RÁKELLENES FÉMKOMPLEXEK OLDATKÉMIÁJA ÉS FARMAKOKINETIKAI VISELKEDÉSÜKET BEFOLYÁSOLÓ TULAJDONSÁGAIK

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Enyedy Éva Anna

Szegedi Tudományegyetem 2019 dc_1661_19

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

RÁKELLENES FÉMKOMPLEXEK OLDATKÉMIÁJA ÉS FARMAKOKINETIKAI VISELKEDÉSÜKET BEFOLYÁSOLÓ TULAJDONSÁGAIK

Enyedy Éva Anna

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Kémiai Intézet, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

> Szeged 2019

dc_1661_19

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. A daganatos betegségek kezelése és a rákellenes platinakomplexek	3
2.2. Rákellenes ruténiumkomplexek	6
2.3. Rákellenes félszendvics fémorganikus ruténium- és ródiumkomplexek	10
2.3.1. Ruténium(η ⁶ -arén)-komplexek	10
2.3.2. Ródium(n ⁵ -arenil)-komplexek	15
2.4. Rákellenes gallium(III)komplexek	18
2.5. Tioszemikarbazonok és fémkomplexeik	21
2.6. Farmakokinetikai viselkedést befolyásoló tulajdonságok: a szérumfehérjékkel való	
kölcsönhatás szerepe	26
3. Célkitűzések	30
4. Alkalmazott vizsgálati módszerek	32
4.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok és komplexek	32
4.2. Fémkomplexek szintézise és röntgenkrisztallográfiai vizsgálata	33
4.3. Oldategyensúlyi vizsgálatok	33
4.3.1. pH-potenciometria	33
4.3.2. ¹ H NMR spektroszkópia	35
4.3.3. UV-látható spektrofotometria	36
4.3.4. Spektrofluorimetria	37
4.4. Ciklikus voltammetria	40
4.5. Elválasztási módszerek: ultraszűrés és kapilláris zónaelektroforézis	40
4.6. Kiegészítő módszerek	41
5. Eredmények és következtetések	43
5.1. Ruténium(III/II)komplexek vizsgálata	43
5.1.1. KP1019 és KP1339 kölcsönhatása humán szérum albuminnal	43
5.1.2. Ruténium(II)-nitrozil-indazol komplexek kölcsönhatása humán szérum	
albuminnal	48
5.2. Félszendvics organoruténium(II)- és organo7ródium(III)-komplexek vizsgálata	51
5.2.1. Félszendvics organoruténium(II)- és organoródium(III)-kationok hidrolitikus	
tulajdonságai és a ligandumok proton disszociációs folyamatai	51
5.2.2. Félszendvics organoruténium(II)- és organoródium(III)-kationok	
komplexképződési egyensúlyi folyamatai	54
5.2.3. Félszendvics organoruténium(II)- és organoródium(III)-komplexek	
kölcsönhatása humán szérum albuminnal	65
5.3. Galliumkomplexek vizsgálata	70
5.3.1. Galliumkomplexek oldategyensúlyi vizsgálata	70
5.3.1.1. Hidroxi-(tio)pironok galliumkomplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata	70
5.3.1.2. Az oxin és a szulfoxin galliumkomplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata	72
5.3.2. Galliumkomplexek kölcsönhatása humán szérumfehérjékkel	77
5.4. Tioszemikarbazonok és fémkomplexeik	83
5.4.1. Tioszemikarbazonok proton disszociációs folyamatai, izomerizációja és	
lipofilitása	
5.4.2. Tioszemikarbazonok réz(II)komplexei	89
5.4.3. Tioszemikarbazonok vas(II/III)komplexei	<u></u> 97
5.4.4. Tioszemikarbazonok gallium(III)- és vanádium(IV/V)komplexei	102
5.5. Rákellenes nemfémes vegyületek kölcsönhatása humán szérum albuminnal	105

5.5.1. Kumarin-származékok kölcsönhatása humán szérum albuminnal	106
5.5.2. Folsav-származékok kölcsönhatása humán szérum albuminnal	109
5.5.3. EGFR inhibitorok kölcsönhatása humán szérum albuminnal	111
6. Összefoglalás	115
7. Az eredmények várható alkalmazása	122
8. Irodalomjegyzék	123
8.1. Az értekezés alapját képező közlemények	123
8.2. Az értekezés anyagából nemzetközi konferenciákon bemutatott előadások	127
8.3. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó további fontosabb közlemények (2002-től)	128
8.4. Az értekezésben felhasznált irodalom	131
Köszönetnyilvánítás	139

dc_1661_19

A dolgozatban szereplő vegyületek nevének rövidítése:

2,4-dipic	piridin-2,4-dikarbonsav
2,5-dipic	piridin-2,5-dikarbonsav
2,6-dipic	piridin-2,6-dikarbonsav
2-QA	kinolin-2-karbonsav
3-AP	3-amino-piridin-2-karboxaldehid-tioszemikarbazon, triapin
3-iQA	3-izo-kinolinkarbonsav
3-Mepic	3-metil-pikolinsav
3OH-flavon	2-(4-fluoro-fenil)-3-hidroxi-4H-kromen-4-on
5-Brpic	5-bromo-pikolinsav
6-Mepic	6-metil-pikolinsav
8-HQ	8-kinolinol, 8-hidroxi-kinolin, oxin
8-HQS	8-hidroxi-kinolin-5-szulfonát, szulfoxin
AA	aszkorbinsav
acac	acetil-aceton
AcFTSC	2-acetil-piridin-tioszemikarbazon
allomaltol	5-hidroxi-2-metil-1,4-piron
apoTf	humán apo-transzferrin
APTSC	3-amino-piridin-2-karboxaldehid- N^4 , N^4 -dimetil-tioszemikarbazon
bpy	2,2'-bipiridin
BR	bilirubin
$C_5Me_5^-$	pentametil-ciklopentadienil-anion (Cp*)
ciszplatin	cisz-[Pt(II)Cl ₂ (NH ₃) ₂]
deferipron	1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridon
DG	danzil-glicin
dhp	deferipron, 1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridon
dmen	N,N'-dimetil-etilén-diamin
DMSO	dimetil-szulfoxid
DOTA	1,4,7,10-tetraazaciklododekán-N,N',N",N"'-tetraecetsav
DSS	4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav
EHMP	N-[(etoxi-karbonil)metil]-3-hidroxi-4-metil-2-piridon
EHP	N-[(etoxi-karbonil)metil]-3-hidroxi-2-piridon
en	etilén-diamin
etil-maltol	2-etil-3-hidroxi-1,4-piron
FaTSC	2-piridin-formamid-tioszemikarbazon
FTSC	2-formil-piridin-tioszemikarbazon
GaM	[trisz-maltoláto-gallium(III)]
GSH	L-glutation
HEPES	2-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]etánszulfonsav
HIm / Im	imidazólium / imidazol
HInd / Ind	indazólium / indazol
HSA	humán szérum albumin
karboplatin	cisz-[diamin-(ciklobután-1,1-dikarboxilát-O,O')-platina(II)]
KP1019	HInd <i>transz</i> -[Ru(III)Cl ₄ (Ind) ₂]
KP1339	nátrium <i>transz</i> -[Ru(III)Cl ₄ (Ind) ₂]
KP46	[trisz-(8-kinolinoláto)-gallium(III)]
L-Pro-FTSC	3-metil-(S)-pirrolidin-2-karboxilát-2-formil-piridin-tioszemikarbazon

dc_1661_19

L-Pro-STSC	(E)-1-(3-((2-karbamo-tioil-hidrazono)metil)-2-hidroxi-5-etil-benzil)pirrolidin-2-karbonsav
maltol	3-hidroxi-2-metil-1,4-piron
Me ₂ N-APTSC	(E)-2-((3-(dimetil-amino)piridin-2-il)metilén)- <i>N</i> , <i>N</i> -dimetil-hidrazin-karbotioamid
Me ₂ N-triapin	(E)-2-((3-(dimetil-amino)piridin-2-il)metilén)hidrazin-karbotioamid
MES	2-(<i>N</i> -morfolino)etán-szulfonsay
Morf-PTSC	(E)- <i>N</i> . <i>N</i> -dimetil-2-((6-(morfolino-metil)piridin-2-il)metilén)hidrazin-karbotioamid
mPip-PTSC	(E)- <i>N</i> , <i>N</i> -dimetil-2-((6-((4-metil-piperazin-1-il)metil)piridin-2-il)metilén)hidrazin-
1	karbotioamid
\mathbf{NAD}^+	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NAMI-A	HIm <i>transz</i> -[Ru(III)Cl ₄ (Im)(DMSO)]
NOTA	1,4,7-triazaciklononán-N,N',N"-triecetsav
O-triapin	3-amino-pridin-2-karboxaldehid-szemikarbazon
oxaliplatin	[((1R,2R)-1,2-ciklohexán-diamin)-oxaláto-platina(II)]
PTA	1,3,5-triaza-7-foszfa-adamantán
<i>p</i> -cimol	1-metil-4-(propán-2-il)benzol
phen	1,10-fenantrolin
PHQ	7-(1-piperidinil-metil)-8-kinolinol
pic	2-pikolinsav
pin	2-pikolil-amin
рр	polipiridil
PTSC	piridin-2-karboxaldehid- N^4 , N^4 -dimetil-tioszemikarbazon
RAPTA-C	$[\operatorname{Ru}(\eta^6-p\operatorname{-cimol})(\operatorname{PTA})\operatorname{Cl}_2]$
RM175	$[Ru(\eta^6-bifenil)(en)(Cl)]PF_6$
RNR	ribonukleotid reduktáz
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
Se-triapin	3-amino-piridin-2-karboxaldehid-szelenoszemikarbazon
SSC	szalicilaldehid-szemikarbazon
STSC	szalicilaldehid-tioszemikarbazon
Tf	humán szérum transzferrin
tioallomaltol	5-hidroxi-2-metil-4H-pirán-4-tion
tiomaltol	3-hidroxi-2-metil-4H-pirán-4-tion
tmeda	N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin
triapin	3-amino-piridin-2-karboxaldehid-tioszemikarbazon, 3-AP
TSK	tioszemikarbazon
WF	warfarin

Az aminosavakat a szabályszerű hárombetűs kódjukkal jelölöm a dolgozatban.

Egyéb rövidítések:

ADME	abszorpció, disztribúció, metabolizmus, exkréció
a.u.	önkényes egység ('arbitrary unit')
β	stabilitási szorzat (lg β : β tízes alapú logaritmusa)
β'	látszólagos stabilitási szorzat (lg β ': β ' tízes alapú logaritmusa)
СТ	töltésátviteli
CZE	kapilláris zónaelektroforézis
D	megoszlási hányados (lgD: D tízes alapú logaritmusa)

D_{74}	megoszlási hányados pH = 7.4-n
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ER	endoplazmatikus retikulum
ESI-MS	elektroporlasztásos ionizációjú tömegspektrometria
ESR	elektronspin rezonancia
FDA	Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal (USA)
FRET	fluoreszcens rezonancia energia transzfer
HMM	nagy molekulatömegű, ' <i>high molecular mass'</i>
Ι	ionerősség
IC ₅₀	maximális gátlási koncentráció fele; itt: az a koncentrációérték, aminél a vizsgált sejtkultúrában a sejtek 50%-a elpusztul a megadott inkubációs idő alatt
ICP-MS	induktívan csatolt plazma-tömegspektrometria
Int.	intenzitás
Ka	proton disszociációs állandó (p K_a : K_a tízes alapú negatív logaritmusa)
K _D	disszociációs állandó (fehérje-ligandum adduktumokra)
$K_{ m w}$	vízionszorzat (p K_w : K_w tízes alapú negatív logaritmusa)
K'	látszólagos egyensúlyi állandó
LMM	kis molekulatömegű, 'low molecular mass'
NMR	mágneses magrezonancia
Р	megoszlási állandó (lgP: P tízes alapú logaritmusa)
PBS	foszfát pufferes sóoldat, 'phosphate-buffered saline'
PBS'	módosított foszfát pufferes sóoldat
PET	pozitron emissziós tomográfia
pМ	a ligandumhoz nem kötött fémion egyensúlyi koncentrációjának tízes alapú negatív
	logaritmusa
ROS	reaktív oxigén származékok, 'reactive oxygen species'
S	oldhatóság
SPECT	egyfotonos emissziós tomográfia

telítés-átvitel differencia, 'saturation transfer difference' mágneses magrezonancia

időkorrelált egyfoton számlálás, 'time correlated single photon counting'

dc_1661_19

STD NMR

optikai úthossz

emissziós hullámhossz

gerjesztő hullámhossz

fluoreszcencia-élettartam

TCSPC

l

 λ_{EM}

 λ_{EX}

τ

dc_1661_19

1. Bevezetés

A daganatos megbetegedések száma a fejlett országokban a várható élettartam növekedésével párhuzamosan jelentősen megemelkedett az utóbbi évtizedekben; a statisztikai adatok szerint az összes haláleset legalább negyede összefüggésbe hozható a rákbetegséggel [1]. A tumor típusától, méretétől, elhelyezkedésétől és stádiumától függően különböző kezeléseket alkalmaznak, mint a daganat sebészi úton való eltávolítása, a sugárterápia és a gyógyszeres kezelések (mint a hormon-, kemoterápiás és molekuláris támadáspontú szerek használata). Jelenleg ~140 kemoterápiás hatóanyag van törzskönyvezve, de a forgalmazott gyógyszerek száma ettől jóval nagyobb az eltérő gyógyszertechnológiai megoldások és gyártók miatt. A kemoterápiás gyógyszerek közül kiemelt fontosságú a platina(II)-tartalmú ciszplatin, melyet több mint 40 éve alkalmaznak mono- és kombinált rákterápiákban [2]. Alkalmazhatóságát azonban gyakran korlátozzák a fellépő súlyos mellékhatások és a kialakuló rezisztencia. Az eddig törzskönyvezett másik két platina(II)komplex (karboplatin és oxaliplatin) ugyan más hatásspektrumú és kedvezőbb mellékhatás-profilú, de rezisztencia ezeknél is fellép. Ennek ellenére a daganatos betegségek kezelésének közel 50%-a során alkalmaznak valamilyen platinakészítményt [3]. Ugyanakkor a nemfémes daganatellenes gyógyszerek alkalmazása során is gyakran jelentkeznek hasonló problémák. Mindezek erősen ösztönzik olyan új vegyületek előállítását és vizsgálatát – köztük fémtartalmúakét is –, melyek hatékonyabbak, mint a jelenleg használatban lévők, de kisebb az egészséges sejtek felé mutatott toxicitásuk, azaz kellően szelektívek, így alkalmazásuk enyhébb mellékhatásokkal jár. Az immunterápiás kezelések, mint pl. a monoklonális antitestek bevezetése, nagyon fontos előrelépést jelentenek a tumorterápiában, de jelenleg klinikai alkalmazásuk leginkább valamilyen kismolekulás kemoterápiás szer (köztük gyakran éppen egy platinakomplex) együttes történik. kismolekulás használata mellett А gyógyszerhatóanyagok közül а legbiztatóbbaknak az epidermális növekedési faktor receptor (EGRF) tirozin-kinázgátlókat tartják, melyekkel – szemben a citosztatikus szerekkel – célzott onkológiai kezelés vált lehetővé egyes ráktípusok esetén.

Az utóbbi évtizedekben számos rákellenes hatású platina-, ruténium-, gallium-, arany- és más fémion-tartalmú komplexet állítottak elő és teszteltek *in vitro*, illetve *in vivo*. A klinikai vizsgálatokba került nem-platina fémkomplexek között kiemelkednek a ruténium-tartalmú NAMI-A, KP1019, KP1339 kódú vegyületek és a fotodinámiás polipiridil-típusú TLD1433 kódú komplex, valamint a gallium(III)ionnak a maltollal és a 8-hidroxi-kinolinnal képzett komplexei. A fémkomplexek rákellenes terápiás szerként való alkalmazásával szembeni idegenkedés egyik oka az, hogy hatásmechanizmusuk általában összetett, a konvencionális gyógyszermolekulákhoz képest nehezebben tanulmányozható. A fémkomplexek gyakran 'prodrug'-nak tekinthetők, azaz jelentős változásokon mehetnek keresztül az emberi szervezetben a hatás helyszínéhez való megérkezésük előtt. Ezért a hatóanyagok racionális fejlesztési és optimalizálási folyamata során kiemelkedően fontos a klinikumba került és a lehetséges gyógyszerjelölt vegyületek oldatbeli viselkedésének, a farma-kokinetikai tulajdonságaikat befolyásoló tényezőknek és a biológiai folyadékokban lejátszódó biotranszformációs folyamataiknak minél mélyebb ismerete. Ehhez szükséges a vegyületek fizikai-kémiai alaptulajdonságainak (pl. oldhatóság, lipofilitás, proton disszociációs állandó) megismerése mellett fémkomplexek esetén a vizes oldatbeli stabilitásuk, aktuális megjelenési formájuk és redoxi tulajdonságaik jellemzése is. A vérszérum transzportfehérjéivel való kölcsönhatás jellegének és mértékének leírása is fontos, mert az befolyásol(hat)ja a hatóanyag eloszlását és tartózkodási idejét a vérben. A humán szérum albuminhoz való kötődés ugyanakkor a célba juttatást is hatékonyan segítheti a tumorszövetekben megfigyelhető szövetközi folyadékpangás okozta fokozott permeabilitás és visszatartás hatásnak köszönhetően. A fémvegyületek humán szérum transzferrinhez való kötődése szintén növelheti a rákos sejtek felé mutatott szelektivitást az azokban fokozottan működő transzferrin receptor rendszer miatt. Az ilyen jellegű oldatkémiai vizsgálatok meglehetősen hiányosak a szakirodalomban az általam tanulmányozott vegyületcsaládok esetén, viszont kapcsolatot jelentenek a molekulatervezés, a szintetikus munka és a biológiai hatás mérése és értelmezése között.

Doktori dolgozatomban ruténium(III)-, gallium(III)komplexek, félszendvics típusú fémorganikus ródium(III)(η^5 -arenil)-, ruténium(II)(η^6 -arén)-komplexek, tioszemikarbazonok fémkomplexei és egyes nemfémes rákellenes vegyületek (pl. epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) gátlók) esetén kapott eredményeimet foglalom össze.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A daganatos betegségek kezelése és a rákellenes platinakomplexek

A bioszervetlen kémia egyik kiemelt ága az orvosi/gyógyászati szervetlen kémia, mely fémkomplexek terápiás és diagnosztikai használatával, fémionok fiziológiai folyamatokban és betegségekben betöltött szerepével foglalkozik [4]. Bár egyes szervetlen vegyületek gyógyászati alkalmazása több ezer éves múltra tekint vissza, gondoljunk az ókori egyiptomiak és kínaiak nemesfém használatára [5], a fémtartalmú gyógyszerek terápiás és diagnosztikai céllal történő alkalmazása leginkább a XX. században nyert teret [6,7]. Megemlíthetem itt az idegrendszerre ható lítiumvegyületeket (pl. Li₂CO₃, bipoláris zavar kezelése), a gyulladásgátló aranyvegyületeket (pl. auranofin, reumás ízületi gyulladás ellenes szer), a fekélyellenes bizmutvegyületeket (pl. bizmut-szubszalicilát/szubcitrát), és az értágító hatású vas(II)-tartalmú nitroprusszid-nátriumot, vagy a klinikai vizsgálatokba került antidiabetikus vanádium(IV)komplexeket is [4-7]. A gadolínium(III)komplexek kontrasztanyagként való alkalmazásával a mágneses rezonancia képalkotás (MRI) során pl. a vérerek képének erősítése vagy a vér-agy gát funkcionális leromlásával összefüggő agydaganatok láthatóbbá tétele vált lehetővé [5,6]. A nukleáris medicinában is számos radioaktív fémkomplexet használnak orvosdiagnosztikai (pl. a hexametil-propilénaminoxim, bisz-tioszemikarbazonok ^{99m}Tc vagy a 8-hidroxi-kinolin (8-HQ) ¹¹¹In komplexe) és terápiás (pl. az etilén-diamin-tetrametilén-foszfonát¹⁵³Sm komplexe) célra.



1. ábra A klinikai használatban lévő platina(II)komplexek szerkezeti képlete.

A legnagyobb áttörést a fémvegyületek terápiás célú alkalmazásának területén ugyanakkor a ciszplatin (*cisz*-[diamin-diklorido-platina(II)], 1. ábra) rákellenes hatásának véletlen felfedezése [8], majd gyógyszerként való 1978-as törzskönyvezése jelentette [2]. Azóta is első vonalbeli szerként intravénás injekció formájában használják előrehaladott hererák, petefészekrák, húgyhólyag-, fej- és nyak-daganatok kezelésében. A ciszplatin a véráramból a sejtekbe passzív diffúzióval lép be [2,9], valamint egy réz-transzporter fehérje (Ctr1) aktív transzportja segítségével [9]. A komplexben koordinált közepes

labilitású klorido ligandumok a vérplazmához viszonyított kisebb kloridion-koncentrációjú citoplazmában, majd sejtmagban részben vagy teljesen vízre cserélődnek. Az így aktivált pozitív töltésű hidrolízistermékek elsősorban a DNS purin bázisaival (guanin N7) létesítenek koordinációs kötést. Keresztkötések alakulnak ki láncon belül ('intrastrand') vagy láncok között ('interstrand'), de egyfogú koordináció is megvalósulhat. Ez a DNS kettős spiráljának jelentős mértékű torzulásához vezet, ami pedig megakadályozza a DNSreplikációt és -transzkripciót [2,9]. A ciszplatin alkalmazhatóságát azonban korlátozzák a fellépő súlyos mellékhatások: hányinger, hányás, hasmenés, vese-, hallásés idegkárosodás [10,11]. A citotoxikus kemoterápiás szerek többsége ugyanis nem kellően szelektív, így ez a platinakomplex sem. A ciszplatin szelektivitását a tumorsejtek fokozott osztódása és anyagcseréje biztosítja, ez azonban sok egészséges sejtre is érvényes; innen származik a mellékhatások egy része (pl. a hányás, a vérképzőszervek érintettsége). Ugyanakkor a platina(II)ion nemcsak a DNS donoratomjaival, hanem kén donoratom tartalmú fehérjékkel, peptidekkel, aminosavakkal is létesíthet koordinációs kötést, ami összefüggésbe hozható a vese- és halláskárosodással [2,11]. A mellékhatások mellett a másik limitáló tényező a ciszplatinterápia során kialakuló rezisztencia [10,11]. Ezek az alapvető problémák indították el az újabb platina- illetve egyéb fémkomplexek fejlesztését és rákellenes hatásuk tesztelését, és vált ez a kutatási irány ma már egy igen fontos és meghatározó, ugyanakkor igencsak szerteágazó területévé a bioszervetlen/koordinációs kémiának.

A rák kezelésére a gyógyszerek használata (hormon-, citotoxikus kemoterápiás és kis molekulás célzott támadáspontú szerek) mellett alapvetően onkosebészeti eljárásokat és sugárterápiát alkalmaznak az egyre inkább előtérbe kerülő immunterápiás módszerekkel kiegészítve. Az egyre fejlettebb terápiás és diagnosztikai eljárások ellenére a daganatos megbetegedések kezelése még napjainkban is nagy kihívást jelent. Bár tagadhatatlan, hogy egyes daganattípusok (pl. Hodgkin-limfóma, hererák) túlélési rátája a korai felismerés és megfelelő kezelés mellett már viszonylag nagy, más rákfajtáknál még mindig rendkívül kicsi a gyógyulás esélye (pl. gyomorrák, májrák) [12]. A klinikai használatban lévő gyógyszereket gyakran kombinálják egymással a jobb hatás és a kevésbé megterhelő mellékhatások elérése céljából. A rákellenes gyógyszerek aktív hatóanyagai biológiai hatásukat és kémiai szerkezetüket tekintve is igen változatosak, hagyományosan a következő csoportokba szokás sorolni őket: DNS támadáspontú vegyületek (pl. platinakomplexek), antimetabolitok, alkilálószerek, citotoxikus antibiotikumok, topoizomerázgátlók, mikrotubulusra ható szerek, stb., valamint célzott hatású szerek, hormonok és monoklonális antitestek. Évente akár 10-15 új gyógyszer kerül klinikai használatba [13], és az új gyógyszerek kifejlesztésének célja egyrészt a nagyobb

4

szelektivitás elérése, másrészt a rezisztencia legyőzése. Az új kismolekulás hatóanyagok között egyre több a célzott támadáspontú vegyület, pl. az "tinib" végződésű tirozin-kináz inhibitorok (pl. erlotinib, gefitinib, imatinib), melyeknél enyhébb mellékhatások kísérik a kezelést. Ugyanakkor nem minden daganattípus esetén lehet ezeket a gyógyszereket használni és a kezelés által kiváltott hatás sem mindig megfelelő mértékű. Az immunterápiás kezelések, mint pl. a monoklonális antitestek alkalmazása (pl. rituximab) nagyon fontos előrelépést jelentenek az onkológiában elsősorban a non-Hodgkin limfómás és krónikus nyiroksejtes leukémiás betegek kezelésében. Ugyanakkor ezek a nagyon drága kezelések sem mentesek a mellékhatásoktól és alkalmazásukkor valamilyen hagyományos kismolekulás kemoterápiás szert – köztük gyakran éppen egy platinakomplexet – használnak, mert önállóan nem kellően hatékonyak [14]. A felsoroltak hozzájárulnak ahhoz, hogy egyelőre nem csökken a kutatói (és piaci) érdeklődés a kis molekulatömegű, klasszikus kemoterápiás hatóanyagok kifejlesztésére és tesztelésére vonatkozóan sem.

A ciszplatint követően még két másik platinakomplexet törzskönyvezett az amerikai Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal (FDA), a karboplatint (cisz-[diamin-(ciklobután-1,1-dikarboxilát-O,O')-platina(II)], petefészekrák kezelése) 1989-ben, és az oxaliplatint ([((1R,2R)-1,2-ciklohexán-diamin)-oxaláto-platina(II)], vastagbélrák kezelése) 2002-ben (1. ábra). Mindkettőben a távozó ligandum (dikarboxilát) a ciszplatinban lévő koordinált kloridmhoz képest valamelyest inertebb, mellyel a mellékhatások összességében mérséklődnek, és az oxaliplatin a ciszplatin-rezisztens tumorokkal szemben is hatékony [10]. Ennek ellenére a karboplatin hánytató- és csontvelő károsító hatása és az oxaliplatin zsibbadtságot okozó hatása – főleg hidegérzet miatt – igen gyakran jelentkezik [15,16]. A kemoterápiás kezelések közel felénél használnak valamilyen platinakomplexet önállóan, vagy más gyógyszerrel kombinálva (pl. bleomicin, vizsgálatba azóta számos vinblastin) [10]. Klinikai ígéretes platina(II)ill. platina(IV)komplex került (pl. nedaplatin és miriplatin (Japánban törzskönyvezettek: 1995, ill. 2009); heptaplatin (Dél-Koreában törzskönyvezett: 1999) lobaplatin (Kínában törzskönyvezett: 2003), lipoplatin (fázis III), satraplatin (fázis III)), de egyik sem lett egyelőre világszerte törzskönyvezett gyógyszer [16,17]. A platina(IV)komplexek kinetikailag inertebbek, többnyire szájon át adhatók. A platina(II)komplexekhez képest további két axiális ligandum beépítésére van lehetőség, melynek megfelelő megválasztásával farmakokinetikai viselkedés finomhangolható [18,19]. a Hatásmechanizmusuk alapján redukciójukkal (elsősorban a rákos sejten belül) az axiális ligandumok disszociálnak és a visszamaradó platina(II)komplex a klinikai gyakorlatban használtakhoz hasonlóan tudja kifejteni hatását [18,19]. Emellett ismertek olyan fotoaktivált platina(IV)-dijodido, és -diazidokomplexek is, melyekből fény hatására összetett reakciók révén alakulnak ki az aktív platina(II)komplexek [20].

A platina mellett a platinacsoportba tartozó elemek (Ru, Rh, Pd, Os, Ir) közül kiemelkedik a ruténium, melynek rákellenes komplexei közül több klinikai kipróbálásra is került, melyeket a következő fejezet mutat be részletesen.

2.2. Rákellenes ruténiumkomplexek

A ruténiumkomplexek rákellenes hatása viszonylag már régóta ismert, pl. a *fac*-[Ru(III)(NH₃)₃Cl₃] komplex egyértelműen hatékony volt *in vivo* szarkómás egereken végzett kísérletekben, de a továbblépést a vízben való rossz oldékonysága nem engedte meg [21,22]. Az oldhatóság növelése érdekében indultak el a koordinált klorido ligandumok számának növelése mellett az egyfogú aromás-nitrogén donoratomokat tartalmazó – elsősorban azol-típusú ligandumokkal – képzett komplexek fejlesztése. Az 1980-as években kifejlesztett komplexek közül kiemelkedett az imidazol-tartalmú KP418 vegyület (2. ábra), melyet Keppler kutatócsoportjában állítottak elő, és leukémia, valamint melanóma esetén mutatott jelentős antitumor hatást rágcsálóknál [23].



2. ábra A KP418 és a klinikai kipróbálásra került ruténium(III)komplexek szerkezeti képlete.

A KP418-cal rokonszerkezetű a Sava és munkatársai által kifejlesztett NAMI-A komplex (2. ábra), melyben az egyik imidazol helyett dimetil-szulfoxid (DMSO) koordinálódik a fémionhoz [24]. Mindkét anionos komplex ellenionja egy imidazólium kation. A NAMI-A *in vitro* humán rákos sejtvonalakon végzett vizsgálatokban nem bizonyult citotoxikusnak, viszont az egereken kapott *in vivo* eredmények kiváló áttétképződés-gátló hatást mutattak [25]. Ugyanakkor a primer tumorokon nem volt mérhető hatása, ami alapján már a kezdetekben is a ciszplatinétól eltérő

hatásmechanizmust javasoltak. A NAMI-A is képes a DNS-hez is kötődni, de elsősorban a sejtfelületen lévő aktin-típusú fehérjékkel és az extracelluláris mátrix kollagénjével lép kölcsönhatásba, megakadályozva a kóros sejtcsoportok leszakadását és szóródását a szervezetben [24]. Röntgenfluoreszcencia mikroszkópos és röntgenabszorpciós spektroszkópiás vizsgálatok azt bizonyították, hogy a sejtekbe ez a komplex alig lép be. A NAMI-A-val 1999-ben kezdődtek a humán kísérletek; ez volt az első ruténiumkomplex, ami klinikai fázis I vizsgálatokba került [26], amit még több fázis I/II tesztelés követett. Monoterápiákban azonban csak mérsékelten bizonyult tolerálhatónak, az ujjakon fájdalmas hólyagképződést okozott, és a 2008-ban végzett gemcitabinnal kombinált klinikai fázis II vizsgálatokban nem mutatott szinergista hatást [27]. Ezen vizsgálatok kedvezőtlen kimenetele miatt azóta a NAMI-A-val nem történtek további humán kísérletek.

Keppler és munkatársai legsikeresebb fejlesztésének a bisz-indazol komplexek tekinthetők. Az indazólium-transz-[tetraklorido-bisz(1H-indazol)rutenát(III)], azaz a KP1019 komplex (2. ábra) humán sejtvonalakon mért citotoxicitása és patkányok vastagbélrákos tumorjain mutatott aktivitása igen ígéretesnek bizonyult [28]. A sikeres preklinikai in vitro és in vivo eredményeket követően a komplex klinikai fázis I vizsgálatokba került [29]. A monoterápiás alkalmazásnál a betegek mérsékelten, de pozitívan reagáltak a kezelésre, főleg a vastagbélrákban szenvedők, és kevesebb, mint 20%-nál jelentkezett mellékhatás (kimerültség, hányás, dehidratáció) [29,30]. A dózis emeléséhez, azonban nem volt megfelelő az intravénásan adagolt komplex vízben való oldhatósága. Emiatt a nátrium sójának (KP1339, 2. ábra) vizsgálatára tértek át, mely sikeresen túljutott klinikai fázis I vizsgálatokon [30], és kombinált terápiákban pedig szinergizmust mutatott gemcitabinnal [31]. A KP1019/1339 komplexek képesek kölcsönhatásba lépni a DNS-sel, de az in vivo vizsgálatok alapján elsősorban fehérje támadáspontokat valószínűsítenek. A legfrissebb eredmények alapján a KP1339 az endoplazmatikus retikulumban (ER) lévő stresszprotein GRP78 szintjét csökkenti és ezáltal váltja ki az apoptózist az ER-stresszre érzékenyebb, intenzíven osztódó rákos sejtekben [29,32].

A KP1019/1339 komplexek vizes oldatban hidrolizálnak, a klorido ligadumok vízmolekulákra cserélődnek, ugyanakkor a hidrolízis sebessége a hőmérséklet, ill. a pH emelésével megnő, valamint HCO_3^- jelenléte szintén fokozza a hidrolízis mértékét [33]. Fiziológiás körülmények között a ruténium +2-es és +3-as oxidációs állapotban fordul elő. A ligandumcsere folyamatok sebessége általában a Ru(II)-komplexek esetén gyorsabb [34]. A komplexek aktiváláshoz szükséges a $CI^- \rightarrow H_2O$ cserefolyamat, melyet a target fehérje donoratomjának koordinációja követ. Emiatt feltételezték a komplex aktiválódását a redukciójuk által ('*activation by reduction*' hipotézis) [29]. XANES ('*X-ray absorption*

near-edge spectroscopy') röntgenabszorpciós spektroszkópiai módszerrel bizonyították, hogy a hipoxiás (oxigénhiányos) szövetekben valóban bekövetkezik a $Cl^- \rightarrow fehérje$ donoratom (elsősorban S) cseréje és a fémion redukciója [32,35].

A KP1019 és KP1339 farmakokinetikai vizsgálatai azt mutatták, hogy a komplexek viszonylag gyorsan és szinte teljes mértékben (99%) a szérumfehérjékhez kötődnek az intravénás adagolást követően [36], így előtérbe került a fémkomplexek humán szérum albuminnal (HSA) és transzferrinel (Tf) való kölcsönhatásának vizsgálata. Ezen két fehérje nagyobb koncentrációban található meg elsősorban szolid (azaz nem vérképzőszervi, vagy nyirokcsomó eredetű) tumorok közelében a fokozott permeabilitás és visszatartás hatás következtében (ld. 2.6. fejezet). A Tf (és a benne kötött vasion, ill. egyéb fémion) ugyanakkor nagyobb mennyiségben kerül felvételre a Tf receptorokat fokozottan kihelyező rákos sejtekbe, azok emelkedett vasigénye miatt. A komplexek az in vitro mérések alapján képesek kölcsönhatásba lépni a Tf-nel [37], emiatt hosszú évekig a Tf-t tartották ezen Ru(III)-komplexek fő transzportfehérjéjének. Ezek alapján a komplexek Tf-adduktumként a Tf-receptorokon keresztüli sejtes felvételét javasolták, "trójai faló" elméletként nevezve ezt a feltételezést [29]. KP1339 komplexszel kezelt egerek vérplazmájának és plazmamodellek kapilláris zónaelektroforézis (CZE) - induktívan csatolt plazmatömegspektrometria (ICP-MS) és gélkromatográfia - ICP-MS analízise azonban azt mutatta, hogy a komplexek egy gyors folyamatban leginkább a HSA-hoz kötődnek [38]. A KP1019 plazmamodellek végzett CZE-ICP-MS mérései szerint is a fiziológiás arányokat közelítő 10:1 arányú HSA:Tf keverékben a komplex 98%-a HSA-hoz kötődött [39]. Elektronspin rezonancia spektroszkópia (ESR) mérések alapján Walsby és munkatársai munkánkkal párhuzamosan megállapították, hogy a KP1019 a HSA-hoz először másodlagos kölcsönhatások révén kötődik, majd egy lassú folyamatban a kloridionok részleges elvesztésével koordinatív kötés alakul ki [40]. A fehérjével való kölcsönhatás során a fémion oxidációs állapota nem változik. Míg a KP1019 a Tf-hez kizárólag koordinatív kötéssel tud kötődni és a kémiai egyensúly beállásához több órára van szükség [40]. A másodlagos kémiai kötéseken keresztüli albuminnal való kölcsönhatás természetére vonatkozó - mint az adduktumok képződési sebessége, a kötés erőssége és helye – részletes vizsgálatok azonban nem történtek.

A humán vizsgálatokig eljutó ruténium-komplexek sikere továbbra is ösztönzően hat újabb fémvegyületek előállítására. A szakirodalomban a bisz-azol, tetraklorido komplexek mellett számos példát találhatunk biológiailag aktív ligandumok Ru(III)komplexeire is [41,42], de egyaránt intenzíven kutatott területnek számít a fotoaktivált Ru(II)-komplexek kifejlesztése is [43]. Ennek a kutatómunkának az eredménye, hogy 2016-ban egy újabb ruténiumkomplex került jutott klinikai fázis I vizsgálatokba: a

8

fotodinámiás terápiás céllal használni kívánt Ru(II)-polipiridil komplex ([Ru(II)(4,4'-

dimetil-2,2'-bipiridin)₂-(2-(2',2":5",2^{*m*}-tertiofén)imidazo[4,5-f][1,10]-fenantrolin)]Cl₂, (TLD-1433, NCT03053635, 3. ábra)) [44]. A komplex sötétben nem citotoxikus, csak látható, közeli infravörös fénnyel történő megvilágítás hatására válik aktívvá reaktív oxigén származékok (ROS, '*reactive oxygen species*') képződéséhez köthetően.

Számos példát láthatunk a szakirodalomban rákellenes ruténium-nitrozil komplexek előállítására és tesztelésére is [45,46]. A nitrogénmonoxid egy endogén hírvivő molekula,



3. ábra A TLD-1433 Ru(II)-komplex szerkezeti képlete.

ingerületátvivő és vérnyomás-szabályozó szerepe van, valamint gyulladásos- és sejthalál mechanizmusokban is részt vesz. Utóbbi révén kapcsolatban áll tumorképződést befolyásoló folyamatokkal. A NO emelkedett vagy csökkent szintje egyaránt lehet kóros állapotok előidézője [47]. A ruténium/ozmium-nitrozil komplexekben nehezen rendelhetők oxidációs számok az egyes atomokhoz. A legtöbb ilyen komplexben +2-es oxidációs állapotúnak vehető a fémion, ezt támasztják alá infravörös spektroszkópiás és röntgendiffrakciós mérések is [48]. Arion és munkatársai számos citotoxikus nitrozil Ru(II)-, ill. Os(II)-komplexeket állítottak elő [P2,TP3,TP11¹], melyek egy csoportjánál négy klorido ligandum mellett egy NO és egy azol ligandum található egymáshoz képest *cisz* vagy *transz* helyzetben [P2]. Az azol ligandum: imidazol, pirazol, benzimidazol vagy indazol, az ellenion: ugyanezen ligandumok kationos formája, n-tetrabutil-ammónium vagy Na⁺. Humán SW480 (vastagbélrák) és CH1 (limfóma) rákos sejtvonalakon citotoxicitásukban jelentős különbségek mutatkoztak elsősorban a kétféle központi fémion analóg szerkezetű komplexei esetében. A Ru(II)-komplexek hatékonyabbak, mint az Os(II)-komplexek, és a KP1019-nél is jóval citotoxikusabbak [P2]. Ilyen típusú komplexek humán szérum albuminnal való kölcsönhatására vonatkozóan nem találtunk információt a szakirodalomban és felmerült a kérdés, hogy az eltérő citotoxicitású komplexek fehérjékhez való kötődésében van-e mérhető különbség.

¹ 'P'-vel az értekezés alapját képező közleményeket jelölöm (ld. 8.1. fejezet), 'TP'-vel pedig a további saját közleményeket (ld. 8.3. fejezet).

2.3. Rákellenes félszendvics fémorganikus ruténium- és ródiumkomplexek

2.3.1. Ruténium(η⁶-arén)-komplexek

rákellenes ruténium(III)komplexek redukció általi aktiválódásának hipotézise А eredményezte, hogy a +2-es oxidációs állapotú fémion vegyületei iránt is megnőtt a kutatói érdeklődés. A klasszikus oktaéderes komplexek mellett (ld. 2.2. fejezet) a fémorganikus Ru(II)-tartalmú vegyületek kifejlesztése és rákellenes hatásuk in vitro és in vivo vizsgálata is intenzíven kutatott területté nőtte ki magát az utóbbi évtizedekben, ugyanakkor meg kell jegyeznem, hogy klinikai kipróbálásig egy ilyen típusú vegyület sem jutott még el. Fémorganikus – azaz fémion-szén kötést tartalmazó – vegyületek között számos rákellenes komplexre találhatunk példát a szakirodalomban. Ilyen vegyület az 1990-es években klinikai fázis I/II vizsgálatokba került titanocén-diklorid, $[Ti(\eta^5-C_5H_5)_2Cl_2]$, (4. ábra) [49], ami azonban nem bizonyult kellően hatásosnak, így a humán kísérletek 10 év után befejeződtek vele [50]. A ferrocén ([Fe(η^5 -C₅H₅)₂]) nem, de a ferrocénium-kation [Fe(η^5 - $(C_5H_5)_2$ citotoxikusnak bizonyult humán rákos sejtvonalakon [51]. A ferrocifén (4. ábra) és különböző származékai pedig szóródó (invazív), tamoxifén kezelésre nem reagáló mellrákos sejteken mutattak kiemelkedő hatásosságot, de az ilyen típusú vegyületek tesztelése is csak az állatkísérletekig jutott [52]. A félszendvics, fémorganikus rákellenes ruténiumkomplexek kifejlesztésének elindítása elsősorban Tochter, Sadler és Dyson kutatócsoportjaihoz kötődnek [53].



4. ábra Néhány nevezetes rákellenes szendvics és félszendvics komplex szerkezeti képlete.

A benzol és származékainak η^6 -hexahapto kötődése a fémionhoz képes stabilizálni a +2-es oxidációs állapotot és az aromás, semleges ligandum három kötőhelyet foglal el, szabadon hagyva másik három koordinációs pozíciót. Az ilyen típusú komplexekben általában egy- vagy kétfogú ligandumok koordinálódnak a fémionhoz, és a koordinációs szférát pedig könnyen távozó, klorido segédligandumok telítik. Az aréngyűrű jelenléte a vegyületben megnöveli a ligandumcsere sebességét és a lipofilitást is, mely a sejtbe jutást segítheti. Ezeknek a félszendvics, 'zongoraszék' geometriájú komplexeknek a biológiai aktiválódása már nem redukcióhoz, hanem ligandumcsere folyamatokhoz köthető [54]. Az első Ru(η^6 -arén) típusú komplex, melyet rákos sejtvonalon teszteltek, a [Ru(η^6 -C₆H₆)(metronidazol)Cl₂] (4. ábra) volt, mely a metronidazolhoz képest nagyobb és szelektívebb citotoxicitást mutatott [55].

Egy másik, régebb óta ismert komplex, a [Ru(η^6 -C₆H₆)(DMSO)Cl₂], pedig gátolta a topoizomeráz II enzim működését, mely a replikálódott cirkuláris DNS-ek szétválasztását végzi és emiatt rákellenes vegyületek gyakori célmolekulája [56]. Az egyfogúként koordinálódó ligandumok közül kiemelkedik a hidrofil 1,3,5-triaza-7-foszfa-adamantán (PTA), melynek [Ru(η^6 -p-cimol)(PTA)Cl₂] (RAPTA-C, 4. ábra) komplexét Dyson és munkatársai állították elő [57,58]. A RAPTA-C az in vitro sejtes vizsgálatok során elhanyagolható citotoxicitást mutatott, viszont képes volt egerekben gátolni az emlőrák tüdőben való áttétképződését, de az elsődleges tumor mérete ugyanakkor nem csökkent [59]. Ez a fajta viselkedés egyértelműen jelzi a RAPTA-C és rokon vegyületeinek a ciszplatintól eltérő hatásmechnizmusát. Nem DNS-, hanem fehérje támadáspontúak ezek a komplexek, elsősorban hiszton fehérjékhez kötődnek [60] és az új, daganat közeli vérerek képződését gátolják. A RAPTA-C-ben koordinált klorido ligandumok vízre cserélődnek, de a Cl⁻↔H₂O csere mértéke függ az oldat pH-jától és a kloridionok koncentrációjától. A hidrolízis visszaszorítható valamelyest a kloridionok kétfogú (O,O) donoratomokat tartalmazó ligandumokra (pl. oxalát, β-diketonát) történő cseréjével. Gyakran kombinálják olyan kétfogú ligandumokkal a RAPTA-C-t, melyeknek önállóan is van rákellenes hatása szinergista hatást remélve: pl. a $[Ru(\eta^6-p-cimol)(PTA)(kurkumin)]^+$ komplex erősen citototoxikusnak bizonyult ciszplatinra rezisztens petefészekrákos sejteken (IC₅₀ ~ 1 µM) [61]. (Az in vitro citotoxicitás méréseknél az IC50 érték azt a koncentrációt mutatja, melynél a sejtek 50%-a elpusztul a megadott inkubációs idő alatt.)

A Ru(η^6 -arén)-komplexek másik fontos képviselői az ún. RAED típusú komplexek [62-64]. Sadler és munkatársainak nevéhez fűződik a diamin-alapú, etilén-diamint (en) tartalmazó komplexek kifejlesztése, mint pl. a [Ru(η^6 -bifenil)(en)(Cl)]PF₆ (RM175, 4. ábra), melynek citotoxicitása a karboplatinhoz hasonló és nem mutat keresztrezisztenciát a ciszplatinnal [65]. Később számos származékát előállították ennek a komplexnek variálva az aromás arén ligandumot (pl. p-cimol, toluol, benzol, tetrahidroantracén), a kétfogú (N,N) donoratomokat tartalmazó ligandumot (pl. 2,2'-bipiridin (bpy), 1,10-fenantrolin (phen) és származékaik) vagy a klorido távozócsoportot (pl. [, Br]). Sadler a ciszplatinhoz hasonlóan ezeknél a komplexeknél is az aktiválódás első lépésének a Ru–Cl kötés hidrolízisét tartja, és a képződő akvakomplex, $[Ru(\eta^6-arén)(L)(H_2O)]^{2+}$ (L = ligandum) az aktív részecske, ami a target makromolekulával reagál. Így munkáikban rendszeresen vizsgálják a Cl \rightarrow H₂O cserefolyamat kinetikáját elsősorban ¹H NMR spektroszkópiai és UV-látható spektrofotometriai módszerekkel [62,64-68]. Megállapították, hogy a hidrolízis sebességét alapvetően befolyásolja az aréngyűrű, a kétfogú és a halogenido ligandum típusa [62]. Másrészt Sadler munkáiban leírja, hogy a biológiai hatást befolyásolhatja a $[Ru(\eta^6-arén)(L)(H_2O)]^{2+/+}$ komplexben a vízmolekula deprotonálódását jellemző proton disszociációs állandó (Ka) értéke is. Az akva formát tartják aktívabbnak a vegyes hidroxido $[Ru(\eta^6-aren)(L)(OH)]^{+/0}$ komplexhez képest, amit a Ru-H2O kötés Ru-OH-hoz hasonlított labilisabb karakterével magyaráznak. Számos esetben meghatározták $Ru(\eta^6$ -arén) komplexek pK_a értékeit ¹H NMR titrálások segítségével, és úgy találták, hogy kis p K_a esetén (< 7) jellemzően kevésbé citotoxikusak a komplexek [62]. Megállapították azt is, hogy az (N,N) ligandum (N,O) vagy (O,O) ligandumra történő cseréje nagymértékben befolyásolja a pKa értékét és a Ru-Cl kötés hidrolízisének sebességét is [62,66-68]. Pl. a negatívan töltött acetil-acetonát $Ru(\eta^6-p)$ cimol) komplexének pK_a-ja (9,41) és a Cl⁻/H₂O csere sebessége is nagyobb a semleges etilén-diamin komplexéhez képest ($k = 1,23 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; p $K_a = 8,25$) [67]. A p K_a -k meghatározása során méréseiket azonban többnyire kloridion-mentes közegben végezték, a biológiailag releváns rendszerekben azonban jelentős a kloridion-koncentráció (vérszérumban: 100 mM; citoszolban: 24 mM; sejtmagban: 4 mM [66]), ami befolyásolja az egyensúlyi folyamatokat.

A $[Ru(\eta^6-arén)(en)Cl]^+$ komplexek hatásmechanizmusa még nincs részleteiben feltárva, azonban bizonyos, hogy másképpen viselkednek a biológiai rendszerekben, mint a ciszplatin vagy a RAPTA-C. A rákellenes komplexek esetén gyakran a DNS a targetmolekula (ld. Pt(II)-komplexek 2.1. fejezetben), emiatt részletesen vizsgálták a RM175 és rokonvegyületeinek kölcsönhatását DNS-sel és a DNS-t alkotó bázisokkal [62,69]. Megállapították, hogy ezek a félszendvics komplexek a ciszplatintól eltérően egyfogúként koordinálódnak a DNS-hez, nem képződnek keresztkötéssel adduktumok. A fémionhoz elsősorban a guanin bázis N7 nitrogénje koordinálódik. Nukleozidok esetén a következő reaktivitási sorrendet állították fel: guanozin-N7 > timidin-N3 > citidin-N3 > adenozin-N7/N1 [69]. Megfigyelték azt is, hogy ha az (N,N) donoratomokat tartalmazó etilén-diamin helyett pl. az (O,O) donor acetil-aceton (acac) koordinálódik, akkor a guanin és adenin N7 nitrogénjének ruténium felé mutatott affinitása már összemérhető. Másrészt a koordinációs kötés mellett jelentősek a másodlagos kölcsönhatások is, mint pl. a ' π - π stacking' kölcsönhatás az aréngyűrű és a DNS bázisai között, az aréngyűrű interkalációja a DNS bázispárok közé, vagy az etilén-diamin NH₂ csoportja és a guanin bázis oxigénje között létrejövő hidrogénkötés [69]. Nukleoszómákkal végzett *in vitro* vizsgálatok azt mutatták, hogy a [Ru(η^6 -*p*-cimol)(en)Cl]⁺ komplex DNS felé mutatott affinitása a fehérjékhez képest nagyobb [60], ugyanakkor fehérjékkel való kölcsönhatásuk Cys-SH, His-N, Met-S csoportokon keresztüli koordinációval is elképzelhető [70,71].

A RAPTA-C és RM175 komplexekben koordinált ligandumok és származékaik mellett még nagyon sokféle vegyület $Ru(\eta^6$ -arén)-komplexét állították elő és tesztelték [63]. A kétfogú ligandumok koordinációs módja is igen változatos; a teljesség igénye nélkül sorolok fel néhány kiemelkedő vegyületcsaládot, melyek többségét Sadler, Keppler, Hartinger és Turel kutatócsoportjaiban állítottak elő. (N,N) donor ligandumok: N-fenilazopiridinek [72], paullonok [73], indolokinolinok [74]; (N,O) donorok: pikolinátok [75,76], 8-hidroxi-kinolinok [77]; (O,O) donorok: hidroxi-pironok [78], flavonoidok [79], β-diketonok [80]; (O,S) donorok: tio-hidroxi-pironok [81]; valamint (N,S) donorok: karbotioamidok [82] és tioszemikarbazonok [83]. Általános megfigyelés, hogy inkább az és (S,N) donoratomokat tartalmazó ligandumok komplexei a (N,N), (O,S)citotoxikusabbak, míg az (O,O) és (N,O) ligandumoké kevésbé. Az önmagukban is jelentős citotoxicitást mutató ligandumok komplexei (pl. paullonok, flavonoidok, 8hidroxi-kinolinok) is rendre kis IC₅₀ értékeket adnak [63]. A citotoxicitási adatok azonban nem korreláltak egyértelműen sem a hidrolízis sebességével, sem a komplexek pK_a értékeivel, sem a töltésükkel [63].

A félszendvics organoruténium komplexek azonban nemcsak a rákellenes hatásuk miatt érdekesek, ilyen típusú vegyületeknek vizes oldatbeli homogén katalitikus reakciói is széles körben kutatott területnek számít [84,85]. Ruténiumkomplexek által katalizált szelektív hidrogénezési reakciók közül számos ismert a szakirodalomban [84], pl. a $[Ru(\eta^6-C_6Me_6)(bpy)(H_2O)]^{2+}$ komplex nagy hatékonysággal katalizálja ketonok alkoholokká való átalakulását nátrium-formiát hidrogéndonor jelenlétében viszonylag enyhe körülmények között [85]. A vizes oldatbeli speciáció ismerete így a katalizátorként használt komplexek esetén is hasznos lehet.

A félszendvics $Ru(\eta^6$ -arén)-komplexek vizes oldatbeli stabilitására vonatkozóan azonban korábban gyakorlatilag nem voltak elérhetőek egyensúlyi adatok a szakirodalomban, ahogyan fentebb is említettem csak egyes komplexek p K_a értékeit találhatjuk meg elsősorban Sadler és időnként Hartinger munkáiban [62,66,68,72,86,87].

13

Ru(η⁶-*p*-cimol)-komplexek oldategyensúlyi vizsgálatára vonatkozó 2013-tól publikált munkáinkat [P3-P6,P12,P16] megelőzően 2009-ben jelent meg Buglyó és Farkas azon

közleménye, melyben a $[Ru(\eta^6-p$ cimol)(H₂O)₃]²⁺ fémorganikus kation (5. ábra) kloridionok jelenlétében lejátszódó hidrolitikus folyamataira határoztak meg egyensúlyi állandókat pH-potenciometriás, UV-látható és ¹H NMR spektroszkópiai mérések segítségével [88]. Emellett az N-metilacetohidroxámsavval való komplexképződési egyensúlyokat is jellemezték. Két kétmagvú hidroxido-hidas komplex a $[(Ru(\eta^6-p-cimol)_2(H_2O)_2(\mu OH_{2}^{2+}$ és a $[(Ru(\eta^{6}-p-cimol))_{2}(\mu-$ OH)₃]⁺ feltételezésével le tudták írni a



5. ábra A $[Ru(\eta^6-p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ fémorganikus kation különböző megjelenési formái vizes oldatban kloridionok jelenlétében [89].

hidrolitikus folyamatokat, de a kloridionok jelenlétében pH-tól függő különböző vegyes hidroxido-klorido-hidas komplexek vannak jelen (5. ábra) [89]. A semleges, lúgos pH-kon képződő domináns [(Ru(η^6 -*p*-cimol))₂(μ -OH)₃]⁺ komplex szerkezetét korábban már leírták [90,91]. Enyhén savas pH-n azonban a hidroxido-hidak részben klorido-hidakra cserélődnek [89]. Emellett jellemezték a [Ru(η^6 -toluol)(H₂O)₃]²⁺ hidrolitikus folyamatait is abban a munkájukban, ahol az aromás ligandumon lévő szubsztituensek hatását vizsgálták a hidrolízis állandókra [92].

