

**Wechselwirkungen des Zytostatikums
cis-[Amminchloro(2-methylpyridin)platin(II)]
(AMD 473) mit methioninhaltigen Peptiden**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften der
Fakultät für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

Friederike Becker

Bochum 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2000 bis Oktober 2003 am Lehrstuhl für Analytische Chemie der Ruhr-Universität Bochum angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. W. S. Sheldrick PhD für den mir gewährten Freiraum bei der Gestaltung des Themas, sein Interesse und seine ständige Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Reaktionsverhalten von Cisplatin in vivo	2
1.2	Cisplatinanaloge Antitumorpräparate	5
1.3	Reaktionsverhalten von Cisplatin gegenüber schwefelhaltigen Verbindungen.....	7
2	Problemstellung	9
3	Kenntnisstand	11
3.1	Reaktionsverhalten von AMD 494 und AMD 473	11
3.2	Reaktionen von AMD 473 mit Oligonukleotiden.....	14
3.3	Reaktionsverhalten von Cisplatin	15
3.4	Reaktionen von Cisplatin mit Methioninhaltigen Verbindungen	16
3.5	Konkurrenzreaktion von Peptiden und Nukleotiden mit Pt(II)-Komplexen.....	18
3.6	Peptidspaltung in Anwesenheit von Pt(II)-Komplexen	21
4	Methoden	23
4.1	Chromatographische Untersuchungen	23
4.1.1	Retentionsmechanismus	24
4.1.2	Variation der Trennparameter	26
4.1.3	Chromatographische Untersuchung der Nukleotidkomplexe	27
4.2	Methoden zur Produktcharakterisierung	28
5	NMR- und Strukturdaten der eingesetzten Peptide, Nukleotide und Metallkomplexe	30
6	Reaktionen von AMD 494	36
6.1	Umsetzungen mit dem Tripeptid N-Ac-Gly-Gly-Met-OH	36
6.1.1	Chromatographisches System.....	36
6.1.2	pH-abhängige Produktverteilung	37
6.1.3	Kinetische Untersuchung	39

6.2	Charakterisierung der Komplexe	43
6.3	Diskussion der Ergebnisse und Vergleich von AMD 494 mit Cisplatin und Carboplatin.....	51
7	Reaktionen von $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$	56
7.1	Umsetzungen mit N-Ac-Met-OH.....	56
7.1.1	Chromatographisches System.....	56
7.1.2	pH-abhängige Produktverteilung	57
7.1.3	Kinetische Untersuchung	59
7.1.4	Charakterisierung der Komplexe	60
7.2	Umsetzungen mit dem Tripeptid N-Ac-Gly-Gly-Met-OH	61
7.2.1	Chromatographisches System.....	61
7.2.2	pH-abhängige Produktverteilung	62
7.2.3	Kinetische Untersuchung	63
7.3	Umsetzungen mit dem Tripeptid N-Ac-Gly-Met-Gly-OH	68
7.3.1	Chromatographisches System.....	68
7.3.2	pH-abhängige Produktverteilung	69
7.3.3	Kinetische Untersuchung	71
7.3.4	Charakterisierung der Komplexe	72
7.4	NMR-Charakterisierung der Komplexe	75
7.4.1	Das System $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH	75
7.5	Diskussion.....	85
8	Reaktionsvergleich zwischen AMD 494 und AMD 473.....	89
9	Reaktionen von Cisplatin mit N-Ac-Met-OH und $5'\text{-GMP}^{2-}$	91
9.1	Chromatographisches System	91
9.1.1	pH-abhängige Produktverteilung	92
9.1.2	Kinetische Untersuchung	94
9.2	Charakterisierung der Komplexe	100
9.3	Diskussion.....	115

10	Reaktionen von Cisplatin mit d-ATGGTA in Anwesenheit von N-Ac-Met-OH.....	119
10.1	Chromatographisches System.....	119
10.1.1	Kinetische Untersuchung des Systems [Pt(NH ₃) ₂ (N-Ac-MetH ₁ -OH-κ ² -S,N _M)] ⁺ / d-ATGGTA	119
10.2	Ergebnisse und Diskussion.....	121
11	Zusammenfassung	127
12	Experimenteller Teil.....	138
12.1	Darstellung der Ausgangsverbindungen.....	138
12.1.1	Darstellung von AMD 494.....	138
12.1.2	Darstellung von AMD 473.....	138
12.1.3	Darstellung von [Pt(H ₂ O) ₂ (NH ₃)(2-Methylpyridin)] ²⁺	139
12.1.4	Darstellung von acetylgeschützten N-Ac-Gly-Gly-Met-OH und N-Ac-Gly-Met-Gly-OH	139
12.2	Darstellung der Reaktionslösungen.....	140
12.2.1	Analytische Reaktionslösungen für die Chromatographie	140
12.2.2	Reaktionslösungen für semi-präparative Ansätze.....	140
12.3	Chromatographisches System.....	141
12.3.1	Herstellung der chromatographischen Säule.....	141
12.3.2	Verwendete Chromatographen.....	142
12.4	NMR-Spektroskopie.....	143
12.5	Massenspektrometrie.....	143
12.6	Sonstiges.....	144
12.7	Verwendete Chemikalien.....	144
13	Literaturverzeichnis	145

Abkürzungen

5'-GMP ²⁻	5'-Guanosinmonophosphat
AMD 473	cis-Ammindichloro(2-methylpyridin)platin(II)
AMD 494	cis-Ammindichloro(pyridin)platin(II)
B _{int}	internes Magnetfeld
Carboplatin	cis-Diammin(1,1-dicarboxylato-cylco-butan)platin(II)
Cisplatin	cis-Diammindichloroplatin(II)
d	Dublett
d-A	Deoxyadenosinmonophosphat
d-G	Deoxyguanosinmonophosphat
dien/ Pt(dien)	Diethylen-triamin, N-(2-Aminoethyl)ethan-1,2-diamin
d-T	Deoxythymineinmonophosphat
en/ Pt(en)	Ethylendiamin, Ethan-1,2-diamin
HFB	Heptafluorbuttersäure, Perfluorbuttersäure
H-Met-OH	N-methionin
HMG	High Mobility Group
IPR	Ionenpaarreagenz
m	Multipllett
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
N-Ac-Gly-Gly-Met-OH	N-Acetylglycylglycylmethionin
N-Ac-Gly-Met-Gly-OH	N-Acetylglycylmethionylglycin
N-Ac-Met-OH	N-Acetylmethionin
NER	Nucleotid Excision Repair
PFP	Pentafluorpropionsäure, Perfluorpropionsäure
RP	reversed-phase
RPIPC	reversed-phase Ionenpaarchromatographie
s	Singulett
TFA	Trifluoressigsäure
TSP	Natrium-3-(trimethylsilyl)tetradeuteropropionat

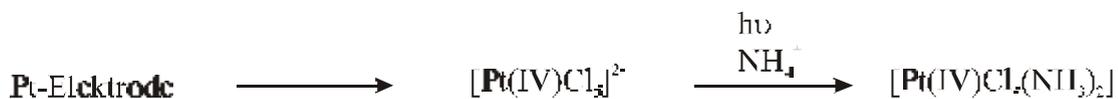
1 Einleitung

Aus einer neuen Studie der Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht hervor, dass weltweit etwa 10 Millionen Menschen [1] und laut Angaben der Deutschen Krebshilfe pro Jahr in der BRD etwa 350 000 Menschen neu an Krebs erkranken, so dass Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland ist. Im Jahre 2001 starben schätzungsweise 210 000 Menschen in Folge einer Krebserkrankung [2].

Im allgemeinen Sprachgebrauch wird von Krebs als einer Krankheit gesprochen, doch darf nicht darüber hinweggesehen werden, dass sich hinter diesem Begriff etwa hundert Krankheitsformen verbergen. Allen gemein ist dabei der unkontrollierte Wachstum von Gewebe, welches sich unbegrenzt ausdehnt, dabei lebenswichtige Funktionen stört und damit lebensbedrohlich wird. [3, 4]. Die Ursachen der Erkrankungen werden zum Beispiel in Gen- und Umweltfaktoren wie chemischen Karzinogenen, Strahlung und Viren vermutet, wobei auch nichtvirale Infektionen und hormonimitierende synthetische Substanzen als mögliche Verursacher gelten.

Eine der bahnbrechendsten Entdeckungen in der Krebstherapie war die Entdeckung der cytostatischen Wirkung eines klassisch anorganischen Komplexes durch ROSENBERG.

Er untersuchte den Einfluss von schwachen Wechselstrom auf den Wachstum von Bakterien und entdeckte, dass es zu einer Hemmung der Zellteilung ohne Inhibition des Bakterienwachstums kam, welcher zu einer Ausbildung langer fadenförmiger Zellen führte. Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, dass nicht der Strom sondern Elektrolyseprodukte der Platinelektroden in der ammoniakalischen Lösung dafür verantwortlich waren.



Weitere Untersuchungen zeigten, dass das unter diesen Umständen unter anderen entstehende cis-[Pt(Cl)₂(NH₃)₂], auch Cisplatin genannt, den filamentösen Wachstum bewirkte [5-9]. Cisplatin ist auch bekannt als Peyronesche Salz, benannt nach Michele Peyrone, der es zuerst synthetisierte [10].

Cisplatin wird als Einzelpräparat oder in Verbindung mit anderen, synergistisch wirkenden Zytostatika wie Bleomycin, Vinblastin, Adriamycin, Cyclophosphamid, Doxorubicin oder Ethidiumbromid gegen Hoden-, Ovarial-, Blasen- und Lungenkarzinome sowie gegen Tumore im Hals-Kopf-Bereich eingesetzt [11]. Die deutlich gesunkene Mortalität bei Hoden- und Blasenkrebs ist zumindest teilweise auf die bis über 90 % angestiegenen Heilungschancen für diese Tumorarten zurückzuführen. Cisplatin ist seit 1983 das umsatzstärkste Cytostatikum in den USA [12].

Dosislimitierend in den Behandlungen mit Cisplatin sind die starken Nebenwirkungen, wie die Nephrotoxizität, die Otoxizität, die Myelotoxizität, Beeinträchtigungen des Gastrointestinalbereichs sowie periphere Neuropathien, wobei dort vor allem die Nierenschädigung und die Knochenmarkschädigung stark einschränkend sind.

1.1 Reaktionsverhalten von Cisplatin in vivo

Das seit 1978 zugelassene Cisplatin wird normalerweise in einer wässrigen salzhaltigen Lösung dem Patienten intravenös verabreicht, dabei bindet sich ungefähr 50 % an Serumproteine und der Rest wird wieder ausgeschieden. Aufgrund der hohen Chloridkonzentration im Blutserum ($[Cl^-] = 0,104 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) verbleibt Cisplatin unverändert, so dass es als neutrales Molekül passiv durch die Zellmembran in das Cytoplasma diffundiert, wo die Chlorid-Konzentration sehr viel geringer ist ($[Cl^-] = 0,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) [13]. Durch Hydrolyse entstehen kationische Komplexe, die sehr viel reaktiver sind und zum Polyanion DNA diffundieren (s. Abb.1.1). Die durch Deprotonierung entstehenden Hydroxospezies sind allerdings wiederum unreaktiver.

In einfachen cytoplasmafreien Systemen konnte gezeigt werden, dass die Reaktionen zwischen Antitumorpräparat und DNA eher kinetisch als thermodynamisch kontrolliert sind, wobei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Hydrolyse des Cisplatin ist [19]. Die Reaktionen von Cisplatin mit DNA *in vivo* führen zu einer Reihe von Produkten, wobei die Koordinierung zweier Basen desselben Strangs oder eines komplementären Strangs statt finden kann, was im ersten Fall zu Intrastrang- und im zweiten Fall zu Interstrangprodukten führt (s. Abb. 1.2).

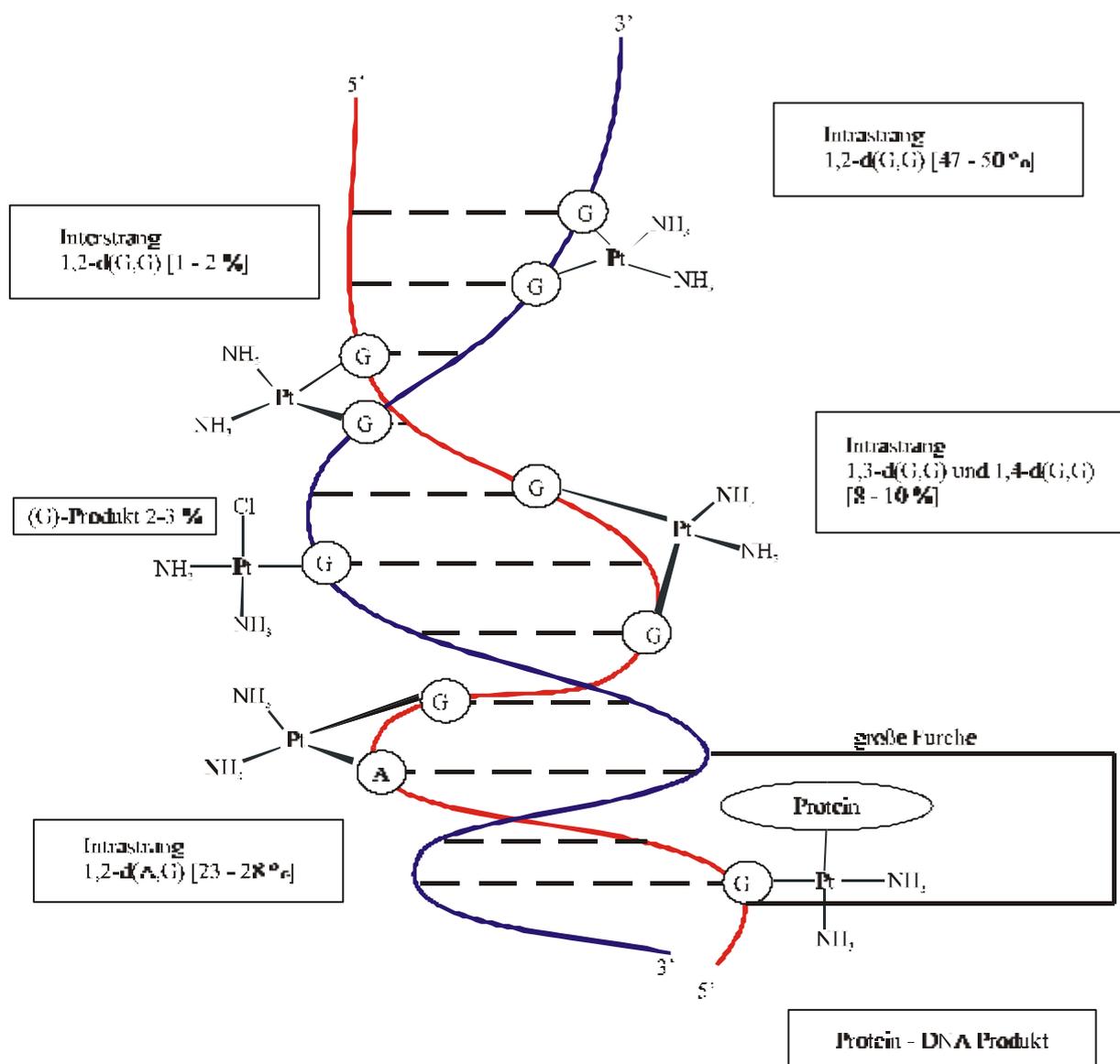


Abb 1.2: Reaktionsprodukte von Cisplatin mit DNA; typische Populationen sind in Klammern angegeben

Das dominierend Hauptprodukt ist das 1,2-d(G,G)-Intrastrang Produkt, in dem zwei benachbarte Guaninbasen involviert sind [13]. Ein weiteres Produkt ist ein 1,2-d(A,G)-Interstrang, und das 1,2-d(G,G)-Interstrangprodukte sowie ein 1,3- und 1,4-d(G,G)-Produkt, in dem die beiden Nukleobasen nicht mehr direkt benachbart sind. Die Bildung einer koordinativen Bindung zwischen Cisplatin und DNA bewirkt eine strukturelle Störung der helicalen Struktur, wobei die DNA um bis zu 35° gebogen wird, allerdings ist noch nicht geklärt ob dann Reparaturmechanismen, wie die Nucleotide Excision Repair (NER), aktiviert werden, oder ob die Bindung sogenannter High Mobility Groups (HMG), die sich ausgleichend an der Verkrümmung anlagern, die DNA-Platin-Addukte für eine Reparatur blockieren [13, 20], oder ob ein Zusammenwirken mehrerer Faktoren die Sensitivität eines Tumors gegenüber Cisplatin bewirken [21].

1.2 Cisplatinanaloge Antitumorpräparate

Neben den starken Nebenwirkungen wird im Laufe der Anwendung von Cisplatin durch eine auftretende Wirkstoffresistenz der therapeutische Effekt eingeschränkt [22-24]. Die Resistenzentwicklung ist genauso wie der Reaktionsmechanismus noch nicht vollständig geklärt. Mögliche Erklärungen werden in der Literatur diskutiert. Dazu zählen die möglichen Veränderungen des transmembranen Transports von Cisplatin [25], die Deaktivierung von Cisplatin durch intrazelluläre Thiole [26-27], verbesserte DNA-Reparaturfähigkeit [28], Beeinflussung der Aktivität der Proteinkinase, Variationen im Folat-Metabolismus und in der Expression von Onkogenen [29]. Aus Gründen der Unverträglichkeit und der Resistenz wurden eine Vielzahl von neuen cisplatinanalogen Verbindungen getestet von denen nur wenige die klinischen Studien erreichten. Eine kleine Auswahl an platinhaltigen Cytostatika sind in der nachfolgenden Abbildung 1.3 präsentiert.

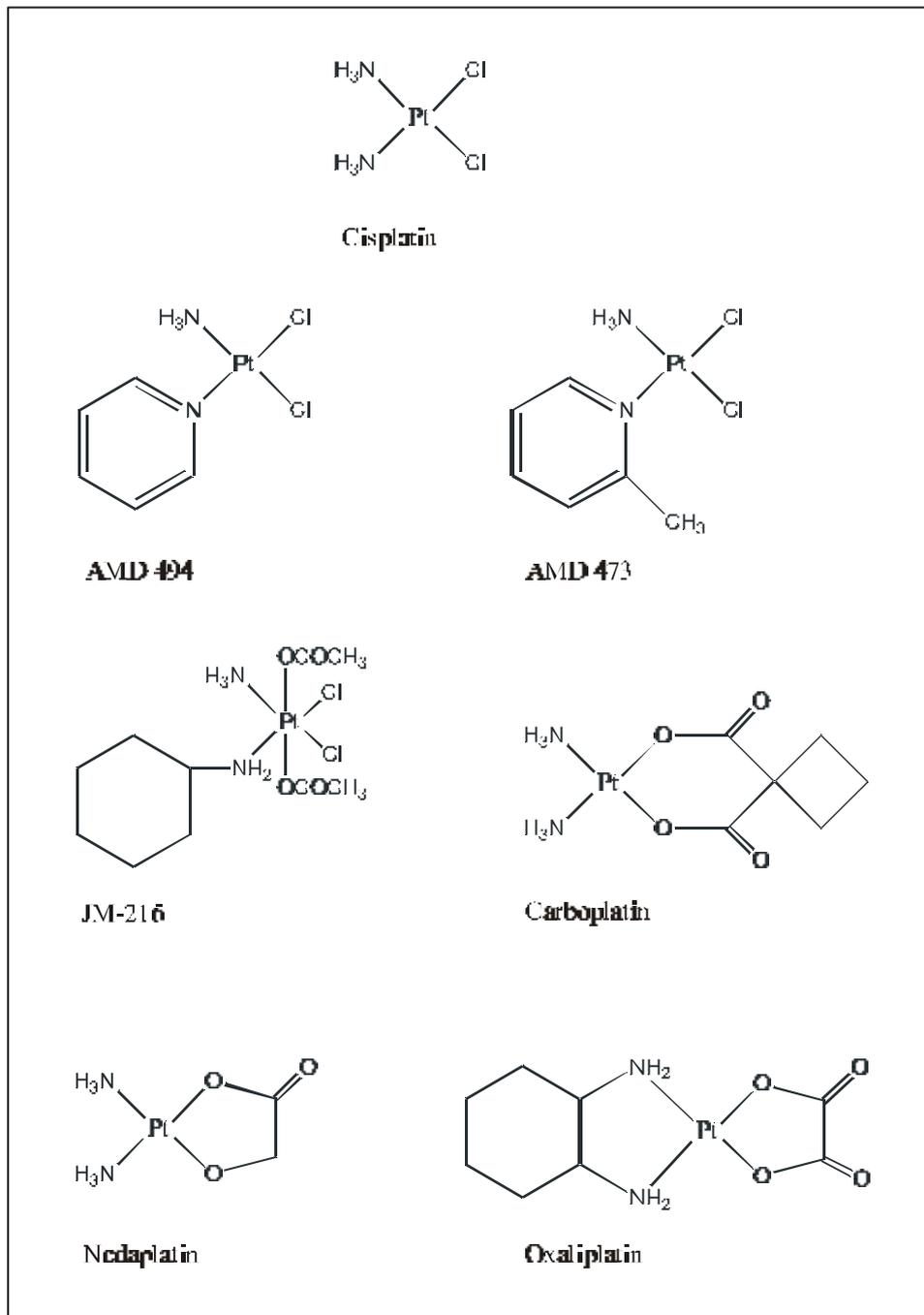


Abb. 1.3: Strukturen einiger platinhaltiger Antitumorpräparate

In Zellen, die eine Resistenz gegenüber Cisplatin entwickelt haben oder besitzen, ist die Konzentration an intrazellulären Thiolen erhöht. Für eine erfolgreiche Therapie bei entwickelter Resistenz wurde eine Verbindung gesucht, die eine geringere Reaktivität gegenüber schwefelhaltigen Verbindungen besitzt. Das führte zu AMD 473 einem cisplatinanalogen Präparat der dritten Generation, bei dem ein Amminligand durch ein 2-

Methylpyridin ersetzt wurde. Die Methylgruppe des aromatischen Liganden befindet sich fast senkrecht zu der quadratisch-planaren Koordinationsebene des Platins und behindert einen axialen Ligandenaustausch cis zum aromatischen Liganden. AMD 473 befindet sich in der klinischen Erprobungsphase Stufe III, in denen geringere Resistenzfaktoren gegenüber Cisplatin bestätigt werden konnten. In der Anwendung zeigt sich, dass sich die Myelotoxizität (hauptsächlich: Thrombopenie) dosislimitierend auswirkt, wohingegen keine Anzeichen von Nephro- oder Neurotoxizität auftreten [30]. Darüber hinaus zeigten die letzten Studien, dass AMD 473 auch bei einer oralen Verabreichung eine Tumorphibierung aufweist. Der therapeutische Index entspricht dafür ungefähr dem für JM-216, das ein oral zu verabreichendes Medikament in der klinischen Erprobungsphase III ist [30]. Ein AMD 473-analoger Komplex ist AMD 494, bei dem 2-Methylpyridin durch unsubstituiertes Pyridin ersetzt wurde.

An dieser Stelle seien auch einige Cytostatika der zweiten Entwicklungsgeneration genannt, in der sich die Erkenntnis zunutze gemacht wurde, dass die Toxizität einer platinhaltigen Verbindung stark von der Labilität ihrer Leaving-Groups abhängt [31-32], so dass die beiden Chlorliganden durch einen Chelatliganden ersetzt wurden. Das Carboplatin wird heute als Hochdosenpräparat weltweit eingesetzt, Nedaplatin findet Anwendung in Japan und Oxaliplatin befindet sich in der klinischen Erprobungsphase II.

Das Reaktionsverhalten von Carboplatin mit methioninhaltigen Peptiden und Oligonukleotiden wurde erst kürzlich im Rahmen einer Doktorarbeit von KLEINE untersucht [33-34].

1.3 Reaktionsverhalten von Cisplatin gegenüber schwefelhaltigen Verbindungen

Wie schon in Kapitel 1.1 kurz erwähnt ist das Reaktionsverhalten von Cisplatin und seiner Analoga gegenüber schwefelhaltigen Peptiden von großer Bedeutung, da vermutet wird, dass auch sie einen entscheidenden Beitrag zur Toxizität von Antitumorpräparaten leisten [35]. Die aus diesem Grunde verabreichten sogenannten *rescue-agents* sind in Regelfall schwefelhaltige Liganden. Eine kleine Auswahl wird in Abbildung 1.4 präsentiert.

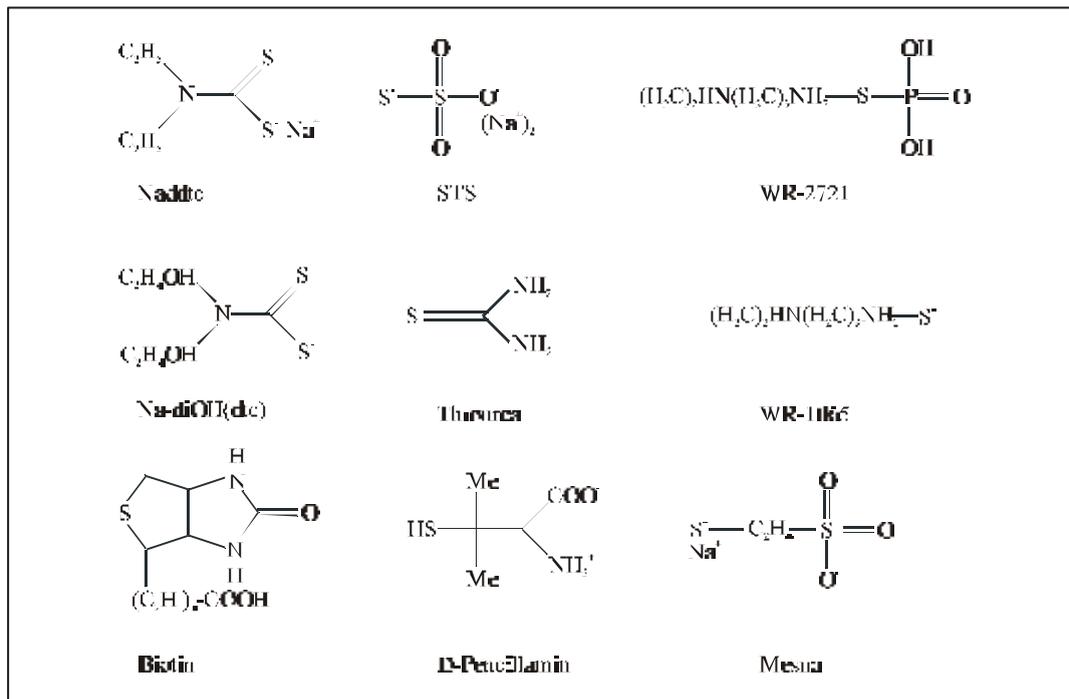


Abb.1.4: Strukturen einiger potentieller Rettungsreagenzien [36]

Besonders zu betonen sind die vielversprechenden Ergebnisse, die man mit der Verbindung WR-2721 erzielt, das inzwischen in einigen europäischen Ländern registriert ist, wobei WR-2721 eigentlich kein Rettungsreagenz darstellt. Es wird erst nach einer Cisplatininfusion verabreicht und wirkt daher als Vorstufe oder Precursor (pro-drug), das in seine aktive Form WR-1066 umgewandelt wird. Es zeigte sich, dass die schweren Nebenwirkungen während der Chemotherapie reduziert wurden [36].

2 Problemstellung

Im Mittelpunkt der hier vorliegenden Arbeit steht das Reaktionsverhalten der platinhaltigen Komplexe AMD 473 und AMD 494 gegenüber schwefelhaltigen Peptiden.

Nach der intravenösen Injektion auf dem Weg zum Zellkern sind weiche Nucleophile bevorzugte Koordinationsstellen für das weiche Platinatom. Es wird angenommen, dass darin eine Ursache der Toxizität von Cisplatin besteht. Die Auswahl von AMD 473 zu medizinischer Nutzung beruht allein auf der Tatsache, dass AMD 473 eine sehr viel langsamere Reaktion mit schwefelhaltigen Verbindungen, wie GSH, zeigt. Tatsächlich konnten klinische Studien bei chemotherapeutischen Behandlungen mit AMD 473 deutlich mildere Nebenwirkungen als bei Cisplatin-Behandlungen bestätigen. Dieses divergente Reaktionsverhalten von AMD 473 gegenüber Cisplatin soll hier im Laufe dieser Arbeit mit Hilfe der Modellverbindung N-Ac-Gly-Gly-Met-OH, N-Ac-Gly-Met-Gly-OH und N-Ac-Met-OH eingehender untersucht werden, wobei auch der Platinkomplex AMD 494 eingesetzt wird.

Die Reaktionen von platinhaltigen Metallkomplexen mit DNA in Gegenwart von N-Ac-Met-OH als Modell für schwefelhaltige Peptide wird mit Cisplatin untersucht. Es werden dazu als Nukleotidmodellverbindungen 5'-GMP²⁻ und im weiteren Verlauf der Arbeit das Oligonukleotid d-ATGGTA eingesetzt.

Zur Analyse der möglichen Produktbildung wird die *reversed-phase* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) verwendet, wobei vorwiegend die *reversed-phase* Ionenpaarchromatographie (RPIPC) eingesetzt wird. In den chromatographischen Untersuchungen von Systemen mit dem Oligonukleotid wurde die Variante der Ionenunterdrückung genutzt. Die thermodynamisch begünstigten Reaktionsprodukte werden durch eine pH-abhängige Untersuchung nach einer Inkubationszeit von 3 Wochen (504 Stunden) bei $T = 40^\circ \text{C}$ bestimmt. Reaktionsmechanistische Aussagen können mit Hilfe von zeitabhängigen Untersuchungen von Analysenlösungen mit variierendem pH-Wert getroffen werden. Die RPIPC ist neben der qualitativen Produktbestimmung auch für die semi-präparative Trennung für eine Vielzahl von Produkten geeignet, die sodann NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch charakterisiert werden können. In einfacheren Systemen wird die ESI / MS-Kopplung zur Produktcharakterisierung genutzt.

Die aus den Versuchsreihen gewonnen Erkenntnisse sollen vor allem folgende Fragen und Problemstellung beantworten:

- a) Was bewirkt die Substitution eines Amminliganden durch Pyridin bei AMD 494 und 2-Methylpyridin bei AMD 473 im Reaktionsverhalten gegenüber schwefelhaltigen Peptiden im Vergleich mit Cisplatin und Carboplatin?
- b) In welcher Art beeinflusst der Substituent am aromatischen Liganden das Reaktionsverhalten von AMD 473 im Gegensatz zum unsubstituierten Pyridinliganden bei AMD 494?
- c) Systematische chromatographische und qualitative Untersuchung des ternären Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH / $5'$ -GMP²⁻ mit anschließender Charakterisierung der Reaktionsprodukte
- d) Werden durch die Reaktionen von Cisplatin mit $5'$ -GMP²⁻ in Anwesenheit von N-Ac-Met-OH in vivo Bedingungen imitiert? Ist eine beschleunigende Wirkung des Peptids auf die Reaktion von Nukleotid und Pt(II)-Komplex unter Bildung ternärer Platin / Peptid / Nukleotid-Komplexe zu beobachten, die einen Transfer vom Cisplatin zum Nukleotid ermöglichen?
- e) Können die durch die Untersuchungen mit $5'$ -GMP²⁻ gewonnen Erkenntnisse auf größere DNA-Modellsysteme übertragen werden? Ist eine wirkliche Konkurrenzreaktion zwischen DNA-Reaktion und Peptidbindung des Pt(II)-Fragments zu beobachten?

3 Kenntnisstand

Die Entwicklung von Cytostatika die auch bei cisplatinresistenten Zellen eine Anti-Tumor-Wirkung besitzen, basiert unter anderem auf der Erkenntnis, dass die erworbene Cisplatin-Resistenz auch durch eine gesteigerte intrazelluläre Entgiftung durch eine Reaktion mit Thiolen beruht [30]. Auch AMD 473 ist ein aus diesem Hintergrund entwickeltes Anti-Tumorpräparat [37-39].

Es zeigte sich in den präklinischen Untersuchungen, dass AMD 473 neben seinen cytostatischen Wirkungen eine Aktivität gegenüber Platin resistenten Zelllinien und einem milderen Toxizitätsverhalten als Cisplatin besitzt [38]. Darüber hinaus wird eine oral zu verabreichende Formulierung von AMD 473 entwickelt [30].

3.1 Reaktionsverhalten von AMD 473 und AMD 494

Allgemein akzeptiert ist, dass platinhaltige Komplexe erst nach der Hydrolyse mit der DNA reagieren, da eine direkte Reaktion nie beobachtet wurde [40-43].

Die Hydrolyse von AMD 473 untersuchten SADLER ET AL. anhand von $^1\text{H} / ^{15}\text{N}$ -NMR-spektroskopischen Untersuchungen [37]. Der Chlor-Ligand trans zum 2-Methylpyridin wird bei AMD 473 langsamer substituiert als es bei Cisplatin zu beobachten ist ($t_{1/2} = 6,0$ h für AMD 473 und $t_{1/2} = 1.8$ h für Cisplatin), aber deutlich schneller als der Chlor-Ligand trans zum Amminliganden. Darüber hinaus sind auch die pK_a -Werte der entsprechenden Aqua-Komplexe um 0.3 Einheiten niedriger als bei Cisplatin [44-45]. Beide Effekte bewirken vermutlich eine langsamere Reaktivität und Aktivität in intrazellulären Prozessen [46].

In der folgenden Abbildung 3.1 wird das Hydrolyseschema von AMD 473 präsentiert.

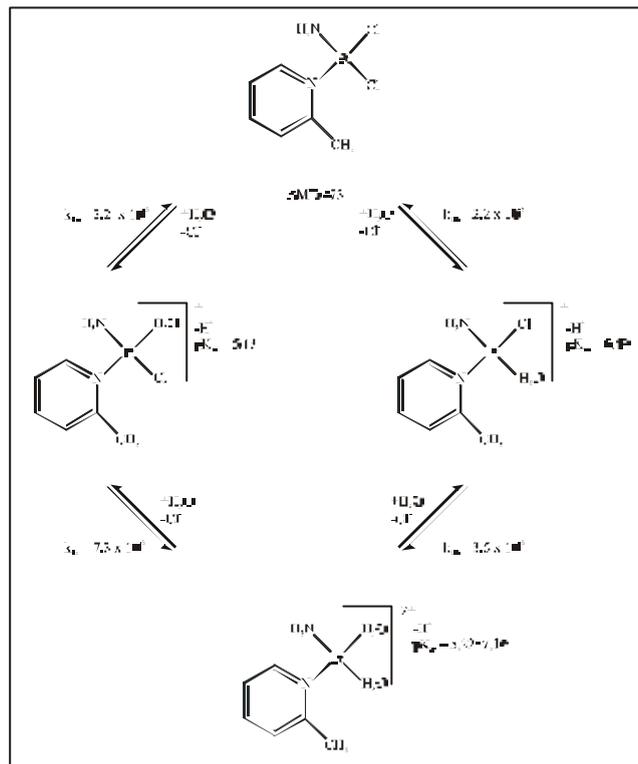


Abb. 3.1: Hydrolyseschema von AMD 473 [37]

Das Hydrolyseverhalten von AMD 494 wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe chromatographisch mit $t_{1/2} = 2.3$ h bestimmt. Die Halbwertszeit des pyridinhaltigen Komplexes unterscheidet sich damit kaum von der Halbwertszeit des Cisplatin ($t_{1/2} = 1.8$ h).

Die Hydrolysekonstanten der einzelnen Platinkomplexe sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tab.3.1: Hydrolysekonstanten von Cisplatin, AMD 494 und AMD 473 [37, 44, 47]

Komplex	k [$s^{-1} \times 10^{-5}$]	$t_{1/2}$ [h]	$c(\text{Cl})$ [$\text{mol} \times \text{l}^{-1}$]	T [$^{\circ}\text{C}$]
Cisplatin	7.7	1.8	0.1	25
	7.51	1.8		
AMD 473 trans	3.2	6.0	0.1	25
AMD 473 cis	2.2	8.7		
AMD 494		2.3	0.0	25

Pharmakokinetische Parameter von AMD 473 untersuchte die Arbeitsgruppe um BLAIR unter zu Hilfenahme der LC / MS –Kopplung anhand von Plasmaproben [48-49].

HOLFORD ET AL. bestimmten das Reaktionsprofil von Cisplatin, AMD 473 und AMD 494 gegenüber weichen Nucleophilen anhand von Leitfähigkeitsmessungen, wobei dazu Thioharnstoff als schwefelhaltige Verbindung eingesetzt wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.2 dargestellt [50].

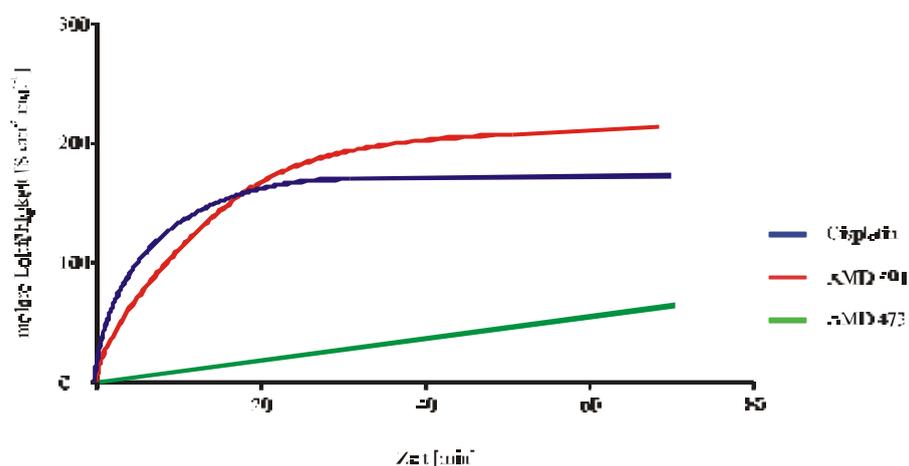


Abb. 3.2: Leitfähigkeitsmessungen von Platinkomplexen gegenüber weichen Nucleophilen [50]

Cisplatin und AMD 494 reagieren sehr rasch mit der schwefelhaltigen Verbindung, im Gegensatz zu AMD 473. Das bedeutet, wird die Größe des Liganden am Metallzentrum von Cisplatin über AMD 494 zu AMD 473 erhöht, wird eine Abnahme in der Reaktion mit weichen Nucleophilen erreicht. Weiterführende in vivo imitierende Studien konnten auch in zellulären Prozessen einen Affinitätsmangel gegenüber schwefelhaltigen Verbindungen weiter bestätigen [51-55].

GIBSON ET AL. untersuchten den Einfluss größerer Liganden auf die Reaktionen zwischen Proteinen und AMD 473-analogen Verbindungen und konnten zeigen, dass die Reaktionen mit Methionineinheiten der Proteine Ubiquitin und Myoglobin langsamer waren, da der sterisch anspruchsvollere Ligand eine Koordination am Platin behindert [56].

3.2 Reaktionen von AMD 473 mit Oligonukleotiden

AMD 473 bestätigte in der ersten Phase von klinischen Studien eine Wirksamkeit gegenüber Zelllinien, die eine Cisplatin-Resistenz erworben hatten. Es ist daher wichtig, die Art und Weise wie ein Ligand die Natur einer platininduzierten DNA-Liaison beeinflusst, zu verstehen. Wie zuvor beschrieben, spielt der sterische Effekt des 2-Methylpyridin eine wichtige Rolle in der Bestimmung der Hydrolysekonstanten und dem reaktionsmechanistischen Verhalten gegenüber schwefelhaltigen Verbindungen und kleinen Nukleotideinheiten [57].

In den Reaktionen mit einer DNA-Duplex zeigte sich eine hohe Stereoselektivität, da sich vorwiegend nur ein Stereoisomer als Hauptprodukt bildete. In Abbildung 3.3 wird das Reaktionsschema präsentiert, welches aufgrund von 2D-NOESY-Untersuchungen vermutet wird [46]:

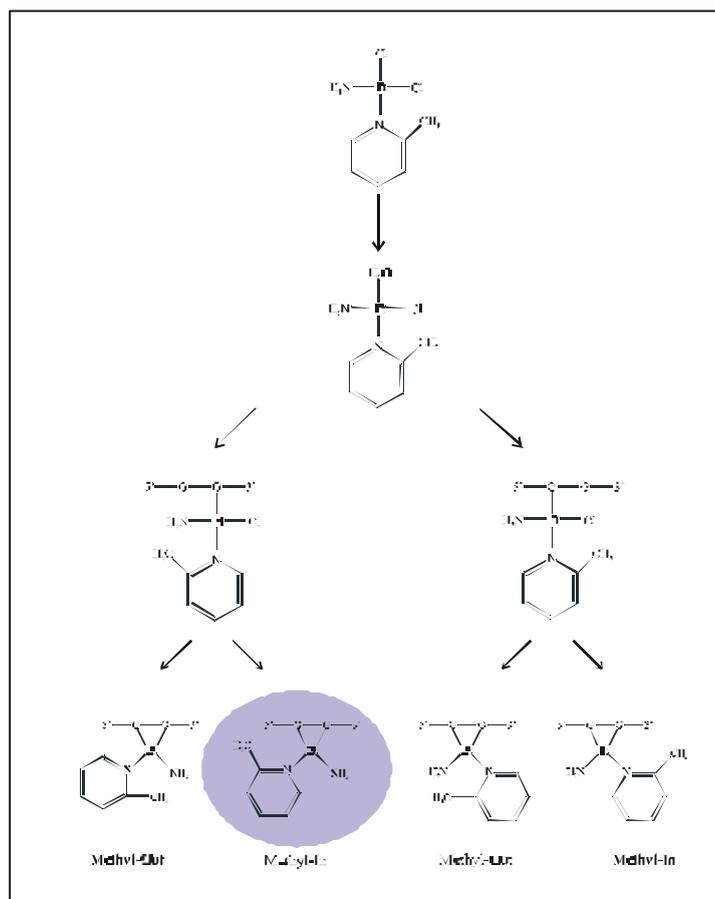


Abb. 3.3: *Reaktionspfade von AMD 473 mit DNA-Duplex, die Hauptprodukte sind blau unterlegt [46]*

Die Monoaquaespezies mit H_2O trans zu 2-Methylpyridin reagiert schneller mit DNA, so dass die Bildung monofunktionaler Addukte mit N_7 der Nukleotidbase Guanin in Position trans zum aromatischen Liganden gegenüber solchen Produkten mit N_7 der Nukleotidbase Guanin in cis-Position zum 2-Methylpyridin bevorzugt wird. Die 3'-G-monofunktionalen Pt(II)-Produkte bilden sich gewöhnlich schneller als Pt(II)-5'-G-Produkte und unterliegen schneller einem Ringschluss [58-60]. Gilt dies auch für AMD 473 kann das zusammen mit der Präferenz der Substitution trans zum aromatischen Liganden eine Begründung für die bevorzugte Bildung des bifunktionalen Addukts mit dem N_7 -Atom der 3'-Guaninbase in trans Position zum 2-Methylpyridin sein. BAUER ET AL. unterstreichen die Bedeutung des 2-Methylsubstituenten, da in ihren Untersuchungen von cis- und trans-[PtCl(NH₃)₂(4-Methylpyridin)] eine bevorzugte Bildung von Monoaddukten auftrat, in denen der Methylsubstituent weiter von der Koordinationsebene entfernt lag [61]. GIBSON ET AL. untersuchten das Reaktionsverhalten von trans-Isomeren AMD 473-analoger Verbindungen gegenüber DNA und konnten eine Anti-Tumoraktivität feststellen [62].

3.3 Reaktionsverhalten von Cisplatin

Obwohl der Mechanismus der Wirkungsweise von Cisplatin und seiner Analoga nicht vollständig geklärt ist, kann davon ausgegangen werden, dass die DNA das hauptsächliche Ziel darstellt, wie bereits in Kapitel 1 erläutert. Der Transport durch die Zellmembran und die Bildung möglicher Intermediate mit Proteinen wird immer noch in der Literatur diskutiert, wobei die Hydrolyse von Cisplatin, sein Transport zur DNA und die Bildung von Nukleotid-Platin-Addukten, sowie die bevorzugte Platinierung der DNA an den N_7 der Guaninbasen mit der daraus resultierenden strukturellen Veränderung der DNA akzeptiert sind. Dabei ist sicher, dass die Reaktion mit der DNA die Hydrolyse voraussetzt (s. Kap. 1.1) [58-59, 63-65].

Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen ist das Reaktionsverhalten von Cisplatin mit schwefelhaltigen Peptiden, da nach dem Prinzip der HSAB Platin als weiches Element den ebenso klassifizierten Schwefel zur Bindung bevorzugt. Die bevorzugte Reihe der Liganden für Platin stellt sich wie folgt dar [66]:



Für die in dieser Arbeit verwendeten Pt(II)-Komplexe sind potentielle Koordinationsstellen die terminalen Aminogruppen, die Amidstickstoffe des Peptidrückgrats sowie die Schwefelatome des Methionins, wobei die Carboxylatgruppen unter stark sauren Bedingungen als koordinative Stelle bevorzugt werden. Zur einer Voraussage der möglichen Produkte ist allerdings nötig, auch die elektronischen Einflüsse und die kinetischen und sterischen Präferenzen zu berücksichtigen, wobei die Bildung von Fünf- oder Sechsringen thermodynamisch bevorzugt ist.

3.4 Reaktionen von Cisplatin mit Methioninhaltigen Verbindungen

Die hohe Affinität des Cisplatins zu Schwefelatomen zeigt sich in der Tatsache, dass nach einem Tag bis zu 98 % des intravenös verabreichten Antitumorpräparates an Protein gebunden ist, wobei hauptsächlich das Serumprotein Albumin koordiniert wird [67-68].

Das Reaktionsverhalten von Cisplatin gegenüber schwefelhaltigen Peptiden wird zumeist an kleineren Bioliganden wie H-Met-OH untersucht, wobei die Produktzuordnung unter Zuhilfenahme von NMR-spektroskopischen Methoden erfolgt.

ALLAIN ET AL konnten zeigen, dass die Reaktionen von Cisplatin mit schwefelhaltigen Verbindungen durch Hydrolyse maßgeblich beeinflusst werden. Sie zeigten, dass cis-[PtCl(H₂O)(NH₃)₂]⁺ sehr viel schneller mit Methionin reagiert, als Cisplatin selber [69].

LEGENDRE ET AL und KOZELKA ET AL gehen davon aus, dass die Diaqua- und / oder die Aqua / Hydroxo-Spezies an die DNA koordinieren [70-71].

Die Arbeitsgruppe um SADLER konnte die Reaktionsprodukte unter Zuhilfenahme der multinuklearen NMR-Spektroskopie eindeutig charakterisieren [72]. Es bildet sich unter Abspaltung eines Chlorliganden das monodentat koordinierte κ -S-Intermediat, welches dann entweder unter Abspaltung eines weiteren Chlorliganden oder eines Amminliganden zum κ^2 -S,N_M-Chelat (Komplex 14 bzw. Komplex 13) weiterreagiert (s. Abb. 3.4).

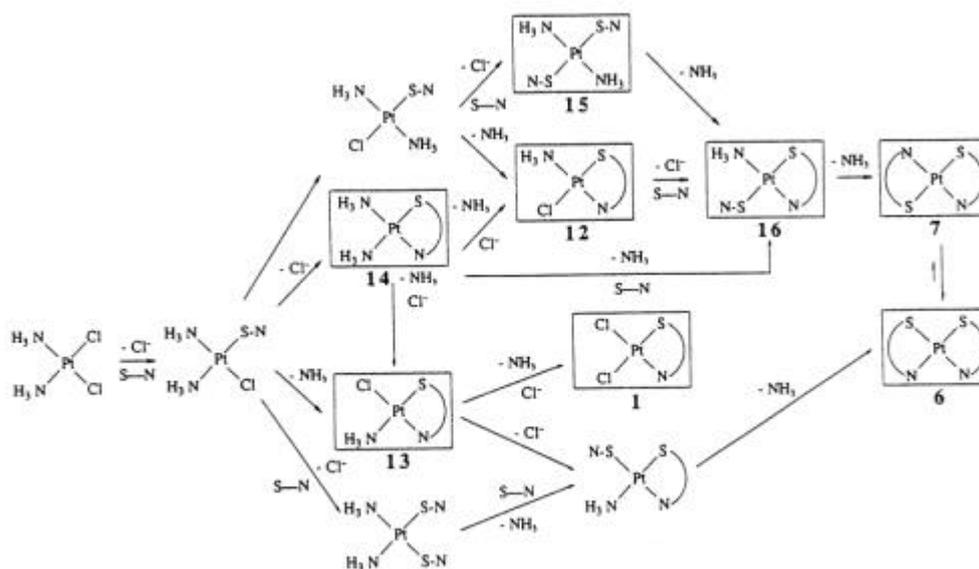


Abb. 3.4: Reaktionen von Cisplatin mit Methionin [72]

Alternativ zur Abspaltung des Chlorliganden kann eine cis-trans-Isomerisierung auftreten. Nach Koordination eines weiteren Methionins zu einer 1:2-κ-S:κ-S'-Spezies (Komplex 15), entsteht der κ²-S,N_M:κ²-S',N_M' (Komplex 7), wobei die Schwefelatome in trans-Position zueinander stehen. Durch die cis-trans-Isomerisierung wird der Komplex 6 gebildet, der das stabile Endprodukt der Reaktion ist [73]. Komplex 6 wird auch über die beiden unteren Reaktionswege erreicht. Die Isomerisierung des trans-Produkts wird auch von BERNERS-PRICE ET AL. bestätigt [74]. Die Bildung der κ²-S,N_M:κ²-S',N_M'-Spezies wird nur bei kleineren Peptideinheiten beobachtet, da HAHN und KLEINE in ihren Arbeiten eine solche Koordination bei längeren Peptidsequenzen nicht beobachten konnten [33, 16].

In Reaktionen von Cisplatin mit dem Serumprotein Albumin konnte SADLER eine Koordination des Platins an ein Methionin wie auch an ein Cystein nachweisen [75]. Zusätzlich zu den monodentat koordinierten Komplexen entstand neben dem κ²-S,N_M auch ein Protein-Crosslinkprodukt, da der starke Trans-Effekt des Schwefels einen Verlust eines Amminliganden bewirkt.

In Arbeiten, die sich mit den Reaktionen von Cisplatin und Transferrin, einem 80 kDa Protein das Eisen im Plasma transportiert, beschäftigen, konnten HOESCHELE und SADLER zeigen, dass die bevorzugten Koordinationsstellen die Positionen Met 256 und Met 499 sind [76]. Die Bildung eines κ^2 -S,N_M-Chelats konnte allerdings nur bei rekombiniertem N-lobe und nicht bei dem intakten Protein beobachtet werden.

KEPPLER bestätigte die Dominanz der Methioninkoordination im Albumin [77], im Gegensatz zu JOHNSON ET AL., die in massenspektrometrischen Untersuchungen eine Koordination am Threonin 457 fanden [78]. GIBSON ET AL. belegten massenspektrometrisch eine bevorzugte Cisplatin-Koordination am Met 1 sowie His 68 [56, 79-80]. Einen guten Überblick über die Reaktionen von Pt(II)-Komplexen mit Peptiden geben die in unserer Arbeitsgruppe erstellten Arbeiten, sowie die Arbeiten von APPLETON und REEDIJK [81-91]. Hahn und Wolters untersuchten die Reaktionen des Komplexes Pt(en) mit verschiedenen Peptiden. Es bestätigte sich dort die Bildung der Chelatkomplexe [16, 81, 87].

Darüber hinaus wurde das Migrationsverhalten Pt(dien) untersucht, wobei nach der Bildung des kinetisch bevorzugtem κ -S eine Wanderung des Platinatoms zum thermodynamisch favorisiertem κ -N(Guanin) beziehungsweise κ -N(Imidazol) zu beobachten ist [66, 92-97].

3.5 Konkurrenzreaktionen von Peptiden und Nukleotiden mit Pt(II)-Komplexen

Der cytotoxische Effekt des Cisplatin wird vermutlich in der Bildung von intrastrang-Produkten begründet, in denen zwei benachbarte Guaninbasen eines DNA-Stranges koordiniert sind [98]. Kristallstrukturen und NMR-spektroskopische Untersuchungen belegen die Koordination des Platinatoms an N₇ der Guaninbasen von Oligonukleotiden [100-102]. Die head-to-head Konformation und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen konnten ebenfalls bestätigt werden [103-104].

Intermolekulare Konkurrenzreaktionen zwischen Peptiden und Nukleotiden mit Cisplatin wurden mit Hilfe der Peptidmodellverbindungen N-Acetylmethionin und 5'-GMP²⁻ und GpG als Nukleotidmodellverbindung, untersucht [105-106].

SADLER untersuchte die Reaktionen von Cisplatin mit 5'-GMP²⁻ in Gegenwart von HMet-OH. Er konnte folgendes Reaktionsschema bestätigen [105]:

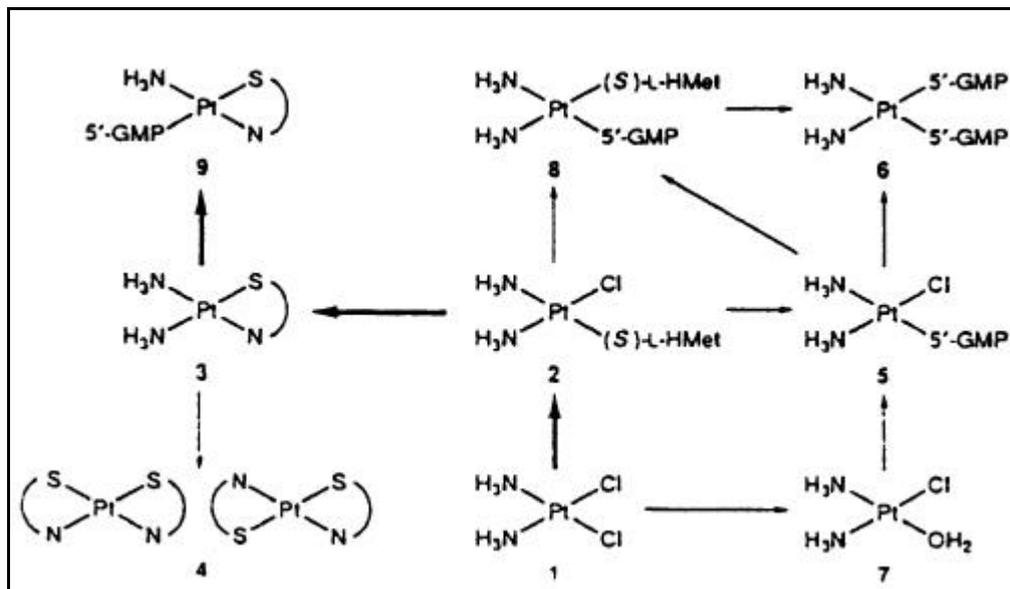


Abb. 3.5: Schema der Reaktion von Cisplatin mit 5'-GMP²⁻ in Gegenwart von H-Met-OH [105]

Es bildet sich entweder durch Hydrolyse Komplex 7 oder durch die direkte Reaktion mit einem Peptid Komplex 2. Das monodentate κ -S kann durch den Verlust eines weiteren Chlorliganden den κ^2 -S,N_M-Chelat bilden (Komplex 3).

Der κ -S-Precursor kann allerdings auch mit einem weiteren Peptid zum κ -S: κ -S' oder durch Austausch des koordiniertem Peptids mit einem Nukleotid zum κ -N₇ reagieren.

Eine weitere Alternative ist die Bildung eines ternären κ -S: κ -N₇, wobei dieses nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Das ternäre κ -S: κ -N₇ sowie auch das monodentate κ -S können zum κ -N₇: κ -N₇ weiter reagieren. In dieser Arbeit wurde auch die Reaktionsbeschleunigung durch die Anwesenheit von Methionin beobachtet, die auch von KEPLER bestätigt wurde [107-108].

In einer weiteren Arbeit mit Pt(en) zeigte SADLER, dass die Anwesenheit von 5'-GMP²⁻ (pH ungefähr 4) eine κ^2 -S,N_M Ringöffnung ermöglicht [106]. Es entsteht ein κ -S: κ -N₇ koordinierter Komplex, der bei Reaktionen mit GpG langsamer zum κ^2 -N₇,N'₇ weiterreagiert, als es bei 5'-GMP²⁻ beobachtet wurde.

Peleg-Shulman et al. konnten in ihren Studien eine Spaltung der Protein-Platin-Bindung bei pH = 6.4 in Anwesenheit von 5'-GMP²⁻ nicht beobachten [109].

Die Platin-DNA-Komplexe, Hauptursache der cytotoxischen Wirkung des Cisplatin, wurden von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht [63-64, 110-115]. Die Ergebnisse von KOZELKA ET AL und REEDIJK ET AL basieren auf chromatographischen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen. REEDIJK wies neben der $\kappa^2\text{-N}_7, \text{N}'_7$ an der GpG-Sequenz auch eine Chelatisierung an der ApG- und GpA-Sequenz nach [116] und konnte eine regioselektive Platinierung der DNA zeigen [117].

Die Arbeitsgruppe um KOZELKA konnte für die Reaktion mit Einzel- und Doppelstrang Oligonukleotiden folgenden Reaktionsmechanismus bestätigen, dargestellt in Abbildung 3.6:

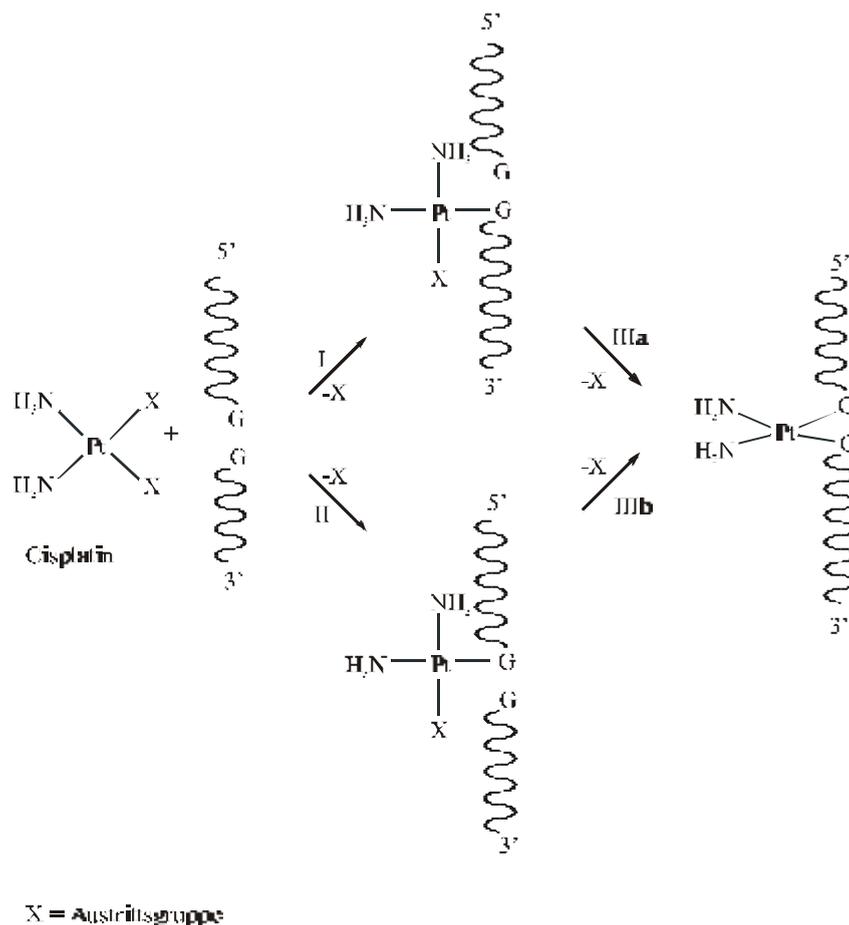


Abb. 3.6: Bindung eines Pt(II)-Komplexes an eine GpG-Sequenz eines Oligonukleotids [110]

Es entsteht im ersten Reaktionsschritt das monodentate $\kappa\text{-N}_7$, wobei der Platinkomplex an die 5'-Guaninbase sowie auch an die 3'-Guaninbase koordinieren kann (Reaktionsweg I und II).

