

## Kutatási beszámoló a K 77833 OTKA pályázatról

### Biológiai aktivitású fémkomplexek kölcsönhatása szérumban fehérjékkel

*A projektben számos potenciális vagy valós biológiai aktivitással rendelkező fémkomplex biológiai rendszerekben való átalakulásait vizsgáló elsősorban szérumban fehérjékkel való kölcsönhatásainak felderítését tűztük ki célul. Attól függően, hogy milyen molekuláról van szó, ezek a vizsgálatok kiterjedhetnek a fémkomplex előállítására, képződési sajátosságainak jellemzésére is. A szérumfehérjékkel, transzferrinnel és/vagy albuminnal való vizsgálat a kölcsönhatás elsősorban ultraszűrési, és spektrofluorimetriás nyomonkövetését jelentette, melyet esetenként site-markerekkel való kompetíciós mérésekkel egészítettünk ki. A stabilitási állandók ismeretében a fémionok (vanádium(IV,V), cink(II), ruténium(II,III), réz(II) stb. részecskeeloszlása a szérumban számíthatóvá válik. Az eloszlás – a valós koncentrációviszonyoknak megfelelően, de akár szérumban felhasználásával készült mintákból is – kromatográfiás illetve kapillár-elektroforézis módszerekkel igazolható.*

### Antidiabetikus fémkomplexek

Korábbi publikációinkban már részletesen leírtuk számos antidiabetikus vanádium(IV/V) és cink(II) komplex oldatspeciációját, jelen projekt keretében leginkább a vérszérumban való eloszlásukat jelentős mértékben meghatározó fehérje-kölcsönhatásokra koncentráltunk. Ennek keretében:

- i) Modellszámolást végeztünk néhány antidiabetikus Zn(II) komplex (maltoláto, picolináto, dipicolináto) vérszérumban való eloszlására vonatkozóan a meglévő oldategyensúlyi eredményeink alapján, melyet kapilláris zóna elektroforézis (CZE)-induktív csatoltású plazma tömegspektrometria ICP(MS) módszer segítségével sikerült alátámasztani. Azt találtuk, hogy a véralkotók közül a humán szérumban albumin (HSA) messze a legjelentősebb fémmegkötő ezen komplexek esetén.
- ii) Részletesen vizsgáltuk a hordozó ligandumok és az albumin közötti kölcsönhatást is ultraszűrési-UV mérések, STD-NMR mérésekkel. Kötőhelymarker anyagok bevonásával fluorimetriás, ultraszűrési-UV, CZE-UV mérésekkel meghatároztuk az adott kötőhelyhez tartozó kötési állandókat, így a ligandumok legvalószínűbb kötési helyeit. Megállapítottuk, hogy a semleges 3-hidroxi-1,2-dimetil-piridinon nem kötődik, a maltol gyenge kötődést mutat az albumin II. kötőhelyén, míg a vizsgált pikolinátok mind a két kötőhelyen képesek kötődni. A dipikolinsav és pikolinsav elsődleges kötőhelye az I, a 6-metil-pikolinsavé a II. kötőhely. Molekulamechanikai (docking) számolásokkal is sikerült ezt alátámasztani.
- iii) Jellemeztünk számos VO(IV) és Zn(II) komplex lipofilitását vizsgáltuk összefüggést keresve a hordozó ligandumaik lipofilitásával. A semleges fémkomplex lipofil karakterének fontos szerepe van a felszívódásban és a fehérjékhez való kötődésben. Megállapítottuk, hogy a kémiai speciáció ismerete elengedhetetlen, míg a különböző képződő komplexek egyedi UV-vis spektrumának ismerete igen hasznos a megbízható lipofilitás meghatározásához e kinetikailag labilis fémkomplexek esetén.

iv) A vanadát(V)-apotranszferrin egyensúly tanulmányozását kizszorításos módszerrel végeztük hpno (2-hidroxi-piridin N-oxid) és maltol ligandumokkal,  $^{51}\text{V}$ -NMR és ultraszűrési módszerrel is meghatároztuk a fiziológiai körülmények között a stabilitási állandókat. Megállapítottuk, hogy a (hidrogén)karbonácion nem verseng a vanadáttal, kizszorítás inkább a vanadát-karbonát komplex létrejötte miatt lehetséges. Sem a hpno, sem a maltol nem képes koordinálódni a vanadáthoz reális ( $cV < 10 \mu\text{M}$ ) vérérum körülmények között. Kovalens jellegű vanadát - humán szerum albumin (HSA) kölcsönhatást nem tudtunk kimutatni.

