

6 Untersuchungen zur Reaktivität von Platin(II)-Komplexen mittels HPLC

Die durchgeführten kinetischen Untersuchungen zur Reaktivität von Platin(II)-Komplexen setzen voraus, dass zu jedem Zeitpunkt der Reaktion die Konzentration der auftretenden Komponenten bestimmbar ist. In der Literatur kommen hierfür einige verschiedene Analytikverfahren wie die UV/VIS-Spektroskopie, die NMR-Spektroskopie aber auch die Polarimetrie und Potentiometrie zur Anwendung [145,104].

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete HPLC-Methode zeichnet sich durch hohe Empfindlichkeit und Aussagefähigkeit für physiologisch relevante Konzentrationen aus. Außerdem sind hohe Reproduzierbarkeit, geringe Analysenzeiten und hohe Genauigkeit gewährleistet.

Die zu vermessenden Substanzen lassen sich durch UV-Detektion erfassen, da die untersuchten Platinkomplexe in den Neutralliganden aromatische Reste beinhalten und demnach $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge zu beobachten sind.

Die Peaks werden durch Vergleich der Retentionszeiten zugeordnet, wobei die Peakfläche der Stoffmenge proportional ist. Der zeitliche Verlauf einer Reaktion lässt sich in sinnvollen Abständen verfolgen, da die Einzelmessungen schnell und einfach durchgeführt werden können.

Allgemeine Grundlagen zur HPLC- Messmethode sind in Kapitel 5 beschrieben.

Als mobile Phase für die Reaktivitätsuntersuchungen wird ein polares Zweikomponentengemisch aus Methanol und Na₂SO₄-Lösung (20mM, pH=3) verwendet. Dieses System hat sich besonders bei der Untersuchung von [1,2-Diarylethylendiamin]platin(II)-Komplexen bewährt, da zum einen die vollständige Elution der aufgetragenen Verbindungen möglich ist und zum anderen ein starkes Peaktailing vermieden wird [146,147]. Die prozentuale Zusammensetzung der mobilen Phase muss individuell gewählt werden.

6.1. Reaktivitätsuntersuchungen

Mit Hilfe der HPLC sollte die Reaktivität ausgewählter Platin(II)-Komplexe untersucht und miteinander verglichen werden. Es sollte einerseits der Einfluss der Konfiguration der asymmetrischen Platin(II)-Komplexe mit verschiedenen Alkylresten am C2 des

Neutralliganden und andererseits der Einfluss unterschiedlich substituierter Malonsäurederivate als Abgangsgruppen festgestellt werden.

Als Ursache für die Antitumoraktivität von Platinverbindungen wie dem etablierten Cisplatin, Carboplatin und weiterer Platin(II)-Komplexe wird die Reaktion mit zellulärer DNA und anderer Nukleophile, z.B. Proteine, verantwortlich gemacht (s. Kap.1). Eine Reaktion mit Proteinen oder Enzymen führt neben einer verringerten Bioverfügbarkeit zu unerwünschten und toxischen Nebenwirkungen. Dazu zählt z.B. die dosislimitierende Nephrotoxizität von Cisplatin, welche durch Reaktion mit SH-haltigen Enzymen der Nierentubuli vonstatten geht. Dies geschieht entweder durch direkte Interaktion mit dem Molekül als auch nach vorheriger Hydrolyse.

Daher sind Untersuchungen zur Reaktivität von besonderer Bedeutung. Das verwendete HPLC-Modell lässt Aussagen darüber zu und ist zur Interpretation von Antitumoreffekten essentiell, gleichgültig ob es Informationen zur direkten nukleophilen Substitution gibt oder zur Substitution nach vorangegangener Hydrolyse. Dieses HPLC-Modell wurde bereits ausführlich beschrieben [147,46].

Als Modell-Nukleophil diente Iodid, welches eine mit einem Angriff an die Guanosin-Base der DNA vergleichbare Reaktion mit dem Platinmolekül eingeht. Guanosin ist ebenso wie Cystein und Methionin schlecht löslich und resultiert in einer unzureichenden Trennung von Zwischen- und Endprodukten [46,57]. Bei Verwendung von Iodid erfolgt in der Regel eine gute Trennung der Reaktanden und dadurch eine geeignete Abschätzung der Reaktivität *in vivo*.

In Anlehnung an die physiologische Körpertemperatur geschieht dies bei einer Messtemperatur von 37°C.

Die Fließmittelzusammensetzung sowie die Detektionswellenlänge sind für jeden Platin(II)-Komplex individuell angepasst worden (s. **Tab.9.1**).

Die Ergebnisse der Reaktivitätsuntersuchungen wurden zum späteren Vergleich mit der ermittelten Antitumoraktivität in der Pharmakologischen Testung (s. Kap.7) herangezogen.

6.1.1. Allgemeine Grundlagen zur Substitution quadratisch planarer Platin(II)-Komplexe und deren Reaktionskinetik

Platin(II) bildet sehr stabile, quadratisch planare low-spin d^8 -Komplexe aus, deren Bildungsmechanismus und Substitutionskinetik eingehend untersucht worden sind [148-151,155]. Die Reaktionen dieser Komplexe verlaufen über einen bimolekularen

Verdrängungsmechanismus, dem sogenannten S_N2 -Mechanismus, unter Konfigurationserhalt [152,153]. Ein Angriff an das Platin kann von ober- oder unterhalb der Molekülebene erfolgen (**Abb.6.1**). Dabei wird ein fünffach-koordinierter Übergangszustand durch Assoziation eines Nucleophils durchlaufen, wobei sowohl die Konzentration von Edukt als auch Nucleophil entscheidend sind. Nach der Bindungslösung erfolgt die Rückbildung der planaren Struktur. Dieser assoziative Mechanismus ist bestätigt worden und ein dissoziativer, gemäß einem S_N1 -Mechanismus, wurde von Gray bereits 1962 widerlegt [154]. Für die Struktur des Übergangszustandes werden die trigonale Bipyramide und die quadratische planare Form diskutiert, die sich gegenseitig ineinander umlagern können (s. **Abb.6.1a**).

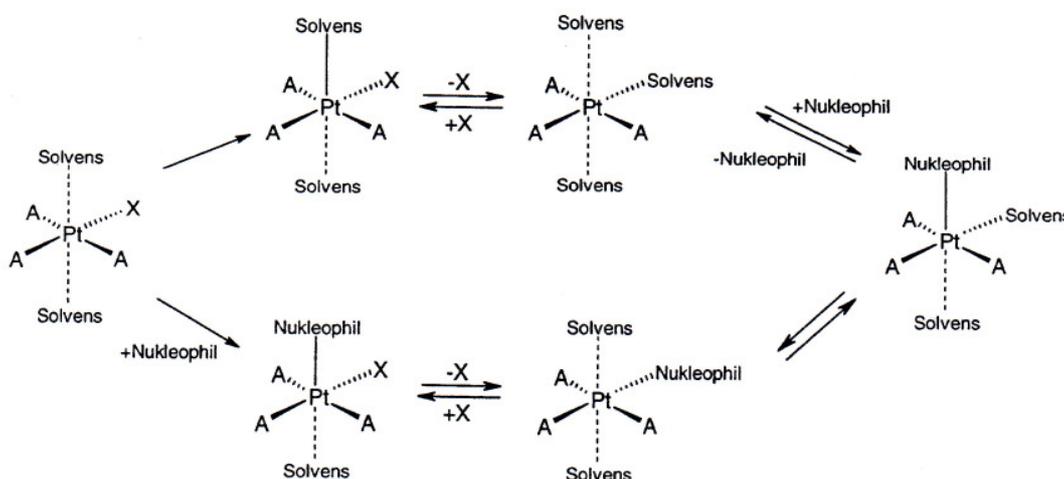


Abb.6.1 Allgemein akzeptierter Substitutionsmechanismus quadratisch planarer Platin(II)-Komplexe

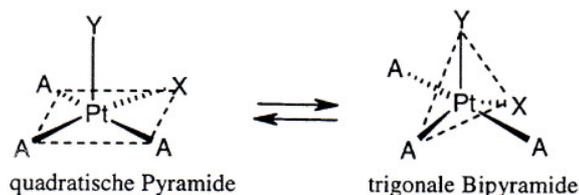


Abb.6.1a Übergangszustand bei der Substitutionsreaktion quadratisch planarer Platin(II)-Komplexe. X steht für ein Solvensmolekül oder eine Abgangsgruppe des Komplexes, die vom Nucleophil verdrängt wird.

Die Geschwindigkeit einer Reaktion ist nicht direkt messbar; man misst daher die zeitliche Änderung der Konzentration oder einer ihr proportionalen Größe und versucht durch graphische oder numerische Verfahren die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k zu ermitteln.

Ligandensubstitutionsreaktionen der allgemeinen Formel $[\text{PtA}_3\text{-X}] + \text{Y} \rightarrow [\text{PtA}_3\text{-Y}] + \text{X}$ sind Reaktionen erster Ordnung in Bezug auf den Metallkomplex und erster Ordnung im Hinblick auf Metallkomplex und angreifendes Nukleophil. Dies führt zu dem zweitemigen Geschwindigkeitsgesetz

$$v = k_S[\text{PtA}_3\text{X}] + k_Y[\text{PtA}_3\text{X}][\text{Y}]$$

k_S ist die Geschwindigkeitskonstante des so genannten Lösungsmittel- oder auch Solvensweges, in dem die Abgangsgruppe X durch ein Wassermolekül ersetzt wird, welches wiederum schnell durch das Nukleophil Y verdrängt werden kann. Der Solvensweg steht für die Bindungstendenz an Nukleobasen der DNA. Parallel dazu ist außerdem eine direkte nukleophile Verdrängung von X durch Y möglich, deren Geschwindigkeitskonstante durch k_Y wiedergegeben wird. Es beschreibt den Nukleophilweg und steht unter anderem für eine mögliche Inaktivierung der Komplexe im Körper. Der in **Abb.6.2** dargestellte Mechanismus verdeutlicht diese beiden Substitutionsschritte am Beispiel der Umsetzung von [Ethyldiamin]dichloroplatin(II)-Komplexen mit Cl^- als Abgangsgruppe X und Nu als Nukleophil Y für den Austausch beider Cl^- gegen I.

