

**Synthese, pharmakologische Testung und wirkmechanistische  
Untersuchungen zytotoxischer Eisen(salophen)-Komplexe**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Annegret Hille  
aus Stralsund

April, 2009

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ronald Gust am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin in der Zeit von Januar 2006 bis April 2009 durchgeführt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. R. Gust
  - 2. Gutachter: Prof. Dr. W. S. Sheldrick
- Disputation am: 14.07.2009

Ich danke allen, die mich durch ihr Interesse, ihr Fachwissen und ihre Hilfsbereitschaft unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Ronald Gust gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit, dieses Thema bearbeiten zu dürfen, die Diskussionsbereitschaft und den gewährten kreativen Freiraum.

Weiterhin möchte ich mich an dieser Stelle bedanken bei

Herrn Prof. Dr. William S. Sheldrick (Analytische Chemie, Fakultät für Chemie und Biochemie, Ruhr-Universität Bochum) für die Erstellung des 2. Gutachtens,

allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,

den Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazie für die Aufnahme der Kernresonanz-, Massen- und Infrarot-Spektren und Ausführung der Elementaranalysen,

Herrn Dr. J. Spandl (Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin) für die Aufnahme der Ramanspektren,

Frau Univ.-Doz. Dr. Brigitte Kircher und ihren Mitarbeitern (Immunobiologie und Stammzelllabor, Universitätsklinik für Innere Medizin V, Hämatologie und Onkologie, Medizinische Universität Innsbruck) für die Untersuchung der biologischen Aktivität ausgewählter Substanzen an verschiedenen Blutkrebszelllinien,

Herrn Dr. Dr. Aram Prokop und seinen Mitarbeitern (Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie, Charité Berlin; Kliniken der Stadt Köln) für die Analyse der Antitumoraktivität bestimmter Komplexe an ausgewählten Blutkrebszelllinien.

Großer Dank gilt den Mitgliedern der Forschergruppe FOR-630 für die Organisation, Kooperation, Diskussionsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre während meiner Aufenthalte in Bochum und Heidelberg.

Ich bin auch meiner Familie, meinen Freunden und ehemaligen Arbeitskollegen für ihr Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben, dankbar.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>2 Zielsetzung .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Übergangsmetall(salophen)-Komplexe.....</b>	<b>10</b>
3.1 Synthese und Charakterisierung .....	10
3.2 Zeitabhängiger Zytotoxizitätstest .....	11
3.3 Untersuchungen zur DNA-Interaktion.....	13
3.4 Untersuchung der Redoxaktivität .....	14
3.5 Rolle reaktiver Sauerstoffspezies ( <i>Reactive Oxygen Species</i> , ROS) .....	14
3.6 Untersuchung der Apoptose-Induktion .....	15
3.7 Überwachung zellphysiologischer Parameter .....	15
3.8 Biologische Eigenschaften gegenüber Blutkrebszellen.....	16
<b>4 [Fe<sup>III</sup>(saldach)Cl]-Komplexe.....</b>	<b>18</b>
4.1 Synthese und Charakterisierung .....	18
4.2 Zeitabhängiger Zytotoxizitätstest .....	19
<b>5 Substituierte Übergangsmetall(salophen)-Komplexe.....</b>	<b>21</b>
5.1 Synthese und Charakterisierung .....	21
5.1.1 Charakterisierung der Liganden.....	22
5.1.2 Charakterisierung der [Fe <sup>III</sup> (salophen-OMe)Cl]-Komplexe .....	23
5.1.3 Charakterisierung der [Ni <sup>II</sup> (salophen-OMe)]-Komplexe .....	25
5.2 Zeitabhängiger Zytotoxizitätstest der [Fe <sup>III</sup> (salophen-OMe)Cl]-Komplexe .....	28
5.3 Zeitabhängiger Zytotoxizitätstest der [Ni <sup>II</sup> (salophen-OMe)]-Komplexe .....	31
<b>6 [Fe<sup>III</sup>(salophen)Cl] .....</b>	<b>32</b>
6.1 Kurzzeit-Zytotoxizitätstest und lichtmikroskopische Aufnahmen.....	32
6.2 Selektivität und Resistenzüberwindung .....	33
<b>7 Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
<b>8 Ausblick .....</b>	<b>38</b>
<b>9 Zusammenfassung der Ergebnisse (deutsch) .....</b>	<b>39</b>
<b>10 Zusammenfassung der Ergebnisse (englisch) .....</b>	<b>40</b>
<b>11 Veröffentlichungen.....</b>	<b>40</b>
<b>12 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>41</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>45</b>

# 1 Einleitung

Neben der Verwendung von Übergangsmetallkomplexen als Katalysatoren in der organischen Synthese,<sup>[1-10]</sup> erweisen sich auch einige Elemente der ersten Übergangsreihe zur Aufrechterhaltung lebenswichtiger biologischer Funktionen, da sie aufgrund ihrer nur teilweise besetzten *d*-Orbitale genau definierte Redoxreaktionen ermöglichen.<sup>[11, 12]</sup> So sind Mangan und Kupfer Bestandteile von Metalloenzymen mit Schutzfunktionen, wie z. B. Superoxiddismutasen, die für die "Entsorgung" der auf natürlichem Wege entstehenden freien Radikale verantwortlich sind. Je nach Art des enthaltenen aktiven Zentrums überführt die reduzierte Form des Metalls in einer Ein-Elektronen-Reduktion das hoch toxische Superoxidradikalanion in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, woraufhin ein zweites Equivalent des Superoxidradikalanions zu molekularem Sauerstoff oxidiert wird. Im Anschluss erfolgt die Umwandlung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die Katalase in die unschädlichen Endprodukte H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub>. Das Übergangsmetall Kobalt ist als Zentralatom in einem Tetrapyrrol-System Bestandteil der Cobalamine, Eisen repräsentiert beispielsweise das Metallzentrum des Sauerstoff-Transportproteins Hämoglobin. Für eine Therapie maligner Erkrankungen kommen in zunehmendem Maße Übergangsmetallkomplexe in Betracht, da sie aufgrund ihrer Redoxpotenziale und Koordinationsgeometrien in der Lage sind, die biologische Aktivität gezielt zu steuern. Auf der anderen Seite werden die pharmakologischen Eigenschaften (Zellaufnahme, Transport) zum großen Teil auch durch die Ligandenstruktur bestimmt.

Salophen (Salophen = *N,N'*-Bis(salicyliden)-1,2-phenylendiamin) und Saldach (Saldach = *N,N'*-Bis(salicyliden)-1,2-cyclohexandiamin) zählen zu den vierzähligen Chelatliganden, die mit Übergangsmetallen stabile Komplexe bilden und neben verschiedenen anderen Derivaten für die Entwicklung metallhaltiger Zytostatika als sehr aussichtsreich gelten.<sup>[13-20]</sup>

Dass sogar freie Liganden, wie z. B. Methoxy-substituierte Salophene, als antibakterielle, fungizide und tumorwachstumshemmende Wirkstoffe eingesetzt werden, konnte kürzlich gezeigt werden.<sup>[21,22]</sup>

Selbst Lanthanoidkomplexe, die aufgrund ihrer *f*-Orbitale als Kontrastmittel für bildgebende Verfahren Verwendung finden, eignen sich gleichermaßen als Tumordiagnostika.<sup>[23,24]</sup>

Erfolgreich werden seit Jahren platinhaltige Wirkstoffe zur Behandlung bösartiger Tumoren eingesetzt.<sup>[25-28]</sup> Obwohl Cisplatin das Mittel der Wahl im Kampf gegen Hodenkrebs ist, wird sein klinischer Einsatz durch Nebenwirkungen wie Nephro-, Oto- und Neurotoxizität sowie primäre oder erworbene Resistenzen limitiert. Ein Ersatz der Chloro-Liganden Cisplatin

durch ein Cyclobutan-1,1-dicarboxylato-Strukturelement führte zu einer deutlichen Reduzierung der Nebenwirkungen, besonders der Nierenschädigung.

Bereits Anfang der achtziger Jahre berichteten Kidani *et al.* über Platinkomplexe mit DACH (DACH = 1,2-Diaminocyclohexan) als Carrier-Ligand, deren Antitumoraktivität durch die Stereochemie der anomeren Kohlenstoffatome bestimmt wird.<sup>[29, 30]</sup> Optimierungen im Bereich der Abgangsgruppe führten zu [*R,R*-1,2-Diaminocyclohexan]oxalatoplatin(II), dem etablierten Zytostatikum Oxaliplatin, das allein oder als Kombinationspräparat zur Therapie eines fortgeschrittenen Kolonkarzinoms eingesetzt wird. Im Gegensatz zu Cisplatin werden Oxaliplatin-DNA-Addukte durch das DNA-*Mismatch*-Reparatursystem nicht erkannt, sind also im Vergleich zu Cisplatin-DNA-Addukten deutlich toxischer.

Parallel dazu konnte vor 20 Jahren anhand von [1,2-Diarylethylendiamin]dichloroplatin(II)-Komplexen gezeigt werden, dass die antiproliferativen Eigenschaften über das Substitutionsmuster und die Stereochemie beider Arylringe steuerbar sind.<sup>[31]</sup> So fungiert 1,2-Bis(4-fluorphenyl)-1,2-ethylendiamin als Carrier-Ligand für die zytotoxische PtCl<sub>2</sub>-Einheit, was, verglichen mit Cisplatin, in Abhängigkeit von der Stereochemie der chiralen Kohlenstoffatome zu einer 120-fach stärkeren Anreicherung in Tumorzellen führte.<sup>[32-35]</sup> Auf der anderen Seite konnte durch einen Austausch der NH<sub>3</sub>-Liganden Cisplatins gegen eine 1,2-Phenylendiamin-Struktureinheit ein weiterer Platinkomplex erhalten werden, der unter physiologischen Bedingungen in der Lage ist, die Bildung von Radikalen zu beeinflussen, indem er in wässrigem, physiologischen Milieu leicht oxidierbar ist, was wiederum zur Ausbildung eines [*o*-Benzochinodimin]platin(II)-Komplexes führte. Zeitgleich entstehendes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist bekanntermaßen an der Entstehung radikaler Sauerstoffspezies beteiligt, die in großer Menge für Zellschädigungen verantwortlich sind.<sup>[36, 37]</sup>

In den letzten Jahren ist die Zahl der Publikationen, die sich mit der Erforschung übergangsmetallbasierter Wirkstoffe beschäftigen, rasant gestiegen.

Rutheniumkomplexe sind in Abhängigkeit von ihrer Ligandenstruktur gezielt zur Identifizierung von Metastasen einsetzbar und können als Proteinkinase-Inhibitoren dienen.<sup>[15, 38]</sup> Im Arbeitskreis von Herrn Professor Dr. Sheldrick (Ruhr-Universität Bochum) konnten eindeutige Beweise für einen interkalativen Bindungsmodus diverser Ruthenium-, Rhodium- und Iridiumverbindungen mit der DNA erbracht werden.<sup>[39-45]</sup> Eine ergänzende Übersicht über mögliche DNA-Interaktionen als Furchenbinder, Metallointerkalatoren bzw. Metalloinsertoren wird in einem Artikel von Zeglis *et al.* vorgestellt.<sup>[46]</sup>

Zu der Gruppe übergangsmetallbasierter Wirkstoffe zählen weiterhin Ferrocifenderivate, [2-Acetoxy-(2-propinyl)benzoat]hexacarbonyldicobalt (Co-ASS) oder auch Carbonyleisen-

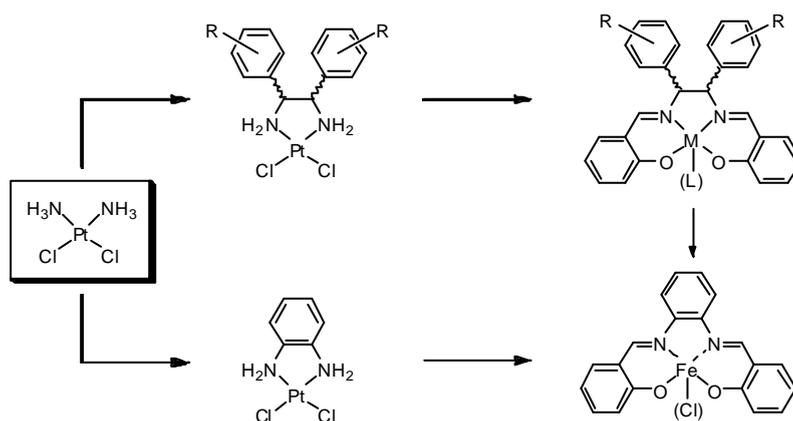
Nucleosidanaloga, die über spezifische, auf das Metallkomplexfragment zurückzuführende Wirkeigenschaften verfügen.<sup>[47-51]</sup> Außerdem ist bekannt, dass das toxische Potenzial vieler Übergangsmetallkomplexe in einer vermehrten Bildung freier Radikale besteht, was letztendlich zu massiven Zellschädigungen führt.<sup>[52-55]</sup>

Darüber hinaus ist über kovalente Addukte zwischen Nickel(diarylsalen)-Komplexen (Salen = *N,N'*-Bis(salicyliden)-1,2-ethylendiamin) und der DNA berichtet worden.<sup>[56-58]</sup>

In jüngster Zeit geraten zunehmend Eisenkomplexe mit Schiff-Base-Liganden in den Fokus aktueller Krebsforschung, darunter sogar ein Methoxy-substituierter Eisen(salophen)-Komplex, der das Wachstum cisplatinresistenter Ovarialkarzinomzellen hemmt.<sup>[18-20]</sup>

Was die verschiedenen Resistenzmechanismen betrifft, nimmt das membranständige P-Glykoprotein einen zentralen Stellenwert ein, da es für den Substratstrom aus der Zelle verantwortlich ist. Die Zytostatika, die Substrate für P-Glykoprotein sind, gehören verschiedenen Klassen an und verfügen über ein gemeinsames Strukturmerkmal: Aromatische bzw. heteroaromatische Ringsysteme. Es wäre deshalb interessant zu erfahren, ob es unsere Eisen(salophen)-Komplexe trotzdem schaffen, Resistenzen zu überwinden.

In Anbetracht der Tatsache, dass über das zuvor Erwähnte hinaus die Sauerstoffaffinität sowohl von Kobalt- als auch von Eisenkomplexen ausreichend erforscht ist, sahen wir uns dazu veranlasst, Übergangsmetallkomplexe zu entwickeln, deren biologische Eigenschaften gleichermaßen über die Auswahl des Liganden und des Zentralatoms steuerbar sind (**Abb. 1**).<sup>[59-61]</sup>



**Abb. 1** Entwicklung der Leitstrukturen  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})]$  bzw.  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$ .  $\text{M}(\text{II}) = \text{Co}$ ,  $\text{Fe}$ ;  $\text{M}(\text{III}) = \text{Fe}$ ,  $\text{L} = \text{Cl}$ .

Erste Tests verliefen viel versprechend. Eine zeitabhängige Analyse der antiproliferativen Aktivität an verschiedenen Tumorzelllinien ergab, dass sowohl der Art des Metalls als auch

der Struktur des Liganden eine große Bedeutung zukommt. So haben sich [*d,l*-*N,N'*-Bis(salicyliden)-1,2-diaryl-1,2-ethylendiamino]eisen(II)-Komplexe mit Fluor- oder Methoxy-substituierten Arylringen als besonders wirksam herausgestellt, indem sie das Tumorwachstum stärker hemmten als Cisplatin. Eine Steigerung dieses Effekts konnte erreicht werden, indem man die substituierte 1,2-Diaryl-1,2-ethylendiamin-Teilstruktur durch 1,2-Phenylendiamin ersetzte, was wiederum zu den Leitstrukturen  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})]$  bzw.  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  (**Abb. 1**) führte.<sup>[62]</sup>

Allen diesen Beobachtungen zufolge ergab sich die Notwendigkeit, die Antitumoraktivität dieser beiden Eisenkomplexe eingehender zu beleuchten, um ihrem Wirkmechanismus auf den Grund zu gehen. Es sollte analysiert werden, inwiefern das Zentralatom bzw. der Ligand die biologischen Eigenschaften dieser Verbindungen beeinflusst.

## 2 Zielsetzung

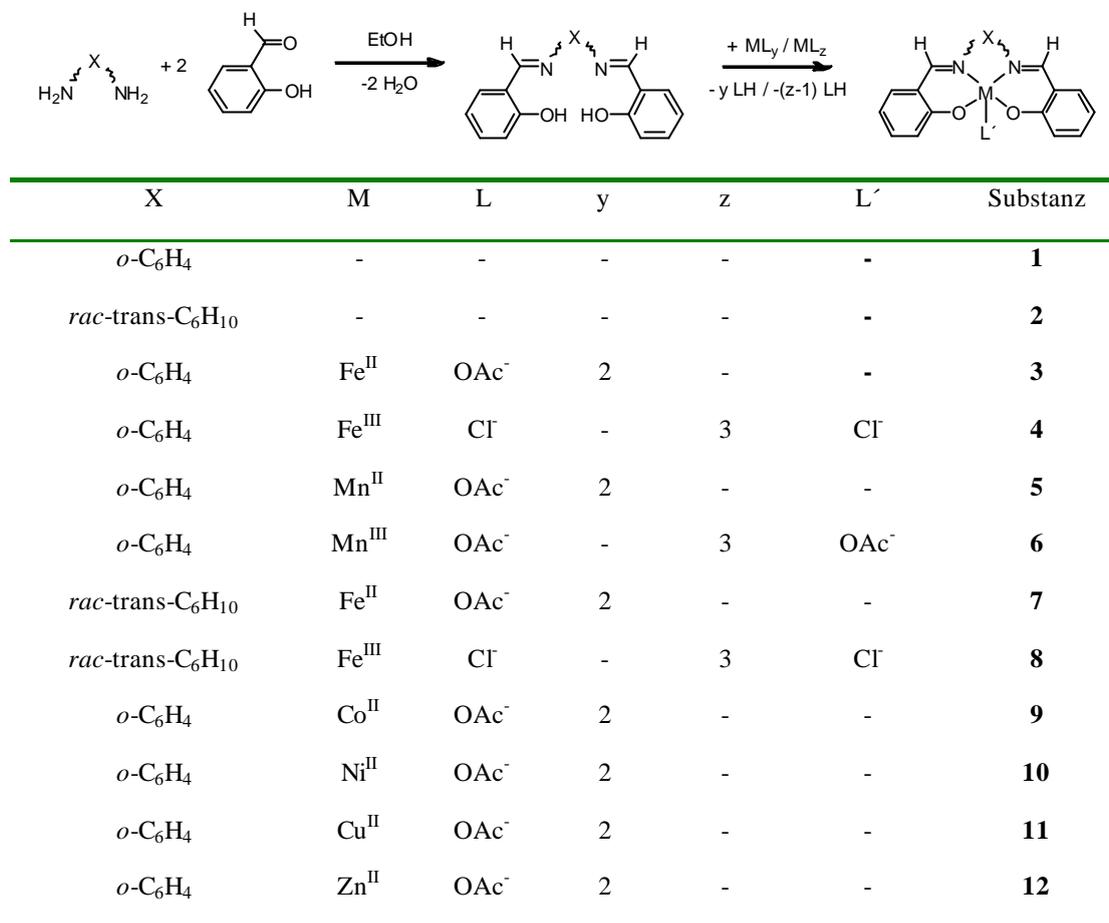
In der vorliegenden Arbeit wird ein Konzept präsentiert, das sich mit der Synthese, Charakterisierung und pharmakologischen Testung zytotoxischer Schiff-Base-Übergangsmetallverbindungen beschäftigt. Als Leitstrukturen dienten die Eisenkomplexe  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})]$  bzw.  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$ .

Anhand eines zeitabhängigen Chemosensitivitätstests sollte zunächst an der MCF7-Brustkrebszelllinie ermittelt werden, wie sich ein Austausch des Eisen-Zentralatoms gegen Mangan, Kobalt, Nickel, Kupfer oder Zink auf die Antitumoraktivität der jeweiligen Salophen-Komplexe auswirkt. Als Referenz wurde das etablierte Zytostatikum Cisplatin eingesetzt. Darüber hinaus stellte sich die Frage, inwiefern das Tumorzellwachstum durch die Änderung der Oxidationsstufe des Zentralatoms beeinflusst wird. Es sollten in diese Studie wirkmechanistische Untersuchungen mit einbezogen werden, um die Ursache der Tumorzellschädigung herauszufinden. Dabei galt es zu analysieren, in welchem Ausmaß eine übermäßige Bildung freier Radikale, die vermehrte Freisetzung des Reparaturenzyms Superoxiddismutase (SOD), Interaktionen mit der DNA und Induktion des programmierten Zelltodes für die Antitumoraktivität verantwortlich sind. Chemosensitivitätstests an weiteren Tumorzellen sollten Aussagen über die Selektivität der Substanzen ermöglichen. Um zu erfahren, wie sich strukturelle Veränderungen der Liganden auf die biologischen Eigenschaften der jeweiligen Komplexe auswirken, wurde der Salophen-Baustein 1,2-Phenylendiamin durch 1,2-Diaminocyclohexan ersetzt. Eine weitere Studie widmete sich der Fragestellung, welchen Einfluss die Stereochemie *RR*-, *SS*- und *RS*- konfiguierter  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{saldach})\text{Cl}]$ -Komplexe auf das Tumorzellwachstum ausübt.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass Methoxy-substituierte  $[d,l-N,N'$ -Bis(salicyliden)chloro-1,2-diaryl-1,2-ethylendiamino]eisen(III)-Komplexe (**Abb. 1**,  $\text{M(III)} = \text{Fe}$ ,  $\text{L} = \text{Cl}$  und  $\text{R} = \text{OMe}$ ) im Vergleich zu ihren unsubstituierten Analoga die antiproliferativen Eigenschaften steigern konnten und so wurde auch im Rahmen dieser Arbeit auch ermittelt, wie sich eine  $\text{OCH}_3$ -Substitution auf die biologischen Eigenschaften der  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$ -Komplexe auswirkt. Um die Tumorselektivität zu beurteilen, sollte eine wirksame Verbindung exemplarisch an gesunden Zellen und resistenten Tumorzellen ausgetestet werden.