Im nachfolgenden Schritt bildet sich das $\kappa^2\text{-N}_7, \text{N}'_7$ (Reaktionsschritte IIIa und IIIb) Sie konnten in ihren Untersuchungen die Bevorzugung der 5'-Koordinations bestätigen. MARZILLI untermauerten diesen Koordinationsmodus. SADLER untersuchte die Reaktionen zwischen Cisplatin und dem Oligonukleotid d-ATACATGGTACATA*d-TATGTACCATGTAT [118]. Er zeigte, dass die strukturellen Veränderungen der Cisplatin-Koordination von der DNA Sequenz abhängig sind. LIPPARD ermittelte anhand einer ^{195}Pt -NMR-spektroskopischen Untersuchung die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten [119]. LIPPARD zeigte auch, dass mit zunehmender Kettenlänge des Nukleotids die Reaktionsgeschwindigkeit zunimmt [120].

Brabec et al. untersuchten die Reaktion von Cisplatin mit DNA in Anwesenheit von N-Ac-Met-OH [121], worauf an späterer Stelle näher eingegangen werden soll.

3.6 Peptidspaltung in Anwesenheit von Pt(II)-Komplexen

KOSTIC ET AL. haben die platin- bzw. palladiuminduzierte Peptidspaltung in sauren Medien beschrieben, wobei der Reaktionsmechanismus zwischen Platin und Palladium keinen Unterschied besitzt.

Der von ihm vorgeschlagene Reaktionsmechanismus unterscheidet zwischen internen und externen Angriff und ist schematisch in der nachfolgenden Abbildung dargestellt [122].

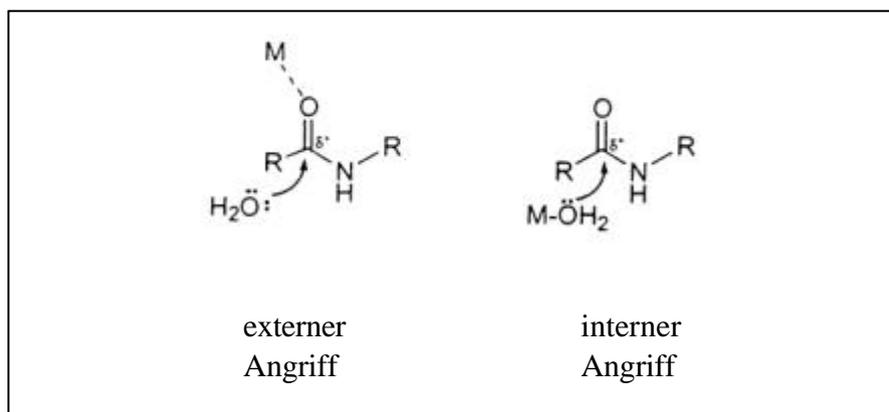


Abb. 3.7: *externer und interner Angriff bei der metallinduzierten Peptidspaltung nach Kostic [122]*

Die möglichen Koordinationsstellen für das Metallatom am Peptid ist zum Beispiel der Schwefel einer Methioninseitenkette.

Für den externen Angriff fungiert das Metallatom als Lewis-Säure, die durch Wechselwirkung mit dem Carbonylsauerstoff diese Gruppe polarisiert und somit den Sauerstoff für einen externen Angriff eines Wassermoleküls aktiviert. Bei der internen Peptidspaltung ist das Wassermolekül kovalent an das Metallzentrum gebunden.

KOSTIC konnte bei Ac-met-X (z. B. X = gly) immer die Spaltung der Met-X-Bindung beobachten [123-127]. Sobald ein C-terminal endständiges Methionin vorhanden ist, findet eine Abspaltung der Acetylgruppe statt und die Bildung eines 7-gliedrigen κ^2 -S,N_M-Chelats inhibiert die Peptidspaltung. In einer Vielzahl von Arbeiten hat KOSTIC die Peptidspaltung an verschiedenen Sequenzen untersucht [122, 128-132].

Der von unserer Arbeitsgruppe vorgeschlagene Reaktionsmechanismus ist deutlich verschieden zu den zuvor beschriebenen [16, 33]. In Abbildung 3.8 ist der Mechanismus dargestellt.

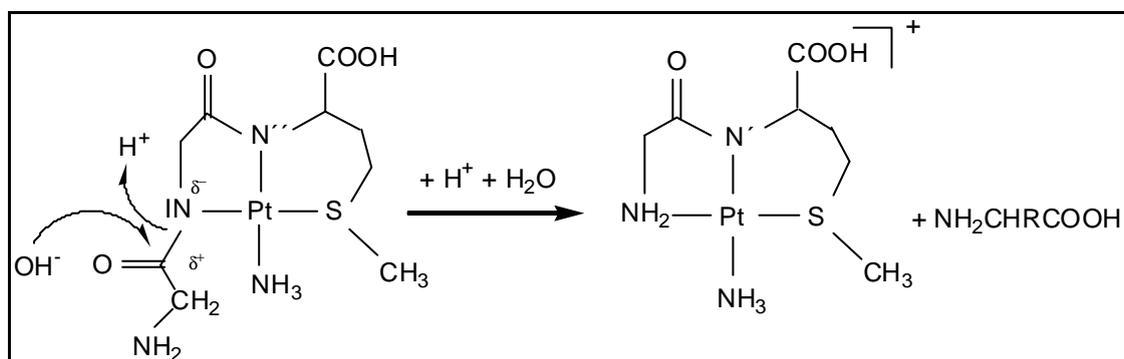


Abb. 3.8: Mechanismus der platininduzierten Hydrolyse methioninhaltiger Peptide [16, 33]

Der trans-Effekt des Schwefels polarisiert die Pt-N-Bindung, so dass eine negative Teilladung am Stickstoff entsteht, die wiederum zu einer positiven Teilladung am Kohlenstoff der Carbonylgruppe führt. Der Angriff des Wassermoleküls oder OH findet an dieser Stelle statt. Die Spaltungsprodukte können nach circa 100 Stunden beobachtet werden.

4 Methoden

4.1 Chromatographische Untersuchungen

Die Wirkungsweise von Cisplatin im menschlichen Organismus bedarf weiterer Aufklärung. Zu Aufklärungszwecken des Wirkungsmechanismus von Platin(II)-Chemotherapeutika wird die Chromatographie eingesetzt. Diese analytische Methode hat eine große Bedeutung in der Erforschung des Reaktionsweges. Es werden dazu nicht nur platiniierte Biomoleküle, die aus dem biologischen Gewebe stammen, untersucht, sondern auch die Reaktionen von Cisplatin und seinen Analoga mit Modellverbindungen verfolgt [82;133-134)

Die *reversed-phase*-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) ermöglicht Reaktionsgemische von Platin(II)-Komplexen mit Peptiden und Nukleotiden zu quantifizieren und zu isolieren. Die Anwendung der Umkehrphasenchromatographie beruht auf der ausschließlichen Tatsache, dass die Produktgemische zumeist in wässrigen Systemen vorliegen, da Wasser ein favorisiertes Lösungsmittel ist. Darüber hinaus sind die Verbindung gut in Wasser löslich, so dass sich wässrige oder damit mischbare mobile Phasen anbieten.

Der ionische Charakter der Probenmoleküle hat zur Folge, dass sich keine ausreichende Wechselwirkung zwischen den hydratisierten und hydrophilen Ionen und der lipophilen stationären Phase einstellt. Eine Möglichkeit ist die Ionenunterdrückung. Hierbei werden durch die Wahl des geeigneten pH-Wertes des Eluenten, die Ionenbildung der Probensubstanz unterdrückt und eine neutrale Spezies liegt vor. Diese können dann von der apolaren stationären Phase retardiert werden. Dabei ist zu beachten, dass der Anwendungsbereich von modifizierten Silicagel im Bereich von $2 < \text{pH} < 7,5$ liegt [135]. Der amphotere Charakter der Aminosäuren und Peptide ermöglicht nicht den Einsatz dieser Methode, da immer eine funktionelle Gruppe in ihrer ionischen Form vorliegt.

Durch den Einsatz der *reversed-phase* Ionenpaarchromatographie (RPIPC) kann dieses Retentionsproblem gelöst werden. Diese Methode besitzt für ungeladene sowie auch für geladene Probenmoleküle hohe Trennleistung. Durch den Zusatz geeigneter Gegenionen, dem Ionenpaarreagenz, werden nach außen hin neutrale Ionenpaare gebildet, die von der stationären unpolaren Phase retardiert werden.

4.1.1 Retentionsmechanismus

Es werden in der Literatur zahlreiche Modelle des Retentionsmechanismus diskutiert, von denen hier nur die wichtigsten vorgestellt werden sollen (s. Abb. 4.1).

Bei dem sogenannten Ionenpaar-Modell bilden das im Eluent enthaltene Ionenpaarreagenz mit einem entgegengesetzt geladenen Probenmolekül ein nach außen hin neutrales Ionenpaar, welches von der hydrophoben stationären Phase ausreichend retadiert wird (s. Abb. 4.1 a) [136].

Ein weiteres Modell geht von der Belegung der stationären Phase durch das Ionpaarreagenz aus, da das lipophile IPR durch seine unpolaren Alkylketten eine Affinität zu den Alkylketten der stationären Phase hat, dargestellt in Abbildung 4.1 (b). Je länger die Ketten des IPRs sind desto höher ist die Belegung des stationären Säulenmaterials und desto länger ist die Retention der Probenmoleküle. Die so adsorbierten Ionenpaarreagenzien stehen in einem reversiblen Gleichgewicht mit den im Eluenten verbleibenden IPRs, so dass ein dynamischer Austauschprozess stattfindet.

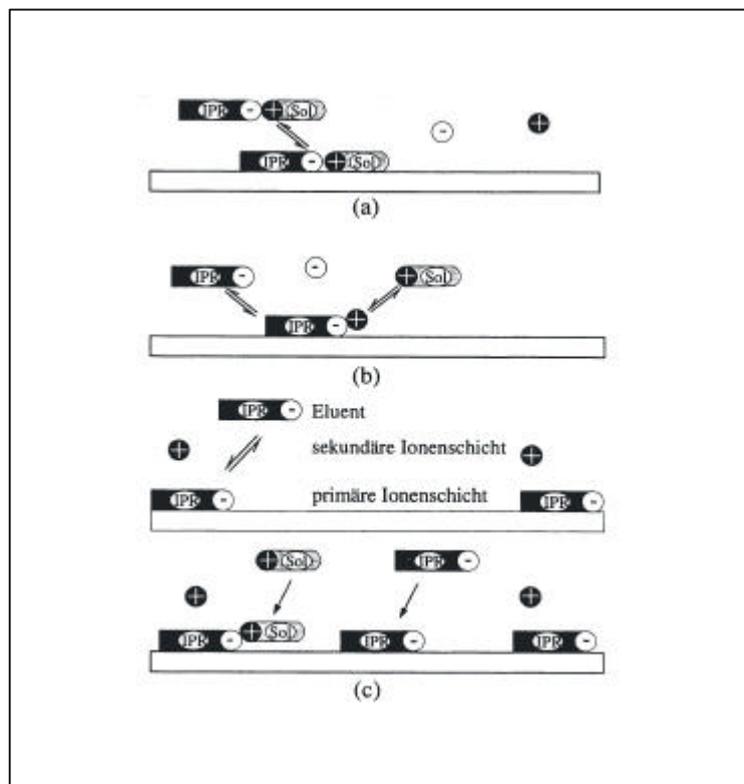


Abb. 4.1: Modelle zum Ionenpaarmechanismus [136]

Da diese beiden Modelle die experimentellen Daten nicht ausreichend erklären konnten, wurde ein weiteres Modell etabliert. BIDLINGSMEYER ET AL. beschrieben einen sogenannten Ioneninteraktionsmodus [137-138]. Es wird hierbei von einer elektrischen Doppelschicht aus adsorbiertem IPR in der ersten Ionenschicht und einem geeigneten Gegenion in der zweiten Ionenschicht ausgegangen (s. Abb. 4.1 c). Es entsteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen adsorbierten und im Eluenten vorhandenen IPR. In einem weiteren dynamischen Gleichgewicht wird ein Gegenion durch ein Probenmolekül ausgetauscht und letzteres kann so an der stationären Phase adsorbiert werden. Der notwendige Ladungsausgleich erfordert an einer anderen Stelle in der primären Ionenschicht, die Adsorption eines weiteren IPRs, so dass nicht unbedingt ein Ionenpaar, sondern ein Paar von Ionen, aufgenommen wird.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Komplexmische von Aminosäuren und Peptiden mit verschiedenen Metallfragmenten wie $[\text{Pt}(\text{dien})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{n}^6\text{-C}_6\text{H}_6)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$ und Cisplatin unter Zuhilfenahme von RPIPC mit der Perfluorcarbonsäure Pentafluorpropionsäure (PFP) getrennt werden [16, 33, 81-83, 139-140]. Aber auch die Homologen Trifluoressigsäure und Heptafluorbuttersäure sind zur Trennung dieser Substanzklassen geeignet und bieten sich zur Optimierung der Trennbedingungen an. Eine weitere Verlängerung der Kettenlänge des IPRs ist nicht sinnvoll, da die entsprechenden Substanzen dann nicht mehr leicht flüchtig im Ölvakuum sind und keine Trennung der semi-präparativen und analytischen Ansätze mehr ermöglichen. Die weiteren Vorteile dieser Perfluorcarbonsäuren sind ihre gute Löslichkeit in allen üblichen *reversed-phase* Eluenten und ihre UV-Transparenz. Selbst bei einer unvollständigen Abtrennung dieser Ionenpaarreagenzien ist eine Charakterisierung der Komplexe mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie möglich, da sie naturgemäß keine störenden Resonanzen aufweisen. Limitierend für die Verwendung von Ionenpaarreagenzien ist ausschließlich ihre starke Acidität. Sie dissoziieren im Eluenten vollständig, so dass der pH-Wert des Eluenten stark abfällt. Die maximale Konzentration sollte so abgestimmt sein, dass der pH-Wert des Eluenten den unteren Grenzwert von 2,0 einhält. Durch Variation des IPRs, des Eluenten (Methanol, Acetonitril, Tetrahydrofuran) bei isokratischen oder Gradientenbetrieb und der Säulentemperatur können sehr gute Trennbedingungen erhalten werden.

4.1.2 Variation der Trennparameter

In dieser Arbeit wurde die *reversed-phase* Ionenpaarchromatographie mit der perfluorierten Carbonsäure Pentafluorpropionsäure zur Trennung der Reaktionsgemische von Cisplatin, AMD 494 und $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{NO}_3)_2(2\text{-Methylpyridin})]$ mit den Peptiden N-Ac-Met-OH, N-Ac-Gly-Met-Gly-OH, N-Ac-Gly-Gly-Met-OH, sowie dem Nukleotid 5'-GMP²⁻ eingesetzt. Es hat sich gezeigt, dass der Einsatz von PFP die besten Trennergebnisse erzielt. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurde die Volumenmenge an PFP auf 0,1% beschränkt, da somit auch die Einhaltung des pH-Werts gegeben ist.

Die folgende Tabelle 4.1 zeigt eine Auflistung der Parameter, die für die Optimierung der Trennbedingungen im Rahmen dieser Arbeit angepasst wurden.

Tab. 4.1: Variable Parameter in der RPIP-Chromatographie [82]

Parameter der RPIPC	Auswirkung der Parametervariation
Art des Ionenpaarreagenzes	Elutionszeit und Selektivität
Konzentration des organischen Modifiers	Elutionszeit
Art des organischen Modifiers	Elutionszeit und Selektivität
Konzentration des IPR's	Elutionszeit und Selektivität
Temperatur	Selektivität, Elutionszeit und Auflösung
pH-Wert des Eluenten	Elutionszeit und Selektivität

Bei einem Optimierungsprozess eines noch nicht chromatographisch untersuchten Systems wird aufgrund von Erfahrungswerten von einem Eluenten, der einen hohen Methanolgehalt (35%) und PFP als IPR enthält, ausgegangen. Man gewährleistet damit die Detektion sämtlicher Reaktionsprodukte. Die Reduktion des organischen Modifiers ermöglicht die Verbesserung der Trennbedingungen. Unter Zuhilfenahme der Gradientenelution kann man Produkte mit geringer Retardierung sowie Produkte, die langsam eluieren, detektieren. Nachteilig ist, dass die Veränderung des Modifiziergehalts im Eluenten einen Einfluss auf das dynamische Gleichgewicht zwischen gelösten und adsorbiertem IPR hat. Die Erhöhung des Methanolgehalts erwirkt eine Desorption des Ionenpaareagenz, so dass es zu einem Störsignal

aufgrund einer UV-Absorption kommt. Die nachfolgende Reäquilibration dauert wenige Minuten.

Es wurde bei den chromatographischen Untersuchungen der binären Metallkomplex / Peptid- und ternären Systemen von Metall / Peptid / 5'-GMP²⁻ ausschließlich Methanol als organischer Modifier eingesetzt, obwohl Acetonitril durchaus bei geringerem Druck bessere Auflösungen erzielt. Acetonitril besitzt aber die Eigenschaft mit den Hydrolyseprodukten des cis-[Pt(Cl)₂(NH₃)₂] *on-column* Reaktionen einzugehen. Die daraus entstehenden (MeCN-κN)- oder (MeCN-κN)₂-koordinierten Komplexe führen zu Peakverbreiterungen und unerwünschten Nebenprodukten. Es wurde aus diesem Grunde auf Acetonitril als Modifier in binären Metallkomplex / Peptid- und ternären Systemen von Metall / Peptid / 5'-GMP²⁻ verzichtet. Eine *on-column* Reaktion von abgesättigten Pt(II)-Komplexen mit dem stark sauren Eluenten treten nicht auf.

Bei der Arbeit mit Umkehrphasen ist zu beachten, dass die Benetzung der lipophilen Alkylseitenketten mit IPR von der Konzentration des organischen Modifiers abhängt. Sinkt der Gehalt an Modifier unter 20% ist keine vollkommene Benetzung garantiert. Bei einem Gehalt an MeOH unter 10% fallen die Alkylseitenketten zusammen, so dass ein täglicher Spülvorgang unerlässlich ist. Bei einem MeOH der über 65% ist, richten sich die Ketten wieder auf.

Die Trenntemperatur sollte wenn möglich zwischen 20-40° C liegen und während der Messung aus Gründen der Reproduzierbarkeit konstant sein. Die Temperaturwahl hat Einfluss auf Selektivität, die Auflösung und das Retentionsverhalten eines chromatographischen Systems (s. Tab. 4.1).

4.1.3 Chromatographische Untersuchung der Nukleotid-Komplexe

Die chromatographische Trennung von Platin-Oligonukleotid-Produkten unter zu Hilfenahme eines chromatographischen Systems bestehend aus Methanol als organischer Modifier und PFP als IPR war nicht möglich. ANDERSEN ET AL verwenden ein Trennsystem für Oligonukleotide, welches aus einem NaCl-Gradienten, der 10 mM NaOH enthält, besteht [141]. KOZELKA ET AL beschreibt, dass mit Verwendung eines Puffersystems bei pH = 4,8 eine ansprechende Trennleistung erzielt wurde [63]. Der Zusatz von Acetonitril als

organischer Modifier zeigte eine zusätzliche Reduktion der Signalbreite und die Systeme von Cisplatin / Peptid / d-Hexamer konnten innerhalb von 75 Minuten unter Verwendung eines Acetatpuffers und eines Stufengradienten bestehend aus 1% beziehungsweise 8% MeCN getrennt werden. Die Produktzuordnung erfolgte über einen Vergleich der Retentionszeiten der Produkte mit denen von KLEINE untersuchten Systemen und massenspektrometrischen Untersuchungen der Reaktionsgemische [33].

4.2 Methoden zur Produkt-Charakterisierung

Die thermodynamisch stabilen Produkte aus Umsetzungen von Pt(II)-Komplexen mit methioninhaltige Peptiden und Nukleotiden wurden unter Zuhilfenahme der semi-präparativen RPICP getrennt. Der Einsatz multinuklearer NMR-Spektroskopie (^1H , ^{195}Pt) ermöglichte die Koordinationsstellen zu bestimmen.

Die Reinheit der isolierten Verbindungen wurde vor und nach den NMR-Messungen chromatographisch überprüft.

Die Zuordnung der ^1H -NMR-Signale beruht in den meisten Fällen auf eine Auswertung von homonuklearen Kopplungsexperimenten (HH, COSY), wobei aussagekräftige Resonanzen die Methylgruppe des Methionins und die \mathbf{H}_a der Glycine liefern. Die Aufnahme von ^{195}Pt -NMR-Spektren informiert eindeutig über die Art der koordinierten Donoratome, allerdings liefert die Detektion dieses Nukleus nur qualitative Aussagen, da durch Quadrupol – und Relaxationsphänomene die Signalintensitäten nicht direkt zu vergleichen sind. [119]

Während des semi-präparativen Trennverfahrens wird der pH-Wert von ca. 2 erreicht, so dass die Reaktionen stark beschleunigt werden. Darüber hinaus werden die Konzentrationen der Produkte bei der Aufarbeitung, durch Einrotieren der Fraktionen stark erhöht, so dass die Bildung von Folgeprodukten forciert wird. Das bedeutet, Precursor sind mit Hilfe dieser Technik nicht zu charakterisieren. Allerdings kann die Bildung von einfachen Vorläuferprodukten wie der $\kappa\text{-S}$ - und $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Vorläufer durch eine zeitabhängige ^1H -NMR-Untersuchung bei entsprechendem pH-Wert beobachtet werden. Die Konzentrationen dieser Lösungen betragen 80 mM. Aufgrund der hundertfachen Konzentrationserhöhung im

Vergleich zu den analytischen Reaktionslösungen der chromatographischen Untersuchungen ist demzufolge mit einer schnelleren Reaktion zu rechnen.

Zusätzlich ist es bei der pH-Wert Bestimmung der in deuterierten Lösungsmitteln vorliegenden Mikroansätzen notwendig den Isotopeneffekt zu berücksichtigen. Den Zusammenhang zwischen gemessenen pH-Wert (pH_{exp}) und tatsächlichem pD-Wert zeigt Gleichung [142].

$$\text{pD} = \text{pH}_{\text{exp}} + 0,40$$

Sämtliche für D_2O oder DMSO-d_6 Lösung angegebene pH-Werte entsprechen den unkorrigierten Werten pH_{exp} .

Mit Hilfe der ESI-massenspektrometrischen Untersuchungen können die stöchiometrischen Zusammensetzungen der Komplexe ermittelt werden. Mit der Anwendung der direkten LC-MS-Kopplung ist eine Produktcharakterisierung, auch von einigen Intermediaten, bei einer Vielzahl von Systemen möglich. Auf die Einschränkungen wird an entsprechender Stelle eingegangen.

Es soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass auch die FAB-Massenspektrometrie zur Produktaufklärung angewandt wurde. Die eingesetzten Matrices sind 3-Nitrobenzol, Glycerin und Milchsäure, ausgenommen davon sind Systeme mit Nukleotiden, die nach Behandlung mit Ionentauschern in H_2O / Isopropanol / Ammoniumacetat gemessen wurden.

Bei Verbindungen mit identischen Koordinationsmodi konnte mit Hilfe der UV-Messungen eine Unterscheidung erreicht werden. Es werden dazu bei unterbrochenen Fluss während einer chromatographischen Untersuchung mit Hilfe eines UV-Detektors UV-Spektren akquiriert [16, 33, 81-82].

5 NMR- und Strukturdaten der eingesetzten Peptide, Nukleotide und Metallkomplexe

Zur Veranschaulichung der in den folgenden Kapiteln verwendeten Peptide, Nukleotide und Platinkomplexe werden im folgenden deren Strukturen und die in der Arbeit genutzte Nomenklatur vorgestellt.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen außerdem die dazugehörigen ^1H -NMR-Daten der unkoordinierten Verbindungen, um einen Vergleich mit den chemischen Verschiebungswerten der charakterisierten Komplex-Verbindungen zu vereinfachen.

In der nachfolgenden Abbildung sind die verwendeten Peptide abgebildet:

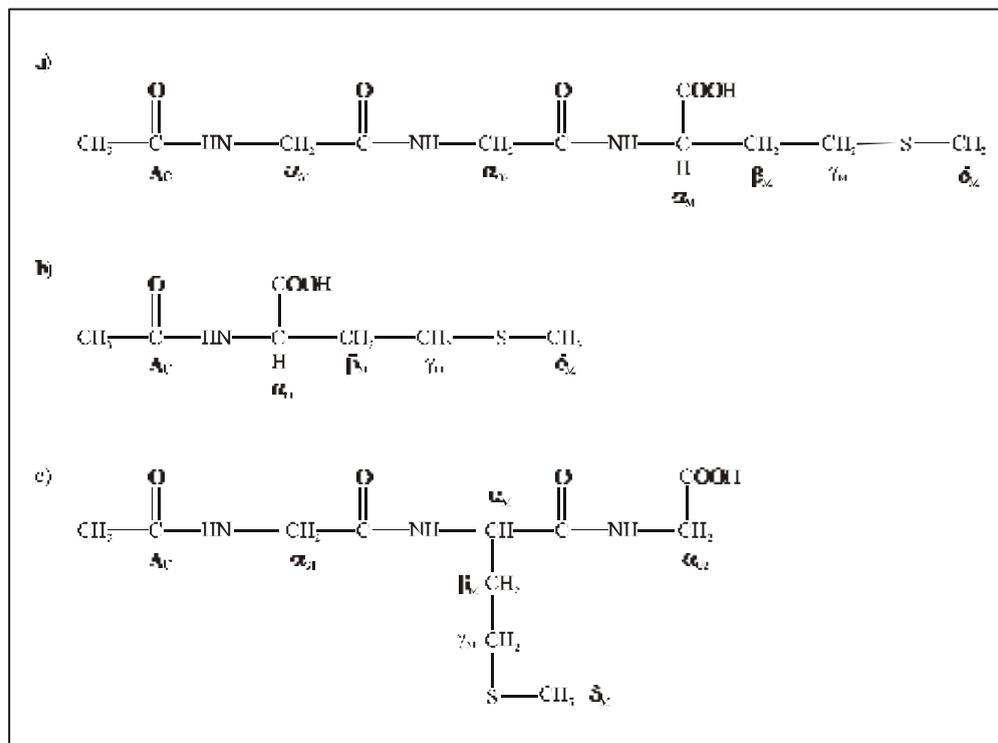


Abb. 5.1: Strukturen und Nomenklatur der verwendeten Peptide

a) N-Ac-Gly-Gly-Met-OH b) N-Ac-Met-OH

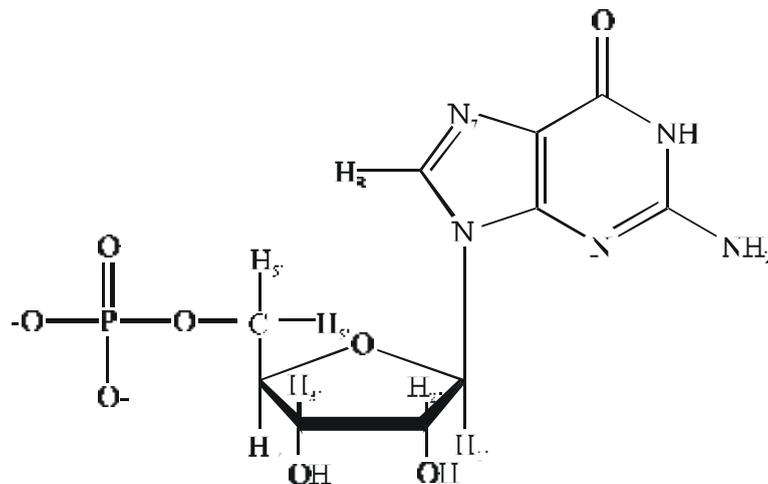
c) N-Ac-Gly-Met-Gly-OH

Die Tabelle 5.1 fasst die dazugehörigen ^1H -NMR-Daten zusammen:

Tab. 5.1: ^1H -NMR-Daten der verwendeten Peptide

Signalzuordnung	N-Ac-Gly-Gly-Met	N-Ac-Met-OH	N-Ac -Gly-Met-Gly
α_{G1}	3,94		3,96
α_{G2}	3,98		3,98
α_M	4,56	4,56 m	4,55
β_M	2,03 – 2,15 m	2,03; 2,15 m	2,03 – 2,15 m
γ_M	2,62 m	2,4; 2,62 m	2,62 m
δ_M	2,10	2,10 s	2,10
Ac	2,01	2,01 s	2,01
pH	2,17	2,25	2,39

Die Verbindung $5'\text{-GMP}^{2-}$ ist die einfachste Modellverbindung für die DNA. Die Struktur des Nucleotids ist in Abbildung 5.2 präsentiert:

**Abb. 5.2:** Struktur von $5'\text{-GMP}^{2-}$

Das N₇ ist die bevorzugte Koordinationsstelle für platinhaltige Verbindungen bei physiologischen pH-Werten. Die Reaktionen von platinhaltigen Verbindungen mit $5'\text{-GMP}^{2-}$ können ^1H -NMR-spektroskopisch überwacht werden. Denn koordiniert ein Platin an N₇, so erfährt das benachbarte Proton H₈ einen Tieffeldshift und dieses Proton kann als chemische Sonde zur Reaktionsüberwachung genutzt werden.

Die Tabelle 5.2 enthält die ^1H -NMR-Daten von $5'$ -GMP $^{2-}$:

Tab. 5.2: ^1H -NMR-Daten von $5'$ -GMP $^{2-}$

Signalzuordnung	$5'$ -GMP $^{2-}$
H ₈	8,20 s
H _{1'}	5,93 d
H _{2'} /H _{3'}	4,49 m
H _{4'}	4,32 m
H _{5'}	3,99 m
pH	6,20

Das Oligonukleotid d-ATGGTA wurde schon von KLEINE eingesetzt, um das Reaktionsverhalten von Nukleotiden mit Pt(II)-Komplexen in Gegenwart von methioninhaltigen Peptiden zu untersuchen [33].

Die Bestandteile des Hexamers sind in Abbildung dargestellt:

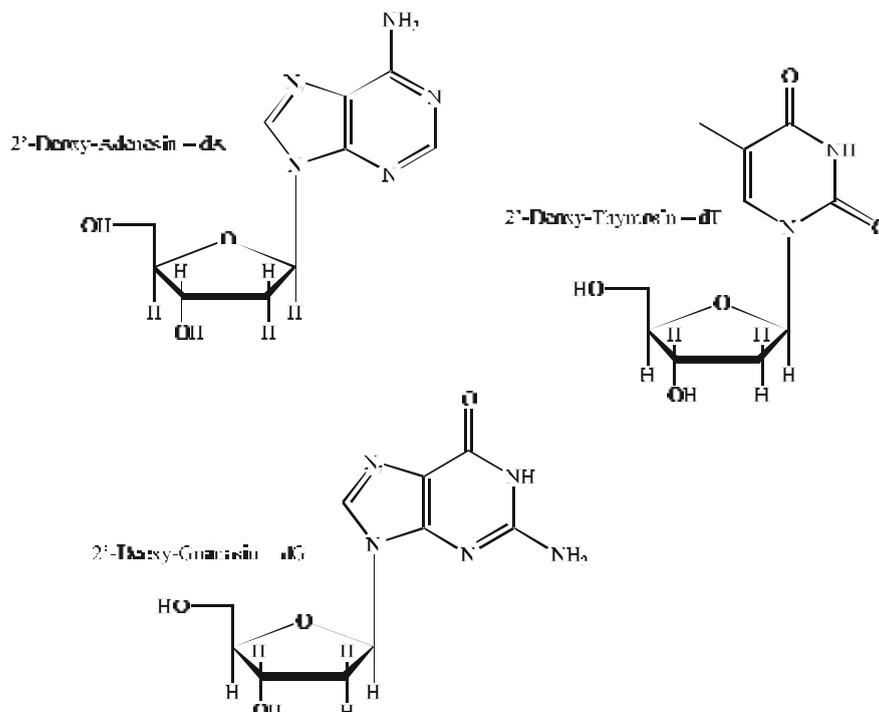


Abb. 5.3: Bestandteile des Hexamers d-ATGGTA

Die Verknüpfung der Nucleobasen erfolgt über eine Phosphodiesterbindung und es entsteht ein Oligonucleotid, wobei sich ein polymeres Rückgrat aus Zuckerresten und Phosphat bildet.

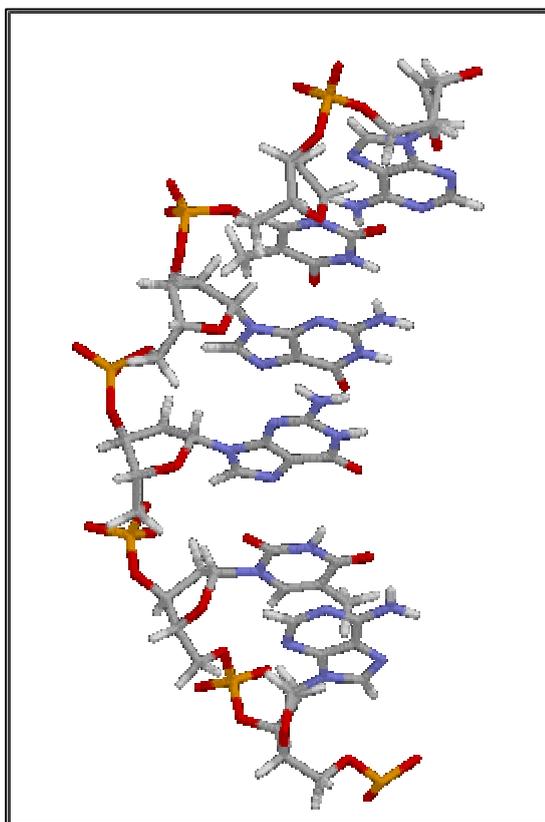


Abb. 5.4: Struktur des Hexamers d-ATGGTA

Das ^1H -NMR-Spektrum wird in Abbildung 5.5 präsentiert. Es wird sich zeigen, dass der Bereich der aromatischen Protonen sehr aussagekräftig ist bezüglich der Koordination eines Platinatoms an das Nucleotid. Die bevorzugten Koordinationspositionen dieses Metalls an ein Oligonucleotid sind die N_7 der Guaninbasen. Die chemische Sonde bei der ^1H -NMR-spektroskopischen Überwachung von Reaktionen ist das benachbarte H_8 -Wasserstoffatom, wie schon zuvor bei $5'$ - GMP^{2-} beschrieben.

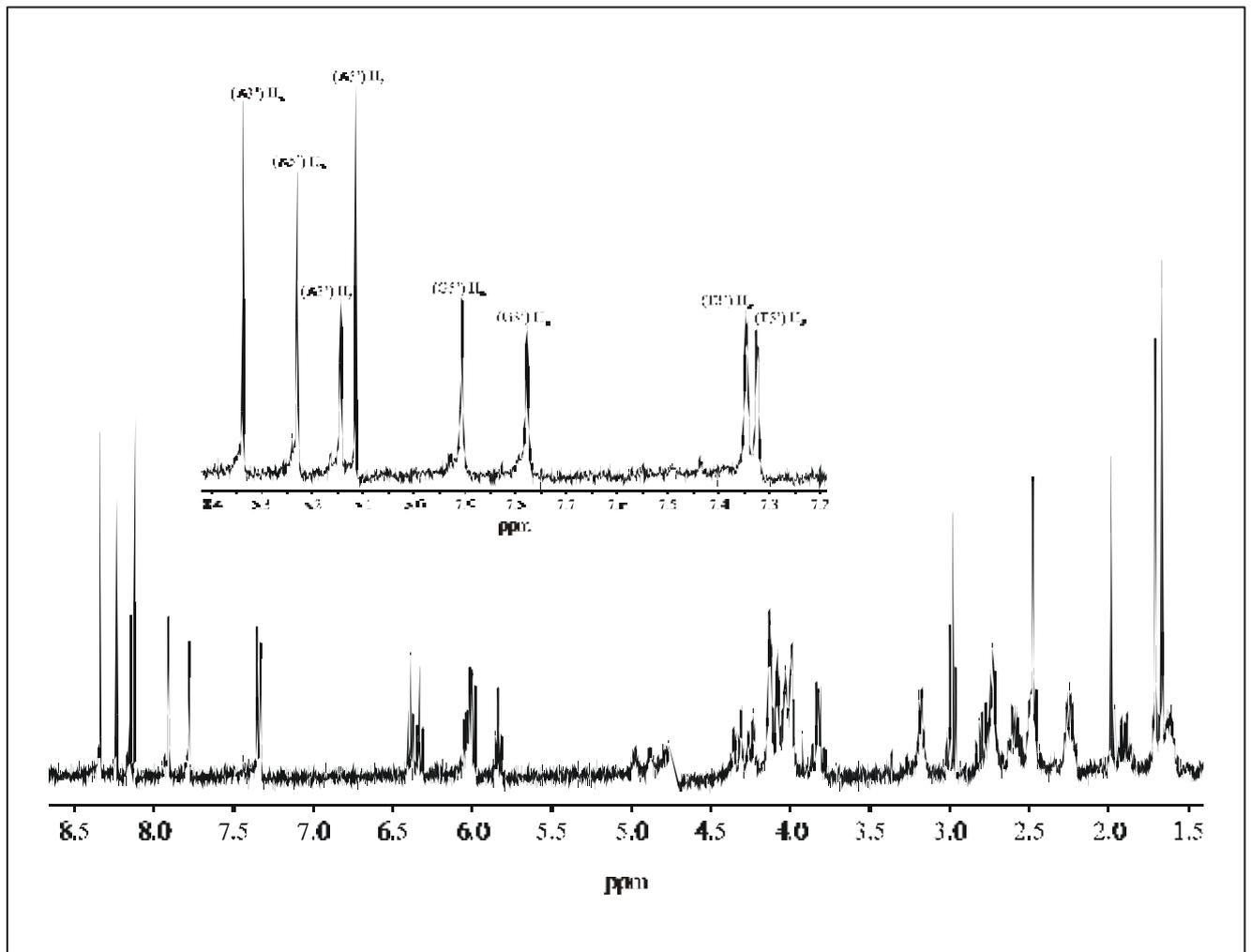


Abb. 5.5: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Hexamers *d*-ATGGTA

Die Werte für die chemischen Verschiebungen der Protonen sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst:

Tab. 5.3: $^1\text{H-NMR}$ -Daten des Hexamers *d*-ATGGTA

Signalzuordnung	<i>d</i> -ATGGTA ⁻
CH ₃ (T3')	1,67
CH ₃ (T5')	1,71
(A3') H ₂	8,15
(A5') H ₂	8,11
(A3') H ₈	8,34
(A5') H ₈	8,23

Fortsetzung Tab. 5.3: ^1H -NMR-Daten des Hexamers d-ATGGTA

(T3') H ₆	7,35
(T5') H ₆	7,32
(G3') H ₈	7,77
(G5') H ₈	7,90

Die verwendeten Platin(II)-Komplexe sind in Kapitel 1 vorgestellt worden und werden hier mit der in den nachfolgenden Kapiteln verwendeten Nomenklatur präsentiert.

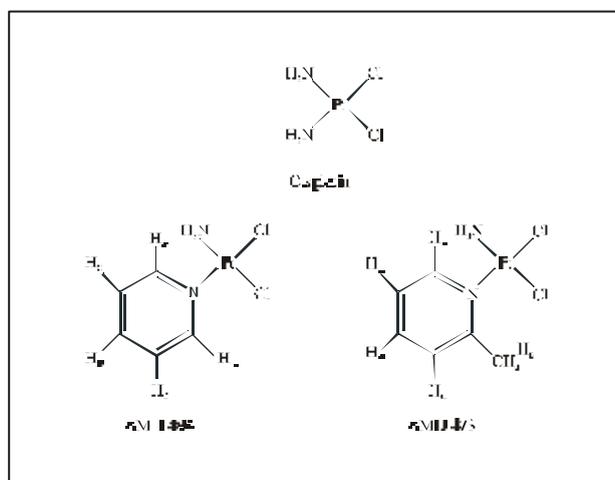


Abb. 5.6: Strukturen der verwendeten Pt(II)-Komplexe

Die NMR-Daten von AMD 473 und AMD 494 sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst:

Tab. 5.4: NMR-Daten von AMD 494 und AMD 473

Signalzuordnung	AMD 494	AMD 473
H _E		3,02
H _D		7,45
H _C	7,54	7,52
H _B	7,93	7,90
H _A	8,80	8,80
^{195}Pt	-1650	-1650

6 Reaktionen von AMD 494

6.1 Umsetzungen mit dem Tripeptid N-Ac-Gly-Gly-Met-OH

6.1.1 Chromatographisches System

Für die chromatographische Trennung des Systems AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH im Verhältnis 1:1 und 1:2 erwies es sich als notwendig mit einem Stufengradienten zu arbeiten. Eine optimale Trennung erfolgte bei der Verwendung von drei Eluenten mit unterschiedlichen Gehalten an organischen Modifier. Der Anteil an MeOH wurde nach 30 Minuten von 10% auf 20% erhöht und nach 48 Minuten erfolgte eine erneute Konzentrationserhöhung auf 35% MeOH. Bei einer Säulentemperatur von 25°C wurden die angesetzten 17 Reaktionslösungen mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml·min⁻¹ chromatographiert, wobei die Detektorwellenlänge 220 nm betrug. Mit 0,1% PFP als IPR konnten innerhalb von 70 Minuten sämtliche Reaktionsprodukte getrennt werden.

Die nachfolgende Abbildung zeigt ein ausgewähltes Chromatogramm, das die Elutionsreihenfolge verdeutlicht.

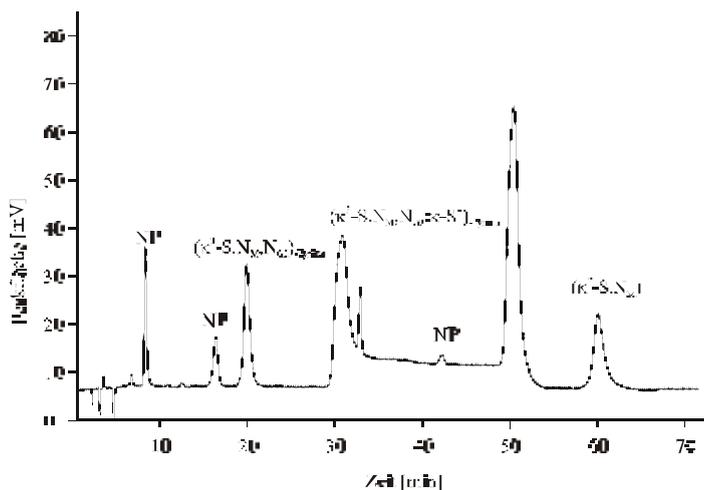


Abb. 6.1: Chromatogramm eines 1:1 Ansatzes des System AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH; 10%, 20%, 35% MeOH; 0,1% PFP; Reaktionszeit (t) = 21 Tage; 25°C; pH = 5,5

Die als Nebenprodukt gekennzeichneten Signale sind Verunreinigungen beziehungsweise Abbauprodukte der Edukte, da sie keinen Einfluss auf die Reaktionen nehmen, wurden sie in den nachfolgenden Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt.

6.1.2 pH-abhängige Produktverteilung

Es wurden analytische Reaktionslösungen des Systems AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH im Verhältnis 1:1 mit einer Einwaagekonzentration von 0,8 mM bezogen auf das Peptid angesetzt. Die einzelnen Reaktionslösungen wurden mit entsprechenden Äquivalentanteilen an 0,1 M Natronlauge oder 0,1 M Salpetersäure, 80 µl entsprechen dabei einem Äquivalent, versetzt und 21 Tage (504 Stunden) bei 40° C inkubiert. Nach dieser Frist wurden die pH-Werte gemessen und die Lösungen chromatographiert. Die Lagerung fand bei 4° C im Kühlschrank statt, wobei sich die Produktverteilung nur noch unwesentlich änderte. Die Integrale der Signale wurden gegen den zugehörigen pH-Wert aufgetragen und man erhält eine pH-abhängige Produktverteilungskurve.

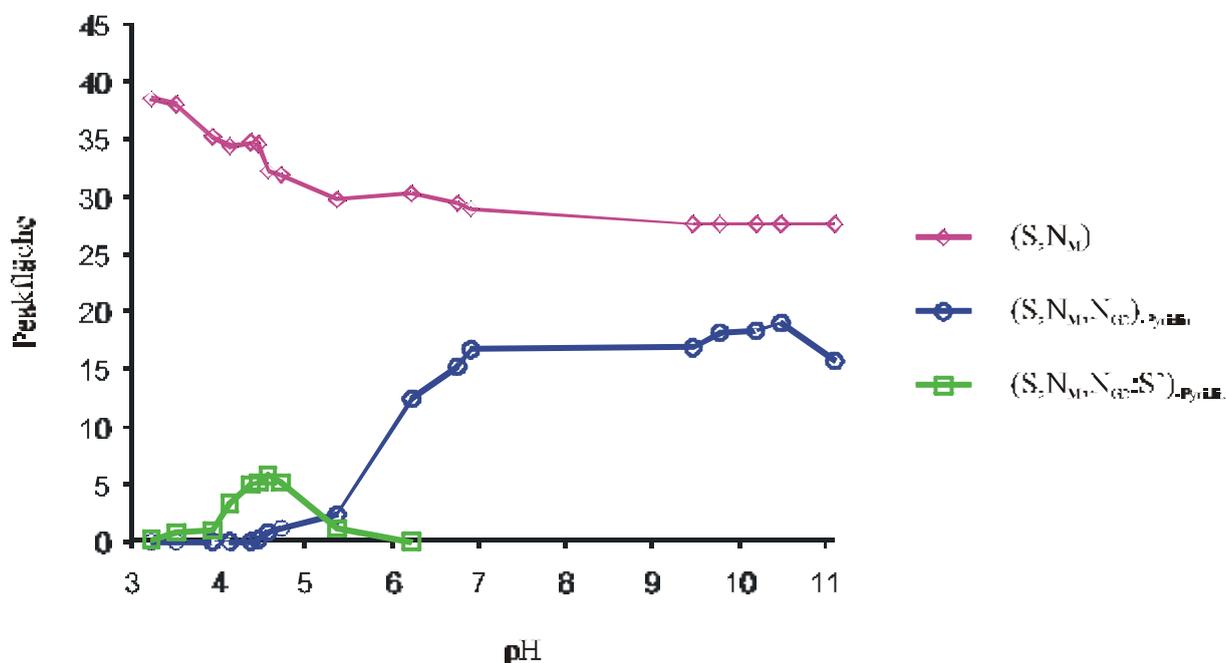


Abb. 6.2: pH-abhängige Produktverteilung des Systems AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH (1:1); Reaktionszeit (t) = 504 Stunden

Über den gesamten pH-Bereich dominiert ein Produkt, der κ^2 -S,N_M-koordinierter Komplex [Pt(H₂O)(Pyridin)(N-Ac-Gly-Gly-MetH₁-OH- κ^2 -S,N_M)]⁺, dessen Konzentration im pH-Bereich $6,90 \leq \text{pH} \leq 11$ ungefähr konstant bleibt und im pH-Bereich $6,77 \geq \text{pH} \geq 3,22$ leicht steigt.

Erst ab pH > 6 erscheint ein weiteres Hauptprodukt. Es ist ein tridentat koordinierter Komplex [Pt(NH₃/H₂O)(N-Ac-Gly-GlyH₁-MetH₁-OH- κ^3 -S,N_M,N_{G2})], der allerdings unter Verlust des Pyridin-Liganden gebildet wird. Dieses Produkt wird nach 504 Stunden im pH-Bereich $4,3 < \text{pH} < 11$ detektiert. Ein Nebenprodukt ist vermutlich ein 1:2 Komplex, wie die Untersuchung einer 1:2-Kinetik zeigen wird. Dieser Komplex liegt weder im stark sauren noch im basischen Bereich vor und seine Konzentration nimmt mit steigender Zunahme an tridentat koordiniertem [Pt(H₂O)(N-Ac-Gly-GlyH₁-MetH₁-OH- κ^3 -S,N_M,N_{G2})] ab. Er erscheint im pH-Bereich $3,4 < \text{pH} < 5,3$, mit einem Peakmaximum bei etwa pH = 4,5. Beide zuletzt genannten Produkte sind schon durch eingehende Untersuchungen des Systems N-Ac-Gly-Gly-Met-OH und CDDP durch KLEINE bekannt und spektroskopisch vollständig charakterisiert worden [33-34].

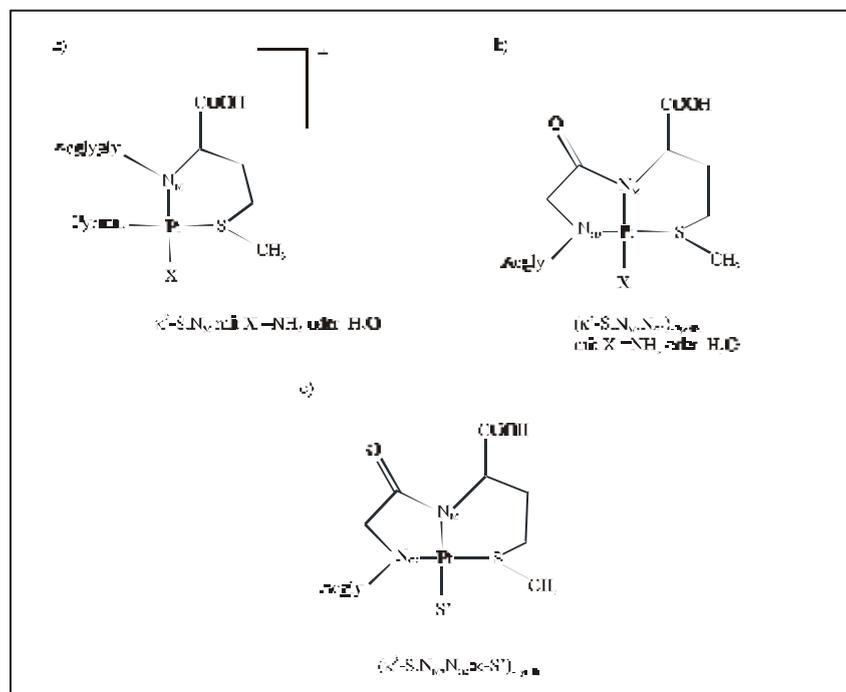


Abb. 6.3: Strukturen des bidentaten κ^2 -S,N_M (a), des κ^3 -S,N_M,N_{G2} (b) und des 1:2-Komplexes (c)

6.1.3 Kinetische Untersuchungen

Die zu diesem Zweck angesetzten Reaktionslösungen wurden über einen Zeitraum von 42 Tagen bei 40° C aufbewahrt und währenddessen kontinuierlich chromatographisch untersucht. Für einen Vergleich mit der pH-abhängigen Produktverteilung (s. Abb. 6.2) wurden nach Ablauf von 21 Tagen die pH-Werte der Kinetiken gemessen. Der zeitabhängige Reaktionsverlauf wurde anhand von analytischen Reaktionslösungen bei einem pH-Wert von 4,6 und 6,6 in äquimolaren Zusammensetzungen und bei einem pH-Wert von 6,5 in der Zusammensetzung 1:2 untersucht.

Auf eine zeitabhängige Untersuchung im stark sauren Bereich wurde verzichtet, da sich dort ausschließlich der bidentate Komplex $[\text{Pt}(\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O})(\text{Pyridin})(\text{N-Ac-Gly-Gly-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ bildet.

Die in Abb. 6.4 dargestellten Chromatogramme zeigen beispielhaft die Produktbildung.

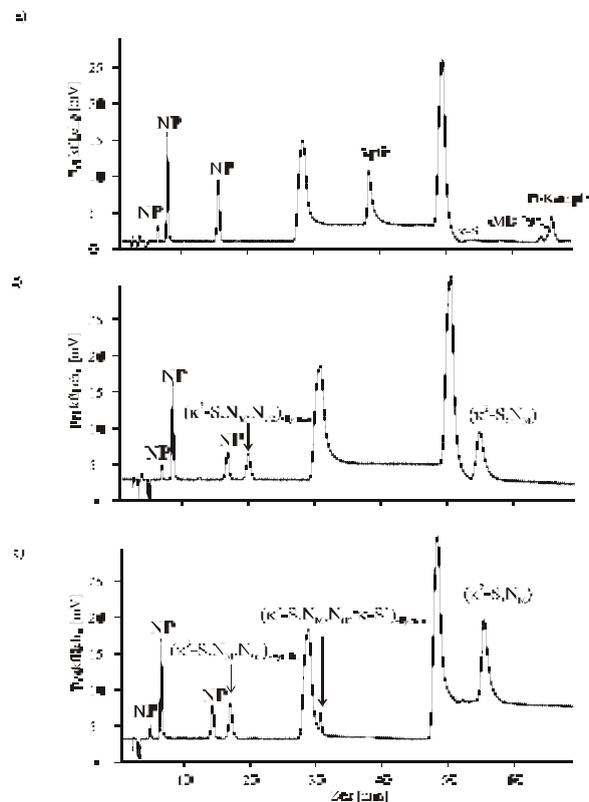


Abb. 6.4: Chromatogramme eines 1:1 Kinetikansatzes des System AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH; 10%, 20%, 35% MeOH; 0,1% PFP; 25°C; pH = 4,6
 a) $t = 0,5$ Stunden b) $t = 28$ Stunden c) $t = 504$ Stunden

Im leicht sauren Bereich bei einem pH-Wert von 4,6 zeigt sich, dass sich innerhalb der ersten Stunde (Abb. 6.4 Chromatogramm (a)) neben dem Hydrolyseprodukt von AMD 494 sofort eine schwefelkoordinierte κ S-Spezies bildet. Das Peptid und AMD 494 nehmen kontinuierlich ab und werden in dem darauffolgenden Chromatogramm (b) nicht mehr detektiert. Sie sind abreagiert. Aus dem κ -S bildet sich schnell das bidentat koordinierte Hauptprodukt und das offensichtlich κ^3 - S, N_M, N_{G2} koordinierte Produkt, welches mit Verlust des Pyridinliganden entsteht. Da der tridentate [Pt(Pyridin)(N-Ac-Gly-GlyH₁-MetH₁-OH- κ^3 - S, N_M, N_{G2})] Komplex nicht gebildet wird, muss davon ausgegangen werden, dass eine anfängliche Cl / S-Substitution der Position cis zum Pyridin am Metallzentrum für die Wechselwirkung von AMD 494 mit N-Ac-Gly-Gly-Met-OH von untergeordneter Bedeutung ist. Der voraussichtlich 1:2 koordinierte Komplex wird erst nach 120 Stunden detektiert (Chromatogramm (c)).

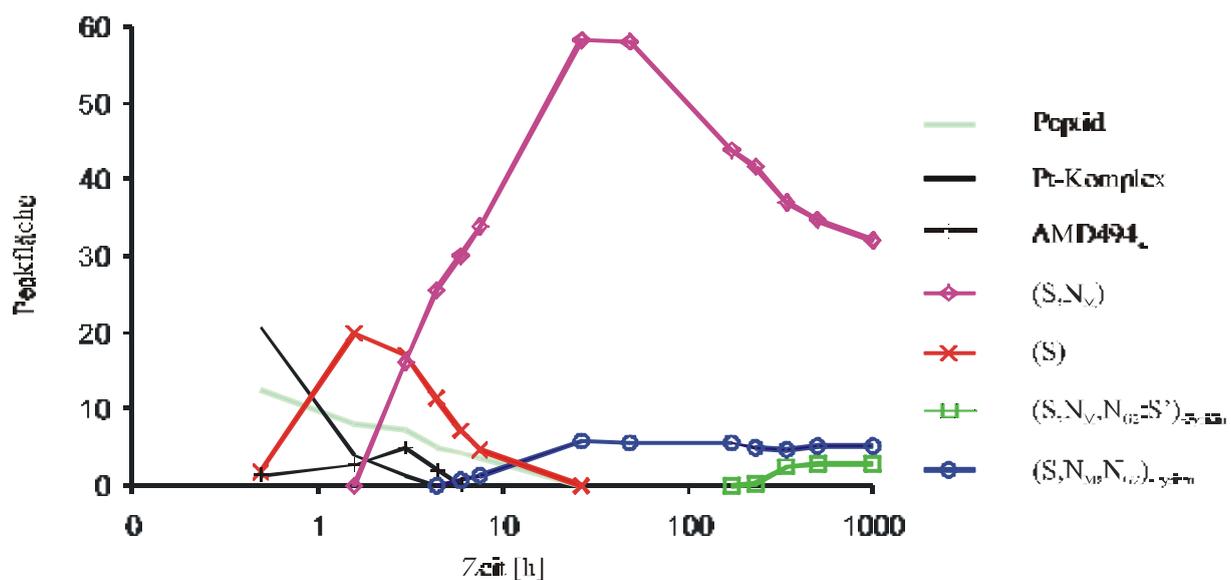


Abb. 6.5: zeitabhängige Produktverteilung des Systems AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH (1:1); pH = 4,6

Die Auftragung der Peakflächen gegen die logarithmische Zeitskala (s. Abb. 6.5) zeigt deutlich die Entstehung eines nicht näher spezifizierten Hydrolyseproduktes von AMD 494 und die schnelle Bildung des κ -S. Die Konzentration des schwefelkoordinierten Precursors nimmt zugunsten des bidentat koordinierten κ^2 - S, N_M Produktes [Pt(NH₃/H₂O)(Pyridin)(N-

Ac-Gly-Gly-MetH₁-OH-κ²-S,N_M)]⁺ ab, was sich in einem steilen Anstieg der Peakfläche manifestiert. Das Peakmaximum ist bei 27 Stunden. Nach 100 Stunden zeigt sich eine langsame Peakflächenabnahme, wobei die Zerfallsprodukte nicht detektiert werden konnten.

Nach 8 Stunden beginnt die Bildung des tridentat koordiniertem κ³-S,N_M,N_{G2} [Pt(NH₃/H₂O)(N-Ac-Gly-GlyH₁-MetH₁-OH-κ³-S,N_M,N_{G2})] und erreicht nach 78 Stunden ein Peakmaximum. Er wird auch nach 1000 Stunden mit vergleichbarer Intensität detektiert.

