Rákellenes fémkomplexek oldatkémiája és farmakokinetikai viselkedésüket befolyásoló tulajdonságaik
Enyedy Éva A. MTA doktori értekezés

Válasz Noszál Béla professzor úr opponensi véleményére

Hálásan köszönöm Noszál Béla professzor úrnak doktori dolgozatom részletes áttanulmányozását, pozitív és több ponton is gondolatébresztő bírálatát. Az opponensi véleményben megfogalmazott észrevételeire és kérdéseire az alábbi válaszokat adom:

***1. kérdés**: A 6. oldalon platinacsoportba tartozó elemeket említ és sorol fel: Ru, Rh, Pd, Os, Ir. Milyen csoportosítás alapján történt ez a besorolás?*

Válasz: A platinacsoport elemei (6 elem: Ru, Os, Rh, Ir és Pd, Pt) nemesfémek, az átmeneti fémekhez tartoznak, a periódusos rendszer d-mezőjében, az 5. és 6. periódusban találhatók, a VIII, IX, X. csoportban. A 3 triádként emlegetett elemcsoport tagjai. Számos fizikai és kémiai tulajdonságukban mutatnak nagy hasonlóságot, emiatt a platinacsoport tagjait gyakran megkülönböztetik a hármas triád másik három (Fe, Co, Ni) elemétől.

***2. kérdés**: A 15. oldalon a d^6-os Ru(II) ionnal izoelektronos Os(II) és Ir(III) komplexekről ír. Ezek nem izoelektronosak, hiszen az elektronhéjak száma sem azonos, így az elektronok száma sem, amin nem változtat, hogy a külső héjon azonos számú elektront tartalmaznak.*

Válasz: A bírálónak igaza van: az „izoelektronos" kifejezés valóban azonos elektronszámot jelent, ami a felsorolt ionokra nem igaz. A Ru(II) elektronkonfigurációja: $[Kr]4d^6$, az Os(II)-ioné: $[Xe]4f^{14}5d^6$, az Ir(III)-ioné: $[Xe]4f^{14}5d^6$. Az izoelektronosságot néha kiterjesztik a „vegyérték izoelektronosságra" (*valence isoelectronicity*), én itt nyílván erre gondoltam (a d^6 vegyérték elektronszerkezet miatt).

***3. kérdés**: Az NMR vizsgálatokban referenciaként használt DSS (nátrium-trimetil-szilil-propánszulfonát) valamilyen mértékben nyilvánvalóan koordinálódik az oldatban lévő fémionokhoz, ami valamilyen mértékben megváltoztatja az egyensúlyi viszonyokat és a DSS NMR csúcsainak kémiai eltolódását is. Vizsgálták-e ennek mértékét?*

Válasz: A fém-ligandum egyensúlyi rendszerek vizsgálatakor mindig kulcsfontosságú, hogy a mintákhoz adott segédanyagok (pl. ionerősséget biztosító só, puffer) ne lépjenek kölcsönhatásba se a fémionnal, se a ligandummal, se a képződő komplexekkel. A DSS, mint szulfonát ligandum általában nagyon kis stabilitású komplexeket képez, vizes oldatban nem kell gyakorlatilag az átmeneti fémionokhoz való koordinálódásával számolni [P. Thuér, et al., Dalton Trans. 48 (2019) 8756–8772, A.P. Côté, et al., Coord. Chem. Rev. 245 (2003) 49–64]. Szilárd fázisban röntgenkrisztallográfiás mérések alapján nagyobb méretű fémionokhoz (pl. lantanoida(III)ionok, ólom(II), uranil(VI)) való koordinálódását viszont leírták [J. Harrowfield, et al., Dalton Trans. 46 (2017) 11533–11536, A.P.

