

Stabilität des Ferricinium-Kations und seine cytotostatische Wirkung

Stability of Ferricinium and its Cytostatic Effect

M. Wenzel*, Y. Wu, E. Liss und E. W. Neuse
Pharmazeutisches Institut der Freien Universität Berlin,
Königin-Luise-Straße 2+4, D-1000 Berlin 33
Z. Naturforsch. **43c**, 963–966 (1988);
received April 5, 1988

Ferricinium, Dimethyl-ferricinium, Deuterium, Tumor Cells, Cytostatic Effect

The relative stabilities of different ferricinium cations were studied in buffer or serum-containing solution and *in vivo* and compared with their cytostatic effects in cultures of Yoshida ascites tumor cells.
Although the ferricinium cation itself was the most unstable cation compared with the dimethyl-ferricinium cation and the deuterated ferricinium derivatives it showed the highest cytostatic effect.

Einleitung

Nach den Untersuchungen von Köpf-Maier *et al.* [1–4] sind Metallocen-Derivate wie Titanocen-Dichlorid oder Ferricinium-Salze als Cytostatika wirksam.
Da Titanocen-Dichlorid in Wasser oberhalb von pH 5,5 sehr schnell hydrolysiert, hält Döppert [5] eine direkte cytotostatische Wirkung dieser Verbindung für ausgeschlossen. Nach Döppert ist möglicherweise das Hydrolyse-Produkt Cyclopentadien für die cytotostatische Wirkung verantwortlich. Die gleiche Vermutung wird hinsichtlich der cytotostatischen Wirkung des Ferricinium-Kations geäußert. Eine cytotostatische Wirkung von Cyclopentadien (oder seines Dimeren) ist aber nach Köpf-Maier [6] auszuschließen. Um diese Problematik weiter zu studieren, haben wir die Stabilität verschiedener Kationen mit Ferricinium-Struktur *in vitro* und *in vivo* photometrisch untersucht. Außerdem wurde die cytotostatische Wirkung von Ferricinium (Fc⁺) und

von unterschiedlich stabilen Ferricinium-Derivaten bestimmt.

Material und Methoden

Substanzen

Herstellung von deuteriertem Ferrocen

Analog zur Vorschrift von Fritz *et al.* [8] wurde 12 g Ferrocen (64,5 mmol) mit 65,1 g D₃PO₄ (85%) (645 mmol) und 110 ml absolutem Dioxan versetzt. Danach wurde 5 Std. am Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde unter Eiskühlung mit NaOH (30%) neutralisiert und wäßrige Phase und ausgefallenes Phosphat mehrfach mit Ether extrahiert. Der gesammelte Etherextrakt wurde mit Wasser bis zum neutralen pH gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotations-Verdampfer eingengt. Um einen möglichst hohen Grad der Deuterierung zu erhalten, wurde das gewonnene Ferrocen noch weitere zweimal der gleichen Prozedur wie oben beschrieben unterzogen.

Ausbeute: 90,5%, C₁₀D₁₀Fe (MG = 196).

Durch NMR konnte ein Deuterierungsgrad von 96,5% festgestellt werden. Nach Reinigung durch Sublimation liegt der Schmelzpunkt des deuterierten Ferrocens bei 137–138 °C. (Schmelzpunkt von normalem Ferrocen 173–175 °C.)

Deuterierung von Dimethyl-Ferrocen

Analog zu dem oben durchgeführten Verfahren zur Deuterierung von Ferrocen wurden die Ringprotonen beim Dimethyl-Ferrocen durch Deuterium ersetzt.

Ausbeute: 82,4% an C₁₂H₆D₈Fe (MG = 222).

Durch NMR konnte bei den Ringprotonen ein Deuterierungsgrad von 91% bestimmt werden; die Methyl-Protonen zeigten keinen Deuterium-Einbau.

Herstellung der Ferricinium-Salze

FcBF₄ und Di-Methyl-FcBF₄ wurden nach der Methode von Schumann [7] hergestellt.* Herstellung der Ferricinium-Chloride: Da die Tetrafluorborat-Salze für die *in vivo*-Anwendung zu toxisch waren, wurden die Chlorid-Salze nach folgendem Verfahren hergestellt. Eine wäßrige Lösung von Ferricinium-

* M. Wenzel, Pharmazeutisches Institut der Freien Universität Berlin, Königin-Luise-Straße 2+4.
Y. Wu, Kernforschungszentrum Shanghai, China.
E. Liß, Institut für Klinische Chemie der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz, 1000 Berlin 45.
E. W. Neuse, Dep. Chemistry, University of Witwatersrand, Johannesburg, Südafrika.

