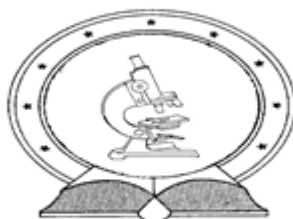


DE TTK



1949

**Hisztidintartalmú oligopeptidek és modelljeik fél- és teljes
szendvics Ru(II)-komplexei: oldategyensúly és szintézis**

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Bihari Zsolt

Témavezető: Dr. Buglyó Péter, egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2017

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács **Kémiai Tudományok Doktori Iskola K/2 programja** keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

Debrecen, 2017. április 10.

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Bihari Zsolt** doktorjelölt **2013 - 2016** között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/2** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.*

Debrecen, 2017. április 10.

a témavezető aláírása

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Kémia tudományágban

Írta: **Bihari Zsolt** okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémiai Tudományok doktori iskolája
(Koordinációs és analitikai kémiai programja) keretében

Témavezető: **Dr. Buglyó Péter**, egyetemi docens

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 2016.09.26.

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2017.

“It is not knowledge, but the act of
learning, not possession but the act of
getting there, which grants the
greatest enjoyment.”

Carl Friedrich Gauss

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a *Richter Gedeon Nyrt. Talentum Alapítványának*, hogy doktori képzésem során ösztöndíjat biztosított számomra.

Köszönöm *Prof. Dr. Fábíán István* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra a doktori értekezésem elkészítését az általa vezetett Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, *Dr. Buglyó Péter* egyetemi docensnek sokoldalú szakmai segítségéért, hasznos és értékes tanácsaiért.

Köszönet illeti *Dr. Farkas Etelka* professzor emeritát, *Dr. Sóvágó Imre* professzor emeritust és *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi tanárt, akik szívesen segítettek, ha kérdések merültek fel bennem.

Szeretném köszönetemet kifejezni *Nagyné Dombi Gizella* Tanszéki irodavezetőnek, aki mindig segítségemre volt a hivatalos ügyek intézésében.

Köszönettel tartozom a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* minden volt és jelenlegi tagjának, akik hasznos tanácsokkal segítették munkámat és baráti légkört biztosítottak. Külön köszönöm *Dr. Földi-Bíró Lindának*, hogy megtanította a műszerek használatát, és tanácsért mindig fordulhattam hozzá. Köszönet illeti *Dr. Kállay Csillát*, *Dr. Baginé Dr. Timári Saroltát*, *Dr. Fáriné Turi Ildikót*, *Dr. Lekkáne Szabó Orsolyát*, *Dr. Grenács Ágnest* és *Dávid Ágnes PhD* hallgatót szakmai, emberi és baráti támogatásukért. Külön szeretnék köszönetet mondani *Csire Gizellának* és *Lihi Norbertnek*, akikre bármiben számíthattam, és akikkel a hosszú évek során őszinte és mély barátság alakult ki közöttünk.

Köszönet illeti *Hüse Ilona* vegyésztechnikust, valamint *Godó Attila* műszaki ügyintézőt, akik segítségemre voltak a munkám során.

Köszönöm *Dr. Nagy Lajosnak*, *Dr. Kiss Attilának*, *Dr. Biri Bernadettnek*, *Nagy Tibornak* és *Antal Borbálának* az ESI-MS, *Dr. Nagy Zoltán* és *Dr. Baranyai Zsolt* egyetemi adjunktusnak az NMR mérésekben, *Dr. Eugenio Garribbának*, *Valeria Ugonenak* és *Lihi Norbertnek* a DFT számításokban nyújtott segítségüket.

Külön köszönet illeti *Dr. João D. G. Correiat* és az Universidade de Lisboa; Instituto Superior Técnico - IST; Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares kutatócsoport minden tagját, akik az egy hónapos lisszaboni tanulmányutam alatt segítettek a munkámat.

Végül, de nem utolsósorban hálásan köszönöm *szüleimnek*, *testvéremnek*, *feleségemnek* és családtagjainak, illetve barátaimnak a folyamatos támogatást, szeretetet és azt, hogy mindig mellettem álltak.

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
2.1 A vizsgált fémionok általános jellemzése	3
2.2 Rákellenes hatású platinakomplexek	3
2.3 Potenciálisan rákellenes hatású, oktaéderes szerkezetű Ru(III)-komplexek.....	4
2.4 Potenciálisan rákellenes hatású, félszendvics szerkezetű Ru(II)-komplexek.....	5
2.5 Az imidazolcsoportot tartalmazó vegyületek fémionmegkötő képessége ..	7
2.6 Egy vagy több imidazolgyűrűt tartalmazó oligopeptid modellvegyületek kölcsönhatása platinafémionokkal	8
2.7 Potenciálisan rákellenes hatású, teljes szendvics típusú peptidkonjugátumok.....	17
2.8 Specifikus szekvenciát tartalmazó peptidek jelentősége.....	21
2.9 Kelátképzőt tartalmazó konjugátumok és gallium(III)komplexeik.....	22
2.10 Célkitűzések	25
3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	26
3.1 Felhasznált vegyszerek.....	26
3.2 Vizsgált ligandumok	27
3.3 Teljes szendvics ruténium(II)komplex előállítása.....	28
3.4 Szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS).....	28
3.5 pH-potenciometria	30
3.6 Mágneses-magrezonancia spektroszkópia (NMR).....	33
3.7 UV-látható spektroszkópia.....	34
3.8 Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia.....	34
3.9 Elektroporlasztásos ionizációjú tömegspektrometria (ESI-MS)	35
3.10 Kvantumkémiai számítások (DFT)	36

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK.....	37
4.1 Új peptid ligandumok szintézise és pH-potenciometriás vizsgálata	37
4.2 A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kation kölcsönhatása His-modell kismolekulákkal	38
4.3 A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kölcsönhatása hisztidint tartalmazó oligopeptidekkel	47
4.3.1 Egy és két hisztidin aminosavat tartalmazó dipeptidek ruténium(II)komplexei	47
4.3.2 A három hisztidint tartalmazó oligopeptidek ruténium(II)komplexei ..	59
4.4. HAV szekvenciát tartalmazó peptid ruténium(II)komplexei	69
4.4.1 HAV szekvenciát tartalmazó félszendvics Ru(II)-komplex	69
4.4.2. HAV szekvenciát tartalmazó teljes szendvics típusú Ru(II)-komplex szintézise, jellemzése és biológiai vizsgálata	72
5. ÖSSZEFOGLALÁS	79
6. SUMMARY	82
7. IRODALOMJEGYZÉK	86
8. FÜGGELÉK	102

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

Å	angström
Ala, A	alanin
Ac	acetylsoport (védőcsoport)
AcHm	N-acetil-hisztamin
ACN	acetonitril, CH ₃ CN
Ac ₂ O	ecetsavanhidrid
A375	humán melanómasejt
CAR	sejt adhéziós felismerés (Cell Adhesion Recognition)
COSY	kétdimenziós homokorrelációs spektroszkópia (Correlation Spectroscopy)
Cp	ciklopentadienil anion
Cp*	pentametilkiklopentadienil anion
Ct	aromás gyűrű középpontját jelöli ("centroid")
DCM	diklórmétán
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropil-etilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamid
DMSO	<i>N,N</i> -dimetil-szulfoxid
DODT	2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol
ESI	elektroporlasztásos ionizáció (ElectroSpray Ionization)
Et ₂ O	dietil-éter
Fmoc	9-fluorenil-metiloxi-karbonil (védőcsoport)
HAV	histidil-alanil-valinil szekvencia
HAVAY-NH ₂	H-His-Ala-Val-Ala-Tyr-NH ₂
H, His	hisztidin
H*, His(<i>N</i> 3-Me)	<i>N</i> 3-metilezett hisztidin
HOBt	<i>N</i> -hidroxibenzotriazol
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High-Performance Liquid Chromatography)
HSQC	kétdimenziós heterokorrelációs mérés, valamely heteroatommal (pl. ¹³ C) közvetlen kémiai kötésben lévő proton detektálására (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
IC ₅₀	a maximális hatás felének eléréséhez szükséges koncentráció
KP1019	<i>transz</i> -[Ru(III)Cl ₄ (Ind) ₂]IndH, Ind = indazol
KP1339	<i>transz</i> -[Ru(III)Cl ₄ (Ind) ₂]IndNa, Ind = indazol
MCF-7	humán emlőkarcinóma sejtvonal
MDA-MB-231	humán emlőkarcinóma sejtvonal
Me	metilcsoport

Meim	N-metilimidazol
MS	tömegspektrometria
NAMI-A	<i>transz</i> -[Ru(III)Cl ₄ (Im)(DMSO)]ImH, Im = imidazol, DMSO = dimetil-szulfoxid
^{nat} Ga	a gallium természetes, stabil izotópjai
N _{amino}	N-terminális aminocsoport
NH _{amid} , N ⁻ _{amid}	protonált és deprotonált amidnitrogén
N _{1im} , N _{3im}	1-es vagy 3-as helyzetben lévő imidazolnitrogén
NMP	N-metil-2-pirrolidon
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia (Nuclear Magnetic Resonance)
NODA-GA	2,2'-(7-(1-karboxil-4-((4-benzil-izotiocianát) amino)-4-oxobutil)-1,4,7-triazononán-1,4-diil) diecetsav
NOTA	1,4,7-tirazaciklononán-1,4,7-triecetsav
NOTAC6	1,4,7-tirazaciklononán-1-hexanoiksav-4,7-diecetsav
NOTAC8	1,4,7-tirazaciklononán-1-octanoiksav-4,7-diecetsav
OH _{karboxil} , O ⁻ _{karboxilát}	protonált karboxiloxigén és deprotonált karboxilát oxigén
PBS	foszfát-puffer
PC-3	humán prosztatata sejtvonala
<i>p</i> -cym, <i>p</i> -cimol	1-izopropil-4-metilbenzol
PN	imidazolil-foszfin
RP-HPLC	fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography)
RuCp	[(η ⁵ -C ₅ H ₅)Ru] ⁺ , [(η ⁵ -ciklopentadienil)Ru] ⁺
SPPS	szilárdfázisú peptidszintézis (Solid-Phase Peptide Synthesis)
TBTU	2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium tetrafluoroborát
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butil (védőcsoport)
TFA	trifluorecetsav
TIS	triizopropil-szilán
TOF	repülési idő (Time Of Flight)
Trt	trifenil-metil, tritil (védőcsoport)
TSP	nátrium-3-trimetilszilil-1-propánszulfonát
UV-Vis	ultraibolya-látható (UV-Visible)
Val, V	valin
Tyr, Y	tirozin
Xaa	aminosav
⁶⁷ Ga	a gallium gamma-sugárzó izotópjai, t _{1/2} = 3,3 nap

1. BEVEZETÉS

A kemoterápiában közel 40 éve használják a platina(II)iont tartalmazó síknégyszetes ciszplatint, $[(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2]$. Használata során azonban számos mellékhatás lépett fel, továbbá az irodalomban beszámoltak a kezeléseket követően kialakuló sejtrezisztenciáról is, melyek korlátozzák az alkalmazhatóságot. Az említett hátrányok miatt kezdődött el intenzív kutatómunka olyan új fémkomplexek kifejlesztésére, melyek hasonló aktivitással, de nagyobb szelektivitással és kisebb toxicitással rendelkeznek. A platinacsoportba tartozó ruténium vegyületei is így kerültek a kutatás előterébe. Az utóbbi évtizedekben számos ruténium(II)- és oktaéderes ruténium(III)komplex daganatellenes aktivitását igazolták; ilyen például a ruténium(III)-tartalmú KP1019, a KP1339, mely a KP1019 nátrium-sója, illetve a NAMI-A. Utóbbi volt az első ruténium fémiont tartalmazó komplex, mely a klinikai kipróbálás fázisába lépett és jelenleg a II. fázisba jutott. A kutatási eredmények azt mutatták, hogy az ezekben a vegyületekben lévő Ru(III) *in vitro* a megfelelő Ru(II) -vegyületté képes redukálódni, amely felelős lehet a megfigyelt citotoxicitásért. A +2 oxidációs állapotot például egy félszendvics szerkezetű, ún. zongoraszék geometriában penta- vagy hexahapto kötésmóddal, aromás ligandumokkal fém-szén kötést kialakítva is stabilizálni lehet. Ebben a szerkezetben a három szabad koordinációs hely közül általában kettőt egy (XY) kelátképző pl. NN- vagy OO-donor ligandum foglal el, míg a harmadik koordinációs helyen valamilyen egyfogú ligandum található.

Az irodalomban számos Ru(II) -komplexet szilárd fázisban jellemeztek, oldatbeli viselkedésük tanulmányozására azonban alig található adat. Ezért a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén, a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban, a félszendvics szerkezetű Ru(II) -komplexekkel az utóbbi egy évtizedben végzett oldategyensúlyi vizsgálatok értékes információkat nyújthatnak a komplexek biotranszformációs, ligandumcsere reakciókban történő átalakulásának a megértésében. A lágy karakterű Ru(II) -kation főleg S- és N-donoratomokkal hoz létre stabil kötéseket, így például a biológiai rendszerekben igen gyakran előforduló, felületi hisztidin imidazolil N-donoratomot tartalmazó peptidekkel kölcsönhatásba léphet.

Az utóbbi években a félszendvics szerkezetű komplexek mellett a kutatások a teljes szendvics típusú vegyületek vizsgálatára is kiterjedtek. Jelenleg az

irodalomban még csak kevés, de ígéretes eredmény található a teljes szendvics szerkezetű, ruténium(II)-t tartalmazó vegyületek biológiai aktivitásáról. Az ilyen típusú komplexek többféle úton előállíthatóak, például vizes közegben, látható fény besugárzással, jó hozammal szintetizáltak vegyületeket.

Napjainkban egyre intenzívebb kutatások folynak peptidkonjugátum komplexek előállítására is, ahol a fémiont, vagy fémiont tartalmazó komplexet egy olyan bioaktív peptidhez kapcsolják hozzá, melyet a rákos sejtek felszínén található receptorok felismerhetnek, így a várhatóan rákellenes vegyület könnyen és szelektíven juthat el a célsejtekig, ahol kifejtheti citotoxikus hatását. Az ilyen biokonjugátumok a peptid szekvenciában olyan aminosav sorrendet tartalmaznak, melyek a biofelismerési folyamatokban játszanak szerepet. Ilyen konzervált szekvencia például a hisztidil-alanil-valinil (His-Ala-Val, HAV). A vizsgálatok azt mutatták, hogy a HAV szekvenciát tartalmazó szintetikus peptidek számos rákos sejtvonalakon mutattak apoptotikus hatást, továbbá gátolhatják a sejtek közötti adhéziós folyamatokat, így a gyógyszermolekulák könnyebben eljuthatnak a rákos sejtekig. A vegyületek szervezetben történő eloszlásának követéséhez például radioaktív gallium(III)-fémiont tartalmazó triaza kelátor egységet kapcsolhatunk a peptid alapú komplexhez, így akár két fémiont is tartalmazó, peptidkonjugátum komplexet lehet előállítani.

