

Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA). A MEKC vizsgálatok során első lépésben a kapillárist 5-5 percig 0,1 M NaOH és puffer oldatokkal prekondicionáltuk (puffer: 25 mM borát, 70 mM SDS, pH=9,1), majd a biológiai minták elválasztást követően 0,5 M NaOH (3 perc) és puffer (4 perc) oldatokkal mostuk az esetlegesen visszamaradó szennyezők eltávolítására. A vizsgálatok során jól zárt mintatartóban elhelyezett 2,0 mM [Gd(DTPA-BMA)] komplexet tartalmazó pH=7,4-es vérplazma mintákat 37°C-on inkubáltuk. A vérplazma mintákból időközönként kivett oldatokat MEKC módszerrel tanulmányoztuk. Az általunk alkalmazott kísérleti körülmények mellett a teljes elválasztási idő 12 perc volt, míg a [Gd(DTPA-BMA)] komplex disszociációja ilyen feltételek mellett több óra, így a mérés körülményei nem befolyásolták a reakciót. A kísérleti körülmények kiválasztásakor számos előkísérletet elvégeztünk a [Gd(DTPA-BMA)] komplex disszociációja és a Ca(II)-, Zn(II)- és [Cu(DTPA-BMA)] komplexek képződése $\geq 2,0$ mM Gd(DTPA-BMA) oldatban tanulmányozható megfelelő pontossággal.

- 2) A ligandumokból készített törzsoldatok pontos koncentrációját pH-potenciometriás titrálással Ca(II)-ion felesleg (40-szeres) jelenlétében és távollétében felvett titrálási görbékből számítottuk, figyelembe véve a protonálódási lépcsőknek megfelelő ekvivalens lúgmennyiséget. A Ca(II)-felesleg jelenlétében végzett titrálások során a komplexképződéssel párhuzamosan „leszorul” a ligandumról az összes disszociábilis proton, így meghatározhatjuk a ligandumhoz tartozó teljes protonkoncentrációt. A viszonylag nagy Ca(II)-ion felesleg nem zavarja a meghatározást, mivel a Ca(II)-ion hidrolízise csak nagy pH értékeknél következik be. A viszonylag nagy Ca(II)-ion felesleg alkalmazása garantálja a Ca(II)-komplexek képződését olyan ligandumok esetében is, amelyek viszonylag kis Ca(II)-ion affinitással bírnak.
- 3) A Ga(III)-, Sc(III)- és Ln(III)-komplexek oldatfázisú szerkezetét, dinamikai folyamatait és képződését változtatott hőmérsékletű 1D (^1H ^{13}C) és 2D (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC és ^1H - ^{13}C HMBC) NMR spektroszkópiás módszerekkel vizsgáltuk. Az általunk tanulmányozott Ga(III)-, Sc(III)- és Ln(III)-komplexek több izomerje fordulhat elő oldatfázisban, amelyek átalakulhatnak egymásba (pl. konformációs és koordinációs izomerek). A Ga(III)-, Sc(III)- és Ln(III)-komplexek izomerizációs folyamatait jellemző sebességi állandókat a változtatott hőmérsékletű multinukleáris NMR spektroszkópiás vizsgálatok segítségével határoztuk meg, míg a kinetikai és aktiválási paramétereket (ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger) a sebességi állandók ismeretében az *Eyring* egyenlettel számítottuk.
- 4) A [Gd(DOTA)]⁻, [Gd(BT-DO3A)], [Gd(HP-DO3A)] és [Gd(HB-DO3A)] komplexek vízben nem oldódó Type I kollagénnel (Bovin Achilles tendon) kialakított kölcsönhatásait ultraszűrőssel és dialízissel vizsgáltuk (pH=7,4, 0,001 M Na₂HPO₄, 0,15 M NaCl, 37°C). A Gd(III)-komplexek kollagén felületén történő adszorbeiója *Langmuir* izotermával jellemezhető. A Gd(III)-komplexek Type I kollagén felületén történő adszorbeió-deszorbeió folyamatát jellemző egyensúlyi állandók a (log*b*) 2,41 – 2,55 tartományban találhatóak. Köztudott, hogy a hemoglobin bomlásakor képződő bilirubin erős elektrosztatikus kölcsönhatást alakíthat ki kollagénnel (log*b*=3,73), ami a

