

# Fortschritt in Richtung bioorthogonaler Katalyse mit Organometallverbindungen\*\*

Timo Völker, Felix Dempwolff, Peter L. Graumann und Eric Meggers\*

**Abstract:** Die Katalyse von bioorthogonalen Transformationen in Lebewesen ist eine enorme Herausforderung – allerdings birgt sie auch großes Potenzial für zukünftige Anwendungen. Wir berichten hier über Rutheniumkomplexe, die in der bioorthogonalen Katalyse unter biologisch relevanten Bedingungen und in lebenden Zellen eingesetzt werden können. Die Katalysatoren aktivieren Allylcarbamate-geschützte Amine mit bisher unerreichter hoher Aktivität (270 Zyklen) in Gegenwart von Wasser, Luft und millimolaren Thiolkonzentrationen. Durch Fluoreszenzmikroskopie lebender HeLa-Zellen und mithilfe einer aktivierbaren Fluoreszenzsonde konnten wir eine intensive Fluoreszenzentwicklung im Zytoplasma nachweisen und damit die vermutete Bioorthogonalität der Katalysatoren bekräftigen. Zur Illustration der möglichen Anwendungsbreite bioorthogonaler Organometallkatalyse entwickelten wir eine Methode zur intrazellulären, katalytischen Aktivierung einer Zytostatikavorstufe, welche die Apoptose effizient einleitet.

Die bioorthogonale Chemie in lebenden Zellen und Tieren hat unser biologisches Verständnis erweitert und hatte außerdem einen tiefgreifenden Einfluss auf Bereiche wie Bildung, Medikamentenentwicklung und Biotechnologie.<sup>[1]</sup> Bisher wurden bioorthogonale Reaktionen hauptsächlich stöchiometrisch sowie unkatalysiert durchgeführt, und zudem wurden nur wenige artifizielle katalytische Reaktionen für biologische Milieus beschrieben.<sup>[2–6]</sup> Bioorthogonale Katalysatoren erkennen selektiv spezifische funktionelle Gruppen, die in der Natur abwesend sind, und katalysieren ihre Transformation in (lebenden) biologischen Systemen. Um diese Aufgabe handhaben zu können, müssen diese Katalysatoren einen schwierigen Balanceakt zwischen Reaktivität und Stabilität meistern können. Die kombinierte Gegenwart von Wasser, Luft und einem Überfluss an zellulären Komponenten wie millimolare Thiolkonzentrationen fordern

dabei eine hohe Stabilität des Katalysators, wohingegen gleichzeitig die physiologischen Bedingungen (z.B. Temperatur und pH-Wert) und niedrige zelluläre Reagenskonzentrationen eine hohe Reaktivität gegenüber dem designierten Substrat voraussetzen. Des Weiteren darf weder der Katalysator noch das Substrat intrinsisch die biochemische Homöostase des Wirts beeinflussen. Im Moment sind effiziente Katalysatoren, die diesen grundlegenden Kriterien entsprechen, Mangelware in unserem bioorthogonalen Repertoire, allerdings ist eine Bandbreite an vielversprechenden Anwendungen denkbar, angefangen von der Aktivierung (geschützter) Substrate/Wirkstoffvorstufen bis hin zur katalytischen Markierung oder Desaktivierung biologischer Zielstrukturen. Der Vorteil der Signalverstärkung durch katalytischen Umsatz wurde bereits auf dem Gebiet der enzymgesteuerten Biobildgebung und der Nukleinsäure-basierten Sensorik angewendet.<sup>[7,8]</sup> In den letzten Jahren wurden auf diesem Gebiet zudem Fortschritte mit nichtbiologischen, synthetischen Katalysatoren beschrieben, die aus Metallverbindungen wie Palladiumsalzen, Palladiumnanopartikeln oder Organorutheniumkomplexen bestehen.<sup>[2–6]</sup> Besonders hervorzuheben ist dabei die Arbeit von Bradley et al., in der relativ hohe katalytische Aktivitäten von bis zu 30 Zyklen in einer Entschützungsreaktion mit Palladium-modifizierten Harzen beschrieben werden – auch wenn die Effizienz nur unter biologisch relevanten Bedingungen und nicht im lebenden System bestimmt wurde.<sup>[5a]</sup> Wegen der stringenten Voraussetzungen, die durch die zelluläre Umgebung gesetzt werden, ist es trotz dieser ersten Erfolge immer noch äußerst anspruchsvoll, mit einem artifiziellen Katalysator mehrere Katalysezyklen in einem biologischen System zu erreichen.

Wir möchten hier unsere Fortschritte bezüglich metallorganischer Rutheniumkomplexe für die katalytische Aktivierung von Allyloxycarbonyl-geschützten Aminen unter biologisch relevanten Bedingungen und in lebenden Säugetierzellen vorstellen (Schema 1). Die hohe katalytische Produktivität der neuen Katalysator/Substrat-Paare ermöglichte die katalytische Aktivierung einer Chemotherapeutikumvorstufe in HeLa-Zellen und damit die Änderung der zellulären Vitalität in einem An/Aus-Modus von gesund nach apoptotisch.