Buglyó és munkatársai további munkáikban számos kisméretű, főképp oxigén-, nitrogén- és kén-donoratomokat tartalmazó bioligandummal képzett Ru(η^6 -*p*-cimol)komplex oldategyensúlyi viszonyait tárták fel részletesen. A választott oxigéndonor ligandumok pl. citrát, laktát, maltol, 3-hidroxi-1,2-dimetil-piridin-4(1*H*)-on (deferipron), acac [93,94], kéndonor ligandumok pl. metionin, S-metil-L-cisztein [95], nitrogéndonor ligandumok pl. *N*-metil-imidazol, hisztidin-tartalmú peptidek [96,97] voltak. Az (O,O) donoratomokat tartalmazó ligandumokkal a komplexképződés gyors, de viszonylag kisebb stabilitású komplexek képződnek [93,94]. Míg az imidazolcsoportot tartalmazó ligandummokkal lassan áll be a kémiai egyensúly. Az eredményeik azt mutatták, hogy a hisztidintartalmú dipeptidekkel stabilis komplexek képződnek, preferált koordinációs módnak a hisztaminszerű, hattagú (N_{amino},N_{imidazol}) kelátgyűrű képződését tartják [96,97].

2.3.2 Ródium(η⁵-arenil)-komplexek

A d⁶-os elektronszerkezetű Ru(II)-ionnal izoelektronos Os(II)- és Ir(III)-komplexek előállítása és in vitro citotoxicitásának vizsgálata is régebb óta intenzíven kutatott területnek számít [98-101], míg az oktaéderes Rh(III)-komplexek irányába az érdeklődés csak az utóbbi évtizedekben erősödött meg [100-102]. Holott a Rh(III) néhány vegyületének rákellenes hatását már azelőtt publikálták [103], hogy Rosenberg átütő felfedezése a ciszplatinra vonatkozóan 1965-ben megszületett [8]. Így régóta ismert pl. a $RhCl_3 \cdot 3H_2O$, valamint a mer- $[RhCl_3(NH_3)_3]$ és a mer, cisz- $[RhCl_3(DMSO)_2(NH_3)]$ komplexek antitumor hatása [104,105]. A szisztematikus szerkezet-hatás összefüggések feltárására vonatkozó munkák azonban csak az elmúlt 10 évben jelentek meg, elsősorban [RhCl₃(DMSO)(LL)] típusú komplexekre vonatkozóan, ahol LL egy (N,N) donoratomokat tartalmazó aromás ligandum, pl. bpy, phen, polipiridil (pp) származékok [101,106]. Sheldrick és munkatársainak legfontosabb megállapításai azok voltak, hogy az aromás gyűrűk számának növelésével mért IC50 értékek egyre inkább csökkennek a különböző humán rákos sejtvonalakon (MCF-7, HT-29 és HEK-293), és az (N,N) donor ligandum metil-, klór- és nitro-szubsztituense rendre növeli a citotoxicitást [101,106]. A $[Rh(H_2O)_6]^{3+}$ hexaakva-kation igen lassú vízcsere sebességet mutat ($k = 2, 2 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$) [107], ez az inertség azonban jelentős mértékben lecsökken ciklopentadienil (C5H5) és pentametil-ciklopentadienil (C₅Me₅⁻) ligandumok koordinációjával. A C₅Me₅⁻ esetén ez 14 nagyságrend növekedést jelent a sebességi állandó értékében ($k = 1.6 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$) [107,108] az anionos arenil-ligandum erős transz-hatásának köszönhetően [101]. A pentametilciklopentadienilben lévő metilcsoportok elektronküldő hatása miatt a létrejövő C-Rh kötés erősebb a ciklopentadienil komplexhez hasonlítva, így a C₅Me₅⁻ ligandum nehezebben disszociál. Ezek a tulajdonságok is hozzájárultak ahhoz, hogy a szakirodalomban a $Rh(III)(\eta^5-C_5Me_5)$ -komplexek a gyakoribbak az Rh(III)(n⁵-arén/arenil)egyéb komplexekhez képest. Ezekben a komplexekben is legtöbbször egy kétfogú ligandum koordinálódik a fémionhoz és egy kloridion telíti a koordinációs szférát, hasonlóan a $Ru(II)(\eta^6-p-cimol)$ vegyületeihez (ld. 2.3.1. fejezet). Találhatunk példákat (O,O) kelátképző ligandumok komplexeire: pl. maltol (6.a ábra), deferipron [109], kurkumin [110], flavonoid-származékok (6.a ábra) [111]. Ezek közül az utóbbiak erős citotoxikus hatást mutattak petefészek-, vastagbél- és tüdőrákos sejtvonalakon, de meg kell jegyezni, hogy a vizsgált kétfogú flavonoloknak önmagában is van ilyen hatása, és a $Rh(III)(\eta^5$ -C₅Me₅) komplexeik IC₅₀ értékei nagyon hasonlóak a ligandumok saját értékeihez [111]. Az (N,O) donor ligandumokkal előállított komplexek közül a 8-hidroxi-kinolin [112,113] és a 1,2-naftokinon-1-oximátok [114] komplexeit emelhetjük ki, melyekre viszonylag kis IC₅₀ értékeket kaptak sejtvonaltól függően (0,8-11 μ M). Az 1-nitrozo-2-naftol Rh(III)(η^5 -C₅Me₅) komplexe egyértelműen erősebb *in vitro* rákellenes hatással bír, mint maga a ligandum [114]. Az (N,N) donoratomokat tartalmazó ligandumok közül kiemelkednek a 2-(piridin-2-il)tiazolok [115] és az aromás diiminek (bpy, phen, pp) [106,116,117]. Sheldrick kutatócsoportja az etilén-diamin és aromás polipiridil ligandumok komplexeinek (6.b ábra)



6. ábra $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)Cl]^{+/0}$ komplexek szerkezeti képlete néhány (a) (O,O) és (b) (N,N) donor pp ligandumokkal.

összefüggéseit szerkezet-hatás tanulmányozta részletesen [116], és a vastagbél- és mellrákos sejtvonalakon történő citotoxicitások meghatározása mellett а komplexek DNS-sel való kölcsönhatását is spektro-fotometriás, feltárták cirkuláris és dikroizmus viszkozitás mérési módszerekkel. Míg az etilén-diamin és a bpy komplexei nem voltak citotoxikusak, az kiterjedtebb egyre aromás szerkezet egyértelműen növelte a citotoxikus hatást, hasonlóan a [RhCl₃(DMSO)(LL)] komplexeknél tapasztaltakhoz [116], ugyanakkor pl. a phen kloro-, nitro- és dimetilezett származékainak IC50 értékei az alapvegyülethez voltak hasonlóak [106]. A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(pp)Cl]^+$ komplexek

interkaláció révén képesek kötődni a DNS-hez, de csak a viszonylag kisebb pp ligandumoknál, a nagyobb méretűeknél felületi kötődést írtak le [116]. Ugyanakkor a kezelt sejtek Rh-tartalmának atomabszorpciós spektroszkópiai mérése azt mutatta, hogy minél lipofilebb és nagyobb számú aromás gyűrűt tartalmaz a ligandum, a komplex sejtbe jutása annál hatékonyabb; a rákellenes hatás kialakításában ennek a ténynek is minden bizonnyal szerepe van [116].

Fontos megemlíteni, hogy a $[Rh(III)(\eta^5-C_5Me_5)(L)(H_2O)]^{2+}$ (ahol L: en, bpy, phen) komplexnek jelentős katalitikus hatása van egyes vizes oldatbeli reakcióknál. Képesek a formiátiont szén-dioxiddá oxidálni, miközben hidridion és azzal $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(H)]^+$ hidridokomplex képződik fiziológiás körülmények között [118,119]. A hidridokomplex pedig regioszelektíven tudja redukálni koenzimeket (pl. a NAD⁺ \rightarrow 1,4-NADH átalakulást). Sadler és munkatársai megfigyelték, hogy az önmagában nem toxikus formiát hozzáadására az említett $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(H_2O)]^{2+}$ komplexek citotoxikus hatása megnő, melyet a katalitikus hidrogén-transzfer reakcióhoz, a NAD⁺ redukciójához kötöttek [118,119].

A $Rh(\eta^5-C_5Me_5)$ félszendvics fémorganikus komplexeket leggyakrabban a $[\{(Rh(\eta^5-C_5Me_5)(\mu-Cl)Cl\}_2]$ dimer [120] (7. ábra) segítségével állítják elő. A klorido dimer vizes oldatban az oldat pH-jától és kloridion koncentrációjától függően különböző formákban jelenhet meg. A komplexek oldatbeli egyensúlyi viszonyainak jellemzéséhez elengedhetetlen a $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ kation hidrolitikus folyamatainak megismerése kloridionok távol- és jelenlétében. Kloridion-mentesítést követően a dimer savas pH-jú oldatban a triakva-kation formájában van jelen és a pH növelésével a trisz-µ-hidroxido kétmagvú $[(Rh(\eta^5-C_5Me_5))_2(\mu-OH)_3]^+$ komplex (7. ábra) képződik ¹H és ¹⁷O NMR spektroszkópiai mérések alapján. A komplexek szerkezetét röntgenkrisztallográfiai mérésekkel is igazolták [121,122]. Fish és munkatársai a $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ fémorganikus kation hidrolízisét jellemző p $K_a = 5,3$ -as értéket határoztak meg pHpotenciometriás mérések alapján [121], de mivel monomer ↔ dimer átalakulás történik az egyensúlyi állandó ilyen formában való megadása nem korrekt. Emellett egy másik kétmagvú komplex, $[(Rh(\eta^5-C_5Me_5))_2(\mu-OH)_2]^{2+}$, képződését is feltételezték, de a kétféle hidroxido komplex képződésének átfedő pH-tartománya miatt nem próbáltak egyensúlyi állandót megadni erre az utóbbi részecskére [121].



7. ábra (a) A [{(Rh(η^5 -C₅Me₅)(μ -Cl)Cl}₂] klorido dimer, (b) a [Rh(η^5 -C₅Me₅)(H₂O)₃]²⁺ kation és (c) a [(Rh(η^5 -C₅Me₅))₂(μ -OH)₃]⁺ kétmagvú komplex szerkezeti képlete és röntgenkrisztallográfia módszerrel meghatározott szerkezete [120-122].

Fish és kutatócsoportja az 1990-es évek közepén már vizsgálta a $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ kation kölcsönhatását egyfogú (N) donor ligandumokkal (pl. anilin, piridin) [123], majd DNS bázisokkal (adenin, guanin, citozin, timin), NAD⁺-dal,

nukleozidokkal és nukleotidokkal [124,125] elsősorban különböző pH-kon felvett ¹H NMR spektrumok, elektroporlasztásos ionizációjú tömegspektrometria (ESI-MS) mérések segítségével. Eredményeik leginkább a képződő komplexek összetételére, oldatbeli és szilárd fázisú szerkezetére vonatkoznak, az adatokból a komplexek stabilitását jellemző egyensúlyi állandókat azonban nem határoztak meg. Sadler kutatócsoportja (N,N) donor ligandumok $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(H_2O)]^{2+}$ (L = en, bpy, phen) komplexeinek pK_a értékeit határozta meg kloridionokat nem tartalmazó D₂O oldatban ¹H NMR titrálásokkal [119]. Rh(n⁵-C₅Me₅) komplexek oldatbeli speciációjára vonatkozó részletes oldategyensúlyi méréseket Buglyó és Farkas kutatócsoportja végzett elsősorban monohidroxámsavak (acetohidroxámsav, N-metil-acetohidroxámsav) [126] és aminohidroxámsavak (α/β alanin-hidroxámsav, y-amino-vajsav-hidroxámsav) [127] esetén pH-potenciometriás, ¹H NMR, ESI-MS módszerekkel, a mi munkáinkkal párhuzamosan. Az (O,O) donor monohidroxámsavak $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(H_2O)]^+$ és $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(OH)]$ komplexeket képeznek vizes oldatban, de a primer hidroxámsavval kétmagvú $[(Rh(\eta^5 -$ C₅Me₅))₂(L)₂(OH)] részecske is megjelenik a ligandum hidroximáto koordinációs módjának köszönhetően [126]. Az aminohidroxámsavakkal jellemzően kétmagvú komplexek képződnek, és jóval összetettebb a kép a változatos koordinációs {hidroxamáto-(O,O) és (Namino, Nhidroxamáto)} módok miatt, ami az egyes komplexek képződésének sebességében is jelentős különbséget eredményez. Az (O,O) donoratomokon keresztüli koordinációs mód kialakulása gyors, míg a nitrogéneken keresztül megvalósuló kötődés nagymértékben megnöveli az egyensúly beállásához szükséges időt [127].

2.4. Rákellenes gallium(III)komplexek

A fémtartalmú rákellenes vegyületek közül a platina(II)komplexeket követően másodikként a gallium(III)ion sói, majd később komplexei kerültek terápiás alkalmazásra [128,129]. A kemoterápiás galliumvegyületek mellett fontos kiemelni a ⁶⁷Ga és ⁶⁸Ga izotópok elsősorban makrociklusos ligandumokkal (pl. DOTA, NOTA) képzett nagy termodinamikai stabilitású komplexeit is, melyeket tumordiagnosztikában használnak SPECT és PET (azaz egyfotonos ill. pozitron emissziós tomográfia) vizsgálatoknál [129,130]. Már az 1970-es években rámutattak arra, hogy a gallium(III)ion képes akkumulálódni Hodgkin-limfómás betegek nyirokcsomóiban [131], és néhány év múlva további humán kísérletek indultak a Ga(NO₃)₃-tal, majd a GaCl₃-dal [131,132]. Ezek a sók azonban a gyomorból rosszul szívódnak fel, biohasznosulásuk igen kicsi. Az intravénásan alkalmazott Ga(NO₃)₃ húgyhólyagrákos és leukémiás betegeknél hatásosnak bizonyult, de így is csak egy kis hányada hasznosult a beadott sónak [128]. Ennek oka, hogy a

gallium(III)ionnak erős a hidrolízisre való hajlama, a vizes oldatokban megjelenő $[Ga(OH)_i]^{3-i}$ (i = 1-4) hidroxido-komplexek közül fiziológiás pH-n elsősorban a gallát, $[Ga(OH)_4]^-$ dominál [133], ami a vesén keresztül gyorsan kiürül [131,134]. Komplexképződéssel a hidrolitikus folyamatok azonban visszaszoríthatók [135]. Az ún. második generációs kemoterápiás galliumvegyületekhez a citrát, a maltol és a 8-hidroxikinolin komplexei, míg a harmadik generációs vegyületekhez hidrazonok, tioszemikarbazonok, fenolátok, piridin- és azol-származékok komplexei tartoznak [128,131,132,136,137].

Tényleges terápiás alkalmazást így először a Ga(NO₃)₃-nak citráttal stabilizált formája (GaniteTM) nyert a rákos állapotokat gyakran kísérő hiperkalcémia, azaz magas vérplazma kalciumszint kezelésében [138]. A citráttal képződő komplex kis stabilitású, a hidrolízist a ligandum csak részben tudja megakadályozni, emiatt további komplexképzők kipróbálására került sor. Az (O,O) donor maltollal képzett [trisz-maltoláto-gallium(III)]



8. ábra (a) A [trisz-maltoláto-gallium(III)] (GaM) és (b) a [trisz-(8-kinolinoláto)-gallium(III)] (KP46) szerkezeti képlete és röntgenkrisztallográfia módszerrel meghatározott szerkezete [139,148].

(GaM, 8. ábra) oktaéderes geometriájú [139] és semleges töltésű komplex, in vitro citotoxicitása egyértelműen meghaladta a Ga(NO₃)₃-ét, és a sikeres állatkísérleteket követően fázis GaM klinikai I/II а vizsgálatokba került szájon át adagolható formában [139-141]. A farmakokinetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a GaM komplexből a fémion döntően a vérben a vas(III)ionokat szállító Tf-hez kötődik és a Tf-receptorok segítségével jut be a sejtekbe [139]. A gallium(III)ion igen sok tulajdonságában hasonlóságot vas(III)ionnal; mutat a pl.

hasonló az ionsugaruk, az elektronaffinitásuk, az elektronegativitásuk és a koordinációs kémiai sajátságuk is, viszont fiziológiás körülmények között a gallium(III) nem redox aktív [48,135]. A hasonlóság miatt a Tf a vaskötő helyein képes a gallium(III)ionokat megkötni, bár a vas(III)ionokhoz képest gyengébben [142]. A vérben a Tf vaskötő helyeinek csak ~1/3-a telített vas(III)ionokkal (ld. 2.6. fejezet) [143,144], így lehetőség van a

gallium(III)ionokhoz való koordinációra is. A rákos sejtek vasigénye intenzív osztódásukból adódóan nagy, így az egészséges sejtekhez képest több Tf receptor található a sejtfelszínükön [145]. Ez a sajátság biztosítja valamelyest a GaM szelektivitását. A sejtbe került gallium(III)ionok fő támadáspontjának a DNS-szintézisben kulcsszerepet játszó ribonukleotid reduktáz (RNR) enzimet (ld. 2.5. fejezet) tartják [132,139]. A gallium(III)ion a vaskötő helyekre kötődik a két alegységből álló heterodimer fehérje R2 alegységében, ennek következtében a DNS-szintézisben zavar lép fel, ami apoptotikus folyamatokat indít el és a sejtek pusztulásához vezet [145,146]. A GaM a klinikai vizsgálatok alapján jól tolerálható, hatásosnak bizonyult többféle rákos betegség esetén is (limfóma, hepatocelluláris karcinóma), de a tesztelése 2005-től nem folytatódott tovább [138,141].

A gallium(III)ion Tf-nel való kölcsönhatása adta az ötletet egy doxorubicin-Ga-Tf konjugátum előállítására, mely az érzékeny sejteken a doxorubicinnel hasonló rákellenes hatást mutatott, de a doxorubicinre rezisztens sejteken a konjugátum képes volt visszafordítani a rezisztenciát [147]. Azonban ennek a konjugátumnak a fejlesztése is megállt a preklinikai fázisban.

Az (N,O) donoratomokat tartalmazó 8-HQ (8-kinolinol vagy oxin) oktaéderes geometriájú komplexe [148], a [trisz-(8-kinolinoláto)-gallium(III)] (KP46, 8. ábra) már az in vitro citotoxicitás teszteknél is nagyon kicsi IC50 értékeket mutatott a többi galliumkomplexhez képest (pl. IC₅₀ = 2,5 µM vastagbélrákos sejtvonal [149]); és patkányokban képes volt a tumor méretét csökkenteni [135,149]. Az ígéretes preklinikai vizsgálatokat követően Keppler és kutatócsoportjának 2004-ben sikerült elindítania a KP46 humán tesztelését [150]. A szájon át alkalmazott komplex a klinikai fázis I/II vizsgálatok során nem okozott vesekárosodást, jól tolerálható és hatásos volt többfajta szolid tumor esetén, pl. veserákos betegeknél [150,151]. A KP46 hatásmechanizmusát tekintve azonban a GaM komplexszel szemben nem a ribonukleotid reduktáz inhibícióján keresztül fejti ki hatását. A KP46 az extracelluláris mátrix és a sejtek közötti kapcsolat kialakításában szerepet játszó, a sejtmembránba ágyazott integrinek deregulációján keresztül hat [152]. Röntgenabszorpciós spektroszkópiás mérések alapján pedig a galliumion koordinációs szférája nem változik meg a Tf (sem a HSA) jelenlétében [153]. Így a Tf-független sejtes felvétel megvalósulását valószínűsítették. Ennek ellentmondó CZE-MS vizsgálatok szerint a fémion szinte kizárólag a Tf-hez kötődik, míg a HSA szerepe igen mérsékelt [154]. A KP46 a GaM-hez hasonlóan semleges töltésű, de lipofilebb és sokkal rosszabb a vízoldhatósága (KP46: $\lg P = +0.88$; $S = \sim 36 \mu M$ [155]; GaM: $\lg P = +0.41$; $S = \sim 24 m M$ [139]). A KP46 farmakokinetikai mérései alapján azonban a vízoldhatóságot jóval meghaladó maximális szérumkoncentrációkat mértek, ami arra utal, hogy a vérben a komplex nagyobb részt fehérjékhez kötődik [156].

Összességében megállapíthatjuk, hogy a két klinikai vizsgálatba került és szerkezetükben hasonló trisz-ligandumú galliumkomplex mind hatásmechanizmusában, mind a szérumfehérjékhez való kötődésükben jelentős különbséget mutat, ami vélhetően az eltérő oldatkémiai viselkedésüknek is köszönhető. Azonban oldategyensúlyi viszonyaikat és vérszérumfehérjékkel való kölcsönhatásukat sem vizsgálták az egyensúlyi állandók meghatározása céljából korábban. A KP46 esetében ennek leginkább a vízben való limitált oldhatósága lehet az oka. Ugyanakkor gallium(III)komplexek vizes oldatbeli stabilitását részletesen vizsgálták pl. (O,O) donoratomokat tartalmazó hidroxi-piridinonok [157], különböző poliamino-polikarbonsavak [158,159] és (N,N,N,O,O) donor makrociklusos származékok esetében [130].

2.5. Tioszemikarbazonok és fémkomplexeik

A tioszemikarbazon (TSK) vegyületcsalád az 1800-as években már ismert volt, de a kutatói érdeklődést inkább csak a XX. sz. közepétől keltette fel, amikor felismerték a TSK-ok különböző biológiai hatását [160,161]. A TSK-ok között találunk tuberkulózis-, vírusfertőzések-, malária elleni és antitumor hatású vegyületeket [161,162]. Az alapvázuk (N,S) donoratomokat tartalmaz (9. ábra), fémionokhoz semleges és anionos formában képesek koordinálódni. Az anionos koordinációnál a hidrazin-NH csoport deprotonálódik



9. ábra A tioszemikarbazonok általános szerkezeti képlete tion és tiol formákban, és az E és Z izomerek összehasonlítása.

és tioláto kötési mód jön létre a tion-tiol tautomériának köszönhetően [163]. (A tion↔tiol formákat a 9. ábra mutatja.) A TSK-ok szerkezete sokféleképpen variálható különböző szubsztituensek beépítésével, és általában egy koordinációra alkalmas harmadik donorcsoport is megtalálható a vegyületekben. Szintézisük a megfelelő aldehid vagy keton és egy tioszemikarbazid kondenzációs reakciójával

történik [161]. Leggyakoribbak az α -*N*-heterociklusos TSK-ok, ahol legtöbbször piridin-N van koordinációs pozícióban; valamint jól ismertek a szalicil-aldehid-TSK-ok is, melyeknél pedig egy fenolos-OH csoport is koordinálódni képes az (N,S) donoratomok mellett.

A TSK-ok közül elsőként az 1940-es években a tioacetazont (10. ábra) törzskönyvezték multirezisztens tuberkulózis ellen [164]. Majd a 1960-as években az *N*-metil-izatin-TSK került klinikai alkalmazásba bárányhimlő ellen [165], de a védőoltások elterjedésével használata ma már teljesen visszaszorult. A TSK-ok rákellenes tulajdonságát először 1956-ban írták le: a 2-formil-piridin-TSK (FTSC) leukémia elleni hatását igazolták egereknél [166]. Később az 5-hidroxil-2-formil-piridin-TSK (10. ábra) került klinikai fázis I vizsgálatba, mint leukémiaellenes szer, de használatakor erős emésztőrendszeri toxicitás jelentkezett mellékhatásként [167]. A TSK-ok további optimalizálása vezetett a 3-amino-piridin-2-karboxaldehid-tioszemikarbazonhoz (triapin vagy 3-AP, 10. ábra), mellyel több mint 30 klinikai fázis I/II vizsgálat történt [168-170]. A triapin mono- és kombinált

terápiákban (pl. ciszplatinnal, gemcitabinnal, doxorubicinnel) bíztató eredményeket mutatott mieloid leukémia esetén, viszont rövid biológiai felezési ideje miatt szolid tumorokkal szemben jóval kevésbé volt hatékony [170-174]. Alkalmazását emellett számos mellékhatás, pl. hányás, methemoglobinémia kíséri [170]. Mindezek a problémák további TSK-ok fejlesztését ösztönözték, melyek közül 2015-ben egy tetrahidrokinolin-származék, a Coti-2, majd 2016-ban a di-2piridil TSK, a DpC kódnevű



10. ábra Néhány nevezetes tioszemikarbazon szerkezeti képlete. (A keretezett vegyületek kemoterápiás szerként klinikai vizsgálatba kerültek.)

vegyület (10. ábra) jutott sikeresen klinikai vizsgálatba [175]. A DpC-t a di-2-piridil-TSKok között kiemelkedő Dp44mT (10. ábra) továbbfejlesztésével állították elő Richardson és munkatársai [176]. Az α-N-heterociklusos TSK-ok szintézisével, in vitro humán rákos sejtvonalakon végzett tesztelésével, in vivo állatkísérletekkel, valamint a klinikai vizsgálatokra kiválasztott vegyületek farmakokinetikai és farmakodinámiás viselkedésével kapcsolatos eredményekkel számos összefoglaló közlemény foglalkozik [160,162,177-Ugyanakkor hatásmechanizmus megértéséhez szükséges 179]. а oldatkémiai tulajdonságokra, a hatás szempontjából érdekes létfontosságú fémionokkal való komplexképzésre vonatkozó adatok meglehetősen hiányosak a szakirodalomban, feltehetően a vegyületek vízben való korlátozott oldhatósága miatt.

A triapin és származékainak biológiai hatása elsősorban a ribonukleotid reduktáz enzim inhibícióján alapul [180,181]. Ez az enzim a dezoxi-ribonukleotidok képződését katalizálja, aktív centrumában két vasion és egy Tyr gyök található [180,181]. A tumorsejtekben a fokozott osztódás miatt ezen enzim expressziója megnő, így gátlása potenciális célpont a rákterápia során [182]. Az általánosan elfogadott hatásmechanizmus alapján a triapin az enzim R2 alegységével lép kölcsönhatásba. A képződő vas(II)-TSK komplex közvetlenül vagy még inkább az oxigénnel való reakciója során képződő reaktív oxigén származékok által képes a katalitikus centrumban lévő Tyr gyököt kioltani, ami az enzim inaktiválását okozza [180]. Ennek következtében a TSK-ok vas(II/III)ionokkal képzett komplexeinek oldatbeli stabilitása és redoxi tulajdonsága befolyásol(hat)ja a TSKok biológiai hatását. A vasionok felé mutatott nagy affinitásuk miatt gyakran szokták a TSK-okat is vaskelátorokként említeni; ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a hematológiai betegségekben használt klasszikus vas(III)-kelátorok elsősorban oxigén donoratomokat tartalmaznak (pl. dezferrioxamin B, deferipron), meglehetősen hidrofilek, egyértelműen a vas(III)ionokkal képeznek nagyobb stabilitású komplexeket a vas(II)ionokhoz hasonlítva [183] és rákellenes hatásuk csekély [184].

A vasionokkal való komplexképződés mellett egyre többször felmerül az intracellulárisan képződő rézkomplexek szerepe is a hatásmechanizmusban, elsősorban azoknál a TSK-oknál, melyek citotoxicitását jellemző IC₅₀ érték a nM-os koncentrációtartományba esik [185-187]. Ezek tipikusan azok a vegyületek, melyek N-terminálisan diszubsztituáltak (pl. Dp44mT, DpC, piridin-2-karboxaldehid-N⁴,N⁴-dimetil-TSC (PTSC)) [186,187]. Jól ismert az is, hogy nem csak a TSK-ok, hanem a szintetizált réz(II)komplexeik is gyakran jelentős antitumor hatással bírnak [161,162,185-189]. Azonban a réz(II)ionokkal való komplexképződés hatása szinergista, vagy antagonista is lehet a ligandum saját citotoxicitásával összevetve. Az N-terminálisan diszubsztituált α-Npiridil- és a szalicil-aldehid-TSK-ok esetében gyakran meghaladja a komplexek citotoxicitása a ligandumét [188,189], míg a nem szubsztituált (pl. triapin) vegyületeknél a réz(II)komplex kevésbé aktív [189]. A nM-os citotoxicitású TSK-ok és az aktív rézkomplexeik javasolt hatásmechanizmusa az intracelluláris réz(II)→réz(I) redukcióhoz köthető ROS termelődésen alapul [187,189]. Ilyen kontextusban mindenképpen érdekes a TSK-ok rézionokkal képzett komplexeinek oldatbeli stabilitása és redoxi tulajdonságaik ismerete.

A terápiás alkalmazás mellett kiemelném, hogy a réz(II)ion bisz(TSK)-kal képzett ⁶⁴Cu izotóppal jelölt (S,N,N,S) koordinációs módú komplexeit (pl. [⁶⁴Cu(ATSM)], ahol

ATSM: diacetil-bisz-(4-metil-tioszemikarbazon)) rákos- és szívbetegségeket gyakran kísérő hipoxiás (oxigénszegény) szövetek PET diagnosztikájára használják [190,191].

A TSK-oknak nemcsak a réz(II)ionnal, hanem más fémionokkal pl. platina(II), ruténium(II), nikkel(II), gallium(III), cink(II), vanádium(IV/V)) képzett komplexei is mutatnak citotoxikus hatást [160-162]. A komplexképzés megváltoztatja a lipofilitást, a töltést és a méretet, ezáltal a transzportfolyamatokat, de eltérő hatásmechanizmust is eredményezhet. Pl. egyes nikkel(II)- és palládium(II)komplexek DNS topoizomeráz-IIα gátlásán keresztül hathatnak [162,192], valamint néhány TSK ligandum és réz(II)komplex inhibíciós hatását is leírták [192,193].

A TSK fémkomplexek szintézisének, szilárd fázisú szerkezetvizsgálatának nagyon bőséges a szakirodalma, jó néhány összefoglaló közlemény is született ebben a témakörben [160,162,163]. A TSK-ok, ahogyan korábban is említettem, alapvetően a kénen és az azometin-N-en keresztül koordinálódnak a fémionokhoz (9. ábra), míg a háromfogú α-Npiridil TSK-okkal (N_{piridil},N,S) és a szalicil-aldehid TSK-okkal (O,N,S) donoratomokon keresztüli koordináció valósul meg. A szilárd formában előállított komplexekben a röntgenkrisztallográfiai mérések alapján a háromfogú TSK-ok leggyakrabban a teljesen deprotonált formájukban azaz (N_{piridil},N,S⁻) ill. (O⁻,N,S⁻) donoratomokon keresztül koordinálódnak, és így a komplexképződés a hidrazin-nitrogén csoport deprotonálódásával és a tion-tiol átrendeződéssel (9. ábra) jár. Ugyanakkor számos példa van a protonált hidrazin-N csoportot tartalmazó komplexekre is. A réz(II)ionnal tipikusan síknégyzetes geometriájú mono-komplexek képződnek, mint ahogyan а triapin komplex röntgenkrisztallográfiásan meghatározott szerkezete [189] mutatja a 11.a ábrán. Ugyanakkor a jellemzően oktaéderes geometriájú komplexeket képező vas(III)- és gallium(III)ionokkal bisz-komplexek kikristályosodása a jellemző (11.c,d ábra) [137]; de ezekkel a fémionokkal is lehetséges a mono-komplexek szilárd fázisú előállítása (11.b ábra) [137].

 α -*N*-piridil TSK-ok vaskomplexeinek redoxi potenciálját számos esetben jellemezték, többnyire a bisz-komplexek acetonitril vagy egyéb szerves oldószer – víz elegyében, ciklikus voltammetriás mérésekkel [195,196]. A reverzibilis, egy elektonátmenettel járó folyamatokat mutató voltamogrammokról leolvasott redoxi potenciál értékek -170 – +225 mV vs. NHE tartományba esnek, melyek jóval pozitívabbak a klasszikus vaskelátorok komplexeihez viszonyítva (pl. deferipron: -620 mV [197]; dezferrioxamine B: -482 mV [198]), és negatívabbak a vas(II)ionokat kedvelő ligandumok komplexeihez képest (pl. phen: +1140 mV [199]). A TSK-ok vaskomplexeinek közepes redoxi potenciál értéke egyértelműen jelzi, hogy ezeknek a ligandumoknak a vas(II)ionok felé mutatott affinitása is jelentős, másrészt lehetővé teszi az intracellulárisan képződő

vaskomplexek Fenton-reakcióban való részvételét és így ROS termelődést, ami a ribonukleotid reduktáz enzim inhibíciójához vezethet [178,195]. Az α -*N*-piridil TSK-ok réz(II)komplexeinek ciklikus voltammetriás tanulmányozásával azonban nem igazán lehet redoxi potenciálokat meghatározni, a rendszerek irreverzibilitása miatt [189].



11. ábra (a) A triapin réz(II)ionnal, (b) a PTSC gallium(III)ionnal képzett mono-komplexének és a 2-acetil-piridin-*N*,*N*-dimetil-TSK (c) vas(III)- és (d) gallium(III)ionnal képzett bisz-komplexének röntgenkrisztallográfiai módszerrel meghatározott szerkezete [137,189].

Munkáinkkal párhuzamosan Szoboszlai és munkatársai meghatározták а látszólagos stabilitási állandókat a Dp44mT (10. ábra) réz(II), vas(II), kobalt(II), nikkel(II) és cink(II) komplexeire pH = 7,4-n spektrofotometriás titrálásokkal [200]. Megállapították, hogy a felsorolt kétértékű fémionok közül a rézionnal képződnek a legstabilisabb komplexek. Ebben a közleményükben a Dp44mT p K_a -it is meghatározták. Réz(II)ionokkal való komplexképződési folyamatok vizsgálatakor a legegyszerűbb α-N-piridil TSK (FTSC) esetén több kutatócsoport is határozott meg egyensúlyi állandókat, de azok meglehetősen ellentmondásosak. Pl. a [CuLH]²⁺ és [CuL]⁺ összetételű komplexek deprotonálódására vonatkozóan Ainscough p $K_a = 3,6$ és 11,5 [201], míg Antholine 2,40 és 8,30 [202] értékeket kaptak. Antholine közleményében a [CuL]⁺ komplexre egy $\lg\beta$ = 16,90 értéket adtak meg etilén-diaminnal végzett spektrofotometriás kiszorításos mérések alapján, de az állandó számításakor nem vették figyelembe, hogy a mérésekhez használt pH-n (8,5) vegyes hidroxido komplexek is képződnek. A TSK-ok proton disszociációs állandóit csak elvétve találhatjuk meg a szakirodalomban [203-207], de az adatok alapján az α-N-piridil TSK-oknál a pH növelésével egyértelműen először a piridínium nitrogén deprotonálódik, majd a hidrazin-nitrogén (pl. FTSC: $pK_1 = 3,67$; $pK_2 = 10,93$ [203]).

Számos közlemény fellelhető a TSK-ok C=N kettős kötése mentén létrejövő Z/E izoméria (9. ábra) oldatbeli tanulmányozására vonatkozóan főleg ¹H NMR spektroszkópia és DFT számolások használatával [208-211]. Általában az E izomer a domináns forma oldatban, de az izomerek eloszlását nagymértékben befolyásolja a szubsztituensek típusa és az oldószer anyagi minősége: pl. míg az FTSC 100%-ban az E formában van jelen semleges pH-n vízben és tiszta DMSO-ban [211], addig az *N*-terminális dimetilezett PTSC származéknál már mind a kétféle forma képződik (78% E, 22% Z) [211].

2.6. Farmakokinetikai viselkedést befolyásoló tulajdonságok: a szérumfehérjékkel való kölcsönhatás szerepe

A terápiás és diagnosztikai felhasználású vegyületek hatásmechanizmusának megértéséhez alapvetően fontos megismerni, hogy vizes oldatokban milyen formában vannak jelen. A fémkomplexek oldatszerkezete gyakran különbözik az eredeti szilárd formától, valamint jelentős változásokon mehetnek keresztül a biológiai folyadékokban a hatás helyszínéhez érve. Ezért is a fémkomplexek gyakran tekinthetők'*prodrug*'-nak, azaz a biológiai hatásért nem az eredeti kémiai összetételű vegyület a felelős [152,212]. A farmakokinetika a gyógyszerek szervezeten belüli sorsával foglalkozik; leírja, hogy hogyan hat a szervezet a gyógyszerre, azaz jellemzi, hogy:

- i) hogyan szívódik fel a hatóanyag (abszorpció);
- ii) hogyan oszlik meg a szervezet egyes vízterei között (disztribúció);
- iii) milyen biotranszformációs folyamatokon megy keresztül (metabolizmus);
- iv) és végül hogyan ürül ki a szervezetből (exkréció) [213,214].

A négy farmakokinetikai eseményt mind a magyar, mind az angol nyelvű szakirodalomban az 'ADME' betűszóval jelölik. Az ADME jellemzőket egyes fizikaikémiai tulajdonságok nagymértékben befolyásolják, mint pl. a vegyületek vízben való lipofilitása, töltése, mérete, (de)protonálódási oldhatósága, folyamatai (pK_a) , fémkomplexeknél azok oldatbeli stabilitása és így aktuális sztöchiometriája és a vérszérum transzportfehérjéivel való kölcsönhatása. Ezek szerepe persze az adminisztráció módjától is függ. A rákellenes gyógyszereket leggyakrabban intravénásan alkalmazzák (pl. ciszplatin, karboplatin, KP1339, doxorubicin, paklitaxel [3,29,215,216]), de a betegek számára kíméletesebb orális adagolás is egyre inkább előfordul (pl. erlotinib, afatinib, KP46 [150,217,218]). A szájon át adott gyógyszerhatóanyagoknak a változatos pH-jú gyomor-bél traktusból kell hatékonyan felszívódnia, majd a májkapugyűjtőéren át a májba jutnak, ahol különböző mértékben metabolizálódnak ('first pass' metabolizmus). Ezt követően kerülnek a szisztémás vérkeringésbe, majd jutnak el a szövethez. Az intravénásan
adott gyógyszerek viszont közvetlenül a véráramba kerülnek (pH = 7,4), így biohasznosulásuk igen jó is lehet (akár ~100%) [213,214]. Ennek megfelelően nem elegendő a nemfémes vegyületek és fémkomplexek csupán pH = 7,4-n való megjelenési formáinak az ismerete. A közeg pH-ja a proton disszociációs egyensúlyokon keresztül hat a vegyület protonáltsági állapotára, befolyásolja a fémkomplex látszólagos stabilitási állandóját, így bizonyos pH-tartományokban akár a fémkomplex teljes disszociációja is megtörténhet. (A látszólagos egyensúlyi/stabilitási állandó (K', β ') figyelembe veszi a komplexképződéssel konkuráló folyamatokat, mint pl. a protonálódás, fémionok hidrolízise az adott körülmények között.) A protonáltsági állapot és a sztöchiometria megváltozása maga után vonja a vegyület/fémkomplex töltésének és lipofilitásának megváltozását. Mindez befolyásolja a sejtmembránokon való áthaladást, így magát a felszívódást és a célsejtbe való bejutást is, azaz hat az abszorpciós és disztribúciós folyamatokra. Ugyanakkor a véráramba kerülve a gyógyszerhatóanyagok kölcsönhatásba léphetnek véralkotókkal, melyek közül a nagy molekulatömegű (HMM) transzport fehérjéket (HSA, Tf, globulinok) kell kiemelni [219]. Ugyanis a szérum transzportfehérjéivel való kölcsönhatás jelentős mértékben befolyásol(hat)ja a hatóanyag vérben való eloszlását és tartózkodási idejét, másrészt a fehérjékhez való kötődés a célba juttatást is segítheti [219,220].

Ezen felsorolt okok miatt a hatóanyagok racionális fejlesztési és optimalizálási folyamata igényli, hogy a potenciális, vagy már klinikumba került gyógyszervegyületek oldategyensúlyi viszonyait, a farmakokinetikai viselkedésüket befolyásoló fizikai-kémiai tulajdonságaikat minél mélyebben megismerjük.

A HSA a vérben tipikusan 630 µM koncentrációban van jelen, a vérplazma fehérjetartalmának az 55-60%-át adja és annak a leggyakoribb fehérjekomponense [219,220]. Az albuminnak szerepe van az ozmózisnyomás és a vér kolloid rendszerének fenntartásában, valamint számos változatos szerkezetű endogén (pl. hormonok, zsírsavak, bilirubin, fémionok) és exogén (pl. gyógyszerhatóanyagok és metabolitjaik) anyagot szállít [220]. A HSA mivel nem specifikus szállítófehérje és kiemelkedő a koncentrációja a vérben, számos hozzá kötődő gyógyszerhatóanyag eloszlását és biológiai felezési idejét is befolyásolni tudja. A fehérjével való kölcsönhatás révén ugyanis a vegyület nem hagyja el az érpályát és nem jut el a farmakológiai hatás helyére. A szabad molekulák viszont kijutnak a vérkeringésből és a kémiai egyensúlyra való törekvés pedig a kötött frakcióból újra pótolja a szabad frakciót. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a HSA maga is képes az érfalon áthatolni, de a szövetközi és a vérben található albumin cseréje normális esetben igen lassú [219,220]. A rákos szöveteknél a kapillárisok szabálytalanok, lyuggatottak és rendszerint hiányzik a megfelelő nyirokkeringés, ami visszajuttathatná az ott pangó

folyadékot és fehérjéket a keringésbe. Ezt nevezik fokozott permeabilitás és visszatartás hatásnak ('*enhanced permeability and retention effect*') [221]. Emiatt a rákellenes vegyület HSA-hoz való kötődése a célba juttatást is hatékonyan segítheti. A HSA egyre kedveltebb gyógyszerhatóanyag-hordozó is [221,222], pl. a paklitaxel tartalmú rákellenes szer, az abraxán esetében is ezt a stratégiát alkalmazzák [223].

A HSA másodlagos kémiai és koordinációs kötések révén is képes hatóanyagokat megkötni [220]. Ezen kölcsönhatások kialakulásának kinetikája és erőssége nagy különbségeket mutathat. Számos kötőhelye van zsírsavak, szerves molekulák és fémionok számára [220]. A másodlagos kölcsönhatások révén kötődő anyagok a három hidrofób "zsebben" kötődnek leginkább. Ezeket a klasszikus Sudlow osztályozás szerint az I., II. és III. kötőhelyként nevezik, melyek rendre a IIA, IIIA és IB aldoménban helyezkednek el (12.a ábra) [220,224,225].



12. ábra (a) A HSA szerkezete és az I. (IIA aldomén), II. (IIIA aldomén) és III. (IB aldomén) kötőhelyek helyzete. (b) A HSA His (•), Met (•) és a Cys34 (•) aminosavainak pozíciója. (A Protein Data Bank adatai alapján: 1E7I, [226,227].)

Az I. kötőhelyen nagy affinitással kötődik a warfarin (WF), valamint pl. a fenilbutazon, különböző szalicilátok és szulfonamidok. A II. kötőhelyen általában aromás semleges, vagy egy perifériás csoportjukon negatív töltésű vegyületek kötődnek (pl. diazepam, ibuprofen, klofibrát) [220]. A III. kötőhelyet nem régen fedezték fel, főként zsírsavak megkötésében vesz részt, de flexibilis szerkezetének köszönhetően igen változatos szerkezetű vegyületek képesek itt kötődni (pl. metilnarancs, hemin) [225]. A humán szérum albuminon négy fő fémion-kötőhely található [228]:

- i) az N-terminális Asp-Ala-His kezdőszekvenciájú, a szakirodalomban 'ATCUN'ként említett kötőhely, mely elsősorban réz(II)- és nikkel(II)ionokhoz koordinálódik;
- ii) a sokféle fémion (pl. cink(II), kadmium(II)) megkötésére szolgáló A-zseb (vagy 'multi metal binding site');

- iii) a B zseb, ahol kadmium(II) és mangán(II) képes kötődni;
- iv) és a Cys34 aminosav, mely a fehérje egyetlen szabad tiolcsoportját adja (12.b ábra), ahol elsősorban higany(II)-, ezüst(I)-, platina(II)ionok kötődnek, de ezzel a tiolcsoporttal létesítenek kovalens kötést a maleimid-tartalmú vegyületek is [TP2].

Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a HSA tizenhat His imidazol és hat metionin kén donoratomot is tartalmaz (12.b ábra), melyek egyfogú koordinációja fémionokhoz szintén lehetséges, különösen a fehérje felületén lévő, könnyebben hozzáférhető csoportok esetében.

A Tf az emberi szervezet specifikus vasszállító fehérjéje, koncentrációja ~37 μ Mos, kötési helyei átlagosan 30%-ban telítettek vas(III)ionokkal. Két homológ egységből épül fel, melyekben egy-egy vaskötő hely van (13.a ábra); ahol két Tyr, egy His és egy Asp aminosav oxigén és nitrogén donoratomjai koordinálódnak a fémionhoz, az 5. és 6. kötési helyen egy szinergista CO₃^{2–} kötődik (13.b ábra) [144,229]. Bár ez a kötőhely igen szelektív a vas(III)ionokra nézve, de számos hasonló méretű és töltésű fémion képes itt kötődni, pl. alumínium(III), vanádium(IV) és gallium(III). A vas(III)ionokkal való kölcsönhatást jellemző kötési állandókhoz képest (1g K_1 = 21,91, 1g K_2 = 20,62 (25 mM HCO₃[–] jelenlétében [230]), a gallium(III)ion kötési állandói kisebbek (1g K_1 = 20,3, 1g K_2 = 19,3) [142]. A gallium(III)ionokkal telített Tf-t ugyanúgy felismerik a receptorok és felveszik a sejtek [144]. A fémkomplexek Tf-nhez való kötődése is növelheti a rákos sejtek felé mutatott szelektivitást, a már említett fokozottan működő Tf-receptorok miatt.



13. ábra A holoTf szerkezete: a két homológ alegység; jobb oldalon a vas(III) koordinációs szférája. (A Protein Data Bank adatai alapján: 3QYT, [226,227].)

A vérszérum LMM komponensei közül a fémionokhoz koordinálódókat kell kiemelni, melyek a fémkomplexekből az eredeti ligandumot részben, vagy akár egészben ki is szoríthatják. Ilyen LMM komponens pl. a kloridion (~100 mM), a foszfát (~1,1 mM), a citrát (99 μ M), a His (77 μ M) és a Cys (33 μ M) [231]. A velük való reakció általában gyorsabb, mint a fehérjékkel való koordinációs kötés kialakulása.

3. Célkitűzések

Munkánk során rákellenes ruténium-, ródium- és galliumkomplexek, valamint tioszemikarbazonok fémkomplexeinek oldatkémiai viselkedését, szérumfehérjékkel való kölcsönhatását tanulmányoztuk. A biológiailag aktív fémkomplexek farmakokinetikai viselkedésének és hatásmechanizmusának átfogó megértéséhez szükséges annak ismerete, hogy milyen kémiai formában vannak jelen vizes oldatban, az emberi test egyes víztereiben. Ugyanis a konvencionális nemfémes hatóanyagokhoz képest egy fémkomplexszel sokkal többféle és nagyobb fokú változás mehet végbe a hatás helyszínére érkezése során. Ennek megfelelően a szilárd fázisú szerkezet ismerete nem elegendő a összefüggések feltérképezéséhez. szerkezet-hatás Klasszikus oldategyensúlyi vizsgálatokkal, - amiket a ligandumok és fémkomplexeik vízben való rossz oldhatósága gyakran megnehezít -, számos olyan oldatkémiai tulajdonságot tudunk jellemezni (pl. protonálódási folyamatok, lipofilitás, stabilitás, oldatszerkezet), ami nagyban segíti a lehetséges átalakulások megismerését. A szérumfehérjékkel való kölcsönhatások jellemzése a kötődés kinetikáját, erősségét, és helyét illetően elsősorban a disztribúciós folyamatok megismerését támogatja. A fémkomplexek fehérjékkel való kölcsönhatásának kvantitatív leírásához ugyanakkor segítséget nyújtanak az egyszerűbb kétkomponensű fehérje-ligandum rendszerek vizsgálatánál kidolgozott kísérleti metódusaink és a számítások során nyert tapasztalataink. Munkánk egyik célja olyan rákellenes hatású fémkomplexek, nemfémes vegyületek vizsgálata, melyeket korábban a szakirodalomban nem, vagy csak kevéssé tanulmányoztak, vagy éppen megkérdőjelezhetők az elvégzett vizsgálatok eredményei. A másik célunk, hogy összefüggéseket keressünk és tárjunk fel a kapott termodinamikai adatok, redoxi tulajdonságok, oldatszerkezeti információk, kristályszerkezeti adatok és fehérjékhez való kötődési képesség, valamint a citotoxikus hatás között.

A következő felsorolt vegyületeket, ill. vegyületcsaládokat választottuk vizsgálatainkhoz, melyekkel kapcsolatban az alábbi kérdések megválaszolására törekedtünk:

1. Klinikai vizsgálatokba került ruténium(III)komplexek (KP1019, KP1339) és rokonszerkezetű ruténium(II)-nitrozil-indazol vegyületek humán szérum albuminnal való kölcsönhatásának jellemzése, különös tekintettel az ellenion és az egyes szerkezeti változtatások hatására.

2. Félszendvics ródium(III)(η^5 -C₅Me₅)-, ruténium(II)(η^6 -arén) triakva fémorganikus kationok kétfogú ligandumokkal képzett komplexekeinek oldategyensúlyi vizsgálata, annak feltérképezése céljából, hogy a különböző típusú donoratomok hogyan hatnak a

30

komplexképződés sebességére, a kialakuló komplex stabilitására, deprotonálódására és kloridion-affinitására.

3. Ródium(III)(η^5 -C₅Me₅) és ruténium(II)(η^6 -*p*-cimol) kétfogú ligandumokkal képzett komplexeinek humán szérum albuminon való kötődésének jellemzése, hogy megismerjük a fémorganikus-ion és a donoratomok típusának hatását elsősorban a kölcsönhatás természetére vonatkozóan.

4. Hidroxi-(tio)pironok és 8-hidroxi-kinolinok gallium(III)komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata, kiemelten a klinikai vizsgálatokba került maltoláto és oxináto komplexek oldatbeli stabilitásának összehasonlítása céljából. Majd a két triszligandumú komplex humán szérum albuminnal és transzferrinel való kölcsönhatásának összehasonlítása az eltérő sejtes felvételük és hatásmechanizmusuk jobb megértése céljából.

5. Tioszemikarbazonok és réz(II)- és vas(II/III)ionokkal (valamint gallium(III)-, vanádium(IV/V)ionokkal) képzett komplexeinek oldatkémiai jellemzése, középpontba helyezve azt a kérdést, hogy a jelentős mértékben eltérő citotoxicitású ligandumok fémionok felé mutatott affinitása és a komplexek redoxi tulajdonságai és a biológiai hatás között fenn áll-e valamilyen kapcsolat.

6. Rákellenes nemfémes vegyületek (epidermális növekedési faktor receptor gátlók, kumarin- és folsav-származékok) humán szérum albuminnal való kölcsönhatásának jellemzése, a kötési állandók meghatározására szolgáló módszerek kritikai vizsgálata mellett.

4. Alkalmazott vizsgálati módszerek

4.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok és komplexek

A felhasznált ligandumok egy része, DNS kötőhely marker anyagok, puffer alapanyagok és reagensek, fémsók (CuCl₂, ZnCl₂, GaCl₃, FeCl₃, RuCl₃, VOSO₄, KCl, NaCl, AgNO₃, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, KNO₃), vaspor, KOH, NaOH, HCl, HNO₃, 2-(N-morfolino)etán-2-[4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-il]etánszulfonsav (HEPES), 4,4szulfonsav (MES), dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav (DSS) és oldószerek Sigma-Aldrich, Fluka, VWR vagy Reanal termékek. Sigma-Aldrich termékek a [{(Rh(η^5 -C₅Me₅))(μ -Cl)Cl}₂] és [{(Ru(η^6 -pcimol))(µ-Cl)Cl}2] dimerek, a zsírsavat is tartalmazó HSA, az apoTf és a humán vérszérum. A [{($Ru(\eta^6$ -toluol))(μ -Cl)Cl}₂] dimert az irodalomban jól ismert eljárás alapján magunk állítottuk elő [232], míg a [{(Ru(η^6 -(2-fenoxi-etanol))(μ -Cl)Cl}₂] dimert Andreia Valente-től (University of Lisbon) kaptuk. Egyes ligandumokat és fémkomplexeket egvüttműködő partnereink állították elő: i) Ru(III)-indazol komplexek. a tioszemikarbazonok jelentős része, EGFR inhibitor molekulák (Bernhard K. Keppler, University of Vienna); ii) Ru/Os(II)-nitrozil komplexek, prolin-, morfolin-, N-metilpiperazin-tioszemikarbazon konjugátumok (Vladimir B. Arion, University of Vienna); iii) redukált Schiff-bázis kumarin származékok (Bernadette S. Creaven, Institute of Technology Tallaght, Dublin). A folát-hidroxamát konjugátumokat Lisszabonban, az Instituto Superior Tecnico intézetben szintetizáltam korábban [233].

Az oldatok készítéshez Milli-Q vizet használtunk. A fémsók, ill. vaspor vízben vagy sósavban való oldása után a kapott törzsoldatok koncentrációját pH-potenciometriásan (félszendvics dimerek), komplexometriásan EDTA mérőoldattal (Ga(III), Cu(II), Zn(II), Ni(II)) vagy permanganometriás módszerrel (Fe(II), V(IV)O) határoztuk meg. A [Rh(η^5 -C₅Me₅)(H₂O)₃]²⁺, [Ru(η^6 -*p*-cimol)(H₂O)₃]²⁺ és [Ru(η^6 -toluol)(H₂O)₃]²⁺ törzsoldatok előállításához a félszendvics dimerekből készült oldatok kloridion-mentesítését AgNO₃ oldattal végeztük. A ligandum-törzsoldatok koncentrációját pH-potenciometriás titrálással határoztuk meg. A HSA és apoTf törzsoldatok pufferben készültek (pH = 7,4; 2-[4-(2hidroxi-etil)piperazin-1-il]etánszulfonsav (HEPES), foszfát, foszfát pufferes sóoldat, '*phosphate-buffered saline*' (PBS), PBS') és a fehérje törzsoldatokat egy napon belül mindig felhasználtuk. (A PBS' puffer összetétele: 1,5 mM KCl; 101 mM NaCl; 12 mM Na₂HPO₄; 3 mM KH₂PO₄). A HSA, és az apoTf törzsoldatok pontos koncentrációját UV-látható spektrofotometriásan határoztuk meg a moláris abszorbanciák alapján: ε_{280nm} (HSA) = 36850 M⁻¹cm⁻¹ [234]; ε_{280nm} (apoTf) = 92300 M⁻¹cm⁻¹ [235]. Az apoTf-nel végzett kísérleteknél a pufferoldat 25 mM NaHCO₃-ot is tartalmazott, ami a fiziológiás vérszérum HCO₃⁻-koncentrációjának felel meg. A humán szérummal a nagy viszkozitása miatt négyszeres hígításban dolgoztunk.

