

**Nyílt láncú és makrociklusos ligandumokkal képzett lantanida(III) komplexek
termodinamikai, kinetikai és relaxometriás vizsgálata**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Thermodynamic, kinetic and relaxation studies on lanthanide complexes of open-
chain and macrocyclic ligands**

PhD Thesis Abstract



Pálinkás Zoltán

Témavezetők:

Dr. Tóth Éva (University of Orléans)

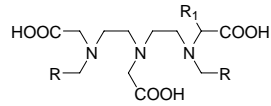
Dr. Tóth Imre, Dr. Brücher Ernő (Debreceni Egyetem)

Debreceni Egyetem

Debrecen, 2012.

Pálinkás Zoltán: Nyílt láncú és makrociklusos ligandumokkal képzett lantanida(III) komplexek termodinamikai, kinetikai és relaxometriás vizsgálata

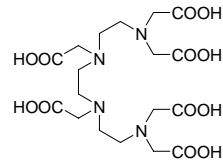
I. A vizsgált ligandumok szerkezeti képlete és elnevezése/ Ligands used for the studies



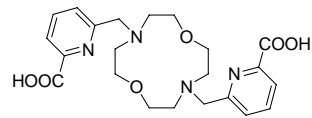
R=COOH ; R₁=H ; H₃DTPA

R=COOH ; R₁= ; H₃BOPTA

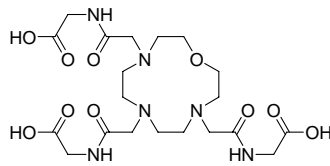
R=CONHMe; R₁=H ; H₃DTPA-BMA



H₆TTHA



H₄(bp12c4)



H₅L

II. Bevezetés és célkitűzések

Napjainkban az egyik leghatékonyabb orvos-diagnosztikai módszer a mágneses rezonanciás képalkotás (MRI), melynek során - relaxációsebességet növelő reagensként - főleg Gd(III)-poliamino-polikarboxilát komplexeket alkalmaznak a kép élességét fokozó kontrasztanyagként. A Gd(III)-komplexek kontrasztanyagkénti alkalmazhatóságának egyik legfontosabb kritériuma a nagy relaxivitas mellett az elegendően nagy kinetikai inertség, mivel a disszociáció során képződő Gd^{3+} -ion és a szabad ligandum egyaránt toxikus az élő szervezet számára. A Gd(III)-komplexek kinetikai inertsége disszociációjuk sebességével jellemezhető, amelyet a $[Gd(DTPA)]^{2-}$ és származékai esetében endogén fémionokkal (főként Zn^{2+} és Cu^{2+}) lejártszódnó csere reakcióik vizsgálatával tanulmányozták. Tekintetbe véve azonban a testfolyadékokban jelenlévő potenciális komplexképző ligandumokat is (fehérjék, aminosavak, endogén anionok), ligandumcsere reakciók révén is lejátszódhat a Gd(III)-komplexek disszociációja.

Kísérleti tapasztalatok alapján elmondható, hogy makrociklusos kelátképzők alkalmazásával, elsősorban DOTA és származékai segítségével kinetikailag inertebb kontrasztanyagok fejleszthetők, sajnos azonban ez nem mindig jár együtt a komplexek termodinamikai stabilitásának a növekedésével. Figyelembe véve továbbá az élő szervezetben található kis molekulákat, lejátszódhat a Gd(III)-komplexekben lévő egy vagy több kötött vízmolekula kicserélődése például laktát-, citrát-, foszfát- és hidrogénkarbonát ionokkal, mely a kontrasztanyag hatékonyságának csökkenésével járhat, de elvben lehetőséget ad koncentrációjuk meghatározására is.

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén már több évtizede folynak intenzív kutatások a lantanoida(III)-aminopolikarboxilát komplexek koordinációs kémiájának részletes megismerése céljából. A kezdetben csak nyíltláncú ligandumok körére kiterjedő vizsgálatokat egyre inkább felváltotta, kiegészítette az

Pálinkás Zoltán: Nyílt láncú és makrociklusos ligandumokkal képzett lantanida(III) komplexek termodinamikai, kinetikai és relaxometriás vizsgálata

újonnan előállított makrociklusos ligandumokkal képzett lantanoida(III)-komplexek tanulmányozása.

Munkám során ezen kutatásokba kapcsolódtam be, általánosan a következő célkitűzések mellett: (i) a klinikai gyakorlatban már használt, nyílt láncú ligandumokkal képzett Gd(III)-komplexek ($[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$, $[\text{Gd}(\text{BOPTA})]^{2-}$, $[\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})]$) disszociációjának megismerése a biológiai feltételekhez közeli körülmények között, különös tekintettel a korábban még nem tanulmányozott ligandumcsere reakciók körére, (ii) egy új, a La Coruna-i Egyetem (Spanyolország) Szervetlen Kémiai Tanszékén előállított pikolinát karokat tartalmazó dioxa-diazaciklododekán makrociklusos ligandum (bp12c4) lantanida(III)-komplexei fizikai-kémiai sajátságainak jellemzése, (iii) a dr. Tircsó Gyula által előállított oxo-triazaciklododekán makrociklusos gyűrűn alapuló, trisz-glicinát ligandum (L^1) termodinamikai, kinetikai és relaxometriás vizsgálata, valamint a fent említett két új makrociklusos ligandum koordinációs kémiai sajátságainak összehasonlítása a DOTA és DOTA-analóg ligandumok tulajdonságaival.

