



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Perspectives in Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/permed



EINGELADENER ÜBERSICHTSARTIKEL

Anwendung der Platinspeziation zum Nachweis einer Aktivierung oder Inhibierung von Pt enthaltenden Krebsmedikamenten[☆]



Bernhard Michalke*

Helmholtz-Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Abteilung Analytische BioGeoChemie, Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, Deutschland

Eingegangen am 3. August 2009; angenommen am 11. Januar 2010

SCHLÜSSELWÖRTER

Platinspeziation;
Krebsmedikamente;
Cisplatin;
Carboplatin;
Oxaliplatin

Zusammenfassung Dieser Artikel gibt einen Überblick über die Platinspeziation im Hinblick auf Pt-haltige Medikamente, die zur Krebstherapie eingesetzt werden. Zunächst werden die verfügbaren Medikamente auf Platin-Basis vorgestellt und ihr vermuteter Reaktionsmechanismus wird beschrieben. Inzwischen ist allgemein akzeptiert, dass diese Pt-Komplexe ihre therapeutische Wirkung durch koordinative Bindung an die DNA entfalten, was zur Biegung der DNA-Struktur und zur Inhibierung der DNA-Polymerasereaktion führt. Dosislimitierende Nebenwirkungen, wie z. B. Nephrotoxizität und Resistenz gegenüber einigen dieser Pt-Verbindungen, stellen jedoch immer noch ein erhebliches Problem dar. Die Platinspeziation rückte immer mehr in das Zentrum des Interesses, als bekannt wurde, dass (1) die aktiven Wirkstoffen nicht die ursprünglich verabreichten Medikamente selbst, sondern deren Hydrolyseprodukte sind und dass (2) die gleichzeitige Bildung inaktiver Pt-Proteinkomplexe, die die Wirksamkeit der antitumoralen Pt-Medikamente zusätzlich reduzieren, mit der Bildung der zytotoxischen Pt-DNA-Läsionen konkurrieren. Es wurden auf Chromatographie oder Kapillarelektrophorese beruhende Methoden der Speziationsanalyse eingesetzt und jeweils in Kombination mit Massenspektrometrie (MS) mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP) oder mit Elektrospray-Ionisation-(ESI-)Massenspektrometrie angewendet.

Im Artikel werden diese Pt-Speziationsexperimente beschrieben, die mit Untersuchungen zur Hydrolysekinetik in wässriger Lösung ihren Anfang nahmen. Auf diese Experimente folgten Speziationsuntersuchungen in Modelllösungen, die Proteine oder schwefelhaltige Liganden enthielten, welche ebenfalls für die Deaktivierung des Pt-Wirkstoffs in vivo verantwortlich sein könnten. Die Experimente führten zu einem besseren Verständnis der metabolischen

DOI von Original Artikel: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.01.006>.

[☆] Dieser Artikel wurde in Englisch als Invited Review im Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 24 (2010) 69–77 publiziert. Aus dem Englischen von: Cornelia Schmutzler. E-Mail-Adresse: CABSchmutzler@aol.com. Deutsche Version online verfügbar seit: 20. November 2013.

* Tel.: +49 89 3187 4206; fax: +49 89 3187 3348.

E-Mail-Adresse: bernhard.michalke@helmholtz-muenchen.de

Form, in der der Metallkomplex in die Tumorzellen gelangt. Außerdem wurde mit ihnen geklärt, ob der metabolisierte Komplex zu diesem Zeitpunkt schon inaktiviert ist und, wenn ja, auf welche Weise. Beispielsweise wurde die Kinetik der Reaktion von Cisplatin (*cis*-[Diammindichloroplatin(II)]) mit Albumin, Transferrin, Myoglobin, Ubiquitin und Metallothionein untersucht und die Reaktionsprodukte wurden speziiert.

Darüber hinaus führten verschiedene Forschungsgruppen Pt-Speziationsuntersuchungen im Serum behandelter Krebspatienten durch, die im Abschnitt „Untersuchungen in Serum oder Plasma“ dargestellt sind.

Der Abschnitt „Untersuchungen im Urin behandelter Krebspatienten“ befasst sich mit Speziationsexperimenten an denjenigen Metaboliten der Pt-Komplexe, die vom Organismus ausgeschieden werden. Auf diese Weise könnte sich eine Beurteilung des *in-vivo*-Metabolismus Pt-haltiger Medikamente durchführen lassen. Schließlich werden im letzten Abschnitt des Artikels analytische Techniken beschrieben, die für die Entwicklung neuer metallhaltiger Krebsmedikamente erforderlich sind.

© 2014 Published by Elsevier GmbH.

Inhalt

Einleitung: Pt-haltige Medikamente und Wirkmechanismus	80
Speziationsuntersuchungen	82
Speziation von Hydrolysaten: Untersuchungen in wässriger Lösung	82
Untersuchungen in Modelllösungen, die Proteine und/oder andere schwefelhaltige Liganden enthalten	83
Interaktionen mit Proteinen	83
Interaktionen mit kleinen Liganden	84
Interaktionen mit Nukleotiden	85
Untersuchungen in Serum oder Plasma	85
Untersuchungen im Urin behandelter Krebspatienten	87
Untersuchungen an neuen Pt-haltigen Medikamenten	87
Schlussfolgerungen	87
Offenlegung von Interessenkonflikten	88
Danksagung	88

Einleitung: Pt-haltige Medikamente und Wirkmechanismus

Forschungsarbeiten über Platin waren hauptsächlich durch seine Verwendung in Arzneimitteln und seine Emission in die Umwelt motiviert. Historisch gesehen wurde die Platinspeziation anfangs wegen der Akkumulation des Edelmetalls in der Umwelt durchgeführt, insbesondere nach Einführung von Katalysatoren auf Pt-Basis für Kraftfahrzeuge. Jedoch wurde die Pt-Speziation bald auf biologische und klinische Fragestellungen ausgedehnt, da Pt Allergien auslösen kann und weil es - seine interessanteste Eigenschaft - das Schlüsselmetall in vielen Krebsmedikamenten ist. Seine pharmakologische Anwendung bei der Krebstherapie, seine Wirkungskinetik *in vivo* und sein Vorliegen im Abwasser von Kliniken veranlasste die Speziation von Pt insbesondere im Hinblick auf den Grad der Aktivierung und Inaktivierung von Pt-Verbindungen während der Krebstherapie. Hauptsächlich diese pharmakologischen Aspekte der Pt-Speziation werden in diesem Artikel besprochen.

Der Antitumor-Mechanismus von Platin: Bei verschiedenen Tumorarten kann die Mortalitätsrate durch die Anwendung hochaktiver Medikamente, die häufig Metallatome enthalten, dramatisch gesenkt werden. Dies gilt insbesondere für Medikamente auf Platin-Basis, die bei der Behandlung einer Vielzahl von Malignomen zu den effektivsten Wirkstoffen gehören. In den 1960er Jahren entdeckte Roberts, dass Pt-Komplexe die Zellteilung

inhibieren, ein Befund, der für die Krebstherapie von höchster Bedeutung war und 1965 von Rosenberg et al. erstmals publiziert wurde [1]. Inzwischen wurde für eine Reihe von Pt-haltigen Verbindungen gezeigt, dass sie antitumorale Aktivität oder in dieser Hinsicht zumindest vielversprechende Eigenschaften aufweisen. Einige davon, z. B. Cisplatin und Carboplatin ($\{(SP-4-2)\text{-Diammin}[1,1\text{-cyclobutandi(-carboxylato-}\kappa O\text{)-(2-)}]\text{platin(II)}\}$), werden zur Chemotherapie von Hoden-, Ovarial-, Kopf-, Hals-, Blasen- und Lungenkarzinomen eingesetzt. Cisplatin war das erste Pt-haltige Medikament, das bei der Krebsbehandlung angewendet wurde, und kann als die Stammverbindung dieser Klasse von Antitumor-Wirkstoffen gelten [2].

In den letzten drei Jahrzehnten wurden vielerlei Anstrengungen im Hinblick auf die Synthese und die Erprobung der tumorinhibierenden Eigenschaften neuer Metallkomplexe unternommen, die u. a. Pt, Ru oder Pd enthalten, mit dem Hauptziel, neue Krebsmedikamente zu entwickeln. Von diesen erhofft man sich bessere Wirksamkeit, höhere Selektivität für Tumorgewebe, geringere Toxizität, ein breiteres Aktivitätsspektrum, weniger Resistenzentwicklung durch die Tumorzellen und günstigere pharmakologische Eigenschaften (z. B. die Möglichkeit der oralen Einnahme) im Vergleich zu Cisplatin. Jedoch wurde bisher von Tausenden getesteter metallhaltiger Verbindungen nur ein geringer Teil, etwa 30, in klinischen Studien geprüft, und nur wenige der Pt-haltigen Wirkstoffe sind weltweit zugelassen worden [3,4]. Beispielsweise ist für Cisplatin

und Carboplatin gleichermaßen bekannt, dass die *cis*-Diamminplatin(II)-Spezies zytotoxische Aktivität aufweisen, die *trans*-Diamminplatin(II)-Spezies dagegen nicht. Der Unterschied zwischen den beiden Isomeren hinsichtlich der Antitumor-Aktivität wird der Tatsache zugeschrieben, dass das *trans*-Isomer aufgrund des 180°-Winkels zwischen seinen semi-labilen Chlorid- bzw. Carboxylat-Liganden keine 1,2-GpG-Intrastrangvernetzungen ausbilden kann [5]. Weiterführende Untersuchungen konzentrierten sich auf Oxaliplatin {(SP-4-2)-[(1R,2R)Cyclohexandiamin- κ^2N,N'][(ethandioato(2-)- κ^2O^1,O^2]-platin(II))}, das in Frankreich zur Behandlung von Kolorektalkarzinomen zugelassen ist. Bei Tests an Cisplatin-resistenten Tumoren wies Oxaliplatin keine Kreuzresistenz mit Cisplatin auf und zeigte auch nur geringe Nephrotoxizität.

