

Kohlenstoffmonoxid freisetzende Moleküle für die therapeutische CO-Verabreichung in vivo

Sandra García-Gallego und Gonçalo J. L. Bernardes*

Bioanorganische Chemie · Kohlenmonoxid · Photochemie · Übergangsmetalle · Wirkstoffverabreichung

Professor Carlos Romão zum
65. Geburtstag gewidmet

Die Entwicklung Kohlenmonoxid freisetzender Moleküle (carbon-monoxide-releasing molecules, CORMs) als pharmazeutische Wirkstoffe stellt eine attraktive und sichere Alternative zur Verabreichung von gasförmigem CO dar. Die meisten bisher entwickelten CORMs sind Carbonylkomplexe von Übergangsmetallen. Obgleich derartige CORMs im Tierversuch bei einer Reihe von Krankheiten vielversprechende Resultate gezeigt haben, fehlen ihnen noch die notwendigen Attribute für eine weitergehende klinische Entwicklung. Hier werden die bis jetzt entwickelten Methoden der CORM-Selektion beschrieben. Weiterhin werden neue Erkenntnisse hinsichtlich der In-vivo-Reaktivität von Metall-Carbonylkomplexen im Zusammenhang mit Methoden für den CO-Nachweis in lebenden Zellen dargelegt. Es wird aufgezeigt, wie diese den Entwurf und die Synthese neuer CORMs vorantreiben.

1. Einführung

Kohlenmonoxid ist eine anerkannte therapeutische Verbindung, die unter physiologischen wie pathologischen bei einer ganzen Reihe von Abwehrmechanismen eine Rolle spielt (Abbildung 1).^[1,2] Im Unterschied zu anderen gasförmigen „Systemen“, die gegenwärtig im klinischen Einsatz oder in einem frühen Stadium der klinischen Entwicklung sind und mit einer Reihe intrazellulärer Ziele wechselwirken (zum Beispiel Stickstoffmonoxid und Schwefelwasserstoff), ist CO ein stabiles Molekül, das vornehmlich in einer vom Redoxzustand abhängigen Weise mit Übergangsmetallen reagiert. Die Einsatzfähigkeit von CO als Inhalationsgas ist aufgrund der fehlenden Spezifität und seiner Toxizität bei

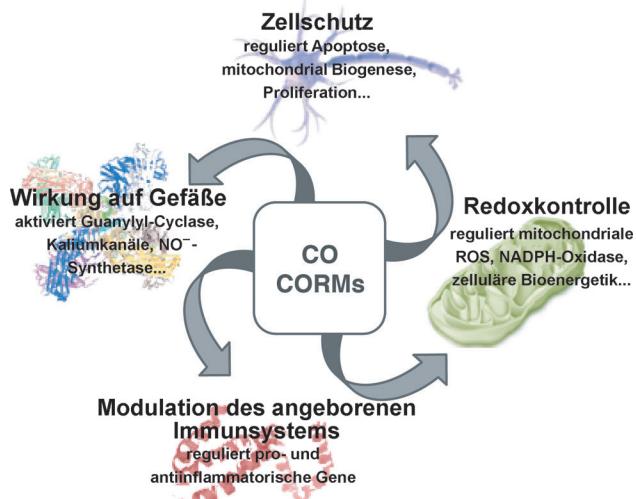


Abbildung 1. Biologische Wirkungen von Kohlenmonoxid, das als Gas oder in Form eines CO freisetzenden Moleküls (CORM) verabreicht wird. Nach Lit. [1].

[*] Dr. S. García-Gallego, [+] Dr. G. J. L. Bernardes
Department of Chemistry, University of Cambridge
Lensfield Road, CB2 1EW Cambridge (UK)
E-Mail: gbj53@cam.ac.uk
Dr. G. J. L. Bernardes
Instituto de Medicina Molecular
Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa
Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa (Portugal)
E-Mail: gbernardes@fm.ul.pt
Homepage: <http://gbernardes-lab.com>
[+] Aktuelle Adresse: Polymer- und Fasertechnologie
KTH Königliche Technische Hochschule
100 44 Stockholm (Schweden)

höheren Konzentrationen mit Unsicherheiten behaftet. Um dieses Problem zu umgehen, haben Motterlini und Mitarbeiter vorgeschlagen, CO freisetzende Moleküle (CORMs) als pharmazeutische Agentien für die kontrollierte Verabreichung von CO einzusetzen.^[3] Durch Fokussierung auf die

Übergangsmetall-Carbonylkomplexe [Fe(CO)₅], [Mn₂(CO)₁₀] („CORM-1“) und [{RuCl₂(CO)₃}₂] (CORM-2) wurde zunächst gezeigt, dass CO unter bestimmten physiologischen Bedingungen transportiert und freigesetzt werden kann, wenn es an ein Metallatom gebunden ist. Im Unterschied zu Carbonylkomplexen des Eisens und des Mangans, die zur CO-Freisetzung die Bestrahlung mit Licht erfordern, übertrug der Ruthenium-Carbonylkomplex CORM-2 das CO sogar in Dunkelheit spontan. Dabei konnten pharmakologische Effekte beobachtet werden, die denen von CO-Gas identisch waren; dazu gehörte die Weitstellung der Blutgefäße (Vasodilatation) und ein damit einhergehender Abfall des arteriellen Blutdrucks.^[3] Dieses lipidlösliche System wurde zu wasserlöslichen CORMs wie [RuCl(Glycinato)(CO)₃] (CORM3) oder (Na₂[H₃BCO₂]) (CORMA1) weiterentwickelt, bei denen die chemischen Strukturen verschiedene CO-Freisetzungsscharakteristiken und biologische Eigenschaften beisteuerten.^[1]

Im vergangenen Jahrzehnt ist eine Reihe unterschiedlicher Moleküle als CORMs – Moleküle, die in der Lage sind, CO unter bestimmten biologischen Bedingungen freizusetzen – vorgestellt worden. Hierzu gehört ein breites Spektrum metallorganischer Komplexe (M = Ru, Fe, Mn, V, Co, Ir, Cr, Mo, W) sowie eine Anzahl von Hauptgruppenelementverbindungen (α,α -Dialkylaldehyde, Oxalate, Borcarboxylate und Silacarboxylate).^[4-7] Die meisten dieser Moleküle setzen CO bei einfacher thermischer Aktivierung oder durch Hydrolyse in biologischen Puffern frei.^[8] Eine kontrollierte und spezifische Anlieferung von CO lässt sich auch mit stabilen Verbindungen erreichen, die CO nur dann freisetzen, wenn sie durch einen internen (z.B. eine enzymatische Reaktion)^[9-13] oder externen Auslösemechanismus (z. B. Anregung durch Licht)^[14-16] aktiviert werden. Die zuletzt genannte Strategie nutzt photoaktivierbare CORMs (PhotoCORMs) – Moleküle, die befähigt sind, CO in einem bestimmten Zielgewebe zeitlich kontrolliert freizusetzen. Ein ideales Photoaktivierungsprofil zeigt Maxima bei großen Wellenlängen^[14] bei vollständiger Stabilität des CORMs in Abwesenheit von Licht. Seit das erste PhotoCORM, [Mn₂(CO)₁₀], von Motterlini und Mitarbeitern^[3] vorgestellt wurde, haben mehrere Forschungsgruppen sich diese Strategie zunutze gemacht. So haben etwa Schatzschneider und Mitarbeiter mit Erfolg [Mn(CO)₃(R-tpm)]⁺-Komplexe [tpm = Tris(pyrazolyl)me-

than] entwickelt, die an Peptid-^[17] oder SiO₂-Nanopartikel^[18] gekuppelt werden konnten, ohne die Bedingungen der photochemischen CO-Freisetzung der Metallkomplexe zu verändern.

Ungeachtet der großen Anzahl vorgestellter CORMs haben sich die meisten therapeutischen Studien bislang auf das kommerziell erhältliche CORM-2 und das wasserlösliche CORM-3 konzentriert. In einem Mausmodell für Herzinfarkte konnte CORM-3 die Schädigung des Herzmuskels und das Ausmaß des Infarktes im Verlauf der Reperfusion vermindern.^[19] Nach Organtransplantationen verbesserte es die Überlebensrate beträchtlich. Die entzündungshemmenden Eigenschaften von CORMs konnten bei der Behandlung von Arthritis,^[20] bakteriellen Infektionen^[21] oder Nervenentzündungen belegt werden.^[22] Zusätzlich machen die gefäßerweiternden Eigenschaften,^[23] die Hemmung der Thrombocyten-Aggregation^[24] sowie ein antiapoptotischer Effekt die CORMs zu interessanten Alternativen bei der Behandlung von Krankheiten wie Diabetes mellitus und der Alzheimer-Demenz. Obwohl diese Komplexe in der Lage waren, die therapeutischen Nutzeffekte von gasförmigem CO in zahlreichen Tiermodellen menschlicher Krankheiten nachzustellen, fehlt ein zuordnungsfähiges pharmakokinetisches Profil (PK-Profil). Dies verhindert bislang den Schritt hin zu klinischen (Weiter)Entwicklungen. Im vorliegenden Kurzaufsatz erörtern wir heute verfügbaren Methoden zur CORM-Selektion und diskutieren nachfolgend, wie neue Einsichten in die In-vivo-Reaktivität der CORMs – insbesondere von Metall-Carbonylkomplexen – im Zusammenspiel mit Methoden der Quantifizierung und der Detektion in lebenden Zellen den Entwurf und die Synthese effizienterer CORMs vorantreiben.

