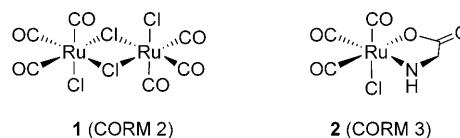


Acyloxybutadien-Fe(CO)₃-Komplexe als enzymatisch aktivierbare, CO freisetzende Moleküle (ET-CORMs)**

Steffen Romanski, Birgit Kraus, Ulrich Schatzschneider, Jörg-Martin Neudörfl, Sabine Amslinger* und Hans-Günther Schmalz*

Wie Stickstoffmonoxid (NO), so ist auch Kohlenmonoxid (CO) ein wichtiges biologisches Signalmolekül, das jedoch erst spät als solches erkannt wurde.^[1] Tatsächlich werden in unserem Körper konstant kleine Mengen an CO produziert, vorwiegend im Zuge des enzymatischen Abbaus von Hämoglobin durch Häm-Oxygenasen (HOs). Zu den biologischen Wirkungen von Kohlenmonoxid zählen zellprotektive, entzündungshemmende und gefäßerweiternde Effekte, die unter anderem im Zusammenhang mit der Reaktion unseres Körpers auf Verletzungen von Bedeutung sind.^[2] Trotz der positiven biologischen Eigenschaften befindet sich die Nutzung von CO als therapeutischem Agens noch in einem frühen Stadium.^[3] Der Einsatz von gasförmigem CO ist erwartungsgemäß riskant, denn die hohe Affinität von CO zu Hämoglobin gefährdet die Sauerstoffversorgung des Organismus und bewirkt zudem eine geringe Bioverfügbarkeit.^[4]

Ein vielversprechender Ansatz, diese Probleme zu umgehen und kontrollierte CO-Mengen direkt ins Gewebe einzubringen, besteht in der Verwendung von CO freisetzenden Molekülen (CO releasing molecules, CORMs). Als Pioniere auf diesem Gebiet haben Motterlini und Mitarbeiter eine Reihe von Carbonylübergangsmetallkomplexen identifiziert, die diese Funktion erfüllen.^[5] Während die ersten CORMs wie [Mn₂(CO)₁₀] eine UV-Aktivierung benötigten, wird die CO-Freisetzung aus dem zweikernigen Rutheniumkomplex **1** (CORM-2) durch Ligandenaustausch mit DMSO ausgelöst (Schema 1).^[6] Der einkernige Glycinatokomplex **2** (CORM-3) ist besser wasserlöslich und setzt CO unter physiologischen Bedingungen frei.^[7] Die Testung verschiedener CORMs^[8] in biologischen Assays lieferte vielversprechende Ergebnisse



Schema 1. Bekannte CO freisetzende Verbindungen (CORMs) für biologische Untersuchungen.

(unter anderem vasodilatorische, entzündungshemmende, renoprotektive, anti-ischämische und anti-apoptotische Wirkungen), die nun in präklinischen Studien weiter verfolgt werden.^[5]

Dennoch bleibt die Suche nach neuen CORMs ein wichtiges Ziel, da die bisherigen Verbindungen schwerwiegende Nachteile aufweisen. Zum Beispiel erfolgt die CO-Freisetzung aus CORM-3 sehr schnell ($t_{1/2} \approx 1$ min) und unspezifisch,^[9] sodass eine dosierte Verabreichung von CO an ein Zielgewebe schwierig ist. Eine grundsätzliche Möglichkeit zur Überwindung dieses Problems ist die Verwendung stabiler Vorstufen, die erst durch einen molekularen Auslösemechanismus (Trigger) in die eigentlichen CORMs umgewandelt werden.^[10] Ein Beispiel hierfür ist die pH-abhängige CO-Freisetzung aus Boran-Carbonat (CORM-A1)^[11] oder davon abgeleiteten Aminoderivaten.^[12] Auch die photoinduzierte Decarbonylierung von Carbonylübergangsmetallkomplexen UV-aktiver organischer Liganden wäre an dieser Stelle zu nennen.^[13]

Als ein neuartiges Konzept stellen wir hier die Verwendung von Acyloxybutadien-Fe(CO)₃-Komplexen als enzymatisch aktivierbare, CO freisetzende Moleküle (enzyme-triggered CO-releasing molecules, ET-CORMs) vor. Die Idee basiert auf einer früheren Beobachtung, dass Dienol-Fe(CO)₃-Komplexe (z.B. **4**) sehr labil sind und sich bereits unter schwach oxidierenden Bedingungen rasch zersetzen (wahrscheinlich über eine 16-Valenzelektronen-Zwischenstufe des Typs **5**). Unsere Überlegung bestand nun darin, dass sich solche Komplexe als CORMs eignen könnten, falls sie sich unter physiologischen Bedingungen aus stabilen Vorstufen erzeugen lassen. Vielversprechend erschien für diesen Zweck die Verwendung von Dienylesterkomplexen des Typs **3**, die einerseits ausreichend stabil sein sollten, andererseits jedoch nach Aufnahme in eine Zelle durch Esterasen gespalten werden könnten. Die oxidative Zersetzung der resultierenden Dienol-Fe(CO)₃-Komplexe vom Typ **4** sollte im Anschluss zur intrazellulären Freisetzung von drei CO-Molekülen führen (Schema 2).