Derzeit werden drei intravenös zu verabreichende Pt(II)-Komplexe, Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin, weltweit in der klinischen Praxis eingesetzt [6]. Abgesehen von diesen drei Medikamenten haben Nedaplatin {(SP-4-3)-diammin[(hydroxyl- κO)acetat(2-)- κO]platin(II)}, Lobaplatin {(SP-4-3)-[(1R,2R)-1,2-cyclobutandimethanamin- $\kappa N,\kappa N'$][(2S)-2-(hydroxy- κO)propanoato(2-) κO]platin} und Heptaplatin {(SP-4-2)-[(4R,5R)-2-(1-methylethyl)-1,2-dioxolan-4,5-dimethanamin- $\kappa N^4,\kappa N^5$][propandioato(2-)- $\kappa O^1,\kappa O^3$]platin} ausschließlich lokal begrenzte Anwendung als Krebsmedikamente in Japan, China bzw. Südkorea gefunden [4,7–9]. Weiterhin werden etwa 10 Platinverbindungen in klinischen Studien getestet, darunter der oral zu verabreichende Pt(IV)-komplex Satraplatin {(OC-6-43)-bis(acetato- κO)ammindichloro(cyclohexanamin- κN)platin(IV),JM216}[7,10]. In Abb. 1 ist die chemische Struktur von vier wichtigen Pt-haltigen Medikamenten dargestellt.

Roberts und Pascoe haben als erste die Interaktion zwischen Pt und DNA nachgewiesen - inzwischen das allgemein akzeptierte Konzept für die therapeutische Wirkung nicht nur von Cisplatin sondern auch von allen anderen der oben erwähnten Metallkomplexe. Diese Pt-Spezies gehen eine koordinative Bindung mit der DNA ein, was zu einer Biegung der DNA-Struktur um 30° bis 40° führt [11–13]. Schließlich wird, als Konsequenz der Inhibierung der DNA-Polymerasereaktion [14], Apoptose bzw. Nekrose in der Krebszelle induziert [15]. Die Addukte aus Platin und DNA oder (Oligo-)Nukleotiden sind ausführlich charakterisiert worden [4,10,16–18]. Als bevorzugtes Ziel in der DNA wurden die Guanin-Reste identifiziert, mit denen die meisten Intrastrang-Addukte zwischen den Pt-Komplexen und der DNA ausgebildet werden. Unglücklicherweise sind alle diese Pt-haltigen Medikamente jeweils nur gegen eine begrenzte Anzahl von Tumorarten chemotherapeutisch wirksam und die Behandlung selbst ist von erheblichen Nebenwirkungen begleitet. Zu diesen dosislimitierenden Nebenwirkungen gehört auch Nephrotoxizität, die zwar in Pt-basierten Medikamenten der zweiten Generation wie Carboplatin reduziert ist, jedoch immer noch ein großes Problem bei der Krebstherapie darstellt. Schließlich verhindert auch die von den Krebszellen entwickelte Resistenz gegen Cisplatin und verwandte Verbindungen eine wirksame Behandlung bestimmter Arten von Neoplasien.

Die Effizienz, mit der Pt-haltige Medikamente eine koordinative Bindung an die DNA eingehen, ist von zweierlei abhängig: einerseits von der Bildung des tatsächlich aktiven Hydrolyseprodukts und andererseits davon, ob es durch Bindung an Serumproteine oder schwefelhaltige Aminosäuren oder Peptide inaktiviert wird. Die genaue Rolle, die Pt-Proteinkomplexe bei der Aktivität der Medikamente spielen,

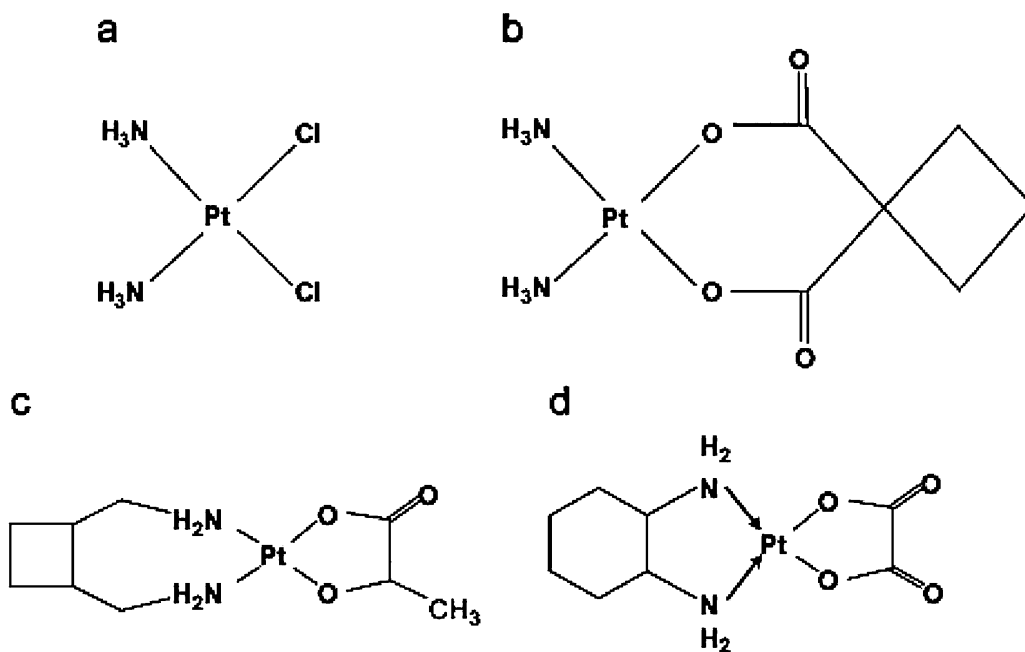


Abb. 1 Die chemischen Strukturen von Cisplatin (a), Carboplatin (b), Lobaplatin (c) und Oxaliplatin (d). Aus Timerbaev et al. [25], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

muss jedoch noch geklärt werden. In einigen Publikationen wurde vorgeschlagen, dass Cisplatin-bindende Proteine die Ursache für viele der Nebenwirkungen des Medikaments sein könnten [19]. Inzwischen ist klar, dass die Bildung von Pt-Proteinkomplexen, die effektiv mit der Bildung der zytotoxischen Pt-DNA-Läsionen kompetiert, die Wirksamkeit von Pt-haltigen Krebsmedikamenten reduzieren kann und dass der Pt-Proteinkomplex keine signifikante Antitumor-Aktivität aufweist [5].

Da der Abbau der Pt-haltigen Medikamente zu den aktiven Hydrolysaten erster Ordnung zeitabhängig ist, richtet sich die Reaktivität der Medikamente nach der Hydrolysekinetik. Diese Hydrolysekinetik wiederum wird negativ beeinflusst durch parallel ablaufende Inaktivierungsreaktionen, die durch die Bindung des Pt-Medikaments an Serumproteine und -peptide, zumeist über Schwefelgruppen, ausgelöst werden.

Daher muss Interaktionen des metallhaltigen Medikaments mit makromolekularen Komponenten des Blutes besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Solche Makromoleküle können anschließend vom Tumorgewebe aufgenommen werden und darin akkumulieren. In diesem Zusammenhang stellt die Bindung an Serumproteine einen wichtigen Aspekt dar, wenn diese Proteine, also z. B. Albumin oder Transferrin, eine Funktion beim Pt-Transport haben könnten. Solche Interaktionen bestimmen auch die Gesamtverteilung und Exkretion des Medikaments sowie Unterschiede bei Wirksamkeit, Aktivität und Toxizität [20].

Folglich war es das Ziel der Forscher, den Wirkmechanismus von Pt-haltigen Medikamenten aufzudecken, indem sie deren Speziation nach Aktivierung durch Hydrolyse oder nach Inhibierung durch Serumproteine untersuchten. Die eingesetzten Methoden der Speziationsanalyse basierten auf Chromatographie oder Kapillarelektrophorese und wurden jeweils in Kombination mit Massenspektrometrie (MS) mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP) oder mit Elektrospray-Ionisierungs-(ESI)-Massenspektrometrie angewendet.

Die Arbeiten begannen mit der Untersuchung der Hydrolysekinetik der Pt-haltigen Medikamente in wässriger Lösung (Abschnitt „Speziation von Hydrolysaten: Untersuchungen in wässriger Lösung“), gefolgt von Experimenten zur Hydrolysekinetik in Modelllösungen, die Proteine und/oder schwefelhaltige Liganden enthielten (Abschnitt „Untersuchungen in Modelllösungen, die Proteine und/oder andere schwefelhaltige Liganden enthalten“). Von den letzteren Experimenten erwartete man sich weitere Informationen zu den komplexen Wechselwirkungen zwischen der Hydrolyse/Aktivierung und der Inaktivierung/Elimination der Pt-Medikamente aus dem reaktiven Pool. Unterstützende Untersuchungen wurden anschließend im Serum (Abschnitt „Untersuchungen in Serum oder Plasma“) und Urin (Abschnitt „Untersuchungen im Urin behandelter Krebspatienten“) von Patienten durchgeführt.