bőr sárga elszíneződését eredményezi.¹ Ennek megfelelően feltételezhető, hogy a makrociklusos Gd(III)-komplexek Type I kollagénnel gyenge elektrosztatikus kölcsönhatást alakíthatnak ki.

5) A La(III)-, Nd(III)- és [Gd(AAZTA)]⁻ komplexek röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatai alapján szilárd fázisban dimerek képződnek. A dimer szerkezetű [Ln(AAZTA)(H₂O)]₂²⁻ molekulában Ln(III)-ionhoz torzult kétszeresen fedett négyzetes antiprizmás elrendezésben három nitrogén, három karboxilát és egy belső szférás vízmolekula oxigén monodentátként koordinálódik, míg a negyedik karboxilát és a szomszédos [Ln(AAZTA)]⁻ komplex egyik karboxilát oxigén donoratomja hídhelyzetben bidentátként koordinálódik mindkét központi fémionhoz szokatlan, tízes koordinációjú Ln(III)-iont eredményezve. Mivel a monomer ([Gd(AAZTA)(H₂O)]⁻) és dimer ([Gd(AAZTA)(H₂O)]₂²⁻) szerkezetű Gd(III)-komplexben kettő és egy belső szférás vízmolekula található Gd(III)-iononként, így a Gd(III)-komplex relaxivitásának koncentráció függése során a kapott $r_{1\rho}$ értékek csökkennének a dimer szerkezetű [Gd(AAZTA)(H₂O)]₂²⁻ komplex mennyiségének növekedésével. Azonban a kapott $r_{1\rho}$ értékek monoton nőnek a Gd(III)-komplex koncentrációjának növekedésével igazolva a monomer szerkezetű [Gd(AAZTA)(H₂O)]⁻ komplex kizárólagos jelenlétét oldatban [GdL]=0,1 – 4,0 mM tartományban. A ¹⁷OH₂ víz ¹⁷O NMR jelének Dy(III)-komplex indukált eltolódása szintén alátámasztotta a két belső szférás vízmolekulát tartalmazó [Dy(AAZTA)(H₂O)]₂⁻ komplex dominanciáját széles koncentráció tartományban ([DyL]=0 – 90 mM).²

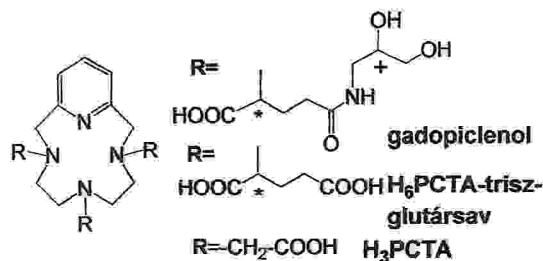
6) Az elmúlt 10-15 évben számos aggodalom merült fel a Gd(III)-komplexek MRI kontrasztanyagkénti alkalmazásával és a Gd(III)-komplexek *in vivo* akkumulációjával kapcsolatban. A makrociklusos Gd(III)-komplexek *in vivo* retenciójának felismerését követően számos humán és állatkísérlet segítségével igazolták, hogy a Gd³⁺ szervezetbeli akkumulációja intakt Gd(III)-komplex formájában történik szemben a nyíltláncú [Gd(DTPA)]²⁻ és származékaival, amelyek esetében a Gd(III)-komplexek disszociációját követően a szabaddá vált Gd³⁺ felhalmozódása is bekövetkezhet különböző szervekben és szövetekben (máj, lép, vese, csont és agy). Ennek megfelelően a Bayer-Schering Pharma, a Guerbet és a Bracco Imaging gyógyszervállalatok olyan új típusú Gd(III)-komplexek fejlesztésébe kezdtek, amelyek lényegesen nagyobb relaxivitással rendelkeznek, mint a klinikai gyakorlatban jelenleg is használt MRI kontrasztanyagok, így esetükben az alkalmazott dózis csökkentésével (≤0,05 mmol/kg testsúly) jelentősen mérsékelhető a Gd³⁺ élő szervezeten belüli felhalmozódása. A Gd(III)-komplexek fejlesztése során nem csak a relaxációs sajátosságok optimalálására, hanem biztonságos alkalmazásukat befolyásoló egyensúlyi, kinetikai és szerkezeti tulajdonságaik javítására is törekszenek.

