

# Markierung von Biomolekülen für medizinische Anwendungen – Sternstunden der Bio-Organometallchemie\*\*

Nils Metzler-Nolte\*

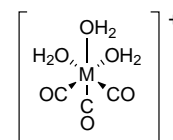
Durch die Modifizierung von Proteinen mit Übergangsmetallverbindungen wurden grundlegende Erkenntnisse über Struktur und Funktion von Biomolekülen gewonnen, die nicht zuletzt auch Auswirkungen auf die medizinische Forschung haben. In der weit überwiegenden Zahl der Untersuchungen wurden Koordinationsverbindungen mit „harten“ Donoratomen wie O, N und S aus Carboxylaten, Alkoholaten, Amiden, Aminen und Sulfiden eingesetzt. Andere Eigenschaften und somit eine veränderte Reaktivität gegenüber Biomolekülen können von Organometallverbindungen erwartet werden. Diese werden typischerweise durch  $\pi$ -rückbindende Liganden wie CO, Phosphane oder aromatische  $\pi$ -Systeme wie  $\eta^6$ -gebundene Arene oder  $\eta^5$ -Cyclopentadien (Cp) stabilisiert und können durchaus stabil in aeroben, wässrigen Medien sein – vorausgesetzt, geeignete Übergangsmetalle und Liganden werden eingesetzt. Darüber hinaus können gerade die besonderen chemischen und spektroskopischen Eigenschaften von Organometallverbindungen gewinnbringend für die selektive Reaktion mit Biomolekülen sowie die direkte Detektion dieser Biokonjugate eingesetzt werden. Mehrere Arbeitsgruppen berichteten in der letzten Zeit über beachtliche Fortschritte in diesem schnell wachsenden, interdisziplinären Forschungsgebiet.

$^{99m}\text{Tc}$  ( $t_{1/2} = 6\text{ h}$ ) ist ein metastabiles Isotop des langlebigen  $^{99}\text{Tc}$ -Isotops ( $t_{1/2} = 2.13 \times 10^5\text{ a}$ ). In Radiopharmazeutika ist es das am häufigsten verwendete Isotop.<sup>[1–5]</sup> Dies verdankt es seinen ausgezeichneten physikalischen Eigenschaften: Eine Halbwertszeit von 6 h ist lang genug für chemische Synthesen und um nach Injektion in den Patienten aussagekräftige Bilder zu erhalten. Andererseits ist sie so kurz, dass relativ große Mengen von  $^{99m}\text{Tc}$  gegeben werden können, ohne den Patienten einer zu hohen Dosis an Radioaktivität auszusetzen. Durch die Photonenenergie von 140 keV werden ausgezeichnete Bilder erhalten; das  $^{99m}\text{Tc}$ -Isotop wird zudem leicht aus kommerziell erhältlichen  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$ -Generatoren gewonnen. Das besser lösliche  $\text{TcO}_4^-$  wird aus an Aluminiumoxid adsorbiertem  $^{99}\text{Mo}$ -Molybdat eluiert. Je nach Alter und Häufigkeit der Verwendung des  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$ -Generators enthält das Eluat zwischen 20 und 85 %  $^{99m}\text{Tc}$  in  $\mu\text{M}$ -Konzentrationen, verunreinigt lediglich mit dem langlebigen  $^{99}\text{Tc}$ -Isotop als Nebenprodukt. Aus den radiophysikalischen Eigen-

schaften lässt sich leicht ableiten, dass  $^{99m}\text{Tc}$ -Radiopharmazeutika jeweils frisch hergestellt und sofort verwendet werden müssen. Idealerweise sollte die Herstellung in Form eines „Kits“, welches auch von technischem Personal in Krankenhäusern einfach, schnell, gefahrlos und ohne aufwendige Reinigung benutzt werden kann, möglich sein. Roe und Mitarbeiter stellten kürzlich eine neue Festphasen-Synthesemethode vor, mit der ohne nachfolgende Reinigung eine hohe Ligand-Beladung mit  $^{99m}\text{Tc}$  erreicht werden kann.<sup>[6]</sup> In geradezu idealer Weise erfüllt auch ein neuer Typ von Tc-Organometallverbindungen diese Anforderungen. Die Verbindung wird schnell und in quantitativer Ausbeute gebildet, indem das Generator-Eluat einfach in ein Gefäß gegeben wird, welches bereits alle Reagentien in einer CO-Atmosphäre enthält.

