



Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von lipophilen  
Cisplatin- und Betulinsäurederivaten

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II  
Institut für Chemie

von

Diplom-Chemiker Bernd Kalinowski  
geb. am 07.06.1977 in München

Gutachter:

1. Prof. Dr. René Csuk
2. Prof. Dr. Rainer Schobert

Halle (Saale), im September 2007

**Verteidigung der Promotion am 14.01.2008**

**urn:nbn:de:gbv:3-000013214**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013214>]

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Notwendigkeit der Entwicklung neuer Antitumorwirkstoffe.....	1
1.2 Zielstellung.....	3
2 Theoretischer Teil.....	5
2.1 Verwendete Substanzklassen.....	5
2.1.1 Platin-Verbindungen.....	5
2.1.1.1 Grundlagen.....	5
2.1.1.2 Aktuelle Forschungsansätze.....	8
2.1.2 Betulinsäure.....	12
2.2 Methoden zur Verbesserung der Löslichkeit lipophiler Wirkstoffe.....	16
2.2.1 Allgemeine Strategien zu Verbesserung der Löslichkeit.....	16
2.2.1.1 pH-Variation.....	16
2.2.1.2 Organische Cosolventien.....	17
2.2.1.3 Komplexierung in isotonischer Lösung.....	17
2.2.1.4 Einsatz von Tensiden.....	17
2.2.1.5 Emulsionen.....	18
2.2.1.6 Liposome.....	18
2.2.1.7 Nanotechnologie.....	19
2.2.2 Beschreibung der angewendeten Methoden.....	20
2.2.2.1 Cyclodextrine.....	20
2.2.2.1.1 Struktur der Cyclodextrine.....	20
2.2.2.1.2 Derivate der Cyclodextrine.....	21
2.2.2.1.3 Toxizität der Cyclodextrine.....	22
2.2.2.1.4 Komplexbildung des Cyclodextrins.....	23
2.2.2.1.5 Einsatz der Cyclodextrine in der Pharmazie.....	24
2.2.2.2 Micellen.....	24
2.2.2.2.1 Allgemeines.....	24
2.2.2.2.2 Physiologische Mischmicellen.....	25
2.3 Elementanalytik mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS).....	27
2.4 Zellkulturen.....	29
2.4.1 Allgemeines.....	29
2.4.2 Züchtung von Zelllinien.....	29
2.4.3 Verwendung und Bedeutung von Zellkulturen.....	30
3 Ergebnisse und Diskussion.....	31
3.1 Erhöhung der Löslichkeit von THPC <sub>11</sub> -subs.PDAP <sub>tcis</sub> 4.....	31
3.1.1 Verwendung eines organischen Lösungsmittels.....	31
3.1.2 Einsatz von Cyclodextrin als Komplexierungsmethode.....	32
3.1.2.1 Wahl des Lösungsmittels.....	33
3.1.2.2 Mikrowelle als Lösungsunterstützer.....	34
3.1.2.3 Optimales Verfahren.....	35
3.1.2.4 Ergebnisse für alle vorliegenden Substanzen.....	36
3.1.2.4.1 HO-Spacer-Verbindungen.....	36
3.1.2.4.2 THP-Carbo-Verbindungen.....	36
3.1.2.4.3 THP-Cis-Verbindungen.....	37
3.1.2.4.4 Gallensäure-Platin-Konjugate.....	39
3.1.2.5 5-Tage-Messungen.....	40
3.1.2.5.1 langkettige THP- und Gallensäure-Platin-Konjugate.....	40
3.1.2.5.2 OH-Spacer-Verbindungen und kurzkettige THP-Verbindungen.....	41

3.1.2.5.3 Vergleich Komplexierung langkettiger Verbindungen mit CD's und Micellen.....	41
3.1.2.6 Zusammenfassung.....	42
3.1.3 Einsatz von Micellen als Komplexierungsmethode.....	43
3.1.3.1 Micellare Lösung von ChaC <sub>8</sub> 2-subst.PDAPtcis 27 und ChaC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcarbo 29.....	43
3.1.3.2 Präparationsmethode.....	45
3.1.3.3 Lösungsmittel.....	46
3.1.3.3.1 Art des Lösungsmittels.....	46
3.1.3.3.2 Menge des Lösungsmittels.....	48
3.1.3.4 Micellen-Zugabe.....	48
3.1.3.5 Reaktionsführung.....	51
3.1.3.5.1 Variation der Reaktionsdauer.....	51
3.1.3.5.2 Variation der Reaktionstemperatur.....	52
3.1.3.6 Filtration.....	53
3.1.3.7 Optimales Verfahren.....	54
3.1.3.8 Ergebnisse für alle vorliegenden Substanzen.....	55
3.1.3.8.1 OH-Spacer-Verbindungen.....	55
3.1.3.8.2 THP-Carbo-Verbindungen.....	56
3.1.3.8.3 THP-Cis-Verbindungen.....	57
3.1.3.8.4 Gallensäure-Verbindungen.....	58
3.1.3.9 Zusammenfassung.....	58
3.1.4 Emulsionen.....	59
3.1.4.1 Ofen-Programm für die AAS-Messung.....	59
3.1.4.2 Emulsionen mit NaCl-Lösung.....	60
3.1.4.3 Emulsionen mit Glycerol.....	61
3.2 Struktur-Wirkungs-Untersuchungen der Platinverbindungen.....	61
3.2.1 Cytotoxizität der THP-Verbindungen.....	61
3.2.2 THP-Verbindung ohne Platin-Komplex.....	63
3.2.3 Kinetik der Toxizität von THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcis 4.....	65
3.2.4 Wirksamkeit der eingekapselten Verbindungen.....	66
3.2.5 Vergleich von THPC <sub>11</sub> N-subst.PDAPtcis 8 und THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcis 4.....	70
3.2.6 Vergleichende Aufnahmekinetiken von THPC <sub>4</sub> 2-subst.PDAPtcis 1, THPC <sub>6</sub> 2-subst.PDAPtcis 2 und THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcis 4.....	72
3.2.7 Untersuchung des Kupfer-Einflusses auf die Aufnahme der Verbindungen in die Zelle.....	73
3.2.8 Variation der Konzentrationen bei der Inkubation.....	74
3.2.9 Zeitliche Aufnahmekinetiken von THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcis 4 und CDDP.....	76
3.2.10 Vergleich Platingehalt Zellmaterial - DNA.....	77
3.2.11 Reaktion von reiner DNA mit CDDP und THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcis.....	79
3.2.12 Zusammenfassung.....	80
3.3 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von neuen Betulinsäurederivaten.....	81
3.3.1 IC <sub>50</sub> -Werte von Betulinsäure-Derivaten.....	81
3.3.1.1 Vergleichende C3- und C28-Derivatisierungen.....	81
3.3.1.2 Derivatisierungen an C28.....	82
3.3.1.3 Derivatisierungen an C3.....	83
3.3.1.4 C28-Derivatisierungen der Acetyl-Betulinsäure.....	84
3.3.2 Zusammenfassung.....	85
3.4 Homogenitätstest zur SS-GFAAS.....	86
3.5 Zusammenfassung und Ausblick.....	87
4 Experimenteller Teil.....	90
4.1 Flüssig-AAS.....	90
4.2 Feststoff-AAS.....	90
4.3 Komplexierung mit HP-β-Cyclodextrin.....	91

4.4	Komplexierung mit Mizellen .....	91
4.5	Zellkultur.....	92
4.5.1	Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes mittels SRB-assay.....	92
4.5.2	Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes per Zählung.....	92
4.5.3	Herstellung der platinieren Zellproben .....	92
4.6	Synthesen .....	93
4.6.1	NMR-Spektren .....	93
4.6.1.1	Tetrahydropyranloxyundecene .....	93
4.6.1.1.1	<sup>1</sup> H-Spektrum.....	93
4.6.1.1.2	<sup>13</sup> C-Spektrum.....	94
4.6.1.2	Tetrahydropyranloxyundecanol.....	95
4.6.1.2.1	<sup>1</sup> H-Spektrum.....	95
4.6.1.2.2	<sup>13</sup> C-Spektrum.....	96
4.6.2	Synthesevorschriften .....	97
4.6.2.1	Tetrahydropyranloxyundecene.....	97
4.6.2.2	Tetrahydropyranloxyundecanol.....	97
6	Abbildungen.....	99
7	Tabellen.....	101
8	Abkürzungen.....	102
9	Geräte und Materialien.....	104
10	Literaturverzeichnis .....	105

# 1 Einleitung

## 1.1 Notwendigkeit der Entwicklung neuer Antitumorwirkstoffe

Trotz intensiver Forschung waren Krebserkrankungen in Deutschland mit 209.329 von 818.271 Todesfällen<sup>1</sup> im Jahr 2004 immer noch die zweithäufigste Todesursache und ursächlich für ein Viertel aller Sterbefälle, die festgestellten Neuerkrankungen betragen im Jahr 2000 394.680 Fälle<sup>2</sup>. Der finanzielle Aufwand für die Behandlung von Tumorerkrankungen liegt mit 14,714 Milliarden Euro im Jahr 2002 auf einem entsprechend hohen Niveau<sup>3</sup> und bietet somit großen Anreiz für pharmakologische und medizinische Forschung. Es wurden im Laufe der Zeit zwar große Fortschritte bei der Aufklärung der molekularen, zellulären und genetischen Prozesse im Verlaufe einer Krebserkrankung erzielt, diese konnten bisher aber noch nicht in umfassende kausale Therapien umgesetzt werden<sup>4</sup>. Verbesserte Heilungschancen beruhen vor allem auf erhöhter Vorsorge, besseren Operationstechniken sowie neueren Technologien in Bestrahlung und Chemotherapie. Hat der Tumor aber einmal Metastasen gebildet, bleibt nur noch die Chemotherapie als Behandlungsmöglichkeit.

Für die Chemotherapie stehen heute eine Vielzahl unterschiedlicher Medikamente zur Verfügung. Exemplarisch seien an dieser Stelle nur Taxol, Doxorubicin, Vinblastin sowie Cisplatin genannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Cisplatinderivate sowie Derivate eines neuen, gegen Tumore wirksamen Naturstoffes untersucht.

Die cytotoxische Wirkung von Cisplatin als erster Platinverbindung in der Krebstherapie wurde 1965 zufällig entdeckt<sup>5</sup>. Es ist seit über dreißig Jahren wichtiger Bestandteil der Chemotherapie und noch heute Rückgrat der Behandlung von Hoden-, Eierstock-, Blasen-, Gebärmutterhals-, Kopf-, Nacken- sowie Lungentumoren<sup>6</sup>.

Der Einsatz und die Wirksamkeit von Cisplatin werden jedoch von zwei Faktoren wesentlich eingeschränkt. Zum einen verursacht Cisplatin teils gravierende Nebenwirkungen wie Nierenschäden, Übelkeit und Erbrechen; die therapeutisch erforderliche Dosis liegt oft in der Nähe der akzeptablen Toxizitätsgrenze. Ein zweites Problem ist das stellenweise Auftreten von

Resistenz, die entweder von Anfang an besteht oder durch die Behandlung selbst erworben werden kann. Dieses Problem stellt sich vor allem bei der Behandlung von Gebärmutterhalstumoren; hier besteht innerhalb von fünf Jahren eine 80%ige Rückfallwahrscheinlichkeit und eine wiederholte Anwendung von Cisplatin scheitert oft an der angeeigneten Resistenz der Tumore<sup>7</sup>.

Angesichts der zahlreichen Krebs-Neuerkrankungen, der hohen Anzahl der Todesfälle und der angeführten Probleme beim Einsatz von Cisplatin ergibt sich weiterhin ein erheblicher Forschungsbedarf, der sich auf den zielgerichteten Einsatz der Medikamente („drug targeting“) und auf die Überwindung der Resistenzen bezieht.

Das pentacyclische Triterpenoid Betulinsäure ist im Gegensatz zum Cisplatin ein jüngerer Objekt der pharmazeutischen Forschung. In den 80er Jahren wurde erstmals über ihr Antitumor-Potential berichtet<sup>8</sup>, Mitte der 90er Jahre über ihre Einsatzmöglichkeiten in der HIV-Therapie<sup>9</sup>. Die als Naturstoff beispielsweise aus Platanenrinde<sup>10</sup> gewonnene Betulinsäure zeigt hohe Selektivität und kann somit in Dosen bis zu 500mg pro Kilogramm Körpergewicht verabreicht werden. Diese positiven Eigenschaften haben das Interesse an Betulinsäure in den vergangenen Jahren kontinuierlich wachsen lassen. Zusätzlich werden laufend neue Derivate synthetisiert um ein optimales Mittel gegen Krebs- bzw. Tumorerkrankungen zu finden.

In beiden Fällen – sowohl bei Cisplatinderivaten als auch bei Betulinsäurederivaten – müssen im Rahmen der pharmakologischen und medizinischen Forschung gegebenenfalls Methoden entwickelt werden, mit denen die stark lipophilen Verbindungen für die Chemotherapie in therapeutisch ausreichender Konzentration in Lösung gebracht werden können. Für die Wirksamkeitsstudien müssen ferner Analysemethoden entwickelt werden, die die Bestimmung dieser Verbindungen in Injektionslösungen sowie in möglichst vielen organischen Materialien möglich machen.

## 1.2. Zielstellung

In der Abteilung Medizinische/Pharmazeutische Chemie am Biozentrum beschäftigt man sich im Rahmen verschiedener Drittmittelprojekte mit der Herstellung neuartiger Antitumorwirkstoffe. Dabei handelt es sich um Cisplatin-analoge Verbindungen des Typs **A** sowie um Betulinsäurederivate **B**.

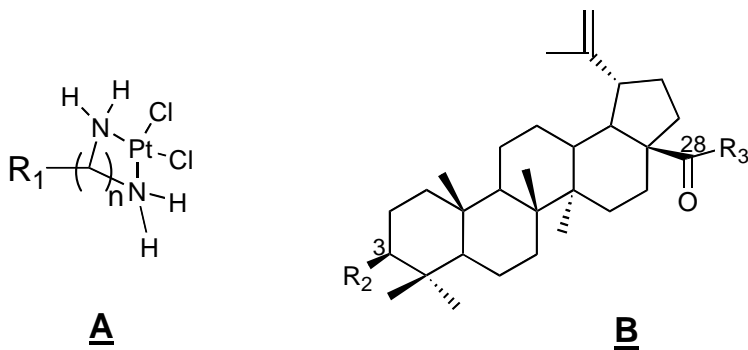


Abbildung 1: Grundstruktur der Cisplatin-analogen Verbindungen **A** sowie der Betulinsäurederivate **B** ( $R_1 = (CH_2)_n$ -Kette mit Transportmolekül,  $R_2, R_3 =$  organische Liganden)

Um die Strukturen der Verbindungen weiter optimieren zu können sind detaillierte Aussagen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen notwendig. Hauptziel dieser Arbeit war es deshalb, durch Testung unterschiedlich substituierter Verbindungen an geeigneten Zellsystemen die Effekte von Strukturänderungen zu evaluieren.

Neben der Bestimmung der cytotoxischen Eigenschaften der unterschiedlichen Cisplatin-analogen Substanzen bzw. der Betulinsäurederivate war ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit die Erhöhung der Löslichkeit der Verbindungen beider Substanzklassen. Limitierender Faktor bei präklinischen und später auch klinischen Testungen ist oftmals die schlechte Applizierbarkeit. Deshalb wurden unterschiedliche Systeme getestet, um von vornherein sicher zu stellen, dass die Substanzen in für die Testsysteme geeigneten Konzentrationen gelöst werden können.

Einen dritten Schwerpunkt der Arbeit bildete die Bestimmung der Platin-Konzentrationen in den Lösungen und im gefriergetrockneten Zellmaterial. Dazu mussten entsprechende Methoden der Flüssig- bzw. Feststoff-Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) bereitgestellt werden. Diese

Arbeiten bildeten im Falle der Cisplatin-analogen Verbindungen die Voraussetzung für alle Struktur-Eigenschafts-Evaluierungen.



## 2 Theoretischer Teil

Entsprechend der Zielstellung ging es bei der vorliegenden Arbeit darum, am Beispiel von ausgewählten, in der Arbeitsgruppe Paschke hergestellten Cisplatin- und Betulinsäurederivaten sowie einigen, im Rahmen dieser Arbeit neu hergestellten Vertretern, einen Beitrag zum Verständnis der Wirkungsweise sowie den Struktur-Eigenschafts-Beziehungen dieser potentiellen Wirkstoffe zu leisten. Die Untersuchungen zu dieser Problematik erweisen sich als außerordentlich komplex und sind nur durch die Zusammenarbeit unterschiedlicher Fachdisziplinen erfolgreich zu gestalten.

Die Teilgebiete Synthese, Platinanalytik, Toxizitätsmessung und Löslichkeitsverbesserung stellen deshalb eine untrennbare Einheit dar. Im Folgenden werden die Grundlagen und Grundprinzipien erläutert, die ich bei der Durchführung der einzelnen Arbeiten beachten musste.

### 2.1 Verwendete Substanzklassen

#### 2.1.1 Platin-Verbindungen

##### 2.1.1.1 Grundlagen

Platin-Verbindungen standen am Beginn der Entwicklung einer einzigartigen und wichtigen Klasse von Krebsmedikamenten. Seit den ersten Berichten von *Rosenberg et.al.*<sup>11</sup> 1969 über die Einsatzmöglichkeiten von Platin-Verbindungen gegen Tumore wurden neben Cisplatin weitere Verbindungen auf ihre Wirksamkeit untersucht. Die heutigen Aktivitäten auf diesem Forschungsgebiet zeigen die nach wie vor hohe Aktualität der Platin-Verbindungen in der Krebsforschung.

Auch wenn Cisplatin als Verbindung schon 1845 unter der Bezeichnung *Peyrone's Chloride*<sup>12</sup> beschrieben wurde, war die Antitumorwirkung bis gegen Ende der 60'er Jahre des 20. Jahrhunderts unbekannt<sup>13</sup>, bis *Rosenberg* den Einfluss von elektrischen Feldern auf das Wachstum von Bakterien untersuchte: *Escherichia coli* wurde in einer  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -haltigen

Nährlösung kultiviert; dabei entstanden unter Einwirkung von Sonnenlicht aus den Platinelektroden bestimmte Platinverbindungen und die Unterbrechung der Zellteilung wurde registriert. Dieser Effekt beruht allerdings nicht auf dem elektrischen Feld selbst, sondern auf der Gegenwart kleiner Mengen von Platin-Verbindungen wie cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] und cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>]. Letztlich stellte sich als wirksame Verbindung Cisplatin [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] heraus, wohingegen das trans-Isomer wirkungslos war.

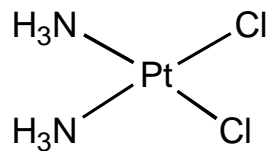
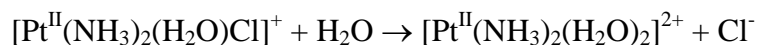
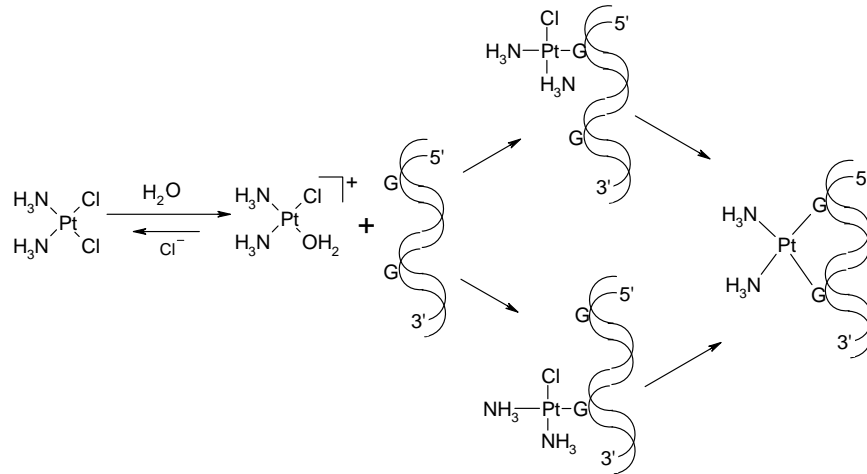


Abbildung 2: Cisplatin

Die Verabreichung von cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] an den Organismus erfolgt per Injektion. Der biochemische Mechanismus der Wirkung des Cisplatins ist heute in weiten Teilen aufgeklärt<sup>14</sup>. Die Dissoziation des Moleküls außerhalb der Zellen wird von der Chloridkonzentration der extrazellulären Flüssigkeiten verhindert, ein Ligandenaustausch kann somit nicht stattfinden. Der Komplex diffundiert passiv durch die Zellmembran, innerhalb der Zelle werden die Chloroliganden aufgrund des niedrigen Chloridgehaltes (97% geringer als außerhalb der Zelle) durch Wasser substituiert:

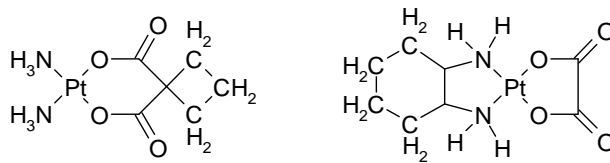


Dieser hydratisierte Komplex kann nun mit den N7-Atomen der Guanin-Basen der DNA unter Bildung einer Bindung reagieren.



**Abbildung 3: Mechanismus der Reaktion von Cisplatin mit DNA**

Die Antitumorwirkung des Cisplatin beruht nach gängigen Vorstellungen auf der Bildung dieser Platin-DNA-Addukte<sup>15,16</sup>. Nach der auf Cisplatin zurückzuführenden festgestellten Rückbildung von Tumoren bei Tieren wurde mit klinischen Studien an menschlichen Tumoren begonnen. Phase I der klinischen Phase startete 1971<sup>17</sup>, die Genehmigung der FDA (**F**ood and **D**rug **A**dministration) wurde 1978 unter dem Namen „platinol“ erteilt. Die Zulassung von Carboplatin folgte 1989 unter dem Namen „paraplatin“, wobei in jüngster Zeit auch oxali-Platin (Eloxatin) für die Routinebehandlung von Darmkrebs eingesetzt wurde und weitere Verbindungen sich in den klinischen Phasen I und II befinden<sup>18</sup>.



**Abbildung 4: Carboplatin und Oxali-Platin**

Die meisten der bekannten Antitumorplatinverbindungen haben die Formel  $\text{cis-}[\text{PtX}_2(\text{NHR}_2)_2]$  (R= organisches Fragment; X= abgehende Gruppe, z.B.  $\text{Cl}^-$  oder chelatisierende Bis-carboxylate). So wurden beispielsweise 1,2-Diaminocyclohexan-(DACH-)Derivate<sup>19</sup> und Pyrazin-Derivate<sup>20</sup> untersucht, aber auch Verbindungen mit anderen Metallzentren getestet<sup>21,22</sup>.

Cisplatin ist bekannt für seine besondere Wirksamkeit gegen feste Tumortypen wie Hodenkrebs, Eierstockkrebs, Knochenkrebs und kleinzellige Lungentumore mit einer Heilungsrate von über 90%.

### 2.1.1.2 Aktuelle Forschungsansätze

Die Suche nach neuen antitumoraktiven Platinverbindungen führt aufgrund der teils gravierenden Nebenwirkungen und der Resistenzbildungen auch zu Strukturen, die nicht nach dem Prinzip des Cisplatins aufgebaut sind<sup>23</sup>. *Rosenberg* hat beispielsweise Pt(IV)-Verbindungen noch als inaktiv angesehen, nun werden sie vermehrt synthetisiert und getestet<sup>24,25,26,27,28</sup>, da sie nach der intrazellulären Reduktion zur analogen Pt(II)-Verbindung ebenfalls cytotoxisches Potential besitzen können. Satraplatin als in der Klinischen Phase III stehend weist unter den Platin(IV)-Verbindungen den größten Fortschritt auf.

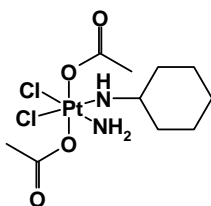


Abbildung 5: Struktur von Satraplatin

Wesentliche Wirkung von Satraplatin ist die Inaktivierung der Glutathion-S-Transferase (GST), die das Cisplatin in der Zelle abfangen und inaktivieren kann<sup>29</sup>.

Ein weiteres Thema von großem Interesse ist die Darstellung von *trans*-Platin(II)-Verbindungen<sup>30,31,32,33,34</sup>, die ebenfalls lange Zeit als inaktiv eingestuft wurden. Heute sind einige Ausnahmen von dieser Regel bekannt. Man erhofft sich von der *trans*-Konformation aufgrund anderer DNA-Bindungsstrukturen eine Überwindung der Cisplatinresistenz.

Häufiger Ansatz sind auch Verbindungen mit mehreren Platinzentren<sup>35,36,37</sup>. Ähnlich wie bei den vorigen Ansätzen erwartet man von multinuklearen Verbindungen neben der direkten Proportionalität von Cytotoxizität zur Anzahl der Platin-Zentren unterschiedliche

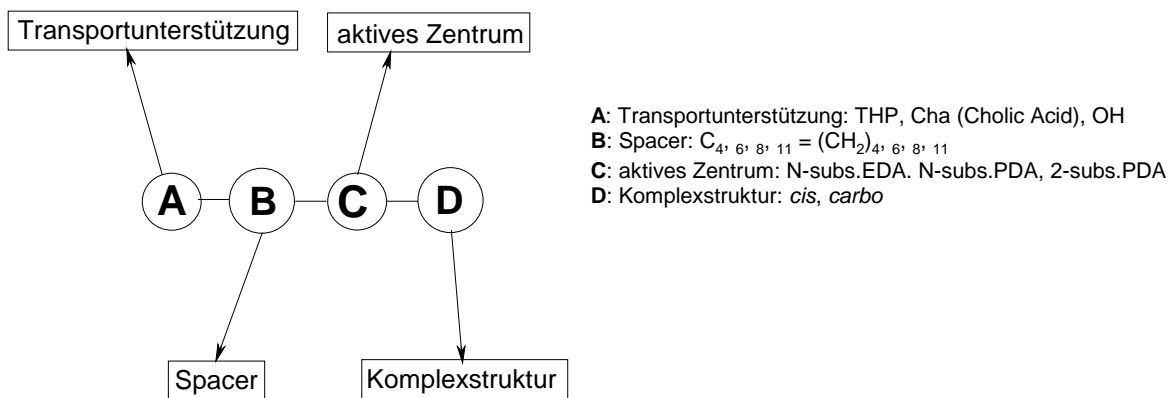
Bindungsmuster im Vergleich zu Cisplatin und damit die Fähigkeit, dessen Resistenzproblem zu lösen. Eine Verbindung befindet sich bereits in Phase II-Studien<sup>38</sup>.

Eine weitere Überlegung besteht darin, durch ein einzelnes Molekül eine Kombinationstherapie zu ermöglichen, so z.B. durch die Anbindung eines photoaktivierbaren Komplexes<sup>39</sup>. Brunner hat in ausführlichen Arbeiten Porphyrin-Platin-Komplexe als aussichtsreiche Spezies vorgestellt<sup>40,41</sup>.

Im Rahmen von „Drug-Targeting“-Strategien werden Platin-Einheiten auch mit Biomolekülen verknüpft, um Sensitivität und Selektivität der Verbindungen zu erhöhen. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt; die drei Einheiten:

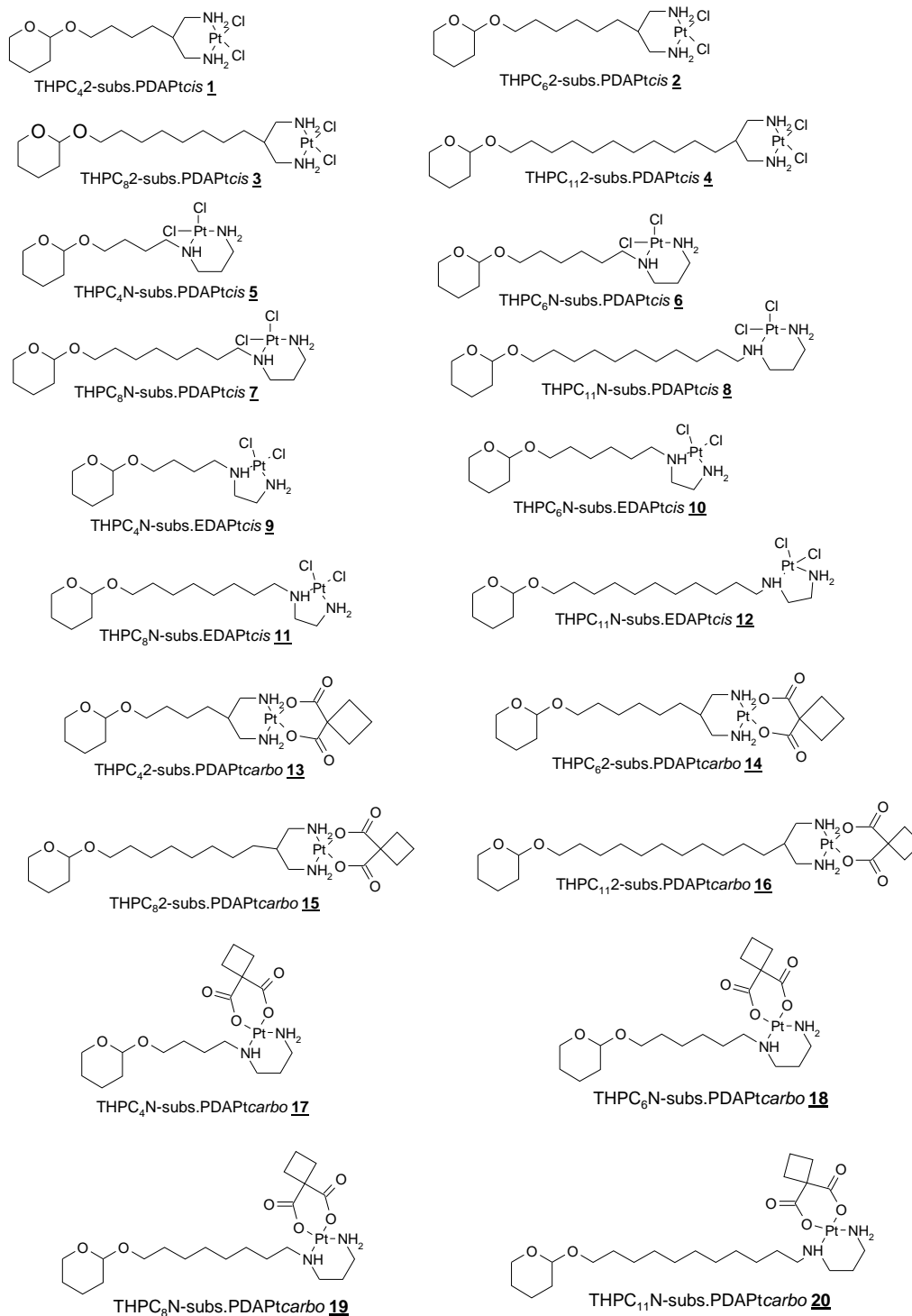
1. eine den Transport unterstützende Struktur
2. ein Spacer (n-Alkylkette mit n= 4,6,8,11)
3. das aktive Zentrum (Cisplatin-analoge oder Carboplatin-analoge Struktur) sowie unterschiedlicher Anbindung an den Spacer (N-substituiert oder C-C-verknüpft)

wurden systematisch variiert, um nach den cytotoxischen Testungen konkrete Aussagen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen machen zu können.