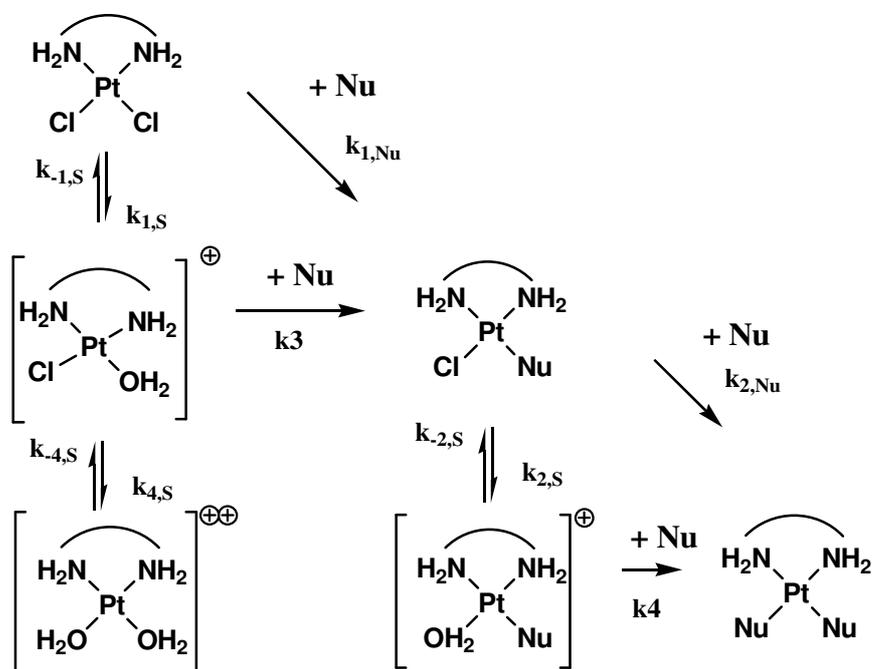


Abb.6.2 Zweistufiger Reaktionsmechanismus für die Umsetzung von [Ethyldiamin]dichloroplatin(II)-Komplexen mit Iodid

6.1.1.1. Berechnung von Geschwindigkeitskonstanten irreversibler Konsekutivreaktionen

Wenn Solvens und Nukleophil im mindestens 25-fachen Überschuss vorliegen, wie es bei folgenden Untersuchungen der Fall war, handelt es sich um eine zweistufige Konsekutivreaktion pseudoerster Ordnung mit einem bimolekularen Substitutionsmechanismus nach allgemeiner Formel [155]:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{S}} + k_{\text{Y}}[\text{Y}] \quad (1)$$

Eine mathematische Erfassung beider Substitutionsschritte, also der Austausch der Abgangsgruppen, ergibt sich dann aus den folgenden Gleichungen:

$$k_{1,\text{obs}} = k_{1,\text{S}} + k_{1,\text{I}}[\text{I}] \quad (2)$$

$$k_{2,\text{obs}} = k_{2,\text{S}} + k_{2,\text{I}}[\text{I}] \quad (3)$$

In **Abb.6.3** ist eine solche Reaktion am Beispiel der Umsetzung von **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** dargestellt. Die Auftragung der jeweiligen Konzentrationsänderungen von Edukt, Zwischenprodukt und Produkt gegen die Zeit entspricht diesem Verlauf einer Konsekutivreaktion. Die gegeneinander aufgetragenen Messwerte erhält man direkt aus den entsprechenden Chromatogrammen des Programms *KromaSystem 2000*, berechnet aus der Fläche des jeweiligen Peaks zur Summe aller Peakflächen, die der Startkonzentration proportional ist.

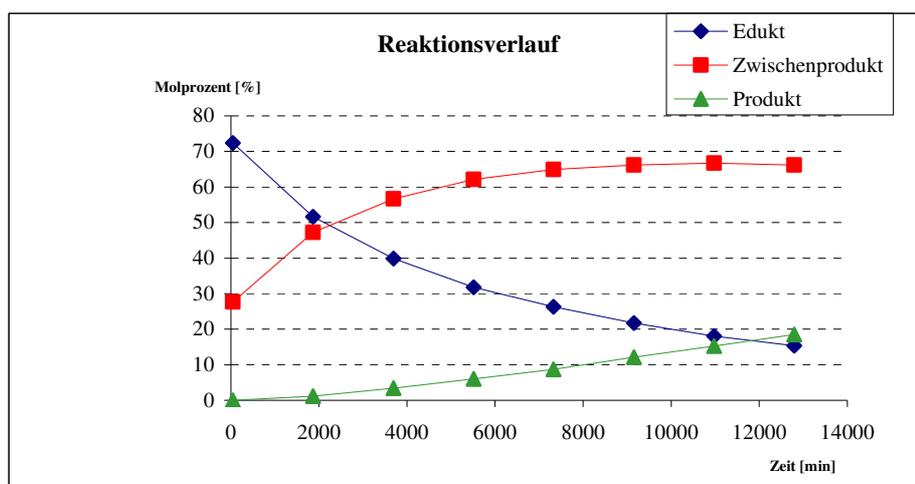


Abb.6.3 Darstellung der Konzentration-Zeit-Kurve am Beispiel der Umsetzung von **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** mit einem 100-fachen KI-Überschuss bei 37°C, pH=6

Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k für die erste Substitutionsstufe $k_{1,obs}$ ergibt sich aus der Berechnung nach A.A.Frost [148] und ist als Integrationsmethode detailliert bei Schmid beschrieben [155]. Aus der graphischen Auftragung $\ln[A]$ gegen die Zeit wird aufgrund der Beziehung

$$\ln[A] = \ln[A_0] - (k_{1,obs} \times t) \quad (4)$$

eine Gerade mit der Steigung $k_{1,obs}$ erhalten.

Statt der Konzentration kann auch eine ihr proportionale Größe eingesetzt werden, was mit den prozentualen Stoffmengenanteilen möglich ist. Dazu werden die vom *KromaSystem 2000* berechneten Peakflächen zur Summe aller Peakflächen ins Verhältnis gesetzt. Da die spezifische Absorption von Zwischen- und Endprodukt(en) nicht mit der des Eduktes identisch ist, werden deren Flächen zuvor mit einem Korrekturfaktor multipliziert.

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten des zweiten Schrittes $k_{2,obs}$ ($\text{PtA}_2\text{X/Y} + \text{Y} \rightarrow \text{PtA}_2\text{Y}_2 + \text{X}^-$) ist etwas aufwendiger [156,56]. Zur Berechnung von $k_{2,obs}$ sind folgende Gleichungen erforderlich:

$$\alpha_{\max} = e^{-\tau_{\max}} \quad (5)$$

$$\tau_{\max} = 1 / (1 - \kappa) \times \ln \kappa \quad (6)$$

$$\kappa = k_{2,obs} / k_{1,obs} \quad (7)$$

Demnach wird zuerst α_{\max} berechnet. Dazu werden die Relativkonzentrationen $\beta = [B]/[A_0]$ gegen die zugehörigen $(1-\alpha)$ -Werte aufgetragen ($\alpha = [A]/[A_0]$). Aus dem Kurvenmaximum kann $(1-\alpha)_{\max}$ graphisch ermittelt und α_{\max} berechnet werden. Die Bestimmung von τ_{\max} geschieht mit Gleichung (5). Wenn dies bekannt ist, erhält man κ laut Gleichung (6). $k_{2,obs}$ ergibt sich nun nach (7).

Die Relativkonzentrationen $\alpha = [A]/[A_0]$, $\beta = [B]/[A_0]$ und $\gamma = [C]/[A_0]$ stehen für Edukt, Zwischen- und Endprodukt. Die Flächen der jeweiligen Peaks werden den Chromatogrammen entnommen und durch die Ausgangspeakfläche A_0 dividiert. Die erhaltenen Molprozent-Angaben ergibt eine wie in **Abb.6.3** als Beispiel dargestellte Graphik.

Wenn die Abgangsgruppensubstitution gemäß **Abb.6.2** erfolgt, können die Geschwindigkeitskonstanten für den Solvensweg $k_{1,S}$ und $k_{2,S}$ sowie die Konstanten für den Nukleophilweg k_{1,I^-} und k_{2,I^-} durch die Umsetzung eines Platin(II)-Komplexes mit steigenden Iodid-Konzentrationen ermittelt werden.

Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen $k_{1,obs}$ bzw. $k_{2,obs}$ sowie dem Nukleophil Iodid mit k_S als Achsenabschnitt und K_{I^-} als Steigung.

In Abschnitt 6.2. findet sich eine Aufstellung der erhaltenen Werte. Die Daten für die substanzspezifischen $k_{1,obs}$ - und $k_{2,obs}$ -Werte finden sich im Anhang, Kap.10.

Die verwendeten Reaktionsbedingungen führen allerdings für die zu vermessenden Komplexe nicht immer zu irreversiblen Reaktionen. Besonders die Platin(II)-Verbindungen mit chelatgebundenen Dicarbonsäuren als Abgangsgruppen besitzen häufig trotz hohem Nukleophilüberschuss keinen linearen Zusammenhang zwischen $\ln[A]$ und der Reaktionszeit. Diese Reversibilität ist erkennbar, sobald man die prozentualen Stoffmengenanteile von Edukt, Zwischenprodukt(en) und Produkt gegen die Zeit aufträgt. Dies trifft dann mindestens für einen Schritt der Reaktion zu, wie aus **Abb.6.4** ersichtlich ist.

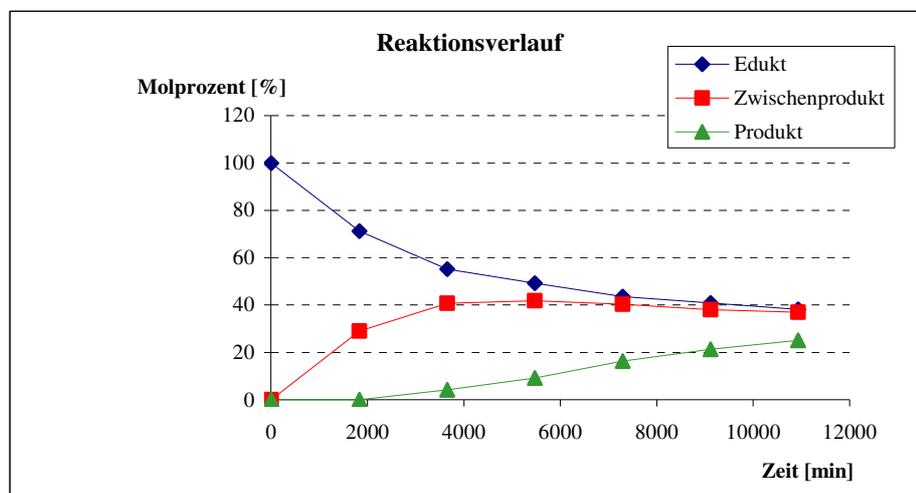


Abb.6.4 Reaktionsverlauf von **m-4F-OH-Mal** mit 350mM KI entsprechend dem Verlauf einer zweistufigen Konsekutivreaktion mit $k_{1,obs} \approx k_{2,obs}$ und $k_{1,obs}$ sowie $k_{2,obs}$ reversibel

Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten wäre somit erheblich aufwendiger als für irreversible Reaktionen. Daher wurde für diese Bestimmung das Kinetiksimulationsprogramm *KSIM Version 2.00* verwendet, das von Neil C. Miller kostenlos im Internet zur Verfügung

gestellt wird [156]. Das Programm ermöglicht die Eingabe der prozentualen Stoffmengenanteile in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer aller beteiligten Reaktionspartner.

