Mag	yar
-----	-----

Kémiai Folyóirat

Kémiai Közlemények

123. ÉVFOLYAM, 2017

2

A Magyar Kémikusok Egyesülete tudományos folyóirata A Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Osztályának közleményei Magyar Kémiai folyóirat 123. évfolyam, 2. szám 45-108. oldal, 2017

Útmutatás szerzőknek

A Magyar Kémiai Folyóirat fő feladata egyrészt a magyar kémiai szaknyelv folyamatos ápolása, s a kémiai tudomány fejlődéséhez, az aktuális tudományos újdonságokhoz alkalmazása, egyidejűleg a minél teljesebb körű szakmai információ-csere késedelem nélkül biztosítása, s az, hogy magas szakmai színvonalon tegye hozzáférhetővé az érdeklődök számára a hazai és külföldön élő magyar kémikusok kiemelkedő tudományos kutatási eredményeit, sikereit és mutassa be a kémiai tudományok világszerte bekövetkező fejlődését, változását, a kémia legfrissebb vívmányait, alkalmazásait, az érdeklődés gyújtópontjába kerülő területeit, másrészt, hogy segítséget nyújtson következő kémikus nemzedékeknek a kémiai tudomány anyanyelven való megismeréséhez, a kémiai ismeretek, fogalmak szakmailag helyes és pontos magyar nyelvű kifejezéseinek megtanulásához.

A Magyar Kémiai Folyóirat negyedévenként jelenik meg. Eredeti magyarnyelvű közleményeket – az alább megadott, szigorúan korlátozott terjedelemben, a nemzetközi tudományos folyóiratok átlagos színvonalát

elérő munkák esetén – jelentet meg, előnybe részesítve fiatal kutatók első önálló közleményeit. Összefoglaló cikkeket közöl (felkérés alapján) hazai kiemelkedő teljesítményű kutatóműhelyek hosszabb idő alatt elért eredményeiről, hazai nemzetközi konferenciákról, a nemzetközi érdeklődés gyújtópontjába került kutatási területekről, bemutatva a friss eredményeket, fejlődési irányokat, s ha van, a hazai hozzájárulást, külföldön élő, sikeres magyar származású vegyész-kutatók munkájáról, a szomszédos országokban, határainkon kívül működő magyar kémikusok közzétételre érdemes tudományos eredményeiről. Helyet kapnak a folyóiratban könyvismertetések, kémiai és rokontárgyú kiadványokról. Külön rovatként közli a korábban már a Magyar Kémiai Folyóirat-ba beolvadt Kémiai Közlemények profiljából átvéve akadémiai székfoglalók, MTA doktora címért megvédett értekezések és PhD-dolgozatok összefoglalóit és akadémiai fórumokon elhangzott egyes előadások rövidített változatát. Idegen nyelven már közzétett cikkek másod-közlését a folyóirat nem vállalja. Terjedelem túllépést csak a szerkesztőbizottság hozzájárulásával, a többlet terjedelem megváltása ellenében fogad el.

Az egyes közlemény-fajták térítésmentesen, szerkesztőbizottsági hozzájárulás nélkül kitölthető terjedelme (nyomtatott oldalak):

1. Összefoglaló közlemények a) jelentős, aktuális kutatási terület legújabb nemzetközi eredményeiről: max. 8 + 1 oldal angol nyelvű kivonat, b) kiemelkedő hazai kutatóhelyek újabb eredményeiről, ill. c) külföldön alkotó magyar származású kiemelkedő elismertségű kutatók munkásságáról: max. 6 + 1 oldal angol nyelvű kivonat.

2. Eredeti közlemények: új tudományos eredményeket bemutató, lektorált magyar nyelvű közlemények: max. 4 + 1 oldal angol nyelvű kivonat. Előnyt élveznek fiatal kutatók (pl. kiemelkedő PhD értekezések összefoglalója) és határon túli magyar kutatók munkái.

3. A "Kémiai Közlemények" rovatban a) Akadémiai székfoglaló előadások rövidítve és b) MTA Doktora védések anyagának összefoglalói: max. 4-4, továbbá c) a Szerk. Bizottság, vagy az MTA Kémiai Tud. Osztálya által kiválasztott és az Osztály szervezésében elhangzott előadás összefoglalója: max. 2 oldal + féloldalas angol nyelvű kivonat.

4. Könyvismertetés: max. fél oldal.

A megadott maximális terjedelem túllépéséhez esetenként a Szerkesztő Bizottság - a költség-többlet szerző általi megtérítése ellenében - hozzájárulhat.

A papír-alakú bírálatokat a következő címre kérjük eljuttatni: 1111 Budapest, Szent Gellért tér 4, BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Szerves Kémia Csoport, Huszthy Péter szerkesztő.

Az ELTE címet (ebben a formában: Magyar Kémiai Folyóirat, főszerkesztő, c/o ELTE Általános és Szervetlen Kémiai Tanszék, 1528 Budapest 112., Pf. 32.) csak akkor használják, ha kimondottan a főszerkesztőnek szóló levélről van szó (pl. reklamáció - mondjuk elfogult bírálat, plágium, etc. esetében).

Az irodalmi hivatkozásoknál a DOI számokat is kérjük feltüntetni.

A kézirat elkészítését segítő mintafájlt, valamint a részletes formai követelményeket a folyóirat honlapján találja meg:

http://www.mkf.mke.org.hu

Magyar Kémiai Folyóirat Hungarian Journal of Chemistry

és

MTA Kémiai Közlemények

A Magyar Kémikusok Egyesületének lapja

Megindította Than Károly 1895-ben

Főszerkesztő: Sohár Pál

A szerkesztőbizottság tagjai: Baranyai András, Felinger Attila, Gelencsér András, Keglevich György, Szilágyi László, Wölfling János

> Szerkesztő: Huszthy Péter Vendégszerkesztő: Hajós Péter

Technikai szerkesztő: Molnár István

TARTALOMJEGYZÉK

CONTENTS

I AK I ALOWJEG I ZEK	CONTENTS
Napjaink koordinációs kémiája 47	Today's coordination chemistry 47
ELŐADÁSOK	LECTURES
<i>Enyedy Éva Anna:</i> Rákellenes tioszemikarbazonok és fémkomplexeik: a stabilitás és a biológiai aktivitás kapcsolata	<i>Éva Anna Enyedy:</i> Anticancer thiosemicarbazones and their metal complexes: relationship between stability and bioactivity
Szávuly Miklós István, Lakk-Bogáth Dóra, Csonka Róbert, Turcas Ramona, Speier Gábor, Kaizer József: Divastartalmú oxidoreduktázok szerkezeti és funkcionális modelljei	Miklós István Szávuly, Dóra Lakk-Bogáth, Róbert Csonka, Ramona Turcas, Gábor Speier, József Kaizer: Structural and functional models of non-heme diiron oxidoreductases
Szekeres Levente, Szunyogh Dániel, Galbács Gábor, Jancsó Attila: Metalloproteinek fémkötőhelyein alapuló oligopeptidek, mint potenciális toxikus fémion érzékelők	<i>Levente Szekeres, Dániel Szunyogh, Gábor Galbács,</i> <i>Attila Jancsó:</i> Oligopeptide probes for toxic metal ion sensing, inspired by the metal binding domains of metalloproteins
Papp Tamara, Kollár László, Kégl Tamás: Az ón(II)-halogenidek koordinációs kémiájának jelentősége a platinakatalizált hidroformilezési	<i>Tamara Papp, László Kollár, Tamás Kégl</i> : The role of tin-halides in platinum-catalyzed hydroformylation
reakcióban	<i>Gyula Tircsó, Ernő Brücher, Zsolt Baranyai, Ferenc</i> <i>Krisztián Kálmán, Imre Tóth:</i> Synthesis of Linear and Macrocyclic Aminopolycarboxylate Ligands and Chemical Characterization of their Metal Complexes for Safe Use in Medical Imaging

<i>Gajda Tamás, Szorcsik Attila, Dancs Ágnes, Matyuska Ferenc:</i> Polidentát tripodális ligandumok biomimetikus fémkomplexei	<i>Tamás Gajda, Attila Szorcsik, Ágnes Dancs, Ferenc Matyuska:</i> Biomimetic complexes of polidentate tripodal ligands
Buglyó Péter, Farkas Etelka: Potenciálisan rákellenes	<i>Péter Buglyó, Etelka Farkas:</i> Interaction between
hatású platinafémionok kölcsönhatása	platinum metal ions with anticancer potential and
hidroxámsavakkal és származékaikkal	hydroxamic acids or their derivatives

Napjaink koordinációs kémiája

Több mint 120 éve annak, hogy Alfred Werner alapvető munkájának eredményei közlésre kerültek, majd ezt követőn a komplexvegyületek kémiája (a koordinációs kémia) önálló és rohamosan fejlődő tudományterületté vált. Ezen belül ma már rendkívül szerteágazóak és állandóan változnak, bővülnek a kutatott területek, az azokhoz alkalmazható/rendelkezésre álló módszerek köre. A múlt század során jellemző módon jelentős alapkutatási eredmények születtek pl. egyensúlyi állandók meghatározásában, komplexek kinetikai jellemzésében, katalitikus szerepük tanulmányozásában, stb. Mindezen eredményekhez számos magyar kutató is jelentősen hozzájárult. A már elhunytak közül pl. Burger Kálmán, Kőrös Endre, Inczédy János, Simándi László, Barcza Lajos, Gergely Arthur említhető. Szerencsére több olyan neves "előd" is megnevezhető, akik velünk vannak, de tevékenységük már nem ezen területre irányuló, pl. Beck Mihály, Markó László, Horváth Attila, Nagypál István, Papp Sándor. Az alapkutatási eredmények az utóbbi évtizedekben számos területen teremtik meg a hasznosulás lehetőségét. A biológia és a környezettudomány például, nagyon sok olyan gyakorlati problémát vet fel, amelyek a fémionok jelenlétével, szerepével kapcsolatosak. Napjainkban igen eredményesen folynak többek között azok a biokoordinációs/bioszervetlen kémiai kutatások, amelyeknek céljai között szerepel, hogy feltárjon, értelmezzen és a kémia nyelvén fogalmazzon meg hiteles magyarázatot biológiai folyamatokra, jelenségekre, továbbá segítse ezen ismeretek átvitelét orvosdiagnosztikai, gyógyászati, szerves szintézisbeli, környezetvédelmi új, hatékony eljárások, technológiák kifejlesztésére.

Az MTA Kémiai Tudományok Osztálya, a Magyar Tudomány Ünnepe 2015. évi rendezvénysorozatának részeként, "Napjaink koordinációs kémiája" címmel tudományos ülést szervezett 2015. november 11-én, melynek keretében, elsősorban néhány biokoordinációs/bioszervetlen kémiai kutatás közelmúltbeli eredményeit ismertették az előadók. Az előadásokkal kívántuk szemléltetni a nemzetközileg is kiemelkedő koordinációs kémiai kutatások eredményeit pl. az alábbi területeken: (i) Metalloenzimek szerkezetének és az általuk katalizált folyamatok kémiai mechanizmusának megismerésére irányuló kutatások (szerkezeti, illetve funkcionális modellek révén). Ez egyrészt jelenti az életfolyamatok modellezését célzó alapkutatást, másrészt un. bioutánzó reakciók kidolgozását, aminek esetleg gyakorlati jelentősége is lehet (ii) A neurodegenerativ elváltozások kifejlődésében szerepet játszó fehérjék komplexképzési folyamatainak megismerése céljából végzett bioszervetlen kémiai kutatások. A mikroorganizmusok vas-felvételében kulcsszerepet játszó és gyógyászati jelentőségű hidroxámsav-alapú sziderofórok és egyéb hidroxámsavak szelektív fémionmegkötését befolyásoló tényezők feltárása. (iii) A ritkaföldfém-amino-polikarboxilát komplexek kutatása, ami kiemelten a mágneses rezonancia képalkotás (MRI) kontrasztanyagainak, elsősorban a gadolínium-komplexeknek (de más, pl. átmeneti fémionok (Mn(II), Cu(II)), főcsoportbeli elemek kationjai (Ca(II), Sr(II), Ga(III), In(III), Tl(III), Bi(III) komplexeinek is) kémiai vizsgálatát, új ligandumok szitézisét, a komplexek egyensúlyi, kinetikai és szerkezeti jellemzését, a szerkezet-hatás összefüggések feltárását célozza. (iv) Elsősorban gallium- és platinafém komplexek körében több laboratóriumban is folytatott széleskörű kutatások (geometria, összetétel, töltés, termodinamikai stabilitás, ligandumcsere folyamatok, redoxi tulajdonságok stb. vizsgálata) számos ligandum(család) bevonásával. Bizonyítottan (vagy potenciálisan) rákellenes hatású fémkomplexek tanulmányozása. (v) Fémkomplex alapú katalizátorrendszerek aktivitásának és szelektivitásának szisztematikus növelésére irányuló (kísérleti és számításos módszerekkel történő) kutatások. (vi) Toxikus fémionok (pl. Hg^{II}, Cd^{II}) érzékeny, gyors és egyszerű (akár helyszíni) kimutatását lehetővé tevő oligopeptid próba-molekulák kifejlesztése oldatbeli és szilárd hordozón immobilizált formában történő alkalmazásokra. (vii) Arany(I) szupramolekuláris szerkezetekbe beépítése révén kialakított komplexek (melyeknek, újszerű kémiai és hasznos fizikai tulajdonságaik révén, számos területen elképzelhető gyakorlati hasznosításuk is) előállítása és karakterizálása.

Az elhangzott előadások alapján készültek a Magyar Kémiai Folyóirat jelen számában olvasható dolgozatok, melyek révén az olvasó informálódhat a fent említett koordinációs kémiai vonatkozású kutatások közül néhánynak az új eredményeiről, azok gyakorlati jelentőségéről, és az új kutatási trendekről. E dolgozatok szemléltetik, hogy napjaink koordinációs kémiai kutatásai számos területen jelentősen hozzájárulnak hiteles tudományos eredményeken nyugvó és napjaink több, jelentős problémájának megoldására új utakat és lehetőségeket kínáló ismeretek szerzéséhez.

Farkas Etelka

Rákellenes tioszemikarbazonok és fémkomplexeik: a stabilitás és a biológiai aktivitás kapcsolata

ENYEDY Éva Anna^{a*}

^aSzegedi Tudományegyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Dóm tér 7., 6720, Szeged, Magyarország

1. Bevezetés

A tioszemikarbazonok (TSK-k, 1.a. ábra) és fémkomplexeik igen változatos szerkezetű és farmakológiai hatású vegyületek.^{1,2} Az a-N-heterociklusos TSK-k rákellenes hatását már 1956-ban leírták;3 és a legismertebb képviselőjük a 3-amino-piridin-2-karbaldehid-TSK (Triapine, 1.b. ábra) klinikai fázis I/II tesztelés alatt áll.⁴ A Triapine mono- és kombinált terápiákban bíztató eredményeket mutatott mieloid leukémia esetén,⁵ viszont rövid biológiai felezési ideje miatt szolid tumorokkal szemben jóval kevésbé hatékony és alkalmazását számos mellékhatás pl. hányás, methemoglobinémia kíséri.6 Mindezek a problémák további TSK-k fejlesztését ösztönözték, melyek között számos ígéretes α-N-piridil TSK-t találunk (1.c. ábra),7-9 míg a 2015-ben humán klinikai kísérletekbe került COTI-2 (1.b. ábra) egy tetrahidrokinolin-származék.10



1. Ábra. Tioszemikarbazon (TSK) alapváz (a). Klinikai vizsgálatban lévő Triapine és COTI-2 (b). Néhány ígéretes TSK (c).

A Triapine és származékainak biológiai hatása elsősorban a DNS bioszintézisében kulcsszerepet játszó ribonukleotid reduktáz (RNR) enzim inhibícióján alapul. A RNR a dezoxiribonukleotidok képződését katalizálja, aktív centrumában két vasion és egy Tyr gyök található. A tumorsejtekben a fokozott osztódás miatt az RNR expresszió megnő, így ennek az enzim gátlása potenciális célpont a rákterápia során. Az általánosan elfogadott hatásmechanizmus alapján a Triapine 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 (ROS) által képes a katalitikus centrumban lévő Tyr gyököt kioltani, ami az enzim

* Tel.: +36 62/544 334 ; fax: +36 62/544 340; e-mail: enyedy@chem.u-szeged.hu

inaktiválásához vezet.¹¹ Ennek következtében a TSK-k vas(II/III)ionokkal képzett komplexeinek oldatbeli stabilitása és redoxi tulajdonsága egyértelműen befolyásol(hat)ja a TSK-k biológiai hatását.

A TSK-k alapvetően a kénen és az azometin-N-en keresztül koordinálódnak a vasionokhoz. A hidrazin-NH csoport deprotonálódhat és tiolátszerű kötési mód jöhet létre a tion-tiol tautomeriának (1.a. ábra) köszönhetően. Az α-N-piridil TSK-k háromfogú, (N_{piridil},N,S) donoratomokat tartalmazó ligandumok, semleges vagy anionos módon koordinálódnak.^{1,12} A koordinációs sajátságok tovább variálhatók a kén egyéb kalkogénatomra (O,Se), vagy pl. a piridil-N fenolos-OH csoportra való cseréjével. Mindez lehetővé teszi a stabilis komplexképzést számos egyéb fémionnal is a vasionokon kívül (pl. réz(II), platina(II), nikkel(II), cink(II), vanádium(IV/V)).12 Jól ismert az is, hogy nem csak a TSK-k, hanem fémkomplexeik is jelentős bírnak.^{1,2} A antitumor hatással komplexképzés megváltoztatja a lipofilitást, a töltést és a méretet, ezáltal a transzportfolyamatokat, de eltérő hatásmechanizmust is eredményezhet. Pl. a réz(II)-TSK komplexek antiproliferatív hatása ROS termelődéséhez köthető a fémkomplex fiziológiás redukálószerek általi redukcióját követően.13 viszont a Egyes réz(II)-TSK komplexek DNS topoizomeráz-IIa inhibícióján keresztül hatnak.14

А TSK-fémkomplexek fizikai-kémiai karakterizálása általában szilárd fázisban és szerves oldószerek oldatában történik a viszonylag rossz vízben való oldhatóságuk miatt. A farmakológiai hatás megértéséhez viszont alapvetően fontos, hogy ismerjük, milyen formában vannak jelen ezen fémkomplexek a vizes oldatokban, mert az eltérő lehet az eredeti szilárd formától. A különböző TSK-k RNR inhibíciójának megértéséhez pedig vas(II/III)ionokkal való kölcsönhatás teljesebb ismerete szükséges. Az irodalomban azonban meglehetősen hiányosak az ilyen jellegű oldategyensúlyi eredmények. Ez indokolta a 2009-től elindított vizsgálatainkat,15 mely során számos különböző donorcsoportot és szubsztituenseket tartalmazó TSK (2. ábra) vas(II/III)-, réz(II)-, gallium(III)-, nikkel(II)-, cink(II)és vanádium(IV/V)ionokkal képzett komplexeinek oldatbeli tanulmányoztuk.16-24 viselkedését А képződő fémkomplexek összetételének, stabilitásának és redoxi tulajdonságainak összehasonlító jellemzése mellett az a célunk, hogy feltárjuk ezen paraméterek hogyan függnek össze a biológiai aktivitással. Jelen közleményben az eddig publikált legfontosabb eredményeinket foglaljuk össze.

2. A tioszemikarbazonok és fémkomplexeik oldategyensúlyi vizsgálata

2.1. A vizsgált tioszemikarbazonok proton disszociációs folyamatai és lipofilitásuk

A TSK-k jellemzően vízben rosszul oldódó vegyületek, emiatt a legtöbb oldategyensúlyi mérést keverék-oldószerben (30% (m/m) dimetil-szulfoxid (DMSO/H₂O)) végeztük. A vizsgált TSK-k szerkezeti képletét a 2. ábra (és 1.b) mutatja.



 Ábra. A vizsgált tioszemikarbazonok szerkezeti képlete és rövidítésük. (SSC egy szemikarbazon)

Ha a ligandumok oldékonysága jobb volt (S \ge 1 mM), ill. az alkalmazott mérési módszer nem igényelt magas koncentrációt (pl. spektrofotometria, fluorimetria) akkor tiszta vizes közegben is történtek mérések.

Néhány TSK pH-potenciometriás módszerrel meghatározott proton disszociációs állandójának negatív logaritmusát (pK_a) mutatja az 1. táblázat. Az α-N-piridil TSK-knak két disszociábilis protonja van.^{15,16} Az első deprotonálódási folyamat a piridinium nitrogénhez (N¹H⁺) rendelhető, míg a második 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 (1.a. ábra). A metil- és aminocsoportok jelenléte egyértelműen befolyásolja a ligandumok pKa-it (1. táblázat); a hatás nagysága és iránya a szubsztituensek pozíciójától függ. Az N-terminális elektronküldő metilcsoportok (R₃) a pK₁-t növelik, míg a pK2-t ~fél nagyságrenddel csökkentik. Az R2 pozícióban lévő metilcsoport mindkét pKa-t növeli. Viszont az aminocsoport ugyanezen pozícióban a pK1-t gyakorlatilag nem befolyásolja, de megnöveli a pK2-t. A Triapinban lévő aminocsoport (R1) jelentősen növeli a piridinium nitrogén bázicitását az FTSC alap ligandumhoz viszonyítva, de csökkenti a hidrazin nitrogén pKa-ját. A piridin helyett fenol-gyűrűt tartalmazó STSC-nek is két disszociábilis protonja van, de a teljesen protonált ligandum (H₂L) semleges.¹⁸ Az első deprotonálódás itt a fenolos hidroxilcsoporton történik, míg a pK₂ ugyanúgy a hidrazin nitrogénhez rendelhető. A HL⁻ forma negatív töltése felelős a pK₂ több mint egy nagyságrenddel való növekedéséért az FTSC-hez hasonlítva. A kénatom oxigénre történő cseréje (STSC \rightarrow SSC) a hidrazin nitrogén pK-ját szintén megnöveli, értéke a mérhető pH-tartományban már nem határozható meg. Így az SSC szemikarbazon esetében pK₂ tartozik a fenolos hidroxilcsoport disszociációjához, míg pK₁ a karbamoilcsoporthoz.²²

Az 1. táblázatban szereplő ligandumok fiziológiás pH-n a semleges HL formájukban vannak jelen, kivételt az STSC jelent. A semleges töltés segíti a vegyületek sejtes felvételét, viszont a rossz vízoldhatósághoz is hozzájárul. Az optimális hidro-lipofil sajátság megtalálása érdekében az FTSC, PTSC és STSC ligandumokra disszociábilis protonokat tartalmazó farmakofór szubsztituensek (Pro, morfolin, metil-piperazin) kerültek, és a kapott vegyületek már sokkal jobb vízoldékonyságúak voltak (2. ábra).^{19-21,23}

1. Táblázat

Néhány kalkogénszemikarbazon proton disszociációs állandójának tízes alapú negatív logaritmusa (p K_a)^a, *n*-oktanol-víz megoszlási hányadosának logaritmusa (lgD_{7,4})^b és a ligandumok protonaltsági állapota pH = 7,4-n. {t = 25,0 °C, I = 0,1 M KCl}

	pK1	pK ₂	lgD _{7,4}	% (pH 7,4)
Triapine	3,92 °	10,78°	+0,85 ^d	100% HL
FTSC	3,13 °	11,13 °	$+0,73\pm0,01$	100% HL
PTSC	3,38°	10,54 °	+1,15 f	100% HL
APTSC	4,31°	10,29°	+1,30 f	100% HL
FaTSC	3,15 °	11,61 °	-	100% HL
AcTSC	3,64 °	11,52 °	-	100% HL
STSC	8,89 ^d	12,59 ^d	+1,74 ^d	96% H ₂ L, 4% HL ⁻
SSC	1,9 ^g	9,32 ^g	+1,04 ^g	100% HL

a 30% (m/m) DMSO/H₂O oldószerelegyben meghatározva, L a ligandumok teljesen deprotonált formáját jelöli; ^b További lgD_{7,4} értékek: Morf-PTSC = +0,61,²³ mPip-PTSC = -0,03,²³ L-Pro-FTSC = <-1,7,²⁰ L-Pro-STSC = -0,60;¹⁹ ^c 15. hivatkozás; ^d 18. hivatkozás; ^e 16. hivatkozás; ^f 24. hivatkozás; ^g 22. hivatkozás, SSC szemikarbazon.

A TSK-k pK_a-it UV-látható spektrofotometria segítségével is meg lehetett határozni, mert a proton disszociációs folyamatokat jól detektálható spektrális változások kísérik. Másrészt ezek a ligandumok a konjugált elektronrendszerüknek és merev szerkezetüknek köszönhetően fluoreszcensek, pH-függő emissziós spektrumaik felbontásával a savi disszociációs állandók szintén meghatározhatók.^{16,18,19} Emissziós maximumuk a látható hullámhossz-tartományba esik, ami lehetővé teszi a sejtbejutásuk és eloszlásuk monitorozását fluoreszcens mikroszkópiával.²⁵

A ¹H NMR spektroszkópia segítségével nemcsak a TSK-k deprotonálódása követhető nyomon, hanem az izomerek jelenléte is. A Z/E izoméria a C=N² kettős kötéshez kapcsolódóan jön létre, az izomerek aránya függ az oldószertől és a pH-tól is. Az α -N-piridil TSK-k poláris oldószerekben jellemzően az E-formában fordulnak elő. Az N-terminális dimetilezett származékok esetén a Z-izomer jelenléte is jelentős, pl. a PTSC-nél a Z izomer aránya eléri a ~40%-ot a 30% (m/m) DMSO/H₂O elegyben semleges pH-n.¹⁶

A PTSC morfolin- és metil-piperazin-konjugátumai (2. ábra) extra deprotonálódó csoportokat tartalmaznak (Morf-PTSC: morfolinium-NH⁺, mPip-PTSC: két piperazinium-NH⁺) a piridinium és hidrazin nitrogéneken kívül. Vizes oldatukban mért pH-függő ¹H NMR spektrumaik elemzésével nemcsak az E és Z izomerek arányát, hanem a deprotonálódásukhoz tartozó mikroállandókat is meghatároztuk, ahogyan a Morf-PTSC példája is mutatja a 3. ábrán. Az izomerek eltérő savi disszociációs állandói az egyes protonáltsági fokok esetén intramolekuláris hidrogénhidak jelentétével (3.b. ábra) jól értelmezhető voltak.²³



3. Ábra. A Morf-PTSC ligandum ¹H NMR spektruma az aromás régióban pH = 7,58-n (10% D₂O), szürke keretben a Z izomerhez tartozó csúcsok vannak jelölve (a). A HL forma E és Z izomerje (b) és koncentrációeloszlási görbéi a ¹H NMR mérések alapján meghatározott mikroállandók²³ segítségével számolva (c). {I = 0,1 M KCl; t = 25 °C}

A TSK-k fiziológiás pH-n meghatározott megoszlási hányadosainak (lgD74, 1. táblázat) összehasonlításakor fontos figyelembe venni a vegyületek aktuális protonáltsági állapotát és így töltését, melyek a meghatározott pKa-k segítségével könnyen megadhatók. A vizsgált TSK-k lipofilitása nagymértékben függ a szubsztituensektől. Az FTSC-hez hasonlítva megállapítható, hogy az R1 pozíciójú aminocsoport a lipofilitást csak kis mértékben, míg az N-terminális dimetilezés nagyobb mértékben növeli azt, a vártnak megfelelően.18,24 A piridin-nitrogén helvett fenolos OH-csoport jelenléte a molekulában egy nagyságrenddel megnöveli a lgD7,4 értéket (vö. FTSC és STSC),18 a kén oxigénre történő cseréje pedig csökkenti azt (vö. STSC és SSC).²² A farmakofór szubsztituensek (Pro, morfolin, metil-piperazin) bevezetése a hidrofilitás növelésével járt, de eltérő mértékben. A morfolincsoport pH = 7,4-n gyakorlatilag már deprotonált formában van a Morf-PTSC-ben, a molekula 97%-ban semleges, ami miatt a lgD7,4 értéke a PTSC ligandumétól a várthoz képest csak kisebb mértékben alacsonyabb.23 Ezzel szemben a mPip-PTSC vegyületben a metil-piperidinium nitrogén 74%-ban protonált, aminek köszönhetően a molekula hidrofilebb.23 A Pro-konjugátumok karakterűek a referenciaegyértelműen hidrofilebb vegyületükhöz képest: lgD7,4 értékük több mint 2 nagyságrenddel kisebb, ami az aminosav-rész ikerionos szerkezetének (N_{Pro}H⁺, COO⁻) köszönhető.^{19,20}

2.2. Réz(II)komplexek

A réz(II)-TSK komplexek rákellenes hatása már több mint negyven éve ismert;²⁶ számos olyan komplexet állítottak elő, melyek a ligandumukhoz képest jóval nagyobb aktivitással bír. A komplexek nagy száma ellenére az irodalomban elvétve található termodinamikai adat a vizes oldatbeli viselkedésükre vonatkozóan.27 Az általunk eddig vizsgált réz(II)-TSK komplexek ugyan változatos sztöchiometriát és koordinációs módot mutatnak, viszont közös jellemzőjük, hogy vizes közegben biológiailag releváns körülmények között (pH = 7,4, μ M-os koncentrációtartomány) kiemelkedő stabilitásúak.^{15,18-20,22,23} A speciációt és a pH-potenciometria. komplexek szerkezetét mindig elektronspin rezonancia (ESR) spektroszkópia és UV-látható spektrofotometria kombinált használatával határoztuk meg, az egyes publikációkban megadott kísérleti körülménynek mellett.

Az α-N-piridil és a szalicilaldehid TSK-k alapvetően háromfogú ligandumok, a réz(II)ionnal elsősorban mono-ligandumú komplexeket képeznek. Reprezentatív példaként az STSC komplexképzése látható a 4. ábrán. A savas pH-tartományban képződő 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 a vegyes hidroxido [CuL(OH)]⁻ komplex.¹⁸



4. Ábra. A réz(II) — STSC (1:1) rendszer koncentrációeloszlási görbéi, a komplexek szerkezete és izotróp ESR paraméterei.¹⁸ {30% (m/m) DMSO/H₂O; $c_{STSC} = c_{Cu(II)} = 1 \text{ mM}; I = 0,1 \text{ M KCl}; t = 25 °C}$

Ugyanez a koordinációs séma figyelhető meg az L-Pro-STSC származéknál,¹⁹ és az α -N-piridil TSK-knál (pl. Triapine) is,¹⁵ csak utóbbi esetben a fenoláto-O⁻ helyett α -piridin-N koordinálódik. Ugyanakkor az α -N-piridil TSK-k ligandum feleslege esetén bisz-komplexek is képződnek, a TSK-k (N,N), (N,S⁻) koordinációjával különböző kötési izomerek jönnek létre. A Triapine, PTSC és APTS ligandumokkal ESR csendes [Cu₂L₃]⁺ dimer részecske is megjelenik pH = 5 – 9 tartományban, melynek képződését elektrospray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS) módszerrel is sikerült igazolnunk.¹⁵ Az L-Pro-FTSC esetén az aminosav-rész is részt vesz a

koordinációban, a ligandum ötfogúként koordinálódik a (COO⁻,N_{Pro},N,N,S⁻) donoratomokon keresztül négyzetes piramisos geometriai elrendezésben, és kizárólag mono-ligandumú komplexek képződnek.²⁰ A morfolin és a metil-piperazin-konjugátumok nitrogén donoratomja szintén részt vesz a fémion megkötésében, és az így létrejövő négyfogú koordináció jelentős stabilitásnövekedéssel jár az alap PTSC ligandumhoz viszonyítva.²³



5. Ábra. A réz(II) ? TSK (1:1) rendszere a meghatározott stabilitási állandók^{15,18-20,22,23} segítségével számolt p[Cu] értékek pH = 7,4-n. {30% (m/m) DMSO/H₂O vagy H₂O: Morf-PTSC, mPip-PTSC, L-Pro-FTSC esetén; $c_L = c_{Cu(II)} = 1 \text{ mM}$; I = 0,1 M KCl; t = 25 °C} (SSC egy szemikarbazon)

A réz(II)-TSK komplexek stabilitása fiziológiás pH-n a ligandumok pK_a-i és a komplexekre meghatározott stabilitási szorzatok^{15,18-20,22,23} segítségével számolt pM (= p[Cu] = -lg[Cu]) értékek alapján jól összehasonlítható (5. ábra). Minél kisebb a ligandumhoz nem kötött fémion koncentrációja, azaz nagyobb a p[Cu] értéke annál nagyobb a ligandum fémkötő képessége az adott körülmények között. Az adatok alapján ezen rézkomplexek stabilitása kiemelkedő, mert 1 µM-os oldatukban pH = 7,4-n a bomlásuk ≤ 1%-os. A p[Cu] értékek összehasonlításával a

i) az N-terminális dimetilezés kis mértékben növeli a rézkomplexek stabilitását (vö. Triapine és APTSC);

következő hatások figyelhetők meg:

ii) a piridin-N fenolos-OH csoportra történő cseréje növeli a réz(II)-kötő képességet pH 7,4-n (*vö*. Triapine és STSC);

iii) a S/O cserével jelentősen csökken a réz(II)komplexek stabilitása (vö. STSC és SSC);

iv) a Pro jelenléte, ha donoratomjai nem vesznek részt a koordinációban, akkor alig növeli a réz(II)-kötés erősségét (vö. STSC és L-Pro-STSC);

v) a koordinációban résztvevő extra donoratomok jelentősen növelik a stabilitást (ld. Morf-PTSC, mPip-PTSC, L-Pro-FTSC).

Az 5. ábrán szereplő TSK-k közül a Triapine, APTSC, PTSC mutat kiemelkedő proliferációgátlást (IC₅₀ <1 μ M, 41M humán petefészek rákos sejtvonal),⁷ míg az L-Pro-STSC kicsi (IC₅₀ = 62 és >100 mM, CH1 humán petefészek és SW480 vastagbélrák sejtvonalak),¹⁹ a többi ligandum elhanyagolható (IC₅₀ >100 mM) hatást gyakorol.^{18,20,22,23} A ligandumok antiproliferatív hatása nem korrelál a réz(II)komplexek stabilitásával. A Triapine és APTSC réz(II) komplexének aktivitása a ligandum saját hatásához hasonló,¹³ míg a TSK-konjugátumok (Morf-PTSC,

mPip-PTSC, L-Pro-FTSC, L-Pro-STSC) esetén a réz(II)komplexek antiproliferatív hatása egyértelműen nagyobb.^{19,20,23} (A többi esetben még nem ismertek az IC₅₀ értékek.) Ezek a citotoxikus réz(II)komplexek többnyire kiemelkedő stabilitásúak, de önmagában ez még nem magyarázhatja a nagyobb biológiai aktivitásukat, bizonyára szerepe van a redukálhatóságuknak is. Ennek össze-hasonlító vizsgálata jelenleg folyik laboratóriumainkban; előzetes méréseink jelentős különbségeket mutattak az egyes donorcsoportok esetén az aszkorbinsav és glutation általi redukciók mértékét és sebességét illetően.

2.3. Vas(II)- és vas(III)komplexek

A daganatos sejtek fokozott proliferációja miatt nagyobb a vasfelvételük, emiatt emelkedett a sejtfelszíni transzferrin receptor és a RNR enzim expressziója. Ez indokolta a vaskelátorok kemoterápiába történő potenciális bevezetését. Viszont a hematológiai betegségekben használt klasszikus vas(III)-kelátorok oxigén donoratomokat tartalmaznak (pl. deszferrioxamin, deferiprone) és meglehetősen hidrofilek, ami miatt antitumor hatásuk csekély. Az α -N-piridil TSK-k rákellenes hatása viszont nem csupán a vas(III)ionok megkötésén alapul, erős RNR inhibitorok, amihez szükséges, hogy fiziológiás körülmények között reverzibilis redoxi reakcióban vegyenek részt. Az α -N-piridil TSK-k hatásmechanizmusának jobb megértéséhez mindenképen szükséges a vas(II)- és vas(III)ionokkal képzett komplexek vizes oldatbeli stabilitásának az ismerete.

A vas(II)ionokkal az α -N-piridil TSK-k és az STSC (2. ábra) mono- ([FeLH], [FeL], [FeL(OH)]) és az oktaéderes geometriának köszönhetően biszkomplexeket ([FeL₂H] és [FeL₂]) képeznek; a vas(III)ionokkal pedig döntően a deprotonált hidrazin-N-t tartalmazó [FeL] és [FeL₂] komplexek jönnek létre a vizsgált pH-tartományban. (A komplexek töltését az egyszerűség kedvéért nem adjuk meg.) A meghatározott stabilitási állandók^{15,16,18} birtokában elmondhatjuk, hogy pH = 7,4-n mindkét fémionnal az [FeL₂] összetételű komplex az uralkodó részecske. Ezekben a komplexekben a ligandumok háromfogúként, az (N,N,S⁻) vagy (O⁻,N,S⁻) donoratomokon keresztül koordinálódnak (6.b. ábra).



6. Ábra. A vas(II) (vagy vas(III)) ? STSC ? FTSC (1:2:2) hipotetikus rendszerben a fémionok megoszlása a két ligandum között pH = 5,0 és 7,4-n a vaskomplexek stabilitási szorzatai^{16,18} segítségével számolva (a). {30% (m/m) DMSO/H₂O; $c_{Fe} = 1 \text{ mM}$; $c_{FTSC} = c_{STSC} = 2 \text{ mM}$; I = 0,1 M KCl; t = 25 °C} Az FTSC és STSC ligandumokkal képződő [FeL₂] biszkomplexek szerkezeti képlete (a töltés az egyszerűség kedvéért nincs feltüntetve) (b).

A legegyszerűbb α -N-piridil TSK (FTSC) és az STSC esetén jól szemléltetető a +2 és +3 töltésű vasionok felé mutatott eltérő preferencia, melyet a 6.a. ábra mutat. A vas(II)ionok pH = 7,4-n az FTSC-vel, míg a vas(III)ionok az STSC-vel képeznek stabilisabb komplexet a hard-szoft karakterüknek megfelelően.

A koordinálódó donorcsoport típusa mellett jelentősen kihatnak a vaskomplexek stabilitására az alap TSK vázhoz kapcsolódó szubsztituensek is, melyek befolyásolják az antiproliferatív hatást. Választott TSK-k (és az SSC szemikarbazon) sejtproliferációt gátló hatását jellemző pIC_{50} (= $-lgIC_{50}$) értékeket mutat a 7.a. ábra.



7. Ábra. Választott TSK ligandumok proliferációt gátló hatását jellemző pIC₅₀ értékek (IC₅₀: mol/dm³) humán petefészekrák sejtvonalakon (CH1, 41M) (a).^{18,19,22,28} A vas(III) és vas(II) biszkomplexek stabilitási szorzatainak különbsége: lgβ[Fe^{III}L₂] – lgβ[Fe^{II}L₂] (b). A vas(II) – TSK és vas(III) – TSK rendszereke a meghatározott stabilitási állandók^{15,16,18,19,22} segítségével számolt pM értékek pH = 7,4-n, ahol [M] a ligandumhoz nem kötött vasion egyensúlyi koncentrációja. {30% (m/m) DMSO/H₂O c_{Fe} = 1 mM; c_L = 10 mM; I = 0,1 M KCl; t = 25 °C} (c).

Ezen TSK-k vas(II)- és vas(III)ionok felé mutatott affinitásbeli különbségét jellemzi az [FeL2] biszkomplexek stabilitási szorzatainak különbsége (7.b. ábra).^{15,16,18,19,22} Ez alapján elsősorban azok a ligandumok mutatnak csekély biológiai aktivitást pIC_{50} értékek), melyek (kis vas(III)komplexeinek nagyobb lgb értéke а a vas(II)komplexeihez hasonlítva (FaTSC, L-Pro-FTSC, STSC, SSC). A vas(II/III)komplexek stabilitási szorzatainak viszonyától függ a vas(III)/vas(II) rendszer redoxi potenciálja, ez viszont csak az α-N-piridil TSK-kra ismert a 7. ábrán lévő vegyületek közül.16 A meghatározott formálpotenciál értékek +40 - +160 mV közé esnek az FaTSC kivételével; egyértelmű lineáris függést nem mutatnak az IC50 értékekkel. Viszont a kivételt jelentő FaTSC komplexeihez tartozó potenciál érték kisebb (E' = -170 mV), és ez a ligandum a sorozatban a legkevésbé aktív. Érdemes figyelembe venni a vasionokkal képződő komplexek stabilitásának megítélésekor a fémionok eltérő hidrolízisre való hajlamát is. Ennek megfelelően lettek pM értékek számolva pH = 7,4-n, melyeket a 7.c. ábra mutat.

Ezen értékek alapján elmondható, hogy összefüggést elsősorban a pIC₅₀ és p[Fe(II)] értékek között láthatunk: minél nagyobb p[Fe(II)], azaz a vas(II)-kötés erőssége, annál erősebb a ligandum sejtproliferációt gátló hatása. Ezen korreláció megerősítéséhez újabb ligandumok bevonásával további vizsgálatokat végzünk jelenleg.

2.4. Gallium(III)komplexek

A gallium(III)komplexek rákellenes hatása a fémion vas(III)ionokhoz hasonló koordinációs kémiai sajátságán és biokémiai anyagcsere útján alapul, viszont a gallium(III) nem redoxi aktív fiziológiás körülmények között és emiatt a Fe/Ga csere után a vastartalmú biomolekula nem képes ellátni a funkcióját. Számos gallium(III)-TSK komplex jelentős citotoxicitást mutat,^{1,2,7} de oldatbeli stabilitásukról korábban nem volt információ.

vizsgált gallium(III)-TSK komplexek a vártnak А megfelelően hasonló szerkezetűek oldatban, mint a vas(III)komplexek.^{16,18,22} A meghatározott stabilitási szorzatok egyértelmű lineáris korrelációt mutatnak a vas(III)komplexek megfelelő állandóival. Azaz а gallium(III) is egyértelműen stabilisabb komplexet képez az (O⁻,N,S⁻), (O⁻,N,O⁻) donoratomokat tartalmazó STSC, SSC ligandumokkal az (N,N,S⁻) donor α-N-piridil TSK-okhoz viszonyítva. Ugyanakkor a stabilitásuk jóval kisebb a vas(III)komplexekéhez képest, olyannyira hogy pl. az FTSC esetén a $[GaL_2]^+$ komplex 0,5 mM-os oldatában pH = 7,4-n a bomlás 100%-osnak tekinthető, de az STSC esetén is ez 52%. Biológiai hatásuk így nem köthető a komplex eredeti formájához, valószínű a ligandum-, fémioncsere.



8. Ábra. A PTSC és a gallium(III) - PTSC (1:2) rendszer fluoreszcens emissziós intenzitása 470 nm-en a pH függvényében vízben.¹⁶ { l_{EX} = 395 nm; $c_{Ga(III)}$ = 5 mM; c_L = 10 mM; I = 0,1 M KCl; t = 25 °C} Beszúrt ábrák: a PTSC ligandum és a gallium(III) ? PTSC (1:1) rendszer 3D fluoreszcens spektrumai pH = 4,2-n.

Fontos megemlíteni, hogy a gallium(III)-TSK komplexek fluoreszcensek, gerjesztési és emissziós spektrumuk eltér a szabad ligandumétól, ahogy a 8. ábra 3D spektrumai is mutatják. Ez lehetőséget ad a komplexképződés monitorozására tiszta vizes közegben a módszer alacsony koncentráció igénye miatt. A 8. ábra a PTSC és a komplex emissziós intenzitásának pH-függését mutatja. A két görbe lefutásának különbsége egyértelműen rámutat arra, hogy a fémkomplex csak pH = 2 - 6 között van jelen az oldatban, nagyobb pH-kon disszociál.

