

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**RÁKELLENES GALLIUM- ÉS PLATINAFÉM KOMPLEXEK
OLDATKÉMIÁJA, KÖLCSÖNHATÁSUK VÉRSZÉRUM-
FEHÉRJÉKKEL ÉS DNS-SEL**

DÖMÖTÖR ORSOLYA

Témavezető:

DR. ENYEDY ÉVA ANNA

egyetemi adjunktus



Kémia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

**Természettudományi és
Informatikai Kar,**

**Szervetlen és Analitikai Kémiai
Tanszék**

Szeged, 2014

I. BEVEZETÉS

A XX. és a jelen század egyik legnagyobb egészségügyi kihívása kétségtől a daganatos megbetegedések kezelése, gyógyítása. Az egyébként csak nevében egységes, de mind megjelenését, mind lefolyását tekintve változatos kórkép kezelésére többféle módszer áll rendelkezésre. Az adott tumor típusától, elhelyezkedésétől és előrehaladottságától függően sebészi eltávolítás, sugárkezelés, vagy gyógyszeres terápia, ill. ezek kombinációja jöhet szóba. Az utóbbi csoportba tartoznak a kemoterápiás szerek, a hormonterápia és az egyre sikeresebben alkalmazott immunterápia. Közel 40 éve alkalmazzák a ciszplatint (*cis*-[Pt(II)Cl₂(NH₃)₂]) a kemoterápiában. Igen hatékony, első vonalbeli szer az előrehaladott hererák, petefészekrák, fej- nyak-daganatok kezelésében. A ciszplatin alkalmazásának azonban határt szabnak a kezelés során szinte mindig fellépő súlyos, olykor tartós károsodást okozó mellékhatások. Másik limitáló tényező lehet a terápia során kialakuló rezisztencia. Az eddig forgalomba került két további származék, a karboplatin (*cis*-[Pt(II)(ciklobután-1,1-dikarbonsav)(NH₃)₂]) és az oxaliplatin ([Pt(II)((1R,2R)-1,2-ciklohexándiamin)oxalát]) részben jobb mellékhatásprofilal és más hatásspektrummal rendelkezik, mint a ciszplatin, a keresztrezisztencia azonban fennáll a hatóanyagok között. Ezért indokoltá vált további, más hatásspektrumú, enyhébb mellékhatásokkal rendelkező, rezisztenciát kivédő fémkomplexek kifejlesztése.

Az utóbbi években számos sikerrel kecsegtető ruténium-, gallium-, platina-, arany- és más központi fémionnal rendelkező komplexet állítottak elő és teszteltek *in vitro*, ill. *in vivo*. Klinikai szempontból is biztatóak a Ru(III) tartalmú KP1019 (HInd *trans*-[Ru(III)Cl₄(Ind)₂]; Ind = indazol) (ill. KP1339; az előbbi komplex Na-sója) és NAMI-A (HIm *trans*-[Ru(III)Cl₄(Im)(DMSO)]; Im = imidazol; DMSO = dimetil-szulfoxid) komplexek. Előbbi klinikai fázis I/II vizsgálatokban kolorektális daganatok kezelésében volt kiemelkedően hatásos, és a fellépő mellékhatások igen enyhék voltak. A NAMI-A *in vitro* ugyan hatástalan volt, de klinikai tesztelés során áttétképződést gátló hatásának bizonyult. A ruténiumkomplexek eredendően a ciszplatin mintájára kerültek kifejlesztésre. Sokáig elsődleges támadáspontjukként a DNS-t tartották számon. Mára egyre valószínűbb, hogy más, főként fehérje természetű támadáspontokkal is rendelkeznek.

A szintén klinikai tesztelés alatt álló KP46 ([*tris*-(8-kinolinolato)Ga(III)]) és [*tris*-maltolato-Ga(III)] (maltol = 3-hidroxi-2-metil-4H-pirán-4-on) komplexeknél már tisztán fehérje támadáspontokat feltételeznek. A fő támadáspont a ribonukleotid redukáz lehet, ami a DNS-szintéziséhez szükséges ribonukleotidok redukciójáért felel és a rákos szövetekben nagy mennyiségben van jelen a sejtekben. A tumorszelektivitás másik okaként azonban a szérumfehérjék szerepét feltételezik, akárcsak a Ru(III)-komplexek esetében. Ez a szelektív transzport egyfelől megvalósulhat a transzferrinen (Tf) keresztül. A Tf a szervezet fő vasszállító