Nach Vorgabe des Reaktionsmechanismus werden die vom Programm berechneten Kurven durch Veränderung theoretischer Reaktionsparameter an die experimentell ermittelten Datenpunkte solange angepasst, bis eine optimale Übereinstimmung erreicht ist. Diese Molprozent-Zeit-Verläufe wurden nach Runge-Kutta berechnet. Die Größe der Zeitintervalle zwischen den ermittelten Punkten orientiert sich hierbei an der Konzentrationsänderung. Je größer diese ist, desto kleiner ist das Zeitintervall zwischen den jeweiligen Punkten, und dadurch finden sich zu Beginn der Reaktion besonders viele Punkte.

Sinkt mit steigender Reaktionsdauer die Konzentrationsänderung der Reaktionsteilnehmer, sind viel weniger Werte für eine ausreichende Berechnung notwendig und dessen Dauer kann durch Erhöhung der Zeitintervalle erheblich gesenkt werden [157-159].

Sobald die optimale Kurve durch Anpassung erhalten wurde, kann für jeden simulierten Molprozent-Zeit-Verlauf eine Gleichung berechnet werden, der dann die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} entnommen werden kann.

Dieses Verfahren findet bereits in der Literatur Anwendung [160,161].

Die Gleichungen zur Konzentrationsberechnung von Produkt, Zwischenprodukt sowie des Eduktes stimmen mit denen einer irreversiblen Konsekutivreaktion überein [148].

Für die Malonsäurederivate werden 2-Schritt-Reaktionen mit totaler Reversibilität beschrieben, welche biphasisch ablaufen, d.h. erst erfolgt eine schnelle Phase der Substitution, bis schließlich ab einem bestimmten Punkt eine kleinere Geschwindigkeitskonstante erhältlich ist, wie es auch aus der obigen **Abb.6.4** ersichtlich ist.

Eine Überprüfung, ob mit dem Kinetiksimulationsprogramm KSIM vergleichbare Werte wie mit der für irreversible Konsekutivreaktionen beschriebenen Methode berechnet werden, ergab eine positive Übereinstimmung [109]. Am Beispiel von **m-4F-PtCl₂** konnte gezeigt werden, dass die Methode anwendbar ist und die ermittelten Daten sich direkt miteinander vergleichen lassen.

6.2. Messergebnisse und Diskussion

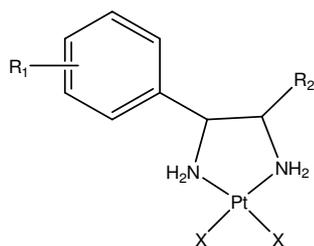
In den folgenden Untersuchungen sollte sowohl der Einfluss der Abgangsgruppe als auch des Neutralliganden auf die Reaktivität und das Substitutionsverhalten von asymmetrischen und symmetrischen Platin(II)-Komplexen festgestellt werden. Hierzu wurden nur die RS- und SR-konfigurierten Verbindungen eingesetzt. Eine Vermessung von racemischen Substanzen würde aufgrund von starken Wechselwirkungen mit dem C₁₈-Säulenmaterial zu keinen auswertbaren Ergebnissen führen. Es erfolgt entweder gar keine Elution oder dann nur verbunden mit großem Tailing der erhaltenen Peaks.

Die berechneten k_{obs} -Werte sind Mittelwerte aus zwei bis drei HPLC-Messungen. Eine genaue Aufstellung der Daten findet sich im Anhang, Kapitel 10 sowie die Versuchsbedingungen in Kapitel 9.

6.2.1. Einfluss der Alkylgruppe am C2 von unsymmetrischen Platin(II)-Komplexen auf die Reaktivität

Tab.6.1 gibt eine Übersicht der in diesem Abschnitt untersuchten Verbindungen. Es sollte der Einfluss des unterschiedlich substituierten Neutralliganden gezeigt werden. Dafür wurden nur die Dichloroverbindungen herangezogen, da Chlor nach Cleare [162] als optimale Abgangsgruppe gilt. Solche Gruppen sollen für eine schnelle Reaktion mit der DNA, gute Bioverfügbarkeit und geringe Toxizität stehen.

Als Vergleich diente der symmetrische, gut untersuchte Platin(II)-Komplex **m-4F-PtCl₂**.



<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>X</u>	<u>Verbindung</u>
4F	4F-phenyl	Cl	m-4F-PtCl ₂
H	CH ₃	Cl	RS-Ph/Met-Cl ₂
H	CH ₃	Cl	SR-Ph/Met-Cl ₂
4F	CH ₂ CH ₃	Cl	RS-4F-Ph/Et-Cl ₂
4F	CH ₂ CH ₃	Cl	SR-4F-Ph/Et-Cl ₂
4F	CH(CH ₃) ₂	Cl	RS-4F-Ph/iProp-Cl ₂

<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>X</u>	<u>Verbindung</u>
4F	CH(CH ₃) ₂	Cl	SR-4F-Ph/iProp-Cl ₂

Tab.6.1 Dichloroplatin(II)-Komplexe zur Untersuchung der Reaktivität

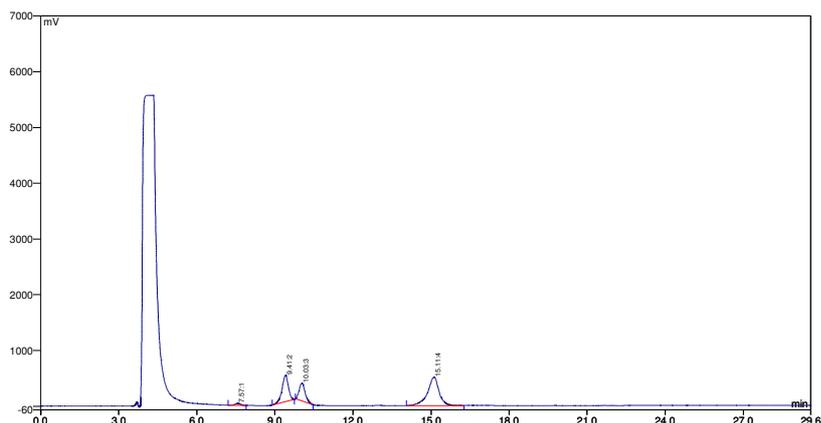
Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten für den Solvensweg und die direkte nukleophile Verdrängung finden sich in **Tab.6.2**. Die Abbildungen **6.6** bis **6.9** stellen die Konstanten des ersten und zweiten Substitutionsschrittes gegen steigende Nukleophilkonzentrationen, hier Kaliumiodid, dar.

Verbindung	k_{1,S} x 10⁵ [s ⁻¹]	k_{1,I⁻} x 10⁵ [l · mol ⁻¹ · s ⁻¹]	k_{2,S} x 10⁵ [s ⁻¹]	k_{2,I⁻} x 10⁵ [l · mol ⁻¹ · s ⁻¹]
Cisplatin	18.40	-	-	-
m-4F-PtCl ₂ ^S	10.39	834.9	2.87	227.9
RS-Ph/Met-Cl ₂	17.82	441.86	6.16	138.09
SR-Ph/Met-Cl ₂	17.69	495.12	5.79	148.19
RS-4F-Ph/Et-Cl ₂	8.77	767.79	5.10	117.32
SR-4F-Ph/Et-Cl ₂	7.66	717.39	4.52	112.29
RS-4F-Ph/iProp-Cl ₂	10.72	671.21	3.54	207.18
SR-4F-Ph/iProp-Cl ₂	11.35	710.82	3.95	185.61

^S: nach Schnurr [110]

Tab.6.2 Berechnete Geschwindigkeitskonstanten für Solvensweg (k_S) und direkte nukleophile Verdrängung (k_{I⁻}) bei 37°C und pH=6

Es ist anzumerken, dass für die untersuchten Komplexe aufgrund des unsymmetrischen Neutralliganden zwei jeweils zueinander diastereomere Zwischenprodukte detektiert werden können. Das Iodid kann von beiden Seiten angreifen und Racemate entstehen lassen [164]. Diese Zwischenprodukte treten in annähernd gleichem Verhältnis auf und unterscheiden sich in ihrer Lipophilie nur geringfügig. Je nach sterischem Verhältnis ist eines davon leicht in der Bildung bevorzugt. Die Retentionszeiten liegen sehr dicht beieinander, so dass es zur Peaküberlagerung kommt. Eine Peakzuordnung ist ohne Isolierung der Zwischenprodukte nicht möglich, daher wurde zur Bestimmung von k_{obs} die jeweilige Summe der Peakflächen herangezogen. **Abb.6.5** verdeutlicht dieses Problem am Beispiel von **RS-Ph/Met-Cl₂** während einer Reaktivitätsmessung.



No.	PNo	Ret. Time min	Type	Name	Area mV*min	Amount	Rel. Ar %
1	?	7.57	MLR	E	8.4313e+000	?	1.73
2	?	9.41	MOD	ZW1	1.3248e+002	?	27.18
3	?	10.03	MOD	ZW2	8.3704e+001	?	17.17
4	?	15.11	MLR	P	2.6289e+002	?	53.92

Abb.6.5 Auftreten zwei zueinander diastereomere Zwischenprodukte am Beispiel von **RS-Ph/Met-Cl₂**

Da **m-4F-PtCl₂** als Referenzsubstanz diente, soll dessen Reaktivität anhand der Geschwindigkeitskonstanten noch einmal verdeutlicht werden mit **Abb.6.6**.

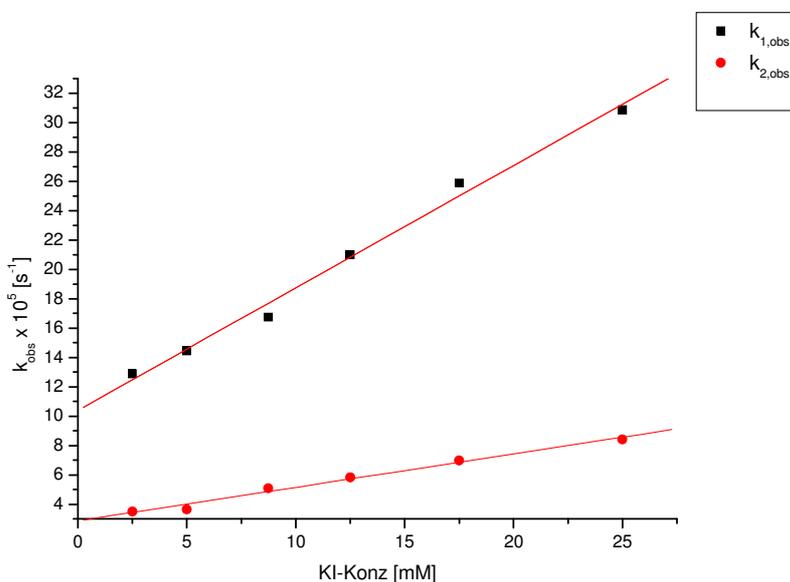


Abb.6.6 Ermittelte k_{obs} -Werte von **m-4F-PtCl₂**, bei verschiedener KI-Konzentration, 37°C und pH=6

Sowohl beim Solvens- als auch beim Nukleophilweg zeigte sich bei beiden Substitutions-schritten eine klare Abhängigkeit von der KI-Konzentration. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Solvolyse liegen mit $k_{1,S} = 10.39 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $k_{2,S} = 2.87 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ deutlich unter der

von Cisplatin ($k_{1,S} = 18.40 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). Werte von Cisplatin für die direkte nukleophile Verdrängung lassen sich nicht bestimmen, da bei der Reaktion mit Kaliumiodid kein einheitliches Produktspektrum entsteht. Es treten reaktive Nebenprodukte wie Hydroxoplatin(II) auf, die eine genaue Peakzuordnung erschweren [155]. Zusätzlich kommt es zu Wechselwirkungen der entstehenden Aquaplatin(II)-Spezies mit dem Säulenmaterial, so dass diese nicht mehr eluiert werden können [160].