2.5 .Vanádium(IV/V)komplexek

Az irodalomban számos citotoxikus vanádium(IV/V)-TSK komplexet is leírtak,² de vizes oldatbeli stabilitásukról nem volt adat. A pH-potenciometriás, ESR spektroszkópiás és spektrofotometriás vizsgálataink UV-látható mutatták,22,24 hogy kizárólag monokomplexek képződnek $([MLH], [ML], [ML(OH)]), \text{ és } pH = 7,4-n a [V^{IV}OL(OH)]$ ill. [V^VO₂L] részecskék a dominánsak. Stabilitásuk nagymértékben függ a fémion oxidációs állapotától: a V^VO₂⁺ komplexek a nagyobb stabilitásúak; másrészt függ a koordinálódó donoratomokról. A stabilitási trend mindkét oxidációs állapotú fémionnal: STSC > SSC > PTSC > APTSC > Triapine. A vanádium(IV) Triapine-nal képzett komplexe olyan kis stabilitású, hogy fiziológiás pH-n disszociációja teljesnek mondható már az 1 mM-os koncentrációjú oldatában is.²⁴ Így nem meglepő, hogy ezen ligandumok körében csak a vanádium(V)-STSC komplex proliferáció gátlása haladta meg a ligandum önálló hatását.²⁴

3. Összefoglalás

Rákellenes vegyületek fejlesztésekor alapvetően fontos a szerkezet-aktivitás összefüggések vizsgálata. A TSK-k antitumor hatása elsősorban a vastartalmú RNR enzim inhibícióján alapul és így összefüggésbe hozható a vegyületek vasionok felé mutatott affinitásával. Másrészt a TSK-k egyes fémkomplexei is jelentős antiproliferatív hatással bírnak rákos sejteken, hatásmechanizmusuk megértéséhez szükséges a komplexek fiziológiás körülmények közötti formáinak és azok stabilitásának ismerete. Mindezek miatt végeztünk összehasonlító oldategyensúlvi vizsgálatokat változatos szerkezetű és koordinációs tulajdonságú TSK-kkal. A legfontosabb eredményeket foglaltuk össze jelen közleményben a ligandumok lipofilitása, protonálódási és réz(II)-, vas(II)-, vas(III)-, gallium(III)-, vanádium(IV)- és vanádium(V)-ionokkal való komplexképzési folyamataikkal kapcsolat-ban, összefüggést keresve a rákellenes hatással.

Megállapítottuk, hogy a vizsgált TSK-knak a metil-piperazin-konjugátum kivételével fiziológiás pH-n a semleges töltésű formájuk az uralkodó. Lipofilitásuk függ az alapváztól: a szalicilaldehid származékok lipofilebbek, mint az α -N-piridil típusúak; és függ a szubsztituensektől is: az N-terminálisan metilezett vegyületek lipofilebbek, míg a TSK-konjugátumok (Pro, morfolin, metil-piperazin) hidrofilebbek.

A vizsgált fémionok körében a réz(II)komplexek adódtak a legstabilisabbnak, különösen kiemelkedő a stabilitás a négy- ill. ötfogú ligandumként koordinálódó Morf-PTSC, mPip-PTSC és L-Pro-FTSC esetében. Ezen utóbbi vegyületek réz(II)komplexeinek proliferáció gátló hatása egyértelműen meghaladja a ligandumok saját hatását. A vas(II/III)ionokkal semleges pH-n biszkomplexek képződnek; és a TSK-k affinitása a vas kétféle oxidációs állapotú ionjához nagymértékben függ a koordinálódó donoratomok típusától. Az (N,N,S⁻) kötésmód a vas(II), míg az (O⁻,N,S⁻) koordináció a vas(III)ionokkal való komplexképzésnek kedvez. A komplexek stabilitását a szubsztituensek is befolyásolják. Azt találtuk, hogy a TSK-k antiproliferatív hatása erősen korrelál a

vas(II)komplexek stabilitásával. A TSK-k gallium(III)ionokkal képzett komplexeinek összetétele és geometriája igen hasonló a vas(III)ionokkal képződőkkel, viszont alapvető különbség a gallium(III)komplexek kisebb stabilitása. Ennek megfelelően biológiai hatásuk a legtöbb esetben nem köthető a komplex eredeti, [GaL2] formájához. A vanádium(IV/V) ionokkal mono-ligandumú komplexek képződnek, melyek stabilitása az α-N-piridil TSK-k esetén jóval kisebb az (O⁻,N,S⁻) donoratomokat tartalmazó STSC ligandummal képest. A ligandum képzett komplexekhez önálló antiproliferatív hatását csak a vanádium(V) STSC ligandummal képzett komplexe haladta meg.

A meghatározott oldategyensúlyi adatok segítségével megadható a TSK-k és fémkomplexeik megjelenési formája fiziológiás pH-n, vizes oldatban, mely gyakran különbözik az eredetileg szilárd formában előállítottól, viszont nagyobb valószínűséggel lehet felelős a biológiai hatásért. Ezen aktív formák ismerete mindenképpen hozzájárul a hatásmechanizmus értelmezéséhez.

Köszönetnyilvánítás

A közlemény az OTKA PD103905 pályázat és a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatásával készült. A szerző köszönetet mond az idézett cikkekben szereplő társszerzők, elsősorban Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol, Vladimir B. Arion (University of Vienna) és Nagy Nóra Veronika (MTA, TTK) közreműködésért.

Hivatkozások

- 1. Dilworth, J.R.; Hueting, R. *Inorg. Chim. Acta.* **2012**, *389*, 3-15. https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.02.019
- 2. Beraldo, H.; Gambino, D. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2004, 4, 31-39.
- 3. Brockman, R.W.; Thomson, J.R.; Bell, M.J.; Skipper, H.E. *Cancer Res.* **1956**, *16*, 167–170.
- Merlot, A. M.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R. *Antioxid. Redox Signal.* 2013, 18, 973–1006. https://doi.org/10.1089/ars.2012.4540
- Zeidner, J.F.; Karp, J.E.; Blackford, A.L.; Smith, B.D.; Gojo, I.; Gore, S.D.; Levis, M.J.; Carraway, H.E.; Greer, J.M.; Ivy, S.P.; Pratz, K.W.; McDevitt, M.A. *Haematologica* 2014, 99, 672–678. https://doi.org/10.3324/haematol.2013.097246
- Kolesar, J.; Brundage, R. C.; Pomplun, M.; Alberti, D.; Holen, K.; Traynor, A.; Ivy, P.; Wilding, G. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011, 67, 393-400.
- Kowol, C.R; Berger, R.; Eichinger, R.; Roller, A.; Jakupec, M.A.; Schmidt, P.P.; Arion, V.B.; Keppler, B.K. *J. Med. Chem.* 2007, *50*, 1254-1265. https://doi.org/10.1021/jm0612618
- Richardson, D.R.; Ka linowski, D.S.; Richardson, V.; Sharpe, P.C.; Lovejoy, D.B.; Islam, M.; Bernhardt P.V. J. Med. Chem. 2009, 52, 1459–1470. https://doi.org/10.1021/jm801585u
- Jansson, P.J.; Kalinowski, D.S.; Lane, D.J.R.; Kovacevic, Z.; Seebacher, N.A.; Fouani, L.; Sahni, S.; Merlot, A.M.; Richardson D.R. *Pharmacol. Res.* 2015, 100, 255–260. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.013
- 10. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02433626 (Letöltés időpontja: 2016.04.20.)

- Shao, J.; Zhou, B.; Di Bilio, A.J.; Zhu, L.; Wang, T.; Shih, C.Q.J.; Yen, Y. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 586-592. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0384
- Lobana, T.S.; Sharma, R.; Bawa, G.; Khanna, S. *Coord. Chem. Rev.* 2009, 253, 977-1055. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.07.004
- Kowol, C.R; Heffeter, P.; Miklos, W.; Gille, L.; Trondl, R.; Cappellacci, L.; Berger, W.; Keppler, B.K. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2012, *17*, 409-423. https://doi.org/10.1007/s00775-011-0864-x
- 14. Zeglis, B.M.; Divilov, V.; Lewis, J.S. J. Med. Chem. 2011, 54, 2391-2398. https://doi.org/10.1021/jm101532u
- Enyedy, E.A.; Nagy, N.V.; Zsigoč, Eč.; Kowol, C.R.; Arion, V.B.; Roller, A.; Keppler, B.K.; Kiss, T. Eur. *J. Inorg. Chem.* 2010, 1717-1728.
- Enyedy, E.A.; Primik, M.F.; Kowol, C.R.; Arion, V.B.; Kiss, T.; Keppler, B.K. *Dalton Trans.* 2011, 40, 5895-5905. https://doi.org/10.1039/c0dt01835j
- Popovic-Bijelic, A.; Kowol, C.R.; Lind, M.E.S.; Luo, J.; Himo, F.; Enyedy, E.A.; Arion, V.B.; Gräslund, A. *J. Inorg. Biochem.* 2011, *105*, 1422-1431.
- Enyedy, E.A.; Zsigoě, E.; Nagy, N.V.; Kowol, C.R.; Roller, A.; Keppler, B.K.; Kiss, T. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012, 4036-4047.
- Milunovic, M.N.M.; Enyedy, E.A.; Nagy, N.V.; Kiss, T.; Trondl, R.; Jakupec, M.A.; Keppler, B.K.; Krachler, R.; Novitchi, G.; Arion, V.B. *Inorg. Chem.* 2012, *51*, 9309-9321.
- Bacher, F.; Enyedy, E.A.; Nagy, N.V.; Rockenbauer, A.; Bognar, G.M.; Trondl, R.; Novak, M.S.; Klapproth, E.; Kiss, T.; Arion, V.B. *Inorg. Chem.* 2013, *52*, 8895-8908.

- Bacher, F.; Dömötör, O.; Kaltenbrunner, M.; Mojovic, M.; Popovic-Bijelic, A.; Gräslund, A.; Ozarowski, A.; Filipović, L.; Radulović, S.; Enyedy, E.A.; Arion, V.B. *Inorg. Chem.* 2014, *53*, 12595-12609.
- Enyedy, E.A.; Bognár, G.M.; Nagy, N.V.; Jakusch, T.; Kiss, T.; Gambino, D. *Polyhedron* **2014**, *67*, 242-252. https://doi.org/10.1016/j.poly.2013.08.053
- Bacher, F.; Dömötör, O.; Chugunova, A.; Nagy, N.V.; Filipović, L.; Radulović, S.; Enyedy, E.A.; Arion, V.B. Dalton Trans. 2015, 44, 9071-9090. https://doi.org/10.1039/C5DT01076D
- Kowol, C.R.; Nagy, N.V.; Jakusch, T.; Roller, A.; Heffeter, P.; Keppler, B.K.; Enyedy, E.A. J. Inorg. Biochem. 2015, 152, 62-73. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.08.023
- Kowol, C.R.; Trondl, R.; Arion, V.B.; Jakupec, M.A.; Lichtscheidl, I.; Keppler, B.K. *Dalton Trans.* 2010, *39*, 704-706. https://doi.org/10.1039/B919119B
- Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano. C. Chem. Rev. 2014, 114, 815-862.
- Gaál, A.; Orgován, G.; Polgári, Z.; Réti, A.; Mihucz, V.G.; Bősze, S.; Szoboszlai, N.; Streli, C. *J. Inorg. Biochem.* 2014, *130*, 52-58.
- https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.09.016
 28. Kowol, C.R; Trondl, R.; Heffeter, P.; Arion, V.B.; Jakupec, M.A.; Roller, A.;Galanski, M.; Berger, W.; Keppler, B.K. J. Med. Chem. 2009, 52, 5032-5043. https://doi.org/10.1021/jm900528d

Anticancer thiosemicarbazones and their metal complexes: relationship between stability and bioactivity

Thiosemicarbazones (TSCs) are versatile compounds regarding their structures, metal binding abilities and pharmacological properties including anticancer activity. Among the TSCs the most studied representative is Triapine (3-aminopyridine-2carboxaldehyde thiosemicarbazone) which has already been evaluated in several clinical phase I and II trials showing encouraging results in the treatment of hematological malignancies such as myeloid leukemia, although was found to be inactive against solid tumors. A novel promising TSC, COTI-2 has recently entered into human clinical trials. Due to the success of these compounds TSCs and their metal complexes have gained improving focus and attention. The iron-requiring enzyme ribonucleotide reductase is most probably the main target for Triapine and related TSCs. This enzyme is responsible for the production of deoxyribonucleotides required for the DNA synthesis, thus for the cell proliferation. Triapine acts as an efficient inhibitor of this enzyme via destruction of the iron-dependent tyrosyl radical. Consequently, the iron binding ability of the TSCs and the redox properties of their iron complexes are assumed to affect the biological activity. Copper(II) complexes of TSCs show remarkable antitumor effect as well, although their efficacy is mostly connected to their cellular redox cycling. Some copper(II) complexes are reported to inhibit efficiently topoisomerase-IIa. Despite the large number of TSC compounds studies on their solution behavior are fairly rare in the literature. However, the knowledge of the speciation and the most plausible chemical forms of these compounds in aqueous solution under physiological conditions is a mandatory prerequisite. Characterizations of these TSC complexes are generally performed in solid phase or in the solutions of organic solvents in most of the studies in the literature. Our aim is to understand how the structural changes on the TSC scaffold affect the protonation processes, lipophilicity, the metal binding abilities and the redox properties revealing correlation between these parameters and their antiproliferative activity. In the present work the most important results obtained on the copper(II), iron(II/III), gallium(III) and vanadium(IV/V) complexes of various TSCs are summarized.

Triapine belongs to the family of α-N-pyridyl TSCs and possesses two dissociable protons. Its first deprotonation process can be attributed to the pyridinium unit, while the second one to the hydrazinic N²-H group of the thiosemicarbazide moiety. In the latter the resulting negative charge is mainly localized on the S atom via the thione-thiol tautomeric equilibrium. The presence of the various substituents such as methyl and amino groups on the α -pyridyl TSC backbone undoubtedly affects these deprotonation processes. Based on the proton dissociation constants determined it was pointed out that the studied TSCs are neutral at physiological pH except a methylpiperazine conjugate. Their hydro-lipophilic character also strongly depends on the TSC scaffold itself and the type of the substituents. Namely, the salicylaldehyde TSC is more lipophilic than the corresponding α -N-pyridyl TSC, the N-terminally dimethylated compounds are more lipophilic, while the pharmacophoric group containing TSC-conjugates (Pro. morpholine, methylpiperazine) display higher hydrophilicity, thus higher water solubility. The TSCs usually have limited water solubility, thus most of the solution equilibrium studies were performed in solvent mixtures (30% dmso/water). Notably the studied TSCs are fluorescent compounds due to their rigid structure and the conjugated electron system. Therefore the pK_a values of these ligands could be determined via the deconvolution of the pH-dependent emission fluorescence spectra even in pure water at the applied low concentrations. ¹H NMR spectroscopy was found to be advantageous for the detection of the presence of Z/E isomers with respect to the C=N² azomethine double bond and for the determination of the microscopic proton dissociation constants of these isomers as well.

The α -N-pyridyl and salicylaldehyde TSCs are basically tridentate ligands coordinating via (N_{pvr},N,S) or (O⁻,N,S) donor set, respectively. The speciation and the solution structures of the complexes were determined by the combined use of pH-potentiometry, UV-visible spectrophotometry, fluorometry, ¹H, ⁵¹V NMR and EPR spectroscopy depending on the type of the studied metal ions. However, the studied copper(II) complexes display the formation of species with diversified stoichiometry in solution (e.g. [CuLH], [CuL], [CuL(OH)], [CuL₂H], [CuL₂], [Cu₂L₃]), a common feature was observed, namely their significantly high stability under biologically relevant conditions such as pH 7.4 and mM concentration range. Among the studied metal complexes copper(II) compounds were found to be the most stable in solution, especially in the case of the Morf-PTSC, mPip-PTSC and L-Pro-FTSC ligands (Fig. 2.) which are able to coordinate to the metal center via four or five donor atoms due to the presence of additional functional groups. It was also observed that the N-terminally dimethylation can slightly increase the stability of the copper(II) complexes. The antiproliferative activity of these latter copper(II) complexes exceeds that of the metal-free ligand precursors. Based on the stability data it could be concluded that the exchange of the pyridine nitrogen to the phenolic hydroxyl group increases the copper(II) binding ability of TSCs at pH 7.4, while the sulfur/oxygen exchange in the thiosemicarbazide moiety leads to significant decrease in the complex stabilities. The tridentate TSCs form bis-ligand complexes with iron(II) and iron(III) ions at neutral pH, and the affinity towards the iron ions in the two kinds of oxidation states is strongly affected by the type of the coordinating donor atom sets. The (N,N,S⁻) binding mode is favored by the iron(II) ions, while iron(III) ions form higher stability complexes with ligands with (O⁻,N,S⁻) donor set at neutral pH. The stability of the complexes is modified by the various substituents. It was found that the antiproliferative activity of the TSCs shows correlation with the stability of the iron(II) complexes. The stoichiometry and structure of the gallium(III) TSC complexes are rather similar to those of the iron(III) species, although their solution stability is much lower. The stability constants of the $[Ga(III)L_2]$ complexes are lower by 2-3 orders of magnitude showing an unambiguous linear correlation with those of the $[Fe(III)L_2]$ complexes. Thus gallium(III) ions exhibit higher affinity towards ligands possessing (O⁻,N,S⁻) and (O⁻,N,O⁻) donor sets. E.g. in the case of the simplest α -N-pyridyl TSC (FTSC) the $[Ga(III)L_2]$ complex suffers a complete decomposition at pH 7.4 already in the mM concentration range. Therefore the biological effect of the gallium(III) complexes of TSCs in many cases cannot be connected to the original chemical form, $[Ga(III)L_2]$, obtained in solid phase. It should be noted that the gallium(III) complexes of TSCs are fluorescent, which allows the monitoring the complexation processes in pure aqueous solution in fairly low concentrations. The tridentate TSCs form mono-ligand complexes with vanadium(IV/V) ions exclusively such as [MLH], [ML], [ML(OH)]. The predominating species are [V(IV)OL(OH)] and [V(V)O₂L] at physiological pH. The stability of the complexes depends on the oxidation state of the vanadium ion and the type of the coordinating donor atoms. Namely, vanadium(V) forms the higher stability complexes and the stability of the α -N-pyridyl TSC complexes is much lower compared to that of the salicylaldehyde TSC.

On the basis of the determined stability constants the actual chemical forms of the TSCs and their metal complexes in solution can be predicted, which may differ from the original composition and can be responsible for the biological effect. The deeper knowledge of these active forms and their solution stability contributes to understanding of the alterations in the efficacy of these compounds, the mechanism of action and may help in the development of more effective chemotherapeutics.

Divastartalmú oxidoreduktázok szerkezeti és funkcionális modelljei

SZÁVULY Miklós István^a, LAKK-BOGÁTH Dóra^a, CSONKA Róbert^a, TURCAS Ramona^a, SPEIER Gábor^a és KAIZER Józset^{a,*}

^aPE Kémia Intézet, Bioszerves és Biokoordinációs Kémiai Kutatócsoport, Egyetem utca 8., 8200 Veszprém, Magyarország

A triplett-állapotú dioxigén két pártalan elektronnal rendelkezik, stabilis és ezért szingulett-állapotú szerves szubsztrátumokkal szemben inert. A lényegesen nagyobb energiatartalmú, instabilabb szingulett-állapotú dioxigén és redoxireakciókban, reaktivitása nagyobb valamint elektrociklikus reakciókban (pl. olefinekkel, Diels-Aldertípusú reakciókban) jól reagál. A dioxigénnek a redoxireakciókban mutatott viszonylagos inertsége az első elektron termodinamikailag kedvezőtlen felvételével is magyarázható ($E^0 = -0.32$ V). A spin-tiltott folyamat tehát a dioxigén fotooxidációs, illetve átmenetifémekkel történő oxidatív-addíciós reakciójával oldható fel.

A dioxigént felhasználó metalloenzimek (oxidoreduktázok) és szintetikus modelljeik kapcsán az elsődleges kérdés, hogy a dioxigén aktiválása milyen módon, milyen lépéseken keresztül valósul meg. Ennek megértésében sokat segíthet az intermedier-kutatás, amelynek feladata, hogy **az** enzimfolyamatokban és az azokat modellező bioutánzó rendszerekben a reaktív intermedierek elkülönítésén és spektroszkópiai jellemzésén keresztül információt nyújtson a dioxigén- és rajta keresztül a szubsztrátaktiválás mechanizmusáról. A vastartalmú oxidoreduktázok az aktív centrumban lévő fémionok száma szerint egy- illetve kétmagvú, a fémek koordinációs övezete alapján pedig hem-típusú és nem-hem-típusú csoportra oszthatóak. A hem-típusú enzimekben a vasiont a porfirinligandum övezi, míg a nem-hem-típusú enzimekben a vasiontartalmú kavitás két jellegzetes aminosavrészből; hisztidinből és egy savas (aszparaginsav, glutaminsav) egységből épül fel. Utóbbiak igen változatos módon, egy-, illetve kétfogú, valamint terminális és hídhelyzetű ligandumként is részt vehetnek a komplexképzésben.¹ A termodinamikailag inert dioxigénmolekula aktiválását reaktív peroxo- és oxo-intermedierek képződésén keresztül képzelik el, amelyek reakciója a megfelelő szubsztrátum molekulával már könnyen értelmezhető (1. ábra).



1. Ábra. Vastartalmú enzimek reaktív intermedierjei

A nem-hem-típusú divastartartalmú enzimek funkciójukat tekintve igen változatos kémiai reakciókért felelősek. Ide sorolható pl. a ribonukleotid reduktáz (R2), a sztearil-ACP Δ^9 deszaturáz (Δ^9 D, ACP = acilhordozó fehérje), az oldható metán-monooxigenáz (sMMO), a human deoxihipuszin hidroxiláz (hDOHH) és a hemeritrin (Hr) (2. *Ábra*).²



2. Ábra. Néhány divas(II)tartalmú enzim aktív centruma.

Az R2 enzimet Escherichia coli és Salmonella typhimurium baktériumokból izolálták. Utóbbi esetében az aktív centrum röntgendiffrakciós szerkezetét is sikerült meghatározni. Ezen enzimek a DNS szintézishez elengedhetetlen dezoxi-ribonukleotidokat állítják elő a ribonukleotidok redukciójával. Ezen folyamat a reakcióban nélkülözhetetlen tirozil gyök kialakításán keresztül értelmezhető.3 A Δ9D enzimek segítségével a sztearinsav cisz-helyzetű kettőskötést (C9=C10) tartalmazó telítetlen zsírsavvá, olajsavvá alakul át,4 míg a metanotróf baktériumokban (Methylococcus capsulatus, Methylosinus trichosporium) található sMMO enzim a metán metanollá történő szelektív oxidációját katalizálja.5,6 A hDOHH enzim a hipuszin szintézisében vesz részt. A legújabb kutatások azt sejtetik, hogy az enzimnek és az általa katalizált folyamatoknak a megértése nagyban hozzájárulhat új antitumor és anti-HIV-1 terápiák kidolgozásához.^{7,8} A Hr a dioxigén reverzibilis megkötésében játszik szerepet (3. Ábra).9,10

^{*} Tel.: +36-88-624-720; fax: +36-88-624-469; e-mail: kaizer@almos.vein.hu



3. Ábra. Néhány divas(II)tartalmú enzim által katalizált reakció

A fenti enzimek redukált formája dioxigénnel metastabilis intermediereket eredményez, amelyek szerkezetét UV-vis, rezonancia-raman és némely esetben röntgendiffrakciós mérésekkel (EXAFS, X-ray) igazolták.² Ezen eredmények alapján az oxidált forma a Hr enzim esetében egy Fe^{III}(µ-O₂R)₂(µ-O)Fe^{III}OOH, míg az R2 (élettartam: 2,7 perc), Δ^9 D (30 perc), sMMO (1 s) és hDOHH enzimek esetében egy Fe^{III}(µ-O₂)Fe^{III} szerkezetű peroxidhoz (P) vezet (3-4. Ábra). Az UV-vis spektrum 5-800 nm tartományában megjelenő elnyelések az $O_2^{2-} \rightarrow Fe^{III}$ töltésátvitelhez (CT), a rezonancia-raman spektrum 8-900 cm⁻¹ tartományában megjelenő rezgések pedig a peroxid v(O-O) rezgéséhez rendelhetők. Az EXAFS mérések az első koordinációs övezetben uralkodó viszonyokat (kötéstávolságokat) írják le, beleértve a Fe Fe távolságokat. Az így kialakult intermedierek egyfajta puffer szerepet töltenek be, az adott szubsztrátum reakciója a belőlük levezethető reaktív, magas vegyértékű µ-oxo komponensekhez (X, Q) köthetőek. A hDOHH esetében a képződő hDOHH_{peroxo} enzim stabilitása lehetővé tette a röntgendiffrakciós szerkezetének a meghatározását (5. Ábra).7



4. Ábra. Divas(II)tartalmú enzimek reaktív intermedierjei



5. Ábra. A hDOHH_{peroxo} enzim röntgenszerkezete

A nagyfokú stabillitás (1-2 nap szobahőmérsékleten) a fémionok környezetében fellelhető nagyszámú hisztidinnek, valamint a karboxilátok terminális helyzetével magyarázható.

Az irodalomban számos peroxo-divas(III) szerkezet található, melyek az előbbiekben ismertetett enzimek szerkezeti modelljeinek tekinthetőek. Ezen komplexek jól megválasztott ligandumokkal képzett prekurzor vegyületek felhasználásával készültek dioxigén és/vagy H₂O₂ hatására. Az előállításukhoz vas(II), vas(III), egy és kétmagvú komplexek is felhasználhatóak. Ezekben többnyire *N*-donoratomot tartalmazó, polipiridil-típusú ligandumokat találhatunk.

Az eddig ismert peroxo-divas(III) komplexek igen változatos szerkezetekkel írhatóak le: Fe^{III}(µ-O₂)Fe^{III}; $Fe^{III}(\mu-O)(\mu-O_2)Fe^{III}$, $Fe^{III}(\mu-OH)(\mu-O_2)Fe^{III}$, $Fe^{III}(\mu-OR)(\mu-O_2)Fe^{III}, Fe^{III}(\mu-OR)(\mu-O_2CR')(\mu-O_2)Fe^{III}$. A legelterjedtebbek a $Fe^{III}(\mu-O)(\mu-O_2)Fe^{III}$ szerkezetek, melyek Fe^{II}(µ-OH)₂Fe^{II} - dioxigén, Fe^{III}(µ-O)(µ-OH)Fe^{III} -H₂O₂, valamint Fe^{II} - H₂O₂ reakciójával állíthatók elő (6. Ábra). Ezek többsége csak alacsony hőmérsékleten (~40°C/CH₃CN, ~60°C/CH₃CN) generálható, izolálható. Kivételt képez az IndH ligandummal képzett peroxid, amely Fe^{III}(u-O₂)Fe^{III} szobahőmérsékleten is képezhető. Fe^{II} prekurzor összetételű szerkezethez juthatunk hidrogénperoxiddal történő reakciójával. PBI és Me-PBI ligandumok esetében az eddig ismert legstabilabb komplexekhez jutottak. Stabilitásuk segédligandumok alkalmazásával (szubsztituált piridinek) tovább nővelhető. A szintézisek során felhasznált ligandumok a 7. ábrán láthatóak.



6. Ábra. Néhány irodalmi példa peroxo-divas(III) komplexek előállítására

Az előállított intermedierekhez az enzimekhez hasonlóan karakterisztikus UV-vis elnyelések és rezonancia-raman rezgések rendelhetők. Ezek alapján, kiegészítve a röntgendiffrakciós mérések eredményeivel (EXAFS, X-ray), számos hasznos információ nyerhető az adott szerkezetre vonatkozóan. Az irodalomban fellelhető adatokat az 1. Táblázatban tüntettem fel.

Az irodalomban található adatokat elemezve megállapítható, hogy a peroxo-divas(III) komplexekben a vasak közötti távolságot nagymértékben meghatározza, hogy az ionok között milyen hídligandum foglal helyet. A legnagyobb Fe-Fe távolság (4,01 Å) a $[Fe_2(HB(3,5-iPr_2pz)_3)_2)(\mu-O_2)$ $(\mu$ -O₂CCH₂C₆H₅)₂] komplex esetében figyelhető meg, ahol a Fe-O-O-Fe egységet két hídhelyzetű karboxilátcsoport egészít ki. A legkisebb Fe-Fe távolságok (~3,15 Å) pedig az oxohidas szerkezeteknél találhatók. Általánosságban kijelenthető, hogy az oxohídak protonálása, illetve alkilezése a Fe Fe távolságok megnövekedésével jár együtt. A szerkezeteket tekintve tehát a kötéstávolság a következő sorrendben növekszik: $Fe^{III}(\mu-O)(m-O_2)Fe^{III} < Fe^{III}(\mu-OR)(\mu-O_2CR')(m-O_2)Fe^{III} <$ Fe^{III}(*m*-OH)(*m*-O₂)Fe^{III}. A Fe–Fe kötéshosszakban megmutatkozó különbségek a n(O-O) értékekben is megmutatkoznak, értékük lineárisan változik a kötéshossz értékével (8. Ábra), amit elméleti számításokkal is alátámasztottak. Ezen összefüggés alapián а rezonancia-raman adatok birtokában megbecsülhetjük a fémek közötti távolságot, ami nyilván kihatással van mind az intermedier stabilitására, mind a reaktivitására.

Az irodalomban, a peroxo-divas(III) komplexekre fellelhető adatokat összevetve az enzimekre kapott adatokkal, nagyfokú hasonlóságot figyelhetünk meg, ami arra utal, hogy az előállított vegyületek szerkezetileg jól leírják az enzim aktív centrumában, a fémionok koordinációs övezetében uralkodó viszonyokat.



7. Ábra. A peroxo-divas(II) komplexekhez használt ligandumok

|--|

Peroxo-vegyületek	UV-vis, λ_{max} , / nm	rRaman	r (Fe-Fe)	hivatkozás
	$(\varepsilon, M^{-1} \text{ cm}^{-1})$	v (O-O) (cm ⁻¹)	(Å)	
hDOHH _{peroxo}	630 (2800)	855	3,44	[7]
sMMO	725 (1800)	-	-	[11,12]
$\Delta^9 D$	700 (1100)	898	-	[13,14]
R2	700 (1800)	868	3,68	[15]
$[Fe_2(\mu-O)(\mu-O_2)(6-Me_3-TPA)]^{2+}$	490 (1100); 640 (1100)	847	3,14	[16]
$[Fe_2(\mu-O)(\mu-O_2)(BQPA)]^{2+}$	480 (1000); 620 (1000)	844	3,13	[17]
$[Fe_2(\mu-O)(\mu-O_2)(6-Me-BQPA)]^{2+}$	480 (1000); 620 (1000)	853	3,15	[17]
$[Fe_2(\mu-O)(\mu-O_2)(BnBQA)(CH_3CN)_2]^{2+}$	505 (1300); 650 (1300)	854	3,16	[17,18]
$[Fe_2(\mu-OH)(\mu-O_2)(BnBQA)(CH_3CN)_2]^{3+}$	730 (2400)	925	3,41	[19]
$[Fe_2(\mu-O)(\mu-O_2)(IndH)]^{2+}$	690 (1500)	874	3,16	[20]
$[Fe_2(\mu-O_2)(PBI)_4(CH_3CN)_2]^{2+}$	720 (1360)	876	-	[21]
$[Fe_2(\mu-O_2)(Me-PBI)_4(CH_3CN)_2]^{2+}$	685 (1400)	876	-	[21]
[Fe ₂ (HB(3,5-iPr ₂ pz) ₃) ₂)(µ-O ₂)	694 (1725)	885	4,01	[22,23]
$(\mu - O_2 CCH_2 C_6 H_5)_2]$				
$[Fe_2(N-Et-HPTB)(\mu-O_2)(OPPh_3)_2]$	588 (1500)	900	3,46	[24,25]
$[Fe_2(6-Me_2-BPP)_2(\mu-O_2)(\mu-OH)]^+$	644 (3000)	908	3,40	[26]
$[Fe_2(6-Me_2-BPP)_2(\mu-O_2)(\mu-O)]$	577 (1500)	847	3,17	[26]
$[Fe_2(Ph-bimp)(\mu-O_2)(\mu-O_2CC_6H_5)]^{2+}$	700 (1700)	884	3,33	[27]

^a 6-Me₃-TPA = trisz(6-metil-2-piridilmetil)-amin; BQPA = bisz(2-kinolilmetil)(2-piridilmetil)-amin; BnBQA = *N*-benzil-*N*,*N*-bisz(2-kinolilmetil)-amin; IndH = 1,3-bisz(2'-piridil-imino)-izoindolin; PBI = 2-(2-piridil)-benzimidazol; 3,5-iPr₂pz = 3,5-bisz(izopropil)-pirazol; *N*-Et-HPTB = *N*, *N*, *N*, *N*'-tetrakisz(1'-etilbenzimidazolil-2'-metil)-2-hidroxi-1,3-diaminopropán); 6-Me₂-BPP = bisz(6-metil-2-piridilmetil)-amin; Ph-bimp = 2,6-bisz[Disz[2-(1-metil-4,5-difenilimidazoli])-metil) aminometil]-4-metilfenolát.



 Ábra. Összefüggés a szerkezet (EXAFS) és a spektroszkópiai jellemzők (rRaman) között peroxo-divas(III) intermedierekre.¹⁷

Az irodalomban a szerkezeti modellek mellett számos funkcionális modell is található. Ezen rendszerek többnyire a peroxo-komplexek képződési és bomlási kinetikáját, valamint reaktivitását írják le.

A funkcionális modellek közül a $[(BnBQA)Fe^{II}(\mu-OH)_2 Fe^{II}(BnBQA)]^{2+}$ -tartalmú rendszert emelném ki, ami nagyon jól modellezi az R2 enzim elemi folyamatait (*9. Ábra*). A prekurzor komplex dioxigénnel való reakciója a korábban ismertetett [Fe₂(μ -O)(μ -O₂)(BnBQA)(CH₃CN)₂]²⁺ intermediert

eredményezi ($\lambda_{max} = 650 \text{ nm}, t_{1/2} = 40 \text{ perc } -40^{\circ}\text{C-on}$), amely sztöchiometrikus mennyiségű sav (HClO₄ v. HNO₃) hatására egy kevésbé stabilis [Fe₂(μ -OH)(μ -O₂)(BnBQA)(CH₃CN)₂]²⁺ peroxo formává alakul át ($\lambda_{max} = 730 \text{ nm}, t_{1/2} = 140 \text{ s } -40^{\circ}\text{C-on}$). Ennek exponenciális bomlása 15-20%-os hozammal a vegyes vegyértékű [Fe^{III,IV}₂(μ -O)(BnBQA)]⁵⁺ komplexet eredményezi (antiferromágneses csatolt vas(III)/vas(IV) centrum, S = $\frac{1}{2}$ Mössbauer és ESR), amely az R2 enzim esetében az oxidációért felelős reaktív részecskeként (X) került említésre.¹⁹



9. Ábra. Szerkezeti és funkcionális R2 modell¹⁹

Megállapítást nyert, hogy a [(PBI)Fe^{III}(µ-O₂)Fe^{III}(PBI)]⁴⁺ összetételű komplex képződési és bomlási folyamata reverzibilis, valamint hogy a peroxo-komplex bomlása dioxigént eredményez. Ez alapján a vizsgált rendszer a kétmagvú kataláz enzimek funkcionális modelljének tekinthető.²¹

A $[Fe^{II}(IndH)(MeCN)_3](CIO_4)_2$ és H_2O_2 reakciója acetonitrilben $[Fe_2(\mu-O)(\mu-O_2)(IndH)_2]^{2+}$ összetételű komplexet eredményez, amely aktív katalizátornak bizonyult egyes oxigén atom transzfer (OAT) és hidrogén atom transzfer (HAT) folyamatokban. Oxidálószerként hidrogén peroxidot, modellszubsztrátként szubsztituált tioanizol és benzilalkohol származékokat használtak (*10. Ábra*).²⁰



10. Ábra. [Fe₂(*ě*-O)(*ě*-O₂)(IndH)₂]²⁺-katalizált OAT és HAT folyamatok²⁰

A részletes reakciókinetikai vizsgálatok során a szubsztituált szubsztrátokra kapott *Hammett* összefüggések mindkét esetben negatív ρ értéket eredményeztek (ρ = -0,4 és -0,85), amely értékek alapján az oxidációért felelős részecskéhez elektrofil karakter társítható (*11. Ábra*). Mivel a peroxidok nukleofil karakterűek, ezért feltételezhető hogy a fenti HAT és OAT folyamatok Fe^{IV}O intermedieren keresztül játszódnak le.²⁰



11. Ábra. A $[Fe_2(\mu-O)(\mu-O_2)(IndH)_2]^{2+}$ -katalizált OAT és HAT folyamatok esetében kapott Hammett összefüggések.²⁰

A benzilalkohol oxidációja során észlelt kinetikus izotóp effektus értéke (KIE = 9,1) alapján valószínűsíthető, hogy a hidrogén atom transzfer a sebesség-meghatározó lépésben megy végbe (12. Ábra).



12. Ábra. A $[Fe_2(\mu-O)(\mu-O_2)(IndH)_2]^{2+}$ -katalizált HAT folyamatok esetében észlelt kinetikus izotóp effektus (*KIE*).

A szubsztituált tioanizol származékok esetében a sebességeket a redoxipotenciálok függvényében ábrázolva az egyenes meredeksége -0,8-nak adódott, amely alapján kijelenthetjük, hogy a folyamat direkt oxigén transzferen keresztül játszódik le, az elektrontranszfer, mint lehetséges részlépés kizárható (*13. Ábra*).



13. Ábra. A redoxi potenciál és a reakciósebességi állandók közötti összefüggés a $[Fe_2(\mu-O)(\mu-O_2)(IndH)_2]^{2^+}$ -katalizált OAT folyamatra.²⁰

Köszönetnyilvánítás

A kutatás az Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (OTKA K108489), és a Bolyai János Kuratórium (MTA) finanszírozásával valósult meg.

Hivatkozások

- 1. Costas, M.; Mehn, M. P.; Que, L., Jr. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 939. https://doi.org/10.1021/cr020628n
- Du Bois, Mizoguchi, T. J.; Lippard, S. J. Coord. Chem. Rev. 2000, 202-204, 443.
 - https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)00336-2
- Stubbe, J.; van der Donk, W. Chem. Rev. 1998, 98, 705. https://doi.org/10.1021/cr9400875
- 4. Lindqvist, Y.; Huang, W.; Schneider, G.; Shanklin, J. *EMBOJ.* **1996**, *15*, 4081.
- Rosenzweig, A. C.; Lippard, S. J. Acc. Chem. Res. 1994, 27, 229. https://doi.org/10.1021/ar00044a003
- Rosenzweig, A. C.; Nordlund, P.; Takahara, P. M.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 409. https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90222-8
- Han, Z.; Sakai, N.; Böttger, L. H.; Klinke, S.; Hauber, J.; Trautwein, A. X.; Hilgenfeld, R. *Structure* 2015, 23, 1. https://doi.org/10.1016/j.str.2014.12.001
- Vu, V. V.; Emerson, J. P.; Martinho, M.; Kim, Y. S.; Münck, E.; Park, M. H.; Que, L., Jr. *PNAS* 2009, *106*, 14814. https://doi.org/10.1073/pnas.0904553106
- 9. Stenkamp, R. E. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 715. https://doi.org/10.1021/cr00027a008
- Wilkins, P. C.; Wilkins, R. G. Coord. Chem. Rev. 1987, 79, 195. https://doi.org/10.1016/0010-8545(87)80003-6
- Liu, K. E.; Valentine, A. M.; Wang, D.; Huynh, B. H.; Edmondson, D. E.; Salifoglou, A.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10714.
- Valentine, A. M., Stahl, S. S.; Lippard, S. J. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 3876. https://doi.org/10.1021/ja9839522
- Broadwater, J. A.; Ai, J.; Loehr, T. M.; Sanders, L.; Fox, B. G. *Biochemistry* 1998, *37*, 14664. https://doi.org/10.1021/bi981839i
- Broadwater, J. A.; Achim, C.; Münck, E.; Fox, B. G. Biochemistry 1999, 38, 12197. https://doi.org/10.1021/bi9914199
- Skulan, A. J.; Brunold, T. C.; Baldwin, J.; Saleh, L.; Bollinger, J. M.; Solomon, E. I. J. *Am. Chem. Soc.* 2004, *126*, 8842. https://doi.org/10.1021/ja049106a
- 16.

Structural and functional models of non-heme diiron oxidoreductases

Metalloenzymes with non-heme diiron centers have emerged as important class of enzymes. Several members of them are now structurally characterized. The following review summarizes recent investigations with non-heme diiron oxidoreductases soluble (Ribonucleotide reductase (R2), methane monooxygenase (sMMO), stearoyl-acyl carrier protein (ACP) Δ^9 -desaturase (Δ^9 D), human deoxyhypusine hydroxylase (hDOHH) and hemerythrin (Hr), via their synthetic models focusing specifically on the synthesis, characterization, and spectral behavior of well-defined peroxo-diiron(III) intermediates. Fundamental biochemical processes are catalyzed by these enzymes, such as biodegradation of hydrocarbons, or synthesis of essential biomolecules including DNA building blocks. Better understanding on biologically determinant reactions may lead scientists to the discovery of crucial drugs and even "green solutions" in industrial applications. A brief overview on reaction kinetics, that has afforded useful insights into the mechanism of dioxygen activation and substrate oxidation by diiron centers, is also included in this paper.

Dong, Y. H.; Zang, Y.; Shu, L. J.; Wilkinson, E. C.; Que, L., Jr.; Kauffmann, K.; Münck, E. J. Am. Chem. Soc. **1986**, 108, 5027. https://doi.org/10.1021/ja00276a065

- Fiedler, A. T.; Shan, X.; Mehn, M. P.; Kaizer, J.; Torelli, S.; Frisch, J. R.; Kodera, M.; Que, L., Jr. *J. Phys. Chem.* 2008, *112*, 13037. https://doi.org/10.1021/jp8038225
- Kryatov, S. V.; Taktak, S.; Korendovych, I. V.; Rybak-Akimova, E. V.; Kaizer, J.; Torelli, S.; Shan, X.; Mandal, S.; MacMurdo, V. L.; i Payeras, A. M.; Que, L., Jr. *Inorg. Chem.* 2005, *44*, 85. https://doi.org/10.1021/ic0485312
- Cranswick, M. A.; Meier, K. K.; Shan, X.; Stubna, A.; Kaizer, J.; Mehn, M. P.; Münck, E.; Que, L., Jr. *Inorg. Chem.* 2012, *51*, 10417. https://doi.org/10.1021/ic301642w
- Pap, J. S.; Cranswick, M. A.; Balogh-Hergovich, É.; Baráth, G.; Giorgi, M.; Rohde, G. T.; Kaizer, J.; Speier, G.; Que, L., Jr. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 3858. https://doi.org/10.1002/ejic.201300162
- Pap, J. S.; Draksharapu, A.; Giorgi, M.; Browne, W. R.; Kaizer, J.; Speier, G. *Chem. Commun.* 2014, *50*, 1326. https://doi.org/10.1039/C3CC48196D
- 22. Kim, K.; Lippard, S. J. J. Am. Chem. Soc. **1996**, 118, 4914. https://doi.org/10.1021/ja9604370
- Brunold, T. C.; Tamura, N.; Kitajima, M.; Moro-oka, Y.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5674. https://doi.org/10.1021/ja980129x
- Dong, Y.; Yan, S.; Young, V. G., Jr.; Que, L., Jr. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 1996, 35, 618. https://doi.org/10.1002/anie.199606181
- Dong, Y.; Ménage, S.; Brennan, B. A.; Elgren, T. E.; Jang, H. G.; Pearce, L. L.; Que, L., Jr. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 1851. https://doi.org/10.1021/ja00058a033
- Zhang, X.; Furutachi, H.; Fujinami, S.; Nagatomo, S.; Maeda, Y.; Watanabe, Y.; Kitagawa, T.; Suzuki, M. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 826. https://doi.org/10.1021/ja045594a
- Ookubo, T.; Sugimoto, H.; Nagayama, T.; Masuda, H.; Sato, T.; Tanaka, K.; Maeda, Y.; Okawa, H.; Hayashi, Y.; Uehara, A.; Suzuki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 701. https://doi.org/10.1021/ja953705n

Synthetic diiron complexes are often investigated as structural models of active centers in the title enzymes. They are proved to have the potential to catalyze the oxidation of alkanes, alcohols, sulfides in the presence of atmospheric dioxygen, or various peroxides. Highly reactive, short lived oxygen-species have been identified as responsible particles for most biochemical transformations. Typical forms of these intermediates can be described by the following general structures: $Fe^{III}(\mu$ -O₂)Fe^{III}; $Fe^{III}(\mu-O)(\mu-O_2)Fe^{III}$, $Fe^{III}(\mu-OH)(\mu-O_2)Fe^{III}$, Fe^{III}(µ-OR) $(\mu-O_2)Fe^{III}$, $Fe^{III}(\mu-OR)(\mu-O_2CR')(\mu-O_2)Fe^{III}$. Early results in this subject showed that high valent oxidation states of oxo-, peroxo complexes could be maintained only at extreme conditions (-40-60°C, specific organic solvents). Fortunately, advances in ligand design and synthesis have improved the lifespan. By fine tuning bi-, tri- and tetradentate N-donor ligands the iron-oxygen species have become observable and identifiable by all spectroscopic methods at room temperature as well. Oxygen donor ligands (carboxylates, alcohols) are less favored, however they are widespread in enzymes. In models, the electron rich N-donor environment has the advantage of flexible electron adjustment in the iron centered N-Fe-O system. Both organic and inorganic peroxides are suitable for synthesis. Usually, a precursor complex (in the form of a mononuclear Fe^{II}) is converted to an oxo-bridged Fe^{III} complex. The bridge moiety strongly determines reactivity. By analyzing literature data it can be concluded that in peroxodiiron(III) complexes reactivity depends on the Fe-Fe distance that is naturally regulated by the corresponding bridge ligand. Concerning the extremes: highest Fe-Fe distance (4,01 Å) was observed in a double carboxylate-bridged

 $[Fe_2(HB(3,5-iPr_2pz)_3)_2)(\mu-O_2)(\mu-O_2CCH_2C_6H_5)_2]$ complex. The shortest Fe-Fe distance was generated by a m-O bridge. Generally, protonation of oxo-bridges and alkylation increase bond distance. The sequence is as follows: $Fe^{III}(\mu-O)(\mu-O_2)Fe^{III}$ $< \operatorname{Fe}^{III}(\mu-OR)(\mu-O_2CR')(\mu-O_2)\operatorname{Fe}^{III} < \operatorname{Fe}^{III}(\mu-OH)(\muO_2)\operatorname{Fe}^{III}$ Various values of Raman n(O–O) vibrations can confirm the differences in bond distances, furthermore articles often include theoretical quantum chemical calculations in order to support data. Mössbauer spectroscopy, experimental X-rav crystallography and EXAFS are widely used for the same purpose. Peroxodiiron(III) complexes are considered good structural models by adequately mimicking the coordination sphere in the active center of the corresponding enzyme.