Vor fast einem Jahrzehnt berichteten wir, dass der metallorganische Halbsandwichkomplex  $[\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}]$  (**Ru1**;  $\text{Cp}^* = \eta^5\text{-Pentamethylcyclopentadienyl}$ ,  $\text{cod} = \eta^4\text{-1,5-Cyclooctadien}$ ) die Umwandlung bioorthogonaler *O*-Allylcarbamate hin zu ihren entsprechenden Aminen unter biologisch relevanten Bedingungen (Gegenwart von Wasser, Luft und Thiolen) und in lebenden HeLa-Zellen katalysieren kann, wenn auch mit einer so niedrigen katalytischen Aktivität, dass bedeutungsvolle Anwendungen schwierig zu ver-

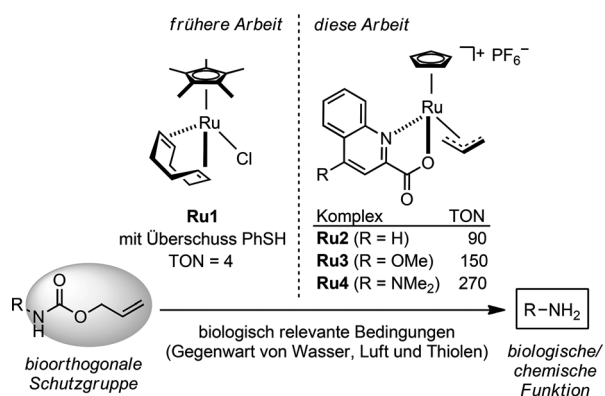
[\*] T. Völker, Prof. Dr. E. Meggers  
Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg  
Hans-Meerwein-Straße, 35043 Marburg (Deutschland)  
E-Mail: meggers@chemie.uni-marburg.de

Prof. Dr. E. Meggers  
College of Chemistry and Chemical Engineering  
Xiamen University, Xiamen 361005 (Volksrepublik China)

Dr. F. Dempwolff, Prof. Dr. P. L. Graumann  
LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie  
Hans-Meerwein-Straße, 35043 Marburg (Deutschland)

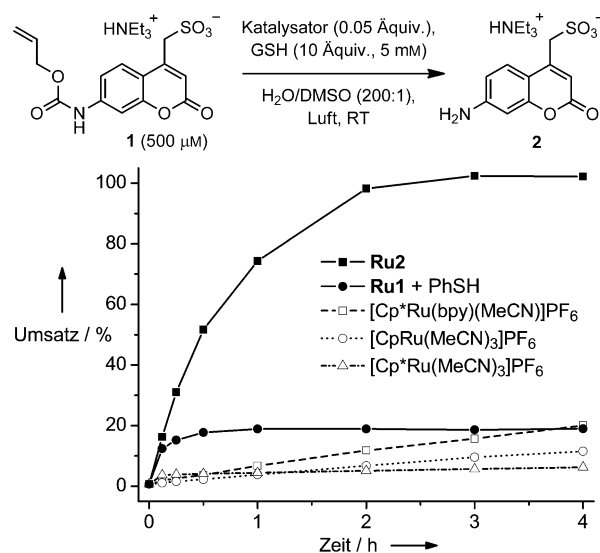
[\*\*] Für die finanzielle Unterstützung danken wir dem LOEWE Schwerpunkt SynChemBio des Landes Hessen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201404547> zu finden.



**Schema 1.** Diese und frühere Arbeit (siehe Lit. [4a]) zur katalytischen Spaltung von O-Allylcarbamaten mit Organorutheniumkomplexen unter biologisch relevanten Bedingungen. TON = katalytische Produktivität.

wirklichen waren (Schema 1).<sup>[4a,9]</sup> Um potentere Organometallkatalysator/Substrat-Paare zu identifizieren, begannen wir unsere Arbeit mit der Evaluierung von verschiedenen Rutheniumhalbsandwichkomplexen, die dafür bekannt sind, effiziente Tsuji-Trost-Katalysatoren zu sein.<sup>[10]</sup> Wir untersuchten diese Komplexe in einer Desallylierungsreaktion mit *N*-(Allyloxycarbonyl)aminocumarin **1** in Wasser, an Luft und in Gegenwart von Glutathion (GSH; 5 mM; Abbildung 1).<sup>[11]</sup> Der neue wasserlösliche, geschützte Fluorophor **1** ermöglichte uns, den Anteil an ungewollten organischen Cosolventien minimal zu halten und damit so nah wie möglich an biologisch relevanten Bedingungen zu bleiben. Um typische Konzen-



**Abbildung 1.** Katalytische Entschützung von **1** mit Organorutheniumkomplexen unter biologisch relevanten Bedingungen. Reaktionsbedingungen: **1** (1.0 Äquiv., 500 μM), Katalysator (0.05 Äquiv., 25 μM) und Glutathion (GSH; 10 Äquiv., 5 mM) in Wasser/DMSO (200:1) bei Raumtemperatur und in Gegenwart von Luft. Für **Ru1** wurde Thiophenol (PhSH; 5.0 Äquiv., 2.5 mM) zum Reaktionsgemisch hinzugefügt. Die Umsätze wurden über die Fluoreszenzintensität bestimmt ( $\lambda_{\text{ex}} = 395$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm). Die Mittelwerte von je drei unabhängigen Messungen sind angegeben.