Az oxigénre érzékeny mintáknál (Fe(II), V(IV)O, L-glutation (GSH), aszkorbinsav (AA), 3-amino-piridin-2-karboxaldehid-szelenoszemikarbazon (Se-triapin)) szigorúan anaerob körülmények között dolgoztuk, míg a fényre érzékeny anyagoknál (pl. kurkumin) fénytől védett egyedi mintákkal dolgoztuk.

4.2. Fémkomplexek szintézise és röntgenkrisztallográfiai vizsgálata

A vizsgált szilárd formában is előállított fémkomplexek szintézise egyrészt nemzetközi együttműködés keretében partnerek kutatócsoportjaiban történt, melybe gyakran a hallgatóim is bekapcsolódtak. Ugyanakkor számos fémkomplexeket szintetizáltunk a saját laboratóriumunkban is, elsősorban röntgendiffrakciós mérésre alkalmas egykristályok előállítása céljából: [Rh(η^5 -C₅Me₅)(8-kinolinoláto)Cl], [Rh(η^5 -C₅Me₅)(kurkumináto)Cl], [Rh(η^5 -C₅Me₅)(phen)(N-metil-imidazol)](BPh₄)₂; [Ru(η^6 -toluol)(L)Cl] (ahol L: a 2-pikolinsav, 3-metil-2-pikolinsav, 5-bromo-2-pikolinsav és 2,4-dipikolinsav deprotonált formái) és [Ru(η^6 -toluol)(acac)Cl]. A komplexek jellemzése ¹H, ¹³C NMR spektroszkópia, elemanalízis és/vagy ESI-MS módszerekkel történt a röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat mellett. Ezen utóbbi méréseket May Nóra V. végezte (MTA TTK, Budapest). A komplexek szintézise és karakterizálása részletesen megtalálható az adott komplexszel kapcsolatos eredményeket leíró közleményünkben [P12,P14,P16].

4.3. Oldategyensúlyi vizsgálatok

4.3.1. pH-potenciometria

A vizes közegben lejátszódó komplexképződési egyensúlyi folyamatok egyik legáltalánosabb vizsgálati módszere a pH-potenciometria, abban az esetben, ha a folyamatot pH változás kíséri, azaz ha a komplexképződés során proton szorítódik le a ligandumról.

A komplexképződés az alábbi általános egyenlettel írható le (a töltések jelölésétől az egyszerűség kedvéért eltekintünk):

$$pM + qL + rH \rightleftharpoons M_pL_qH_r \tag{1}$$

ahol *M*: fémion, *L*: deprotonált ligandum, *H*: proton; *p*, *q*, *r*: sztöchiometriai együtthatók. Ez alapján a képződő részecskék stabilitási szorzata a következő:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p L_q H_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r}$$
(2)

A ligandumok protonálódási állandóinak, illetve a különféle fémionokkal képződő komplexek stabilitási szorzatainak meghatározásához a titrálási görbék kiértékelésékor többféle illesztő programot (HYPERQUAD, PSEQUAD [236,237]) használtunk. A programban bemenő adatként szerepelnek továbbá a mintához adagolt mérőoldat-térfogat– pH kísérleti adatpárok, az asszociátumok (különböző protonáltsági fokú ligandum részecskék, $M_pL_qH_r$ komplexek és hidroxidokomplexek) száma, az asszociátumok összetétele, a komponensek kiindulási teljes koncentrációja, a minta kiindulási térfogata, az ismert és az ismeretlen (közelítő) stabilitási szorzatok és különböző állandók, pl. titráló oldat koncentrációja, vízionszorzat (K_w). A programok, bár eltérő iterációs módszerrel, a keresett stabilitási szorzatokat az M, L és H komponensekre felírt anyagmérleg-egyenletek (3-5 egyenletek) megoldásával adják meg, ahol n a rendszerben képződő asszociátumok számát jelöli.

$$c_{M} = [M] + \sum_{i=1}^{n} p_{i} \beta_{p_{i}q_{i}r_{i}} [M]^{p_{i}} [L]^{q_{i}} [H]^{r_{i}}$$
(3)

$$c_{L} = [L] + \sum_{i=1}^{n} q_{i} \beta_{p_{i}q_{i}r_{i}} [M]^{p_{i}} [L]^{q_{i}} [H]^{r_{i}}$$
(4)

$$c_{\rm H} = [{\rm H}] + \sum_{i=1}^{n} r_i \beta_{p_i q_i r_i} [{\rm M}]^{p_i} [{\rm L}]^{q_i} [{\rm H}]^{r_i}$$
(5)

Az iterációsorozat végén megkapjuk a számított stabilitási szorzatokat és a titrálási görbék illesztését jellemző illesztési paramétert. A dolgozatban közölt stabilitási állandók után zárójelben szereplő szám az állandó utolsó számjegyével azonos nagyságrend szerinti standard deviáció értékét jelöli. A koncentráció eloszlási görbék számolása a komplexek összetételének, stabilitási állandójának és a komponensek teljes koncentrációjának ismeretében a MEDUSA nevű program segítségével történt [238].

A pH-potenciometriás vizsgálatokat vizes oldatban (vagy rossz oldhatóság esetén 30% vagy 60% (m/m) DMSO/víz oldószerelegyben) végeztük, általában 25,0±0,1°C-on 0,20 M vagy 0,10 M (KCl vagy KNO₃) ionerősség mellett. A pH-potenciometriás mérésekhez Orion 710A pH-mérőt, Metrohm Dosimat 665 tipusú automata bürettát, valamint Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektródot, ill. a kloridion-mentes közegű mérésekhez Metrohm '*double-junction*' 6.0255.100 elektródot használtunk, ahol a külső töltet telített KNO₃ oldat volt. A mérőműszer hitelesítése 0,05 M kálium-hidrogén-ftalát oldatra (t = 25°C; pH = 4,008), valamint a vízionszorzat értékére (*I* = 0,20 vagy 0,10 M (KCl/KNO₃); t = 25 °C; p*K*_W = 13,76 ±0,01 [239]) történt. A DMSO/víz keverékoldószerben kivitelezett méréseknél p*K*_W = 14,53 ±0,05 (30% (m/m) DMSO) és

16,15 \pm 0,01 (60% (m/m) DMSO) volt. A titrálásokat ismert koncentrációjú, KH-ftalát oldatra meghatározott karbonátmentes KOH mérőoldattal végeztük argon atmoszféra alatt 25,0 \pm 0,1 °C-on. A pH-mérő által mért értékek pH-értékre való alakítását az Irving és munkatársai által javasolt módszerrel végeztük [240]. A mérésekhez elkészített minták 5 vagy 10 cm³ térfogatúak voltak, ezekben a ligandum koncentrációja 0,8-4 mM volt, a fém-ligandum arány rendszertől függően 1:1 és 1:8 között változott a mintákban.

Fontos megjegyeznem, hogy a dolgozat terjedelmi korlátai miatt az összes – számos fémion-ligandum rendszernél többféle kísérleti módszerrel (pl. pH-potenciometria, UVlátható spektrofotometria, ¹H NMR-, ESR spektroszkópia) és különböző körülmények között (pl. H₂O *vs.* DMSO/H₂O oldószerelegyek; 0,20 M KNO₃ *vs.* 0,20 M KCl ionerősség) is – meghatározott egyensúlyi állandót nem tudom bemutatni. Az egyensúlyi állandók a dolgozat alapjául szolgáló közleményekben megtalálhatók részletesen, így az egyes vegyületcsaládoknál kiválasztott, reprezentatív példák segítségével igyekeztem a legjellemzőbb adatokat összefoglalni.

A pH-potenciometria fontos és elterjedt módszer a komplexképződés tanulmányozására, azonban vannak hiányosságai. Pl. ha két részecske képződése azonos pH-effektussal jár, akkor azok nem különböztethetők meg ezzel a módszerrel. Előfordulhat az is, hogy az adott fémion-ligandum rendszer többféle kémiailag reális modellel is ugyanolyan jó illesztéssel leírható. A meghatározott stabilitási állandók nem adnak információt a komplexekben megvalósuló kötésmódokról és koordinációs geometriáról. Modellrendszerekkel való összevetés ugyan nyújthat további információt, ugyanakkor a pH-potenciometriás mérési eredményeket spektroszkópiai módszerekkel (pl. NMR, ESR, UV-látható spektrofotometria, fluorimetria) is fontos kiegészíteni.

4.3.2. ¹H NMR spektroszkópia

A ¹H NMR spektroszkópia kiválóan alkalmas a ligandumok protonálódási folyamatainak, ill. izomerek, fémkomplexek képződésének követésére és segítségével mikroállandókat is meg lehet határozni. A ¹H NMR vizsgálatokat Bruker Ultrashield 500 Plus (500 MHz) és Bruker Avance III (600 MHz) típusú készülékeken végeztük. Az utóbbi készülékkel mértük nagy hígítású (~10-20 μM) mintáinkat is TXI (¹H, ¹³C, ¹⁵N) krio-mérőfejet használva. A minták 10% (V/V) D₂O-t, ill. 30% (V/V) D₆-DMSO-t és belső standardként DSS-t tartalmaztak. Többnyire a ligandumok, fémorganikus kationok, fémion-ligandum rendszerek ¹H NMR spektrumait rögzítettük különböző pH-kon, de állandó pH-n is végeztünk méréseket változó fémion-ligandum arány mellett. A mintákat általában 25,0±0,1°C-on 0,20 M vagy 0,10 M (KCl vagy KNO₃) ionerősség mellett mértük. Minden NMR-es mérésnél WATERGATE vízelnyomási pulzusszekvenciát használtunk.

Az NMR spektrumok kvantitatív kiértékelése a PSEQUAD programmal történt [237], ahol bemenő adatokként a kémiai eltolódást vagy az egyes részecskeféleségekhez tartozó integrálok arányai alapján számolt egyensúlyi koncentrációkat adtuk meg.

A 'Saturation Transfer Difference' (STD, telítés-átviteli különbség) NMR spektroszkópiás mérésekkel a fehérje-ligandum kölcsönhatás tényére és mértékére lehet következtetni. Az STD kísérlet során a fehérje proton-átmeneteit telítjük és a ligandummal való gyenge kölcsönhatás révén a telítés hatása átterjed a ligandum molekulára, a fehérjéhez nem kötődő ligandumra azonban nincs hatása. Elvégezzük a kísérletet besugárzással és a nélkül is, és a két spektrum különbsége maga az STD NMR spektrum. Így csak akkor kapunk jelet, amikor a ligandum kötődik a fehérjéhez.

4.3.3. UV-látható spektrofotometria

Az UV-látható spektrofotometriás módszert igen sokrétűen alkalmaztuk az egyes kémiai rendszerek jellemzésére. Egyrészt a ligandumok különböző pH-kon 200-800 nm hullámhossz tartományban rögzített UV-látható spektrumainak segítségével savi disszociációs állandókat és a különböző protonáltságú ligandumformák moláris abszorbancia spektrumait határoztunk meg. Természetesen erre akkor nyílt lehetőségünk, ha a ligandum abszorbeál a fenti hullámhossztartományban és a deprotonálódásra kellően érzékenyek az egyes kromofór csoportok. Másrészt komplexképződési egyensúlyi folyamatokat is vizsgáltunk a fém-ligandum töltésátviteli és/vagy a d-d átmenetekhez (elsősorban Cu(II)) tartozó sávok követésével. Az egyensúlyi állandók meghatározása mindig állandó hőmérsékleten (többnyire 25,0±0,1°C-on) és állandó ionerősség mellett történt.

A mérési adatokból az egyensúlyi állandókat a PSEQUAD programmal [237] számoltuk. Ekkor a pH-potenciometriás mérési adatok kiértékelésére vonatkozó részben (4.3.1) felsoroltak mellett további bemenő adatként szerepelt a rendszerben képződő színes részecskék száma, és a különböző hullámhosszakon mért abszorbancia értékek. A réz(II)-TSK [CuL]⁺ komplexeinek látszólagos stabilitási szorzatait (β') vizes közegben EDTA-val – melynek réz(II)ionnal képzett komplexének stabilitás állandója jól ismert [241] – határoztuk meg kompetíciós reakcióval spektrofotometriásan. Majd a TSK ligandum p K_{a} -inak ismeretében számítottuk a komplexek stabilitási szorzatait (β): β [CuL]⁺ = β' [CuL]⁺ × α_H , ahol $\alpha_H = 1 + [H^+]/K_a$ (HL) + $[H^+]^2/(K_a$ (HL) × K_a (H₂L⁺)); [H⁺] = 10^{-5,90}.

Spektrofotometriásan vizsgáltuk továbbá egyes tioszemikarbazonok, bisz-indazol-Ru(III)- és Ru/Os(II)-nitrozil komplexek hidrolitikus stabilitását, Cu(II)- és Fe(III)tioszemikarbazon komplexek redoxi reakcióját L-glutationnal és aszkorbinsavval.

Bizonyos esetekben a fehérjékkel való kölcsönhatásról is közvetlen vagy közvetett információt kaphatunk az UV-látható spektrofotometriás mérések segítségével. Ilyenkor általában a fehérje elnyelési sávoknál nagyobb hullámhosszakon detektálunk változásokat. Valamint az ultraszűrés után, a lipofilitás jellemzése végett végzett *n*-oktanol/víz megoszlások mérése során kapott minták vizsgálatához, ill. a fluorimetriás emissziós spektrumok korrekciójához is vettünk fel UV-látható spektrumokat.

Az UV-látható spektrofotometriás méréseket Hewlett Packard 8452A diódasoros és Thermo Scientific Evolution 220 spektrométereken végeztük. Az optikai úthossz (*l*) rendszertől függően 0,5-5,0 cm között változott, annak érdekében, hogy értékelhető spektrumokat kapjunk. Az oxigén kizárása melletti kinetikai mérésekhez zárt tandemküvettát alkalmaztunk argontúlnyomás mellett, és minden oldaton a reakció indítása előtt 10-15 percig argont áramoltattunk át, melyet előtte lúgos pirogallolt tartalmazó oldaton vezettünk át.

A ligandumok, fémkomplexek megoszlási hányadosait (*D*) (és állandóit (*P*)) *n*oktanol és vizes fázis közötti megoszlás alapján határoztuk meg. A vizes fázisok UVlátható spektrumainak segítségével határoztuk meg az adott vegyület megoszlás előtti és utáni koncentrációját. Az *n*-oktanolos és a pufferelt vizes fázist előzetesen kölcsönösen telítettük egymással. Az adott vegyületet a vizes pufferoldatban oldottuk fel, majd hozzáadtuk az *n*-oktanolt 1:1 térfogatarányban. Az érintkező fázisokat három órán át kevertettük, majd centrifugát használva választottuk el őket. A számolást az alábbi egyenlet alapján végeztük az abszorpciós maximumot közrefogó hullámhossz tartományban.

$$D = \frac{A(\text{eredeti}) - A(\text{vizes fázis})}{A(\text{vizes fázis})}$$
(6)

A megoszlási állandót, mely a vegyületek semleges formájára vonatkozik az egyensúlyi állandók ismeretében számoltuk.

4.3.4. Spektrofluorimetria

A spektrofluorimetria elsősorban nagyfokú érzékenységének és sokrétű felhasználhatóságának köszönhetően napjaink közkedvelt vizsgálati módszere. A fluoreszcens anyagok az UV-látható sugárzás abszorpciója révén kialakuló gerjesztett állapotból fénykibocsátás útján jutnak vissza alapállapotba úgy, hogy a fénykibocsátást nem előzi meg spinátfordulás, azaz szingulett állapotból sugároz az adott vegyület. A

fluorofórok jellemzően piko-, nanoszekundumos fluoreszcencia-élettartammal bírnak. A fluorofórok többnyire kiterjedt delokalizált elektronrendszerűek és planáris szerkezetűek. Az általunk tanulmányozott két fehérje, a HSA és az apoTf tartalmaz fluoreszcens Tyr és Trp aminosavakat. A HSA-ban egyetlen Trp van a 214-es pozícióban a IIA doménban, ez az I-es hidrofób kötőhelynél található [220]. A Trp szelektíven gerjeszthető 295 nm-en. Így ha az I-es kötőhelyen kötődik egy vegyület, az hatással van a Trp emissziójának intenzitására. Az ilyen típusú vizsgálatok az ún. fluoreszcencia-kioltás ('*quenching*', kvencselés) jelenségén alapulnak [242]. Ekkor a HSA kezdeti emissziós intenzitása az adott vegyület hozzáadásával csökken, és ennek mértékéből a fehérje-vegyület kölcsönhatásról, a kötés erősségéről kaphatunk információt. Hasonlóképpen a Tyr-nal való kölcsönhatás is tanulmányozható, ekkor a gerjesztő hullámhossz 280 nm.

Néhány esetben a vizsgálni kívánt vegyület önmagában is fluoreszcens, a különböző pH-kon felvett emissziós spektrumok segítségével (teljesen analóg módon az UV-látható spektrofotometriás méréseknél és adatfeldolgozásnál leírt módon) követhetjük a ligandumok proton disszociációs folyamatait, vagy a komplexképződést, de a nagymolekulákkal való kölcsönhatások közvetlen követése is lehetővé válik.

Sokszor a molekulák közötti kölcsönhatások közvetlenül nem követhetők fluorimetriásan, ekkor alkalmazhatóak a fluoreszcens markerek. A HSA hidrofób zsebeinek markerei a WF és bilirubin (BR) (I. kötőhely), valamint a danzil-glicin (DG) (II. kötőhely) [219,220,224,243,244]. Ezekre a marker vegyületekre igaz az, hogy önmagukban alig vagy egyáltalán nem emittálnak fényt; de a makromolekulához kötődve többszörösére nő a fluoreszcens intenzitásuk és általában az emissziós maximumuk értéke is megváltozik. Ha a marker–makromolekula rendszert alkalmas versengő vegyülettel titráljuk, akkor a marker kiszorul kötőhelyéről, így a mért emissziós intenzitás csökken.

A fluorimetriás méréseket igen híg oldatokban végeztük (μM-os koncentrációk) a jelentős belső filter hatás és az önabszorpció elkerülése miatt. Ha az adott hullámhossz tartományban az abszorbancia nagyobb, mint 0,05, akkor a mért intenzitás korrekciója szükséges, ehhez a következő képletet használtuk (az intenzitást Int.-el jelöljük) [242]:

$$Int._{korr} = Int._{mért} \times 10^{(A_{EX} + A_{EM})/2};$$
(7)

ahol Int._{mért} és Int._{korr} a mért és a korrigált fluoreszcens intenzitások, A_{EX} és A_{EM} a vizsgált minta gerjesztő és emissziós hullámhosszon mért abszorbanciája.

A fluorimetriás emissziós spektrumok kvantitatív kiértékelésére lehetőséget ad az, hogy adott körülmények között a mért intenzitás egyenes arányban függ a fluorofór(ok) koncentrációjától. A mérési adatokat, szemben a hagyományos linearizálási módszerekkel (Stern-Volmer, Lineweaver-Burk és Scatchard illesztések [242,245,246]) a PSEQUAD programmal értékeltük ki [237]. A program előnye, hogy alkalmas teljes spektrumok analízisére, és képes egyszerre több emittáló komponens figyelembevételére, míg az említett grafikus módszerek csak egy hullámhosszon való kiértékelést tesznek lehetővé, az egyensúlyi koncentrációk helyett helytelenül analitikai (teljes) koncentrációkat használnak, és egyszerre csak egy emittáló részecske figyelembevételére alkalmasak. Ha fehérjével való kölcsönhatást vizsgálunk, akkor az alábbi egyensúlyi reakció írható fel:

$$p$$
 (ligandum) + q (fehérje) \rightleftharpoons (ligandum) $_p$ (fehérje) $_q$; (8)

$$\beta_{pq}' = [(\text{ligandum})_p(\text{fehérje})_q]/([\text{ligandum}]^p[\text{fehérje}]^q); \qquad (9)$$

 β_{pq} ': látszólagos stabilitási szorzat fehérje–ligandum adduktumra;

[a]: 'a' részecske egyensúlyi koncentrációja;

q, p: sztöchiometriai együtthatók; ha q = p = 1, akkor az egyes kötőhelyekkel való kölcsönhatások 1:1 arányú reakciókként értelmezzük;

ligandum: ligandumok, ill. kötőhely-markerek, fémkomplexek.

Az anyagmérlegek pedig ennek megfelelően a (3)-(5) egyenletekkel analóg módon felírhatóak. A koncentrációk és a mért emissziós intenzitás között a fehérje – ligandum rendszerre az alábbi egyenlet teremt kapcsolatot (ha q = p = 1):

Int._i =
$$\varphi_{\text{ligandum}}^1 \times [\text{ligandum}] + \varphi_{\text{fehérje}}^1 \times [\text{fehérje}] + \varphi_{\text{fehérje}}^1 - \text{ligandum} \times [\text{fehérje} - \text{ligandum}]$$
(10)

Az egyenletben az *Int.*_i az *i*-edik hullámhosszon mért emissziós intenzitás és φ^{i}_{x} az x komponens "moláris emissziója" *i*-edik hullámhosszon. A program az UV-látható számolásokhoz hasonlóan megadja az emittáló komponensek "egyedi spektrumát", ennek információtartalma azonban kevesebb, mivel a számolt "moláris intenzitás" a műszertől és annak beállításaitól is függ. Ennek megfelelően a dolgozatban közölt intenzitásokat is önkényes egységben (*a.u.*) adom meg. Hasonlóképpen számolhatók kiszorítási állandók egy fehérje – kötőhely marker – kompetítor rendszerre. Itt a kötőhely marker kötési állandóját előzetesen meg kell határozni, majd rögzített marker:fehérje arányú mintákat (általában 1:1) titráltunk a kompetítor vegyülettel.

A Stern-Volmer-féle egyenesillesztés [242] során fehérje kezdeti (Int.₀) és a "kioltó" anyag vegyület jelenlétében az emissziós maximumnál mért intenzitás (Int.) hányadosát ábrázolják a "kioltó" vegyület teljes (analitikai) koncentrációjának függvényében, majd a kapott pontokra illesztett egyenes meredeksége adja a kötési állandót. A Stern-Volmer-féle illesztés alapja a (11) egyenlet:

$$\operatorname{Int.}_{0}/\operatorname{Int.} = 1 + [Q] \times K_{\mathrm{SV}}$$
(11)

A (11) egyenletben az Int.₀ és Int. a "kioltó" vegyület távol-, majd jelenlétében mért emisszió és [Q] a "kioltó" egyensúlyi koncentrációja, K_{SV} a Stern-Volmer állandó, amit szokás kötési állandóként értelmezni. Amennyiben csak részleges kioltás van, úgy a (11) képlet a következőképpen módosul:

Int.₀ / (Int.₀ – Int.) =
$$1/(f_a \times K_{SV} \times [Q]) + 1/f_a$$
 (12)

Itt a kötési állandó az y-tengelymetszet és a meredekség hányadosa. Az f_a tag a fluorofór hozzáférhető hányadát jelöli. Részleges kioltást tapasztalhatunk, ha a jelenlévő fluorofórok nem egyformán hozzáférhetőek a kioltó számára. Több esetben használtuk mi is ezeket a közelítéseket, de a PSEQUAD program [237] által számolt állandókat fogadtuk el végleges állandónak.

A fluorimetriás méréseket Hitachi F-4500, termosztálható mintatartóval ellátott spektrofluoriméteren végeztük 25,0 vagy 37,0 °C-on. A minták összetételétől és a vizsgálni kívánt fluorofórtól függően változó kísérleti paramétereket alkalmazva dolgoztunk (λ_{EX} [nm] = Trp: 295, Tyr: 280, WF: 310, DG: 335, BR: 487, KP46: 367). A vegyületek koncentrációja jellemzően a 0,2-30 µM tartományba esett.

4.4. Ciklikus voltammetria

Cu(II)-Fe(III)-komplexek redoxi Α módszer segítségével és tulajdonságait tanulmányoztuk elsősorban tioszemikarbazonok esetén. A ciklikus voltammogram elemzésével kapott katódos, anódos csúcspotenciálok, csúcsáramok segítségével kaphatunk információt a reakcióban résztvevő elektronok számára, a folyamat reverzibilitására és a formálpotenciál értékére. A ciklikus voltammetriás méréseket egy számítógép vezérelte Autolab-PGSTAT 204 típusú elektrokémiai mérőműszerrel végeztük. A rendszerben többnyire platina munka- és segéd-, valamint Ag/AgCl/KCl (1 vagy 3 M) referencia elektródot alkalmaztunk. A méréseket 25,0±0,1 °C-on, állandó ionerősség mellett végeztük, a fémionok koncentrációja általában 1 mM volt, változó fém-ligandum arányt használtunk.

4.5. Elválasztási módszerek: ultraszűrés és kapilláris zónaelektroforézis

Az ultraszűrés segítségével kisméretű molekulák fehérjékkel való kölcsönhatása vizsgálható. A makromolekulákhoz kötött és a szabad kismolekula frakciót megfelelő inkubálást követően membránszűrő segítségével elválasztjuk centrifugálással. Ezután két frakciót kapunk: a szűrőn átjutó ún. LMM, míg a szűrőn fennmaradó rész a HMM frakció. Mindkét frakció összetétele vizsgálható megfelelő analitikai módszerrel, pl. UV-látható spektrofotometria, fluorimetria, ICP-MS stb. A kötési állandók (látszólagos képződési állandók) számolásához a PSEQUAD programot [237] használtuk, melyhez az analitikai módszerrel meghatározott egyensúlyi koncentrációkat használtuk fel.

Az ultraszűréshez egyszer használatos Millipore Amicon Ultra-0.5 (10 kDa) membránszűrőt használtunk. A mintákat Eppendorf MiniSpin Plus vagy Sanyo Harrier 18/80 termosztálható centrifugával centrifugáltuk 10000 rpm fordulatszámon 5-15 percig, addig, amíg a mintatérfogat 80-85%-a átjutott a szűrőn (a minta teljes leszűrése az egyensúly eltolódásához vezetne). Ellenőriztük mindig, hogy a vizsgált vegyület önmagában átmegy-e a szűrőn, és csak a ≥95%-ban átjutókkal dolgoztunk. A minták 0,50 cm³ térfogatban készültek, a HSA-t 50-630 µM koncentrációban használtuk, a vérszérum négyszeres hígítású volt. Többnyire csak a fehérjementes LMM frakcióját analizáltuk (Hewlett Packard 8452A spektrométerrel, Hitachi F-4500 típusú spektrofluoriméterrel, vagy ICP-MS készülékkel (ld. 4.2.7. Kiegészítő mérések). Mindhárom detektálási módszer esetén előzetes kalibrációt végeztünk a fémkomplexekkel.

A kapilláris zónaelekroforézis (CZE) technikát elterjedten használják fehérjekismolekula – akár fémkomplex – kölcsönhatások követésére [247]. Az elektroforetikus elválasztási módszerek azon alapulnak, hogy elektromos potenciálkülönbség hatására az ionok a töltésüknek megfelelő elektród felé vándorolnak. Méréseink során a HSA és a bisz-indazol-Ru(III)-komplexek és kisméretű kétfogú ligandumok (maltol, dhp, pic) kölcsönhatását vizsgáltuk abból kiindulva, hogy a nagy móltömegű fehérje és a hozzá kötött vegyület elektroforetikus mozgékonysága eltér a szabadtól (ill. háromkomponensű rendszerek esetén a kötőhely-markerétől). A CZE méréseket Agilent HP^{3D} CZE System és Agilent G7100 készülékeken végeztük a Bécsi Egyetemen, detektáláshoz UV-látható online detektort használtunk. А mérési körülmények leírása megtalálható közleményeinkben [P1,P17]. A háttér elektrolit minden esetben foszfát puffer volt (pH = 7,40), és a mintákat, a mintatartót és a kapillárist rendszertől függően 25 vagy 37 °C-on termosztáltuk. A mintákban a HSA koncentráció rendszerint 5-100 µM között változott. A nem-kötött vegyülethez rendelt csúcs csúcsmagasságát, ill. a csúcs alatti területét követtük méréseink kiértékeléséhez.

4.6. Kiegészítő módszerek

Az ESR spektroszkópia módszerrel a Cu(II)- és V(IV)-komplexek esetén nyertünk fontos információkat a különböző pH-kon felvett spektrumokból számolt ESR paraméterek (g-faktor, hiperfinom csatolási állandó) segítségével elsősorban a koordinációs módról és a komplexek geometriájáról. A mérésekhez a mintákat többnyire mi készítettük, de a spektrumok felvételét és kiértékelését May Nóra V. végezte (MTA TTIK, Budapest). A spektrumok felvétele szobahőmérsékleten, vagy 77 K-en történt általában a fémionra nézve 0,5-1 mM-os oldatokban egy BRUKER EleXsys E500 spektrométerrel. A fluoreszcens

élettartammérésekhez Rodrigo F.M. de Almeida-tól (Centro de Química e Bioquímica, University of Lisbon) kaptunk segítséget. Egyes Ru-tartalmú mintáinkban fém összkoncentrációjának meghatározása induktívan csatolt plazma-tömegspektrometria (ICP-MS) segítségével történtek (Agilent 7500ce készülék) Bernhard K. Keppler laboratóriumában (Institute of Inorganic Chemistry, University of Vienna).

A vegyületek citotoxikológiai vizsgálatát Petra Heffeter (Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna), Szakács Gergely, Veronika F.S. Pape (MTA TTIK, Budapest), Michael Jakupec (Institute of Inorganic Chemistry, University of Vienna) és Spengler Gabriella (SZTE, ÁOK, Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet) végezte. A fehérje-kis molekula kölcsönhatások STD NMR spektroszkópiai mérései Hetényi Anasztázia (SZTE, ÁOK, Orvosi Vegytan) segítségével történtek egy Bruker Avance III (600 MHz) típusú készüléken. Egyes rákellenes vegyületek (redukált Schiff-bázis kumarin származékok, EGFR inhibitorok) és a KP46 komplex HSA-hoz való kötődésére vonatkozó kísérleti eredményeinket molekuláris dokkolással Tiziano Tuccinardi (Department of Pharmacy, University of Pisa) és Borics Attila (SZBK, Szeged) erősítette meg.

5. Eredmények és következtetések

5.1. Ruténium(III/II)komplexek vizsgálata

5.1.1. KP1019 és KP1339 kölcsönhatása humán szérum albuminnal

A klinikai vizsgálatokba jutott KP1339 és a KP1019 (2. ábra) ruténium(III)-tartalmú biszindazol komplexek HSA-hoz való kötődését spektrofluorimetriás, ultraszűrés és kapilláris zónaelektroforézis technikákkal vizsgáltuk különös tekintettel a lehetséges kötőhelyek azonosítására. A szakirodalomban ismert volt korábban, hogy a KP1019 ehhez a fehérjéhez először másodlagos kémiai kölcsönhatások révén kötődik, majd átrendeződés révén koordinációs kötés alakul lassan [40]. A KP1339 és a KP1019 hidrolízisének [33] visszaszorítása érdekében méréseinket leginkább 150 mM NaCl jelenlétében 25 °C-on, pH = 7,40-en (foszfát pufferben) végeztük.

A komplexek közvetlen kölcsönhatását HSA-val spektrofluorimetria segítségével kezdtük el vizsgálni. Első lépésként a IIA aldoménben, azaz az I. kötőhelyen megvalósuló kölcsönhatást monitoroztuk a fehérje egyetlen Trp-jának (Trp214) emissziós tulajdonságán keresztül. Ennek az aminosavnak a szelektív gerjesztésekor ($\lambda_{EX} = 295$ nm) ha az I. kötőhelyen kötődik egy vegyület, akkor ennek hatására megváltoznak a hidrofób-hidrofil viszonyok, ami hatással van a Trp emissziójának intenzitására. Ekkor a fehérje kezdeti emissziós intenzitása a vegyület hozzáadásával folyamatosan csökken (kioltás történik), és a csökkenés mértékéből a HSA-fémkomplex kölcsönhatásról nyerhetünk információt.



14. ábra (a) A HSA – KP1339 rendszer fluoreszcencia emissziós spektrumai változó fehérje:komplex arányoknál mérve (fekete) és a HSA saját spektruma (piros). (b) A 334 nm-en mért relatív intenzitáscsökkenés (Int./Int.₀ %) és a Stern-Volmer-féle egyenesillesztés a kapott pontokra (beszúrt ábra). { $c_{\text{HSA}} = 1 \,\mu\text{M}$; $c_{\text{KP1339}} = 0.14,7 \,\mu\text{M}$; $\lambda_{\text{EX}} = 295 \,\text{nm}$; 25 °C; pH = 7,40 (20 mM foszfát puffer, 150 mM NaCl)}

A HSA - KP1339 rendszerben a Trp-kioltásos fluorimetriás mérések alapján a kémiai egyensúly gyorsan beáll, így 10-15 perc várakozási időt alkalmaztunk az emissziós spektrumok felvételekor. Ez a gyors, másodlagos kölcsönhatásokkal létrejövő kötődés farmakológiai szempontból előnyös, mert megnöveli a véráramban való tartózkodási időt, ami lassabb kiürülést eredményez. A mért intenzitásokat mindig korrigáltuk az oldatok jelentős abszorbanciája miatt (ld. belső filter hatás figyelembevétele 4.3.4. fejezet). A 14.a ábra a HSA – KP1339 rendszer emissziós spektrumait mutatja különböző arányoknál rögzítve, és jól látható, hogy a HSA kezdeti emissziós intenzitása a hozzáadott komplex koncentrációjának növelésével folyamatosan csökken. A mért spektrumokból a PSEQUAD program [237] segítségével számítottunk kötési állandókat, de a Stern-Volmer-féle egyenesillesztést [242] is elvégeztük (14.b ábra). Ebben az esetben a kétféle módszerrel számolt állandó jó egyezést mutatott (1. táblázat). A KP1019 önmaga is emittál a vizsgált hullámhossz-tartományban, a fluoreszcens indazólium ellenionja miatt, így a Stern-Volmer módszerrel nem voltak kiértékelhetők a mért spektrumok. A PSEQUAD programmal [237] viszont az egyensúlyi állandót meg tudtuk határozni (1. táblázat), mivel a program képes egyszerre több emittáló részecske kezelésére is.

	KP1019	KP1339
Fluorimetria	lg	K'
Trp214 kioltás (PSEQUAD)	5,66(6)	4,69(6)
(Stern-Volmer)	-	4,66(6)
WF-kiszorítás	5,8(1)	5,7(1)
DG-kiszorítás	5,8(2)	5,3(1)
BR-kiszorítás	6,25(6)	6,01(2)
Ultraszűrés–UV-látható sp.		
$\lg K_1$ '	4,7(2)	5,0(1)
$\lg K_2$ '	4,6(2)	4,67(5)

1. táblázat A bisz-indazol-Ru(III)-komplexek különböző mérési technikák alapján számolt HSA kötési- és kiszorítási állandói. {25 °C, pH = 7,40 (20 mM foszfát puffer, 150 mM NaCl)}

Trynda-Lemiesz és munkatársai szintén tanulmányozták a KP1019 kölcsönhatását albuminnal ezzel a kioltásos módszerrel [248], azonban az általuk tapasztalt intenzitáscsökkenés inkább az alkalmazott nagy koncentrációk miatt fellépő belső filter hatásból eredhetett. A számolt látszólagos stabilitási állandók alapján a KP1339 komplex közel egy nagyságrenddel gyengébben kötődik az. I. kötőhelyhez, mint a KP1019. Ezt a különbséget nehéz megindokolni, hiszen a kötődő ágenseket hasonlónak gondoljuk, így a kölcsönhatást ultraszűrés–UV-látható technikával vizsgáltuk tovább.

A HSA – komplex rendszer ultraszűrés után kapott mintáinak LMM frakcióját UVlátható spektrofotometriásan vizsgáltuk és a megfelelő (külső) kalibrálást használva határoztuk meg a szabad fémkomplexek mennyiségét. A fehérjén kötött KP1339 komplex arányát mutatja a 15.a ábra az analitikai koncentrációk arányának függvényében. Megállapítottuk, hogy a HSA két ekvivalens fémkomplex megkötésére volt képes mindkét fémkomplex esetében, és a meghatározott makroállandók (1. táblázat) az elleniontól függetlenül hasonló mértékű megkötődést mutattak. Ugyanakkor a szakirodalomban 1, 4 ill. 10 ekvivalens KP1019 komplex maximális megkötődését is leírták [36], ezekkel a mi adataink nem egyeznek. Azt azonban meg kell jegyezni, hogy a Ru(III)-komplexek egy része a fehérjék felületén gyengén kötődhet [249,250], viszont az ultraszűréssel ezek az adduktumok disszociálhatnak. Másrészt az ultraszűrés segítségével kapott állandók, melyek segítségével számolt koncentráció eloszlási görbéket mutat a 15.b ábra, csak a globális kötődési folyamatot írják le, de nem tükrözik az egyes kötőhelyekhez való affinitást.



15. ábra (a) A fehérjén kötött KP1339 egyensúlyi és a HSA analitikai koncentrációjának aránya az analitikai koncentrációk arányának függvényében, kísérleti pontok (két párhuzamos mérésből) és a lépcsőzetes stabilitási állandók alapján számolt görbe (szaggatott). (b) A számolt egyensúlyi koncentrációk az egyes részecskékre a HSA – KP1339 rendszerben. { $c_{HSA} = 58 \ \mu\text{M}$; $c_{KP1339} = 0$ – 150 μM ; 25 °C; pH = 7,40 (20 mM foszfát puffer; 150 mM NaCl)}.

A IIA és IIIA aldoménekben megvalósuló kölcsönhatásokat háromféle marker segítségével monitoroztuk. A WF az I. kötőhely markere, a BR valószínűleg ezen kötőhely közelében, azt átfedve kötődik, míg a DG a II. kötőhelyen kötődik [243,244]. A 16.a ábra jól mutatja, hogy WF és DG vegyületeknek van, míg a BR-nak nincs mérhető saját emissziója, de emissziós intenzitásuk sokszorosára nő (ill. BR esetében megjelenik), amikor a fehérje megfelelő kötőzsebébe megkötődnek. A kötőhely kiszorításos méréseket megelőzően mindig meghatároztuk a mérési körülményeink között a kötőhely marker-HSA kölcsönhatást jellemző látszólagos stabilitási állandókat (lgK'= 5,6(1) (HSA-WF);

5,2(1) (HSA-DG); 7,3(2) (HSA-BR)), melyek jó egyezést mutattak az irodalmi adatokkal [224,243,244,251,TP17]. Végeztünk méréseket más körülmények között is (pl. 37 °C; HEPES puffer; pH = 8,5), de a kötési állandók csak kis mértékben változtak. A kiszorításos mérések során a HSA-t és a markert 1:1 arányban tartalmazó mintát titráltunk a fémkomplexszel, ami, ha kiszorítja a markert, akkor a mért intenzitás lecsökken, mivel a szabad marker kevésbé emittál, mint a HSA-hoz kötött. A szakirodalomban korábban is leírták már, hogy a KP1019 verseng az albumin kötőhelyeiért a WF-nal, de az adatok kvantitatív kiértékelése nem történt meg [248]. A kiszorítást kísérő intenzitáscsökkenést mutatja a 16.b ábra a HSA - WF - KP1339 rendszerben. A spektrumok felbontásával nyert kötési állandókat az 1. táblázatban mutatom be, melyek alapján megállapíthattuk, hogy mindkét vizsgált Ru(III)-komplex közepes erősséggel kötődik az I. és II. kötőhelyeken. A két komplex viselkedésében nincs lényegi eltérés, azaz az ellenionok különbözősége nem befolyásolja a HSA-hoz való kötődést. A Trp214 kioltásos méréseknél a KP1339 estében kapott kisebb állandó okaként azt valószínűsítettük a méréseink alapján, hogy kismértékű indazol ligandum disszociáció történik a komplexről (ez a KP1019 esetében visszaszorul az ellenion jelenléte miatt). A kis koncentrációban jelenlévő indazol saját emissziója megnöveli a mért intenzitást a vizsgált hullámhossz-tartományban, ami kisebb mértékű kioltást eredményez.



16. ábra (a) A kötőhely markerek és HSA komplexeik normált egyedi emissziós spektrumai, WF, HSA–WF ($\lambda_{EX} = 310 \text{ nm}$); DG, HSA–DG ($\lambda_{EX} = 335 \text{ nm}$) és HSA–BR ($\lambda_{EX} = 487 \text{ nm}$), a [HSA–marker] spektrumokat a PSEQUAD programmal számítottuk. (b) HSA–WF (1 µM:1 µM) rendszer KP1339 komplexszel (0-18 µM) történő titrálásakor mért emissziós spektrumok. Beszúrt ábra: a mért (•) és a számított (pontozott vonal) intenzitás változása 390 nm-en. {25 °C; pH = 7,40 (20 mM foszfát puffer, 150 mM NaCl)}

A spektrofluorimetriás mérések mellett a kötőhely markerekkel való kompetíciót a vízben jobban oldódó WF és DG esetében CZE és ultraszűrés–UV-látható módszerekkel is vizsgáltuk. Ezen elválasztási módszereket alkalmazva a kis- és nagymolekulatömegű részecskék elválnak, ill. elválaszthatók egymástól. A markerek aktuális koncentrációját

meg lehetett becsülni külső kalibrálás segítségével. Mindkét módszernél a kötőhely marker és a fémkomplex közötti versengés egyértelműen kimutatható volt, bár a számolt kötési állandók a CZE esetében valamivel kisebbek a spektroszkópiai módszer alapján várthoz képest, ami a kémiai egyensúly eltolódására utal.

A spektrofluorimetriás vizsgálatainkkal rámutattunk arra, hogy a két Ru(III)komplex és a bilirubin között versengés tapasztalható az albuminhoz való kötődésben, melynek klinikai relevanciája van. A BR és a Ru(III)-komplexek versengését szemlélteti a 17. ábra, egy olyan hipotetikus rendszerben, ahol a HSA és a komplex ekvimoláris mennyiségben van jelen változó BR koncentráció mellett. A 11 µM-os érték a BR normál koncentrációja a vérben, míg a 34 és 68 µM már kóros állapotot (pl. májelégtelenség) jelez. A számításaink alapján az jósolható, hogy a BR koncentrációjának növekedésével a kiszorított Ru(III)-komplex mennyisége megnő, a két komplex viselkedése hasonló. Ha nő a szabad fémkomplex mennyisége, az fokozott mellékhatásokhoz vagy gyorsabb kiürüléshez vezethet [219,220]. Ezek az eredmények magyarázatul szolgálhatnak az emelkedett bilirubin szintű, azaz *hiperbilirubinémiában* szenvedő betegek KP1019 komplexszel történő kezelésekor tapasztalt rossz válaszreakciókra [250,253].



17. ábra Az I. (IIA aldomén) kötőhelyen a nem kötött ("szabad") KP1339 (kék) és KP1019 (piros) %-os megoszlása egy hipotetikus HSA–BR–Ru(III)-komplex rendszerben, változó BR koncentrációk alkalmazásával. { $c_{\text{HSA}} = 630 \ \mu\text{M}$; $c_{\text{Ru(III)-komplex}} = 630 \ \mu\text{M}$; fluorimetrás állandók ($\lg K'_{\text{BR}}, \lg K'_{\text{BR-kiszorítás}}$ (KP1339/1019)) alapján számolva}.

5.1.2. Ruténium(II)-nitrozil-indazol komplexek kölcsönhatása humán szérum albuminnal

A KP1019 és KP1339 komplexekhez hasonló szerkezetűek Arion és munkatársai által előállított ruténium(II)-nitrozil-indazol komplexek, melyekben négy klorido ligandum mellett egy NO és egy indazol ligandum található egymáshoz képest *transz* helyzetben (18. ábra) [254]. Az ellenion az azol ligandum kationos formája, ill. nátriumion. Ezen komplexek és néhány ozmiumanalóg hidrolízisét és HSA-hoz való kötődését jellemeztük. A vizsgálatok célja az volt, hogy képet kapjunk a szerkezeti változtatások kötési állandót befolyásoló hatásáról. A komplexek *in vitro* citotoxicitást jellemző IC₅₀ értékeikben jelentős különbségek mutatkoztak, elsősorban a kétféle központi fémion között. A Ru(II)-komplexek rendre két nagyságrenddel hatékonyabbnak bizonyultak, mint az Os(II)-komplexek, valamint a KP1019-nél is jóval citotoxikusabbak voltak az SW480 (vastagbélrák) és CH1 (limfóma) humán rákos sejtvonalakon.



18. ábra A vizsgált Ru(II)/Os(II)-nitrozil komplexek szerkezeti képlete

Az 1-5 komplexek (18. ábra) vizes oldatbeli stabilitását pH = 7,40-n 0,10 M NaCl jelenlétében vizsgáltuk UV-látható spektrofotometriásan. A komplexek 24 órán keresztül stabilisnak mutatkoztak vizes oldatban, a koordinált kloridionok nagy valószínűséggel nem cserélődtek vízmolekulákra, hiszen az spektrális változással járna és azt nem tapasztaltuk. A HSA-nal való kölcsönhatást először ultraszűrés–UV-látható fotometriás módszerrel tanulmányoztuk. A cisz-konfigurációjú 1 megtapadt a szűrő felületén, így csak a 2-5 komplexeket vizsgáltuk ezzel a módszerrel. A komplexek nagy száma miatt csak néhány kitüntetett HSA:komplex koncentrációnál vizsgáltuk a rendszereket, célunk itt az összehasonlítás volt és nem a kötési állandók meghatározása. A 2. táblázatban látható, hogy a fehérje koncentrációját a vérszérumnak megfelelő 630 μ M-nak, a hígított szérum mintával összehasonlítható esetében 160 μ M-nak választottuk, ill. egy hígabb, 50 μ M-os koncentráció esetén is végeztünk méréseket.

		1	2	3	4	5	KP1019
Ultraszűrés:	(µM)		kötött komplex (%) ^a				
HSA/komplex	630/320	_	93	92	94	92	$97^{\rm b}$
	160/80	_	88	92	83	81	90 ^b
	50/50	-	70	79	77	64	72 ^b
Szérum/komplex	-/80 ^c	_	-	86	-	81	-
Fluorimetria:]	lg <i>K</i> '		
Trp214-Kioltás		5,06(1)	5,10(1)	-	4,95(3)	4,92(3)	at
WF-kiszorítás		4,98(1)	5,00(1)	-	5,00(1)	4,90(1)	d. 1. oláz
DG-kiszorítás		4,69(1)	4,61(1)	4,65(1)	4,58(1)	4,37(1)	1. tál

2. táblázat A komplexek kötődése a HSA-hoz (vagy szérumfehérjékhez); ultraszűrés alapján számolt HSA-hoz kötött komplex mennyiségek és a fluorimetriás mérésekből számolt látszólagos kötési és kiszorítási állandók (lg*K*²). {pH = 7,40 (20 mM foszfát puffer); 0,10 M NaCl; 25 °C}

^a Két párhuzamos mérésből kapott értékek, relatív standard deviáció: $\pm 3-4\%$. ^b A HSA – KP1019 rendszer ultraszűréses mérések alapján számolt lépcsőzetes stabilitási állandói alapján számolt értékek. ^c Négyszeres hígítású vérszérum, c_{HSA} ~160 μ M.

A fémkomplexekből az első két esetben ($c_{\text{HSA}} = 630, 160 \ \mu\text{M}$) 0,5 ekvivalens, míg a harmadik esetben ($c_{HSA} = 50 \mu M$) 1 ekvivalens található a fehérje mellett. Előzetes UVlátható spektrofotometriás mérésekből megállapítottuk, hogy 120 perc inkubációs idő elegendő a kémiai egyensúly beállásához. A minták LMM frakciójában a szabad fémkomplex koncentrációját UV-látható spektrofotometriával határoztuk meg. A 2. táblázatban látható, hogy a fiziológiás koncentrációjú albuminhoz a fémkomplexek igen nagy mennyiségben, 92-94%-ban kötődnek. A vizsgált komplexek albuminhoz való kötődésének mértékében nem találtunk számottevő eltérést. A négyszeres hígítású mintáknál már valamivel kevesebb fémkomplex kötődik a fehérjéhez, ami a hígulás miatti fokozott disszociációs készséggel magyarázható. Megfigyelhetőek kisebb különbségek: i) a 4 és 5 komplexek valamivel kisebb mértékben kötődtek a fehérjéhez, ez azonban nem tendenciaszerű, ii) a hígabb 50 µM-os HSA koncentrációjú mintáknál az 5 és 2 komplexek mutatnak kisebb affinitást a fehérje iránt. Az is látható, hogy még az 50-50 µM-os koncentrációknál is a fémkomplexek döntően (64-79%) a fehérjéhez kötődnek. A KP1019 ultraszűrés alapján számolt megkötés mértékétől (ld. 2. táblázat) a nitrozil komplexek sem maradnak el jelentősen. A vérszérummal végzett kísérletek a 3 és 5 komplexek esetében a tisztán albumint tartalmazó mintákkal közel egyező fémkomplex megkötést mutattak, ami alapján elsősorban a HSA felelős a véráramban ezen fémkomplexek szállításáért.

A HSA hidrofób zsebeiben való kötődést spektrofluorimetria segítségével vizsgáltuk. A komplexeknél tapasztalt nagyfokú hidrolitikus stabilitás is a másodlagos kölcsönhatások lehetőségét erősíti a koordinatív kötődéssel szemben. Az indazólium sók, azaz a **4** és **5** komplexek intenzíven emittáltak (19.a ábra), akár csak a KP1019 (ld. feljebb).



19. ábra A **4** komplex (a) és a HSA (b) 3D fluoreszcencia spektrumai. { $c_{\text{komplex}} = 10 \ \mu\text{M}$; $c_{\text{HSA}} = 1 \ \mu\text{M}$; 25 °C; pH = 7,40 (20 mM foszfát puffer, 0,10 M NaCl)}

Ezt a Trp214 kioltásos ($\lambda_{EX} = 295$ nm) mérések értelmezésekor figyelembe kellett venni, viszont a WF és a DG gerjesztési hullámhosszán nem okoz problémát. A számolt kioltási és WF-kiszorítási állandók az adott komplexnél jól egyeznek egymással (2. táblázat). A II. kötőhelyen valamivel gyengébb mértékű kiszorítást tapasztaltunk. Az egyes komplexek között nem figyelhető meg számottevő eltérés a kötőhelyekhez való affinitásban, egyedül az **5**-ös komplex marad el kis mértékben a többi komplex állandóitól, ami az ultraszűrés eredményével összhangban van. A fluorimetriás állandókat összevetve a KP1019 állandóival azt látjuk, hogy az előbbiek közel egy nagyságrenddel elmaradnak a KP1019 I. és II. kötőhelyen mért kiszorítási állandóitól. Az ultraszűrés viszont nem mutatott ilyen különbségeket, így feltételezhető, hogy további kötőhelyek is rendelkezésre állnak a fehérjén a nitrozil komplexek számára. A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált fémkomplexek albuminnal való kölcsönhatásukban nem mutatnak jelentős különbséget, azaz hasonló és jelentős mértékben kötődtek a fehérjéhez elleniontól, fémion fajtájától függetlenül.

5.2. Félszendvics organoruténium(II)- és organoródium(III)-komplexek vizsgálata

5.2.1. Félszendvics organoruténium(II)- és organoródium(III)-kationok hidrolitikus tulajdonságai és a ligandumok proton disszociációs folyamatai

Félszendvics fémorganikus akvakationok komplexképződési oldategyensúlyi jellemzéséhez elengedhetetlen hidrolízisét megismernünk. folyamatainak azok (Hidrolízisen jelen esetben a fémion-centrumhoz koordinált vízmolekulák deprotonálódását értem.) A $[Ru(\eta^6-p-cimol)(H_2O)_3]^{2+}$ és $[Ru(\eta^6-toluol)(H_2O)_3]^{2+}$ akvakationok hidrolitikus folyamatait kloridionok jelenlétében, ill. azok távollétében is részletesen tanulmányozták már (ld. 2.3.1. fejezet), a fő hidrolízis termék a kétmagvú három hidroxido-hidas $[(Ru(\eta^6-p-cimol))_2(\mu-OH)_3]^+$, ill. $[(Ru(\eta^6-toluol))_2(\mu-OH)_3]^+$, de kloridionok jelenlétében különböző klorido, vegyes klorido-hidroxido részecskék is megjelennek savas, enyhén savas pH-tartományban (5. ábra). A képződő komplexek stabilitási szorzatait magunk is meghatároztuk, mert ezek a pH-potenciometriás titrálások egyben a törzsoldatok koncentrációjának a meghatározására is szolgáltak; a kapott állandók mindig jó egyezést mutattak a Buglyó és munkatársai által közölt adatokkal [88,89,92].

A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ akvakation hidrolízisét pH-potenciometriás és ¹H NMR spektroszkópiás titrálások segítségével tanulmányoztuk 0,1 M, 0,2 M KCl ionerősség mellett és a kloridionok távollétének hatását 0,2 M KNO₃-ot tartalmazó oldatban vizsgáltuk. A hidrolitikus egyensúlyok gyorsan beálltak a vizsgált pH-tartományban (2-11,5) és mindegyik közegben kétmagvú hidroxido-hidas komplexek ([(Rh($\eta^5-C_5Me_5$))₂(μ -OH)₂]²⁺, [(Rh($\eta^5-C_5Me_5$))₂(μ -OH)₃]⁺) feltételezésével leírhatók voltak (3. táblázat).

3. táblázat A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ akvakation^a hidrolízisével képződő részecskék pHpotenciometriásan meghatározott stabilitási szorzatai (β) különböző ionerősségeknél. {25 °C}

lgβ	0,2 M KCl	0,1 M KCl	0,2 M KNO ₃
$[M_2H_{-2}] = [(Rh(\eta^5 - C_5Me_5))_2(H_2O)_2(\mu - OH)_2]^{2+a}$	-11,12(1)	-10,48(2)	-8,53(7)
$[M_2H_{-3}] = [(Rh(\eta^5 - C_5Me_5))_2(\mu - OH)_3]^+$	-19,01(1)	-18,07(3)	-14,26(4)

^a A koordinált vízmolekulák kloridionok jelenlétében részben/teljesen klorido ligandumra cserélődhetnek.