In contrast with the above strategy functional modelling requires chemical approach. There is less focus on structural similarity. Mostly, the formation and self-decay of peroxo-complexes is investigated. As an example, the $[(BnBQA)Fe^{II}(\mu-OH)_2Fe^{II}(BnBQA)]^{2+}$ complex can be mentioned here. The reaction of this precursor state with dioxygen results in a $[Fe_2(\mu-O)(\mu-O_2)(BnBQA)(CH_3CN)_2]^{2+}$

form that can be transformed into an unstable $[Fe_2(\mu-OH)(\mu-O_2)(BnBQA)(CH_3CN)_2]^{2+}$ with stoichiometric amount of acid (HClO₄ v. HNO₃). The active species was identified as a mixed-valent $[Fe^{III,IV}_2(\mu-O)(BnBQA)]^{5+}$ complex responsible for oxidation in functional R2 enzyme mimicking reactions.

The reactivity of active intermediates is often tested by small organic substrates (thioanisole, benzyl alcohol) in oxygen atom transfer (OAT), or hydrogen atom transfer (HAT) reactions. Characteristic changes in UV-Vis spectra can be followed by time-based measurements as is was done with $[Fe^{II}(IndH)(MeCN)_3](ClO_4)_2$. Hammett constants, calculated by the use of para-substituted substrates, revealed the short presence of an Fe^{IV}O intermediate involved in the oxidation. Labelled, non-radioactive heavy-atoms (D, ¹⁸O) have been successfully applied for the determination of kinetic isotope effect (KIE). The KIE value is an important information on the nature of the rate-limiting step in the mechanism. During the oxidation of benzyl alcohol (KIE=9.1) catalyzed by $[Fe_2(\mu-O)(\mu-O_2)(IndH)_2]^{2+}$ hydrogen atom transfer happens in the rate-limiting step. Thioanisole oxidation catalyzed by the same intermediate has been found to be a direct oxygen transfer reaction determined by the correlation between redox potentials and rate constants.

The final aim of reaction kinetics is the discovery of an exact enzyme mechanism. Based on the results summarized in this article, an explicit challenge for the future is the design of new catalysts that are able to use dioxygen or peroxides for efficient and selective oxidation reactions that can be exploited in both pharmacology and several industrial area.

Metalloproteinek fémkötőhelyein alapuló oligopeptidek, mint potenciális toxikus fémion érzékelők

SZEKERES Levente^a, SZUNYOGH Dániel^b, GALBÁCS Gábor^a és JANCSÓ Attila^{a,*}

^aSZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Dóm tér 7, 6720 Szeged, Magyarország ^bMTA-SZTE Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport, Dóm tér 7, 6720 Szeged, Magyarország

1. Bevezetés

A környezetben megjelenő toxikus fémionok lehetnek természetes eredetűek, de származhatnak antropogén forrásokból is. Ezek a fémionok a környezetben különböző átalakulásokon mehetnek át, ami befolyásolja megjelenési formájukat, mobilitásukat, oldhatóságukat és ennek megfelelően bioelérhetőségüket is.1 Toxicitásuk miatt a táplálékláncba kerülésük jelentős kockázati tényezőt jelent a tápláléklánc összes szereplője számára. Mindez elengedhetetlenné teszi hatékony kimutatásukat és meghatározásukat, szükség esetén eltávolításukat a szennyezett közegekből, továbbá a mérgezések kezelését, a detoxifikálást. A fémionok vizes környezeti mintákból vagy biológiai fluidumokból történő kimutatására elterjedten használt robusztus, (nagy)műszeres analitikai kémiai eljárások melletti alternatívaként egyre nagyobb figyelem fordul kémiai / biokémiai szenzorok fejlesztése felé. Ezekben jól megtervezett molekulák fémion megkötése az adott fémion kimutatására / mennyiségi meghatározására alkalmas (pl. optikai) jelet produkál.²⁻⁴ A területen belül is különösen érdekes bio-inspirált molekulák, illetve rendszerek receptorként történő alkalmazása, melyek a "természet által kódoltan" hordozhatják egy szenzor számára kulcsfontosságú sajátságokat, az érzékenységet és a szelektivitást. Oligopeptidek, fehérjék és enzimek, vagy akár egyszerűbb sejtek, fémionokkal adott szelektív reakcióik révén (bio)kémiai szenzorok ígéretes receptorai lehetnek. A szakirodalomban számos összefoglaló közlemény tárgyalja ilyen típusú receptorok optokémiai szenzorokban történő alkalmazását.⁵⁻⁹ A szintetikus oligopeptid szenzorok ugyan drágábbak, mint a sejt alapúak, azonban rendkívül érzékennyé és szelektívvé tehetők. Emellett az optimális működési körülmények tekintetében alkalmazásuk rendszerint jóval kevésbé korlátozott, mint akár a sejt, akár a fehérje alapú szenzoroké.

A fluoreszcenciás elven működő fémion-szenzorok meglehetősen népszerűek,^{2,3,5,10} köszönhetően előnyös tulajdonságaiknak, például (i) érzékenység, (ii) egyszerű alkalmazhatóság, (iii) a lumineszcens tulajdonságok finom-hangolásának számos lehetősége, és nem utolsó sorban (iv) mérsékelt költségük.² Fluoreszcens szenzor molekulák kiválóan alkalmazhatók fémionok kimutatására / mérésére élő rendszerekben is.^{6,11} Így nem meglepő, hogy a peptid típusú receptoron alapuló fémion érzékelők is leginkább fluorofór csoporto(ka)t tartalmaznak jelképző

elemként.^{5–7,9,12} A fluoreszcenciás elven működő fémion-szenzorokat a fémion-kötőhely és a fluorofór csoport(ok) egymáshoz viszonyított helyzete alapján három nagyobb csoportba sorolhatjuk.¹³ Az ún. I. Típusú. érzékelőkben maga a fluorofór a fémion-kötő ligandum. A peptid alapú szenzorok szinte kizárólag a II. illetve III. típusba sorolhatók (1. Ábra). A II. Típusú molekulákban a fluorofór csoporthoz közvetlenül vagy egy "spacer" révén kapcsolódik a fémion felismerő egység. A III. típusú érzékelőkben a receptorhoz kapcsolódó két egység, egy fluorofór és egy másik elem között alakul ki kapcsolat. Ha ez a két elem megfelelő fluorofór párt alkot, FRET (fluorescence resonance energy transfer) effektus jöhet létre, illetve a fluorofór kölcsönhatása a másik elemmel teljesen új kémiai minőséget is létrehozhat (excimer vagy exciplex képződik), amely egy új fluoreszcencia sáv megjelenését eredményezi.3



1. Ábra. A peptid fémion-felismerő egységet tartalmazó fémion-érzékelők két jellemző típusa

Számos publikáció igazolja a fenti szerkezeti csoportokba sorolható fluorofór-jelzett peptidek alkalmazhatóságát fémionok érzékelésére. Működési elvük szerint "TURN ON" választ adó CHEF (chelation-enhanced fluorescence),14-17 OFF" "TURN jellegű CHEQ (chelation-enhanced quenching),17,18 illetve FRET típusú vizsgáltak.19,20 szenzorokat is А szenzorikai alkalmazhatóság szempontjából ideális "TURN ON" választ, de a "TURN OFF" effektust is a fluorofór gerjesztett állapotának HOMO szintje és a receptor HOMO ill. LUMO

^{*} Főszerző. Tel.: +36-62-544335 ; fax: +36-62-544340; e-mail: jancso@chem.u-szeged.hu

pályái közötti belső elektron transzfer folyamat, az ún. PET (photoinduced electron transfer) ki/be kapcsolása okozhatja (2. Ábra).²¹ Mindenképpen meg kell jegyezni, hogy CHEF CHEQ hatást más mechanizmusok vagy is eredményezhetnek.^{3,6} A FRET mechanizmus alapfeltétele, hogy a gerjesztett fluorofór (donor) emissziós sávja átfedjen a másik, alapállapotú fluorofór (akceptor) valamely abszorpciós sávjával, melynek révén dipól-dipól kölcsönhatáson alapuló sugárzásmentes rezonancia energia átmenet tud létrejönni a két molekularészlet között. A transzfer eredményeként az akceptor csoport fluoreszcens emissziója erősödik, míg a donor emissziós intenzitása csökken (2. Ábra).^{3,10} A FRET kialakulásának másik fontos feltétele, hogy a csoportok belül legyenek a kölcsönhatás hatótávolságán, az ún. Förster-távolságon, melyet a fémion-megkötése által okozott konformáció változás biztosíthat. Mivel fémion-indukálta FRET а megvalósulásához több feltétel együttes teljesülése (erős fémion-koordináció valamint a donor és akceptor csoportok kellő közelségbe kerülése a fémion-megkötődés hatására) szükséges, ezért az ilyen típusú szenzorokkal nagyobb eséllyel nyerhető fémion-szelektív válasz.

Fémion koordináció CHEQ Fluorofór Receptor Fluorofór **TURN ON** CHEF Fluorofór Recepto FRET

2. Ábra. A PET be-, ill. kikapcsolásával működő "TURN OFF" és "TURN ON", valamint FRET szenzorokra jellemző molekulapálya energiaszintek a fémion megkötődése előtt és után^{10,2}

A fémionok érzékelésére potenciálisan alkalmas fluoreszcens peptideket bemutató munkák rendszerint nagy hangsúlyt fektetnek a rendszerek analitikai kémiai szempontból történő leírására. A fémionokkal képződő komplexek oldatbeli speciációjának feltérképezése azonban szinte mindig hiányzik ezekből a munkákból, noha ennek esszenciális jelentősége lenne a vegyületek alkalmazhatósági körülményeinek (pH- és koncentráció-tartomány, fémion-ligandum arány) megállapítása,

vagy a molekulák továbbfejlesztése szempontjából. Ugyancsak ritka, hogy az érzékelő rendszereket immobilizált formában is vizsgálnák,18,22 ami viszont a szenzorikai alkalmazásuk szempontjából lenne kulcsfontosságú.

Csoportunk az utóbbi években számos olyan, cisztein tartalmú oligopeptid előállításával és vizsgálatával foglalkozott, melyek szekvenciáit nehézfémionok megkötésében szerepet játszó (vagy arra potenciálisan alkalmas) fehérjék (szabályzó, szállító vagy dajka fehérjék) inspirálták. A peptidek jelentős "szoft" fémion affinitását kihasználva, módosításuk révén olyan vegyületek fejleszthetők, melyek toxikus fémionok hatékony, szelektív érzékelésére alkalmasak lehetnek. A megfelelő előállítási metódussal, ill. jól megtervezett módosításokkal (fluorófor csoportok beépítésével) mind a fémion-megkötésre adott válasz, mind a szilárd hordozón történő rögzítés biztosítható. Jelen közlemény az ezen a területen végzett munkáinkról és eddigi eredményeinkről ad összefoglaló jellegű áttekintést.

2. A CueR fémszabályzó fehérjék fémion-kötő szakaszát modellező oligopeptidek vizsgálata

A fémionok sejten belüli koncentrációjának érzékelése és szabályzása alapvető fontosságú az élő szervezetek, így a baktériumok számára is, fémion-homeosztázisuk fenntartásához.²³ A prokariótákban ezt a szerepet a transzkripció szintjén működő fémszabályzó, vagy más néven fémszenzor fehérjék töltik be.23-25 Ezek az ún. transzkripciós faktorok DNS-hez való kötődésükkel elősegítik vagy gátolják a fémionok felvételében, szállításában, eltávolításában, raktározásában vagy redoxi-átalakításában szerepet játszó fehérjék termelődését.²³⁻²⁵ Funkcionális szempontból ezen fehérjék két típusba sorolhatók, melyek a fémion felvételéért vagy a fémion eltávolításáért / tárolásáért felelős gének szabályzását végzik.23 Szerkezeti hasonlóságaik alapján tíz olyan fehérjecsaládot különböztetünk meg, melyeknek legalább egy eleme fémion-érzékelőként működik.23 Az egyik legnépesebb, és legváltozatosabb család a MerR, melynek tagjai transzkripciós aktivátorként működnek.^{23,26} Ebbe a családba tartozik a baktériumok réz-eltávolítás folyamataiban résztvevő fehérjék termelődését irányító CueR is.²⁷ A CueR valójában egy, a 11. elemcsoport egyértékű fémionjait szelektíven érzékelni képes, természetes bioszenzornak is tekinthető, hiszen a megfelelő gén transzkripcióját kimagasló érzékenységgel, de csak Cu+-, Ag+- vagy Au+-ionok jelenlétében aktiválja.28 A szelektív működésben döntő szerepet játszik a molekula *C*-terminális végéhez közel elhelyezkedő 10-12 aminosavból álló fémion-kötő hurok, mely a végein elhelyezkedő két cisztein közvetlen koordinációja és egyéb kölcsönhatások révén lineáris koordinációs geometriába kényszeríti a fémionokat.²⁸ A megfelelő fémion felismerése szempontjából tehát alapvető kérdés, hogy milyen módon képesek, illetve képesek-e egyáltalán egyéb fémionok megkötődni ezen a kötőhelyen? Vajon a fentebbi egyértékű ionokhoz hasonló koordinációs kémiai preferenciákkal bíró Hg²⁺ miért nem képes indukálni a fehérje működését? A funkcionális szelektivitás a fémkötő doménhez történő



koordinációban vagy az ennek következtében bekövetkező / elmaradó fehérje-szerkezetváltozásban keresendő inkább? A fenti kérdésekre adandó válaszok megtalálása nem csak a fehérje mechanizmusának megértése szempontjából érdekes, de az így nyert információkat fel lehet használni akár a szabályzási mechanizmuson alapuló bioszenzorok, akár a kötőhely továbbgondolt szekvenciáját, mint receptort alkalmazó fémion érzékelők fejlesztéséhez. A fémkötő domén fémion-kötő sajátságainak megismerése céljából több olyan peptidet is előállítottunk, melyek szekvenciája valamely CueR fémkötő doménjével azonos, vagy azok egy-két aminosavban módosított variánsai (3. Ábra).



3. Ábra. Bakteriális CueR fehérjék fémkötő szakaszát alkotó peptidek (PP, EC) és variánsaik (PS, HS) szekvenciái (a módosítások hely aláhúzással jeölve), valamint egyikük sematikus szerkezete a potenciális fémion-kötőhelyek kiemelésével. (A peptidek szekvenciáiban az egyes aminosavakat az egyszerűség kedvéért mindenhol az egybetűs kódjaikkal jelöljük. (A: Ala, C: Cys, P: Pro, G: Gly, D: Asp, S: Ser, I: Ile, Q: Gln, H: His)

A módosítások olyan pozíciókban történtek, melyek a 12. elemcsoport fémionjaira érzékeny fehérjék fémkötőhelyeihez tették hasonlóbbá a peptidek szekvenciáit. Célunk az így nyert ligandumok és különböző karakterű egy- és kétértékű fémionok $(Ag^+,$ Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}) kölcsönhatásának tanulmányozása volt pH-potenciometriás titrálások, valamint UV-, CD- és NMR-spektroszkópiai módszerek alkalmazásával.

2.1. A CueR fémkötő szakaszát modellező peptidek kölcsönhatása Zn^{2+} - $^{29-31}$ és Cd^{2+} -ionokkal 32,33

Az oligopeptidek tiolcsoportjainak koordinációját a vizsgált átmenetifém-ionokhoz (Hg2+- és Ag+-ionok esetében is) UV-titrálásokkal követtük. Erre a kölcsönhatás létrejöttét egyértelműen jelző tiolátfémion töltésátviteli sávok ~210-300 nm hullámhossz-tartományban való megjelenése ad lehetőséget.34 A különböző fémion-ligandum összetételű rendszerekben felvett spektrum-sorozatokkal igazoltuk, hogy mindkét fémion már enyhén savas pH-tartományban is képes leszorítani a tiolcsoportok protonjait és pH~6-ra kialakulnak a két koordinálódó tiolátot tartalmazó ML

összetételű komplexek. Főként Cd2+-ionokkal ligandumfelesleg esetén egyértelműen kimutatható volt a két ligandum két-két tiolátcsoportjának részvételével kialakuló bisz-komplexek képződése (lásd a két abszorbancia-változás lépcsőt a 4. Ábrán).



4. Ábra. A Cd²⁺ – PP 0,5:1 összetételű rendszer részecske eloszlási diagramja ($c_{PP} = 110^{-4}$ M) az UV-titrálások koncentrációjára szimulálva, valamint a 245 nm-en mért abszorbancia változás () pH-függése. (A diagramon L a teljesen deprotonált ligandumot, míg H a protont jelöli.)

1. Táblázat. A Zn ²⁺	⁺ és Cd²⁻	⁺ -ionok monokomple:	keinek látszólagos	stabilitási állandói ^a	, valamint a lig	gandumok j	avasolt kötésmóo	lja
			0					

Ligandum	Zn^{2+} , lg K'		Cd ²⁺ ,	Cd^{2+} , lg K'	
	pH = 7,0	pH = 8,0	pH = 7,0	pH = 8,0	résztvevő csoportok
РР	6,48	8,29	8,27	10,09	2×S ⁻ ,COO ⁻ ,(COO ⁻)
PS	6,53	8,39	8,20	10,03	2×S ⁻ ,COO ⁻ ,(COO ⁻)
HS	7,02	9,06	8,26	10,11	$2 \times S^{-}, N_{im}, (COO^{-})$
EC	6,90	8,85	8,57	10,51	2×S ⁻ ,COO ⁻ ,COO ⁻

^a K' = $\frac{\Sigma[M^{2+}]_{k\"{o}t\"{o}tt}}{[M^{2+}]_{szabad}\Sigma[L]_{szabad}}$

¹H-NMR mérésekkel nem tiolátcsoportok csak а koordinációját, de legalább az egyik Asp-karboxilát részvételét is igazolni tudtuk a His aminosavat nem tartalmazó peptidek esetében. HS А peptid törzskomplexeiben (ML, ML₂), illetve a protonált bisz-komplexekben $(MH_2L_2,$ MHL_2) a hisztidin imidazolgyűrűje – az oldallánc protonjai ¹H-rezonanciáinak fémionok hatására történő kémiai-eltolódás változásai alapján – egyértelműen kötődik mindkét fémionhoz. pH-potenciometriás titrálásokkal meghatároztuk a fémionpeptid rendszerekre jellemző részecske-speciációt, valamint a képződő komplexek stabilitását. Az **4. Ábra** a bisz-komplexek jelentős mennyiségben való képződését szemlélteti a Cd²⁺–**PP** 0,5:1 mólarányú rendszerben. A Zn²⁺és Cd²⁺-ionokat valamint a **PP** ligandumot 1:1:1 összetételben tartalmazó virtuális rendszerre szimulált részecskeeloszlás (**5. Ábra**) pedig a két fémion 1:1 összetételű komplexeinek stabilitás-különbségét tükrözi.

Az **1. Táblázat** a négy peptid Zn^{2+} és Cd^{2+} (mono)komplexeinek pH = 7,0 és 8,0-ra számítható látszólagos stabilitási állandóit hasonlítja össze. Ezek alapján megállapítható, hogy a peptidek eltérő szekvenciái donorcsoport-összetétele és csak kis mértékben befolyásolják az adott fémionhoz való affinitásukat. A több potenciális donorcsoport jelenléte ugyan az EC esetében okoz szerény mértékű stabilitás-növekedést, azonban a His koordinálódásának hatása csak a Zn2+ komplexek stabilitásában látszik, feltehetőleg a Zn2+ imidazol-donor iránti jelentősebb preferenciája miatt, összevetve a Cd²⁺-ionnal. A His stabilitás-növelő hatása valószínűleg azért nem jelentkezik markánsabban a hisztidint nem tartalmazó peptidekhez képest, mert ezekben az Asp karboxilátok kötődése hasonló hozzájárulást eredményez.



5. Ábra. A $Zn^{2+} - Cd^{2+} - PP$ 1:1:1 összetételű rendszerre szimulált részecske eloszlási diagram ($c_{PP} = 110^{-3}$ M). A Zn^{2+} -ion komplexeit szaggatott, míg a Cd^{2+} -komplexeket folytonos vonalak jelölik. . (A diagramon L a teljesen deprotonált ligandumot, míg H a protont jelöli.)

2.2. A CueR fémkötő szakaszát modellező peptidek kölcsönhatása Hg²⁺- $^{29-31}$ és Ag⁺-ionokkal^{31,33}

Hg²⁺-ionok extrém affinitása tiolátokhoz Α tanulmányozott peptideknél is rendkívül stabilis komplexek képződését eredményezi.35 Az ekvimoláris összetételű Hg2+ - ligandum rendszerekben már pH 2 alatt az összes fémion kötött formában van jelen, és a peptidek kötésmódja UV- és ¹H-NMR titrálásaink alapján a teljes pH-tartományban változatlan {2Cys-S-} típusú. Sem bisz-komplexek képződését, sem a HS His egységének koordinációját nem tudtuk kimutatni a komplex(ek)ben. Cirkuláris dikroizmus méréseink szerint a két tiolátHg2+ kötés kialakulásával a ligandumok konformáció változást szenvednek, melynek révén feltehetőleg a CueR fémion-kötött állapotát is jellemző hurokszerű szerkezet jön létre, ami biztosítja a Hg²⁺ számára ideális (torzult) lineáris koordinációs geometriát.36

Az Ag⁺ – peptid rendszerekben az Ag⁺-ion a kétértékű fémionoktól markánsan eltérő koordinációs sajátságokat mutat. A fémion peptidekhez való koordinációját már 2-es pH körül egyértelműen bizonyítják UV-, CD- és NMR méréseink, valamint a pH-potenciometriás mérések során már savas pH-n megfigyelt extra lúgfogyás a szabad ligandumhoz képest (6. Ábra). Az Ag⁺ – PP 1:1 mólarányú rendszerben meglepő módon pH ~ 5,5-6 felett egy spektrofotometriásan és a titrálási görbéken is jól követhető deprotonálódási folyamat játszódik le. amely egyértelműen а második tiolcsoport protonvesztéséhez és koordinálódásához rendelhető. Ez alapvető eltérés a kétértékű fémionokhoz képest, melyek pH = 6 körül már mindkét cisztein deprotonálódott tiolcsoportjához kötődnek. A 6-os és 8-as pH-n Ag+-ionok jelen- és távollétében felvett ¹H-NMR spektrumok alátámasztják ezeket a megállapításokat. A 6-os pH-n mért spektrumokon a δ = 2,8-3,4 ppm-tartományban a kötött ciszteinre jellemző és a szabad ligandum cisztein C8H2 jeleire emlékeztető rezonanciák együttes, hasonló intenzitású jelenléte olyan részecskére utal, melynek két izomer szerkezetében az egyik, ill. másik Cys kötődik a fémionhoz, és a szerkezetek közötti ligandumcsere az NMR időskálán lassú (7. Ábra). pH = 8,8-nál már egyértelmű mindkét tiolát koordinálódása az Ag+-ionhoz.



6. Ábra. Az Ag⁺ – **PP** 1:1 összetételű rendszer és a szabad **PP** ligandum-koncentrációra normált titrálási görbéi a ligandumra fogyott lúgekvivalenseket a pH függvényében ábrázolva, ill. a fémion jelen- () és távollétében () mért abszorbancia változás 230 nm-en



7. Ábra. Az **PP**¹H-NMR spektrumának részletei Ag⁺-ionok jelen és távollétében kétféle pH-n. Az üres nyilak a nem kötött, míg a teli nyilak az Ag⁺-ionokhoz kötött Cys egységek CH₂ rezonanciáit mutatják.

A p $K_{\rm s} \sim 6.5$ értékkel jellemezhető deprotonálódást kísérő viszonylag kicsi abszorbancia növekedés felveti annak lehetőségét is, hogy a már savas körülmények között tiolátként kötődő Cys mellett a másik Cys egység oldallánca pH ~ 6-ig protonált, tiol formában koordinálódik az Ag⁺-ionhoz. A protonált tiolcsoport Ag⁺-koordinációja ugyan nem gyakori, de van rá példa az irodalomban.³⁷ A {Cys-S⁻,Cys-SH} típusú kötésmód CueR fehérje fémkötő centrumában is racionális lehetőség, aminek jelentős szerepe lehet a molekula működési mechanizmusában.³¹

2.3. A CueR modellpeptidek vizsgálatával nyert eredmények hasznosíthatósága

А fémion – oligopeptid rendszerek vizsgálatának legjelentősebb eredménye, hogy a modellezett CueR egy- és kétértékű fémionokkal szemben mutatott eltérő viselkedését a peptidek szintjén is ki tudtuk mutatni. Ez egyrészt komoly lépés a CueR fémion-felismerő mechanizmusának megértése felé, másrészt lehetőséget teremt arra, hogy a mechanizmus révén fluoreszcenciás jelet felismerő produkáló. genetikailag módosított baktériumokat tervezzünk, melyek egy adott fémionra hangolható szelektív fémion-érzékelőként működhetnek. Csoportunkban jelenleg is folynak kutatások ebben az irányban. Az eredmények másik tanulsága, hogy a CueR fémkötő szakasza által inspirált flexibilis molekuláknál rigidebb szerkezetek fémion-szelektivitás szükségesek а jobb módosíthatóságához, ugyanakkor a Hg²⁺-ionok által kialakított hurokszerű szerkezet optimális lehet FRET fluoreszcenciás érzékelők fejlesztéséhez.

3. Az AfArsR fehérje As(III)-kötő szakaszát modellező peptid vizsgálata

Az Acidithiobacillus ferrooxidans baktériumban található ArsR arzén szabályzó fehérje a C-terminus-hoz közeli flexibilis fragmensén található három Cys tiolátcsoportjai révén köti az As(III)-at.38 Ez a (fél)fémkötő szakasz azért keltette fel csoportunk érdeklődését, mert modellszámítások alapján a megkötődés folyamatában először két szomszédos Cys egység kapcsolódik az As(III)-hoz, majd ez elősegíti a harmadik, távolabbi Cys-tiolát koordinációját.38 Ennek révén a molekula As(III)-at nem kötő állapotában egymástól távol elhelyezkedő fragmensek a félfém megkötésének hatására kerülnek közel egymáshoz. Ez ideálisnak tűnt egy FRET hatáson alapuló fémion-szenzor kialakításához, melyben a három Cys biztosíthatná a nagy affinitású kötőhelvet toxikus ...szoft" karakterű fémionok számára (8. Ábra). Ebből a célból állítottuk elő az Ac-WGENCCHGTRDCAG-Dans (ArsWD) szekvenciájú oligopeptidet, melyben az N-terminális Trp, illetve C-terminális danzilcsoport 3, ill. 2 aminosav hosszúságú "spacer"-en keresztül kapcsolódik a két, terminusokhoz közelebb eső ciszteinhez. Az aminosav kódok jelentése: W: Trp, G: Gly, E: Glu; N: Asn, C: Cys, H: His, T: Thr, R: Arg, D: Asp, A: Ala.

Eredményeink tárgyalása előtt azonban érdemes kritikailag áttekinteni néhány, az **ArsWD**-nél rövidebb, fluorofór-párral jelzett peptid fluoreszcenciás viselkedését bemutató munkát, és az ezekben levont következtetéseket.



8. Ábra. Az AfArsR As(III)-kötőhelyéről mintázott oligopeptid (ArsWD) szekvenciája, és a fémion-kötés hatására remélt FRET effektus

3.1. Rövid láncú flurofór-párral jelzett oligopeptidek, mint FRET elven működő fémion szenzorok?

A szakirodalomban több közlemény tárgyal olyan rövid láncú oligopeptideket, melyekben a Trp (W) / Danzil (Dans) fluorofór pár vagy közvetlenül a néhány aminosavból álló fémion-kötő fragmenshez kapcsolódik, vagy attól egy-két aminosavval távolabb található, pl. Dans-HPGHWG-NH₂,³⁹ Dans-CPGCW-NH₂.⁴⁰ A szerzők különböző fémionok hatására jelentős fluoreszcencia intenzitás-növekedést mutattak ki a danzilcsoportra jellemző hullámhossz-tartományban (=500–550 nm között) függetlenül attól, hogy a danzilcsoport vagy a triptofán abszorpciós sávján gerjesztették a rendszereket. Utóbbi esetben az intenzitás növekedését a szerzők a fémionok által indukált FRET jelenségként azonosították.



 Ábra. Fémion-indukált PET gátlás az egymáshoz közeli Trp/Dans fluorofór párt tartalmazó oligopeptidekben, és a CHEF/FRET effektusok relatív hatása

A molekulák azonban egyértelműen túl kicsik ahhoz, hogy a két fluorofór csoport a szabad peptidekben a Förstertávolságon kívül⁴¹ legyen egymástól. Ez azt jelenti, hogy fémionok távollétében is létrejöhet rezonancia energia transzfer a Trp donor és a danzil akceptor között. Ezt a szerzők által bemutatott, fémiont nem tartalmazó oldatokról felvett fluoreszcencia spektrumok is bizonyítják: a Trp egységet gerjesztve gyakorlatilag alig látszik a Trp emissziós sávja 340 nm környékén, míg a danzilcsoport emissziója jelentős. A fémionok jelenlétében a két fluorofór közeledéséből fakadó extra FRET hatás, ha nem is elhanyagolható, de valószínűleg csekély. A szerzők feltehetőleg a fémion megkötődés által előidézett PET kikapcsolás (lásd Bevezető) következményét, azaz CHEF effektust figyelnek meg, melyhez jelentősen hozzájárulhat a danzilcsoport abszorpciós sávjainak eltolódása (a danzilcsoport számottevően gerjeszthető lehet a Trp gerjesztésére használt hullámhosszon is). Ezeket a feltételezhető effektusokat szemlélteti a **9. Ábra**.

3.2. Az ArsWD kölcsönhatása Zn^{2+} -, Cd^{2+} - és Hg^{2+} -ionokkal

A ligandum kölcsönhatását a 12. elemcsoport fémionjaival spektrofluorimetriával UV-pH titrálásokkal és tanulmányoztuk. A tiolátfémion töltésátviteli sávok megjelenésének, illetve intenzitás-változásának követését megnehezítette, hogy a jelentős tagszámú peptidnek, elsősorban a triptofán és danzil egységek miatt, jelentős elnyelése van = 210 – 250 nm között. Ez limitálta a mintákban beállítható koncentrációt, ugyanakkor kis koncentrációk mellett kicsi a fémion-koordináció okozta effektus is. Ez a Zn²⁺-ionok esetében gyakorlatilag meggátolta, hogy a komplexképződéssel kapcsolatban lényegi információhoz jussunk. Cd²⁺-ArsWD rendszerben Α а fémion-koordinációval párhuzamosan csapadék képződött, így csak ligandum felesleg jelenlétében, pH ~ 8 felett végeztünk méréseket, ilyen körülmények között ugyanis a csapadék feloldódott. A csapadék feloldódása ligandum felesleg mellett, valamint a bázikus pH-tartományban tapasztalt szignifikáns abszorbancia különbség 245 nm környékén a szabad ligandum elnyeléséhez képest bisz-komplexek képződésére utal. Ennek jelét a másik két fémion esetében nem tapasztaltuk, ami nem meglepő a peptid mérete, és a jelentős számú potenciális donorcsoport jelenléte miatt (3Cys,His,Asp,Glu). A CueR fehérje fémion-kötő szakaszát modellező peptidekhez hasonlóan az ArsWD is már pH = 2 körül megköti a Hg²⁺-ionok teljes mennyiségét 1:1 fémion-ligandum arány mellett. A Hg2+-ArsWD 1:1 rendszerben semleges pН 240-290 felett nm hullámhossz-tartományban jelentkező karakterisztikus abszorbancia növekedés a Hg2+ koordinációs szférájának átrendeződésére utal. Míg savas körülmények között két Cys-tiolát koordinációja valószínűsíthető, pH 7 felett a harmadik Cys is részt vehet a Hg²⁺-megkötésében.^{42,43} Ilyen jellegű pH-függő $\{2S^-\} \rightarrow \{3S^-\}$ koordinációs mód változást más szerzők is leírtak a Hg²⁺-ionokat és három cisztein-tartalmú oligopeptideket tartalmazó rendszerekben.44

Az elmondottak tükrében rendkívül meglepő, hogy a remélt fluoreszcencia erősítő hatást a fémionok jelenlétében – egyetlen kivételtől eltekintve – nem tapasztaltuk. A Hg²⁺-ionok, annak ellenére, hogy semleges pH felett képesek a három ciszteinhez koordinálódni, enyhe kioltást okoztak mind a Trp, mind a danzilcsoport fluoreszcenciájára. A Hg²⁺, Pb²⁺ és egyéb nehézfém elemeknél ez gyakran megfigyelt jelenség,^{45,46} noha az **ArsWD** esetében bízni lehetett abban, hogy a fémion nem kerül a fluorofór csoportok közvetlen környezetébe. A Cd^{2+} -**ArsWD** 0,5:1 összetételű mintákban egészen bázikus körülmények mellett 283 nm-en történő gerjesztést alkalmazva a danzilcsoport emissziójának látványos növekedését figyeltük meg (**10. Ábra**). Ilyen változás Cd^{2+} -ionok távollétében nem történik. A megfigyelt FRET-jellegű effektust minden valószínűség szerint két ligandum együttes koordinációja eredményezi a Cd^{2+} -ionhoz, melynek révén a Trp és Danzil egységek a FRET hatótávolságán belül kerülnek egymáshoz. A két ligandum együttes koordinációját igénylő rendszereknek azonban csekély gyakorlati alkalmazhatósága lehet egy immobilizálást igénylő érzékelő fejlesztésénél.



10. Ábra. Fluoreszcencia spektrumok a Cd²⁺ – ArsWD 0,5:1 rendszerben a pH függvényében (_{ex} = 283 nm, c_{ArsWD} = 1,3510⁻⁵ M)

Tapasztalataink és az irodalmi adatok áttekintése arra utalnak, hogy tényleges FRET effektuson alapuló oligopeptid receptorra épülő fémion érzékelőt a fluorofór egységek fémion-kötőhelytől távolabbi elhelyezésével lehetne kialakítani, és a molekulatervezésnél érdemes számítógépes modellszámításokra támaszkodni.

4. Az Ac-YCSSCY szekvenciájú szilárd hordozón rögzített hexapeptid Cd²⁺-kötésének vizsgálata⁴⁷

A CXXC szekvencia (ahol X bármilyen aminosavat jelöl) a metallotioneninek mellett fémion szállító-, raktározó-, ill. dajkafehérjékben egyaránt előfordul. Egyebek mellett a Hg^{2+} -kötő MerP,⁴⁸ a bakteriális vagy humán ATP7A és ATP7B fehérjék,⁴⁹ ill. a réz-chaperon bakteriális Atx1, vagy az ezzel analóg humán Atox1 (HAH1)50 is ezt a szekvenciát alkalmazza "szoft" karakterű fémionok megkötésére. A természetes szekvenciák alapján tervezte meg csoportunk azt a hexapeptid molekulát, melyben a CXXC fragmens középső két aminosavjának helyére a vegyület hidrofil karakterét növelő S (Ser) egységek, míg a terminális pozíciókba Y (Tyr) aminosavak kerültek. A tirozin aminosavak, noha nem a legjobb természetes fluorofórok, a vegyület oldhatóságának biztosítása szempontjából jó választásnak tűntek. Érdemes azt is leszögezni, hogy a hexapeptid (YY) előállításával nem egy kiváló fémion-szelektivitású receptor molekula kialakítása volt a cél, sokkal inkább a szilárd hordozókon történő rögzítés lehetőségét, illetve az immobilizált vegyület viselkedését terveztük feltárni a rendkívül egyszerű ligandum segítségével.

4.1. A hidrofil karakterű gyantán rögzített YY peptid (YY-NTG) Cd²⁺-kötő képessége

Az előzetes reményekkel ellentétben a vegyület vízoldhatósága nem volt elegendően nagy ahhoz, hogy részletes oldatfázisú vizsgálatokat végezzünk, és ilyen módon is karakterizáljuk a ligandum fémion-affinitását. Fluoreszcenciás mérések elvégzéséhez megfelelő koncentrációt ugyanakkor el tudtunk érni, s ezzel a kísérlettel igazolni tudtuk, hogy a fémion-kötés fluoreszcenciásan követhető, koncentráció arányos kioltást eredményez (**11. Ábra**).

Az YY hexapeptidet egy jó duzzadási karakterű hidrofil gyantára (Novasyn TG amino resin) felépítettük, majd tanulmányoztuk az érintkeztetési idő, az összeállított minták kiindulási pH-ja és a Cd²⁺-koncentráció hatását a fémion-kötési sajátságokra. Eredményeink alapján 30 perc minden esetben elegendő volt a kötő-helyek telítéséhez és ezt követően már nem csökkent a minták ICP-MS módszerrel visszamért Cd2+-koncentrációja. Az összeállított minták pH-jának növelése pH ~ 4-5-ig növelte a megkötött Cd²⁺-ion mennyiségét. A nagyobb pH-értékeknél történő mérésekhez puffer oldatok alkalmazására volt szükség, ugyanis a kölcsönhatás okozta proton-disszociáció miatt a magasabb kezdeti pH-ra beállított minták a kísérlet ideje alatt jelentősen (pH~4,5-ig) visszasavanyodtak. A gyanta elméleti kapacitásához képest 1,5-szörös feleslegben Cd^{2+} -iont tartalmazó, HEPES segítségével pH = 7,0-re pufferelt mintából az **YY-NTG** 0,243 mg/10,0 mg (gyanta) kapacitással távolította el a fémionokat. Ez gyakorlatilag megegyezik a peptiddel módosított gyanta elméleti Cd²⁺-kötő képességével, ha ligandumonként 1 ekvivalens fémion koordinációját feltételezzük.



11. Ábra. Az **YY** ligandum fluoreszcencia spektruma 1 ekv. Cd^{2+} -ion jelen- (folytonos vonal) és távollétében (szaggatott vonal) (_{EX} = 278 nm, pH = 7,0, c_{YY} = 1,010⁻⁵ M). A belső ábra a 308 nm-en mért fluoreszcencia intenzitásának csökkenést mutatja a Cd^{2+} : **YY** arány függvényében.⁴⁷

A módosított gyanta kimért mennyiségét savas oldatban Cd²⁺-ionok távol- és jelenlétében folyamatos kevertetés mellett NaOH mérőoldattal is megtitráltuk. A homogén oldatokhoz viszonyítva lassabban lejátszódó folyamatok miatt hosszabb várakozási időkkel dolgoztunk. Figyelembe véve egy ilyen mérés extrém körülményeit, a

szilárd-folyadék határfelületen lejátszódó folyamatokat, az ionerősség beállításának problémáját és az egyéb technikai nehézségeket, a titrálásokkal nyert adatok jó becslésként kezelendők. Meg kell ugyanakkor említeni, hogy sem a titrálási görbék jellege, sem a kiértékelésükkel nyert képződési állandók⁴⁷ nem utaltak a ligandumok közeli elhelyezkedéséből esetlegesen adódó polielektrolit-hatásra.



12. Ábra. Az YY megoszlása a különböző Cd^{2+} -iont kötő formák között a pH függvényében, a fémion-kötő vizsgálatoknál alkalmazott koncentráció-arányra számolva: Cd^{2+} : **YY** = 0,66 : 1, $c_{Cd^{2+}}$ = 1,4410⁻⁴ M. (L a teljesen deprotonált ligandumot, míg H a protont jelöli.)⁴⁷

A titrálások révén meghatározott protonálódási és komplexképződési állandók jó összhangban vannak a Cd^{2+} -megkötődés vizsgálatok eredményeivel. A legtöbb kísérletnél használt Cd^{2+} :**YY-NTG** 0,66:1 arányra, illetve az ilyen összetételű minták koncentrációira szimulált eloszlásgörbe (**12. Ábra**) jól szemlélteti, hogy a komplexképződési folyamatok már pH 3 felett megindulnak, és pH ~ 6-ra az **YY** ligandum kínálta kötőhelyek 1 ekv. Cd^{2+} -ion koordinálódásával telítődnek. Fontos megjegyezni, hogy ez a telítés már a 1:1 Cd^{2+} :**YY-NTG** aránynál is megtörténik.

A stabilitási adatok alapján az **YY-NTG** Cd^{2+} -kötésének erősségét pH = 7,0-nél jellemző látszólagos stabilitási állandó is számolható. Ennek értéke lg*K*' = 10,1, amely kiemelkedő fémion-affinitást jelez. Ezt szemlélteti a **2. Táblázatban** feltüntetett néhány, két cisztein tartalmú oligopeptid Cd²⁺-komplexére vonatkozó állandóval való összevetés. A látványos stabilitásbeli különbség a vegyület rögzítésének hatása, ami a peptidek Cd²⁺-ionok megkötődését elősegítő orientációját indukálhatja.

2. Táblázat. Két ciszteint tartalmazó oligopeptidek Cd^{2+} -kötő képességét jellemző látszólagos stabilitási állandók (pH = 7,0, *T* = 298 K). Az adatok vizes oldatbeli mérésekre vonatkoznak, ellentétben az **YY-NTG**-vel.

Ligandum	$\lg K' (pH = 7,0)$	Referencia
Ac-GCASCDNARAAKK-NH2	7,96	51
Ac-CPCP-NH ₂	8,39	52
Ac-MTCSGCSRPG-NH2	8,30	53
c(GMTCSGCSRP)	9,20	53
YY-NTG	10,10	47

4.2. Az üveg és kvarc hordozókon rögzített hexapeptid fémion-kötő képessége

Egy házilag épített reaktorban téglalap alakú kétoldalas üveg és kvarc lapokra is felépítettük az **YY** peptidet (**13. Ábra**). A kvarc lapokon a szilanizálást követő peptidszintézis 100 %-os sikerességét feltételezve, a szilanolcsoportok becsülhető felületi borítottsága alapján a lapok elméleti Cd^{2+} -kötő kapacitása ~ 0,351 µg Cd^{2+} /lapka.



13. Ábra. Az üveg vagy kvarc lapon immobilizált hexapeptid felülethez való kapcsolódási módjának sematikus ábrázolása

A kvarclapokat egyenként 10,0 ml, 100 g/l koncentrációjú Cd^{2+} -ion tartalmú oldatba helyeztük, melyek pH-ját HEPES pufferrel pH = 7,0-re állítottuk. Az így elkészített mintákból a reakció után a fémion koncentrációjának visszamérésével számolható Cd^{2+} -kötő kapacitás 0,225 µg-nak adódott, ami az elméleti érték 64,1 %-a. Ez igazolja a szintézis folyamatának sikerességét, és egyúttal a hexapeptid, mint receptor molekula megfelelő működését is.

5. Összefoglalás

Kutatásaink olyan, metalloproteinek fémkötőhelyei által inspirált, oligopeptidek kifejlesztését célozzák, melyek hatékony és szelektív fémion-kötő képessége kihasználható fémion-érzékelésre alkalmas rendszerek fejlesztéséhez. A CueR réz-efflux szabályzó fehérjék fémkötő doménjét modellező oligopeptidek vizsgálatával a fehérje működési mechanizmusában is potenciálisan szerepet játszó különbséget tártunk fel az egyértékű Ag+-ion, illetve a kétértékű Zn2+-, Cd2+- és Hg2+-ionok koordinációs módja között. Reményeink szerint az eredményeket egyaránt hasznosítani tudjuk fémion-receptor molekulák tervezésénél, illetve a CueR működési mechanizmusán alapuló sejtes fémion-jelzőrendszer fejlesztésénél. Az AfArsR félfém-kötőhelyén alapuló, terminális pozíciókban Trp és danzilcsoportokkal jelzett oligopeptid vizsgálatával nyert tapasztalatok arra mutatnak, hogy egy jól működő FRET szenzorhoz a fluorofór csoportok fémion-kötőhelytől távol(abb)i pozícionálása szükséges. A vizes oldatbeli vizsgálatok mellett egy CXXC motívumot tartalmazó hexapeptidet többféle szilárd hordozón rögzítve is előállítottunk. Az immobilizált ligandum kiváló Cd2+-kötő képességet mutatott mind gyanta hordozón, mind kvarc és üveg mátrixokon. Ezzel igazoltuk a szintézisünk sikerességét, ill. annak alkalmazhatóságát további, hatékonyabb és szelektívebb fémion-megkötésre alkalmas molekulákra.

