

- res verfeinert, Reflex/Parameter-Verhältnis 9.25, alle sechs Schweratome bis auf C1-Atom mit anisotropen Auslenkungsparametern, alle Wasserstoffatome gefunden und frei verfeinert, anomale Dispersion berücksichtigt, shift/error < 0.001, Restelektronendichte 0.20 $\Delta e_{\text{e}} \text{\AA}^{-3}$ (105 pm neben Ge) und $-0.31 \Delta e_{\text{e}} \text{\AA}^{-3}$, $R = \sum(M(|F_0| - |F_c|)/|\sum F_0|) = 0.017$, $R_w = [\sum w(|F_0| - |F_c|)^2 / \sum w|F_0|^2]^{1/2} = 0.019$. Die Verfeinerung des anderen Enantiomers ergab einen größeren R-Wert (0.0263). Zur Stützung des FehlordnungsmodeLL wurden drei zusätzliche Datensätze zwischen -35°C und -110°C von einem anderen Kristall aufgenommen. Alle vier Messungen bestätigen das FehlordnungsmodeLL und damit die Nichtplanarität des $\text{C}_2\text{N}_2\text{Ge}-\text{Fünfringes}$, da sich die großen Schwingsellipsoide der C1-Atome als weitgehend temperaturvariant erweisen und somit nur durch die Fehlordnung und nicht durch thermisches Schwingsverhalten alleine erklärt werden können. Die Strukturverfeinerung ergab annähernd gleiche Verhältnisse der Hauptachsen der thermischen Parameter. b) Röntgenstrukturanalyse von **3c** ($\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{GeN}_2$): $a = 1378.40(4)$, $b = 1403.19(3)$, $c = 641.45(1)$ pm, $V = 124010$ pm 3 , Messung bei -50°C , $\rho_{\text{ber.}} = 1.289 \text{ gcm}^{-3}$, $\mu = 30.2 \text{ cm}^{-1}$, $Z = 4$, Kristallstruktursystem orthorhombisch, Raumgruppe $Pmmm$, Enraf-Nonius CAD4, $\lambda = 154.184$ pm (CuK α , Graphit-Monochromator), $\omega/2\theta$ -Scan, 4635 gemessene Reflexe ($-h, +k, \pm l$), davon 1143 unabhängig, 1143 zur Verfeinerung benutzt, Strukturlösung mit Patterson-Methode und Differenz-Fourier-Synthesen, empirische Absorptionskorrektur, Transmissionskoeffizienten 0.8592–0.999, 118 verfeinerte Parameter, $R = \sum(|F_0| - |F_c|)/|\sum F_0| = 0.035$, $R_w = [\sum w(|F_0| - |F_c|)^2 / \sum w|F_0|^2]^{1/2} = 0.029$, Restelektronendichte +0.68, $-0.76 \Delta e_{\text{e}} \text{\AA}^{-3}$. c) Weitere Einzelheiten zu den Kristallstrukturerorschungen können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, Gesellschaft für wissenschaftlich-technische Information mbH, W-7514 Eggenstein-Leopoldshafen 2, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-56578, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.
- [8] Röntgenstrukturanalyse von **5a** ($\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{Ge}_2\text{N}_4\text{NiO}_2$): $a = 965.1(1)$, $b = 1671.8(2)$, $c = 1811.5(2)$ pm, $\beta = 101.51(1)^{\circ}$, $V = 2864 \cdot 10^6$ pm 3 , Messung bei 25°C , $\rho_{\text{ber.}} = 1.39 \text{ gcm}^{-3}$, $\mu = 33.8 \text{ cm}^{-1}$, $F_{000} = 1248$, $Z = 4$, Kristallsystem monoklin, Raumgruppe $P2_1/c$, Enraf-Nonius CAD4, $\lambda = 154.184$ pm (CuK α , Graphit-Monochromator), Meßmethode $\omega/2\theta$, 5288 gemessene Reflexe ($\pm h, -k, +l$), davon 4651 unabhängig, 4645 zur Verfeinerung benutzt, Strukturlösung mit Patterson-Methode und Differenz-Fourier-Synthesen, empirische Absorptionskorrektur, Transmissionskoeffizienten 0.939–0.999, 280 verfeinerte Parameter, $R = \sum(|F_0| - |F_c|)/|\sum F_0| = 0.052$, $R_w = [\sum w(|F_0| - |F_c|)^2 / \sum w|F_0|^2]^{1/2} = 0.049$, Restelektronendichte +0.98, $-0.74 \Delta e \text{\AA}^{-3}$. Siehe auch [7c].