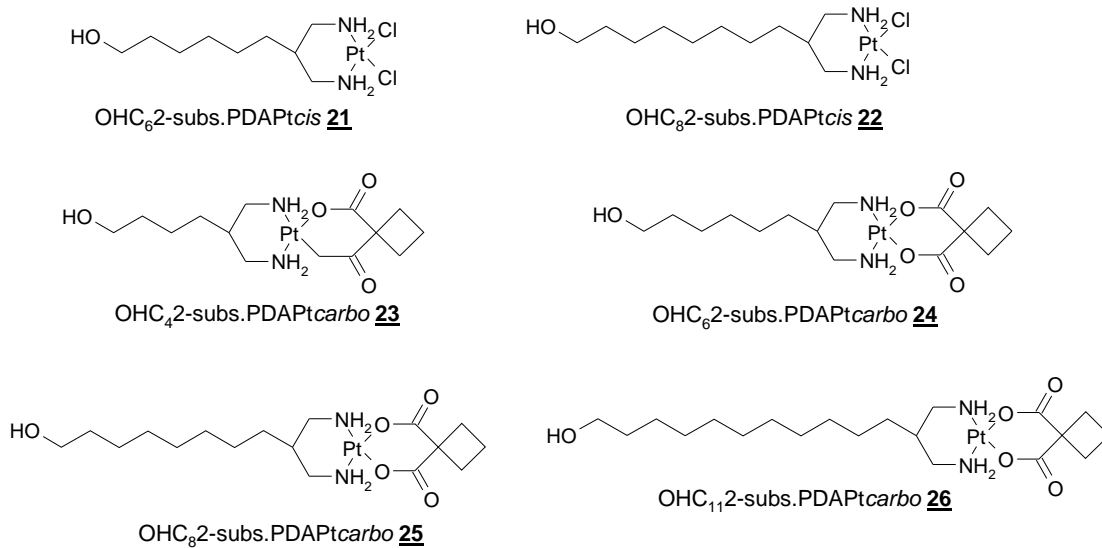
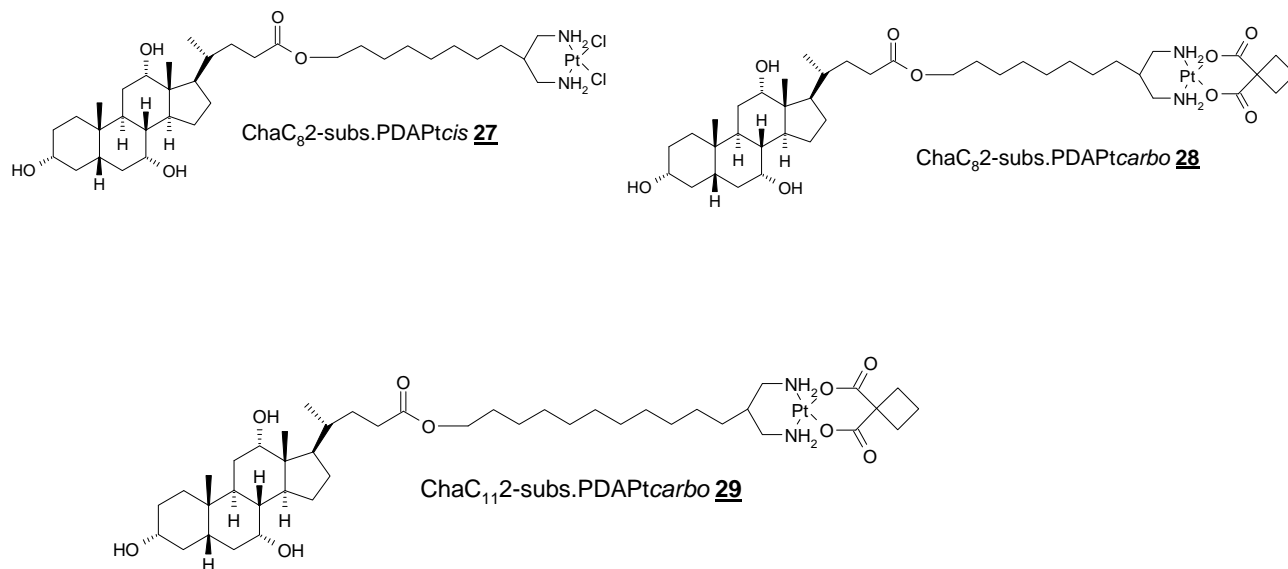


**Abbildung 6: Aufbau der verwendeten Platin-Verbindungen**

Hieraus ergibt sich folgendes Reservoir an Verbindungen, die für Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen zur Verfügung stehen:



**Abbildung 7: Verbindungen mit THP als Transportunterstützung und *cis*- oder *carbo*-Platin-analoger Struktur**

Abbildung 8: Verbindungen mit OH als Transportunterstützung und *cis*- oder *carbo*-Platin-analoger StrukturAbbildung 9: Verbindungen mit Gallensäure als Transportunterstützung und *cis*- bzw. *carbo*-Platin-analoger Struktur

## 2.1.2 Betulinsäure

Betulinsäure ist das Oxidationsprodukt von Betulin, einem Triterpenalkohol dessen Name sich wiederum aus dem lateinischen Namen der Birke (*Betula*) ableitet, in deren Rinde und Pflanzensaft Betulin einen Hauptbestandteil (bis zu 8%) darstellt. Aber auch Betulinsäure selbst ist in der Pflanzenwelt weit verbreitet und kann beispielsweise aus Platanenborke extrahiert werden. Betulinsäure ist ein weißes Pulver mit einer molaren Masse von 456,71 g/mol; eine Totalsynthese ist wegen der schwierigen Stereochemie nicht sinnvoll, die Natur stellt deshalb bis heute die Hauptquelle für Betulinsäure dar. Schon die amerikanischen Ureinwohner verwendeten Birkenrinde in Tees und anderen Getränken um Halsschmerzen und Beschwerden des Verdauungstraktes wie Durchfall und Ruhr zu behandeln<sup>42</sup>. In der heutigen pharmazeutischen Forschung stellt Betulinsäure zwar ein relativ junges Feld dar, dennoch sind bereits etliche Einsatzmöglichkeiten wie die Entzündungshemmung<sup>43,44,45</sup>, Malaria-Medikamente<sup>46,47</sup>, antimikrobiische Medikamente<sup>48,49</sup>, als Anthelminthikum<sup>50,51,52</sup> sowie als Mittel gegen Fettleibigkeit<sup>53</sup> identifiziert worden, wobei die größten Felder die Krebs- und die AIDS-Forschung<sup>54,55,56</sup> darstellen.

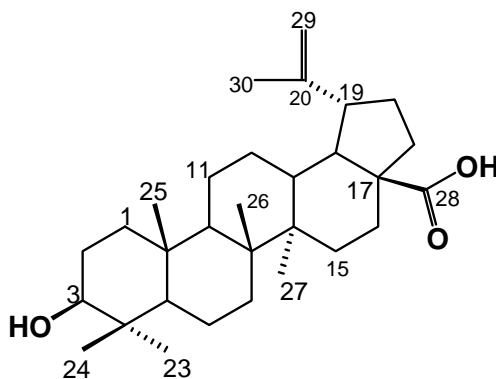


Abbildung 10: Strukturformel der Betulinsäure

Die Wirksamkeit gegen die Replikation von HIV-1 beruht auf der Hemmung des Zelleintritts, der HIV-Protease<sup>57</sup> und der reversen Transkriptase<sup>58</sup>. Der Mechanismus ist bisher nicht aufgeklärt, jedoch wurden über Synthese und Testung etlicher Betulinsäurederivate wichtige Erkenntnisse



über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ermittelt. So hat eine Hydrierung der Doppelbindung C20=C29 nur einen minimalen Effekt auf die Wirksamkeit<sup>59</sup>, ein Ergebnis das sich im Rahmen anderer Studien immer wieder bestätigt hat. *Mayaux* ermittelte für mehrere am C28 Amid-derivatisierte Verbindungen ein deutlich höheres Anti-HIV-Potential, auch *Evers* ermittelte für die H-Donorfunktion der Amid-Bindung eine wichtige Rolle im Potential gegen den HI-1-Virus<sup>60</sup>. Hingegen ermittelte *Evers* durch die Testung mehrerer Derivate für das C30 keine wesentliche sterische Bedeutung. Laut Kashiwada kann die Wirksamkeit der Betulinsäure gegen HIV durch eine Esterbindung an C3 erhöht werden, bei sterisch anspruchsvollen kurzkettigen Liganden sogar deutlich<sup>61</sup>. Gestützt auf diese Erkenntnisse konzentriert sich die Forschung aktuell primär auf Derivatisierungen an C28.

Wie schon beschrieben wirkt Betulinsäure gegen zahlreiche humane Tumorzelllinien, wobei sich das cytotoxische Potential durch direkte Einwirkung auf die Mitochondrien ergibt, wodurch dann die Apoptose ausgelöst wird<sup>62</sup>. Die Untersuchung von Derivaten konzentriert sich auf die gleichen funktionellen Gruppen wie bei der HIV-Forschung. *Kim* beispielsweise registriert durch das Herstellen eines Ketons bzw. zweier Oxime an C20 das Sinken der Cytotoxizität<sup>63</sup>, *Kvasnica* steigert die Cytotoxizität durch Derivatisierung mit Phtalanhydriden an C3<sup>64</sup>. *Symon* derivatisiert die C20=C29-Doppelbindung durch die Bildung von Cyclopropanen, wobei lediglich eine Zielverbindung eine leichte Verbesserung der Cytotoxizität gegenüber der Betulinsäure aufweist<sup>65</sup>. Auch bei der Anti-Tumor-Wirkung ergeben sich bei den untersuchten Betulinsäurederivaten die meisten Unterschiede bei Modifikationen an C28.

Bei der Untersuchung von C28-Derivaten der Betulinsäure wurden zwar unterschiedliche Ergebnisse erzielt, einige grundsätzliche Erkenntnisse können aber festgehalten werden. Die Veresterung mit Alkylgruppen bewirkt eine Abnahme der Aktivität<sup>66</sup>, hingegen kann sie durch die Einführung einer Amid-Bindung teils deutlich gesteigert werden<sup>67</sup>. Auch durch die Gestaltung des Restes an der Amid-Bindung kann Einfluss genommen werden, da sich die Wirksamkeit mit zunehmender Länge und Hydrophobie weiter steigern lässt. Die Bildung von Benzyl-Oximen lässt die anti-HIV-1-Wirkung stark sinken<sup>68</sup>, dagegen bringt der Ersatz der C28-Säuregruppe durch eine NH-CO-CH-Gruppierung sehr gute Ergebnisse gegen HIV-1.

Weiterhin bietet Betulinsäure Einsatzmöglichkeiten durch seine antibakteriellen<sup>69</sup> sowie anti-inflammatorischen Eigenschaften<sup>70</sup>, ferner durch sein Potential in der Behandlung von Malaria<sup>71</sup> und starken Schmerzen<sup>72</sup> sowie im Einsatz gegen Parasiten<sup>73</sup>. 2006 wurde auch ihre Einsatzmöglichkeit gegen Fettleibigkeit vorgeschlagen, da Betulinsäure DGAT (Diacylglycerolacyltransferase) mit einem  $IC_{50}$  von 9,6 mM inhibiert<sup>74</sup>.

Auf Basis dieses Standes der Wissenschaft wurden die folgenden, an C3 und C28 systematisch derivatisierten Betulinsäurederivate hergestellt und auf ihre Wirksamkeit untersucht. Auf diese Weise sollen grundsätzliche Aussagen zur Optimierung des Betulinsäuremoleküls in der Antitumorforschung möglich werden.

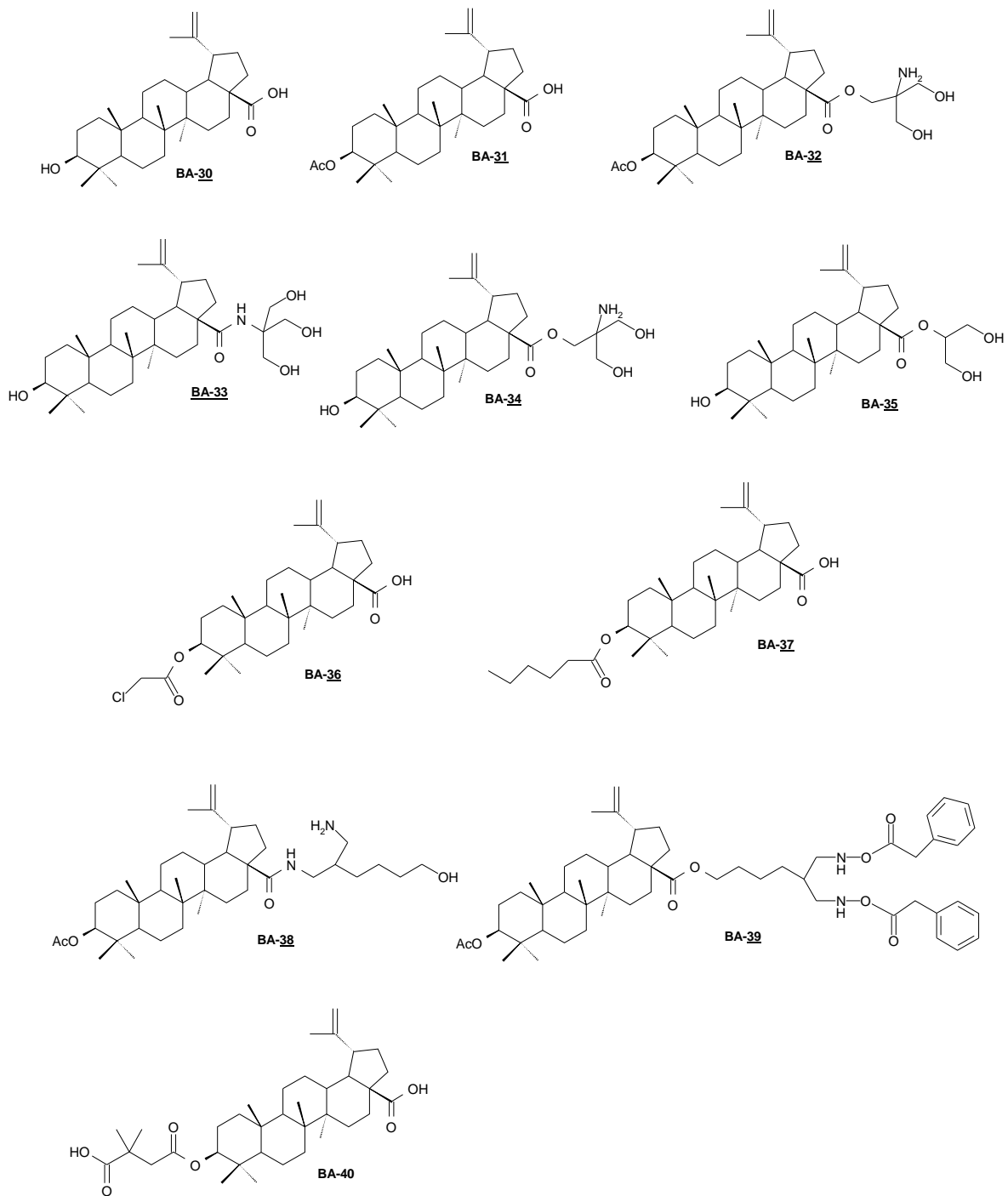


Abbildung 11: Betulinsäure-Derivate (BA-30 – BA-40)

## 2.2. Methoden zur Verbesserung der Löslichkeit lipophiler Wirkstoffe

### 2.2.1 Allgemeine Strategien zu Verbesserung der Löslichkeit

Im Zentrum dieser Arbeit standen ein Cisplatin-Konjugat mit teils langen lipophilen Spacern sowie Betulinsäurederivate, welche das Problem aufwerfen, in herkömmlicher Injektionslösung (0,9% NaCl-Lösung) fast nicht löslich zu sein.

Dieses Problem ist in der medizinisch-pharmazeutischen Forschung nicht neu, so dass sich mittlerweile eine generelle Strategie zur Lösung desselben etabliert hat<sup>75</sup>. Die Reihenfolge dieser Vorschläge ergibt sich neben praktischen auch aus finanziellen Überlegungen.

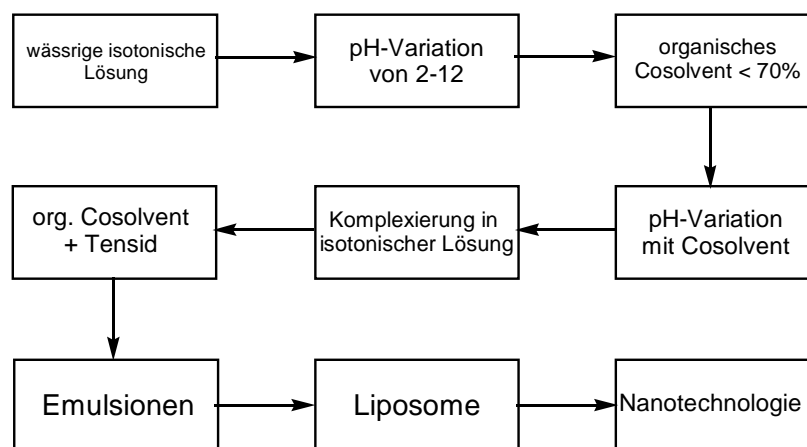


Abbildung 12: Möglichkeiten zur Erhöhung der Löslichkeit eines lipophilen Stoffes

#### 2.2.1.1 pH-Variation

Löst sich der Wirkstoff nicht ausreichend in isotonischer Lösung, so wird als erstes der pH-Wert variiert, was bei IV-Applikationen in der Spanne von 2-12 möglich ist<sup>76</sup>. In dieser Arbeit war dies nicht realisierbar, weil sich die Verbindungen jeweils chemisch verändern würden und damit der positive therapeutische Effekt verloren ginge. Es ist somit auch nicht möglich, eine der von Strickley angesprochenen Variationen unter Einbeziehung einer pH-Variation anzuwenden.

### 2.2.1.2 Organische Cosolventien

Als nächste Möglichkeit wird die Verwendung von organischen Cosolventien vorgeschlagen, von denen eine breite Palette zur Verfügung steht. So können beispielsweise Ethanol oder Glycerin bei intravenöser Anwendung bis zu 10% und DMF bis zu 7 % zugesetzt werden<sup>77</sup>. Allerdings kann es bei sensiblen Patienten schon bei diesen niedrigen Konzentrationen zu Schmerzen, Entzündungen oder Hämolyse kommen. Der Vorteil von organischen Lösungsmitteln liegt somit eher in der präklinischen Testung der Verbindungen, wenn zur Erhöhung der Löslichkeit nicht ausreichend Zeit zur Verfügung steht und auf diesen Nachteil noch keine Rücksicht genommen werden muss. Generell kann die intravenöse Kompatibilität festgestellt werden, indem der prozentuale Anteil des organischen Lösungsmittels ermittelt wird, der in vitro bei 50% gesunder roter Blutzellen Hämolyse verursacht (LD<sub>50</sub>-Wert).

### 2.2.1.3 Komplexierung in isotonischer Lösung

Der nächste mögliche Schritt zur Erhöhung der Löslichkeit ist der Einsatz von Komplexierungsmitteln, bevorzugt werden in diesem Zusammenhang Cyclodextrine und ihre Derivate<sup>78</sup>. Typischerweise werden nur Verbindungen mit einem aromatischen Ring oder einer unpolaren Seitenkette von Cyclodextrinen komplexiert, aber schon geringe Variationen am Gerüst des Cyclodextrins können erhebliche Änderungen der Löslichkeit bewirken. Die Einsatzbreite der verschiedenen Cyclodextrine ist allerdings höchst unterschiedlich, da etwa der intravenöse Einsatz des  $\beta$ -Cyclodextrins nicht zugelassen ist, weil es mit Cholesterin ausfällt. Beim Einsatz von Cyclodextrinen ist es auch mit einfachen Methoden nach Higuchi und Connors möglich, die Zusammensetzung der Komplexe aufzuklären<sup>79</sup>.

### 2.2.1.4 Einsatz von Tensiden

Sollte der Wirkstoff bis zu diesem Punkt noch nicht ausreichend in Lösung gebracht worden sein, so kann er mit Hilfe von oberflächenaktiven Substanzen auch „umgedreht“ werden. Die oberflächenaktiven Substanzen für intravenöse Infusionen beinhalten beispielsweise Cremophor

EL, Cremophor RH 60 und Polysorbat 80. Die zur Lösung verwendete Zubereitung ist üblicherweise eine Mischung von oberflächenaktiven Substanzen und Lösungsmitteln wie Cremophor/Ethanol, Cremophor/Ethanol/DMA, oder Polysorbat 80/ PEG 300/Ethanol, aber auch unverdünnte oberflächenaktive Stoffe können eingesetzt werden wie Polysorbat 80 zur Lösung von Docetaxel. Die Obergrenze für die Anwendung in vivo ist <10% für die Cremophore und bis zu 25% für Polysorbat 80. In diese Kategorie fallen auch Micellen, die ebenfalls in der Lage sind einem lipophilen Wirkstoff eine nach außen hydrophile Hülle zu geben. Micellen können einfache monomolekulare Systeme sein (nur Gallensalze), binäre (Gallensalz plus Phospholipid oder Fettsäure) oder ternäre (Gallensalz plus Phospholipid plus Fettsäure) Mischmicellen darstellen<sup>80</sup>.

### **2.2.1.5 Emulsionen**

Sollten alle bisher genannten Möglichkeiten nicht zum Ziel führen, der Wirkstoff aber in Ölen löslich sein, können Emulsionen für die intravenöse Anwendung eingesetzt werden. Emulsionen enthalten typischerweise 10-20% Öl und den Anteil der öl-löslichen Verbindung in der Ölphase<sup>81</sup>. Eine solche Zusammensetzung wird wegen des Aufwandes selten kommerziell eingesetzt, trotzdem sind Emulsionen in der präklinischen Phase brauchbar, in der eine improvisierte Emulsion durch langsames Zugeben einer konzentrierten Wirkstoff-Lösung zu einem organischen Lösungsmittel bei konstantem Rühren hergestellt wird.

### **2.2.1.6 Liposome**

Auch liposomale Rezepturen können als Mittel zur Lösung bei intravenöser Anwendung eingesetzt werden, diese Strategie ist aber komplex und Liposome werden normalerweise nicht für Erhöhung der Löslichkeit verwendet, eher für pharmakokinetische Zwecke. Liposome sind kugelförmige Bläschen, die sich aus einer äußeren Lipid-Doppelschicht-Membran und einem wässrigen Kern mit einem Gesamtdurchmesser von unter 100µm aufgebaut sind. Moderat hydrophobe Verbindungen können noch im Kern gelöst werden, mit zunehmender Hydrophobie

werden sie zwischen den Lipidschichten der Membranen eingelagert. Liposomale Rezepturen bieten einige Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden wie bessere Pharmakokinetik, erhöhte Wirksamkeit und geringere Toxizität.

### 2.2.1.7 Nanotechnologie

Im Zuge der Entwicklung der Nanotechnologie werden auch Möglichkeiten zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung untersucht<sup>82</sup>, der Einsatz in der therapeutischen Praxis ist allerdings vorerst noch nicht denkbar. In der zitierten Arbeit wurden MSNs (MCM-41-type mesoporous silica nanorods) eingesetzt, die gegenüber Gastmolekülen in der Röhre inert sind und mit superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln verschlossen werden. Die beladenen Röhren können nun transportiert werden, am Zielort wird zum Entfernen des Verschlusses ein Magnetfeld angelegt, die Wirkstoffmoleküle werden freigesetzt und können ihre Wirkung entfalten.

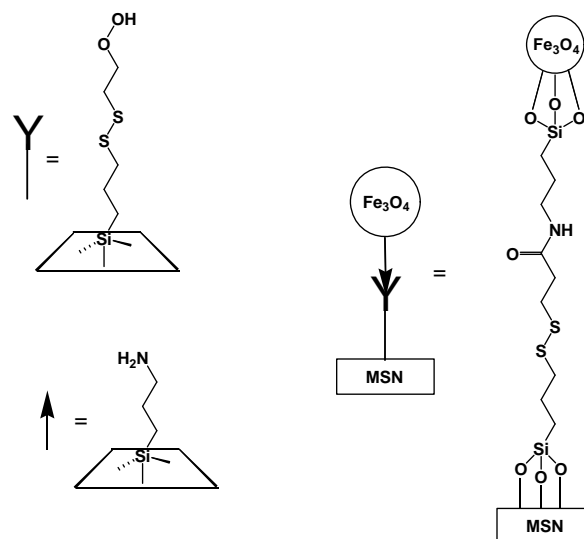


Abbildung 13: Prinzip des Röhrenverschlusses

## 2.2.2 Beschreibung der angewendeten Methoden

### 2.2.2.1 Cyclodextrine

#### 2.2.2.1.1 Struktur der Cyclodextrine

Die Cyclodextrine bestehen aus mehreren Glukoseeinheiten die  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpft sind<sup>83</sup>. Die Glukosemoleküle ordnen sich in der „Sessel“-Konformation an, so dass die „Sitzflächen“ des „Sessels“ parallel zur Achse des Cyclodextrins stehen.

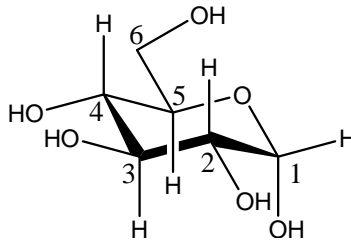


Abbildung 14:  $\alpha$ -D-Glukose-Molekül in der Sesselkonformation

Damit ergibt sich ein unterer Teil mit den Ring-Sauerstoff-Atomen und den C5-Atomen der Glukosemoleküle, die primären Hydroxylgruppen stehen alle nach unten. Im mittleren Bereich liegen die Kohlenstoff- und Sauerstoffatome der  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen den Glukoseeinheiten. Im oberen Teil befinden sich die Kohlenstoffatome 2 und 3 mit ihren (sekundären) Hydroxylgruppen. Auf Seite der primären Hydroxylgruppen ist der Hohlraum enger, da sie frei rotieren können und dadurch den Innendurchmesser effektiv verkleinern. Durch diese Anordnung ergibt sich eine konusförmige Gesamtstruktur des Cyclodextrin-Moleküls. Durch die Stellung der Hydroxylgruppen an den Rändern besteht innen ein hydrophober Hohlraum und außen ein hydrophiler Bereich.



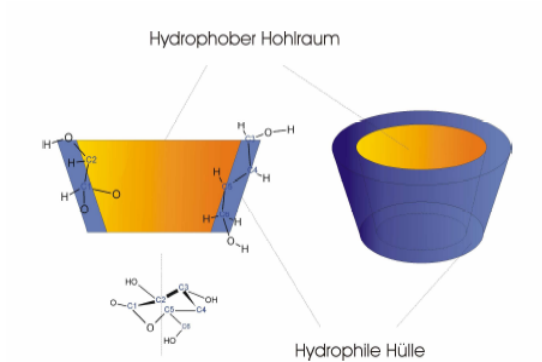


Abbildung 15: Schematischer Aufbau der Cyclodextrine<sup>84</sup>

Für die unterschiedlichen Ringgrößen ergeben sich folgende Daten<sup>84</sup>:

Typ	Molekulargewicht [g/mol]	Hohlraumdurchmesser [Å]	Hohlraumhöhe [Å]	Außendurchmesser [Å]	Hohlraumvolumen [ml/mol]	H <sub>2</sub> O-Moleküle im Innenraum
α-CD	972	4,7 – 5,3	7,9	13,7	174	6
β-CD	1135	6,0 – 6,5	7,9	15,3	262	11
γ-CD	1297	7,5 – 8,3	7,9	16,9	472	17

Tabelle 1: Molekulare Größen von Cyclodextrinen

#### 2.2.2.1.2 Derivate der Cyclodextrine

Cyclodextrine können gegebenenfalls chemisch verändert werden, um gewünschte Eigenschaften zu verbessern oder zu erschaffen, beispielsweise um die Verträglichkeit in der medizinischen Anwendung zu erhöhen. Im Folgenden sind deshalb einige gebräuchliche Derivate mit entsprechenden veränderten Eigenschaften aufgeführt.

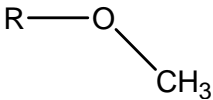
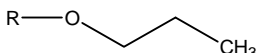
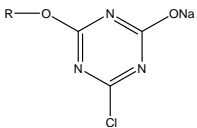
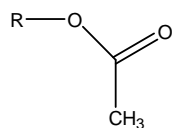
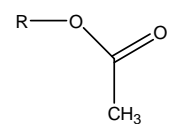
Derivat	Substituent	Eigenschaften
Methyl-Cyclodextrin (Me-OH)		gute Wasserlöslichkeit gute Lösungsvermittlung hydrophober Stoffe in wässrigen Medien löslich in organischen Lsg.mitteln
Hydroxypropylcyclodextrin (HP-CD)		gute Wasserlöslichkeit gute Lösungsvermittlung hydrophober Stoffe in wässrigen Medien löslich in organischen Lsg.mitteln
Monochlortriazinyl-Cyclodextrin (MCT-CD)		reaktiv (z.B. gegenüber Baumwollfasern)
Acetyl-Cyclodextrin (Ac-CD)		biologisch abbaubar
Triacetyl-Cyclodextrin (TAc-CD)		lipophil

Tabelle 2: Cyclodextrin-Derivate und ihre Eigenschaften

### 2.2.2.1.3 Toxizität der Cyclodextrine

Die natürlichen Cyclodextrine sind mit Ausnahme des  $\gamma$ -Cyclodextrins weitgehend widerstandsfähig gegen Enzyme des Verdauungstraktes und werden deshalb unverändert wieder ausgeschieden. Auch eventuell gebildete Metabolite oder Abbauprodukte sind unproblematisch. Da die in dieser Arbeit verwendeten Verbindungen nur mittels Injektionen verabreicht werden, soll hier auch nur dieser Bereich behandelt werden.

$\beta$ -Cyclodextrin darf keinesfalls intravenös gegeben werden, da es mit Cholesterol ausfällt, was im Blutkreislauf unerwünscht ist. HP- $\beta$ -Cyclodextrin und  $\gamma$ -Cyclodextrin hingegen sind bei intravenösem Einsatz unbedenklich.

#### 2.2.2.1.4 Komplexbildung des Cyclodextrins

Die breite Anwendung der Cyclodextrine beruht auf ihrer Fähigkeit, durch das Eingehen von Wirt-Gast-Beziehungen Komplexe bilden zu können. Die unterschiedlichen Derivate wirken allerdings sehr selektiv und machen auf diese Weise die Voraussetzungen deutlich, die zur Ausbildung eines Komplexes erfüllt werden müssen: Das Gastmolekül muss räumlich in den Hohlraum des Cyclodextrins passen, es müssen intermolekulare Wechselwirkungen möglich sein und es muss zumindest eine kleine Menge Wasser vorhanden sein.

Die komplexbildende Reaktion selber kann wie folgt beschrieben werden:

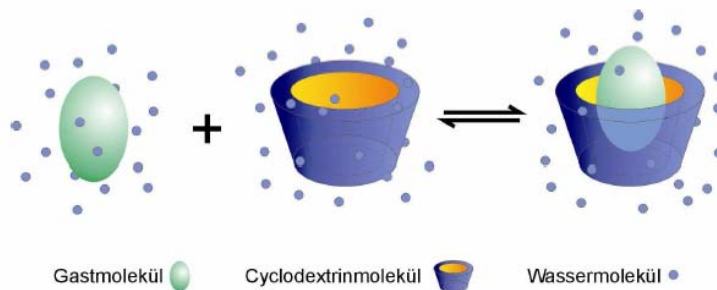


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Komplexbildung<sup>84</sup>

Im Ausgangszustand sind Wirt und Gast von Wassermolekülen umgeben, beim Cyclodextrin sind sie sowohl im Innenraum vorhanden als auch sättigen sie die Hydroxylgruppen am Rand ab. Diese Abschirmung senkt die Barriere für das „Rutschen“ des Gastes in den Wirt, zeitgleich werden die im Hohlraum vorhandenen Wassermoleküle unter Gewinnung von Entropie entfernt. Der Komplex wird nun durch van der Waals-Kräfte und eventuell Wasserstoffbrücken-Bindungen am Rande des Hohlraums stabilisiert, die Stabilität des Komplexes hängt von der Art und Stärke der Wechselwirkungen ab.

Experimentell werden die Komplexe durch Reaktion in Lösung, Suspension, durch Kneten oder Komplexierung in organischen Lösungsmitteln hergestellt.

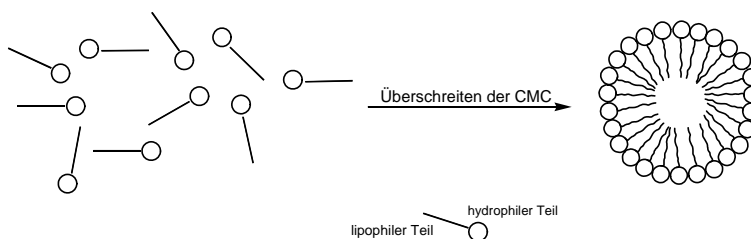
#### **2.2.2.1.5 Einsatz der Cyclodextrine in der Pharmazie**

Cyclodextrine und die zahlreichen Derivate finden weitreichende Anwendung in der Chemie, und auch in der Pharmazie beweisen zahlreiche Forschungen die Vielseitigkeit der Cyclodextrine. Die Anwendungen beziehen sich auf die Erhöhung des Wirkstoffgehaltes in Mundwässern<sup>85</sup>, flüssigen Medikamenten<sup>86</sup>, Salben<sup>87</sup>, für die rektale Anwendung<sup>88</sup> und in Augentropfen<sup>89</sup>. Die in dieser Arbeit verwendeten Verbindungen werden aber per Infusion verabreicht – in diesem Gebiet fanden Cyclodextrine in aktueller Forschung weniger Anwendung. Als weitere Einschränkung kommt hinzu, dass nur wenige Cyclodextrine intravenös verabreicht werden dürfen und so die Zahl der theoretisch einsetzbaren Cyclodextrine von vornherein deutlich geringer ist. Für intravenöse Anwendung bereits zugelassen sind lediglich  $\gamma$ -Cyclodextrin sowie HP- $\beta$ -Cyclodextrin. Weitere Derivate werden zur Zeit erforscht<sup>90</sup>, wobei der Wirkstoff-Cyclodextrin-Komplex u.a. der Gegenwart von Cholesterol ausgesetzt wird und der Grad der Verdrängung als Maß für die Einsatzfähigkeit in einer Infusionslösung verwendet wurde.

### **2.2.2.2 Micellen**

#### **2.2.2.2.1 Allgemeines**

Micellen sind Aggregate aus amphiphilen Substanzen, die sich in einem Dispersionsmedium spontan zusammenlagern. Diese amphiphilen Substanzen bestehen aus einem hydrophilen Teil („Kopf“) und einem lipophilen Teil („Schwanz“). Aufgrund der Neigung zur Phasentrennung lagern sich ab einer bestimmten Konzentration (kritische Micellenbildungskonzentration CMC) die lipophilen Teile nach innen zusammen und die hydrophilen richten sich nach dem Wasser außen aus. Es entsteht ein kugelförmiges Makromolekül mit einem Durchmesser von 20-50 nm.



**Abbildung 17: Schema der Micellenbildung**

Eine wichtige positive Eigenschaft macht Micellen für die pharmazeutische Forschung besonders interessant: Sie entgehen der Erkennung und Vernichtung durch das Immunsystem, bleiben so länger im Blutkreislauf als der unmaskierte Wirkstoff und lagern sich aufgrund ihrer Größe auch an feste Tumore an, was als „passives drug targeting“ bezeichnet wird. In der aktuellen Forschung wird aber auch viel Wert auf „aktives drug targeting“ gelegt, dass also die Wirkstoff-Träger beispielsweise mit Hilfe von Antikörpern spezifisch die Tumore erkennen oder den Wirkstoff gezielt am Tumor freigegeben<sup>91</sup>.

Die Micellen gliedern sich in mehrere Typen, so beispielsweise Polymermicellen oder physiologische Mischmicellen.

Durch Fortschritte in der Chemie der amphiphilen Polymere stehen nun wasserlösliche, bioverträgliche und bioabbaubare Polymermicellen zur Verfügung. Diese Micellen besitzen auf ihrer Oberfläche reaktive funktionelle Gruppen für Wechselwirkungen mit dem Zielmolekül<sup>92</sup>. Auf diese Weise ist der Boden für vielversprechende Forschung beim „aktiven drug targeting“ bereitet.

#### **2.2.2.2.2 Physiologische Mischmicellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten physiologischen Mischmicellen stellen eine vielversprechende Arzneiform dar. Die Gallensäuren werden im Gastrointestinaltrakt in der Leber synthetisiert und in der Gallenblase zunächst in Form von Natriumsalzen zwischengespeichert. Sie fungieren durch die Ausbildung von Micellen als Lösungsvermittler wasserunlöslicher Substanzen<sup>93</sup>,

beispielsweise bilden sie im Dünndarm mit Fetten, die als Tröpfchen mit einem Durchmesser von 100nm aus dem Magen kommen, Emulsionen. Durch diese Emulsionen vergrößert sich die Oberfläche an der die Lipasen angreifen können, erheblich. Im weiteren Verlauf bilden die Gallensäuren mit Phospholipiden und/oder freien Fettsäuren physiologische Mischmicellen, um schlecht lösliche Spaltprodukte der Lipolyse aktiv bzw. passiv durch die Phospholipidmembran des Dünndarms transportieren zu können<sup>94</sup>. Diese Eigenschaften und Funktionen der physiologischen Micellen und Mischmicellen schaffen die Möglichkeit, optimierte physiologisch verträgliche Wirkstofftransportsysteme zu entwickeln. Bisher im Handel erhältlich sind als Injektionslösung Valium ® MM und als orale Applikation (nur in besonderen Fällen intramuskulär oder intravenös) Konaktion ® MM der Firma Hoffmann-La Roche.