Um dieses Konzept zu testen, galt es zunächst, einige potenziell geeignete Acyloxydien-Fe(CO)₃-Komplexe zu

[*] Dipl.-Chem. S. Romanski, Dr. J.-M. Neudörfl, Prof. Dr. H.-G. Schmalz
Department für Chemie, Universität zu Köln
Greinstraße 4, 50939 Köln (Deutschland)
E-Mail: schmalz@uni-koeln.de

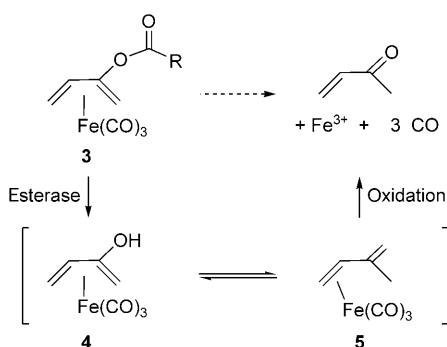
Dr. S. Amslinger
Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg
Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg (Deutschland)
E-Mail: sabine.amslinger@chemie.uni-regensburg.de

Dr. B. Kraus
Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie,
Universität Regensburg (Deutschland)

Prof. Dr. U. Schatzschneider
Institut für Anorganische Chemie,
Universität Würzburg (Deutschland)

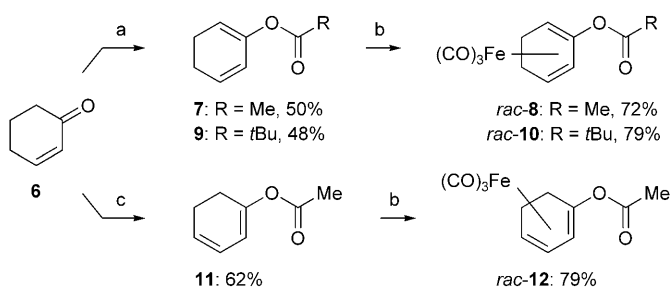
[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (FOR 630) und dem Fonds der Chemischen Industrie (Doktorandenstipendium für S.R. und Liebig-Stipendium für S.A.) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201006598> zu finden.



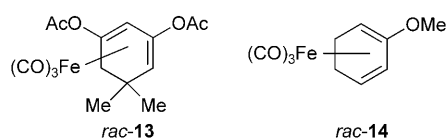
Schema 2. Vorgeschlagener Funktionsmechanismus enzymatisch aktivierbarer, CO freisetzender Moleküle (ET-CORMs) vom Typ 3.

synthetisieren. Als solche wählten wir die Komplexe *rac-8*, *rac-10* und *rac-12* aus, die gemäß Schema 3 aus Cyclohexanon (**6**) hergestellt wurden.^[14] Die Synthese von *rac-8* und *rac-10*



Schema 3. Synthese der Komplexe *rac-8*, *rac-10* und *rac-12*. a) LDA, THF, -78°C , dann Ac_2O oder PivCl ; b) $[\text{Fe}_2(\text{CO})_9]$, Et_2O , 40°C , 20 h; c) LiHMDS, TPPA, THF, -78°C , dann Ac_2O . LDA = Lithiumdiisopropylamid, LiHMDS = Lithiumhexamethyldisilazid, PivCl = Pivaloylchlorid, TPPA = Trispyrrolidinophosphorsäuretriimid.

begann mit der kinetisch kontrollierten Deprotonierung von **6** (LDA, THF, -78°C) und dem Abfangen des intermediären Dienolates entweder mit Acetanhydrid (zu **7**) oder mit Pivaloylchlorid (zu **9**). Die thermische Umsetzung der erhaltenen Diene mit $[\text{Fe}_2(\text{CO})_9]$ in Diethylether führte in guten Ausbeuten zu den Komplexen *rac-8* bzw. *rac-10*. Zur Synthese des Komplexes *rac-12* (dem Isomer von *rac-8*) wurde **6** zunächst mit LiHMDS in Gegenwart von 1.5 Äquivalenten TPPA deprotoniert und das resultierende (thermodynamisch stabilere) Dienolat zu **11** acetyliert, dessen Komplexierung schließlich *rac-12* lieferte. Als weitere Verbindungen wurden der Diacetoxydienkomplex *rac-13*,^[15] der sich von Dimedon (als einer nicht toxischen Vorstufe) ableitet, sowie der Methoxy-substituierte Komplex *rac-14*^[16] (als Esterase-unempfindliche Referenzverbindung) nach Literaturvorschriften synthetisiert (Schema 4).