- [9] Vgl. beispielsweise F. Glocking, A. McGregor, M. L. Schneider, H. M. M. Shearer, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1970**, 32, 3101. Bisher sind nur wenige Metallkomplexe stabiler German- und Stannandiyle beschrieben worden; siehe beispielsweise W. P. Neumann, *Chem. Rev.* **1991**, 91, 311, zit. Lit.; M. S. Holt, W. L. Wilson, J. H. Nelson, *ibid.* **1989**, 89, 11.
- [10] a) Die Rechnungen wurden auf einem Cray-Vektorrechner mit dem GAUSSIAN-90-Programmpaket durchgeführt; vgl. W. J. Hehre, C. Radom, P. von R. Schleyer, J. A. Pople, *Ab Initio Molecular Orbital Theory*, Wiley, New York, **1986**; T. Clark, *A Handbook of Computational Chemistry*, Wiley, New York, **1985**. – Geometrien wurden im Rahmen der angegebenen Symmetrierestriktionen auf RHF- (Singulettzustände) bzw. UHF-Niveau (Tripletzustände) mit dem LANL1DZ-Basisatz vollständig optimiert. Auf diese Weise wurden auch die Frequenzrechnungen zur Bestimmung lokaler Minima durchgeführt. Die angegebenen Energien ergeben sich aus single-point-Rechnungen mit Störungstheorie bis zur zweiten Ordnung (MP2) auf den RHF/LANL1DZ-Geometrien; vgl. P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 270–283, 284–298, 299–310. b) Zur π -Elektronen-Delokalisierung vgl. S. S. Shaik, P. C. Hiberty, J.-M. Lefour, G. Ohanessian, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 363.
- [11] a) H. Bock, B. Solouki, H. S. Aygen, M. Bankmann, O. Breuer, R. Dammel, J. Dörr, M. Hann, D. Jaculi, J. Mintzer, S. Mohumand, H. Müller, P. Rosmus, B. Roth, J. Wittmann, H.-P. Wolf, *J. Mol. Struct.* **1988**, 173, 31; H. Bock, M. Kremer, H. Schmidbaur, *J. Organomet. Chem.* **1992**, 429, 1. b) Quarzrohr (40 \times 1.5 cm) mit drei 1.5 cm langen Quarzwolle-Pfropfen in 30 cm-Röhrenen an PE-Spektrometer Leybold Heraeus UPG 200 (Auflösung ca. 20 meV, 2000 counts s $^{-1}$). Die bei einem Meßdruck von 10^{-4} mbar registrierten Spektren sind mit $\text{Ar}(^2\text{P}_{3/2}) = 15.76 \text{ eV}$ geeicht. c) Vgl. beispielsweise K. Kimura, S. Katsumata, Y. Achiba, T. Yamazaki, S. Iwata, *Handbook of He-I Photoelectron Spectra of Fundamental Organic Molecules*, Halstead Press, New York, **1981**. d) Die Zuordnung der PE-Spektren von **3b** und **3c** durch Koopmans' Korrelation, $\text{IE}_M^V = -\epsilon_M^{\text{MNDO}}$, mit MNDO-Eigenwerten gelingt nicht zuverlässig, da bei Optimierung des Ge-Parametersatzes (M. J. S. Dewar, G. L. Grady, E. F. Healy, *Organometallics* **1987**, 6, 186–189) als einzige Stickstoffverbindung MeGeNM_2 berücksichtigt wurde. Qualitativ ist für die Reihenfolge der ersten drei Banden unter C_{2v} -Symmetrie $n_{\text{N}}^- (\text{a}_2) < n_{\text{Ge}}^- (\text{a}_1) \approx n_{\text{N}}^+ (\text{b}_1)$ zu erwarten, wobei jeweils die Banden der letzten M^{**} -Zustände überlappen.
- [12] a) A. J. Arduengo III, R. L. Harlow, M. Kline, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 361; b) A. J. Arduengo III, H. V. Rasika Dias, R. L. Harlow, M. Kline, *ibid.* **1992**, 114, 5530; c) D. A. Dixon, A. J. Arduengo III, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 4180.