Schubiger, Alberto und Mitarbeiter berichteten über die Synthese und Anwendungen des bemerkenswerten Komplexes  $\text{fac}[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  **1**.<sup>[7]</sup> Dieser einfache Komplex weist neben einer „unteren“ organometallischen Hälfte mit drei Carbonylliganden eine „obere“ koordinationschemische Hälfte mit drei Wassermolekülen als typische Liganden vom Werner-Typ auf. Ebenso wie die analoge Re-Verbindung  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  **2** ist **1** in wässriger Lösung über Tage stabil. Nach der Eluierung des Radioisotopes  $^{99m}\text{Tc}$  aus einem  $^{99}\text{Mo}$ -Reaktor (siehe oben) wird eine Salzlösung (0.9 % NaCl in  $\text{H}_2\text{O}$ ) von  $[\text{O}^{99m}\text{TcO}_4]^-$  mit typischen Tc-Konzentrationen um  $1\text{ }\mu\text{M}$  erhalten. Bei der von Schubigers Arbeitsgruppe patentierten Herstellung wird diese Salzlösung direkt mit einem Überschuss von  $\text{NaBH}_4$  unter 1 atm CO zur Reaktion gebracht und **1** in weniger als 20 min quantitativ erhalten. Der Erfolg dieser Reaktion ist bemerkenswert, weil in Abwesenheit von CO, welches nur schlecht in Wasser löslich ist (ca.  $1\text{ mM}$  bei  $25^\circ\text{C}$ ), nur wenig  $\text{TcO}_2$  entsteht. Angesichts der geringen  $[\text{O}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ -Konzentration erscheint eine trimolekulare Reaktion höchst unwahrscheinlich. Andere Reduktionsmittel wie  $\text{SnCl}_2$  und  $[\text{S}_2\text{O}_4]^{2-}$  liefern weder **1** noch **2**, und es ist daher wahrscheinlich, dass ein Intermediat aus  $\text{BH}_4^-$  und CO gebildet wird, welches als Reduktionsmittel wirkt und darüber hinaus mögliche Metallcarbonyl-Intermediate stabilisiert, z. B. das bekannte Addukt  $\text{H}_3\text{B} \cdot \text{CO}$ .

Wasser- und CO-Ligandenaustauschreaktionen in **1** wurden kürzlich untersucht.<sup>[8]</sup> Der Ligandenaustausch von  $^{12}\text{CO}$  gegen  $^{13}\text{CO}$  ist relativ langsam und konnte mit  $^{99}\text{Tc}$ -NMR-Spektroskopie verfolgt werden. Aufgrund der Kopplung mit bis zu drei  $^{13}\text{C}$ -Kernen wird nacheinander ein Dublett, ein Triplett und schließlich ein Quartett beobachtet, der Isotopenshift beträgt  $\Delta\delta = 1.05$  pro Kohlenstoff-Masseneinheit. Wird **1** zwei Wochen unter CO-Druck aufbewahrt, sind alle Wasserliganden gegen CO ausgetauscht, und der homoleptische Komplex  $[\text{Tc}(\text{CO})_6]^+$  wird im Gleichgewicht mit teil-



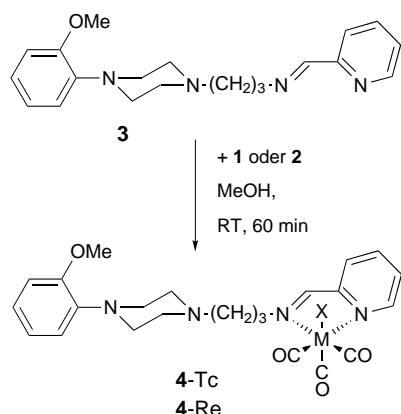
1: M = Tc  
2: M = Re

[\*] Prof. N. Metzler-Nolte  
Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 364, 69120 Heidelberg (Deutschland)  
Fax: (+49) 6221-54-6430  
E-mail: Nils.Metzler-Nolte@urz.uni-heidelberg.de

[\*\*] Der Autor dankt A. P. Schubiger und D. Grotjahn für Sonderdrucke sowie K. Severin für hilfreiche Diskussionen. Die Daten in Abbildung 1 wurden mit Erlaubnis und Hilfe von M. Salmann und G. Jaouen verwendet. Ich danke Dres. H. und H. Weiss für ihre Gastfreundschaft; während des Aufenthaltes bei Ihnen entstand ein Großteil dieses Beitrages.