## 2.3 Elementanalytik mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

*Sir Alan Walsh* wird als Begründer der modernen AAS angesehen<sup>95</sup>. Seit 1952 arbeitete er unermüdlich daran, die AAS zu einer praktisch anwendbaren Analysenmethode zu machen. Von ihm stammt der erste Entwurf für die Messung der Atomabsorption, eine für die AAS taugliche Weiterentwicklung der abgeschlossenen Hohlkathodenlampe sowie die erste Realisierung eines Atomspektrometers. Seitdem hat sich die AAS durch weitgehende Verbesserungen in allen Teilbereichen zu einer etablierten Methode der instrumentellen Analytik entwickelt, die vor allem durch hohe Spezifität, hohe Selektivität und einfache Bedienbarkeit ihre Berechtigung erhält.

Aus dem Grundzustand kann durch die Zuführung von Energie ein Elektron in einen angeregten Zustand angehoben werden, sofern die zugeführte Energie genau der Energiedifferenz zwischen beiden Zuständen entspricht. Angeregte Zustände sind instabil, so dass sie nach kurzer Zeit (ca.  $10^{-8}$ s) unter Abgabe der Energie auf verschiedene Arten (Stoßrelaxation, Strahlung) wieder in den Grundzustand zurückkehren. Die durch Strahlung übertragene Energiedifferenz entspricht gemäß dem Planck'schen Gesetz einer bestimmten Wellenlänge bzw. Frequenz, stellt sich somit als Spektrallinie dar und kann deshalb mit Hilfe der Spektroskopie beobachtet werden.

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

**Abbildung 18: Planck'sches Gesetz**

mit:  $\Delta E$  Energiedifferenz  
 $h$  Planck'sches Wirkungsquantum  
 $\nu$  Frequenz  
 $c$  Lichtgeschwindigkeit  
 $\lambda$  Wellenlänge

Aus der Vielzahl der möglichen Energieniveaus ergeben sich mehrere spektrale Übergänge, die wegen der besseren Übersichtlichkeit in Termschemas (Grotian-Diagramm) dargestellt werden. Die Tatsache, dass jedes Atom ein anderes Spektrum besitzt, eröffnet die Möglichkeit der elementspezifischen Analyse.

Die AAS lässt sich neben der qualitativen auch für die quantitative Analyse einsetzen. Grundlage hierfür ist das Lambert-Beer'sche Gesetz. 1760 entdeckte *Lambert*, dass mit wachsender Schichtdicke  $d$  der Messküvette oder Messstrecke die Lichtschwächung linear zunimmt. Beer stellte 1852 fest, dass bei konstanter Schichtdicke die Lichtabsorption bei zunehmender Konzentration ebenfalls linear zunimmt. Aus der Kombination beider Gesetzmäßigkeiten ergibt sich das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung 2)<sup>96</sup>:

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

**Abbildung 19: Lambert-Beer'sches Gesetz**

mit:  $E_{\lambda}$  Extinktion  
 $\varepsilon_{\lambda}$  spektraler Extinktionskoeffizient  
 $c$  Konzentration  
 $d$  Schichtdicke

Mit Hilfe einer modifizierten Form des Lambert-Beer'schen Gesetzes erfolgt die quantitative Auswertung.

$$E_{\lambda} = \log \frac{I_0}{I_d} = k_{\lambda} \cdot N_0 \cdot d$$

**Abbildung 20: Modifiziertes Lambert-Beer'sches Gesetz für die AAS**

mit:  $E_{\lambda}$  Extinktion  
 $I_0$  Lichtintensität vor der Absorption  
 $I_d$  Lichtintensität nach der Absorption  
 $k_{\lambda}$  Extinktionskoeffizient  
 $N_0$  Anzahl der Atome in der Atomisierungseinrichtung  
 $d$  durchstrahlte Schichtdicke

Da die AAS eine indirekte Messmethode darstellt, wird zur Auswertung der Messwerte eine Kalibrierung benötigt, welche entweder mit zertifizierten Referenzmaterialien oder selbst hergestellten Standards erfolgen kann.



Für die Messung der getrockneten Zellproben wurde die direkte Feststoff-AAS eingesetzt, da bei dieser Methode im Gegensatz zur Anwendung von ESI-MS<sup>97</sup>, ICP-MS<sup>98,99,100</sup> oder Flüssig-AAS<sup>101</sup> keine Probenvorbereitung nötig ist.

## **2.4 Zellkulturen**

### **2.4.1 Allgemeines**

Die Zelle ist die kleinste selbstständige Organisationseinheit des Organismus, sie besitzt einen Stoffwechsel und ist in der Lage zu wachsen und sich zu vermehren. Der Ausgangspunkt für eine Züchtung wird Primärkultur genannt, die direkt aus Zellen, Organen oder Geweben eines Organismus gewonnen wurde. Mit den gebildeten Subkulturen entsteht dann eine Zelllinie, bei der alle Zellen genetisch identisch sind. In Zellkulturen können Zelllinien gezüchtet werden, die für weitere Experimente benötigt werden. Die Züchtung kann auf Glas, Kunststoff oder Metall vorgenommen werden<sup>102</sup>.

### **2.4.2 Züchtung von Zelllinien**

Im ersten Schritt werden die Stammzellen in die Brutgefäße überführt, dort wachsen sie über mehrere Phasen an der Oberfläche an. In der ersten Phase erfolgt die Adsorption an der Oberfläche über dikovalente Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$ ), danach erfolgt der Kontakt über Glykoproteine und die Anheftung über zelleigene Proteoglykane. Anschließend breitet sich die Zelle auf der Oberfläche aus, bevor die Proliferation erfolgt.

Für die aus ihrer normalen Umgebung entfernten Zellen müssen unter In-vitro-Bedingungen Voraussetzungen geschaffen werden, die Proliferation, Wachstum und die verschiedenen Zellfunktionen ermöglichen. Auch die Abfallprodukte aus dem Stoffwechsel müssen so lange wie möglich neutralisiert werden. Hierzu wird als Puffer in der Regel  $\text{NaHCO}_3$  verwendet, wobei das  $\text{CO}_2$  im Inkubationsschrank noch zugeführt wird. Da bei der In-vitro-Züchtung das

Immunsystem des Organismus als Schutz gegen Kontaminationen fehlt, werden als Ersatz Antibiotika zugegeben. Die Zellkulturmedien enthalten weiterhin Aminosäuren, Salze, Vitamine und sonstige Substanzen. Der pH-Wert muss in einem schmalen Bereich gehalten werden, damit die Zellfunktionen optimal erfüllt werden können. Sind die Nährstoffe aufgebraucht, so sinkt der pH-Wert aufgrund des weiter zugeführten CO<sub>2</sub> ab, so dass zur Feststellung dieses Zeitpunktes ein Indikator ebenfalls zugesetzt wird.

Die Zellen wachsen, bis die Oberfläche vollständig bedeckt ist (Konfluenz), dann kommt es aufgrund der fehlenden freien Oberfläche zum Stopp der Zellteilung (Kontaktinhibition). Zur Weiterzucht (Subkultivierung) ist – nach dem Entfernen des alten Mediums und einem Waschschrift mit phosphatgepufferter Salzlösung - das Ablösen der Zellen und Überführung in neue Kulturmedien nötig (passagieren). Überwiegend wird für das Ablösen Trypsin bzw. Trypsin-EDTA verwendet. Die erhaltene Zellsuspension kann in neue Kulturmedien ausgesät werden und wird analog behandelt, bis die benötigte Gesamtmenge der Zellen gewachsen ist.

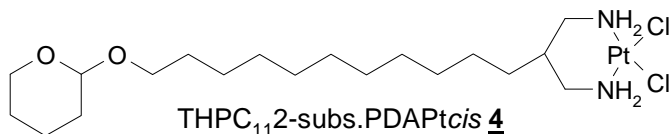
### **2.4.3 Verwendung und Bedeutung von Zellkulturen**

Zellkulturen haben eine wichtige Bedeutung bei der Erforschung der Wirkung von Chemikalien auf bestimmte Zellen. Dabei stellen Zellkulturen die ersten lebenden Organismen dar, mit denen in diesbezüglichen Projekten gearbeitet wird. Die Palette der Einsatzmöglichkeiten ist dabei breit gestreut. Zum einen werden Cytotoxizitätsuntersuchungen durchgeführt, bei denen der Anteil der nicht überlebenden Zellen gemessen wird und so der LD<sub>50</sub>-Wert bestimmt werden kann.

Weiterhin können Uptake-Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen die Aufnahme des Stoffes in die Zelle registriert wird, über spezielle Marker (z.B. Fluoreszenz-Marker) kann gegebenenfalls der exakte Weg und Wirkungsort dieses Stoffes bestimmt werden. So erlauben Arbeiten mit Zellkulturen erste Aussagen darüber, ob ein neuer Wirkstoff erfolgversprechend ist, oder ob der eingeschlagene Weg nicht weiter verfolgt werden sollte.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

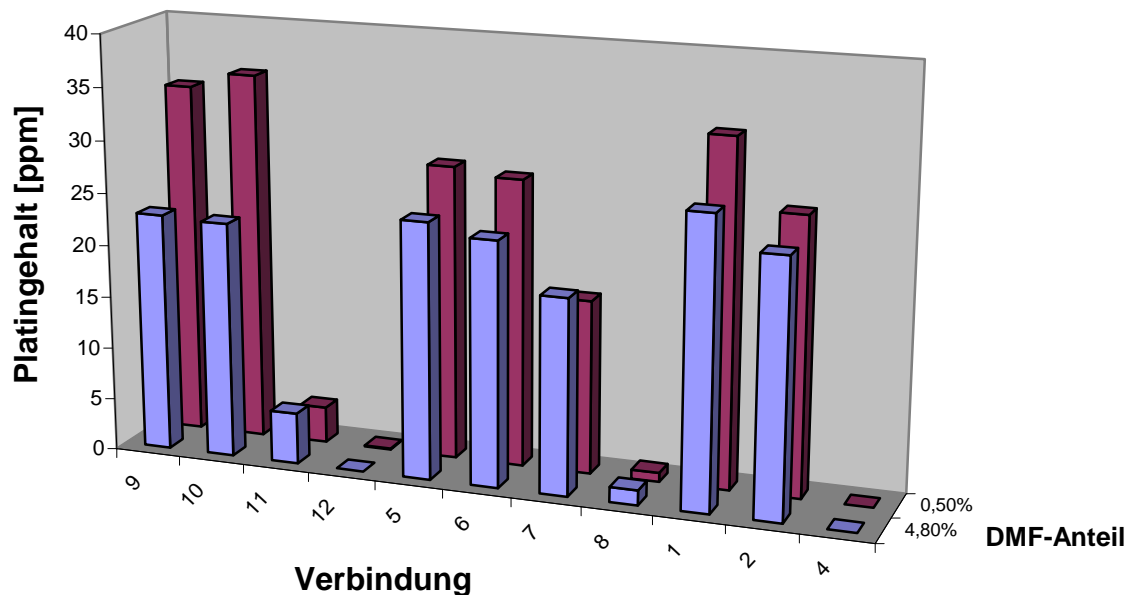
### 3.1 Erhöhung der Löslichkeit von THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis 4



Entsprechend der Vorgehensweise in der Literatur muss zuerst geprüft werden, ob das Problem der geringen Löslichkeit einer lipophilen Verbindung zunächst mit einer Änderung des pH-Wertes behoben werden kann. In diesem Falle allerdings könnten den Verbindungen eine bemerkenswerte Änderung des pH-Wertes strukturell gefährlich werden, weshalb dieser Weg nicht verfolgt wurde. Als erster Schritt wurde somit die Verwendung eines organischen Lösungsmittels getestet.

#### 3.1.1 Verwendung eines organischen Lösungsmittels

Für diese Testreihe wurde DMF eingesetzt, weil sich die Verbindungen in reinem DMF vollständig lösen. Allerdings konnte der DMF-Anteil nur gering erhöht werden, weil aufgrund des geplanten Einsatzes in Infusionslösungen ein Anteil von maximal 5% zugesetzt werden darf. Für diese Testreihe wurden 4,8% DMF zugesetzt.



**Abbildung 21: Vergleich der Löslichkeiten bei erhöhtem DMF-Anteil**

Als Modellreihen wurden die THP-Verbindungen mit Cisplatin-analoger Struktur (THPC<sub>4-11</sub>N-subst.PDAPtcis **9-12**; THPC<sub>4-11</sub>N-subst.EDAPtcis **5-8**; THPC<sub>4-11</sub>2-subst.PDAPtcis **1-2, 4**) getestet. Eine Erhöhung des DMF-Anteils hat nur in seltenen Fällen und auch dann nur zu einer marginalen Steigerung der Löslichkeit geführt, meistens ist die Löslichkeit gesunken oder in etwa auf dem gleichen Niveau geblieben. Somit kann festgehalten werden, dass diese Methode nicht geeignet ist um die nötige bedeutende Steigerung der Löslichkeit der Verbindungen durch Zusatz eines organischen Co-Solvents zu erreichen.

### 3.1.2 Einsatz von Cyclodextrin als Komplexierungsmethode

In der Pharmazie sind Cyclodextrine eine gängige Methode, um schlecht oder gar nicht wasserlösliche Verbindungen in Lösung zu bringen<sup>103</sup>. Zusätzlich wird bei diesem Ansatz die Bandbreite der Einsatzmöglichkeiten dadurch limitiert, dass die Verbindung intravenös

verabreicht werden soll. Aus diesem Grund wurden nach Sichtung der Literatur HP- $\beta$ -Cyclodextrin und  $\lambda$ -Cyclodextrin für die Versuche verwendet.

Die Probenvorbereitung erfolgt in folgenden Schritten: Die Verbindung wird eingewogen, Lösungsmittel (Ethanol oder Methanol) sowie die Cyclodextrin-Lösung (0,05 mol/l) dazugegeben und danach 30 Minuten auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Dieses Gemisch wird anschließend gefriergetrocknet, der Rückstand in 0,9% NaCl-Lösung (gleiches Gesamtvolumen wie vorher) gelöst, die Lösung filtriert und das Filtrat zur Messung verwendet.

### 3.1.2.1 Wahl des Lösungsmittels

Analog etlicher Veröffentlichungen zu vergleichbaren Verbindungen wurden mit Ethanol und Methanol zwei Lösungsmittel getestet. Als Musterverbindungen wurden ChaC<sub>8</sub>2-subst.PDAPtcis **27** und ChaC<sub>8</sub>2-subst.PDAPtcarbo **28** ausgewählt, beide über drei verschiedene Schüttelzeiten, um kinetische Einflüsse ausschließen zu können.

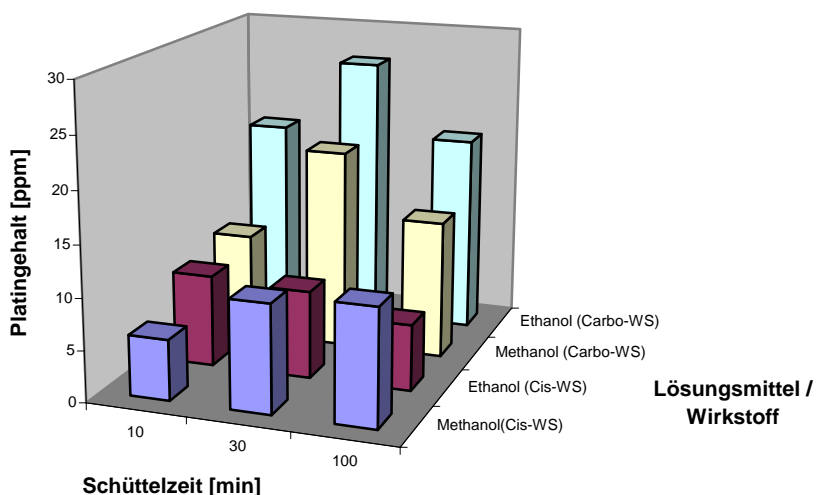
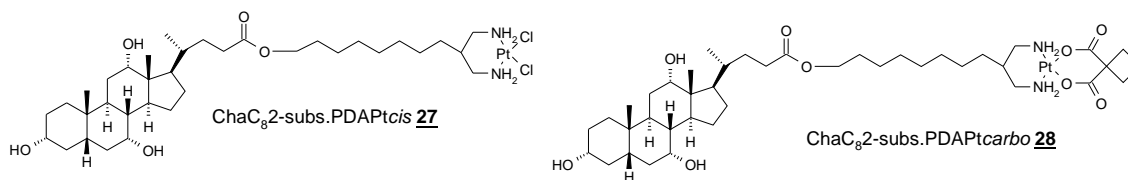


Abbildung 22: Vergleich der Lösungsmittel Methanol und Ethanol bei Cyclodextrin-Komplexierung

Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass beim ChaC<sub>8</sub>2-subst.PDAPtcis **27** Ethanol eindeutig das wirkungsvollere Lösungsmittel darstellt, wohingegen beim ChaC<sub>8</sub>2-subst.PDAPtcarbo **28** Methanol bei längeren Schüttelzeiten bessere Ergebnisse liefert. Für die weiteren Versuche wurde deshalb Ethanol als Lösungsmittel verwendet, Methanol als potenzieller Ersatz aber in Reserve gehalten.

Weiterhin kann festgehalten werden, dass sich bei Ethanol als Lösungsmittel 30 Minuten als eine optimale Schütteldauer herausgestellt haben.

### 3.1.2.2 Mikrowelle als Lösungsunterstützer

Mikrowellen werden in der Chemie nicht nur für Aufschlüsse, sondern immer häufiger auch in der Synthese eingesetzt. Die Komplexierung lipophiler Verbindungen durch Cyclodextrine ist als chemische Reaktion anzusehen, daher wurden auch Mikrowellen getestet. Als Modell-Verbindung wurde erneut ChaC<sub>8</sub>2-subst.PDAPtcis **27** eingesetzt, die maximale Temperatur wurde auf 40°C bzw. 120°C eingestellt, bei letzterer müsste aber im Erfolgsfall kontrolliert werden, ob die Verbindung noch unzerstört vorliegt.

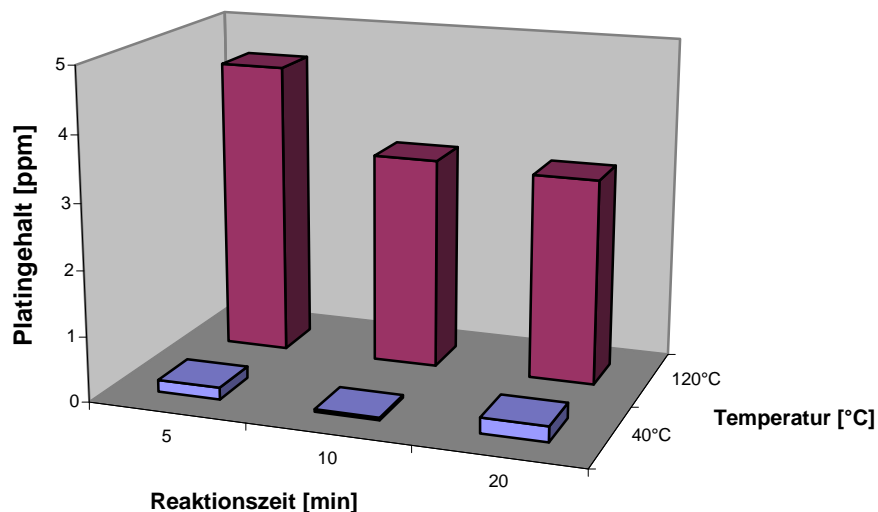


Abbildung 23: Lösungen mit Mikrowellenunterstützung

Die Maximaltemperatur wurde jeweils nach wenigen Sekunden erreicht, die maximale Einstellung für Druck nie auch nur annähernd erreicht.

Die Unterschiede infolge der eingestellten Maximaltemperaturen waren ziemlich groß. Bei 40°C ist die gelöste Menge nicht erwähnenswert, bei 120°C erreicht sie beim höchsten Wert nach 5 Minuten mit 5,0 ppm immerhin 62% der gelösten Menge des optimalen Verfahrens. Da aber bei dieser hohen Temperatur geklärt werden müsste, ob die Verbindung noch unzerstört vorliegt und der apparative Aufwand ungleich höher ist, stellt der Einsatz einer Mikrowelle keine nützliche Alternative für die angestrebte Anwendung dar.

### **3.1.2.3 Optimales Verfahren**

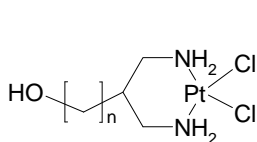
Aufgrund dieser Versuche hat sich folgendes Vorgehen als ideal herausgestellt:

- Einwiegen der Verbindung (ca. 1mg)
- Zugabe von Ethanol (1,25ml)
- Zugabe von HP-β-Cyclodextrin (0,05M, 1,25ml)
- 30 Minuten waagerechtes Schütteln bei 400 U/min
- Gefriertrocknung
- Zugabe von NaCl-Lösung (0,9%, 2,5ml)
- Filtrieren

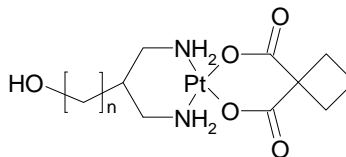
### 3.1.2.4 Ergebnisse für alle vorliegenden Substanzen

#### 3.1.2.4.1 HO-Spacer-Verbindungen

Für die folgenden HO-Spacer-Verbindungen wurden Ergebnisse ermittelt:



n = 6, 8  
=> 21, 22



n = 4, 6, 8, 11  
=> 23, 24, 25, 26

Probe	maximal möglicher Gehalt [μmol/l]	realer Gehalt [μmol/l]	gelöste Menge [%]
HOC <sub>6</sub> 2-subst.PDAPt <sub>cis</sub> <u>21</u>	909	940 ± 5	103,4
HOC <sub>8</sub> 2-subst-PDAPt <sub>cis</sub> <u>22</u>	650	588 ± 74	90,5
HOC <sub>4</sub> 2-subst.PDAPt <sub>carbo</sub> <u>23</u>	819	855 ± 25	104,4
HOC <sub>6</sub> 2-subst.PDAPt <sub>carbo</sub> <u>24</u>	963	1098 ± 150	114,0
HOC <sub>8</sub> 2-subst.PDAPt <sub>carbo</sub> <u>25</u>	705	664 ± 24	94,2
HOC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPt <sub>carbo</sub> <u>26</u>	503	682 ± 22	135,6

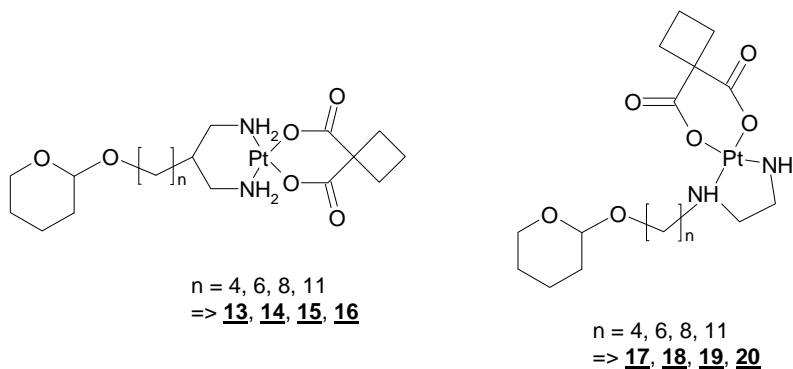
**Tabelle 3: Löslichkeiten der OH-Spacer-Verbindungen mit HP-β-Cyclodextrin**

Der maximal mögliche Gehalt berechnet sich durch die Annahme, dass die gesamte eingewogene Probe in Lösung gegangen wäre. Die Verbindungen gehen alle vollständig in Lösung.

#### 3.1.2.4.2 THP-Carbo-Verbindungen

Für die folgenden THP-Verbindungen wurden Ergebnisse ermittelt:





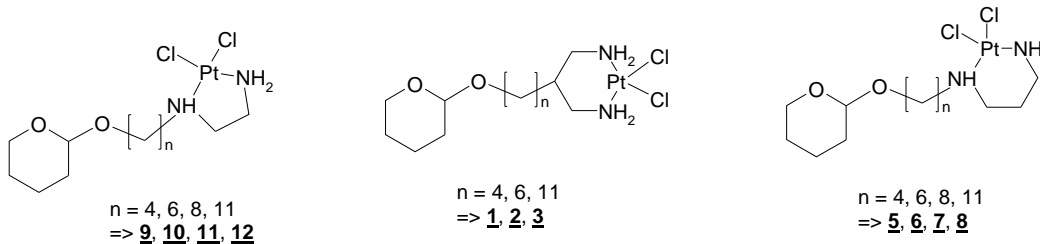
Probe	maximal möglicher Gehalt [ $\mu\text{mol/l}$ ]	realer Gehalt [ $\mu\text{mol/l}$ ]	gelöste Menge [%]
THPC <sub>4</sub> N-subs.EDAPtcarbo <b>17</b>	481	651 ± 24	135,3
THPC <sub>6</sub> N-subs.EDAPtcarbo <b>18</b>	634	997 ± 28	157,3
THPC <sub>8</sub> N-subs.EDAPtcarbo <b>19</b>	805	837 ± 10	106,0
THPC <sub>11</sub> N-subs.EDAPtcarbo <b>20</b>	621	106 ± 23	17,1
THPC <sub>4</sub> 2-subs.PDAPtcarbo <b>13</b>	720	771 ± 6	107,1
THPC <sub>6</sub> 2-subs.PDA Ptcarbo <b>14</b>	551	799 ± 24	145,0
THPC <sub>8</sub> 2-subs.PDA Ptcarbo <b>15</b>	674	794 ± 11	117,8
THPC <sub>11</sub> 2-subs.PDA Ptcarbo <b>16</b>	541	681 ± 43	125,9

**Tabelle 4: Löslichkeiten der THP-Carbo-Verbindungen mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin**

Auch bei dieser Verbindungsgruppe geht mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin fast alles in Lösung.

### 3.1.2.4.3 THP-Cis-Verbindungen

Für die folgenden THP-Cis-Verbindungen wurden Ergebnisse ermittelt:



Probe	maximal möglicher Gehalt [µmol/l]	realer Gehalt [µmol/l]	gelöste Menge [%]
THPC <sub>4</sub> N-subs.EDAPtcis <b><u>9</u></b>	938	1151 ± 39	122,7
THPC <sub>6</sub> N-subs.EDAPtcis <b><u>10</u></b>	209	177 ± 24	84,7
THPC <sub>8</sub> N-subs.EDAPtcis <b><u>11</u></b>	91	141 ± 8	154,9
THPC <sub>11</sub> N-subs.EDAPtcis <b><u>12</u></b>	720	41 ± 13	5,7
THPC <sub>4</sub> 2-subs.PDAPtcis <b><u>1</u></b>	790	867 ± 31	109,7
THPC <sub>6</sub> 2-subs.PDAPtcis <b><u>2</u></b>	695	646 ± 21	92,9
THPC <sub>11</sub> 2-subs.PDAPtcis <b><u>3</u></b>	404	15 ± 6	4,5
THPC <sub>4</sub> N-subs.PDAPtcis <b><u>5</u></b>	936	1028 ± 49	109,8
THPC <sub>6</sub> N-subs.PDAPtcis <b><u>6</u></b>	211	409 ± 8	193,8
THPC <sub>8</sub> N-subs.PDAPtcis <b><u>7</u></b>	653	887 ± 28	135,8
THPC <sub>11</sub> N-subs.PDAPtcis <b><u>8</u></b>	585	467 ± 9	79,8

**Tabelle 5: Löslichkeiten der THP-Cis-Verbindungen mit HP-β-Cyclodextrin**

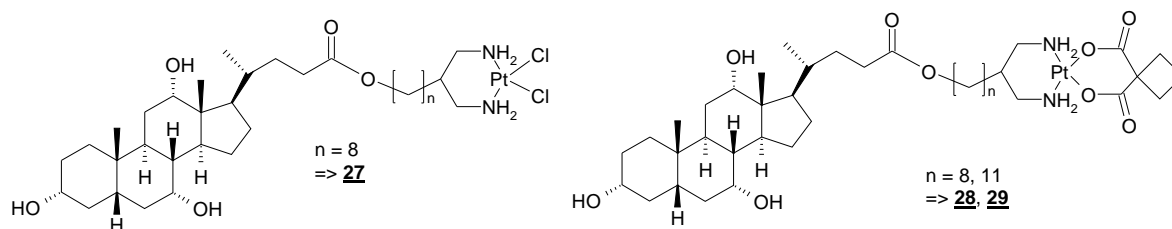
Auch hier kann man eine größtenteils vollständige Lösung der Verbindungen feststellen.

Ebenfalls bestätigt sich der Befund, dass größere Kettenlängen mit HP-β-Cyclodextrin schlechter

in Lösung zu bringen sind, auch wenn die Abnahme der gelösten Menge nicht bei allen Verbindungsgruppen gleich stark ist. Die teilweise über 100%igen Befunde sind darauf zurückzuführen, dass keine idealen oder mehrfach gereinigten Proben der Verbindung vorliegen. Verbindungen mit der Kettenlänge 11 werden - aufgrund des großen Rückgangs der gelösten Stoffmenge, die sich auch bei wiederholtem Ansetzen der Proben nicht verbessert hat - später Gegenstand der anderen Lösungsmethoden sein.

#### 3.1.2.4.4 Gallensäure-Platin-Konjugate

Für die folgenden Gallensäuren-Verbindungen wurden Ergebnisse erzielt:



Probe	maximal möglicher Gehalt [ $\mu\text{mol/l}$ ]	realer Gehalt [ $\mu\text{mol/l}$ ]	gelöste Menge [%]
ChaC <sub>8</sub> 2-subst.Ptcis <b>27</b>	515	36 ± 3	6,8
ChaC <sub>8</sub> 2-subst.Ptcarbo <b>28</b>	542	146 ± 12	27,0
ChaC <sub>11</sub> 2-subst.Ptcarbo <b>29</b>	461	122 ± 7	26,5

**Tabelle 6: Löslichkeiten der Gallensäure-Verbindungen mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin**

Die Komplexierung mittels Cyclodextrinen ist für die Gallensäure-Verbindungen in diesem Ansatz also nur bedingt einsetzbar, gegebenenfalls muss auf andere Systeme ausgewichen werden.

### 3.1.2.5 5-Tage-Messungen

Bei diesen Messungen wird die gleiche Probe an fünf aufeinander folgenden Tagen gemessen, weil bei Versuchen mit Labormäusen die Verbindung fünf Tage nacheinander gespritzt wird und auf diese Weise festgestellt werden sollte, ob es vertretbar ist, dass die Lösung nur am ersten Tag frisch zubereitet wird und aus dieser fünf Tage die Injektion entnommen wird.

#### 3.1.2.5.1 langkettige THP- und Gallensäure-Platin-Konjugate

In dieser Zusammenstellung wurden die aufgrund ihrer Cytotoxizität primär interessanten Verbindungen getestet. Die Lösung wurde an einem Sonntag angesetzt, in einem Kühlschrank bei 4°C gelagert und an fünf Tagen hintereinander gemessen.

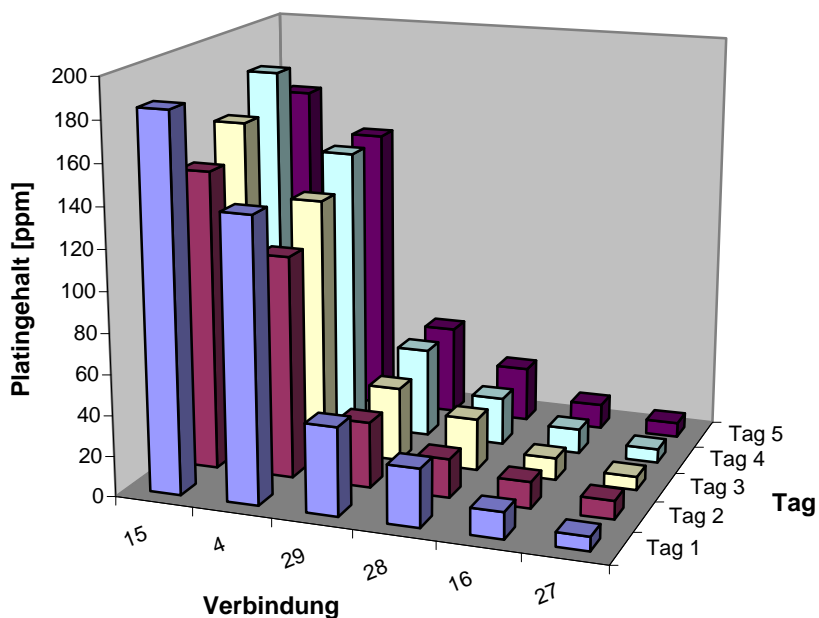


Abbildung 24: 5-Tage-Messung langkettiger THP- und Gallensäure-Platin-Konjugate

Als Ergebnis ist festzuhalten, dass sich die Konzentration der Lösungen nicht ändert. Schlussfolgernd können die Cyclodextrin-Lösungen bedenkenlos über lange Zeit im Kühlschrank gelagert werden.

### 3.1.2.5.2 OH-Spacer-Verbindungen und kurzkettinge THP-Verbindungen

Diese Verbindungen wurden ausgewählt, um größtmögliche Unterschiede zu den oben getesteten Verbindungen zu bieten. Es bestätigt sich die Vermutung, dass auch bei diesen Verbindungen keine Probleme mit der Haltbarkeit der Lösungen auftreten.