v) A humán-szerumalbumin legalább két egymástól független helyen köti a  $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}$ -et, az egyik a fehérje N-terminális végén található ( $\text{Cu}^{\text{II}}$  kötőhely), míg a másik a „többszemes” kötőhely két domén határán. ( $\text{Zn}^{\text{II}}$  és más kétértékű fémionok kötésére alkalmas) A  $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}$  (leglább részben) monomerként kötődik a fehérje N-terminális végén, míg a másik kötőhelyen azonban már dimerként. A két kötőhely kompetícióban van egymással, ráadásul egyik kötődés sem kvantitatív, a telítéshez fémion feleslegre van szükség.

vi) Gél elektroforézis kísérletek igazolták, hogy a  $(\text{V}^{\text{IV}}\text{O})_2\text{hTF}$  részecske előfordulhat zárt konformációban is, hasonlóan az analóg  $\text{Fe}^{\text{III}}$  vegyülethez. Ez létfontosságú lehet a sejtbe történő bejutás, a transferrin receptor felismerés tekintetében.

vii) Mind az oxovanádium(IV)- illetve dioxovanádium(V)-komplexek modelszámításokon alapuló biospeciációja azt mutatta, hogy a legfontosabb fémion szállító fehérje az apotranszferrin kizszorítja az eredeti ligandumot a komplexéből. Ezen tény alapján kijelenthető, hogy a vanádium a komplexek aktív metabolitja, a ligandumra csak a felszívódás elősegítése ( $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}$ ), esetleg a toxicitás csökkentése ( $\text{V}^{\text{V}}$ ) érdekében van szükség; eredményünket farmakokinetikai vizsgálatok is megerősítették.

Megállapítható, hogy számos - valószínűleg kisebb nagyobb mértékben az összes - eddig tanulmányozott kismolekulás komplex esetében egy humán szerum albumin -  $\text{V}(\text{IV})\text{O}$  - eredeti ligandum terner komplex képződik. Azonban ebben az eredeti komplex csupán egy imidazolcsoporton keresztül kötődik a fehérjéhez, ez a kötés nem elég stabil ahhoz, hogy terápia során alkalmazható koncentrációviszonyok között az apotranszferrinnel felvegye a versenyt. A fémion szállításában tehát jelen termodinamikai adataink alapján a HSA terner komplexének nem lehet szerepe.

viii) Az mhcp (2-metil-3H-5-hidroxi-6-karboxi-4-pirimidinon etil észter)  $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}$  komplexe a maltolhoz és a dhp komplexhez hasonló viselkedést mutat a transferrinnel való kölcsönhatás tekintetében.

ix) A felszívódást elősegítendő japán partnereink számos vízben kevésbé oldódó (O,O) illetve (S,O) piron illetve piridiongyűrűt tartalmazó ligandumok  $\text{V}(\text{IV})$ - és  $\text{Zn}(\text{II})$ -biskomplexet állítottak elő, és vizsgálták antidiabetikus hatásukat. Megállapítottuk, hogy a tiomaltol és származékaik esetében a kénkoordináció növelte a stabilitást a  $\text{Zn}(\text{II})$  esetében. A  $\text{VO}(\text{IV})$  vegyületek stabilitása az eredeti leginkább vizsgált biszmaltozó komplexéhez hasonló.