A kloridionok koordinációjának köszönhetően a meghatározott stabilitási szorzatok nagymértékben eltérnek a különböző közegekben, a kloridionok jelenlétében meghatározott adatok így látszólagos stabilitási szorzatoknak tekintendők. A vizsgált fémorganikus kationok hidrolitikus folyamatainak eltérő pH-tartományát és a kloridionok jelenlétének hatását jól szemléltetik a 20. ábrán bemutatott koncentráció eloszlási görbék. Ezek alapján a hidrolízisre való hajlam a $[Ru(\eta^6-toluol)(H_2O)_3]^{2+} > [Ru(\eta^6-p-cimol)(H_2O)_3]^{2+} > [Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ sorrendben csökken, valamint a kloridionok jelenlétében a hidrolízis részecskék bázikusabb pH-tartományban jelennek meg, azaz a hidrolízis részben visszaszorul. Fiziológiás pH-n mindenképpen számolni kell a kétmagvú hidroxido-hidas komplexek képződésével mindhárom félszendvics fémorganikus ion esetén.



20. ábra A (a) $[\text{Ru}(\eta^6\text{-toluol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$, (b) $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$, (d) $[\text{Rh}(\eta^5\text{-}C_5\text{Me}_5)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ fémorganikus kationok koncentráció eloszlási görbéi 0,2 M KCl ionerősség mellett, ill. (c) a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-}C_5\text{Me}_5)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ esetén 0,2 M KNO₃-t tartalmazó közegben. A szaggatott vonalak az akvakationokat, a folyamatos vonalak a kétmagvú hidroxido-hidas komplexek összegzett frakcióját jelölik. A számítások az 3. táblázatban lévő, ill. szakirodalmi [88,89,92] adatok alapján történtek. {25 °C; $c_{\text{Rh/Ru}} = 1,0 \text{ mM}$ }

Néhány vizsgálat történt a $[Ru(\eta^6-2\text{-fenoxietanol})(H_2O)_3]^{2+}$ akvakationnal is, ennek hidrolízisét 0,2 M KCl ionerősség mellett vizsgáltuk. A ¹H NMR spektrumok segítségével beazonosított részecskékre az UV-látható spektrofotometriásan meghatározott stabilitási szorzatok (lg β [M₂H₋₂] = -5,98(1); lg β [M₂H₋₃] = -12,10(1)) ennek az organoruténium kationnak a [Ru(η^6 -*p*-cimol)(H₂O)₃]²⁺-hoz nagyon hasonló hidrolízisre való hajlamát mutatták.

A fémorganikus kationok kölcsönhatását különböző donoratomokat tartalmazó ((O,O), (O,S), (O,N), (N,N)) kétfogú ligandumokkal vizsgáltuk (21. ábra). A ligandumok proton disszociációs állandói (K_a) gyakran ismertek voltak már a szakirodalomban, bár az alkalmazott körülmények időnként eltértek az általunk használttól. A komplexképződés vizsgálata előtt így a p K_a értékeket mindig meghatároztuk pH-potenciometriás mérésekkel (4. táblázat). A deprotonálódást gyakran követtük UV-látható spektrofotometriás és ¹H NMR spektrumok megváltozásán keresztül is. Ezeknek a méréseknek persze nem csak az proton disszociációs állandó meghatározása volt a célja, hanem az hogy megismerjük a

ligandumok különböző protonáltsági állapotaihoz tartozó egyedi UV-látható spektrumait, ill. a ¹H NMR csúcsok pozícióját, melyek a későbbi spektrum-felbontásokhoz, ill. az NMR spektrumoknál a csúcsok beazonosításához szükségesek voltak.



21. ábra A vizsgált kétfogú ligandumok szerkezeti képlete és nevük rövidítése.

5.2.2. Félszendvics organoruténium(II)- és organoródium(III)-kationok komplexképződési egyensúlyi folyamatai

A fémorganikus kationok kölcsönhatását különböző donoratomokat tartalmazó kétfogú ligandumokkal vizsgáltuk, melyek félszendvics ("zongoraszék" geometriájú) komplexeinek egy része jelentős citotoxikus hatással bír. A vizsgálataink alapvető célja a komplexképződés sebességének, a fémkomplexek stabilitásának, kloridion-affinitásának, szerkezetének és lipofilitásának összehasonlítása volt. Kapcsolatot kerestünk egyes krisztallográfiai és oldategyensúlyi adatok között, valamint a vizes oldatbeli stabilitás, humán szérum albuminnal való kölcsönhatás és a citotoxicitás összefüggésit is vizsgáltuk. A választott ligandumok (O,O) donoratomokat tartalmazó hidroxi-pir(id)onok, ill. 3hidroxi-flavon, kurkumin, acetil-aceton; (O,S) donor hidroxi-tiopironok; (O,N) donor 2pikolinsav származékok, 8-hidroxi-kinolinok; alifás és/vagy aromás (N,N) donor vegyületek (21. ábra). Mivel a tanulmányozott rendszerekben a kloridion is koordinálódó ligandum, a méréseket kloridionokat tartalmazó (0,2 M KCl), ill. attól mentes (0,2 M KNO₃) közegekben is végeztük gyakran párhuzamosan az összehasonlítás érdekében.



22. ábra A fémorganikus kationok ($[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$, $[Ru(\eta^6-p-cimol)(H_2O)_3]^{2+}$, $[Ru(\eta^6-toluol)(H_2O)_3]^{2+}$) – kétfogú ligandum (X,Y) rendszerekben lejátszódó komplexképződési, deprotonálódási és H_2O/Cl^- csere egyensúlyi folyamatok, melyekre vonatkozó egyensúlyi állandók meghatározása történt.

A komplexképződési egyensúlyokat pH-potenciometria, ¹H NMR spektroszkópia és UV-látható spektrofotometria kombinált használatával tanulmányoztuk. A komplexképződés a kétfogú ligandumokkal általában egyszerű sémát követ (22. ábra): többnyire csak $[Ru(\eta^6-arén)(L)(H_2O)]^{2+/+}$ ill. $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(H_2O)]^{2+/+}$ (továbbiakban [ML]) és a koordinált víz deprotonálódásával $[Ru(\eta^6-arén)(L)(OH)]^{+/0}$, ill. $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(OH)]^{+/0}$, ill. $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(OH)]^{+/0}$ (továbbiakban [ML(OH)]) típusú mono-komplexek képződnek. Ugyanakkor kloridionok jelenlétében a H₂O és OH⁻ ligandumok részben vagy teljesen kloridionokra cserélődhetnek. A biológiai hatás szempontjából különös fontossággal bír az [ML] komplexekben a víz↔kloridion cserefolyamat. Kivételt a hidroxi-tiopironok jelentenek (ld. később), mert vegyes hidroxido-oligomerek is képződnek, valamint ligandum-felesleg hozzáadásakor bisz-komplexek is megjelennek.

Az oldategyensúlyi méréseink jelentős része Rh(η^5 -C₅Me₅)-komplexek vizsgálatára irányult, a tanulmányozott ligandumok: maltol, allomaltol, deferipron, kurkumin, acetilaceton, tiomaltol, pic, 6-Mepic, 2-QA, 3-iQA, 8-HQ, 8-HQS, PHQ, bpy, phen, pin, en, dmen és tmeda voltak. A Ru(η^6 -*p*-cimol) esetén az etil-maltol, allomaltol, 3OH-flavon, EHP, EHMP, kurkumin, acetil-aceton, tiomaltol, tioallomaltol, pic, 6-Mepic, 2,6-dipic, 8-HQ, 8-HQS, PHQ ligandumok komplexeit vizsgáltuk. Tanulmányoztuk a pikolinát származékok (pic, 3-Mepic, 5-Brpic, 2,4-dipic, 2,5-dipic), a kurkumin és az acetil-aceton Ru(η^6 -toluol)-komplexeit és a bpy Ru(η^6 -2-fenoxietanol)-komplexét is. A ligandumok képletei a 21. ábrán láthatóak.

Az egyensúlyi állandók (K [ML], K_a [ML], K' (H₂O/Cl⁻)) meghatározása előtt azonban mindig meg kellett vizsgálni az egyes folyamatok sebességét is, a megfelelő várakozási idők megválasztásához. A *transz*-hatással bíró η^6 -arén és η^5 -arenil ligandumok koordinációja a Ru(II)- és Rh(III)-ionok hexaakva komplexeiket jellemző víz cseresebességet jelentős mértékben megnövelik. Jellemzően a $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ kation víz cseresebessége (~ 10^5 s⁻¹) jóval nagyobb, mint a [Ru(n⁶-arén)(H₂O)₃]²⁺ (~ 10^{-3} - 10^{-1} s⁻¹) komplexeké [101,108]. Ennek tükrében nem meglepő, hogy a Ru(η^6 -arén)komplexek képződése rendre sokkal lassabb volt az analóg Rh(n⁵-C₅Me₅)-komplexekéhez képest. Ezen utóbbi fémorganikus kationnal a komplexképződés egyedül az alifás nitrogén donoratomokat tartalmazó diaminoknál lassú, itt akár több óra is szükséges az egyensúly beállásához körülményektől (pH, koncentráció) függően, ugyanakkor a többi ligandummal percek alatt megtörténik a komplexképződés. Míg a Ru(η^6 -arén)-komplexek közül csak az (O,O) donoratomokat tartalmazó ligandumokkal volt gyors az egyensúlyi állapot elérése. Pl. a $[Ru(\eta^6-toluol)(H_2O)_3]^{2+}$ – 3-Me-pic rendszerben 5-6 óra is szükséges az egyensúly eléréséhez (23. ábra). A vizsgált ligandumok körében általános trendként a komplexképződés sebességére a következő sorrend állítható fel: (O,O) > (O,N) > (N,N)_{aromás} > (N,N)_{alifás}. Míg az [ML(OH)] vegyes hidroxido-komplexek képződése az [ML] komplexekből és ezen mono-komplexekben a H₂O↔Cl⁻ cserefolyamat minden esetben gyors volt.



23. ábra A $[Ru(\eta^6-toluol)(H_2O)_3]^{2+}$ – 3-Mepic (1:1) rendszer UV-látható spektrumainak időfüggése pH = 1,92-n. A beszúrt ábra a 308 nm-es hullámhosszon mért abszorbancia változását mutatja. {I = 0,2 M (KCl); 25 °C; $c_L = c_{Ru} = 123 \mu\text{M}$; $\ell = 1 \text{ cm}$ }

Amennyiben a komplexképződési egyensúlyi állapot nem állt be néhány percen (max. 10-15 perc) belül, akkor a pH-potenciometriás titrálásos mérési módszert nem tudtuk használni. Ilyen rendszereknél egyedi mintákat készítettünk és az egyensúly beállása után mértük a pH-t, az UV-látható és/vagy ¹H NMR spektrumokat. Ugyancsak kizárta a szokásos vizes közegű pH-potenciometriás titrálás alkalmazását, ha a ligandum és komplexei nem voltak kellő mértékben ($S \ge 1-2$ mM) vízben oldhatóak (pl. 8-hidroxikinolinok: 8-HQ (oxin), PHQ; 3-OH-flavon; kurkumin). Ilyenkor UV-látható spektrofotometriás mérések történtek, ill. vízoldható modellvegyületeket is bevontunk a vizsgálatokba (pl. 8-HQ esetén 8-HQS, kurkumin esetén acetil-aceton).

A komplexképződés pH-tartománya, a képződő [ML] komplex stabilitása nagymértékben függ a koordinálódó donoratomok típusától, ahogyan a 24. ábra ¹H NMR spektrumain beazonosított csúcsok is mutatják. A nagyobb stabilitású komplexeknél (pl. 8-HQS, etilén-diamin) a komplexképződés már a titrálások kezdeti pH-ján (~2) megkezdődik, vagy akár teljesnek is mondható (8-HQS), míg a kisebb stabilitású komplexeknél (pl. maltol) csak jóval nagyobb pH-n. A pH növelésével jellemzően a bázikus pH-tartományban kétféle folyamat játszódik le: i) [ML] komplex disszociációja, ami a szabad ligandum, ill. a fémion jellemzően kétmagvú trihidroxido formájának a megjelenéséhez vezet; ii) vegyes hidroxido [ML(OH)] komplex képződése. Az [ML] komplex disszociációja és deprotonálódása a ¹H NMR spektrumok segítségével egymástól jól megkülönböztethető folyamatok. A komplexben kötött fémorganikus ion és ligandum a nem-kötöttekkel jellemzően lassú, míg az akva- és a vegyes hidroxidokomplexek gyors cserefolyamatban vannak egymással az NMR időskálán tekintve.



24. ábra A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+} - 8$ -HQS (a), etilén-diamin (b) és maltol (c) rendszerek különböző pH-kon mért ¹H NMR spektrumai az arenil-ligandum metilcsoportjainak régiójában. Jelcsoportok jelölései: $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ kation (fekete keret), $[(Rh(\eta^5-C_5Me_5))_2(\mu^2-OH)_3]^+$ (fekete szaggatott keret), $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(H_2O)/(OH)]^{0/+/2+}$ komplexek (szürke keret). {10% (V/V) D₂O/H₂O; *I* = 0,2 M (KNO₃); 25 °C; *c*_L = *c*_{Rh} = 1,0 mM}

A lassú cserefolyamatok esetén a csúcsintegrálok alapján kapott móltörteken alapult az egyensúlyi állandó (K [ML]) számítása, míg a gyors cserefolyamatoknál a kémiai eltolódás pH függvényében mért változását használtuk az állandó (K_a [ML]) meghatározásához. Bár az egyensúlyi állandók meghatározása elsődlegesen pHpotenciometriás titrálások alapján történt, a ¹H NMR spektroszkópiás mérések mellett UVlátható spektrumok felbontásával is nyertünk állandókat. Abban az esetben, amikor a komplexképződés már a titrálás induló pH-ján is közel 100%-osnak mondható, akkor a K [ML] állandó meghatározása érdekében az állandó ionerősség (I = 0.2 M) megtartása mellett a pH-t csökkenteni kell, ahhoz hogy a disszociációfokot növeljük a kisebb koncentrációk alkalmazása mellett. Az erős sav és a háttérelektrolit összkoncentrációját állandó értéken tartva a pH-t ~ 0,7-ig lehet lecsökkenteni, és az ebben a pH-tartományban mért spektrumok segítségével lehetségessé vált sok esetben az egyensúlyi állandó meghatározása. Egyes nagy stabilitású komplexek (pl. $[Rh(n^5-C_5Me_5)(L)(H_2O)_3]^{2+/+}$, L = 3-iQA, bpy, pin) esetében a K [ML] állandó meghatározása etilén-diaminnal történő kompetíciós mérésen alapult. Az etilén-diaminnal történő ligandumkiszorítást kísérő spektrális változásokat mutatja a 25. ábra reprezentatív példaként. Vegyes ligandumú komplexek képződését a vizsgált rendszereknél ¹H NMR spektroszkópiai módszerrel zártuk ki.



25. ábra A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+} - 3-iQA - etilén-diamin rendszer UV-látható spektrumai különböző 3-iQA : etilén-diamin arányoknál. A beszúrt ábra a 334 nm-es hullámhosszon mért abszorbancia változását mutatja az illesztett görbével együtt. {<math>I = 0,2$ M (KNO₃); 25 °C; $c_L = c_{Rh} = 99 \ \mu$ M; $c_{en} = 0 - 148 \ \mu$ M; pH = 7,4 (20 mM foszfát puffer); $t_{várakozási} = 24$ h; $\ell = 0,5$ cm}

Az 4. táblázatban, a dolgozat terjedelmi korlátai miatt, néhány kiválasztott reprezentatív fémorganikus kation – ligandum rendszerre vonatkozó különböző típusú egyensúlyi állandókat gyűjtöttem össze. Az [ML] komplexek deprotonálódását jellemző pK_a értékek összehasonlítása azt mutatja, hogy adott ligandum esetén a Rh(η^5 -C₅Me₅) > Ru(η^6 -*p*-cimol) > Ru(η^6 -toluol) sorrendben csökken, ami jól korrelál a fémorganikus kationok hidrolízisre való hajlamával.



26. ábra A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ – etilén-diamin (1:1) rendszer koncentráció eloszlási görbéi kloridionok jelenlétében (zöld vonalak) és anélküli közegben (fekete vonalak). {I = 0,2 M (KCl vagy KNO₃); 25 °C; $c_{en} = c_{Rh} = 1,0$ mM}

A táblázat adatai megmutatják azt is, hogy a p K_a -t egyértelműen befolyásolja a koordinálódó donoratom típusa. Ugyanakkor a kloridionok jelenlétében a vegyes hidroxidokomplexek képződése a bázikusabb pH-k felé tolódik, és a kloridionok jelenlétében a komplexképződés részlegesen visszaszorul (26. ábra). A meghatározott p K_a

[ML] értékek alapján elmondható, hogy fiziológiás pH-n a vizsgált komplexek döntő része [ML] (és nem [ML(OH)]) formában, ill. a kisebb stabilitású komplexek részben/teljesen disszociált formában van jelen.

4. táblázat Képződési (*K* [ML]), proton disszociációs (*K_a* [ML]) és mono-komplexekben történő víz/klorid cserefolyamatra vonatkozó (*K*' (H₂O/Cl⁻)) egyensúlyi állandók reprezentatív fémorganikus kation ([Rh(η^5 -C₅Me₅)(H₂O)₃]²⁺, [Ru(η^6 -p-cimol)(H₂O)₃]²⁺, [Ru(η^6 -toluol)(H₂O)₃]²⁺) – ligandum rendszerekben. {*I* = 0,2 M; 25 °C}

ligandum ^a	lgK [ML]	p <i>K</i> a [ML]	<i>I</i> (0,2 M)	lgK' (H ₂ O/Cl [−])		
		$Rh(\eta^5-C_5Me_5)$				
maltol	6,73(1)	10,60(9)	KCl			
	8,45(1)	9,51(4)	KNO ₃	1,17(1)		
deferipron	8,93(1)	11,90(7)	KCl			
	10,90(1)	10,37(3)	KNO ₃	0,78(1)		
acac	6,44(1)	_	KCl	1,11(1)		
tiomaltol ^b	>15 ^d	_	KCl	0,95(1)		
ріс	8,90(1)	10,44(7)	KCl			
_	9,18(1)	9,32(2)	KNO ₃	2,20(1)		
8-HQ (oxin)	15,02(3)	10,27(5)	KNO ₃	1,81(1)		
bpy	12,95(6)	10,39(2)	KCl	2,58(1)		
en	14,48(1)	11,05(1)	KCl	2,14(1)		
	15,04(5)	9,58(2)	KNO ₃			
 Ru(η ⁶ - <i>p</i> -cimol)						
etil-maltol	8,35(1)	9,32(2)	KCl	0,90(2)		
tioallomaltol ^c	>13.4 ^d	-	KCl	-		
ріс	>10,7 ^d	8,90(2)	KCl	1,4(1)		
8-HQ	16,53(2)	9,19(4)	KNO ₃	0,89(2)		
en	14,03(2)	7,97(1)	KNO ₃	1,51(1)		
		Ru(η ⁶ -toluol)				
acac	8,01(7)	9,32(3)	KCl	_		
ріс	>10,8 ^d	8,47(1)	KCl	1,3(1)		
8-HQ	16,45(2)	8,94(1)	KNO ₃	0,97(1)		

^a A ligandumok p K_a értékei {I = 0,2 M KCl; T = 25°C}: maltol (8,45); etil-maltol (7,97); deferipron (3,64; 9,77); acac (8,76); tiomaltol (8,06); pic (5,26); 8-HQ (4,99; 9,51); bpy (4,52); en (7,19; 9,98). ^b lgK [ML₂] = 6,8(1); lgK (ML + HL \rightleftharpoons ML₂H) = 4,9(1); p K_a [ML₂H] = 6,33(4). ^c lgK [ML₂] = 7,12(4); lgK (ML + HL \rightleftharpoons ML₂H) = 5,16(1); p K_a [ML₂H] = 5,7(1). ^d lgK [ML] határértékek UV-látható spektrometriás egyedi minták alapján (pH= 0,7-2).

A vizsgált félszendvics fémkomplexek vizes oldatbeli stabilitását jellemző lg*K* [ML] értékeket a ligandumok eltérő bázicitása és a fémorganikus kationok különböző hidrolízisre való hajlama miatt közvetlenül nem lehet összehasonlítani. Adott körülmények mellett számolt pM* értékek (azaz a ligandumhoz nem kötött fémorganikus kationt tartalmazó részecskék egyensúlyi összesített koncentrációjának tízes alapú negatív logaritmusa; pM* = $-lg([M]+2[M_2(OH)_2]+2[M_2(OH)_3])$ viszont összevethetők egymással. Fiziológiás pH-n számolt pM* értékeket mutat Rh(η^5 -C₅Me₅)-komplexekre a 27. ábra, mely alapján a fémorganikus kation különböző típusú donoratomokat tartalmazó ligandumok felé mutatott affinitása a következő általánosan felírt sorrendet követi ezen a pH-n:

 $(O,N)_{8-hidroxi-kinolinátok} \sim (N,N) > (O,N)_{2-pikolinátok} > (O,O)_{hidroxi-piridinon} > (O,O)_{hidroxi-pironok}.$



27. ábra A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ – ligandum (1:1) rendszerekben számolt pM* értékek pH = 7,4-n. pM* = $-lg([[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}] + 2[[(Rh(\eta^5-C_5Me_5))_2(\mu^2-OH)_2]^{2+}] + 2[[(Rh(\eta^5-C_5Me_5))_2(\mu^2-OH)_3]^{+}])$. { $I = 0, 2 M (KNO_3); 25 \, ^\circ\text{C}; c_L = c_{Rh} = 1, 0 \, \text{mM}$ }

Az (N,N) donorokat tartalmazó tmeda-val viszont pH = 7,4-n csak nagyon kis stabilitású komplex képződik, melynek oka valószínűleg a ligandum és a pentametilciklopentadienil-gyűrű metilcsoportjai közötti sztérikus taszítás. Ennek következménye lehet az, hogy a gyűrű metilcsoportjai a tmeda esetén jóval nagyobb mértékben térnek ki az öt szénatom által alkotott arenil-gyűrű síkjából, mint a szubsztituálatlan etilén-diaminnál (28. ábra), valamint a Rh–N és a Rh–gyűrű centroid távolság is nagyobb.



28. ábra A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(Cl)]^+$ komplexek, ahol L = en (a) vagy tmeda (b) és a $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(phen)(N-metil-imidazol)]^{2+}$ komplex (c) szerkezete. Az atomok termális ellipszoidokkal ábrázolva 50% valószínűség mellett; a kristályban levő vízmolekulák, metanol és ellenionok nincsenek ábrázolva a jobb átláthatóság érdekében.

Az (O,O) donoratomokat tartalmazó hattagú kelátgyűrűt képező kurkumin és acac ligandumokkal a hidroxi-pironoknál kisebb stabilitású komplexek képződnek (pl. Rh(n⁵- C_5Me_5)-komplexekre pM* = 4,25 (maltol); 4,12 (kurkumin); 3,93 (acac) {I = 0,2 M (KCl); $c_{\rm L} = c_{\rm Rh} = 1,0$ mM; pH = 7,4}). A kisebb stabilitás miatt pedig egyre inkább számolni kell disszociációjával komplexek a biológiailag ezen jelentős releváns (µM-os koncentrációtartomány, fiziológiás pH) körülmények között. Valószínűleg ez a kisebb oldatbeli stabilitás az oka annak, hogy a kurkumin saját citotoxicitásához (IC₅₀ = 39,6 μ M) hasonlítva a Rh(η^5 -C₅Me₅)-, Ru(η^6 -p-cimol)-, és Ru(η^6 -toluol)-komplexek hasonló, vagy még csekélyebb biológiai aktivitást (IC₅₀ = 34,8-82,3 µM) mutatnak Colo 320 humán vastagbél adenocarcinoma sejtvonalon.

A Ru(η^6 -arén)-komplexek nem csak a lassabb képződésükben és kisebb p K_a [ML] értékükben különböznek a Rh(η^5 -C₅Me₅) analógjaiktól, hanem lgK [ML] stabilitási állandóik is rendre nagyobbak (kivételt a (N,N) donoratomokat tartalmazó ligandumok jelentenek). Viszont a [Ru(η^6 -arén)(H₂O)₃]²⁺ kation erősebb hidrolízisre való hajlama miatt fiziológiás pH-ra számolt pM* értékeik, vagy a látszólagos stabilitási állandóik már összevethetők az organoródium(III)komplexek megfelelő állandóival.

A tiomaltol és tioallomaltol komplexképződési egyensúlyi folyamati a Rh(η^5 - C_5Me_5) és Ru(η^6 -*p*-cimol) esetén jelentősen különböznek a többi kétfogú ligandumnál tapasztaltakhoz hasonlítva. A pH > 6 tartományban 1:1 fémorganikus kation:ligandum aránynál felvett ¹H NMR és UV-látható spektrumok elemzése azt mutatta, hogy nem csak az [ML] komplex egyszerű deprotonálódása történik, hanem vízben rosszul oldódó [(ML)_i(OH)_i] összetételű többmagvú vegyes hidroxido-oligomer részecskék is képződnek. A ligandum arányának növelésével savas pH-n [ML₂H], majd enyhén savas, semleges pHkon [ML₂] bisz-komplexek is megjelennek, ami ezen hidroxi-tiopiron ligandumok egyfogú koordinációjának köszönhető. A 29.a ábra az [ML₂H] képződésének pH-tartományában változó fémorganikus kation-ligandum arányok mellett rögzített ¹H NMR spektrumokat mutatja egy kiválasztott ligandum-protonhoz tartozó jelcsoport kémiai eltolódásának tartományában. Mind az [ML] komplexben kötött, mind a szabadon lévő ligandumhoz (HL) tartozó jelek kémiai eltolódása megváltozik az arány függvényében. Az NMR időskálán gyors és lassú cserefolyamatok párhuzamos lejátszódása figyelhető meg. Gyors cserefolyamat áll fenn a szabadon lévő és a bisz-ligandumú komplexben egyfogúként koordinált formák között, valamint az [ML] és az [ML₂H] komplexekben kétfogúan kötött, és így deprotonált formák között (29.b ábra). Ugyanakkor lassú cserefolyamat van a szabadon lévő és a komplexekben kétfogúan koordinált ligandum formák között. A változó pH-kon és változó fémorganikus kation ligandum arányoknál rögzített ¹H NMR spektrumok elemzésével meghatározott egyensúlyi állandók az 4. táblázatban találhatók meg.



29. ábra (a) A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ – tiomaltol rendszer változó arányok mellett rögzített ¹H NMR spektrumai a ligandum CH(6) protonjának kémiai eltolódásának tartományban a protonált [ML₂H] komplex képződésének vizsgálatához. (b) A jelölők hozzárendelése és a rendszerben lejátszódó cserefolyamatok. { $c_{tiomaltol} = 1 \text{ mM}$; 25 °C; pH = 3,85; I = 0,20 (KCl)}

A Ru(η^6 -2-fenoxietanol) – bpy (1:1) rendszerben a savas pH-kon uralkodó [ML] komplex pH > 6 tartományban a várthoz képest eltérően viselkedik. Ugyanis az [ML(OH)] komplex képződésével párhuzamosan a pH növelésével a ¹H NMR spektrumok tanúsága szerint szabad 2-fenoxietanol jelenik meg és a bpy ligandum protonjaihoz tartozó jelek kiszélesednek, miközben az oldat színe halvány sárgából szürkés-zöldre változik. Mindez az arén részleges elvesztését követő Ru(II) oxidációjához köthető. Az arén-gyűrű elvesztést a Ru(η^6 -*p*-cimol) – 8-hidroxi-kinolin (8-HQS, 8-HQ) rendszerekben is detektálni tudtuk, de csak ligandumfelesleg esetén. Az arén-gyűrű hiányában a Ru(II) nagyon érzékeny az oxidációra és a paramágneses Ru(III)-ionok képződését ESR spektroszkópia segítségével is sikerült igazolnunk ezekben az esetekben.

A biológiai hatás szempontjából fontos lehet a $[Ru(\eta^6-arén)(L)(H_2O)]^{2+/+}$, ill. $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(H_2O)]^{2+/+}$ komplexekben a $H_2O\leftrightarrow Cl^-$ cserefolyamat jellemzése is a stabilitás és deprotonálódás mellett. A szilárd formában előállított klorido-komplexek vízben oldása során a közeg kloridion koncentrációjától függően bekövetkezhet a $Cl^- \rightarrow H_2O$ csere, hasonlóan a ciszplatin esetéhez [9], ill. ezen a kötési helyen valószínűsíthető egy targetfehérje donoratomjának a koordinációja is (hacsak nem történik ligandumkiszorítás). Ennek megfelelően a komplex kloridion-affinitása kihathat a
citotoxikus hatásra is. Ugyanakkor egy egyszeresen negatív töltésű ligandum esetén a Cl⁻ \rightarrow H₂O cserével (pl. [Ru(η^6 -arén)(L)(Cl)] \rightarrow [Ru(η^6 -arén)(L)(H₂O)]⁺) a komplex töltése, és egyben lipofilitása is, megváltozik, ami a sejtmembránon való áthaladást befolyásolja. A lg*K*' (H₂O/Cl⁻) állandókat (4. táblázat) különböző kloridion-koncentrációk mellett rögzített UV-látható spektrumok segítségével határoztuk meg. Olyan állandó pH-t igyekeztünk választani a mérésekhez, ahol az akva- és a klorido-komplexek képződése ~100%-os. A cserefolyamat minden vizsgált esetben gyors volt, ami miatt a mérések során általában az akvakomplexet titráltuk KCl oldattal. Így viszont az ionerősség mérési pontonként változott, ennek megfelelően a kapott állandók csak becsült értékeknek tekinthetők. Ezen hiba becslése végett a Ru(η^6 -toluol) 3-Mepic ligandummal képzett komplexére azonos ionerősségű egyedi minták segítségével is meghatároztuk a lg*K*' (H₂O/Cl⁻) állandót (*I* = 0,3 M NaClO₄). A kétféle módszerrel kapott állandók 0,1 logaritmus egységen belül különböztek csak.

A Rh(η^5 -C₅Me₅)-komplexek esetén a meghatározott lg*K*' (H₂O/Cl⁻) és p*K*_a [ML] állandók között egyértelmű korrelációt tudtunk leírni a vizsgált kétfogú ligandumok körében (30. ábra). A nagyobb lg*K*' (H₂O/Cl⁻) esetén a komplexeknek kisebb a p*K*_a értéke, azaz nagyobb a hidroxidion-affinitásuk.



30. ábra A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(H_2O)]^{2+/+}$ komplexek lg*K*' (H₂O/Cl⁻) és p*K_a* [ML] állandói közötti korreláció. (R² = 0,84). {*I* = 0,2 M (KNO₃); 25 °C}

A Ru(η^6 -arén)-komplexeknek kisebb a lgK' (H₂O/Cl⁻) állandója ugyanazon ligandum esetén, azaz kisebb a kloridion-affinitásuk az analóg Rh(η^5 -C₅Me₅)komplexekhez hasonlítva. Ennek megfelelően a Cl⁻ \rightarrow H₂O, ill. Cl⁻ \rightarrow fehérje donoratom csere termodinamikailag kedvezőbb a Ru(η^6 -arén)-komplexeknél, melyek *in vitro* citotoxicitása rendre nagyobb. A Rh(η^5 -C₅Me₅)-komplexek esetén is az irodalmi és együttműködő partnereink által meghatározott IC_{50} és lgK' (H₂O/Cl⁻) értékek elemzése is azt mutatta, hogy a nagyobb kloridion-affinitású komplexek a biológiailag kevésbé aktívak. Kivételt képeznek ezen viselkedés alól, azok a komplexek, ahol a koordinált ligandumnak önállóan is van citotoxikus hatása (pl. phen, 8-HQ, PHQ) és így a fémkomplex biológiai aktivitása elsősorban ahhoz köthető.

Több félszendvics fémorganikus komplexet is sikerült röntgenkrisztallográfiai mérésre alkalmas egykristály formájában előállítanunk: [Rh(ŋ⁵-C₅Me₅)(8-kinolinoláto)Cl], $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(kurkumináto)C], [Ru(\eta^6-toluol)(L)C]]$ (ahol L: a pic, 3-Mepic, 5-Brpic, 2,4-dipic deprotonált formái), $[Ru(\eta^6-toluol)(acac)Cl]$, valamint $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(en)Cl]^+$ (28.a ábra), $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(dmen)Cl]^+$, $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(tmeda)Cl]^+$ (28.b ábra) és $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(tmeda)Cl]^+$ C₅Me₅)(pin)Cl]⁺. Ezen komplexek mindegyike a vártnak megfelelően tipikus 'zongoraszék' geometriai elrendeződést mutat: a penta- vagy hexahapto koordinációjú arenil vagy arén elfoglal három koordinációs helyet, és a ligandum kétfogú kötődése mellett a koordinációs szférát egy klorido ligandum telíti. A feljebb felsorolt és az $[Rh(\eta^{5}-C_{5}Me_{5})(L)Cl]^{+/0}$ előállított együttműködő partnerek által komplexek krisztallográfiai adatait és a vonatkozó lgK' (H2O/Cl⁻) értékeket multilineáris regressziós módszerrel elemezve összefüggést találtunk közöttük (31. ábra).



31. ábra A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(H_2O)]^{2+/+}$ komplexek számított és mért lg*K*' (H₂O/Cl⁻) állandói közötti korreláció (R² = 0,88). A multilineáris regresszióval kapott összefüggés egyenlete: számolt lg*K*' (H₂O/Cl⁻) = 27,59×Rh–centroid távolság – 0,23×(X–Rh–Y) kötésszög – 0,23×(metilcsoport-gyűrűsík) torziós szög + 0,46×[ML] töltése – 28,75.

Az analízis során a Rh–gyűrű középpont távolság, Rh–donoratom, Rh–Cl kötéstávolságra, X–Rh–Y, X–Rh–Cl, Cl–Rh–Y kötésszögekre, metilcsoport-gyűrű sík torziós szögére és az [ML] komplex töltésére vonatkozó adatokat használtuk fel. A felállított összefüggés alapján a kiválasztott lgK' (H₂O/Cl⁻) értékekkel összefüggést mutató

adatok lineáris kombinációjával a lg*K*' (H₂O/Cl⁻) érték megbecsülhetővé válik. Az így számolt állandókat a kísérleti úton meghatározott állandók függvényében mutatja a 31. ábra. A felállított egyenlet alapján, a fémkomplexek kloridion-affinitása (azaz lg*K*' (H₂O/Cl⁻) értéke) egyértelmű függést mutat a Rh–gyűrű középpont távolság, X–Rh–Y kötésszög és a metilcsoport-gyűrű sík torziós szög krisztallográfiai adatokkal. A leírt összefüggés alapján a fémkomplex röntgenszerkezete alapján a kloridion-affinitása megjósolható.

5.2.3. Félszendvics organoruténium(II)- és organoródium(III)-komplexek kölcsönhatása humán szérum albuminnal

A humán szérum albuminnal való kölcsönhatás egyértelműen befolyásolni tudja egy fémkomplex vérben való eloszlását, valamint ezen transzportfehérjéhez való kötődés késleltetheti a kiürülést és segítheti a tumor szövetekben való felhalmozódást (ld. 2.6. fejezet). Számos félszendvics fémorganikus komplex kölcsönhatását tanulmányoztuk albuminnal spektroszkópiás (fluorimetria, UV-látható spektrofotometria, ¹H NMR) és elválasztási (ultraszűrés, CZE) módszerekkel. A méréseket fiziológiás pH-n 37, ill. 25 °Con végeztük a vérszérum kloridion-koncentrációjának (100 mM) megfelelő puffert használva (PBS'). Így a kloridionok jelenléte miatt a komplexekben az akva ligandum részben kloridionra van cserélve. A Rh(η^5 -C₅Me₅) maltol, deferipron, pic, 3-Mepic, 2-QA, bpy, phen és en, valamint a Ru(η^6 -*p*-cimol) maltol, deferipron és pic komplexeit vizsgáltuk. A ligandum nélküli [Rh(η^5 -C₅Me₅)(H₂O)₃]²⁺ és [Ru(η^6 -*p*-cimol)(H₂O)₃]²⁺ kationok albuminon való kötődését is tanulmányoztuk összehasonlításképpen. Ez a két fémorganikus kation eltérő viselkedést mutat mind a kölcsönhatás sebességét, mind mértékét tekintve.

A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ – HSA rendszerben a kémiai egyensúly a kötött - nem kötött frakciók között gyakorlatilag néhány perc alatt beáll, viszont az UV-látható spektrumok órákon át tartó átrendeződést mutatnak a fehérjén. A kötött $Rh(\eta^5-C_5Me_5)$ -hoz tartozó töltésátviteli sáv abszorpciós maximuma 365 nm-ről 356 nm-re csökkent az idő előrehaladtával. Az előző fejezetben bemutatott $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)Cl]^{+/0}$ klorido-komplexek jellemző töltésátviteli sávjának abszorpciós maximumának hullámhosszát és moláris abszorbanciáját mutatja a 32. ábra a HSA-on kötött $Rh(\eta^5-C_5Me_5)$ -hez tartozó értékekkel együtt. Az adatok a kétfogú ligandum nélküli $Rh(\eta^5-C_5Me_5)$ arenil-komplexhez a HSA (N,N) donoratomokon keresztüli kötődését valószínűsítik, ami pl. megvalósulhat egy hisztidin imidazol-nitrogénjének és egy szomszédos amid-nitrogénnek a koordinációjával.



32. ábra Néhány $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)Cl]^{+/0}$ klorido-komplex, a HSA-on kötött $Rh(\eta^5-C_5Me_5)$ arenil-komplex és a $[(Rh(\eta^5-C_5Me_5))_2(\mu^2-OH)_3]^+$ kétmagvú komplex jellemző λ_{max} és ε_{max} értékei.

A fémorganikus kation nagy feleslege (1:1-1:60) mellett is elvégzett ultraszűrés-UV-látható spektrofotometriás mérések maximálisan ~20-25 ekvivalens Rh(η^5 -C₅Me₅) arenil-komplex megkötődését mutatták a fehérjén. (Megjegyzem, hogy ilyen nagy fémkomplex-felesleg biológiailag teljesen irreleváns.) A [Ru(η^6 -*p*-cimol)(H₂O)₃]²⁺ kationok ellenben igen lassan (24 óra) kötődnek meg az albuminon és a maximálisan megkötődő Ru(η^6 -*p*-cimol) egység száma kisebb (~10-12 ekvivalens), de hasonlóan (N,N) koordináció valószínűsíthető. A Rh(η^5 -C₅Me₅) komplexeiben mindig gyorsabb ligandum cserefolyamatokat mutat, mint a Ru(η^6 -*p*-cimol), így várható is volt a fehérjével gyorsabban beálló egyensúlyi állapot. Ugyanakkor azt is fontos megjegyezni, hogy fiziológiás pH-n, 100 mM kloridion-koncentráció mellett a kétféle fémorganikus kation nem egyforma formában van jelen; a Ru(η^6 -*p*-cimol) 100%-ban a kétmagvú hidroxidokomplexként [(Ru(η^6 -*p*-cimol))₂(μ^2 -OH)₃]⁺, mely az akva/klorido formához képest jóval inertebb, míg a Rh(η^5 -C₅Me₅) esetén ez az arány csak 60%-os.

 $Rh(\eta^5-C_5Me_5)$ -komplexek az akvakationhoz hasonlóan gyorsan megkötődnek a fehérjén, míg a $Ru(\eta^6-p$ -cimol)-komplexek reakciója ehhez képest általában lassabb (pl. a deferipron komplexnél 3-5 perc az I. kötőhelyen a fluorimetriás mérés alapján), de lényegesen gyorsabb a folyamat, mint a kétmagvú hidroxido-részecske esetén tapasztalható, hiszen a ligandum koordinációja itt visszaszorítja a hidrolízist. Ezek a tapasztalatok a fémkomplexek koordinatív kötését valószínűsítik az albuminon. Ezt támasztja alá a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) hozzáadásával végzett ultraszűréses méréssorozatunk is. A fehérje denaturációját követően másodlagos kémiai kötések révén a

hidrofób zsebben (I. kötőhely) eredendően megkötött warfarin teljes mértékben disszociált, míg a $Rh(\eta^5-C_5Me_5)$ akva- és bpy komplexe kötve maradt.

Abban az esetben, ha a komplex nem veszti el az eredeti ligandumát albuminon való kötődés közben, azaz a kötődés asszociatív jellegű, akkor az akva ill. klorido ligandum helyén a fehérje oldallánci aminosav donoratomjainak a koordinációja képzelhető el. $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(H_2O)]^{2+/+}$ (L= deferipron, en, bpy) komplexek esetén ¹H NMR spektroszkópia segítségével aminosav modellek (N-metil-imidazol (His); Nacetil-cisztein metil észter (Cys) és N-acetil-metionin (Met)) bevonásával vizsgáltuk, hogy melyik típusú donoratom koordinációja a legkedvezőbb. A modellvegyületek közül egyértelműen az N-metil-imidazol képez legnagyobb mértékben vegyes ligandumú komplexeket, ami alapján az albumin hisztidin imidazol-nitrogéneken keresztüli koordinációja a legvalószínűbb a $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)]$ -HSA adduktumokban. A fehérjekomplexben megvalósuló koordinációs geometriát a [Rh(n⁵-C₅Me₅)(phen)(N-metilimidazol)]²⁺ vegyes ligandumú komplex röntgenkrisztallográfiásan meghatározott szerkezete alapján képzeljük el (28.c ábra). A HSA 16 hisztidint tartalmaz, melyből 5-6 kimondottan a fehérje felületén jól elérhető helyen van, de található az I. kötőhelyen is (His242) [220]. Megvizsgáltuk közvetlen (Trp214 kioltásos) és közvetett (warfarin kiszorításos) fluorimetriás módszerrel is a kiválasztott $Rh(\eta^5-C_5Me_5)$ és $Ru(\eta^6-p-cimol)$ komplexek (maltol, deferipron, pic, bpy, en) megkötődését az I. kötőhelyen, valamint a II. kötőhelyen danzil-glicin segítségével. A meghatározott állandók az I. kötőhelyen rendre nagyobbak voltak, mint a II. kötőhelyen ($\Delta \lg K' \sim 0, 1-0, 6$), bár ez nem számottevő különbség. A kötési állandók fordított korrelációt mutattak a komplexek stabilitásával: minél nagyobb stabilitású a félszendvics komplex, annál kisebb volt a kapott állandó. Így a kisebb stabilitású komplexeket képező (O,O) donoratomokat tartalmazó maltol és deferipron esetén a lgK' értéke gyakorlatilag megegyezett a ligandum nélküli [Rh(η^5 - $C_5Me_5(H_2O_{3})^{2+}$ és $[Ru(\eta^6-p-cimol)(H_2O_{3})^{2+}$ kationokra kapott állandókkal (pl. I. kötőhely, lgK': 6,1-6,2 (Rh), 5,7-6,0 (Ru)). Ez leginkább úgy képzelhető el, hogy a megkötődés módja is azonos, ami a ligandum disszociációját jelenti. Ugyanakkor a nagyobb stabilitású (N,N) donoratomokat tartalmazó en, bpy ligandumok komplexeinél egyik vizsgált kötőhelyen sem volt mérhető kölcsönhatás.

A komplexek fehérjén való globális megkötődésének mértékét elsősorban ultraszűrés-UV-látható spektrofotometriás mérések segítségével jellemeztük. Az ultraszűrést követően a kis molekulatömegű frakciók UV-látható spektrumainak felbontása révén megkaptuk a fehérjén a Ru(η^6 -*p*-cimol) ill. Rh(η^5 -C₅Me₅) ligandum nélkül, ill. a kétfogú ligandum komplexeként megkötődő mennyiségeket. A fehérjén kötött $Rh(\eta^5-C_5Me_5)$ megoszlását mutatja a 33. ábra ekvimoláris mennyiségben komplexet és HSA-t tartalmazó mintákra. A deferipron komplexe a ligandumot elveszti a vizsgált körülmények között, azaz disszociatív a kötődés módja, ugyanakkor a bpy, en komplexei asszociatív módon kötődnek ligandumvesztés nélkül. A pikolinátok (pic, 2-QA) komplexeinél a disszociatív és asszociatív kötési módok párhuzamosan jelentkeznek.



33. ábra A $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ kation és a $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(L)(H_2O)]^{2+/+}$ komplexek megkötődése HSA-n 1:1 komplex:fehérje arány esetén ultraszűrés–UV-látható módszer alapján. { $c_{HSA} = c_{Rh} = 50 \ \mu\text{M}; \ \text{pH} = 7,4 \ (\text{PBS}^2); \ 25 \ ^{\circ}\text{C}; \ t_{várakozási} = 24 \ \text{h}}$

A deferipron és 2-pikolinsav $Rh(\eta^5-C_5Me_5)$ komplexének HSA-val való kölcsönhatását CZE módszerrel is vizsgáltuk. Reprezentatív példaként a deferipron komplexe esetén kapott elektroferogramokat mutatja a 34. ábra. Az elektroferogramok elemzése azt mutatta, hogy a HSA mennyiségének növelésével a szabad fémkomplex mennyisége csökken, míg ezzel párhuzamosan a szabad ligandum jele növekszik. Ezek az eredmények is azt támasztják alá, hogy az albumin kisebb, mint 0,5 ekvivalens jelenlétében is képes a komplex teljes mennyiségét megkötni, ami a komplex disszociációjával jár. A 2-pikolinsav komplexe esetében azt tapasztaltuk, hogy a fehérje hozzáadásával a szabad fémkomplex mennyisége lecsökken, és megjelenik a szabad ligandumhoz tartozó jel az elektroferogramokon, de a ligandum móltörtje elmarad a deferipron komplexénél tapasztalthoz képest.



34. ábra A deferipron (dhp) ligandum és a $[Rh(\eta^5-C_5Me_5)(dhp)(H_2O)]^+$ komplex HSA jelenlétében kapott elektroferogramjai. Jelölések: $\blacktriangle = [Rh(\eta^5-C_5Me_5)(dhp)]^+; \bullet = [dhp]; \bullet = [HSA],$ [HSA-[Rh(η^5 - C₅Me₅)(dhp)], [HSA-[Rh(η^5 - C₅Me₅)]. { $c_{femkomplex} = 200 \ \mu\text{M}; c_{dhp} = 200 \ \mu\text{M}; 25 \ ^{\circ}\text{C}; pH = 7,40 \ (20 \ \text{mM} \ foszfát \ puffer)$ }

Összességében megállapítottuk, hogy a kisebb stabilitású komplexeknél inkább disszociatív jellegű a kölcsönhatás az albuminnal, míg a nagyobb stabilitású komplexeknél fémkomplex-HSA adduktumok képződése a jellemző.

5.3. Galliumkomplexek vizsgálata

5.3.1. Galliumkomplexek oldategyensúlyi vizsgálata

A klinikai vizsgálatokba jutott [trisz-(8-kinolinoláto)gallium(III)] (KP46) és [triszmaltoláto-gallium(III)] (GaM) komplexek (8. ábra) oldatbeli stabilitását jellemző egyensúlyi adatok és vérszérum-fehérjékkel való kölcsönhatásuk kvantitatív leírása nem volt megtalálható korábban a szakirodalomban. Ugyanakkor a két Ga(III)-komplex, bár szerkezetük igen hasonló, farmakológiai hatásukban nagyfokú különbséget mutat (ld. 2.4. fejezet). Munkánk célja az volt, hogy feltárjuk milyen oldatkémiai tulajdonságokban rejlő különbségeket lehet összefüggésbe hozni az eltérő biológiai viselkedéssel.

5.3.1.1. Hidroxi-(tio)pironok galliumkomplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata

A vizsgálatainkba bevontuk a maltol mellett az allomaltol, tiomaltol és tioallomaltol ligandumok (21. ábra) komplexeit is. A fémkomplexek stabilitási állandóinak meghatározása előtt a ligandumok proton disszociációs folyamatait jellemeztük pHpotenciometriás és UV-látható spektrofotometriás módszerekkel tiszta vizes közegben. A tiomaltol és a tioallomaltol deprotonált formái oxidációra érzékenyek, de a tiomaltol különböző pH-kon felvett spektrumain (35. ábra) az izobesztikus pontok jelenléte mutatja, hogy az alkalmazott körülményeink között sikerült az oxidációt megakadályoznunk. A hidroxi-piron és hidroxi-tiopiron ligandumok proton disszociációs állandóit az 5. táblázat mutatja, melyek közül a vizsgálati körülmények között csak a maltolra volt korábbi adat [255-257]. A deprotonálódási állandó egyértelműen a hidroxilcsoporthoz rendelhető mindegyik esetben. Az alloszármazékokban az elektronküldő metilcsoport а hidroxilcsoporthoz képest para helyzetben van és az elektronszívó oxigénre kifejtett árnyékoló hatása kevésbé érvényesül, mint *orto* helyzetben, ami miatt a p K_a értékek rendre A tioszármazékok proton disszociációs állandói is kisebbek ~0,4 kisebbek. nagyságrenddel. Feltehetően a kénatom oxigénhez képesti jobb polarizálhatósága miatt a deprotonált formák aromás gyűrűjében kedvezőbb elektrondelokalizáció tud kialakulni a tioszármazékoknál, ami miatt azok jobban stabilizálódnak.



35. ábra A tiomaltol pH = 1,98-11,49 tartományban mért UV-látható spektrumai. A beszúrt ábra a 388 nm-es hullámhosszon mért abszorbancia pH-függő változását mutatja. {I = 0,2 M (KCl); 25 °C; $c_L = 52 \mu$ M; $\ell = 1$ cm}

A Ga(III)-ionnal képződő (O,O⁻) ill. (S,O⁻) koordinációjú [GaL]²⁺, [GaL₂]⁺ és [GaL₃] komplexek pH-potenciometriás mérések segítségével meghatározott stabilitási szorzatait az 5. táblázat tartalmazza. A maltol és allomaltol esetében a mono-komplexek stabilitási állandóinak meghatározásához pH = 0,7-2 közötti egyedi minták voltak szükségesek a komplex disszociációjának növelése érdekében. Ezekben a mintákban az ionerősség állandó érteken tartása mellett cseréltük a KCl-tartalmat fokozatosan HCl-ra, és a rögzített UV-látható spektrumok változása alapján számoltuk az egyensúlyi állandót. Majd az így kapott állandó konstans értéken tartásával számoltuk a bisz- és triszkomplexek stabilitási szorzatait a pH-potenciometriás titrálási adatokból. A meghatározott speciációs modell helyességét UV-látható spektrofotometriás és ¹H NMR spektroszkópiás titrálásokkal erősítettük meg.

	módszer	maltol	allomaltol	tiomaltol	tioallomaltol
pK _a	pH-metria	8,45(1)	7,97(1)	8,06(1)	7,64(1)
pK _a	UV-látható sp.	8,46(1)	7,93(1)	8,06(1)	7,63(1)
lgβ[GaL] ²⁺	UV-látható sp. pH-metria	10,63(2)	9,86(1)	_ 10,37(6)	- 9,63(5)
$\lg \beta [GaL_2]^+$	pH-metria	21,07(4)	19,23(2)	19,05(6)	17,67(6)
lgβ[GaL₃]	pH-metria	28,77(2)	26,87(1)	25,59(2)	24,71(5)

5. táblázat Hidroxi-(tio)piron ligandumok proton disszociációs állandói (K_a) és Ga(III)komplexeik stabilitási szorzatai (β). {I = 0,20 M (KCl); 25 °C}

A 36. ábrán a Ga(III) – maltol (1:3) rendszer ¹H NMR spektrumai láthatók különböző pH-kon rögzítve. Az egyes fémkomplexekhez ($[GaL]^{2+}$, $[GaL_2]^+$ és $[GaL_3]$) és a nem-koordinált ligandumhoz tartozó jelcsoportok külön csúcsokként jelennek meg az NMR időskálán lassú cserefolyamatoknak köszönhetően. A 3 mM-os ligandum-

koncentráció mellett mért spektrumok azt mutatják, hogy a trisz-komplex az uralkodó részecske pH = 6-8 között, ugyanakkor pH > 10 tartományban a komplex teljes mértékben disszociál. A csúcsok integráljaiból számolt fémionhoz koordinált, ill. szabadon lévő ligandum százalékos megoszlása jól illeszkedik a pH-potenciometriás titrálásokból kapott állandók alapján számolt koncentráció eloszlási görbékre (36.b. ábra).

A meghatározott stabilitási szorzatokat összehasonlítva a következő trendet láthatjuk: maltol > allomaltol > tionaltol > tioallomaltol, ami megegyezik a ligandumok '*hard*'-'*szoft*' Lewis-bázis karakterének sorrendjével.