Die Produktbildung des vermutlich 1:2 koordinierten Produkts findet erst nach 100 Stunden und in geringem Umfang statt.

Die Reaktionen sind nach einer Inkubationszeit von 1000 Stunden bei 40°C noch nicht vollständig abgeschlossen.

Die kinetische Untersuchung bei einem pH-Wert von 6,6 zeigt eine ähnliche Tendenz, doch die Reaktionen laufen etwas langsamer ab als bei der zuvor gezeigten kinetischen Untersuchung bei einem niedrigeren pH-Wert.

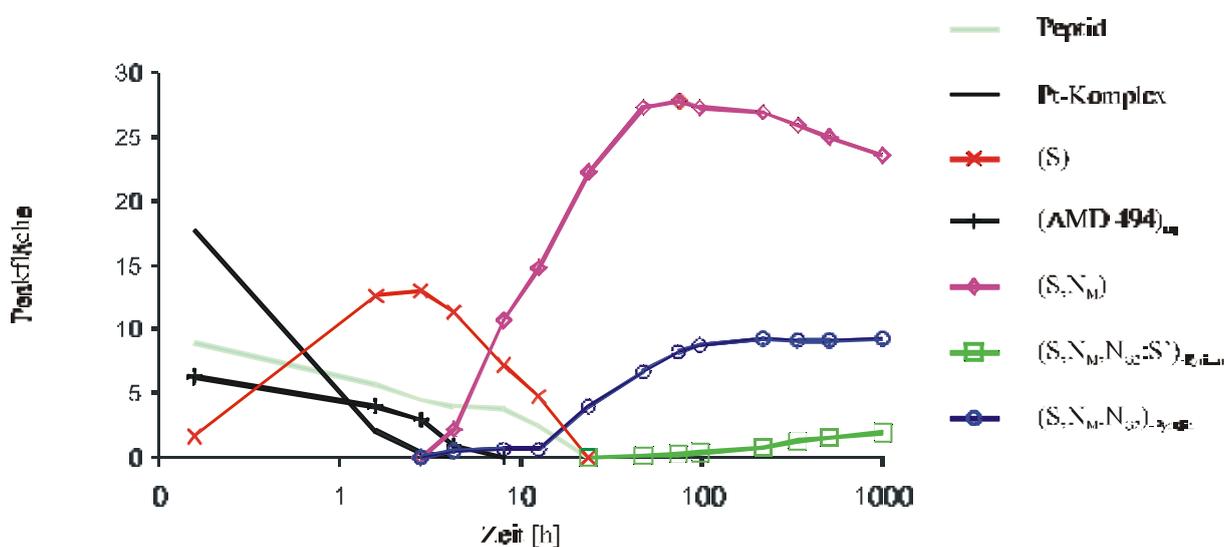


Abb. 6.6: zeitabhängige Produktverteilung des Systems AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH (1:1); pH = 6,6

Die Abnahme der Peakflächen für das Peptid und den Platinkomplex verlaufen analog. Innerhalb der ersten Stunde bildet sich das thermodynamisch favorisierte schwefelkoordinierte κS-Produkt, das innerhalb eines Tages zugunsten des bidentaten

Hauptproduktes weiterreagiert (s. Abb. 6.6). Die gebildete Konzentration des κ^2 -S,N_M Chelats ist bei diesem höherem pH-Wert allerdings deutlich schwächer. Die Kurve durchläuft bei 75 Stunden ein Maximum. Anschließend beobachtet man eine langsame aber kontinuierliche Peakflächenabnahme.

Die Bildung des tridentat koordiniertem κ^3 -S,N_M,N_{G2} und des 1:2 Produkts verlaufen bevorzugter, als zuvor beschrieben. Aber auch hier reicht die Konzentration des 1:2-Produkts nicht zur semi-präparativen Trennung mit anschließender ¹H-NMR-Untersuchung aus, so dass bei einer Isolierung nur die beiden 1:1-Komplexe vollständig spektroskopisch charakterisiert werden. Es ist allerdings zu beachten, dass die Produktbildung auch nach 1000 Stunden nicht vollständig abgeschlossen scheint.

Die Produktverteilung des Ansatzes im stöchiometrischen Verhältnis 1:2 bei pH = 6,5 zeigt keine neuen Produkte, doch sollte die Evidenz erbracht werden, dass sich tatsächlich eine 1:2 Spezies bildet.

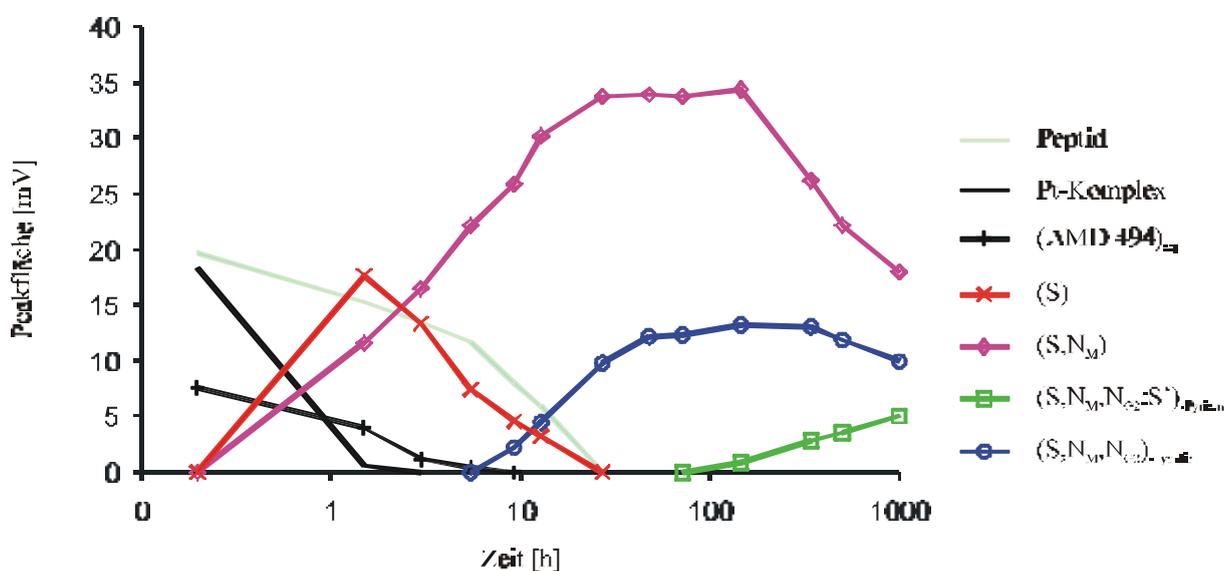


Abb. 6.7: zeitabhängige Produktverteilung des Systems AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH (1:2); pH = 6,5

Erneut verläuft die Reaktion, dargestellt in Abbildung 6.7, analog zu den zuvor beschriebenen kinetischen Untersuchungen. Innerhalb der ersten 24 Stunden ist eine stetige Abnahme an Bioligand und Metallkomplex zu beobachten. Neben der Hydrolyse des Platinkomplexes und

der Bildung des schwefelkoordinierten Komplexes werden eine Vielzahl von Nebenprodukten detektiert, deren Signalintensitäten allerdings sehr gering sind und bei der Auftragung der Signalfächen nicht berücksichtigt wurden. Erstaunlich ist die Bildung des bidentaten $\kappa^2\text{-S,N}_M$ innerhalb der ersten Stunde, dessen maximale Konzentration bei dieser Kinetik schon bei 28 Stunden erreicht wird. Die Konzentration bleibt konstant und nimmt nach 100 Stunden ab. Daraus entstehenden Zerfallsprodukte konnten nicht detektiert werden.

Zeitversetzt aber mit gleichem Kurvenverlauf zeigt sich die Bildung des tridentat koordinierten Produkts.

Bei weiterer Untersuchung zeigt sich eine parallele Abnahme an bidentat und tridentat koordinierten Produkten, sowie eine deutlich gesteigerte Produktzunahme an voraussichtlich $\kappa^3\text{-S,N}_M,\text{N}_{G2}:\kappa\text{-S}'$ koordiniertem Komplex, aber eine Dominanz der 1:2-Spezies wurde in dem untersuchten Zeitraum nicht beobachtet.

6.2 Charakterisierung der Komplexe

Bei der Umsetzung des Peptids N-Ac-Gly-Gly-Met-OH mit AMD 494 entstehen zwei Produkte mit 1:1 Stöchiometrie und eine 1:2-Spezies. Darüber hinaus sind eine Vielzahl an Nebenprodukten zu beobachten, die aber aus konzentrationstechnischen Gründen nicht berücksichtigt werden konnten.

Die Produkte im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 von Bioligand zu Metallkomplex konnten durch semi-präparative RPIPC isoliert und sowohl UV- und NMR-spektroskopisch als auch massenspektrometrisch charakterisiert werden. Hingegen konnte das 1:2-Produkt nur massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Das Hydrolyseprodukt von AMD 494 wurde anhand einer HPLC-Kinetik identifiziert.

Das Zwischenprodukt $\kappa\text{-S}$ konnte mit Hilfe einer NMR-Kinetik charakterisiert werden. Da die im Verlauf der Reaktion entstehenden Produkte eine Vielzahl von unterschiedlichen Resonanzen hervorrufen ist eine vollständige Signalzuordnung unmöglich. Eine zeitgleiche chromatographische Überwachung der NMR-Lösung vereinfacht die Zuordnung der Produkte. Durch die höhere Konzentration der NMR-Lösung gegenüber der verdünnten analytischen Lösung der chromatographischen Untersuchung wurden die Reaktionen beschleunigt. Die Abbildung 6.8 zeigt ein bei $\text{pH} = 2$ nach 30 Minuten aufgenommenes Spektrums eines 1:1 Kinetikansatzes.

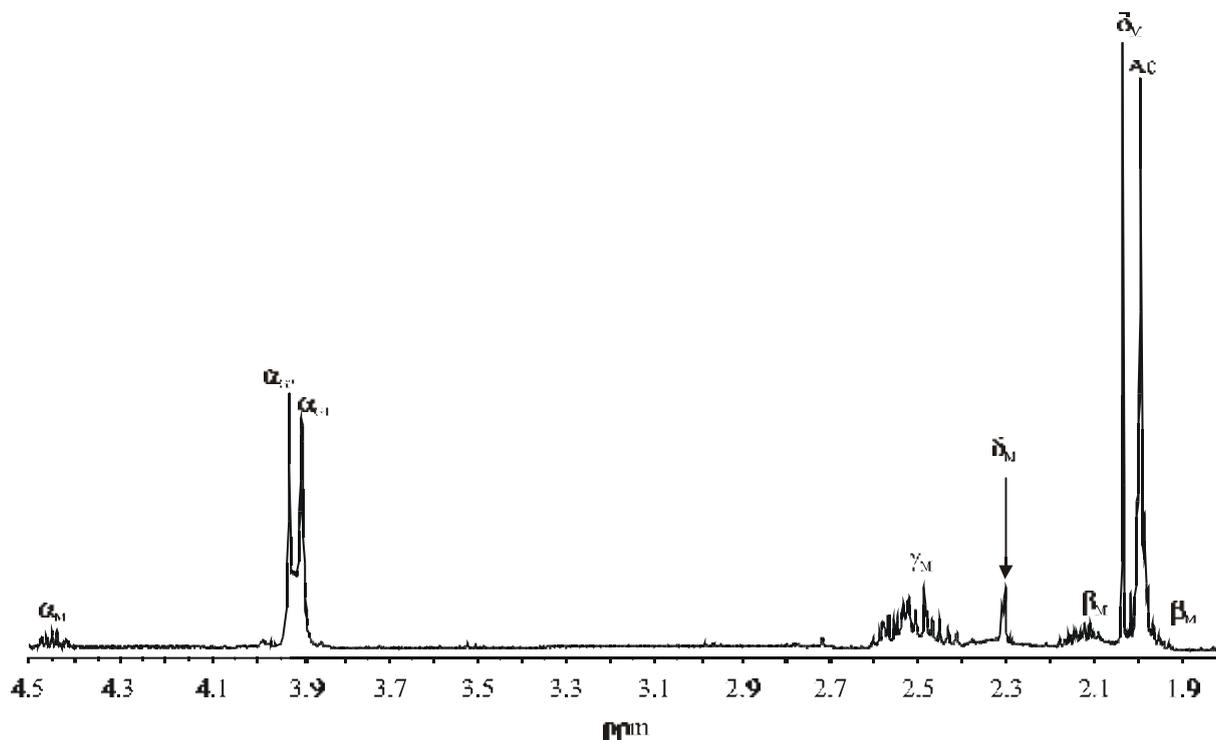


Abb. 6.8: Ausschnitt aus einem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum einer 1:1-NMR-Kinetik des Systems AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH nach 0,5 Stunden; $\text{pH} = 2,05$; 30°C ; $c = 80\text{ mM}$; D_2O

Aus Übersichtsgründen sind hier nur die Resonanzen des Peptids abgebildet. Neben dem unkoordinierten Peptid ist das Signal der $\kappa\text{-S}$ -koordinierten Spezies mit einer Resonanz bei 2,30 ppm zu erkennen. SADLER ET AL. fanden Verschiebungswerte für $[\text{PtCl}(\text{L-H-Met-}\kappa\text{S})(\text{NH}_3)_2]^+$ bei 2,48 ppm [105] und für $[\text{Pt}(\text{en})\text{MeCO-Met-}\kappa\text{S}]\text{Cl}^+$ bei 2,43 ppm [106]. Im weiteren Verlauf der Kinetik ist die Abnahme an unkoordinierten Thioether zu erkennen. Die wichtigsten chemischen Verschiebungswerte der Resonanzen sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Zum Vergleich ist in Abbildung 6.9 ein Spektrum dieser Kinetik nach 5 Stunden abgebildet. Zu diesem Zeitpunkt der Reaktion ist der Thioether des Bioliganden vollständig koordiniert und die Resonanz des $\kappa\text{-S}$ ist verschwunden. Bei einem Verschiebungswert von 2,54 ppm und 2,51 ppm erscheinen Signale für eine $\kappa^2\text{-S,N}_M$ Koordinierung, wodurch die Bildung von

Diastereomeren angezeigt wird [106]. SADLER ET AL nennen für den Komplex $[\text{Pt}(\text{en})(\text{MeCO-Met-}\kappa^2\text{S},\text{N}_M)]^+$ Verschiebungswerte von 2,45 ppm, 2,43 ppm und 2,36 ppm [106].

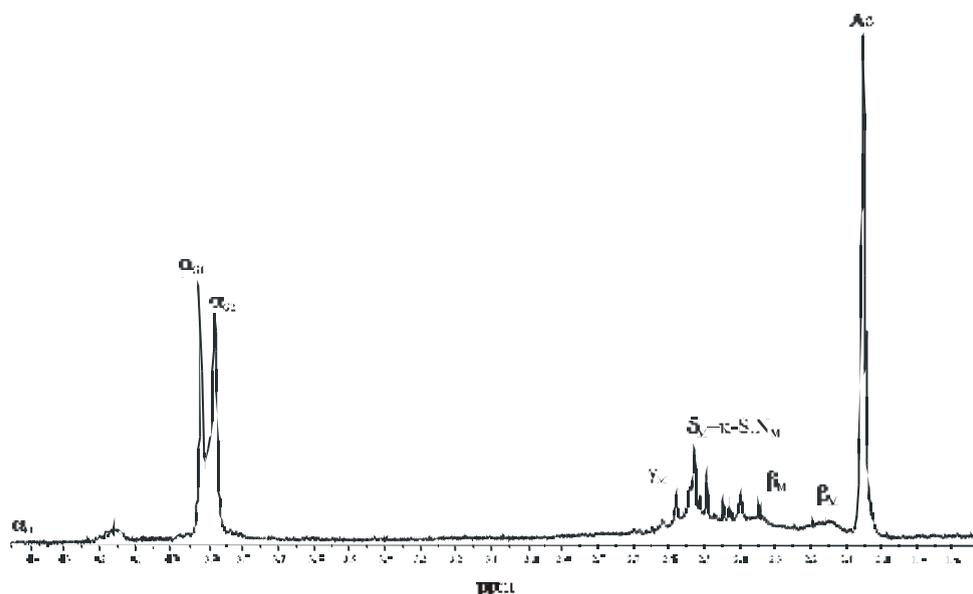


Abb. 6.9: Ausschnitt aus einem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum einer 1:1-NMR-Kinetik des Systems AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH nach 5 h; pH = 2,05; 30° C; c = 80 mM

Die wichtigsten chemischen Verschiebungswerte der Resonanzen der $^1\text{H-NMR}$ -Kinetik der Reaktion von AMD 494 und N-Ac-Gly-Gly-Met-OH sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Tab. 6.1: wichtigste chemische Verschiebungen und Aufspaltungsmuster des $\kappa^2\text{S}$ - und des $\kappa^2\text{S},\text{N}_M$ -Produkts

Signalzuordnung	$\kappa^2\text{S}$	$\kappa^2\text{S},\text{N}_M$
δ_M	2,30 s	2,51; 2,54 s
pH	2,05	2,05

Das über den gesamten pH-Bereich dominierende Produkt der 1:1 Verteilung ist der bidentat koordinierte Komplex $[\text{Pt}(\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O})(\text{Pyridin})(\text{N-Ac-Gly-Gly-Met-OH-}\kappa^2\text{S},\text{N}_M)]^+$. Das ^1H -Spektrum des isolierten Komplexes, dargestellt in Abbildung 6.10 zeigt, dass die $\delta\text{-CH}_3$ -Gruppe einen Tieffeldshift um etwa +0,4 ppm und die $\alpha\text{-CH}_M$ -Protonen eine Verschiebung

um -0,16 ppm zu höherem Feld erfahren haben, was für eine κ^2 -S,N_M-Koordinierung charakteristisch ist. Die Resonanzen der Methylgruppe des Thioethers sind somit bei 2,51 ppm und 2,54 ppm und die der α -CH_M-Protonen sind bei 4,40 ppm zu finden.

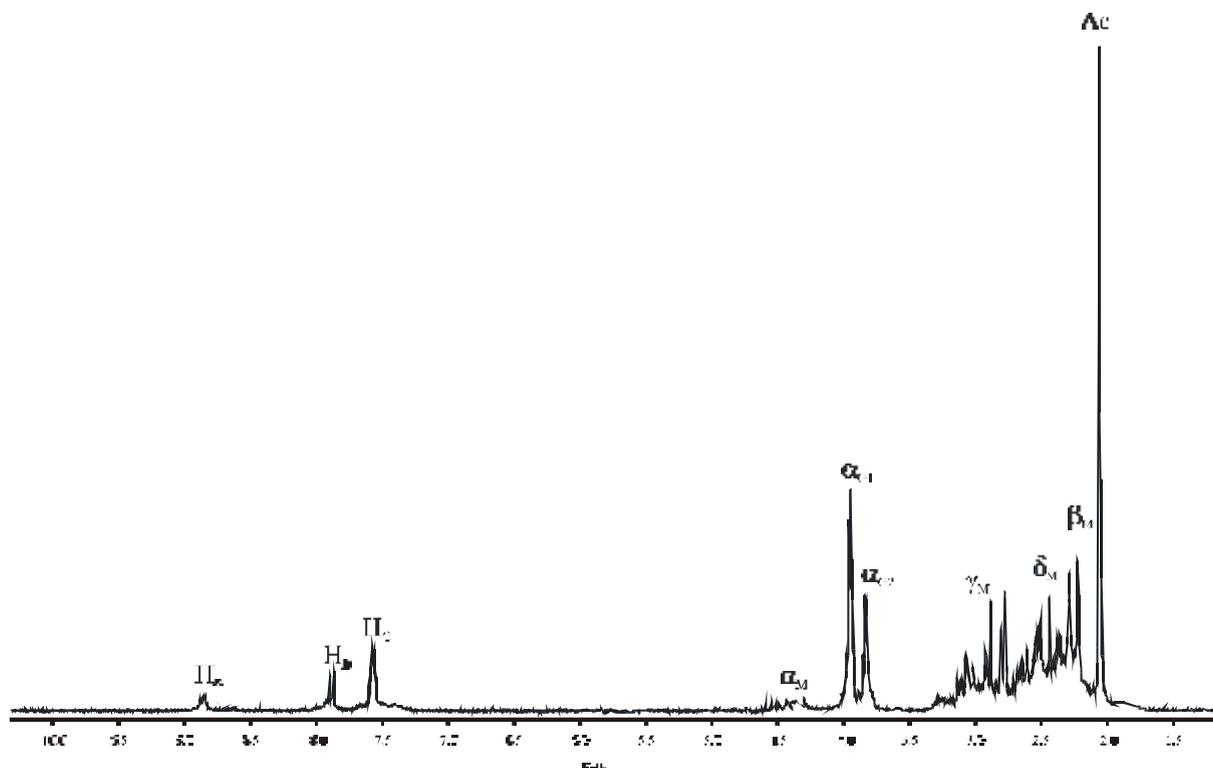


Abb. 6.10: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des κ^2 -S,N_M Produkts; pH = 2,45; D₂O

Der Verschiebungswert der Glycineinheit α -CH_{G1} entspricht der im freien Peptid bei 3,94 ppm. Allerdings findet man die Resonanz der α -CH_{G2} Protonen bei 3,88 ppm, was einem Hochfeldshift von -0,10 ppm entspricht gegenüber 3,98 ppm im freien Peptid. Die Resonanzen der β _M- und der γ _M-Protonen sind durch die Koordination am Schwefel ebenfalls zu höherem Feld verschoben. Durch die große Signalbreite und die Überlagerung der Resonanzen ist eine genaue Zuordnung nicht möglich. Auch die Aufnahme eines H,H-COSY brachte in dieser Hinsicht keine eindeutigen Informationen.

Das Proton **H_B** des Aromaten erfährt einen Tieffeldshift um -0,11 ppm, wobei **H_A** und **H_C** keine chemische Verschiebung erfahren. Auffällig ist weiterhin die Verbreiterung ihrer Resonanzen, bedingt durch Relaxationsphänomene die durch die Koordination eines Peptids entstehen.

Da der Komplex schlecht löslich in D_2O ist, wurde zur Verbesserung der ^{195}Pt -Spektrqualität ausnahmsweise $\text{DMSO-}d_6$ als Lösungsmittel eingesetzt. Die folgende Abbildung 6.11 zeigt das ^{195}Pt -Spektrum des tridentaten Produktes.

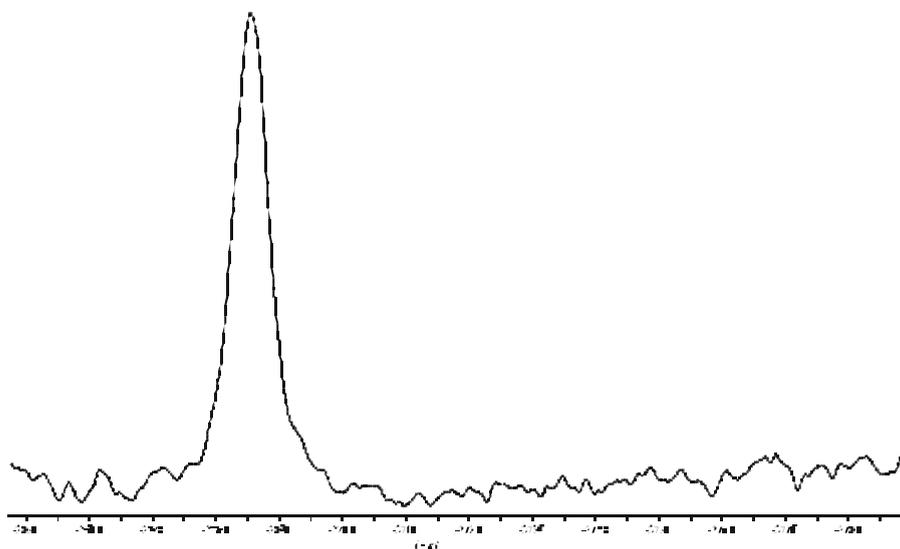


Abb. 6.11: ^{195}Pt -NMR-Spektrum des $\kappa^2\text{-S,N}_M$ Produkts (600MHz); $\text{DMSO-}d_6$

Anhand des ^{195}Pt -Resonanzsignals bei -2680 ppm, wird eine N_2SO -Umgebung indiziert [143]. Die in der Literatur für eine N_3S -Koordinationsphäre am Platin angegebenen chemischen Verschiebungswerte liegen zwischen -3050 ppm und -3150 ppm [145-146]. Durch die Tatsache, dass im ^1H -NMR-Spektrum Resonanzen für den Pyridinliganden enthalten sind und die $\kappa^2\text{-S,N}_M$ Koordination belegt wird, sowie eine N_2SO -Umgebung nachgewiesen wurde, wird der Verlust des Amminliganden bestätigt. Es ist zu vermuten, dass die Substitution des Ammoniaks, trans zu N_M stehend, durch H_2O erst bei den stark sauren Bedingungen der semi-präparativen HPLC-Trennung erfolgt. Die chemischen Verschiebungswerte und die Aufspaltungsmuster sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst.

Eine massenspektrometrische Untersuchung belegte den Komplex $[\text{Pt}(\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O})(\text{N-Ac-Gly-Gly-MetH}_1\text{-OH})\text{-}\kappa^2\text{-S,N}_M]^+$ mit einem Molekülionenpeak bei $m/z = 596$ (s. Tab. 6.3). Der berechnete Wert des Molekülpeaks ist $m/z = 597$.

Das bei basischen pH-Werten zuerst eluierende tridentat koordinierte Produkt $[\text{Pt}(\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O})(\text{N-Ac-Gly-GlyH}_1\text{-MetH}_1\text{-OH})-\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}]$ zeigt zwei um +0,4 ppm tieffeldverschobene Resonanzen für die Methylprotonen der Thioethergruppe des Methionins (s. Abb. 6.12). Hinzukommend zu einer Hochfeldverschiebung der $\alpha\text{-CH}$ des Methionins, die um -0,2 ppm zu höherem Feld verschoben wurden und denen damit die Resonanzen bei 4,34 ppm zugewiesen werden können, ist ein Tieffeldshift der aufgespaltenen $\alpha\text{-CH}_2$ -Resonanzen des Glycins (Gly_2) zu beobachten. Die δ_M -Protonen sind aufgrund der Koordination des Schwefels tieffeldverschoben und zwischen 2,53 ppm und 2,56 ppm zu finden.

Daraus bestätigt sich der vermutete $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}$ Koordinationsmodus (s. Tab. 6.2). Das Fehlen der Resonanzen der aromatischen Protonen des Pyridinliganden im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, belegt den Verlust des Aromaten. Die N_3S -Umgebung am Platin zeigt der ^{195}Pt -Verschiebungswert von -3150 ppm an, welcher in guter Übereinstimmung mit dem von APPLETON ET AL charakterisierten Komplex $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{metH-}\mathbf{K}^2\text{-S,N}_M)]^+$ ist [145-146].

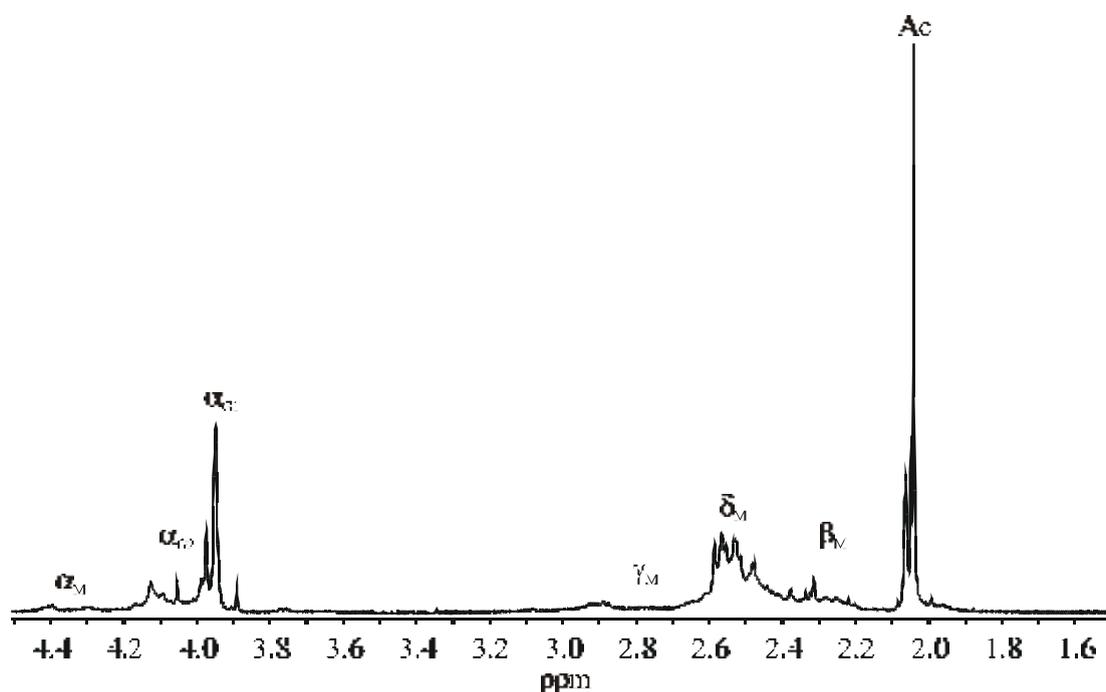


Abb. 6.12: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des $\mathbf{K}^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}$ Produkts; $\text{pH} = 2,23$

Tab. 6.2: Chemische Verschiebungen und Aufspaltungsmuster der AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH Komplexe und des freien Peptids

Signalzuordnung	N-Ac-Gly-Gly-Met	κ^2 -S,N _M	κ^3 -S,N _M ,N _{G2}
α_{G1}	3,94s	3,90 s	3,90 s
α_{G2}	3,98s	3,88 s	3,97 - 4,15 m
α_M	4,56m	4,40 m	4,34 m
β_M	1,95; 2,10m	2,00 – 2,40 m	1,98 - 2,45 m
γ_M	2,62m	2,45 - 2,70 m	2,50 - 2,81 m
δ_M	2,10s	2,51; 2,54 s	2,53; 2,56 m
Ac	2,01s	2,05 s	2,05; 2,08 s
H _A		8,80	
H _B		7,82	
H _C		7,54	
¹⁹⁵ Pt		-2680	-3150
pH	2,21	2,45	2,23

Die massenspektrometrische Untersuchung sichert diese NMR-spektroskopischen Daten durch einen M⁺-Peak bei m/z = 516, der einem [Pt(NH₃)(N-Ac-Gly-GlyH₁-MetH₁-OH- κ^3 -S,N_M,N_{G2})] Komplex entspricht. Die Auflistung der Peakzuordnung ist in Tabelle 6.3 gezeigt, wobei der berechnete Wert in Klammern angegeben ist.

Der 1:2-Komplex konnte nicht in für die NMR-Spektroskopie ausreichenden Mengen isoliert werden. Das UV-Spektrum zeigt einen ähnlichen Verlauf wie ein trikoordinierter Komplex, allerdings ist sein Maximum ausgeprägter und zu höheren Wellenlängen verschoben.

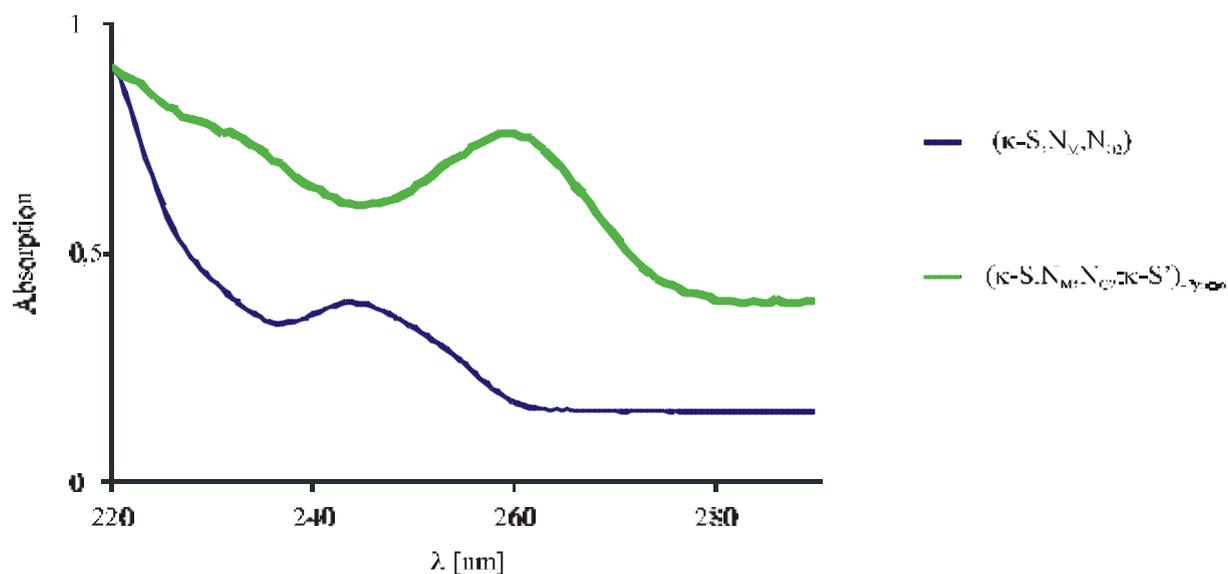


Abb. 6.13: Normierte UV-Spektren der tridentat koordinierten K^3 - S,N_M,N_{G2} und K^3 - $S,N_M,N_{G2}:K^3S'$ -Spezies

Der Vergleich der vorhandenen UV-Daten mit den Ergebnissen von KLEINE zeigt, dass von einer K^3 - $S,N_M,N_{G2}:K^3S'$ -Koordination ausgegangen werden kann [33-34].

Für das alternative 1:2-Produkt $[Pt(N\text{-Ac-Gly-Gly-MetH}_1\text{-OH-}K^2\text{-}S,N_M)(N\text{-Ac-Gly-Gly-MetH}_1\text{-OH-}K^2\text{-}S',N'_M)]$ wäre kein Absorptionsmaximum im Bereich $\lambda = 250 - 270$ nm zu erwarten.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen ergaben einen eindeutig Hinweis auf eine 1:2 Stöchiometrie mit einem Molekülion $m/z = 804$ mit Übereinstimmung zwischen beobachtetem und berechnetem Isotopenpattern. Der berechnete Wert für den entsprechenden Molekülpeak ist 806.

Tab. 6.3: Massenspektrometrische Daten (ESI-MS) der AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH Komplexe mit berechneten Werten in Klammern

Signalzuordnung	K^2 - S,N_M	K^3 - S,N_M,N_{G2}	K^3 - $S_1,N_M,N_{G2}:K^3S'$
$[M]^+$	596 (597)	516 (518)	804 (806)

6.3 Diskussion der Ergebnisse und Vergleich von AMD 494 mit Cisplatin und Carboplatin

Bei der Reaktion der AMD473-analogen Verbindungen AMD 494 mit dem methioninhaltigen Peptid N-Ac-Gly-Gly-Met-OH bilden sich drei Produkte über den gesamten pH-Bereich. Das Hauptprodukt ist der bidentate κ^2 -S,N_M-Komplex. Die beiden weiteren in geringeren Konzentrationen auftretenden Produkte sind eine 1:2-Spezies und der κ^3 -S,N_M,N_{G2} koordinierte Komplex, die sich beide durch den Verlust des Pyridinliganden auszeichnen.

Herausragend ist die Bildung des bidentaten Hauptprodukts, das nach 504 Stunden in hoher Konzentration über den gesamten pH-Bereich zu beobachten ist. Bei Zugabe von N-Ac-Gly-Gly-Met-OH zum κ^2 -S,N_M im Verhältnis 1:1 zeigte sich keine weitere Reaktion. Allerdings erwies sich der isolierte κ^2 -S,N_M als nicht inert, da er bei einer Inkubation bei 40°C nach 100 Stunden unter Verlust des Pyridinliganden zum tridentat koordiniertem Komplex [Pt(NH₃/H₂O)(N-Ac-Gly-GlyH₁-MetH₁-OH- κ^3 -S,N_M,N_{G2})] weiterreagierte. Das mögliche Folgeprodukt [Pt(Pyridin)(N-Ac-Gly-GlyH₁-MetH₁-OH- κ^3 -S,N_M,N_{G2})] eines κ^2 -S,N_M-Komplexes mit Schwefel in der cis-Position zum Pyridinliganden wurde nicht detektiert. Daher muss davon ausgegangen werden, dass eine Substitution Cl→S der Position cis zum Pyridin zumindest kinetisch eindeutig im untersuchten pH-Bereich weniger favorisiert ist. SADLER ET AL. zeigten bei Untersuchungen der Reaktion von AMD 473 mit 5'-GMP²⁻, dass die Position trans zum Ammin, also cis zum aromatischen Liganden, durch sterische Behinderung langsamer substituiert wurde [57]. Die Ergebnisse der aktuellen Untersuchung scheinen diesen Befund auch für den sterisch anspruchsloseren Liganden Pyridin zu bestätigen.

Studien von HOLFORD ET AL. mit AMD 494 zeigen, dass das kinetische Reaktionsprofil bei Reaktionen mit weichen Nucleophilen wie die Seitenkette des Methionins beinahe identisch mit dem von Cisplatin ist (s. Kap. 3.2) [50]. Dies konnten die aktuellen Untersuchungen der Reaktion von AMD 494 mit dem acetylgeschützten N-Ac-Gly-Gly-Met-OH bestätigen, da die Entstehung der Hauptprodukte in einem Zeitraum von 60 Stunden bei neutralen pH-Werten abgeschlossen war (s. Abb. 6.6). Dies entspricht ungefähr den zeitlichen Produktbildungen die KLEINE bei Untersuchungen von Reaktionen der Systeme Cisplatin mit methioninhaltigen

Peptiden dokumentierte [33]. Auch dort ist die Bildung zum κ^2 -S, N_M -Chelat nach ca. 40 Stunden abgeschlossen, wie die Abbildung 6.14 zeigt.

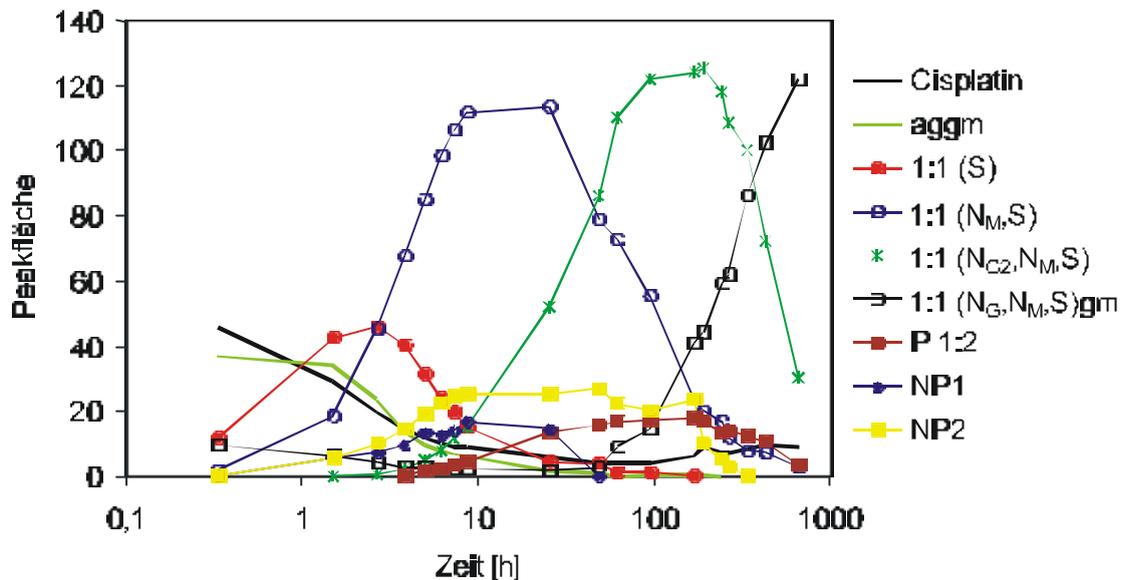


Abb. 6.14: zeitabhängige Produktverteilung des Systems Cisplatin / NAc-Gly-Gly-Met-OH (1:1) ; pH = 5,2; [33]

Diese Kinetik zeigt, das sich aus dem schwefelkoordinierten κ -S ebenfalls schnell der Chelat κ^2 -S, N_M bildet. Das dominierende Hauptprodukt ist das in dieser Arbeit charakterisierte κ^3 -S, N_M , N_{G2} Produkt, das im pH-Bereich $3 \leq \text{pH} \leq 6,5$ zum Spaltprodukt weiterreagiert.

Auffällig ist hierbei die exklusive Bildung der 1:1 Produkte und eine N-terminale Peptidspaltung im pH-Bereich $\text{pH} \leq 6,5$. Allgemein kann man soweit für die Reaktionen von Cisplatin mit methioninhaltigen Peptiden folgendes Schema formulieren:



Grundsätzlich ist die Produktbildung in Systemen Cisplatin / Peptid durch den Verlust von drei Substituenten und die Bildung der thermodynamisch stabilen κ^3 -S, N_M , N_{G2} Spezies bestimmt. Darin besteht der größte Unterschied zum System AMD 494. Hier scheint trotz der kinetische Favorisierung der Position trans zum Pyridin, nach einer Chelatisierung zum κ^2 -

S,N_M, der Verlust von Pyridin entweder inhibiert oder thermodynamisch ungünstig zu sein. Hierbei wäre eine Labilisierung der Pt-N(Pyridin)-Bindung auf Grund des großen Trans-Effekts des Thioethers-Schwefelatom zu erwarten. Der isolierte bidentate AMD 494-Komplex zeigte allerdings, erst nach einer Inkubationszeit, die über 100 Stunden liegt, nachweislich die Bildung von Zerfallsprodukten, unter anderem den κ^3 -S,N_M,N_{G2}-Komplex. Das bedeutet, dass der Trans-Effekt des koordinierten Schwefels der Methionineinheit offensichtlich bei pH-Werten von $3 \leq \text{pH} \leq 11$ nicht ausreicht um den Verlust des Pyridins mit gleicher Geschwindigkeit wie den des Amminliganden des Cisplatin zu bewerkstelligen, da der tridentat koordinierte Komplex erst nach einer wesentlich längeren Reaktionsphase detektiert wurde.

Damit ergibt sich folgendes Reaktionsschema für die Umsetzungen von AMD 494 mit N-Ac-Gly-Gly-Met-OH, dargestellt in Abbildung 6.15:

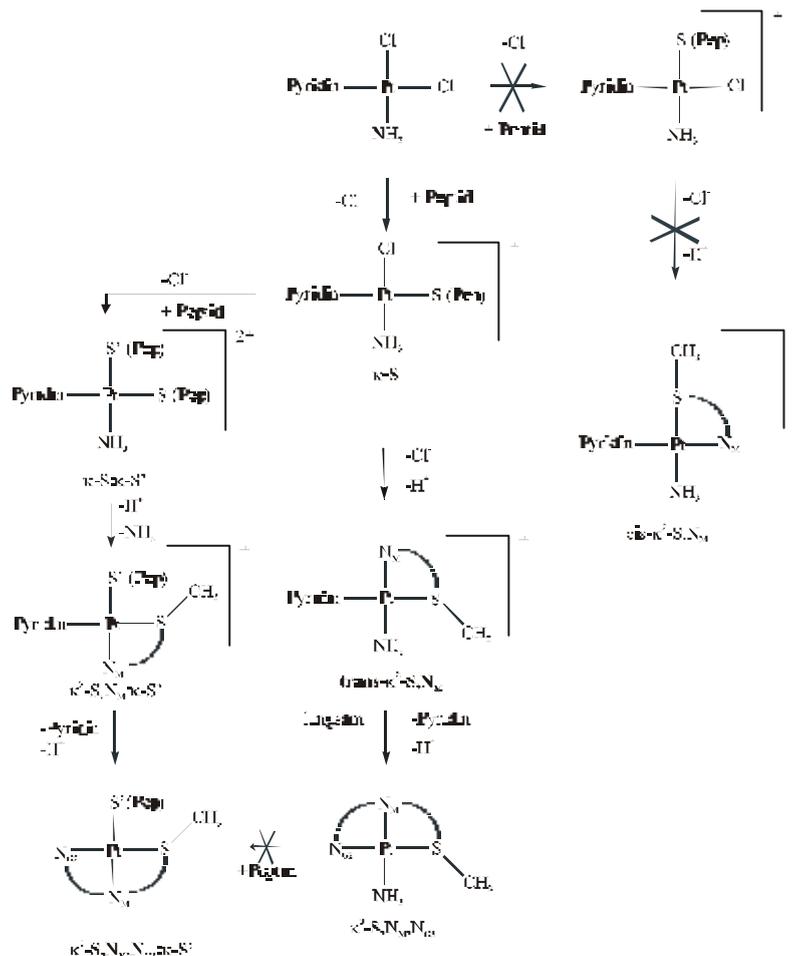


Abb. 6.15: Reaktionsschema für die Umsetzung von AMD 494 mit N-Ac-Gly-Gly-Met-OH

Die Reaktionen von AMD 494 werden somit durch die sterische Hinderung der Position cis zum Pyridin für die anfängliche κ -S-Koordination bestimmt. Die Weiterreaktion des aus dem κ -S (trans zum Pyridin) schnell gebildeten κ^2 -S, N_M -Komplexes geschieht recht langsam, da der Verlust des Pyridin-Liganden kinetisch und thermodynamisch weniger begünstigt ist, als der Verlust von Amminliganden bei Cisplatin.

Die Peptidspaltung ist bei AMD 494 im biologisch relevanten Zeitraum ($t \leq 200$ h) nicht von Bedeutung.

Es zeigte sich, dass der bidentat koordinierte Komplex auch in Anwesenheit von Peptidüberschuss nicht zur 1:2 Spezies weiterreagiert und somit ein alternativer Reaktionsweg existieren muss. Vergleicht man dazu Systeme von Carboplatin mit methioninhaltigen Peptiden, so zeigte sich, dass der Austausch der beiden Chloroliganden durch Cyclobutan-1,1-dicarboxylat einen zweiten Reaktionsweg eröffnet [33-34].

Die Reaktion von Carboplatin mit Peptiden zeichnet sich durch eine initialisierende Ringöffnung aus. Das daraus resultierende κ -S-Produkt ist relativ stabil und protegiert somit die kinetisch begünstigte Bildung des κ -S: κ -S' woraus ein zu Cisplatin alternativer Reaktionsweg resultiert. Der 1:2-Komplex reagiert über eine einfache Chelatisierung zum κ^2 -S, N_M : κ -S', welches dann zum κ^3 -S, N_M , N_{G2} : κ -S' weiterreagiert. Wie zuvor beschrieben ist findet eine Peptidspaltung im pH-Bereich $\text{pH} \leq 6,5$ statt.

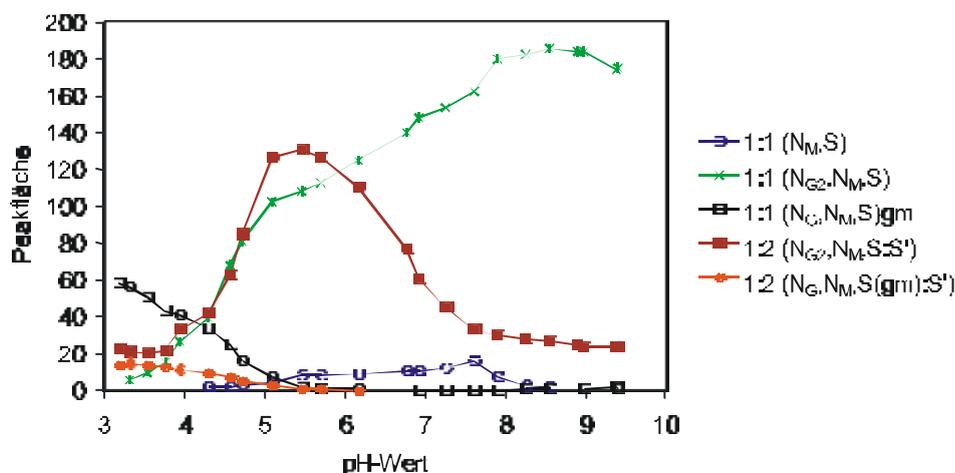


Abb. 6.16: pH-abhängige Produktverteilung des Systems Carboplatin / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH [33]

Die pH-Verteilung, dargestellt in Abbildung 6.16 zeigt die signifikante Konkurrenz beider Reaktionswege für die äquimolaren Reaktionen von Carboplatin mit methioninhaltigen Peptiden im pH-Bereich $4 \leq \text{pH} \leq 7$. Da der 1:2-Komplex sowohl bei AMD 494 als auch bei Carboplatin gebildet wird, muss davon ausgegangen werden, dass der für Carboplatin nachgewiesene Vorläufer $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-S}'$ auch bei AMD 494 in geringeren nicht nachweisbaren Konzentrationen entsteht.

Es kann daher für die Wechselwirkungen zwischen AMD 494 und methioninhaltige Peptide allgemein formuliert werden:

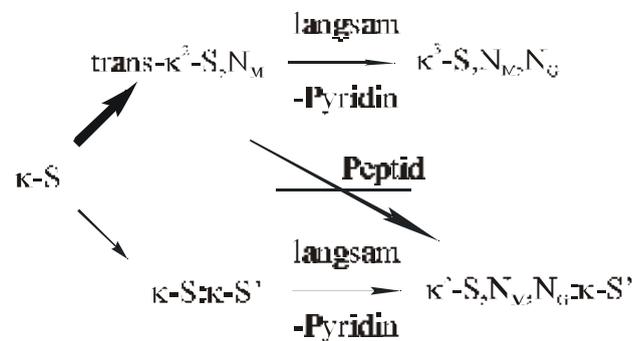


Abb. 6.17: formales Reaktionsschema für die Umsetzung von AMD 494 mit methioninhaltigen Peptiden

7 Reaktionen von $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$

7.1 Umsetzungen mit N-Ac-Met-OH

7.1.1 Chromatographisches System

Die chromatographische Trennung des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / N-Ac-Met-OH im Verhältnis 1:1 erfolgte mit einem Stufengradienten bestehend aus 7%, und 20% MeOH. Der Wechsel der Eluenten erfolgte nach 35 Minuten. Mit 0,1% PFP als IPR konnten innerhalb von 65 Minuten sämtliche Reaktionsprodukte getrennt werden. Die angesetzten 12 Reaktionslösungen wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ bei einer Säulentemperatur von 25°C chromatographiert. Die Detektorwellenlänge betrug 220 nm.

Die nachfolgende Abbildung 7.1 zeigt ein Beispielchromatogramm, das die Elutionsreihenfolge verdeutlicht.

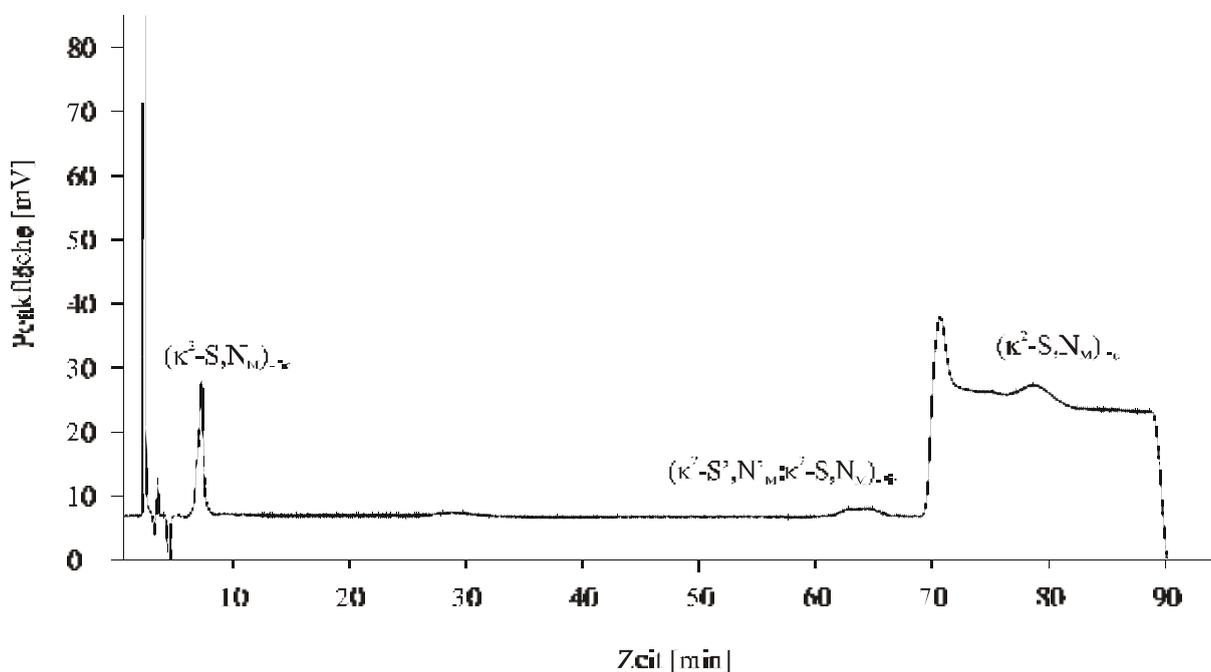


Abb. 7.1: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des System $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / N-Ac-Met-OH; 7, 20% MeOH; 0,1% PFP; 25°C ; $\text{pH} = 4,5$; Reaktionszeit (t) = 504 Stunden

7.1.2 pH-abhängige Produktverteilung

Es wurden analytische Reaktionslösungen des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / N-Ac-Met-OH im Verhältnis 1:1 mit einer Einwaagekonzentration von 0,8 mM bezogen auf das Peptid angesetzt. Die einzelnen Reaktionslösungen wurden mit entsprechenden Äquivalentanteilen an 0,1 M Natronlauge versetzt und 21 Tage (504 Stunden) bei 40° C temperiert. Nach dieser Frist wurden die pH-Werte gemessen und die Lösungen chromatographiert. Die Lagerung fand bei 4° C im Kühlschrank statt, wobei sich die Produktverteilung nur noch unwesentlich änderte. Eine pH-abhängige Produktverteilungskurve erhält man durch die Auftragung der Integrale der Signale gegen den zugehörigen pH-Wert (s. Abb. 7.2).

Die äquimolare Umsetzung von $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ und N-Ac-Met-OH führt zu zwei $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Komplexe als Hauptprodukte, die nach 21 Tagen über den gesamten pH-Bereich als Hauptprodukte beobachtet werden.

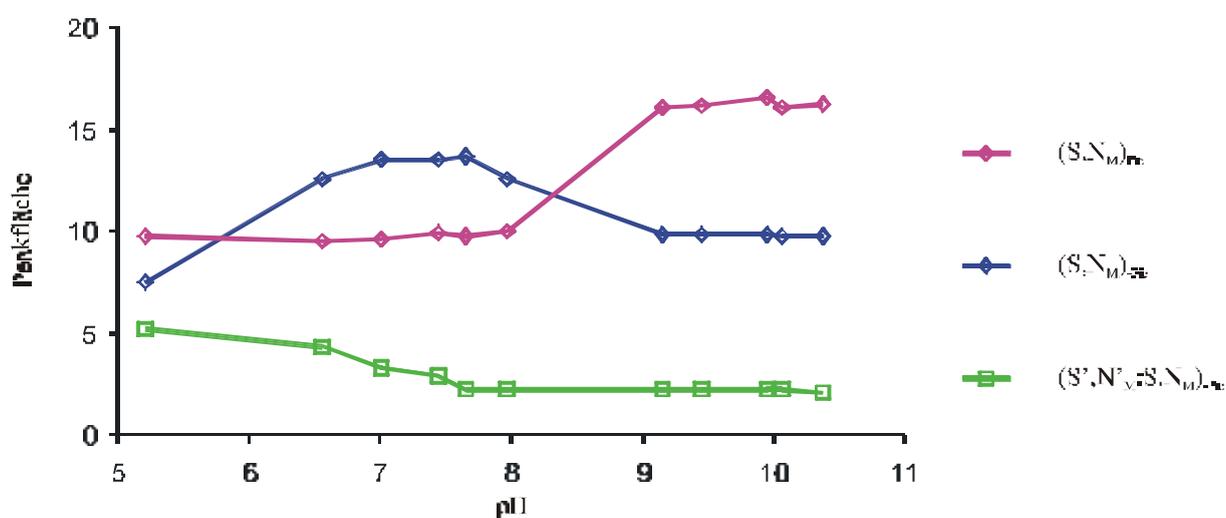


Abb. 7.2: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / N-Ac-Met-OH (1:1); Reaktionszeit: 21 Tage (504 Stunden)

Der bidentate Komplex $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})(\text{N-Ac-MetH}_{1\text{-OH}}\text{-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ erreicht einen maximalen Wert ab $\text{pH} \geq 9$. Der Komplex $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{N-Ac-MetH}_{1\text{-OH}}\text{-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]$, der kein Picolin enthält, erreicht seine maximale Signalintensität bei $\text{pH} = 7,66$. Ein weiteres Produkt ist der Komplex $[\text{Pt}(\text{N-Ac-MetH}_{1\text{-OH}}\text{-}\kappa^2\text{-S,N}_M)(\text{N-Ac-MetH}_{1\text{-OH}}\text{-}\kappa^2\text{-S}',\text{N}'_M)]$,

dessen Konzentration unter basischen Bedingungen abnimmt. Seine Konzentrationsabnahme korreliert mit einer Zunahme des bidentaten $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})(\text{N-Ac-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]$ Komplexes.