A doktori munkám első szakaszában egy félszendvics ruténium(II) akvaion és fehérjék felületi hisztidin imidazolilcsoportja közötti kölcsönhatást vizsgáltuk. A dolgozat második részében pedig a teljes szendvics peptidkonjugátum komplex szintézisének kapott eredményeinket foglaltam össze.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A vizsgált fémionok általános jellemzése

A periódusos rendszerben közvetlenül a vas alatt, a könnyű platinafémek csoportjában található a *ruténium* (Ru), mely elektronszerkezete $[\text{Kr}]4d^75s^1$. Oxidációs száma +2 és +8 között változhat, de π -komplexekben és fémorganikus vegyületekben ennél kisebb oxidációs állapotban is előfordulhat. A +2, +3 és +4 oxidációs állapotban kationokat képez, míg ettől nagyobb oxidációs állapotokban oxokationok és oxoanionok formájában van jelen. A ruténiumnál a +3-as oxidációs állapot tekinthető a legstabilabbnak. Komplexei leginkább oktaéderesek, például a kis spinszámú $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, melyben a vízmolekulák N-donor ligandumokkal helyettesíthetők. A +2-es oxidációs állapotú ruténium könnyen oxidálódik +3-as állapottá, azonban megfelelő ligandumokkal (π -akceptor, η^5 -arenil vagy η^6 -arén) +2-es állapotban stabilizálható a fémion. A d^6 elektronszerkezetű, ruténium(II) vegyületek oktaéderesek és diamágnesesek. A Ru(II) igen nagyszámú komplexet képez mind σ -donor (aminok, halogenidek) mind π -akceptor (CN^- , CO, NO, Cp^-) ligandumokkal. A fémion oxidációs állapotától, valamint a ligandum természetétől függően a képződő komplexek kinetikai inertségét nagy különbségek jellemezhetik, így a ligandum cseresebességek a másodperc – év tartományban változhatnak.¹

A *gallium* (Ga) a periódusos rendszerben a földfémek csoportjába tartozó elem, elektronszerkezete: $[\text{Ar}]3d^{10}4s^24p^1$. Legjellemzőbb oxidációs állapota a +3. Koordinációs vegyületeiben az oktaédes geometria a leggyakoribb. A fémion hard preferenciát mutat, megfelelő ligandumokkal kinetikailag labilis komplexet képez, de hidroxidokomplexei viszonylag inertek. Állatkísérletekben jelentős citotoxikus hatást mutatott számottevő toxicitás nélkül.¹ A galliumnak a legjelentősebb izotópjai a stabilis ^{69}Ga és ^{71}Ga , valamint a ^{67}Ga és ^{68}Ga radioizotópok.

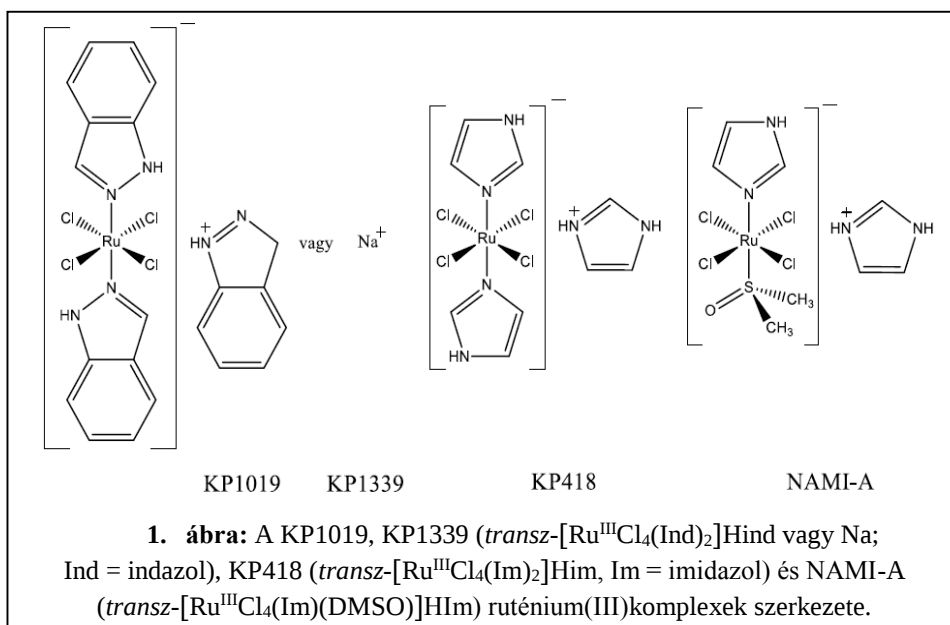
2.2 Rákellenes hatású platinakomplexek

A WHO *World Cancer 2012 Report*-ban közölt adatai alapján a rák a vezető halálozási ok a fejlett országokban. Becslések szerint két évtized múlva közel duplájára nőhet a diagnosztizált esetek száma. Azonban a statisztikák alapján a daganatos betegek túlélési rátája növekedett a hatékonyabb rákellenes vegyületek kifejlesztésének, alkalmazásának köszönhetően.²

A platinafém alapú rákellenes vegyületek több mint 40 éve vannak klinikai használatban.³ A gyógyszeres terápia történetében az 1965-ben felfedezett ciszplatín⁴ nagy mérföldkövet jelentett, mely új korszakot nyitott a fémiontartalmú gyógyszerek alkalmazásában.⁵ Napjainkig a ciszplatín és második, harmadik generációs analógjai (karboplatin, oxaliplatín, szatraplatin) a leghatásosabb kemoterápiás vegyületek a klinikumban.⁶ Klinikai felhasználhatóságuk főbb problémái azonban a jelentős toxicitás és a kialakuló rezisztencia.^{7,8} Ezért a ciszplatín felfedezése óta intenzíven folyik olyan új fémkomplexek kifejlesztése, melyek megfelelő citotoxikusságuk mellett jobb szelektivitással és kis toxicitással rendelkeznek, valamint a platinakomplexekkel összevethető a ligandumcseresebességük.^{9,10} Így került a kutatás előterébe a ruténium, mely komplexei ígéretesnek tűnnek a jövőbeli rákterápiás felhasználásban.¹¹

2.3 Potenciálisan rákellenes hatású, oktaéderes szerkezetű Ru(III)-komplexek

A ruténium-tartalmú komplexek iránti érdeklődés a ruténium-vörös rákellenes aktivitásának felfedezése nyomán indult el, valamint amikor kimutatták a ruténium komplexek tumor szövetekben történő felhalmozódását.^{12,13} Clarke és munkatársai 1976-ban igazolták a *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃] rákellenes hatását, azonban a klinikai tesztek során oldhatósági problémába ütköztek. Áttörést Keppler, Alessio és Sava indazol és imidazol ligandumokat tartalmazó ruténium komplexei

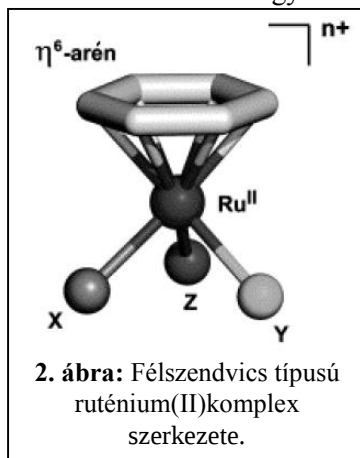


jelentették. Ezekben az oktaéderes Ru(III)-komplexekben a központi fémionhoz a négy kloridionon kívül axiálisan egy-egy indazol (KP1019 és annak nátriumsója a KP1339) vagy imidazol (KP418) ligandum koordinálódik, míg a KP418-analóg NAMI-A vegyületben az egyik imidazol ligandumot egy DMSO molekulával helyettesítették (*1. ábra*). Jelenleg ezek a komplexek a klinikai kipróbálás I./II. fázisában vannak.^{14,15}

Az intravénásan szervezetbe juttatott ruténium-komplexek tárolását az albumin, míg szállításukat a transferrin végzi, ez a ruténium vashoz történő hasonlóságából adódik.^{16,17} A rákos sejtekben jelenlevő nagy mennyiségű transferrin receptor segítségével a ruténium-komplexek a transferrinhez kötődve juthatnak el a rákos sejtekig, ahol az endoszómába kerülve, az oxigénhiányos állapotnak köszönhetően a gyorsabb ligandumcserére képes megfelelő +2-es oxidációs állapotú komplexszé redukálódni.^{18,19} Ezt követően, például a DNS-hez kötődve fejthetik ki rákellenes hatásukat. Ezt a hipotézist “*activation by reduction*”, azaz redukció útján történő aktiválásnak nevezik az irodalomban.²⁰ Fontos megemlíteni, hogy a ruténium-komplexek nem redukálódnak mialatt koordinálódnak a szérum fehérjékhez, ez a folyamat a rákos sejten belül történik.^{21,22} A redukció általi aktiválás hipotézis érvényességének bizonyítékaul szolgál, hogy csökkentett oxigén atmoszféra alatt megnövekedett a citotoxicitás és a DNS-hez való kötődés a KP418 komplexnél.²³ A KP1019 NMR vizsgálata során pedig a redukzív környezetben (aszcorbinsav, glutation) rövid idő alatt Ru(III)-ból Ru(II)-komplex alakult ki, miközben a reaktivitás megnövekedett.^{24,25}

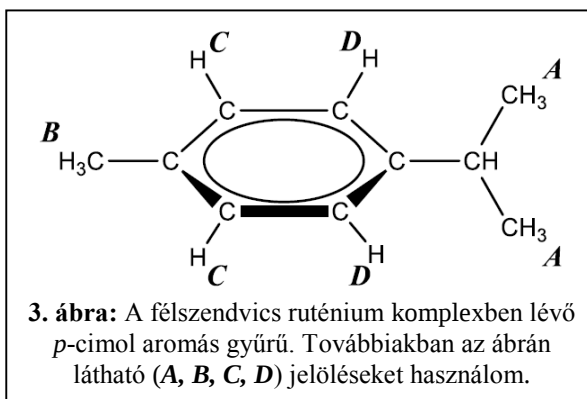
2.4 Potenciálisan rákellenes hatású, félszendvics szerkezetű Ru(II)-komplexek

A félszendvics, η^6 -arén ligandumot tartalmazó ruténium vegyületek kutatásának úttörői Sadler és Dyson.^{26,27} A +2-es oxidációs állapotú ruténium fémiont az ún. zongoraszék geometriájú, félszendvics szerkezetű, $[(\eta^6\text{-arén})\text{Ru}(\text{XY})(\text{Z})]^{n+}$ általános összetételű komplexekben lehet stabilizálni (*2. ábra*), ahol az XY valamilyen kelátképző, míg a Z egy monodentát ligandumot jelöl. Ezek olyan fémorganikus vegyületek, melyekben a fémion hat egyenrangú fém-szén kötést kialakítva, hexahapto kötésmóddal aromás gyűrűhöz



kötődik. A η^6 -arén stabilizálja a +2-es oxidációs állapotú ruténiumot, hidrofóbbá teszi, mely fokozza a biomolekuláris felismerési folyamatokat. A $[(\eta^6\text{-benzol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]\text{SO}_4$ volt a legelső ilyen típusú komplex melyet izoláltak és szerkezetileg is karakterizáltak.^{28,29} Sadler és munkatársai megállapították, hogy egy adott $[(\eta^6\text{-arén})\text{Ru}(\text{XY})(\text{Z})]$ komplex (arén = bifenil; XY = etilén-diamin; Z = Cl^- -ion) a sejtmagban döntően már akva vagy inaktív hidroxidokomplex formájában van jelen.³⁰ Ezért kutatócsoportunkban részletesen vizsgálták a különböző aromás ligandumokat tartalmazó ruténium(II) akvakomplexek hidrolitikus folyamatait kloridion jelen- és távollétében.^{31,32} A pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás, illetve különböző NMR és ESI-TOF-MS módszerekkel kapott oldategyensúlyi és szerkezeti eredmények azt mutatták, hogy a $[(\eta^6\text{-arén})\text{Ru}(\text{XY})(\text{Z})]$ komplexek disszociációjával képződő $[(\eta^6\text{-arén})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ ionok, egyéb ligandum távollétében vizes oldatban a pH 4-6 közötti tartományban, reverzibilis folyamatokban átalakulnak a megfelelő, $[(\eta^6\text{-arén})\text{Ru}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ összetételű inaktív hidroxidokompleksszé.

Számos fémorganikus komplex, mely η^5 -arenil vagy η^6 -arén ligandumot tartalmaz, rákellenes hatást mutatott.³³⁻³⁶ Az irodalomban 1992-ben tettek említést először a ruténium(II)-arén félszendvics típusú komplexek lehetséges gyógyászati (rákellenes³⁰, maláriaellenes³⁷⁻³⁹ hatás) felhasználásáról.⁴⁰ Azt is megállapították, hogy a szerkezetbeli biotranszformációs reakciók során a +2-es oxidációs állapotú ruténium gyorsabban koordinálódik a biomolekulákhoz, mint a Ru(III).⁴¹ Ezek a ligandumcsere és redoxi átalakulások nyilvánvalóan szorosan összefüggnek az *in vivo* hatásokkal, így a biológiai aktivitás mélyebb megértése, megismerése végett elengedhetetlen ezen komplexek kis és nagy biomolekulákkal való kölcsönhatásának vizsgálata. Kutatócsoportunkban szilárd és oldatfázisban tanulmányozták a biológiai jelentőségű, döntően O-donor kismolekulák és azok modelljeinek $[(\eta^6\text{-p-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kationnal való kölcsönhatását.⁴²⁻⁴⁴ Kiterjesztve ezt a kutatást, doktori munkám keretében az N-donoratomú kismolekulák és modelljeik kölcsönhatását

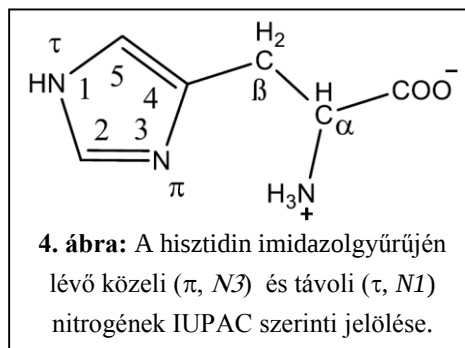


vizsgáltuk a modellként választott *p*-cimol gyűrűt tartalmazó, félszendvics

ruténium(II) akvakationnal. A *p*-cimol szerkezete és gyűrű hidrogénjeinek jelölése a 3. ábrán látható.

