

Synthese und Antitumoraktivität von [1,2-Diamino-1-(*p*-hydroxy)benzyl]ethan(dichloro)platin(II)-Komplexen

Synthesis and Antitumor Activity of [1,2-Diamino-1-(*p*-hydroxy)benzyl]ethane(dichloro)platinum(II) Complexes

Henri Brunner*, Friedrich Maiterth und Barbara Treittinger

Institut für Anorganische Chemie der Universität Regensburg,
Universitätsstraße 31, D-W-8400 Regensburg

Z. Naturforsch. **47b**, 942–946 (1992); eingegangen am 20. Februar 1992

1,2-Diaminoethanes, Dichloroplatinum(II) Complexes,
Human Mammary Carcinoma MDA-MB 231, Antitumor Activity

The complexes [1,2-diamino-1-(*p*-hydroxy)benzyl-1-(methyl, ethyl, and phenyl)]ethane(dichloro)platinum(II) were synthesized and characterized. The benzylic *p*-hydroxy group of the 1,2-diaminoethane ligand leads to good water-solubility of the complexes. The ligands were synthesized in a Strecker-type reaction, starting from the corresponding *p*-methoxybenzylketones. The amino nitriles were reduced to the diamines. Finally, the *p*-methoxy groups were converted into hydroxy groups by ether cleavage. For the preparation of the complexes, K_2PtCl_4 was added to the ligands. The antitumor activity of the platinum(II) compounds was tested towards the human mammary carcinoma cell line MDA-MB 231. The antitumor effect depends on the substituents and increases in the series phenyl, methyl, and ethyl. As a maximum, a growth inhibition value of 77% was obtained.

Einleitung

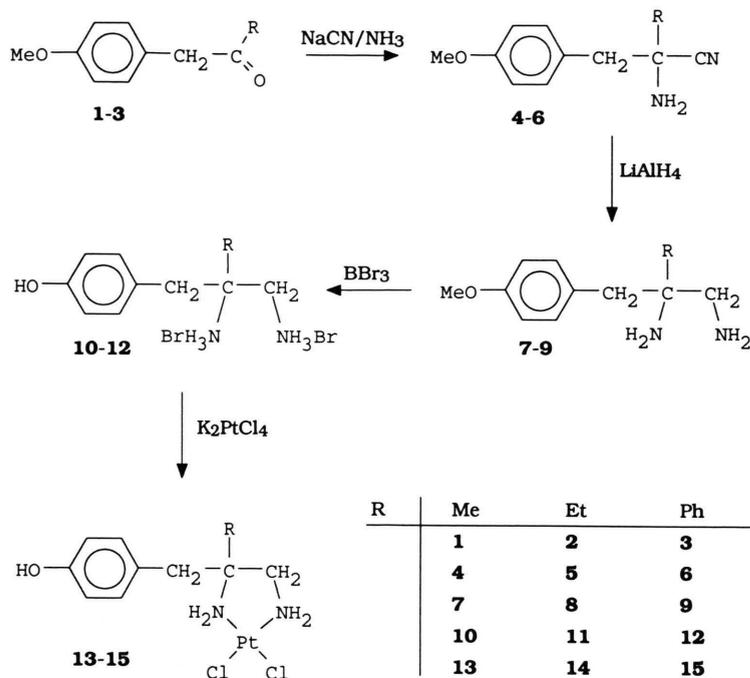
(1,2-Diamino-1-benzyl)ethan(dichloro)platin(II) bewirkt eine starke Antitumoraktivität *in vitro* gegenüber der MDA-MB 231-Mammatumor-Zelllinie und *in vivo* gegenüber der P 388-Leukämie der Maus bei einer im Vergleich zu *cis*-Platin geringen Toxizität [1–3]. Um die Wasserlöslichkeit der Verbindung zu erhöhen, wurden verschiedene Strategien verfolgt. Da die schlechte Löslichkeit von Platin(II)-Komplexen auf die Bildung von Kolumnarstrukturen zurückgeführt wird [4], wurde die Wasserlöslichkeit durch Substitution des 1,2-Diaminoethangerüsts erhöht (Störung der Kolumnarstrukturen) [5]. Neben der Substitution am Diaminliganden wurde die Löslichkeit auch durch Einführung von Abgangsgruppen wie Malonat, Oxalat und Hydroxycarboxylat verbessert [6–9]. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß auch die Einführung einer hydrophilen *p*-Hydroxygruppe am Benzylrest in drei verschiedenen 1,2-Diaminoethanliganden eine gute Wasserlöslichkeit der resultierenden Komplexe [1,2-Diamino-1-(*p*-hydroxy)benzyl-1-(methyl, ethyl bzw. phenyl)]ethan-

(dichloro)platin(II) bewirkt. Die cytotoxische Potenz der Platin(II)-Komplexe wird *in vitro* an der MDA-MB 231-Mammatumor-Zelllinie untersucht [10].