fehérjéje, azonban képes más fémionok szállítására is. A szelektivitást a sejtek felgyorsult osztódása következtében fokozottan működő transzferrin receptor rendszer biztosítja. Másik fontos szállító fehérje a humán szérumban albumin (HSA), ami utóbbi vizsgálatok eredményei szerint szintén képes tumor szövetekben szelektíven felhalmozódni a rákos szöveteknél megfigyelhető szövetközi folyadék pangás miatt. Emellett kimutattak kifejezetten a rákos szövetekre jellemző érfalon keresztüli aktív transzport mechanizmusokat is. A transzportfehérjék továbbá elősegíthetik a hatóanyagok tartós jelenlétét a keringésben, megakadályozhatják azok idő előtti ürülését a szervezetből. Manapság sok esetben úgy módosítják egy-egy hatóanyag szerkezetét, hogy az elősegítse a szérumban fehérjéhez való kötődést.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Ahhoz, hogy egy hatóanyag által kifejtett hatást átfogó módon megérthessünk, szükséges annak feltérképezése, hogy az adott anyag milyen formában van jelen a test egyes vizeitereiben; milyen módon és formában kerül a sejtekhez; pontosan hol és hogyan fejt ki hatását; meddig tartózkodik a szervezetben és azután milyen utakon távozik. Különös jelentősége van az ilyen jellegű vizsgálatoknak a fémkomplexek esetében, amelyek a klasszikus szerves hatóanyagoktól eltérően sokkal szélsőségesebb változásokon mehetnek keresztül akár csak a vérbe való adagolás és a támadáspontig való eljutás folyamán. A fémkomplexek esetében általában kevés és hiányos információ áll rendelkezésre a fent említett mechanizmusokat illetően. A klasszikus oldategyensúlyi vizsgálatok is igen hasznosnak bizonyulhatnak számos farmakokinetikát illető kérdésben. A vérszérumban alkotókkal való kölcsönhatásvizsgálatok ugyanezen tulajdonságok szélesebb körű értelmezését segítik elő. További fontos lépés a lehetséges támadáspontok felderítése, tisztázása.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy a választott fémkomplexeket jellemezzük mind klasszikus oldategyensúlyi módszerekkel, mind pedig a vérszérumban található humán szérumban albuminnal, ill. transzferrinnel való kölcsönhatásuk szempontjából. Egyes esetekben a DNS-sel, mint lehetséges támadásponttal való kölcsönhatásokat is számba vettük. Vizsgálatainkat úgy választottuk meg, hogy azok illeszkedjenek az egyes komplexekkel eddig végzett kutatásokhoz, és szerves módon kiegészítsék, megmagyarázzák, esetleg megkérdőjelezzék azok eredményeit.

Ennek megfelelően készültek:

1. oldategyensúlyi vizsgálatok

- a.) a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]^{2+}$ kation (O,O), (O,N), ill. (O,S) donoratommokkal rendelkező ligandumokkal alkotott komplexeivel;

- b.) valamint a Ga(III)-ion oxinnal, szulfoxinnal, maltollal és tiomaltollal képzett komplexei esetében.
2. Vizsgálatuk a humán szérum albumin és
 - a.) a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]\text{-dhp}$ és -pikolinsav komplexe, ill.
 - b.) a Ga(III)-ion oxinnal és maltollal képzett komplexei, valamint
 - c.) néhány Pt(IV)/(II)-,
 - d.) néhány Ru(III)/(II)- és Os(II)-komplexek közötti kölcsönhatást; továbbá
3. a választott Ga(III)-komplexek esetében a transferrinnel való kölcsönhatást is számba vettük.
4. A DNS-sel, mint lehetséges támadásponttal való kölcsönhatást Ru(III)-szalán és Ru(II)-fenantrolin komplexek esetében vizsgáltuk.
5. A spektrofotometriás módszer kötési állandók meghatározásához való használhatóságát citotoxikus redukált Schiff-bázis kumarin származékok és az albumin reakciójának vizsgálatával teszteltük.

III. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Klasszikus oldategyensúlyi méréseket a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]\text{-}$ és a Ga(III)-komplexek, valamint a kumarin ligandumok esetén végeztünk. Fehérjékkel, vagy DNS-sel való kölcsönhatások vizsgálatakor a mérési körülményeket az adott rendszertől függően választottuk meg, de a pH mindig a fiziológiásnak ($\text{pH} = 7,40$) felelt meg.

pH-potenciometria

pH-potenciometriás vizsgálatokat a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]\text{-}$ és a Ga(III)-komplexek esetén végeztünk vizes közegben általában $25\text{ }^\circ\text{C-on}$ $0,20\text{ M}$ (KCl) ionerősség mellett. Végeztünk továbbá méréseket a Ga(III)-maltol, -oxin és -szulfoxin rendszereknél 30 , ill. 60% (m/m) DMSO/víz keverékoldószer elegyekben is. A ligandum deprotonálódási állandók (pK_a) meghatározásához HYPERQUAD programot, a komplex stabilitási szorzatok ($\lg\beta$) számolásához pedig PSEQUAD programot használtunk.

^1H NMR spektroszkópia

Elsősorban a speciáció alátámasztása érdekében használtuk a ^1H NMR spketroszkópiát a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]\text{-}$ és Ga(III)-komplexek vizsgálata esetén. A HSA-nal vagy apoTf-nel való kölcsönhatást a Pt(II)-, $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]\text{-}$, és Ga(III)-komplexeknél vizsgáltuk rutin $^1\text{H-}$ vagy STD (*saturation transfer difference*) NMR mérésekkel. A minták 10% (V/V) $\text{D}_2\text{O-t}$ és belső standardként $4,4\text{-dimetil-4-szilapentán-1-}$

szulfonsavat (DSS) tartalmaztak, és WATERGATE vízelnyomási pulzusszekvenciát használtunk. A Ga(III)-komplexek közül a KP46 komplexszel híg minták készültek: 20 μM fémkomplex és 5 μM HSA vagy 20 μM apoTf koncentrációkkal, ezeket a mintákat 600 MHz-es készüléken, krio mérőfejet alkalmazva vizsgáltuk. Kvantitatív kiértékeléshez a PSEQUAD programot használtuk.