Schema 4. Strukturformeln der Komplexe *rac-13* und *rac-14*.

Alle hergestellten Komplexe erwiesen sich als ausreichend luftstabil und konnten durch die gängigen spektroskopischen Methoden charakterisiert werden. Die strukturellen Zuordnungen wurden zusätzlich durch eine Röntgenkristallstrukturanalyse von *rac-12* untermauert (Abbildung 1), die auch die Vorzugskonformation dieser Verbindung im Kristall offenbarte.

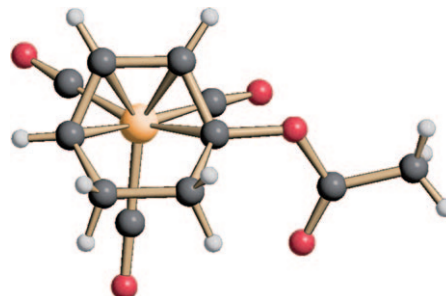


Abbildung 1. Struktur des Komplexes *rac-12* im Kristall; grau C, weiß H, orange Fe, rot O.

Während wir für die Essigsäureester *rac-8*, *rac-12* und *rac-13* eine leichte Spaltbarkeit durch Esterasen (z. B. Schweineleberesterase) erwarteten, erachteten wir den Pivalinsäureester *rac-10* als schwerer hydrolysierbar (auch unter nicht-enzymatischen Bedingungen), sodass dieser Komplex zum Nachweis der Esterase-Aktivierung besonders gut geeignet erschien. Im Vorfeld der Überprüfung der ET-CORM-Eigenschaften galt es, geeignete Esterasen für die individuellen Komplexe zu identifizieren. Die Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse von *rac-8*, *rac-10*, *rac-12* und *rac-13* erfolgte unter den gleichen Bedingungen, die später im Myoglobin-Assay zum Nachweis der CO-Freisetzung angewendet werden sollten (siehe unten). Typischerweise wurde hierzu ein Komplex in wenig DMSO mit der Lösung einer Esterase in Phosphatpuffer vermischt, und der Umsatz wurde mit HPLC an chiraler Phase (oder GC im Fall von *rac-8*) verfolgt. Diese Methodik ermöglichte es auch, eine kinetische Racematspaltung zu detektieren, als zweifelsfreien Nachweis eines enzymatischen Prozesses.^[17] Durch Testung einer Reihe kommerziell verfügbarer Enzyme konnten für alle Substrate geeignete Esterasen gefunden werden (Tabelle 1). Die Umsetzung der Komplexe *rac-12* und *rac-13* mit Schweineleberesterase (PLE) ging eindeutig mit einer kinetischen Racematspaltung einher (70 bis $>90\%$ *ee* des nicht umgesetzten Komplexes bei ca. 80 % Umsatz). Im Falle der Komplexe *rac-8* und *rac-10* erwies sich eine Lipase aus *Candida rugosa* (LCR) als überlegen. Erwartungsgemäß reagierte der Pivalinsäureester *rac-10* wesentlich langsamer als die Acetate *rac-8* und *rac-12*.

Tabelle 1: Identifizierung geeigneter Esterasen für die enzymatische Hydrolyse der Acyloxydien- $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Komplexe, nachgewiesen durch kinetische Racematspaltung.

Enzym ^[a]	<i>rac-8</i>	<i>rac-10</i>	<i>rac-12</i>	<i>rac-13</i>	<i>rac-14</i>
PLE	–	–	+	+	–
LCR	+	+	+	–	–

[a] PLE = Schweineleberesterase; LCR = Lipase aus *Candida rugosa*.

8, *rac-12* und *rac-13*, und der Methoxy-substituierte Komplex *rac-14* reagierte gar nicht unter diesen Bedingungen.

Die Esterase-initiierte CO-Freisetzung aus den Komplexen (als Folge der enzymatischen Hydrolyse) wurde nun mithilfe eines von Motterlini et al.^[6] etablierten, Myoglobin(Mb)-basierten Assays untersucht. In diesem Assay wird der Umsatz von Desoxymyoglobin (desoxy-Mb), das in situ durch Reduktion von Mb mit Dithionit erzeugt wird, zu Kohlenmonoxy-Myoglobin (MbCO) spektrophotometrisch verfolgt (500–750 nm). In Einklang mit dem vorgeschlagenen Mechanismus (Schema 2) konnte die CO-Freisetzung eindeutig nachgewiesen werden, und zwar aus *rac-12* (Abbildung 2) und *rac-13* in Gegenwart von PLE und aus *rac-8*, *rac-10* und *rac-12* in Gegenwart von LCR. In Abwesenheit von Esterasen wurde unter den gleichen Bedingungen keine CO-Freisetzung (oder nur eine sehr langsame im Fall von *rac-13*) detektiert.^[18] Somit konnte die postulierte enzymatische Aktivierung der Komplexe als CO freisetzende Moleküle (ET-CORMS) zweifelsfrei demonstriert werden.^[19]