2. Gegenwärtige Beschränkungen des klinischen Einsatzes von CORMs

Ungeachtet der höchst vielseitigen Chemie von CORMs – verschiedene Klassen von Metall-Carbonylverbindungen sowie organische Moleküle^[4,6,25,26] fehlen den meisten CORMs die Wirkstoffe kennzeichnenden Eigenschaften, die für die klinische Weiterentwicklung notwendig sind. Ein ideales CORM sollte eine Reihe von Anforderungen erfüllen:



Gonçalo Bernardes ist Gruppenleiter an der Universität Cambridge (England) und Direktor der Abteilung Chemische Biologie und Pharmazeutische Biotechnologie am Instituto de Medicina Molecular. Nach seiner Promotion an der Universität Oxford (England) im Jahr 2008 war er als Postdoktorand am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung (Potsdam-Golm), an der ETH Zürich sowie als Gruppenleiter bei der Firma Alfama Lda. tätig. Seine Forschungen konzentrieren sich auf die Entwicklung chemoselektiver Reaktionen zur Modifikation von Biomolekülen zum verbesserten Verständnis und zur Beeinflussung menschlicher Erkrankungen.



Sandra García-Gallego promovierte 2013 an der Universität von Alcalá unter der Leitung von Dr. F. Javier de la Mata und Dr. M. Ángeles Muñoz-Fernández mit einer Arbeit über die Synthese von Metallkomplexen und Metallocendrimeren sowie deren Evaluation als antivirale Wirkstoffe. Gegenwärtig ist sie Postdoktorandin in der Forschungsgruppe von Dr. Michael Mälkoch an der Königlich-Technischen Hochschule (KTH) in Stockholm. Der Schwerpunkt ihrer Forschungen liegt auf der Synthese von Metallkomplexen und makromolekularen Architekturen für biomedizinische Anwendungen.

len: therapeutische Wirkung bei geringer Toxizität; hinreichende Absorption, Verteilung, Verstoffwechselung und Ausscheidung durch den Körper; Löslichkeit und Stabilität in aeroben wässrigen Medien; ein adäquates PK-Profil, sowie biologische Kompatibilität und Stabilität im Blut. In den folgenden Abschnitten erörtern wir die wesentlichen Beschränkungen, denen die bis heute entwickelten CORMs unterliegen.

2.1. Empfindlichkeit und CO-Freisetzungskinetik der CORMs

Die meisten CORMs sind metallorganische Carbonylkomplexe, bei denen das CO an ein Übergangsmetallatom in einer niedrigen Oxidationsstufe gebunden ist. Von diesen Komplexen setzen viele CO als Folge einer Hydrolyse frei, sobald sie in einer wässrigen Pufferlösung gelöst werden. Das ist zum Beispiel bei dem an der Luft stabilen und wasserlöslichen CORM-3 der Fall, der in wässriger Lösung instabil ist ($t_{1/2}$ beträgt in menschlichem Blutplasma gerade einmal 3,6 min).^[27] Dies hat, ungeachtet der nützlich erscheinenden therapeutischen Aktivität bei verschiedenen Versuchstieren, zum Ausschluss von einer klinischen Entwicklung geführt.^[28,29] Durch Feinabstimmung der Koordinations- und der Wirkstoffosphären konnten CORMs mit besserer Stabilität im wässrigen Milieu ($t_{1/2}$ bis 1 h) synthetisiert werden. Dies ging mit verbessertem therapeutischen Verhalten *in vivo* einher.^[15,30-33]

Die Kinetik des CORM-Transportes zum Wirkort ist ein Schlüsselpunkt, der den Grad der Gewebespezifität bestimmt. CORMs mit schneller CO-Freisetzung ($t_{1/2}$ im (Milli)Sekundenbereich) sind in Fällen, in denen die CO-Freisetzung in einem schmalen Zeitfenster stattfinden muss (zum Beispiel bei der Untersuchung des kinetischen Verhaltens von Ionenkanälen)^[34] besonders nützlich. Für therapeutische Anwendungen *in vivo* ist eine zeitlich steuerbare CO-Freisetzung wünschenswert, die das CO an sein biologisches Ziel führt.^[15,30-33]

2.2. Cytotoxizität und Akkumulation im Gewebe

Obgleich eine Reihe von CORMs vielversprechende klinischen Daten ergaben, wobei ihre Wirksamkeit vornehmlich in ihrer Zellschutzhörigkeit lag,^[3,23,24] sind ihre toxikologischen Profile in vielen Fällen bislang nur schlecht verstanden. Beispielsweise könnte eine Akkumulation der metallhaltigen Verbindung, die nach der CO-Freisetzung zurückbleibt, im Körper zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Aktuelle Berichte zur Toxizität, die sich im Wesentlichen auf CORM-3 beziehen, führen zu widersprüchlichen Schlüssen. Eine Behandlung humaner gingivaler Fibroblasten (Bindegewebsmutterzellen aus Zahnfleischgewebe) oder mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut mit CORM-3 (500 μ M, 24 h) führte nicht zu erkennbaren Toxizitätsanzeichen,^[35] während CORM-3 bei gleicher Konzentration für RAW264.7-Makrophagen zytotoxisch zu sein scheint.^[36] Unterschiedliche Testsysteme zur Messung der zellulären Toxizität (intrazelluläre LDH-Freisetzung im ersten Beispiel, Zellquantifizierung im

zweiten) könnten die Ursache für die widersprüchlichen Befunde sein, da Metall-Carbonyl-CORMs die Nachweisreaktionen stören könnten.^[37]

Um dieses Problem anzugehen, führten Winburn und Mitarbeiter^[37] eine Vergleichsstudie zu den Wirkungen von gasförmigem CO, CORM-2 sowie seines CO-freien Analogons (iCORM-2) an primären Herzmuskelzellen der Ratte und zwei weiteren Zell-Linien (HEK 293 und MDCK) durch. Die Analyse ergab ein schmales therapeutisches Fenster zwischen Zellen schützenden (< 20 μ M) und zytotoxischen (> 100 μ M) CORM-2-Konzentrationen. Im Unterschied zu CO-Gas führten beide Rutheniumkomplexe zu einer verminderten Lebensfähigkeit der Zelle, zu abnormalen Zellgestalten, zu erhöhter Apoptose und Nekrose, zu einer Arrestierung des Zellzyklus, sowie zu verminderter mitochondrialer Enzymaktivität. Dies deutet auf eine von der Kernstruktur der Komplexe herrührenden Toxizität hin. Eine mögliche Anreicherung von iCORM-2 oder irgendeines sonstigen giftigen iCORM-Folgeproduktes würde einer pharmazeutischen Weiterentwicklung im Wege stehen. Eine detaillierte Evaluierung der toxikologischen Profile der CORMs mittels robuster zytotoxikologischer Messungen und geeigneter Kontrollansätze wird entscheidend für etwaige klinische Anwendungen in der Zukunft sein.

2.3. Reaktivität gegenüber Proteinen

Um CORMs als pharmazeutische Wirkstoffe zu etablieren, ist es entscheidend, ihre Wechselwirkungen mit Biomolekülen, insbesondere solchen wie den Proteinen des Blutplasmas, die ihre PK- und ADME-Profile regulieren, zu verstehen. Nur wenige Studien haben sich jedoch diesem Thema zugewandt. Der Komplex *fac*-Na[Mo(Histidinato)(CO)₃] (ALF186) hat sich als gutes Modell für die Untersuchung einiger grundlegender Wechselwirkungen metallorganischer Komplexe mit biologischen Medien erwiesen.^[38] Ausgelöst durch O₂ setzt ALF186 sämtliche CO-Äquivalente augenblicklich frei; diese werden dann durch den Blutkreislauf fortgeleitet, entweder an Hämoglobin gebunden oder ungebunden. Als metallhaltiges Nebenprodukt entstehen CO-freie Polyoxyometallate, die nur schwach mit Proteinen wechselwirken, wie durch Röntgenbeugung mit dem als Modellverbindung dienenden Hühnereiweiß-Lysozym (HEWL) gezeigt werden konnte.

