

Zur Antitumorwirkung o-substituierter [1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe und ihrer Methylether

Johann Karl und Helmut Schönenberger^{*)**}

Institut für Pharmazie, Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie II, Sonderforschungsbereich 234, Universität Regensburg, Universitätsstraße 31, D-8400 Regensburg

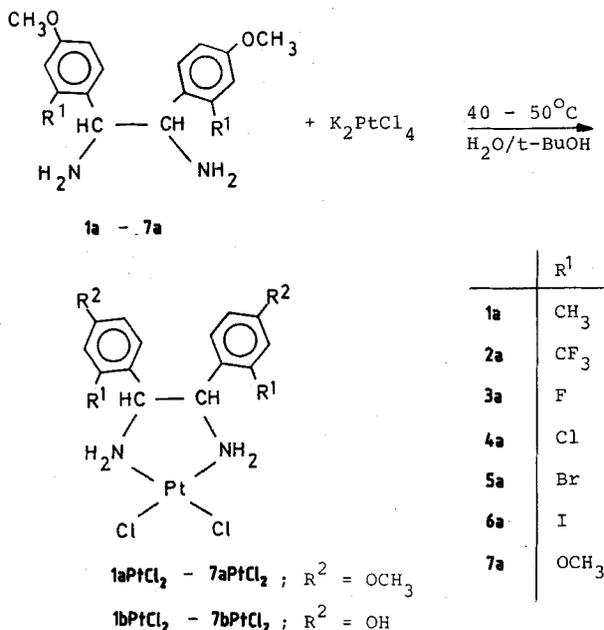
Eingegangen am 20. November 1987

Die Synthese der in o-Stellung CH_3 -, CF_3 -, F-, Cl-, Br-, I- und OCH_3 -substituierten [1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe **1a-PtCl₂** bis **7a-PtCl₂** wird beschrieben. Ihre Wirkung an der menschlichen, hormonunabhängigen MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie und an der lymphocytischen Leukämie P 388 der Maus wird mit der analog o-substituierter [1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe (**1b-PtCl₂** bis **7b-PtCl₂**) verglichen. Die 4-OH substituierten Platinkomplexe (**1b-PtCl₂** bis **7b-PtCl₂**) hemmen das Tumorstadium beider Tumormodelle stärker als die entsprechenden 4- OCH_3 -substituierten Platinkomplexe **1a-PtCl₂** bis **7a-PtCl₂**, die Effekte sind jedoch im Vergleich zum Cisplatin schwächer ausgeprägt.

Antitumor Activity of o-Substituted [1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatin(II)-Complexes and their Methyl ethers

The synthesis of [1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatin(II)-complexes with CH_3 -, CF_3 -, F-, Cl-, Br-, I-, and OCH_3 -substituents in o-positions of both benzene rings **1a-PtCl₂** to **7a-PtCl₂** is described. Their effect on the human, hormone-independent MDA-MB 231 breast cancer cell line and on the lymphocytic leukemia P 388 of the mouse is compared with that of the analogously o-substituted [1,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethylenediamine]dichloroplatin(II)-complexes **1b-PtCl₂** to **7b-PtCl₂**. The OH-substituted platinum complexes **1b-PtCl₂** to **7b-PtCl₂** are more active on both tumor models than the corresponding 4- OCH_3 -substituted platinum complexes **1a-PtCl₂** to **7a-PtCl₂**, but are less active than cisplatin.

In Fortführung unserer Arbeiten über antitumorale Dichloro[diphenylethylenediamin]platin(II)-Komplexe^{1, 2)} wurden o- und o,o'-substituierte [1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe synthetisiert und umfassend getestet^{3, 4)}. Neben [meso-1,2-Bis(2,6-dichlor-4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II), das sich durch eine dem Cisplatin überlegene Wirkung am DMBA-induzierten, hormonabhängigen Mammacarcinom der SD-Ratte auszeichnet⁴⁾, zeigten einige der o-substituierten Komplexe ausgeprägte cytotoxische Eigenschaften. Da durch die diastereomeren [1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe an der Leukämie P 388 der Maus bessere Antitumoraktivitäten als durch die entsprechenden hydroxy-substituierten Komplexe erreicht wurden⁵⁾, war bei Überführung von o-substituierten [1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexen in die Methylether eine ähnliche Wirkungssteigerung zu erwarten. Es wurden die in o-Stellung durch CH_3 -, CF_3 -, F-, Cl-, Br-, I- und OCH_3 -Reste substituierten [1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe **1a-PtCl₂** bis **7a-PtCl₂** synthetisiert und vergleichend zu den 4-OH-analogen Verbindungen **1b-PtCl₂** bis **7b-PtCl₂** getestet (vgl. Syntheschema und Tabelle 1).



Synthese und Analytik

Die Synthesen der in o-Stellung CH_3 -, CF_3 -, F-, Cl-, Br- und I-substituierten 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylenediamine und deren Vorstufen wurden bereits beschrieben⁴⁾. Das Verfahren zur Herstellung von 1,2-Bis(2,4-dimethoxyphenyl)ethylendiamin ist im experimentellen Teil aufgeführt. Die Dichloroplatin(II)-Komplexe werden gewöhnlich durch Umsetzung der freien Liganden mit K_2PtCl_4 in H_2O als Reaktionsmedium erhalten. In unserem Fall führte der Zusatz von t-BuOH als Lösungsmittel (bis zu 50 %) und eine Reaktionstemp. von 40–50 °C zu einer schnelleren Reaktion mit wesentlich höheren Ausbeuten.