In Urinproben kann auch die zeitabhängige Pt-Speziation nach kompletter Metabolisierung und Exkretion untersucht werden. Darüber hinaus kann die Pt-Speziation zur Abschätzung von möglichen Risiken durch Krankenhausabwasser beitragen. Schließlich wurde dieselbe Analysestrategie auch bei der Entwicklung neuer Pt-Medikamente angewendet.

Speziationsuntersuchungen

Speziation von Hydrolysaten: Untersuchungen in wässriger Lösung

Hann et al. [21] setzten die HPLC-ICP-MS zur Speziation von Cisplatin und seinen Abbauprodukten in Wasser bei verschiedenen Chloridkonzentrationen ein. Diese Studie basierte auf dem Befund, dass die Kinetik des Cisplatinabbaus zu hydrolysierten, aktiven Formen langsam erfolgt und anscheinend von der Cl^- -Konzentration abhängig ist. In Anwesenheit von flüssigem Medium, das nur geringe Konzentrationen an Chlorid enthielt, bildeten sich sowohl der Monohydratkomplex $\text{cis-}[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ als auch der Dihydratkomplex $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$. Der Monohydratkomplex hat sich als die zytotoxischere Spezies von den beiden Cisplatin-Hydraten herausgestellt. Beide hydratisierten Spezies binden über Intra- und Interstrang-Crosslinks an den Guanosin-Rest der DNA [22].

Bei ihrer grundlegenden Arbeit wendeten Hann und Mitarbeiter zur exakten Quantifizierung die spezies-unspezifische Post-column-Isotopenverdünnungsanalyse in Verbindung mit ICP-MS zur Bestimmung der Isotopen ^{194}Pt und ^{196}Pt an [21]. Zur Beurteilung des kinetischen Profils wurden frisch hergestellte Cisplatin-Lösungen mit einer Konzentration von 2 mg/l (in 0, 50 und 100 mg/l Cl^-) sofort sowie anschließend 28 Stunden lang in regelmäßigen Abständen von 1,6 Stunden und zuletzt noch einmal nach 48 Stunden analysiert. Die Kinetik der Hydratation von Cisplatin wurde, unter der Annahme, dass die Chloridkonzentration in der 50-mg/l- und der 100-mg/l-Lösung konstant blieb, als pseudo-erster Ordnung angesehen. Bei diesen hohen Chloridkonzentrationen war die Bildung neuer, unbekannter Verbindungen ausgeschlossen, da die Summe der Konzentrationen von Cisplatin, Monoaqua-Cisplatin und Diaqua-Cisplatin während der Messungen stets konstant blieb [21].

Darüber hinaus waren die Autoren in der Lage, millimolare Mengen von Cisplatin in ausschließlich wässriger Lösung zu inkubieren und Chlorid in ihr kinetisches Modell zu integrieren. Diese Modellhydrolyse von Cisplatin und Monoaqua-Cisplatin konnte ebenfalls als Reaktion erster Ordnung behandelt werden, im Gegensatz zu den früheren Modellen mit Cisplatin in Lösungen hoher Chloridkonzentration nahm jedoch die Summe der Konzentrationen von Cisplatin, Monoaqua-Cisplatin und Diaqua-Cisplatin während der Reaktion ab, während die Summe unbekannter Pt-Spezies zunahm. Die errechneten Reaktionsgeschwindigkeiten betragen $1,79 \times 10^{-5}/\text{s}$, $1,68 \times 10^{-5}/\text{s}$ und $2,06 \times 10^{-5}/\text{s}$ bei einer Chloridkonzentration von 0, 50 bzw. 100 mg/l, jeweils für den ersten Aqueationsschritt. Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen wurden in das kinetische Modell eingeführt und am Computer wurden Ausgleichskurven berechnet. Dies ist in Abb. 2 dargestellt.

Es sollte angemerkt werden, dass der Versuchsaufbau offenbar zuverlässig funktionierte und anderen überlegen war, da bei dem System zur Auftrennung der Spezies Probleme vermieden worden waren, die andere Autoren mit organischen Elutionsmitteln wie Acetonitril beobachtet hatten (z. B. [23]).

Wenclawiak und Wollmann [24] präsentierten einen anderen analytischen Ansatz zur Auftrennung verschiedener

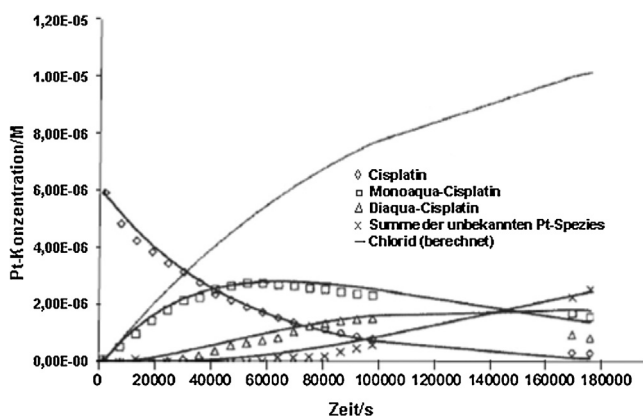


Abb. 2 Abbau von Cisplatin bei einer Chloridkonzentration von 0 mM. Die durchgezogenen Linien geben die Ausgleichskurven der Reaktionsgeschwindigkeiten an. Aus Hann et al. [21], mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Platin-Medikamente und ihrer Hydrolyseprodukte. Ihre Arbeit zielte auf die kinetische Messung der Stabilität von Pt-Komplexen in wässriger Lösung mithilfe der Kapillarelektrophorese. Die SDS-Konzentration und der pH-Wert des Hintergrundelektrolyten sowie die angelegte Spannung und die Probeninjektionsbedingungen wurden so optimiert, dass die Trennung von Cisplatin, $[cis\text{-Diammin-aquachloroplatin}]^+$ und $[cis\text{-Diammin-diaquaplatin}]^{2+}$ in einem Lauf durchgeführt werden konnte. Die Methode erlaubte die Untersuchung der Stabilität von Cisplatin in Wasser oder in Natriumchloridlösungen mit Konzentrationen von 100 mM oder 4 mM (der Konzentration im Blut bzw. Zytoplasma) durch Verfolgen der relativen Abnahme der Peak-Fläche des Medikaments [25]. Außerdem war der Abbau von Cisplatin von der Chloridkonzentration abhängig. Die kinetischen Kurven waren den von Hann et al. beschriebenen ähnlich [21].

Zhang et al., die sich auf die Aqutation zweier zweikerniger antitumoraler Pt-Komplexverbindungen in 15 mM Perchlorat-, Acetat- oder Phosphatlösungen konzentrierten, wandten bei ihrer Studie die NMR-Spektroskopie an [26]. Die Geschwindigkeitskonstante des ersten Aqationsschrittes war für $[{cis\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2}_2(\mu\text{-NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2)]^{2+}$ halb so groß wie für $[{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2}_2(\mu\text{-NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2)]^{2+}$, jedoch waren die Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- und die Rückreaktionen mit Acetat und Phosphat bei beiden Verbindungen recht ähnlich, so dass sich nur langsam, nämlich erst nach etwa 80-100 h Gleichgewichtsbedingungen einstellten.

Nygren et al. entwickelten eine neue Methode zur Pt-Speziation hydrophiler und hydrophober Verbindungen in einem einzigen Lauf, indem sie hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) mit ICP-Massenspektrometrie kombinierten [23]. Die Methoden erforderten weniger Lösungsmittel bei der ICP-MS, was die Sensitivität für den Analyten und die Robustheit des Verfahrens verbesserte. Die Methode bot eine wertvolle Alternative zur raschen Analyse freier und intakter Krebsmedikamente auf Platin-Basis. Dieser Erfolg motivierte Falta et al. [27], das Verfahren zur Quantifizierung von Platin-haltigen Medikamenten in gespickten Proben von Humanplasma einzusetzen.

Diese Experimente werden im Abschnitt „Untersuchungen in Serum oder Plasma“ beschrieben.

Untersuchungen in Modelllösungen, die Proteine und/oder andere schwefelhaltige Liganden enthalten

Interaktionen mit Proteinen

Einer der kritischsten Engpässe bei der Entwicklung neuer metallhaltiger Krebsmedikamente besteht in der Notwendigkeit genauerer Informationen über die metabolische Form, in der der Metallkomplex in die Tumorzellen gelangt oder darüber, ob dieser metabolisierte Komplex zu diesem Zeitpunkt schon inaktiviert ist und, wenn ja, auf welche Weise. Publizierten Daten zufolge [15] sind Pt-haltige Medikamente bereits kurz nach der Verabreichung zum größten Teil an extra- und intrazelluläre Proteine gebunden. Ein typischer Ansatz zur Untersuchung von Protein-Medikamenten-Interaktionen und ihrer jeweiligen Kinetik besteht in der Speziation ungebundener und gebundener Fraktionen des Pt-haltigen Medikaments mittels SEC [28–30]. Solche Untersuchungen werden v. a. unter Verwendung von Albumin als Interaktionspartner für Cisplatin durchgeführt, es wurden jedoch auch Experimente mit γ -Globulin oder sogar Cytochrom c beschrieben [6]. Ein gemeinsames Ergebnis verschiedener SEC-Studien ist die zweistufige Natur des Bindungsprozesses, wobei der erste Schritt schneller abläuft.