Ein ^{99m}Tc -markiertes Biotinkonjugat in einer Tumor-„Pretargeting“-Methode mit monoklonalen Antikörpern**

Von Peter Koch und Helmut Robert Mäcke*

Ein wichtiges Bindeglied zwischen Chemie, Biologie und Medizin ist die Synthese und der Einsatz von difunktionellen Chelatbildnern, die einerseits eine gewisse Spezifität für radioaktive Metall-Ionen aufweisen, andererseits zur kovalenten Kupplung an Biomoleküle geeignet sind^[1]. Monoklonale Antikörper (MAbs) gehören zu den Biomolekülen, die in den letzten Jahren eine gewisse klinische Anwendung gefunden haben^[2]. Vor allem tumorassoziierte MAbs sind potentielle diagnostische und therapeutische Substanzen, wenn sie mit γ -Strahlen emittierenden (d.h. bild- oder signalgebenden) bzw. Partikelstrahlen emittierenden (d.h. zytotoxischen) Radionucliden markiert sind. Derartige MAbs werden zwar zum Teil erfolgreich in diagnostischen Anwendungen eingesetzt, haben allerdings auch Nachteile, wie eine lange Verweilzeit im Blut und eine unspezifische Bindung an normales Gewebe. Die Folgen davon sind ein ungünstiges Tumor/Nichttumor-Verhältnis bei der MAb-Bindung sowie eine hohe und unnötige Strahlenbelastung für den Patienten.

Ein erfolgversprechender Weg, das Problem lange zirkulierender, radioaktiv markierter Antikörper zu umgehen, wird unter dem Begriff „Pretargeting“-Strategie diskutiert und experimentell getestet. Wir berichten hier über die erfolgreiche Entwicklung der chemischen und physikochemischen Grundlagen einer solchen Strategie mit dem Avidin/Biotin-System^[3]. Dieses System ist schematisch in Abbildung 1 wiedergegeben. Es wird seit mehreren Jahren in einer Vielzahl biochemischer Studien, z.B. zur selektiven Proteinspaltung^[4], und vor allem in der biologischen und medizinischen Analytik^[5] eingesetzt.

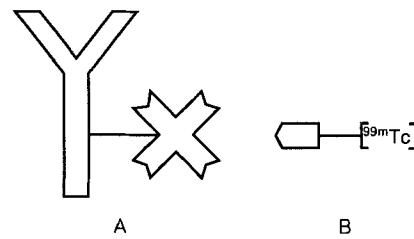


Abb. 1. Schematische Darstellung der Antikörper/Avidin/Biotin-Pretargeting-Methode. Avidin ist ein Glycoprotein ($M = 68000$) mit vier Bindungsstellen für Biotin ($K_D = 10^{-15} \text{ M}^{-1}$), ein natürlich auftretendes Vitamin. A = Konjugat aus MAb (links) und Avidin (rechts), B = Konjugat aus PnAO-Biotin und ^{99m}Tc .