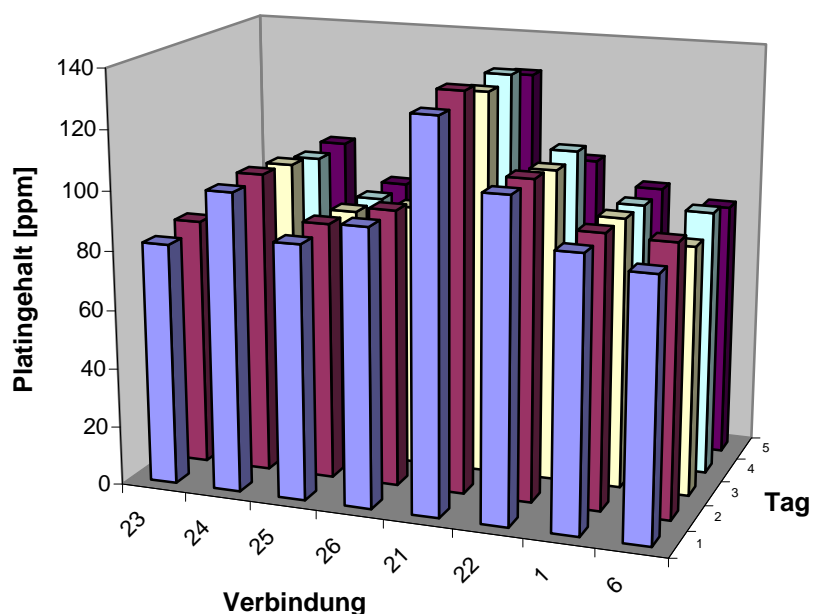
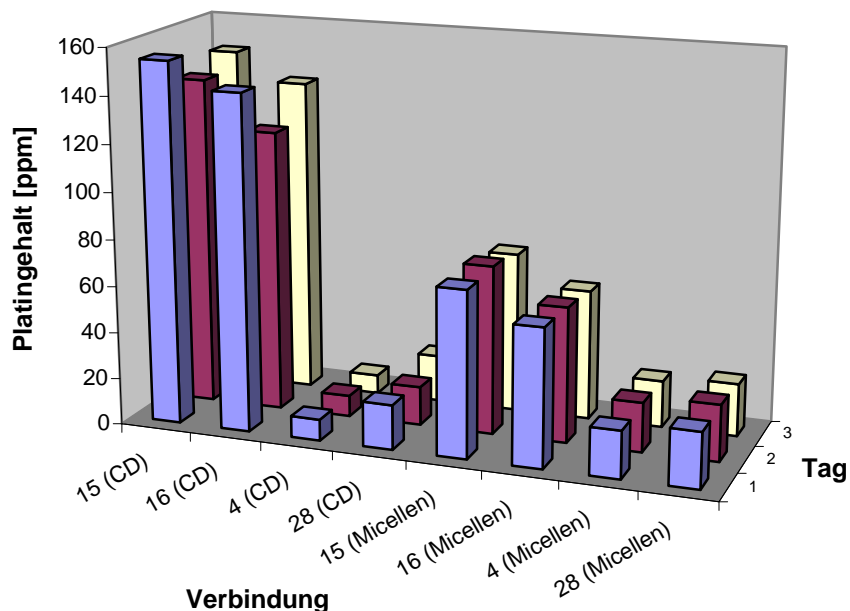


Abbildung 25: 5-Tage-Messung von OH-Spacer-Verbindungen und kurzkettingen THP-Verbindungen

### 3.1.2.5.3 Vergleich Komplexierung langkettiger Verbindungen mit CD's und Micellen

Bei dieser Messung sollte die Haltbarkeit der komplexierenden Lösungen von Micellen und Cyclodextrinen direkt verglichen werden. Micellen sind eine weitere Möglichkeit, schlecht wasserlösliche Verbindungen vermehrt in Lösung zu bringen. Bei langkettigen THP-Verbindungen werden zwar nicht die Konzentrationen des HP- $\beta$ -Cyclodextrins erreicht,

interessant wird ihre Anwendung aber, weil sie beim wichtigen THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** eine Verdopplung der Löslichkeit im Vergleich mit dem Cyclodextrin ermöglichen.



**Abbildung 26: 3-Tage-Messung der Komplexe langkettiger Verbindungen mit Cyclodextrinen und Micellen**

Bei beiden Komplexierungsmethoden erweist sich die Haltbarkeit der Lösung über drei Tage, sie ergeben an allen drei Tagen fast identische Werte, sind also ebenfalls über längere Zeit im Kühlschrank lagerbar.

### 3.1.2.6 Zusammenfassung

Der Einsatz von HP- $\beta$ -Cyclodextrin hat sich als einfaches und wirksames Mittel erwiesen, um die Konzentration der getesteten Verbindungen zu erhöhen. Lediglich einfache Lösungsmittel waren notwendig und der Einsatz zusätzlicher Apparaturen wie Ultraschall oder Mikrowelle war nicht erforderlich. Mit diesem Verfahren ließen sich alle OH-Verbindungen zu 100% in Lösung bringen, bei den Verbindungen mit THP als Transportunterstützung erwies sich der (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-

Spacer an der EDA-Struktur als Hindernis für eine Cyclodextrin-Komplexierung. Ebenso scheint wie bei THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** die 2-PDA-Verknüpfung an einen (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-Spacer die Komplexbildung zu verhindern. Die Komplexlösungen selbst sind über lange Zeit stabil und können somit auch als Vorrat über längere Zeit gelagert werden.

### 3.1.3 Einsatz von Micellen als Komplexierungsmethode

#### 3.1.3.1 Micellare Lösung von ChaC<sub>8</sub>2-subst.PDAPtcis **27** und ChaC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcarbo **29**

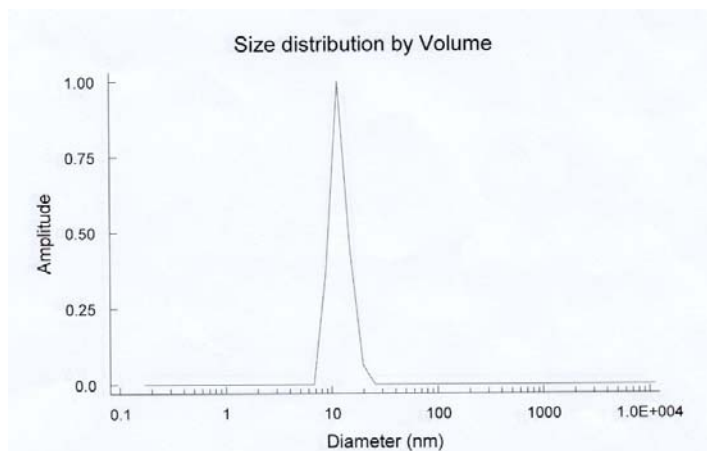
Diese beiden Verbindungen wurden ausgesucht, weil ihre bisherigen maximalen Löslichkeiten mit Hilfe des HP-β-Cyclodextrins nicht groß genug waren um therapeutische Ansprüche zu erfüllen. Die Präparationsmethode wird im experimentellen Teil beschrieben. Es ergaben sich folgende Konzentrationen:

Verbindung	Platin-Gehalt [ppm]	Konzentration [μmol/l]	Teilchengröße
ChaC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcarbo <b>29</b>	79,71 ± 1,69	409	28,3 nm
ChaC <sub>8</sub> 2-subst.PDAPtcis <b>27</b>	16,00 ± 1,18	82	19,4 nm

**Tabelle 7: Konzentrationen der micellaren Lösung von ChaC<sub>8</sub>2-subst.PDAPtcis **27** und ChaC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcarbo **29****

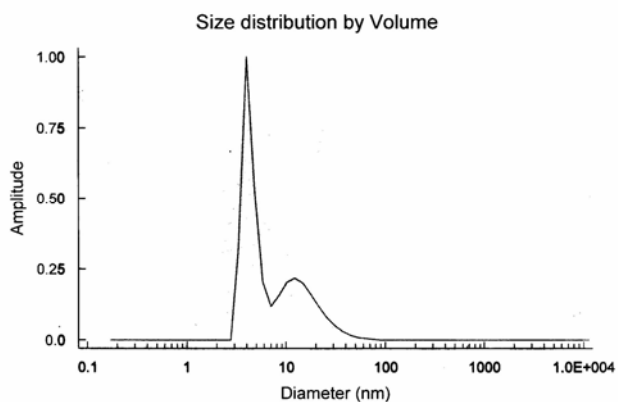
Mit diesen Gehalten kann zunächst festgehalten werden, dass diese Verbindungen in einer Micellen-Lösung eingesetzt werden sollten, da hier höhere Löslichkeiten erzielbar sind.

Die Teilchengrößen sind wie folgt verteilt:



**Abbildung 27: Korngrößenverteilung von ChaC<sub>8</sub>2-subst.PDAPtcis 27 in micellarer Komplexierung**

Bei ChaC<sub>8</sub>2-subst.PDAPtcis ist eine eindeutig definierte Korngrößenverteilung zu erkennen, die Micellen wurden also einheitlich gebildet. Der durchschnittliche Korngrößendurchmesser von 19,4 nm liegt für Micellen im unteren Bereich und ist damit therapeutisch unbedenklich.



**Abbildung 28: Korngrößenverteilung von ChaC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcarbo 29 in micellarer Komplexierung**

Bei der Verbindung mit dem längeren Spacer ist die Korngrößenverteilung nicht ganz so eindeutig, aber klar genug, um eine ausreichende Bildung von Micellen um das Molekül feststellen zu können. Dieser Effekt ist bei längerkettigen Verbindungen häufiger zu beobachten, da die räumliche Beweglichkeit auch wesentlich höher ist. Der durchschnittliche Korndurchmesser liegt mit 28,3 nm ebenfalls erwartungsgemäß höher.



### 3.1.3.2 Präparationsmethode

In dieser Arbeit wurden Mischmicellen eingesetzt, bei deren Herstellung es prinzipiell mehrere mögliche Vorgehensweisen gibt. Die erste Möglichkeit ist, die Verbindung zu den fertigen Mischmicellen zu geben. Bei dieser Methode ergab sich aber bei der Korngrößenmessung ein sehr breit verteiltes Spektrum, was auf eine schlechte und unvollkommene Komplexierung der Verbindung schließen lässt. Aus diesem Grund wurden die Verbindung und beide Komponenten der Mischmicellenlösung zeitgleich miteinander vermengt.

Folgendes Schema wurde zur Herstellung der Micellenlösungen verwendet:

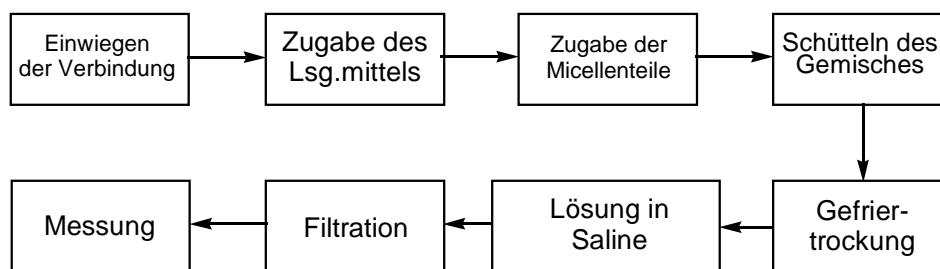


Abbildung 29: Schema der Micellenbildung

Dieses Schema wurde als Basis für die Optimierung der Löslichkeit von THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** verwendet. Die Schritte „Einwiegen der Verbindung“ (ca. 1mg, entspricht 673 µmol/l), Gefriertrocknung, Lösung in Phosphatpuffer (pH= 7,4, 2,5 ml) und Messung (mittels ZAAS) wurden dabei stets unverändert beibehalten. Die Micellenlösungen besteht zum einen aus Na-Glycoxychololat (5%ig, Lösungsmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH im Verhältnis 50:50), zum anderen aus SPC (2,5%ig, Lösungsmittel CHCl<sub>3</sub>), die getrennt zu der Lösung gegeben werden. Alle anderen Schritte der Micellenbildung wurden variiert, um eine Optimierung durchführen zu können.

Weiterhin muss beachtet werden, dass die Micellenbildung eine chemische Reaktion darstellt, folglich können die Ergebnisse analog der Ausbeute bei organischen Synthesen bei unterschiedlichen Ansätzen unterschiedliche Konzentrationen ergeben.

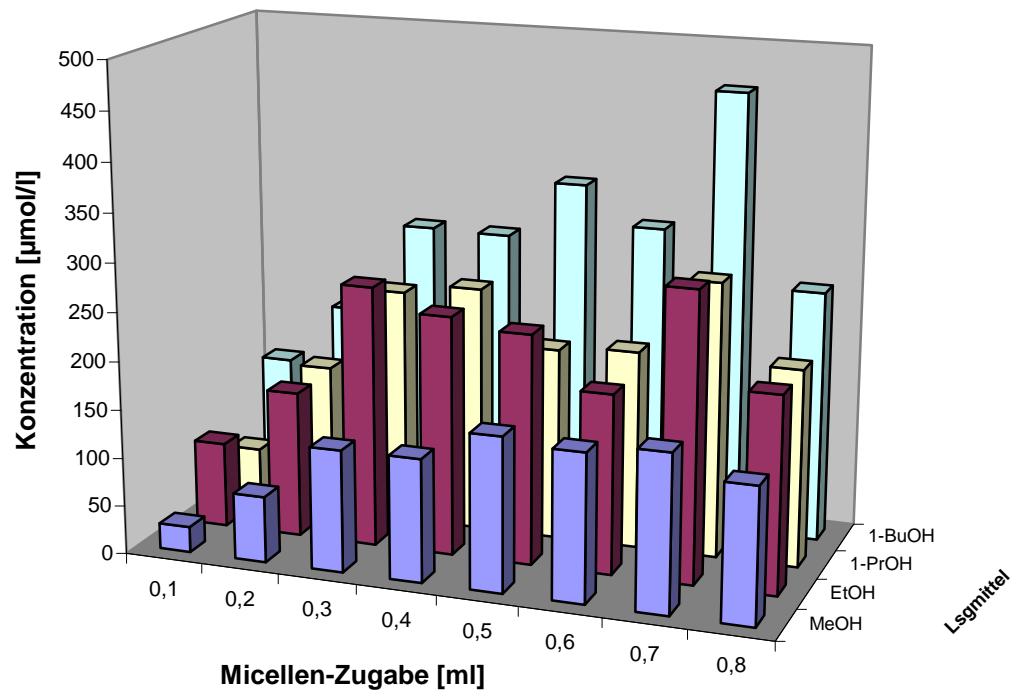
### 3.1.3.3 Lösungsmittel

#### 3.1.3.3.1 Art des Lösungsmittels

Gebräuchliche Lösungsmittel sind vor allem Methanol und Ethanol. Aufgrund der besseren Eigenschaften von Ethanol wurden zusätzlich noch 1-Propanol und 1-Butanol getestet. Es wurden jeweils 2 ml Lösungsmittel zu der Verbindung gegeben. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Micellen-Zugabe [ml]	MeOH	EtOH	1-PrOH	1-BuOH
0,1	26,4	87,9	56,3	131,8
0,2	68,1	150,8	154,2	196,4
0,3	125,9	268,9	242,8	291,7
0,4	126,8	246,6	253,7	290,4
0,5	158,8	236,9	198,5	349,9
0,6	152,5	184,9	204,4	310,7
0,7	161,8	297,2	282,9	455,4
0,8	139,4	202,3	203,1	259,2

**Tabelle 8: Konzentrationen des THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis in  $\mu\text{mol/l}$  bei verschiedenen Lösungsmitteln**



**Abbildung 30: Einfluss der Lösungsmittel auf die Micellen-Löslichkeit**

Eindeutig feststellbar ist der positive Einfluss der wachsenden Kettenlänge des Lösungsmittels, aus dem sich 1-Butanol als optimal ergibt.

### 3.1.3.3.2 Menge des Lösungsmittels

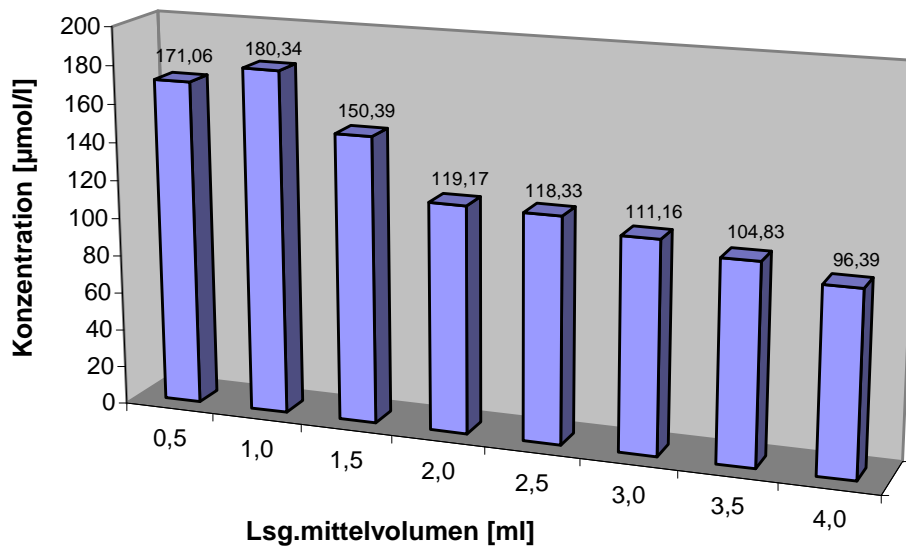


Abbildung 31: Verlauf der Konzentrationen bei variiertem Lösungsmittelvolumen

Die Erhöhung der Lösungsmittelmenge bewirkt keinen positiven Effekt, im Gegenteil sinken die Konzentrationen kontinuierlich ab. Als ideal ist eine Zugabe von 1ml Lösungsmittel zu bezeichnen.

### 3.1.3.4 Micellen-Zugabe

Es wurden die Micellen-Teile Na-glycocholat und SPC verwendet. SPC ist unter dem Handelsnamen Phospholipon 90 bekannt. Es ist ein hochgereinigtes Sojalecithin mit einem Mindestgehalt an Phosphatidylcholin (PC) von 90% (m/m) und einem mittleren Molekulargewicht von 800 g/mol. Nach seiner chemischen Struktur ist PC ein Glycerinphospholipid, dessen GlycerinGrundgerüst ( $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ) an allen drei Kohlenstoffatomen substituiert ist. Die Substituenten in den Positionen 1 und 2 sind Fettsäuren, an Position 3 ist Phosphorylcholin gebunden. Das PC enthält folgende typische

Fettsäurenbesetzung: 12,9% Palmitinsäure, 4,4% Stearinsäure, 10,5% Ölsäure, 66,5% Linolsäure, 5,7% Linolensäure. Das optimale Verhältnis der Stoffmengen von Na-glycocholat und SPC beträgt laut Literatur und eigenen Erkenntnissen 3,175.

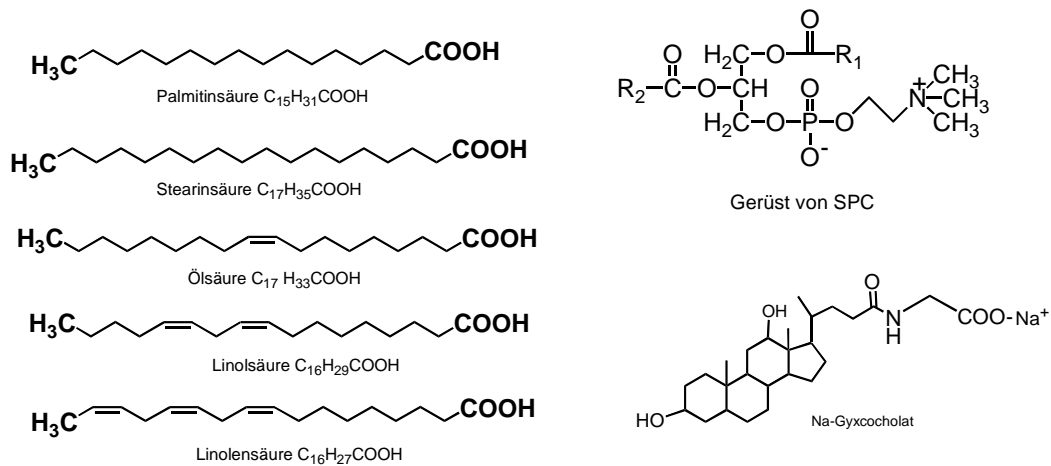


Abbildung 32: Strukturformeln von SPC und Na-glycocholat

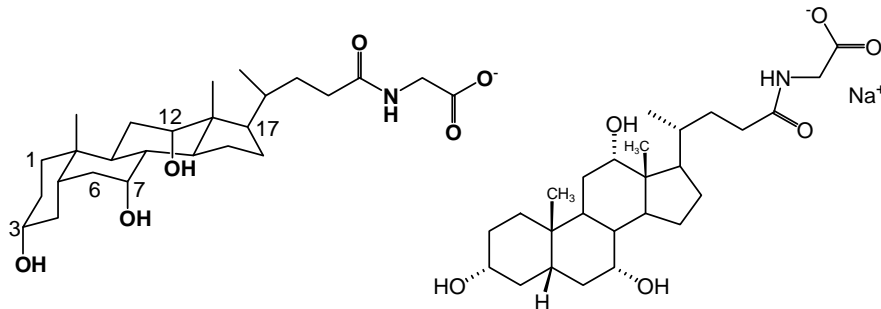


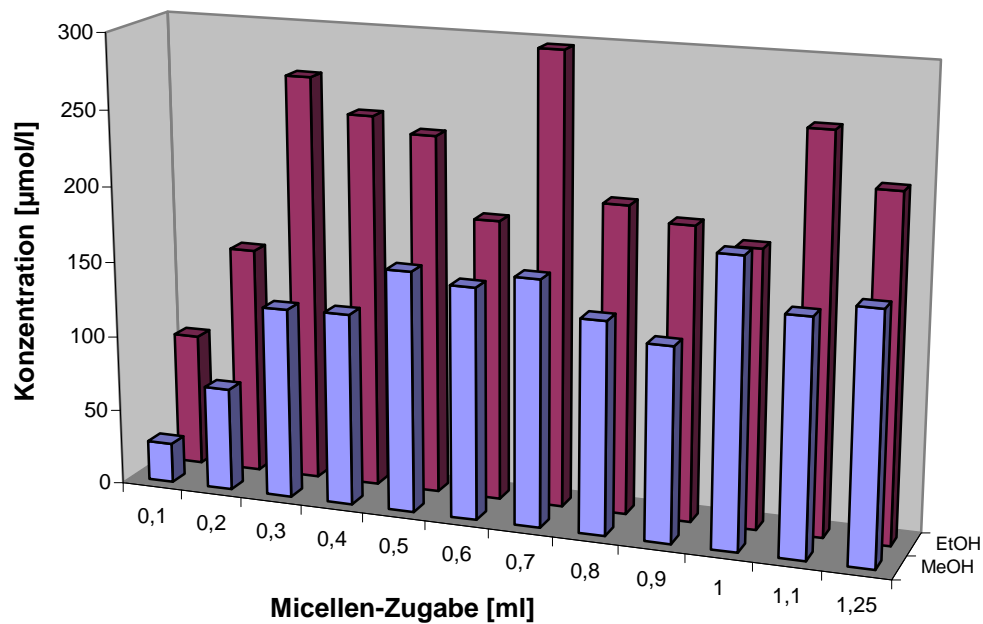
Abbildung 33: Strukturformel von Natrium-Glycocholat

Diese Micellen-Teile wurden jeweils in gleichem Volumen nacheinander zur gelösten Verbindung gegeben, wobei die Menge im Folgenden variiert wurde.

Micellen-Zugabe [ml]	MeOH	EtOH
0,1	26,4	87,9
0,2	68,1	150,8
0,3	125,9	268,9

0,4	126,8	246,6
0,5	158,8	236,9
0,6	152,5	184,9
0,7	161,8	297,3
0,8	139,4	202,3
0,9	127,6	193,0
1,0	188,4	182,0
1,1	154,6	259,2
1,25	163,5	225,1

**Tabelle 9: Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$  bei variiertem Micellen-Zugabe**



**Abbildung 34: Verlauf der Konzentrationen bei variiertem Micellen-Zugabe**

Aus diesen Werten ist ersichtlich, dass optimale Löslichkeiten schon bei einer Micellen-Zugabe ab 0,3 ml erreicht werden können. Die Zugabe von mehr als 0,7 ml der Micellen-Bestandteile

erhöht nicht mehr die Konzentration, hingegen nimmt die Gefahr zu, dass freie Micellen-Bestandteile später ausfallen. Als brauchbar kann somit der Bereich von 0,3 bis 0,7 ml bezeichnet werden.

### 3.1.3.5 Reaktionsführung

#### 3.1.3.5.1 Variation der Reaktionsdauer

In dieser Reihe wurde ermittelt, welche Zeitspanne für die vollständige Reaktion der Verbindung mit den Micellen-Bestandteilen nötig ist.

Reaktionsdauer [min]	Ethanol	Methanol
5	94,7	273,6
10	194,7	244,9
15	180,3	199,7
20	156,7	226,3

Tabelle 10: Verlauf der Konzentrationen in  $\mu\text{mol/l}$  bei variiertem Reaktionsdauer

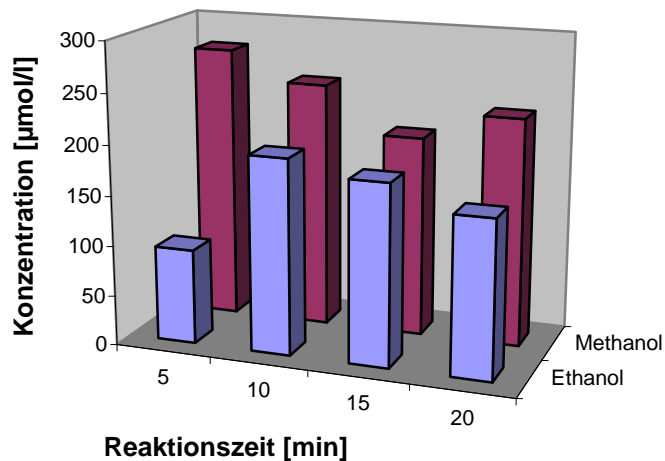


Abbildung 35: Verlauf der Konzentrationen bei variiertem Reaktionsdauer

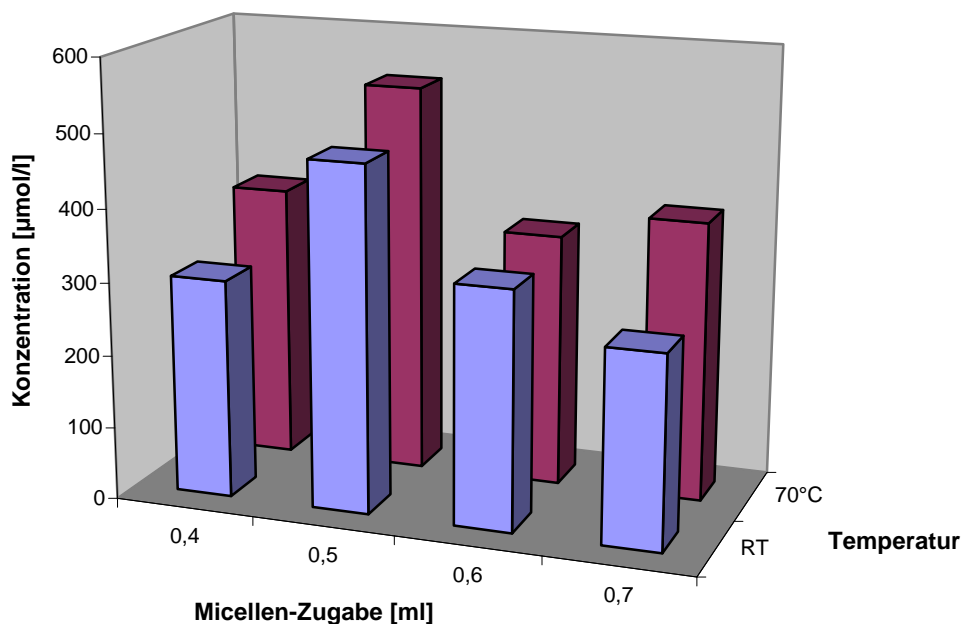
Eine Reaktionszeit von lediglich fünf Minuten reicht nicht aus, für eine vollständige Reaktion sind mindestens zehn Minuten notwendig.

### 3.1.3.5.2 Variation der Reaktionstemperatur

Weiterhin wurde untersucht, ob die Temperatur wesentlichen Einfluss auf die Einschlussreaktion besitzt. Als weiterer Wert neben der Raumtemperatur wurden 70°C eingestellt.

	V(Mic.) 0,4ml	V(Mic.) 0,5ml	V(Mic.) 0,6ml	V(Mic.) 0,7ml
RT	300,6	474,0	327,1	264,3
70°C	378,6	536,0	347,8	383,3

**Tabelle 11: Verlauf der Konzentrationen bei unterschiedlicher Reaktionstemperatur**



**Abbildung 36: Verlauf der Konzentrationen bei unterschiedlicher Reaktionstemperatur**

Es wird deutlich, dass die Erhöhung der Reaktionstemperatur keinen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute des Verbindungs-Einschlusses besitzt. Da allerdings auch keine Spaltung des



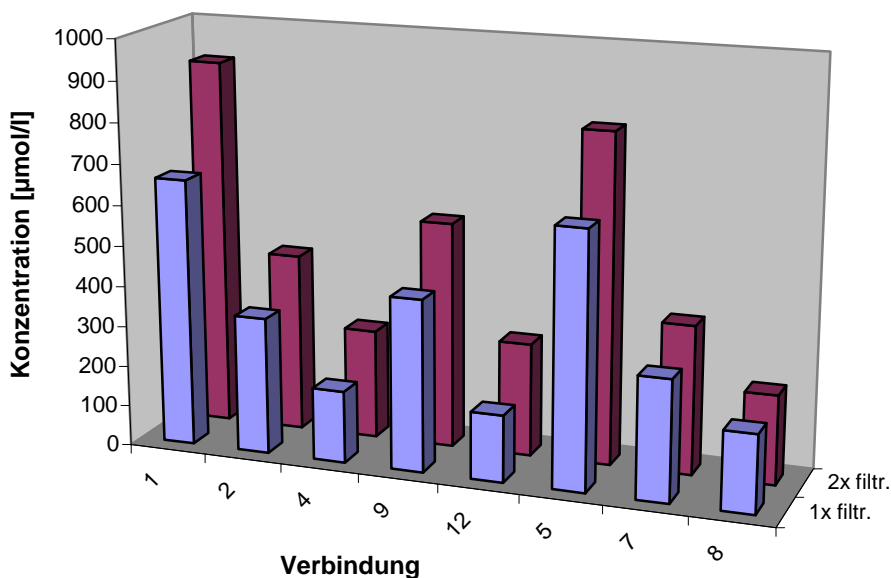
Moleküls befürchtet werden muss, steht einer Temperatur von 70°C zur Unterstützung der Reaktion nichts entgegen.

### 3.1.3.6 Filtration

Für die Filtration der Reaktionslösung wurden CA-Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,22µm verwendet. Bei höherer Micellenzugabe (1,25 ml) ergaben sich nach einiger Zeit eine Schleierbildung, so dass erneut filtriert werden musste. Dabei ergaben sich folgende Änderungen der Konzentrationen:

	1x filtr.	2x filtr.
THPC <sub>4</sub> 2-subst.PDAPtcis <u>1</u>	659,6	907,6
THPC <sub>6</sub> 2-subst.Ptcis <u>2</u>	336,9	440,6
THPC <sub>11</sub> 2-subst.Ptcis <u>4</u>	177,4	269,4
THPC <sub>4</sub> N-subst.EDAPtcis <u>9</u>	423,8	557,1
THPC <sub>11</sub> N-subst.EDAPtcis <u>12</u>	165,2	278,6
THPC <sub>4</sub> N-subst.PDAPtcis <u>5</u>	629,6	811,0
THPC <sub>8</sub> N-subst.PDAPtcis <u>7</u>	298,0	366,0
THPC <sub>11</sub> N-subst.PDAPtcis <u>8</u>	192,2	219,6

**Tabelle 12: Verlauf der Konzentrationen bei zweifacher Filtration**



**Abbildung 37: Verlauf der Konzentrationen bei zweifacher Filtration**

Bei jeder Verbindung steigt durch die zweite Filtration die Konzentration an. Der abgetrennte Niederschlag besteht also aus nicht an der Komplexierung beteiligten Micellen-Bestandteilen. Dies stützt die Absicht, mit geringerer Micellen-Zugabe zu arbeiten.

### 3.1.3.7 Optimales Verfahren

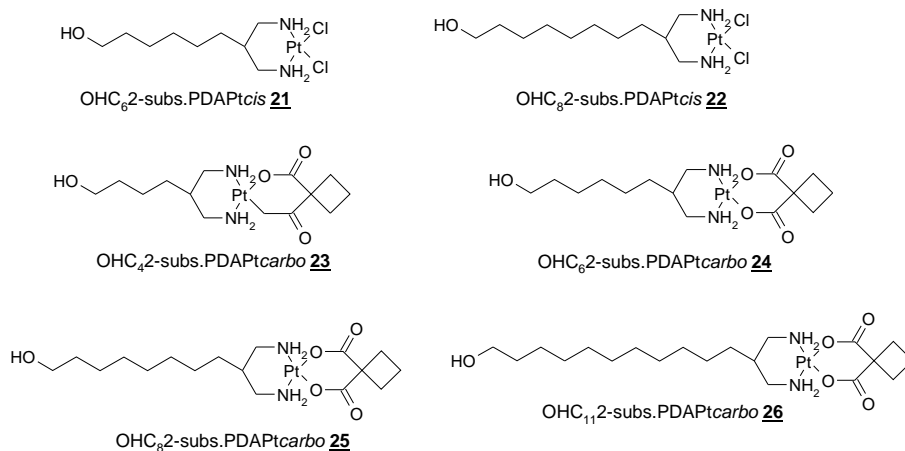
Aus den Testergebnissen lassen sich folgende optimalen Bedingungen für die Komplexierung mittels Micellen ableiten:

- Einwiegen der Verbindung, ca., 1mg
- Zugabe von 1 ml 1-BuOH
- Zugabe von 0,5 ml Na-glycocholatlösung (5%) und 0,5 ml SPC-Lösung (2,5%)
- 30 Minuten bei 70°C rotieren (420 U/min)
- Gefriertrocknung

- Lösung in 2,5 ml NaCl-Lösung (0,9%)
- Filtration
- Messung mittels Zeeman-AAS

### 3.1.3.8 Ergebnisse für alle vorliegenden Substanzen

#### 3.1.3.8.1 OH-Spacer-Verbindungen

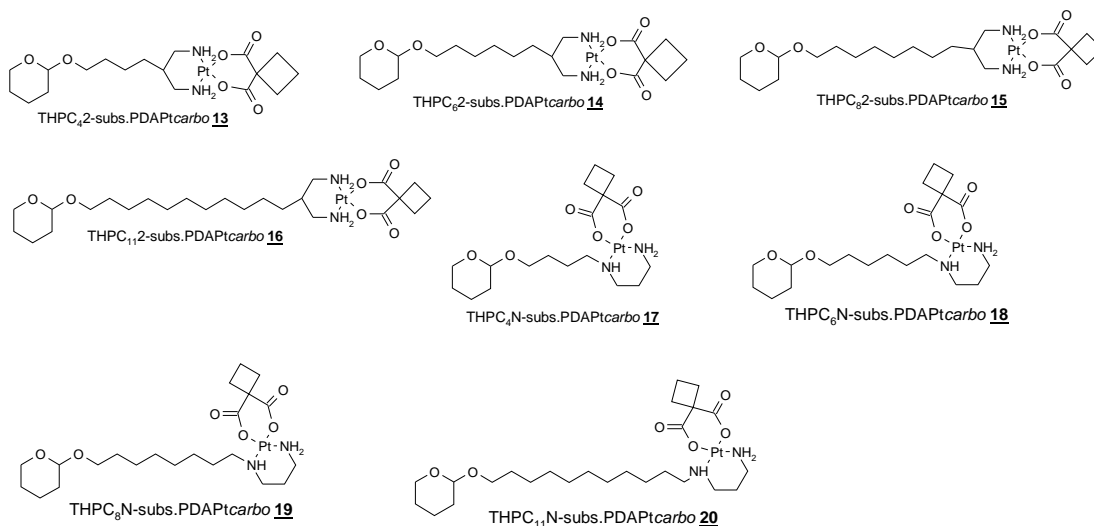


Probe	maximal möglicher Gehalt [ $\mu\text{mol/l}$ ]	realer Gehalt [ $\mu\text{mol/l}$ ]	gelöste Menge [%]
HOC <sub>6</sub> 2-subst.PDAPtcis <u>21</u>	1090	973 $\pm$ 27	89,3
HOC <sub>8</sub> 2-subst.PDAPtcis <u>22</u>	1299	409 $\pm$ 43	31,5
HOC <sub>4</sub> 2-subst.PDAPtcarbo <u>23</u>	1126	1294 $\pm$ 50	114,9
HOC <sub>6</sub> 2-subst.PDA Ptcarbo <u>24</u>	1237	1340 $\pm$ 28	108,3
HOC <sub>8</sub> 2-subst.PDA Ptcarbo <u>25</u>	794	237 $\pm$ 39	29,8
HOC <sub>11</sub> 2-subst.PDA Ptcarbo <u>26</u>	530	417 $\pm$ 9	78,7

Tabelle 13: Gehalte der OH-Verbindungen in micellarer Komplexierung

Die Verbindungen dieser Gruppe gehen fast komplett in Lösung, lediglich bei der Kettenlänge 8 gibt es jeweils einen deutlichen Rückgang der Konzentrationen.