^{**} Die Arbeit wurde in der Anfangsphase durch die *Wilhelm-Sander*-Stiftung und anschließend durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie (038715/6) gefördert. Unser Dank gilt diesen und folgenden Förderinstitutionen: Deutsche Forschungsgemeinschaft, *Walter-Schulz*-Stiftung, *Matthias-Lackas*-Stiftung und dem Fonds der Chemischen Industrie, die uns durch Bereitstellung von Geräten und Sachmitteln zusätzlich gefördert haben.

Für die technische Mitarbeit danken wir Frau *M. Beer*, Herrn *F. Birk*, Frau *B. Hofmann*, Frau *P. Pistor*, Herrn *P. Richthammer* und Frau *S. Ternus*.

Tab. 1: Analytische Daten o-substituierter [1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe

Verbindung	R	Ausbeute %	Formel (Mol.-Masse)	Berechnet Gefunden		
				C	H	N
meso-1a-PtCl ₂	CH ₃	85	C ₁₈ H ₂₄ Cl ₂ N ₂ O ₂ Pt (566.4)	38.2 37.8	4.27 4.17	4.95 4.93
D,L-1a-PtCl ₂	CH ₃	60	C ₁₈ H ₂₄ Cl ₂ N ₂ O ₂ Pt (566.4)	38.2 38.5	4.27 4.17	4.95 5.00
meso-2a-PtCl ₂	CF ₃	80	C ₁₈ H ₁₈ Cl ₂ F ₆ N ₂ O ₂ Pt (674.5)	32.1 32.1	2.69 3.00	4.15 4.36
meso-3a-PtCl ₂	F	95	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₂ F ₂ N ₂ O ₂ Pt (574.3)	33.5 33.6	3.16 2.91	4.88 4.91
meso-4a-PtCl ₂	Cl	91	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₄ N ₂ O ₂ Pt (607.2)	31.7 31.6	2.99 3.10	4.61 4.57
meso-5a-PtCl ₂	Br	92	C ₁₆ H ₁₈ Br ₂ Cl ₂ N ₂ O ₂ Pt (696.1)	27.6 27.5	2.61 2.78	4.02 3.91
meso-6a-PtCl ₂	I	82	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₂ I ₂ N ₂ O ₂ Pt (790.1)	24.3 24.5	2.30 2.33	3.55 3.41
meso-7a-PtCl ₂	OCH ₃	90	C ₁₈ H ₂₄ Cl ₂ N ₂ O ₄ Pt (598.3)	36.1 36.3	4.04 3.97	4.68 4.66

Die analytischen Daten der Komplexe 1a-PtCl₂ bis 7a-PtCl₂ sind in Tab. 1 aufgelistet. Ihre IR-Spektren zeigen die charakteristischen Merkmale der Dichloroplatin(II)-Komplexe. Durch die Überführung in den Komplex wird die NH-Bindung geschwächt. Die verringerte Bindungsenergie ruft eine Absorption bei niedrigeren Wellenzahlen hervor (freier Ligand: ν -NH = 3400 – 3300 cm⁻¹; Pt-gebundener Ligand: ν -NH = 3300 – 3100 cm⁻¹). Besonders charakteristisch sind die Pt-N- und Pt-Cl-Schwingungen, die im Fall der erstgenannten im Bereich von 650 – 450 cm⁻¹ und im Fall der letztgenannten zwischen 345 und 320 cm⁻¹ auftreten⁶.

Auch die ¹H-NMR-Spektren werden durch den Einfluß des Platinatoms stark beeinflusst. Aufgrund des induktiven Effekts werden besonders die NH₂-Signale des freien Liganden nach tieferem Feld verschoben. Da nach Komplexbildung eine Rotation um die C-N-Achse nicht mehr möglich ist, sind die beiden Protonen am Stickstoff aufgrund ihrer Nachbarschaft zu einem asymmetrischen C-Atom diastereotop, wodurch verschiedene NH-Signale für axial- und äquatorialständige H-Atome auftreten. Als Folge einer Kopplung zwischen ¹⁹⁵Pt, der NH₂- und der benzylicen CH-Gruppierung sind die N-H- und CH-Signale verbreitert (vgl. auch⁴).