Reprint requests to Prof. Dr. M. Wenzel.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/88/1100–0963 \$ 01.30/0

* Wir danken Herrn Schumann für die Überlassung einer größeren Substanzmenge der Ferricinium-Verbindungen.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

BF_4 wurde auf eine Ionenaustauscher-Säule (Dowex 50WX8, Korngröße 200–400, Gegenion H) gebracht und mit 6 N HCl eluiert. Durch Einengen im Vakuum wurde das gewünschte dunkelblaue Chlorid der Ferricinium-Derivate gewonnen. Die Lösungen wurden stets wenige Minuten vor Gebrauch hergestellt.

Serum: Nyegaard & Co. AS, Oslo, Norwegen, c/o Fa. Merck, Darmstadt.

Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche NMRI-Mäuse (24–28 g). Für die Resorptionsversuche wurden den Mäusen 0,5 ml einer Lösung von 15 mg Ferriciniumsalz/ml (ca. 0,06 mmol/l) i.p. injiziert. Zum Ausspülen des Bauchraums der getöteten Tiere nach i.p. Injektion diente 0,2 N Salzsäure und Phosphat-Puffer, pH 7,3 (0,15 molar). Die Zeitdifferenz zwischen Töten und Beginn des Ausspülens betrug maximal 1 Minute.

Photometrie

Die Konzentration der Ferricinium-Kationen wurde durch Extinktions-Messung, im Serum teilweise durch Ableitungsspektroskopie bestimmt. Photometer: SP 8-100 Py Unicam Ltd.

Vermehrung von Tumorzellen in der Suspensionskultur

Es wurden Yoshida-Ascites Tumorzellen verwendet, die sich in der Suspensions-Kultur mit einer Verdoppelungszeit von ca. 12 h vermehren.

Das benutzte Kulturmedium wurde wie folgt hergestellt: Der Grundsubstanz von 51,9 g RPMI 1640 (Firma Seromed; mit L-Glutamin, ohne NaHCO_3) wurden 825 ml HEPES-Pufferlösung (59,4 g gleichnamige Trockensubstanz der Fa. Seromed in 1650 ml H_2O), Heparin zugefügt. Nach Auffüllen mit H_2O auf 5 l wurde das Kulturmedium durch Membranfilter der Porengröße 0,2 (Hauptfilter der Fa. Satorius) steril filtriert und zur Lagerung bei -180°C tiefgefroren.

Diesem Basismedium wurde 10% foetales Kälberserum zugesetzt. Die Zellzüchtung erfolgte durch Einbringen von ca. 120000 Zellen in 4 ml Kulturmedium (3×10^4 Zellen/ml) pro Kulturröhrchen (Fa. Falcon). Auf ein Begasen der Zellkulturen konnte bei Verwendung des hier beschriebenen Kulturmediums verzichtet werden. Das optimale Milieu in pH

Bereich 7,1–7,4 konnte anhand des im Kulturmedium enthaltenen pH-Farbindikators zu jeder Zeit kontrolliert werden.

Zur Inkubation wurden die Zellkulturen über 48 Std. bei 37°C mittels eines Rollers für Kulturröhrchen konstant bewegt. Nach dieser Zeit wurde die Zellzahl bestimmt und die Relation der Vermehrung von behandelten Zellen zur Vermehrung von Kontrollzellen errechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Zunächst untersuchten wir die Stabilität von Ferricinium- und Dimethyl-Ferricinium-Ionen als Lösung der Tetrafluorborate. Wie Abb. 1a zeigt, zersetzt sich das Ferricinium-Kation bei 25°C und pH 7,3 langsam. Die Halbwertszeit beträgt ca. 240 Min.