In einer Arbeit von Timerbaev et al. [31] wurde CE angewendet, um die Interaktionen von Cisplatin mit Albumin aus Humanserum (HSA) zu untersuchen. Sie fanden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit höher ist, wenn das molare Verhältnis Cisplatin/HSA erhöht wird. Die kinetische Kurve zeigte ein Maximum bei einem 20-fachen Überschuss von Cisplatin, wobei 10 Mol Platin pro Mol Protein gebunden waren. Dies zeigte eine starke Metall-Protein-Koordination an verschiedenen Bindungsstellen im HSA an und anscheinend nicht nur Bindung an einen Cystein-Rest des Proteins [31]. Auch die Kombination von CE und ICP-MS wurde verwendet, um die Kinetik der Cisplatin-Albumin-Reaktion zu messen und die Anzahl der an das Protein gebundenen Medikamentenmoleküle zu bestimmen [25]. Wenn das molare Verhältnis Medikament/Protein anstieg, stieg auch die Reaktionsgeschwindigkeit; das Maximum der kinetischen Kurve wurde bei einem 20-fachen Überschuss von Cisplatin bei etwa 50 h erreicht. Die Reaktion wurde als pseudo-erster Ordnung mit $k = 5,5 \times 10^{-5} / \text{s}$ charakterisiert. Dieses kinetische Verhalten wie auch die Beobachtung, dass ein größerer Teil des Pt gebunden war, widersprach früheren Ergebnissen, die anhand der Trennung der Pt-Spezies durch Größenausschlusschromatographie erhaltenen worden waren. Eine mögliche Erklärung könnte ein generelles Problem bei der Speziationsanalyse sein: die Stabilität des Komplexes (der Spezies) während der Trennung an stationären Phasen. Da nämlich bei der Kapillaronenelektrophorese (CZE) zur Trennung der Pt-Spezies deren unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld, entsprechend ihren unterschiedlichen m/z-Werten, genutzt werden anstatt der Interaktion mit der stationären Phase, gilt es als gesichert, dass die Stabilität der Spezies bei der CZE besser gewahrt bleibt als bei der Trennung durch

LC (z. B. SEC) [32]. Die abweichenden Ergebnisse der früheren, SEC-basierten Experimente wurden daher in dieser Publikation mit einem Verlust der Bindung während des Gelfiltrationsverfahrens erklärt, das zur Abtrennung des ungebundenen Platins verwendet worden war [30].

Die Gruppe um Sanz-Medel [15] verfolgte einen „Bottom-up“-Ansatz bei der Untersuchung der Interaktionen zwischen Pt-Medikamenten und Proteinen. HSA, Transferrin (TF) und Immunglobulin G (IgG) wurden mit Cisplatin in steigenden Konzentrationen inkubiert und dann mittels HPLC–ICP-MS analysiert. Die Autoren waren in der Lage, innerhalb von 40 min nicht gebundenes Cisplatin, Cisplatin-TF und Cisplatin-HSA nachzuweisen. Im Fall von TF wurden parallel auch die Schwefel- und Eisen-Peaks untersucht. HSA zeigte innerhalb von 24 h völlige Komplexbildung, da angenommen wurde, dass 80 % des Medikaments exkretiert oder anderswo gespeichert wurden. Die berechnete molekulare Stöchiometrie betrug Pt:HSA = 4:1. Transferrin bildete ebenfalls Komplexe mit Pt. Dies war an den parallel eluierenden Peaks für S (TF-Apoprotein), Fe (eisenbeladenes TF) und Pt ersichtlich. Das Addukt wies eine Stöchiometrie von 1:1 auf. Pt ersetzte offenbar nicht das Eisen an seiner spezifischen Bindungsstelle im Transferrin. In einem zweiten Schritt ihres Bottom-up-Ansatzes wurden die Cisplatin-Protein-Interaktionen durch ESI-Q-TOF-MS charakterisiert [15]. Durch diese Experimente konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Cisplatin zu einer Spaltung von Disulfidbrücken im HSA mit der Möglichkeit einer intermolekularen Quervernetzung des Proteinmoleküls führt.

Xie et al. [5] untersuchten die Reaktionsprodukte nach Inkubation von Carboplatin mit HSA und γ -Globulin, da beide Proteine zusammen mehr als 80 % des gesamten Plasmaproteins ausmachen. Innerhalb einiger Tage nahm der Carboplatin-Peak signifikant ab und stattdessen nahm ein neuer Peak zu, der Carboplatin-HSA zugeschrieben wurde. Nach 21 Tagen waren mehr als 70 % des Carboplatins mit HSA komplexiert, wohingegen γ -Globulin in diesem Zeitraum zu einem Komplex mit einer 1:1-Stöchiometrie reagierte.

Tatsächlich wurde von Ivanov et al. [33] mittels NMR Methionin als das primäre Ziel im HSA bestätigt. Sie identifizierten Methionin (nicht dagegen Cystein) als die hauptsächliche schwefelhaltige Bindungsstelle bei der Interaktion von Cisplatin mit verschiedenen Arten von Albumin. In derselben Arbeit wurde ein an der Bildung eines S,N-Makrochelats beteiligter stickstoffhaltiger Ligand entdeckt. Andererseits wurde mittels NMR kein Beleg dafür gefunden, dass Histidinreste bei der Bindung von Cisplatin an Albumin als N-Donoren eine Rolle spielen.

Andere Proteine, die im Hinblick auf die Bindungsrate an Cisplatin untersucht wurden, waren Myoglobin, Ubiquitin, Metallothionein und noch einmal Transferrin [6]. Die Kinetik der Bindung von Cisplatin an zelluläres Metallothionein war pseudo-erster Ordnung und die Geschwindigkeitskonstante betrug $6,3 \times 10^{-4} / \text{s}$ ($\tau_{1/2} = 18 \text{ min}$). Cox et al. [34] dagegen wiesen durch NMR-Messungen einen im Wesentlichen zweiphasigen kinetischen Prozess für die Reaktion zwischen Cisplatin und Apotransferrin nach. Sie schlugen vor, dass zelluläres Metallothionein erhebliche Mengen an Cisplatin abfangen kann und deshalb wesentlich zur Resistenz gegen Cisplatin beitragen kann. Ähnliche Interaktionen mit Albumin wurden auch für Pt-haltige Medikamente der dritten Generation wie z. B.

Oxaliplatin gezeigt [50]. Dieser Wirkstoff wird zunächst durch sequenzielle Abspaltung des Oxalat-Liganden in eine „Pt-CHXN“-Spezies [CHXN = (1R,2R)-Cyclohexan-1,2-diamin] überführt. Der aktive Metabolit „Pt-CHXN“ reagiert rasch mit Schwefelfunktionen in kleinen Biomolekülen wie Glutathion, Cystein und Methionin und daraufhin mit Proteinen, Albumin und γ -Globuline, unter Ausbildung einer kovalenten Bindung [6].

Interaktionen mit kleinen Liganden

Cisplatin und Carboplatin wurden auch im Hinblick auf ihre Reaktivität mit S-haltigen Liganden getestet, insbesondere mit L-Methionin (L-Met). Zur Trennung und Identifizierung der Pt-Spezies wurde LC-MS eingesetzt. Die endgültigen Reaktionsprodukte, $[(\text{NH}_3)_2(\text{Met})]\text{Pt}$ und zwei Isomere, $[(\text{Met})_2]\text{Pt}$, waren in beiden Fällen identisch (Cisplatin und Carboplatin) [35]. Die Isomere wiesen unterschiedliche chromatographische Retentionszeiten auf. In Gegenwart einer Natriumchloridlösung (150 mM) reagierte sowohl Carboplatin als auch Cisplatin mit L-Met zu fünf Methionin-Platin-Addukten. Dieser Befund stützte Ergebnisse von Studien anderer Arbeitsgruppen, denen zufolge Carboplatin in diesem Medium in Cisplatin umgewandelt wird [22]. Weitere Untersuchungen konzentrierten sich auf Oxaliplatin. Luo et al. [36] beschrieben eine HPLC-Methode zur Untersuchung der Biotransformationsprodukte von Oxaliplatin unter Verwendung von ^3H -markiertem Oxaliplatin und ^{35}S -markierten Nucleophilen (z. B. Glutathion, Cystein, Methionin, Harnstoff, Aspartat, Creatinin und einige andere) zum Nachweis von „Pt-DACH“-Biotransformationsprodukten (Pt-Komplexe, die 1,2-Diaminocyclohexan-Carrierliganden enthalten, werden als „DACH“-Komplexe bezeichnet) [22]. Als hauptsächliche Biotransformationsprodukte wurden ein Pt-DACH-Biscysteinokomplex, ein Pt-DACH-Monomethioninkomplex und freies DACH identifiziert. Weniger häufige Produkte waren u. a. ein Pt-DACH-Dichlorokomplex, ein Pt-DACH-Diglutathionkomplex und ein Pt-DACH-Monoglutathionkomplex.