III. Alkalmazott vizsgálati módszerek

A DTPA, BOPTA, DTPA-BMA és TTHA ligandumok esetében a **pH-potenciometriás titrálásokat** standardizált NaOH-oldattal végeztük 25 °C-on, állandó ionerősség mellett (0.15 M NaCl). A mintákat (10 ml) mágneses keverővel kevertettük, és állandó nitrogén atmoszféra alatt tartottuk. A méréseket Metrohm 6.0233.100 kombinált üvegelektrod segítségével végeztük. A pH-mérő kalibrációjához KH-ftalát (pH= 4.004) és bórax (pH= 9.177) puffereket használtunk. A H^+ ion koncentrációkat az Irving és munkatársai által javasolt módon számítottuk.

A Gd(III)-komplexek és a TTHA között lejátszódó **ligandumcsere reakciókat** a vízprotonok longitudinális relaxációsebességének a mérésével követtük

MS-4 NMR spektrométer (Institute Jozef Stefan, Ljubljana), 9 MHz; ill. Bruker minispec mq20 NMR analyzer, 20 MHz alkalmazásával. A longitudinális relaxációs időket az inversion recovery módszerrel ($180^\circ - \square - 90^\circ$) mértük. A Gd(III)-komplexek koncentrációja a legtöbb esetben 1 mM volt.

A TTHA koncentráció-függő mérések során a TTHA koncentrációja 5-40 mM volt, a minták pH-ját pedig HEPES puffer (pH= 7.4) segítségével tartottuk állandó értéken. A pH-függő méréseknél (pH= 6.5-11.0), a TTHA koncentrációja 10 mM volt. Az endogén anionok jelenlétében végzett kísérletek során a TTHA koncentrációja 2.0 mM volt, a minták pH-ját 7.4 értéken tartva, a citrát-, foszfát- és hidrogén-karbonát ionok koncentrációja pedig 0-20 mM és 0-40 mM között változott.

A $[\text{Ce}(\text{bp}12\text{c}4)]^+$ -komplex **protonkatalizált disszociációját** nagy HCl-felesleg mellett vizsgáltuk. A reakciókat spektrofotometriás módszerrel 25 °C-on követtük 280 nm-en, a protonkoncentráció 0.001-0.04 M, a komplex koncentrációja pedig 0.0001 M volt.

A $[\text{Gd}(\text{bp}12\text{c}4)]^+$ és Zn^{2+} -ionok között lejátszódó fémcsere reakciót a vízprotonok relaxációsebességének mérésével követtük Bruker Avance 500, (11.75 T) NMR spektrométer alkalmazásával a pH =4.6-5.3 tartományban. A Zn^{2+} -ionok koncentrációját 0.005 M és 0.03 M között változtattuk, míg a Gd^{3+} komplex koncentrációja 0.0002 M volt. 0.02 M N-metil-piperazint használtunk pufferként, az állandó ionerősséget pedig 0.1 M KCl segítségével állítottuk be.

A Cu^{2+} ionokkal lejátszódó cserereakciót UV-vis spektrofotometria segítségével követtük 300 nm-en. A gadolínium(III)-komplex koncentrációja 0.0001 M volt, a Cu^{2+} ionok koncentrációja pedig 0.001 M és 0.02 M között változott, a mérések során MES puffert használtunk (pH =4.6-5.3).

A CeL^1 -komplex protonkatalizált disszociációjának kinetikáját 270 nm-en mértük, a protonkoncentráció 0.03-0.4 M között változott, a CeL^1 koncentrációja pedig 0.1 mM volt.

Pálinkás Zoltán: Nyílt láncú és makrociklusos ligandumokkal képzett lantanida(III) komplexek termodinamikai, kinetikai és relaxometriás vizsgálata

A GdL^1 -komplex Zn^{2+} és Eu^{3+} ionokkal lejátszódó fémcseré reakcióit relaxometriás módszerrel vizsgáltuk (Stelar relaxométer, 7.2 MHz) a $pH=3.5-5.3$ tartományban $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on. A Zn^{2+} koncentrációt 0.01 M és 0.071 M között, az Eu^{3+} koncentrációt pedig 0.01 M és 0.075 M között változtattuk, a Gd^{3+} -komplex koncentrációja pedig 0.001 M volt. 0.02 M N-metil-piperazint használtunk pufferként, és 0.15 M NaCl-ot az állandó ionerősség beállítására.

A Cu^{2+} -ionokkal végbemenő fémcseré reakciót spektrofotometriás módszerrel követtük 272 nm -en. A gadolínium(III)-komplex koncentrációja 0.0001 M volt, a Cu^{2+} koncentráció pedig 0.0004 M és 0.02 M között változott, N-metil piperazint használtunk a különböző pH -k ($4.3-5.25$) beállítására.