## Rákellenes tioszemikarbazon komplexek

A klinikai fázis II-ben lévő kemoterápiás gyógyszermolekula, a Triapin és számos származékának kölcsönhatását vizsgáltuk különböző fémionokkal: Cu(II), Zn(II), Fe(II/III), Ga(III). Itt a szerkezet – hatás összefüggés felderítése volt általában a célunk. Megállapítottuk, hogy az N-terminálisan dimetilált vegyületek jelentősen megnövelik a (N<sub>pir</sub>,N,S<sup>-</sup>) kelát stabilitását, ami magyarázhatja a nagyobb citotoxicitásukat is. A Fe(III) és Fe(II) ionok széles pH-tartományban igen stabilis bisz komplexeket képeznek, ugyanakkor a Ga(III)-komplexek híg vizes oldatokban jelentős mértékben hidrolizálnak. Megállapítottuk, hogy a ligandumok és Ga(III)-komplexei erős fluoreszcens sajátosságot mutatnak, mely a sejtekbe történő bejutásuk, ill. a sejten belüli eloszlásuk monitorozását teszi lehetővé fluoreszcens mikroszkóppal. A feltételezett hatásmechanizmus alapján a ribonukleotid redukáz enzim inhibíciója során *in situ* képződő katalitikus mennyiségű Fe(II)-tioszemikarbazon komplex fiziológiás számolt látszólagos állandója korrelál a mért IC<sub>50</sub> értékekkel.

Részletesen vizsgáltuk az szalicilaldehid-tioszemikarbazon komplexképző sajátosságát; megállapítottuk, hogy az (O,N,S<sup>-</sup>) koordináció egyértelmű stabilitás növekedést okoz a Ga(III) ionnál, míg stabilitás csökkenést a Fe(II)-ionnal az alfa-N-piridil tioszemikarbazonok (N<sub>pir</sub>,N,S<sup>-</sup>) koordinációjához képest. A szalicilaldehid tioszemikarbazonok jóval kisebb biológiai aktivitásának az egyik lehetséges oka lehet a hatásmechanizmus szempontjából fontos Fe(II)-komplexek kisebb stabilitása.

Egy prolin aminosavat oldalláncban tartalmazó szalicilaldehid tioszemikarbazon vizsgálata során megállapítottuk, hogy az ikerionos szerkezetnek köszönhetően ezen ligandum fémkomplexei sokkal jobb vízdékonyságot mutatnak, de a koordinációs módjuk alapvetően nem különbözik az alapvegyülethez képest, mert a prolin nem vesz részt a fémion kötésében. A ligandum citotoxikus hatása messze alatta marad a Cu(II) komplexének biológiai aktivitását tekintve.

## Ruténium(II/III) komplexek

Az antitumor Ru-komplexek közül két klinikai fázisban lévő Ru(III) komplex (KP1019 és KP1339) és a HSA közötti kölcsönhatást vizsgáltuk kompetíciós mérésekkel kötőhelymarker anyagok bevonásával fluorimetriás, ultraszűrés-UV, CZE-UV módszerekkel. Megállapítottuk, hogy a két komplex kötési erősségében nincs mérhető különbség és képesek mind az I. és mind a II. kötőhelyen kötődni közepes erősséggel.

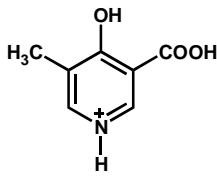
A potenciálisan antitumor hatású Ru(II) komplexek közül részletesen vizsgáltuk [Ru(II)(eta-6-*p*-cimol)(OX)H<sub>2</sub>O] típusú komplexek vizes oldatbeli speciációját pH-potenciometriás, UV-vis fotometriás és <sup>1</sup>H NMR módszerekkel. Ezekben a komplexekben a Ru(II)-t a *p*-cimol félszendvics

típusú komplexben stabilizálja az oxidációval szemben, míg az (O,X) X = O; piron (etil-maltol, allomaltol) vagy piridinon (alkoxi-karbonil-metil-3-hidroxi-2(1H)-piridonok), X = S (tiomaltol, tioallomatol) ligandumokat jelöl. Megállapítottuk, hogy az (O,O) ligandumokkal mono komplexek (ML és ML(OH)) képződnek, a koordinált víz deprotonálódása már fiziológiás pH-n elindul. A sokkal nagyobb biológiai aktivitású (O,S) vegyületek esetén azonban lényegesen stabilisabb komplexek képződnek, 1:1 M=L arány esetén még pH = 1-n is 100%-ban képződik az ML komplex, bár pH > 6 felett elindul a komplex hidrolízise, oligomerek képződnek. Ligandum felesleg esetén azonban ML<sub>2</sub>H és ML<sub>2</sub>, ML<sub>3</sub> komplexek is képződnek, melyekben (S)(O,S); (S)(O,S); (S)(S)(S) koordinációs módok valósulhatnak meg. Azaz, a protonált és a deprotonált ligandum is képes egyfokú kén koordinációra ezekben a Ru(II)-címol komplexekben.