weise carbonylierten Verbindungen erhalten.  $[\text{Tc}(\text{CO})_6]^+$  wurde bereits 1965 von Hieber und Mitarbeitern erhalten, jedoch nur durch Elementaranalyse charakterisiert.<sup>[9]</sup> Merbach und Mitarbeiter erhielten infolge der hohen Symmetrie des Kations hochaufgelöste NMR-Spektren und bestimmten  $\delta(^{99}\text{Tc}) = -1961$ ,  $\delta(^{13}\text{C}) = 190.2$  und  $^1J(\text{Tc}, \text{C}) = 261$  Hz für  $[\text{Tc}(\text{CO})_6]^+$ . Wie **1** sehr wirkungsvoll zur Markierung von Biomolekülen eingesetzt werden kann, wurde in mehreren Arbeiten gezeigt.<sup>[10, 11]</sup>

Die große Herausforderung für eine neue Generation von Radiopharmazeutika ist das Targeting spezifischer Rezeptoren. Erwartungsgemäß werden die drei Wasserliganden von **1** leicht durch andere Donoren, z. B. Amine, ersetzt. Besonders stabile Komplexe werden mit aromatischen Aminen wie Histidin (His) erhalten, so entsteht der pharmakologisch interessante Komplex **4-Tc** durch Reaktion von **1** mit der Schiff-Base des Arylpiperazins **3** (Schema 1).<sup>[10]</sup> Arylpiperazine sind die am besten untersuchten Liganden für die



Schema 1. Markierung von **3** als Serotoninrezeptor-Ligand mit **1** oder **2**.

5-HT<sub>1A</sub>-Unterklasse der Serotoninrezeptoren im zentralen Nervensystem (ZNS). Im Unterschied zu den Fortschritten bei der Markierung anderer Peptide und Proteine mit Radiopharmazeutika sind nur wenige Beispiele für  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierte ZNS-Rezeptoren bekannt. Ohne nachfolgende Reinigung wurde für **4-Tc** eine Markierungsausbeute von 90–95 % erreicht, was einer spezifischen Aktivität von etwa 30 GBq  $\mu\text{mol}^{-1}$  entspricht. Diese Aktivität ist etwa eine Größenordnung höher als die, die mit bisher bekannten Tc-Komplexen mit einem 'N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>'-Ligandensatz erreicht werden konnte. Die Rezeptoraffinität und -selektivität von **4** wurden mit dem nichtradioaktiven Re-Analogon **4-Re** untersucht. Das Konjugat **4-Re** bindet mit hoher Affinität ( $5 \pm 2$  nM) an den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor. Auch die Selektivität von **4-Re** für den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor ist hoch, was die Bindungskonstanten  $>1$   $\mu\text{M}$  für die verwandten Rezeptoren 5-HT<sub>2A</sub>, Dopamin-D2, 5-HT-Transporter und D-Transporter zeigen. Schließlich ist auch die Stabilität des Biokonjugats unter physiologischen Bedingungen ausgezeichnet. Weder UV/Vis-Spektroskopie noch Dünnschichtchromatographie des „kalten“ **4-Re** zeigten nach 24 h Inkubierung mit Serum bei 37 °C Anzeichen von Zersetzung.