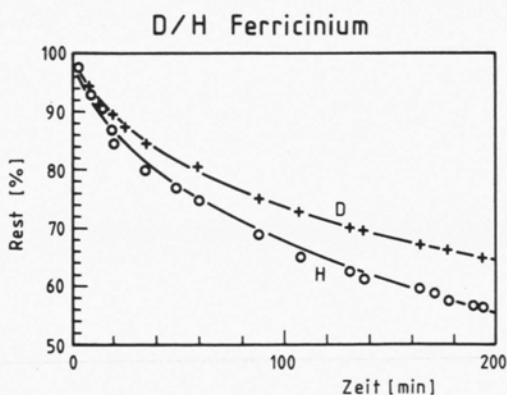
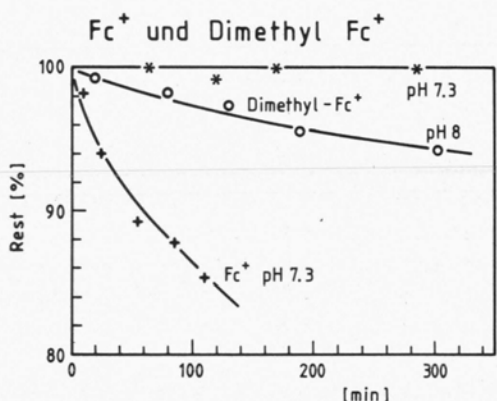


Abb. 1a/1b. Stabilität von Ferricinium-Derivaten in Puffer.
a) Ferricinium und Dimethyl-Ferricinium bei pH 7,3 bzw. 8;
b) Ferricinium (H) und Ferricinium- d_{10} (D)

Lösung jeweils 1 mg Substanz/ml Phosphat-Puffer
 $T = 25^\circ\text{C}$ $\lambda = 617\text{ nm}$

Schneller ist der Zerfall bei pH 8. (In der Abb. nicht dargestellt.) Die starke pH-Abhängigkeit des Ferricinium-Zerfalls (zu Fe^{3+} -Ionen) hatten bereits Bergmann und Lorenz dargestellt [9]. Wie durch die Donator-Eigenschaft der Methylgruppen zu erwarten, ist dagegen das Dimethyl-ferricinium sowohl bei pH 7,3 als auch bei pH 8 wesentlich stabiler. Gemäß Abb. 1b kann auch durch Austausch aller H-Atome gegen Deuterium beim Ferricinium eine Stabilisierung erreicht werden.

Im Serum ließ sich ebenfalls ein Zerfall des Ferricinium-Kations nachweisen, wie Abb. 2 durch Verringerung der Extinktion bei 617 nm zeigt. Gleichzeitig entsteht ein zweites Absorptionsmaximum ($\lambda = 535$ nm). Es handelt sich dabei möglicherweise um ein Eisen-Protein-Addukt, da in Phosphat-Puffer dieses zweite Extinktions-Maximum nicht auftritt. Eine Reaktion von Ferricinium-Ionen mit Serum-Proteinen hatten auch Bergmann und Lorenz [9] beschrieben.

Bei den Versuchen von Köpf-Maier *et al.* zur cyto-statischen Wirkung des Ferriciniums wurden die Ferricinium Salze den Mäusen dreimal jeweils in einer Dosis von 40–200 mg/kg i.p. injiziert (ca. 3–15 mg pro Maus). Die behandelten Mäuse hatten ein solides Ehrlich-Carcinom in der Nacken-Region. Das i.p. gegebene Ferricinium kann eine cytostatische Wirkung nur erzielen, wenn es selbst – oder wirksame Metaboliten – aus dem Peritonealraum abtransportiert wird und via Blutbahn den Tumor erreicht. Wir haben untersucht, wie lange sich nach i.p.-Injektionen die Ferricinium-Ionen im Bauchraum nachweisen lassen. Durch Spülen des Bauchraums mit

Puffer-Lösung konnten nach 5 Min. nur noch 6,5% der applizierten Dosis erfaßt werden; spült man jedoch mit 0,2 N Salzsäure, so kann ca. 28% der applizierten Dosis wiedergefunden werden. Nach 30 Min. war weder beim Spülen mit Puffer noch mit 2 N HCl das Ferricinium-Kation im Bauchraum nachweisbar. Eine ähnlich geringe Wiederfindung erhält man beim Dimethyl-Ferricinium, obwohl dieses Kation *in vitro* deutlich stabiler ist. Vergleiche Abb. 1 und Tab. I.

Tab. I. Wiederfindung der Kationen Fc^+ bzw. Di-Methyl- Fc^+ im Bauchraum von Mäusen nach i.p. Gabe.