Szegedi Tudományegyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
MTA-SZTE Lendület Funkcionális Fémkomplexek Kutatócsoport
6720 Szeged, Dóm tér 7.
enyedy@chem.u-szeged.hu

Côté, et al., Coord. Chem. Rev. 245 (2003) 49–64]. A DSS-t a vizsgált komplexekkel összemérhető koncentrációban használtuk a ^{1}H NMR spektroszkópiás méréseinknél, de történtek mérések nélküle is, amikor az oldószerjeleket használtuk referenciaként. Mérhető különbség nem volt a spektrumok között. Másrészt számos olyan példát láttunk munkánk során, ahol az NMR mérések alapján kapott részecskeeloszlások jó egyezést mutattak a másfajta technikával (pl. pH-potenciometria) kapott eredmények alapján számoltakkal; így szemben más segédanyagokkal (pl. DMSO, HEPES) a DSS esetében nem gondoltunk egyensúlyt zavaró kölcsönhatásra.

***4. kérdés**: A 37. oldalon L-glutationt említ, az L azonban csak a komponens aminosavakra érvényes relatív konfigurációs megjelölés, nem a belőlük képződött peptidek vagy fehérjék egészére.*

Válasz: Elfogadom a bíráló észrevételét, az γ-L-glutamil-L-ciszteinil-glicin tripeptid elnevezése valóban glutation (L nélkül).

***5. kérdés**: Az értekezés talán legtöbb kérdést felvető része a spektrofluorimetriás mérések értékelésére vonatkozó fejezet. Az értékelésben használt anyagmérleg egyenletek nyilvánvalóan helyesek, a (10) egyenletben lévő moláris emissziók és ezek szelektivitása azonban kevésbé meggyőző, különös tekintettel arra, hogy a fluorometriásan aktív triptofán ill. tirozin egységek sok-sok kötésen át azonos kovalens környezetben vannak az asszociált és az asszociálatlan fehérjékben. Mennyire képes megváltoztatni ezeket a „moláris emissziókat" az asszociáció? A fluoreszcencia érzékenysége kétségen kívül kiemelkedő tud lenni, de a fent említett okokat is figyelembe véve, összességében felveszi-e ez a módszer az NMR-ben ismert ligandumkötési vizsgálatokkal, ahol a ligandumon mérhető a kötés okán bekövetkezett relaxáció-változás.*

Válasz: Az NMR és fluorimetriás spektroszkópiai módszerek egyaránt hasznos információkat szolgáltatnak a fehérje-kis molekula kölcsönhatásokról, de a kapott információ eltérő jellegű és a két módszer koncentrációigényében is nagy a különbség. A fluorimetriás módszert kis koncentrációk mellett lehet és kell használni (ez μM-os koncentrációtartományt jelent), ami hozzájárult a módszer elterjedt használatához a vízben gyakran rosszul oldódó vegyületek vizsgálatakor. Az NMR módszer használatát a korlátozott oldhatóság gyakran eleve megakadályozza, technikailag is nehezebb feladat a ligandum jelein mért változásokat követni a fehérje mellett, de valóban szokás a ligandum jeleinek sávszélesedésén, relaxációs idejének megváltozásán keresztül jellemezni a kölcsönhatást a különböző 2D NMR-es technikák mellett [W. Becker, et al., ChemPhysChem 19 (2018) 895–906]. Mi a rutin ^{1}H NMR mérések mellett csak az STD („*saturation transfer difference*")-NMR technikát használtuk néhány esetben a kötődés tényének és mértékének megítélése céljából.

Fluorimetriás mérést végezve, ha a fehérje saját emissziójának megváltozását követjük, az a ligandum globális kötődéséről nem ad információt, csak az adott kötési helyen bekövetkező kötődést tudjuk jellemezni az emisszió megváltozását mérve. Általában valóban igaz, hogy egy kismolekula megkötődése a fehérje szerkezetében, így spektroszkópiai tulajdonságaiban (mint emisszió, fényelnyelés) sem okoz nagy változást, de a HSA esetében mégis lehetőségünk van a Trp emisszióján keresztül információt nyerni. Erre az ad lehetőséget, hogy a Trp-t szelektíven lehet gerjeszteni, és így