2.5 Az imidazolcsoportot tartalmazó vegyületek fémionmegkötő képessége

Az átmenetifémionok megkötése szempontjából a biológiai rendszerek egyik legfontosabb kötőhelyei a hisztidin aminosav imidazolgyűrűjének nitrogén donoratomjai. Az imidazol pK_s értéke közel esik a fiziológiás pH-hoz. Ennek következtében a hisztidintartalmú biomolekulák környezetének kis mértékű pH változása megváltoztathatja az imidazolgyűrű töltését. Amíg kis pH-n, mindkét imidazolnitrogén protonált formában van és imidazólium kationt képez, addig erősen lúgos pH-n, illetve fémkomplexekben az imidazol mindkét nitrogénen lévő protonját is elveszítheti, és így kialakulhat az imidazolát ion, mely két fémiont is megköthet. A hisztidintartalmú peptidok biológiai aktivitásában fontos szerepet játszik az imidazolgyűrű tautomerizációja.⁴⁵ Az irodalomban különböző NMR technikákkal tanulmányozták az imidazolbeli tautomer állapotok változását.^{46–48} Az IUPAC szerinti, a hisztidinre vonatkozó nomenklatúrát a 4.



4. ábrán tüntettem fel. A imidazolnitrogén atomjait *pros* (közeli, π , $N3$) és *tele* (távoli, τ , $N1$) jelölésekkel különböztetjük meg. Innentől kezdve az imidazolnitrogének $N1$, illetve $N3$ jelölését fogom használni az értekezésemben.

A továbbiakban, az imidazolt tartalmazó vegyületek, illetve a több hisztidin aminosavat tartalmazó oligopeptidok, fehérjék platinafémionokkal való kölcsönhatásának irodalmi eredményeit ismertetem, az oligopeptidokban és peptidokban lévő aminosavak egy-, illetve hárombetűs rövidítéseit használva.⁴⁹

Az irodalomban több átmenetifémion kölcsönhatását vizsgálták imidazol tartalmú molekulákkal, valamint imidazol ligandumot tartalmazó komplexeket is szintetizáltak a jobb vízoldhatóság elérése érdekében. Az egyik legegyszerűbb szerkezetű imidazolt tartalmazó modellvegyület az N-metilimidazol (Meim). Dyson kutatócsoportjában szintetizáltak először Meim ligandumot tartalmazó ruténium(II) félszendvics komplexeket, melyek lényegében hasonló citotoxicitás

értéket mutattak, mint a RAPTA (Ru-Arén-PTA, PTA = 1,3,5-triaza-7-foszfaadamantán) komplex.⁵⁰

Az N-metilimidazolt karbén komplexek előállítására is használták, azonban a $[(\eta^5\text{-Cp})\text{Ru}(\text{MeCN})_3](\text{PF}_6)$ komplexszel való reakciója során az imidazolgyűrű C2-es szénatomja helyett a Meim N3-as nitrogénje koordinálódott a fémionhoz, egy kétmagvú $[(\eta^5\text{-Cp})_2\text{Ru}_2(\kappa^1\text{N}, \text{N}'\text{-Meim})_2(\mu\text{-OH})_2](\text{PF}_6)_2$ komplex képződése során. A komplex kristályszerkezetét röntgendiffrakciós módszerrel igazolták.⁵¹ Imidazol, illetve alkil-imidazol monodentát ligandumok koordinálódását is vizsgálták félszendvics ruténium(II)-vel.^{50,52} Az irodalomban ismert az imidazol hídligandumként való felhasználása, mely során az imidazolgyűrűhöz valamilyen vegyületet (fenoxazint, etakrinsavat) konjugálnak. Az így kialakított imidazol-alapú ligandumokat félszendvics típusú Ru(II)-fémionhoz kapcsolták, így P-glikoprotein inhibitorokat sikerült előállítani, melyek jelentős rákellenes hatását igazolták.⁵³ Hasonlóképpen szintetizáltak GST (Glutation-S-Transzferáz) inhibitor komplexet, $[(\eta^6\text{-p-cimol})\text{Ru}]^{2+}$ és imidazolátó hídligandumot tartalmazó etakrinsav reakciójával.⁵⁴ Imidazolil-foszfin (PN) ligandumokkal is előállítottak félszendvics szerkezetű ruténium(II)komplexeket,⁵⁵ és röntgendiffrakciós technikával meghatározták a komplexek szerkezetét, ahol a ruténium három szabad koordinációs helyére két imidazolil-foszfin és egy kloridion koordinálódott. A Ru-N_{im} kötéstávolságok 2,096 Å és 2,087 Å, míg a Ru-Cl kötéstávolság 2,400 Å voltak.⁵⁵

2.6 Egy vagy több imidazolgyűrűt tartalmazó oligopeptid modellvegyületek kölcsönhatása platinafémionokkal

A félszendvics, η^6 -arén ruténium komplexek aminosavakkal, peptidekkel, valamint nukleobázisokkal való kölcsönhatásának vizsgálatát *Sheldrick és Beck* foglalták össze.^{56,57} Az 1970-es években szintetizáltak először félszendvics komplexeket α -aminosav ligandumokkal.⁵⁸ Ma már számos fémion (Fe, Ru, Os, Rh) α -aminokarboxilát karbonil komplexe is ismeretes.⁵⁹ Az oldalláncot nem tartalmazó α -aminosav anionokkal N,O-kelátú diasztereomereket kaptak 1:1 aránynál, míg a koordinálódó oldalláncot tartalmazó α -aminosav anionok tridentát módon koordinálódtak.^{60–62} A Co, Rh, Ir η^5 -arenil (Cp, Cp*), valamint a Ru, Os η^6 -arén komplexei hasonló szerkezetű vegyületeket alkottak α -aminosav ligandumokkal, fémionközpontú kiralitáscentrum kialakulása közben.

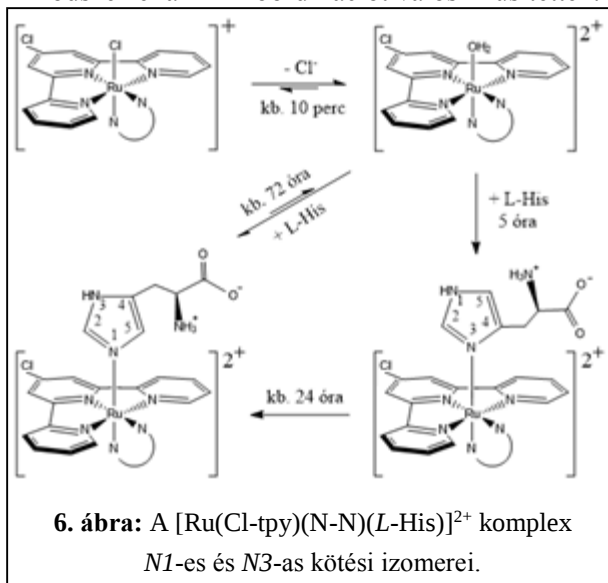
Sadler és munkatársai a legfontosabb biomolekulák kölcsönhatását vizsgálták a platinafémionokat tartalmazó komplexekkel. Így került a kutatás előterébe az

abszolút konfiguráció meghatározására a CIP (Cahn-Ingold-Prelog) konvekciót használják, azonban a pszeudooktaédes komplexeknél, melyek arén ligandumot tartalmaznak, az IUPAC-ban nem tisztázott az elnevezésük.

Az aminosavak közül az *L*-hisztidinnel (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$, Cl^-),⁷² valamint (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$, $\text{O}^-_{\text{karboxilát}}$) kötési izomereket detektáltak.⁶⁰ Az NMR, ESI-MS és HPLC módszerekkel kapott eredmények azt mutatták, hogy az igen lassú komplexképződés során *N1* és *N3* kötési izomerek alakultak ki, valamint a komplexképződés 310 K hőmérsékleten, 24 óra elteltével még csak 22 %-os volt.^{73,74} Az egy hisztidint tartalmazó, kis tagszámú oligopeptidek fémionhoz való koordinációjának tanulmányozásakor igazolták, hogy először a hisztidin imidazolnitrogénje koordinálódik a fémionhoz, majd a peptidcsoport fémion indukált deprotonálódásával és koordinációjával egy hattagú kelátgyűrű alakul ki.^{75–79}

Kostic és munkatársai a $[\text{Pt}(\text{trpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ (trpy = 2,2',6',2''-terpiridin) és a *Candida krusei* gombából származó citokróm-c közötti kölcsönhatást vizsgálták, ahol a fehérje hisztidin imidazolnitrogénje kötődött a fémionhoz és kialakult a $[\text{Pt}(\text{trpy})\text{His}]^+$ komplex.^{80,81} Míg az UV-látható spektroszkópiás vizsgálat során nem tudták eldönteni, hogy az imidazolnitrogének közül az *N1* vagy *N3* koordinálódik, addig ^1H NMR módszerrel az *N1* koordinációt valószínűsítették.⁸⁰

A $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{N-N})\text{Cl}]^+$ (Cl-tpy = 4'-kloro-2,2',6',2''-terpiridin és N-N = 1,2-diaminoetán; 1,2-diaminociklohexán) és *L*-His közötti reakciót vizsgálva a $[\text{Pt}(\text{trpy})\text{His}]^+$ -hez hasonlóan az imidazolnitrogén koordinációját igazolták (6. ábra). DFT számításokkal azt is sikerült meghatározniuk, hogy az *N1*-es nitrogén



6. ábra: A $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{N-N})(\text{L-His})]^{2+}$ komplex *N1*-es és *N3*-as kötési izomerei.

koordinációja termodinamikailag preferáltabb, mint az *N3*-as nitrogéné.⁸²

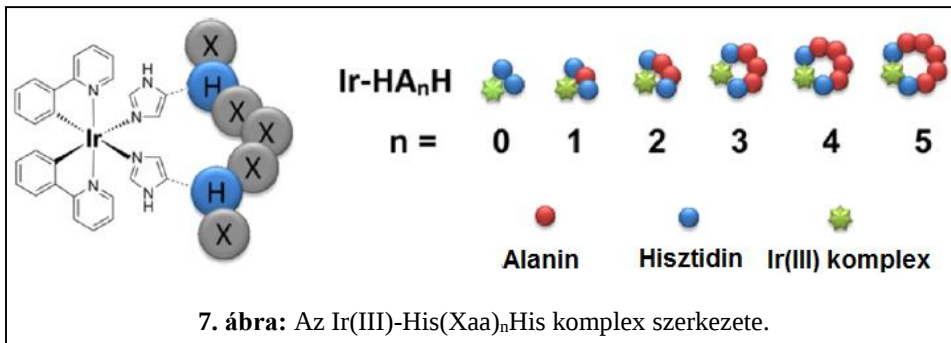
Az H-Ala-His-OH, H-Gly-His-OH, H-Gly-His-Gly-OH, H-Gly-Gly-His-OH és H-Gly-His-Lys-OH oligopeptidek kölcsönhatását ugyancsak kiterjedten

vizsgálták számos fémionnal. A $[(\text{en})\text{Pd}(\text{D}_2\text{O})_2]^{2+}$ és a $\text{cisz}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{D}_2\text{O})_2]^{2+}$ is könnyen alkot (N_{amino} , N3_{im}) kötésmódú komplexet nagyon savas ($\text{pH} < 1$)^{76,83} közegben, míg más fémionok csak nagyobb pH-n.^{84,85} A palládium(II) már $\text{pH} < 2$ esetén indukálja az amidcsoport deprotonálódását és koordinálódását, amikor is (N_{amino} , N^-_{amid} , N3_{im}) kötésmódú komplex keletkezik.⁸³ A H-Ala-Ala-His-OH, H-Gly-Gly-His-OH, H-Pro-His-OH és H-His-His-OH réz(II)komplexeinél is ezt a kötődést igazolták.^{86,87} Az amidcsoport fémion indukált deprotonálódását és koordinálódását több fémionnal való kölcsönhatás vizsgálata során is megfigyelték, ahol a koordináció a következő pH-kon játszódik le: $\text{Pd} (2) < \text{Cu} (4) < \text{Ni} (8) < \text{Co} (10)$.^{78,88}

A szekvenciában első helyen hisztidint tartalmazó oligopeptidek (H-His-Gly-OH, H-His-Gly-Gly-OH, H-His-His-OH, H-His-Gly-His-OH) kölcsönhatását a Cu(II) ^{86,89}, Cu(II)/Ni(II) ⁹⁰, $\text{Fe(II)/Zn(II)/Cu(II)/Ni(II)/Co(II)}$ ^{84,85} fémionokkal tanulmányozták leggyakrabban. A vizsgálatok azonban nem csak ezekre a fémionokra limitálódtak, platinafémionokkal is történtek kísérletek. Különböző NMR (1D, 2D és ¹⁹⁵Pt NMR) módszerekkel részletesen vizsgálták a H-His-Ala-OH és H-His-Gly-Ala-OH, valamint platina ($\text{cisz}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{D}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$; $[(\text{dien})\text{Pt}(\text{D}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2$; K_2PtCl_4) vagy palládium ($[(\text{dien})\text{Pd}(\text{D}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2$; $[(\text{en})\text{Pd}(\text{D}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$; K_2PdCl_4) közötti kölcsönhatást.⁷⁶ Az eredmények azt mutatták, hogy a Pd(II) -sók már $\text{pH} < 1$ -nél az N_{amino} , N1_{im} vagy N3_{im} csoportok deprotonálódását is indukálhatják. A $[(\text{dien})\text{Pd}(\text{D}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2$ imidazollal való kölcsönhatásakor imidazolátóhidas komplex képződését figyelték meg, ahol a ligandum két fémiont is meg tud kötni az N1 és N3 nitrogénjével. A Pt(II) -sók esetében, amíg savas közegben a karboxilátcsoport kötődését igazolták, miközben a C-terminus felőli alanin karboxilcsoportjának kémiai eltolódása 182,02 ppm-ről 180,29 ppm-re változott, addig a pH növelésével (N_{amino} , N3_{im}) koordináció alakult ki. A $[(\text{dien})\text{Pt}(\text{D}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$ imidazol komplexénél, ellentétben a palládium megfelelő komplexénél tapasztaltakkal, imidazolató híd kialakulását nem mutatták ki. Itt a fémion főleg a hisztidin N3 imidazolnitrogénjéhez kötődött.⁷⁶

A fehérjékben az aminosavak, több mint 30 %-a α -hélixet alkot így a metalloproteinekben az átmenetifémionok gyakran az α -hélixben kötődnek. Ennek okán a His-(Xaa)₃-His aminosav szekvenciát tartalmazó oligopeptidek kölcsönhatását vizsgálták platinafémionokkal.⁹¹ Az irodalomban beszámoltak irídium(III)-at tartalmazó hisztidin peptidek sejtjelölő tulajdonságáról is.^{92,93} A szekvenciában különböző pozícióban két hisztidint tartalmazó peptideket szintetizáltak: His-(Xaa)_n-His (ahol Xaa = Ala, $n = 0-5$) (7. ábra). A His-His peptid

lassan és gyengébben kötődött, míg az alanint tartalmazó peptidek gyorsabban reagáltak az irídium(III)komplexszel.