Die Werte des Nukleophilweges sind für **m-4F-PtCl₂** sehr hoch ($k_{1,I^-} = 834.9 \times 10^{-5} \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $k_{2,I^-} = 227.9 \times 10^{-5} \text{ l mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Idealerweise sollten die Konstanten des Solvensweges (k_S) möglichst hoch und die des Nukleophilweges (k_{I^-}) möglichst klein sein. k_S steht für die Bindungstendenz an Nucleobasen der DNA, und die parallel dazu ablaufende, direkte nukleophile Verdrängung von X durch Y gilt als Maß für die Inaktivierung im Körper durch Reaktion mit Bionucleophilen wie thiolhaltigen Molekülen.

Überträgt man dies nun auf die Ergebnisse von **m-4F-PtCl₂**, zeigt sich ein gemischtes Bild mit relativ hohen Werten für k_{I^-} und niedrigeren für k_S . Diese Verbindung besitzt daher kein optimales Reaktivitätsverhalten und steht im Einklang mit unzureichender Pharmakokinetik und Antitumorwirkung *in vivo* (vgl. Kap.7).

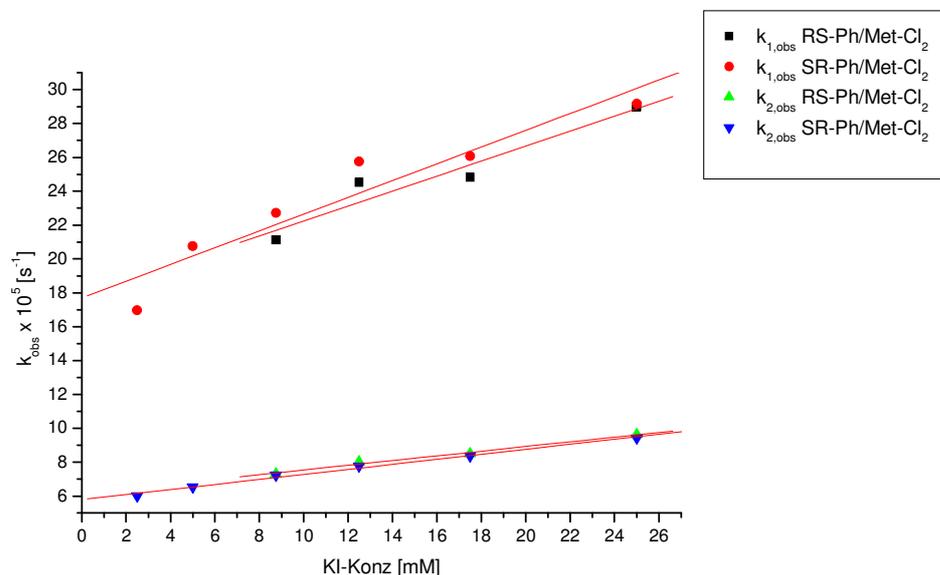


Abb.6.7 Ermittelte k_{obs} -Werte für die Reaktion des **RS- und SR-Ph/Met-Cl₂**-Komplexes bei verschiedenen KI-Konzentrationen, 37°C und pH=6

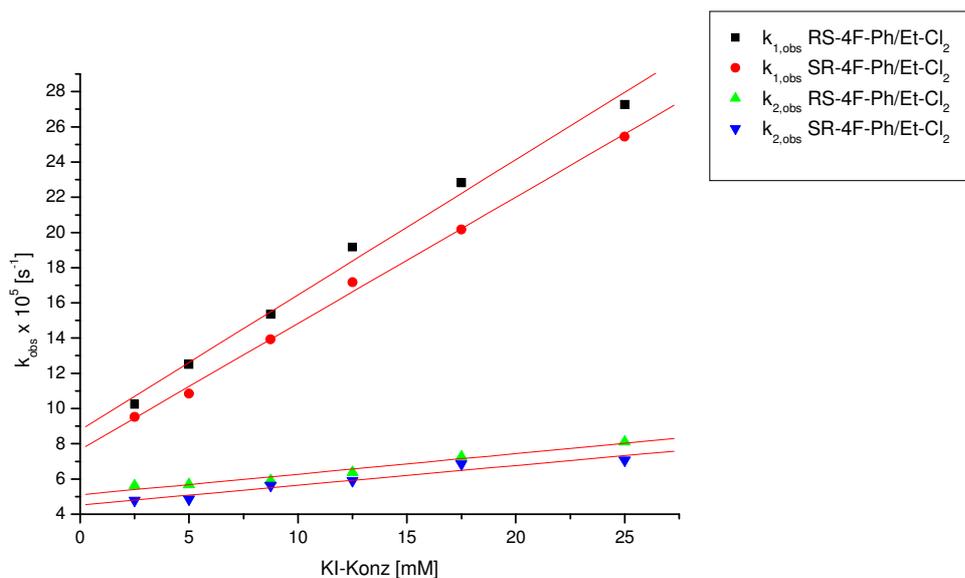


Abb.6.8 Ermittelte k_{obs} -Werte für die Reaktion des **RS-** und **SR-4F-Ph/Et-Cl₂**-Komplexes bei verschiedenen KI-Konzentrationen, 37°C und pH=6

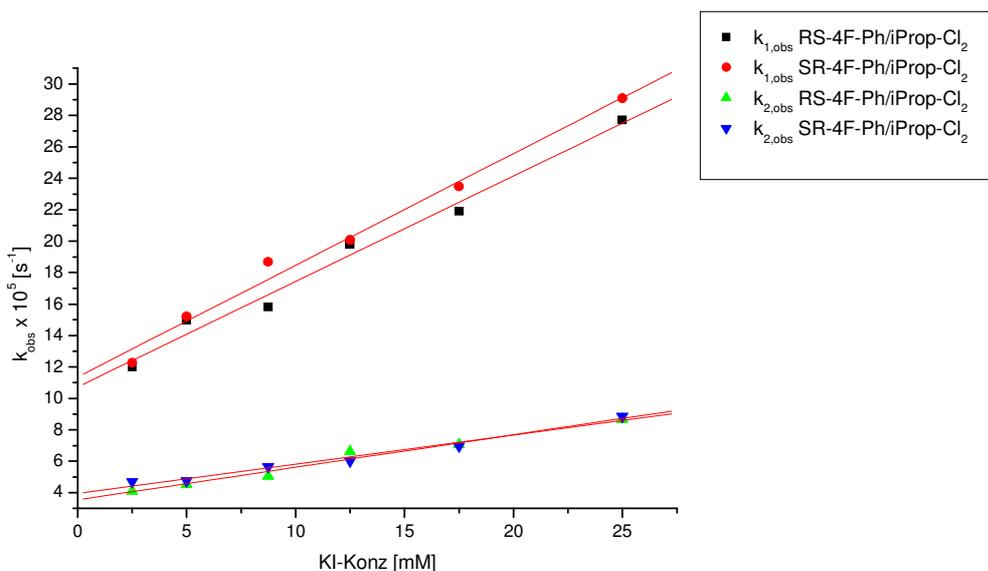


Abb.6.9 Ermittelte k_{obs} -Werte für die Reaktion des **RS-** und **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂**-Komplexes bei verschiedenen KI-Konzentrationen, 37°C und pH=6

Die Auftragung von $k_{1,obs}$ und $k_{2,obs}$ der asymmetrischen Verbindungen gegen steigende KI-Konzentrationen zeigt einige Parallelen zu dem symmetrischen Platin(II)-Komplex **m-4F-PtCl₂**. Bei den untersuchten Dichloroverbindungen sind beide Substitutionsschritte durch den direkten nukleophilen Angriff bestimmt. Der Austausch des ersten Chlors verläuft schneller als der des zweiten.

Der erste Substitutionsschritt, beschrieben durch die $k_{1,obs}$ -Werte, zeigt einige Besonderheiten.

Als reaktivste Verbindungen erwiesen sich die unsubstituierten Komplexe **RS-** und **SR-Ph/Met-Cl₂**. In früheren Studien wurden sie bereits auf Antitumoraktivität geprüft [58], und dort zeigte sich ein nahezu identisches Wirkspektrum der Enantiomere *in vitro*.

Gegenüber den 4F-substituierten Komponenten besaßen sie hohe Solvolyskonstanten. Diese überstiegen sogar jene von **m-4F-PtCl₂** mit $k_{1,S} = 17.82 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $k_{2,S} = 6.16 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (**RS-Ph/Met-Cl₂**) sowie $k_{1,S} = 17.69 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $k_{2,S} = 5.79 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (**SR-Ph/Met-Cl₂**). Sie erreichten somit fast den Wert des ersten Solvolyseschlittes von Cisplatin.

Interessanterweise lagen die Geschwindigkeitskonstanten für den Nukleophilweg bedeutend niedriger. Besonders die erste Substitution verläuft nur halb so schnell wie die von **m-4F-PtCl₂**: $k_{1,I} = 441.86 \times 10^{-5} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (**RS-Ph/Met-Cl₂**) und $k_{1,I} = 495.12 \times 10^{-5} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (**SR-Ph/Met-Cl₂**). Dieser Komplex scheint demnach eine günstigere Kinetik als **m-4F-PtCl₂** zu besitzen. Die Bindung an DNA wäre bevorzugt und die Inaktivierung zurückgedrängt worden, was die geringeren k_I -Werte zu belegen scheinen.

Beim Vergleich der Komplexe mit einem 4-Fluorphenylring erwiesen sich **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** und **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** reaktiver als ihre jeweiligen Isomerenpaare. Der C2-Isopropyl Komplex könnte demnach eine höhere Reaktivität gegenüber einer DNA-Bindung besitzen, was die im Vergleich zum Ethylrest größeren Solvolyskonstanten besonders im 1. Schritt belegen: der Wert für **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** beträgt $11.35 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und der für **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** $8.77 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

Eine Änderung im Ethylendiamin bewirkt somit eine Änderung in der Hydrolysegeschwindigkeit [164]. Dieses Ergebnis stimmte mit der Antitumoraktivität überein (s.Kap.7). An den untersuchten Zelllinien erwies sich hier **4F-Ph/iProp-Cl₂** effektiver im Hinblick auf eine Proliferationshemmung als **4F-Ph/Et-Cl₂**.