6. Kísérleti rész

6.1. Előállított vegyületek

A tanulmányozott, terminális pozíciókban védett (acetil és savamid) oligopeptideket az Fmoc stratégián alapuló szilárdfázisú szintézissel54 állítottuk elő Rink Amide AM gyantát alkalmazva. Az C-terminális helvzetben danzilcsoportot tartalmazó peptid előállítása Dansyl NovaTag hordozón történt. A gyanta mátrixokon rögzített ligandumok szintéziséhez kiemelkedő sav-stabilitású, különböző duzzadási képességű hordozókat (benzhydrylamine resin - BHA-resinHCl ill. Novasyn TG amino resin) használtunk. A szintézis befejezésével az N-terminális aminocsoportokat acetil-védőcsoportokkal láttuk el, az oldallánci védőcsoportokat pedig 92% v/v trifluorecetsav (TFA) tartalmú eleggyel hasítottuk. Az üveg, ill. kvarc hordozón történő peptidszintézishez az anyagok felületét egy oxidáló, erősen savas oldattal tisztítottuk (cc. H₂SO₄ és 30% v/v H₂O₂ 3:1 arányú keveréke), majd szárítást követően 10% v/v (3-aminopropil)trietoxiszilán-t (APTES) tartalmazó vizes oldattal szilanizáltuk. Az APTES szabad aminocsoportjára módosított Fmoc-módszerrel55 építettük fel az oligopeptid láncokat. A szilárd hordozóról lehasított peptideket Shimadzu LC-20 típusú HPLC készüléken egy SUPELCO Discovery BIO Wide Pore C18 (25×10 mm, 5 m) félpreparatív kolonna alkalmazásával tisztítottuk. A vegyületek előállításának részletei megtalálhatók az idézett hivatkozásokban.32,47

6.2. Kísérleti módszerek

pH-potenciometria:^{29-32,47} A ligandumok protonálódási és komplexképződési folyamatait vizes oldatokban pH-potenciometriás titrálásokkal követtük (I = 0,1 M NaClO₄, $T = 298,0 \pm 0.1$ K). A gyantán rögzített oligopeptid vizsgálatakor ~ 0,03 g tömegű peptiddel-dekorált gyantaszemcsét is kevertettünk a megtitrált mintákban. A titrálásokat számítógép által vezérelt, Dosimat 665 (Metrohm) automata bürettából, Orion 710A digitális pH-mérőből és Metrohm Micro pH üvegelektródból felépített automata titráló rendszerrel végeztük. A protonálódási és komplexképződési egyensúlyokat az alábbi általános folyamattal, és az arra vonatkozó képződési állandóval jellemeztük:

$$pM + qH + rL \rightleftharpoons M_pH_qL_r \tag{1}$$

$$\beta_{M_pH_qL_r} = \frac{M_pH_qL_r}{[M]^p[H]^q[L]^r}$$
(2)

Az egyenletekben M a fémiont, H a protonokat, míg L a ligandumot jelöli.

UV-Vis és CD-spektroszkópia:^{29–32} Az UV-Vis méréseket Shimadzu UV-3600 UV-VIS-NIR vagy Thermo Evolution 220 spektrofotométereken végeztük 1,0 cm úthosszú, teflon dugóval ellátott cellákban. A szinkrotron radiációs CD (SRCD) spektrumokat az Aarhusi Egyetemen, Dániában, az "SRCD facility at the CD1 beamline on the storage ring ASTRID at the Institute for Storage Ring Facilities (ISA) komplexumban vettük fel 0,1 mm úthosszú kvarc cellákat (SUPRASIL, Hellma GmbH, Germany) alkalmazva, 175-260 nm hullámhossz-tartományban.

Spektrofluorimetria:47 А fluorimetriás vizsgálatokat Hitachi-F4500 spektrofluoriméteren végeztük 1,0 cm × 1,0 cm méretű, Teflon dugóval ellátott kvarc cellát alkalmazva. Az emissziós spektrumokat az adott fluorofór(pár)nak megfelelő hullámhossz-tartományban és gerjesztési hullámhosszak alkalmazásával vettük fel (tirozin: EX = 278 nm, $_{\rm EM}$ = 285–400 nm; triptofán: $_{\rm EX}$ = 283 nm, $_{\rm EM}$ = 295-700), rendszerint 5 nm és 10 nm slit-eket alkalmazva a gerjesztő, illetve emittált fénysugárra. A spektrumokat az önabszorpció és a belső filter hatások figyelembevételével korrigáltuk.41

1H-NMR spektroszkópia:29–32 A 1H-NMR méréseket 500,132 MHz-es Bruker Avance DRX 500 spektrométeren végeztük. A spektrumokat T = 298 K hőmérsékleten, rendszerint H₂O:D₂O 90:10% v/v oldószerben vagy tiszta D₂O-ban vettük fel a zgpr vagy zgcppr pulzus szekvenciát alkalmazva a H₂O/HDO rezonanciák preszaturációja céljából. A D₂O-ban végzett méréseknél a pH* értékek (a deutérium-effektussal nem korrigált pH-méter leolvasás) beállítását NaOD adagolásával végeztük.

ICP-MS:⁴⁷ A szilárd hordozókon immobilizált peptidek fémion-megkötő képességének vizsgálatához a minták fémion-koncentrációjának meghatározását egy Agilent 7700x ICP-MS készülékkel végeztük. A többpontos kalibrációs görbék felvételéhez kereskedelmi forgalomban kapható standard oldatokat (Inorganic Ventures) és nyomelem analitikai tisztaságú ioncserélt vizet (Millipore Elix Advantage 5 + Synergy) alkalmaztunk. Az adatok értékeléséhez a ¹¹¹Cd tömegcsúcsát használtuk.

A különböző rendszerek vizsgálatakor alkalmazott kísérleti körülményeket, műszerbeállításokat és egyéb technikai részleteket a módszerek neve mellett megjelölt hivatkozások tartalmazzák.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők ezúton mondanak köszönetet az összefoglalt munkákat tartalmazó angol nyelvű közlemények társszerzőinek, valamint az anyagi támogatásért az alábbi forrásoknak: OTKA NKTH CK 80850, TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0005, EGT és a Norvég Finanszírozási Mechanizmus (Magyari Zoltán Posztdoktori Ösztöndíj 2010), FP7/2007-2013 Grant No. 226716, HURO/1001/232/2.2.2. (METCAP), MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj 2011-2014, FP7/2007-2013, Grant No. 312284, ISOLDE/CERN beam time grants IS448 and IS488, Danish Council for Independent Research (Nature and Universe) of the Ministry for Higher Education and Science -NICE grant.

Hivatkozások

- 1. Sparks, D. L. *Elements* **2005**, *1*, 193–197. https://doi.org/10.2113/gselements.1.4.193
- Bargossi, C.; Fiorini, M. C.; Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N. *Coord. Chem. Rev.* 2000, 208, 17–32. https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)00252-6
- Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Micheloni, M. Coord. Chem. Rev. 2012, 256, 170–192. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.010
- Valeur, B.;Leray, I. Coord. Chem. Rev. 2000, 205, 3–40. https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)00246-0
- Prodi, L.; Bolletta, F.; Montalti, M.; Zaccheroni, N. *Coord. Chem. Rev.* 2000, 205, 59–83. https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)00242-3
- 6. Jiang, P.; Guo, Z. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 205–229. https://doi.org/10.1016/j.cct.2003.10.013
- Imperiali, B.; Pearce, D. A.; Sohna Sohna, J.-E.; Walkup, G.; Torrado, A. SPIE Proc. Fallahi, M.; Swanson, B.I., Ed. Boston, MA, **1999**, pp 135–143. https://doi.org/10.1117/12.372909
- Verma, N.; Singh, M. *BioMetals* 2005, *18*, 121–129. https://doi.org/10.1007/s10534-004-5787-3
- Liu, Q.; Wang, J.; Boyd, B. J. *Talanta* 2015, *136*, 114–127. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.020
- Dutta, M.; Das, D. *Trends Anal. Chem.* 2012, *32*, 113–132. https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.08.010
- Carter, K. P.; Young, A. M.; Palmer, A. E. *Chem. Rev.* 2014, 114, 4564–4601. https://doi.org/10.1021/cr400546e
- Pazos, E.; Vázquez, O.; Mascareńas, J. L.; Vázquez, M. E. *Chem. Soc. Rev.* 2009, *38*, 3348–3359. https://doi.org/10.1039/b908546g
- Afaneh, A. T.; Schreckenbach, G. J. Phys. Chem. A 2015, 119, 8106-8116. https://doi.org/10.1021/acs.jpca.5b04691
- Joshi, B. P.; Lohani, C. R.; Lee, K.-H. Org. Biomol. Chem. 2010, 8, 3220–3226. https://doi.org/10.1039/b925744f
- Kim, J.-M.; Lohani, C. R.; Neupane, L. N.; Choi, Y.; Lee, K.-H. *Chem. Commun.* 2012, 48, 3012–3014. https://doi.org/10.1039/c2cc16953c
- Wang, P.; Liu, L.; Zhou, P.; Wu, W.; Wu, J.; Liu, W.; Tang, Y. *Biosens. Bioelectron.* 2015, *72*, 80–86. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.094
- Neupane, L. N.; Thirupathia, P.; Janga, S.; Jang, M. J.; Kim, J. H.; Lee, K.-H. *Talanta* 2011, *85*, 1566–1574. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.052
- Torrado, A.; Walkup, G. K.; Imperiali, B. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 609–610. https://doi.org/10.1021/ja973357k
- Godwin, H. A.; Berg, J. M.; J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 6514–6515. https://doi.org/10.1021/ja961184d
- White, B. R., Liljestrand, H. M.; Holcombe, J. A. *Analyst* 2008, *133*, 65–70. https://doi.org/10.1039/B711777A
- Fegley, M. E. A.; Pinnock, S. S.; Malele, C. N.; Jones Jr., W. E. *Inorg. Chim. Acta* 2012, *381*, 78–84. https://doi.org/10.1016/j.ica.2011.11.040
- Joshi, B. P.; Park, J.-Y.; Lee, K.-H. Sensors Actuators B Chem. 2014, 191, 122–128. https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.09.075
- Ma, Z.; Jacobsen, F. E.; Giedroc, D. P. *Chem. Rev.* 2009, 109, 4644–4681. Https://doi.org/10.1021/cr900077w

- Waldron, K. J.; Rutherford, J. C.; Ford, D.; Robinson, N. J. *Nature*, **2009**, *460*, 823–830. https://doi.org/10.1038/nature08300
- 25. Waldron K. J.; Robinson, N. J. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *6*, 25–35. https://doi.org/10.1038/nrmicro2057
- Brown, N. L.; Stoyanov, J. V.; Kidd, S. P.; Hobman, J. L. *FEMS Microbiol. Rev.* 2003, *27*, 145–163. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00051-2
- Outten, F. W.; Outten, C. E.; Hale, J.;. O'Halloran, T. V J. Biol. Chem. 2000, 275, 31024–31029. https://doi.org/10.1074/jbc.M006508200
- Changela, A.; Chen, K.; Xue, Y.; Holschen, J.; Outten, C. E.; O'Halloran, T. V.; Mondragón, A. *Science*, 2003, 301, 1383–1387. https://doi.org/10.1126/science.1085950
- Jancsó, A.; Gyurcsik, B.; Mesterházy, E.; Berkecz, R.; J. Inorg. Biochem. 2013, 126, 96–103. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.05.019
- Szunyogh, D.; Gyurcsik, B.; Larsen, F. H.; Stachura, M.; Thulstrup, P. W.; Hemmingsen, L.; Jancsó, A. *Dalton Trans.* 2015, 44, 12576–12588. https://doi.org/10.1039/C5DT00945F
- Szunyogh, D.; Szokolai, H.; Thulstrup, P. W.; Larsen, F. H.; Gyurcsik, B.; Christensen, N. J.; Stachura, M.; Hemmingsen, L.; Jancsó, A.; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, *54*, 15756–15761. https://doi.org/10.1002/anie.201508555
- Jancsó, A.; Szunyogh, D.; Larsen, F. H.; Thulstrup, P. W.; Christensen, N. J.; Gyurcsik, B.; Hemmingsen, L. *Metallomics* 2011, *3*, 1331–1339. https://doi.org/10.1039/c1mt00138h
- Szunyogh, D. Ph.D. értekezés, Szegedi Tudományegyetem, 2016.
- Kagi, J. H. R.; Vasak, M.; Lerch, K.; Gilg, D. E. O.; Hunziker, P.; Bernhard, W. R.; Good, M. *Environ. Health. Perspect.* **1984**, *54*, 93–103. https://doi.org/10.2307/3429795
- Wright, J. G.; Natan, M. J.; MacDonnell, F. M.; Ralston, D. M.; O'Halloran, T. V. *In Progress in Inorganic Chemistry: Bioinorganic* Chemistry, Lippard, S. J. Ed.; John Wiley & Sons: New York, **1990**, Vol. 38, pp. 323–412. https://doi.org/10.1002/9780470166390.ch6
- Bebout, D. C. In Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd. 2011, DOI: 10.1002/9781119951438.eibc0124. https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0124
- Bharti, A.; Bharati, P.; Bharty, M. K., Dani, R. K.; Singh, S.; Singh, N. K. *Polyhedron* **2013**, *54*, 131–139. https://doi.org/10.1016/j.poly.2013.02.035
- Qin, J.; Fu, H.-L.; Ye, J.; Bencze, K. Z.; Stemmler, T. L.; Rawlings, D. E.; Rosen, B. P. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 34346–34355. https://doi.org/10.1074/jbc.M706565200

- Wang, P.; Wu, J.; Zhou, P.; Liu, W.; Tang, Y. J. Mater. Chem. B, 2015, 3, 3617–3624. https://doi.org/10.1039/C5TB00142K
- Li, Y.; Li, L.; Pu, X.; Mab, G.; Wang, E.; Kong, J.; Liu, Z.; Liu, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, *22*, 4014–4017. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.088
- Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer US: New York, 2006. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4
- 42. Pujol, A. M.; Lebrun, C.; Gateau, C.; Manceau, A.; Delangle, P. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 3835–3843. https://doi.org/10.1002/ejic.201200484
- Łuczkowski, M.; Stachura, M.; Schirf, V.; Demeler, B.; Hemmingsen, L.; Pecoraro, V. L. *Inorg. Chem.* 2008, 47, 10875–10888. https://doi.org/10.1021/ic8009817
- Iranzo, O.; Thulstrup, P. W.; Ryu, S. B.; Hemmingsen, L.; Pecoraro, V. L. *Chem. Eur. J.* 2007, *13*, 9178–9190. https://doi.org/10.1002/chem.200701208
- Joshi, B. P.; Park, J.; Lee, W. I.; Lee, K.- H. *Talanta* 2009, 78, 903–909. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.12.062
- 46. White, B. R.; Liljestrand, H. M.; Holcombe, J. A. *Analyst* 2008, *133*, 65–70. https://doi.org/10.1039/B711777A
- Galbács, G.; Szokolai, H.; Kormányos, A.; Metzinger, A.; Szekeres, L.; Marcu, C.; Peter, F; Muntean, C.; Negrea, A.; Ciopec, M.; Jancsó, A.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2016, *89*, 243–253. https://doi.org/10.1246/bcsj.20150333
- Steele, R. A.; Opella, S. J. Biochemistry 1997, 36, 6885–6895. https://doi.org/10.1021/bi9631632
- Forbes, J. R.; His, G.; Cox, D. W. J. Biol. Chem. 1999, 274, 12408–12413. https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12408
- 50. Rosenzweig, A. C. *Chemistry & Biology* 2002, *9*, 673–677. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00156-4
- Krzywoszynska, K.; Rowinska-Zyrek, M.; Witkowska, D.; Potocki, S.; Luczkowski, M.; Kozlowski, H.; *Dalton Trans.* 2011, 40, 10434–10439. https://doi.org/10.1039/c1dt10562k
- Kulon, K.; Woźniak, D.; Wegner, K.; Grzonka, Z.; Kozłowski, H. J. Inorg. Biochem. 2007, 101, 1699–1706. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.04.001
- Rousselot-Pailley, P.; Sénčque, O.; Lebrun, C.; Crouzy, S.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Ferrand, M.; Delangle, P. *Inorg. Chem.* 2006, 45, 5510–5520. https://doi.org/10.1021/ic060430b
- Chan, W. C.; White, P. D. Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach, Oxford University Press: Oxford, 2000.
- Malachowski, L.; Stair, J.; Holcombe, J. A. Pure Appl. Chem. 2004, 76, 777–787. https://doi.org/10.1351/pac200476040777

72

Oligopeptide probes for toxic metal ion sensing, inspired by the metal binding domains of metalloproteins

Toxic metal ions appear in the environment from natural and anthropogenic sources. The detection and removal of these ions is essential due to their potential adverse effects to every life form. Besides the well-known and broadly applied, robust analytical techniques used for the analysis of metal ions from environmental and biological fluids, an increasing attention is devoted to the development of novel, alternative detection techniques based on the use of chemical/biochemical sensors. A particularly interesting sub-category of chemical sensors utilize bioinspired molecules or systems as receptors that naturally possess the properties being essential for a sensory element: sensitivity and selectivity. Oligopeptides, proteins or even simple cells may be efficient receptors of (bio)chemical sensors, based on a response that is induced by their selective reactions with metal ions. Sensors based on synthetic oligopeptides are generally more expensive than full-cell based biosensors, however, the former ones could be developed and fine-tuned to bear outstanding sensitivity and selectivity. Besides, their applicability is much less limited in terms of the required conditions for an optimal operation, as compared to protein- or cell-based sensors. In recent years, our research group has been working on the synthesis and investigation of numerous cysteine containing oligopeptides that had been inspired by the metal binding domains of various metalloproteins (regulators, transporters, chaperons). Gaining a benefit from the large affinity of these sequences for soft metal ions, the modification of the ligands may lead to compounds that can be successfully used in the efficient and selective sensing of toxic metal ions. Introducing well-designed modifications (i.e. attaching fluorophore units into proper positions), these molecules may be capable for providing a metal-ion mediated response and at the same time their immobilization to solid matrices may also be possible. This publication provides a brief summary of our efforts and achievements within this field.

We have synthesized several, terminally protected, 12-mer oligopeptides possessing two cysteine residues close to their *C*and *N*-terminus. The amino acid sequences of these ligands are either identical to the metal binding domain of the bacterial metalloregulatory protein CueR²⁷ (from *E. coli* or *V. cholerae*) or their slightly modified variants with amino acid substitutions at one or two positions. The transcriptional activator CueR displays an outstanding functional selectivity for the group eleven monovalent ions while it does not respond to Zn²⁺ or Hg^{2+, 28} It was shown that the coordination of the two cysteines from the metal binding loop of CueR, together with other interactions (H-bonding or electrostatic), restrict the bound monovalent metal ions into a linear coordination geometry.²⁸

The major result of our studies on the various metal ion – oligopeptide systems is a finding that the model ligands possess fundamentally distinct binding features for the monovalent ion Ag^+ and the divalent ions Zn^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+} .^{29–32} The binding of Ag^+ to the ligands under acidic conditions (even at pH = 2) was proved by UV-, CD- and ¹H-NMR experiments, as well as pH-potentiometric titrations (Figure 6).³¹ Spectroscopic data suggest the coordination of at least one of the Cys-sidechain donors as a thiolate to Ag^+ in the $Ag^+ - PP$ 1:1 system (PP = Ac-SCPGDQGSDCPI-NH₂). However, a deprotonation process in the pH-range of pH ~ 5.5 – 8 can be clearly observed both on the pH- and UV-titration curves (Figure 6.) that can be attributed to

the proton release of the second thiol group of the ligand. This pH-dependent change in the coordination environment of Ag^+ , shown also by the recorded ¹H-NMR spectra (Figure 7), represents a remarkable difference as compared to divalent metal ion - ligand systems where both cysteines are bound to the metal ions as thiolates at or below $pH \sim 6$. The Ag⁺-promoted thiol-deprotonation ($pK_a \sim 6.5$), vide supra, is accompanied by a modest change in the recorded absorbances, especially if compared to the absorbance increase induced by the addition of Ag^+ to the peptide under acidic conditions (Figure 6.). This may lead to an assumption that below pH ~ 6 the second cysteine sidechain group is also bound to Ag^+ in its protonated form (as a thiol), besides the coordinated thiolate moiety. Indeed, a {Cys-S⁻,Cys-SH} type coordination environment around the monovalent metal ions is also possible in the metal binding site of CueR.31 These results are an important step towards the deeper understanding of the mechanism of operation of the protein. At the same time, our findings also provide an opportunity for utilizing the complex recognition mechanism of the protein in the development of genetically modified bacteria that produce a fluorescence signal as a response to a specific metal ion and thus behave as a metal-responsive biosensor. There is an ongoing research in our group in this direction. Another experience of these studies is that more rigid structures, as compared to the flexible CueR model peptides, are needed for the efficient tuning of metal ion selectivity. Nevertheless, a loop structure formed by Hg^{2+} when binding to the ligands might be utilized in the development of FRET-based metal ion sensing molecules.

We have also studied an oligopeptide, comprising the arsenic-binding C-terminal flexible loop of the ArsR-family metalloid regulator protein AfArsR, encompassing three Cys residues for the binding of the regulated metalloids. We have introduced a Trp and a danysl unit as a fluorophore pair into the two termini of the ligand in order to initiate a FRET-response via metal ion chelation. (The sequence of the investigated ligand, ArsWD, is: Ac-WGENCCHGTRDCAG-Dans.) However, FRET-effect was observed only with Cd²⁺ and only in the presence of ligand excess at high pH (pH > 9). This is likely to be the result of bis-complex formation bringing the two fluorophores into close proximity. However, systems that require the simultaneous binding of two receptors to the metal ion have little, if any, applicability in sensory elements with immobilized receptors. Based on literature data and our own results, we believe that in order to obtain a real FRET-based metal ion sensing oligopeptide receptor one should position the fluorophore units in a larger (optimal) distance relative to the metal ion binding centre. Computational model calculations should assist the rational design of such molecules.

Besides aqueous studies we have also synthesized, on various solid supports, a hexapeptide ligand (**YY**: Ac-YCSSCY), encompassing the well-known CXXC-motif found in a number of metalloproteins. The two tyrosine residues were used as natural fluorophore units with less hydrophobic character as compared to tryptophane while the two serine units were introduced to provide reasonable water solubility for the ligand. In spite of this the solubility of the hexapeptide was not enough for detailed studies and for the characterization of the metal-binding affinity of the compound in aqueous solution.

Nevertheless, we could perform a series of fluorescent measurements where the concentration ratio of Cd^{2+} and the peptide was systematically varied. These experiments revealed that the coordination of Cd²⁺-ions by the ligand could be monitored by this technique and that Cd²⁺-binding resulted in a concentration-dependent quenching of the tyrosine fluorescence (Figure 11). It is important to note that the YY hexapeptide was meant to be a simple fluorescent probe allowing us to investigate the possibilities of immobilization on various solid matrices and to study the metal binding features of a cysteine containing peptide in its immobilized form. Besides the Cd²⁺-capturing experiments where metal ion binding by the immobilized peptide was monitored ICP-MS we also performed

pH-potentiometric titrations with a resin-bound form of **YY** in the absence and presence of Cd^{2+} -ions. The species distribution diagram, calculated from the formation constants of the various Cd^{2+} -coordinated adducts of **YY**, correlate well with the results of metal ion capturing experiments. These results demonstrate that Cd^{2+} -binding occurs already from pH ~ 3 and that the immobilized metal binding sites are filled by one equivalent of Cd^{2+} ion per ligand (Figure 12). In summary, the immobilized peptide showed an excellent Cd^{2+} -binding property either when attached to a resin or to glass or quartz matrices. This finding verified the success of our synthetic approach and, at the same time, it also showed the feasibility of the procedure in the immobilization of more efficient metal-receptor candidates.

Az ón(II)-halogenidek koordinációs kémiájának jelentősége a platinakatalizált hidroformilezési reakcióban

PAPP Tamara^{a,} KOLLÁR László^{a,b} és KÉGL Tamás^{a,b,*}

^aPécsi Tudományegyetem, Kémiai Intézet, Szervetlen Kémia Tanszék, Ifjúság útja 6., 7626, Pécs ^bPécsi Tudományegyetem, MTA-PTE Szelektív Kémiai Szintézisek Kutatócsoport, Ifjúság útja 6., 7626, Pécs

1. Bevezetés

A hidroformilezést, vagy másik, kevésbé elterjedt nevén, oxo reakciót Otto Roelen fedezte fel 1938-ban.¹ A reakció lényegét tekintve szénmonoxid és hidrogén olefinekre történő addíciója, mely valamilyen átmenetifém katalizátor segítségével megy végbe. A C=C kötés funkcionalizálására épülő eljárások közül az egyik legsokoldalúbb, és leghatékonyabb szintetikus módszernek tekinthető. A reakció hőszínezetét tekintve exoterm, és termékként aldehid izomerek keletkeznek (1. Ábra). Ha a kettős kötést formázó sp² szénatomok egyenértékűek, úgy csak egy aldehid képződik (a). Egyszeresen szubsztituált prokirális olefinekből kiindulva a lineáris aldehidek mellett királis elágazó aldehidek jöhetnek létre, amennyiben a katalizátor is optikailag aktív ligandumot tartalmaz (b). A lehetséges keletkező izomerek száma megnő, ha a reakció alkén izomerizációval kombinálódva megy végbe (c).



1. Ábra. A hidroformilezési reakció etilén (a), aromás olefinek (b) és belső olefinek (c) esetében

Katalizátorként számos átmenetifém-komplex jöhet szóba kobalt,² ródium,³⁻⁶ platina,⁷ és irídium⁸ központi atomokkal.

A homogénkatalitikus eljárások közül a hidroformilezés a legnagyobb volumenű, évenként több mint 10 millió tonna oxo termék előállításával.⁹ Ennek a legnagyobb része az aldol dimerizációval 2-etil-hexanollá alakítható butiraldehid, mely a műanyaglágyítóként népszerű dioktil-ftalát egyik alapanyaga. Az aldehidek önmagában is értékes termékek lehetnek, azonban (gyakran tandem, vagy dominó reakcióban¹⁰) továbbalakíthatók alkoholokká, karbonsavakká, vagy aminokká. A királis aldehideket eredményező aszimmetrikus hidroformilezés az enantiomerikusan tiszta termékek iránt egyre nagyobb igénnyel fellépő gyógyszer- és növényvédőszer ipar számára válik jelentőssé.

A hidroformilezéssel kapcsolatos eredményeket az utóbbi időszakban is számos összefoglaló tanulmány dolgozta fel, ezek közül csak az alternatív fémeket,¹¹ az iparilag jelentős A hidroformilezés általános mechanizmusát tekintve viszonylagos konszenzus alakult ki az elmúlt két évtizedben. A főbb elemi lépések megegyeznek, függetlenül attól, hogy a katalizátor kobalt,¹⁴ ródium,¹⁵ vagy platina¹⁶ központi atomra épül (2. Ábra).



2. Ábra. A hidroformilezés általános mechanizmusa

A reakció egy átmenetifém-hidrido komplexre történő olefin koordinációval indul, majd folytatódik az alkén fém-hidrogén kötésbe történő formális beékelődésével (olefin inzerció), mely valójában inkább a hidrido ligandum valamelyik (eredetileg alkén) szénatomra történő vándorlását jelenti. Ha az olefin az etilénnél nagyobb szénatomszámú, akkor itt elágazik a reakciómechanizmus, ugyanis attól függően, hogy a hidrid melyik szénatomra kerül át, alakul ki elágazó, vagy lineáris átmenetifém-alkil komplex. Ha az alkén prokirális, akkor az elágazó alkil komplexek között már megjelenik a két optikai izomer is. A koordinatíve telítetlen komplexre általában exoterm reakcióban koordinálódik egy szénmonoxid a külső gáztérből, majd ez karbonil ligandumként beékelődik a fém-alkil szén kötésbe, ily módon koordinatíve telítetlen acil-komplex izomerek alakulnak ki. A dihidrogén molekula oxidatív addíciója ezen acil-komplexekre történik meg, majd az így létrejövő dihidrido-komplexek egyik hidrogénje átkerül az acil szénre a reduktív eliminációs lépés során. A körfolyamat végeztével megkapjuk az aldehid termékeket, és visszakapjuk a hidrido-komplex katalizátort.

alkalmazásokat,¹² és a hidroformilezéssel kapcsolatos elméleti számításokat¹³ összegyűjtő munkákat emeljük itt ki.

^{*} tkegl@gamma.ttk.pte.hu

Az egyszerű, halogeno és foszfán ligandumokat tartalmazó platinakomplexek ritkán mutatnak katalitikus aktivitást a hidroformilezés során. Ón(II)-halogenidek jelenlétében azonban hatékony katalizátorok alakulhatnak ki. A szakirodalomban először Hsu és Orchin 1975-ben egy rövid,17 majd Schwager és Knifton 1976-ban¹⁸ egy hosszabb közleményben számolt be Pt/Sn-tartalmú aktív hidroformilező rendszerekről. Jelen közlemény célja a Pt/Sn rendszerekben, az ón(II)-halogenidek elektronikus sajátságairól szóló ismeretek összefoglalása, alapvetően a számításos kémia területén született eredményekre alapozva. Az ón(II)-fluorid beékelődésével és az így kapott Pt-SnF2Cl komplex elektronszerkezetével kapcsolatos eredmények ugyanakkor jelen közleményben kerülnek először ismertetésre.

2. Alkalmazott elméleti módszerek

Valamennyi számítást a DFT (sűrűségfunkcionál elmélet) módszerrel végeztük el, a gradiens-korrigált PBEPBE¹⁹ funkcionál alkalmazásával, mely átmenetifém-komplexek számítására általában megbízható eredményt ad. Báziskészletként a platinához a tripla- ζ def2-TZVP bázist²⁰ választottuk, míg az összes többi atomot a dupla- ζ def2-SVP²⁰ báziskészlettel számoltuk az Sn és Pt atomokon a megfelelő pszeudopotenciállal. Vibrációs analízissel igazoltuk a kapott egyensúlyi geometriák valódi minimum (nincs imaginárius frekvencia) vagy átmeneti állapot jellegét (egy imaginárius frekvencia). A Bader-analízist az AIMAll programmal²¹ végeztük el. Az NBO analízishez a GENNBO 5.0^{22} programot alkalmaztuk. A számításokhoz a Gaussian 09²³ programcsomagot használtuk.

2.1. Bader-analízis

A Bader-féle QTAIM (Quantum Theory of Atoms in Molecules) analízis²⁴ a háromváltozós $\rho(\mathbf{r})$ elektronsűrűségfüggvény topológiai vizsgálatán alapul. Kiindulópontja a kritikus pontok keresése, melyek a $\rho(\mathbf{r})$ függvény szélsőértékei, azaz azon pontok, ahol a gradiens, azaz $\nabla \rho(\mathbf{r}) = (0,0,0)$. A kötéskritikus pontban számított elektronsűrűség ugyanakkor a kötések erősségére is enged következtetni, különösen, ha hasonló jellegű kötéseket hasonlítunk össze.

Két atom között, az ún. kötéskritikus ponton keresztül definiálható egy-egy útvonal (kötésútvonal), mely a maximális elektronsűrűségű pontokat köti össze. A kötésútvonal megléte egyben a két atom közti kovalens kötés meglétének szükséges (de nem elégséges!) feltétele is. Az útvonalak segítségével információt nyerhetünk a kötések erősségéről és formájáról (pl. hajlítottság) is. Három, vagy több atom között a kötésútvonalak gyűrűbe is szerveződhetnek, ilyenkor a gyűrűn belül találunk egy ún. gyűrűkritikus pontot is, ahol az elektronsűrűségnek (a gyűrűn belül) minimuma van. Találunk még olyan útvonalakat is, melyek az elektronsűrűség gradiensét követik és egy-egy kötéskritikus pontban végződnek: ezek az ún. atomi medencéket határolják el egymástól. Ily módon egyfajta szemléletes képet kaphatunk az egyes atomok "vonzáskörzetéről".

2.2. NBO analízis

Egy adott Y hullámfüggvényhez rendelhető természetes orbitálok (NO) az egyelektronos redukált sűrűségoperátor sajátfüggvényeiként definiálhatók (1. egyenlet):

$$\hat{\Gamma}\varphi_{\rm k} = p_{\rm k}\varphi_{\rm k} \tag{1}$$

ahol a p_k sajátértékek az egyes \ddot{o}_k természetes orbitálok populációinak feleltethetők meg. A természetes orbitálok teljes ortonormált függvényrendszert, azaz bázist alkotnak. Betöltöttségük a Pauli-elv figyelembe vételével (zárt héjú rendszerre) 0 és 2 között bármilyen értéket felvehet. Kiválasztásuknál szempont, hogy az elektronsűrűség a lehető legkevesebb orbitál között legyen elosztva. Ezt úgy érhetjük el, ha az első kiválasztott próbaorbitált variációs módon maximalizáljuk, majd ugyanezt elvégezzük az összes többi orbitállal, szem előtt tartva, hogy mindegyik ortogonális legyen az összes többivel.

A természetes atomorbitálok (NAO) { $_{k}^{(A)}$ } az "A" atom lokalizált egycentrumos orbitáljai molekuláris környezetben.²⁵ Jellemzőjük, hogy mind intraatomosan, mind interatomosan ortogonálisak:

$$\left\langle \varphi_{j}^{(A)} \middle| \varphi_{k}^{(B)} \right\rangle = \delta_{j,k} \delta_{A,B} \tag{2}$$

Az egyes NAO-k populációiból és a magtöltésből (ZA) számíthatók az egyes atomok parciális töltései:

$$Q_{\rm A} = Z_{\rm A} - \sum_{\rm k} p_{\rm k}^{\rm (A)} \tag{3}$$

A természetes kötőorbitálok (NBO) természetes hibrid orbitálokból (NHO) $\{h_A\}$ állnak össze, melyek az NAO-khoz hasonlóan teljes ortonormált függvényrendszert alkotnak. Az NHO-k az NAO-k lineárkombinációi az adott centrumon:

$$h_{\rm A} = \sum_{\rm k} a_{\rm k} \varphi_{\rm k}^{\rm (A)} \tag{4}$$

Az egycentrumos NBO-k közül az atomtörzsi orbitálok jellemzően tisztán NAO karakterűek, míg a magános párok (LP) egy-egy normált NHO-ból állnak elő. A kétcentrumos NBO-k az egymáshoz rendelt ("egymás felé mutató") NHO-k lineáris kombinációjával jönnek létre:

$$\Omega_{\rm AB} = a_{\rm A} h_{\rm A} + a_{\rm B} h_{\rm B} \tag{5}$$

Az a_A és a_B polarizációs koefficiensekre igaz, hogy $a_A^2 + a_B^2 = 1$. Az ortogonalitás megőrzése miatt minden egyes kötő NBO-t ki kell egészíteni egy ellentétes fázisú lazító NBO-val:

$$\Omega_{AB}^* = a_{\rm B}h_{\rm A} - a_{\rm A}h_{\rm B} \tag{6}$$

A lokalizált NBO-k összessége az adott molekulára egy Lewis-jellegű határszerkezetet ("ideális Lewis-szerkezet") jelöl ki.

Az NBO-k közötti donor-akceptor kölcsönhatások kiszámítása egyelektronos Hamilton-operátor (azaz a Fock, vagy DFT esetében a Kohn-Sham operátor) segítségével

E rel [kcal/mol]

történik, NBO bázison. A diagonális (vagyis perturbálatlan) elemek az orbitálenergiákat adják meg:

$$\varepsilon_i = \left\langle \Omega_i \middle| \hat{F} \Omega_j \right\rangle, \quad \varepsilon_j^* = \left\langle \Omega_j^* \middle| \hat{F} \Omega_j^* \right\rangle$$
(7)

Az egyelektronos operátor mátrixreprezentációjának diagonálistól eltérő elemeiből a két orbitál közti donor-akceptor kölcsönhatás energiája számítható ki:

$$\Delta E_{i \to j} = -2 \frac{\left\langle \Omega_i \left| \hat{F} \Omega_j^* \right\rangle^2}{\varepsilon_j^* - \varepsilon_j} \tag{8}$$

Ha egy Lewis-típusú NBO-t a lehetséges perturbációs kölcsönhatások, és az azokkal kapcsolatba hozható töltésátvitelek segítségével kiegészítjük az összes lehetséges Ω_j^* nem Lewis NBO-val, akkor eljutunk a természetes lokalizált molekulaorbitálokhoz (NLMO), melyeknek pontosan kétszeres a betöltöttségük, azaz egy-egy elektronpárt reprezentálnak. Az ábrázolásuk (egy erre alkalmas program segítségével) hasznos segítséget nyújthat az egyes donor-akceptor kölcsönhatásokban résztvevő elektronpárok vizualizációjához.

3. Eredmények

A Pt-foszfin-ón-klorid rendszereket mind *in situ* [PtCl₂(P₂)] + SnCl₂, mind 'kipreparált' [PtCl(SnCl₃)(P₂)] (ahol P₂ két monofoszfánt, vagy egy difoszfánt jelöl) szokták alkalmazni. Bár a platinatartalmú katalizátorok aktivitása elmarad a ródiumtartalmú rendszerekétől, jelentőségük mégsem elhanyagolható, elsősorban az aszimmetrikus hidroformilezés területén, a jó kemoszelektivitás, azaz a hidrogénezett termékek csekély aránya, valamint számos esetben a jó enantioszelektivitás miatt.

Kokatalizátorként az ón(II)-fluorid sikeres alkalmazására is találunk példát.²⁶ A [PtCl₂(P₂)] + SnF₂, rendszerek az ón-kloridos rendszerekhez képest kisebb katalitikus aktivitással, ugyanakkor lényegesen jobb termikus stabilitással jellemezhetők. A rendszer másik előnyös tulajdonsága az alacsony hőmérsékleten elérhető nagyobb optikai hozam volt.

3.1. A katalitikusan aktív species kialakulása

Általánosan elfogadott, hogy а Pt/Sn-katalizált hidroformilezési reakció aktív katalizátora a [PtH(SnCl₃)(P₂)] komplex, mely az analóg kloro-komplexből alakul ki, a hidrogénnyomás hatására. A [PtCl(SnCl₃)(P₂)] prekurzor a megfelelő dikloro-komplexből állítható elő az ón-halogenidnek a Pt-Cl kötésbe történő beékelődésével. A beékelődés mechanizmusát Rocha és Almeida számolta MP2/HF elméleti szinten²⁷ (a geometriákat a Hartree-Fock módszerrel számították ki, majd az energiaértékeket a másodrendű Mřller-Plesset szinten pontosították) és azt találták, hogy a triklorosztannáto-komplex kialakulása igen kis aktiválási energiagáttal megy végbe. Hasonló eredményre jutott munkatársaival,28 Wasserscheid amikor ciszа [PtCl(SnCl₃)(PH₃)₂] képződési mechanizmusát vizsgálták DFT módszerrel, a B3LYP hibrid funkcionál alkalmazásával. Azt találták, hogy első lépésben az SnCl2 adduktot képez a Pt-komplexszel, annak kloro ligandumján keresztül, és ennek viszonylag jelentős kötési energiája (18,7 kcal/mol) megmagyarázza, hogy a beékelődést leíró átmeneti állapot energiája miért lehet kisebb, mint a kiindulási állapoté, azaz dikloro-komplex és az ón-klorid energiájának az összegéé (3. Ábra).



3. Abra. Az ón(II)-halogenid Pt-Cl kötésbe történő beékelődésének mechanizmusa. A fekete színnel jelölt energiaértékek az ón-kloridra (28-es irodalom), a szürkével jelöltek az ón-fluoridra (saját eredmények) vonatkoznak. A relatív energiák az ón-halogenid addukthoz viszonyítva kerültek feltüntetésre.

ón(II)-fluorid beékelődését PBEPBE Az mi а sűrűségfunkcionál módszer segítségével vizsgáltuk meg. Jelentős hasonlóság figyelhető meg az ón-klorid tartalmú rendszerrel, azonban a *cisz*-[PtCl₂(PH₃)₂-SnF₂] addukt képződése még nagyobb energianyereséggel (23,0 kcal/mol), ugyanakkor maga a beékelődés kisebb aktiválási energiával jár (13,6 kcal/mol). Lényeges eltérés viszont, hogy a cisz-[PtCl(SnF₂Cl)(PH₃)₂] komplex energiája az addukthoz képest alig alacsonyabb, mindössze 1,1 kcal a különbség. A kapott eredmény arra enged következtetni, hogy az ón-fluorid beékelődése nagyjából egyensúlyi folyamat, ami megmagyarázza, hogy az NMR-spektroszkópia segítségével miért nem találunk jól definiált [PtCl(SnF₂Cl)(P₂)] komplexeket.

3.2. Az ón-halogenidek hatása a katalitikus ciklus néhány lépése során

A propilén Pt–monofoszfin–ón-klorid rendszer által katalizált hidroformilezését első ízben Schwager és Knifton vizsgálta részletesebben.¹⁸ DFT számítások segítségével mi arra kerestük a választ, hogy az elterjedt B3LYP funkcionál közepes bázissal kombinálva alkalmas-e a kísérleti lineáris regioszelektivitás visszaadására. Másrészt vizsgáltuk, hogy mind az elágazó, mind a lineáris butiraldehid izomerek keletkezése milyen reakciócsatornán keresztül történik.²⁹ Abban az esetben, ha a reakció egyik elemi lépése (vagyis itt az olefin koordináció és az azt követő beékelődés) kinetikailag kontrollált és irreverzibilis folyamat, úgy két kiválasztott regioizomer koncentráció aránya az egyes reakciócsatornák sebességi állandóiból, azok pedig az aktiválási szabadentalpiákból határozhatók meg:

$$\frac{c1}{c2} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{e^{-\frac{\Delta G_1^2}{RT}}}{e^{-\frac{\Delta G_2^2}{RT}}} = e^{-\frac{\Delta \Delta G^2}{RT}}$$
(9)

Az oldószerhatás figyelembe vételével, katalizátorként egyszerű *cisz*- és *transz*-[PtH(SnCl₃)(PH₃)₂] komplexeket alkalmazva a lineáris regioszelektivitásra 83% értéket kaptunk, ami igen jó egyezést mutat a 85%-os kísérleti adattal.

Az olefininzerciós lépés kitüntetett jelentősége miatt górcső vettük a különféle hidrido-olefin komplexek alá elektronszerkezetét, hogy magyarázatot találjunk azok termodinamikai stabilitásban mutatkozó különbségeire. A komplexek alapvetően két csoportra oszthatók, aszerint, hogy a triklorosztannáto ligandum ekvatoriális, vagy axiális pozíciót foglal el. A 4. Ábrán látható, propén ligandumot tartalmazó adduktok esetében az ekvatoriális komplex egyenetlenebb elektronsűrűség eloszlást eredményez a Pt-C-C síkban. Ezen három atom (vagyis a központi fém és a két olefines szénatom) között minden esetben találunk gyűrűkritikus pontot, és ezek az axiális adduktokban nagyjából egyenlő távolságra helyezkednek el a két Pt-C kötésútvonaltól. Az ekvatoriális komplexekben azonban a gyűrűkritikus pontok jóval közelebb találhatók az SnCl₃ ligandumtól távolabb eső Pt-C útvonalhoz képest. Az elektronsűrűség torzulásával összhangban, а kötéstávolságokban is változás figyelhető meg. A Pt-Sn kötésútvonallal kisebb szöget bezáró Pt-C kötés távolsága kisebb, míg a távolabbié nagyobb lesz. A C-C kötéshossz ugyanakkor csak elhanyagolható mértékben változik.



4. Ábra. A triklorosztannát ligandumot ekvatoriális (balra), illetve axiális (jobbra) pozícióban tartalmazó [PtH(SnCl₃)(PH₃)₂(propén)] olefin adduktok Laplace-térképe. A kötéstávolságok Ĺ mértékegységben vannak megadva.

Az NPA töltéseket összehasonlítván az ón atom esetében nagyjából azonos értékeket kaptunk, azonban a Pt kevésbé pozitív, a hidrid hidrogének viszont kevésbé negatívak, ha az SnCl₃ ligandum ekvatoriális helyzetben van. Ilyenkor nagyobb eltérés mutatkozik a kétféle foszfán ligandum (axiális és ekvatoriális) foszfor atomjának parciális töltése között; az axiális P atomok pozitívabbak és gyengébben koordinálódnak, mint az ekvatoriálisak.