### 3.1.3.8.2 THP-Carbo-Verbindungen

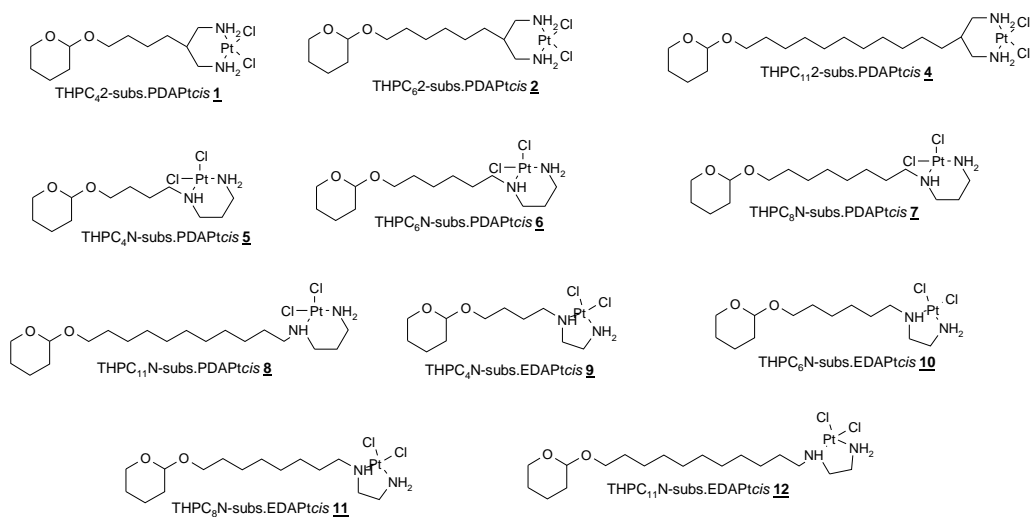


Probe	maximal möglicher Gehalt [ $\mu\text{mol/l}$ ]	realer Gehalt [ $\mu\text{mol/l}$ ]	gelöste Menge [%]
THPC <sub>4</sub> 2-subs.PDA Ptcarbo <b>13</b>	649	801 $\pm$ 22	123,4
THPC <sub>6</sub> 2-subs.PDA Ptcarbo <b>14</b>	739	869 $\pm$ 28	117,5
THPC <sub>8</sub> 2-subs.PDA Ptcarbo <b>15</b>	636	717 $\pm$ 15	112,7
THPC <sub>11</sub> 2-subs.PDA Ptcarbo <b>16</b>	626	550 $\pm$ 35	87,8
THPC <sub>4</sub> N-subs.EDAPtcarbo <b>17</b>	741	1159 $\pm$ 33	156,4
THPC <sub>6</sub> N-subs.EDAPtcarbo <b>18</b>	2528	2032 $\pm$ 58	80,4
THPC <sub>8</sub> N-subs.EDAPtcarbo <b>19</b>	1476	1529 $\pm$ 77	103,6
THPC <sub>11</sub> N-subs.EDAPtcarbo <b>20</b>	834	114 $\pm$ 11	13,7

Tabelle 14: Gehalte der THP-Carbo-Verbindungen in micellarer Komplexierung

Auch bei dieser Gruppe ergibt sich bei allen Verbindungen eine nahezu vollständige Komplexierung durch die Micellen.

### 3.1.3.8.3 THP-Cis-Verbindungen



Probe	maximal möglicher Gehalt [μmol/l]	realer Gehalt [μmol/l]	gelöste Menge [%]
THPC <sub>4</sub> 2-subst.PDAPtcis <b>1</b>	944	716 ± 47	75,8
THPC <sub>6</sub> 2-subst.PDAPtcis <b>2</b>	1290	394 ± 33	30,5
THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcis <b>4</b>	714	171 ± 19	23,9
THPC <sub>4</sub> N-subst.EDAPtcis <b>5</b>	889	459 ± 26	51,7
THPC <sub>11</sub> N-subst.EDAPtcis <b>8</b>	614	79 ± 22	12,8
THPC <sub>4</sub> N-subst.PDAPtcis <b>9</b>	1217	1254 ± 89	103,7
THPC <sub>8</sub> N-subst.PDAPtcis <b>11</b>	727	618 ± 53	85,1
THPC <sub>11</sub> N-subst.PDAPtcis <b>12</b>	957	285 ± 17	29,7

Tabelle 15: Gehalte der THP-Cis-Verbindungen in micellarer Komplexierung

Diese Ansätze wurden mit der Zugabe von jeweils 0,3 ml der Micellenbestandteile und Ethanol als Lösungsmittel hergestellt. Es zeigt sich deutlich, dass für Verbindungen mit längererkettigen Spacern generell nur schlechte Löslichkeiten zu erzielen sind. Die unterschiedliche Komplexstruktur am Platinzentrum spielt dabei keine Rolle.

#### 3.1.3.8.4 Gallensäure-Verbindungen

Probe	maximal möglicher Gehalt [ $\mu\text{mol/l}$ ]	realer Gehalt [ $\mu\text{mol/l}$ ]	gelöste Menge [%]
ChaC <sub>8</sub> 2-subst.PDAPtcis <u>27</u>	755	111 $\pm$ 12	14,7
ChaC <sub>8</sub> 2-subst.PDAPtcarbo <u>28</u>	508	112 $\pm$ 7	22,0
ChaC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcarbo <u>29</u>	585	152 $\pm$ 11	26,0

**Tabelle 16: Gehalte der Gallensäure-Verbindungen in micellarer Komplexierung**

Auch bei dieser Gruppe von Verbindungen können mit der Komplexierung durch Micellen nur geringe Löslichkeiten erzielt werden.

#### 3.1.3.9 Zusammenfassung

Der Einsatz von Micellen zur Erhöhung der Wirksamkeit hat sich im Wesentlichen als Alternative zum HP- $\beta$ -Cyclodextrin herausgestellt. Nur bei einigen Verbindungen der Spacerlänge 11 mit THP als Transportunterstützung gab es Probleme mit der Einkapselung. Entscheidend ist aber die deutliche Erhöhung der Konzentration des THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis 4, welche sich in der cytotoxischen Evaluierung als interessanteste Verbindung herausstellt. Die Löslichkeit konnte um mehr als das 10-fache erhöht werden, spätere Ansätze ergaben sogar noch höhere Werte. Aus diesem Grund wurden die Micellen in der weiteren Arbeit als Standardmethode eingesetzt, zumal die Nachteile gegenüber dem Cyclodextrin nur gering waren.

### 3.1.4 Emulsionen

Folgende Grundansätze für die Emulsionen wurden verwendet:

Ansatz Nr.	Anteil EtOH	Anteil Miglyol	Anteil Solutol
I	15T	----	80T
II	30T	30T	55T
III	10T	30T	55T

Tabelle 17: Grundansätze für die Emulsionen

In diesen Grundansätzen wurde jeweils 1mg THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** eingewogen und einige Tage geschüttelt. Danach wurde filtriert und mit dem jeweiligen Lösungsmittel aufgenommen, sodass sich im Falle einer vollständigen Lösung ein Gehalt von 500µmol/l ergeben hätte.

#### 3.1.4.1 Ofen-Programm für die AAS-Messung

Durch den hohen Lipidanteil der Emulsionen ist es notwendig, einen Modifier zu benutzen, der vor der Probe in das Graphitrohr pipettiert wird, um das Anhaften der Probe zu vermeiden. In diesem Fall werden 6 µl einer Triton X-100-Lösung verwendet (Triton X-100/H<sub>2</sub>O 1:10), zu dem 16 µl der Probe pipettiert werden. Anschließend wird das Ofenprogramm gestartet.

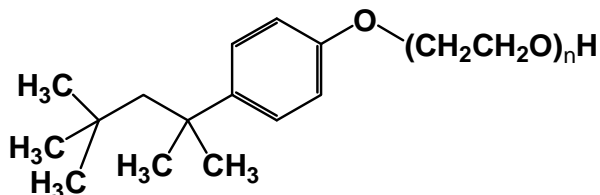


Abbildung 38: Strukturformel von Triton X-100

Es wurde folgendes Ofenprogramm für die Messung verwendet:

Stufe	Temperatur [°C]	Rampe [s]	Dauer [s]	Argonstrom	Auswertung
1	110	5	40	an	
2	140	5	60	an	
3	450	15	20	an	
4	600	5	20	an	
5	1750	10	20	an	
6	2300	0	5	aus	x
7	2400	1	5	an	

**Tabelle 18: AAS-Ofenprogramm zur Messung der Emulsionen**

### 3.1.4.2 Emulsionen mit NaCl-Lösung

Für NaCl-Lösung ergaben sich folgende Werte:

Ansatz Nr.	Konzentration [ $\mu\text{mol/l}$ ]
I	$169 \pm 46$
II	$234 \pm 37$
III	$295 \pm 30$

**Tabelle 19: Konzentrationen für NaCl als Emulsionsbildner**

Mit zunehmender Konzentration zeigte sich eine intensivere Trübung.



### 3.1.4.3 Emulsionen mit Glycerol

Für Glycerol ergaben sich folgende Werte:

Ansatz Nr.	Konzentration [ $\mu\text{mol/l}$ ]
I	$66 \pm 17$
II	$219 \pm 15$
III	$114 \pm 17$

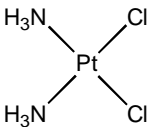
Tabelle 20: Konzentrationen für Glycerol als Emulsionsbildner

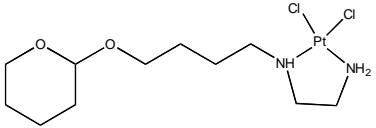
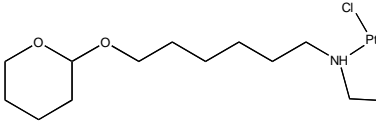
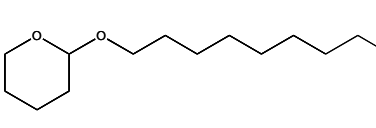
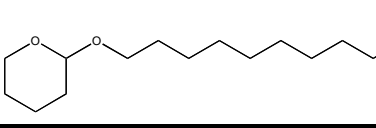
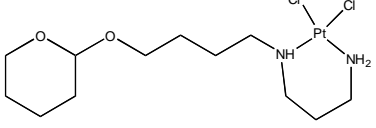
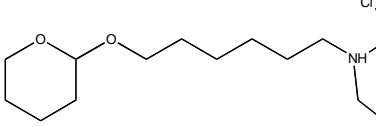
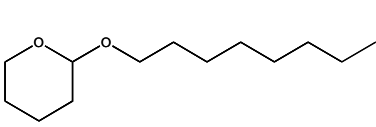
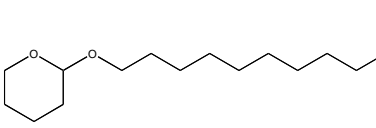
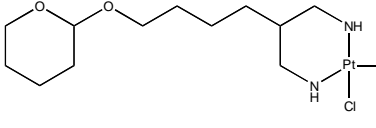
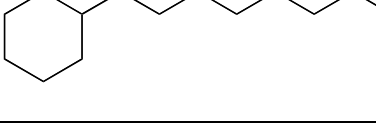
Mit zunehmender Konzentration zeigte sich auch in diesem Fall eine intensivere Trübung.

## 3.2 Struktur-Wirkungs-Untersuchungen der Platinverbindungen

### 3.2.1 Cytotoxizität der THP-Verbindungen

In vorangegangenen Arbeiten erwiesen sich die Carboplatinverbindungen als deutlich weniger wirksam als die analogen Cisplatinverbindungen. Die Gallensäureverbindungen wiesen zwar vergleichbare Cytotoxizitäten auf, sind aber wesentlich schwieriger und teurer herzustellen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit nur die THP-Verbindungen in die engere Untersuchung einbezogen. Getestet wurden die zwei Keimzelltumor-Zelllinien 1411HP und H12.1, erstere mit Cisplatin-Resistenz und letztere mit Sensitivität gegenüber Cisplatin.

Verbindung	Strukturformel	IC <sub>50</sub> 1411HP [ $\mu\text{M}$ ]	IC <sub>50</sub> H12.1 [ $\mu\text{M}$ ]
CDDP Cisplatin		$2,4 \pm 0,8$	$0,93 \pm 0,3$

<b>9</b> THPC <sub>4</sub> N- subs.EDAPtcis		$28,5 \pm 9,2$	$11 \pm 1,7$
<b>10</b> THPC <sub>6</sub> N- subs.EDAPtcis		$29 \pm 7,9$	$13 \pm 2,0$
<b>11</b> THPC <sub>8</sub> N- subs.EDAPtcis		$12,3 \pm 3,8$	$20 \pm 7,2$
<b>12</b> THPC <sub>11</sub> N- subs.EDAPtcis		$4,7 \pm 1,5$	$10,3 \pm 3,8$
<b>5</b> THPC <sub>4</sub> N- subs.PDAPtcis		$11,7 \pm 0,6$	$12,7 \pm 0,6$
<b>6</b> THPC <sub>6</sub> N- subs.PDAPtcis		$8,7 \pm 3,2$	$11 \pm 1,0$
<b>7</b> THPC <sub>8</sub> N- subs.PDAPtcis		$5,3 \pm 0,6$	$6 \pm 1,0$
<b>8</b> THPC <sub>11</sub> N- subs.PDAPtcis		$4,3 \pm 0,6$	$5,7 \pm 0,6$
<b>1</b> THPC <sub>4</sub> 2- subs.PDAPtcis		$28,3 \pm 2,9$	$9,3 \pm 2,1$
<b>2</b> THPC <sub>6</sub> 2- subs.PDAPtcis		$13 \pm 2,6$	$13,3 \pm 5,8$

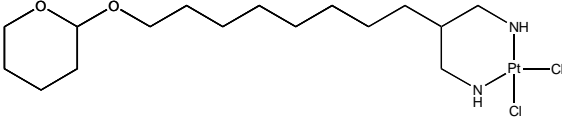
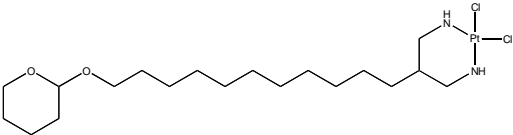
<b>3</b> THPC <sub>8</sub> 2- subs.PDAPtcis		5,8 ± 0,3	5,3 ± 0,6
<b>4</b> THPC <sub>11</sub> 2- subs.PDAPtcis		0,7 ± 0,2	1,4 ± 0,4

Tabelle 21: IC<sub>50</sub>-Werte der THP-Verbindungen nach 96h

Aus diesen Werten sind mehrere Trends abzulesen. Zum einen steigt die Toxizität mit der Spacerlänge, vermutlich weil mit der steigenden Lipophilie die Membrangängigkeit zunimmt und mehr Platin in der Zelle auch mehr Schaden verursacht. Diese Steigerung der Wirksamkeit ist allerdings nicht immer gleich groß, bei den THP2-substituierten PDA-Verbindungen ist sie mit Abstand am stärksten ausgeprägt. Weiterhin ist anzumerken, dass die getesteten Verbindungen von dem Resistenzfaktor der Zelllinie 1411HP, nachdem etwa die dreifache Dosis CDDP für die gleiche Wirkung benötigt werden, abgekoppelt sind und für die drei unterschiedlichen Anknüpfungsarten N-substituiertes EDA, N-substituiertes PDA und 2-substituiertes PDA unterschiedlich verlaufen. Die besten Werte weist THPC<sub>11</sub>2-substituiertes PDAPtcis **4** auf, dessen IC<sub>50</sub> gegen H12.1 mit dem von Cisplatin vergleichbar ist und das gleichzeitig die CDDP-Resistenz von 1411HP zu brechen imstande ist. Abschließend kann festgehalten werden, dass der Wirkmechanismus der THP-Verbindungen aufgrund der Resistenzüberwindung sich von der Wirkung des CDDP unterscheidet. Weiterhin ist die symmetrische Anbindung des Platinkomplexes THPC<sub>11</sub>2-substituiertes PDAPtcis **4** entscheidend, das analoge unsymmetrisch gebundene THPC<sub>11</sub>N-substituiertes PDAPtcis **8** weist schließlich deutlich schlechtere Werte auf.

### 3.2.2 THP-Verbindung ohne Platin-Komplex

In Bezug auf das Cisplatin scheint klar, dass die toxische Wirkung auf das Platinzentrum des THPC<sub>11</sub>2-substituiertes PDAPtcis **4** zurückzuführen ist. Um jedoch diese Theorie zu bestätigen, wurde

nach Literaturvorgaben<sup>104</sup> ein Molekül **41** synthetisiert und getestet, das bis auf den Platinkomplex mit dem THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** identisch ist (Synthesevorschrift im experimentellen Teil).

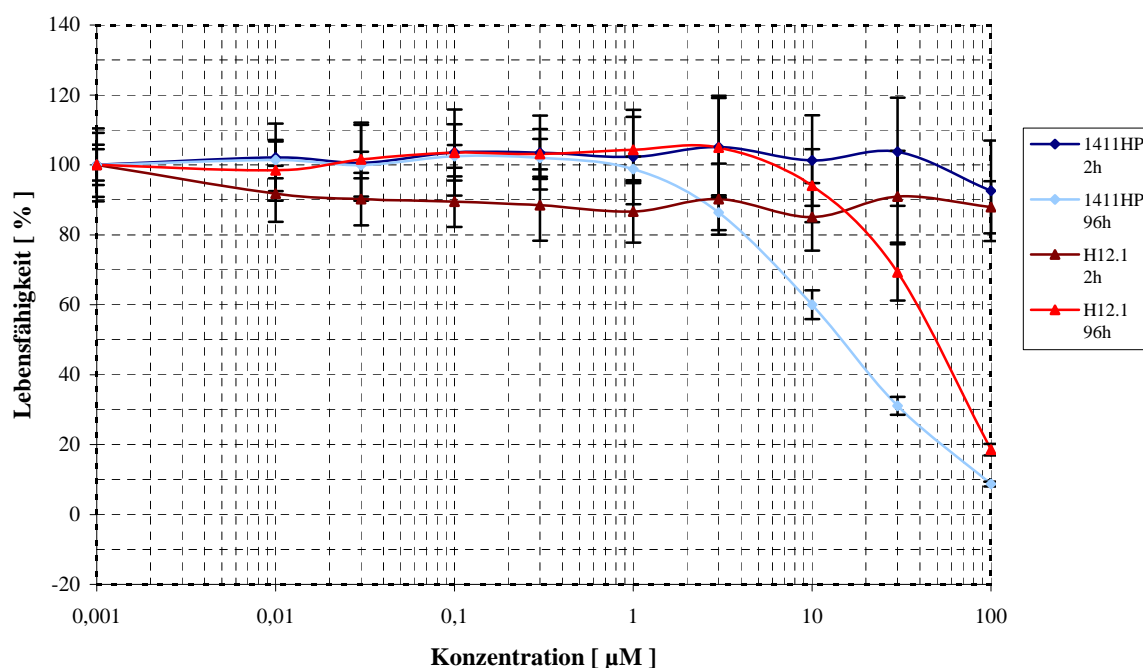
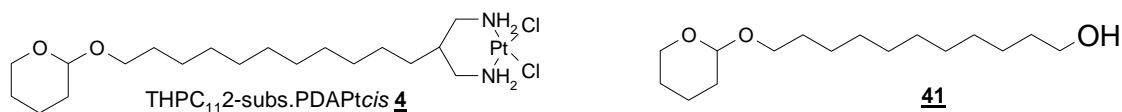


Abbildung 39: Cytotoxizität des THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** ohne Platin-Einheit

In Abbildung 39 wird deutlich, dass bei langer Einwirkung und hoher Konzentration auch diese Verbindung Toxizität aufweist. Die vorher beschriebene Toxizität des THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** hat jedoch eine andere Qualität und ist eindeutig nicht auf den lipophilen Strukturanteil zurückzuführen.

### 3.2.3 Kinetik der Toxizität von THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis 4

In diesen Testreihen wurde untersucht, wie schnell die toxische Wirkung des THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis 4 einsetzt. Als Inkubationszeiten wurden zwei bzw. 96 Stunden gewählt.

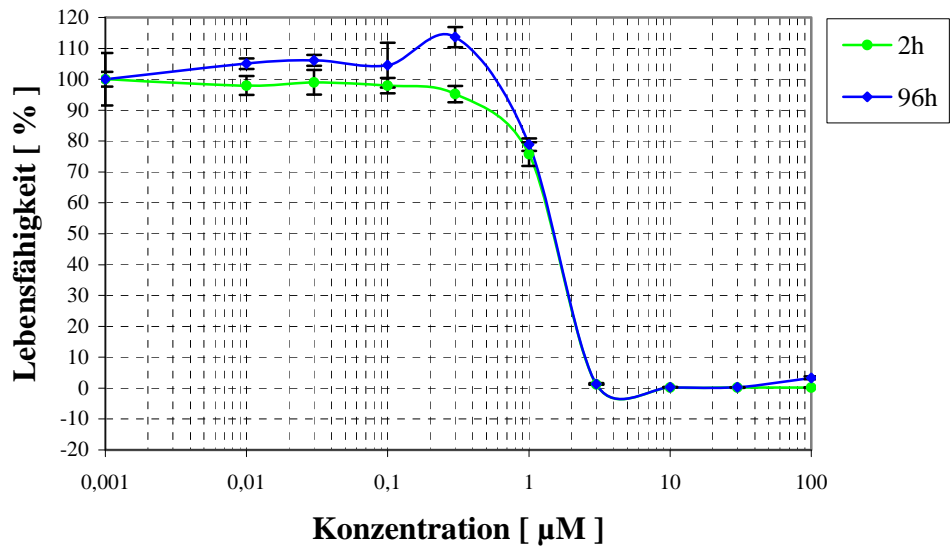


Abbildung 40: Wirkung von THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis gegen 1411HP bei variabler Einwirkzeit

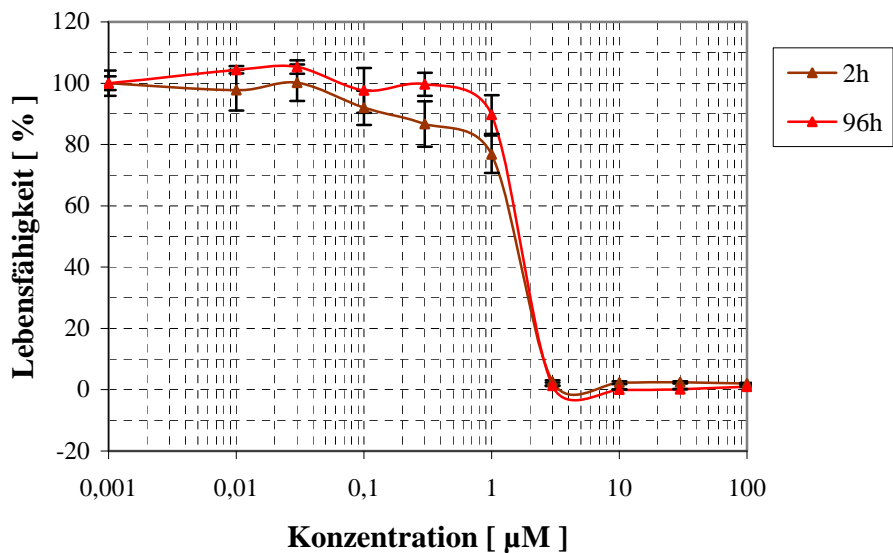


Abbildung 41: Wirkung von THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis gegen H12.1 bei variabler Einwirkzeit

Aus diesen Grafiken geht hervor, dass die freie Verbindung THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis **4** bereits nach zwei Stunden ihre volle Wirkung entfaltet hat und die Verlängerung der Inkubation auf 96 Stunden den identischen IC<sub>50</sub>-Wert ergibt. Ebenfalls klar ersichtlich ist das Fehlen eines Unterschiedes zwischen der sensitiven und der resistenten Zelllinie.

### 3.2.4 Wirksamkeit der eingekapselten Verbindungen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Löslichkeit von THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis **4** durch die Einkapselung in Cyclodextrine und Micellen erhöht. Im Folgenden wurde nun der Einfluss der Einkapselung auf die Wirksamkeit der Verbindung untersucht.

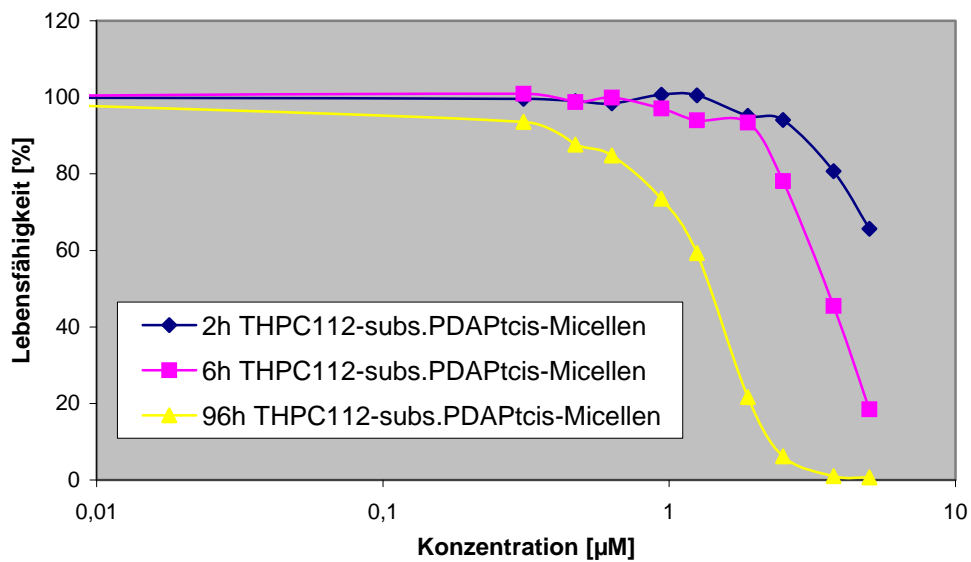
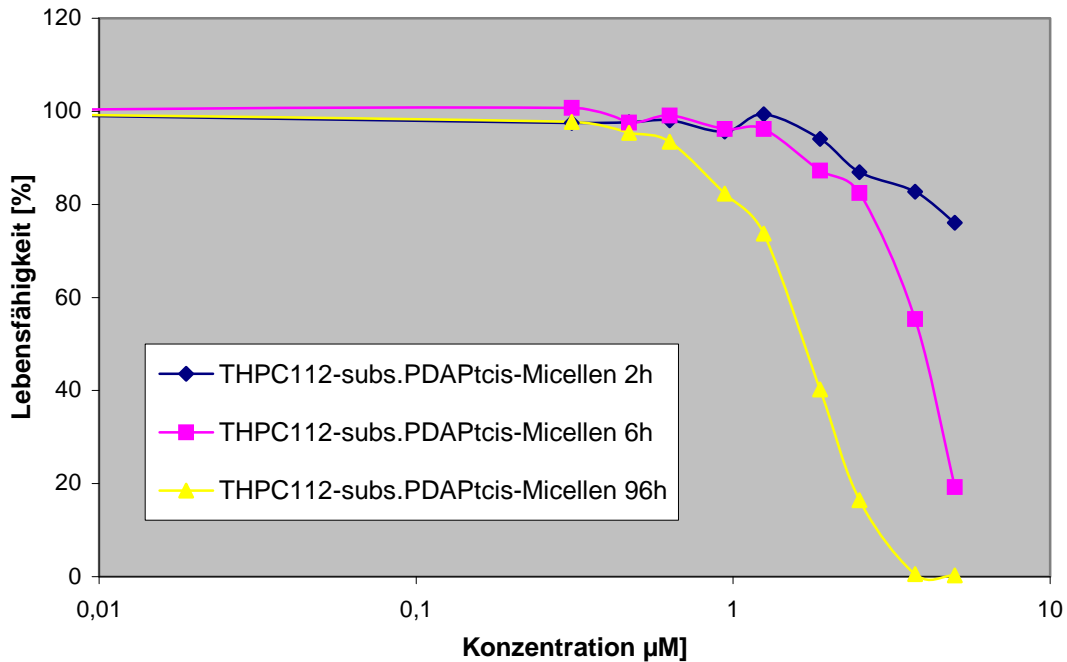


Abbildung 42: Wirksamkeit des eingekapselten THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis **4** gegen 1411HP



**Abbildung 43: Wirksamkeit des eingekapselten THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis 4 gegen H12.1**

Gegenüber der Zelllinie 1411HP entfaltet das eingekapselte THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis 4 seine Wirkung nicht in kurzer Zeit, sondern benötigt, wie der Grafik zu entnehmen ist, bis zu vier Tage.

Gegenüber der Linie H12.1 ist Verlauf der Wirksamkeit analog, auch hier werden vier Tage für die volle Entfaltung der Wirksamkeit benötigt.

Die reinen Micellenlösungen zeigen zwar auch toxische Erscheinungen, sind aber in der Wirkung deutlich weniger toxisch und in diesem Zusammenhang vernachlässigbar.

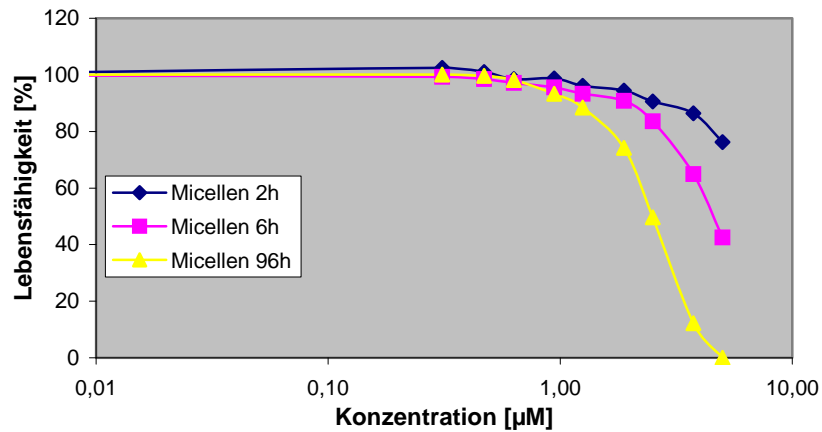


Abbildung 44: Wirksamkeit der reinen Micellen-Lösung gegen H12.1

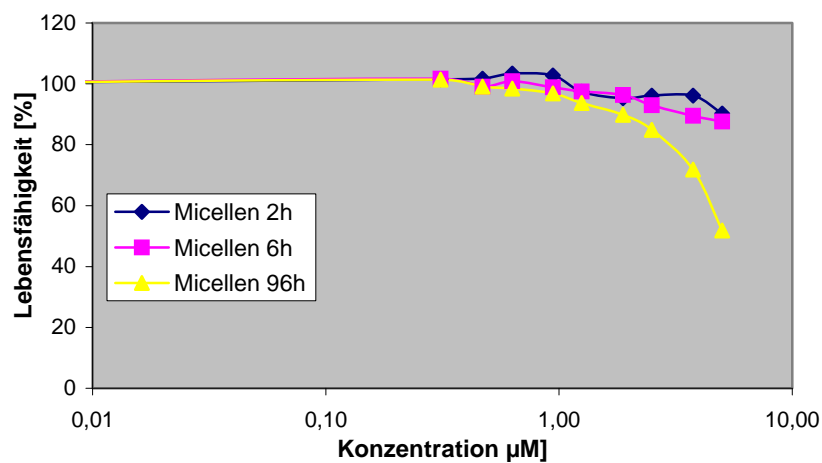
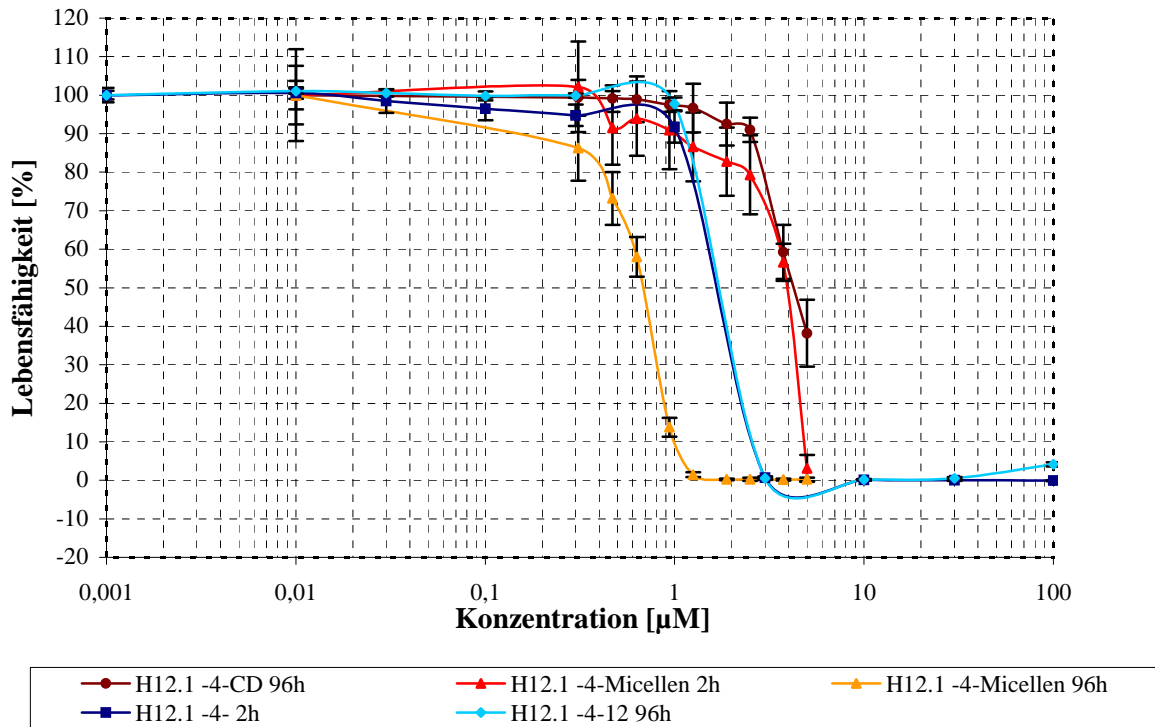


Abbildung 45: Wirksamkeit der reinen Micellen-Lösung gegen 1411HP

Die zweite Methode zur Steigerung der Konzentration des lipophilen THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis **4** bestand im Einsatz von Cyclodextrinen. Auch diese Methode wurde nun auf ihren cytotoxischen Einfluss auf die Wirkung der reinen Verbindung untersucht.