A *cisz*-diamminoplatina(II) komplexszel a koordináció az N-terminus felől indul meg és az N_{amino}, N3_{imidazol} koordinálódik, a második imidazol kötődése nem mutatható ki. A [(dien)Pd(D₂O)₂]²⁺ komplex N-terminus felőli hisztidinnél az N1 és N3 nitrogénhez is koordinálódhat egyszerre, míg a C-terminus felőli hisztidin esetében vagy az N1-hez, vagy az N3-hoz kötődött savas pH-n. Semleges és lúgosabb közegben már mind a két imidazolnitrogén meg tud kötni palládium fémiont. Ez a tulajdonság a His és az Ac-His esetében volt tapasztalható.⁹⁴

Fairlie és munkatársai az *i* és *i*+4 pozícióban metilezett hisztidint (His*) tartalmazó (Ac-His*-Glu-Leu-Thr-His*-Val-Thr-Asp-His*-NH₂, Ac-His*-Glu-Leu-Thr-His*-Ala-Val-Thr-Asp-Tyr-His*-Glu-Leu-Thr-His*-NH₂ és Ac-His*-Ala-Ala-Ala-His*-Glu-Leu-Thr-His*-His*-Val-Thr-Asp-His*-NH₂) peptidek [Pd(en)]²⁺ komplexeit vizsgálták. A kötési izomerek felderítésére 1D, 2D és ¹⁵N NMR technikát alkalmaztak.^{95,96} A [(en)Pd(His*(Xaa)₃-His*)]²⁺ komplex képződése során 22-tagú makrociklus keletkezett. 2008-ban az Ac-His-Ala-Ala-Ala-His-NH₂ és

ennek metilezett hisztidin származékainak a kölcsönhatását is vizsgálták [(en)Pd(NO₃)₂] komplexszel. A kapott eredmények alapján a

1. táblázat: A kötési izomerek szabad ligandumhoz viszonyított, a $\Delta\delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{komplex}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{ligandum}}$ egyenlet alapján számolt kémiai eltolódás értékei.

Kötési izomerek	$\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{imidazol}}$					
	$\Delta\delta\text{C2}$		$\Delta\delta\text{C4}$		$\Delta\delta\text{C5}$	
	His1	His5	His1	His5	His1	His5
N1,N1	3,55	3,56	-2,61	-0,72	8,57	6,97
N1,N3	2,66	3,67	-2,92	8,07	8,00	-3,13
N3,N1	3,44	3,36	5,98	-1,55	-0,70	8,57

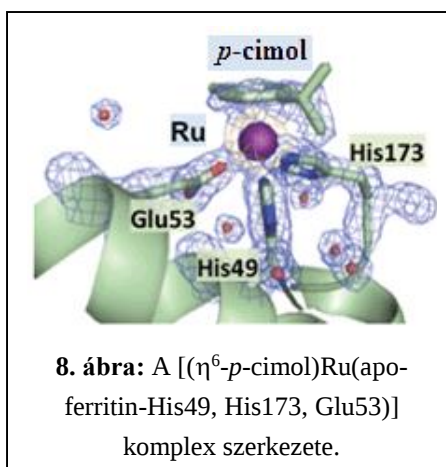
fémionhoz az oligopeptidek imidazolnitrogénjei különböző preferenciával

A *cisz*- $[(\text{NH}_3)_4\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ és $[(\text{en})\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ kölcsönhatását Ac-His-Ala-Arg-Ala-His-NH₂ és Ac-Met-Ala-Arg-Ala-Met-NH₂-el,⁹⁷ míg a $[(\text{en})\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ és *cisz*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ -ét Ac-His-(Ala)₃-Met-OH oligopeptiddel vizsgálták. Megállapították, hogy a metionin kén donoratomjával kinetikailag gyorsan koordinálódott, azonban a termodinamikailag stabil komplexben már az imidazolgyűrű kötődik a fémionhoz.^{98,99}

A fémion-fehérje kölcsönhatásának vizsgálatai alapján az imidazolil oldallánc valószínűleg a legfontosabb fémionmegkötő, amely számos metalloenzim aktív centrumában megtalálható, vagy fémionok szállításában vesz részt. Nagyszámú közleményt publikáltak, melyekben a ciszplatin^{102–104} vagy ruténium(II/III)^{105–109} komplexek és szérum fehérjék közötti kölcsönhatást vizsgálták, egyebek mellett HPLC-vel kapcsolt MS technikával.¹¹⁰ Mind az *in vivo*, mind az *in vitro* kutatások azt mutatták, hogy a platina, illetve ruténium alapú rákellenes komplexek főleg a szérum fehérjékhez kötődnek.^{110,111} Ezen fehérjék közül az albumin és a

transzferrin játszik fontos szerepet a gyógyszermolekulák szállításában és metabolizmusában.^{110,112} A ciszplatinhoz képest a ruténium alapú komplexek kisebb toxicitást mutatnak, valamint specifikusan akumulálódnak a rákos sejtekben.⁹ Ezen tulajdonságoknak, a ruténium biomolekulákhoz (transzferrin, albumin) való kötődése adhat magyarázatot.⁹ A rákos sejteknek, gyors osztódásuk miatt, nagyobb a vas igényük és több transzferrin receptort expresszálnak a felszínükön. A transzferrin a két vaskötő helyen kívül további 17 másik felületi imidazolilcsoportot tartalmaz, melyek potenciális fémionmegkötő helyként szolgálnak.^{113,114} Kimutatták, hogy a *transz*-[(Im)₂Ru(Cl)₄], *transz*-[(Ind)₂Ru(Cl)₄] és a NKP1339 komplexek is kölcsönhatásba lépnek a szérum fehérjékkel.^{108,115}

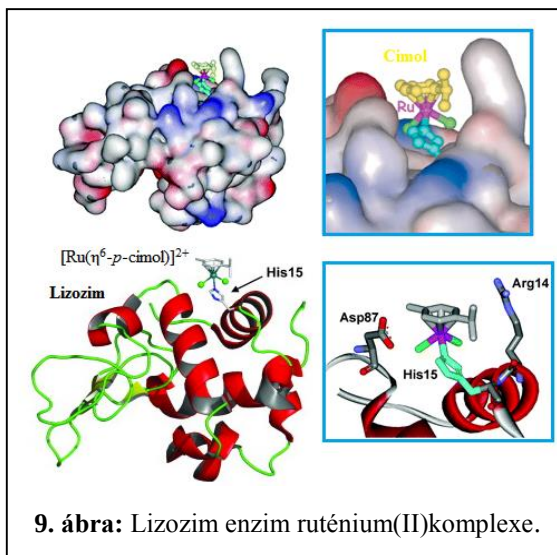
Krisztallográfiai adatok azt mutatták, hogy a *transz*-[(Im)₂Ru(Cl)₄] mind a két vaskötő helyen az imidazolgyűrűhöz koordinálódik.^{105,108,116} Molekula modellezéssel igazolták, hogy a félszendvics ruténium(II)komplexek nem helyettesítik a vas(III)-iont a holotranszferrinhez (holoTf) való kötődés során, azonban a C- és N-lebény vaskötő helyei körül lévő hisztidin imidazolokhoz koordinálódik.¹¹⁷ A holoTf ligandum számos fémiont (gallium^{118–120}; ruténium^{105,106,121}) szállíthat el ily módon a rákos sejtekig. HPLC-vel kapcsolt ESI-MS technikával vizsgálták a ruténium-arének (arén = *p*-cimol, bifenil) és az apo- vagy holotranszferrin közötti kölcsönhatást.¹¹⁷ Azt találták, hogy a ruténium(II) arén komplexek holoTf-hez történő kötődése nincs hatással a transzferrin receptorok transzferrin (Tf) felismerésére, így hasonló felvétel mutatható ki, mint a Fe₂-Tf esetében. Amíg itt a komplexált holoTf hasonló citotoxicitást mutatott az MCF-7 rákos sejtvonalon, mint a szabad Ru(II)-komplex, addig a ciszplatinnal, a citotoxicitást jelző IC₅₀ érték drámai csökkenését tapasztalták. Ebből arra lehet következtetni, hogy a ciszplatin, a ruténium arén komplexekkel ellentétben, más módon koordinálódik a Tf-hez, így más a hatásmechanizmusa, citotoxicitása és toxicitása is. Ahogy azt a 8. ábra mutatja, az apo-ferritin és egy *p*-cimol Ru(II)-komplex kölcsönhatását is igazolták, és röntgen-krisztallográfiás módszerrel kimutatták, hogy a ruténium(II) a His49 és His173 egységekhez koordinálódott.¹²² A félszendvics ruténium a ferritin három részéhez



is tud koordinálódni. Első ilyen kötőhely a His114, Cys126, ahol a kötéstávolságok rendre a következő 2,08 és 2,11 Å. A második kötőhelyen His49, Glu53 és His173 (kötéstávolságok: 2,06; 2,25 és 2,21 Å) volt (8. ábra). A harmadik kötőhelyen az Asp38, Glu45 és Cys48 aminosavak koordinálódtak a fémionhoz. A 8. ábrán feltüntetett koordinációs szerkezet hasonló, mint amit a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{MeIm})_2(\text{Cl})]^+$ komplex esetében leírtak⁵⁰, noha a Ru-Ct kötéstávolság az apo-ferritinben kötött ruténium esetén hosszabb, mint a metilimidazol származéknál. A tripszin enzimmel emésztett, hisztidintartalmú transzferrin kölcsönhatását is vizsgálták ruténium komplexekkel, és tömegspektrometriás módszerrel azonosították az egyes fragmensek fémionmegkötő képességét, ahol a ruténium csak az N-donorú hisztidinhez kötődött.^{73,123} A citokróm-c két imidazolilcsoportjának (His26 és His33) ruténiumhoz való kötődését is detektálták HPLC, UV-látható, NMR és ESI-MS-el.⁷³ Egy ruténium(II)komplex humán béta-amiloid 1-28 peptid fragmens ($\text{A}\beta_{1-28}$) His6, His13 és His14 oldalláncához történő szelektív koordinálódását is kimutatták ESI-MS módszerrel és 2D NMR technikával igazolták a peptid-fémion kölcsönhatást.¹²⁴

A fehérjék kötőzsebeibe, vagy felületi oldalláncokon található aminosavakhoz is koordinálódhat a fémion, így a fehérjék gyógyszerszállító rendszerként is szolgálhatnak.^{125–127} A ruténium komplexek gyakran szelektíven kötődnek a fehérjék felületi hisztidil imidazolnitrogénjeihez,^{128–130} ugyanakkor az ilyen típusú vegyületek hisztidinnel való kölcsönhatását még alig tanulmányozták, és a biológiai hatásuk is sem tisztázott. A jelenlegi elképzelések alapján a vérszérumban található kis és nagy molekulatömegű biomolekulákkal való kölcsönhatásnak köszönhető a ruténium vegyületek platinakomplexekhez viszonyított jóval kisebb toxicitása.^{35,131} Öt ekvivalens NAMI-A komplexet¹³⁰ egy ekvivalens HSA-val reagáltatva, a humán szérum albumin IIA és IIIA doménjében található hisztidin imidazolnitrogén¹¹⁶ ruténium(III)komplexhez történő kötődést is igazolták. A $[(\eta^6\text{-arén})\text{Ru}(\text{HSA})]$ (arén = *p*-cimol, bifenil) komplexben a fémion a tripszinnel emésztett albumin His128, His247 és His510 egységeihez történő koordinációját HPLC/ESI-MS módszerrel igazolták. *Hartinger és munkatársai* az N-fenil-pikolinamid ligandumot tartalmazó arén-ruténium(II) *hiszton fehérje* His79 és His106 imidazolil oldalláncához történő koordinációját is kimutatták.¹³² *Sadler és munkatársai* a lizozim enzim ruténium(II)komplexét izolálták, ahol ugyancsak a hisztidil oldallánc kötődött a félszendvics ruténium(II)komplexhez.¹²³ Ez volt az első félszendvics-fehérje komplex, mely molekulaszervezetét is igazolták (9. ábra). A lizozim egyetlen His15 egysége koordinálódott a $[(\eta^6\text{-}p\text{-}$

cimol)Ru]²⁺-hoz. A Ru-N kötéstávolság 2,11 Å-nak, míg a Ru-arén 2,21-2,39 Å-nak adódott röntgendiffrakció alapján. Hasonlóak a kötéstávolságok a [(η⁶-*p*-cimol)Ru(*L*-His-metilészter)(Cl)]-ben: 2,063 Å (Ru-N_{im}) és 2,159-2,171 Å (Ru-arén). Azt is megállapították, hogy a ruténium felületi hisztidinhez való kötődése nem módosította



az enzim szerkezetét. A hisztidin aminosavat tartalmazó fehérjefragmens ruténium komplexének összetételét ESI-MS-el is igazolták.¹³³