Im Unterschied zu ALF186 setzen CORM-3 und andere *fac*-[RuL₃(CO)₃]-Komplexe in phosphatgepufferter Lösung bei pH 7.4 nur Spuren an CO frei und ergeben auch nach langen Inkubationszeiten in Blut nur geringe Mengen an Carboxyhämoglobin (CO-Hb). Eine umfassende Untersuchung der Wechselwirkungen von CORM-3 mit Proteinen durch Atomemissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-AES), Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) und Infrarotspektroskopie (IR) ergab, dass dieser Ruthenium-Carbonylkomplex rasch mit Proteinen wie Myoglobin aus dem Pferdeherzen, Hämoglobin und Albumin und Transferrin des Menschen sowie HEWL reagiert. Man findet hernach an diese Proteine gebundene Ruthenium-Verbindungen.^[28] Kristalle des Modell-

proteins HEWL, das mit einer CORM-3-Lösung getränkt worden war, wurden einer Röntgenbeugungsanalyse unterzogen. Diese Untersuchungen zeigten, dass CORM-3 mit dem exponierten Histidinrest 15 von HEWL nach Verlust eines Chloridions, eines Glycinations und eines CO-Liganden ein stabiles $[\text{Ru}(\text{CO})_2(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -Addukt bildet (Abbildung 2A). Eine Folgestudie mit $[\text{RuCl}_2(1,3\text{-Thiazol})(\text{CO})_3]$,

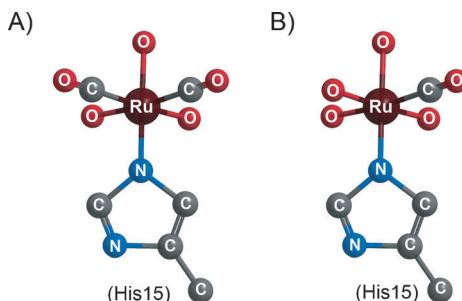


Abbildung 2. Ru-His15-Addukte von HEWL mit A) CORM-3^[28] und B) $[\text{RuCl}_2(1,3\text{-Thiazol})(\text{CO})_3]$.^[39] Mit einem „O“ gekennzeichnete Liganden repräsentieren Wassermoleküle.

einem weiteren *fac*- $[\text{RuL}_3(\text{CO})_3]$ -CORM mit Modellcharakter, ergab, dass auch dieses mit HEWL ein Rutheniumaddukt bildet. In diesem Fall entstehen lediglich Monocarbonyl-Rutheniumverbindungen, die kovalent an den benannten Histidylrest sowie an zwei Aspartylreste an der Proteinoberfläche binden (Abbildung 2 B).^[39]

Fasst man sie zusammen, deuten diese Resultate darauf hin, dass *fac*- $[\text{RuL}_3(\text{CO})_3]$ -CORMs *in vivo* das CO durch eine Zerfallsreaktion ihrer Addukte an Blutplasmaproteine freisetzen. *fac*- $[\text{RuL}_3(\text{CO})_3]$ -Komplexe reagieren nach Übertritt in den Blutstrom rasch mit Plasmaproteinen und verlieren dabei ein Äquivalent CO in Form von CO_2 , sodass Protein- $[\text{Ru}(\text{CO})_2]$ -Addukte entstehen. Diese Addukte, die mit dem Blutkreislauf im Körper transportiert werden, erreichen durch den langsamen Verlust von CO die Verteilung von CO auf verschiedene Organe und Gewebe. Dabei wird ein rascher Anstieg der Menge an CO-Hb verhindert.^[29] Diese mechanistische Interpretation ist in Einklang mit der therapeutischen Vielseitigkeit von CORM-3^[1] und deutet darauf hin, dass die Heranziehung von Metalloproteinen eine nutzbringende Strategie für die therapeutische CO-Darreichung *in vivo* sein könnte.

2.4. Nachweis der CO-Freisetzung

Die Entwicklung von CORMs als Leitstrukturen erfordert eine Feinabstimmung ihrer CO-Freisetzungsgeschwindigkeit unter physiologischen Bedingungen. Bei der Quantifizierung dieses Vorgangs müssen mehrere Faktoren unter Kontrolle gehalten werden, darunter die Testlösung, die Temperatur, sowie das Vorhandensein von O_2 oder Licht, die sämtlich die CO-Freisetzungsgeschwindigkeit unmittelbar beeinflussen können. Elektrochemische Gerätschaften (z. B. CO-Elektroden)^[5] sowie auf manometrischen oder gaschromatographischen^[4] Messungen beruhende Methoden haben

bei der quantitativen Erfassung von CO bisher nur begrenzte Anwendung gefunden, da CO nur wenig wasserlöslich ist.

Bislang wurden die meisten CORM-Strukturen mittels des Desoxymyoglobin-Carbonylierungsassays selektiert. Dieses Verfahren nutzt Desoxymyoglobin, das ein CO-Akzeptor ist, um die von einem CORM freigesetzte CO-Menge zu quantifizieren. Die Bildung von Mb-CO wird quantifiziert und mit der durch das CORM freigesetzten CO-Menge in Beziehung gesetzt. Dieser Assay hat jedoch mehrere Nachteile:^[40-42] Modifikationen des Verfahrens wurden vorgeschlagen.^[43] Die starke Absorption des Myoglobins in Nah-UV- und im sichtbaren Bereich lassen keine Kombination des Systems mit einer Photolyse in lufthaltigen Medien zu. Dies schränkt die Nützlichkeit bei der Quantifizierung der CO-Freisetzung durch PhotoCORMs ein. Weiterhin wurde jüngst nachgewiesen, dass CORM-2 und CORM-3 bei alleiniger Anwesenheit von reduziertem Myoglobin CO nicht mit merklicher Geschwindigkeit freisetzen.^[44] Tatsächlich ist das bei diesem System eingesetzte Reduktionsmittel Natriumdithionit für die Auslösung der CO-Freisetzung verantwortlich. Daraus folgt, dass die Evaluierung von CORM auf der Grundlage des Mb-CO-Assays unzureichend ist und eine Neudeinition der CO-Freisetzungsprofile der CORMs notwendig ist. Folglich ist die Klassifizierung von CORM-2 und CORM-3 als Schnellfreisetzer,^[8] weil die CO-Freisetzung bei der Inkubation mit Desoxymyoglobin innerhalb einer Minute erfolgt, nicht länger akzeptabel, weil diese Verbindungen in Abwesenheit von Dithionit tatsächlich nur eine langsame CO-Freisetzung zeigen. Es ist daher wichtig, die CO-Freisetzungsprofile der mit dem Mb-CO-Testsystem ermittelten CORMs erneut in Augenschein zu nehmen, um CO-Freisetzungsgeschwindigkeiten zweifelsfrei zu ermitteln und sie mit berichteten biologischen Wirkungen in Beziehung zu setzen.

3. Fortschritte bei der CORM-Entwicklung

3.1. Neudeinition der CO-Freisetzungsgeschwindigkeit

Es sollten robuste und akkurate Testverfahren zum Einsatz kommen, um die CO-Freisetzungsgeschwindigkeit aus CORMs zu ermitteln. Schätzwerte zur CO-Freisetzung lassen sich mit theoretischen Ansätzen wie etwa der Dichtefunktionaltheorie (DFT) ermitteln, wie Vummaleti et al. demonstriert haben.^[45] In diesem Beispielfall befanden sich die vorhergesagten CO-Freisetzungsprofile verschiedener Mangan-Carbonylkomplexe in guter Übereinstimmung mit experimentellen Beobachtungen. Obwohl die Nutzbarkeit dieses Ansatzes begrenzt ist, weil er die Umwandlung von CORMs in wässriger Lösung oder im Blutplasma einkalkuliert, könnten derartige DFT-Rechnungen sich bei der Identifizierung möglicher, durch In-situ-IR-Spektroskopie nachgewiesener^[46] Intermediate als nützlich erweisen.

McLean et al. haben einen alternativen Oxyhämoglobin-Assay vorgestellt, bei dem der Einsatz von Dithionit entfällt. Die Methode beruht auf der Annahme, dass die Effizienz der CO-Freisetzung durch ein CORM aus der intrazellulären Wechselwirkung mit Anionen resultiert.^[44] Da Hämoglobin eine höhere Affinität für CO aufweist als für O_2 , entfällt bei

diesem Verfahren die Notwendigkeit, desoxygiertes, reduziertes Hämoglobin einzusetzen. Durch die Unterschiede in den Absorptionsspektren von Oxyhämoglobin und Carboxyhämoglobin in der Soret-Region ($\lambda = 422$ nm) mit einem Maximum zwischen zwei isosbestischen Wellenlängen ist dieses System ideal für die Messung der Verdrängung von O_2 durch CO.

In jüngerer Zeit wurden zwei Testsysteme für eine effiziente CO-Quantifizierung in lebenden Zellen mittels fluoreszierender Reportermoleküle beschrieben.^[47] Chang et al.^[48] entwickelten eine schaltbare fluoreszierende palladiumhaltige Sondenverbindung (COP-1), bei der das Metallatom die Fluoreszenz des Bordipyromethendifluorid(BODIPY)-Kerns durch elektronische Scheratomeffekte löscht. Die Wechselwirkung mit CO löst eine fluorogene Carbonylierungsreaktion aus (Abbildung 3 A), wobei Pd^0 sowie eine

wird in einer verschlossenen Schlenk-Küvette die Gasphase untersucht, die sich mit der photolysierten Lösung im Gleichgewicht befindet, und unter bestimmten Bedingungen wurde ein Verteilungskoeffizient von 54:1 zwischen Gas- und Flüssigphase berechnet. Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich in den Methoden der CO-Quantifizierung; Verwendung finden Infrarotspektroskopie, ein programmierbarer Gaschromatograph mit einer vorgepackten Carbosieb-Säule, thermische Leitfähigkeitsmessung, sowie Blitzlichtphotolyse. Schließlich ist es auch möglich, die Gaschromatographie mit der Massenspektrometrie zu koppeln (GC-MS), obgleich sich diese Technik auf die geringe Löslichkeit von CO in Wasser stützt.^[51] Zusammengenommen erleichtern diese jüngsten Fortschritte in der Methodik der CO-Quantifizierung und der Bildgebung das Design neuer CORMs mit definierten CO-Freisetzungsgeschwindigkeiten für biologische Anwendungen.