Tab. 2: ¹H-NMR Daten^{a)} der Platinkomplexe 1a-PtCl₂ bis 7a-PtCl₂

Verbindung	aromatische H	benzyliche H bzw. -NH ₂ ^{b)}	-OCH ₃	-CH ₃	
meso-1a-PtCl ₂	8.21 (d; 2H), 6.64–6.73 (m; 4H)	6.06 (d; 2H)	5.34 (mc; 2H), 4.55 (mc; 2H)	3.77 (s; 6H)	1.93 (s; 6H)
D,L-1a-PtCl ₂	7.91 (d, ³ J = 8 Hz; 2H), 6.78 (dd, ³ J = 8 Hz, ⁴ J = 2 Hz; 2H), 6.56 (d, ⁴ J = 2 Hz; 2H)	6.30 (d; 2H)	5.15 (mc; 2H), 4.60 (mc; 2H)	3.70 (s; 6H)	2.27 (s; 6H)
meso-2a-PtCl ₂	8.64 (s; 2H), 7.20 (d, ³ J = 9 Hz; 2H), 7.14 (d, ⁴ J = 3 Hz; 2H)	6.73 (d; 2H)	5.88 (mc; 2H), 4.59 (mc; 2H)	3.88 (s; 6H)	–
meso-3a-PtCl ₂	8.36 (t, ³ J = 9 Hz, ⁴ J _{HF} = 9 Hz; 2H), 6.77 (dd, ³ J = 9 Hz, ⁴ J = 3 Hz; 2H), 6.67 (dd, ⁴ J = 2 Hz, ³ J _{HF} = 12 Hz; 2H)	6.30 (d; 2H)	5.61 (mc; 2H), 4.60 (mc; 2H)	3.80 (s; 6H)	–
meso-4a-PtCl ₂	8.41 (d; 2H), 6.90–6.92 (m; 4H)	6.40 (d; 2H)	5.64 (mc; 2H), 4.77 (mc; 2H)	3.82 (s; 6H)	–
meso-5a-PtCl ₂	8.38 (d, ³ J = 7 Hz; 2H), 7.08 (d, ⁴ J = 3 Hz; 2H), 6.95 (dd, ³ J = 9 Hz, ⁴ J = 3 Hz; 2H)	6.44 (d; 2H)	5.61 (mc; 2H), 4.72 (mc; 2H)	3.82 (s; 6H)	–
meso-6a-PtCl ₂	8.25 (d; 2H), 7.33 (d, ⁴ J = 3 Hz; 2H), 6.96 (dd, ³ J = 9 Hz, ⁴ J = 3 Hz; 2H)	6.50 (d; 2H)	5.58 (mc; 2H), 4.54 (mc; 2H)	3.81 (s; 6H)	–
meso-7a-PtCl ₂	8.17 (d, ³ J = 3 Hz; 2H), 6.41–6.48 (m; 4H)	6.09 (d; 2H)	5.16 (mc; 2H), 4.63 (mc; 2H)	3.78 (s; 6H), 3.50 (s; 6H)	–

a) Chemische Verschiebung in δ (ppm); die Platinkomplexe wurden in d₇-DMF gelöst, Me₄Si als interner Standard.

b) Um eine Zuordnung der Signale zur NH₂- bzw. benzylicen CH-Gruppe treffen zu können, ist in jedem einzelnen Fall die Synthese der N-deuterierten Verbindungen erforderlich, da ein H-D-Austausch bei den Komplexen nicht erfolgt.

Im Falle des an beiden N-Atomen deuterierten (\pm) [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexes konnte das bei höchstem Feld liegende Signal der benzylicen CH-Gruppierung zugeordnet werden.

Im Vergleich zum Racemat sind bei diesem Verbindungstyp die NH- und CH-Signale der Mesoform zu höherem Feld verschoben.

Pharmakologische Ergebnisse

Die Antitumorwirkung von Cisplatin und davon abgeleiteten Platin-komplexen wird durch eine spezifische Hemmung der DNA-Synthese hervorgerufen^{7,8}. Die Frage, ob die Bildung von „Interstrand-Cross-Links“, „Intrastrand-Cross-Links“ oder „DNA-Protein-Cross-Links“ für diesen Effekt verantwortlich ist, wird kontrovers diskutiert⁹. Da die bifunktionelle Koordination des A_2Pt -Fragments ($A = NH_3$, primäres Amin oder Diamin) mit den N-7-Positionen benachbarter Guanosinmoleküle in einem DNA-Strang die bevorzugte Reaktion ist, wird die Ausbildung von „Intrastrand-Cross-Links“ als Wirkursache favorisiert⁹.

Aufgrund dieser wirkungsmechanistischen Erkenntnisse bieten sich analytische Verfahren, die den Nachweis einer A_2Pt -DNA-Interaktion erlauben, als in vitro-Testmethoden an. Besonders einfach läßt sich eine Reaktion von A_2PtCl_2 mit DNA durch UV-Differenzspektroskopie nachweisen. Es wurde gefunden, daß bei antitumoraktiven Platinokomplexen die Extinktion im Absorptionsmaximum den doppelten Wert der Extinktion bei 295 nm aufweist und ihre UV-Differenzspektren sehr ähnlich sind¹⁰. So liegt der Quotient $\Delta E_{max}/\Delta E_{295}$, im Falle des Cisplatins bei ca. 2.2 ($[Pt]/[P] = 0.01$ bis 0.1), und des unwirksamen Transplatins bei ca. 1.2^{10,11}. Mit Ausnahme von **D,L-1a-PtCl₂** zeigen alle neuen Komplexe das für Cisplatin typische UV-Differenzspektrum. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Inagaki u. Mitarb.¹¹ besitzen sie ein Absorptionsminimum bei etwa 246 nm und ein Absorptionsmaximum zwischen 270 und 280 nm. Die bei 295 nm zu erwartende Schulter ist meist nur schwach ausgeprägt. Die Quotienten der Platinokomplexe **1a-PtCl₂** bis **7a-PtCl₂** liegen in der Größenordnung von 2 (siehe Tab. 2). Aufgrund dieser Befunde sind alle Platinokomplexe, ausgenommen **D,L-1a-PtCl₂**, in der Lage, an die DNA zu binden und erfüllen damit das für antitumoraktive Komplexe geforderte Kriterium. Die UV-Differenzspektren der hydroxy- und methoxy-substituierten Platinokomplexe weisen bis auf eine Aus-