A rákellenes platinakomplexek maláriellenes hatását több kutatócsoportban vizsgálták és igazolták. A WHO 2015-ös adatai szerint a világon 214 millió maláriás esetet diagnosztizáltak, kb. 25%-os halálozási aránnyal.¹³⁴ A malária ellen sikeresen használt vegyület a klorokin (CQ). A félszendvics típusú ruténium-arén komplexek rákellenes hatása mellett azok potenciális antimaláriás hatását is kimutatták. A [(η⁶-arén)Ru(CQ)(L)₂] (arén = benzol, *p*-cimol; L = Cl, H₂O, etiléndiamin, valamint CQ = klorokin származék) komplexek sokkal aktívabbnak bizonyultak, mint maga a CQ molekula.^{37,135} A *Plasmodium falciparum* parazita okozza a malária kialakulását az emberi szervezetben. A maláriás betegeknél a Plasmodium falciparum több, hisztidinben gazdag fehérje túlzott kifejeződését segíti elő. Ezek a fehérjék szekvenciájukban 34 % hisztidint és 37 % alanint tartalmaznak.¹³⁶ A hisztidinben gazdag peptidek abnormális szintje számos betegség, például AIDS,¹³⁷ vesebetegség,¹³⁷ asztma,¹³⁷ valamint malária¹³⁸ jelenlétét is igazolja. Így nem kizárható, hogy a potenciálisan rákellenes, maláriaellenes félszendvics szerkezetű ruténium(II)komplexek gyógyszerként történő alkalmazása során a hisztidinben gazdag fehérjék felületi imidazolil oldalláncához koordinálódjanak. Hasonló megállapítást tehetünk az emlősökben is megtalálható hisztidin triád fehérje családok (HIT – Hisztidin Triad Protein family) esetében is, melyek konzervált, hisztidinben gazdag His-Xaa-His-Xaa-His-Xaa-Xaa szekvenciát tartalmaznak.^{139,140}

2.7 Potenciálisan rákellenes hatású, teljes szendvics típusú peptidkonjugátumok

Röviddel a ciszplatin klinikai alkalmazásba való kerülése után a teljes szendvics típusú komplexek (titanocén, ferrocén, rutenocén, ozmocén) rákellenes hatását is vizsgálták.¹⁴¹ A fémorganikus gyógyszerek biokémiai felhasználhatóságának új területét nyitotta meg a rutenocén és származékainak tanulmányozása.¹⁴² A kationos, fémorganikus, teljes szendvics $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arén})(\eta^5\text{-C}_5\text{R}_5)]$ ($\text{R} = \text{H}$ (Cp); $\text{R} = \text{CH}_3$ (Cp*)) komplexek, melyek szintézisével részletesen *Moriarty és munkatársai* foglalkoztak,¹⁴³ is fontos *in vitro* biológiai aktivitást mutattak.^{144,145} *Williams és munkatársai* teljes szendvics ruténium ciklopentadienil komplexeket állítottak elő, és 13 rákos sejten vizsgálták citotoxikus aktivitásukat. A vizsgált sejtvonalból 11-en (pl. A549, MCF7, MDA-MB-231, PC3) szelektivitást és jelentős citotoxicitást ($\text{IC}_{50} = 0,03\text{--}37,6 \mu\text{M}$) mértek.¹⁴⁶

Aromás gyűrűt tartalmazó α -aminosavakkal (fenilalanin, tirozin, triptofán) alkotott teljes szendvics típusú komplexeket is előállítottak,^{147–152} például olyan új ciklopentadienil ruténium(II)komplexeket szintetizáltak, melyek biológiailag fontos komponenseket tartalmaztak.¹⁵⁰ Az aromás gyűrűt tartalmazó bioaktív triptamin, N-acetil-triptamin, N-acetil-L-triptofán etilészter, N-acetil-L-fenilalanin és N-acetil-L-tirozin molekulákkal, 60–70 %-os hozammal állítottak elő teljes szendvics típusú komplexeket.¹⁵⁰ *Moriarty és munkatársai* terminálisan védett, míg *Sheldrick és munkatársai* terminálisan nem védett fenilalanin (Phe), tirozin (Tyr) és triptofán (Trp) aminosavakat reagáltattak a $[(\eta^5\text{-Cp})\text{Ru}(\text{MeCN})_3]\text{PF}_6$ -tal, így alakítva ki a teljes szendvics szerkezetű komplexeket.^{148,153}

Az utóbbi években intenzíven vizsgált fémorganikus komplexek peptid biokonjugátumai új lehetőséget biztosítanak a hatásosabb gyógyszerek fejlesztésében.^{154–157} A konjugátum egyik tagja lehet hordozó (oligopeptid), amihez több hatóanyag molekulát is kapcsolhatunk, miközben a stabilitást, vízdahatóságot növelhetjük és célba juttathatjuk a molekulákat. A '90-es évek elején azonosították a plazma membránon átjutó, kis tagszámú peptidek szállító tulajdonságát.^{158,159} Ezek közül a terápiás és diagnosztikus ágensek plazma membránon való átjuttatásának hatásos eszközei a penetráló peptidek (CPP - Cell-Penetrating Peptide),^{160,161} melyekkel új utat nyithatunk hatóanyagok rákos sejtekbe való célzott bejuttatására. Manapság is jelentős kutatás folyik a CPP-k karakterizálásával és tulajdonságaik optimalizálásával összefüggésben.^{162–164} Mivel a fenti peptidkonjugátumok szerteágazóan használhatóak, ily módon

Rh(III)-, illetve Ru(II)-komplexeiket is eredményesen jutattak el rákos sejtmagig.^{165,166}

Az elmúlt években a fémionok és fémkomplexek peptid-nukleinsavakkal (PNA) alkotott komplexei is felkeltették a kutatók érdeklődését,^{167,168} például olyan Ru(II)-konjugátumokat állítottak elő szilárdfázisú peptidszintézissel, amelyben a ruténium komplexet a peptid szabad N-terminális aminos csoportjához kapcsolták.¹⁶⁶ Metzler-Nolte és munkatársai szintetizálták az első rutenocén-PNA konjugátumot és tulajdonságait összehasonlították a ferrocén-PNA konjugátuméival. Azt találták, hogy a rutenocén-konjugátum stabilabb volt a ferrocén származékánál, így ennek és kisebb toxicitásának köszönhetően ígéretes vegyületként szolgálhat új, gén-célzott vegyületek fejlesztésében.¹⁶⁹

A legtöbbször tanulmányozott konzervált aminosav szekvenciák az Arg-Gly-Asp (RGD),¹⁷⁰ Met-Ser-His (MSH)¹⁷¹ és His-Ala-Val (HAV),¹⁷² melyek receptor molekulákkal léphetnek kölcsönhatásba. Az RGD szekvenciát, mely az integrin $\alpha_v\beta_3$ receptorhoz kötődik, különösképpen a tumor optikai jelölésére,¹⁷³ rákellenes peptideknél,^{174,175} vagy gyógyszer szállító rendszereknél¹⁷⁶ alkalmazzák. A His(RGD)His peptid irídium-konjugátum komplex A549-es rákos sejtvonalon való sejtfelvételének vizsgálatakor, a szabad His(RGD)His pentapeptiddel ellentétben nagyobb szelektivitást tapasztaltak. Az MCF-7 sejteken is vizsgálatokat végeztek, ahol nem meglepő módon csekély sejtfelvételt tapasztaltak, hiszen ezek a rákos sejtek csak kis mennyiségben fejezik ki az integrint.¹⁷⁷

A 3 kDa-os *gasztrointesztinális hormon szekretin* szintetikus humán szekretin peptidje 27 aminosav egységből épül fel. A szekvenciájában a hatodik pozícióban egy fenilalanint (Phe) tartalmaz, melyhez szelektíven kapcsoltak $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{R})\text{Ru}]^+\text{-t}$.¹⁷⁸ A reakció előrehaladtával, az NMR spektrumban 7,2-es ppm-nél lecsökkent a szabad peptid fenilcsoportjának jele, és helyette a már teljes szendvics komplexben kötött, $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{R})\text{Ru}(\eta^6\text{-Phe})]$ egység új jele jelent meg 6,2 ppm-nél. A peptid szekvenciájában hisztidin aminosav is található, azonban az imidazol-fémion kölcsönhatását csak többszörös fémion feleslegnél sikerült kimutatni, többmagvú komplex képződésekor, MALDI MS-el.¹⁷⁸

Az irodalomban többször beszámoltak biológiailag fontos oligopeptidek fémiont is tartalmazó biokonjugátumairól. Gmeiner és munkatársai rutenocén alapú dopamin receptor ligandumot tartalmazó származékokat állítottak elő, melyek a rutenocénmentes vegyületekkel összehasonlítva, növekedett affinitást és specifikusságot mutattak a D4-dopamin receptor felé.¹⁷⁹ A rákos sejtek felszínén

túlzottan kifejeződő szomatosztatin receptorokhoz kötődő, ciklikus okreotát okatapeptidet tartalmazó rutenocén biokonjugátumot Metzler-Nolte és munkatársai szintetizálták. Ebben a biokonjugátumban az N-terminális aminocsoportot tartalmazó peptidet kapcsolták a karboxilcsoportot tartalmazó rutenocén egységhez.¹⁸⁰

Loreno és munkatársai 2-fenilpiridin alapú ruténium(II) metallocén származékokat állítottak elő, melyek kis citotoxikus hatását tapasztalták HL-60 leukémia sejteken. A legjobb IC₅₀ érték a 16,61 μM volt 72 óra elteltével. A ciszplatinnal ilyen körülmények között 2,1 μM-os IC₅₀ értéket mértek.¹⁴⁵

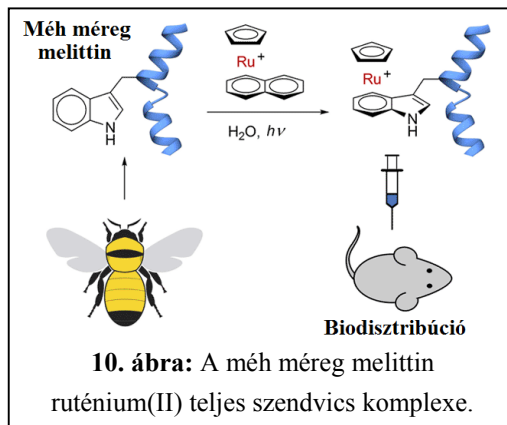
Bízható *in vitro* és *in vivo* rákellenes hatást és szelektivitást mutató [(η⁵-Cp)Ru(η⁶-arén)] szendvics komplexeket állítottak elő különböző ellenionokkal, és jellemezték a komplexek szerkezetét, valamint biológiai aktivitását.¹⁴⁴ A már korábban ferrocén vegyülettel kialakított ferrokin és ferrocifen klinikai terápiákhoz hasonlóan (η⁵-Cp*)Ru vegyületeket is előállítottak. A ferrokin nagy aktivitást mutatott a klorokin rezisztens malária parazita ellen, míg a ferrocifen proliferációt gátló hatást mutatott a hormonfüggő és nem hormonfüggő emlődagatanatos sejteken.^{181,182}

A rutenocén származékokat radiofarmakonokként (^{97/103/106}Ru) is használhatják tumor sejtek felderítésére. Fontos, peptid alapú antibiotikumok is jelezhetőek (η⁵-arenil)Ru(II)-fémionnal. A ciklikus bifenilészter számos biológiailag aktív komponens szerkezeti alkotója, ilyen például a K-13 proteáz inhibitor is. Perason és munkatársai számoltak be először a K-13 rutenocén komplexéről¹⁸³, mely előállításához először (η⁵-Cp)Ru(MeCN)₃-ot fotokémiai úton kapcsoltak aromás gyűrűt tartalmazó *p*-kloro-fenilalaninhoz 85 %-os hozammal, majd S_NAr reakcióban az izotirozin fenolos OH-csoportjához kötötték.¹⁸⁴

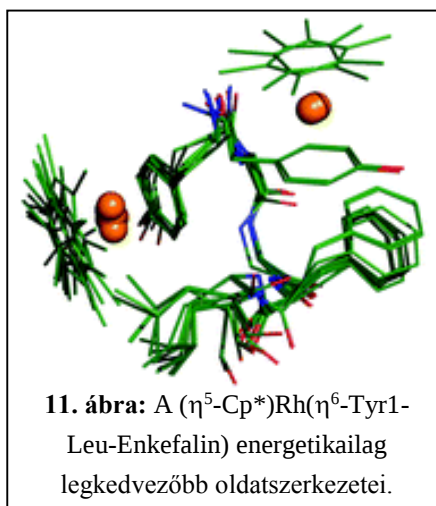
Kudinov és munkatársai látható-fény besugárzással, vizes közegben és szobahőmérsékleten [(η⁵-Cp)Ru(η⁶-naftalin)](PF₆) komplexet reagáltattak aromás aminosavakkal és kis tagszámú peptidokkal 95 %-os hozammal.¹⁸⁵ Ilyenkor a fény bevilágítás hatására szakad le a (η⁵-Cp)Ru és (η⁵-Cp*)Ru fragmens, melyet aromás gyűrűhöz kapcsolhatunk.^{186–189} Noha a (η⁵-Cp)Ru és (η⁵-Cp*)Ru aromás gyűrűt tartalmazó aminosavakkal stabil komplexet képez, ha a jó σ-donor ligandum (tioéter, amino vagy imidazol ligandum) közel helyezkedik el az aromás gyűrűhöz, akkor azok meggátolhatják a teljes szendvics komplex képződését. A fenti egységeket angiotenzin I és II peptidek fenilalanin és tirozin oldalláncainak aromás gyűrűihez is szelektíven kapcsolták. A kialakult [(η⁵-Cp)Ru(angiotenzin)]

komplexeiket ESI-MS módszerrel azonosították. A bevilágításhoz foszfor borítású Philips HPL-N 400W-os, nagy-nyomású higany lámpát használtak, a reakciót pedig NMR módszerrel követték.

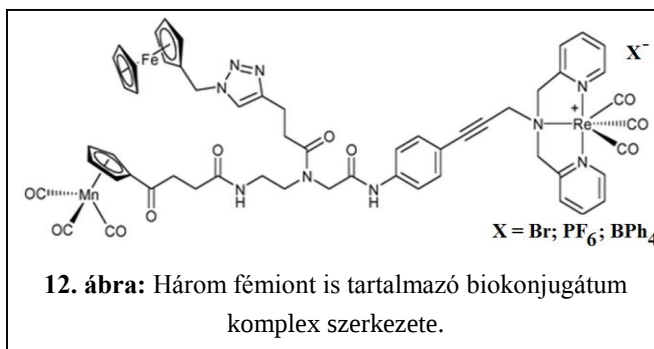
Aminosav-észter (η^6 -naftalin)Ru komplexeket is szintetizáltak és azt találták hogy, a komplexek öt rákos sejttípuson a ciszplatinhoz hasonló citotoxicitást mutattak. Ezek a komplexek hidrofób fenilalanint és tirozint tartalmaztak, melyek a sejtek membránján könnyedén átjuthatnak. Az orvoslásban is használt, apitoxin méh méreg 52 %-át kitevő melittin egy 26 aminosavból álló lineáris peptid, mely egyetlen triptofán (Trp, W) aminosavat tartalmaz. *Perekalin és munkatársai* fény bevilágítással a $[(\eta^5\text{-Cp})\text{Ru}]^+$ egységet vizes közegben, szelektíven kapcsolták ehhez az aromás oldalláncához.¹⁹⁰ A $[(\eta^5\text{-Cp})\text{Ru}(\eta^6\text{-Trp-melittin})]$ komplex sematikus szerkezete a 10. ábrán látható.