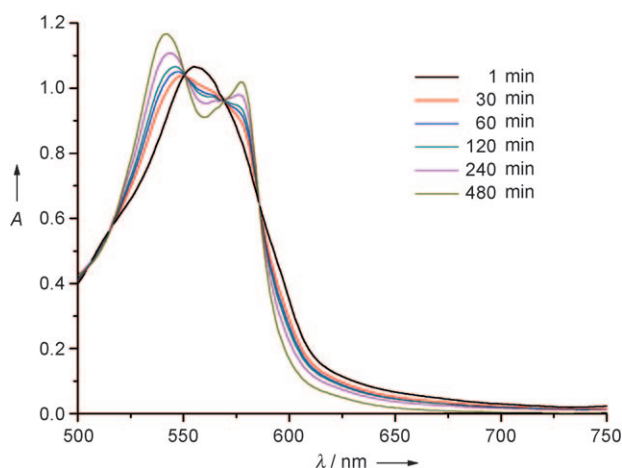


Abbildung 2. Nachweis der enzymaktivierten CO-Freisetzung durch Verfolgen der Änderungen im Bereich der Q-Bande im UV/Vis-Spektrum von reduziertem Pferdeskelettmuskel-Myoglobin (76 μM) in Gegenwart von Komplex *rac-12* (1.3 Äquiv.) und PLE (ca. 0.01 Äquiv.) in Phosphatpuffer (0.1 M, pH 7.4).

Nachdem wir unsere ET-CORMs in vitro charakterisiert hatten, bestand die nächste Aufgabe darin, das biologische Potenzial dieser Verbindungen in einem Zell-Assay zu überprüfen. Ein wichtiges biologisches Angriffsziel von CO ist die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), ein wichtiges pro-inflammatorisches Enzym. Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) erzeugen NO und L-Citrullin aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff unter Verwendung von NADPH als Cosubstrat. NOS haben einen fest gebundenen Häm-Co-

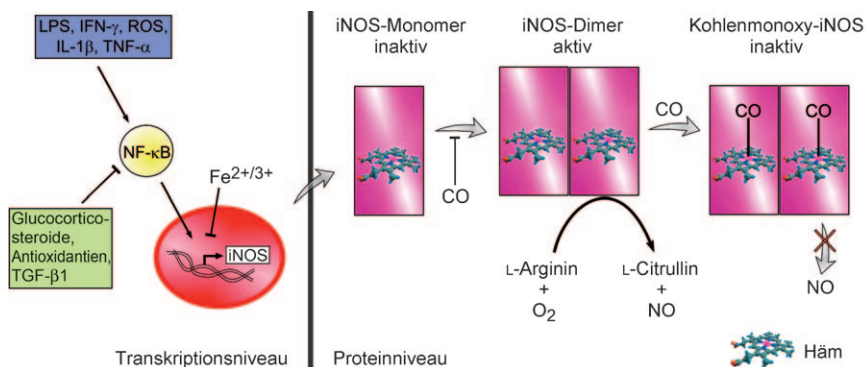


Abbildung 3. Regulierung von Transkription und Proteinaktivität der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) durch Eisenspezies und CO.^[22] Die Transkription von iNOS kann durch verschiedene Faktoren, z. B. Lipopolysaccharid (LPS), Interferon- γ (IFN- γ), oxidativen Stress/reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Interleukin-1 β (IL-1 β) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) induziert werden. Dies erfolgt jeweils über die Aktivierung von Nuklearfaktor- κB (NF- κB). Die Aktivierung von NF- κB wiederum kann beispielsweise durch Glucocorticoide, Antioxidantien oder Transforming Growth Factor-1 β (TGF- β 1) verhindert werden.

faktor, der für ihre Oxygenase-Aktivität notwendig ist (Abbildung 3).^[20] iNOS ist die induzierbare Form der NOS und spielt in zellulären Abwehrmechanismen gegen Bakterien, Viren, Parasiten und Tumoren eine wichtige Rolle.^[21] Die Wirkung von CO gegen iNOS beruht auf zwei verschiedenen Effekten: Zum einen kann CO die Dimerisierung des inaktiven monomeren iNOS-Proteins zum enzymatisch aktiven Dimer verhindern; zum anderen unterdrückt CO die iNOS-Aktivität, indem es an das Eisenzentrum von Häm (Fe-Protoporphyrin IX) unter Bildung des inaktiven Kohlenmonoxy-iNOS-Komplexes bindet (Abbildung 3).^[23]