nahme keine Unterschiede auf. Während **D,L-1a-PtCl₂** nicht an die DNA bindet, zeigt der entsprechende hydroxy-substituierte Komplex **D,L-1b-PtCl₂** den höchsten Q-Wert unter den neu synthetisierten Platinokomplexen.

Zum Nachweis der tumorhemmenden Eigenschaften wurden die Platinokomplexe an der hormonunabhängigen MDA-MB 231 Mammatumorzelllinie in vitro getestet. Die 4-O-CH₃-substituierten Komplexe **1a-PtCl₂** bis **7a-PtCl₂** zeigen in der Beeinflussung des [³H]-Thymidineinbaus und der Zellzahl keine gravierenden Unterschiede. Lediglich die 4-OH-substituierten Verbindungen **meso-1b-PtCl₂** und **D,L-1b-PtCl₂** hemmen den [³H]-Thymidineinbau wesentlich stärker als das Zellwachstum. Diese Unterschiede deuten an, daß an der Antitumorwirkung dieser Verbindungen weitere Effekte beteiligt sind, z. B. eine Hemmung der Thymidinkinase oder des Transmembrantransports. Die in o-Stellung durch F-, Cl-, Br- und I-substituierten Komplexe **meso-3a-PtCl₂**, **meso-4a-PtCl₂**, **meso-5a-PtCl₂** und **Meso-6a-PtCl₂** führen zu einer starken Hemmung der hormonunabhängigen MDA-MB 231 Brustkrebszelllinie, während die in o-Position methylierten, trifluormethylierten und methoxylierten Komplexe **meso-1a-PtCl₂**, **meso-2a-PtCl₂** und **meso-7a-PtCl₂** über eine deutlich geringere Antitumoraktivität verfügen, übereinstimmend mit der UV-Differenzspektroskopie ruft **D,L-1a-PtCl₂** keine signifikante Hemmung an der MDA-MB 231 Zelllinie hervor. Aus den Ergebnissen in Tab. 2 wird jedoch deutlich, daß die Q-Werte nicht mit den ED₅₀-Werten des Zellversuchs korrelieren. Für quantitative Aussagen zur Antitumoraktivität neu synthetisierter Platinokomplexe ist die UV-Differenzspektroskopie-Methode daher wenig geeignet. Entgegen unserer Annahme schneiden im Vergleich mit den entsprechenden 4-OH-substituierten Platinokomplexen **1b-PtCl₂** bis **7b-PtCl₂** die entsprechenden 4-OCH₃ Analoga **1a-PtCl₂** bis **7a-PtCl₂** nicht besser sondern eher etwas schlechter ab.

Tab. 3: Antitumoreffekt der o-substituierten [1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe **1b-PtCl₂** bis **7b-PtCl₂** und deren Methylether **1a-PtCl₂** bis **7a-PtCl₂** an der hormonunabhängigen, menschlichen MDA-MB 231 Brustkrebszelllinie und ihr Einfluß auf die Sekundärstruktur der DNA im UV-Differenzspektroskopie-Versuch

Verbindung	³ H]Thymidineinbau		Zellzahl		
	% T/C (bei 5 × 10 ⁻⁶ M)	ED ₅₀ ^{b)} (M)	% T/C (bei 5 × 10 ⁻⁶ M)	ED ₅₀ (M)	Q ^{a)}
meso-1a-PtCl₂	67	7.3 × 10 ⁻⁶	76	8.9 × 10 ⁻⁶	2.0
meso-1b-PtCl₂	38	3.3 × 10 ⁻⁶	61	7.6 × 10 ⁻⁶	1.95
D,L-1a-PtCl₂	82	>1 × 10 ⁻⁵	90	>1 × 10 ⁻⁵	—
D,L-1b-PtCl₂	30	3.3 × 10 ⁻⁶	87	>1 × 10 ⁻⁵	2.65
meso-2a-PtCl₂	72	>1 × 10 ⁻⁵	75	1.0 × 10 ⁻⁵	2.4
meso-2b-PtCl₂	36	3.2 × 10 ⁻⁶	46	4.0 × 10 ⁻⁶	2.4
meso-3a-PtCl₂	29	1.9 × 10 ⁻⁶	46	4.0 × 10 ⁻⁶	2.1
meso-3b-PtCl₂	12	0.9 × 10 ⁻⁶	21	1.5 × 10 ⁻⁶	2.15
meso-4a-PtCl₂	44	2.7 × 10 ⁻⁶	40	3.4 × 10 ⁻⁶	2.3
meso-4b-PtCl₂	22	2.6 × 10 ⁻⁶	21	2.1 × 10 ⁻⁶	2.0
meso-5a-PtCl₂	36	3.2 × 10 ⁻⁶	61	4.3 × 10 ⁻⁶	2.0
meso-5b-PtCl₂	13	1.2 × 10 ⁻⁶	43	4.3 × 10 ⁻⁶	1.95
meso-6a-PtCl₂	47	3.5 × 10 ⁻⁶	52	4.4 × 10 ⁻⁶	1.7
meso-6b-PtCl₂	21	2.1 × 10 ⁻⁶	22	1.0 × 10 ⁻⁶	1.75
meso-7a-PtCl₂	62	7.1 × 10 ⁻⁶	64	6.5 × 10 ⁻⁶	1.7
cis-Pt	17	3.2 × 10 ⁻⁷	26	2.4 × 10 ⁻⁷	3.3