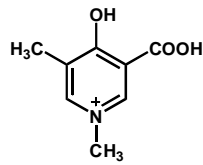
A ruténium(III) ion kinetikai szempontból semmiképp sem tekinthető labilis fémionnak, de a Ru(III)-edta komplexeinek szabad koordinációs pozíciójában a ligandum-csere sebesség felgyorsul, ezáltal lehetővé vált a terner komplexek képződésének vizsgálata. Bidentát ligandumokkal [Ru<sup>III</sup>(edtaH<sub>x</sub>)L]<sup>2-</sup> (x = 0, 1, 2 and 3) összetételű komplexek képződnek, amelyek közül a teljesen deprotonált az uralkodó fiziológiás pH-n, a protonált komplexek inkább az (N,O) és (S,O) donorcsoportokat tartalmazó ligandumokra jellemzőbbek. A protonálódás a karboxilátcsoporton következik be x=3 esetén a Ru<sup>III</sup> egyik koordinációs pozíciója szabad. Savas közegben a stabilitási sorrend a (O,O) < (N,O) < (S,O), ami részben megváltozik pH 7.4-re: (O,O) ≈ (N,O) < (S,O). A ligandumcsere kinetikája disszociatív mechanizmusú.

### **Fémion homeosztázis terápia az Alzheimer kór kezelésében**

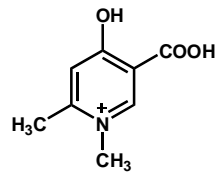
Napjainkban egyre inkább elfogadottabb tény, hogy számos neurodegeneratív betegség egyik oka a fémionháztartás felborulása. Al(III), Fe(III), Zn(II) és Cu(II) azok a legfőbb ionok, melyek nagymértékben szerepet játszhatnak neurodegeneratív betegségek kialakulásában, és a betegségre jellemző β-amiloid oligomerek és aggregátumok képződésében. A felhalmozódott, aggregálódást elősegítő fémionok eltávolítására alkalmas ligandumok lehetnek a különböző piridin-hidroxi-karbonsav-származékok. A vegyületek szintézise és vizsgálata a Padovai egyetemmel együttműködve történnek. Mivel feltehetően, a gyógyászati célra megfelelő és alkalmazásra kerülő ligandumok a véráramban szállítódnak, kölcsönhatásuk különböző vérben lévő molekulákkal, elsősorban az albuminnal fontos lehet. A ligandum humán szérum albuminnal való kölcsönhatását ultraszűrésessel UV-látható spektrofotometriás, és spektrofluorimetriás mérésekkel vizsgáltuk.



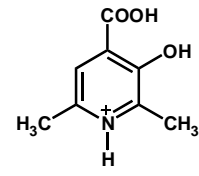
DQ5



DQ715



DQ716



DT726

A DQ5, DQ715, DQ716 és DT726 hidroxipiridinkarbonsav ligandumok-humán szérumban (HSA) kölcsönhatás tanulmányozása során egyedül a DT726 molekula esetében sikerült jelentős kölcsönhatást egyértelműen kimutatnunk mind spektrálisan mind ultraszűrővel. A DQ5 és DQ715 ligandumok albuminhoz való kötődését spektrofluorimetriás vizsgálatok elemzése alapján zártuk ki. A DT726 molekulával végzett mérések eredményei viszont azt mutatják, hogy megfelelően nagy ligandum felesleg mellett a HSA molekula akár négy DT726 ligandum megkötésére is képes lehet. Bár az eredmények nem egyértelműek, de a molekula kitüntetett kötődésében feltehetően a nagyobb hidrofobicitása játszhat szerepet. A számolt HSA-DT726 stabilitási állandó nagyságrendje hasonló, mint az irodalomban található antibiotikum-HSA kötés stabilitását jellemző kötési állandó értéke.

Szeged, 2013. június 28.

Kiss Tamás

témavezető