### 3 Übergangsmetall(salophen)-Komplexe

#### 3.1 Synthese und Charakterisierung



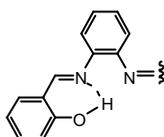
**Abb. 2** Synthetisierte Testsubstanzen

Die in **Abb. 2** angeführten Schiff-Base-Liganden **1** und **2** wurden in einer Kondensationsreaktion des Diamins mit zwei Äquivalenten Salicylaldehyd erhalten und ohne weitere Aufreinigung für nachfolgende Komplexbildungsreaktionen eingesetzt. In den IR-Spektren aller Liganden konnte der sog. "Salicyl-Effekt" beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um eine mesomere Grenzstruktur des Salicyliden-Bausteins und der Imin-Gruppe (**Abb. 3**).<sup>[63]</sup> Eine Abnahme der C=N-Schwingungsfrequenz in den IR-Spektren aller Komplexe bestätigte den Verlust dieser intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung. Außerdem konnte eine Zunahme der C-O- und C-N-Schwingungsfrequenzen bei 1278 und 1403cm<sup>-1</sup> (**1**) bzw. 1280 und 1501cm<sup>-1</sup> (**2**) in allen Komplexen beobachtet werden, was im Einklang mit Literaturdaten steht.<sup>[64, 65]</sup> In den Massenspektren wurden alle Verbindungen anhand ihrer Molekülionen-Peaks identifiziert. Die Substanzen **4** und **8** besaßen das charakteristische Chlor-Isotopenverteilungsmuster und es konnte bewiesen werden, dass es sich hierbei um

einen axial gebundenen Chloro-Liganden handelt, da der Nachweis anionisch gebundenen Chlorids negativ ausfiel. Die elementare Zusammensetzung aller Verbindungen (CHN) stimmte zu mindestens 99.6% mit den theoretisch ermittelten Werten überein.

Der Ligand **1** sowie die Komplexe **10** und **12** konnten mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie charakterisiert werden. Der Ligand **2** lag als Racemat vor.

Die Synthese und Lagerung der Verbindungen **3**, **5** und **7** erfolgte unter Inertgas-Bedingungen (Schlenk-Technik). Für die Synthese des Komplexes **12** wurden zeitgleich zwei Äquivalente Salicylaldehyd mit einem Äquivalent 1,2-Phenylendiamin und einem Äquivalent  $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in Ethanol zur Reaktion gebracht.<sup>[66]</sup>

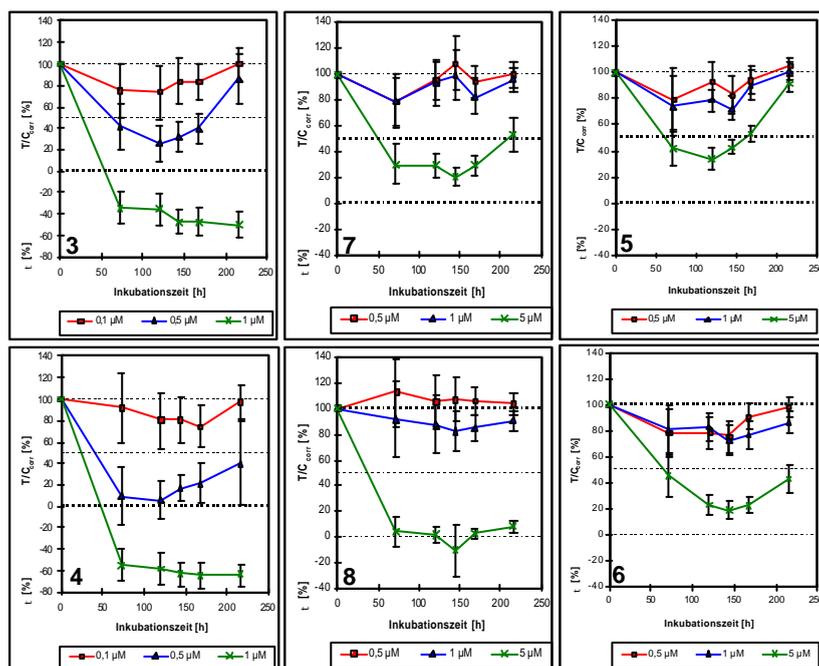


**Abb. 3** Darstellung der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung ("Salicyleffekt")

### 3.2 Zeitabhängiger Zytotoxizitätstest

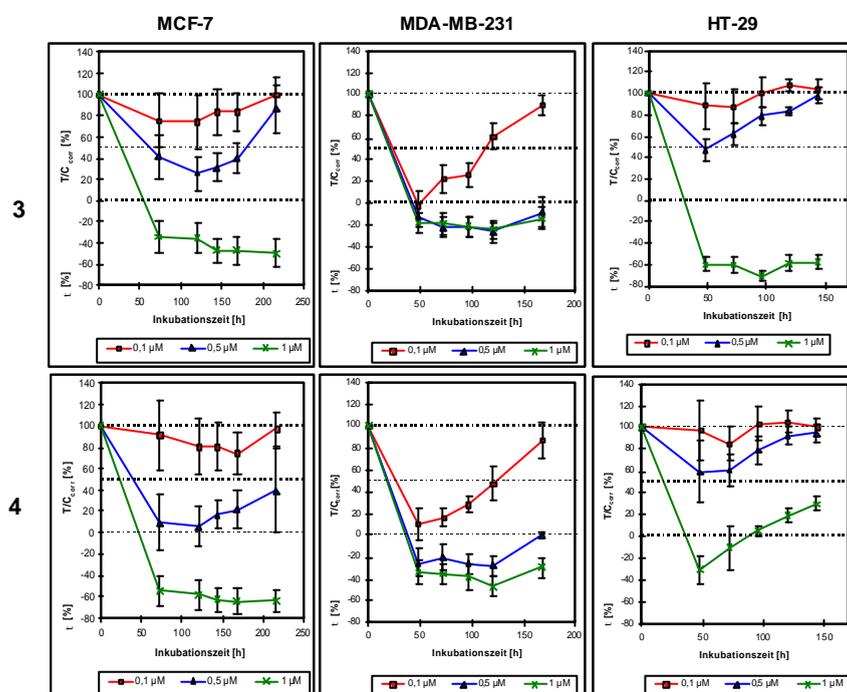
Generell kann anhand dieses Chemosensitivitätstests abgeschätzt werden, welche Auswirkungen eine Substanz auf das Tumorzellwachstum hat.<sup>[67]</sup>

$T/C_{\text{corr}} > 80\%$	keine antiproliferative Wirkung
$80\% \geq T/C_{\text{corr}} \geq 20\%$	antiproliferative Wirkung
$20\% \geq T/C_{\text{corr}} \geq 0\%$	zytostatische Wirkung
$t < 0\%$	zytotoxische Wirkung



**Abb. 4** Zeitabhängiges Zytotoxizitätsprofil der Verbindungen **3-8** an MCF7-Brustkrebszellen.

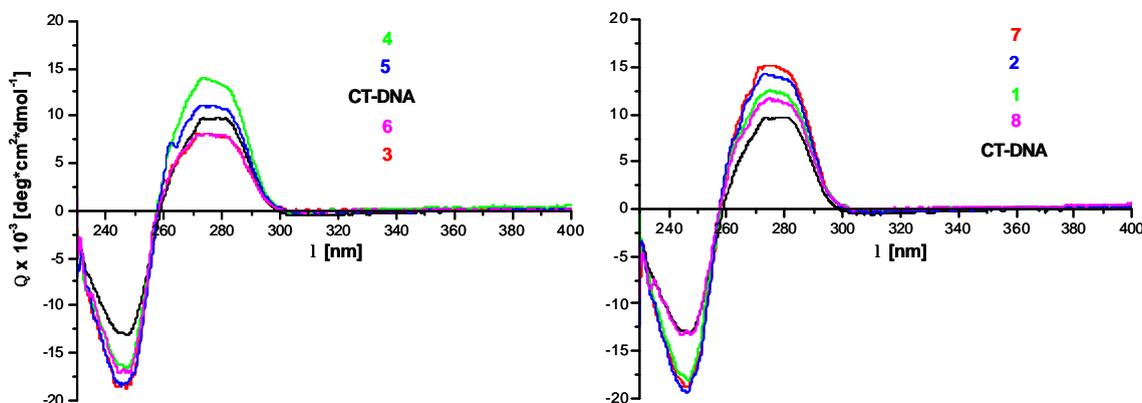
In **Abb. 4** ist der Einfluss des Zentralatoms und der Ligandenstruktur der Verbindungen **3-8** auf das MCF7-Brustkrebszellwachstum erkennbar. Es konnte eine deutliche Wirkungsabschwächung verzeichnet werden, sobald Fe(II) (**3**) ( $-50\% \leq t \leq -34\%$ ,  $c = 1\mu\text{M}$ ) durch Mn(II) (**5**) ( $74\% \leq T/C_{\text{corr}} \leq 100\%$ ,  $c = 1\mu\text{M}$ ) ersetzt wurde. Weiterhin ist ersichtlich, dass das Eisen-Zentralatom und der Salophen-Ligand für den zytotoxischen Effekt verantwortlich waren: Ein teilweises Aufheben der  $sp^2$ -Hybridisierung (Austausch des 1,2-Phenylendiamin-Strukturelements {Komplexe **3** und **4**} gegen 1,2-Cyclohexandiamin {Komplexe **7** und **8**}) führte zu einer drastischen Abnahme der zytotoxischen Eigenschaften der Eisen(salophen)-Komplexe (**3** und **4**).



**Abb. 5** Zeitabhängiges Zytotoxizitätsprofil der Verbindungen **3** und **4** an MCF7- und MDA-MB-231-Brustkrebszellen sowie HT29-Kolonkarzinomzellen.

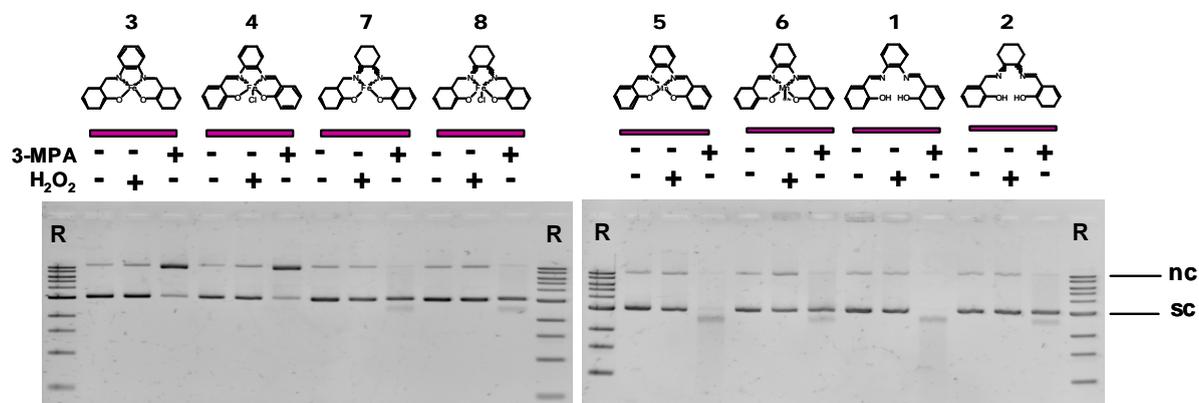
Anhand der **Abb. 5** wird das Verhalten beider Eisen(salophen)-Komplexe (**3** und **4**) gegenüber verschiedenen Tumorzellen ersichtlich. Am empfindlichsten reagierten MDA-MB-231-Brustkrebszellen auf eine Applikation beider Substanzen. Eine Änderung der Oxidationsstufe des Eisen-Zentralatoms von +II (**3**) auf +III (**4**) bewirkte nur eine geringfügige Zunahme der Zytotoxizität.<sup>[66]</sup>

### 3.3 Untersuchungen zur DNA-Interaktion



**Abb. 6** Zirculardichroismus-Messungen an CT-DNA in Anwesenheit der Substanzen **1-8**.

Anhand von Schmelztemperaturaufnahmen und Zirculardichroismus-Untersuchungen der CT-DNA in Anwesenheit der Substanzen **1-8** konnte ein interkalativer Bindungsmodus ausgeschlossen werden (**Abb. 6**). Die Schmelztemperaturmessungen wurden unter Mitwirkung von Herrn Dr. S. Schäfer im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W. S. Sheldrick in Bochum durchgeführt.<sup>[66]</sup>



**Abb. 7** Gelelektrophoretische Analyse der Wechselwirkung zwischen pBR322-Plasmid-DNA und den Substanzen **1-8** in 1xTE Puffer ohne Zusatz, in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. Mercaptopropionsäure (MPA).

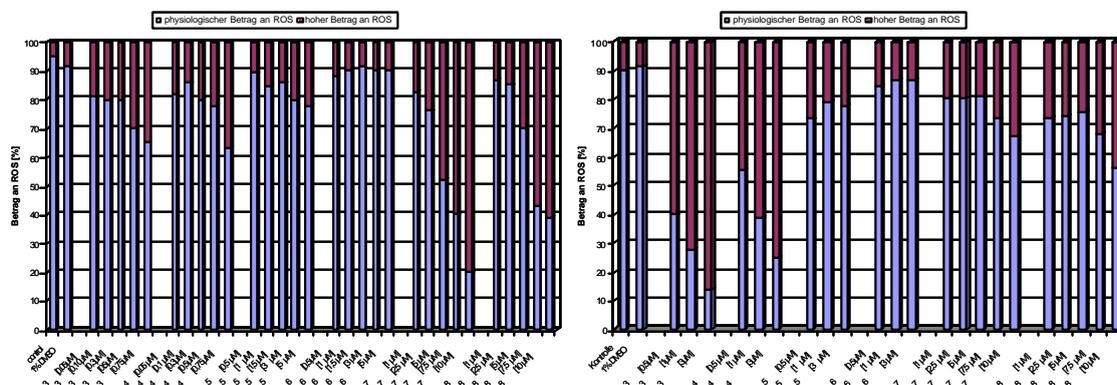
**Abb. 7** verdeutlicht die Interaktion der Verbindungen **1-8** mit pBR322-Plasmid-DNA. Beide Eisen(salophen)-Komplexe **3** und **4** führten in Anwesenheit des Reduktionsmittels MPA nur zu Einzelstrangbrüchen (*nc*), wohingegen die zirkuläre, doppelsträngige Form (*sc*) unter Einwirkung der Saldach-Analoga **7** und **8** und des Liganden **2** nahezu intakt blieb, dafür aber zusätzlich DNA-Fragmente höherer Mobilität auftraten. Ausschließlich kurze Fragmente, die

multiple DNA-Strangbrüche vermuten lassen, wurden von dem Liganden **1** und dem zweiwertigen Mangan(salophen)-Komplex (**5**) verursacht.<sup>[66]</sup>

### 3.4 Untersuchung der Redoxaktivität

Cyclovoltametrische Messungen der Substanzen **1-8**, die hier nicht explizit angeführt sind, ergaben keine Korrelation zwischen Redoxaktivität und Zytotoxizität. Diese Messungen wurden von Frau C. Bischof im Arbeitskreis von Herrn Dr. U. Schatzschneider in Bochum durchgeführt.<sup>[66]</sup>

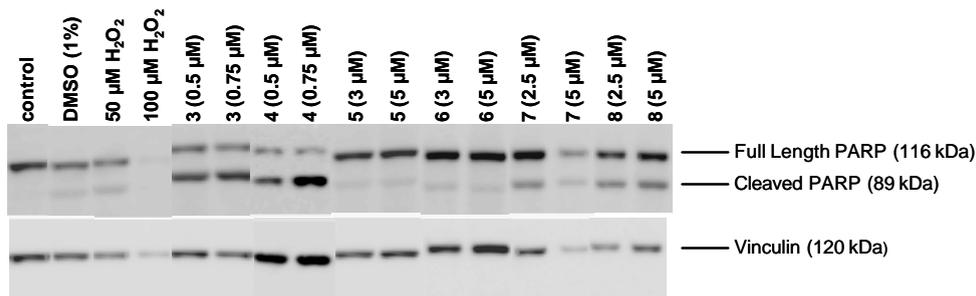
### 3.5 Rolle reaktiver Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS)



**Abb. 8** Quantifizierung freigesetzter Radikale in MCF7-Zellen (li) und Jurkat-Zellen (re), verursacht durch Anwesenheit der Substanzen **1-8**.

Sowohl in adherenten Zellen (MCF7) als auch in Suspensionszellen (Jurkat) wurde ein hohes Ausmaß an generierten freien Radikalen in Anwesenheit der Testsubstanzen ermittelt (**Abb. 8**). Verglichen mit adherent wachsenden MCF7-Tumorzellen reagierten die in Suspensionskulturen gehaltenen Jurkat-Zellen weitaus empfindlicher gegenüber freigesetzten Radikalen, die in Anwesenheit der Substanzen **3** und **4** erzeugt wurden. Anders verhielt es sich mit den Saldach-Derivaten **7** und **8**: Unter ihrem Einfluss wurden in MCF7-Brustkrebszellen fast doppelt so viele freie Radikale gebildet wie in Jurkat-Zellen. Diese Messungen wurden unter Mitwirkung der Mitarbeiter des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. S. Wölfl in Heidelberg durchgeführt.<sup>[66]</sup>

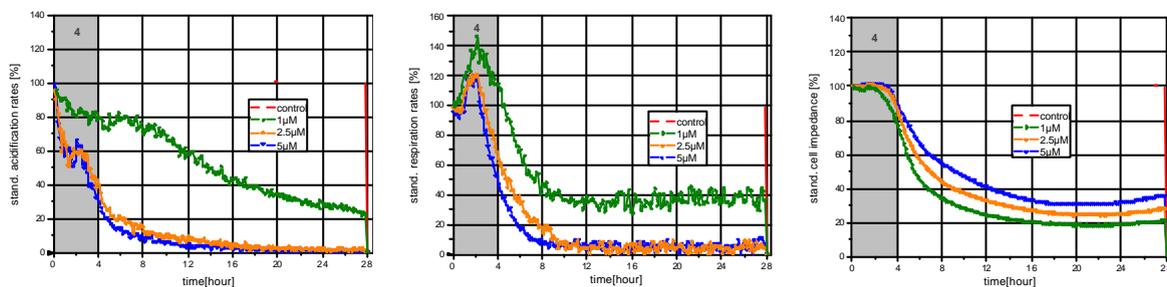
### 3.6 Untersuchung der Apoptose-Induktion



**Abb. 9** PARP-Spaltung in Anwesenheit der Substanzen **3-8** in Jurkat Zellen (Western Blotting).

**Abb. 9** zufolge verursachten alle vier Eisenkomplexe (die Salophen-Derivate **3** und **4** in geringeren Konzentrationen als ihre Saldach-Analoga **7** und **8**) eine Spaltung des Reparaturenzyms PARP in Jurkat-Zellen, was als Indiz für eine frühzeitige Einleitung apoptotischer Vorgänge interpretiert werden konnte. Diese Daten wurden von den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. S. Wölfl in Heidelberg erhoben.<sup>[66]</sup>

### 3.7 Überwachung zellphysiologischer Parameter

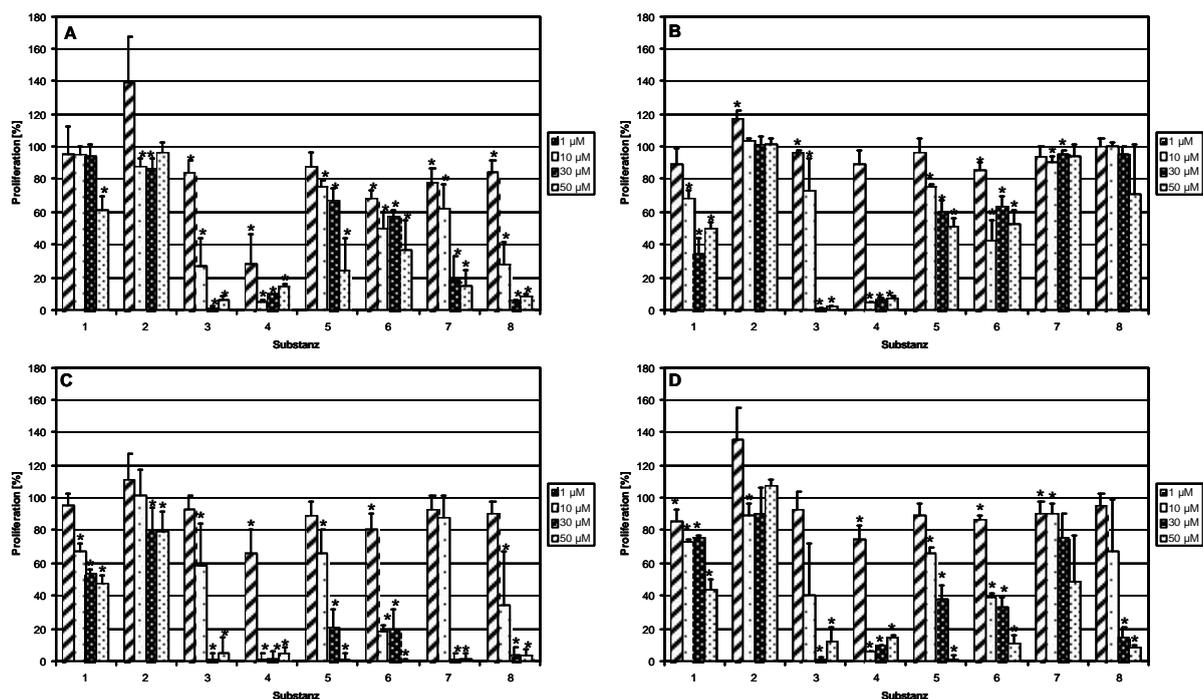


**Abb. 10** Überwachung verschiedener Parameter (pH, O<sub>2</sub>-Verbrauch, Zellhaftung), die Auskunft über Veränderungen des Zellstoffwechsels geben. Hier werden die Auswirkungen des [Fe<sup>III</sup>(salophen)Cl]-Komplexes (**4**) auf den Metabolismus von MCF7-Brustkrebszellen skizziert.