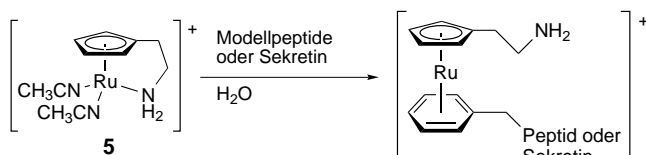
Teilstücke aus Einzelketten-Antikörpern (single chain antibody fragments, scFvs) stellen eine weitere attraktive Zielstruktur für Radiomarkierungs-Studien dar, da sie die Darstellung von Tumoren ermöglichen könnten. Sie werden leicht aus kombinatorischen Bibliotheken und durch Zellexpression, z. B. in *E. coli*, erhalten; sie sind im Körper stabiler gegenüber Inaktivierung und Abbau als die kompletten Antikörper und durchdringen die Zellmembranen leichter. Außerdem zeigen sie eine hohe Tumor-zu-Hintergrund-Verteilung. Bis vor kurzem war jedoch keine leistungsfähige Methode zur Markierung von scFvs mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  bekannt. Nach Expression in *E. coli* werden scFvs üblicherweise durch Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography, IMAC) gereinigt, wofür an den N-Terminus des Peptids eine His-Markierung, d. h. eine Folge von etwa sechs Histidinmolekülen, angebracht wird. Der His-Rest stellt einen chelatisierenden Liganden für **1** dar, und tatsächlich wurden verschiedene His-markierte scFv-Komplexe in guten Ausbeuten erhalten.<sup>[11]</sup> In einer optimierten Methode wurden Aktivitäten bis zu 3.3 GBq  $\text{mg}^{-1}$  (entsprechend etwa 90 % Markierungsausbeute) durch Mischen der Lösungen von **1** und dem scFv erhalten. Durch Vergleichsexperimente wurden Reinheit und Identität der Tc(CO)<sub>3</sub>-markierten scFvs bestimmt. Nach der Inkubation mit einem 100fachen Überschuss an freiem Histidin wurde der Verlust an Radioaktivität mit dem von nicht His-markiertem scFv verglichen und so die His-Markierung als Bindungsstelle des Metallkomplexes bestätigt.

Untersuchungen zur In-vivo-Stabilität wurden mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -markiertem Anti-Mucin scFv-M12 in der Maus durchgeführt. Eine Stunde nach Injektion zeigten Gelfiltrationsprofile von Mausserum 75 % der Aktivität bei dem intakten scFv, der Großteil der verbleibenden Aktivität wurde im Serumalbumin gefunden. Die markierten scFvs werden durch die Niere ausgeschieden, und es findet sich fast die gesamte im Urin nachweisbare Aktivität an den scFv gebunden. Schließlich wiesen Biodistribution und Tumorkolorisierung Tc(CO)<sub>3</sub>-markierter scFv-M12 und anti-HER2-scFv-4D5 keine Unterschiede zu den jeweiligen  $^{125}\text{I}$ -markierten scFvs auf.

Die besonderen Eigenschaften von **1** leiten sich aus der ungewöhnlichen Ligandenkombination ab. Die  $\sigma$ -gebundenen Wassermoleküle in **1** werden leicht durch andere Liganden ersetzt, wohingegen die Carbonylliganden, im Verbund mit weiteren Push-pull-Liganden wie in **4**, eine hohe kinetische Stabilität der gebildeten  $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -Komplexe garantieren. Aus der d<sup>6</sup>-Low-Spin-Elektronenkonfiguration resultiert eine hohe thermodynamische Stabilität der Tc<sup>I</sup>-Komplexe. Obwohl von Davison et al. bereits vor 15 Jahren in Tc-Isocyanidkomplexen zur Herz-Untersuchung erfolgreich eingeführt („Tc-Sestamibi“),<sup>[12]</sup> ist die formale Oxidationsstufe +1 in biologisch aktiven Tc-Verbindungen eher ungewöhnlich und allein mit Liganden vom Werner-Typ (typischerweise N, O oder S) schwierig zu stabilisieren.

Komplexe mit  $\eta$ -gebundenen  $\pi$ -Liganden, z. B.  $[(\eta\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Cr}(\text{CO})_3]$  oder  $[(\eta\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCp}]^+$ , stellen ebenfalls eine häufige Klasse von Organometallverbindungen dar. Die Stabilität der beiden Verbindungsklassen in wässriger Lösung ist bekannt, und  $[\text{CpRu}]^+$ -Benzolderivate sind wertvolle

Ausgangsverbindungen für die Synthese von Arylethern.<sup>[13]</sup> Ferner koordiniert das kationische  $[\text{CpRu}]^+$ -Fragment Aminosäureamide und -ester. Aus dieser Erkenntnis heraus entwickelten Beck und Mitarbeiter eine inzwischen patentierte Methode zur Übergangsmetall-katalysierten Peptidsynthese in Lösung.<sup>[14–16]</sup> Bei einer Reihe von Modellverbindungen beobachteten Grotjahn und Mitarbeiter einen interessanten Einfluss der Temperatur auf das Koordinationsverhalten des donorsubstituierten  $[\text{CpRu}]^+$ -Derivates **5** (Schema 2).<sup>[17, 18]</sup> Donorsubstituierte Cyclopentadienyl-Komplexe



Schema 2. Schematische Darstellung der Reaktion von **5** mit aromatischen Ringen in Aminosäuren und Peptiden.