A ^1H - és ^{13}C -NMR méréseket a $[La(DTPA-BMA)]$ és az $[Eu(DTPA)]^{2-}$ komplexek esetében Bruker Avance (500 MHz) spektrométeren végeztük a $274-298\text{ K}$ hőmérséklet tartományban, esetenként ligandum felesleget is alkalmazva. A minták pH -ját 7.4 -re állítottuk be. A $La(DTPA-BMA)$ és az $EuDTPA$ koncentrációja közelítőleg 0.1 M volt, míg a feleslegben alkalmazott ligandumok (DTPA-BMA és DTPA) koncentrációja 0.25 és 0.5 M között változott.

PARACEST méréseket végeztünk az YbL^1 komplex esetében Bruker Avance 500 (11.75 T) NMR spektrométerrel laktát, valamint karbonát-ionok jelen-és távollétében, $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on. Az YbL^1 koncentrációja 20 mM volt, a karbonát ionoké $0-1.0\text{ M}$, míg a laktát ionoké 1.5 M volt. 0.01 M HEPES puffert használtunk a minták állandó pH -jának fenntartására ($pH=7.4$). A minták 10% D_2O -t tartalmaztak.

Az ^{17}O -NMR vizsgálatokat (GdL^1 és $[Gd(bp12c4)]^+$) Bruker Avance 500 (11.75 T, 67.8 MHz) spektrométeren végeztük. Megmértük a transzverzális és longitudinális relaxációs időket és kémiai eltolódásokat (^{17}O) a $287.2-343.3\text{ K}$ hőmérséklet tartományban. A GdL^1 komplex készítése során (3%) ligandumfelesleget alkalmaztunk, hogy elkerüljük a mérés szempontjából zavaró fémion felesleget.

Relaxometriás módszerrel vizsgáltuk **vegyes komplexek** képződésének a lehetőségét a $Gd^{III}/Gd(bp12c4)$ komplexek és karbonát-, foszfát-, laktát-, citrát-ionok, valamint endogén fémionok (Cu, Zn, Ca) között (Stelar relaxométer, 7.2 MHz, 25 °C). A Gd(III)-komplexek koncentrációja minden esetben 1 mM volt, a méréseket 10 mm NMR csőben hajtottuk végre növekvő anion/kation koncentráció mellett (0-300 mM). A komplexek és a hozzáadott endogén (anion/kation) pontos koncentrációját minden egyes mérési pontban korrigáltuk. 0.01 M HEPES pufferrel állítottuk be a minták pH-ját 7.4 körüli értékre, az állandó ionerősséggé pedig 0,15 M NaCl-ot használtunk.

IV. Új tudományos eredmények

Vizsgáltuk a $[Gd(DTPA)]^{2-}$, $[Gd(BOPTA)]^{2-}$ és $[Gd(DTPA-BMA)]$ komplexek és a TTHA kicserélő ligandum között lejátszódó ligandumcsere reakciók sebességét. Megállapítottuk, hogy a reakció a TTHA közvetlen támadásával játszódik le, és sokkal gyorsabb a biszamid-származék komplex esetében, mint a másik két ligandumnál. A különböző pH értékeknél kapott eredmények alapján elmondható, hogy a $[Gd(DTPA)]^{2-}$ és $[Gd(BOPTA)]^{2-}$ reakciójának sebessége minimum görbe szerint változik a pH-val, míg a $[Gd(DTPA-BMA)]$ esetén a reakciósebesség közel exponenciálisan nő a pH növelésével. A semleges $[Gd(DTPA-BMA)]$ -komplex és a kicserélő TTHA ligandum között nem lép fel tasztítás, így nagy a cserereakció sebessége. A $[Gd(DTPA)]^{2-}$ és $[Gd(BOPTA)]^{2-}$ két negatív töltésű: pH > 8.5 esetén a reakciósebesség növekedés a TTHA kevésbé protonált formáinak közvetlen támadásával magyarázható, míg a pH csökkenésével tapasztalt sebességnövekedés a protonált H_3TTHA és H_2TTHA ligandumról a Gd-komplexre történő protontranszfer lehetőségével értelmezhető.

Pálinkás Zoltán: Nyílt láncú és makrociklusos ligandumokkal képzett lantanida(III) komplexek termodinamikai, kinetikai és relaxometriás vizsgálata

Vizsgáltuk a plazmában lévő citrát, karbonát és foszfát ligandumok hatását a $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$, $[\text{Gd}(\text{BOPTA})]^{2-}$ és $[\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})]$ ligandumcsere reakcióira. Mindhárom ligandum növelte a Gd(III)-komplexek ligandumcsere reakcióinak sebességét: a karbonát-ionnak van a legjelentősebb hatása: a $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ és $[\text{Gd}(\text{BOPTA})]^{2-}$ ligandumcsere sebessége közelítőleg 50%-kal, míg a $[\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})]$ -é 100%-kal nő meg a karbonát-iont nem tartalmazó mintákéhoz képest. A citrát-ionnak csak a $[\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})]$ -komplex ligandumcsere reakciójára van észlelhető hatása, míg a foszfát-ionok sebességnövelő hatása gyakorlatilag elhanyagolható mindhárom komplex esetében. A tanulmányozott ligandumcsere reakciók sebessége alapján a komplexek kinetikai inertsége a $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-} > [\text{Gd}(\text{BOPTA})]^{2-} > [\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})]$ irányban csökken.