a) $Q = \Delta E_{max}/\Delta E_{295}$ bei einem $[Pt]/[P]$ -Verhältnis von 0.2 bis 0.35 im Inkubationsansatz; Mittelwert aus 2 Tests.

b) ED₅₀ = diejenige Konzentration, bei der die Zellzahl bzw. der [³H]Thymidineinbau im Vergleich zur Kontrolle um 50 % vermindert ist.

Tab. 4: Antitumoraktivität der o-substituierten [1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe **1b-PtCl₂** bis **7b-PtCl₂** und ihrer Methylether **1a-PtCl₂** bis **7a-PtCl₂** an der lymphocytischen Leukämie P 388 der CDF₁-Maus

Verbindung	Dosis ^{a)} (mg/kg/Tag)	T-C ^{b)} (g)	mediane Überlebens- zeit (d)	Spanne (d)	T/C, %	T/C, % der Hydroxy- derivate (b)
meso-1a-PtCl₂ (CH ₃)	12.5	0.4	10.5	9-12	95	136 ^{c)}
	25	1.5	10.5	8-12	95	145 ^{c)}
	50	0.8	11.5	10-14	105	164 ^{c)}
D,L-1a-PtCl₂ (CH ₃)	12.5	1.7	13.5	9-14	123	114
	25	1.7	13	12-15	118	123
	50	1.7	15	11-16	136 ^{c)}	123
meso-2a-PtCl₂ (CF ₃)	12.5	1.0	12.5	11-14	125 ^{c)}	144 ^{c)}
	25	1.6	13	11-14	130 ^{c)}	150 ^{c)}
	50	0.9	14	14	140 ^{c)}	172 ^{c)}
meso-3a-PtCl₂ (F)	12.5	0.3	13	12-13	118	160 ^{c)}
	25	0.9	14	12-16	127 ^{c)}	170 ^{c)}
	50	1.2	15	14-15	136 ^{c)}	175 ^{c)}
meso-4a-PtCl₂ (Cl)	12.5	1.1	11	9-13	100	132 ^{c)}
	25	0.8	11	10-12	100	132 ^{c)}
	50	0.7	11.5	9-13	105	145 ^{c)}
meso-5a-PtCl₂ (Br)	12.5	1.8	12	10-14	109	145 ^{c)}
	25	2.1	11.5	7-14	105	150 ^{c)}
	50	2.1	14.5	13-15	132 ^{c)}	155 ^{c)}
meso-6a-PtCl₂ (I)	12.5	1.1	10.5	10-12	95	136 ^{c)}
	25	1.2	12.5	8-15	114	136 ^{c)}
	50	1.7	12.5	11-14	114	164 ^{c)}
meso-7a-PtCl₂ (OCH ₃)	12.5	0.0	10	9-11	91	nicht synthetisiert
	25	0.4	11	9-13	100	
	50	0.3	10.5	9-11	95	
cis-Pt	4	1.5	21	17-26	213 ^{c)}	

a) Alle Komplexe wurden ip als Suspensionen in Olivenöl an den Tagen 1, 5 und 9 appliziert.

b) T = Körpergewichtsdifferenz (Tag 1–Tag 5) der behandelten Tiere; C = Körpergewichtsdifferenz (Tag 1–Tag 5) der Kontrolltiere.

c) Aktiv (T/C > 125 %).

Als geeignetes in vivo-Modell wählten wir die lymphocytische Leukämie P 388 der Maus, von der bekannt ist, daß sie sehr sensitiv gegenüber Platinkomplexen ist. Dieses Tumormodell wird von vielen Forschungsinstituten als Routineeingangstest für Zytostatika verwendet. Die Ergebnisse mit **1a-PtCl₂** bis **7a-PtCl₂** und **1b-PtCl₂** bis **7b-PtCl₂** in diesen Tests sind in Tab. 4 wiedergegeben. **Meso-1a-PtCl₂** und **meso-7a-PtCl₂** zeigen in Übereinstimmung mit den schwachen Hemmwirkungen an der MDA-MB 231 Zelllinie keine Aktivität an diesem Tumormodell. Überraschend ist das Ergebnis mit dem Komplex **D,L-1a-PtCl₂**, der in der höchsten Dosis (50 mg/kg) eine signifikante Hemmung (% T/C = 136) hervorruft. Da UV-spektrophotometrisch keine Bindung an die DNA und in vitro keine cytotoxische Wirkung feststellbar ist, muß ein aktiver Metabolit als Wirkursache angenommen werden. **1b-PtCl₂**, vermutlich ein Hauptmetabolit von **1a-PtCl₂**, zeigt an der MDA-MB 231 Brustkrebszelllinie ausgeprägte cytotoxische Eigenschaften und im UV-Differenzspektroskopie-Test eine Bindung an Basenbausteine der DNA. Innerhalb der in o-Stellung halogenierten Verbindungen ergeben sich interessante Wirkungsunterschiede. Während die Cl- und I-substituierten Komplexe **meso-4a-PtCl₂** und **meso-6a-PtCl₂** über den gesamten Dosisbereich inaktiv sind, erreicht die o-Br-Verbindung **meso-5a-PtCl₂** erst in der 50 mg Dosierung einen % T/C-Wert von