Munkánk során részletesen tanulmányoztuk a PCTA-trisz-glutársav ligandum (2. ábra) Gd(III)-komplexének egyensúlyi, disszociáció kinetikai, relaxációs és szerkezeti sajátosságait. A PCTA ligandummal képződő Gd(III)-komplex belső szférájában két

¹ U. Nagarajan, J. G. Christopher, B. Chandrasekaran, R. R. Jonnalagadda, U. N. Balachandran, K. Kohsaku, *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *61*, 404 – 410.

² S. Aime, L. Calabi, C. Cavallotti, E. Gianolio, G. B. Giovenzana, P. Losi, A. Maiocchi, G. Palmisano, M Sisti, *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 7588-7590.

vízmolekula található $[\text{Gd}(\text{PCTA})(\text{H}_2\text{O})_2]$, amelyek gyors csere folyamatokban vesznek részt az oldószer vízmolekulákkal.³ Azonban a $[\text{Gd}(\text{PCTA})(\text{H}_2\text{O})_2]$ komplex termodinamikai stabilitása és kinetikai inertsége nem teszi lehetővé *in vivo* alkalmazását.⁴



2. ábra A PCTA, PCTA-trisz-glutársav és gadopipiclenol ligandumok szerkezete

Meglepő módon a $[\text{Gd}(\text{PCTA-trisz-glutarát})(\text{H}_2\text{O})_2]$ komplex lényegesen nagyobb kinetikai inertséggel rendelkezik, mint a $[\text{Gd}(\text{PCTA})(\text{H}_2\text{O})_2]$ komplex. Igazoltuk, hogy az oldalláncban található királis szénatomok konfigurációja jelentősen befolyásolhatja a $[\text{Gd}(\text{PCTA-trisz-glutarát})(\text{H}_2\text{O})_2]$ komplex termodinamikai és kinetikai sajátosságait. A lehetséges 8 diasztereomer közül a RRR/SSS $[\text{Gd}(\text{PCTA-trisz-glutarát})(\text{H}_2\text{O})_2]$ komplex közel 5-ször inertebb, mint a $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ komplex (Gd(DOTA): $t_{1/2}=23$ óra, $[\text{Gd}(\text{PCTA-trisz-glutarát})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (RRR/SSS): $t_{1/2}=120$ óra, 1 M HCl, 25°C). A RRR/SSS $[\text{Gd}(\text{PCTA-trisz-glutarát})(\text{H}_2\text{O})_2]$ komplex kiugróan nagy kinetikai inertsége már önmagában is meglepő, mivel a PCTA-trisz-glutársav ligandum 7 donortomja vesz csak részt a Gd(III)-ion koordinációjában, míg a távoli karboxilát csoportok nem koordinálnak a Gd(III)-ionhoz. A kiugróan nagy kinetikai inertség mellett a RRR/SSS $[\text{Gd}(\text{PCTA-trisz-glutarát})(\text{H}_2\text{O})_2]$ komplex relaxivitása is lényegesen meghaladja a racem $[\text{Gd}(\text{PCTA-trisz-glutarát})(\text{H}_2\text{O})_2]$ és $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ komplexek relaxivitását ($[\text{Gd}(\text{PCTA-trisz-glutarát})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (RRR/SSS): $r_{1p}=9,3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $[\text{Gd}(\text{PCTA-trisz-glutarát})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (racem): $r_{1p}=7,2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$: $r_{1p}=3,4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, H_2O , 0,5 T, 37°C). Az RRR/SSS $[\text{Gd}(\text{PCTA-trisz-glutarát})(\text{H}_2\text{O})_2]$ komplex biokompatibilitásának növelése érdekében a Gd(III)-ionhoz nem koordinálódó távoli karboxilát csoportokat amidáltuk izoszerinollal (3-amino-1-2-propándiol). A három izoszerinol egység 16 gadopipiclenol izomer képződését teszi lehetővé RRR/SSS $[\text{Gd}(\text{PCTA-trisz-glutarát})(\text{H}_2\text{O})_2]$ komplexből kiindulva. Azonban a távoli izoszerinol egységek kiralitása nem befolyásolja a gadopipiclenol ligandummal képződő Gd(III)-komplex kinetikai inertségét. Meglepő módon a RRR/SSS gadopipiclenol komplex relaxivitása jelentősen meghaladja a teljesen racem gadopipiclenol relaxivitását (gadopipiclenol (RRR/SSS): $r_{1p}=13,0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, gadopipiclenol (racem): $r_{1p}=11 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, H_2O , 0,5 T, 37°C), ami lényegesen kisebb dózissal alkalmazás esetén is (0,05 mmol/kg testsúly) a jelenleg alkalmazott makrociklusos $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$, $[\text{Gd}(\text{HP-DO3A})(\text{H}_2\text{O})]$ és $[\text{Gd}(\text{BT-DO3A})(\text{H}_2\text{O})]$ komplexek 0,1 mmol/kg dózissal felhasználása során kapott kontraszt hatást eredményez.⁵

