182</sup>. Die Proben wurden in zwei Schritten aufgearbeitet. Zunächst wurde mit 150 µl konzentrierter Salpetersäure versetzt und die Zellen auf dem Wasserbad lysiert, bis eine klare Lösung entstand. Je nach Zellzahl und erwarteter Platinkonzentration wurde das Lysat durch Verdünnung mit Purelab Plus®-Wasser in den Kalibrierbereich gebracht. Proben, bei denen diese (abgeschätzte) Verdünnung nicht ausreichte und deren Konzentrationen somit oberhalb des Kalibrierbe-

reichs lagen, wurden durch den Autosampler des Geräts während der Messung eigenständig mit Wasser verdünnt. Wenn nach Verdünnung im Verhältnis 1:10 die Probenkonzentration nicht innerhalb des Kalibrierbereichs lag, wurde die Probe erneut mit entsprechend höherem Verdünnungsfaktor aufgearbeitet und vermessen.

### Kalibrierung

Für die Bestimmung der Platinkonzentrationen wurde vor jeder Messung eine Kalibrierung durchgeführt. Dabei entschied die erwartete Platinmenge über den verwendeten Kalibrierbereich von 1-10 ng/ml Platin (Dreifachinjektion) oder 5-50 ng/ml (Einfachinjektion).

AL-1 [10 µg/ml] bzw. AL-2 [1 µg/ml] und Purelab Plus®-Wasser wurden für die Herstellung des am höchsten konzentrierten Standards des jeweiligen Kalibrierbereichs gemischt, sodass Lösungen mit einer Konzentration von 10 ng/ml Platin (Standard A, Dreifachinjektion) bzw. 50 ng/ml (Standard B, Einfachinjektion) entstanden. Die übrigen Standards zur Kalibrierung wurden aus Purelab Plus®-Wasser und dem höchsten Standard durch den Autosampler des Geräts (Tab. 3-8) hergestellt.

Tab. 3-8: Herstellung der Kalibratoren durch den Autosampler für die Kalibrierbereiche von 1,0 - 10,0 ng/ml (A) und von 5,0 – 50,0 ng/ml (B).

	Platin [ng/ml]	Standard A [µl]	Wasser [µl]	Platin [ng/ml]	Standard B [µl]	Wasser [µl]
Kalibrator	A	A	A	B	B	B
1	1	2	18	5	2	18
2	2	4	16	10	4	16
3	3	6	14	20	8	12
4	4	8	12	30	12	8
5	5	10	10	40	16	4
6	7,5	15	5	50	20	0
7	10	20	0	–	–	–

Das Injektionsvolumen betrug sowohl für die Standards als auch für die Proben immer 20 µl. Die Kalibratorreihen wurden mittels GF-AAS analysiert. Dabei wurde das Absorptionssignal über die Peakhöhe ausgewertet. Aus den bei der Mehrfachbestimmung erhaltenen Mittelwerten wurde mittels linearer Regression eine Kalibriergerade erstellt, die dann zur Berechnung der Platinkonzentrationen der vermessenen Proben diente. Eine Wichtung der Kalibriergeraden fand nicht statt.

### **Qualitätssicherung während der Messung**

Zur Qualitätssicherung der Probenmessung dienten Qualitätskontrollproben (QC-Proben) in drei Konzentrationen, die den gesamten Arbeitsbereich abdeckten (niedrige, mittlere und hohe Konzentration). Diese Qualitätskontrollproben wurden unabhängig von den Standards für die Kalibrierung aus der AL-1 durch Mischen mit Purelab Plus®-Wasser hergestellt und in Aliquoten bei -20 °C eingefroren. Es wurde gefordert, dass mindestens 67 % der berechneten Konzentrationen innerhalb von  $\pm 15$  % des nominalen Wertes liegen und dass mindestens 5 % der Proben einer Messreihe aus QC-Proben bestehen. Dadurch wurden die Messungen hinsichtlich ihrer Richtigkeit und Präzision überprüft. Um eine korrekte Messung zu gewährleisten, erfolgte nach 50 Proben eine Rekalibrierung. Jeder Kalibrator und jede Probe wurden im PROMT (*precision optimized measurement time*)-Modus vermessen, d.h. es wurden mindestens zwei Injektionen durchgeführt. Bei einer Abweichung der Messsignale um mehr als 5 % folgten eine dritte Bestimmung und ggf. noch eine vierte Messung. Lag die Standardabweichung dann nicht unter 15 % bzw. im Bereich der Bestimmungsgrenze unter 20 %, wurde die entsprechende Probe im folgenden Analysenlauf erneut vermessen.

### 3.4 Gleichgewichtsmikrodialysekammer

#### 3.4.1 Modellbeschreibung

Eine Mikrodialysekammer besteht aus einem Kunststoff-Röhrchen, das durch eine semipermeable Membran aus Cellulose in zwei Kammern mit einem Füllvolumen von 100  $\mu\text{l}$  unterteilt wird. Die Membran weist einen *Cut-off* von 5 kDa auf, d.h. Makromoleküle mit einer molaren Masse von über 5 kDa werden zurückgehalten, wohingegen alle kleineren Moleküle ungehindert passieren können. Durch diese Trennung in zwei Bereiche ermöglicht die Mikrodialysekammer eine In-vitro-Überprüfung postulierter Aktivierungsmechanismen makromolekularer Prodrugs (Abb. 3-9). Mit diesem System lassen sich verschiedene Bedingungen – z.B. unterschiedliche pH-Werte oder eine enzymatische Aktivierung – simulieren.

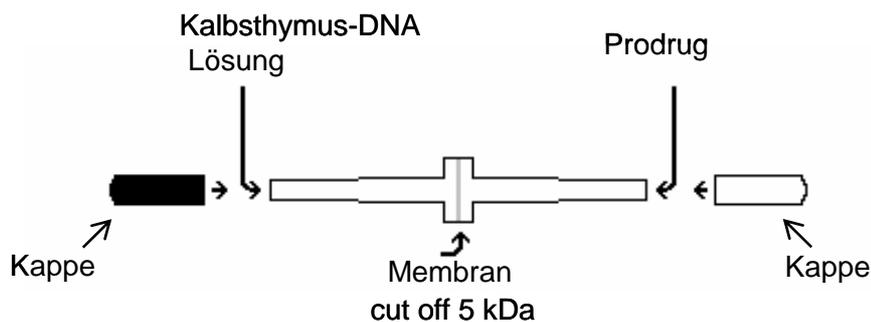


Abb. 3-9: Aufbau der Gleichgewichtsmikrodialysekammer.

Zur Überprüfung der Aktivierung makromolekularer Platinkomplexe wurden die Trennung in zwei Bereiche zur modellhaften Simulation von zwei Kompartimenten – interstitielle und intrazelluläre Flüssigkeit eines Tumors – ausgenutzt. Ausgehend von der Annahme, dass der reaktive Molekülteil aus dem makromolekularen Platinkomplex durch Hydrolyse freigesetzt wird, sollte dieses niedermolekulare Molekül durch die semipermeable Membran diffundieren und in die angrenzende Kammer gelangen. In diese Kammer wurde eine Kalbsthymus-DNA-Lösung gefüllt und der DNA-Platinierungsgrad als Parameter für die Reaktivität der Platinkomplexe nach Isolation der DNA mittels flammenloser Graphitrohratomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) bestimmt.

### 3.4.2 Vorversuche zur Einstellung des pH-Wertes

Albumin ist als Protein aus diversen Aminosäuren aufgebaut, deren saure und basische funktionelle Gruppen in ihrer Gesamtheit einen stark puffernden Effekt ausüben. Die damit verbundene Verschiebung des Gesamt-pH-Wertes des Puffers musste durch Zusatz von Natronlauge oder Phosphorsäure ausgeglichen werden. Zur Bestimmung der dazu notwendigen Menge wurde in einem Vorversuch Albuminlösung zu bereits eingestelltem Puffer gegeben und mit NaOH oder Phosphorsäure potentiometrisch bis zum gewünschten pH-Wert titriert. Die Elektrolytkonzentrationen des Puffers sollten aus Gründen der Vergleichbarkeit – die Einflüsse auf die Reaktivität diverser Platinkomplexe wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben<sup>23,24</sup> – und der physiologischen Ähnlichkeit mit der interstitiellen Flüssigkeit konstant gehalten werden. Die zur pH-Wert Einstellung eingesetzte Stoffmenge an Phosphat wurde deshalb bei der Einwaage an  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  zur Herstellung der Pufferlösungen berücksichtigt.

### 3.4.3 Untersuchung der Aktivierung durch unspezifische und saure Hydrolyse

Zunächst wurden die benötigten Lösungen für das simulierte interstitielle und das simulierte intrazelluläre Kompartiment separat, wie aus Tab. 3-9 und Tab. 3-10 ersichtlich, hergestellt, wobei aufgrund eines möglichen Einflusses unterschiedlicher Elektrolytkonzentrationen eine einheitliche Elektrolytkonzentration für alle Versuche eingestellt wurde (Abb. 3-10).

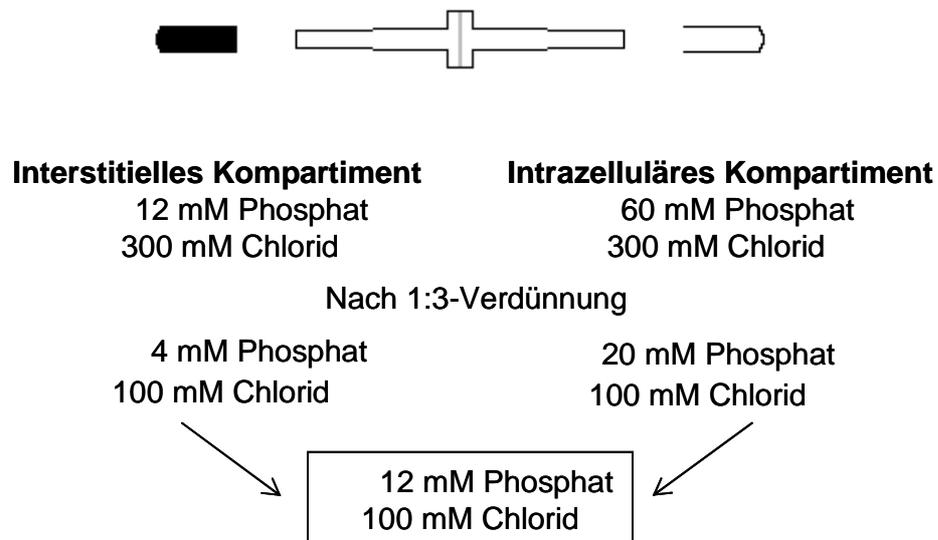


Abb. 3-10: Beispiel der Einstellung einer einheitlichen Elektrolytkonzentration bei pH 7,4.

Die Lösungen, welche Albumin enthielten, wurden 30 Minuten bei 37 °C vorinkubiert, um eine Bindung des Zytostatikums zu ermöglichen, bevor die Einstellung des gewünschten pH-Werts durch Zugabe von NaOH oder Phosphorsäure erfolgte. Anschließend wurden beide Seiten der Kammer befüllt. Die Gleichgewichtsmikrodialysekammern wurden bei 37 °C (12 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 5,0-7,4) in einem Schüttelinkubator inkubiert und die DNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit einem Qiagen<sup>®</sup> DNA Mini Kit isoliert (s. Kap. 3.7). Der Gehalt an DNA wurde durch ein UV-photometrisches Verfahren bestimmt und die daran gebundene Platinmenge mittels flammenlosen Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) quantifiziert (s. Kap. 3.3.2). Die Reaktivität der Albumin-Platinkomplexe wurde mit der Reaktivität der ungebundenen Komplexe, mit der Reaktivität von Carboplatin in Anwesenheit von Albumin und mit einem PEG-Platinkomplex (hier nur bei pH 7,4) verglichen.

Tab. 3-9: Pipettierschemata zur Herstellung verschiedener Lösungen für die Mikro dialysekammern ohne Inkubation mit Albumin (angegeben ist das eingesetzte Volumen in  $\mu\text{l}$ ).

Ohne Albumin	Simuliertes interstitielles Kompartiment			Simuliertes intrazelluläres Kompartiment			
	Lösung	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,4	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,4
Puffer pH 7,4 (60/300)							33
Puffer pH 7,4 (12/300)				33			
Puffer pH 6,0 (60/300)						33	
Puffer pH 6,0 (12/300)			33				
Puffer pH 5,0 (60/300)					33		
Puffer pH 5,0 (12/300)	33						
DNA SL					20	20	20
Platinkomplex	7,5	7,5	7,5				
Wasser	59,5	59,5	59,5	47	47	47	

Tab. 3-10: Pipettierschemata zur Herstellung verschiedener Lösungen für die Mikro dialysekammern mit Inkubation von Albumin (angegeben ist das eingesetzte Volumen in  $\mu\text{l}$ ).

Mit Albumin	Simuliertes interstitielles Kompartiment			Simuliertes intrazelluläres Kompartiment			
	Lösung	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,4	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,4
Puffer pH 7,4 (60/300)							33
Puffer pH 7,4 (12/300)				33			
Puffer pH 6,0 (44,1/300)						33	
Puffer pH 6,0 (12/300)			33				
Puffer pH 5,0 (23,7/300)					33		
Puffer pH 5,0 (12/300)	33						
DNA SL					20	20	20
Platinkomplex	7,5	7,5	7,5				
Wasser	21,3	25,9	27,6	47	47	47	
Albumin SL	30	30	30				
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> [0,85 %]	8,2	3,6					
NaOH [0,1 M]				1,9			

### 3.4.4 Untersuchung der Aktivierung durch Butyrylcholinesterase

Butyrylcholinesterase ist ein im Blut und in anderen Geweben vorkommendes, unspezifisches Enzym, das in der Lage ist, neben seinem eigentlichen Substrat Butyrylcholin auch andere Ester zu spalten. Butyrylcholinesterase weist z.B. gegenüber der spezifischeren Acetylcholinesterase ein größeres aktives Zentrum auf, das auch für andere Substrate zugänglich ist<sup>186</sup>.

#### Bestimmung der Esteraseaktivität (Ellman-Assay)

Die eingesetzte Enzymmenge sollte sich an der physiologischen Butyrylcholinesteraseaktivität orientieren. Der Referenzbereich liegt bei Kindern (über 6 Jahren) und Erwachsenen bei 3500 bis 8500 U/l. Die Aktivität von Enzymen hängt stark von der chemischen Umgebung ab, in der sie sich befinden. Deshalb wurde eine Aktivitätsbestimmung im verwendeten Reaktionspuffer durchgeführt. Nach Angabe des Herstellers betrug die Aktivität der Butyrylcholinesterase in einem Medium aus Butyrylcholin-Cl [4 mM], MgCl<sub>2</sub> [40 mM] und NaCl [100 mM] 9,3 U/mg (1 U ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol Substrat (Butyrylcholin) in einer Minute bei pH 8 und 37 °C umsetzen kann). Diese Aktivität wurde durch acidimetrische Titration der entstehenden Buttersäure mit NaOH bestimmt. Eine analoge Aktivitätsbestimmung im verwendeten Phosphatpuffer konnte aufgrund der Pufferkapazität nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde auf den Ellmann-Assay als UV-spektrometrische Methode zurückgegriffen<sup>187</sup>. Ursprünglich für die Messung der Acetylcholinesteraseaktivität entwickelt, wird dieser Assay in modifizierter Form auch für Butyrylcholinesterase (= Pseudocholinesterase) eingesetzt. Ausgenutzt wird hierbei, dass das bei enzymatischer Spaltung aus Butyrylthiocholin freigesetzte Thiocholin in der Lage ist, 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure zu spalten. Das daraus resultierende gelbe Dianion, kann bei einer Wellenlänge von 412 nm photometrisch quantifiziert werden.

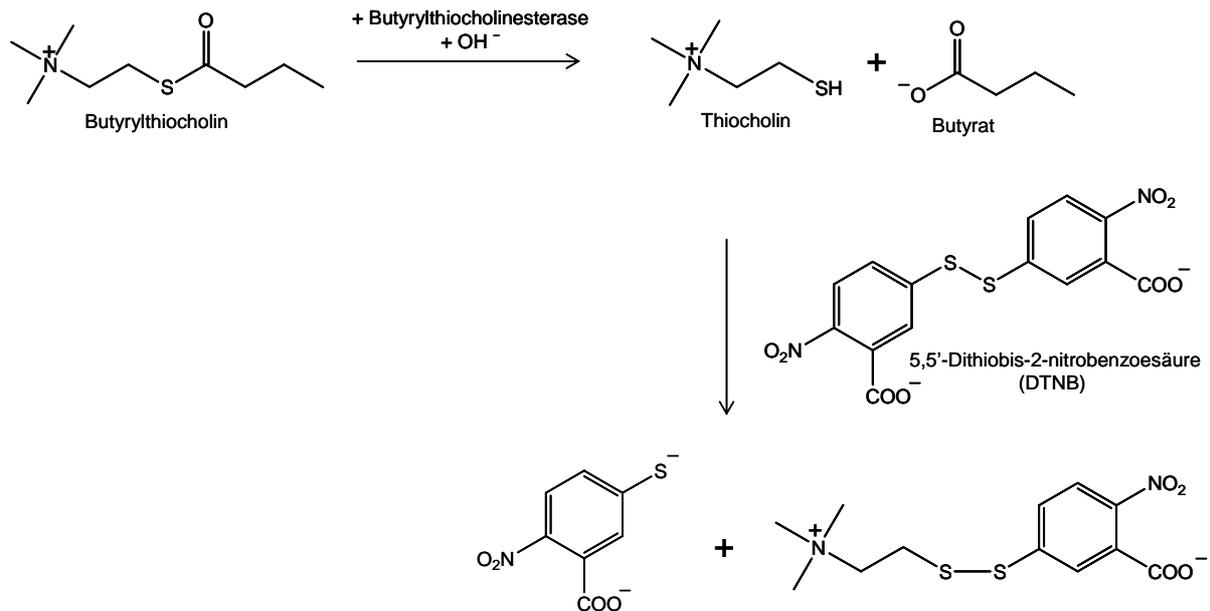


Abb. 3-11: Dem Ellman-Assay zu Grunde liegende Reaktionsgleichung. Das resultierende Dianion kann bei 412 nm photometrisch erfasst werden.

Für den Assay wurden die benötigten Lösungen (entsprechend Tab. 3-11) hergestellt und je drei Ansätze 1, 2, 3, 4 bzw. 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Im direkten Anschluss folgte die UV-spektrometrische Vermessung bei 412 nm.

Tab. 3-11: Zusammensetzung des Mediums für die Anwendung des Ellman-Assays

Assay-Bestandteile	Volumen	Bemerkung
Ellmann-Puffer pH 7,4	890 $\mu\text{l}$	Temperiert
DTNB-SL [7 mM]	50 $\mu\text{l}$	
Butyrylthiocholin-SL [10 mM]	50 $\mu\text{l}$	
Butyrylcholinesterase-AL [3,33 U/ml]	10 $\mu\text{l}$	Eisgekühlt

Die Aktivität [A] der Esterase konnte anschließend nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$A = \frac{\Delta A \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot m} \quad \text{Gl. 3-15}$$

A	Aktivität [U/mg]
$\Delta A$	Zunahme der Absorption pro Minute [ $\text{min}^{-1}$ ]
V	Volumen des Ansatzes [ml]
$\varepsilon$	molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
m	Einwaage Esterase [mg] pro Ansatz

Der molare Extinktionskoeffizient ( $\varepsilon = 14140 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) konnte der Literatur entnommen werden, die Schichtdicke der Küvette war mit 1 cm vorgegeben. Volumen (1 ml) und Einwaage an Esterase ( $3,58 \cdot 10^{-3} \text{ mg}$ ) ergaben sich aus der Versuchsvorschrift. Die Aktivität der Butyrylcholinesterase-Stammlösung (SL-2) wurde anhand der ermittelten Aktivität der Reinsubstanz auf 50 U/ml eingestellt.

### **Quantifizierung der Esterspaltung durch Butyrylcholinesterase**

In einer ersten Untersuchung wurde eine mögliche Esterspaltung *nach* der Bindung des Platinkomplexes an Albumin untersucht. Die Lösungen des simulierten interstitiellen Kompartiments wurden zur Bindung des Platinkomplexes an Albumin 30 Minuten inkubiert (vgl. Tab. 3-10). Im Anschluss folgten die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Butyrylcholinesterase-Stammlösung (SL-2) zur Einstellung einer Esteraseaktivität von 5000 U/l und eine Inkubation der Gleichgewichtsmikrodialysekammer über 24 Stunden.

In einer zweiten Untersuchung sollte eine mögliche Esterspaltung *vor* der Bindung des Platinkomplexes an Albumin untersucht werden. Hierzu erfolgte die Zugabe von 7  $\mu\text{l}$  der Esteraselösung zur Einstellung der Esteraseaktivität von 5000 U/l zu dem simulierten interstitiellen Kompartiment gefolgt von 30 Minuten Inkubation, *bevor* Albumin zur Bindung der Platinkomplexe zugesetzt wurde. Es folgte eine 24-stündige Inkubation in der Gleichgewichtsmikrodialysekammer.

Die Isolierung der DNA und Quantifizierung der Platinierung wurde wie in den Kap. 3.4.3. beschrieben durchgeführt.

### **3.4.5 Untersuchung zur Stabilität des PEG-Platinkomplexes**

Durch die Untersuchung zur Stabilität des PEG-Platinkomplexes sollte geklärt werden, ob für die nachfolgenden Untersuchungen der Aufnahme des PEG-Platinkomplexes in Tumorzellen von einer niedermolekularen oder makromolekularen Verbindung ausgegangen werden kann. Da der DNA-Platinierungsgrad als Surrogatparameter hier keine Aussagekraft hat – die aufgenommene Menge Platin in eine Zelle muss nicht einem reaktionsfähigem Platinkomplex entsprechen – wurde die Menge an niedermolekularem Platin, welches durch die semipermeable Membran diffundiert und in die angrenzende Kammer gelangt ist, analysiert. Dazu wurde in eine Seite der Kammer 150  $\mu\text{M}$  Platinkomplexlösung gegeben (12 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM NaCl, pH 7,4), in die andere Hälfte reiner Puffer gefüllt. Die Gleichgewichtsmikrodialysekammern wurden bei 37 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert und 10  $\mu\text{l}$  Probe zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Das entfernte Volumen an Puffer wurde ergänzt und die entnommene Platinmenge bei der Kalkulation der gesamten Platinmenge in der Mikrodialysekammer berücksichtigt. Nachfolgend wurde prozentual berechnet, wie viel Platin (bezogen auf die Gesamtmenge Platin) durch die semipermeable Membran diffundiert ist.

## **3.5 Zellkultur**

Zur Vermeidung einer Kontamination mit Bakterien oder Pilzen wurden sämtliche Arbeiten mit menschlichen Tumorzellen unter einer Laminar-Air-Flow-Werkbank bzw. einer Zytostatika-Werkbank unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

### **3.5.1 Lagerung der Zellen**

Damit für die Zellkulturversuche ein gleich bleibender Zellpool („Backups“) zur Verfügung stand, wurden Zellen mit 10 % DMSO in Kryovials tiefgefroren. Die konfluenten Zellen in einer 175  $\text{cm}^2$  Gewebekulturflasche wurden trypsiniert, abgelöst und zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Nährmedium

resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden je 0,9 ml in fünf Kryovials pipettiert, jeweils mit 0,1 ml DMSO versetzt und zunächst auf -80 °C heruntergekühlt, bevor nach einer Woche eine dauerhafte Lagerung in einem Tank mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) erfolgte. Die Zugabe von DMSO und das langsame Einfrieren schützen vor Bildung von Eiskristallen und einer damit verbundenen Zerstörung der Zellen.

### **3.5.2 Auftauen der Zellen**

Die Kryovials mit den gefrorenen Zellen sowie das verwendete Nährmedium wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Das Nährmedium wurde in sterile Gewebekulturflaschen vorgelegt, die aufgetaute Zellsuspension vorsichtig hinzu pipettiert und zur Inkubation in den Brutschrank gegeben.

### **3.5.3 Kultivierung der Zellen**

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) mit Nährmedium im Brutschrank kultiviert. Das im Medium enthaltene Natriumhydrogencarbonat gewährleistete in Verbindung mit dem konstanten CO<sub>2</sub>-Gehalt einen stabilen pH-Wert. Ein im Medium enthaltener Farbindikator (Phenolrot) zeigte durch Farbumschlag von rot nach gelb an, wenn das Nährmedium verbraucht war. Der Verbrauch ist abhängig von der vorhandenen Zellanzahl sowie der metabolischen Aktivität der Zellen. Eine Erneuerung des Mediums erfolgte alle zwei bis drei Tage, indem altes Medium durch eine sterile Pasteurpipette abgesaugt und neues, auf 37 °C vorgewärmtes Medium, mit einer sterilen Messpipette hinzugegeben wurde. Bei der verwendeten Zelllinie handelte es sich um eine adhärenz Zelle, die einen Monolayer ausbildete. Eine Kontrolle des Zellwachstums fand visuell unter dem Inversmikroskop statt.

### **Teilen (Splitten) der Zellen**

Nach Ausbildung des Monolayers unter Ausnutzung der Oberfläche der Zellkulturflaschen ist es notwendig, den Zellen erneut Raum für weiteres Wachstum zu geben. Das Teilen (Splitten) der Zellen verhindert ein Übereinanderwachsen und die damit häufig einhergehenden Veränderungen der Eigenschaften der Zellen. Zum Teilen der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS-Puffer gewa-

schen, wodurch abgestorbene Zellen und trypsinhemmende Substanzen wie Bestandteile des Kälberserums und Calcium entfernt wurden. Anschließend wurde mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung versetzt und für kurze Zeit im Brutschrank auf 37 °C erwärmt. Trypsin löst unter diesen Bedingungen die Zellen enzymatisch vom Untergrund und bringt sie in Suspension. Das Lösen der Zellen konnte mikroskopisch kontrolliert werden. Dann folgte die Zugabe von 8 ml frischem Medium, welches einerseits Trypsin-EDTA inaktiviert und andererseits noch haftende Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abspült und resuspendiert. Um restliches Trypsin-EDTA zu entfernen und eine Schädigung der Zellen durch Trypsin zu verhindern, wurde die Zellsuspension 4 Minuten bei 260 g zentrifugiert und anschließend wieder in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Je nach Versuchsplanung wurde entweder mit einem Teil der Zellen – je nach Bedarf 1:5 bis 1:20 verdünnt – neue Zellkulturflaschen angeimpft, oder die Zellsuspension komplett für einen Versuch verwendet.

### **3.5.4 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe eines Casy<sup>®</sup>1-Zellzählgeräts, welches auf dem Prinzip eines Coulter-Counter beruht. 20 µl Zellsuspension wurden zu 10 ml sterilfiltrierter Casy<sup>®</sup>ton-Lösung gegeben und im Casy<sup>®</sup>-Zellzählgerät vermessen. Die Messung findet in einer Kapillare statt, die während des Messvorganges mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist und an der eine konstante Spannung angelegt wird. Zellen, die durch die Kapillare gespült werden, ändern den Widerstand innerhalb der Kapillare. Die Änderung des Widerstandes verhält sich proportional zur Anzahl und zum Volumen der vorhandenen Zellen. So wurden neben der Zellzahl auch Daten zu mittlerem Durchmesser und Volumen der Zellen erhoben.

## **3.6 Zytotoxizitätstest (MTT-Assay)**

### **3.6.1 Grundlagen**

Der MTT-Assay stellt eine einfache Methode da, die zytotoxische Wirkung unterschiedlichster Substanzen auf Zellen zu untersuchen. Grundlage ist die Umsetzung

des Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem violetten Formazan-Produkt (Abb. 3-12). Als Endpunkt wird somit die mitochondriale Aktivität noch lebender Zellen erfasst. Der MTT-Assay wurde an unserem Institut durch Müller et al. etabliert und optimiert<sup>188</sup>. Mit steigender Konzentration des Zytostatikums nimmt die Anzahl der überlebenden Zellen und somit die Menge des gebildeten Farbstoffs ab (Abb. 3-13). Daraus können eine Dosis-Wirkungs-Kurve und der  $EC_{50}$ -Wert ermittelt werden. Die  $EC_{50}$  ist in diesem Fall die Konzentration, bei der die Hälfte der Zellen abstirbt.

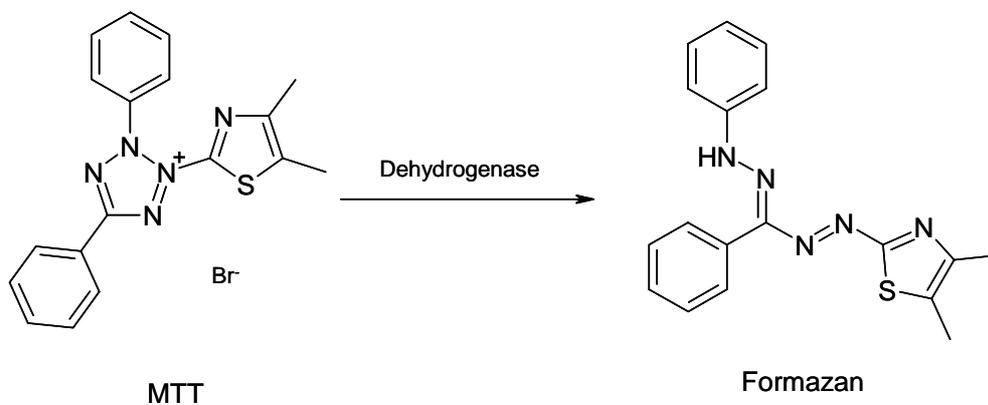


Abb. 3-12: Reaktion des Tetrazoliumsalzes MTT zum violetten Formazan.

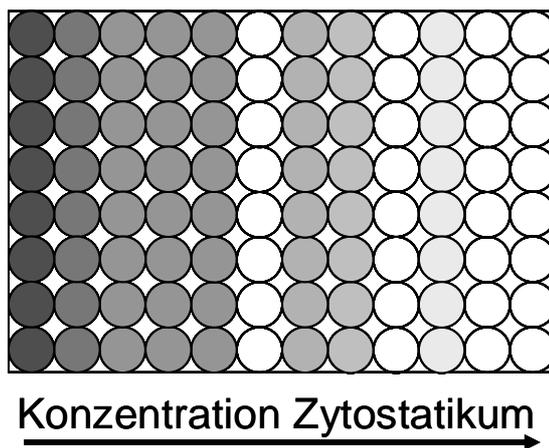


Abb. 3-13: Schematische Darstellung eines MTT-Tests in einer 96-Well-Platte.

### 3.6.2 Versuchsbedingungen

Ausgehend von der Bestimmung der Zellzahl erfolgte eine Aussaat von ca. 10000 Zellen pro Well in einer 96er Multiwell-Platte. Das Medium wurde 12 Stunden später in den einzelnen Wells durch 100 µl platinkomplexhaltiges Medium unterschiedlicher Konzentration ersetzt. Nach 72 Stunden Inkubationsphase wurde jedes Well mit 20 µl MTT-Lösung versetzt und die Multiwell-Platte für etwa 60 Minuten im Inkubator belassen, bis sich erste Formazan-Kristalle in Form von Nadeln bildeten. Zur Lyse der Zellen und der entstandenen wasserunlöslichen Formazan-Kristalle diente eine Mischung aus Isopropanol und Salzsäure (s. Kap 3.1.4). Der Zusatz von HCl verminderte durch Senkung des pH-Werts den Einfluss des im Nährmedium enthaltenen pH-Indikators Phenolrot auf die Absorption der Lösung. Die im Sauren vorliegende gelbe Farbe des Indikators störte die Absorptionsmessung des Formazans nicht. Die Absorptionsmessung erfolgte UV-spektrometrisch in einem Multiwell-Reader bei 595 und 690 nm. Die Absorptionen bei 690 nm wurden zur Korrektur von den Werten bei 595 nm abgezogen, damit das Ergebnis nicht durch die Absorption von nicht umgesetztem MTT bzw. von Zellbestandteilen und Proteinen verfälscht wurde. Die Ergebnisse wurden mit der Software GraphPad Prism<sup>®</sup> Version 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) ausgewertet und aus den erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven der EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt.

### 3.6.3 Bestimmung des Resistenzgrades

Aus den ermittelten EC<sub>50</sub>-Werten der verschiedenen untersuchten Platinkomplexe wurde nach folgender Gleichung der Resistenzgrad (RG) bestimmt:

$$RG = \frac{EC_{50res}}{EC_{50sens}} \quad \text{Gl. 3-16}$$

EC<sub>50res</sub> = EC<sub>50</sub> für die cisplatinresistente Zelllinie A2780cis

EC<sub>50sens</sub> = EC<sub>50</sub> für die cisplatinsensitive Zelllinie A2780

Der Resistenzgrad gibt an, in welchem Verhältnis die EC<sub>50</sub>-Werte der resistenten Zelllinie und der sensitiven Zelllinie zueinander stehen.

### 3.7 Quantifizierung der DNA-Platinierung

Eine Quantifizierung der DNA-Platinierung, berechnet als Platin-Nukleotid-Verhältnis, erfolgte sowohl nach Isolierung der Kalbsthymus-DNA aus den Gleichgewichtsmikrodialysekammern als auch nach Inkubation von Tumorzellen mit verschiedenen Platinkomplexen. Anschließend folgte eine Quantifizierung der DNA und der Platinmenge aus derselben Probe.

#### Isolierung der DNA

Die DNA-Isolierung wurde durch Festphasenextraktion mittels QIAamp<sup>®</sup> DNA-Blood-Mini-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Hinsichtlich der Volumina der zugesetzten Reagenzien und Puffer wurde das Probenaufarbeitungsprotokoll der Fa. Qiagen eingehalten.

Die Aufarbeitung begann mit der Resuspendierung des Zellpellets mit 20 µl Protease und 200 µl Lysepuffer (Puffer AL). Dieser Ansatz wurde unter Zugabe von 20 µl RNase-Lösung für 15 Minuten im Ultraschallbad bei 56 °C inkubiert. Im Falle der Isolierung der reinen Kalbsthymus-DNA aus den Gleichgewichtsmikrodialysekammern konnte auf den Zusatz von Protease und RNase-Lösung verzichtet werden. Anschließend wurde mit 200 µl 96 %-igem Ethanol (V/V) versetzt, gemischt, das Lysat auf eine QIAamp<sup>®</sup>-Silikasäule aufgegeben und eine Festphasenextraktion der DNA durchgeführt (Abb. 3-14).

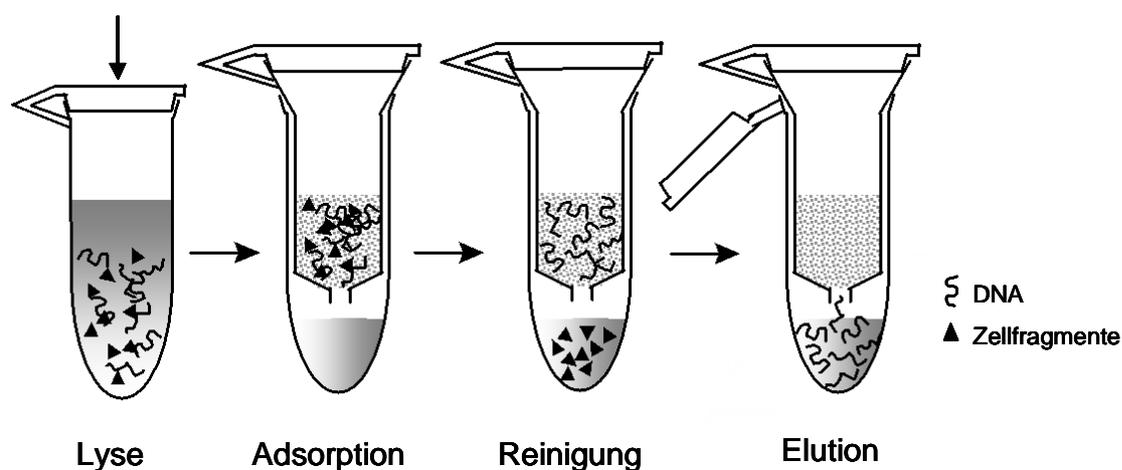


Abb. 3-14: DNA-Isolierung aus Tumorzellen durch Festphasenextraktion<sup>182</sup>.

Unter diesen Bedingungen (hohe Salzkonzentration, Ethanol, pH < 9) adsorbiert die DNA an die Silikamembran, sodass in zwei Waschschrritten Zellbestandteile von der Säule gewaschen und die DNA aufgereinigt werden konnte. Dazu wurde jeweils 500 µl der Waschpuffer AW-1 und AW-2 auf die Säule gegeben und bei 6000 g für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA in zwei Schritten mit jeweils 200 bzw. 100 µl des Elutionspuffers (Puffer AE; pH > 9) durch Zentrifugation bei 6000 g für 5 Minuten von der Säule eluiert. Das erhaltene Eluat wurde sofort weiter verarbeitet oder bei -20 °C tiefgefroren.

### **Quantifizierung des DNA-Gehalts**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und der Reinheit der isolierten DNA erfolgte mittels UV-Spektrometrie. Dafür wurden die Proben mit Puffer AE auf eine Konzentration von ca. 10 bis 50 µg DNA/ml verdünnt und die Absorptionen bei den Wellenlängen 260, 280 und 320 nm gegen Puffer AE als Referenz gemessen. Eine Voraussetzung für die Auswertbarkeit der Ergebnisse war eine Absorption bei 320 nm von  $< \pm 0,010$ . Dieser Wert diente als Nullwert und wurde von den Absorptionen bei 260 bzw. 280 nm abgezogen. Wenn das Verhältnis dieser korrigierten Absorptionen zwischen 1,7 und 1,9 lag, konnte eine vollständige Abtrennung der Proteine aus den Proben angenommen werden.

Der DNA-Gehalt [µg/ml] wurde aufgrund des linearen Zusammenhangs mit der korrigierten Absorption [ $A_{260}^*$ ] bei 260 nm nach folgender Formel berechnet:

$$C_{DNA} = A_{260}^* \cdot 50 \text{ [}\mu\text{g/ml]}$$

Gl. 3-17

Aus der erhaltenen Konzentration und dem Volumen des Eluats konnte die absolute Menge an DNA ermittelt werden. Daraus wurde mit Hilfe der durchschnittlichen molaren Masse [ $M$  (Nukleotid) = 330 g/mol] die Stoffmenge an Nukleotiden berechnet. Die DNA-Quantifizierung wurde von A.C. Pieck hinsichtlich Richtigkeit und Präzision validiert<sup>183</sup>.

### Quantifizierung des Platingehalts

Die Quantifizierung des Platingehalts erfolgte mittels GF-AAS. Der verwendete Kalibrierbereich richtete sich nach der zu erwartenden Konzentration (s. Kap. 3.3.2). Das bei der DNA-Isolierung erhaltene Eluat wurde ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

### Berechnung des Platin-Nukleotid-Verhältnisses

Die gemessene Platinstoffmenge wurde anschließend auf die ermittelte Stoffmenge an Nukleotiden bezogen und als Platinatome pro 1 Million Nukleotide dargestellt.

## 3.8 Proteinbestimmung

### 3.8.1 Grundlagen

Eine Proteinbestimmung wurde immer dann durchgeführt, wenn lange Inkubationszeiten notwendig waren, welche eine Vergleichbarkeit aufgrund verschiedener Wachstumseigenschaften von sensitiven und resistenten Zellen verhinderte, oder ein Verlust von Zellen durch Zellyse (Eigenschaft eines untersuchten Platinkomplexes) vermutet wurde. Zur Proteinbestimmung diente der BCA-Test-Kit der Firma Pierce. Dieses Kit enthielt die Lösungen A (BCA) und B (4 %  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Das Prinzip dieser Proteinbestimmung beruht darauf, dass Proteine im alkalischen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduzieren. Zwei Moleküle BCA (Bichinolin-4-carbonsäure) reagieren dann mit  $\text{Cu}^+$  unter Bildung eines intensiv purpur gefärbten Chelatkomplexes (s. Abb. 3-15).

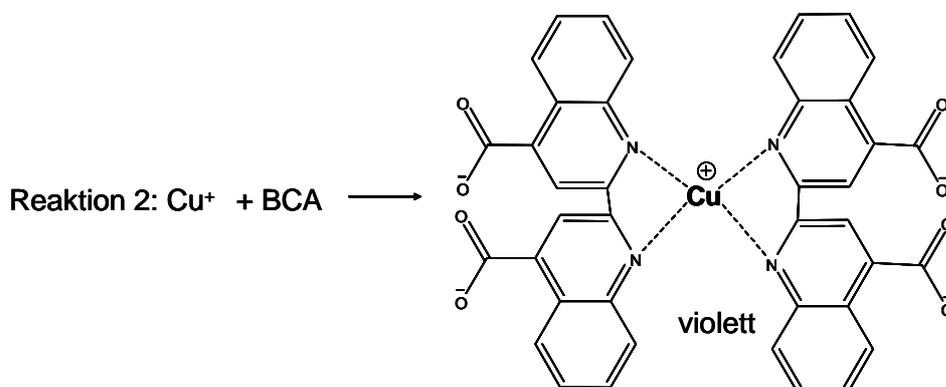


Abb. 3-15: Reaktion zur Proteinbestimmung.

### Teilvalidierung

Die Firma Pierce empfiehlt eine Auswertung mittels quadratischer Regression. Diese Empfehlung widersprach eigenen Beobachtungen, nach denen ein linearer Zusammenhang vorhanden zu sein schien. Zur Klärung dieses Widerspruchs erfolgte eine Teilvalidierung nach den FDA-Richtlinien, die in Kap. 3.2.2.3 beschrieben wurden. Folgende Aspekte wurden untersucht:

- Linearität und Arbeitsbereich
- Präzision und Richtigkeit
- Bestimmungsgrenze

Die Zusammensetzung der verwendeten Arbeitslösungen zur Untersuchung der Linearität kann Tab. 3-12 entnommen werden. Qualitätskontrollproben wurden aus humanem Serumalbumin hergestellt und bei -20 °C eingefroren.

Tab. 3-12: Herstellung der Standards für die Kalibrierung (angegeben ist das zugesetzte Volumen in  $\mu\text{l}$ ).

Lösung	S1 [25 $\mu\text{g/ml}$ ]	S2 [50 $\mu\text{g/ml}$ ]	S3 [75 $\mu\text{g/ml}$ ]	S4 [100 $\mu\text{g/ml}$ ]	S5 [200 $\mu\text{g/ml}$ ]
RSA [2 mM]	7,5	7,5	22,5	15	30
Wasser	592,5	292,5	578,5	285	270

Die Stabilität der eingesetzten Rinderserumalbuminlösungen (RSA) wurde von der Firma Pierce mit mehr als einem Jahr angegeben.

### 3.8.2 Messbedingungen

#### Probenaufarbeitung

Die entnommene Proteinmenge (20  $\mu\text{l}$  Proteinlösung) wurde zur Zellyse 30 Minuten mit 10  $\mu\text{l}$  0,1 N NaOH versetzt und anschließend mit dem gleichen Volumen 0,1 N HCl neutralisiert sowie eine geeignete Menge Wasser zur Verdünnung in den Kalibrierbereich hinzugefügt. Für eine dreifache Bestimmung jeder Probe wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  des Ansatzes in 96-Well-Mikrotiterplatten mit 200  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung,

bestehend aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil der Lösung B, versetzt. Nach 60 Minuten Inkubation bei 60 °C erfolgte die Messung der Absorption bei 570 nm.

### **Kalibrierung**

Auf jeder Mikrotiterplatte wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Die Kalibrierung wurde akzeptiert, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Abweichung der Residuen  $\leq 15 \%$ , am LLOQ:  $\leq 20 \%$
- Mindestens drei von fünf Standards, einschließlich des LLOQ- und des ULOQ- Standards mussten vorangehende Kriterien erfüllen
- Korrelationskoeffizient  $r \geq 0,99$  (lineare Regression, gewichtet  $1/x$ )

### **Qualitätssicherung während der Messung**

Zur Qualitätssicherung der Probenmessung dienten Qualitätskontrollproben (QC-Proben) in drei Konzentrationen, die den gesamten Arbeitsbereich abdeckten (niedrige, mittlere und hohe Konzentration). Diese Qualitätskontrollproben wurden unabhängig von den Standards für die Kalibrierung aus Rinderserumalbumin durch Mischen mit Wasser hergestellt und in Aliquoten bei -24 °C eingefroren. Es wurden mindestens drei Qualitätskontrollproben pro Mikrotiterplatte mittels einer Doppelbestimmung vermessen (entspricht  $> 5 \%$  aller Proben). Die berechneten Konzentrationen von mindestens zwei der drei Qualitätskontrollproben je Platte sollten dabei innerhalb von  $\pm 15 \%$  des nominalen Wertes liegen.

## **3.9 Fluoreszenzassay**

Zur Quantifizierung der Aufnahme von Fluorescein gekoppeltem Rinderserumalbumin (FITC-BSA) in Tumorzellen wurde ein Fluoreszenzassay verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mittels eines Fluoroscan Ascent<sup>®</sup> Plattenlesegerätes.

### **Teilvalidierung**

Da diese Methode dazu dienen sollte, den Vergleich der Aufnahme von FITC-BSA in sensitive und resistente Zellen zu ermöglichen, sowie den Einfluss verschiedener Inhibitoren zu untersuchen, wurde eine Teilvalidierung notwendig. Diese

Teilvalidierung wurde nach den FDA-Richtlinien, die in Kap. 3.2.3.3 beschrieben wurden, durchgeführt. Folgende Aspekte wurden untersucht:

- Linearität und Arbeitsbereich
- Präzision und Richtigkeit (eingeschränkt)
- Bestimmungsgrenze
- Einfrier-Auftau-Stabilität der eingesetzten FITC-Rinderserumalbumin Stammlösung

Die Zusammensetzung der verwendeten Arbeitslösungen und Standards zur Untersuchung der Linearität kann Tab. 3-13 entnommen werden. Die Arbeitslösungen wurden jeweils frisch aus der FITC-Rinderserumalbumin-Stammlösung durch Verdünnung mit 0,1 % Triton-PBS Puffer zubereitet. Qualitätskontrollproben in niedrigen, mittleren und hohen Bereich wurden aus FITC-Rinderserumalbumin und 0,1 % Triton-PBS-Puffer hergestellt und bei – 20 °C eingefroren.

*Tab. 3-13: Herstellung der Standards für die Kalibrierung der FITC-BSA-Bestimmung (angegeben ist das zugesetzte Volumen in  $\mu\text{l}$ ).*

Lösung	S1 [0,01 $\mu\text{g}$ ]	S2 [0,025 $\mu\text{g}$ ]	S3 [0,05 $\mu\text{g}$ ]	S4 [0,1 $\mu\text{g}$ ]	S5 [0,25 $\mu\text{g}$ ]	S6 [0,5 $\mu\text{g}$ ]
FITC-BSA [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]				6	15	30
FITC-BSA [1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	6	15	30			
0,1 % Triton- PBS-Puffer	594	585	570	594	585	570

### 3.9.1 Messbedingungen

#### Probenaufarbeitung

Das Zellpellet aus den Inkubationsversuchen (s. Kapitel 3.11.2) wurde zur Zellyse 30 Minuten mit 600  $\mu\text{l}$  0,1 % Triton-PBS-Puffer versetzt. Die Lösung wurde danach bei 6000 g für 5 Minuten zentrifugiert und mögliche Matrixbestandteile abgetrennt. Für eine zweifache Bestimmung jeder Probe wurden jeweils 300  $\mu\text{l}$  dieses Ansatzes in 96-Well-Mikrotiterplatten gegeben und die Fluoreszenz bei einer

Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm gemessen.

### Kalibrierung

Auf jeder Mikrotiterplatte wurde eine Kalibrierung analog Kapitel 3.8.1 durchgeführt.

### Qualitätssicherung während der Messung

Die Qualitätssicherung der Probenmessung wurde mittels der hergestellten Qualitätskontrollproben (QC-Proben) analog Kapitel 3.8.1 durchgeführt.

## 3.10 Lipophiliebestimmung

Als Maß für die Lipophilie einer Substanz wird häufig das Verteilungsverhalten zwischen einer organischen (n-Octanol) und einer wässrigen Phase herangezogen. Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten n-Octanol / Wasser erfolgte nach der OECD-Richtlinie<sup>189</sup> zur Testung von Chemikalien mittels der Shake-Flask-Methode. Hierzu musste ein Ansatz n-Octanol mit einer kleinen Menge doppelt destilliertes Wasser und ein Ansatz doppelt destilliertes Wasser mit einer kleinen Menge an n-Octanol 24 Stunden im Schüttelinkubator bei 23 °C gesättigt werden. Nach anschließender Phasentrennung wurde ein Gemisch im Verhältnis 1:1 hergestellt, der wässrigen Phase 8 µM Platinkomplex zugefügt und dieser Ansatz für eine Stunde im Schüttelinkubator bei 23 °C inkubiert. Es folgten zwei weitere Versuche, bei denen das Volumenverhältnis n-Octanol / Wasser verdoppelt bzw. halbiert wurde. Jeder Ansatz erfolgte als Doppelbestimmung. Die Platinkonzentration in der wässrigen Phase vor ( $C_0$ ) und nach ( $C_t$ ) Inkubation wurde mittels AAS quantifiziert und der Verteilungskoeffizient  $P_{ow}$  errechnet (s. Gl. 3–17). Häufig findet auch die logarithmierte Form des Verteilungskoeffizienten, der log P-Wert, Verwendung.

Verteilungskoeffizient  $P_{ow}$ :

$$P_{ow} = \frac{C_0 - C_t}{C_0}$$

GL 3-18

## **3.11 Zellinkubationsversuche mit Platinkomplexen**

### **3.11.1 Ermittlung der intrazellulären Platinkonzentration**

Ausgehend von Versuchsbedingungen die aus Vorarbeiten von J. Zisowsky hervorgingen<sup>85</sup>, wurden diese zur Substanz- und Aufwandsoptimierung auf 6-Well Platten adaptiert.

### **3.11.2 Messung der zellulären Aufnahme niedermolekularer und makromolekularer Platinkomplexe**

Nach Bestimmung der Zellzahl (s. Kap 3.5.4) wurden je  $2 \cdot 10^6$  Zellen auf sterile 6-Well-Platten ( $10 \text{ cm}^2$ ) ausgesät und den adhären Zellen 5-8 Stunden Zeit gegeben, an den Boden der Platten anzuheften. Dann wurde das überstehende Medium entfernt, durch 1 ml platinkomplexhaltiges [ $100 \mu\text{M}$ ] Medium ersetzt und unterschiedlich lange inkubiert. Direkt nach der Inkubation musste das platinhaltige Medium schnell abgesaugt werden, um eine weitere Aufnahme der Platinkomplexe zu verhindern. Es folgten zwei Waschschrte mit je 1 ml eisgekühltem PBS-Puffer, die Reste des Nährmediums und der Platinkomplexe entfernen sollten. Danach erfolgte eine Zugabe von  $200 \mu\text{l}$  Trypsin-Lösung (zur Ablösung der Zellen) je Well, welches nach ca. 2 Minuten Einwirkzeit mit 1 ml Nährmedium inaktiviert wurde. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Suspension konnten noch haftende Zellen abgelöst und anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Durch Zentrifugation für eine Minute bei  $1000 \text{ g}$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  wurden die Zellen sedimentiert und im Anschluss daran die überstehende Flüssigkeit abgesaugt. Das so entstandene Zellpellet wurde in 1 ml PBS-Puffer durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Bei Bedarf wurden  $20 \mu\text{l}$  zur Proteinbestimmung entnommen. Nach Zentrifugation bei  $6000 \text{ g}$  für eine Minute folgte ein weiterer Waschschrte mit 1 ml PBS-Puffer. Das nach abschließender Zentrifugation erhaltene Pellet konnte eingefroren oder direkt zur Vermessung der Platinkonzentration (s. Kap. 3.3.2), der Fluoreszenz (s. Kap. 3.9) oder zur Isolierung und Vermessung der DNA (s. Kap. 3.7) weiter verarbeitet werden.

### 3.11.3 Charakterisierung der Aufnahmemechanismen makromolekularer Platinkomplexe

#### 3.11.3.1 Endozytosemechanismen

Anhand dieser Untersuchung sollte geklärt werden, ob die postulierte Aufnahme unveränderter makromolekularer Platinkomplexe ein durch Endozytose vermittelter Prozess ist, der durch entsprechende Inhibitoren gehemmt werden kann. Der Begriff Endozytose ist ein Überbegriff, der die Prozesse Phagozytose (die Aufnahme größerer Partikel) und Pinozytose (die Aufnahme von Flüssigkeiten und Lösungen) zusammenfasst. Häufig wird dieser Begriff aber synonym für die Pinozytose verwendet. Diese gängige Praxis wird im Folgenden beibehalten. Zurzeit sind vier verschiedene grundsätzliche endozytische Wege beschrieben, die in ihren Einzelheiten komplex und noch nicht völlig aufgeklärt sind. An dieser Stelle soll eine vereinfachte Übersicht gegeben werden (Abb. 3-16).

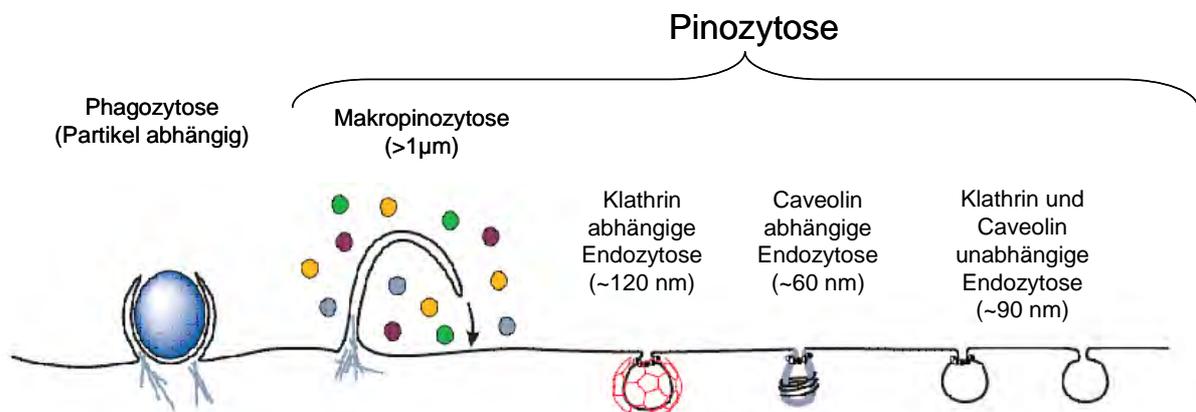


Abb. 3-16: Übersicht über die verschiedenen Endozytosewege<sup>190</sup>.

Als am Besten untersuchter und vermutlich bedeutendster Endozytoseweg gilt der Klathrin abhängige Weg, der früher auch als Rezeptor vermittelter Endozytoseweg (*receptor-mediated endocytosis*) bezeichnet wurde. Diese Bezeichnung ist obsolet, da heute bekannt ist, dass auch an den meisten anderen Endozytoseprozessen spezifische Rezeptor-Ligand-Interaktionen beteiligt sind. Bei der Klathrin abhängigen

Endozytose lagern sich ligandenbeladene Rezeptoren mit dem Protein Klathrin in der Membran zusammen und bilden Einstülpungen, die so genannten „Klathrin bedeckten Gruben“ (*clathrin-coated pits*). Diese stellen den Ausgangspunkt für die Endosomenbildung dar<sup>190</sup>. Ein zweiter Weg ist die Caveolin abhängige Aufnahme. Hierbei bilden sich kurze, tubulusartige Einstülpungen, die durch eine dichte Packung aus Cholesterol und Glykosphingolipiden, den sogenannten „lipid rafts“, gekennzeichnet sind. Das Protein Caveolin interagiert mit diese Strukturen und bewirkt so die Endozytose<sup>190</sup>. Über die Klathrin und Caveolin unabhängige Endozytose ist bisher wenig bekannt. Als gesichert gilt eine Beteiligung weiterer lipidreicher Mikrodomänen (*rafts*) auf der Plasmamembran<sup>190,191</sup>. Die vierte Form, die Makropinozytose, ist ebenfalls noch wenig untersucht. Rezeptorunabhängig bilden sich durch vom Zytoskelettprotein Aktin hervorgerufene Einstülpungen der Zellmembran große Vesikel, die hohe Volumina an extrazellulärem Milieu aufnehmen können<sup>190,192</sup>. Diese Vorgänge werden in vielen Zelltypen durch Wachstumsfaktoren stimuliert.

### **Charakterisierung der Aufnahme von Albumin**

Um den Substanzaufwand der nur in kleinem Maßstab synthetisierten Platinkomplexe gering zu halten, erfolgten die Charakterisierung der Aufnahme makromolekularer Substanzen in die Tumorzellen sowie die Vorversuche zur Auswahl geeigneter Inhibitoren und Inhibitionsbedingungen unter Verwendung von FITC-Rinderserumalbumin (FITC-BSA) als Modellsubstanz. Die Art der Aufnahme von Albumin scheint durch chemische Modifikationen nicht beeinflusst zu werden<sup>193</sup>. Die Aufnahmeversuche wurden analog Abschnitt 3.11.1. durchgeführt. Das Medium enthielt anstatt der 100 mM Platinkomplexe 20 µg/ml FITC-BSA (2 µl der Stammlösung in 998 µl Medium), ausgehend von der Publikation von Yumoto et al.<sup>193</sup>. Die Quantifizierung erfolgte mittels des entwickelten und validierten Fluoreszenzassays (s. Kap 3.9).

### **Inhibition der Aufnahme makromolekularer Substanzen**

Der Endozytoseweg, über den Albumin in die Zelle gelangt, ist nicht eindeutig geklärt. Einige Arbeitsgruppen identifizierten die Klathrin abhängige<sup>194,193,190</sup>, andere die Caveolin vermittelte<sup>195,196,190</sup> Endozytose als maßgeblichen Mechanismus.

Vermutlich ist der Aufnahmeweg entscheidend vom untersuchten Zelltyp abhängig. Zum Nachweis der Aufnahme durch Endozytose sollte die Aufnahme der makromolekularen Substanzen durch Verwendung von Endozytoseinhibitoren blockiert werden. Hierzu wurden zur Beeinflussung beider postulierter Aufnahmewege  $\beta$ -Methylcyclodextrin und Bafilomycin A<sub>1</sub> ausgewählt.  $\beta$ -Methylcyclodextrin löst Cholesterol aus Membranen und inhibiert damit den Caveolin vermittelten Endozytoseweg. Bafilomycin A<sub>1</sub> ist ein spezifischer Inhibitor der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase und inhibiert die Klathrin abhängige Endozytose. Die vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase ist in der endosomalen Membran lokalisiert und verantwortlich für die Erniedrigung des pH-Werts in den Endosomen. Der niedrige pH-Wert ist essentiell für die Dissoziation von Ligand und Rezeptor nach rezeptorvermittelter Endozytose. Zu Beginn erfolgte eine Optimierung der von Yumoto et al.<sup>193</sup> verwendeten Bedingungen durch Inhibitionsversuche der Endozytose von FITC-Rinderserumalbumin. Diese Ergebnisse wurden dann für Inhibitionsversuche der Aufnahme der Platinkomplexe verwendet.

### **Inhibition mit $\beta$ -Methylcyclodextrin**

Die Zellen wurden 10 Minuten mit 5 mM  $\beta$ -Methylcyclodextrin in PBS-Puffer vorinkubiert. Danach folgte ein Aufnahmeversuch mit FITC-BSA über 60 Minuten analog Abschnitt 3.11.2, wobei dem verwendeten Medium ebenfalls 5 mM  $\beta$ -Methylcyclodextrin zugesetzt wurde. Es erfolgten grundsätzlich Kontrollversuche unter gleichen Bedingungen ohne  $\beta$ -Methylcyclodextrin. Die Quantifizierung wurde mittels des entwickelten und validierten Fluoreszenzassays (Abschnitt 3.9) durchgeführt.

Ausgehend von den Ergebnissen aus diesen Versuchen wurden die Bedingungen für die Experimente zur Inhibition der Aufnahme der Platinkomplexe festgelegt, die Tab. 3-14 entnommen werden können. Die Kontrollversuche erfolgten unter gleichen Bedingungen ohne  $\beta$ -Methylcyclodextrin. Die aufgenommene Platinmenge wurde durch Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt (s. Kap. 3.3.2).

Tab. 3-14: Bedingungen der Inhibitionsversuche mit  $\beta$ -Methylcyclodextrin.

Substanz	Vorinkubation	Inkubation	Messmethode
FITC-Rinder-serumalbumin (FITC-BSA)	10 Minuten 5 mM $\beta$ -MCD in PBS-Puffer	60 Minuten 20 $\mu$ g/ml FITC-BSA 5 mM $\beta$ -MCD in Medium	Fluoreszenz
Platinkomplexe	10 Minuten 2,5 mM $\beta$ -MCD in PBS-Puffer	120 Minuten 100 $\mu$ M Platinkomplex 2,5 mM $\beta$ -MCD in Medium	AAS

### Inhibition mit Bafilomycin A<sub>1</sub>

Die Zellen wurden 30 Minuten mit 100 nM Bafilomycin A<sub>1</sub> in PBS-Puffer vorinkubiert. Danach folgte ein Aufnahmeversuch mit FITC-BSA über 60 Minuten analog Abschnitt 3.11.2. Es erfolgten grundsätzlich Kontrollversuche unter gleichen Bedingungen ohne Bafilomycin A<sub>1</sub>, die insbesondere aufgrund des Gehalts an DMSO (DMSO besitzt permeabilitätserhöhende Eigenschaften) notwendig waren. Die Quantifizierung wurde mittels des entwickelten und validierten Fluoreszenzassays (Kap. 3.9) durchgeführt.

Die aus den Ergebnissen dieser Experimente hervorgegangenen Bedingungen für die Versuche zur Inhibition der Aufnahme der Platinkomplexe gibt Tab. 3-15 wieder. Die Kontrollversuche erfolgten unter gleichen Bedingungen ohne Bafilomycin A<sub>1</sub>. Die Quantifizierung wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie durchgeführt (s. Kap. 3.3.2).

Tab. 3-15: Bedingungen der Inhibitionsversuche mit Bafilomycin A<sub>1</sub>.

Substanz	Vorinkubation	Inkubation	Messmethode
FITC-Rinder-serumalbumin (FITC-BSA)	30 Minuten 100 nM BafA <sub>1</sub> in PBS	60 Minuten 20 $\mu$ g/ml FITC-BSA in Medium	Fluoreszenz
Platinkomplexe	60 Minuten 100 nM BafA <sub>1</sub> in PBS	120 Minuten 100 $\mu$ M Platinkomplex	AAS

### 3.11.4 Membranpräparation

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Lokalisation der Oxaliplatin-Analoga wurde eine Membranpräparation durchgeführt. Hierzu wurde abweichend von der in Kap. 3.11.2 beschriebenen Vorschrift ein Aufnahmeversuch mit  $5 \cdot 10^6$  Zellen durchgeführt und das erhaltene Zellpellet mit 5 ml Purelab Plus<sup>®</sup>-Wasser resuspendiert. Nun folgte eine Zerstörung der Zellen mit dem Polytron<sup>®</sup>-Biohomogenisator. Mit einer Hochleistungszentrifuge konnte durch 10-minütige Zentrifugation bei 2 °C und 40.000 g eine erste Trennung der Zellmembran vom Cytosol vorgenommen werden. Der Überstand wurde abgenommen und zur Messung der cytosolischen Platinkonzentration verwahrt. Durch drei weitere Zentrifugationsschritte unter selbigen Bedingungen, bei denen jeweils mit 5 ml Purelab Plus<sup>®</sup>-Wasser gewaschen wurde, erfolgte eine Aufreinigung der Membran. Das erhaltene Zellpellet diente zur Quantifizierung der membrangebundenen Platinfraktion.

## 3.12 Statistische Datenanalyse

### 3.12.1 Deskriptive Statistik

Zur zusammenfassenden Darstellung der Daten wurden folgende Lage- und Streumaße berechnet:

Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ ):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Gl. 3-19}$$

Standardabweichung (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{Gl. 3-20}$$

$\bar{x}$  = Mittelwert aus n Einzelmessungen

$x_i$  = Messwert

n = Anzahl der Messungen

Relative Standardabweichung (RSD) =

Variationskoeffizient (VK):

$$VK = RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \text{ [%]} \quad \text{Gl. 3-21}$$

Standardfehler (SE):  $SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$  Gl. 3-22

Spannweite (*range*): Die Spannweite wird durch den größten (Maximum) und kleinsten Wert (Minimum) terminiert.

Der Standardfehler wurde immer dann verwendet, wenn die Mittelwerte verschiedener Versuche mit unterschiedlichem Stichprobenumfang vergleichend dargestellt wurden.

### 3.12.2 Statistische Tests zur Überprüfung von Unterschiedshypothesen

Mit Hilfe der Teststatistik wird beurteilt, welche von zwei gegensätzlichen Hypothesen (Nullhypothese oder Alternativhypothese) über die Grundgesamtheit von Messwerten angenommen werden kann. Die zu beweisende Theorie wird dabei als Alternativhypothese formuliert und die Entscheidung ob diese akzeptiert werden kann, von der Nullhypothese aus getroffen. Ziel der Teststatistik ist es, die Wahrscheinlichkeit ( $p$ ) zu berechnen, mit der die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt wird (Irrtumswahrscheinlichkeit). Je nach Fragestellung und Beschaffenheit der Messwerte wurde ein entsprechender statistischer Test ausgewählt. Das Ergebnis wurde als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit bei oder unter 5 % lag ( $p \leq 0,05$ ). Bei Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $p \leq 0,01$  lag ein hoch signifikantes, bei  $p \leq 0,001$  ein höchst signifikantes Ergebnis vor. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tests werden im Folgenden kurz erläutert.

Die Testauswahl zur Testung von Unterschiedshypothesen erfolgte immer in Abhängigkeit von Skalierung und Verteilung der Daten, der Stichprobengröße und der Anzahl der untersuchten Gruppen. Des Weiteren wurde berücksichtigt, ob die Variablen voneinander abhängig sind oder nicht. Da aufgrund der aufwändigen Zellkulturversuche in der Regel ein geringer Stichprobenumfang von 3-6 vorlag, wurde auf eine Prüfung auf Normalverteilung und Varianzhomogenität verzichtet. Eine Normalverteilung ist Voraussetzung für die Anwendung parametrischer Testverfahren für intervallskalierte und normalverteilte Variablen, sodass grundsätzlich nichtparametrische Tests zur Anwendung kamen. Eine Übersicht über

diese Testverfahren für ordinalskalierte Werte bzw. nicht-normalverteilte intervallskalierte Variablen gibt Tab. 3-16.

Tab. 3-16: Statistische Tests zur Prüfung von Unterschiedshypothesen.

Test	Skalierung	Anzahl der Stichproben	Abhängigkeit
Mann-Whitney-U-Test	ordinal*	2	unabhängig
Wilcoxon-Test	ordinal*	2	abhängig
Kruskal-Wallis-Test	ordinal*	> 2	unabhängig
Friedman-Test	ordinal*	> 2	abhängig

\* oder nicht-normalverteilt, intervallskaliert

Eine Ausnahme wurde dann gemacht, wenn das Ziel darin lag, zu zeigen, dass zwischen zwei Datensätzen kein Unterschied vorhanden war. Dies ist normalerweise mit dem kleinen Stichprobenumfang und gegebenen statistischen Tests nicht möglich. Um hier das Ergebnis absichern zu können, wurde der Stichprobenumfang erhöht, mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft und, falls kein Widerspruch vorlag, ein parametrischer t-Test verwendet, da dieser Unterschiede besser erkennen kann, als die entsprechenden nichtparametrischen Tests.