UV-látható spektrofotometria

Klasszikus oldategyensúlyi mérésekhez a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ - és a Ga(III)-komplexek, valamint kumarin ligandumok vizsgálatához vettük igénybe. Az adott rendszertől függően fém-ligandum töltésátviteli sávokat, és/vagy ligandum sávokat követtünk. A mérésekből komplex stabilitási állandókat és/vagy ligandum savi disszociációs állandókat számoltunk a PSEQUAD programmal. Fotometriásan vizsgáltuk továbbá a Pt(II)-, Pt(IV)-, *bisz*-indazol-Ru(III)- és Ru/Os(II)-nitrozil komplexek hidrolitikus stabilitását. Bizonyos esetekben a fehérjékkel való kölcsönhatásról is közvetlen vagy közvetett információt kaptunk az UV-látható fotometriából. A Pt(IV)-komplexeknél a HSA Cys34-hez való kötődést vizsgáltuk közvetett módon 2,2'-ditioldipiridin (DTDP) segítségével.

Spektrofluorimetria

Spektrofluorimetriás technikával főként a makromolekula-kismolekula kölcsönhatásokat követtük. Ennek megfelelően készültek Trp kioltásos mérések a HSA I-es kötőhelyén való kölcsönhatás követésére, Tyr kioltásos mérések az apoTf-hez való kötődés követésére, valamint fluoreszcens markereket is felhasználtunk. Ezek a HSA esetében a warfarin (WF, I-es kötőhely), danzilglicin (DG, II-es kötőhely) és bilirubin (BR, I-es kötőhely) voltak. A DNS-sel való kölcsönhatást etidium-bromid (EB, interkakálódó marker), és 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, DNS kis árok) segítségével vizsgáltuk. A KP46 és Ru(II)-phen komplexek esetében a komplexek saját emisszióját is követtük. A Ga(III)-oxin rendszer esetében a pH-függő komplexképződés követésére és stabilitási állandó számolására is használtuk ezt a módszert. A vizsgálatok során egyensúlyi- (*steady-state*) és fluoreszcencia-élettartam méréseket (*time correlated single photon counting* üzemmódban) végeztünk. A méréseket rendszerint PSEQUAD programmal értékeltük ki.

Ultraszűrés

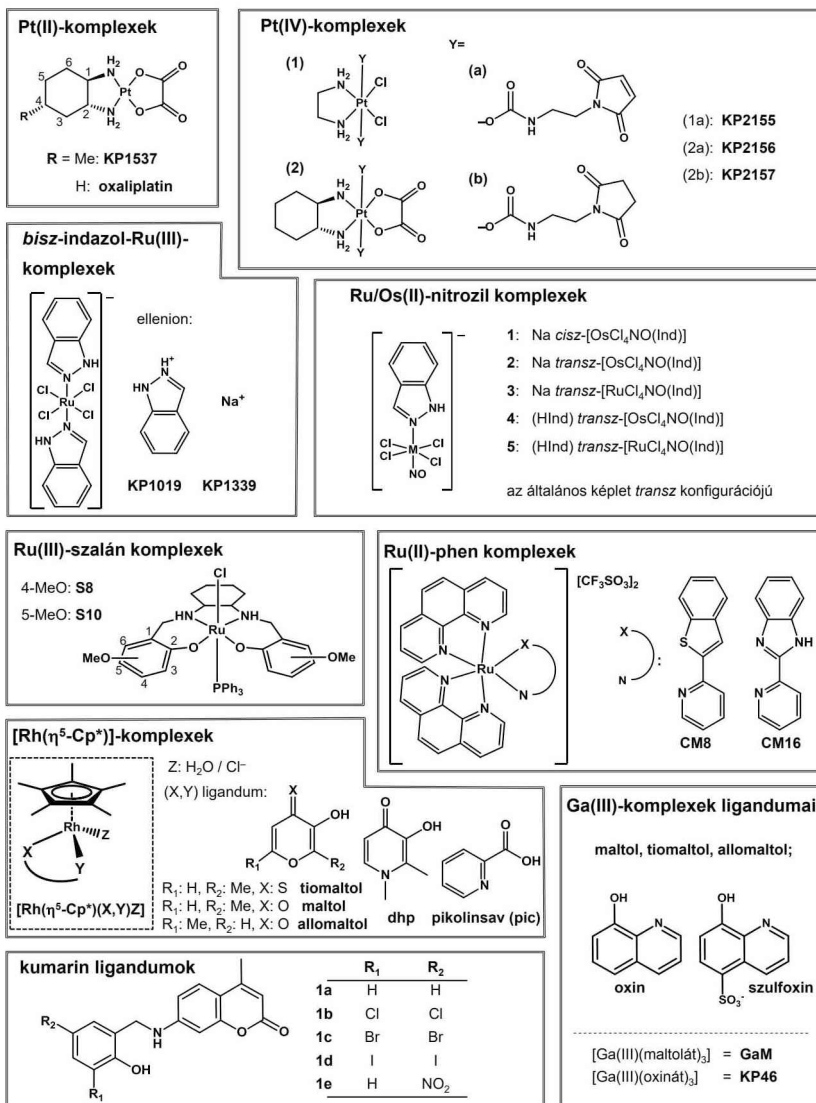
Az ultraszűrés során a makromolekulához (HSA) kötött és a szabad kismolekula frakciót megfelelő inkubálást követően membránszűrő segítségével választottuk el. A fehérjementes frakciókat spektrofotetriás-, fluorimetriás- vagy ICP-MS technikával vizsgáltuk.