³ S. Aime, M. Botta, S. G. Crich, G. B. Giovenzana, G. Jommi, R. Pagliarin, M. Sisti, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 2992-3000

⁴ Gy. Tircsó, Z. Kovács, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9269-9280

⁵ R. Napolitano, L. Lattuada, Zs. Baranyai, N. Guidolin, G. Marazzi, WO2020030618

- 7) Egyetérttek a bírálóval, hogy képződő $[\text{Cu}_2(\text{EBTA})(\text{H}_2\text{O})_3]$ oldatfázisú képződésének alátámasztása érdekében más módszerekkel is tanulmányozhattuk volna a Cu(II) – EBTA rendszereket. Azonban a bíráló által javasolt ESR spektroszkópia és ESI-MS módszerek se nyújtanak közvetlen bizonyítékot a Cu(II) – EBTA rendszer oldatfázisú összetételére az általában alkalmazott vizsgálati körülmények miatt (ESR: folyékony nitrogénben fagyasztott minták (77 K), ESI-MS: oldószer elpárologtatás 300°C-on, nagy vákuum és ionizáció). Azonban a kétmagvú $[\text{Cu}_2\text{L}]$, $[\text{Cu}_2(\text{L})\text{H}_{-1}]$ és $[\text{Cu}_2(\text{L})\text{H}_{-1}]$ részecskék ^1H NMR spektroszkópiás módszerrel vélhetően tanulmányozhatók a Cu(II)-ionok között kialakuló elektron spin kölcsönhatások miatt, ami részlegesen diamágneses Cu(II)-komplexek képződését eredményezheti.
- 8) Az opponensnek igaza van abban, hogy a különböző Ga(III)-, Sc(III)- és Ln(III)-komplexek oldatfázisú szerkezetének értelmezése megkívánja az NMR spektrumok bemutatását, amelyre helyhiány miatt sajnos nem került sor. A Ga(III) – DOTA és Ln(III) – DOTA rendszerek esetében az ^1H NMR spektrumok elengedhetetlenek a $[\text{Ga}(\text{DOTA})]^-$ és $[\text{Ln}(\text{DOTA})]^-$ komplexek képződési mechanizmusának igazolásához (119 – 120 oldal, 48., 49. és 50. ábra).
- 9) A bírálóval egyetérttek abban, hogy a különböző bázicitású ligandumok fémion affinitását legegyszerűbb adott körülményre definiált (pl. $[\text{M}^{n+}]_{\text{tot}}=1 \mu\text{M}$, $[\text{L}]_{\text{tot}}=10 \mu\text{M}$, $\text{pH}=7,4$)⁶ látszólagos stabilitási állandóval összehasonlítani. Ugyanakkor a javasolt feltételek távol állnak az *in vivo* vizsgálatokban alkalmazott körülményektől (pl. a szabad ligandum toxikus