### 3.12.3 Korrelationsanalyse

Bei einer Korrelationsanalyse wird die Existenz, Stärke und Richtung eines Zusammenhangs zwischen zwei Variablen untersucht. Die Berechnung gründet sich auf Wertepaare, die aus den zugrunde liegenden abhängigen Stichproben gebildet werden. Die Stärke des Zusammenhangs wird mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten  $r$  charakterisiert, der Werte zwischen -1 und +1 annehmen kann. Liegt ein starker Zusammenhang vor, so ist  $r = 1$ ; existiert gar kein Zusammenhang zwischen den beiden Variablen, so ist  $r = 0$ . Negative Korrelationskoeffizienten deuten auf einen gegenläufigen Zusammenhang hin. Die in Tab. 3-17 genannten Grenzen wurden zur Beschreibung des Ausmaßes einer Korrelation herangezogen.

Tab. 3-17: Ausmaß des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen in Abhängigkeit vom Korrelationskoeffizienten.

Korrelationskoeffizient	Ausmaß der Korrelation
$r \geq 0,9$	sehr hoch
$r < 0,9$	hoch
$r < 0,7$	mittel
$r < 0,5$	gering
$r < 0,2$	sehr gering

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten hängt vom Skalenniveau, der Verteilung der zu untersuchenden Variablen und der Art des untersuchten Zusammenhangs ab. Bei intervallskalierten und normalverteilten Variablen sowie linearen Zusammenhängen wurde in der Regel der Korrelationskoeffizient nach Pearson, bei mindestens einer ordinalskalierten oder nicht-normalverteilten Variable der Rangkorrelationskoeffizient nach Kendall berechnet. Die Normalverteilung ist für die Korrelation nach Pearson keine Voraussetzung, aber für eine anschließende Prüfung auf statistische Signifikanz, welche auf parametrischen Testverfahren beruht, notwendig. In Fällen, in denen die Datenlage auf einen linearen Zusammenhang hinwies, aber der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung negativ ausfiel, wurde dieser lineare Zusammenhang mit Hilfe der Korrelation nach Pearson untersucht, eine lineare Regression durchgeführt und auf die Angabe eines p-Werts (Irrtumswahrscheinlichkeit) verzichtet.

### 3.12.4 Regressionsanalyse

Die Regressionsanalyse quantifiziert den Zusammenhang zwischen einer unabhängigen und einer abhängigen Variablen. Sie dient dazu, Zusammenhänge zu erkennen, die Art des Zusammenhangs zu erklären und den Wert der abhängigen aus den Werten der unabhängigen Variablen vorherzusagen. Bei der einfachen linearen Regression wird nur ein unabhängiger Parameter verwendet, basierend auf dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate, eine Geradengleichung ermittelt, die den linearen Zusammenhang zwischen der unabhängigen Variablen  $x$  und der abhängigen Variablen  $y$  beschreibt:

$$y = a \cdot x + b$$

Gl. 3-23

 $a$  = Steigung $b$  = Ordinatenabschnitt

Auch bei der linearen Regression wird der Korrelationskoeffizient (nach Pearson) herangezogen, um das Ausmaß der Korrelation (oder Nicht-Korrelation) zu beurteilen. Zur Berechnung des mittleren Korrelationskoeffizienten ( $\bar{r}$ ) wurde zunächst eine Z-Transformation nach Fisher vorgenommen (s. Gl. 3-24) und anschließend das arithmetische Mittel der Z-Werte zurücktransformiert (s. Gl. 3-25).

$$Z = 0,5 \cdot \ln\left(\frac{1+r}{1-r}\right)$$

Gl. 3-24

$$r = \frac{e^{2Z} - 1}{e^{2Z} + 1}$$

Gl. 3-25

Z = transformierter Korrelationskoeffizient (nach Fisher)

Diese Umrechnung erfolgte vor dem Hintergrund, dass die Werte für den Korrelationskoeffizienten nicht Maßzahlen einer Kardinalskala sind und somit der Mittelwert der Korrelationskoeffizienten ohne vorherige Z-Transformation nicht interpretierbar ist<sup>189</sup>.

## 4 Ergebnisse der Methodenentwicklung und -validierung

### 4.1 CE-Methode zur Untersuchung der Platin-Nukleotid-Adduktbildung

#### 4.1.1 Optimierung der Trennung der Platin-Nukleotid-Addukte

Zu Beginn wurde versucht, eine bestehende Methode von U. Warnke<sup>32</sup> zu übernehmen. Die von U. Warnke entwickelte Methode nutzt einen Trennpuffer bestehend aus Ammoniumacetat 16,2 mM mit einem pH-Wert von 9,8. Die Trennung erfolgt bei 20 kV und 25 °C. Diese Methode eignete sich aus mehreren Gründen nur begrenzt für die Untersuchung und den Vergleich strukturell unterschiedlicher Platinkomplexe. Zum einen wurde im Fall der albuminbindenden Platinkomplexe (PL04, PL07) ein Abbauprodukt detektiert, welches mit den potentiell entstehenden monofunktionalen Addukten komigriert, zum anderen war das Zeitfenster (Detektionsfenster) in dem die Addukte detektiert wurden sehr schmal und insbesondere die Trennung des bifunktionalen dGMP-Addukts von dAMP unzureichend (s. Abb. 4-1).

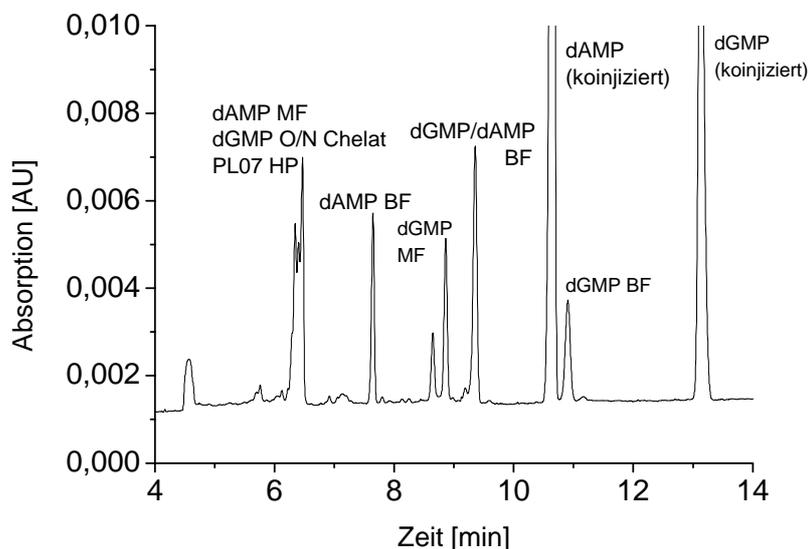


Abb. 4-1: Elektropherogramm von Cisplatin nach 12 Stunden Inkubation mit dAMP und dGMP (Methode U. Warnke) und darauf folgender Koinjektion von dAMP, dGMP und PL07 (MF=monofunktionales Addukt, BF=bifunktionales Addukt, HP= Abbauprodukt).

Da die Reaktivität verschiedener Platinkomplexe gegenüber dAMP und dGMP untersucht werden sollte, bestand die Möglichkeit, dass minimale strukturelle Variationen am stabilen Liganden der Platinkomplexe aufgrund veränderter Masse zu einer Veränderung der Migrationszeit des bifunktionalen dGMP-Addukts führen und dieses dann mit dAMP komigriert. Die Methode von U. Warnke wurde deshalb optimiert und anschließend neu validiert.

### pH-Wert gesteuerte Trennungsoptimierung

Der von U. Warnke verwendete Ammoniumacetatpuffer, welcher für die CE/MS Kopplung notwendig war, wurde aufgrund mangelnder Pufferkapazität gegen den gebräuchlichen und stabilen Boratpuffer [100 mM] ausgetauscht.

Im ersten Schritt wurde eine pH-Wert gesteuerte Trennungsoptimierung durchgeführt. Eine Änderung des pH-Werts resultierte in einer Veränderung der Migrationszeit des bifunktionalen dGMP-Addukts, sodass bei einem pH-Wert von 9,1 ein deutlich vergrößertes Detektionsfenster für dieses Addukt entstand. Abb.4-2 zeigt an einem Beispiel von vier Puffern das pH-abhängige Migrationsverhalten dieses Addukts.

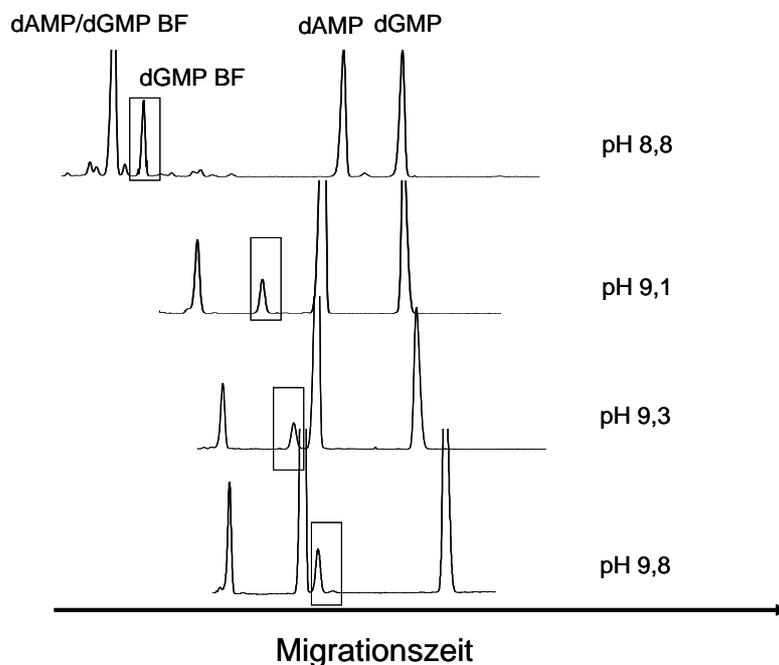


Abb.4-2: Optimierung der Trennung des bifunktionalen dGMP-Addukts (BF=bifunktionales Addukt).

Die Änderung der pH-Werte bewirkte allerdings keine Verbesserung der Trennung des Abbauprodukts der albuminbindenden Platinkomplexe von potentiellen monofunktionalen Addukten. Deshalb wurde versucht, mit unterschiedlich großen Mengen des Micellbildners SDS und Zusatz von Ethanol über die micellare elektrokinetische Chromatographie eine Auftrennung zu erreichen. Es zeigte sich, dass auch mit dem Micellbildner SDS und Ethanol keine Trennung zu erreichen war. Des Weiteren entstanden deutliche Verschiebungen des Adduktumsters, die eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von U. Warnke verhinderten und eine aufwändige Identifikation der Addukte durch CE/MS-Kopplung notwendig gemacht hätten. Vor diesem Hintergrund wurde eine Optimierung unter Veränderung der Pufferkonzentration durchgeführt.

### Elektrolytkonzentration gesteuerte Trennungsoptimierung

Abb. 4-3 ist zu entnehmen, dass eine Erhöhung der Pufferkonzentration die Auftrennung der Analyten deutlich verbesserte. Dieser Effekt ist durch eine Zunahme der Peakschärfe aufgrund einer Aufkonzentrierung der Probe in der Kapillare (*stacking*, s. Kap. 3.2.1) erklärbar. Zusätzlich verbesserte die Verringerung des EOF durch Abnahme des Zetapotentials die Trennung.

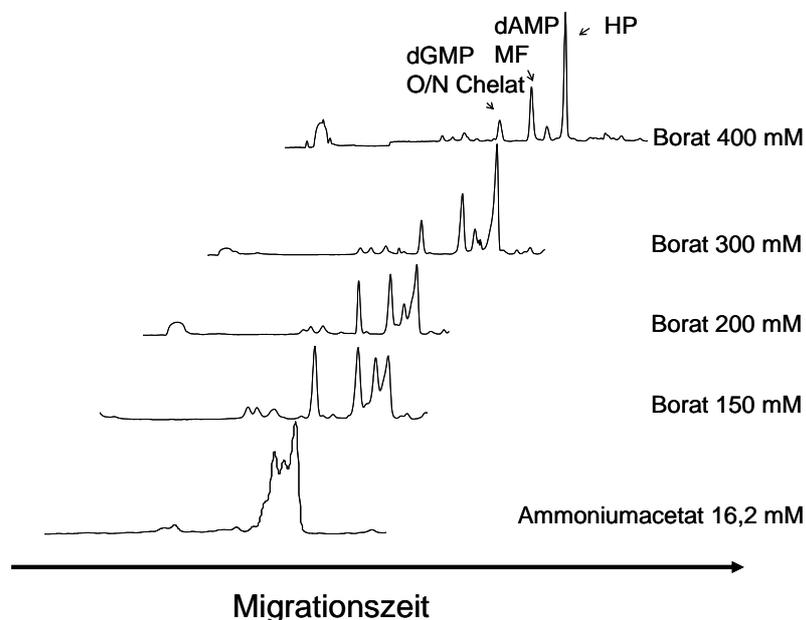


Abb. 4-3: Optimierung der Trennung potentieller monofunktionaler Addukte vom Abbauprodukt der albuminbindenden Platinkomplexe (MF=monofunktionales Addukt).

Auf eine höhere Elektrolytkonzentration als 400 mM Borat wurde verzichtet, da dadurch zum einen der Strom steigt, was zu einer stärkeren Joule'sche Erwärmung führt, und zum anderen die Analysenzeit deutlich zunimmt. Eine weitere geringfügige Verbesserung der Trennung erfolgte durch ein Absenken der Kapillartemperatur von 25 auf 19 °C. Abb. 4-4 zeigt ein Elektropherogramm, erzeugt mit der für die Analytik der Platin-Nukleotid-Addukte verwendeten Methode.

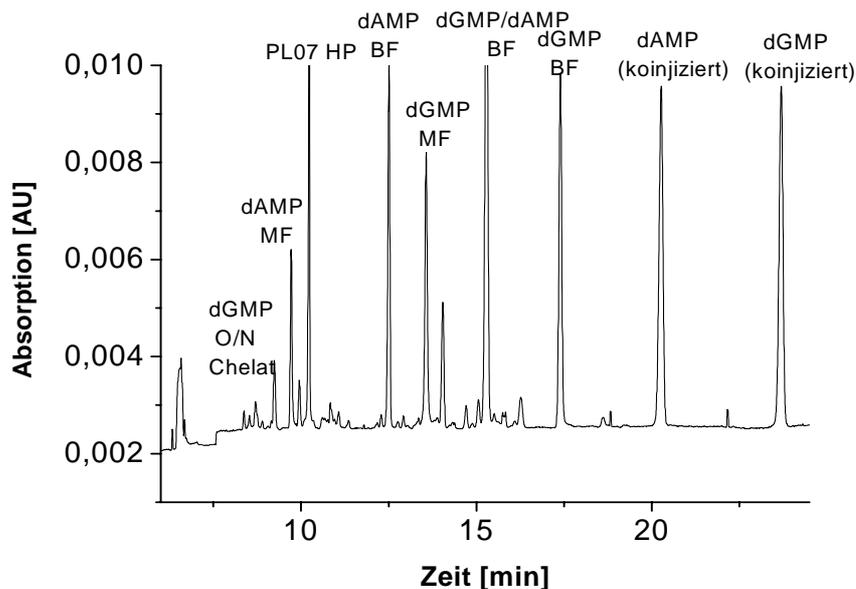


Abb. 4-4: Elektropherogramm von Cisplatin nach 12 Stunden Inkubation mit dAMP und dGMP (400 mM Borat, pH 9,1, 20 kV, 19 °C) und darauf folgender Koinjektion von dAMP, dGMP und PL07 (MF=monofunktionales Addukt, BF=bifunktionales Addukt, HP=Abbauprodukt).

Wie aus dem Elektropherogramm ersichtlich, ist es mit dieser Methode möglich, das Abbauprodukt der albuminbindenden Platinkomplexe von monofunktionalen Addukten zu trennen. Weiterhin wurde die Trennung des bifunktionalen dGMP-Addukts von dAMP optimiert. Die Vergrößerung des Detektionsfensters (zwischen erstem Addukt und dAMP) für verschiedene Addukte – von ca. 5 Minuten bei der Methode von U. Warnke auf ca. 14 Minuten – erlaubt mehr Spielraum bei der Analyse neuer, strukturell abgewandelter Platinkomplexe und wiegt den Nachteil längerer Analysenzeiten auf.

## 4.1.2 Validierung

Da weitreichende Änderungen der Methode notwendig waren und die Methode zur Routineanalytik eingesetzt werden sollte, wurde entschieden, eine vollständige Validierung durchzuführen.

### 4.1.2.1 Nachweisgrenze

Nach Optimierung der Trennbedingungen wurde die Nachweisgrenze, basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens drei, experimentell bestimmt. Für beide Nukleotide konnte eine Nachweisgrenze von 2  $\mu\text{M}$  unter Verwendung der UV-Detektion bei 254 nm ermittelt werden.

### 4.1.2.2 Linearität

Zunächst wurde getestet, ob die Verwendung eines internen Standards eine Verbesserung der Anpassung bewirkt. Durch den internen Standard sollten zwei Nachteile der Methode aufgehoben werden. Durch eine stärkere Joule'sche Erwärmung aufgrund der relativ hohen Elektrolytkonzentration kann es zur Ausdehnung der Flüssigkeit in der Kapillare kommen, was zu einer schlechteren Injektionspräzision durch Verlust von Probe am Kapillareinlass führt. Die Verwendung sehr kleiner Probenvolumina (100  $\mu\text{l}$ ) verursachte durch Verdunstungseffekte eine mangelnde Stabilität im Autosampler, die auch bei der Validierung der Methode von U. Warnke beschrieben wurde<sup>32</sup>. Als interner Standard fand das Nukleotid TMP (4  $\mu\text{L}$  Stammlösung TMP in 96  $\mu\text{l}$  Probe = 120  $\mu\text{M}$  TMP) Verwendung, da hier wegen der geringen Basizität eine vernachlässigbare Reaktivität gegenüber Platinkomplexen bekannt war und TMP günstige Migrationseigenschaften besitzt (TMP wird kurz nach dAMP und dGMP bei guter Basislinientrennung detektiert)<sup>32,34</sup>. Insgesamt wurden sechs Kalibriergeraden (Konzentrationsbereich 5-150  $\mu\text{M}$ , sechs Standards) ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4-1 zusammengefasst.

Tab. 4-1: Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) und Residuen der Kalibriergeraden der Nukleotide dAMP und dGMP in Abhängigkeit vom verwendeten linearen Regressionsmodell mit und ohne internen Standard (I.S.).

Gütekriterien	dAMP	dGMP	dAMP + I.S.	dGMP + I.S.
<b>linear (ungewichtet)</b>				
$\bar{r}^*$	0,9935	0,9940	0,9983	0,9986
<b>Residuen (n = 36)</b>				
Spannweite [%]	-266 - 1383	-584 - 133	-12,3 - 80,6	-20,7 - 16,6
Mittelwert <sup>#</sup> [%]	64,0	36,7	12,8	5,3
<b>linear (Wichtung 1/x)</b>				
$\bar{r}^*$	0,9935	0,9950	0,9982	0,9990
<b>Residuen (n = 36)</b>				
Spannweite [%]	-21,9 - 41,8	-18,8 - 40,1	-12,5 - 14,6	-7,5 - 11,7
Mittelwert <sup>#</sup> [%]	9,1	7,5	5,3	3,6
<b>linear (Wichtung 1/x<sup>2</sup>)</b>				
$\bar{r}^*$	0,9930	0,9950	0,9972	0,9987
<b>Residuen (n = 36)</b>				
Spannweite [%]	-15,8 - 29,6	-12,9 - 25,4	-12,6 - 12,1	-8,8 - 8,3
Mittelwert <sup>#</sup> [%]	6,7	5,5	4,5	3,1

\* Mittelwert des Korrelationskoeffizienten, Berechnung nach Gl. 3-24 bzw. Gl. 3-25 (n = 6)

# Die Mittelwerte wurden nach Betragsbildung berechnet.

Wie sich anhand der Residuen deutlich erkennen lässt, ist der Einsatz eines internen Standards notwendig. Es empfiehlt sich, zusätzlich eine Wichtung vorzunehmen, da Homoskedastizität, d.h. Varianzenhomogenität der Messwerte, bei großen Arbeitsbereichen (> Faktor 10) in aller Regel nicht gegeben ist. Dadurch wird ein zu starker Einfluss der hohen Messwerte auf die Regression vermieden<sup>180</sup>. Die beste Anpassung wurde durch eine lineare Regression, gewichtet  $1/x^2$ , ermittelt. Bei diesem Modell lagen die Residuen zwischen -12,6 und 8,3 %, die Mittelwerte (n = 36) zwischen 3,1 und 4,5 %. Ausreißer (Residuen > 15 %, am LLOQ > 20 %) wurden unter Verwendung dieses Modells nicht gefunden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde dieses Modell zur Quantifizierung der Nukleotide dAMP und dGMP gewählt.

Abb. 4-5 zeigt zwei charakteristische,  $1/x^2$  gewichtete Kalibriergeraden für dAMP und dGMP.

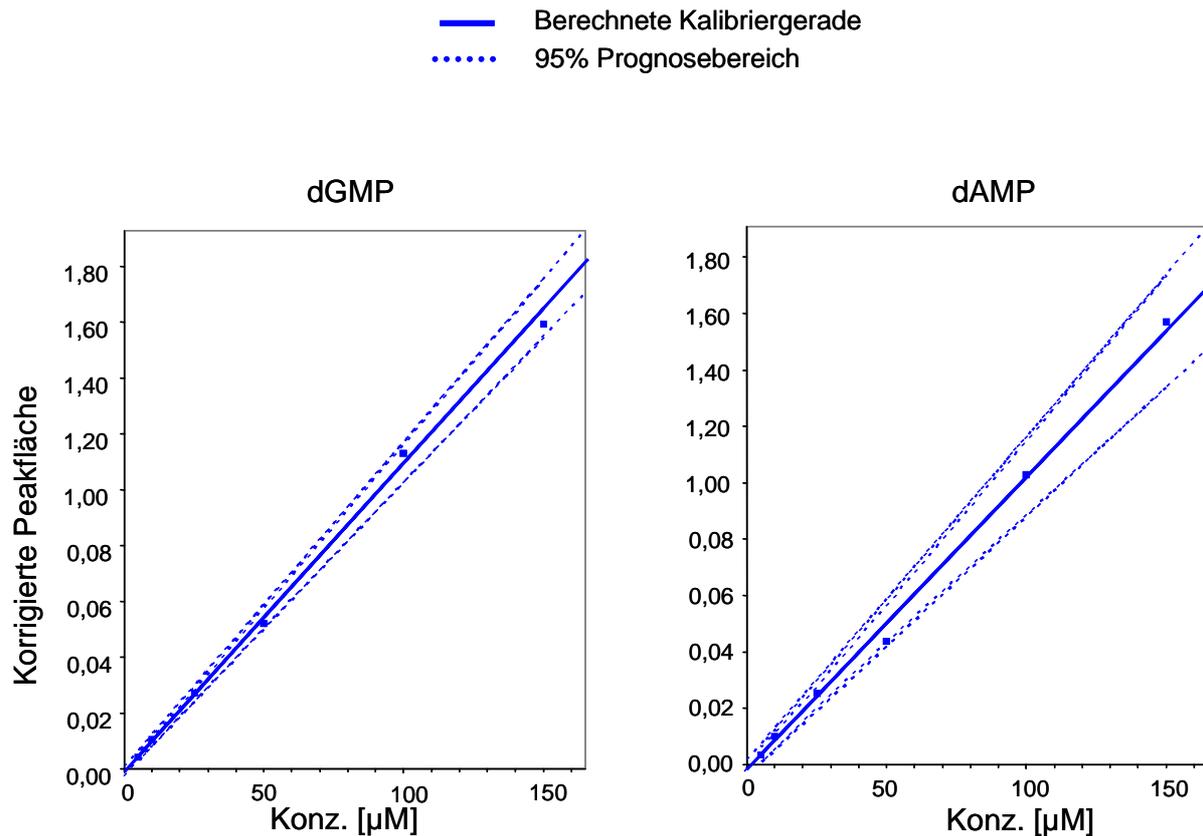


Abb. 4-5: Charakteristische Kalibriergeraden der Nukleotide dAMP und dGMP bei Verwendung eines internen Standards, Wichtung  $1/x^2$ .

#### 4.1.2.3 Bestimmungsgrenze

Als Bestimmungsgrenze wurde für die Nukleotide eine Konzentration von 5 µM ermittelt. Tab. 4-2 zeigt die Daten zur Präzision und Richtigkeit bezüglich des LLOQ. Sie demonstrieren, dass das jeweilige LLOQ mit hinreichender Präzision und Richtigkeit erfasst werden konnte (relative Standardabweichung und relativer Fehler nicht größer als 20 %).

Tab. 4-2: Präzision und Richtigkeit am LLOQ ( $n=5$ ).

	dAMP	dGMP
<b>LLOQ [µM]</b>	5,0	5,0
Präzision, VK [%]	10,0	8,3
Richtigkeit [%]	91,6	102,5

#### 4.1.2.4 Präzision und Richtigkeit

##### Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision wurde ermittelt, indem dieselbe Probe fünfmal hintereinander injiziert wurde. Sie wurde für drei verschiedene Konzentrationen der Nukleotide untersucht. Tab. 4-3 zeigt, dass die Variationskoeffizienten der Wiederholpräzision für alle Konzentrationen durchweg unter 3 % lagen.

Tab. 4-3: Wiederholpräzision der entwickelten Methode ( $n = 5$ ).

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Wiederholpräzision, VK [%]	
	dAMP	dGMP
120	2,7	2,8
60	2,6	1,4
20	2,7	2,8

##### Methodenpräzision (*Within-day-Präzision*)

Die Variationskoeffizienten der Within-day-Präzision können Tab. 4-4 entnommen werden.

Tab. 4-4: Within-day-Präzision der entwickelten Methode ( $n = 5$ ).

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Within-day-Präzision, VK [%]	
	dAMP	dGMP
120	1,2	1,3
60	1,4	1,1
20	1,9	2,2

Alle ermittelten Variationskoeffizienten lagen unter 3 %. Die Ergebnisse zeigen die hohe Präzision der Methode.

##### Vergleichspräzision (*Between-day-Präzision*)

Die berechneten Variationskoeffizienten der Between-day-Präzision finden sich in Tab. 4-5. Die Between-day-Präzision gilt als Kriterium der Reproduzierbarkeit der Methode über einen längeren Zeitraum. Erwartungsgemäß war die Streuung der Messergebnisse hier etwas größer als bei der Within-day-Präzision.

Tab. 4-5: *Between-day-Präzision der entwickelten Methode (n = 5).*

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Between-day-Präzision, VK [%]	
	dAMP	dGMP
120	4,0	4,1
60	6,2	2,6
20	5,7	3,3

### Richtigkeit

Zur Untersuchung der Richtigkeit wurden drei QC-Proben [120, 60 und 20  $\mu\text{M}$ ] sowohl an einem Tag (*Within-day-Richtigkeit*) als auch an fünf aufeinander folgenden Tagen (*Between-day-Richtigkeit*) vermessen. Die Richtigkeit wurde nach Gl. 3-12 berechnet. In Tab. 4-6 und Tab. 4-7 sind die Ergebnisse dargestellt.

Tab. 4-6: *Within-day-Richtigkeit der Methode (n = 5).*

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Richtigkeit [%]	
	dAMP	dGMP
120	105,3	99,8
60	101,9	94,9
20	104,8	99,5

Tab. 4-7: *Between-day-Richtigkeit der Methode (n = 5).*

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Richtigkeit [%]	
	dAMP	dGMP
120	101,4	99,9
60	102,3	98,5
20	100,2	98,6

Die berechneten Konzentrationen wichen in allen Fällen um weniger als  $\pm 6\%$  von den Nominalwerten ab.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Methode hinsichtlich Präzision und Richtigkeit die Akzeptanzkriterien der FDA, wonach Variationskoeffizient und relativer Fehler nicht größer als 15 % sein dürfen, erfüllt<sup>179</sup>.

#### 4.1.2.5 Stabilität im Autosampler

Die Ergebnisse aus Tab. 4-8 verdeutlichen, dass die Stabilität der Kalibratoren und Qualitätskontrollproben über 12 Stunden gewährleistet ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Proben, die Oxaliplatin enthielten, bei Raumtemperatur im Autosampler über sechs Stunden keiner quantitativ bedeutenden Umsetzung mit Nukleotiden unterlagen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden bis zu 12 Messproben, die Oxaliplatin oder Carboplatin enthielten – Carboplatin ist unter den gewählten Bedingungen deutlich weniger reaktiv – nacheinander vermessen.

Tab. 4-8: Stabilität im Autosampler in An- und Abwesenheit von Oxaliplatin.

<b>Stabilität im Autosampler nach 12 h [%]</b>		
<b>Konzentration [<math>\mu</math>M]</b>	<b>dAMP</b>	<b>dGMP</b>
120	98,1	99,1
60	97,8	98,6
20	95,1	96,4
<b>Stabilität im Autosampler nach 6 h [%] in Anwesenheit von Oxaliplatin</b>		
120	100,2	99,4
60	100,1	98,2
20	100,5	100,1

## 4.2 CE-Methode zur Untersuchung der Albuminbindung

### 4.2.1 Trennung

Die Untersuchung der Albuminbindung der albuminbindenden Platinkomplexe sollte aufgrund der pH-Abhängigkeit (vgl. Kap 1.5.1) bei einem physiologischen pH-Wert (pH 7,4) erfolgen. Eine ausreichende Basislinientrennung von Albumin und ungebundenem Platinkomplex gelang auf Anhieb mit einem Trennpuffer bestehend aus 0,02 M Phosphat (pH 7,4) bei 7 kV und 25 °C. Ein repräsentatives Elektropherogramm am Beispiel von PL07 zeigt Abb. 4-6. Weitere Verwendung fand

diese Methode zur Untersuchung der Stabilität der albuminbindenden Platinkomplexe.

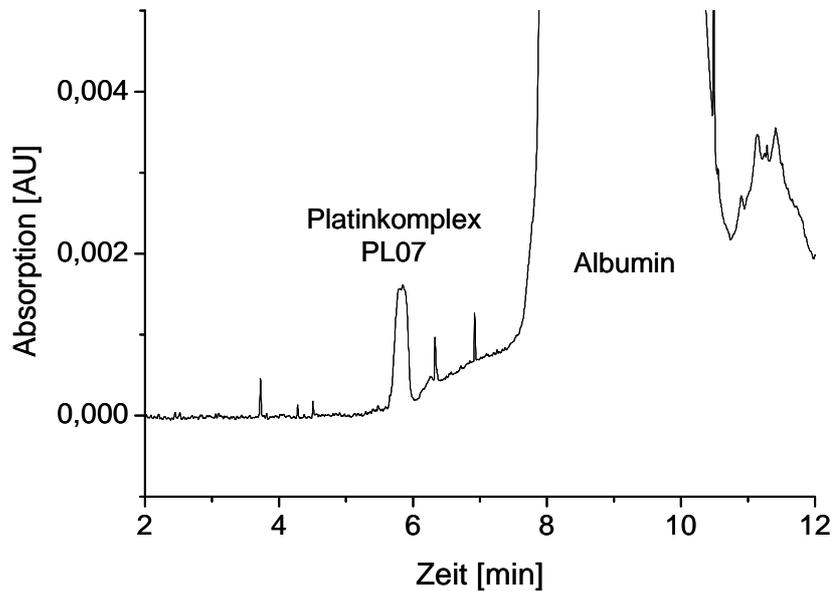


Abb. 4-6: Charakteristisches Elektropherogramm der Analytik von PL07 in Anwesenheit von Albumin (Inkubationszeit = 10 Minuten).

## 4.2.2 Validierung

Auf eine aufwändige Validierung wurde verzichtet, da diese Methode nicht für umfangreiche quantitative Untersuchungen eingesetzt werden sollte. Die Validierung beschränkte sich auf die Untersuchung der Linearität, welche den linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Signal der Analyten belegt.

### 4.2.2.1 Linearität

Die Untersuchungen zur Linearität wurden unter Verwendung von 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4) durchgeführt. Insgesamt wurden drei Kalibriergeraden (Arbeitsbereich 5-150  $\mu\text{M}$ , fünf Standards) ausgewertet. Die Ergebnisse unter Berücksichtigung der besten ermittelten Wichtung von  $1/x$  sind in Tab. 4-9 zusammengefasst und typische Kalibriergeraden in Abb. 4-7 dargestellt.

Tab. 4-9: Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) und Residuen der Kalibriergeraden der Platinkomplexe PL04 und PL07 (lineare Regression, Wichtung  $1/x$ ).

	PL04	PL07
$\bar{r}^*$	0,9997	0,9996
<b>Residuen (n = 15)</b>		
Spannweite [%]	-3,9-5,5	-4,8-5,5
Mittelwert <sup>#</sup> [%]	1,8	2,8

\* Mittelwert des Korrelationskoeffizienten, Berechnung nach Gl. 3-24 bzw. Gl. 3-25 (n = 6)

# Die Mittelwerte wurden nach Betragsbildung berechnet.

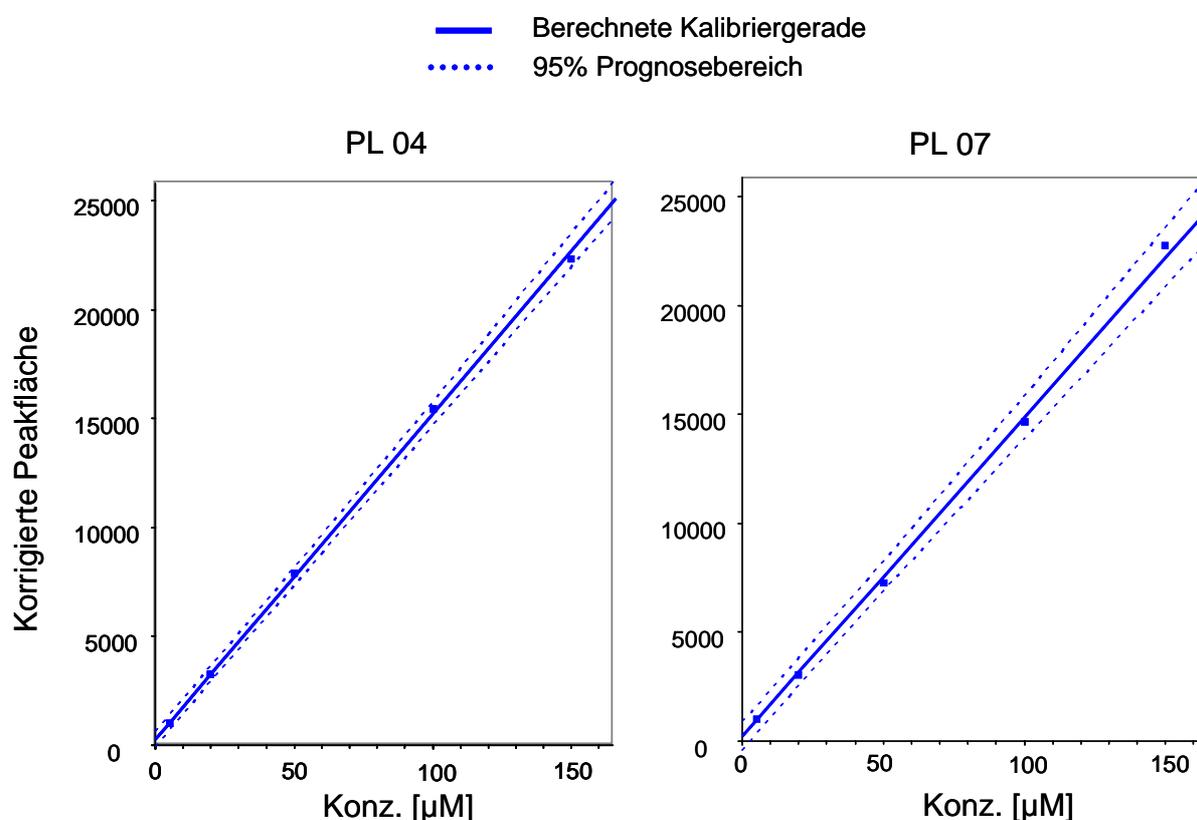


Abb. 4-7: Charakteristische Kalibriergeraden der Platinkomplexe PL04 und PL07, Wichtung  $1/x$ .

#### 4.2.3 Stabilitätsuntersuchungen albuminbindender Platinkomplexe

##### Einfrier-Auftau- und Langzeitstabilität der Platinkomplexe in der Stammlösung

Die Untersuchung der Einfrier-Auftau-Stabilität der albuminbindenden Platinkomplexe in der Stammlösung (Lösungsmittel: Wasser) diente dazu, den

Einfluss extremer Temperaturschwankungen von -20 °C (Tiefkühlschrank) bis 25 °C (Raumtemperatur) zu überprüfen. Die Stabilität wurde nach einem, zwei bzw. drei Einfrier-Auftau-Zyklen nach Gl. 3-11 berechnet. Als Referenz fand nach modifizierter Vorschrift der FDA (vgl. Kap. 3.2.3.3) für den ersten Einfrier-Auftau-Zyklus eine frisch zubereitete Lösung der Platinkomplexe, für den zweiten und dritten Zyklus ein frisch aufgetautes Aliquot Anwendung.

Tab. 4-10: Einfrier-Auftau- und Langzeitstabilität der Platinkomplexe PL04 und PL07 in der Stammlösung [Konzentration der Platinkomplexe: 2 mM].

Zyklus	Einfrier-Auftau-Stabilität [%]	
	PL04	PL07
1	99,4	101,6
2	98,8	96,8
3	101,0	97,2
Zeitdauer [Monate]	Langzeitstabilität [%]	
	PL04	PL07
6	97,0	105,3

Die Ergebnisse der Tab. 4-10 zeigen, dass sowohl wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen als auch eine Zeitspanne von sechs Monaten keinen relevanten Einfluss auf die Stabilität der albuminbindenden Platinkomplexe in der Stammlösung haben.

#### **Stabilität der Platinkomplexe im Reaktionsansatz zur Kopplung an Albumin.**

Da im Rahmen der Entwicklung der Methode zur Analytik der Platin-Nukleotid-Addukte festgestellt wurde, dass die albuminbindenden Platinkomplexe unter basischen Bedingungen schnell ein Abbauprodukt bilden, sollte untersucht werden, inwieweit die Stabilität unter den Reaktionsbedingungen der Bindung an Albumin gegeben ist. Nach Hydrolyse der Maleinimidstruktur kann Maleaminsäure entstehen, welche nicht mehr zur Reaktion mit der Sulfhydrylgruppe des Albumins fähig ist<sup>197,198</sup> (vgl. Kap. 7.2.1). Die Stabilität der Platinkomplexe in dem Kopplungsansatz (Konzentration 0,15 mM, 4 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, 37 °C), wurde nach 0, 15, 30, 45 und 60 Minuten analysiert.

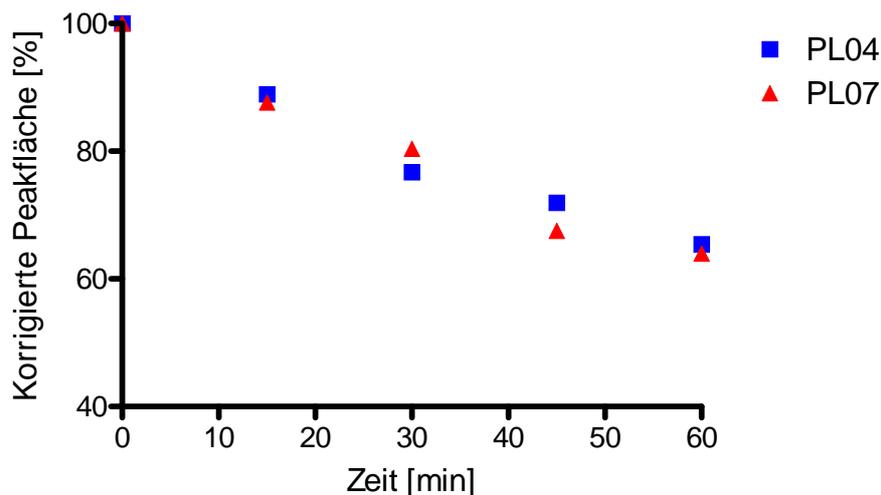


Abb. 4-8: Stabilität von PL04/PL07 unter Kopplungsbedingungen.

Wie aus Abb. 4-8. ersichtlich, kommt es unter den Reaktionsbedingungen der Albuminbindung zu einer Abnahme der Konzentration der Platinkomplexe. Nach 30 Minuten kann diese bei bis zu 20 % liegen. Dieses Ergebnis erforderte weitere Untersuchungen. Zum einen wurde die Stabilität der Stammlösung im Kühlschrank sowie bei Raumtemperatur überprüft, um sicherzustellen, dass zu Versuchsbeginn noch keine Hydrolyse eingesetzt hat, zum anderen mussten Geschwindigkeit und Ausmaß der Albuminbindung untersucht werden (vgl. Kapitel 5.1), da Hydrolyse der Maleinimidfunktion und Bindung an Albumin als Konkurrenzreaktion aufzufassen sind.

#### **Stabilität der Platinkomplexe im Kühlschrank und bei Raumtemperatur**

Da die Untersuchung zur Stabilität unter Kopplungsbedingungen zeigte, dass die albuminbindenden Platinkomplexe instabil sind, wurden diese nach dem Auftauen für maximal zwei Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Die Verwendung außerhalb des Kühlschranks wurde möglichst kurz gehalten (in der Regel wenige Minuten). Tab. 4-11 legt dar, dass die Stabilität der Platinkomplexe in der Stammlösung sowohl nach zwei Stunden im Kühlschrank wie auch nach einer Stunde bei Raumtemperatur gewährleistet war.

Tab. 4-11: Stabilität der Platinkomplexe [%] in der Stammlösung, gelagert im Kühlschrank und bei Raumtemperatur [Konzentration: 0,15 mM].

Zeitdauer [h]	PL04	PL07
<b>Kühlschrank</b>		
1	99,4	101,6
2	98,8	96,8
<b>Raumtemperatur</b>		
1	99,7	101,9

### 4.3 BCA-Methode zur Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung diente das BCA-Test-Kit der Firma Pierce. Da dieser Anbieter zur Auswertung eine quadratische Regression der Kalibriergeraden empfiehlt und dieser Zusammenhang im verwendeten Kalibrierbereich nicht beobachtet werden konnte, wurde zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Konzentration und Signal des Analyten eine Teilvalidierung der Methode durchgeführt.

#### 4.3.1 Teilvalidierung

Im Rahmen der Teilvalidierung wurde die Linearität zur Festlegung des geeigneten Regressionmodells getestet, die Bestimmungsgrenze (LLOQ) ermittelt und anschließend Präzision und Richtigkeit bestimmt. Bei der Ermittlung der Präzision wurden die Untersuchungen auf die Between-day-Präzision beschränkt, die als Kriterium für die Reproduzierbarkeit der Methode über einen längeren Zeitraum gilt und in der Regel mit einer höheren Variabilität behaftet ist als die Within-day-Präzision.

### 4.3.1.1 Linearität

Tab. 4-12 zeigt die Korrelationskoeffizienten bei linearer Regression ( $r$ ) und die Residuen der verschiedenen Modelle im Vergleich. Insgesamt wurden sechs Kalibriergeraden ausgewertet.

Tab. 4-12: Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) und Residuen der Kalibriergeraden in Abhängigkeit vom verwendeten Regressionsmodell.

	linear	linear (Wichtung 1/x)
$\bar{r}^*$	0,998	0,996
<b>Residuen (n = 30)</b>		
Spannweite [%]	-14,7 - 17,7	-10,8 - 9,0
Mittelwert <sup>#</sup> [%]	5,0	4,1
	linear (Wichtung 1/x <sup>2</sup> )	nichtlinear quadratisch
$\bar{r}^*$	0,993	–
<b>Residuen (n = 30)</b>		
Spannweite [%]	-11,5 - 10,8	-8,1 - 7,7
Mittelwert <sup>#</sup> [%]	3,7	2,9

\* Mittelwert des Korrelationskoeffizienten, Berechnung nach Gl. 3-24 bzw. Gl. 3-25 (n = 6)

# Die Mittelwerte wurden nach Betragsbildung berechnet.

Bei ähnlicher Güte der Anpassung sollte prinzipiell das einfachste Modell gewählt werden. Der ermittelte Zusammenhang ist linear (Abb. 4-9), sodass als Regressionsmodell im Kalibrierbereich von 25-200 µg/ml im folgendem die lineare Regression mit einer Wichtung von 1/x gewählt wurde, obwohl auch eine quadratische Regression zu einer guten Anpassung führt.

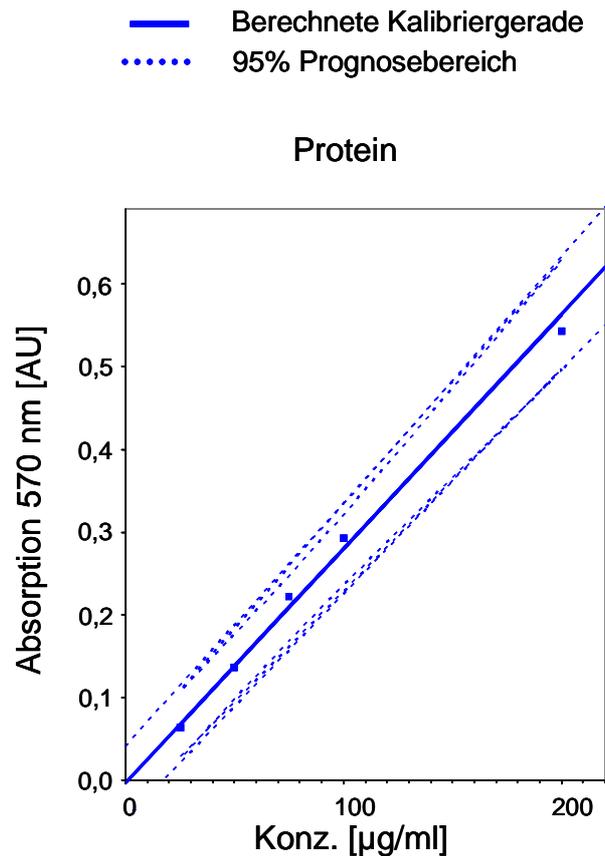


Abb. 4-9: Charakteristische Kalibriergerade der Proteinbestimmung, Wichtung  $1/x$ .

#### 4.3.1.2 Bestimmungsgrenze

Als Bestimmungsgrenze wurde für die Proteine eine Konzentration von  $25 \mu\text{g/ml}$  ermittelt. Tab. 4-2 zeigt die Ergebnisse zur Präzision und Richtigkeit am LLOQ.

Tab. 4-13: Präzision und Richtigkeit am LLOQ ( $n=5$ ).

<b>LLOQ [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	25
Präzision, VK [%]	5,6
Richtigkeit [%]	91

Wie ersichtlich, konnte das LLOQ mit hinreichender Präzision und Richtigkeit erfasst werden.

### 4.3.1.3 Präzision und Richtigkeit

Der Tab. 4-14 lassen sich die berechneten Variationskoeffizienten der Between-day-Präzision entnehmen, der Tab. 4-15 die Ergebnisse zur Richtigkeit. Zur Untersuchung der Richtigkeit wurden drei QC-Proben (120, 60 und 30 µg/ml) an fünf aufeinander folgenden Tagen vermessen.

Tab. 4-14: Between-day-Präzision der Proteinbestimmung (n = 5).

Konzentration [µg/ml]	Between-day-Präzision, VK [%]
120	8,1
60	4,1
30	7,1

Tab. 4-15: Between-day-Richtigkeit der Proteinbestimmung (n = 5).

Konzentration [µg/ml]	Richtigkeit [%]
120	104,7
60	104,4
30	103,3

Wie zu erkennen ist, erfüllt die Methode hinsichtlich Präzision und Richtigkeit die Akzeptanzkriterien der FDA, wonach Variationskoeffizient und relativer Fehler nicht größer als 15 % sein dürfen<sup>179</sup>.

## 4.4 Fluoreszenzassay zur Bestimmung von FITC-Rinderserumalbumin

Fluoreszierendes Albumin wird häufig zur Bestimmung der Aufnahme von Albumin und zur Charakterisierung der Endozytosemechanismen in Zellen eingesetzt<sup>193,199,200,201</sup>. Leider fanden sich auch nach gründlicher Literaturrecherche keine Angaben zur Qualitätssicherung quantitativer Bestimmungen, sodass eine Teilvalidierung durchgeführt wurde.

#### 4.4.1 Teilvalidierung

Analog zur Teilvalidierung der BCA-Methode wurden Linearität, Bestimmungsgrenze sowie Präzision und Richtigkeit bestimmt (s. Kap. 4.3.1). Zusätzlich erfolgte eine Stabilitätsuntersuchung der FITC-Rinderserumalbumin-Stammlösung, da von Seiten des Anbieters ein möglicher Fluoreszenzverlust von FITC-Rinderserumalbuminlösungen beschrieben wurde, genauere Stabilitätsdaten jedoch fehlten.

##### 4.4.1.1 Linearität

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Linearität können Tab. 4-16 entnommen werden. Insgesamt wurden sechs Kalibriergeraden (Arbeitsbereich 10-500 nM, sechs Standards) ausgewertet. Dargestellt ist das beste ermittelte Regressionsmodell mit einer Wichtung von  $1/x^2$ . Die Notwendigkeit der Wichtung erklärt sich durch den großen Kalibrierbereich, welcher einen Faktor 50 umfasst, da in diesem Fall die Varianzenhomogenität der Messwerte nicht gegeben ist.

Bei der Auswertung der Standards der Kalibriergeraden fand sich ein Ausreißer, der für die untere Grenze der Spannweite von - 19,74 % verantwortlich war. Da hier weder der höchste noch der niedrigste Standard betroffen waren und alle anderen Standards unter 15 % Abweichung vom Nominalwert lagen, erfüllte auch diese Kalibriergerade die von der FDA geforderten Kriterien.

Tab. 4-16 Korrelationskoeffizient ( $r$ ) und Residuen der Kalibriergeraden von FITC-Rinderserumalbumin (lineare Regression, Wichtung  $1/x^2$ ).

FITC-Rinderserumalbumin	
$\bar{r}^*$	0,9934
<b>Residuen (n = 36)</b>	
Spannweite [%]	-19,74 - 11,84
Mittelwert <sup>#</sup> [%]	5,1

\* Mittelwert des Korrelationskoeffizienten, Berechnung nach Gl. 3-24 bzw. Gl. 3-25 (n = 6)

# Die Mittelwerte wurden nach Betragsbildung berechnet.

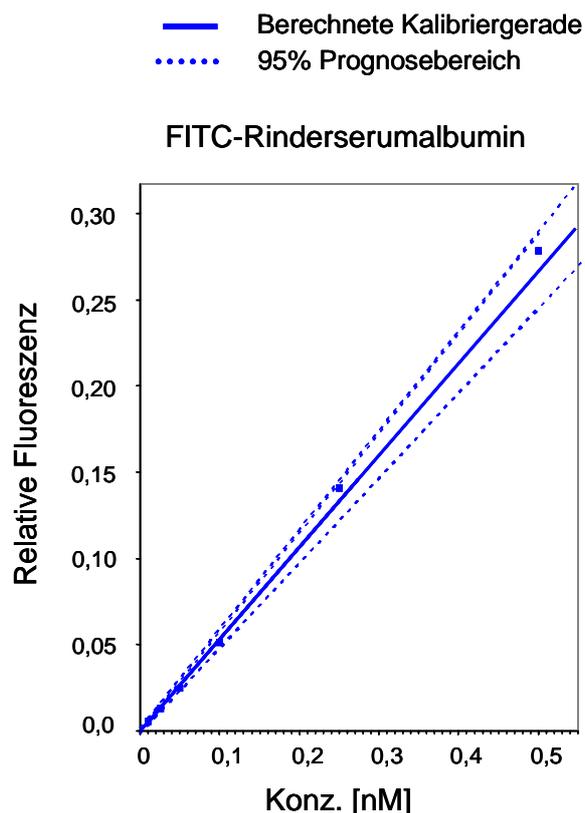


Abb. 4-10: Charakteristische Kalibriergeraden der Bestimmung von FITC-Rinderserumalbumin, Wichtung  $1/x^2$ .

#### 4.4.1.2 Bestimmungsgrenze

Als Bestimmungsgrenze wurde für FITC-Rinderserumalbumin eine Konzentration von 10 nM ermittelt. Tab. 4-17 zeigt die Ergebnisse zur Präzision und Richtigkeit bezüglich des LLOQ.

Tab. 4-17: Präzision und Richtigkeit am LLOQ.

<b>LLOQ [nM]</b>	10
Präzision, VK [%]	5,6
Richtigkeit [%]	101,4

Auffallend ist die hohe Empfindlichkeit dieser Methode, mit der fluoreszierendes Albumin im unteren nanomolaren Konzentrationsbereich erfasst werden kann.

#### 4.4.1.3 Präzision und Richtigkeit

Die ermittelten Daten zur Präzision und Richtigkeit der Methode lassen sich den Tab. 4-18 und Tab. 4-19 entnehmen. Aus ihnen geht hervor, dass die Anforderungen der FDA erfüllt werden. Zur Untersuchung der Richtigkeit wurden drei QC-Proben [300, 60 und 30 nM] an fünf aufeinander folgenden Tagen vermessen.

Tab. 4-18: *Between-day-Präzision der Bestimmung von FITC-RSA (n = 5).*

Konzentration [nM]	Between-day-Präzision, VK [%]
300	3,5
60	6,1
30	4,0

Tab. 4-19: *Between-day-Richtigkeit der Bestimmung von FITC-RSA (n = 5).*

Konzentration [nM]	Richtigkeit [%]
300	101,0
60	96,7
30	92,3

#### 4.4.1.4 Stabilitätsuntersuchungen

In Lösungen kann FITC-Rinderserumalbumin vor allem unter Licht- oder pH-Einfluss (pH<7) schnell Fluoreszenzverlust zeigen<sup>202</sup>. Der Anbieter machte keine detaillierten Angaben über die Stabilität dieser Lösungen, sodass die Stammlösung untersucht werden musste. Tab. 4-20 belegt die Einfrier-Auftau Stabilität der Stammlösung sowie die Stabilität bei Raumtemperatur während der Verwendungsdauer. Als Referenz wurde stets mit einer neu hergestellten Stammlösung verglichen.

Tab. 4-20: *Stabilität der Stammlösung von FITC-RSA.*

Zyklus	Einfrier-Auftau-Stabilität [%]
1	97,6
2	99,0
3	101,7
Zeitdauer [h]	Stabilität bei Raumtemperatur [%]
1	100,3

## 5 Ergebnisse zur Untersuchung makromolekularer Platin-komplexe

### 5.1 Bindung an Albumin

Die untersuchten Platinkomplexe sollen nach intravenöser Applikation rasch an das körpereigene Albumin binden. Die schnelle und selektive Bindung der albuminbindenden Platinkomplexe ist der erste entscheidende Schritt im Konzept der Ausnutzung von Albumin als Träger für Platinkomplexe und wird im Folgenden charakterisiert.

#### 5.1.1 Kinetik der Albuminbindung

Die Untersuchung der Geschwindigkeit der Albuminbindung erfolgte *in vitro* mittels Kapillarelektrophorese. Es zeigte sich, dass bereits nach 15 Minuten beide Substanzen zu mehr als 90 % an Albumin gebunden vorlagen (Abb. 5-1). Nach 30 Minuten konnte kein ungebundener Platinkomplex mehr detektiert werden.

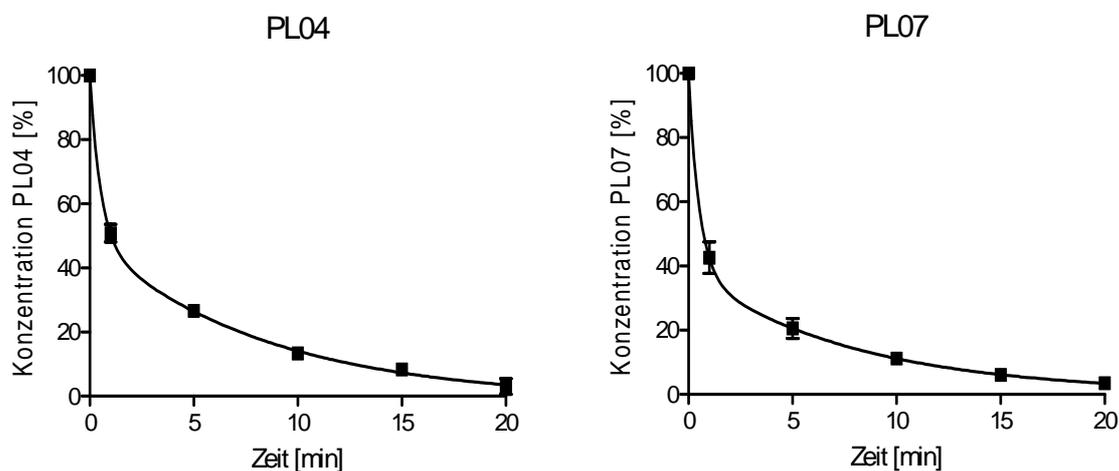


Abb. 5-1: Bindung von PL04 und PL07 an humanes Serumalbumin ( $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=3$ ). Die SD war teilweise so niedrig, dass sie in der Grafik durch das Symbol überdeckt wird.

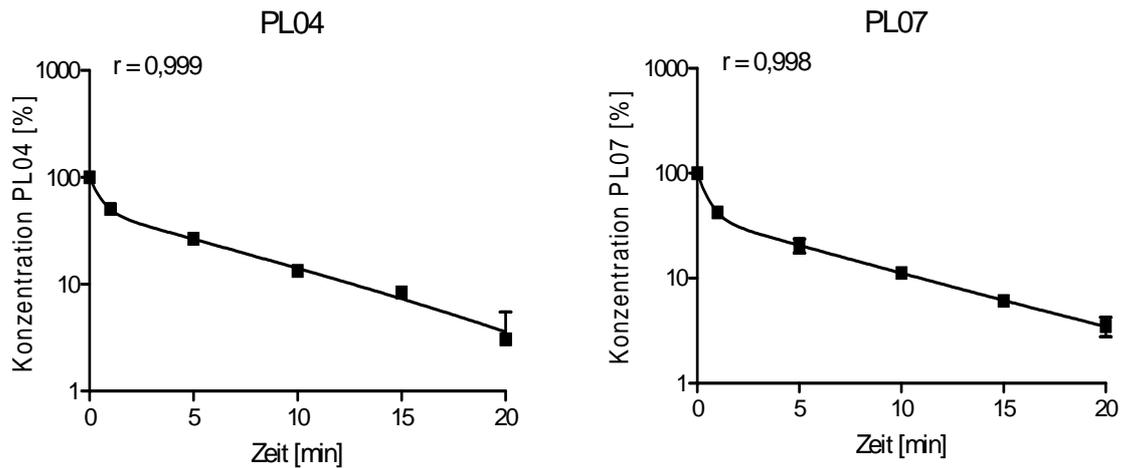


Abb. 5-2: Bindung der Platinkomplexe an humanes Serumalbumin ( $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=3$ ). Logarithmierte Darstellung mit Korrelationskoeffizienten der Anpassung des Modells einer biphasischen exponentiellen Abnahme.

Logarithmisch aufgetragen (Abb. 5-2) lässt sich eine exponentielle Abnahme der korrigierten Peakfläche erkennen. Die Bindung zeichnet sich durch einen biphasischen Verlauf aus und konnte mit dem Modell einer biphasischen exponentiellen Abnahme beschrieben werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die Inkubationszeit zur Kopplung der Platinkomplexe auf 30 Minuten festgelegt.

### 5.1.2 Spezifität der Albuminbindung

Platinkomplexe sind in der Lage durch Ligandenaustausch kovalent an nukleophile Strukturen zu binden. Demzufolge könnte die Bindung an Albumin auch auf unspezifischen Reaktionen beruhen. Im Folgenden wurde ein Inhibitionsversuch mit EMC-blockiertem Albumin durchgeführt (EMC = 6-Maleinimidocaprinsäure). Eine Bindung der Platin-Prodrugs an das Albumin ließ sich nach Vorinkubation mit EMC nicht mehr beobachten (Abb. 5-3, Tab. 5-1). Dieses Ergebnis verdeutlicht, das Albumin spezifisch an die Maleinimidstruktur der Platinkomplexe bindet.

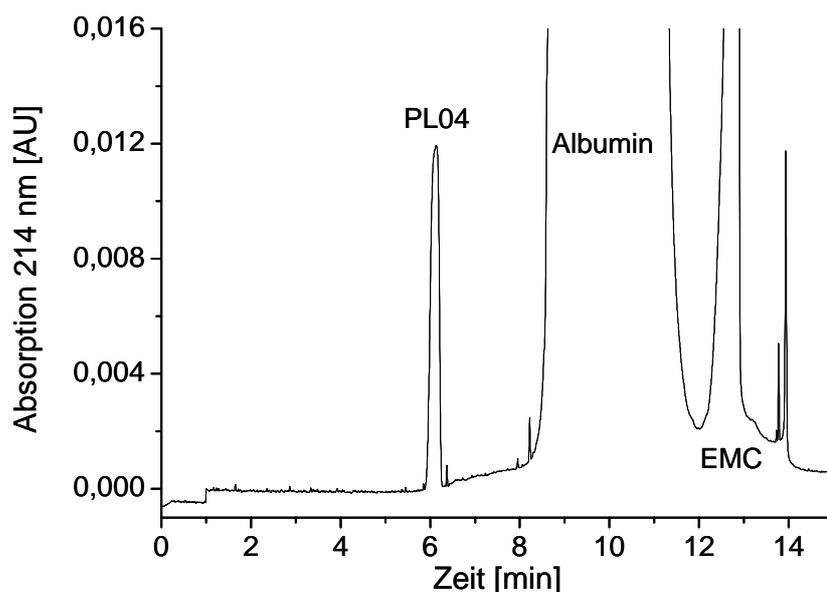


Abb. 5-3: Beispielerlektropherogramm von PL04 nach 10 Minuten Inkubation mit EMC-blockiertem Albumin.

Tab. 5-1: Korrigierte Peakfläche der Platinkomplexe nach 10 Minuten Inkubation mit EMC-blockiertem Albumin bezogen auf die Peakfläche von 150  $\mu$ M Platinkomplex in Puffer.

Substanz	Korrigierte Peakfläche [%]
PL04	102,3
PL07	95,0

Ein Hydrolyseprodukt oder eine korrespondierende deutliche Abnahme der korrigierten Peakfläche (s. Abschnitt 4.2.3), die im Falle einer Hydrolyse der Maleinimidfunktion der albuminbindenden Platinkomplexe zu erwarten gewesen wäre, konnte nicht detektiert werden.

## 5.2 Platin-Nukleotid-Adduktbildung

Im nächsten Schritt wurden die Art der gebildeten Platin-Nukleotid-Addukte und die Reaktivität der Platinkomplexe gegenüber Nukleotiden untersucht. Beide Faktoren

haben entscheidenden Einfluss auf die Zytotoxizität der Platinkomplexe und die Wirksamkeit *in vivo* (vgl. Kap. 1.3.2).

### 5.2.1 Identifizierung der Addukte albuminbindender Platinkomplexe

Zur Charakterisierung des Adduktprofils und zur Untersuchung der Reaktivität gegenüber den Nucleotiden dAMP und dGMP wurde die optimierte und neu validierte kapillarelektrophoretische Methode von U. Warnke verwendet, die in Kap.4.1 beschrieben wurde. Mit der optimierten Methode konnten die verschiedenen mono- und bifunktionalen Addukte der Platinkomplexe mit dAMP und dGMP getrennt werden. Sowohl bei PL04 als auch bei PL07 wurde mit jedem Nucleotid nur die Bildung eines einzigen Adduktes detektiert. Die Inkubation mit einem dAMP/dGMP-Gemisch ergab die Bildung von drei Addukten, wobei es sich bei dem zusätzlichen Peak vermutlich um das mischfunktionale Addukt handelt. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit der Platin-Prodrugs mit Cisplatin und Oxaliplatin ist anzunehmen, dass PL07 mit den Nucleotiden dAMP und dGMP die gleichen Addukte wie Cisplatin und PL04 die gleichen Addukte wie Oxaliplatin bildet (Abb. 5-4).

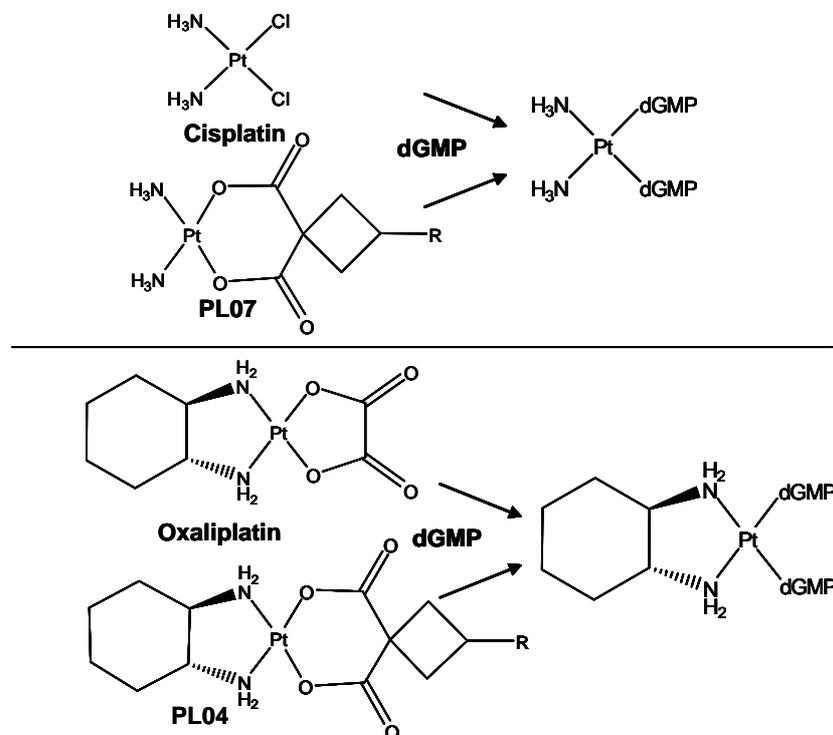


Abb. 5-4: Mögliches bifunktionales Addukt am Beispiel der Reaktion mit dGMP.

Durch separater Inkubation der Nucleotide dAMP und dGMP mit Cisplatin oder Oxaliplatin wurden die bekannten und durch U. Warnke identifizierten<sup>32,33</sup> Addukte erzeugt, die anschließend zur Identifikation der Addukte der albuminbindenden Platinkomplexe koinjiziert wurden. Durch Koinjektion von dAMP- und dGMP-Lösungen, die separat mit Cisplatin inkubiert wurden, konnte indirekt nachgewiesen werden, dass das Prodrug PL07 die erwarteten bifunktionalen Addukte bildet. Vergleichbare Ergebnisse ließen sich für PL04 durch Koinjektion von mit Oxaliplatin inkubierten Nucleotid-Lösungen erzielen (Abb. 5-5 bis Abb. 5-8). Im Gegensatz zu Cisplatin konnten jedoch keine monofunktionalen Addukte detektiert werden (vgl. Abb. 4-4).