Szegedi Tudományegyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
MTA-SZTE Lendület Funkcionális Fémkomplexek Kutatócsoport
6720 Szeged, Dóm tér 7.
enyedy@chem.u-szeged.hu

a Tyr és Phe aminosavak emisszióját nem mérjük, másrészt a HSA-ban egyetlen egy Trp (Trp-214) van éppen a I. kötőhelynél. Ha a kismolekula ezen a kötőhelyen kötődik, nagyon gyakran az a Trp emissziójának teljes kioltását eredményezi, azaz a fehérje és a fehérje-ligandum adduktum „moláris emisszió"-ja jelentős mértékben fog különbözni. Ez a kioltás nem feltétlenül jelenti egy tényleges Trp – ligandum kötés létrejöttét, a Trp-214 emisszióját pl. ütközéses úton is kiolthatja egy – az I. kötőhelyen kötődő – kismolekula. A kötőhely markerekkel végzett kísérletekben pedig azt lehet kihasználni, hogy a kötött és a szabadon lévő marker emissziójában van nagy különbség olyan gerjesztési hullámhosszat választva, ahol a fehérje saját emissziójával már nem kell számolnunk.

***6. kérdés**: A 4.4. pontban leírt ciklikus voltammetriás mérésekben említi a réz(II) és vas(II) ionokat, valamint a tioszemikarbazont, mint ligandumot, de szívesen olvasnánk arról, hogy konkrétan milyen redoxi folyamatok játszódnak ott le.*

Válasz: A ciklikus voltammetriás módszerrel elsősorban a tioszemikarbazonok vas- és rézkomplexeit vizsgáltuk, főleg semleges pH-n, a méréstechnika nagyobb koncentrációigénye és a vegyületek korlátozott oldatósága miatt többnyire oldószerelegyben. A mérések során a Cu(II)/Cu(I) és a Fe(III)/Fe(II) elektonátmeneteket tanulmányoztuk a félérték potenciálok meghatározása céljából, melyek a Cu(II)- ill. Fe(III)-komplexek oxidáló képességéről adnak információt, a redukciós-oxidációs folyamatok reverzibilitásából pedig következetni lehet arra is, hogy vajon a ligandum mind a kétféle oxidációs állapotú fémionnal stabilis komplexet képez-e az adott körülmények között. Általános tapasztalat az volt, hogy a vizsgált vas biszkomplexek reverzibilis, kvázi-reverzibilis folyamatokat mutatnak $[Fe(III)L_2] \leftrightarrow [Fe(II)L_2]$ átalakulásokhoz köthetően; aminek az az oka, hogy ez a ligandumcsalád a Fe(II)- és Fe(III)-ionokkal is stabilis komplexet képez. A rézkomplexeknél viszont rendszerint csak a redukciós folyamatot lehetett detektálni, valószínűleg a képződő Cu(I)-komplexek kis stabilitása miatt. Megjegyzem, hogy a redoxi potenciálok alapján meg lehet becsülni, hogy pl. egy természetes redukálószer képes-e redukálni a Fe(III)- ill. Cu(II)-komplexeket, de a redoxi reakciók kinetikájának vizsgálata talán nagyobb jelentőségű ennek a kérdésnek az eldöntésére.

***7. kérdés**: A kapilláris zóna elektroforézis módszer ismertetésénél azt írja, hogy „az ionok a töltésüknek megfelelő elektród felé vándorolnak". Indokolt lenne ennél pontosabb megfogalmazás. Egyrészt, alapból, az ionok a töltésükkel ellentétes elektród felé vándorolnak (tehát pl. a negatív töltésűek az anód felé), másrészt viszont lehet, hogy az elektroozmotikus áramlás (EOF) megváltoztatja az áramlási irányt.*

Válasz: Köszönöm a bíráló megjegyzését az oldott anyagok vándorlására vonatkozóan, elfogadom, hogy elnagyoltan írtam erről. Az elektromos térben egy ion vándorlása az alkalmazott feszültség és a kapilláris hossza mellett az ion elektroforetikus mozgékonyságától függ, az pedig alapvetően függ az ion töltésétől és méretétől. Az oldott anyag mozgékonyságán alapuló áramlásához hozzáadódik a vivő elektrolit (puffer) elektroozmotikus áramlása. Általában az áramlás a kapillárisban az anódtól a katód felé történik, de nemcsak a kationok vándorolnak a katód felé, hanem az anionok is, hiszen az elektroozmotikus áramlás minden oldott részecskét azonos irányban mozgat, de ennek megfelelően a

Szegedi Tudományegyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
MTA-SZTE Lendület Funkcionális Fémkomplexek Kutatócsoport
6720 Szeged, Dóm tér 7.
enyedy@chem.u-szeged.hu

detektornál először a kationok, majd a semleges részecskék és végül a negatívan töltött ionok jelennek meg.