hatású lenne). Másrészt a stabilitási és protonálódási állandók ismeretében az adott komplex bármilyen körülményre definiált látszólagos stabilitási állandója könnyen számítható. Az általunk vizsgált pH érzékeny MRI kontrasztanyagok ligandumai az oldalláncban szulfonamid, primer, szekunder és tercier amino-csoportokat tartalmaznak, amelyek deprotonálódásukat követően koordinálnak a Gd(III)-ionhoz a belső szférában található vízmolekulákat helyettesítve (13. táblázat). Mivel a Gd(III)-komplexek látszólagos stabilitását lényegesen befolyásolja a protonált részecskék képződése, így a legkisebb protonálódási állandóval rendelkező szulfonamid, primer, szekunder és tercier amino-csoportokat tartalmazó Gd(III)-komplexek rendelkeznek a legnagyobb pM értékekkel, de pH-érzékeny MRI kontrasztanyagkénti felhasználásuk nem lehetséges a fiziológiás pH tartományban már deprotonált és Gd(III)-ionhoz koordinált donatoratomok miatt.
- 10) A különböző Ga(III)-komplexek fizikai-kémiai sajátosságainak vizsgálatát a ^{68}Ga alapú PET radiofarmakonok fejlesztésének céljából végeztük. Mivel a $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ -komplexek PET célú felhasználása radiokémiai koncentráció tartományban történik (10^{-12} – 10^{-10} M), így esetükben citotoxicitás kiváltására nincs lehetőség. Az általunk tanulmányozott Ga(III)-komplexek citotoxicitását nem vizsgáltuk.
- 11) Az AAZTA és DOTA ligandumok c(RGDfK), TATE és PSMA konjugátumai Ga(III)-, Sc(III)- és Bi(III)-komplexeinek *in vitro* receptor affinitás vizsgálati alátámasztották, hogy a DOTA-biokonjugátum komplexek lényegesen kisebb affinitással rendelkeznek, mint az analóg AAZTA-biokonjugátum komplexek az adott receptorhoz. Mivel a

⁶ V. C. Pierre, M. Melchior, D. M. J. Doble, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 8520-8525

biológiailag aktív fragmensek megegyeznek, így az AAZTA- és DOTA-biokonjugátumok Ga(III)-, Sc(III)- és Bi(III)-komplexeinek eltérő integrin, szomatosztatin és PSMA receptor affinitását feltételezhetően a ligandumok ill. azok fémkomplexei eddig nem azonosított eltérései eredményezhetik.^{7,8}