Die Interaktionen von Cisplatin, Carboplatin und ihren Analoga mit Nucleosid-Monophosphaten, Di- und Trinucleotiden wurden von Keppler und Mitarbeitern mittels CE in Kombination mit einem Diodenarray-Detektor systematisch untersucht [37–40]. Die Adduktbildung führte bei den modifizierten Nucleotiden im Vergleich zu den freien Nucleotiden zu einer deutlichen Verschiebung von λ_{max} in einen niedrigeren Energiebereich. Daher konnte die Identifizierung der einzelnen Platin-Nucleotid-Addukte auf der Grundlage sowohl der charakteristischen UV-Spektren als auch der Unterschiede im elektrophoretischen Verhalten erfolgen. Die Kinetik der Bindungseigenschaften von 5'-GMP an Cisplatin unter simulierten physiologischen Bedingungen wurde von derselben Gruppe untersucht, wobei der Chloridkonzentration im Inter- und Intrazellulärraum besondere Aufmerksamkeit gewidmet wurde [38]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bildung von Addukten deutlich durch die Anwesenheit von Chloridionen beeinflusst wird. Darüber hinaus wurde der Einfluss der schwefelhaltigen α -Aminosäuren L-Methionin und L-Cystein untersucht, die eine starke Interaktion mit Pt-haltigen Chemotherapeutika zeigten. Unglücklicherweise liefert die Analyse

mittels UV-spektroskopischer Detektion allein nur begrenzte Strukturinformationen für die Platin-DNA-Addukte. Daten zur Struktur wurden jedoch mittels ESI-MS-Detektion bei der Charakterisierung platinierter DNA-Nukleotide erhalten [41]. In zwei weiteren Arbeiten schlug Reedijk vor, dass in Proteine eingebaute Pt-Methionin-Addukte als Platin-Reservoir für die spätere DNA-Platinierung dienen könnten [42].

Interaktionen mit Nukleotiden

Alle oben dargestellten Untersuchungen haben gezeigt, dass sich bei Patienten, die mit Pt-haltigen Medikamenten behandelt werden, eine große Anzahl von Pt-Addukten bildet, und dass die Bildung von DNA-Addukten mit Cisplatin ein entscheidender pharmakokinetischer Parameter ist, der bei einer Krebstherapie, die sich auf Pt-haltige Medikamente stützt, in jedem Fall optimiert werden muss. Daher ist nicht nur die Identifizierung von Pt-DNA-Adduktspezies sondern auch die Quantifizierung der DNA-Addukte mit Cisplatin außerordentlich wichtig. Folglich haben Sar et al. [43] eine Studie durchgeführt, bei der DNA-Nukleotide nach in-vitro-Inkubation mit Cisplatin mittels ESI-Q-TOF-MS untersucht wurden. Es gelang die strukturelle Charakterisierung der zwischen reinem Guanosinmonophosphat (dGMP) und Cisplatin gebildeten Komplexe. Anschließend wurden die DNA-Addukte mittels HPLC-ICP-MS quantifiziert, wobei das DNA-Rückgrat anhand des ^{31}P in P-Peptiden detektiert wurde. Dies war möglich durch den Einsatz einer Kollisionszelle oder einer dynamischen Reaktionszelle. Gleichzeitig wurde das ^{195}Pt -Isotop gemessen, um Cisplatin-DNA-Addukte nachzuweisen. Mit diesem Ansatz war eine Schätzung der Konzentration der Cisplatin-DNA-Addukte in in-vivo-DNA-Proben möglich [43]. Auf das Nukleotid GMP konzentrierten sich auch Arbeiten von Gammelgaard et al. [44] und Hann et al. [45]. Ihre Studien waren durch die Tatsache motiviert, dass die Antitumor-Aktivität von Pt-haltigen Medikamenten im Allgemeinen auf ihrer koordinativen Bindung an freie Elektronenpaare, insbesondere am Guanin, beruht. Daher untersuchten beide Gruppen die zeitaufgelöste Interaktion von Cisplatin mit Guanosin-Monophosphat, wobei sie sich insbesondere auf die Bildung der Mono- und Bis-Addukte zwischen dem Pt-Medikament und GMP konzentrierten. Hann und Mitarbeiter verfolgten den Ablauf der zeitabhängigen Reaktion zwischen Cisplatin und 5'-GMP mittels HPLC-ICP-MS. Aufgrund des zweistufigen Mechanismus wurde zusammen mit dem Hauptprodukt, dem Bis-Addukt $\text{cis}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{GMP})_2]^{2-}$ ein Mono-Addukt als Zwischenprodukt beobachtet. Darüber hinaus lieferte die HPLC-ICP-sf-MS eindeutige stöchiometrische Informationen über das GMP-Hauptaddukt. Zu diesem Zweck wurde das Pt/P-Verhältnis durch simultane Messung von ^{31}P und ^{195}Pt bestimmt. Das ermittelte Pt/P-Signalverhältnis von 1/2 stimmt mit dem molaren Verhältnis im Bis-Addukt $\text{cis}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{GMP})_2]^{2-}$ überein.

Untersuchungen in Serum oder Plasma

Cisplatin ist unter den zur Chemotherapie von Hoden- oder Eierstockkrebs angewendeten Medikamenten immer noch die erste Wahl [3,4,46]. Seine Nephrotoxizität und die Entwicklung zellulärer Resistenz [47,48] können jedoch zu

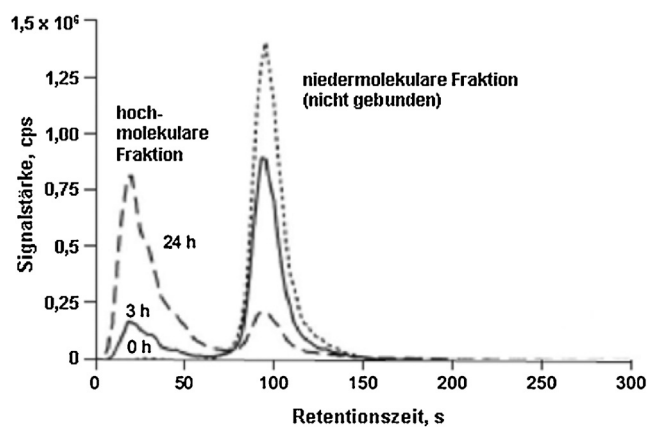


Abb. 3 Chromatogramme einer Serumprobe nach 5 min, 3 h und 24 h Inkubation mit Cisplatin, analysiert auf einer Größenausschluss-Chromatographiesäule. Die Signalintensität bezieht sich auf ^{195}Pt . Aus Szpunar et al. [51], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Komplikationen führen, und nach sehr hoher Dosierung kann es zu karzinogenen und genotoxischen Effekten kommen, die das Risiko für sekundäre Malignome deutlich erhöhen. Diese Nebenwirkungen von Cisplatin sind die Folge von Reaktionen des Medikaments mit Serumkomponenten, insbesondere Proteinen und schwefelhaltigen Aminosäuren. Daher wurde die Untersuchung von Biotransformationsprodukten im Serum als grundlegende Voraussetzung für eine systematische Krebstherapie und als der logische nächste Schritt nach der Untersuchung der Pt-Protein-Interaktionen in Modelllösungen angesehen. Da es sich bei diesen Experimenten um die Weiterführung der oben beschriebenen Versuchen zu den aktiven Pt-CHXN-Komplexen mit S-haltigen Proteinen handelt (siehe Abschnitt „Untersuchungen in Modelllösungen, die Proteine und/oder andere schwefelhaltige Liganden enthalten“), wurden sie anschließend mit Plasma durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass etwa 85 % des gesamten Platins z. B. von Oxaliplatin innerhalb von 5 Stunden Inkubation an Plasmaproteine gebunden waren. Ähnliche Resultate wurden erhalten, wenn die Interaktion des Medikaments mit Gesamtplasma oder nur mit Albumin untersucht wurde [49,50]. Jedoch ließ sich im Fall von Oxaliplatin keine Akkumulation von Pt beobachten, was z. T. die fehlende Nephrotoxizität sowie die verzögerte und reversible Neurotoxizität erklären könnte.

Szpunar et al. [15] waren die ersten, die mit SEC-ICP-MS kombinierte Speziationsverfahren einsetzten, um die Interaktion von Cisplatin mit Serum zu untersuchen. **Abb. 3** zeigt die zeitabhängigen Veränderungen in Chromatogrammen einer Serumprobe, die mit Cisplatin inkubiert wurde. Nach 3 h Inkubation waren noch etwa 80 % des Medikaments ungebunden; dieser Wert liegt etwas niedriger als der, welcher in früheren, mittels Ultrafiltration durchgeführten Studien beobachtet worden war. Auch belegte dieses mittels SEC erhaltene Ergebnis (60 ± 10 kDa für den Hauptbindungspartner von Pt) deutlicher, dass HSA (66,5 kDa) ein Pt-Bindungspartner ist, als die mittels Ultrafiltration erhaltenen Resultate. Darüber hinaus bot die Kombinationsmethode im Hinblick auf Geschwindigkeit, Zweckmäßigkeit, Selektivität und Genauigkeit bei

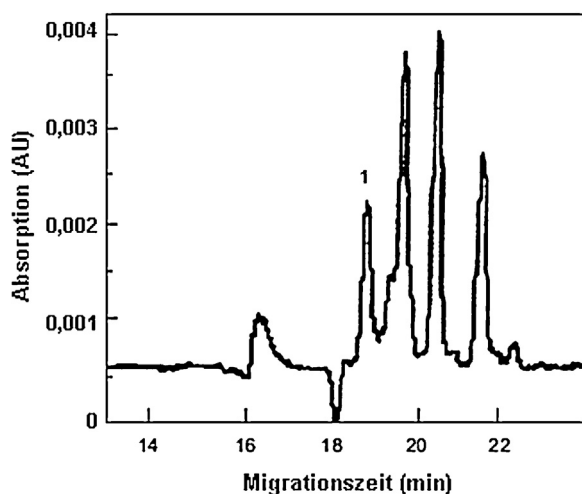


Abb. 4 MECK-Elektropherogramm von mit Cisplatin gespiktem Serum (Peak 1). Elektrolyt: 110 mM SDS, 50 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4. Die MECK-Methode war optimiert worden mit dem Ziel, die Pt-Spezies von den Serum-Matrixkomponenten zu trennen. Dies resultierte auch in der gewünschten Separation von Cisplatin von seinen Hydrolyseprodukten (Peaks zwischen 9 und 23 min) in den Serumproben. Aus Huang et al. [52], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

der Unterscheidung zwischen den verschiedenen Protein-Metallkomplex-Konjugaten erhebliche Vorteile im Vergleich zu Methoden auf der Grundlage von Ultrafiltration und anschließender off-line durchgeführter Metallbestimmung. Jedoch stellte die irreversible Adsorption von Cisplatin oder seiner Hydrolyseprodukte an das Säulenmaterial ein Problem dar [6] (siehe Abschnitt „Untersuchungen in Modelllösungen, die Proteine und/oder andere schwefelhaltige Liganden enthalten“).