Synthese der Liganden und Komplexe

Das Keton **1** ist ein kommerzielles Produkt. Die Ketone **2** und **3** werden aus *p*-Methoxybenzonnitril und den entsprechenden Grignardverbindungen erhalten [11]. Ausgehend von den *p*-Methoxybenzylketonen **1–3** werden *via* Streckersynthese mit NaCN und NH_4Cl/NH_3 die α -Aminonitrile **4–6** dargestellt (Schema 1) [12, 13]. Nach der Reduktion der Aminonitrile mit $LiAlH_4$ erhält man die Diamine **7–9**, die destillativ gereinigt werden. Um aus den Methoxygruppen in den Verbindungen **7–9** die freien Hydroxygruppen zu erhalten, müssen die Ether gespalten werden. Die gängigste Methode hierzu ist die Verwendung von Bortribromid in absolutem Methylenchlorid bei $-78^\circ C$ [14, 15]. Für eine erfolgreiche Durchführung der Etherspaltung ist ein vierfacher Überschuß an BBr_3 nötig. Man erhält die freien Liganden **10–12** als hygroskopische Dihydrobromide (Schema 1). Die farblosen, festen Produkte werden unter Inertgasatmosphäre abgesaugt und getrocknet. Die Synthese von Dichloroplatin(II)-Komplexen mit Aminliganden ist in der Literatur mehrfach beschrieben

* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Brunner.



SCHEMA 1

[16, 17]. Die Liganden **10** und **11** sind bei pH 6 wasserlöslich und werden bei Raumtemperatur mit einer äquimolaren wäßrigen Lösung von K_2PtCl_4 versetzt. Während der Komplexierung wird der pH-Wert konstant bei 6 gehalten. Nach einiger Zeit fallen die Komplexe **13** und **14** als gelbe Feststoffe aus (Schema 1). Der Ligand **12** ist bei pH 6 wasserunlöslich, so daß auf ein Reaktionsgemisch aus Wasser und *tert*-Butanol [5] zurückgegriffen wird, um den Komplex **15** zu erhalten. Die Komplexe **13–15** sind anhand von IR, $^1\text{H-NMR}$ und Elementaranalyse charakterisiert.

Antitumortest

Die MDA-MB 231-Zellen wachsen als Monolayer in Kulturflaschen in wasserdampfgesättigter, 5% CO_2 -haltiger Atmosphäre bei 37 °C [18]. Zur Züchtung wird dem Medium (Richter's Medium) 10% Kälberserum (NCS) zugefügt. Kurz vor der Konfluenz wird das Nährmedium abgesaugt und die Zellen werden mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lö-

sung geerntet. Die Zellsuspension verdünnt man mit frischem Medium. Mit jeweils 100 μl dieser Zellsuspension werden dann die 96 Löcher von Mikrotiterplatten aufgefüllt und in wasserdampfhaltiger, 5% CO_2 -haltiger Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Nach zwei Tagen wird das verbrauchte Medium abgezogen, und die Testsubstanzen (gelöst in DMF) werden in einer Verdünnung 1:1000 (150 μl) in Richters Medium + 5% NCS zugegeben. Nach 48-stündiger Inkubationszeit wird die überstehende Lösung abgeschüttelt, und die Zellen werden mit 1-proz. Glutardialdehydlösung in PBS (phosphate buffered saline, pH 7,4) fixiert. Nach Anfärben der Zellkerne mit Kristallviolett werden die Zellen mit 75-proz. Ethanol zerstört, und man erhält eine ethanolische Kristallviolettlösung. Man mißt die Extinktion dieser Lösungen bei 578 nm mit einem Spektralphotometer (BIO-TEK-309-Tecnorama) bei 25 °C. Dabei sind die optischen Dichten direkt proportional zu den Zellzahlen [19], so daß sich aus dem Quotienten (Extinktion Testsubstanz/Extinktion Kontrol-

le) × 100 der Meßwert T/C (%) ergibt. Kontrolle: Lösungsmittel in Richters Medium (1 : 1000). Die Komplexe **13–15** weisen eine hohe cytotoxische Potenz auf. Es werden Wachstumshemmraten bis zu 77,3% (**14**, Tab. I) erreicht. Die Substituenten am C 1-Kohlenstoffatom beeinflussen die Antitumorwirksamkeit der Platin(II)-Komplexe. Die Wirksamkeit nimmt in der Reihenfolge **15** (43,8% T/C), **13** (39,3% T/C) und **14** (22,7% T/C) zu.