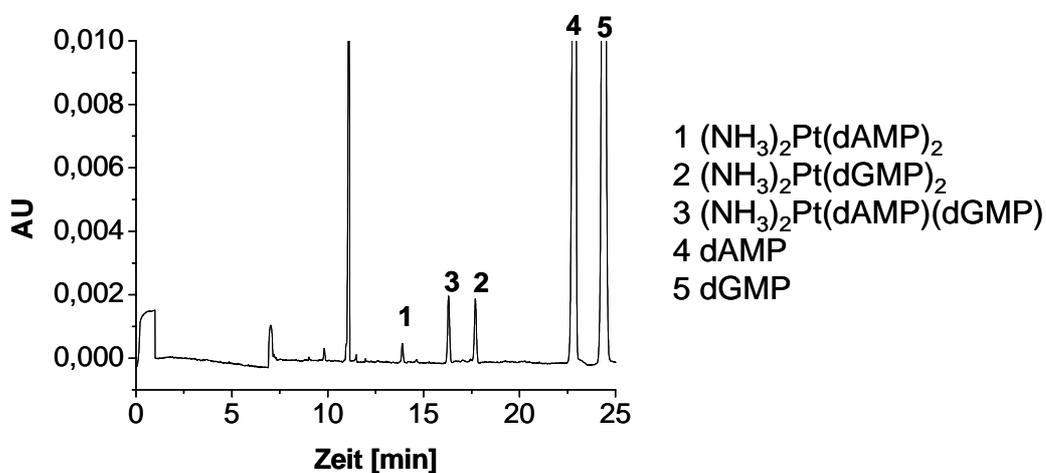


Abb. 5-5: Elektropherogramm 48 Stunden nach Inkubation von dAMP und dGMP [150  $\mu\text{M}$  jeweils] mit PL07 [150  $\mu\text{M}$ ].

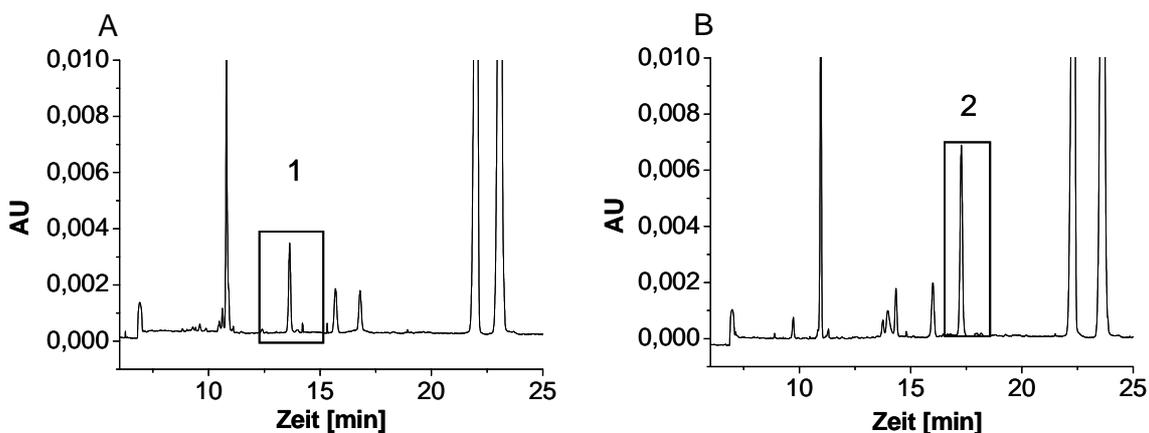


Abb. 5-6: Elektropherogramm 48 Stunden nach Inkubation von dAMP und dGMP [150  $\mu\text{M}$  jeweils] mit PL07 [150  $\mu\text{M}$ ] und Koinjektion einer separat inkubierten Cisplatinlösung mit dAMP (A) und dGMP (B).

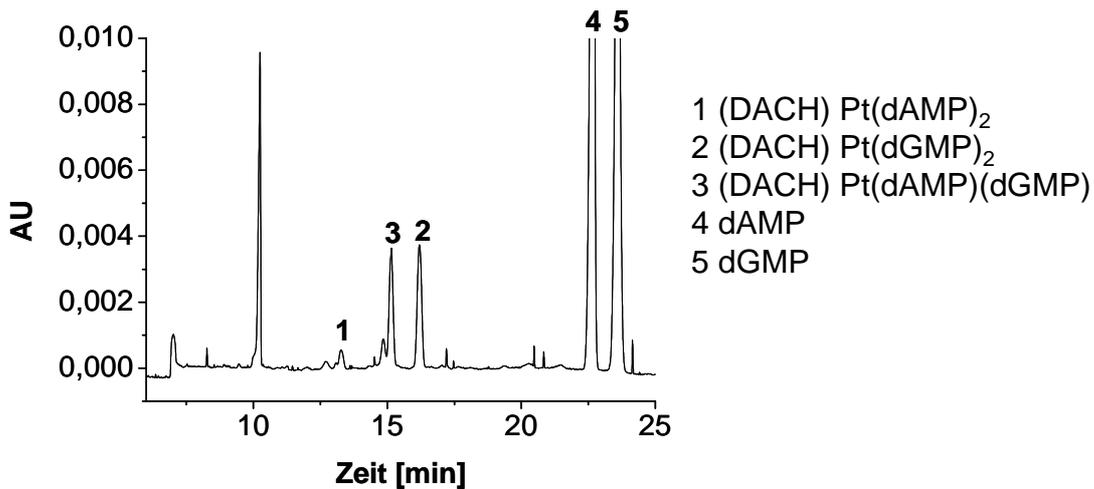


Abb. 5-7: Elektropherogramm 48 Stunden nach Inkubation von dAMP und dGMP [150  $\mu$ M jeweils] mit PL04 [150  $\mu$ M].

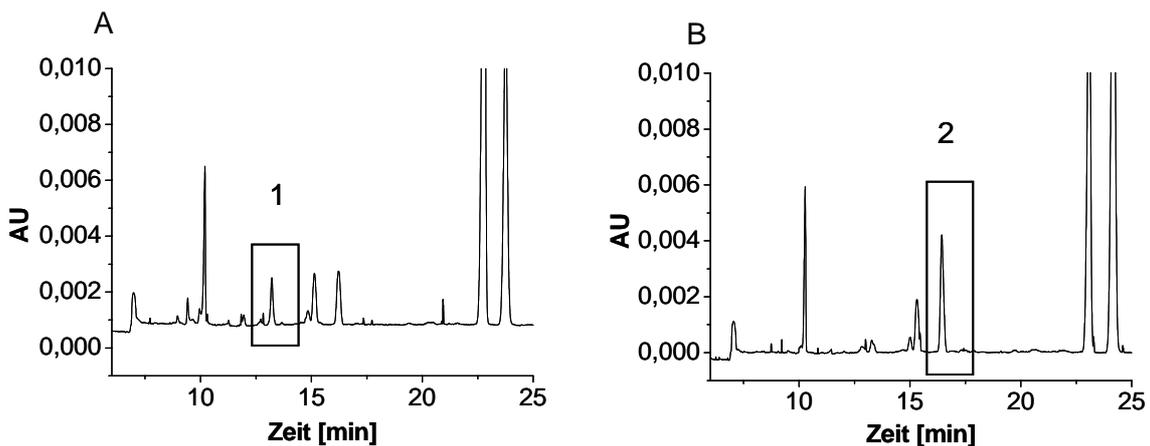


Abb. 5-8: Elektropherogramm 48 Stunden nach Inkubation von dAMP und dGMP [150  $\mu$ M jeweils] mit PL04 [150  $\mu$ M] und Koinjektion einer separat inkubierten Oxaliplatinlösung mit dAMP (A) und dGMP (B).

### 5.2.2 Reaktivitätsvergleich verschiedener Platinkomplexe

Die Untersuchung der Reaktivität der Platinkomplexe gegenüber dAMP und dGMP ergab eine etwas höhere Reaktivität von PL04 im Vergleich zu PL07 und Carboplatin. Cisplatin zeigte die höchste Reaktivität (Abb. 5-9). Die Einzelergebnisse können Anhang A1 entnommen werden.

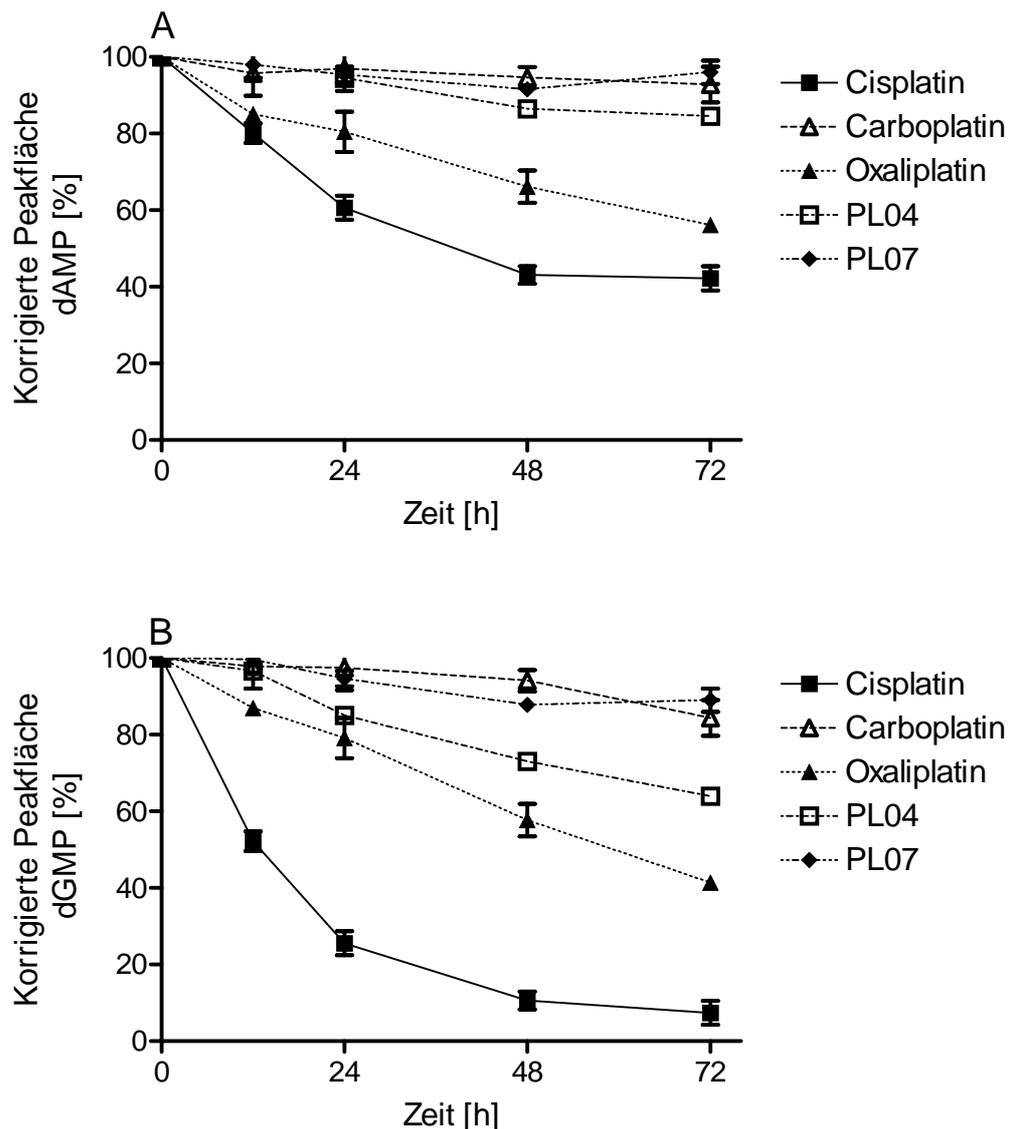


Abb. 5-9: Abnahme der korrigierten Peakfläche von dAMP (A) und dGMP (B) [150  $\mu$ M jeweils] während der Inkubation mit verschiedenen Platinkomplexen [150  $\mu$ M] ( $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=3$ ).

### 5.3 Bioaktivierung

Im nächsten Schritt sollte die Adduktbildung der neuen Platinkomplexe PL04 und PL07 nach der Bindung an Albumin zur Überprüfung der Aktivierungshypothese – der hydrolytischen Freisetzung einer niedermolekularen reaktiven Platin-Spezies aus dem makromolekularen Träger – untersucht werden. Hierzu wurden die

Komplexe 30 Minuten mit Albumin vorinkubiert und dieser Ansatz anschließend mit dAMP und dGMP versetzt. Nach 96 Stunden wurde das Albumin mit Sulfosalicylsäure ausgefällt und der Überstand, in dem sich die wasserlöslichen Addukte befinden sollten, kapillarelektrophoretisch untersucht. Hierbei konnten jedoch keine Addukte detektiert werden.

Diese Beobachtung führte zu der Fragestellung, ob die Platinkomplexe nach der Bindung an Albumin aktiv bleiben und reaktive Platin-Spezies freisetzen können. Als mögliche Ursache konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der direkte Kontakt zwischen Nukleotiden, entstehenden Platin-Nukleotid-Addukten und der großen Menge an Albumin für die fehlende Nachweisbarkeit der Addukte nach Fällung des Albumins verantwortlich war (s. Kap. 7.2.2).

Um eine sterische Hinderung der Reaktion bzw. eine Abschirmung der albumingebundenen Platinkomplexe durch die Proteinumgebung auszuschließen, wurde deshalb auf die Verwendung von Gleichgewichtsmikrodialysekammern zurückgegriffen.

Die makromolekularen PEG-Platinkomplexe wurden ebenfalls mit dieser Technik untersucht um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Hier erfolgte ausgehend von den erzielten Ergebnissen zusätzlich eine Stabilitätsuntersuchung.

An der Aktivierung der albumingebundenen Platinkomplexe könnten neben der Dissoziation einer reaktiven Platinspezies vom albumingebundenen Cyclobutandicarboxylat-Liganden durch Hydrolyse in vivo verschiedene weitere Mechanismen beteiligt sein. Diskutiert werden eine gesteigerte Aktivierung bei niedrigeren pH-Werten, die im Tumorgewebe (pH 6-7) und in Lysosomen (pH 5-6) vorliegen. Zusätzlich würde eine enzymatische Esterspaltung zur Freisetzung eines niedermolekularen Platinkomplexes führen.

Folgende Aspekte einer Aktivierung wurden deshalb in der Mikrodialysekammer untersucht:

- Aktivierung bei pH 7,4
- Aktivierung bei pH 5,0 und pH 6,0
- Aktivierung in Gegenwart von Butyrylcholinesterase (Esterspaltung) vor und nach der Bindung an Albumin

### 5.3.1 Vorversuch zur Einstellung des pH-Wertes

Tab. 5-2 gibt die experimentell ermittelten Mengen an Natronlauge oder Phosphorsäure an, die eingesetzt wurden, um den puffernden Effekt einer zugesetzten Albuminlösung in 100  $\mu$ l Puffer auszugleichen.

Tab. 5-2: Experimentell ermitteltes Volumen an Natronlauge oder Phosphorsäure (bezogen auf 100  $\mu$ l) zur pH-Puffereinstellung in Gegenwart von Albumin ( $n = 3$ ).

Zusatz	pH 7,4	pH 6,0	pH 5,0
NaOH 0,1 M	1,9 $\mu$ l		
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> [0,85 %]		3,6 $\mu$ l	8,2 $\mu$ l

### 5.3.2 Untersuchung der Aktivierung durch unspezifische Hydrolyse

Durch graphische Auftragung des Platinierungsgrades der Kalbsthymus-DNA gegen die Zeit wurde die Entwicklung der Platinierung über den Messzeitraum als Surrogat-Parameter für die Reaktivität der Platinkomplexe dargestellt (Abb. 5-10).

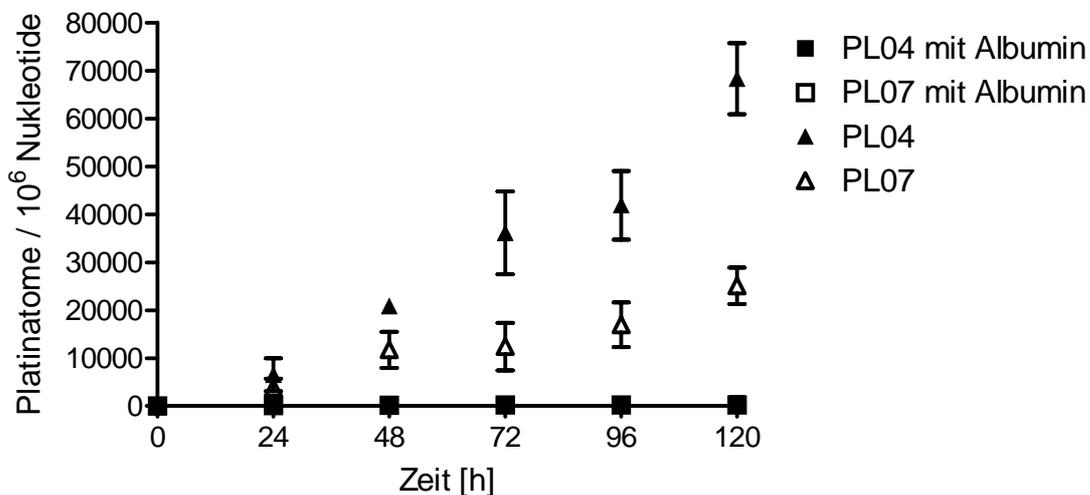


Abb. 5-10: Platinierungsgrad der DNA über einen Zeitraum von 120 Stunden. Vergleich zwischen niedermolekularen und makromolekularen Platinkomplexen ( $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=3$ ).

Dem Graphen ist zu entnehmen, dass die Bindung an Albumin die Reaktivität der Platinkomplexe deutlich verminderte. Es zeigte sich ein annähernd linearer Verlauf

der Platinierung über den gesamten Bestimmungszeitraum, sodass eine Regressionsgerade mittels linearer Regression ermittelt wurde. Die Steigung der ermittelten Regressionsgeraden, welche ein Maß für die Geschwindigkeit (und das Ausmaß) der Platinierung ist, wurde als Vergleichskriterium herangezogen (Abb. 5-11 und Abb. 5-12, Tab. 5-3). Dadurch wurde eine Aussage über das Verhältnis der Reaktivität zwischen den Substanzen (relative Reaktivität) gegenüber DNA ermöglicht.

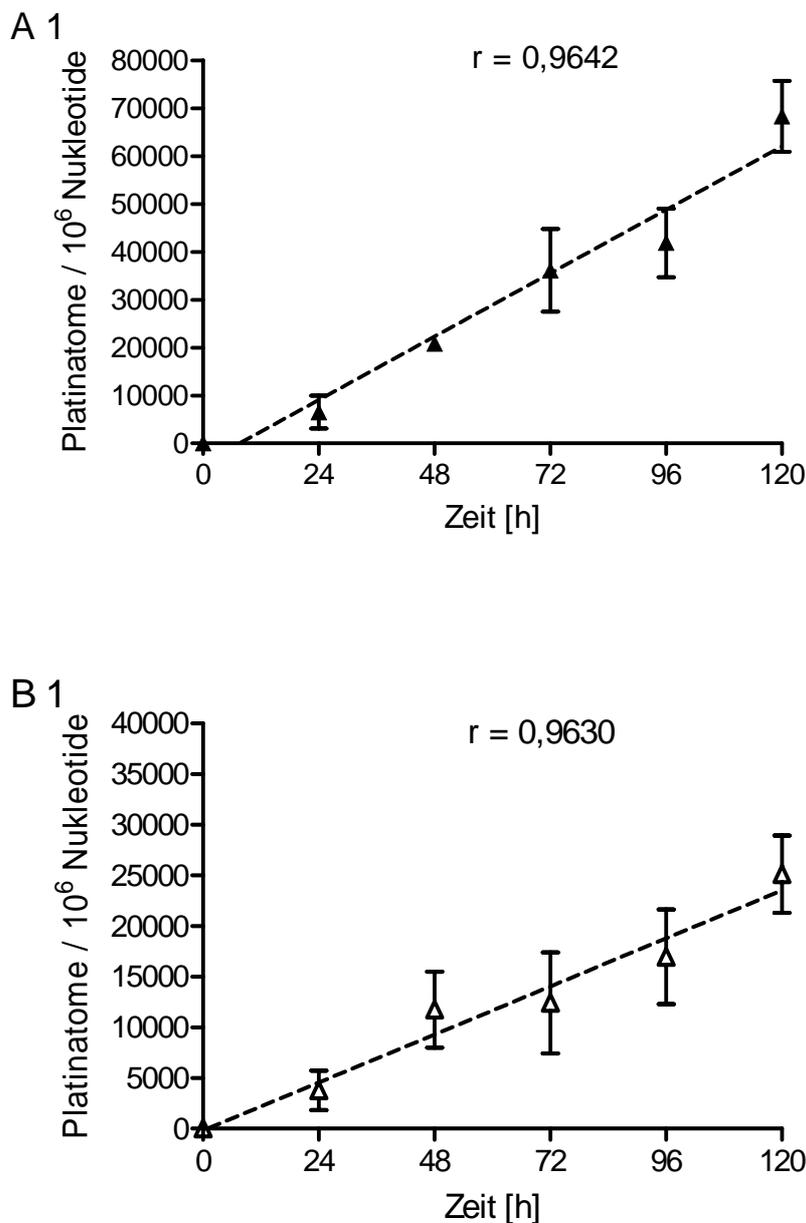


Abb. 5-11: Platinierung der DNA durch die Platinkomplexe PL04 (**A1**) und PL07 (**B1**) über einen Zeitraum von 120 Stunden ( $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=3$ ).

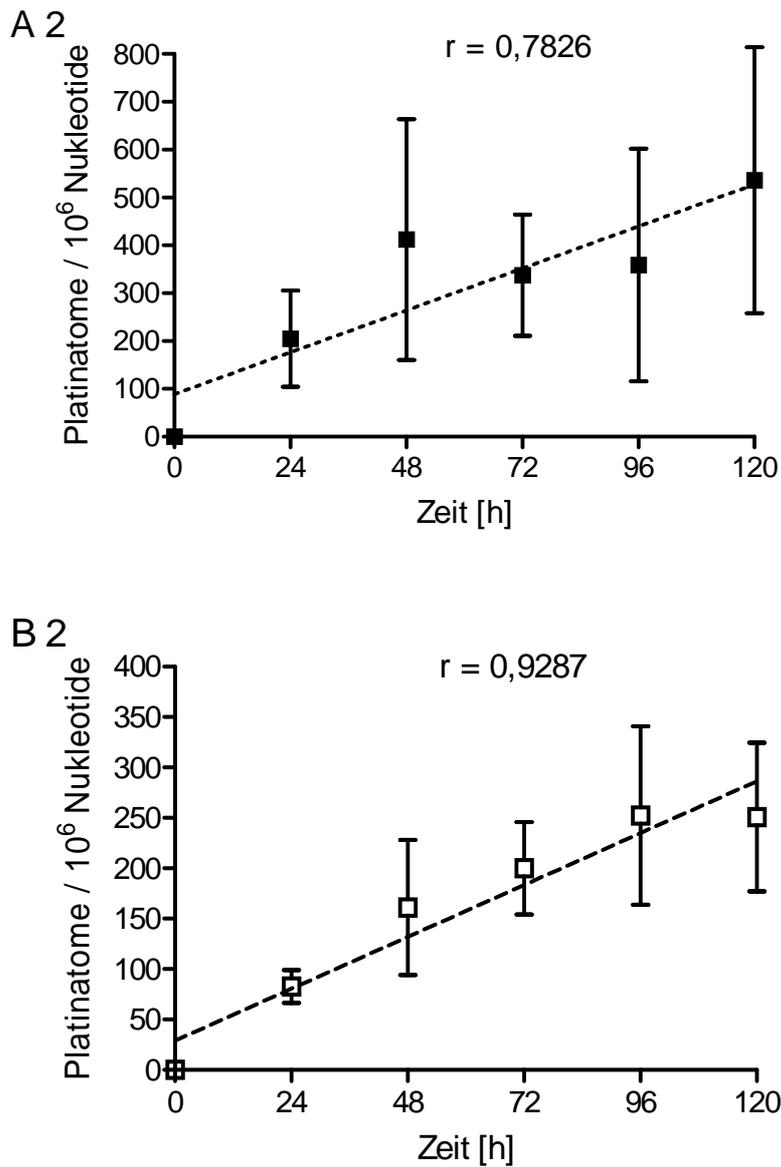


Abb. 5-12: Platinierung der DNA durch die Platinkomplexe PL04 (**A2**) und PL07 (**B2**) nach Albuminbindung über einen Zeitraum von 120 Stunden ( $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=3$ ).

Auffallend ist die höhere Variabilität (Standardabweichung) bei der Platinierung durch die makromolekularen Platinkomplexe, welche zum Teil der niedrigen PlatinKonzentration zuzuschreiben ist.

Tab. 5-3: DNA-Platinierung, Steigung der Regressionsgeraden.

	<b>PL04</b>	<b>PL07</b>	<b>PL04 Albumin</b>	<b>PL07 Albumin</b>
Steigung der Regressionsgeraden	551,0	197,3	3,7	2,1

Aus der ermittelten Steigung der Regressionsgeraden wurde die relative Reaktivität als Quotient der jeweils zu vergleichenden Platinkomplexe errechnet.

Tab. 5-4: Relative Reaktivität von PL04 und PL07 mit und ohne Vorinkubation mit Albumin.

<b>Vergleich</b>	<b>Steigung Regressions- gerade (Verwendeter Quotient)</b>	<b>Relative Reaktivität</b>
PL04 / PL04 Albumin	551,0 / 3,7	148,9
PL07 / PL07 Albumin	197,3 / 2,1	93,9
PL04 Albumin / PL07 Albumin	3,7 / 2,1	1,8
PL04 / PL07	551,0 / 197,3	2,8

Den Daten der Tab. 5-4 ist zu entnehmen, dass die Reaktivität der Platinkomplexe PL04 und PL07 nach der Bindung an Albumin deutlich eingeschränkt war. PL04 zeigte sowohl ungebunden wie auch nach Bindung an Albumin eine geringfügig höhere Reaktivität als PL07.

Im Folgenden sollte geklärt werden, inwieweit die bloße Anwesenheit des Makromoleküls Albumin die Diffusion niedermolekularer Platinkomplexe durch die semipermeable Membran der Mikrodialysekammer, z.B. durch unspezifische Bindung oder Erhöhung der Viskosität des Puffers, beeinflussen kann. Hierzu wurde die Platinierung der Kalbsthymus-DNA durch Carboplatin als Struktur analogon des albuminbindenden Platinkomplexes PL07 in An- und Abwesenheit von Albumin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-13 dargestellt.

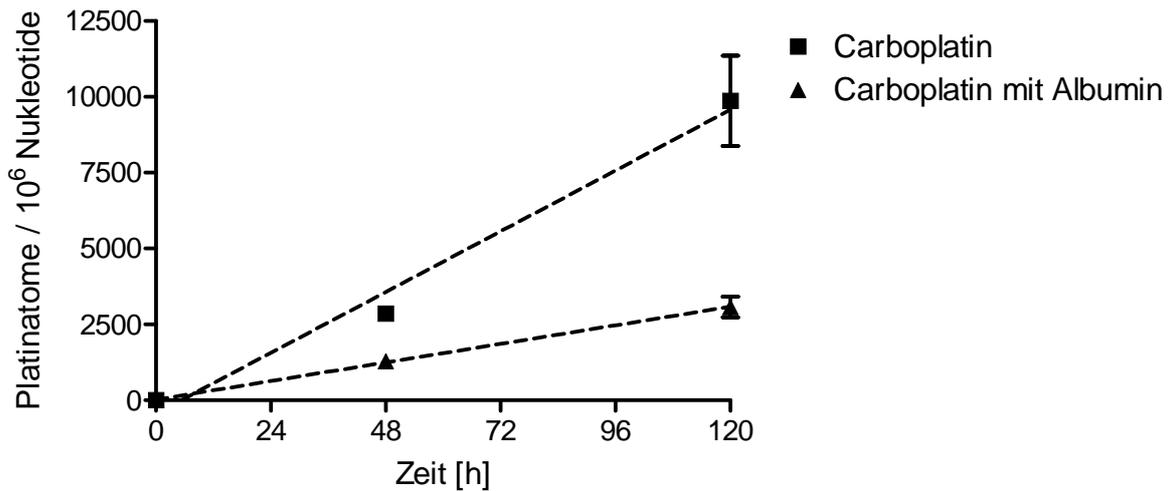


Abb. 5-13: Platinierungsgrad der DNA über einen Zeitraum von 120 Stunden. Vergleich der Platinierung durch Carboplatin in An- und Abwesenheit von Albumin ( $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=3$ ).

Aus den Verläufen der Platinierung wurde wiederum eine Regressionsgerade ermittelt und die Steigung der ermittelten Regressionsgeraden als Vergleichskriterium verwendet (Tab. 5-5).

Tab. 5-5: DNA-Platinierung, Steigung der Regressionsgeraden.

	Carboplatin	Carboplatin Albumin	Relative Reaktivität
Steigung der Regressionsgeraden	83,4	25,6	3,3

Es ergab sich eine relative Reaktivität von 3,3, d.h. durch die Anwesenheit von Albumin in der Mikrodialysekammer nahm die Platinierung der DNA durch Carboplatin auf ca. 1/3 ab.

### 5.3.3 Untersuchung der Aktivierung durch saure Hydrolyse

Zur Simulation einer Aktivierung der Platinkomplexe in einer sauren Umgebung wurde der pH-Wert in der Mikrodialysekammer durch Zusatz von Phosphorsäure [0,85 %] auf pH 6,0 (pH-Wert im Tumorgewebe) bzw. 5,0 (pH-Wert in Lysosomen)

eingestellt und der Platinierungsgrad der DNA nach 120 Stunden verglichen. Abb. 5-14 zeigt die Ergebnisse für die ungebundenen Platinkomplexe PL07 und PL04.

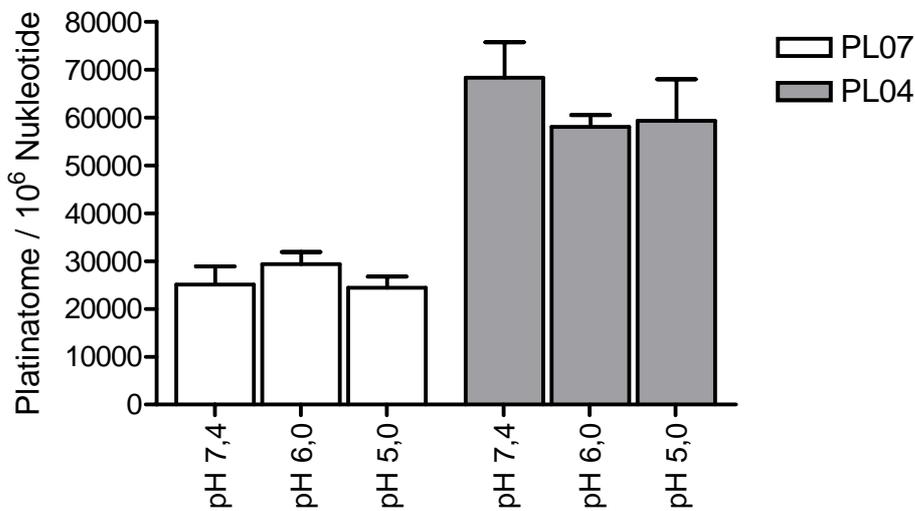


Abb. 5-14: Platinierungsgrad der DNA nach 120 Stunden. Vergleich der Platinierung durch niedermolekulare Platinkomplexe bei verschiedenen pH-Werten ( $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=3$ ).

Sowohl für PL07 als auch für PL04 konnte keine Steigerung der Reaktivität bei pH 5,0 oder 6,0 im Vergleich zu pH 7,4 gezeigt werden.

Abb. 5-15 zeigt die Ergebnisse für die albumingebundenen Platinkomplexe.

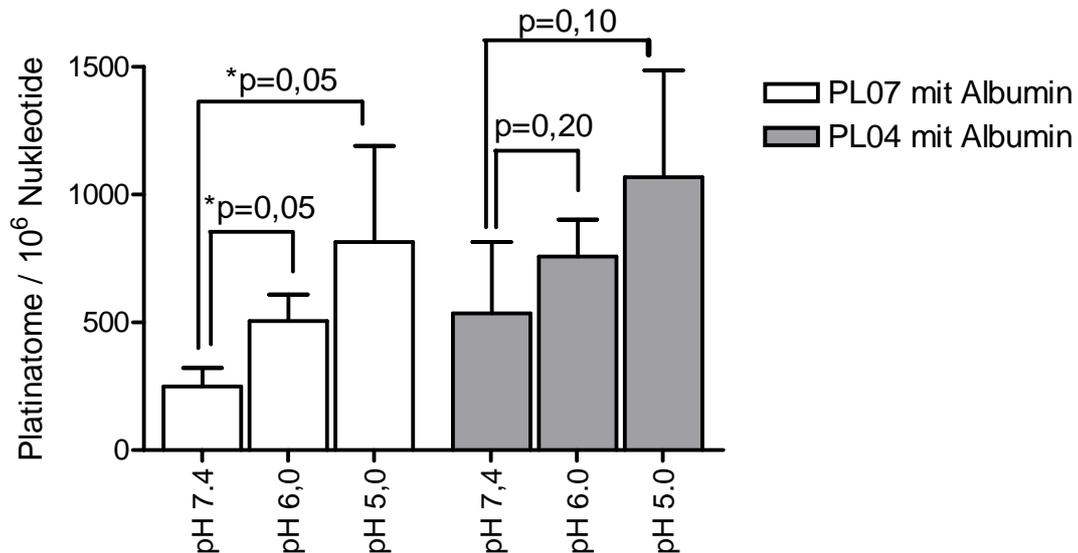


Abb. 5-15: Platinierungsgrad der DNA nach 120 Stunden. Vergleich der Platinierung durch albumingebundene Platinkomplexe bei verschiedenen pH-Werten ( $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=3$ ,  $*p \leq 0,05$ ).

Waren die Substanzen an Albumin gebunden, führte dies bei niedrigerem pH-Wert (6,0 oder 5,0) zu einer stärkeren Platinierung der DNA. Tendenziell lässt sich aus Abb. 5-15 der Zusammenhang entnehmen, dass mit sinkendem pH-Wert die Reaktivität der Platinkomplexe steigt. Das Ausmaß der Platinierung erhöhte sich um den Faktor 2-3. Eine Prüfung auf statistische Signifikanz der Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen bei pH 7,4 ergab ein signifikantes Ergebnis für PL07, nicht jedoch für PL04 (Mann-Whitney).

#### **5.3.4 Untersuchung der Aktivierung durch Butyrylcholinesterase**

Zur Simulation einer Aktivierung der Platinkomplexe durch Butyrylcholinesterase wurde in einem Vorversuch die Butyrylcholinesteraseaktivität unter Versuchsbedingungen bestimmt und anschließend eine mögliche Aktivierung der albumingebundenen Platinkomplexe durch Spaltung des Esters im Linker zwischen albuminbindendem Molekülteil und Platinkomplex unter annähernd physiologischer Esteraseaktivität untersucht. Eine Spaltung der Esterfunktion der Prodrugs vor der Bindung an Albumin hätte eine Abtrennung des albuminbindenden Molekülteils zur Folge. Dadurch entstünden niedermolekulare, reaktive Platinkomplexe, die nicht mehr für das Prodrugkonzept zur Verfügung stehen. Eine Spaltung der Esterfunktion nach der Bindung an Albumin würde zur Aktivierung durch Freisetzung eines niedermolekularen Platinkomplexes führen (s.Kap. 7.2.3).

#### **Vorversuche zur Bestimmung der Butyrylcholinesteraseaktivität**

In Tab. 5-6 sind die mittels Ellman-Assay bestimmten UV-Absorptionen aufgeführt. Durch Einsetzen der durchschnittlichen Zunahme der Absorption pro Minute in Gl. 3-15 wurde die Esteraseaktivität berechnet. Aus dem arithmetischen Mittel der Aktivitäten der drei Ansätze ergab sich die durchschnittliche Esteraseaktivität, die für die hier gegebenen Versuchsbedingungen galt.

Tab. 5-6: UV-Absorptionsmessung zur Bestimmung der Esteraseaktivität.

Messzeit [min]	1 [AU]	2 [AU]	3 [AU]	Mittelwert
1	0,260	0,262	0,252	
2	0,432	0,512	0,460	
3	0,641	0,625	0,591	
4	0,795	0,786	0,757	
5	0,975	1,006	0,894	
Resultierende Enzymaktivität [U/mg]	3,53	3,67	3,17	3,46

Um eine annähernd physiologische Esteraseaktivität in den Mikrodialysekammern einzusetzen (Zielkonzentration 5000 U/l), wurde der Reinsubstanz eine Aktivität von 3,5 U/mg zu Grunde gelegt. Verwendete Stamm- und Arbeitslösungen wurden daraufhin eingestellt.

#### Quantifizierung der Aktivierung durch Butyrylcholinesterase

Zur Untersuchung des Einflusses der Butyrylcholinesterase nach der Albuminbindung wurden die albuminbindenden Platinkomplexe zuerst 30 Minuten an Albumin gekoppelt und dann 30 Minuten mit Esterase inkubiert (Ansatz **AE**). Zur Untersuchung des Einflusses vor der Albuminbindung erfolgte die Inkubation zuerst mit Esterase und dann mit Albumin (jeweils 30 Minuten, Ansatz **EA**). Nach darauf folgender Inkubation in den Mikrodialysekammern für 24 Stunden und Isolierung der DNA wurde die Konzentration der DNA und der Platinierungsgrad bestimmt. In Abb. 5-16 sind die Ergebnisse für PL04 und PL07 im Vergleich zur DNA-Platinierung durch die albumingebundenen Platinkomplexe ohne Enzymzusatz (Ansatz **A**) dargestellt.

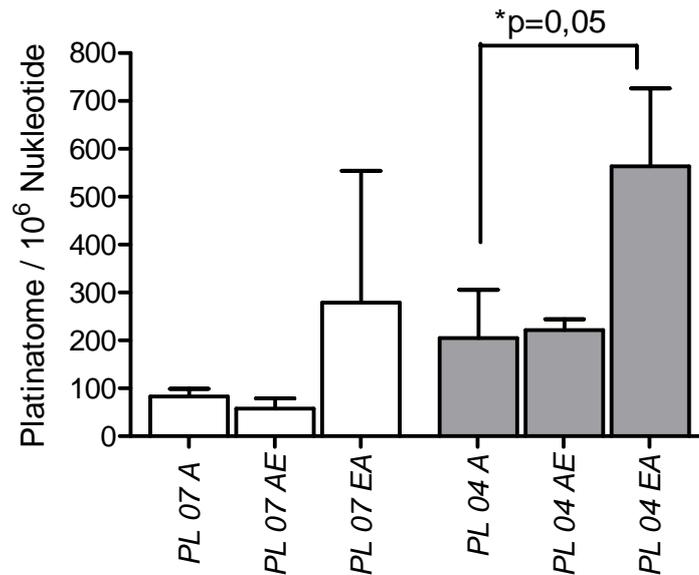


Abb. 5-16: DNA-Platinierung durch 24-stündige Exposition mit PL04 bzw. PL07. Die Ansätze wurden entweder nur mit Albumin (30 Minuten; bezeichnet mit **A**), erst mit Albumin (30 Minuten) und dann mit Esterase (30 Minuten; bezeichnet mit **AE**) oder erst mit Esterase (30 Minuten) und dann mit Albumin (30 Minuten; bezeichnet mit **EA**) vorinkubiert ( $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=3$  \* $p \leq 0,05$ ).

Wie die Ergebnisse erkennen lassen, führte die Umsetzung mit Butyrylcholinesterase nach Inkubation und Kopplung an Albumin nicht zu einer Steigerung der DNA-Platinierung. Eine Umsetzung mit Butyrylcholinesterase vor der Kopplung an Albumin konnte das Ausmaß der DNA-Platinierung erhöhen (~3-fach). Eine Prüfung auf statistische Signifikanz der Unterschiede in Vergleich zu den Ergebnissen ohne Enzymeinwirkung ergab ein signifikantes Ergebnis für PL04 (Mann-Whitney). Für die Substanz PL07 war das Ergebnis nicht signifikant (PL07,  $p = 0,14$ ), kann also nur als Tendenz aufgefasst werden.

### 5.3.5 Aktivierung eines PEG-Platinkomplexes

Wie aus den Ergebnissen zur Untersuchung der Reaktivität albuminbindender Platinkomplexe ersichtlich, kam es nach Bindung an Albumin zu einem deutlichen Reaktivitätsverlust. Dieses Ergebnis lässt sich unter anderem durch funktionelle Gruppen im Albumin erklären, die der Freisetzung reaktiver niedermolekularer Platinkomplexe entgegenwirken (s. Kap. 7.2.3). Um diese Hypothese zu bestätigen und derartige

Probleme im Zusammenhang mit makromolekularen Trägern zu beseitigen, wurde von der Arbeitsgruppe Kratz ein Polyethylenglykol-Platinkomplex mit einem Molekulargewicht von 10 kDa synthetisiert, im Rahmen dieser Arbeit untersucht und mit den albuminbindenden Platinkomplexen verglichen (Abb. 5-17).

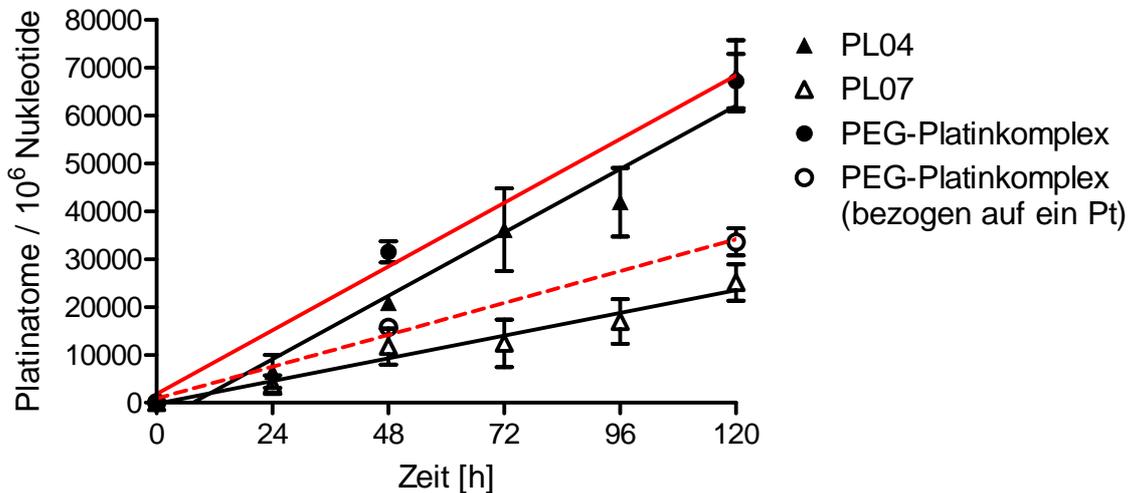


Abb. 5-17: Platinierungsgrad der DNA nach 120 Stunden. Vergleich der Platinierung durch niedermolekulare albuminbindende Platinkomplexe und durch einen PEG-Platinkomplex ( $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=3$ ).

Es zeigte sich, dass der makromolekulare PEG-Platinkomplex zu einer hohen Platinierung der DNA führte, die mit der Platinierung durch *niedermolekulare* albuminbindende Platinkomplexe vergleichbar ist. Zu berücksichtigen ist hier, dass an einem Molekül PEG-Platinkomplex zwei reaktionsfähige Platinkomplexe gebunden sind, sodass für einen direkten Vergleich das Ausmaß der Platinierung zusätzlich auf einen Platinkomplex bezogen dargestellt wurde. Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass es hier zu einer Aktivierung durch Hydrolyse und Freisetzung reaktiver niedermolekularer Platinkomplexe kommt.

### 5.3.6 Untersuchungen zur Stabilität des PEG-Platinkomplexes

Die in Kap. 5.3.5 beschriebenen Ergebnisse bedingten die Notwendigkeit zur Untersuchung der Stabilität des makromolekularen PEG-Platinkomplexes, da die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muss, dass eine sehr rasche Hydrolyse zur schnellen Freisetzung niedermolekularer Platinkomplexe führt. Diese direkt nach der

Lösung des makromolekularen Komplexes entstehenden niedermolekularen Komplexe können für die gemessene Platinierung der DNA verantwortlich sein. Eine gewisse Stabilität ist aber Voraussetzung für die Ausnutzung des EPR-Effektes zur Anreicherung der makromolekularen Platinkomplexe im Tumor. Des Weiteren sollte für die nachfolgenden Zellkulturversuche untersucht werden, ob und wie lange unter Versuchsbedingungen ein Makromolekül vorliegt. Hierzu wurde der Anteil an Platin gemessen, welcher durch die semipermeable Membran der Mikrodialysekammer diffundiert ist. Das Ergebnis wurde zur gesamten Platinmenge in der Mikrodialysekammer in Bezug gesetzt.

*Tab. 5-7: Gleichgewichtseinstellung in einer Mikrodialysekammer. Bestimmt wurde die Platinmenge, die durch eine semipermeable Membran diffundiert ist (n=2).*

Zeit [h]	Platin [%]	
	PL07	PEG-Platinkomplex
0,5	16,8	1,2
1	24,0	1,3
2	33,8	1,5
4	38,4	2,6
8	48,2	5,6
19	55,5	15,6
48	50,6	32,9

Wie Tab. 5-7 entnommen werden kann, zeigt der PEG-Platinkomplex eine langsame Freisetzung niedermolekularer Platinspezies, während es im Falle eines niedermolekularen Platinkomplexes nach 4-8 Stunden zu einer Gleichgewichtseinstellung in der Mikrodialysekammer kommt (vgl. Anhang A3). Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die hohe Reaktivität des PEG-Platinkomplexes auf einer langsamen, erwünschten Freisetzung einer reaktiven Platinspezies beruht. Graphisch betrachtet ergibt sich interessanter Weise eine Reaktionskinetik 0. Ordnung mit einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (entnommen der Steigung der Geraden) von  $2,735 \cdot 10^{-8}$  mol/l/h für die Gleichgewichtseinstellung durch den PEG-Platinkomplex. Der freie Platinkomplex zeigt die erwartete Diffusion nach einer Kinetik 1. Ordnung.

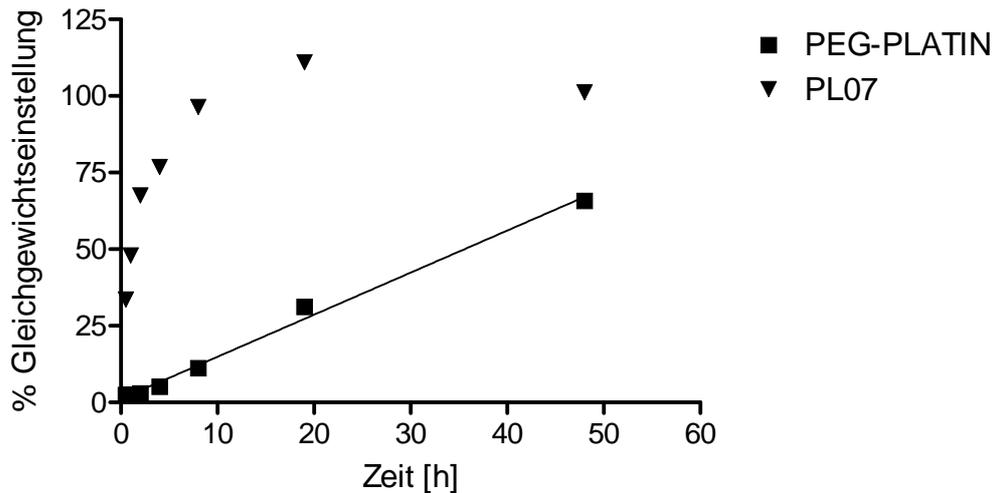


Abb. 5-18 Gleichgewichtseinstellung in einer Mikrodialysekammer. Eine 100 % Gleichgewichtseinstellung entspricht einer äquivalenten Platinkonzentration auf beiden Seiten der semipermeablen Membran.

Für die Zellkulturversuche wird gefolgert, dass über eine Inkubationszeit von zwei Stunden nahezu ausschließlich das Makromolekül für die ermittelten Effekte verantwortlich ist.

## 5.4 Zelluläre Aufnahme

Aus den Ergebnissen der Mikrodialysekammerexperimente entstand die Frage, ob die albuminbindenden Platinkomplexe als makromolekulare Verbindungen internalisiert und intrazellulär aktiviert werden können. Tierexperimentelle Daten, die im Anschluss der Arbeit diskutiert werden (s. Kap. 7.2.5), gaben zusätzlichen Anlass, diese Hypothese zu untersuchen. Dementsprechend wurden Aufnahmeversuche und Zytotoxizitätsuntersuchungen in einer Ovarialkarzinomzelllinie durchgeführt. Da von der verwendeten Ovarialkarzinomzelllinie A2780 bekannt war, dass ein Hauptresistenzmechanismus cisplatinresistenter Zellen in einer verminderten Aufnahme liegt, wurde die resistente Zelllinie A2780cis in die Untersuchungen einbezogen.

### 5.4.1 Charakterisierung der Zelllinien

Zu Beginn der Arbeit mit der Tumorzelllinie A2780 und der cisplatinresistenten Variante A2780cis wurde die Sensitivität der Tumorzelllinien gegenüber Cisplatin und verwandter Platinkomplexe durch den MTT-Assay ermittelt. Aus den erhaltenen  $EC_{50}$ -Werten wurde nach Gleichung 3-16 der Resistenzgrad dieses Zelllinienpaares gegenüber den verwendeten Platinkomplexen berechnet. Der MTT-Assay wurde ebenfalls dafür genutzt, eine maximale Passagenanzahl zu definieren, während der ohne neuerliche Platinexposition – welche zur Veränderung der Resistenzmechanismen führen könnte – der Resistenzgrad erhalten blieb.

#### Bestimmung der Sensitivität und des Resistenzgrades

Die mittels MTT-Assay erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven zur Untersuchung der Sensitivität des Ovarialkarzinomzelllinienpaares gegenüber Cisplatin sind in Abb. 5-19 dargestellt.

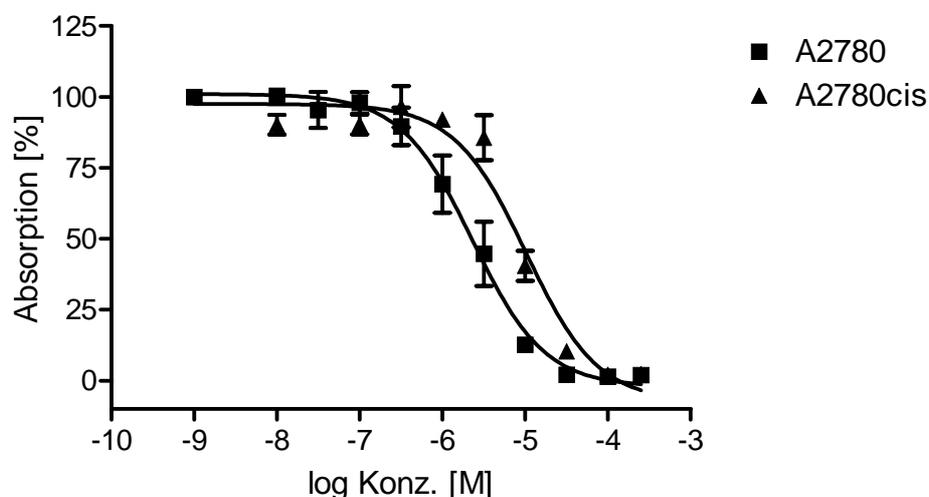


Abb. 5-19: Ergebnisse des MTT-Assays mit Cisplatin für die verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und A2780cis ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=6$ ).

Tab. 5-8 gibt eine Übersicht über die aus den Konzentrations-Effekt-Kurven ermittelten  $EC_{50}$ -Werte der untersuchten Platinkomplexe und dem daraus berechneten Resistenzgrad.

Tab. 5-8: Ermittelte  $EC_{50}$ -Werte und kalkulierter Resistenzgrad verschiedener Platinkomplexe in A2780 und A2780cis Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-6$ ).

Zytotoxizität	Cisplatin	Oxaliplatin	Carboplatin
log $EC_{50}$ sensitiv ( $EC_{50}$ )	$-5,63 \pm 0,09$ [2,3 $\mu$ M]	$-5,39 \pm 0,03$ [4,1 $\mu$ M]	$-4,12 \pm 0,11$ [75,9 $\mu$ M]
log $EC_{50}$ resistent ( $EC_{50}$ )	$-4,99 \pm 0,08$ [10,2 $\mu$ M]	$-4,87 \pm 0,09$ [13,5 $\mu$ M]	$-3,71 \pm 0,09$ [195,0 $\mu$ M]
Resistenzgrad	4,4	3,3	2,5

Der ermittelte Resistenzgrad von 4,4 für Cisplatin entsprach dem in der Dissertation von J. Zisowsky bestimmten Resistenzgrad<sup>85</sup>.

### Ermittlung einer maximalen Passageanzahl

Angestrebt wurde eine Verwendung der resistenten Zelllinie A2780cis über 12 Passagen ohne neuerliche Cisplatinexposition. Abb. 5-20 zeigt vergleichend die Ergebnisse des MTT-Assays der ersten Passage nach dem Auftauen der Zellen und der 12. Passage.

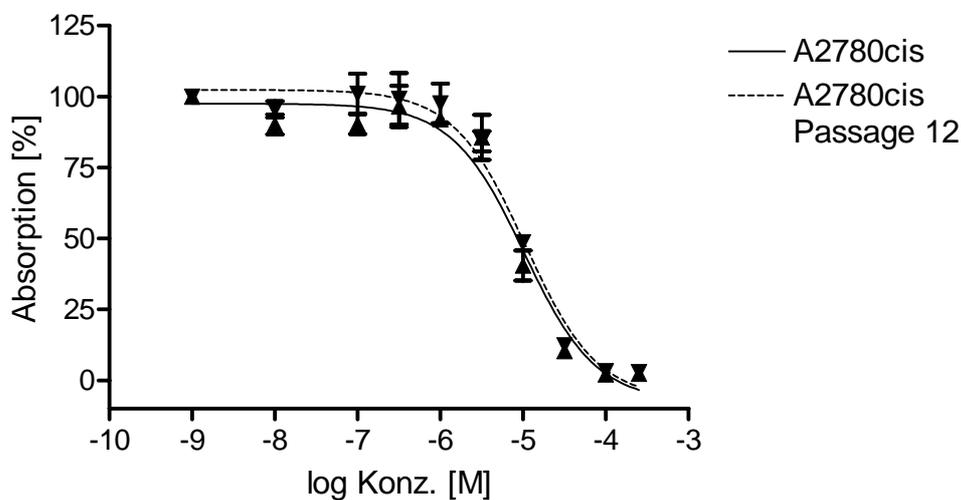


Abb. 5-20: Ergebnisse des MTT-Assays mit Cisplatin für die verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und A2780cis zur Bestimmung der maximal verwendeten Passageanzahl ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=6$ ).

Nach zwölf Passagen konnte keine Veränderung der Sensitivität und damit des Resistenzgerades gegenüber Cisplatin festgestellt werden, sodass eine Verwendung

der resistenten Zelllinie über 12 Passagen ohne weitere Cisplatinexposition erfolgte. Nach der 12. Passage wurde grundsätzlich ein neues Backup der resistenten Zelllinie aufgetaut und eingesetzt.

### 5.4.2 Quantifizierung der intrazellulären Platinkonzentration

Mit den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob die Platin-Albuminkomplexe unverändert in die Zelle aufgenommen werden. Dazu wurde die Ovarialkarzinomzelllinie A2780 verwendet. Die aus dieser Zelllinie hervorgegangene cisplatinresistente Zelllinie A2780cis wurde in die Untersuchungen einbezogen.

#### 5.4.2.1 Oxaliplatin und Carboplatin als Referenz

Da diese Zellkulturversuche eine relativ große Menge an Substanz benötigten, war es sinnvoll, die kommerziell erhältlichen und strukturverwandten Platinkomplexe Carboplatin und Oxaliplatin zur Charakterisierung der Zelllinien zu verwenden.

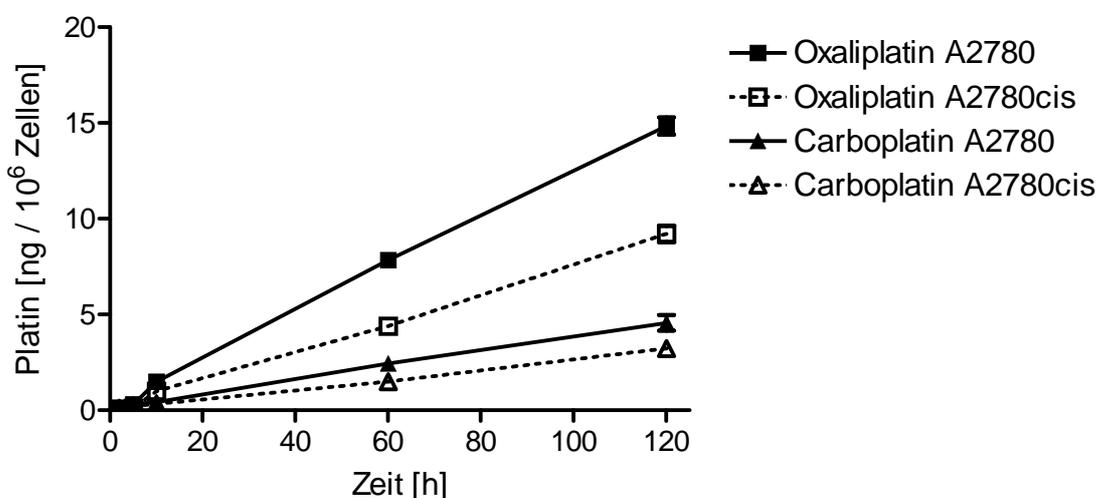


Abb. 5-21: Platinkonzentration in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit Oxaliplatin und Carboplatin ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-6$ ).

Wie Abb. 5-21 zeigt, wurde Oxaliplatin gut in die Zellen aufgenommen. In resistenten Zellen war die Platinkonzentration deutlich geringer, wie es auch für Cisplatin beschrieben ist<sup>203</sup>. Die Aufnahme von Carboplatin erfolgte auf einem niedrigeren Niveau, der Unterschied zwischen der sensitiven und der resistenten Zelle war

geringer ausgeprägt. Nach 120 Minuten war der Unterschied in der intrazellulären Platinkonzentration zwischen sensitiven und resistenten Zellen für beide Platinkomplexe signifikant (Oxaliplatin  $p \leq 0,01$ , Carboplatin  $p \leq 0,05$  Mann-Whitney).

#### 5.4.2.2 Albuminbindende Platinkomplexe

Nach Charakterisierung der Zelllinien mit Carboplatin und Oxaliplatin wurden vergleichend zu einem definierten Zeitpunkt (120 Minuten) die Aufnahme der freien und an Albumin gebundenen Platinkomplexe PL04 und PL07 untersucht.

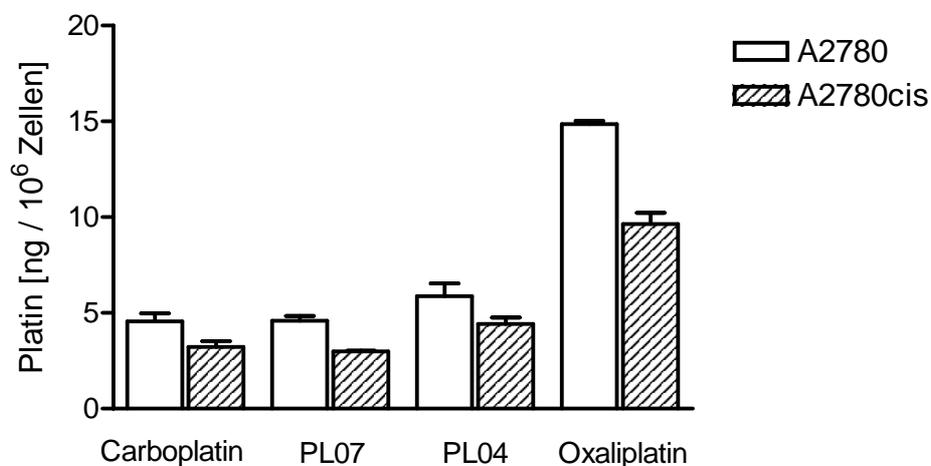


Abb. 5-22: Platinkonzentration in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit PL04 und PL07 im Vergleich zu Carboplatin und Oxaliplatin ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-6$ ).

Aus Abb. 5-22 wird ersichtlich, dass PL04 und PL07 in ähnlichem Ausmaß wie Carboplatin in die Zellen aufgenommen werden. Die Gesamtmenge Platin, welche in die Zelle aufgenommen wurde, ist vergleichsweise gering und Platinkonzentration in resistenten Zellen statistisch signifikant vermindert (s. Tab. 5-9).

Tab. 5-9: Vergleich der intrazellulären Platinkonzentration nach 120 Minuten.

Verglichene Gruppen	Mann-Whitney-Test
Oxaliplatin A2780 / A2780cis	p = 0,001
Carboplatin A2780 / A2780cis	p = 0,013
PL04 A2780 / A2780cis	p = 0,029
PL07 A2780 / A2780cis	p = 0,012

Im nächsten Schritt wurde die Aufnahme der an Albumin gebundenen Komplexe in die Zellen untersucht (s. Abb. 5-23). Die makromolekularen Verbindungen verursachten eine um das 3-6-fache geringere intrazelluläre Konzentration. Beide albumingebundenen Platinkomplexe verhielten sich bezüglich ihrer zellulären Aufnahme ähnlich. Interessant ist, dass kein Unterschied zwischen der Aufnahme in resistente und sensitive Zellen erkennbar war.

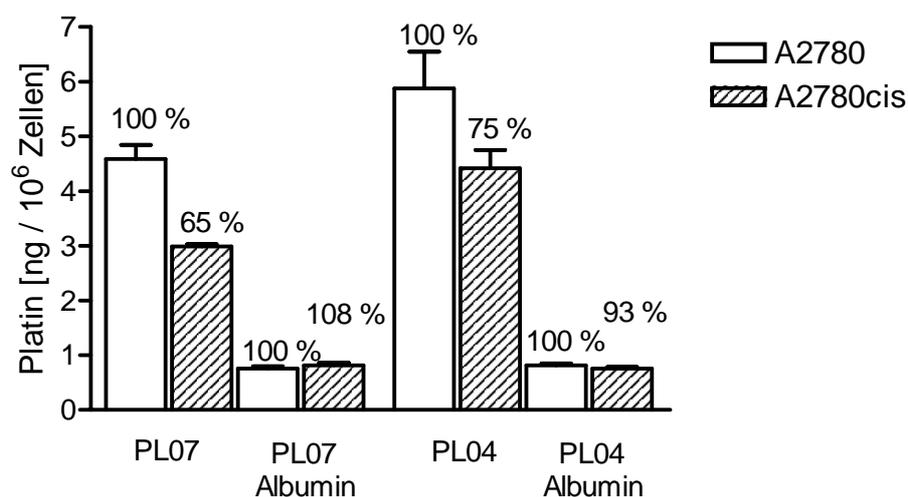


Abb. 5-23: Vergleich der intrazellulären Konzentration der unkonjugierten und albumingebundenen Platinkomplexe PL04 und PL07 [100  $\mu$ M] in A2780- und A2780cis-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-14$ ). Die Konzentration in sensitiven Zellen wurde jeweils als 100 % gesetzt.

Dieses Ergebnis wurde ebenfalls statistisch analysiert. Um auch geringe Unterschiede erkennen zu können, wurden der Stichprobenumfang und somit die Anzahl der durchgeführten Experimente mit den Platin-Albuminkomplexen auf mindestens 10 erhöht und danach der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung durchgeführt. Anhand der ermittelten p-Werte konnte geschlossen werden, dass nichts gegen eine Normalverteilung sprach (Stichproben zwischen 10-20 lassen keinen Be-

weis einer Normalverteilung zu). Dies erlaubte die Anwendung parametrischer Tests, mit denen mögliche Unterschiede besser erkannt werden können.

Tab. 5-10: Vergleich der intrazellulären Platinkonzentration nach 120 Minuten Inkubation mit Platin-Albumin-Komplexen.

Verglichene Gruppen	t -Test	Varianzanalyse
PL04 A2780 / A2780cis	$p = 0,200$	
PL07 A2780 / A2780cis	$p = 0,302$	
PL04 / PL07 / A2780 / A2780cis		$p = 0,463$

Wie Tab. 5-10 entnommen werden kann, bestand weder zwischen der Konzentration der einzelnen Platinkomplexe in sensitiven und resistenten Zellen noch zwischen den einzelnen Substanzen ein signifikanter Unterschied.

#### 5.4.2.3 PEG-Platinkomplex

Die Aufnahme des PEG-Platinkomplexes wurde ebenfalls an der cisplatin sensitiven und -resistenten A2780-Ovarialkarzinomzelllinie untersucht. Die Ergebnisse dieses Versuches sind Abb. 5-24 und Abb. 5-25 zu entnehmen, wobei immer vergleichend die albumingebundenen Platinkomplexe dargestellt sind.

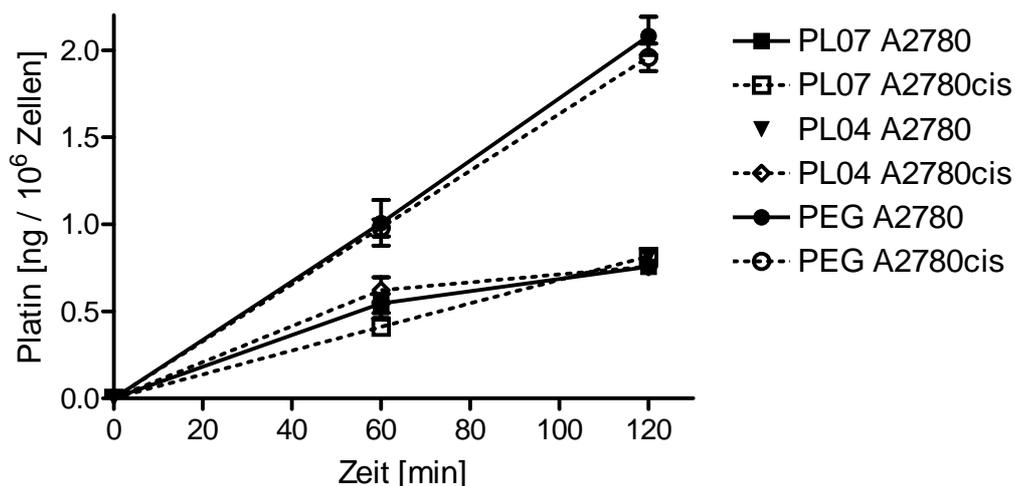


Abb. 5-24: Konzentration des PEG-Platinkomplexes [100  $\mu\text{M}$ ] und der albumingebundenen Platinkomplexe PL04 und PL07 [100  $\mu\text{M}$ ] in A2780- und A2780cis-Zellen über 120 Minuten ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-14$ ).

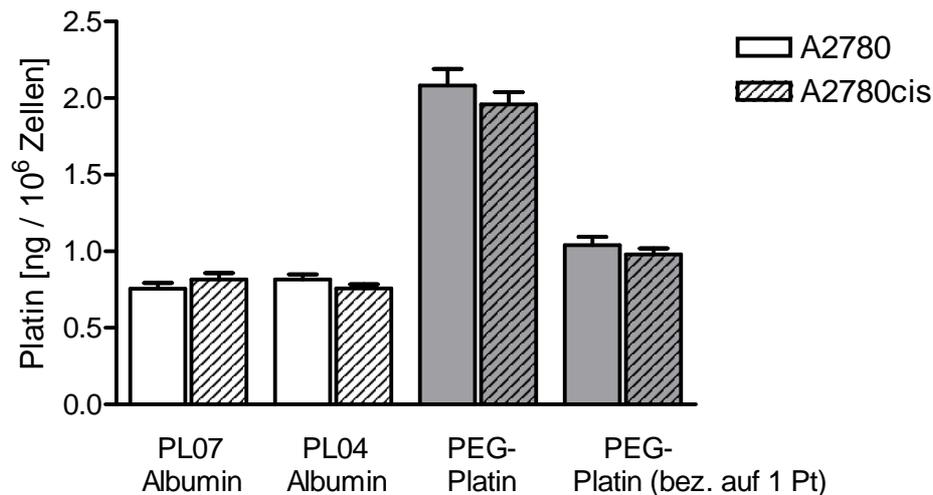


Abb. 5-25: Vergleich der intrazellulären Konzentration des PEG-Platinkomplexes [100  $\mu$ M] mit den albumingebundenen Platinkomplexen PL04 und PL07 [100  $\mu$ M] in A2780- und A2780cis-Zellen nach 120 Minuten ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=6-14$ ).