Die Strukturen der $\kappa^2\text{-S,N}_M$ und des 1:2-Komplexes sind in Abbildung 7.3 dargestellt, wobei die Beweislage für $(\kappa^2\text{-S,N}_M)_{\text{Pic}}$ sich aus dem ESI m/z-Peak sowie aus der Tatsache ergibt, dass der $(\kappa^2\text{-S,N}_M)_{\text{Pic}}$ wahrscheinlich dessen Folgeprodukt ist.:

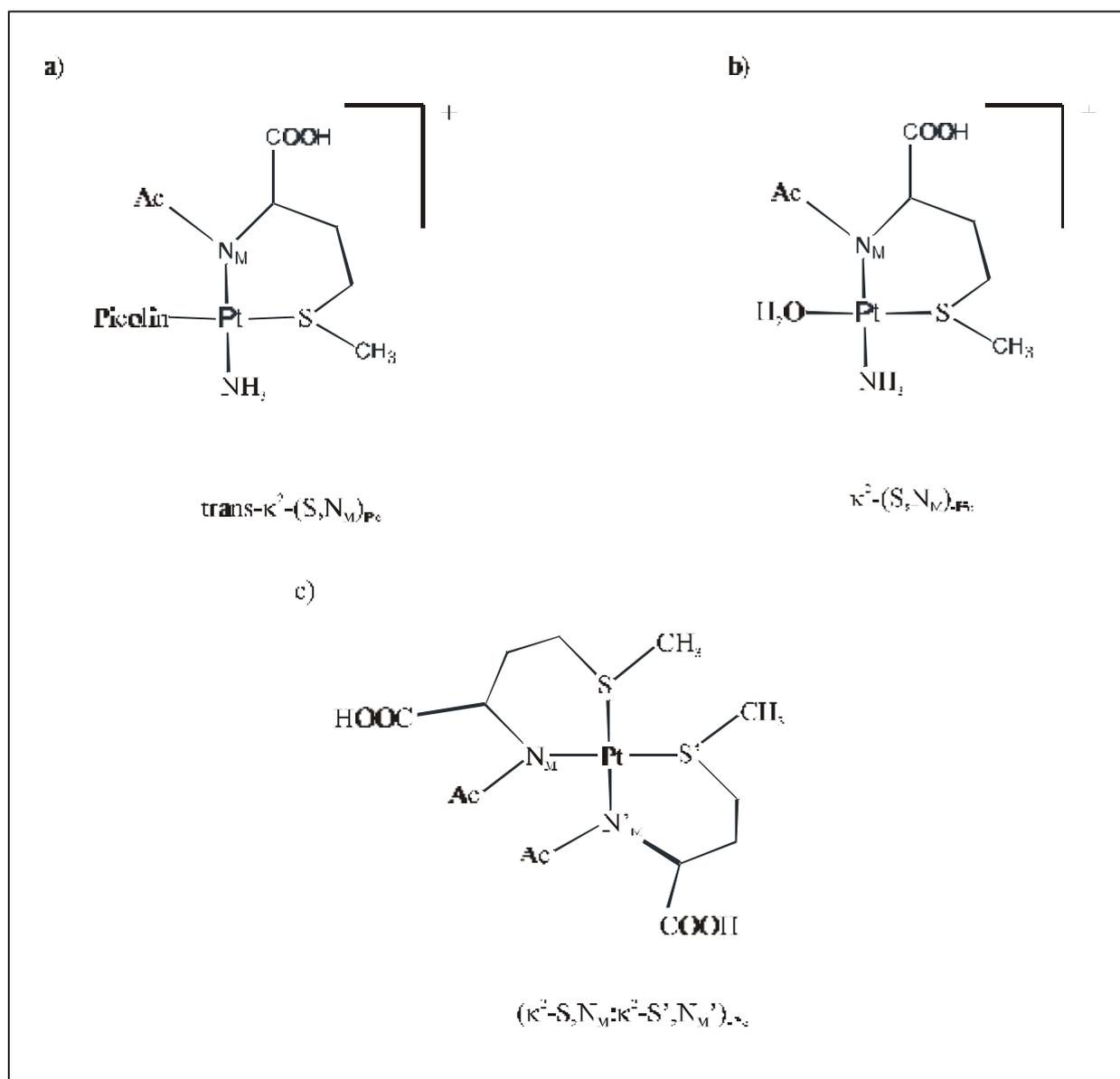


Abb. 7.3: Strukturen der bidentaten $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Komplexe und des 1:2-Komplexes

7.1.3 Kinetische Untersuchung

Der zeitabhängige Reaktionsverlauf wurde anhand einer analytischen Reaktionslösung bei einem pH-Wert von 7,94 in äquimolarer Zusammensetzung untersucht. Die zu diesem Zweck angesetzten und über einen Zeitraum von 42 Tagen bei 40° C aufbewahrten Reaktionsansätze wurden kontinuierlich chromatographiert, wobei die pH-Werte nach Ablauf von 21 Tagen gemessen wurden.

Bei der Untersuchung des Ansatzes bei einem pH-Wert von 7,94 zeigt sich eine stetige Abnahme an Peptid und $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$. Die Edukte sind erst nach einem Zeitraum von über 100 Stunden abreagiert. Es bildet sich innerhalb der ersten beiden Stunden der Komplex $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})(\text{N-Ac-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$, der dann nach 330 Stunden sein Peakmaximum erreicht und über einen Zeitraum von 1000 Stunden stabil ist. Da nur ein Peak zu einem $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Komplex zugeordnet werden konnte, muss entweder lediglich eine Substitution des Thioether-Schwefels nur trans zum Picolin stattfinden oder die $\text{cis-}\kappa^2\text{-S,N}_M$ und $\text{trans-}\kappa^2\text{-S,N}_M$ weisen ähnliche Retentionszeiten auf.

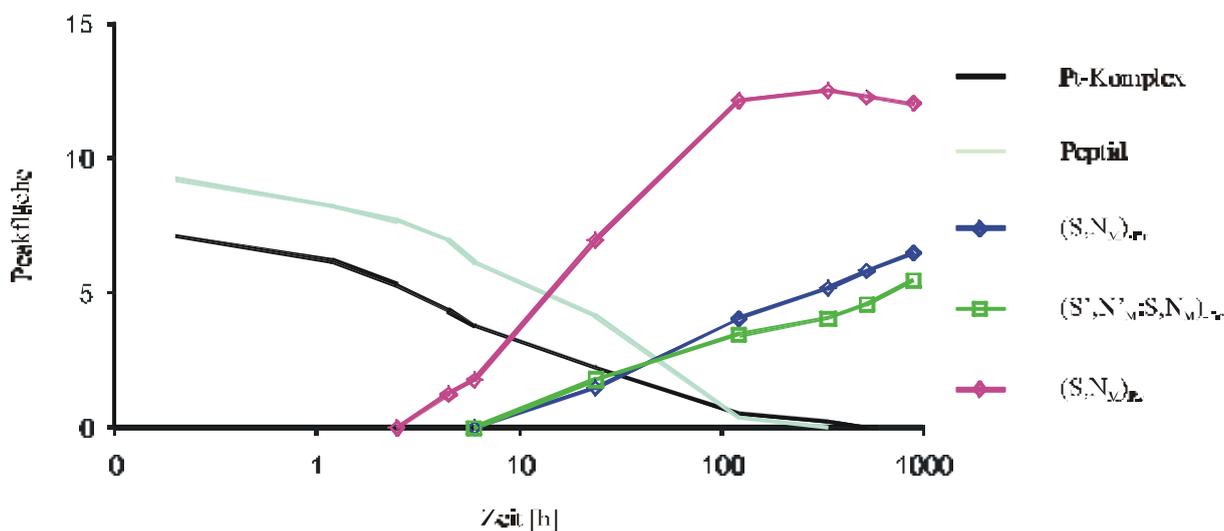


Abb. 7.4: zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+} / \text{N-Ac-Met-OH}$ (1:1); pH = 7,94

Der bidentate Komplex $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{N-Ac-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ und der Komplex $[\text{Pt}(\text{N-Ac-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)(\text{N-Ac-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S',N'_M})]$ entstehen zeitgleich, wobei

der $\kappa^2\text{-S,N}_M$ koordinierte Komplex nur leicht dominiert. $\kappa\text{-S}$ und $\kappa\text{-S}'$: $\kappa\text{-S}$ -Vorläuferprodukte konnten im Verlauf der zeitabhängigen chromatographischen Messungen nicht detektiert werden.

7.1.4 Charakterisierung der Produkte

Durch die Studien des Systems Cisplatin / N-Ac-Met (s. Kap. 9.3) und aufgrund der Entstehung nur eines Hauptproduktes sowie zweier Nebenprodukte, wurde auf die zeitaufwendige semi-präparative Trennung verzichtet. Der Einsatz der LC / MS-Kopplung ermöglichte eine rasche direkte Identifizierung der Produkte. Die Untersuchung einer Analysenlösung bei $\text{pH} = 6$ lieferte einen Molekülpeak $m/z = 500$ (s. Abb. 7.5), was dem Kation $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})(\text{N-Ac-Gly-Gly-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ entspricht, wobei der theoretisch erwartete Molekülpeak einen Wert für $m/z = 497$ von ergab.

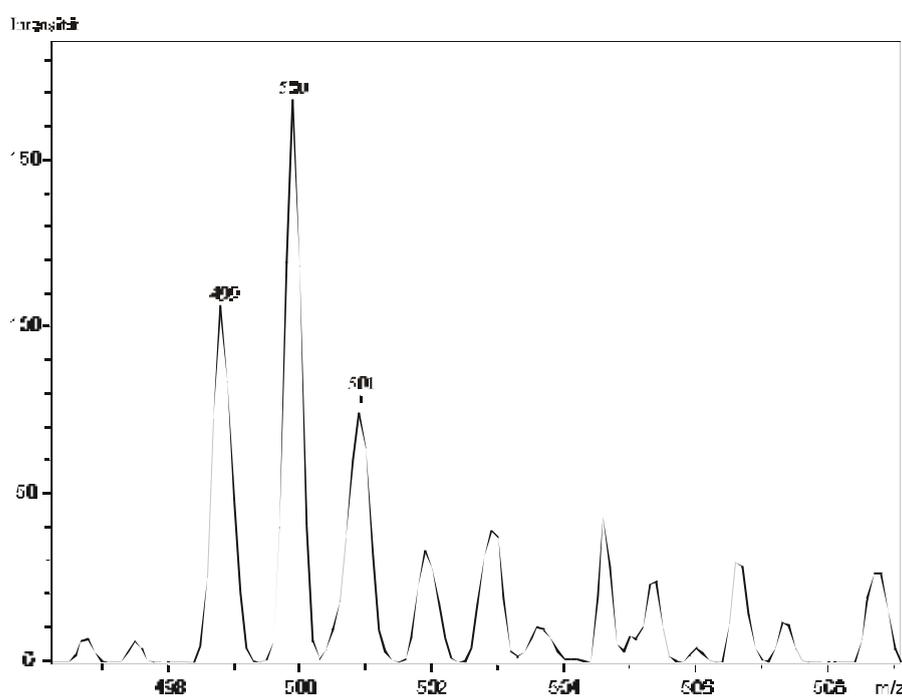


Abb. 7.5: ESI-MS-Spektrum des bidentaten $(\kappa^2\text{-S,N}_M)_{\text{Pic}}$ -Komplexes

Das $[\text{M}]^+$ -Kation des picolinfreien bidentaten $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Komplexes, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{H}_2\text{O})(\text{N-Ac-Gly-Gly-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ konnte durch einen Molekülpeak bei $m/z = 421$ bewiesen werden und der Molekülpeak der 1:2 Spezies findet sich bei $m/z = 578$. Die massenspektrometrischen Daten sind Tabelle 7.1 zusammengefasst, wobei die berechneten Massen in Klammern angegeben sind.

Tab. 7.1: ESI-MS-Daten der bidentaten und des 1:2 Komplexes

m/z	$\kappa^2\text{-S,N}_M$	$(\kappa^2\text{-S,N}_M)\text{-Pic}$	1:2
	500 (497)	421 (421)	578 (578)

7.2 Umsetzungen mit dem Tripeptid N-Ac-Gly-Gly-Met-OH

7.2.1 Chromatographisches System

Die chromatographische Trennung des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH im Verhältnis 1:1 und 1:2 erfolgte mit einem Stufengradienten bestehend aus 7% und 17% MeOH bei einer für dieses System vorteilhaften Temperatur von 21° C. Mit 0,1% Pentafluorpropionsäure als IPR konnten innerhalb von 80 Minuten sämtliche Reaktionsprodukte getrennt werden. Die angesetzten 19 Reaktionslösungen wurden, nach einer 21-tägigen Inkubationszeit, bei einer Detektorwellenlänge von 220 nm und mit einer Fließgeschwindigkeit von $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ chromatographiert.

Die in den ersten 10 Minuten eluierenden Substanzen sind Verunreinigungen des Peptids und wurden in den anstehenden Untersuchungen nicht berücksichtigt, da sie keinen Einfluss auf die Reaktionen hatten. Die zwischen 25 und 35 Minuten erscheinenden Peaks sind auf Verunreinigungen des Metallkomplexes zurückzuführen, die für die weiteren Untersuchungen keinen Einfluss hatten, so dass sie nicht weiter behandelt wurden.

Einige der erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 7.6 dargestellt.

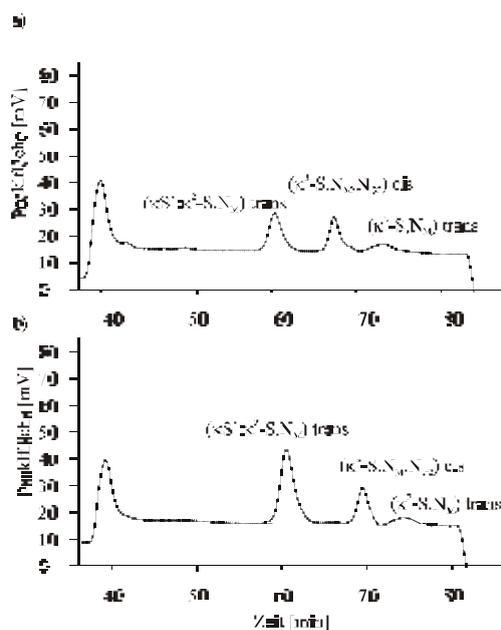


Abb. 7.6: Ausschnitte aus Chromatogrammen eines 1:1 Ansatzes des System $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / *N*-Ac-Gly-Gly-Met-OH; 7%, 17% MeOH; 0,1% PFP; Reaktionszeit (t) = 504 Stunden; 21° C; a) pH = 5,2; b) pH = 7,12 ;

7.2.2 pH-abhängige Produktverteilung

Die Strukturen der wichtigsten Komplexe sind in der nachfolgenden Abbildung 7.7 dargestellt:

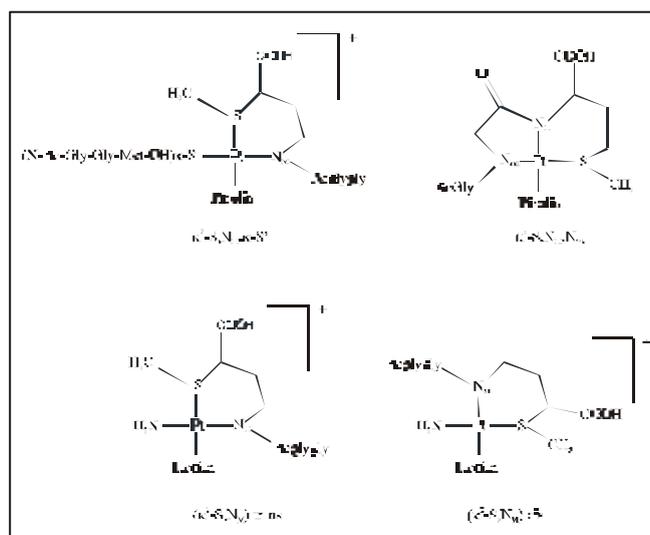


Abb. 7.7: Strukturen der wichtigsten Komplexe des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / *N*-Ac-Gly-Gly-Met-OH

Die Verlängerung des Peptids mit der Einführung von zwei weiteren Glycineinheiten führt zu einer Erhöhung der Produktvielfalt.

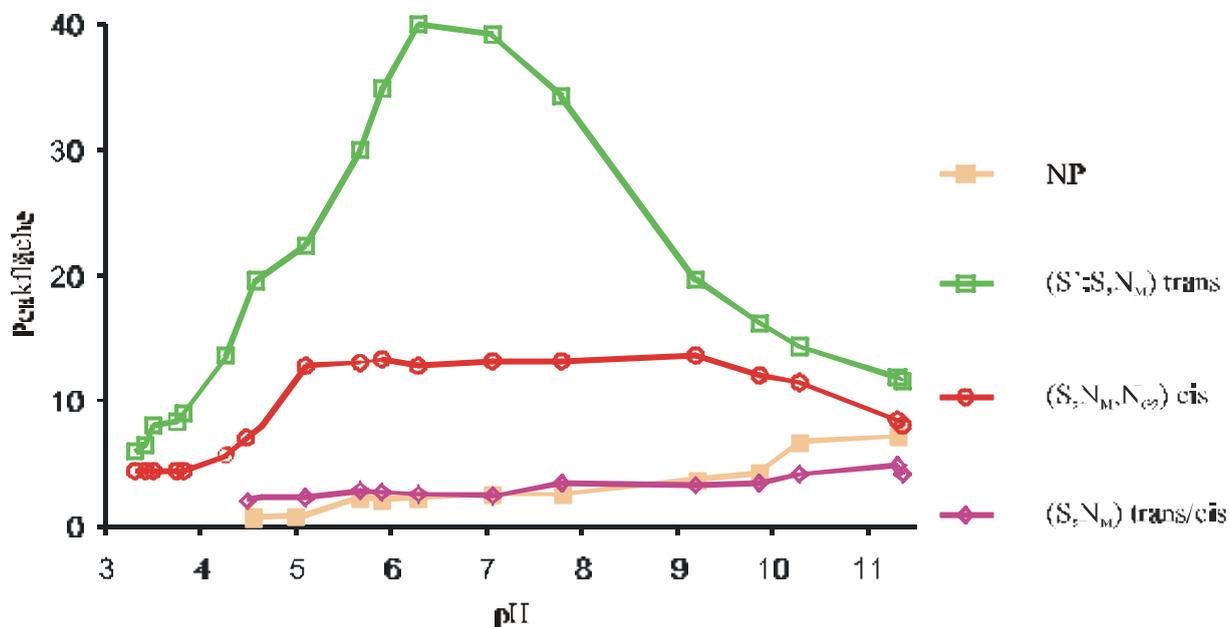


Abb. 7.8: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+} / \text{N-Ac-Gly-Gly-Met-OH}$ (1:1) nach 21 Tagen

Aus den Kurvenverläufen ist ersichtlich, daß bei der 1:1-Umsetzung von $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ mit $\text{N-Ac-Gly-Gly-Met-OH}$ die Peakfläche eines 1:2-Komplexes $[\text{Pt}(2\text{-Methylpyridin})(\text{N-Ac-Gly-Gly-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S, N}_M)(\text{N-Ac-Gly-Gly-Met-OH-}\kappa\text{-S})]^+$ über einen pH-Bereich von $4 \leq \text{pH} \leq 11$ dominiert.

Ein $\kappa^3\text{-S, N}_M, \text{N}_{G2}$ koordinierter Komplex $[\text{Pt}(2\text{-Methylpyridin})(\text{N-Ac-Gly-GlyH}_1\text{-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^3\text{-S, N}_M, \text{N}_{G2})]$ wird außerdem über den gesamten pH-Bereich detektiert und durchläuft ein Maximum zwischen $\text{pH} = 5$ und $\text{pH} = 9$. Eine im Säuren zu erwartenden Peptidspaltung konnte bei diesem Komplex in dem Beobachtungszeitraum nicht festgestellt werden.

7.2.3 Kinetische Untersuchungen

Die zeitabhängigen Untersuchungen der Reaktionen von $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ mit dem Peptid $\text{N-Ac-Gly-Gly-Met-OH}$ wurden in äquimolaren Verhältnissen im Säuren,

Neutralen und leicht Basischen durchgeführt. Die analytischen Reaktionslösungen wurden bei 40°C temperiert und fortlaufend chromatographiert. Die pH-Werte der Analysenlösungen wurden nach 21 Tagen bestimmt.

Die nachfolgenden Chromatogramme (s. Abb. 7.9 (a) und (b) und (c)) sollen die Produktbildung bei der Kinetik im Sauren verdeutlichen. In Chromatogramm (a) nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten wurde neben den beiden Edukten das schwefelkoordinierte Vorläuferprodukt detektiert. Nach 56 Stunden (s. Abb. 7.9 (b)) sind Peptid und Metallkomplex, sowie der schwefelkoordinierte Precursor und die drei Hauptprodukte gebildet. Nach weiteren 120 Stunden ist das monodentate $\kappa\text{-S}$ abreagiert und nur noch die Hauptprodukte in der Lösung präsent.

In den ersten 35 Minuten eluieren nur Verunreinigungen, die keinen Einfluss auf die kinetischen Untersuchungen haben und daher nicht weiter berücksichtigt wurden (s. Kap. 7.2.1).

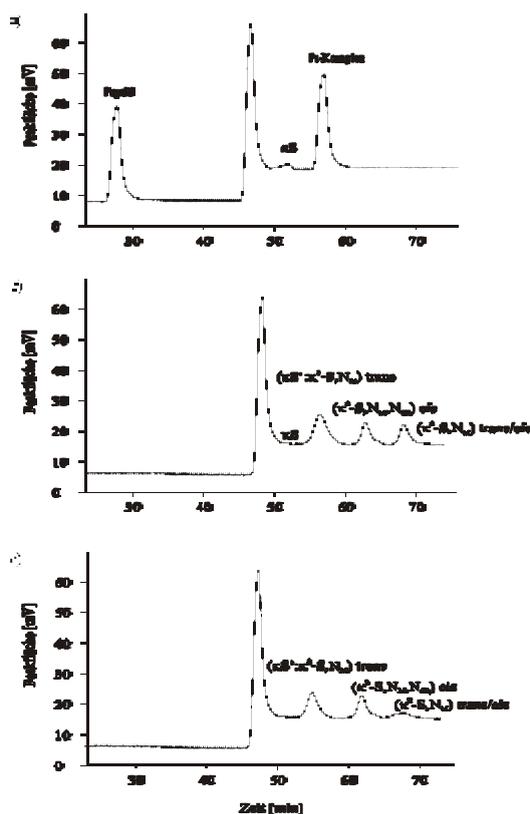


Abb. 7.9: Ausschnitte aus Chromatogrammen eines 1:1 Kinetikansatzes des System $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / *N*-Ac-Gly-Gly-Met-OH; 7%, 17% MeOH; 0,1% PFP; 21°C ; pH = 4,10; a) $t = 10$ min; b) $t = 56$ Stunden ; c) $t = 120$ Stunden

Die Auftragung der Signalintensitäten gegen die Zeit zeigt (s. Abb. 7.10), dass die Peakintensitäten des Bioliganden und des Metallkomplexes nach 30 Minuten abnehmen. Das Peptid ist nach 60 Stunden abreagiert und das Platinfragment nach 6 Stunden. Ohne Verlust des Picolins kommt es zu einer sofortigen Bildung des monodentaten $\kappa\text{-S}$ -Produkts, dessen maximale Signalintensität schon nach ca. 30 Minuten erreicht ist. Es reagiert weiter zum bidentaten $\kappa^2\text{-S, N}_M$ -Produkt (trans zum Picolin-N), das nach 8 Stunden sein Peakmaximum durchläuft. Da der $\kappa^2\text{-S, N}_M$ -Precursor mit dem Thioether in cis-Position zum Picolin des sich zeitgleich bildenden tridentatem ($\kappa^3\text{-S, N}_M, \text{N}_{G2}$)cis nicht durch ein weiteres Signal detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass beide $\kappa^2\text{-S, N}_M$ -Intermediate die gleichen Retentionszeiten t_R besitzen.

Da alle Komplexe im weiteren Verlauf der Untersuchung zu einer Vielzahl von Produkten zerfallen, war nach 1000 Stunden eine Produktzuordnung nicht mehr möglich.

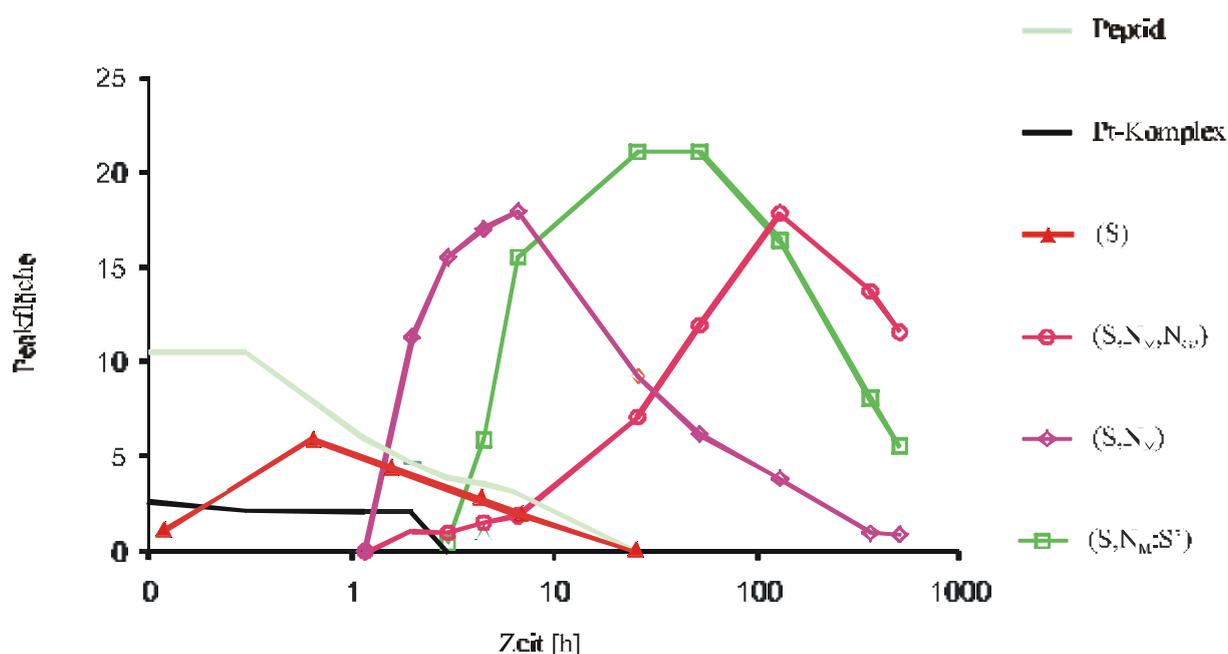


Abb. 7.10: zeitabhängige Produktverteilungen des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+} / \text{N-Ac-Gly-Gly-Met-OH}$ (1:1); $\text{pH} = 4,10$

Die Kinetik in neutraler Lösung wird in der folgenden Abbildung präsentiert:

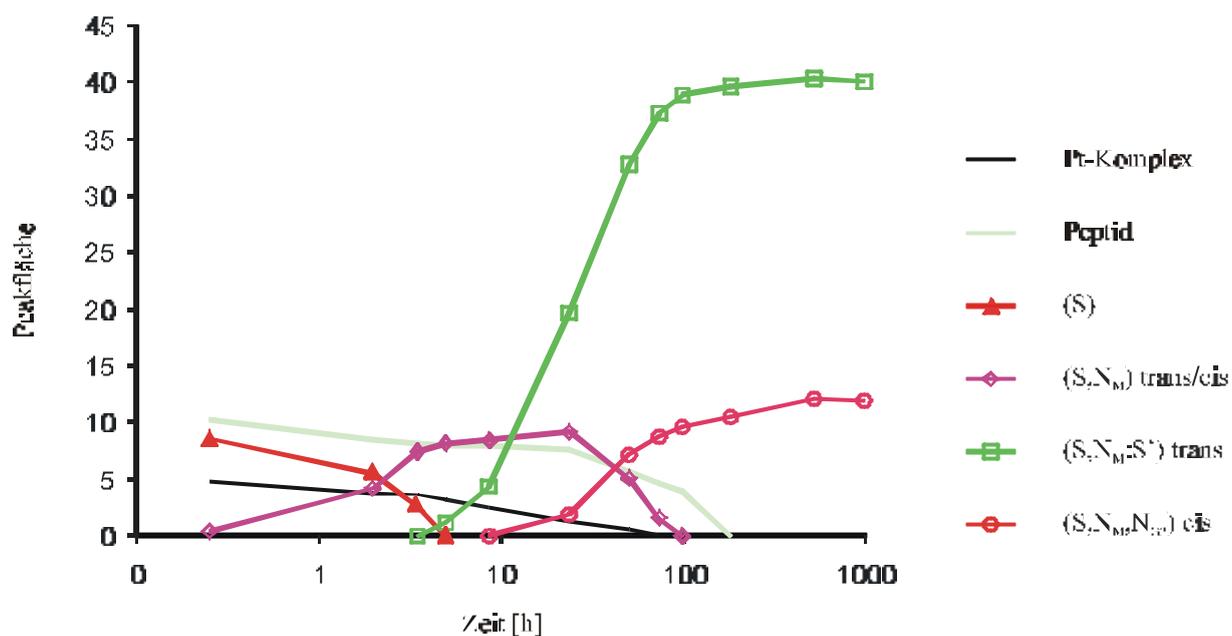


Abb. 7.11: zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+} / \text{N-Ac-Gly-Gly-Met-OH}$ (1:1); $\text{pH} = 6,12$

Die Signalintensitäten der Edukte nehmen stetig aber wesentlich langsamer als bei $\text{pH} = 4,10$ ab. Der Platinkomplex wird nach 100 Stunden nicht mehr detektiert und das Peptid kann nach 120 Stunden nicht mehr nachgewiesen werden. Es bildet sich sofort das trans zum Picolin monodentat substituierte $\kappa\text{-S}$ Produkt, welches zum $\kappa^2\text{-S, N}_M$ weiterreagiert. Dieses Vorläuferprodukt ist bei den höherem pH-Wert relativ stabil und kann über einen Zeitraum von 100 Stunden detektiert werden. Es erreicht sein Peakmaximum bei 25 Stunden und nimmt dann kontinuierlich ab. Nach 3 Stunden bildet sich daraus offensichtlich das $\kappa^2\text{-S, N}_M:\kappa\text{-S}'$ Produkt. Die Peakfläche steigt zu diesem Zeitpunkt steil und bildet nach 50 Stunden das Hauptprodukt. Nach 9 Stunden kann der tridentate $\kappa^3\text{-S, N}_M, \text{N}_{G2}$ detektiert werden, dessen maximale Signalintensität nach 500 Stunden erreicht wird. Wiederum konnte der $\kappa^2\text{-S, N}_M$ -Vorläufer mit cisständigem Thioether-S zum Picolin-N-Liganden nicht als getrennter Peak detektiert werden.

Eine Peptidspaltung konnte wieder nicht beobachtet werden.

Das weitere Erhöhen des pH-Werts verlangsamt die Produktbildung derart, dass weitere Aussagen getroffen werden können.

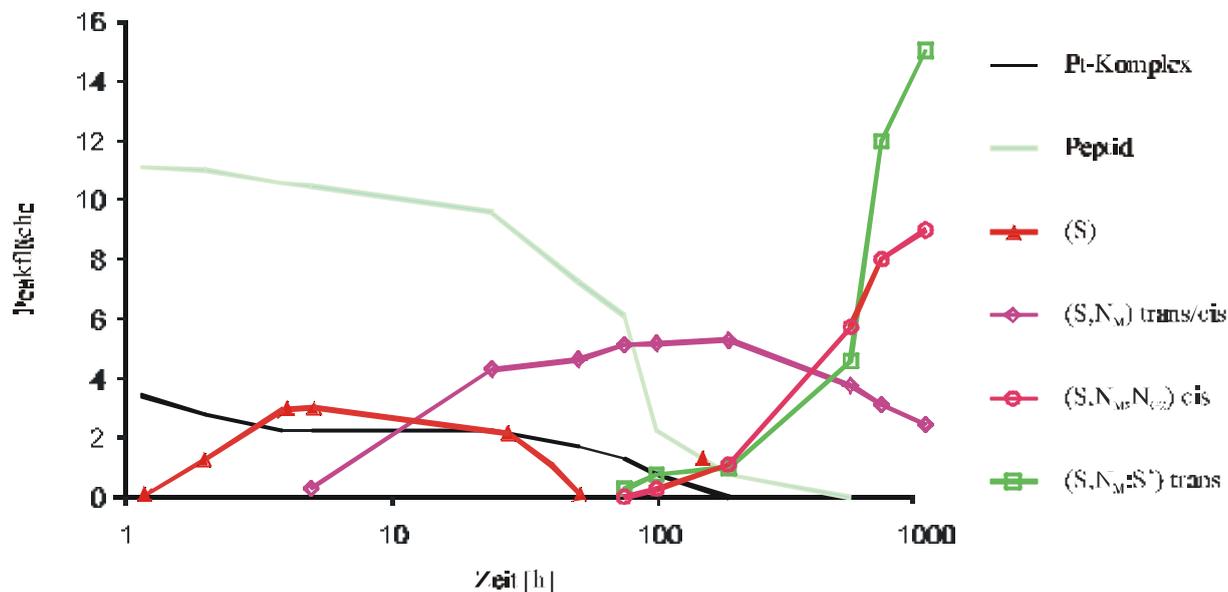


Abb. 7.12: zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+} / \text{N-Ac-Gly-Gly-Met-OH}$ (1:1); $\text{pH} = 8,71$

Es bilden sich innerhalb der ersten Stunde das schwefelkoordinierte Intermediat mit dem Thioether-S in trans Position zum Picolin, das zu dem zuvor beschriebenen $\kappa^2\text{-S, N}_M$ Produkte weiterreagiert.

Es entsteht aus dem $\kappa^2\text{-S, N}_M$ -Precursor im weiteren Verlauf der Untersuchung der 1:2-Komplex $[\text{Pt}(2\text{-Methylpyridin})(\text{N-Ac-Gly-Gly-MetH}_1\text{-OH-}\kappa\text{-S, N}_M)(\text{N-Ac-Gly-Gly-Met-OH-}\kappa\text{-S}')^+]^+$, der erstmals nach einer Reaktionsfrist von 100 Stunden in nennenswerter Konzentration erscheint. Seine Konzentration steigt nur langsam, da die Bildung des $[\text{Pt}(2\text{-Methylpyridin})(\text{N-Ac-Gly-GlyH}_1\text{-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^3\text{-S, N}_M, \text{N}_{G2})]$ bei diesem pH-Wert offensichtlich kinetisch äquivalent favorisiert ist. Die Produktbildung des $\kappa^2\text{-S, N}_M:\kappa\text{-S}'$ und des $\kappa^3\text{-S, N}_M, \text{N}_{G2}$ verlaufen zeitgleich und treten mit der Abnahme des $\kappa^2\text{-S, N}_M$ auf, so dass vermutet werden kann, dass der $\kappa^2\text{-S, N}_M$ -Precursor mit dem Thioether-S in cis-Position zum aromatischen Liganden und der trans-Precursor unter den gewählten Trennbedingungen identische Retentionszeiten besitzen und daher chromatographisch auf Grund identischer t_R -Zeiten nicht unterschieden werden können.

7.3 Umsetzungen mit dem Tripeptid N-Ac-Gly-Met-Gly-OH

7.3.1 Chromatographisches System

Die chromatographische Trennung des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / N-Ac-Gly-Met-Gly-OH im Verhältnis 1:1 und 1:2 erfolgte mit einem Stufengradienten bestehend aus 1, 5, 20% Methanol. Bei einer Säulentemperatur von 25° C und mit 0,1% Pentafluorpropionsäure als IPR konnten innerhalb von 50 Minuten die Reaktionsprodukte von den Verunreinigungen getrennt werden. Darüber hinaus sind die chromatographischen Trennungen so gewählt worden, dass ein direkter Vergleich zu dem System Cisplatin / N-Ac-Gly-Met-Gly-OH möglich war (s. Kap. 7.5).

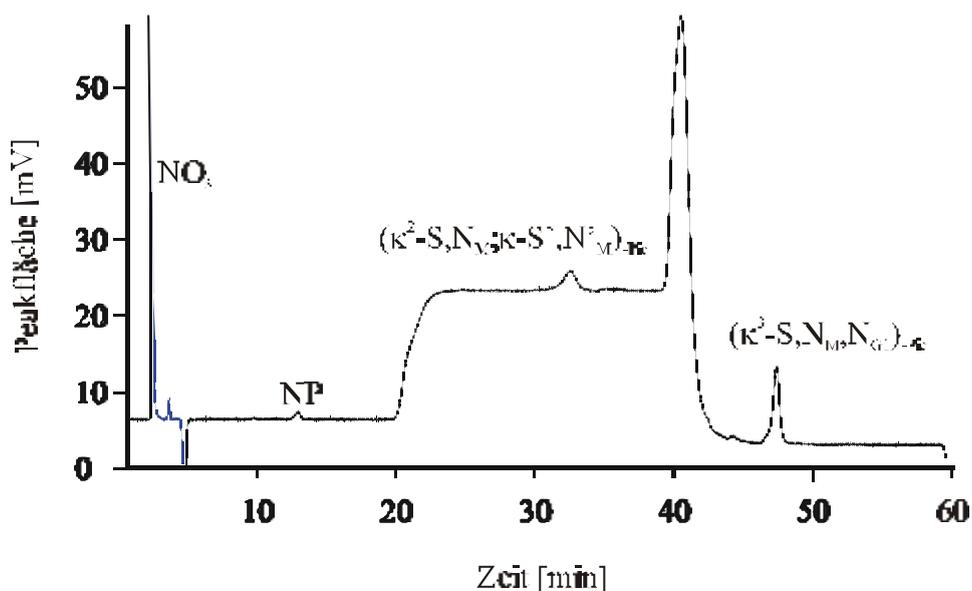


Abb. 7.13: Chromatogramme eines 1:1 Ansatzes des System $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / N-Ac-Gly-Met-Gly-OH; 1%, 5%, 20% MeOH; 0,1% PFP; 25°C; pH = 6,12; Reaktionszeit (t) = 504 Stunden

Nach einer Inkubationszeit von 21 Tagen (504 Stunden) wurden die pH-Werte der Reaktionsansätze gemessen und die Lösungen chromatographiert. Bei der anschließenden Lagerung bei 4° C änderte sich die Produktverteilung kaum. Dargestellt in Abbildung 7.13 ist ein Chromatogramm zur Verdeutlichung der Elutionsreihenfolge. Die in den

Chromatogrammen als Nebenprodukte gekennzeichneten Peaks, sind Verunreinigungen aus Peptid und Metallkomplex, die die Untersuchungen nicht beeinflussten und nicht weiter berücksichtigt wurden.

7.3.2 pH-abhängige Produktverteilung

Die in Abbildung 7.14 dargestellte pH-abhängige Produktverteilung weist deutliche Unterschiede zu der des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH auf.

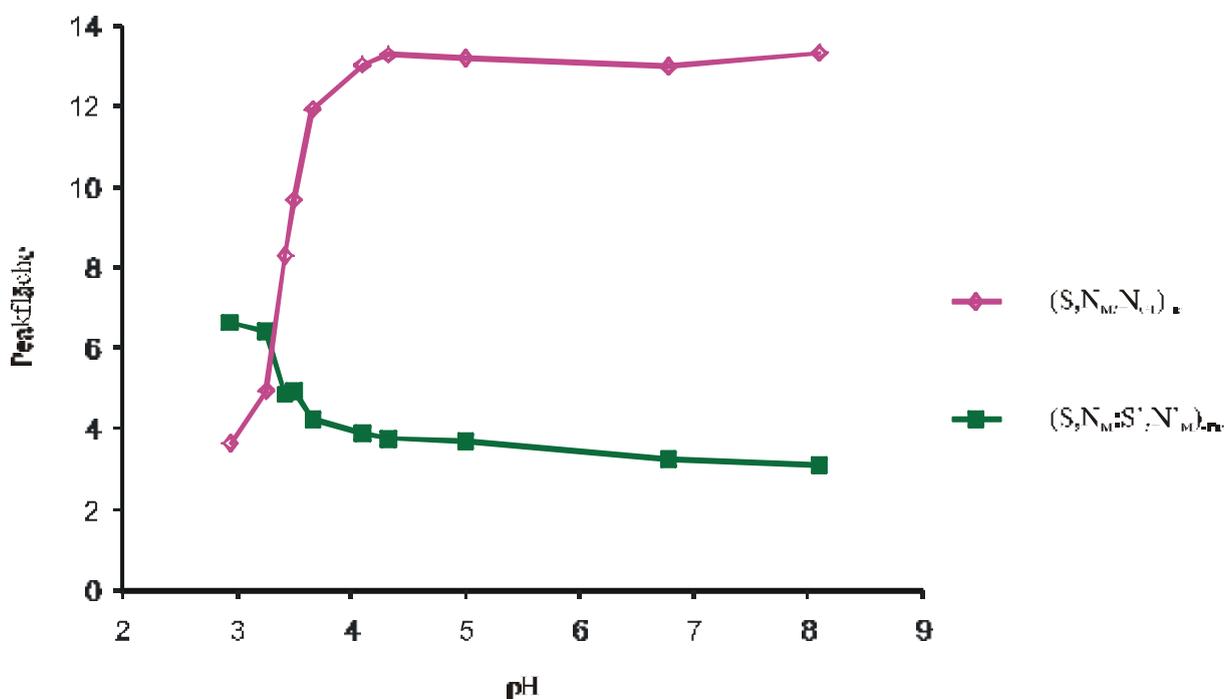


Abb. 7.14: pH-abhängige Produktverteilung nach 21 Tagen der Reaktion $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / N-Ac-Gly-Met-Gly-OH im Verhältnis 1:1

Es bildet sich nahezu über den gesamten pH-Bereich das tridentat-koordinierte $\kappa^3\text{-S}, N_M, N_{G2}$ mit größter Signalintensität, die im pH-Bereich $3,8 \leq \text{pH} \leq 4,5$ sprunghaft ansteigt und ab $\text{pH} = 5$ konstant bleibt. Im sauren Milieu dominiert ein 1:2-Komplex, der $\kappa^2\text{-S}, N_M; \kappa^2\text{-S}', N'_{M2}$ koordiniert ist, dessen bidentater $\kappa\text{-S}; \kappa\text{-S}'$ -Vorläufer nicht detektiert wurde. Es muss an dieser

Stelle auf die Problematik der unterschiedlichen molaren Extinktionskoeffizienten hingewiesen werden. Die pH-abhängige Untersuchung zeigt, wie bislang die Auftragung der bei einer Detektorwellenlänge von $\lambda = 220$ nm detektierten Signalfächen gegen die logarithmische Zeitskala. Die UV-Spektren des $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}$ und der 1:2-Spezies bei 220 nm zeigen jeweils sehr unterschiedliche molare Extinktionskoeffizienten (s. Abb. 7.15).

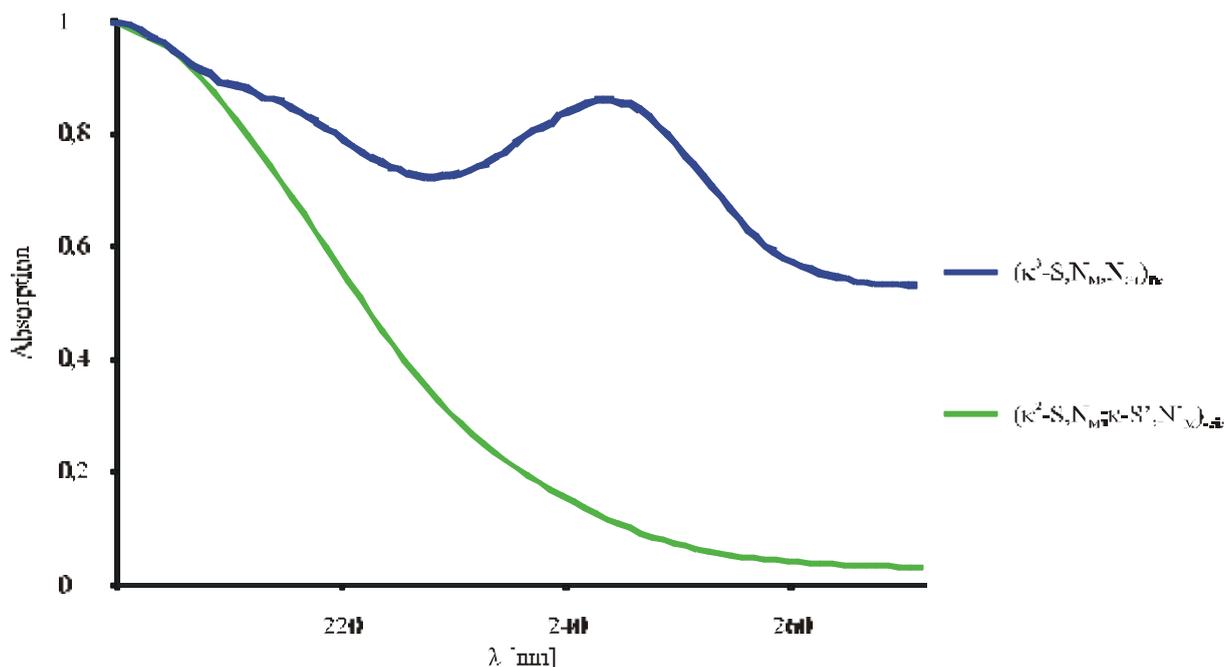


Abb. 7.15: normierte UV-Spektren des tridentaten $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}$ und der 1:2-Spezies aus dem System $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+} / \text{N-Ac-Gly-Met-Gly-OH}$

Um einen Vergleich der tatsächlich vorliegenden Konzentrationen anstellen zu können, muss daher diese Tatsache berücksichtigt werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass das Konzentrationsverhältnis zwischen $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}$ und $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa^2\text{-S',N}'_M$ bei pH-Werten ab $\text{pH} = 4$ nahezu gleich ist und bei pH-Werten < 3 vermutlich die $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa^2\text{-S',N}'_M$ Koordination überwiegt. Eine Umwandlung der integrierten Extinktionswerte für die Peakflächen in Produktmengen wäre nur bei bekannten molaren Extinktionskoeffizienten möglich.

In Abbildung 7.16 sind die wichtigsten Strukturen aus den Reaktion zwischen AMD 473 und N-Ac-Gly-Met-Gly-OH abgebildet.

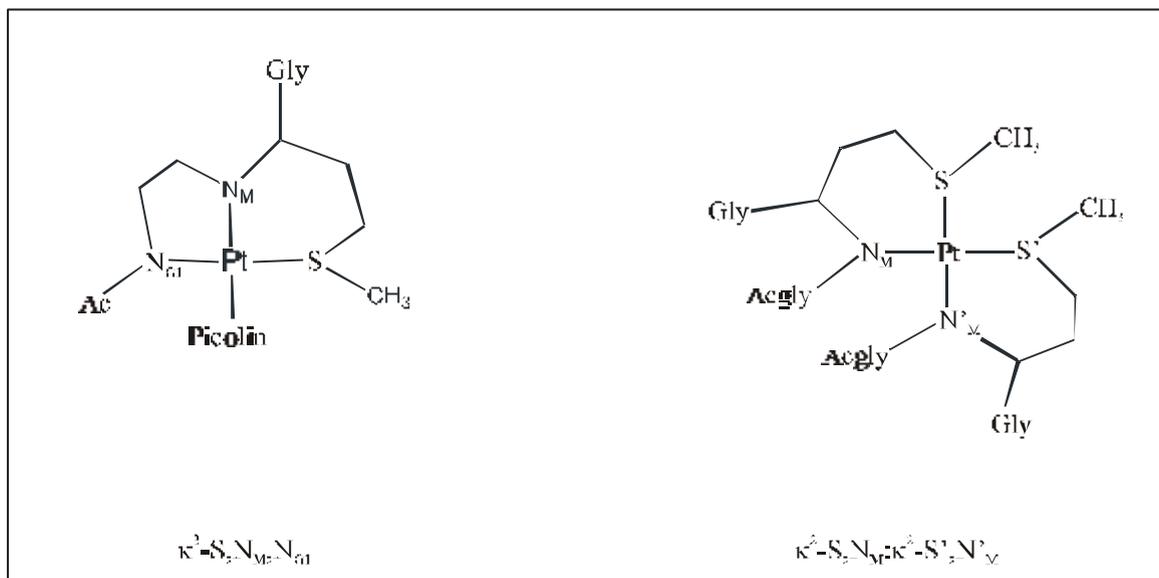


Abb. 7.16: Strukturen wichtiger Komplexe aus dem System $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / $N\text{-Ac-Gly-Met-Gly-OH}$

7.3.3 Kinetische Untersuchung

Die kinetische Untersuchung des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / $N\text{-Ac-Gly-Met-Gly-OH}$ fand ausschließlich im Neutralen statt, da die Bildung von 1:2- und Spaltungsprodukten unterbunden werden sollte. Der zeitliche Verlauf der Produktentwicklung ist in Abbildung 7.17 dargestellt: Auch hier muss erneut berücksichtigt werden, dass die molare Extinktion der $\kappa^3\text{-S}_2\text{N}_M\text{-N}_{G2}$ Spezies größer als die der 1:2-Spezies ist und daher kein Zusammenhang zwischen Signalintensität und Konzentration besteht. Das bedeutet für die Aussage der zeitabhängigen Untersuchung, dass nur die zeitliche Entstehung der Produkte berücksichtigt werden kann.

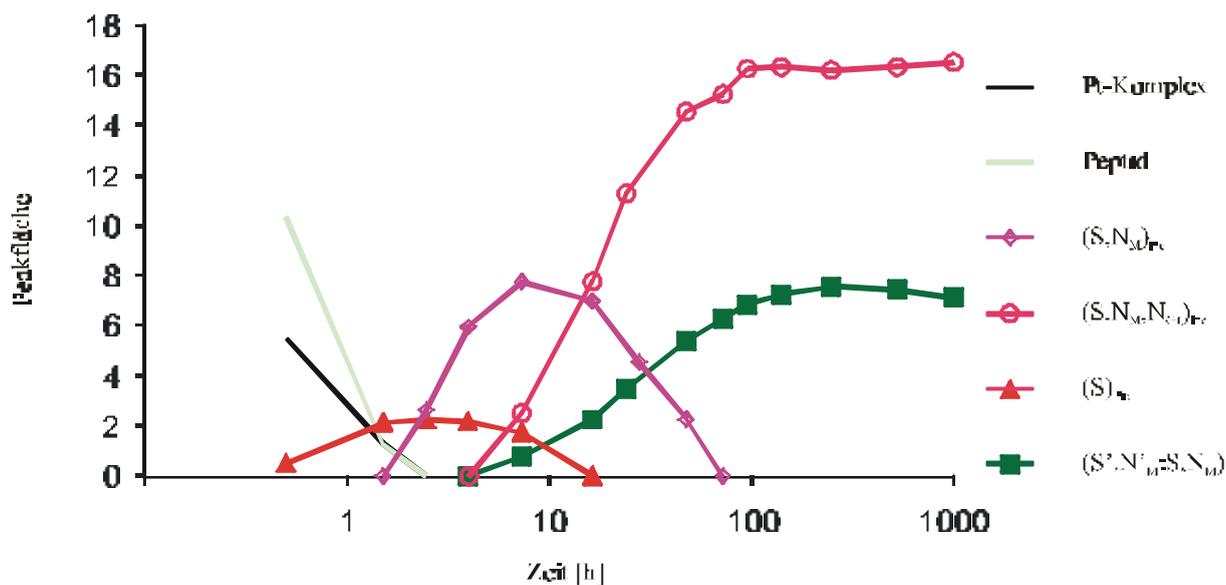


Abb. 7.17: zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+} / \text{N-Ac-Gly-Met-Gly-OH}$ (1:1); $\text{pH} = 6,75$

Die Edukte werden nach 6 Stunden nicht mehr detektiert. Das erste Produkt ist ein $\kappa\text{-S}$, das keinen Verlust von Picolin aufweist, was anhand von UV-Spektren belegt wurde. Das monodentate Intermediat reagiert schnell weiter zum $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Chelat, das bei 8 Stunden ein Peakmaximum durchläuft und zum tridentat koordinierten $\kappa^3\text{-S,N}_M,\text{N}_{G2}$ weiterreagiert. Das $\kappa^2\text{-S,N}_M;\kappa^2\text{-S}',\text{N}'_M$ Produkt erscheint erstmals nach 8 Stunden und bildet sich kontinuierlich während der weiteren Reaktionsfrist, dokumentiert durch eine permanente Intensitätszunahme. Erst nach 524 Stunden nimmt die Konzentration leicht ab. Die 1:2 Spezies konkurriert mit dem tridentaten $\kappa^3\text{-S,N}_M,\text{N}_{G2}$.

7.3.4 Charakterisierung der Produkte

Aufgrund der geringen Produktvielfalt ist auf eine semi-präparative Trennung verzichtet worden, da der Einsatz der LC / MS-Technik eine schnelle und einfache Produktcharakterisierung ermöglichte.

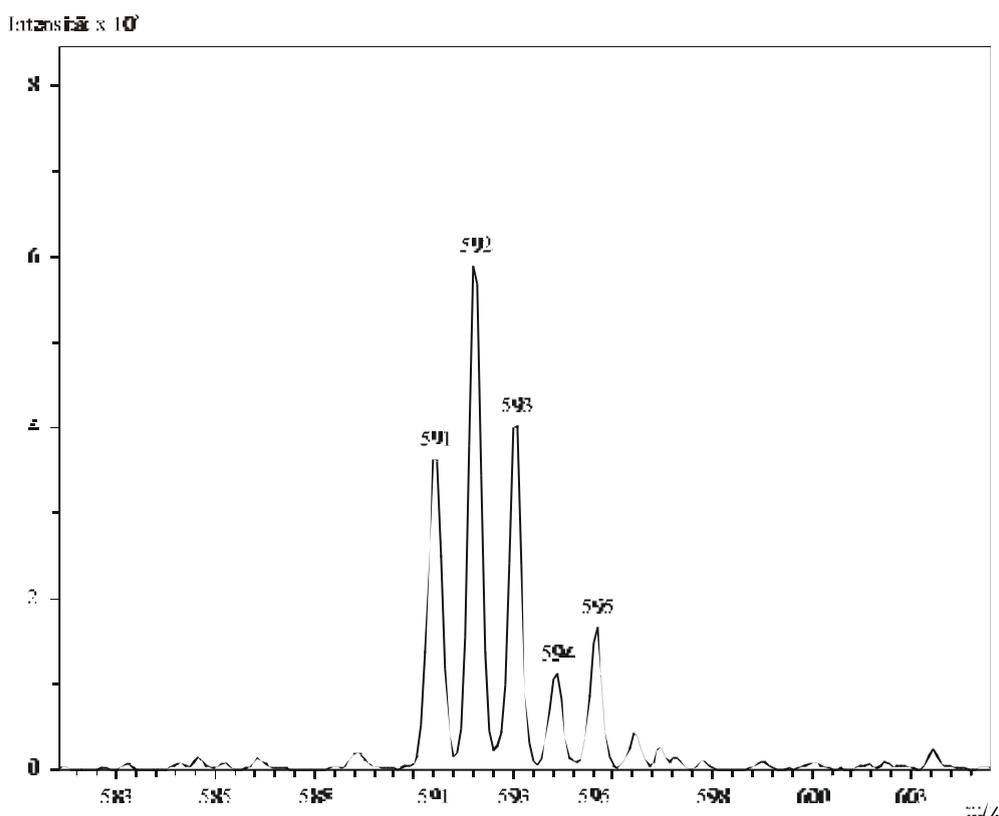


Abb. 7.18: ESI-MS-Spektrum des tridentaten $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{N}_{G2}$ -Komplexes

Die Produktzuordnung konnte mit den erhaltenen Massenspektren direkt vorgenommen werden. Der aus dem $\kappa^2\text{-S,N}_M$ koordinierten entstehende $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{N}_{G2}$ tridentat koordinierte Komplex zeigt einen Molekülpeak bei $m/z = 592$ (s Abb. 7.18), mit einer Geräte typischen Genauigkeit von $\Delta = -2$.

Auch der bidentate Precursor konnte durch die LC / MS-Technik durch einen Molekülpeak bei $m/z = 610$ bestätigt werden, welcher dem Komplex $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})(\text{N-Ac-Gly-MetH}_1\text{-Gly-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]$ entspricht.

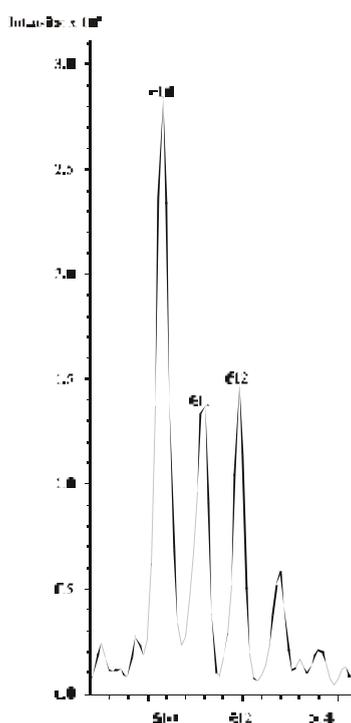


Abb. 7.19: ESI-MS-Spektrum des bidentaten $k^2\text{-S},N_M$ -Komplexes

Mit einem Molekülpeak bei $m/z = 804$ konnte die Stöchiometrie der 1:2 Spezies bestätigt werden.

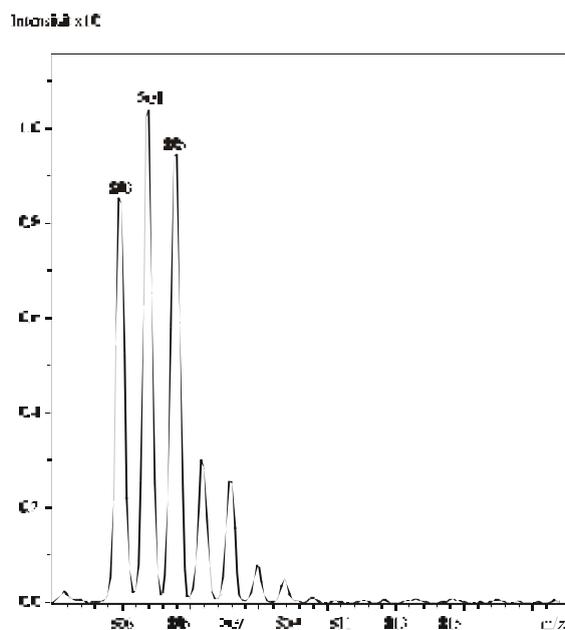


Abb. 7.20: ESI-MS-Spektrum des $k^2\text{-S},N:k^2\text{-S}',N'_M$ -Komplexes

In der folgenden Tabelle sind die ESI-massenspektrometrischen Daten zusammengefasst, wobei die theoretischen Massen in Klammern angegeben werden:

Tab. 7.2 : ESI-massenspektrometrische Daten der 1:1 Komplexe und des 1:2 Komplexes

Signalzuordnung	$\kappa^3\text{-S,N}_M,\text{N}_{G2}$	$\kappa^2\text{-S,N}_M$	1:2
m/z	592 (594)	610 (612)	804 (806)

7.4 NMR-Charakterisierung der Komplexe

7.4.1 Das System $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH

Die Hauptprodukte aus der Umsetzung von $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ mit dem Tripeptid N-Ac-Gly-Gly-Met-OH konnten in ausreichender Reinheit semi-präparativ getrennt werden, so dass eine eindeutige Charakterisierung mit Hilfe der ^1H / ^{195}Pt -NMR-Spektroskopie sowie ESI-Massenspektrometrie möglich war.

Die UV-Spektroskopie kann im Gegensatz zu den analogen Cisplatin-Komplexen Produkte aus Systemen mit AMD 473 mit unterschiedlichen Koordinationsmodi nicht herangezogen werden, da durch den Einbau des aromatischen Liganden in die Koordinationssphäre des Metalls ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich 240-260 nm erzeugt werden. So kann für die beschriebenen Verbindungen nicht mehr eindeutig zwischen bi- und tridentaten Spezies unterschieden werden (s. Abb. 7.21).