Kapilláris zóna elektroforézis

Kísérleteink során a HSA és a *bisz*-indazol-Ru(III)- és $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -komplexek kölcsönhatását vizsgáltuk, melyre az adott lehetőséget, hogy a nagy móltömegű

fehérje és a hozzá kötött fémkomplex elektroforetikus mozgékonyága eltér a szabad fémkomplexétől (vagy háromkomponensű rendszerek esetén a kötőhely markerétől). A szabad fémkomplex, ligandum vagy marker csúcsmagasságát, ill. a csúcs alatti területét követtük méréseink kiértékeléséhez.

A dolgozatban vizsgált fémkomplexek, fém-ligandum rendszerek, ligandumok szerkezeti képletét és jelölését az 1. ábra tartalmazza.



[Rh(η⁵-Cp*)]-komplexek

Z: H₂O / Cl⁻
(X,Y) ligandum:

[Rh(η⁵-Cp*)(X,Y)Z]

R₁: H, R₂: Me, X: S tiomaltol
R₁: H, R₂: Me, X: O maltol
R₁: Me, R₂: H, X: O allomaltol

dhp pikolinsav (pic)

Ga(III)-komplexek ligandumai

maltol, tiomaltol, allomaltol;

oxin

szulfoxin

[Ga(III)(maltolát)₃] = GaM
[Ga(III)(oxinát)₃] = KP46

kumarin ligandumok

	R ₁	R ₂
1a	H	H
1b	Cl	Cl
1c	Br	Br
1d	I	I
1e	H	NO ₂

1. ábra. A dolgozatban vizsgált fémkomplexek, fémkomplex-ligandum rendszerek és ligandumok szerkezeti képlete és jelölésük.

IV. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Az oxaliplatin és a KP1537 vizsgálata

- 1.1. A fémkomplexek hidrolízisét UV-látható spektrofotometriásan követtük 25 °C és 37 °C hőmérsékleten, ill. 0; 23 és 100 mM NaCl valamint 13 mM NaHCO₃ jelenlétében. Kloridionok jelenlétében az eredeti komplexek bomlása gyorsabb a tiszta vizes közeghez viszonyítva, de még 100 mM kloridion koncentráció mellett is viszonylag lassú folyamat (> 4 nap).
 - A KP1537 kloridionok jelenlétében vizsgált bomlásakor sárga tűs kristályok jelentek a mintában, a képződő dikloridokomplex rossz vízoldhatósága miatt.
 - Ettől eltekintve a két fémkomplex hidrolitikus viselkedése nagyon hasonló volt.
- 1.2. A HSA-nal való kölcsönhatást STD-NMR, ultraszűrés–ICP-MS és fluorimetriás technikákkal követtük.
 - A fehérjéhez való kötődés igen lassú folyamat, 48 óra elteltével sem áll be az egyensúly.
 - Kloridionok jelenlétében fokozódott az oxaliplatin és a KP1537 albuminhoz való kötődése.
 - A két fémkomplex igen hasonló mértékben, mérsékelt affinitással kötődik a HSA-hoz.
 - A fémkomplexek kötődésekor sem az I-es sem pedig a II-es hidrofób kötőhely nem érintett az albuminon.
 - Más fehérjék szerepe is valószínű a Pt(II)-komplexek kötésében a humán szérummal végzett kísérletek alapján, ezek lehetnek az irodalmakban is említett γ -GL-ok.
- 1.3. Mindezen eredmények alapján a KP1537 oxaliplatinétól eltérő mellékhatás-profilja nem magyarázható a – farmakokinetikai paraméterekre közvetlenül kiható – hidrolízisbeli vagy szérum fehérjékhez való kötésbeli különbségekkel.

2. Maleimiddel kapcsolt Pt(IV)-komplexek kölcsönhatása HSA-nal

- 2.1. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a maleimid funkciós csoport révén képesek-e a KP2155 és KP2156 fémkomplexek a Cys34-hez kötődni a HSA-on. A kölcsönhatást közvetett spektrofotometriás technikával követtük [3].
 - Ehhez előzetesen megbízható módszert dolgoztunk ki a hozzáférhető Cys mennyiségének követésére.

- Rámutatunk arra, hogy a HSA a kisméretű SH-donoroktól (GSH, Cys) eltérően a DTDP reagenssel csak egyetlen szubsztitúciós lépésben reagál. A reakció lejátszódásához szükséges időt és körülményeket is optimalizáltuk.
- 2.2. Ezt követően közvetett módon megállapítottuk, hogy a KP2155 és K2156 komplexek az albuminnal 1:1 adduktumot képeznek, és a kötődés mértéke közel kvantitatív.
- 2.3. Az albuminhoz való kapcsolás a komplexek tartós jelenlétét biztosíthatja a véráramban.

3. Ruténium- és ozmiumkomplexek vizsgálata

3.1. A KP1019 és a KP1339 kölcsönhatása HSA-nal

3.1.1. Célunk a két fémkomplex albuminhoz való gyors, másodlagos kölcsönhatásokkal való kötődésének tanulmányozása volt spektrofotometriás, ultraszűrés–UV-látható és CZE technika felhasználásával [2].