Huang et al. [52] führten, unter Einsatz der mizellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie (MECK) und der Isotachophorese (ITP) mit indirekter UV-Detektion, eine weitere Studie zur Interaktion von Cisplatin und Serum sowie zur Quantifizierung von Hydrolyse- und Biotransformationsprodukten von Cisplatin durch. Bei dieser Vorgehensweise lag die Nachweisgrenze (limit of detection, LoD) für Pt-Spezies bei 2-5 mMol/l, was für die Untersuchung von Pt-Spezies im Serum nach partieller Biotransformation von intravenös verabreichtem Cisplatin als ausreichend angesehen wurde [52]. Bei dieser Arbeit stellte sich heraus, dass ein zuvor beschriebenes CE-Puffersystem mit 50 mM SDS, das zur Trennung von Hydrolyseprodukten von Cisplatin in Modelllösungen ausreichend gewesen war, eine nur unzureichende Trennung von Pt-Spezies in Serumproben ergab. Daher wurde die MECK-Methode im Hinblick auf die Separation der Analytspezies von den Matrixkomponenten im Serum optimiert. Bei einer SDS-Konzentration von > 110 mM wurde die Pt-Spezies zufriedenstellend von den Serumkomponenten getrennt. Dadurch verbesserte sich die gewünschte Auflösung zwischen Cisplatin und seinen Hydrolyseprodukten in Serumproben. Weiterhin beeinflusste auch die Phosphatkonzentration die Trennung von Cisplatin von seinen Hydrolyseprodukten und musste sorgfältig optimiert werden. Abb. 4 zeigt die Analyse von Cisplatin in gespiktem Serum nach Optimierung der MECK-Methode.

Mit den Bedingungen der transienten ITP, die der MECK-Trennung vorgeschaltet war, wurde eine vorherige Aufkonzentrierung der Pt-Spezies ungeachtet der Leitfähigkeit der Probe erreicht. Die gleichzeitige Anwendung dieser Methode entweder auf Cisplatin-Proben in wässriger, chloridhaltiger Lösung oder auf Cisplatin-Proben in Serum ergab vollkommen verschiedene (zeitabhängige) Cisplatin/Monoaqua-Cisplatin-Quotienten, wobei diese in Cisplatin-Serum-Proben etwa 200-mal höher waren (Verhältnis 3,15-4,04). Insgesamt gesehen zeigte die Kinetik in Serum eine ähnliche Zeitabhängigkeit wie die in chloridhaltiger Lösung (siehe [21]), jedoch lagen die Reaktionskonstanten deutlich niedriger. In einer aktuellen Arbeit untersuchten Moller et al. erstmals die Anwendbarkeit zweier CE-ICP-MS-Zerstäuber auf Pt-Speziationsexperimente [53]. Ihren Ergebnissen zufolge zeigte der CEI-100-Zerstäuber eine fünffach höhere Sensitivität und wurde daher für Experimente zur Bindung von Carboplatin an Serumproteine, v. a. HSA, verwendet. Mit steigender Inkubationszeit nahm der Peak des freien Wirkstoffs ab und es erschien ein Pt-HSA-Peak. Die Wiederfindung lag nach 5-minütiger Inkubation bei nahezu 100% im Vergleich zu einem internen Standard, wobei aus Gründen der Qualitätskontrolle zwei Pt-Isotope gemessen wurden. Nach 24 h lag der mittlere Prozentsatz des freien Carboplatin bei etwa 70% und nach 48 h bei etwa 60%.

Xie et al. [5] verwendeten eine ähnliche SEC-ICP-MS-Technik wie Szpunar et al. [51] und untersuchten die zeitabhängige Reaktion von Carboplatin mit Serumproteinen. In dieser Arbeit beobachteten sie den Zeitverlauf der Pt-Speziation in Plasmaproben von Patienten, die sich einer Chemotherapie unterzogen, und fanden, dass die Konzentration von Carboplatin abnahm, während Carboplatin-HSA gebildet wurde. Der Grund dafür war der direkte Austausch von Pt-Liganden in Carboplatin durch freie Sulfhydryl-(Thiol-)Gruppen von Cysteinresten in der α -Helix des HSA. Außerdem wurde Carboplatin- γ -Globulin untersucht.

In einer kürzlich publizierten Arbeit setzten Falta et al. [27] HILIC in Kombination mit ICP-Massenspektrometrie zur Quantifizierung von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin in gespikten humanen Plasmaproben ein. Zunächst untersuchten die Autoren die Verteilung dieser Pt-Medikamente in verschiedenen Blutkompartimenten wie Vollblut, Plasma-Pelletfraktion, Plasma-Ultrafiltrat und Protein-Restfraktion. Es stellte sich heraus, dass die Verteilung unabhängig von der anfänglichen Konzentration, aber abhängig vom verwendeten Medikament war. Der im Ultrafiltrat vorgefundene Pt-Anteil betrug 16,8%, 56,8% und 10,4% im Fall von Cisplatin, Carboplatin bzw. Oxaliplatin. Mit dem HILIC-ICP-MS-Ansatz ließ sich schließlich zeigen, dass $88 \pm 12\%$ des Cisplatin und $106 \pm 7\%$ des Carboplatin als Ausgangssubstanz vorlagen, Oxaliplatin dagegen blieb nur zu $34 \pm 0,4\%$ unverändert.

Es ist erwähnenswert, dass die Nebenwirkungen von Cisplatin nicht nur auf Reaktionen mit Proteinen im Serum beschränkt sind, sondern auch Komponenten im Zielgewebe betreffen. Daher wird die Charakterisierung von Biotransformationsprodukten in Gewebe als weiterführende Untersuchung zum Verständnis der systematischen Probleme bei der Krebstherapie angesehen und hier ebenfalls kurz erwähnt.

Esteban-Fernández et al. [54] führten In-vivo-Experimente an Ratten aus, denen Pt-Medikamente injiziert wurden. Die Autoren untersuchten die Bindung von Platin an Proteine in der Niere und im Innenohr, um die nephrotoxischen und ototoxischen Effekte von Pt-Medikamenten zu charakterisieren. Nach Behandlung von Ratten mit Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin wurde die Pt-Akkumulation in den beiden Organen analysiert. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass nicht nur der (Gesamt-) Pt-Gehalt, sondern vielmehr die Struktur des Medikaments (die tatsächliche Pt-Spezies) für die Änderung der Organfunktion verantwortlich ist. Speziationsstudien an Proben der Niere und des Innenohrs mittels 2D-Flüssigchromatographie (Größenausschlusschromatographie + FPLC) in Kombination mit ICP-MS demonstrierten eine vollständige Bindung des Platins an Proteine. Ein Metallothionein-Standard eluierte bei derselben Retentionszeit wie einige der cytosolischen Pt-Biomoleküle. Peaks des freien Pt-Medikaments wurden nicht beobachtet.

Untersuchungen im Urin behandelter Krebspatienten

Urin wird als Matrix für das Pt-Biomonitoring verwendet, um den Zeitverlauf der Pt-Exkretion nach der Verabreichung zu verfolgen und die biologische Halbwertszeit zu bestimmen. Außerdem lassen sich die Pt-Metaboliten (Spezies), die letztlich vom Organismus ausgeschieden werden, charakterisieren. Auf diese Weise könnte sich eine Beurteilung des in-vivo-Metabolismus Pt-haltiger Medikamente durchführen lassen.

Speziation des Urins von Krebspatienten zeigt, dass etwa 40% der Ausgangssubstanz (Cisplatin) in hydrolysierte Form als Monoaqua-Cisplatin exkretiert werden [21]. Der restliche Teil wird als (natives) Cisplatin exkretiert, das dann entsprechend der für hohe Chloridkonzentrationen ermittelten Kinetik hydrolysiert wird. In einer weiteren Arbeit, durchgeführt von Tang et al. [55], wurde die Speziation von Platinverbindungen in Urin von Patienten, die mit Cisplatin behandelt worden waren, mittels HPLC–ICP-MS untersucht. Bei der Analyse trat als Hauptkomponente Cisplatin auf, jedoch wurden auch ein Monoaqua-Cisplatin-Komplex und ein Pt-Creatininkomplex im Verhältnis 1:1 identifiziert. Letzterer, so wurde festgestellt, war die zweithäufigste Pt-Spezies im Urin. Weitere Peaks entsprachen Cisplatin-Harnstoff und Cisplatin-Harnsäure, die beide durch Vergleich ihrer Retentionszeiten mit der von Standardsubstanzen identifiziert wurden. Bei einem parallel durchgeführten Experiment wurde Urin von Carboplatin-behandelten Patienten untersucht. In diesem Fall war die hauptsächliche Pt-Spezies im Urin die Ausgangssubstanz Carboplatin [55]. Keine der seltener auftretenden Spezies stimmte mit einer derjenigen überein, die sich in Proben nachweisen ließen, welche nach einer Cisplatin-Behandlung genommen worden waren. Drei Wochen nach der Behandlung war es anscheinend zur Transformation gekommen, da eine der Proben sowohl Cisplatin als auch dessen Monoaqua-Komplex enthielt. Koelensperger et al. [56] entwickelten eine spezies-spezifische IDMS-Methode zur genauen Quantifizierung von Carboplatin in Urin mittels LC–ESI-TOF-MS und LC–ICP-MS. Bei der IDMS wurde mit ^{194}Pt angereichertes Carboplatin eingesetzt.