36. ábra (a) A Ga(III) – maltol 1:3 rendszer ¹H NMR spektrumai különböző pH-kon rögzítve; a részecskék jelölése: [HL], $[L]^-$ (Δ , kék háttérrel); $[GaL]^{2+}$ (\bullet); $[GaL_2]^+$ (\circ); $[GaL_3]$ (\blacksquare). (b) A csúcsintegrálok (×; \bullet), valamint a pH-potenciometriásan meghatározott stabilitási szorzatok segítségével számolt koncentráció eloszlási görbék (folytonos vonalak). { $c_L = 3 \text{ mM}$; $c_M:c_L = 1:3$; 25,0 °C; I = 0,20 M (KCl); 10% D₂O}

5.3.1.2. Az oxin és a szulfoxin galliumkomplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata

A 8-hidroxi-kinolin (oxin, 8-HQ) komplexeinek vízoldhatósága közismerten rossz, de a pK_a ligandum értékei meghatározhatók tisztán oldatban UV-látható vizes spektrofotometriás mérések mellett pH-potenciometriás titrálások segítségével is. Ugyanakkor a Ga(III) komplexeinek sokkal rosszabb vízoldhatósága miatt a mérésekhez DMSO jelenléte is szükséges volt. Ennek megfelelően az oxin p K_a -it 30% és 60% (m/m)os DMSO/H2O oldószerelegyekben is meghatároztuk. Emellett az oxin jobb vízoldhatóságú analógjaként a szulfoxint (8-HQS, 21. ábra) is bevontuk a vizsgálatainkba összehasonlításként, ill. a háromféle oldószerben történtek mérések a maltollal is. A szulfoxin szulfonátcsoportja a vizsgált pH-tartományban mindvégig deprotonált formában van, és a negatív töltés révén így sokkal jobban oldódik vízben, mint az oxin. Az oxin, szulfoxin ill. maltol különböző körülmények között meghatározott proton disszociációs állandóit az 5. és 6. táblázatok tartalmazzák. Az oxin és szulfoxin esetén kapott p K_1 a kinolínium nitrogén (NH⁺) deprotonálódásához tartozik, míg a második lépcsőzetes deprotonálódási folyamat a fenolos hidroxilcsoporthoz köthető. A tiszta vizes közegben meghatározott egyensúlyi állandók jó egyezést mutatnak a szakirodalomban található, más körülmények között mért állandókkal [258-260]. Az oxin p K_a -i valamivel nagyobbak, mint a szulfoxiné a szulfonátcsoport elektronszívó tulajdonságának köszönhetően. Mind a két ligandumnál azt tapasztaltuk, hogy a tízszer hígabb (100 μ M) oldatban meghatározott p K_1 kisebb, míg a p K_2 nagyobb a töményebb (1 mM) oldatban kapotthoz képest (6. táblázat). A szakirodalom szerint ennek valószínű oka, hogy a HL részecske α/β (*cisz/transz*) formáinak aránya koncentrációfüggő [261], ami a pK_a megváltozásához vezet. Megfigyelhető, hogy a DMSO mennyiségének növelésével a p K_1 értékek csökkennek, míg a p K_2 értékek növekednek. A relatív permittivitás (dielektromos állandó, ε_r , a DMSO és a víz értékiből számolt érték) reciprokának függvényében ábrázolva a p K_a értékeket lineáris összefüggést kapunk (37. ábra), ahol a p K_1 értékekre illeszthető egyenes meredeksége negatív, míg a p K_2 értékeknél pozitív. Ez jól magyarázható a Born-féle elektrosztatikus oldószer modellel [262]. Azaz a kationos savak (kinolínium-NH⁺) p K_a -ja csökken, míg a semleges töltésű savak (fenolos-OH) pKa-ja növekszik a DMSO koncentrációját megnövelve, mert a DMSO a vízhez képest erősebben szolvatálja a semleges formákat.



37. ábra Korrelációs diagram a különböző DMSO koncentrációknál mért (a) pK_a és (b) $\lg\beta[\operatorname{GaL}_q]$ (q = 1,2, vagy 3) értékek és az oldószer(elegyek) számolt relatív permittivitásának reciproka (1 / ε_r) között; L: maltol (×), oxin (•, \circ) és szulfoxin (\blacktriangle , Δ). {I = 0,20 M (KCl) vízben ($\varepsilon_r = 78,3$), I = 0,10 M (KCl) 30 ($\varepsilon_r = 76,7$) és 60% ($\varepsilon_r = 72,4$) (m/m) DMSO/H₂O elegyben; 25,0 °C}

Fontos megjegyezni, hogy az oxin gyengén fluoreszkáló vegyület és a különböző pH-kon felvett emissziós spektrumok felbontásával a p K_1 értéket meg lehetett határozni (6. táblázat). A második lépcsőzetes deprotonálódási folyamat pH-tartományában csökkenni

kezdett a mért emissziós intenzitás, amit azonban az intenzitás növekedése követett, és az csak pH > ~11-n kezdett újra csökkenni. Ez az anomális viselkedés nem tette lehetővé a p K_2 számítását a fluorimetriás adatok alapján. A jelenség a szakirodalom szerint azzal magyarázható, hogy gerjesztett állapotban a semleges oxin molekula részben ikerionos (NH⁺ és O⁻) formában van jelen, és inter/intramolekuláris H-hidak alakulhatnak ki, ami megakadályozza az alapállapotú molekula deprotonálódási állandójának fluorimetriás meghatározását [261,263].

		módszer	0% (m/m)	30% (m/m)	60% (m/m)
oxin	pK_1	pH-metria	4,99(2) ^b	4,42(1)	3,64(1)
	p <i>K</i> ₂	pH-metria	9,51(1) ^b	10,15(1)	11,14(1)
	$\lg \beta [GaL]^{2+}$	UV-látható sp.	13,13(8)	13,64(6)	14,50(5)
		extrapolalt adat	13,04		
	$\lg \beta [GaL_2]^+$	fluorimetria	25,54(5)	26,60(3)	30,15(2)
		UV-látható sp.	25,58(3)		
		extrapolált adat	25,73		
	lg <i>β</i> [GaL ₃]	fluorimetria	36,79(1)	37,87(2)	41,93(3)
		UV-látható sp.	36,41(1)		
		extrapolált adat	36,61		
szulfoxin	p <i>K</i> ₁	pH-metria	3,90(2) ^c	3,43(2)	2,91(1)
	p <i>K</i> ₂	pH-metria	8,37(1) ^c	8,91(1)	9,95(1)
	$\lg \beta [GaL]^{2+}$	UV-látható sp.	11,99(1)	12,63(3)	14,13(5)
	$\lg\beta[GaL_2]^+$	pH-metria	23,25(2)	25,01(2)	27,14(9)
	$lg\beta[GaL_3]$	pH-metria	33,17(1)	35,06(1)	38,36(9)

6. táblázat Az oxin (8-HQ) és szulfoxin (8-HQS) p K_a értékei és Ga(III)-komplexeik stabilitási szorzatai (β) vízben, 30% és 60% (m/m) DMSO/víz oldószerelegyekben. {I = 0,20 M (KCl) vízben, I = 0,10 M (KCl) 30 és 60% (m/m) DMSO/H₂O; 25 °C}^a

^a Maltolra vonatkozó adatok vízben ld. 5. táblázat. 30% (m/m) DMSO/H₂O: $pK_a = 9,00(1)$, $\lg\beta[GaL_1]^{2+}$: 11,33(1), $\lg\beta[GaL_2]^+$: 22,24(3), $\lg\beta[GaL_3]$: 30,64(1); 60% (m/m) DMSO/H₂O: $pK_a = 9,87(1)$, $\lg\beta[GaL_2]^{2+}$: 12,15(2), $\lg\beta[GaL_2]^+$: 24,74(6), $\lg\beta[GaL_3]$: 34,08(4). ^b UV-látható spektrofotometria: $pK_1 = 5,03(1)$, $pK_2 = 9,66(1)$ ($c_L = 1$ mM) és $pK_1 = 4,78(1)$, $pK_2 = 9,74(1)$ ($c_L = 100$ µM); fluorimetria: $pK_1 = 4,96(1)$ ($c_L = 50$ µM). ^c UV-látható spektrofotometria: $pK_1 = 3,83(1)$, $pK_2 = 8,39(1)$ ($c_L = 1$ mM) és $pK_1 = 3,63(1)$, $pK_2 = 8,48(1)$ ($c_L = 100$ µM); ¹H NMR: $pK_1 = 3,92(1)$, $pK_2 = 8,38(1)$ ($c_L = 1$ mM).

A Ga(III) komplexképzése az oxin és szulfoxin kétfogú (N,O) donoratomokat tartalmazó ligandumokkal hasonló sémát követ, mint ahogyan az előző fejezetben bemutatott hidroxi-(tio)pironoknál láttuk; azaz mono-, bisz- és trisz-komplexek képződnek. A komplexekre a különböző módszerekkel meghatározott stabilitási szorzatok a 6. táblázatban találhatók meg. Az oxin esetében pH-potenciometriás méréseket nem lehet végezni tiszta vizes közegben, így 30 és 60% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegyekben határoztuk meg az állandókat. Az oxin és szulfoxin mono-komplexeinek stabilitási szorzatát egyedi minták segítségével határoztuk meg UV-látható spektrofotometriásan, pH

= 1-2 tartományban. A 37.b ábra trendje alapján jól látható, hogy a DMSO-tartalom (azaz az $1/\varepsilon_r$ értékének) növelésével a stabilitási szorzatok is nőnek, de nemcsak az oxin, hanem szulfoxin és a maltol esetében is. Mivel a különböző közegekben meghatározott állandók lineáris összefüggést mutattak az oldószer(elegyek) relatív permittivitásának reciprokával mind a három ligandum esetében, az oxin Ga(III)-komplexeinek stabilitási állandóit tiszta vizes közegben a DMSO tartalmú mérések, valamint a szulfoxinra számolt adatokra illesztett egyenes meredeksége alapján extrapoláltuk. (6. táblázat). Ezek az extrapolált állandók jó egyezést mutattak az UV-látható spektrofotometriás titrálások segítségével nyert állandókkal.



38. ábra (a) A Ga(III) – oxin (1:3) rendszer 3D fluoreszcencia spektrumai pH = 7,40-en. (b) Fluoreszcencia mikroszkópos felvételek a KP46 komplex SW480 vastagbélráksejtekbe való bejutásáról 5 perces, ill. 3 órás inkubációt követően. (c) A Ga(III) – oxin (1:3) rendszer emissziós spektrumai különböző pH-kon mérve. (d) Az 530 nm-en mért emissziós intenzitások a pH függvényében 1:5 (\Diamond); 1:3 (\bullet); 1:2 (Δ) és 1:1 (\circ) fém-ligandum arányoknál és a ligandumra vonatkozóan (×). { $c_{L} = 50 \ \mu$ M; $\lambda_{EX} = 367 \ nm; 25 °C; I = 0,20 \ M(KCl)$ }

A szakirodalomban ismert volt, hogy a Ga(III) trisz-oxináto komplexe erősen fluoreszcens [264]. Az oxin önmagában kevéssé emittál, de fluorogén tulajdonságának köszönhetően Ga(III)-ionhoz koordinálódva emissziós intenzitása közel a tízszeresére növekszik a [GaL₃] komplexben. A spektrofluorimetria fémkomplexek stabilitási állandóinak meghatározásához való használata igen ritka a szakirodalomban [239], viszont rossz vízoldhatóságú fluoreszcens vegyületek esetében kifejezetten hasznos. A [triszoxináto-gallium(III)] komplex (8. ábra), azaz a KP46 3-dimenziós fluorimetriás spektruma a 38.a ábrán látható. Ezek alapján a komplex gerjesztési maximuma $\lambda_{EX} = 367$ nm-nél van, az emissziós spektrumot pedig 450-650 nm tartományban érdemes mérni (példaként pH 2-11,5 tartományban 1:3 fémion-ligandum aránynál rögzített emissziós spektrumokat és a különböző fémion-ligandum arányok mellett mért intenzitásokat az emissziós maximumon az 38.c,d ábrákon mutatom). A mért spektrumok alapján számoltuk a bisz- és triszkomplexek stabilitási szorzatait (6. táblázat), melyek igen hasonlónak adódtak a másik két módszerrel kapottakhoz, mutatva, hogy megfelelő fémion-ligandum rendszer esetén a fluorimetria is alkalmas módszer az oldatbeli stabilitás jellemzésére. A kapott adatok alapján mind a két 8-hidroxi-kinolin ligandum esetén a trisz-komplex az uralkodó részecske fiziológiás pH-n.

A KP46 intenzív fluoreszcens tulajdonságát (38.a) kihasználva javaslatunkra a Bécsi Egyetemen fluoreszcencia mikroszkópos technikával sikerült a komplex sejtekbe jutását is követni (38.b ábra). Az SW480 vastagbélrák sejteken végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a fémkomplex több órán keresztül stabilis maradt sejtes környezetben. Az is megfigyelhető volt, hogy a komplex percek alatt felhalmozódott a sejtekben, majd idővel a sejtmag körüli lemezes képletekben, feltehetően az endoplazmás retikulumban, ill. annak fehérje összetevőiben dúsult fel.

A két klinikai vizsgálatba került galliumkomplex oldatbeli stabilitásának összehasonlításához fiziológiás pH-n kiszámítottuk a fémion eloszlását a komplexek koncentrációjának függvényében (39. ábra). Az oxinnal képzett trisz-komplex stabilitási szorzata ~8 nagyságrenddel nagyobb, mint a maltol esetében. Ennek következtében igen híg, ugyanakkor fiziológiás szempontból releváns koncentrációtartományban az oxin komplex disszociációja jóval kisebb mértékű, mint a maltol komplexé. Az oldatban szabad maltol és $[Ga(OH)_4]^-$ jelenik meg. Az eredményeink alapján várható, hogy a két komplex vérszérumbeli eloszlása eltérő, hiszen a KP46 komplex nagy stabilitása révén kevésbé képes ligandumcsere folyamatokban részt venni, mint a trisz-maltoláto-komplex.



39. ábra A Ga(III) maltollal (piros görbék) és oxinnal (lila görbék) képzett [GaL₃] komplexeinek koncentráció eloszlási görbéi a komplex analitikai koncentrációjának függvényében pH = 7,4-n. A szaggatott vonalak az oxinkomplex vízoldhatatlan koncentrációtartományát jelölik. {I = 0,20 M (KCl); 25,0 °C}

5.3.2. Galliumkomplexek kölcsönhatása humán szérumfehérjékkel

Az 5.3.1. fejezetben részletezett oldategyensúlyi vizsgálatok egyértelműen rámutattak arra, hogy a KP46 oldatbeli stabilitása sokkal nagyobb a GaM komplexhez hasonlítva, másrészt jóval lipofilebb is (lg $P_{KP46} = +0,88$ [155]; lg $P_{GaM} = +0,41$ [139]). Ezen tulajdonságok előrevetítik a két galliumkomplex vérszérumban való eltérő viselkedését. A vérszérum LMM és HMM komponensei közül elsősorban a '*hard*' donoratomokat tartalmazó vegyületekkel való kölcsönhatásokat kell számba venni, hiszen ezek a ligandumok versenghetnek a Ga(III)-ionért, hasonlóan az Al(III)-ionhoz [265]. Ugyanakkor ezen semleges töltésű komplexek a HSA hidrofób zsebeiben is megkötődhetnek másodlagos kémiai kölcsönhatások révén, és fehérje nagy szérumkoncentrációja miatt egy akár gyenge megkötődés is meghatározó lehet a szérumspeciációra nézve.

Elsőként a potenciálisan versengő LMM (citrát, foszfát, oxalát) ligandumok hatását vizsgáltuk a komplexek stabilitására UV-látható spektrofotometriásan. Ehhez 20 μ M KP46-ot ill. 80 μ M GaM komplexet használtunk, ami a terápiás szérumkoncentrációjuknak felel meg. A méréseink azt mutatták, hogy ezek az LMM vegyületek nem képesek kiszorítani az eredeti ligandumot a komplexekből a szérumbeli koncentrációjukat ($c_{citrát} = 98 \mu$ M; $c_{oxalát} = 9,2 \mu$ M; $c_{foszfát} = 1,1 m$ M [231]) és annak tízszeresét használva sem.

A GaM és HSA kölcsönhatásának ¹H NMR spektroszkópiai és ultraszűréses vizsgálata egyaránt azt mutatta, hogy a komplex nem kötődik a fehérjén. A KP46 komplexnél azonban az ultraszűrést nem tudtuk használni a korlátozott vízoldhatóság és a szűrőn való megtapadása miatt, ugyanakkor sikerült STD NMR spektrumokat felvennünk híg oldatban ($c_{KP46} = 20 \mu$ M). Ez a technika alkalmas viszonylag gyenge, másodlagos

kölcsönhatások követésére is. A spektrumok felvétele 600 MHz-es készüléken kriomérőfej alkalmazásával történt. A KP46 ¹H NMR spektrumán (40.a ábra) mágnesesen nem ekvivalens ligandum protonokhoz tartozó jelek láthatóak, ami különböző szerkezeti izomerek meglétére utal. Az STD NMR spektrumon (40.b ábra) megjelennek a komplex jelei, ami egyértelműen arra utal, hogy a KP46 kötődik az albuminhoz. Az is megállapítható, hogy a fémkomplex nem disszociál a kötődés során. A KP46 változatlan koordinációs szféráját a HSA jelenlétében mások is leírták röntgenabszorpciós spektroszkópiás eredmények alapján [153].



40. ábra (a) A KP46 ¹H NMR, és (b) a KP46 – HSA rendszer STD NMR spektrumai. $\{c_{KP46} = 20 \ \mu\text{M}; c_{HSA} = 5 \ \mu\text{M}; 7 \ ^{\circ}\text{C}; \text{pH} = 7,40 \ (20 \ \text{mM} \text{ foszfát puffer}, 0,10 \ \text{M} \text{ KCl}); 10\% \ \text{D}_2\text{O}\}.$

A KP46 saját fluoreszcens tulajdonságát kihasználva is lehetett albuminhoz való kötődését monitorozni. Azt találtuk, hogy a komplex emissziós intenzitása a fehérje jelenlétében nagymértékben megnő (41.a ábra), a kémiai egyensúly perceken belül beállt. Figyelembe véve a HSA saját emisszióját, a mért spektrumok segítségével a KP46 kötési állandóját is meg lehetett határozni, ami lgK' = 4,04(8) adódott. Ez az állandó egy viszonylag gyengébb kölcsönhatásra utal. CZE mérésekkel csak kismértékű kötődést írtak le Groessl és munkatársai 50 µM HSA-t és 20 µM komplexet tartalmazó mintáknál [154], bár a spektroszkópiás adatokból számolt állandónk alapján 30%-nyi megkötődést várnánk ilyen körülmények között. A KP46 albuminon való megkötődése valószínűleg az aromás ligandumainak köszönhető, melyek ' π - π stacking' kölcsönhatásba léphetnek a fehérje aminosav oldalláncaival. A lehetséges kötési helyek feltérképezéséhez együttműködő partnerem, T. Tuccinardi végzett molekuláris dokkolásos számításokat, melyek alapján a KP46 legvalószínűbb kötési helye az IB aldoménban van (41.b ábra). A komplex egy oxin liganduma oldószernek kitett pozícióban van, míg a másik kettő egy-egy hidrofób üregben helyezkedik el (41.c ábra).



41. ábra (a) A KP46 – HSA rendszer (\circ, \blacktriangle : két párhuzamos mérés) és a HSA saját (×) emissziós intenzitása 532 nm-en mérve a változó HSA koncentráció függvényében. { $c_{\text{KP46}} = 16 \mu$ M; $c_{\text{HSA}} = 3-95 \mu$ M; $\lambda_{\text{EX}} = 367$ nm; 25 °C; pH = 7,40 (20 mM HEPES puffer, I = 0,10 M KCl)} (b) A KP46 elhelyezkedése a HSA IB alegységének hidrofób zsebében (III. kötőhely). (c) A felület színezése a Kyte-Doolittle hidrofobicitási skálának megfelelően sötétkék az erősen hidrofób és világoskék a kisebb hidrofobicitású helyeken.

Az apo-transzferrin (apoTf) komplexképzése Ga(III)-ionokkal jól jellemzett és a látszólagos kötési állandók alapján [142] (ld. 2.6. fejezet) várható az apoTf általi ligandumkiszorítás a GaM és KP46 esetében, de eltérő mértékben. A KP46 ill. GaM komplex – apoTf rendszerekre felvett ¹H NMR spektrumok elemzése egyértelműen igazolta, hogy az eredeti ligandumot valóban részlegesen kiszorítja a fehérje a galliumion koordinációs szférájából, ahogyan a KP46 esetén mutatja a 42. ábra.



42. ábra Az oxin (a), a KP46 (c) és annak apoTf jelenlétében (b) felvett ¹H NMR spektrumai. A kinagyított spektrumrészleten a szabad ligandumhoz tartozó csúcsokat kék háttér jelöli. { $c_{\text{oxin}} = 60 \,\mu\text{M}$; $c_{\text{KP46}} = 20 \,\mu\text{M}$; $c_{\text{apoTf}} = 20 \,\mu\text{M}$; $c_{\text{NaHCO}_3} = 25 \,\text{mM}$; 7 °C; pH = 7,40; 10% D₂O; $t_{\text{várakozás}} = 1 \,\text{h}$ }

A megfelelő csúcsintegrálok arányából kiszámolható, hogy az oxin 71%-a a Ga(III)-ionhoz kötött az adott körülmények között az apoTf jelenlétében, ami igen jó egyezést mutat az

egyensúlyi állandók alapján számolt 70%-os értékkel. (A szabad maltol megjelenésének detektálása a komplex jó vízben való oldhatósága miatt technikailag jóval egyszerűbb volt. Az NMR spektrumok elemzése során a vegyes ligandumú komplexek képződését az adott körülmények között ki tudtuk zárni.)

Az apoTf a Tyr és Trp aminosavjainak köszönhetően fluoreszcens, és a két Fe(III) (ill. Ga(III)) kötőhely közelében található két Tyr, melyek fluoreszcenciája kioltódik a fémion kötődésekor [266], így az emissziós intenzitás csökkenésén keresztül a fémionhoz való koordináció követhető. Ennek megfelelően felvettük az apoTf emissziós spektrumát a komplexek (valamint GaCl₃) jelenlétében is, és a különböző fehérje-komplex arányoknál rögzített spektrumokat, ill. az intenzitások megváltozását mutatja a 43. ábra. Az egyensúly a komplexek esetén 15-20 perc alatt állt be. Az emissziós intenzitás egyértelműen lecsökken a komplexekkel való kölcsönhatás következtében, de ennek mértéke a nagyobb stabilitású KP46-nál sokkal kisebb, hiszen az apoTf kevésbé képes az oxint kiszorítani a maltolhoz viszonyítva. Ugyanakkor a GaCl₃ a mért emissziós intenzitást még tízszeres feleslegben és 4 óra inkubációt követően sem befolyásolja jelentősen. A fémion ugyanis koordinálódó ligandumok nélkül fiziológiás pH-n döntően a meglehetősen inert [Ga(OH)₄]⁻ formában van jelen [267]. Az apoTf és a [Ga(OH)₄]⁻ közötti reakció meglehetősen lassú, ezért ürülnek ki a (hidrolizált) galliumsók gyorsan a szervezetből a veséken keresztül [139,140]. A GaM viszont sokkal gyorsabban reagál a transzferrinnel.



43. ábra (a) Az apoTf emissziós spektrumának változása GaM hozzáadására; (b) a 340 nm-es hullámhosszon mért intenzitások változása a hozzáadott GaM (×), KP46 (*) ill. GaCl₃ (\blacktriangle) hatására. { $c_{apoTf} = 0,2 \ \mu$ M; $c_{komplex} = 0,2-4 \ \mu$ M (GaM vagy KP46); a GaCl₃ esetében: $c_{apoTf} = 2 \ \mu$ M; $c_{GaCl_3} = 10-40 \ \mu$ M; $\lambda_{EX} = 280 \ nm; 25 \ ^{\circ}C; pH = 7,40 (20 \ nm HEPES, 0,10 \ M \ KCl)}$

Mivel a KP46 és szabad ligandumának emissziós intenzitása között jelentős a különbség (ld. 5.3.1.2. fejezet), és az apoTf nem emittál a komplex gerjesztési maximumánál ($\lambda_{EX} = 367$ nm), a fehérje általi ligandumkiszorítás spektrofluorimetriásan is követhető a komplex saját emissziójának megváltozásán keresztül. A KP46 emissziós

intenzitása egyértelműen lecsökken a fehérje jelenlétében (44.a ábra), ami azzal magyarázható, hogy az apoTf galliumionhoz való koordinációjakor kiszoruló oxin csak gyengén emittál. A mérési pontok alapján és a stabilitási állandók segítségével számított fehérjéhez kötött fémion mennyisége elfogadható egyezést mutatott (44.b ábra), ami igazolja a feltételezésünket a lejátszódó folyamatról.



44. ábra (a) A KP46 – apoTf rendszer emissziós intenzitása (*) és a KP46 kalibráló egyenese (\Box) a KP46 koncentrációjának függvényében. (b) Ezen mérési adatok alapján számolt [apoTf–Ga(III)] egyensúlyi koncentrációk (*) együtt ábrázolva a stabilitási állandók alapján jósolt görbével. { c_{apoTf} = 25 µM; c_{KP46} = 2,5-20 µM; λ_{EX} = 367 nm; λ_{EM} = 532 nm; 25 °C; pH = 7,40 (20 mM HEPES, 0,10 M KCl)}

A Ga(III)-apoTf [142]; a fémion hidrolízis állandói [267], a ligandumok (maltol, oxin) p K_a -i, a Ga(III)-ligandum komplexek stabilitási szorzatai, a maltol-HSA [TP17] és a KP46-HSA adduktum kötési állandója segítségével modellszámolást végeztünk a gallium vérszérumbeli eloszlására vonatkozóan (45. ábra). A számításkor a fehérjék koncentrációja megfelelt a vérben lévőnek, és feltételeztük, hogy az apoTf kötőhelyei 30%-ban Fe(III)ionokkal telítettek [229]. Az eloszlást a komplexek analitikai koncentrációja természetesen nagyban befolyásolja. A GaM komplex terápiás szempontból releváns koncentrációtartományában ($\leq 160 \mu$ M [140]) a Tf-nek van döntő szerepe (45.a ábra) a Ga(III) szállításában. A maltol fehérje általi kiszorítása 40 μ M-nál kisebb komplex koncentrációnál teljesnek mondható. A KP46 esetében viszont az apoTf szerepe kevésbé látszik hangsúlyosnak (45.b ábra), ami a komplex nagy stabilitásának köszönhető. A KP46 nagy része a HSA-hoz kötődik. Pl. 20 μ M-os komplex koncentrációnál a fémion 65%-a található ilyen formában, míg 20-25% apoTf-hez kötődik. A fennmaradó mennyiség pedig szabad KP46-ként található a rendszerben.

Ezen sokkomponensű modell segítségével, ami persze nagyon leegyszerűsíti a valós, biológiailag releváns kémiai rendszert, bizonyos következtetések levonhatók a két összehasonlított komplexre vonatkozóan:

- (i) A GaM szállításában a HSA nem vesz részt.
- (ii) Az apoTf jelentős mennyiségű Ga(III)-iont szállít az eredeti GaM komplex disszociációját okozva ezzel. Ez alapján a GaM komplexben lévő fémion a sejtbe valóban a Tf-receptorokon keresztül juthat be.
- (iii) A KP46 döntően a HSA-hoz reverzibilisen kötve változatlan formában szállítódik a vérszérumban, ami késleltetheti a komplex keringésből való kiürülését, másrészt felveti a komplex eredeti formában való Tf-független sejtes felvételét. A munkánkkal párhuzamosan végzett biológiai mérések is ezt támasztották alá [152,156].



45. ábra A GaM – (a) és a KP46 – (b) HSA – Tf vegyes rendszer koncentráció eloszlási görbéi a fémkomplexek analitikai koncentrációjának függvényében az általunk meghatározott, ill. irodalmi egyensúlyi állandók alapján. {pH = 7,40; $c_{HSA} = 630 \mu$ M; $c_{Tf} = 37 \mu$ M (figyelembe lett véve, hogy a kötőhelyek 30%-osan telítettek vas(III)ionokkal)} (*A szaggatott rész a KP46 oldhatósági határán túli koncentrációkat jelöli.*)

5.4. Tioszemikarbazonok és fémkomplexeik

5.4.1. Tioszemikarbazonok proton disszociációs folyamatai, izomerizációja és lipofilitása

A tioszemikarbazonok oldatkémiai viselkedésének tanulmányozását nehezíti vízben való rossz oldhatóságuk, és feltehetően ez is hozzájárul ahhoz, hogy csak csekély számú oldategyensúlyi adat lelhető fel erre a vegyületcsaládra a szakirodalomban. A legtöbb oldategyensúlyi mérést mi is keverék-oldószerben (30% (m/m) DMSO/H₂O) végeztük a megfelelő oldhatóság eléréséhez. A vizsgált legfontosabb α -*N*-piridil- és szalicilaldehid-(tio)szemikarbazonok szerkezeti képletét a 46. ábra mutatja. Ha a vegyületek oldhatósága jobb volt ($S \ge 1$ mM, pl. L-Pro-STSC, L-Pro-FTSC, Morf-PTSC, mPip-PTSC), ill. ha az alkalmazott mérési módszer nem igényel nagy koncentrációt (pl. spektrofotometria, fluorimetria) akkor tiszta vizes közegben is történtek mérések.



46. ábra A vizsgált legfontosabb (tio)szemikarbazon szerkezeti képlete és nevük rövidítése.

A vegyületek oldatbeli viselkedését ((de)protonálódás, stabilitás, izomerizáció) pHpotenciometria, UV-látható spektrofotometria, ¹H NMR spektroszkópia és fluorimetria kombinált használatával tanulmányoztuk. Néhány kiválasztott TSK pH-potenciometriás ill. UV-látható spektrofotometriás módszerrel meghatározott proton disszociációs állandójának negatív logaritmusát (p K_a) mutatja az 7. táblázat. Az alapvázas α -*N*-piridil-TSK-oknak két disszociábilis protonja van. Az első deprotonálódási folyamat (H₂L⁺ \rightleftharpoons HL + H⁺) a piridínium nitrogénhez (N¹H⁺) rendelhető, míg a második (HL \rightleftharpoons L⁻ + H⁺) a tioszemikarbazid-rész hidrazin nitrogénjéhez (N³H). Ebben a második lépcsőzetes folyamatban képződő L⁻ formában a negatív töltés főképp a kénatomon lokalizálódik a tion-tiol tautomériának köszönhetően (ld. 2.5. fejezet).

7. táblázat Néhány tioszemikarbazon és az SSC proton disszociációs állandójának tízes alapú negatív logaritmusa (pK_a)^a, *n*-oktanol-víz megoszlási hányadosának logaritmusa ($lgD_{7,4}$)^a. {I = 0,1 M KCl; 25,0 °C; 30% (m/m) DMSO/H₂O (pH-potenciometria) vagy H₂O (UV-látható spektrofotometria)}

	р <i>К</i> 1	р <i>К</i> 2	közeg	lgD _{7,4}
FTSC	3,13	11,13	DMSO/H ₂ O	+0,73
	3,48	10,72	H_2O	
triapin	3,92	10,78	DMSO/H ₂ O	+0,85
	4,25	10,58	H_2O	
PTSC	3,38	10,54	DMSO/H ₂ O	+1,15
	3,61	10,22	H_2O	
APTSC	4,31	10,29	DMSO/H ₂ O	+1,30
	4,64	10,09	H_2O	
AcFTSC	3,64	11,52	DMSO/H ₂ O	+1,02
Me ₂ N-triapin	4,43	10,87	H_2O	+1,21
Me ₂ N-APTSC	4,93	10,69	H_2O	+1,52
O-triapin	4,24	>12,5	DMSO/H ₂ O	+0,22
Se-triapin	3,87	9,48	DMSO/H ₂ O	+0,85
STSC	8,89	12,59	DMSO/H ₂ O	+1,74
	8,53	>11,5	H_2O	
SSC	~1,9	9,32	DMSO/H ₂ O	+1,04

^a A p K_a és log $D_{7,4}$ állandók standard deviációja ±0,01-0,07 közöttiek.

A metil- és aminocsoportok jelenléte egyértelműen befolyásolja a ligandumok p K_a értékeit; a hatás nagysága és iránya azonban a szubsztituensek pozíciójától is függ. Az *N*terminális elektronküldő metilcsoportok (R₃) a p K_1 -t növelik, míg a második proton disszociációs állandó értékét ~fél nagyságrenddel csökkentik. Az R₂ pozícióban lévő metilcsoport mindkét p K_a -t növeli. A triapinban lévő aminocsoport (R₁) jelentősen megnöveli a piridinium nitrogén bázicitását az FTSC alap ligandumhoz viszonyítva, de csökkenti a hidrazin nitrogén p K_a -ját. Abban az esetben, amikor ez az amino-nitrogén dimetilezett (Me₂N-APTSC) a p K_a -k egyértelmű növekedését látjuk. A kénatom cseréje oxigénre (O-triapin) és szelénre (Se-triapin) ellentétes irányú változást hoz a p K_a értékekben a megváltozó polarizálhatóságnak megfelelően: az O-triapin p K_a -i rendre nagyobbak, míg a Se-triapin esetében azok kisebbek. Fontos megjegyezni, hogy a Setriapin rendkívül érzékeny az oxigén jelenlétére, így a méréseket szigorúan anaerob körülmények között kellett végezni. Ennek hiányában a ligandum bomlása és oxidációja során H₂Se lép ki a molekulából az ESI-MS mérések tanúsága szerint ([M+1]⁺ (C₇H₁₀N₅Se) m/z = 244,01 \rightarrow [M(-H₂Se)+1]⁺ (C₇H₈N₅) m/z = 162,08), ami elemi vörös szelénné oxidálódik.

A piridin- helyett fenol-gyűrűt tartalmazó STSC-nek is két disszociábilis protonja van, de a teljesen protonált forma (H₂L) semleges. Az első deprotonálódási lépés itt a fenolos hidroxilcsoporton történik, míg a p K_2 ugyanúgy a hidrazin nitrogénhez rendelhető. A HL⁻ forma negatív töltése felelős a második proton disszociációs állandó több mint egy nagyságrenddel való növekedéséért az FTSC-hez hasonlítva. A kénatom oxigénre történő cseréje (STSC \rightarrow SSC) a hidrazin nitrogén p K_a -ját ebben az esetben is megnöveli, pontos értéke a mérhető pH-tartományban már nem határozható meg. Így az SSC szemikarbazon pK₂-je tartozik fenolos hidroxilcsoport disszociációjához, а míg pK_1 а karbamoilcsoporthoz.



47. ábra (a) Az Me₂N-APTSC ligandum különböző pH-kon rögzített UV-látható spektrumai vizes közegben. (b) A ligandum különböző formáinak számolt moláris abszorbancia spektrumai. { $c_{\rm L} = 40 \ \mu\text{M}$; pH = 2 – 11,5; $I = 0,10 \ \text{M}$ (KCl); 25 °C; $\ell = 1,0 \ \text{cm}$ }

A TSK-ok p K_a -it UV-látható spektrofotometria segítségével is meg tudtuk határozni, mert a proton disszociációs folyamatokat jól detektálható spektrális változások kísérik; a kapott állandók pedig mindig jó egyezést mutattak a pH-potenciometriás módszeren alapulókkal, abban az esetben, ha csak egyféle izomer volt jelen az oldatban (ld. később). Az UV-látható spektrofotometria mérési technika a kisebb koncentrációigénye miatt ugyanakkor lehetővé tette a tiszta vizes közegű méréseket is, reprezentatív példát mutat a 47. ábra az Me₂N-APTSC ligandumra. A vizes közegben felvett UV-látható spektrumok felbontásával számolt p K_a értékek a vártnak megfelelően valamelyest különböztek az oldószerelegyben kapottaktól (7. táblázat). Az α -*N*-piridil-TSK-ok p K_1 értéke lecsökken, míg a p K_2 megnő a kisebb dielektromos állandójú DMSO jelenlétében, ami jól magyarázható a Born-féle elektrosztatikus oldószer modellel [262]. Azaz a kationos savak (piridínium nitrogén, H₂L⁺) p K_a -ja csökken, míg a semlegeseké (HL) megnő az oldószer relatív permittivitásának csökkenésével, hiszen a DMSO a semleges formákat erősebben képes szolvatálni, mint a töltötteket, ami miatt az első esetben kedvezőbbé, míg a másodikban kedvezőtlenebbé válik a deprotonálódás. Az STSC vegyületnél ugyanakkor a p K_1 megnő a DMSO/H₂O elegyben, mert ez a semleges H₂L formában lévő fenolos OH-csoport deprotonálódásához rendelhető folyamatot jellemzi.

A vizsgált TSK-ok Schiff-bázisoknak tekinthetők és ennek köszönhetően, nagyon savas, ill. lúgos pH-kon a C=N² kötésük felnyílhat és a megfelelő aldehid, ill. keton és tioszemikarbazid képződik, amit figyelembe kellett vennünk a mérések megtervezésénél. A tapasztalataink szerint a bomlás sebessége nagymértékben függ a közegtől (pl. tiszta vízben gyorsabb, mint a DMSO/H₂O elegyben), a pH-tól (széles pH-tartományban, fiziológiás pH-t is beleértve, nem tapasztalható mérhető bomlás, de pH < ~2 és pH > ~11 tartományokban már igen), másrészt függ a ligandum szubsztituenseitől is. A sav-katalizálta bomlást jellegzetes abszorbanciacsökkenés kíséri a 330 nm-es hullámhossz környékén, ami a vegyületek elektronrendszerében a konjugáció mértékének a jelentős csökkenésével magyarázható. Az FTSC 24 óra alatt csak kismértékű bomlást mutat 100 μ M-os oldatban (< 10%) pH =2,3-n, míg az AcPTSC-nél a bomlás már néhány óra alatt teljesnek mondható. A bomlás sebessége a következő sorrendet mutatta: AcPTSC >> PTSC > AcFTSC > FTSC, azaz minél több metilcsoportot tartalmaz a molekula, annál gyorsabb a folyamat a savas közegben.

Fontos megjegyezni, hogy a TSK-ok a konjugált elektronrendszerüknek és merev szerkezetüknek köszönhetően fluoreszcensek, és a különböző pH-kon felvett emissziós spektrumaik felbontásával szintén tudtunk savi disszociációs állandókat meghatározni vízben (pl. STSC, L-Pro-STSC, FTSC, PTSC esetén). Emissziós maximumuk a látható hullámhossztartományba esik, ami lehetővé teszi a sejtbe jutásuk és eloszlásuk monitorozását fluoreszcens mikroszkópiával [268].

A ¹H NMR spektroszkópia segítségével nemcsak a TSK-ok deprotonálódása követhető nyomon, hanem az izomerek jelenléte is. A Z/E izoméria a C=N² kettős kötéshez kapcsolódóan jön létre, és a jelenlévő izomerek aránya függ az oldószertől és a pH-tól is [208-210]. Részletesen vizsgáltuk az FTSC, PTSC, AcFTSC és AcPTSC ligandumoknál DMSO- d_6 -ban, D₂O-ban és 30% (v/v) DMSO- d_6 /H₂O elegyben (pH = 6-n, ahol a HL formák a dominánsak) az izomerek jelenlétét. A ¹H NMR spektrumok elemzése

azt mutatta, hogy ezek az α -*N*-piridil-TSK-ok poláris oldószerekben jellemzően az Eformában fordulnak elő (48. ábra).



48. ábra Az AcPTSC ligandum E, Z és E' izomerjeinek javasolt szerkezete. A baloldal E' izomer képletét az AcPTSC röntgenszerkezete alapján [210] rajzoltuk fel.

Az N-terminális dimetilezett származékoknál a Z-izomer jelenléte is jelentős, pl. a PTSC-nél a Z izomer aránya eléri a ~40%-ot a 30% (v/v) DMSO- d_6/H_2O elegyben pH=6n. Az AcPTSC ligandumnál a Z és E izomerek mellett egy harmadik részecske is megjelenik (E'), ami egy tioamid-típusú intramolekuláris hidas és kiterjedt delokalizált π elektronrendszerrel bíró forma (48. ábra). A PTSC morfolin- és metil-piperazinkonjugátumai (46. ábra) extra deprotonálódó csoportokat tartalmaznak (Morf-PTSC: morfolinium-NH⁺, mPip-PTSC: két piperazinium-NH⁺) a piridinium és hidrazin nitrogéneken kívül.



49. ábra (a) A Morf-PTSC ligandum ¹H NMR spektruma az aromás régióban pH = 7,58-n (10-90% D₂O/H₂O), szürke háttérrel a Z izomerhez tartozó csúcsok vannak jelölve. (b) A HL forma E és Z izomerjének szerkezete. (c) Koncentráció eloszlási görbék a ¹H NMR mérések alapján meghatározott mikroállandók segítségével számolva. {I = 0,1 M KCl; 25 °C}

Vizes oldatukban különböző pH-kon mért ¹H NMR spektrumaik elemzésével nemcsak az E és Z izomerek arányát, hanem azok deprotonálódásához tartozó mikroállandókat is meghatároztuk, ahogyan a Morf-PTSC példája is mutatja a 49. ábrán. Az izomerek eltérő savi disszociációs állandói az egyes protonáltsági fokok esetén intramolekuláris hidrogénhidak jelentétével (49.b. ábra) jól értelmezhetők, hiszen a hidrogénkötésbe kerülő protonok disszociációja nehezített, ami a p K_a emelkedésével jár (pl. Morf-PTSC: p K_3 (hidrazin nitrogén) = 10,14 (E); >11,5 (Z)).

Az 7. táblázatban szereplő ligandumok fiziológiás pH-n HL formájukban vannak jelen; kivételt az STSC jelent, mely részben negatívan töltött (vízben: 93% H₂L, 7% L⁻). A semleges töltés segíti a vegyületek sejtmembránokon való áthaladását, viszont rossz vízoldhatóságot eredményez. A vegyületek lipofilitását ezeknél a vegyületeknél is noktanol/víz közötti megoszlásos UV-látható spektrofotometriás mérésekkel jellemeztük. A fiziológiás pH-n meghatározott megoszlási hányadosok (lgD7,4, 7. táblázat) összehasonlításakor fontos figyelembe venni a vegyületek aktuális protonáltsági állapotát és így töltését, melyek a meghatározott p K_a -k segítségével könnyen megadhatók. Az adatok alapján a vizsgált TSK-ok lipofilitása nagymértékben függ a szubsztituensektől. Az FTSC alapvegyülethez hasonlítva megállapítható, hogy az R1 pozíciójú aminocsoport a lipofilitást csak kis mértékben, míg az N-terminális dimetilezés nagyobb mértékben növeli azt, a vártnak megfelelően. A piridingyűrű aminocsoportjának metilezése is növeli a lipofilitást. A kalkogénatom cseréje csak az O-triapin esetében okozott a lipofilitásban csökkenést, a triapin és Se-triapin lipofilitása hasonlónak adódott. A piridin-nitrogén helyett a fenolos OH-csoport jelenléte a molekulában egy nagyságrenddel megnöveli a $D_{7,4}$ értéket (vö. FTSC és STSC), a kén oxigénre történő cseréje pedig csökkenti azt (vö. STSC és SSC).

Az optimális hidrofil-lipofil sajátság megtalálása érdekében az FTSC, PTSC és STSC ligandumokra disszociábilis protonokat tartalmazó farmakofór szubsztituensek (L-Pro, morfolin, metil-piperazin) kerültek (V.B. Arion együttműködő partner révén), és a kapott vegyületek vízben már sokkal jobban oldódnak (lg $D_{7,4}$ értékek: Morf-PTSC = +0,61, mPip-PTSC = -0,03, L-Pro-FTSC < -1,7, L-Pro-STSC = -0,60). A morfolincsoport pH = 7,4-n gyakorlatilag már deprotonált formában van a Morf-PTSC-ben, így a molekula 97%-ban semleges, ami miatt a lg $D_{7,4}$ értéke a PTSC ligandumétól a várthoz képest csak alig kisebb. Ezzel szemben a mPip-PTSC vegyületben a metil-piperidinium nitrogén 74%ban protonált, aminek köszönhetően a molekula hidrofilebb. Az L-Pro-konjugátumok egyértelműen hidrofilebb karakterűek a referenciavegyületükhöz képest: $D_{7,4}$ értékük több mint 2 nagyságrenddel kisebb, ami az aminosav-rész ikerionos szerkezetének (N_{Pro}H⁺, COO⁻) köszönhető. Ez a nagymértékű hidrofil jelleg növekedés ugyanakkor nem bizonyult kedvezőnek a biológiai hatás szempontjából, amit az 5.4.3. fejezetben mutatok be.

5.4.2. Tioszemikarbazonok réz(II)komplexei

A Cu(II)-TSK komplexek rákellenes hatása már több mint negyven éve ismert; számos olyan komplexet állítottak elő, melyek a ligandumukhoz képest citotoxikusabbak rákos sejtvonalakon [161,162,185-189]. Ugyanakkor a TSK-ok hatásmechanizmusának feltérképezése során az intracellulárisan képződő redoxi aktív rézkomplexeknek is szerepet tulajdonítanak a hatás kialakításában, bár a közölt eredmények erre vonatkozóan meglehetősen ellentmondásosak [188,189]. A vizsgált rézkomplexek nagy száma ellenére csak elvétve található termodinamikai adat a vizes oldatbeli viselkedésükre vonatkozóan a szakirodalomban [200-207]. Az általunk tanulmányozott Cu(II)-TSK komplexek változatos összetételt és koordinációs módokat mutatnak (ld. lejjebb), viszont közös jellemzőjük, hogy vizes közegben, biológiailag releváns körülmények között (pH = 7,4 és µM-os koncentrációtartomány) kiemelkedő stabilitásúak. Az oldatbeli stabilitást és a komplexek szerkezetét pH-potenciometria, ESR spektroszkópia és UV-látható spektrofotometria kombinált használatával jellemeztük 30% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegyben és/vagy tiszta vízben.

Az alapvázas α -*N*-piridil- (pl. FTSC) és szalicilaldehid TSK-ok (pl. STSC) háromfogú ligandumok, a Cu(II)-ionnal elsősorban mono-komplexeket képeznek. Reprezentatív példaként az STSC komplexképzése látható az 50. ábrán. A savas pHtartományban jelenlévő protonált komplexben ([Cu(LH)]⁺) a ligandum (O⁻,N,S) donoratomokon keresztül koordinálódik, miközben a hidrazin-N még protonált formában van. Ennek deprotonálódásával jön létre a ligandum (O⁻,N,S⁻) dianionos koordinációja a [CuL] komplexben, majd a pH-t tovább növelve képződik egy vegyes hidroxido [CuL(OH)]⁻ komplex. Az ESR spektrumok felbontásával nyert izotróp paraméterek (50. ábra) is a koordinációs módok szignifikáns megváltozását támasztották alá az egyes részecskékben. A pH növelésével bekövetkező [CuLH]⁺ komplex deprotonálódást, majd a [CuL(OH)]⁻ részecske létrejöttét is az egyre kisebb g_0 és egyre nagyobb A_0 értékek jellemzik a Cu(II)-ion körül megnövekvő ligandumtér-erőnek megfelelően. A d-d sávok abszorpciós maximumai is megváltoznak a pH növelésével a fémion körüli koordinációs mód módosulása miatt, főleg az (O⁻,N,S) \rightarrow (O⁻,N,S⁻) átrendeződés okoz nagyobb változást (λ_{max} : 630 nm [CuLH]⁺ \rightarrow 580 nm [CuL] \rightarrow 570 nm [CuL(OH)]⁻). Az STSC ligandum feleslege esetén sem képződnek a mono-ligandumú komplexeken kívül más összetételű részecskék.



50. ábra A Cu(II) – STSC (1:1) rendszer koncentráció eloszlási görbéi, a komplexek szerkezete és izotróp ESR paraméterei. {30% (m/m) DMSO/H₂O; $c_{\text{STSC}} = c_{\text{Cu(II)}} = 1 \text{ mM}$; I = 0,1 M KCl; 25 °C}



51. ábra (a) A Cu(II) – triapin (1:2) rendszer különböző pH-kon felvett ESR spektrumai, és (b) koncentráció eloszlási görbéi. {30% (m/m) DMSO/H₂O; $c_{\text{triapin}} = 2 \text{ mM}$; $c_{\text{Cu(II)}} = 1 \text{ mM}$; I = 0,1 M KCl; 25 °C} (c) A [Cu₂L₃]⁺ komplexhez rendelt ESI-MS spektrum részlete, ahol a szaggatott vonalak a szimulált csúcsokat mutatják a [Cu₂C₂₁H₂₄N₁₅S₃]⁺ (= [Cu₂L₃]⁺) részecskére. { $c_{\text{triapin}} = 0,1 \text{ mM}$; $c_{\text{Cu(II)}} = 0,05 \text{ mM}$; pH = 7,4}

Ugyanez a koordinációs séma figyelhető meg az L-Pro-STSC származéknál is. Az α -*N*-piridil-TSK-oknál (pl. triapin, FTSC) is hasonló összetételű mono-komplexek képződnek, de ekkor a fenoláto-O⁻ helyett a piridin-N koordinálódik és ennek megfelelően a [CuL]⁺ komplex egyszeresen pozitív töltésű.

Az α -*N*-piridil-TSK-ok feleslege esetén ugyanakkor bisz-komplexek ([CuL₂H]⁺, [CuL₂]) is kialakulnak (ld. triapinnál 51. ábra), és különböző kötési izomerek jönnek létre feltehetően a ligandumok (N_{piridin},N,S⁻)(N vagy S⁻) vagy (N_{piridin},N⁻)(N,S⁻) koordinációs módjának variálódásával. A triapin, PTSC és APTSC ligandumokkal [Cu₂L₃]⁺ kétmagvú részecske jelenlétét is leírtuk a pH = 5 – 9 tartományban (51.a,b ábra), mely egy ESR csendes részecske a Cu(II) centrumok közelsége miatt; képződését ESI-MS módszerrel is sikerült igazolnunk (51.c. ábra). A [Cu₂L₃]⁺ komplex fragmentációja során [CuL]⁺ és [CuL₂H]⁺ egymagvú részecskéket lehetett detektálni.

Az alapvázas α -*N*-piridil-TSK-okhoz képest az L-Pro-FTSC esetén az aminosav-rész is részt vesz a koordinációban, a ligandum ötfogúként a (COO⁻,N_{Pro},N_{piridin},N,S⁻) donoratomokon keresztül kötődik a fémionhoz négyzetes piramisos geometriai elrendezésben (52.a ábra). A morfolin- és a metil-piperazin-konjugátumok nitrogén donoratomjai szintén részt vesznek a Cu(II)-ion megkötésében, így ezek a ligandumok négyfogúan koordinálódnak (52.b,c ábra). A koordinációs szféra nagyobb fokú telítődésének köszönhetően az L-Pro-FTSC, Morf-PTSC és mPip-PTSC ligandumok kizárólag mono-komplexeket képeznek a Cu(II)-ionnal.



52. ábra (a) L-Pro-FTSC, (b) Morf-PTSC és (c) mPip-PTSC ligandumok [CuL(Cl)] komplexeinek röntgenkrisztallográfia módszerrel meghatározott szerkezetei. Az atomok termális ellipszoidokkal ábrázolva 50% valószínűség mellett; a kristályban levő vízmolekulák és metanol nincsenek ábrázolva a jobb átláthatóság érdekében.

A Cu(II) – (tio)szemikarbazon rendszerekben a képződő komplexek összetételét és stabilitási szorzataikat elsősorban pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg, melynek eredményét a különböző pH-kon felvett UV-látható és ESR-spektrumok segítségével támasztottuk alá általában 30% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegyben, ill. a

dc_1661_19 Eredmények és következtetések: Tioszemikarbazonok és fémkomplexeik

vízben jól oldódó L-Pro-FTSC, Morf-PTSC és mPip-PTSC TSK-konjugátumok esetében vizes közegben. Ugyanakkor a rögzített spektrumok felbontásával számos esetben stabilitási állandókat közvetlenül is meghatároztunk. Példaként kiválasztott Cu(II) – (tio)szemikarbazon rendszerekben képződő komplexek stabilitási szorzatait mutatja a 8. táblázat.

8. táblázat Néhány tioszemikarbazon és az SSC Cu(II)-komplexeinek stabilitási szorzatainak (β) tízes alapú logaritmusa (lg β). {I = 0,1 M KCl; 25,0 °C; 30% (m/m) DMSO/H₂O vagy H₂O}

lgβ	[CuLH] ²⁺	$[CuL]^+$	[CuL(OH)] ^a	közeg	kiemelt módszer
FTSC	16,44(5)	14,76(1)	5,46(2)	DMSO/H ₂ O	fotometria/pH-metria
triapin	16,69(2)	14,35(2)	4,68(3)	DMSO/H ₂ O ^b	ESR/pH-metria
	20,08(8)	17,57(6)	8,93(8)	H_2O	fotometria
APTSC	17,05(4)	15,12(4)	5,63(4)	DMSO/H ₂ O ^c	ESR/pH-metria
mPip-PTSC	26,53(1)	20,26(3)	8,4(1)	H_2O	pH-metria/fotometria
L-Pro-FTSC	24,80(2)	22,85(2)	10,03(9)	DMSO/H ₂ O	pH-metria/fotometria
STSC	23,03(4)	19,02(4)	8,75(9)	DMSO/H ₂ O	pH-metria
	24,44(2)	20,17(1)	9,20(2)	H_2O	fotometria
L-Pro-STSC	21,58(3)	17,54(3)	6,97(4)	DMSO/H ₂ O	pH-metria
SSC	_	10,58(2)	4,30(1)	DMSO/H ₂ O	pH-metria

^a [CuL(OH)] = [CuLH₋₁]. ^b További lg β értékek: [CuL(OH)₂] = -7,57(3); [CuHL₂] = 28,67(3); [CuL₂] = 20,95(2); [Cu₂L₃]⁺ =39,50(9). ^c További lg β értékek: [CuL(OH)₂] = -6,75(6); [CuHL₂] = 29,63(3); [CuL₂] = 22,40(3); [Cu₂L₃]⁺ =42,95(9).

A Cu(II)-TSK komplexek oldatbeli stabilitása a meghatározott stabilitási szorzatok segítségével nem vethető közvetlenül össze. Ugyanakkor a ligandumok p K_a -i és a különböző komplexekre meghatározott stabilitási szorzatok segítségével számolt p[Cu(II)] értékek alapján a ligandumok Cu(II)-ionok felé mutatott affinitása már összehasonlítható az adott körülmények között. Választott (tio)szemikarbazonok p[Cu(II)] értékeit fiziológiás pH-n mutatja az 53. ábra. A 30% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegy esetén kapott eredmények (53.a ábra) alapján elmondható, hogy ezen Cu(II)-komplexek stabilitása kiemelkedő, mert 1 μ M-os oldatukban pH = 7,4-n a disszociációjuk \leq 1%-os. Kivételt az O-triapin jelent, ahol a komplex disszociációja ugyanilyen körülmények között 14%-os. A p[Cu(II)] értékek összehasonlításával a következő hatások figyelhetők meg:

- i) a triapin piridingyűrűjén lévő NH₂ csoport jelenléte gyakorlatilag nem befolyásolja a Cu(II)-ionok felé mutatott affinitást (vö. triapin és FTSC);
- ii) a S/O cserével jelentősen csökken a Cu(II)-komplexek stabilitása (vö. STSC és SSC; triapin és O-triapin);
- iii) az N-terminális dimetilezés növeli a rézkomplexek stabilitását (vö. triapin és APTSC);

- iv) a piridin-nitrogén fenolos-OH csoportra történő cseréje szintén növeli a Cu(II)-kötő képességet pH = 7,4-n (vö. FTSC és STSC);
- v) és az L-Pro-konjugáció, ha az aminosav-egység donoratomjai nem vesznek részt a koordinációban, akkor csekély mértékben befolyásolja a Cu(II)-komplex stabilitását (vö. STSC és L-Pro-STSC).