12) Jelenleg több Mn(II)-komplex klinikai vizsgálata is folyamatban van. Közülük a [Mn(PyC3A)]⁻ (RVP-001) klinikai egyes fázisának befejezésére 2022 augusztusában került sor. A jelenleg futó klinikai vizsgálatok közül a legérdekesebb a májvizsgálatokra javasolt szájon át szedhető MnCl₂ × 4 H₂O (Orviglance), amelynek klinikai hármas fázisú vizsgálatai 2023 februárjában fejeződtek be.⁹ Az MRI vizsgálatokra javasolt Mn(II) alapú kontrasztanyagok alkalmazása 0,1 mmol/kg testsúly dózisban történik, így az intravénásan bejuttatott Mn(II) mennyisége lényegesen meghaladja a vérérszék Mn(II) koncentrációját (0,9 - 2,2 μM). Ennek megfelelően a Mn(II)-komplex kismértékű disszociációja a szervezet számára már nehezen tolerálható mennyiségű Mn(II)-ion szabaddá válását eredményezheti, aminek hosszú távú akkumulációja akár „manganizmus” kialakulásához vezethet.¹⁰ Ezzel szemben a humán szervezetben 3,5 – 4,0 g vas található, amely jelentős része a székum vas transzport fehérjékhez koordináltan kering a véráramban (pl. transferrin). Mivel a székum vas transzport fehérjék vas kötő képességének csak 25 - 30% telített, így jelentős vas felesleg megkötésére és szállítására van lehetőség. Sőt a Fe(III) élő szervezetben történő akkumulációjának kezelésére számos szájon át szedhető készítmény ismert (pl. DFO, DFP, DFX), amelyek a szervezetben esetlegesen szabaddá váló és felhalmozódó Fe(III) eltávolítására is alkalmasak.¹¹ Ezek alapján a nagy spinszámú Fe(III)-komplek MRI kontrasztanyagkénti alkalmazása lényegesen nagyobb biztonsággal történhet, mint a Mn(II)-komplek esetében. Közelmúltban J. Morrow és munkatársai számos alkoholos-OH csoportot oldalláncban tartalmazó triaza-makrociklusos ligandum Fe(III)-komplexét javasolták MRI kontrasztanyag célú felhasználásra,¹² míg Aime és munkatársai Fe(III) akkumuláció kezelésére javasolt és engedélyezett DFX ligandum [Fe(DFX)₂] komplexét javasolták hasonló célú alkalmazásra.¹³ A Fe(III) alapú MRI kontrasztanyagok előállításával és vizsgálatával foglalkozó publikációk és szabadalmak száma alapján ez a terület jelentős fejlődésen mehet keresztül, ami *in vivo* vizsgálatokban alkalmazható hatékony Fe(III)-komplek fejlesztését eredményezheti a közeljövőben.

⁷ S. Ghiani, I. Hawala, D. Szikra, G. Trencsényi, Z. Baranyai, G. Nagy, A. Vágner, R. Stefania, S. Pandey, A. Maiocchi, *Eur. J. Nuc. Med. Mol. Imag.* **2021**, *48*, 2351–2362

⁸ D. Horváth, A. Vágner, D. Szikra, Gy. Trencsényi, N. Demitri, N. Guidolin, A. Maiocchi, S. Ghiani, F. Travagin, G. B. Giovenzana, Zs. Baranyai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202207120

⁹ Val M. Runge, J. T. Heverhagen, *Invest. Radiol.* **2023**, DOI: 10.1097/RLI.0000000000001037

¹⁰ M. G. Cersosimo, W. C. Koller, *NeuroToxicology*, **2006**, *27*, 340–346

¹¹ S. Entezari, S. M. Hagi, N. Norouzkhani, B. Sahebazar, F. Vosoughian, D. Akbarzadeh, M. Islampanah, N. Naghsh, M. Abbasalizadeh, N. Deravi, *J. Toxicol.* **2022**, 4911205

¹² E. A. Kras, E. M. Snyder, G. E. Sokolow, J. R. Morrow, *Acc. Chem. Res.*, **2022**, *55*, 1435-1444

¹³ L. Palagi, E. Di Gregorio, D. Costanzo, R. Stefania, C. Cavallotti, M. Capozza, S. Aime, E. Gianolio, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 14178-14188

Válaszaim ismertetését követően újból szeretném megköszönni Dr. Enyedi Éva Anna értekezésem gyors és alapos bírálatát, építő javaslatait.

Trieszt, 2024. január 8.



Dr. Baranyai Zsolt