trationen in zellulären Analysen nachzuahmen, wählten wir des Weiteren eine Substratkonzentration von 500 μM, die um einige Größenordnungen kleiner ist als bei regulären Synthesereaktionen.<sup>[12]</sup> Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt und zeigen, dass unter diesen besonders schwierigen Reaktionsbedingungen praktisch keine katalytische Aktivität für die allgemeingebrauchlichen Acetonitrilkomplexe [Cp*Ru*(MeCN)<sub>3</sub>]PF<sub>6</sub> (Cp = η<sup>5</sup>-Cyclopentadienyl) und [Cp\**Ru*(MeCN)<sub>3</sub>]PF<sub>6</sub> und nur eine niedrige Aktivität für den 2,2'-Bipyridin(bpy)-Komplex [Cp\**Ru*(bpy)(MeCN)]PF<sub>6</sub> gefunden wurde. Der von uns bereits veröffentlichte Katalysator **Ru1** präsentierte in Kombination mit einem Überschuss an Thiophenol zwar eine signifikante Anfangsaktivität, wurde jedoch relativ schnell (in weniger als 30 min) desaktiviert. Zu unserer Überraschung erreichte allerdings der Komplex [Cp*Ru*(QA)(η<sup>3</sup>-allyl)]PF<sub>6</sub> (**Ru2**; QA = 2-Chinolincarboxylat) mit einer Katalysatorbeladung von lediglich 5 Mol-% einen vollständigen Umsatz innerhalb von 3 h und kombinierte damit die hohe Reaktivität unseres früheren Katalysators mit einer lang anhaltenden Aktivität.

Der Chinolinkomplex **Ru2** wurde zuerst von Kitamura et al. beschrieben und wird gewöhnlich in (Des-)Allylierungsreaktionen mit verschiedenen Nukleophilen eingesetzt.<sup>[13]</sup> Um die Struktur-Aktivitäts-Beziehung von **Ru2** zu analysieren, untersuchten wir die drei homologen Cp\*- und 2-Pyridincarboxylatderivate, die bereits als Katalysatoren für S-Allylierungen beschrieben wurden.<sup>[14]</sup> Es zeigte sich, dass diese Katalysatoren – ([Cp*Ru*(PA)(η<sup>3</sup>-allyl)]PF<sub>6</sub> (PA = 2-Pyridincarboxylat), [Cp\**Ru*(QA)(η<sup>3</sup>-allyl)]PF<sub>6</sub> und [Cp\**Ru*(PA)(η<sup>3</sup>-allyl)]PF<sub>6</sub>) – zwar die meisten Komplexe übertrafen, die wir bereits in unserem Labor untersuchten, aber nicht die hohe katalytische Aktivität von **Ru2** erreichten (Tabelle 1). Wir glauben, dass die reduzierte Aktivität der Cp\*-Derivate durch die sterische Hinderung der fünf Methylgruppen verursacht wird<sup>[15]</sup> und die schnelle Desaktivierung der Pyridinkomplexe eine Konsequenz der elektronischen Eigenschaften des zweizähligen Liganden ist – besonders seiner π-Bindungseigenschaften.<sup>[16]</sup> Wir nahmen deshalb an, dass sogar eine noch größere katalytische Aktivität für die Chinolinkomplexe erreicht werden könnte, sobald die π-Rückbindung des zweizähligen Liganden reduziert wird. Und tatsächlich, als wir π-elektronenschiebende Gruppen wie

**Tabelle 1:** Katalytische Entschützung von **1** mit **Ru2**-homologen Organorutheniumkomplexen unter biologisch relevanten Bedingungen.<sup>[a]</sup>

Nr.	Komplex	Kat. [Äquiv]	Umsatz [%] <sup>[b]</sup>		
			1 h	4 h	24 h
1	<b>Ru2</b> [Cp <i>Ru</i> (QA)(allyl)]PF <sub>6</sub>	0.05	74	> 99	> 99
2	[Cp <i>Ru</i> (PA)(allyl)]PF <sub>6</sub>	0.05	43	80	85
3	[Cp* <i>Ru</i> (QA)(allyl)]PF <sub>6</sub>	0.05	10	38	84
4	[Cp* <i>Ru</i> (PA)(allyl)]PF <sub>6</sub>	0.05	3	10	52
5	<b>Ru2</b> [Cp <i>Ru</i> (QA)(allyl)]PF <sub>6</sub>	0.01	16	47	65
6	<b>Ru3</b> [Cp <i>Ru</i> (QA-OMe)(allyl)]PF <sub>6</sub>	0.01	32	79	93
7	<b>Ru4</b> [Cp <i>Ru</i> (QA-NMe <sub>2</sub> )(allyl)]PF <sub>6</sub>	0.01	29	91	> 99