Tab. I. Antitumoraktivität der Komplexe **13–15** *in vitro* an der MDA-MB 231 Mammatumor-Zelllinie.

Komplex	Konz. (× 10 ⁻⁶ mol/l)	% T/C-Wert
13	10	39,3 ± 10,7
	5	54,1 ± 11,9
	1	78,8 ± 17,8
14	10	22,7 ± 8,2
	5	28,8 ± 7,1
	1	61,7 ± 17,3
15	10	43,8 ± 8,6
	5	57,4 ± 9,8
	1	80,4 ± 11,1

Experimenteller Teil

Die Ketone **1–3**

0,12 mol (2,88 g) Magnesium werden mit 20 ml abs. Ether unter N₂-Atmosphäre überschichtet. Unter Rühren werden 0,12 mol des entsprechenden Bromids (Ethylbromid, Phenylbromid) in 100 ml abs. Benzol zugegeben. Zuerst werden *ca.* 10 ml dieser Lösung zugetropft, dann wird die weitere Zugabe so dosiert, daß die Reaktionslösung schwach siedet. Nach Beendigung der Zugabe wird noch 30 min refluxiert. Zu der abgekühlten Lösung werden 0,10 mol (14,72 g) *p*-Methoxybenzylnitrid in 100 ml Benzol zugetropft. Anschließend wird 4 h am Rückfluß gehalten. Die Reaktionsmischung wird bei 0 °C mit 100 ml halbkonz. HCl hydrolysiert, die organische Phase abgetrennt und die wäßrige Phase zweimal mit je 200 ml Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. **2** wird im Hochvakuum kugelrohrdestilliert und **3** wird aus Methanol umkristallisiert. Keton **1** kann käuflich erworben werden.

p-Methoxybenzylethylketon (**2**)

Farbloses Öl, Sdp. 110 °C (10⁻⁴ Torr), Ausbeute 46%. – IR (Film): 3060, 3030 (CH arom.), 2970, 2930, 2900, 2830 (CH aliph.), 1710 (C=O), 1505, 1450 (C=C) [cm⁻¹]. – ¹H-NMR (CDCl₃, 60 MHz):

7,20–6,95 (4H, AA'BB', H arom.), 3,75 (3H, s, OCH₃), 3,55 (2H, s, benzyl. H), 2,40 (2H, q, ³J = 7,0 Hz, CH₂), 1,00 (3H, t, ³J = 7,0 Hz, CH₃) [ppm].

p-Methoxybenzylphenylketon (**3**)

Farblose Kristalle aus MeOH, Schmp. 87–89 °C, Ausbeute 23%. – IR (KBr): 3040, 3010 (CH arom.), 2980, 2920, 2900, 2880, 2820 (CH aliph.), 1680 (C=O), 1500, 1430 (C=C), 770, 730 (CH arom.) [cm⁻¹]. – ¹H-NMR (CDCl₃, 60 MHz): 7,98, 7,13 (9H, 2 m, H arom.), 4,15 (2H, s, benzyl. H), 3,75 (3H, s, OCH₃) [ppm].

Die Aminonitrile **4–6**

0,20 mol (11,80 g) NH₄Cl werden in 40 ml H₂O gelöst und mit 40 ml konz. NH₃ versetzt. Dann wird eine Lösung von 0,20 mol (10,80 g) NaCN in 20 ml H₂O zugegeben. Anschließend werden 0,20 mol des entsprechenden Ketons in 120 ml MeOH zugetropft. Während der Zugabe des Ketons bildet sich ein Niederschlag, der durch weitere Methanolzugabe wieder in Lösung geht. Nach einer Rührzeit von 15 h bei 50 °C wird die Lösung mit 2N HCl angesäuert (pH 2) und mit Ether extrahiert, um das überschüssige Keton zu entfernen. Die wäßrige Phase wird mit konz. NH₃ alkalisch gemacht und erneut mit Ether extrahiert. Die etherische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen.