132. Die beiden o-CF₃- und o-F-substituierten Komplexe **meso-2a-PtCl₂** und **meso-3a-PtCl₂** zeigen eine dosisabhängige Antitumorwirkung, die aber deutlich unter der des Cisplatin liegt. Bei den letztgenannten Verbindungen sind die verhältnismäßig niedrigen T-C-Werte interessant, die auf eine geringe Toxizität schließen lassen.

Mit Hilfe des Leukämie P 388-Testmodells kann deutlicher als im in vitro-Test an der MDA-MB 231-Zelllinie gezeigt werden, daß (mit Ausnahme von **D,L-1b-PtCl₂**) 4-OH-substituierte Platinkomplexe stärker tumorhemmend als ihre 4-CH₃-O-substituierten Analoga sind. Die erstgenannten Verbindungen besitzen sogar in der niedrigsten Dosierung von 12.5 mg/kg Körpergewicht signifikante Hemmeffekte. Aus den Versuchen geht weiterhin hervor, daß o-ständige Substituenten in beiden Benzolringen einen großen Einfluß auf die Antitumoraktivität ausüben. Dies wird durch die Tatsache verdeutlicht, daß sowohl bei den 4-hydroxy- als auch bei den 4-methoxy-substituierten Platinkomplexen diejenigen mit F- und CF₃-Substituenten in 2-Positionen die jeweils aktivsten sind.

Eine Korrelation zwischen den Ergebnissen, die im in vitro-Test an der MDA-MB 231 Mammatumorzelllinie und im in vivo-Test an der P 388 Leukämie erzielt wurden, war nicht feststellbar. Während **meso-2a-PtCl₂** sich im in vivo-Versuch als einer der aktivsten Komplexe erwies, war er im in vitro-

Experiment fast völlig inaktiv. Umgekehrt verhält sich der o-Cl-substituierte Komplex **meso-4a-PtCl₂**. Dieser, an der MDA-MB 231 Brustkrebszelllinie stark cytotoxische Komplex, zeigte an der Leukämie P 388 keine tumorhemmenden Eigenschaften.

Das Fehlen einer Korrelation zwischen in vitro- und in vivo-Befunden ist erstaunlich, da wir bei Dichloro(1,2-diphenylethylendiamin)platin(II)-Komplexen mit variablen Substituenten in p-Position eine gleiche Wirkungsabstufung an beiden Tumormodellen feststellen konnten¹³. Vermutlich ist die außerordentlich geringe Wasserlöslichkeit der neuen Komplexe für dieses abweichende Verhalten verantwortlich. Zur Klärung dieser Frage sind Untersuchungen mit wasserlöslichen Diaqual(1,2-diphenylethylendiamin)platin(II)sulfaten geplant.

Experimenteller Teil

Schmp.: Büchi 10-Schmelzpunktapparat, nicht korr. – ¹H-NMR-Spektren: PFT-NMR-Spektrometer WM 250 der Bruker Analytischen Meßtechnik GmbH (250 MHz). – *Elementaranalysen*: Mikroanal. Labor Universität Regensburg.

Die Synthese der Liganden **1a–6a** wurde bereits beschrieben⁴.

Orthosubstituierte [1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexe **1a-PtCl₂–7a-PtCl₂**

1 mmol o-substituiertes 1,2-Bis(4-methoxyphenyl)ethylendiamin wurde unter Erhitzen auf 40–50 °C in einem Gemisch aus 20 ml H₂O, 2 ml 2N HCl und 20 ml t-BuOH gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird mit 0.5 N NaOH auf 6.0 eingestellt, und 415 mg (1 mmol) K₂PtCl₄ gelöst in 5 ml H₂O werden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird so lange bei 40–50 °C unter Lichtausschluß gerührt, bis keine Änderung des pH-Wertes mehr erfolgt. Er wird durch Zugabe von 0.5 N NaOH laufend auf 6 eingestellt. Dann wird der Niederschlag abgesaugt, zuerst mit 2N HCl und dann mit H₂O gewaschen und über P₂O₅ i. Vak. getrocknet.