Injektions-Lösung: FcCl bzw. Di-Methyl- FcCl (15 mg/ml) in Puffer;

Dosis: 270 mg/kg (1,45 mmol/kg Fc^+ ; 1,26 mmol/kg Di-Methyl- Fc^+);

Spül-Lösung: Phosphat-Puffer pH 7,3 (1/15 m) bzw. 0,2 N HCl.

Nach dem Töten wurde der Bauchraum mit $2 \times 1,25$ ml Lösung gespült. Danach wurde die Spüllösung auf pH 2 eingestellt und fotometriert.

Mittelwerte von 3 Tieren (n.n. = nicht nachweisbar).

Zeit nach Injektion [Min.]	Fc^+ [Wiederfindung in Puffer HCl]		Di-Methyl- Fc^+ [% der Dosis] Puffer HCl]	
	Puffer	HCl	Puffer	HCl
0	35,8	71,1	78,7	78,9
3	16,4	30,5	12,2	41,7
5	6,5	28,1	8,4	32,4
30	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Im Blutserum der Mäuse wurde 5 Min. nach der i.p.-Injektion von Ferricinium-Chlorid* (siehe Tab. I) kein Ferricinium-Kation gefunden. Die Erfassungsgrenze unserer photometrischen Methode für das Ferricinium liegt bei 0,2 mg Fc^+ /ml Serum. Damit hätten wir eine Resorption von 5% der injizierten Menge im Blut nachweisen können. Wenn im Bauchraum nach 5 Min. nur 30% der injizierten Dosis wiederfindbar und demnach 70% der injizierten Ferricinium-Menge verschwunden sind, jedoch im Blut nicht nachweisbar sind, muß die Ferricinium-Verbindung offensichtlich *in vivo* ebenfalls schnell zerfallen.

Dies Ergebnis wird auch durch einen Versuch an Ratten bestätigt: Nach Gabe von 60 mg/kg i.p. von Ferricinium bzw. Dimethylferriciniumchlorid war

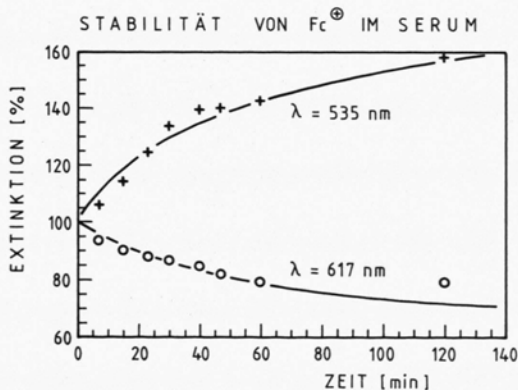


Abb. 2. Extinktion bei der Inkubation von Ferricinium- BF_4 mit Serum (Zeitabhängigkeit).

* Für die *in vivo*-Versuche wurde bewußt das Ferricinium-Chlorid gewählt, da dieses Anion am wenigsten die physiologischen Verhältnisse stört, im Vergleich zu anderen Ferricinium-Salze wie Tetrachloroferrat, BF_4^- usw.

in den verschiedenen Urin-Proben (im Zeitraum 0–48 Std.) keine Ferricinium-Verbindung nachweisbar. Das wahrscheinliche Zerfallsprodukt Cyclopentadien (oder sein Dimeres) ist jedoch nicht cytostatisch wirksam [6].

Angesichts der *in vitro* und *in vivo* nachgewiesenen Unstabilität des Ferricinium-Kations ergibt sich folgende Frage:

Kann man durch erhöhte Stabilität bei der Ferricinium-Struktur zu einer verlängerten (und damit erhöhten) cytostatischen Wirkung kommen? Eine verbesserte Stabilität der Ferricinium-Struktur erreicht man beim vollständig deuterierten Ferricinium und beim Dimethyl-Ferricinium.

Abb. 3 und Tab. II zeigen entsprechende Vergleiche zur cytostatischen Wirkung mit den verschiedenen Ferricinium-Verbindungen bei Kulturen von Yoshida-Sarkom-Zellen. Das Ausmaß der Hemmwirkung des Ferriciniums (als Tetrafluorborat) entspricht den Ergebnissen von Köpf-Maier [3]. Demnach haben die verschiedenen Anionen des Ferriciniums keinen Einfluß auf die Hemmwirkung. Diesen Befund hatte auch schon Köpf-Maier erhoben.