Megállapítottuk, hogy az bp12c4 ligandum és a lantanida(III)ionok között pillanatszerűen gyors a komplexképződés. Megállapítottuk a direkt pH-potenciometriás mérések alapján, hogy a ligandum stabilis komplexeket képez a lantanida(III)ionokkal, a $[\text{Zn}(\text{bp12c4})]$ - és $[\text{Cu}(\text{bp12c4})]$ -komplex stabilitása pedig közel azonos a $\text{Gd}(\text{bp12c4})$ stabilitásával.

Vizsgáltuk a $[\text{Gd}(\text{bp12c4})]^{+}$ és a Zn(II), valamint Cu(II)-ionok között lejátszódó fémcsere reakciók lefolyását. Megállapítottuk, hogy a Zn(II) jelenlétében lezajló fémcsere reakció lejátszódhat a Zn(II)-ionok közvetlen támadásával, illetve protonkatalizált úton is. A Cu(II)-csere esetében nem várt pH-függést tapasztaltunk: a sebességi állandók értékei a pH növelésével nőttek. Magyarán a Cu(II)-ionok hidroxokomplex képződési hajlama szolgálhat, ami alacsonyabb pH-n bekövetkezhet, mint Zn(II)-ionok esetében. A fémcsere reakciók során kapott sebességi állandók összevetéséből az látszik, hogy a $[\text{Gd}(\text{bp12c4})]$ kinetikai inertsége nem nagyobb, mint a $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ -komplexé.

A Gd(III)-komplexek relaxációs hatását befolyásolhatja a belső szférában kötött vízmolekula cseresebessége, ezért ^{17}O -NMR vizsgálatok segítségével

meghatároztuk a Gd(bp12c4) komplexben kötött vízmolekula/vízmolekulák cseresebességét az oldószer vízmolekulákkal. Vizsgálatainkból kiderült, hogy a mért vízcseresebesség értéke közelítőleg azonos a Gd^{3+} (aqua) ion vízcseresebességével, és a második legnagyobb érték az irodalomban mindezidáig fellelhető értékek között.

Megvizsgáltuk egy új, általunk előállított makrociklusos ligandum (L^1) komplexképződési sajátosságait lantanida(III)-, és biológiai szempontból jelentős fémionokkal. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az L^1 ligandum viszonylag stabilis komplexet képez a lantanida(III)-ionokkal, azonban a fémioncsere reakciók vizsgálata alapján a GdL^1 komplex kinetikai inertsége messze elmarad a várttól. Ennek oka feltehetőleg a spontán disszociáció nagymértékű hozzájárulása a különböző fémionokkal lejátszódó reakcióutakhoz.

Minthogy a GdL^1 -komplex két vízmolekulát tartalmaz a belső koordinációs szférában, erős vegyeskomplex képződést figyeltünk meg laktát- és hidrogénkarbonát ionokkal, mely a GdL^1 *in vivo* relaxivitásának csökkenéséhez vezethet. Meghatároztuk a GdL^1 vízcseresebességét, és vizsgáltuk az Yb-komplex PARACEST tulajdonságait laktát- és hidrogénkarbonát ionok jelenlétében.

V. Az eredmények várható gyakorlati alkalmazása

Bár vizsgálataink alapkutatás jellegűek, a kapott kísérleti eredmények, és az általuk felállított hipotéziseink segítséget nyújthatnak az MRI kontrasztanyagok esetleges *in vivo* disszociációjának pontosabb megértésében, illetve új kontrasztanyagok tervezésében.

A ligandumcsere reakciókat mindezidáig kevesen tanulmányozták ilyen részletességgel. A részletes kinetikai vizsgálataink során egy jól leírható modellt állítottunk fel a ligandumcsere reakció mechanizmusának leírására, melynek alapján összehasonlítottuk három, a klinikai gyakorlatban már alkalmazott kontrasztanyag

kinetikai inertségét. Eredményeink alapján elmondható, hogy a [Gd(DTPA-BMA)]-komplex kinetikai inertsége elmarad a várttól.

Megállapítottuk, a [Gd(bp12c4)]⁺-komplex esetében a vízcseré sebesség kimagaslóan gyors. Figyelembe véve, hogy egy komplex relaxivitását nagymértékben befolyásolja annak vízcseré sebessége, ezen megfigyelésünk új, nagyobb relaxivitással bíró (hatékonyabb) kontrasztanyagok fejlesztésének első lépése lehet.