Die hier vorgeschlagene Pretargeting-Strategie setzt einen tumorspezifischen monoklonalen Antikörper ein, an den Avidin kovalent unter Erhalt der Immunkompetenz gekuppelt ist. Das nichtradioaktive Konjugat wird injiziert und reichert sich über mehrere Tage im Tumor an. Anschließend wird ein radioaktiv markiertes Biotinderivat injiziert. Aufgrund seiner kurzen Verweilzeit im Blut bindet es rasch und irreversibel an tumorlokaliertes Avidin und kann durch

* Prof. Dr. H. R. Mäcke, Dipl.-Chem. P. Koch
Institut für Nuklearmedizin
Universitätsspital Basel
Petersgraben 4, CH-4031 Basel (Schweiz)

** Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Nr. 31-27739.89) und von der Regionalen Krebsliga beider Basel gefördert. Das Bild zur Patientenstudie verdanken wir Dr. G. Paganelli, Universität Mailand.

Aufnahmen mit einer externen γ -Kamera nachgewiesen werden. Das Radionuclid der Wahl für ein derartiges, schnell den Tumor lokalisierendes Agens ist ^{99m}Tc , ein Übergangsmetall-Radionuclid mit kurzer physikalischer Halbwertszeit und optimalen kernphysikalischen Eigenschaften für eine *in-vivo*-Anwendung. Da Biotin kaum zur Metallbindung geeignete funktionelle Gruppen enthält^[6], muß es mit difunktionalen Liganden so modifiziert werden, daß das resultierende Konjugat folgende Voraussetzungen erfüllt: 1) schnelle Komplexbildung bei $^{99m}\text{TcO}_4^-$ -Konzentrationen von etwa 10^{-7} M unter milden Bedingungen; 2) hohe kinetische Stabilität des ^{99m}Tc -markierten Konjugats unter physiologischen Bedingungen, d. h. es darf kein Transfer des Radionuclids auf konkurrierende Liganden, wie sie im Serum und Gewebe häufig vorkommen, stattfinden; 3) durch die Modifikation darf sich die biologische Aktivität des Biotins nicht ändern, d. h. die Bindung an Avidin muß weiterhin quantitativ sein.

Wir haben das PnAO-Biotin-Derivat **1**^[7] synthetisiert (Abb. 2, Tabelle 1), indem wir (+)-Biotin-N-hydroxysuccin-

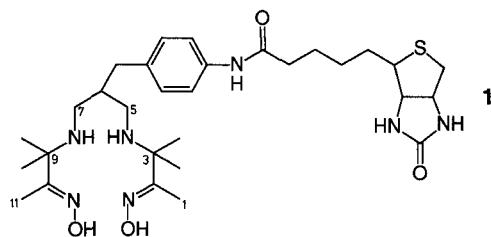


Abb. 2. Biotinylierter 6-p-Aminobenzyl-3,3,9,9-tetramethyl-4,8-diazaundecan-2,10-diondioxim = PnAO-Biotin = **1**.

imidester mit (6-p-Aminobenzyl-3,3,9,9-tetramethyl-4,8-diazaundecan-2,10-diondioximat)kupfer(II) in wasserfreiem Dimethylsulfoxid umsetzen, das als Schutzgruppe fungierende Cu^{2+} mit NaCN abspalteten und das Konjugat mitteldruckflüssigkeitschromatographisch (MPLC) reinigten^[8].

Tabelle 1. ^{13}C -NMR-, ^1H -NMR- und MS-Daten von PnAO-Biotin **1** [a].

^{13}C -NMR (90 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 25 °C, TMS): δ = 9.06 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{NOH}$), 25.03 ($\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CO})\text{NH}$), 25.56 ($(\text{CH}_3)_2\text{CNH}$), 27.97 (CH_2CHS), 28.13 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHS}$), 36.00 (PhCH_2CH), 36.05 ($\text{CH}_2(\text{CO})\text{NH}$), 39.85 (SCH_2CH), 40.91 (PhCH_2CH), 44.45 (CH_2NH), 55.25 (CH_2CHS), 56.68 ($(\text{CH}_3)_2\text{CNH}$), 59.06 (SCH_2CHNH), 60.90 (CH_2CHCHNH), 118.68 (Ph), 128.79 (Ph), 135.24 ($\text{C}(\text{Ph})\text{NH}(\text{CO})$), 136.78 ($\text{C}(\text{Ph})\text{CH}_2$), 159.69 ($\text{C}=\text{NOH}$), 162.50 ($\text{NH}(\text{CO})\text{NH}$), 170.69 ($\text{C}(\text{Ph})\text{NH}(\text{CO})$)