Ruténium alapú biokonjugátumot *Metzler-Nolte és munkatársai* is előállítottak, $(\eta^5\text{-iPrCp})\text{Ru}$ és az enkefalin pentapeptid reakciójával.¹⁹¹ *Fish*-el való együttműködésük során tirozinyűrűt tartalmazó *G-protein* receptor peptidhez kapcsoltak $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh}$ -ot vizes közegben, szobahőmérsékleten. A vizsgálatok három, különböző pozícióban tirozint tartalmazó *G-protein* peptidre, nevezetesen a Tyr1-Leu-Enkefalin-ra, Tyr4-Neurotenzin-re és a Tyr3-Oktreotid-re fókuszálódtak. A citotoxicitás vizsgálatokat MCF-7 és HT-29 rákos sejtvonalakon végezték. A $(\eta^6\text{-Cp}^*)\text{Rh}(\text{Tyr1-Leu-Enkefalin})$ komplex (11. ábra) ^{13}C NMR spektrumában nagyobb térő (kisebb ppm) felé tolódtak a tirozin C1,C2-6, C3-5 és C4 gyűrű szén jelei amikor a $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh}$ -mal komplexáltak.



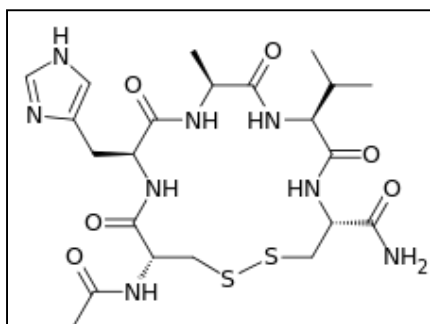
Az első, három fémiont is tartalmazó rákellenes, sejtpenetráló és radiojelzett heterofémorganikus komplexet is ők szintetizálták (12. ábra). Ez a biokonjugátum molekula egy ferrocenil, egy mangán trikarbonil, valamint egy rénium trikarbonil egységet is tartalmazott.¹⁹² A komplexet ESI-MS technikával azonosították, továbbá ¹H és ¹³C NMR módszerrel karakterizálták.



2.8 Specifikus szekvenciát tartalmazó peptidek jelentősége

A gyógyszereket specifikusan és szelektíven kell eljuttatni a rákos sejtekig úgy, hogy az egészséges sejtekben ne okozzon kárt, ugyanis az súlyos mellékhatásokhoz vezethet. Ehhez, a gyógyszernek számos biológiai gáton kell túljutnia.¹⁹³ Az endotél sejtek egy folyamatos sejtréteget képeznek az erek felszínén, feladatuk az anyagáramlás szabályozása az érpalya és a szövet között.¹⁹⁴ Hatásos gyógyszer szállító rendszereket állíthatunk elő úgy, hogy egy endoteliális felszíni receptorhoz kötődő antitestet, specifikus aminosavat tartalmazó peptideket használunk.¹⁹³ A rákellenes terápia új képviselőiként jelentek meg a kadherine (cadherin).¹⁹⁵ A sejtek szoros kapcsolódásának kialakításában kadherin transzmembrán molekulák vesznek részt. Több daganatos sejtkben bizonyos kadherin típusok túlzottan kifejeződnek, például az A375 melanoma rákos sejtvonal az N-kadherint,¹⁹⁶ a MCF-7 az E-kadherint,¹⁹⁷ a PC-3 pedig mindkettőt túlzottan kifejezi.¹⁹⁸ A kadherine a transzmembrán glikoproteinek egy szupercsaládja, az emberi szervezetben több, mint 80 tagjuk fordul elő.¹⁹⁹ A kadherin antagonisták tumor növekedés gátló és metasztázis gátló hatást mutattak.^{200,201} Közös szerkezeti elemük az intracelluláris adhézión kölcsönhatások kialakításában szerepet játszó sejt adhézión felismerő (CAR – Cell Adhesion Recognition) szekvencia. Ilyen a His79-Ala80-Val81 (HAV – Hisztidil-Alanil-Valil) szekvencia,^{202–204} mely megtalálható a különböző típusú kadherineben.²⁰⁵ A sejt adhézión molekulák (CAM – Cell Adhesion Molecule) onkológiai terápiás célpontként fontos szerepet kaptak a rákkutatásban, továbbá

részt vesznek a rákos sejtek proliferációjában, valamint metasztázisának szabályozásában is.²⁰⁰ A konzervált HAV szekvencia²⁰⁶ a kadherin első extracelluláris doménjében található (PDB: 1EDH) és a kadherinek közötti homofilikus kölcsönhatásért felelős. Több kutatócsoport foglalkozott lineáris és ciklikus szintetikus peptidek előállításával, melyek gátolják a szoros kapcsolat kialakulását.²⁰⁷ Kutatási eredmények azt mutatták, hogy a specifikus HAV szekvenciát tartalmazó kadherin peptidek gátolják a rákos sejtek invázióját és növelik a permeabilitást.²⁰⁸ Már a klinikai kipróbálás I. fázisában van az ADH-1 nevű ciklikus pentapeptid (13. ábra), mely az N-kadherint túlexpresszáló melanoma²⁰⁹ ellen mutatott rákellenes hatást, valamint gátolja az emlő, a petefészek és a tüdő daganatos sejteinek növekedését.²¹⁰ Az N-terminálison lévő konzervált HisAlaVal szekvencia aminosav sorrendjének módosításával mutáns peptideket is szintetizáltak és kadherinhez történő kötődésüket vizsgálták.^{172,211} A kutatási eredmények azt igazolták, hogy csak az N-terminálistól nézve hisztidint, alanint és valint tartalmazó peptid növelte a paracelluláris porozitást.

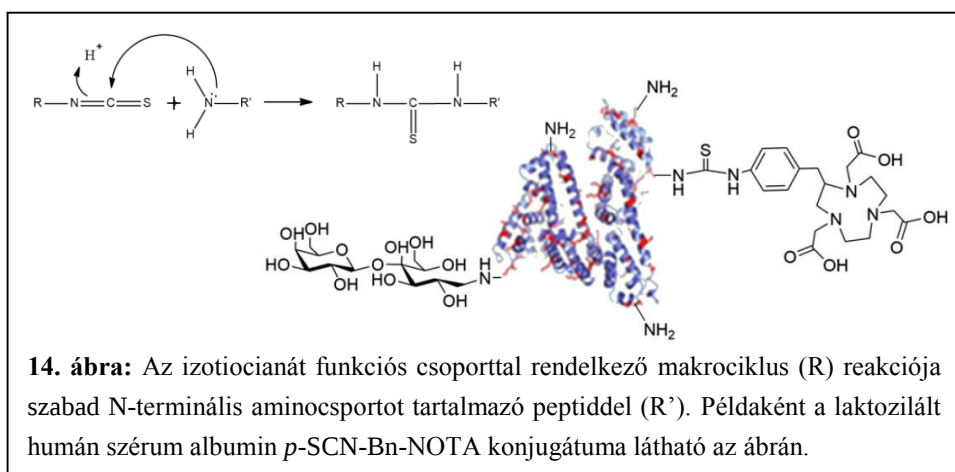


13. ábra: A His-Ala-Val tartalmú ADH-1 (Exherin™) szerkezete.

2.9 Kelátképzőt tartalmazó konjugátumok és gallium(III)komplexeik

Az irodalomban egyre többször találkozni olyan konjugátum komplexekkel, melyekben egy biológiailag fontos aminosav szekvenciához, peptidhez valamilyen kelátort (pl. DOTA, NOTA) kapcsolnak (14. ábra). Ezek a bifunkcionális kelátorok egyrészt tartalmaznak egy komplexképző egységet, valamint egy kémiai reaktív funkciós csoportot, melyhez például a peptid lánc N-terminális aminocsoportját kapcsolhatjuk.²¹² Az ilyen típusú vegyületeket eredményesen alkalmazzák biodisztribúciós vizsgálatokban, azaz a vegyület szervezetben történő eloszlásának követése válik lehetővé ezáltal. Az ilyen poliaminokarboxilát kelátorok kinetikailag inert komplexet képeznek, például gallium(III) radioizotópokkal is, továbbá kovalensen kapcsolhatók szállító molekulákhoz.^{213,214} A bifunkciós kelátképző ágens funkciós csoportja *p*-SCN-Bn, vagy például NHS

is lehet. Amíg a *p*-SCN-Bn-nél egy ekvivalens tiokarbamid funkciós csoporttal a peptid N-terminális aminocsoportjához kapcsolhatjuk a kelátképzőt, addig az NHS-nél 10-15-ször több aktív észtert kell alkalmazni a kapcsolat során.²¹⁵ A gallium(III)-NOTA komplexek kitértetett stabilitásúak ($\log K = 31,0$; $pM = 26,4$) a Ga-DOTA-hoz ($\log K = 21,3$; $pM = 15,2$) képest.²¹⁶ Ez a termodinamikai stabilitás megóvjaa a fémiont a transzmetallálástól, ugyanis a transzferrin gallium(III)komplexének stabilitási állandója ($\log K_1 = 20,3$ és $\log K_2 = 19,3$) kisebb, mint a Ga-NOTA állandója.²¹⁷ További előny, hogy a kinetikai oldalról nézve a Ga-NOTA komplexek gyorsabban képződnek a DOTA-hoz képest, azaz nem szükséges hosszabb reakcióidő és magasabb hőmérséklet a komplexáláshoz.



A NOTA kelátoroknak is több típusa van, például NODASA (1,4,7-triazaciklononán-N-szukcininsav-N,N-dieetsav) és NODAGA (1,4,7-triazaciklononán-N-glutaminsav-N,N-dieetsav).²¹⁸ A tumor képződésben többfajta fémion radioizotópját használják, ilyen lehet például a gallium(III) ^{67}Ga (γ , $t_{1/2} = 3,25$ nap) és a ^{68}Ga (β^+ , $t_{1/2} = 68$ perc) izotópja.^{219–221}

A galliumnak két NMR aktív kvadrupól természetes izotópja is van, az egyik a ^{69}Ga , míg a másik a ^{71}Ga . Ez utóbbi közkeletűebb a nagyobb érzékenységének köszönhetően, így nem radioaktív gallium(III)-fémiont tartalmazó komplexek kimutatására ^{71}Ga NMR módszer nyújt információt.²²² *André és munkatársai* Wistar típusú egereken biodistribúciós vizsgálatokat végeztek RGD tripeptidhez kapcsolt Ga-NOTA kelátorral, valamint ^1H és ^{71}Ga NMR technikával meghatározták a Ga-NOTA komplexek szerkezetét.²²³ ^{71}Ga NMR technikával megmérték a gallium(III)-fémiont és H_2O (0 ppm / 53 Hz); NOTA (+171 ppm / 210 Hz); NOTAC6 (+165,5 ppm / 528,5 Hz); NOTAC8 (165,8 ppm / 621,8 Hz) ligandumokat tartalmazó komplexek kémiai eltolódását (ppm) és jelszélességét

(Hz).²²³ Míg savas pH-n a gallium hexaakva komplexként $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, 0,0 ppm-nél figyelhető meg, addig a vizes oldatban a pH-tól függően a gallium(III)-fémionnak különböző részecskéi fordulnak elő, úgy mint a $[\text{Ga}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$; $[\text{Ga}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$; $\text{Ga}(\text{OH})_3$ és a $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$.^{224,225} NMR-ben azonban csak az oktaéderes akvakomplexet és a 222 ppm-nél megjelenő tetraéderes $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ -et lehet detektálni, és a köztes 3,5–7 pH tartományban a jelszélesedésnek és gyors cserének köszönhetően nem látunk gallium-komplex jeleket. A pH növelésével a $\text{Ga}(\text{OH})_3$ fehér csapadékként kicsapódik az oldatból, azonban ez a csapadék szűréssel könnyen eltávolítható az oldat tisztájától.²²⁶

2.10 Célkitűzések

A bemutatott előzményeknek megfelelően korábban számos hisztidintartalmú oligopeptid kölcsönhatását vizsgálták különböző platinafémionokkal. Azonban az irodalomban a félszendvics ruténium(II), valamint az egy, kettő, illetve három hisztidil imidazolcsoportot tartalmazó modellvegyületek közötti kölcsönhatás oldategyensúlyi vizsgálatára nem található adat. A doktori munkám során célul tűztük ki a szervezetbe bejuttatott várhatóan rákellenes hatású, félszendvics szerkezetű $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{XY})(\text{Z})]^{n+/+}$ ruténium komplexek biotranszformációja során keletkező $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ akvaion kölcsönhatásának vizsgálatát imidazolilnitrogén donoratomot tartalmazó modellvegyületekkel. Ezek az oldategyensúlyi vizsgálatok lehetővé tehetik a biológiai rendszerekben előforduló kis- és nagytömegű biomolekulák oldalláncában található hisztidil imidazolgyűrű nitrogénjének és a fémion kölcsönhatásának a modellezését. A fémionnal való vizsgálatokat az N-donoratot tartalmazó N-metilimidazol, N-acetil-hisztamin és egy vagy két imidazolgyűrűt tartalmazó kereskedelembe kapható dipeptidek, illetve szilárdfázisú peptidszintézissel előállított három hisztidint tartalmazó tri-, tetra- és pentapeptidekre is célunk volt kiterjeszteni.

Az irodalmi előzményekben a peptid alapú komplexekről leírtak alapján, célunk volt olyan teljes szendvics típusú, ruténium(II)-fémiont tartalmazó peptidkonjugátum komplexek előállítása is, melyek egy biológiailag aktív aminosav szekvenciát, egy potenciálisan rákellenes tulajdonságú fémiont, valamint egy olyan kelátképző ágenst tartalmaznak, melyhez radioaktív fémiont adva elvileg lehetővé válik a vegyületek szervezetben történő eloszlásának követése. Az így előállított komplexek biológiai vizsgálatát különböző rákos sejtvonalakon terveztük elvégezni, hogy több információt szerezzünk a komplexek potenciális rákellenes hatásáról.