Alátámasztottuk, hogy a GdL¹ komplex kinetikai inertsége messze elmarad a várttól. Az észlelt PARACEST effektus az YbL¹ komplex esetében azonban - a ligandum átalakításával a kellő termodinamikai stabilitás és kinetikai inertség elérése érdekében – olyan új ligandumok előállításának a lehetőségét vetíti elő, melyekkel klasszikus MRI és PARACEST kontraszt anyagok is tervezhetőek.

II. Introduction and objectives of the thesis

Over the last few decades, Magnetic Resonance Imaging (MRI) has become one of the most powerful and highly efficient methods in medical diagnostics. This technique is based on the measurement of water proton relaxation rates in human tissues, and provides three dimensional, high resolution images. Since the water proton relaxation rates differ in healthy and diseased tissues, important diagnostic informations can be obtained with the use of MRI. In order to reduce the time of examinations and significantly increase the contrast of the images, contrast agent (CA) are widely used in the clinical practice. Contrast agents are paramagnetic compounds – Gd(III)-chelates in majority – which can improve the sensitivity and specificity of MRI. Nowadays, more than 30 % of the clinical MR examinations are assisted by the use of contrast agents. The efficiency of MRI contrast agents is described with their relaxivity; the longitudinal paramagnetic relaxation rate enhancement of water protons in the presence of 1 mM of the contrast agent.

There are several advantages of MRI: it is a non-invasive technique and in contrast to X-ray or computer tomography, utilizes non-ionizing radiation. In addition, the measurement of the *in vivo* concentration of certain metabolites (enzymes, endogenous anions and cations, pH, pO₂) might be possible with the use of the so-called smart or intelligent contrast agents, which have been introduced recently and which are in spectacular development.

The most important requirement for a contrast agent to be applied *in vivo* is non-toxicity. In order to avoid toxicity, Gd³⁺ is complexed with suitable multidentate ligands, poly-amino-carboxylates in general. Indeed, the free gadolinium ion can not be injected into the body since it may interact with endogenous metabolites in many different ways (it can bind to the donor groups of different proteins or small anions, replace other metal ions in enzymes, or, due to its ionic radius similar to Ca²⁺, it may interfere in Ca²⁺-regulated signal transmission processes. Moreover, Gd³⁺ tends to form hydroxo complexes and precipitate under physiological conditions (pH= 7.4). These processes are strongly related to the *in vivo* dissociation of CA, when the highly toxic free Gd³⁺ ion and the toxic free ligand capable of forming chelates appear in the body. By consequence, the dissociation of Gd-based contrast agents leads to toxicity (LD₅₀ values for free Gd³⁺ and for uncomplexed ligands are in the range of 0.1-0.2 mmol/kg). In addition to the general requirements of being efficient and non-toxic, contrast agents have to meet other demands, such as good water solubility and low osmolality.

The objectives of the thesis are (i) to develop novel Gd³⁺ complexes with improved relaxivity and to understand the relations between the structure of the complex and all parameters that will influence relaxivity and (ii) to investigate the thermodynamic stability and kinetic inertness of the complexes formed with Gd³⁺ and

other lanthanide ions, two factors directly related to the *in vivo* safety of contrast agents.

III. Experimental methods

In the case of DTPA, BOPTA, DTPA-BMA and TTHA, the **pH-potentiometric titrations** were made with standardized NaOH solution at 25 °C at a constant ionic strength, (0.15 M NaCl). The samples (10 ml) were stirred with a magnetic stirrer, while a constant N₂ flow was bubbled through the solutions. A Metrohm 6.0233.100 combined electrode was used to measure the pH. The pH-meter was calibrated using standard KH-phtalate (pH= 4.004) and borax (pH= 9.177) buffers. The potentiometric measurements were carried out with the use of a computer-controlled Methrom 702 SM Titrino automatic burette. The H⁺ ion concentrations have been calculated from the measured pH values by the method, suggested by Irving et al.

The progress of the **ligand exchange reactions** between the Gd³⁺ complexes formed with the DTPA derivatives (GdL) and H_iTTHA (H_iX) in the absence and presence of the endogenous anions was followed by measuring the water proton relaxation rates (1/T₁) of the samples with an MS-4 NMR spectrometer (Institute Jozef Stefan, Ljubljana) at 9 MHz or a Bruker minispec mq20 NMR analyzer at 20 MHz. The longitudinal relaxation times were measured by the inversion recovery method (180° - τ - 90°) by using 8-10 different τ values. The concentration of the GdL complexes in the samples was generally 1.0 mM.

For studying the effect of TTHA on the reaction rates, the concentration of TTHA was varied between 5-40 mM, while the pH of the samples was maintained constant (pH= 7.4) by a non-coordinating buffer, HEPES. In the pH-dependent measurements the pH of the samples was varied in a broad pH range (6.5-11.0), when

the concentration of TTHA was 10 mM. In the samples containing the different endogenous anions, the concentration of TTHA was 2.0 mM, the pH was adjusted to 7.4, the citrate-, phosphate- and hydrogen-carbonate concentrations were varied between 0-20 mM and 0-40 mM, respectively.