***8. kérdés**: A kapilláris zónaelektroforézis módszer leírásánál azt mondja, hogy „A nem kötött vegyülethez rendelt csúcs csúcsmagasságát ill. a csúcs alatti területét követtük." Itt a nem kötött vegyület nyilván a ligandum, azaz a „kismolekula", ami általában gyors cserereakcióban kötődik a fehérjéhez, amely reakciónak az időállandója összehasonlíthatatlanul rövidebb, mint a kapilláris elektroforézis néhány perces futamideje. így a ligandum végül is egy csúcsot ad, hacsak nem képződik egy erősen inert asszociátum. Fennállte méréseikben ez az utóbbi helyzet, ami indokolná annak hangsúlyozását, hogy a nem kötött vegyülethez rendelt csúcs magasságát mérték?*

Válasz: A kapilláris zónaelektroforézis módszer valóban elsősorban azokban az esetekben használható jól, amikor inert adduktumok képződnek, pl. amikor egy fémkomplex koordinációs kötéssel kötődik a fehérjéhez és a képződő adduktum disszociációja lassú. Ilyen helyzet állt fent a $Rh(\eta^5\text{-}C_5Me_5)$- és $Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})$-komplexeknél. A gyors egyensúlyi folyamatok esetében számolni kell a fehérjéről disszociálódó ligandummal a kapillárisban, erre utalhat ez elektroferogramon a ligandumhoz és a fehérje/fehérje-ligandum adduktumhoz tartozó csúcsok nem megfelelő elválása, a ligandumcsúcsok kiszélesedése. Ezekben a kísérletekben a nemkötött ligandumhoz rendelt csúcsok változását figyeltük meg a különböző fehérje-ligandum arányú mintákban, pl. a HSA-KP1339-warfarin rendszerben a nem-kötött warfarin csúcsának a növekedését követtük a versengő fémkomplex koncentrációjának növelésének hatására [ld. O. Dömötör et al., J. Biol. Inorg. Chem. 18 (2013) 9–17, 7. ábra], és a szabad warfarin koncentrációjának növekedését a csúcsmagasság alapján mértük. A részletezett gyors cserefolyamatok problémája miatt ezekből a mérésekből kapott egyensúlyi állandókat nem lehet nagyon komolyan venni (nem is egyeztek jól a más módszerből kapottakkal), itt pusztán a kötőhelyért való versengést szerettük volna igazolni ezzel a módszerrel is.

***9. kérdés**: Vizsgálták a KP1019 és a KP1339 vegyületek humán szérum albuminhoz való kötődését, és az eredményekben az 1. táblázat adatai szerint, főleg a legmegbízhatóbbnak tekintett PSEQUAD kiértékelés szerint határozott különbségeket találtak (bár ezt a 46. oldalon leírtakban nem erősíti meg). Mivel az említett két vegyület (2. ábra) csak az ellenionban (indazolium ill. nátrium) különbözik egymástól (amely ellenion vizes oldatban ráadásul a ruténium komplextől minden bizonnyal disszociált állapotban van), gondoltak-e arra, hogy magának az indazoliumnak, esetleg a nátriumnak a humán szérum albuminhoz való kötődését külön (tehát a ruténium komplex nélkül) is megvizsgálják, ami az egyébként igen bonyolult, legalább terner rendszer egyszerűsödését és az eredmények könnyebb értelmezhetőségét jelenthetné.*