Az olefin inzerciós lépést vizsgáltuk királis modell esetében is. A szubsztrátum sztirol volt, míg az optikailag aktív ligandum szerepét a 2,3-(difoszfano)-bután (chiraphosH) töltötte be.³⁰ A reakciót benzol oldószerben Consiglio és munkatársai vizsgálták és elágazó regioszelektivitásra 62%, míg enantioszelektivitásra 45% értékeket kaptak.³¹ Az (*R*)-2-fenil-propanal keletkezett nagyobb mennyiségben. A számításaink során a PBEPBE funkcionál segítségével meghatároztuk az összes lehetséges átmeneti állapot geometriáját és relatív szabadentalpiáját, majd a regio-, valamint enantiszelektivitást a 9-es egyenlet szerint számítottuk ki. A PBEPBE geometriákon MP4(SDQ) szinten

is meghatároztuk az energiákat. Különösen az ily módon korrigált értékek adtak igen jó egyezést a kísérleti (47%), enantioszelektivitásra míg az elágazó regioszelektivitás esetében a becslés kevésbé bizonyult pontosnak (86%). Az eltérés oka az egyszerűsített modellben keresendő, nevezetesen a királis ligandum fenil csoportjainak elhagyásában, mely a sztérikusan amúgy gátoltabb elágazó átmeneti állapotokra a valósnál kisebb energiákat eredményez. Az optikai hozamra adott kitűnő becslés viszont arra enged következtetni, hogy a királis indukcióért elsősorban a ligandum váza, nem pedig a foszforokon található fenil csoportok királis elrendeződése felelős.



5. Ábra. A sztirol inzercióját leíró domináns átmeneti állapotok egyszerűsített szerkezete. Az aktiválási szabadentalpiák kcal/mol mértékegységben vannak megadva. Fekete színnel a PBEPBE, míg szürkével a PBEPBE geometrián az MP4(SDQ) módszerrel korrigált értékek láthatók.

Az 5. Ábrán a domináns (legalacsonyabb energiájú) átmenet állapotok láthatók, melyek egyenként a lineáris, az (S) és az (R) reakciócsatornákat jelölik ki. Feltűnő, hogy ezek mindegyikénél ekvatoriális pozícióban helyezkedik el a triklorosztannáto ligandum. Ha pl. a TS-R átmeneti állapotot összehasonlítjuk, az analóg, ám az SnCl3 ligandumot axiális helyzetben tartalmazó TS-R2 átmeneti állapottal, akkor láthatjuk, hogy utóbbi érezhetően kisebb termodinamikai stabilitással rendelkezik. Ha az elektronszerkezetben mutatott különbségeket a Bader-analízis segítségével megvizsgáljuk (6. Ábra), akkor azt tapasztaljuk, hogy a TS-R2-ben kötésútvonalat találunk a platina és mindkét olefines szénatom között, míg a TS-R esetében nem. Ez összhangban van a TS-R átmeneti állapotban megfigyelhető nagyobb Pt-C kötéstávolságokkal is. Az ekvatoriális triklorosztannát tehát nagyobb mértékben képes aktiválni a koordinált olefineket, csökkentvén így a hidridvándorlás energiagátját.



6. Ábra. A TS-R és TS-R2 átmeneti állapototokra kapott kötésútvonalak, a kötés- és gyűrűkritikus pontok feltüntetésével.

A hidroformilezés katalitikus ciklusának fontos lépése az oktaéderes dihidrido-komplexekből kiinduló reduktív elimináció, mely aztán az aldehid termékekhez vezet. Ismeretesek olyan esetek, amikor nem az olefin inzerció, hanem a végső reduktív elimináció a reakció sebességmeghatározó lépése.³² Nem meglepő, hogy a triklorosztannáto ligandum pozíciójának itt is alapvető jelentősége van az egyes komplex izomerek stabilitására és az aldehid elimináció sebességére. A monofoszfánokat tartalmazó modell esetében úgy találtuk, hogy azon dihidrido-komplexek játszanak lényeges szerepet a reakciómechanizmusban, ahol az SnCl₃ ligandum az acil csoporthoz képest transz helyzetben található. A 7. Ábrán látható, a propén hidroformilezése során keletkező lineáris acil komplexek esetében például a transz komplex stabilitásban mutatkozó előnye 13,9 kcal/mol a cisz komplexhez képest. A nagyobb stabilitás feltehetőleg annak köszönhető, hogy az acil csoporthoz viszonyított transz pozíció kiegyensúlyozottabb töltéseloszlást eredményez, ahogy ez az NBO számítások alapján megállapítható.



7. Ábra. Oktaéderes Pt-dihidrido-acil komplexek számított szerkezete. A kötéstávolságok Ĺ mértékegységben vannak megadva. Az NBO módszerrel számított parciális töltések dőlt betűkkel vannak jelölve.

A SnCl₃ ligandum pozíciójának nagy jelentősége van a királis difoszfint tartalmazó rendszer reduktív eliminációs lépésében is. Amennyiben mind az acil csoport, mind a triklórsztannáto ligandum elhelyezkedése ekvatoriális, úgy a dihidrogén oxidatív addíciója jóval kisebb energiagáttal megy végbe, és a keletkező dihidrido-komplex is 9,0 kcal/mol-lal stabilisabb az axiális acil ligandumot tartalmazó komplexhez viszonyítva (8. Ábra).



8. Ábra. Az elágazó (R)-2-fenil-propanalhoz vezető dihidrogén addíciós, majd reduktív eliminációs lépések mechanizmusa. A szabadentalpia értékek kcal/mol-ban vannak megadva.

Az aldehid reduktív eliminációs lépés három átmeneti állapoton keresztül mehet végbe. Az egyik lehetséges esetben az acil csoport axiális helyzetben van, és ez reagál az egyik hidriddel. A második reakcióút az ekvatoriális acil és az axiális hidrogén között zajlik le. Végül, messze a legkedvezőbb eset, amikor mindkét távozó csoport a triklorosztannáto ligandumhoz képest ekvatoriális helyzetben van.

3.3. Az SnX₃ ligandum transz-hatása: NBO számítások

A triklorosztannát ligandum platina-foszfán kompexekben betöltött speciális szerepére már igen korán, a 60-as években felfigyeltek. Chatt és Shaw 1962-ben különböző *transz*-[PtHX(PEt₃)₂] komplexeket karakterizált a Pt-H kötés vegyértékrezgése alapján.33 Megállapították, hogy az SnCl₃ az erősebb transz-hatású ligandumok közé tartozik, mivel az X=Cl esethez képest a karakterisztikus rezgés alacsonyabb hullámszámnál volt megfigyelhető. A Pt-H kötés erőállandójának csökkenésére szemléletes magyarázatot kaphatunk az NBO módszer segítségével. A 9. Ábrán a *transz*-[PtHX(P)₂] komplexekre jellemző donor-akceptor kölcsönhatást láthatjuk, mely az ón magános párja és a σ^*_{Pt-H} lazító NBO között jön létre. A számítások egyszerűsítése végett foszfán ligandumként a PH₃ szerepel, míg az SnX₃ ligandumok közül a triklorosztannáton kívül vizsgáltuk az SnF2 beékelődésével keletkező SnF2Cl-t is, melynek jelentőségét a nagyobb termikus stabilitás és potenciálisan a jobb elérhető szelektivitás adja.26



9. Ábra. A trihalogenosztannát ligandum s-donor kölcsönhatását reprezentáló elektronpár (természetes lokalizált molekula orbitál – balra), illetve a magános pár és a s^{*}_{Pt-H} NBO-k közötti átfedés a *transz*-[PtH(SnF₂Cl)(PH₃)₂] komplexben.

A *transz*-hatásért leginkább felelős $n_{Sn} \rightarrow \sigma^*_{Pt-H}$ kölcsönhatáshoz igen jelentős stabilizációs energia rendelhető hozzá (1. Táblázat, utolsó sor). Az SnF₂Cl ligandum esetében számított kölcsönhatási energia meghaladja az SnCl₃ esetében kapott értéket, és mindkettő nagyobb, mint a kloro ligandumra kapott DE. A donor-akceptor kölcsönhatást reprezentáló elektronpárt az n_{Sn} NBO-ból származtatható NLMO jeleníti meg, melyen markánsan látszik a domináns akceptor pálya, azaz a s^{*}_{Pt-H} szerepe.

A kölcsönhatási energiákban mutatkozó különbség összhangban van a számított n(Pt-H) hullámszámokkal, a Pt-H kötéstávolságokkal, valamint a természetes atomorbitál bázison számított Wiberg kötésindexekkel (WBI). A hidrido ligandum és a platina központi atom parciális töltései is

123. évfolyam, 2. szám, 2017.

egyértelmű tendenciát mutatnak, mivel az erősebb donor-akceptor kölcsönhatás következménye az elektronsűrűség hangsúlyosabb átvitele az X ligandumtól a Pt és a H atomok felé. A hidrid karakter az egyre nagyobb *transz*-hatással együtt így a Cl>SnCl₃>SnF₂Cl sorrendben egyre erősebbé válik, ami magyarázatot adhat a katalitikusan aktív hidrido-komplexek reaktivitásban mutatkozó különbségére is.

1. Táblázat. A H-Pt kötés erősségének jellemzésére szolgáló paraméterek a *transz*-[PtHX(PH₃)₂] komplexekben.

	X=Cl	X=SnCl ₃	X=SnF2Cl
r(Pt-H) (Å)	1,590	1,608	1,614
$v(Pt-H) (cm^{-1})$	2139	2062	2035
q(H)	-0,007	-0,131	-0,151
q(Pt)	-0,113	-0,128	-0,152
WBI	0,594	0,482	0,460
$\Delta E_{n \to \sigma^*} (kcal/mol)$	90,2	673,6	1306,1

Köszönetnyilvánítás

A szerző köszönetet mond a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj programnak és az OTKA K113177 projektnek az anyagi támogatásért.

Hivatkozások

- Roelen, O. (to Chemische Verwertungsgesellschaft Oberhausen m.b.H.). German Patent DE 849548, 1938/1952; U.S. Patent 2327066, 1943.
- 2. Hebrard, F.; Kalck, P. *Chem. Rev.* 2009, *109*, 4272–4282. https://doi.org/10.1021/cr8002533
- van Leeuwen, P. W. N. M., Claver, C., Eds. Rhodium Catalyzed Hydroformylation; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands, 2000.
- Whiteker, G. T.; Cobley, C. J. Top. Organomet. Chem. 2012, 42, 35–46. https://doi.org/10.1007/3418_2011_28
- Trzeciak, A. M.; Ziółkowski, J. Coord. Chem. Rev. 1999, 190-192, 883–900.
- https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00127-7
 Diéguez, M.; Pámies, O.; Claver, C. *Tetrahedron: Asymmetry* 2004, *15*, 2113–2122.
- https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.04.039
 van Duren, R.; van der Vlugt, J. I.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Vogt, D. *Dalton Trans*. 2007, 1053–1059.
- https://doi.org/10.1039/b615428j 8. Piras, I.; Jennerjahn, R.; Jackstell, R.; Spannenberg, A.;
- Franke, R.; Beller, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2011, *50*, 280–284. https://doi.org/10.1002/anie.201001972
 9. Wiese, K.-D.; Obst, D. In Catalytic Carbonylation Reactions; Beller, M., Ed.; Springer Berlin Heidelberg:
- Berlin, Heidelberg, 2006; Chapter Hydroformylation, pp 1–33. https://doi.org/10.1007/3418_015
 Eilbracht, P.; Färfacker, L.; Buss, C.; Hollmann, C.;
- 10. Enoracht, F., Farlacker, E., Buss, C., Hohmann, C., Kitsos-Rzychon, B. E.; Kranemann, C. L.; Rische, T.; Roggenbuck, R.; Schmidt, A. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3329–3366. https://doi.org/10.1021/cr970413r

- Pospech, J.; Fleischer, I.; Franke, R.; Buchholz, S.; Beller, M. Angew. Chem., Int. Ed. 2013, 52, 2852–2872. https://doi.org/10.1002/anie.201208330
- Franke, R.; Selent, D.; Boerner, A. Chem. Rev. 2012, 112, 5675–5732. https://doi.org/10.1021/cr3001803
- 13. Kégl, T. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 4304–4327. https://doi.org/10.1039/C4RA13121E
- Huo, C.-F.; Li, Y.-W.; Beller, M.; Jiao, H. Organometallics 2003, 22, 4665–4677. https://doi.org/10.1021/om0304863
- 15. Decker, S. A.; Cundari, T. R. *Organometallics* **2001**, *20*, 2827–2841. https://doi.org/10.1021/om010019q
- da Silva, J. C. S.; Dias, R. P.; de Almeida, W. B.; Rocha, W. R. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 1986–2000. https://doi.org/10.1002/jcc.21483
- Hsu, C. Y.; Orchin, M. J. Am. Chem. Soc. 1975, 97, 3553–3553. https://doi.org/10.1021/ja00845a064
- Schwager, I.; Knifton, J. J. Catal. 1976, 45, 256–267. https://doi.org/10.1016/0021-9517(76)90140-8
- Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Phys. Rev. Lett.* 1996, 77, 3865–3868. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.3865
- 20. Weigend, F.; Ahlrichs, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005, 7, 3297–3305. https://doi.org/10.1039/b508541a
- Keith, T. A. AIMAll (Version 15.05.18), TK Gristmill Software, Overland Park KS, USA, (aim.tkgristmill.com), 2015.
- Glendening, E. D.; Badenhoop, K., J; Reed, A. E.; Carpenter, J. E.; Bohmann, J. A.; Morales, C. M.; Weinhold, F. NBO 5.0, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison. 2001.
- 23. Frisch, M. J. et al. Gaussian 09 Revision C.01. Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.
- 24. Bader, R. F. W. Atoms in Molecules A Quantum Theory; Oxford University Press, Oxford, 1990.
- Reed, A. E.; Curtiss, L. A.; Weinhold, F. Chem. Rev. 1988, 88, 899–926. https://doi.org/10.1021/cr00088a005
- Kollár, L.; Kégl, T.; Bakos, J. J. Organomet. Chem. 1993, 453, 155–158.
- https://doi.org/10.1016/0022-328X(93)80341-8 27. Rocha, W. R.; de Almeida, W. B. *Int. J. Quantum Chem.* **1997**, *65*, 643–650. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-461X(1997)65:5<643::A ID-QUA30>3.0.CO;2-0
- Illner, P.; Zahl, A.; Puchta, R.; van Eikema Hommes, N.; Wasserscheid, P.; van Eldik, R. *J. Organomet. Chem.* 2005, 690, 3567–3576.
- https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2005.03.029
 29. Bedekovits, A.; Kollár, L.; Kégl, T. *Inorg. Chim. Acta* 2010, *363*, 2029–2045.
- https://doi.org/10.1016/j.ica.2009.12.013
- Papp, T.; Kollár, L.; Kégl, T. Organometallics 2013, 32, 3640–3650. https://doi.org/10.1021/om4002654
- Consiglio, G.; Morandini, F.; Scalone, M.; Pino, P. J. Organomet. Chem. 1985, 279, 193–202. https://doi.org/10.1016/0022-328X(85)87017-0
- Lazzaroni, R.; Settambolo, R.; Alagona, G.; Ghio, C. Coord. Chem. Rev. 2010, 254, 696–706. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.032
- Chatt, J.; Shaw, B. L. J. Chem. Soc. 1962, 5075–5084. https://doi.org/10.1039/jr9620005075

The role of tin-halides in platinum-catalyzed hydroformylation

The hydroformylation or oxo reaction, discovered by Otto Roelen¹ is the transition metal mediated formal addition of carbon monoxide and dihydrogen to the double bond of an alkene. It is one of the most versatile methods for the functionalization of C=C bonds and therefore can be considered as a very robust synthetic tool. Substituted alkenes afford at least two aldehyde isomers. Prochiral olefins provide a racemic mixture of chiral aldehydes when achiral catalyst is used. By utilization of chiral catalysts enantioselectivity can be achieved (Fig. 1). Asymmetric hydroformylation is of great interest for the pharmaceutical and agrochemical industry, since the demand for enantiomerically pure products is constantly increasing. For instance, the hydroformylation reaction of vinyl aromatics may give rise of intermediates toward optically active functionalized 2-arylpropanoic acids, which serve as nonsteroidal anti-inflammatory agents. A wide variety of transition metal complexes may serve as catalyst for hydroformylation, with cobalt, ² rhodium,³⁻⁶ platinum,⁷ and iridium⁸ central atoms. The platinum/tin-catalyzed hydroformylation of alkenes was first reported in the literature by Hsu and Orchin¹⁷ in 1975, and Schwager and Knifton¹⁸ in 1976. Soon, the Pt-containing catalytic systems were successfully applied for asymmetric hydroformylation employing various chiral phosphanes. Remarkable enantioselectivities were reported both for "preformed" $PtCl(SnCl_3)(diphosphane)$ catalysts and for *in situ* $PtCl_2(diphosphane) + tin(II)$ chloride systems. Apart from $SnCl_2$, tin(II)-fluoride was also successfully employed as cocatalyst.²⁶ It is generally accepted, regardless of which metal is centered in the catalyst, that the initial step of hydroformylation is the coordination of the olefin onto the hydrido complex, which is usually formed when the precursor reacts with H₂ under hydroformylation conditions. The formation of the alkyl complex via migratory insertion followed by CO addition and insertion, then the oxidative addition of H₂ onto the acyl complex and the reductive elimination resulting in the initial

hydrido complex and the aldehydes as products. The goal of this study is to give an insight into the electronic structure of platinum-tin complexes and its impact for the various elementary steps of hydroformylation, such as the formation of the active catalyst, the olefin insertion of the reductive elimination of aldehyde. For the computational studies Natural Bond Orbital (NBO) analysis²⁵ and the quantum theory of atoms in molecules²⁴ (QTAIM) by Bader were employed.

It is assumed for Pt/Sn catalyzed hydroformylation, that the active catalyst is complex [PtH(SnCl₃)(P₂)] (where P₂ stands for diphospane or two monophosphanes) which forms from the analogous chloro complex under hydrogen pressure. The precursor [PtCl(SnCl₃)(P₂)] is either pre-prepared or can be generated *in situ* from $[PtCl(SnCl_3)(P_2)]$ and $SnCl_2$ via the insertion of tin(II) chloride into the Pt-Cl bond. The mechanism of SnF2 insertion into the Pt-Cl bond in complex $[PtCl_2(PH_3)_2]$ has been investigated by means of DFT calculations employing the PBEPBE functional. The formation of the adduct was found to be a rather exothermic process with somewhat higher interaction energy found for the insertion of SnCl2 by Wasserscheid and co-workers.28 The barrier for the insertion is similar for the two tin-halides, however, the formation of complex [PtCl(SnF₂Cl)(PH₃)₂] is almost an equilibrium process, which is not a case for the $[PtCl_2(PH_3)_2] +$ $SnCl_2 \rightarrow [PtCl(SnCl_3)(PH_3)_2]$ reaction. This observation might explain why no Pt-ClSnClF2 complex has been detected by NMR spectroscopy.

The mechanism of Pt/Sn catalyzed propene hydroformylation²⁹ and asymmetric styrene hydroformylation³⁰ was investigated by us previously, employing DFT methods. The regioselectivity and the enantioselectivity were found to be determined in the olefin migratory insertion step in both cases. The estimated regioselectivitiy for the Pt-bis(monophosphine) system, based upon the computed relative rates of the individual reaction channels (83%), revealed an excellent agreement with the experimental ones reported by Schwager and Knifton (85%).¹⁸ For the chiral system, which was intended to model the Pt-chiraphos system employed by Consiglio and co-workers,³ an enantiomeric excess of 47% was computed agreeing reasonably with the experimentally determined value of 45%. Our results suggested that the enantioselectivity is determined by the chiral backbone of the Pt-diphosphine moiety, rather than the chiral arrangement of the phenyl groups attached to the phosphorus atoms.

The QTAIM analysis revealed ring critical point in all Pt-olefin complexes with more pronounced distortion in the electron density distribution for complexes where the SnCl₃ ligand accommodates the equatorial position (Fig. 4.). The energetically more preferred transition states for the asymmetric model possess SnCl₃ in equatorial position as well with increased Pt-C distances. Moreover, no bond path can be observed between platinum and the internal olefinic carbon atom whereas Pt-C interactions are notably stronger for the higher energy transition states, where SnCl₃ is in axial position (Fig. 6).

The position of the SnCl₃ ligand is profound for the barrier of the aldehyde reductive elimination step. The *trans* arrangement with respect to the acyl group results in a more even electron density distribution (Fig. 7). The preferred pathway for the oxidative addition of H₂ and the reductive elimination of the aldehydes is found to be the one when the arrangement of the hydrogen atoms is perpendicular to the Pt-C_{acyl} bond (Fig 8). The dominant route for the aldehyde elimination involves the diphosphane ligand with axial-equatorial arrangement and the equatorial SnCl₃ *trans* to the hydride ligand migrating to the acyl carbon.

The role of trichlorostannate was the subject of various studies even in the early 60s. Based on IR studies, measuring the Pt-H stretching frequency, Chatt and Shaw characterized a number of complexes of the trans-[PtH(X)(PEt₃)₂] type and found that SnCl₃ has a moderately strong trans-influence.³³ The decrease of the force constant of the Pt-H bond can straightforwardly be interpreted by means of NBO calculations. Fig. 9 depicts the donor-acceptor interaction characteristic for trans-[PtH(X)(P2)] complexes taking place between the lone pair of tin and the antibonding σ^*_{Pt-H} NBO. The $n_{Sn} \rightarrow \sigma^*_{Pt-H}$ interaction accounts for the trans influence and it can be associated with a high stabilization energy. The interaction energy is the highest for ligand SnF₂Cl (1306.1 kcal/mol) followed by SnCl₃ (673.6 kcal/mol) and it is much lower for the complex containing the chloro ligand (90.2 kcal/mol). This tendency is in accord with the structural (Pt-H distance) and IR (n(Pt-H)) descriptors as well as with the decrease of the Pt-H Wiberg bond index in the order of $SnF_2Cl \rightarrow SnCl_3 \rightarrow Cl$ (see Table 1). The stronger the s-donor ability, the higher the electron density which is transferred from the lone pair of tin towards the H and Pt atoms which is in line with their more negative partial charge. The more pronounced hydride character in complex trans-[PtH(SnF₂Cl)(PH₃)₂] might provide an explanation for the change of reactivity and selectivity for the tin(II) fluoride containing systems.

Nyíltláncú és makrociklusos aminokarboxilát ligandumok szintézise és fémkomplexeik vizsgálata: koordinációs kémia az orvosi képalkotás szolgálatában

TIRCSÓ Gyula, BRÜCHER Ernő, BARANYAI Zsolt, KÁLMÁN Ferenc Krisztián és TÓTH Imre*

^aDebreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Egyetem tér 1., 4032 Debrecen, Magyarország

1. Bevezetés

A "Ritka(föld)fém" kutatócsoport feltehetően a Debreceni Egyetem Kémiai Intézetének egyik leghosszabb ideje tématerületen dolgozó, ritkaföldfémazonos а aminopolikarboxilát komplexek koordinációs kémiájával foglalkozó egysége. Az 1960-as években még a ritkaföldfémek ioncserés elválasztása jelentette a fő célt, amit 1980 után inkább az orvosi képalkotás fontos modalitásának, a mágneses rezonanciás képalkotásnak (MRI) a kontrasztanyagaként elterjedt Gd³⁺-vegyületek vizsgálata követett. A Magyar Kémiai Folyóirat hasábjain és a Magyar Kémikusok Lapjában rendszeresen publikáltunk kutatási eredményeket és összefoglaló áttekintéseket¹ és a félévszázad fontosabb eredményeit ebben a cikkben és az abban idézett irodalmakban találhatja meg az érdeklődő olvasó.

Munkánk célja a fémkomplexek előállítása és fizikai-kémiai jellemzése a koordinációs kémia eszközeivel. Ez többnyire a ligandumok szintézisét, a fémkomplex oldatban és/vagy szilárd formában való előállítását, az egyensúlyi állandók meghatározását, a szerkezet vizsgálatát, a képződés és a bomlás kinetikájának tanulmányozását jelenti, amit esetenként speciális tulajdonságok (pl. a paramágneses jellemző adatok, fotófizikai hatást paraméterek, oldékonyság) mérése is kiegészít. A ritkaföldfém ionok (Ln³⁺) mellett vizsgálataink gyakran kiterjednek az emberi szervezetben előforduló (esszenciális) kationok és (endogén) anionok komplexeire is. Újabban jelentőssé váltak számunkra is az alternatív MRI kontrasztanyagoknak tekinthető Mn²⁺-komplexek, de dolgozunk olyan elemek fémkomplexeivel is - nem radioaktív izotópokat használva amelyeknek sugárzó izotópjai a radiodiagnosztikában (Single Photon Emission Computer Tomography, SPECT, Pozitron Emission Tomography, PET), vagy а radioimmunoterápiában (RIT) bírnak egyre növekvő fontossággal. Az integrált alkalmazás, a diagnosztika és a terápia együttes megvalósítása az un. teragnosztika ma már a világ néhány vezető kórházában napi gyakorlat.²

A jelen áttekintés, ami a "**Napjaink koordinációs kémiája**" tudományos ülésen (Tóth, I., MTA, 2015. NOVEMBER 11.) elhangzott, a csoportnak az elmúlt fél évtizedben elért eredményeit veszi számba, tartalmazva az együttműködő partnereink jelentős hozzájárulását is: Prof. A. Dean Sherry (University of Texas at Dallas, Richardson, TX, USA), Dr. Kovács Zoltán (University of Texas Southwestern Medical

Center, Dallas, TX, USA), Prof. Dr. Mark Woods (Portland State University és Oregon Health Sciences University, Portland, OR, USA), Prof. Dr. Carlos Platas-Iglesias (Universidade da Coruňa, A Coruňa, Spanyolország); Prof. Dr. Jakab-Tóth Éva (Centre de Biophysique Moléculaire, Orleans, Franciaország), Prof. Dr. Silvio Aime (University of Turin, Olaszország), Prof. Dr. Mauro Botta (Universitŕ degli Studi del Piemonte Orientale "A. Avogadro", Alessandria, Olaszország), Prof. Dr. Raphaël Tripier (Universite de Bretagne Occidentale, Brest, Franciaország), Prof. Dr. Goran Angelovski (Max Planck Institute for Biological Cybernetics, Tübingen, Németország), Dr. Christian Vanasschen (Forschungszentrum Jülich Research Center, Köln, Németország), míg az ipari partnerek közül a Dr. Alessandro Maiocchi és Dr. Fulvio Uggeri által képviselt Bracco Imaging SpA-t, (Milánó, Olaszország) tartjuk fontosnak kiemelni.

2. MRI kontrasztanyagok

A modern orvosdiagnosztikai képalkotó eljárások fő feladata, hogy nem invazív módon információt szolgáltassanak az emberi testről, illetve az élő szervezetben leiátszódó folyamatokról. Az MRI vizsgálatoknál paramágneses anyagokat (komplexek, fémoxidok, stb.) alkalmaznak kontrasztanyagként, amelyek közül a Gd³⁺-ion és komplexei váltak piacvezetővé az elmúlt 30 évben.³ A Gd3+-alapú kontrasztanyagok sikertörténetét két dolog is beárnyékolja. Az egyre növekvő számú kontrasztanyagos vizsgálat hatására folyamatosan nő az ivóvizek Gd-tartalma, ami a nagyobb diagnosztikai központok környezetében pozitív Gd³⁺-anomália néven vált ismertté.⁴ Sokkal komolyabb problémát jelentett viszont a 2000-es évek elején Nefrogén Szisztémás Fibrózis (NSF) néven ismertté vált betegség, amiért a csökkent vesefunkciójú vagy transzplantáció előtt álló páciensek esetében, a szervezetből való lelassult kiürülés eredményeképp, a nyíltláncú ligandumok komplexeiből felszabaduló toxikus Gd3+ tehető felelőssé.5 Alkalmazási irányelvek bevezetésével az NSF betegséget ugyan sikerült visszaszorítani, de a történtek hatására egyrészt a kimagaslóan inert Gd3+-komplexek keresése újabb lendületet vett⁶ másrészt az esszenciális épülő (Mn^{2+}) Fe²⁺, ${\rm Fe}^{3+}$. stb.) fémionokra kontrasztanyag-kutatás is érezhetően megélénkült.⁷ Az elmúlt 1-2 évben ugyanakkor olyan eredmények kerültek napvilágra amelyek azt bizonyítják, hogy egészséges vesefunkciójú páciensek esetében történhet is

^{*} Tel.: +36-52-512900/ ext. 22371 ; fax: +36-52-518-660 ; e-mail: imre.toth@science.unideb.hu

Gd(III)-visszamaradás/felhalmozódás, amennyiben a betegek többszöri kontrasztanyagos MR vizsgálaton esnek át.⁸ Ezen figyelmeztető tapasztalatok a szervezet által jobban tolerált paramágneses fémionokra (pl. Mn^{2+}) alapozó kontrasztanyagok kutatására helyezik át a hangsúlyt, amellyel a 2.2 fejezetben foglalkozunk részletesebben.

2.1. Gd-alapú komplexek

Célunk a jelenleg kereskedelmi forgalomban lévő Gd(III)-alapú kontrasztanyagokénál jobb fizikai-kémiai mutatókkal rendelkező komplexek kifejlesztése. Ennek alapvető eszköze a ligandumok szerkezetének célirányos módosítása. Egy másik fontos célkitűzésünk a jelenleg forgalomban lévő komplexek kinetikai tulajdonságainak részletes vizsgálata, a biológiai rendszerekben lejátszódó disszociációjuk, fémion és ligandumcsere folyamataik jobb megértése.

2.1.1. Az oldalláncok alfa-szénatomján metilcsoportokat tartalmazó makrociklusos ligandumok

Az oktadentát DOTA ligandumot a diagnosztikai és terápiás alkalmazások "arany standard"-jaként emlegetik a komplexei kiemelkedően nagy stabilitása és inertsége miatt, de a szerkezetileg analóg, az acetát oldalláncok alfa-szénatomján metilcsoportokat tartalmazó DOTMA komplexek fizikai-kémiai paramétereit korábban alig vizsgálták.

Munkánk során a DOTMA ligandum és származékai egyes endogén (Ca²⁺-, Mg²⁺-, Cu²⁺- ill. Zn²⁺-) és Ln³⁺-ionokkal képződő komplexei egyensúlyi és kinetikai (képződés-, bomlás-, ill. oldószercsere) jellemzését végeztük el. Ezen túl a szabad ligandum, a kétszeresen protonált Cu2+-komplex, ill. a Gd3+-ionnal képződő kelát szerkezetét is sikerült szilárd fázisban röntgendiffrakciós módszerrel meghatározni. Az eredményeink azt mutatják, hogy: 1. a ligandum donoratomjainak a bázicitása a metilcsoport hiperkonjugatív elektronküldő hatásának eredményeként nagyobb a szerkezetileg analóg DOTA komplexképző esetében tapasztalt értékektől, és a 4. protonálódásra jellemző lépcsőzetes állandó nagyobbnak adódik az összes vizsgált ionerősség mellett (0,15 M NaCl, 1,0 M KCl, ill. 1,0 M Me₄NCl), mint a log K_3^{H} , amit a ligandum protonálódás bekövetkező konformáció-változásával hatására értelmezünk. 2. a komplexek stabilitása a Cu²⁺-ioné kivételével az összes vizsgált fémion (K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ce^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} és Yb³⁺) esetében kisebb, mint a megfelelő DOTA komplexeké, ami a komplexképző metilcsoportjai sztérikus hatásának tudható be.9-10 A Cu²⁺-ion esetében több független módszer segítségével (közvetlen, ligandumkompetíciós UV-látható ill. spektrofotometria és ESR spektroszkópia) igazoltuk, hogy az irodalomban más makrociklusos ligandum (pl. DOTA, DOTAM, stb. 1. ábra) esetére publikált stabilitási állandók korrekcióra szorulnak. Ez azt is jelenti, hogy Cu²⁺-ion esetében is a DOTMA-komplex a kisebb stabilitású. A [Cu(DOTAM)]²⁺ tetragonális piramisos szerkezetű, amelyben a Cu2+-iont a makrociklus nitrogénatomjai és egy kloridion koordinálja.¹⁰



1. Ábra. Az acetát oldalláncok alfa-szénatomján metilcsoportokat tartalmazó makrociklusos komplexképzők

A [Cu(H₂DOTMA)] kétszeresen protonált komplexben az egyik proton a makrociklus nitrogénatomját, a másik pedig egy karboxilátcsoportot protonál, ami a Cu2+-ionra nézve síknégyzeteshez közeli geometriát eredményez. Ez lényeges különbség a Cu₂DOTA·4H₂O- és a H₂CuDOTA-komplexek [Cu(DOTA)]²⁻egységeiben tapasztalt geometriához viszonyítva,¹¹ ahol a fémiont koordináló donoratomoknak oktaéderes az elrendeződése. 3. A ritkaföldfém(III)komplexek esetében az oldatban lehetséges négyzetes antiprizmás (NAP) és torzult négyzetes antiprizmás (TNAP) izomerek közül túlnyomóan a TNAP izomer fordul elő ([Gd(DOTMA)(H₂O)]⁻ esetében szilárd fázisban is), ami nagyobb Gd-H₂O kötéstávolsággal és közel egy nagyságrenddel nagyobb vízcseresebességgel rendelkezik, tehát a kontrasztanyagként ez az értékesebb izomer. 4. A vizsgált [Ln(DOTMA)]⁻-komplexek képződése а DOTA-komplexek esetében leírtakhoz hasonlóan több egymást követő lépésben megy végbe, de több mint két nagyságrenddel lassabban. 5. Az [Ln(DOTMA)]komplexek savkatalizált disszociációja a megfelelő [Ln(DOTA)(H₂O)]⁻-komplexekhez mérten 30-400-szor lassabb. Összegezve, a DOTMA ligandummal képződő Ln³⁺-komplexek stabilitása kisebb és lassabban is képződnek, mint a megfelelő DOTA komplexek, amit ellensúlyoz a [Ln(DOTMA)]⁻-komplexek nagyobb inertsége, ill. a Gd³⁺-kelát [Gd(DOTA)]⁻-komplexszel megegyező, jó relaxivitása.9, 12

A bifunkciós *S-SSS*-NB-DO3MAA és *S-RRRR*-NB-DOTMA komplexképzők az Ln³⁺-ionokkal oldatban különböző izomereket képeznek. Az *S-SSS*-NB-DO3MAA komplexképzővel kizáróan TNAP izomer képződött, míg az *S-RRRR*-NB-DOTMA esetében a NAP izomer oldatbeli megjelenésével kell számolni (tehát a két izomer között fennálló dinamikai egyensúly megszűntethető). Ezek alapján lehetőségünk nyílt két nagyon hasonló szerkezetű ligandumra nézve az egyes NAP és TNAP izomer komplexeik stabilitását, képződési-, és bomlás-kinetikai paramétereit meghatározni egyazon fémion esetére. A tisztán tudományos eredményeken túl ez egy eddig nem ismert új "eszközt" szolgáltat a Ln^{3+} -komplexek stabilitásának, képződési- és bomláskinetikai paramétereinek a hangolására is. Ezt a sikert némiképp beárnyékolja az a tapasztalatunk, hogy a makrociklushoz kötött *para*-nitrobenzil-csoport miatt a komplexképződés során regioizomerek is képződtek (amit korábban is tapasztaltak, de racememizációval értelmeztek), ami aztán az izomerek HPLC technikával történő elválasztását teszi szükségessé.¹²

1.1.1.2. A PCTMA ligandumot (1. ábra) a PCTA¹³ és DOTMA9 ligandumokkal kapott eredményeink alapján terveztük meg, és piklén, ill. az L-tejsav-metil-észterének triflátja közötti reakcióban keletkező észter szappanosításával állítottuk elő.14 A PCTMA ligandum Mg²⁺-, Ca²⁺-, Mn²⁺-, Zn²⁺- és Cu²⁺-ionokkal képződő komplexei oldategyensúlyát mononukleáris komplexekkel tudtuk leírni, a Mg²⁺-ion esetében tisztán ML, a Ca²⁺-ionnál ML és MHL, míg a további fémionok esetében MH₂L komplexek képződősével is számolni kell, de vegyes hidroxido-komplexek képződését egyik rendszer esetében sem tudtuk kimutatni. A Mg2+ és Ca2+ ionok esetében a megfelelő PCTA komplexeknél valamivel kisebb stabilitású komplexek képződtek, a Zn2+- és Mn2+-ionok esetében a stabilitás összemérhető. A Cu2+-komplexek esetében több nagyságrenddel nagyobb a stabilitási állandó, amit csak spektrofotometriás módszerrel sikerült meghatároznunk (log $K_{[Cu(PCTMA)]}=23,93(0,09)$ vs. log $K_{[Cu(PCTA)]}=18,79)$. A Gd3+-ionnal végzett relaxometriás kísérleteink alapján log $K_{\text{[GdL]}}=20,68(2)$, ami 0,3 log K egységgel nagyobb, mint a [Gd(PCTA)]-komplexre kapott érték. A [Gd(PCTMA)] relaxivitása 8,51 mM⁻¹s⁻¹ (25 °C-on és 20 MHz-en), ami közel a duplája a klinikai gyakorlatban legjobbnak vélt kontrasztanyag, a [Gd(DOTA)(H₂O)]⁻, relaxivitásának, ill. nagyobb az összes kereskedelmi forgalomban lévő Gd³⁺-alapú ágens relaxivitás értékénél. Ez az adat vérszérumban 8,15 mM⁻¹s⁻¹ értékre csökken, ami a komplex és a szérum komponenseinek a kölcsönhatására utal. A vizsgált bioligandumok közül a laktátionnal tapasztaltuk a vegyeskomplex legstabilabb képződést. А [Gd(PCTMA)(H₂O)₂]-komplex nagy relaxivitása a központi fémionhoz két vízmolekula koordinációjának (amit lumineszcenciás módszerrel támasztottunk alá), ill. azok gyors cseréjének (ezt ¹⁷O-NMR módszerrel igazoltuk) az eredménye. A [Gd(PCTMA)(H2O)2]-komplex savkatalizált disszociációjára jellemző sebességi állandó 0,1-2,0 M savkoncentráció tartományban $k_1 = (1,40\pm0,06)'10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. megközelíti [Gd(DOTA)]⁻-komplexre Ez közölt $(k_1=8,4'10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}, \text{ ill. } k_1=1,8'10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$ adatokat, és több mint egy nagyságrenddel kisebb a PCTA ligandum Eu³⁺-komplexe esetében tapasztalt értéknél (k_1 =5,1'10⁻⁴ M⁻¹s⁻¹).^{13,15,16} Hasonló következtetésre jutottunk a Mn²⁺-komplex vizsgálatakor is, bár ebben az esetben a sebességi állandó értékében tapasztalt csökkenés kisebb kétszeres. A [Gd(PCTMA)]mértékű, mindössze komplexszel végzett képződéskinetikai vizsgálataink

ugyanakkor rámutattak a PCTMA ligandum egy kevésbé előnyös tulajdonságára is: a komplex képződési sebessége kisebb a DOTA komplexénél. Ezek alapján a PCTMA komplexképző jól "ötvözi" DOTMA és PCTA ligandumok tulajdonságait, és a [Gd(PCTMA)] a fizikai-kémiai jellemzői alapján képes felvenni a versenyt a [Gd(DOTA)]-alapú Dotarem MRI kontrasztanyaggal.

2.1.2. Nyíltáncú EDTA-származékok szerkezetének hatása a Ln³⁺-komplexeik oldategyensúlyára és inertségére

Az elmúlt években nagyszámú EDTA származékot vizsgáltunk (ezek egy része a kereskedelmi forgalomban is kapható, de néhányat mi magunk is előállítottunk), amelyekben az EDTA két imino-diacetat-csoportját (IMDA) összekötő etilénhidat formálisan különböző, akár donoratomokat is tartalmazó "egységgel" helyettesítettük (pl. foszfinátcsoport (BIMP), metilhidrazin-csoportokat tartalmazó piridin egység (HYD), éteres oxigén (OBETA), metilcsoportok helyzetű (DMPDTA), geminális cisz-izoforon-diamin (cisz-IPDTA)).¹⁷⁻²¹ Ezáltal rálátásunk van az említett csoportok és a képződő komplexek fizikai-kémiai sajátságai közötti összefüggésekre, amik igen hasznosak új komplexképzők (akár makrociklusos ligandumok) tervezésekor és előállításakor.

Az egyensúlyi vizsgálatok szerint a képződő komplexek stabilitása csökkent, amennyiben az IMDA-csoportokat összekötő egység nem tartalmazott koordinálódó donoratomot és ezzel párhuzamosan nőtt a ligandum kétmagvú komplexek képződősére való hajlama is (DMPDTA és cisz-IPDTA).¹⁷⁻¹⁸ Az cisz-izoforonszármazék esetében ez a csökkenés még számottevőbb, ami arra az ismert tényre utal, hogy az IMDA-csoportok közötti összekötőelem előrendezettsége és "hossza" nagymértékben befolyásolja a képződő komplexek stabilitását. A láncban donoratomot tartalmazó komplexképzők esetében a foszfinátcsoport IMDA-csoportok közé történő "illesztése" a BIMP komplexek esetében nem javítja a ligandum komplexképző sajátságait. (A Ln³⁺-ionok komplexeinél pl. a megfelelő [Ln(EDTA)]-komplexhez képest kisebb stabilitás a jellemző, és megjelennek a kis stabilitású (log *K*=3,0-3,5) kétmagvú komplexek is).19 Az [Ln(BIMP)]²-komplex savkatalizált bomlására jellemző sebességi állandó kisebb, ugyanakkor a fémion közvetlen támadásával lejátszódó reakcióra jellemző sebességi együttható nagyobb, mint azt a megfelelő [Ln(EDTA)]-komplex esetében tapasztalták, de összességében a Cu2+-ionnal lejátszódó cserereakciók nagyon gyorsan játszódnak le, és csak a "stopped-flow" technikával követhetők.¹⁹ A koordinálódó éteres oxigénatomnak köszönhetően viszont az OBETA ligandummal képződő Ln³⁺-komplexek stabilitása és inertsége is javul a megfelelő [Ln(EDTA)]-komplexekhez mérten.20 Amennyiben merev metilhidrazin-csoportokat tartalmazó piridin egységet (HYD) "ékeltünk" a két IMDA-csoport közé, már sokkal jobb, a kereskedelmi forgalomban lévő és leggyakrabban alkalmazott nyíltláncú MRI kontrasztanyagra, a [Gd(DTPA)]²⁻- komplexre jellemző bomláskinetikai adatokhoz hasonló sebességi állandókat kaptunk.²¹



2. Ábra. A vizsgált nyíltáncú komplexképzők szerkezete

A fiziológiás körülménynek mellett (pH=7,4, c_{Cu2+}=1 ěM) számított felezési idő ebben az esetben még nagyobbnak is adódott ($t_{1/2}$ =5298 óra), mint a [Gd(DTPA)]²⁻-komplexre jellemző érték (t_{1/2}=202 óra). Ez felettébb meglepő, mivel a HYD ligandumban egy donoratommal kevesebb koordinálja a központi fémiont, ami rámutat a komplexképző merev szerkezetének a képződő kelát kinetikai inertségére gyakorolt hatására, ill. annak fontosságára. Lumineszcenciás mérésekkel igazoltuk, hogy a [Gd(HYD)]-komplexben a központi fémionhoz két vízmolekula is koordinálódik, amely ¹⁷O-NMR spektroszkópiás módszerrel kapott adataink szerint gyorsan cserélődik az oldószer vízmolekulákkal ($k_{ex}^{298}=7,8\times10^6$ s⁻¹). A két koordinált vízmolekulának köszönhetően a [Gd(HYD)]-komplex relaxivitása nagyobb, mint azt a kereskedelmi forgalomban kapható, a belső koordinációs szférában egy vízmolekulát tartalmazó komplexek esetében találták (r_{1p}=7,7 mM⁻¹s⁻¹ 20 MHz-en, és 25 °C-on vs. 4,5-4,8 mM⁻¹s⁻¹, ami a kis molekulatömegű [Gd(DTPA)]²⁻ és [Gd(DOTA)]⁻ komplexre és származékaikra jellemző érték). Ezen túl, a [Gd(HYD)]-komplex nem képez stabil vegyeskomplexeket a legfontosabb bioligandumokkal (citrát-, foszfát-. karbonát-, stb.) fiziológiás pH-n, így összességében (stabilitás/ inertség/ vízcsere sebesség/ relaxivitás) jobb, mint a kereskedelmi forgalomban kapható [Gd(DTPA)]²⁻kontrasztanyag. EDTA-származékok nyíltláncú Az méretszelektivitása, ami pl. a lantaidák elválasztásának fontos, a két IMDA csoport közötti molekularész flexibilitásától függ. A komplex stabilitási állandók növekedésére pl. az EDTA és EGTA esetében a La³⁺-tól a Lu³⁺-ig 4,7 és 2,05 logK egység. A két IMDA csoportot az 1,4-diazepán két N-atomjához kapcsolva a kapott ligandum méret szelektivitása- $\log K_{LuL} - \log K_{LaL} = 8,22 - valamennyi$ eddig ismert liganduménál nagyobb a kisméretű ionokra kedvező merev szerkezet következtében.21

2.1.3. Nyíltáncú és makrociklusos egy, ill. két pikolinát csoportot tartalmazó ligandumok: labilis és a rendkívül inert komplexek

Nyíltáncú (etilén-diamin és *transz*-1,2-ciklohexán-diamin) és makrociklusos (1,4,7,10-teraazaciklododekán és 1,4,8,11-tetraazacikloteradekán) aminok oldalláncaiban egy, ill. két pikolinátcsoportot tartalmazó ligandumok (3. ábra) egyensúlyi és kinetikai vizsgálataihoz az EDDADPA komplexképzőre vonatkozó 10 éve publikált közlemények jelentették a kiindulópontot.²²

Az irodalmi adatok elemzése alapján megállapítottuk, hogy a etilén-diaminhoz kapcsolt két pikolinátcsoport eredményesen használható antennaként az Eu3+- és a Tb3+-ionok lumineszcenciájának érzékenyítésére. Ezen túl ígéretes az is, hogy a Gd³⁺-komplex relaxivitása a kereskedelmi forgalomban lévő kontrasztanyagokra jellemző értékekkel megegyező vagy azokat kismértékben meg is haladja.22a A Ca2+- és Gd3+-ionokra meghatározott stabilitási állandók alapján ugyanakkor az EDDADPA kikerült a kutatók látószögéből és részletes egyensúlyi, szerkezeti, ill. kinetikai vizsgálatok nem történtek vele.22b A ligandum előállítását elsősorban a bomláskinetikai adatok hiánya inspirálta, de a Ca²⁺- és Gd³⁺-komplexekre közölt stabilitási állandók és a DTPA azonos fémionokkal képződő komplexei stabilitásának összehasonlítása is "gyanút keltő" volt. Az EDDADPA komplexek stabilitásának meghatározása rendhagyó volt, mivel a Ca2+ és Mg2+-ionok egyensúlyi rendszereit kivéve, minden további fémion esetében kompetíciós módszert kellett kidolgoznunk (különböző ligandumokra, pl. ciklén, TTHA (2. ábra), és fémionokra, pl. Gd3+-ionra alapozva) a Zn2+, Cu2+- és Ln³⁺-komplexek stabilitási állandóinak meghatározásához.²³ Az irodalmi adatokkal ellentétben a H4EDDADPA ligandum nagy stabilitású komplexeket képez az Ln3+-ionokkal $(\log K_{\text{LaL}} = 20,13(7), \log K_{\text{GdL}} = 20,23(4) \text{ és } \log K_{\text{LuL}} = 20,49(5)).$ UV-látható, ¹H-NMR spektroszkópiás és DFT számolások segítségével alátámasztottuk, hogy a Zn2+- és a Cu²⁺-komplexek esetében a komplexképző hatfogú ligandumként koordinálódik a fémionokhoz és az acetát oldalláncok nem vesznek részt a koordinációban.