Der PEG-Platinkomplex zeigte ein ähnliches Verhalten wie die albumingebundenen Platinkomplexe. Auch hier wurde kein Unterschied zwischen der Konzentration in sensitiven und resistenten Zellen festgestellt (t-Test nach 120 Minuten  $p = 0,428$ ), allerdings gelangte deutlich mehr Platin in die Tumorzellen. Zu berücksichtigen ist dabei, dass an einem Molekül PEG zwei Platinkomplexe gebunden sind, sodass für einen direkten Vergleich die intrazelluläre Konzentration zusätzlich auf ein Platinatom bezogen dargestellt wurde. Wie ersichtlich, war die intrazelluläre Konzentration der unterschiedlichen Makromoleküle dann vergleichbar.

#### 5.4.2.4 Kontrollversuch bei 4 °C

Die in Kap. 5.4.2.2 beschriebenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Albumin-Platinkomplexe über einen eigenen Transportmechanismus, z.B. durch unspezifische oder Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden. Möglich wäre aber auch eine passive Adsorption an der Zelloberfläche. Als eine einfache Möglichkeit, hier zu differenzieren, wurde mit den Albumin-Platinkomplexen ein Kontrollversuch bei 4 °C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sind endozytotische Vorgänge deutlich eingeschränkt.

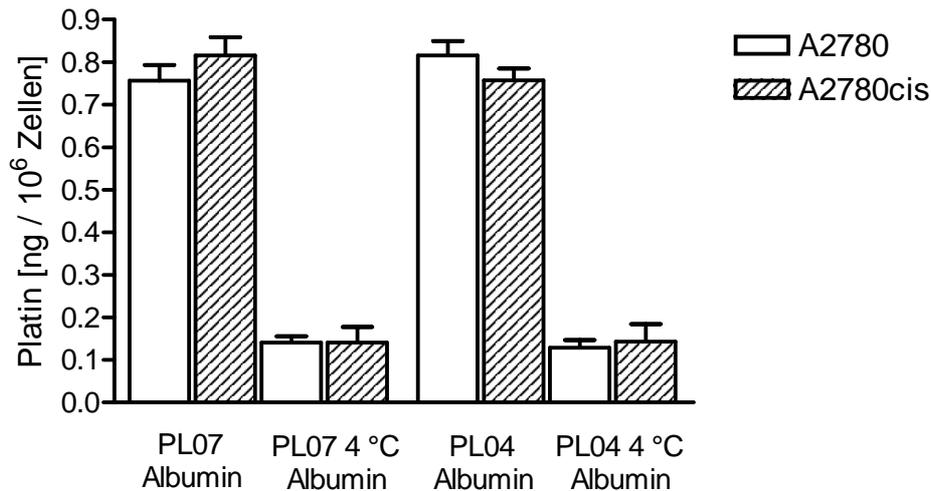


Abb. 5-26: Konzentration der albumingebundenen Platinkomplexe PL04 und PL07 bei 4 °C und 37 °C in A2780- und A2780cis-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-14$ ).

Es zeigte sich, dass die Aufnahme der Albumin-Platinkomplexe bei 4 °C deutlich vermindert war (Abb. 5-26). Dies wurde als zusätzliches Indiz für eine Aufnahme durch Endozytose gesehen.

### 5.4.3 Charakterisierung der Aufnahmemechanismen

Ausgehend von den Ergebnissen zur Aufnahme der makromolekularen Platinkomplexe, die vermuten lassen, dass für diese Komplexe ein eigenständiger Aufnahmemechanismus besteht, der bei platinresistenten Zellen nicht verändert ist, sollte untersucht werden, ob Endozytose vermittelte Prozesse an der Aufnahme dieser Komplexe beteiligt sind. Um den Substanzaufwand der nur in kleinem Maßstab synthetisierten Platinkomplexe gering zu halten, wurden Vorversuche zur Auswahl geeigneter Inhibitoren und Inhibitionsbedingungen mit FITC-Rinder-serumalbumin durchgeführt. Die intrazelluläre FITC-Konzentration wurde mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit validierten Fluoreszenzassays bestimmt.

### 5.4.3.1 Vorversuche mit FITC-Rinderserumalbumin

#### Kinetik der Aufnahme von FITC-Rinderserumalbumin

Zur Untersuchung möglicher Endozytose-Inhibitoren wurde FITC-Rinderserumalbumin als Modellsubstanz verwendet. Die Aufnahme dieses Makromoleküls wurde in der cisplatin-sensitiven und -resistenten Zelllinie über 120 Minuten charakterisiert.

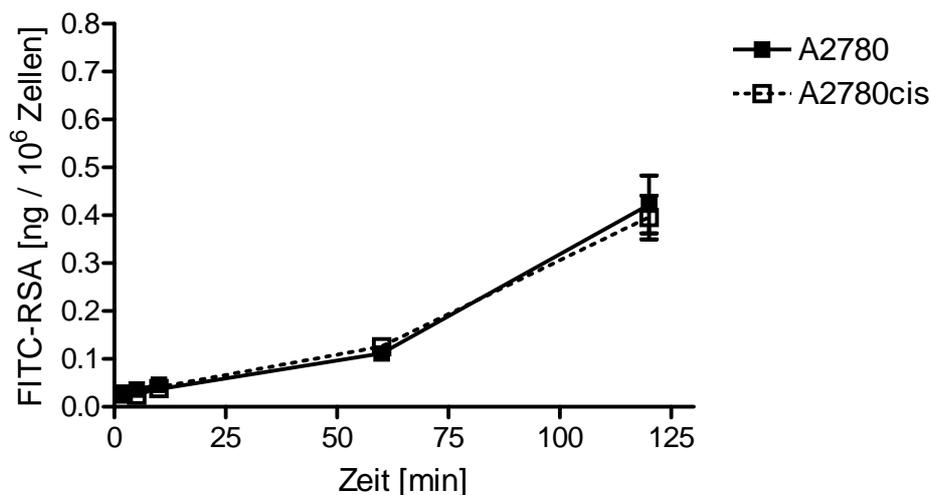


Abb. 5-27: Konzentration von FITC-Rinderserumalbumin [20 µg/ml] in A2780- und A2780cis-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-4$ ).

Die Aufnahme von FITC-Rinderserumalbumin in sensitive und resistente Tumorzellen war vergleichbar und zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney).

#### Optimierung der Versuchsbedingungen einer Endozytoseinhibition

Zu Beginn erfolgte eine Optimierung der von Yumoto et al. verwendeten Bedingungen durch Inhibitionsversuche der Endozytose von FITC-Rinderserumalbumin<sup>193</sup>. In Tab. 5-11 sind die durchgeführten Veränderungen und die Gründe hierfür aufgeführt, in den Abb. 5-28 und Abb. 5-29 sind die Ergebnisse dargestellt, die unter optimierten Versuchsbedingungen erhalten wurden.

Tab. 5-11: Optimierung der Versuchsbedingungen für die Endozytoseinhibition.

<b><math>\beta</math>-Methylcyclodextrin</b>		
<b>Parameter</b>	<b>Änderung</b>	<b>Gründe</b>
<u>Konzentration</u>	Alt: 5,0 mM	Ab 5 mM beginnende Ablösung der Zellen (verursacht hohe Variabilität)
Vorinkubation und Inkubation	Neu: 2,5 mM	Ausreichende Hemmung für 2,5 mM beschrieben <sup>193</sup> Geplante Inkubationszeit für Platin-komplexe doppelt so lang
<b>Bafilomycin A<sub>1</sub></b>		
<b>Parameter</b>	<b>Änderung</b>	<b>Gründe</b>
<u>Zeit</u>	Alt: 30 Minuten	Geringere Variabilität der Ergebnisse
Vorinkubation	Neu: 60 Minuten	Geplante Inkubationszeit für Platin-komplexe doppelt so lang

Wie aus Tab. 5-11 hervorgeht, wurde für die Inkubation mit  $\beta$ -Methylcyclodextrin die Konzentration des Inhibitors optimiert, für die Inkubation mit Bafilomycin A<sub>1</sub> die Zeit der Vorinkubation.

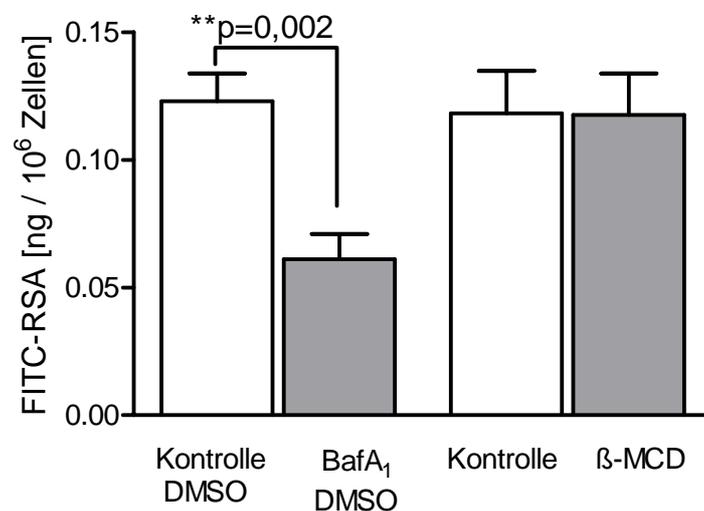


Abb. 5-28: Einfluss von Bafilomycin A<sub>1</sub> (BafA<sub>1</sub>) und  $\beta$ -Methylcyclodextrin ( $\beta$ -MCD) auf die intrazelluläre Konzentration von FITC-Rinderserumalbumin [20  $\mu$ g/ml] in A2780-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ; n=3-6, \*\*p  $\leq$  0,01).

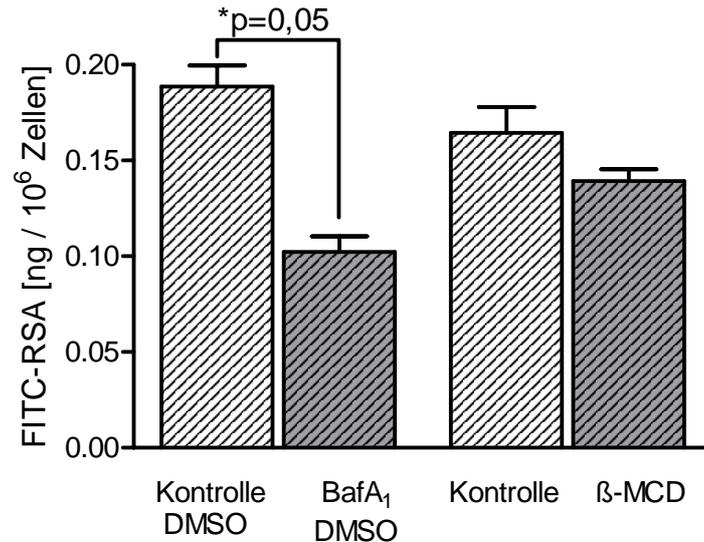


Abb. 5-29: Einfluss von Bafilomycin A<sub>1</sub> (BafA<sub>1</sub>) und β-Methylcyclodextrin (β-MCD) auf die intrazelluläre Konzentration von FITC-Rinderserumalbumin [20 µg/ml] in A2780cis-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-6$ ,  $*p \leq 0,05$ ).

Sowohl in sensitiven wie auch resistenten Zellen war eine statistisch hochsignifikante bzw. signifikante Inhibition der Aufnahme von FITC-Rinderserumalbumin durch Bafilomycin A<sub>1</sub> festzustellen (Mann-Whitney). β-Methylcyclodextrin hatte keinen signifikanten Einfluss (Abb. 5-28, Abb. 5-29).

#### 5.4.3.2 Inhibition der Aufnahme makromolekularer Platinkomplexe

Die optimierten Versuchsbedingungen aus 5.4.3.1 wurden für Inhibitionsversuche der Aufnahme der makromolekularen Platinkomplexe verwendet. Abb. 5-30 und Abb. 5-31 zeigen die Ergebnisse für die Inhibitionsversuche mit β-Methylcyclodextrin.

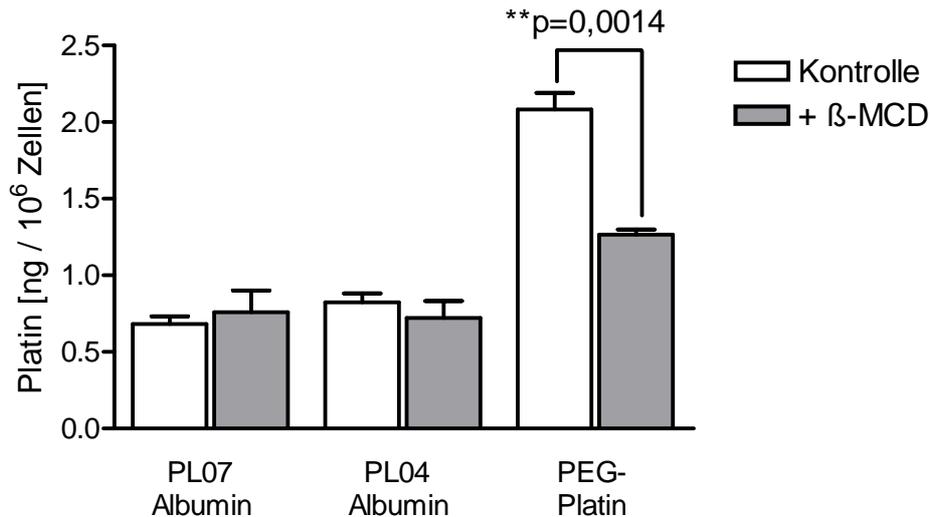


Abb. 5-30: Einfluss von  $\beta$ -MCD auf die intrazelluläre Platinkonzentration nach Inkubation mit makromolekularen Platinkomplexen [100  $\mu$ M] in A2780-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-9$ ,  $**p \leq 0,01$ ).

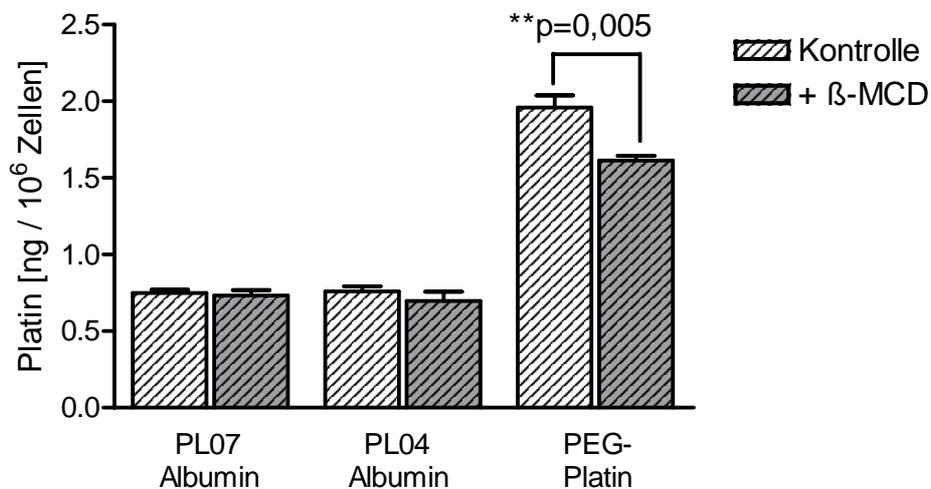


Abb. 5-31: Einfluss von  $\beta$ -MCD auf die intrazelluläre Platinkonzentration nach Inkubation mit makromolekularen Platinkomplexen [100  $\mu$ M] in A2780cis-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-9$ ,  $**p \leq 0,01$ ).

$\beta$ -Methylcyclodextrin hatte keinen Einfluss auf die Aufnahme der makromolekularen albumingebundenen Platinkomplexe in den sensitiven wie auch in den resistenten Zellen. Die Aufnahme des makromolekularen PEG-Platinkomplexes wurde in beiden Fällen inhibiert. Die Inhibition war hoch signifikant (Mann-Whitney), in den sensitiven

Zellen aber deutlich ausgeprägter. Hier betrug die Inhibition etwa 40 %, in den resistenten Zellen 18 %.

Abb. 5-32 und Abb. 5-33 zeigen die Ergebnisse für die Inhibitionsversuche mit Bafilomycin A<sub>1</sub>.

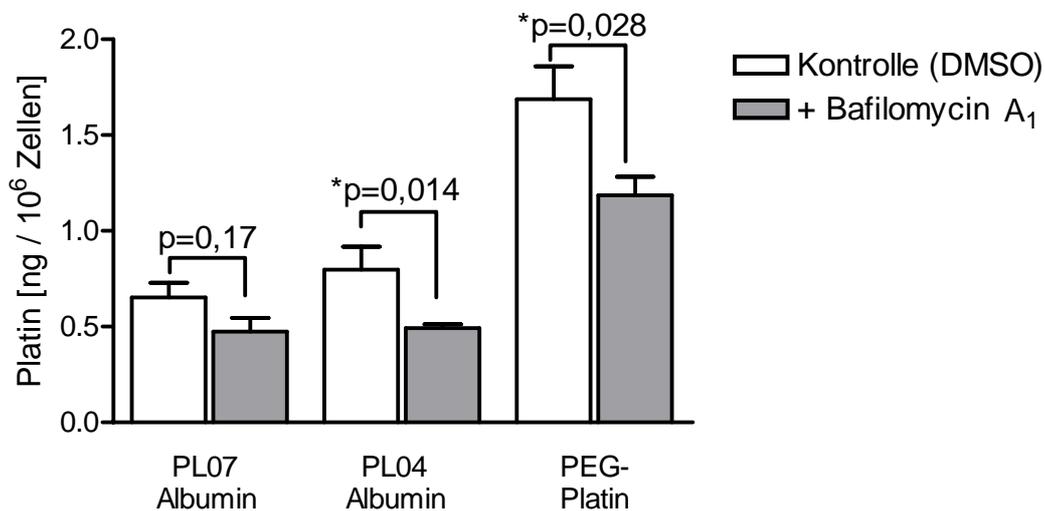


Abb. 5-32: Auswirkung von Bafilomycin A<sub>1</sub> auf die intrazelluläre Platinkonzentration nach Inkubation mit makromolekularen Platinkomplexen [100 μM] in A2780-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ; n=4, \*p ≤ 0,05).

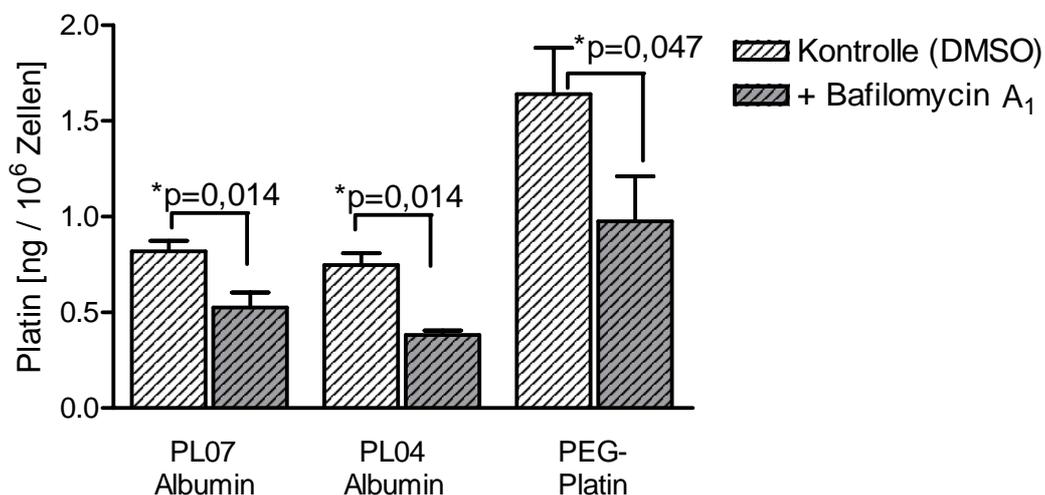


Abb. 5-33: Auswirkung von Bafilomycin A<sub>1</sub> auf die intrazelluläre Platinkonzentration nach Inkubation mit makromolekularen Platinkomplexen [100 μM] in A2780cis-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ; n=4-5, \*p ≤ 0,05).

Die Aufnahme der albumingebundenen Platinkomplexe wie auch die Aufnahme des PEG-Platinkomplexes wurde durch Bafilomycin A<sub>1</sub> in den sensitiven und in den resistenten Zellen inhibiert. Verglichen mit der Inhibition der Aufnahme von Albumin (s. 5.4.3.1) fällt die Inhibition geringer aus. Die Prüfung auf statistische Signifikanz der gemessenen Unterschiede ergab für alle Versuche mit Ausnahme der Inhibition der Aufnahme von PL07 in der sensitiven Zelllinie (aber auch mit gleicher Tendenz) ein signifikantes Ergebnis ( $p \leq 0,05$ ; Mann-Whitney).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Aufnahme der albuminbindenden Platinkomplexe durch den Endozytoseinhibitor Bafilomycin A<sub>1</sub> inhibiert wurde.  $\beta$ -Methylcyclodextrin hatte keinen Einfluss. Die Aufnahme des PEG-Platinkomplexes wird durch beide Substanzen eingeschränkt.

#### 5.4.3.3 Inhibition der Aufnahme niedermolekularer Platinkomplexe

Die Resultate der Versuche zur Inhibition der Aufnahme der makromolekularen Platinkomplexe zeigten den Einfluss der eingesetzten Endozytoseinhibitoren auf die albumingebundenen Platinkomplexe. Ein Kontrollversuch sollte klären, ob diese Inhibitoren auch die Aufnahme der ungebundenen, niedermolekularen Platinkomplexe beeinflussen.

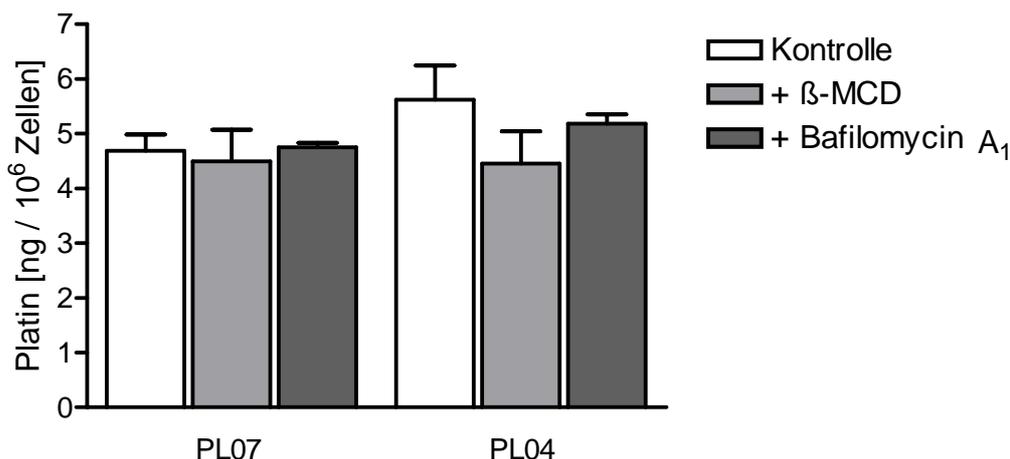


Abb. 5-34: Einfluss von Bafilomycin A<sub>1</sub> und  $\beta$ -Methylcyclodextrin auf die intrazelluläre Konzentration niedermolekularer Platinkomplexe [100  $\mu$ M] in A2780-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-4$ ).

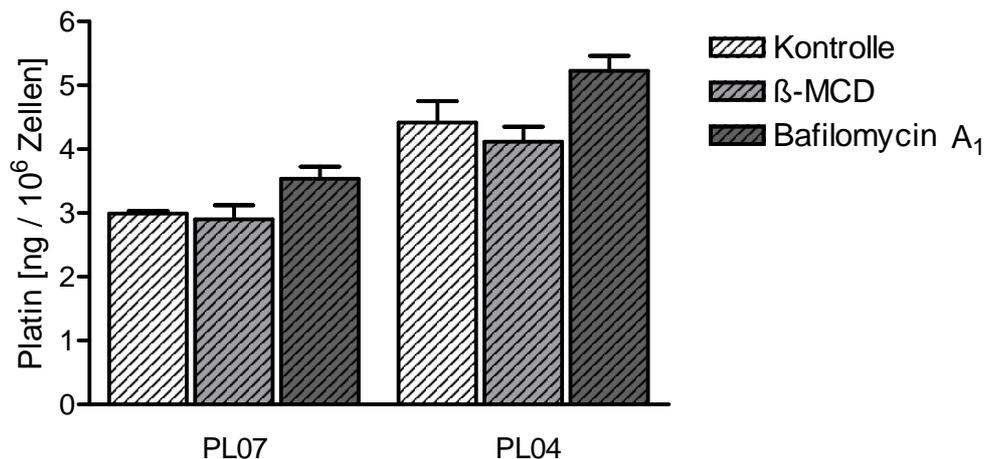


Abb. 5-35: Einfluss von Bafilomycin A<sub>1</sub> und  $\beta$ -Methylcyclodextrin auf die intrazelluläre Konzentration niedermolekularer Platinkomplexe [100  $\mu$ M] in A2780cis-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ; n=3-4).

Wie sich den Abb. 5-34 und Abb. 5-35 entnehmen lässt, wurde weder mit Bafilomycin A<sub>1</sub> noch mit  $\beta$ -Methylcyclodextrin eine Inhibition der Aufnahme der niedermolekularen Platinkomplexe erzielt. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die erzielte Inhibition der Aufnahme der makromolekularen Platinkomplexe (Abb. 5-30 bis Abb. 5-33) nicht durch freigesetzte oder ungebundene niedermolekulare Platinkomplexe verfälscht werden konnte.

## 5.5 Zytotoxizität

Die mit Hilfe des MTT-Assays durchgeführten Zytotoxizitätstests sollten zur Klärung der Frage beitragen, ob die makromolekularen Platinkomplexe intrazellulär aktiviert werden. Da die vorausgehenden Untersuchungen zeigten, dass die Aufnahme der makromolekularen Platinkomplexe in resistente Zellen nicht beeinflusst zu sein scheint, wurde dem Resistenzgrad besondere Beachtung geschenkt. Die Zytotoxizität des makromolekularen PEG-Platinkomplexes wurde ebenfalls bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen finden sich in Tab. 5-12 und Tab. 5-13 sowie in Abb. 5-36. Die Einzelergebnisse sind in Anhang A4 aufgeführt.

Tab. 5-12: Ermittelte  $EC_{50}$ -Werte und Resistenzgrad der niedermolekularen Platinkomplexe PL04 und PL07 in A2780- und A2780cis-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-6$ ).

Zytotoxizität	PL04	PL07
log $EC_{50}$ sensitiv ( $EC_{50}$ )	$-5,19 \pm 0,11$ [6,5 $\mu$ M]	$-4,42 \pm 0,07$ [38,0 $\mu$ M]
log $EC_{50}$ resistent ( $EC_{50}$ )	$-4,68 \pm 0,08$ [20,9 $\mu$ M]	$-3,84 \pm 0,06$ [144 $\mu$ M]
Resistenzgrad	3,5	3,7

PL04 erwies sich als deutlich zytotoxischer als PL07. Der ermittelte  $EC_{50}$ -Wert war vergleichbar mit dem  $EC_{50}$ -Wert für Oxaliplatin. PL07 war etwas zytotoxischer als Carboplatin (s.Kap.5.4.1).

Tab. 5-13: Ermittelte  $EC_{50}$ -Werte und Resistenzgrad der albumin gebundenen Platinkomplexe PL04 und PL07 in A2780- und A2780cis-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-6$ ).

Zytotoxizität	PL04 Albumin	PL07 Albumin	PEG-Platin
log $EC_{50}$ sensitiv ( $EC_{50}$ )	$-3,58 \pm 0,10$ [263 $\mu$ M]	$-3,54 \pm 0,16$ [288 $\mu$ M]	$-5,21 \pm 0,11$ [6,2 $\mu$ M]
log $EC_{50}$ resistent ( $EC_{50}$ )	$-3,47 \pm 0,12$ [338 $\mu$ M]	$-3,53 \pm 0,11$ [295 $\mu$ M]	$-4,65 \pm 0,11$ [22,4 $\mu$ M]
Resistenzgrad	1,3	1,0	3,6

Nach Bindung an Albumin waren die Platinkomplexe PL04 und PL07 nur noch schwach zytotoxisch. Der  $EC_{50}$  liegt in cisplatin sensitiven Zellen um den Faktor 40 (PL04) bzw. 7,5 (PL07) höher als vor der Bindung an Albumin. Für beide Substanzen wurde ein deutlich geringerer Resistenzgrad bzw. eine Überwindung der Resistenz beobachtet.

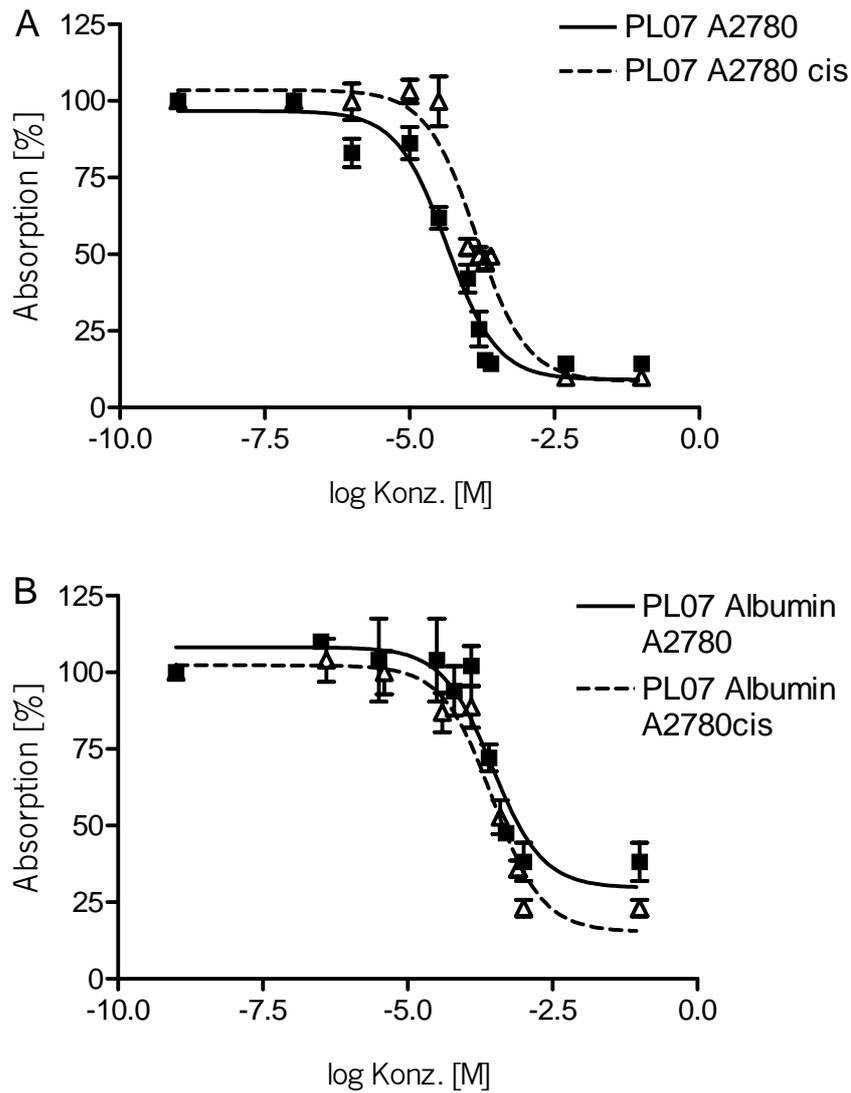


Abb. 5-36: Unterschiedliche Lage der Konzentrations-Effekt-Kurven vor (A) und nach (B) Bindung von PL07 an Albumin in A2780- und A2780cis-Zellen.

Der makromolekulare PEG-Platinkomplex war wesentlich zytotoxischer. Die ermittelte Zytotoxizität und der errechnete Resistenzgrad waren mit Oxaliplatin und niedermolekularem PL04 vergleichbar.

## 6 Ergebnisse zur Untersuchung neuer Oxaliplatin-Analoga

Eine der Hypothesen zur Aufnahme der Platinkomplexe besteht darin, dass der Hauptanteil dieser Komplexe durch passive Diffusion in die Zelle gelangt. Danach sollten lipophilere Komplexe deutlich besser in die Zelle aufgenommen werden. Substanzen, die ähnliche lipophile Eigenschaften besitzen und sich bei gleicher Ladung in ihrer Molekülgröße nur geringfügig unterscheiden, sollten hingegen ein ähnliches Aufnahmeverhalten aufweisen. Die intrazelluläre Platinkonzentration wird als eine entscheidende Voraussetzung für den zytotoxischen Effekt angesehen<sup>203</sup>. Häufig findet sich in der Literatur die These, dass durch den Einsatz lipophilerer Platinkomplexe über eine gesteigerte passive Diffusion die intrazelluläre Platinkonzentration in Tumorzellen erhöht und möglicherweise auch Resistenz überwunden werden könnte<sup>169,204</sup>.

Im Rahmen verschiedener Projekte zur Aufnahme unterschiedlicher Platinkomplexe in Tumorzellen wurden auch Carboplatin und Cisplatin in den Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und A2780cis untersucht.

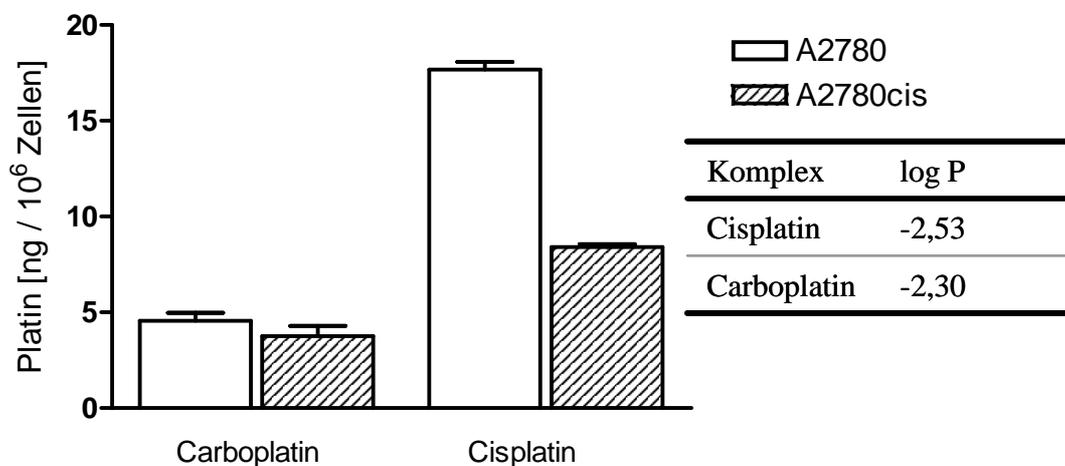


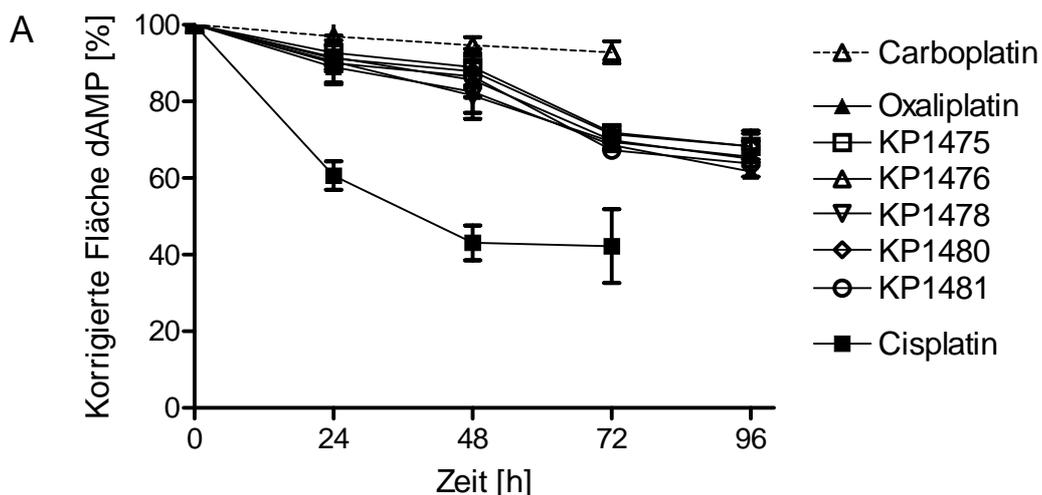
Abb. 6-1: Platinkonzentration in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit Carboplatin und Cisplatin [100  $\mu$ M] nach 120 Minuten ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3$ ).

Cisplatin zeigt eine eingeschränkte Aufnahme in resistenten Tumorzellen (Abb. 6-1). Auffallend ist die deutlich stärkere Aufnahme von Cisplatin in die Zellen bei ähnlichem log P-Wert. Der log P-Wert beschreibt das Verteilungsverhalten in einem Octanol / Wasser-Gemisch und ist der gebräuchlichste Parameter zur Charakterisierung der lipophilen Eigenschaften einer Substanz.

Allerdings unterscheiden sich Carboplatin und Cisplatin durch ihre austauschbaren Liganden. Diese Beobachtung führte dazu, die Bedeutung der Lipophilie der Platinkomplexe anhand einer Reihe neuer Oxaliplatin-Analoga systematisch zu untersuchen. Gleichzeitig sollte der Einfluss der Lipophilie auf Zytotoxizität und Resistenz analysiert werden. Die Substanzen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Keppler synthetisiert.

## 6.1 Reaktivität gegenüber Nukleotiden

Die Reaktivität der Platinkomplexe könnte, gerade vor dem Hintergrund der vermuteten Beteiligung verschiedener Transporter, ein wichtiger Faktor für die Aufnahme der Platinkomplexe in Tumorzellen sein. Vorstellbar wären z.B. reaktivitätsabhängige Unterschiede in der Bindung am extrazellulären Met-Motiv des humanen Kupfertransporters CTR1 und eine damit verbundene unterschiedliche Stabilisierung eines Ionenkanals oder Endozytose in die Zelle. Deshalb wurde die Reaktivität der verwendeten Platinkomplexe gegenüber den Nukleotiden dAMP und dGMP mit der validierten kapillarelektrophoretischen Methode untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 6-2 A und B dargestellt. Die Einzelergebnisse können Anhang B1 entnommen werden.



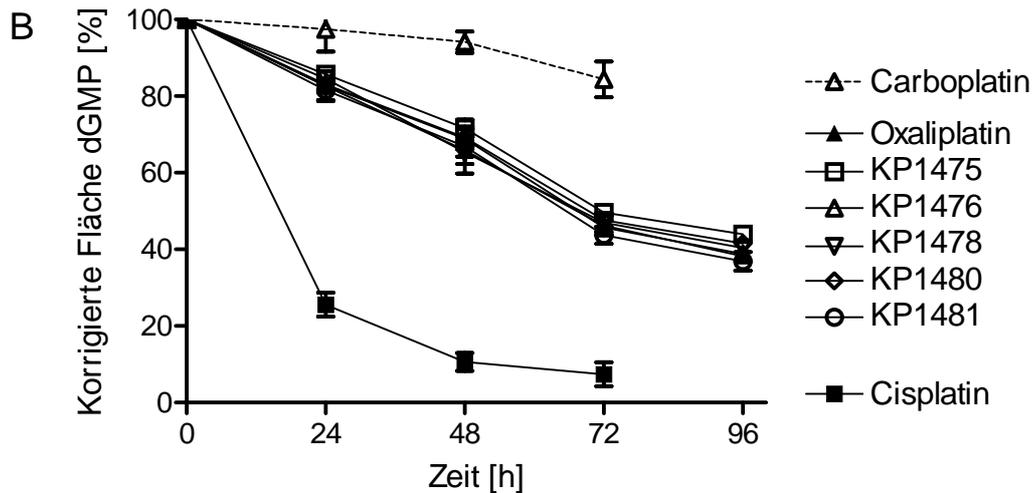


Abb. 6-2: Abnahme der korrigierten Peakfläche von dAMP (A) und dGMP (B) [150  $\mu$ M jeweils] während der Inkubation mit verschiedenen Platinkomplexen ( $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=3$ ).

Insgesamt gesehen war bei allen Platinkomplexen die Reaktivität gegenüber dGMP deutlich stärker ausgeprägt als gegenüber dAMP. Carboplatin wies die niedrigste, Cisplatin die höchste Reaktivität auf. Die Oxaliplatin-Analoga unterschieden sich nur geringfügig.

## 6.2 Zelluläre Aufnahme

Im nächsten Schritt wurde die intrazelluläre Platinkonzentration nach unterschiedlichen Inkubationszeiten zur Charakterisierung der Aufnahme der Platinkomplexe in A2780- und A2780cis-Zellen untersucht. Da hier ein direkter Vergleich zwischen strukturell sehr ähnlichen Substanzen durchgeführt werden sollte, wurde versucht, durch Verwendung eines Kontrollversuchs die Variabilität der Zellkulturversuche zu minimieren.

### 6.2.1 Etablierung eines Kontrollversuchs

Untersuchungen an humanen Zellen bringen häufig eine hohe Variabilität mit sich. Zum einen können die Eigenschaften der Tumorzellen zwischen verschiedenen Passagen variieren, zum anderen schon geringfügige Veränderungen – z.B. der Nährmedienzusammensetzung oder der Inkubationsbedingungen (Temperatur, CO<sub>2</sub>)

– eine Änderung der Eigenschaften hervorrufen. Für die Untersuchung und den direkten Vergleich der Oxaliplatin-Analoga wurde deshalb die Aufnahme von Oxaliplatin als Kontrolle verwendet. Hierzu wurde in sechs unabhängigen Versuchen die Aufnahme von 100  $\mu\text{M}$  Oxaliplatin nach 60 Minuten in der sensitiven und resistenten Zelllinie untersucht, Mittelwert und Variationskoeffizient berechnet und anhand der ermittelten Streuung ein „Vertrauensbereich“ definiert. Im Folgenden wurden bei jedem Experiment, in dem die aufgenommene Menge verschiedener Platinkomplexe untersucht wurde, zwei Parallelversuche mit Oxaliplatin durchgeführt und die Ergebnisse nur dann verwendet, wenn die Resultate beider Parallelversuche im festgesetzten „Vertrauensbereich“ lagen. Tab. 6-1 gibt die Ergebnisse wieder, die zur Festlegung dieses Bereiches führten.

*Tab. 6-1: Mittelwert, Variationskoeffizient und festgelegter Vertrauensbereich des Kontrollversuchs mit 100  $\mu\text{M}$  Oxaliplatin über 60 Minuten.*

Zelllinie	$\bar{X}$ [ng Platin / $10^6$ Zellen]	VK [%]	Vertrauensbereich (festgelegt)
A2780	7,8	6,1	MW $\pm$ 10 %
A2780cis	4,1	8,9	MW $\pm$ 10 %

### 6.2.2 Quantifizierung der intrazellulären Platinkonzentration

Abb. 6-3 und Abb. 6-4 zeigen die Ergebnisse der Aufnahmeversuche, die mit Oxaliplatin und den Oxaliplatin-Analoga über 120 Minuten erzielt wurden. Die Substanz KP1475 wurde nicht dargestellt, da hier nach kurzer Zeit eine Ablösung der Zellen beobachtet werden konnte. Die gemessenen Platinkonzentrationen waren um ein Vielfaches höher und aufgrund der Ablösung der Zellen und damit verbundenem Verlust an Zellmaterial während der Waschschriffe nicht reproduzierbar. Der Verlust an Zellmaterial wurde durch Messung der Proteinkonzentration festgestellt und variierte zwischen 30 und 60 %.

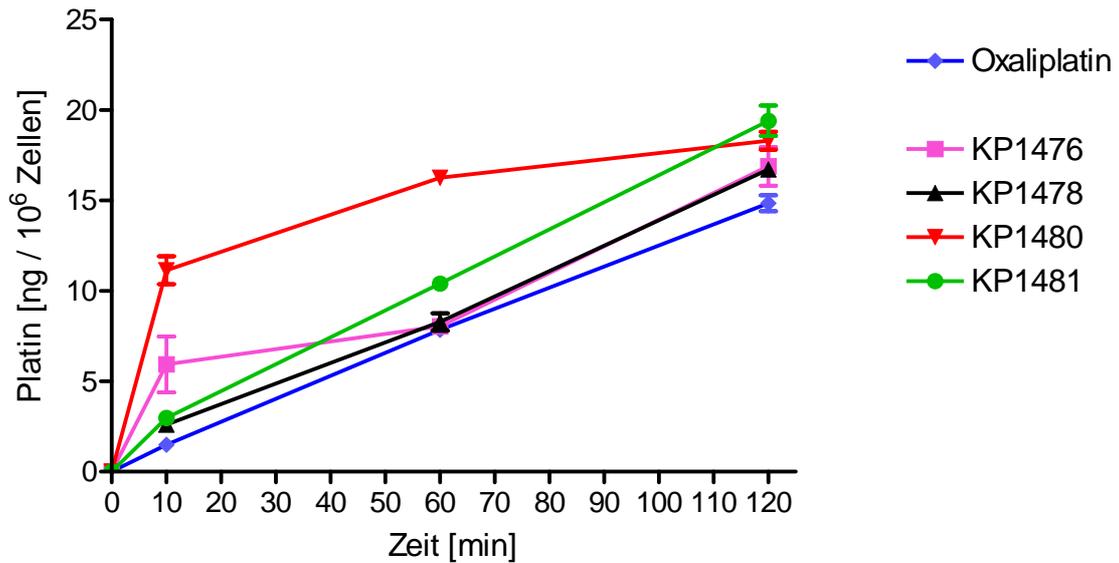


Abb. 6-3: Platinkonzentration in A2780-Zellen nach Inkubation mit Oxaliplatin und Oxaliplatin-Analoga [100  $\mu$ M] ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-6$ ).

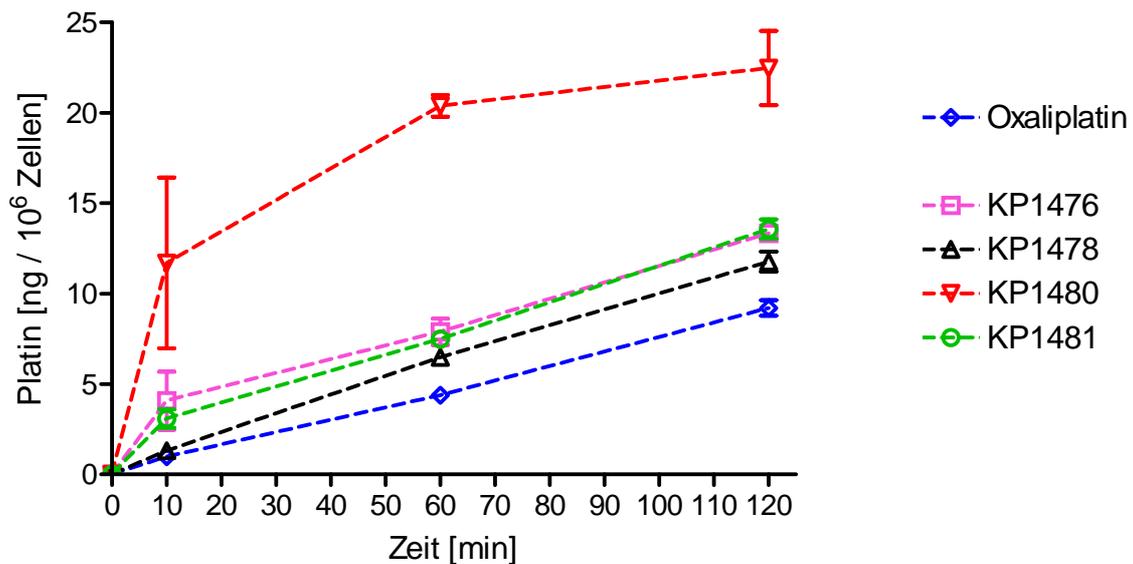


Abb. 6-4: Platinkonzentration in A2780cis-Zellen nach Inkubation mit Oxaliplatin und Oxaliplatin-Analoga [100  $\mu$ M] ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-6$ ).

In beiden Zelllinien konnten zwei Aufnahmephasen unterschieden werden. Die Aufnahme der Platinkomplexe in der ersten Phase – es wird während der ersten Minuten auch vom „early uptake“ gesprochen – variierte deutlich. In der zweiten Phase der Aufnahme zeigten sämtliche Platinkomplexe eine ähnliche, nahezu lineare Zunahme der Platinkonzentration. Aus einer Parallelverschiebung der

Aufnahmekinetik wird ersichtlich, dass die Geschwindigkeit der Aufnahme in der zweiten Phase vergleichbar war. In der resistenten Zelllinie wurden deutlich geringere Platinkonzentrationen bestimmt. Eine Ausnahme bildete KP1480. Bei dieser Substanz wurde in der resistenten Zelllinie eine höhere Platinkonzentration quantifiziert (s. Abb. 6-5). Der Platinkonzentrations-Zeit-Verlauf wies Unterschiede im Vergleich zu den anderen Oxaliplatin-Analoga auf. Dieses Ergebnis erforderte Untersuchungen über einen längeren Zeitraum, welche Aussagen über die weitere Entwicklung der intrazellulären Platinkonzentration ermöglichen. Dadurch konnte untersucht werden, ob der Platinkomplex KP1480 ein grundlegend anderes Verhalten aufweist.

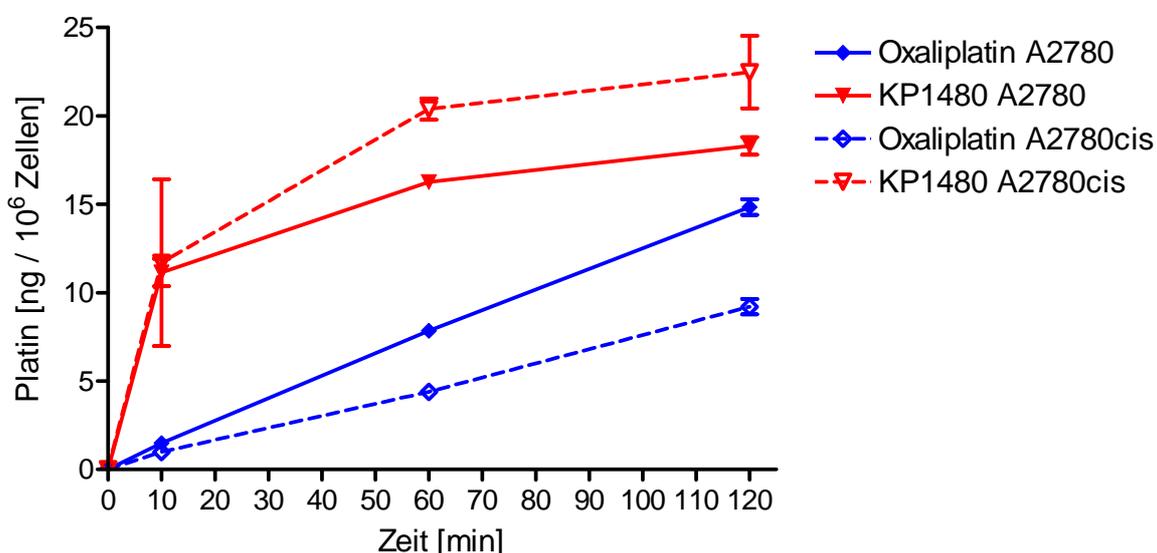


Abb. 6-5: Platinkonzentration in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit Oxaliplatin und KP1480 [100  $\mu$ M] über 120 Minuten ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-6$ ).

In Abb. 6-6 ist die Entwicklung der intrazellulären Platinkonzentration unter Einwirkung von Oxaliplatin und KP1480 im direkten Vergleich der sensitiven und resistenten Zelllinie über den verlängerten Untersuchungszeitraum von 240 Minuten dargestellt.

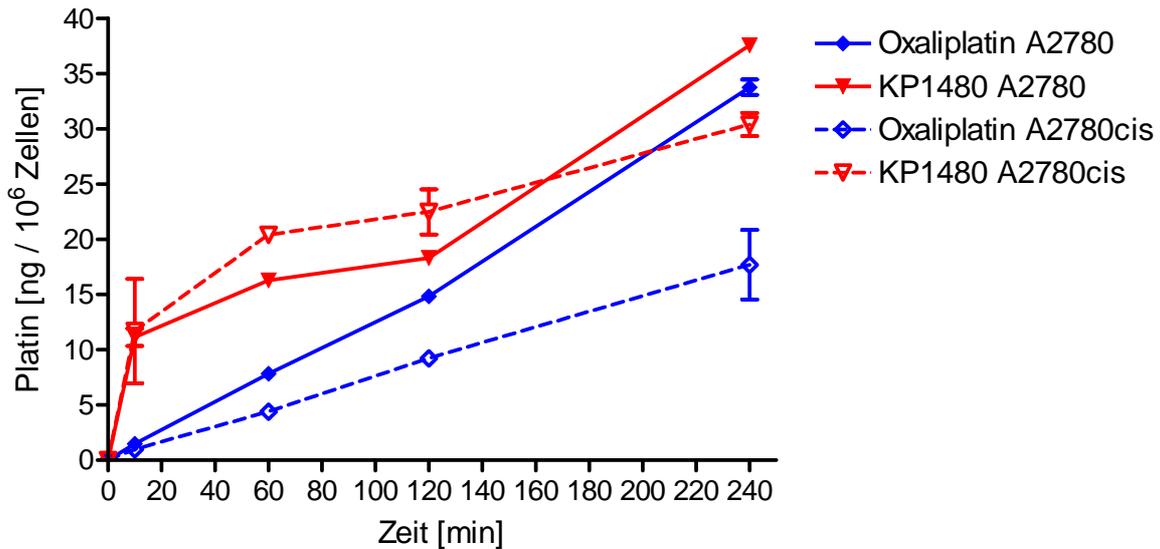


Abb. 6-6: Platinkonzentration in A2780- und A2780cis-Zellen nach Inkubation mit Oxaliplatin und KP1480 [100  $\mu$ M] über 240 Minuten ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3-6$ ).

Die Aufnahmegeschwindigkeit von Oxaliplatin blieb weiterhin nahezu linear. Das Aufnahmeverhalten von KP1480 glied sich über diesen verlängerten Untersuchungszeitraum dem Aufnahmeverhalten von Oxaliplatin an.

### 6.3 Zytotoxizität

Häufig wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Platinkonzentration im direkten Zusammenhang mit der Zytotoxizität der Platinkomplexe steht. Als weiterer wichtiger Parameter wurde deshalb die Zytotoxizität von Oxaliplatin und der Oxaliplatin-Analoga in die Untersuchungen einbezogen. Abb. 6-7 gibt einen Überblick über die mit dem MTT-Assay ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven in A2780- und A2780cis-Zellen (vgl. Anhang B4).

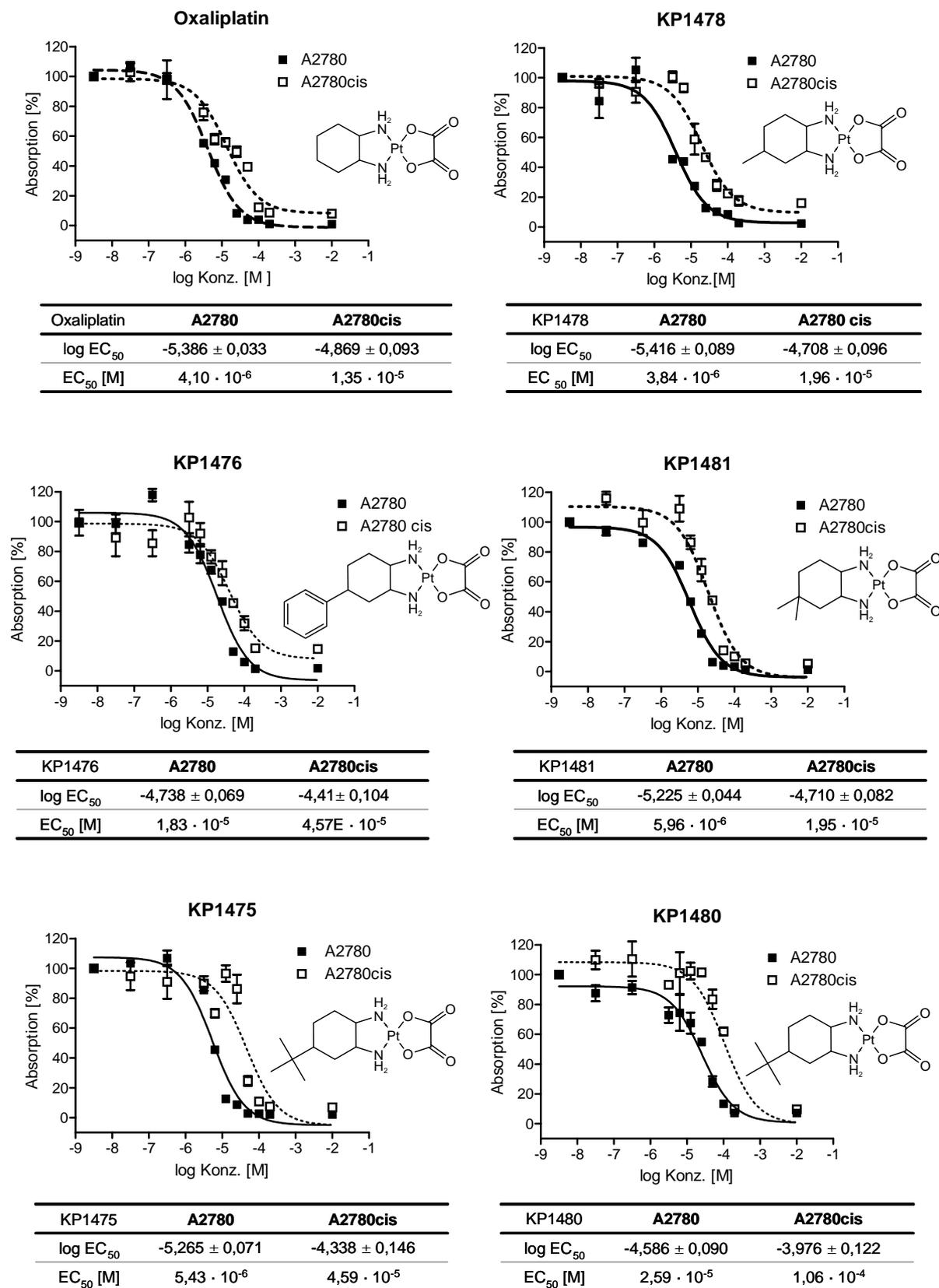


Abb. 6-7: Konzentrations-Effekt-Kurven der verschiedenen Platinkomplexe in A2780- und A2780cis-Zellen (n=3).

Die aus den Konzentrations-Effekt-Kurven ermittelten  $EC_{50}$ -Werte der Platinkomplexe und der daraus kalkulierte Resistenzgrad sind in Abb. 6-8 vergleichend dargestellt.

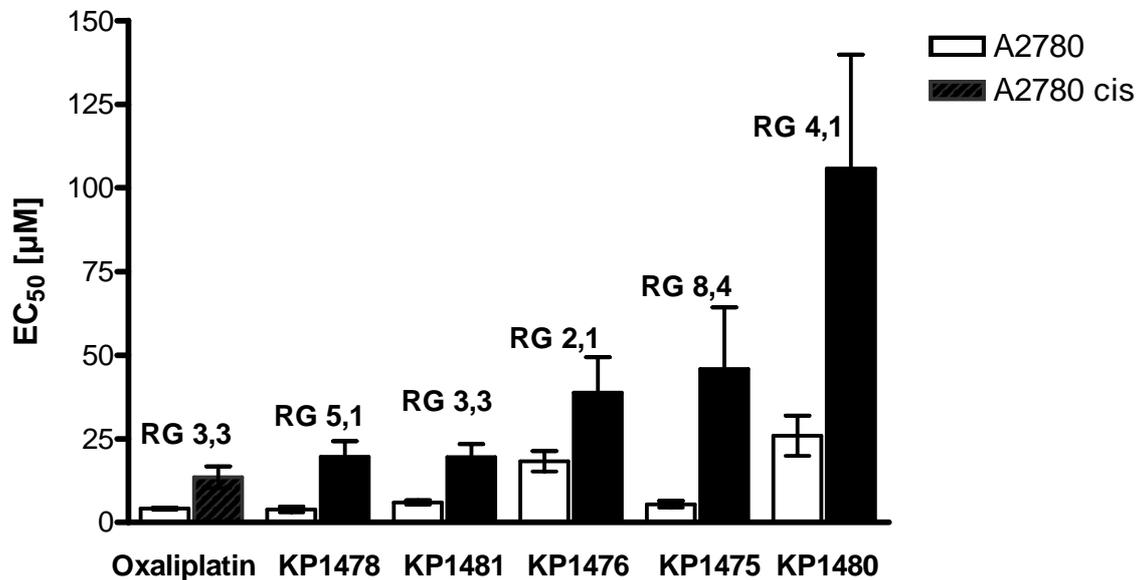


Abb. 6-8:  $EC_{50}$  und kalkulierter Resistenzgrad (RG) verschiedener Platinkomplexe in A2780 und A2780cis-Zellen ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3$ ).

Auffallend ist die geringe Zytotoxizität von KP1480. Diese Substanz wies, verglichen mit Oxaliplatin, gegenüber sensitiven Zellen eine sechsfach, gegenüber resistenten Zellen eine achtfach geringere Zytotoxizität auf. Der Resistenzgrad (RG) der untersuchten Platinkomplexe variierte mit Ausnahme der Substanzen KP1476 und KP1475 zwischen 3,3 und 5,1. Die Substanz KP1475, welche ein Stereoisomer von KP1480 ist, zeigte eine höhere Zytotoxizität als KP1480 und einen Resistenzgrad von 8,4. Der Resistenzgrad von KP1476 ist mit 2,1 geringfügig geringer.

## 6.4 Korrelationsanalysen

### 6.4.1 Beziehung zwischen Lipophilie und zellulärer Aufnahme

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Lipophilie der Platinkomplexe und der Aufnahme in Tumorzellen wurde eine lineare Regression der gemessenen Platinkonzentrationen zwischen der 10. und 120. Minute – in diesem Zeitraum stieg

die Platinkonzentration mit steigender Inkubationszeit annähernd linear an – durchgeführt. Die Steigung der ermittelten Regressionsgeraden wurde als Maß für die Aufnahmegeschwindigkeit innerhalb dieses Zeitraums betrachtet. Der rückextrapolierte Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Ordinate (y-Abschnitt) wurde als Parameter für den „early uptake“ verwendet. Dies hatte den Vorteil, dass für diese Phase der Aufnahme, die eine relativ hohe Variabilität aufwies, ein leicht zu ermittelnder Parameter zur Verfügung stand. Tab. 6-2 gibt eine Übersicht über die Lipophilie-Parameter der Platinkomplexe und die aus den Aufnahmeexperimenten ermittelten Steigungen und Schnittpunkte der Regressionsgeraden.

*Tab. 6-2: Lipophilie der Platinkomplexe sowie Steigungen und Ordinaten Schnittpunkte der ermittelten Regressionsgeraden in A2780- und A2780cis-Zellen.*

Komplex	log P	P	A2780 Steigung	A2780 y-Abschnitt	A2780cis Steigung	A2780cis y-Abschnitt
Oxaliplatin	-1.76	0,017	0,121	0,379	0,075	0,113
KP1478	-1.28	0,052	0,129	1,043	0,095	0,520
KP1481	-0,68	0,209	0,149	1,466	0,095	2,014
KP1476	-0.28	0,525	0,101	3,878	0,084	3,093
KP1480	0.42	2,630	0,064	11,170	0,096	12,110

### **Beziehung zwischen Lipophilie und Aufnahmegeschwindigkeit**

Zur Untersuchung der Beziehung zwischen Lipophilie und Aufnahmegeschwindigkeit wurden die logarithmierten Octanol / Wasser-Koeffizienten (log P) der Platinkomplexe mit den ermittelten Steigungen der Regressionsgeraden als Maß für die Aufnahmegeschwindigkeit korreliert. Da der Shapiro-Wilk-Test ergab, dass für die Verteilung der Steigung nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden durfte, wurde eine Rangkorrelation nach Kendall durchgeführt. Abb. 6-9 zeigt, dass in der sensitiven und resistenten Zelllinie kein Zusammenhang zwischen der Lipophilie der Platinkomplexe und der Aufnahmegeschwindigkeit in die Tumorzellen besteht. Zwar ergab die Rangkorrelation nach Kendall eine geringe gegenläufige (A2780) bzw. mittlere (A2780cis) Korrelation, diese war jedoch in beiden Fällen nicht signifikant (A2780  $r = -0,40$ ,  $p = 0,327$ ; A2780cis  $r = 0,60$ ,  $p = 0,142$ ).

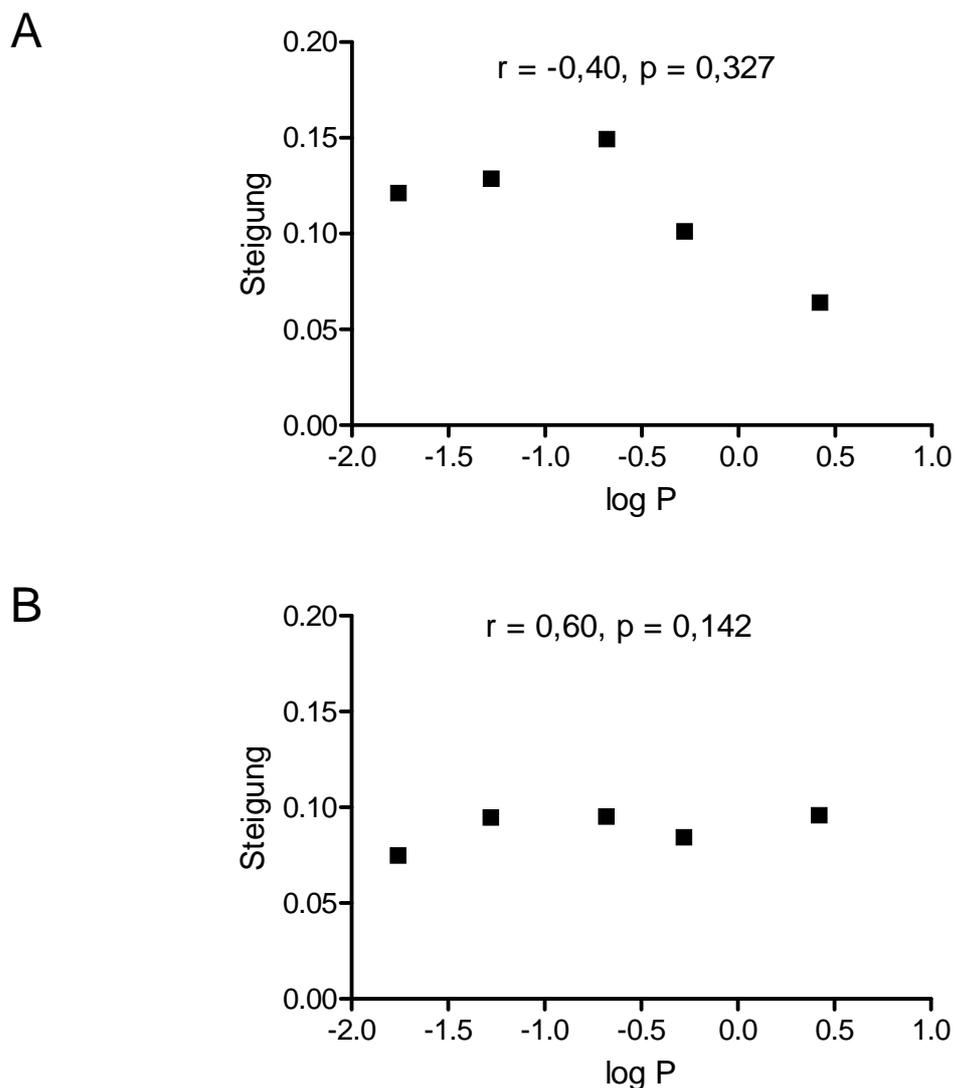


Abb. 6-9: Beziehung zwischen Lipophilie ( $\log P$ ) und Aufnahmegeschwindigkeit verschiedener Platinkomplexe in A2780- (**A**) und A2780cis-Zellen (**B**).