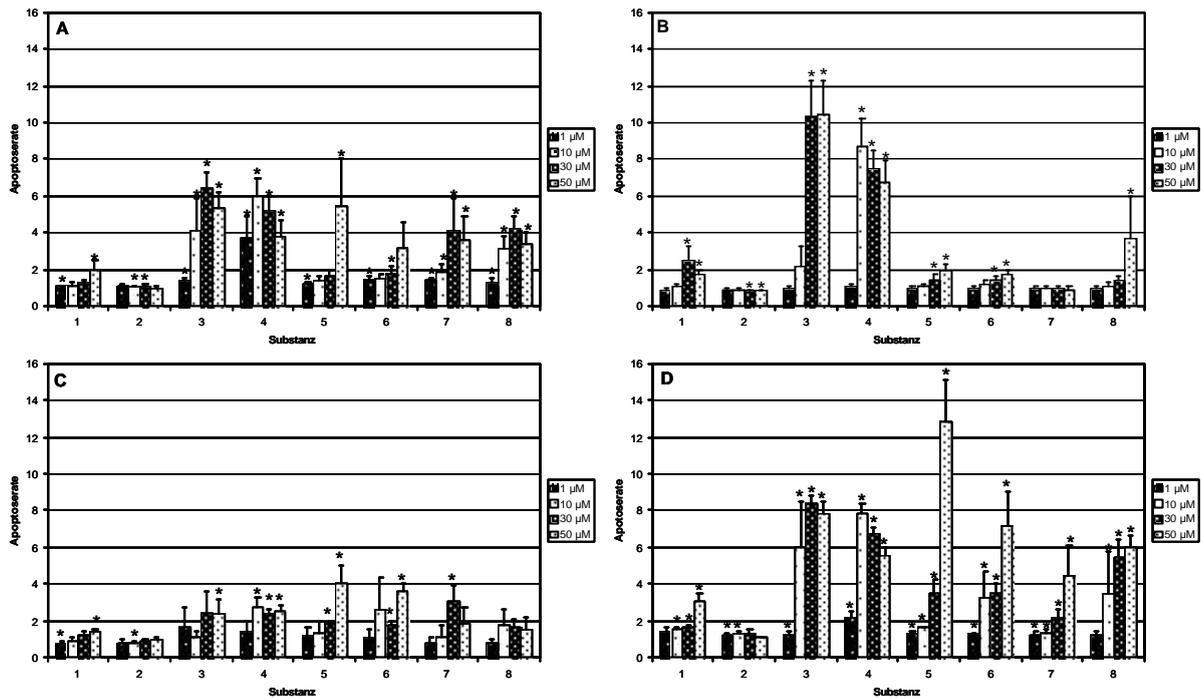
Aus **Abb. 10** wird ersichtlich, dass bereits unmittelbar nach Substanzzugabe (0-4h) eine irreversible Schädigung der Tumorzellen auftrat, was zu einem sofortigen Erlöschen sämtlicher zellphysiologischer Vorgänge führte. Auch ein kurzzeitiger Anstieg metabolischer Aktivitäten (z. B. Glykolyse) als Antwort auf den Stress, der durch die Substanz **4** verursacht wurde, konnte keinen Erholungseffekt der Zellen bewirken. Diese Messungen wurden von Herrn Dr. H. Alborzinia im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. S. Wölfl in Heidelberg durchgeführt.<sup>[66]</sup>

### 3.8 Biologische Eigenschaften gegenüber Blutkrebszellen

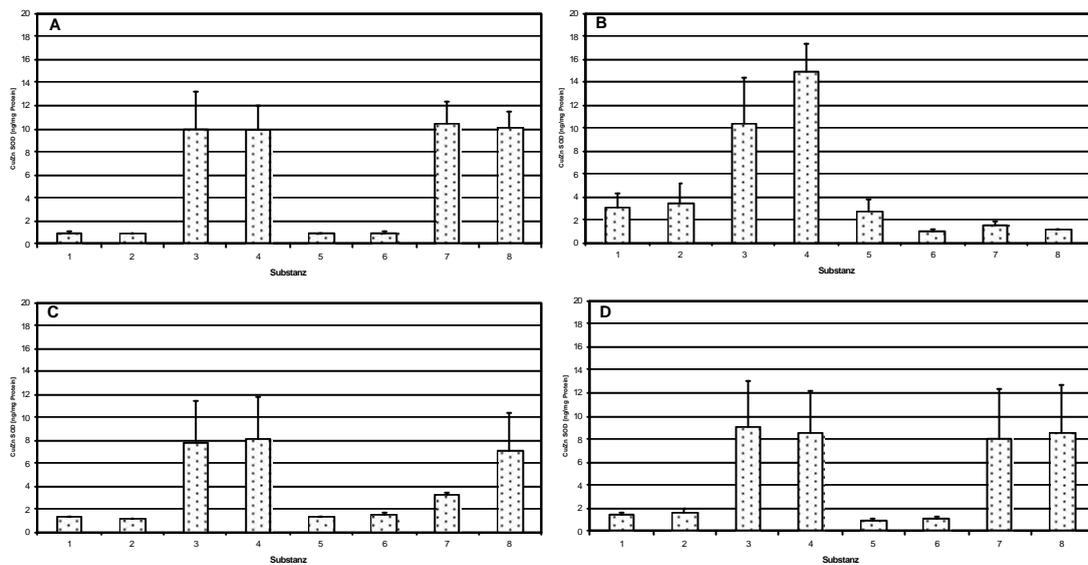
Für die folgenden pharmakologischen Untersuchungen wurden verschiedene Blutkrebszellen mit den Testsubstanzen 1-8 inkubiert. Die Bestimmung der Proliferationshemmung, Apoptoseinduktion und Superoxiddismutase-Freisetzung wurden unter der Leitung von Frau Priv.-Doz. Dr. B. Kircher in Innsbruck durchgeführt. Die Versuchsvorschriften sind im **Anhang 2** festgehalten, da die folgenden Daten noch nicht eingereicht worden sind.



**Abb. 11** Proliferationshemmende Wirkung auf die Tumorzellen HL60 (A), K562 (B), SUP-B15 (C) und U937 (D).



**Abb. 12** Apoptose-Induktion in den Tumorzellen HL60 (A), K562 (B), SUP-B15 (C) und U937 (D).



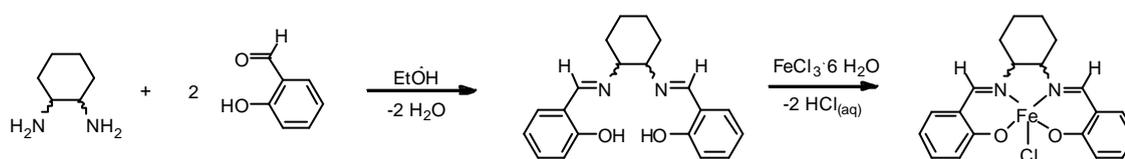
**Abb. 13** Cu/Zn-Superoxiddismutase-Freisetzung in den Tumorzellen HL60 (A), K562 (B), SUP-B15 (C) und U937 (D). Die Konzentration der entsprechenden Substanz betrug 10 µM.

Um die Tumorselektivität der Substanzen **1-8** beurteilen zu können, wurden die Liganden und Komplexe auch an Leukämie- und Lymphomzelllinien (HL60, SUP-B15, K562 und U937) ausgetestet. Es zeigte sich, dass das Tumorzellwachstum in Suspensionskulturen in gleichem Maße gehemmt wird wie in adherent wachsenden Zellen (MCF7, MDA-MB-231 und HT29). Aus **Abb. 11** wird ersichtlich, dass HL60- und SUP-B15-Zellen gleichermaßen empfindlich auf die Anwesenheit der Verbindungen **3**, **4**, **7** und **8** reagierten, wohingegen die anderen beiden Zellarten (K562 und U937) deutlicher auf die Applikation der Verbindungen **3** und **4**

ansprechen. Interessanterweise wurde Apoptose signifikant von den Substanzen **3**, **4**, **7** und **8** in K562-Zellen induziert, während der programmierte Zelltod in SUP-B15-Zellen nur in geringerem Ausmaß eingeleitet wurde (**Abb. 12**) Weiterhin stellte sich heraus, dass *ausschließlich* die Eisenkomplexe **3**, **4**, **7** und **8** zu einer vermehrten Freisetzung des Reparaturenzyms Superoxiddismutase in HL60-, SUP-B15- und U936-Zellen führten (**Abb. 13**). Interessanterweise konnte in Anwesenheit der Eisen(saldach)-Komplexe **7** und **8** in chronisch myeloischen Leukämiezellen (K562) kein erhöhter Betrag des Enzyms Superoxiddismutase detektiert werden (**Abb. 13 B**).

## 4 [Fe<sup>III</sup>(saldach)Cl]-Komplexe

### 4.1 Synthese und Charakterisierung



Cyclohexandiamin	Fe <sup>III</sup>	Cl	Substanz
<i>rac</i> -trans-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	-	-	<b>2</b>
<i>RR</i> -trans-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	-	-	<b>13</b>
<i>SS</i> -trans-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	-	-	<b>14</b>
<i>RS</i> -cis-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	-	-	<b>15</b>
<i>rac</i> -trans-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	x	x	<b>8</b>
<i>RR</i> -trans-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	x	x	<b>16</b>
<i>SS</i> -trans-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	x	x	<b>17</b>
<i>RS</i> -cis-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	x	x	<b>18</b>

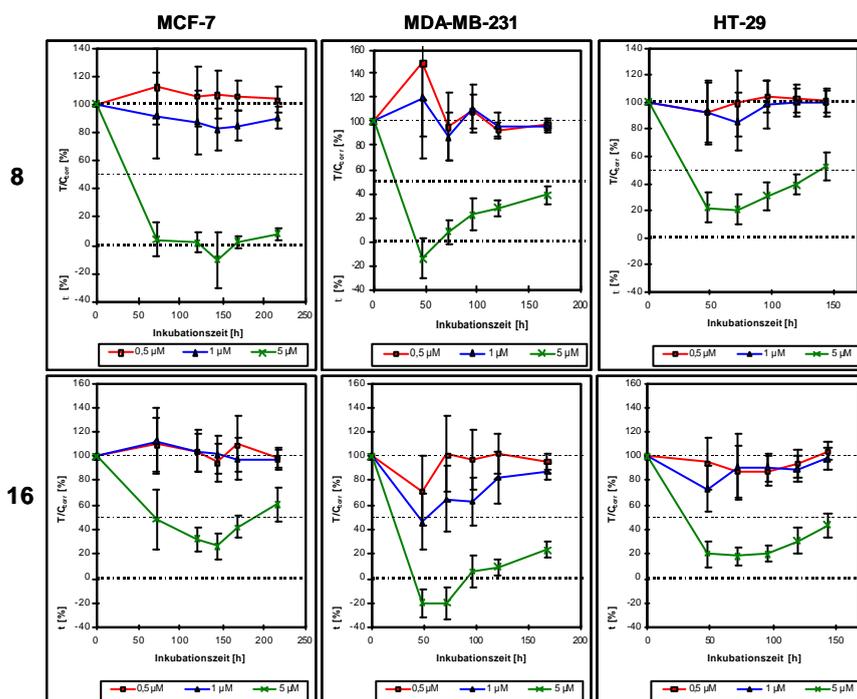
**Abb. 14** Synthetisierte Testsubstanzen

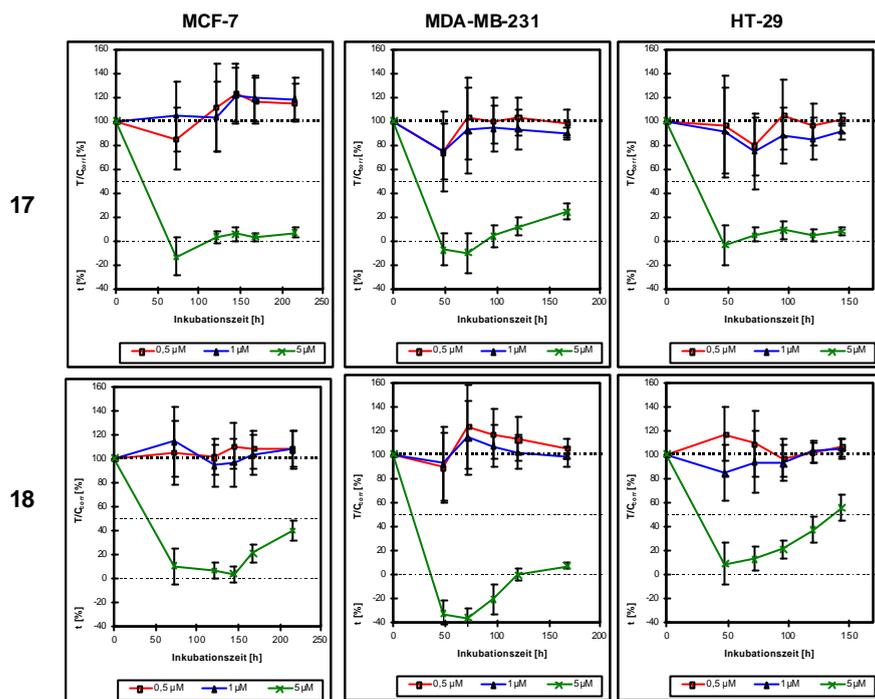
Die Synthese und Analytik des als Racemat vorliegenden Liganden **2** ist bereits dokumentiert.<sup>[66]</sup> Die Stereoisomeren **13-15** wurden in einer Kondensationsreaktion der freien Amine (*SS*-1,2-Diaminocyclohexan und *R,S*-Diaminocyclohexan) bzw. des *in situ* erzeugten Amins *RR*-1,2-Diaminocyclohexan mit zwei Äquivalenten Salicylaldehyd erhalten. Die spezifischen Drehwerte des Enantiomerenpaares **13** und **14** konnten polarimetrisch ermittelt werden, die Liganden **2** und **15** waren optisch inaktiv. Für die Synthese der Eisenkomplexe wurden die Liganden mit einem leichten Überschuss des Metallsalzes in Ethanol unter

Rückfluss erhitzt. Der Beweis für die stattgefundenene Komplexbildung konnte anhand des Molekülionen-Peaks und des Chlor-Isotopenmusters im Massenspektrum erbracht werden. In den IR-Spektren der Komplexe wurde eine zu niedrigeren Wellenzahlen verschobene C=N-Schwingungsfrequenz detektiert und die breite, für den "Salicyleffekt" der Liganden charakteristische Bande, im Bereich von  $3500\text{-}2500\text{cm}^{-1}$ , verschwand. Anhand der Protonenresonanzspektren der Liganden **13-15** konnte eine Aussage über die Intensität der Wasserstoffbrücken-Assoziation getroffen werden. Das Resonanzsignal des Imin-Protons  $H_b$  beider Enantiomeren (**13** und **14**) lag bei  $d = 8.26\text{ppm}$ , wohingegen es im Spektrum des *cis*-Isomers (**15**) aufgrund der *cis*-Konfiguration etwas entschirmter war ( $d = 8.29\text{ppm}$ ) und deshalb bei einer geringeren Magnetfeldstärke in Resonanz treten konnte: Der "Salicyleffekt" war demzufolge im *R,S*-*cis*-konfigurierten Ligand etwas ausgeprägter.

Die elementare Zusammensetzung jeder Substanz stimmte mindestens zu 99.6% mit dem theoretisch ermittelten Wert überein.<sup>[68]</sup>

## 4.2 Zeitabhängiger Zytotoxizitätstest



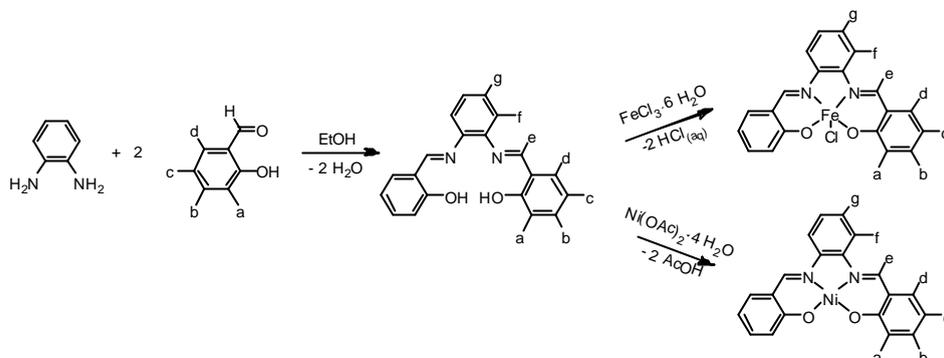


**Abb. 15** Antiproliferative Wirkung der Substanzen **8**, und **16-18** an MCF7-, MDA-MB-231- und HT29-Zellen.

Die Liganden **2** und **13-15** beeinflussten das Tumorzellwachstum nicht in dem getesteten Konzentrationsbereich ( $0.5\mu\text{M} \leq c \leq 5.0\mu\text{M}$ ). Prinzipiell waren alle Stereoisomeren an MDA-MB-231-Zellen am wirksamsten ( $-35\% \leq t \leq -10\%$ ,  $c = 5\mu\text{M}$ , Inkubationszeit: 72h, **Abb. 15**). Darüber hinaus zeigten die Verbindungen **16-18** an MCF7- und an HT29-Zellen ein nahezu identisches Wirkprofil: Einer rasanten Abnahme der Ausgangszellmenge folgte eine langsame, konstante Zunahme der Tumorzellmenge nach einer Einwirkzeit von über 50h ( $c = 5.0\mu\text{M}$ ). Da die Graphen der Komplexe **8** und **16-18** in ihrer Verlaufsform an allen drei Zelllinien denen des *racemisch* konfigurierten  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{saldach})\text{Cl}]$ -Komplexes (**8**) stark ähneln, konnte geschlussfolgert werden, dass die Stereochemie keinen signifikanten Einfluss auf die Tumorselektivität ausübt.<sup>[68]</sup>

## 5 Substituierte Übergangsmetall(salophen)-Komplexe

### 5.1 Synthese und Charakterisierung



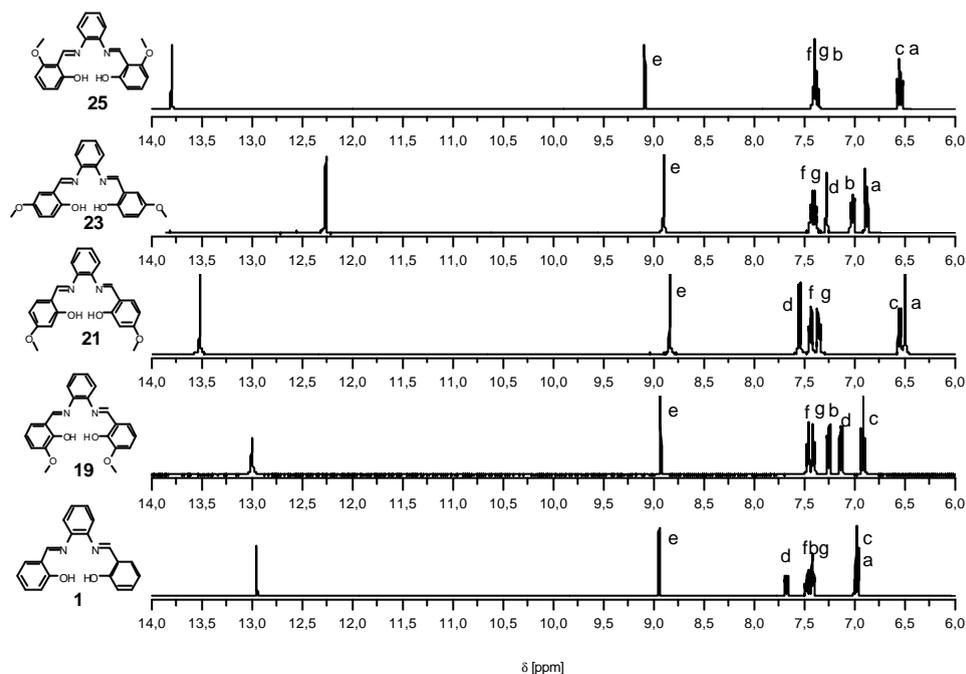
a	b	c	d	Fe	Ni	Substanz
H	H	H	H	-	-	<b>1</b>
H	H	H	H	x	-	<b>4</b>
H	H	H	H	-	x	<b>10</b>
OMe	H	H	H	-	-	<b>19</b>
OMe	H	H	H	x	-	<b>20</b>
OMe	H	H	H	-	x	<b>27</b>
H	OMe	H	H	-	-	<b>21</b>
H	OMe	H	H	x	-	<b>22</b>
H	OMe	H	H	-	x	<b>28</b>
H	H	OMe	H	-	-	<b>23</b>
H	H	OMe	H	x	-	<b>24</b>
H	H	OMe	H	-	x	<b>29</b>
H	H	H	OMe	-	-	<b>25</b>
H	H	H	OMe	x	-	<b>26</b>
H	H	H	OMe	-	x	<b>30</b>

**Abb. 16** Synthetisierte Testsubstanzen. Die Positionen e, f und g sind mit Protonen besetzt.

Die oben angeführten Liganden und Komplexe wurden in gleicher Weise erhalten, wie ihre unsubstituierten Analoga **1**, **4** und **10** (Kapitel 3.1).

### 5.1.1 Charakterisierung der Liganden

Alle Liganden wurden mit Hilfe der  $^1\text{H-NMR}$ -, IR- und Raman-Spektroskopie charakterisiert. Die Analyse der elementaren Zusammensetzung (CHN) erbrachte mindestens eine 99.6%ige Übereinstimmung mit den theoretisch berechneten Werten.<sup>[69]</sup>



**Abb. 17**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (Ausschnitt) der Liganden **1**, **19**, **21**, **23** und **25** in  $\text{DMSO-}d_6$ . Die Zuordnung der Substitutionspositionen beider Salicyl-Aromaten a-d ist in **Abb. 16** aufgelistet. Die Resonanzsignale im Bereich von 12 bis 14 ppm beziehen sich auf die phenolischen Protonen.

Aufgrund der chemischen Verschiebungen der Protonenresonanzsignale (**Abb. 17**) konnten Rückschlüsse auf die unterschiedliche Elektronendichteverteilung innerhalb der Liganden gezogen werden, was später zur Interpretation der Zytotoxizitätsbefunde ihrer Eisen- bzw. Nickelkomplexe herangezogen wurde. Die Position der Methoxy-Gruppe hatte einen geringfügigen Einfluss auf die Eigenschaften, die den "Salicyleffekt" charakterisieren. Das erkennt man daran, dass die Lage der  $\text{H}_e$ -Resonanzsignale in den Verbindungen **1**, **19** und **23** nahezu identisch ist ( $d = 8.94, 8.92$  und  $8.90\text{ppm}$ ). Die Imin-Protonen des Liganden **21** erscheinen im Vergleich zu **1** bei höherem Feld, was dem *para*-dirigierenden Effekt der  $\text{OCH}_3$ -Gruppe in **21** zuzuschreiben ist.