^1H -NMR (360 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 25 °C, TMS): δ = 1.10 (d, 12 H, $(\text{CH}_3)_2\text{CNH}$), 1.38 (m, 2 H, CH_2CHS), 1.50 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CO})$), 1.62 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1.68 (s, 6 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{NOH}$), 2.08 (m, 1 H, $\text{Ph}-\text{CH}_2\text{CH}$), 2.20 (d, 4 H, CH_2NH), 2.28 (t, 2 H, $\text{CH}_2(\text{CO})\text{NH}$), 2.47 (m, 2 H, PhCH_2CH), 2.58 (d, 1 H, SCH_2CHNH), 2.82 (q, 1 H, SCH_2CHNH), 3.12 (m, 1 H, CH_2CHS), 4.12 (m, 1 H, CHCHNH), 4.31 (m, 1 H, SCH_2CHNH), 6.39 (d, 2 H, $\text{NH}(\text{CO})\text{NH}$), 7.08 (d, 2 H, Ph), 7.46 (d, 2 H, Ph), 9.77 (s, 1 H, $\text{PhNH}(\text{CO})$), 10.37 (s, 2 H, $\text{C}=\text{NOH}$)

FAB-MS (8 keV): m/z 604 (M^+)

[a] Die NMR-Signale wurden mit Hilfe der Experimente HCCORR und COLOC zugeordnet.

Die Synthese des ^{99m}Tc -Komplexes unterliegt zwei sehr wichtigen und einschränkenden Rahmenbedingungen. Ausgangsmaterial ist eine ca. 10^{-7} M physiologische Kochsalzlösung von TcO_4^- , d. h. ein Edukt – Generator-eluiertes TcO_4^- – liegt relativ verdünnt vor und muß zu einer zur koordinativen Bindung geeigneten Oxidationsstufe reduziert werden. Üblicherweise wird Sn^{2+} in Gegenwart der schwachen Kom-

plexbildner Citrat oder Tartrat als Zwei-Elektronen-Reduktionsmittel verwendet. Diese Liganden sollen die Bildung von Technetium/Zinn-Kolloiden verhindern und Technetium(v) auf die Technetium-affinen Liganden, die an Biomoleküle gekoppelt sind, übertragen. Das von uns auf diesen Grundlagen entwickelte Markierungsprotokoll ergibt innerhalb von 15 min bei Raumtemperatur und physiologischem pH eine Markierungsausbeute von 99 % (siehe *Experimentelles*).

Die Qualitätskontrolle von ^{99m}Tc -PnAO-Biotin bezüglich der radiochemischen Reinheit wurde hochdruckflüssigkeitschromatographisch (HPLC) durchgeführt^[8]. Das ^{99m}Tc -markierte Konjugat (>99 %) eluierte nach 2 min 18 s, TcO_4^- nach 1 min 30 s und ^{99m}Tc -Tartrat nach 1 min 5 s.

Die biologische Aktivität von ^{99m}Tc -PnAO-Biotin wurde mit zwei ähnlichen Experimenten getestet. Im ersten wurde das markierte Konjugat mit Avidin bei 37 °C im Phosphatpuffer (pH 7.4) 10 min unter Schütteln inkubiert und danach einer Gelfiltration (Sephadex G50) unterzogen. Etwa 99 % des ^{99m}Tc waren an das hochmolekulare Protein Avidin gebunden – ein deutlicher Hinweis, daß das Biotin bei der Modifizierung seine biologische Aktivität bewahrt hat. Im zweiten Experiment, das eher der Situation in einem soliden Tumor ähnelt, wurde die Bindungsfähigkeit mit Avidin, das an Agarosekügelchen immobilisiert war, getestet. ^{99m}Tc -PnAO-Biotin wurde auf die Säule gebracht und langsam (1 mL pro min) mit Phosphatpuffer (pH 7.4) eluiert. 98 ± 2 % (Mittelwert aus fünf Versuchen) der Radioaktivität war an das immobilisierte Avidin gebunden, was wiederum als starker Hinweis darauf gelten kann, daß das modifizierte Biotin eine hohe Affinität zu Avidin aufweist.