Vor dem eigentlichen iNOS-Inhibitions-Assay untersuchten wir die potenzielle Cytotoxizität der ET-CORMs unter Verwendung der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW267.4, in der iNOS leicht durch Lipopolysaccharid (LPS) induziert werden kann.^[24] Die Lebensfähigkeit der Zellen nach Inkubation mit den Verbindungen wurde mithilfe des MTT-Tests ermittelt.^[25] Zusätzlich wurde, nach Einfärben der Zellkerne mit Kristallviolett, die Zahl intakter Zellen photometrisch bestimmt. Tabelle 2 zeigt für beide Assays die ET-CORM-Konzentrationen, bei denen eine 50-proz. (IC_{50}) oder 20-proz. Inhibierung (IC_{20}) festgestellt wurde.

Das Pivaloat *rac-10* zeigte im Kristallviolett-Assay bei den untersuchten Konzentrationen keine signifikante Toxi-

Tabelle 2: Cytotoxizitätsdaten der ET-CORMs.^[a]

Verbindung	MTT		Kristallviolett	
	IC_{50} [μM]	IC_{20} [μM]	IC_{50} [μM]	IC_{20} [μM]
<i>rac-8</i>	67.1 ± 3.6	28.1 ± 0.6	73.6 ± 6.9	28.6 ± 7.2
<i>rac-10</i>	— ^[b]	— ^[b]	> 100	> 100
<i>rac-12</i>	39.6 ± 0.9	11.2 ± 2.2	47.0 ± 2.7	14.4 ± 3.5
<i>rac-13</i>	54.3 ± 1.0	21.8 ± 0.6	95.2 ± 3.8	37.7 ± 1.0
<i>rac-14</i>	> 100	> 100	> 100	> 100

[a] Die Daten wurden durch den MTT- und den Kristallviolett-Assay unter Verwendung von RAW264.7-Zellen, die mit LPS (10 ng mL^{-1}) stimuliert wurden, ermittelt. [b] Bei *rac-10* trat im MTT-Test eine ungewöhnliche Farbe auf, was eine korrekte Auswertung der Zellviabilität verhinderte.

zität, und auch der Methoxy-substituierte Komplex *rac-14* erwies sich bis zu einer Konzentration von 100 μM als nicht toxisch. Im Unterschied dazu zeigten die Acetate *rac-8*, *rac-12* und *rac-13* im MTT-Test IC_{20} -Werte in einem Bereich von 11–28 μM sowie von 14–38 μM im Kristallviolett-Assay.

Mit dem Wissen um die Cytotoxizitätsprofile der verschiedenen Komplexe (Abbildung 4, linke Seite) konnten wir nun die Untersuchung des Einflusses der ET-CORMs auf die iNOS-katalysierte NO-Bildung in Angriff nehmen. Zu diesem Zweck wurde die NO-Produktion indirekt über die Messung des im Zellmedium akkumulierten Nitrits bestimmt, wozu ein auf dem Griess-Test^[26] basierender Mikrotiterplatten-Assay verwendet wurde. Um falsch-positive Ergebnisse aufgrund cytotoxischer Effekte auszuschließen, wurden die Messungen nur bei ET-CORM-Konzentrationen unterhalb der IC_{20} -Werte (Tabelle 2) durchgeführt.

Von den fünf getesteten ET-CORMs erwies sich das Diacetat *rac-13* als der aktivste Inhibitor der NO-Bildung in LPS-stimulierten RAW267.4-Zellen. Die Behandlung der Zellen mit *rac-13* führte bei einer Konzentration von 15 μM zu einer Verminderung der LPS-induzierten NO-Produktion von bis zu $(68 \pm 6)\%$ bezogen auf die nur mit LPS behandelten Zellen der Kontrolle. Bei 20 μM (d.h. nahe der Cytotoxizitätsgrenze) wurde keine weitere Erhöhung der Aktivität beobachtet. Insgesamt verursachte *rac-13* eine signifikante NO-Inhibition bereits bei 5 μM ($(33 \pm 6)\%$ Inhibition). *rac-12* zeigt eine sehr ähnliche Aktivität ($(30 \pm 7)\%$ Inhibition der NO-Freisetzung bei 5 μM) wie *rac-13*. Die höhere Toxizität von *rac-12* ermöglichte jedoch keine Messungen oberhalb von 10 μM . Das Isomer *rac-8* erwies sich als weniger aktiv (Herabsetzung der NO-Bildung um $(16 \pm 10)\%$ bei 25 μM). Die Esterase-unempfindliche Referenzverbindung *rac-14* und der relativ Hydrolyse-unempfindliche Pivalinsäureester *rac-10* bewirkten keine signifikante Unterdrückung der NO-Bildung bei Konzentrationen bis zu 50 μM (siehe Abbildung S18D,E in den Hintergrundinformationen).^[27]