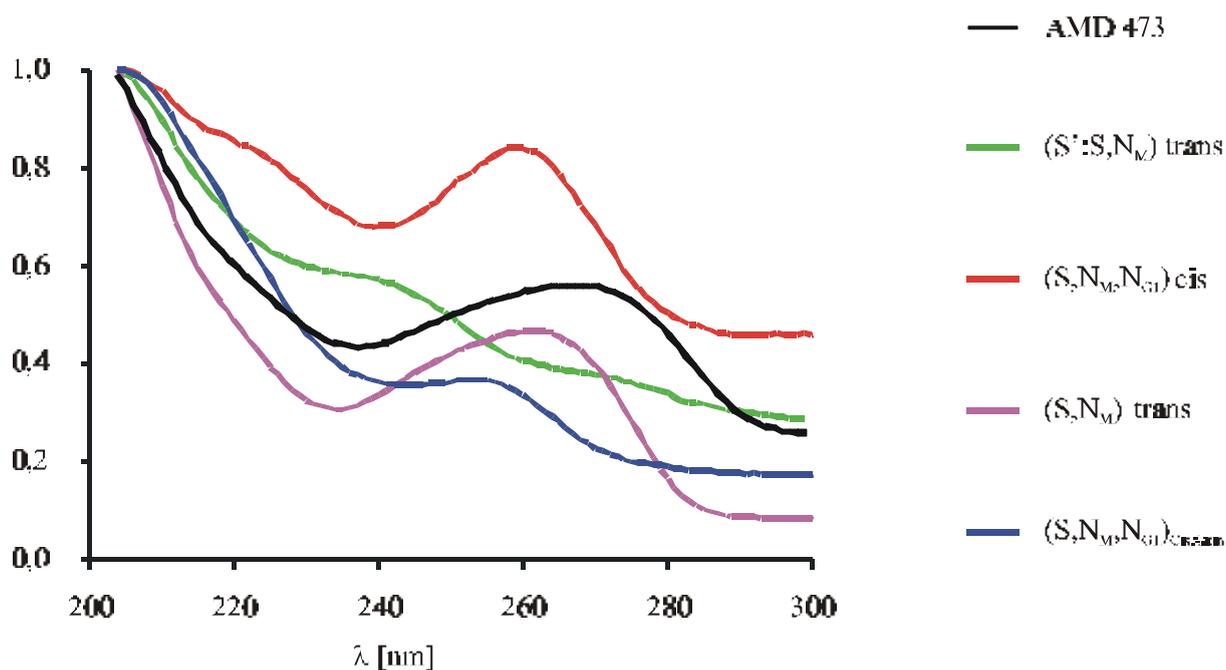


Abb. 7.21: normierte UV-Spektren der wichtigsten Produkte aus dem System $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$ / *N*-Ac-Gly-Gly-Met-OH und AMD 473

Allerdings zeigen die UV-Spektren, dass die molaren Extinktionskoeffizienten bei 220 nm sehr ähnlich sind, mit der einzigen Ausnahme des tridentaten, dessen Extinktionskoeffizient etwas größer ist. Man kann daher die Signalflächen der Produkte bei den HPLC-Untersuchungen in etwa miteinander vergleichen.

Die Bildung der κ -S und κ^2 - S, N_M Intermediate kann durch eine zeitabhängige ^1H -NMR-Untersuchung bei pH = 4 beobachtet werden.

Zuerst entsteht der koordinierte κ -S Precursor, der einen Verschiebungswert der δ - CH_3 Protonen des Thioethers um + 0,24 aufweist und bei 2,34 ppm zu finden ist (s. Abb. 7.22) [106].

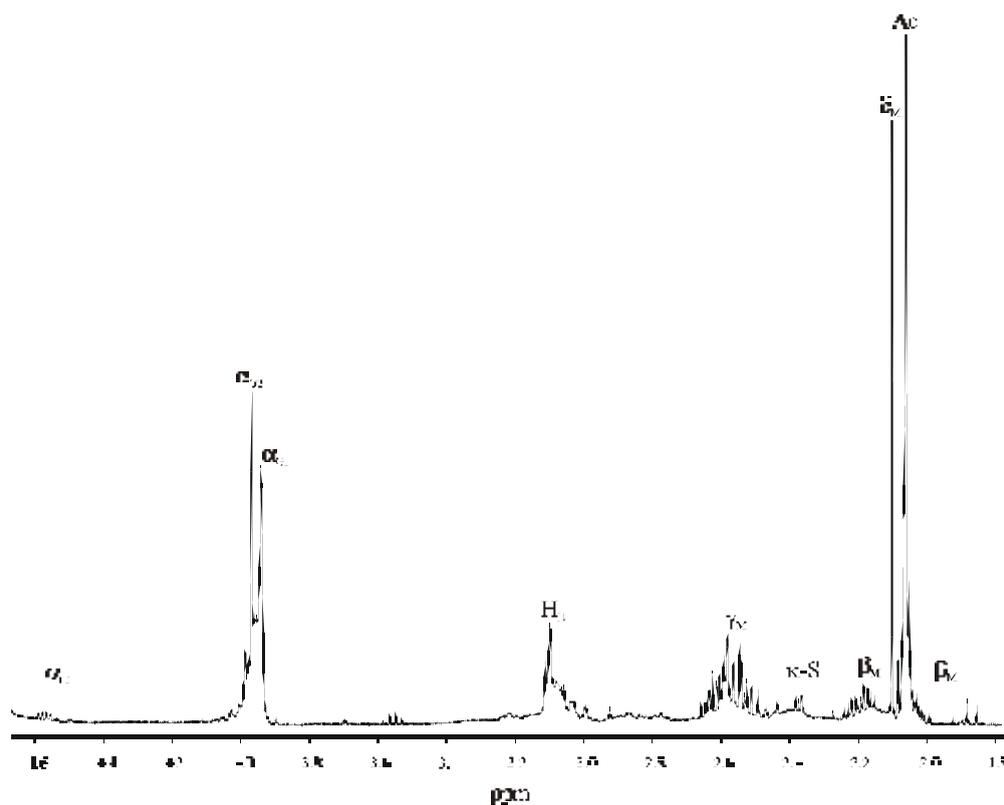


Abb. 7.22: Ausschnitt aus einem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum einer 1:1-NMR-Kinetik des Systems AMD 473 / *N*-Ac-Gly-Gly-Met-OH nach 0,5 Stunden; $\text{pH} = 5,00$; 30°C ; $c = 80 \text{ mM}$; D_2O

Nach einer weiteren Reaktionsdauer von 30 Minuten erscheinen mehrere Signale zwischen 2,5 ppm und 2,4 ppm für die $\delta_{\text{M-CH}_3}$ Protonen, was die Bildung der Diastereomeren des $\kappa^2\text{-S,N}_\text{M}$ -Chelats indiziert (s. Abb. 7.23) [146]. Darüber hinaus sind die vielen Signale ein eindeutiges Indiz für die Entstehung beider $\kappa^2\text{-S,N}_\text{M}$ -Chelate, wobei einmal der Thioether-S in der Position cis zum Picolin und einmal in der Position trans zum Picolin koordiniert ist.

Außerdem ist der Shift der α_{M} -Protonen um $-0,13 \text{ ppm}$ zu höherem Feld mit einem chemischen Verschiebungswert von $4,44 \text{ ppm}$ ein eindeutiges Kennzeichen für eine zweite Koordination am Stickstoff des Methionins.

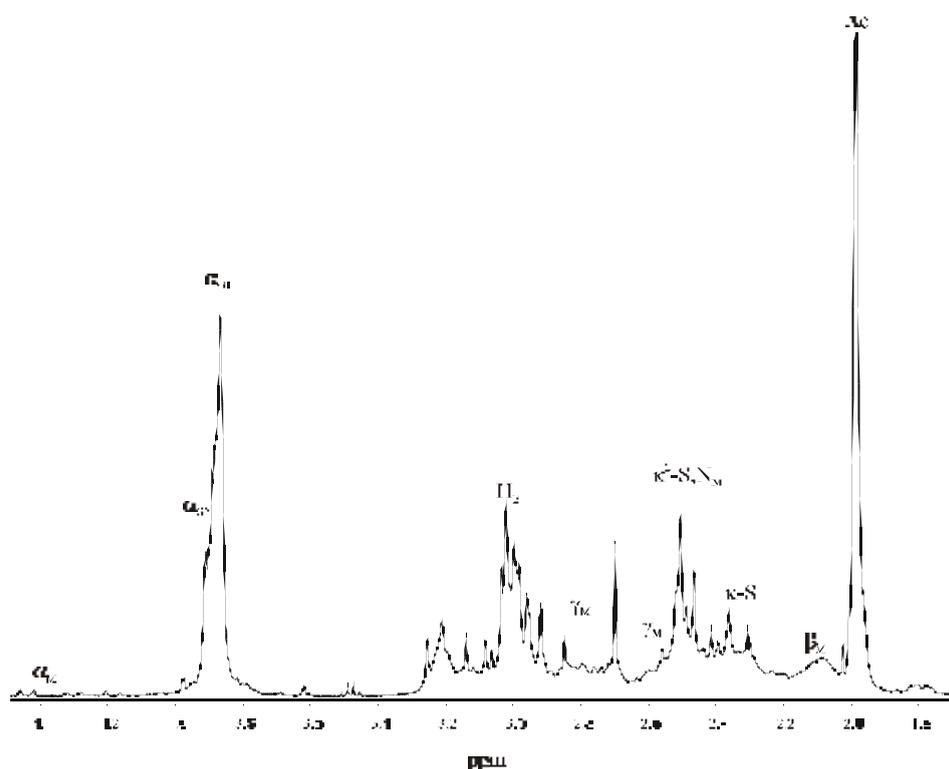


Abb. 7.23: Ausschnitt aus einem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum einer 1:1-NMR-Kinetik des Systems AMD 473 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH nach 3 Stunden; pH = 5,00; 30° C; $c = 80 \text{ mM}$; D_2O

Der über den gesamten pH-Bereich stabile 1:2 Komplex konnte in ausreichender Menge durch semi-präparative RPIPC erhalten werden. Wie schon zuvor beschrieben erbrachte das UV-Spektrum (s. Abb. 7.21) keinen Aufschluss über den Koordinationsmodus, da im Beisein des aromatischen Liganden keine Unterscheidung zwischen bidentater und tridentater Koordination möglich ist. Im FAB-Massenspektrum konnte der Molekülpeak nicht identifiziert werden, da der Komplex in den zu Verfügung stehenden Matrices (s. Kap. 4.2) sich entweder zu gut oder zu schlecht löste.

Das $^1\text{H-NMR}$ (s. Abb. 7.24) zeigt eine chemische Verschiebung der Acetylprotonen des ersten Peptids bei 2,07 und 2,06 ppm und für das zweite Peptid bei 1,96 ppm.

dass die H-Protonen, die direkt am Aromaten gebunden schwächer abgeschirmt sind, als Protonen oberhalb und unterhalb des Aromaten.

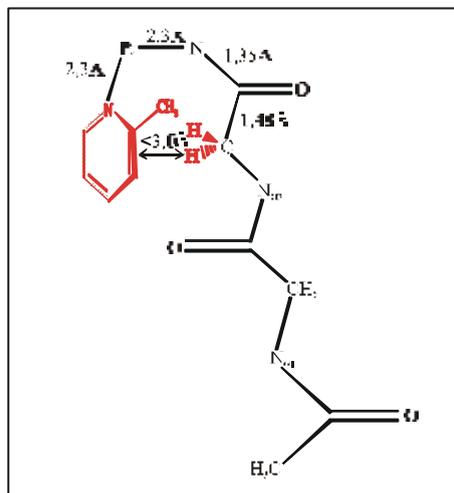


Abb. 7.25: Schematische Anordnung des Picolins und des Peptids in der $K^2\text{-S},N_M:k\text{-S}'$ -Koordinierung

In diesem Fall ist das aromatische Ringsystems des Picolins beinahe senkrecht zur quadratischen Ebene des Metallzentrums und der α_{G2} -Protonen, allerdings ausschließlich bei einer Koordinierung des Thioether-S in trans Position zum N-Picolin. Der Abstand zwischen Aromat und Glycineinheit ist nach Modellbau kleiner als 3,00 Angström (s. Abb. 7.25) [46] und damit muss davon ausgegangen werden, dass deren chemischer Verschiebungswert durch den Ringsrom signifikant beeinflusst wird. Der Hochfeldshift bedeutet, dass die $\alpha_{G2}\text{-CH}_2$ durch die räumliche Nähe zum Aromaten eine starke Abschirmung erfahren.

Durch die Koordination über den Schwefel des Methionins sind die β_M und γ_M zu tieferem Feld verschoben. Die Zuordnung der Resonanzen wird durch die erhöhte Signallbreite erschwert, wobei auch das H,H-COSY keine weiteren Informationen ergab. Im Bereich 3,88 ppm bis 4,50 ppm sind die Signale der unkoordinierten α_M' , α_{G1}' - und α_{G2}' - sowie der koordinierten α_M -Protonen zu finden.

Die Aufnahme eines ^{195}Pt -NMR-Spektrums erbrachte den eindeutigen Beweis einer N_2S_2 -Umgebung mit einer Resonanz bei -3560 ppm [146]. Die Struktur des Komplexes ist in Abbildung 7.7 abgebildet.

Die NMR-spektroskopischen Verschiebungswerte und Aufspaltungsmuster sind in Tabelle 7.3 zusammengefasst.

Neben dem Komplex mit 1:2 Stöchiometrie bildeten sich auch zwei Produkte im Verhältnis 1:1, deren beider Struktur erst durch einen Vergleich ihrer NMR-spektroskopischen Ergebnisse geklärt werden konnten.

Der $\kappa^2\text{-S,N}_M$ koordinierte Komplex, zeigt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (s. Abb. 7.26) die eindeutigen Tieffeldshifts der CH_3 -Protonen des Thioethers. Man erhält mehrere Signale bei 2,43 ppm und 2,38 ppm, die damit um ca. + 0,3 ppm tieffeldverschoben sind im Vergleich zum freien Peptid (s. Tab. 7.3) [106]. Die Tatsache, dass für die CH_3 -Protonen des Thioethers eine Vielzahl von Signalen vorliegen, die nicht alle durch Bildung von Diastereomeren erklärbar sind, muss davon ausgegangen werden, dass ein Gemisch aus cis und trans $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Chelat vorliegt, denn für reines $(\kappa^2\text{-S,N}_M)\text{trans}$ wären maximal vier Signale für $\delta_M\text{-CH}_3$ zu erwarten.

Die α_M -Protonen des Methionins shiften um $- 0,2$ ppm zu höherem Feld und sind bei 4,33 ppm zu finden, mit der für eine $\kappa^2\text{-S,N}_M$ Koordinierung charakteristischen Aufspaltung. Die Resonanz der $\alpha_{G1}\text{-CH}_2$ Protonen sind bei 3,95 ppm zu finden und entsprechen denen im unkoordinierten Peptid. Erneut erfahren die Protonen der Gly₂-Einheit einen ungewöhnlichen Hochfeldshift um $- 0,3$ ppm, der sich auch schon bei der zuvor diskutierten 1:2 Verbindung zeigte, so dass die Resonanzen bei 3,68 ppm diesen Protonen zugeordnet werden können. Allerdings ist der Integralwert für $\alpha_{G2}\text{-CH}_2$ kleiner als für $\alpha_{G1}\text{-CH}_2$, wodurch ein cis/trans-Gemisch weiter belegt wird. Die Resonanzen beider Glycineinheiten sind zum Triplet aufgespalten.

Die Koordinierung des Schwefelatoms bewirkt naturgemäß einen Tieffeldshift der β_M - und γ_M -Protonen. Auch hier lassen sich die Signale aufgrund der starken Peakverbreiterung nur schwer zuordnen.

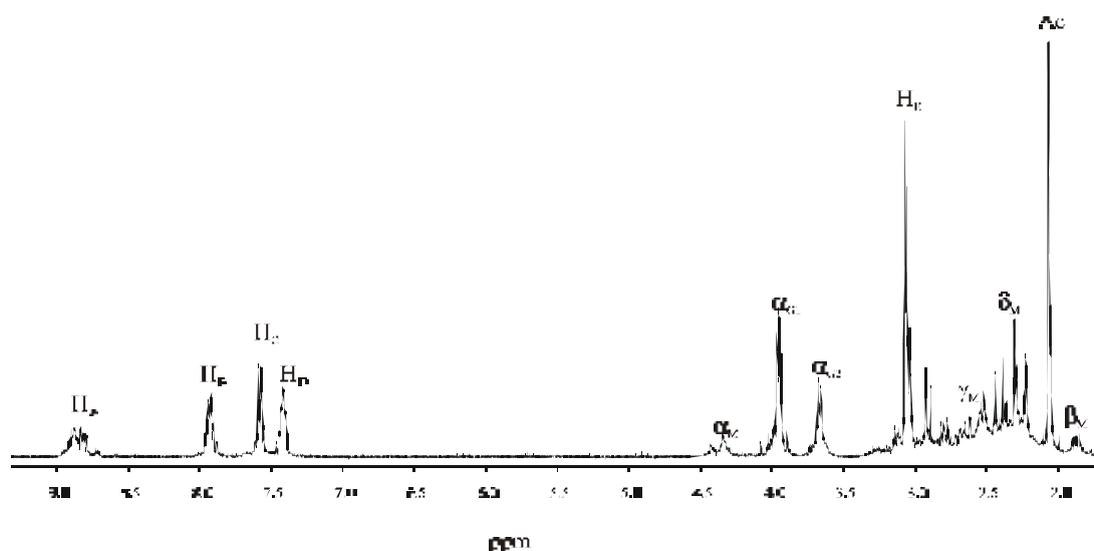


Abb. 7.26: ^1H -NMR-Spektrum des $\text{K}^2\text{-S,N}_M$ -Produkts; $\text{pH} = 2,05$

Für die Protonen des 2-Methylpyridins erhält man Verschiebungswerte von 8,87 ppm für H_A , 7,94 ppm für H_B , 7,59 ppm für H_C , 7,41 ppm für H_D und bei 3,03 ppm erscheint die Resonanz der CH_3 -Protonen der Methylgruppe (H_E).

Da auch hier aufgrund des ^1H -NMR-Spektrums eine Koordinierung des Stickstoff $\text{N}_{\text{G}2}$ nicht auszuschließen war, wurde ein ^{195}Pt -Spektrum (s. Abb. 7.27) aufgenommen. Einer Resonanz bei - 3040 ppm weisen APPLETON ET AL einer N_2SO -Umgebung (nach $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$) am Platin zu [146], so dass von einer bidentaten Koordinierung am Platin ausgegangen werden muss.

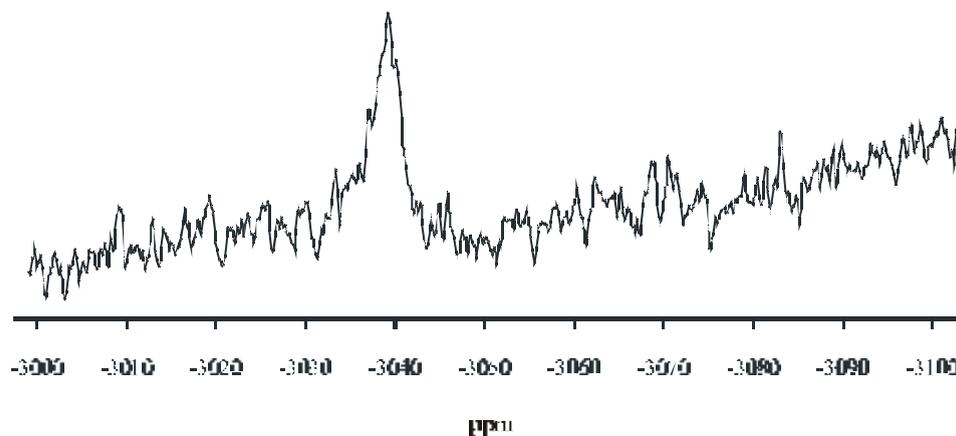


Abb. 7.27: ^{195}Pt -NMR-Spektrum des $\text{K}^2\text{-S,N}_M$ -Produkts; (600MHz)

Die chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsmuster des Komplexes sind am Ende des Kapitels zusammengefasst (s. Tab. 7.3).

Eine FAB-Messung bestätigte die Stöchiometrie mit einem Molekülpeak $m/z = 614$ und die zuvor angenommene Koordinationssphäre am Platin ist damit eindeutig geklärt. Als Fragmentierungen sind die Abspaltung des Aminliganden und die Abgabe der COOH-Gruppe und des 2-Methylpyridins zu beobachten. Die Fragmentierungsmuster sind am Ende des Kapitels kurz zusammengefasst (s. Tab. 7.2).

Die massenspektrometrische Untersuchung des tridentat koordinierten $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_G$ zeigte die Stöchiometrie im Verhältnis 1:1, mit einem Molekülpeak bei $m/z = 595$ an. Es wird die Abspaltung der COOH-Gruppe und der Verlust des 2-Methylpyridin beobachtet, mit den jeweiligen Massen bei $m/z = 549$ und $m/z = 502$ (s. Tab. 7.2). Die in den Klammern angegebenen Werte entsprechen den theoretischen Molekülmassen.

Tab. 7.2 : FAB-massenspektrometrische Daten der beiden 1:1 Produkte

Peakzuordnung	$\kappa^2\text{-S,N}_M$	$\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_G$
[1:1]	614 (611)	595 (594)
[1:1] – COOH	569 (567)	549 (549)
[1:1] – COOH - Picolin	474 (472)	
[1:1] – Picolin		502 (501)

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}$ zeigt, dargestellt in Abbildung 7.28, ein eindeutiges Aufspaltungsmuster für einen tridentat koordinierten Komplex. Die δ_M -Protonen erfahren durch die Schwefelkoordination, neben den β_M - und γ_M -Protonen, einen Tieffeldshift, wobei die $\delta\text{-CH}_3$ -Protonen ein Singulett bei 2,58 ppm aufweisen. Die α_M -Protonen sind um $-0,23$ ppm zu höherem Feld verschoben und liegen bei einem Verschiebungswert von 4,33 ppm vor. Die Koordination am Stickstoff N_{G2} bewirkt einen Tieffeldshift der α_{G2} -Protonen auf 4,01 ppm, wobei die Koordination eine Aufspaltung des Singuletts zum Multiplett bewirkt. Die Acetylgruppe weist eine Resonanz bei 1,95 ppm auf.

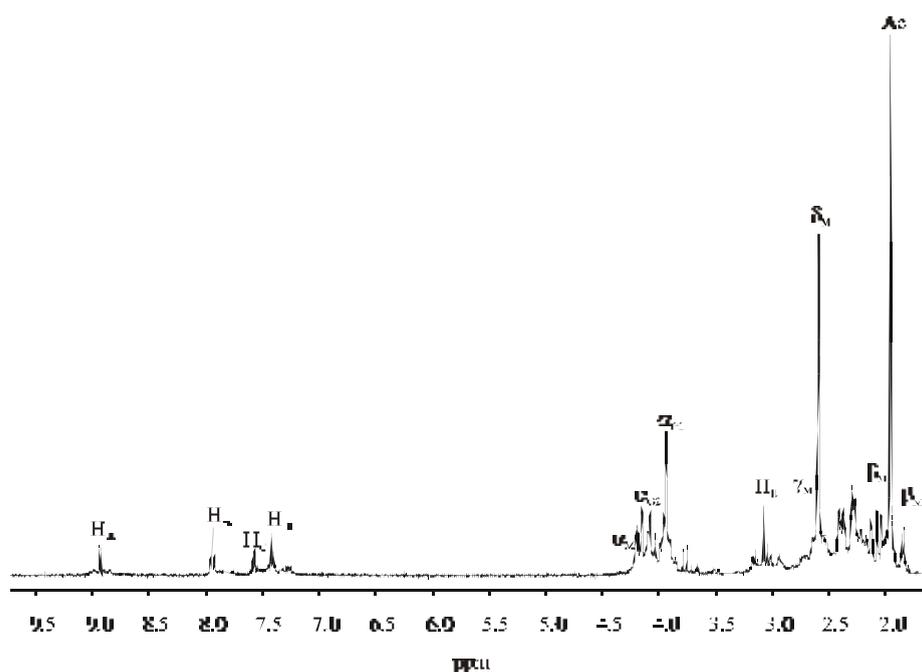


Abb. 7.28: ^1H -NMR-Spektrum des $\mathbf{K}^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}$ -Produkts; $\text{pH} = 2,38$; D_2O

Das in Abbildung 7.29 präsentierte ^{195}Pt -Spektrum zeigt einen Verschiebungswert bei -3150 ppm, wodurch eine N_3S -Koordinationsphäre am Platin charakterisiert wird [146].



Abb. 7.29: ^{195}Pt -NMR-Spektrum des $\mathbf{K}^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}$ -Produkts; (600MHz); D_2O

Die Struktur des Komplexes ist in Abbildung 7.7 dargestellt.

Die chemischen Verschiebungswerte und die Aufspaltungsmuster der NMR-charakterisierten Produkte sind in Tabelle 7.3 zusammengefasst:

Tab. 7.3: Chemische Verschiebungen und Aufspaltungsmuster des Peptids, der beiden 1:1 $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_G$ - und des $\kappa^2\text{-S,N}_M$ - Produkts und der 1:2-Spezies

Signalzuordnung	N-Ac-Gly-Gly-Met	$\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_G$	$\kappa^2\text{-S,N}_M$	$\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa\text{-S}'$
$\alpha'_{G1}, \alpha_{G1}$	3,94	4,01 s	3,95 m	3,98 s
α_{G2}	3,98	3,9 – 4,2 m	3,68 s	3,64 s
α'_{G2}				3,98 s
α_M	4,56	4,33 m	4,43 m	4,32 – 4,43 m
α'_M				4,50 m
β_M	2,03 – 2,15 m	1,9 – 2,45 m	1,8 – 2,45 m	1,8 – 2,45 m
γ_M	2,62 m	2,45 – 3,2 m	2,45 – 3,2 m	2,45 – 3,1 m
δ_M	2,10	2,58 s	2,38 - 2,43 m	2,45 – 2,53 m
δ'_M				2,24; 2,30 s
Ac	2,01	1,95	2,02	2,07 s; 2,06 s; 1,95 s
H_E		3,02	3,03	3,06 s
H_D		7,45	7,41	7,42 m
H_C		7,52	7,59	7,58 m
H_B		7,90	7,94	7,93 m
H_A		8,80	8,87	8,80 m
195 Pt		- 3150	- 3040	- 3560
pH	2,17	2,05	2,38	2,45

7.5 Diskussion

Der Vergleich des Reaktionsverhaltens der in dieser Arbeit untersuchten methioninhaltigen Peptiden mit AMD 473 zeigt eine eindeutige Favorisierung der trans-Position zum Picolin für die Erstsstitution, in Einklang mit Untersuchungen von SADLER ET AL an 5'-GMP²⁻ [57].

Die zeitabhängige Produktverteilung des Peptids N-Ac-Met-OH zeigt die bevorzugte Entstehung des $(\kappa^2\text{-S,N}_M)_{\text{Pic}}$ ohne Verlust des Picolinliganden. Im weiteren Verlauf der Untersuchung wird die Bildung des picolinfreien bidentaten $\kappa^2\text{-S,N}_M$ beobachtet, der langsam

aus dem $(\kappa^2\text{-S},\text{N}_\text{M})_{\text{Pic}}$ mit dem Thioether-Schwefel trans zum Picolin-Liganden entsteht, da die Picolin-N-Pt-Bindung durch den trans-Effekt des Schwefels labilisiert wird.

Darüber hinaus verläuft die Bildung des $(\kappa^2\text{-S},\text{N}_\text{M})_{\text{Pic}}$ -Chelats recht langsam, wodurch der relative Anteil an dem bevorzugten $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-S}'$ und seinem $\kappa^2\text{-S},\text{N}_\text{M}:\kappa^2\text{-S}',\text{N}'_\text{M}$ Folgeprodukt signifikant im Vergleich zum Cisplatin / N-Ac-Met-OH-System (s. Kap 9.3) erhöht wird.

Das Produktspektrum des AMD 473 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH-Systems bekräftigt den hohen kinetischen Vorteil der $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-S}'$ -Spezies durch die beobachtete Bildung des $\kappa^2\text{-S},\text{N}_\text{M}:\kappa^2\text{-S}'$ -Komplex als Hauptprodukt. Wiederum bestätigt sich die eindeutige kinetische Bevorzugung der Position trans zum Picolin, durch den geringen Anteil an dem konkurrierendem tridentaten Komplex $(\kappa^3\text{-S},\text{N}_\text{M},\text{N}_{\text{G}2})_{\text{Pic}}$. Allerdings können hier keine picolinfreien Produkte beobachtet werden, da wahrscheinlich auf Grund der sterischen Behinderung des längeren Ac-Gly-Gly-Peptidrückgrats durch den aromatischen Liganden eine Verdrängung des Picolins im Vergleich zum N-Ac-Met-OH und N-Ac-Gly-Met-Gly-OH kinetisch ungünstig ist. Daraus resultierende Folgeprodukte $\kappa^2\text{-S},\text{N}_\text{M}:\kappa^2\text{-S}',\text{N}'_\text{M}$ und $\kappa^3\text{-S},\text{N}_\text{M},\text{N}_{\text{G}2}:\kappa\text{-S}'$ konnten in den untersuchten Reaktionsfristen nicht beobachtet werden.

Die Bedeutung der Länge des zum Methionrest N-terminalen Peptidrückgrats wird anhand der Untersuchungen mit dem Tripeptid N-Ac-Gly-Met-Gly-OH deutlich. Es bildet sich dort im Gegensatz zum N-Ac-Gly-Gly-Met-OH der $\kappa^2\text{-S},\text{N}_\text{M}:\kappa^2\text{-S}',\text{N}'_\text{M}$ als Hauptprodukt. Dagegen entsteht bei Reaktionen von Oligopeptiden mit Cisplatin vorzugsweise das tridentate $\kappa^3\text{-S},\text{N}_\text{M},\text{N}_{\text{G}2}$, was die zeitabhängige Produktverteilung für N-Ac-Gly-Met-Gly-OH mit dem Antitumorpräparat bei $\text{pH} = 6,02$ beispielhaft zeigt (s. Abb. 7.30). Ab etwa 100 Stunden dominiert die $\kappa^3\text{-S},\text{N}_\text{M},\text{N}_{\text{G}2}$ -Spezies als Hauptprodukt. Der 1:2 $\kappa^2\text{-S},\text{N}_\text{M}:\kappa^2\text{-S}',\text{N}'_\text{M}$ -Komplex entsteht kontinuierlich über die gesamte Reaktionsfrist allerdings in deutlich geringerer Konzentration als mit AMD 473.

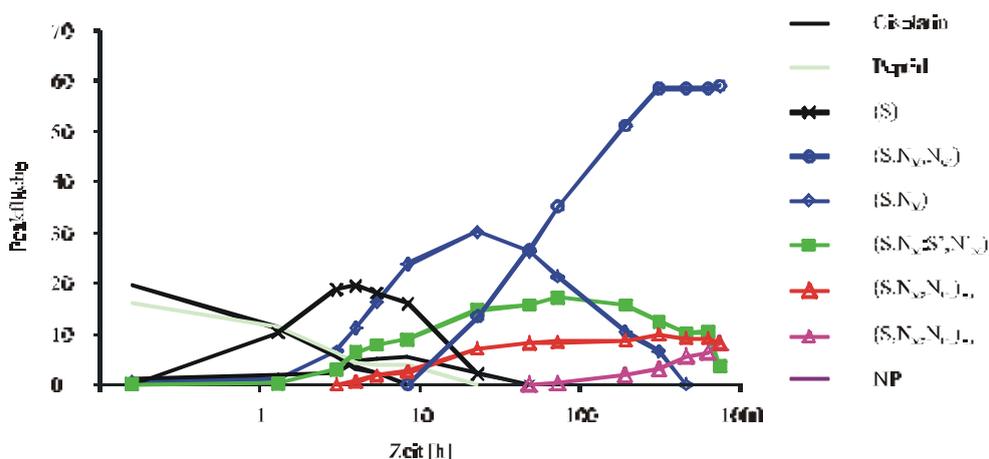


Abb. 7.30: zeitabhängige Produktverteilung des Systems Cisplatin / NAc-Gly-Met-Gly-OH (1:1); pH = 6,02

Man kann allgemein folgendes Reaktionsschema für die Reaktionen von AMD 473 mit methioninhaltigen Peptiden formulieren, dargestellt in der folgenden Abbildung:

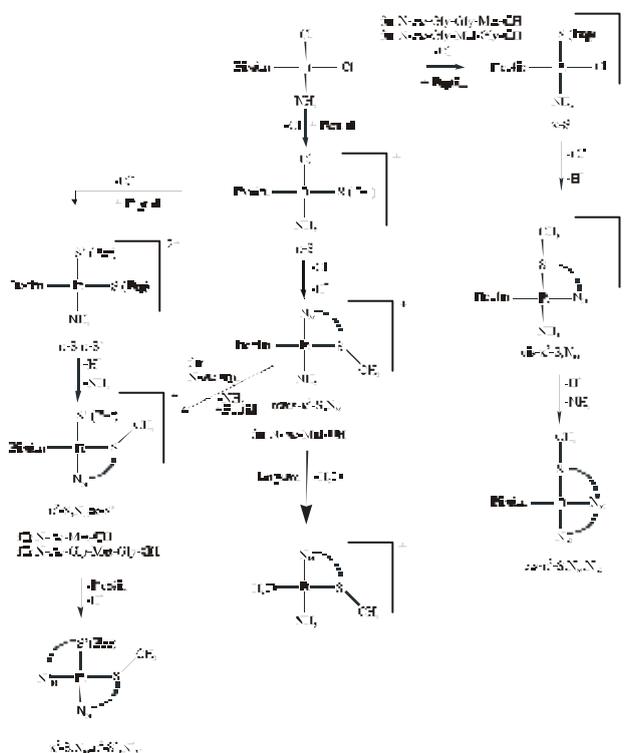


Abb. 7.31: Reaktionsschema für die Umsetzung von AMD 473 mit methioninhaltigen Peptiden

Das Reaktionsverhalten von AMD 473 wird durch die Substitution trans zum Picolin bestimmt. Die Substitution cis zum Picolin dagegen verläuft langsamer und spielt nur eine untergeordnete Rolle. Die Reaktion vom $(\kappa^2\text{-S},\text{N}_\text{M})\text{trans}$ zum $\kappa^2\text{-S},\text{N}_\text{M}:\kappa\text{-S}'$ konnte in den Untersuchungen nicht eindeutig bestätigt werden. Da sie aber auch nicht ausgeschlossen werden kann, ist sie daher mit einem gestrichelten Pfeil gekennzeichnet.

Zusammenfassend gilt für alle Peptide, dass die $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-S}'$ Intermediate bei AMD 473 im Gegensatz zu CDDP stabiler sind, da in Systemen von AMD 473 1:2-Produkte eindeutig bevorzugt gebildet werden [16, 33]. Die Chelatisierung hingegen findet verlangsamt statt, da die Anwesenheit des aromatischen Liganden eine Annäherung der Peptidseitenkette behindert.

8 Reaktionsvergleich zwischen AMD 494 und AMD 473

Folgender Vergleich zwischen den Platinkomplexen AMD 494 und AMD 473 in den pH-abhängigen Produktverteilungen und den zeitabhängigen Produktverteilungen mit dem Peptid N-Ac-Gly-Gly-Met-OH zeigt die Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Reaktionsverhalten der beiden Komplexe mit methioninhaltigen Peptiden.

Eine Gemeinsamkeit ist die klare kinetische Bevorzugung der Position trans zum aromatischen Liganden, wobei in Systemen von AMD 494 gezeigt werden konnte, dass die κ -S-Erstsstitution des Chlorliganden in Position cis zum Pyridin nur von geringer Bedeutung sein muss (s. Kap. 6.3).

Ein näherer Vergleich der pH-abhängigen Produktverteilungen zeigt, dass in Systemen von AMD 494 der bidentate κ^2 -S,N_M-Komplex dominiert, wobei bei höheren pH-Werten der Anteil der κ^3 -S,N_M,N_{G2} unter Verlust des Pyridinliganden als weiteres Produkt entsteht (s. Abb. 6.2). Die Bildung von 1:2-Produkten spielt bei Systemen von AMD 494 eine untergeordnete Rolle.

Dies ist auch der gravierendste Unterschied beider Systeme zueinander, was der Vergleich mit der pH-abhängigen Produktverteilung des Systems AMD 473 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH eindeutig unterstreicht (s. Abb. 7.8). Bei AMD 473 bildet sich über den gesamten pH-Bereich die κ^2 -S,N_M: κ -S'-Spezies als Hauptprodukt. Es scheint, dass eine ausreichende Labilisierung der Pt-N(Picolin)-Bindung aufgrund des großen Trans-Effekts des Thioether-Schwefelatoms nicht erfolgt, denn Produkte, die auf den Verlust des Picolins zurückzuführen wären, konnten innerhalb der gewählten Inkubationszeiten nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu reicht der Trans-Effekt des Schwefels bei Reaktionen von AMD 494 mit N-Ac-Gly-Gly-Met-OH aus, einen Verlust des Pyridins mit etwa gleicher Geschwindigkeit wie den des Amminliganden des Cisplatin zu erwirken, so dass der Pyridin-freie κ^3 -S,N_M,N_{G2} beobachtet wird.

Allerdings konnte bei Umsetzungen von AMD 473 mit methioninhaltigen Peptiden gezeigt werden, dass in 1:2-Komplexen bei kurzen N-terminalen Peptidketten (z. Bspl. Ac oder Ac-Gly) durchaus ein Verlust des Picolins zu beobachten ist (s. Kap. 7.5).

Es lässt sich daraus resümieren, dass der sterische Einfluss der Größe des aromatischen Liganden, die Reaktionen von AMD 494 und AMD 473 mit methioninhaltigen Peptiden

entscheidend bestimmt, was die Korrelation zwischen der Abnahme der relativen Reaktivitäten mit schwefelhaltigen Verbindungen und die Größe des Aromaten bestätigt [50, 53].

Allgemein kann damit folgendes formales Reaktionsschema für die Wechselwirkungen mit N-Ac-Gly-Gly-Met-OH formuliert werden:

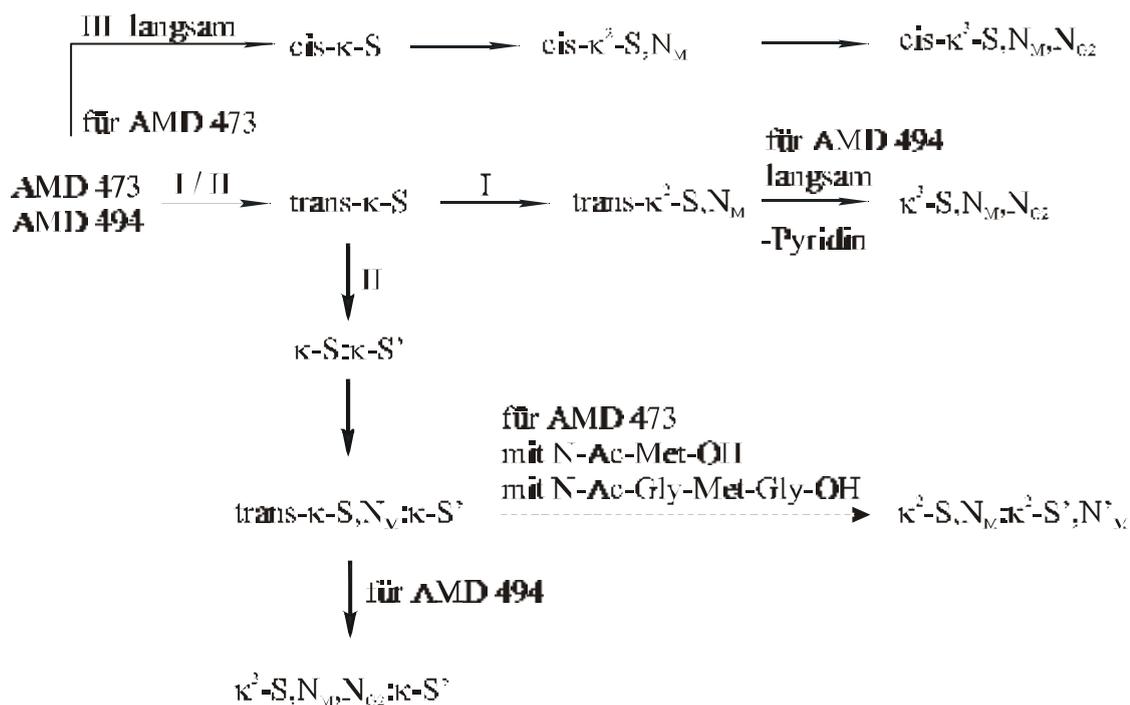


Abb. 8.1: formales Reaktionsschema für die Umsetzung von AMD 494 und AMD 473 mit N-Ac-Gly-Gly-Met-OH

Für AMD 473 ist Reaktionsweg II mit der Bildung der 1:2-Spezies von größerer Bedeutung als Reaktionsweg I. Auf Grund seiner geringeren Sperrigkeit kann der Pyridinligand im $\text{trans-}\kappa^2\text{-S}_2\text{N}_M$ -Komplex des AMD 494 zugunsten der Bildung eines tridentaten $\kappa^3\text{-S}_1\text{N}_M\text{N}_{G2}$ -Komplexes verdrängt werden. Als Folge wird Reaktionsweg I von AMD 494 bevorzugt.

9 Reaktionen von Cisplatin mit N-Ac-Met-OH und 5'-GMP²⁻

9.1 Chromatographisches System

Für die Trennung der ternären Systeme von Cisplatin mit N-Ac-Met-OH und 5'-GMP²⁻ erwies es sich als vorteilhaft eine Stufengradienten bestehend aus 1%, 5% und 10% Methanol als organischen Modifier mit PFP als Ionenpaareagenz einzusetzen. Der Wechsel des Gehalts an organischen Modifier erfolgt nach 30 beziehungsweise 70 Minuten. Eine optimale Trennleistung wurde bei einer Säulentemperatur von 22° C erreicht. Die nachfolgende Abbildung 9.1 zeigt ein Beispielchromatogramm, das die Elutionsreihenfolge verdeutlicht.

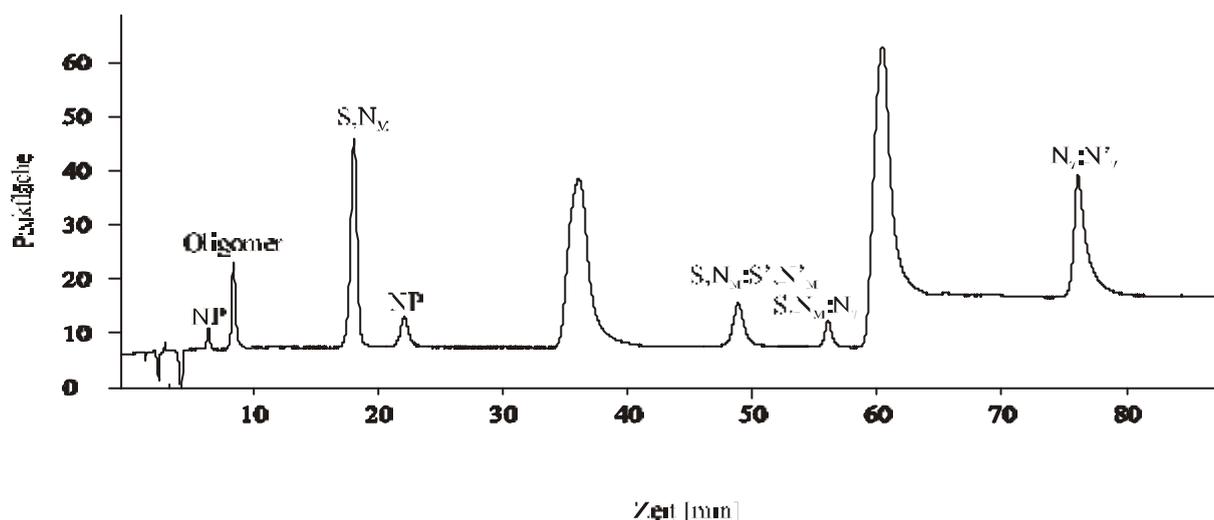


Abb. 9.1: Chromatogramme eines 1:1:1 Ansatzes des System Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻; 1%, 5%, 10% MeOH; 0,1% PFP; 22° C; pH = 4,5

Die in den ersten Minuten auftretenden Nebenprodukte sind Verunreinigungen des Peptids und haben keinen Einfluss auf die Reaktionen. Sie werden daher in den nachfolgenden Untersuchungen nicht weiter behandelt.

9.1.1 pH-abhängige Produktverteilung

Die analytischen Reaktionslösungen des Systems Cisplatin/ N-Ac-Met-OH/ 5'-GMP²⁻ im Verhältnis 1:1:1, mit einer Einwaagekonzentration von 0,8 mM bezogen auf das Peptid, wurden mit entsprechenden Äquivalentanteilen an 0,1 M Salpetersäure oder 0,1 M Natronlauge versetzt, wobei 80 µl einem Äquivalent entsprechen.

Nach einer Inkubationsdauer von 21 Tagen bei 40° C wurden die pH-Werte bestimmt und die Lösungen chromatographiert. Die Lagerung fand bei 4° C im Kühlschrank statt, wobei die Produktverteilung sich nur unwesentlich änderte. Die Integrale der Signale wurden gegen den zugehörigen pH-Wert aufgetragen und man erhält eine pH-abhängige Produktverteilungskurve, dargestellt in Abbildung 9.2.

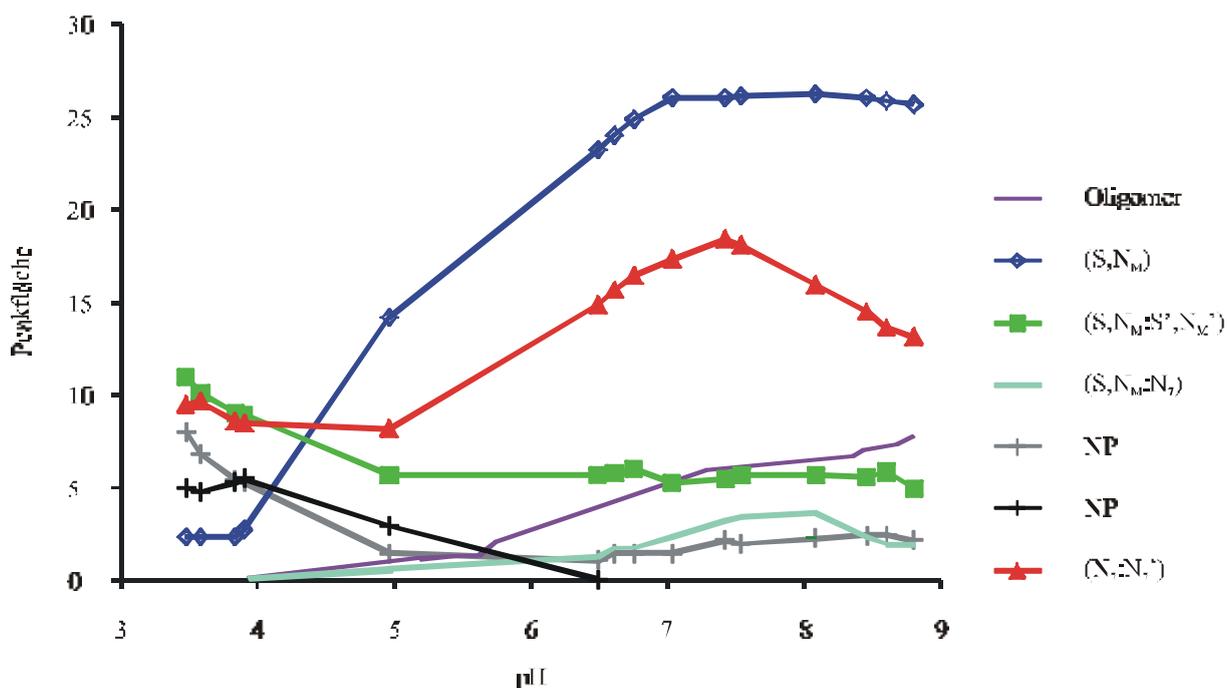


Abb. 9.2: pH-abhängige Produktverteilung des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻ (1:1:1); Reaktionszeit: 21 Tage

Über den gesamten untersuchten pH-Bereich liegt eine 1:2-Spezies vor, die bei pH = 7,5 ihre maximale Signalintensität erreicht. Dabei sind zwei Nukleotidmoleküle am Platin koordiniert, wobei die jeweilige Koordination über das N₇ des Guanosinmonophosphats erfolgt.

Das zweite 1:2 Produkt ist ein $\kappa^2\text{-S,N}_M:\kappa^2\text{-S}',\text{N}'_M$ koordinierter Komplex, dessen maximale Peakintensität bei pH = 3,5 zu finden ist.

Ab etwa pH = 5 dominiert ein $\kappa^2\text{-S,N}_M$ koordinierter Chelat-Komplex, der ab pH = 6 das Hauptprodukt ist. Darüber hinaus erscheint bei gleichem pH-Wert das vermutlich $\kappa^2\text{-S,N}_M:\kappa\text{-N}_7$ koordinierte Produkt, das nach einer 21-tägigen Inkubation, die einzige gemischt koordinierte Spezies von Peptid und Nukleotid darstellt.

Die schon von WIRTH ET AL. beschriebenen $\mu\text{-N}_1,\text{N}_7$ -verbrückten Oligomere treten ab pH = 5,5 auf und ihre Signalintensität nimmt mit steigenden pH-Werten zu [148-149]. Ein nur im Sauren detektiertes und ein über den gesamten untersuchten pH-Bereich stabiles Nebenprodukt konnten auch mit Hilfe der ESI/ MS-Technik nicht weiter charakterisiert werden.

Die Strukturen der wichtigsten Komplexe sind Abbildung 9.3 präsentiert.

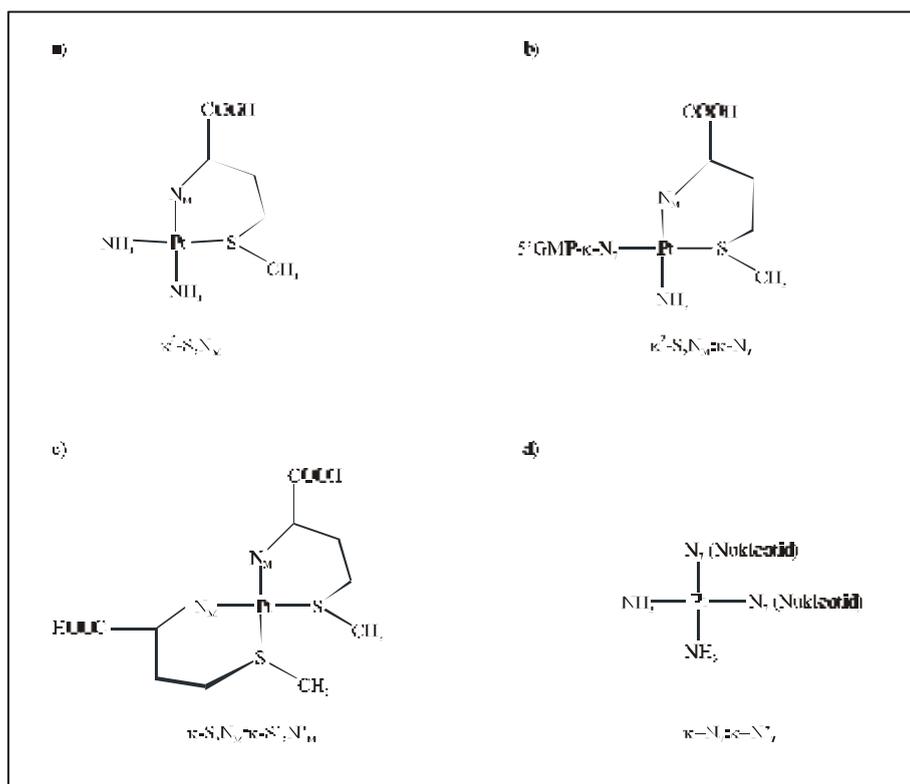


Abb. 9.3: Strukturen des bidentaten $\kappa^2\text{-S,N}_M$ (a), des $\kappa^2\text{-S,N}_M:\text{N}_7$ (b) und der 1:2-Komplexe (c) und (d)

9.1.2 Kinetische Untersuchungen

Der zeitabhängige Reaktionsverlauf wurde anhand analytischer Reaktionslösungen bei neutralen pH-Werten in äquimolarer Zusammensetzung und bei Nukleotidüberschuss untersucht. Die zu diesem Zweck angesetzten und über einen Zeitraum von 42 Tagen bei 40°C aufbewahrten Reaktionsansätze wurden kontinuierlich chromatographiert, wobei die pH-Werte nach Ablauf von 21 Tagen gemessen wurden.

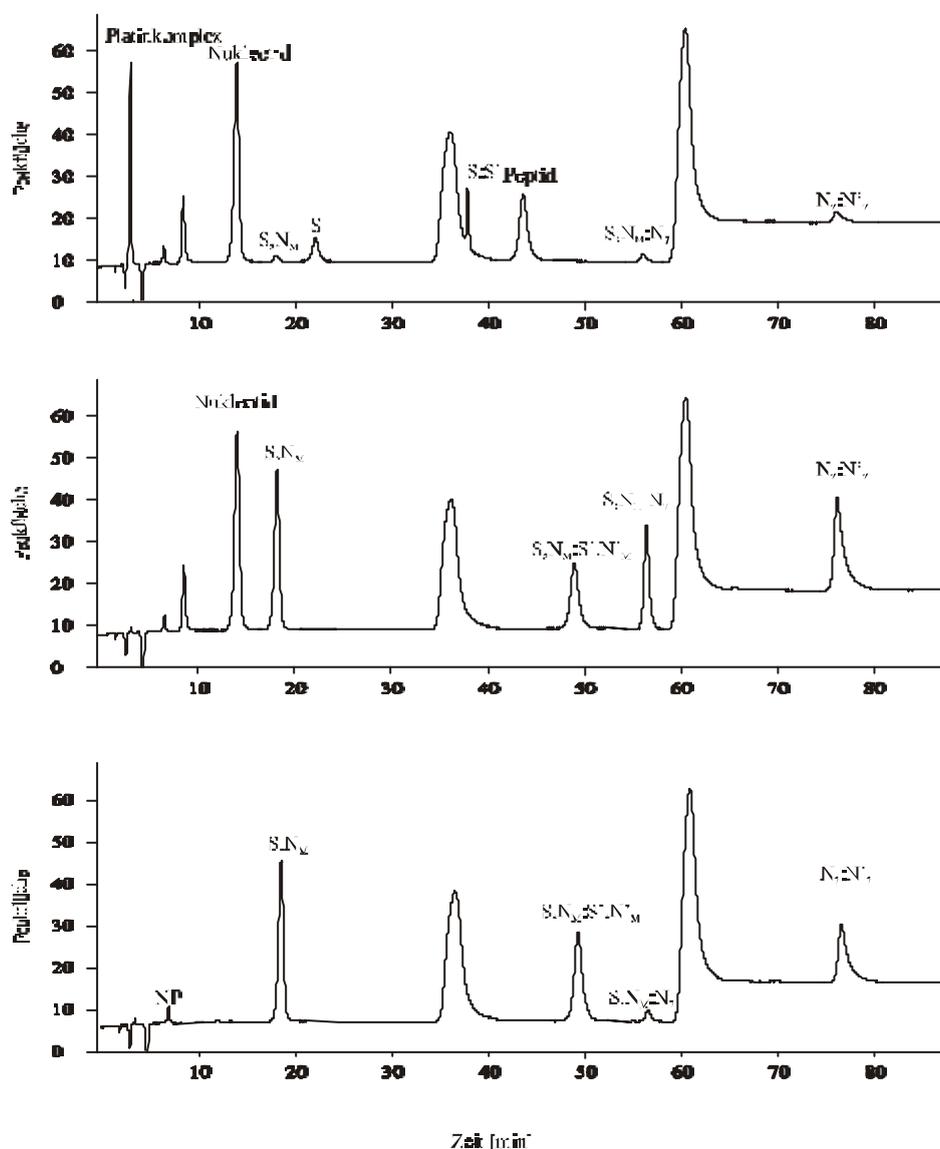


Abb. 9.4: Chromatogramme eines 1:1:1 Kinetikansatzes des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻; 1%, 5%, 10% MeOH; 0,1% PFP; 22° C; pH = 6,22
 a) t = 10 min b) t = 56 Stunden c) t = 120 Stunden

Man beobachtet eine rasche Abnahme an Peptid und Metallkomplex, da beide innerhalb von 24 Stunden abreagiert sind. Eine signifikante Reduktion an Nukleotidkonzentration wird erst nach Ablauf eines Tages detektiert. Allerdings ist trotz der stetigen Abnahme ein vollständiger Verbrauch nicht zu beobachten, da auch nach 1000 Stunden 5'-GMP²⁻ in der Lösung präsent ist. Aus Untersuchungen von KLEINE ET AL ist bekannt, dass bei sauren pH-Werten eine langsame Abspaltung des Phosphatrestes zu beobachten ist [34], was auch hier die Begründung für die Konzentrationsabnahme bei $t > 100$ Stunden zu sein scheint, da keine Signalzunahme an Nukleotid/ Metallkomplexen zu beobachten ist. Auffällig sind auch die signifikanten Konzentrationsabnahmen für das wahrscheinlich κ^2 -S,N_M: κ -N₇ koordinierte Produkt und κ -N₇: κ -N'₇, wo ebenfalls eine Phosphatsspaltung nach $t > 100$ Stunden vermutet werden muss.