3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

3.1 Felhasznált vegyszerek

Az oldategyensúlyi vizsgálatok során alkalmazott vegyszerek

A kísérletekhez használt ligandumokat a *Sigma-Aldrich*től (N-metilimidazol (Meim), N-acetil-hisztamin (AcHm)), a *Bachem*től (H-Ala-His-OH, H-His-Ala-OH, H-His-His-OH) szereztük be.

A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{RuCl}_2]_2$ dimer prekursor előállításához szükséges $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -t a *Merck*, α -terpinént az *Acros Organics* szállította.

A teljes szendvics típusú komplex előállításához szükséges $[(\eta^6\text{-naftalin})\text{Ru}(\eta^5\text{-ciklopentadienil})]\text{PF}_6$ prekuzort a *Sigma-Aldrich* cég gyártja.

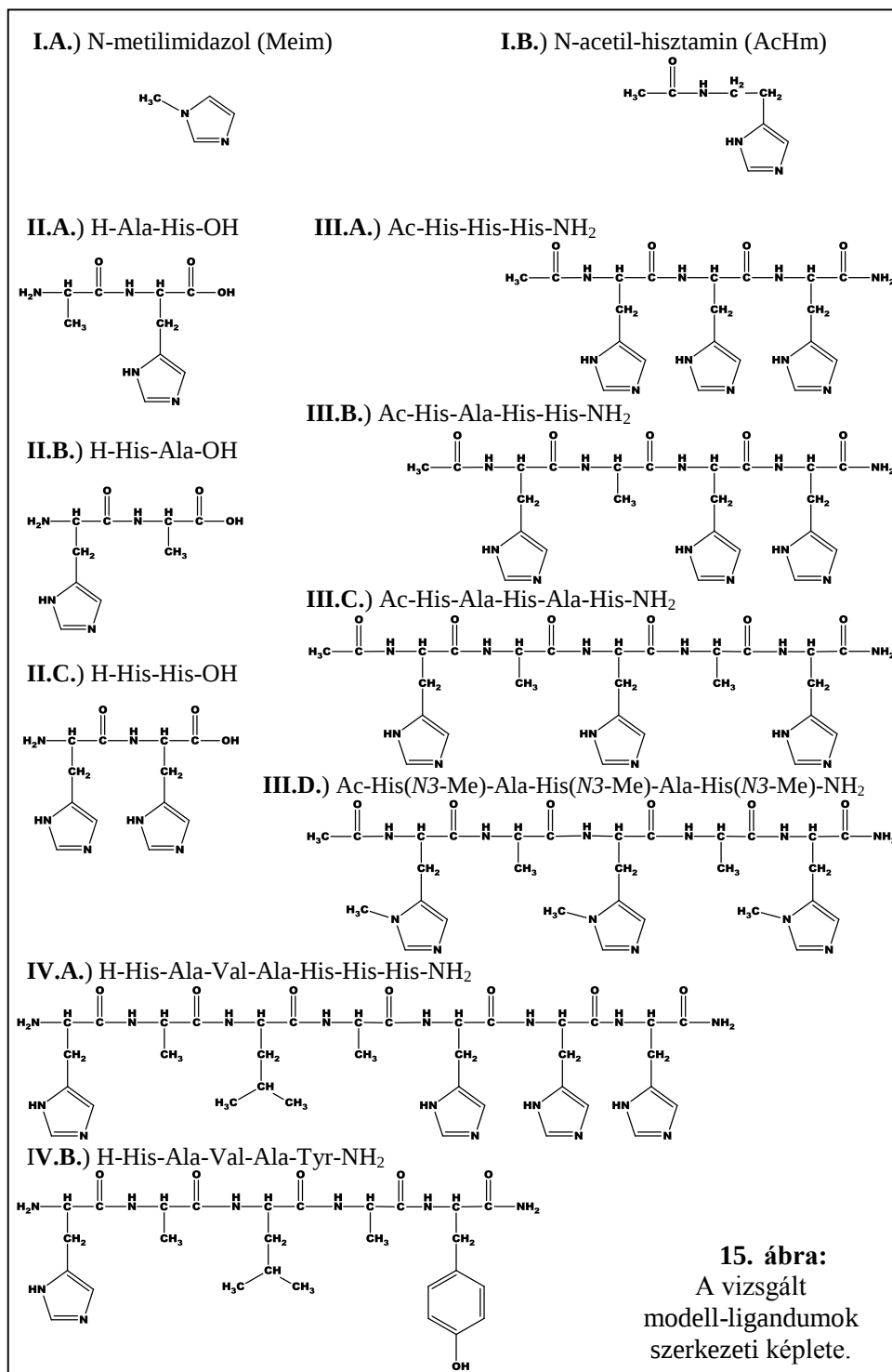
A kloridion mentes ruténium törzsoldatot a megfelelő mennyiségű szilárd dimer háromszor ioncserélt vízben való oldásával, majd *Reanal* gyártmányú ezüst-nitráttal történő kloridmentesítéssel készítettük. A puffernek használt KH-ftalát törzsoldat közvetlen bemeréssel készült *Aldrich* gyártmányú vegyszerből. A HCl és HNO_3 mérőoldat tömény sav hígításával készült, koncentrációját KOH (*Aldrich*) mérőoldattal határoztuk meg. Az NMR vizsgálatokhoz a *Sigma-Aldrich* által forgalmazott 99,8%-os izotóptisztaságú deuterált vizet használtuk.

A peptidszintézis során alkalmazott vegyszerek

A peptidek előállítása során alkalmazott oldószerek és vegyszerek kereskedelmi forrásból származnak és további tisztítás nélkül használtuk őket. A Rink Amide AM gyantát, a 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium tetrafluoroborátot (TBTU) valamint a 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) védőcsoporttal ellátott aminosav-származékokat: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH a *Novabiochem* (Svájc), a Fmoc-His(N3-Me)-OH a *Chem-Impex International* (USA) forgalmazza. Az analitikai tisztaságú *N,N*-dimetil-formamidot (DMF), az *N,N*-diizopropil-etilamint (DIEA), az etán-1,2-ditiolt és a trifluorecetsavat (TFA) a *Merck*, az *N*-hidroxi-benzotriazol hidrátot ($\text{HOBt} \cdot \text{H}_2\text{O}$), az *N*-metil-2-pirrolidont (NMP), a triizopropil-szilánt (TIS), a 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiolt (DODT) és a 2-metil-2-butanolt a *Sigma-Aldrich* forgalmazza. A piperidin, a diklórmétán (DCM), a dietil-éter (Et_2O) és a 96 %-os ecetsav a *Molar Chemicals*, míg a szintézis célra alkalmas tisztaságú *N,N*-dimetil-formamid és az ecetsavanhidrid a *VWR International* terméke.

Az acetonitrilt (ACN) a *VWR International*, míg a HPLC-tisztaságú trifluorecetsavat (TFA) a *Sigma-Aldrich* szállította.

3.2 Vizsgált ligandumok



3.3 Teljes szendvics ruténium(II)komplex előállítása

A teljes szendvics típusú $[(\eta^6\text{-Tyr})\text{Ru}(\eta^5\text{-Cp})]$ komplex előállításához kimértük a $[(\eta^6\text{-naftalin})\text{Ru}(\eta^5\text{-Cp})]\text{PF}_6$ prekursor (26,34 mg, 60 μmol) és a tirozin aminosavat tartalmazó H-His-Ala-Val-Ala-Tyr-NH₂ (34.63 mg, 44 μmol) oligopeptidet, majd nehézvizet (6,5 ml) adtunk hozzá. A reakció beindításához 500W-os, 9000 lumen névleges fényerejű lámpát használtunk. A reakcióelegyet 4 napon át kevertettük, és kb. 35°C-on tartottuk a hőmérsékletet. Az oldat színe világos sárgáról barnásra változott és az oldatban megjelent a reakció során felszabaduló fehér színű naftalin. A reakció végbemenetelét ¹H NMR spektroszkópiával folyamatosan követtük. A nyerstermékéből a naftalint vákuummal eltávolítottuk, majd az oldatot lefagyasztottuk a liofilizáláshoz. Az előállított és liofilizált teljes szendvics komplex tisztaságát pH-potenciometria, NMR, MS, HPLC technikákkal ellenőriztük.

3.4 Szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS)

Merrifield a szilárdfázisú peptidszintézis-módszer²²⁷ kidolgozásáért 1984-ben Nobel-díjat kapott. A szilárdfázisú peptidszintézis módszereit többféle szempont szerint csoportosíthatjuk. Az alkalmazott technika alapján beszélhetünk lépésenkénti szintézisről vagy fragmenskondenzációról; a kivitelezés módja alapján lehet szakaszos vagy áramló oldatos; valamint a szintetikus eljárás alapján alkalmazhatunk Fmoc/*t*Bu²²⁸ vagy Boc/Bzl²²⁹ stratégiát. Ennél a besorolásnál az első esetben az N-terminális aminocsoportokat 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) csoporttal védjük, míg a másik esetben a védelmét a *terc*-butoxi-karbonil (*t*Boc) csoport biztosítja.

A *Merrifield*-féle szintézis szilárd, oldhatatlan hordozón, úgynevezett gyantán történik, amely egy finomszemcsés műanyag. A szemcsék felületén és azok belsejében olyan funkciós csoportok vannak, amelyek lehetővé teszik, hogy a szemcsékhez aminosavakat kapcsolhassunk kémiai kötással. Az első lépésben a peptid C-terminálisán lévő aminosavat kapcsoljuk a gyantára kovalens kötással. A további aminosavakat ehhez az aminosavhoz kapcsoljuk, így a növekvő peptid a szintézis végéig a szilárd hordozóhoz kötve marad. A szilárd hordozó szemcsemérete, alakja, homogenitása, duzzadási tulajdonsága és a funkciós csoport kiépítésének lehetősége alapvető jelentőségű a szintézis sikerességének szempontjából. A szilárd hordozónak számos követelménynek kell megfelelnie. Például tartalmazzon a következő aminosav felkapcsolásához alkalmas funkciós

csoportot, viszont ne tartalmazzon a szintézis során zavaró egyéb funkciós csoportokat. Elengedhetetlen, hogy mentes legyen mindenféle szennyezésektől. Valamint a kialakított peptid-gyanta kötés könnyen hasítható legyen a szintézis végeztével, de a szintézis során végig állandó maradjon. Ezen kívül a növekvő peptidláncok a szintézis során az oldószerek és a reagensek számára végig jól hozzáférhetőek legyenek, azaz sztérikusan ne legyenek gátolva. Fontos a jó duzzadókéesség, hiszen a reakciók egy szerves oldószerral szolvatált térhálós polimer-mátrixban játszódnak le. A gyantának stabilnak kell lennie a fizikai és kémiai behatásokkal szemben a szintézis körülményei között, ne reagáljon reagensekkel, oldószerekkel, és az épülő peptidlánccal sem.

Munkánk során a különböző pozícióban hisztidin aminosavat tartalmazó peptidek: Ac-His-His-His-NH₂, Ac-His-Ala-His-His-NH₂, Ac-His-Ala-His-Ala-His-NH₂, Ac-His(N3-Me)-Ala-His(N3-Me)-Ala-His(N3-Me)-NH₂ (15. ábra: **III. A.-D.**), illetve a HAV szekvenciát tartalmazó oligopeptidek: H-His-Ala-Val-Ala-His-His-His-NH₂ és a H-His-Ala-Val-Ala-Tyr-NH₂ (15. ábra: **IV. A.-B.**) szilárdfázisú peptidszintézisét Liberty 1TM automatikus mikrohullámú peptidszintetizáló készülékkel (CEM, Matthews, NC) végeztük. Az N-terminuson acilezett, illetve szabad aminocsoporttal rendelkező peptideket Fmoc/tBu technikával állítottuk elő, amelyhez a C-terminuson amid végződést biztosító Rink Amide AM típusú gyantát használtunk. A hasítást a készülék 0,1 mol/dm³ HOBt·H₂O és 20 % (V/V) piperidin-tartalmú DMF segítségével végzi el, melyhez 180 másodpercig 80°C-on 30 W teljesítményű mikrohullámú sugárzást alkalmaz. Ezt követően történik az aminosavoldat hozzáadása négyszeres feleslegben, 0,2 mol/dm³ koncentrációban, a funkciós csoportok aktiválása a TBTU/HOBt/DIEA stratégiának megfelelően történik (aktivátor reagenst, azaz 0,5 mol/dm³ HOBt·H₂O és 0,5 mol/dm³ TBTU DMF-es oldatát, valamint aktivátor bázist, azaz 2 mol/dm³ DIEA NMP-s elegyét alkalmazzuk). Az aminosav gyantához, illetve a megelőző aminosavhoz kapcsolását (négyszeres aminosav-felesleg mellett) szintén 30 W teljesítményű mikrohullám alkalmazásával, 80°C-on végzi a készülék, 300 másodpercen át. Ezt a két műveletet ismételve felépíthető a kívánt aminosav-szekvencia. Az egyes reakciólépéseket követően a készülék DMF hozzáadásával és annak gyantáról történő leszűrésével távolítja el a reagensek feleslegét. Amennyiben a ligandum N-terminusának acetilezésére van szükség, azt az utolsóként kapcsolt aminosav Fmoc védőcsoportjának hasítását követően 6 % (V/V) ecetsavanhidrid- és 5 % (V/V) DIEA-tartalmú DMF oldat hozzáadásával végzi a készülék. A szintézis befejeztével a peptidet tartalmazó gyantát

diklórmétános, 96 %-os ecetsavas, 2-metil-2-butanolos, majd dietil-éteres mosásnak vetettük alá.

A peptidek gyantáról történő hasítását szobahőmérsékleten, 94 % TFA, 2,5 % TIS, 2,5 % H₂O és 1 % DODT elegyében hajtottuk végre. A hasítóelegy nem csak a peptid gyantáról való hasítására, hanem az oldalláncok védőcsoportjainak eltávolítására is alkalmas. A nyerterméket a hasítóelegy hideg dietil-éterbe csepegtetésével csaptuk ki, a fehér csapadékot centrifuga segítségével választottuk el a folyadéktól, majd dekantáltuk és az argongázos szárítást követően vízben oldottuk fel és lyofilizáltuk a lyofilizáláshoz.