### Beziehung zwischen Lipophilie und früher Aufnahmegeschwindigkeit

Zur Untersuchung der Beziehung zwischen Lipophilie und der frühen Aufnahmegeschwindigkeit wurden die  $\log P$ -Werte mit den ermittelten Ordinaten Schnittpunkten der Regressionsgraden korreliert (Abb. 6-10).

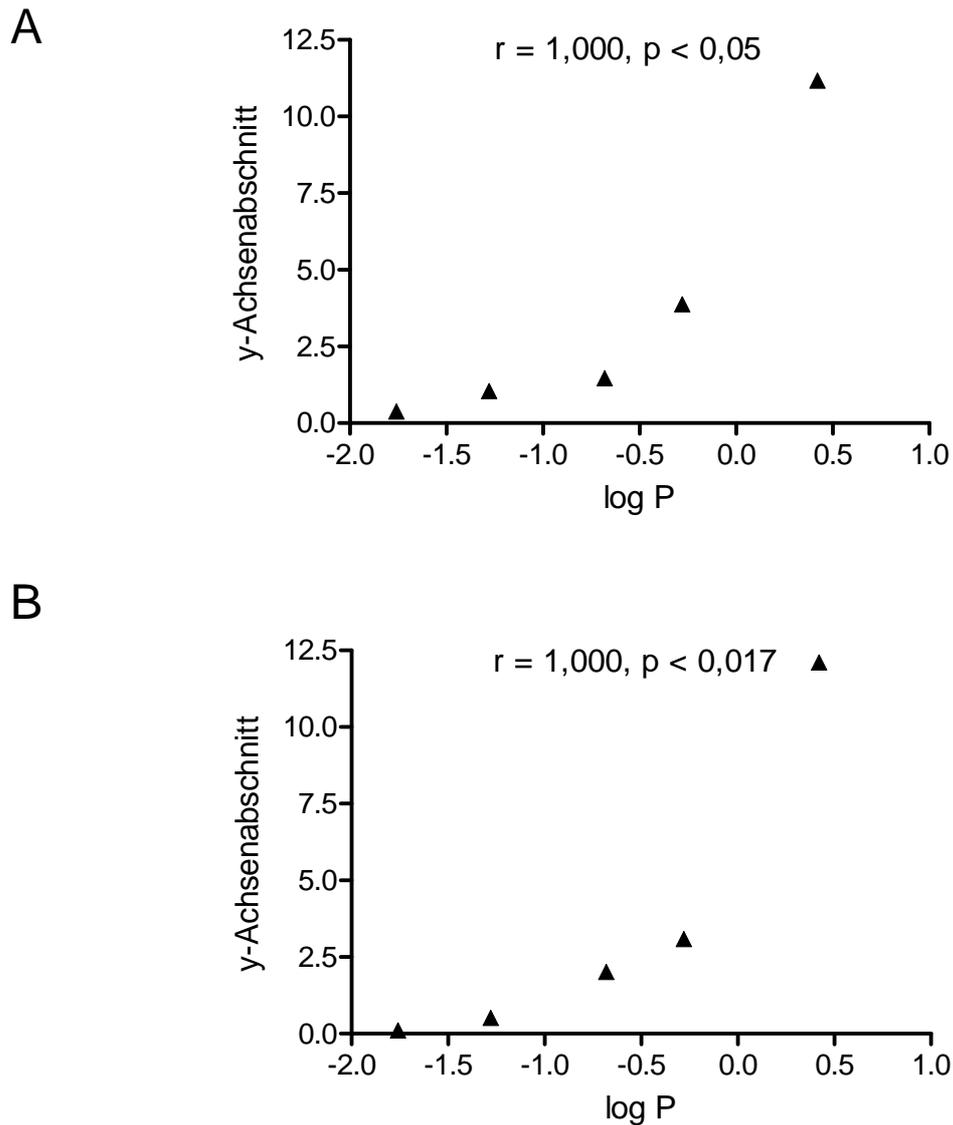


Abb. 6-10: Beziehung zwischen Lipophilie ( $\log P$ ) und früher Aufnahme verschiedener Platinkomplexe in A2780- (**A**) und A2780cis-Zellen (**B**).

Sowohl in der sensitiven wie auch in der resistenten Ovarialkarzinomzelllinie ist ein Zusammenhang zwischen den  $\log P$ -Werten als Maß für die Lipophile und der ersten Aufnahmephase offensichtlich. Dementsprechend wurde für diesen Zusammenhang in beiden Zelllinien eine sehr hohe, signifikante Korrelation gefunden (Rangkorrelation nach Kendall).

Die Rangkorrelation nach Kendall wurde verwendet, da der Zusammenhang nicht linear zu sein schien und keine Normalverteilung der Ordinatenabschnitte (y-Abschnitte) vorlag. Die visuelle Betrachtung legte vielmehr eine exponentielle Abhängigkeit nahe. Die Darstellung der Korrelation mit den nicht logarithmierten

Octanol / Wasser-Koeffizienten (P) sollte dann eine lineare Beziehung ergeben, die durch eine lineare Regression beschrieben werden kann. Die Ergebnisse dieser linearen Regression zeigt Abb. 6-11. Das Ausmaß der Korrelation wurde über den Korrelationskoeffizienten  $r$  (entspricht der Korrelation nach Pearson) beurteilt.

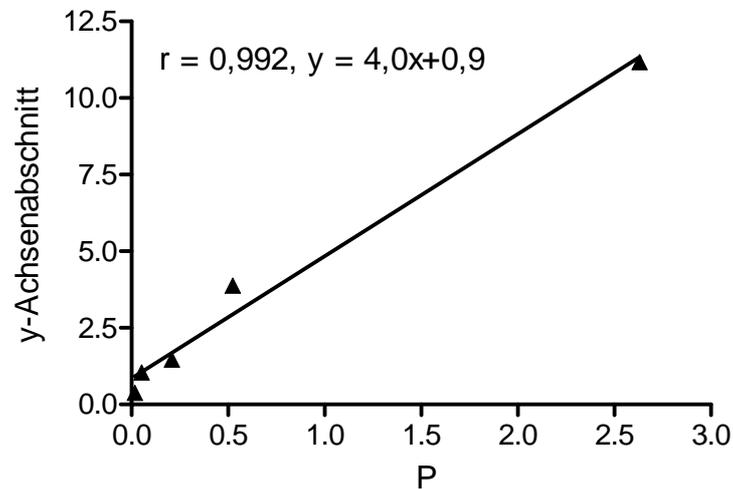
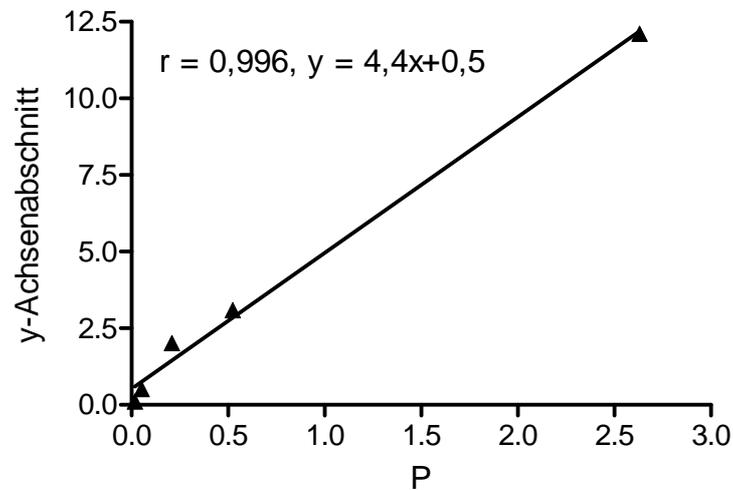
**A****B**

Abb. 6-11: Beziehung zwischen Lipophilie (P) und früher Aufnahme verschiedener Platinkomplexe in A2780- (**A**) und A2780cis-Zellen (**B**), mit Korrelationskoeffizienten und Regressionsgleichungen.

Die Korrelation zwischen den Octanol / Wasser-Koeffizienten (P) und den ermittelten Ordinatenschnittpunkten war sehr hoch (Korrelation nach Pearson). Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis auf eine lineare Beziehung zwischen den Octanol / Wasser-Koeffizienten und der frühen Aufnahme der Platinkomplexe in Tumorzellen. Angemerkt sei, dass der gebräuchliche parametrische Test auf statistische Signifikanz hier aufgrund des negativen Testergebnisses der Prüfung auf Normalverteilung der Ordinatenschnittpunkte (Shapiro-Wilk) nicht durchgeführt werden darf.

### Einbeziehung von Cisplatin und Carboplatin

Im nächsten Schritt wurden zusätzlich Carboplatin und Cisplatin als „strukturfremde“ Platinkomplexe mit anderen stabilen und austauschbaren Liganden in die Analyse einbezogen. Tab. 6-3 gibt eine Übersicht über die Lipophilie-Parameter und den aus den Aufnahmeversuchen kalkulierten Steigungen und Ordinatenschnittpunkten von Cisplatin und Carboplatin.

Tab. 6-3: Lipophilie von Cisplatin und Carboplatin sowie Steigungen und Ordinatenschnittpunkte der ermittelten Regressionsgeraden in A2780- und A2780cis-Zellen.

Komplex	log P	P	A2780 Steigung	A2780 y-Abschnitt	A2780cis Steigung	A2780cis y-Abschnitt
Cisplatin	-2,53	0,003	0,154	-0,446	0,074	-0,058
Carboplatin	-2,30	0,005	0,037	0,105	0,031	-0,016

Abb. 6-12 zeigt die Beziehung zwischen log P-Werten und den Ordinatenschnittpunkten unter Berücksichtigung aller untersuchten Platinkomplexe.

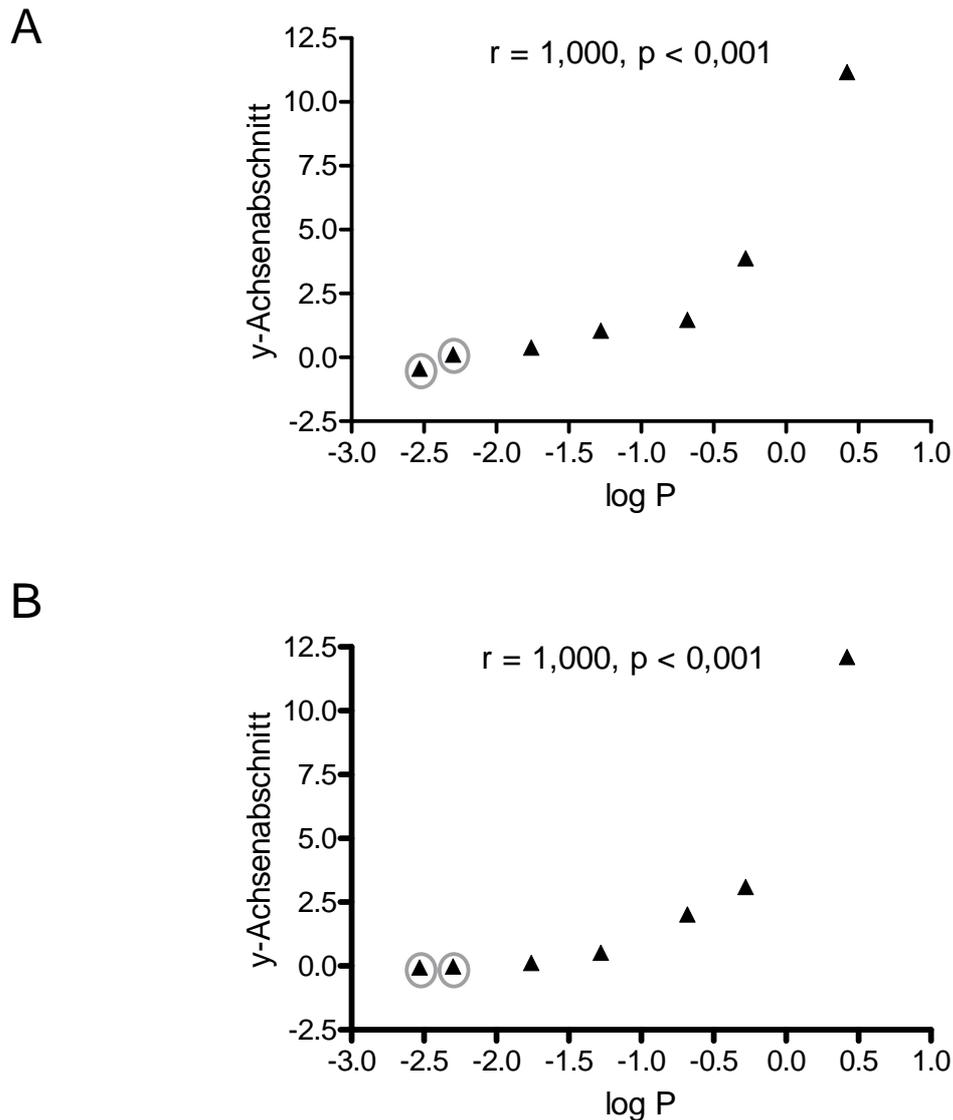


Abb. 6-12: Beziehung zwischen Lipophilie ( $\log P$ ) und früher Aufnahme verschiedener Platinkomplexe in A2780- (**A**) und A2780cis-Zellen (**B**), nach Integration von Cisplatin und Carboplatin (grau gekennzeichnet).

Die gefundene Korrelation blieb sehr hoch, das Signifikanzniveau der Korrelation wurde von signifikant auf höchst signifikant verbessert (A2780  $r = 1.000$ ,  $p < 0,001$ , A2780cis  $r = 1.000$ ,  $p < 0,001$ , Rangkorrelation nach Kendall).

Die Beziehung zwischen den Octanol / Wasser-Koeffizienten ( $P$ ) und den Ordinaten schnittpunkten kann Abb. 6-13 entnommen werden.

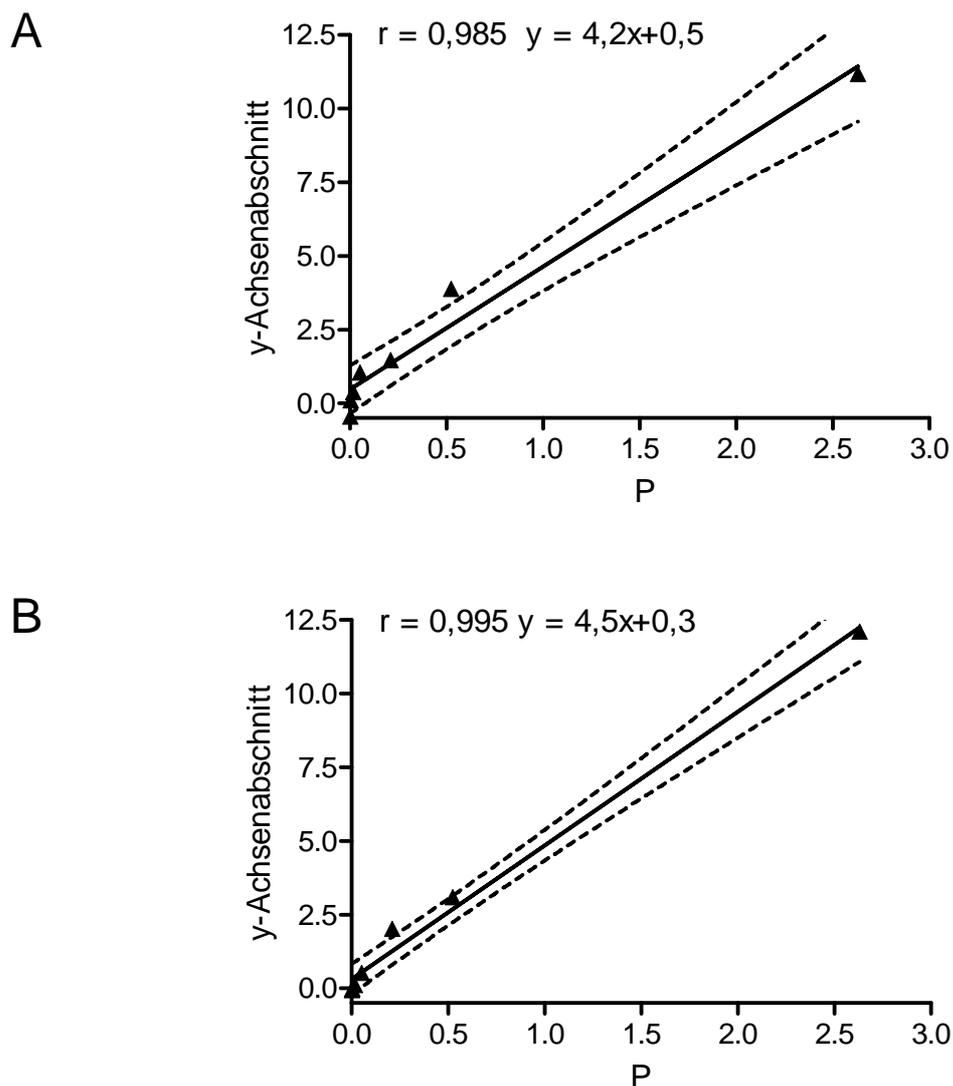


Abb. 6-13: Beziehung zwischen Lipophilie (P) und früher Aufnahme verschiedener Platinkomplexe in A2780- (A) und A2780cis-Zellen (B), mit Korrelationskoeffizienten, Regressionsgleichungen und 95 % Konfidenzintervallen nach Integration von Cisplatin und Carboplatin.

Auch diese sehr hohe Korrelation zwischen den Octanol / Wasser-Koeffizienten (P) und den ermittelten Ordinatenabschnitten blieb erhalten (A2780  $r = 0,985$ ; A2780cis  $r = 0,995$ ; Korrelation nach Pearson).

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die frühe Phase der Aufnahme der Oxaliplatin-Analoga in Tumorzellen von deren lipophilen Eigenschaften abhängig ist. Bemerkenswert ist, dass sich auch die strukturell unterschiedlichen Platinkomplexe Cisplatin und Carboplatin in das Modell integrieren ließen. Der ermittelte mathematischen Zusammenhang zwischen den Octanol / Wasser-Koeffizienten (P)

und den ermittelten Ordinatenabschnitten, insbesondere unter Berücksichtigung der 95 % Konfidenzintervalle der beiden Regressionsgeraden weist darauf hin, dass Gemeinsamkeiten zwischen der resistenten und sensitiven Zelllinie bestehen. Dieser Zusammenhang wurde durch Korrelation der ermittelten Ordinatenabschnitte der Platinkomplexe in den beiden Zelllinien überprüft. Das Ergebnis findet sich in Abb. 6-14.

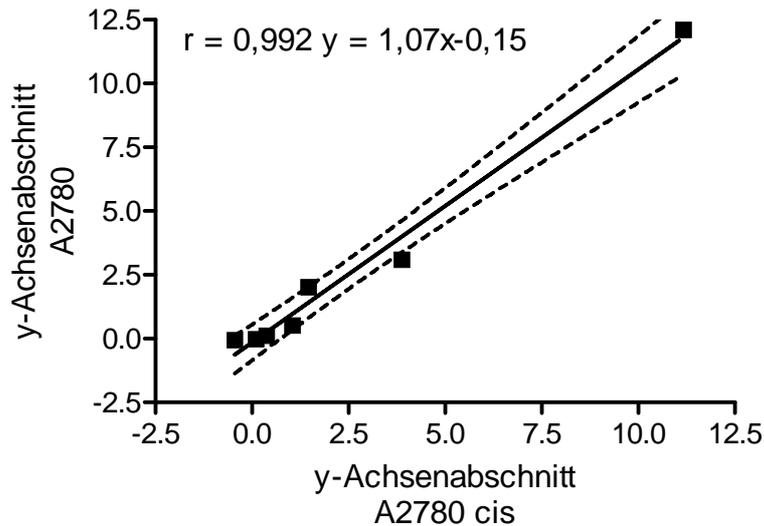


Abb. 6-14: Beziehung zwischen der frühen Aufnahme der Platinkomplexe in A2780- und A2780cis-Zellen, mit Korrelationskoeffizient, Regressionsgleichung und 95 % Konfidenzintervall.

Die gefundene Korrelation zwischen den Ordinatenabschnitten war sehr hoch ( $r = 0,992$  Korrelation nach Pearson). Die Steigung der Regressionsgeraden betrug annähernd 1. Daraus kann gefolgert werden, dass sich die frühe Aufnahme in den untersuchten sensitiven und resistenten Tumorzellen nicht unterscheidet.

#### 6.4.2 Beziehungen zwischen Struktur, Lipophilie und Zytotoxizität

Zur Untersuchung der Beziehung zwischen Struktur und Zytotoxizität der Oxaliplatin-Analoga wurden die an den untersuchten Zelllinien ermittelten  $EC_{50}$ -Werte der Platinkomplexe mit der Lipophilie der Platinkomplexe korreliert (Abb. 6-15). Die Substanzen KP1475 und KP1476 (in Abb. 6-16) sind für die in Kapitel 7.3.3 folgende Diskussion gesondert gekennzeichnet (in grau markiert).

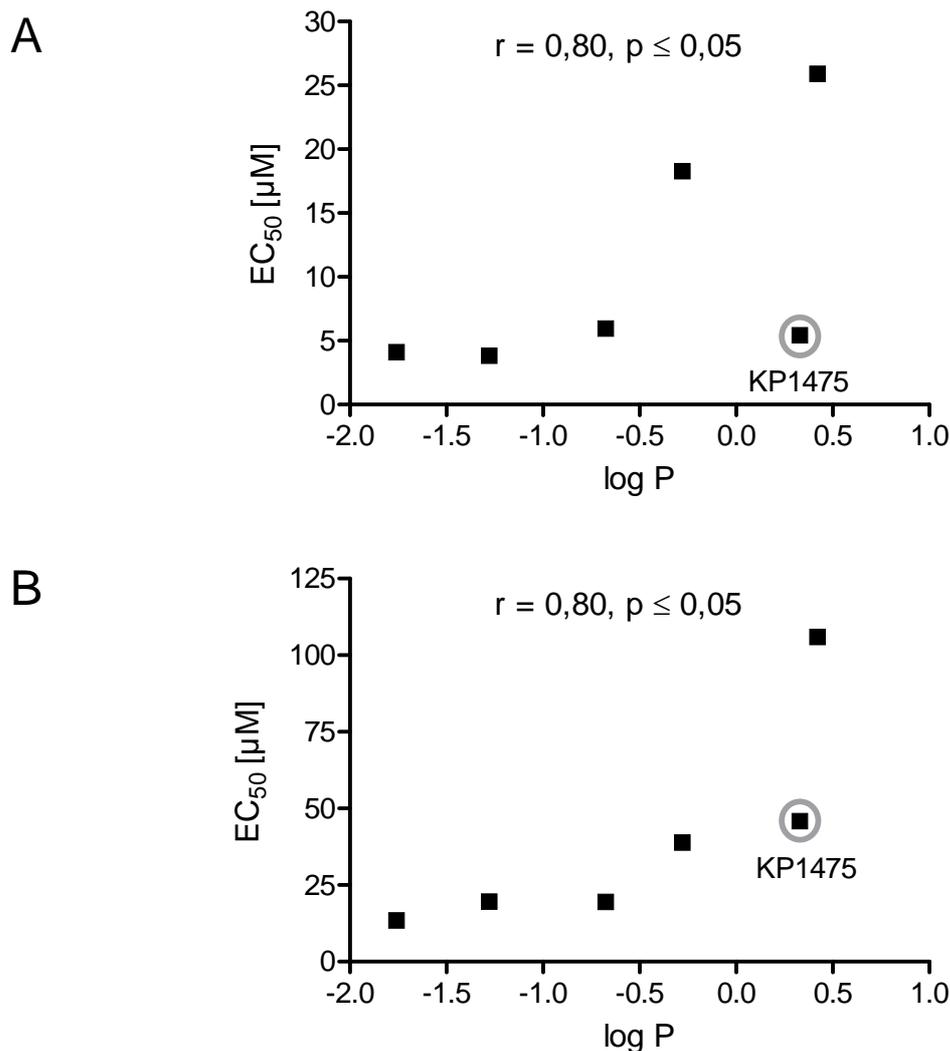


Abb. 6-15: Beziehung zwischen Lipophile der Oxaliplatin-Analoga und der Zytotoxizität in A2780- (A) und A2780cis-Zellen (B).

Der Platinkomplex KP1475 verursachte nach kurzer Zeit eine Ablösung der Zellen und führte zu vielfach höheren Platinkonzentrationen (s. Kap. 6.2.2). Dies deutete auf eine Schädigung der Zellmembran hin. Deshalb wurde die Substanz zur Untersuchung von Struktur-Zytotoxizitätsbeziehungen analoger Platinkomplexe nicht weiter berücksichtigt.

Die gefundene Korrelation zwischen Lipophile und Zytotoxizität (ohne KP1475) ist hoch und statistisch signifikant (A2780  $r = 0,8$ ,  $p = 0,05$ ; A2780cis  $r = 0,8$ ,  $p = 0,05$ ; Rangkorrelation nach Kendall). Das Ergebnis lässt auf einen inversen Zusammenhang zwischen Lipophilie und Zytotoxizität schließen: Je höher die Lipophilie, desto geringer ist die zytotoxische Wirkung der Platinkomplexe.

Galanski et al. und Habala et al., die Struktur-Aktivitätsuntersuchungen mit einem Teil der verwendeten Oxaliplatin-Analoga in verschiedenen Zelllinien durchführten, stellten die Theorie auf, dass große, sterisch voluminöse Substituenten am DACH-Liganden die Zytotoxizität senken<sup>177,205</sup>. Zur Überprüfung dieser These wurde der Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht der Substanzen als einfaches Maß für die Größe der Substituenten und dem ermittelten  $EC_{50}$ -Wert untersucht (s. Abb. 6-16). Eine Korrelation bestand nicht (A2780  $r = -0,74$ ,  $p = 0,862$ ; A2780cis  $r = 0,009$ ,  $p = 0,983$ ; Rangkorrelation nach Kendall).

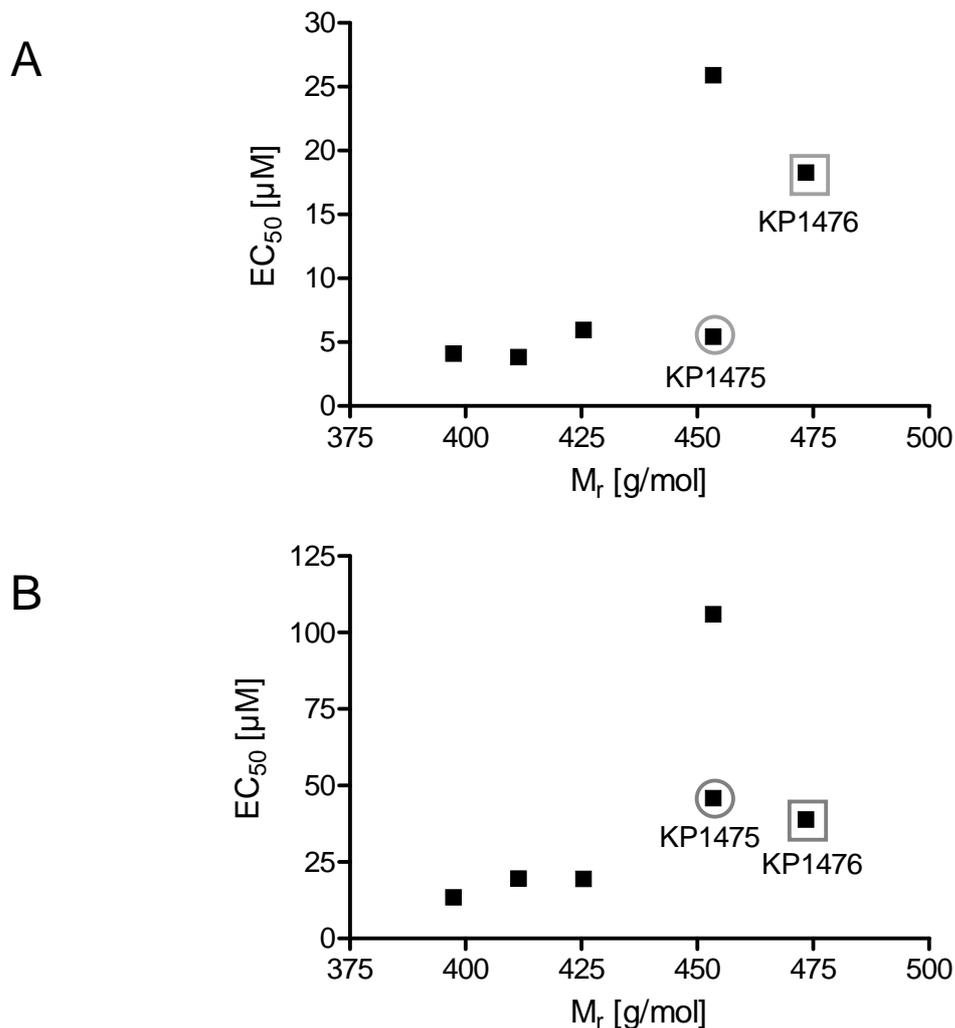


Abb. 6-16: Beziehung zwischen dem Molekulargewicht der Oxaliplatin-Analoga und der Zytotoxizität in A2780- (A) und A2780cis-Zellen (B).

### 6.4.3 Weiterführende Untersuchungen mit der Substanz KP1480

Im Folgenden wurde untersucht, warum der lipophilste Platinkomplex KP1480 eine geringere Zytotoxizität bei höherer gemessener intrazellulärer Platinkonzentration im Vergleich zu Oxaliplatin aufweist (s. Kap. 6.2.2.).

#### **Efflux**

Da in den vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde, dass die frühe Aufnahme der Platinkomplexe mit der Lipophilie korreliert, bestand die Hypothese, dass eine gesteigerte Elimination aus der Zelle (Efflux) – sei es durch passive Diffusion oder den Transport über die Kupfertransporter ATP7A und ATP7B – für die niedrige Zytotoxizität verantwortlich sein könnte. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Zellen 12 Stunden mit 5  $\mu$ M Platinkomplex inkubiert und die intrazelluläre Platinkonzentration gemessen. Parallel dazu wurden Zellen inkubiert, bei denen nach 12 Stunden das Medium gewechselt wurde und eine Auswaschphase von 12 Stunden folgte. Die Platinmenge wurde trotz der langen Versuchsdauer auf die eingesetzte Zellzahl bezogen und nicht, wie es in vielen Publikationen zu lesen ist, die Platinmenge als Platin pro mg Protein dargestellt. Diese Darstellung ist deshalb unzulässig, weil der Zuwachs an Zellen durch die Zellteilung mit einer erhöhten Proteinmenge einhergeht, die kalkulierte Platinmenge pro mg Protein dementsprechend geringer wird und somit einen Efflux vortäuscht. Zusätzlich weisen sensitive und resistente Zellen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten auf.

Abb. 6-17 zeigt, dass für beide Substanzen nach 12 Stunden nur eine geringe Elimination aus der sensitiven wie auch aus der resistenten Tumorzelle feststellbar ist. Unterschiede, welche die geringere Zytotoxizität von KP1480 erklären könnten, wurden nicht gefunden.

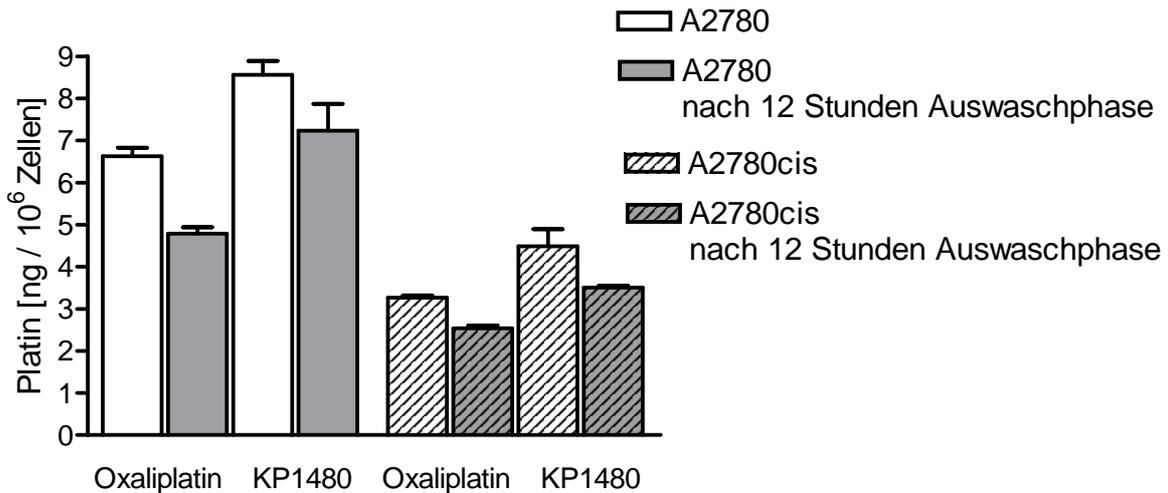


Abb. 6-17: Platinkonzentration in A2780- und A2780cis- Zellen nach 12 Stunden Inkubation mit 5  $\mu$ M Platinkomplex und nach 12 Stunden Auswaschphase ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3$ ).

### DNA-Adduktbildung

Im folgenden Experiment wurde der Frage nachgegangen, ob der lipophile Platinkomplex KP1480 in gleichem Ausmaß wie Oxaliplatin die DNA erreicht. Dazu wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen mit 100  $\mu$ M der Platinkomplexe über 4 Stunden inkubiert, die DNA isoliert und sowohl DNA als auch Platinkonzentration quantifiziert.

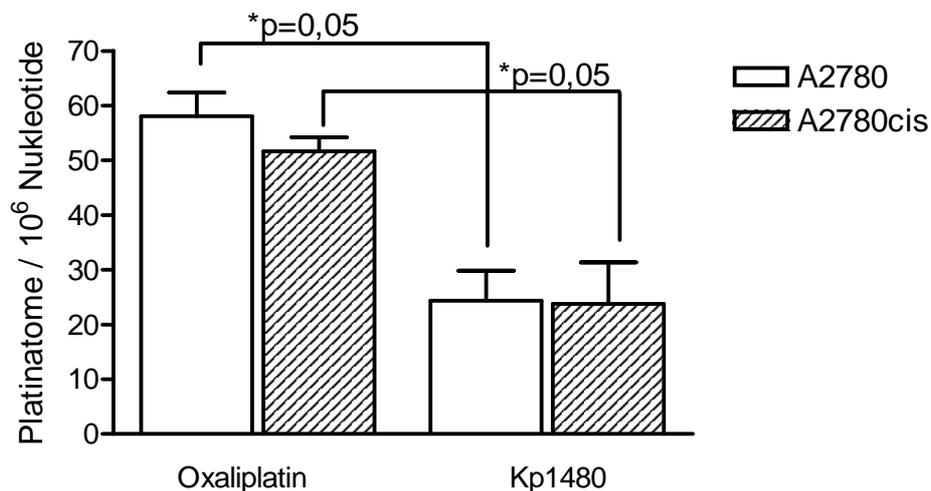


Abb. 6-18: Platinierung der DNA der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 und A2780cis durch Oxaliplatin und KP1480 nach 4 Stunden Inkubation ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=3$ ,  $*p \leq 0,05$ ).

Es zeigte sich, dass KP1480 sowohl in der sensitiven als auch resistenten Zelllinie deutlich weniger Addukte bildet als Oxaliplatin. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (Mann-Whitney). Es sei angemerkt, dass die durch KP1480 verursachte Platinierung der DNA mit der AAS nicht mehr erfasst werden konnte und von Dr. Weber am Institute for Analytical Sciences (ISAS) in Dortmund mit einer validierten Alternativmethode<sup>181</sup> quantifiziert wurde.

### Membranpräparation

Aus den Ergebnissen der Experimente zur DNA-Adduktbildung geht hervor, dass die lipophile Substanz KP1480 trotz verglichen mit Oxaliplatin höherer Aufnahme in die Zelle und ähnlicher Reaktivität gegenüber Nukleotiden (s. Kap.6.1), eine geringere DNA-Platinierung verursacht. Mit der getrennten Erfassung des Platingehaltes der Zellmembran im Vergleich zur Gesamtbelastung der Zelle sollte untersucht werden, ob KP1480 eine höhere Affinität zu Zellmembranen besitzt und deshalb die DNA nicht erreichen kann.

Hierzu wurden  $10^7$  Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  Platinkomplex über zwei Stunden inkubiert, die Membranpräparation durchgeführt und der Platingehalt der Membran und der zytosolischen Fraktion quantifiziert. Zur Darstellung der Ergebnisse in Abb. 6-19 wurde kalkuliert, wieviel Platin in der Membran im Verhältnis zur gesamten bestimmten Platinmenge (Membran und Zytosol) gefunden wurde.

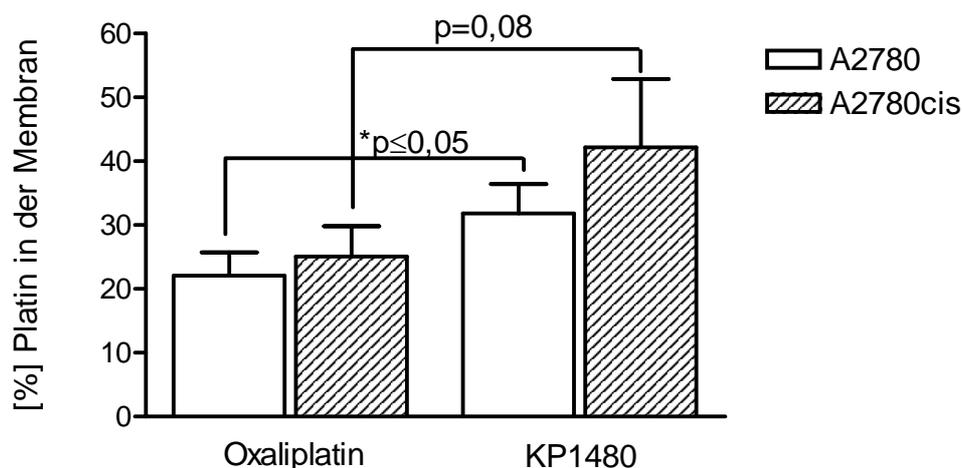


Abb. 6-19: Platinmenge in % in der Membran bezogen auf die gesamte aufgenommene Platinmenge in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 und A2780cis (n=6 \*p ≤ 0,05).

Die lipophile Substanz KP1480 zeigte eine geringfügig höhere Anreicherung in den isolierten Membranen im Vergleich zu Oxaliplatin. Das Ergebnis war für die sensitive Zelllinie signifikant ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney). Für die resistente Zelllinie war die Tendenz einer Membrankumulation ebenfalls zu erkennen, statistische Signifikanz wurde aber nicht erreicht ( $p = 0,08$ , Mann-Whitney).

#### 6.4.4 Einfluss der Lipophilie auf den Resistenzgrad

Häufig findet sich in der Literatur die These, dass durch den Einsatz von Platinkomplexen mit erhöhter Lipophilie Resistenzen überwunden werden können<sup>169,204</sup>. Die eingeschränkte Aufnahme von Cisplatin ist ein wichtiger Resistenzmechanismus der A2780cis-Zellen. Die Aufnahme von Oxaliplatin war in diesen Zellen im Vergleich zu der Aufnahme in sensitive A2780-Zellen ebenfalls hochsignifikant eingeschränkt ( $p \leq 0,01$ , Mann-Whitney, s. Kap. 5.4.2.1). Die verwendeten, gegen Cisplatin resistenten A2780cis-Zellen zeigten eine ausgeprägte Kreuzresistenz zu Oxaliplatin (s. Kap. 5.4.1). Die Untersuchung des Einflusses der Lipophilie auf die Zytotoxizität sollte die Frage einer möglichen Resistenzüberwindung durch eine Erhöhung der intrazellulären Platinkonzentration in Tumorzellen klären.

Abb. 6-20 gibt die Beziehung zwischen Lipophilie und Resistenzfaktor wieder.

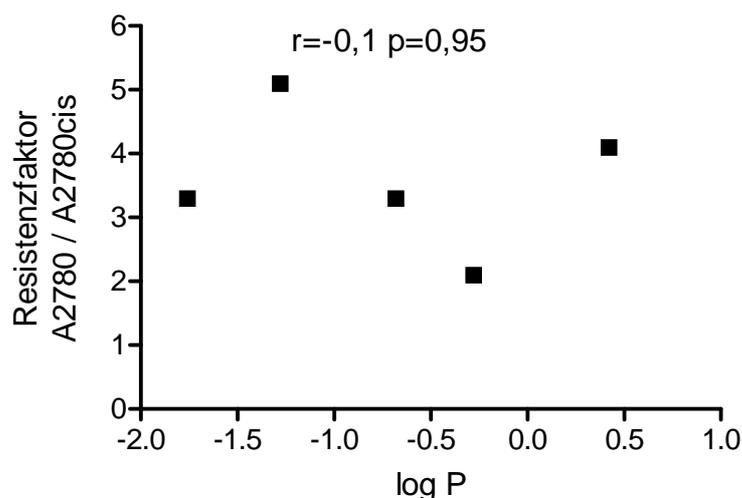


Abb. 6-20: Beziehung zwischen der Lipophilie der Oxaliplatin-Analoga und dem Resistenzgrad.

Ein Zusammenhang konnte nicht gefunden werden ( $r = -0,1$ ,  $p = 0,95$  Rangkorrelation nach Kendall). Die Substanz KP1475 wurde aus den genannten Gründen nicht berücksichtigt.

## 7 Diskussion

Die Diskussion folgt der Gliederung des Ergebnisteils, wobei die Abschnitte Methodenoptimierung und –validierung, Untersuchung makromolekularer Platinkomplexe und Untersuchung der Oxaliplatin-Analoga separat abgehandelt werden.

### 7.1 Methodenoptimierung und –validierung

#### 7.1.1 CE-Methoden

##### **CE-Methode zur Untersuchung der Platin-Nukleotid-Adduktbildung**

Die CE-Methode von U. Warnke ist eine nach internationalen Kriterien der FDA<sup>179</sup> validierte Methode zur In-vitro-Untersuchung der Adduktbildung von Platinkomplexen mit Nukleotiden. Allerdings eignet sich diese Methode nur in begrenztem Umfang für die Untersuchung strukturell sehr unterschiedlicher Platinkomplexe. So ist beispielsweise die Trennung des bifunktionalen dGMP-Addukts von dAMP unzureichend und das Detektionsfenster (Zeitfenster) für entstehende Addukte von Nukleotiden mit strukturell unterschiedlichen Platinkomplexen zu schmal. Zusätzlich komigriert ein Abbauprodukt der albuminbindenden Platinkomplexe mit möglichen monofunktionalen Addukten. Ein weiteres Problem besteht in der geringen Stabilität der Nukleotide im Autosampler. Kritisch muss zusätzlich gesehen werden, dass die Reaktion der Platinkomplexe im Autosampler mit anwesenden Nukleotiden während des Analysenzeitraumes nicht untersucht wurde.

Bei dem Abbauprodukt der albuminbindenden Platinkomplexe handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine ringoffene Form des Maleinimids. Die basisch katalysierte Spaltung von Maleinimiden (Hydrolyse) wurde von Khan et al. beschrieben und verläuft über verschiedene Zwischenstufen zur Maleaminsäure (4-Amino-4-oxo-but-2-en-carbonsäure) (s. Abb. 7-1)<sup>197</sup>.

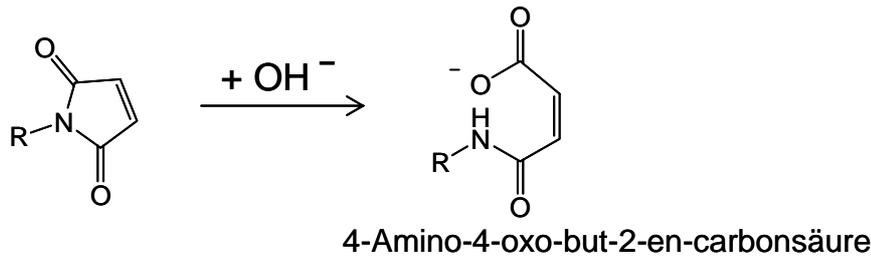


Abb. 7-1: pH-abhängige Hydrolyse eines N-Alkylmaleinimids.

Zur Minimierung der basisch katalysierten Hydrolyse hätte ein neutraler oder saurer Trennpuffer verwendet werden müssen. Unter diesen Bedingungen ist die Trennung der Nukleotide und Platin-Addukte aufgrund geringerer Unterschiede im Masse/Ladungsverhältnis allerdings deutlich schwieriger<sup>32</sup>. Durch die dadurch zu erwartende drastische Verschiebung der Migrationszeiten der Nukleotide und der Platin-Nukleotid-Addukte wäre ein Bezug auf die Elektropherogramme von Warneke nicht möglich und eine aufwändige Identifizierung z.B. durch MS-Kopplung notwendig geworden. Deshalb wurde eine Optimierung der Trennung bevorzugt.

Eine ausreichende Trennung gelang mittels eines höher konzentrierten Boratpuffers, dessen pH-Wert 9,1 betrug, durch Ausnutzung des *stacking-effekts* und pH-bedingter Migrationszeitverschiebungen (s. Kap. 3.2.1). Dem Nachteil der relativ hohen Elektrolytkonzentration, welche durch stärkere Joule'sche Erwärmung über eine Ausdehnung der Flüssigkeit in der Kapillare zu einer schlechteren Injektionspräzision durch Verlust von Probe am Kapillareinlass führen könnte, wurde durch den Einsatz eines internen Standards vorgebeugt. Hiermit wurde zugleich die Stabilität der Proben im Autosampler verbessert. Die Ursache der geringen Stabilität beruhte auf Verdunstung der kleinen verwendeten Probenvolumina, was nach einigen Stunden zu erhöhten Konzentrationen führte. Es handelte sich also nicht um ein Stabilitätsproblem der Substanzen, sondern um einen physikalischen Effekt der den internen Standard im gleichen Maße betrifft. Nach Überprüfung des Ausmaßes der Adduktbildung von Oxaliplatin mit Nukleotiden während der Lagerdauer im Autosampler wurde anhand der Ergebnisse – nach 6 Stunden konnte keine relevante Reaktion festgestellt werden – festgelegt, dass bei einer Analysenzeit von 30 Minuten 12 Proben mit Oxaliplatin-Analoga oder Carboplatin (aufgrund der geringeren Aktivität) nacheinander vermessen werden können. Allerdings ist es

notwendig, diese Überprüfung für andere Reaktionsbedingungen, wie z.B. veränderte Elektrolytkonzentrationen oder in Anwesenheit von schwefelhaltigen Aminosäuren zu wiederholen, da sich hier die Reaktivität und auch das Verhältnis der Reaktivität der Platinkomplexe untereinander deutlich verändern kann<sup>24,206</sup>.

Die gute Within- bzw. Between-day-Präzision der Methode (s. Kap. 4.1.2) ist auf die hohe Stabilität der Nukleotide und auf den internen Standard zurückzuführen, der neben dem Verdunstungsfehler auch Unregelmäßigkeiten der hydrodynamischen Injektion kompensiert. Dass die Within-day-Präzision etwas besser ist als die Wiederholpräzision liegt an einem Wechsel der Kapillare, der während des Validierungsprozesses notwendig wurde. Unterschiede an den Kapillarenden, die durch das Schneiden der Kapillare entstehen, können minimale Schwankungen der Injektionspräzision zur Folge haben<sup>207</sup>.

Der Nachteil der optimierten Methode ist eine niedrige Empfindlichkeit mit einem LLOQ von 5  $\mu\text{M}$  für die Nukleotide dAMP und dGMP. Dies ist durch den geringen Kapillarinne Durchmesser (ID 75  $\mu\text{m}$ ) begründet, der die Schichtdicke der Detektionszelle festlegt. Für eine Bestimmung der In-vitro-Adduktbildung von Platin-komplexen mit Nukleotiden ist die Empfindlichkeit allerdings ausreichend, da die Reaktionsbedingungen an die Empfindlichkeit angepasst werden können. Jedoch ist die Methode nicht für eine Bestimmung der Addukte unterschiedlicher Platinkomplexe – vor allem von solchen mit geringerer Reaktivität als Cisplatin – mit Nukleotiden zellulärer DNA aus Zellkulturversuchen oder In-vivo-Experimenten (nach enzymatischer Verdau) geeignet. Solche Untersuchungen setzen andere instrumentelle Methoden oder Detektionsverfahren voraus, die eine höhere Empfindlichkeit ermöglichen. Lösungsmöglichkeiten, die zum Erfolg führen könnten, sind der Einsatz von Immunoassays, LIF-Detektoren zur Messung der Laserinduzierten Fluoreszenz oder HPLC-Methoden. Die sehr empfindlichen Immunoassays haben den Nachteil, dass eine Differenzierung zwischen verschiedenen Addukten nur begrenzt möglich ist. Ein Vergleich zwischen Platinkomplexen mit unterschiedlichen Neutralliganden erfordert jeweils adduktspezifische Antikörper. Außerdem kann ein *shielding* der Addukte durch gebundene HMG-Proteine in Zellkulturexperimenten und *in vivo* dazu führen, dass die Adduktbildung deutlich unterschätzt wird<sup>208</sup>.

Geeigneter ist die Verwendung von LIF-Detektoren, was aber eine Derivatisierung mit einem geeigneten fluoreszierenden Agens erfordert. Die meisten in der Literatur beschriebenen Verfahren der Fluoreszenzmarkierung freier Nucleotide, die sich prinzipiell auch für den Nachweis von Platinaddukten eignen, beruhen auf einer Derivatisierung der Phosphatgruppe am 5'-Ende des Riboserestes durch ein Amin unter Ausbildung eines Phosphoramidats. Ein interessanter Ansatz für die Kapillarelektrophorese ist in der Dissertation von Wörth beschrieben<sup>209</sup>. Nucleotide lassen sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bodipy-EDA unter Carbodiimid (EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid) – Katalyse im wässrigen Milieu zu einem fluoreszierenden Phosphoramidat umsetzen (Abb. 7-2).

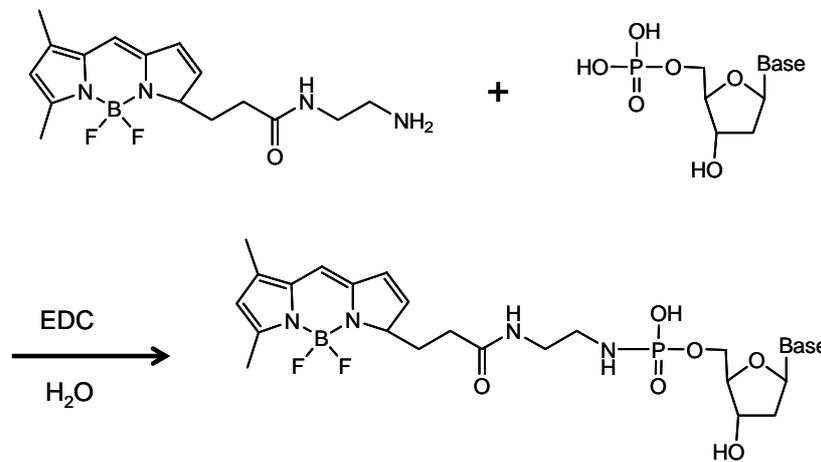


Abb. 7-2: Fluoreszenzderivatisierung von Nucleotiden nach Wörth<sup>209</sup>.

Mit dieser Methode wurden Nucleotide in pikomolarer Konzentration erfasst [LLOQ 6 pM]. Allerdings ist diese Methode bislang noch für nicht zur quantitativen Analyse genomischer DNA und der Trennung von Platin-DNA-Addukten optimiert und validiert worden.

Mittels der HPLC kann die Detektionsgrenze für freie Nucleotide in den subpikomolaren Bereich gesenkt werden<sup>210</sup>, wobei die Trennung von Addukten, die sich hinsichtlich ihrer Lipophilie nur unwesentlich unterscheiden, äußerst diffizil ist<sup>211,40</sup>. Für solche Verbindungen die ein unterschiedliches Masse/Ladungsverhältnis aufweisen, ist die Kapillarelektrophorese prinzipiell besser geeignet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine einfache kapillarelektrophoretische Methode zur Untersuchung der Platin-Nucleotid-Adduktbildung

unterschiedlicher Platinkomplexe optimiert und nach international anerkannten Kriterien validiert wurde. Für Experimente, die in der Durchführung der relativ niedrigen Empfindlichkeit angepasst werden können, ist sie aufgrund der hohen Trennleistung, der direkten Probenvermessung ohne vorgeschaltete Derivatisierung oder Probenaufarbeitung, relativ kurzen Analysenzeiten und sehr niedrigen Kosten gut geeignet und den meisten anderen Verfahren überlegen (Tab. 7-1).

Tab. 7-1: Vergleich verschiedener Methoden zur Trennung von Platin-Nukleotid-Addukten.

Referenz	Untersuchte Platinkomplexe	Methode	Bemerkung
Fichtinger-Schepman et al. 1985 <sup>212</sup>	Cisplatin	Austauschchromatographie H-NMR AAS	Trennung über verschiedene Säulen Großer Substanzbedarf Analysenzeit mehrere Stunden
Hongo et al. 1994 <sup>211</sup>	Cisplatin Carboplatin	RP-HPLC-Gradient	Trennung mono- und bifunktionaler dGMP-Addukte Keine Erfassung von dAMP-Addukten Analysenzeit 1 Stunde
Saris et al. 1996 <sup>40</sup>	Cisplatin Oxaliplatin Lobaplatin	Kationenaustauscher RP-HPLC-Gradient in Kombination mit AAS oder <sup>32</sup> P-Postlabeling	Hohe Empfindlichkeit Nur bifunktionale Addukte Analysenzeit mehrere Stunden Radioaktives Material
Sharma et al. 1995 <sup>213</sup>	Cisplatin	CZE/LIF	Hohe Empfindlichkeit Nur bifunktionale Addukte und Nukleotide Derivatisierung notwendig
Warnke et al. 2001 <sup>32</sup> und eigene Arbeit	Cisplatin Carboplatin Oxaliplatin Lobaplatin	CZE CZE/ESI-MS	Trennung aller bekannten Addukte und Nukleotide in einem Lauf Analysenzeit 30 Minuten Niedrige Empfindlichkeit

### **CE-Methode zur Untersuchung der Albuminbindung und Stabilität der albuminbindenden Platinkomplexe**

Zur Überprüfung der Albuminbindung und der Stabilität albuminbindender Platin-komplexe PL04 und PL07 wurde eine Methode entwickelt, die eine Analyse bei physiologischem pH-Wert (pH 7,4) ermöglicht. Die Einstellung des pH-Werts auf pH 7,4 ist aufgrund der pH-abhängigen Bindung der Maleinimidstruktur der Platin-komplexe an die freie Sulfhydrylgruppe im Albumin und der basisch katalysierten Ringöffnung des Maleinimids unbedingt notwendig. Auf eine aufwendige Validierung wurde verzichtet, da diese Methode nicht für umfangreiche quantitative Untersuchungen entwickelt werden sollte. Die Validierung begrenzte sich auf die Untersuchung der Linearität. Deshalb können mit dieser Methode nur relative Aussagen gemacht werden. Zur Qualitätskontrolle wurde grundsätzlich gegen eine frisch aufgetaute Lösung von PL04 oder PL07 als Referenz gemessen. Der große Vorteil der Methode liegt in der kurzen Analysenzeit von 15 Minuten, der Verwendung wässriger Trennpuffer und somit sehr niedriger Kosten. Kratz et al. verwendeten zur Überprüfung der Albuminbindung vergleichbarer Doxorubicin- und Camptothecin-Derivate eine HPLC-Methode mit einem binären Gradienten aus Phosphatpuffer pH 7,4 und Acetonitril. Die Analysenzeit betrug ca. 60 Minuten<sup>173,175</sup>. Kritisch anzumerken ist, dass mit beiden Methoden die Bindungsstelle der Platin-komplexe am Albumin nicht eindeutig charakterisiert werden kann. Die Ergebnisse zur Albuminbindung und zur Stabilität der Platinkomplexe werden ausführlicher in Kap. 7.2.1 diskutiert.

#### **7.1.2 Proteinbestimmung und Fluoreszenzassay**

Die BCA-Methode zur Proteinbestimmung und der entwickelte FITC-Fluoreszenzassay zur Optimierung der Aufnahmeexperimente makromolekularer Substanzen wurden teilvalidiert. Die Gründe für die Validierung dieser bioanalytischen Methoden seien im Folgenden kurz angeführt. Für Albumin-FITC wird vom Hersteller ein möglicher Licht- und pH-abhängiger Fluoreszenzverlust in Lösung beschrieben, ohne dass Stabilitätsdaten angegeben sind<sup>202</sup>. Zur Anwendung des BCA-Kits zur Proteinbestimmung werden die Aufnahme einer Kalibriergeraden und die Auswertung mittels einer quadratischen Regression empfohlen, allerdings

fanden sich keine Daten zur Validierung oder Hinweise auf den Einsatz von separat hergestellten und gelagerten Qualitätskontrollproben. Systematische Fehler (Verdünnungsfehler der Kalibratoren und andere Fehlerquellen) lassen sich anhand der Qualitätskontrollproben aufdecken. Durch den Einsatz der Kontrollen ist es zudem möglich, eine Zersetzung der Stammlösung, aus dem die Kalibratoren hergestellt werden, frühzeitig zu entdecken. Die Ermittlung von Präzision und Richtigkeit ermöglicht erst eine Bewertung und Einschätzung der erzielten Ergebnisse und eine quantitative Aussage. Relativmessungen in Bezug zu einer Kontrolle können nur sehr bedingt für quantitative Aussagen verwendet werden, da hier von Voraussetzungen ausgegangen wird – wie Linearität und Varianzenhomogenität – die oft nicht, oder nur in einem sehr begrenzten Konzentrationsbereich gültig sind.

### **7.1.3 Abschließende Bemerkung zur Validierung analytischer Methoden**

Auf eine Validierung analytischer Methoden, die zur Quantifizierung von Analyten im Rahmen experimenteller Versuche eingesetzt werden, wird häufig verzichtet. Dies ist ein Faktor, der – neben anderen, wie z.B. einer unzureichenden Statistik – mit dafür verantwortlich ist, dass ein Großteil der publizierten Ergebnisse nicht reproduzierbar ist<sup>214,215</sup>. Deshalb ist es unbedingt notwendig, alle verwendeten analytischen Methoden einer kritischen Überprüfung zu unterziehen. Hierbei sollte genau abgewogen werden, ob der Aufwand einer Validierung angemessen ist, oder welche Maßnahmen, z.B. in Form einer Teilvalidierung, zur Qualitätssicherung getroffen werden müssen.

## **7.2 Makromolekulare Platinkomplexe**

### **7.2.1 Bindung an Albumin**

Der erste entscheidende Schritt im Konzept der Ausnutzung von Albumin als Träger für Platinkomplexe basiert auf einer raschen und selektiven Bindung der albuminbindenden Platinkomplexe über die Maleinimidstruktur an die Sulfhydrylgruppe des Cysteins in Position 34 von Albumin (s. Kap. 1.5.1). Diese Bindungsfähigkeit wurde *in vitro* mittels der eigens entwickelten kapillarelektrophoretischen Methode für die

Platinkomplexe PL04 und PL07 untersucht. Bereits nach 15 Minuten lagen beide Substanzen zu mehr als 90 % an Albumin gebunden vor, nach 30 Minuten konnte kein ungebundener Platinkomplex mehr detektiert werden. Das Inhibitionsexperiment mit EMC-blockiertem Albumin zeigte, dass die Bindung an Albumin innerhalb der ersten Minuten im Wesentlichen auf die Maleinimidgruppe zurückzuführen ist und nicht unspezifisch, z.B. über eine kovalente Bindung durch Ligandenaustausch, verläuft. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Kratz und Warnecke mit albuminbindenden Doxorubicin- und Camptothecin-Derivaten erzielt<sup>173,175</sup>. Auch hier erfolgte eine nahezu quantitative Bindung, die nach Blockade des Albumins mit EMC nicht auftrat. Ein zusätzlicher Hinweis auf die spezifische Bindung an das Cystein<sup>34</sup> wurde in diesen Arbeiten durch HPLC-MS-Kopplung gewonnen. Humanes Serumalbumin besteht *in vivo* aus einer Mischung aus 70 % Mercaptalbumin und 30 % Nicht-Mercaptalbumin, in dem das Cystein in Position 34 oxidiert vorliegt<sup>216,217,218</sup>. Durch die HPLC-MS-Kopplung konnten die Autoren zeigen, dass die Bindung nur an das Mercaptalbumin erfolgt. Obwohl in dieser wie auch in den Arbeiten von Kratz und Warnecke kein direkter Nachweis der Bindung an die spezifische Position des Cysteins<sup>34</sup> erbracht wurde, kann aus der zusammenfassenden Betrachtung der Ergebnisse auf diese Bindung geschlossen werden.

Die Stabilitätsuntersuchungen von PL04 und PL07 unter den Bedingungen der Bindung an Albumin ergaben einen Abbau der Substanzen in der angestrebten Kopplungszeit von 30 Minuten. Zeitgleich wurde ein Abbauprodukt beobachtet. Da die basisch katalysierte Hydrolyse der Maleinimidstruktur zur Maleaminsäure gut beschrieben ist, wurde auf eine weitere Identifizierung verzichtet. Allerdings ist die Maleaminsäure nicht mehr zur Kopplung an Cystein fähig<sup>198,219</sup>, weshalb die Hydrolysereaktion als Konkurrenzreaktion zur Bindung an Albumin aufzufassen ist. In Anwesenheit von Albumin konnte innerhalb der Bindungszeit kein Hydrolyseprodukt detektiert werden. Dieses Ergebnis ist plausibel, da die Hydrolyse zur Maleaminsäure mehrere reversible Schritte beinhaltet<sup>198,219</sup> und die Reaktion mit der nukleophilen Sulfhydrylfunktion sehr schnell verläuft, wodurch die Hydrolyse in Anwesenheit von Albumin in den Hintergrund tritt. Allerdings wurde aus der möglichen Hydrolyse die Notwendigkeit ersichtlich, die Stammlösungen der albuminbindenden Platinkomplexe mit besonderer Vorsicht zu behandeln und nur in einem durch

geeignete Stabilitätsuntersuchungen gesicherten Rahmen zu verwenden. Eine alternative Möglichkeit hätte in einer Stabilisierung der Stammlösungen durch saure Puffer bestanden, aber in Anbetracht vieler pH- und elektrolytabhängiger Experimente wurde eine Absicherung über Stabilitätsuntersuchungen bevorzugt.

Für die Umsetzung der Platinkomplexe mit Albumin musste ein 6-facher Überschuss an Albumin verwendet werden, um eine vollständige Bindung zu erreichen. Die Ursache für diesen Überschuss ist in der Zusammensetzung von handelsüblichem Serumalbumin begründet. Handelsübliches humanes Serumalbumin besitzt einen geringeren Anteil an Mercaptalbumin als natives Albumin *in vivo*. Für das verwendete humane Serumalbumin wurde ein Verhältnis von 21 % Mercaptalbumin zu 79 % Nicht-Mercaptalbumin durch die Arbeitsgruppe Kratz bestimmt. Zur Gewährleistung der vollständigen Bindung an Albumin und zur Vermeidung der Ergebnisverfälschung durch ungebundene Platinkomplexe wurde entschieden, in allen Experimenten mit einem 6-fachen Überschuss an Albumin zu arbeiten. Die Verwendung des Überschusses an Albumin für die In-vitro-Experimente kann als Kritikpunkt gesehen werden und wird in den folgenden Kapiteln des Öfteren aufgegriffen.

## 7.2.2 Platin-Nukleotid-Adduktbildung

Die Art der Adduktbildung mit Nukleotiden der DNA und die Reaktivität der Platin-Komplexe haben entscheidenden Einfluss auf die Zytotoxizität der Platinkomplexe und die Wirksamkeit *in vivo* (vgl. Kapitel 1.3.2 und 1.3.3).

Mit Hilfe der optimierten kapillarelektrophoretischen Methode von U. Warnke wurden beide Eigenschaften für die albuminbindenden Platinkomplexe untersucht. Das Ergebnis, dass PL04 mit den Nukleotiden dAMP und dGMP dieselben Addukte bildete wie Oxaliplatin und PL07 wie Cisplatin, konnte aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten erwartet werden. PL04 und Oxaliplatin besitzen den DACH-Liganden, PL07, Cisplatin und Carboplatin die beiden Ammin-Liganden als stabile Neutralliganden (Abb. 7-3). Da Nebenprodukte in Form unbekannter Peaks mit Ausnahme eines Abbauprodukts der Platinkomplexe (Maleaminsäure, s. Kap. 7.2.1), welches auch bei separater Injektion der Platinkomplexe nachweisbar war, nicht detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass die Maleinimidfunktion, welche potentiell auch an nukleophile Stickstoffverbindungen zu binden vermag, nicht mit den nukleophilen Zentren der Nukleotide reagiert.

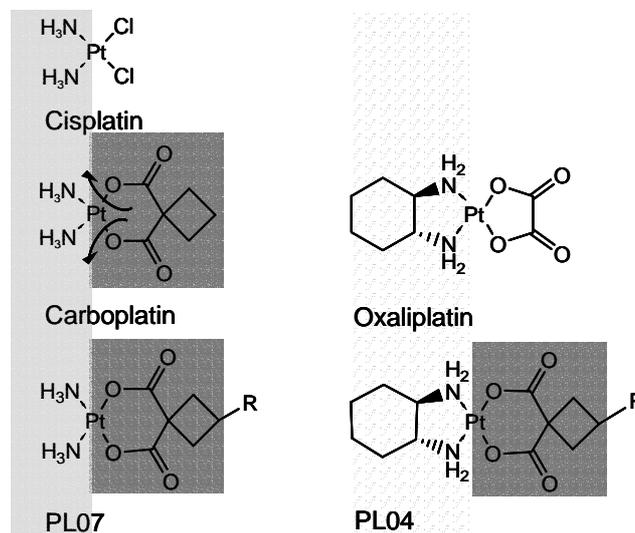


Abb. 7-3: Strukturverwandtschaften der untersuchten Platinkomplexe (hell- und mittelgrau = Neutralliganden, dunkelgrau = austauschbare Liganden).

Allerdings wurden für die albuminbindenden Platinkomplexe PL04 und PL07 keine monofunktionalen Addukte detektiert. Dieses Adduktmuster ist auf den austauschbaren Cyclobutandicarboxylat-Liganden (CBDCA) zurückzuführen. Eine vergleichbare Adduktbildung wurde auch in der Literatur durch Küng et al. und Warnke et al. beschrieben und durch eigene Untersuchungen mit Carboplatin bestätigt. Als Ursache wird eine direkte Reaktion von Carboplatin mit Nukleotiden ohne vorherige Hydrolyse diskutiert<sup>32,34,219</sup>. Ein weiterer Erklärungsansatz lässt sich aus der chemischen Besonderheit des CBDCA-Liganden formulieren. Die Ringöffnung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Substitutionsreaktion. Für Carboplatin wurde eine schnelle Rückbildung des Chelatringes beobachtet und eine sterische Behinderung nukleophiler Substitutionsreaktionen<sup>28,29</sup>. Möglicherweise ist erst dann eine Reaktion möglich, wenn der Chelatligand vollständig entfernt wurde.