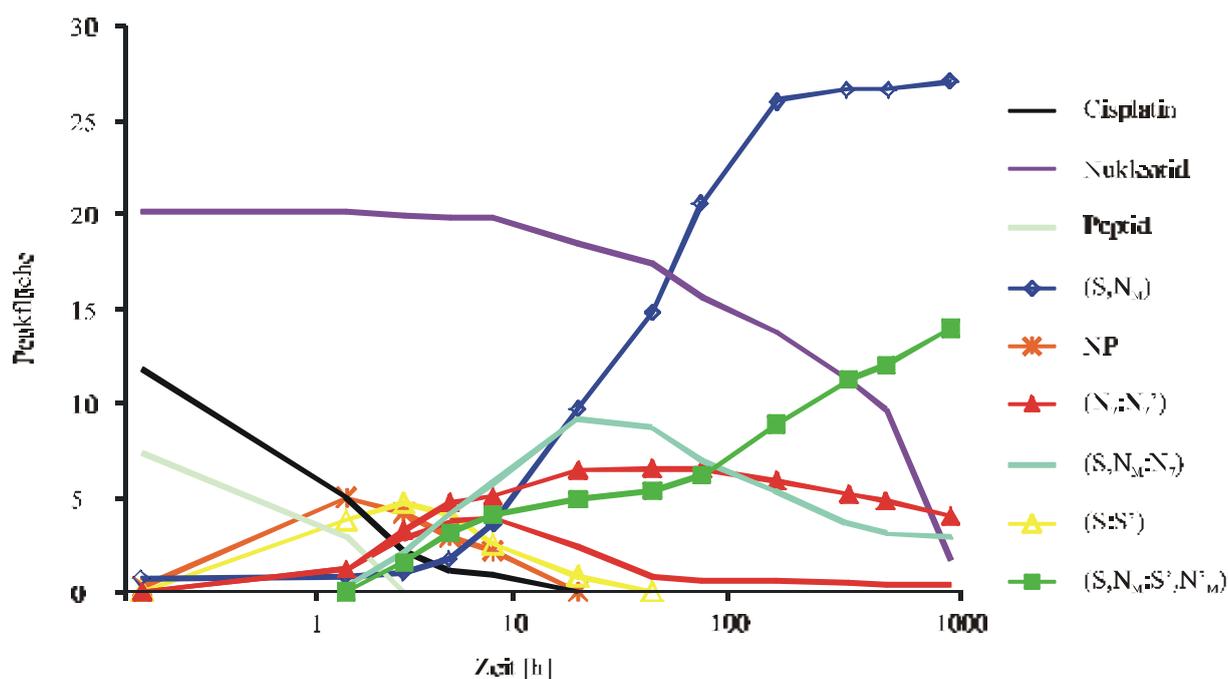


Abb. 9.5: zeitabhängige Produktverteilung des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻ (1:1:1) ; pH = 6,22

Neben dem monodentaten κ -S-Precursor entsteht sehr rasch der κ^2 -S,N_M koordinierte Komplex, der innerhalb von 100 Stunden seine maximale Signalintensität erreicht und nach 75 Stunden das Hauptprodukt dieser Reaktion ist. Der ebenfalls schnell sich bildende κ -S: κ -S' Vorläufer erreicht nach 5,5 Stunden seine maximale Konzentration und ist nach 100

Stunden zum $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa^2\text{-S',N}'_M$ abreagiert. Dieses 1:2-Produkt wird nach 2 Stunden in messbaren Konzentrationen detektiert und bildet sich kontinuierlich über die gesamte untersuchte Reaktionsfrist.

Nach zwei Stunden erscheint erstmals ein Nukleotid / Peptid-Komplex, der vermutlich $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa\text{-N}_7$ koordiniert ist. Dieser Komplex erreicht nach 24 Stunden seine maximale Peakintensität. Mit geringerer Signalintensität erscheint innerhalb der ersten Stunde der $\kappa\text{-N}_7\text{:}\kappa\text{-N}'_7$ 1:2-Komplex, der nach 75 Stunden seine maximale Signalintensität aufweist. Eine Transferreaktion von $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa\text{-N}_7$ zu $\kappa\text{-N}_7\text{:}\kappa\text{-N}'_7$ konnte unter diesen Bedingungen nicht gezeigt werden.

Die Reaktionen sind nach 1000 Stunden offensichtlich nicht vollständig abgeschlossen, da die Konzentrationen an $\kappa^2\text{-S,N}_M$ und $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa^2\text{-S',N}'_M$ weiter zunehmen. Darüber hinaus sind wiederum Konzentrationsabnahmen des vermuteten $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa\text{-N}_7$ und der $\kappa\text{-N}_7\text{:}\kappa\text{-N}'_7$ -Spezies nach $t > 100$ Stunden zu beobachten, was eine Phosphatabspaltung des Guanosinmonophosphats vermuten lässt.

Zur Vermeidung der Guanosinentstehung wurden bei den nachfolgenden Untersuchungen der pH-Wert erhöht und die Bevorzugung von Metall / Nukleotidkomplexen durch einen Nukleotidüberschuss angestrebt.

Bei der zeitabhängigen Untersuchung von Reaktionen des Systems Cisplatin/ N-Ac-Met-OH/ 5'-GMP²⁻ im stöchiometrischen Verhältnis 1:1:2 bei einem pH-Wert von 7,7 zeigt sich eine stetige Abnahme des Metallkomplexes (s. Abb. 9.6), der nach einer Reaktionsdauer von 52 Stunden nicht mehr detektiert wird. Die Konzentrationsabnahme an Peptid verläuft anfangs stetig, aber nach 48 Stunden ist keine wesentliche Änderung der Signalfläche zu beobachten. Allerdings nimmt die Konzentration an unkoordiniertem Peptid nach 500 Stunden wieder zu. Eine Reaktion des Nukleotids beginnt erst nach 2 Stunden indiziert durch eine Peakflächenabnahme, die stetig verläuft. Nach 100 Stunden verändert sich die Signalintensität nicht mehr, was mit dem Verbrauch an Metallkomplex korreliert.

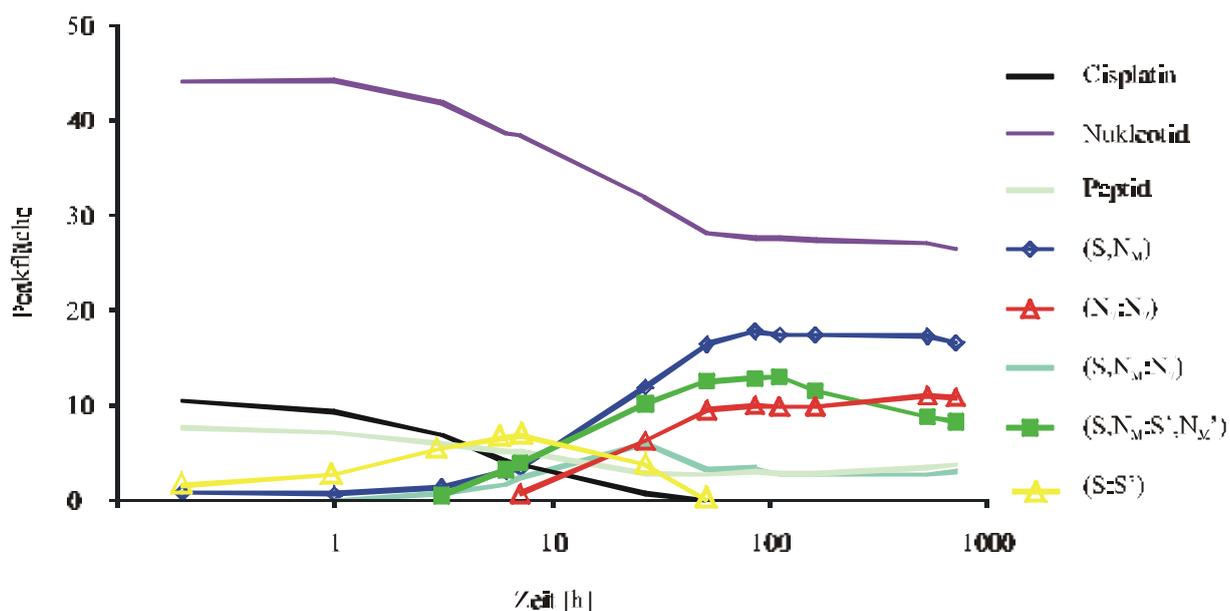


Abb. 9.6: zeitabhängige Produktverteilung des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻ (1:1:2); pH = 7,7

Die Entstehung des monodentaten κ -S-Vorläufers konnte unter diesen Bedingungen nicht detektiert werden. Es entsteht innerhalb der ersten Stunde neben dem bidentaten κ^2 -S,N_M auch der κ -S: κ -S' Precursor, der eindeutig zum κ^2 -S,N_M: κ^2 -S',N'_M weiterreagiert. Nach 4 Stunden Inkubation erscheint erstmals das wahrscheinlich κ^2 -S,N_M: κ -N₇ koordinierte Produkt, das nach 48 Stunden seine maximale Signalintensität erreicht, die dann langsam abnimmt. Die κ -N₇: κ -N'₇ Spezies bildet sich nach 8 Stunden, wobei kein Konnex zwischen diesen Produkten beobachtet werden kann.

Eine Bevorzugung des κ -N₇: κ -N'₇ 1:2-Produkts und eine Aufklärung der dazugehörigen Intermediate sollte durch eine weitere Erhöhung des Nukleotidanteils erreicht werden.

Bei der zeitabhängigen Untersuchung von Reaktionen des Systems Cisplatin/ N-Ac-Met-OH/ 5'-GMP²⁻ im stöchiometrischen Verhältnis 1:1:4 wurden innerhalb der ersten Stunden eine Vielzahl an Vorläuferprodukten detektiert, deren Signalintensität nicht ausreichte eine zufriedenstellende Produktzuordnung zu ermöglichen. Sie sind daher nicht weiter berücksichtigt worden.

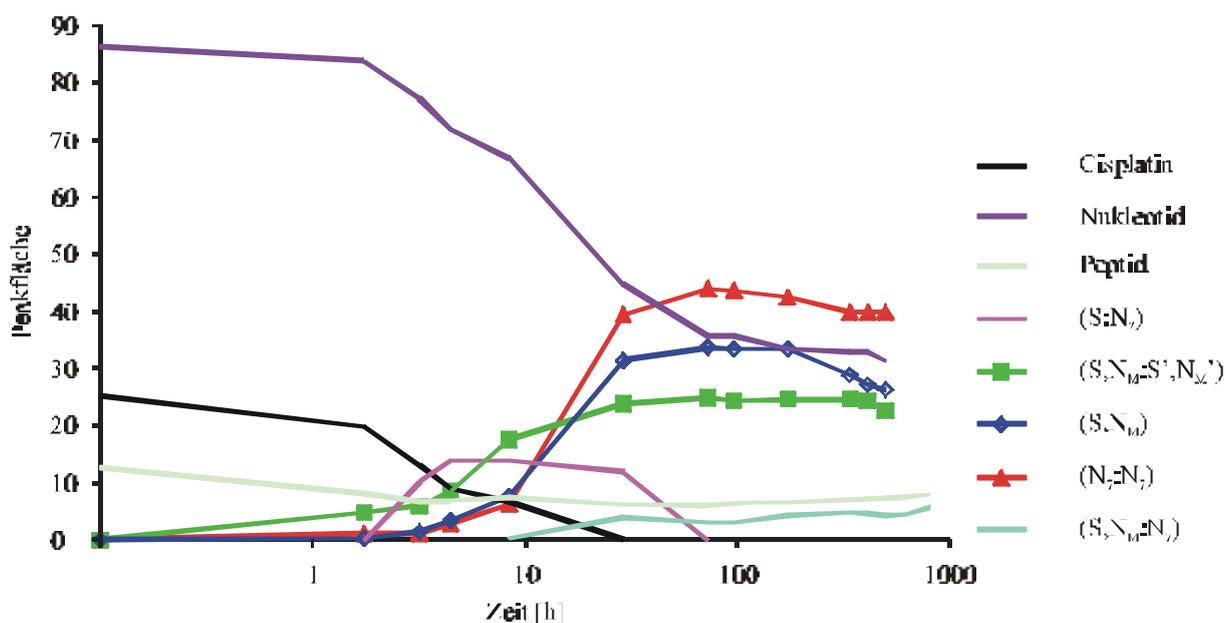


Abb. 9.7: zeitabhängige Produktverteilung des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻ (1:1:4); pH = 7,06

Die Abnahme der Peakintensität an Nukleotid ist diesmal innerhalb der ersten Stunde zu beobachten und verläuft stetig innerhalb der ersten 100 Stunden der Inkubationsdauer. Über diese Reaktionsfrist hinaus ist keine Intensitätsabnahme mehr zu beobachten. Die Hauptprodukte der Reaktion sind der κ^2 -S₂N_M-Chelatkomplex, die κ^2 -S₂N_M: κ^2 -S',N'_M Spezies und der κ -N₇: κ -N'₇ Komplex, wobei letzterer das Hauptprodukt der Reaktion ist. Dieser Komplex erscheint erstmals nach zweistündiger Inkubation in ausreichender Konzentration. Er erreicht nach 48 Stunden sein Peakmaximum und ist das Hauptprodukt. Synchron dazu bildet sich das κ^2 -S₂N_M allerdings mit geringerer Konzentration. Der hohe Nukleotidüberschuss bewirkt eine deutliche Bevorzugung der Metall / Nukleotid-1:2-Spezies. Der sich nach zweistündiger Inkubationsdauer bildende κ -S: κ -N₇ wurde erstmals detektiert. Er erreicht nach 6 Stunden sein Peakmaximum und wird nach 100 Stunden nicht mehr detektiert. Es scheint eine Wechselbeziehung zwischen der leichten Zunahme des Peptidsignals und der Konzentrationsabnahme an κ -S: κ -N₇ zu bestehen.

Innerhalb der ersten Stunde der Reaktion erscheint das κ^2 -S₂N_M: κ -N₇, das nach 75 Stunden seine maximale Konzentration erreicht und bei länger andauernder Inkubation nur leicht

abnimmt. Das $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa^2\text{-S',N'}_M$ bildet sich sofort und erreicht nach etwa 100 Stunden seine maximale Intensität.

Die reaktionsmechanistischen Beziehungen zwischen $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{N-Ac-MetH}_{1\text{-OH}}\text{-}\kappa^2\text{-S,N}_M)(5'\text{-GMP-}\kappa\text{-N}_7)]^+$ und der $\kappa\text{-N}_7\text{:}\kappa\text{-N'}_7$ -Spezies sollte durch eine zeitabhängige Studie bestätigt werden, in der nach zwölfstündiger Inkubation des binären Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH, 5'-GMP²⁻ nachträglich zugesetzt wurde (s. Abb. 9.8).

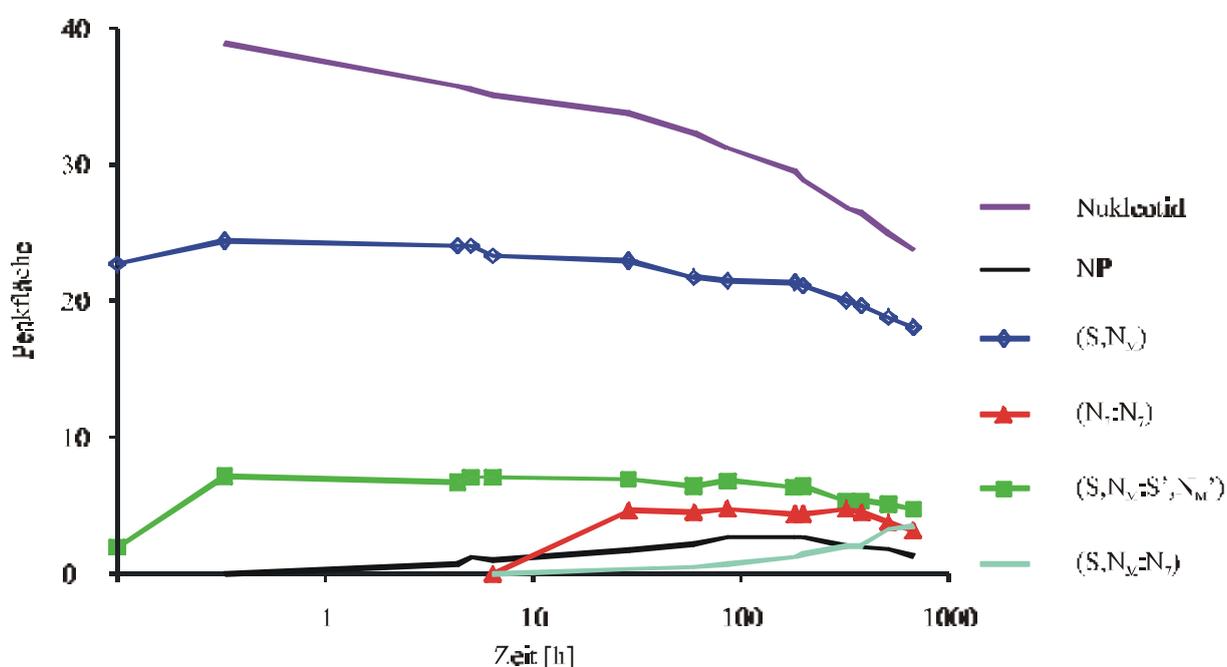


Abb. 9.8: zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Ac-MetH}_{1\text{-OH}}\text{-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+ / 5'\text{-GMP}^{2-}$ (1:1); $\text{pH} = 6,20$

Das nach 12 Stunden dominierende Hauptprodukt $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Ac-MetH}_{1\text{-OH}}\text{-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ reagiert mit 5'-GMP²⁻ sehr langsam. Vielmehr scheint die $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Spezies relativ inert zu sein, da sie weder durch Zugabe an Nukleotid oder unter Temperatureinfluss, hohe Mengen an Folgeprodukten innerhalb von 1000 Stunden bildet, im Gegensatz zu Systemen mit H-Met-OH: Dort beobachteten SADLER ET AL., dass der $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Chelat Ringöffnungen bei pH ungefähr 4 eingeht. [106]. Erst nach 75 Stunden kann eine detektierbarer Verbrauch an $\kappa^2\text{-$

S,N_M durch die Bildung von Nukleotidprodukten festgestellt werden. Zeitgleich mit der Abnahme an κ^2 -S,N_M wird die Bildung des κ^2 -S,N_M: κ -N₇ nach 75 Stunden beobachtet.

Obwohl ein κ -S: κ -N₇ als Precursor nicht detektiert wurde, kann eine Reaktion vom κ^2 -S,N_M über κ -S: κ -N₇ zum κ -N₇: κ -N'₇ nicht vollständig ausgeschlossen werden, da diese 1:2-Spezies schon nach 6 Stunden Inkubation erscheint und damit deutlich vor der κ^2 -S,N_M: κ -N₇-Spezies. Bei pH = 6,2 sollte eine langsame Ringöffnung noch möglich sein. Es kann aber auch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass das Nukleotid mit noch in der Lösung befindlichen Metallkomplex reagiert.

Die Signalfläche der κ^2 -S,N_M: κ^2 -S',N'_M-Spezies bleibt nach etwa 6 Stunden Inkubation nahezu konstant.

9.2 Charakterisierung der Komplexe

Die Hauptprodukte aus der Umsetzung von Cisplatin mit dem Peptid N-Ac-Met-OH in Anwesenheit von 5'-GMP²⁻ konnten in ausreichender Reinheit semi-präparativ getrennt werden, so dass eine eindeutige Charakterisierung mit Hilfe der UV/ Vis- und der ¹H/ ¹⁹⁵Pt-NMR-Spektroskopie möglich war. Durch den Einsatz der ESI-Massenspektrometrie konnten auch die Stöchiometrien einiger Intermediate ermittelt werden.

Mit Hilfe einer zeitabhängigen NMR-Untersuchung bei pH = 7 konnte die Bildung des monodentaten κ -S-Vorläufers beobachtet werden.

Zuerst entsteht der monodentate κ -S, der einen Verschiebungswert der δ -CH₃ Protonen des Thioethers um + 0,33 aufweist und bei 2,43 ppm zu finden ist (s. Abb. 9.9).

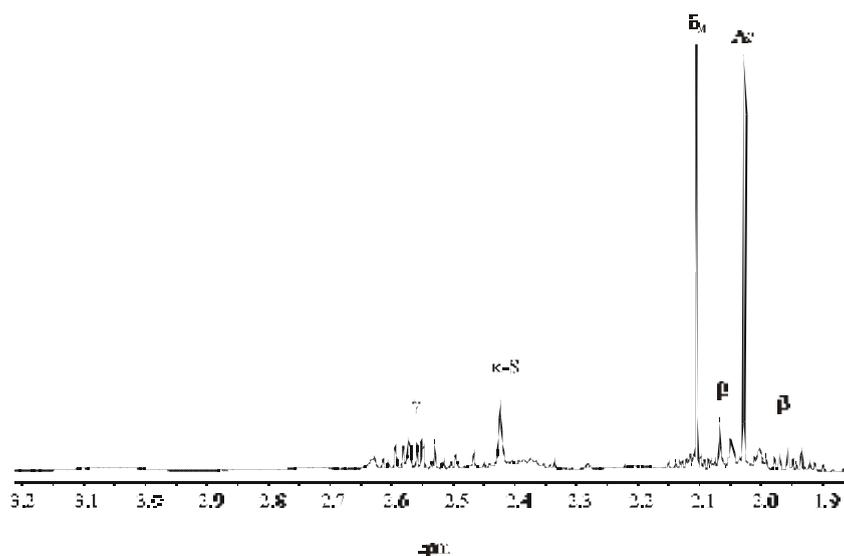


Abb. 9.9: Ausschnitt aus einem ^1H -NMR-Spektrum einer 1:1-NMR-Kinetik des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH nach 0,1 Stunden; pH = 5,00; 30° C; D_2O ; $c = 80 \text{ mM}$

Nach weiteren 3 Stunden Reaktionsdauer erscheinen die Signale des bidentaten $\kappa^2\text{-S}_2\text{N}_M$ zwischen 2,45 ppm und 2,62 ppm. Durch die Koordination am N_M des Methionins erfährt das α_M -Proton einen Tieffeldshift um $-0,25 \text{ ppm}$, so dass die Resonanzen bei 4,31 ppm dem $\text{CH-}\alpha_M$ zugewiesen werden kann.

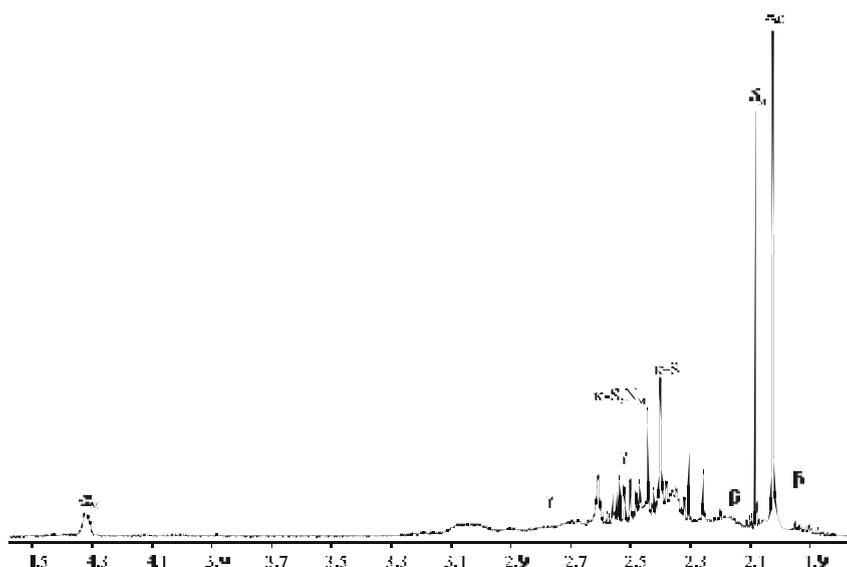


Abb. 9.10: Ausschnitt aus einem ^1H -NMR-Spektrum einer 1:1-NMR-Kinetik des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH nach 3 Stunden; pH = 7,00; 30° C; D_2O ; $c = 80 \text{ mM}$

Das Nukleotid 5'-GMP²⁻ stellt die einfachste Modellverbindung für DNA dar. Eine Koordinierung eines Platinatoms unter physiologischen Bedingungen findet hauptsächlich am N₇ des Guanosinmonophosphats statt. Daher kann man das H₈-Proton als NMR-spektroskopische Sonde nutzen, denn die Lage der H₈-Resonanz im ¹H-NMR-Spektrum ist isoliert, so dass eine Koordination des Stickstoff N₇ am Metallkomplex durch einen Tieffeldshift des H₈-Signals verfolgt werden kann.

In den aufgenommenen ¹H-NMR-Spektren einer Kinetikmessung eines äquimolaren Mikroansatzes des ternären Systems in D₂O nach a) 5 Minuten b) 6 Stunden c) 24 Stunden (s. Abb. 9.11) zeigt sich, dass die Reaktionen zwischen Metallkomplex und Peptid bei c = 80 mM sehr schnell sind. Schon innerhalb der ersten Minuten bildet sich der κ-S-Precursor. Nach einer Reaktionsdauer von 6 Stunden kann kein freies δ_M-Signal mehr beobachtet werden, wobei die der κ²-S,N_M-Koordinationen entsprechenden Resonanzen (s. a. Abb. 9.9, Abb. 9.10) vorhanden sind.

Die Reaktion von Nukleotid und Metallkomplex in Anwesenheit von Peptid ist relativ langsam. Es ist zwar die Bildung an κ²-S,N_M:κ-N₇ innerhalb der ersten 6 Stunden zu beobachten, doch ist das Signal bei 8,85 ppm sehr klein (s. Abb. 9.11 (b)). Es erscheint das Signal der N₇:N'₇-Spezies bei 8,50 ppm. Die Resonanzen beider Produkte werden im weiteren Verlauf der Untersuchung größer, doch ist die Konzentration im Vergleich zum unkoordinierten Nukleotid sehr gering.

Die Zuordnung der β_M- und γ_M-Resonanzen erfolgte über H,H-COSY-Spektren, da die Signale durch die Koordination am Thioether-Schwefel stark verbreitert werden.

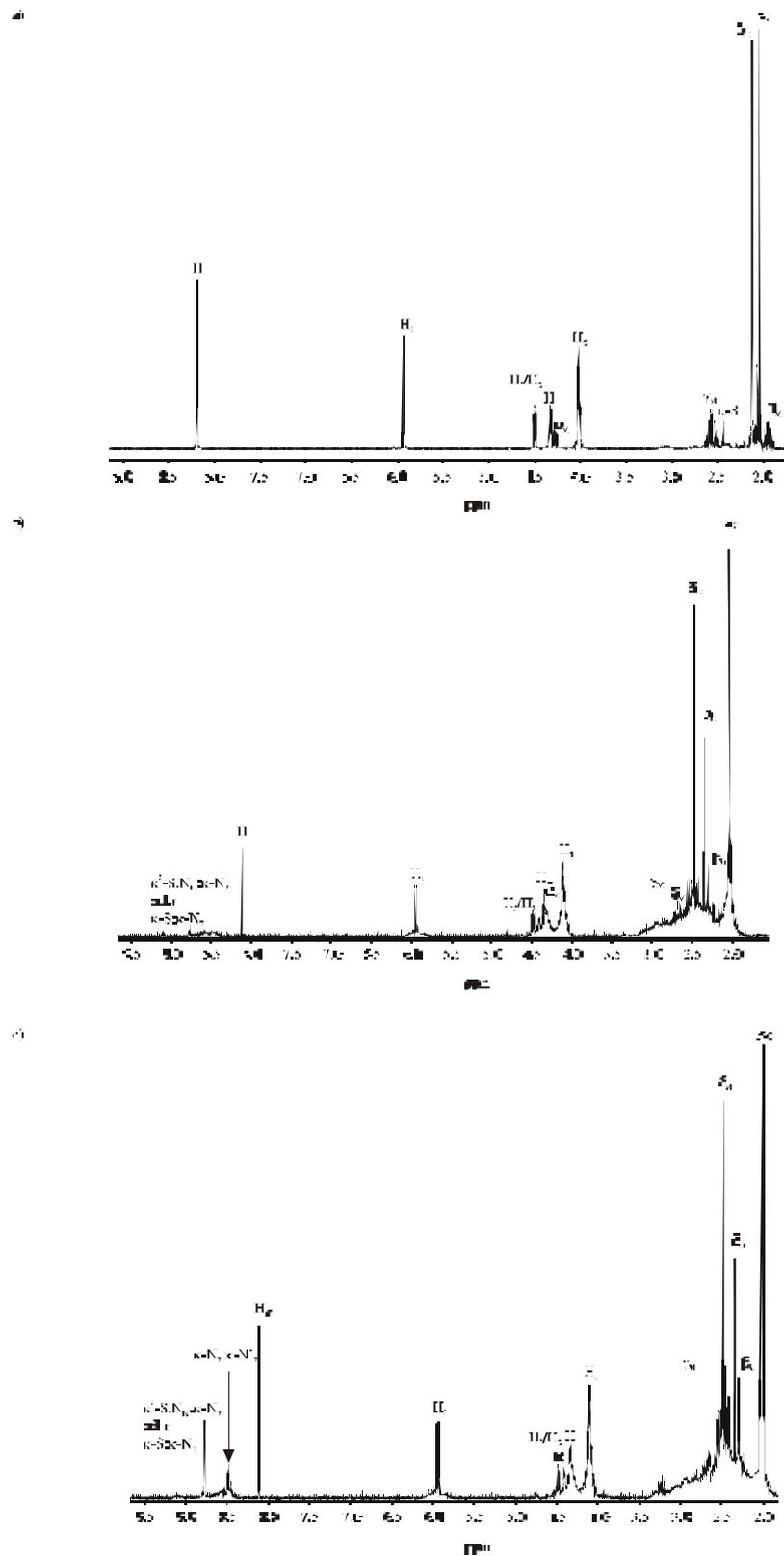


Abb. 9.11: Ausschnitte aus $^1\text{H-NMR}$ -Spektren einer 1:1:1-NMR-Kinetik des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻ nach a) 5 Minuten, b) 6 Stunden und c) 25 Stunden; $\text{pH} = 7,00$; 30°C ; D_2O ; $c = 80 \text{ mM}$

Eine kinetische Untersuchung des binären Systems Cisplatin / 5'-GMP²⁻ zeigt dagegen, dass die Reaktion von Metallkomplex und Nukleotid in Abwesenheit von N-Ac-Met-OH sehr schnell verläuft. Schon innerhalb ersten Stunden ist 5'-GMP²⁻ verbraucht und es hat sich vollständig die 1:2-Spezies gebildet (s. Abb. 9.12). Das Signal des H₈-Protons ist bei 8,50 ppm zu finden.

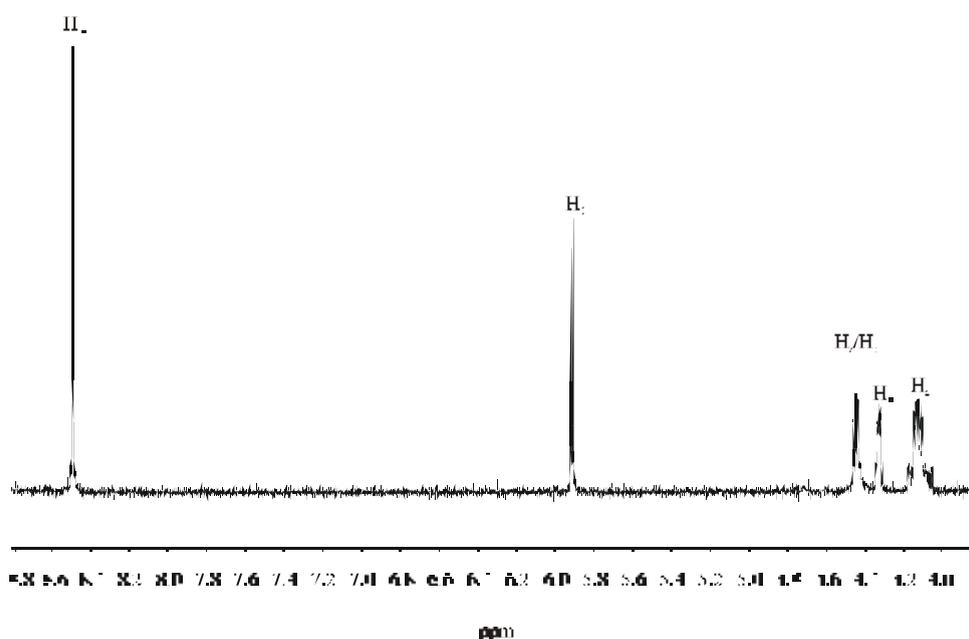


Abb. 9.12: Ausschnitt aus einem ¹H-NMR-Spektrum einer 1:1-NMR-Kinetik des Systems Cisplatin / 5'-GMP²⁻ nach 5 Stunden; pH = 7,00; 30° C; D₂O; c = 80 mM

In Tabelle 9.1 werden die wichtigsten chemischen Verschiebungswerte und Aufspaltungsmuster der NMR-spektroskopischen Untersuchungen zusammenfassend präsentiert.

Tab. 9.1: Chemische Verschiebungen und Aufspaltungsmuster des κ^2 -S,N_M: κ -N₇- und des κ -N₇: κ -N₇-Produktes und 5'-GMP²⁻

Signalzuordnung	5'-GMP ²⁻	κ^2 -S,N _M : κ -N ₇	κ -N ₇ : κ -N ₇
δ _M		2,43; 2,45 s	
H ₈	8,20 s	8,85 s	8,50 s
pH	6,20	7,00	7,00

Weitere Nebenprodukte konnten nur mit Hilfe der ESI / MS-Technik bestätigt werden, da durch die Vielzahl der Produkte und ihrer Diastereomere eine vollständige Aufklärung durch eine ¹H-NMR-Kinetik nicht möglich ist. Exemplarisch ist hier das erhaltene MS-Spektrum für den κ -S: κ -N₇ abgebildet.

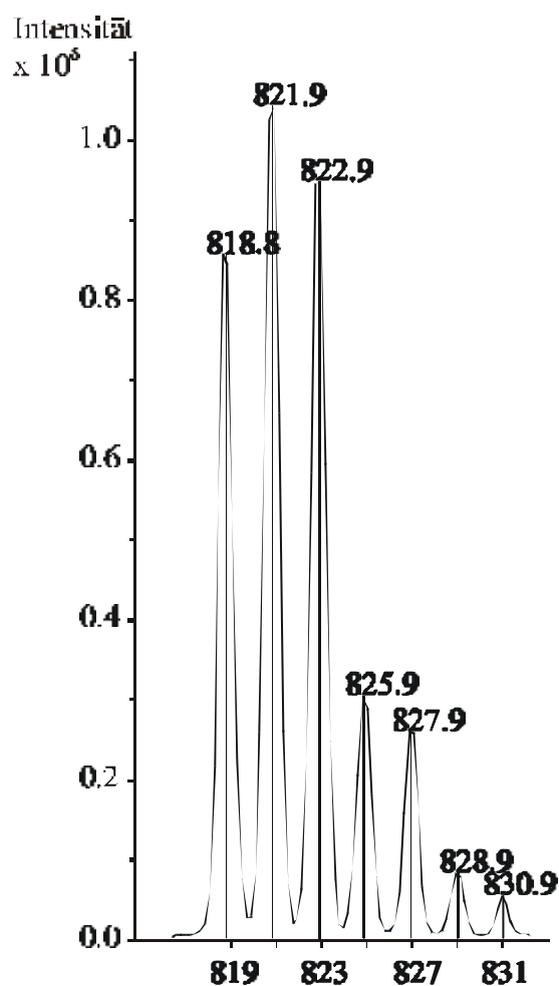


Abb. 9.13: ESI-MS-Spektrum des κ S: κ N₇-Komplexes

Der berechnete Wert für das Hauptisotop liegt bei $m/z = 826$. Es zeigt sich im Spektrum ein Peak bei 822, so dass die Abweichung 4 beträgt, was im Bereich der Geräte typischen Genauigkeit liegt.

Ferner konnte so auch das Vorliegen des κ -S: κ -S'-Precursors durch einen Molekülpeak $m/z = 610$ bestätigt werden, was einem $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Ac-Met-OH-}\kappa\text{-S})(\text{N-Ac-Met-OH-}\kappa\text{-S})]^{2+}$ entspricht mit einer Genauigkeit von $\Delta = -2$.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung sind in Tabelle 9.2 zusammengefasst, wobei die berechneten Werte für das Hauptisotop in Klammern angegeben sind.

Tab. 9.2 : ESI-massenspektrometrische Daten des κ -S. κ -N₇ und der κ -S. κ -S'-Spezies

Peakzuordnung	κ -S. κ -N ₇	κ -S. κ -S'
[1:2]		610 (612)
[1:1:1]	822 (826)	

In der nachfolgenden Abbildung 9.14 sind die UV-Spektren der Hauptprodukte aus den Reaktionen von 5'-GMP²⁻ mit Cisplatin in Anwesenheit des Peptids N-Ac-Met-OH dargestellt.

Die Platin / Nukleotid-Komplexe zeigen deutliche Maxima zwischen 255 und 265 nm und besitzen einen charakteristischen Kurvenverlauf. Im Vergleich dazu zeigen die Platin/ Peptid-Komplexe kein Maximum, so dass die Spektren Aufschluss über eine Koordinierung von 5'-GMP²⁻ am Metallzentrum geben.

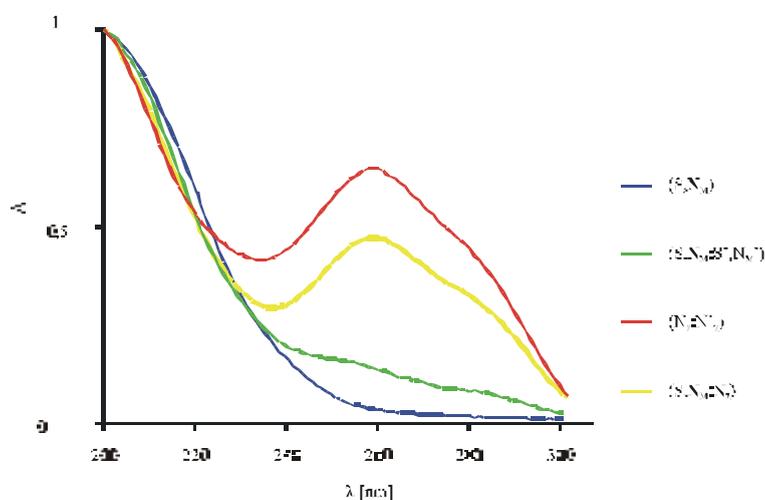


Abb. 9.14: normierte UV-Spektren der wichtigsten Produkte aus dem System Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻

Mit Hilfe der semi-präparativen Trennung war eine Charakterisierung der Hauptprodukte möglich.

Das ¹H-NMR-Spektrum des bidentaten κ²-S,N_M zeigt eine Tieffeldverschiebung der δ_M-Protonen, so dass die Signale bei 2,63 ppm, 2,47 ppm und 2,37 ppm den δ_M-CH₃ zugeordnet werden können [57, 106]. Das chirale Zentrum am Schwefel und die mögliche cis und trans Ausrichtung der C-N-Bindung in der Acetylgruppe bewirken die Entstehung von bis zu 4 Isomeren, wodurch die Vielzahl der Resonanzen für die δ_M-Protonen erklärt werden.

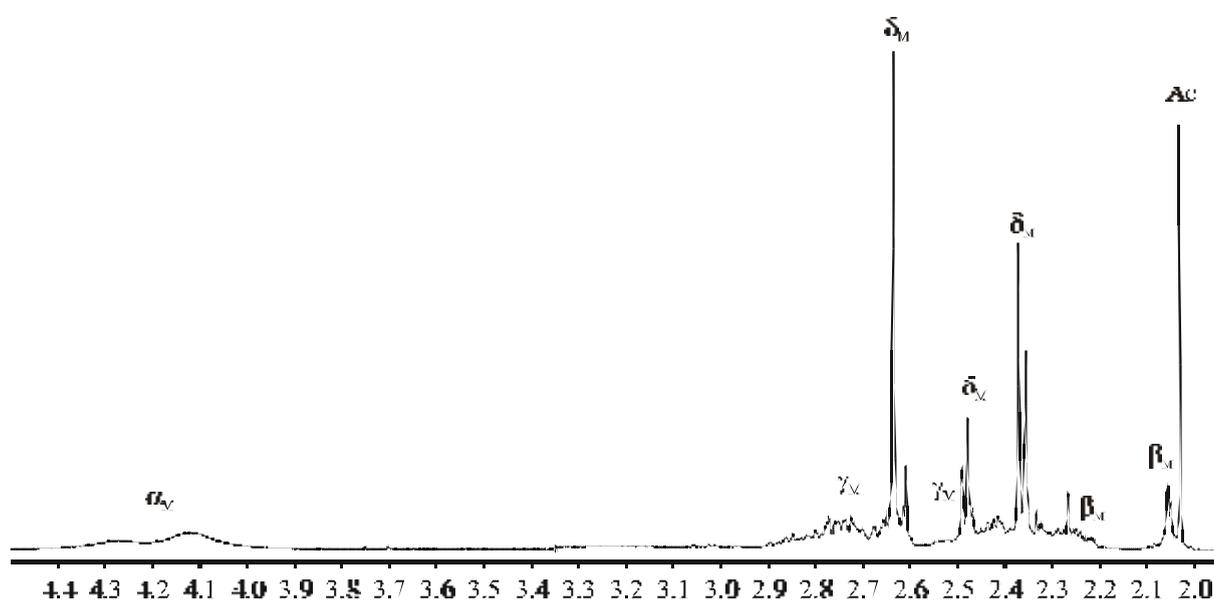


Abb. 9.15: ¹H-NMR-Spektrum des κ²-S,N_M-Produkts; pH = 2,17

Darüber hinaus zeigt das Spektrum die für eine N_M-Koordinierung charakteristische Hochfeldverschiebung des α_M-Protons um -0,36 ppm zu 4,20 ppm. Durch die Koordinierung des Thioethers sind die Resonanzen der β_M- und γ_M-Protonen ebenfalls zu tieferem Feld verschoben, allerdings ist durch die große Signalverbreiterung eine Signalzuordnung schwierig. Die Resonanz der Acetylgruppe ist bei 2,05 ppm zu finden.

Die Koordinationssphäre am Platin wird weiterhin durch ein ¹⁹⁵Pt-Spektrum bestätigt mit für eine N₃S-Umgebung typischen Verschiebungswert von -3081 ppm (s. Abb. 9.16) [146].

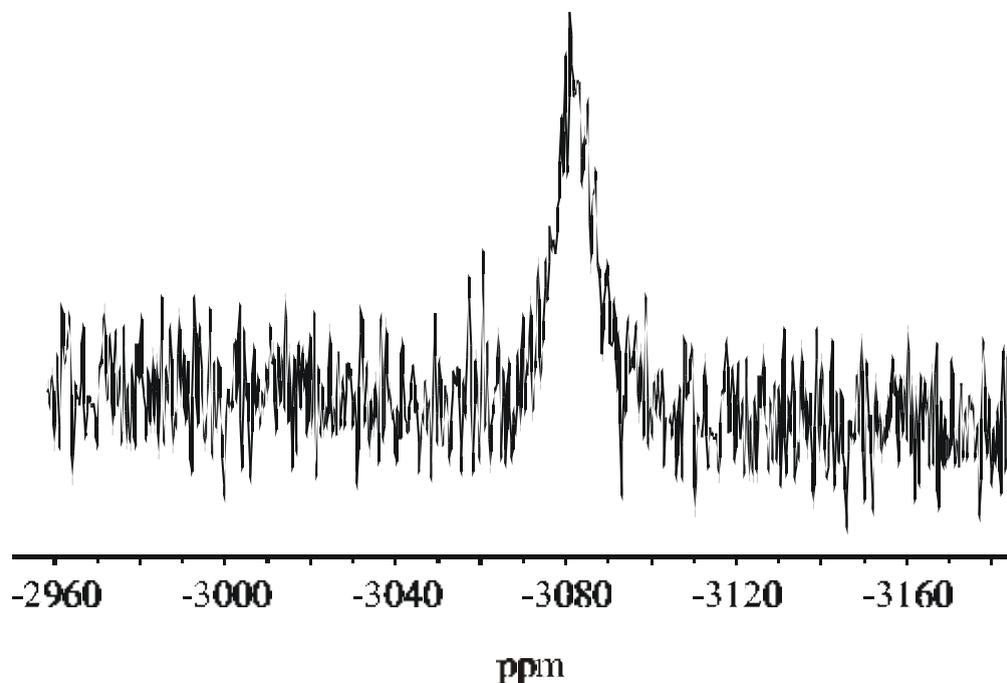


Abb. 9.16: ¹⁹⁵Pt-NMR-Spektrum des κ^2 -S,N_M-Produkts; (600MHz)

Die NMR-spektroskopischen Daten und Aufspaltungsmuster sind in Tabelle 9.4 zusammengefasst.

Die FAB-Massenspektrometrie bestätigte die 1:1 Stöchiometrie durch einen Molekülpeak $m/z = 420$. Es wird der Verlust der beiden Amminliganden beobachtet, mit den jeweiligen Signalen bei $m/z = 402$ und $m/z = 386$. Ferner ist die Abspaltung der COOH-Gruppe durch ein Signal bei 376 zu beobachten (s. Tab. 9.3).

Die Stöchiometrie des κ^2 -S,N_M: κ^2 -S',N'_M wurde anhand massenspektrometrischer Untersuchungen durch einen Molekülpeak bei $m/z = 576$ bestätigt (s. Tab. 9.3). Darüber

hinaus kann man den Verlust eines Peptids, sowie die Abspaltung einer COOH-Gruppe beobachten.

Tab. 9.3 : FAB-massenspektrometrische Daten der Cisplatin / Peptid-Produkte, berechnete Werte der Hauptisotopen in Klammern

Peakzuordnung	$\kappa^2\text{-S,N}_M$	$\kappa^2\text{-S,N}_M\cdot\kappa^2\text{-S',N}'_M$
[1:2]		576 (578)
[1:1]	420 (421)	
[1:1] - 1×NH ₃	402 (404)	
[1:1] - 2×NH ₃	386 (387)	385 (387)
[1:1] – COOH	376 (376)	
[1:1] - 2×NH ₃ – COOH		342 (342)

Die 1:2-Spezies zeigt im ¹⁹⁵Pt-NMR-Spektrum eine für eine N₂S₂-Koordinationsphäre typischen Verschiebungswert von –3560 ppm, was die Koordinierung zweier Peptide am Metallzentrum eindeutig bestätigt.

Im ¹H-NMR-Spektrum konnte eine $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa^2\text{-S',N}'_M$ Koordinierung bestätigt werden, da eine $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa\text{-S'}$ Koordinierung zusätzliche Signale durch die $\kappa\text{-S'}$ -Koordinierung zu Folge hätte.

Die Resonanzen der δ_M -Protonen sind bei zwischen 2,42 ppm und 2,59 ppm zu finden und damit um etwa 0,3 ppm tieffeldverschoben im Vergleich zum unkoordinierten Peptid [106]. Die Resonanz des α_M -Protons wird durch die Koordinierung am N_M hochfeldverschoben, so dass das Signal bei 4,13 ppm diesem zugeordnet werden kann.

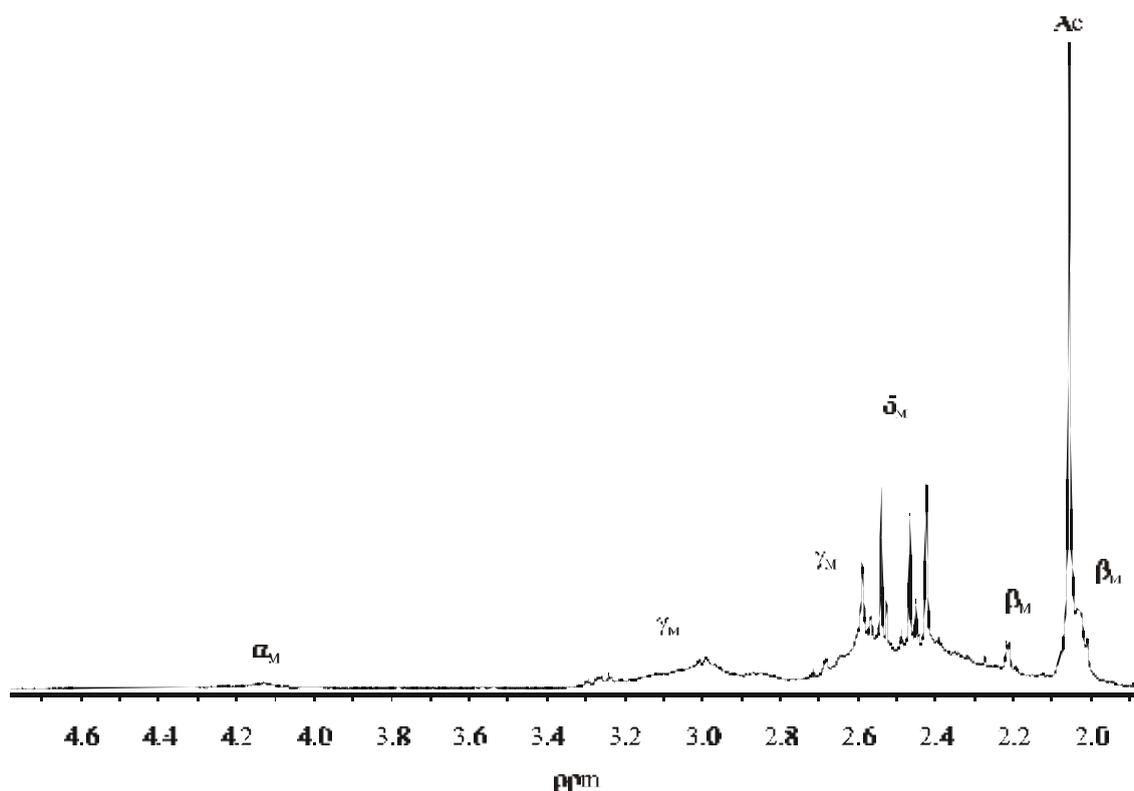


Abb. 9.17: ¹H-NMR-Spektrum des κ^2 -S,N_M: κ^2 -S',N'_M-Produkts; pH = 2,25

Die β_M - und γ_M -Protonen sind durch die Koordinierung am Schwefel des Methionins ebenfalls tieffeldverschoben und stark verbreitert. Die Resonanz der Acetylgruppe ist bei 2,06 ppm zu finden. Die chemischen Verschiebungswerte und Aufspaltungsmuster sind in Tabelle 9.4 zusammengefasst.

Tab. 9.4: Chemische Verschiebungen und Aufspaltungsmuster des κ^2 -S,N_M: κ^2 -S',N'_M-Produktes

Signalzuordnung	N-Ac-Met-OH	κ^2 -S,N _M : κ^2 -S',N' _M	κ^2 -S,N _M
α_M	4,56 m	4,13 m	4,20 m
β_M	2,03; 2,15 m	2,00 – 2,30 m	2,03 – 2,33 m
γ_M	2,4; 2,62 m	2,40 – 3,20 m	2,40 – 2,87 m
δ_M	2,10 s	2,42; 2,48; 2,54; 2,59 s	2,63; 2,47; 2,37 s
Ac	2,01 s	2,06 s	2,05 s
¹⁹⁵ Pt		-3560 m	-3081 m
pH	2,25	2,25	2,17

Das ¹H-NMR-Spektrum des N₇:N'₇ zeigt einen Tieffeldshift des H₈-Protons um +0,25 ppm, so dass die H₈-Resonanz bei 8,45 ppm zu finden ist.

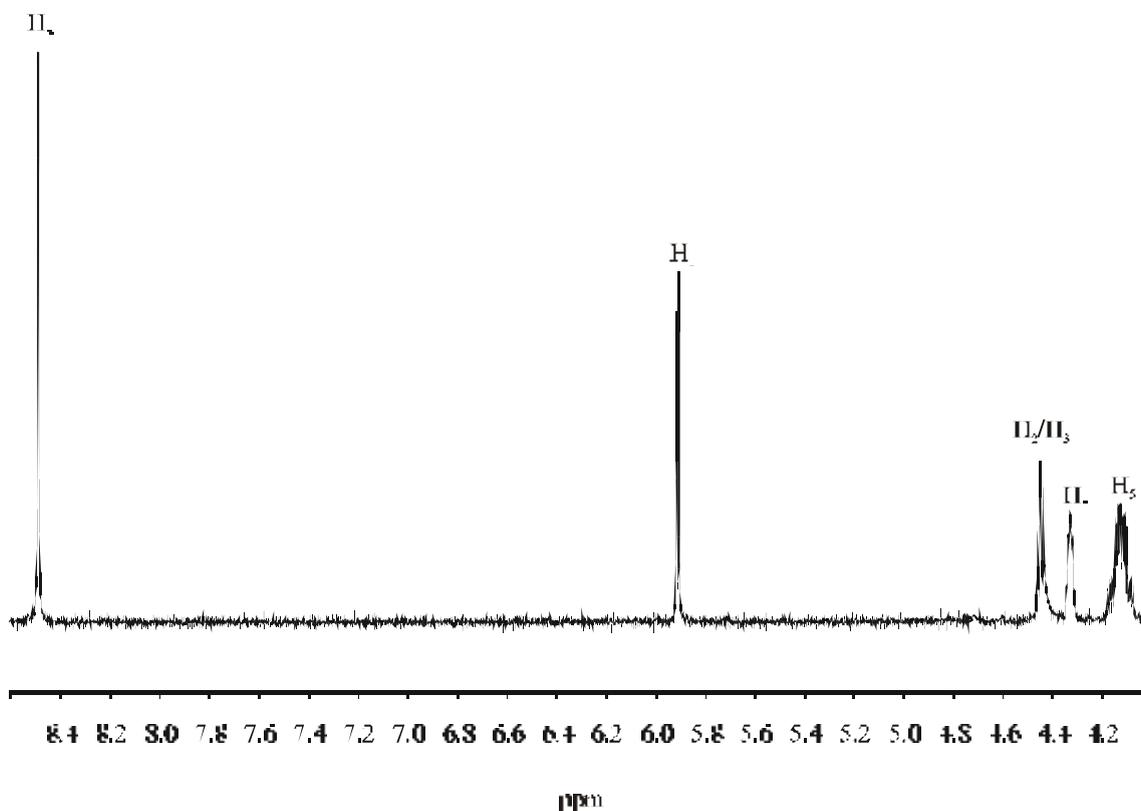


Abb. 9.18: ¹H-NMR-Spektrum des $\kappa\text{N}_7:\kappa\text{N}'_7$ -Produkts; pH = 2,83

Durch die Koordinierung des N₇ am Metallkomplex ist der chemische Verschiebungswert der H_{5'} um +0,13 tieffeldverschoben und bei 4,12 ppm zu finden. Der Hochfeldshift der H_{1'} ist mit -0,03 gering, so dass die Resonanz des Protons fast unverändert bei 5,90 ppm vorliegt, im Vergleich zu 5,93 im unkoordinierten Nukleotid.

Da das Protonen-NMR-Spektrum keinerlei eindeutige Hinweise auf eine $\kappa\text{-N}_7:\kappa\text{-N}'_7$ Koordinierung zeigte, wurde ein ¹⁹⁵Pt-NMR-Spektrum aufgenommen. Dort zeigte sich ein chemischer Verschiebungswert von -2530 ppm, der eine N₄-Umgebung am Platin kennzeichnet [119].

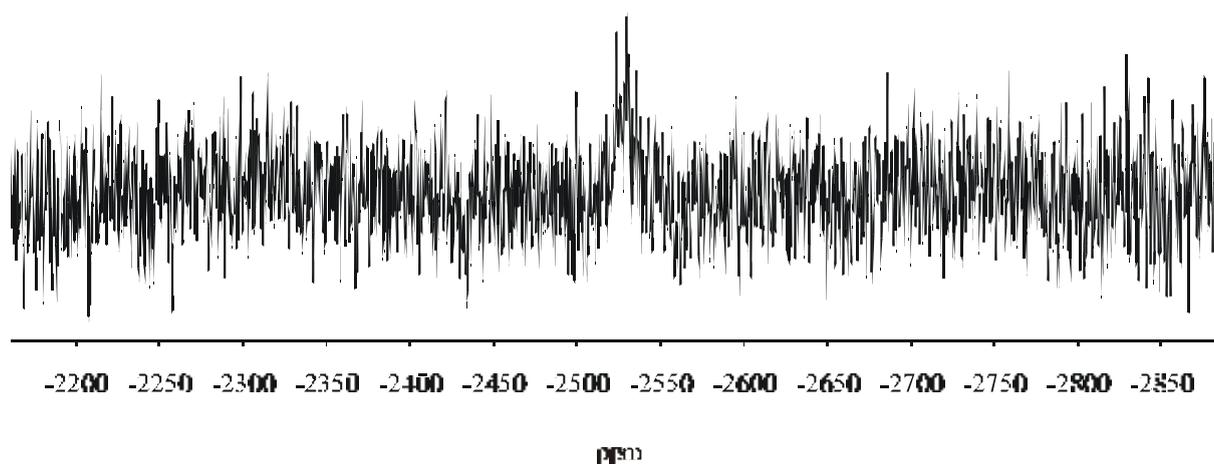


Abb. 9.19: ^{195}Pt -NMR-Spektrum des $\kappa\text{N}_7:\kappa\text{N}'_7$ -Produkts; (600MHz)

Die chemischen Verschiebungswerte und Aufspaltungsmuster werden Tabelle 9.5 präsentiert. Die massenspektrometrische Untersuchung bestätigt die 1:2 Stöchiometrie mit einem Molekülpeak bei $m/z = 1040$ (s. Tab 9.6). Im Fragmentierungsmuster lässt sich der Verlust einer Phosphateinheit und der beiden Amminliganden beobachten ($m/z = 931$).

Die 1:1:1-Stöchiometrie des vermuteten $\kappa^2\text{-S,N}_M:\kappa\text{-N}_7$ wurde mit Hilfe der der ESI / MS-Technik durch einen Molekülpeak mit $m/z = 812$ bestätigt, mit der Gerät spezifischen Genauigkeit von $\Delta = -3$ (s. Tab. 9.6). Das entspricht dem Komplex $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{N-Ac-MetH}_{1-}\text{OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)(5'\text{-GMP-}\kappa\text{-N}_7)]^+$.

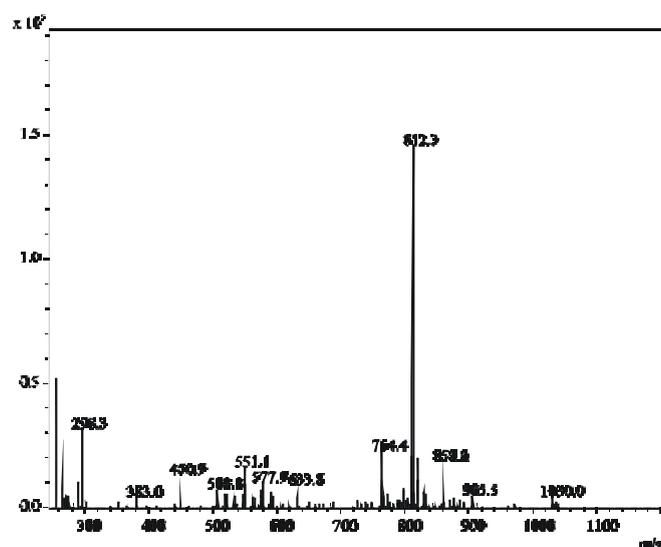


Abb. 9.20: ESI-MS-Spektrum des $\kappa^2\text{-S,N}_M:\kappa\text{-N}_7$ -Komplexes

Das vermutlich κ^2 -S,N_M: κ -N₇ koordinierte Produkt konnte in für die ¹H-NMR-Spektroskopie ausreichenden Konzentrationen isoliert werden.

Für die δ_M -Protonen findet man bei 2,33 ppm und 2,61 ppm Resonanzen, die mit den für die κ^2 -S,N_M-Spezies beobachteten Werte von 2,37 ppm und 2,63 ppm vergleichbar sind (s. Abb. 9.15).