**Abbildung 46: Vergleich der Einkapselung von THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis in Cyclodextrine und Micellen**

In diesem Diagramm wird der Unterschied zwischen der Einkapselung in Cyclodextrine und Micellen deutlich. Der Cyclodextrin-Komplex hemmt die Wirkung der Verbindung in hohem Maße und erreicht selbst nach 96h nur wenig mehr Toxizität als der Micellenkomplex nach 2h. Als weitere zentrale Erkenntnis wird deutlich, dass auch der komplexierte Wirkstoff keinen Unterschied zwischen sensitiver und resistenter Tumorzelllinie zeigt, dass sich der Wirkmechanismus also wesentlich von dem des CDDP unterscheiden muss.

### 3.2.5 Vergleich von THPC<sub>11</sub>N-subst.PDAPtcis **8** und THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4**

Beim folgenden Vergleich wurden die beiden Verbindungen THPC<sub>11</sub>N-subst.PDAPtcis **8** und THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4**, die sich lediglich in der Art der Verknüpfung zwischen Platinkomplex und Spacer unterscheiden, auf resultierende Effekte dieses Unterschiedes untersucht. Hierbei wurde zunächst mittels SS-GFAAS untersucht, wieviel Platin in die Zelle aufgenommen wurde.

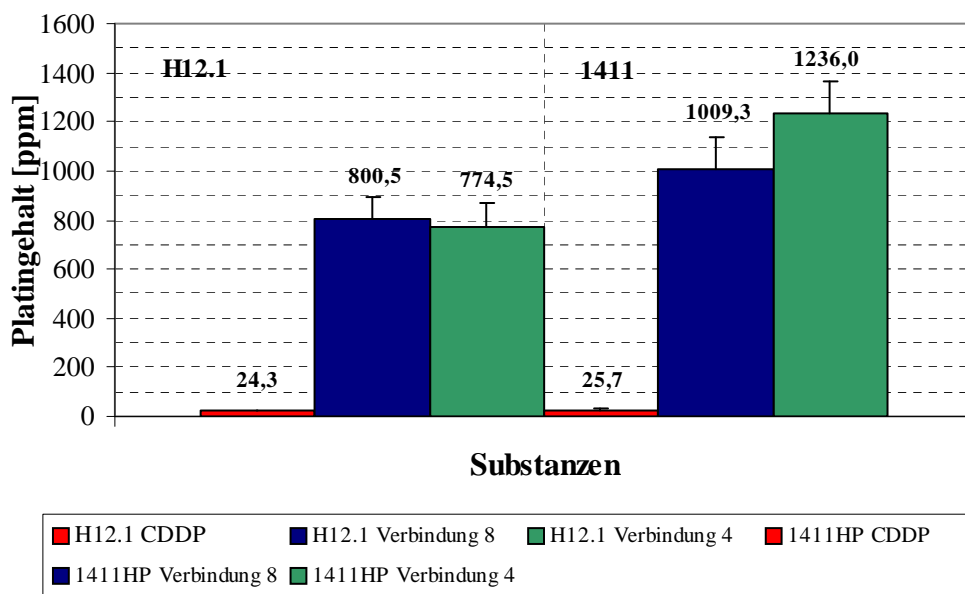
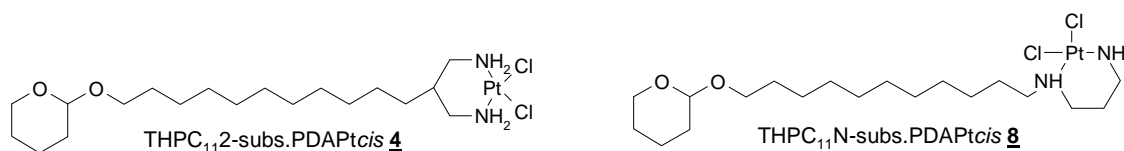


Abbildung 47: Aufnahmekinetik CDDP, THPC<sub>11</sub>N-subst.PDAPtcis **8** und THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** (je 30µM über 2h)

Zunächst ist festzuhalten, dass sehr viel mehr von beiden THP-Verbindungen als vom Cisplatin in die Zelle aufgenommen wird, das seine toxische Wirkung also mit einer wesentlich kleineren Konzentration innerhalb der Zelle erreicht. Die THP-Verbindungen werden in beide Zelllinien in gleichem Maß aufgenommen, also muss der -(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>- Spacer als identisches Strukturmerkmal

der beiden Moleküle für die hohe Aufnahme rate verantwortlich sein. Dies ist zumindest nicht verwunderlich, da auch schon andere Arbeitsgruppen festgestellt haben, dass ein Spacer aus elf (CH<sub>2</sub>)-Einheiten optimale Voraussetzungen für die Membranpassage bietet<sup>105</sup>.

Im nächsten Schritt wurden THPC<sub>11</sub>N-subst.PDAP<sub>tcis</sub> **8** und THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAP<sub>tcis</sub> **4** in einem SRB-assay verglichen um aufzuzeigen, welche unterschiedlichen Wirkungen sich mit diesen vergleichbaren Aufnahme rates ergeben.

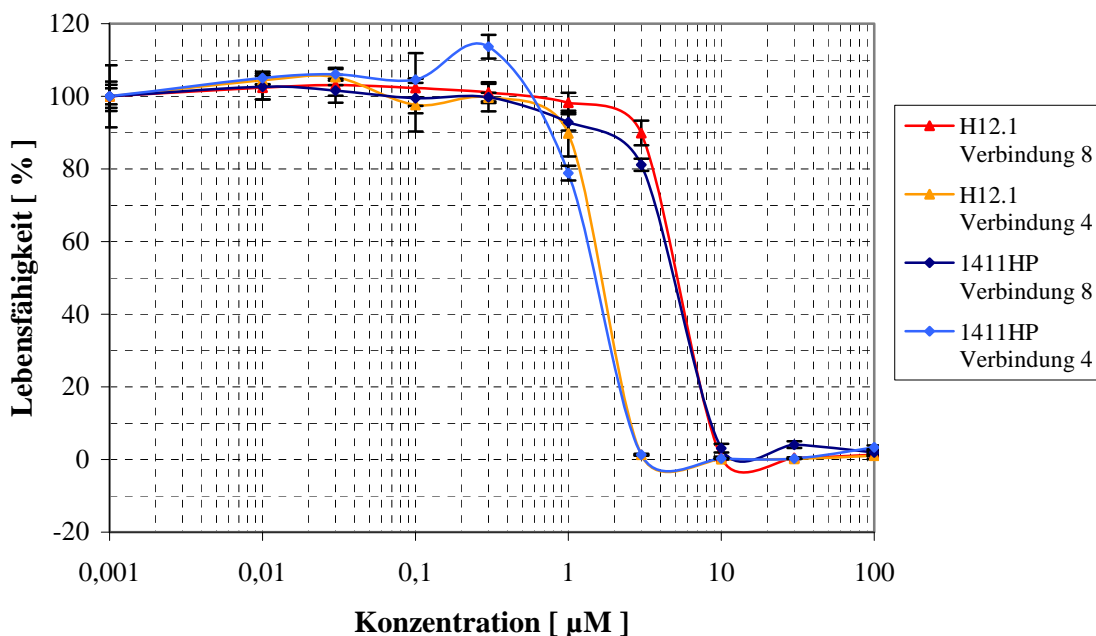


Abbildung 48: Vergleich der Verbindungen THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAP<sub>tcis</sub> **4** und THPC<sub>11</sub>N-subst.PDAP<sub>tcis</sub> **8** bei Inkubation über 96 h

Dieser Ansatz macht deutlich, dass THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAP<sub>tcis</sub> **4** mit der gleichen Konzentration in der Zelle einen deutlich höheren Effekt erzielt als THPC<sub>11</sub>N-subst.PDAP<sub>tcis</sub> **8**. Der einzige Unterschied zwischen beiden Molekülen besteht in der Verknüpfung des Platinkomplexes mit dem Spacer; bei THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAP<sub>tcis</sub> **4** ist diese Verknüpfung symmetrisch aufgebaut, bei THPC<sub>11</sub>N-subst.PDAP<sub>tcis</sub> **8** dagegen abgeknickt. Dieser strukturelle Unterschied ist ursächlich

für die unterschiedliche cytotoxische Wirkung, was ein wertvolles Ergebnis für die Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen darstellt.

### 3.2.6 Vergleichende Aufnahmekinetiken von THPC<sub>4</sub>2-subst.PDAPtcis 1, THPC<sub>6</sub>2-subst.PDAPtcis 2 und THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis 4

Nachdem im vorigen Abschnitt untersucht wurde, welchen Effekt eine veränderte Anknüpfung des Platinkomplexes hat, wurde in diesen Testreihen die symmetrische Anbindung beibehalten und lediglich die Spacerlänge verändert. Aus den IC<sub>50</sub>-Werten ist zu entnehmen, dass kürzere Spacerlängen auch eine geringere Wirksamkeit bewirken. Mit den Aufnahmekinetiken über eine Dauer von zwei Stunden soll nun ermittelt werden ob analog dem Vergleich THPC<sub>11</sub>N-subst.PDAPtcis 8 vs. THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis 4 die Gründe hierfür in innerzellulären Vorgängen zu suchen sind.

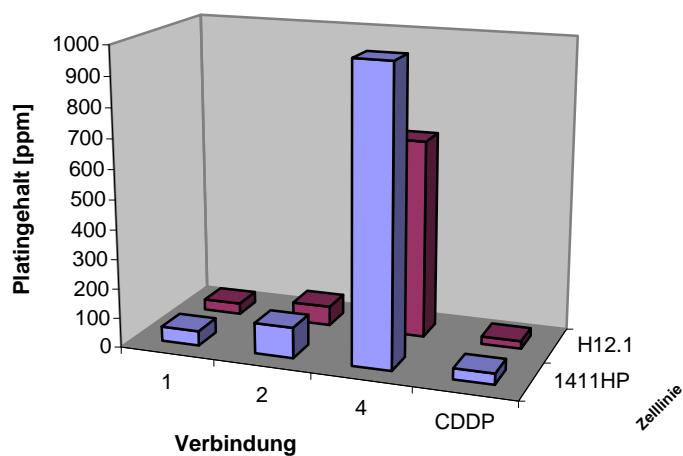
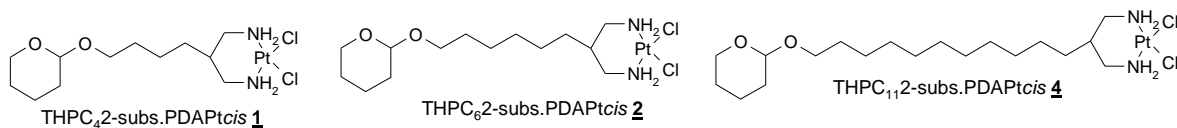


Abbildung 49: Vergleich der Konzentrationen in der Zelle von THPC<sub>4</sub>2-subst.PDAPtcis 1, THPC<sub>6</sub>2-subst.PDAPtcis 2 und THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis 4

Deutlich ist zu sehen, dass die Aufnahme von THPC<sub>4</sub>2-subst.PDAPtcis **1** und THPC<sub>6</sub>2-subst.PDAPtcis **2** in beide Zelllinien weit hinter der von THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** zurück bleibt. Somit kann eindeutig die verminderte Konzentration der Verbindungen mit kürzeren Spacerlängen als Grund für die schlechteren IC<sub>50</sub>-Werte festgehalten werden. Dies kann auch als weitere Bestätigung der These gelten, nach der die Spacerlänge 11 optimal ist<sup>106</sup>.

### 3.2.7 Untersuchung des Kupfer-Einflusses auf die Aufnahme der Verbindungen in die Zelle

Wie bereits beschrieben, gelangt das CDDP über aktive Diffusion in die Zelle. Theorien zufolge werden dazu die Kupfer-Kanäle in der Zellmembran benutzt<sup>107,108</sup>. Zur Kontrolle dieser Theorie im vorliegenden Zellmodell wurde dem Nährmedium CuSO<sub>4</sub> zugesetzt, in der gleichen Konzentration wie der CDDP oder THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4**, jeweils zwei Stunden vor der eigentlichen Wirkstoffzugabe (Vorinkubation = VI) sowie zeitgleich.

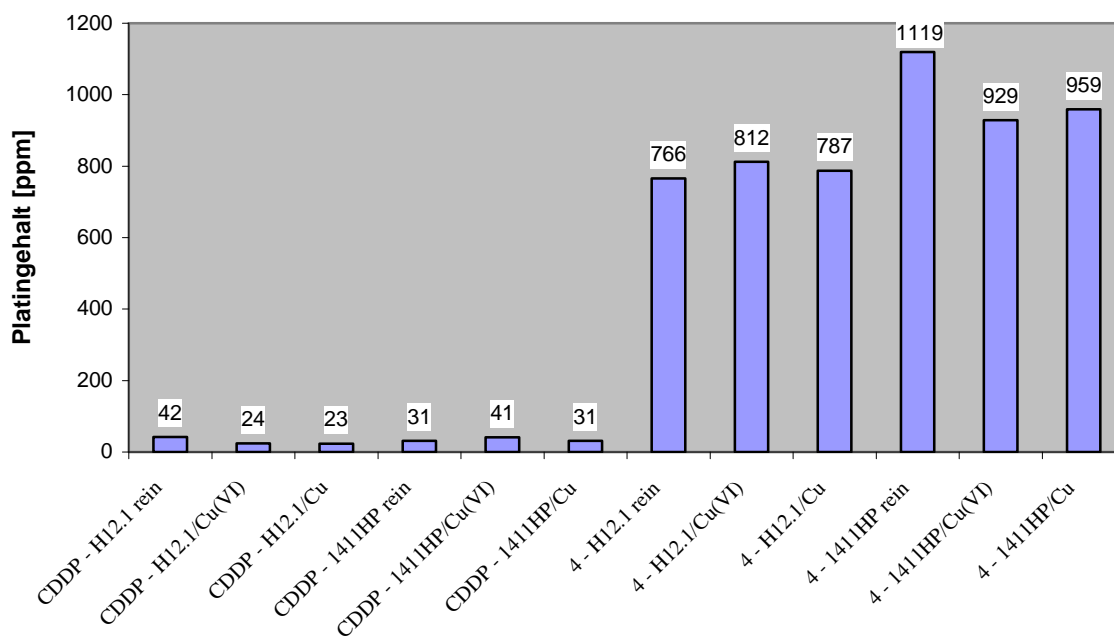


Abbildung 50: Entwicklung der Aufnahme von CDDP und THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** in die Zelle bei Kupfer-Zugabe

Sollte diese Theorie zutreffen, müssten die Platingehalte der Zellproben bei gleichzeitiger und vorheriger Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  absinken, da die Kupferionen die zur Diffusion ins Innere der Zelle benötigten Kanäle zumindest teilweise besetzen. In diesem Ansatz ist das aber weder bei den CDDP- noch bei den THP-Proben der Fall, es liegen alle gemessenen Werte im Rahmen der biologischen Schwankungsbreite. Dieses Ergebnis lässt nun zwei mögliche Schlüsse zu: entweder ist das Kupfer beim Duell um die Kanäle kein ernst zunehmender Konkurrent von CDDP und  $\text{THPC}_{112}$ -subs.PDAPtcis **4**, oder der Großteil der Verbindungen gelangt über andere Wege ins Innere der Zelle.

### 3.2.8 Variation der Konzentrationen bei der Inkubation

In diesen Ansätzen wurde die Menge der in der Nährlösung gelösten Verbindung kontinuierlich erhöht um zu kontrollieren, ob die Platinierung der Zelle proportional steigt. Die Verbindung wird dabei in steigenden Konzentrationen (IC-Wert: Maß für die prozentuale Hemmung der Zellteilung, d.h. die  $\text{IC}_{90}$ -Konzentration hemmt das Wachstum zu 90%) angegeben.

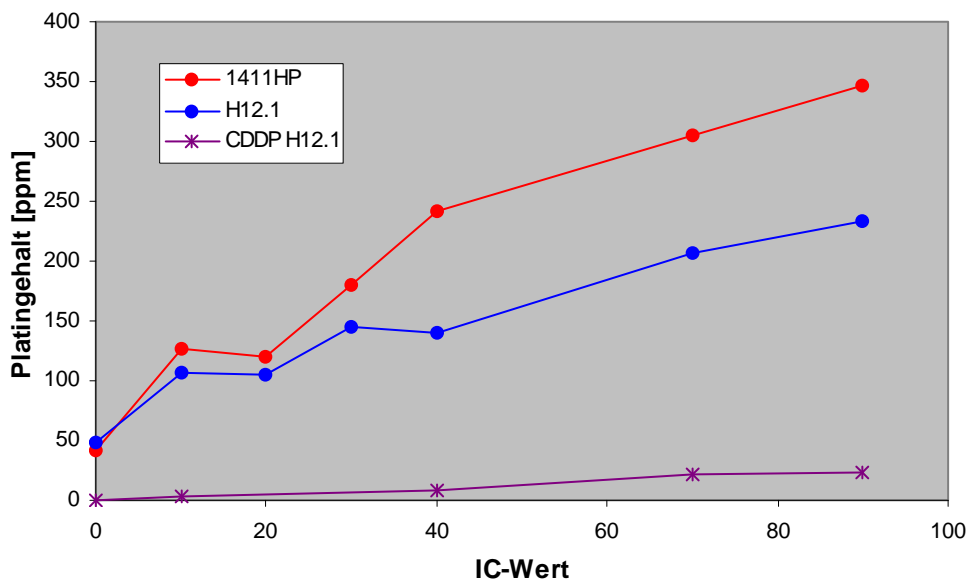
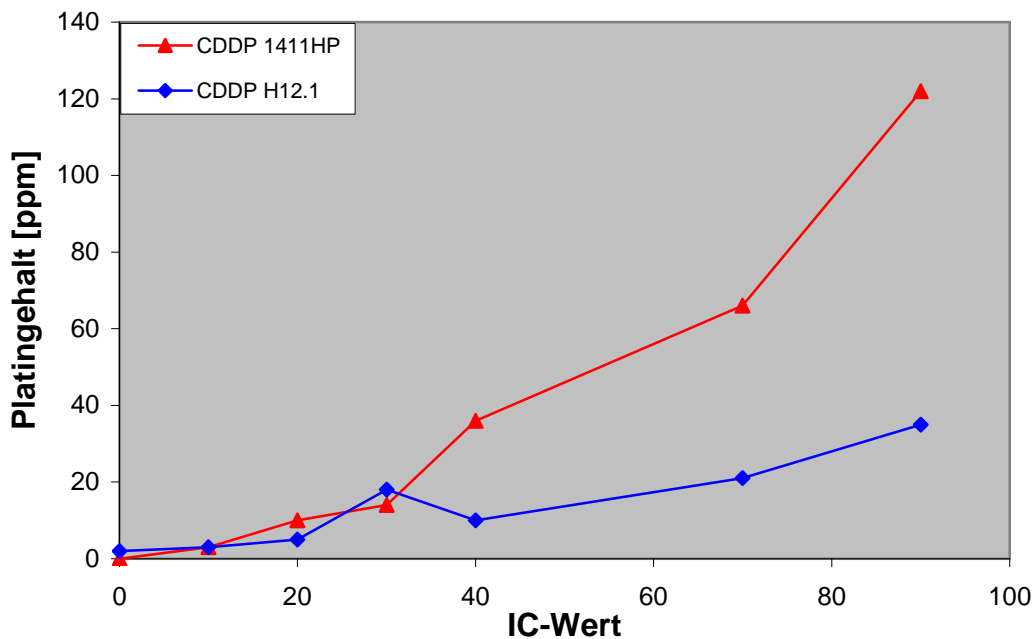


Abbildung 51: Aufnahme von  $\text{THPC}_{112}$ -subs.PDAPtcis **4** in die Zelle bei steigender Konzentration

Es ist deutlich zu sehen, dass mit steigender THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis 4-Konzentration auch die Platinierung des Zellmaterials ansteigt. Allerdings ist nach diesen Werten schlecht zu entscheiden, ob der Zusammenhang in einer direkten Proportionalität oder in einem logarithmischen Anstieg begründet liegt. Angesichts der in biologischen Systemen üblichen Standardabweichungen – wie auch hier zu sehen - lässt sich diese Frage nicht eindeutig beantworten, was für die weiteren Untersuchungen aber auch nicht schwerwiegend ist.



**Abbildung 52: Entwicklung der Aufnahme von CDDP in die Zelle bei steigender Konzentration**

Aus dieser Testserie ist ebenfalls klar ersichtlich, dass mit steigender CDDP-Konzentration die Platinierung des Zellmaterials direkt proportional zunimmt, auch wenn die Standardabweichungen bei H12.1 teilweise sehr groß sind. Deutlich hingegen ist, dass die CDDP-sensitive Zelllinie H12.1 bei identischen IC-Zugaben wesentlich weniger Wirkstoff aufnimmt als die resistente Linie 1411HP. Ein Grund für die ausgebildete Resistenz scheinen also Inaktivierungsreaktionen innerhalb der Zelle gegen CDDP zu sein.

### 3.2.9 Zeitliche Aufnahmekinetiken von THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis 4 und CDDP

In diesen Testreihen sollte untersucht werden, ob die Aufnahme der beiden Verbindungen in die Zelle von der Dauer der Inkubation abhängt. Zu diesem Zweck wurde die Inkubationszeit zwischen zwei Minuten und vier Stunden variiert. Die Aufnahmekinetiken wurden bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt, um feststellen zu können, wann eine maximale Aufnahme von THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis 4 in die Zelle erreicht wird.

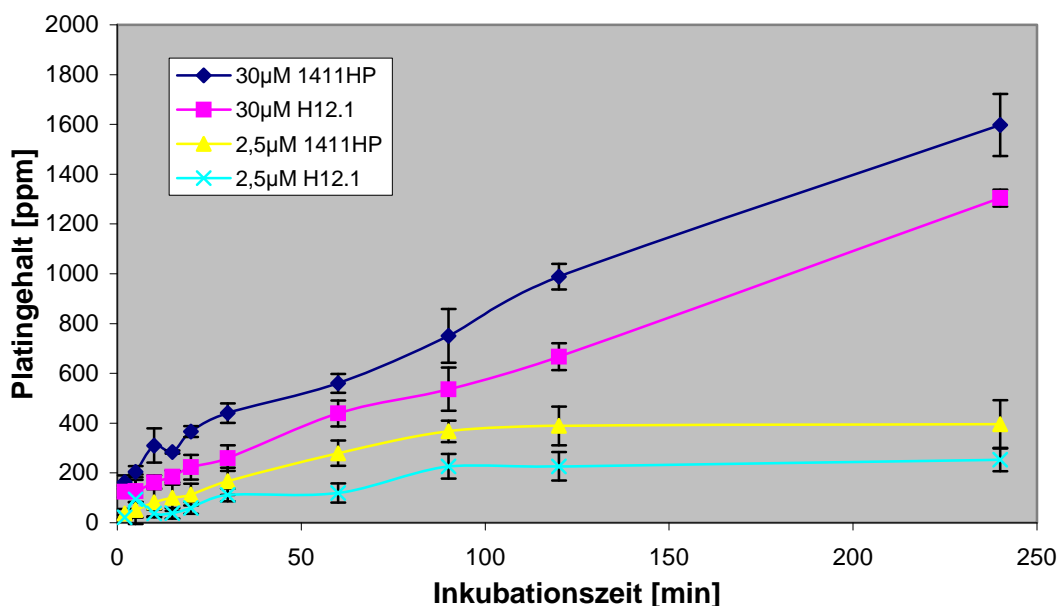


Abbildung 53: Aufnahme von THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis 4 in die Zelle in Abhängigkeit von der Zeit

Es zeigt sich, dass der Platingehalt des Zellmaterials direkt proportional zur Inkubationszeit bis zu einem maximalen Wert steigt. Dieser Wert liegt für eine Konzentration von 2,5μM bei circa 240 ppm für die Zelllinie H12.1 und bei ca. 390 ppm für die Zelllinie 1411HP. Eine Konzentration von 30μM bewirkt ebenfalls konstant steigende Platingehalte – bei 1411HP pro Minute Inkubationszeit 6ppm Platin und bei H12.1 5ppm -, jedoch wurde innerhalb der gemessenen Zeitspanne kein Maximalwert erreicht. Vergleichende Testungen wurden mit CDDP durchgeführt.



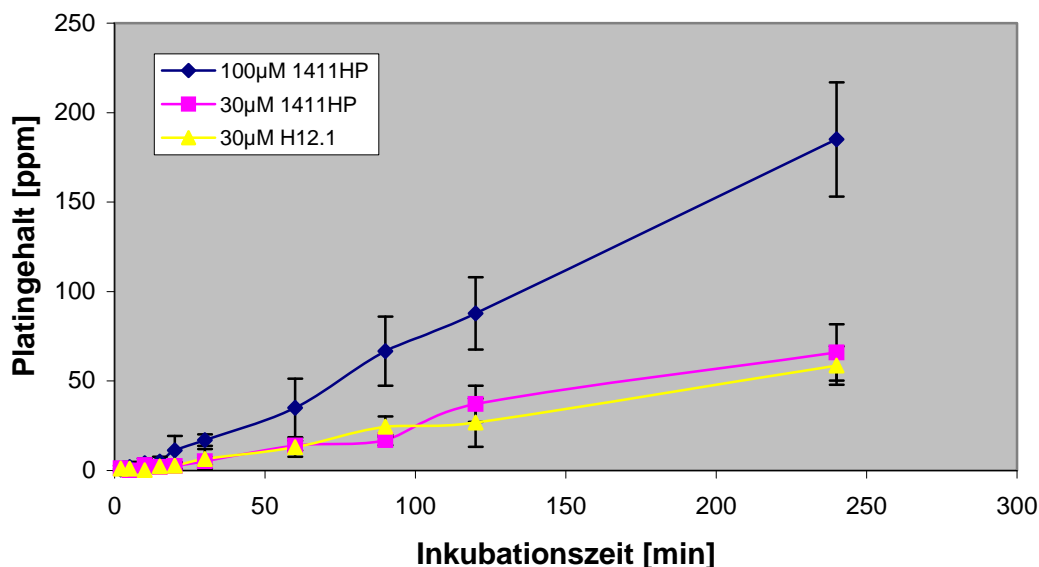


Abbildung 54: Aufnahme von CDDP in die Zelle in Abhängigkeit von der Zeit

CDDP zeigt bei zunehmender Inkubationszeit ebenfalls konstant steigende Platinierung. Für die Konzentration 30µM ergibt sich bei 1411HP eine Erhöhung von 0,28 ppm, bei H12.1 0,25ppm Platin pro zusätzlicher Minute Inkubationszeit. Eine Erhöhung auf 100µM bewirkt eine zusätzliche Platinierung von 0,78ppm Platin pro Minute.

### 3.2.10 Vergleich Platingehalt Zellmaterial - DNA

Aus der Literatur<sup>109,110</sup> ist bekannt, dass Cisplatin seine wesentliche Wirkung an der DNA entfaltet. Um einen direkten Vergleich diesbezüglich zwischen resistenter und sensibler Zelllinie bzw. Cisplatin und THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPt<sub>cis</sub> **4** ziehen zu können, wurde zunächst der Platingehalt des gesamten Zellmaterials nach Inkubation mit Konzentrationen in Höhe der IC<sub>90</sub>-Werte untersucht. Parallel dazu wurde aus analogen Ansätzen die DNA aus den Zellen isoliert und ebenfalls auf den Platin-Gehalt untersucht. Auf diese Weise können evtl. ein Mechanismus der Resistenz und Unterschiede im Wirkmechanismus zwischen CDDP und THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPt<sub>cis</sub> **4** festgestellt werden.

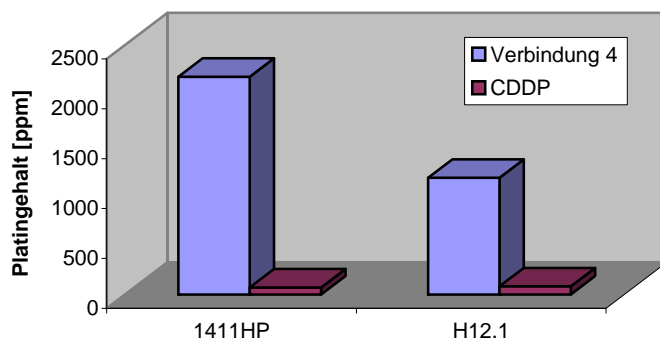


Abbildung 55: Platingehalt des Zellmaterials

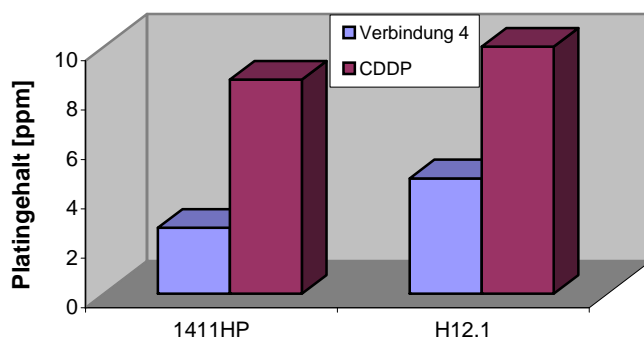


Abbildung 56: Platingehalt der isolierten DNA

Zunächst ist wie schon bei den bisherigen Ansätzen festzuhalten, dass THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis **4** eine deutlich höhere Platinierungsrate im Vergleich mit dem CDDP aufweist. Ebenso deutlich ist zu erkennen dass THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis **4** in die eigentlich Platin-resistente Zelllinie doppelt so gut eindringt wie in die sensitive Linie. In den DNA-Proben sind interessanterweise beide Effekte umgedreht: Von den großen Mengen THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis **4** in der Zelle kommt nur ein sehr geringer Teil – 0,12% bei 1411HP und 0,40% bei H12.1 – an der DNA an, der allergrößte Teil reagiert also in anderen Teilen der Zelle. Beim CDDP hingegen erreichen wesentlich größere Anteile des intrazellulären Platins die DNA: 12,3% bei 1411HP und 12,2% bei H12.1. Da in beiden Fällen die IC<sub>90</sub>-Konzentrationen eingesetzt wurden, kann daraus

geschlossen werden, dass die Anlagerung von THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** an die DNA nicht die Apoptose auslöst. Zudem ist festzuhalten, dass CDDP bei beiden Zelllinien die gleiche Konzentration an der DNA benötigt wird, um die gleiche Menge an Zellen zu zerstören (90%). Der Wirkmechanismus ist also in beiden Zelllinien gleich, was auf eine eindimensionale Wirkung des CDDP deutet und andere mögliche Apoptosewege marginalisiert.

### 3.2.11 Reaktion von reiner DNA mit CDDP und THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis

Bisher konnte festgestellt werden, dass CDDP besser an die DNA bindet als THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4**, obwohl dieses eine wesentlich höhere Konzentration im gesamten Zellmaterial aufweist. Die Gründe hierfür sind unbekannt, ein Hinweis darauf kann durch die Untersuchung der Reaktion von freier DNA (aus Heringssperma) mit CDDP und THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** gewonnen werden. Dazu wurden 50mg DNA eingewogen und eine NaCl-Lösung mit 30µM CDDP bzw. THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** zupipettiert. Bei vollständiger Reaktion ergäbe sich ein Platingehalt von 1000ppm. Das Reaktionsgemisch wurde nun 6 Stunden bei 37,5°C in den Brutschrank gestellt. Danach wurden 10ml 1-Propanol zugegeben um die DNA auszufällen, der Rückstand wurde dreimal mit DMF und einmal mit EtOH gewaschen, um nicht gebundenen Wirkstoff abzutrennen. Der getrocknete Rückstand wurde analog den Zellproben mittels AAS auf Platin getestet. CDDP platinerte die DNA dabei zu  $68 \pm 12$  %, THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** dagegen nur zu  $33 \pm 5$  %. Daraus ist ersichtlich, dass schon der Platingehalt der DNA selber einen Unterschied zwischen CDDP und THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** aufweist, der vermutlich auf die sterische Hinderung von letzterem zurückzuführen ist, wenn auch der Unterschied nicht so groß ist wie aufgrund der realen Zell- und DNA-Proben zu vermuten gewesen wäre.