Meso-1,2-Bis(2,4-dimethoxyphenyl)ethylendiamin (**7a**)

18.7 g (77 mmol) meso-1,2-Bis(2-hydroxyphenyl)ethylendiamin¹² werden mit 25.5 g (153 mmol) 2,4-Dimethoxybenzaldehyd (Janssen Chimica) in Acetonitril unter Rückfluß erhitzt. Die Suspension wird ständig mit einem KPG-Rührer gerührt und so lange zum Sieden erhitzt, bis sich einheitliche, gelbe Kuben bilden (ca. 4–5 h). Nach Abdestillieren der Hälfte des Lösungsmittels und Abkühlen auf RT wird das gebildete N,N'-Disalicyliden-meso-1,2-bis(2,4-dimethoxyphenyl)ethylendiamin abgesaugt, mit wenig Acetonitril gewaschen und im Exsikkator über P₂O₅ getrocknet. Gelbe Kuben, Schmp. 167–168 °C; Ausb. 76 % d. Th. – ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 3.68 (s; 6H, OCH₃), 3.72 (s; 6H, OCH₃), 5.24 (s; 2H, CH), 6.30–7.32 (m; 14H, H arom.), 8.12 (s; 2H, CH=N).

30 g (56 mmol) N,N'-Disalicyliden-meso-1,2-bis(2,4-dimethoxyphenyl)ethylendiamin werden in 200 ml 3N H₂SO₄ suspendiert und auf etwa 80 °C erwärmt. Der bei der Hydrolyse frei werdende Salicylaldehyd wird mittels Wasserdampfdestillation aus der Reaktionsmischung entfernt. Ist im Destillat kein Aldehyd mehr nachzuweisen, wird die Reaktionslösung heiß filtriert und nach Abkühlen vorsichtig mit 20 %iger NaOH-Lösung auf pH 12 eingestellt. Der Niederschlag wird mit CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten Extrakte werden mit H₂O gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird soweit eingeeengt, bis das Produkt auszukristallisieren beginnt. Man gibt etwa 100 ml Ether hinzu und läßt im Eisfach kristallisieren. Das Ethylendiamin **7a** wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und aus CHCl₃/Ether umkristallisiert. Farblose Blättchen,

Schmp. 118–119 °C; Ausb. 60 % d. Th. – ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1.47 (s; 4H, NH₂), 3.73 (s; 6H, OCH₃), 3.78 (s; 6H, OCH₃), 4.35 (s; 2H, CH), 6.40–6.50 (m; 4H, H arom.), 7.19 (d, ³J = 8Hz; 2H, H arom.). – C₁₈H₂₄N₂O₄ (332.3) Ber. C 65.1 H 7.28 N 8.4 Gef. C 64.9 H 7.23 N 8.4.

UV-Differenzspektroskopie

Kalbsthymus-DNA Typ I (Sigma) wird bei 4 °C in 0.01 N NaClO₄-Lösung gelöst. Die Konzentration der DNA-Lösung soll zwischen 1 × 10⁻⁴ und 5 × 10⁻⁵ molar, bezogen auf Phosphor, liegen (Phosphorgehalt der Kalbsthymus-DNA: 8.77 %). Die genaue Konzentration der DNA-Lösung wird spektrophotometrisch bei 260 nm (ε = 6600⁹) bestimmt. Die Platinkomplexe werden zu Versuchsbeginn in DMF gelöst, und ihre Endkonzentration wird als das molare Verhältnis zwischen Platin und Phosphor im Inkubationssatz angegeben. Die Pt/P-Werte der einzelnen Tests sollten im Bereich zwischen 0.2 und 0.3 liegen. Folgende Inkubationsansätze werden in Reagenzgläser mit Schraubverschluß pipettiert:

- | | |
|------------------------------------|----------------------------|
| 1. 10 ml DNA-Lösung | + 20 µl Testsubstanzlösung |
| 2. 10 ml 0.01 N NaClO ₄ | + 20 µl DMF |
| 3. 10 ml DNA-Lösung | + 20 µl DMF |
| 4. 10 ml 0.01 N NaClO ₄ | + 20 µl Testsubstanzlösung |

Die Reagenzgläser werden 4 d im Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die Aufnahme der Differenzspektren (Uvikon Photometer, Tandemquarzküvette (Hellma)). In der Meßküvette wird die vordere Kammer mit Lösung 1 und die hintere Kammer mit Lösung 2 gefüllt, die Referenzküvette enthält entsprechend Lösungen 3 und 4. Zur Auswertung wird aus den Spektren die Extinktion im Maximum und bei 295 nm ermittelt und der Quotient $Q = \Delta E_{\max} / \Delta E_{295}$ gebildet.