53. ábra A Cu(II) – (tio)szemikarbazon (1:1) rendszerekben képződő komplexekre meghatározott stabilitási szorzatok segítségével számolt p[Cu(II)] értékek pH = 7,4-n (a) 30% (m/m) DMSO/H₂O, és (b) vizes közegben. { $c_{\rm L} = c_{\rm Cu(II)} = 1 \ \mu$ M; $I = 0,1 \ M$ KCl; 25 °C}

Vizes közegben is végeztünk UV-látható spektrofotometriás méréseket monoligandumú Cu(II)-TSK komplexek esetén (FTSC, PTSC, triapin, APTSC, Me₂N-triapin, Me₂N-APTSC, STSC), valamint a TSK-konjugátumoknál pH-potenciometriás méréseket (Morf-PTSC, mPip-PTSC, L-Pro-FTSC) az oldatbeli stabilitás közvetlen összehasonlítása végett. A pH = 2-11,5 tartományban 1:1 fémion-ligandum arányok mellett rögzített UVlátható spektrumok felbontásával a [CuLH]²⁺ és [CuL]⁺ komplexek deprotonálódására vonatkozó pKa értékeket határoztuk meg (l. triapin komplexeinél 54.a ábra). Az alapvázas TSK-ok $[CuLH]^{2+}$ típusú komplexeinek p K_a értéke 2,08-2,51 közé esik, míg a $[CuL]^+$ részecskék deprotonálódását p $K_a = 8,53-8,78$ jellemzi, de számottevő mértékben nem különböztek egymástól a különböző ligandumok esetén. Ezek az értékek egyben azt is jelentik, hogy a $[CuL]^+$ komplex széles pH-tartományban dominánsan képződik (pH = 3,5-7,5). A vizes oldatban vizsgált rendszerekben a Cu(II)-komplexek képződése gyakorlatilag már a titrálás kezdeti pH-ján (pH ~2) is teljesnek mondható. Így EDTA segítségével történő kiszorítást végeztünk olyan állandó pH-n (ált. pH = 5,9), ahol a $[CuL]^+$ komplex uralkodó ezekben a rendszerekben (lásd triapin komplexénél 54.b ábra). A spektrális változásokból számítottuk a [CuL]⁺ komplex látszólagos stabilitási állandóját (β), majd stabilitási szorzatát (β) a ligandum p K_a -inak ismeretében. A meghatározott egyensúlyi állandók segítségével p[Cu(II)] értékeket számoltunk (53.b ábra), melyek egyértelműen

nagyobbak voltak a 30% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegyben kapottakhoz képest. Azaz a DMSO jelenlétében a Cu(II)-komplexek képződése kisebb mértékű, amit a vizes oldatokra való extrapoláció során figyelembe kell vennünk. Ha az egyes ligandumok p[Cu(II)] értékeit hasonlítjuk össze, akkor a 30% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegyben megfigyelt trendeket látjuk a vizes közegben is (ld. feljebb). További megállapításaim:

- vi) a piridingyűrű 3-aminocsoportjának dimetilezése növeli a ligandumok Cu(II)-ionok felé mutatott affinitását (*vö.* triapin és Me₂N-triapin; APTSC és Me₂N-APTSC);
- vii) a TSK-konjugátumok esetén a koordinációban résztvevő extra donoratomok növelik a stabilitást (vö. PTSC és Morf-PTSC, mPip-PTSC; FTSC és L-Pro-FTSC).



54. ábra (a) A Cu(II) – triapin (1:1) rendszer különböző pH-kon felvett UV-látható spektrumainak felbontásával kapott moláris abszorbancia spektrumok a $[CuLH]^{2+}$, $[CuL]^+$ és [CuL(OH)] komplexekre. {I = 0,1 M KCl; 25 °C; vizes közeg} (b) A Cu(II) – triapin (1:1) – EDTA rendszerre felvett spektrumok, ahol az ábrán látható számok a $c_{EDTA}/c_{([CuL]^+)}$ arányt mutatják. { $c_{triapin} = c_{Cu(II)} = 25 \ \mu$ M; $c_{EDTA} = 0-175 \ \mu$ M; pH = 5,90 (50 mM MES); I = 0,1 M KCl; 25 °C; várakozási idő: 4 óra; $\ell = 1,0 \ \text{cm}$ }

A biológiai hatás szempontjából a Cu(II)-komplexek oldatbeli speciációja mellett a redoxi tulajdonságaik jellemzése is érdekes lehet. A ciklikus voltammetriás mérések igénylik a legalább 0,5-1 mM koncentrációjú Cu(II)-tartalmú oldatokat, így ezeket a méréseket is 30% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegyben végeztük. Az általános tapasztalatunk az volt, hogy a ciklikus voltamogrammok alapján a redoxi folyamatok irreverzibilisek, többnyire csak a katódos csúcspotenciálokat lehet detektálni, ami nem kielégítő a megfelelő összehasonlításhoz. Emiatt a Cu(II)-komplexek oxidáló hatását közvetlen redoxi reakcióban biológiai redukálószerekkel (aszkorbinsav és L-glutation) vizsgáltuk tiszta vizes közegben, fiziológiás pH-n. A redoxireakciókat spektrofotometriásan követtük, szigorúan oxigénmentes körülmények között, tandemküvettát használva. Az FTSC, PTSC, triapin, O-triapin, APTSC, Me₂N-triapin, Me₂N-APTSC, STSC ligandumok Cu(II)-komplexeit vizsgáltuk általában 50 ekvivalens redukálószer

jelenlétében. A felsoroltak közül a legkisebb stabilitású O-triapin komplexét mind a kétféle redukálószer pillanatokon belül redukálta, míg a többi komplexnél az aszkorbinsavval nem volt mérhető spektrális változás az alkalmazott körülmények között. Az erélyesebb GSH viszont képes redukálni ezeket a komplexeket. Az 55.a ábra a Cu(II) – APTSC – GSH (1:1:50) rendszerben 0-120 perc között mért UV-látható spektrumokat mutatja. A reaktánsok összekeverése után a λ_{max} eltolódik néhány nm-rel a nagyobb hullámhosszak felé (430 – 438 nm), feltehetően a GSH-nal történő vegyes ligandumú komplex képződése miatt. Majd az abszorbancia jelentős mértékben csökken ebben a hullámhossztartományban, miközben a spektrum alakja egyre inkább a szabad liganduméra hasonlít. Valószínűleg a képződő Cu(I)-komplex disszociációja történik, a Cu(I)-ion pedig komplexet képez a GSH-val [269]. Amikor a redoxi egyensúly beáll, azaz már további spektrális változás nem detektálható, akkor elmondható, hogy az alkalmazott körülmények között (azaz 50-szeres GSH felesleg mellett) a Cu(II)-komplexek teljes mennyiségének redukciója nem történt meg egyik vizsgált rendszerben sem a vizsgálati idő alatt (55.b ábra).



55. ábra (a) A Cu(II) – APTSC – GSH (1:1:50) rendszerben rögzített UV-látható abszorbancia spektrumok 0 és 120 perc között. A szaggatott vonal a ligandum spektrumát, a zöld nyilak az oxigén hatását jelölik. (b) A Cu(II)-komplexek abszorpciós maximumának hullámhosszán mért abszorbancia változások a GSH jelenlétében különböző ligandumok komplexei esetén. A meghatározott pszeudo-elsőrendű sebességi állandók (k_{obs} / perc⁻¹): 4,30×10⁻⁴ (PTSC), 6,97×10⁻⁴ (Me₂N-APTSC), 1,60×10⁻² (APTSC), 4,47×10⁻² (Me₂N-triapin), 8,40×10⁻² (STSC), 4,13×10⁻² (FTSC), 1,10×10⁻¹ (triapin). { $c_{L} = c_{Cu(II)} = 25 \mu$ M; $c_{GSH} = 1250 \mu$ M; pH = 7,40 (50 mM HEPES); I = 0,1 M KCl; 25 °C; $\ell = 1,0$ cm}

Ha oxigéngázt buborékoltattunk a mintába (55.a ábra), akkor gyakorlatilag visszakapjuk az eredeti spektrumot, ami a redoxi reakció reverzibilitását mutatja, bár a CV mérések során nem kaptunk reverzibilis folyamatokra jellemző csúcspárokat, feltehetően azért, mert ott nem volt ami stabilizálja a Cu(I) oxidációs állapotot. A vizsgált komplexekben az (N_{piridin},N,S⁻) koordinációs mód ugyan megegyezik, az STSC kivételével, azonban a redoxi

reakció sebességében nagy különbséget láthatunk (55.b ábra). A számolt tapasztalati sebességi állandók (k_{obs}) értéke annál nagyobb volt, minél inkább kisebb p[Cu(II)] értékekkel jellemezhető az adott rézkomplex (ld. a k_{obs} értékeket az 55.b ábra ábraaláírásában), azaz a Cu(II)-komplex redukciója a nagyobb stabilitás esetén lassabban megy végbe.

Együttműködő partnereinknek köszönhetően (V.B. Arion, P. Heffeter, G. Szakács) számos TSK humán rákos sejtvonalakon mért in vitro citotoxicitását is ismerjük. A ligandumok és az egy ekvivalens Cu(II)-ionokkal együtt inkubált minták pIC₅₀ értékekeit mutatja az 56. ábra. A TSK-ok citotoxikus hatása összefüggést mutat a RNR enzim inhibíciójához kötődően a vasionok felé mutatott affinitásukkal (ld. 5.4.3. fejezet), ugyanakkor egyes ligandumoknál (pl. Dp44mT, Me₂N-APTSC) az intracellulárisan képződő rézkomplexek jelentőségét hangsúlyozzák [186,187,270]. A kapott pIC₅₀ adatok alapján az STSC, Morf-PTSC, mPip-PTSC és L-Pro-FTSC vegyületek gyakorlatilag nem citotoxikusak, ugyanakkor rézkomplexeinek biológiai hatása már jelentős. Mind a négy ligandum kiemelkedő stabilitású komplexet képez a Cu(II)-ionokkal fiziológiás pH-n (53.b ábra) csakúgy, mint a háromfogú (N_{piridin},N,S⁻) donoratomokon keresztül koordinálódó α-N-piridil-TSK-ok is. Mégis az utóbbi esetekben a rézionok jelenlétében a mért biológiai aktivitás kisebbnek adódott, csak a PTSC és a Me₂N-APTSC ligandumoknál közelítették meg a citotoxicitás értékek egymást. Ennek a két vegyületnek a Cu(II)-komplexét lehetett a leglassabban redukálni GSH-val (55. ábra). Azokban az esetekben, ahol a Cu(II)-ionok jelenléte és koordinációja a citotoxicitást nem csökkentette le (PTSC, Me₂N-APTSC) vagy éppen jelentősen növelte azt (négy- ill. ötfogú TSK-konjugátumok, STSC) (56. ábra), ott a rézkomplexekhez kötődő hatásmechanizmust valószínűsíthetjük, vagy legalábbis nem zárhatjuk ki azt; míg a többi esetben a Fe(III/II)-ionokkal való komplexképződésnek lehet meghatározóbb szerepe.

Ugyanakkor a citotoxicitás adatok azt is mutatják, hogy a koordinálódó donoratomokban való eltérés, a különböző pozícióban lévő metilcsoportok jelenléte nagymértékben befolyásolja a TSK-ok biológiai hatását. Az α -*N*-piridil-TSK-oknál az N-terminális dimetilezés jelentős mértékben növeli a citotoxicitást, míg a piridingyűrű aminocsoportjának dimetilezése inkább csökkenti azt. A négyfogú (N,N_{piridin},N,S⁻), az ötfogú (COO⁻,N_{Pro},N_{piridin},N,S⁻), ill. az (O⁻,N,S⁻) koordinációs módú ligandumok nem bizonyultak citotoxikusnak a rákos sejtvonalakon. A felsorolt szerkezeti változások nyilvánvalóan a vasionokkal való kölcsönhatásukra is jelentősen kihatnak, ennek részletes vizsgálatával foglalkozik a következő fejezet.



56. ábra Tioszemikarbazonok *in vitro* citotoxicitása (pIC₅₀) MES-SA humán méh szarkóma sejtvonalakon (Morf-PTSC és mPip-PTSC esetében HeLa méhnyak karcinóma sejtvonalakon) (bal oldali teli oszlopok) és pIC₅₀ értékek egy ekvivalens Cu(II) jelenlétében (jobb oldali üres oszlopok).

5.4.3. Tioszemikarbazonok vas(II/III)komplexei

A daganatos sejteknek fokozott proliferációjuk miatt nagyobb a vasfelvételük, és így emelkedett a sejtfelszíni transzferrin receptorok és a RNR enzim expressziója is. Ez indokolta a vaskelátorok kemoterápiába történő potenciális bevezetését. A TSK-ok azonban a hematológiai betegségekben használt klasszikus Fe(III)-kelátoroktól jelentősen eltérnek (ld. 2.5. fejezet). Az α -*N*-piridil-TSK-ok rákellenes hatása ugyanis nem csupán a Fe(III)-ionok megkötésén alapul, erős RNR inhibitorok, amihez szükséges, hogy fiziológiás körülmények között vaskomplexeik reverzibilis redoxi reakcióban vegyenek részt. Így az α -*N*-piridil-TSK-ok hatásmechanizmusának jobb megértését segíti, ha megismerjük nemcsak a Fe(III)-, hanem a Fe(II)-ionokkal képzett komplexeik vizes oldatbeli stabilitását és a vaskomplexek redoxi tulajdonságait is.

A vasionok komplexképződési egyensúlyait TSK-okkal elsősorban 30% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegyben pH-potenciometriás és UV-látható spektrofotometriás mérésekkel tanulmányoztuk, a Fe(II)-ionoknál az oxigén szigorú kizárása mellett. A meghatározott stabilitási szorzatok (9. táblázat) birtokában elmondható, hogy mono-([FeLH], [FeL]), és az oktaéderes geometriának köszönhetően bisz-komplexek ([FeL₂H], [FeL₂]) képződnek. Jellemzően a pH > 10,5 tartományban vegyes hidroxidokomplexek is megjelennek, de csak kis koncentrációban. Fiziológiás pH-n mind a kétféle oxidációs állapotú vasionnal az [FeL₂] összetételű bisz-komplexek a dominánsak (ha c_L/c_{Fe} \geq 2). Ezekben a komplexekben a ligandumok háromfogúként koordinálódnak (N,N,S⁻), (O⁻,N,S⁻) (57.b ábra), ill. az SSC szemikarbazon esetén (O⁻,N,O⁻) donoratomokon keresztül. A különböző koordinációs mód miatt a vizsgált vegyületeknek a Fe(III)- ill. a Fe(II)-ionokkal képzett komplexeinek stabilitása között jelentős eltérés figyelhető meg egy adott TSK esetén, ami a ciklikus votammetriás mérések segítségével meghatározott redoxi potenciálokban (E'_{1/2} [Fe(III)L₂]/[Fe(II)L₂]) is jól tükröződik (10. táblázat).

9. táblázat Néhány tioszemikarbazon Fe(II)-, és Fe(III)-komplexeinek stabilitási szorzatainak tízes alapú logaritmusa (lg β). {I = 0,1 M KCl; 25,0 °C; 30% (m/m) DMSO/H₂O} A komplexek töltése az egyszerűség kedvéért nincs feltüntetve.^a

	Fe(II)				Fe(III)		
lgβ	[FeLH]	[FeL]	[FeL ₂ H]	[FeL ₂]	[FeL]	[FeL ₂]	
FTSC	_	12,48(3)	26,2(1)	22,31(5)	14,48(2)	25,44(4)	
triapin	15,91(2)	12,29(3)	27,70(3)	22,55(5)	14,03(3)	26,25(5)	
APTSC	-	14,37(4)	29,09(5)	24,16(5)	15,48(2)	28,59(5)	
AcTSC	_	14,37(3)	28,35(9)	23,75(5)	16,69(3)	29,70(74)	
FaTSC	15,96(3)	11,23(7)	27,41(5)	21,59(8)	16,77(2)	30,51(4)	
L-Pro-FTSC ^b	17,84(6)	11,97(5)	-	-	17,73(4) ^c	-	
STSC	21,00(5)	13,56(9)	32,35(9)	24,73(9)	$18,68(3)^{d}$	32,51(9) ^d	
L-Pro-STSC	18,14(4)	12,24(6)	28,86(5)	21,07(6)	$19,48(3)^{e}$	33,32(4) ^e	
SSC	_	6,70(7) ^f	_	11,77(3)	12,42(6) ^g	21,63(5)	

^a A kis koncentrációban képződő vegyes hidroxidokomplexek stabilitási állandói nincsenek feltüntetve. ^b Tiszta vizes közegben meghatározott állandó. ^c lgß [Fe(III)LH] = 21,16(3). ^d lgß [Fe(III)LH] = 22,26(2); lgß [Fe(III)L₂H] = 39,14(5). ^e lgß [Fe(III)LH] = 22,39(4); lgß [Fe(III)L₂H] = 38,24(3). ^f lgß [Fe(II)LH₋₁] = -1,90(2). ^g lgß [Fe(III)L₁] = 8,04(9).

Az (N,N,S[¬]) és az (O[¬],N,S[¬]) koordinációs módú TSK-oknak a +2 és +3 töltésű fémionok felé mutatott eltérő preferenciáját jól szemlélteti az 57.a ábra. A fémion megoszlása a legegyszerűbb α -*N*-piridil-TSK (FTSC) és szalicilaldehid-TSK (STSC) között különböző a Fe(II)- és Fe(III)-ionoknál: a Fe(II)-ionok pH = 7,4-n az FTSC-vel, míg a Fe(III)-ionok az STSC-vel képeznek stabilisabb komplexet a *'hard-szoft'* karakterüknek megfelelően. További összehasonlítások tehetők a pM értékek segítségével is (10. táblázat). Az FTSC és STSC adatait összevetve láthatjuk, hogy a p[Fe(II)] érték az első ligandumnál jelentősen nagyobb a p[Fe(III)]-hoz hasonlítva. Ugyanez a trend figyelhető meg a többi háromfogú α -*N*-piridil-TSK-nál is, míg az STSC esetén a p[Fe(III)] a nagyobb.


57. ábra (a) A Fe(II)/Fe(III) – STSC – FTSC (1:2:2) hipotetikus rendszerben a fémionok megoszlása a két ligandum között pH = 7,4-n a vaskomplexek stabilitási szorzatai segítségével számolva. {30% (m/m) DMSO/H₂O; $c_{Fe} = 1$ mM; $c_{FTSC} = c_{STSC} = 2$ mM; I = 0,1 M KCl; 25,0 °C} (b) Az FTSC és STSC ligandumokkal képződő [FeL₂] bisz-komplexek szerkezeti képlete.

10. táblázat Néhány tioszemikarbazon Fe(II)-, és Fe(III)-komplexeinek stabilitási szorzatainak segítségével számolt pM (= -lg[Fe(II/III)]) értéke^a és a bisz-komplexek félérték potenciálja semleges pH-n ($E'_{1/2}$ [Fe(III)L₂]/[Fe(II)L₂]) normál hidrogén elektróddal (NHE) szemben. {I = 0,1 M KCl; 25,0 °C; 30% (m/m) DMSO/H₂O}

	p[Fe(II)]	p[Fe(III)]	<i>E</i> ' _{1/2} (mV) vs. NHE
FTSC	10,71	6,23	+160
triapin	11,61	7,63	+70
APTSC	14,61	10,83	+50
AcTSC	11,58	9,23	+40
FaTSC	9,00	9,83	-170
L-Pro-FTSC ^b	7,90		_ ^c
STSC	8,20	8,40	-138
L-Pro-STSC	8,18	10,86	-300^{d}
SSC	6,20	7,70	_

^a c_{Fe} = 1 μM; c_L = 10 μM; pH = 7,4. A Fe(III)-komplexeknél a ligandumhoz nem kötött frakciónál a Fe(III)-hidroxidokomplexek is figyelembe voltak véve. ^b Tiszta vizes közegben kapott adat. ^c pH=7,4-n redoxi reakció játszódik le. ^d Az L-Pro-STSC C=S \rightarrow C=NH cserével származtatható L-Pro-SISC jelölésű analóg ligandum komplexe esetén: E'_{1/2} = -340 mV.

Az L-Pro-FTSC konjugátum komplexképzése a vasionokkal eltér az alapvázas ligandumokhoz képest, mert nem képződnek bisz-komplexek (9. táblázat), ahogyan azt a Cu(II) ill. egyéb fémionok (Ga(III), Zn(II)) esetén is megfigyeltük. Bár nem sikerült

röntgenkrisztallográfiás mérésre alkalmas egykristályt növeszteni ilyen típusú vaskomplexekből, de valószínűsíthető, hogy ennek oka itt is a ligandum ötfogú, $(COO^-, N_{Pro}, N_{piridin}, N, S^-)$ donoratomokon keresztüli koordinációja, ahogyan a Cu(II)-ionnál az 52.a ábra mutatja. Ugyanakkor a Fe(III)-ionokkal pH > 7 tartományban redoxi reakció játszódik le (58.a ábra), mely során a Fe(III) oxidálja a ligandumot és egy öttagú tiadiazol-gyűrű jön létre a tioszemikarbazon-rész átalakulásával. Az így képződő vegyület már a (COO⁻, N_{Pro}, N_{piridin}, N_{tiadiazol}) donoratomokon keresztül koordinálódik a vasionhoz (58.b ábra).



58. ábra (a) A Fe(III) és L-Pro-FTSC között bázikus pH tartományban valószínűleg lejátszódó redoxi reakció, és (b) az N-terminálisan dimetilezett L-Pro-FTSC származék aerob körülmények között képződő Fe(III)-komplexének röntgenkrisztallográfia módszerrel meghatározott szerkezete.

Ahogyan azt az 5.4.2. fejezetben bemutattam az L-Pro-STSC és STSC komplexképzése a Cu(II)-ionnal nagyon hasonló. Ha azonban a vaskomplexekre számolt pM értékeket is összevetjük egymással (10. táblázat) látható, hogy míg a Fe(II) esetében kapott értékek szintén hasonlóak a két ligandumnál, addig a Fe(III)-ionnál az L-Pro-STSC pM értéke egyértelműen nagyobb. A Fe(III)-ionok felé mutatott nagyobb affinitás jól tükröződik a jelentősen negatívabb félérték potenciálban is (10. táblázat). Hasonló $E'_{1/2}$ $[Fe(III)L_2]/[Fe(II)L_2]$ értéket mértünk az L-Pro-STSC C=S \rightarrow C=NH cserével származtatható L-Pro-SISC jelölésű analógjának vaskomplexére is. Ezen utóbbi ligandum röntgenkrisztallográfiai vizsgálata Fe(III)-komplexének azt mutatta, hogy а tioszemikarbazon-rész teljesen kiszorul a koordinációs szférából és 2×(O⁻,N_{Pro},COO_{Pro}⁻) koordináció valósul meg. Ugyanezt a kötési módot javasoljuk az L-Pro-STSC esetén is, ami megmagyarázza az eltérő viselkedést az STSC-hez képest.

A bisz-komplexekre meghatározott redoxi potenciál értékek (10. táblázat) a ligandumok +2 és +3 töltésű vasionok felé mutatott affinitás különbségét mutatják meg, hiszen minél negatívabb ez az érték, annál inkább a Fe(III)-ionokkal való komplexképzés a kedvezményezettebb. Abban az esetben, ha mind a kétféle fémionnal a bisz-komplexek képződése domináns a redoxi potenciál meghatározásának körülményei alatt (semleges

pH), akkor egyértelmű összefüggést kell látnunk a $E'_{1/2}$ [Fe(III)L₂]/[Fe(II)L₂] és ΔpM értékek között a $E'_{1/2}$ (komplex) = E' (Fe(III)_{aq}/Fe(II)_{aq}) – 0,059×lg($\beta_{\text{Fe(III)-komplex}}/\beta_{\text{Fe(II)-komplex}}$) [198,271] összefüggés révén. Ezt a korrelációt mutatja az 59.a ábra. A pontokra illesztett egyenes meredeksége 56 mV-nak adódott, ami jó közelítéssel megfelel az irodalmi 59 mV-nak. Ezen ábrán külön jelöltem a jelentősebb *in vitro* citotoxicitást mutató (IC₅₀ < 10 µM) ligandumokat.

Megvizsgáltam a MES-SA és multidrog rezisztens MES-SA-Dx5 sejtvonalakon kapott IC₅₀ értékek és a redoxi potenciálok ($E'_{1/2}$ (komplex)) közötti összefüggést, de nincs korreláció az adatok között. Csupán az látszik, hogy azok a ligandumok az aktívak, melyek vaskomplexeinek redoxi potenciálja a -170 – +160 mV tartományba esik, de azon belül is jellemzően a +40 – +160 mV tartományban van. Azok a TSK-ok, melyeknél a redoxi potenciál ezen tartományon kívül esik, azaz az egyikféle vasion felé mutatott affinitás jelentősen meghaladja a másik felé mutatottat, azoknak nincs, vagy nem jelentős a rákellenes hatása (pl. STSC, L-Pro-STSC, SSC). Ennek megfelelően azoknál a TSK-oknál várhatunk jelentősebb citotoxicitást, ahol a Δ pM a ~ -3,2 – -5,2 tartományba esik.



59. ábra (a) A Fe(III/II)-tioszemikarbazon rendszerekben képződő bisz-komplexek semleges pH-n (pH_{semleges} = pK_w/2) mért félérték potenciálja ($E'_{1/2}$ [Fe(III)L₂]/[Fe(II)L₂]) a pM értékek különbségének függvényében. {c_{Fe} = 1 µM; c_L = 10 µM; pH = 7,4}. A kapott összefüggés egyenlete: $E'_{1/2} = -55,97 \times \Delta pM - 131,4$. R² = 0,98. A pirossal jelölt pontok azokat a ligandumokat jelölik, melyek MES-SA humán méh szarkóma sejtvonalon mért *in vitro* citotoxicitására kapott IC₅₀ kisebb, mint 10 µM. A Dp44mT esetén a pM értékeket a [200] adatai alapján becsültem meg. (b) p[Fe(II)] értékek korrelációja a pIC₅₀ értékekkel MES-SA (\blacklozenge) és multidrog rezisztens MES-SA-Dx5 (\blacklozenge) sejtvonalakon mérve.

Az *in vitro* citotoxicitás természetesen sokféle fizikai-kémiai tulajdonságtól függhet. Ezért megvizsgáltuk a ligandumok lipofilitását jellemző $lgD_{7,4}$ (7. táblázat) és az IC₅₀ értékek közötti összefüggést is, de nem találtunk korrelációt az adatok között (pl.

inaktív vegyületeknél lg $D_{7,4}$: -1,7 – +1,74; aktív TSK-ok: lg $D_{7,4}$: +0,72 – +1,98), ugyanakkor az erősen hidrofil jelleg nem tűnik kedvezőnek. Összevetettük a számított p[Fe(III)] és pIC₅₀ értékeket is, de az adatok között nem volt összefüggés. Ugyanakkor egyértelmű lineáris kapcsolat látszik a p[Fe(II)] és pIC₅₀ értékek között (59.b ábra) mind a kétféle vizsgált sejtvonalon, mely szerint nagyobb p[Fe(II)] esetén nagyobb a ligandum citoxoticitása. Ezen korreláció és a redoxi potenciálok kapcsán tett megfigyeléseink alapján megállapíthatjuk, hogy annál citotoxikusabbak a TSK-ok, minél nagyobb a Fe(II)ionok felé mutatott affinitásuk, de a vaskomplexek redoxi potenciálja ill. Δ pM értéke jellemzően a fentebb megjelölt (E'_{1/2} (komplex): +40 – +160 mV; Δ pM: -3,2 – -5,2) tartományba esik. Mindez összhangban van a RNR enzim gátlásán alapuló feltételezett hatásmechanizmussal [180], mely szerint az első lépés a Fe(II) bisz-komplex képződőse (így ennek stabilitása kulcsfontosságú), majd ennek oxidációjával képződő Fe(III)komplex redukciójának is le kell játszódnia fiziológiás körülmények között a Fentonreakció megvalósulásához (így a vaskomplexek redoxi potenciálja nem lehet túlságosan negatív értékű, és a képződő Fe(III)-komplex stabilitása sem lehet túlságosan kicsi).

5.4.4. Tioszemikarbazonok gallium(III)- és vanádium(IV/V)komplexei

A Ga(III)-komplexek rákellenes hatása gyakran a fémion Fe(III)-ionokhoz hasonló koordinációs kémiai sajátságán és biokémiai anyagcsere útján alapul (ld. GaM komplex 2.4. fejezetben), viszont a Ga(III) nem redoxi aktív fiziológiás körülmények között és emiatt a Fe→Ga csere után az eredetileg vastartalmú biomolekula nem képes ellátni a funkcióját. Számos Ga(III)-TSK komplex jelentős citotoxicitását írták le a szakirodalomban [137,160,272,273], de oldatbeli stabilitásukról korábban nem volt információ.

Az általunk vizsgált Ga(III)-TSK komplexek pH-potenciometriás mérések segítségével meghatározott sztöchiometriája a vártnak megfelelően hasonlónak adódott, mint azt a Fe(III)-komplexeknél találtuk, azaz a mono-komplexek mellett domináns a bisz-komplexek képződése. A Ga(III)-komplexek stabilitása azonban jóval kisebb a Fe(III)-komplexekéhez képest. A meghatározott stabilitási szorzatok egyértelmű lineáris korrelációt mutatnak a Fe(III)-komplexek megfelelő állandóival, mint ahogyan a bisz-komplexekre a 60.a ábra azt mutatja. Azaz a Ga(III)-ionnál is a stabilitási szorzatok trendje a következő: $(O^-,N,S^-) > (N,N,S^-) > (O^-,N,O^-)$.



60. ábra (a) Ga(III)- és Fe(III)-tioszemikarbazon bisz-komplexek stabilitási szorzatainak korrelációja különböző donoratomokat tartalmazó ligandumok esetén: (O^-,N,O^-) : SSC; (N,N,S^-) : FTSC, PTSC, triapin, APTSC, AcFTSC, FaTSC; (O^-,N,S^-) : STSC; $(R^2 = 0.953)$. (b) Predominancia görbék: a Ga(III) – STSC – FTSC (1 mM : 2 mM : 2 mM) hipotetikus rendszerben számolt fémioneloszlás pH-függése. {I = 0,1 M KCl; 25 °C; 30% (m/m) DMSO/H₂O}

Az STSC és FTSC Ga(III)-kötő képességét predominancia görbék számolásával közvetlenül össze tudjuk hasonlítani (60.b ábra). Az ábra alapján az (O⁻,N,S⁻) donoratomokat tartalmazó ligandum (STSC) a teljes vizsgált pH-tartományban egyértelműen stabilisabb komplexet képez az (N,N,S⁻) donor α -*N*-piridil-TSK-hoz hasonlítva. Viszont a nagyobb stabilitású komplexet képező STSC sem képes a fémiont teljes mértékben megkötni a mM-os koncentrációtartományban 1:2 fémion-ligandum arány mellett. Hígabb oldatban a komplex disszociációja még nagyobb mértékű: pl. a triapin vagy PTSC esetén a [GaL₂]⁺ komplex 100 µM-os oldatában pH = 7,4-n a disszociáció már 100%-osnak tekinthető, de az STSC esetén is eléri a 90%-ot.

Fontos megemlíteni, hogy a Ga(III)-TSK komplexek fluoreszcensek, gerjesztési és emissziós spektrumuk eltér a szabad ligandumétól, ahogy a 61.a ábra 3D spektrumai is mutatják. Ez lehetőséget ad a komplexképződés monitorozására tiszta vizes közegben, mert a módszerhez elegendőek a kis koncentrációk is. A 61.a ábra a PTSC és a komplex emissziós intenzitásának pH-függését mutatja. A két görbe lefutásának különbsége egyértelműen rámutat arra, hogy a fémkomplex vízben csak pH = 2 – 6 között van jelen az oldatban, nagyobb pH-kon disszociál. Mindez összhangban van a 30% (m/m) DMSO/H₂O közegben kapott stabilitási szorzatok segítségével számolt koncentráció eloszlási görbék által mutatott képpel (61.b ábra). A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy a Ga(III)-tioszemikarbazon komplexek csekély stabilitásúak fiziológiás pH-n, így a biológiai hatásuk nem köthető a komplex eredeti formájához, valószínű a ligandum-, ill. fémioncsere. Egyes esetekben a citotoxicitási adatok értelmezésénél egyszerűen nem vették figyelembe, hogy a bisz-komplexek két citotoxikus ligandumot tartalmaznak és nem számoltak a komplexek teljes disszociációjával [137], ami a Ga(III)-TSK komplex aktivitásának téves megítéléséhez vezetett.



61. ábra (a) A PTSC és a Ga(III) – PTSC (1:2) rendszer fluoreszcens emissziós intenzitása 470 nm-en a pH függvényében tiszta vízben. { $\lambda_{EX} = 395 \text{ nm}$; $c_{Ga(III)} = 5 \mu M$; $c_L = 10 \mu M$; I = 0,1 M KCl; 25 °C} Beszúrt ábrák: a PTSC ligandum és a Ga(III) – PTSC (1:1) rendszer 3D fluoreszcens spektrumai pH = 4,2-n { $c_L = 10 \mu M$ }. (b) A Ga(III) – PTSC (1:2) rendszer koncentráció eloszlási görbéi 30% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegyben. { $c_{Ga(III)} = 5 \mu M$; $c_L = 10 \mu M$ }

A szakirodalomban számos citotoxikus vanádium(IV/V)-TSK komplex előállítását és tesztelését is leírták [160,161,163], de vizes oldatbeli stabilitásukról korábban nem volt adat. A pH-potenciometriás, ESR és ⁵¹V NMR spektroszkópiás és UV-látható spektrofotometriás vizsgálataink azt mutatták, hogy kizárólag mono-komplexek képződnek ([MLH], [ML], [ML(OH)]), és pH = 7,4-n a [V(IV)OL(OH)] ill. [V(V)O₂L] részecskék a dominánsak. Stabilitásuk nagymértékben függ a fémion oxidációs állapotától: a V(V)O₂⁺ komplexek rendre nagyobb stabilitásúak; másrészt függ a koordinálódó donoratomoktól. A stabilitási trend mindkétféle oxidációs állapotú fémionnal: STSC > SSC >> PTSC > APTSC > triapin. A V(IV)O triapinnal képzett komplexe olyan kis stabilitású, hogy fiziológiás pH-n a disszociációja teljesnek mondható már az 1 mM-os koncentrációjú oldatában is. Így nem meglepő, hogy ezen ligandumok körében csak a vanádium(V)-STSC komplex sejtosztódás-gátlása haladta meg a ligandum önálló hatását (IC₅₀ értékek: >100 μ M (STSC); 27,4 μ M ([V(V)O₂(L)]⁻) A2780 humán petefészek karcinóma sejtvonalon).

5.5. Rákellenes nemfémes vegyületek kölcsönhatása humán szérum albuminnal

A preklinikai és klinikai vizsgálatokba kerülő, azaz bizonyítottan legalább in vitro citotoxikus hatást mutató vegyületek alapvető oldatkémiai jellemzése (pl. p K_a , lgP, lg $D_{7,4}$ adatok meghatározása) mellett a humán szérum albuminnal való kölcsönhatás kvantitatív leírása is kulcsfontosságú [274], mert ezek a tulajdonságok alapvetően kihatnak a farmakokinetikai viselkedésre. Hiszen a p K_a megszabja, hogy a vegyület egy adott pH-n milyen protonáltsági állapotban van, így milyen a töltése; a megoszlási hányados pedig információt nyújt a passzív membrántranszport folyamatok valószínűségéről. Ugyanakkor, ahogyan az irodalmi bevezetőben is részletesen kifejtettem, a HSA-hoz való kötődés a rákellenes hatóanyagok célba juttatását is segítheti, egyrészt az oldhatóság és a kiürülési idő növelésén keresztül, másrészt a fokozott permeabilitás és visszatartás hatásnak (ld. 2.6. fejezet) köszönhetően a HSA-nak és a HSA-adduktumoknak a rákos szövetekben való akkumulálódása miatt [220,221,223]. Az általunk vizsgált nemfémes antitumor hatású vegyületek ugyanakkor egyszerűbb modellként is szolgáltak számunkra a fehérjékkel való kölcsönhatások jellemzésére a rendszer kisebb komponensszáma miatt. A kötési állandók meghatározása során a szakirodalomban elterjedten használt linearizálási módszerek helyett/mellett, a fluorimetriás és a fotometriás spektrumok felbontásához és az elválasztási módszerekkel nyert képződési függvények illesztéséhez iterációs programot használtunk a megbízhatóbb eredmények eléréséhez, a fémion-ligandum rendszerek jellemzésénél megszokott oldategyensúlyi megközelítést és szemléletet alkalmazva. Többek között számos kismolekula, köztük rákellenes hatású, kumarin alapvázas redukált Schiff-bázis vegyületek, EGFR inhibitor gyógyszermolekulák és folát-hidroxamát/aminosav konjugátumok (62. ábra) humán szérum albuminnal való kölcsönhatását tanulmányoztuk, ezek eredményeit mutatom be a dolgozatban. A rákellenes hatás mellett az is közös vonás ezen kismolekulákban, hogy vízben való oldhatóságuk korlátozott. A fehérjével való kölcsönhatás jellemzéséhez többféle spektroszkópiai (közvetlen és kötőhely marker spektrofluorimetria, UV-látható anyagokkal végzett spektrofotometria) és elválasztástechnikai (ultraszűrés) módszert együttesen alkalmaztunk. A kísérleti adatok alapján javasolt kötőhelyeket a molekulamechanikai (dokkolásos) számítások több esetben is alátámasztották.



62. ábra A vizsgált vegyületek (folsav- és redukált Schiff-bázis származékok, EGFR inhibitorok) szerkezeti képlete és nevük rövidítése. (A folsavnak és az FPhe vegyületnek nincs rákellenes hatása [233].)

5.5.1. Kumarin-származékok kölcsönhatása humán szérum albuminnal

A vizsgált redukált Schiff-bázis kumarin-származékok (62. ábra) közepes rákellenes aktivitást mutattak HT29 (vastagbélrák) sejtvonalon (IC₅₀ = 60-80 μ M) [275], melyek HSA-nal való kölcsönhatását tanulmányoztuk. Első lépésként fiziológiás pH-n a vegyületek protonáltsági állapotának megítéléséhez meghatároztuk p K_a -jukat UV-látható spektrofotometriás titrálásokkal igen híg 0,5-2 μ M-os oldatokban, 4 cm-es optikai úthosszt használva (11. táblázat). A spektrális változások alapján meghatározott p K_a -k egyértelműen a fenolos OH-csoport deprotonálódásához köthetők. A hidroxilcsoportokhoz viszonyított *orto*- és *para*-helyzetű halogénatom negatív induktív effektusa révén kisebb p K_a -t eredményez az **1a** referenciavegyülethez képest. A nitrocsoport is növeli a vegyület savasságát negatív mezomer effektusa révén. Mivel ezek a vegyületek erősen fluoreszcensek, a különböző pH-kon felvett emissziós spektrumuk felbontásával is meg lehetett p K_a -jukat határozni, az **1e** kivételével, ahol is deprotonálódás nem okozott mérhető spektrális változást.

11. táblázat A redukált Schiff-bázis kumarin-származékok p K_a -i, a HL és L⁻ részecskék százalékos megoszlása pH = 7,4-n, és a HSA kötődési állandójuk (lgK'(HSA) ill. K_D disszociációs állandó). {25 °C}

	1a	1b	1c	1d	1e
pK_a^{a} (UV-látható sp.)	9,63(2)	7,51(1)	7,46(1)	7,36(2)	6,80(1)
pK_a^{a} (fluorimetria)	9,71(1)	8,00(1)	7,55(1)	7,35(1)	-
L ⁻ _{7,4} (%)	1	43	45	51	79
HL _{7,4} (%)	99	57	55	49	21
$\lg K'(\mathrm{HSA})^{\mathrm{b}}$	5,68(3)	6,45(1)	7,5(1)	7,22(4)	7,09(2)
$K_{\rm D}/\mu{ m M}$	2,09	0,35	0,03	0,06	0,08

^a I = 0,10 M (KCl), vizes oldatban: ≤0,2% (V/V) DMSO. ^b pH = 7,40 (20 mM foszfát puffer, 1% (V/V) DMSO). PSEQUAD [237] programmal történő számolás alapján.

A kumarin-származékok általános kötőhelye HSA-n a szakirodalom szerint az I. kötőhely [220,276,277], emiatt Trp214 kioltásos fluorimetriás méréseket tudtunk végezni. A kölcsönhatás időfüggésének mérése alapján egy órás várakozási idő elegendő volt az egyensúly beállásához. A mérési körülmények között a kumarin-származékok nagy moláris abszorbanciája miatt szükséges volt a mért intenzitások korrekciója [242], mind a gerjesztő, mind pedig az emissziós hullámhosszakon. A Trp kioltás következtében mindegyik vegyületnél intenzitáscsökkenést tapasztaltuk, de a kioltási görbék (63.a ábra) a kezdő intenzitás ~25%-os értékére telítenek, azaz részleges kioltás történt, amit az adatok kiértékelése során figyelembe vettük. A PSEQUAD [237] programmal számolt állandókat az 11. táblázat mutatja, melyek nagy értékek, erős kötődésre utalnak a fehérje I. kötőhelyén.

A kioltásos méréseket klasszikus módon szokás az említett linearizálási módszerekkel kiértékelni. Mivel itt részleges kioltást kaptunk, megvizsgáltuk, hogy milyen állandót tudunk meghatározni a módosított Stern-Volmer-féle egyenesillesztéssel [242], melyet az **1b** esetén mutat az 63.b ábra. Ideális esetben a pontok egy egyenesre illeszkednek, és a kioltási (K_{SV}) állandó az y-tengelymetszet és a meredekség hányadosa. Az egyenestől felfelé való elhajlás gyakran a statikus és dinamikus kioltás egyidejű meglétét jelzi. Esetünkben a viszonylag nagy kötési állandó miatt a kisebb koncentrációk tartományában (ld. szürke pontok) az egyenestől való eltérés oka inkább a módszer legszembetűnőbb hibája, nevezetesen az, hogy az egyensúlyi koncentrációt analitikai koncentrációval helyettesíti. A görbe kezdeti szakaszára illesztett egyenesből egy lg K_{SV} = 6,17(4) állandó számítható, amit szokás kötési állandóként értelmezni, de ez a valós állandó alulbecsléséhez vezet. A módszer további hiányossága, hogy csak egy hullámhosszon történő kiértékelést tesz lehetővé és nem képes több emittáló részecskét kezelni.



63. ábra (a) A HSA 342 nm-en emissziójának mért és számított Trp214 kioltási görbéi a különböző HSA – kumarin-származék rendszerekben: **1a** (\circ , fekete szaggatott vonal), **1b** (\blacklozenge , bordó folyamatos vonal), **1c** (\blacktriangle , fekete folyamatos vonal), **1d** (\Box , fekete pontozott vonal), relatív intenzitás = Int._{mért} / Int._{kezdeti}. { $c_{HSA} = 1 \mu M$; $c_L = 0-7 \mu M$; $\lambda_{EX} = 295 nm$; 25 °C; pH = 7,40 (20 mM foszfát puffer, 1% (V/V) DMSO)}. (b) A HSA – **1b** rendszer titrálásának Stern-Volmer-féle ábrázolása.

Bár a vegyületek saját maguk is emittálnak, saját intenzitásukat a fehérjéhez való kötődés megváltoztathatja. Spektrumbeli változást azonban csak az **1c** vegyületnél tapasztaltunk: a kötődés hatására egyrészt a ligandum emissziós maximuma kisebb hullámhosszak felé tolódott, másrészt mérsékelt intenzitásbeli csökkenést tapasztaltunk a fehérje jelenlétében (64.a ábra). Emiatt a spektrumoknak elsősorban csak a 305-360 nm közötti szakaszát használtuk a szoftveres kiértékeléshez, ami tisztán a Trp emissziójának változását mutatta. Az **1c** kötődésre való spektrális érzékenysége alkalmassá tette arra, hogy a vegyület saját emissziós sávjai felhasználásával is számoljunk kötési álladót. Az így számolt állandó lgK² = 7,54(6), ami jó egyezést mutat a Trp214 kioltásból számolt lgK² = 7,5(1)-ös állandóval. Ezen állandók hasonlósága megerősíti azt a feltételezésünket, hogy a vizsgált vegyületek az I. kötőhelyen kötődnek a HSA-hoz.

Együttműködő partnerem, T. Tuccinardi által végzett dokkolásos számolások rámutattak arra, hogy a vizsgált vegyületek a kumarin-típusú warfarintól teljesen eltérő orientációval kötődnek a HSA I. kötőhelyén, a hidrofób zsebet kialakító aminosavak a warfarinnál megszokott kumaringyűrű helyett [278] a vegyületek fenol(át)-gyűrűjével lépnek hidrofób kölcsönhatásba. A fenolát további dipólus-kölcsönhatást tud kialakítani a környező Arg-281-el. Ennek megfelelően pH = 7,40-n a részlegesen deprotonált (11. táblázat) **1b**, **1c** (64.b ábra), **1d** és **1e** erősebben kötődik ezen a helyen, mint a 99%-ban protonált formában lévő **1a**.



64. ábra (a) A HSA – 1c rendszer fluoreszcens spektrumai. Beszúrt ábra: a spektrumok intenzitásának változása 450 nm-en (•), a pontozott vonal az 1c független mérésből származó kalibráló egyenese. { $c_{\text{HSA}} = 1 \ \mu\text{M}$; $c_{1c} = 0.4 \ \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{EX}} = 295 \ \text{nm}$; 25 °C; pH = 7,40 (20 mM foszfát puffer, 1% (V/V) DMSO} (b) Az 1c elhelyezkedése a HSA I. kötőhelyén (IIA aldomén) a dokkolásos számolás alapján.

5.5.2. Folsav-származékok kölcsönhatása humán szérum albuminnal

A folsav (62. ábra) egy jól ismert vitamin, egyrészt fontos szerepe van a terhesség korai szakaszában az embrió idegcsőzáródási folyamatában, másrészt koenzimként a DNS előállításánál a purin és pirimidin nukleotidok bioszintézisében vesz részt. A rákos sejteknek az intenzív osztódásukhoz nagyobb mennyiségű folsavra van szükségük, emiatt a sejtfelszínükön az egészséges sejtekhez képest jóval több folát-receptor van [279]. Ezen alapszik a folát-konjugátum típusú rákellenes vegyületek fejlesztése. Egyes hidroxámsavak a cink-tartalmú mátrix metalloproteinázok hatékony inhibitorai [280]. Ezen fehérjebontó enzimek emelkedett szintje jellemző számos daganattípus esetén, és fontos szerepük van a tumor metasztázis képzésében is. Az inhibitoraikként működő hidroxámsavak közül több gyógyszermolekula is törzskönyvezve lett illetve került klinikai kipróbálásra, pl. marimastat, batimastat [281]. Lisszaboni posztdoktori munkám során olyan folsavhidroxamát konjugátumokat állítottam elő (pl. 62. ábra Fha, FPheha), melyek hatékony inhibitorainak bizonyultak többféle mátrix metalloproteináznak és humán rákos sejtvonalakon (A549, PPC-1, Tsu-Pr1) is kifejtettek antiproliferatív hatást (IC₅₀ = 75-150 µM) [233]. Később ezen folát-hidroxámsavak lipofilitásának, proton disszociációs állandóinak (12. táblázat) és Zn(II)-ionokkal képzett komplexeik stabilitási állandóinak meghatározása [P36] mellett a HSA-hoz való kötődésüket is tanulmányoztuk. Mivel a szakirodalomban a folsav albuminnal való kölcsönhatására vonatkozó kötési állandó sem volt elérhető, így az Fha és FPheha mellett a folsavat és a FPhe-t, mint az FPheha dikarbonsav párját, is bevontuk a vizsgálatokba.

A vizsgált vegyületek karboxilcsoportjainak protonálódásával a vízben való oldhatóságuk lecsökken. Emiatt pH-potenciometriás titrálásokkal csak 60% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegyben tudtuk a p K_a -kat meghatározni a pH = 2-12 tartományban, ugyanakkor pH > 5 felett tiszta vizes közegben is lehetett méréseket végezni (12. táblázat). A kapott p K_a -k alapján a karboxilcsoportok deprotonált, a hidroxámsavcsoportok protonált, míg a heterociklusos pterincsoport részben deprotonált formában van fiziológiás pH-n; azaz a folát-származékok mindenképpen negatív töltésűek ezen a pH-n. Ennek köszönhető a hidrofil jellegük (ld. $D_{7,4}$ értékek a 12. táblázatban).

12. táblázat. A folsav-származékok p K_a -i vizes oldatban {25 °C, I = 0,1 M KCl}, $D_{7,4}$ megoszlási hányadosuk pH = 7,4-n, a HSA-ligandum adduktumok stabilitási szorzatai (β ') és a Trp214 kioltásos mérésekből számolt kötési állandók (K'). {25 °C, pH = 7,40 (20 mM foszfát puffer, 150 mM NaCl)}

	folsav	FPhe	Fha	FPheha
pH-potenciometria				
pK _a (pterin)	8,04(2)	8,07(6)	7,54(4)	7,30(3)
р <i>K</i> а (CONHOH)	-	_	9,19(2)	9,12(1)
D _{7,4}	0,00	0,01	0,04	0,08
Ultraszűrés-UV-látható sp.				
lgβ' (HSA-L)	3,92(4)	5,04(5)	4,31(5)	4,4(1)
$lg\beta'$ (HSA-L ₂)	7,29(6)	8,6(1)	7,7(1)	8,3(1)
$lg\beta'$ (HSA-L ₃)	-	12,0(1)	~11	11,7(2)
Fluorimetria / Trp214 kioltás				
lgK' PSEQUAD	4,67(5)	5,74(4)	4,7(1)	5,04(3)
lg <i>K</i> ' módosított Stern-Volmer ^a	4,6(1)	5,4(1)	4,5(1)	5,0(1)

^a Módosított Stern–Volmer linearizáció: Int.₀/(Int.₀–Int.) vs. 1/ c_{ligand} [242] (λ_{EX} = 295 nm; λ_{EM} = 320 nm).

A fehérjén való megkötődés tényéről gyakran meg lehet győződni UV-látható különbségspektrumok számításával. Ha a fehérje-ligandum rendszerre felvett spektrum nem a fehérje és a ligandum önálló abszorbanciájának összegét adja, az a kölcsönhatás miatt megváltozó elektronszerkezetnek köszönhető. Ezt a nem-additív jelleget mutatja a folsav esetén az 65.a ábra. A teljes megkötődésre vonatkozóan ultraszűrés/UV-látható spektrofotometriás méréseket végeztük. Az LMM fázis mennyiségi analízise alapján számoltuk a kötött, ill. szabadon lévő folát egyensúlyi koncentrációját, majd az analitikai koncentrációk ismeretében számítottuk az egyensúlyi állandókat a PSEQUAD [237] programmal. A meghatározott állandók látszólagos, makroszkópikus stabilitási szorzatok. A mért és a kötési állandók segítségével számolt fehérjén megkötött mennyiségeket

mutatja a 65.b ábra. Ezen állandók alapján, ill. A kölcsönhatás mértéke jelentős, a folsav esetén kettő, míg a másik három vegyületnél három a fehérjén maximálisan megkötődő kismolekulák száma. (Megjegyzem a fehérje vérszérumbeli koncentrációjánál nagyobb folát koncentráció nem realisztikus.) Fluorimetriás Trp214 kioltásos méréseknél az I. kötőhelyen jelentős mértékű intenzitáscsökkenést tapasztaltunk. A teljes spektrum és a PSEQUAD program használatával meghatározott kötési állandók valamelyest nagyobbnak adódtak a csak egyféle hullámhosszon történő (módosított) Stern–Volmer linearizációval kapottakhoz képest, hasonlóan a kumarin-származékoknál tapasztaltakhoz. Ezen a kötőhelyen a kötés erőssége az alábbi sorrendben változott: FPhe > FPheha > folsav ~ Fha. A warfarin kiszorításának mértéke is hasonló trendet mutatott. A fenil-alanint tartalmazó származékok erősebb kötődése a fehérjén valószínűleg az aromás gyűrűn keresztüli '*stacking*' kölcsönhatásnak köszönhető.



65. ábra (a) A folsav – HSA rendszerben kapott különbség UV-látható spektrumok, ahol Δ Absz. = Absz (HSA-folsav) – Absz. (HSA) – Absz. (folsav). { $c_{\text{HSA}} = 10 \ \mu\text{M}$; $c_{\text{folsav}} = 5$, 10, 20, 40 μ M; 25 °C; pH = 7,40 (5 mM foszfát puffer; 0,1 M KCl)} (b) A fehérjén kötött folsav (•), Fha (×), FPhe (\blacktriangle) és FPheha (\circ) egyensúlyi és a HSA analitikai koncentrációjának aránya az analitikai koncentrációk arányának függvényében az ultraszűréses mérések alapján. A stabilitási szorzatok alapján számolt görbéket a folytonos vonalak jelölik. { $c_{\text{HSA}} = 200 \ \mu\text{M}$; 25 °C; pH = 7,40 (100 mM foszfát puffer); 0,1 M KCl)}

5.5.3. EGFR inhibitorok kölcsönhatása humán szérum albuminnal

A növekedési faktorok és a receptor tirozin kinázok nemcsak a sejtek növekedését és differenciálódását szabályozzák, hanem a rosszindulatú daganatok kialakulásában is szerepet játszanak. Az EGFR gátlása ígéretes tumorterápiás célpont, amennyiben ezek a fehérjék túltermelődnek az adott ráktípusnál [282]. A gefitinib (62. ábra) volt az első EGFR inhibitor, melyet törzskönyveztek (2003-ban) [283], de azóta már számos ezen mechanizmus alapján működő új vegyület került klinikai használatba, pl. a harmadik

generációsnak számító osimertinib 2017-ben [284]. A farmakokinetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a gefitinib, az afatinib és az erlotinib (62. ábra) intenzíven kötődnek szérumfehérjékhez [285-287], de a HSA-hoz való kötődést jellemző egyensúlyi állandók meghatározására vonatkozó információ meglehetősen limitált és gyakran ellentmondó volt a szakirodalomban. Emiatt végeztük el ezen három gyógyszermolekula mellett az osimertinib és egy bizonyítottan EGFR-gátló hatású új fejlesztésű molekula (KP2187, 62. ábra) albuminnal való kölcsönhatásának összehasonlító vizsgálatát.