Zur Trennung der Spezies musste ein Kompromiss zwischen ausreichender Trennung und einer Zusammensetzung des Elutionsmittels gefunden werden, das sowohl für die ES- als auch für die ICP-Ionisierung geeignet ist. Mit dieser Methode waren die Autoren in der Lage, Carboplatin in Urin abzutrennen und genau zu quantifizieren. Die kombinierte, analytische Gesamtunsicherheit betrug 5,7%.

Untersuchungen am Abwasser onkologischer Stationen, das den Urin der Patienten enthielt, sind in [21] beschrieben. Solche Proben enthalten Metaboliten von Pt-haltigen Medikamenten sowie die exkretierten restlichen nativen Pt-Medikamente aus dem Urin der Patienten, darüber hinaus jedoch wahrscheinlich auch zusätzliche Reaktionsprodukte des Abwassers mit Pt-Spezies aus dem Urin. Diese Messungen ergaben, dass der Anteil des exkretierten intakten Cisplatin etwa ebenso hoch war wie der von Monoaqua-Cisplatin (Pt-Gesamtkonzentration: $60\ \mu\text{g/l}$). Anders bei Carboplatin: Aufgrund seiner Stabilität erreichte Carboplatin die Abwasseraufbereitung intakt [57], wohingegen Messungen im Fall von Oxaliplatin mehr als 15 verschiedene Metaboliten ergaben sowie nur einen geringen Anteil der Ausgangssubstanz [58].

Untersuchungen an neuen Pt-haltigen Medikamenten

Im Fall neu entwickelter metallhaltiger Krebsmedikamente sind die dargestellten analytischen Techniken erforderlich, um die Interaktion des intakten Wirkstoffs mit biologisch relevanten Molekülen sowie seine Umwandlung unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Vaccina et al. [59] entwickelten daher auf der Basis der Kationenaustausch-HPLC-ICP-MS eine Methode zum Nachweis des neuen Triplatinkomplexes „BBT 3464“ (als frei zirkulierendes Medikament) und seiner Metaboliten im Serum. Die LoD war sehr niedrig, $0,5\ \mu\text{g/l}$ Pt bzw. $0,15\ \mu\text{g/l}$ Pt nach vorheriger Aufkonzentrierung. Diese Methode wurde überprüft und als geeignet für die Bestimmung von unverändertem „BBR 3464“ in humanem Plasma bei einer klinischen Phase-II-Studie befunden.

Darüber hinaus ergab eine Auswertung der Literatur zu neuen metallhaltigen Krebsmedikamenten nur wenige neue Kandidaten für Chemotherapeutika. Diese enthielten jedoch alle Rutheniumkomplexe, die nicht Thema dieses Übersichtsartikels sind.

Schlussfolgerungen

Krebsmedikamente auf Platin-Basis sind wirksame Chemotherapeutika und im Fall der meisten Malignome immer noch die am häufigsten eingesetzten Wirkstoffe. Ihr Wirkmechanismus hängt ab von der Interaktion mit DNA und der Inhibition der DNA-Polymerasereaktion, was letztlich zur Apoptose der Tumorzelle führt. Beim Transport Pt-haltiger Medikamente sowie ihrem Wirkmechanismus spielen Serumproteine eine wichtige Rolle. Es hat sich herausgestellt, dass bei der Ausbildung von Bindungen an Bioliganden insbesondere schwefelhaltige Peptide und Proteine von Bedeutung sind.

In diesen wichtigen Bereich der Forschung zur Anwendung und zum Wirkmechanismus von Pt-haltigen

Chemotherapeutika wurden effiziente analytische Speziationmethoden eingeführt. Die meisten Methoden stützen sich auf verschiedene HPLC-Trenntechniken in direkter Kombination mit sensitiven und selektiven Detektionsmethoden. Die ICP-Massenspektrometrie nimmt inzwischen eine herausragende Stellung als eine solche Detektionsmethode ein, da sich mit ihr vergleichsweise einfach Pt-spezifische Signale von Krebsmedikamenten und ihren Hydrolyseprodukten online messen lassen. Die mittels HPLC-ICP-MS erhaltenen Ergebnisse wurden durch Strukturinformationen, z. B. aus ESI-MS-Experimenten, weiter gestützt. Bei der Aufklärung rascher kinetischer Veränderungen wurden zur raschen Trennung von Pt-Spezies sogar Kapillarelektrophoretiken eingesetzt. Auf diese Weise haben Methoden der Platinspeziation erheblich zum Verständnis der Aktivierung der Medikamente durch Hydrolyse bzw. zu ihrer Inaktivierung durch Bindung an Proteine beigetragen. Solche Untersuchungen wurden nicht nur in sorgfältig kontrollierten Modellen, sondern auch in Serumproben von Patienten durchgeführt. Die Ergebnisse der letzteren Experimente bestätigten die anhand von Modelllösungen gewonnenen Einsichten. Die Speziation von Urinproben von Patienten erbrachte Informationen zum Zeitverlauf der Pt-Exkretion und über die biologische Halbwertszeit. Weiterhin ermöglichte die Pt-Speziation in Urin den Nachweis von Pt-Metaboliten, die letztlich vom Organismus ausgeschieden wurden, und damit die Beurteilung des Metabolismus der Pt-Medikamente in vivo. Die Ergebnisse der Pt-Speziation wurden auch zur Beurteilung der Wirksamkeit neuer Chemotherapeutika auf Platin-Basis angewendet und erbrachten frühzeitige Informationen zu ihrer möglichen Affinität, Reaktionen mit deaktivierenden Liganden einzugehen.

Es besteht kein Zweifel, dass die Platinspeziation von den interessantesten Entwicklungen auf dem Gebiet der Speziationmethoden insgesamt profitieren wird. Darauf aufbauend kann sie dazu beitragen, weitere Probleme bei der Forschung über Pt-haltige Medikamente zu lösen, und diesem wichtigen Forschungsfeld einige starke Impulse geben.

Offenlegung von Interessenkonflikten

Beim Autor besteht kein Interessenkonflikt.

Danksagung

Der Autor möchte Herrn Prof. Dr. S. Halbach für die kritische Durchsicht des Manuskripts danken.

Dieser Review ist Teil der Serie von Übersichtsartikeln über Spurenelemente in dieser Zeitschrift, die von der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente e. V. initiiert wurde.

Literatur

- [1] Rosenberg B, van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965;205:698–9.
- [2] Rosenberg B. The start platinum complexes for the treatment of cancer: why the search goes on. In: Lippert B, editor. *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, vol. 4. Zurich: Helvetica Chimica Acta; 1999. p. 3–30.
- [3] Wong E, Giandomenico DM. Current status of platinum-based anti-tumor drugs. *Chem Rev* 1999;99:2451–66.
- [4] Galanski M, Arion VB, Jakupec MA, Keppler BK. Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr Pharm Des* 2003;9:2078–89.
- [5] Xie R, Johnson W, Rodriguez L, Gounder M, Hall GS, Buckley B. A study of the interactions between carboplatin and blood plasma proteins using size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:2815–22.
- [6] Timerbaev AR, Hartinger ChG, Aleksenko SS, Keppler BK. Interactions of antitumor metalodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. *Chem Rev* 2006;106:2224–48.
- [7] Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK. Tumour-inhibiting platinum complexes – state of the art and future perspectives. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;146:1–53.
- [8] McKeage MJ. Lobaplatin: a new antitumour platinum drug. *Expert Opin Invest Drugs* 2001;10:119–28.
- [9] Galanski M, Jakupec MA, Keppler BK. Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches. *Curr Med Chem* 2005;12:2075–94.
- [10] Guo Z, Sadler PJ. Metals in medicine. *Angew Chem Int Ed* 1999;38:1513–31.
- [11] Takahara PM, Frederick CA, Lippard SJ. Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA. *J Am Chem Soc* 1996;118:12309–12.
- [12] Takahara PM, Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* 1995;377:649–52.
- [13] Silverman AP, Bu W, Cohen SM, Lippard SJ. 2.4-A crystal structure of the asymmetric platinum complex {Pt(amine)(cyclohexylamine)}(2+) bound to a dodecamer DNA complex. *J Biol Chem* 2002;277(51):49743–9.
- [14] Gelasco A, Lippard SJ. NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a *cis*-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry* 1998;37(26):9230–9.
- [15] Esteban-Fernández D, Montes-Bayon M, Gonzales EB, Gomez Gomez MM, Palacios MA, Sanz-Medel A. Atomic (HPLC–ICP-MS) and molecular mass spectrometry (ESI-Q-TOF) to study cisplatin interactions with serum proteins. *J Anal Atom Spectrom* 2008;23:378–84.
- [16] Reedijk J. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3611–6.
- [17] Reedijk J. Medicinal applications of heavy-metal compounds. *Curr Opin Chem Biol* 1999;3:236–40.
- [18] Guo Z, Sadler PJ. Medicinal inorganic chemistry. *Adv Inorg Chem* 2000;49:183–306.
- [19] Appleton TG. Donor atom preferences in complexes of platinum and palladium with amino acids and related molecules. *Coord Chem Rev* 1997;166:313–59.
- [20] Kratz R, Keppler BK, Hartmann M, Messori L, Berger MR. Comparison of the antiproliferative activity of two antitumour ruthenium(III) complexes with their apotransferrin and transferrin-bound forms in a human colon cancer cell line. *Met Based Drugs* 1996;3(1):15–23.
- [21] Hann S, Koellensperger G, Zs Stefánka, Stineder G, Fürhacker M, Buchberger W, Mader RM. Application of HPLC–ICP-MS to speciation of cisplatin and its degradation products in water containing different chloride concentrations and in human urine. *J Anal Atom Spectrom* 2003;18:1391–5.