The proton assisted dissociation of the Ce^{3+} complex of $bp12c4^{2-}$ has been studied in the presence of a large excess of HCl, when the complex is unstable. The reaction was followed at 25 °C by monitoring the decrease of the absorbance of the complex at 280 nm in the range of proton concentrations 0.001-0.04 M. The concentration of the complex was 0.0001 M.

The exchange reactions between $Gd(bp12c4)(H_2O)_q^+$ and Zn^{2+} have been studied by measuring the longitudinal relaxation rates ($1/T_1$) of water protons on a Bruker Avance 500 (11.75 T) NMR spectrometer in the pH range 4.6-5.3. The Zn^{2+} concentration varied between 0.005 M and 0.03 M, while the concentration of the Gd^{3+} complex was 0.0002 M. 0.02 M N-methyl-piperazine was used as buffer and the ionic strength was 0.1 M KCl.

The dissociation rate constants of the metal exchange reaction with Cu^{2+} were determined by UV-vis measurements following the increase of the absorbance at 300 nm. The concentration of the gadolinium(III)-complex was 0.0001 M, the Cu^{2+} concentration varied between 0.001 M and 0.02 M and MES was used as buffer. The rate of the exchange reaction was studied at different pHs (4.6-5.3).

The proton assisted dissociation of CeL^1 has been studied in the presence of a large excess of HCl, where the complex is unstable. The reaction was followed by monitoring the decrease of the absorbance of the complex at 270 nm in the range of proton concentrations 0.03-0.4 M. The concentration of the CeL^1 was 0.1 mM.

The exchange reactions between GdL^1 and Zn^{2+} and Eu^{3+} have been studied by measuring the longitudinal relaxation rates ($1/T_1$) of water protons on a Stellar relaxometer (7.2 MHz) in the pH range 3.5-5.3, at 25 °C. The temperature in the

sample holder was maintained with an air stream. The Zn^{2+} concentration varied between 0.01 M and 0.071 M, the Eu^{3+} concentration varied between 0.01 M – 0.075 M, while the concentration of the Gd^{3+} complex was 0.001 M. 0.02 M N-methyl-piperazine was used as buffer and the ionic strength was 0.15 M NaCl.

The dissociation rate constants of the metal exchange reaction with Cu^{2+} were determined by UV-vis measurements following the increase of the absorbance at 272 nm. The concentration of the gadolinium(III)-complex was 0.0001 M, the Cu^{2+} concentration varied between 0.0004 M and 0.02 M and N-methyl piperazine was used as buffer. The rate of the exchange reaction was studied at different pHs (4.3-5.25).

1H - and ^{13}C -NMR spectra of $La(DTPA-BMA)$ and $Eu(DTPA)^{2-}$ were recorded on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer in the temperature range 274-298 K in the absence and presence of ligand excess. The pH of the samples was adjusted to 7.4. The concentration of $La(DTPA-BMA)$ and $Eu(DTPA)^{2-}$ were 0.1 M, while the concentration of DTPA-BMA and DTPA excess were varied between 0.25 and 0.5 M.

PARACEST spectra of YbL^1 were measured on a Bruker Avance 500 (11.75 T) NMR spectrometer in the absence and presence of lactate and carbonate ions at 37 °C. The concentration of YbL^1 was 20 mM, the concentration of carbonate was varied between 0-1.0 M, while concentration of the lactate was 1.5 M. 0.01 M HEPES was used as buffer to maintain a constant pH=7.4, in case of lactate binding measurements the pH was varied between 6.5-8.0. 10 % D_2O was added to the samples.

Variable-temperature ^{17}O -NMR measurements on the $GdL^1/Gd(bp12c4)^+$ complex were performed on Bruker Avance 500 (11.75 T, 67.8 MHz) spectrometer. Transverse and longitudinal ^{17}O relaxation times and chemical shifts were measured between 287,2 K and 343,3 K. GdL^1 was prepared by mixing the

ligand stock solution with a GdCl_3 solution. A slight excess of ligand (3 %) was used to ensure complete coordination of Gd(III) , and the pH was adjusted to 5,55 with addition of NaOH. The absence of free Gd(III) was controlled with the xylenolorange test.

The formation of ternary complexes between $\text{GdL}^1/\text{Gd(bp12c4)}$ and carbonate, phosphate, lactate and citrate ions as well as some endogenous metal ions (Cu, Zn, Ca) has been studied by measuring the longitudinal relaxation rates ($1/T_1$) of water protons on a Stellar relaxometer at 7.2 MHz at 25 °C. The concentration of the Gd(III) complex was 1 mM while the concentration of each anion varied between 0-300 mM depending on the relaxivity changes by adding small portions of known concentration of cation/anion stock solution to 1.0 ml complex solution in a 10 mm NMR tube. The exact concentration of the complex and the added ions were corrected at each point. 0.01 M HEPES buffer was used, and the samples were contained 0,15 M NaCl.