13. táblázat A vizsgált EGFR inhibitorok spektrofotometriásan meghatározott proton disszociációs állandói (K_a), a különböző protonáltságú részecskék eloszlása és a vegyületek megoszlási hányadosa ($D_{7,4}$) pH = 7,4-n. {I = 0,1 M (KCl); 25 °C} HSA-val való kölcsönhatást jellemző látszólagos stabilitási állandók. {pH = 7,4 PBS puffer); 37 °C}

	gefitinib	erlotinib	afatinib	KP2187	osimertinib	
pK _{a1}	5,27(2)	5,38(2)	5,05(3)	5,58(1)	4,74(1)	
	irod: 5,4 [285]	irod: 5,6	irod: 5,0	$5,56(1)^{b}$	irod: 4,4 [288]	
		[286]	[287]	5,56(1) ^c		
p <i>K</i> _{a2}	8,00(5)	-	8,80(2)	9,20(6)	8,99(5)	
	irod: 7,2 [285]		irod: 8,2	9,21(1) ^b	irod: 9,5 [288]	
			[287]	9,21(2) ^c		
	Protonáltsági állapot pH = 7,4-n (%)					
H_2L^{2+}	-	-	-	1,5	-	
\mathbf{HL}^+	80	1	96	97	97	
L	20	99	4	1,5	3	
lgD _{7,4}	irod: +2,5 ^a	irod: +2,9	irod: +3,8	+1,86(3)	irod: +3,4	
		[286]	[287]		[288]	
		Kölcsönhatás	HSA-val			
Trp214 kioltás	4,2(1)	4,4(1)	3,9(1)	4,2(1)	4,9(1)	
irodalmi:						
	4,16 [290]	4,29 [291]	5,87 [292] ^d			
WF kiszorítás	4,0(1)	4,3(1)	4,3(1) ^e	4,3(1)	4,6(1)	
DG kiszorítás	nem mérhető	nem mérhető	nem mérhető	kötődés	4,3(1)	
HSA-n kötött	89	92	83	>92	98	
frakció ^f (%)						

^a lgP = +3,2 [289] értékből számolva: lgD = lgP + lg(L móltörtje)). ^b Spektrofluorimetriás titrálásból. ^c pHpotenciometriás titrálásból. ^d Borjú szérum albumin. ^e A mérés a vegyület malát sójával készült. ^f 630 µM HSA és 10 µM EGFR inhibitor koncentráció esetén.

A vegyületek p K_a értékeit UV-látható spektrofotometriás titrálásokkal határoztuk meg, míg a KP2187 jobb vízoldhatósága (ld. lg $D_{7,4}$ 13. táblázatban) megengedte az állandók pH-potenciometriás, valamint fluoreszcens tulajdonsága a fluorimetriás titrálások segítségével történő meghatározását (13. táblázat). A KP2187 fluorofór csoportja kellően érzékenynek bizonyult a proton disszociációs folyamatokra: a deprotonálódással képződő formák fluoreszcenciája egyre inkább intenzívebbé vált (66. ábra). Az EGFR inhibitorok első p K_a -ja a kinazolin-gyűrűhöz rendelhető, az osimetrinib kivételével, ott a piridíniumnitrogénhez. A második p K_a az alifás-nitrogénekhez tartozik: N(CH₃)₂H⁺ (afatinib, osimertinib), NH₃⁺ (KP2187) és N_{morfolin}H⁺ (gefitinib). A meghatározott p K_a -k alapján a vegyületek, az erlotinib kivételével, főképp az egyszeresen protonált HL⁺ formájukban vannak jelen fiziológiás pH-n, vizes oldatban.

A vegyületek fluoreszcens tulajdonságait különböző oldószerekben (hexán, benzol, *n*-oktanol, etanol, metanol, víz) és oldószerelegyekben is vizsgáltuk. Az afatinib és az osimertinib nem fluoreszcens egyik közegben sem, míg az erlotinib, a gefitinib és a KP2187 fluoreszcens sajátságai erős függést mutatnak az oldószer polaritásától és hidrogénkötés kialakítására való képességétől. Pl. a KP2187 semleges formájának emissziós intenzitása a vízben kicsi, míg alkoholokban H₂O << metanol < etanol << *n*oktanol irányban jelentősen megnő, és hexánban gyakorlatilag nem fluoreszcens.



66. ábra (a) A KP2187 fluoreszcens spektrumai különböző pH-kon. (b) A vegyület koncentráció eloszlási görbéi és az emissziós intenzitás változása 477 nm-en a pH-függvényében. { $c_{\text{KP2187}} = 10 \,\mu\text{M}$; $\lambda_{\text{EX}} = 370 \,\text{nm}$; $I = 0,10 \,\text{M}$ KCl; 25 °C}

A HSA-val való kölcsönhatást elsősorban spektrofluorimetriás mérések segítségével jellemeztük; az ultraszűrést nem lehetett használni, mert a vízben legjobban oldódó KP2187 is jelentős mértékben a szűrőre tapadt (20-85%-ban, szűrőtípustól függően). A kölcsönhatás során nemcsak a fehérje, hanem a vegyületek saját emissziójának a megváltozásával is számolni kell. A HSA, a KP2187 és a HSA – KP2187 rendszerre mért 3D fluoreszcencia spektrumok jól mutatják (67. ábra), hogy a kötődés során a HSA $\lambda_{\rm EM}$ = 330 nm-nél lévő emissziós csúcsa kissé lecsökken, miközben a KP2187 saját intenzitása ~10-szeresére nő az adott körülmények között, másrészt $\lambda_{\rm EX}$ = 280 nm, $\lambda_{\rm EM}$ = 441 nm-nél megjelenik egy extra keresztcsúcs. Ez tipikus esete a fluoreszcens rezonancia energia transzfer (FRET) jelenségnek [242]. Hasonlóan az erlotinib és a gefitinib is a HSA jelenlétében sokkal erősebb fluoreszcenciát mutat.



67. ábra A HSA (a), a KP2187 (b) és a HSA – KP2187 (1:5) rendszer (c) 3D fluoreszcens spektrumai. A csúcsoknál a számok a csúcsok intenzitását jelölik az adott $[\lambda_{EX}, \lambda_{EM}]$ értékeknél. { $c_{HSA} = 1 \mu M$; $c_{KP2187} = 5 \mu M$; pH = 7,4 PBS puffer; 37 °C}

A Trp214 kioltásos mérésekből mérsékelt kötődést lehetett megállapítani afatinib < gefitinib ~ KP2187 < erlotinib sorrendben (lg $K^2 ~ 4$), az osimertinib kivételével, ami majdnem egy nagyságrenddel erősebben kötődik az I. kötőhelyen, mint az afatinib (13. táblázat). A WF kiszorításos mérések hasonló kötési állandókat eredményeztek, mint a közvetlen kioltásos mérések. Míg a II. kötőhely kötési markerének (DG) kiszorítása az afatinib, a gefitinib és az erlotinib esetében nem volt kimérhető effektussal járó folyamat. A KP2187 esetében egyértelműen volt kompetíció, a jelentős spektrális átfedés miatt az adatok nem voltak alkalmasak kvantitatív kiértékelésre. A KP2187 esetében fluoreszcens élettartam-mérésekkel 370 nm-es gerjesztést használva kétféle átlagos élettartammal ($\tau_1 = 4,8(4)$ ns, $\tau_2 = 10,1(1)$ ns) jellemezhető HSA-KP2187 adduktumot lehetett leírni, ami szintén alátámasztja a kétféle kötőhelyen való megkötődést. A molekuláris dokkolásos számítások is a KP2187 I. és II. kötőhelyen történő megkötődését támasztották alá, de a vegyület semleges formájában, annak ellenére, hogy oldatban a HL⁺ forma az uralkodó. Az osimertinib pedig egyértelműen kötődik a II. kötőhelyen is a DG kiszorítás alapján.

A meghatározott kötési állandók alapján 10 µM EGFR inhibitor és 630 µM HSA koncentrációk mellett becslést végeztük a fehérjén kötött frakcióra (13. táblázat). A kötési állandók ugyan nem nagyok, de a fiziológiásan releváns körülmények között, azaz a HSA nagy feleslege mellett, a kötődés mértéke igen jelentős. 92% és 89%-os megkötődést számoltunk az erlotinib-re és a gefitinib-re, ami jó egyezésben van a 95% ill. 90%-os szérumfehérjékhez való kötődésre vonatkozó értékekkel, amiket a farmakokinetikai mérések alapján kaptak [285,286].

A vizsgált nemfémes vegyületek albuminnal való kölcsönhatásának tanulmányozása során nem csak arra mutattunk rá, hogy egy viszonylag gyengébb kötődésnek is szerepe van a szérumbeli eloszlásban, hanem a különböző kísérletes technikák alkalmazhatóságát és korlátait is össze tudtuk hasonlítani.

6. Összefoglalás

A terápiás és diagnosztikai felhasználású fémkomplexek gyakran jelentős változásokon mennek át az emberi szervezet víztereiben még a hatás helyszínéhez való megérkezésük előtt. Számos nemfémes rákellenes vegyület biológiai hatása ugyanakkor esszenciális fémionokkal való intra-, vagy extracelluláris komplexképződéssel kapcsolatos. Így a gyógyszerhatóanyagok racionális fejlesztési és optimalizálási folyamata során fontossá válik ezeknek a fémkomplexeknek az oldatbeli viselkedésének megismerése, azaz vizes oldatbeli stabilitásuk, aktuális megjelenési formájuk és redoxi tulajdonságaik feltárása. Ezek a jellemzők a farmakokinetikai tulajdonságaikat is jelentősen befolyásolják, valamint a vérszérum transzportfehérjéivel (pl. albumin, transzferin) való kölcsönhatásuk erősségének, a képződő adduktumok összetételének és a kötés helyének leírása is fontos ebből a szempontból, mert a fehérjékhez való kötődés kihat a vegyület eloszlására és tartózkodási idejére a vérben. Dolgozatomban rákellenes hatású ruténium(III)-, ródium(III)(η^5 -C₅Me₅)gallium(III)komplexek, félszendvics fémorganikus és $rut\acute{e}nium(II)(\eta^6\text{-}ar\acute{e}n)\text{-}komplexek, \ tioszemikarbazonok \ f\acute{e}mkomplexeinek, \ valamint \ egyes$ nemfémes rákellenes vegyületek széles körű oldatkémiai vizsgálatával kapott eredményeinket mutattam be. Ezen eredmények alapján az alábbi legfontosabb következtetésekre jutottunk:

1. Klinikai vizsgálatokba került két bisz-indazol ruténium(III)komplex (KP1019, KP1339) és velük rokonszerkezetű ruténium(II)-nitrozil-indazol (ill. analóg ozmium(II)-) vegyületek humán szérum albuminnal való kölcsönhatását tártuk fel elsősorban közvetlen Trp214 kioltásos és kötőhely markerekkel való kompetíciós spektrofluorimetriás mérésekkel, kiegészítve azokat ultraszűrés és CZE módszerekkel.

1.1. Megállapítottuk, hogy a meglehetősen inertnek tekinthető KP1019 és KP1339 komplexek másodlagos kölcsönhatásokon keresztül közepes erősséggel képesek kötődni az albumin I. és II. kötőhelyein egy gyors folyamatban a nagyon lassan kialakuló koordinációs kötések mellett. A két komplex viselkedésében nincs lényeges különbség, azaz az eltérő ellenionok (indazolium, Na⁺) nem befolyásolják a fehérjéhez való kötődést.

1.2. Rámutattunk arra, hogy ez a két bisz-indazol ruténium(III)komplex verseng a bilirubinnal az albuminhoz való kötődésben, ami magyarázatot ad arra a klinikai megfigyelésre, hogy az emelkedett bilirubin szintű, azaz hiperbilirubinémiában szenvedő, KP1019 komplexszel kezelt betegeknél miért volt gyenge a kiváltott hatás.

Ugyanis a megnövekvő bilirubin koncentráció miatt a kiszorított, szabadon lévő ruténiumkomplex mennyisége megemelkedhet, ami fokozott mellékhatásokhoz és/vagy gyorsabb kiürüléshez vezet.

1.3. Megállapítottuk, hogy a vizsgált ruténium/ozmium(II)-nitrozil-indazol vegyületek a vérben döntően a humán szérum albuminhoz kötődnek másodlagos kölcsönhatások révén. A komplexek hasonló és jelentős mértékben kötődnek ehhez a fehérjéhez elleniontól (indazolium, Na⁺), fémion típusától (Ru/Os) és a NO és indazol ligandumok egymáshoz viszonyított térállásától (*cisz/transz*) függetlenül. A komplexek citotoxicitásában jelentkező nagy eltérés az albuminhoz való kötődés különbségével így biztosan nem magyarázható.

2. Részletes, összehasonlító vizsgálatot végeztünk félszendvics $[Rh(III)(\eta^5 - C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$, $[Ru(II)(\eta^6 - p - cimol)(H_2O)_3]^{2+}$ és $[Ru(II)(\eta^6 - toluol)(H_2O)_3]^{2+}$ fémorganikus kationok különböző (O,O), (O,S), (N,O) és (N,N) donoratomokat tartalmazó kétfogú ligandumokkal képzett komplexeinek oldatkémiai viselkedésének feltárására céljából pH-potenciometria, UV-látható spektrofotometria és ¹H NMR spektroszkópiai módszerek kombinációjával. Az átfogó vizsgálat legfontosabb eredményei:

2.1. Jellemeztük a $[Rh(III)(\eta^5-C_5Me_5)(H_2O)_3]^{2+}$ hidrolitikus folyamatait pH 2-11,5 tartományban három különböző kloridion-koncentráció mellett és meghatároztuk a képződő kétmagvú hidroxido-hidas komplexek ($[(Rh(\eta^5-C_5Me_5))_2(H_2O)_2(\mu-OH)_2]^{2+}$, $[(Rh(\eta^5-C_5Me_5))_2(\mu-OH)_3]^+$) stabilitási szorzatait a szakirodalomban először. Megállapítottuk, hogy kloridionok jelenlétében a hidrolízis részecskék a bázikusabb pH-tartományban jelennek meg, azaz a hidrolízis részben visszaszorul; és a $[Ru(II)(\eta^6-arén)(H_2O)_3]^{2+}$ kationokhoz képest kisebb a hidrolízisre való hajlama az organoródium triakva kationnak.

A hidroxi-pir(id)onok, 3-hidroxi-flavon, kurkumin, acetil-aceton; hidroxi-tio-pironok; 2pikolinsav származékok, 8-hidroxi-kinolinok; alifás és/vagy aromás (N,N) donoratomokat tartalmazó ligandumok komplexeinek vizsgálata során az alábbi következtetéseket vontuk le:

2.2. A Ru(η^6 -arén)-komplexek képződése rendre sokkal lassabb az analóg szerkezetű Rh(η^5 -C₅Me₅)-komplexekéhez képest; és a komplexképződés sebességére általános trendként az (O,O) > (O,N) > (N,N)_{aromás} > (N,N)_{alifás} sorrend írható fel a ligandum donoratomjaitól függően.

2.3. Fiziológiás pH-n a vizsgált fémorganikus kationok különböző típusú donoratomokat tartalmazó ligandumokkal képzett komplexeinek stabilitására vonatkozóan a kapott általános trend: $(O,N)_{8-hidroxi-kinolinátok} \sim (N,N) > (O,N)_{2-pikolinátok} > (O,O)_{hidroxi-piridinon} > (O,O)_{hidroxi-pironok}.$

2.4. A mono-komplexek pK_a értékei egy adott ligandum esetén a $Rh(\eta^5-C_5Me_5) > Ru(\eta^6-p\text{-cimol}) > Ru(\eta^6\text{-toluol})$ sorrendet mutatják, ami jól korrelál a fémorganikus kationok hidrolízisre való hajlamával.

2.5. Rh(η^5 -C₅Me₅)-komplexek lgK' (H₂O/Cl⁻) és p K_a állandói között egyértelmű lineáris korreláció van: a nagyobb kloridion-affinitást mutató komplexeknek kisebb a p K_a -ja.

2.6. A $[Rh((\eta^5-C_5Me_5)(L)Cl]^{+/0}$ komplexek egyes krisztallográfiai adatai (a Rh–gyűrű középpont távolság, X–Rh–Y kötésszög és a metilcsoport-gyűrű sík torziós szög) és lg*K*' (H₂O/Cl⁻) értékei között összefüggést írtunk le multilineáris regressziós módszer segítségével, mellyel a röntgenszerkezet alapján a kloridion-affinitás megjósolható, melynek fontos szerepe van a biológiai hatásban.

Tanulmányoztuk kétfogú ligandumok ródium(III)(η^5 -C₅Me₅) és ruténium(II)(η^6 -*p*-cimol) komplexeinek humán szérum albuminnal való kölcsönhatását spektrofluorimetria, UV-látható spektrofotometria, ¹H NMR spektroszkópia, ultraszűrés és CZE módszerekkel.

2.7. Megállapítottuk, hogy a komplexek koordinációs kötés révén oldatbeli stabilitásuktól függően eltérő mértékben és eltérő módon kötődnek a fehérjén. A kisebb stabilitású komplexek (pl. deferipron) esetén az eredeti ligandumot kiszorítja a fehérje és csak a fémorganikus fémion-arenil komplex kötődik, míg a nagyobb stabilitású komplexnél (pl. 2,2'-bipiridin) a fémkomplex-HSA adduktumok képződése a jellemző.

2.8. Modell-vegyületekkel végzett mérések alapján ekkor a szabad koordinációs helyen a fehérjének egy hisztidin-nitrogénje koordinálódik legvalószínűbben. A kétfajta megkötődési mód (disszociatív *vs.* asszociatív) azonban egymással párhuzamosan is kialakulhat (pl. pikolinátok esetében), valamint függ az adott fémkomplex-fehérje aránytól is.

3. Összehasonlítottuk a két klinikai vizsgálatba jutott, eltérő farmakokinetikai tulajdonságot és hatásmechanizmust mutató, de szerkezetükben hasonló Ga(III)-komplex ([trisz-(8-oxináto)gallium(III)] (KP46) és [trisz-maltoláto-gallium(III)] (GaM)) oldatbeli stabilitását, egyéb hidroxi-(tio)pironok és 8-hidroxi-kinolinok komplexeinek bevonása mellett. A KP46 és GaM komplexek humán szérum albuminnal és transzferrinel való

kölcsönhatásának részletesen vizsgálata során magyarázatot kaptunk az eltérő viselkedésükre.

3.1. A vízben rosszul oldódó oxin komplexeinek stabilitási szorzatait 30 és 60% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegyekben meghatározott egyensúlyi állandók tiszta vizes közegre történő extrapolációjával, másrészt spektrofluorimetriás titrálások segítségével határoztuk meg, kihasználva a ligandum fluorogén tulajdonságát. Megállapítottuk, hogy az oxinnal képzett fiziológiás pH-n uralkodó trisz-komplex stabilitási szorzata ~8 nagyságrenddel nagyobb a maltol komplexéhez hasonlítva. A stabilitási állandók alapján a biológiailag releváns koncentrációtartományban az oxin komplexének disszociációja jóval kisebb mértékű, így a maltol komplexénél az endogén ligandumokkal történő cserefolyamatok valószínűsége jóval nagyobb.

3.2. A meghatározott egyensúlyi állandók alapján rámutattunk arra, hogy az apotranszferrin képes a KP46 és GaM komplexből kiszorítani a ligandumot, viszont annak mértéke a kisebb stabilitású GaM esetében jóval nagyobb. Ugyanakkor a KP46 a közepes értékű kötési állandója alapján képes biológiailag releváns körülmények között a HSA-hoz kötődni másodlagos kölcsönhatások révén, az eredeti szerkezetét megtartva. Az egyensúlyi állandók segítségével modelleztük a két fémkomplex vérszérumbeli eloszlását, és megállapítottuk, hogy a GaM komplex terápiás szempontból releváns koncentrációtartományában ($\leq 160 \mu$ M) a Tf-nek van döntő szerepe a fémion szállításában. A maltol fehérje általi kiszorítása 40 µM-nál kisebb koncentrációnál gyakorlatilag már teljesnek mondható. Így a komplexben lévő fémion a sejtbe a Tfreceptorokon keresztül valóban bejuthat. Míg a KP46 esetében a HSA szerepe a jelentős. Ehhez a fehérjéhez reverzibilisen kötődve a komplex az eredeti formájában szállítódik a vérben, ami késleltetheti a keringésből való kiürülését, és felveti a komplex Tf-független sejtes felvételének lehetőségét.

4. Számos különböző szerkezetű és koordinációs módú tioszemikarbazon proton disszociációs és többféle fémionnal való komplexképződési egyensúlyai folyamatait, valamint a komplexek oldatszerkezetét és redoxi tulajdonságait tanulmányoztuk. A szakirodalomban először építettünk fel összehasonlítható oldatszerkezeti és termodinamikai adatokból álló adatbázist a tioszemikarbazonok Cu(II)-, Fe(II)- és Fe(III)ionokkal képzett komplexeire vonatkozóan. A fő kérdésünk az volt, hogy a különböző citotoxicitású tioszemikarbazonok hatása, a fémionok felé mutatott affinitása, és a komplexek redoxi tulajdonságai között van-e valamilyen összefüggés. **4.1.** Megállapítottuk, hogy a vizsgált tioszemikarbazonok oldatbeli stabilitását, $C=N^2$ kettős kötéshez kapcsolódó Z/E-izomerizációs és protonálódási egyensúlyait a szubsztituensek és az oldószer anyagi minősége jelentős mértékben befolyásolja. Az alapvázas α -N-piridil-tioszemikarbazonok poláris oldószerekben jellemzően az E-formában fordulnak elő, de az N-terminálisan dimetilezett származékoknál már a Z izomer jelenléte is jelentős. A p K_a értékek alapján az α -N-piridil-tioszemikarbazonok fiziológiás pH-n a semleges HL formájukban vannak jelen; vízoldhatóságuk és így lipofilitásuk azonban a szubsztituensek és a kalkogénatom változtatásával jelentősen finomhangolható. A tioszemikarbazonok konjugált elektronrendszerüknek és merev szerkezetüknek köszönhetően gyakran fluoreszcensek, ami számos esetben megengedte a p K_a -k fluorimetriás titrálásokkal történő meghatározását is.

4.2. Különböző módszerekkel (pH-potenciometria, UV-látható spektrofotometria, ESR spektroszkópia) végzett méréseink alapján a szalicilaldehid-tioszemikarbazonokkal a réz(II)ion kizárólag mono-komplexeket képez, különböző protonáltsági állapotban ([CuLH]⁺, [CuL], [CuL(OH)]⁻), melyekben a ligandum háromfogúként koordinálódik. Míg az α -N-piridil-tioszemikarbazonokkal a ligandum feleslege mellett bisz- és kétmagvú komplexek is képződnek. Megállapítottuk, hogy fiziológiás pH-n kiemelkedő a réz(II)komplexek stabilitása és az N-terminális dimetilezéssel tovább növelhető a stabilitás. A stabilitási állandók meghatározása többnyire 30% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegyben történt a ligandumok vízben való korlátozott oldhatósága miatt. A párhuzamosan végzett vizes közegű mérések azt mutatták, hogy a DMSO jelenlétében a réz(II)komplexek képződése valamelyest kisebb mértékű, amit figyelembe kell venni a vizes oldatokra való extrapoláció során.

4.3. Rámutattunk arra, hogy az α -N-piridil-tioszemikarbazonok réz(II)komplexeinek glutation általi redukciójának sebességében jelentős különbség van az azonos koordinációs szféra ellenére. Minél nagyobb a réz(II)komplex stabilitása, annál lassabb ez a redoxi reakció. A rézionok felé kiemelkedő affinitást mutató N-terminálisan dimetilezett származékok ugyanakkor azok a ligandumok, melyek citotoxicitása nM-os tartományba esik, és rézkomplexük aktivitása akár meg is haladja a ligandumét. Ezekben az esetekben azt feltételezzük, hogy az intracellulárisan képződő rézkomplexeknek szerepe van a hatásmechanizmusban.

4.4. A tioszemikarbazonok a vas(II)- és vas(III)ionokkal mono- és bisz-komplexeket képeznek; fiziológiás pH-n mind a kétféle oxidációs állapotú vasionnal az [FeL₂] összetételű bisz-komplexek a dominánsak. A ligandumok +2 és +3 töltésű vasionok felé mutatott affinitása alapvetően függ a koordinálódó donoratomoktól, pl. az (O⁻,N,S⁻)

koordinációs módú ligandumok a vas(III)ionokat jobban kedvelik, mint az (N,N,S⁻) kötésmódúak. A ligandumok citotoxicitása és a vaskomplexeik redoxi potenciálja között nem találtunk összefüggést, de megállapítottuk, hogy azok a ligandumok az aktívak, melyek vaskomplexeinek redoxi potenciálja jellemzően a +40 - +160 mV tartományban van. Egyértelmű lineáris kapcsolatot írtunk le a számított p[Fe(II)] és kétféle humán rákos sejtvonalon mért pIC₅₀ értékek között. Megállapítottuk, hogy minél nagyobb a tioszemikarbazon vas(II)ionok felé mutatott affinitása, annál nagyobb a ligandum citoxoticitása, amennyiben a vaskomplexek redoxi potenciálja a feljebb megadott tartományba esik. Ez a megfigyelésünk összhangban van a tioszemikarbazonok ribonukleotid reduktáz enzim gátlásán alapuló hatásmechanizmusával. Ennek első lépése egy stabilis vas(II)komplex képződése, ugyanakkor ennek oxidációjával képződő vas(III)komplex stabilitásának is elegendően nagynak kell lennie ahhoz, hogy a komplex Fenton-típusú reakcióban részt tudjon venni.

4.5. A gallium(III)-tioszemikarbazon komplexek stabilitása jóval kisebb az analóg vas(III)komplexekéhez képest, és a meghatározott stabilitási szorzatok egyértelmű lineáris korrelációt mutatnak a vas(III)komplexek megfelelő állandóival. Ez a kisebb stabilitás az oka annak, hogy a gallium(III)komplexek pH = 7,4-n a biológiailag releváns koncentrációkban gyakorlatilag teljes mértékben disszociálnak. Így érthető módon a komplexek citotoxicitása a ligandumokéval egyezik meg. Hasonló viselkedést írtunk le a vanádium(IV/V)komplexek esetében is.

5. Rákellenes nemfémes vegyületek (epidermális növekedési faktor receptor gátlók, kumarin- és folsav-származékok) humán szérum albuminnal való kölcsönhatásának vizsgálatakor az adott vegyületcsaládon belül az egyes szerkezeti változtatások hatását tanulmányoztuk a farmakokinetikai viselkedést befolyásoló tulajdonságokra. Jellemeztük a vegyületek lipofilitását, meghatároztuk proton disszociációs állandóikat és az albuminnal való kölcsönhatásukat jellemző kötési állandóikat és kötési helyeiket. A kapott adatok elemzése alapján az alábbiakat állapítottuk meg:

5.1. A vizsgált redukált Schiff-bázis kumarin-származékok a HSA I. kötőhelyén viszonylag erősen kötődnek ($\lg K' = 5,7-7,5$), a kumarin-típusú warfarintól teljesen eltérő orientációval.

5.2. A választott folsav-származékok közepes erősséggel kötődnek az albuminhoz, a folsav esetén kettő, míg a másik három vizsgált vegyületnél (FPhe, FPheha, Fha) három a fehérjén maximálisan megkötődő kismolekulák száma.

5.3. Az EGFR inhibitorok (gefitinib, afatinib, erlotinib, osimertinib, KP2187) szintén közepes erősségű kötődést mutatnak a HSA I. kötőhelyén ($\lg K' = 3,9-4,9$). A fehérjével való kölcsönhatásra a vegyületek saját emissziója is érzékeny, ami alapján számolt kötési állandó jó egyezést mutat a HSA saját emissziójának változásából számolttal. Bár a kötési állandók nem nagyok, a fiziológiásan releváns körülmények között, azaz a HSA nagy feleslege mellett, a kötődés mértéke igen jelentős mindegyik EGFR inhibitor esetében (~90%).

5.4. Rámutattunk arra, hogy a mért spektrumok felbontása, az elválasztási módszerekkel kapott képződési függvények illesztése megbízhatóan elvégezhető a fehérje-ligandum rendszereknél is numerikus eljárások segítségével (a fémion-ligandum rendszereknél használt eljárásokhoz hasonlóan), szemben a szakirodalomban elterjedt linearizálási módszerekkel.

7. Az eredmények várható alkalmazása

A fémtartalmú daganatellenes vegyületek fejlesztése fontos kutatási irányvonalat jelent, melynek célja a mellékhatások csökkentése és a jobb gyógyászati tulajdonságok elérése. Ugyanakkor a fémkomplexek klinikai vizsgálatokba csak ritkán és lassan jutnak el, mely gyakran a hatásmechanizmusra és az oldatbeli viselkedésre vonatkozó információk hiánya miatt van. A szerkezet-biológiai hatás összefüggések vizsgálatához a fémkomplexek esetén fontos ismerni azok vizes oldatbeli stabilitását és megjelenési formáját fiziológiás körülmények között (azaz vizes oldatban, pH ~ 7,4-n, általában kisebb koncentrációban). A biológiai hatásért felelős forma ugyanis gyakran különbözik az eredeti, általában szilárd fázisban jellemzett szerkezettől. Ugyanakkor a fémkomplexek endogén bio-ligandumokkal (pl. szérumfehérjék) való kölcsönhatásának minél szélesebb körű ismerete is szükséges, mert azok alapvetően befolyásolhatják a farmakokinetikai tulajdonságokat. Az általunk meghatározott - és a szakirodalomban először publikált -, in vitro fém-ligandum, fémkomplex-fehérje kölcsönhatásokra vonatkozó termodinamikai adatok birtokában (matematikailag és kémiailag) modellezni tudjuk а biológiailag releváns koncentrációviszonyok és bioligandumok jelenlétében a fémkomplexek viselkedését. Ezek az ismeretek hozzájárulhatnak újabb, hatásosabb és megfelelőbb farmakokinetikai tulajdonságú vegyületek előállításához. A kapott eredmények alapján több vegyületcsalád (tioszemikarbazonok, félszendvics fémorganikus komplexek) esetén is sikerült olyan adatbázisokat felépíteni, melyek egymással összehasonlítható paramétereket fognak össze, mint pl. lipofilitás, pKa értékek, fémkomplexek oldatbeli stabilitása, kristályszerkezeti adatok, formál potenciál értékek, fehérjék és modelljeik felé mutatott affinitási adatok és citotoxicitás. Ezen termodinamikai, kinetikai és biológiai adatok korrelációs elemzése hozzájárul a rákellenes hatásban és mellékhatásokban megfigyelhető különbségek jobb megértéséhez és így támogat(hat)ja az ígéretes gyógyszermolekulák (pre)klinikai vizsgálatát.

8. Irodalomjegyzék

8.1. Az értekezés alapját képező közlemények (tématerületek szerint; 'P': publikáció)

Ruténiumkomplexek

[P1] O. Dömötör, C.G. Hartinger,* A.K. Bytzek, T. Kiss, B.K. Keppler, É.A. Enyedy* Characterization of the binding sites of the anticancer ruthenium(III) complexes KP1019 and KP1339 on human serum albumin via competition studies
JOURNAL OF BIOLOGICAL INORGANIC CHEMISTRY 18 (2013) 9–17.
IF: 3,164; Q1; független hivatkozások: 44; doi: 10.1007/s00775-012-0944-6

[P2] O. Dömötör, A. Rathgeb, P.S. Kuhn, A. Popović-Bijelić,* G. Bačić, É.A. Enyedy,* V.B. Arion*

Investigation of the binding of cis/trans- $[MCl_4(1H-indazole)(NO)]^-$ (M = Ru, Os) complexes to human serum albumin JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 159 (2016) 37–44.

IF: 3,205; Q2; független hivatkozások: 5; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.02.003

Félszendvics Ruténium-, és Ródiumkomplexek

[P3] A. Kurzwernhart, W. Kandioller, É.A. Enyedy, M. Novak, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, C.G. Hartinger*

3-Hydroxyflavones vs. 3-hydroxyquinolinones: structure-activity relationships and stability studies on Ru^{II}(arene) anticancer complexes with biologically active ligands DALTON TRANSACTIONS 42 (2013) 6193–6202. IF: 4,097; D1; független hivatkozások: 40; doi: 10.1039/c2dt32206d

[P4] É.A. Enyedy*, G.M. Bognár, T. Kiss, M. Hanif, C.G. Hartinger*
 Solution equilibrium studies on anticancer ruthenium(II)-η⁶-p-cymene complexes of 3-hydroxy-2(1H)-pyridones
 JOURNAL OF ORGANOMETALLIC CHEMISTRY 734 (2013) 38-44.
 IF: 2,302; Q2; független hivatkozások: 8; doi:10.1016/j.jorganchem.2012.10.042

[P5] É.A. Enyedy, É. Sija, T. Jakusch*, C.G. Hartinger, W. Kandioller, B.K. Keppler, T. Kiss* Solution equilibria of anticancer ruthenium(II)-(η^6 -p-cymene)-hydroxy(thio)pyr(id)one complexes: impact of sulfur vs. oxygen donor systems on the speciation and bioactivity JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 127 (2013) 161–168. IF: 3,274; Q1; független hivatkozások: 6; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2013.05.002

[P6] É. Sija, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, T. Kiss, É.A. Enyedy*
Solution equilibrium studies of anticancer ruthenium(II)-η⁶-p-cymene complexes of pyridinecarboxylic acids
POLYHEDRON 67 (2014) 51–58.
IF: 2,011; Q2; független hivatkozások: 3; doi: 10.1016/j.poly.2013.08.057

[P7] O. Dömötör, S. Aicher, M. Schmidlehner, M.S. Novak, A. Roller, M.A. Jakupec, W. Kandioller, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, É.A. Enyedy* Antitumor pentamethylcyclopentadienyl rhodium complexes of maltol and allomaltol: synthesis, solution speciation and bioactivity JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 134 (2014) 57–65. IF: 3,444; Q1; független hivatkozások: 23; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.01.020 [P8] É.A. Enyedy*, O. Dömötör, C.M. Hackl, A. Roller, M.S. Novak, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, W. Kandioller

Solution equilibria and antitumor activity of pentamethylcyclopentadienyl rhodium complexes of picolinic acid and deferiprone

JOURNAL OF COORDINATION CHEMISTRY 68 (2015) 1583–1601.

IF: 1,756; Q2; független hivatkozások: 4; doi:10.1080/00958972.2015.1023195

[P9] É.A. Enyedy*, J.P. Mészáros, O. Dömötör, C.M. Hackl, A. Roller, B.K. Keppler, W. Kandioller

Comparative solution equilibrium studies on pentamethylcyclopentadienyl rhodium complexes of 2,2'-bipyridine and ethylenediamine and their interaction with human serum albumin JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 152 (2015) 93–103. IF: 3,205; Q1; független hivatkozások: 2; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.08.025

[P10] G. Nogueira, O. Dömötör, A. Pilon, M.P. Robalo, F. Avecilla, M. H. Garcia, É.A. Enyedy*, A. Valente*
(η⁶-2-Phenoxyethanol) ruthenium(II)-complexes of 2,2'-bipyridine and its derivatives: solution speciation and kinetic behavior
JOURNAL OF ORGANOMETALLIC CHEMISTRY 820 (2016) 20–29.
IF: 2,184; Q1; független hivatkozások: 1; doi: 10.1016/j.jorganchem.2016.07.017

[P11] C.M. Hackl, M.S. Legina, V. Pichler, M. Schmidlehner, A. Roller, O. Dömötör, E.A. Enyedy, M.A. Jakupec, W. Kandioller,* B.K. Keppler *Thiomaltol-based organometallic complexes with 1-methylimidazole as leaving group: synthesis, stability and biological behavior*CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL 22 (2016) 17269–17281.
IF: 5,317; D1; független hivatkozások: 5; doi: 10.1002/chem.201603206

[P12] O. Dömötör, V.F.S. Pape, N.V. May, G. Szakács, É.A. Enyedy* Comparative solution equilibrium studies of antitumor ruthenium(η^6 -p-cymene) and rhodium(η^5 - C_5Me_5) complexes of 8-hydroxyquinolines DALTON TRANSACTIONS 46 (2017) 4382–4396. IF: 4,099; Q1; független hivatkozások: 7; doi: 10.1039/C7DT00439G

[P13] O. Dömötör, C. M. Hackl, K. Bali, A. Roller, M. Hejl, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, W. Kandioller, É.A. Enyedy* *Comparative equilibrium and structural studies of new pentamethylcyclopentadienyl rhodium complexes bearing (O,N) donor bidentate ligands*JOURNAL OF ORGANOMETALLIC CHEMISTRY 846 (2017) 287–295.
IF: 1,946; Q1; doi: 10.1016/j.jorganchem.2017.06.027

[P14] J.M. Poljarević, T.G. Gál, N.V. May, G. Spengler, O. Dömötör, A.R. Savić, S. Grgurić-Šipka, É.A. Enyedy*

Comparative solution equilibrium and structural studies of half-sandwich ruthenium(II)(η^6 -toluene) complexes of picolinate derivatives JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 181 (2018) 74–85. IF: 3,063; Q2; DOI: 10.1016/ j.jinorgbio.2017.12.017

[P15] J.P. Mészáros, O. Dömötör, C.M. Hackl, A. Roller, B.K. Keppler, W. Kandioller, É.A. Enyedy*

Structural and solution equilibrium studies on half-sandwich organorhodium complexes of (N,N) donor bidentate ligands NEW JOURNAL OF CHEMISTRY 42 (2018) 11174–11184.

IF: 3,201; Q1; DOI: 10.1039/C8NJ01681J

[P16] J.P. Mészáros, J.M. Poljarević, G.T. Gál, N.V. May, G. Spengler, É.A. Enyedy* Comparative solution and structural studies of half-sandwich rhodium and ruthenium complexes bearing curcumin and acetylacetone JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 195 (2019) 91–100. IF: 3,063; Q2; DOI: 10.1016/J.JINORGBIO.2019.02.015

GALLIUMKOMPLEXEK

[P17] É.A. Enyedy*, O. Dömötör, E. Varga, T. Kiss, R. Trondl, C.G. Hartinger, B.K. Keppler Comparative solution equilibrium studies of anticancer gallium(III) complexes of 8hydroxyquinoline and hydroxy(thio)pyrone ligands
JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 117 (2012) 189–197.
IF: 3,197; Q2; független hivatkozások: 19; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.08.005

[P18] Dömötör O., Bali K., Hetényi A., **Enyedy É.A**.* *Rákellenes gallium(III)komplexek oldategyensúlyi jellemzése és szérumfehérjékkel való kölcsönhatásuk vizsgálata* MAGYAR KÉMIAI FOLYÓIRAT 120 (2014) 127–131. ISSN: 1418-9933

[P19] É.A. Enyedy,* O. Dömötör, K. Bali, A. Hetényi, T. Tuccinardi, B.K. Keppler Interaction of the anticancer gallium(III) complexes of 8-hydroxyquinoline and maltol with human serum proteins JOURNAL OF BIOLOGICAL INORGANIC CHEMISTRY 20 (2015) 77–88. IF: 2,495; Q1; független hivatkozások: 15; doi: 10.1007/s00775-014-1211-9

TIOSZEMIKARBAZONOK ÉS KOMPLEXEIK

[P20] É. A. Enyedy*, N.V. Nagy, É. Zsigó, C.R. Kowol*, V.B. Arion, B.K. Keppler, T. Kiss Comparative solution equilibrium study of the interaction of copper(II), iron(II) and zinc(II) with Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone) and related ligands EUROPEAN JOURNAL OF INORGANIC CHEMISTRY 2010 (2010) 1717–1728. IF: 2,909; Q1; független hivatkozások: 22; doi: 10.1002/ejic.200901174

[P21] É.A. Enyedy*, M.F. Primik, C.R. Kowol, V.B. Arion, T. Kiss, B.K. Keppler Interaction of Triapine and related thiosemicarbazones with iron(III)/(II) and gallium(III): a comparative solution equilibrium study DALTON TRANSACTIONS 40 (2011) 5895–5905.

IF: 3,838; Q1; független hivatkozások: 22; doi: 10.1039/C0DT01835J

[P22] É.A. Enyedy*, É. Zsigó, N.V. Nagy, C.R. Kowol, A. Roller, B.K. Keppler, T. Kiss Complex formation ability of salicylaldehyde thiosemicarbazone towards Zn^{II} , Cu^{II} , Fe^{II} , Fe^{III} and Ga^{III} ions EUROPEAN JOURNAL OF INORGANIC CHEMISTRY 2012 (2012) 4036–4047.

IF: 3,120; Q1; független hivatkozások: 7; doi: 10.1002/ejic.201200360

[P23] M.N.M. Milunovic, É.A. Enyedy*, N.V. Nagy, T. Kiss, R. Trondl, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, R. Krachler, G. Novitchi, V.B. Arion* *L- and D-proline thiosemicarbazone conjugates: coordination behavior in solution, and the effect of copper(II) coordination on their antiproliferative activity*INORGANIC CHEMISTRY 51 (2012) 9309–9321.
IF: 4,593; D1; független hivatkozások: 20; doi: 10.1021/ic300967j

[P24] F. Bacher, É.A. Enyedy*, N.V. Nagy, A. Rockenbauer, G.M. Bognár, R. Trondl, M.S. Novak, E. Klapproth, T. Kiss, V.B. Arion* Copper(II) complexes with highly water-soluble L- and D-proline thiosemicarbazone conjugates as potential inhibitors of Topoisomerase IIα INORGANIC CHEMISTRY 52 (2013) 8895–8908. IF: 4,794; D1; független hivatkozások: 19; doi: 10.1021/ic401079w [P25] É.A. Enyedy*, G.M. Bognár, N.V. Nagy, T. Jakusch, T. Kiss, D. Gambino Solution speciation of potential anticancer metal complexes of salicylaldehyde semicarbazone and its bromo derivative
POLYHEDRON 67 (2014) 242–252.
IF: 2,011; Q2; független hivatkozások: 15; doi: 10.1016/j.poly.2013.08.053

[P26] F. Bacher, O. Dömötör, M. Kaltenbrunner, M. Mojović, A. Popović-Bijelić, A. Gräslund, A. Ozarowski, L. Filipovic, S. Radulović, É.A. Enyedy,* V.B. Arion* Effects of terminal dimethylation and metal coordination of proline-2-formylpyridine thiosemicarbazone hybrids on lipophilicity, anti-proliferative activity and hR2 RNR inhibition INORGANIC CHEMISTRY 53 (2014) 12595–12609. IF: 4,762; D1; független hivatkozások: 10; doi: 10.1021/ic502239u

[P27] F. Bacher, O. Dömötör, A. Chugunova, N.V. Nagy, L. Filipović, S. Radulović, É.A. Enyedy,* V.B. Arion* Strong effect of copper(II) coordination on antiproliferative activity of thiosemicarbazone-

Strong effect of copper(II) coordination on antiproliferative activity of thiosemicarbazone piperazine and thiosemicarbazone-morpholine hybrids DALTON TRANSACTIONS 44 (2015) 9071–9090. IF: 4,177; Q1; független hivatkozások: 18; doi: 10.1039/C5DT01076D

[P28] C.R. Kowol*, N.V. Nagy, T. Jakusch, A. Roller, P. Heffeter, B.K. Keppler, É.A. Enyedy* Vanadium(IV/V) complexes of Triapine and related thiosemicarbazones: synthesis, solution equilibrium and bioactivity JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 152 (2015) 62–73.

IF: 3,205; Q1; független hivatkozások: 8; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.08.023

[P29] C.R. Kowol,* W. Miklos, S. Pfaff, S. Hager, S. Kallus, K. Pelivan, M. Kubanik, É.A.
Enyedy, W. Berger, P. Heffeter,* B.K. Keppler
Impact of stepwise NH₂-methylation of Triapine on the physico-chemical properties, anticancer activity, and resistance circumvention
JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY 59 (2016) 6739–6752.
IF: 6,259; D1; független hivatkozások: 6; doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00342

[P30] Enyedy É.A.*

Rákellenes tioszemikarbazonok és fémkomplexeik: a stabilitás és a biológiai aktivitás kapcsolata MAGYAR KÉMIAI FOLYÓIRAT 123 (2017) 48–55. ISSN: 1418-9933

[P31] F. Bacher, O. Dömötör, É.A. Enyedy*, L. Filipović, S. Radulović, G.S. Smith, V.B. Arion* Complex formation reactions of gallium(III) and iron(III/II) with L-proline-thiosemicarbazone hybrids: a comparative study INORGANICA CHIMICA ACTA 455 (2017) 505–513. IF: 2,002; Q2; független hivatkozások: 1; doi: 10.1016/j.ica.2016.06.044

[P32] O. Dömötör, N.V. May, K. Pelivan, T. Kiss, B.K. Keppler, C.R. Kowol, É.A. Enyedy* A comparative study of α-N-pyridyl thiosemicarbazones: spectroscopic properties, solution stability and copper(II) complexation
INORGANICA CHIMICA ACTA 472 (2018) 264–275.
IF: 2,264; Q2; független hivatkozások: 3; doi: 10.1016/j.ica.2017.07.001

[P33] S. Kallus, L. Uhlik, S. van Schoonhoven, K. Pelivan, W. Berger, É.A. Enyedy, T. Hofmann, P. Heffeter*, C.R. Kowol*, B.K. Keppler
Synthesis and biological evaluation of biotin-conjugated anticancer thiosemicarbazones and their iron(III) and copper(II) complexes
JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 190 (2019) 85–97.
IF: 3,063; Q2; doi: 10.1016/J.JINORGBIO.2018.10.006

[P34] P. Heffeter*, V.F.S. Pape, **E.A. Enyedy**, B.K. Keppler, G. Szakacs, C.R. Kowol* *Anticancer thiosemicarbazones: chemical properties, interaction with iron metabolism, and resistance development* ANTIOXIDANT & REDOX SIGNALING 30 (2019) 1062–1082. IF: 6,337; D1; független hivatkozások: 2; doi: 10.1089/ars.2017.7487

*R*ÁKELLENES NEMFÉMES VEGYÜLETEK KÖLCSÖNHATÁSA HUMÁN SZÉRUM ALBUMINNAL [P35] É.A. Enyedy*, E. Farkas, O. Dömötör, M.A. Santos Interaction of folic acid and some matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor folate-γ-hydroxamate derivatives with Zn(II) and human serum albumin JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 105 (2011) 444–453. IF: 3,354; Q1; független hivatkozások: 5; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2010.12.00

[P36] O. Dömötör, T. Tuccinardi, D. Karcz, M. Walsh, B.S. Creaven, É.A. Enyedy* Interaction of anticancer reduced Schiff base coumarin derivatives with human serum albumin investigated by fluorescence quenching and molecular modeling
BIOORGANIC CHEMISTRY 52 (2014) 16–23.
IF: 2,152; Q2; független hivatkozások: 23; doi: 10.1016/j.bioorg.2013.10.003

[P37] O. Dömötör, K. Pelivan, A. Borics, B.K. Keppler, C.R. Kowol*, É.A. Enyedy* *Comparative studies on the human serum albumin binding of the clinically approved EGFR inhibitors gefitinib, erlotinib, afatinib, osimertinib and the investigational inhibitor KP2187* JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 154 (2018) 321–331. IF: 2,831; Q1; doi: 10.1016/j.jpba.2018.03.011

8.2. Az értekezés anyagából nemzetközi konferenciákon bemutatott előadások *(fordított kronológiai sorrendben)*

10. <u>É.A. Enyedy</u> (plenáris előadás, meghívott előadó); *Interactions of metallodrugs with serum proteins via the example of antitumor organorhodium and gallium complexes;* Chemistry towards Biology (CTB9), 2018.09.24-27., Budapest

9. <u>É.A. Enyedy</u>, N.V. May, P. Heffeter, V.F.S. Pape, G. Szakács, B.K. Keppler, C.R. Kowol ('keynote' előadás, meghívott előadó); *Comparative solution studies on complexation of antitumor thiosemicarbazones with copper(II) and iron(II/III): relationship between stability and cytotoxicity;* 35th International Conference on Solution Chemistry, 2018.08.26-30., Szeged

8. <u>Orsolya Dömötör</u>, Christian R. Kowol, Bernhard K. Keppler, Attila Borics, Éva A. Enyedy; Solution chemistry studies of hypoxia-activated cobalt complexes of EGFR inhibitors and their interaction with human serum albumin; 35th International Conference on Solution Chemistry, 2018.08.26-30., Szeged

7. <u>É.A. Enyedy</u>, J.M. Poljarevic, O. Dömötör, J.P. Mészáros, N.V. May, I. Szatmári, F. Fülöp, G. Spengler; *Comparative solution equilibrium studies on various antitumor half-sandwich organometallic complexes of 2-picolinates and 8-quinolinols;* ISMEC2018, International Symposium on Metal Complexes, 2018.06.3-7., Firenze, Olaszország

6. J.P. Mészáros, O. Dömötör, C.M. Hackl, A. Roller, W. Kandioller, B.K. Keppler, É.A. Enyedy; *Half-sandwich rhodium(III) complexes formed with (N,N) ligands: structural characterization and solution chemistry;* XXVI. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry, 2017.06.4-9., Smolenice, Szlovákia

5. <u>É.A. Enyedy</u>, O. Dömötör, J.P. Mészáros, C.M. Hackl, M.A. Jakupec, W. Kandioller, B.K. Keppler; *Comparative solution speciation study on antitumor* $Rh(III)(\eta^5-C_5Me_5)$ *complexes;* 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2016.08.28-09.01. Budapest

4. <u>O. Dömötör</u>, K. Bali, J.P. Mészáros, C.M. Hackl, W. Kandioller, B.K. Keppler, É.A. Enyedy; *Complexes* of $Rh(III)(\eta^5-Cp^*)$ with (N,O) and (N,N)-donor bidentate ligands: solution equilibrium and interaction with human serum albumin; XXV. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry (ICCBIC); 2015.05.31-06.05. Smolenice, Szlovákia

3. <u>É.A. Enyedy</u>, C.R. Kowol, N.V. Nagy, G.M. Bognár, T. Kiss, V.B. Arion, B.K. Keppler ('keynote' előadás, meghívott előadó); *Comparative solution equilibrium study of anticancer copper complexes of chalcogensemicarbazones;* XII International Symposium on Inorganic Biochemistry, Collaboration and Beyond, 2013.08.28-09.01., Wrocław, Lengyelország

2. <u>Éva A. Enyedy</u>, C.R. Kowol, N.V. Nagy, É. Zsigó, T. Jakusch, V.B. Arion, B.K. Keppler, T. Kiss; *Metal complexes of the antitumor drug Triapine and related thiosemicarbazones;* International Symposium on Metal Complexes (ISMEC2012), 2012.06.18-22. Lisszabon, Portugália

1. <u>É.A. Enyedy</u>, C.R. Kowol, É. Zsigó, T. Jakusch, N.V. Nagy, M.F. Primik, V.B. Arion, B.K. Keppler, T. Kiss; *Interaction of Triapine and related thiosemicarbazones with various metal ions: comparative solution equilibrium studies;* 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, 2011.08.31-09.3., Budapest, Magyarország

8.3. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó további fontosabb közlemények (2002-től) (*PhD fokozatszerzés óta; témakörönként, 'TP': további publikáció*)

RÁKELLENES HATÁSÚ FÉMKOMPLEXEK BIOSPECIÁCIÓS VIZSGÁLATA

[TP1] A.I. Tomaz*, T. Jakusch, T.S. Morais, F. Marques, R.F.M. de Almeida, F. Mendes, **E.A. Enyedy**, I. Santos, J. Costa Pessoa, T. Kiss, M.H. Garcia $[Ru^{II}(\eta^5-C_5H_5)(bipy)(PPh_3)]^+$, a promising large spectrum antitumor agent: cytotoxic activity and interaction with human serum albumin JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 117 (2012) 262–269. IF: 3,197; Q2; független hivatkozások: 23; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.06.016

[TP2] V. Pichler, J. Mayr, P. Heffeter,* O. Dömötör, É.A. Enyedy, G. Hermann, D. Groza, G. Köllensperger, M. Galanksi, W. Berger, B.K. Keppler, C.R. Kowol* *Maleimide-functionalised platinum(IV) complexes as synthetic platform for targeted drug delivery*CHEMICAL COMMUNICATIONS 49 (2013) 2249–2251.
IF: 6,718; D1; független hivatkozások: 35; doi: 10.1039/c3cc39258a

[TP3] A. Rathgeb, A. Böhm, M.S. Novak, A. Gavriluta, O. Dömötör, J.B. Tommasino, É.A. Enyedy, S. Shova, S. Meier, M.A. Jakupec, D. Luneau,* V.B. Arion* *Ruthenium-nitrosyl complexes with glycine, L-alanine, L-valine, L-proline, D-proline, L-serine, L-threonine and L-tyrosine: synthesis, X-ray diffraction structures, spectroscopic and electrochemical properties and antiproliferative activity* INORGANIC CHEMISTRY 53 (2014) 2718–2729.

IF: 4,762; D1; független hivatkozások: 15; doi: 10.1021/ic4031359

[TP4] R. Trondl, L.S. Flocke, C.R. Kowol, P. Heffeter, U. Jungwirth, G.E. Mair, R. Steinborn, É.A. Enyedy, M.A. Jakupec,* W. Berger, B.K. Keppler *Triapine and a more potent dimethyl derivative induce ER stress in cancer cells*MOLECULAR PHARMACOLOGY 85 (2014) 451–459.
IF: 4,128; D1; független hivatkozások: 12; doi: 10.1124/mol.113.090605

[TP5] V.F.S. Pape, D. Türk, P. Szabó, M. Wiese, **E.A. Enyedy***, G. Szakács* Synthesis and characterization of the anticancer and metal binding properties of novel pyrimidinylhydrazone derivatives JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 144 (2015) 18–30.

IF: 3,205; Q1; független hivatkozások: 6; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.12.015

[TP6] A. Dobrova, S. Platzer, F. Bacher, M.N.M. Milunovic, A. Dobrov, G. Spengler, É.A. Enyedy, G. Novitchi, Vladimir B. Arion* Structure-antiproliferative activity studies on L-proline- and homoproline-4-N-pyrrolidine-3thiosemicarbazone hybrids and their nickel(II), palladium(II) and copper(II) complexes DALTON TRANSACTIONS 45 (2016) 13427–13439.