Die Nähe des Sauerstoffatoms der in *ortho*-Position befindlichen Methoxy-Gruppe und die Position des  $\text{H}_e$ -Protons im entschirmenden Bereich des Anisotropiekegels der Imin-Gruppe

fürten dazu, dass dieses Proton in Verbindung **25** tieffeldverschoben erscheint. Auf die Protonen H<sub>f</sub> und H<sub>g</sub> hatte eine Substitution der Salicyl-Aromaten keinen Einfluss: Ihre Resonanzfrequenzen liegen in allen Liganden ungefähr bei  $\delta = 7.4\text{ppm}$ . Dass sich die Effekte der *ortho*- und *para*-dirigierenden funktionellen Gruppen des Salicyl-Aromaten (-OH und -OMe) addierten, erkennt man daran, dass im unsubstituierten Ligand **1** die Elektronendichte zu gleichen Anteilen auf die Umgebung der Protonen H<sub>a</sub> und H<sub>e</sub> bei  $\delta = 7.0\text{ppm}$  verteilt vorliegt. Eine zweite *ortho*- bzw. *para*-dirigierende Gruppe in den Positionen *b* und *d* des Salicyl-Aromaten führte dazu, dass die Elektronendichte vermehrt im Bereich der Protonen H<sub>a</sub> und H<sub>c</sub> vorzufinden war, was sich in einer Hochfeldverschiebung der H<sub>a</sub>- und H<sub>c</sub>-Resonanzfrequenzen äußerte ( $\delta = 6.5\text{ppm}$ ). Das Signal der phenolischen Protonen wurde am meisten von einer *para*-befindlichen Methoxy-Gruppe beeinflusst ( $\delta = 12.26\text{ppm}$ , **23**). Eine Interpretation der IR- und Raman-Spektren der Liganden **19**, **21**, **23** und **25** wird in den Kapiteln 5.1.2 und 5.1.3 vorgenommen.<sup>[69]</sup>

### 5.1.2 Charakterisierung der [Fe<sup>III</sup>(salophen-OMe)Cl]-Komplexe

Die Identifizierung der Komplexe **20**, **22**, **24** und **26** erfolgte anhand der IR-Spektren, des Molekülionen-Peaks und des Isotopenmusters des Chloro-Liganden in den Massenspektren. Die elementare Zusammensetzung (CHN) ergab mindestens eine 99.6%ige Übereinstimmung mit den theoretisch berechneten Werten.

Von den substituierten Liganden und ihren Eisenkomplexen wurden IR- und Ramanspektren aufgenommen, um die Komplexbildung anhand der Metall-Heteroatom-Bindung zu verifizieren und daraus dann eine Stärke der *s*-Donor-*p*-Akzeptor-Bindung zwischen Ligand und Zentralatom ableiten zu können.<sup>[69]</sup>

Substanz	$\nu$ (C-O)
<b>19</b>	1255 s
<b>20</b>	1275 s
<b>21</b>	1246 m
<b>22</b>	1263 m
<b>23</b>	1271 s
<b>24</b>	1303 m
<b>25</b>	1251 s
<b>26</b>	1257 s

**Tab. 1** Frequenzen [ $\text{cm}^{-1}$ ] ausgewählter IR-Banden der Liganden und ihrer [Fe<sup>III</sup>(salophen-OMe)Cl]-Komplexe. Eine Zuordnung erfolgte in Anlehnung an publizierte Daten.<sup>[70]</sup>

Bezieht man sich bei der Beurteilung der C-O-Bindungsstärke auf die entsprechende Schwingungsbande im IR (**Tab. 1**), so lässt sich für die Liganden folgender Trend erkennen: Die stärkste C-O-Bindung konnte dem *para*-substituierten Ligand ( $\nu = 1271\text{cm}^{-1}$ ) zugeordnet werden. Es folgten beide *ortho*-substituierte Derivate **19** und **25** ( $\nu = 1255$  bzw.  $1251\text{cm}^{-1}$ ) und zuletzt der *meta*-substituierte Ligand **21** ( $\nu = 1246\text{cm}^{-1}$ ). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in allen Komplexen die phenolische C-O-Schwingungsbande um einen Betrag  $\Delta\nu$  zu höheren Frequenzen verschoben wurde, die Bindungsstärke folglich zugenommen hatte. Die stärkste C-O-Bindung besaß der *para* zur O-Fe-Bindung substituierte Komplex **24** ( $\Delta\nu = 32\text{cm}^{-1}$ ), gefolgt von dem *ortho*-substituierten Derivat **20** ( $\Delta\nu = 20\text{cm}^{-1}$ ). Die Verbindung mit der Methoxy-Gruppe in *meta*-Position zur O-Fe-Bindung (**23**) wies die drittstärkste C-O-Bindung auf ( $\Delta\nu = 17\text{cm}^{-1}$ ) und der *ortho*-substituierte Eisenkomplex **26** zeigte nur eine geringe Differenz ( $\Delta\nu = 6\text{cm}^{-1}$ ).

Substanz	$\nu$ (C=N)	$\nu$ (Ar-O)	$\nu$ (Fe-N)	$\nu$ (Fe-O)	$\nu$ (Fe-Cl)
<b>19</b>	1612 s	1573 m	-	-	-
		1467 s			
<b>20</b>	1602 w	1546 s	529 w	456 m	340 s
		1435 s			
<b>21</b>	1616 m	1566 w	-	-	-
		1464 w			
<b>22</b>	1608 w	1522 w	520 w	480 w	338 s
		1374 w	504 s	439 m	332 s
<b>23</b>	1623 m	1571 s	-	-	-
		1489 s			
<b>24</b>	1616 s	1535 s	636 m	476 w	321 m
		1463 s			
<b>25</b>	1614 m	1586 s	-	-	-
		1469 s			
<b>26</b>	1604 w	1541 s	540 w	480 m	322 s
		1431 s			

**Tab. 2** Ausgewählte Raman-Frequenzen [ $\text{cm}^{-1}$ ] der freien Liganden und ihrer Eisenkomplexe. Eine Zuordnung erfolgte in Anlehnung an bereits publizierte Daten<sup>[70, 71]</sup>

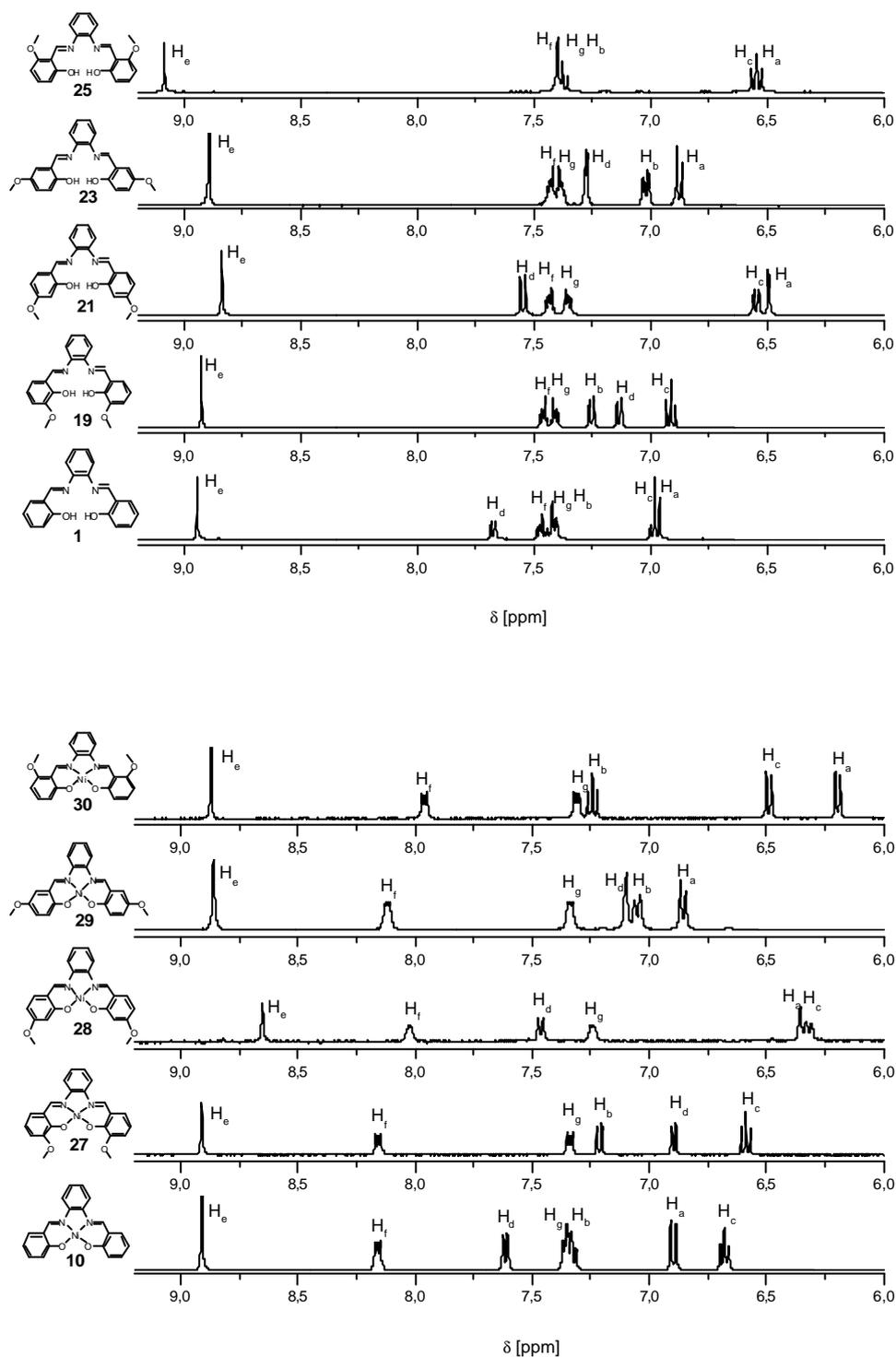
Die Metall-Heteroatom-Bindung wurde mit Hilfe der Raman-Spektroskopie identifiziert und sich bei der Zuordnung auf bereits publizierte Daten berufen, da Überlagerungen mit anderen Schwingungsbanden in diesem Wellenzahlbereich auftreten können (**Tab. 2**).

Die Schwingungsfrequenz der Fe-N-Bindung lag in allen Komplexen oberhalb der der Fe-O-Bindung. Wegen des geringfügig niedrigeren Elektronegativitätswertes des Stickstoffs können seine Orbitale besser mit denen des Zentralatoms überlappen, es resultieren bessere  $\sigma$ -Donor-Eigenschaften. Die Fe-N-Bindung wird gestärkt, was sich in einem Anstieg der Schwingungsfrequenz widerspiegelte.

Anhand der Intensität der Raman-Banden konnte der Charakter der C=N-Bindung vor und nach der Komplexbildung beurteilt werden. Verglichen mit den Spektren der Komplexe trat die C=N-Schwingungsbande bei allen Ligandenspektren intensiver in Erscheinung, was auf eine sehr gute Polarisierbarkeit der vollständig durchkonjugierten Salophen-Grundstruktur zurückzuführen ist und damit ramanintensiv ist. Eine Komplexbildung führte dazu, dass das freie Elektronenpaar der Stickstoffatome nicht mehr in Resonanz mit den  $sp^2$ -hybridisierten Kohlenstoffatomen treten konnte, was mit einer Intensitätsabnahme der C=N-Schwingungsbande einherging.

### 5.1.3 Charakterisierung der $[Ni^{II}(\text{salophen-OMe})]$ -Komplexe

Neben der routinemäßigen Identifikation der Verbindungen (Molekülionen-Peak im Massenspektrum, Verschiebungen der C=N- und der C-O-Schwingungsfrequenzen im IR nach einer Koordination an das Zentralatom) besitzen die  $[Ni^{II}(\text{salophen-OMe})]$ -Komplexe den Vorteil, dass es sich bei ihnen um diamagnetische Verbindungen handelt, die der Protonenresonanzspektroskopie zugänglich sind. Auf diese Weise konnte die Auswirkung der Komplexbildung auf die Elektronendichteverteilung mit Hilfe der  $^1H$ -NMR-Spektroskopie genau analysiert werden (**Abb. 18**). Die noch unveröffentlichten Daten der Komplexe **27-30** finden sich im **Anhang 2**.



**Abb. 18** <sup>1</sup>H-NMR-Spektren (Ausschnitt) der Liganden und ihrer Ni(II)-Komplexe in DMSO-*d*<sub>6</sub>. Die Zuordnung der Substitutionspositionen a-d ist in der Tabelle (**Abb. 16**) angeführt.

Anhand der chemischen Verschiebungen wurde festgestellt, dass die Elektronendichteverteilung in den Liganden signifikant von der Stellung der Methoxy-Gruppe abhing, und die Komplexierung zusätzlich eine Trennung überlagerter Signale hervorrief.

Das Imin-Proton ( $H_e$ ), das im negativen Bereich des Anisotropiekegels der C=N-Doppelbindung liegt, erfuhr einen Hochfeld-Shift, sobald sich der elektronenschiebende Substituent in *para*-Positionen ( $d = 8.84\text{ppm}$  {**21**}) zur Azomethin-Struktureinheit befand. Die Methoxy-Gruppe in *ortho*-Position ( $d = 9.02\text{ppm}$  {**25**}) zur C=N-Doppelbindung führte zur Tieffeldverschiebung des Protonensignals  $H_e$ . Eine Komplexierung bewirkte in beiden Fällen eine Zunahme der Elektronendichte im Bereich der Imin-Protonen ( $d = 8.67$  {**28**} und  $8.87\text{ppm}$  {**30**}).

Welchen enormen Einfluss das Nickel-Zentralatom auf die elektronische Umgebung der Liganden ausübte wurde anhand der chemischen Verschiebung der Brückenprotonen  $H_f$  und  $H_g$  ersichtlich: Während das Resonanzsignal von  $H_g$  in allen Komplexen an nahezu unveränderter Position vorzufinden war, erschien das von  $H_f$  deutlich tieffeldverschoben, was auf die aufgehobene freie Drehbarkeit der Liganden und die Anisotropieeffekte der Imin-Doppelbindung zurückzuführen sein könnte.

Darüber hinaus bewirkte die Position der Methoxy-Gruppe eine Umverteilung der Elektronendichte innerhalb der Salicyl-Aromaten der Nickelkomplexe. Der Einfluss der Stellung der  $\text{OCH}_3$ -Gruppe auf die chemische Verschiebung aller Salicyl-Protonen der Liganden wurde bereits in Kap. 5.1.1. beschrieben. Mit dem Einbau des Nickel-Zentralatoms war größtenteils eine diamagnetische Verschiebung der Protonen  $H_a$ - $H_d$  verbunden. Interessanterweise konnte zusätzlich eine Separation der Signale  $H_a$  und  $H_c$  in den Verbindungen **10** und **30** beobachtet werden.

Nickel verfügt aufgrund seiner Stellung im Periodensystem der Elemente über energetisch abgesenkte *d*-Orbitale und besitzt sehr gute *s*-Akzeptor- aber weniger gute *p*-Donor-Eigenschaften, um mit dem betreffenden Chelatligand eine synergistische Wechselwirkung einzugehen. Dieser zeichnet sich durch zwei unterschiedliche Heteroatome (N, O) aus, von denen N der bessere *s*-Donor ist. Bezieht man sich auf die Resonanzfrequenzen der phenolischen Protonen der Liganden **19** und **23** (Abb. 17), so wäre zu erwarten, dass bei den entsprechenden Nickelkomplexen **27** und **29** viel Elektronendichte in die *d*-Orbitale des Nickels gelangt und in Form einer *p*-Rückbindung in die antibindenden Sauerstoff-Orbitale zurückgegeben wird, was zu einer Schwächung der Ni-O-Bindung führen und gleichzeitig eine Stärkung der C-O-Bindung bewirken würde.

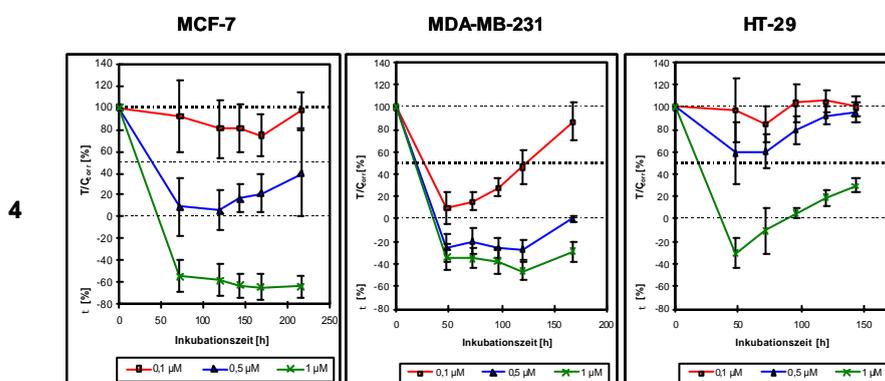
Das konnte anhand unserer IR-Ergebnisse der Nickelkomplexe nicht bestätigt werden (Tab. 3): Die C-O-Schwingungsfrequenz in Verbindungen **27** und **29** wurde statt dessen im Vergleich zu den freien Liganden zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben, was einer

geschwächten Bindung entsprechen würde. Daher sollte eine simultane Beteiligung beider Heteroatome an diesem *s*-Donor-*p*-Akzeptor-Synergismus genauer analysiert werden.

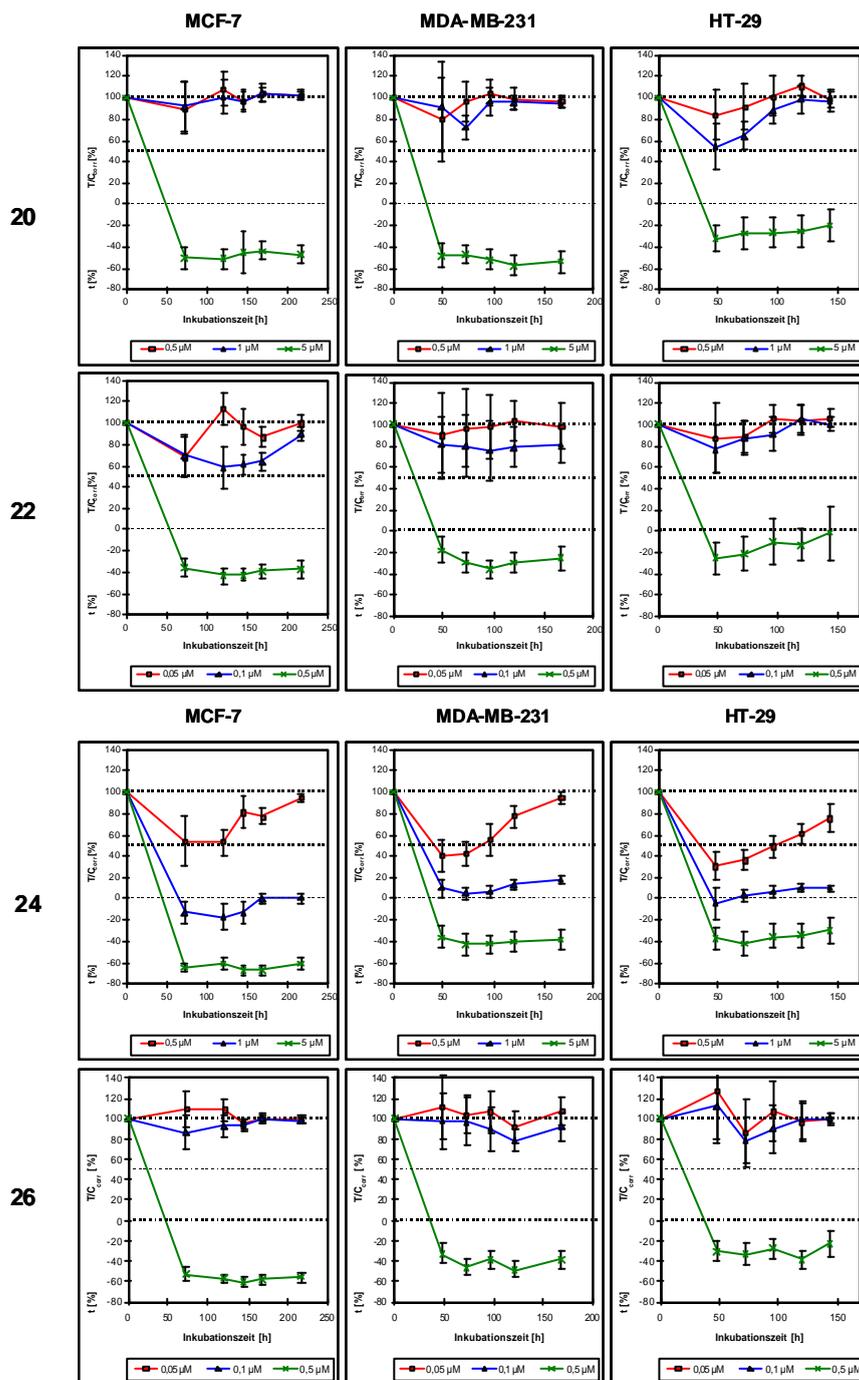
Substanz	$\tilde{\nu}$ (C-O)
<b>19</b>	1255 s
<b>27</b>	1247 s
<b>21</b>	1246 m
<b>28</b>	1254 m
<b>23</b>	1271 s
<b>29</b>	1253 m
<b>25</b>	1251 s
<b>30</b>	1254 s

**Tab. 3** Frequenzen [ $\text{cm}^{-1}$ ] ausgewählter IR-Banden der Liganden und ihrer  $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{salophen-OMe})]$ -Komplexe. Eine Zuordnung erfolgte in Anlehnung an Literaturwerte.<sup>[70]</sup>

## 5.2 Zeitabhängiger Zytotoxizitätstest der $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen-OMe})\text{Cl}]$ -Komplexe



**Abb. 19** Zeitabhängiges Zytotoxizitätsprofil des unsubstituierten Komplexes  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  (4) an MCF7-, MDA-MB-231- und HT29-Zellen.



**Abb. 20** Zeitabhängiges Zytotoxizitätsprofil der Substanzen **20**, **22**, **24** und **26** an MCF7-, MDA-MB-231- und HT29-Zellen

Die **Abb. 19** und **20** demonstrieren den signifikanten Einfluss einer der  $\text{OCH}_3$ -Gruppe auf die biologischen Eigenschaften der  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen-OMe})\text{Cl}]$ -Komplexe **20**, **22**, **24** und **26**. Jede Verbindung separat betrachtet zeigte an allen drei Zelllinien einen fast identischen Kurvenverlauf (**Abb. 20**), wohingegen das unsubstituierte Analogon  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  (**4**) in unterschiedlichem Maße die Proliferation von MCF-7-, MDA-MB-231- und HT-29-Krebszellen beeinflusste (**Abb. 19**). Eine Substitution führte offenbar zu einem totalen Verlust der Tumorselektivität.

Die Einzigartigkeit der Verbindung **24** im Vergleich zu den anderen Komplexen **20**, **22**, und **26** zeichnete sich durch eine flache Konzentration-Wirkungs-Kurve aus, wohingegen die anderen Derivate einen steilen Verlauf widerspiegeln.