- [22] Barefoot RR. Speciation of platinum compounds: a review of recent applications in studies of platinum anticancer drugs. *J Chromatogr B* 2001;751:205–11.
- [23] Nygren Y, Hemstroem P, Astot C, Naredi P, Bjoern E. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) utilizing a mobile phase with a low-volatile organic modifier for determination of cisplatin, and its monohydrolyzed metabolite. *J Anal Atom Spectrom* 2008;23(7):948–54.
- [24] Wenclawiak BW, Wollmann W. Separation of platinum(II) anti-tumour drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr A* 1996;724:317–26.
- [25] Timerbaev ARK, ung A, Keppler BK. Capillary electrophoresis of platinum group elements – analytical speciation and biochemical studies. *J Chromatogr A* 2002;945:25–44.
- [26] Zhang J, Thomas DS, Davies MS, Berners-Price SJ, Farrell N. Effects of geometric isomerism in dinuclear platinum antitumor complexes on aquation reactions in the presence of perchlorate, acetate and phosphate. *J Biol Inorg Chem* 2005;10(6):652–66.
- [27] Falta Th, Koellensperger G, Standler A, Buchberger W, Mader RM, Hann S. Quantification of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin in spiked human plasma samples by ICP–SFMS and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) combined with ICP-MS detection. *J Anal Atom Spectrom* 2009;24:1336–42.
- [28] Chen D, Ohta N, Ukai M, Masuda M, Yotsuyanagi T. Binding and aggregation of human gamma-globulin by *cis*-diamminedichloroplatinum(II) through disulfide bond. *Biol Pharm Bull* 1994;17(12):1561–6.
- [29] Trynda-Lemiesz L, Kozłowski H, Keppler BK. Effect of *cis*-, *trans*-diamminedi-chloro-platinum(II) and DBP on human serum albumin. *J Inorg Biochem* 1999;77:141–6.
- [30] Yotsuyanagi T, Ohta N, Futo T, Ito S, Chen D, Ikeda K. Multiple and irreversible binding of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) to human serum-albumin and its effect on warfarin-binding. *Chem Pharm Bull* 1991;39:3003–6.
- [31] Timerbaev AR, Aleksenko SS, Polec-Pawlak K, Ruzik R, Semenova O, Hartinger CG, Oszwaldowski S, Galanski M, Jarosz M, Keppler BK. Platinum metallo-drug–protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry: characterization of interactions between Pt(II) complexes and human serum albumin. *Electrophoresis* 2004;25:1988–95.
- [32] Michalke B. The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: 1. General aspects. *Trends Anal Chem* 2002;21(2):142–53.
- [33] Ivanov AI, Christodoulou J, Parkinson JA, Barnham KJ, Tucker A, Woodrow J, Sadler PJ. Cisplatin binding sites on human albumin. *J Biol Chem* 1998;273:14721–30.
- [34] Cox MC, Barnham KJ, Frenkiel TA, Hoeschele JD, Mason AB, He QY, Woodworth RC, Sadler PJ. Identification of platination sites on human serum transferrin using C-13 and N-15 NMR spectroscopy. *J Biol Inorg Chem* 1999;4:621–31.
- [35] Heudi O, Mercier-Jobard S, Cailleux A, Allan P. Mechanisms of reaction of L-methionine with carboplatin and oxaliplatin in different media: a comparison with cisplatin. *Biopharm Drug Dispos* 1999;20:107–16.
- [36] Luo FR, Yen TY, Wyrick SD, Chaney SG. High-performance liquid chromatographic separation of the biotransformation products of oxaliplatin. *J Chromatogr B* 1999;724:345–56.
- [37] Zenker A, Galanski M, Bereuter TL, Keppler BK, Linder W. Capillary electrophoretic study of cisplatin interaction with nucleoside monophosphates, di- and trinucleotides. *J Chromatogr A* 1999;852:337–46.
- [38] Zenker A, Galanski M, Bereuter TL, Keppler BK, Linder W. Kinetics of binding properties of 5'-GMP with cisplatin under simulated physiological conditions by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 2000;745:211–9.
- [39] Zenker A, Galanski M, Bereuter TL, Keppler BK, Linder W. Time-dependent interactions of platinum(II) complexes with 5'-GMP under simulated physiological conditions studied by capillary electrophoresis. *J Biol Inorg Chem* 2000;5:498–504.
- [40] Küng A, Zenker A, Galanski M, Keppler BK. Capillary electrophoretic study of carboplatin and analogues with nucleoside monophosphates, di- and trinucleotides. *J Inorg Biochem* 2001;83:181–6.
- [41] Warnke U, Gysler J, Hofte B, Tjaden UR, Van der Greef J, Kloft C, Schunack W, Jaehde U. Separation and identification of platinum adducts with DNA nucleotides by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Electrophoresis* 2001;22:97–103.
- [42] Reedijk J. Why does cisplatin reach guanine-N7 with competing S-donor ligands available in the cell? *Chem Rev* 1999;99:2499–510.
- [43] Sar DG, Montes Bayon M, Gonzales EB, Sanz-Medel A. Speciation studies of cisplatin adducts with DNA nucleotides via elemental specific detection (P and Pt) using liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry and structural characterization by electrospray mass spectrometry. *J Anal Atom Spectrom* 2006;21:861–8.
- [44] Gammelgaard B, Hansen HR, Sturup S, Moller Ch. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry as a detector in drug metabolism studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4(9):1187–207.
- [45] Hann S, Zenker A, Galanski M, Bereuter TL, Stingeder G, Keppler BK. HPLC-UV–ICP-SFMS study of the interaction of cisplatin with guanosine monophosphate. *Fresenius J Anal Chem* 2001;370(5):581–6.
- [46] Lippart B. Cisplatin chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Zurich: Helvetica Chimica Acta; 1999.
- [47] O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW. Clinical status of cisplatin, carboplatin and other platinum based antitumor drugs. In: Lippart B, editor. Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Zurich: Helvetica Chimica Acta; 1999. p. 31–71.
- [48] McKeage MJ. Clinical toxicology of platinum-based cancer chemotherapeutic agents. In: Kelland LR, Farrel N, editors. Platinum-based drugs in cancer therapy. Totawa, NJ: Humana Press; 2000. p. 251–75.
- [49] Biosdrón-Celle M, Lebouil A, Allain P, Gamelin E. Pharmacokinetic properties of platinum derivatives. *Bull Cancer* 2001;88:S14–9.
- [50] Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res* 2000;6:1205–18.
- [51] Szpunar J, Makorov A, Pieper T, Keppler BK, Łobinski R. Investigation of metallo-drug–protein interactions by size-exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Anal Chim Acta* 1999;387:135–44.
- [52] Huang Z, Timerbaev AR, Keppler BK, Hirokawa T. Determination of cisplatin and its hydrolytic metabolite in human serum by capillary electrophoresis techniques. *J Chromatogr A* 2006;1106:75–9.
- [53] Moller Ch, Sturup S, Hansen HR, Gammelgaard B. Comparison of two CE–ICP-MS interfaces and quantitative measurements of carboplatin in plasma samples using an internal standard. *J Anal Atom Spectrom* 2009;24(9):1208–12.
- [54] Esteban-Fernández D, Gómez-Gómez MM, Canas B, Verdaguier JM, Ramirez R, Palacios MA. Speciation analysis of platinum antitumor drugs in impacted tissues. *Talanta* 2007;72(2):768–73.
- [55] Tang X, Hayes II JW, Schroder L, Cacini W, Depta G, Dorsey J, Edler RC, Tepperman K. Determination of biotransformation

- products of platinum drugs in rat and human urine. *Met Based Drugs* 1997;4:97–101.
- [56] Koellensperger G, Zs Stefanka, Meelich K, Galanski M, Keppler BK, Stingerder G, Hann S. Species specific IDMS for accurate quantification of carboplatin in urine by LC–ESI–TOFMS and LC–ICP–QMS. *J Anal Atom Spectrom* 2008;23:29–36.
- [57] Lenz K, Köllensperger G, Hann S, Weissenbacher N, Mahnik SN, Fuehrhacker M. Fate of cancerostatic platinum compounds in biological wastewater treatment of hospital effluents. *Chemosphere* 2007;69:1765–74.
- [58] Hann S, Zs Stefanka, Lenz K, Stingerder G. Novel separation method for highly sensitive speciation of cancerostatic platinum compounds by HPLC–ICP–MS. *Anal Bioanal Chem* 2005;381:405–12.
- [59] Vacchina V, Torti L, Allievi C, Łobinski R. Sensitive species-specific monitoring of a new triplatinum anti-cancer drug and its potential related compounds in spiked human plasma by cation-exchange HPLC–ICP–MS. *J Anal Atom Spectrom* 2003;18:884–90.