Die ethylierte Verbindung scheint anfälliger in Bezug auf Inaktivierungsreaktionen zu sein. $k_{1,I}$: $767 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (**RS-4F-Ph/Et-Cl₂**) liegt deutlich höher als für **RS-4F-Ph/iProp-Cl₂**: $k_{1,I}$: $671.21 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Eventuell bewirkt bei letzterem der sterisch anspruchsvollere Alkylrest am C2 eine erschwerte Annäherung eines Nukleophils.

Allerdings zeigt sich im zweiten Substitutionsschritt ein umgekehrtes Bild. Die C2-Isopropyl-Verbindung reagierte stärker mit dem Nukleophil KI als jene mit einer Ethylgruppe am C2 des Ethylendiamins.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die Komplexe **4F-Ph/Et-Cl₂** und **4F-Ph/iProp-Cl₂** eine Reaktionskinetik ähnlich dem symmetrischen **m-4F-PtCl₂** besaßen. Es ließ sich kein zufrieden stellendes Ergebnis erreichen, da die Werte für die direkte, nukleophile Verdrängung, k_I - relativ hoch waren. Die Pharmakokinetik dieser Verbindungen scheint daher

noch nicht optimal zu sein. Dafür sprachen ebenfalls die Daten der Chemosensitivitätstestung, wo bereits in geringer Konzentration stark zytotoxische Effekte erreicht wurden (vgl. Kap.7).

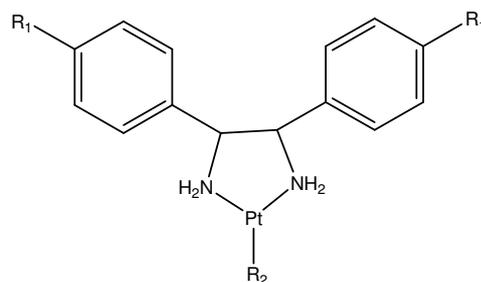
Die sterischen Einflüsse des asymmetrischen Neutralliganden schienen besonders im zweiten Substitutionsschritt eine Rolle zu spielen. Durch den großen Raumbedarf des an Platin koordinierten Iodids ist der Angriff weiterer voluminöser Teilchen erschwert. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass der Austausch des ersten Chloratoms schneller als der des zweiten erfolgte.

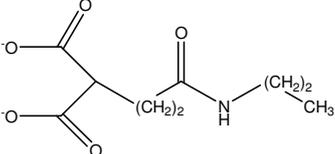
Wichtig für Reaktivität und Stabilität der unterschiedlich am C2 substituierten Komplexe ist der Einfluss der Bindung zwischen dem Platin-Zentralatom und dem Neutralliganden. Die Hydrolysegeschwindigkeit sollte mit länger werdender Alkylkette am C2 zunehmen, da der positive +I-Effekt solcher Alkylgruppen eine höhere Elektronendichte am Platin induziert. Dadurch kann die Pt-Cl-Bindung gelockert werden, und es könnte eine schnellere Hydrolyse eintreten [165]. Je geringer im Vergleich dazu die Elektronendichte am Pt ist, desto mehr wird der Übergangszustand deaktiviert [167,168]. Ein Ethylrest würde demnach stabilisierender als ein C2-Methyl-Komplex wirken. Je höher der pks-Wert der Verbindung, desto besser für die Reaktivität; der pks-Wert steigt z.B. vom C2-unsubstituierten zum methylierten Komplex von 4.47 auf 4.68. Aufgrund dieser Erkenntnisse müsste der Komplex **Ph/Met-Cl₂** unreaktiver als **4F-Ph/Et-Cl₂** sein, was auch für die Werte der direkten nukleophilen Verdrängung als Maß für Inaktivierungsreaktionen zutrifft. Die Solvolyse erfolgt schneller, was für ähnliche DNA-Bindungsaktivität wie Cisplatin spricht.

Die Interligandabstoßung zwischen dem eintretenden Iodid und der räumlich größeren Alkylkette kommt beim **4F-Ph/iProp-Cl₂** zum Tragen. Der Übergangszustand während der Substitution ist deutlich erschwert. Die Solvolysegeschwindigkeit steigt aufgrund des höheren +I-Effektes des Isopropylrestes. Der Nukleophilweg wird gegenüber der ethylierten Verbindung zurückgedrängt [166].

6.2.2. Einfluss der Abgangsgruppe auf die Reaktivität

Bei den folgenden Messungen wurde nur noch der [1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]-Komplex verwendet. Die Reaktivität sollte anhand chelatgebundener Dicarbonsäuren als Abgangsgruppe untersucht werden. **Tab.6.3** gibt eine Übersicht dieser Verbindungen. Die jeweiligen Malonsäurederivate wurden mit *Mal* abgekürzt.



<u>R1</u>	<u>R2</u>	<u>Verbindung</u>
4F	-OOC-CH(OH)-COO-	m-4F-OH-Mal
4F	-OOC-CH(COOCH ₃)-COO-	m-4F-Mal-Ester
4F	-OOC-CH(NHCOCH ₃)-COO-	m-4F-AM-Mal
4F	-OOC-CH(NH ₂)-COO-	m-4F-NH ₂ -Mal
4F	-OOC-CH(CH ₃ O)-COO-	m-4F-MeO-Mal
4F		m-4F-SM-Mal

Tab.6.3 Auf ihre Reaktivität im HPLC-Assay untersuchte Platin(II)-Komplexe mit Dicarbonsäuren als Abgangsgruppen

Tab.6.4 gibt die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten für Solvens- und Nukleophilweg an. In **Abb.6.10** und **6.11** sind die Werte des ersten und zweiten Substitutionsschrittes gegen steigende Kaliumiodid-Konzentration aufgetragen.

Verbindung	$k_{1,S} \times 10^5$ [s ⁻¹]	$k_{1,I^-} \times 10^5$ [l · mol ⁻¹ · s ⁻¹]	$k_{2,S} \times 10^5$ [s ⁻¹]	$k_{2,I^-} \times 10^5$ [l · mol ⁻¹ · s ⁻¹]
m-4F-OH-Mal	1.71	305.16	18.51	106.51
m-4F-Mal-Ester	6.98	136.78	17.55	253.45
m-4F-MeO-Mal	4.06	611.81	8.68	193.34
m-4F-NH ₂ -Mal	n.b.			
m-4F-AM-Mal	n.b.			
m-4F-SM-Mal	n.b.			

n.b.: nicht bestimmbar

Tab.6.4 Berechnete Geschwindigkeitskonstanten für Solvensweg (k_S) und direkte nukleophile Verdrängung (k_{I^-}) bei 37°C und pH=6

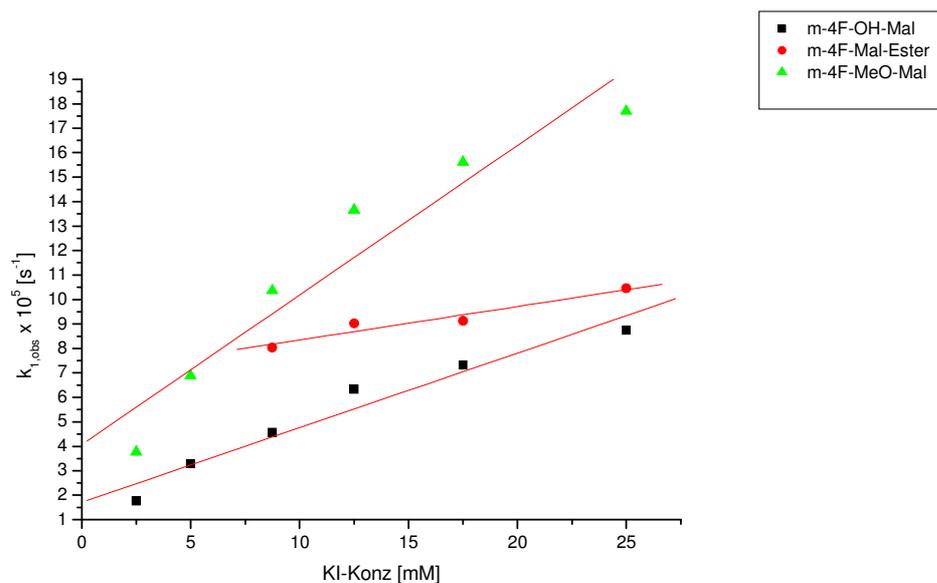


Abb.6.10 Ermittelte $k_{1,obs}$ -Werte der [1,2-Diarylethylendiamin)platin(II)-Komplexe mit unterschiedlichen Malonsäurederivaten als Abgangsgruppen bei steigender KI-Konzentration, 37°C und pH=6

Nach Cleare [162] wird Hydroxymalonsäure neben Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure (CBDC) zu den reaktionsträgen Abgangsgruppen gezählt. Dies bedeutet eine verlangsamte Reaktion mit dem Zielmolekül DNA, eine hohe Bioverfügbarkeit und so gut wie keine Ausbildung toxischer Nebenprodukte. Die geringen Solvolyse- und Nukleophilkonstanten im Vergleich zu **m-4F-PtCl₂** bestätigen dies: $k_{1,S} = 1.71 \times 10^{-5} s^{-1}$ und $k_{1,I} = 305.16 \times 10^{-5} l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ (**m-4F-OH-Mal**). Die geringe Reaktivität steht im Einklang mit einer niedrigeren Antitumoraktivität *in vitro* (s. Kap.7).

Die Reaktion der untersuchten Malonsäurederivate war in beiden Substitutionsschritten von der Nukleophilkonzentration abhängig. Am stärksten traf dies für **m-4F-MeO-Mal** bei der Ringöffnung im ersten Schritt zu, was aus **Abb.6.10** deutlich wird. Es wurden beinahe doppelt so hohe Werte für die direkte nukleophile Verdrängung als für **m-4F-OH-Mal** erhalten: $k_{1,I} = 611.81 \times 10^{-5} l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ und $k_{2,I} = 193.51 \times 10^{-5} l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ gegenüber $k_{1,I} = 305.16 \times 10^{-5} l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ und $k_{2,I} = 106.51 \times 10^{-5} l \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$. Die Solvolysekonstanten k_S zeigten annähernd Werte wie für **m-4F-PtCl₂**. Sie lagen für **m-4F-MeO-Mal** zwar bedeutend niedriger ($k_{1,S} = 4.06 \times 10^{-5} s^{-1}$; $k_{2,S} = 8.68 \times 10^{-5} s^{-1}$), aber anhand dieser Reaktivität lässt sich die Methoxymalonsäure eher zu den optimalen anstatt reaktionsträgen Abgangsgruppen zählen. Die Bindung an DNA wäre erhöht aber auch eine Inaktivierung durch Bionukleophile könnte in verstärktem Maß möglich sein.