Válasz: A KP1019-ben lévő indazólium ellenion kölcsönhatását tanulmányoztuk az albuminnal és az I. kötőhelyen nem, a II. kötőhelyen csak egy viszonylag gyenge kötődést találtunk. Az indazol saját emisszióját figyelembe vettük ugyanakkor a számoláskor. A nátriumionok kölcsönhatását nem vizsgáltuk, mivel a puffer jelentős mennyiségű NaCl-ot tartalmazott (150 mM) minden esetben, ami jóval nagyobb a komplexek koncentrációjánál. Mindez nem indokolja a Trp-kioltásos kísérletben a

Szegedi Tudományegyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
MTA-SZTE Lendület Funkcionális Fémkomplexek Kutatócsoport
6720 Szeged, Dóm tér 7.
enyedy@chem.u-szeged.hu

KP1339 komplexnél kapott kisebb állandókat, miközben az I. kötőhely markerének, a warfarinnak a kiszorításából számolt állandó igen hasonló a két komplexre. Ezt az ellentmondást, csak úgy tudtuk megmagyarázni, hogy a KP1339 komplexnél feltehetően a koordinált indazol ligandum kis része disszociál, és a szabad indazol relatíve nagy emissziója a kioltásos kísérletnél kisebb állandót eredményez. (A warfarinnal és danzil-glicinnel történő mérések nagyobb gerjesztési hullámhosszaknál történnek, ott ez kevésbé zavaró hatás.) A KP1019 komplexnél az indazólium ellenion jelenléte visszaszoríthatja ezt a disszociációt.

***10. kérdés**: A KP1019 és a KP1339 vegyüetek humán szérum albuminhoz való kötődésekor a kötőhely azonosítására kompetíciós reakciókat használtak, tekintve, hogy a humán szérum albumin több kötőhelyet tartalmaz, melyek közül a warfarin az I. kötőhelyhez, a danzil glicin viszont a II. kötőhelyhez kötődik amint ezt irodalmi adatok mutatják. Kérdés (és ez az irodalmi adatokra vonatkozik, hogy a humán szérum albumin zsebeiben mennyire szelektív (netán kizárólagos) a warfarin ill. a danzil-glicin ilyetén kötődése.*

Válasz: A szakirodalomban széles körben elfogadott a warfarin I. kötőhelyen való megkötődése [G. Sudlow, et al., Mol. Pharmacol. 11 (1975) 824–832], röntgenkrisztallográfiás módszerrel is igazolták ezt [I. Petitpas, et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 22804–22809]. Másodlagos kötőhelyként a III. kötőhelyet említik (IB aldomén) [F. Zsila, Mol. Pharmaceutics 10 (2013) 1668–1682]. A II. kötőhelyen általában semleges, vagy negatívan töltött vegyületek kötődnek, pl. diazepam, ibuprofen és számos danzil-származék is: danzil-szarkozin, danzil-Phe, danzil-norvalin és idesorolják a danzil-glicint is, ezek legtöbbjére röntgenszerkezet is elérhető [C.F. Chignell, Mol. Pharmacol. 5 (1969) 244–252, F. Zsila, Mol. Pharmaceutics 10 (2013) 1668–1682]. A danzil-glicin másodlagos kötőhelyen való megkötődéséről nem találtunk információt a szakirodalomban. Ezekben a kiszorításos kísérletekben 1:1 arányú albumin-kötőhely marker mintákat használunk kis koncentrációkban dolgozva (főleg 1 μM), és ilyen körülmények mellett a marker molekula megkötődése nem 100%-os, így egy második molekula megkötődése a másodlagos kötőhelyen nem valószínű.

***11. kérdés**: A 30. ábrán is látható módon – mint írja is – korreláció van a $pK_a[ML]$ és a $lgK'(H_2O/Cl^-)$ értékek között. Próbálták-e ezt a jelenséget a Lewis-féle savbázis elmélet Pearson-féle értelmezésével magyarázni?*

Válasz: A kétfogú ligandumok félszendvics $Rh(\eta^5\text{-}C_5Me_5)$-komplexeinél megfigyeltük a kloridionok és hidroxidionok felé mutatott affinitások közötti korrelációt (azaz a $pK_a[ML]$ és a $lgK'(H_2O/Cl^-)$ értékek közötti összefüggést), ami nem meglepő tekintve a kétféle anion 'hard' Lewis bázis karakterét. Azaz azokhoz a komplexekhez, melyek kisebb pK_a-val jellemezhetők, a kloridion erősebben koordinálódik. A semleges (N,N) donoratomokat tartalmazó ligandumok komplexeinek nagyobb pozitív töltése (erősebb Lewis sav jellege) is bizonyára hozzájárul ahhoz, hogy ezeknek a komplexnek nagyobb a Cl^-/OH^- ionok felé mutatott affinitása az (O,N) ligandumok komplexeihez képest.