- Ezen Ru(III)-komplexek kötődése a HSA-hoz gyors volt, percek alatt lejátszódott. Mindkét fémkomplex kötődik a fehérje I-es és II-es hidrofób zsebeiben. A kétféle kötőhelyhez való kötődésben nem találtunk jelentős affinitásbeli különbséget, a számolt állandók közepes értékek.
 - A két komplex közel azonos mértékben kötődött az egyes kötőhelyeken, tehát az ellenionok különbözősége nem befolyásolja a HSA-hoz való kötődést.
 - A fluorimetriás eredményeket CZE-sel és ultraszűréssel is alátámasztottuk. A közvetlen ultraszűréses vizsgálatok 2 ekvivalens komplex megkötődését mutatták az albuminon.
 - Kimutattuk továbbá a vizsgált Ru(III)-komplexek és a bilirubin (endogén metabolit) közti versengést az albumin I-es kötőhelyén; ennek klinikai jelentősége lehet, ugyanis a hiperbilirubinémiás betegek KP1019 komplexszel való kezelésekor a hatásosság rosszabb volt.
- 3.1.2. Vizsgálataink rámutattak arra, hogy a fémkomplexek a viszonylag lassan kialakuló koordinatív kötődését a fehérjén egy gyors, másodlagos kölcsönhatásokkal létrejövő kötődés előzi meg, ami már alkalmas lehet arra, hogy az idő előtti kiürüléstől megóvja a komplexeket [2].

3.2. Ru(II)-, Os(II)-nitrozil komplexek HSA-nal való kölcsönhatása

3.2.1. A KP1019 komplexszel szerkezetileg rokon Ru(II)- és (Os)-nitrozil komplexek esetén szintén a HSA-nal való kölcsönhatást vizsgáltuk.

- Az egyes komplexek (1-5) között azonban nem találtunk számottevő eltérést az egyes kötőhelyekhez való affinitásban. Egyedül az 5-ös komplex maradt el kissé a kötés mértékét illetően a többi komplextól.
- A vérszérummal végzett kísérletek szerint a fő szállító fehérje a HSA.
- A KP1019-től, hogy az I-es és II-es kötőhelyen mért kiszorítási állandók közel egy nagyságrenddel kisebbek a nitrozil komplexek esetében, ugyanakkor az ultraszűrés nem mutatott ilyen különbségeket. Feltételezhető, hogy további – a nitrozil komplexek számára hozzáférhető – kötőhelyek is vannak a fehérjén.

4. Ru(III)-szalán és Ru(II)-fenantrolin komplexek kölcsönhatása DNS-sel

4.1. Egyik fontos célunk a DNS-sel való kölcsönhatások kvantitatív jellemzése volt, ehhez fluorimetriás egyensúlyi- és élettartam méréseket végeztünk.

- Fluorimetriás módszert dolgoztunk ki az ismert DNS-marker molekulák a DAPI és az EB kötőhelyméret igényének és kötési erősségének meghatározására. A számolt kötőhelyméret a preferált bázis szakaszok előfordulási sűrűségét is kifejezi a DNS-láncon, és nem azonos a marker valós helyigényével [8].

4.2. A Ru(III)-szalán komplexek (S8, S10) esetében [8]:

- a kiszorítás tényét fluoreszcencia-élettartam mérésekkel támasztottuk alá.
- A komplexek interkaláció útján való megkötődését tapasztaltuk. Feltehetőleg nem a kis árok felől interkalálódnak a komplexek.
- A citotoxicitásbeli eltéréseket minden valószínűség szerint nem a DNS-sel való kölcsönhatásuk különbözősége okozza.

4.3. A Ru(II)-phen komplexek (CM8, CM16) esetében:

- a komplexek a kis árokban viszonylag nagy sűrűséggel és nagy affinitással kötődnek a DNS-lánchoz,
- a koordinálódó phen ligandumok feltehetően extrahelikális „stacking” révén a kis árokba simulnak, azonban a harmadik ligandum nem elég kiterjedt ahhoz, hogy ténylegesen interkalálódjon.

4.4. Mind a Ru(III)-szalán, mind pedig a Ru(II)-phen komplexek esetében számoltunk kiszorítási állandókat az adott markerre nézve, azt azonban meg kell jegyezni, hogy a számolt állandó minden esetben az adott marker kötőhelyméretét veszi alapul, amivel a fémkomplexek kötőhelymérete (vagy kötési sűrűsége) a DNS-en valószínűleg nem egyezik [8].

5. $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -komplexek vizsgálata

5.1. A $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -komplexek vizsgálatakor elsődleges célunk az volt, hogy leírjuk a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Z}_3]$ ($\text{Z} = \text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$) vizes oldatbeli viselkedését és különböző (O,O), (O,N) és (O,S) donor ligandumokkal (ld. 1. ábra) való komplexképzését [5,9].

- A kloridion koordinálódó ligandumként bázikusabb pH-tartomány felé tolja el a fémion $([\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]^{2+})$ hidrolízisét.
- Komplexképzés szempontjából az (O,O) donor maltollal, allomaltollal és dhp-val, valamint az (O,N) donor pic-val kizárólag $[\text{MLZ}]$ és $[\text{MLH}_{-1}]$ ($=[\text{ML}(\text{OH})]$) monokomplexek képződnek.
- Az $[\text{MLZ}]$ komplexek $\text{p}K_a$ -ja általában nagy (9,32-11,90).
- Az (O,S) donor tiomaltollal biszkomplexek $([\text{ML}_2\text{H}], [\text{ML}_2])$ is képződnek ligandumfelesleg jelenlétében.
- Az $[\text{MLZ}]$ komplexekre az $(\text{O,O}) < (\text{O,N}) < (\text{O,S})$ általános stabilitási trend állapítható meg.
- A kloridion koordináló ligandumként nagyobb pH-tartomány felé tolja el a komplexképződést.
- A tiomaltollal képzett monokomplex csak savas pH-n stabilis, fiziológiás pH-n valószínűleg vegyes hidroxido oligomer részecskék képződnek.
- Modellszámolások alapján az (O,O) és (O,N) donor ligandumok közül fiziológiás pH-n, μM -os tartományban csak a dhp-val és pic-val képzett $[\text{MLZ}]$ komplexek mutatnak kellő stabilitást.
- A $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ csere mértéke az egyes komplexek esetében igen eltérő, ez hozzájárulhat a biológiai aktivitásbeli különbségekhez.