Eine deutlich geringere Nukleophilabhängigkeit zeigte der veresterte Malonsäurekomplex **m-4F-Mal-Ester**. Im Zytotoxizitätsassay ließ sich eine mit **m-4F-MeO-Mal** vergleichbare

Antitumoraktivität beobachten (Kap.7). Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten scheinen jedoch auf eine günstigere Pharmakokinetik hinzudeuten. Die Werte für die Solvolyse von **m-4F-Mal-Ester** gegenüber den anderen Malonsäurederivaten waren erhöht: $k_{1,S} = 6.98 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ und $k_{2,S} = 17.55 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$, was für ausreichende DNA-Bindung sprechen würde.

Inaktivierungsreaktionen wären zurückgedrängt, was die Konstanten der direkten nukleophilen Verdrängung belegten: $k_{1,I} = 136.78 \times 10^{-5} \text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$; $k_{2,I} = 253.45 \times 10^{-5} \text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.

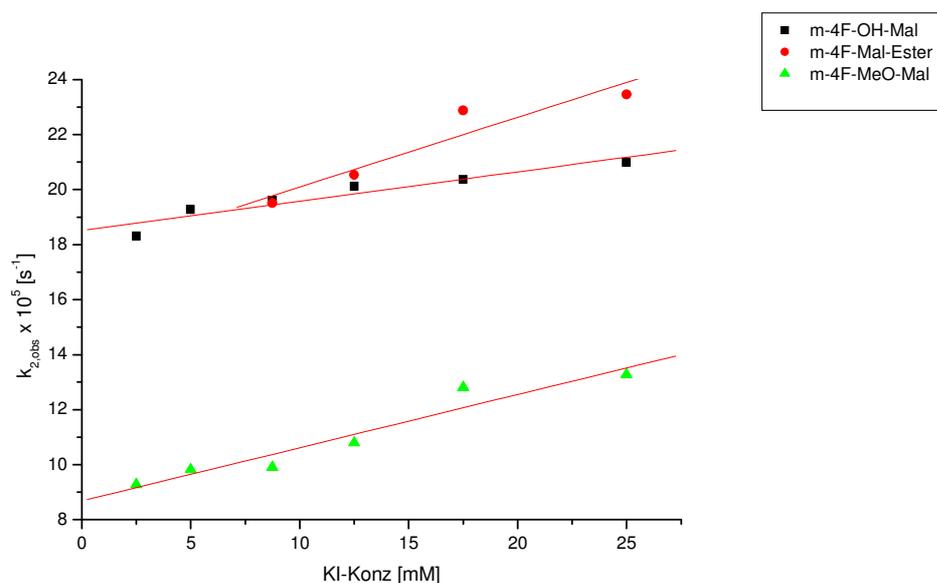


Abb.6.11 Ermittelte $k_{2,obs}$ -Werte der [1,2-Diarylethylendiamin)platin(II)-Komplexe mit unterschiedlichen Malonsäurederivaten als Abgangsgruppen bei steigender KI-Konzentration, 37°C und pH=6

Während der Reaktion von **m-4F-OH-Mal** und in geringerem Maß von **m-4F-Mal-Ester** ist kein Zwischenprodukt detektierbar. Der zweite Substitutionsschritt war bedeutend schneller als der erste: $k_{2,obs} \gg k_{1,obs}$ (**m-4F-OH-Mal**: $k_{1,obs} = 1.76 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$; $k_{2,obs} = 18.31 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$). Das entstehende Zwischenprodukt reagierte sofort mit dem zweiten Iodid zum Endprodukt weiter, und eine Detektion war nicht mehr möglich. **M-4F-MeO-Mal** wies im Vergleich dazu kleinere Werte für $k_{2,obs}$ auf, wodurch das Zwischenprodukt als Peak erschien und die Auswertung erleichtert wurde.

Mit *KSIM* ist in beiden Fällen eine Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten beider Substitutionsschritte möglich. Die $k_{2,obs}$ -Werte von **m-4F-OH-Mal** sowie **m-4F-Mal-Ester** spiegeln jedoch eher den Bereich einer Größenordnung wider und sollten nicht absolut verstanden werden.

Die Platin(II)-Komplexe mit den jeweiligen Säurederivaten als Abgangsgruppe erschienen im Chromatogramm als Doppelpeak. Durch die meso-Konfiguration und die dadurch bedingten sowohl axial- als auch äquatorialständigen Phenylringe, die durch Interkonversion ineinander übergehen können, ist eine Pseudoasymmetrie gegeben. Die zwei Peaks traten in annähernd gleichem Verhältnis auf, ließen sich jedoch nicht trennen. Daher wurden diese Peakflächen zusammen addiert, was am Beispiel von **m-4F-Mal-Ester** in **Abb.6.12** veranschaulicht ist.

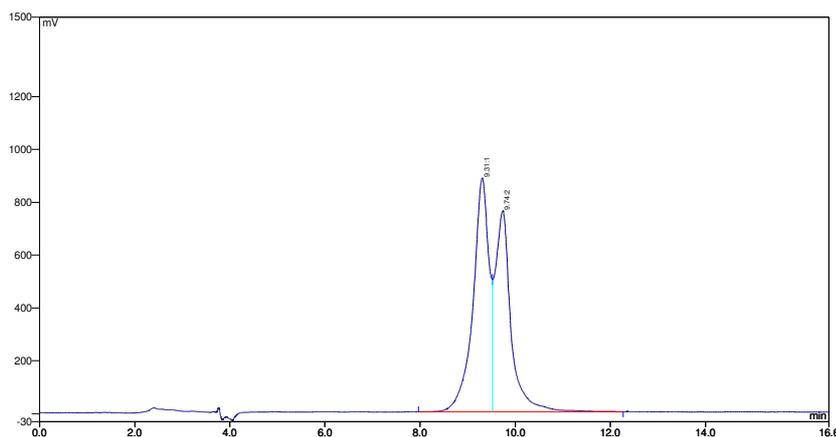


Abb.6.12 Peakaufspaltung von **m-4F-Mal-Ester**

Alle untersuchten Komplexe bilden bevorzugt einen 6-gliedrigen Chelating aus. Thermodynamisch stabiler wäre ein Fünfring, wie er zum Beispiel im Oxaliplatin durch den Oxalat-Rest vorliegt. Die Bildungsgeschwindigkeit eines Chelatinges sinkt, je mehr C-Atome enthalten sind; der Ringschluss zum Siebenring ist bereits erschwert. Durch die damit abnehmende Stabilität ist die Reaktivität erhöht [169,170] und die Intermediatbildung erleichtert. Ist schließlich die ringoffene Form entstanden, kann die bereits freie Carboxylatfunktion intramolekulare Wasserstoffbrücken unter anderem zu den Amin-Protonen ausbilden, wie es auch beim CBDC-Rest des Carboplatins der Fall ist [171,172]. Eine erhöhte Stabilität ist die Folge, was eine Begründung für die relativ geringen Geschwindigkeitskonstanten des Nukleophilweges von **m-4F-OH-Mal** und **m-4F-Mal-Ester** sein könnte.

Da die Labilität der Carboxylatliganden zusätzlich von der Basizität abhängig ist [174], sind eventuell die +I- und -I-Effekte der Methoxy- und Esterfunktion von **m-4F-MeO-Mal** und **m-4F-Mal-Ester** von Interesse. Die unkatalysierte Solvolysengeschwindigkeitskonstante sinkt, wie die Basizität steigt [174]. Dies trifft für die k_S -Werte von **m-4F-MeO-Mal** im Vergleich zu **m-4F-Mal-Ester** zu: die zugehörigen Werte waren für die elektronenreichere Verbindung

m-4F-MeO-Mal beinahe um die Hälfte geringer als die des Komplexes mit destabilisierender Ester-Abgangsgruppe.

Wird in den beweglichen Malonat-6-Ring ein langkettiger, voluminöser Rest eingeführt, wie es im Fall von **m-4F-SM-Mal** stattfand, scheint durch diesen sperrigen Rest ein Ligandenaustausch sterisch gehemmt zu sein. Die k_{obs} -Werte sind demnach durch den verminderten Angriff am zentralen Platin sehr klein. Bei dem untersuchten Komplex **m-4F-SM-Mal** ließ sich keine Reaktivitätsmessung durchführen. Der Komplex erwies sich als inert auch bei Zusatz einer sehr hohen KI-Konzentration sowie einer Erniedrigung des pH-Wertes (s. 6.3.3.). Es war kein Zwischen- oder Endprodukt detektierbar.

Die Reaktivität von **m-4F-NH₂-Mal** und **m-4F-AM-Mal** ließ sich ebenfalls nicht bestimmen, da keine eindeutige Produktzuordnung möglich war und uneinheitliche Ergebnisse hinsichtlich der k_{obs} -Werte erhalten wurden. Die jeweiligen Reaktivitätskonstanten wiesen sehr hohe Werte für k_{S} und k_{I} auf, die sogar jene von **m-4F-PtCl₂** überstiegen. Diese Ergebnisse erschienen unwahrscheinlich, da sich keine dazu passende starke Antitumoraktivität finden ließ (Kap.7).

Bereits in früheren Studien zur Herstellung dieser Komplexe zeigten sich die ersten Schwierigkeiten. Zur Kopplung der gut wasserlöslichen Aminomalonsäure an 1,2-Diaminocyclohexanplatin(II)-Komplexe schlug Gandolfi den Weg über die Umsetzung des Bariumsalzes der Säure mit anschließender Gefriertrocknung vor [175], um das Problem der Isolierung des gut wasserlöslichen Produktes zu umgehen. Es finden sich weitere Quellen, die ebenso verfahren [176].

Leider brachte in unserem Fall eine auf diesem Wege durchgeführte Umsetzung nicht das gewünschte Ergebnis. In den ¹H-NMR-Spektren fanden sich neben den Signalen der Endprodukte weitere, welche auf eine zweite vorliegende Verbindung hinweisen könnten. Diese ließ sich jedoch nicht dem Ausgangskomplex **m-4F-PtSO₄** zuordnen. Eine Überprüfung mittels IR-Spektroskopie brachte folgende Ergebnisse: Es lagen Schwingungen einer C=O-Gruppe bei $\nu = 1670 \text{ cm}^{-1}$, 1575 cm^{-1} und 1607 cm^{-1} vor, die für eine Kopplung der Carboxylatfunktion sprechen würden. Eine Schwingung bei 1705 cm^{-1} einer freien COOH-Gruppe fehlte ebenso wie eine Bande für ungebundene OH-Gruppen bei 3520 cm^{-1} und 3300 cm^{-1} . Eine Umsetzung des Aquasulfatoplatin(II)-Komplexes mit dem Malonsäurederivat schien demnach stattgefunden zu haben.

Wären noch Reste von **m-4F-PtSO₄** vorhanden, wären diese bei der Reaktivitätsmessung mittels HPLC bereits nach sehr kurzer Dauer vollständig mit KI umgesetzt worden, was

überprüfende Messungen bestätigten. Daher waren die Resultate der Reaktivitätsuntersuchungen umso überraschender.