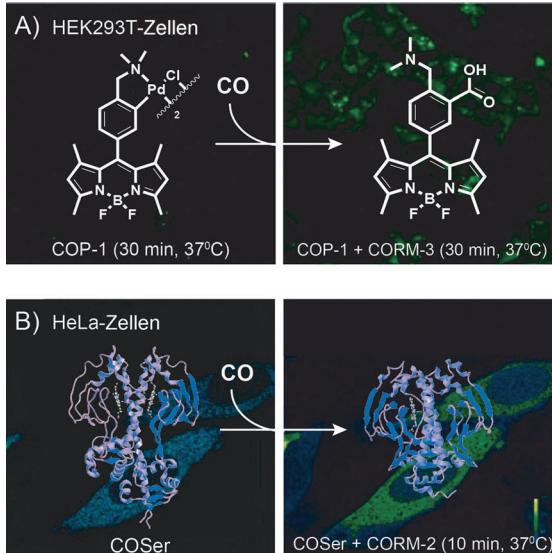


Abbildung 3. CO-Nachweis in lebenden Zellen mittels A) COP-1^[48] und B) COSer.^[49]

stark fluoreszierende Verbindung entstehen. Das zweite Nachweisverfahren, von Wang et al. entwickelt,^[49] stützt sich auf ein genetisch codiertes, fluoreszierendes Sondenmolekül (COSer), das sich die Vorteile der einzigartigen Selektivität der CO-Bindung durch das dimere Hämprotein CooA als effektiven CO-„Reporter“ zunutze macht (Abbildung 3 B). In beiden Fällen sind die fluoreszierenden Sondenmoleküle in der Lage, CO in lebenden Zellen (sowie im Fall von COP-1 in wässrigen Pufferlösungen) mit hoher Selektivität für eine breite Auswahl biologisch relevanter niedermolekularer Verbindungen zu detektieren. Obwohl im Vergleich zu CO-Ser bei COP-1 der Anstieg der Fluoreszenz und auch die Empfindlichkeit größer sind, spricht der Biosensor viel schneller an und arbeitet nach einem reversiblen Mechanismus, der für die Echtzeit-Detektion von CO geeignet ist.

Rimmer et al.^[50] haben eine Reihe analytischer Verfahren für die Quantifizierung der CO-Freisetzung aus Photo-CORMs vorgestellt, die das Spektrum der zur Photolyse benutzten Lösung unberührt lassen und mit Untersuchungen in durchlüfteten Medien kompatibel sind. Bei diesen Verfahren

3.2. Verbessertes CORM-Design

Um den Entwurf von CORMs mit geeigneten pharmazeutischen Eigenschaften rationeller zu gestalten, haben Romão et al. ein Modell eines Metall-Carbonylkomplexes aus drei Komponenten vorgeschlagen:^[52] A) dem Metallzentrum, das die wesentlichen Eigenschaften und die Toxizität des Moleküls vorgibt, B) der inneren Koordinationssphäre (CO und Nachbarliganden) für die Feinabstimmung sowie Stabilität und Reaktivität gegenüber Blutplasmaproteinen, für die Reaktion auf einen spezifischen Reiz oder zur Schaffung eines bestimmten CO-Freisetzungssprofils sowie C) der Wirkstoffssphäre, die man durch Modifikation distaler Bindungsstellen der Nachbarliganden erhält, wodurch die gewünschten pharmakologischen Parameter (Wasserlöslichkeit, Biokompatibilität, Gewebespezifität) moduliert werden.

Dieses Konzept war die Grundlage für den Entwurf neuer Komplexe mit gegenüber CORM-3, das oft als CORM der Wahl erachtet wird, verbesserten Eigenschaften.^[23] ALF492, ALF795 und B_{12} -ReCORM-2 (Abbildung 4) sind drei Beispiele für neue CORMs mit günstigen Merkmalen für In-vivo-Anwendungen, darunter erhöhte Löslichkeit, Biokompatibilität, definierte CO-Freisetzungsgeschwindigkeiten und Gewebespezifität.

ALF492: Dieses CORM auf Rutheniumbasis, $[RuCl_2(\text{Thiogalactopyranosid})(CO)_3]$,^[53] zeigt hinsichtlich seiner wirkstoffartigen Eigenschaften und seines CO-Freisetzungssprofils im Vergleich mit anderen CORMs eine signifikante Verbesserung. ALF492 trägt einen von Galactose abgeleiteten Liganden, der an das Metall gebunden ist und die Wasserlöslichkeit und Biokompatibilität steigert. Dies führt in vivo durch Wechselwirkung mit Asialoglykoprotein-Rezeptoren zu einer Anreicherung in der Leber. ALF492 bietet bei Versuchsmäusen vollständigen Schutz gegen experimentelle cerebrale Malaria (ECM) sowie gegen akute Verletzungen der Lunge, ohne den Sauerstofftransport durch Hämoglobin zu beeinträchtigen. Die beobachtete Schutzwirkung ist von CO abhängig und geht mit der Induktion der Hämoxigenase-1 einher, was zu der Schutzwirkung beiträgt. In Kombination mit dem Antimalarialmittel Artesunat bietet

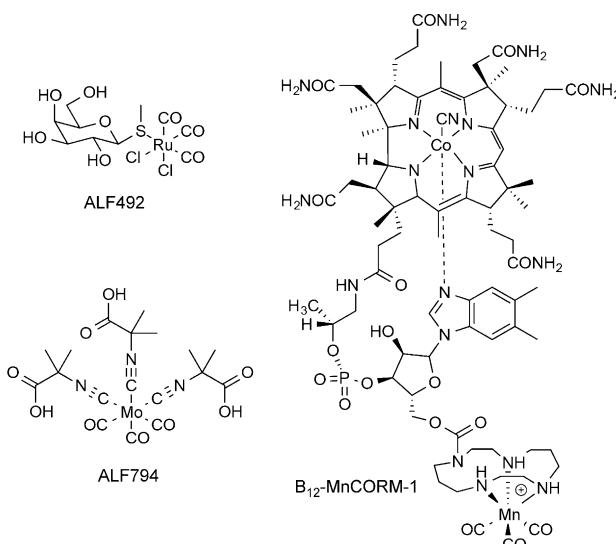


Abbildung 4. Strukturformeln von drei neuen CORMs, die als therapeutische Wirkstoffe vielversprechend sind.^[46, 53, 54]

ALF492 auch Schutz vor ECM nach Beginn dieser schweren Krankheit. Dieser ausgeprägte Schutzeffekt verdeutlicht das Potenzial der CORMs für die Behandlung schwerer Formen der Malaria.

ALF794: Dieses Molybdän-CORM, $[\text{Mo}(\text{CNCMe}_2\text{CO}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]$, hat eine geringe Toxizität und günstige wirkstoffartige Eigenschaften. Es liefert das CO spezifisch zur Leber und eignet sich bei der Maus zur Behandlung von durch Acetaminophen induziertem akutem Leberversagen.^[54] Das Anfügen von Methylgruppen an den Isocyanacetatliganden hat die CO-Lieferung zur Leber relativ zum Ausgangskomplex $[\text{Mo}(\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]$ (ALF795) signifikant verbessert. Fünf Minuten nach intravenöser Verabreichung erreicht ALF794 relative Konzentrationsverteilung von 5.27 (Leber/Blut) und 12.58 (Leber/Niere); für ALF795 betragen diese Verteilungsverhältnisse nur 0.33 bzw. 0.5. Während ALF795 durch die Nieren rasch ausgeschleust zu werden scheint, gilt dies nicht für ALF794. Statt dessen wird die Leber effizient angesteuert, sodass bei Versuchstieren mit akuter Leberschädigung ein günstiger kurativ-therapeutischer Verlauf erreichbar ist.

$\text{B}_{12}\text{-MnCORM-1}$: Zobi und Mitarbeiter haben CORMs auf der Basis biokompatibler Molekülgerüste wie Cyanocobalamin (Vitamin B_{12}) hergestellt. Das Rhenium(II)-Konjugat $\text{B}_{12}\text{-ReCORM-2}$, bei dem die Metalleinheit über die axiale Cyanogruppe des Vitamins koordiniert ist, zeigt in einem Ischämie-Reperfusionschaden-Modell einen Zellschutzeffekt. Allerdings ist die Aufnahme der Substanz in die Zellen schlecht.^[32] Die Optimierung der Synthesestrategie durch Einbau der Metalleinheit – in diesem Fall Mangan – in die Ribosylgruppe der Gerüststruktur, lieferte das Konjugat $\text{B}_{12}\text{-MnCORM-1}$.^[46] Nach der aktiven Internalisierung durch lebende 3T3-Fibroblasten setzte dieses System unter Einwirkung von sichtbarem Licht CO frei und verhinderte so das Absterben der Fibroblasten unter Hypoxie und metabolischer Verarmung. Eine Reihe von CORMs mit potenziellem pharmakologischem Wert könnte sich mithilfe dieser Strategie synthetisieren und intrazellulär verabreichen lassen.