5.2. A szérumbeli oldategyensúlyi viszonyok felderítésének második lépéseként HSA-nal való kölcsönhatásvizsgálatok készültek $\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Z}_3$ -al, valamint dhp-, ill. pikolinsav komplexével. Ehhez ^1H NMR, ultraszűrési, fluorimetriás és CZE méréseket végeztünk.

- A $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -fémion és a dhp-, ill. pic komplexek jelentős mértékben kötődnek a HSA-hoz.
- A komplexek kötődése részben a koordinált ligandumok kiszorításával jár. A fémkomplex disszociációja a kisebb stabilitású dhp komplex esetében kifejezettebb, mint a pic komplexnél. Ebből következően a kötődés valószínűleg naggyobbszt koordinatív jellegű.
- Az I-es és II-es kötőhelyen is kötődnek mind a fémion mind pedig a fémkomplexek; a pic komplex mindkét kötőhelyen gyengébben kötődik, mint a dhp komplex vagy a fémion.

6. Ga(III)-komplexek

- 6.1. A Ga(III) maltollal, tiomaltollal és oxinnal, ill. szulfoxinnal való kölcsönhatását klasszikus oldategyensúlyi módszerekkel vizsgáltuk, elsődleges célunk a már klinikai tesztelés alatt álló *tris*komplexek (KP46 és GaM) vizes oldatbeli stabilitásának jellemezése [1,6].
- Az oxinnal képződő komplexek rossz vízdíszíthatósága miatt 30 és 60% (m/m) DMSO-víz oldószer elegyben pH-potenciometriásan határoztuk meg a stabilitási szorzatokat. Tisztán vizes közegre a fenti mérések és a szulfoxinnal párhuzamosan (mindhárom közegben) meghatározott állandók alapján extrapoláltunk $\lg\beta$ értékeket a Ga(III)–oxin rendszerre.
 - Az oxinnal képződő komplexek fluoreszcens sajátsága révén spektrofotometriás titrálások segítségével is számoltunk kötési állandókat.
 - A két fentebbi módszerrel nyert állandók jól egyeznek a híg oldatban végzett UV-látható titrálások eredményeivel.
 - Fiziológias pH-n a GaM mM-os míg a KP46 μ M-os koncentráció-tartományban stabilis; a GaM stabilitása jóval kisebb a KP46-hoz viszonyítva.
- 6.2. Igen híg – ugyanakkor fiziológias szempontból releváns – (néhány tíz μ M-os) koncentráció-tartományban az oxin képes megakadályozni a fémkomplex disszociációját, míg a maltol csak részben így feltételezhető, hogy a vérérszék kis és nagy molekulatömegű komponenseivel eltérő mértékben vagy módon lépnek kölcsönhatásba [1,6].
- 6.3. Az előbbi következtetés alátámasztására a HSA-nal és az apoTf-nel való kölcsönhatását vizsgáltuk a GaM és KP46 komplexeknek. Ehhez ^1H NMR, ultraszűrés, UV-látható, fluorimetriás és számítógépes dokkolásos módszereket alkalmaztunk [6,7].
- Méréseink és modellszámolások alapján a GaM komplex terápiás szempontból releváns koncentráció-tartományában a komplex nagyobbbrészt disszociál és a Ga(III)-ion szállításában főként a Tf vesz részt.
 - A GaM nem kötődik a HSA-hoz, csak a szabad maltol ligandum.
 - A KP46 esetében viszont a Tf szerepe kevésbé hangsúlyos a fémkomplex nagy stabilitása miatt.
 - A HSA-nal viszont a teljes komplex lép kölcsönhatásba, és a KP46 nagy része ehhez a fehérjéhez kötődik.
- 6.4. Tehát, míg a GaM nagyobbbrészt disszociál, addig a KP46 feltehetőleg változatlan formában szállítódik a vérérszékben [6,7].

7. Kumarin alapvázás redukált Schiff bázis vegyületek kölcsönhatása HSA-nal

7.1. A kumarin ligandumokkal (**1a-1e**) végzett kísérleteinkben a fluorimetriás módszert és annak PSEQUAD programmal való kiértékelhetőségét teszteltük [4].

- Előzetesen meghatároztuk a ligandumok proton disszociáció állandóit UV-látható fotometrián.
- A PSEQUAD programmal való kiértékeléssel teljes spektrumok alapján több emittáló részecske figyelembevételével számolhatók kötési állandók.
- A kumarin ligandumok igen nagy affinitással kötődtek a HSA I-es kötőhelyén, és ez az elsődleges kötőhely.
- Dokkolásos számolások alapján a fiziológiás pH-n részben deprotonálódott fenolos OH-csoporttal rendelkező ligandumok (**1b**, **1c**, **1d**, **1e**) erősebben kötődnek az I-es kötőhelyen, mint az ilyen pH-n nem deprotonálódó **1a** ligandum.