Fazit: Mit den Acyloxycyclohexadien- $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Komplexen haben wir eine neuartige Klasse leistungsfähiger, CO freisetzender Moleküle vorgestellt, die durch enzymatische Spaltung einer Esterfunktion aktiviert werden (ET-CORMs). Der vorgeschlagene Auslösemechanismus wurde durch CO-Freisetzungsexperimente (Myoglobin-Assay) sowie durch einen Zell-Assay, der auf einer iNOS-Inhibition als bedeutende biologische Reaktion auf CO basiert, untermauert. Die wirksamste der bislang untersuchten Verbindungen (*rac-13*) zeigte eine stärkere Aktivität als z.B. $([\gamma\text{-C}_5\text{H}_4\text{CO}_2\text{Me})\text{Fe}(\text{CO})_2\text{Br}]$ ^[28] oder Pyron-basierte $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Komplexe.^[29] Diese Verbindung weist zwar eine gewisse Cytotoxizität auf, ist allerdings unseres Wissens das potenteste CORM, das je in einem solchem Assay charakterisiert wurde (30 % NO-Inhibition bei 5 μM).^[30]

Das hier vorgestellte Konzept eröffnet vielversprechende neue Optionen für die Entwicklung einer neuen Generation CO freisetzender Moleküle (CORMs), die eine kontrollierte und möglicherweise sogar gewebe selektive CO-Abgabe ermöglichen. Die kurze und flexible Synthese bietet beste Voraussetzungen für eine Variation der Dienyl-esterliganden und somit für eine Feinabstimmung der pharmakologischen und biologischen Eigenschaften (z.B. Wasserlöslichkeit) in der Zukunft.

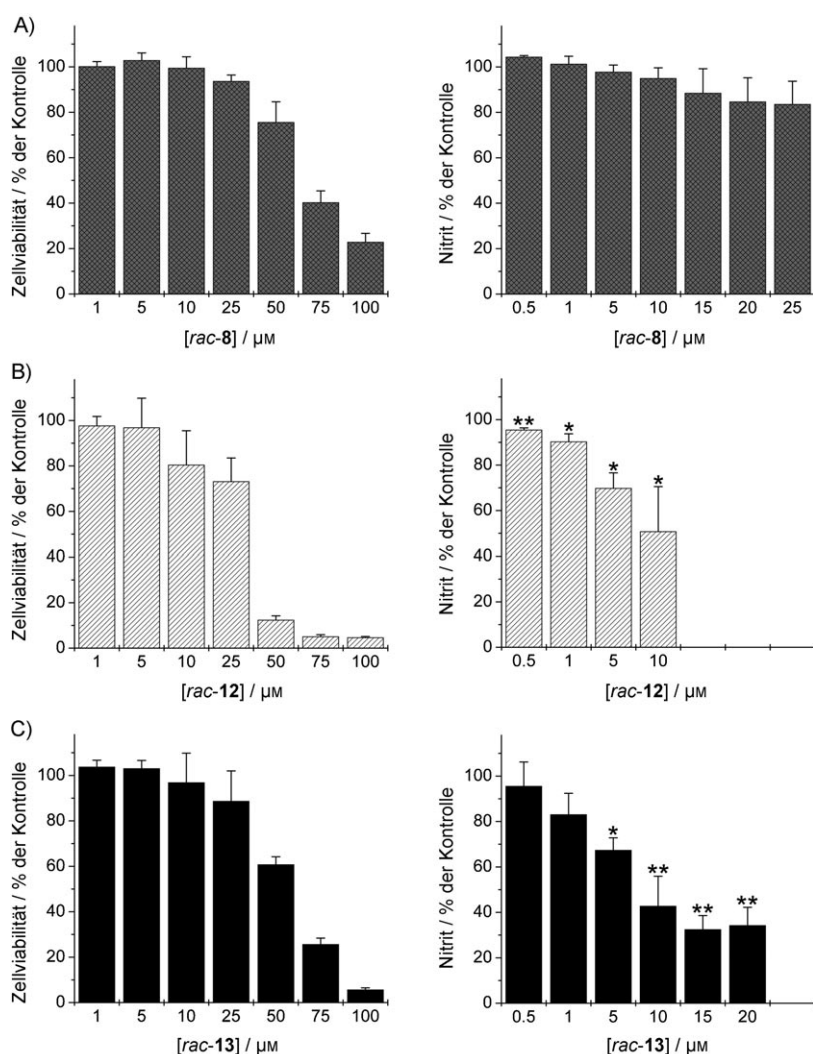


Abbildung 4. Ergebnisse der In-vitro-Zell-Assays. Verwendet wurden jeweils RAW264.7-Zellen, die mit LPS (10 ng mL^{-1}) stimuliert wurden. Links: Ergebnisse der MTT-Tests nach einer Inkubationszeit von 24 h bei verschiedenen Substanzkonzentrationen. Rechts: Inhibition der NO-Bildung (Griess-Assay). Die Daten entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier Parallelen. Signifikanzniveau: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Eingegangen am 20. Oktober 2010
Online veröffentlicht am 14. Februar 2011