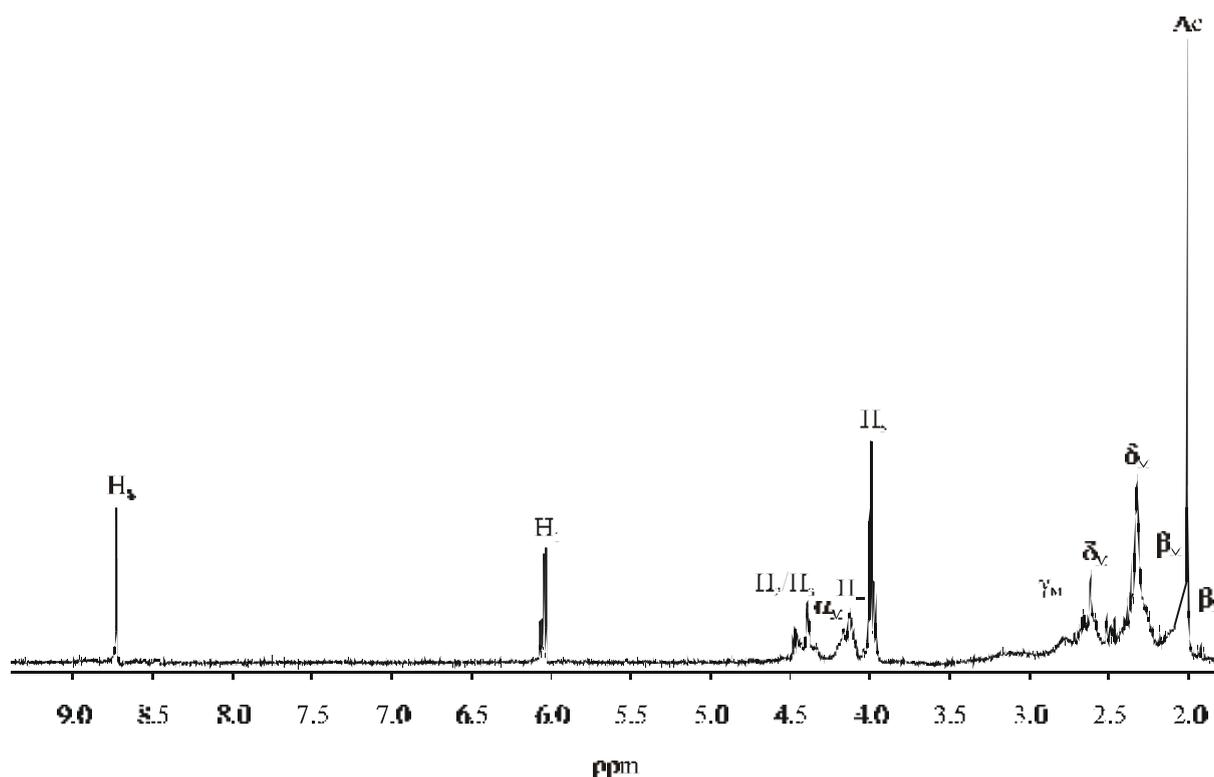


Abb. 9.21: ¹H-NMR-Spektrum des κ^2 -S,N_M: κ -N₇-Produkts; pH = 2,42

Man findet auch zwei Resonanzen für das α_M -CH bei etwa 4,21 ppm und 4,35 ppm, die mit Hilfe eines H,H-COSY-Spektrums zugeordnet werden konnten, wodurch erneute eine κ^2 -S,N_M bestätigt werden konnte.

Die Koordinierung des 5'-GMP²⁻ am N₇ verursacht einen Tieffeldshift des H₈-Protons, dessen Resonanz bei 8,86 ppm vorliegt. Die Resonanzen der H₂/H₃ und H₁ sind bei 4,38 ppm respektive 6,03 ppm zu finden (s. Tab. 9.5).

Die massenspektrometrische Untersuchung belegte aber eine äquimolare Zusammensetzung, so dass davon ausgegangen werden muss, dass ein Gemisch zwei unterschiedlicher Isomere

vorliegt. Die HPLC-chromatographische Untersuchung bestätigte dies, wobei sich die Retentionszeiten nur unwesentlich voneinander unterschieden.

Tab. 9.5: Chemische Verschiebungen und Aufspaltungsmuster des κ^2 -S,N_M: κ -N₇, des κ -N₇: κ -N'₇-Komplexes und 5'-GMP²⁻

Signalzuordnung	5'-GMP ²⁻	κ^2 -S,N _M : κ -N ₇	κ -N ₇ : κ -N' ₇
α_M		4,21 m; 4,35m	
β_M		1,98 – 2,30 m	
γ_M		2,40 – 3,20 m	
δ_M		2,61 s; 2,33 s	
Ac		2,00 s	
H ₈	8,20 s	8,86 s	8,45 s
H ₁ '	5,93 d	6,03 m	5,90 m
H ₂ '/H ₃ '	4,49 m	4,38 m	4,46 m
H ₄ '	4,32 m	4,12 m	4,32 m
H ₅ '	3,99 m	3,98 m	4,12 m
¹⁹⁵ Pt			- 2530
pH	6,20	2,42	2,83

Die Tabelle 9.6 stellt nochmals zusammenfassend die massenspektrometrischen Ergebnisse des κ^2 -S,N_M: κ -N₇- und des κ -N₇: κ -N'₇-Produkts vor.

Tab. 9.6: FAB / ESI-massenspektrometrische Daten des κ^2 -S,N_M: κ -N₇- und des κ -N₇: κ -N'₇-Komplexes

Peakzuordnung	κ^2 -S,N _M : κ -N ₇	κ -N ₇ : κ -N' ₇
[1:2]		1040 (1040)
[1:1:1]	812 (815)	
[1:1] - 2×NH ₃ - PO ₄		931 (931)

9.3 Diskussion

In diesem Kapitel wurden die Auswirkungen der Anwesenheit von schwefelhaltigen Peptiden bei Wechselwirkungen zwischen 5'-GMP²⁻ und dem Antitumorpräparat Cisplatin untersucht. Es wurden physiologisch relevante pH-Werte verwendet.

Die Untersuchungen der Reaktionen von Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻ zeigte die Bildung von $\kappa^2\text{-S,N}_M$, $\kappa^2\text{-S,N}_M:\kappa^2\text{-S',N}'_M$, $\kappa^2\text{-S,N}_M:\kappa\text{-N}_7$, $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7$ und $\kappa\text{-N}_7:\kappa\text{-N}'_7$, deren Charakterisierung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie, FAB-Massenspektrometrie, ESI / MS-Technik und UV / VIS-Spektroskopie erfolgte.

Der $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Chelat ist das Hauptprodukt der äquimolaren Umsetzungen von Cisplatin mit 5'-GMP²⁻ und N-Ac-Met-OH.

Ein Vergleich zum binären System Cisplatin / N-Ac-Met-OH zeigt, dass die maximale Konzentration des $\kappa^2\text{-S,N}_M$ in An- und Abwesenheit des Nukleotids bei äquimolaren Umsetzungen innerhalb des gleichen Zeitrahmens erreicht wird, dargestellt in Abbildungen 9.5 und 9.22.

Bei der zeitabhängigen Untersuchung des binären Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH bei pH = 6,70 (s. Abb. 9.22) wird innerhalb der ersten 24 Stunden neben einem nicht näher charakterisierten Nebenprodukt nur der bidentate $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Ac-MetH}_{1\text{-OH}}\text{-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ -Komplex gebildet, der auch im weiteren Verlauf der Inkubation das dominierende Hauptprodukt ist, im Gegensatz zu Studien von BRABEC ET. AL, der den monodentaten $\kappa\text{-S}$ -Komplex als Hauptprodukt dieser Reaktion vorschlug [121]. Seine Zuordnung beruht jedoch auf der Annahme, dass die Acetylfunktion als Schutzgruppe ausreicht um eine Stickstoffkoordinierung zu verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit und unter Zuhilfenahme molekulspektroskopischer und -spektrometrischer Methoden konnte allerdings eine Stickstoffkoordinierung trotz Schutzgruppe eindeutig nachgewiesen werden [106].

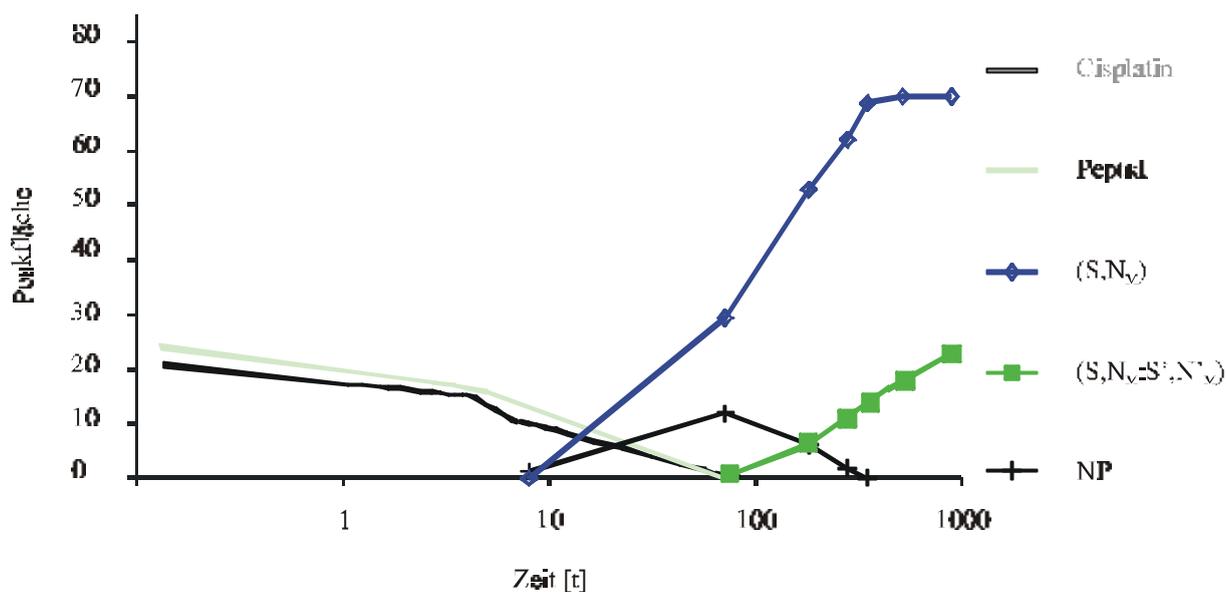


Abb. 9.22: zeitabhängige Produktverteilung des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH (1:1); pH = 6,70

Allerdings ist die Bildung der 1:2-Spezies $\kappa^2\text{-S}_M:\kappa^2\text{-S}'_M\text{-N}'_M$ in Anwesenheit von 5'-GMP²⁻ begünstigt (s. Abb. 9.5), da die Reaktion zwischen Nukleotid und Metallkomplex einen effektiven Peptidüberschuss bewirkt, der zu einer Favorisierung dieser 1:2-Spezies führt. Die Reaktionen von isoliertem $\kappa^2\text{-S}_M\text{-N}$ zeigen, dass diese Spezies in neutraler Lösung sehr stabil ist und nur sehr langsam mit dem Nukleotid reagiert. Dabei ist ein langsamer Transfer des Platins zum Nukleotid zu beobachten, es entsteht dabei sowohl der $\kappa^2\text{-S}_M:\kappa\text{-N}_7$ als auch vermutlich der $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7$. Letzterer wurde durch ESI / MS-Untersuchungen an dem 1:1:4 Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻-System nachgewiesen. SADLER ET AL. beschrieben für das System Cisplatin / L-Methionin / 5'-GMP²⁻ eine Ringöffnungsreaktion zu $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7$, die bei einem pH-Wert von etwa 4 beobachtet wurde [106]. Allerdings ist der $\kappa^2\text{-S}_M:\kappa\text{-N}_7$ das Hauptprodukt bei Umsetzungen von L-Methionin und Cisplatin im Beisein von 5'-GMP²⁻ [107].

Besagte Ringöffnung könnte auch die Abnahme an Oligonukleotid bei Reaktionen mit $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Ac-MetH}_{1-1}\text{-OH-}\kappa^2\text{-S}_M)]^+$ erklären, da dann die Entstehung des $\kappa\text{-N}_7:\kappa\text{-N}'_7$ als Folgeprodukt des Peptidverlusts plausibel wäre. SADLER ET AL. konnten für die monodentate $\kappa\text{-S}$ -Spezies bei Überschuss von 5'-GMP²⁻ feststellen, dass neben der $\kappa^2\text{-S}_M$ -Chelatbildung auch der $\kappa\text{-N}_7:\kappa\text{-N}'_7$ detektiert wurde [105-106].

BRABEC ET AL. schlugen für N-Acetylmethionin nur die $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7$ -Koordinierung vor [121], wengleich diese Ergebnisse, wie bereits zuvor erwähnt, aufgrund der vorschnellen Annahme einer Behinderung der N_M -Koordinierung in Frage zu stellen sind.

Bei Umsetzungen mit erheblichem Überschuss an 5'-GMP²⁻ entsteht als Hauptprodukt die $\kappa\text{-N}_7:\kappa\text{-N}'_7$ -Spezies, die über mehrere Wochen stabil ist. In Anwesenheit von Peptid zeigt der $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(5'\text{-GMP}-\kappa\text{-N}_7)_2]^{2-}$ keine Folgeprodukte. Der Vorläuferkomplex $\kappa\text{-N}_7$ konnte nicht detektiert werden, wie auch HAMBLEY schon bei Untersuchungen zu GpG feststellte [59]. Allerdings zeigte sich, dass die $\kappa\text{-N}_7:\kappa\text{-N}'_7$ -Spezies des 5'-GMP²⁻ in Abwesenheit von Peptiden eine Halbwertszeit von 6 Stunden besitzt. Im Gegensatz dazu beträgt diese bei Anwesenheit von N-Ac-Met-OH etwa 50 Stunden (s. Abb. 9.7), was bedeutet, dass die $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7$ -Spezies im Gegensatz zu Carboplatin / Peptid / 5'-GMP²⁻-Systemen die Reaktion zum $\kappa\text{-N}_7:\kappa\text{-N}'_7$ verlangsamt [33-34].

Man kann damit folgendes Reaktionsschema formulieren:

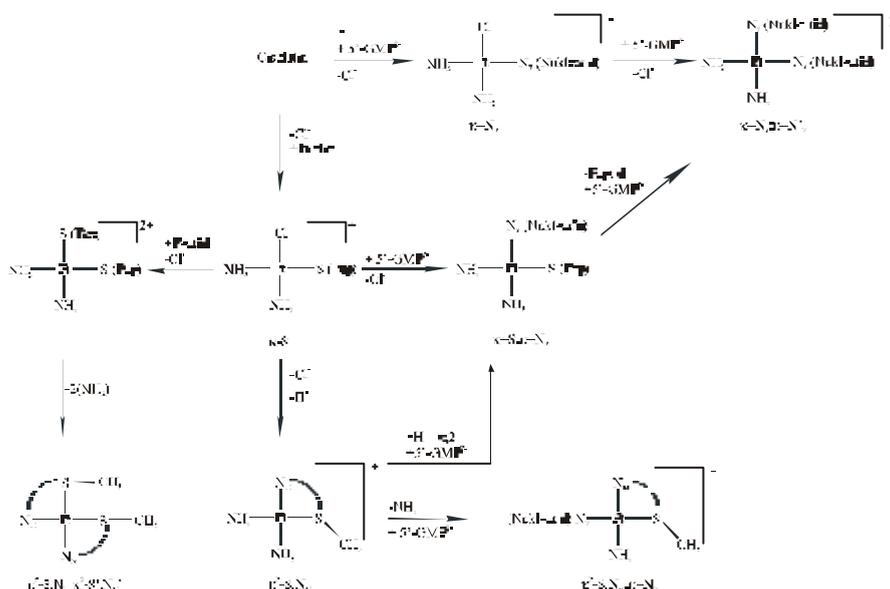


Abb. 9.23: Reaktionsschema für die Umsetzung von Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻

Die direkte Reaktion zwischen Platinkomplex und 5'-GMP²⁻ über das $\kappa\text{-N}_7$ -Intermediat konnte wie bereits erwähnt nicht experimentell bestätigt werden [105].

Darüber hinaus konnte eine Beschleunigung der Platinierung von Nukleotiden durch die Anwesenheit des N-Ac-Met-OH im System Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻ nicht bestätigt werden. Das κ^2 -S,N_M ist bei pH-Werten von etwa 7 kinetisch und thermodynamisch recht stabil, so dass eine Ringöffnungsreaktion mit 5'-GMP²⁻ unter diesen Bedingungen nicht zu beobachten ist. Dagegen zeigt Abb. 9.7, dass das gemischte κ -S: κ -N₇ unter Freisetzung von N-Ac-Met-OH langsam mit 5'-GMP²⁻ zum κ -N₇: κ -N'₇-Produkt weiterreagieren kann.

Für eine vollständige Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Cisplatin in vivo ist der Einsatz einer Modellverbindung sinnvoll, welche im Gegensatz zu 5'-GMP²⁻ die Bildung von κ^2 -N₇,N₇-Makrochelaten ermöglicht. Aus diesem Grunde sind Untersuchungen mit längeren DNA-Bruchstücken, wie zum Beispiel das Hexamer d-ATGGTA, aussagekräftiger als die des einfachen 5'-GMP²⁻. Darauf wird im nächsten Kapitel eingegangen.

10 Reaktionen von Cisplatin mit d-ATGGTA in Anwesenheit von N-Ac-Met-OH

10.1 Chromatographisches System

Für die chromatographische Trennung des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH / d-ATGGTA erwies es sich als notwendig mit einem 10 mM Ammoniumacetatpuffer zu trennen, unter der Verwendung von Acetonitril als organische Modifier. Eine optimale Trennung erfolgte mit dem Einsatz eines Stufengradienten, wobei der Anteil an MeCN nach 32 Minuten von 1% auf 7% erhöht wurde und nach 60 Minuten erfolgte eine erneute Konzentrationserhöhung auf 30% MeCN.

10.1.1 Kinetische Untersuchung des Systems $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Ac-MetH}_{1\text{-OH}}\text{-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ / d-ATGGTA

Es wurde eine analytische Reaktionslösung des Systems $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Ac-MetH}_{1\text{-OH}}\text{-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ / d-ATGGTA im Verhältnis 1:1 mit einer Einwaagekonzentration von 0,8 mM bezogen auf das Nukleotid angesetzt und fortlaufend chromatographiert. Die Inkubation fand bei 40° C statt.

Die zeitabhängige Auftragung der Signalflächen ist in Abbildung 10.1 dargestellt:

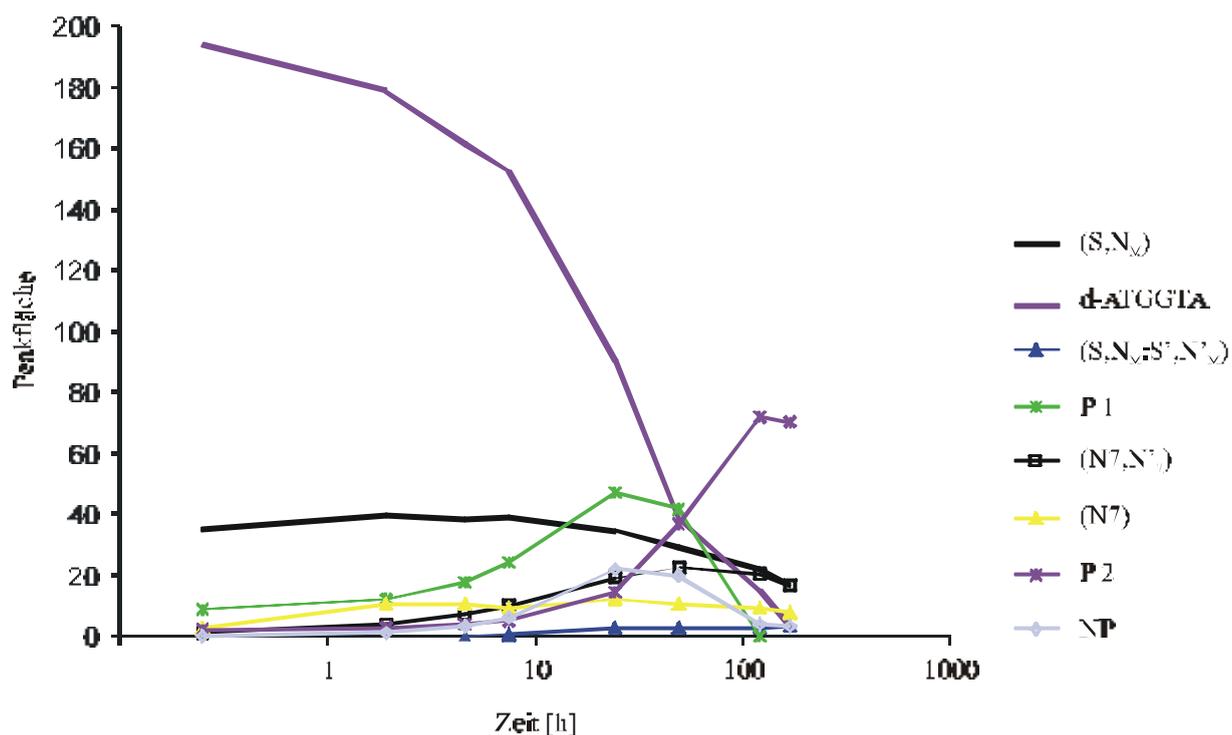


Abb. 10.1: zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(NH_3)_2(N\text{-Ac-MetH}_1\text{-OH-K-S, N}_M)]^+ / d\text{-ATGGTA (1:1); pH = 5,2$

Die Signalintensität des Metallfragments bleibt in den ersten 10 Stunden Reaktionsfrist konstant. Erst danach ist eine kontinuierliche Abnahme zu beobachten, wobei auch nach über 100 Stunden noch Metallkomplex in der Lösung ist. Das Nukleotid nimmt über den gesamten Zeitraum der Untersuchung ab und ist nach 100 Stunden abreagiert. Nach 12 Stunden wird der $\kappa^2\text{-S, N}_M:\kappa^2\text{-S', N}'_M$ Komplex detektiert, dessen Signalintensität nur gering zunimmt.

Innerhalb der ersten Stunde der Inkubation erscheint der monodentate $\kappa\text{-N}_7$ ($t_R = 66$ min), dessen Peakfläche im weiteren Verlauf nur leicht abnimmt. Fast zeitgleich kann der $\kappa\text{-N}_7:\kappa\text{-N}'_7$ ($t_R = 67$ min) detektiert werden. SADLER ET AL konnten eine Ringöffnung des $\kappa^2\text{-S, N}_M$ Komplexes bei $\text{pH} = 4$ nachweisen, der dann in Gegenwart von GpG zum $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7$ reagiert [106]. In diesen Untersuchungen zeigte sich ebenfalls, dass die Verdrängung von S-koordinierten Bioliganden durch die DNA-Modellverbindung vermutet werden kann, da eine weitere Spezies P2 mit einer kürzeren Retentionszeit ($t_R = 45$ min) erstmals nach 3 Stunden erscheint. Sie ist nach 100 Stunden das Hauptprodukt der Reaktion.

10.2 Ergebnisse und Diskussion

Die gewonnenen Erkenntnisse aus den Untersuchungen von Reaktionen mit Cisplatin oder Carboplatin und Nukleotiden in Anwesenheit von Peptiden zeigten, dass die Identifizierung der Produkte mit Hilfe der ESI / MS-Technik möglich ist [33]. Allerdings gelang bisher keine zufriedenstellende HPLC / ESI / MS-Kopplung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Nukleotid-Produktgemische deshalb mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie und der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie charakterisiert. Die N-terminal acetylierte Aminosäure ist die kleinste Modellverbindung für ein Peptid und daher ein häufig verwendeter Bioligand zur Imitierung des Reaktionsverhaltens zwischen Cisplatin und methioninhaltigen Peptiden in vivo [106, 121]. Die Reaktionsprodukte von Cisplatin / N-Ac-Met-OH-Systemen sind in dem vorangegangenen Kapitel 9 eingehend diskutiert worden.

Zur Untersuchung des Reaktionsverhaltens von DNA gegenüber $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -koordinierten Platin, wurde die Umsetzung des $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Ac-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ -Komplexes mit dem Hexamer auch durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie überprüft.

Die $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchung vom $\kappa^2\text{-S,N}_M$ mit Hexanukleotid (1:1; 80 mM) zeigt, dass bei hoher Eduktkonzentration nach einer 2-tägigen Inkubation bei $\text{pH} = 5,2$ und $T = 40^\circ\text{C}$ ein gemischtes Produkt entstanden ist. Die Signale der unkoordinierten Guaninprotonen bei 7,77 ppm und 7,90 ppm sind nicht mehr im Spektrum vorhanden.

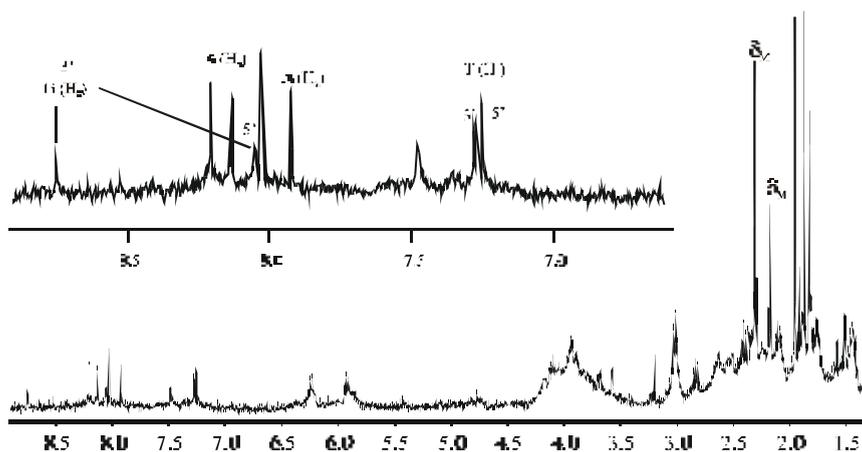


Abb. 10.2: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines 1:1 Reaktionsansatzes des Systems $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Ac-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ / d-ATGGTA-Gemisches; nach 48 Stunden; $\text{pH} = 5,20$; 30°C ; $c = 80\text{ mM}$

Im Vergleich zum unkoordinierten Nukleotid weisen die Protonen des Thymins (H_6) und des Adenins (H_2 , H_8) durch eine Koordination des Guanin- N_7 einen Tieffeldshift um 0,1 ppm. Das H_8 -Proton der 3'-Guanineinheit wird um +1,0 ppm tieffeldverschoben und ist bei 8,76 ppm zu finden. MARZILLI wies diesen Wert einer N_7 -Koordination zu [150]. Die Resonanz für H_8 -Proton der 5'-Guanineinheit ist um + 0,3 ppm tieffeldverschoben und ist somit bei 8,1 ppm zu finden.

Anhand der Methioninprotonen erwies sich eine Produktzuordnung als nicht möglich, da die Isomerenbildung beim κ^2 - S,N_M -Komplex zu einer Vielzahl an δ_M -Signalen im Bereich 2,3ppm – 2,6 ppm (s. Kap. 9. 2) führt.

Die massenspektrometrische Untersuchung zeigte neben dem Molekülpeak κ^2 - N_7,N'_7 -Komplexes ($m/z = 2086$) des einen Molekülpeak $m/z = 2260$, wobei damit nicht zwischen κ^2 - $S,N_M:\kappa$ - N_7 und κ - $S:\kappa^2$ - N_7,N'_7 unterschieden werden konnte.

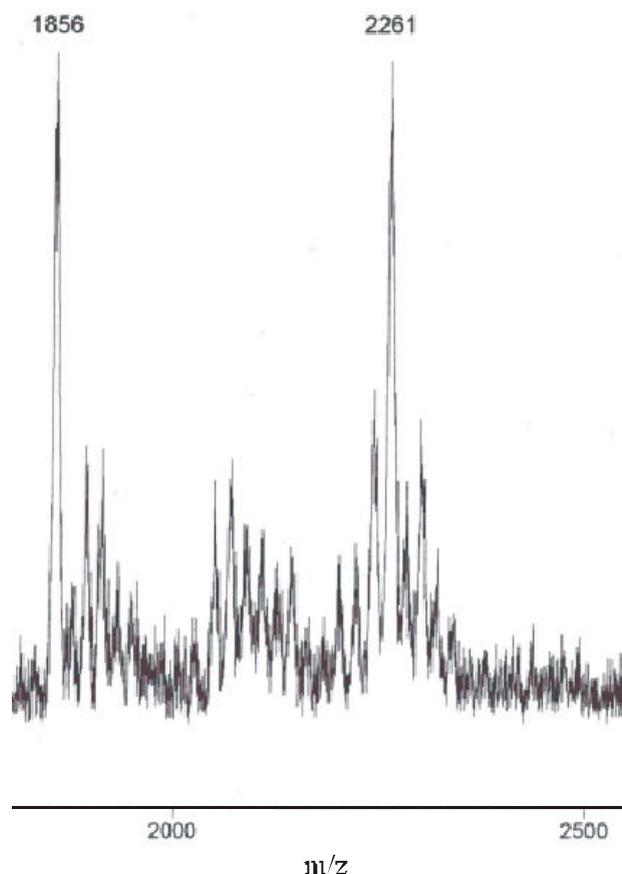


Abb. 10.3: Massenspektrum des $[Pt(NH_3)_2(N\text{-Ac-MetH}_1\text{-OH-}\mathbf{K}^2\text{-S,N}_M)]^+$: d-ATGGTA-Reaktionsgemisches nach 12 Stunden im Verhältnis 1:1; pH = 5,20

Nach Abbildung 10.1 muss dieser Peak zum Endprodukt P2 zugeordnet werden. Nach Vergleich mit dem Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'GMP²⁻-System kann davon ausgegangen werden, dass hier der κ^2 -S,N_M: κ -N₇-Komplex vorliegt. Spezies P1 in Abbildung 10.1 weist ein Maximum nach 30 Stunden auf und fällt bis 150 Stunden auf Null. P1 kann vermutlich zum gemischten κ -S: κ -N₇-Komplex als Vorläufer des κ^2 -N₇,N'₇-Bisaddukts zugeordnet werden.

Das Hauptprodukt des ternären Systems wurde NMR-spektroskopisch untersucht. Es zeigte sich im ¹H-NMR-Spektrum, dass die Reaktionen von Cisplatin mit dem Hexanukleotid in Anwesenheit von N-Ac-Met-OH bei pH = 5,2 innerhalb einer dreistündiger Inkubation einsetzen.

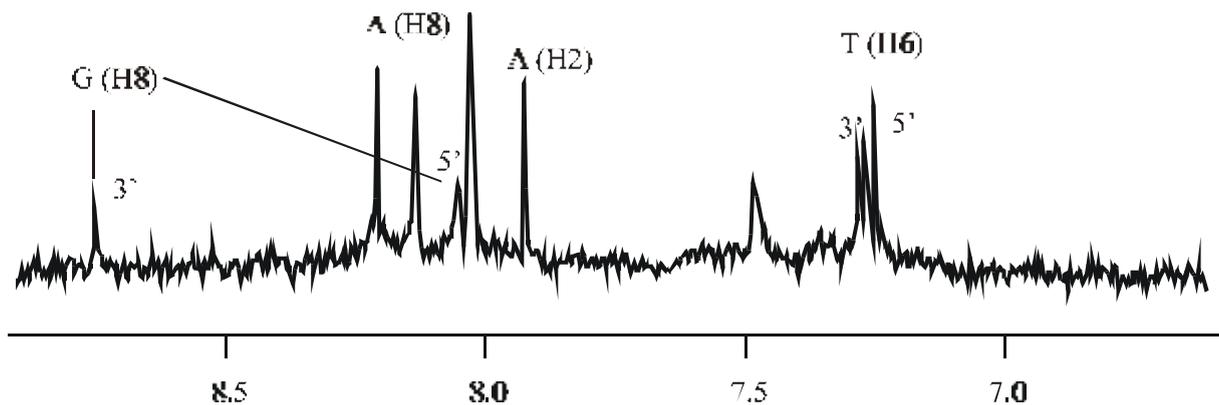


Abb. 10.4: ¹H-NMR-Spektrum eines 1:1 Reaktionsansatzes des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH / d-ATGGTA-Gemisches; nach 12 Stunden; pH = 5,20; 30° C; c = 80 mM

Ein ¹H-NMR-Spektrum nach 12 Stunden Inkubationszeit, dargestellt in Abbildung 10.4 zeigt, dass die Protonen des Thymins (H₆) und des Adenins (H₂, H₈) einen Tieffeldshift durch eine Koordination des N₇ um etwa 0,1 ppm erfahren haben. Das H₈-Proton der 3'-Guanineinheit wird um +1,0 ppm tieffeldverschoben und ist bei 8,76 ppm zu finden, was für eine κ -N₇-Koordination charakteristisch ist. Da die Zuordnung der Methioninprotonen unmöglich war, ist aus Übersichtsgründen nur der aromatische Bereich abgebildet worden. Nach 12 Stunden sind die Signale der unkoordinierten Guanin-H8-Protonen verschwunden, das bedeutet, dass die Bildung des κ^2 -N₇,N'₇-Bisaddukts bei der relativ hohen Eduktkonzentration schon in

kurzer Zeit abgeschlossen ist. Die massenspektrometrische Untersuchung bestätigt, ohne vorherige Trennung der Reaktionsprodukte, die Entstehung des $\kappa^2\text{-N}_7\text{:N}'_7$ und des $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Chelats.

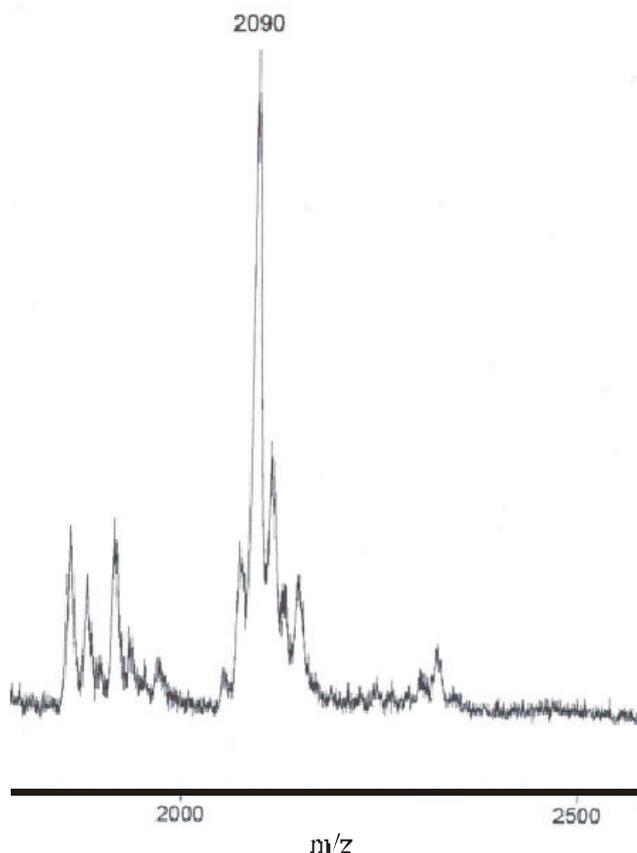


Abb. 10.5: Ausschnitt eines Massenspektrums des Cisplatin : N-Ac-Met-OH : d-ATGGTA-Reaktionsgemisches nach 12 Stunden im Verhältnis 1:1

Im Gegensatz zu analogen Systemen mit $5'\text{-GMP}^{2-}$ und der chromatographischen Untersuchung, vorgestellt in Abbildung 10.1, können nach 12 Stunden gemischte Produkte wie der $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa\text{-N}_7$ -Komplex in den MALDI-TOF-Spektren nicht beobachtet werden. Dies schließt die Bildung des $\kappa\text{-S:}\kappa\text{-N}_7$ -Komplexes als Intermediat allerdings nicht aus.

SADLER ET AL. zeigten bei Untersuchungen von GpG in Anwesenheit von N-Ac-Met-OH, dass sich das stabile monofunktionale Produkt $\kappa\text{-S:}\kappa\text{-N}_7$ bildet, in dem der Chlorligand des (en)PtCl₂ durch eine N₇ einer Guaninbase substituiert ist, wobei die konkurrierende Bildung des $\kappa^2\text{-S,N}_M$ auch berücksichtigt werden muss [106]. Bei pH = 4 zeigt sich, dass anschließend eine Abnahme an $\kappa^2\text{-S,N}_M$ stattfindet, da die Ringöffnung eintritt und sich der $\kappa\text{-S:}\kappa\text{-N}_7$ bildet. SADLER ET AL. konnten ebenfalls zeigen, dass GpG sehr viel langsamer als $5'\text{-GMP}^{2-}$

das S-kordiniertes Peptid im $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7$ -Komplex verdrängt, was er durch die Anwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen in größeren Nukleotideinheiten erklärte [106]. BRABEC ET AL. beobachteten ebenfalls eine Behinderung der Platinierung von DNA in Anwesenheit von Methionin, die er durch das Vorliegen als Edukt des für die DNA Koordination ungünstigen $\kappa^2\text{-S,N}_M$ erklärte [121]. Die entsprechenden Arbeiten mit längeren Peptiden von KLEINE bestätigen allerdings die Substitution eines Peptids im $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7$ -Komplex durch ein N_7 -Guaninatom [33-34].

Die Umsetzung des $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Ac-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ -Komplexes mit dem Hexamer zeigt, dass sich daraus der $\kappa\text{-N}_7:\kappa\text{-N}'_7$ langsam bildet (s. Abb. 10.1). Die massenspektrometrische Untersuchung dieses Systems belegt die Koordination der DNA und sprechen deshalb für die Entstehung eines gemischten $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7$ -koordiniertem Zwischenprodukts.

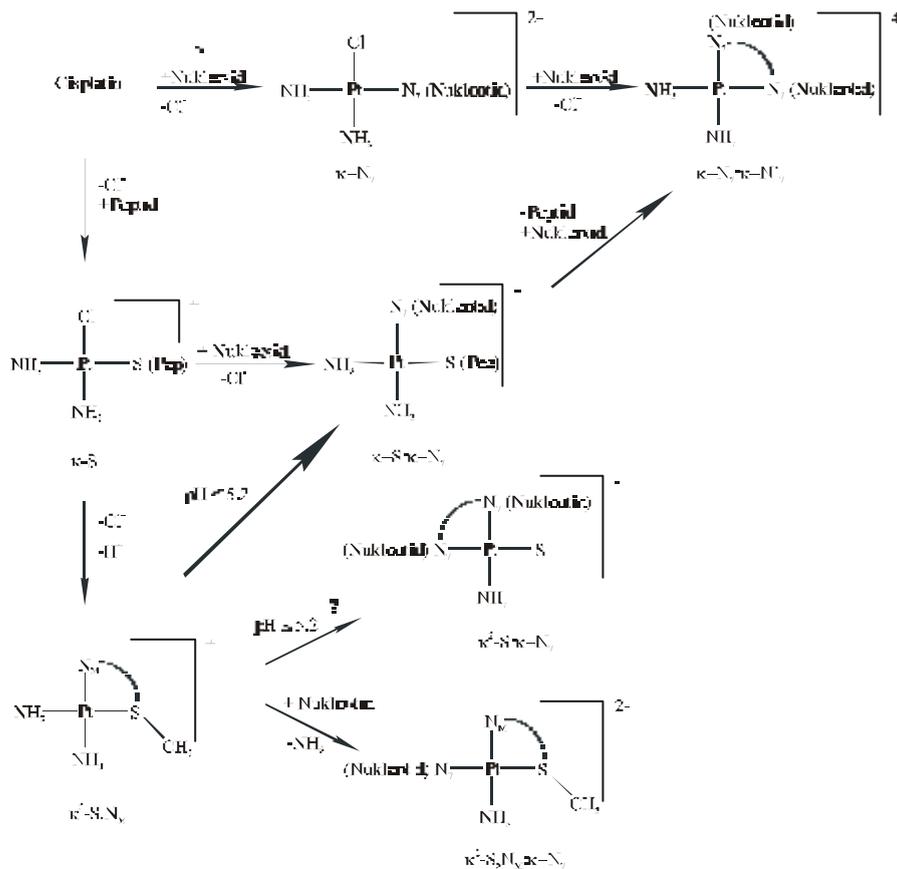


Abb. 10.6: Reaktionsschema für die Umsetzung von Cisplatin / N-Ac-Met-OH / d-ATGGTA³⁻

Wie auch schon bei den Untersuchungen des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'GMP² ist die κ^2 -S,N_M Ringöffnung und daraus resultierende κ -S: κ -N₇ zu berücksichtigen. Da in den hier vorgestellten Ergebnissen keine Unterscheidung zwischen κ -S: κ^2 -N₇:N₇' und κ^2 -S,N_M: κ -N₇ möglich war sind die Reaktionspfeile mit einem Fragezeichen versehen. Die massenspektrometrischen Untersuchungen ergaben, dass eine Nukleotid-Peptid-Platinverbindung vorliegt. Aber eine Aussage über die Koordinationssphäre am Platin konnte nicht getroffen werden. Die δ_M -Resonanzen des Methionins geben auf Grund der Isomerenbildung keine eindeutigen Hinweise auf Produktbildung.

Es zeigte sich, dass die Peptidmodellverbindung N-Ac-Met-OH für die analytische Untersuchung des Reaktionsverlaufs zwischen Cisplatin und DNA wenig geeignet ist. Für zukünftige Arbeiten ist es somit sinnvoll auf längere methioninhaltige Peptide als Modellverbindungen auszuweichen.

11 Zusammenfassung

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde zum einen der Einfluss eines aromatischen Liganden auf die Wechselwirkungen von cisplatinanalogen Komplexen mit methioninhaltigen Peptiden untersucht. Dabei wurden die Metallkomplexe AMD 494 und AMD 473 mit dem Peptid N-Ac-Gly-Gly-Met-OH umgesetzt. Die so gewonnenen Erkenntnisse wurden mit den mechanistischen Untersuchungen des Cisplatin und Carboplatin verglichen. Darüber hinaus wurden die Reaktionen von AMD 473 mit den Peptiden N-Ac-Met-OH, N-Ac-Gly-Gly-Met-OH und N-Ac-Gly-Met-Gly-OH untersucht, um den Einfluss einer Verlängerung des N-beziehungsweise C-terminalen Peptidrückgrats auf das Reaktionsverhalten dieses Platinkomplexes aufzuklären.

Zum anderen wurde das Reaktionsverhalten des Cisplatin gegenüber Nucleotiden, wie 5'-GMP²⁻ und d-ATGGTA, in An- und Abwesenheit von methioninhaltigen Peptiden untersucht, wobei N-Ac-Met-OH als Peptidmodellverbindung eingesetzt wurde.

Die Reaktionen der Pt(II)-Komplexe wurden sowohl zeit- als auch pH-abhängig untersucht. Die pH-abhängigen Untersuchungen dienen dazu, eine Aussage über die thermodynamisch stabilen Endprodukte zu treffen. Es wurden dazu Reaktionslösungen mit unterschiedlichen pH-Werten bei 40° C über 21 Tage inkubiert und fortlaufend chromatographiert. Die Verfolgung des zeitabhängigen Reaktionsverlaufs bei ausgewählten pH-Werten dient der Aufklärung des Reaktionsmechanismus. Zur Auftrennung der Produktgemische wurde die reversed-phase Ionenpaarchromatographie mit dem Ionenpaar-Reagenz Perfluorcarbonsäure PFP eingesetzt. Die besten Trennbedingungen wurden mit Methanol als organischen Modifizier erzielt. Durch Variation der Konzentration des organischen Modifiers und der Trenntemperatur konnten die Reaktionsgemische optimal getrennt werden, wobei die Temperatur zwischen 20° C und 25° C variierte. Der Einsatz von Stufengradienten ermöglichte die vollständige Trennung von schwach retardierenden Reaktionsprodukten und solchen mit langen Retentionszeiten in akzeptablen Analysezeiten. Die Trennung des Hexamersystems erfolgte mit einem Acetat / Acetonitrilpuffer.

Die Charakterisierung der semi-präparativ getrennten thermodynamisch stabilen Endprodukte erfolgte unter Zuhilfenahme der multinuklearen NMR-Spektroskopie (¹H, ¹⁹⁵Pt), sowie der ESI und FAB-Massenspektrometrie und der UV / VIS-Spektroskopie. Wichtige Intermediate

konnten mittels HPLC / ESI / MS-Kopplung identifiziert werden. Die ternären Hexamer / Metall / Peptid-Komplexe und binären Hexamer / Metall-Komplexe konnten nicht semi-präparativ getrennt werden. Der Koordinationsmodus wurde mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und der MALDI-Massenspektrometrie untersucht.

Ein Vergleich zwischen den Platinkomplexen AMD 494 und AMD 473 in den pH-abhängigen und den zeitabhängigen Produktverteilungen mit dem Peptid N-Ac-Gly-Gly-Met-OH zeigt die Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Reaktionsverhalten der beiden Komplexe mit methioninhaltigen Peptiden.

In dem System von AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH dominiert des $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Komplex, wobei bei höheren pH-Werten der Anteil des $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}$ unter Verlust des Pyridinliganden als weiteres Produkt zunimmt (s. Abb. 11.1). Die Bildung von 1:2-Produkten spielt bei Systemen von AMD 494 eine untergeordnete Rolle.

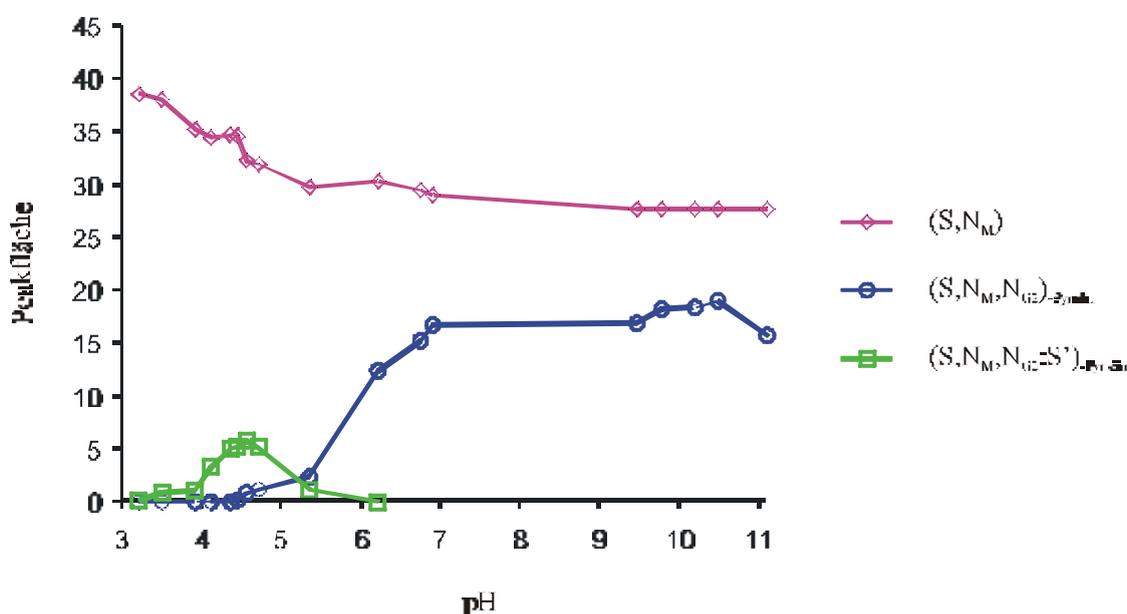


Abb. 11.1: pH-abhängige Produktverteilung des Systems AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH (1:1); Reaktionszeit (t) = 504 Stunden

Im Gegensatz dazu bildet sich bei AMD 473 über den gesamten pH-Bereich der tridentat-koodinierte $\kappa^3\text{-S,N}_M,\text{N}_{G2}$ und die $\kappa^2\text{-S,N}_M:\kappa\text{-S}'$ -Spezies, wobei der 1:2-Komplex das Hauptprodukt ist.

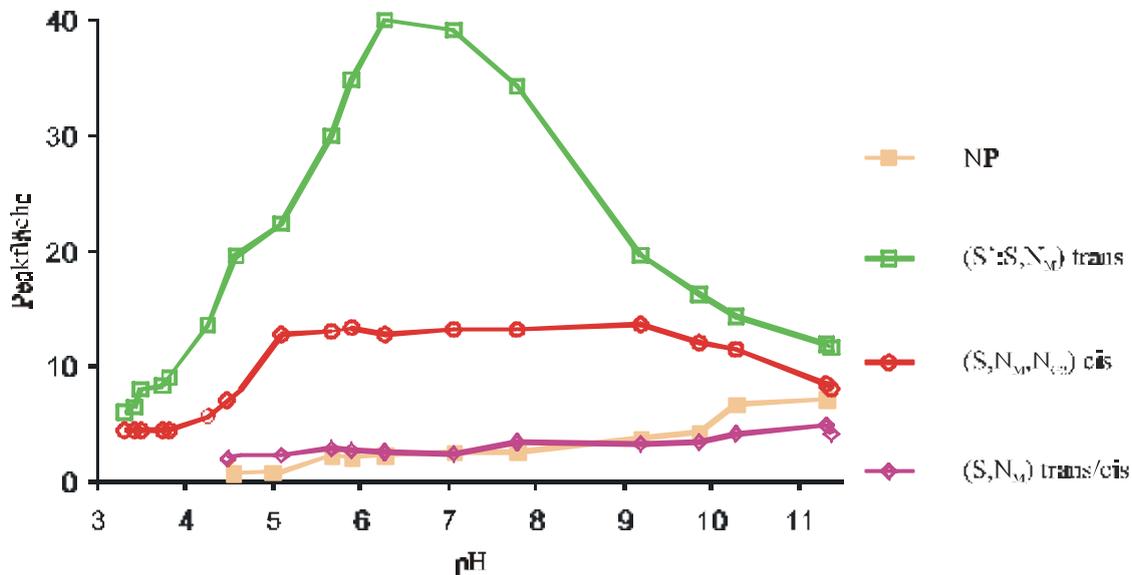


Abb. 11.2: pH-abhängige Produktverteilung des Systems $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+} / \text{N-Ac-Gly-Gly-Met-OH}$ (1:1) nach 21 Tagen

Eine ausreichende Labilisierung der Pt-N(Picolin)-Bindung aufgrund des großen Trans-Effekts des Thioether-Schwefelatoms kann nicht festgestellt werden, denn Produkte, die auf den Verlust des Picolins zurückzuführen wären, konnten innerhalb der gewählten Inkubationszeiten nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wird bei Reaktionen von AMD 494 mit N-Ac-Gly-Gly-Met-OH ein Verlust des Pyridins mit vergleichbarer Geschwindigkeit wie bei den transständigen Amminliganden des Cisplatin durch den Trans-Effekts des Schwefels erwirkt, so dass der Pyridin-freie $\kappa^3\text{-S,N}_M,\text{N}_{G2}$ beobachtet wird.

Allgemein kann damit folgendes formales Reaktionsschema für die Wechselwirkungen von AMD 494 und AMD 473 mit N-Ac-Gly-Gly-Met-OH formuliert werden:

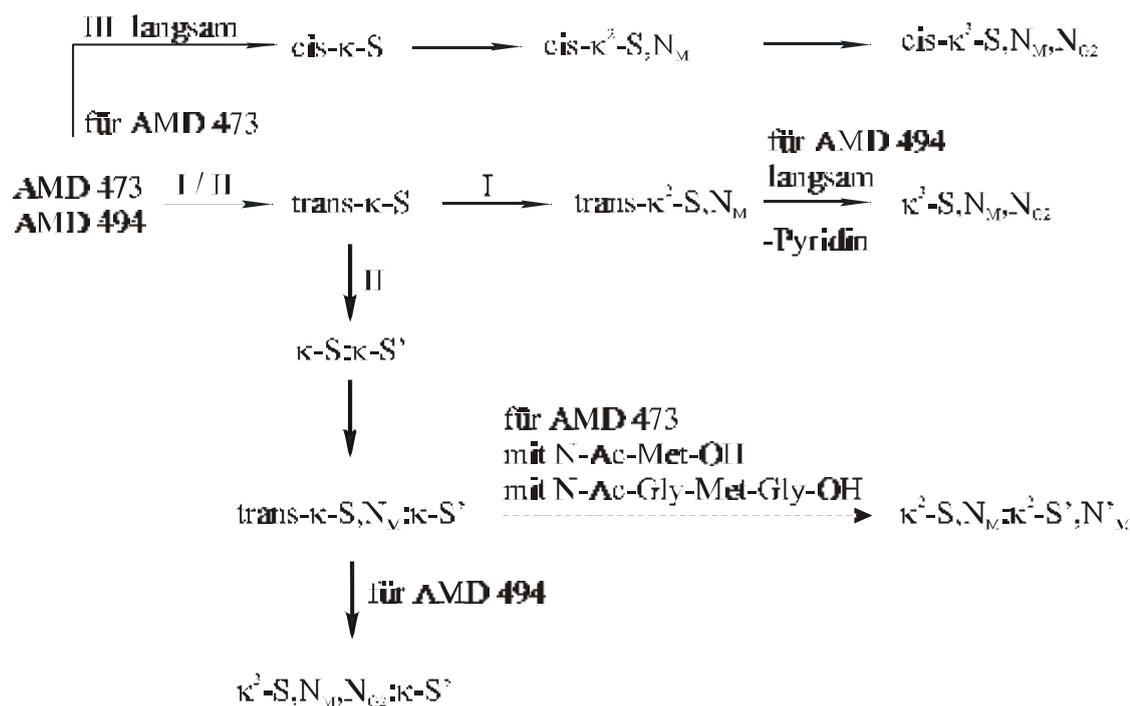


Abb. 11.3: formales Reaktionsschema für die Umsetzung von AMD 494 und AMD 473 mit N-Ac-Gly-Gly-Met-OH

Der ortho-Methyl-Substituent am Pyridin bei AMD 473 führt dazu, dass der Reaktionsweg II mit der Bildung der 1:2-Spezies für diesen Metallkomplex von größerer Bedeutung ist als Reaktionsweg I. Obwohl die κ^2 -S, N_M: κ -S'-Spezies für N-Ac-Gly-Gly-Met-OH bei pH \geq 6,1 stabil ist, konnte bei Umsetzungen von AMD 473 mit anderen methioninhaltigen Peptiden gezeigt werden, dass in 1:2-Komplexen bei kurzen N-terminalen Peptidketten (z. Bspl. Ac oder Ac-Gly) durchaus ein Verlust des Picolins zu beobachten ist (s. Kap. 7.5). Reaktionsweg III spielt für AMD 473 eine untergeordnete Rolle, da das Reaktionsverhalten durch die κ -S-Erstsubstitution trans zum aromatischen Liganden bestimmt wird. Die analoge H₂O/S(Thioether)-Substitution cis zum 2-Methylpyridin verläuft wesentlich langsamer und ist daher von geringerer Bedeutung.

Die Begünstigung des Reaktionswegs I für AMD 494 kann nur in der geringeren Sperrigkeit des Pyridinliganden begründet sein. Der Pyridinligand im trans- κ^2 -S, N_M-Komplex des AMD 494 wird hierbei zugunsten der Bildung eines tridentaten κ^3 -S, N_M, N_{G2}-Komplexes verdrängt. Reaktionsweg III hat für diesen Platinkomplex keine, Reaktionsweg II nur eine geringe Bedeutung.

Folgender Vergleich zwischen den Platinkomplexen AMD 494 und AMD 473 mit Cisplatin und Carboplatin in den pH-abhängigen Produktverteilungen und den zeitabhängigen Produktverteilungen mit dem Peptid N-Ac-Gly-Gly-Met-OH verdeutlicht die Unterschiede im Reaktionsverhalten der beiden Komplexe mit methioninhaltigen Peptiden.

Grundsätzlich ist die Produktbildung in Systemen Cisplatin / Peptid durch den Verlust von drei Substituenten und die Bildung der thermodynamisch stabilen $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}$ Spezies bestimmt. Darin besteht der größte Unterschied zum System AMD 494 und AMD 473. Hier scheint trotz der kinetischen Favorisierung der $\kappa\text{-S}$ -Erstsubstitution in der Position trans zum Pyridin / 2-Methylpyridin, nach einer Chelatisierung zum $\kappa^2\text{-S,N}_M$, der Verlust von Pyridin / 2-Methylpyridin entweder inhibiert oder thermodynamisch ungünstig zu sein. Hierbei wäre eine Labilisierung der Pt-N(Pyridin/ 2-Methylpyridin)-Bindung auf Grund des großen Trans-Effekts des Thioethers-Schwefelatom zu erwarten. Es zeigt sich in der Untersuchung von AMD 494 mit dem Peptid N-Ac-Gly-Gly-Met-OH beziehungsweise von AMD 473 mit den Peptiden N-Ac-Met-OH und N-Ac-Gly-Met-Gly-OH, erst nach einer Inkubationszeit bei 40° C, die weit über 100 Stunden liegt, nachweislich ein Aromatenverlust und die Bildung von Zerfallsprodukten, unter anderem der $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}$ - respektive $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa^2\text{-S',N}'_M$ -Komplex. Diese Beobachtungen weisen daraufhin, dass der Trans-Effekt des koordinierten Schwefels der Methionineinheit offensichtlich bei pH-Werten von $3 \leq \text{pH} \leq 11$ nicht ausreicht um den Verlust des Pyridins / 2-Methylpyridin mit gleicher Geschwindigkeit wie den des Amminliganden des Cisplatins zu bewerkstelligen. Der tridentat koordinierte $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}$ Komplex bei AMD 494 beziehungsweise die picolinfreien $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa^2\text{-S',N}'_M$ -1:2-Komplexe von AMD 473 werden erst nach einer wesentlich längeren Reaktionsphase detektiert.

Die Reaktion von Carboplatin mit Peptiden zeichnet sich durch eine initialisierende Ringöffnung aus. Das daraus resultierende $\kappa\text{-S}$ -Produkt ist relativ stabil und protegirt somit die kinetisch begünstigte Bildung des $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-S}'$. Der 1:2-Komplex reagiert über eine einfache Chelatisierung zum $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{:}\kappa\text{-S}'$, welches dann zum $\kappa^3\text{-S,N}_M\text{,N}_{G2}\text{:}\kappa\text{-S}'$ weiterreagiert. Da der letztgenannte 1:2-Komplex sowohl bei AMD 494 als auch bei Carboplatin gebildet wird, muss davon ausgegangen werden, dass der für Carboplatin nachgewiesene Vorläufer $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-S}'$ auch bei AMD 494 in geringeren wenn auch nicht nachweisbaren Konzentrationen entsteht. Das Produktspektrum des AMD 473 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH-Systems bekräftigt für den

sperrigeren Picolin-Liganden den hohen kinetischen Vorteil der κ -S: κ -S'-Spezies durch die beobachtete Bildung des κ^2 -S, N_M : κ -S'-Komplex als Hauptprodukt.