[1-(*p*-Methoxy)phenyl-2-amino-2-cyano]propan (**4**)

Gelbes Öl, Ausbeute 56%. – IR (Film): 3360 (NH), 3040 (CH arom.), 2930, 2840 (CH aliph.), 2220 (CN), 1690, 1620 (NH), 1510, 1460 (C=C), 820 (CH arom.) [cm⁻¹].

[1-(*p*-Methoxy)phenyl-2-amino-2-cyano]butan (**5**)

Gelbes Öl, Ausbeute 24%. – IR (Film): 3380, 3310 (NH), 3080, 3020 (CH arom.), 2960, 2920, 2870, 2830 (CH aliph.), 2200 (CN), 1620 (NH), 1500, 1460 (C=C) [cm⁻¹].

[1-(*p*-Methoxy)phenyl-1-phenyl-2-amino-2-cyano]ethan (**6**)

Gelbes, wachsartiges Produkt, Ausbeute 34%. – IR (Film): 3380, 3310 (NH), 3060, 3020 (CH arom.), 2990, 2940, 2920, 2900, 2820 (CH aliph.), 2160 (CN), 1660 (NH), 1480, 1430 (C=C) [cm⁻¹].

Die Diamine **7–9**

67,20 mmol (2,55 g) LiAlH₄ werden in 70 ml abs. THF suspendiert. Zu dieser Suspension wer-

den 33,60 mmol des entsprechenden Aminonitrils in 50 ml abs. THF bei 0 °C unter N₂-Atmosphäre getropft. Anschließend wird die Reaktionsmischung 15 h refluxiert. Nach Abkühlen auf 0 °C wird vorsichtig mit 20 ml H₂O versetzt, das schlammige Hydrolyseprodukt abfiltriert und über Nacht in einer Soxhlet-Apparatur mit 150 ml THF ausgezogen. Filtrat und Extrakt werden vereinigt und vom Lösungsmittel befreit. Der ölige Rückstand wird kugelrohrdestilliert.

[1,2-Diamino-1-(*p*-methoxy)benzyl-1-methyl]ethan (**7**)

Farbloses Öl, Sdp. 90 °C (10⁻⁴ Torr), Ausbeute 18%. – IR (Film): 3360, 3280 (NH), 3040, 3000 (CH arom.), 2910, 2820 (CH aliph.), 1610, 1590 (NH), 1510 (C=C), 840 (CH arom.) [cm⁻¹]. – ¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): 7,10–6,84 (4H, AA'BB', H arom.), 3,79 (3H, s, OCH₃), 2,59 (2H, s, benzyl. H), 2,54 (2H, s, CH₂N), 1,35 (4H, m (br.), NH), 0,99 (3H, s, CH₃) [ppm].

[1,2-Diamino-1-(*p*-methoxy)benzyl-1-ethyl]ethan (**8**)

Farbloses Öl, Sdp. 95 °C (10⁻⁴ Torr), Ausbeute 15%. – IR (Film): 3360, 3280 (NH), 3050, 3020 (CH arom.), 2960, 2920, 2870, 2840, 2820 (CH aliph.), 1600, 1570 (NH), 1510, 1470 (C=C) [cm⁻¹]. – ¹H-NMR (CDCl₃, 60 MHz): 7,15–6,70 (4H, AA'BB', H arom.), 3,75 (3H, s, OCH₃), 2,55 (2H, s, benzyl. H), 2,45 (2H, s, CH₂N), 1,35 (2H, q, ³J = 6,0 Hz, CH₂), 1,10 (4H, m (br.), NH), 0,85 (3H, t, ³J = 6,0 Hz, CH₃) [ppm].

[1,2-Diamino-1-(*p*-methoxy)benzyl-1-phenyl]ethan (**9**)

Farbloses Öl, Sdp. 170 °C (10⁻⁴ Torr), Ausbeute 14%. – IR (Film): 3360, 3300 (NH), 3080, 3060, 3020 (CH arom.), 2990, 2940, 2920, 2900, 2830 (CH aliph.), 1605, 1570 (NH), 1500 (C=C) [cm⁻¹]. – ¹H-NMR (CDCl₃, 60 MHz): 7,20 (5H, m, H arom.), 7,10–6,65 (4H, AA'BB', H arom.), 3,70 (3H, s, OCH₃), 3,00, 2,65 (2H, AB, ²J = 13,0 Hz, benzyl. H), 2,80 (2H, s, CH₂N), 1,90 (4H, m (br.), NH) [ppm].