Die instabilere Ferricinium-Verbindung hat erstaunlicherweise eine stärkere cytostatische Wirkung als das Dimethyl-Ferricinium. Dieser Unterschied zwischen Ferricinium und Dimethyl-Ferricinium spricht für die Überlegungen von Döppert [5], daß

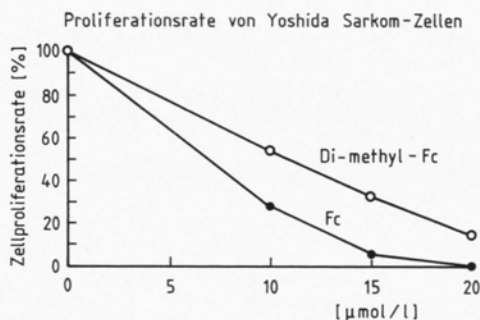


Abb. 3. Proliferationsrate von Yoshida-Sarkom-Zellen in Anwesenheit von Ferricinium- BF_4 bzw. Dimethyl-Ferricinium- BF_4 . Mittelwerte von je 4 Kultur-Röhrchen.

die cytostatische Wirkung nicht von der Ferricinium-Struktur selbst ausgeht, sondern von einem Zerfallsprodukt. Gleichzeitig zeigten die – hier nicht aufgeführten – Versuche, daß in der Kultur Yoshida Ascites-Sarkom-Zellen etwas empfindlicher reagieren als Ehrlich Ascites-Carcinom-Zellen.

Läßt man die Ferricinium-Stammlösung 24 Std. stehen, bevor man sie den Tumor-Zellen zusetzt, so ist die biologische Wirkung vermindert, und zwar beim Ferricinium deutlich stärker als bei Dimethyl-Ferricinium. Dieses Ergebnis stimmt in seiner Tendenz mit der unterschiedlichen Zerfalls-Geschwindigkeit gemäß Abb. 1 überein. Andererseits beweist dieses Experiment, daß die *in vitro* entstandenen Zerfallsprodukte des Ferriciniums im Vergleich zum Ausgangsprodukt keine erhöhte cytostatische Wirkung haben. Für die Schlußfolgerung, daß nicht die Substanzen selbst, sondern Folgeprodukte für die cytostatische Wirkung verantwortlich sind, sprechen auch die Versuche mit deuterierten Verbindungen.

Tab. II. Hemmwirkung von deuterierten und normalen Ferricinium-Salzen bei der *in vitro*-Kultur von Yoshida-Ascites-Tumorzellen. Dosierung: 10^{-5} mol/l als Tetrafluorborate.

	Zellproliferationsrate in % der unbehandelten Kontrolle	
	H-Verbindung	D-Verbindung
Ferricinium	$8,9 \pm 4,1$ (n = 4)	$54,5 \pm 12,9$ (n = 8)
Dimethyl-Ferricinium	$51,0 \pm 9,2$ (n = 6)	$57,3 \pm 6,4$ (n = 6)

Tab. II zeigt, daß das instabilere und gleichzeitig cytostatisch wirksamere Ferricinium durch Deuterierung erheblich an cytostatischer Wirkung einbüßt. Hingegen wird die cytostatische Wirkung des von vornherein stabileren Dimethyl-Ferricinium durch Deuterierung nur wenig verändert. Dies entspricht den Verhältnissen beim Zerfall des Ferricinium-Kations gemäß Abb. 1b, danach ist die deuterierte Ferricinium-Verbindung stabiler als das Ferricinium selbst.

- [1] H. Köpf und P. Köpf-Maier, Angew. Chem. **91**, 509 (1979).
- [2] P. Köpf-Maier, H. Köpf und E. W. Neuse, Angew. Chem. **96**, 446–447 (1984).
- [3] P. Köpf-Maier, Z. Naturforsch. **40c**, 843–846 (1985).
- [4] P. Köpf-Maier, J. Cancer Res. Clin. Oncol. **108**, 336–340 (1984).

- [5] K. Döppert, J. Organometallic Chem. **319**, 351–354 (1987).
- [6] P. Köpf-Maier und H. Köpf, J. Organometallic Chem. (1988), im Druck.
- [7] H. Schumann, Chemiker-Z. **108**, 289–290 (1984).
- [8] H. P. Fritz und P. Schäfer, Chem. Berichte **97**, 1836–1835 (1964).