3.3. Kontrollierte CO-Freisetzung und Gewebeansteuerung

Die effiziente Zielführung eines CORMs hängt von einer geeigneten Halbwertszeit der CO-Freisetzung ab, die es dem Molekül erlaubt, das gewünschte Erkrankungsgebiet im Körper zu erreichen. Hydrolyse oder Ligandenaustausch sind die für die Auslösung der CO-Freisetzung am häufigsten genutzten Mechanismen, doch sind noch weitere Prozesse, die die CO-Freisetzung aus Metall-Carbonylkomplexen fördern, ebenfalls untersucht worden. Dabei haben insbesondere Mechanismen, die eine gewisse Kontrolle über die CO-Freisetzungskinetik gestatten, beträchtliche Aufmerksamkeit erlangt. Das Borcarbonat-CORM-A1 zeigt eine pH-Wert- sowie temperaturabhängige Freisetzung von CO.^[25] Es hat bei 37°C und pH 7.4 eine Halbwertszeit von circa 21 Minuten, die sich durch Herabsetzen des pH-Wertes und Erhöhung der Temperatur verkürzen lässt. Durch Enzyme ausgelöste Systeme (ET-CORMs) wie Acyloxybutadien-Eisentricharbonylkomplexe^[9] treten als attraktive Alternativen zu den chemisch ausgelösten Systemen in Erscheinung. Diese Verbindungen, die unter normalen Bedingungen in Pufferlösungen stabil sind, werden durch enzymatische Spaltung einer Esterbindung aktiviert, was zu einer Keto-Enol-Tautomerisierung führt, die die Fe-CO-Bindung schwächt und so die CO-Freisetzung bewirkt. Kunz et al.^[55] beschreiben den Einsatz magnetischer Fe_2O_3 -Nanopartikel, die mit $[\text{RuCl}(\text{p-DO-PA})(\text{CO})_3]$ -Einheiten versehen sind und nach Einbringen in ein Magnetfeld kontrolliert CO freisetzen. Diese alternative Strategie eröffnet neue Möglichkeiten für die Entwicklung gewebspezifischer CORMs.

Eine verbreitete Strategie, die ein hohes Maß an Kontrolle über die Kinetik der CO-Freisetzung möglich macht, stützt sich auf Licht als Auslöser.^[14, 15] Die meisten PhotoCORMs sind Metall-Carbonylkomplexe, die in wässriger Lösung im Dunkeln lange genug stabil sind, um das Zielgewebe zu erreichen. Nach der Anregung durch Licht, setzen diese Systeme ein (oder mehrere) CO-Äquivalente frei, die dann in das biologische Zielgebiet diffundieren. Die Entwicklung der PhotoCORMs konzentriert sich auf die photolytische CO-Freisetzung durch Licht innerhalb eines phototherapeutischen Fensters ($\lambda > 600 \text{ nm}$). Drei Strategien stehen dabei im Mittelpunkt:^[15] A) Verschieben des Absorptionsmaximums des PhotoCORMs hin zum roten Ende des Spektrums durch geeignete Kombinationen von Metallen und Coliganden (z.B. Chelatoren mit ausgedehnten aromatischen π -Systemen), B) Anknüpfen eines Photosensibilisators für die CO-Freisetzung an die Metall-Carbonyleinheit, zum Beispiel ein organisches Farbstoffmolekül oder einen Metallkomplex, und C) der Einsatz der Zweiphotonenabsorption, um die photolytische Freisetzung von CO aus einem PhotoCORM-Prowirkstoff zu erzwingen. Diese Strategien sind mit Erfolg bei der Erschaffung einer neuen Generation von PhotoCORMs zum Einsatz gekommen, bei denen sich die CO-Freisetzung mit sichtbarem Licht aktivieren lässt.^[14, 15] Gonzalez et al.^[56] haben Mangan-Carbonylkomplexe mit Azaheteroaren-Liganden synthetisiert, die in ihren Gerüsten ausgedehnte konjugierte und elektronenreiche Donorfunktionen beherbergen. Diese Systeme setzen bei Bestrahlung mit Licht ($\lambda = 400\text{--}550 \text{ nm}$) bereitwillig CO frei. Die Freiset-

zungs- und Quantenausbeuten der PhotoCORMs bei $\lambda = 509$ nm steigen mit zunehmender Konjugation und Einbeziehung einer SMe-Gruppe im Ligandengerüst beständig. Ein Bromidligand verbessert ebenfalls die CO-Donorfähigkeit.

Govender et al. haben die ersten CO freisetzenden Metallocendrimere hergestellt, die sie als „PhotoCORMs der nächsten Generation“ bezeichneten.^[57] Sie bestehen aus dendritischen Polypyridylgerüsten der ersten und zweiten Generation und sind mit vier beziehungsweise acht $[\text{Mn}(\text{CO})_3]$ -Einheiten versehen. Diese Gerüststrukturen sind bei Dunkelheit in gepufferter Lösung bis zu 16 Stunden stabil, zeigen aber nach Anregung mit Licht ($\lambda = 410$ nm) eine photoinduzierte CO-Freisetzung. Die Halbwertszeit und die Quantenausbeute der CO-Freisetzung sind bei den Metallocendrimeren der ersten und der zweiten Generation ähnlich, was darauf hindeutet, dass jede der $[\text{MnBr}(\text{bpy})(\text{CO})_3]$ -Endgruppen unabhängig von den anderen agiert, aber die Gesamtmenge an freigesetztem Kohlenmonoxid pro Molekulinheit mit der Generation des Dendrimers bis zu einem Wert 15 CO pro Molekül Metallocendrimer der zweiten Generation zunimmt.

Kürzlich stellten Antony et al. das erste wasserlösliche übergangsmetallfreie CORM vor, das durch sichtbares Licht aktivierbar ist (Abbildung 5).^[58] Auf 6-Hydroxy-3-oxo-3H-

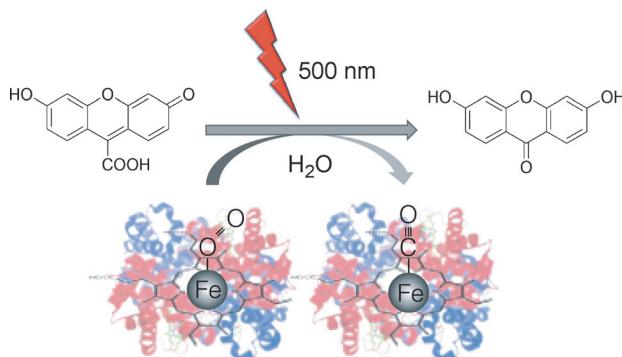


Abbildung 5. Das erste wasserlösliche übergangsmetallfreie CORM, das durch sichtbares Licht aktivierbar ist.^[58]

xanthen-9-carbonsäure aufbauend, ist es in der Lage, bei Bestrahlung mit Licht ($\lambda = 500$ nm) in Wasser und in Methanol CO freizusetzen. Seine günstigen spektroskopischen Eigenschaften, die Wasserlöslichkeit und die Umwandlung in ein nicht interferierendes Photoprodukt machen das Potenzial dieser PhotoCORMs für Einsätze in Biologie und Medizin deutlich.

Die selektive Hinführung von CORMs zu ihren Zielzellen wird durch Konjugation eines Metall-Carbonylgerüstes mit einem Zielortliganden, zum Beispiel einem Peptid, einem Antikörper oder einem Nanopartikel, erleichtert. So wurde beispielsweise das Muster-PhotoCORM $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]^+$ mittels einer kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) an ein Trägerpeptid gekuppelt.^[17,59] In jüngerer Zeit hat das Aufpfropfen derselben Molekülbaueinheit auf Siliciumdioxid- und Kohlenstoffnanomaterialien zu Systemen geführt, die CO zu soliden Tumoren leiten sollen.^[18,60] Bischof et al.^[61] beschreiben den Ruthenium(II)-

dicarbonylkomplex $[\text{RuCl}_2(\text{Cpp-L-PNA})(\text{CO})_2]$, der mit einem Peptidnucleinsäure(PNA)-Monomer konjugiert ist, um die Aufnahme durch Zellen und die Spezifität der CO-Anlieferung zu verbessern. In allen Fällen waren die Charakteristika der lichtinduzierten CO-Freisetzung mit denen der Ausgangsverbindungen vergleichbar.