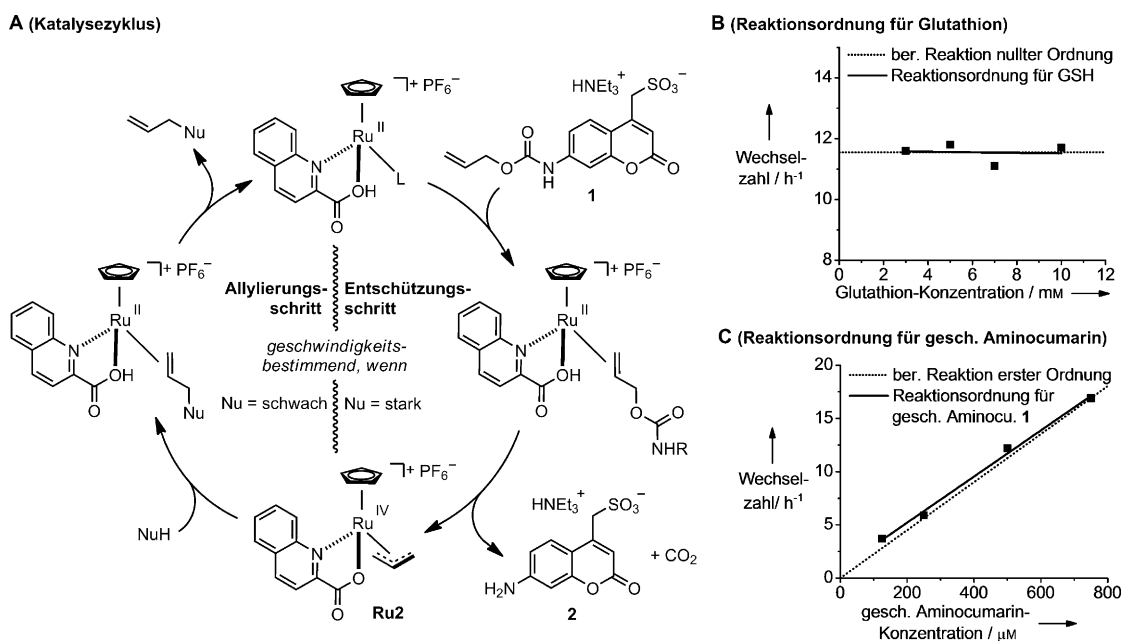
[a] Reaktionsbedingungen: siehe Abbildung 1. [b] Die Umsätze wurden über die Fluoreszenzintensität bestimmt ( $\lambda_{\text{ex}} = 395$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm). Die Mittelwerte von je drei unabhängigen Messungen sind angegeben. QA-OMe = 4-Methoxy-2-chinolincarboxylat, QA-NMe<sub>2</sub> = 4-(*N,N*-Dimethylamino)-2-chinolincarboxylat.

Methoxy (**Ru3**) oder Dimethylamino (**Ru4**) als Reste am Chinolinliganden einführen, konnten wir einen signifikanten Anstieg in der Aktivität beobachten, was sich in der erreichten katalytischen Produktivität (TON: 90 (**Ru2**), 150 (**Ru3**) und 270 (**Ru4**)) widerspiegelte (siehe Hintergrundinformationen für mehr Details). Selbst mit nur 1 Mol-% Katalysatorbeladung konnte der Dimethylaminokatalysator **Ru4** eine vollständige Aktivierung des geschützten Fluorophors **1** innerhalb von 4 h unter biologisch relevanten Bedingungen erreichen (Tabelle 1).

Interessanterweise haben Kitamura et al. einen gegenläufigen Reaktivitätstrend für analoge Chinolinkomplexe bei Allylierungen mit Alkoholen und Desallylierungen mit Allylethern gefunden.<sup>[16]</sup> Sie beobachteten, dass eine reduzierte  $\pi$ -Rückbindungsfähigkeit des zweizähligen Liganden in einer abgeschwächten katalytischen Aktivität resultierte und schlussfolgerten daraus, dass dieser Effekt der niedrigeren Elektrophilie des  $\eta^3$ -Allylliganden zugeschrieben werden kann. Dies bedeutet, dass in Gegenwart von schwachen Nukleophilen wie Alkoholen der Allylierungsschritt geschwindigkeitsbestimmend ist. Allerdings lassen unsere eigenen mechanistischen Untersuchungen für **Ru2** darauf schließen, dass sich bei einem Überschuss an starken Thionukleophilen (z.B. Glutathion) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt von der Allylierung hin zur Entschützung verschiebt (Abbildung 2). Weitere Untersuchungen ergaben zudem, dass unter biologisch relevanten Bedingungen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht von der Glutathionkonzentration

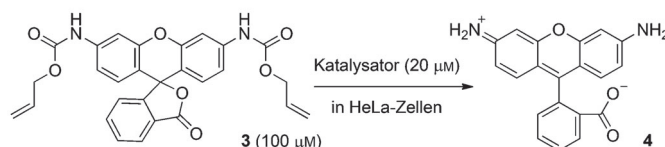
beeinflusst wird (Reaktion nullter Ordnung). Diese Befunde lassen uns vermuten, dass die millimolaren Thiolkonzentrationen in lebenden Zellen die katalytische Aktivität der Rutheniumkatalysatoren nicht reduzieren, sondern vielmehr einen schnellen Reaktionsfortschritt erst ermöglichen, da die Allylierung die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr limitiert.