Die Liganden **10–12**

Zu einer Lösung von 7,20 mmol des entsprechenden Diamins in 150 ml abs. CH₂Cl₂ wird bei –78 °C unter N₂-Atmosphäre eine Lösung von 43,20 mmol (10,81 g) BBr₃ in 100 ml CH₂Cl₂ getropft und 24 h bei 20 °C gerührt. Bei 0 °C werden langsam 30 ml abs. Methanol zugegeben. Das aus-

gefallene Produkt wird schnell abgesaugt, mit wenig abs. CH₂Cl₂ gewaschen und im Hochvakuum (10⁻⁴ Torr) getrocknet.

[1,2-Diamino-1-(*p*-methoxy)benzyl-1-methyl]ethan-dihydrobromid (**10**)

Farbloses Pulver, Ausbeute quantitativ. – ¹H-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz): 7,05–6,70 (4H, AA'BB', H arom.), 5,45 (7H, m (br.), NH, OH), 2,73 (2H, s, benzyl. H), 2,62 (2H, s, CH₂N), 1,03 (3H, s, CH₃) [ppm].

[1,2-Diamino-1-(*p*-methoxy)benzyl-1-ethyl]ethan-dihydrobromid (**11**)

Farbloses Pulver, Ausbeute quantitativ. – ¹H-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz): 8,27, 8,17 (7H, 2 m (br.), NH, OH), 7,15–6,76 (4H, AA'BB', H arom.), 3,10 (2H, s, benzyl. H), 3,00, 2,86 (2H, AB, ²J = 14,3 Hz, CH₂N), 1,75, 1,61 (2H, 2 m, ³J = 7,3 Hz, CH₂), 0,96 (3H, t, ³J = 7,3 Hz, CH₃) [ppm].

[1,2-Diamino-1-(*p*-methoxy)benzyl-1-phenyl]ethan-dihydrobromid (**12**)

Farbloses Pulver, Ausbeute 17%. – ¹H-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz): 8,33 (7H, m, NH, OH), 7,28 (5H, m, H arom.), 7,16–6,74 (4H, AA'BB', H arom.), 3,14 (2H, s, benzyl. H), 2,91 (2H, s, CH₂N) [ppm].

Die Dichloroplatin(II)-Komplexe **13–15**

5,00 mmol **10**, **11** werden in 30 ml H₂O (**12** in 30 ml H₂O/*tert*-Butanol 1:1) gelöst und auf pH 5–6 gebracht. Unter Rühren wird eine Lösung von 5,00 mmol K₂PtCl₄ (2,075 g) in 50 ml H₂O zuge tropft. Anschließend wird bei 20 °C 4 h gerührt. Während der Reaktion wird ständig der pH-Wert kontrolliert und wenn notwendig mit 1 N NaOH auf pH 5–6 gebracht. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit H₂O gewaschen und im Hochvakuum (10⁻⁴ Torr) getrocknet.

[1,2-Diamino-1-(*p*-methoxy)benzyl-1-methyl]ethan(dichloro)platin(II) (**13**)

Gelbes Pulver, Zers. ab 300 °C, Ausbeute 36%. – IR (KBr): 3390 (OH), 3310, 3270, 3250, 3190 (NH), 3020, 3010 (CH arom.), 2970, 2960, 2940, 2920 (CH aliph.), 1620, 1585 (NH), 1515 (C=C), 730, 705 (CH arom.), 320 (PtCl) [cm⁻¹]. – ¹H-NMR (DMF-d₇, 250 MHz): 9,51 (1H, s (br.), OH), 7,22–6,80 (4H, AA'BB', H arom.), 5,43, 4,92 (4H, 2 m (3:1), NH), 3,14, 3,06 (2H, AB, ²J =

13,5 Hz, benzyl. H), 2,85, 2,57 (2H, 2m, CH₂N), 1,37 (3H, s, CH₃) [ppm].

Elementaranalyse C₁₀H₁₆Cl₂N₂O_{Pt} (446,2)

Ber. C 26,91 H 3,61 N 6,28,
Gef. C 27,01 H 3,61 N 6,08.