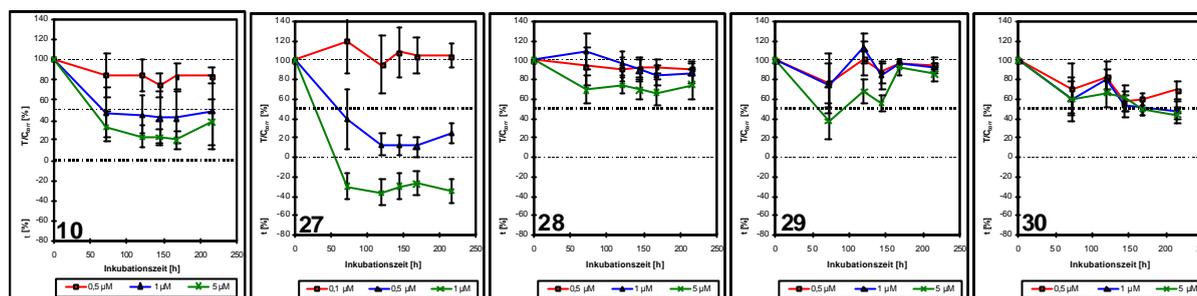
Um eine Korrelation zwischen den biologischen Eigenschaften der Komplexe **20**, **22**, **24** und **26** und ihrer elektronischen Struktur zu erkennen, wurde die chemische Verschiebung der phenolischen Protonen der dazugehörigen Liganden **19**, **21**, **23** und **25** in die Interpretation mit einbezogen.

Anhand der chemischen Verschiebung der phenolischen Protonen sollte indirekt auf die Stärke der O-Fe-Bindung geschlossen werden. Die unterschiedliche Position der OCH<sub>3</sub>-Gruppe könnte die Stärke der Sauerstoff-Eisen-Bindung beeinflussen und folglich eine *end-on*-Koordination molekularen Sauerstoffs begünstigen, wodurch Folgereaktionen hervorgerufen werden könnten, die wiederum das Tumorzellwachstum beeinflussen würden.

Es wird vermutet, dass eine Substanz umso toxischer ist, je mehr Elektronendichte über den phenolischen Sauerstoff an das Eisen weitergeleitet werden kann, denn die Substanzen **20** und **24** ( $d = 12.27$  bzw.  $13.00\text{ppm}$ ) mussten im Vergleich zu den Regioisomeren **22** und **26** ( $d = 13.52$  bzw.  $13.78\text{ppm}$ ) in einer zehnfach höheren Konzentration appliziert werden um Tumorzellen abtöten zu können. Allerdings zeigte die Substanz **24** ein flaches, fein abgestuftes Wirkprofil an allen Tumorzellen.

Eine umfassende Struktur-Wirkungs-Beziehung aufgrund der Elektronendichteverteilung zu erheben, die wiederum auf der Interpretation der Ramandaten basiert, ist aber erst dann sinnvoll, wenn eine eindeutige Zuordnung getroffen werden kann (ein Vergleich theoretisch berechneter Frequenzdaten mit experimentell erhobenen). Dann wäre es möglich, einen Donor-Akzeptor-Synergismus der O-Fe-Bindung zu beschreiben, die Bindungsstärken zu ermitteln, die Möglichkeit einer Sauerstoffanlagerung in der 6. Koordinationsstelle der Komplexe zu diskutieren, um letztendlich einen Zusammenhang zur biologischen Aktivität der Substanz herstellen zu können.<sup>[69]</sup>

### 5.3 Zeitabhängiger Zytotoxizitätstest der $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{salophen-OMe})]$ -Komplexe



**Abb. 21** Zeitabhängiges Zytotoxizitätsprofil der Nickelkomplexe **10**, **27**, **28**, **29** und **30** an MCF7-Brustkrebszellen.

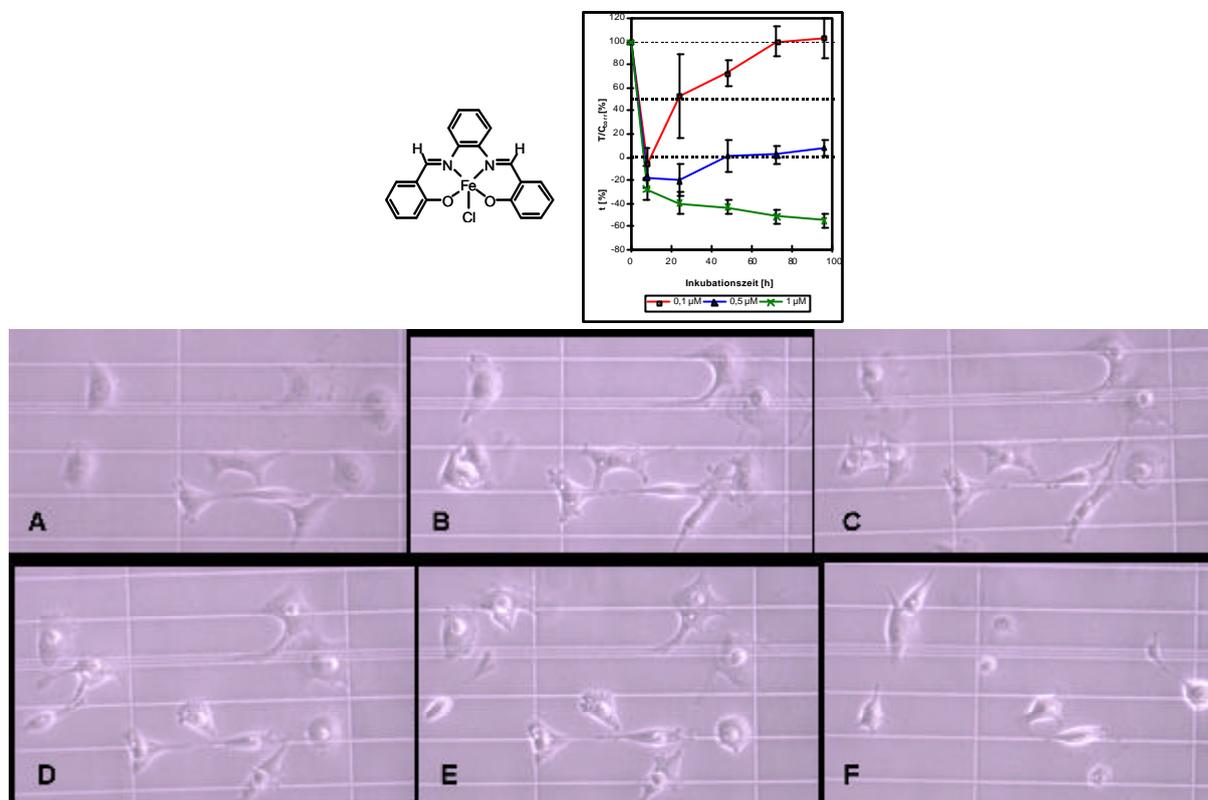
Aus der **Abb. 21** geht hervor, dass zytotozide Effekte an MCF7-Tumorzellen nur in Anwesenheit des Nickelkomplexes **27** erreicht wurden. Die Beurteilung der antiproliferativen Eigenschaften des Derivats **30** im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 5,0  $\mu\text{M}$  war aufgrund einer erschwerten Löslichkeit in DMSO (max. 1,2 mM) sowie der Unlöslichkeit in DMF und protischen Lösungsmitteln nur bedingt möglich.

Mit Hilfe der  $^1\text{H-NMR}$ -Daten (**Abb. 18**) wurde zunächst die unterschiedliche Elektronendichteverteilung der Nickelkomplexe untersucht, um dann eine Korrelation zwischen der biologischen Aktivität und der Stellung der Methoxy-Gruppe herstellen zu können. Da die Nickelkomplexe (**Abb. 21**) im Vergleich zu den Eisenderivaten (**Abb. 20**) an MCF7-Zellen ein völlig anderes Zytotoxizitätsprofil entfalteten und beide Übergangsmetalle sich in ihren *s*-Akzeptor-*p*-Donor-Eigenschaften unterscheiden, konnte anhand dieser Daten noch keine Aussage getroffen werden.

Momentan wird untersucht, ob die Zytotoxizität des wirksamsten Nickelkomplexes (**27**) auf der Fähigkeit beruht, freie Radikale zu erzeugen.

## 6 [Fe<sup>III</sup>(salophen)Cl]

### 6.1 Kurzzeit-Zytotoxizitätstest und lichtmikroskopische Aufnahmen



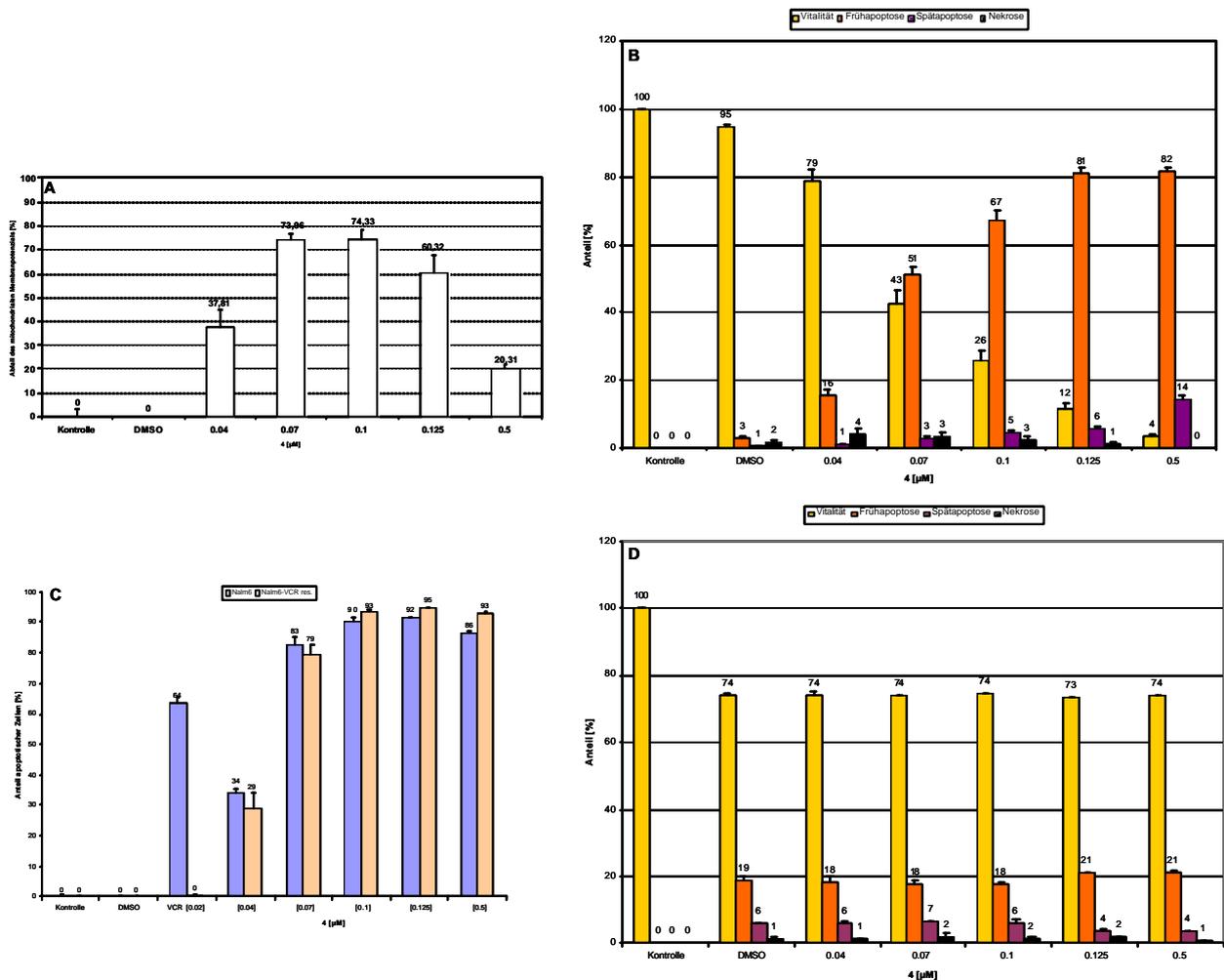
**Abb. 22** Zeitabhängiges Zytotoxizitätsprofil (oben) und Lichtmikroskopische Untersuchung der Substanzwirkung (**4**) auf MCF7-Zellen (unten). **A:** Unmittelbar vor Substanzzugabe, **B:** 2h, **C:** 4h, **D:** 6h, **E:** 8h und **F:** 26h nach Zugabe des Komplexes [Fe<sup>III</sup>(salophen)Cl] (**4**) ( $c = 0.5\mu\text{M}$ ).

Beide Eisen(salophen)-Komplexe **3** und **4** haben sich bereits als Substanzen mit einer frühzeitig einsetzenden Wirkung an verschiedenen Zelllinien erwiesen (Kap. 3.2), so dass exemplarisch MCF7-Brustkrebszellen mit der Substanz **4** inkubiert wurden und eine Beobachtung der Zellkultur über einen Zeitraum von 8-96h nach Substanzzugabe erfolgte (**Abb. 22**, oben).

Anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen der Inkubation von MCF7-Brustkrebszellen mit der Verbindung [Fe<sup>III</sup>(salophen)Cl] (**4**) über einen Zeitraum von 2-26h konnte belegt werden, dass bereits nach 2h ein Wirkungseintritt zu verzeichnen war (**Abb. 22**, unten). Das Auftreten charakteristischer morphologischer Veränderungen (Ausstülpungen der Zellmembran) deutete auf die Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) hin. Eine simultane Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen (Annexin/Propidiumiodid-Doppelfärbung) konnte durchflusszytometrisch vorgenommen werden. Weiterhin erfolgte die

Untersuchung des Membranpotenzials der Mitochondrien, um die apoptotischen Vorgänge genauer zu beschreiben. Abschließend wurde bestimmt, ob die Substanz in der Lage ist Resistenzen von Tumorzellen gegen herkömmliche Zytostatika zu überwinden.

## 6.2 Selektivität und Resistenzüberwindung



**Abb. 23** Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials nach 32h in BJAB Burkitt-Lymphomzellen (A) und Nachweis der Apoptose (Annexin/Propidiumiodid-Doppelfärbung) in Nalm6 B-Zell-Leukämiezellen 48h nach Zugabe des Komplexes  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  (B). DNA-Fragmentierungsmuster an nicht resistenten (Nalm6) und Vincristin-resistenten Nalm6-Zellen (Nalm6-VCR res.) 72h nach Substanzeinwirkung (C) und Annexin/Propidiumiodid-Doppelfärbung gesunder Leukozyten 48h nach Substanzeinwirkung (4) (D).

Der konzentrationsabhängige Zusammenbruch des Membranpotenzials (Abb. 23 A) wurde als eindeutiges Indiz für den mitochondrialen Apoptose-Kaskadeweg gewertet. Abb. 23 B erbringt den Beweis dafür, dass Frühapoptose eingeleitet wurde, was dem Zytotoxizitätsbefund aus Abb. 22 (oben,  $c = 0.5\mu\text{M}$ , 48h) ähnelt: Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich um verschiedene Tumorzellen handelt, konnte im Bereich der oberen

Fehlergrenze gezeigt werden, dass 19% der MCF7-Brustkrebszellen eine Inkubationszeit von 48h mit der Verbindung **4** überlebten. **Abb. 23 B** zufolge konnte in 81% der Nalm6 B-Zell-Leukämiezellen Apoptose diagnostiziert werden.

Die in **Abb. 23 C** gezeigten Daten repräsentieren die gemessene Apoptoseinduktion via DNA-Fragmentierung in % und verdeutlichen das selektive Verhalten der Substanz **4** gegenüber nicht resistenten und Vincristin-resistenten Nalm6-Zellen. Man erkennt sehr gut, dass Nalm6-Zellen sowohl auf Vincristin (Anteil apoptotischer Zellen = 64% unter Einwirkung von Vincristin,  $c = 0.02\mu\text{M}$ ) als auch auf den Eisenkomplex **4** ansprechen, wohingegen die Vincristin-resistenten Tumorzellen (Nalm6-VCR res.) nur auf eine Behandlung mit der Substanz **4** reagierten.

Darüber hinaus liefert die **Abb. 23 D** Belege dafür, dass  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  an nicht entarteten Leukozyten selbst in einer für Tumorzellen zytotoxischen Konzentration ( $c \geq 0.125\mu\text{M}$ ) keine Schäden hervorrief.

Es werden momentan mit dieser Substanz noch weitere Tests und vergleichbare Untersuchungen mit dem zweiwertigen Analogon (**3**) durchgeführt. Um genauere Informationen über die von  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  eingeleitete Apoptose zu erhalten, wurde diese Substanz einer Genexpressionsanalyse unterzogen. Alle Messungen erfolgten unter der Leitung von Herrn Dr. Dr. A. Prokop an der Charité in Berlin bzw. werden noch in den Kliniken der Stadt Köln erfolgen. Die Versuchsvorschriften hierzu sind bereits publiziert worden.<sup>[41, 45, 50, 72]</sup>

## 7 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte herausgearbeitet werden, über welches enorme biologische Potenzial die  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})]$ - und  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$ -Komplexe verfügen und welche entscheidende Rolle dabei das Eisen-Zentralatom spielt. Neben antiproliferativen und zytotoxischen Effekten gegenüber verschiedenen Tumorzellen konnten auch Beweise für DNA-Interaktionen (Einzelstrangbruch, *nicht*-interkalativer Bindungsmodus), die Generation freier Radikale sowie die Freisetzung des Reparaturenzyms Cu/Zn-Superoxiddismutase erbracht werden. Die DNA-Interaktionen betreffend, berichteten Silvestri *et al.* über  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salen})\text{Cl}]$ , das sein zytotoxisches Potenzial nicht interkalativ, sondern über elektrostatische Wechselwirkungen mit der DNA entfaltet.<sup>[18]</sup> Das steht im Einklang mit unseren Ergebnissen. Daten, die mittels CD-Messungen, Gelelektrophorese und DNA-Schmelztemperaturaufnahmen erhoben wurden, konnten diese Interaktion auch für die

Komplexe  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})]$  und  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  bestätigen. Ferner konnte bewiesen werden, dass  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  über den mitochondrialen Kaskadeweg Apoptose einleitet, was mit den Beobachtungen von Woldemariam *et al.* vergleichbar ist. Er berichtete, dass  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salen})\text{Cl}]$  in HEK-293-Zellen auf mitochondrialem Weg Apoptose induziert.<sup>[19]</sup>

Über welches enorme biologische Potenzial die Verbindung  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  verfügt, äußerte sich darin, dass sie einerseits selektiv das Tumorzellwachstum stoppte, dort Apoptose einleitete und Resistenzen gegen herkömmliche Zytostatika überwand, auf der anderen Seite aber gesunde Zellen nicht angriff. Ergebnisse einer Expressionsanalyse, die Auskunft über eine Herauf- bzw. Herabregulation Apoptose-assoziiierter Gene liefern sollen, werden in absehbarer Zeit vorliegen. Anhand der Beobachtung, dass gesunde Zellen selbst eine für Tumorzellen toxische Konzentration ( $0.125 \leq c \leq 0.6\mu\text{M}$ ) überlebten, ergeben sich weitere Fragen, die im Anschluss an den Diskussionsteil kurz skizziert werden. Da es sich bei der Apoptose um einen energieverbrauchenden Prozess handelt und wir anhand zellphysiologischer Parameter eine gesteigerte Glykolyserate zur ATP-Gewinnung beobachteten, konnte hiermit das Einleiten eines programmierten Zelltodes untermauert werden.

Welchen entscheidenden Einfluss die Ligandenstruktur der Eisenkomplexe auf die proliferativen Eigenschaften ausübt, wurde ersichtlich, sobald Salophen durch Saldach ersetzt worden ist: Die Antitumoraktivität wurde drastisch reduziert. Darüber hinaus besaßen die Stereoisomeren *RR*-, *SS*- und *RS*- $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{saldach})\text{Cl}]$  einen mit dem des *racemisch* konfigurierten Analogon (**2**) vergleichbaren Kurvenverlauf an den drei Zelllinien MCF7, MDA-MB-231 und HT29, so dass ein chirales primäres Angriffsziel unwahrscheinlich erscheint.

Interessanterweise wurde von Gao *et al.* über *RR*-, *SS*- und *RS*-konfigurierte *N,N*-Bis-salicyldiaminocyclohexane berichtet, die sich von unseren *RR*-, *SS*- und *RS*-konfigurierten Saldach-Liganden nur durch Reduktion der Imin-Doppelbindung unterscheiden. Die von Gao *et al.* untersuchten chiralen *N,N*-Bis-salicyldiaminocyclohexane verhielten sich erstaunlicherweise genauso zytotoxisch gegenüber MCF7-Brustkrebszellen wie unsere Verbindung **3**. Sowohl  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})]$  (**3**) als auch der reine *RR*-konfigurierte Ligand aus der Gruppe um Gao (*N,N*-Bis-salicyldiaminocyclohexan) besaßen an MCF7-Tumorzellen  $\text{IC}_{50}$ -Werte von  $0.4\mu\text{M}$ .<sup>[73]</sup> Erklärungen für das ähnlich zytotoxische Verhalten der *N,N*-Bis-salicyldiaminocyclohexane Gao's und unserer Eisen-Salophene konnten bis zu dem jetzigen Zeitpunkt nicht erbracht werden, jedoch widerlegen Ergebnisse der Gruppe um Bailly die

Vermutung, eine reduzierte Imino-Gruppe in den Eisen-Saldach-Komplexen könne als ausschlaggebendes Detail für die DNA-Spaltung in Frage kommen.<sup>[74]</sup>

Vielmehr verdichten sich die Hinweise darauf, dass verschiedene Mechanismen gleichzeitig ablaufen, denn alle Eisenkomplexe begünstigten einerseits die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, auf der anderen Seite aktivierten sie Schutzmechanismen (Freisetzung der Superoxiddismutase), um einer übermäßigen Anreicherung freier Radikale entgegen zu wirken. Ergänzend zu dem nicht-toxischen Verhalten von  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  gegenüber normalen Leukozyten wurde berichtet, dass auch Fibroblasten von einem Methoxy-substituierten Eisen(salophen)-Komplex nicht angegriffen werden.<sup>[20]</sup>

Die Antitumoraktivität der Eisen(salophen)-Komplexe könnte möglicherweise in einem dem Cytochrom  $\text{P}_{450}$  ähnelnden Wirkmechanismus begründet liegen. Es wäre denkbar, dass Eisen(salophen)-Komplexe als Bestandteil einer prosthetischen Gruppe fungieren, molekularen Sauerstoff *end-on* koordinieren und freie Radikale bilden, die ihrerseits den Organismus mehr oder weniger schnell schädigen. Diese Vermutung stützt sich auf Berichte von Ueno *et al.*, die Metallkomplexe entwickelten, die ihrerseits präzise Einblicke in das Zusammenspiel von Hämoxigenase, Cytochrom  $\text{P}_{450}$ ,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  und der Schiff-Base  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})]^+$  gestatten.<sup>[75]</sup> Da über eine Stabilisierung der Oxidationsstufe +III durch den OMe-Substituenten berichtet wurde, könnte die zytotoxische Wirkung des Komplexes  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  dadurch hervorgerufen werden, dass unter dem Einfluss zellulärer Reduktionsäquivalente eine Koordination molekularen Sauerstoffs an ein Fe(II)-Zentrum stattfindet, was dann über die Radikalformation Zellschädigungen bewirkt.<sup>[76]</sup>

Maligne Tumorzellen zeichnen sich durch eine erhöhte Glycolyserate aus, was bereits bestätigt werden konnte.<sup>[66]</sup> Ferner zeigten Lehnen-Beyel *et al.*, dass bereits nach 5h die antiproliferative Aktivität des Chelatkomplexes Fe(III)/8-hydroxychinolin gegenüber L929-Mäusefibroblastenzellen in Anwesenheit eines erhöhten D-Glucose-Spiegels stark anstieg, was sie einem künstlich erhöhten Pool chelatisierbaren, dreiwertigen Eisens zuschrieben.<sup>[77]</sup> Im Verlauf des Glucose-Metabolismus entstehe ein Überschuss zellulärer Reduktionsmittel, der zweiwertiges, gebundenes Eisen erzeuge, was wiederum eine Bildung freier Radikale (Fenton-Reaktion) forcieren und auf diese Weise zellschädigend wirken würde. Im Vergleich dazu konnten wir an MCF7-Zellen zeigen, dass  $\text{Fe}(\text{OAc})_2$  einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $50\mu\text{M}$  besaß, während  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  erst in einer Konzentration von  $100\mu\text{M}$  die Hälfte der Ausgangszellmenge abtötete.