Die Resultate der Experimente zur Reaktivität der Platinkomplexe gegenüber den Nukleotiden dAMP und dGMP ergaben eine fallende Reaktivität in der Reihenfolge Cisplatin>Oxaliplatin>PL04>PL07>Carboplatin. Die gefundenen Reaktivitätsunterschiede zwischen den etablierten Platinkomplexen sind literaturkonform und chemisch plausibel. Die austauschbaren Liganden von Oxaliplatin und Carboplatin sind entropiestabilisierte Chelatliganden und damit schlechtere Abgangsgruppen<sup>11</sup>. Der Malonsäure-Chelatring von Carboplatin behindert zusätzlich durch seine sterische Konformation – der Cyclobutanring ist über der Platinebene lokalisiert – den Angriff von Nukleophilen. Schwieriger zu interpretieren sind die Unterschiede zwischen PL04 und PL07. Diese beiden Platinkomplexe unterscheiden sich nur in ihren stabilen Liganden. PL04 besitzt den DACH-Liganden, PL07 zwei Amminliganden. Die höhere Reaktivität von PL04 im Vergleich zu PL07 muss also auf den DACH-Liganden beruhen und ist möglicherweise auf einen höheren trans-Effekt (vgl. Kap. 1.2) durch den positiv induktiven (+I) Einfluss des Kohlenstoffrings zurückzuführen.

### 7.2.3 Bioaktivierung

In einem nächsten Schritt sollte die Freisetzung einer reaktiven niedermolekularen Platinspezies aus dem makromolekularen Prodrug als Mechanismus der Aktivierung

der an Albumin gebundenen Platinkomplexe überprüft werden. Hierzu wurden die Platinkomplexe PL04 und PL07 an Albumin gebunden und über 96 Stunden mit den Nukleotiden dAMP und dGMP inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte eine Fällung des Albumins und eine kapillarelektrophoretische Untersuchung des Überstandes auf Nukleotide und Platin-Nukleotid-Addukte. Platin-Nukleotid-Addukte ließen sich zu keinem Zeitpunkt nachweisen. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch schon von U. Warnke gemacht, der albuminbindende Platinkomplexe mit säurelabiler Hydrazonsollbruchstelle und Ethylendiamindichloroplatin(II) als reaktive Teilstruktur untersuchte (Abb. 7-4)<sup>220</sup>.

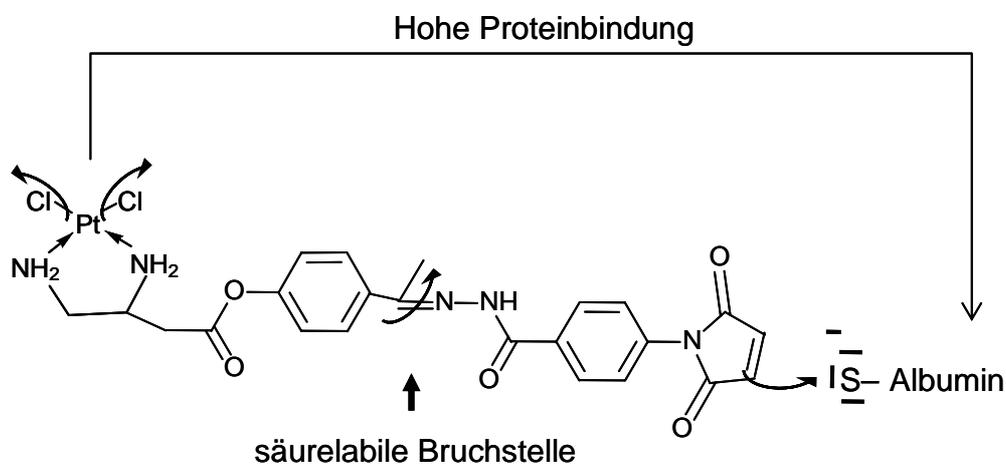


Abb. 7-4: Säurelabiles Prodrug mit Hydrazonstruktur.

Mit dieser Substanz konnte nur eine äußerst geringe Wechselwirkung mit Nukleotiden nach der Kopplung an Albumin beobachtet werden. Als eine mögliche Ursache wird die Bindung der freigesetzten Ethylendiamindichloroplatin(II)-Teilstruktur an Albumin diskutiert. Der vergleichbare niedermolekulare Platinkomplex bindet schnell an Albumin. Nach separater Inkubation dieses Platinkomplexes mit dem Nukleotid dGMP in Anwesenheit von Albumin blieb die Nukleotid-Adduktbildung aus.

Bei der Entwicklung der neuen albuminbindenden Platinkomplexe PL04 und PL07 wurden diese Erkenntnisse allerdings bereits berücksichtigt und versucht, die Problematik einer irreversiblen Albuminbindung durch Verwendung des Cyclobutandicarboxylat-Liganden (CBDCA) und veränderter Positionierung des albumin-

bindenden Molekülteils – anstelle des Neutralliganden wurde der austauschbare Ligand substituiert – zu lösen.

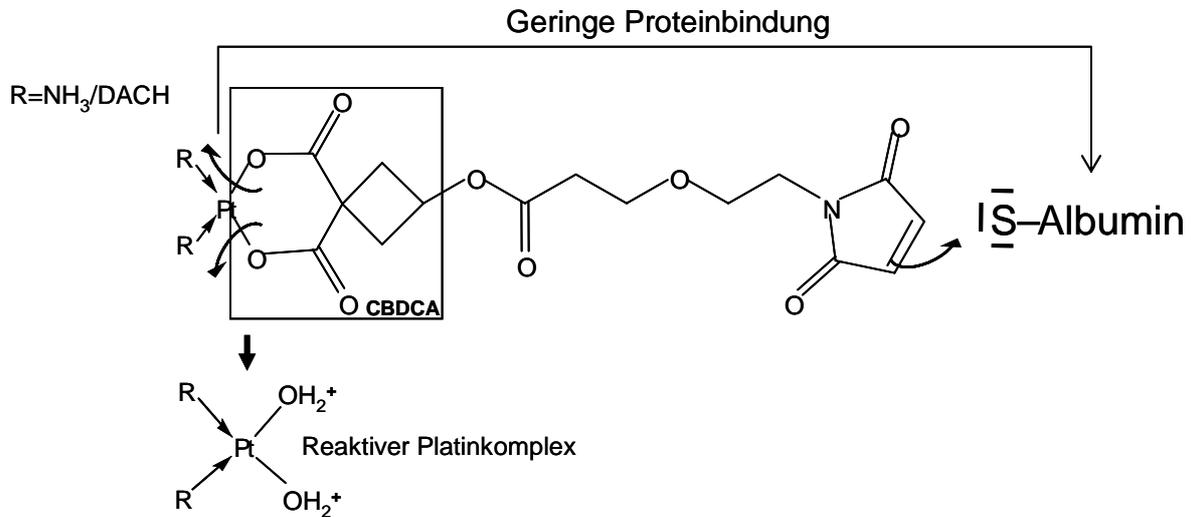


Abb. 7-5: Grundstruktur der albuminbindenden Platinkomplexe.

Carboplatin als verwandter Platinkomplex besitzt aufgrund des weniger reaktiven CBDCA-Liganden eine sehr geringe Proteinbindung<sup>221,222</sup>. Durch Synthese der albuminbindenden Teilstruktur an diesen austauschbaren Liganden sollte eine Reaktion durch den direkten Kontakt von reaktivem Platinkomplex – erst nach der Hydrolyse des CBDCA-Liganden entsteht ein reaktiver Komplex – und Albumin verhindert werden (Abb. 7-5).

Eine starke, unspezifische Bindung an Albumin als Erklärung für die fehlende Nachweisbarkeit der Platin-Nukleotid-Addukte wurde deshalb vorerst als unwahrscheinlich angenommen. Als mögliche Ursache konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der direkte Kontakt zwischen Nukleotiden, entstehenden Platin-Nukleotid-Addukten und der großen Menge an Albumin für die fehlende Nachweisbarkeit der Addukte nach Fällung des Albumins verantwortlich war. Albumin ist Transporter und Bindungspartner vieler verschiedener Substanzen im humanen Blut und besitzt unterschiedlichste Bindungsstellen. Eine Bindung der Nukleotide an Albumin könnte diese räumlich abschirmen und vor der Reaktion mit den Platinkomplexen schützen. Auch wäre durch Bindung der Platin-Nukleotid-Addukte eine gemeinsame Fällung mit Albumin denkbar. Demzufolge musste ein System gefunden werden, das eine Trennung von Albumin und der entsprechenden Zielstruktur gewährleistete. Nur so konnte die Überprüfung der Hypothese einer (extrazellulären) Aktivierung erfolgen.

Durch die Verwendung einer Mikrodialysekammer wurde diese Problematik gelöst. Eine Mikrodialysekammer besteht aus zwei Kammern, die durch eine semipermeable Membran getrennt werden. Durch den Einsatz von Kalbsthymus-DNA anstelle der freien Nukleotide wurde die Trennung von Zielstruktur und makromolekularem Platin-komplex erreicht. Die Mikrodialysekammer kann auch als Zweikompartiment-System aufgefasst werden, das eine stark vereinfachte Simulation der Bedingungen im Tumorgewebe ermöglicht. Die eine Seite der Kammer stellt dabei den Intrazellulär-raum, die andere den Extrazellulärraum dar. Durch Einfüllen von DNA in die eine und Platinkomplex (frei oder an Albumin gebunden) in die andere Seite der Kammer kann der Anteil der Substanz bestimmt werden, der in der Lage ist, die semipermeable Membran zu passieren und auf der anderen Seite DNA zu platinieren. Da die semipermeable Membran nur Substanzen mit einem Molekulargewicht  $< 5$  KDa passieren lässt, ist die plattinierte DNA ein Maß für intermediär freigesetzte, reaktive niedermolekulare Platinspezies.

Die Strukturen der albuminbindenden Platinkomplexe erlauben mehrere Hypothesen zur Freisetzung solcher niedermolekularer, reaktiver Platinverbindungen nach Albuminbindung (Abb. 7-6).

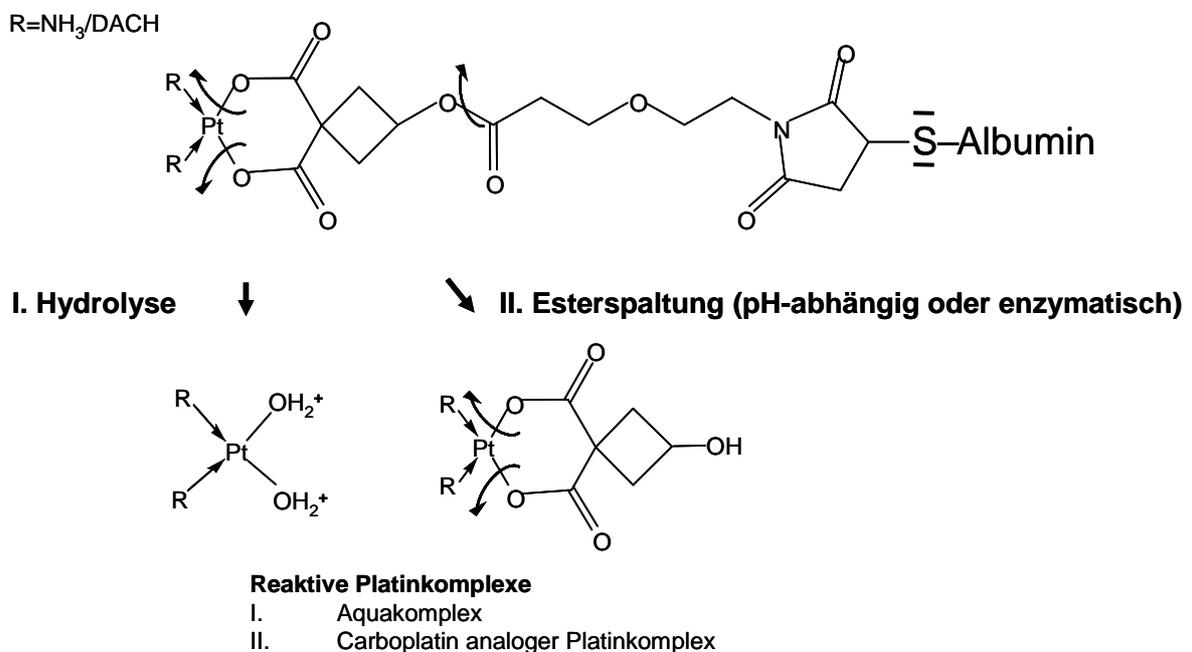


Abb. 7-6: Struktur der albumingebundenen Platinkomplexe mit eingezeichneten Sollbruchstellen.

Hauptmechanismus soll die Hydrolyse des Cyclobutandicarboxylat-Liganden (CBDCA) sein, wodurch ein niedermolekularer Aquakomplex vom Albumin gelöst wird. Als erster Schritt zur Ringöffnung des CBDCA-Liganden wird eine Protonierung eines Sauerstoffs angenommen<sup>11</sup>. Deshalb ist eine pH-Abhängigkeit der hydrolytischen Aktivierung denkbar. Als ein weiterer Mechanismus ist eine pH-abhängige oder enzymatische Spaltung der Esterfunktion möglich. Eine gesteigerte Aktivierung in niedrigen pH-Bereichen käme der Anwendbarkeit *in vivo* im Sinne eines Drug Targeting entgegen, da gerade Tumorgewebe häufig einen geringeren pH-Wert aufweist<sup>223,224</sup>.

Auch die Internalisierung als makromolekularer Komplex mit anschließender intrazellulärer Aktivierung – z.B. durch lysosomalen Abbau des Albumins kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Mikrodialysekammern ermöglichten die Simulation verschiedener Reaktionsbedingungen. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

### **Aktivierung durch unspezifische Hydrolyse**

Die Resultate dieser Versuche ergaben, dass die Reaktivität der Platinkomplexe PL04 und PL07 bei pH 7,4 nach der Bindung an Albumin im Vergleich zu den ungebundenen, niedermolekularen Substanzen um den Faktor 100-150 niedriger war. Daraus lässt sich folgern, dass entweder nur eine geringe Freisetzung reaktiver niedermolekularer Platinkomplexe erfolgte, oder diese reaktiven Platinspezies an das Albumin binden. Dieses Ergebnis überraschte, da das Design der albuminbindenden Platinkomplexe eine Bindung an Albumin vermeiden sollte. Ein Erklärungsansatz lässt sich aus dem chemischen Verhalten dieser Platinkomplexe ableiten.

Anders als Cisplatin, das mit den Chlorid-Liganden zwei voneinander unabhängige Liganden aufweist, die auch separat ausgetauscht werden können, besitzen Carboplatin und seine Analoga PL04 und PL07 einen zweizähligen Chelatliganden. Wird dieser Ligand an einer Position hydrolysiert, ist er über die zweite Bindungsstelle weiterhin gebunden (zweigliedrige Ringöffnung). Da die albuminbindende Teilstruktur an den CBDCA-Liganden synthetisiert wurde, ist eine reaktive Funktion in unmittelbarer Proteinumgebung fixiert. Es können ein zweiter Hydrolyseschritt (vollständige Aktivierung des Platinkomplexes) oder eine (unerwünschte) Bindung an Albumin folgen (Abb. 7-7).

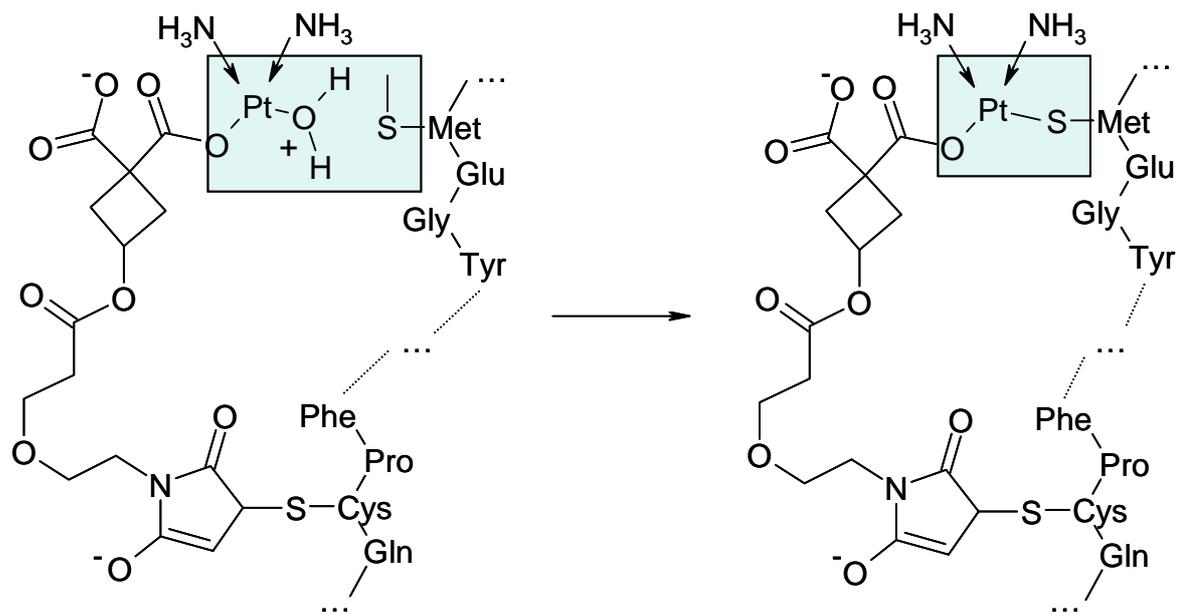


Abb. 7-7: Darstellung der Bindung an Albumin nach Teilhydrolyse (hier am Beispiel einer Rückbindung von PL07 an Cystein<sub>87</sub> dargestellt). Die Aminosäuresequenz von Albumin ist in Ausschnitten wiedergegeben (Gln = Glutamin<sub>33</sub>, Cys = Cystein<sub>34</sub>, Pro = Prolin<sub>35</sub>, Phe = Phenylalanin<sub>36</sub>, Tyr = Tyrosin<sub>84</sub>, Gly = Glycin<sub>85</sub>, Glu = Glutaminsäure<sub>86</sub>, Met = Methionin<sub>87</sub>).

Nach Teilhydrolyse des CBDCA-Liganden kann es zu einem elektrophilen Angriff des kationischen Aquakomplexes auf eine nukleophile Struktur des Albumins wie z.B. die Thiol- oder Hydroxygruppe einer benachbarten Aminosäure kommen. Dabei wird Platin unter Wasserabspaltung kovalent an die nukleophile Gruppe gebunden und steht für weitere Schritte der Bioaktivierung nicht mehr zur Verfügung.

In Anbetracht dieser Möglichkeiten muss diskutiert werden, ob der CBDCA-Ligand und die damit einhergehende Aktivierung durch unspezifische Hydrolyse eine geeignete Variante für das Prodrug-Konzept darstellt. Der zweite Hydrolyseschritt der die Freisetzung des reaktiven Platinkomplexes ermöglichen würde, verläuft sehr langsam: In Hydrolyseexperimenten wurde eine Halbwertszeit von mehreren Tagen ermittelt<sup>29,28,225</sup>. In dieser Zeitspanne ist der reaktive Monoaquakomplex in der Proteinumgebung fixiert und steht für Reaktionen mit dem Protein zur Verfügung. Selbst wenn es zu einer Freisetzung des reaktiven Platinkomplexes kommt, müsste es sich um einen Diaquakomplex (evtl. Dichlorokomplex) handeln, der als ein Analogon der aktivierten Form des Cisplatin aufgefasset werden kann. Für Cisplatin

wurde eine sehr schnelle Albuminbindung an verschiedene Positionen des Albumins gezeigt. Als bevorzugte Bindungsstellen wurden die Aminosäuren Methionin, Cystein und Histidin ermittelt. Auch eine Spaltung von Disulfidbrücken und Peptidbindungen ist beobachtet worden<sup>226,227,228</sup>. U. Warnke konnte zeigen, dass nach der Inkubation von Cisplatin mit Albumin keine Reaktion mit Nukleotiden erfolgte<sup>220</sup>. Die erzielten Ergebnisse und die Tatsache, dass Albumin zahlreiche Bindungsstellen für den erwarteten aktivierten Platinkomplex besitzt, erfordert eine Änderung der Strategie. Eine Lösungsmöglichkeit könnte darin bestehen, die Sollbruchstelle zu verschieben. Prinzipiell ist der CBDCA-Ligand keine schlechte Wahl, da Carboplatin eine geringe Proteinbindung aufweist, die auf diesen wenig reaktiven Liganden zurückzuführen ist. Eine säurelabile oder enzymatisch spaltbare Sollbruchstelle, die eine Abspaltung eines niedermolekularen Platinkomplexes mit intaktem CBDCA-Liganden erlaubt, könnte zum Erfolg führen.

Gestützt wird diese These durch ein Kontrollexperiment, mit dem die Auswirkung der Anwesenheit der relativ großen Menge an Albumin auf die Fähigkeit von Carboplatin zur Reaktion mit Kalbsthymus-DNA untersucht wurde. Es sollte geklärt werden, inwieweit die bloße Anwesenheit von Albumin die Fähigkeit eines niedermolekularen Platinkomplexes mit vergleichbarer Struktur zur Reaktion mit der DNA, sei es durch Proteinbindung oder Behinderung der Diffusion durch die semipermeable Membran, einschränkt. Wie sich zeigte, erniedrigte die Anwesenheit von Albumin in der Mikrodialysekammer die Reaktivität von Carboplatin gegenüber der DNA auf ca. ein Drittel. Das Ausmaß der DNA-Platinierung über die Zeit stieg aber weiterhin linear an. Auch hier kommt es vermutlich zu einer Proteinbindung, die aber im Vergleich zu den Experimenten mit den albumingebundenen Platinkomplexen nur zu einer moderaten Einschränkung der Reaktivität führte. Ein ähnliches Verhalten kann auch für einen freigesetzten niedermolekularen Platinkomplex mit intaktem CBDCA-Liganden angenommen werden.

Die Tatsache, dass die Substanz PL04 sowohl in niedermolekularer Form als auch an Albumin gebunden eine etwas höhere Platinierung als PL07 verursachte, deckt sich mit den Ergebnissen der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen zur Reaktivität der Platinkomplexe.

### **Aktivierung durch saure Hydrolyse**

Ein niedrigerer pH-Wert könnte die Aktivierung der makromolekularen Platin-komplexe steigern. Denkbar ist eine deutlich schnellere Freisetzung eines reaktiven Aquakomplexes durch eine säurekatalysierte Ringöffnung des CBDCA-Liganden – dadurch wäre die reaktive Teilstruktur nicht so lange in unmittelbarer Protein-umgebung fixiert – oder die Freisetzung einer weniger reaktiven, dem Carboplatin ähnlichen Verbindung durch Esterspaltung (Abb. 7-6). Niedrigere pH-Werte finden sich häufig im Tumorgewebe und intrazellulär in den Lysosomen. In der Literatur differieren die Angaben zum pH-Wert im Tumorgewebe (6,2 - 6,75)<sup>224,229</sup> und in Lysosomen (4,5 - 5,2)<sup>230</sup>. Die gewählten pH-Werte von 6,0 bzw. 5,0 sollten exemplarisch die physiologischen Bedingungen imitieren.

Bei der Versuchsplanung musste berücksichtigt werden, dass die Elektrolytkonzentration die Aktivierung der Platinkomplexe beeinflussen kann. Die Chloridkonzentration wird als entscheidend für die Aktivierung von Cisplatin angesehen, aber auch für Carboplatin wird eine Aktivierung über einen Chlorokomplex als Zwischenstufe diskutiert. Der Einfluss der Phosphatkonzentration ist erst in Ansätzen bekannt (s. Kap. 1.3.1). Um eine Vergleichbarkeit der Experimente bei verschiedenen pH-Werten zu ermöglichen, musste deshalb darauf geachtet werden, die Elektrolytkonzentrationen konstant zu halten. Da die Albumin-Prodrugs sich nach ihrer Bildung im Blut befinden und die aktiven Platinspezies aus den Albumin-Prodrugs im Extrazellulärraum des Tumorgewebes freigesetzt werden sollen, wurde entschieden, die physiologische Chloridkonzentration von 100 mM zu adaptieren und Phosphorsäure zur Einstellung des pH-Werts zu verwenden. Die Konzentration an Phosphat, die durch Zugabe der Phosphorsäure erhöht wurde, betrug maximal (bei pH 5) 12 mM. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit wurde diese Phosphatkonzentration in allen Experimenten eingestellt.

Ein niedrigerer pH-Wert verursachte tendenziell eine höhere Platinierung der DNA durch die albumingebundenen Platinkomplexe. Bei einem pH-Wert von 5,0 zeigte sich eine etwa 2-3-fache Aktivierung. Die Reaktivität der ungebundenen Platin-komplexe wurde durch einen niedrigeren pH-Wert nicht beeinflusst. Die leichte Reaktivitätserhöhung der Albuminkomplexe könnte durch eine schnellere Hydrolyse des CBDCA-Liganden verursacht sein, wodurch der partiell aktivierte Monoaqua-komplex nicht so lange in unmittelbarer Proteinumgebung fixiert vorliegt. Eine

Spaltung der Esterfunktion mit Freisetzung einer carboplatinähnlichen Verbindung ist auch nicht auszuschließen (Abb. 7-6). Wird das Ergebnis allerdings im Kontext der im Vergleich zum ungebundenen Platinkomplex drastisch um den Faktor 100-150 reduzierten Platinierung bei pH 7,4 gesehen, so lässt dies den Schluss zu, dass der Einfluss eines niedrigen pH-Wertes gering einzuschätzen ist. Für die ungebundenen Platinkomplexe wäre ebenfalls eine Aktivierung erwartet worden. Möglicherweise fällt diese bei dem hohen Platinierungsgrad der DNA nicht ins Gewicht, bzw. es kommt, wie von Warnke et al. und Kung et al. vermutet<sup>32,34</sup>, zu einer direkten, hydrolyseunabhängigen Reaktion der in der Mikrodialysekammer frei diffundierenden Platinkomplexe mit den Nukleotiden der Kalbsthymus-DNA.

### **Aktivierung durch enzymatische Esterspaltung**

Butyrylcholinesterase, auch als unspezifische Cholinesterase bezeichnet, ist in der Lage, ein weites Spektrum an Estern zu spalten. Sie findet sich mit hoher Aktivität im humanen Blut (~5000 U/min), sodass die Platinkomplexe nach einer intravenösen Applikation direkt der relativ breiten Esteraseaktivität dieses Enzyms ausgesetzt sind. Sowohl PL04 als auch PL07 weisen eine Esterstruktur innerhalb des Molekülteils auf, der die Maleinimidstruktur mit dem Platinkomplex verbindet (s. Abb. 7-8). Die Spaltung dieser Esterfunktion der Prodrugs *vor* der Bindung an Albumin hätte somit eine Abtrennung des albuminbindenden Molekülteils zur Folge. Dadurch entstünden niedermolekulare Platinkomplexe, die nicht mehr für das Prodrugkonzept zur Verfügung stünden. Eine Spaltung der Esterfunktion *nach* der Bindung an Albumin würde zu einer dem Carboplatin vergleichbaren Verbindung führen. Wie bereits diskutiert, sollte diese Verbindung geeignete Eigenschaften haben, um eine unerwünschte irreversible Bindung an Albumin zu vermeiden. Zur Überprüfung des Einflusses der Butyrylcholinesterase wurde das Enzym den Platinkomplexen sowohl vor wie auch nach der Bindung an Albumin zugesetzt und die Auswirkung auf die Platinierung der Kalbsthymus-DNA analysiert.

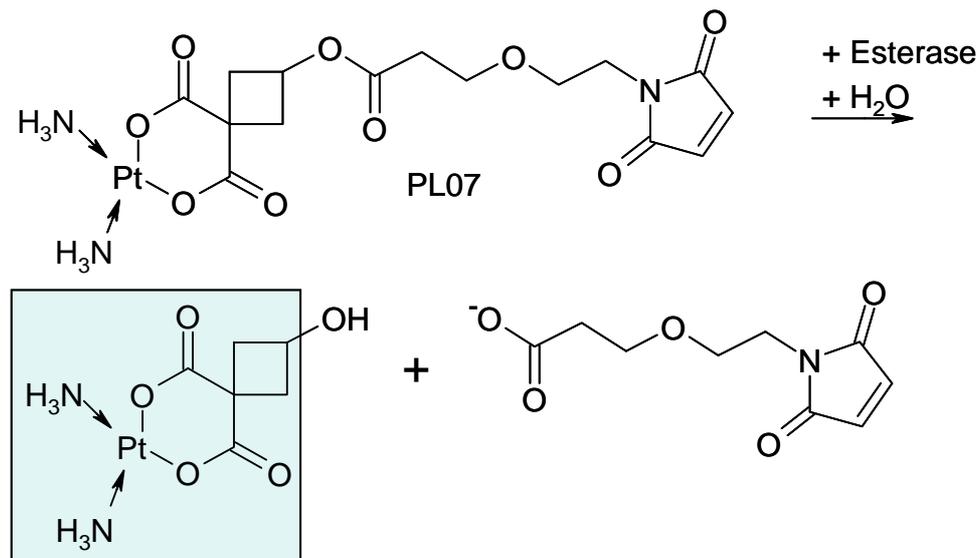


Abb. 7-8: Enzymatische Hydrolyse der Esterstruktur am Beispiel von PL07. Die Struktur von Carboplatin innerhalb des Produktes ist hervorgehoben.

Die Umsetzung der freien Platinkomplexe PL04 und PL07 mit der Esterase vor der Bindung an Albumin resultierte, im Vergleich zur Inkubation ohne Enzym, in einer etwa 3-fach höheren Platinierung der DNA, die ihre Ursache in der fehlenden Kopplung – die albuminbindende Komponente wurde durch die Esterspaltung entfernt – an Albumin hat (vgl. Kap. 5.3.4). Die Auswirkung auf den Platinierungsgrad der DNA ist aber, im Vergleich zur reduzierten Reaktivität nach Bindung an Albumin, gering. Zudem liegen *in vivo* Esterase und Albumin nebeneinander vor, sodass eine Spaltung durch die Esterase und die rasche Kopplung an Albumin als Konkurrenzreaktion ablaufen.

Sind die Platinkomplexe an Albumin gekoppelt, so zeigte die Esterase keinen Einfluss auf eine Aktivierung. Der Zytostatikum-Albumin-Komplex stellt ein Makromolekül mit entsprechend großer sterischer Hinderung da. Es kann angenommen werden, dass der an Cystein 34 gekoppelte Platinkomplex räumlich derart abgeschirmt ist, dass mit dem esteratischen Zentrum der Butyrylcholinesterase keinerlei Wechselwirkung erfolgen kann und somit eine enzymatische Hydrolyse nicht möglich ist.

Die geringe Aktivierung der Platinkomplexe in diesen In-vitro-Experimenten liefert Hinweise darauf, dass eine Spaltung der Platinkomplexe durch Butyrylcholinesterase

als Aktivierungsmechanismus (positiv) oder als Konkurrenzreaktion zur Albuminbindung (negativ) vernachlässigbar ist.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass zur Durchführung der Versuche aus Kostengründen equine Butyrylcholinesterase verwendet wurde. Diese vom Pferd stammende Cholinesterase wird häufig anstelle humaner Butyrylcholinesterase verwendet. Allerdings sind beide Enzyme nicht vollständig identisch. Sie weisen Unterschiede bezüglich ihrer Aminosäuresequenz im esteratischen Zentrum in den Positionen 69, 277 und 285 auf. Dies führt zu einer veränderten Affinität zu Substraten, wie in Untersuchungen mit Esterasehemmstoffen gezeigt werden konnte<sup>186</sup>. Die Ergebnisse dieser Versuche können demzufolge nur bedingt von Pferdeserumesterase auf humane Esterase übertragen werden.

### Ein PEG-Platinkomplex im Vergleich

Zur Bestätigung der Hypothese, dass der makromolekulare Träger Albumin mit seinen zahlreichen potentiellen Bindungsstellen – neben der möglicherweise ungünstigen Auswahl der austauschbaren Liganden am Platinkomplex – für die geringe Reaktivität der Albumin-Platin-Prodrugs verantwortlich ist, wurde ein Polyethylenglykol-Platinkomplex (PEG) mit einem Molekulargewicht von 10 KDa untersucht und mit den albuminbindenden Platinkomplexen verglichen (s. Abb. 7-9).

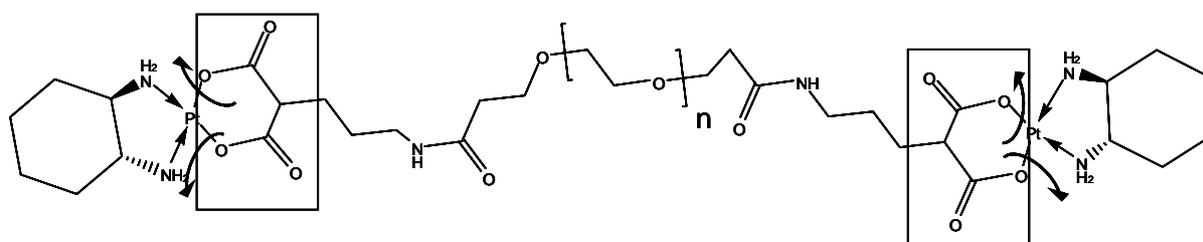


Abb. 7-9: PEG-Platinkomplex mit Malonateilstruktur.

Der makromolekulare PEG-Platinkomplex verursachte eine relativ hohe Platinierung der DNA, vergleichbar mit der Platinierung durch die ungebundenen niedermolekularen albuminbindenden Platinkomplexe. Dieses Ergebnis konnte so nicht interpretiert werden, da die Möglichkeit in Betracht gezogen werden musste, dass eine rasche Hydrolyse zur schnellen Freisetzung niedermolekularer Platinkomplexe führt – diese also direkt nach Lösung des makromolekularen Komplexes zur

Verfügung stehen – ,welche dann für die gemessene Platinierung der DNA verantwortlich sind. Dies würde bedeuten, dass der PEG-Platinkomplex für das Prodrug-Prinzip nicht geeignet wäre, da eine ausreichende Stabilität für die Anreicherung im Tumor Voraussetzung ist. Zur Interpretation dieses Experimentes wurden Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt, die eine langsame Freisetzung niedermolekularer Platinspezies belegen. Die Reaktionskinetik 0. Ordnung im beobachteten Zeitrahmen, die sich aus dem linearen Zusammenhang von Konzentration und Zeit ergibt (s. Kap. 5.3.6), lässt die Vermutung zu, dass die Diffusion durch die semipermeable Membran der Mikrodialysekammer allein von der Freisetzung des niedermolekularen Platinkomplexes abhängt. Aus beiden Versuchen zusammen lässt sich folgern, dass der PEG-Platinkomplex in Gegensatz zu den Albumin-Platinkomplexen hydrolytisch aktiviert werden kann. Die Struktur des Makromoleküls Albumin ist wahrscheinlich zum großen Teil verantwortlich für die mangelnde Aktivierbarkeit der Albumin-Platinkomplexe. Allerdings fehlen zur quantitativen Beurteilung des Einflusses der Polymerstruktur auf die Reaktivität vergleichende Untersuchungen mit einem niedermolekularen Strukturanalogon des PEG-Platinkomplexes. Ein entsprechendes Oxaliplatinderivat mit Malonatstruktur wurde von der Arbeitsgruppe Keppler synthetisiert und soll noch untersucht werden. Zusätzlich werden PEG-Platinkomplexe mit höherem Molekulargewicht benötigt, um den Einfluss des Molekulargewichts auf die Freisetzung zu beurteilen. Der EPR-Effekt zur Ausnutzung der Anreicherung im Tumor kommt erst ab einem Molekulargewicht > 30-40 kDa zum tragen.

Mit ausreichend großen PEG-Polymeren und geeigneten gekoppelten Platin-komplexen ließen sich vermutlich einfacher makromolekulare Prodrugs zur Ausnutzung des EPR-Effektes im Sinne eines Drug Targeting entwickeln, allerdings müsste auf den Vorteil des doppelten Prodrug-Konzepts (vgl. Kap. 1.5.1) verzichtet werden.

### **Kritische Betrachtung der Gleichgewichtsmikrodialysekammer**

Die eingesetzte Mikrodialysekammer wurde verwendet, um eine Trennung von Zielstruktur und makromolekularem Prodrug zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen zu erreichen. Die Mikrodialysekammer kann somit als Modell betrachtet werden, mit dem zwei Kompartimente, in diesem Fall interstitielle und intrazelluläre

Flüssigkeit, simuliert werden können. Zur Testung verschiedenster Reaktionshypothesen makromolekularer Prodrugs stellt sie aufgrund der variabel einstellbaren Bedingungen ein nahezu optimales Werkzeug dar. Auch zur Überprüfung der Stabilität makromolekularer Substanzen ist dieses System hervorragend geeignet, da eine Abtrennung des Makromoleküls, die für eine anschließende Analytik häufig notwendig ist, durch die zwei getrennten Kammern nicht erforderlich ist.

Allerdings sind auch die Grenzen dieses Systems deutlich zu erkennen und sollen im Folgenden kurz erörtert werden.

- Die meisten Reaktionshypothesen sind komplex und beziehen mehrere Kompartimente mit ein. Dies lässt sich schon am Beispiel der untersuchten Hypothese der interstitiellen Freisetzung einer aktiven Platinspezies im Tumorgewebe mit nachfolgender Platinierung zellulärer DNA verdeutlichen. Die Tumorzelle selbst ist schon ein Mehrkompartiment-System, das durch Zellmembran, Kernmembran und endoplasmatisches Retikulum in mehrere Reaktionsräume unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung unterteilt ist. Diese muss eine Substanz passieren, soll sie die im Nukleus befindliche DNA platinieren.
- Die Mikrodialysekammer kann nur als sehr vereinfachtes Modell unterschiedlicher Kompartimente aufgefasst werden, die einzig von einer semipermeablen Membran getrennt werden. Kleine Moleküle können diese Membran ungehindert passieren. Dies gilt insbesondere für Elektrolyte und  $H^+$ -Ionen, sodass sich bezüglich Ionenkonzentration und pH-Wert nach kurzer Zeit ein Gleichgewicht einstellt. Es ist mit diesem Modell nicht möglich, einen Gradienten aufzubauen und aufrecht zu erhalten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Einsatz dieses Modells dann sinnvoll ist, wenn die Reaktionshypothese einer makromolekularen Substanz genau definiert ist. Der entscheidende Schritt der Aktivierung, wie z.B. der Zusatz von Enzymen oder ein niedrigerer pH-Wert im Falle Enzym- oder pH-labiler Sollbruchstellen kann relativ einfach nachgestellt werden. Ein Screening verschiedener Substanzen ermöglicht dann eine Auswahl geeigneter Verbindungen für aufwändigere Untersuchungen.

### 7.2.4 Zelluläre Aufnahme und Zytotoxizität

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Reaktivität der albumingebundenen Platin-komplexe legten nahe, dass entstehende niedermolekulare Platinspezies rasch an andere reaktive funktionelle Gruppen des Albumins binden. Die Annahme, dass eine reaktive Platinverbindung interstitiell im Tumorgewebe freigesetzt wird, ist daher anzuzweifeln. Aus den vorliegenden tierexperimentellen Daten (s. Kap. 7.2.5) geht jedoch deutlich eine Wirksamkeit der Platinkomplexe hervor. Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich am ehesten durch eine intrazelluläre Aktivierung nach Aufnahme der Albuminkonjugate in die Zelle erklären und wurde durch Zellkultur-experimente überprüft.

#### Niedermolekulare Platinkomplexe im Vergleich

Die Charakterisierung der cisplatin-sensitiven- und resistenten Zelllinie, die mit Hilfe der strukturverwandten Platinkomplexe Carboplatin und Oxaliplatin durchgeführt wurde, ergab für beide Substanzen eine deutlich eingeschränkte Aufnahme in der resistenten Zelllinie. Die Aufnahme von Carboplatin erfolgte insgesamt auf einem niedrigeren Niveau, der Unterschied zwischen der sensitiven und der resistenten Zelle war geringer ausgeprägt. Dieses Ergebnis erlaubt den Schluss, dass einer der Hauptresistenzmechanismen von A2780cis-Ovarialkarzinomzellen, die geringere Aufnahme von Cisplatin, ein genereller Resistenzmechanismus für unterschiedliche Platinkomplexe ist. Gestützt wird diese Vermutung durch die durchgeführten Zytotoxizitätstests (s. Kap. 5.4.1), die eine Kreuzresistenz zwischen Cisplatin, Oxaliplatin und Carboplatin ergaben. Der geringere Resistenzgrad und die geringere Zytotoxizität von Carboplatin könnten zum Teil auf die reduzierte Aufnahme und den geringeren Unterschied der Platinmenge zwischen sensibler und resistenter Zelllinie zurückzuführen sein. Aber auch andere Ursachen, wie ein unterschiedliches initiales Adduktmuster sind denkbar (vgl. Kapitel 1.3.3).

Die neuen albuminbindenden Platinkomplexe zeigten vor der Bindung an Albumin ein ähnliches Verhalten wie Carboplatin. PL04 wurde tendenziell etwas besser aufgenommen als PL07. Die Gesamtmenge Platin, welche in die Zelle aufgenommen wurde, war (verglichen mit Oxaliplatin) vergleichsweise gering und die Aufnahme der Platinkomplexe in resistente Zellen statistisch signifikant eingeschränkt.

PL04 und PL07 unterscheiden sich strukturell ausschließlich in ihren stabilen Liganden, verursachten aber vergleichbare intrazelluläre Platinkonzentrationen. Dies führt zu der Annahme, dass der austauschbare Cyclobutandicarboxylat-Ligand der entscheidende Faktor für die Aufnahme in die untersuchten Tumorzellen darstellen muss. Da dieser Ligand die Reaktivität maßgeblich beeinflusst, könnte hier ein Zusammenhang bestehen. In der Literatur werden einige Aufnahmemechanismen diskutiert, die diesen Zusammenhang plausibel erscheinen lassen (s. Kap. 7.3).

Interessant ist eine Gesamtbetrachtung der Aufnahme verschiedenster niedermolekularer Platinkomplexe in Tumorzellen, die durch Vergleich mit Ergebnissen aus der Dissertation von J. Zisowsky möglich wurde<sup>85</sup>. Bisher ging man davon aus, dass der größte Anteil der Platinkomplexe durch passive Diffusion in die Zelle gelangt, wobei seit einigen Jahren auch die Beteiligung aktiver Transportmechanismen diskutiert wird. Folglich sollten lipophilere Platinkomplexe besser in die Zelle gelangen. Aufgrund der eigenen Resultate und der Untersuchungen von J. Zisowsky muss diese These angezweifelt werden. Die Lipophilie der albuminbindenden Platinkomplexe wurde zwar nicht bestimmt, sollte sich aber aufgrund der unterschiedlichen Neutralliganden (PL04 = DACH-Ligand, PL07 = Ammin-Liganden) deutlich unterscheiden. Dem zu Folge wäre ein größerer Unterschied der Aufnahme zwischen PL04 und PL07 zu erwarten gewesen. Cisplatin, das von J. Zisowsky in den verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien untersucht wurde, wird im Vergleich zu den hier verwendeten Platinkomplexen in größerem Ausmaß in A2780-Ovarialkarzinomzellen aufgenommen, besitzt aber eine ähnliche Lipophilie wie Carboplatin (Tab. 7-2)<sup>85</sup>.

Tab. 7-2: Aufnahme und physikochemische Eigenschaften der untersuchten Platinkomplexe (1 = höchste, 5 = geringste intrazelluläre Platinkonzentration nach 120 Minuten).

Rang	Platinkomplex	Lipophilie (log P)	Wasserlöslichkeit
1	Cisplatin	-2,5	mind. 7 mM
2	Oxaliplatin	-1,65	mind. 25 mM
3	PL04	Nicht ermittelt	mind. 75 mM
4	PL07	Nicht ermittelt	mind. 4 mM
5	Carboplatin	-2,3	mind. 25 mM

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass Wasserlöslichkeit und Lipophilie der Platinkomplexe häufig nicht korrelieren. Eine bessere oder schlechtere Wasserlöslichkeit scheint aber auch nicht ausschlaggebend für die Aufnahme zu sein, wie von Moeller et al. postuliert<sup>204</sup>. PL04 und PL07 zeigen eine deutlich unterschiedliche Wasserlöslichkeit. Beide Substanzen verhielten sich in diesem Versuch ähnlich. Aufgrund dieser Ergebnisse, die im Widerspruch zur These der passiven Diffusion als Hauptmechanismus der Aufnahme stehen, entstand das zweite Projekt dieser Arbeit, in dem in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Professor Keppler, Universität Wien, Oxaliplatin-Analoga untersucht wurden, die sich bezüglich der Substituenten und Lipophilie unterscheiden.

### **Makromolekulare Platinkomplexe im Vergleich**

Die makromolekularen Verbindungen zeigten im Vergleich zu den niedermolekularen Platinkomplexen eine eingeschränkte Aufnahme. Beide albumingebundenen Platinkomplexe (PL04 und PL07) verhielten sich ähnlich. Überraschenderweise konnte kein Unterschied zwischen der Aufnahme in sensitive und resistente Zellen festgestellt werden. Der Befund, dass sich beide albumingebundenen Platinkomplexe bezüglich ihrer Aufnahme in die Zelle ähnlich verhielten und die Aufnahme in resistente Zellen nicht eingeschränkt wurde, spricht für einen eigenständigen Transportmechanismus der makromolekularen Verbindungen, z.B. durch unspezifische oder rezeptorvermittelte Endozytose. Gerade für Tumore, deren Hauptresistenzmechanismus in der verringerten Aufnahme der Platinkomplexe liegt, eröffnet sich möglicherweise eine neue Perspektive zur Resistenzüberwindung, die

bisher nicht beschrieben ist. Dieser Hypothese könnte eine geringere Aufnahme makromolekularer Komplexe per se entgegengehalten werden, da aufgrund der Molekülgröße nicht von einer quantitativ relevanten passiven Diffusion in die Zelle auszugehen ist. Die gemessene intrazelluläre Platinkonzentration ist aber nur moderat reduziert (s. Abb. 5-23). Die Erklärung liegt möglicherweise in einer gesteigerten Endozytoserate von Tumorzellen<sup>192,231</sup> im Vergleich zu nicht entarteten Zellen, die durch eine erhöhte metabolische Aktivität verursacht ist. Zusätzlich dürfte es durch den EPR-Effekt zu einer erhöhten Konzentration der makromolekularen Substanzen im Tumorgewebe kommen, sodass die verringerte Aufnahme kompensiert werden könnte. Ein weiteres Ergebnis, dass die Hoffnung bestärkt, durch Ausnutzung der Endozytosewege Resistenz überwinden zu können, liefert die Untersuchung des PEG-Platinkomplexes. Auch hier wurde innerhalb von 120 Minuten kein Unterschied zwischen der intrazellulären Platinkonzentration nach Inkubation mit den Platinkomplexen in sensitiven und resistenten Zellen festgestellt, allerdings gelangt deutlich mehr Platin in die Tumorzellen. An einem Molekül PEG sind zwei Platinkomplexe gebunden. Daraus lässt sich folgern, dass durch Mehrfachbeladung eines makromolekularen Trägers die aufgenommene Platinmenge erhöht werden kann. Bislang sind in der Literatur keine makromolekularen Platinkomplexe beschrieben, die speziell zur Resistenzüberwindung durch Ausnutzung alternativer Aufnahmemechanismen synthetisiert wurden. Interessant wären makromolekulare Substanzen, die mehrere Platinatome tragen und Sollbruchstellen besitzen, die eine gezielte intrazelluläre Freisetzung ermöglichen. Die Anreicherung im Tumorgewebe durch den EPR-Effekt in Verbindung mit einer ausreichenden Beladung der Zelle über die endozytotische Aufnahme polynuklearer makromolekularer Platinkomplexe und eine spezifische intrazelluläre Freisetzung könnten zum Erfolg führen (Abb. 7-10). Als spezifische Sollbruchstellen für eine intrazelluläre Freisetzung würden sich säurelabile Strukturen eignen, die sensitiv auf eine Erniedrigung des pH-Werts auf pH 5-6 reagieren (lysosomaler pH-Wert). Hier gibt es bereits viel versprechende Systeme mit verschiedenen Dicarbonsäuren<sup>223,232</sup>. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung spezifisch durch Cathepsin B spaltbarer Peptidketten. Unterstützend käme hinzu, dass die lysosomale Protease Cathepsin B in einigen Tumoren überexprimiert gefunden wurde<sup>233,234</sup>. Als geeignete Träger zur Mehrfachbeladung bieten sich

aufgrund der geringen Toxizität und der Möglichkeit einer definierten Beladung vor allem verschiedene PEG-Derivate an.

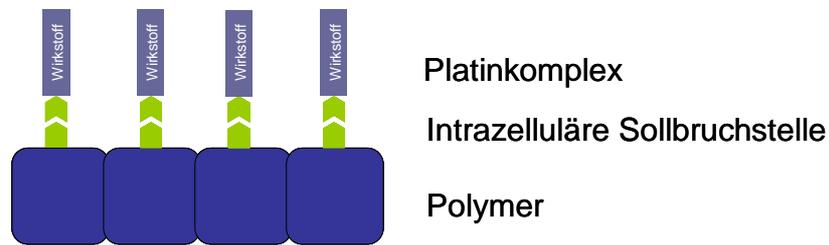


Abb. 7-10: Vorschlag für den Aufbau eines Polymers zur Resistenzüberwindung.

Für das Konzept der albuminbindenden Platinkomplexe ist entscheidend, dass es zu einer relativ guten Internalisierung der makromolekularen Verbindungen kommt, was die Hypothese einer intrazellulären Aktivierung offen lässt.

### **Endozytose als Aufnahmemechanismus makromolekularer Platinkomplexe**

Da makromolekulare Platinkomplexe möglicherweise einen neuen Ansatz zur Resistenzüberwindung darstellen, wurde deren Aufnahmemechanismus näher untersucht. Ziel war es die postulierte endozytische Aufnahme durch Inhibition der Endozytose der Tumorzellen zu belegen und den zugrunde liegenden Endozytosemechanismus (s. Kap. 3.11.3.1) genauer zu charakterisieren.

Die vorherige Etablierung einer einfachen Methode zur Erfassung der Aufnahme einer kostengünstigen, den makromolekularen Platinkomplexen strukturell ähnlichen Substanz (FITC-Albumin) ermöglichte eine geeignete Auswahl von Inhibitoren und eine schnelle Optimierung der Versuchsbedingungen ohne Verwendung der nur in geringen Mengen synthetisierten Platinkomplexe PL04 und PL07. Zusätzlich steht nun eine Möglichkeit zur Verfügung, FITC-Albumin abhängige Endozytosevorgänge in sensitiven und resistenten Zellen vergleichend zu untersuchen. In dem Befund der vergleichbaren Aufnahme von FITC-Albumin in sensitive und resistente A2780-Ovarialkarzinomzellen wurde eine Bestätigung der bisher erzielten Ergebnisse und ein weiteres Indiz für den Einsatz makromolekularer Substanzen zur Resistenzüberwindung gesehen. Die erfolgreiche Inhibition der Aufnahme von FITC-Albumin durch Bafilomycin A<sub>1</sub> deutet auf einen Klathrin vermittelten

Endozytosemechanismus hin. Das unbeeinflusste Aufnahmeverhalten in Gegenwart von  $\beta$ -Methylcyclodextrin ist ein Hinweis darauf, dass der Caveolin abhängige Endozytoseweg nicht beteiligt ist (s. Kap. 3.11.3.1).

Diese Ergebnisse wurden mit den Albumin-Platinkomplexen in beiden Zelllinien bestätigt. Das – im Vergleich zum FITC-Albumin – etwas niedrigere erreichte Inhibitionsniveau kann durch den vorhandenen Überschuss an Albumin, durch weitere beteiligte Transportprozesse, oder auch durch ungebundene niedermolekulare Platinkomplexe verursacht sein. Die Resultate der aus diesem Grunde durchgeführten Vergleichsversuche mit niedermolekularen Platinkomplexen macht jedoch deutlich, dass die erzielte Inhibition der Aufnahme der makromolekularen Platinkomplexe nicht durch extrazellulär freigesetzte oder ungebundene niedermolekulare Platinkomplexe verfälscht wurde.

Die Aufnahme des makromolekularen PEG-Platinkomplexes ließ sich neben Bafilomycin A<sub>1</sub> zusätzlich mit  $\beta$ -Methylcyclodextrin beeinflussen. Dies weist auf eine Beteiligung eines weiteren, vermutlich des Caveolin abhängigen Endozytosewegs hin. Es kann allerdings nicht unterschieden werden, welcher dieser Mechanismen bevorzugt wird. Überraschender Weise fiel die erreichte Inhibition mit  $\beta$ -MCD in der resistenten Zelllinie deutlich geringer aus. Möglicherweise ist die Zusammensetzung der Membran, insbesondere der cholesterolreichen Domänen verändert. Eine verminderte Konzentration an Cholesterol wurde bereits von Caffrey et al. in einer cisplatinresistenten Ovarialkarzinomzelllinie beschrieben<sup>91</sup>. Hinweise auf erhöhte Cholesterolanteile in resistenten Ovarialkarzinomzelllinien ergaben sich aus der unterschiedlichen Beeinflussung der Cisplatin Aufnahme durch Amphotericin B, einem Porenbildner mit Cholesterol<sup>235</sup>. Es gibt allerdings auch gegenteilige Befunde, die keine Veränderung der Cholesterolkonzentration nachweisen konnten<sup>93</sup>. Zur Klärung dieser Fragestellung sollten weitere Untersuchungen folgen.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass ein klarer Nachweis des Transports makromolekularer Platinkomplexe durch Endozytose gelang. Es konnten Hinweise auf die Art der beteiligten Endozytoseprozesse ermittelt werden. Für eine genaue Charakterisierung der verantwortlichen Endozytosemechanismen sind allerdings weitere Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren notwendig, vor allem weil die genauen Prozesse der Endozytose noch nicht in allen Einzelheiten bekannt sind<sup>190,191,236</sup>. Häufig beeinflussen die eingesetzten Inhibitoren sekundär andere

Aufnahmeprozesse. Dementsprechend werden Ergebnisse aus Versuchen mit verschiedenen Inhibitoren für Schlussfolgerungen zu den Aufnahmemechanismen benötigt.

### **Zytotoxizität**

Die durchgeführten Zytotoxizitätstests sollten zur Klärung der Frage beitragen, ob die Substanzen intrazellulär aktiviert werden. Zusätzlich stand, bedingt durch die Ergebnisse zur Untersuchung der Aufnahme der makromolekularen Platinkomplexe, der Einfluss der Bindung an Albumin auf den Resistenzgrad im Fokus. Vor der Bindung an Albumin erwies sich PL04 als deutlich zytotoxischer als PL07. Der ermittelte  $EC_{50}$ -Wert war vergleichbar mit dem  $EC_{50}$ -Wert für Oxaliplatin. PL07 war etwas zytotoxischer als Carboplatin ( $EC_{50}$ : Cisplatin < Oxaliplatin < PL04 < PL07 < Carboplatin). Die Resistenzgrade für PL04 (3,5) und PL07 (3,7) lagen in einem Bereich, der auch für Oxaliplatin (3,3) ermittelt wurde.

Da die beiden Substanzen ein vergleichbares Aufnahmeverhalten in die Tumorzellen zeigten, kann die höhere Zytotoxizität von PL04 nur durch den einzigen strukturellen Unterschied, dem stabilen DACH-Liganden, verursacht sein. Das ist plausibel, da der DACH-Ligand über einen gehinderten replikativen Bypass ein deutlich erhöhtes Maß an Einzelstrangbrüchen verursacht und somit eine geringere Adduktmenge eine erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zu Verbindungen mit Ammin-Liganden zur Folge hat (s. Kap. 1.3.3). Die geringfügig erhöhte Reaktivität dieser Verbindung dürfte ebenfalls in Form einer erhöhten Adduktbildung am höheren zytotoxischen Effekt beteiligt sein. Die leicht erhöhte Zytotoxizität und der höhere Resistenzgrad von PL07 im Vergleich zu Carboplatin lässt sich aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten am ehesten durch die Maleinimidstruktur erklären, die intrazellulär mit Nukleophilen, wie z.B. Glutathion – eine erhöhte Glutathionkonzentration ist in dieser Zelllinie ein weiterer entscheidender Resistenzmechanismus – reagieren kann. Das gebundene Glutathion würde zur Inaktivierung der Platinkomplexe fehlen.

Nach Bindung an Albumin sind die Platinkomplexe PL04 und PL07 nur noch sehr schwach zytotoxisch. Der  $EC_{50}$ -Wert ist für beide makromolekularen Komplexe sowohl für die sensitive wie auch für die resistente Zelle vergleichbar und liegt bei 263-328  $\mu\text{M}$ . Für beide Substanzen wurde ein deutlich geringerer Resistenzgrad bzw. eine Überwindung der Resistenz beobachtet.

Dieser Befund sollte sehr kritisch und mit Vorsicht interpretiert werden. Auf der einen Seite zeigen die Ergebnisse, dass eine Überwindung von Resistenz, die ihre Hauptursache in einer eingeschränkten Aufnahme hat, durch makromolekulare Platinkomplexe möglich sein könnte. Auf der anderen Seite sind die albumingebundenen Platinkomplexe nur noch sehr begrenzt als zytotoxisch einzustufen. Für einen zytotoxischen Effekt werden Konzentrationen benötigt, die *in vivo* unerreichbar sind. Es ist nicht davon auszugehen, dass eine Zelle auf Substanzen mit geringer Toxizität in hoher Konzentration vergleichbar reagiert wie auf hochtoxische Substanzen. Möglicherweise liegt hier ein rein konzentrationsabhängiger, unspezifischer Effekt zu Grunde. Zum Nachweis der Resistenzüberwindung sollten deshalb unbedingt weitere, intrazellulär aktivierbare makromolekulare Platinkomplexe untersucht werden.

Der  $EC_{50}$ -Wert liegt in der cisplatin sensitiven Zelllinie um den Faktor 40 (PL04) bzw. 7,5 (PL07) höher als vor der Bindung an Albumin. Dies lässt den Schluss zu, dass ein großer Teil der Platinkomplexe irreversibel an Albumin gebunden hat und nicht mehr für eine zytotoxische Wirkung zur Verfügung steht. Die Ergebnisse der Mikrodialysekammerversuche wurden somit weitgehend bestätigt. Die noch messbare zytotoxische Wirkung gibt zwar den Hinweis auf eine geringe zelluläre Aktivierung, aber zum Einsatz im Sinne des ursprünglichen Prodrug-Konzepts, welches als Aktivierungshypothese die interstitielle Hydrolyse im Tumorgewebe mit Freisetzung einer reaktiven niedermolekularen Platinspezies hatte, scheinen die albuminbindenden Substanzen wenig geeignet.

Der makromolekulare PEG-Komplex erwies sich als wesentlich zytotoxischer. Die ermittelte Zytotoxizität und der errechnete Resistenzgrad ist mit den für Oxaliplatin und niedermolekularem PL04 ermittelten Resistenzgraden vergleichbar. Dieses Ergebnis spiegelt die Resultate der Mikrodialysekammerversuche wider, denen eine gleichmäßige Freisetzung reaktiver niedermolekularer Platinspezies entnommen werden konnte. Im MTT-Zytotoxizitätstest werden die Tumorzellen über eine Dauer von 72 Stunden der Substanz ausgesetzt, sodass es nahe liegend ist, dass die zytotoxischen Effekte hauptsächlich durch diese reaktiven niedermolekularen Platinverbindungen bedingt sind. Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zeigten auch, dass niedermolekulare Platinkomplexe in der Regel besser aufgenommen werden als makromolekulare Platinkomplexe. Der Anteil der makromolekularen

Platinkomplexe an der intrazellulären Platinkonzentration wird somit wahrscheinlich gering sein, so dass eine Beeinflussung des Resistenzgrades nicht zu erwarten ist. Diese Befunde bestätigen allerdings die prinzipielle Eignung der PEG-Platinkomplexe als hydrolytisch aktivierbare Prodrugs.

### 7.2.5 Diskussion der Tierversuche

Zeitgleich mit dieser Arbeit wurden in einem Tierversuch die beiden Prodrugs PL04 und PL07 bezüglich ihrer antitumoralen Wirksamkeit an tumortragenden Nacktmäusen (MaTu, humanes Mammakarzinom) im Vergleich zu Carboplatin getestet. Die Ergebnisse dieser Versuche<sup>176</sup>, die von der Arbeitsgruppe Kratz initiiert wurden, werden im Folgenden als Diskussionsgrundlage wiedergegeben.

Beide albuminbindende Platinkomplexe wurden in Dosen von 2 · 50 mg/kg (Tag 7, 14) bzw. 3 · 25 mg/kg (Tag 7, 14, 21) intravenös (als Carboplatin-Äquivalente) appliziert. Diese Dosierungen stützten sich auf die Ergebnisse einer vorgelagerten Toxizitätsstudie, bei der gesunde Mäuse jeweils mit 1 · 50 mg/kg und 1 · 100 mg/kg behandelt wurden. Carboplatin wurde in gleichen Dosierungen und zusätzlich mit einer Dosierung von 2 · 75 mg/kg (der MTD von Carboplatin) verabreicht. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 7-11 und Tab. 7-3 zusammengefasst.

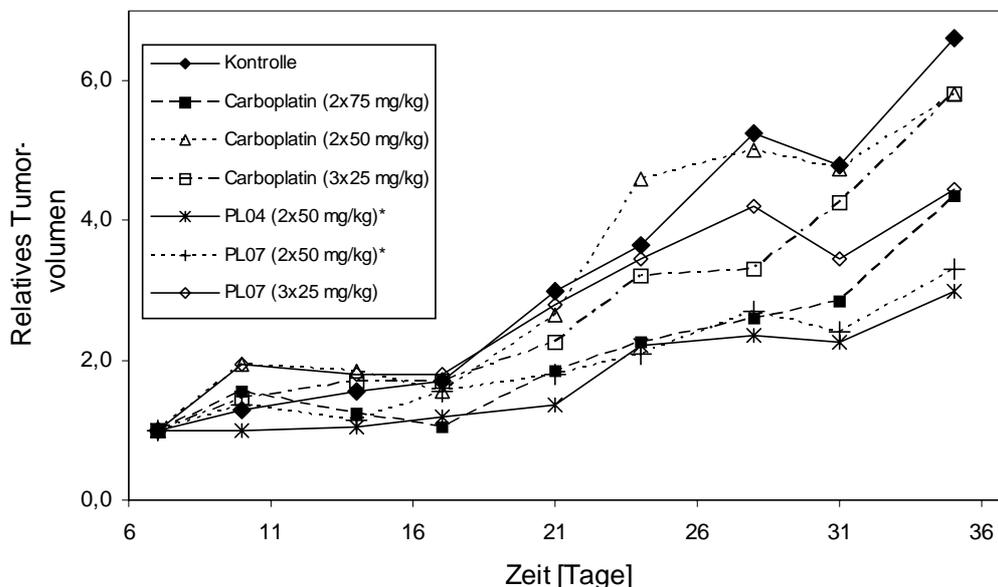


Abb. 7-11: Hemmung des Tumorwachstums bei tumortragenden Nacktmäusen während der Therapie mit PL04, PL07 und Carboplatin (\* = signifikant gegenüber Kontrolle,  $p \leq 0.05$ ).

Tab. 7-3: Zusammenfassung der Ergebnisse des Tierversuchs.

Verbindung	Tag der Behandlung	Einzel-dosis <sup>a</sup> [mg/kg]	Gesamt-dosis <sup>a</sup> [mg/kg]	Todes-fälle	Änderung Körpergewicht [%] (Tag)	Inhibition Tumorwachstum [%] maximal (Tag)
Puffer	7,14,21	–	–	0	0 (14)	–
Carboplatin	7,14	75	150	0	-8 (14)	50 (28)
Carboplatin	7,14	50	100	0	-6 (10)	88 (21)
Carboplatin	7,14,21	25	75	0	-6 (17)	63 (28)
PL04	7,14	50	100	0	-15 (17)	45 (28)*
PL04	7,14,21	25	75	2	nicht bestimmt	nicht bestimmt
PL07	7,14	50	100	0	-8 (17)	50 (31)*
PL07	7,14,21	25	75	0	-6 (17)	67 (35)

<sup>a</sup> Dosen beziehen sich auf Carboplatin-Äquivalente

\* signifikant gegenüber Kontrolle ( $p < 0.05$ )

Die Behandlung der Mäuse mit Carboplatin resultierte bei den niedrigen Dosierungen in einer geringen Hemmung des Tumorwachstums (Abb. 7-11). Lediglich bei der höchsten Dosis (2 · 75 mg/kg) zeigte Carboplatin eine moderate Aktivität (maximale Inhibition des Tumorwachstums  $T/C$  max. = 50 %). Eine ähnliche Hemmung des Tumorwachstums nach 36 Tagen wurde nach Behandlung mit Prodrug PL07 bei niedrigerer Dosierung (3 · 25 mg/kg) beobachtet (Prodrug PL04, das ebenfalls bei einer Dosierung von 3 · 25 mg/kg verabreicht wurde, produzierte 2 Todesfälle; die Ergebnisse sind daher nicht abgebildet).

Beide Prodrugs erzielten bei der höheren Dosierung 2 · 50 mg/kg die höchste antitumorale Aktivität, die sich in einer Hemmung des Tumorwachstums auf 45 bzw. 50 % gegenüber der Kontrolle äußerte. Dieser Effekt erwies sich als statistisch signifikant ( $p \leq 0.05$ ), wogegen die Behandlung mit Carboplatin bei keiner Dosierung eine signifikante Wirksamkeit gegenüber der Kontrolle erbrachte.

PL07 zeigte sich ähnlich toxisch wie Carboplatin (gemessen an der relativen Gewichtsveränderung). PL04 erwies sich als deutlich toxischer. Bei einer Dosierung von 3 · 25 mg/kg verursachte dieses Prodrug zwei Todesfälle.

Diese Ergebnisse überraschten und erwiesen sich als nicht konsistent mit den durchgeführten In-vitro-Untersuchungen der albuminbindenden Platinkomplexe. Aufgrund der fehlenden Aktivierbarkeit der Platin-Albumin-Komplexe wäre eine geringere Wirksamkeit erwartet worden. Zur Interpretation dieser Ergebnisse müssen verschiedene Aspekte diskutiert werden. Nicht immer lassen sich *in vitro* erzielte Ergebnisse mit In-vivo-Daten korrelieren<sup>237,238</sup>. Pharmakokinetik und Metabolismus der untersuchten Substanzen, zusammen mit der komplexen Physiologie vieler solider Tumoren (z.B. verschiedene Kompartimente im Tumor, Verteilungsbarrieren, Elektrolytverschiebungen) lassen sich in Zellkulturversuchen nicht simulieren. Diese Problematik trifft besonders auf die makromolekularen Verbindungen zu. Ihre pharmakokinetischen Besonderheiten, insbesondere die Anreicherung im Tumorgewebe über den EPR-Effekt und die in der Regel lange Halbwertszeit, erschweren eine Voraussage<sup>162,239</sup>. Für verschiedene PEG-Zytostatika-Komplexe wurde z.B. gezeigt, dass Verbindungen mit einem hohen Molekulargewicht, die im Zellversuch nahezu unwirksam waren, im Tierversuch eine hohe Wirksamkeit aufwiesen<sup>240</sup>.