Szegedi Tudományegyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
MTA-SZTE Lendület Funkcionális Fémkomplexek Kutatócsoport
6720 Szeged, Dóm tér 7.
enyedy@chem.u-szeged.hu

***12. kérdés**: Mint a 77. oldalon írja, a gallium komplexeknél vizsgálták a kis molekulatömegű ligandumok (citrát, foszfát, oxalát) hatását a komplexek stabilitására. Ez a kérdés más összefüggésben, az értekezés egyéb részein is felvetődik, tekintve, hogy a pH beállításra használt pufferek – többek közt – foszfátot tartalmaznak, ami nyilván nemcsak a pH beállítás, hanem a koordinációs egyensúlyok szempontjából is szerepet játszik. Vizsgálták-e ezt a kérdést a többi fémion komplexeinél?*

Válasz: Ahogyan a 3. kérdésre adott válaszban is írtam, a pufferként használt vegyületektől is kémiai inertséget várunk, de ez nagyon sok esetben sajnos nem teljesül elsősorban a pufferek koordinációja miatt, pl. HEPES, foszfát esetében ez gyakran megtörténik. Egy gyenge kölcsönhatás is zavaró lehet a pufferek nagy koncentrációban való alkalmazásakor. A pufferek kiválasztásakor meg szoktuk vizsgálni, különösen új típusú komplexek esetében, ennek lehetőségét, pl. így jártunk el a félszendvics ruténium-, ródiumkomplexek, vagy a klasszikus ruténiumkomplexek (pl. KP1019) vizsgálatakor. A pufferrel beállított pH-n megvizsgáljuk, hogy a komplexek (pl. ^{1}H NMR, UV-látható) spektruma mennyire tér el a csak erős sav/erős bázis hozzáadásával beállított azonos pH-jú oldatra felvettől. Azt a puffert használtuk, ami a leginkább „ártatlannak" tűnt.

***13. kérdés**: A 101 – 102. oldalon azt olvashatjuk, hogy vizsgálták a tioszemikarbazon típusú ligandumok lipofilitását és nem találtak összefüggést a logD és az IC_{50} értékek között. Ehhez annyi kommentárt érdemes fűzni, hogy a logD és az IC_{50} egyaránt fontos adatok, de míg az IC_{50} értékek főleg a farmakodinámiás tulajdonságokkal függenek össze, addig a logD adatok a farmakokinetikai viselkedésre lehetnek prediktorok, így nem különösebben meglepő, hogy az in vitro sejtes IC_{50} és a logD adatok közt nem mutatkozott összefüggés.*

Válasz: Természetesen elfogadom és osztom a bíráló véleményét. A vegyületek lipofilitása befolyásolhatja a sejtes felvételüket, de hasonló lipofilitású vegyületeknél valóban nem várható összefüggés a két adatsor között, hiszen az IC_{50} értékeket valóban a kiváltott biológiai hatás fogja elsősorban meghatározni.

Az utolsó pontban összegyűjtött stilisztikai és az egyéb megjegyzéseket elfogadom és köszönöm.

Végezetül szeretném még egyszer megköszönni professzor úr alapos munkáját, elismerő szavait és a téma kutatása szempontjából előremutató javaslatait.

Szeged, 2020. június 25.

Enyedy Éva Anna
.....
Dr. Enyedy Éva Anna
egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
MTA-SZTE Lendület Funkcionális Fémkomplexek Kutatócsoport
6720 Szeged, Dóm tér 7.
enyedy@chem.u-szeged.hu