Daneben führte ein effizienter bioorthogonaler Syntheseweg über eine katalysatorfreie Oximierung zu dem Ziel-System $[\text{Mo}(\text{bpy}^{\text{CH}_3,\text{CH}=\text{Aoa-TGF}\beta_1\text{-OH}})(\text{CO})_4]$, das von Pfeiffer et al. hergestellt worden ist.^[62] In diesem Fall wurde der Molybdän-Carbonylkomplex mit einer Aldehydgruppe in der Peripherie des 2,2'-Bipyridyl(bpy)-Liganden an ein bioaktives Peptid (transforming growth factor β -targeting; auf TGF β zielend) gekuppelt, das an seinem N-Terminus mit Aminoxyessigsäure funktionalisiert war. Die CO-Freisetzung wurde durch Bestrahlung mit einer LED-Anordnung bei $\lambda = 468$ nm erheblich verbessert, wodurch ein tieferes Eindringen in das Gewebe erreicht werden konnte als mit den zuvor verfügbaren PhotoCORMs.

Ungeachtet der Frage, welches der Auslösemechanismus der CO-Freisetzung ist, bleibt beim Einsatz von CORMs unausweichlich ein Metall-CO-Ligand-Fragment mit möglichen Negativwirkungen im biologischen System zurück. Im Fall der PhotoCORMs sollten die Metall-Ligand-Fragmente, die bei Bestrahlung mit Licht entstehen, oder die Sekundärprodukte, die sich durch Folgereaktionen mit dem Medium oder mit O_2 leicht bilden, vollständig charakterisiert und identifiziert werden. Eine solche Charakterisierung wurde kürzlich von Berends et al. für Mangan(I)-Komplexe beschrieben.^[40] Mögliche akute und langfristige toxikologische Effekte müssen weitergehend untersucht werden, wenn PhotoCORMs als pharmazeutische Agentien genutzt werden sollen.

3.4. Die Vermeidung von Nebenprodukten: makromolekulare Träger

Makromolekulare Systeme sind bei dem Bemühen, die pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern, als Träger für CORMs ebenfalls untersucht worden (Abbildung 6). Eine solche Verbesserung ließe sich durch 1) die Vermeidung einer raschen Ausscheidung durch die Niere, 2) das Anzielen von Organen/Strukturen, die Nanopartikel einfangen (etwa die Leber oder schnellwachsende Tumoren), und/oder 3) den Einsatz von Zielsteuerungsliganden erreichen. Die Kombination von CORMs mit nanometergroßen Trägern wurde erstmals bei einem Mizellenystem und bei funktionalisierten SiO_2 -Nanopartikel eingesetzt. Hasegawa et al.^[63] strebten danach, Metall-Carbonylkomplexe in Mizellenform zu entwickeln, die im Gewebe nur langsam diffundieren und somit die Möglichkeit verbessern sollten, distale Drainageorte des Gewebes zu erreichen. Die Forscher entwickelten hierzu ein neues CO-Liefersystem auf Grundlage einer polymeren Mizelle mit einer $[\text{RuCl}(\text{Aminosäure-Anion})(\text{CO})_3]$ -Struktur als CO freisetzende Einheit. Das System zeigt eine große CO-Kapazität und eine verzögerte CO-Freisetzung, und es kann CO als Reaktion auf die Anwesenheit von Verbindungen mit Thiolgruppen, wie Cystein oder Glutathion, freisetzen. Sie

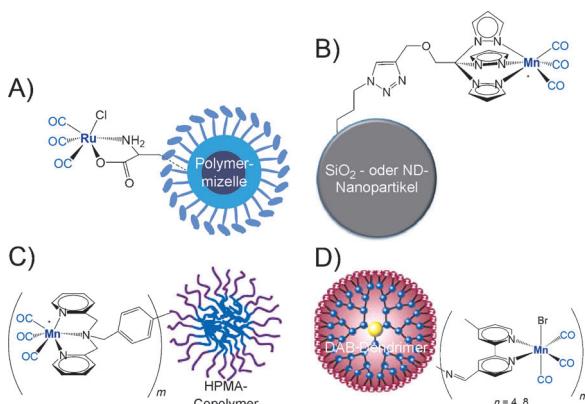


Abbildung 6. Beispiele für makromolekulare CORMs: A) eine Mizelle,^[63] B) ein SiO_2 - oder Nanodiamantensystem,^[18, 60] C) ein HPMA-Copolymer^[64] und D) ein Diaminobutan-Dendrimer.^[57]

konnten damit wirkungsvoll die Lipopolysaccharid-induzierte Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in menschlichen Monocyten aufhalten und die Cytotoxizität der $[\text{RuCl}(\text{Aminosäure-Anion})-(\text{CO})_3]$ -Einheiten signifikant vermindern. Dördelmann et al. funktionalisierten SiO_2 -Nanopartikel^[18] und Nanodiamanten^[60] mittels CuAAC-Reaktion mit modifizierten $[\text{Mn}(\text{tpm})(\text{CO})_3]^+$ -Baugruppen. Diese Nanopartikel zeigten eine ähnliche lichtinduzierte CO-Freisetzung wie der freie Komplex und könnten somit eine Darreichungsform für CORMs bei der Behandlung solider Tumoren darstellen. Daneben kamen die schon erwähnten $[\text{RuCl}(\pi\text{-DOPA})(\text{CO})_3]$ -Einheiten nach kovalenter Anbindung an die Oberflächen magnetischer Fe_2O_3 -Nanopartikel^[55] auch bei der Konstruktion gewebespezifischer CORM-Systeme zum Einsatz, die CO bei Anlegen eines Magnetfeldes freisetzen.

Weitere Systeme auf der Grundlage von Polymeren und Dendrimeren wurden ebenfalls als alternative makromolekulare CORM-Träger vorgeschlagen. Durch Konjugation eines metallorganischen *fac*- $[\text{Mn}(\text{CO})_3]$ -Fragments an Methacrylat- oder Methacrylamidpolymere erzeugten Brückmann et al. Copolymerkonjugate mit PhotoCORM-Verhalten, deren Makromolekülgröße und Größenverteilungen eine passive Zielführung des Wirkstoffs ermöglichen.^[64] Dendrimere wie die von Govender et al.^[57] beschriebenen vier- und achtkernigen $[\text{Mn}(\text{CO})_3]$ -funktionalisierten Metalldendrimere stellen aufgrund ihrer Monodispersität und der leichten Herstellung eine attraktive Alternative zu anderen makromolekularen Trägersystemen dar. Diese Systeme akkumulieren infolge der erhöhten Permeabilität und des Retentionseffektes (EPR-Effekt) passiv und selektiv in Tumorgewebe.^[64]

Weiterhin beschrieben Matson et al. ein Material auf Peptidbasis, das spontan CO freisetzt.^[65] Das Material besteht aus einem Nanofasergel, das ein amphiphiles Peptid mit kovalent angeknüpften Rutheniumtricarbonyl-Einheiten enthält, das CO langsamer freisetzt als lösliche CO-Donoren. Herzmuskelzellen (Cardiomyozyten) unter oxidativem Stress wiesen eine höhere Überlebensrate auf, wenn sie mit diesem Material auf Peptidbasis behandelt wurden, was sein Potenzial als biologisch abbaubares Gel für eine örtlich begrenzte therapeutische CO-Darreichung unterstreicht.

3.5. Jenseits einfacher CO-Träger

Während die meisten CORMs durch die Freisetzung von CO eine biologische Wirkung entfalten, haben mehrere Untersuchungen erwiesen, dass die beobachteten Effekte sich nicht allein durch das freigesetzte CO restlos erklären lassen.^[66, 67] Zu den Eigenschaften, die sich durch gasförmiges CO nicht nachahmen lassen, gehören die potente antibakterielle Wirkung von CORM-3,^[21, 68] die Inhibition der Zellatmung und die Förderung des Transports von Kationen durch die Membranen.^[66, 69]

Eine partielle Erklärung für die antibakterielle Wirkung, die von CORMs ausgeht, könnte die rasche Akkumulation von Metall-Carbonylkomplexen in Bakterienzellen sein, die zu einer hohen CO-Konzentration am Ziel führt.^[68] Eine Reihe von CORMs hat Potenzial als Bakterizide gegen ein breites Spektrum an Mikroorganismen, darunter sowohl Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) als auch Gram-negative Bakterien (*Escherichia coli*).^[21] Darüber hinaus steigerte CORM-3 die Überlebensrate von Mäusen, die mit *Pseudomonas aeruginosa* infiziert waren.^[36, 39] Tavares et al. haben nachgewiesen, dass das Vermögen von CORMs, Bakterien abzutöten, mit dem oxidativen Stress einhergeht, der in der Zelle durch die bei der CO-Freisetzung entstehenden Metallkomplexe ausgeht.^[70] Gestützt wird diese Folgerung durch die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und die Schädigung der DNA, sowie deren verminderte Aktivität, wenn ROS-Abfangsysteme zum Einsatz kommen. Abschließend sei ein Mechanismus nach Art des „Trojanischen Pferdes“ erwähnt, der zur Erklärung der antibakteriellen Wirkung von CORMs vorgeschlagen wurde. Nach diesem Modell sollen nach der Aufnahme des CORMs in die Zelle zelleigene thiolgruppenhaltige Moleküle die Freisetzung von CO begünstigen, das an die terminale Oxidase der Atmungskette bindet und so die Zellatmung hemmt (Abbildung 7).^[68, 71] Der inhibitorische Effekt der CORMs wird von Thiolen wie *N*-Acetylcystein verhindert,^[36, 67] ein Verhalten, das nicht mit deren antioxidativen Eigenschaften (Verhinderung des CO-Angriffs auf die