Die kinetische Stabilität von ^{99m}Tc -PnAO-Biotin bezüglich der Abdissoziation des Metall-Ions, der Disproportionierung oder des Transfers von $^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}$ zu Serumproteinen wurde durch Inkubation mit Phosphat-gepuffter physiologischer Kochsalzlösung (37 °C) während 24 h getestet. Es wurden mehrere Proben genommen (nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 und 24 h) und mit HPLC und TLC (Silicagel, 2-Propanol/25proz. NH_3 , 9/1) analysiert. Innerhalb der ersten 6 h trat kein signifikanter Verlust an gebundenem ^{99m}Tc auf, und nach 24 h waren 2.5 % TcO_4^- nachweisbar. In einem zweiten Experiment wurde ^{99m}Tc -PnAO-Biotin mit frisch gewonnenem humanem Serum inkubiert und in den gleichen Zeitabständen wie beim oben beschriebenen Experiment durch Gelfiltration (Biogel P2) analysiert. Auch unter diesen experimentellen Bedingungen war die Stabilität des Konjugats ähnlich hoch.

Die physikochemischen Daten zeigen, daß ^{99m}Tc -PnAO-Biotin neutral und lipophil ist: Es wird leicht in Diethylether extrahiert und wandert bei der Papierelektrophorese weder anodisch noch kathodisch. Bereits früher waren andere PnAO-Derivate als Chelatliganden für Technetium getestet worden, und eine Röntgenstrukturanalyse zeigte, daß ^{99m}Tc im entsprechenden Komplex fünffach koordiniert vorliegt, wobei eine $\text{Tc}=\text{O}$ -Einheit die Spitze einer quadratischen Pyramide einnimmt und der vierzählige Ligand sich pseudomakrocyclisch anordnet mit einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen den beiden Oxim-Sauerstoffatomen. Im Koordinationsverband bewirkt die TcO^{3+} -Einheit eine Abspaltung der beiden Aminprotonen des Liganden, was den neutralen Komplex erklärt^[9].

Nach einer Prüfung auf Sterilität und Pyrogenfreiheit (Pyrogen = fieberauslösende Substanz) wurde das Konjugat erfolgreich in einem Dreischrittverfahren in der Diagnose von tumorkranken Patienten eingesetzt, und eine klinische Studie mit 15 Gehirntumorpatienten wurde inzwischen abgeschlossen. Die Komplex- und Konjugatstabilität, die sich im in-vitro-Experiment zeigte, wurde *in vivo* bestätigt. Außer-

dem konnte die hohe Affinität von ^{99m}Tc -PnAO-Biotin für tumorassoziiertes Avidin durch Imaging mit einer externen γ -Kamera nachgewiesen werden. Ein typisches Beispiel für den positiven Nachweis eines Gehirntumors zeigt Abbildung 3^[10]. In dieser Studie wurde somit erstmals erfolgreich



Abb. 3. Einphotonenemissions-Computer-tomographie (SPECT) eines Patienten mit einem Gehirntumor. Die Aufnahme erfolgte 30 min nach der Injektion von ^{99m}Tc -PnAO-Biotin. Ein Gehirntumor-spezifischer, avidinierter monoklonaler Antikörper war drei Tage zuvor injiziert worden. Der Tumor ist am linken Rand in der Mitte deutlich zu erkennen.

ein ^{99m}Tc -Komplex in Patienten in einer Pretargeting-Methode eingesetzt. Ähnliche Komplexe für therapeutische Anwendungen werden zur Zeit entwickelt.