[1,2-Diamino-1-(*p*-methoxy)benzyl-1-ethyl]ethan(dichloro)platin(II) (**14**)

Gelbes Pulver, Zers. ab 300 °C, Ausbeute 46%.
– IR (KBr): 3400 (OH), 3280, 3230, 3180, 3120 (NH), 3040, 3010 (CH arom.), 2980, 2960, 2940, 2890 (CH aliph.), 1620, 1580 (NH), 1520 (C=C), 805, 750 (CH arom.), 330 (PtCl) [cm⁻¹]. – ¹H-NMR (DMF-d₇, 250 MHz): 9,53 (1H, s (br.), OH), 7,31–6,81 (4H, AA'BB', H arom.), 5,52, 5,03, 4,61 (4H, 3m (2:1:1), NH), 3,23, 2,96 (2H, AB, ²J = 14,0 Hz, benzyl. H), 2,71 (2H, s, CH₂N), 1,76 (2H, m, ³J = 7,5 Hz, CH₂), 1,07 (3H, t, ³J = 7,5 Hz, CH₃) [ppm].

Elementaranalyse C₁₁H₁₈Cl₂N₂O_{Pt} (460,3)

Ber. C 28,70 H 3,95 N 6,08,
Gef. C 28,60 H 3,98 N 5,99.

[1,2-Diamino-1-(*p*-methoxy)benzyl-1-phenyl]ethan(dichloro)platin(II) (**15**)

Gelbes Pulver, Zers. ab 300 °C, Ausbeute 38%.
– IR (KBr): 3520 (OH), 3320, 3250, 3220, 3130 (NH), 3040 (CH arom.), 2980, 2960, 2920 (CH aliph.), 1620, 1585 (NH), 1520 (C=C), 730, 705 (CH arom.), 320 (PtCl) [cm⁻¹]. – ¹H-NMR (DMF-d₇, 250 MHz): 9,43 (1H, s (br.), OH), 7,46, 7,33 (5H, 2m, H arom.), 6,77–6,57 (4H, AA'BB', H arom.), 5,61 (4H, m, NH), 3,56, 3,38 (2H, AB, ²J = 13,6 Hz, benzyl. H), 3,19 (2H, m, CH₂N) [ppm].

Elementaranalyse C₁₅H₁₈Cl₂N₂O_{Pt} (508,3)

Ber. C 35,44 H 3,58 N 5,51,
Gef. C 35,64 H 3,71 N 5,40.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Degussa AG für die Unterstützung dieser Arbeit.

-
- [1] H. Brunner, M. Schmidt und G. Unger, *Eur. J. Med. Chem., Chim. Ther.* **20**, 509 (1985).
 [2] H. Brunner, R. Kroiß und M. Schmidt, *Eur. J. Med. Chem., Chim. Ther.* **21**, 333 (1986).
 [3] U. Holzinger, Dissertation, Universität Regensburg (1987).
 [4] D. S. Martin (Jr.), R. A. Jacobson, L. D. Hunter und J. E. Benson, *Inorg. Chem.* **9**, 1276 (1970).
 [5] H. Brunner, P. Hankofer und B. Treittinger, *Chem. Ber.* **123**, 1029 (1990).
 [6] T. Totani, K. Aono, M. Komura und Y. Adachi, *Chem. Lett.* **1986**, 429.
 [7] C. F. J. Barnard, M. J. Cleare und P. C. Hydes, *Chem. Brit.* **1986**, 1001.
 [8] P. Schwartz, S. J. Meischen, G. D. Gale, L. P. Atkins, A. B. Smith und E. M. Walker, *Cancer Treat. Rep.* **61**, 1519 (1977).
 [9] Shianogi and Co., Ltd. (T. Totani, K. Aono, M. Komura, Inv.), *Eur. Pat.* 84 106 210.2 (März 1984); *C. A.* **102**, P 198 004v (1985).
 [10] F. Maiterth, Dissertation, Universität Regensburg (1991).
 [11] J. B. Canonne, G. Foscolos und G. Lemay, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 155.
 [12] *Organikum*, 17. Aufl., S. 447, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1986).
 [13] R. M. Herbst und T. B. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **54**, 2463 (1932).
 [14] D. L. Manson und O. C. Musgrave, *J. Chem. Soc.* **1963**, 1011.
 [15] F. C. Benton und T. E. Dillon, *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 1128 (1947).
 [16] L. M. Hall, R. J. Speer, H. J. Ridgway und S. J. Norton, *J. Inorg. Biochem.* **11**, 139 (1979).
 [17] G. L. Johnson, *Inorg. Synth.* **8**, 242 (1966).
 [18] R. Cailleau, R. Young, M. Olive und W. R. Reeves, *J. Nat. Canc. Inst.* **53**, 661 (1974).
 [19] R. J. Gillies, N. Didiers und M. Deuton, *Anal. Biochem.* **159**, 109 (1986).