IF: 4,029; Q1; független hivatkozások: 12; doi: 10.1039/C6DT02784A

[TP7] T. Kiss*, É.A. Enyedy, T. Jakusch Development of application of speciation in chemistry COORDINATION CHEMISTRY REVIEWS 352 (2017) 401–423.
IF: 13,324; D1; független hivatkozások: 9; doi: 10.1016/j.ccr.2016.12.016

[TP8] A. Sîrbu, O. Palamarciuc, M.V. Babak,* J.M. Lim, K. Ohui, E.A. Enyedy, S. Shova, D. Darvasiová, P. Rapta, W.H. Ang,* V.B. Arion* *Copper(II) thiosemicarbazone complexes induce marked ROS accumulation and promote nrf2-mediated antioxidant response in highly resistant breast cancer cells*DALTON TRANSACTIONS 46 (2017) 3833–3847.
IF: 4,099; Q1; független hivatkozások: 9; doi: 10.1039/C7DT00283A

[TP9] O. Dömötör, R.F.M. de Almeida, L. Côrte-Real, C.P. Matos, F. Marques, A. Matos, C. Real, T. Kiss, É.A. Enyedy, M.H. Garcia, A.I. Tomaz*
Studies on the mechanism of action of antitumor bis(aminophenolate) ruthenium(III) complexes
JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 168 (2017) 27–37.
IF: 3,063; Q2; független hivatkozások: 5; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.12.008

[TP10] T. Jakusch*, K. Kozma, É.A. Enyedy, N.V. May, A. Roller, C.R. Kowol, B.K. Keppler, T. Kiss* Complexes of pyridoxal thiosemicarbazones formed with vanadium(IV/V) and copper(II): solution equilibrium and structure
INORGANICA CHIMICA ACTA 472 (2018) 243–253.
IF: 2,264; Q2; független hivatkozások: 2; doi: 10.1016/j.ica.2017.08.018

[TP11] E. Orlowska, M.V. Babak, O. Dömötör, E.A. Enyedy, P. Rapta, M. Zalibera, L. Bučinský, M. Malček, C. Govind, V. Karunakaran, Y. Chouthury S. Farid, T. McDonnell, D. Luneau, D. Schaniel, W.H. Ang, V.B. Arion*
NO Releasing and Anticancer Properties of Octahedral Ruthenium-Nitrosyl Complexes with Equatorial 1H-indazole Ligands
INORGANIC CHEMISTRY 57 (2018) 10702–10717.
IF: 4.700; D1; független hivatkozások: 1; doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b01341

[TP12] V.F.S. Pape, N.V. May, G.T. Gál, I. Szatmári, F. Szeri, F. Fülöp, G. Szakács*, É.A. Enyedy* Impact of copper and iron binding properties on the anticancer activity of 8-hydroxyquinoline derived Mannich bases

DALTON TRANSACTIONS 47 (2018) 17032–17045. IF: 4,099; Q1; doi: 10.1039/C8DT03088J

[TP13] T. Kiss*, É.A. Enyedy, T. Jakusch, O. Dömötör
Speciation of metal complexes of medicinal interest: relationship between solution equilibria and pharmaceutical properties
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 26 (2019) 580–606.
IF: 3,469; Q2; független hivatkozások: 1; doi: 10.2174/0929867325666180307113435

[TP14] O. Palamarciuc, M.N.M. Milunovic,* A. Sîrbu, E. Stratulat, A. Pui, N. Gligorijevic, S. Radulovic, J. Kožíšek, D. Darvasiová, P. Rapta, E.A. Enyedy, G. Novitchi, S. Shova, V.B. Arion* Investigation of the cytotoxic potential of methyl imidazole-derived thiosemicarbazones and their copper(II) complexes with dichloroacetate as co-ligand NEW JOURNAL OF CHEMISTRY 43 (2019) 1340–1357. IF: 3,469; Q1; doi: 10.1039/C8NJ04041A

[TP15] K. Ohui, E. Afanasenko, F. Bacher, R.L.X. Ting, A. Zafar, N. Blanco-Cabra, E. Torrents, O. Dömötör, N.V. May, D. Darvasiova, É.A. Enyedy, A. Popović-Bijelić, J. Reynisson, P. Rapta, M.V. Babak, G. Pastorin, V.B. Arion* *New Water-Soluble Copper(II) Complexes with Morpholine-Thiosemicarbazone Hybrids: Insights into the Anticancer and Antibacterial Mode of Action* JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY 62 (2019) 512–530. IF: 6,253; D1; doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01031 [TP16] É.A. Enyedy,* J.P. Mészáros, G. Spengler, M. Hanif, C.G. Hartinger* *Comparative solution studies of cancer-related gallium(III) and iron(III) complexes of 3-hydroxy-2(1H)-pyridinones*POLYHEDRON (2019) nyomdában
IF: 2,067; Q2; doi: 10.1016/j.poly.2019.04.010

FEHÉRJE-LIGANDUM KÖLCSÖNHATÁSOK VIZSGÁLATA

[TP17] É.A. Enyedy*, L. Horváth, A. Hetényi, T. Tuccinardi, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, T. Kiss* Interactions of the carrier ligands of antidiabetic metal complexes with human serum albumin: a combined spectroscopic and separation approach with molecular modeling studies BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY 19 (2011) 4202–4210. IF: 2,921; Q1; független hivatkozások: 9; doi: 10.1016/j.bmc.2011.05.063

[TP18] T. Żołek, É.A. Enyedy, K. Ostrowska, V. Pósa, D. Maciejewska*
Drug likeness prediction of 5-hydroxy-substituted coumarins with high affinity to 5-HT1A and 5-HT2A receptors
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 115 (2018) 25–36.
IF: 3,466; D1; doi: 10.1016/j.ejps.2018.01.011

[TP19] T. Żołek*, O. Dömötör, K. Ostrowska, É.A. Enyedy, D. Maciejewska*
Evaluation of blood-brain barrier penetration and examination of binding to human serum albumin of 7-Oarylpiperazinylcoumarins as potential antipsychotic agents
BIOORGANIC CHEMISTRY 84 (2019) 211–225.
IF: 3,929; Q2; doi: 10.1016/j.bioorg.2018.11.034

ANTIDIABETIKUS VEGYÜLETEK BIOSPECIÁCIÓS VIZSGÁLATA

[TP20] T. Kiss*, T. Jakusch, D. Hollender, Á. Dörnyei, É.A. Enyedy, J. Costa Pessoa, H. Sakurai, A. Sanz-Medel *Biospeciation of antidiabetic VO(IV) complexes*COORDINATION CHEMISTRY REVIEWS 252 (2008) 1153–1162.
IF: 10,570; D1; független hivatkozások: 96; doi: 10.1016/j.ccr.2007.09.011

[TP21] T. Kiss*, T. Jakusch, D. Hollender, É.A. Enyedy*, L. Horváth *Comparative studies on the biospeciation of antidiabetic VO(IV) and Zn(II) complexes* JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 103 (2009) 527–535. IF: 3,252; Q1; független hivatkozások: 14; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2008.11.006

[TP22] A.K. Bytzek, É.A. Enyedy*, T. Kiss, B.K. Keppler, C.G. Hartinger* *Biodistribution of antidiabetic Zn(II) complexes in human serum and in vitro protein binding studies by means of CZE–ICP-MS*ELECTROPHORESIS 30 (2009) 4075–4082.
IF: 3,077; Q1; független hivatkozások: 15; doi: 10.1002/elps.200900212

[TP23] É.A. Enyedy*, D. Hollender, T. Kiss

Lipophilicity of kinetically labile metal complexes through the example of antidiabetic Zn(II) and VO(IV) compounds JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 54 (2011) 1073–1081.

JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 54 (2011) 10/3–108 IF: 2,967; D1; független hivatkozások: 9; doi: 10.1016/j.jpba.2010.12.025

[TP24] T. Kiss,* T. Jakusch, B. Gyurcsik, A. Lakatos, É.A. Enyedy, É. Sija Application of modeling calculations in the description of metal ion distribution of bioactive compounds in biological systems
COORDINATION CHEMISTRY REVIEWS 256 (2012) 125–132.
IF: 11,016; D1; független hivatkozások: 11; doi: 10.1016/j.ccr.2011.07.014

8.4. Az értekezésben felhasznált irodalom

- [1] WHO report: http://globocan.iarc.fr (2019.05.11.)
- [2] Y. Jung, S.J. Lippard, Chem. Rev. 107 (2007) 1387–1407.
- [3] K.D. Mjos, C. Orvig, Chem. Rev. 114 (2014) 4540–4563.
- [4] Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B., Bevezetés a Bioszervetlen Kémiába, Nemzeti Tankönyvkiadó (2007)
- [5] C. Orvig, M.J. Abrams, Chem. Rev. 99 (1999) 2201–2204.
- [6] K.H. Thompson, C. Orvig, Dalton Trans. (2006) 761–764.
- [7] J.C. Dabrowiak, Metals in Medicine, John Wiley & Sons, Ltd. (2009)
- [8] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, Nature 205 (1975) 698–699.
- [9] S. Ishida, J. Lee, D.J. Thiele, I. Herskowitz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 14298–14302.
- [10] L. Kelland, Nat. Rev. Cancer 8 (2007) 573–584.
- [11] R. Oun, Y.E. Moussa, N.J. Wheate, Dalton Trans. 47 (2018) 6645–6653.
- [12] Kásler M., Ottó Sz., Kenessey I., Orv. Hetil. 158 (2017) 84–89.
- [13] https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs (2019.05.11.)
- [14] R.K. Mehmood, J. Parker, S. Ahmed, E. Qasem, A.A. Mohammed, M. Zeeshan, E. Jehangir, World J. Oncol. 5 (2014) 97–108.
- [15] M. Galanski, Recent Pat. AntiCancer Drug Discov. 1 (2006) 285–295.
- [16] C. Monneret, Ann. Pharm. Fr. 69 (2011) 286–295.
- [17] U. Ndagi, N. Mhlongo, M.E. Soliman, Drug Des. Devel. Ther. 11 (2017) 599–616.
- [18] M.D Hall, T.W. Hambley, Coord. Chem. Rev. 232 (2002) 49–67.
- [19] X. Han, J. Sun, Y. Wang, Z. He, Med. Res. Rev. 35 (2015) 1268–1299.
- [20] I. Muhammad, W. Ayub, I.S. Butler, Z. Rehman, Coord. Chem. Rev. 376 (2018) 405–429.
- [21] M.J. Clarke, S. Bitler, D. Rennert, M. Buchbinder, A.D. Kelman, J. Inorg. Biochem. 12 (1980) 79– 87.
- [22] S.C. Srivastava, L.F. Mausner, M.J. Clarke, Prog. Clin. Biochem. Med. 10 (1989) 111–149.
- [23] B.K. Keppler, W. Rupp, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 111 (1986) 166–168.
- [24] E. Alessio, Eur. J. Inorg. Chem. 2017 (2017) 1549–1560.
- [25] G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni, E. Alessio, Anti-Cancer Drugs 3 (1992) 25–31.
- [26] G. Sava, A. Bergamo, Int. J. Oncol. 17 (2000) 353–365.
- [27] S. Leijen, S. A. Burgers, P. Baas, D. Pluim, M. Tibben, E. van Werkhoven, E. Alessio, G. Sava, J. H. Beijnen, J.H.M. Schellens, Invest. New Drugs 33 (2015) 201–214.
- [28] B.K. Keppler, M. Henn, U.M. Juhl, M.R. Berger, R. Niebl, F.E. Wagner, Prog. Clin. Biochem. Med. 10 (1989) 41–69.
- [29] R. Trondl, P. Heffeter, C.R. Kowol, M.A. Jakupec, W. Berger, B.K. Keppler, Chem. Sci. 5 (2014) 2925–2932.
- [30] H.A Burris, S. Bakewell, J.C. Bendell, J. Infante, S.F Jones, D.R Spigel, G.J Weiss, R.K. Ramanathan, A. Ogden, D. Von Hoff, ESMO Open 1 (2016) e000154.
- [31] J.B. Gifford, W. Huang, A.E. Zeleniak, A. Hindoyan, H. Wu, T.R. Donahue, R. Hill, Mol. Cancer Ther. 15 (2016) 1043–1052.
- [32] G.K. Gransbury, P. Kappen, C.J. Glover, J.N. Hughes, A. Levina, P.A. Lay, J.F. Musgrave, H.H. Harris, Metallomics 8 (2016) 762–773.
- [33] A. Küng, T. Pieper, R. Wissiack, E. Rosenberg, B.K. Keppler, J. Biol. Inorg. Chem. 6 (2001) 292–299.
- [34] M. J. Clarke, Coord. Chem. Rev. 236 (2003) 209–233.
- [35] A.A. Hummer, P. Heffeter, W. Berger, M. Filipits, D. Batchelor, G.E. Büchel, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, A. Rompel, J. Med. Chem. 56 (2013) 1182–1196.
- [36] A.R. Timerbaev, C.G. Hartinger, S.S. Aleksenko, B.K. Keppler, Chem. Rev. 106 (2006) 2224–2248.
- [37] F. Kratz, M. Hartmann, B. Keppler, L. Messori, J. Biol. Chem. 269 (1994) 2581–2588.
- [38] A.K. Bytzek, K. Boeck, G. Hermann, S. Hann, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, G. Koellensperger, Metallomics 3 (2011) 1049–1055.
- [39] K. Polec-Pawlak, J.K. Abramski, O. Semenova, C.G. Hartinger, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, M. Jarosz, Electrophoresis 27 (2006) 1128–1135.
- [40] N. Cetinbas, M.I. Webb, J.A. Dubland, C.J. Walsby, J. Biol. Inorg. Chem. 15 (2010) 131–145.
- [41] L. Zeng, P. Gupta, Y. Chen, E. Wang, L. Ji, H. Chao, Z.-S. Chen, Chem. Soc. Rev. 46 (2017) 5771– 5804.
- [42] K. Lin, Z.Z. Zhao, H.B. Bo, X.J. Hao, J.Q. Wang, Front. Pharmacol. 9 (2018) 1323.
- [43] F. Heinemann, J. Karges, G. Gasser, Acc. Chem. Res. 50 (2017) 2727–2736.
- [44] https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03053635 (2019.05.11.)

- [45] B. Serli, E. Zangrando, E. Iengo, G. Mestroni, L. Yellowlees, E. Alessio, Inorg.Chem. 41 (2002) 4033–4043.
- [46] B. Serli, E. Zangrando, T. Gianferrara, L. Yellowlees, E. Alessio, Coord. Chem. Rev. 245 (2003) 73–83.
- [47] J. R. Hickok, D. -D. Thomas, Curr. Pharm. Des. 16 (2010) 381-391.
- [48] N.N. Greenwood, A. Earnshaw, Az elemek kémiája I.-III., Nemzedékek Tudása Tankönyvkiadó, Budapest (2004).
- [49] P. Köpf-Maier, Eur. J. Clin. Pharmacol. 47 (1994) 1–16.
- [50] M.M. Harding, G. Mokdsi, Curr. Med. Chem. 7 (2000) 1289–1303.
- [51] P. Köpf-Maier, H. Köpf, E.W. Neuse, Angew. Chem. Int. Ed. 96 (1984) 456–457.
- [52] Y. Wang, P. Pigeon, S. Top, M.J. McGlinchey, G. Jaouen, Angew. Chem. Int. Ed. 54 (2015) 10230– 10233.
- [53] G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, J. Med. Chem. 54 (2011) 3–25.
- [54] C.G. Hartinger, N. Metzler-Nolte, P.J. Dyson, Organometallics 31 (2012) 5677–5685.
- [55] L.D. Dale, J.H. Tocher, T.M. Dyson, D.I. Edwards, D.A. Tocher, Anticancer Drug Des. 7 (1992) 3–14.
- [56] Y.N.V. Gopal, D. Jayaraju, A.K. Kondapi, Biochemistry 38 (1999) 4382–4388.
- [57] A. Bergamo, A. Masi, P.J. Dyson, G. Sava, Int. J. Oncol. 33 (2008) 1281–1289.
- [58] B. Wu, M.S. Ong, M. Groessl, Z. Adhireksan, C.G. Hartinger, P.J. Dyson, C.A. Davey, Chem. Eur. J. 17 (2011) 3562–3566.
- [59] P.J. Dyson, G. Sava, Dalton Trans. (2006) 1929–1933.
- [60] Z. Adhireksan, G.E. Davey, P. Campomanes, M. Groessl, C.M. Clavel, H. Yu, A.A. Nazarov, C.H.F. Yeo, W.-H. Ang, P. Dröge, U. Rothlisberger, P.J. Dyson, C.A. Davey, Nat. Commun. 5 (2014) article number: 3462.
- [61] R. Pettinari, F. Marchetti, F. Condello, C. Pettinari, G. Lupidi, R. Scopelliti, S. Mukhopadhyay, T. Riedel, P.J. Dyson, Organometallics 33 (2014) 3709–3715.
- [62] A.M. Pizarro, A. Habtemariam, P.J. Sadler, Top. Organomet. Chem. 32 (2010) 21–56.
- [63] S.M. Meier-Menches, C. Gerner, W. Berger, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, Chem. Soc. Rev. 47 (2018) 909–928.
- [64] P. Zhang, P.J. Sadler, J. Organomet. Chem. 839 (2017) 5–14.
- [65] R.E. Aird, J. Cummings, A.A. Ritchie, M. Muir, R.E. Morris, H. Chen, P.J. Sadler, D.I. Jodrell, Br. J. Cancer 86 (2002) 1652–1657.
- [66] Y.K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariama, P.J. Sadler, Chem. Commun. 0 (2005) 4764-4776.
- [67] R. Fernandez, M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons, P.J. Sadler, Chem. Eur. J. 10 (2004) 5173– 5179.
- [68] A.F. Peacock, A. Habtemariam, R. Fernández, V. Walland, F.P. Fabbiani, S. Parsons, R.E. Aird, D.I. Jodrell, P.J. Sadler, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 1739–1748.
- [69] H. Chen, J.A. Parkinson, S. Parsons, R.A. Coxall, R.O. Gould, P.J. Sadler, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 3064–3082.
- [70] F. Wang, H. Chen, J.A. Parkinson, P.S. Murdoch, P.J. Sadler, Inorg. Chem. 41 (2002) 4509–4523.
- [71] F.Y. Wang, J. Bella, J.A. Parkinson, P.J. Sadler, J. Biol. Inorg. Chem. 10 (2005) 147–155.
- [72] S.J. Dougan, M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons, P.J. Sadler, Inorg. Chem. 45 (2006) 10882– 10894.
- [73] W.F. Schmid, R.O. John, G. Muhlgassner, P. Heffeter, M.A. Jakupec, M. Galanski, W. Berger, V.B. Arion, B.K. Keppler, J. Med. Chem. 50 (2007) 6343–6355.
- [74] L.K. Filak, G. Muhlgassner, F. Bacher, A. Roller, M. Galanski, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, V.B. Arion, Organometallics 30 (2011) 273–283.
- [75] A.F.A. Peacock, S. Parsons, P.J. Sadler, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 3348–3357.
- [76] S.H. van Rijt, A. Mukherjee, A.M. Pizarro, P.J. Sadler, J. Med. Chem. 53 (2010) 840–849.
- [77] M. Kubanik, H. Holtkamp, T. Söhnel, S.M.F. Jamieson, C.G. Hartinger, Organometallics 34 (2015) 5658–5668.
- [78] M. Hanif, H. Henke, S.M. Meier, S. Martic, M. Labib, W. Kandioller, M.A. Jakupec, V.B. Arion, H.B. Kraatz, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, Inorg. Chem. 49 (2010) 7953–7963.
- [79] A. Kurzwernhart, W. Kandioller, C. Bartel, S. Bachler, R. Trondl, G. Muhlgassner, M.A. Jakupec,
 V.B. Arion, D. Marko, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, Chem. Commun. 48 (2012) 4839–4841.
- [80] M. Uršič, T. Lipec, A. Meden, I. Turel, Molecules 22 (2017) E326.
- [81] W. Kandioller, C.G. Hartinger, A.A. Nazarov, M.L. Kuznetsov, R.O. John, C. Bartel, M.A. Jakupec, V.B. Arion, B.K. Keppler, Organometallics 28 (2009) 4249–4251.
- [82] S.M. Meier, M. Hanif, Z. Adhireksan, V. Pichler, M. Novak, E. Jirkovsky, M.A. Jakupec, V.B. Arion, C.A. Davey, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, Chem. Sci. 4 (2013) 1837–1846.

- [83] F.A. Beckford, G. Leblanc, J. Thessing, M. Shaloski, B.J. Frost, L. Li, N.P. Seeram, Inorg. Chem. Commun. 12 (2009) 1094–1098.
- [84] P. Kumar, R.K. Gupta, D.S. Pandey, Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 707–733.
- [85] G. Süss-Fink, J. Organomet. Chem. 751 (2014) 2–19.
- [86] P.C.A. Bruijnincx, P.J. Sadler, Adv. Inorg. Chem. 61 (2009) 1–62.
- [87] J. Kljun, A.K. Bytzek, W. Kandioller, C. Bartel, M.A. Jakupec, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, I. Turel, Organometallics 30 (2011) 2506–2512.
- [88] P. Buglyó, E. Farkas, Dalton Trans. (2009) 8063–8070.
- [89] L. Bíró, E. Farkas, P. Buglyó, Dalton Trans. (2012) 285–291.
- [90] D.R. Robertson, T.A. Stephenson, J. Organomet. Chem. 116 (1976) C29–C30.
- [91] M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons, S.A. Moggach, P.J. Sadler, Inorg. Chim. Acta 359 (2006) 3020–3028.
- [92] L. Bíró, A.J. Godó, Z. Bihari, E. Garribba, P. Buglyó, Eur. J. Inorg. Chem. 2013 (2013) 3090–3100.
- [93] L. Bíró, E. Farkas, P. Buglyó, Dalton Trans. (2010) 10272–10278.
- [94] L. Bíró, D. Hüse, A.C. Bényei, P. Buglyó, J. Inorg. Biochem. 116 (2012) 116–125.
- [95] J. Patalenszki, L. Bíró, A.C. Bényei, T.R. Muchova, J. Kasparkova, P. Buglyó, RSC Adv. 5 (2015) 8094–8107.
- [96] Z. Bihari, Z. Nagy, P. Buglyó, J. Organomet. Chem. 782 (2015) 82–88.
- [97] Z. Bihari, V. Ugone, E. Garribba, N. Lihi, P. Buglyó, J. Organomet. Chem. 823 (2016) 116–125.
- [98] M. Hanif, M.V. Babak, C.G. Hartinger, Drug Discov. Today 19 (2014) 1640–1648.
- [99] Z. Liu, P.J. Sadler, Acc. Chem. Rev. 47 (2014) 1174–1185.
- [100] C.H. Leung, H.J. Zhong, D.S.H. Chan, D.L. Ma, Coord. Chem. Rev. 257 (2013) 1764–1776.
- [101] Y. Geldmacher, M. Oleszak, W.S. Sheldrick, Inorg. Chim. Acta 393 (2012) 84–102.
- [102] N. Katsaros, A. Anagnostopoulou, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 42 (2002) 297–308.
- [103] A. Taylor, N. Carmichael, Cancer Studies 2 (1953) 36–79.
- [104] M.J. Cleare, P.C. Hydes, Met. Ions Biol. Syst. 11 (1980) 1–62.
- [105] G. Mestroni, E. Alessio, A. Sessanta o Santi, S. Geremia, A. Bergamo, G. Sava, A. Boccarelli, A. Schettino, M. Coluccia, Inorg. Chim. Acta 273 (1998) 62–71.
- [106] Y. Geldmacher, K. Splith, I. Kitanovic, H. Alborzinia, S. Can, R. Rubbiani, M.A. Nazif, P. Wefelmeier, A. Prokop, I. Ott, S. Wölfl, I. Neundorf, W.S. Sheldrick, J. Biol. Inorg. Chem. 17 (2012) 631–646.
- [107] L. Dadci, H. Elias, U. Frey, A. Hörnig, U. Koelle, A.E. Merbach, H. Paulus, J.S. Schneider, Inorg. Chem. 34 (1995) 306–315.
- [108] A. Cusanelli, L. Nicula-Dadci, U. Frey, A.E. Merbach, Chimica 50 (1996) 618–620.
- [109] A.P. Abbott, G. Capper, D.L-. Davies, J. Fawcett, D.R.J. Russell, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1995) 3709–3713.
- [110] J. Markham, J. Liang, A. Levina, R. Mak, B. Johannessen, P. Kappen, C.J. Glover, B. Lai, S. Vogt, P.A. Lay, Eur. J. Inorg. Chem. 2017 (2017) 1812–1823.
- [111] A. Kurzwernhart, S. Mokesch, E. Klapproth, M.S. Adib-Ravazi, M.A. Jakupec, C.G. Hartinger, W. Kandioller, B.K. Keppler, Eur. J. Inorg. Chem. 2016 (2016) 240–246.
- [112] T.T. Thai, B. Therrien, G. Süss-Fink, Inorg. Chem. Comm. 12 (2009) 806–807.
- [113] U. Sliwinska, F.P. Pruchnik, S. Ułaszewski, M. Latocha, D. Nawrocka-Musiał, Polyhedron 29 (2010) 1653–1659.
- [114] S. Wirth, C.J. Rohbogner, M. Cieslak, J. Kazmierczak-Baranska, S. Donevski, B. Nawrot, I.P. Lorenz, J. Biol. Inorg. Chem. 15 (2010) 429–440.
- [115] M. Gras, B. Therrien, G. Süss-Fink, A. Casini, F. Edafe, P.J. Dyson, J. Organomet. Chem. 695 (2010) 1119–1125.
- [116] M.A. Scharwitz, I. Ott, Y. Geldmacher, R. Gust, W.S. Sheldrick, J. Organomet. Chem. 693 (2008) 2299–2309.
- [117] J.D. Blakemore, E.S. Hernandez, W. Sattler, B.M. Hunter, L.M. Henling, B.S. Brunschwig, H.B. Gray, Polyhedron 84 (2014) 14–18.
- [118] J.J. Soldevila-Barreda, I. Romero-Canelón, A. Habtemariam, P.J. Sadler, Nat. Commun. 6 (2015) Article number: 6582.
- [119] J.J. Soldevila-Barreda, A. Habtemariam, I. Romero-Canelón, P.J. Sadler, J. Inorg. Biochem. 153 (2015) 322–333.
- [120] M.R. Churchill, S.A. Julis, F.J. Rotella, Inorg. Chem. 16 (1977) 1137–1141.
- [121] M.S. Eisen, A. Haskel, H. Chen, M.M. Olmstead, D.P. Smith, M.F. Maestre, R.H. Fish, Organometallics 14 (1995) 2806–2812.
- [122] A. Nutton, P.M. Baily, P.M. Maitlis, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1981) 1997–2002.
- [123] S. Ogo, H. Chen, M.M. Olmstead, R.H. Fish, Organometallics 15 (1996) 2009–2013.

- [124] R.H. Fish, Coord. Chem. Rev. 185-186 (1999) 569–584.
- [125] D.P. Smith, H. Chen, S. Ogo, A.I. Elduque, M. Eisenstein, M.M. Olmstead, R.H. Fish, Organometallics 33 (2014) 2389–2404.
- [126] P. Buglyó, P.L. Parajdi-Losonczi, A.C. Bényei, N. Lihi, L. Bíró, E. Farkas, ChemistrySelect 2 (2017) 8127–8136.
- [127] P.L. Parajdi-Losonczi, P. Buglyó, H. Skakalova, J. Kasparkova, N. Lihi, E. Farkas, New J. Chem. 42 (2018) 7659–7670.
- [128] P. Collery, B.K. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 42 (2002) 283–296.
- [129] G. Bandoli, A. Dolmella, F. Tisato, M. Porchia, F. Refosco, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 56–77.
- [130] E.W. Price, C. Orvig, Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 260–290.
- [131] J.A. Lessa, G.L. Parrilha, H. Beraldo, Inorg. Chim. Acta 393 (2012) 53-63.
- [132] C.R. Chitambar, Pharmacol. Res. 115 (2017) 56–64.
- [133] B. Hacht, Bull. Korean Chem. Soc. 29 (2008) 372–376.
- [134] D.P. Kelsen, N. Alcock, S. Yeh, J. Brown, C. Young, Cancer 46 (1980) 2009–2013.
- [135] M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, Dalton Trans. (2008) 183– 194.
- [136] G.M. Knorr, C.R. Chitambar, Anticancer. Res. 18 (1998) 1733–1737.
- [137] C.R. Kowol, R. Berger, R. Eichinger, A. Roller, M.A. Jakupec, P.P. Schmidt, V.B. Arion, B. K. Keppler, J. Med. Chem. 50 (2007) 1254–1265.
- [138] L.R. Bernstein, Therapeutic Gallium Compounds; Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine; M. Gielen, B.R.T. Tiekink (Eds.). Wiley, London, (2005) 259–277.
- [139] L.R. Bernstein, T. Tanner, C. Godfrey, B. Noll, Metal-Based Drugs 7 (2000) 33–48.
- [140] L.R. Bernstein, Pharmacol. Rev. 50 (1998) 665–682.
- [141] https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00050687 (2019.05.11.)
- [142] W.R. Harris, V.L. Pecoraro, Biochemistry 22 (1983) 292–299.
- [143] E.N. Baker, P.F. Lindley, J. Inorg. Biochem. 47 (1992) 147–160.
- [144] J.B. Vincent, S. Love, Biochim. Biophys. Acta 1820 (2012) 362–378.
- [145] E.L. MacKenzie, K. Iwasaki, Y. Tsuji, Antioxid. Redox. Signal. 10 (2008) 997–1030.
- [146] J. Narasimhan, W.E. Antholine, C.R. Chitambar, Biochem. Pharmacol. 44 (1992) 2403–2408.
- [147] F. Wang, X. Jiang, D.C. Yang, R.L. Elliott, J.F. Head, Anticancer Res. 20 (2000) 799–808.
- [148] H. Schmidbaur, J. Lettenbauer, D.L. Wilkinson, G. Müller, O. Kumberger, Z. Naturforsch. 46b (1991) 901–911.
- [149] P. Collery, J.L. Domingo, B.K. Keppler, Anticancer Res. 16 (1996) 687–692.
- [150] R.D. Hofheinz, C. Dittrich, M.A. Jakupec, A. Drescher, U. Jaehde, M. Gneist, N. Graf von Keyserlingk, B.K. Keppler, A. Hochhaus, Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 43 (2005) 590–591.
- [151] M.A. Jakupec, B.K. Keppler, Curr. Top. Med. Chem. 4 (2004) 1575–1583.
- [152] U. Jungwirth, J. Gojo, T. Tuder, G. Walko, M. Holcmann, T. Schöfl, K. Nowikovsky, N. Wilfinger, S. Schoonhoven, C.R. Kowol, R. Lemmens-Gruber, P. Heffeter, B.K. Keppler, W. Berger, Mol. Cancer Ther. 13 (2014) 2436–2449.
- [153] A.A. Hummer, C. Bartel, V.B. Arion, M.A. Jakupec, W. Meyer-Klaucke, T. Geraki, P.D. Quinn, A. Mijovilovich, B.K. Keppler, A. Rompel, J. Med. Chem. 55 (2012) 5601–5613.
- [154] M. Groessl, A. Bytzek, C.G. Hartinger, Electrophoresis 30 (2009) 2720–2727.
- [155] A.V. Rudnev, L.S. Foteeva, C. Kowol, R. Berger, M.A. Jakupec, V.B. Arion, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, J. Inorg Biochem. 100 (2006) 1819–1826.
- [156] A.R. Timerbaev, Metallomics 1 (2009) 193–198.
- [157] R. Cusnir, C. Imberti, R.C. Hider, P.J. Blower, M.T. Ma, Int. J. Mol. Sci. 18 (2017) 116–139.
- [158] W.R. Harris, A.E. Martell, Inorg. Chem. 15 (1976) 713–720.
- [159] R.J. Motekaitis, A.E. Martell, Inorg. Chem. 19 (1980) 1646–1651.
- [160] J.R. Dilworth, R. Hueting, Inorg. Chim. Acta 389 (2012) 3–15.
- [161] H. Beraldo, D. Gambino, Mini-Rev. Med. Chem. 4 (2004), 31–39.
- [162] G. Pelosi, The Open Crystallograph. J. 3 (2010) 16–28.
- [163] T.S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 977–1055.
- [164] E.M. Bavin, R.J.W. Rees, J.M. Robson, M. Seiler, D.E. Seymour, D. Suddaby. J. Pharm. Pharmacol. 2 (1950) 764–772.
- [165] G.A. Kune, Br. Med. J. 2 (1964) 621.
- [166] R.W. Brockman, J.R. Thomson, M.J. Bell, H.E. Skipper, Cancer Res. 16 (1956) 167–170.
- [167] I.H. Krakoff, E. Etcubanas, C. Tan, K. Mayer, V. Bethune, J.H. Burchenal, Cancer Chemother. Rep. 58 (1974) 207–212.
- [168] S. Attia, J. Kolesar, M.R. Mahoney, H.C. Pitot, D. Laheru, J. Heun, W. Huang, J. Eickhoff, C. Erlichman, K.D. Holen, Invest. New Drugs 26 (2008) 369–379.
- [169] J. Kolesar, R.C. Brundage, M. Pomplun, D. Alberti, K. Holen, A. Traynor, P. Ivy, G. Wilding, Cancer Chemother. Pharmacol. 67 (2011) 393–400.
- [170] A.M. Merlot, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, Antioxid. Redox Signaling 18 (2013) 973–1006.
- [171] L. Feun, M. Modiano, K. Lee, J. Mao, A. Marini, N. Savaraj, P. Plezia, B. Almassian, E. Colacino, J. Fischer, S. MacDonald, Cancer Chemother. Pharmacol. 50 (2002) 223–229.
- [172] C.A. Kunos, E. Chu, J.H. Beumer, M. Sznol, S.P. Ivy, Cancer Chemother. Pharmacol. 79 (2017) 201–207.
- [173] J.E. Karp, F.J. Giles, I. Gojo, L. Morris, J. Greer, B. Johnson, M. Thein, M. Sznol, J. Low, Leuk. Res. 32 (2008) 71–77.
- [174] W.R. Schelman, S. Morgan-Meadows, R. Marnocha, F. Lee, J. Eickhoff, W. Huang, M. Pomplun, Z. Jiang, D. Alberti, J.M. Kolesar, P. Ivy, G. Wilding, A.M. Traynor, Cancer Chemother. Pharmacol. 63 (2009) 1147–1156.
- [175] K.Y. Salim, S.M. Vareki, W.R. Danter, J. Koropatnick, Oncotarget 7 (2016) 41363–41379.
- [176] Z.L. Guo, D.R. Richardson, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, K.C. Tan-Un, G.C. Chan, J. Hematol. Oncol. 9 (2016) article number: 98.
- [177] D.S. Kalinowski, P. Quach, D.R. Richardson, Future Med. Chem. 1 (2009) 1143–1151.
- [178] Y. Yu, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, A.R. Siafakas, P.J. Jansson, C. Stefani, D.B. Lovejoy, P.C. Sharpe, P. Bernhardt, D.R. Richardson, J. Med. Chem. 52 (2009) 5271–5294.
- [179] N.S. Moorthy, N.M. Cerqueira, M.J. Ramos, P.A. Fernandes, Mini-Rev. Med. Chem. 13 (2013) 1862–1872.
- [180] J. Shao, B. Zhou, A.J. Di Bilio, L. Zhu, T. Wang, C.Q.J. Shih, Y. Yen, Mol. Cancer Ther. 5 (2006) 586–592.
- [181] R.A. Finch, M. Liu, S.P. Grill, W.C. Rose, R. Loomis, K.M. Vasquez, Y. Cheng, A.C. Sartorelli, Biochem. Pharmacol. 59 (2000) 983–991.
- [182] M.L. Kuo, H.S. Hwang, P.R. Sosnay, K.A. Kunugi, T.J. Kinsella, Cancer J. 9 (2003) 277–285.
- [183] D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, Pharmacol. Rev. 57 (2005) 547–583.
- [184] T.B. Chaston, D.B. Lovejoy, R.N. Watts, D.R. Richardson, Clin. Cancer Res. 9 (2003) 402–414.
- [185] R.W. Byrnes, M. Mohan, W.E. Antholine, R.X. Xu, D.H. Petering, Biochemistry 29 (1990) 7046– 7053.
- [186] P.J. Jansson, P.C. Sharpe, P.V. Bernhardt, D.R. Richardson, J. Med. Chem. 53 (2010) 5759–5769.
- [187] D.B. Lovejoy, P.J. Jansson, U.T. Brunk, J. Wong, P. Ponka, D.R. Richardson, Cancer Res. 71 (2011) 5871–5880.
- [188] A. Gulea, D. Poirier, J. Roy, V. Stavila, I. Bulimestru, V. Tapcov, M. Birca, L. Popovschi, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 23 (2008) 806–818.
- [189] C.R. Kowol, P. Heffeter, W. Miklos, L. Gille, R. Trondl, L. Cappellacci, W. Berger, B.K. Keppler, J. Biol. Inorg. Chem. 17 (2012) 409–423.
- [190] J.L. Hickey, P.S. Donnelly, Coord. Chem. Rev. 256 (2012) 2367–2380.
- [191] A.R. Cowley, J.R. Dilworth, P.S. Donnelly, A.D. Gee, J.M. Heslop, Dalton Trans. (2004) 2404–2412.
- [192] F. Bisceglie, A. Musiari, S. Pinelli, R. Alinovi, I. Menozzi, E. Polverini, P. Tarasconi, M. Tavone, G. Pelosi, J. Inorg. Biochem. 152 (2015) 10–19.
- [193] J. Chen, Y. Huang, G. Liu, Z. Afrasiabi, E. Sinn, S. Padhye, Y. Ma, Toxicol. Appl. Pharmacol. 197 (2004) 40–48.
- [194] D.X. West, A.E. Liberta, Coord. Chem. Rev. 123 (1993) 49–71.
- [195] D.R. Richardson, P.C. Sharpe, D.B. Lovejoy, D. Senaratne, D.S. Kalinowski, M. Islam, P.V. Bernhardt, J. Med. Chem. 49 (2006) 6510–6521.
- [196] C.R. Kowol, R. Trondl, P. Heffeter, V.B. Arion, M.A. Jakupec, A. Roller, M. Galanski, W. Berger, B.K. Keppler, J. Med. Chem. 52 (2009) 5032–5043.
- [197] M. Merkofer, R. Kissner, R.C. Hider, W.H. Koppenol, Helv. Chim. Acta 87 (2004) 3021–3034.
- [198] I. Spasojević, S.K. Armstrong, T.J. Brickman, A.L. Crumbliss, Inorg. Chem. 38 (1999) 449-454.
- [199] D. Lide, Handbook of Chemistry and Physics, 86th edn. CRC. Taylor & Francis, Boca Raton (2005) 8–21.
- [200] A. Gaál, G. Orgován, Z. Polgári, A. Réti, V.G. Mihucz, S. Bősze, N. Szoboszlai, C. Streli, J. Inorg. Biochem. 130 (2014) 52–58.
- [201] E.W. Ainscough, A.M. Brodie, W.A. Denny, G.J. Finlay, J.D. Ranford, J. Inorg. Biochem. 70 (1998) 175–185.
- [202] W.E. Antholine, J.M. Knight, D.H. Petering, Inorg. Chem. 16 (1977) 569–574.
- [203] D.J. Leggett, W.A.E. McBryde, Talanta 21 (1974) 1005–1011.

- [204] D. Chuguryan, V. Dzyubenko, Radiokhim. 30 (1988) 171–177.
- [205] F. Kandemirli, J. Chem. Eng. Data 55 (2010) 2714–2718.
- [206] K. Brodowska, I. Correia, E. Garribba, F. Marques, E. Klewicka, E. Łodyga-Chruscińska, J.C. Pessoa, A. Dzeikala, L. Chrusciński, J. Inorg. Biochem. 165 (2016) 36–48.
- [207] M.S. El-Shahawi, W. Ahmad, G.I. Mohammed, Y.M. Moustafa, G.A. Al-Hazmi, A.A. El-Asmy, New J. Chem. 41 (2017) 4853–4861.
- [208] P.V. Bernhardt, M. Martínez, C. Rodríguez, M. Vazquez, Dalton Trans. 41 (2012) 2122–2130.
- [209] D.R. Richardson, D.S. Kalinowski, V. Richardson, P.C. Sharpe, D.B. Lovejoy, M. Islam, P.V. Bernhardt, J. Med. Chem. 52 (2009) 1459–1470.
- [210] C.R. Kowol, R. Eichinger, M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, B.K. Keppler, J. Inorg. Biochem. 101 (2007) 1946–1957.
- [211] M.M.B. Pessoa, G.F.S. Andrade, V.R.P. Monteiro, M.L.A. Temperini, Polyhedron 20 (2001) 3133– 3141.
- [212] A.K. Renfrew, Metallomics 6 (2014) 1324–1335.
- [213] S. E. Rosenbaum, Basic Pharmacokinetics and pharmacodynamics, Wiley, Hoboken (2017)
- [214] F.D. King, Medicinal Chemistry: Principles and Practice, Royal Society of Chemistry, Cambridge (2002)
- [215] O. Tacar, P. Sriamornsak, C.R. Dass, J. Pharm. Pharmacol. 65 (2013) 157–170.
- [216] R. Hajek, J. Vorlicek, M. Slavik, Neoplasma 43 (1996) 141–154.
- [217] D.E. Thurston, Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs, CRC Press, Boca Raton (2007)
- [218] O. Juan, S. Popat, Ther. Adv. Med. Oncol. 9 (2017) 201–216.
- [219] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Mol. Asp. Med. 33 (2012) 209–290.
- [220] T. Peters, All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications, Academic Press, San Diego (1996)
- [221] F. Kratz, J. Control. Release 132 (2008) 171–183.
- [222] M.T. Larsen, M. Kuhlmann, M.L. Hvam, K.A. Howard, Mol. Cell. Ther. 4 (2016)
- [223] B. Elsadek, F. Kratz, J. Controlled Release 157 (2012) 4–28.
- [224] G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, Mol. Pharmacol. 11 (1975) 824-832.
- [225] F. Zsila, Mol. Pharmaceutics 10 (2013) 1668–1682.
- [226] http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do, (2019.05.11.)
- [227] L.L.C. Schrödinger, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.1r1.
- [228] W. Bal, M. Sokołowska, E. Kurowska, P. Faller, Biochim. Biophys. Acta 1830 (2013) 5444–5455.
- [229] W.R. Harris, L. Messori, Coord. Chem. Rev. 228 (2002) 237–262.
- [230] P. Aisen, A. Leibman, J. Zweier, J. Biol. Chem. 253 (1978) 1930–1936.
- [231] G. Berthon, Handbook of Metal Ligand Interactions in Biological Fluids, Vol 1-4; Marcel Dekker, New York (1995)
- [232] R.A. Zelonka, M.C. Baird, Can. J. Chem. 50 (1972) 3063–3072.
- [233] M.A. Santos, É.A. Enyedy, E. Nuti, A. Rossello, N.I. Krupenko, S.A. Krupenko, Bioorg. Med. Chem. 15 (2007) 1266–1274.
- [234] G.H. Beaven, S. Chen, A. D'Albis, W.B. Gratzer, Eur. J. Biochem. 42 (1974) 539–546.
- [235] N.D. Chasteen. Adv. Inorg. Chem. 5 (1983) 201–233.
- [236] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, Talanta 43 (1996) 1739–1753.
- [237] L. Zékány, I. Nagypál, D.L. Leggett (Ed.), Computational Methods for the Determination of Stability Constants, Plenum Press, New York, (1985) 291–353.
- [238] I. Puigdomenech, Medusa, https://www.kth.se/che/medusa, (2019.05.11.)
- [239] SCQuery, The IUPAC Stability Constants Database, Academic Software (Ver. 5.5), R. Soc. Chem. (1993–2005)
- [240] H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Pettit, Anal. Chim. Acta 38 (1967) 475–488.
- [241] J. Felcman, J.F. Da Silva, Talanta 30 (1983) 565–570.
- [242] J.R. Lakowicz, Topics in Fluorescence Spectroscopy Volume 6: Protein Fluorescence, Kluwer Academic Publishers, Boston (2002)
- [243] C.F. Chignell, Mol. Pharmacol. 5 (1969) 244–252.
- [244] N. Muller, F. Lapicque, E. Drelon, P. Netter, J. Pharm. Pharmacol. 46 (1994) 300–304.
- [245] B. Valeur, Molecular fluorescence principles and applications, 1st ed. Wiley-VCH, Weinheim (2001)
- [246] H.X. Zhang, X. Huang, P. Mei, K.H. Li, C.N. Yan, J. Fluoresc. 16 (2006) 287–294.
- [247] H. Holtkamp, C.G. Hartinger, Drug Discov. Today Technol. 16 (2015) 16–22.
- [248] L. Trynda-Lemiesz, A. Karaczyn, B.K. Keppler, H. Kozłowski, J. Inorg. Biochem. 78 (2000) 341– 346.

- [249] A. Levina, J.B. Aitken, Y.Y. Gwee, Z.J. Lim, M. Liu, A.M. Singharay, P.F. Wong, P.A. Lay, Chemistry 19 (2013) 3609–3619.
- [250] C.G. Hartinger, M.A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessl, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P.J. Dyson, B.K. Keppler, Chem. Biodiversity 5 (2008) 2140–2155.
- [251] T.C. Pinkerton, K.A. Koeplinger, Anal. Chem. 62 (1990) 2114–2122.
- [252] D.E. Epps, T.J. Raub, F.J. Kézdy, Anal. Biochem. 227 (1995) 342–350.
- [253] R.A. Weisiger, J.D. Ostrow, R.K. Koehler, C.C. Webster, P. Mukerjee, L. Pascolo, C. Tiribelli, J. Biol. Chem. 276 (2001) 29953–29960.
- [254] G.E. Büchel, A. Gavriluta, M. Novak, S.M. Meier, M.A. Jakupec, O. Cuzan, C. Turta, J.B. Tommasino, E. Jeanneau, G. Novitchi, D. Luneau, V.B. Arion, Inorg. Chem. 52 (2013) 6273–6285.
- [255] É.A. Enyedy, L. Horváth, K. Gajda-Schrantz, G. Galbács, T. Kiss, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1936–1945.
- [256] V. Monga, B.O. Patrick, C. Orvig, Inorg. Chem. 44 (2005) 2666–2677.
- [257] B. Song, K. Saatchi, G.H. Rawji, C. Orvig, Inorg. Chim. Acta 339 (2002) 393–399.
- [258] S. Tsakovski, K. Benkhedda, E. Ivanova, F.C. Adams, Anal. Chim. Acta 453 (2002) 143–154.
- [259] P. Letkeman, A.E. Martell, R.J. Motekaitis, J. Coord. Chem. 10 (1980) 47–53.
- [260] O. Jarjayes, S. Hamman, F. Sarrazin, T. Benaissa, C.G. Beguin, New J. Chem. 22 (1998) 361–366.
- [261] M. Amati, S. Belviso, P.L. Cristinziano, C. Minichino, F. Lelj, I. Aiello, M. La Deda, M. Ghedini, J. Phys. Chem. A 111 (2007) 13403–13414.
- [262] M. Born, Z. Phys. 1 (1920) 45–48.
- [263] E.M. Filip, I.V. Humelnicu, C.I. Ghirvu, Acta Chem. Iasi 17 (2009) 85–96.
- [264] F. Zhang, X. Liu, F. Huang, Z. Zhuo, L. Lu, Z. Xu, Y. Wang, X. Tao, W. Bian, W. Tang, Chin. Sci. Bull. 56 (2011) 479–483.
- [265] W.R. Harris, Z. Wang, Y.Z. Hamada, Inorg. Chem. 42 (2003) 3262–3273.
- [266] N.G. James, C.L. Berger, S.L. Byrne, V.C. Smith, R.T. MacGillivray, A.B. Mason, Biochemistry 46 (2007) 10603–10611.
- [267] E. Farkas, E. Kozma, T. Kiss, I. Toth, B. Kurzak, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1995) 477-481.
- [268] C.R. Kowol, R. Trondl, V.B. Arion, M.A. Jakupec, I. Lichtscheidl, B.K. Keppler, Dalton Trans. 39 (2010) 704–706.
- [269] L.C. Königsberger, E. Königsberger, G. Hefter, P.M. May, Dalton Trans. 44 (2015) 20413–20425.
- [270] S. Hager, K. Korbula, B. Bielec, M. Grusch, C. Pirker, M. Schosserer, L. Liendl, M. Lang, J. Grillari, K. Nowikovsky, V.F.S Pape, T. Mohr, G. Szakács, B.K. Keppler, W. Berger, C.R. Kowol, P. Heffeter, Cell Death Dis. 9 (2018) 1052.
- [271] A.M. Albrecht-Gary, A.L. Crumbliss, in: H. Sigel, A. Sigel (Eds.), Metal Ions in Biological Systems, vol.35, Marcel-Dekker, New York (1998)
- [272] C.R. Chitambar, W.E. Antholine, Antioxid Redox Signal. 18 (2013) 956–972.
- [273] J. Qi, Q. Yao, K. Qian, L. Tian, Z. Cheng, D. Yang, Y. Wang, Eur. J. Med. Chem. (2018) 91–100.
- [274] K. Yamasaki, V.T.G. Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri, Biochim. Biophys. Acta 1830 (2013) 5435–5443.
- [275] B.S. Creaven, E. Czeglédi, M. Devereux, É.A. Enyedy, A. Foltyn-Arfa Kia, D. Karcz, A. Kellett, S. McClean, N.V. Nagy, A. Noble, A. Rockenbauer, T. Szabó-Plánka, M. Walsh, Dalton Trans. 39 (2010) 10854–10865.
- [276] K.J. Fehske, U. Schläfer, U. Wollert, W.E. Müller, Mol. Pharmacol. 21 (1982) 387–393.
- [277] A.M. Zatón, J.M. Ferrer, J.C. Ruiz de Gordoa, M.A. Marquinez, Chem. Biol. Interact. 97 (1995) 169–174.
- [278] J. Ghuman, P.A. Zunszain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry, J. Mol. Biol. 353 (2005) 38–52.
- [279] C.P. Leamon, J.A. Reddy, Adv. Drug Deliv. Rev. 56 (2004) 1127–1141.
- [280] C.T. Supuran, A. Casini, A. Scozzafava, Med. Res. Rev. 23 (2003) 535–558.
- [281] H.S. Rasmussen, P.P. McCann, Pharmacol. Ther. 75 (1997) 69–75.
- [282] S.V. Sharma, D.W. Bell, J. Settleman, D.A. Haber, Nat. Rev. Cancer 7 (2007) 169–181.
- [283] D.E. Thurston, Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs, CRC Press, Boca Raton (2007)
- [284] O. Juan, S. Popat, Ther. Adv. Med. Oncol. 9 (2017) 201–216.
- [285] Astra Zeneca/Iressa: Product monograph, https://www.astrazeneca.ca/content/dam/azca/downloads/productinformation/iressa-productmonograph-en.pdf, (2019.05.11.)
- [286] Roche product information/Tarceva: Product monograph, http://www.rochecanada.com/content/dam/rochecanada/enCA/documents/Research/ClinicalTrialsFo rms/Products/ConsumerInformation/MonographsandPublicAdvisories/Tarceva/Tarceva PME.pdf, (2019.05.11.)

- [287] Boehringer human pharmaceuticals/Giotrif: Product monograph, https://www.boehringeringelheim.ca/sites/ca/files/documents/giotrifpmen.pdf, (2019.05.11.)
- [288] Astra Zeneca/Tagrisso, Product Monograph, https://www.astrazeneca.ca/content/dam/azca/downloads/productinformation/tagrisso-productmonograph-en.pdf, (2019.05.11.)
- [289] B. Zhitomirsky, Y.G. Assaraf, Drug Resist. Updat. 24 (2016) 23–33.
- [290] M.Z. Kabir, W.V. Tee, S.B. Mohamad, Z. Alias, S. Tayyab, RSC Adv. 6 (2016) 91756–91767.
- [291] Z. Ye, Y. Ying, X. Yang, Z. Zheng, J. Shi, Y. Sun, P. Huang, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 78 (2014) 405–413.
- [292] A.M. Alanazi, A.S. Abdelhameed, PLoS One 11 (2016) e0146297.

Köszönetnyilvánítás

Hálás szívvel köszönöm Prof. Kiss Tamásnak, hogy az általa vezetett Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban kezhettem el dolgozni közel 14 évvel ezelőtt Szegeden, és azt, hogy munkámat mind szakmailag, mind emberileg folyamatosan támogatatta. Köszönöm Prof. Farkas Etelkának pályám elindítását és hogy a Vele való közös munka életreszóló útmutatást adott a szakmai céljaim megvalósításához. Megkülönböztetett köszönettel tartozok Dr. Dömötör Orsolyának a kitartó és lelkiismeretes munkájáért, mellyel nagyban hozzájárult az értekezésben összefoglalt eredmények megszületéséhez.

Szeretném megköszönni a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport minden jelenlegi és volt tagjának, valamint a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék vezetőjének, Prof. Galbács Gábornak és munkatársainak, hogy munkámat támogatták és folyamatosan bíztattak. Nagyon örülök, hogy egy elismert és színvonalas kutatóhelyen végezhetem munkámat.

Köszönet illeti valamennyi végzett és jelenlegi PhD, diplomamunkás és szakdolgozó hallgatómat munkájukért, kiemelve Mészáros János Péter PhD hallgatót. Köszönöm Szűcsné Tóth Katalin technikus közreműködését. Munkájukkal jelentősen hozzájárultak a dolgozatban tárgyalt eredményekhez.

Köszönöm a velem együttműködő számos hazai és külföldi kolléga munkáját, kiemelve Prof. Bernhard K. Kepplert (Bécsi Egyetem, Szervetlen Kémia Intézet) és Dr. May Nóra Veronikát (MTA TTK, Budapest), akikkel nagyon eredményes munkakapcsolatot sikerült kialakítani az elmúlt évtizedben.

Köszönöm a Magyar Tudományos Akadémia (Bolyai János Kutatási Ösztöndíj), az OTKA/NKFIA (FK124240, PD103905, PD050011), az Új Nemzeti Kiválósági Ösztöndíj és a GINOP-2.3.2-15-2016-00038 pályázatok anyagi támogatását.

Töretlen szeretekükért és támogatásukért nagyon hálás vagyok szüleimnek, és külön köszönöm Édesanyámnak, hogy megszerettette velem a kémiát első kémia tanáromként és hogy példát mutatott az élet minden területén. Köszönöm Adrienn önzetlen és kitartó segítségét.

Hálával tartozok férjemnek, Hollender Dominiknak és a két kincsünknek, akik szeretetükkel átsegítenek minden nehézségen, és akik nélkül nem az lennék, aki vagyok.

Az értekezést Édesanyám emlékének ajánlom.