3. Ábra. A vizsgált egy és két pikolinátcsoportot tartalmazó ligandumok

Az Ln³⁺-komplexek esetében a ligandum nyolcfogú és a fémion belső koordinációs szférájában egy koordinált vízmolekula is található. Amint azt a fentebb bemutatott állandók értékei mutatják, a Ln³⁺-komplexek stabilitási állandói alig változnak az ionméretek függvényben. Ennek a furcsa tapasztalatnak a magyarázatát DFT módszerrel történt számolások adták meg. Az [Ln(EDDADPA)]-komplexek esetében a központi fémion és a nitrogén atomok közötti kölcsönhatás erőssége csökken a kisebb méretű fémionok felé haladva, amit a növekvő elektrosztatikus kölcsönhatás nem képes felülírni az Ln³⁺-ionok növekvő hidratációs energiái miatt. (Ez utóbbi a ritkaföldfém sorozaton belül a növekvő kötési energiák és az ionok hidratációs szabadenergiái eredőjének a függvénye.) A [Gd(EDDADPA)]- komplex és a Cu²⁺-ion közötti fémioncsere reakció vizsgálatával a komplex inertségét mértük fel. Nagy pH és fémion koncentráció tartományban kapott adatokból kiszámítottuk az egyes reakció utakra (savkatalizált, a Cu2+ közvetlen támadásával lejátszódó reakció, stb.) jellemző sebességi állandókat, amelyeket az EDTA és DTPA Gd3+-komplexeire publikált adatokkal hasonlítottunk össze. A [Gd(EDDADPA)]komplex savkatalizált disszociációjára jellemző sebességi állandó $(k_1=11,8\pm2,4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$ a $[\text{Gd}(\text{EDTA})]^{-}$ $(k_1=87 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$ és a $[Gd(DTPA)]^2$ -komplexekre jellemző állandók ($k_1=0,58$ M-1s-1) közzé esik, de a Cu2+ közvetlen támadásával lejátszódó reakció az EDTA és a DTPA komplexek esetében tapasztaltaknál gyorsabban játszódik le.²⁴ A komplexek kinetikai inertségét fiziológiás körülményekre vonatkoztatva (pH=7,4, c_{Cu2+}=1 mM) gyakran a felezési idők kiszámításával hasonlítják össze, amely a [Gd(EDDADPA)]-komplex esetére t1/2=0,15 órának adódik, így az adott kelát nem javasolható in vivo vizsgálatokra.23

Az EDDADPA ligandum Ln3+-komplexei esetében tapasztalt kinetikai sajátságok javulását a komplexképző alapvázának a módosításától vártuk. Irodalmi példák alapján a flexibilis etilén-diamin "híd" transz-1,2-ciklohexán- diaminra történő cseréjétől a képződő komplexek inertségének a javulása várható,25 ami a CDDADPA komplexképző ligandum megtervezését és előállítását eredményezte. A CDDADPA ligandum komplexeinek stabilitása kis mértékben meghaladja a megfelelő EDDADPA komplexekét (log K_{GdL} =20,68 vs. 20,23), míg az MRI kontrasztanyagoknál fontos paraméterek (a koordinált vízmolekulák száma és az azzal összefüggésben lévő relaxivitás értéke) nem változtak rossz irányba.6b A [Gd(CDDADPA)]-komplex disszociációja a [Gd(EDDADPA)]kelát esetében tapasztalt mechanizmus szerint játszódik le, de annál nagyságrendekkel kisebb sebességgel. A fiziológiás körülményekre (pH=7,4, c_{Cu2+}=1 ěM) extrapolált felezési idő $t_{1/2}=1,49\times10^5$ óra, ami az összes nyíltláncú kereskedelmi forgalomban lévő Gd3+-alapú kontrasztanyag esetében ismert értékektől 2-3 nagyságrenddel nagyobb. A számolásaink eredményeként kapott felezési idő megközelíti néhány makrociklusos Gd3+-komplexre publikált felezési idő értékét (pl. [Gd(DO3A)]), amely alapján a [Gd(CDDADPA)]⁻ kitűnő MRI kontrasztanyag-jelöltnek tekinthető.6b

A ligandum alapvázában végrehajtott változtatásoknak a komplexek sajátságaiban megnyilvánuló hatását makrociklusos komplexképzők esetére is vizsgáltuk. Előállítottunk két 1,4,8,11-teraazaciklotetradekán

dipikolinátot (Me2TEDPA és CB-TEDPA), ezek a komplexképzők egy és ugyanazon makrociklus flexibilisebb, ill. egy etilén keresztkötésnek köszönhetően tekinthetők.6a,26 merev származékainak А Ln³⁺-komplexekre vonatkozó egyensúlyi adatokat ezen komplexképzőkre egyelőre nem sikerült számszerűleg meghatározni, mivel a Me2TEDPA komplexei vizes közegben semleges pH-körül termodinamikailag nem stabilak és belőlük a fémion már pH=7,0 körül is hidrolizál. Ezzel szemben a keresztkötött 1,4,7,10-tetraaza-biciklo [5.5.2]tetradekán makrocikluos dipikolinát Ln³⁺-komplexeit (noha ezek stabilitási állandói sem voltak mérhetőek) csoportunkban sikerült első ízben előállítani mikrohullámú hőmérsékleten (140-150 reaktorban nagy °C-on n-butanolban), hosszú reakcióidőket (40 óra) alkalmazva.6a Az [Ln(CB-TEDPA)]⁺-komplexek rendkívül inertek, mivel a 2 M sósav-oldatban közel fél év során a bomlás mértéke nem haladja meg az 1%-ot, de a Cu2+-ion nagy feleslegének (pH=4,6), bioligandumok (a H_2PO_4 ⁻/HPO₄²⁻ ionoknak 250-szeres feleslege pH=7,4-nél), ill. nagy stabilitású komplexeket képző multidentát ligandumok (a TTHA ligandum 250-szeres feleslege pH=5,0-nél) jelenléte sem képes detektálható bomlást eredményezni. Ezen adataink alapján az [Ln(CB-TEDPA)]+-komplexek bomlás nélkül alkalmazhatók lehetnek in vivo körülmények között is, bár a fémionhoz koordinált vízmolekula hiányában, a gyenge relaxációs hatás miatt MRI kontrasztanyagként nem jó, helyette olyan alkalmazások jöhetnek számításba, ahol a koordinált oldószer molekulák jelenléte nem elvárás, vagy kifejezetten hátrányos is (pl. lumineszcens próbák).^{6a}

Hasonló következtetésekre jutottunk a DO3A-PIC komplexképző két vegyértékű és Ln3+-ionokkal képződő komplexei vizsgálata során is: a képződő komplexek stabilitása meghaladta az DO3A ligandum Ln³⁺-komplexei esetében tapasztaltat, ami a pikolinátcsoport koordinációjára utal.^{27,28} A komplexképződést a DO3A- és DOTA komplexek esetében már tankönyvi példaként ismert lassú reakciók jellemezték. A Gd3+-komplex savkatalizált disszociációjára jellemző sebességi állandók pedig a megfelelő DO3A- és DOTA-komplexek sebességi állandói közé estek. A vizsgált két vegyértékű fémionok esetében DFT módszerrel végzett számolásaink szerint a pikolinát csoport koordinációja csak a nagyobb méretű Ca2+, ill. Pb2+-ionok esetében következik be, míg a Mg2+-, Zn2+-, Cu2+-, Cd2+-ionok esetében az oldalláncok közül csak az acetát karok koordinálódnak.28

2.1.4. Egyensúlyi és bomláskinetikai vizsgálatok fiziológiáshoz közeli körülmények között

A Gd³⁺-komplexek fiziológiás körülmények között lejátszódó reakcióinak megértése érdekében meghatároztuk hat klinikai gyakorlatban is alkalmazott ligandum (DTPA, DTPA-BMA, BOPTA, DOTA, HP-DO3A, DO3A-BT, 4. ábra) Gd³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ és Ca²⁺ ionokkal képzett komplexeinek stabilitási állandóját 0,15 M NaCl ionerősség alkalmazása mellett 25°C-on. Az egyensúlyi adatok ismeretében modellszámításokat végeztünk olyan plazmamodell alkalmazásával, ahol figyelembe vettük a

vérplazmában jelenlévő főbb komponensekből képződő komplexek stabilitási és protonálódási állandóit, valamint a rosszul oldódó részecskék oldhatósági szorzatait (20 komponens, 350 oldható és 8 oldhatatlan részecske). A plazma modellel végzett számításaink szerint [Gd(DTPA-BMA)] jelenlétében a plazmában pH=7,4 értéken kialakuló egyensúlyban a [Gd(DTPA-BMA)]komplex 17%-a disszociál, míg az ionos nyíltláncú kontrasztanyagok disszociációjának mértéke sokkal kisebb.^{29,30} A disszociált Gd³⁺-ion GdPO₄ csapadékot képez, míg a szabad ligandum a plazmában lévő kismennyiségű kicserélhető Cu2+- és Zn2+-ionokkal képez komplexeket. A [Gd(DTPA-BMA)] disszociációjával keletkező viszonylag nagyobb mennyiségű ligandum [Ca(L)]-komplexeket is képez, amit kapilláris elektroforézissel mutattunk ki.^{30a} A nyíltláncú kontrasztanyagok Gd3+-komplexei és Cu2+-ionok közötti cserereakciók endogén ligandumok jelenlétében a komplexek disszociációja útján mennek végbe, amit egyes endogén ionok, főként a bikarbonát-/karbonát-, kisebb mértékben a foszfát- és citrát-ionok katalizálnak vegyes komplexek képződésével.²⁹ A makrociklusos Gd³⁺komplexek disszociációja csak proton katalizált úton megy végbe (ami pH=7,4 esetén rendkívül lassú), az endogén ligandumoknak nincs hatása a disszociáció sebességére.^{29,31} A páciensekbe injektált Gd³⁺-tartalmú kontrasztanyagok az extracelluláris térben történt eloszlás után, normális veseműködés esetén aránylag gyorsan, kb. 1,5 órás felezési idővel $(t_{1/2})$ a vesén keresztül ürülnek ki. A Gd³⁺-komplexek disszociációja ettől sokkal lassabb. A disszociáció felezési ideje a legkevésbé inert [Gd(DTPA-BMA)] esetén is 10 óra körüli, ezért a testfolyadékokban a komplex egyensúlyok nem alakulnak ki. Így a Gd3+-komplexek disszociációjának mértéke az egyensúlyi viszonyokra számítottnál lényegesen kisebb. A kiürülés sebessége a vesebetegek esetében ugyanakkor jóval kisebb ($t_{1/2}$ =10-100 óra is lehet), ezért a Gd³⁺-komplex disszociációjának mértéke is nagyobb és a disszociált Gd³⁺ az NSF kialakulásának egyik rizikó faktora. A [Gd(DTPA)]²⁻ és [Gd(DTPA-BMA)] és a TTHA közötti ligandumcsere reakciók döntően a TTHA-nak a komplexen történő támadásával folynak le és a [Gd(DTPA-BMA)]-val történő reakció sokkal gyorsabb .29b

2.1.5. "Smart" és duális kontrasztanyagok

Intelligens ("smart") kontrasztanyagoknak tekinthetjük azokat a Gd³⁺-komplexeket amelyek relaxációs paraméterek változásával képesek reagálni a környezetükben történo változásokra (pl. a homérséklet értékében, az oxigén parciális nyomásában (hipoxia), az enzimaktivitásban, a pH-ban, az esszenciális fémionok koncentrációjában történo változására). A pH mérésére "in vivo" körülmények között a vizsgált etil-amin funkciós csoportot tartalmazó DO3A származékok (AE-DO3A) közül a N-methoxietil-N-metiloldalláncot tartalmazó [Gd(AE-DO3A)]aminoetil komplexet találtuk a legalkalmasabbnak, mivel a fiziológiás pH tartományhoz közel a komplex olyan deprotonálódási folyamatban vesz rész, ami befolyásolja a fémcentrumhoz koordinált vízmolekulák számát (és ezáltal a relaxivitás értékét is).32

Vizsgálataink alapján a szulfonamid-oldalláncot tartalmazó DO3A származék ligandumok (DO3A-SA) Gd(III)-komplexei is alkalmasak erre.³¹ Tanulmányoztuk a DO3A-SA ligandum és számos fémionnal képzett komplexének egyensúlyi, szerkezeti viszonyait, képzodési és disszociációs reakcióik kinetikai, valamint [Ln(DO3A-SA)]-komplexek dinamikai sajátosságait.



4. Ábra. A Gd(AE-DO3A) komplexek szerkezetének változása a pH függvényében (DO3A=1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7-triecetsav)

Az alkáliföldfém- és átmenetifém-ionok kisebb koordinációs száma miatt DO3A-SA komplexeikben a szulfonamid csoport deprotonálódása és koordinációja a fémionokhoz nem következik be, így ezek szerkezete nagyon hasonló a megfelelo DO3A komplexekhez. A deprotonált és koordinált szulfonamid csoportot tartalmazó [Ln(DO3A-SA)]-komplexekben az acetát karok rotációja lényegesen gyorsabb, mint a megfelelo [Ln(DOTA)]-komplexekben. Disszociációs kinetikai vizsgálataink alapján a [Gd(DO3A-SA)]-komplex elegendoen inert a biológiai vizsgálatokhoz.³¹

Egy másik példánk az "okos" kontrasztanyagokra a nitroimidazol (azomicin) "egységet" tartalmazó [Gd(DO3A-NIM)]-komplex. A ligandum szerkezetébol adódóan a Gd³⁺-komplex termodinamikailag stabil, kinetikailag inert, amely képes hipoxiás sejtekben dúsulni (a nitroimidazol "egység" nitrocsoportja reduktív közegben aminocsoporttá redukálódik, amely képes kovalens kötés kialakítására a sejten található különbözo belül makromolekulákkal, ez pedig gátolja a komplex "kiürülését").33

Nyolc aril-foszfonát és fluórozott-aril-foszfonát oldalláncot tartalmazó DO3A származék Ca²⁺-, Zn²⁺-, Cu²⁺- és Ln³⁺-ionokkal képzodo komplexeinek a sajátságait határoztuk meg. A fluorozott-aril-foszfonát DO3A származékok Ln³⁺-komplexei alkalmasak lehetnek ¹H- és ¹⁹F-MRI kettos kontrasztanyagoknak.³⁴

2.2. Mn-alapú komplexek: nyíltláncú és makrociklusos példák

A Mn²⁺-ion komplexálására olyan ligandum alkalmas, amely termodinamikailag és redoxi szempontból is stabil, kinetikailag inert komplexet képez vele, és a vegyület tartalmaz koordinált vízmolekulát is, hogy megfelelően nagy relaxivitással rendelkezzen. A [Mn(DOTA)]²⁻-komplex stabilitása és kinetikai paraméterei alapján kiváló jelölt lenne, de a fémionhoz koordinált vízmolekula hiánya miatt nem rendelkezik kellő relaxációs hatással.^{35a} A [Mn(EDTA)]²⁻-komplex ezzel szemben jó relaxációs hatással bír, amihez viszont kis inertség párosul,^{35b} ezért a fentebb feltüntetett kritériumokat kielégítő, a Mn²⁺-ion komplexálására alkalmas komplexképző(k) megkeresése a nyíltláncú és makrociklusos ligandumok körében egyaránt előrelépést hozhat.

Munkánk során ezért egyrészt nagyszámú, a kereskedelmi forgalomban is kapható EDTA-származék Mn²⁺komplexének a disszociációs kinetikáját vizsgáltuk (2. ábra). Vizsgálatainkat a makrociklusos komplexképzőkre is kiterjesztettük. Tudni akartuk, hogy: 1. melyik makrociklusra (9-aneN3, 12-aneN4 és 14-aneN4) érdemes építeni a további fejlesztéseinket; 2. a 12-aneN4 DOTA ligandum oldalláncainak számát (pl. DO3A, ciszDO2A és transzDO2A) és minőségét (DO3AM, DO3P, stb.). A 12 tagú makrociklusban található donoratomokat (ODO3A, PCTA, stb.) változtatva is kerestük a megfelelő ligandumot.

Nyíltláncú (pl. EDTA, CDTA, BIMP, OBETA, stb., lsd. 2. ábra) és ciklusos (AAZTA, 6. ábra) ligandumok Mn²⁺-komplexeinek a kinetikai viselkedéséről a Cu²⁺-ionnal lejátszódó cserereakcióik tanulmányozásával gyűjtöttünk hogy információt. Megállapítottuk, nvíltláncú а komplexképzők közül egyedül a transz-ciklohexándiamin-tetraecetsav (transzCDTA) képez inert komplexet a Mn^{2+} -ionnal (fiziológiás körülményre számított felezési idő $t_{1/2}$ = 12 órának adódott). Ezt tudva, ill. a Gd³⁺-komplexek esetére fellelhető, elsősorban amid típusú ligandumokra publikált adatokra alapozva új transzCDTA-bisz(amid) származékokat állítottunk elő, és megvizsgáltuk a Mn2+-komplexeik egyensúlyi és kinetikai viselkedését, ill. meghatároztuk a komplexek relaxivitását. Az amidcsoportok természetének megválasztásával (primer/szekunder/tercier) a képződő Mn²⁺-komplexek kinetikai inertsége tovább hangolható, így elsősorban a transzCDTA-bisz(piperidin)-amidjait állítottuk elő.32 Az előállított komplexképzők Mn2+-komplexei olyan jó paramétereket mutattak (a makrociklusos [Mn(DOTA)]2-val összemérhető disszociációs felezési idő, a kereskedelmi [Gd(DTPA)]²⁻lévő forgalomban és [Gd(DOTA)]komplexekkel összemérhető relaxivitás, stb.), hogy ezekből szabadalmi bejelentés születhetett³⁶ és már ipari partner, a Bracco Imaging Spa érdeklődését is felkeltette.

makrociklus üregméretének a Mn²⁺-komplexek А fizikai-kémiai tulajdonságaira és szerkezetére gyakorolt hatásáról a 9-aneN3, 12-aneN4 és 14-aneN4 makrociklusok monopikolinát-származékainak vizsgálatával (NOMPA, DOMPA és TEMPA) kaphattunk információt.³⁷ A Mn²⁺-komplexek stabilitási állandói alapján a Mn²⁺-ion komplexálására a DOMPA ligandum a legalkalmasabb. A relaxometriás méréseink ugyanakkor azt mutatták, hogy csak a NOMPA komplexe tartalmaz a belső koordinációs vízmolekulát, szférájában amit а komplexek röntgenszerkezetei is alátámasztottak. A Cu2+-ionnal lejátszódó fémioncsere reakciók vizsgálatai alapján megállapítottuk, hogy a [Mn(DOMPA)]⁺és а



5. Ábra. A Mn²⁺-ion komplexálására alkalmazott makrociklusos ligandumok

[Mn(NOMPA)]⁺-komplexek bomláskinetikája nem függ a kicserélő fémion koncentrációjától és a disszociáció spontán, ill. savkatalizált úton játszódik le a korábban vizsgált Mn²⁺-komplexek esetében tapasztaltaktól nagyságrendekkel gyorsabban. A két komplex közül a [Mn(DOMPA)]⁺-komplex az inertebb, tehát a további fejlesztéseket is ezzel a makrociklussal érdemes végezni.³⁷

A háromszorosan helyettesített 1,4,7,10-tetraazaciklododekán származékok Mn²⁺-komplexeinek a relaxometriás vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy ezek belső koordinációs szférájában nincs vízmolekula, tehát a donoratomok számát tovább kell csökkenteni. Ez a cisz- és transzDO2A származékok vizsgálatát eredményezte. Mivel a DO3A és származékai kellő mennyiségben álltak rendelkezésünkre, indokoltnak látszott ezek Mn2+-komplexeivel is részletes egyensúlyi és kinetikai vizsgálatot végezni, mert ez is további ligandumok tervezéséhez nyújthatott segítséget. Ezen vizsgálatok eredményeit összefoglalva megállapítottuk: 1. a karboxilátcsoportok foszfonátcsoportokra történő cseréje a Mn2+-komplex stabilitási állandójának a növekedését eredményezi, de ha figyelembe vesszük a ligandumok bázicitását is (pl. látszólagos stabilitási állandó, vagy pM-érték) akkor kiderül, hogy a foszfonátcsoport egyensúlyi szempontból nem előnyös. A [Mn(DO3P)]³⁻-komplex Cu²⁺-ionnal lejátszódó disszociációja viszont rendkívül gyorsan, a nyíltláncú ligandumok esetében tapasztalt sebességgel játszódik le, amely kizárja ezt az oldalláncot a további fejlesztések során alkalmazandó "építőelemek" köréből. 2. a makrociklus piridincsoport által történő merevítése minden szempontból előnyös. 3. az oldalláncban az acetát csoportok amidokra történő cseréje jelentősen növeli a Mn2+-komplexek kinetikai inertségét, miközben megfelelően nagy marad a termodinamikai stabilitás. Ezek alapján amid az funkcióscsoport hasznos "építőelem".38

A kétszeresen helyettesített 1,4,7,10-tetraazacikolododekán származékok, a *transz*DO2A és a *cisz*DO2A ligandumok Mn²⁺-ionnal képződő komplexeiről azok egyensúlyi, redoxi, kinetikai és a relaxációs tulajdonságainak a vizsgálatával gyűjtöttünk adatokat. Megállapítottuk, hogy az acetát oldalláncok helyzete gyakorlatilag nincs hatással a

komplexek stabilitására és kinetikai inertségére. Koordinált vízmolekula csak a cisz-származékban található, amely redoxi szempontból is stabilabb, így a további fejlesztések alapját is ebben a ligandumban láttuk.³⁹ Ezen információkat az előzőekben bemutatott szisztematikus vizsgálatok eredményeivel "összefésülve" megterveztük, előállítottuk és vizsgáltuk az oldalláncok alfa szénatomján metilcsoportot tartalmazó ciszDO2MA, ill. az amidszármazék ciszDO2AM^{Me2}, és a ciszDO2AM^{Pip} ligandumokat.^{40,41} A ciszDO2MA ligandummal kapott eredményeinket a [Mn(ciszDO2A)]-komplexre jellemző adatokkal összehasonlítva a ciszDO2MA komplex nagyobb termodinamikai, de kisebb redoxi stabilitását tapasztaltuk. A [Mn(ciszDO2MA)]-komplex savkatalizált disszociációjára jellemző sebességi állandó 1/6-a a ciszDO2A esetében tapasztalt állandónak, ami jó összhangban van a DOTA PCTMA¹¹ ligandumok DOTMA⁹ és a PCTA eredményeinkkel. Gd³⁺-komplexeire kapott Az acetátcsoportok amidcsoportra történő cseréje ugyanakkor a stabilitási állandó csökkenését (log K_{MnL} =12,64(5)), de a relaxivitás és a kinetikai inertség további javulását eredményezi.40,41

3. A nukleáris medicina területén hasznosuló komplexek vizsgálata

Az MRI-ben és a fémes elemek radioizotópjait a SPECT, a PET és a olekuláris sugárterápiában fémkomplexekként alkalmazó eljárásokban a ligandumok nagyfokú egybeesése nyilvánvaló hasonlóságokat sejtet a kémiai problémák terén is. Ugyanakkor a nukleáris technikák nagy érzékenysége olyan kis (sub-nM-os, azaz 10-9 M) koncentrációkat enged meg, ami az MRI mM-os tartományával való közvetlen összevetéseket korlátozza. A ligandumok szintézise, beleértve a bifunkciós kelátorokat is (amelyek fémkötő helyet és a célba juttatásért felelős biovektor kovalens kötésére alkalmas horgony csoportot is tartalmaznak), nvilvánvalóan azonos fontossággal bír minden modalitásban. Emellett a radiokémikusoknak is hasznos adat lehet a komplex stabilitási viszonyainak ismerete, nem is beszélve a képződési reakció kinetikájának a leírásáról, különösen, ha rövid felezési idejű izotóppal végzi a jelölést. Ezekhez az adatokhoz a koordinációs kémia eszköztárával, "hideg izotópokkal" dolgozva is eljuthatunk. A nagyszámú lehetséges radioizotóp közül azokat vesszük számba, amelyek hideg izotópjaival ilyen jellegű vizsgálatokat végeztünk a közelmúltban.

A PET-ben jelenleg alkalmazott ⁺-sugárzó izotópok mellett (¹⁸F, ¹¹C, ¹⁵O és ¹³N) egyre jelentősebb a generátorból nyerhető fémizotópok (pl. ⁶⁸Ga: ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga; ⁴⁴Sc: ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc) felhasználása.⁴² A ⁶⁸Ga-cal előnyös radiokémiai sajátosságai [89% ⁺; _{1/2} = 68 perc, $E_{\hat{a}+,max}$ =1,89 MeV], hozzáférhetősége és kedvező ára miatt intenzív kémiai és sikeres klinikai kutatások folynak.⁴³ A ciklotronban termelhető ⁶⁴Cu (_{1/2} = 12,7 óra) is előnyösen használható folyamatok hosszabb időn át történő követésére. A SPECT a ^{99m}Tc dominanciája mellett használ ¹¹¹In-készitményeket is (pl. [In(DOTATOC)], a -terápiában pedig rohamosan terjed a nagy energiájú ⁹⁰Y- és a közepes energiájú ¹⁷⁷Lu-komplex alapú készítmények használata. (Ezen két elem esetében a ritkaföldfém kémia kompetenciája nyilvánvaló.)

Cu²⁺, Ga³⁺, In³⁺ és újabban Sc³⁺-ionok gyors komplexálására alkalmas ligandumok előállítása és vizsgálatai során kapott eredményeink az alábbiak szerint foglalhatók össze. Az AAZTA komplexképző (6. ábra) stabil komplexet képez a Cu²⁺- (log $K_{[CuL]}$ =22,27(2)), a Ga³⁺- (log $K_{[GaL]}$ =22,36(2)) és az In³⁺-ionokkal (log $K_{[InL]}$ =29,86(5)).⁴⁴ A Ga³⁺-komplex transzferrin, ill. Cu2+-ionok hatására lejátszódó disszociációs reakcióira jellemző sebességi állandókkal számított felezési idők ($t_{1/2}=21-24$ óra 7,4-es pH-n) a Ga³⁺-radioizotóp felezési idejével való (t_{1/2}=67,7 perc) összehasonlítása alapján megállapítható, hogy az AZZTA ligandum hasznos a 68Ga PET izotóp (gyors) megkötésére és in vivo alkalmazására is. A komplex stabilitásának és inertségének a javítása érdekében előállítottuk és vizsgáltuk a merev transz1,2ciklohexán-diamin alapra épülő komplexképzőt (6. ábra).



6. Ábra. A NOTA, TRAP(CHX)₃, AAZTA és CyAAZTA ligandumok szerkezete

A CyAAZTA ligandum érdekes módon nem előnyös a Ga³⁺-ion komplexálására, (noha a komplexképző bázicitása, ill. a Ga³⁺-komplex stabilitása megegyezik az AAZTA ligandum esetében kapott állandókkal), mert gyorsabban disszociál ($t_{1/2}$ =8,5 óra 7,4-es pH-n), ami a fiziológiás pH-n képződő [GaL(OH)]⁻ vegyeskomplex kisebb inertségéből ered.⁴⁵

Tanulmányoztuk a $[Ga(DOTA)]^{-}$ komplex képződésének sebességét etanol-víz elegyekben. A $[Ga(DOTA)]^{-}$ képződési reakcióinak sebességmeghatározó lépése a kétszer protonált * $[Ga(H_2DOTA)]^{+}$ köztitermék deprotonálódása és végtermékké történő átrendeződése. A *[Ga(HDOTA)] köztitermék protonálódási állandója, a DOTA ligandum $\log K_1^{\rm H}$ és $\log K_2^{\rm H}$ értékeihez hasonlóan, csökken az etanol koncentrációjának növekedésével, ami adott H⁺ koncentrációnál a $[Ga(DOTA)]^{-}$ gyorsabb képződését eredményezi etanolban.⁴⁶

A Cu²⁺-ion komplexálására három foszfinátcsoportot tartalmazó triazaciklononán származékot (pl. TRAP(CHX)₃) is kipróbáltunk, ez a ligandum a [Cu(NOTA)]⁻-komplexnél 3-5 log egységgel kisebb stabilitású komplexeket képez.⁴⁷

Foglalkoztunk két halogenid, a fluorid és a jodid vegyeskomplexeinek vizsgálatával is. Nem kovalensen kötött halogén radioizotópok hordozójaként újabban szelektíven célba juttatható fémkomplexet is alkalmaznak. Az [Al(NOTA)]-komplex az első ilyen céllal vizsgált kelát, amely fluorid formájában ¹⁸F-izotóp megkötésére képes stabil és vélhetően inert vegyeskomplex képződés során.⁴⁸ Az

[Al(NOTA)]-komplex stabilitását különmintás ²⁷Al-NMR ¹Hés pH-potenciometriás, technikák kombinációjával határoztuk meg (log $K_{[AIL]}=17,9(1)$ és vizsgáltuk a kelát vegyeskomplex képző hajlamát is.49 A komplex savkatalizált úton nagyon lassan bomlik, és a OH-ion katalizált disszociációja is kellően lassú ahhoz, hogy a komplexet in vivo alkalmazhassák. Ezzel szemben a [Tl(DOTA)]-komplex esetében (ami ugyancsak kirívó kinetikai inertséggel bír) nem sikerült vegyeskomplexet előállítani a diagnosztikai és terápiás izotópokkal egyaránt rendelkező jodidionnal.⁵⁰ A [Tl(DOTA)]-komplex a Gd³⁺-komplexszel összemérhető inertséggel rendelkezik, így a komplexből in vivo körülmények között (²⁰¹Tl-izotóppal mért) gyors Tl-felszabadulás⁵¹ a fémion redukciójának lehet a következménye.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki az anyagi támogatásáért az OTKA PD-83253 (K. F. K.), K-84291 (T. Gy.) és K-109029 (T. I.) pályázatoknak, a TÁMOP-4.2.2./B-10/ 1-2010-0024 (A Debreceni Egyetem tudományos képzési műhelyeinek támogatása), a TÁMOP 4.2.4.A/ 1-11-1-2012-0001 (Magyary Zoltán Posztdoktori Ösztöndíj - Nemzeti Kiválóság Program (B. Zs.), a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 (ENVIKUT) azonosító számú projekteknek és a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatói Ösztöndíjának (T. Gy. és K. F. K.).

Hivatkozások

- a). Tircsó, Gy. Magyar Kémikusok Lapja, 2009, 64(10), 301–302.
 - b). Brücher, E.; Tóth, I.; Tircsó, Gy. *Magy. Kém. Foly.* **2011**, *118*, 74–82.,
- Baum, R. P.; Harshad R. Kulkarni, H. R.; *Theranostics*, 2012, 2(5), 437–447. https://doi.org/10.7150/thno.3645
- Brücher, E.; Baranyai, Zs.; Tircsó, Gy. The Future of Biomedical Imaging: Synthesis and Chemical Properties of the DTPA and DOTA Derivative Ligands and Their Complexes, *Chapter 5.2 in Biomedical Imaging: The Chemistry of Labels, Probes and Contrast Agents"*, Ed. Martin Braddock, Royal Society of Chemistry, 2011, 208-260. https://doi.org/10.1039/9781849732918-00208
- Knappe, A.; Möller, P.; Dulski, P.; Pekdeger, A. Chemie der Erde – Geochemistry, 2005, 65(2), 167-189.
- Pintér, I.; Vágási, K.; Wittmann, I.; Nagy, J. Orvosi Hetilap, 2007, 148(38), 1801-1804. https://doi.org/10.1556/OH.2007.28183
- a). A. Rodríguez-Rodríguez, D. Esteban-Gómez, R. Tripier, Gy. Tircsó, Z. Garda, I. Tóth, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, Carlos Platas-Iglesias, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*(*52*), 17954; https://doi.org/10.1021/ja511331n
 b). Gy. Tircsó, M. Regueiro-Figueroa, V. Nagy, Z. Garda, T. Garai, F. K. Kálmán, D. Esteban-Gómez, É. Tóth, C. Platas-Iglesias, *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22(3)*, 896. https://doi.org/10.1002/chem.201503836
- a). Drahos, B.; Lukes, I.; Toth, E. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012, 1975–1986; https://doi.org/10.1002/ejic.201101336/pd
 b). Zhang, Q.; Gorden, J. D.; Beyers, R. J.; Goldsmith, C. R. *Inorg. Chem.* 2011, *50*, 9365-9373;

https://doi.org/10.1021/ic2009495 c) Su, H.; Wu, C.; Zhu, J.; Miao, T.; Wang, D.; Xia, C.; Zhao, X.; Gong, Q.; Song, B.; Ai, H. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 14480-14483; https://doi.org/10.1039/C2DT31696J d) Loving, G. S.; Mukherjee, S.; Caravan, P.; *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4620-4623; https://doi.org/10.1021/ja312610j e). Phukan, B.; Patel, A. B.; Mukherjee, C. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 12990-12994; https://doi.org/10.1039/C5DT01781E f). Forgács, A.; Regueiro-Figueroa, M. J.; Barriada, L.; Esteban-Gómez, D.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Botta, M.; Platas-Iglesias, *C. Inorg. Chem.* **2015**, *54(19)*, 9576-9587. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01677

- a). Kanal, E.; Tweedle, M. F., *Radiology*. 2015, *275(3)*, 630-634; https://doi.org/10.1148/radiol.15150025
 b). Karabulut, N. *Diagn. Interv. Radiol.* 2015, *21*, 269-270. https://doi.org/10.5152/dir.2015.001
- Aime, S.; Botta, M.; Garda, Z.; Kucera, B. E.; Tircsó, Gy.; Young, V. G.; Woods M. *Inorg. Chem.*, 2011, 50(17), 7955–7965. https://doi.org/10.1021/ic2012827
- Tircsó, Gy.; Nagy, N. V.; Baranyai, Zs.; Garda, Z.; Nagy, V.; Kucera, B.; Young, V. G.; Payne, K.; Rockenbauer, A.; Tóth, I.; Brücher, E.; Woods, M. *előkészületben*
- Riesen, A.; Zehnder, M.; Kaden, T. A. *Helv. Chim. Acta* 1986, *69*, 2074-2080 https://doi.org/10.1002/hlca.19860690831 és Riesen, A.; Zehnder, M.; Kaden, T. A. *Helv. Chim. Acta* 1986, *69*, 2067-2073. https://doi.org/10.1002/hlca.19860690830
- Tircsó, Gy.; Webber, B. C.; Kucera, B. E.; Young, V. G.; Woods M. *Inorg. Chem.*, 2011, *50(17)*, 7966–7979. https://doi.org/10.1021/ic2012843
- Tircsó, Gy.; Kovács, Z.; Sherry, A. D., *Inorg. Chem.*, 2006, 45(23), 9269–9280. https://doi.org/10.1021/ic0608750
- 14. Póta, K.; Do, Q. N.; Kovács, Z.; Tóth, É.; Tircsó, Gy. közlésre előkészítve.
- Wang, X. Y.; Jin, T. Z.; Comblin, V.; Lopezmut, A.; Merciny, E.; Desreux, J. F., *Inorg. Chem.* **1992**, *31(6)*, 1095-1099. https://doi.org/10.1021/ic00032a034
- Takács, A.; Napolitano, R.; Purgel, M.; Bényei, A. Cs.; Zékány, L.; Brücher, E.; Tóth, I.; Baranyai, Zs.; Aime S. *Inorg. Chem.*, **2014**, *53(6)*, 2858–2872. https://doi.org/10.1021/ic4025958
- Forgács, A., Giovanni B. Giovenzana, G. B.; Botta, M., Brücher, E.; Tóth, I.; Baranyai Zs.; *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012, 2074–2086. https://doi.org/10.1002/ejic.201101294
- Giania, A. M.; Vágner, A.; Negri, R.; Baranyai, Zs.; Giovenzana, G. B. *Polyhedron*, **2016**, *109*, 115–119. https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.02.010
- Tircsó, Gy.; Kálmán, F. K.; Pál, R.; Bányai, I.; Varga, T. R.; Király, R.; Lázár, I.; Québatte, L.; Merbach, A. E.; Tóth, É.; Brücher, E. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2062–2073. https://doi.org/10.1002/ejic.201101299
- 20. a). Baranyai, Zs.; Botta, M.; Fekete, M.; Giovenzana, G. B.; Negri, R.; Tei, L.; Platas-Iglesias, C. *Chem. Eur. J.* 2012, *18(25)*, 7680–7585. https://doi.org/10.1002/chem.201200265
 b). Negri, R.; Baranyai, Zs.; Tei, L.; Giovenzana, G. B.; Platas-Iglesias, C.; Bényei, A. Cs.; Bodnár, J.; Vágner, A.; Botta, M. *Inorg. Chem.* 2014, *53(23)*, 12499–12511. https://doi.org/10.1021/ic5020225
 c.) Tei L.; Baranyai Zs.; Brücher E.; Cassino C.; Demicheli F.; Masciocchi N.; Giovenzana G. B.; Botta M, *Inorg. Chem.* 2010, *49*, 616 https://doi.org/10.1021/ic901848p

- Bonnet, C. S.; Laine, S.; Buron, F.; Tircsó, Gy.; Pallier, A.; Helm, L.; Suzenet, F.; Tóth É. *Inorg. Chem.* 2015, *54(12)*, 5991–6003.
 - https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00804
- a). Platas-Iglesias, C.; Mato-Iglesias, M.; Djanashvili, K.; Muller, R. N.; Vander Elst, L.; Peters, J. A.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T. *Chem. Eur. J.* 2004, *10*, 3579–3590. https://doi.org/10.1002/chem.200306031
 b). N. Chatterton, N.; Gateau, C.; Mazzanti, M.; Pecaut, J.; Borel, A.; Helm, L.; Merbach, A. E. *Dalton Trans.* 2005, 1129–1135. https://doi.org/10.1039/B416150E
- Kálmán, F. K., Végh, A.; Regueiro-Figueroa, M.; Tóth, É.; Platas-Iglesias, C.; Tircsó Gy. *Inorg. Chem.* 2015, *54(5)*, 2345–2356. https://doi.org/10.1021/ic502966m
- 24. a). Brücher, E.; Szarvas, P. *Inorg. Chim. Acta.* 1970, *4*, 632–636; https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)93367-X
 b). Sarka, L.; Burai, L.; Brücher, E. *Chem. Eur. J.* 2000, *6*, 719–724. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(20000218)6:4<719 ::AID-CHEM719>3.0.CO;2-2
- 25. a). Nyssen, G. A.; Margerum, D. W. *Inorg. Chem.*, **1970**, *9(8)*, 1814–1820.
 https://doi.org/10.1021/ic50090a007
 b). McMurry, T. J.; Pippin, C. G.; Wu, C.; Deal, K. A.; Brechbiel, M. W.; Mirzadeh, S.; Gansow, O. A. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3546–3549.
 https://doi.org/10.1021/jm980152t
- Rodríguez-Rodríguez, A.; Regueiro-Figueroa, M.; Esteban-Gómez, D.; Tripier, R.; Tircsó, Gy.; Kálmán, F. K.; Bényei, A.; Cs.; Tóth, I.; de Blas, A. Rodríguez-Blas T.; Platas-Iglesias, C. *Inorg. Chem.* 2016, *55(5)*, 2227–2239. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02627
- Regueiro-Figueroa, M.; Bensenane, B.; Ruscsák, E.; Esteban-Gómez, D.; Charbonničre, L. J.; Tircsó, Gy.; Tóth, I.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C. *Inorg. Chem.*, 2011, 50, 4125–4141. https://doi.org/10.1021/ic2001915
- Regueiro-Figueroa, M.; Ruscsák, E.; Fra, L.; Tircsó, Gy.; Tóth, I.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C.; Esteban-Gómez, D. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014, *36*, 6165–6173. https://doi.org/10.1002/ejic.201402693
- 29. a.) Baranyai, Zs.; Pálinkás, Z.; Uggeri, F.; Maiocchi, A.; Aime, S.; Brücher, E. *Chem. Eur. J.* 2012, *18*, 16426–16435. https://doi.org/10.1002/chem.201202930
 b.) Pálinkás Z.; Baranyai Zs.; Brücher E.; Rózsa B. *Inorg. Chem.* 2011, *50*, 3471
 https://doi.org/10.1021/ic102390p
- 30. a.) Baranyai, Z.; Brucher, E.; Uggeri, F.; Maiocchi, A.; Toth, I.; Andrasi, M.; Gaspar, A.; Zékány, L.; Aime, S. *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 4789–4799. https://doi.org/10.1002/chem.201405967
 b.) Baranyai Zs.; Pálinkás Z.; Uggeri F.; Brücher E., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 1948
 https://doi.org/10.1002/ejic.200901261
- Takács, A.; Napolitano, R.; Purgel, M.; Bényei, A. Cs.; Zékány, L.; Brücher, E.; Tóth, I.; Baranyai, Z.; Aime, S.. *Inorg. Chem.* 2014, *53*, 2858–2872. https://doi.org/10.1021/ic4025958
- Baranyai, Zs.; Rolla, G. A.; Negri, R.; Forgács, A.; Giovenzana, G. B.; Tei, L. *Chem. Eur. J.* 2014, 20(10), 2933–2944. https://doi.org/10.1002/chem.201304063
- Rojas-Quijano, F. A.; Tircsó, Gy.; Tircsóné Benyó, E.; Baranyai, Zs.; Tran Hoang, H.; Kálmán, F. K.; Gulaka, P. K.; Kodibagkar, V. D.; Aime, S.; Kovács, Z.; Sherry, A. D., *Chem. Eur. J.* 2012, 18(31), 9669–9676. https://doi.org/10.1002/chem.201200266