Stichwörter: Carbonylliganden · CO-Freisetzung · Enzymkatalyse · Inhibitoren · Wirkstoff-Transport

- [1] Spezialausgabe: M. K. Choi, L. E. Otterbein, *Antioxid. Redox Signaling* **2002**, 4, 227–338.
- [2] Übersichtsartikel: S. W. Ryter, J. Alam, A. M. K. Choi, *Physiol. Rev.* **2006**, 86, 583–650.
- [3] A. Hoetzel, R. Schmidt, *Anaesthesist* **2006**, 55, 1068–1079.
- [4] T. R. Johnson, B. E. Mann, J. E. Clark, R. Foresti, C. J. Green, R. Motterlini, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3850–3858; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3722–3729.
- [5] a) R. Motterlini, B. E. Mann, T. R. Johnson, J. E. Clark, R. Foresti, C. J. Green, *Curr. Pharm. Des.* **2003**, 9, 2525–2539; b) B. E. Mann, R. Motterlini, *Chem. Commun.* **2007**, 4197–4208; c) R. Alberto, R. Motterlini, *Dalton Trans.* **2007**, 1651–1660; d) R. Motterlini, L. E. Otterbein, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, 9, 728–743.
- [6] R. Motterlini, J. E. Clark, R. Foresti, P. Sarathchandra, B. E. Mann, C. J. Green, *Circ. Res.* **2002**, 90, e17–e24.
- [7] T. R. Johnson, B. E. Mann, I. P. Teasdale, H. Adams, R. Foresti, C. J. Green, R. Motterlini, *Dalton Trans.* **2007**, 1500–1508.
- [8] Eisenhaltige CORMs: a) D. Scapens, H. Adams, T. R. Johnson, B. E. Mann, P. Sawle, R. Aqil, T. Perrior, R. Motterlini, *Dalton Trans.* **2007**, 4962–4973; b) I. J. S. Fairlamb, J. M. Lynam, B. E. Moulton, I. E. Taylor, A. K. Duhme-Klair, P. Sawle, R. Motterlini, *Dalton Trans.* **2007**, 3603–3605; μ^2 -Alkin-[Co₂(CO)₆]-Komplexe als CORMs: c) A. J. Atkin, S. Williams, P. Sawle, R. Motterlini, J. M. Lynam, I. A. S. Fairlamb, *Dalton Trans.* **2009**, 3653–3656.
- [9] R. Motterlini, B. E. Mann, R. Foresti, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2005**, 14, 1305–1318.
- [10] R. Foresti, M. G. Bani-Hani, R. Motterlini, *Intensive Care Med.* **2008**, 34, 649–658.
- [11] R. Motterlini, P. Sawle, J. Hammad, S. Bains, R. Alberto, R. Foresti, C. J. Green, *FASEB J.* **2005**, 19, 284–286.
- [12] T. S. Pitchumony, B. Spingler, R. Motterlini, R. Alberto, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4849–4854.
- [13] a) J. Niesel, A. Pinto, H. W. Peindy N'Dongo, K. Merz, I. Ott, R. Gust, U. Schatzschneider, *Chem. Commun.* **2008**, 1798–1800; b) H. Pfeiffer, A. Rojas, J. Niesel, U. Schatzschneider, *Dalton Trans.* **2009**, 4292–4298; c) R. D. Rimmer, H. Richter, P. C. Ford, *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 1180–1185; d) U. Schatzschneider, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 1451–1467.
- [14] Die vom Cyclohexanon abgeleiteten Komplexe erachten wir als sinnvolle Modellverbindungen für entsprechende Derivate nicht toxischer Naturstoffe mit einer Cyclohexanon-Substruktur (für zukünftige Untersuchungen).
- [15] A. Boháč, M. Lettrichová, P. Hrnčiac, M. Hutta, *J. Organomet. Chem.* **1996**, 507, 23–29; A. Boháč, M. Lettrichová, P. Hrnčiac, *Synthesis* **1991**, 881–882.
- [16] M. C. P. Yeh, C.-C. Hwu, *J. Organomet. Chem.* **1991**, 419, 341–355.
- [17] Enzymatisch-kinetische Racematspaltung von Alkoxy-carbonyl-substituierten 1,3-Dien-Fe(CO)₃-Komplexen: N. W. Alcock, D. H. G. Crout, C. M. Henderson, S. E. Thomas, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 746–747.
- [18] Ein Kontrollexperiment bestätigte, dass *rac-14* keine CO-Freisetzung unter den Bedingungen des Myoglobin-Assays in Gegenwart von PLE oder LCR zeigt.