Die hohe katalytische Aktivität der Chinolinkomplexe **Ru2–Ru4** ermutigte uns, die neuen Katalysator/Substratpaare unter zellulären Bedingungen zu evaluieren (Abbildung 3). Dazu wurden HeLa-Zellen auf Objektträgern kultiviert und mit Bis[N-(Allyloxycarbonyl)]rhodamin 110 (**3**; 100  $\mu\text{M}$ ) 30 min lang inkubiert. Nachdem extrazellulärer, geschützter Fluorophor durch zweimaliges Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) entfernt worden war, konnte frisches Medium mit Katalysator (20  $\mu\text{M}$ ) hinzugegeben werden. Nach anschließender Aufnahme des Katalysators sollte nun ausschließlich im Zellinneren – dort, wo die aktivierbare Sonde vorliegt – die Fluoreszenzintensität ansteigen. Und tatsächlich, als die Fluoreszenzänderung der lebenden Zellen mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie beobachtet wurde, zeigte sich im Zytoplasma ein bemerkenswerter Anstieg der grünen Fluoreszenz (**Ru2**=70-fach, **Ru3**=90-fach und **Ru4**=130-fach) im Verlauf von 10 min. Durch Kontrollexperimente bestätigten wir, dass sich in Abwesenheit des Katalysators keine Fluoreszenz entwickelt und nur eine mäßige Fluoreszenz (8-fach) auftritt, wenn der deutlich ineffizientere Komplex **Ru1** in Kombination mit

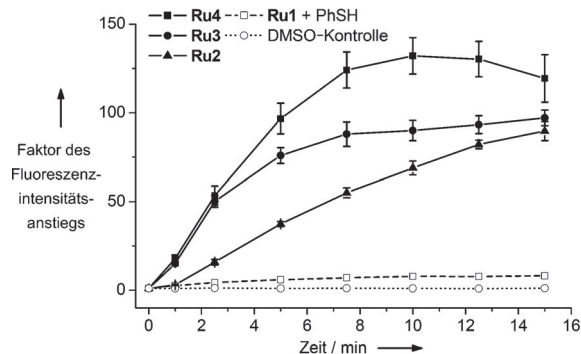


**Abbildung 2.** A) Katalysezyklus für die Entschützung von **1** mit **Ru2** unter biologisch relevanten Bedingungen. Nu = Nukleophil (z. B. Glutathion), L = unbestimmter Ligand (z. B. Wasser). B) Reaktionsordnung bezüglich Glutathion in der Entschütungsreaktion von **1**. Reaktionsbedingungen: **1** (1.0 Äquiv., 500  $\mu\text{M}$ ), **Ru2** ( $10^{-3}$  Äquiv., 0.5  $\mu\text{M}$ ) und Glutathion (6–20 Äquiv., 3–10 mm) in Wasser/DMSO (200:1) bei Raumtemperatur und in der Gegenwart von Luft. Die Wechselzahlen wurden nach 30 min über die Fluoreszenzintensität bestimmt ( $\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ ). Die Mittelwerte von je drei unabhängigen Messungen, die lineare Regressionsgerade und die berechnete Gerade für eine Reaktion nullter Ordnung sind angegeben. C) Reaktionsordnung bezüglich **1** in der Entschütungsreaktion von **1**. Reaktionsbedingungen: **1** (125–750  $\mu\text{M}$ ), **Ru2** (0.5  $\mu\text{M}$ ) und Glutathion (5 mm) in Wasser/DMSO (200:1) bei Raumtemperatur und in der Gegenwart von Luft. Die Wechselzahlen wurden nach 30 min über die Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Mittelwerte von je drei unabhängigen Messungen, die lineare Regressionsgerade und die berechnete Gerade für eine Reaktion erster Ordnung sind angegeben.

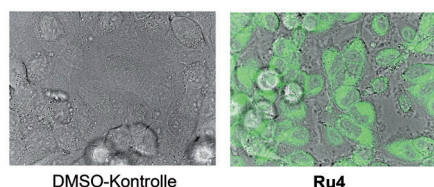
A (Katalytische Entschützung in HeLa-Zellen)



B (Fluoreszenz des entschützten Rhodamins im Zytoplasma)



C (Konfokale Mikroskopie)



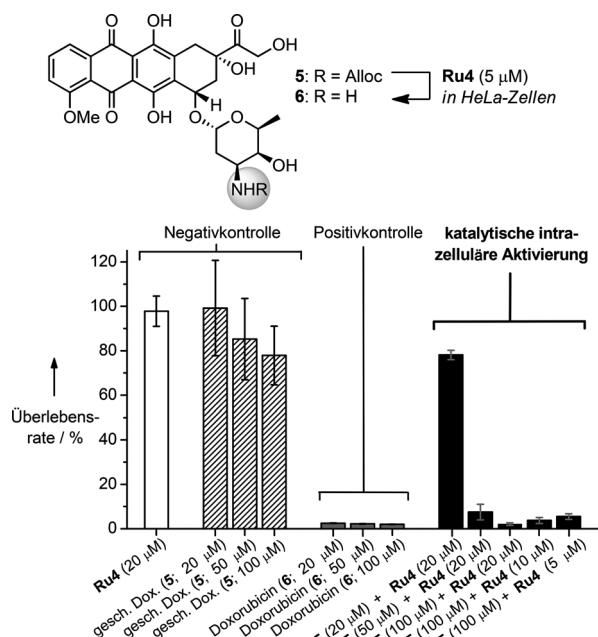
**Abbildung 3.** A) Katalytische Entschützung von **3** mit Organorutheniumkomplexen in HeLa-Zellen. B) Zeitlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität im zellulären Zytoplasma, gemessen mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500\text{--}555 \text{ nm}$ ). Reaktionsbedingungen: HeLa-Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert (35 mm/12 mm/180  $\mu\text{m}$ ; 350 000 Zellen/Objektträger), mit **3** (100  $\mu\text{M}$ ) 30 min lang inkubiert, mit PBS-Puffer gewaschen und in frischem Medium mit Katalysator (20  $\mu\text{M}$ ) bei 37°C inkubiert. Für **Ru1** wurde zusätzlich Thiophenol (250  $\mu\text{M}$ ) hinzugegeben, und für die Kontrollreaktion wurde 1 % DMSO anstelle des Katalysators verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten sind als Mittelwert von je acht Zellen angegeben. C) Überlagerte Hellfeld- und Fluoreszenzbilder nach 10 min Inkubation mit 1 % DMSO (Kontrollreaktion) oder 20  $\mu\text{M}$  **Ru4**.