Experimentelles

Die neunstufige Synthese von 1 wird an anderer Stelle publiziert werden.

Markierung von 1 mit ^{99m}Tc : 1.7 mL einer N_2 -gesättigten Lösung von 900 μg (1.49 μmol) 1, 4.5 μg (0.02 μmol) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 8.05 mg (28.5 μmol) Kaliumnatriumtartrat $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ werden mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt. Zu dieser Lösung werden 740–1100 MBq frisch eluiertes $^{99m}\text{TcO}_4^-$ gegeben; nach ca. 15 min bei Raumtemperatur ist die Reaktion abgeschlossen, und das Präparat ist nach Sterilfiltration bereit zur Injektion. Soll eine Markierung mit hoher spezifischer Aktivität erreicht werden, kann überschüssiges unmarkiertes 1 mit einer C₁₈-Sepak-Kartusche leicht entfernt werden: Hydrophiles I wird mit H_2O ausgewaschen, während ^{99m}Tc -PnAO-Biotin mit Methanol entfernt wird. Das Lösungsmittel wird bei 40 °C unter N_2 abgedampft und der Rückstand zur Injektion in Phosphatpuffer aufgenommen.

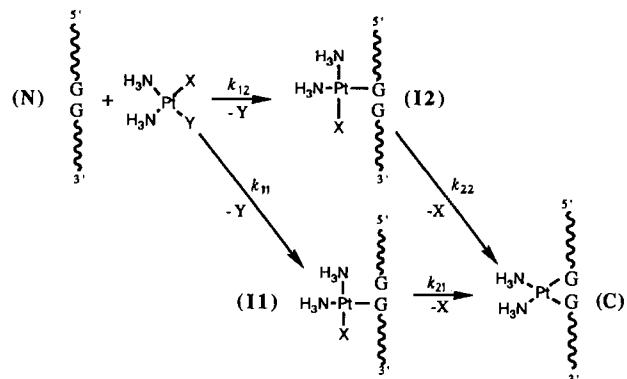
Eingegangen am 8. April,
veränderte Fassung am 4. Juni 1992 [Z 5292]

- [1] M. K. Moi, C. F. Meares, S. J. DeNardo, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6266–6267; D. J. Hnatowich, U. U. Layne, R. J. Childs, D. Lateigne, M. A. Davis, T. W. Griffin, P. W. Doherty, *Science* **1983**, *220*, 613–617; M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, R. W. Atcher, J. Schlam, J. Esteban, D. E. Simpson, D. Colcher, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 2772–2781; G. Ruser, W. Ritter, H. R. Maecke, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *2*, 345–349.
- [2] J. P. Mach, S. Correl, M. Forni, J. Ritschard, A. Donath, P. Alberto, *N. Engl. J. Med.* **1980**, *303*, 5–10; T. A. Waldmann, *Science* **1991**, *252*, 1657–1662.
- [3] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Immunol. Today* **1984**, *5*, 39–42.
- [4] D. Hoyer, H. Cho, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3249–3250.
- [5] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 408–412.
- [6] H. Sigel, *Experientia* **1981**, *37*, 789–798.
- [7] PnAO ist ein Acronym, das für diese Art Liganden verwendet wird (Propylenamindioxim).
- [8] Das Produkt ist gemäß TLC (Kieselgel, $\text{CH}_3\text{CN}/25\text{proz. NH}_3$ 10/1, $R_f = 0.18$) und HPLC (C18, Bondapak 10 μm , 0.01 M Ammoniumacetat (pH 7)/ CH_3CN 2/3) rein. Die ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektren und die FAB-Massenspektren sind in Einklang mit der vorgeschlagenen Struktur.
- [9] S. Jurisson, E. O. Schlepper, D. E. Troutner, L. R. Cannings, D. P. Nowotnik, R. D. Neirinckx, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 543–549.
- [10] Bei einem Teil der Patienten wurde die Avidin/Biotin-Pretargeting-Methode mit der Anwendung eines ^{99m}Tc -markierten Antikörpers verglichen. Die Pretargeting-Methode zeigte den Tumor sehr deutlich, da die unspezifische Aufnahme des Radiotracer sehr gering war, so daß ein gutes Tumor/Nichttumor-Verhältnis resultierte, während der direkt markierte Antikörper eine hohe unspezifische Lokalisierung aufwies. Eine ausführliche Studie zum Vergleich der beiden Methoden wird an anderer Stelle publiziert werden.