### 3.2.12 Zusammenfassung

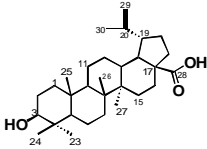
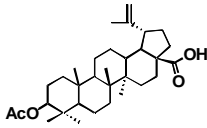
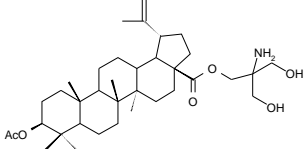
Es wurde durch die Ermittlung der Cytotoxizitäten verschiedener, systematisch variiertes Platinkonjugate ein eindeutiger Trend zu Verbindung THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** ermittelt, welche nicht nur die größte Wirksamkeit aufwies, sondern zusätzlich in der Lage war, Cisplatin-Resistenz zu brechen. In Rahmen von Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Toxizität vom Platinatom ausgelöst wird, welches aber in einer ganz bestimmten Weise (PDA an Position 2 substituiert) mit dem Spacer verbunden sein muss, um seine Wirkung ausüben zu können. Die (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-Kette hat keinen direkten Einfluß auf die Toxizität, bietet unter den getesteten Spacerlängen aber die mit Abstand höchste Diffusionsrate ins Zellinnere. Die Diffusion in die Zelle ist dabei unabhängig von den Kupferkanälen in der Zellmembran. Im Unterschied zum CDDP gelangt THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4** in weitaus größeren Mengen ins Zellinnere, dringt dabei aber nicht an die DNA vor, sondern reichert sich vermutlich in den Mitochondrien an. Die Überwindung der Cisplatinresistenz der Zelllinie 1411HP beruht also auf einem völlig anderen Wirkmechanismus von THPC<sub>11</sub>2-subst.PDAPtcis **4**.

### 3.3 Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von neuen Betulinsäurederivaten

Bei der Betulinsäure gibt es wie bereits ausgeführt mit C3 und C28 zwei wesentliche Ansatzpunkte für Derivatisierungen. Die große räumliche Entfernung zwischen beiden Stellen deutet bereits auf einen sehr komplexen Wirkmechanismus hin. Analog dem Verfahren bei den Cisplatinderivaten wurden auch bei der Betulinsäure an C3 und C28 unterschiedliche Reste angehängt, um die Auswirkungen der Substitutionen auf die Reaktivität des Gesamtmoleküls ermitteln zu können.

#### 3.3.1 IC<sub>50</sub>-Werte von Betulinsäure-Derivaten

##### 3.3.1.1 Vergleichende C3- und C28-Derivatisierungen

	Liposarkom	A549	518A2
<b>BA-30</b> 	12,01 ± 0,84	10,96 ± 1,42	11,99 ± 0,98
<b>BA-31</b> 	9,88 ± 0,11	8,03 ± 0,56	11,83 ± 2,15
<b>BA-32</b> 	2,10 ± 0,11	1,91 ± 0,11	2,14 ± 0,12

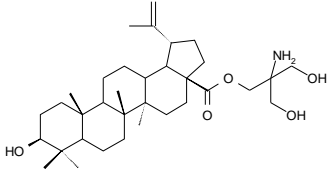
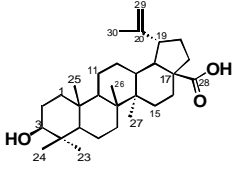
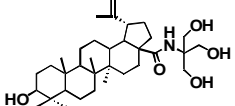
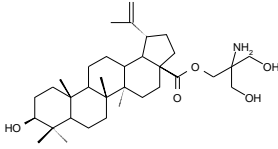
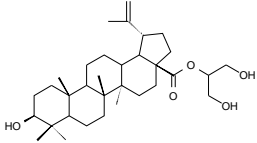
<b>BA-34</b> 	13,83 ± 0,32	21,32 ± 1,09	24,73 ± 2,39
---	--------------	--------------	--------------

Tabelle 22: IC<sub>50</sub>-Werte der Betulinsäure-Derivate BA-30, BA-31, BA-32 und BA-34

Die Acetylierung an der C3-Position bewirkt nur eine geringe Verbesserung der Toxizität, die alleinige Veresterung mit TRIS an C28 sogar eine leichte Verschlechterung. Die Kombination beider Derivatisierungen dagegen hat eine deutliche Verbesserung zur Folge. Diese offensichtliche Synergie deutet auf einen komplexen Apoptose-Mechanismus hin.

### 3.3.1.2 Derivatisierungen an Position C28

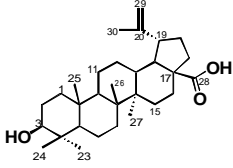
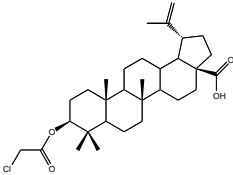
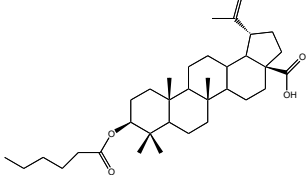
	Liposarkom	A549	518A2
<b>BA-30</b> 	12,01 ± 0,84	10,96 ± 1,42	11,99 ± 0,98
<b>BA-33</b> 	30,84 ± 6,43	38,49 ± 1,26	25,86 ± 10,03
<b>BA-34</b> 	13,83 ± 0,32	21,32 ± 1,09	24,73 ± 2,39

<b>BA-35</b> 	39,43 ± 5,83	38,52 ± 4,28	47,45 ± 13,91
---	--------------	--------------	---------------

**Tabelle 23: IC<sub>50</sub>-Werte von Betulinsäure-C28-Derivate BA-33, BA-34, BA-35**

Die getesteten alleinigen Derivatisierungen an C28 bedeuten in keinem Fall eine Verbesserung der Toxizität. In diesem Fall sind aber die verschiedenen IC<sub>50</sub>-Werte von BA-33 und BA-34, die sich nur durch die Anknüpfung des TRIS über eine Amid- bzw. eine Ester-Bindung unterscheiden, bemerkenswert.

### 3.3.1.3 Derivatisierungen an C3

	Liposarkom	A549	518A2
<b>BA-30</b> 	12,01 ± 0,84	10,96 ± 1,42	11,99 ± 0,98
<b>BA-36</b> 	5,50	6,65	6,58
<b>BA-37</b> 	14,74	> 50	> 50

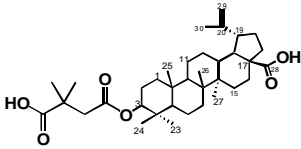
<p><b>BA-40</b></p> 	29,84 ± 2,90	29,07	28,94
---	--------------	-------	-------

Tabelle 24: IC<sub>50</sub>-Werte der Betulinsäure-C3-Derivate BA-30, BA-36, BA-37 und BA-40

In den alleinigen C3-Derivatisierungen wird Potential zur Verbesserung der Toxizität deutlich, wie bei der Cholacetyl-Betulinsäure BA-36. Bei den anderen Verbindungen sinkt die Toxizität teilweise erheblich und macht deutlich, dass der Wirkmechanismus sehr sensibel auf kleine Veränderungen am Molekül reagiert.

### 3.3.1.4 C28-Derivatisierungen der Acetyl-Betulinsäure

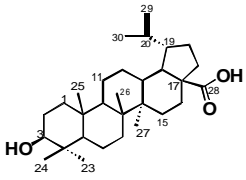
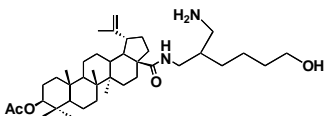
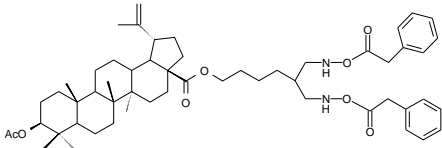
	Liposarkom	A549	518A2
<p><b>BA-30</b></p> 	12,01 ± 0,84	10,96 ± 1,42	11,99 ± 0,98
<p><b>BA-38</b></p> 	> 50	> 50	> 50
<p><b>BA-39</b></p> 	> 50	> 50	> 50

Abbildung 57: IC<sub>50</sub>-Werte der Acetyl-Betulinsäurederivate BA-38 und BA-39 in µg/ml



Lange lipophile Reste an C28 haben ein starkes Absinken der Toxizität zur Folge, unabhängig davon, ob sie über eine Amid- oder eine Esterbindung angekoppelt wurden.

### 3.3.2 Zusammenfassung

Als ein wesentliches Ergebnis ist festzuhalten, dass in der Tat C3 als auch C28 aktiv an der Wirkung der Betulinsäure beteiligt sind, die teils erheblich schlechteren  $IC_{50}$ -Werte belegen dies deutlich. Weiterhin erweist sich die Acetylierung an C3 ausschließlich positiv, wie die Verbesserungen des  $IC_{50}$ -Wertes von der Betulinsäure BA-30 zur acetylierten Betulinsäure BA-31 und vom BA-34 zum BA-32 belegen. Die zusätzliche Einführung eines Chloratoms bewirkt eine weitere deutliche Steigerung der Wirksamkeit. Ein längerer lipophiler Rest an C3 wie beim BA-40 oder der Hexanoyl-Betulinsäure BA-37 hat jedoch einen negativen Einfluss. Die TRIS-Veresterung an C28 dagegen zieht nur von der BA-31 zum BA-32 eine Steigerung der Wirkung nach sich, beim Vergleich von Betulinsäure BA-30 und BA-34 ist kein Unterschied erkennbar. Auch an C28 haben andere sterisch anspruchsvolle Reste nicht den positiven Effekt wie das TRIS. Selbst wenn das Tris(hydroxymethyl)-aminomethan über eine Amid- statt über eine Esterbindung mit dem C28 verknüpft wird, hat dies eine wesentliche Verschlechterung des  $IC_{50}$ -Wertes zur Folge.

Ähnlich wie bei den Platinderivaten sind also auch bei der Betulinsäure nur ganz bestimmte Substitutionen sinnvoll und genauso sind auch nur ganz bestimmte Kombinationen erfolgreich. Bei den Betulinsäurederivaten scheinen die Zusammenhänge mit teils konträren Ergebnissen wie beim BST wesentlich komplizierter zu sein. Auch konnte noch nicht untersucht werden, ob die unterschiedlichen Ergebnisse eventuell auch mit der Aufnahmefähigkeit des Stoffes ins Zellinnere zusammenhängen. Neben der weiteren systematischen Synthese und Testung von an C3 und C28 substituierten BA-Derivaten sollte auch auf diesen Punkt in der Zukunft Wert gelegt werden.

### 3.4 Homogenitätstest zur SS-GFAAS

Nach Kurfürst<sup>111</sup> muss für alle Materialien, die in der Mikroanalyse mit kleinsten Probenmengen eingesetzt werden, ein Homogenitätstest durchgeführt werden, um eine ausreichend homogene Verteilung des Analyten im Material sicherzustellen. Für die festen Zellproben wurde dieser Test mit der Zelllinie H12.1 durchgeführt, auf die eine Cisplatin-Lösung mit einer Konzentration von 30  $\mu\text{mol/l}$  vier Stunden lang eingewirkt hat. Die mittlere Einwaage lag bei 149,2  $\mu\text{g}$ , es wurden 50 Messungen durchgeführt.

Messung-Nr.	Einwaage [mg]	Intensität [IE]	korr. Intensität [IE/mg]
1	0,1459	0,17219591	1,1802
2	0,1444	0,24531377	1,6988
3	0,1471	0,18203427	1,2375
4	0,1438	0,20095269	1,3974
5	0,1407	0,20364528	1,4474
6	0,1478	0,21612756	1,4623
7	0,1441	0,21781761	1,5116
8	0,1433	0,19168462	1,3376
9	0,1465	0,25695517	1,7540
10	0,1491	0,26007301	1,7443
11	0,1577	0,19183527	1,2165
12	0,1433	0,21327705	1,4883
13	0,1556	0,22576815	1,4510
14	0,1468	0,13766911	0,9378
15	0,1512	0,20411196	1,3499
16	0,1448	0,14853173	1,0258
17	0,1505	0,26089169	1,7335
18	0,1465	0,20214843	1,3799
19	0,145	0,19875842	1,3707
20	0,1416	0,22266737	1,5725
21	0,1537	0,27309002	1,7768
22	0,1599	0,28077005	1,7559
23	0,145	0,21998539	1,5171
24	0,1446	0,22083548	1,5272
25	0,1477	0,26108629	1,7677

Messung-Nr.	Einwaage [mg]	Intensität [IE]	korr. Intensität [IE/mg]
26	0,1529	0,26242324	1,7163
27	0,1467	0,26549865	1,8098
28	0,1518	0,23984673	1,5800
29	0,1452	0,14919726	1,0275
30	0,145	0,22453348	1,5485
31	0,1418	0,2023723	1,4272
32	0,1483	0,24762584	1,6698
33	0,1555	0,23440746	1,5074
34	0,1474	0,22187485	1,5053
35	0,145	0,25065169	1,7286
36	0,1462	0,26578324	1,8179
37	0,1405	0,25424996	1,8096
38	0,158	0,18291597	1,1577
39	0,1571	0,28675668	1,8253
40	0,1519	0,27291643	1,7967
41	0,1425	0,18023249	1,2648
42	0,1546	0,25415775	1,6440
43	0,1467	0,19281164	1,3143
44	0,1518	0,2374032	1,5639
45	0,1588	0,22509795	1,4175
46	0,143	0,247148	1,7283
47	0,1507	0,24703668	1,6393
48	0,1552	0,27972711	1,8024
49	0,1485	0,2249109	1,5146
50	0,1573	0,29152779	1,8533

Abbildung 58: Werte für die Homogenitätsmessung der festen Zellprobe

Es ergab sich nach Kurfürst eine Homogenitätskonstante von 5,70, damit eignet sich dieses Probenmaterial für die Mikroanalyse. Für die anderen Zellproben kann dieses Ergebnis übertragen werden, da bei allen die gleiche Methode zur Herstellung verwendet wurde.

Für die Messungen am SS-GF AAS wurde folgendes Temperatur-Zeit-Programm für den Ofen verwendet:

Stufe	Temperatur [°C]	Rampe [°C/s]	Dauer [s]	Argonstrom	Peakauswertung
1	105	8	40	an	
2	130	8	30	an	
3	1400	300	6	an	
4	1550	300	14	an	
5	2400	1900	8	aus	x
6	2550	1000	5	an	

**Tabelle 25: Ofenprogramm für die Messung des festen Zellmaterials**

### 3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Voraussetzung für die Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ist die Verbesserung der Löslichkeit der zu untersuchenden Verbindungen. Zunächst konnte die Löslichkeit des im Zentrum dieser Arbeit stehenden THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis **4** bis hin zur fast vollständigen Lösung deutlich gesteigert werden. Hierzu war es erforderlich, physiologische Mischmicellen einzusetzen, da einfachere und preiswertere Systeme wie etwa das HP- $\beta$ -CD nicht den erforderlichen Erfolg zeigten und die Möglichkeiten aufgrund der beabsichtigten intravenösen Anwendung stark eingeschränkt waren. Die Wirkung des mit Mischmicellen komplexierten THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis **4** setzt im Vergleich zu freien Verbindung zwar verzögert ein, dann aber sogar leicht verbessert. Zudem ist die Größe einer einzelnen Micelle für den intravenösen Einsatz unbedenklich.

Bei den Cytotoxizitätsmessungen zeigte die Spacerlänge 11 die besten Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass allein die verstärkte Aufnahme der Verbindung in die Zelle aufgrund der vergleichbaren Größen von Membrandicke und Spacerlänge und nicht innerzelluläre Mechanismen dafür verantwortlich sind. Für die eigentliche toxische Wirkung ist die symmetrische Anbindung des Platins an den Spacer verantwortlich, das unsymmetrisch gebundene Analogon THPC<sub>11</sub>N-substanz.PDAPtcis **8** kann entweder wegen des sterischen Unterschiedes die Reaktion des THPC<sub>11</sub>2-substanz.PDAPtcis **4** nicht ausführen oder es wird schneller inaktiviert. Die Aufnahme der Verbindung in die Zelle ist direkt proportional zur Konzentration im Medium und zur Inkubationszeit. Nicht geklärt werden konnte die Art der Aufnahme in die Zelle, lediglich die Unabhängigkeit von den Kupfer-Transportkanälen wurde festgestellt. Das THPC<sub>11</sub>2-substanz.PDAPtcis **4** hat zwar einen ähnlichen IC<sub>50</sub>-Wert wie das CDDP, benötigt für diese Wirkung aber eine wesentlich größere Konzentration innerhalb der Zelle und arbeitet innerzellulär somit ineffektiver. Von den erheblichen Mengen an innerzellulärem THPC<sub>11</sub>2-substanz.PDAPtcis **4** gelangt jedoch nur sehr wenig an die DNA, auf dieser Etappe an seinen Reaktionsort ist das CDDP viel wirkungsvoller. Diese Erkenntnis legt nahe, dass die Wirkung des THPC<sub>11</sub>2-substanz.PDAPtcis **4** eine grundsätzlich andere ist, dass sie nicht an der DNA ansetzt und vermutlich ebenfalls nicht im Zellkern. Belegt ist aber unabhängig vom Ort der Wirkung, dass das Platinzentrum für diese verantwortlich ist.

Bei den Betulinsäurederivaten konnten die Thesen aus dem aktuellen Stand der Literatur präzisiert werden. So war es auch an C3 durch Derivatisierungen möglich, das cytotoxische Potential zu steigern, dies aber nur durch kurzkettige Veresterungen, die im Idealfall noch einen ionischen Liganden tragen. Reaktionen an C28 beinhalten zwar auch Verbesserungspotential in sich, dies ist aber wie bei C3 auf wenige Gruppen beschränkt. Lediglich der TRIS-ester bewirkt ein deutliches Absinken des IC<sub>50</sub>-Wertes, offensichtlich ist die freie Amidgruppe dafür ein Grund, da auch 2b gegenüber 1b deutliche Vorteile aufweist. Lange Ketten und lipophile Gruppen dagegen bewirken im Gegensatz zu den Erkenntnissen bei Cisplatin nahezu eine Inaktivierung der cytotoxischen Aktivität des Moleküls.

Diese Ergebnisse zeigen das große Potential, das Platinverbindungen und Betulinsäurederivate nach wie vor in der Antitumorforschung besitzen und machen die Existenzberechtigung dieses Forschungsansatzes eindrucksvoll deutlich. Das Fehlen von pauschalen Schlüssen und Theorien macht jedoch auch den großen Arbeitsaufwand deutlich, der für tragfähige Ergebnisse notwendig ist.

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Flüssig-AAS

Für die Messungen der Cyclodextrin- und Micellenlösungen wurde folgendes Ofenprogramm verwendet:

Stufe	Temperatur [°C]	Rampe [s]	Dauer [s]	Argonstrom	Auswertung
1	110	1	20	an	
2	130	5	30	an	
3	650	10	30	an	
4	1400	10	20	an	
5	2300	0	6	aus	x
6	2400	1	2	an	

**Tabelle 26: Ofenprogramm am ZAAS für Cyclodextrin und Micellenlösungen**

### 4.2 Feststoff-AAS

Für die Analysen der gefriergetrockneten Zellproben wurde folgendes Temperatur-Zeit-Programm verwendet:

Stufe	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/s]	Haltezeit [s]	Argonstrom	Peakauswertung
1	105	8	40	an	
2	130	8	30	an	
3	1400	300	6	an	
4	1550	300	14	an	
5	2400	1900	8	aus	x
6	2550	1000	5	an	

**Tabelle 27: Temperaturprogramm für das SS-GF AAS**

### 4.3 Komplexierung mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin

Die Lösung mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin wurden nach folgendem Schema hergestellt:

- Einwiegen der Verbindung (ca. 1mg)
- Zugabe von Ethanol (1,25ml)
- Zugabe von HP- $\beta$ -Cyclodextrin (0,9% NaCl, 0,05M, 1,25ml)
- 30 Minuten waagrechtes Schütteln bei 400 U/min
- Gefriertrocknung
- Zugabe von NaCl-Lösung (0,9%, 2,5ml)
- Filtration
- Bestimmung der Konzentration per AAS

### 4.4 Komplexierung mit Mizellen

Die Lösungen mit den Mizellen wurden nach folgendem Schema hergestellt:

- Einwiegen der Verbindung (ca. 1mg)
- Zugabe von 1-BuOH (1 ml)
- Zugabe von 0,5 ml Na-glycocholat-Lösung (5% in MeOH/CHCl<sub>3</sub> 50/50) und 0,5 ml SPC-Lösung (2,5% in CHCl<sub>3</sub>)
- 30 Minuten bei 70°C rotieren (420 U/min)
- Gefriertrocknung
- Zugabe von NaCl-Lösung (0,9%, 2,5ml)
- Filtration
- Bestimmung der Konzentration per AAS

## **4.5 Zellkultur**

### **4.5.1 Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes mittels SRB-assay**

Die Zellen wurden in 96-well-Platten ausgesät (jeweils 3.000) und nach 24 Stunden mit der zu testenden Verbindung in unterschiedlichen Konzentrationen für 96 Stunden beladen. Am Tag 5 nach dem Aussäen wurden die Prozentzahlen der überlebenden Zellen bestimmt. Die Zellen wurden mit 10%iger Trichloressigsäure fixiert und nach der Literaturvorschrift<sup>112</sup> behandelt. Die Absorption wurde bei 570nm mit einem 96-well-Platten-Reader bestimmt. Die Konzentration, die das Zellwachstum zu 50% inhibiert, wurde für jedes Experiment mit einer semilogarithmischen Dosis-Wirkungs-Kurve berechnet.

### **4.5.2 Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes per Zählung**

Für die Zelllinien Liposarkom, A549 und 518A2 wurden die IC<sub>50</sub>-Werte mit einem anderen Verfahren ermittelt. Jeweils 25.000 Zellen wurden in kleine Petrischalen (Durchmesser 6cm) ausgesät und nach 24 Stunden mit der zu testenden Verbindung in unterschiedlichen Konzentrationen für 72 Stunden beladen. Am Tag 4 nach dem Aussäen wurde das Medium entfernt, die überlebenden Zellen vom Boden abgelöst und die Konzentration der Zellen in der Suspension durch Zählung mit der Neubauer-Kammer bestimmt. Die Konzentration, die das Zellwachstum zu 50% inhibiert, wurde für jedes Experiment mit einer semilogarithmischen Dosis-Wirkungs-Kurve berechnet.

### **4.5.3 Herstellung der platinieren Zellproben**

250.000 Zellen wurden in große Petrischalen (Durchmesser 15cm) gesät und über drei Tage angezogen. Am Tag 4 wird das saubere Medium entfernt, durch mit einer bestimmten Konzentration eines Wirkstoffes versetzten Nährlösung ersetzt und eine definierte Zeit inkubiert.



Danach werden die Zellen gewaschen, abgelöst, getrocknet und das trockene Zellmaterial per AAS auf den Platingehalt untersucht.

## 4.6 Synthesen

Im Rahmen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sollte auch kontrolliert werden, ob das Platin-Zentrum überhaupt einen Einfluss auf die Toxizität besitzt. Zu diesem Zweck wurde nach Literaturangaben<sup>113</sup> über zwei Stufen ein Molekül synthetisiert, das mit dem THPC<sub>112</sub>-subs.PDAPtcis **4** bis auf die Cisplatinkomponente identisch ist.

### 4.6.1 NMR-Spektren

#### 4.6.1.1 Tetrahydropyranoxyundecene

##### 4.6.1.1.1 <sup>1</sup>H-Spektrum

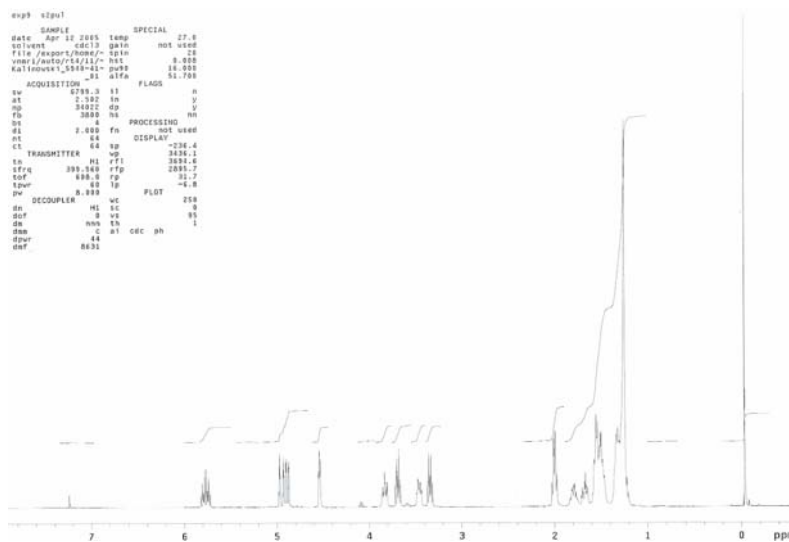


Abbildung 59: <sup>1</sup>H-Spektrum von Tetrahydropyranoxyundecene

- 5,77 ppm: 1H

- 4,92 ppm: 2H

- 4,54 ppm: 1H
- 3,76 ppm: 2H
- 3,40 ppm: 2H
- 2,00 ppm: 2H
- 1,75 ppm: 2H
- 1,50 ppm: 6H
- 1,25 ppm: 12H

#### 4.6.1.1.2 $^{13}\text{C}$ -Spektrum

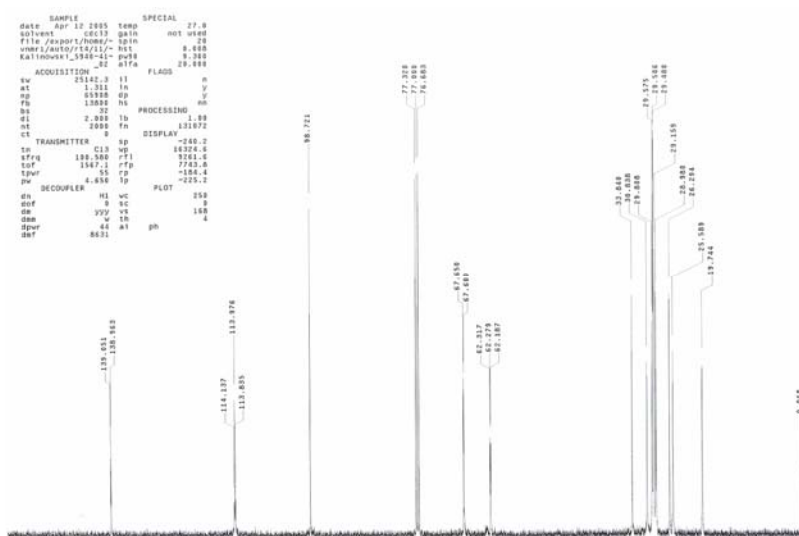


Abbildung 60:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von Tetrahydropyran-2-ylacetat

- 139,0 ppm: 1C
- 114,0 ppm: 1C
- 98,7 ppm: 1C
- 67,6 ppm: 1C
- 62,2 ppm: 1C

- 33,8 ppm: 2C
- 30,8 ppm: 6C
- 29,0 ppm: 1C
- 25,5 ppm: 1C
- 19,7 ppm: 1C

#### 4.6.1.2 Tetrahydropyranoxyundecanol

##### 4.6.1.2.1 <sup>1</sup>H-Spektrum

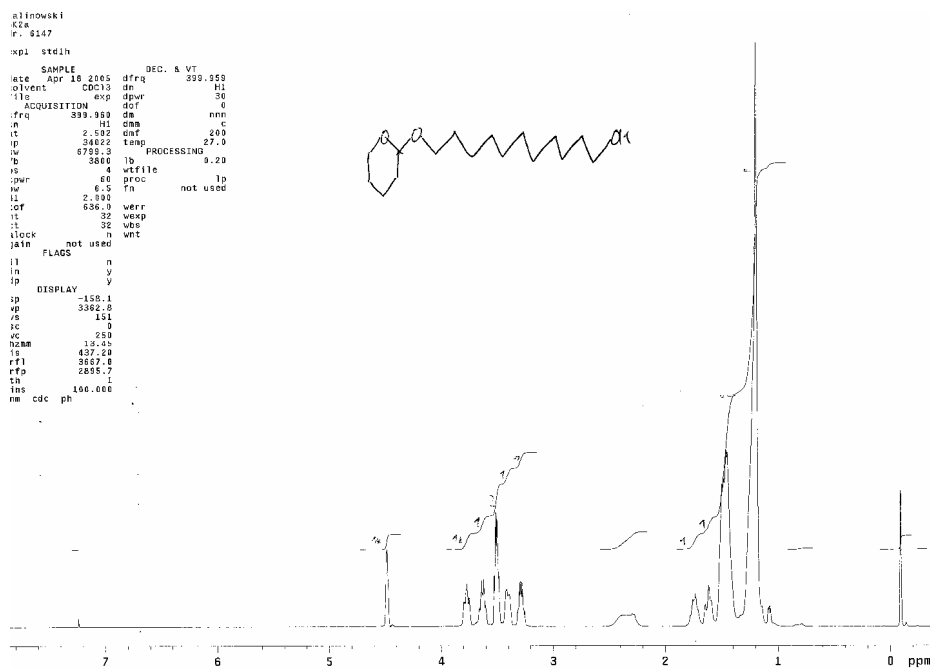


Abbildung 61: <sup>1</sup>H-Spektrum des Tetrahydropyranoxyundecanol

- 4,48 ppm: 1H
- 3,70 ppm: 2H
- 3,53 ppm: 2H
- 3,34 ppm: 2H

- 1,69 ppm: 2H

- 1,47 ppm: 8H

- 1,19 ppm: 14H

#### 4.6.1.2.2 $^{13}\text{C}$ -Spektrum

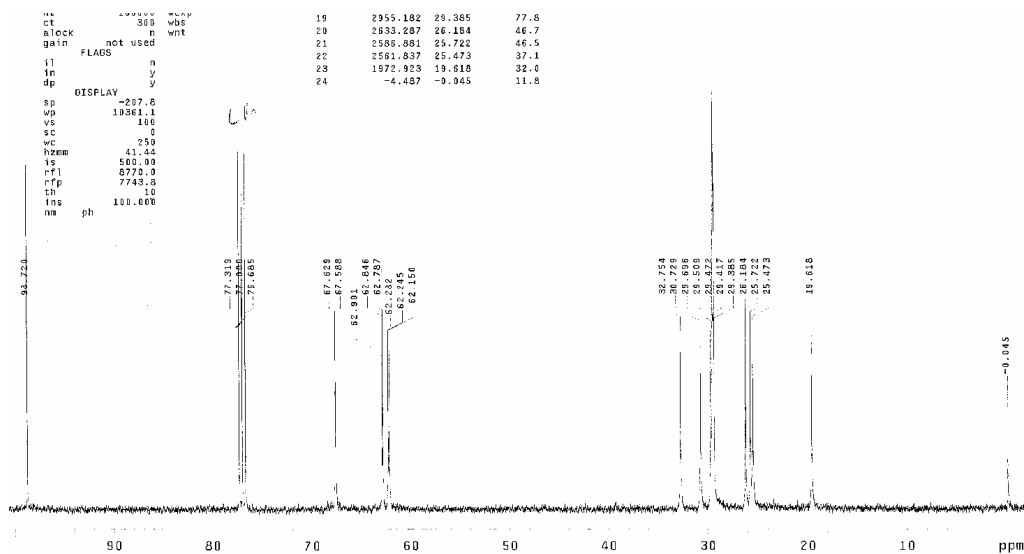


Abbildung 62:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum des Tetrahydropyran-2-ylundecanol

- 98,6 ppm: 1C

- 67,8 ppm: 1C

- 62,5 ppm: 1C

- 62,1 ppm: 1C

- 32,6 ppm: 1C

- 30,6 ppm: 1C

- 29,6 ppm: 1C

- 29,4 ppm: 6C

- 26,1 ppm: 1C

- 25,5 ppm: 1C

- 19,5 ppm: 1C

## 4.6.2 Synthesevorschriften

### 4.6.2.1 Tetrahydropyranoxyundecen

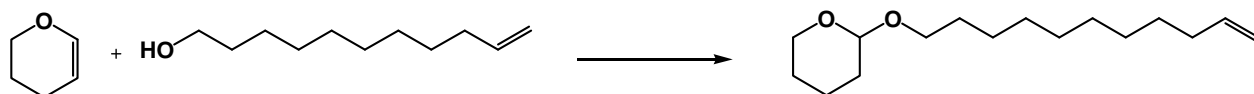


Abbildung 63: Synthese von Tetrahydropyranoxyundecen

Der Alkohol ( $M = 170,29 \text{ g/mol}$ ,  $12,0 \text{ g} \equiv 70,5 \text{ mmol}$ ) wird mit Dihydroxyppyran ( $M = 84,12 \text{ g/mol}$ ,  $6,2 \text{ g} \equiv 73,7 \text{ mmol}$ ) vermischt, auf  $0^\circ\text{C}$  abgekühlt und zwei Tropfen  $\text{HCl}_{\text{konz}}$  zugegeben. Das Gemisch wird nun vier Stunden bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt und weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wird das Reaktionsgemisch mit Ether extrahiert, gründlich mit wässriger  $\text{NaOH}$  (10%) und Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels ergeben sich  $16,7 \text{ g}$  des Produktes ( $M = 254,42 \text{ g}$ , 93%).

### 4.6.2.2 Tetrahydropyranoxyundecanol

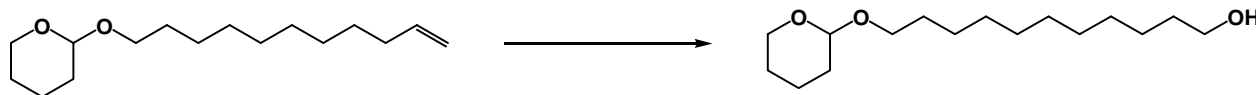


Abbildung 64: Synthese von Tetrahydropyranoxyundecanol

$\text{NaBH}_4$  ( $0,9 \text{ g}$ ) wird in trockenem THF ( $30 \text{ ml}$ ) gerührt, auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt, unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre gehalten und  $\text{BF}_3$ -etherat ( $3 \text{ ml}$ ) in trockenem THF über fünf Minuten zugegeben. Nach weiteren 15 Minuten wird das Produkt der ersten Stufe ( $M = 254,42 \text{ g/mol}$ ,  $5 \text{ g} \equiv 18,4 \text{ mmol}$ ) in THF ( $10 \text{ ml}$ )

langsam zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt, auf 0°C gekühlt und vorsichtig mit wässriger NaOH (10%, 53ml) behandelt, gefolgt von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (30%, 53ml) und eine Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend mit Ether extrahiert, der Ether-Extrakt mit wässriger FeSO<sub>4</sub>-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Die Destillation des Rückstandes unter HV ergab ca. 2g des Produktes (40%, M=271,43 g/mol).