Ein weiterer Aspekt ist, dass eine Aktivierung der makromolekularen Albuminkomplexe *in vivo* auch auf vielfältig andere Art als vorher postuliert – z.B. durch einen enzymatischen Abbau von Albumin in den Lysosomen, Einwirkung von membranständigen Enzymen oder einer gesteigerten Metabolisierung in der Leber – vonstatten gehen könnte. Mit der Mikrodialysekammer können, wie bereits diskutiert, nur genau definierte Mechanismen überprüft werden.

Allerdings kann bei den vorliegenden Tierversuchen auch nicht ausgeschlossen werden, dass eine ungebundene Zytostatikafraktion für die Wirksamkeit der Albumin-Platinkomplexe verantwortlich war. Rein rechnerisch ist eine Überdosierung gegeben. Bei einem durchschnittlichen Blutvolumen von 90 ml/kg bei der Maus<sup>241</sup> und einer Dosierung von 50 mg/kg (= 50 mg/90 ml Blut) Carboplatinäquivalent (M, 371,25 Da) ergibt sich eine theoretische Konzentration von 1,5 mM der Prodrugs nach intravenöser Gabe. Wird von einer durchschnittlichen Konzentration von 600 µM Albumin im Plasma ausgegangen – die Konzentration liegt bei der Maus eher etwas tiefer<sup>242</sup>) – muss selbst bei einer vollständigen Bindung an Albumin mit 60 % freier Substanz gerechnet werden. Dabei ist unklar, wie der Anteil an bindungsfähigem Mercaptalbumin am Mausalbumin ist. Humanes Serumalbumin besteht *in vivo* aus einer Mischung aus 70 % Mercaptalbumin und 30 % Nicht-

Mercaptalbumin, in dem das Cystein in Position 34 oxidiert vorliegt<sup>216,218,243</sup>. Ist dieses Verhältnis in der Maus ähnlich, so erhöht sich der kalkulierte ungebundene Anteil von 60 auf ca. 70 %. Hinzu kommt, dass die Konzentration an Albumin im Vollblut geringer ist als die Konzentration im Plasma, die als Normwert zugrunde gelegt worden ist. Um diese Zweifel auszuräumen, sollten bei den nächsten Tierversuchen einige zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden. Vor Beginn der Versuche könnte der Anteil an Mercaptalbumin mit dem Ellman-Assay bestimmt werden, der zur Bestimmung der freien Sulfhydrylgruppen eingesetzt wird. Die Abnahme einer kleinen Menge Plasma zur Gewinnung von Ultrafiltrat würde Aufschluss über die ungebundene Zytostatikafraktion geben. Eine Methode zur Bestimmung der Platinkonzentration im Ultrafiltrat mittels Atomabsorptionsspektrometrie ist im Arbeitskreis bereits für humane Proben etabliert. Wünschenswert wäre auch eine Entnahme des Tumormaterials nach Abschluss der Tierversuche. Eine Analyse der Platinkonzentration könnte die höhere Kumulation im Tumorgewebe im Vergleich zu Carboplatin belegen.

### **7.2.6 Abschließende Beurteilung des Konzepts der makromolekularen Platinkomplexe**

Aus den Untersuchungen dieser Arbeit kann geschlossen werden, dass die albuminbindenden Platinkomplexe in ihrer jetzigen Form aufgrund der mangelnden Aktivierbarkeit nicht für das Prodrugkonzept geeignet sind. Die Ergebnisse der durchgeführten Tierversuche sind ohne zusätzliche Untersuchungen in Frage zu stellen. Allerdings bietet der Ansatz trotzdem einige Perspektiven. Im Sinne des ursprünglichen Konzepts sollte die Verbindung, wie in Kap. 7.2.3 diskutiert, modifiziert werden. Die Aktivierbarkeit neuer Verbindungen ließe sich leicht in der Mikrodialysekammer überprüfen. Bei Erfolg wäre es dann lohnenswert, die Tierversuche wie in Kap. 7.2.5 vorgeschlagen, durchzuführen.

Es sollte aber auch noch einmal überdacht werden, wie die Erfolgsaussichten solcher Substanzen angesichts offensichtlicher Problematiken für die humane Anwendung sind. Einige wesentliche Punkte seien im Folgenden kurz angeführt.

- Die als viel versprechend angesehenen Platinkomplexe benötigen einen relativ stabilen austauschbaren Liganden, der vermutlich Voraussetzung für eine geringe Proteinbindung ist. Solche Platinkomplexe zeigen häufig auch eine geringe Reaktivität und werden deshalb hoch dosiert. Eine hohe Dosierung der albuminbindenden Platinkomplexe führt zu einer Auslastung der Kapazität der Albuminbindung. Diese Problematik lässt sich am Beispiel von Carboplatin verdeutlichen. Die maximale Dosis liegt bei ca. 800 mg absolut. Bei einem  $M_r$  von 371,25 Da und 5 Liter durchschnittlichem Blutvolumen entspricht dies einer Konzentration von 430  $\mu\text{M}$ . Ein vergleichbarer albuminbindender Komplex sollte ähnlich dosiert werden können. Die durchschnittliche Serumalbuminkonzentration liegt bei 600  $\mu\text{M}$ . Bei einem Anteil von 70 % Mercaptalbumin (vgl. Abschnitt 7.2.1) ist von 420  $\mu\text{M}$  bindungsfähigem Albumin auszugehen. Nach der theoretisch angenommenen, vollständigen Bindung eines carboplatinähnlichen, albuminbindenden Komplexes wäre die Kapazität der Albuminbindung erschöpft.
- Die meisten Tumorpatienten haben begleitende Erkrankungen. Eine tumorbedingte Kachexie führt z.B. oft zu einem schlechten Ernährungszustand. Die Mangelernährung ist häufig mit einer Hypoalbuminämie<sup>244,245</sup> verbunden. Auch andere Begleiterkrankungen, wie Entzündungsreaktionen und fortgeschrittene Niereninsuffizienz (Nebenwirkung vieler Zytostatika), erniedrigen die Serumalbuminkonzentration<sup>246,247</sup>. Diese pathologischen Veränderungen würden zur Ausnutzung des Prodrugkonzepts eine Albuminbestimmung und eine Dosisindividualisierung erfordern.
- Der Anteil an verfügbarer (reduzierter) Sulfhydrylfunktion (Cystein<sup>34</sup>) als Bindungsstelle für die albuminbindenden Platinkomplexe ist variabel. Das Alter der Patienten hat nach den Ergebnissen einer Studie von Era et al. großen Einfluss auf die Zusammensetzung des Albumins. Bei älteren Patienten (60-90 Jahre) fanden sich deutlich geringere Anteile (48 %) an Mercaptalbumin<sup>243</sup>. Das Verhältnis von Mercaptalbumin zu Albumin kann auch pathologisch verändert sein. Bei Diabetikern und Patienten mit Mangelernährung wurde ebenfalls eine niedrigere Konzentration an Mercaptalbumin berichtet<sup>248,249</sup>. Krebspatienten erhalten im Normalfall eine Kombinations-

chemotherapie und häufig supportiv weitere Arzneimittel. Neben einer möglichen physiologisch oder pathologisch bedingten veränderten Zusammensetzung des Albumins muss zusätzlich eine Proteinbindung dieser Arzneistoffe, eventuell unter Beteiligung des Cysteins<sup>34</sup>, berücksichtigt werden. Daraus folgt die Notwendigkeit der Bestimmung des bindungsfähigen Mercaptalbumins vor jeder Applikation.

- Albumin besitzt eine Halbwertszeit von ca. 19 Tagen. Dies würde bedeuten, dass unter der Annahme einer nahezu vollständigen Beladung, ausgeglichener Neusynthese und unverändertem Abbau des modifizierten Albumins, nach 95 Tagen (5 Halbwertszeiten) keine Platinkomplexe mehr gebunden sein dürften. Erst dann stünde die Ausgangsmenge an kopplungsfähigem Albumin für einen zweiten Zyklus zur Verfügung.

Diese Kritikpunkte führen zu der Schlussfolgerung, dass das Konzept der albuminbindenden Platinkomplexe in der Praxis mit einem aufwändigen Monitoring verbunden sein muss, wenn nicht ein gewisser Anteil an ungebundener Substanz billigend in Kauf genommen werden soll. Da dies bei hoch toxischen Substanzen (vgl. PL04 im Tierversuch) zu einer nicht vorhersagbaren Toxizität führen kann, werden Zulassung und klinische Akzeptanz schwierig zu erreichen sein.

Deshalb könnten klar definierbare synthetische makromolekulare Platinkomplexe oder *ex vivo* hergestellte Platin-Biopolymer-Komplexe (Albumin) die besseren Alternativen zur Ausnutzung der physiologischen Besonderheiten solider Tumore darstellen. Natürlich sind auch hier viele Schwierigkeiten zu überwinden.

Bei *ex vivo* hergestellten Platinkomplexen mit Biopolymeren wird immer die Gefahr einer irreversiblen Bindung des Platins an reaktive Strukturen des Biopolymers bestehen. Die meisten Biopolymere mit ausreichendem Molekulargewicht, die als Träger in Frage kommen sind Proteine (z.B. Albumin und Transferrin), welche Aminosäuren wie Cystein, Methionin oder Histidin enthalten, die als potentielle Bindungspartner der Platinkomplexe (Cisplatin) bekannt sind. Die Herausforderung, die sich daraus ergibt wird sein, eine definierte Beladung und ausreichende Stabilität der Platin-Biopolymer-Komplexe zu gewährleisten. Bisher sind, wahrscheinlich vor dem Hintergrund dieser Problematik, bis auf die untersuchten Komplexe keine Versuche dieser Art mit Platinkomplexen publiziert worden.

Synthetische Polymere besitzen den Vorteil einer definierten Struktur, Beladung und Wirkstofffreisetzung sind daher einfacher zu steuern. Allerdings kommen als Träger für Platinkomplexe nur solche Polymere in Frage, die keine reaktiven funktionellen Strukturen (Nukleophile) besitzen, an denen die Platinkomplexe kovalent binden können. Wie die Ergebnisse mit dem PEG-Platinkomplex zeigten, könnten solche Platinkomplexe die notwendigen Voraussetzungen zur Ausnutzung des EPR-Effekts der soliden Tumoren mitbringen. Strukturelle Optimierungen aufgrund von In-vitro-Untersuchungen, wie z.B. Ergebnisse mit Hilfe der Mikrodialysekammer, sollten sich wegen der einheitlichen Struktur leichter realisieren lassen als mit Biopolymeren.

Bisher gibt es nur wenige Veröffentlichungen, die sich mit makromolekularen Platinkomplexen befassen, wobei viele der untersuchten Komplexe zu klein sein dürften, um effektiv über den EPR-Effekt im Tumor angereichert zu werden. Die Tab. 7-4 gibt einen Überblick über wesentliche Arbeiten zu makromolekularen Platinkomplexen der letzten Jahre.

Tab. 7-4: Wichtige Arbeiten zu makromolekularen Platinkomplexen.

Referenz	Polymer	Aktivierung	Intention	System	Anmerkungen
Uchino et al. 2005 <sup>250</sup>	Micelle PEG- PEG(Glu)	Hydrolyse	EPR-Effekt Toxizität↓ Ansprechen Zytotox.↑	Maus Zellen	+ Gute antitumorale Aktivität- + Geringe systemische Toxizität - Kumulation in der Leber
Stathopoulos et al. 2005 <sup>251</sup>	Liposomen	Unklar Membran- verschmelz- ung? Endozytose?	EPR-Effekt Toxizität↓ Dosis- findung (Phase I)	Mensch	+ Geringe Toxizität - Keine Stabilitätsdaten angegeben
Smit et al. 2005 <sup>252</sup>	Polyaspart- amid	Hydrolyse	Toxizität↓	Maus	- Für EPR-Effekt zu klein (25 kDa) - Keine Stabilitätsdaten - Kumulation in der Leber - Kumulation in der Niere

Jun et al. 2005 <sup>253</sup>	Polyphosphazen (Glutamin)	Hydrolyse	EPR-Effekt Zytotox.↑	Maus Zellen	+ Kumulation im Tumor belegt + Hohe Zytotoxizität in Tumorzellen - Keine Toxizitätsdaten
Ren et al. 2005 <sup>254</sup>	PEG	Hydrolyse	Zytotox.↑	Zellen	- Für EPR-Effekt zu klein (4-10 kDa) - Keine Stabilitätsdaten - Nur 2 Platinkomplexe pro PEG
Rademaker-Lakheiet al 2004 <sup>149</sup>	Polyacrylamid	Spaltung durch Peptidasen	EPR-Effekt Toxizität↓ Dosisfindung (Phase I)	Mensch	+ Geringe Toxizität - Keine Response - Für EPR-Effekt zu klein (25 kDa)
Aronov et al 2004 <sup>255</sup>	PEG	Gezielte Freisetzung im Nukleus	EPR-Effekt Toxizität↓ Zytotox.↑	Zellen	+ Akkumulation im Nukleus belegt - Geringe (!) Adduktbildung - Für EPR-Effekt zu klein (25 kDa)
Furin et al 2003 <sup>256</sup>	PEG	Gezielte Spaltung durch lysosomale Peptidasen (Cathepsin) sowie Hydrolyse	Toxizität↓ Zytotox.↑	Zellen Maus	+ Stabilitätsdaten gezeigt - Für EPR-Effekt zu klein (4-10 kDa) - Aktivität nur (!) für Substanz ohne Peptidstruktur gezeigt
Nakamura et al 2002 <sup>257</sup>	Cisplatin beladene Mikrosphären			Maus	Direkte tumorale Injektion + Kumulation in den Lymphknoten + Gute antitumorale Aktivität
Ichinose et al 2000 <sup>258</sup>	Dextran	Hydrolyse	EPR-Effekt Toxizität↓ Zytotox.↑	Maus	+ Gute antitumorale Aktivität - Kumulation in der Leber - Kumulation in der Niere

Es fällt auf, dass das Interesse an makromolekularen Platinkomplexen in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat. Allerdings verwundert es, dass nach viel versprechenden veröffentlichten präklinischen Daten – insbesondere über Dextrane

als Trägersysteme – zu einigen Substanzen keine weiteren Veröffentlichungen zu finden sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass negative Ergebnisse (im Sinne eines Publikationsbias) nicht weiter publiziert wurden. Auffallend ist auch das häufige Auftreten einer Kumulation in der Leber. Mit diesem Phänomen muss bei makromolekularen Substanzen anscheinend immer gerechnet werden.

Nur zwei dieser makromolekularen Verbindungen, AP5280 und die liposomale Verbindung Lipoplatin<sup>®</sup> wurden bisher in klinischen Studien getestet.

Interessant ist, dass in keiner der aufgeführten Veröffentlichungen resistente Zellen oder Tumore in die Untersuchungen einbezogen wurden. Makromolekulare Platinkomplexe, die zur Überwindung der Resistenz durch Ausnutzung alternativer Aufnahmemechanismen synthetisiert wurden, sind bisher nicht bekannt. Wie bereits diskutiert, wären mehrfach beladene, makromolekulare Platinkomplexe mit gezielter intrazellulärer Freisetzung erste Strukturen, die geeignet sein könnten. Dieses Ziel ist ebenfalls am ehesten mit synthetischen Polymeren zu erreichen. Auch hier wäre es natürlich sinnvoll und wünschenswert, *erst* In-vitro-Versuche – wie z.B. die Mikrodialysekammerversuche und Zellkulturexperimente – zur Strukturoptimierung durchzuführen und *danach* Tierversuche zu initiieren.

### 7.3 Oxaliplatin-Analoga

Die Ergebnisse zur Aufnahme verschiedener niedermolekularer Platinkomplexe (vgl. Kap. 7.2.4), die nicht die erwartete Abhängigkeit von der Lipophilie zeigten, führten dazu, die Bedeutung der Lipophilie der Platinkomplexe anhand strukturell analoger Oxaliplatinderivate zu untersuchen. In Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Zusammenhang zwischen Lipophilie und Aufnahmekinetik in Tumorzellen systematisch anhand verschiedener strukturell verwandter Platinkomplexe analysiert. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob durch lipophilere Substanzen die Aufnahme gesteigert und, wie vielfach vermutet<sup>169-172</sup>, Resistenz, die vor allem mit verringerter Aufnahme einhergeht, überwunden werden kann.

Zurzeit werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die neben der passiven Diffusion an der Aufnahme der Platinkomplexe beteiligt sind (vgl. Kap. 1.4.2). Die wichtigsten Publikationen und Hypothesen sind als Diskussionsgrundlage in Tab. 7-5 gegenübergestellt.

Tab. 7-5: Veröffentlichungen zur Aufnahme verschiedener Platinkomplexe.

Referenz	Postulierte Aufnahmemechanismen	Beeinflussende Substanzeigenschaften
Marverti et al. 1995 <sup>92</sup>	Nur passive Diffusion	Lipophilie, Molekülgröße, Ladung
Pereira-Maia et al. 2003 <sup>121</sup>	Transport der Aquakomplexe	Reaktivität
Guo et al. 2004 <sup>120</sup>	Bindung am CTR1 und Stabilisierung eines Ionenkanals	Reaktivität
Holzer et al. 2004 <sup>119</sup>	Bindung am CTR1 und Endozytose des Rezeptorkomplexes	Reaktivität
Yonezawa et al. 2006 <sup>97</sup>	Transport von Cisplatin und Oxaliplatin durch OCT	Strukturelle Unterschiede
Zhanget et al. 2006 <sup>98</sup>	Transport von Cisplatin und Oxaliplatin durch OCT	Strukturelle Unterschiede
Holzer et al. 2006 <sup>259</sup>	Transport von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin durch CTR1, Oxaliplatin zusätzlich ungeklärter Mechanismus	Reaktivität Strukturelle Unterschiede

### 7.3.1 Vergleich der Reaktivität

Mehrere Autoren kommen zu dem Schluss, dass die zelluläre Aufnahme der Platinkomplexe von der Reaktivität gegenüber Nukleophilen, bzw. der Bindung an methioninreiche Strukturen des CTR1 abhängig ist. Unabhängig davon, ob nun nach Guo et al.<sup>120</sup> ein Ionenkanal stabilisiert wird, oder nach Holzer et al.<sup>119</sup> eine Endozytose des Rezeptorkomplexes erfolgt, wäre es nahe liegend, dass die höhere Reaktivität eines Platinkomplexes zu einer vermehrten Bindung an diese methioninreichen Strukturen und damit zu einer erhöhten Aufnahme führt. Zusätzlich ist die Reaktivität ein Faktor, der entscheidenden Einfluss auf die Zytotoxizität der Platinkomplexe hat. Gerade Platinkomplexe mit sehr großen (KP1480/1475) oder aromatischen (KP1476) Substituenten könnten durch sterische Abschirmung des Platinkomplexes vor nukleophilen Angriffen (vgl. Carboplatin) eine erniedrigte, oder durch einen stärkeren trans-Effekt eine erhöhte Reaktivität aufweisen.

Alle untersuchten Oxaliplatin-Analoga zeigten eine vergleichbare Reaktivität gegenüber den Nukleotiden dAMP und dGMP. Vermutlich sind die Substituenten an

Position 4 des neutralen DACH-Liganden zu weit vom Platin-Zentralatom und dem austauschbaren Oxalatliganden entfernt, um die Reaktivität gegenüber Nukleotiden unter In-vitro-Bedingungen messbar zu beeinflussen. Folglich kann die Reaktivität als möglicher Einflussfaktor bei der Interpretation der Ergebnisse vernachlässigt werden.

### 7.3.2 Beziehungen zwischen Lipophilie und zellulärer Aufnahme

Die Substanz KP1475 wird aufgrund ihrer Besonderheiten in Kap. 7.3.3 gesondert diskutiert. Dies gilt ebenfalls für bestimmte Merkmale der Substanz KP1480.

Zur Untersuchung der Aufnahmekinetik der Oxaliplatin-Analoga in Tumorzellen wurde die intrazelluläre Platinkonzentration nach 10, 60 und 120 Minuten ermittelt. Die Untersuchung ergab eine schnelle frühe Aufnahmephase und eine langsamere zweite Phase mit annähernd linearer Zunahme der Platinkonzentration in der sensitiven wie auch in der resistenten Zelllinie mit steigender Inkubationszeit. Die Aufnahme in die resistenten Zellen war in allen Untersuchungen (bis auf KP1480) deutlich eingeschränkt. Die frühe Aufnahmephase unterschied sich zwischen den Substanzen deutlich, die zweite Phase schien – erkennbar an einem parallelen Verlauf – vergleichbar.

#### Aufnahmegeschwindigkeit

Die annähernd lineare Zunahme der Platinkonzentration in der zweiten Aufnahmephase wurde schon häufig beschrieben und auch von J. Zisowsky für Cisplatin in den verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und A2780cis bestätigt<sup>85,203</sup>. Zur Ermittlung der Aufnahmegeschwindigkeit in dieser Phase wurde eine lineare Regression durchgeführt. Die ermittelte Steigung entspricht der Aufnahmegeschwindigkeit  $v$  ( $\text{ng Platin} \cdot 10^6 \text{ Zellen}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

Die Untersuchung der Beziehung zwischen der Lipophilie der Oxaliplatin-Analoga und der Aufnahmegeschwindigkeit ergab keine statistisch signifikante Korrelation. Die Aufnahmegeschwindigkeit ist dementsprechend unabhängig von der Lipophilie. Aus der erkennbaren Parallelverschiebung der zweiten Aufnahmephase, die in einer vergleichbaren Aufnahmegeschwindigkeit (Steigung der Regressionsgraden) der Platinkomplexe resultiert, wird deutlich, dass die Aufnahme durch die unterschiedliche Substitution am DACH-Liganden weitgehend unbeeinflusst bleibt.

Diese Beobachtungen liefern einen Hinweis auf die möglichen beteiligten Mechanismen. Die Annahme der passiven Diffusion als dominanter Aufnahmeweg ist unwahrscheinlich. Aufgrund der unterschiedlichen Lipophilie und der ähnlichen Molekülgröße hätten nach Gl. 1.2 verschiedene Aufnahmegeschwindigkeiten beobachtet werden müssen.

Gegen den Transport über organische Kationentransporter (OCT) spricht dessen Substratspezifität, welche dieser Transporter nach ersten Erkenntnissen für Platinkomplexe aufweist<sup>97,98</sup>. Aufgrund der unterschiedlichen und zum Teil sperrigen Substituenten (KP1476, KP1480) würde es verwundern, wenn hier kein Einfluss bestünde. Der Transport als Aquakomplex über einen eigenen spezifischen Transporter ist ebenfalls wenig plausibel. Es gelten die gleichen Anmerkungen, die schon für den OCT-Transporter gemacht wurden. Die großen strukturellen Unterschiede bleiben nach Hydrolyse des Oxalatliganden bestehen. Allerdings könnte es sich bei der Hydrolyse um einen vorgelagerten Prozeß handeln, welcher der Bindung an Transporter vorausgeht, da Aquakomplexe hoch reaktive Verbindungen darstellen.

Die vergleichbare Aufnahmegeschwindigkeit der Oxaliplatin-Analoga lässt sich somit am ehesten mit einer Beteiligung des Kupfertransporters 1 (CTR1) erklären. Nach der Bindung an diesen Transporter könnte die Aufnahme entweder über Endozytose oder durch Ionenkanalbildung erfolgen<sup>119,120</sup>, wie in Abb. 7-12 dargestellt ist.

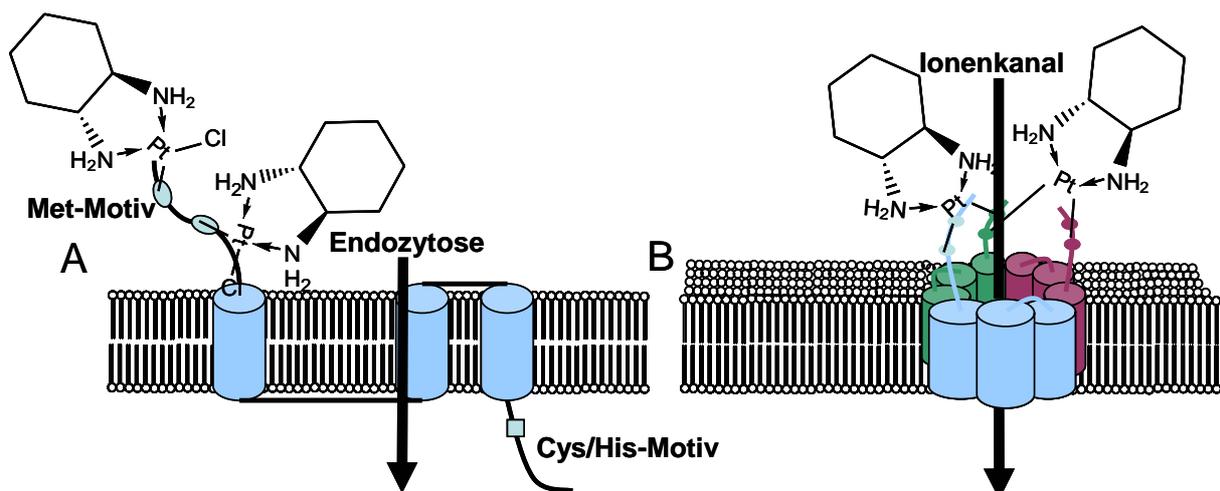


Abb. 7-12: Hypothese der CTR1 vermittelten Platinkomplexaufnahme.

Beide postulierten Mechanismen lassen sich in Einklang mit der strukturunabhängigen Aufnahmegeschwindigkeit bringen. Das Ausmaß der Bindung an die methioninreiche, extrazelluläre Domäne des Transporters sollte wegen der nahezu identischen Reaktivität der Oxaliplatin-Analoga und, da die Substituenten durch den neutralen DACH-Liganden räumlich von den austauschbaren Oxalatliganden getrennt vorliegen, ähnlich sein. Endozytische Vorgänge zeigen in der Regel ein lineares Aufnahmeverhalten<sup>91</sup>. Der Ionenkanal, der nach der Hypothese von Guo et al. durch die Quervernetzung dreier Untereinheiten stabilisiert wird, entspricht der biologisch aktiven Form des Kupfertransporters. Interessanterweise wurde die Struktur dieses Ionenkanals für den Kupfertransport erst 2006 belegt, zwei Jahre nachdem erstmals die Beteiligung des Ionenkanals am Transport von Cisplatin vorgeschlagen wurde<sup>105</sup>. Die ermittelte Porengröße von ~ 9Å (Angström) ist so groß, dass die Platinkomplexe strukturunabhängig durch passive Diffusion (die Lipophilie spielt hier im Gegensatz zur Diffusion durch eine Membran keine Rolle) in die Zelle gelangen könnten. Als weiteres Indiz für die Hypothese der Aufnahme über den CTR1-Transporter kann die von Kassack und Stratenschulte gefundene geringere Expression dieses Transporters in der verwendeten resistenten Zelllinie A2780cis angesehen werden, welche die verringerte Aufnahme der Platinkomplexe erklären würde<sup>260</sup>.

Allerdings muss angemerkt werden, dass es natürlich auch denkbar ist, dass die beobachtete Kinetik der Aufnahme aus einer Überlagerung mehrerer Mechanismen resultiert. So zeigten Holzer et al., dass in einer murinen Fibroblastenzelllinie ein weiterer Transportprozess den CTR1 vermittelten Transport konzentrationsabhängig überlagerte<sup>259</sup>. Um den Beitrag von CTR1 an der Aufnahme der Platinkomplexe genauer einschätzen zu können, sollten weitere spezifische Experimente durchgeführt werden. Hier böte sich eine Überexpression oder Inhibition von CTR1 an. Eine veränderte Aufnahmekinetik der Oxaliplatin-Analoga könnte dann Rückschlüsse auf die Rolle von CTR1 erlauben.

Zusätzlich ist die Frage interessant, welche Substanzeigenschaften die zweite Aufnahmephase maßgeblich beeinflussen. Aus der Annahme des CTR1 vermittelten Transports, der von einer Bindung der Platinkomplexe ausgeht, ergibt sich ein möglicher Einfluss der Reaktivität gegenüber nukleophilen Strukturen als entscheidender Faktor für die Aufnahmegeschwindigkeit. Zur Überprüfung dieser

Hypothese bietet sich eine vergleichende Untersuchung strukturell verwandter Oxaliplatin-derivate mit unterschiedlicher Reaktivität an, die inzwischen geplant ist.

### **Frühe Aufnahme**

Zur besseren Beschreibung der initialen Aufnahme wurden die (rückextrapolierten) Ordinaten Schnittpunkte der berechneten Regressionsgeraden verwendet. Möglich ist dieses Vorgehen nur, wenn die erste Aufnahmephase eine höhere Aufnahmegeschwindigkeit als die zweite Phase besitzt und die zweite Phase einen linearen Verlauf nimmt. Dann ist die ermittelte Konzentration (der Ordinaten Schnittpunkt) ein Maß für die Menge Platin, welche durch den ersten, schnelleren Prozess in die Zelle gelangt.

Die höchstsignifikante Korrelation unter Berücksichtigung aller untersuchter Platinkomplexe, die zwischen der Lipophilie der Platinkomplexe und den ermittelten Ordinaten Schnittpunkten gefunden wurde, könnte ein Indiz für eine passive Diffusion der Platinkomplexe durch die Zellmembran sein, welche somit die Kinetik der frühen Aufnahmephase bestimmen würde.

Es ist jedoch auch möglich, dass die frühe Aufnahmephase nur eine schnelle lipophilieabhängige Verteilung in die äußere Zellmembran widerspiegelt, ohne dass die Platinkomplexe in das Zellinnere gelangen. Mit der verwendeten Methode der Platinbestimmung kann nicht unterschieden werden, wo das Platin lokalisiert ist.

Die frühe Aufnahmephase unterschied sich zwischen der resistenten und der sensitiven Tumorzelllinie nicht, sodass gefolgert werden kann, dass der Resistenzmechanismus, der verantwortlich für die geringere Aufnahme der Platinkomplexe ist, nur in der zweiten Aufnahmephase von Bedeutung ist.

### **7.3.3 Beziehungen zwischen Lipophilie, Zytotoxizität und Resistenz**

Aufgrund der beobachteten Konzentrationszunahme in den Aufnahmeversuchen und den bisher publizierten Ergebnisse ähnlicher Untersuchungen<sup>169,204</sup> wurde eine Zunahme der Zytotoxizität (sinkender  $EC_{50}$ ) mit steigender Lipophilie erwartet. Durch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration könnte auf diese Weise Resistenz, die vor allem mit verringerter Aufnahme der Platinkomplexe einhergeht, überwunden werden.

Die Untersuchung des Einflusses der Lipophilie auf die Zytotoxizität sollte die Frage einer möglichen Resistenzüberwindung in der verwendeten Ovarialkarzinomzelllinie klären.

### **Einfluss der Lipophilie auf die Zytotoxizität**

Überraschenderweise fand sich eine hohe, statistisch signifikante Korrelation mit negativem Korrelationskoeffizient zwischen der Lipophilie und den  $EC_{50}$ -Werten der Platinkomplexe. Daraus folgt ein inverser Zusammenhang: je höher die Lipophilie, desto weniger zytotoxisch sind die Platinkomplexe. Dieses Ergebnis kann verschiedene Ursachen haben. Ein offensichtlicher Mechanismus, der zu der geringeren Zytotoxizität führen könnte, wäre eine gesteigerte Ausschleusung (Efflux) der lipophileren Platinkomplexe. Eine weitere Möglichkeit, die aufgrund der Lipophilie wahrscheinlich erscheint, ist eine intrazelluläre Kompartimentierung der Platinkomplexe durch eine höhere Affinität zu Zellmembranen oder einen ATP7A bedingten erhöhten Einschluss in Vesikel<sup>129</sup> und ein damit verbundener Schutz der DNA vor der Platinierung.

Galanski et al. und Habala et al. führten Untersuchungen der Struktur-Aktivitätsbeziehung mit einem Teil der verwendeten Oxaliplatin-derivate in verschiedenen Zelllinien durch und folgerten aus ihren Ergebnissen, dass große, sterisch voluminöse Substituenten am DACH-Liganden die Zytotoxizität senken. Zusätzlich fanden sie eine höhere Aktivität der Substanzen mit axialer Substitution, wobei insbesondere KP1475 auffiel<sup>177,205</sup>. Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde das Molekulargewicht der Substanzen als einfaches Maß für die Größe der Substituenten mit den ermittelten  $EC_{50}$ -Werten korreliert. Ein Zusammenhang wurde jedoch nicht gefunden.

Der Frage nach dem Mechanismus, welcher für die geringere Zytotoxizität der lipophileren Platinkomplexe verantwortlich sein könnte, wurde durch vergleichende Untersuchung des lipophilsten Platinkomplexes KP1480 mit Oxaliplatin nachgegangen. Beide Substanzen zeigten einen ähnlichen, geringen Efflux nach 12-stündiger Auswaschphase, sodass die Hypothese einer gesteigerten Ausschleusung der lipophileren Substanzen vermutlich verworfen werden kann. Durch Untersuchung der gebildeten Platin-DNA-Addukte konnte nachgewiesen werden, dass KP1480 trotz der erhöhten zellulären Konzentration deutlich weniger Addukte (~ 50%) bildet.

Dies kann als Indiz für eine intrazelluläre Kompartimentierung gesehen werden. Eine durchgeführte Membranpräparation konnte dieses Ergebnis tendenziell bestätigen. Die lipophile Substanz KP1480 zeigte eine geringfügig höhere Anreicherung in den isolierten Membranen im Vergleich zu Oxaliplatin. Anhand der Ergebnisse der DNA-Platinierung wäre jedoch ein größerer Unterschied zu erwarten. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass Platinkomplexe, die über ATP7A in Vesikel aufgenommen wurden und somit nicht für eine Reaktion mit der DNA zur Verfügung stehen, durch die Membranpräparation vermutlich nicht extrahierbar sind, sondern in der zytosolischen Fraktion verbleiben. Daher ist die Aussagekraft sehr begrenzt.

Bei der Untersuchung der Aufnahme der Platinkomplexe fiel auf, dass der Platin-komplex KP1475 nach kurzer Zeit eine Ablösung der Zellen verursachte und zu vielfach höheren Platinkonzentrationen führte. Dies lässt eine Zellyse vermuten, die zur Nekrose führt und Grund für die – vor allem im Vergleich zum Stereoisomer KP1480 – hohe Zytotoxizität sein könnte. Der zugrunde liegende Mechanismus der Zytotoxizität wäre also unabhängig vom eigentlichen zytotoxischen Wirkmechanismus der Platinkomplexe zu sehen, sondern beruht wahrscheinlich eher auf einer Einlagerung in die Zellmembran und einer nachfolgenden, möglicherweise durch die axiale Substitution bedingte, Zerstörung dieser Membran. Somit ist diese Substanz zur Untersuchung von Struktur-Zytotoxizitätsbeziehungen analoger Platinkomplexe ungeeignet und wurde nicht weiter berücksichtigt. Rappel et al. konnten mittels einer kapillarelektrophoretischen Methode zeigen, dass Substanzen mit axialen und equatorialen Substituenten unterschiedlich mit organischen Mikrotröpfchen einer Mikroemulsion interagieren und folgerten aus diesen Ergebnissen bereits die Hypothese einer unterschiedlichen Reaktion mit Zellmembranen<sup>261</sup>. Dieser Effekt wird von I. Buß in der eigenen Arbeitsgruppe weiter untersucht.

Erwähnenswert ist, dass der membranersetzende Effekt in der resistenten Zelllinie deutlich schwächer ausgeprägt war (erkennbar an einem relativ hohen  $EC_{50}$ -Wert und Resistenzgrad). Dies deutet auf eine andere Membranzusammensetzung der resistenten Zelle hin, die schon aufgrund der eigenen Ergebnisse zur Inhibition der Endozytose mit  $\beta$ -Methylcyclodextrin postuliert wurde (vgl. Kap. 5.4.3.2).

### **Einfluss der Lipophilie auf Platinresistenz**

Der von Moeller et al. und Tallen et al. postulierte Zusammenhang zwischen einer Erhöhung der Lipophilie der Platinkomplexe und einer dadurch vermittelten Resistenzüberwindung wurde in der A2780-Ovarialkarzinomzelllinie nicht bestätigt<sup>169,204</sup>. Dieses Ergebnis spiegelt die Resultate der Zytotoxizitätsuntersuchungen und der weiterführenden Untersuchungen mit der Substanz KP1480 wider, die eine intrazelluläre Kompartimentierung und einen damit verbundenen Schutz der DNA vor der Platinierung nahelegen. Eine Beeinflussung der Resistenz wäre nur dann zu erwarten gewesen, wenn eine Erhöhung der Lipophilie der Platinkomplexe in sensitiven und resistenten Zellen einen unterschiedlichen Einfluss gehabt hätte. In beiden Zellen führte eine Erhöhung der Lipophilie jedoch gleichermaßen zu einer geringeren Zytotoxizität.

### **7.3.4 Abschließende Beurteilung des Konzepts der Strukturoptimierung durch Veränderung der Lipophilie**

Die Ergebnisse der Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, können als Hinweis gewertet werden, dass der Einsatz lipophilerer Oxaliplatin-Analoga bei Ovarialkarzinomen keinen Vorteil besitzt. Die erhoffte und auch gefundene erhöhte intrazelluläre Platinkonzentration war sowohl in der sensitiven als auch resistenten Zelllinie mit einer erniedrigten Zytotoxizität verbunden, die möglicherweise auf einer intrazellulären Kompartimentierung beruht. Maßgebliche Arbeiten, die zu einem anderen Schluss kommen, sollen kurz diskutiert werden.

Platts et al. fanden für fünf untersuchte Platinkomplexe in einer Ovarialkarzinomzelllinie eine exponentielle Abhängigkeit der zellulären Aufnahme von der Lipophilie<sup>262</sup>. Die durchgeführte Konzentrationsbestimmung, die nur an einem Zeitpunkt erfolgte (Endpunktmessung), erlaubt allerdings keine Aussage über eine zeitliche Entwicklung und verleitet zur möglicherweise fälschlichen Annahme einer unterschiedlichen Aufnahmegeschwindigkeit. Die Ergebnisse der eigenen Arbeit zeigen den gleichen Zusammenhang, der aber nur für die frühe Aufnahmephase gilt. Danach wurden keine Unterschiede der Aufnahmegeschwindigkeit zwischen verschiedenen Platinkomplexen gefunden. Somit ist es vorstellbar, dass die

Resultate von Platts et al. ebenfalls auf eine initiale, lipophilieabhängige Aufnahme (oder auch nur Kumulation in der Zellmembran) zurückzuführen sind.

Mertelle et al. zeigten eine lipophilieabhängige Aufnahme von Cisplatin, Oxaliplatin und Satraplatin in resistenten, nicht aber in sensitiven Plattenepithelkarzinomzellen<sup>172</sup>. Die Autoren vermuten die Beteiligung eines Ionenkanals oder Transporters in der sensitiven Zelllinie, die in der resistenten Zelllinie nicht mehr vorhanden ist. Dieses Ergebnis ist auch vor dem Hintergrund der Hypothese der reaktivitätsabhängigen Aufnahme interessant. Möglicherweise korreliert die Aufnahme in der sensitiven Zelllinie mit der unterschiedlichen Reaktivität dieser Verbindungen. Dieser Aspekt wurde in dieser Untersuchung jedoch nicht berücksichtigt.

Von den Autoren wird geschlussfolgert, dass eine Erhöhung der Lipophilie eine erhöhte Aufnahme in der resistenten Zelle bewirkt, die eine Resistenzüberwindung möglich macht. Anhand der Betrachtung der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse wird klar, dass solche Aussagen nicht einfach getroffen werden dürfen. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass eine Erhöhung der zellulären Aufnahme durch lipophilere Komplexe in der untersuchten Ovarialkarzinomzelllinie nur sehr begrenzt möglich ist. Die maximalen Konzentrationsunterschiede, welche durch die Verwendung lipophilerer Substanzen erreichbar sind, werden nur von der initialen Aufnahme bestimmt, die sich zudem noch in den resistenten und sensitiven Zellen nicht unterschied. Weiterhin ist nicht gesichert, ob die gemessene erhöhte Platinkonzentration auf eine erhöhte Aufnahme in die Zelle oder auf eine Kumulation in Zellmembranen beruht. Auch die Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen, aus denen eine geringere Zytotoxizität der lipophileren Platinkomplexe hervorgeht, könnten auf eine Kumulation hindeuten. Die Frage dabei muss deshalb sein, ob der Unterschied für die zytotoxische Wirkung *in vivo* relevant ist. Wenn die gemessene zusätzliche Platinaufnahme biologisch aktiven Platinkomplexen entspricht, dürfte die Relevanz *in vivo* sowohl von der Halbwertszeit der Substanz wie auch von der Dauer der Exposition der jeweiligen Zellen, also dem Konzentrationsverlauf am Wirkort abhängig sein. Sind die Zellen dem Platinkomplex nur kurz ausgesetzt, könnte eine erhöhte Platinierung der DNA durch die höhere intrazelluläre Konzentration des Platinkomplexes entscheidend sein. Je länger die Zellen den Platinkomplexen ausgesetzt sind, desto unbedeutender sind die Unterschiede in der initialen

Aufnahme für die insgesamt aufgenommene Platinmenge. Eine eindeutige Antwort auf die Frage, ob der Unterschied in der initialen Aufnahme für die zytotoxische Wirkung relevant ist, ließe sich deshalb nur durch die Aufnahme eines Konzentrations-Zeit-Profiles und der Platinierung der DNA in Tumorzellen *in vivo* gewinnen.

Ein weiterer Aspekt, der berücksichtigt werden muss ist, dass eine erhöhte Aufnahme nicht spezifisch für Tumorzellen ist. Wie der Einfluss der Erhöhung der Lipophilie auf die Toxizität ist, bliebe abzuwarten. Eine Untersuchung von Screnci et al. fand allerdings einen inversen (!) Zusammenhang zwischen der Lipophilie und der Platinkonzentration in unterschiedlichen Nervenzellen der Ratte<sup>76</sup>. Konsequenterweise wurde auch keine Korrelation mit der Neurotoxizität festgestellt.

In dieser Studie korrelierte eine Zunahme der Toxizität eher mit einer höheren Reaktivität der Verbindungen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte aber auch berücksichtigt werden, dass die Untersuchungen nur mit einer Zelllinie durchgeführt wurden. Möglicherweise reagieren verschiedene Zellen sehr unterschiedlich auf eine Zunahme der Lipophilie. Dies gilt auch für verschiedene Tumorentitäten. Für die praktische Anwendung ergibt sich daraus die Notwendigkeit, zu identifizieren, welche Mechanismen eine geringere Zytotoxizität der lipophileren Substanzen verursachen und welche Resistenzmechanismen durch den Einsatz lipophilerer Substanzen überwunden werden können. Danach sollte untersucht werden, ob es Tumoren gibt, deren Resistenzentwicklung hauptsächlich mit diesen Resistenzmechanismen assoziiert ist. In solchen Tumoren könnte ein Einsatz lipophilerer Substanzen von Vorteil sein.

## 8 Zusammenfassung

Der Einsatz der Platinkomplexe in der Chemotherapie wird durch ihre Toxizität und primäre oder sekundäre Resistenz limitiert. Im Fokus dieser Arbeit standen zwei Ansätze, mit denen die Wirkung der Platinkomplexe optimiert werden könnte.

Der erste Ansatz beruht auf anatomischen Unterschieden zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe solider Tumore, aufgrund derer makromolekulare Substanzen im Tumor kumulieren können (EPR-Effekt). In der vorliegenden Arbeit wurden Platinkomplexe untersucht, die nach intravenöser Applikation gezielt an Albumin binden und *in vivo* ein Biopolymer als makromolekulares Prodrug bilden. Zusätzlich wurde ein makromolekularer PEG-Platinkomplex als vollsynthetische Alternative in die Untersuchungen einbezogen. Der zweite Ansatz beruht auf der strukturellen Abwandlung bekannter Platinkomplexe. Durch Steigerung der Lipophilie soll die Aufnahme in Tumorzellen erhöht und Resistenz, die mit einer erniedrigten Platinaufnahme einhergeht, umgangen werden. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden neue Oxaliplatin-Analoga untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurden verschiedene Methoden entwickelt oder optimiert und nach internationalen Richtlinien validiert. Dazu gehörte eine kapillarelektrophoretische Methode zur Analyse des DNA-Adduktumusters und der Reaktivität strukturell unterschiedlicher Platinkomplexe. Eine weitere kapillarelektrophoretische Methode diente zur Charakterisierung der Bindungskinetik an makromolekulare Träger. Mit einer Methode zur Quantifizierung von Fluorescein-Rinderserumalbumin wurden die Versuchsbedingungen zur Aufnahme makromolekularer Platinkomplexe optimiert. Die Etablierung eines Testsystems auf der Basis einer Gleichgewichtsmikrodialysekammer schaffte die Voraussetzung für eine Überprüfung postulierter Reaktionsmechanismen makromolekularer Platinkomplexe *in vitro*. Die Untersuchungen der albuminbindenden Platinkomplexe ergaben, dass die Bindung an Albumin zur Bildung des makromolekularen Prodrugs schnell und spezifisch verläuft. Allerdings führte dies zu einem deutlichen Aktivitätsverlust. Mit Hilfe der Mikrodialysekammer wurde gezeigt, dass die angenommene Aktivierung des Prodrugs durch hydrolytische Freisetzung eines reaktiven Platinkomplexes nicht in ausreichendem Maße stattfindet. Auch niedrigere pH-Werte oder die Anwesenheit einer Esterase als potentielle Einflussfaktoren hatten keinen aktivierenden Effekt. Der

PEG-Platinkomplex hingegen wies in diesem Testsystem eine hohe Reaktivität auf und bietet sich somit als mögliche Alternative an. Die zelluläre Aufnahme der makromolekularen Platinkomplexe wurde in cisplatin-sensitiven und -resistenten Tumorzellen untersucht. Ein wichtiger Resistenzmechanismus der Tumorzellen ist eine geringere Aufnahme niedermolekularer Platinkomplexe. Die makromolekularen Platinkomplexe zeigten keine eingeschränkte Aufnahme in resistente Zellen. Als maßgeblicher Aufnahmemechanismus dieser Substanzen wurde die Endozytose identifiziert. Zudem wurden Hinweise auf die Art der beteiligten Endozytoseprozesse erhalten. Durchgeführte Zytotoxizitätstests zeigten, dass die Bindung an Albumin zu einem geringeren Resistenzgrad führte, wobei die Konjugate allerdings nur noch wenig zytotoxisch wirkten. Der makromolekulare PEG-Platinkomplex hingegen erwies sich als wesentlich zytotoxischer, zeigte aber deutliche Kreuzresistenz zu Cisplatin.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die albuminbindenden Platinkomplexe in ihrer jetzigen Form nicht für das Prodrugkonzept geeignet sind. Synthetische Polymere weisen vermutlich günstigere Eigenschaften auf. Allerdings könnten sich strukturelle Modifikationen, die im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagen wurden, günstig auf eine Aktivierbarkeit der Albumin-Platinkomplexe auswirken. Des Weiteren entstand aus dieser Arbeit die Hypothese einer Resistenzüberwindung durch makromolekulare Platinkomplexe. Auch für solche Substanzen, die zur Resistenzüberwindung eingesetzt werden könnten, wurden Strukturvorschläge gemacht. Neue makromolekulare Verbindungen ließen sich mit den etablierten Methoden leicht überprüfen.

Im Rahmen der Untersuchungen der Oxaliplatin-Analoga wurde die Reaktivität der Verbindungen als möglicher Einflussfaktor auf die Aufnahme in Tumorzellen bestimmt und die Aufnahme in sensitive und resistente Tumorzellen charakterisiert. Anschließend wurde der Einfluss der Lipophilie der Platinkomplexe auf Aufnahme, Zytotoxizität und Resistenz untersucht. Alle untersuchten Oxaliplatin-Analoga zeigten eine vergleichbare Reaktivität. Die Untersuchungen zur Aufnahme der Oxaliplatin-Analoga weisen auf zwei differenzierbare Aufnahmephasen hin. Die frühe Aufnahme korrelierte dabei mit der Lipophilie der Platinkomplexe und unterschied sich zwischen sensitiven und resistenten Zellen nicht. Die Aufnahmegeschwindigkeit in der zweiten Aufnahmephase erwies sich als Lipophilie unabhängig und war zwischen den

Oxaliplatin-Analoga vergleichbar. Mit steigender Lipophilie nahm allerdings die Zytotoxizität der Platinkomplexe trotz einer erhöhten intrazellulären Platinkonzentration ab. Ein Zusammenhang zwischen einer Erhöhung der Lipophilie der Platinkomplexe und einer dadurch vermittelten Resistenzüberwindung zeigte sich nicht. Vergleichende Untersuchungen zwischen Oxaliplatin und dem lipophilsten Platinkomplex ergaben Hinweise auf eine intrazelluläre Kompartimentierung und einen damit verbundenen Schutz der DNA vor einer Platinierung. Die lipophileren Oxaliplatin-Analoga waren somit in den untersuchten Tumorzelllinien nicht von Vorteil.

Die Ergebnisse beider Teile der Arbeit können einen Beitrag zur Optimierung der Platinkomplexe leisten. Es zeigte sich, dass insbesondere die makromolekularen Platinkomplexe sowohl als Prodrugs als auch im Hinblick auf eine mögliche Resistenzüberwindung Potenzial besitzen und weiter untersucht werden sollten.

Auch die Ergebnisse der Untersuchungen der Oxaliplatin-Analoga können zur Entwicklung neuer Platinkomplexe beitragen. Weitere Versuche sollten den Einfluss der Lipophilie auf eine intrazelluläre Kompartimentierung abklären. Danach könnte untersucht werden, ob Tumorzellen verschiedener Tumorzelllinien vergleichbar auf eine Zunahme der Lipophilie reagieren. Sollten Tumorzelllinien identifiziert werden, in denen eine Erhöhung der Lipophilie der Platinkomplexe zu einer gesteigerten Zytotoxizität führt, ließen sich Tumoren selektieren, in denen der therapeutische Einsatz lipophilerer Substanzen von Vorteil ist.

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] Peyrone M. *Über die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür*. Ann Chem Pharm 1844; 51: 1-29
- [2] Rosenberg B. *Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on*. In: Lippert B (Hrsg.): Cisplatin - Helvetica Chimica Acta, Wiley-VCH, Zürich /Weinheim 1999; 3-27
- [3] Highley M, Calvert A. *Clinical experience with cisplatin and carboplatin*. In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): Platinum based drugs in cancer therapy - Humana Press, Totowa, New Jersey 2000; 171-194
- [4] Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L, Greco FA, Loehrer PJ. *Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide*. NEJM 1987; 316: 1435-1440
- [5] De Wit R. *Treatment of disseminated non-seminomatous testicular cancer: The European experience*. Semin Surg Oncol 1999; 17: 250-256
- [6] Giaccone G. *Clinical perspectives on platinum resistance*. Drugs 2000; 59: 9-17
- [7] O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. *Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs*. Drugs 2000; 59: 19-27
- [8] Schmoll HJ, Höfken K, Possinger K. *Epitheliale Ovarialkarzinome*. In: Kompendium Internistische Onkologie - Springer Verlag 1999; 426-439
- [9] Pfisterer J, du Bois A. *Taxane nicht mehr erste Wahl beim Ovarialkarzinom?* <http://www.ago-ovar.de/leitlinien/stellungnahme.html>, 2002
- [10] O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. *Clinical experience - DACH-based platinum drugs*. In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): Platinum based drugs in cancer therapy - Humana Press, Totowa, New Jersey 2000; 231-249
- [11] Ott I, Gust R. *Besonderheiten anorganischer Zytostatika. Medizinische Chemie der Platinkomplexe*. Pharm Unserer Zeit 2006; 35: 124-133
- [12] Ahn JH, Kang YK, Kim TW, Bahng H, Chang HM, Kang WC, Kim WK, Lee JS, Park JS. *Nephrotoxicity of heptaplatin: a randomized comparison with cisplatin in advanced gastric cancer*. Cancer Chemother Pharmacol 2002; 50: 104-110
- [13] Choi CH, Cha YJ, An CS, Kim KJ, Kim KC, Moon SP, Lee ZH, Min YD. *Molecular mechanisms of heptaplatin effective against cisplatin-resistant cancer cell lines: less involvement of metallothionein*. Cancer Cell Int 2004; 4: 6-18

- [14] Min YJ, Bang SJ, Shin JW, Kim dH, Park JH, Kim GY, Ko BK, Choi DH, Cho HR. *Combination chemotherapy with 5-fluorouracil and heptaplatin as first-line treatment in patients with advanced gastric cancer*. J Korean Med Sci 2004; 19: 369-373
- [15] Lee JW, Park JK, Lee SH, Kim SY, Cho YB, Kuh HJ. *Anti-tumor activity of heptaplatin in combination with 5-fluorouracil or paclitaxel against human head and neck cancer cells in vitro*. Anticancer Drugs 2006; 17: 377-384
- [16] Carr JL, Tingle MD, MCKeage MJ. *Satraplatin activation by haemoglobin, cytochrome C and liver microsomes in vitro*. Cancer Chemother Pharmacol 2006; 57: 483-490
- [17] Choy H. *Satraplatin: an orally available platinum analog for the treatment of cancer*. Expert Rev Anticancer Ther 2006; 6: 973-982
- [18] gpc.biotech. *Phase III SPARC Study*. <http://www.gpc-biotech.com>, 2006
- [19] Sternberg CN. *Satraplatin in the treatment of hormone-refractory prostate cancer*. BJU Int 2005; 96: 990-994
- [20] Sternberg CN, Whelan P, Hetherington J, Paluchowska B, Slee PH, Vekemans K, Van EP, Theodore C, Koriakine O, Oliver T, Lebwohl D, Debois M, Zurlo A, Collette L. *Phase III trial of satraplatin, an oral platinum plus prednisone vs. prednisone alone in patients with hormone-refractory prostate cancer*. Oncology 2005; 68: 2-9
- [21] Rosenthal ECE. *Zusammenfassung der Reaktionsmechanismen*. Online Scripte, Institut für Chemie, Humboldt-Universität Berlin, <http://amor.cms.hu-berlin.de/~genslerm/hu-chem/skripte.htm>, 2006
- [22] Berners-Price SJ, Appleton TG. *The chemistry of cisplatin in aqueous solution*. In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum based drugs in cancer therapy* - Humana Press, Totowa, New Jersey 2000; 3-35
- [23] Jennerwein M, Andrews PA. *Effect of intracellular chloride on the cellular pharmacodynamics of cis-diamminedichloroplatinum(II)*. Drug Metab Dispos 1995; 23: 178-184
- [24] Heudi O, Mercier-Jobard S, Cailleux A, Allain P. *Mechanisms of reaction of L-methionine with carboplatin and oxaliplatin in different media: a comparison with cisplatin*. Biopharm Drug Dispos 1999; 20: 107-116
- [25] Fink D, Howell SB. *How does cisplatin kill cells?* In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum based drugs in cancer therapy* - Humana Press, Totowa, New Jersey 2000; 149-167
- [26] Cohen SM, Lippard SJ. *Cisplatin: From DNA damage to cancer chemotherapy*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 2001; 67: 93-130

- [27] Wang D, Lippard SJ. *Cellular processing of platinum anticancer drugs*. Nat Rev Drug Discovery 2005; 4: 307-320
- [28] Frey U, Ranford JD, Sadler PJ. *Ring-Opening Reactions of the Anticancer Drug Carboplatin - NMR Characterization of Cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CBDCA-O)(5'-GMP-N7)] in Solution*. Inorg Chem 1993; 32: 1333-1340
- [29] Barnham KJ, Frey U, Murdoch PD, Ranford JD, Sadler PJ, Newell DR. *[Pt(CBDCA-O)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(L-Methionine-S)] - Ring-Opened Adduct of the Anticancer-Drug Carboplatin (Paraplatin) - Detection of A Similar Complex in Urine by NMR-Spectroscopy*. J Am Chem Soc 1994; 116: 11175-11176
- [30] Mani S, Graham MA, Bregman DB, Ivy P, Chaney SG. *Oxaliplatin: A review of evolving concepts*. Cancer Invest 2002; 20: 246-263
- [31] Chaney SG. *The Chemistry and Biology of Platinum Complexes with the 1,2-Diaminocyclohexane Carrier Ligand (Review)*. Int J Oncol 1995; 6: 1291-1305
- [32] Warnke U, Gysler J, Hofte B, Tjaden UR, van der GJ, Kloft C, Schunack W, Jaehde U. *Separation and identification of platinum adducts with DNA nucleotides by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry*. Electrophoresis 2001; 22: 97-103
- [33] Warnke U, Rappel C, Meier H, Kloft C, Galanski M, Hartinger CG, Keppler BK, Jaehde U. *Analysis of platinum adducts with DNA nucleotides and nucleosides by capillary electrophoresis coupled to ESI-MS: indications of guanosine 5'-monophosphate O6-N7 chelation*. Chembiochem 2004; 5: 1543-1549
- [34] Kung A, Zenker A, Galanski M, Keppler BK. *Capillary electrophoretic study of carboplatin and analogues with nucleoside monophosphates, di- and trinucleotides*. J Inorg Bioc 2001; 18: 181-186
- [35] Eastman A, Barry MA. *Interaction of Trans-Diamminedichloroplatinum(II) with DNA - Formation of Monofunctional Adducts and Their Reaction with Glutathione*. Biochemistry 1987; 26: 3303-3307
- [36] Eastman A. *The Formation, Isolation and Characterization of Dna Adducts Produced by Anticancer Platinum Complexes*. Pharmacol Ther 1987; 34: 155-166
- [37] Lilley DMJ. *Cisplatin adducts in DNA: Distortion and recognition*. J Biol Inorg Chem 1996; 1: 189-191
- [38] Scheeff ED, Briggs JM, Howell SB. *Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin*. Mol Pharmacol 1999; 56: 633-643

- [39] Blommaert FA, Vandijkknijnenburg HCM, Dijt FJ, Denengelse L, Baan RA, Berends F, Fichtingerschepman AMJ. *Formation of DNA-Adducts by the Anticancer Drug Carboplatin - Different Nucleotide-Sequence Preferences In-Vitro and in Cells*. *Biochemistry* 1995; 34: 8474-8480
- [40] Saris CP, vandeVaart PJM, Rietbroek RC, Blommaert FA. *In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells*. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2763-2769
- [41] Spingler B, Whittington DA, Lippard SJ. *2.4 angstrom crystal structure of an oxaliplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link in a DNA dodecamer duplex*. *Inorg Chem* 2001; 40: 5596-5602
- [42] Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. *Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin*. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 227-235
- [43] Faivre S, Chan D, Salinas R, Woynarowska B, Woynarowski JM. *DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells*. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 225-237
- [44] Zamable DB, Lippard SJ. *The response of cellular proteins to cisplatin-damaged DNA*. In: Lippert B (Hrsg.): *Cisplatin - Helvetica Chimica Acta*, Wiley-VCH, Zürich/ Weinheim 1999; 73-110
- [45] Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A. *Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts*. *Cancer Res* 1999; 59: 3968-3971
- [46] Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y. *Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts*. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 53: 3-11
- [47] Chaney SG, Vaisman A. *Specificity of platinum-DNA adduct repair*. *J Inorg Biochem* 1999; 77: 71-81
- [48] Siddik ZH. *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*. *Oncogene* 2003; 22: 7265-7279
- [49] Mello JA, Acharya S, Fishel R, Essigmann JM. *The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin*. *Chem Biol* 1996; 3: 579-589
- [50] Billings PC, Davis RJ, Engelsberg BN, Skov KA, Hughes EN. *Characterization of High Mobility Group Protein-Binding to Cisplatin-Damaged DNA*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 1286-1294
- [51] Donahue BA, Augot M, Bellon SF, Treiber DK, Toney JH, Lippard SJ, Essigmann JM. *Characterization of a DNA Damage-Recognition Protein from Mammalian-Cells that binds specifically to Intrastrand D(GpG) and D(ApG) DNA Adducts of the Anticancer Drug Cisplatin*. *Biochemistry* 1990; 29: 5872-5880

- [52] Vaisman A, Lim SE, Patrick SM, Copeland WC, Hinkle DC, Turchi JJ, Chaney SG. *Effect of DNA polymerases and high mobility group protein 1 on the carrier ligand specificity for translesion synthesis past platinum-DNA adducts*. *Biochemistry* 1999; 38: 11026-11039
- [53] Jordan P, Carmo-Fonseca M. *Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA in vivo*. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 2831-2836
- [54] Smith ML, Kontny HU, Bortnick R, Fornace AJ. *The p53-regulated cyclin G gene promotes cell growth: p53 downstream effectors cyclin G and GADD45 exert different effects on cisplatin chemosensitivity*. *Experimental Cell Research* 1997; 230: 61-68
- [55] Delmastro DA, Li JB, Vaisman A, Solle M, Chaney SG. *DNA damage inducible-gene expression following platinum treatment in human ovarian carcinoma cell lines*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 39: 245-253
- [56] Wang GQ, Gastman BR, Wieckowski E, Goldstein LA, Gambotto A, Kim TH, Fang BL, Rabinovitz A, Yin XM, Rabinowich H. *A role for mitochondrial Bak in apoptotic response to anticancer drugs*. *J Biol Chem* 2001; 276: 34307-34317
- [57] Makin GWJ, Corfe BM, Griffiths GJ, Thistlethwaite A, Hickman JA, Dive C. *Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate*. *EMBO J* 2001; 20: 6306-6315
- [58] Wang P, Song JH, Song DK, Zhang J, Hao CH. *Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis*. *Cellular Signalling* 2006; 18: 1528-1535
- [59] Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG, Levrero M, Wang JYJ. *The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage*. *Nature* 1999; 399: 806-809
- [60] Kharbanda S, Pandey P, Yamauchi T, Kumar S, Kaneki M, Kumar V, Bharti A, Yuan ZM, Ghanem L, Rana A, Weichselbaum R, Johnson G, Kufe D. *Activation of MEK kinase 1 by the c-Abl protein tyrosine kinase in response to DNA damage*. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4979-4989
- [61] Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, Zhang QX, Tian L, Wang YB, Siddik ZH, Mills GB, Claret FX. *Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells*. *J Biol Chem* 2003; 278: 19245-19256
- [62] Wang GD, Reed E, Li QQ. *Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer (Review)*. *Oncol Rep* 2004; 12: 955-965
- [63] Sanchez-Prieto R, Sanchez-Arevalo VJ, Servitja JM, Gutkind JS. *Regulation of p73 by c-Abl through the p38 MAP kinase pathway*. *Oncogene* 2002; 21: 974-979

- [64] Dijt FJ, Chottard JC, Girault JP, Reedijk J. *Formation and structure of reaction products of cis-PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> with d(ApG) and/or d(GpA) in di-, tri- and penta-nucleotides. Preference for GpA chelation over ApG chelation.* Eur J Biochem 1989; 179: 335-344
- [65] Dijt FJ, Fichtinger-Schepman AM, Berends F, Reedijk J. *Formation and repair of cisplatin-induced adducts to DNA in cultured normal and repair-deficient human fibroblasts.* Cancer Res 1988; 48: 6058-6062
- [66] Fichtinger-Schepman AM, Dijt FJ, Bedford P, van Oosterom AT, Hill BT, Berends F. *Induction and removal of cisplatin-DNA adducts in human cells in vivo and in vitro as measured by immunochemical techniques.* IARC Sci Publ 1988; 321-328
- [67] Duckett DR, Drummond JT, Murchie AIH, Reardon JT, Sancar A, Lilley DM, Modrich P. *Human MutS alpha recognizes damaged DNA base pairs containing O-6-methylguanine, O-4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct.* Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 6443-6447
- [68] Mu D, Tursun M, Duckett DR, Drummond JT, Modrich P, Sancar A. *Recognition and repair of compound DNA lesions (base damage and mismatch) by human mismatch repair and excision repair systems.* Mol Cell Biol 1997; 17: 760-769
- [69] Zdraveski ZZ, Mello JA, Farinelli CK, Essigmann JM, Marinus MG. *MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA.* J Biol Chem 2002; 277: 1255-1260
- [70] Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, Hamilton TC, Chaney SG. *The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts.* Cancer Res 1998; 58: 3579-3585
- [71] Screnci D, McKeage VJ. *Platinum neurotoxicity: clinical profiles, experimental models and neuroprotective approaches.* J Inorg Biochem 1999; 77: 105-110
- [72] Warnke U. *Platinkomplexe in der (Krankenhaus-)Apotheke. Patientenindividuelle Zytostatikazubereitung.* Pharm Unserer Zeit 2006; 35: 110-116
- [73] Thompson SW, Davis LE, Kornfeld M, Hilgers RD, Standefer JC. *Cisplatin Neuropathy - Clinical, Electrophysiologic, Morphologic, and Toxicologic Studies.* Cancer 1984; 54: 1269-1275
- [74] Gregg RW, Molepo JM, Monpetit VJA, Mikael NZ, Redmond D, Gadia M, Stewart DJ. *Cisplatin Neurotoxicity - the Relationship Between Dosage, Time, and Platinum Concentration in Neurologic Tissues, and Morphological Evidence of Toxicity.* J Clin Oncol 1992; 10: 795-803

- [75] Screnci D, Er HM, Hambley TW, Galettis P, Brouwer W, MCKeage MJ. *Stereoselective peripheral sensory neurotoxicity of diaminocyclohexane platinum enantiomers related to ormaplatin and oxaliplatin*. Br J Cancer 1997; 76: 502-510
- [76] Screnci D, MCKeage MJ, Galettis P, Hambley TW, Palmer BD, Baguley BC. *Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs*. Br J Cancer 2000; 82: 966-972
- [77] Holmes J, Stanko J, Varchenko M, Ding H, Madden VJ, Bagnell CR, Wyrick SD, Chaney SG. *Comparative neurotoxicity of oxaliplatin, cisplatin, and ormaplatin in a Wistar rat model*. Toxicol Sci 1998; 46: 342-351
- [78] Jodrell DI, Egorin MJ, Canetta RM, Langenberg P, Goldbloom EP, Burroughs JN, Goodlow JL, Tan S, Wiltshaw E. *Relationships Between Carboplatin Exposure and Tumor Response and Toxicity in Patients with Ovarian-Cancer*. J Clin Oncol 1992; 10: 520-528
- [79] Jaehde U, Kloft C. *Zytostatika maßgeschneidert dosieren. Dosis-Individualisierung in der Krebs-Chemotherapie*. Pharm Unserer Zeit 2006; 35: 150-156
- [80] Grothey A. *Oxaliplatin-safety profile: Neurotoxicity*. Semin Oncol 2003; 30: 5-13
- [81] Gamelin L, Boisdrion-Celle M, Morel A, Gamelin E. *Oxaliplatin neurotoxicity*. Bull Cancer 2006; 93: S17-S22
- [82] Gamelin L, Boisdrion-Celle M, Delva R, Guerin-Meyer V, Ifrah N, Morel A, Gamelin E. *Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: A retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer*. Clin Cancer Res 2004; 10: 4055-4061
- [83] Kaye SB. *Drug Resistance reversal - are we getting closer?* Eur J Cancer 2002; 38: S3
- [84] Materna V. *Bedeutung des ABC-Transporters MRP2/cMOAT/ABCC2 bei der Cisplatinresistenz humaner Tumorzellen*. Humboldt-Universität Berlin, Dissertation 2002
- [85] Zisowsky J. *Charakterisierung der Platinsensitivität von cisplatinempfindlichen und -resistenten Tumorzellen*. Universität Bonn, Dissertation 2004
- [86] Sharp SY, Rogers PM, Kelland LR. *Transport of cisplatin and bis-acetato-ammine-dichlorocyclohexylamine Platinum(IV) (JM216) in human ovarian carcinoma cell lines: identification of a plasma membrane protein associated with cisplatin resistance*. Clin Cancer Res 1995; 1: 981-989