Testung an der hormonunabhängigen, menschlichen Mammatumorzelllinie MDA-MB 231⁴⁾

MDA-MB 231-Zellen (Dr. M. E. Lippman, NCI, Bethesda, Md. USA) werden in McCoy 5a-Medium (Boehringer Mannheim), das 10 % NCS (newborn calf serum, Gibco, Glasgow Scotland), Gentamycin (40 µg/ml) und NaHCO₃ (11 g/5 l; pH = 7.35) enthält, bei 37 °C (5 % CO₂, H₂O gesättigt) gezüchtet. In der logarithmischen Wachstumsphase werden die Zellen mit 2 ml 0.05 % Trypsin-0.02 % EDTA in 0.15 M NaCl vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. 2 × 10⁴ Zellen werden in 2 ml 5 % NCS-haltigem Medium 2 d lang bebrütet, dann wird das Medium gewechselt und der Platinkomplex als 1000-fach konzentrierte Stammlösung in DMF zugegeben (2 µl). Die wirkstofffreie Kontrolle enthält die gleiche DMF-Konzentration (0.1 %). 2 h vor Ende der 2 d dauernden Inkubation werden 1 µCi [³H]-Thymidin (New England Nuclear, Boston, Mass. USA) einpipettiert. Durch Absaugen des Mediums und zweimaliges Waschen mit eiskalter PBS-Lösung^{*)} wird der [³H]-Thymidin-Einbau gestoppt. Die Zellen werden durch 5-minütige Inkubation bei 4 °C mit 2 ml PBS-EDTA (0.02 %) -Lösung abgelöst und in Zentrifugengläser überführt. Das Kulturgefäß wird mit 2 ml PBS-EDTA-Lösung nachgewaschen. Die Zellen werden bei 2500 × g abzentrifugiert, und 2mal mit je 2 ml PBS-Lösung gewaschen.

*) Phosphate Buffered Saline

Das Zellpellet wird in 1 ml PBS-Lösung aufgenommen und kurze Zeit im Ultraschallbad homogenisiert. Davon werden 0.5 ml in 10 ml PBS-Lösung gegeben, und die Zellzahl wird im Z1-Coulter Counter bestimmt. Die andere Hälfte der Zellsuspension wird mit 0.5 ml H₂O versetzt, und die Zellen werden mit einem Ultraschallstab (Branson cell disruptor B 15) zerstört.

Durch Zugabe von 4 ml 10 proz. Trichloressigsäure fällt man die säureunlösliche Fraktion und saugt sie nach mehrstündigem Stehen ab (0.45 µm Membranfilter, Metrical Gelman). Die Filter werden mit 10 ml Szintillator (Quickszint 212, Zinsser) versetzt, und nach 2 h wird die Radioaktivität im Szintillationszähler (LS 8000 Beckman) gemessen.

Testung an der lymphocytischen Leukämie P 388

Dieser Tumorstamm wird auf weiblichen DBA/2-Mäusen (Ivanovas Kissleg) in Ascitesform gehalten. Die Testung der Substanzen erfolgt an weiblichen CDF₁-Mäusen (Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover) mit einem Körpergewicht von 17–21 g und einem Alter von 6–10 Wochen. Eine tumortragende DBA/2-Maus wird getötet und unter sterilen Bedingungen der milchig-trübe Ascites entnommen. Dieser wird mit steriltfiltrierter, eiskalter PBS-Lösung auf eine Zellzahl von $1 \times 10^6/0.1$ ml Injektionsvolumen verdünnt und den CDF₂-Mäusen ip appliziert (Tag 0). Anschließend werden die Tiere in Gruppen zu je 6 randomisiert und an den Tagen 1, 5 und 9 die Testsubstanzen, nach Körpergewicht dosiert und in Olivenöl suspendiert, ip verabreicht. Als positive Kontrollsubstanz dient Cisplatin; die Kontrolltiere erhalten Olivenöl. Zur Bestimmung der Antitumoraktivität wird die mediane Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrolle ermittelt.

Literatur

- 1 B. Wappes, M. Jennerwein, E. v. Angerer, J. Engel, H. Schönenberger, H. Brunner, M. Schmidt, M. Berger, D. Schmähl und S. Seeber, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **107**, 15 (1984).
- 2 B. Wappes, M. Jennerwein, E. v. Angerer, H. Schönenberger, J. Engel, M. Berger und K.-H. Wrobel, *J. Med. Chem.* **27**, 1280 (1984).
- 3 J. Karl, Dissertation Universität Regensburg (1985).
- 4 J. Karl, R. Gust, Th. Spruß, M. R. Schneider, H. Schönenberger, J. Engel, K.-H. Wrobel, F. Lux and S. Trebert-Haerberlin, *J. Med. Chem.* **31**, 72 (1988).
- 5 M. Jennerwein, Dissertation Universität Regensburg (1985).
- 6 S. Mylonas, A. Valavanidis, V. Voukouvalidis und M. Polyssiou, *Inorg. Chem.* **17**, 2520 (1978).
- 7 H. E. Harder und B. Rosenberg, *Int. J. Cancer* **6**, 207 (1970).
- 8 J. A. Howle und G. R. Gale, *Biochem. Pharmacol.* **19**, 2757 (1970).
- 9 A. L. Pinto und S. J. Lippard, *Biochem. Biophys. Acta* **780**, 167 (1985).
- 10 K. Inagaki, Y. Kidani, K. Suzuki und T. Tashiro, *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 2286 (1980).
- 11 K. Inagaki und Y. Kidani, *Inorg. Chem. Acta* **46**, 35 (1980).
- 12 F. Vögtle und E. Goldschmitt, *Chem. Ber.* **109**, 1 (1976).
- 13 M. Jennerwein, B. Wappes, R. Gust, H. Schönenberger, J. Engel, S. Seeber and R. Osieka, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, eingereicht. [Ph 444]