der frühen Übergangsmetalle haben als Polymerisations-Katalysatoren einige Aufmerksamkeit erlangt („Constrained-Geometry“-Katalysatoren). Gibt man **5** bei Raumtemperatur zu Modellpeptiden wie Boc-Met-Phe-OMe oder Boc-Phe-His-OMe (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Met = Methionin, Phe = Phenylalanin), so entsteht eine Mischung verschiedener Spezies mit einer  $\sigma$ -Bindung zu den Thioethern oder Stickstoff-Donoren. Nach Erwärmen der Probe auf 60 °C für 6 h vereinfacht sich das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum erheblich, und es wird nur noch eine Verbindung beobachtet, die typische Signale für eine  $\pi$ -Koordination des  $[\text{CpRu}]^+$ -Fragmentes an den Phenylring aufweist (Schema 2).

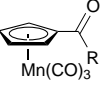
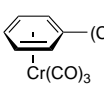
Diese Beobachtung nutzten die Autoren für die regio-selektive Markierung von Sekretin, einem aus 27 Aminosäuren bestehenden Peptid mit einer Molmasse von ca. 3 kDa. Sekretin ist ein gastrointestinales Peptidhormon mit einem einzigen Phenylalaninrest an Position 6. Daneben stellen ein N-terminaler Histidin-, vier Arginin-, zwei Glutamin- und ein Aspartat-Rest gut koordinierende Gruppen für Metallionen dar. Gibt man **5** in einem NMR-Röhrchen zu einer wässrigen Lösung von Sekretin, so erhält man nach 8 h bei Raumtemperatur ein gut aufgelöstes  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Vor allem fällt auf, dass die Signale des Phenylalanins im aromatischen Bereich zu höherem Feld (ca. 6.2) verschoben sind, wie üblicherweise bei der Koordination von Arenen an  $[\text{CpRu}]^+$  beobachtet wird. Eine Bindung von  $[\text{CpRu}]^+$  an Sekretin wird auch durch Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie bestätigt. Schließlich beweist der Edman-Abbau des Peptids, dass die Bindungsstelle des Metallfragments in der Tat das Phenylalanin 6 ist, da in dem HPL-Chromatogramm das teilweise abgebauten Ru-Sekretins das Signal für Phenylalanin eindeutig fehlt. Die Regioselektivität dieser Reaktion in Gegenwart von über 25 Amidbindungen, Carboxylatgruppen und sogar einem Histidin (man erinnere sich an die bereits beschriebene stabile Bindung von **1** an His) ist beeindruckend. Grotjahn und Mitarbeiter beobachteten eine Art „Wasser-Effekt“: Die Wanderung des  $[\text{CpRu}]^+$ -Fragmentes von N-, S-, O- $\sigma$ -Koordination zu dem  $\pi$ -Komplex vollzog sich für Sekretin in Wasser erheblich schneller als für die Modell-

peptide in Wasser-Methanol-Mischungen. Möglicherweise ist das relativ unpolare  $[(\text{Benzol})\text{RuCp}]^+$ -Fragment in Wasser aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen gegenüber  $[\text{CpRuL}_3]^+$ -Komplexen, in denen L ein harter Donorligand des Peptids (N, S oder O) ist, stabilisiert. Diese Stabilisierung könnte sich schon in Übergangszuständen der Reaktion auswirken und damit den beobachteten kinetischen Effekt erklären. Alternativ könnten Intermediate mit koordinierten Wassermolekülen analog zu **1** auftreten. Es lohnt sicherlich, dieser Frage weiter nachzugehen. Ebenfalls in Analogie zu **1** zeigt das Organometallfragment  $[\text{CpRu}]^+$  eine einzigartige Reaktivität und Selektivität, die mit Koordinationsverbindungen so nicht erreicht werden kann.