giftigem Thiophenol verwendet wird. Diese Experimente zeigen, dass die Chinolinkomplexe **Ru2–Ru4** in der Lage sind, die Zellmembran leicht zu passieren und zudem *O*-Allylcarbamate effizient in lebenden Zellen zu entschützen. Erwähnenswert ist auch, dass der gemessene Reaktivitätstrend in Säugetierzellen der gleichen Reihenfolge entspricht wie unter biologisch relevanten Bedingungen (**Ru2** < **Ru3** < **Ru4**; Tabelle 1).

Um das Potenzial von bioorthogonalen Organometallkatalysator/Substrat-Paaren für zukünftige Anwendungen zu demonstrieren, entschieden wir uns dafür, unser effizientes **Ru4**/Allylcarbamate-System abschließend auf ein Problem der Krebstherapie anzuwenden. Um das umliegende gesunde Gewebe während der Behandlung nicht zu schädigen, ist in der modernen Krebstherapie die räumliche sowie zeitliche Aktivierung von Propharmaka in malignem Gewebe ein wichtiges Ziel.<sup>[17]</sup> Wir glauben, dass die katalytische Aktivierung von Chemotherapeutika in Tumoren möglich ist und

möglicherweise einen alternativen Weg für zukünftige Behandlungen bietet. Das erste Beispiel in diesem neuen Feld der medizinischen Chemie wurde kürzlich von Bradley, Unciti-Broceta et al. vorgestellt.<sup>[5e]</sup> Sie zeigten, dass katalytisch aktive, Palladium-funktionalisierte Polystyrolmikrokugeln in der Lage sind, Propargyl-geschütztes 5-Fluoruracil im extrazellulären Raum zu aktivieren. Nach Aktivierung und anschließender zellulärer Aufnahme des potenten Chemotherapeutikums 5-Fluoruracil wurde nach fünf Tagen bei verschiedenen Zelllinien ein Verlust der Überlebensrate beobachtet. Wir nehmen an, dass die Aktivierung eines Propharmakons im zellulären Zytoplasma einen stärkeren therapeutischen Effekt sowie weniger Nebenwirkungen als die extrazelluläre Katalyse aufweisen könnte. Aus diesem Grund und da bekannt ist, dass Anthracycline bei niedrigen Konzentrationen die Apoptose schnell einleiten können, entwickelten wir eine intrazelluläre Aktivierungsstrategie mit dem häufig verwendeten Chemotherapeutikum Doxorubicin.<sup>[18]</sup> Der zytotoxische Effekt von Doxorubicin kann hauptsächlich auf die DNA-Bindung und anschließende Strangbrüche zurückgeführt werden.<sup>[19]</sup> Zur Blockierung der Toxizität von Doxorubicin setzten wir dessen DNA-Affinität herab, indem wir die positive Ladung am primären Amin mit der bioorthogonalen Allylcarbamate-Schutzgruppe maskierten. Das entsprechende Propharmakon *N*-(Allyloxycarbonyl)doxorubicin (**5**) zeigte wie angenommen keine Toxizität, während der freie Wirkstoff Doxorubicin (**6**) innerhalb weniger Stunden nach Inkubationsbeginn die Apoptose einleitete (Abbildung 4). Solange die HeLa-Zellen mit nur 20  $\mu\text{M}$  der Wirkstoffvorstufe **5** inkubiert, mit PBS-Puffer gewaschen und in frischem Medium mit **Ru4** (20  $\mu\text{M}$ ) versetzt wurden, konnte nach 24 h bloß ein kleiner Abfall in der zellulären Überlebensrate beobachtet werden. Wenn allerdings die Konzentration des ungiftigen Propharmakons auf 50 und 100  $\mu\text{M}$  erhöht wurde, konnte eine effiziente und konzentrationsabhängige Reduzierung der Zellvitalität [(7.5  $\pm$  3.5)% bzw. (2.1  $\pm$  0.6)%] gemessen werden. Da der Katalysator und die Wirkstoffvorstufe **5** keine Toxizität bei diesen Konzentrationen aufweisen, schlussfolgern wir, dass diese drastische Änderung der Überlebensrate auf die effiziente Aktivierung des Propharmakons **5** im Zytoplasma zurückzuführen ist (siehe Hintergrundinformationen für die Aktivierung von **5** unter biologisch relevanten Bedingungen). Bei höheren Konzentrationen des geschützten Doxorubicins **5** (100  $\mu\text{M}$ ) konnten selbst deutlich geringere Katalysatorbeladungen von 10 und 5  $\mu\text{M}$  **Ru4** verwendet werden, um auf eine effiziente Weise die zelluläre Apoptose einzuleiten, sodass Überlebensraten von (3.7  $\pm$  1.3) und (5.5  $\pm$  1.3)% beobachtet wurden. In einem Kontrollexperiment versuchten wir das geschützte Doxorubicin **5** (50  $\mu\text{M}$ ) mit dem weniger aktiven Katalysator **Ru1** (20  $\mu\text{M}$ ) zu aktivieren. Wie erwartet konnten wir allerdings wegen der geringeren katalytischen Effizienz von **Ru1** keine Änderung in der Überlebensrate feststellen (siehe Hintergrundinformationen). Wegen seiner intrinsischen Toxizität konnte diesmal, im Unterschied zu den weiter oben vorgestellten Kinetikmessungen, das Thiophenoladditiv nicht eingesetzt werden, um die katalytische Aktivität des Katalysators **Ru1** zu erhöhen. Die beschriebenen Zellexperimente zeigen eindeutig, dass eine hohe katalytische Aktivität wie