In der Literatur finden sich einige Angaben, die sich mit der Umsetzung von Aminomalonsäure und Homologen beschäftigen und die Erkenntnisse von Gandolfi widerlegen. Der durch elektrostatische Interaktionen zwischen dem negativen COO^- und dem positiven Platinatom zuerst entstehende O,O-Chelat kann sehr schnell in das thermodynamisch stabilere N,O-gekoppelte Produkt isomerisieren. Es treten daher isomere Mischungen O,O zu N,O im Verhältnis 3:2 und 5:1 auf [177-180]. Dies widerspricht allerdings der gefundenen erstaunlich hohen Reaktivität, da ein gebildeter N,O-Fünfring aufgrund höherer Stabilität reaktionsträger im Vergleich zum 6-Ring wäre.

Als weitere Möglichkeit könnten zwei Platinatome über eine freie COOH-Gruppe gekoppelt sein [181]. Sollte dies der Fall sein, müssten sich im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Signale für gekoppelte Methinprotonen zwischen den beiden Chelatringen bei 3.62 und 5.82 finden lassen, was auch zu einem geringen Teil zutrif.

Abschließend lässt sich anmerken, dass zwar die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **m-4F-NH₂-Mal** und **m-4F-AM-Mal** zum Teil uneinheitlich zu bewerten waren, aber immer ein großer Anteil des gewünschten Produktes vorlag. Da die getestete *in vitro*-Aktivität mit der Theorie übereinstimmte, wurde bei diesen beiden Komplexen aufgrund der nicht zufrieden stellenden Messungen auf eine ergänzende Reaktivitätsuntersuchung verzichtet.

6.2.3. pH-Abhängigkeit der Reaktivität ausgewählter Platin(II)-Komplexe

Bei den Komplexen mit chelatgebundener Dicarbonsäure als Abgangsgruppe ist ein Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktivität wahrscheinlich. Es ist anzunehmen, dass durch eine Erniedrigung des pH-Wertes die nach der Ringöffnung im ersten Schritt freie Carboxylatfunktion protoniert und somit eine Rückreaktion verhindert wird. Die Reversibilität würde demnach zurückgedrängt werden [182]. Die Geschwindigkeitskonstanten müssten sich demnach im Sauren erhöhen. Da zwischen dem pH-Wert von Tumor- und gesundem Gewebe ein Unterschied besteht, ist diese Reaktivität von Bedeutung. Tumorzellen wandeln Glucose anaerob in Milchsäure und aerob zu H_2O und CO_2 um. Die Milchsäureanreicherung bewirkt ein Absinken des pH-Wertes von 7.2-7.4 auf 6.8 [183]. Dieser pH-Gradient zwischen extra- und intrazellulärem Milieu steuert durch die H^+ -Barriere die Aufnahme von Zytostatika in die Tumorzellen und bestimmt somit die Zytotoxizität einer Verbindung mit [184-186]. Optimal wären demnach eine gute Stabilität im Blut und eine gewisse Säurelabilität für spezifische antitumorale Wirksamkeit [187].

Die pH-Abhängigkeit sollte an den Verbindungen **m-4F-OH-Mal**, **m-4F-Mal-Ester** sowie **m-4F-MeO-Mal** untersucht werden.

Zur Überprüfung der Annahme, dass eine pH-Änderung Einfluss auf die Reaktivität hat, wurden die Komplexe mit 5mM KI-Lösungen versetzt, die mit 0.1N H₂SO₄ oder 0.1N NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt waren. Es wurde ein pH-Bereich zwischen 3.5 und 7.5 ausgewählt, da dort die größte physiologische Relevanz vorhanden ist.

Für die Dichloroplatin(II)-Komplexe ist eine pH-unabhängige Reaktion zu erwarten, was die Messungen an **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** und **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** bestätigten und **Abb.6.13** verdeutlicht.

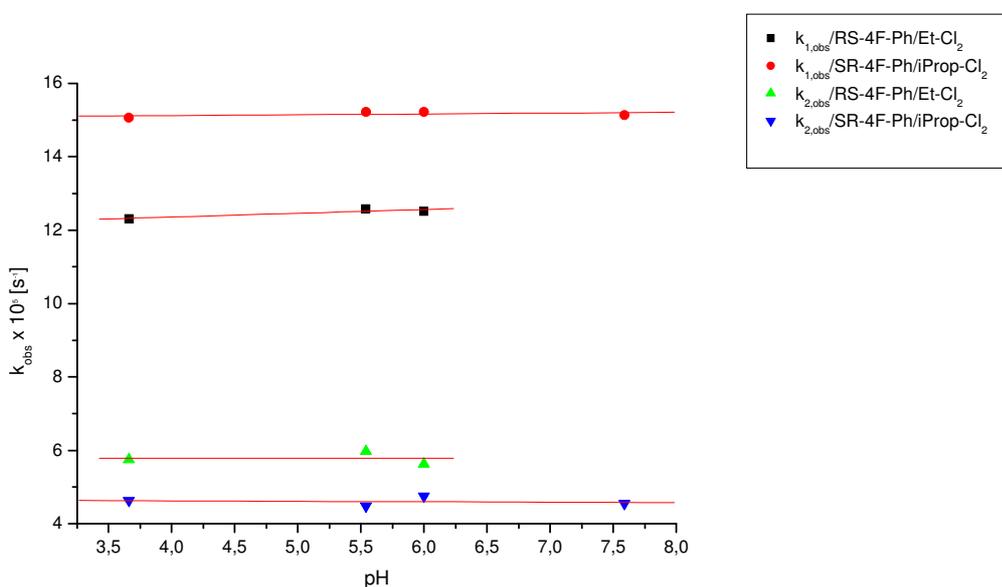


Abb.6.13 Ermittelte $k_{1,obs}$ - und $k_{2,obs}$ -Werte der Reaktion von **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** und **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** bei 37°C in Abhängigkeit vom pH-Wert mit 5mM KI-Lösung

Die Abspaltung einer als Abgangsgruppe gebundenen Dicarbonsäure kann sowohl über eine unkatalysierte spontane Ringöffnung (k_0) als auch über einen H⁺-katalysierten (k_1) Weg erfolgen. Die jeweiligen Edukte – unprotonierte und protonierte Form – stehen miteinander im Gleichgewicht [188]. Die dazugehörige Gleichung für die Ringöffnung lautet:

$$k_{obs} = k_0 + k_1 [H^+]$$

Der zweite Substitutionsschritt ist dann nur noch durch

$$k_{\text{obs}} = k_2 [\text{H}^+]$$

zu beschreiben. Dies wurde ausführlich an der Hydrolyse von Carboplatin untersucht und ist in **Abb.6.14** noch einmal schematisch dargestellt.

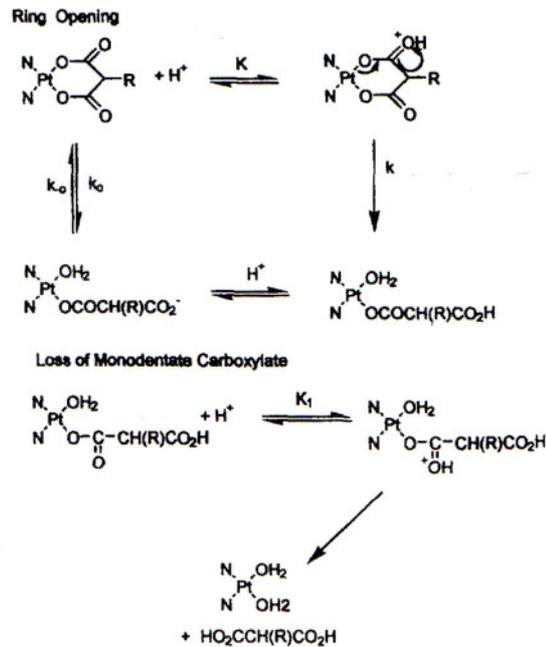


Abb.6.14 Säurekatalysierte Hydrolyse von Carboplatin nach Hay [188]

Im Basischen führt die Hydrolyse zu substituierten Dihydroxospezies [189].

Allsopp et al [190] untersuchten die Reaktion von Carboplatin mit Chlorid als Nukleophil im pH-Bereich von 4-10. Am geringsten ist die Zersetzung des Zytostatikums bei pH 6-7.5. Die Reaktionsmechanismen im Sauren, Neutralen und Basischen zeigt **Abb.6.15**.

Die säurekatalysierten Substitutionsreaktionen mit Protonierung des Sauerstoffs der Carboxylgruppe, Ringöffnung und Eintritt eines Solvensmoleküls sowie als letztem Schritt der Ligandenaustausch durch ein Nukleophil sind vielfach untersucht worden [191-194].

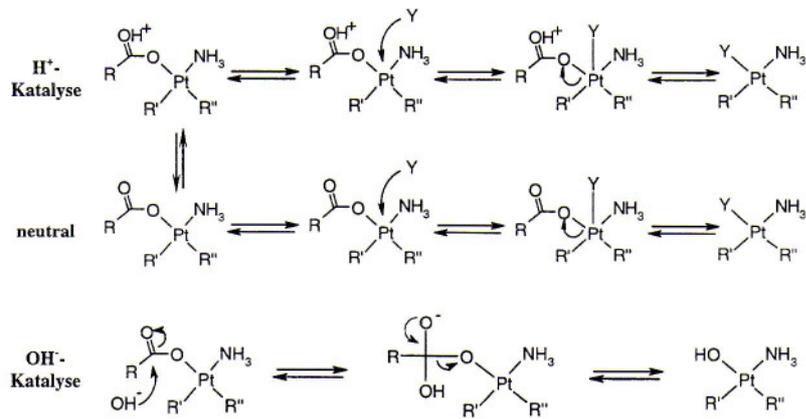


Abb.6.15 Reaktionsmechanismus für die Substitutionsreaktion Carboplatins bei saurem, neutralem und basischem pH-Wert

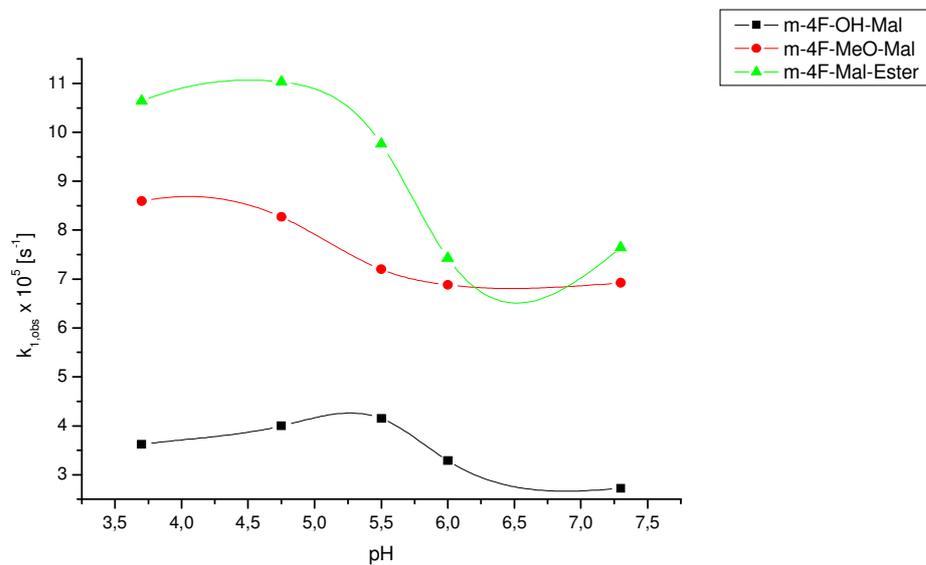


Abb.6.16 Ermittelte $k_{1,obs}$ -Werte der Malonsäurederivate als Abgangsgruppe mit 5mM KI-Lösung bei verschiedenen pH-Werten und 37°C