Auch bei der Anwendung von Bio-Organometallverbindungen für biologische Assays gibt es erhebliche Fortschritte. IR-spektroskopische Untersuchungen von Carbonylliganden in Organometallverbindungen bieten die Möglichkeit, Bio-konjugate dieser Organometallverbindung selbst in komplexen Mischungen wie Zellextrakten oder dem Serum von Patienten selektiv und mit hoher Empfindlichkeit zu detektieren, da die Banden mit etwa 2000  $\text{cm}^{-1}$  in einem Bereich liegen, in dem wenige andere organische Gruppen absorbieren. Zudem haben die Carbonylbanden üblicherweise hohe Extinktionskoeffizienten, was die gute Empfindlichkeit der Methode sichert. Die Anwendung dieser Technik für Steroidhormone, Peptide und biogene Amine wurde von Jaouen und seiner Arbeitsgruppe entwickelt und hierfür der Name Carbonyl-Metallo-Immuno-Assay (CMIA) vorgeschlagen.<sup>[19, 20]</sup> Ein wesentlicher Vorteil der Methode besteht darin, dass die üblicherweise in Immunoassays verwendeten radioaktiven Marker (RIA) überflüssig werden. Für die Routineanalytik, z. B. in Krankenhäusern, muss sich diese Technik allerdings mit anderen etablierten, nichtradioaktiven Assays auf der Basis von Fluoreszenzdetektion oder enzymatischen Methoden messen, die bei einfacher Handhabung ebenfalls eine hohe Empfindlichkeit und Selektivität garantieren. Allerdings ist keine dieser eher traditionellen Techniken für die gleichzeitige Analyse von mehr als einer Substanz geeignet. Andererseits steigt durch die Kostenexplosion im Gesundheitswesen die Nachfrage nach simultanen, kostengünstigen Analysemethoden, bei denen in einem Assay auf mehrere Substanzen gleichzeitig getestet werden kann. Jaouen und seine Mitarbeiter an der Université Paris Sud haben nun eine Erweiterung der CMIA-Technik für die gleichzeitige Analyse von zwei<sup>[21]</sup> und sogar drei Verbindungen in einem Sonderband des *Journal of Organometallic Chemistry* zum Thema „Bio-Organometallic Chemistry“ veröffentlicht.<sup>[22]</sup> In Verbindung mit instrumentellen Verbesserungen<sup>[23]</sup> ist nun die gleichzeitige Analyse mehrerer Spezies, z. B. die Kontrolle des Medikamentenspiegels im Blut von Patienten, in nur 20  $\mu\text{L}$  Serum möglich.

Die Grundlage der Methode sind die unterschiedlichen Frequenzen der Metall-Carbonyl-Streckschwingungen in verschiedenen Metall-Carbonyl-Komplexen.<sup>[22]</sup> Tabelle 1 enthält drei Beispiele solcher Komplexe, **6–8**, zusammen mit ihren charakteristischen Streckschwingungen  $\nu(\text{CO})$ . Die Konjugate **6–8** wurden erhalten, indem die Metallkomplexe kovalent an Carbamazepin, Phenobarbital und Diphenylhydantoin, drei bekannte Medikamente gegen Epilepsie, ge-

Tabelle 1. Carbonylkomplexe von Antiepilepsie-Medikamenten und ihre IR-Carbonylstreckschwingungen. Die charakteristischen Banden sind fett gedruckt.

Metallcarbonyl-Komplex	$\tilde{\nu}$ [cm <sup>-1</sup> ]
$\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-\text{R}$ $\text{Co}_2(\text{CO})_6$	2095, <b>2058</b> , 2032
<b>6:</b> R = Carbamazepin 	<b>2033</b> , 1958
<b>7:</b> R = Phenobarbital 	<b>1973</b> , 1899
<b>8:</b> R = Diphenylhydantoin	

bunden werden. Für alle drei Verbindungen wurden Mono-CMIAs bereits beschrieben. Epilepsie-Patienten werden zuweilen mit einem „Cocktail“ aller drei Medikamente behandelt. Da die individuelle Empfindlichkeit von Patient zu Patient erheblich variiert, ist es wünschenswert, zumindest während einer stationären Behandlung die Serumkonzentration regelmäßig zu kontrollieren, wodurch die optimale Dosis für jeden Patienten erreicht und unerwünschte Nebenwirkungen minimiert werden.