**Abbildung 4.** Katalytische Entschützung von **5** (Alloc = Allyloxycarbonyl) mit **Ru4** in HeLa-Zellen. Reaktionsbedingungen: HeLa-Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen kultiviert (9000 Zellen/Vertiefung); farblos Balken: Negativkontrolle; Zellen wurden 3 h mit 1 % DMSO inkubiert, mit PBS-Puffer gewaschen und 24 h in frischem Medium mit **Ru4** (20 μM) inkubiert; schraffierte Balken: Negativkontrolle; Zellen wurden 3 h mit **5** (20–100 μM) inkubiert, mit PBS-Puffer gewaschen und 24 h in frischem Medium mit 1 % DMSO inkubiert; graue Balken: Positivkontrolle; Zellen wurden 3 h mit **6** (20–100 μM) inkubiert, mit PBS-Puffer gewaschen und 24 h in frischem Medium mit 1 % DMSO inkubiert; schwarze Balken: katalytische intrazelluläre Aktivierung; Zellen wurden 3 h mit **5** (20–100 μM) inkubiert, mit PBS-Puffer gewaschen und 24 h in frischem Medium mit **Ru4** (5–20 μM) inkubiert. Überlebensraten wurde über die MTT-Methode ermittelt. Die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten (je 9 Vertiefungen) sind angegeben. gesch. Dox.: geschütztes Doxorubicin.

auch Stabilität für die metallorganische Wirkstoffaktivierung in zukünftigen medizinischen Anwendungen von Vorteil sein wird.

Zusammenfassend haben wir neue bioorthogonale metallorganische Komplexe für die Entschützung von Allyloxycarbonyl-geschützten Aminen vorgestellt. Die beschriebenen Katalysatoren weisen unter biologisch relevanten Bedingungen eine unerreichte hohe katalytische Produktivität von bis zu 270 Zyklen sowie eine effiziente Aktivität in Säugtierzellen auf. Wir zeigten, dass die Ligandenarchitektur die Stabilität und Reaktivität des Katalysators stark beeinflusst, sowohl unter biologisch relevanten Bedingungen als auch im zellulären Zytoplasma. Wir konnten des Weiteren demonstrieren, dass die stringenten Voraussetzungen einer biologischen Umgebung, wie millimolare Thiolkonzentrationen, nicht natürlicherweise von Nachteil für einen Katalysator sein müssen, sondern sogar hilfreich für einen schnellen Reaktionsfortschritt sein können. Zudem führten wir eine katalytische Aktivierung einer Doxorubicinvorstufe im zellulären Zytoplasma durch, woraufhin wir die Vitalität der HeLa-Zellen in einem effizienten An/Aus-Modus von gesund nach apoptotisch ändern konnten. Auch wenn diese Anwendung

nur ein erstes Beispiel darstellt und noch lange nicht voll für die Krebstherapie entwickelt ist, erwarten wir dennoch bedeutende Ergebnisse von zukünftigen bioorthogonalen Organometallkatalysator/Substrat-Paaren mit signifikantem Wert für die chemische Biologie und medizinische Chemie. Hervorzuheben ist für die vorgestellten Katalysatoren, dass sie sowohl passiv in Zellen diffundieren können als auch mit anderen biomedizinischen Techniken wie der zielgerichteten Wirkstoffabgabe<sup>[20]</sup> kombiniert werden können, um schlussendlich ein Modulsystem zu ergeben, das spezifisch für bestimmtes Gewebe oder zytoplasmatische Strukturen ist.