- Placidi, M. P.; Botta, M.; Kálmán, F. K.; Hagberg, G. E.; Baranyai, Zs.; Krenzer, A.; Rogerson, A. K.; Tóth, I.; Logothetis, N. K.; Angelovski, G. *Chem. Eur. J.* 2013, *19(35)*, 11644–11660. https://doi.org/10.1002/chem.201300763
- 35. a). Drahoš, B.; Kubíček, V.; Bonnet, C. S.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Tóth É.; *Dalton Trans.*, 2011, 40, 1945–1951. https://doi.org/10.1039/C0DT01328E
 b). K. Kálmán, F. K.; Gyula Tircsó, Gy. *Inorg. Chem.*, 2012, 51(19), 10065–10067. https://doi.org/10.1021/ic300832e
- Baranyai, Zs.; Garda, Z.; Kálmán, F. K.; Krusper, L.; Tircsó, Gy.; Tóth, I. Magyar szabadalom, P1500076, Benyújtva: 2015 február 25.
- Molnár, E.; Camus, N.; Patinec, V.; Rolla, G. A.; Botta, M.; Tircsó, Gy.; Kálmán, F. K.; Fodor, T.; Tripier, R.; Platas-Iglesias, *C. Inorg. Chem.* 2014, *53*, 5136-5149. https://doi.org/10.1021/ic500231z
- Garda, Z.; Molnár, E.; Botár, R.; Fodor, T.; Kálmán, F. K., Kovács, Z.; Tóth, I.; Tircsó, Gy. J. Biol. Inorg. Chem. 2014, 19, S691-S691. https://doi.org/10.1007/s00775-013-1082-5
- Garda, Z.; Forgács, A.; Do, Q. N.; Kálmán, F. K.; Timári, S.; Tóth, I.; Baranyai, Zs.; Tei, L.; Kovács Z.; Tircsó, Gy. J. *Inorg. Biochem.* 2016, *163*, 206-213. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.07.018
- Garda, Z.; Kálmán, F. K.; Nagy, V.; Lóczi, Sz.; Póta, K.; Do, Q. N.; Platas-Iglesias, C., Kovács, Z.; Tóth É, Tircsó Gy. előkészületben.
- Attila Forgács, A.; Tei, L.; Baranyai, Zs.; Tóth, I.; Zékány, L.; Botta, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2016, *8*, 1165–1174. https://doi.org/10.1002/ejic.201501415
- 42. Szilvási, I. Nukleáris medicina, *Medicina Könyvkiadó Zrt.*, Budapest, **2010**.
- Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J.; *Chem. Rev.* 2010, *110*, 2858–2902. https://doi.org/10.1021/cr900325h
- Baranyai, Zs.; Uggeri, F.; Maiocchi, A.; Giovenzana, G. B.; Cavallotti, C.; Takács, A.; Tóth, I., Bányai, I.; Bényei, A. Cs.; Brücher, E.; Aime, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2013, *1*, 147–162. https://doi.org/10.1002/ejic.201201108
- Vágner, A.; D'Alessandria, C.; Gambino, G.; Schwaiger, M.; Aime, S.; Maiocchi, A.; Tóth, I.; Baranyai, Zs.; Tei L. *Chemistry Select* 2016, 2, 163–171. https://doi.org/10.1002/slct.201500051
- Pfeifer-Leeg, M.; Szabó, G.; Baranyai, Z.; Niksch, T.; Weigand, W.; Freesmeyer, M. Z. *Anorg. Allg. Chem.* 2016, 6, 486–491. https://doi.org/10.1002/zaac.201600016
- Baranyai, Zs.; Reich, D.; Vágner, A.; Weineisen, M.; Tóth, I.; Wester, H.-J.; Notni, J. *Dalton Trans.* 2015, 44, 11137-11146. https://doi.org/10.1039/C5DT00576K
- McBride, W. J.; Sharkey, R. M.; Karacay, H; D'Souza, C. A.; Rossi, E. A.; Laverman, P.; Chang, C.-H.; Boerman, O. C.; Goldenberg, D. *M. J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 991–998. https://doi.org/10.2967/jnumed.108.060418
- Farkas, E.; Fodor, T.; Kálmán, F. K.; Tircsó, Gy., Tóth, I. *Reac. Kinet. Mech. Cat.* 2015, *116(1)*,19-33. https://doi.org/10.1007/s11144-015-0892-6
- Fodor, T.; Bányai, I.; Bényei, A.; Platas-Iglesias, C.; Purgel, M.; Horváth, G. L.; Zékány, L.; Tircsó, Gy.; Tóth, I. *Inorg. Chem.*, 2015, 54(11), 5426–5437. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00458
- Hijnen, N. M.; de Vries, A.; Blange, R.; Burdinski, D.; Gru"ll, H. *Nucl. Med. Biol.* 2011, *38*, 585-592. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2010.10.009

Synthesis of Linear and Macrocyclic Aminopolycarboxylate Ligands and Chemical Characterization of their Metal Complexes for Safe Use in Medical Imaging

In recent years there is an active interest in the chemistry of linear and macrocyclic aminopolycarboxylate complexes of lanthanides (Ln(III)), Ga(III), In(III), Sc(III), Cu(II) and Mn(II) ions because several of them are used or have been proposed for use in medical diagnosis and therapy as radiopharmaceuticals, optical probes and Magnetic Resonance Imaging (MRI) contrast agents (CAs). The use of complexes in living systems necessitates the knowledge of their in vivo behaviour which is generally characterized by in vitro studies of the complexation properties, such as stability constants and structures of the complexes and their formation and dissociation rates. Since biofluids contain a lot of complex forming ligands and metal ions which compete with the components of the Gd(III)-aminopolycarboxylate complexes administered to the patients (often referred to as competitive biological media), these complexes must be highly inert in order to reach the target organ or tissue. So for the characterization of the complexes used in medical diagnosis or therapy, the knowledge of the kinetic properties (mainly the rate of dissociation) is particularly important. The main fields of our interest are the synthesis and study of the Gd(III) and Mn(II) based MRI CAs. Some of the ligands prepared to complex Gd(III) and Mn(II) ions are also suitable for the complexation of the radioactive isotopes of Ga(III), In(III), Sc(III) or Cu(II) and in this respect we have studied the complexes of these metal ions, too. Since it is known that the more rigid ligands may form more inert complexes, we have synthesized some ligands by modifying the structure of the known macrocyclic DOTA and PCTA ligands, by the attachment of methyl groups to the acetate moieties. The stability constants of the Mg(II), Ca(II), Cu(II), Zn(II) and Ln(III) complexes formed with the DOTMA ligand are somewhat lower than those of the DOTA complexes, but the rate of acid assisted dissociation of [Gd(DOTMA)]⁻ is about one order of magnitude lower than that of [Gd(DOTA)]⁻. The [Gd(DOTMA)]⁻ also exists predominantly in the form of twisted square antiprismatic (TSAP) isomer for which the water exchange is more favourable. By the attachment of a nitrobenzyl group to the DOTMA, a bifunctional ligand is obtained which can be attached to biological macromolecules. The linking of the nitrobenzyl group (after its reduction to amine functionality) has essentially no effect on the complexation properties of DOTMA. The ligand PCTMA is the polymethylated analogue of the PCTA. The two ligands have similar complexation properties but the relaxivity of [Gd(PCTMA)] is double of that of [Gd(DOTA)]⁻ and the rate of its acid catalyzed dissociation is close to that of [Gd(DOTA)].

The complexation properties of several known and some newly synthesized EDTA derivative ligands have also been investigated. The stability constant data indicate that the length and the rigidity of the chain bridging the two IMDA groups and the presence of any functional groups in the chain strongly affect the complex forming properties of the ligands. The presence of a phosphinate group does not improve the complexation properties of the ligand BIMP. The pyridine-based ligand with two hydrazine functions has very favourable complexation properties and the [Gd(HYD)]⁻² complex is as kinetically inert as the [Gd(DTPA)]^{2^{-2}} and its relaxivity is relatively high, because two water molecules are coordinated in the inner sphere of Gd(III) in [Gd(HYD)]^{-2^{-2}}.

attaching the two IMDA groups to 1,4-diazepane, the obtained *cis*IPDTA ligand is highly selective for the Ln(III) ions of lower size. The stability constants of the complexes from La(III) to Lu(III) increase by 8.22 log K units, which is the highest increase in log K values along the Ln-series known so far.

The influence of the picolinate functional group(s) on the stability constant of the complexes is very significant. By replacing the acetate groups in the linear EDTA or CDTA and in macrocyclic DOTA, the resulting ligands form complexes of very high stability. The ligand EDDADPA is octadentate in the Ln(III) complexes while hexadentate in the Zn(II) and Cu(II) complexes as the ¹H NMR studies and the DFT calculations indicated. The stability constants of [Ln(EDDADPA)] complexes do not change with the increase in the lanthanide atomic numbers which was interpreted by DFT calculations. The kinetic inertness of [Gd(EDDADPA)] complex is relatively low, but the replacement of the ethylene bridging unit in the skeleton by a rigid diaminocyclohexane linker provides a ligand (CDDADPA) with more favourable Gd(III)-complex properties for a potential CA. When two picolinate groups are attached to the 14-membered cyclam, the stability of complexes formed with the Me₂TEDPA ligand is low and the coordinated Ln(III) ions hydrolyze at pH \sim 7. However, by bridging the two nitrogen atoms in opposite positions in cyclam (cross-bridged or reinforced cyclam) the ligand behaves exceptionally. The Gd(III) complex [Gd(CB-TEDPA)]⁺ (which was prepared in n-butanol at high temperature) is extremely inert, its dissociation could not be observed in strong acids or in the presence of high TTHA excess. Unfortunately there is no water molecule in the inner sphere of Gd(III), so it can not be regarded as a potential CA.

Because of the discovery of the disease Nephrogenic Systemic Fibrosis (NSF) and its association to Gd(III)-based CAs, the re-examination of the physico-chemical properties of the clinically used CAs became a point of interest. The stability constants of six commercial CAs have been re-determined under similar conditions (25 and 37 °C at 0.15 M NaCl ionic strength). By the use of the stability constants equilibrium calculations have been made, indicating the species distribution in a simplified plasma model (20 components, about 350 complexes). The calculations have shown that near physiological conditions, only phosphate ions can compete with the ligands of CAs because of the low solubility of GdPO₄. The kinetics of decomplexation of the linear and macrocyclic CAs differ considerably. At near-physiological conditions the decomplexation of linear CAs occur through the dissociation of Gd(III) complexes assisted by the endogenous ligands, mainly bicarbonate/carbonate. The role of proton-, citrate- and phosphate-assisted dissociation is lower. The decomplexation of macrocyclic, DOTA-derivative, Gd(III) complexes occurs through the proton assisted dissociation and this is very slow at pH=7.4. The extent of in vivo decomplexation of CAs depends on the rates of dissociation and elimination of Gd(III) complexes from the body. The dissociation takes place by transmetallation as [Zn(L)] [Cu(L)] and [Ca(L)] complexes and GdPO₄ are formed. Based on the kinetic and pharmacokinetic data, an open two-compartment model has been developed to predict the extent of in vivo dissociation of Omniscan ([Gd(DTPA-BMA)]). The relaxivities of Gd(III) complexes formed with DO3A derivative ligands containing different ethyl-amine substituents as the fourth functional group show changes in the pH range of 6 - 9, because of the deprotonation and coordination of the amine nitrogen. These Gd(III) complexes can be regarded as promising pH-sensitive ("smart") contrast agents. The fourth side chain in the ligand can also be a sulphonamide group where the stability of the Gd(III) complex is higher and the relaxivities are pH-sensitive because of the changes in denticity of the ligand. The [Gd(DOTA)]⁻ having a 2-nitroimidazol moiety attached to one carboxylate group via an amide linkage has been prepared and studied as a hypoxia-sensitive MRI CA.

Because of the association between the Gd(III)-based CAs and the disease NSF, the interest in the Mn(II)-based CAs has recently also increased. Detailed studies on Mn(II) complexes of different EDTA and *trans*CDTA derivative ligands indicated that only the *trans*CDTA complexes of Mn(II) are sufficiently inert for use as MRI CAs. The kinetic behaviour of the Mn(II) complexes of *trans*CDTA-bis(amide) derivative ligands are even better in spite of the lower stability constants. We have synthesized *trans*CDTA-bis(amide) derivative ligands with the use of different amines and found the way to tune the kinetic properties of the Mn(II) complexes. The inertness and relaxation properties of some Mn(II) complexes are similar to those of the [Gd(DTPA)]²⁻. The studies on the 9-, 12- and 14 membered macrocyclic ligands containing a picolinate group indicate that for the complexation of Mn(II) the DOMPA ligand is the most suitable. Unfortunately this complex does not accommodate a water molecule in the inner sphere of Mn(II). The decomplexation of [Mn(DOMPA)]⁺ occurs via spontaneous and proton assisted pathways, and its inertness is not sufficiently high. The replacement of acetate side chains for phosphonates results in increased complex stability but the rate of proton assisted dissociation of the complex is quite high. However the attachment of amide functional groups instead of carboxylates leads to the increase of the kinetic inertness of the complexes. By studying the complexation properties of the *cis*DO2A, *cis*DO2MA, *cis*DO2AM and *trans*DO2A ligands we have obtained information about thermodynamic and kinetic stabilities and also on the redox stabilities of the Mn(II) complexes.

For the complexation of radioactive isotopes of Cu(II), Ga(III), In(III) and Sc(III), used or having potential of the use in Nuclear Medicine, similar ligands are suitable as for the complexation of Mn(II) and Ln(III) ions. The formation rates of [Ga(DOTA)]⁻ increases with increasing ethanol content of water-ethanol mixtures. The AAZTA ligand is suitable for the complexation of Cu(II) and Gd(III). Studies are in progress about the formation of ternary complexes with fluoride and iodide ions and [Al(NOTA)] and [Tl(DOTA)]⁻ complexes which seem to be suitable to transport the radioactive isotopes of fluorine or iodine, respectively.

Polidentát tripodális ligandumok biomimetikus fémkomplexei

GAJDA Tamás^{a,*}, SZORCSIK Attila^b, DANCS Ágnes^a és MATYUSKA Ferenc^a

^aSzegedi Tudományegyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Dóm tér 7, 6721 Szeged, Magyarország ^bMTA-SZTE Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport, Dóm tér 7, 6721 Szeged, Magyarország

1. Bevezetés

A natív enzimekhez hasonló aktivitással, szelektivitással és/vagy működési mechanizmussal rendelkező kis molekulatömegű fémkomplexek vizsgálata mind elméleti (a metalloenzimek működésének jobb megismerése), mind gyakorlati (bioutánzó katalizátorok/ mesterséges enzimek) szempontból értékes eredményeket szolgáltathat. A Szegedi Tudományegyetem Bioszervetlen Kémiai kutatócsoportjában (TTIK, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) a kis molekulatömegű biomimetikus katalizátorok fejlesztése 15-20 éves múltra tekinthet vissza. Az első időkben többnyire alkoxo-hidas kétmagvú komplexeket, később multihisztidin peptidek fémkomplexeit vizsgáltuk, de a tripodális (multipodális) ligandumok munkánk során mindvégig jelen voltak.

A tripodális vegyületek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek a lineáris ligandumokkal szemben. A kelátgyűrűk nagyobb száma és az ún. preorganizált szerkezet, ami alatt a ligandum korlátozott konformációs szabadságát szokás érteni, jelentősen növeli a komplex stabilitását. Másrészt a tripodális ligandumokra jellemző faciális koordináció szabad teret enged a szubsztrát megkötődésének, ami a legtöbb fémion-katalizált folyamat meghatározó lépése. A lábak megfelelő derivatizálása ugyanakkor egy olyan moduláris rendszer kialakítását teszi lehetővé, amelyben viszonylag könnyen változtatható a ligandum donorcsoportjainak száma/minősége, így annak fémion affinitása, vagy a kialakuló komplex szerkezete. De további funkciók kiépítése is lehetővé válik: (i) pl. további fémion megkötése, ami a többmagvú aktív centrumokra jellemzően lehetőséget teremt a fémionok kooperációjára a katalitikus ciklusban, (ii) valamint beépíthetőek olyan molekularészek, melyek elősegítik a szubsztrát megkötését, vagy annak aktiválását (pl. sav/bázis katalízis révén).

A fentieknek megfelelően munkánk során előállítottuk és vizsgáltuk néhány egyszerű tripodális platform (cisz, cisz-1,3,5-triamino-ciklohexán, trisz(2-aminoetil) amin, nitrilo-triecetsav) különbözőképpen szubsztituált származékát. Célunk az volt, hogy feltérképezzük a szubsztituensek számának és minőségének hatását réz(II)- és cink(II)-komplexeik összetételére, szerkezetére és termodinamikai stabilitására. Vizsgáltuk továbbá, hogy ezek a sajátságok hogyan befolyásolják a fémkomplexek hidrolitikus és redoxi reakciókra gyakorolt katalitikus hatását.



1. Séma A jelen dolgozatban tárgyalt ligandumok sematikus szerkezete

2. A *cisz, cisz*-1,3,5-triamino-ciklohexán (tach) és egyszerű származékainak fémkomplexei

A tach (L1, 1. séma) egy jól ismert, faciális koordinációt eredményező tripodális ligandum.¹ Minthogy a fémionhoz kötődő hidroxidion, mint nukleofil reaktáns, a hidrolázok funkcionális modelljeinek fontos eleme, a CuL¹(OH) komplex a hidrolitikus reakciók viszonylag aktív katalizátora. Azonban a $2CuL^{1}(OH) = Cu_{2}L^{1}(OH)_{2}$ dimerizációs egyensúlyban (K = 5750)² képződő inaktív dimer miatt a rendszer összességében kis hatékonyságú. Azonban az erősen kötődő szubsztrátok koordinációja megakadályozhatja az inaktív dimer komplex képződését. Ennek megfelelően a CuL¹ komplex hatékonyan képes elősegíteni a nem-aktivált dipeptidek (DP) hidrolízisét.² Eredményeink szerint a pH 7-10 tartományban képződő CuL¹(DP) vegyes komplex felelős a tapasztalt hidrolitikus hatásért. A DP = Gly-Gly. Gly-Leu és Leu-Gly esetekben a hidrolízis a hidroxidion ill. víz nukleofil támadása révén valósul meg (a folyamat pH-függő), s a fémion szerepe csak a karbonil oxigén Lewis-sav aktiválása. Ugyanakkor a Gly-Ser hidrolízise előzőeknél jóval gyorsabb, és a hidrolízis sebessége alig függ a pH-tól. Ez a viselkedés a szerin hidroxilcsoportjának, valószínűleg a réz(II) által elősegített, intramolekuláris nukleofil támadásával magyarázható (1. ábra). A rendszer érdekessége, hogy az 'aktív komplex-szubsztráť adduktumot a Gly-Gly esetében egykristály formában is sikerült kinyerni, s a röntgen vizsgálatok a dipeptid kétfogú {NH2, C=O} koordinációját

^{*} Gajda Tamás. Tel.: 06-62-544335; fax: 06-62-544340; e-mail: gajda@chem.u-szeged.hu

bizonyították. A hidrolízis pH 10 felett már nem játszódik le, összhangban a vegyeskomplexben kötött dipeptid amidcsoportjának fémionindukált deprotonálódásával.



 Ábra A [CuL¹(Gly-Gly)]⁺ komplex röntgenszerkezete és a Gly-Ser dipeptid CuL¹ komplex által elősegített hidrolízisének javasolt mechanizmusa²

A hidrolázok/nukleázok legtöbbjének aktív centrumában két, esetleg három fémion található, melyek jól szervezett együttműködése biztosítja a hatékony hidrolízist.³ Így a mesterséges foszforsav-diészterázok (nukleázok) kifejlesztésének kézenfekvő stratégiája lehet kétmagvú komplexek kialakítása. Ez előnyös lehet a szubsztrát hatékonyabb megkötése, annak ún. dupla Lewis-sav aktiválása, a két fémion között hídként kötődő PO₄-tetraéderben indukált feszülés megjelenése, valamint a távozó csoport stabilizálása szempontjából.

A tach ligandummal rokon 1,3,5-triamino-1,3,5-trideoxicisz-inozitol és ennek N-metil-származékai (tdci (L2), tmci (L³) 1. séma) számos, a fémion koordináció szempontjából kedvező tulajdonsággal rendelkeznek.⁴ E ligandumok három ekvivalens {O_{ax}N_{eq}O_{ax}} faciális kötőhellyel bírnak, melyek egy-, két- ill. hárommagvú komplexek kialakulását is lehetővé teszik. Valóban, egyensúlyi vizsgálataink szerint a réz(II)-L² rendszerben a pH-tól ill. a fém/ligandum aránytól függően, különböző protonáltsági állapotú egy-, két- ill. hárommagvú komplexek képződnek,5 melvekben alkoxo-hidak kötik össze a fémionokat. Meghatároztuk, egy az oldatban levő komplexek aggregációjával létrejövő $Cu_5(L^2H_{-2})(L^2)_2(OH)_2(NO_3)_2](NO_3)_46H_2O$ ötmagvú, összetételű komplex kristályszerkezetét (2. ábra), amely egy igen érdekes Cu₅O₆ klasztert tartalmaz. A komplex azonos ligandumhoz kötődő fémionjait alkoxo-hidak kötik össze, ami megerősíti az oldatfázisban képződő komplexek szerkezetére vonatkozó megállapításainkat. Másrészt, az alkoxo-hidas fémcent-rumokban a fémionok egymástól 3,63-3,78 Å távolságban helyezkednek el, ami hasonlatos a kétmagvú metallo-foszfoészterázok aktív centrumára jellemző fémion szeparációra.³ Mindezen sajátságok alapján többmagvú komplexek hatékony а foszfoészteráz modelleknek ígérkeztek.



2. Ábra A $[Cu_5(L^2H_{22})L^2_2(OH)_2(NO_3)_2]^{4+}$ kation ORTEP ábrázolása⁵

A több egy-, két- ill. hárommagvú $Cu(II)-L^2$ komplex képződése miatt a tapasztalható hidrolitikus hatás várhatóan erősen függ a közeg pH-jától és a fém/ligandum aránytól. Valóban, a komplexeknek a *bisz*-4-nitrofenil-foszfát (bnpp, DNS modell) hidrolízisére gyakorolt hatása maximum-görbe szerint változik, mind a pH, mind a fém/ligandum arány függvényében (3 ábra).



3. Ábra A bnpp hidrolízisének függése a fém/ligandum aránytól (fent, pH = 8,60, [L²] = 0,46 mM, T = 298 K); A bnpp (■), az npp (□) ill. a dnpep (▲) hidrolízisének pH-függése a réz(II)–L² rendszerben (lent, [Cu]=2[L²], T = 298 K). ■,▲: [Cu]= 0,88 mM, □: [Cu]= 3 mM.

Figyelembe véve oldategyensúlyi eredményeinket, a tapasztalt hidrolitikus hatás a kétmagvú Cu₂H₋₃L² komplexhez rendelhető. Bár e komplex említésre méltó foszfomonoészteráz aktivitást is mutat a 4-nitrofenilfoszfáttal (npp) szemben (3. ábra), azonos körülmények között a bnpp hidrolízisének sebessége ~ 150-szer nagyobb. Azaz a komplex hidrolitikus hatása szelektív a foszforsav-diészterekre. Optimális körülmények között 4 mM kétmagvú komplex 35 milliószorosára gyorsítja fel a bnpp autohidrolízisét. Az aktív komplex javasolt szerkezete (4. ábra) alkoxo-hidas fémcentrumot és két terminális hidroxidiont tartalmaz. А komplex kiemelkedő hatékonysága a bnpp hidrolízise során bifunkciós mechanizmussal, a két fémion által biztosított ún. dupla Lewis-sav aktiválással és a fémhez kötött hidroxidion direkt nukleofil katalízisével értelmezhető.



4. Ábra Az ötmagvú komplex egy fragmense és a bnpp hidrolízis javasolt mechanizmusa

Fenti kétmagvú komplex az ún. nem aktivált foszfoészterek hidrolízisét is képes elősegíteni, 2,5 mM-os koncentrációban 26000-szeresére gyorsítja fel a cAMP autohidrolízisét.⁶

Az irodalomból jól ismert, hogy számos foszfoészteráz (pl. bíborsav foszfatáz, protein foszfatáz 1 ill. 2B) tartalmaz vegyesmagvú aktív centrumot,³ amelyekben a két fémion eltérő kémiai sajátságai hasznosulnak. A tdci biner rendszereinek tanulmányozása során felvetődött a kérdés, hogy a két alkalmazott fémion (réz(II) és cink(II)) együttes jelenléte eredményez-e sebességnövekedést a ciklikus nukleotidok (vagy dinukleotidok) hidrolízisében.7 Eredményeink szerint 2.5 mM koncentrációjú vegyes-magvú terner komplex 120000-szeresére képes felgyorsítani a cAMP autohidrolízisét, azaz kb. ötször (negyvenszer) hatékonyabb, mint az analóg biner réz (cink) kétmagvú komplex. Ez a megnövekedett hatékonyság egy



5. Ábra A vegyesmagvú Cu,Zn-komplex által katalizált cAMP hidrolízis javasolt mechanizmusa.

az 5. ábrán megadott trifunkcionális mechanizmussal értelmezhető: (i) dupla Lewis-sav aktiválás, (ii) a réz(II)-hez kötött OH⁻-csoport általános bázis, valamint (iii) a cink(II)-hez kötött vízmolekula általános sav katalízise (távozó-csoport stabilizálás).

Végül említést érdemel, hogy az egyszeresen metilezett aminocsoportokat tartalmazó tmci ligandum (L^3 , 1. séma) a korábban tárgyalt tdci-hez nagyon hasonló egy-, két- és hárommagvú réz(II) komplexeket képez. Ugyanakkor a tdci analóg kétmagvú komplexével ellentétben katalitikus hatása szelektív a foszforsav-monoészterek hidrolízisére.⁸ Míg a Cu₂H₋₃L² komplex 150-szer gyorsabb hidrolízisét eredményezi a bnpp-nek mint az npp-nek, addig az analóg tmci komplex mintegy 2500-szor hatékonyabb a foszforsav-monoészter npp hidrolízisének elősegítésében. Bár ennek a látványos eltérésnek a pontos oka ismeretlen, fenti tapasztalat rávilágít a fémcentrumok környezetében található nem koordinálódó csoportok sztérikus hatásának alapvető jelentőségére.

3. A *cisz,cisz*-1,3,5-triamino-ciklohexán (tach) és a *trisz*(2aminoetil)amin (tren) N-szubsztituált származékainak fémkomplexei

A Bevezetésben említetteknek megfelelően a tripodális ligandumok lábainak megfelelő derivatizálása egy olyan moduláris rendszer kialakítását teszi lehetővé, amelyben változtatható a ligandum fémion affinitása (donor-csoportjainak száma/minősége), valamint további fémkötő-helyek beépítése révén többmagvú komplexek állíthatóak elő. Ebből a célból munkánk során a tach és tren tripodális platformok jónéhány N-szubsztituált származékát állítottuk elő, melyek közül jelen publikációban négy ligandum fog említésre kerülni.

Érdekes összehasonlításra ad lehetőséget a tren3pir (L^4) és tach3pir (L^5) ligandumok koordinációs sajátságai. E ligandumok viszonylag egyszerű koordinációs kémiai sajátsággal bírnak, hiszen a piridin és az amino-nitrogének nem képesek kelátgyűrű kialakítására (vagyis ugyanazon fémionhoz kötődni). Ennek ellenére jól példázzák az ilyen moduláris rendszerekkel elérhető egyszerű sajátságokat. Bár a piridin-nitrogének elvileg alkalmasak további fémion(ok) megkötésére, oldatfázisban mindkét ligandum csak egymagvú komplexeket képez (L^4 esetén kristályos formában izoláltunk egy 2/1 réz(II)/ligandum arányú 3D polimert).



6. Ábra A CuL⁴ és CuL⁵ komplexek sematikus szerkezete

Vizes oldatban az L⁴ ligandum réz(II) komplexeinek mindegyikében a tren alegység négy nitrogénje koordinálja a fémiont. E komplexek trigonális bipiramisos szerkezetűek (6. ábra), amint azt jellegzetes látható és ESR spektrumuk is bizonyítja. Az ötödik pozícióban kötődő vízmolekula pH 8 felett deprotonálódik. A piridingyűrűk sztérikus hatása miatt ez az ötödik koordinációs pozíció nagyobb ligandumok számára nehezen hozzáférhető, így ezek a komplexek nem rendelkeznek számottevő enzimutánzó hatással. Az analóg CuL⁵ komplex azonban jóval nyitottabb koordinációs szférával rendelkezik (6. ábra). A fémion környezete nagyon hasonló a tach platform CuL¹ komplexéhez (1. ábra). Jelentős különbség azonban, hogy míg a CuL¹ komplex komplex deprotonálódása egy dihidroxo-hidas dimert eredményez, addig piridingyűrűk sztérikus hatása miatt CuL⁵ komplex deprotonálódása egymagvú vegyes hidroxo komplexeket eredményez, ami igéretes a hidroláz enzimek funkcionális modellezése szempontjából. Valóban, eredményeink szerint a CuL⁵(OH) komplex hatékonyan képes elősegíteni a foszforsav-diészter bnpp hidrolízisét, és az észlelt katalitikus hatás egyértelműen a monohidroxo komplexhez rendelhető. Ez érthető is, ha meggondoljuk, hogy a víz ebben a komplexben könnyen lecserélhető a szubsztrátra, és a fémionhoz kötött hidroxidion nukleofil támadása indítja el a hidrolízist (7. ábra).



7. Ábra A CuL 5 (OH) komplex által katalizált bnpp hidrolízis javasolt mechanizmusa.

A következő példa két pirazol-származék (L⁶, L⁷ 1. séma) sajátságait hasonlítja össze. A tripodális platformok ebben az esetben is a tren és a tach voltak. A ligandumok szekunder aminocsoportjai és a gyűrű-nitrogének itt már képesek kelát pozícióban kötődni a fémionokhoz, ami jelentősen növeli az ML komplexek stabilitását az alapvegyületekhez (tach, tren) képest. A tren-származéknál a trigonális bipiramisos szerkezet miatt egyetlen, a tach-származéknál fémiontól függően 2-3 gyűrűnitrogén koordinációja valósul meg. A 8. ábra L⁶ ligandum cink(II) komplexének röntgenszerkezetét mutatja, amelyben a ligandum 6 donorcsoportjával kötődik a fémionhoz. A ábrából ugyanakkor az is kiderül, hogy a pirazol-gyűrűk nem koordinálódó nitrogénjei itt már lehetőséget biztosítanak további tényleges fémion megkötésére. Ennek megfelelően L⁶ ligandum réz(II) jelenlétében két egymagvú és három különböző protonáltsági állapotú hárommagvú komplexet képez (9. ábra). A 9.a ábra jól példázza a négyzetes piramisos



8. Ábra A ZnL⁵ komplexek szerkezete

szerkezetű CuL⁶ komplexnek a pirazol-gyűrűk koordinációja miatti kitüntetett stabilitását. Az 1/1 rendszerben pH 6-nál kék színű oldat magasabb pH-n vörösbor színűvé válik, ami a 4-500 nm-nél jelentkező intenzív töltésátviteli sávoknak köszönhető (9.c ábra). Ugyanezen sávok 3/2 fém/ligandum aránynál már pH 5-7 körül kialakulnak (9.d ábra), és egyértelműen a hárommagvú fémkomplexek képződéséhez rendelhetőek. Figyelembe véve a ligandum szerkezetét is, ezek a deprotonálódás során kialakuló töltésátviteli sávok pirazolát-hidas többmagvú fémcentrumok kialakulását jelzik.



9. Ábra A Cu(II)-L⁶ 1:1 (A) és 3:2 (B) rendszerek eloszlásgörbéi és az 506 nm-nél mérhető fényelnyelés pH-függése, valamint a Cu(II)-L⁶ 1:1 (C) and 3:2 (D) rendszerek pH-függő UV-Vis spektrumai

A négyszeresen deprotonált hárommagvú komplex meglehetősen egyedi röntgenszerkezete (10. ábra) igazolja ezt a feltételezést. A lineárisan elhelyezkedő három rezet négy pirazoláthíd köti össze, a Cu-Cu távolságok 3.8 Å körüliek. A két szélső réz(II) a Jahn-Teller torzulás következtében megnyúlt négyzetes piramisos szerkezetű. A középső rézhez négy pirazolát-gyűrű kötődik összenyomott tetraéderes geometria szerint.



10. Ábra A [Cu₃(H₂₂L⁶)₂]²⁺ komplex kation szerkezete

A $[Cu_3(H_{22}L^6)_2]^{2+}$ komplex domináns megjelenése ekvimoláris oldatokban igen nagy termodinamikai stabilitásra utal (a kiindulási CuL⁶ komplex is nagy stabilitású, ráadásul a hárommagvú komplex képződése egy kötött ligandum felszabadulásával jár). A folyamatban két egymagvú komplex oly módon aktivál/pozícionál négy pirazol-gyűrűt, hogy egy nagy affinitású harmadik rézkötőhely képződik. Azaz a hárommagvú komplex képződése alloszterikusan kontrollált a két szélső réz és a pH által.



11. Ábra A hárommagvú komplexek eloszlásgörbéi a Cu(II)-L⁶ (folytonos vonal) és a Cu(II)-L⁷ (szaggatott vonal) rendszerekben 3/2 fém/ligandum arány esetén.

Az analóg tren-alapú L^7 ligandum hasonló koordinációs sajátsággal bír. Ebben az esetben is képződnek hárommagvú komplexek, viszont jelentősen eltér azok relatív stabilitása (11. ábra). Mivel ebben az esetben az egymagvú Cu L^7 komplex trigonális bipiramisos szerkezetű, az két szabad (nem koordinálódó) pirazol-gyűrűt is tartalmaz. Emiatt a kétszer deprotonált hárommagvú komplex kitüntetett stabilitással bír. Egyrészt mert már két pirazolát-híd kialakulása esetén is elegendő donorcsoport áll rendelkezésre a középső réz erős kötődéséhez, másrészt mert a következő deprotonálódások a szélső rezek geometriaváltását idézik elő. Ilyen módon a tripodális platformtól függően az egyébként hasonló összetételű három és négy pirazolát-hidat tartalmazó hárommagvú komplexek képződése két-három pH egységgel tolódik el (11. ábra).

E ligandumok segítségével a dioxigént aktiválni képes oxidációs katalizátorokat szerettünk volna előállítani. Ennek érdekében vizsgáltuk komplexeink pirokatechin oxidáz aktivitását a széles körben használt di-terc-butilpirokatechin (H₂dtbc) modell szubsztrát segítségével, aminek képződése könnyen követhető a termék kinon (dtbq) 400 nm-nél jelentkező elnyelési sávja alapján. A dtbq vízben rosszul oldódik, ezért 50 % etanol-víz elegyben dolgoztunk, és az autooxidációt minden esetben korrekcióba vettük.

Vizsgálataink szerint az egymagvú CuL komplexek egyáltalán nem, a hárommagvú komplexek viszont igen hatékonyan képesek a H₂dtbc oxidációját elősegíteni. A két ligandum hárommagvú komplexeinek képződésére vonatkozó fent említett eltérések a kinetikai sajátságokban is megmutatkoznak. A pirokatechin oxidáz aktivitás mindkét rendszerben maximum görbe szerint változik, viszont az optimális pH két egységgel eltér (12. ábra). A tren-alapú ligandum esetén tapasztaltuk a magasabb pH-optimumot,

ami megfelel annak, hogy ennél a ligandumnál a háromszorosan deprotonált komplex képződése is eltolódik a magasabb pH-k felé (11. ábra). Azaz a H₂dtbc oxidációja a fémionok koordinációs környezete, végső soron a tripodális platform által meghatározott és ennek révén szabályozható is.

Ugyanakkor, az optimális pH-n mindkét rendszer kiemelkedő és közel azonos pirokatechin oxidáz aktivitással bír. Kinetikai eredményeink a 13. ábrán megadott egyszerűsített mechanizmussal írhatóak le. A hárommagvú komplexek közül



12. Ábra A dtbc oxidáció sebességének pH függése a réz(II)-L⁶ () és a réz(II)-L⁷ () 3/2 fém/ligandum arányú rendszerekben 50% EtOH/víz elegyben (T = 298 K, $[Cu^{2+}]/3 = 0.05 \text{ mM}$, $[dtbc]_0 = 1.8 \text{ mM}$).

csak a háromszorosan deprotonált, azaz három pirazolát-hidat tartalmazó komplex tekinthető katalitikus szempontból aktívnak. Ez stabil terner komplexet képez a pirokatechinát dianionnal, és egy intramolekuláris elektrontranszfer révén valósul meg az oxidáció. Majd a termék disszociációja után a dioxigén visszaoxidálja a réz(I) centrumokat. Minthogy az egymagvú komplexek inaktívak, feltételezésünk szerint a középső, még telítetlen koordinációs szférával rendelkező réz alapvető szerepet játszik a szubsztrát megkötésében és oxidációjában.



13. Ábra A dtbc katalizált oxidációjának egyszerűsített mechanizmusa

4. A tripodális peptidek fémkomplexei

Az elmúlt 10 évben számos hisztidinben gazdag oligopeptidet vizsgáltunk a metalloproteinek fémkötő ill. katalitikus sajátságainak modellezése céljából.⁹⁻¹⁴ Az enzimek funkcionális modellezésére a peptid komplexek kézenfekvő választásnak tűnnek, hiszen elvileg az aktív centrumhoz nagyon hasonló fémion környezet alakítható ki. Ennek ellenére a SOD enzim kivételével¹⁰ kevés példa akad az irodalomban enzim mimetikus vizsgálatokra.⁹ Ennek oka nagyrészt az, hogy a kisméretű lineáris peptidekkel a fehérjék harmadlagos szerkezete által meghatározott aktív centrumhoz

hasonló környezet nem, vagy csak speciális esetekben alakítható ki. Bár néhány általunk vizsgált metallopeptid említésre méltó aktivitással bírt,9,10 mindegyiknél gond volt a preorganizált szerkezet hiánya. Jellemző példaként említhető a mátrix metalloproteináz 13 (MMP13) minimalista modelljének tekinthető, az enzim fémkötő-fragmensével azonos Ac-KAHEFGHSLGLDHSK-NH₂ szekvenciájú, peptid cink(II) komplexe.¹³ A peptid lényegében tripodális ligandumként viselkedik, hiszen pH 6-7 között, az MMP13 aktív centrumához hasonlóan, a fémion 3 imidazol-gyűrű által koordinált, sőt a nukleofil reaktáns Zn-OH[?] egység is a natív enzimmel azonos pH-tartományban képződik (14. ábra). Ennek ellenére mind a peptid cink-affinitása, mind a komplex hidrolitikus hatása messze elmarad a natív enzimétől.



14. Ábra Az Ac-KAHEFGHSLGLDHSK-NH₂ peptid cink(II) komplexeinek sematikus szerkezete

Fenti problémák elkerülése miatt, figyelmünk a tripodális peptidek irányába fordult. Azt reméltük, hogy ezek többé-kevésbé preorganizált szerkezete segíthet az enzimek aktív centrumához hasonló környezet, pl. egymáshoz képest megfelelően pozícionált fémcentrumok kialakításában. E célból tren és nitrilotriecetsav (nta) platformokból kiindulva előállítottunk két hisztidin-tartalmú tripodális pszeudopeptidet (His3tren (L⁸) és ntaHis3 (L⁹), ld. 1. séma). Az első esetben a hisztidinek N-terminális, a másodikban C-terminális pozícióban találhatóak, ami alapvetően eltérő koordinációs kémiai sajátságot eredményez réz(II) jelenlétében. A tren-származék (L8) esetén ekvimoláris oldatokban és a semleges pH tartományban bisz-hisztaminszerű koordinációval rendelkező komplexek képződnek. Ugyanakkor az nta-alapú ligandumnál (L9) széles pH-tartományban egy a glicil-hisztidinhez hasonló szerkezet16 alakul ki (15. ábra). Mindkét esetben szabad donorcsoportok állnak rendelkezésre további fémionok megkötésére, így fémion felesleg mellett 3/2 illetve 2/1 fém/ligandum arányú komplexek képződnek.



15. Ábra A Cu(II)-L⁸ és –L⁹ 1/1 és 3/2 fém/ligandum arányú rendszerekben pH 8-9 körül domináns komplexek sematikus szerkezete

Magasabb pH-n, ahogy az a peptidek rézkomplexeinél szokásos, az amid-nitrogének is részt vesznek a koordinációban.

A koordinációs kémiai sajátságok tisztázása után vizsgáltuk a réz(II)-L⁸/L⁹ rendszerek pirokatechin oxidáz aktivitását. Előzetes eredményeinkből kitűnt, hogy a többmagvú komplexek mindkét esetben nagyobb aktivitással bírtak, de csak az nta-származéknál (L⁹) volt jelentős ez az aktivitás növekedés az egymagvú komplexekhez képest. A 16. ábra a telítési kinetikai eredményeket hasonlítja össze az adott rendszerre optimális körülmények között. А Michaelis-Menten modell alapján számolt paraméterek (16. ábra) szerint az nta-származék (L9) kétmagvú rézkomplexe kb. hatszor hatékonyabb mint a hárommagvú Cu(II)-L⁸ komplex. Eredményeink szerint ez jórészt annak köszönhető, hogy a hárommagvú Cu(II)-L⁸ komplexben a fémcentrumok nagyobb távolsága miatt azok izoláltan működnek, míg a kétmagvú komplex kisebb réz-réz távolsága a fémcentrumok közötti kooperációt is lehetővé teszi.



16. Ábra A H₂dtbc oxidáció kezdeti sebességének függése a H₂dtbc koncentrációjától a Cu(II)-L⁸/L⁹ rendszerekben. Cu(II)-L⁸ (\square , [Cu]/[L⁷] = 3/1, [L⁸]_{tot} = 10^{\square 5} M, pH = 7.8); Cu(II)-L⁹ \blacksquare , [Cu]/[L⁸] = 2/1, [L⁹]_{tot} = 10^{\square 5} M, pH = 9.0)

5. Összefoglalás

Egyszerű tripodális platformok (tren, tach, nta) moduláris funkcionalizálása lehetőséget teremt a koordinációs kémiai sajátságok, a képződő komplexek összetételének, szerkezetének, stabilitásának finomhangolására. Ezek ugyanakkor alapvetően meghatározzák a komplexek katalitikus sajátságait, így tervezhetővé válnak olyan enzimszerű tulajdonságok, mint a katalitikus aktivitás pH-függése, a katalitikus fémion megkötődésének alloszterikus kontrollja, vagy a fémionok kooperációja.

Hivatkozások

- Itoh, T.; Hisada, H.; Sumiya, T.; Hosono, M.; Usui, Y.; Fujii, Y., *J. Inorg. Biochem.* 2007 101, 348-361. http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.10.011
- Fujii, Y.; Kiss, T.; Gajda, T.; Tan, X.S.; Sato, T.; Nakano, Y.; Hayashi, Y.; Yashiro, M., *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2002, 7, 843-851 https://doi.org/10.1007/s00775-002-0368-9
- Krämer, R.; Gajda, T.; "Functional Model Complexes for Dinuclear Phosphoesterase Enzymes", *in Perspectives on Bioinorganic Chemistry;* ed. Hay, R. W.; Dilwoth, J. R.; Nolan, K., JAI Press Inc.: Stamford, Connecticut, **1999**, vol. 4, pp 207-240.

https://doi.org/10.1016/s1062-239x(99)80032-7

- 4. Hegetschweiler, K., *Chem. Soc. Rev.*, 1999, *28*, 239-249. https://doi.org/10.1039/a802638f
- Gajda, T.; Düpre, Y.; Török, I.; Harmer, J.; Schweiger, A.; Sander, J.; Kuppert, D.; Hegetschweiler, K., *Inorg. Chem.* 2001, 40, 4918?4927.
 - https://doi.org/10.1021/ic0005902
- Jancsó, A.; Mikkola, S.; Lönnberg, H.; Hegetschweiler, K.; Gajda, T., *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 5404-5415. https://doi.org/10.1002/chem.200305149
- Jancsó, A.; Mikkola, S.; Lönnberg, H.; Hegetschweiler, K.; Gajda, T., *J. Inorg. Biochem.*, 2005, 99, 1283-11293. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.02.027
- 8. Jancsó, A.; Török, I.; Hegetschweiler, K.; Gajda, T.; *ARKIVOC* **2009**, *Part 3*, 217-224.
- Paksi, Z.; Jancsó, A.; Jakab, N.; Gyurcsik, B.; Rockenbauer, A.; Gajda, T., *Dalton Trans.*, 2005, 19, 3187–3194. http://dx.doi.org/10.1039/b507655b

Biomimetic complexes of polidentate tripodal ligands

In order to create highly efficient low molecular weight enzyme mimics, recently synthesized several we new tris(2-aminoethyl)amin (tren), cis,cis-1,3,5-triaminocyclohexane (tach) and nitrilotriacetic acid (nta) based tripodal ligands possessing quite different coordination properties. From the enzyme mimetic point of view, the tripodal ligands have several advantages over the linear and even macrocyclic ligands. These ligands have enhanced chelate effect, and preorganized structure (reduced number of relevant binding conformations) resulting higher stability of the complexes. Tripodal ligands enforce 'facial' metal binding and (partly) enclose the metal ion, similarly to metalloenzymes. By adequate substitution of the tripodal platform it is possible to fine tune the metal binding ability by varying the number and type of donor atoms. Designed substituents may also directly influence the steric environment around the metal centre or may provide additional metal binding site, inducing metal-metal cooperation during the catalytic cycle.