Für alle drei Biokonjugate wurden nach Standardmethoden polyklonale Antikörper in Kaninchen gezüchtet. Durch die entsprechenden mono-CMIAs wurde sichergestellt, dass keiner der Antikörper mit den anderen zwei Konjugaten oder den Tracern Kreuzreaktionen zeigt. Abbildung 1 zeigt die  $\nu(\text{CO})$ -Region des IR-Spektrums einer Mischung der

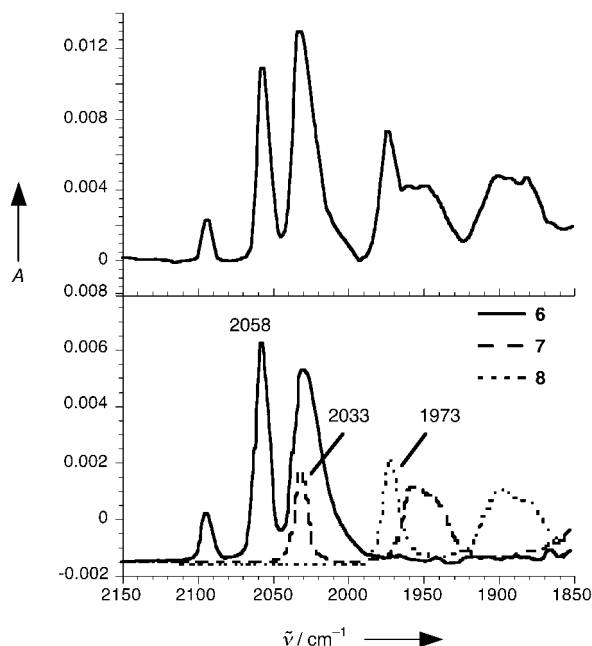


Abbildung 1. Carbonylbereich des IR-Spektrums einer äquimolaren Mischung von **6**, **7** und **8** (oben) und Überlagerung der drei Einzelspektren (unten). Die charakteristische Bande aller drei Komplexe ist in den unteren Spektren markiert.


Konjugate **6–8**, zusammen mit einer Überlagerung der IR-Spektren der reinen Verbindungen bei gleicher Konzentration, die das mathematische Problem verdeutlicht. Die charakteristische Bande des Komplexes **6** bei 2058 cm<sup>-1</sup> ist einer quantitativen Analyse direkt zugänglich, da sie nicht mit anderen Banden überlappt. Hingegen ist die charakteristische Bande von **7** bei 2033 cm<sup>-1</sup> vollständig unter der des Komplexes **6** bei 2032 cm<sup>-1</sup> verborgen, und die Bande von **8** bei 1973 cm<sup>-1</sup> überlappt zumindest teilweise mit der Bande von **7** bei 1958 cm<sup>-1</sup>. Trotzdem ist eine quantitative Dekonvolution nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate möglich, die bei Kenntnis der molaren Extinktionskoeffizienten der drei Verbindungen minimal detektierbare Mengen um 1 pmol ergibt. Dieser Multi-CMIA wurde durch Vergleich mit den Standard-Kalibrierungskurven der entsprechenden Mono-CMIAs validiert, wobei eine ausgezeichnete Übereinstimmung verzeichnet wurde. Darüber hinaus wurde für alle drei Verbindungen in Mono- und Triple-Assays eine ähnliche Empfindlichkeit beobachtet, was ebenfalls für die Praxistauglichkeit der Methode spricht.

Die drei in diesem Beitrag genannten Beispiele belegen ein wachsendes Interesse an Organometallverbindungen zur Lösung biologischer oder medizinischer Probleme. Verschiedenen Bereichen entstammend weisen sie doch einige Gemeinsamkeiten auf. Die Organometallverbindungen reagieren naturgemäß anders als Koordinationsverbindungen, die üblicherweise in vergleichbaren Untersuchungen eingesetzt werden. Dadurch wird die Markierung von Biomolekülen an ungewöhnlichen Positionen (z.B. mit **5**) oder mit bisher unerreichter Geschwindigkeit und Selektivität (z.B. mit **1**) möglich. Die oben diskutierten Verbindungen sind sehr stabil, nicht zuletzt aufgrund ihrer d<sup>6</sup>-Low-Spin-Elektronenstruktur mit gefüllten t<sub>2g</sub>-Orbitalen in einem (pseudo-)oktaedrischen Ligandenfeld. Als solche widerlegen sie die unter Chemikern weit verbreitete Annahme, dass Organometallverbindungen generell empfindlich gegen Sauerstoff und Feuchtigkeit sind und nur in Schlenk-Gefäßen oder Handschuhkästen gehandhabt werden können, ohne eine Zersetzung zu riskieren. Es gibt sicherlich noch eine ganze Reihe weiterer Organometallverbindungen, die durch die Reaktion mit Biomolekülen Konjugate mit außergewöhnlichen neuen Eigenschaften zu bilden vermag. Denkbar sind z.B. hochspezifische, enantio-selektive Katalysatoren aus katalytisch aktiven Organometallverbindungen und Peptiden. Neue Methoden für die Molekularbiologie könnten aus der Kombination funktioneller Organometallfragmente mit Oligonucleotiden resultieren. Konjugate aus Organometallverbindungen und biologisch aktiven Peptiden oder Antikörper(fragmente)n könnten eine neue Ära in der medizinischen Diagnostik einleiten und die Voraussetzungen für neue Behandlungsmöglichkeiten schaffen. Allerdings steht die Forschung in diesen Bereichen erst am Anfang.