Verknüpfung benachbarter Guaninreste in einem Oligonucleotid durch *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺: kinetische Analyse der Zwei-Schritt-Reaktion**

Von Florence Gonnet, Jiří Kozelka*
und Jean-Claude Chottard

Das Antitumormittel *cis*-Diammindichloroplatin(II) („Cisplatin“) bindet an DNA unter Verknüpfung von zwei benachbarten Guaninresten innerhalb des DNA-Stranges^[1]. Das Makrochelat wird in einer Zwei-Schritt-Reaktion (Schema 1) mit einer der hydrolysierten Cisplatin-Formen – *cis*-[PtCl(NH₃)₂(H₂O)]⁺ oder *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺ – als reaktiver Platinverbindung gebildet. Dabei sind 60–65 % des Platins an GG-Einheiten der DNA gebunden, wie sowohl in in-vitro- als auch in in-vivo-Experimenten gezeigt werden konnte^[2–7]. Dieser Prozentsatz überschreitet signifikant die Wahrscheinlichkeit, zwei benachbarte Guaninreste aufzufinden. Da die in Schema 1 gezeigten Reaktionen unter den entsprechenden experimentellen Bedingungen irreversibel sind, bedeutet dies, daß die Reaktivität von Guaninresten in GG-Sequenzen höher ist als in anderen Positionen. Die Ursache für diese unterschiedliche Reaktivität von Guaninresten ist unbekannt. Ein Faktor ist möglicherweise die Verstärkung des negativen Potentials am N7-Atom eines Guaninrestes, der sich in direkter Nachbarschaft zu einem weiteren Guaninrest befindet, wie durch ab-initio-Rechnungen vorausgesagt wurde^[8]. Wie wir kürzlich durch Molecular Modelling zeigen konnten^[1], könnten auch nicht-bindende Wechselwirkungen im Übergangszustand^[9], vor allem solche zwischen den Liganden am Platin und den DNA-Resten in Nachbarschaft zum platinierten Guanin, eine Rolle spielen. Ein solcher Mechanismus wäre ligandenabhängig, und die Bindungsselektivität des Platinkomplexes sollte sich durch die Wahl der Liganden beeinflussen lassen.



Schema 1. Bindung eines *cis*-Pt(X)(Y)(NH₃)₂-Komplexes (X, Y = austretende Gruppen) an die GpG-Sequenz eines Oligonucleotids.

Es stellt sich sofort die Frage, ob der 5'-Guaninrest einer d(GpG)-Sequenz die Reaktivität des 3'-Guanins erhöht oder umgekehrt. Bisher konnte auf diese Frage keine Antwort gefunden werden, weil es nicht möglich war, die Geschwindigkeitskonstanten für die Platinierung der beiden Guaninreste (k_{11} und k_{12} in Schema 1) getrennt zu bestimmen.

[*] Dr. J. Kozelka, F. Gonnet, J.-C. Chottard
URA 400, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques
45 rue des Saints Pères, F-75270 Paris Cedex 06 (Frankreich)

[**] Wir danken Dr. J. Igolen für das d(TGG)-Trinucleotid. Diese Arbeit wurde durch die Europäische Gemeinschaft gefördert (Projekt-Nr. ST2J-0462-C), wodurch ein regulärer wissenschaftlicher Austausch mit der Arbeitsgruppe von Prof. J. Reedijk, Leiden, NL, möglich war.