IV. Results

The Gd(DTPA)^{2-} , Gd(BOPTA)^{2-} and Gd(DTPA-BMA) complexes, used as contrast agents in MRI, undergo exchange reactions with multidentate ligands, like TTHA. The dissociation of Gd^{3+} complexes through the ligand exchange reactions occurs significantly faster at pH=7.4 than the dissociation via the proton assisted pathway. The ligand exchange reactions take place with the direct attack of the $\text{H}_i\text{TTHA}^{(6-i)-}$ species on the Gd^{3+} complexes, through the formation of ternary intermediates. The formation of ternary intermediates is related to the intramolecular rearrangements, occurring in the Gd^{3+} complexes. The rate of the rearrangements is higher in the Gd(DTPA-BMA) (it is indicated by NMR studies) and so the rates of the

ligand exchange reactions of this complex are about two to three orders of magnitude higher than those of the Gd(DTPA)^{2-} and Gd(BOPTA)^{2-} . The lower kinetic inertness of Gd(DTPA-BMA) is consistent with the experiences, showing that it dissociates faster than Gd(DTPA)^{2-} or Gd(BOPTA)^{2-} , so the amount of retained Gd^{3+} in the living systems can be higher when Gd(DTPA-BMA) (Omniscan) is used as MRI contrast agent.

The rates of the ligand exchange reactions of Gd(DTPA-BMA) increase with the increase of pH from 6.5 to 9, because the attack of the less protonated $\text{H}_7\text{TTHA}^{(6-i)-}$ species via the formation of the ternary intermediates is more efficient. The increase of the rates of the exchange reactions of Gd(DTPA)^{2-} and Gd(BOPTA)^{2-} from pH 8.5 to 11 can be interpreted similarly, but on the contrary, the increase of pH from 6.5 to 8.5 results in a decrease in the rates of the reactions. This unexpected trend has been interpreted by assuming the validity of the general acid catalysis, which has a lower effect at higher pH. The proton(s) from the $\text{H}_7\text{TTHA}^{(6-i)-}$ species, can be transferred to the coordinated DTPA or BOPTA, when the dissociation of these ligands from the Gd^{3+} complex is more probable.

The ligand exchange reactions take place faster in the presence of the endogenous citrate, phosphate and carbonate ions at pH= 7.4. The rates of the exchange reactions increase with the increase in the concentration of these ions, but the effect of the citrate and phosphate is very low at their physiological concentrations. Phosphate ions may have significant effect on the reaction rates, particularly on that of the Gd(DTPA-BMA) , when the kinetic studies are carried out in phosphate buffer. The effect of the carbonate ions on the reaction rates is well measurable, because of its higher physiological concentration, when the increase in the rates of the exchange reactions is the largest for the Gd(DTPA-BMA) .

The stability constants of the Ln(bp12c4)^+ complexes have been obtained from direct potentiometric titrations, as the complex formation is fast. The stability

increases from the early lanthanides to the middle of the series, then remains relatively constant or slightly declines for the heavier lanthanides, similarly to $\text{Ln}(\text{DTPA})^{2-}$ chelates. In the presence of Zn^{2+} , the dissociation of $\text{Gd}(\text{bp12c4})^+$ proceeds both *via* proton- and metal-assisted pathways, and in this respect, this system is intermediate between DTPA-type and macrocyclic chelates, for which the dissociation is predominated by metal- or proton-assisted pathways, respectively. The Cu^{2+} exchange shows an unexpected pH-dependency, with the observed rate constants decreasing with increasing proton concentration.

The $\text{Gd}(\text{bp12c4})(\text{H}_2\text{O})_q^+$ complex is present in hydration equilibrium between nine-coordinate, monohydrated and ten-coordinate, bishydrated species. The rate of water exchange as assessed by ^{17}O NMR is extremely high, close to that of the Gd^{3+} aqua ion itself. This fast exchange can be accounted for by the flexible nature of the inner coordination sphere. The activation entropy suggests a strong associative character for the water exchange which presumably involves only the nine-coordinate, monohydrated species. Relaxometric and luminescence measurements, together with DFT calculations, indicate strong anion binding to $\text{Ln}(\text{bp12c4})(\text{H}_2\text{O})_q^+$ complexes, consistent with the complete replacement of the inner sphere water molecules.

For the novel ligand L^1 , based on an oxa-aza macrocyclic ring, a comprehensive study was performed, including thermodynamic, kinetic, relaxometric, ^{17}O -NMR and PARACEST measurements of its lanthanide(III)-complexes. Lanthanide ions form stable complexes with L^1 . Strong ternary complex formation was observed between GdL^1 and lactate and carbonate ions. In the presence of carbonate ions, a strong PARACEST effect was detected which increases with increasing carbonate concentration. It is necessary to make a complex ^1H -NMR study in order to understand the origin of this effect.

The constants characterizing the metal-exchange reactions between GdL^1 and $\text{Eu}(\text{III})$ and $\text{Zn}(\text{II})$ ions, as well as the water exchange rate were determined at 25 °C. Surprisingly, the most important pathway in the transmetallation reactions is the

Pálincás Zoltán: Nyílt láncú és makrociklusos ligandumokkal képzett lantanida(III) komplexek termodinamikai, kinetikai és relaxometriás vizsgálata

spontaneous dissociation, which makes the GdL^1 complex kinetically much less inert (half time of dissociation is approximately 14 h) than $Gd(III)$ complexes formed with other macrocyclic ligands.