Um eine Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der Elektronendichteverteilung eingehender zu beurteilen, wurde eine elektronenschiebende funktionelle Gruppe in den

Salicyl-Aromaten der  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$ -Komplexe eingeführt (auf eine Substitution der Protonen  $\text{H}_f$  und  $\text{H}_g$  des Brückenaromaten wurde vorerst verzichtet<sup>[76]</sup>). Es wurde dabei an die Möglichkeit eines Redoxaktivierungsprozesses gedacht, der zu einem chinoiden Strukturelement mit resultierender Zellschädigung führen würde, insofern der Eisen(salophen)-Komplex *para*-ständige OH-Gruppen besäße.<sup>[55, 78, 47]</sup> Das Auftreten eines flachen, fein abgestuften Zytotoxizitätsprofils des *para*-substituierten  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen-OMe})\text{Cl}]$ -Komplexes **24** (Kap. 5.2) verbunden mit zytoziden Effekten ab einer Konzentration von  $c = 5\mu\text{M}$  im Vergleich zu  $c = 0.5\mu\text{M}$  könnte daran liegen, dass *in situ* erzeugte Radikale durch die Methoxygruppe stabilisiert werden und das Ausmaß zellulärer Folgeschäden dadurch minimiert wird. Eine beweiskräftige Interpretation des unterschiedlichen zytotoxischen Verhaltens, die sich auf die Stärke der Eisen-Sauerstoff-Bindung bezieht, konnte hier nur ansatzweise erbracht werden, denn bei Analyse der Ramandaten wurde sich zunächst nur an Literaturwerten orientiert. Eine eindeutige Schwingungsbandenzuordnung sollte noch anhand berechneter Werte erfolgen, um Banden-Überlagerungen im Fingerprint-Bereich zu eliminieren. Dem *s*-Donor-*p*-Acceptor-Synergismus folgend sollte Elektronendichte vermehrt über den phenolischen Sauerstoff zum Eisen Zentralatom gelangen und in Form einer *p*-Rückbindung an die antibindenden Orbitale des Sauerstoffs zurückgegeben werden, was sich in einer resultierenden Stärkung der  $\text{O-C}_{\text{Ar}}$ -Bindung und gleichzeitigen Schwächung der  $\text{O-Fe}$ -Bindung widerspiegeln sollte. Als gesichertes Indiz für den "Betrag" an Elektronendichte, der vom phenolischen Sauerstoff an das Eisen Zentralatom weitergeleitet werden kann, sind die Resonanzsignale der Protonen der freien Liganden anzusehen.

Um zwischen einem Ligand- bzw. Zentralatom-gesteuerten Wirkmechanismus zu unterscheiden, wurde der NMR-taugliche Nickelkomplex  $[\text{Ni}^{\text{II}}\text{salophen}]$  (**10**) entsprechend dem Eisen-Analogon substituiert. Änderungen der Elektronendichteverteilung wurden analysiert und die Zytotoxizitätsprofile der Komplexe an MCF7-Zellen miteinander verglichen. Leider zeigten die Nickelderivate ein komplett unerwartetes Wirkprofil, das in keiner Weise dem der Eisenanaloga entsprach, so dass ein Zentralatom-gesteuerter Wirkmechanismus postuliert werden sollte. Mehrere Fakten stützen diesen Befund. Ein von uns vermuteter, dem Bleomycin entsprechender Mechanismus der Sauerstoff-Aktivierung, ist für Nickelkomplexe eher unwahrscheinlich. Vielmehr wäre die beobachtete Toxizität des Nickels seiner Bindung an S-haltige Zellbestandteile zuzuschreiben, was in folgenden Untersuchungen analysiert werden sollte.<sup>[79]</sup> Darüber hinaus wurde von Reed *et al.* über

Nickelkomplexe berichtet, die über eine basische Seitenkette ihre zellschädigende Wirkung entfalten.<sup>[80]</sup>

Im Vergleich zu Eisen handelt es sich bei dem Übergangsmetall Nickel um ein Metall, das über bessere *s*-Akzeptor-Fähigkeiten verfügt und deshalb andere Donor-Akzeptor-Eigenschaften aufweist. Deshalb sollte zukünftig genau zwischen der *s*-Donor-*p*-Acceptor-Fähigkeit der beiden Heteroatome N und O differenziert werden, um für die unterschiedlichen Metallkomplexe einen Zusammenhang zwischen der Position der Methoxy-Gruppe und der Elektronendichteverteilung beschreiben zu können.

Abschließend betrachtet sind es die Eisen(salophen)-Komplexe, die durch ihre biologischen Eigenschaften gegenüber Tumorzellen bestechen. Sie zeigten einen raschen Wirkungseintritt und griffen sogar Krebszellen an, die gegen herkömmliche Zytostatika Resistenzen entwickelt haben. Erstaunlich war auch die Beobachtung, wie präzise sich anhand der Ligandenstruktur die Zytotoxizität steuern ließ.

## 8 Ausblick

Derzeitige Arbeiten beschäftigen sich mit der Untersuchung der Antitumoraktivität von Fluor-substituierten  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$ -Komplexen. Von zentraler Bedeutung ist hierbei die Beantwortung der Frage, ob eine Elektronen-ziehende funktionelle Gruppe mit ähnlichen lipophilen Eigenschaften das antiproliferative Verhalten der Eisen(salophen)-Komplexe stärker oder geringfügiger beeinflusst als eine Elektronen-schiebende Gruppe.

Jüngsten Ergebnissen zufolge, wurde die Substanz **4** *nicht* durch das P-Glykoprotein aus dem Zellinneren ausgeschleust, so dass dieses Ergebnis als Ausgangspunkt für weitere Resistenz-Untersuchungen dienen könnte.<sup>[81]</sup>

Sinnvoll wäre auch ein Vergleich der Redoxpotenziale aller substituierten  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$ -Komplexe, um Aufschluss über den Einfluss der jeweiligen Liganden auf das redoxaktive Zentrum zu erhalten.

Darüber hinaus bietet die Mößbauer-Spektroskopie eine weitere Möglichkeit, die elektronischen Eigenschaften verschiedenartig substituierter, paramagnetischer Eisenkomplexe zu untersuchen, um die Bindungsverhältnisse mit den biologischen Eigenschaften dieser Komplexe korrelieren zu können.

Von zentraler Bedeutung wäre eine simultane Analytik des Zusammenspiels zellulärer Reduktionsmittel mit einer möglichen Änderung der Oxidationsstufe des Zentralatoms der substituierten Eisenkomplexe. Darüber hinaus könnte eine Variation des Glukosegehalts des

Zellkulturmediums wertvolle Hinweise auf den Eisenstoffwechsel von Tumorzellen liefern. Von enormer Wichtigkeit ist die Frage nach dem Zerfall der Eisenkomplexe unter physiologischen Bedingungen, um Aussagen über eine eventuelle Eisenüberladung und eine sich daraus ergebende erhöhte Toxizität treffen zu können. Abschließend müsste aufgrund der Befunde des mitochondrialen Apoptose-Kaskadewegs auch der Eisengehalt in diesen Zellorganellen bestimmt werden.

## 9 Zusammenfassung der Ergebnisse (deutsch)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden antiproliferativ wirksame Eisen(salophen)-Komplexe dahingehend untersucht, inwiefern deren biologischen Eigenschaften von der Art des Zentralatoms abhängen und über die Auswahl des Liganden steuerbar sind. Ausgehend von den beiden Leitstrukturen  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})]$  und  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  konnten Beweise dafür erbracht werden, dass Eisen verglichen mit Mangan, Kobalt, Nickel Kupfer und Zink maßgeblich für die antiproliferative bzw. zytozide Wirkung gegenüber verschiedenen Tumorzellen (adherent wachsende Zellen und Suspensionskulturen) verantwortlich ist. Es stellte sich heraus, dass die Eisenkomplexe freie Radikale erzeugen, eine vermehrte Freisetzung des Reparaturenzyms Superoxiddismutase bewirken und über den mitochondrialen Kaskadeweg Apoptose induzieren. Darüber hinaus zeigte sich, dass  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  in der Lage war, Resistenzen von Tumorzellen gegen herkömmliche Zytostatika wie z. B. Daunorubicin, Vincristin und Doxorubicin zu überwinden. Interessanterweise war diese Substanz normalen Leukozyten gegenüber unwirksam. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zytotoxizität der Eisenkomplexe drastisch reduziert wurde, sobald die 1,2-Phenylendiamin-Partialstruktur (Salophen) durch 1,2-Diaminocyclohexan (Saldach) ersetzt worden ist. Anhand sukzessiver Substitution der Salicyl-Protonen durch eine Methoxygruppe konnte eine Struktur-Wirkungs-Beziehung an MCF7- und MDA-MB-213-Brustkrebszellen und HT29-Kolonkarzinomzellen ermittelt werden. Unter allen Regioisomeren zeigte nur der *para* zur O-Fe-O-Bindung substituierte  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen-OMe})\text{Cl}]$ -Komplex ein steiles Konzentration-Wirkungs-Profil, wohingegen die *meta*- Analoga bereits in einer Konzentration von  $0.5\mu\text{M}$  zytozide Effekte entfalteten.

## 10 Zusammenfassung der Ergebnisse (englisch)

Here we present iron salophen complexes with outstanding biological properties in different tumor cells. Concerning the lead structures  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{salophen})]$  and  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  both, the influence of the central atom and the role of the ligand on cytotoxic activity was evaluated with the result that iron in relation to manganese, cobalt, nickel copper and zinc is essential for growth inhibitory effects in different tumor cells (adherent growing cells and suspension cell cultures). It could be shown that the iron complexes generated free radicals, forced the release of the repair enzyme superoxid dismutase and induced apoptosis via the mitochondrial pathway. Moreover,  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen})\text{Cl}]$  was able to overcome resistances of tumor cells against commonly used chemotherapeutics like Daunorubicin, Vincristin und Doxorubicin. Interestingly, this compound did not show activity in healthy leucocytes. Additionally, it could be shown that cytotoxicity was drastically reduced when the 1,2-phenylenediamine moiety (salophene) was replaced by 1,2-diaminocyclohexane (saldach). A structure-activity-relationship study (SAR) was worked out with the *para* to the O-Fe-O linkage in the salicylic structure substituted  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salophen-OMe})\text{Cl}]$  complex in breast cancer (MCF7 and MDA-MB-231) and colon carcinoma cells (HT29), whereas the *meta* substituted analogues showed cytotoxic effects already at a concentration of 0.5  $\mu\text{M}$ .

## 11 Veröffentlichungen

- [1] Hille, A.; Ott, I.; Kitanovic, A.; Kitanovic, I.; Alborzina, H.; Lederer, E.; Wöfl, S.; Metzler-Nolte, N.; Schäfer, S.; Sheldrick, W. S.; Bischof, C.; Schatzschneider, U.; Gust, R. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009** (DOI 10.1007/s00775-009-0485-9).
- [2] Hille, A.; Gust, R. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* (eingereicht)
- [3] Hille, A.; Gust, R. *Dalton Trans.* (eingereicht)

## 12 Literaturverzeichnis

- [1] Shargi, H.; Naeimi, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 1525-1531.
- [2] Müller, P.; Chappellet, S. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 1010-1021.
- [3] Karvembu, R.; Hemalatha, S.; Prabhakaran, R.; Natarajan, K. *Inorg. Chem. Comm.* **2003**, *6*, 486-490.
- [4] Bigi, F.; Moroni, I.; Maggi, R.; Sartori, G. *Chem. Comm.* **2002**, 716-717.
- [5] Zhang, W.; Loebach, J. I.; Wilson, S. R.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2801-2803.
- [6] Hansen, K. B.; Leighton, J. L.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10924-10925.
- [7] Schaus, S. E.; Branalt, J.; Jacobsen, E. N. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 403-405.
- [8] Jacobsen, E. N.; Kakiuchi, F.; Konsler, R. G.; Larrow, J. F.; Tokunaga, M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 773-776.
- [9] Bennani, Y. L.; Hanessian, S. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (8), 3161-3196.
- [10] Jacobsen, E. N.; Zhang, W.; Muci, A. R.; Ecker, J. R.; Deng, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7063-7064.
- [11] Sigel, A.; Sigel, H. Metal ions in biological systems. Marcel Dekker, New York, **1976**.
- [12] Kaim, W.; Schwederski, B. Bioanorganische Chemie. Teubner, 3. Aufl. **2004**.
- [13] Antholine, W. E.; Kalyanaraman, D.; Petering, D. H. *Environ. Health Perspect.* **1985**, *64*, 19-35.
- [14] Sigel, A.; Sigel, H. Metal ions as anticancer agents. Marcel Dekker, New York, **1980**.
- [15] Metzler-Nolte, N. *Nachr. Chem.* **2006**, *54*, 967-970.
- [16] Sadler, P.; Guo, Z. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1610-1630.
- [17] Ott, I.; Gust, R. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2007**, *340*, 117-126.
- [18] Silvestri, A.; Barone, G.; Ruisi, G.; Lo Giudice, M. T.; Tumminello, S. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 589-594.
- [19] Woldemariam, G.; Mandal, S. S. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 740-747.
- [20] Lange, T. S.; Kim, K. K.; Singh, R. K.; Strongin, R. M.; McCourt, C. K.; Brard, L. *PLoS ONE* **2008**, *3* (5), e2303.
- [21] Habibi, M.; Montazerzohori, M.; Mokhtari, R.; Harrington, R. W.; Clegg, W. *Acta Crystallogr.* **2007**, *E63*, o4462.

- [22] Eltayeb, N. E.; Teoh, S. G.; Chantrapromma, S.; Fun, H-K.; Ibrahim, K. *Acta Crystallogr.* **2007**, *E63*, o3234-o3235.
- [23] Merbach, A.; Toth, E. (Ed.) *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging.* John Wiley & Sons LTD, **2001**.
- [24] Strongin, R. M.; *et al.* Lanthanide complexes as fluorescent indicators for neutral sugars and cancer diagnosis. WO 2007/109465.
- [25] Rosenberg, B.; van Camp, L.; Krigas, T. *Nature* **1965**, *205*, 698-699.
- [26] Lippert, B. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug.* Wiley Interscience, **1999**.
- [27] Voigt, W.; Dietrich, A.; Schmoll, H-J. *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *2* (35), 134-143.
- [28] Boulikas, T.; Vougiouka, M. *Oncol. Rep.* **2003**, *10*, 1663-1682.
- [29] Noji, M.; Okamoto, K.; Kidani, Y. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 508-515.
- [30] Okamoto, K.; Noji, M.; Tashiro, T.; Kidani, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 929-939.
- [31] Jennerwein, M.; Wappes, B.; Gust, R.; Schönenberger, H.; Engel, J.; Seeber, S.; Osieka, R. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1988**, *114*, 347-358.
- [32] Bernhardt, G.; Reile, H.; Spruss, T.; Koch, M.; Gust, R.; Schönenberger, H.; Hollstein, M.; Lux, F.; Engel, J. *Drugs Future* **1991**, *16* (10), 899-903.
- [33] Gust, R.; Schnurr, B.; Krauser, R.; Bernhardt, G.; Koch, M.; Schmid, B.; Hummel, E.; Schönenberger, H. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1998**, *124*, 585-597.
- [34] Gust, R.; Niebler, H.; Schönenberger, H. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7132-7144.
- [35] Kapp, T.; Dullin, A.; Gust, R. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1182-1190.
- [36] Köckerbauer, R.; Bednarski, P. J. *J. Inorg. Biochem.* **1996**, *62*, 281-298.
- [37] Kannan, K.; Jain, S. K. *Pathophysiology* **2000**, *7*, 153-163.
- [38] Bergamo, A.; Sava, G. *Dalton Trans.* **2007**, 1247-1272.
- [39] Harlos, M.; Ott, I.; Gust, R.; Alborzina, H.; Wölfl, S.; Kromm, A.; Sheldrick, W. S. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3924-3933.
- [40] Schäfer, S.; Ott, I.; Gust, R.; Sheldrick, W. S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *19*, 3034-3046.
- [41] Bieda, R.; Ott, I.; Dobroschke, M.; Prokop, A.; Gust, R.; Sheldrick, W. S. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, (DOI:10.1016/j.jinorgbio.2009.01.008)
- [42] Scharwitz, M. A.; Ott, I.; Gust, R.; Kromm, A.; Sheldrick, W. S. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102* (8), 1623-1630.
- [43] Scharwitz, M. A.; Ott, I.; Geldmacher, Y.; Gust, R.; Sheldrick, W. S. *J. Organomet. Chem.* **2008**, *693* (13), 2299-2309.

- [44] Scharwitz, M. A.; Harlos, M.; Ott, I.; Gust, R.; Sheldrick, W. S. *J Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12 (Suppl. 1)*, 115, P233.
- [45] Dobroschke, M.; Geldmacher, Y.; Ott, I.; Harlos, M.; Kater, L.; Wagner, L.; Gust, R.; Sheldrick, W. S.; Prokop, A. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 177-187.
- [46] Zeglis, B. M.; Pierre, V. C.; Barton, J. K. *Chem. Comm.* **2007**, 4565-4579.
- [47] Schatzschneider, U.; Metzler-Nolte, N. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1534-1537.
- [48] Ott, I.; Gust, R. *Biometals*, **2005**, *18*, 171-177.
- [49] Ott, I.; Schmidt, K.; Kircher, B.; Schumacher, P.; Wiglenda, T.; Gust, R. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 622-629.
- [50] James, P.; Neudörfl, J.; Eissmann, M.; Jesse, P.; Prokop, A.; Schmalz, H-G. *Org. Lett.* **2006**, *8 (13)*, 2763-2766.
- [51] Schlawe, D.; Majdalani, A.; Velcicky, J.; Hebler, E.; Wieder, T.; Prokop, A.; Schmalz, H-G. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1763-1766.
- [52] Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C.; Telser, J. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, *266*, 37-56.
- [53] Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1161-1208.
- [54] Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Meth. Enzymol.* **1990**, *186*, 1-85.
- [55] Routier, S.; Vezin, H.; Lamour, E.; Bernier, J-L.; Catteau, J-P.; Bailly, C. *Nucl. Acid Res.* **1999**, *27 (21)*, 4160-4166.
- [56] Tang, N.; Muller, J. G.; Burrows, C. J.; Rokita, S. E. *Biochemistry* **1999**, *38*, 16648-16654.
- [57] Muller, J. G.; Kayser, L. A.; Paikoff, S. J.; Duarte, V.; Tang, N.; Perez, R. J.; Rokita, S. E.; Burrows, C. J. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *185-186*, 761-774.
- [58] Reed, J. E.; Arnal, A. A.; Neidle, S.; Vilar, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5992-5993.
- [59] Chen, D.; Martell, A. E. *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 1026-1030.
- [60] Feig, A.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 759-805.
- [61] Gust, R.; Ott, I.; Posselt, D.; Sommer, K. *J. Med. Chem.* **2004**, *47 (24)*, 5837-5846.
- [62] Gust, R.; Posselt, D. Metal salophene complexes for prevention and treatment of cancer. WO 2008/090081 A1.
- [63] Vögtle, F.; Goldschmitt, E. *Chem. Ber.* **1976**, *109*, 1-40.
- [64] Kumar, D. N.; Garg, B. S. *Spectrochim. Acta Part A* **2005**, *64*, 141-147.
- [65] Zhang, K-L.; Xu, Y.; Zheng, C-G.; Zhang, Y.; Wang, Z.; You, X-Z. *Inorg. Chim. Acta* **2001**, *318*, 61-66.