- [19] Die Gegenwart kleiner Mengen an Sauerstoff ist für die CO-Freisetzung notwendig, und die Geschwindigkeit der CO-Freisetzung hängt sowohl von der Konzentration der Esterase (enzymatische Hydrolyse) als auch von der Menge des zugesetzten Dithionits ab (Redoxpotential). Während etwas Sauerstoff für die oxidative Zersetzung (Schema 2) essenziell ist, toleriert der Assay keine höheren O₂-Konzentrationen (Reoxidation der CO bindenden Eisen(II)-Form von Mb). Unter den Bedingungen des Assays wurden folgende typische Zeiten für die Freisetzung von 0.5 mol CO pro mol ET-CORM bestimmt: 56 min für *rac-8* (0.09 Äquiv. LCR), 183 min für *rac-12* (0.01 Äquiv. PLE) und 86 min für *rac-13* (0.01 Äquiv. PLE). Wegen der Komplexität des Parameterraumes ermöglichen diese Werte jedoch weder einen „quantitativen Vergleich“ der ET-CORMs noch Vorhersagen ihres biologischen Verhaltens.
- [20] W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles, *Biochem. J.* **2001**, 357, 593–615.
- [21] H. Kleinert, P. M. Schwarz, U. Förstermann, *Biol. Chem.* **2005**, 384, 1343–1364.
- [22] Ungewöhnlich hohe, von der Norm abweichende NO-Konzentrationen führen zu zellulärem Schaden, was als ausschlaggebender Faktor in der Pathophysiologie von menschlichen Erkrankungen betrachtet wird.
- [23] R. N. Watts, P. Ponka, D. R. Richardson, *Biochem. J.* **2003**, 369, 429–440.
- [24] Cytotoxizität ist ein wichtiges Thema im Zusammenhang mit CO freisetzenden Molekülen. Die Toxizität von CO, die zu tödlichen Folgen bei Säugetieren führt, gründet sich auf seiner hohen Affinität zur prosthetischen Häm-Gruppe des Hämoglobins und Myoglobins, wodurch es zur Hypoxie kommt. Zusätzlich bindet CO an Cytochrom-c-Oxidase in den Mitochondrien. Hierdurch wird der mitochondrielle Elektronentransport gehemmt, was wiederum zu einem Zusammenbruch der zellulären Energieversorgung führt.
- [25] Dieser Assay basiert auf der Umsetzung des gelben MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch mitochondrielle Dehydrogenasen zu einem violetten Formazan-Farbstoff, der sich photometrisch quantifizieren lässt.
- [26] Die Zellkulturüberstände wurden 1:1 (v/v) mit Griess-Reagens (1 % Sulfanilamid, 0.1 % Naphthylethylendiamin-Dihydrochlorid in 2 % Phosphorsäure) gemischt, und anschließend wurde die Absorption bei 560 nm gemessen. Zur Quantifizierung des Nitritgehalts wurde NaNO₂ verwendet. Siehe auch: E. Park, M. R. Quinn, *J. Leukocyte Biol.* **1993**, 54, 119–124.
- [27] Der Ether *rac-14* zeigte bei einer Konzentration von 100 μ M eine signifikante Hemmung der NO-Bildung um (11 \pm 3) %. Dies ergibt sich höchstwahrscheinlich aufgrund von Esterase-unabhängigen Zerfallsreaktionen.
- [28] D. Scapens, H. Adams, T. R. Johnson, B. E. Mann, P. Sawle, R. Aqil, T. Perrior, R. Motterlini, *Dalton Trans.* **2007**, 4962–4973.
- [29] CORM-aktive Pyron-Fe(CO)₃-Komplexe lassen sich auch als „Dienylesterkomplexe“ auffassen, jedoch benötigen sie keine Aktivierung durch eine Esterase: P. Sawle, J. Hammad, I. J. S. Fairlamb, B. Moulton, C. T. O'Brien, J. L. Lynam, A. K. Duhme-Klair, R. Foresti, R. Motterlini, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, 318, 403–410.
- [30] Mögliche Effekte von Eisen, die sich auf die Transkription von iNOS auswirken könnten, wurden bisher nicht betrachtet und sind Gegenstand weiterer Untersuchungen. Es ist bekannt, dass freies zelluläres Eisen durch Hemmung der iNOS-Genexpression zu einer Abnahme der Expression von iNOS-Protein führen kann: G. Weiss, G. Werner-Felmayer, E. R. Werner, K. Grunewald, H. Wachter, M. W. Hentze, *J. Exp. Med.* **1994**, 180, 969–976.