V. AZ EREDMÉNYEK ALKALMAZÁSI LEHETŐSÉGEI

Munkánk általános célja, hogy felhívjuk a figyelmet az oldategyensúlyi vizsgálatok létjogosultságára és fontosságára a biológiai szempontból érdekes rendszerek esetében. Ennek részeként a makromolekulákkal való kölcsönhatásokat mennyiségi és minőségi szempontból is próbáltuk leírni, így a meghatározott kötési állandók birtokában képesek lehetünk (az egyébként sokszor kísérletileg nehezen kivitelezhető) fiziológiás koncentrációviszonyok között modellezni a komplexek eloszlását. Az ilyen jellegű *in vitro* vizsgálatok eredményei természetesen egyelőre csak ritkán vonatkoztathatóak közvetlenül az élő rendszerekre, mégis magyarázhatják a fémkomplexek *in vivo* tapasztalt farmakokinetikai viselkedését, és lehetővé válhat, hogy általuk kedvezőbb farmakokinetikai profilú származékok előállítását javasoljuk.

VI. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosító: 10033330

A dolgozat alapját képező közlemények ΣIF: 21,66

- [1] É.A. Enyedy*, **O. Dömötör**, E. Varga, T. Kiss, R. Trondl, C.G. Hartinger, B.K. Keppler; **Comparative solution equilibrium studies of anticancer gallium(III) complexes of 8-hydroxyquinoline and hydroxy(thio)pyrone ligands**
J. Inorg. Biochem. 117 (2012) 189–197. IF: 3,197
Független idéző: 7
- [2] **O. Dömötör**, C.G. Hartinger*, A.K. Bytzek, T. Kiss, B.K. Keppler, É.A. Enyedy*; **Characterization of the binding sites of the anticancer ruthenium(III) complexes KP1019 and KP1339 on human serum albumin via competition studies**
J. Biol. Inorg. Chem. 18 (2013) 9–17. IF: 3,164
Független idéző: 11
- [3] V. Pichler, J. Mayr, P. Heffeter*, **O. Dömötör**, É.A. Enyedy, G. Hermann, D. Groza, G. Köllensperger, M. Galanski, W. Berger, B.K. Keppler, C.R. Kowol*; **Maleimide-functionalised platinum(IV) complexes as a synthetic platform for targeted drug delivery**
Chem. Comm. 49 (2013) 2249–2251. IF: 6,718
Független idéző: 1
- [4] **O. Dömötör**, T. Tuccinardi, D. Karcz, M. Walsh, B.S. Creaven, É.A. Enyedy*; **Interaction of anticancer reduced Schiff base coumarin derivatives with human serum albumin investigated by fluorescence quenching and molecular modeling**
Bioorg. Chem. 52(52) (2014) 16–23. IF: 2,141
Független idéző: 1
- [5] **O. Dömötör**, S. Aicher, M. Schmidlehner, M.S. Novak, A. Roller, M.A. Jakupec, W. Kandollner, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, É.A. Enyedy*; **Antitumor Pentamethylcyclopentadienyl Rhodium Complexes of Maltol and Allomaltol: Synthesis, Solution Speciation and Bioactivity**
J. Inorg. Biochem. 134 (2014) 57–65. IF: 3,274
Független idéző: -
- [6] **Dömötör O.**, Bali K., Hetényi A., Enyedy É.A.*; **Rákellenes gallium(III)komplexek oldategyensúlyi jellemzése és szérum-fehérjékkel való kölcsönhatásuk vizsgálata**
Magyar Kémiai Folyóirat 120(2-3) (2014) 127–131. IF: -
Független idéző: -

- [7] É.A. Enyedy*, **O. Dömötör**, K. Bali, A. Hetényi, T. Tuccinardi, B.K. Keppler;
Interaction of the anticancer gallium(III) complexes of 8-hydroxyquinoline and maltol with human serum proteins
J. Biol. Inorg. Chem. (DOI: 10.1007/s00775-014-1211-9) IF: 3,164
- [8] **O. Dömötör**, L. Côrte-Real, R.F. M. de Almeida, C.P. Matos, F. Marques, P. Adão, C. Real, É.A. Enyedy, M.H. Garcia, A.I. Tomaz*; **On the mechanism of action of anti-tumoral aminophenolate ruthenium(III) complexes**
Chem. Bio. Chem (beküldésre előkészítve, IF: 4,097)
- [9] É.A. Enyedy*, **O. Dömötör**, C.M. Hackl, M. Novak, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, W. Kandioller; **Solution equilibria and antitumor activity of pentamethylcyclopentadienyl rhodium complexes of picolinic acid and deferiprone**
J. Coord. Chem. (beküldött kézirat, IF: 2,212)

A dolgozat témaköréhez kapcsolódó további közlemények ΣIF: 12,94

1. É.A. Enyedy*, E. Farkas, **O. Dömötör**, M.A. Santos;
Interaction of folic acid and some matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor folate- γ -hydroxamate derivatives with Zn(II) and human serum albumin
J. Inorg. Biochem. 105 (2011) 444–453. IF: 3,354
Független idéző: 3
2. A. Rathgeb, A. Böhm, M.S. Novak, A. Gavriluta, **O. Dömötör**, J.B. Tommasino, É.A. Enyedy, S. Shova, S. Meier, M.A. Jakupec, D. Luneau*, V.B. Arion*;
Ruthenium-Nitrosyl Complexes with Glycine, L-Alanine, L-Valine, L-Proline, D-Proline, L-Serine, L-Threonine and L-Tyrosine: Synthesis, X-ray Diffraction Structures, Spectroscopic and Electrochemical Properties and Antiproliferative Activity
Inorg. Chem. 52:(5) (2014) 2718–2729. IF: 4,794
Független idéző: 1
3. F. Bacher, **O. Dömötör**, M. Kaltenbrunner, M. Mojović, A. Popović-Bijelić, A. Gräslund, G. Novitchi, A. Ozarowski, L. Filipovic, S. Radulović, É.A. Enyedy*, V.B. Arion*;
Effects of Terminal Dimethylation and Metal Coordination of Proline-2-Formylpyridine Thiosemicarbazone Hybrids on Lipophilicity, Anti-proliferative Activity and hR2 NMR inhibition
Inorg. Chem. 53 (2014) 12595–609. IF: 4,794
Független idéző: -