Earlier, we reported that the copper(II) complexes of *cis,cis*-1,3,5-triaminocyclo-hexane (tach, L^1) is an efficient metallopeptidase mimic. Tach is an excellent platform to create tailored properties of metal complexes, too. The dinuclear Cu(II) and Zn(II) complexes of *cis,cis*-1,3,5-tris (dimethylamino)-2,4,6-trihydroxycyclohexane (tdci, L^2) provide outstanding rate acceleration for the hydrolysis of phosphodiesters, but possess considerably lower efficiency toward the hydrolysis of phosphomonoesters. The related monomethylated ligand (tmci, L^3) is less rigidly preorganized due to the decreased intraligand repulsions between the methylamino groups, which strongly influences the properties of its metal complexes. Indeed, in contrast to tdci, the dinuclear Cu(II) complexes of tmci do not promote the hydrolysis of phosphodiesters, but allow selective cleavage of phosphomonoesters.

We also prepared several N-substituted derivatives of tren, tach and nta. Since the pyridine nitrogens in L^4 and L^5 are not able to coordinate the metal ion bound to the tripodal units, the ML

- Paksi, Z.; Jancsó, A.; Pacello, F.; Nagy, N.V.; Battistoni, A.; Gajda, T., *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, *102*, 1700-1710. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.04.007
- Kolozsi, A.; Jancsó, A.; Nagy, N.V.; Gajda, T., *J. Inorg. Biochem.* 2009, *103*, 940–947. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.04.006
- Árus, D.; Jancsó, A.; Szunyogh, D.; Matyuska, F.; Nagy, N.V.; Hoffmann, E.; Körtvélyesi, T.; Gajda, T., *J. Inorg. Biochem.* 2012, *106*, 10–18. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.029
- Árus, D.; Nagy, N.V.; Dancs, Á.; Jancsó, A.; Berkecz, R.; Gajda, T., J. Inorg. Biochem. 2013, 126, 61–69. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.05.015
- Árus, D.; Dancs, Á.; Nagy, N.V.; Gajda, T., *Dalton Trans.*, 2013, 42, 12031-12040. https://doi.org/10.1039/c3dt50754h

complexes have similar structure to the corresponding complexes of tren and tach. At higher pH mixed hydroxo complexes are formed. The presence of pyridine rings in L^5 hinder the formation of the dihydroxo bridged dinuclear complex observed in the Cu(II)-tach system. The species Cu L^5 (OH) is an active catalyst for the hydrolysis of phosphodiesters.

Since the pyrazole nitrogens in L^6 and L^7 ligands are in chelating positions, these ligands form stable 5/6N coordinated ML complexes with Cu(II) and Zn(II). In the cases of both ligands, the pyrrole nitrogens of the Cu(II)-bound pyrazole rings create a further metal binding site via pyrazolato bridges, and thus tricopper complexes are formed. The formation of $Cu_3H_4L_2$ species even in equimolar solution is noteworthy, and can be regarded as a pH-driven spontaneous self-assembly. In the crystal structure of $[Cu_3H_4(L^6)_2](ClO_4)_23H_2O$ the two outer copper(II) are 5N coordinated in square pyramidal geometry, while the central copper(II) is bound to four deprotonated pyrrolic nitrogens in tetrahedral geometry. The tricopper complexes of both ligands are highly active catecholase mimics working at surprisingly low pH (5-7). Since the mononuclear CuL^{6/7} species do not show catecholase activity, we assume that the central tetrahedral copper(II) ion has fundamental role in the catechol binding and oxidation.

The presence of C- and N-terminal histidines in the two tripodal peptide derivatives (L^8 and L^9) results in basically different structures in their copper(II) complexes. In the neutral pH range, the mononuclear Cu(II) complexes of L^8/L^9 have Gly-His-like/*bis*-histamine-like coordination mode, respectively. In both cases the loosely bound or non-coordinating donor groups create a further metal binding site, therefore dinuclear (L^9) and trinuclear (L^8) complexes are formed. Above pH 7, the oligonuclear complexes of both L^8 and L^9 have efficient catecholase-like activity, but the cooperation of the metal centres is operating only in the latter case.

Potenciálisan rákellenes hatású platinafémionok kölcsönhatása hidroxámsavakkal és származékaikkal

BUGLYÓ Péter^{a,*} és FARKAS Etelka^a

^aDebreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Egyetem tér 1., 4032 Debrecen, Magyarország

1. Bevezetés

A rákellenes hatású fémkomplexek fontos területet jelenthetnek a kór kezelésében, hiszen ezen vegyületek tulajdonságai (geometria, összetétel, töltés, termodinamikai stabilitás, ligandumcsere folyamatok, redoxi tulajdonságok stb.) széleskörűen szabályozhatók a központi fémion(ok) és a ligandumok módosításával. A jelenleg használt terápiás szerek között a síknégyzetes, *d*⁸ Pt(II) komplexek (1. ábra) kiemelkedő jelentőségűek elsősorban egyes szaporítószervi daganatok kezelésében. Ugyanakkor az alkalmazás során gyakran lépnek fel súlyos mellékhatások és alakul ki sejtrezisztencia, ami azzal magyarázható, hogy ezek a vegyületek nem szelektívek, nem csak a rákos sejtekben fejtik ki hatásukat.^{1,2}



1. Ábra. A rákterápiában alkalmazott néhány platina(II) komplex szerkezeti képlete.

Alternatívát jelenthetnek az utóbbi évtizedekben a kutatás előterébe került egyéb platinafémion-tartalmú komplexek.^{3,4} Ezek egy jellegzetes csoportját képviselik az un. félszendvics szerkezetű, fémorganikus [(η6-arén)M(XY)Z] (arén = aromás ligandum; M = Ru(II), Os(II)) és $[(\eta^5-Cp)M(XY)Z]$ (Cp = ciklopentadienil; M = Rh(III), Ir(III), XY = kelátképző, Z = egyfogú ligandum) összetételű vegyületek (2. ábra). Ezeknek a komplexeknek jellegzetes, "zongoraszék" geometriájuk van; a hexa- vagy pentahapto koordinációjú arén vagy arenil ligandum mellett még három koordinációs helyre köthetnek donoratomok. A π-donor aromás rendszer egyrészt stabilizálja a fémion kis oxidációs állapotát, másrészt felelős a komplex hidrofób jellegéért, ami megfelelő molekuláris felismerést és így nagyobb biológiai hatékonyságot eredményezhet.^{5,6} A három koordinációs helyből kettőt általában egy (N,N), (N,O) vagy (O,O) donor kelátképző ligandum foglal el és a komplex biológiai hatásáért lehet felelős, míg a harmadik helyen egy egyfogú ligandum, például kloridion lehet. Utóbbi, oldatban könnyen vízmolekulára cserélődhet, így ez tekinthető a vegyület reaktív helyének.5,6



2. Ábra. Félszendvics típusú platinafém komplexek sematikus szerkezete.

Az R₁C(O)N(R₂)OH általános összetételű hidroxámsavak régóta ismert, fontos biológiai hatású vegyületcsalád. Az R1 alkil- vagy arilcsoportot jelölhet, míg $R_2 = H$ esetén primer, R₂ = alkil- vagy arilcsoport esetén szekunder hidroxámsavakról beszélünk. Előbbi ligandumok az NH deprotonálódása után a nitrogénen keresztül is képesek fémion-megkötésre, hidroximáto komplexeket kialakítva. A fémion-megkötőhely azonban az OH-csoport fő deprotonálódása után a két O-donoratom, melyek nagy stabilitású, öttagú hidroxamáto kelátot alakítanak ki a fémionokkal. Ezzel a kiváló komplexképző tulajdonsággal értelmezhető a hidroxámsavak jelentős biológiai szerepe. Így ezek a ligandumok fontos szerepet játszanak az alacsonyabb rendű élőlények fémion- (Fe3+) felvételében és szállításában: a sziderofórok egyik családját is alkotják.7 A hidroxámsavak emellett hatékony inhibítorai számos fémiontartalmú biokatalizátornak, metalloenzimnek is. A hiszton-deacetiláz enzimek gátlására képes hidroxámsavak közül például a szuberoilanilid-hidroxámsavat (SAHA, 3. ábra) rákellenes szerként alkalmazzák elsősorban T-sejtes non-Hodgkin limfómák kezelésére.8



3. Ábra. A szuberoilanilid-hidroxámmsav (SAHA) szerkezeti képlete.

A Debreceni Egyetem Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában a több évtizedes oldategyensúlyi tapasztalatokra támaszkodva valamint az utóbbi évtizedben kialakított preparatív infrastruktúra segítségével, egyebek mellett, a 2. ábrán látható, potenciálisan rákellenes hatású

^{*} Tel.: +36 52/512900/22305 ; fax: +36 52/xxxxxx ; e-mail: buglyo@science.unideb.hu.

komplexeket képező fémionok kölcsönhatását vizsgáljuk különböző típusú bioligandumokkal. Oldategyensúlyi kutatásaink a fenti fémionok hidrolízis folyamatainak részletes feltérképezését, a ligandumokkal képződő komplexek összetételének, szerkezetének és stabilitásának vizsgálatát jelentik, míg a szilárd formában előállított és jellemzett komplexek biotranszformációs folyamatainak a tanulmányozása a szerkezet-biológiai hatás összefüggések megismerését segítheti.

Mivel a hidroxámsavak egyes képviselői bizonyítottan rákellenes hatásúak az utóbbi közel egy évtizedben szisztematikus vizsgálatokat végeztünk, egyebek mellett, ezen ligandumok és származékaik valamint a 2. ábrán bemutatott, ugyancsak jelentős biológiai potenciállal rendelkező platinafémionok közötti kölcsönhatások felderítésére. Ez a munka a területen már közölt eredményeinket összegzi.⁹⁻¹⁸

2. Monohidroxámsavak kölcsönhatása félszendvics szerkezetű platinafémionokkal

2.1. Komplexképződés szilárd fázisban

A fémion-ligandum kölcsönhatások feltérképezésére, a képződő vegyületek molekulaszerkezetének megismerésére, a jelenlévő egyéb segédligandumok a képződő komplexek szerkezetére, nuklearitására, stabilitására gyakorolt hatásának megértésére számos platinafém-hidroxamátot állítottunk elő és jellemeztünk szilárd fázisban különböző analitikai módszerekkel.

Eredményeink szerint a relatíve könnyen hozzáférhető $[(\eta^6 - p - \text{cym})\text{MCl}_2]_2 \quad (\text{M} = \text{Ru},$ Os: *p*-cvm 1-metil-4-izopropilbenzol) vagy $[(\eta^5-Cp^*)MCl_2]_2$ (M = Rh, Ir) prekurzorokból illetve az ezekből nyerhető triflát vagy nitrát sókból metanolban, bázis jelenlétében jó hozammal állíthatók elő a monohidroxamát komplexek. Abban az esetben, ha nem vagy csak gyengén koordinálódni képes egyéb ligandum van a reakcióelegyben mind primer mind monohidroxámsavakkal kétmagvú, szekunder 2.2 tapasztaltuk.9,10 összetételű komplexek képződését Példaként a 4. és 5. ábrán egy benzohidroxamáto és egy N-metilacehidroxamáto komplex egykristály röntgendiffracióval meghatározott molekulaszerkezetét tüntettük fel. Látható, hogy a ligandumok a karbonil oxigénjükkel egy-egy fémionhoz kapcsolódnak, míg a hidroxamát oxigének hídként kötik össze a két fémcentrumot telítve ezáltal azok koordinációs szféráját. A fémion és karbonil-O közötti kötéstávolságok egyértelműen kisebbek, mint a fémion hidroxamát-O értékek.9,10

Egyéb, erősebb koordinációra képes egyfogú ligandumok jelenlétében úgy változik a képződő komplexek szerkezete, hogy a hidroxamátok öttagú (O,O) kelátot alakítanak ki és a harmadik koordinációs helyre az egyfogú ligandum lép be. A fentebb írottakra szolgáltat példát az $[(\eta^6-p-cym)Os(meaha)Cl]$ (6. ábra) és a $[(\eta^6-p-cym)Ru(bha)(py)]CF_3SO_3$ (7. ábra) molekulaszerkezete, melyekben egy kloridion vagy piridin (py) koordinálódásával semleges illetve kationos, zongoraszék szerkezetű komplexek képződtek.¹⁰



4. Ábra. A $[(\eta^6-p-cym)Ru(\mu-bha)]_2^{2+}$ kation szerkezete.



5. Ábra. A $[(\eta^6-p-cym)Ru(\mu-meaha)]_2^{2+}$ kation szerkezete.



6. Ábra. A $[(\eta^6-p-cym)Os(meaha)Cl]$ molekulaszerkezete.



7. Ábra. A $[(\eta^6 - p - \text{cym})\text{Ru}(\text{bha})\text{py}]^+$ kation szerkezete.

Primer hidroxamát-Os(II) reakcióelegyekből azonban nem tudtunk egységes terméket izolálni, amit a fémion kisebb redoxi stabilitásával értelmeztünk, összhangban a VO(IV)- vagy Fe(II)-hidroxamát rendszerekbeli már leírt redoxi folyamatokkal.^{19,20} Ezt a kisebb stabilitást támasztja alá annak a vegyes vegyértékű Os^{II}/Os^{VI} vegyületnek a képződése is, ami az $[(\eta^6-p\text{-}cym)Os(meaha)]_2(CF_3SO_3)_2$ aceton/hexán oldatából aerób körülmények között kristályosodott ki.10 А nvert $[{(\eta^6-p-cym)Os(meaha)}(m-O){OsO(meaha)_2}]CF_3SO_3$ komplexben a félszendvics szerkezetű Os egységben két koordinációs

helyet egy hidroxamát ligandum foglal el, míg a harmadik helyre kapcsolódó oxocsoport egy másik, oktaéderes Os=O centrumhoz is kötődik (8. ábra). Itt az axiális helyzetű oxocsoportok mellett további két hidroxamát (O,O) kelát van jelen az Os(VI) koordinációs szférájában.¹⁰



8. Ábra. A $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-}cym)Os(meaha)\}(\mu\text{-}O)\{OsO(meaha)_2\}]^+$ kation szerkezete.

2.2. Komplexképződés vizes oldatban

A félszendvics szerkezetű platinafémionok és a hidroxamát ligandumok közötti kölcsönhatást pH-potenciometriás, NMR, UV-Vis és ESI-TOF-MS módszerek kombinált alkalmazásával tanulmányoztuk azért, hogy meghatározzuk a képződő komplexek összetételét, stabilitási szorzat értékeit és hogy javaslatot tegyünk azok legvalószínűbb oldatszerkezetére.

A számolásokhoz szükséges figyelembe venni a ligandumok protonálódási és a fémionok hidrolitikus folyamatait is. Utóbbi semmilyen irodalmi előzmény területen nem rendelkezésünkre a munka megkezdésekor, így részletesen tanulmányoztuk a modellül választott $[(\eta^6-p-cym)Ru(H_2O)_3]^{2+}$ kation hidrolitikus folyamatait 0,20 M klorid- illetve nitrátion ionerősség jelenlétében.9,12 Kimutattuk, hogy nitrátionok jelenlétében a pH növelésével kizárólag egy részecske, a $[{(\eta^6-p-cym)Ru}_2(m^2-OH)_3]^+$ képződik, melyben a két fémcentrumot három hidroxidion köt össze hídligandumként. 0,20 M KCl ionrősség mellett a 9. ábrán látható módon, pH = 2 esetén a fémion jelentős mértékben [(h⁶-p-cym)Ru(H₂O)₂Cl]⁺ és $[{(\eta^6-p-cym)Ru}_2(\mu^2-Cl)_3]^+$ formájában van jelen, majd a emelésével, a kloridionok cseréjével рH vegves klorido/hidroxido komplexek is megjelennek a rendszerben. A gyengén de koordinálódni képes kloridionok a nagyobb pH-k tartományába tolják a fémion teljes hidrolízisét, a $[{(\eta^6-p-cym)Ru}_2(\mu^2-OH)_3]^+$ komplex megjelenését.¹²



9. Ábra. A H⁺-[(η^6 -p-cym)Ru(H₂O)₃]²⁺-Cl⁻ rendszerben képződő részecskék koncentráció eloszlási görbéi, c_{Ru} = 2 mM, c_{KCl} = 0.20 M, t = 25.0 °C. "M" a [(η^6 -p-cym)Ru egységet jelöli.

További vizsgálatokkal azt is kimutattuk, hogy a hexahapto kötésmódú aromás rendszer elektronellátottságával, a benzolgyűrűhöz kapcsolódó szubsztituensekkel $[(\eta^6 - \operatorname{aren})\operatorname{Ru}(\operatorname{H}_2\operatorname{O})_3]^{2+}$ (aren = benzol, toluol, 1-metil-4izopropilbenzol, 1,3,5-triizopropilbenzol) kationok hidrolitikus sajátságai finomszabályozhatóak illetve, hogy a megfelelő 4d és 5d kationpárok ($[(\eta^6-p-cym)M(H_2O)_3]^{2+}M$ = Ru, Os; $[(\eta^5-Cp^*)M(H_2O)_3]^{2+}$ M = Rh, Ir) közül a nehéz platinafémek kationjai sokkal hajlamosabbak а hidrolízisre.13

A monohidroxámsavakat is tartalmazó rendszerekben a csak (O,O) koordinációra képes szekunder reprezentatívokkal (pl. meahaH) széles pH-tartományban jelenlevő stabil, 1:1 komplex képződését igazoltuk, amelyet pH 8,5 felett vegyes hidroxido komplex képződése követ (10. ábra).⁹



10. Ábra. A $[(\eta^6-p-cym)Ru(H_2O)_3]^{2^+}$ -meaha (A) rendszerben képződő részecskék koncentráció eloszlási görbéi, $c_{Ru} = c_{meaha} = 2 \text{ mM}$, I = 0.20 M (KCl), t = 25.0 °C. "M" a $[(\eta^6-p-cym)Ru \text{ egységet jelöli.}]$

Ugyanazen rendszerben a kölcsönhatás ¹H NMR-rel is kiválóan tanulmányozható volt. Ahogy azt a 11. ábra mutatja, pH 2,12-nél a két dublet, amelyek a fémionhoz kapcsolódó p-cimol izopropilmetil csoportjainak a jelei, két, az NMR időskálán lassú cserében álló részecskéhez tartozik. A független mérésekből ismert akvakomplex (1,32 ppm)¹² melletti új jel (1,26 ppm) a $[(\eta^6-p-\text{cym})\text{Ru}(\text{meaha})(\text{H}_2\text{O})]^+$ komplexhez rendelhető. A jel pH 8,0 felett a nagyobb térerősség irányába eltolódik, ami egy olyan új részecske képződésére utal, amely gyors cserében áll az $[(\eta^6-p-\text{cym})\text{Ru}(\text{meaha})(\text{H}_2\text{O})]^+$ -val és megfeleltethető [(n⁶-p-cym)Ru(meaha)(OH)]-nak. Az is megfigyelhető, hogy a $[{(h^6-p-cym)Ru}_2(\mu^2-OH)_3]^+$ -hoz tartozó dublet (1,20 ppm) csak pH 9,0 felett jelenik meg nagyobb mennyiségben; a ligandum tehát ezen rendszerben még 1:1 fémion-ligandum aránynál is hatékony fémionmegkötő.

Primer hidroxámsavak (pl. ahaH) esetén, ahol a hidroxamát-NH deprotonálódása is bekövetkezhet, azt tapasztaltuk, hogy vizes oldatban 1:1 komplexek feltételezésével ugyancsak jól leírhatók a pH-potenciometriás titrálási görbék, azonban a $pK_{[(\eta^6,p-cym)Ru(aha)(H2O)]^+} = 6,69$ értéke (meahaH esetén ez az érték 9,37), továbbá a rendszerben potenciometriás és NMR módszerrel is kimutatható $[(h^6-p-cym)Ru(ahaH_1)(OH)]^-$ jelenléte arra utal, hogy a komplexképződés másképpen történik mint a szekunder hidroxamáttal. A fenti adatok és a DFT számítások eredményei

alapján a formálisan [(η^6 -*p*-cym)Ru(aha)(OH)] összetételű részecske képződése a primer hidroxamáttal azért kedvezményezett, mert így stabil intermolekuláris H-kötés tud kialakulni a komplexben (11. ábra). A pH további növelésével, a H-kötés felbomlásával [(η^6 -*p*-cym)Ru(ahaH_1)(OH)]⁻ jön létre az erősen lúgos pH tartományban; megállapítható tehát, hogy a primer hidroxámsav kiváló komplexképzője ezen fémionnak.¹⁷



11. Ábra. A $[(\eta^6$ -*p*-cym)Ru(H₂O)₃]²⁺-meaha rendszer pH-függő NMR spektrumainak alifás tartománya, c_{Ru} = c_{meaha} = 2mM, I = 0.20 M (KCl), t = 23 °C.



12. Ábra. A $[(\eta^6-p\text{-}cym)Ru(H_2O)_3]^{2^+}$ -aha rendszerben képződő komplexek javasolt oldatszerkezete.

2.3. A komplexek antiproliferatív tulajdonságai

A szilárdan előállított komplexek közül néhánnyal biológiai teszteket is végeztünk ráksejt vonalakon, meghatározva a vegyületek IC50 értékeit. Eredményeink azt mutatták, hogy az alkalmazott A2780 és A2780cisR (ciszplatin rezisztens) sejtvonalaton a megvizsgált komplexek nem mutattak antiproliferatív hatást a vizsgált 0-200 µM koncentráció tartományban.9 A negatív eredmények azzal értelmezhetőek, hogy bár nagy stabilitású komplexek képződnek fiziológiás pH-n a rendszerekben, ami megakadályozza a biológiailag $[{(\eta^6-p-cym)Ru}_2(\mu^2-OH)_3]^+$ inaktív jelentősebb koncentrációban való megjelenését, a képződő 1:1 összetételű komplexek kinetikai inertsége valószínűleg nem megfelelő, így már azelőtt részt vesznek biotranszformációs reakciókban, mielőtt a célsejteket elérnék.

3. Aminohidroxámsavak kölcsönhatása félszendvics szerkezetű platinafémionokkal

aminohidroxamátok olyan aminokarboxilátokból Az levezethető molekulák, amelyekben a karboxilátcsoport hidroxamátra van cserélve. Ezekben a kelátképző ligandumokban a hidroxamátcsoport oxigénjei mellett a hidroxamát-N és az aminocsoport részvételével egy további donoratompár is rendelkezésre áll fémionok megkötésére. Ahogyan az a 13. ábrán bemutatott, a vizsgálatainkban szereplő különböző aminohidroxamátok szerkezetén látható, a kialakuló (N,N) kelát gyűrűtagszáma és így stabilitása is szabályozhtó az összekötő lánc hosszának a változtatásával. Mivel az M-N (M = félszendvics vagy síknégyzetes szerkezetű platinafémion) kötés jóval inertebb az M-O kötésnél, azt feltételeztük, hogy így az aminohidroxamátokkal képződő platinafém komplexekben a ligandumcsere folyamatok sebessége kisebb lesz, ami megnövekedett biológiai aktivitást eredményezhet.

3.1. Komplexképződés oldatfázisban

A modellül választott $[(\eta^6-p-\text{cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ és a 13. ábrán bemutatott α-alahaH, β-alahaH illetve γ-abhaH közötti komplexképződési folyamatokről megállapítottuk, hogy mindhárom ligandum különböző protonáltsági fokú 1:1 és 2:1 fémion-ligandum arányú részecskéket képez (14. ábra); (N,N) koordinációjú ligandumot is tartalmazó az $[\{(\eta^6-p-cym)Ru\}_2(\mu^2-aminohidroxamátH_1)]^{2+}$ komplexionok stabilitása a $\gamma \to \alpha$ irányban nő. 18 A várakozásnak megfelelően, a ligandumok ezen sorrendjében, a komplexképződési folyamatok az aminocsoport jelenlétében jelentősen lelassultak, megbízható számszerű adatokat tartalmazó oldategyensúlyi modellt csak a g-abhaH rendszerében tudtunk számolni (reprezentatív példa a 14. ábrán látható).



13. Ábra. A vizsgált aminohidroxámsavak szerkezeti képletei.



14. Ábra. A $[(\eta^6-p-cym)Ru(H_2O)_3]^{2+}$ -g-abha (A) rendszerben képződő részecskék koncentráció eloszlási görbéi, $c_{Ru} = c_{g-abha} = 2 \text{ mM}, I = 0.20 \text{ M}$ (KNO₃), t = 25.0 °C. "M" a $[(\eta^6-p-cym)Ru \text{ egységet jelöli.}$

Az ¹H NMR spektrumok a 2,0 < pH < 7,0 tartományban konzisztensek voltak a koncentráció eloszlási görbékkel, ennél lúgosabb minták esetén azonban, azok összetett volta, nem tette lehetővé a jelek teljes hozzárendelését. Ugyanakkor az egyensúlyi modellekben szereplő egyes részecskeféleségekre ESI-TOF-MS technikával nyert mért és számított m/z értékek kiváló egyezése (1. táblázat) is alátámasztotta a felállított oldategyensúlyi modellt. Függetlenül a nitrogének részvételével kialakuló (N,N) kelátgyűrűk tagszámától mindhárom aminohidroxamát kiváló liganduma a fémionnak és hatékonyan képes megakadályozni annak hidrolízisét fiziológiás pH-n.¹⁸

Récsecske	m/z (mért)	m/z (számított)
$[(\eta^6-p-cym)RuCl]^+$	270.980	270.982
$[(\eta^6-p-cym)Ru(\alpha-alaha)]^+$	339.069	339.064
$[((\eta^6\text{-}p\text{-}cym)Ru)_2(\alpha\text{-}alahaH_{-1})]^{2+}$	286.535	286.536
$[((\eta^6\text{-}p\text{-}cym)Ru)_2(\alpha\text{-}alahaH_{-1})_2] + H^+$	677.150	677.123
$[((\eta^6\text{-}p\text{-}cym)Ru)_2(\alpha\text{-}alahaH_{-1})_2] + K^+$	715.109	715.078
$[(\eta^6-p-cym)Ru(\beta-alaha)]^+$	339.059	339.064
$[(\eta^6-p-cym)Ru(\beta-alahaH_{-1})] + K^+$	377.014	377.020
$[((\eta^6\text{-}p\text{-}cym)Ru)_2(\beta\text{-}alahaH_{-1})_2] + H^+$	677.117	677.123
$[((\eta^6\text{-}p\text{-}cym)Ru)_2(\beta\text{-}alahaH_{-1})_2] + K^+$	715.071	715.078
$[(\eta^6-p-cym)Ru(\gamma-abha)]^+$	353.075	353.080
$[((\eta^6\text{-}p\text{-}cym)Ru)_2(\gamma\text{-}abhaH_{-1})(Cl)]^+$	623.051	623.056
$[((\eta^6\text{-}p\text{-}cym)Ru)_2(\gamma\text{-}abhaH_{-1})_2] + H^+$	705.149	705.154
$[((\eta^{6}-p-cym)Ru)_{2}(\gamma-abhaH_{-1})_{2}] + K^{+}$	743.104	743.110

1. Táblázat. A $[(\eta^6-p\text{-}cym)Ru(H_2O)_3]^{2+}$ -aminohidroxamát rendszerekben detektált részecskék mért és számított m/z értékei 1:1 fémion ligandum aránynál.

3.2. Komplexképződés szilárd fázisban

Az oldategyensúlyi modellben, különösen az a-alahaH rendszerben domináns $[{(\eta^6-p-cym)Ru}_2(\mu^2-a-alahaH_{-1})]^{2+}$ részecske stabilitásának, pontos kötésmódjának és molekulaszerkezetének а megismerésére néhány komplexet aminohidroxamát szilárd fázisban is előállítottunk és különböző analitikai módszerekkel karakterizáltunk. Az egykristályként is megvizsgált $[{(\eta^6-p-cym)Ru}_2(\mu^2-\alpha-alahaH_1)(H_2O)Br]Br•H_2O$ és $[{(\eta^6-p-cym)Ru}_2(\mu^2-\alpha-alahaH_{-1})(H_2O)Cl]BF_4\bullet H_2O$ molekulaszer-kezete a 15. és 16. ábrán látható.¹⁸



15. Ábra. A [{($\eta^6\text{-}p\text{-}cym)Ru$ }_2($\mu^2\text{-}á\text{-}alahaH_{\text{-}1})(H_2O)Br]Br{\bullet}H_2O$ molekula-szerkezete.



16. Ábra. A [$\{(\eta^6\text{-}p\text{-}cym)Ru\}_2(\mu^2-\alpha\text{-}alahaH_1)(H_2O)Cl]BF_4\bullet H_2O$ molekulaszerkezete.

Mindkét komplexben a ligandum egy fémionhoz hidroxamát (O,O) kelátot képezve, míg a másikkal a hidroximáto–N és az aminocsoport részvételével koordinálódik. Az (N,N) kelát mellett a fémion harmadik koordinációs helyét egy halogenidion, míg az (O,O) kelátok kiegészítéseként egy-egy vízmolekula foglalja el.

3.3. A komplexek antiproliferatív tulajdonságai

A szilárd formában jellemzett kétmagvú aminohidroxamát komplexek antiproliferatív hatását is megvizsgáltuk A2780, MCF-7, SKOV-3, HCT-116 és HeLa ráksejt vonalakon. A biológiai tesztek eredményei alapján a komplexek nem mutattak citotoxicitást a vizsgált 0-200 mM koncentráció tartományban.¹⁸ Az inaktivitás alapján feltételezhető, hogy az aminocsoport által biztosított kinetikai inertségnövekedés még nem megfelelő, a vizsgált kétmagvú komplexek oldatbeli átalakulása hamarabb megtörténik, mint ahogy hatásukat ki tudnák fejteni.

4. Összefoglalás

A jelenleg a rákterápiában alkalmazott Pt(II) komplexek mellékhatásai illetve a gyakran kialakuló sejtrezisztencia miatt intenzív kutatómunka folyik szelektívebb, kisebb dózisban is hatékony, kevesebb mellékhatással rendelkező fémion-tartalmú szerek kifejlesztésére. Fontos alternatívát egyéb platinafém jelenthetnek olyan vegyületek, amelyekben a fémion bizonyítottan bioaktív kis oxidációs állapota fémorganikus vegyületként arén vagy arenil ligandummal stabilizálható. Ezek a komplexek a szervezetben biotranszformációs reakciók során átalakulhatnak, így a megfelelő $[(\eta^6 \text{-arén})M(H_2O)_3]^{2+}$ (M = Ru, Os) vagy $[(\eta^{5}-Cp^{*})(H_{2}O)_{3}]^{2+}$ (M = Rh, Ir) kationok, mint modellek. komplexképződési folyamatainak tanulmányozása fontos információkkal szolgálhat a szerkezet-biológiai hatás összefüggések feltérképezésében.

Az $R_1C(O)N(R_2)OH$ összetételű hidroxámsavak egyes képviselői, például a hiszton deacetiláz inhibítor SAHA, ugyancsak rákellenes hatásúak. Munkánk célja a két bioaktív egység összekapcsolásával új, platinafém-hidroxamát komplexek előállítása, jellemzése és oldatbeli viselkedésének a megismerése volt.

Mivel a fenti fémionok hidrolitikus tulajdonságaira vonatkozóan nem álltak rendelkezésre számszerű adatok az irodalomban, munkánk kezdetén részletesen tanulmányoztunk ezeket a folyamatokat. Megállapítottuk, hogy kloridionok távollétében egy trihidroxid-hidas kétmagvú részecske, [{(η^6 -arén)M}₂(μ^2 -OH)₃]⁺ (M = Ru, Os) képződik és van jelen pH 7-nél. I = 0,20 M KCl ionerősség jelenlétében, pH = 2 esetén, a fémionok [(η^6 -arén)M(H₂O)₂Cl]⁺ és [{(η^6 -arén)M}₂(μ^2 -Cl)₃]⁺ formájában vannak jelen, majd a pH emelésével, a kloridionok cseréjével vegyes klorido/hidroxido komplexek jelennek meg a rendszerekben; a teljes hidrolízist a kloridionok visszaszorítják.

Eredményeink alapján mind a primer mind a szekunder monohidroxamátok nagy stabilitású, 1:1 összetételű komplexeket képeznek vizes oldatban a fémionokkal, öttagú (O,O) kelátokat kialakítva. A primer hidroxamátokkal, ahol a hidroxamát-NH deprotonálódására is lehetőség van, belső hidrogén-híddal stabilizált részecskét azonosítottunk. Szilárd fázisban mindkét ligandumtípus olyan 2:2 sztöchiometriájú komplexeket képez a félszendvics szerkezetű fémionokkal, amelyekben a ligandumok karbonil-O-jei egy-egy fémionhoz kapcsolódnak, míg hidroxamát-O-jei hídként kötik össze a két egységet. Egyes Ru(II) és Os(II) komplexek citotoxikológiai vizsgálata A2780 és A2780cisR sejtvonalakon nem mutatta azok aktivitását, amit a komplexek nem megfelelőn nagy kinetikai inertségével értelmeztünk.

A vizsgált fémionokkal különböző méretű (N,N) kelát kialakítására is képes a-, b- és g-aminohidroxamátokkal az első két esetben lassú komplexképződési folyamatokat tapasztaltunk, összhangban az M-N kötés inertebb karakterével. Minden rendszerben kimutattuk, hogy a ligandumok egy második fémion megkötésével stabil $[M_2AH_{-1}]^+$ összetételű komplexeket is képeznek és hatékonyan képesek meggátolni a fémionok hidrolízisét a lúgos pH-tartományban. Az (O,O) és (N,N) kötésmódú kétmagvú komplexeket szilárdan is előállítottuk és egyebek mellett egykristály röntgendiffrakciós módszerrel jellemeztük. Különböző ráksejtvonalakon történt in vitro vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a mikromólos koncentráció tartományban a Ru(II) komplexeknek nincs jelentős citotoxikus hatása.

Köszönetnyilvánítás

A közleményben bemutatott munka az OTKA (K112317) és a COST CM1105 anyagi támogatásával készült. A szerzők köszönetet mondanak valamennyi társszerzőnek, elsősorban Dr. Bíró Lindának, Dr. Bényei Attilának, Dr. Denise Egan-nak és Prof. Jana Kasparkova-nak az eredményekhez való jelentős hozzájárulásukért.

Hivatkozások

- Jakupec, M.A.; Galanski, M.; Arion V.B.; Hartinger C.G.; Keppler, B.K. *Dalton Trans.* 2008, 183–194. https://doi.org/10.1039/B712656P
- 2. Florea, A-F.; Büsselberg, D. *Cancers* **2011**, *3*, 1351–1371. https://doi.org/10.3390/cancers3011351
- Yan, Y.K.; Melchart, M.; Habtemariam, A; Sadler, P.J. *Chem. Commun.* 2005, 4764–4776. https://doi.org/10.1039/b508531b
- 4. Süss-Fink, G. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 1673–1688 https://doi.org/10.1039/B916860P
- Bruijnincx, P.C.A.; Sadler, P.J. Adv. Inorg. Chem. 2009, 61, 1–62. https://doi.org/10.1016/S0898-8838(09)00201-3
- Gasser, G.; Metzler-Nolte, N. Curr. Op. Chem. Biol. 2012, 16, 84–91. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.01.013
- Griffith, D.; Devocelle, M.; Marmion, C.J. In Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry; Hughes, A.B.; Ed.; 2009; Vol. 2, pp 93–137.
- Mann, B.S.; Johnson, J.R.; Cohen, M.H.; Justice, R; Pazdur, R. *The Oncologist* 2007, *12*, 1247–1252. https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-10-1247
- 9. Buglyó, P.; Farkas, E. *Dalton Trans.* **2009**, 8063–8070. https://doi.org/10.1039/b908173a
- Godó, A.J.; Bényei, A.Cs.; Duff, B.; Egan, D.A.; Buglyó, P. *RSC Advances*, 2012, 2, 1486–1495. https://doi.org/10.1039/C1RA00998B
- Bíró, L.; Hüse, D.; Bényei, A.Cs.; Buglyó, P. J. Inorg. Biochem. 2012, 116, 116–125 https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.07.020
- Bíró, L.; Farkas, E.; Buglyó, P. *Dalton Trans.*, **2012**, *41*, 285–291 https://doi.org/10.1039/C1DT11405K
- Bíró, L.; Godó, A.J.; Bihari, Zs.; Garribba, E.; Buglyó P. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2013**, 3090–3100 https://doi.org/10.1002/ejic.201201527
- 14. Bíró, L.; Balogh, E.; Buglyó, P. J. Organomet. Chem., **2013**, 734, 61–68 https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2012.11.023
- Hüse, D.; Bíró, L.; Patalenszki, J.; Bényei, A.Cs.; Buglyó, P. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2014**, 5204–5216 https://doi.org/10.1002/ejic.201402559
- Patalenszki, J.; Bíró, L.; Bényei, A.Cs.; Muchova, T.R.; Kasparkova, J.; Buglyó, P. *RSC Advances*, **2015**, *5*, 8094–8107 https://doi.org/10.1039/C4RA15649H
- 17. Parajdi-Losonczi, P.L.; Farkas, E.; Buglyó, P. nem közölt eredmények
- Parajdi-Losonczi, P.L.; Bényei, A.Cs.; Kováts, É.; Timári, I., Radosova Muchova T.; Novohradsky, V.; Kasparkova, J.; Buglyó, P. J. Inorg. Biochem. 2016, 160, 236–245 https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.02.032
- Buglyó, P.; Pótári, N. *Polyhedron* 2005, 24, 837–845 https://doi.org/10.1016/j.poly.2005.03.007
- Farkas, E.; Enyedy, É.A.; Zékány, L.; Deák, Gy. J. Inorg. Biochem. 2001, 83, 107-114. https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)00197-5

Interaction between platinum metal ions with anticancer potential and hydroxamic acids or their derivatives

Platinum(II) complexes currently used in cancer therapy are known to have serious side effects and often drug resistance develops during the treatments. Therefore the development of novel metal complexes with higher selectivity and effectivity at even lower concentration is currently in the focus of intensive research. Half-sandwich type platinum metal complexes with promising antiproliferative potential represent an important option in this field. After administration these complexes may be involved in various biotransformation reactions therefore the study of the complex formation processes of $[(h^6-arene)M(H_2O)_3]^{2+}$ (M = Ru, Os) or $[(h^5-Cp^*)(H_2O)_3]^{2+}$ (M = Rh, Ir) cations as models can provide with valuable informations regarding structure-activity relationship.

Among other chelators, some representatives of the ligand family hydroxamic acids with $R_1C(O)N(R_2)OH$ general formula also exhibit proven anticancer activity. Suberoylanilid hydroxamic acid (SAHA) with histone deacetylase inhibitor activity, for example, is currently used in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. The aim of our work, therefore, was to incorporate these bioactive entities into one molecule with the synthesis and characterization of novel half-sandwich type hydroxamate complexes and to explore the composition and stability of the complexes formed in these systems under physiologically relevant conditions.

Since no information was available at the beginning of our work on the hydrolysis of the above model cations detailed solution equilibrium studes have been carried out in this field. It was found that in the absence of chloride ions a single hydrolytic product, $[{(\eta^6-\text{arene})M}_2(\mu^2-\text{OH})_3]^+$ (M = Ru, Os) with three bridging hydroxide ligands is present at pH = 7. Using 0.20 M KCl ionic strength, under acidic conditions beside the aquo complex, $[(\eta^{6}-\text{arene})M(H_{2}O)_{3}]^{2+},$ $[(\eta^6\text{-arene})M(H_2O)_2Cl]$ and $[\{(\eta^6\text{-arene})M\}_2(\mu^2\text{-Cl})_3]^+$ species could be identified. As it was proved by the combined use of pH-potentiometric, NMR and ESI-TOF-MS techniques, on increasing the pH the hydroxide ions are capable of replacing the chloride ligands resulting in the formation of $[\{(\eta^6\text{-arene})M\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$; chloride ions were shown to hinder the hydrolysis of the cations effectively. Regarding the electron donating effect of the hexahapto coordinating arene ligand, it was shown that there is a linear relationship between this capability (in the order of benzene < toluene < p-cymene < 1,3,5-triisopropyl-benzene) and the stability of the aquo complexes against hydrolysis allowing the fine tuning of the hydrolytic behavior of the half-sandwich type cations.

We have found that both primary and secondary monohydroxamates are capable of forming (O,O) chelated 1:1 complexes with high stability with the above metal ions in aqueous solution. Under basic conditions mixed hydroxo complexes were also identified. For primary hydroxamates where deprotonation of the hydroxamate-NH is also possible this species stabilized with an internal H-bonding was identified and above pH 10 a further deprotonation process resulting in the formation of [MAH₂] type complexes was detected. Both types of ligand family were shown to form 2:2 complexes with the half-sandwich type metal ions in the solid state. In these complexes carbonyl-O donors coordinate to one of the metal centres while the hydroxamate-O-s bridge the two units. With the osmium-containing half-sandwich core redox reactions were also found during wich partial oxidation of the metal ion with subsequent loss of the arene ring and formation of an oxo-bridged dinuclear Os^{II}/Os^{VI} hydroxamato complex was identified. Some of the Ru(II) and Os(II) complexes were screened against human-derived A2780 and A2780cisR (cisplatin resistant) cancer cell lines and showed no activity. This was interpreted with the low kinetic inertness of the complexes.

Regarding the amino derivatives of the hydroxamates having a terminal $-NH_2$ group in chelatable position to the hydroxamate-NH, formation of stable (O,O) and mixed (O,O)(N,N) chelated mono- and dinuclear species was found in partially slow with a alahaH and B alahaH or in fast processes with ă-abhaH over a wide pH-range indicating the generally more inert character of the M-N bond in these complexes. The presence of the latter $[M_2AH_1]^+$ type dinuclear species hindered effectively the hydrolysis of the metal ion under basic conditions and their stability showed a strong correlation with the size of the (N,N) chelates being the five membered one (α -alahaH) is the most stable. Stoichiometry of these complexes was also proven in the solid state by the determination of the crystal and molecular structure of $[{(\eta^6-p-cym)Ru}_2(\mu^2-\acute{a}-alahaH_1)(H_2O)Br]Br•H_2O$ and $[{(\eta^6-p-cym)Ru}_2(\mu^2-\dot{a}-alahaH_{-1})(H_2O)Cl]BF_4\bullet H_2O$. Test of these Ru(II) complexes for their in vitro cytotoxicity using human ovarian carcinoma (A2780), human breast cancer (MCF-7), human ovarian adenocarcinoma (SKOV-3), human colon carcinoma (HCT-116) or human cervix adenocarcinoma (HeLa) cell lines indicated no anti-proliferative activity in the micromolar concentration range.





22nd International Conference on Phosphorus Chemistry

8-13 July 2018, Budapest, Hungary

www.icpc22.mke.org.hu

icpc22@mke.org.hu

icpc22chairman@mail.bme.hu

Főszerkesztő: Sohár Pál

Szerkesztő: Huszthy Péter

Technikai szerkesztő: Molnár István

A szerkesztőség címe:

ELTE Kémiai Intézet, Általános és Szervetlen Kémiai Tanszék, 1117 Budapest, Pázmány sétány 1A; telefon: 372-2911, fax: 372-2592; e-mail: mkf@chem.elte.hu

Kiadó:

Magyar Kémikusok Egyesülete, 1015 Budapest, Hattyú u. 16. II/8.; Felelős kiadó: Androsits Beáta telefon: 201-6883; e-mail: androsits@mke.org.hu URL: http://www.mke.org.hu Internetes változat: http://www.mkf.mke.org.hu

Nyomda:

Europrinting Kft., 1201 Budapest, Vágóhíd u. 55.; telefon: 287-8495, 96; fax: 287-8497 Felelős vezető: Endzsel Ernő

Terjeszti a Magyar Kémikusok Egyesülete Előfizetési díj egy évre MKE tagoknak 1400,- forint, közületeknek 5000,- forint.

Közleményeink kivonatosan is csak a lapunkra való hivatkozással vehetők át.

Egyes cikkek teljes egészben való átvételéhez a szerkesztőség külön engedélye szükséges. A folyóiratot az MTMT indexeli, és a REAL archiválja.

> Index: 25.540 HU ISSN 1418-9933