- [66] Hille, A.; Ott, I.; Kitanovic, A.; Kitanovic, I.; Alborzina, H.; Lederer, E.; Wölfl, S.; Metzler-Nolte, N.; Schäfer, S.; Sheldrick, W. S.; Bischof, C.; Schatzschneider, U.; Gust, R. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, (DOI 10.1007/s00775-009-0485-9).
- [67] Posselt, D.; Dissertation, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin, **2006**
- [68] Hille, A.; Gust, R. *Arch. Pharm. (Wiley)* (eingereicht)
- [69] Hille, A.; Gust, R. *Dalton Trans.* (eingereicht)
- [70] Zhou, M-Y.; Ye, X-R.; Xin, F-B.; Xin, X-Q. *Transition Met. Chem.* **1999**, *24*, 118.
- [71] Belaïd, S.; Landreau, A.; Djebbar, S.; Benali-Baitich, O.; Khan, M. A.; Bouet, G. *Transition Met. Chem.* **2008**, *33*, 511.
- [72] Wieder, T.; Prokop, A.; Bagci, B.; Essmann, F.; Bernicke, D.; Schulze-Osthoff, K.; Dörken, K.; Schmalz, H-G.; Daniel, P. T.; Henze, G. *Leukemia* **2001**, *15*, 1735-1742.
- [73] Gao, J.; Liu, Y-G.; Zhou, Y.; Zingaro, R. A. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1723-1729.
- [74] Routier, S.; Vezin, H.; Lamour, E.; Bernier, J-L.; Catteau, J-P.; Bailly, C. *Nucleic Acid Res.* **1999**, *27*, 4160-4166.
- [75] Ueno, T.; Yokoi, N.; Unno, M.; Matsui, T.; Tokita, Y.; Yamada, M.; Ikeda-Saito, M.; Nakajima, H.; Watanabe, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 9416-9421.
- [76] Zanello, P.; Cinquantini, A. *Transition Met. Chem.* **1985**, *10*, 370-374.
- [77] Lehnen-Beyel, I.; De Groot, H.; Rauen, U. *Biochem. J.* **2002**, *368*, 517-526.
- [78] Hillard, E.; Vessières, A.; Thouin, L.; Jaouen, G.; Amatore, C. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 291-296.
- [79] Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12 (10)*, 1161-1208.
- [80] Reed, J. E.; Arnal, A. A.; Neidle, S.; Vilar, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5992-5993.
- [81] Prokop, A.; persönliche Berichte

## **Anhang 1**

### Veröffentlichung [1]

Hille, A.; Ott, I.; Kitanovic, A.; Kitanovic, I.; Alborzina, H.; Lederer, E.; Wölfl, S.; Metzler-Nolte, N.; Schäfer, S.; Sheldrick, W. S.; Bischof, C.; Schatzschneider, U.; Gust, R.

[*N,N'*-Bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine]metal complexes with cell death promoting properties

*J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 711 (DOI 10.1007/s00775-009-0485-9).

**Veröffentlichung [2]**

Hille, A.; Gust, R.

Relationship Between Anticancer Activity and Stereochemistry of Saldach Ligands and their  
Iron(III) Complexes.

*Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* (eingereicht)

Please contact the corresponding author (Prof. D. Ronald Gust) for pdf request.

**Veröffentlichung [3]**

Hille, A.; Gust, R.

Influence of methoxy groups on antiproliferative effects of  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{salophene}]\text{Cl}$  complexes.

*Dalton Trans.* (eingereicht)

# Influence of methoxy groups on antiproliferative effects of [Fe<sup>III</sup>salophene]Cl complexes

Annegret Hille<sup>a</sup> and Ronald Gust<sup>\*a</sup>

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXX 200X, Accepted Xth XXXXXXXXX 200X

First published on the web Xth XXXXXXXXX 200X

DOI: 10.1039/b000000x

We synthesized methoxy-substituted [*N,N'*-bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine]iron(III) complexes ([Fe<sup>III</sup>salophene-OMe]Cl) and analyzed their biological activity against MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer as well as HT-29 colon carcinoma cells. The results obtained in a time-dependent chemosensitivity test clearly demonstrated the correlation between cytotoxicity of the complexes and the position of methoxy substituents in the salicylidene moieties: 3-OCH<sub>3</sub> (**4**) < 5-OCH<sub>3</sub> (**8**) < H (**2**) < 4-OCH<sub>3</sub> (**6**) = 6-OCH<sub>3</sub> (**10**). Compounds **6** and **10** caused cytotoxic effects already at a concentration of 0.5 μM with a steep concentration response curve. Both, lead compound **2** and complex **8** showed similar time response curves, however, with a 5 fold lower activity compared to **6** and **10**, respectively. Referring to [Fe<sup>III</sup>salophene]Cl (**2**), methoxy substitution was accompanied with the loss of tumor selectivity. Moreover, the free ligands (**1**, **3**, **5**, **7**, and **9**) were inactive.

## Introduction

The discovery of the inorganic complex cisplatin revolutionized the treatment of testicular cancer and led to increased research of organometallic complexes as antitumor agents. [1] Among them, a variety of iron containing compounds has emerged due to their outstanding biological properties.

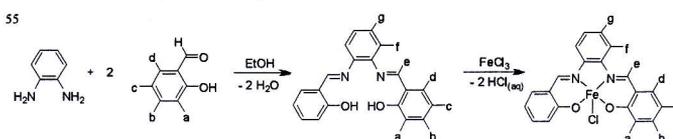
The group of Neuse reported about antitumor activity of a series of ferrocene complexes against Ehrlich ascites tumor in CF1 mice. [2,3] Moreover, according to findings of James *et al.*, enantioselective ferrocenyl nucleoside analogues turned out to be apoptosis-inducing compounds in Burkitt-like lymphoma (BJAB) tumor cells. [4] Hillard *et al.* developed ferrocenyl complexes combining antiestrogenicity and estrogen-independent cytotoxicity in the same molecule in order to address both ER<sup>+</sup> and ER<sup>-</sup> breast cancer cells. [5]

Furthermore, it was demonstrated that the DNA cleavage ability of hydroxy-substituted salen-iron complexes (salen = *N,N'*-bis(salicylidene)ethylenediamine) strongly depended on the position of the hydroxy groups in the salicylidene moiety. [6]

The group of Tumminello postulated a non-intercalative mode of action of salen-iron complexes with DNA, although the flat molecules can be stacked between two base pairs. They confirmed an external, electrostatic interaction between the negatively charged DNA double helix analogously to porphyrazines and metal-porphyrazine complexes. [7] This might induce apoptosis via mitochondrial pathway as demonstrated for human HEK293 cells. [8]

In a previously published structure activity relationship study we described the development of [*N,N'*-bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine]iron(III) complexes as antitumor agents and the evaluation of the mode of action. [9] The same lead structure used Lange *et al.* [10] They revealed a selective action against platinum-resistant ovarian cancer cells due to a 3-methoxy substituent at the salicylidene moiety. This study

confirmed our intention to increase the cytotoxicity of [Fe<sup>III</sup>salophene]Cl complexes by introduction of OCH<sub>3</sub> substituents (scheme 1).



a	b	c	d	Fe <sup>3+</sup>	Cl <sup>-</sup>	compd.
H	H	H	H	-	-	<b>1</b>
H	H	H	H	x	x	<b>2</b>
OMe	H	H	H	-	-	<b>3</b>
OMe	H	H	H	x	x	<b>4</b>
H	OMe	H	H	-	-	<b>5</b>
H	OMe	H	H	x	x	<b>6</b>
H	H	OMe	H	-	-	<b>7</b>
H	H	OMe	H	x	x	<b>8</b>
H	H	H	OMe	-	-	<b>9</b>
H	H	H	OMe	x	x	<b>10</b>

**Scheme 1:** Synthesis of the ligands and their iron(III) complexes with e, f and g are protons.

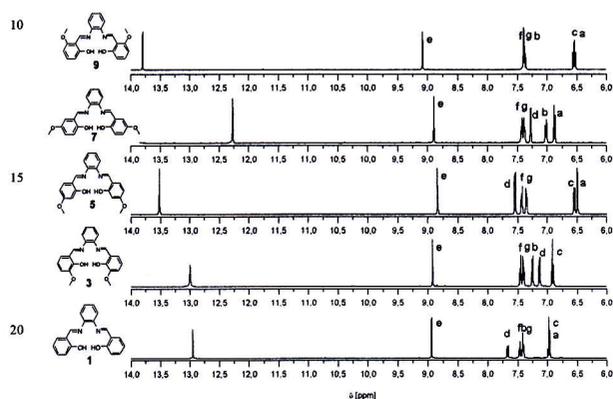
## Results and discussion

### Synthesis

The *N,N'*-bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine ligands were synthesized as previously described. [9] The commercially available 1,2-phenylenediamine was reacted with two equivalents of the respective salicylaldehyde in ethanol. The precipitated products were collected and characterized by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy.

As shown in Figure 1, the position of the methoxy group affected the OH signals, while the resonance of the imine proton was nearly identical for all investigated ligands. Methoxy groups located in ortho or para position (**3** and **7**) shifted the

OH signal to higher field compared to that of the meta derivatives **5** and **9**. The most pronounced effect was observed for the para substituted derivative **8**. These effects might be the consequence of H-bridges of different strength, due to the changed electron density at the oxygen (it is well known, that the phenolic protons of the salophene ligands were incorporated in H-bonds to the amide nitrogen O-H...N=C (salicylic effect)). [11]



**Figure 1:**  $^1\text{H-NMR}$  spectra of the ligands **1**, **3**, **5**, **7** and **9** in  $\text{DMSO-}d_6$ . The resonance peaks in the area of 12-14 ppm belong to the phenolic proton.

The resonance signals of the 1,2-phenylenediamine moiety ( $\text{H}_f$  and  $\text{H}_g$ , see Figure 1 and Scheme 1) appeared nearly in the same position irrespectively of OMe substituents located at the salicylidene, indicating no significant influence on the aromatic ring.

The paramagnetism of the iron complexes made a characterisation by NMR spectroscopy impossible. However, the coordination of the ligands to iron could be verified by infra red and Raman spectroscopy.

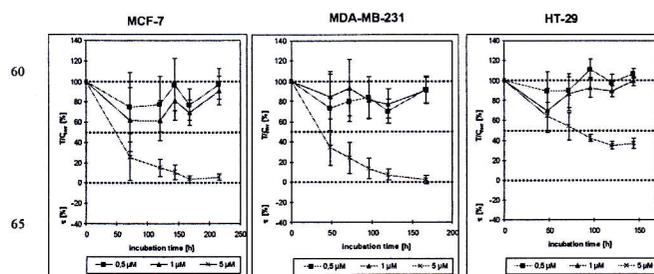
compd	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{Ar}-\text{O})$	$\nu(\text{Fe}-\text{N})$	$\nu(\text{Fe}-\text{O})$	$\nu(\text{Fe}-\text{Cl})$
<b>3</b>	1612s	1573m 1467s	-	-	-
<b>4</b>	1602w	1546s 1435s	{529w}	{456m}	{340s}
<b>5</b>	1616w	1566w 1464w	-	-	-
<b>6</b>	1608w	1522w 1374w	{520w}	{480s}	{338s}
<b>7</b>	1616w	1571s 1489s	-	-	-
<b>8</b>	1598s	1535s 1463s	{636m}	{476w}	{321m}
<b>9</b>	1614m	1586s 1469s	-	-	-
<b>10</b>	1604w	1541s 1431s	{540w}	{480s}	{322s}

**Table 1:** Selected Raman frequencies [ $\text{cm}^{-1}$ ] of compounds **1-10**.

The phenolic OH group and the imine nitrogen were involved in a strong H-bridge resulting in a broad signal in the region from 3300 to 2400  $\text{cm}^{-1}$ . Upon coordination, the band disappeared and the  $\nu(\text{C}=\text{N})$  at about 1610  $\text{cm}^{-1}$  was shifted to lower frequencies. The  $\Delta\nu$  of 10-20  $\text{cm}^{-1}$  is in good agreement with the literature. Two further vibrations at about 1570 and 1470  $\text{cm}^{-1}$  were influenced in the same way ( $\Delta\nu = 30$  to 40  $\text{cm}^{-1}$ ). New bands arose in the region between 600 and 300  $\text{cm}^{-1}$ . Vibrations of the Fe-N ( $\nu \approx 540 \text{ cm}^{-1}$ ) and the Fe-O bond ( $\nu \approx 470 \text{ cm}^{-1}$ ) as well as the Fe-Cl bond ( $\nu \approx 320 \text{ cm}^{-1}$ ) could be assigned by Raman spectroscopy (see Table 1). [12, 13]

### Biological activity

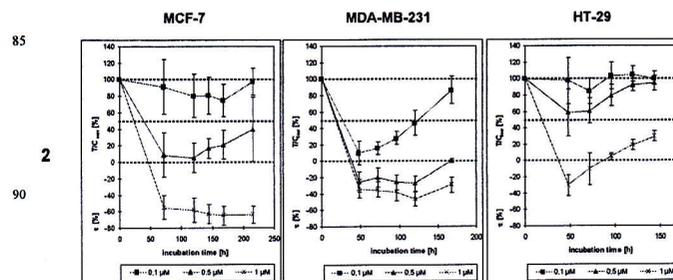
The biological activity of the [salophene]iron complexes was determined against breast cancer (MCF-7 and MDA-MB-231) and colon carcinoma (HT 29) cell lines in relation to cisplatin because this metal based drug is without significance in the therapy of these tumors.



**Figure 2:** Antiproliferative effect of cisplatin on the human MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer as well as the human HT-29 colon carcinoma cell line.

As depicted in Figure 2, cisplatin showed cytostatic activity against MCF-7 and MDA-MB-231 cells ( $\text{T/C}_{\text{corr}} = 3\%$ , respectively). On the HT-29 cell line it was less active ( $\text{T/C}_{\text{corr}} = 35\%$ ). The concentration response curve of cisplatin is characterized by a slow onset of activity and a maximum of cytotoxicity at the end of the experiment (150–200h).

The cytotoxic metal complexes of this study showed their maximum of activity at none characteristic incubation time (compare Figures 3 and 4). So it is impossible to compare the cytotoxic potency of the drugs using a single time measurement, which is ordinary in the determination of the  $\text{IC}_{50}$  values.



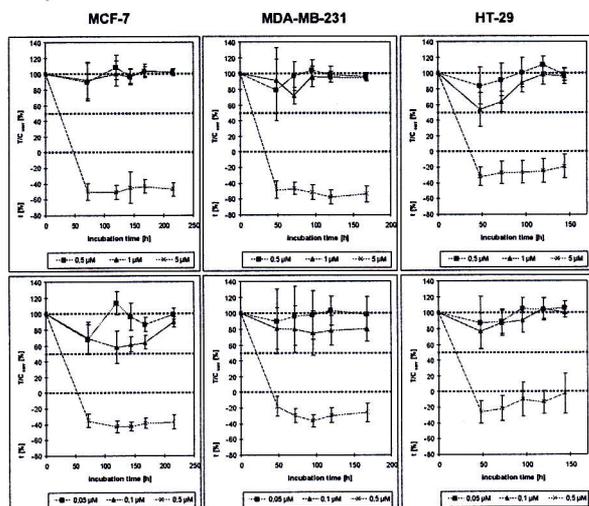
**Figure 3:** Antiproliferative effects of  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{salophene}]\text{Cl}$  (**2**) on the MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer and the HT-29 colon carcinoma cell line.

The lead structure of this study,  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{salophene}]\text{Cl}$  (**2**), was more active than cisplatin (see Figure 3). The highest activity was determined at the MDA-MB-231 cell line. Already at a concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  cytostatic effects were determined (min.  $\text{T}/\text{C}_{\text{corr}} = 10\%$ ). To achieve the same efficacy 0.5  $\mu\text{M}$  were necessary at the MCF-7 and approximately 1.0  $\mu\text{M}$  at the HT-29 cell line.

It is obvious that the iron complexes reached their maximum inhibition of cell growth already during an incubation time of 60 h. The sensitivity of MCF-7 cells seemed to be higher than that of MDA-MB-231 and HT-29 cells, because a clear recuperation of the cells was observed. Such "V shaped profile" documented Bernhardt et al. during the establishment of this crystal violet assay. [14]

As possible reasons for this behaviour, they proposed inactivation of the drugs in the culture medium, damage of only a subpopulation of cancer cells and development of a secondary resistance. In accordance with this, we followed the influence of the metal complexes on tumor cells over a time period up to 244h. The impact of methoxy groups in the salicylidene moiety was studied.

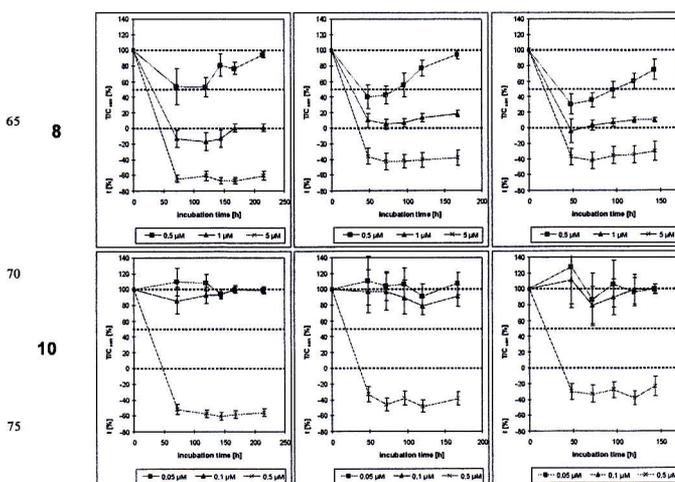
For high cytotoxicity it was necessary to coordinate the ligands to iron. Both the  $\text{FeCl}_3$  and the free ligands did not influence tumor cell growth significantly within a concentration range of 1-5  $\mu\text{M}$  (data not shown). The methoxy groups at the salicylidene rings led to a loss of selectivity and an adjustment of activity.



**Figure 4a:** Antiproliferative effects of the  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{salophene-OMe}]\text{Cl}$  complexes **4**, and **6** on the MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer and the HT-29 colon carcinoma cell line.

The concentration time curves of MCF7, MDA-MB-231 and HT-29 cells were very similar. A 3-methoxy group reduced the antiproliferative effects but caused very steep concentration response curves. For instance,  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{salophene-OMe}]\text{Cl}$  (**4**) was inactive at 0.5 and 1  $\mu\text{M}$  but reached the cytotoxic area at 5  $\mu\text{M}$ . The shift of the methoxy group from the 3- into the 4- (**6**) or the 6-position (**10**) enormously increased the effects at the cell lines. Compounds **6** and **10** caused nearly identical curves as **4** but at 10 fold lower concentrations. An exception regarding the concentration dependent response rep-

resented complex **8**. It was comparable active as **4** at a concentration of 5  $\mu\text{M}$ , but inhibited cell growth also at 1 and 0.5  $\mu\text{M}$ .



**Figure 4b:** Antiproliferative effects of the  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{salophene-OMe}]\text{Cl}$  complexes **8**, and **10** on the MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer and the HT-29 colon carcinoma cell line.

## Conclusions

The graphs of the time response curves not only give information about possible development of resistance but also suggestions about side effects observable in in vivo studies.

Highly reactive platinum(II) complexes such as aquasulfato-platinum(II) derivatives with a very steep concentration activity curves were active in diverse mouse models but showed toxic side effects such as loss of body weight.[15] A reduction of the respective dose reduced both, the antitumor activity and the side effects nearly independent on the used tumor model.

From the analysis of the graphs depicted in Figure 4a comparable behaviour can be deduced for **4**, **6** and **10**. The influence of methoxy groups on the cytotoxicity and selectivity of  $[\text{salophene}]\text{iron(III)}$  complexes is pronounced. Especially the loss of selectivity was unusual and indicated a cell unspecific cellular interaction. Studies on the mode of action of this complex type was part of the first paper of this series.[9]

$[\text{Fe}^{\text{III}}\text{salophene}]\text{Cl}$  (**2**) was able to generate reactive oxygen species (ROS), showed DNA binding and induced apoptosis.

Exchange of the salophene by *N,N'*-bis(salicylidene)-1,2-cyclohexanediamine (saldach) reduced the in vitro effects drastically. An unequivocal mode of action cannot be deduced from these results, but it seems to be very likely that cell death is caused by interference with more than one intracellular target.

Methoxy groups at the salicylidene moiety seem to modify the pharmacological properties. It is obvious that the substitution in meta position to the hydroxyl group bound to iron led to a much higher in vitro activity than in ortho and para position.

Compared to  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{salophene}]\text{Cl}$  (**2**) this means an increase of activity at the MCF-7 and HT-29 cell lines and a slight loss of cytotoxicity against MDA-MB-231 cells.

It is very likely that methoxy substituents at **2** probably influence the cell unspecific redox behaviour of the complex.

This is however speculative and has to be confirmed in a forthcoming study.

An indication is given by Routier *et al.* who showed that the para-substituted [bis(hydroxy)salen]iron(II) complex displayed cell-damaging properties because the hydroxy group built a hydroquinone system cooperating with the redox active metal to facilitate spontaneous formation of free radicals. [6]

In our complexes, however, such formation was impossible since the cleavage of the O-methyl ether was not observed until now under cell culture conditions. Nevertheless, the methoxy groups might influence the electron density at the Fe-O bond due to their electron donating effects. Interestingly the most favoured ortho and para position led to a reduction of activity. This finding induced us to study the effects of +I/+M and -I/-M-substituents at the salicylidene moiety on the cytotoxicity. The results will be published in a forthcoming paper.

## Experimental

### Materials and instrumentation

The following instrumentation was used: <sup>1</sup>H-NMR, Bruker ADX 400 spectrometer at 400 MHz (internal standard, TMS); EI-MS spectra, CH-7A Varian (70 eV); IR spectra (KBr pellets), Perkin-Elmer model 580 A; FT-Raman spectra were measured on a Bruker RFS 100 spectrometer (excitation with 1064 nm line of Nd:YAG laser; power, 100 mW, resolution 3 cm<sup>-1</sup>). Elemental C, H, N analysis were carried out with a Perkin-Elmer 240 B and 240 C elemental analyzer. Chemicals were obtained from Sigma Aldrich (Germany) and used without further purification. Compounds 1 and 2 were synthesized as recently published. [9]

### Synthesis of the ligands and their iron(III) complexes

Two equivalents of the respective salicylaldehyde (7.00 mmol) in ethanol (20 mL) were added dropwise to a solution of one equivalent of 1,2-phenylenediamine in ethanol (10 mL). The mixture was stirred under reflux for 1-2 h and allowed to cool down to room temperature. The product was collected, washed with ethanol and dried (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). The obtained ligand (0.6 mmol) was dissolved in ethanol (10 mL) and heated to reflux in the presence one equivalent of FeCl<sub>3</sub>·6 H<sub>2</sub>O in ethanol (5 mL). After 1 to 2 h, the mixture was allowed to cool to room temperature, the solid was filtered off, washed with ethanol and dried in vacuo.

### Synthesis of 1

1 was obtained from 1,2-phenylenediamine and salicylaldehyde as a crystalline, orange powder (14.55 g, 92%) <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 12.94 (s, 2H, Ar-OH), 8.94 (s, 2H, H<sub>e</sub>), 7.68-7.66 (dd, 2H, H<sub>d</sub>, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, <sup>4</sup>J = 1.5 Hz), 7.48-7.40 (m, 4H, H<sub>g</sub> + H<sub>f</sub>, <sup>3</sup>J = 5.87 and 6.17 Hz, <sup>4</sup>J = 1.58 Hz; 2H, H<sub>b</sub>, <sup>3</sup>J = 9.36 and 8.87 Hz, <sup>4</sup>J = 2.4 and 2.7 Hz), 7.00-6.96 (m, 4H, H<sub>a</sub> + H<sub>c</sub>, <sup>3</sup>J = 7.25 and 7.82 Hz). IR (KBr): ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3435br, 3055m, 1616s, 1565s, 1403m, 1278s. MS (EI, 100 °C): *m/z* (%) = 316 (100) [M<sup>+</sup>]. Elemental analysis. Found C, 75.71; H, 5.05; N, 8.79. Calc. for C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 75.93; H, 5.10; N, 8.86%.