VI. Tudományos közlemények

VI. 1. Az értekezés témájához kapcsolódó publikációk (Publications connected to the thesis)

Közlemények (Articles):

3. Zoltán Pálincás, Zsolt Baranyai, Ernő Brücher and Béla Rózsa; *Kinetics of the exchange reactions between $Gd(DTPA)^2-$, $Gd(BOPTA)^2-$ and $Gd(DTPA-BMA)$, used as MRI contrast agents, and the triethylenetetraamine-hexaacetate ligand* *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 3471-3478

2. Zoltán Pálincás, Adrián Roca-Sabio, Marta Mato-Iglesias, David Esteban-Gómez, Carlos Platas-Iglesias, Andrés de Blas, Teresa Rodríguez-Blas and Éva Tóth; *Stability, Water Exchange, and Anion Binding Studies on Lanthanide(III) Complexes with a Macrocyclic Ligand Based on 1,7-Diaza-12-crown-4: Extremely Fast Water Exchange on the Gd^{3+} Complex* *Inorg. Chem.*, **2009**, 48(18), 8878-8889

1. Marta Mato-Iglesias, Adrian Roca-Sablo, Zoltán Pálincás, David Esteban-Gómez, Carlos Platas-Iglesias, Éva Tóth, Andrés de Blas, and Teresa Rodríguez-Blas;

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Lanthanide Complexes Based on a 1,7-Diaza-12-Crown-4 Platform Containing Picolinate Pendants: A New Structural Entry for the Design of Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents
Inorg. Chem. **2008**, *47*, 7840-7851

Előadások és Poszterek (Lectures and Posters):

7. Zoltán Pálinkás, Róbert Király, Gyula Tircsó, Ernő Brücher,
Ternary complex formation between Gd(III)-chelates formed with heptadentate ligands and endogenous anions, COST D38 Annual Meeting, 2010.06. 21-22., Thessaloniki, Greece (poster)

6. Pálinkás Zoltán, Tircsó Gyula, Tóth Éva, Brücher Ernő, Tóth Imre,
Physico-chemical characterisation of Ln(oxa-aza-glicinate) complexes, 45. Annual Coordination Chemistry Conference, Mátraháza, 2010. 05. 26-28. (oral presentation)

5. Zoltán Pálinkás, Gyula Tircsó, Éva Tóth, Ernő Brücher, Imre Tóth,
Physico-chemical characterisation of lanthanide complexes formed with a novel oxo-aza macrocyclic ligand, 4th Meeting of COST Working Group 2 "MRI Contrast Agents", 5th-6th February 2010, University of Coimbra, Portugal (poster and oral presentation)

4. Zoltán Pálinkás, Adrián Roca-Sabio, Marta Mato-Iglesias, David Esteban Gomez, Carlos Platas-Iglesias, Andrés de Blas, Teresa Rodríguez-Blas and Éva Tóth,
Thermodynamic, kinetic and anion binding studies on lanthanide complexes of a macrocyclic ligand with picolinate arms, 10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 25 - 28 September, 2009 Debrecen (poster)

Pálinkás Zoltán: Nyílt láncú és makrociklusos ligandumokkal képzett lantanida(III) komplexek termodinamikai, kinetikai és relaxometriás vizsgálata

3. Pálinkás Zoltán, Baranyai Zsolt, Tóth Imre és Brücher Ernő,
Kinetics of the ligand exchange reaction of Gd(III)-DTPA derivative complexes in the presence of endogenous anions, 44. Annual Coordination Chemistry Conference, 28/05/08, Siófok, (oral presentation)

2. Zoltán Pálinkás, Marta Mato-Iglesias, Carlos Platas-Iglesias, Éva Tóth,
Thermodynamic and kinetic studies on lanthanide complexes of a macrocyclic ligand with picolinate arms, COST D38 WG 0002/06 MRI Contrast Agents Meeting, Orléans, 29/02/08-01/03/08 (poster)

1. Imre Tóth, Zoltán Pálinkás, Zsolt Baranyai, Béla Rózsa and Ernő Brücher,
Kinetics of the exchange reactions between Gd(III)-complexes of DTPA derivatives and TTHA, COST D38 WG 0002/06 MRI Contrast Agents Meeting, Orléans, 29/02/08-01/03/08 (poster)

**VI. 2 Az értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk
(Publications not connected to the thesis)**

Közlemények (Articles):

1. Zsolt Baranyai, Zoltán Pálinkás, Fulvio Uggeri, and Ernő Brücher; *Equilibrium Studies on the Gd³⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ Complexes of BOPTA, DTPA and DTPA-BMA Ligands: Kinetics of Metal-Exchange Reactions of [Gd(BOPTA)]²⁻*
Eur. J. Inorg. Chem. **2010**, 1948–1956