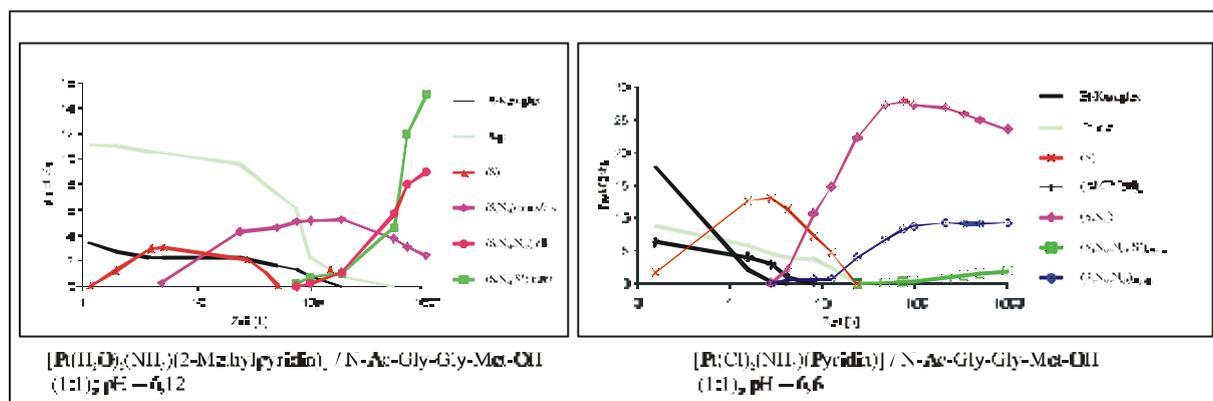


Abb. 11.4: Zeitabhängige Produktverteilungen der Systeme AMD 473 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH und AMD 494 / N-Ac-Gly-Gly-Met-OH

Allerdings können hier keine picolinfreien Produkte beobachtet werden, da wahrscheinlich die durch den aromatischen Liganden verursachte sterische Behinderung des längeren N-terminalen Ac-Gly-Gly-Peptidrückgrats eine Verdrängung des Picolins im Vergleich zum N-Ac-Met-OH und N-Ac-Gly-Met-Gly-OH kinetisch ungünstig macht. Daraus resultierende Folgeprodukte κ^2 -S, N_M : κ^2 -S', N'_M und κ^3 -S, N_M , N_{G2} : κ -S' konnten für N-Ac-Gly-Gly-Met-OH in den untersuchten Reaktionsfristen nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend gilt für alle Peptide, dass die Bildung der κ -S: κ -S' Intermediate bei AMD 473 und AMD 494 im Vergleich zu CDDP begünstigt werden müssen, da in Reaktionssystemen von AMD 473 und AMD 494 1:2-Produkte in wesentlich höheren Konzentrationen entstehen [16, 33]. Die konkurrierende κ^2 -S, N_M -Chelatisierung hingegen findet verlangsamt statt, da die Anwesenheit des cis-ständigen aromatischen Liganden eine Annäherung der Peptidseitenkette behindert. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Einführung eines ortho-Methyl-Substituenten, die Annäherung der Peptidseitenkette an das Metallzentrum weiter behindert (s. Kap. 7.5).

In den Reaktionen von Nukleotiden und Cisplatin in An- und Abwesenheit von methioninhaltigen Peptiden wurde N-Ac-Met-OH als Peptidmodellverbindung eingesetzt. Bei

der zeitabhängigen Untersuchung des ternären Systems von Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻ im stöchiometrischen Verhältnis 1:1:4 konnte innerhalb von zwei Stunden die κ -N₇: κ -N'₇-Spezies detektiert werden, deren Halbwertszeit hier etwa 50 Stunden beträgt. Die κ -N₇: κ -N'₇-Spezies des 5'-GMP²⁻ besitzt in Abwesenheit von methioninhaltigen Peptiden eine Halbwertszeit von 6 Stunden, was bedeutet, dass die Bildung einer κ -S: κ -N₇-Spezies im Gegensatz zu Carboplatin / Peptid / 5'-GMP²⁻-Systemen die Reaktion zum κ -N₇: κ -N'₇ signifikant verlangsamt [33]. Der κ -N₇-Vorläufer konnte nicht detektiert werden.

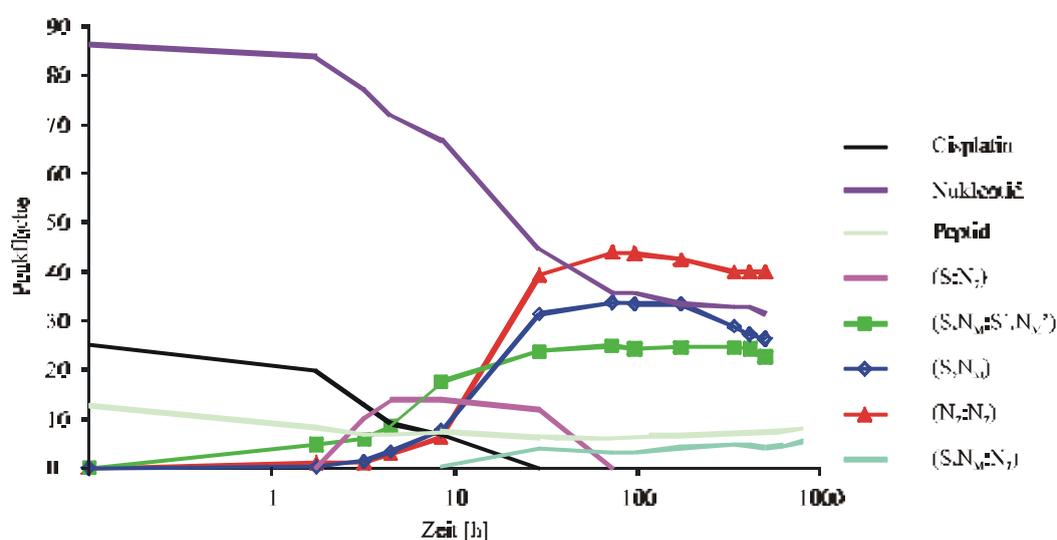


Abb. 11.5: zeitabhängige Produktverteilung des Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH / 5'-GMP²⁻ (1:1:4) ; pH = 7,06

Ein reaktionsmechanistischer Zusammenhang zwischen κ^2 -S,N_M und der κ -N₇: κ -N'₇-Spezies wurde durch eine zeitabhängige Studie ebenfalls bestätigt, in der nach zwölfstündiger Inkubation des binären Systems Cisplatin / N-Ac-Met-OH das Nukleotid 5'-GMP²⁻ nachträglich zugesetzt wurde (s. Abb. 11.6). Da bei pH = 6.2 eine langsame κ^2 -S,N-Ringöffnung möglich ist, muss die Bildung des κ -S: κ -N₇ ebenfalls berücksichtigt werden.

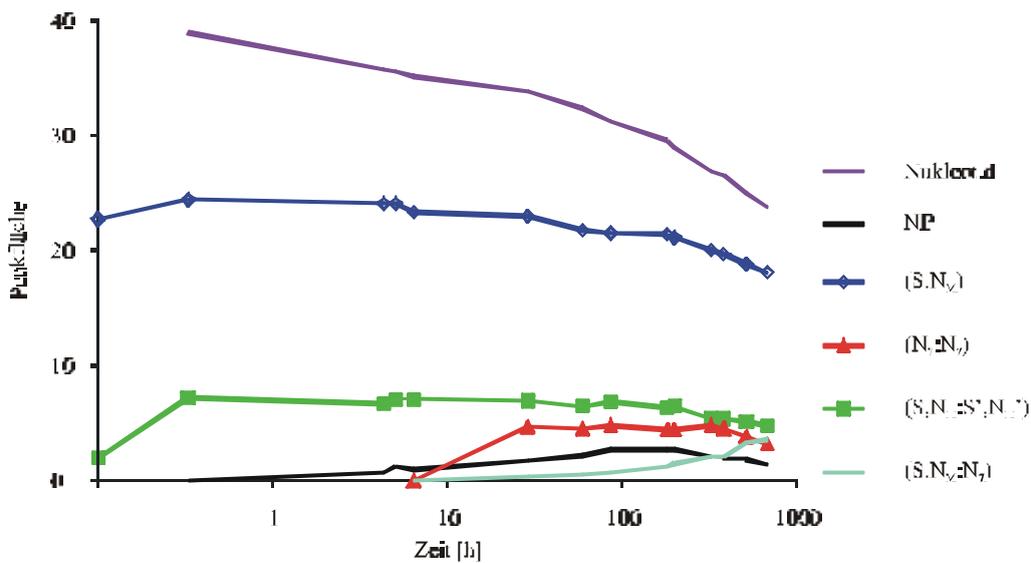


Abb. 11.6: zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[Pt(NH_3)_2(N\text{-Ac-Met-H-OH-}\kappa^2\text{-S, N}_M)]^+ / 5'\text{-GMP}^{2-}$ (1:1); pH = 6,20

Obwohl der $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7$ als Precursor nicht detektiert wurde, kann von einer Reaktion vom $\kappa^2\text{-S, N}_M$ über $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7$ zum $\kappa\text{-N}_7:\kappa\text{-N}'_7$ ausgegangen werden, da diese 1:2-Spezies schon nach 6 Stunden Inkubation erscheint und damit deutlich vor der alternativen $\kappa^2\text{-S, N}_M:\kappa\text{-N}_7$ -Spezies. Das Reaktionsschema von Cisplatin und $5'\text{-GMP}^{2-}$ in Gegenwart von N-Ac-Met-OH ist in der nachfolgenden Abbildung 11.7 präsentiert:

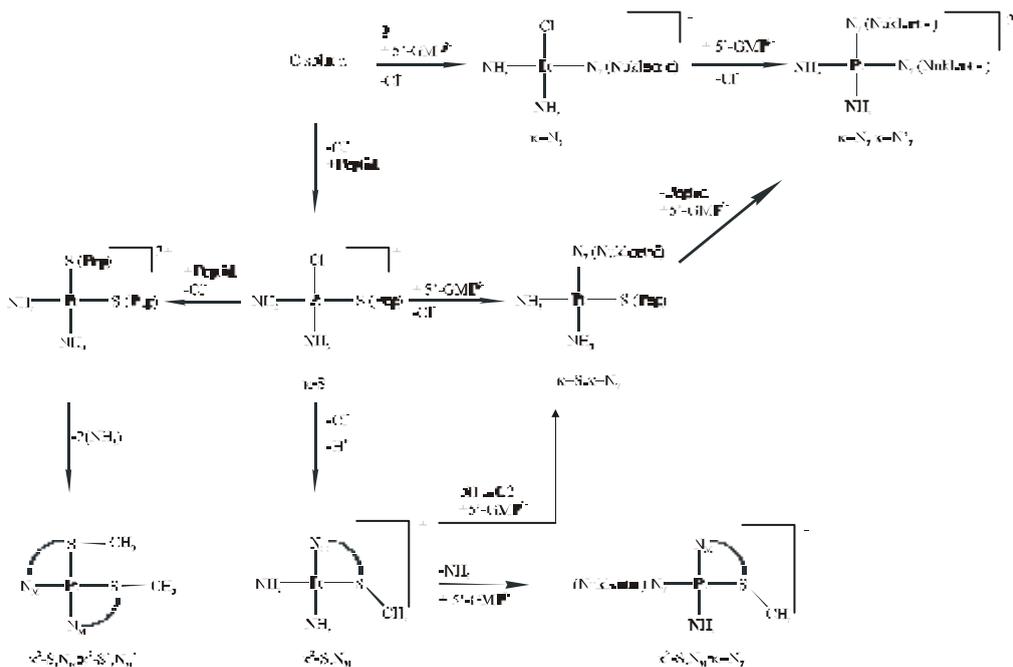


Abb. 11.7: Reaktionsschema für die Umsetzung von Cisplatin / N-Ac-Met-OH / $5'\text{-GMP}^{2-}$

In den weiterführenden Arbeiten wurde das 5-GMP^{2-} durch das Einzelstrangoligonukleotid $d\text{-ATGGTA}$ ersetzt und der pH-Wert der Reaktionslösungen auf $\text{pH} = 5.2$ eingestellt. Ziel dieser Untersuchungen war die Charakterisierung möglicher ternärer Produkte und Erkenntnis über den Einfluss der $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Chelatbildung auf die Reaktionen von DNA mit Peptid-Platin-Komplexen zu gewinnen.

In den hier vorgestellten Untersuchungen konnte die langsame Reaktion zwischen Cisplatin und DNA nach vorheriger Inkubation mit $N\text{-Ac-Met-OH}$ bestätigt werden. Obwohl eine Ringöffnung des gebildeten $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Chelats bei $\text{pH} = 5,2$ nur sehr langsam stattfindet, zeigt die Umsetzung des $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Ac-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+$ -Komplexes mit dem Hexamer, dass sich $\kappa^2\text{-N}_7\text{,N}'_7$ in signifikanten Konzentrationen bildet (s. Abb. 11.8).

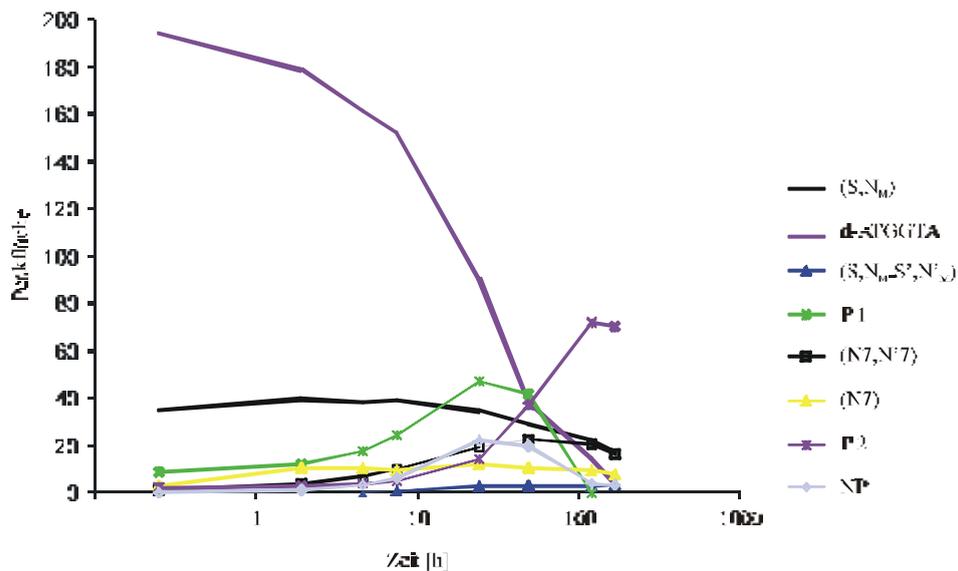


Abb. 11.8: zeitabhängige Produktverteilung des Systems $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{N-Ac-MetH}_1\text{-OH-}\kappa^2\text{-S,N}_M)]^+ / d\text{-ATGGTA}$ (1:1); $\text{pH} = 5,2$

Die massenspektrometrische Untersuchung dieses Systems belegt die $\kappa^2\text{-N}_7\text{,N}'_7$ -Koordination der DNA und auch die Entstehung eines gemischten Produkts.

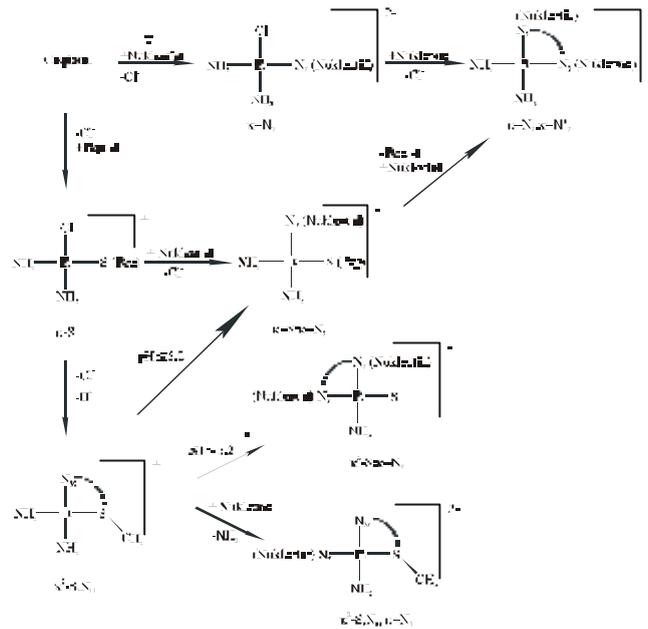


Abb. 11.9: Reaktionsschema für die Umsetzung von Cisplatin / N-Ac-Met-OH / d-ATGGTA

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

- a) In den Reaktionen von AMD 494 und AMD 473 wird eine Erstsitution des weichen Methionin-S-Atoms trans zum aromatischen Liganden deutlich favorisiert. Die Substitution des Chlorliganden in cis Position zum Pyridin / 2-Methylpyridin ist von untergeordneter Bedeutung. Der Trans-Effekt des Schwefels reicht bei AMD 494 und AMD 473 nicht aus um die Pt-N(aromatischer Ligand)-Bindung entscheidend zu schwächen, so dass der Verlust des dritten Liganden wesentlich langsamer geschieht als bei Cisplatin.
- b) Eine weitere Erhöhung der Sperrigkeit des Pyridinliganden durch die Einführung eines ortho-Methyl-Substituenten begünstigt die Bildung des $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-S}'$ -Precursors, wodurch eine Bevorzugung seiner 1:2-Nachfolgeprodukte $\kappa^2\text{-S},\text{N}_M:\kappa\text{-S}'$, $\kappa^3\text{-S},\text{N}_M,\text{N}_{G2}:\kappa\text{-S}'$ beziehungsweise $\kappa^2\text{-S},\text{N}_M:\kappa^2\text{-S}',\text{N}'_M$ bewirkt wird.

- c) Die vollständige Charakterisierung der Produkte aus dem Reaktionssystem Cisplatin / $5'$ -GMP²⁻ / N-Ac-Met-OH wurden unter Zuhilfenahme der ESI-Massenspektrometrie und der multinuklearen NMR-Spektroskopie erreicht. Es wurde festgestellt, dass durch die Bildung von binären und ternären Peptidkomplexen die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Nukleotid und Cisplatin in Anwesenheit eines methioninhaltigen Peptids signifikant abnimmt. Das Vorliegen eines $\kappa\text{-S} \rightarrow \kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7 \rightarrow \kappa\text{-N}_7:\kappa\text{-N}'_7$ -Reaktionswegs für den Platintransfer konnte bestätigt werden.
- d) Die für $5'$ -GMP²⁻ gewonnenen Erkenntnisse konnten durch die Ergebnisse des Cisplatin / N-Ac-Met-OH / d-ATGGTA ergänzt werden. Die Umsetzung des bidentaten $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Komplexes mit dem Hexamer führt sowohl zu einer Bildung des $\kappa^2\text{-N}_7,\text{N}'_7$ -Komplexes als auch zu einer gemischten $\kappa^2\text{-S,N}_M\text{-}\kappa\text{-N}_7$ -Spezies.
- e) Der Einsatz von N-Ac-Met-OH als Modell für methioninhaltige Peptide erwies sich allerdings nicht als optimal, da die Reaktion zum $\kappa^2\text{-S,N}_M$ -Chelat sehr schnell abgeschlossen war. Die nachfolgende Ringöffnungsreaktion findet bei den untersuchten pH-Werten nur sehr langsam statt, so dass daraus resultierende Produkte wie $\kappa\text{-S}:\kappa\text{-N}_7$ und $\kappa^2\text{-N}_7,\text{N}'_7$ nur in geringer Konzentration detektiert werden können.

12 Experimenteller Teil

12.1 Darstellung der Ausgangsverbindungen

12.1.1 Darstellung von AMD 494

AMD 494 wurde nach der Methode von BOREHAM ET AL hergestellt [151].

Es werden 1,7 g $K_2[PtCl_4]$ in 17ml H_2O gelöst und unter Rühren bis auf 40° C erwärmt. Der Platinkomplexlösung werden 2,8 g KI zugesetzt, welches zuvor in 5 ml H_2O suspendiert wird. Die Lösung wird weitere 5 Minuten gerührt. Danach werden 0,35 g Pyridin in gesättigter KOH-Lösung zugesetzt und 30 Minuten gerührt. Anschließend werden 0,21g NH_4Cl in gesättigter KOH-Lösung zugesetzt und wiederum für 0,5 Stunden gerührt. Währenddessen fällt ein dunkelgelber feiner Feststoff aus, der abgenutscht wird und zuerst mit heißem Wasser, Ethanol und Diethylether gewaschen wird. Die zurückbleibende gelbe Substanz wird an der Luft getrocknet und gewogen.

Der Komplex wird mit 2 Äquivalenten $AgNO_3$ versetzt und im Dunkeln für 24 Stunden gerührt. Das ausgefallene AgI wird abzentrifugiert und dem Filtrat werden 0,6 g KCl zugesetzt. Nach 45 Minuten bei 50° C kann die Entstehung eines hellgelben Niederschlags beobachtet werden, der nach weiteren 15 Minuten im Eisbad gekühlt und sofort abzentrifugiert wird.

Ausbeute: $1,2 \text{ g} = 3,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} = 80,5 \%$ der theoretischen Ausbeute

Summenformel: $C_5H_8N_2Cl_2Pt$ $M = 362,5 \text{ g/mol}$

FAB-Massenspektrum:	m/z (%)	Zuordnung
	362 (100)	$[M]^+$

12.1.2 Darstellung von AMD 473

Es werden 1,7 g $K_2[PtCl_4]$ in 17ml H_2O gelöst und unter Rühren bis auf 40° C erwärmt. Der Platinkomplexlösung werden 2,8 g KI zugesetzt, welches zuvor in 5 ml H_2O suspendiert wird [151]. Die Lösung wird weitere 5 Minuten gerührt. Danach werden 0,42 g Picolin in gesättigter KOH-Lösung zugesetzt und 30 Minuten gerührt. Anschließend werden 0,21g

NH_4Cl in gesättigter KOH -Lösung zugesetzt und wiederum für 0,5 Stunden gerührt. Währenddessen fällt ein dunkelgelber feiner Feststoff aus, der abgenutscht wird und zuerst mit heißem Wasser, Ethanol und Diethylether gewaschen wird. Die zurückbleibende gelbe Substanz wird an der Luft getrocknet und gewogen.

Der Komplex wird mit 2 Äquivalenten AgNO_3 versetzt und im Dunkeln für 24 Stunden gerührt. Der ausgefallene AgI -Niederschlag wird abzentrifugiert und dem Filtrat werden 0,6 g KCl zugesetzt. Nach 45 Minuten bei 50°C kann die Entstehung eines hellgelben Niederschlags beobachtet werden, der nach weiteren 15 Minuten im Eisbad gekühlt und sofort abzentrifugiert wird.

Ausbeute: $0,8 \text{ g} = 3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} = 52,5 \%$ der theoretischen Ausbeute

Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$ $M = 378,5 \text{ g/mol}$

FAB-Massenspektrum:	m/z (%)	Zuordnung
	362 (100)	$[\text{M}]^+$

12.1.3 Darstellung von $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)(2\text{-Methylpyridin})]^{2+}$

Es werden 1 mM AMD 473 mit 2mM AgNO_3 versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur verrührt. Der AgCl -Niederschlag wird abzentrifugiert und die darüber stehende Lösung abpipettiert. Der Niederschlag wird noch dreimal mit Wasser gewaschen, die erhaltenen Lösungen vereint und entsprechend verdünnt.

12.1.4 Darstellung von acetylgeschützten N-Ac-Gly-Gly-Met-OH und N-Ac-Gly-Met-Gly-OH

Es wurden 305,8 g Peptid in etwa 100 ml Essigsäure gelöst und mit 400 μl Acetanhydrid versetzt. Die Reaktionslösung wird bei 35°C ca. 5 Stunden gerührt. Danach wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der verbleibende reinweiße Feststoff unter Hochvakuum etwa 30 Minuten getrocknet. Die Lagerung fand bei -80°C statt.

12.2 Darstellung der Reaktionslösungen

12.2.1 Analytische Reaktionslösungen für die Chromatographie

Die Darstellung der analytischen Chromatographielösungen für die pH-abhängigen Untersuchungen erfolgte volumetrisch. Es werden je eingesetztem Äquivalent jeweils 2 ml 4 mM Platinkomplex- und Peptidstammlösung mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette in einen 10 ml Messkolben überführt. Diese wurden durch Einwaage des Peptids bzw. des Platinkomplexes und anschließendem Lösen in 50 ml bidestilliertem Wasser hergestellt. Zur Einstellung des pH-Wertes wurden Äquivalente 0,1 M HNO₃ oder 0,1 M NaOH zugesetzt. Dabei entspricht 1 Äquivalent 80 µl Säure oder Base. Anschließend wurde mit H₂O auf 10 ml aufgefüllt.

Die so hergestellten Lösungen für die pH-abhängigen Versuchsreihen wurden bei 42° C im Brutschrank für 21 Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die pH-Werte gemessen, die Lösungen chromatographiert und anschließend im Kühlschrank bei ca. 4° C aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen ändern sich sowohl der pH-Wert als auch die Zusammensetzung nicht mehr.

Die Herstellung der Lösungen für die kinetischen Untersuchungen erfolgte durch Einwaage von 0,8 mM Platinkomplex und 0,8 mM Peptid und anschließendem Lösen in 10 ml Wasser. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 0,1 M HNO₃ bzw. 0,1 M NaOH eingestellt. Hierbei entspricht ebenfalls 1 Äquivalent 80 µl Säure oder Base. Diese Reaktionslösungen wurden über den gesamten Untersuchungszeitraum bei 42° C inkubiert.

Die Reaktionen von Cis- und Carboplatin mit Nukleotiden wurden bei pH = 5,2 im Puffer durchgeführt. Hierzu diente ein KH₂PO₄/ Na₂HPO₄-Puffer, hergestellt nach der Vorschrift aus den Labortabellen von Merck [152]. Die Einwaage der Reaktionspartner verlief analog zu der zuvor beschriebenen Methode.

12.2.2 Reaktionslösungen für semi-präparative Ansätze

Für die semi-präparativen Lösungen wurden 50 ml der 1 mM Platinstammlösung vorgelegt und die entsprechende Menge Peptid zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 0,1 M HNO₃ bzw. 0,1 M NaOH eingestellt. 1 Äquivalent entspricht hierbei 0,5 ml Säure oder Base. Die Lösungen wurden bis zu 21 Tagen bei 42° C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf

etwa 5 ml eingengt und mit Hilfe der RPICP-Chromatographie in 0,5 ml-Portionen getrennt. Die getrennten Fraktionen wurden aufgefangen und das anfallende Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Es verbleibt ein zähflüssiger Rückstand, der im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend mit Diethylether verrieben wurde. Der Ether wurde danach wieder abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis ein weißes Pulver zurückblieb.

12.3 Chromatographisches System

Der Volumenstrom wurde während aller Messungen konstant bei 0,8 ml/ min gehalten. Die Wellenlänge des UV/Vis-Detektors betrug 220 nm. Die computerunterstützte Datenaufnahme erfolgte mit Hilfe des Eurochrom Integration Package (Version 1.5) incl. eines 20 Bit A/ D-Wandlers der Firma Knauer mit einer Datensammelrate von 1 Hz.

Das Volumen der Probenschleife betrug bei allen analytischen Messungen 20 μ l, es wurden immer 80 μ l dosiert, um eine vollständige Füllung der Schleife zu erreichen.

Als Eluent diente sowohl bei der analytischen als auch bei der semi-präparativen Trennung der Platin / Peptid- und Platin / Peptid / 5-GMP²⁻-Systeme ein Gemisch aus MeOH, H₂O und 0,1 % PFP als Ionenpaarreagenz.

Die Trennsäulen wurden jeden Tag vor Gebrauch mit 15 ml Wasser vorgespült und dann mindestens 15 Minuten der gewünschte Eluent durch die Säule gepumpt. Nach jeder Säulenbenutzung wurden 15 ml Wasser und 90 ml Methanol zur Säulenreinigung aufgespült.

12.3.1 Herstellung der chromatographischen Säule

Für die analytischen Trennungen wurde die Säule selbst gepackt. Hierzu wurde ein Edelstahl-Leerrohr mit einem Innendurchmesser von $d_c = 4$ mm und einer Länge von 25 cm mit Nucleosil-100-C₁₈-Material (endcapped) von Machery & Nagel mit einer Korngröße von $d_p = 5$ μ m gepackt [153].

Dazu wurden 2,4 g des Füllmaterials in einem Gemisch aus 10 ml Dioxan und 10 ml Toluol für etwa 2 min im Ultraschallbad suspendiert. Nach der Zugabe von 25 ml Cyclohexanol wurde die Suspension weitere 5 min im Ultraschallbad homogenisiert. Über ein Füllrohr, wurde die Suspension sofort in die Leersäule überführt. Das Füllrohr wurde mit MeOH

aufgefüllt. Der benötigte Packungsdruck wurde von einer Merck HPLC-Gradientenpumpe erzeugt. Anschließend wurde die Säule mit 200 ml Methanol gespült.

Die Säule zur semi-präparativen Trennung wurde von Herrn Dr. Scheidt vom Lehrstuhl für Organische Chemie II der Ruhr-Universität Bochum mit Nucleosil-100-C₁₈-Material (endcapped) mit einem Teilchendurchmesser von $d_p = 10 \mu\text{m}$ gepackt.

Die selbstgepackten Säulen wurden mit zwei unterschiedlichen Testgemischen bei einem Fluss von 0,7 ml/min und einer Detektorwellenlänge von 254 nm getestet [82-83]. Die nachfolgende Tabelle zeigt die verwendeten Testgemische und Testeluenten.

Tab. 12.1: Zusammensetzung der Testgemische und Testeluenten [82]

	Testgemisch 1	Testgemisch 2
Komponenten	Uracil Acetophenon Benzol Toluol	Aceton Phenol p-Kresol 2,5 Xylenol Phenetol
Lösungsmittel des Testgemisches	60 % MeOH 40 % H ₂ O	80 % MeOH 20 % H ₂ O
Zusammensetzung des Testeluenten	66 % MeOH 34 % H ₂ O	63 % MeOH 37 % H ₂ O

Es wurden symmetrische Peaks mit einer Bodenzahl von etwa 40.000 m^{-1} erhalten.

Das Totvolumen wurde mit einem Fluss von 0,7 ml und bei einer Detektorwellenlänge von 254 nm bestimmt. Das ermittelte Totvolumen betrug im Durchschnitt 2,4 ml.

12.3.2 Verwendete Chromatographen

Der Chromatograph setzt sich aus einer HPLC-Gradientenpumpe vom Typ LiChrom L-6200, einem Säulentermostat L-3760 und einem LiChroGraph UV / VIS-Detektor L-4250 der Firma Merck. Das Injektionssystem bestand aus einem 6-Wege Injektionsventil der Firma Rheodyne (Modell 7125) in Verbindung mit einer 20 μl Probenschleife.

Der optische Lichtweg der Detektorzelle betrug 5 mm.

Für die semi-präparativen Trennungen wurde eine Anlage bestehend aus einer Knauer HPLC-Pumpe (Typ 64), einem Knauer Injektionsventil A0258 mit einer 2 ml-Probenschleife und einem Merck L-4000A UV-Detektor verwendet.

Die Detektorzelle besitzt hier einen Lichtweg von 2 mm.

12.4 NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der FID's erfolgte durch Herrn Gartmann und Herrn Barchan der SC-Abteilung der Ruhr-Universität Bochum an den FT-NMR-Spektrometern DRX 400 und DRX 600 der Firma Bruker. Die ^1H -Spektren wurden bei der Frequenz von 400.13 MHz bzw. 600.13 MHz gemessen. Als Lösungsmittel dienten D_2O oder bei den Nukleotidansätzen Puffer in D_2O , denen als Frequenzstandard Natrium-3-(Trimethylsilyl)propionat- D_4 (TSP) [$\delta = 0,0$] zugesetzt wurde. Für alle Proben wurden 5 mm Probenröhrchen verwendet. Die ^{195}Pt -Spektren wurden DRX 600 Spektrometer bei $\nu = 85,74$ MHz und einer spektralen Breite von 129 kHz aufgenommen. Als externer Standard diente hier eine an $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ gesättigte 1 M NaCl-Lösung [$\delta = -1628$].

Die 400 MHz-Spektren wurden bei Raumtemperatur. Für die Auswertung und Bearbeitung der Spektren diente das Programm WIN-NMR 6.0 der Firma Bruker. Alle Angaben zur chemischen Verschiebung beziehen sich auf die δ -Skala. Für die Beschreibung der Aufspaltungsmuster der Signale werden folgende Abkürzungen eingeführt: s = Singulett, d = Dublett, m = Multiplett.

12.5 Massenspektrometrie

Die FAB-Massenspektren der Platin / Peptid-Komplexe wurden von Herrn Dr. Wolters und seinen Mitarbeitern der SC-Abteilung der Ruhr-Universität Bochum an einem VG Autospec Massenspektrometer der Firma Fisons durchgeführt. Dabei wurde 3-Nitrobenzylalkohol als Matrix und eine Cäsium-Ionenquelle verwendet.

Die ESI-Messungen wurden von Herrn Dr. Wolters von der SC-Abteilung der Fakultät für Chemie ebenfalls durchgeführt. Hierzu stand ein Massenspektrometer Esquire3000plus der Firma Bruker zur Verfügung. Als Probenlösungen dienten die Analytischen Reaktionslösungen, die durch eine direkte HPLC-ESI Kopplung getrennt wurden.

Die FAB-Massenspektren der binären Platin / Nukleotid- und ternären Platin / Peptid / Nukleotid-Komplexe wurden von Herrn Breuckmann vom Lehrstuhl für Organischen Chemie I der Ruhr-Universität Bochum aufgenommen.

12.6 Sonstiges

Alle Reaktionslösungen wurden in einem Brutschrank der Firma Heraeus vom Typ B 6060 inkubiert.

Zur Bestimmung der pH-Werte diente entweder eine Glaselektrode der Firma Schott, oder eine Mikroglaselektrode der Firma Hamilton (Schaftlänge 180 mm). Kalibriert wurden beide Elektroden mit NBS-Puffern bei pH = 4,01 und pH = 9,21.

Die angegebenen pH-Werte sind für den Isotopeneffekt des Deuteriums unkorrigiert und müssen für Vergleiche um 0,41 Einheiten erhöht werden [142].

12.7 Verwendete Chemikalien

Das Cisplatin wurde von der Firma Chempur, die Peptide N-Ac-Met-OH und H-Gly-Gly-Met-OH bei der Firma Bachem erworben. 5'-GMP²⁻ wurden von der Firma Sigma bezogen. Um die Synthese des Hexamers d-ATGGTA kümmerte sich die Firma Invitrogen. Das K₂[PtCl₄] stammt aus einer Spende der Firma Hüls-Degussa. Das bidestillierte Wasser wurde mit einer Anlage der Firma Köttermann hergestellt. Das Methanol und Acetonitril mit HPLC-Qualität sowie das NaOAc und NH₄OAc wurden bei der Firma Baker und die Pentafluorpropionsäure (PFP) von der Firma Acros erworben. Das Pyridin und 2-Methylpyridin wurden bei der Firma Merck käuflich erworben.

13 Literaturverzeichnis

- [1] WHO; Pressemitteilung; **2003**
- [2] Deutsche Krebshilfe; Informationsmaterial; **2003**
- [3] Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 257., neu bearb. Aufl., de Gruyter, Berlin, New York, **1994**
- [4] Krebs - Tumoren, Zellen, Gene (Hrsg.: V. Schirmacher), Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, Heidelberg, **1990**
- [5] B. Rosenberg, L. van Camp, T. Krigas; Nature; **1965**; 205; 698
- [6] B. Rosenberg, E. Renshaw, L. van Camp, J. Hartwick, J. Drobník; J. Bacteriol.; **1967**; 93; 716
- [7] Rosenberg, L. van Camp, E. B. Grimley, A. Y. Thomson; J. Biol. Chem.; **1967**; 242; 1347
- [8] B. Rosenberg, L. van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour; Nature **1969**; 222; 385
- [9] B. Rosenberg in: B. L. Lippert (Ed.); Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug, Wiley VCH, Weinheim; **1999**
- [10] M. Peyrone, Liebigs Annalen; **1844**; 51; 1-29
- [11] W. I. Sundquist, D. P. Bancroft, L. Chassot, S. J. Lippard; J. Am. Chem. Soc.; **1988**, 110, 8559
- [12] C. A. McAuliffe in F. R. Hartley (Ed.); Chemistry of the Platin Group Metals; Recent Developments; **1991**; Elsevier; Amsterdam
- [13] E. R. Jamieson, S. J. Lippard; Chem. Rev.; **1999**; 99; 2467-2498
- [14] R. B. Martin in: B. L. Lippert (Ed.); Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug, Wiley VCH, Weinheim; **1999**
- [15] R. B. Martin in: S. J. Lippard (Ed.); Platinum, Gold and other Metal Chemotherapeutics Agents, ACS Symposium 209; Am. Chem. Soc.; Washington DC; **1983**
- [16] M. Hahn; Dissertation; Ruhr-Universität Bochum; **2000**
- [17] S.E. Miller; D. A. House; Inorg. Chim. Acta; **1990**; 173; 53-60
- [18] T. Yotsuyanagi, M. Usami, Y. Noda, M. Nagata; Int. J. Pharm.; **2002**; 95-104
- [19] D. P. Bancroft; C. A. Lepre; S. J. Lippard; J. Am. Chem. Soc.; **1990**; 112; 6860-6871
- [20] Y. Jung; S. J. Lippard; Biochemistry; **2003**; 42; 2664-2671

- [21] A. Eastman in: B. L. Lippert (Ed.); Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug, Wiley VCH, Weinheim; **1999**
- [22] E. Holler in Metal Complexes in Cancer Chemotherapy (Hrsg.: B. K. Keppler); VCH; Weinheim, Basel, New York, Cambridge, Tokyo; S. 37-71; **1993**
- [23] S. L. Bruhn, J. H. Toney, S. J. Lippard in S. J. Lippard (Ed.); Progress in Inorganic Chemistry: Bioinorganic Chemistry; Vol. 38; John Wiley & Sons, Inc.; New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore; **1990**
- [24] G. Chu; J. Biol. Chem.; **1994**; 269; 787
- [25] W. R. Waud; Cancer Res.; **1987**; 47; 6549
- [26] K. Micetich, L. A. Zwelling, K. W. Kohn; *ibid.*; **1983**; 43; 3609
- [27] S. L. Kelley, A. Baus, B. A. Teicher, M. P. Hacker, D. H. Hamer, J. S. Lazo; Science **1988**; 241; 1813
- [28] A. Eastman, N. Schulte; Biochemistry; **1988**; 27; 4730
- [29] P. A. Andrews, S. B. Howell; Cancer Cells; **1990**; 2; 35
- [30] M. A. Jakupec, M. Galanski; B. K. Keppler; Rev. Physiol. Biochem. Pharmacia.; **2003**; 146; 1-53
- [31] M. J. Cleare; J. D. Hoeschele; Plat. Met. Rev.; **1973**; 17; 2-13
- [32] M. J. Cleare; J. D. Hoeschele; Bioinorg. Chem.; **1973**; 2; 187-210
- [33] M. Kleine; Dissertation; Ruhr-Universität Bochum; **2003**
- [34] M. Kleine, D. Wolters, W. S. Sheldrick; J. Inorg. Biochem.; in press; **2003**
- [35] J. J. Gullo, C. L. Litterst, P. J. Maguire, B. J. Sikis, D. F. Holth, P. V. Woodley; Cancer Chemother. Pharmacia.; **1980**; 5; 21-26
- [36] J. Reedijk; J.-M. Teuben in: B. L. Lippert (Ed.); Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug, Wiley VCH, Weinheim; **1999**
- [37] Y. Chen, Z. Guo, S. Parsons, P. J. Sadler, Chem. Eur. J.; **1998**; 4; 672-676
- [38] F. I. Raynaud, F. E. Boxall, P. M. Goddard, M. Valenti, M. Jones, B. A. Murrer, M. Abrams, L. R. Kelland; Clin. Cancer Res.; **1997**; 3; 2063-2074
- [39] L. R. Kelland in: L. R. Kelland, N. P. Farrell (Eds); Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy; Humana Press Inc.; Totowa; NJ; **2000**
- [40] D. P. Bancroft, C. A. Lepre, S. J. Lippard; J. Am. Chem. Soc.; **1990**; 112; 6860-6871
- [41] N. P. Johnson; J. D. Hoeschele, R. O. Rahn; Chem.-Biol. Interactions; **1980**; 30; 151
- [42] H. Ushay, T. D. Tullius, S. J. Lippard; J. Biochemistry; **1981**; 20; 3744

- [43] D. L. Bodener, P. C. Dedon, P. C. Keng, R. F. Borch; *Cancer Res.*; **1986**; 46; 2745
- [44] A. C. G. Götze, Y. Chen, T. W. Hambley, S. Parsons, N. A. Kratochwil, J. A. Parkinson, V. P. Munk, P. J. Sadler, *Eur. J. Inorg. Chem.*; **2002**; 1035-1039
- [45] L. R. Kelland in: B. L. Lippert (Ed.); *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley VCH, Weinheim; **1999**
- [46] Y. Chen, J. A. Parkinson, Z. Guo, T. Brown, P. J. Sadler, *Angew. Chem.*; **1999**; 111; 2192-2196
- [47] Z. Guo, P. J. Sadler in A. G. Sykes (Ed) *Advances in Inorganic Chemistry*; Academic Press; **1999**; Vol 49;
- [48] T. Oe, Y. Tian, P. J. O'Dwyer, D. W. Roberts, M. D. Malone, C. J. Bailey, I. A. Blair; *Anal. Chem.*; **2002**; 74, No. 3; 591-599
- [49] T. Oe, Y. Tian, P. J. O'Dwyer, D. W. Roberts, C. J. Bailey, I. A. Blair; *J. Chrom. B*; **2003**; 792, 217-227
- [50] J. Holford, F. I. Raynaud, B. A. Murrer, K. Grimaldi; J. A. Hartley, M. Abrams, L. R. Kelland; *Anti-Cancer Drug Des.*; **1998**; 13; 1-18
- [51] L. R. Kelland, S. Y. Sharp, C. F. O'Neill, F. I. Raynaud, P. J. Beale, I. R. Judson; *J. Inorg. Biochem.*; **1999**; 77; 111-115
- [52] P. Mistry, L. R. Kelland, G. Abel, S. Sidhur, K. R. Harrap; *Br. J. Cancer*; **1991**; 64; 215
- [53] J. Holford, S. Y. Sharp, B. A. Murrer, M. Abrams, L. R. Kelland; *Br. J. Cancer*; **1998**; 77; 366-373
- [54] F. I. Raynaud, F. E. Boxall, T. Wong, K. Goddard, B. Nutley, B. A. Murrer, M. Abrams, L. R. Kelland; *Annals Oncol.*; **1998**; 9 (Suppl. 2); Abstr. 190
- [55] J. Holford, P. J. Beale, F. E. Boxall, S. Y. Sharp, L. R. Kelland; *Eur. J. Cancer.*; **2000**; 36; 1984-1990
- [56] T. Peleg-Shulman, Y. Najajreh, D. Gibson; *J. Inorg. Biochem.*; **2002**; 91; 306-311
- [57] Y. Chen, Z. Guo, J. A. Parkinson, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc., Dalton's Trans.*; **1998**; 3577-3585
- [58] F. Reeder, Z. Guo, P. del Murdoch, A. Corazza, T. W Hambley, S. J. Berners-Price, J.-C. Chottard, P. J. Sadler, *Eur. J. Biochem.*; **1997**; 249; 370-382
- [59] T. Hambley; *J. Chem. Soc.*; **2001**; 2711-2718

- [60] P. del Socorro Murdoch, Z. Guo, J. A. Parkinson, P. J. Sadler; *J. Biol. Inorg. Chem.*; **1999**; 4; 32-38
- [61] C. Bauer, T. Peleg-Shulman, D. Gibson, A. H.-J. Wang; *Eur. J. Biochem.*; **1998**; 256; 253-260
- [62] J. Kasparikova, V. Marini, Y. Najajreh, D. Gibson, V. Brabec; *Biochemistry*; **2003**; 42; 6321-6332
- [63] F. Gonnet, J. Kozelka, J.-C. Chottard; *Angew. Chem.*; **1992**; 104; 1494-1496
- [64] F. Reeder, F. Gonnet, J. Kozelka, J.-C. Chottard; *J. Inorg. Biochem.*; **1996**; 2; 1069-1076
- [65] K. J. Barnham, S. J. Berners-Price, T. A. Renkiel, U. Frey, P. J. Sadler, *Angew. Chem.*; **1995**, 107, 2040-2043
- [66] M. Iwamoto; S. Mukundan Jr.; L. G. Marzilli; *J. Am. Chem. Soc.*; 116; **1994**; 6238-6244
- [67] F. Kraatz in: B. K. Keppler (Ed.); *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*; VCH, Weinheim; **1993**
- [68] Y. Chen, P. J. Sadler in: B. L. Lippert (Ed.); *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley VCH, Weinheim; **1999**
- [69] O. Heudi, A. Cailleux, P. Allain; *J. Inorg. Biochem.*; **1998**; 61-69
- [70] J. Kozelka, F. Legendre, F. Reeder, J.-C. Chottard; *Coord. Chem. Rev.*; **1999**; 190-192; 61-82
- [71] F. Legendre; V. Bas, J. Kozelka, J.-C. Chottard; *Chem. Eur. J.*; **2000**; 6; 2002-2010
- [72] R. E. Norman; J. D. Ranford, P. J. Sadler; *Inorg. Chem.*; **1992**; 31; 877-888
- [73] T. G. Appleton, J. R. Hall, S. F. Ralph; *Aust. J. Chem.*; **1986**; 39; 1347-1362
- [74] P. del Socorro Murdoch, J.D. Ranford, P.J. Sadler, S. J. Berners-Price; *Inorg. Chem.*; **1993**; 32; 2249-2255
- [75] A. I. Ivanov, J. Christodoulou, J. A. Parkinson, K. J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow, P. J. Sadler; *J. Biol. Chem.*; **1998**; 273; 14721-14730
- [76] M. C. Cox, K. J. Barnham, T. A. Frenkiel, J. D. Hoeschele, A. B. Mason, Q.-Y. He, R. C. Woodworth, P. J. Sadler; *J. Biol. Inorg. Chem.*; **1999**; 4; 621-631
- [77] L. Trynda-Lemiesz, H. Kozłowski, B. K. Keppler; *J. Inorg. Biochem.*; **1999**; 77; 141-146

- [78] C. S. Allardyce, P. J. Dyson, J. Coffley, N. Johnson; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; **2002**; 16; 933-935
- [79] D. Gibson, C. E. Costello; *Eur. Mass Spectrom.*; **1999**; 5; 501-510
- [80] Y. Najajreh, T. Peleg-Shulman, O. Moshel, N. Farrell, D. Gibson; *J. Biol. Inorg. Chem.*; **2003**; 8; 167-175
- [81] D. Wolters, Dissertation; Ruhr-Universität Bochum; **1999**
- [82] A.F.M. Siebert; Dissertation; Ruhr-Universität Bochum; **1995**
- [83] A. F. M. Siebert, W. S. Sheldrick; *J. Chem. Soc., Daltons Trans.*; **1997**; 385
- [84] T. G. Appleton, J. R. Hall, P. D. Prenzler; *Inorg. Chem.*; **1989**; 28; 815-819
- [85] T. G. Appleton, J. R. Hall, P. D. T. W. Hambley, Prenzler; *Inorg. Chem.*; **1990**; 29; 3562-3569
- [86] T. G. Appleton, J. R. Hall, D. W. Neale, C. S. M Thompson; *Inorg. Chem.*; **1990**; 29; 3985-3595
- [87] D. Wolters, W. S. Sheldrick; *J. Chem. Soc., Daltons Trans.*; **1999**; 1121-1129
- [88] J. Reedijk; *Chem. Rev.*; **1999**; 99; 2499-2510
- [89] T. G. Appleton in: B. L. Lippert (Ed.); *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley VCH, Weinheim; **1999**
- [90] T. G. Appleton; *Coord. Chem. Rev.*; **1997**; 166; 313-359
- [91] T. G. Appleton; J. W. Connor; J. R. Hall; *Inorg. Chem.*; **1988**; 27; 130-137
- [92] E. L. M: Lempers, J. Reedijk; *Inorg. Chem.*; **1990**; 29; 1880-1888
- [93] S. S. G. E. van Boom, J. Reedijk; *J. Chem. Soc.; Chem. Commun.*; **1993**; 1397-1398
- [94] J.-M. Teuben, S. S. G. E. van Boom, J. Reedijk; *J. Chem. Soc.; Daltons Trans.*; **1997**; 3979-3980
- [95] S. S. G. E. van Boom, B. W. Chen, J.-M. Teuben, J. Reedijk; *Inorg. Chem.*; **1999**; 38, 1450-1455
- [96] M. Hahn, D. Wolters, W. S. Sheldrick, F. B. Hulsbergen, J. Reedijk; *J. Biol. Inorg. Chem.*; **1999**; 4; 412-420
- [97] C. D. W: Fröhling, W. S. Sheldrick; *Chem. Commun.*; **1997**; 1737-1738
- [98] J. Reedijk; *Inorg. Chim. Acta*; **1992**; 198-200; 873
- [99] S. E. Sherman, D. Gibson, A. H.-J. Wang, S. J. Lippard; *J. Am. Chem. Soc.*; **1998**; 110; 7368

- [100] G. Admiraal, J. L. van der Veer, A. G. de Graaff, J. H. den Hartog, J. Reedijk; *J. Am. Chem. Soc.*; **1987**; 109; 592
- [101] P. M. Takahara, A. M. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard; *Nature (London)*; **1995**; 377; 649
- [102] D. Yang, S. S. G. E. van Boom, J. Reedijk; J. H. van Boom, A. H.-J. Wang; *Biochemistry*; **1995**; 34, 12912
- [103] D. Yang, S. S. G. E. van Boom, J. Reedijk; J. H. van Boom, N. Farrell, A. H.-J. Wang; *Nat. Struct. Biol.*; **1995**; 2, 577
- [104] K. J. Barnham, S. J. Berners-Price, T. A. Renkiel, U. Frey, P. J. Sadler, *Angew. Chem.*; **1995**, 107, 2040-2043
- [105] K. J. Barnham, M. I. Djuran, P. del Socorro Murdoch, J. D. Ranford, P. J. Sadler; *Chem. Soc., Dalton Trans.*; **1995**; 3721-3726
- [106] K. J. Barnham, Z. Guo, P. J. Sadler; *Chem. Soc., Dalton Trans.*; **1996**; 2867-2876
- [107] A. Zenker, M. Galanski, T. L. Bereuter, B. K. Keppler, W. Lindner; *J. Chrom. B*; **2000**; 745; 211-219
- [108] A. Küng, D. B. Strickmann, M. Galanski, B. K. Keppler; *J. Inorg. Biochem*; **2001**; 691-698
- [109] T. Peleg-Shulman, D. Gibson; *J. Am. Chem. Soc.*; **2001**; 123; 3171-3172
- [110] F. Gonnet, J. Kozelka, J.-C. Chottard; *Angew. Chem.*; **1992**; 104; 1494-1496
- [111] F. Herman, J. Kozelka, V. Stoven, E. Guittet, J.-P. Girault, T. Huynh-Dinh, J. Igolen, J.-Y. Lallemand, J.-C. Chottard; *Eur. J. Biochem.*; **1990**; 194; 119-133
- [112] J. Kozelka, M.-H. Fouchet, J.-C. Chottard; *Eur. J. Biochem.*; **1992**; 205 ;895-906
- [113] V. Monjardet-Bas; J.-C. Chottard, J. Kozelka; *Chem. J. J.*; **2002** ;8; 1144-1150
- [114] J.-M. Teuben, J. Reedijk; *J. Biol. Inorg. Chem.*; **2000**; 5; 463-468
- [115] S. J. Berners-Price, K. J. Barnham, U. Frey, P. J. Sadler; *Chem. Eur. J.*; **1996**; 2; No. 10; 1283-1290
- [116] F. J. Dijt, J.-C. Chottard, J.-P. Girault, J. Reedijk; *Eur. J. Biochem.*; **1989**; 179; 333-334
- [117] R. J. Heetebrij, M. de Kort, N. J. Meeuwenoord, H. den Dulk, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, J. Reedijk; *Chem. Eur. J.*; **2003**; 9; 1823-1827
- [118] J. A. Parkinson, Y. Chen, P. del Socorro Murdoch, Z. Guo, S. J. Berners-Price, T. Brown, P. J. Sadler; *Chem. Eur. J.*; **2000**; 6; No. 19; 3636-3644

- [119] D. P. Bancroft, C. A. Lepre, S. J. Lippard; *J. Am. Chem. Soc.*; **1990**; 112; 6860-6871
- [120] S. K. C. Elmroth, S. J. Lippard; *J. Am. Chem. Soc.*; **1994**; 116; 3633-3634
- [121] O. Vrana, V. Brabec; *Biochemistry*; **2002**; 41; 10994-10999
- [122] N. M. Milovic, N. M. Kostic; *Inorg. Chem.*; **2002**; 31; 3997-4001
- [123] I. E. Burgeson, N. M. Kostic; *Inorg. Chem.*; **1991**; 30; 4299
- [124] L. Zhu, N. M. Kostic; *J. Am. Chem. Soc.*; **1992**; 31; 3994-4001
- [125] L. Zhu, N. M. Kostic; *J. Am. Chem. Soc.*; **1993**; 115; 4566-4570
- [126] L. Zhu, N. M. Kostic; *Inorg. Chim. Acta*; **1994**; 217; 21-28
- [127] E. N. Korneeva, M. V. Ovchinnikov, N. M. Kostic; *Inorg. Chim. Acta*; **1996**; 243; 9-13
- [128] X. Chen, L. Zhu, X. You, N. M. Kostic; *J. Biol. Inorg. Chem.*; **1998**; 3; 1-8
- [129] X. Chen, L. Zhu, H. Xan, X. You, N. M. Kostic; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*; **1996**; 2653-2658
- [130] T. N. Parac, N. M. Kostic; *J. Am. Chem. Soc.*; **1996**; 118; 51-58
- [131] T. N. Parac, N. M. Kostic; *J. Am. Chem. Soc.*; **1996**; 118; 5946-5951
- [132] N. M. Milovic, N. M. Kostic; *J. Am. Chem. Soc.*; **2003**; 125; 7053-7063
- [133] A. Kahmann; Dissertation; Ruhr-Universität Bochum; **1994**;
- [134] W. S Hancock (Ed.) *CRC Handbook of HPLC Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins*; Vol. 1; 7.ed.; CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor; **1990**
- [135] V.R. Meyer; *Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie*; 7. Aufl.; Saale, Sauerländer, Frankfurt, Aarau; **1992**
- [136] W.R Melander, C. Hórvath: in M.T.W. Heran (Ed.); *Ion-Pair Chromatography*; Chromatographic Science Series; Vol; 31; Marcel Dekker; New York, Basel; **1985**
- [137] B.A. Bidlingsmeyer, S.N. Deming, W.P Price, Jr., B. Sachok, M. Petrussek; *J. Chromatogr.*; **1979**; 186; 419;
- [138] B.A. Bidlingsmeyer, *J. Chromatogr. Sci.*; **1980**; 18; 525
- [139] Petra Berendes; Diplomarbeit; Ruhr-Universität Bochum; **1995**
- [140] H.-J- Götze, W.S. Sheldrick, A.F.M Siebert; *Fresenius J. Anal. Chem.*; **1993**; 346; 634
- [141] B. Andersen, N. Margiotta, M. Coluccia, G. Natile, E. Sletten, *Metal Based Drugs*; **2000**; 7; No. 1; 23-32
- [142] H. Galster; *pH-Messungen*; VCH Verlagsgesellschaft; Weinheim; **1990**

- [143] D. Argyropoulos, E. Hoffmann, S. Mtongana, K.R. Koch; *Magn. Res. Chem.*; **2003**; 43; 102–106
- [145] M. El-Khateeb, T.G. Appleton, L.R. Gahan, B.G. Charles, S.J. Berner-Price, A.M. Bolton; *J. Inorg. Biochem.*; **1999**; 77, 13-21
- [146] T. G. Appleton, W. Connor, J.R. Hall; *Inorg. Chem.*; **1988**; 27; 130-137
- [147] H. Fribohn; *Ein- und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie*; 2.Aufl.; **1992**; VCH
- [148] W. Wirth, J. Blotvogel-Baltronat, U. Kleinkes, W. S. Sheldrick; *Inorg. Chim. Acta*; **2002**; 339; 14-26
- [149] W. Wirth; *Dissertation*; Ruhr-Universität Bochum; **2001**
- [150] C. Spellmeyer Fouts, L. G. Marzilli, R. A. Byrd, M. F. Summer, G. Zon, K. Shinozuka; *Inorg. Chem.*; **1988**; 27; 366-376
- [151] C. J. Boreham, J. A. Broomhead, D. P. Fairlie; *Aust. J. Chem.*; **1981**; 34; 659-664
- [152] Merck; *Tabellen für das Labor*; **1995**
- [153] Macherey Nage GmbH & Co KG; Düren; *HPLC-Katalog*; **1993**

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht hätte fertiggestellt hätte werden können.

Speziell bei:

Markus Hahn für seine Begeisterungsfähigkeit, die mich mit dem Thema der Bioanorganischen Chemie infizierte

Marko Kleine, für das sehr spezielle Arbeitsklima in der HPLC-Ecke
Sven Manka

Ralf Stodt, für seine „Aufbaumaßnahmen“ und zahlreichen Diskussionen

Dirk Wolters für die Aufnahme zahlreicher ESI-Spektren und seine Diskussionsbereitschaft

Susann Gencaslan für die wissenschaftlichen und manchmal auch nicht ganz so
Maik Heller wissenschaftlichen Diskussionen

Tobias van Almsick für die besten BANG-BOOM-BANG-Zitate

Iris Müller für die interessanten Gespräche

Heike Mayer-Figge

Manuela Winter

Martin Gartmann, für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren und ihre Diskussions-
Gregor Barchan bereitschaft bei fachlichen Fragen

Rolf Breuckmann für die Aufnahme zahlreicher FAB-Massenspektren

Susanne Bendix für ihre Hilfsbereitschaft

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in allen Belangen immer unterstützt und mich mit meinem Pessimismus immer ertragen haben. Meiner Patentante, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Ich möchte mich besonders bei meinem Freund André bedanken, der für mich da ist und der mich mit seinen Anmerkungen immer an den Rand des Wahnsinns getrieben hat. Ohne ihn wäre mein Leben halb so schön und ich wäre halb so dick.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Friederike Becker
Geburtsdatum: 07.01.1973
Geburtsort: Dinslaken
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulischer und beruflicher Werdegang:

08.1979-06 1983 **Pestalozzischule Voerde**
08.1983-06 1992 **Gymnasium der Stadt Voerde**
06.1992 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
10.1992 **Gerhard-Mercator-Universität Duisburg**
Immatrikulation im Diplomstudiengang Chemie
09.1995 Abschluss des Grundstudiums
09.1996 Vom DAAD geförderter Forschungsaufenthalt an der
McMaster University, Hamilton, Canada
02.1999 Abschluss der mündlichen Diplomprüfungen
11.1999 Diplomarbeit angefertigt bei Prof. Dr. C. Mayer im Fachgebiet
Physikalische Chemie
03. 2000 - 10.2003 Promotion am Lehrstuhl für Analytische Chemie an der Ruhr-
Universität Bochum
Thema der Arbeit: Wechselwirkungen des Zytostatikums cis-
[Amminchloro(2-methylpyridin)platin(II)] (AMD 473) mit
methioninhaltigen Peptiden
Betreuer: W. S. Sheldrick