- [87] Kelland LR, MCKeage MJ. *New Platinum Agents - A Comparison in Ovarian-Cancer*. *Drugs & Aging* 1994; 5: 85-95
- [88] Safaei R. *Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs*. *Cancer Lett* 2006; 234: 34-39
- [89] Roohangiz, Safaei R. *Contribution of endocytic pathways to the uptake of cisplatin*. American Association for Cancer Research [Elektronische Ressource] : annual meeting - Philadelphia, Pa 2004; 45: 5-6
- [90] Andrews PA, Mann SC, Huynh HH, Albright KD. *Role of the Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-adenosine triphosphatase in the accumulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) in human ovarian carcinoma cells*. *Cancer Res* 1991; 51: 3677-3681
- [91] Andrews PA. *Cisplatin Accumulation*. In: Kelland L, Farrel N (Hrsg.): *Platinum based drugs in cancer therapy - Humana Press, Totowa, New Jersey* 2000; 89-113
- [92] Marverti G, Andrews PA. *Stimulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation by modulation of passive permeability with genistein: an altered response in accumulation-defective resistant cells*. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 991-999
- [93] Mann SC, Andrews PA, Howell SB. *Comparison of lipid content, surface membrane fluidity, and temperature dependence of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells*. *Anticancer Res* 1988; 8: 1211-1215
- [94] Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M, Kuo YM, Rochdi M, Howell SB. *Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper*. *Cancer Res* 2002; 62: 6559-6565
- [95] Kruh GD. *Lustrous insights into cisplatin accumulation: copper transporters*. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5807-5809
- [96] Yonezawa A, Masuda S, Nishihara K, Ikuko Y, Katsura T, Inui K. *Organic cation transporter OCT2 (Slc22a2) as a determinant of the cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat*. *Yakugaku Zasshi* 2005; 125: 46-47
- [97] Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui KI. *Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and MATE family)*. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 879-886
- [98] Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, Lagpacan LL, Shu Y, Lapuk A, Chen Y, Komori T, Gray JW, Chen X, Lippard SJ, Giacomini KM. *Organic Cation Transporters Are Determinants of Oxaliplatin Cytotoxicity*. *Cancer Res* 2006; 66: 8847-8857

- [99] Safaei R, Howell SB. *Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs*. Crit Rev Oncol Hematol 2005; 53: 13-23
- [100] Wessling-Resnick M. *Understanding copper uptake at the molecular level*. Nutr Rev 2002; 60: 177-179
- [101] Ehrental W. *Kupfer-Stoffwechsel und Morbus Wilson*. www.klinik.uni-mainz.de/Zentrallabor/Lab-Web/Kupfer\_Stoffwechsel.htm, 2006
- [102] Fatemi N, Sarkar B. *Molecular mechanism of copper transport in Wilson disease*. Environ Health Perspect 2002; 110: 695-698
- [103] Eisses JF, Kaplan JH. *The mechanism of copper uptake mediated by human CTR1: a mutational analysis*. J Biol Chem 2005; 280: 37159-37168
- [104] Jiang J, Nadas IA, Kim MA, Franz KJ. *A Mets motif peptide found in copper transport proteins selectively binds Cu(I) with methionine-only coordination*. Inorg Chem 2005; 44: 9787-9794
- [105] Aller SG, Unger VM. *Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture*. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 3627-3632
- [106] Xiao Z, Wedd AG. *A C-terminal domain of the membrane copper pump Ctr1 exchanges copper(I) with the copper chaperone Atx1*. Chem Commun 2002; 588-589
- [107] Xiao Z, Loughlin F, George GN, Howlett GJ, Wedd AG. *C-terminal domain of the membrane copper transporter Ctr1 from Saccharomyces cerevisiae binds four Cu(I) ions as a cuprous-thiolate polynuclear cluster: sub-femtomolar Cu(I) affinity of three proteins involved in copper trafficking*. J Am Chem Soc 2004; 126: 3081-3090
- [108] Cox DW, Moore SD. *Copper transporting P-type ATPases and human disease*. J Bioenerg Biomembr 2002; 34: 333-338
- [109] Fatemi N, Sarkar B. *Structural and functional insights of Wilson disease copper-transporting ATPase*. J Bioenerg Biomembr 2002; 34: 339-349
- [110] Lutsenko S, Efremov RG, Tsivkovskii R, Walker JM. *Human copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein): biochemical properties and regulation*. J Bioenerg Biomembr 2002; 34: 351-362
- [111] Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell SB. *The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Pharmacol 2002; 62: 1154-1159
- [112] Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. *Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 14298-14302

- [113] Klomp AE, Tops BB, Van D, I, Berger R, Klomp LW. *Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1)*. *Biochem J* 2002; 364: 497-505
- [114] Nitiss JL. *A copper connection to the uptake of platinum anticancer drugs*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 13963-13965
- [115] Beretta GL, Gatti L, Tinelli S, Corna E, Colangelo D, Zunino F, Perego P. *Cellular pharmacology of cisplatin in relation to the expression of human copper transporter CTR1 in different pairs of cisplatin-sensitive and -resistant cells*. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 283-291
- [116] Song IS, Savaraj N, Siddik ZH, Liu P, Wei Y, Wu CJ, Kuo MT. *Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells*. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 1543-1549
- [117] Safaei R, Holzer AK, Katano K, Samimi G, Howell SB. *The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs*. *J Inorg Biochem* 2004; 98: 1607-1613
- [118] Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X, Safaei R, Howell SB. *The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells*. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 817-823
- [119] Holzer AK, Katano K, Klomp LW, Howell SB. *Cisplatin rapidly down-regulates its own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells*. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6744-6749
- [120] Guo Y, Smith K, Petris MJ. *Cisplatin stabilizes a multimeric complex of the human Ctr1 copper transporter: requirement for the extracellular methionine-rich clusters*. *J Biol Chem* 2004; 279: 46393-46399
- [121] Pereira-Maia E, Garnier-Suillerot A. *Impaired hydrolysis of cisplatin derivatives to aquated species prevents energy-dependent uptake in GLC4 cells resistant to cisplatin*. *J Biol Inorg Chem* 2003; 8: 626-634
- [122] Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y. *Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP*. *Int J Cancer* 2002; 101: 488-495
- [123] Kanzaki A, Nakayama K, Miyashita H, Shirata S, Nitta Y, Oubu M, Higashimoto M, Mutoh M, Mori S, Konno S, Ogawa K, Toi M, Takebayashi Y. *Mutation analysis of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinomas*. *Anticancer Res* 2003; 23: 1913-1915

- [124] Miyashita H, Nitta Y, Mori S, Kanzaki A, Nakayama K, Terada K, Sugiyama T, Kawamura H, Sato A, Morikawa H, Motegi K, Takebayashi Y. *Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a chemoresistance marker in human oral squamous cell carcinoma treated with cisplatin.* Oral Oncol 2003; 39: 157-162
- [125] Samimi G, Varki NM, Wilczynski S, Safaei R, Alberts DS, Howell SB. *Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients.* Clin Cancer Res 2003; 9: 5853-5859
- [126] Katano K, Safaei R, Samimi G, Holzer A, Rochdi M, Howell SB. *The copper export pump ATP7B modulates the cellular pharmacology of carboplatin in ovarian carcinoma cells.* Mol Pharmacol 2003; 64: 466-473
- [127] Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen ZS, Terada K, Furukawa T, Yang XL, Gao H, Miura N, Sugiyama T, Akiyama S. *Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance.* Cancer Res 2000; 60: 1312-1316
- [128] Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, Goodman M, Howell SB. *Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells.* Clin Cancer Res 2004; 10: 4661-4669
- [129] Safaei R, Katano K, Larson BJ, Samimi G, Holzer AK, Naerdemann W, Tomioka M, Goodman M, Howell SB. *Intracellular localization and trafficking of fluorescein-labeled cisplatin in human ovarian carcinoma cells.* Clin Cancer Res 2005; 11: 756-767
- [130] Lai GM, Ozols RF, Young RC, Hamilton TC. *Effect of glutathione on DNA repair in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines.* J Natl Cancer Inst 1989; 81: 535-539
- [131] Goddard P, Valenti M, Kelland LR. *The role of glutathione (GSH) in determining sensitivity to platinum drugs in vivo in platinum-sensitive and -resistant murine leukaemia and plasmacytoma and human ovarian carcinoma xenografts.* Anticancer Res 1994; 14: 1065-1070
- [132] Slater AFG, Stefan C, Nobel I, vandenDobbelsteen DJ, Orrenius S. *Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis.* Toxicol Lett 1995; 82-3: 149-153
- [133] Chen G, Frei E, Zeller WJ. *Determination of intracellular reduced glutathione and glutathione related enzyme activities in cisplatin-sensitive and resistant experimental ovarian carcinoma cell lines.* Cancer Lett 1989; 46: 207-211
- [134] Chen G, Hutter KJ, Zeller WJ. *Positive correlation between cellular glutathione and acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells.* Cell Biol Toxicol 1995; 11: 273-281

- [135] Meijer C, Mulder NH, Timmerbosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, deVries EGE. *Relationship of Cellular Glutathione to the Cytotoxicity and Resistance of 7 Platinum Compounds*. *Cancer Res* 1992; 52: 6885-6889
- [136] Tew KD. *Glutathione-Associated Enzymes in Anticancer Drug-Resistance*. *Cancer Res* 1994; 54: 4313-4320
- [137] Sakamoto M, Kondo A, Kawasaki K, Goto T, Sakamoto H, Miyake K, Koyamatsu Y, Akiya T, Iwabuchi H, Muroya T, Ochiai K, Tanaka T, Kikuchi Y, Tenjin Y. *Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray*. *Hum Cell* 2001; 14: 305-315
- [138] Daubeuf S, Leroy P, Paolicchi A, Pompella A, Wellman M, Galteau MM, Visvikis A. *Enhanced resistance of HeLa cells to cisplatin by overexpression of gamma-glutamyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 207-216
- [139] Meijer C, Timmer A, de Vries EGE, Groten JP, Knol A, Zwart N, Dam WA, Sleijfer DT, Mulder NH. *Role of metallothionein in cisplatin sensitivity of germ-cell tumours*. *Int J Cancer* 2000; 85: 777-781
- [140] Ramos-Lima FJ, Vrana O, Quiroga AG, Navarro-Ranninger CN, Halamikova A, Rybnickova H, Hejmalova L, Brabec V. *Structural characterization, DNA interactions, and cytotoxicity of new transplatin analogues containing one aliphatic and one planar heterocyclic amine ligand*. *J Med Chem* 2006; 49: 2640-2651
- [141] Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. *Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis*. *Mutat Res* 2003; 533: 201-209
- [142] Chaney SG, Sancar A. *DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response*. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1346-1360
- [143] Furuta T, Ueda T, Aune G, Sarasin A, Kraemer KH, Pommier Y. *Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells*. *Cancer Res* 2002; 62: 4899-4902
- [144] Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK. *Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003; 146: 1-53
- [145] Hensing TA, Hanna NH, Gillenwater HH, Gabriella CM, Allievi C, Socinski MA. *Phase II study of BBR 3464 as treatment in patients with sensitive or refractory small cell lung cancer*. *Anticancer Drugs* 2006; 17: 697-704
- [146] Voigt W, Dietrich A, Schmol HJ. *Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz. Cisplatin und seine Analoga*. *Pharm Unserer Zeit* 2006; 35: 134-143

- [147] Galanski M, Keppler BK. *Entwicklung, Bedeutung und Perspektiven. Tumorhemmende Metallverbindungen*. Pharm Unserer Zeit 2006; 35: 118-123
- [148] Lu C, Perez-Soler R, Piperdi B, Walsh GL, Swisher SG, Smythe WR, Shin HJ, Ro JY, Feng L, Truong M, Yalamanchili A, Lopez-Berestein G, Hong WK, Khokhar AR, Shin DM. *Phase II study of a liposome-entrapped cisplatin analog (L-NDDP) administered intrapleurally and pathologic response rates in patients with malignant pleural mesothelioma*. J Clin Oncol 2005; 23: 3495-3501
- [149] Rademaker-Lakhai JM, Terret C, Howell SB, Baud CM, De Boer RF, Pluim D, Beijnen JH, Schellens JH, Droz JP. *A Phase I and pharmacological study of the platinum polymer AP5280 given as an intravenous infusion once every 3 weeks in patients with solid tumors*. Clin Cancer Res 2004; 10: 3386-3395
- [150] Busch H, Greene HS. *Studies on the metabolism of plasma proteins in tumorbearing rats*. Yale J Biol Med 1955; 27: 339-349
- [151] Ringsdorf H. *Structure and properties of pharmacologically active polymers*. J Polym Sci 1975; 51: 135-153
- [152] Maeda H, Matsumura Y, Sasamoto K. *Tumor Targeting Mechanism by Biocompatible Macromolecular Drugs*. Proc Am Assoc Cancer Res 1986; 27: 401
- [153] Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. J Control Release 2000; 65: 271-284
- [154] Maeda H, Sawa T, Konno T. *Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS*. J Control Release 2001; 74: 47-61
- [155] Maeda H. *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*. Adv Enzyme Regul 2001; 41: 189-207
- [156] Maeda H, Fang J, Inutsuka T, Kitamoto Y. *Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications*. Int Immunopharmacol 2003; 3: 319-328
- [157] Fang J, Sawa T, Maeda H. *Factors and mechanism of "EPR" effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS*. Adv Exp Med Biol 2003; 519: 29-49
- [158] Wu J, Akaike T, Hayashida K, Okamoto T, Okuyama A, Maeda H. *Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases*. Jpn J Cancer Res 2001; 92: 439-451
- [159] Anon T. *3D-Tumorangiogenese*. www.invitrobiotec.de, 2005

- [160] Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohaln J, Ulbrich K, Akaike T, Maeda H. *Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues*. Jpn J Cancer Res 1998; 89: 307-314
- [161] Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. *Glomerular permselectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge*. Am J Physiol 1978; 234: F455-F460
- [162] Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. *Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice*. J Pharm Sci 1994; 83: 601-606
- [163] Bekerman C, Hoffer PB, Bitran JD. *The role of gallium-67 in the clinical evaluation of cancer*. Semin Nucl Med 1984; 14: 296-323
- [164] Kratz F, Muller-Driver R, Hofmann I, Dreves J, Unger C. *A novel macromolecular prodrug concept exploiting endogenous serum albumin as a drug carrier for cancer chemotherapy*. J Med Chem 2000; 43: 1253-1256
- [165] Hermanson GT. *Bioconjugate techniques*. In: Hermanson GT (HRSG.): Bioconjugate techniques - Academic Press, San Diego, 1996
- [166] Peters T, Jr. *Serum albumin*. Adv Protein Chem 1985; 37: 161-245
- [167] Pedersen AO, Jacobsen J. *Reactivity of the thiol group in human and bovine albumin at pH 3--9, as measured by exchange with 2,2'-dithiodipyridine*. Eur J Biochem 1980; 106: 291-295
- [168] Dingeldein tMA. *Passiver Membrantransport - Prinzip und Mechanismen*. ChemgaPedia-curriculare Enzyklopädie zur Chemie, [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/transport/pass\\_transport.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/transport/diffusion2.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/transport/pass_transport.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/transport/diffusion2.vscml.html), 2006
- [169] Tallen G, Mock C, Gangopadhyay SB, Kangarloo B, Krebs B, Wolff JE. *Overcoming cisplatin resistance: design of novel hydrophobic platinum compounds*. Anticancer Res 2000; 20: 445-449
- [170] Ang WH, Pilet S, Scopelliti R, Bussy F, Juillerat-Jeanneret L, Dyson PJ. *Synthesis and characterization of platinum(IV) anticancer drugs with functionalized aromatic carboxylate ligands: influence of the ligands on drug efficacies and uptake*. J Med Chem 2005; 48: 8060-8069
- [171] Loh SY, Mistry P, Kelland LR, Abel G, Harrap KR. *Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum (II) and (IV) ammine/amine complexes*. Br J Cancer 1992; 66: 1109-1115
- [172] Martelli L, Di MF, Ragazzi E, Apostoli P, Leone R, Perego P, Fumagalli G. *Different accumulation of cisplatin, oxaliplatin and JM216 in sensitive and cisplatin-resistant human cervical tumour cells*. Biochem Pharmacol 2006; 72: 693-700

- [173] Kratz F, Warnecke A, Scheuermann K, Stockmar C, Schwab J, Lazar P, Druckes P, Esser N, Dreves J, Rognan D, Bissantz C, Hinderling C, Folkers G, Fichtner I, Unger C. *Probing the cysteine-34 position of endogenous serum albumin with thiol-binding doxorubicin derivatives. Improved efficacy of an acid-sensitive doxorubicin derivative with specific albumin-binding properties compared to that of the parent compound.* J Med Chem 2002; 45: 5523-5533
- [174] Mansour AM, Dreves J, Esser N, Hamada FM, Badary OA, Unger C, Fichtner I, Kratz F. *A new approach for the treatment of malignant melanoma: enhanced antitumor efficacy of an albumin-binding doxorubicin prodrug that is cleaved by matrix metalloproteinase 2.* Cancer Res 2003; 63: 4062-4066
- [175] Warnecke A, Kratz F. *Maleimide-oligo(ethylene glycol) derivatives of camptothecin as albumin-binding prodrugs: synthesis and antitumor efficacy.* Bioconjug Chem 2003; 14: 377-387
- [176] Warnecke A, Fichtner I, Garmann D, Jaehde U, Kratz F. *Synthesis and biological activity of water-soluble maleimide derivatives of the anticancer drug carboplatin designed as albumin-binding prodrugs.* Bioconjug Chem 2004; 15: 1349-1359
- [177] Habala L, Galanski M, Yasemi A, Nazarov AA, von Keyserlingk NG, Keppler BK. *Synthesis and structure-activity relationships of mono- and dialkyl-substituted oxaliplatin derivatives.* Eur J Med Chem 2005; 40: 1149-1155
- [178] Burgi DS, Chien R-L. *Application and Limits of Sample Stacking in Capillary Electrophoresis.* In: Atria K D (Hrsg.): Capillary Electrophoresis Guidebook, Humana Press, Totowa, New Jersey 1996; 211-226
- [179] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.* 2001
- [180] Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcao AC. *Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; 774: 215-222
- [181] Gelevert T, Messerschmidt J, Meinardi MT, Alt F, Gietema JA, Franke JP, Sleijfer DT, Uges DR. *Adsorptive voltametry to determine platinum levels in plasma from testicular cancer patients treated with cisplatin.* Ther Drug Monit 2001; 23: 169-173
- [182] Kloft C, Appelius H, Siegert W, Schunack W, Jaehde U. *Determination of platinum complexes in clinical samples by a rapid flameless atomic absorption spectrometry assay.* Ther Drug Monit 1999; 21: 631-637
- [183] Pieck AC. *Pharmakokinetik und Platin-DNA-Adduktbildung von Oxaliplatin.* Universität Bonn, Dissertation 2004
- [184] Welz B, Sperling M. *Boris L'vov und die Graphitküvette.* In: Welz B, Sperling M.(Hrsg.): Atomabsorptionsspektrometrie - Wiley-VCH, Weinheim 1997; 29-38

- [185] Welz B, Sperling M. *Der Zeeman-Effekt*. In: Welz B, Sperling M.(Hrsg.): *Atomabsorptionsspektrometrie* - Wiley-VCH, Weinheim 1997; 102-108
- [186] Kovarik Z, Bosak A, Sinko G, Latas T. *Exploring the Active Sites of Cholinesterases by Inhibition with Bambuterol and Haloxon*. *Croat chem acta* 2003; 76: 63-67
- [187] Ellman GL, Courtney K.D., Andres VJr, Feather-Stone RM. *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95
- [188] Mueller H, Kassack MU, Wiese M. *Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines*. *J Biomol Screen* 2004; 9: 506-515
- [189] OECD. *OECD GUIDELINE 107 - Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method*. OECD 1995
- [190] Conner SD, Schmid SL. *Regulated portals of entry into the cell*. *Nature* 2003; 422: 37-44
- [191] Kirkham M, Parton RG. *Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers*. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1745: 273-286
- [192] Amyere M, Mettlen M, Van Der SP, Platek A, Payraastre B, Veithen A, Courtoy PJ. *Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis*. *Int J Med Microbiol* 2002; 291: 487-494
- [193] Yumoto R, Nishikawa H, Okamoto M, Katayama H, Nagai J, Takano M. *Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L946-L955
- [194] Gekle M, Mildenerger S, Freudinger R, Schwerdt G, Silbernagl S. *Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases*. *Am J Physiol* 1997; 272: F668-F677
- [195] Pelkmans L, Helenius A. *Endocytosis via caveolae*. *Traffic* 2002; 3: 311-320
- [196] Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J. *Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules*. *J Cell Biol* 1994; 127: 1217-1232
- [197] Khan MN. *Kinetics and Mechanism of the Alkaline-Hydrolysis of Maleimide*. *J Pharm Sci* 1984; 73: 1767-1771
- [198] Gregory JD. *The Stability of N-Ethylmaleimide and Its Reaction with Sulfhydryl Groups*. *J Am Chem Soc* 1955; 77: 3922-3923

- [199] Antov Y, Barbul A, Mantsur H, Korenstein R. *Electroendocytosis: exposure of cells to pulsed low electric fields enhances adsorption and uptake of macromolecules*. Biophys J 2005; 88: 2206-2223
- [200] Verhulst A, D'Haese PC, De Broe ME. *Inhibitors of HMG-CoA reductase reduce receptor-mediated endocytosis in human kidney proximal tubular cells*. J Am Soc Nephrol 2004; 15: 2249-2257
- [201] Drumm K, Lee E, Stanners S, Gassner B, Gekle M, Poronnik P, Pollock C. *Albumin and glucose effects on cell growth parameters, albumin uptake and Na(+)/H(+)-exchanger Isoform 3 in OK cells*. Cell Physiol Biochem 2003; 13: 199-206
- [202] Sigma. *Produktinformation FITC-Albumin*. www.sigmaaldrich.com, 2006
- [203] Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, Devarakonda K, Kassack MU, Osmak M, Jaehde U. *Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells*. Biochem Pharmacol 2006; 73: 298-307
- [204] Moeller N, Kangarloo BS, Puscasu I, Mock C, Krebs B, Wolff JE. *Rational design of platinum chemotherapeutic drugs: hydrophobicity increases cytotoxicity*. Anticancer Res 2000; 20: 4435-4439
- [205] Galanski M, Habala L, Nazarov AA, Jakupec MA, Yasemi A, Slaby S, Graf von KN, Keppler BK. *Rational development of oxaliplatin analogues --synthesis and preliminary structure-activity relationships*. Int J Clin Pharmacol Ther 2005; 43: 575-576
- [206] Barnham KJ, Djuran MI, delSocorroMurdoch P, Ranford JD, Sadler PJ. *Ring-opened adducts of the anticancer drug carboplatin with sulfur amino acids*. Inorg Chem 1996; 35: 1065-1072
- [207] Schaeper JP, Sepaniak MJ. *Parameters affecting reproducibility in capillary electrophoresis*. Electrophoresis 2000; 21: 1421-1429
- [208] Poirier MC, Reed E, Shamkhani H, Tarone RE, Guptaburt S. *Platinum Drug DNA Interactions in Human Tissues Measured by Cisplatin DNA Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay and Atomic Absorbency Spectroscopy*. Environ Health Perspect 1993; 99: 149-154
- [209] Wörth CCT. *Entwicklung eines Nachweis-Verfahrens für DNA-Addukte basierend auf Fluoreszenzderivatisierung und kapillarelektrophoretischer Trennung*. Dissertation, Krebsforschungszentrum Heidelberg 2000
- [210] Kelman DJ, Lilga KT, Sharma M. *Synthesis and application of fluorescent labeled nucleotides to assay DNA damage*. Chem Biol Interact 1988; 66: 85-100
- [211] Hongo A, Seki S, Akiyama K, Kudo T. *A comparison of in vitro platinum-DNA adduct formation between carboplatin and cisplatin*. Int J Biochem 1994; 26: 1009-1016

- [212] Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J. *Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation*. *Biochemistry* 1985; 24: 707-713
- [213] Sharma M, Jain R, Ionescu E, Slocum HK. *Capillary electrophoretic separation and laser-induced fluorescence detection of the major DNA adducts of cisplatin and carboplatin*. *Anal Biochem* 1995; 228: 307-311
- [214] Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. *Replication validity of genetic association studies*. *Nat Genet* 2001; 29: 306-309
- [215] Ioannidis JP. *Why most published research findings are false*. *PLoS Med* 2005; 2: e124
- [216] Etoh T, Miyazaki M, Harada K, Nakayama M, Sugii A. *Rapid analysis of human serum albumin by high-performance liquid chromatography*. *J Chromatogr* 1992; 578: 292-296
- [217] Era S, Kuwata K, Imai H, Nakamura K, Hayashi T, Sogami M. *Age-related change in redox state of human serum albumin*. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1247: 12-16
- [218] Sogami M, Era S, Nagaoka S, Kuwata K, Kida K, Shigemi J, Miura K, Suzuki E, Muto Y, Tomita E, . *High-performance liquid chromatographic studies on non-mercapt in equilibrium with mercapt conversion of human serum albumin. II*. *J Chromatogr* 1985; 332: 19-27
- [219] Knight P. *Hydrolysis of p-NN'-phenylenebismaleimide and its adducts with cysteine. Implications for cross-linking of proteins*. *Biochem J* 1979; 179: 191-197
- [220] Warnke U. *Untersuchungen zur Platin-DNA-Adduktbildung mittels Kapillarelektrophorese*. Freie Universität Berlin, Dissertation, 2001
- [221] Oguri S, Sakakibara T, Mase H, Shimizu T, Ishikawa K, Kimura K, Smyth RD. *Clinical pharmacokinetics of carboplatin*. *J Clin Pharmacol* 1988; 28: 208-215
- [222] Duffull SB, Robinson BA. *Clinical pharmacokinetics and dose optimisation of carboplatin*. *Clin Pharmacokinet* 1997; 33: 161-183
- [223] Kratz F, Beyer U, Schutte MT. *Drug-polymer conjugates containing acid-cleavable bonds*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1999; 16: 245-288
- [224] Mordon S, Devoisselle JM, Maunoury V. *In vivo pH measurement and imaging of tumor tissue using a pH-sensitive fluorescent probe (5,6-carboxyfluorescein): instrumental and experimental studies*. *Photochem Photobiol* 1994; 60: 274-279

- [225] Guo ZJ, Hambley TW, Murdoch PD, Sadler PJ, Frey U. *Chelate-ring-opened adducts of [Pt(en)(Me-Mal-O,O')] (en equals ethane-1,2-diamine, Me-Mal equals 2-methylmalonate) with methionine derivatives: Relevance to the biological activity of platinum anticancer agents.* J Chem Soc , Dalton Trans 1997; 469-478
- [226] Hahn M, Kleine M, Sheldrick WS. *Interaction of cisplatin with methionine- and histidine-containing peptides: competition between backbone binding, macrochelation and peptide cleavage.* J Biol Inorg Chem 2001; 6: 556-566
- [227] el-Khateeb M, Appleton TG, Gahan LR, Charles BG, Berners-Price SJ, Bolton AM. *Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques.* J Inorg Biochem 1999; 77: 13-21
- [228] Ivanov AI, Christodoulou J, Parkinson JA, Barnham KJ, Tucker A, Woodrow J, Sadler PJ. *Cisplatin binding sites on human albumin.* J Biol Chem 1998; 273: 14721-14730
- [229] Martin GR, Jain RK. *Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy.* Cancer Res 1994; 54: 5670-5674
- [230] Shiraishi N, Shimada T, Hagino Y, Kohno K, Kobayashi M, Kuwano M, Akiyama S. *Potentiation by a biscochlorine alkaloid, cepharanthine, of the toxicity of conjugates of epidermal growth factor with Pseudomonas exotoxin in HeLa cells.* Cancer Res 1988; 48: 1307-1311
- [231] Tanaka T, Shiramoto S, Miyashita M, Fujishima Y, Kaneo Y. *Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME).* Int J Pharm 2004; 277: 39-61
- [232] Kamada H, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Kodaira H, Tsunoda S, Okamoto T, Mukai Y, Shibata H, Nakagawa S, Mayumi T. *Design of a pH-sensitive polymeric carrier for drug release and its application in cancer therapy.* Clin Cancer Res 2004; 10: 2545-2550
- [233] Ebert MP, Kruger S, Fogeron ML, Lamer S, Chen J, Pross M, Schulz HU, Lage H, Heim S, Roessner A, Malfertheiner P, Rocken C. *Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis.* Proteomics 2005; 5: 1693-1704
- [234] Yan S, Sameni M, Sloane BF. *Cathepsin B and human tumor progression.* Biol Chem 1998; 379: 113-123
- [235] Sharp SY, Mistry P, Valenti MR, Bryant AP, Kelland LR. *Selective potentiation of platinum drug cytotoxicity in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian carcinoma cell lines by amphotericin B.* Cancer Chemother Pharmacol 1994; 35: 137-143

- [236] Johannes L, Lamaze C. *Clathrin-dependent or not: is it still the question?* Traffic 2002; 3: 443-451
- [237] Phillips RM, Bibby MC, Double JA. *A critical appraisal of the predictive value of in vitro chemosensitivity assays.* J Natl Cancer Inst 1990; 82: 1457-1468
- [238] Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. *Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models.* Clin Cancer Res 2003; 9: 4227-4239
- [239] Greish K, Fang J, Inutsuka T, Nagamitsu A, Maeda H. *Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting.* Clin Pharmacokinet 2003; 42: 1089-1105
- [240] Riebeseel K, Biedermann E, Loser R, Breiter N, Hanselmann R, Mulhaupt R, Unger C, Kratz F. *Polyethylene glycol conjugates of methotrexate varying in their molecular weight from MW 750 to MW 40000: synthesis, characterization, and structure-activity relationships in vitro and in vivo.* Bioconjug Chem 2002; 13: 773-785
- [241] Riches AC, Sharp JG, Thomas DB, Smith SV. *Blood volume determination in the mouse.* J Physiol 1973; 228: 279-284
- [242] Davies B, Morris T. *Physiological parameters in laboratory animals and humans.* Pharm Res 1993; 10: 1093-1095
- [243] Era S, Hamaguchi T, Sogami M, Kuwata K, Suzuki E, Miura K, Kawai K, Kitazawa Y, Okabe H, Noma A, . *Further studies on the resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin and on human serum albumin in the elderly by high-performance liquid chromatography.* Int J Pept Protein Res 1988; 31: 435-442
- [244] Delmore G. *Assessment of nutritional status in cancer patients: widely neglected?* Support Care Cancer 1997; 5: 376-380
- [245] Fearon KC, Falconer JS, Slater C, McMillan DC, Ross JA, Preston T. *Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminemic cachectic cancer patients with an ongoing acute-phase protein response.* Ann Surg 1998; 227: 249-254
- [246] Haller C. *Hypoalbuminemia in renal failure: pathogenesis and therapeutic considerations.* Kidney Blood Press Res 2005; 28: 307-310
- [247] Don BR, Kaysen G. *Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition.* Semin Dial 2004; 17: 432-437
- [248] Suzuki E, Yasuda K, Takeda N, Sakata S, Era S, Kuwata K, Sogami M, Miura K. *Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus.* Diabetes Res Clin Pract 1992; 18: 153-158

- [249] Soejima A, Matsuzawa N. *[Quantitative as well as qualitative changes of serum albumin in patients with malnutrition]*. Nippon Rinsho 2005; 63: 91-95
- [250] Uchino H, Matsumura Y, Negishi T, Koizumi F, Hayashi T, Honda T, Nishiyama N, Kataoka K, Naito S, Kakizoe T. *Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats*. Br J Cancer 2005; 93: 678-687
- [251] Stathopoulos GP, Boulikas T, Vougiouka M, Deliconstantinos G, Rigatos S, Darli E, Viliotou V, Stathopoulos JG. *Pharmacokinetics and adverse reactions of a new liposomal cisplatin (Lipoplatin): phase I study*. Oncol Rep 2005; 13: 589-595
- [252] Smit T, Snyman JR, Neuse EW, Bohm L, van Rensburg CE. *Evaluation of cisplatin and a novel platinum polymer conjugate for drug toxicity and drug distribution in mice*. Anticancer Drugs 2005; 16: 501-506
- [253] Jun YJ, Kim JI, Jun MJ, Sohn YS. *Selective tumor targeting by enhanced permeability and retention effect. Synthesis and antitumor activity of polyphosphazene-platinum (II) conjugates*. J Inorg Biochem 2005; 99: 1593-1601
- [254] Ren Y, Zhang H, Huang J. *Synthesis and cytotoxic activity of platinum complex immobilized by branched polyethylene glycol*. Bioorg Med Chem Lett 2005; 15: 4479-4483
- [255] Aronov O, Horowitz AT, Gabizon A, Fuertes MA, Perez JM, Gibson D. *Nuclear localization signal-targeted poly(ethylene glycol) conjugates as potential carriers and nuclear localizing agents for carboplatin analogues*. Bioconjug Chem 2004; 15: 814-823
- [256] Furin A, Guiotto A, Baccichetti F, Pasut G, Deuschel C, Bertani R, Veronese FM. *Synthesis, characterization and preliminary cytotoxicity assays of poly(ethylene glycol)-malonato-Pt-DACH conjugates*. Eur J Med Chem 2003; 38: 739-749
- [257] Nakamura Y, Hamabe Y, Ikuta H, Hyon SH, Kuroda Y. *An experimental study of regional chemotherapy using CDDP-loaded microspheres for esophageal cancer*. Surg Today 2002; 32: 335-342
- [258] Ichinose K, Tomiyama N, Nakashima M, Ohya Y, Ichikawa M, Ouchi T, Kanematsu T. *Antitumor activity of dextran derivatives immobilizing platinum complex (II)*. Anticancer Drugs 2000; 11: 33-38
- [259] Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. *Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin*. Mol Pharmacol 2006; 70: 1390-1394
- [260] Kassack MU, Stratenschulte C. *Expression profile of copper transporters in sensitive and cisplatin/oxaliplatin-resistant tumor cell lines*. Int J Clin Pharmacol Ther 2005; 43: 597-598

- [261] Rappel C, Galanski M, Yasemi A, Habala L, Keppler BK. *Analysis of anticancer platinum(II)-complexes by microemulsion electrokinetic chromatography: separation of diastereomers and estimation of octanol-water partition coefficients*. *Electrophoresis* 2005; 26: 878-884
- [262] Platts JA, Hibbs DE, Hambley TW, Hall MD. *Calculation of the hydrophobicity of platinum drugs*. *J Med Chem* 2001; 44: 472-474

## Anhang

### Anhang A Ergebnisse zur Untersuchung makromolekularer Platinkomplexe

#### A1 Kapillarelektrophoretische Untersuchungen

##### Albuminbindungskinetik.

PL04								
Zeit [min]	Korr. Peakfläche			Fläche [%]			MW	SD [%]
0	20499	16785	16866	100	100	100	100	0
1	10024	8308	9109	48,9	49,5	54	50,8	2,8
5	5560	4171	4725	27,1	24,8	28	26,6	1,7
10	2607	2390	2251	12,7	14,2	13,3	13,4	0,8
15	1664	1335	1512	8,2	8	9	8,4	0,5
20	78	598	869	0,4	3,6	5,2	3,1	2,4
30	N.D.	N.D.	N.D.					

PL07								
Zeit [min]	Korr. Peakfläche			Fläche [%]			MW	SD [%]
0	11537	15461	13986	100	100	100	100	0
1	4479	7446	5715	38,8	48,2	40,9	42,6	4,93
5	2208	3743	2587	19,1	24,2	18,5	20,6	3,13
10	1269	1697	1632	11,0	11,0	11,7	11,2	0,4
15	718	912	863	6,2	5,9	6,2	6,1	0,17
20	426	411	576	3,7	2,7	4,1	3,5	0,72
30	N.D.	N.D.	N.D.					

ND: nicht detektierbar

### Reaktivität verschiedener Platinkomplexe gegenüber den Nucleotiden dAMP und dGMP.

<b>Cisplatin</b>								
<b>Zeit [h]</b>	<b>dAMP [µM]</b>	<b>SD</b>	<b>dGMP [µM]</b>	<b>SD</b>	<b>dAMP [%]</b>	<b>SD [%]</b>	<b>dGMP [%]</b>	<b>SD [%]</b>
12	120,2	3,2	78,3	3,8	80,1	2,1	52,2	2,6
24	91,0	5,6	38,4	4,7	60,6	3,7	25,6	3,1
48	64,7	6,8	15,9	3,4	43,1	4,6	10,6	2,3
72	63,3	14,4	11,1	4,7	42,2	9,6	7,4	3,1
<b>Carboplatin</b>								
12	143,5	8,7	146,7	8,7	95,7	5,8	97,8	5,8
24	145,4	9,3	146,2	8,7	97,0	6,2	97,5	5,8
48	141,9	3,2	141,2	4,2	94,6	2,1	94,1	2,8
72	139,2	4,3	126,6	7,0	92,8	2,9	84,4	4,7
<b>Oxaliplatin</b>								
12	127,6	0,7	130,5	2,1	85,1	0,4	87,0	1,4
24	120,7	6,3	118,7	7,9	80,5	4,2	79,1	5,3
48	99,2	7,6	86,6	6,4	66,2	5,0	57,7	4,2
72	84,2	1,2	62,1	0,8	56,2	0,8	41,4	0,6
<b>PL07</b>								
12	146,9	5,8	149,4	5,1	97,9	3,9	99,6	3,4
24	143,1	5,0	142,0	3,1	95,4	3,3	94,6	2,1
48	137,4	1,2	131,7	2,9	91,6	0,8	87,8	1,9
72	144,0	7,3	133,5	4,6	96,0	4,9	89,0	3,1
<b>PL04</b>								
12	151,6	6,3	144,9	1,5	101,1	4,2	96,6	1,0
24	141,7	2,1	127,6	2,4	94,4	1,4	85,1	1,6
48	129,7	3,2	109,5	2,7	86,4	2,1	73,0	1,8
72	126,9	1,6	95,9	0,3	84,6	1,1	63,9	0,2

## A2 Platinierung von Kalbsthymus-DNA in der Mikrodialysekammer

### DNA-Platinierung bei pH 7,4.

Angegeben ist die Platinmenge [Platinatome /  $10^6$  Nukleotide].

Zeit [h]	PL04 mit Albumin		PL07 mit Albumin		PL04		PL07	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
24	205	101	83	16	6517	3418	3774	1954
48	412	252	161	67	20844	1368	11735	3753
72	338	127	200	46	36125	8655	12404	4981
96	359	243	252	89	41869	7168	16960	4662
120	536	278	251	74	68298	7390	25104	3823
Zeit [h]	Carboplatin mit Albumin		Carboplatin		PEG-Platinkomplex		PEG-Platinkomplex (bezogen auf 1 Pt)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
48	1283	104	2856	148	31498	148	15749	1105
120	3073	341	9869	1493	67172	5661	33586	1493

### DNA-Platinierung bei pH 6,0 und pH 5,0 nach 120 Stunden Inkubation.

Angegeben ist die Platinmenge [Platinatome /  $10^6$  Nukleotide].

	PL04 mit Albumin		PL07 mit Albumin		PL04		PL04	
	pH 6,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 5,0
<b>MW</b>	758	1068	505	815	58019	59296	29372	24430
<b>SD</b>	144	420	104	375	2477	8641	2523	2349

### Enzymabhängige DNA-Platinierung nach 24 Stunden Inkubation.

Angegeben ist die Platinmenge [Platinatome /  $10^6$  Nukleotide].

	PL07		PL04	
	AE	EA	AE	EA
<b>MW</b>	58	279	222	564
<b>SD</b>	22	275	23	163

AE/EA: Inkubationsreihenfolge AE= Albumin / Esterase; EA = Esterase / Albumin

### A3 Stabilitäts- und Diffusionsuntersuchung in der Mikrodialysekammer

Diffusion von PL07 und des PEG-Platinkomplexes durch die semipermeable Membran der Mikrodialysekammer.

Angegeben ist die Platinmenge [ $\mu\text{g}$ ].

PL07					
Zeit [h]	Gesamt MW	Kammer 2 MW	Zur Analyse entnommen MW	Kammer 2 Anteil am Gesamtplatin [%]	SD [%]
0,0	2,01	0	0	0	0
0,5	2,01	0,34	0,042	16,80	2,07
1,0	1,97	0,47	0,059	24,04	3,02
2,0	1,91	0,64	0,081	33,80	6,18
4,0	1,83	0,70	0,088	38,36	2,53
8,0	1,74	0,84	0,105	48,15	4,12
* 0,0	3,02	0	0	0	0
19,0	3,02	1,68	0,210	55,52	4,21
48,0	2,81	1,42	0,178	50,59	1,76
PEG-Platinkomplex					
0,0	4,42	0	0	0	0
0,5	4,42	0,05	0,007	1,24	0,30
1,0	4,42	0,06	0,007	1,33	0,38
2,0	4,41	0,07	0,008	1,52	0,37
4,0	4,40	0,11	0,014	2,58	0,13
8,0	4,39	0,25	0,031	5,65	0,17
* 0,0	3,21	0	0	0	0
19,0	3,21	0,50	0,063	15,56	0,51
48,0	3,15	1,04	0,129	33,05	6,81

\* Einsatz einer neuen Mikrodialysekammer

## A4 Zytotoxizitätstests zur Bestimmung der EC<sub>50</sub>

### MTT-Assay mit Cisplatin zur Ermittlung einer maximalen Passageanzahl.

Angegeben ist jeweils die Absorption [% des Ausgangswertes].

log Konz. [%]	A2780 (n=10)		A2780cis (n=6)		A2780cis Passage 12 (n=6)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	<b>Cisplatin</b>					
-9,0	100,00	–	100,00	–	100,00	–
-8,0	100,47	2,57	90,19	8,59	95,50	5,79
-7,5	95,39	10,96	–	–	–	–
-7,0	97,93	10,62	90,25	8,56	101,01	17,15
-6,5	89,58	18,73	96,53	17,75	99,22	22,21
-6,0	69,26	28,58	92,03	6,25	97,60	17,10
-5,5	44,72	31,96	85,57	19,44	84,28	8,59
-5,0	12,64	7,29	40,43	13,00	48,72	4,94
-4,5	2,05	1,31	10,30	3,32	12,36	4,68
-4,0	1,37	1,04	2,06	1,06	3,17	2,10
-3,6	2,02	2,48	2,33	0,52	2,93	1,34

– Konzentration wurde nicht eingesetzt

### MTT-Assays mit verschiedenen Platinkomplexen.

Angegeben ist jeweils die Absorption [% des Ausgangswertes].

log Konz. [%]	A2780 (n=6)		A2780cis (n=6)	
	MW	SD	MW	SD
	<b>Oxaliplatin</b>			
-8,5	100,00	–	100,00	–
-7,5	106,85	4,85	102,80	10,22
-6,5	98,70	5,98	97,81	22,50
-5,5	55,32	2,39	75,91	9,12
-5,2	41,81	2,33	57,91	6,12
-4,9	30,79	0,60	55,84	4,74
-4,6	8,28	0,45	49,51	6,21
-4,3	3,85	0,45	39,42	1,59
-4,0	3,91	0,52	12,29	0,42
-3,7	1,11	0,11	8,64	0,21
-2,0	1,13	0,13	8,67	0,24

– Konzentration wurde nicht eingesetzt

**MTT-Assays mit verschiedenen Platinkomplexen.**

*Angegeben ist jeweils die Absorption [% des Ausgangswertes].*

	A2780 (n=6)		A2780cis (n=6)	
	Carboplatin			
log Konz. [%]	MW	SD	MW	SD
-9,0	100,00	–	100,00	–
-7,0	84,88	18,39	88,51	9,97
-6,5	83,55	22,39	82,30	11,12
-6,0	85,92	22,05	85,26	14,16
-5,5	90,15	17,81	81,00	10,30
-5,0	90,65	12,27	77,39	11,04
-4,5	75,98	10,72	76,09	15,11
-4,0	28,80	8,88	64,32	10,66
-3,5	0,81	0,44	30,77	7,14
-3,0	0,64	1,23	4,56	0,91
-1,0	1,67	0,74	4,56	0,91
	PL07			
log Konz. [%]	MW	SD	MW	SD
-9,0	100,00	–	100,00	–
-6,5	–	–	110,07	1,11
-6,4	103,96	17,29	–	–
-5,5	–	–	104,03	23,40
-5,4	99,91	17,30	–	–
-4,5	–	–	104,03	23,40
-4,4	86,90	15,73	–	–
-4,2	–	–	93,96	13,92
-3,9	88,73	16,61	102,11	11,26
-3,6	–	–	72,16	7,56
-3,4	52,78	13,58	–	–
-3,3	–	–	47,53	2,62
-3,1	35,90	6,49	–	–
-3,0	23,06	6,13	38,19	10,88

– Konzentration wurde nicht eingesetzt

**MTT-Assays mit verschiedenen Platinkomplexen.**

Angegeben ist jeweils die Absorption [% des Ausgangswertes].

		A2780 (n=6)		A2780cis (n=6)	
<b>PL04</b>					
<b>log Konz. [%]</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	
-7,0	100,00	–	100,00	–	
-6,0	106,76	25,06	103,89	14,92	
-5,0	27,80	3,28	62,26	7,45	
-4,5	11,58	4,45	51,88	7,33	
-4,0	6,76	1,60	46,69	5,16	
-3,8	5,08	1,26	20,04	3,14	
-3,7	4,44	3,23	10,89	0,78	
-3,6	3,54	2,91	9,96	0,85	
<b>PL07-Albumin</b>					
<b>log Konz. [%]</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	
-7,0	100,00	–	100,00	–	
-6,0	83,02	11,43	99,73	14,50	
-5,0	86,25	12,92	103,07	9,48	
-4,5	61,85	8,72	99,87	19,94	
-4,0	42,11	11,12	52,40	6,43	
-3,8	25,62	13,95	49,60	6,65	
-3,7	15,50	2,36	47,73	7,27	
-3,6	14,36	3,45	49,47	4,62	
-2,3	13,90	3,10	9,87	2,61	
<b>PL04-Albumin</b>					
<b>log Konz. [%]</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	
-9,0	100,00	–	100,00	–	
-6,5	110,72	8,59	100,66	8,80	
-5,5	104,38	12,52	91,89	15,15	
-4,5	117,96	9,13	111,90	11,30	
-4,2	109,38	4,96	94,15	11,15	
-3,9	106,34	8,45	80,07	13,79	
-3,6	65,59	12,40	60,00	11,85	
-3,3	48,62	5,65	43,43	10,91	
-3	28,24	4,21	27,05	13,05	

– Konzentration wurde nicht eingesetzt

## A5 Intrazelluläre Platinkonzentrationen

Angegeben ist die intrazelluläre Platinmenge [ng / 10<sup>6</sup> Zellen].

A2780				A2780cis		
Oxaliplatin						
Zeit [min]	MW	SE	N	MW	SE	N
2	0,12	0,01	3	0,06	0	3
5	0,32	0,02	3	0,11	0,01	3
10	0,89	0,02	3	1,21	0,03	3
60	6,47	0,39	3	5,44	0,27	3
120	14,86	0,16	3	9,64	0,58	3
Carboplatin						
2	0,15	0,02	6	0,11	0,02	6
5	0,33	0,08	6	0,21	0,03	6
10	0,43	0,06	6	0,32	0,04	6
60	2,44	0,06	6	1,5	0,3	6
120	4,57	0,41	6	3,23	0,29	6
PL07						
120	4,59	0,26	6	2,99	0,04	3
PL07–Albumin						
60	0,55	0,05	3	0,41	0,04	3
120	0,76	0,04	14	0,82	0,04	11
120 4 °C	0,14	0,015	3	0,14	0,037	3
PL04						
120	5,88	0,67	6	4,42	0,34	8
PL04–Albumin						
60	0,51	0,05	3	0,62	0,08	3
120	0,82	0,03	11	0,76	0,03	10
120 4 °C	0,13	0,018	3	0,14	0,041	3
PEG–Platinkomplex						
60	2,08	0,11	9	1,96	0,08	6
120	1,01	0,13	5	0,98	0,05	3

N Anzahl der durchgeführten Versuche

## A6 Untersuchung der Aufnahmemechanismen

### Intrazelluläre Konzentration von FITC-Rinderserumalbumin.

Angegeben ist die intrazelluläre Konzentration von FITC-Rinderserumalbumin [ng / 10<sup>6</sup> Zellen].

Zeit [min]	A2780			A2780cis		
	MW	SE	N	MW	SE	N
2	0,025	0,006	4	0,027	0,008	4
5	0,036	0,009	4	0,025	0,003	4
10	0,046	0,006	4	0,038	0,006	4
60	0,112	0,009	3	0,126	0,004	3
120	0,423	0,061	3	0,395	0,046	3

N Anzahl der durchgeführten Versuche

### Intrazelluläre Konzentration von FITC-Rinderserumalbumin nach Zugabe von Endozytoseinhibitoren.

Angegeben ist die intrazelluläre Konzentration von FITC-Rinderserumalbumin [ng / 10<sup>6</sup> Zellen] nach 60 Minuten Inkubation.

Substanz	A2780			A2780cis		
	MW	SE	N	MW	SE	N
BafA <sub>1</sub>	0,061	0,010	7	0,102	0,008	3
K (DMSO)	0,123	0,011	6	0,189	0,011	3
β-MCD	0,118	0,016	5	0,139	0,006	6
K (PBS)	0,118	0,017	5	0,164	0,014	6

N Anzahl der durchgeführten Versuche

Abkürzungen: BafA<sub>1</sub> = Bafilomycin A<sub>1</sub>, K (DMSO) = Kontrolle DMSO, β-MCD = β-Methylcyclodextrin, K (PBS) = Kontrolle PBS.

### Intrazelluläre Konzentration der makromolekularen Platinkomplexe nach Zugabe von Endozytoseinhibitoren.

Angegeben ist die intrazelluläre Platinkonzentration [ng / 10<sup>6</sup> Zellen] nach 120 Minuten Inkubation.

<b>A2780</b>				
<b>Substanz</b>	<b>Inhibitor</b>	<b>MW</b>	<b>SE</b>	<b>N</b>
PL07-Albumin	β-MCD	0,76	0,14	4
PL07-Albumin	K(PBS)	0,68	0,05	7
PL04-Albumin	β-MCD	0,72	0,11	4
PL04-Albumin	K(PBS)	0,82	0,06	6
PEG	β-MCD	1,27	0,03	9
PEG	K(PBS)	2,08	0,11	4
PL07-Albumin	BafA <sub>1</sub>	0,47	0,07	4
PL07-Albumin	K(DMSO)	0,65	0,08	4
PL04-Albumin	BafA <sub>1</sub>	0,49	0,02	4
PL04-Albumin	K(DMSO)	0,80	0,12	4
PEG	BafA <sub>1</sub>	1,19	0,10	4
PEG	K(DMSO)	1,69	0,17	4
PL07	BafA <sub>1</sub>	4,75	0,08	3
PL07	β-MCD	4,50	0,57	4
PL04	BafA <sub>1</sub>	5,18	0,17	3
PL04	β-MCD	4,45	0,59	4
<b>A2780cis</b>				
<b>Substanz</b>	<b>Inhibitor</b>	<b>MW</b>	<b>SE</b>	<b>N</b>
PL07-Albumin	β-MCD	0,73	0,03	4
PL07-Albumin	K(PBS)	0,75	0,02	6
PL04-Albumin	β-MCD	0,70	0,06	4
PL04-Albumin	K(PBS)	0,76	0,03	5
PEG	β-MCD	1,27	0,03	4
PEG	K(PBS)	1,61	0,03	6
PL07-Albumin	BafA <sub>1</sub>	0,53	0,08	4
PL07-Albumin	K(DMSO)	0,82	0,06	4
PL04-Albumin	BafA <sub>1</sub>	0,38	0,02	4
PL04-Albumin	K(DMSO)	0,75	0,06	4
PEG	BafA <sub>1</sub>	0,98	0,23	5
PEG	K(DMSO)	1,64	0,24	5
PL07	BafA <sub>1</sub>	3,54	0,19	3
PL07	β-MCD	2,90	0,22	3
PL04	BafA <sub>1</sub>	5,23	0,24	3
PL04	β-MCD	4,12	0,23	3

N Anzahl der durchgeführten Versuche

Abkürzungen: PL04A/07A = an Albumin gebundene Platinkomplexe, PEG = PEG-Platinkomplex  
 BafA<sub>1</sub> = Bafilomycin A<sub>1</sub>, K (DMSO) = Kontrolle DMSO, β-MCD = β-Methylcyclodextrin,  
 K (PBS) = Kontrolle PBS

## ANHANG B Ergebnisse zur Untersuchung neuer Oxaliplatin-Analoga

### B1 Kapillarelektrophoretische Reaktivitätsuntersuchung

Reaktivität verschiedener Platinkomplexe gegenüber den Nucleotiden dAMP und dGMP.

KP1475								
Zeit [h]	dAMP [µM]	SD	dGMP [µM]	SD	dAMP [%]	SD [%]	dGMP [%]	SD [%]
0	147,7	2,7	147,1	0,4	100,0	1,9	100,0	0,3
24	136,9	6,6	126,1	2,3	92,7	4,5	85,7	1,6
48	131,3	7,0	105,3	3,4	88,9	4,7	71,6	2,3
72	106,1	0,8	73,0	1,9	71,9	0,5	49,6	1,3
96	100,8	5,0	64,7	1,3	68,3	3,4	44,0	0,9
KP1476								
0	139,3	3,4	139,3	3,4	100,0	2,5	100,0	2,5
24	135,2	4,5	121,8	1,3	91,6	3,1	82,8	0,9
48	126,5	6,7	101,3	4,0	85,7	4,5	68,9	2,7
72	103,2	3,7	67,3	2,8	69,9	2,5	45,7	1,9
96	96,0	6,9	57,1	2,0	65,0	4,7	38,8	1,4
KP1478								
0	142,0	4,3	142,5	0,6	100,0	3,0	100,0	0,4
24	133,6	8,1	124,3	2,5	90,5	5,5	84,5	1,7
48	120,4	9,0	96,1	4,5	81,6	6,1	65,3	3,0
72	102,6	0,2	69,2	3,6	69,5	0,2	47,0	2,4
96	96,7	2,7	59,4	2,7	65,5	1,8	40,3	1,8
KP1480								
0	148,3	3,2	148,3	2,2	100,0	2,2	100,0	1,5
24	134,7	3,0	122,2	1,6	91,2	2,0	83,0	1,1
48	129,8	1,6	101,9	3,2	87,9	1,1	69,2	2,2
72	105,5	3,2	70,1	1,7	71,4	2,2	47,6	1,2
96	100,8	6,0	61,1	1,6	68,3	4,1	41,5	1,1
KP1481								
0	144,4	3,6	147,1	1,0	100,0	2,5	100,0	0,7
24	133,0	3,4	120,0	3,8	90,1	2,3	81,5	2,6
48	127,7	8,0	98,5	4,0	86,5	5,4	66,9	2,7
72	99,4	2,2	64,3	3,4	67,3	1,5	43,7	2,3
96	94,1	1,9	54,2	3,6	63,8	1,3	36,9	2,4
Oxaliplatin								
0	138,2	8,1	145,6	3,3	100,0	5,8	100,0	2,3
24	131,4	6,6	121,5	5,7	89,0	4,5	82,6	3,9
48	121,8	8,1	97,0	9,0	82,5	5,5	65,9	6,1
72	101,4	2,7	68,0	3,7	68,6	1,8	46,2	2,5
96	91,1	2,4	56,3	1,0	61,7	1,6	38,2	0,7

## B2 Intrazelluläre Platinkonzentrationen

Angegeben ist die intrazelluläre Platinmenge [ng / 10<sup>6</sup> Zellen].

<b>A2780</b>			<b>A2780cis</b>			
<b>Oxaliplatin</b>						
<b>Zeit [min]</b>	<b>MW</b>	<b>SE</b>	<b>N</b>	<b>MW</b>	<b>SE</b>	<b>N</b>
10	0,89	0,02	6	0,98	0,11	6
60	6,47	0,39	6	4,39	0,18	6
120	14,86	0,16	6	9,21	0,43	6
<b>KP1475</b>						
10	13,46	2,78	6	4,52	0,35	3
60	16,77	2,47	6	17,70	2,88	3
120	5,85	2,71	6	29,24	4,89	3
<b>KP1476</b>						
10	5,93	1,55	6	4,08	1,61	3
60	8,04	0,34	6	7,89	0,73	3
120	16,89	1,07	6	13,33	0,40	3
<b>KP1478</b>						
10	2,60	0,14	6	1,32	0,20	3
60	8,28	0,49	6	6,48	0,33	3
120	16,72	0,40	6	11,77	0,56	3
<b>KP1480</b>						
10	11,14	0,78	6	11,69	4,72	3
60	16,26	0,36	6	20,39	0,60	3
120	18,31	0,49	6	22,47	2,05	3
<b>KP1481</b>						
10	2,98	0,33	6	3,10	0,51	3
60	10,40	0,36	6	7,49	0,10	3
120	19,41	0,83	6	13,56	0,54	3
<b>Cisplatin</b>						
10	0,59	0,28	3	0,14	0,05	3
60	9,75	0,38	3	5,40	0,22	3
120	17,68	0,70	3	8,40	0,26	3

N Anzahl der durchgeführten Versuche

### B3 Untersuchung der Unterschiede zwischen Oxaliplatin und KP1480

Intrazelluläre Platinkonzentration nach 12 Stunden Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  Platinkomplex und nach 12 Stunden Auswaschphase.

Angegeben ist die intrazelluläre Platinkonzentration [ $\text{ng} / 10^6$  Zellen].

A2780			A2780cis			
Oxaliplatin						
Zeit [h]	MW	SE	N	MW	SE	N
12	6,62	0,21	3	3,3	0,05	3
12+12	5,3	0,43	3	2,4	0,14	3
KP1480						
12	8,56	0,33	3	4,49	0,40	3
12+12	8,232	0,96	3	3,434	0,23	3

N Anzahl der durchgeführten Versuche

Unterschiedliche DNA-Platinierung durch Oxaliplatin und KP1480 nach 4 Stunden Inkubation.

Angegeben ist die Platinmenge [Platinatome /  $10^6$  Nukleotide].

A2780			A2780cis			
Oxaliplatin						
MW	SE	N	MW	SE	N	
58,09	4,30	3	51,64	2,58	3	
KP1480						
24,36	5,49	3	23,78	7,56	3	

N Anzahl der durchgeführten Versuche

**Platinkonzentration in der Membran und im Zytosol von A2780 und A2780cis-Zellen nach 12 Stunden Inkubation mit 5  $\mu$ M Platinkomplex und nach 12 Stunden Auswaschphase.**

*Angegeben ist die Platinkonzentration [ng].*

<b>A2780</b>								
<b>KP1480</b>								
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>MW [%]</b>	<b>SE [%]</b>
Zytosol	28,27	33,71	9,60	8,96	5,37	4,99		
Membran	10,04	4,37	5,87	5,31	3,07	3,59		
Gesamt	38,31	38,08	15,47	14,27	8,44	8,58		
Membran [%]	26,21	11,48	37,94	37,23	36,36	41,87	31,85	4,60
<b>Oxaliplatin</b>								
Zytosol	14,56	15,13	15,59	13,23	8,27	9,34		
Membran	2,76	1,30	5,91	6,50	2,86	2,72		
Gesamt	17,32	16,43	21,49	19,73	11,13	12,06		
Membran [%]	15,92	7,89	27,47	32,94	25,69	22,55	22,08	3,65
<b>A2780cis</b>								
<b>KP1480</b>								
Zytosol	7,22	9,77	6,49	22,79	9,59	10,72		
Membran	4,28	6,53	1,13	4,03	30,20	25,04		
Gesamt	11,50	16,30	7,62	26,82	39,79	35,76		
Membran [%]	37,21	40,05	14,79	15,04	75,90	70,02	42,17	10,69
<b>Oxaliplatin</b>								
Zytosol	16,17	12,82	9,20	8,72	11,06	10,73		
Membran	2,17	1,55	4,57	2,65	6,64	5,47		
Gesamt	18,33	14,38	13,77	11,37	17,70	16,20		
Membran [%]	11,81	10,82	33,17	23,30	37,50	33,78	25,06	4,75

## B4 Zytotoxizitätstests zur Bestimmung der EC<sub>50</sub>

Angegeben ist jeweils die Absorption [% des Ausgangswertes].

A2780 (n=3)			A2780cis (n=3)	
KP1475				
log Konz. [M]	MW	SD	MW	SD
-8,5	100,00	0,00	100,00	0,00
-7,5	103,41	1,61	94,69	15,98
-6,5	106,83	9,07	91,06	19,83
-5,5	85,54	2,52	89,86	8,54
-5,2	45,52	0,76	69,93	4,10
-4,9	12,58	0,46	96,50	9,65
-4,6	8,70	0,91	86,23	16,63
-4,3	2,81	1,06	24,64	4,61
-4	2,68	1,03	10,87	0,96
-3,7	2,07	0,42	7,49	1,37
-2	–	–	7,00	1,73
KP1476				
log Konz. [M]	MW	SD	MW	SD
-8,5	100,00	0,00	100,00	0,00
-7,5	98,56	10,91	89,19	17,47
-6,5	117,87	7,21	85,52	12,29
-5,5	84,61	9,41	102,70	18,20
-5,2	77,76	9,68	92,02	12,41
-4,9	67,58	4,34	76,45	7,61
-4,6	46,51	2,74	65,51	13,82
-4,3	12,92	2,06	45,43	3,96
-4	5,87	0,90	31,92	8,34
-3,7	1,44	0,69	15,19	3,24
-2	–	–	14,67	2,89
KP1478				
log Konz. [M]	MW	SD	MW	SD
-8,5	100,00	0,00	100,00	0,00
-7,5	84,30	19,72	96,28	5,33
-6,5	105,20	14,04	90,62	12,81
-5,5	45,36	2,30	100,45	6,30
-5,2	43,93	1,16	93,15	4,73
-4,9	27,42	3,67	58,78	17,93
-4,6	12,74	0,18	46,73	4,00
-4,3	10,30	1,68	27,98	6,46
-4	8,46	1,24	22,47	2,62
-3,7	2,65	0,47	17,56	5,38
-2	–	–	16	4,00

– Konzentration wurde nicht eingesetzt

Angegeben ist jeweils die Absorption [% des Ausgangswertes].

A2780 (n=3)			A2780cis (n=3)		
KP1480					
log Konz. [M]	MW	SD	MW	SD	
-8,5	100,00	0,00	100,00	0,00	
-7,5	87,53	9,31	109,82	10,83	
-6,5	91,33	7,64	110,42	20,52	
-5,5	72,83	8,79	93,15	3,23	
-5,2	74,37	20,84	101,04	24,33	
-4,9	67,49	12,22	102,38	9,64	
-4,6	54,84	3,21	101,49	4,47	
-4,3	28,30	6,13	83,48	11,19	
-4	13,38	3,42	61,90	4,56	
-3,7	7,20	2,37	9,82	2,05	
-2	–	–	9,67	2,52	
KP1481					
log Konz. [M]	MW	SD	MW	SD	
-8,5	100,00	0,00	100,00	0,00	
-7,5	93,97	4,94	115,92	7,60	
-6,5	86,15	2,32	99,60	14,38	
-5,5	71,08	2,41	109,04	14,86	
-5,2	46,73	1,65	86,50	7,90	
-4,9	25,35	0,84	67,88	12,91	
-4,6	6,31	0,98	47,64	3,74	
-4,3	4,08	0,95	14,17	0,70	
-4	3,24	0,54	10,12	1,07	
-3,7	1,28	0,35	5,53	0,62	
-2	–	–	5,33	0,58	

– Konzentration wurde nicht eingesetzt

# Lebenslauf

Dirk Garmann

## Beruflicher Werdegang

02/2007	Einleitung des Promotionsverfahrens
Seit 05/2006	Freie Mitarbeit bei der regionalen Arzneimittelinformationsstelle der Apothekerkammer Nordrhein
Seit 03/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn
02/2005 – 03/2005	Wissenschaftliche Hilfskraft im Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn
01/2003 – 01/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn, angestellt für das DFG Projekt „Makromolekulare Prodrugs tumorhemmender Platin(II)-Komplexe: Albuminbindende Prodrugs und Poly(ethylenglykol)-Konjugate wasserlöslicher Carboplatin-Analoga“ ( JA 817/2-1)
Seit 01/2003	Anfertigung einer Dissertation im Bereich Klinische Pharmazie unter Leitung von Prof. Dr. U. Jaehde

## Ausbildung

05/2006	Fachapotheker für Arzneimittelinformation
02/2003 – 02/2006	Weiterbildung zum Fachapotheker für Arzneimittelinformation
Seit 02/2003	Kollegiat im Graduiertenkolleg 677 „Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“
01/2003	Approbation zum Apotheker
11/2002	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
05/2002 – 10/2002	Zweite Hälfte des Praktischen Jahres bei der Bayer AG, Leverkusen im Bereich „Pharma Research: Abteilung Herz-Kreislauf-Forschung II“
11/2001 – 04/2002	Erste Hälfte des Praktischen Jahres in der Engel-Apotheke, Mettingen
10/2001	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
03/1999	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
08/1998 – 09/1998	Famulatur in der Zentralapotheke der Maria-Josef-Hospital Greven GmbH
03/1997 – 10/2001	Studium der Pharmazie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

## Zivildienst

01/1996 – 02/1997	Zivildienst im Jugendtreff der Gemeinde Mettingen
-------------------	---

## Schulausbildung

07/1992 – 06/1995	Abitur am Kardinal-von-Galen-Gymnasium Mettingen
08/1986 – 07/1992	Kardinal-von-Galen-Realschule Mettingen
08/1982 – 07/1986	Paul-Gerhard-Grundschule Mettingen

## Publikationen, Kongressbeiträge

### *Wissenschaftliche Originalarbeiten*

Garmann D, Warnecke A, Kratz F, Jaehde U. Reactivity of novel albumin-binding platinum complexes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004 42: 646-647

Warnecke A, Fichtner I, Garmann D, Jaehde U, Kratz F. Synthesis and biological activity of water-soluble maleimide derivatives of the anticancer drug Carboplatin designed as albumin-binding prodrugs. *Bioconjugate Chem* 2004 15: 1349-1359

Zwei weitere Publikationen zur Dissertation in Vorbereitung

### *Abstracta/Kongressmitteilungen*

Garmann D, Warnecke A, Kratz F, Jaehde U. Reactivity of novel albumin-binding platinum complexes World Conference on Magic Bullets, 2004, Nürnberg (Poster)

Garmann D, Warnecke A, Kratz F, Jaehde U. Untersuchungen zur Reaktivität neuer albuminbindender Platinkomplexe. Jahrestagung der Central European Society of Anticancer Drug Research (CESAR), 2004, Rostock (Kurzvortrag)

Garmann D, Warnecke A, Kratz F, Jaehde U. Reactivity of novel albumin-binding platinum complexes. DPhG Jahrestagung, 2004, Regensburg (Poster)

Garmann D, Warnecke A, Kratz F, Jaehde U. Reaktivität neuer albuminbindender Platinkomplexe. Arbeitstagung der CESAR Central European Society of Anticancer Drug, 2005, Frankfurt (Kurzvortrag)

Garmann D, Warnecke A, Kratz F, Jaehde U. Novel albumin-binding platinum complexes: Reactivity and uptake in tumor cells. Symposium on Novel Approaches for the Discovery and the Development of Anticancer Agents, 2005, Wien (Kurzvortrag Englisch)

Garmann D, Galanski M, Keppler BK, Jaehde U. Effect of lipophilicity on early cellular uptake of platinum complexes. Jahrestagung der Central European Society of Anticancer Drug Research (CESAR) 2006, Essen (Kurzvortrag)

Garmann D, Galanski M, Keppler BK, Jaehde U. Effect of lipophilicity on cellular uptake of platinum complexes. DPhG Jahrestagung, 2006, Mainz (Poster)