- [1] P. Sadler, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1610–1630; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1512–1531.
- [2] K. Schwochau, *Technetium*, VCH, Weinheim, **2000**.
- [3] K. Schwochau, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2349–2358; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2258–2267.
- [4] S. Liu, D. S. Edwards, J. A. Barrett, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 621–636.

- [5] M. J. Heeg, S. S. Jurisson, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 1053–1060.
- [6] A. Pollak, D. G. Roe, C. M. Pollock, L. F. L. Lu, J. R. Thornback, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11593–11594.
- [7] R. Alberto, R. Schibli, A. Egli, A. P. Schubiger, U. Abram, T. A. Kaden, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7987–7988.
- [8] N. Aebischer, R. Schibli, R. Alberto, A. E. Merbach, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 260–262; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 254–256.
- [9] W. Hieber, F. Lux, C. Herget, *Z. Naturforsch. B* **1965**, 20, 1159–1165.
- [10] R. Alberto, R. Schibli, A. P. Schubiger, U. Abram, H. J. Pietzsch, B. Johannsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6076–6077.
- [11] R. Waibel, R. Alberto, J. Willuda, R. Finnen, R. Schibli, A. Stichelberger, A. Egli, U. Abram, J. P. Mach, A. Plückthun, P. A. Schubiger, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 897–901.
- [12] M. J. Abrams, A. Davison, A. G. Jones, C. E. Costello, H. Pang, *Inorg. Chem.* **1983**, 22, 2798–2800.
- [13] R. Krämer, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1287–1289; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1197–1199.
- [14] R. Krämer, M. Maurus, K. Polborn, K. Sünkel, C. Robl, W. Beck, *Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 1518–1526.
- [15] K. Haas, W. Ponikwar, H. Nöth, W. Beck, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1200–1203; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1086–1089.
- [16] K. Severin, R. Bergs, W. Beck, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1722–1743; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1634–1654.
- [17] D. B. Grotjahn, C. Joubran, D. Combs, D. C. Brune, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11814–11815.
- [18] D. B. Grotjahn, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 192, 1125–1141.
- [19] M. Salmain, A. Vessièrès, P. Brossier, I. S. Butler, G. Jaouen, *J. Immunol. Methods* **1992**, 148, 65–75.
- [20] G. Jaouen, A. Vessièrès, I. S. Butler, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 361–369.
- [21] A. Varenne, A. Vessièrès, M. Salmain, S. Durand, P. Brossier, G. Jaouen, *Anal. Biochem.* **1996**, 242, 172–179.
- [22] M. Salmain, A. Vessièrès, A. Varenne, P. Brossier, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **1999**, 589, 92–97.
- [23] A. Vessièrès, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 21, 625–633.

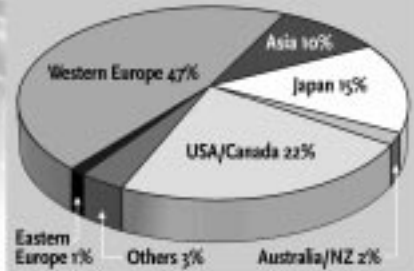
**+++ ANGEWANDTE CHEMIE — A TRULY INTERNATIONAL JOURNAL +++**



## Meet Angewandte Readers all over the world


Angewandte Chemie finds its authors, readers, and subscribers from all parts of the world.

Where do the authors come from?




Join the world of Angewandte authors!  
Submit your best research results to this international top journal.


Where do the readers/subscribers come from?



Join the world of Angewandte subscribers today!  
Order your subscription now with the Order Form on the last page of this issue.



WILEY-VCH, P.O. Box 10 11 61, 69451 Weinheim, Germany  
 Phone +49 (6201) 606-328, Fax +49 (6201) 606-368  
 e-mail: sales-journals@wiley-vch.de, <http://www.wiley-vch.de>


**WILEY-VCH**