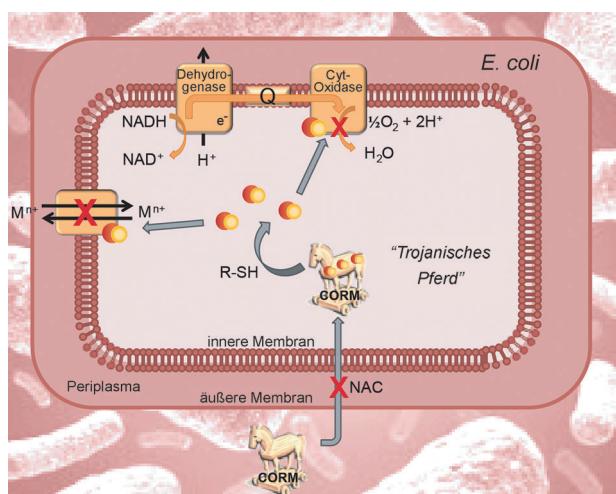


Abbildung 7. Vorgeschlagener „Trojanisches-Pferd“-Mechanismus zur Erklärung der bakteriziden Wirkung von CORMs.^[69, 71]

Oxidasen) erklärbar ist, sondern vielmehr auf die Inhibition der CORM-Aufnahme durch die Bakterienzelle zurückzuführen ist.^[71]

CORMs könnten außerdem einen innovativen Ansatz bei der Behandlung anderer Infektionskrankheiten darstellen. So konnte nachgewiesen werden, dass $[\text{RuCl}(\text{Thiogalactopyranosid})(\text{CO})_3]$ (ALF492)^[53] ein wirkungsvolles Adjuvans bei der Behandlung schwerer Formen der Malaria ist. Die nachlassende Wirksamkeit einiger gegenwärtig verfügbarer Wirkstoffe, insbesondere Antibiotika, bezeugt die Dringlichkeit, neue Therapien auf der Grundlage neuer Konzepte zu entwickeln, die nach Möglichkeit die Resistenzentwicklung umgehen. Der Einsatz von CORMs mit Wirkungsweisen, die sich von gegenwärtig eingesetzten Pharmazeutika unterscheiden, stellt einen vielversprechenden Weg bei der Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe für den klinischen Einsatz dar.

4. Schlussbemerkungen

CORMs – Wirkstoffvorstufen, die in der Lage sind, CO in einer räumlich und zeitlich kontrollierbaren Weise darzureichen – sind als sichere Alternativen zur Verabreichung gasförmigen Kohlenmonoxids bei CO-gestützten Therapieformen im Gespräch. Die meisten der bislang entwickelten CORMs sind Übergangsmetall-Carbonylkomplexe, die in zahlreichen Tierversuchen positive therapeutische Wirkungen gezeigt haben, ohne den Sauerstofftransport durch Hämoglobin zu stören, was bei der Verabreichung von CO-Gas ein wesentlicher Nachteil ist.

Ungeachtet der gemachten Fortschritte bleiben viele Hürden zu überwinden, um die Vorteile von CORMs als pharmazeutische Wirkstoffe zu nutzen. So hat sich etwa das entscheidende Verfahren für die Selektion der meisten der beschriebenen CORM-Strukturen, ein Testverfahren, das sich auf die Quantifizierung des aus den CORMs freigesetzten CO in Gegenwart reduzierten Myoglobins durch Messung des gebildeten Mb-CO stützt, als für die Quantifizierung der CO-Freisetzung als untauglich erwiesen. Tatsächlich wird CO aus CORM-2 und CORM-3 in Gegenwart von reduziertem Myoglobin allein nicht in nennenswerter Menge freigesetzt; es ist vielmehr das bei diesem Verfahren zugesetzte Reduktionsmittel Natriumdithionit, das die Freisetzung von CO aus diesen Komplexen antreibt. Weiterhin hat sich gezeigt, dass die Zerfallsprodukte der CORMs zusätzliche Effekte zeitigen können, die zu den beobachteten biologischen Wirkungen beitragen. So ist die bekannte antibakterielle Wirkung von CORM-3 in der Hauptsache die Folge seiner Fähigkeit, oxidativen Stress zu erzeugen, und keine von CO ausgehende Wirkung. In den vergangenen Jahren ist daher ein beträchtliches Maß an Aufmerksamkeit auf die Entwicklung robuster analytischer Verfahren zur Quantifizierung von CO sowie auf die Synthese von Carbonylkomplexen mit definierten CO-Freisetzungsprofilen und definierter Gewebespezifität, deren Abbauprodukte biologisch inert sind, gerichtet worden.

Um toxische Nebenwirkungen zu vermeiden, muss ein Metallcarbonyl-CORM bevorzugt zum Krankheitsherd geführt und dort dazu veranlasst werden, CO abzugeben.

Gleichzeitig ist eine unspezifische CO-Freisetzung zu vermeiden. Daneben muss die Biokompatibilität des Molekülgerüstes durch die chemische Natur und die Eigenschaften des Metalls und seiner Koordinations- und Wirkstoffssphäre moduliert werden. Durch die Kombination von Organometallchemie in wässrigen Lösung mit Prinzipien der pharmazeutischen Chemie und Fortschritten bei der präzisen mengeabhängigen Erfassung und bildlichen Darstellung der CO-Freisetzung auch in lebenden Zellen werden schließlich therapeutisch aktive CORMs für sichere experimentelle In-vivo-Untersuchungen entstehen.

G.J.L.B. ist Royal Society University Research Fellow im Chemie-Department der Universität Cambridge (England) und Investigador FCT am Instituto de Medicina Molecular in Lissabon (Portugal). Wir danken Nikolaus Krall und Dr. Filipa Cruz für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Eingegangen am 27. Dezember 2013,
veränderte Fassung am 17. Februar 2014
Online veröffentlicht am 28. Juli 2014

Übersetzt von Dr. Thomas Lazar, Paderborn

- [1] R. Motterlini, L. E. Otterbein, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 728–743.
- [2] 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.
- [3] R. Motterlini, J. E. Clark, R. Foresti, P. Sarathchandra, B. E. Mann, C. J. Green, *Circ. Res.* **2002**, *90*, 17e–24e.
- [4] B. E. Mann, *Top. Organomet. Chem.* **2010**, *32*, 247–285.
- [5] R. Motterlini, P. Sawle, J. Hammad, S. Bains, R. Alberto, R. Foresti, C. J. Green, *FASEB J.* **2005**, *19*, 284–286.
- [6] T. S. Pitchumony, B. Spangler, R. Motterlini, R. Alberto, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4849–4854.
- [7] F. Zobi, *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 175–188.
- [8] M. Desnard, R. Foresti, D. Morin, M. Dagouassat, M. Daugouassat, A. Berdeaux, E. Denamur, S. H. Crook, B. E. Mann, D. Scapens, P. Montravers, J. Boczkowski, R. Motterlini, *Antioxid. Redox Signaling* **2012**, *16*, 153–163.
- [9] S. Romanski, B. Kraus, U. Schatzschneider, J.-M. Neudoerfl, S. Amslinger, H.-G. Schmalz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2440–2444; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2392–2396.
- [10] S. Romanski, B. Kraus, M. Guttentag, W. Schlundt, H. Rucker, A. Adler, J.-M. Neudoerfl, R. Alberto, S. Amslinger, H.-G. Schmalz, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 13862–13875.
- [11] S. Romanski, E. Stamellou, J. T. Jaraba, D. Storz, B. K. Krämer, M. Hafner, S. Amslinger, H. G. Schmalz, B. A. Yard, *Free Radical Biol. Med.* **2013**, *65*, 78–88.
- [12] S. Romanski, H. Rücker, E. Stamellou, M. Guttentag, J.-M. Neudörfl, R. Alberto, S. Amslinger, B. Yard, H.-G. Schmalz, *Organometallics* **2012**, *31*, 5800–5809.
- [13] S. Botov, E. Stamellou, S. Romanski, M. Guttentag, R. Alberto, J.-M. Neudörfl, B. Yard, H.-G. Schmalz, *Organometallics* **2013**, *32*, 3587–3594.
- [14] R. D. Rimmer, A. E. Pierri, P. C. Ford, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 1509–1519.
- [15] U. Schatzschneider, *Inorg. Chim. Acta* **2011**, *374*, 19–23.
- [16] D. Crespy, K. Landfester, U. S. Schubert, A. Schiller, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6651–6662.
- [17] H. Pfeiffer, A. Rojas, J. Niesel, U. Schatzschneider, *Dalton Trans.* **2009**, 4292–4298.