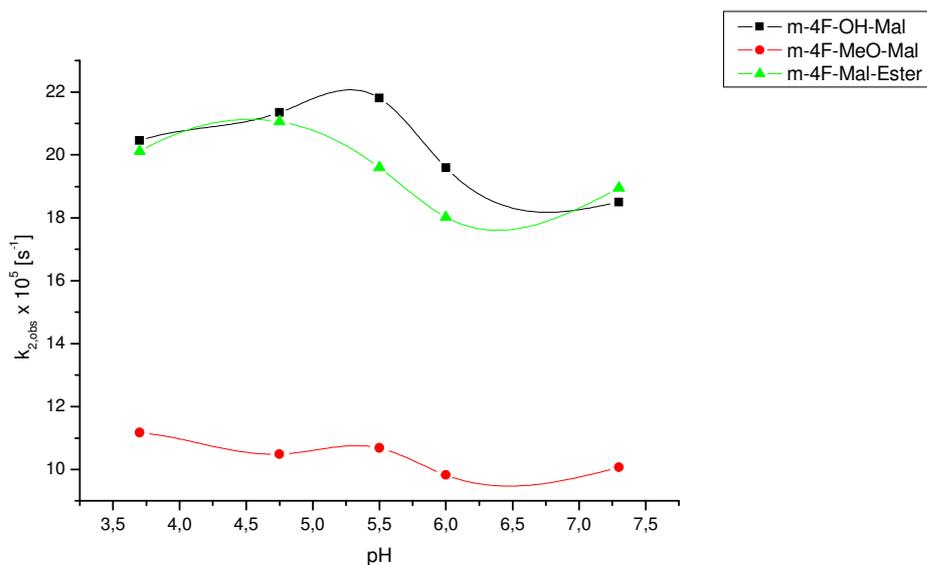


Abb.6.17 Ermittelte $k_{2,obs}$ -Werte der Malonsäurederivate als Abgangsgruppe mit 5 mM KI-Lösung bei verschiedenen pH-Werten und 37°C

Beim Vergleich der pH-Bereiche minimaler und maximaler Reaktivität der untersuchten Platin(II)-Komplexe fällt auf, dass vor allem **m-4F-OH-Mal** und **m-4F-Mal-Ester** eine starke pH-Abhängigkeit sowohl im ersten als auch im zweiten Substitutionsschritt aufwiesen. Die Verbindung **m-4F-MeO-Mal** ließ sich nur geringfügig von der H^+ -Ionen-Konzentration beeinflussen.

Die Kurvenmaxima von $k_{1,obs}$ lagen je nach Verbindung im sauren, schwach sauren sowie im schwach basischen Bereich. Die stärkste Abhängigkeit der Reaktivität vom pH-Wert zeigte der Komplex **m-4F-Mal-Ester**. Eine gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit lag sowohl im Bereich von 4.5 bis 7.5 vor. Die Umsetzung mit dem Nukleophil Iodid war hier im Gegensatz zu den anderen Verbindungen zusätzlich basenkatalysiert. **M-4F-OH-Mal** benötigte für eine erhöhte Reaktivität eine geringere H^+ -Ionen-Konzentration als der Esterkomplex. Im schwach sauren Bereich um 5.5 wurden die höchsten $k_{1,obs}$ -Werte erreicht. Ein ausgeprägtes Reaktivitätsminimum war bei pH-Werten zwischen 6 und 7 zu beobachten. **M-4F-MeO-Mal** besaß bei sinkendem pH-Wert die größte Umsetzungsgeschwindigkeit mit I. Ein Einfluss durch OH^- -Ionen blieb aus. Diese nahezu pH-unabhängige Reaktivität setzte sich im zweiten Substitutionsschritt fort.

Demgegenüber belegten die ermittelten $k_{2,obs}$ -Werte der Verbindungen **m-4F-OH-Mal** und **m-4F-Mal-Ester** eine deutlich bessere Protonierbarkeit. **M-4F-OH-Mal** ließ ähnliche pH-Bereiche maximaler Reaktivität wie im ersten Schritt erkennen. Ebenfalls erwies sich ein schwach saurer pH-Wert von 5.5 als ausreichend. **M-4F-Mal-Ester** benötigte für ein

vergleichbares Ergebnis eine höhere H^+ -Ionen-Konzentration ($pH = 4.5$). Eine gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit ließ sich zusätzlich im schwach Basischen erreichen.

Verbindung	Minimale Reaktivität		Maximale Reaktivität	
	$\underline{k_{1,obs}}$	$\underline{k_{2,obs}}$	$\underline{k_{1,obs}}$	$\underline{k_{2,obs}}$
m-4F-OH-Mal	6-7.20	<4; >6	4.75-5-5	4-5-5.5
m-4F-Mal-Ester	6-7.0	5.5-6.5	3.7-4.75; >7	3.5-4.5; >6.5
m-4F-MeO-Mal	4.75-6.0	4.7; 6.5	<4.5	5.5

Tab.6.5 pH-Bereiche minimaler und maximaler k_{obs} -Werte der untersuchten Komplexe mit chelatgebundenen Dicarbonsäuren als Abgangsgruppen

Die Basizität und Protonierbarkeit der Abgangsgruppen spielen bei der pH-Abhängigkeit eine entscheidende Rolle. Je höher die Basizität ist, desto mehr gewinnt der säurekatalysierte Weg an Bedeutung. Die Angreifbarkeit durch H^+ ist bestimmt durch die Stärke der Pt-O-Bindung, welche wiederum durch die Elektronendichte bestimmt wird.

Durch die Methoxygruppe ist ein +I-Effekt auf das Platinzentralatom vorhanden. Die damit verbundene höhere Stabilität des Chelatrings benötigt mehr H^+ -Ionen für eine gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit. Dafür spricht der pH-Bereich maximaler Reaktivität für **m-4F-MeO-Mal** von 3.5 im ersten Substitutionsschritt. Die veresterte Komponente **m-4F-Mal-Ester** besitzt wegen eines -I-Einflusses der Estergruppe auf die Pt-O-Bindung eine geringere Basizität, so dass weniger H^+ -Ionen für eine vergleichbare Reaktion ausreichen. Die größte Protonierbarkeit weist Hydroxymalonsäure als Abgangsgruppe im Komplex **m-4F-OH-Mal** auf. Die Reaktivität findet daher bereits bei geringerer H^+ -Konzentration der Lösung protonenkatalysiert statt.

6.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Reaktivitätsuntersuchungen

- Die Geschwindigkeitskonstanten der Umsetzung der untersuchten Platin(II)-Komplexe mit Iodid als Modellnukleophil konnten mit dem Kinetiksimulationsprogramm *KSIM* ermittelt werden. Dadurch ließen sich auch die Konstanten mit reversiblen Konsekutivreaktionen berechnen.
- Es sollte der Einfluss des Neutralliganden und der Abgangsgruppe auf die Reaktivität von asymmetrischen sowie von symmetrischen Platin(II)-Komplexen gegenüber I⁻ untersucht werden. Als Referenz diente **m-4F-PtCl₂**. Die beiden Substitutionsschritte sind durch den direkten nukleophilen Angriff bestimmt.
- Die asymmetrischen Komplexe lagen als Dichloroverbindungen vor. Sie trugen sowohl unterschiedlich substituierte Phenylringe als auch verschiedene Alkylreste am C2 des Neutralliganden. Hier lief der Austausch des ersten Chlorids schneller ab als der des zweiten. Die höchsten Geschwindigkeitskonstanten k_S für den Solvensweg wiesen **RS-** und **SR-Ph/Met-Cl₂** auf. Zusätzlich lagen die Werte für k_I für den Nukleophilweg niedriger als für die 4-Fluorphenyl-Komplexe. Somit erschien **Ph/Met-Cl₂** als reaktivste, asymmetrische Verbindung.
- **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** und **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂** zeigten sich reaktiver als ihre jeweiligen SR- und RS-Isomere. Dies stand in Übereinstimmung mit der Zytotoxizitätstestung (vgl. Kap.7). Die isopropylierte Verbindung besaß günstigere Daten in Bezug auf die Pharmakokinetik mit höheren Werten für k_S und im ersten Substitutionsschritt geringeren Werten für k_I . Dabei schienen sterische Einflüsse eine Rolle zu spielen.
- Die Untersuchung des Einflusses der Abgangsgruppe auf die Reaktivität wurde mit dem 4-Fluorphenylliganden durchgeführt. Die Komplexe waren mit verschiedenen Malonsäurederivaten gekoppelt. Sie zeigten alle Nukleophilabhängigkeit bei Zugabe von I⁻. Die Hydroxymalonsäure der Verbindung **m-4F-OH-Mal** zählt zu den reaktionsträgen Abgangsgruppen, was geringe k_S - und k_I -Werte belegen. Der Komplex mit Methoxymalonsäure dagegen besaß ein Reaktionsverhalten, welches eher für das einer optimalen Abgangsgruppe sprechen würde. **M-4F-MeO-Mal** wies hohe Geschwindigkeiten sowohl für den Solvens- als auch für den Nukleophilweg auf. Für **m-4F-Mal-Ester** deuteten gesteigerte k_S -Werte zwar auf eine mit **m-4F-MeO-Mal** vergleichbare Antitumoraktivität hin, allerdings könnten gesteigerte k_S -Werte und geringere für k_I auf eine günstigere Pharmakokinetik hinweisen.

- Bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit zeigte sich wie erwartet keine Beeinflussung der Reaktivität der asymmetrischen Dichlorverbindungen **RS-4F-Ph/Et-Cl₂** und **SR-4F-Ph/iProp-Cl₂**. Bei den Komplexen mit Malonsäurederivaten war eine protonenkatalysierte Steigerung der Reaktivität zu beobachten, was besonders bei **m-4F-OH-Mal** und **m-4F-Mal-Ester** zum Tragen kam. Die methoxylierte Verbindung **m-4F-MeO-Mal** wies eine geringe bis nahezu keine pH-Abhängigkeit auf. Die leichteste Protonierbarkeit zeigte **m-4F-OH-Mal**. Für eine Reaktivitätssteigerung waren hierfür weniger H⁺-Ionen notwendig. Eine basenkatalysierte Steigerung der Umsetzung war bei **m-4F-Mal-Ester** zu erkennen. Die Protonierbarkeit der Verbindungen schien von der Elektronendichte am einfach gebundenen Sauerstoff der Dicarbonsäure beeinflusst zu werden.