### Synthesis of 2

2 was obtained from *N,N'*-Bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine (100 mg, 0.32 mmol) and iron(III) chloride hexahydrate (86.3 mg, 0.32 mmol) as a crystalline, black powder (92.10 mg, 72%) IR (KBr): ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 1605s, 1461m, 1313m. MS (EI, 175 °C): *m/z* (%) = 405 (3) [M<sup>+</sup>], 370 (21) [M<sup>+</sup>-Cl], 56 (19) [Fe]. Elemental analysis. Found: C, 59.24; H, 3.57; N, 6.86. Calc. for C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>FeCl: C, 59.22; H, 3.48; N, 6.91%.

### Synthesis of 3

3 was obtained from 1,2-phenylenediamine and 3-methoxysalicylaldehyde as a crystalline, dark orange powder (1.31 g, 70%) <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 13.00 (s, 2H, Ar-OH), 8.93 (s, 2H, H<sub>e</sub>), 7.48-7.40 (m, 4H, H<sub>g</sub> + H<sub>f</sub>, <sup>3</sup>J = 9.36 and 9.33 Hz, <sup>4</sup>J = 2.67 and 2.29 Hz), 7.26-7.24 (dd, 2H, H<sub>b</sub>, <sup>3</sup>J = 7.83 Hz, <sup>4</sup>J = 1.16 Hz), 7.14-7.12 (dd, 2H, H<sub>d</sub>, <sup>3</sup>J = 8.08 <sup>4</sup>J = 1.09 Hz), 6.93-6.89 (m, 1H <sup>3</sup>J = 7.88 and 7.87 Hz), 3.81 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>). IR (KBr): ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3427br, 1613s, 1573m, 1466s, 1255s, 1205m. MS (EI, 90 °C): *m/z* (%) = 376 (74) [M<sup>+</sup>]. Elemental analysis. Found: C, 70.20; H, 5.44; N, 7.44. Calc. for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 70.20; H, 5.36; N, 7.44%.

### Synthesis of 4

4 was obtained from *N,N'*-Bis(3-methoxysalicylidene)-1,2-phenylenediamine (0.10 g, 0.27 mmol) and FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (0.072 g, 0.27 mmol) as a crystalline, black powder (72.10 mg, 58%) IR (KBr): ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 1602s, 1579s, 1446s, 1435s, 1313m, 1253s, 1199m. MS (EI, 200 °C): *m/z* (%) = 465 (30) [M<sup>+</sup>], 430 (100) [M<sup>+</sup>-Cl]. Elemental analysis. Found: C, 56.79; H, 4.05; N, 6.20. Calc. for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>FeCl: C, 56.74; H, 3.90; N, 6.02%.

### Synthesis of 5

5 was obtained from 1,2-phenylenediamine and 4-methoxysalicylaldehyde as a crystalline, yellow powder (0.96 g, 84%) <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 13.52 (s, 2H, Ar-OH), 8.84 (s, 2H, H<sub>e</sub>), 7.56-7.54 (d, 2H, H<sub>d</sub>, <sup>3</sup>J = 8.64 Hz, 7.45-7.34 (m, 4H, H<sub>g</sub> + H<sub>f</sub>, <sup>3</sup>J = 9.33 and 9.30 Hz, <sup>4</sup>J = 2.41 Hz), 6.56-6.53 (dd, 2H, H<sub>c</sub>, <sup>3</sup>J = 8.62 Hz, <sup>4</sup>J = 2.37 Hz), 6.50-6.49 (d, 2H, H<sub>a</sub>, <sup>4</sup>J = 2.31 Hz), 3.81 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>). IR (KBr): ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3433br, 1614s, 1513m, 1295m, 1204s. MS (EI, 120 °C): *m/z* (%) = 376 (52) [M<sup>+</sup>]. Elemental analysis. Found: C, 70.28; H, 5.28; N, 7.43. Calc. for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 70.20; H, 5.36; N, 7.44%.

### Synthesis of 6

6 was obtained from *N,N'*-Bis(4-methoxysalicylidene)-1,2-phenylenediamine (0.10 g, 0.32 mmol) and FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (0.07 g, 0.27 mmol) as a crystalline, black powder (104. mg, 84%) IR (KBr): ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 1613s, 1574s, 1520s, 1372s, 1309s, 1266s, 1252s, 1208s. MS (EI, 275 °C): *m/z* (%) = 465 (70) [M<sup>+</sup>], 430 (100) [M<sup>+</sup>-Cl]. Elemental anal. Found: C, 56.69; H, 4.09; N, 6.22. Calc. for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>FeCl: C, 56.74; H, 3.90; N, 6.02%.

### Synthesis of 7

7 was obtained from 1,2-phenylenediamine and 5-methoxysalicylaldehyde as a crystalline, orange powder (1.19 g, 82%) <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 12.27 (s, 2H, Ar-OH), 8.89 (s, 2H,

H<sub>e</sub>), 7.44-7.37 (m, 4H, H<sub>g</sub> + H<sub>f</sub>, <sup>3</sup>J = 9.34 and 9.35 Hz, <sup>4</sup>J = 2.63 and 2.64 Hz), 7.28-7.27 (d, 2H, H<sub>d</sub>, <sup>4</sup>J = 3.09 Hz), 7.03-7.00 (dd, 2H, H<sub>b</sub>, <sup>3</sup>J = 8.92 Hz, <sup>4</sup>J = 3.13 Hz), 6.89-6.86 (d, 2H, H<sub>a</sub>, <sup>3</sup>J = 8.96 Hz). IR (KBr): ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3419br, 1617s, 1571s, 1489s, 1270s, 1212m, 1160m. MS (EI, 150 °C): m/z (%) = 376 (63) [M<sup>+</sup>]. Elemental analysis. Found: C, 70.01; H, 5.26; N, 7.43. Calc. for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 70.20; H, 5.36; N, 7.44%.

#### Synthesis of 8

8 was obtained from *N,N'*-Bis(5-methoxysalicylidene)-1,2-phenylenediamine (0.14 g, 0.37 mmol) and FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O (0.10 g, 0.38 mmol) as a crystalline, black powder (56.00 mg, 33%). IR (KBr): ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 1598s, 1536s, 1463s, 1362m, 1287m, 1223m. MS (EI, 250 °C): m/z (%) = 465 (21) [M<sup>+</sup>], 430 (100) [M<sup>+</sup>-Cl]. Elemental analysis. Found: C, 56.78; H, 4.17; N, 6.19. Calc. for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>FeCl: C, 56.74; H, 3.90; N, 6.02%.

#### Synthesis of 9

9 was obtained from 1,2-phenylenediamine and 6-methoxysalicylaldehyde as a crystalline, light orange powder (0.78 g, 63%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 13.78 (s, 2H, Ar-OH), 9.08 (s, 2H, H<sub>e</sub>), 7.41-7.31 (m, 6H, H<sub>g</sub> + H<sub>f</sub>, <sup>3</sup>J = 9.42 Hz, <sup>4</sup>J = 3.66 Hz; 2H, H<sub>b</sub>, <sup>3</sup>J = 8.38 Hz, <sup>4</sup>J = 1.69 Hz), 6.55-6.51 (m, 4H, H<sub>c</sub> + H<sub>a</sub>, <sup>3</sup>J = 9.04 and 9.07 Hz), 3.84 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>). IR (KBr): ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3431br, 1614s, 1470s, 1457s, 1358s, 1251s, 1187s, 1192s. MS (EI, 150 °C): m/z (%) = 376 (100) [M<sup>+</sup>]. Elemental analysis. Found: C, 70.26; H, 5.66; N, 7.48. Calc. for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 70.20; H, 5.36; N, 7.44%.

#### Synthesis of 10

10 was obtained from *N,N'*-Bis(6-methoxysalicylidene)-1,2-phenylenediamine (0.13 g, 0.34 mmol) and FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O (0.097 g, 0.36 mmol) as a crystalline, black powder (97.00 mg, 60%). IR (KBr): ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 1604s, 1572s, 1542s, 1459m, 1431m, 1366m, 1258m. MS (EI, 225 °C): m/z (%) = 465 (31) [M<sup>+</sup>], 430 (100) [M<sup>+</sup>-Cl]. Elemental analysis. Found: C, 56.89; H, 3.90; N, 6.20. Calc. for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>FeCl: C, 56.74; H, 3.90; N, 6.02%.

#### Cell culture conditions

The human MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer and HT-29 colon cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Both cell lines were maintained as a monolayer culture in L-glutamine containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 4.5 g/L glucose (PAA Laboratories GmbH, Austria), supplement with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco, Germany) in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>) at 37 °C. The cell lines were passaged twice a week after previous treatment with trypsin (0.05%/ethylenediaminetetraacetic acid (0.02% EDTA; Boehringer, Germany).

#### In vitro chemosensitivity assay

The in vitro testing of the substances for antitumor activity in adherent growing cell lines was carried out on exponentially dividing human cancer cells according to a previously published microtiter assay. [16] Exponential cell growth was ensured during the whole time of incubation. Briefly, 100 μL

of a cell suspension was placed in each well of a 96-well microtiter plate at 7200 cells/mL (MCF-7), at 3000 cells/mL (MDA-MB-231) and at 1600 cells/mL (HT-29) of culture medium and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>) for 3 d (MCF-7) and for 2 d (MDA-MB-231 and HT-29), respectively. By removing the old medium and adding 200 μL of fresh medium containing an adequate volume of a stock solution of metal complex, the desired test concentration was obtained. Cisplatin was dissolved in dimethylformamide (DMF) while dimethylsulfoxide (DMSO) was used for all other compounds. Eight wells were used for each test concentration and for the control, which contained the corresponding amount of DMF and DMSO, respectively. The medium was removed after reaching the appropriate incubation time. Subsequently, the cells were fixed with a solution of 1% (v/v) glutaric dialdehyde in phosphate buffered saline (PBS) and stored under PBS at 4 °C. Cell biomass was determined by means of a crystal violet staining technique as described earlier [14]. The effectiveness of the complexes is expressed as corrected T/C<sub>corr</sub> [%] or τ[%] values according to the following equation:

$$\text{cytostatic effect: } T/C_{\text{corr}} [\%] = [(T-C_0)/(C-C_0)] \times 100$$

$$\text{cytotoxic effect: } \tau [\%] = [(T-C_0)/C_0] \times 100$$

whereby T (*test*) and C (*control*) are the optical densities at 590 nm of crystal violet extract of the cells in the wells (i. e. the chromatin-bound crystal violet extracted with ethanol (70%) with C<sub>0</sub> being the density of the cell extract immediately before treatment. For the automatic estimation of the optical density of the crystal violet extract in the wells, a microplate autoreader (Flashscan S 12; Analytik Jena, Germany) was used.

#### Acknowledgment

Dr. J. Spandl (Institute of Chemistry and Biochemistry-Inorganic Chemistry, Freie Universität Berlin, Fabeckstr. 34/36, 14195 Berlin) is gratefully acknowledged for Raman measurements. The financial support of DFG – Deutsche Forschungsgemeinschaft (project: FOR 630) is greatly appreciated.

#### Notes and references

<sup>a</sup> Freie Universität Berlin, Institut für Pharmazie, Königin-Luise-Strasse 2+4, D-14195 Berlin, Germany. Fax: +49-30-83856906; Tel: +49-30-83853272; E-mail: [rgust@zedat.fu-berlin.de](mailto:rgust@zedat.fu-berlin.de)

- 1 B. K. Keppler, *Metal complexes in cancer chemotherapy*, VCH, Weinheim, 1993.
- 2 P. Köpf-Maier, H. Köpf, E. W. Neuse, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1984, **333**, 93.
- 3 E. W. Neuse, in *Macromolecules containing metal and metal-like elements*, ed. A. S. Abd-El-Aziz, C. E. Carraher, Jr., C. U. Pittman, Jr., J. E. Sheats, and M. Zeldin, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 2004, vol. 3, Biomedical Applications, ch. 6, pp. 89-117.
- 4 P. James, J. Neudörfl, M. Eissmann, P. Jesse, A. Prokop, H-G. Schmalz, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 2763.
- 5 E. Hillard, A. Vessi res, L. Thouin, G. Jaouen, C. Amatore, *Angew. Chem.*, 2006, **118**, 291.

- 
- <sup>6</sup> S. Routier, H. Vezin, E. Lamour, J-L. Bernier J-P. Catteau, C. Bailly, *Nucl. Acid Res.*, 1999, **27**, 4160.
- <sup>7</sup> A. Silvestri, G. Barone, G. Ruisi, M. T. Lo Giudice, S. Tumminello, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 589.
- <sup>8</sup> G. A. Woldemariam, S. S. Mandal, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 740.
- <sup>9</sup> A. Hille, I. Ott, A. Kitanovic, I. Kitanovic, H. Alborzina, E. Lederer, S. Wölfel, N. Metzler-Nolte, S. Schäfer, W. S. Sheldrick, C. Bischof, U. Schatzschneider, R. Gust, *J. Biol. Inorg. Chem.*, in press.
- <sup>10</sup> T. S. Lange, K. K. Kim, R. K. Singh, R. M. Strongin, C. K. McCourt, L. Brard, *PLoS One*, 2008, **3**, e2303.
- <sup>11</sup> F. Vögtle, E. Goldschmitt, *Chem. Ber.*, 1976, **109**, 1.
- <sup>12</sup> S. Belaïd, A. Landreau, S. Djebbar, O. Benali-Baitich, M. A. Khan, G. Bouet, *Transition Met. Chem.*, 2008, **33**, 511.
- <sup>13</sup> Y-M. Zhou, X-R. Ye, F-B. Xin, X-Q. Xin, *Transition Met. Chem.*, 1999, **24**, 118.
- <sup>14</sup> G. Bernhardt, H. Reile, H. Birnböck, T. Spruss, H. Schöneberger, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1992, **118**, 35.
- <sup>15</sup> H. Reile, T. Spruss, G. Bernhardt, R. Müller, R. Gust, H. Schöneberger, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 1991, **324**, 405.
- <sup>16</sup> H. Reile, H. Birnböck, G. Bernhardt, T. Spruss, H. Schöneberger, *Anal. Biochem.*, 1990, **187**, 262.

## **Anhang 2**

## Unveröffentlichte Daten aus Kapitel 5.1.3

Die Synthese der Komplexe **27-30** erfolgte in Analogie zu der von Verbindung **10**. Die entsprechenden Geräte und Messbedingungen sind bereits publiziert.<sup>[66]</sup>

**[*N,N'*-Bis(3-methoxysalicyliden)-1,2-phenylendiamino]nickel(II) (27)**. Ausbeute: 72% schwarz-roter Feststoff. **<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>): ***d*** = 8.91 (s, 2H, H<sub>e</sub>), 8.17-8.14 (m, 2H, H<sub>f</sub>, <sup>3</sup>J = 9.59, <sup>4</sup>J = 2.93 Hz), 7.35-7.33 (m, 2H, H<sub>g</sub>, <sup>3</sup>J = 9.54, <sup>4</sup>J = 3.04 Hz), 7.22-7.20 (dd, 2H, H<sub>b</sub>, <sup>3</sup>J = 6.87, <sup>4</sup>J = 1.41 Hz), 6.90-6.89 (dd, 2H, H<sub>d</sub>, <sup>3</sup>J = 7.42, <sup>4</sup>J = 1.09 Hz), 6.61-6.57 (m, 2H, H<sub>c</sub>, <sup>3</sup>J = 7.88 and 7.84 Hz), 3.76 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>). **IR** (KBr): ***n*** [cm<sup>-1</sup>] = 1608 s, 1540 s, 1247 s, 1199 s, 740 m. **MS** (EI, 100°C): m/z (%) = 432 (100) [M<sup>+</sup>]. Elementaranalyse (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Ni) ber.: C, 61.01; H, 4.19; N, 6.47; gef.: C, 60.62; H, 4.25; N, 6.43.

**[*N,N'*-Bis(4-methoxysalicyliden)-1,2-phenylendiamino]nickel(II) (28)**. Ausbeute: 95% ockerfarbener Feststoff. **<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>): ***d*** = 8.65 (s, 2H, H<sub>e</sub>), 8.04-8.01 (m, 2H, H<sub>f</sub>, <sup>3</sup>J = 9.30 Hz, <sup>4</sup>J = 2.98 Hz), 7.47-7.45 (dd, 2H, H<sub>d</sub>, <sup>3</sup>J = 8.89 Hz), 7.25-7.23 (m, 2H, H<sub>g</sub>, <sup>3</sup>J = 8.77, <sup>4</sup>J = 2.75 Hz), 6.35-6.29 (m, 4H, H<sub>c</sub> and H<sub>a</sub>, <sup>3</sup>J = 9.29 Hz and 8.58 Hz), 3.32 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>). **IR** (KBr): ***n*** [cm<sup>-1</sup>] = 1612 s, 1519 sh, 1254 m, 1209 s, 747 w. **MS** (EI, 275°C): m/z (%) = 432 (100) [M<sup>+</sup>]. Elementaranalyse (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Ni) ber.: C, 61.01; H, 4.19; N, 6.47; gef.: C, 61.22; H, 4.53; N, 6.54.

**[*N,N'*-Bis(5-methoxysalicyliden)-1,2-phenylendiamino]nickel(II) (29)**. Ausbeute 87% rotbrauner Feststoff. **<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>): ***d*** = 8.86 (s, 2H, H<sub>e</sub>), 8.13-8.11 (m, 2H, H<sub>f</sub>, <sup>3</sup>J = 8.65, <sup>4</sup>J = 2.40 Hz), 7.35-7.33 (m, 2H, H<sub>g</sub>, <sup>3</sup>J = 8.27, <sup>4</sup>J = 2.80 Hz), 7.10 (d, 2H, H<sub>d</sub>, <sup>4</sup>J = 2.61 Hz), 7.06-7.04 (dd, 2H, H<sub>b</sub>, <sup>3</sup>J = 9.15, <sup>4</sup>J = 2.46 Hz), 6.87-6.84 (d, 2H, H<sub>a</sub>, <sup>3</sup>J = 9.15 Hz), 3.72 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>). **IR** (KBr): ***n*** [cm<sup>-1</sup>] = 1602 s, 1531 s, 1253 m, 1216 s, 1174 m, 749 w. **MS** (EI, 225°C): m/z (%) = 432 (100) [M<sup>+</sup>]. Elementaranalyse (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Ni) ber.: C, 61.01; H, 4.19; N, 6.47; gef.: C, 61.03; H, 4.36; N, 6.33.

**[*N,N'*-Bis(6-methoxysalicyliden)-1,2-phenylendiamino]nickel(II) (30)**. Ausbeute: 84% weinrot-brauner Feststoff. **<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>): ***d*** = 8.87 (s, 2H, H<sub>e</sub>), 7.97-7.95 (m, 2H, H<sub>f</sub>, <sup>3</sup>J = 9.61, <sup>4</sup>J = 2.86 Hz), 7.32-7.30 (m, 2H, H<sub>g</sub>, <sup>3</sup>J = 9.40, <sup>4</sup>J = 3.00 Hz), 7.26-7.22 (m, 2H, H<sub>b</sub>, <sup>3</sup>J = 8.38 and 8.22 Hz), 6.50-6.48 (d, 2H, H<sub>c</sub>, <sup>3</sup>J = 8.68 Hz), 6.20-6.19 (d, 2H, H<sub>a</sub>, <sup>3</sup>J = 7.83 Hz), 3.88 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>). **IR** (KBr): ***n*** [cm<sup>-1</sup>] = 1610 s, 1535 s, 1254 s, 1204 s, 1096 m, 747 sh. **MS** (EI, 250°C): m/z (%) = 433 (6) [M<sup>+</sup>]. Elementaranalyse (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Ni) ber.: C, 61.01; H, 4.19; N, 6.47; gef.: C, 60.78; H, 4.26; N, 6.34.

## **Unveröffentlichte Versuchsvorschriften aus Kapitel 3.8**

### **Zelllinien**

Alle Zelllinien wurden vom DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Die Zelllinien HL-60 (AML), K-562 (CML) und U-937 (NHL) wurden in RPMI 1640-Medium ohne Phenolrot (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) mit den Zusätzen {Glutamin (2 mM), Penicillin (100U/mL), Streptomycin (100µg/mL) und Fetales Kälberserum (FCS; 10%); Invitrogen, Gibco, Paisley, Scotland} in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C kultiviert und zweimal wöchentlich passagiert.

Die Zelllinie SUP-B15 wurde in Mc'Coys 5A-Medium (Invitrogen) unter Zusatz von 20% FCS kultiviert.

### **Analyse der Proliferation**

2x10<sup>5</sup> Zellen/ mL Medium wurden in der logarithmischen Wachstumsphase ausgesät (50 µL pro Well, Mikrotiter-Platten, Greiner, Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) und eine Stunde später mit verschiedenen Substanzkonzentrationen ( 1, 10, 30 und 50 µM) für 3 Tage inkubiert. Die Analyse der Proliferation erfolgte mittels EZ4U-Assays (Biomedica, Wien, Österreich). Die Proliferation in Abwesenheit der Testsubstanzen wurde = 100% gesetzt. Um unspezifisch angefärbte Zellbestandteile (durch FCS z. B.) auszuschließen, wurde die optische Dichte des Mediums ohne Substanz subtrahiert.

### **Analyse der Apoptose**

Die Aussaatbedingungen für Apoptose-Messungen entsprachen denen der Proliferations-Bestimmung. Für die Analyse der Apoptose wurde ein "ssDNA-Apoptose-Kit" (Chemicon International, Hofheim, Deutschland) verwendet. Die Apoptoserate wurde bestimmt, indem die optische Dichte der Wells der Apoptose-Messung durch die optische Dichte der Wells der Proliferations-Messung dividiert wurde. Apoptose in Abwesenheit der Substanzen wurde = 1 gesetzt.

### **Analyse der Superoxiddismutase-Freisetzung**

Die Freisetzung der Superoxiddismutase (SOD) wurde mit einem "human Cu/Zn SOD ELISA-Kit" (BMS222CE, Bender MedSystems, Wien, Österreich) bestimmt. Die Endkonzentration der entsprechenden Testsubstanz betrug 10 µM. Der Betrag an SOD wurde in ng SOD pro mg Protein (Bradford-Bestimmung) berechnet.