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások, poszterek

1. **Dömötör O.**, Enyedy É.A., Kiss T. (előadás, magyar)
Rákellenes [bisz-indazol-rutenát(III)]komplexek kölcsönhatásának vizsgálata humán szérum albuminnal kötőhely markerek segítségével
XXXIII. Kémiai Előadói napok, 2010.10.25-27., Szeged.
2. **O. Dömötör**, É.A. Enyedy, T. Kiss, A.K. Bytzek, C.G. Hartinger, B.K. Keppler (poszter)
Interaction of the anticancer ruthenium(III) complexes KP1019 and KP1339 with human serum albumin via competition studies
4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, 2011.08.31-09.03., Budapest, Magyarország.
3. **Dömötör O.**, Varga E., C.G. Hartinger, B.K. Keppler, Kiss T., Enyedy É.A. (előadás)
Rákellenes gallium(III) komplexek oldategyensúlyi vizsgálata
46. Komplexkémia Kollokvium, 2012.05.21-23., Mátrafüred.
4. **O. Dömötör**, E. Varga, K. Bali, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, T. Kiss, É.A. Enyedy (poszter)
Solution studies on antitumor gallium(III) complexes and their interactions with human serum proteins
International Symposium on Metal Complexes, 2012.06.18-22. Lisszabon, Portugália.
Konferencia közlemény: *Acta of the International Symposia on Metal Complexes: ISMEC Group Series*, 2 (2012) 165-166, (ISSN: 2239-2459).
5. É.A. Enyedy, **O. Dömötör**, É. Sija, T. Jakusch, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, T. Kiss, (poszter)
Comparative solution equilibrium study on $[\text{Rh(III)}(\eta^5\text{-Cp}^*)]^{2+}$ and $[\text{Ru(II)}(\eta^6\text{-p-cymene})]^{2+}$ ternary complexes formed with various bidentate ligands
11th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 11, 2012.09.12-16., Granada, Spanyolország.
6. **Dömötör O.**, Bali K., Hetényi A., Enyedy É.A. (előadás)
Rákellenes Ga(III)-komplexek kölcsönhatása vérszérum fehérjékkel
47. Komplexkémia Kollokvium, 2013.05.29-31., Mátraháza.
7. **O. Dömötör**, R.F.M. de Almeida, C.P. Matos, É.A. Enyedy, A.I. Tomaz (poszter)
Interaction of new polydentate Ru(III)-salan complexes with DNA using time resolved and steady state fluorescence spectroscopy
5th European Conference of Chemistry for Life Sciences, 2013.06.10-12., Barcelona, Spanyolország

8. Dömötör O., Kiss G., Mészáros J.P., Enyedy É.A. (előadás)

Rh(III)(η^5 -Cp*) kétfogú N/O/S-donor ligandumokkal képzett komplexek oldategyensúlyi jellemzése és kölcsönhatásuk albuminnal

48. Komplexkémia Kollokvium, 2014.05.28-30, Siófok.

9. É.A. Enyedy, O. Dömötör, W. Kandioller, B.K. Keppler (poszter)

Solution equilibria of analogous Rh(III)(η^5 -Cp*) and Ru(II)(η^6 -p-cymene) complexes formed with various bidentate ligands

7th International Symposium on Bioorganometallic Chemistry, 2014.07.22-25., Bécs, Ausztria.

10. O. Dömötör, G. Kiss, J.P. Mészáros, W. Kandioller, B.K. Keppler, É.A. Enyedy (poszter)

Complexes of Rh(III)(η^5 -Cp*) with N/O-donor bidentate ligands: solution equilibrium and interaction with human serum albumin

7th International Symposium on Bioorganometallic Chemistry, 2014.07.22-25., Bécs, Ausztria.

11. J. Mayr, V. Pichler, P. Heffeter, O. Dömötör, É.A. Enyedy, G. Hermann, D. Groza, G. Kollensperger, M. Galanski, W. Berger, B.K. Keppler, C.R. Kowol (poszter)

Synthesis and characterization of bis-maleimide-functionalized platinum(IV) complexes for tumor-targeted drug delivery

12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2014.08.24-28., Zürich, Svájc.

Konferencia közlemény: *J. Biol. Inorg. Chem.* 19 (2014) S782-S782.

12. Dömötör O., Enyedy É.A. (előadás)

Oldategyensúlyi vizsgálatok a spektrofluorimetria szemszögéből

Koordinációs Kémiai Munkabizottsági Ülés, 2014.11.11., Budapest.

13. Dömötör O. (előadás)

Rákellenes galliumkomplexek oldatkémiaja és kölcsönhatásuk szérum-fehérjékkel

Bolyai Klub Tudományos Ülés, 2014.11. 21., Szeged.