- [18] G. Dördelmann, H. Pfeiffer, A. Birkner, U. Schatzschneider, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 4362–4367.
- [19] J. E. Clark, P. Naughton, S. Shurey, C. J. Green, T. R. Johnson, B. E. Mann, R. Motterlini, *Circ. Res.* **2003**, *93*, 178.
- [20] M. I. Guillén, J. Megías, V. Clérigues, F. Gomar, M. J. Alcaraz, *Rheumatology* **2008**, *47*, 1323–1328.
- [21] L. S. Nobre, J. D. Seixas, C. C. Romao, L. M. Saraiva, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 4303–4307.
- [22] M. G. Bani-Hani, D. Greenstein, B. E. Mann, C. J. Green, R. Motterlini, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *318*, 1315–1322.
- [23] R. Foresti, J. Hammad, J. E. Clark, T. R. Johnson, B. E. Mann, A. Fribe, C. J. Green, R. Motterlini, *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 453–460.
- [24] S. Chlopicki, R. Olszanecki, E. Marcinkiewicz, M. Lomnicka, R. Motterlini, *Cardiovasc. Res.* **2006**, *71*, 393–401.
- [25] R. Motterlini, P. Sawle, J. Hammad, S. Bains, R. Alberto, R. Foresti, C. J. Green, *FASEB J.* **2004**, *19*, 284–286.
- [26] G. L. Bannenberg, H. L. A. Vieira, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, *19*, 663–682.
- [27] T. R. Johnson, B. E. Mann, I. P. Teasdale, H. Adams, R. Foresti, C. J. Green, R. Motterlini, *Dalton Trans.* **2007**, 1500–1508.
- [28] T. Santos-Silva, A. Mukhopadhyay, J. D. Seixas, G. J. L. Bernardes, C. C. Romao, M. J. Romao, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1192–1195.
- [29] T. Santos-Silva, A. Mukhopadhyay, J. D. Seixas, G. J. L. Bernardes, C. C. Romao, M. J. Romao, *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3361–3366.
- [30] W.-Q. Zhang, A. J. Atkin, R. J. Thatcher, A. C. Whitwood, I. J. S. Fairlamb, J. M. Lynam, *Dalton Trans.* **2009**, 4351–4358.
- [31] W.-Q. Zhang, A. C. Whitwood, I. J. S. Fairlamb, J. M. Lynam, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 8941–8952.
- [32] F. Zobi, A. Degonda, M. C. Schaub, A. Y. Bogdanova, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 7313–7322.
- [33] R. Kretschmer, G. Gessner, H. Görls, S. H. Heinemann, M. Westerhausen, *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 6–9.
- [34] M. L. Dallas, J. L. Scragg, C. Peers, *Arterial Chemoreceptors*, Bd. 648 (Hrsg.: C. Gonzalez, C. Nurse, C. Peers), Springer, Dordrecht, **2009**, S. 89–95.
- [35] H. Song, H. Zhao, Y. Qu, Q. Sun, F. Zhang, Z. Du, W. Liang, Y. Qi, P. Yang, *J. Periodontal Res.* **2011**, *46*, 48–57.
- [36] M. Desmard, K. S. Davidge, O. Bouvet, D. Morin, D. Roux, R. Foresti, J. D. Ricard, E. Denamur, R. K. Poole, P. Montravers, R. Motterlini, J. Boczkowski, *FASEB J.* **2009**, *23*, 1023–1031.
- [37] I. C. Winburn, K. Gunatunga, R. D. McKernan, R. J. Walker, I. A. Sammut, J. C. Harrison, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *111*, 31–41.
- [38] J. D. Seixas, A. Mukhopadhyay, T. Santos-Silva, L. E. Otterbein, D. J. Gallo, S. S. Rodrigues, B. H. Guerreiro, A. M. L. Goncalves, N. Penacho, A. R. Marques, A. C. Coelho, P. M. Reis, M. J. Romao, C. C. Romao, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 5985–5998.
- [39] M. F. A. Santos, J. D. Seixas, A. C. Coelho, A. Mukhopadhyay, P. M. Reis, M. J. Romao, C. C. Romao, T. Santos-Silva, *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *117*, 285–291.
- [40] H.-M. Berends, P. Kurz, *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *380*, 141–147.
- [41] S. H. Crook, B. E. Mann, A. J. H. M. Meijer, H. Adams, P. Sawle, D. Scapens, R. Motterlini, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 4230–4235.
- [42] W. Huber, R. Linder, J. Niesel, U. Schatzschneider, B. Spingler, P. C. Kunz, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 3140–3146.
- [43] A. J. Atkin, J. M. Lynam, B. E. Moulton, P. Sawle, R. Motterlini, N. M. Boyle, M. T. Pryce, I. J. S. Fairlamb, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 5755–5761.
- [44] S. McLean, B. E. Mann, R. K. Poole, *Anal. Biochem.* **2012**, *427*, 36–40.
- [45] S. V. C. Vummaleti, D. Branduardi, M. Masetti, M. De Vivo, R. Motterlini, A. Cavalli, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 9267–9275.
- [46] F. Zobi, L. Quaroni, G. Santoro, T. Zlateva, O. Blacque, B. Safarimov, M. C. Schaub, A. Y. Bogdanova, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6719–6731.
- [47] L. Yuan, W. Lin, L. Tan, K. Zheng, W. Huang, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1670–1672; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1628–1630.
- [48] B. W. Michel, A. R. Lippert, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15668–15671.
- [49] J. Wang, J. Karpus, B. S. Zhao, Z. Luo, P. R. Chen, C. He, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9790–9794; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9652–9656.
- [50] R. D. Rimmer, H. Richter, P. C. Ford, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 1180–1185.
- [51] G. Bartolucci, E. Droghetti, C. Focardi, M. Bambagiotti-Alberti, M. Nocentini, G. Smulevich, *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 1041–1045.
- [52] C. C. Romão, W. A. Blättler, J. D. Seixas, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3571–3583.
- [53] A. C. Pena, N. Penacho, L. Mancio-Silva, R. Neres, J. D. Seixas, A. C. Fernandes, C. C. Romao, M. M. Mota, G. J. L. Bernardes, A. Pamplona, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1281–1290.
- [54] A. R. Marques, L. Kromer, D. J. Gallo, N. Penacho, S. S. Rodrigues, J. D. Seixas, G. J. L. Bernardes, P. M. Reis, S. L. Otterbein, R. A. Ruggieri, A. S. G. Goncalves, A. M. L. Goncalves, M. N. D. Matos, I. Bento, L. E. Otterbein, W. A. Blättler, C. C. Romao, *Organometallics* **2012**, *31*, 5810–5822.
- [55] P. C. Kunz, H. Meyer, J. Barthel, S. Sollazzo, A. M. Schmidt, C. Janiak, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4896–4898.
- [56] M. A. Gonzalez, S. J. Carrington, N. L. Fry, J. L. Martinez, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 11930–11940.
- [57] P. Govender, S. Pai, U. Schatzschneider, G. S. Smith, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 5470–5478.
- [58] L. A. P. Antony, T. Slanina, P. Sebej, T. Solomek, P. Klan, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4552–4555.
- [59] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [60] G. Dördelmann, T. Meinhardt, T. Sowik, A. Krueger, U. Schatzschneider, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11528–11530.
- [61] C. Bischof, T. Joshi, A. Dimri, L. Spiccia, U. Schatzschneider, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 9297–9308.
- [62] H. Pfeiffer, T. Sowik, U. Schatzschneider, *J. Organomet. Chem.* **2013**, *734*, 17–24.
- [63] U. Hasegawa, A. J. van der Vlies, E. Simeoni, C. Wandrey, J. A. Hubbell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18273–18280.
- [64] N. E. Brückmann, M. Wahl, G. J. Reiss, M. Kohns, W. Waetjen, P. C. Kunz, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, 4571–4577.
- [65] J. B. Matson, M. J. Webber, V. K. Tamboli, B. Weber, S. I. Stupp, *Soft Matter* **2012**, *8*, 6689–6692.
- [66] J. L. Wilson, H. E. Jesse, R. K. Poole, K. S. Davidge, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2012**, *13*, 760–768.
- [67] S. McLean, R. Begg, H. E. Jesse, B. E. Mann, G. Sanguinetti, R. K. Poole, *Antioxid. Redox Signaling* **2013**, *19*, 1999–2012.
- [68] K. S. Davidge, G. Sanguinetti, C. H. Yee, A. G. Cox, C. W. McLeod, C. E. Monk, B. E. Mann, R. Motterlini, R. K. Poole, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4516–4524.
- [69] J. L. Wilson, H. E. Jesse, B. Hughes, V. Lund, K. Naylor, K. S. Davidge, G. M. Cook, B. E. Mann, R. K. Poole, *Antioxid. Redox Signaling* **2013**, *19*, 497–509.
- [70] A. F. N. Tavares, M. Teixeira, C. C. Romao, J. D. Seixas, L. S. Nobre, L. M. Saraiva, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 26708–26717.
- [71] H. E. Jesse, T. L. Nye, S. McLean, J. Green, B. E. Mann, R. K. Poole, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2013**, *1834*, 1693–1703.