Eingegangen am 22. April 2014  
Online veröffentlicht am 19. August 2014

**Stichwörter:** Bioorthogonalität · Entschützung · Homogene Katalyse · Propharmaka

- a) E. Sletten, C. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998; b) M. Grammel, H. Hang, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 475–484; c) P. Thirumurugan, D. Matosiuk, K. Jazwiak, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905–4979; d) Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11007–11022; e) D. Patterson, L. Nazarova, J. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592–605.
- Übersichtsartikel zu Metallkomplekxkatalyse in biologischen Systemen: a) L. Vigh, F. Joó in *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds*, Vol. 3 (Hrsg.: B. Cornils, W. A. Herrmann), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, S. 1283–1289; b) É. Csajbók, F. Joó in *Organometallic Chirality*, Vol. 20 (Hrsg.: G. Pályi, C. Zucchi, L. Caglioti), Muchi Editore, Modena, **2008**, S. 69–86; c) P. Sasmal, C. Streu, E. Meggers, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1581–1587.
- Übersichtsartikel zu Palladium-geführten Kreuzkupplungen in lebenden Systemen: J. Li, P. Chen, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1728–1731.
- a) C. Streu, E. Meggers, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5773–5776; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5645–5648; b) P. Sasmal, S. Carregal-Romero, A. Han, C. Streu, Z. Lin, K. Namikawa, S. Elliott, R. Klöster, W. Parak, E. Meggers, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1116–1120; c) P. Sasmal, S. Carregal-Romero, W. Parak, E. Meggers, *Organometallics* **2012**, *31*, 5968–5970.
- a) R. Yusop, A. Unciti-Broceta, E. Johansson, R. Sánchez-Martín, M. Bradley, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 239–243; b) C. Spicer, T. Triemer, B. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 800–803; c) N. Li, R. Lim, S. Edwardraja, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15316–15319; d) J. Li, S. Lin, J. Wang, S. Jia, M. Yang, Z. Hoa, X. Zhang, P. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7330–7338; e) J. Weiss, J. Dawson, K. Macleod, W. Rybsko, C. Fraser, C. Torres-Sánchez, E. Patton, M. Bradley, N. Carragher, A. Unciti-Broceta, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3277; f) J. Li, J. Yu, J. Zhao, J. Wang, S. Zheng, S. Lin, L. Chen, M. Yang, S. Jia, X. Zhang, P. Chen, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 352–361; g) M. Yang, J. Li, P. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, DOI: 10.1039/c4cs00117f.
- Siehe auch: a) K. Tishinov, K. Schmidt, D. Häusinger, D. G. Gillingham, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12166–12170; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12000–12004; b) Z. Chen, F. Vohidov, J. M. Coughlin, L. J. Stagg, S. T. Arold, J. E. Ladbury, Z. T. Ball, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10138–10145; c) K. K. Sadhu, T. Eierhoff, W. Römer, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20013–20016.
- G. Zlokarnik, P. Negulescu, T. Knapp, L. Mere, N. Burres, L. Feng, M. Whitney, K. Roemer, R. Tsien, *Science* **1998**, *279*, 84–88.
- S. K. Silverman, *Wiley Encycl. Chem. Biol.* **2009**, *3*, 450–466.

- [9] Anwendungen dieses Katalysator/Substrat-Systems: a) H.-W. Ai, J. Lee, P. G. Schultz, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5506–5508; b) M. Sánchez, C. Penas, M. Vázquez, J. Mascareñas, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 1901–1907.
- [10] a) C. Bruneau, M. Achard, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256, 525–536; b) B. Sundararaju, M. Achard, C. Bruneau, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 4467–4483.
- [11] Glutathion ist praktisch in allen Säugetierzellen in millimolaren Konzentrationen vorhanden: a) A. Meister, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 17205–17208; b) N. Kaplowitz, T. Aw, M. Ookhtens, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1985**, 25, 715–744.
- [12] Es gilt zu beachten, dass die Substratkonzentration die Reaktionskinetik, den Reaktionspfad und die Katalysatordesaktivierung stark beeinflusst.
- [13] H. Saburi, S. Tanaka, M. Kitamura, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 1758–1760; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1730–1732.
- [14] S. Tanaka, P. Pradhan, Y. Maegawa, M. Kitamura, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 3996–3998.
- [15] Kristallstruktur: H.-J. Zhang, B. Demerseman, L. Toupet, Z. Xi, C. Bruneau, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 1601–1609.
- [16] S. Tanaka, H. Saburi, T. Hirakawa, T. Seki, M. Kitamura, *Chem. Lett.* **2009**, 38, 188–189.
- [17] a) L. F. Tietze, K. Schmuck, *Curr. Pharm. Des.* **2011**, 17, 3527–3547; b) N. Graf, S. J. Lippard, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, 64, 993–1004; c) J. B. Zawilska, J. Wojcieszak, A. B. Olejniczak, *Pharmacol. Rep.* **2013**, 65, 1–14.
- [18] B. Pang, X. Qiao, L. Janssen, A. Velds, T. Groothuis, R. Kerkhoven, M. Nieuwland, H. Ovaa, S. Rottenberg, O. van Telling, J. Janssen, P. Huijgens, W. Zwart, J. Neefjes, *Nat. Commun.* **2013**, 4, 1908.
- [19] J. L. Nitiss, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 338–350.
- [20] Übersichtsartikel über Nanomedizin und Wirkstoffabgabe: a) S. Parveen, R. Misra, S. Sahoo, *Nanomedicine: NBM* **2012**, 8, 147–166; b) A. Wang, R. Langer, O. Farokhzad, *Annu. Rev. Med.* **2012**, 63, 185–198; c) Y. Bae, K. Park, *J. Controlled Release* **2011**, 153, 198–205; d) J. Rosenholm, C. Sahlgren, M. Lindén, *Nanoscale* **2010**, 2, 1870–1883.