## 6 Abbildungen

Abbildung 1: Grundstruktur der Cisplatin-analogen Verbindungen A sowie der Betulinsäurederivate B ( $R_1 = (\text{CH}_2)_n$ -Kette mit Transportmolekül, $R_2, R_3 =$ organische Liganden).....	3
Abbildung 2: Cisplatin .....	6
Abbildung 3: Mechanismus der Reaktion von Cisplatin mit DNA .....	7
Abbildung 4: Carboplatin und Oxali-Platin .....	7
Abbildung 5: Struktur von Satraplatin .....	8
Abbildung 6: Aufbau der verwendeten Platin-Verbindungen .....	9
Abbildung 7: Verbindungen mit THP als Transportunterstützung und <i>cis</i> - oder <i>carbo</i> -Struktur .....	10
Abbildung 8: Verbindungen mit OH als Transportunterstützung und <i>cis</i> - oder <i>carbo</i> -Struktur .....	11
Abbildung 9: Verbindungen mit Gallensäure als Transportunterstützung und <i>cis</i> - bzw. <i>carbo</i> -Struktur .....	11
Abbildung 10: Strukturformel der Betulinsäure.....	12
Abbildung 11: Betulinsäure-Derivate (BA-30 – BA-40) .....	15
Abbildung 12: Möglichkeiten zur Erhöhung der Löslichkeit eines lipophilen Stoffes .....	16
Abbildung 13: Prinzip des Röhrenverschlusses .....	19
Abbildung 14: $\alpha$ -D-Glukose-Molekül in der Sesselkonformation.....	20
Abbildung 15: Schematischer Aufbau der Cyclodextrine <sup>84</sup> .....	21
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Komplexbildung <sup>84</sup> .....	23
Abbildung 17: Schema der Micellenbildung.....	25
Abbildung 18: Planck'sches Gesetz.....	27
Abbildung 19: Lambert-Beer'sches Gesetz .....	28
Abbildung 20: Modifiziertes Lambert-Beer'sches Gesetz für die AAS .....	28
Abbildung 21: Vergleich der Löslichkeiten bei erhöhtem DMF-Anteil .....	32
Abbildung 22: Vergleich der Lösungsmittel Methanol und Ethanol bei Cyclodextrin-Komplexierung.....	33
Abbildung 23: Lösungen mit Mikrowellenunterstützung .....	34
Abbildung 24: 5-Tage-Messung langkettiger THP- und Gallensäure-Platin-Konjugate .....	40
Abbildung 25: 5-Tage-Messung von OH-Spacer-Verbindungen und kurzkettigen THP-Verbindungen .....	41
Abbildung 26: 3-Tage-Messung der Komplexe langkettiger Verbindungen mit Cyclodextrinen und Micellen .....	42
Abbildung 27: Korngrößenverteilung von $\text{ChaC}_8$ 2-subst.PDAPt <sub>cis</sub> 27 in micellarer Komplexierung.....	44
Abbildung 28: Korngrößenverteilung von $\text{ChaC}_{11}$ 2-subst.PDAPt <sub>carbo</sub> 29 in micellarer Komplexierung.....	44
Abbildung 29: Schema der Micellenbildung.....	45
Abbildung 30: Einfluss der Lösungsmittel auf die Micellen-Löslichkeit .....	47
Abbildung 31: Verlauf der Konzentrationen bei variiertem Lösungsmittelvolumen .....	48
Abbildung 32: Strukturformeln von SPC und Na-glycocholat .....	49
Abbildung 33: Strukturformel von Natrium-Glycocholat.....	49
Abbildung 34: Verlauf der Konzentrationen bei variiertem Micellen-Zugabe .....	50
Abbildung 35: Verlauf der Konzentrationen bei variiertem Reaktionsdauer.....	51
Abbildung 36: Verlauf der Konzentrationen bei variiertem Reaktionstemperatur .....	52
Abbildung 37: Verlauf der Konzentrationen bei zweifacher Filtration.....	54
Abbildung 38: Strukturformel von Triton X-100.....	59
Abbildung 39: Cytotoxizität des THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPt <sub>cis</sub> 4 ohne Platin-Einheit.....	64
Abbildung 40: Wirkung von THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPt <sub>cis</sub> gegen 1411HP bei variabler Einwirkzeit.....	65
Abbildung 41: Wirkung von THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPt <sub>cis</sub> gegen H12.1 bei variabler Einwirkzeit.....	65
Abbildung 42: Wirksamkeit des eingekapselten THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPt <sub>cis</sub> 4 gegen 1411HP .....	66
Abbildung 43: Wirksamkeit des eingekapselten THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPt <sub>cis</sub> 4 gegen H12.1 .....	67
Abbildung 44: Wirksamkeit der reinen Micellen-Lösung gegen H12.1 .....	68
Abbildung 45: Wirksamkeit der reinen Micellen-Lösung gegen 1411HP .....	68
Abbildung 46: Vergleich der Einkapselung von THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPt <sub>cis</sub> in Cyclodextrine und Micellen.....	69

Abbildung 47: Aufnahmekinetik CDDP, THPC <sub>11</sub> N-subst.PDAPtcis 8 und THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcis 4 (je 30µM über 2h) .....	70
Abbildung 48: Vergleich der Verbindungen THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcis 4 und THPC <sub>11</sub> N-subst.PDAPtcis 8 bei Inkubation über 96 h .....	71
Abbildung 49: Vergleich der Konzentrationen in der Zelle von THPC <sub>4</sub> 2-subst.PDAPtcis 1, THPC <sub>6</sub> 2-subst.PDAPtcis 2 und THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcis 4 .....	72
Abbildung 50: Entwicklung der Aufnahme von CDDP und THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcis 4 in die Zelle bei Kupfer-Zugabe .....	73
Abbildung 51: Aufnahme von THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcis 4 in die Zelle bei steigender Konzentration .....	74
Abbildung 52: Entwicklung der Aufnahme von CDDP in die Zelle bei steigender Konzentration .....	75
Abbildung 53: Aufnahme von THPC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPtcis 4 in die Zelle in Abhängigkeit von der Zeit .....	76
Abbildung 54: Aufnahme von CDDP in die Zelle in Abhängigkeit von der Zeit .....	77
Abbildung 55: Platingehalt des Zellmaterials .....	78
Abbildung 56: Platingehalt der isolierten DNA .....	78
Abbildung 57: IC <sub>50</sub> -Werte der Acetyl-Betulin säurederivate BA-38 und BA-39 in µg/ml .....	84
Abbildung 58: Werte für die Homogenitätsmessung der festen Zellprobe .....	86
Abbildung 59: <sup>1</sup> H-Spektrum von Tetrahydropyranoxyundecene .....	93
Abbildung 60: <sup>13</sup> C-Spektrum von Tetrahydropyranoxyundecene .....	94
Abbildung 61: <sup>1</sup> H-Spektrum des Tetrahydropyranoxyundecanol .....	95
Abbildung 62: <sup>13</sup> C-Spektrum des Tetrahydropyranoxyundecanol .....	96
Abbildung 63: Synthese von Tetrahydropyranoxyundecen .....	97
Abbildung 64: Synthese von Tetrahydropyranoxyundecanol .....	97



## 7 Tabellen

Tabelle 1: Molekulare Größen von Cyclodextrinen.....	21
Tabelle 2: Cyclodextrin-Derivate und ihre Eigenschaften .....	22
Tabelle 3: Löslichkeiten der OH-Spacer-Verbindungen mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin.....	36
Tabelle 4: Löslichkeiten der THP-Carbo-Verbindungen mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin .....	37
Tabelle 5: Löslichkeiten der THP-Cis-Verbindungen mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin.....	38
Tabelle 6: Löslichkeiten der Gallensäure-Verbindungen mit HP- $\beta$ -Cyclodextrin.....	39
Tabelle 7: Konzentrationen der micellaren Lösung von ChaC <sub>8</sub> 2-subst.PDAPt <sub>cis</sub> 27 und ChaC <sub>11</sub> 2-subst.PDAPt <sub>carbo</sub> 29 .....	43
Tabelle 8: Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ bei verschiedenen Lösungsmitteln .....	46
Tabelle 9: Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ bei variiertem Micellen-Zugabe.....	50
Tabelle 10: Verlauf der Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$ bei variiertem Reaktionsdauer .....	51
Tabelle 11: Verlauf der Konzentrationen bei variiertem Reaktionstemperatur .....	52
Tabelle 12: Verlauf der Konzentrationen bei zweifacher Filtration.....	53
Tabelle 13: Gehalte der OH-Verbindungen in micellarer Komplexierung .....	55
Tabelle 14: Gehalte der THP-Carbo-Verbindungen in micellarer Komplexierung .....	56
Tabelle 15: Gehalte der THP-Cis-Verbindungen in micellarer Komplexierung .....	57
Tabelle 16: Gehalte der Gallensäure-Verbindungen in micellarer Komplexierung .....	58
Tabelle 17: Grundansätze für die Emulsionen .....	59
Tabelle 18: AAS-Ofenprogramm zur Messung der Emulsionen .....	60
Tabelle 19: Konzentrationen für NaCl als Emulsionsbildner.....	60
Tabelle 20: Konzentrationen für Glycerol als Emulsionsbildner .....	61
Tabelle 21: IC <sub>50</sub> -Werte der THP-Verbindungen nach 96h.....	63
Tabelle 22: IC <sub>50</sub> -Werte der Betulinsäure-Derivate BA-30, BA-31, BA-32 und BA-34.....	82
Tabelle 23: IC <sub>50</sub> -Werte von Betulinsäure-C28-Derivate BA-33, BA-34, BA-35.....	83
Tabelle 24: IC <sub>50</sub> -Werte der Betulinsäure-C3-Derivate BA-30, BA-36, BA-37 und BA-40.....	84
Tabelle 25: Ofenprogramm für die Messung des festen Zellmaterials.....	87
Tabelle 26: Ofenprogramm am ZAAS für Cyclodextrin und Micellenlösungen .....	90
Tabelle 27: Temperaturprogramm für das SS-GF AAS.....	90

## 8 Abkürzungen

1-BuOH – 1-Butanol  
1-PrOH – 1-Propanol  
AAS – Atomabsorptions-Spektroskopie  
AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome  
Ac – Acetyl  
BA – Betulinsäure  
BA-Suc – Succinyl-Betulinsäure  
BCR – Bureau Communautaire de Reference  
BST – Betulinsäureacetat-TRIS-ester  
CA – Celluloseacetat  
CBDC – Cyclobutandi(carboxylato-)  
CD - Cyclodextrin  
CDDP – *cis*-diaminodichloroplatin (Cisplatin)  
CMC – kritische Mizellenbildungskonzentration  
CRM – Zertifiziertes Referenzmaterial  
CT – Computer-Tomographie  
CV-AAS – cold vapor AAS (Kaldampf-AAS)  
DACH – 1,2-diaminocyclohexan  
Dea-A – Deacetyliertes Amid (der Betulinsäure)  
Dea-E – Deacetylierter Ester (der Betulinsäure)  
DGAT - Diacylglycerolacyltransferase  
DMF – N,N-Dimethylformamid  
D-MEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DNA – Desoxyribonucleinsäure  
D-PBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline  
EDA - Ethylendiamin  
EDL – Elektrodenlose Entladungslampen  
EDTA – Ethylendiamin-tetraacetat  
EG – Elektrographit  
EtOH - Ethanol  
EU – Europäische Union  
FBS – Foetal Bovine Serum  
FDA – Food and Drug Administration  
GF-AAS – graphite furnace-AAS (Graphitrohren-AAS)  
GST - Glutathion-S-Transferase  
HG-AAS – hydride generation–AAS (Hydrid-AAS)  
HIV - Human immunodeficiency virus  
HKL – Hohlkathodenlampe  
HMPD –  
HP – Hydroxypropyl  
HPPS - High Performance Particle Sizer  
HV - Hochvakuum  
IC<sub>50</sub> - die Konzentration eines Inhibitors die nötig ist, um ein Enzym in vivo zu 50% blockieren  
ISO – International Organization for Standardization  
IV – intravenös  
LD<sub>50</sub>-Wert – Dosis eines Stoffes, die bei einmaliger Gabe den Tod von 50% der Versuchsorganismen bewirkt.  
MCT - Monochlortriazinyl  
Me – Methyl

MeOH - Methanol  
MSN - mesoporous silica nanorods  
NMR – Nuclear Magnetic Resonance  
PDA - Propylendiamin  
PC - Phosphatidylcholin  
PG – Pyrokohlenstoff  
ppb – parts per billion ( $10^{-9}$  g/g)  
ppm – parts per million ( $10^{-6}$  g/g)  
REACH – Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals  
RM – Referenzmaterial  
RT - Raumtemperatur  
SI – Systeme international d'Unites (Internationales Einheitensystem)  
SPC – Soja-Phosphatidylcholin  
SRB – Sulforhodamin B  
SS-GFAAS – solid sample graphite furnace-AAS (Feststoff-AAS)  
Tac - Triacetyl  
THGA – transversally heated graphite atomizer (transversal geheizter Graphitrohrföfen)  
THF - Tetrahydrofuran  
THP – Tetrahydropyran  
TRIS - Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
VI = Vorinkubation  
WS – Wirkstoff  
ZAAS – Zeeman-AAS  
ZM - Zellmaterial

## 9 Geräte und Materialien

Alle verwendeten Reagenzien wurden – sofern nicht anders angegeben - von Sigma-Aldrich, Roth, VWR bzw. Acros bezogen.

D-MEM, Trypsin, FBS sowie D-PBS wurden von Invitrogen bezogen.

Das sterile Zubehör zur Zellkultur wurde von Greiner bio-one bezogen.

Die Zelllinien Liposarkom, A549 sowie 518A2 wurden freundlicherweise von Prof. Selzer, Universitätsklinik für Strahlentherapie und Strahlenbiologie, AKH Wien überlassen.

Das SPC wurde von der Phospholipid GmbH, Köln kostenlos zur Verfügung gestellt.

Das HP- $\beta$ -CD und das  $\gamma$ -CD wurden von der Firma Wacker-Chemie aus Burghausen bezogen.

Die Zutaten für die Emulsionen wurden von Prof Mäder, Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie überlassen.

Für die Feststoff-AAS wurde in dieser Arbeit das AAS-5 EA von Analytik Jena mit dem halbautomatischen Feststoffprobengeber SSA 51 eingesetzt. Die DNA-Proben wurden an einem ZEEnit 700 von AnalytikJena gemessen.

Für atomspektroskopische Messung von Lösungen wurde das 4100 ZL von Perkin-Elmer eingesetzt.

Für die NMR-Spektroskopie wurde ein Unity Inova, 500 MHz von Varian eingesetzt.

Als Mikrowelle wurde die Discover von CEM eingesetzt.

Die Partikelgrößenbestimmungen wurden mit einem Malvern HPPS 5002 (Malvern Instruments Ltd., Worcester Shire, UK) durchgeführt.

## 10 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> <http://www.destatis.de/presse/deutsch/pm2005/p4600092.htm>
- <sup>2</sup> Robert-Koch-Institut Berlin, Dachdokumentation Krebs -> Datenbankabfragen -> Neuerkrankungen
- <sup>3</sup> [http://www.gbe-bund.de/cgi-express/oowaro/ExpSrv634/dbxwdevkit/xwd\\_init?isgbetol/xs\\_start/371318126/54359306](http://www.gbe-bund.de/cgi-express/oowaro/ExpSrv634/dbxwdevkit/xwd_init?isgbetol/xs_start/371318126/54359306)
- <sup>4</sup> Ho, Y-P; Au-Yeung, S.C.F.; To, K.K.W.: Medicinal Research Reviews 2003, 23(5), 633-655
- <sup>5</sup> Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T.: Nature 1965, 205, 698-699
- <sup>6</sup> Rosenberg, B. In: Lippert, B.: Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. New York: Wiley-VCH; 1999, 1-27
- <sup>7</sup> Ozols, R.F.: Hematol Onvol Clin North Am 1992, 6(4), 879-894
- <sup>8</sup> Nishino, H.: Cancer Research 1988, 48(18), 5210-5215
- <sup>9</sup> Mayaux, J.F.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1994, 91(9), 3564-3568
- <sup>10</sup> Draeger, B.; Neubert, R.; Galgon, T.; Wohlrab, W.: Ger. Offen. (1998), DE 19713768 A1
- <sup>11</sup> Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V.H.: Nature, **1969**, 222, (5191), 385-386
- <sup>12</sup> Peyrone, M.: Ann. Chemie Pharm., **1844**, 51, 1-29
- <sup>13</sup> Lippert, B. Cisplatin, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, **1999**
- <sup>14</sup> Cepeda, V.; Fuertes, M. A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Quevedo, C.; Perez, J. M.: Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 2007, 7(1), 3-18
- <sup>15</sup> Reedijk, J.: PNAS, **2003**, 100, 7, 3611-3616
- <sup>16</sup> Guddneppanavar, R.; Bierbach, U.: Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 2007, 7(1), 125-138
- <sup>17</sup> Highby, D. J.; Wallace, H. J.; Albert, D. J.; Holland, J. F.: Cancer, **1974**, 33(5), 1219-1228
- <sup>18</sup> [www.cancerbacup.org.uk/info](http://www.cancerbacup.org.uk/info)
- <sup>19</sup> Yu, C. W.; Li, K. K.W.; Pang, W. K.; Au-Yeung, S. C.F.; Ho, Y. P.: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2006, 16, 1686-1691
- <sup>20</sup> Willermann, M.; Mulcahy, C.; Sigel, R. K.O.; Cerda, M. M.; Freisinger, E.; Miguel, P. J.S.; Roitzsch, M., Lippert, B.: Inorganic Chemistry 45(5), 2093-2099
- <sup>21</sup> Galanski, M.: Pharmazie in unserer Zeit 2006, 2, 35, 118-123
- <sup>22</sup> Fakihi, S.; Tung, W. C.; Eierhoff, D.; Mock, C.; Krebs, B.: Z. Anorg. Allg. Chem. 2005, 631, 1397-1402
- <sup>23</sup> bu-Surrah, A. S.: Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 2007, 7(7), 203-211
- <sup>24</sup> Wee Han Ang, Khalaila, I.; Allardyce, C.S.; Juillerat-Jeanerret, L.; Dyson, P.J.: JACS 2005, 127(5), 1382-1383
- <sup>25</sup> P.Sova, Mistr, A.; Kroutil, A.; Zak, F.; Pouchova, P.; Zadinova, M.: Anti-Cancer Drugs 2006, 17(2), 201-206
- <sup>26</sup> Guerra, W.; Silva, H.; Vieira de Almeida, M.; Fontes, A. P. S.: Quimica Nova 2007, 30(1), 56-58
- <sup>27</sup> Markoviv, M.; Knezevic, N.; Momcilovic, M.; Grguric-Sipka, S.; Harhaji, L.; Trajikovic, V.; Stojkovic, M. M.; Sabo, T.; Miljkovic, D.: European Journal of Pharmacology 2005, 517 (1-2), 28-34
- <sup>28</sup> Casa, S. S.; Castineiras, A.; Parajo, Y.; Sanchez, A.; Sanchez-Gonzales, A.; Sordo, J.: Polyhedron. 2005, 24(10) 1196
- <sup>29</sup> Ang, W.H.; Khalaila, I.; Allardyce, C. S.; Juillerat-Jeanerret, L.; Dyson, P. J.: JACS 2005, 127(5), 1382-1383
- <sup>30</sup> Y. Najajreh, Prilutski, D.; Aldeli-Tzaraf, Y.; Perez, J.M.; Khazanov, E.; Barenholz, Y.; Kasparkova, J.; Brabec, V.; Gibson, D.: Angew. Chem. Int. Ed., 2005, 44, 2885-2887
- <sup>31</sup> S. van Zutphen, Pantoja, E.; Soriano, R.; Soro, C.; Tooke, D.M.; Spek, A.L.; den Dulk, H.; Brouwer, J.; Reedijk, J.: Dalton Transactions 2006, 8, 1020-1023
- <sup>32</sup> Martinez, A.; Lorenzo, J.; Prieto, M. J.; Font-Bardia, M.; Solans, X.; Aviles, F. X.; Moreno, V.: Bioorganic & Medicinal Chemistry 2007, 15(2), 969-979
- <sup>33</sup> Quiroga, A. G.; Cubo, L.; de Blas, E.; Aller, P.; Navarro-Ranninger, C.: Journal of Inorganic Biochemistry 2007, 101(1), 104-110

- <sup>34</sup> Nguewa, P. A.; Fuertes, M. A.; Iborra, S.; Najajreh, Y.; Gibson, D.; Martinez, E.; Alonso, C.; Perez, J. M.: *Journal of Inorganic Biochemistry* 2005, 99(3), 727-736
- <sup>35</sup> Fakh S.; Tung, W.C.; Eierhoff, C.; Mock, C.; Krebs, B.: *Z. Anorg. Allg. Chem.* 2005, 631, 1397-1402
- <sup>36</sup> Amunugama, H.; Hirata, A.; Hirata, F.; Casero, R. A.; Angeles-Boza, A. M.; Dunbar, K. R.; Delcros, J. G.; Woster, P. M.: *Abstracts of Papers, 233rd ACS National Meeting, Chicago, IL, United States, March 25-29, 2007*
- <sup>37</sup> Kalayda, G. V.; Jansen, B. A. J.; Wielaard, P.; Tanke, H. J.; Reedijk, J.: *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2005, 10(3), 3005
- <sup>38</sup> Harris, H.A.; Ryan, R.J.; Farrell, N.: *Molecular Pharmacology* 2006, 69 (2), 666-672
- <sup>39</sup> Bednarski, P. J.; Mackay, F. S.; Sadler, P. J.: *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2007, 7(1), 75-93
- <sup>40</sup> Brunner, H.; Gruber, N.: *Inorganica Chimica Acta* 2004, 357(15), 4423-4451
- <sup>41</sup> Brunner, H.; Schellerer, K.M.: *Inorganica Chimica Acta* 2003, 350(1), 39-48
- <sup>42</sup> Yogeewaari, P.; Sriram, D.: *Current Medicinal Chemistry* 2005, 12, 763-771
- <sup>43</sup> Laszczyk, M.; Jaeger, S.; Simon-Haarhaus, B.; Scheffler, A.; Schempp, C. M.: *Planta Medica* 2006, 72(15), 1389-1395
- <sup>44</sup> Honda, T.; Liby, K. T.; Su, X.; Sundararajan, C.; Honda, Y.; Suh, N.; Risingsong, R.; Williams, C. R.; Royce, D. B.; Sporn, M. B.; Gribble, G. W.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006, 16(24), 6306-6309
- <sup>45</sup> Aguirre, M. C.; Delporte, C.; Backhouse, N.; Erazo, S.; Letelier, M. E.; Cassels, B. K.; Silva, X.; Alegria, S.; Negrete, R.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006, 14(16), 5673-5677
- <sup>46</sup> Steele, J. C. P.; Warhurst, D. C.; Kirby, G. C.; Simmonds, M. S. J.: *Phytotherapy Research* 1999, 13(2), 115-119
- <sup>47</sup> Bringmann, G.; Saeb, W.; Assi, L. A.; Francois, G.; Narayanan, A. S. S.; Peters, K.; Peters, E. M.: *Planta Medica* 1997, 63(3), 255-257
- <sup>48</sup> Houghton, P. J.; Mat Ali, R.: *Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 1997, 7(2/3), 96-98
- <sup>49</sup> Kouzi, S. A.; Chatterjee, P.; Pezzuto, J. M.; Hamann, M. T.: *Journal of Natural Products* 2000, 63(12), 1653-1657
- <sup>50</sup> Enwerem, N. M.; Okogun, J. I.; Wambebe, C. O.; Okorie, D. A.; Akah, P. A.: *Phytomedicine* 2001, 8(2), 112-114
- <sup>51</sup> Singh, S. S.; Patro, B.; Tripathi, V.; Srivastava, A.; Pandey, S. C.; Ghosh, A. C.: *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 2002, 24(4), 1031-1037
- <sup>52</sup> Yogeewaari, P.; Sriram, D.: *Current Medicinal Chemistry* 2005, 12(6), 657-666
- <sup>53</sup> Chung, M. Y.; Rho, M.-C.; Lee, S. W.; Park, H. R.; Kim, K.; Lee, I. A.; Kim, D. H.; Jeune, K. H.; Lee, H. S.; Kim, Y. K.: *Planta Medica* 2006, 72(3), 267-269
- <sup>54</sup> Wild, C. T.; Robinson, G. N.; Ashton, M.; Thomas, R.: *PCT Int. Appl.* 2005, 50 pp WO 2005030790 A1
- <sup>55</sup> Bi, Y.; Xu, J.; Wu, X.: *Zhongguo Xinyao Zazhi* 2005, 14(1), 23-26
- <sup>56</sup> Aiken, C.; Chen, C. H.: *Trends in Molecular Medicine* 2005, 11(1), 31-36
- <sup>57</sup> Xu, H.X.; Zeng, F.Q.; Wan, M.; Sim, K.Y.: *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 643
- <sup>58</sup> Pengsuparp, T.; Cai, L.; Fong, H.H.S.; Kinghorn, A.D.; Pezzuto, H.M.; Wani, M.; Wall, M.E.: *J. Nat. Prod.* 1994, 57(3), 415-418
- <sup>59</sup> Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkuskie, R.E.; Consentino, L.M.; Ballas, L.M.; Jang, J.B.; Janzen, W.P.; Chen, I.S.; Lee, K.H.: *Nat. Prod.* 1994, 57(1), 243-247
- <sup>60</sup> Evers, M.; Poujade, C.; Soler, F.; Ribeill, Y.; James, C.; Lelievre, Y.; Gueguen, J.C.; Reisdorf, D.; Morize, I.; Pauwels, R.; De Clerq, E.; Henin, Y.; Boussea, A.; Mayaux, J.F.; Le Pecq, J.B.; Dereu, N.: *J. Med. Chem* 1996, 39(5), 1056-1068
- <sup>61</sup> Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentina, L.M.; Chen, C.H.; Garren, P.E.; Lee, K.H.: *J. Med. Chem.* 1996, 39(5), 1016-1017
- <sup>62</sup> Fulda, S.; Scaffidi, C.; Susin, S.A.; Krammer, P.H.; Kroemer, G.; Peters, M.E.; Debatin, K.M.: *J. Biol. Chem* 1998, 273, 33942
- <sup>63</sup> Kim, J.Y.; Koo, H.M.; Kim, D.S.H.L.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, 11(17), 2405-2408
- <sup>64</sup> Kvasnica, M.; Sarek, J.; Klinotova, E.; Dzubak, P.; Hajduch, M.: *Bioorganic Medicinal Chemistry* 2005, 13, 3447-3454
- <sup>65</sup> Symon, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2005, 31(3), 286-291

- <sup>66</sup> Urban, M.; Salek, J.; Klinot, J.; Korinkova G.; Halduch. M.: J. Nat. Prod. 2004, 67, 1100-1105
- <sup>67</sup> Evers, M.; Poujade, C.; Soler, F.; Ribeill, Y.; James, C.; Lelievre, Y.; Gueguen, J.C.; Reisdorf, C.; Morize, I.; Pauwels, R.; De Clerq, E.; Henin, Y.; Boueseau, A.; Mayyaux, J.F.; Le Pecq, J.B.; Dereu, N.: J. Med. Chem 1996, 39(5), 1056-1068
- <sup>68</sup> Flekhter, O.B.; Boreko, E.I.; Nigmatullina, N.R.; Pavlova, N.I.; Nikolaeva, S.N.; Savinova, O.V.; Eremin, V.F.; Baltina, L.A.; Galin, F.Z.; Tolstikov, E.A.: Russian Journal of Bioorganic Chemistry 2003, 29(3), 296-301
- <sup>69</sup> Chandramu, C.; Manohar, R.D.; Krupadanam, D.G.; Dashavanta, R.V.: Phytother. Res. 2003, 17(2), 129-134
- <sup>70</sup> Recio, M.C.; Giner, R.M.; Manez, S.; Gueho, J.; Jukien, H.R.; Hostettmann, K.; Rios, J.L.: Planta Med. 1995, 61(1), 9-12
- <sup>71</sup> Steele, J.C.; Warhurst, D.C.; Kirby, G.C.; Simmonds, M.S.: Phytother. Res. 1999, 13(2), 115-119
- <sup>72</sup> Krogh, R.; Kroth, R.; Berti, C.; Madeira, A.O.; Sourza, M.M.; Cechinel-Felho, V.; Delle-Monache, F.; Yunes, R.A.: Pharmazie 1999, 54 (6), 464-466
- <sup>73</sup> Enwerem, N.M.; Okogun, J.I.; Wambebe, C.O.; Okorie, D.A.; Akah, D.A.: Phytomed. 2001, 8(2), 112-114
- <sup>74</sup> Chung, M.Y.; Rho, M.C.; Lee, S.W.; Park, H.R.; Kim, K.; Lee, I.A.; Kim, D.H.; Jeune, K.H.; Lee, H.S.; Kim, Y.K.: Planta Medica 2006, 72(3), 267-269
- <sup>75</sup> Strickley, R.G.: Pharmaceutical Research 2004, 21 (2), 201-230
- <sup>76</sup> Powell, M.F.; Nguyen, Baloian, L.: J. Parent. Sci. Technol. 1998, 52(5), 238-311
- <sup>77</sup> Reed, K.W.; Yalkowsky, S.H.: J. Parent. Sci. Technol. 1985, 39(2), 64-69
- <sup>78</sup> Rekharsky, M.V.; Inoue Y.: Chemical Reviews 1998, 1875-1917
- <sup>79</sup> Higuchi, T.; Connors, K.A.: Advances In Analytical Chemistry And Instrumentation 1964, 117-212
- <sup>80</sup> Neubert, R.H.H.; Hildebrand, A.; Janich, M.; Mrestani Y.; Plätzer, M.: Pharmazeutische Zeitung 2000, 44
- <sup>81</sup> Gupta, P.K.; Cannon, J.B.: Emulsions and microemulsions for drug solubilization and delivery. In R. Liu (ed.) Water-Insoluble Drug Formulation, Interpharm Press, Denver, Colorado 2000, 169-211
- <sup>82</sup> Giri, S.; Trewyn, B.G.; Stellmaker M.P.; Lin, V.S.-Y.: Angew. Chemie Int. Ed. 2005, 44(32), 5038-5044
- <sup>83</sup> Li, S.; Purdy, W.C.: Chemical Reviews 1992, 92, 1457-1470
- <sup>84</sup> Gröger, M.; Kretzer E.K.; Woyke, A.: Reader zum Thema Cyclodextrine, Juli 2001, Science Forum der Universität Siegen
- <sup>85</sup> Holbrook, W.P.; Kristmundsdottir, T.; Loftsson, T.: Acta Odontologica Scandinavica 1998, 56(3), 157-160
- <sup>86</sup> Puglisi, G.; Santagati, N.A.; Ventura, C.A.; Pignatello, R.; Panico, A.M.; Spampinato, S.: Journal of Pharmacy and Pharmacology 1991 (43)6, 430-432
- <sup>87</sup> Shin, B.C.; Kim, S.S.; Lee, B.M.: Eur. Pat. Appl 1998, Nr. 917872
- <sup>88</sup> Singla, A.K.; Chawla, M.; Singh, A.: Journal of Pharmacy and Pharmacology 2000, 52(5), 467-486
- <sup>89</sup> Stefansson, E.; Loftsson, T.: Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 2002, 44(1-4), 23-27
- <sup>90</sup> Shinoda, T.; Kagatani, S.; Maeda, A.; Konno, Y.; Hashimoto, H.; Hara, K.; Fujita, K.; Sonobe, T.: DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY 1999, 25(11), 1185-1192
- <sup>91</sup> Yang, M.; Ding, Y. T.; Huang, Z. Q.; Qian, X. P.; Yu, L. X.; Liu, B. R.: Wuji Huaxue Xuebao 2007, 23(2), 205-210
- <sup>92</sup> Kwon, G.S.; Okano, T.: Advanved Drug Delivery Reviews 1996, 21, 107-116
- <sup>93</sup> Karlson, P.; Doenecke D.; Koolman, J.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, 14 Aufl. 1994, 279, 303-308
- <sup>94</sup> Beck, T.: Zur Anatomie des Menschen: Leber und Galle im Wechselspiel. PZ 1998, 14, 11-18
- <sup>95</sup> Welz, B.; Sperling, M.: Atomabsorptionsspektrometrie, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 1997
- <sup>96</sup> Schwedt G.: *Analytische Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999
- <sup>97</sup> Minakata, K.; Nozawa, H.; Okamoto, N.; Suzuki, O.: Journal of Chromatography B 2006, 832, 286-291
- <sup>98</sup> Ghezzi, A.; Aceto, M.; Cassino, C.; Gabano, E.; Osella, A.: Journal of Inorganic Biochemistry 2004, 98, 73-78
- <sup>99</sup> Morrison, J. G.; White, P.; McDougall, S.; Firth, J.W.; Woolfrey, S.G.; Graham, M.A.; Greenslade, D.: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2000, 24, 1-10
- <sup>100</sup> Esteban-Fernandez, D.; Gomez-Gomez, M.M.; Canas, B.; Verdaguer, J.M.; Ramirez, R.; Palacios, M.A.: Talanta 2007, 72(2), 768-773
- <sup>101</sup> Benckroun, B.: Mol. Pharmacol. 1995, 47(6), 1255-1260

- <sup>102</sup> Lindl, T.: Zell- und Gewebekultur, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, 2002
- <sup>103</sup> Chen, H.; Gao, J.; Wang, F.; Liang, W.: Drug Delivery (2007), 14(4), 201-208
- <sup>104</sup> Vig, O.P.; Sharma, M.L.; Verma, M.K.; Malik, Neera.: Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry including Medicinal Chemistry (1980), 19B(7), 581-2
- <sup>105</sup> Perron, V.; Rabouin, D.; Asselin, E.; Parent, S.; Gaudreault, R.; Berube, G.: Bioorganic Chemistry 2005, 33(1), 1-15
- <sup>106</sup> Perron, V.; Rabouin, D.; Asselin, E. ; Parent, S. ; Gaudreault, R. ; Berube, G.: Bioinorganic Chemistry 2005, 33(1), 1-15
- <sup>107</sup> Kuo, M. T.; Chen, Helen H.W.; Song, I. S.; Savaraj, N.; Ishikawa, T.: Cancer and Metastasis Reviews 2007, 26(1), 71-83
- <sup>108</sup> Zisowsky, J.; Koegel, S.; Leyers, S.; Devarakonda, K.; Kassack, M. U.; Osmak, M.; Jaehde, U.: Biochemical Pharmacology 2007: 73(2), 298-307
- <sup>109</sup> Reedijk, J.: PNAS, **2003**, 100, 7, 3611-3616
- <sup>110</sup> Guddneppanavar, R.; Bierbach, U.: Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 2007, 7(1), 125-138
- <sup>111</sup> Kurfürst, U.: Solid Sample Analysis, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1998
- <sup>112</sup> Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R.: Journal of the National Cancer Institute 1990, 82(13), 1107-12
- <sup>113</sup> Vig, O.P.; Sharma, M.L.; Verma, M.K.; Malik, Neera.: Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry including Medicinal Chemistry (1980), 19B(7), 581-2