Az előállított és lyofilizált oligopeptidek tisztaságát minden esetben nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával ellenőriztük, melyhez analitikai Vydac C₁₈ típusú kolonnát (250 mm × 4,6 mm; pórusméret: 300 Å; szemcseméret: 5 µm) és Jasco MD-2010 plus diódasoros detektorral (222 nm, 254 nm, 280 nm) rendelkező fotométert használtunk. A komplexek elválasztásához félpreparatív Vydac C₁₈ típusú kolonnát (250 mm × 10 mm; pórusméret: 300 Å; szemcseméret: 5 µm) és Jasco UV-2077 plus UV-látható detektorral (222 nm, 254 nm, 280 nm) rendelkező készüléket használtunk. Eluensként 0,1 % (V/V) TFA-t tartalmazó desztillált vizet (A) és azonos TFA-tartalmú acetonitrilt (B) alkalmaztunk. Az áramlási sebességet 1,0–2,0 ml/perc tartományba állítottuk be.

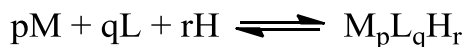
A radioaktív ⁶⁷Ga fémiont tartalmazó komplexeket γ-detektorral rendelkező HPLC készülékkel Dr. João D.G. Correia lisszaboni kutatócsoportjával együttműködve (Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C²TN), Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Portugália) vizsgáltuk.

3.5 pH-potenciometria

Az oldatfázisban végbemenő komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatának kiváló és legáltalánosabb módszere a pH-potenciometria. Amennyiben a komplexképződés pH effektussal jár, tehát ha a fémion hatással van a ligandum protonálódási egyensúlyára, akkor alkalmazható ez a módszer. A vizsgálatokkal a képződő asszociátumok összetételét és stabilitási állandóit határozhatjuk meg, a következőkben leírtak alapján. Mivel a deprotonált ligandumok gyenge bázisnak tekinthetők, ezért a komplexképződés kompetitív reakciót jelent a H⁺-ion és a fémion között, mely az alábbi egyensúllyal jellemezhető:



A H^+ -ionok felszabadulásának eredményeképpen a pH méréséből következtetni tudunk a képződő komplex(ek) stabilitására. A bruttó komplexképződési folyamatra a következő általános egyensúly írható fel:



ahol M = fémion, L = teljesen deprotonált ligandum, H = proton, míg a p, q, r = sztöchiometriai együtthatók. Az egyszerűbb kezelhetőség miatt a részecskék töltését nem tüntettük fel.

A képződő $M_pL_qH_r$ általános összetételű komplex β_{pqr} stabilitási állandóját az alábbi egyenlet szerint definiálhatjuk:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pL_qH_r]}{[M]^p[L]^q[H]^r}$$

Amennyiben a rendszer csak fémiont, protont és ligandumot tartalmaz, akkor az háromkomponensűnek tekinthető. Erre a három komponensre felírt anyagmérlegek a következők:

$$\begin{aligned} C_H &= [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \\ C_M &= [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \\ C_L &= [L] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \end{aligned}$$

Ha a ligandum protonált formája és a fémkomplexe között mérhető kompetíció van, akkor a komplexek stabilitási állandóit meghatározhatjuk a titrálási görbe elemzésével. A kísérleti adatokból a fémkomplexekre meghatározott stabilitási szorzatokat a SUPERQUAD²³⁰ és a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén kifejlesztett PSEQUAD²³¹ nevű számítógépes programmal számítottuk ki. A program a komponensekre felírt anyagmérlegek megoldásával, iterációs módszer segítségével meghatározza a feltételezett komplexek stabilitási állandóit.

Az értékelések során először bemenő adatként meg kell adnunk a mérőoldat térfogat – pH adatpárokat, a komponensek (M, L, H) és asszociátumok (a ligandum különböző protonáltsági fokú részecskéi, $M_pL_qH_r$ fémkomplexek és hidroxidokomplexek) számát, és az utóbbiak pontos sztöchiometriai összetételét, valamint az M, L, H komponensek kiindulási teljes koncentrációját, illetve az ismert és az ismeretlen közelítő stabilitási szorzatokat.

Ezek mellett további szükséges paraméterként meg kell adnunk, a minta kiindulási térfogatát, a mérőoldat koncentrációját, a víziószorzatot és a műszer által kijelzett pH-értéknek egyensúlyi koncentrációval kifejezett pH-értékre történő átszámításához szükséges ún. *Irving-féle* korrekciós tényezőt.²³²

A program az általunk feltételezett asszociátumok és közelítő stabilitási szorzatok figyelembevételével, *Newton-Raphson* iterációval végzi a közelítést mindaddig, míg a mérőoldatra nézve a $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számolt}})^2$ értéke minimumot ad (V : a hozzáadott mérőoldat térfogata). Valamennyi megadott pH-értéknél kiszámolja az összes képződő részecske egyensúlyi koncentrációját és az adott pontokhoz tartozó standard deviáció értékét. Az iterációsorozat végén megkapjuk a finomított stabilitási állandókat, a kísérleti és a számított titrálási görbék pontjaihoz tartozó $|V_{\text{mért}} - V_{\text{számolt}}|$ értékek átlagát (illesztési paraméter) és egy adott, kiválasztott komponensre vonatkozóan – ami általában a fémion – kirajzolja az asszociátumok koncentráció-eloszlási görbáját a pH függvényében.

A számolt stabilitási állandók mellett a zárójelben lévő érték minden esetben a standard deviációt jelöli. A rendszer modelljének a feltételezett asszociátumok egy adott összességét nevezzük. Az a modell fogadható el, mely kémiai megfontolások alapján értelmezhető, és amelynél az illesztési paraméter a legkisebb.

A dolgozatban szereplő koncentrációeloszlási görbéket a SED program Windows alatt futó változata segítségével, a MEDUSA nevű programmal²³³ szerkesztettük meg a képződő komplexek összetétele és stabilitási állandója, valamint a komponensek koncentrációjának ismeretében.

A pH-potenciometriás méréseket Mettler Toledo T50 titrátorral és Metrohm 6.0255.100 típusú double junction üvegelektóddal állandó, $I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$ KNO_3 közegben, míg a $I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$ KCl-tartalmú minták esetében *Mettler Toledo DL50* típusú, DG 114-SC kombinált üvegelektóddal felszerelt készülékkel végeztük. A mérőműszert minden méréssorozat előtt az ismert módon hitelesítettük kálium-hidrogén-ftalátra, ($c = 0,0500 \text{ mol/dm}^3$, $t = 25,0^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4,008$), és a víziószorzat értékére sav-bázis titrálások segítségével ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$, $t = 25,0^\circ\text{C}$, $\text{pK}_w = 13,756 \pm 0,01$). A hidrogénion-koncentrációt az *Irving-féle* korrekciót figyelembe véve a mért pH értékből határoztuk meg. A mérőoldatként alkalmazott kálium-hidroxid lúgoldat pontos koncentrációját ismert koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalátra határoztuk meg a kapott titrálási görbe Gran-féle linearizálásával.²³⁴ A pH-potenciometriás méréseket a $\text{pH} = 2,0 - 11,5$ tartományban végeztük vizes oldatban (ekkor elhanyagolható a diffúziós

potenciálok különbsége az alkalmazott elektródok esetében), ahol a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ -os hőmérsékletet ultratermosztáttal tartottuk fent. A minták titrálása speciálisan kialakított csiszolatos titrálóedényekben történt, tisztított argon atmoszféra alatt, kizárva az oxigén és széndioxid bejutását a rendszerekbe, illetve a gázáram biztosította a kevertetést is. A minták kiindulási összterfogata 4,00–15,00 ml, míg a ligandum koncentrációja 1–10 mM között változott. A ligandum törzsoldat pontos koncentrációjának meghatározáshoz HCl oldat hozzáadásával a ligandum protonált formáját alakítottuk ki, ezután KOH mérőoldattal titráltuk. A felvett titrálási görbéket pedig *SUPERQUAD* nevű program²³⁰ segítségével értékeltük ki. A lassú komplexképződési folyamatok miatt egyedi mintás módszerrel is dolgoztunk. A vizsgált rendszertől függően, ismételt NMR mérések alapján 3–7 napos egyensúly beállást tapasztaltunk. A komplexképződést különböző fémion-ligandum arányoknál tanulmányoztuk, néhány esetben pedig fémion felesleg alkalmazása mellett is végeztünk méréseket. Több reális modell esetén (például ha két részecske képződése azonos pH-effektussal jár) a pH-potenciometria alapvető, de nem elegendő az oldatban keletkező részecskéknek és azok eloszlásának a feltérképezéséhez. Az ilyen esetekben más szerkezeti információkat hordozó módszereket (például NMR spektroszkópia) hívtunk segítségül, melyek jól kiegészíthetik a potenciometriás méréseket.

3.6 Mágneses-magrezonancia spektroszkópia (NMR)

Az NMR spektroszkópia egyebek mellett alkalmas a ligandumok protonálódási folyamatainak és a fémkomplexek oldatbeli szerkezetének vizsgálatára. A d^6 elektronszerkezetű, kis spinszámú Ru(II)-fémion diamágneses, azaz komplexei alkalmasak NMR spektroszkópiás vizsgálatokra. A legtöbb esetben az NMR időskálához viszonyított lassú ligandumcsere miatt a szabad és a komplexben kötött fémion (és/vagy ligandum) jelei elkülönülnek egymástól, a megfelelő protonokhoz rendelhető kémiai eltolódás értékek változásaiból pedig következtethetünk a ligandum fémionhoz való koordinálódására. A mérések során a vizes közegbeli pufferre kalibrált pH-mérő által kijelzett értékek a D_2O oldatokban a pH^* értékeknek felelnek meg. A minták elkészítésekor a ligandumokat D_2O -ban oldottuk, a fémiont pedig 5,00–10,0 mM koncentrációjú nehézvízes oldat formájában használtuk ($I = 0,20 \text{ M KCl}$ vagy KNO_3). Az oldatok pH^* értékeit DCl -, DNO_3 - és NaOD -oldatok segítségével állítottuk be a kívánt értékekre, belső standardként nátrium-3-trimetilszilil-propánszulfonátot (TSP) alkalmaztunk. A vizsgálatok során 3–7 napot vártunk az egyensúly teljes

beállásáig. A vízelnyomásos (WG) NMR méréseket 10 % D₂O, 90 % H₂O oldószer elegy felhasználásával végeztük.

A deutérium-oxidos oldatokban mért pH* értékeket a *Gross-Butle-Purlée* egyenlet felhasználásával számítottuk át pD-skálára.²⁵² Minden NMR ábrán a pH*-t tüntettük fel, melyet a következő egyenlet alapján számoltunk: pD = pH* + 0,40.

Az NMR-méréseket Bruker AM 360 MHz FT-NMR, illetve Bruker Avance DRX 400 MHz FT-NMR készüléken végeztük, a kiértékeléshez pedig az 1D WIN-NMR, valamint a MestReNova szoftvert használtuk. Az általunk előállított peptidek tisztaságának ellenőrzését és azonosítását is elvégeztük, valamint azok pH-függő spektrumait is felvettük. A jelek eltolódása, szélesedése vagy multiplicitásának változása jelezheti az adott funkcióscsoport koordinációját a fémionhoz.

3.7 UV-látható spektroszkópia

A spektrumokat *Perkin Elmer Lambda 25* típusú kétsugaras fotométeren vettük fel, különböző pH értékeken, valamennyi esetben 1,000 cm úthosszú kvarc küvetta alkalmazása mellett. Az adott hullámhosszon regisztrált spektrumból a képződő komplexek szerkezetére, geometriájára tudunk következtetni, emellett a *Lambert-Beer* törvény ($A = \varepsilon \cdot c \cdot l$) mennyiségi meghatározásra is lehetőséget ad. A spektrumok regisztrálását a cég által rendelkezésünkre bocsátott szoftverrel végeztük, a hullámhossz – abszorbancia adatpárokat Excel táblázatkezelő program segítségével ábrázoltuk. A spektrumok kiértékelését és termodinamikai stabilitási állandók meghatározását *PSEQUAD* program²³¹ segítségével végeztük el.

3.8 Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

Optikai forgatóképességet mutatnak azok a molekulák, melyek polarizálhatóságuk anizotrópiája miatt a jobbra, ill. a balra cirkulárisan polarizált fényre nézve különböző törésmutatójúak. Ha egy ilyen közegen síkban polarizált fényt bocsátunk át, a fény polarizációs síkja elfordul. Az $[\alpha]$ elfordulás mértéke a törésmutatón kívül függ az oldószerrel és a hőmérséklettől, valamint a mérés hullámhosszától. A hullámhossz függvényében felvehetjük az optikai forgatóképességi diszperzió görbéket. Az optikailag aktív anyagokban a jobbra és balra cirkulárisan polarizált sugárzás nemcsak különböző törésmutatóval, hanem különböző abszorpciós koefficienssel is jellemezhető. Ennek következtében a kilépő sugárzás elliptikusan polarizált lesz. A síkban polarizált fény két

összetevőjének különböző abszorpcióját cirkuláris dikroizmusnak, vagy felfedezőjéről Cotton-effektusnak nevezik. A kétféle fénysugár abszorpciójának különbségét ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{bal}} - \varepsilon_{\text{jobb}}$) a hullámhossz (λ) függvényében ábrázolva megkapjuk a CD görbét. Csak azoknak a molekuláknak van CD spektrumuk, melyek optikailag aktívak. A fémkomplexek optikai aktivitása a komplex molekula aszimmetriájától származhat. A komplex molekula optikai aktivitását okozhatja a központi fémion aszimmetria centrummá válása, ami a komplex optikai aktivitását eredményezi. A CD méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén végeztük Dr. Kurtán Tibor közreműködésével. A spektrumokat JASCO-810 spektrométeren, szobahőmérsékletű és ionerősséget nem tartalmazó vizes oldatokban vettük fel különböző pH-értékeken, illetve fémion-ligandum arányoknál. A mérésekhez 1,000 cm-es úthosszúságú kvarc küvettát használtunk.

3.9 Elektroporlasztásos ionizációjú tömegspektrometria (ESI-MS)

A tömegspektrometria (Mass Spectrometry, MS) a különböző szerves és szervetlen molekulák ionizációján, majd ezen ionok relatív tömegének meghatározásán alapuló, nagy hatékonyságú analitikai eljárás. Az egyes m/z értékekhez tartozó ionok relatív intenzitása mérhető, így fel tudunk venni egy tömegspektrumot, ami a mintából képződő ionok relatív intenzitását ábrázolja a tömeg/töltés (m/z) függvényében. Ez a mérési módszer rendkívül pontos, így a természetes izotóp eloszlás ismeretében pontosan megtudjuk határozni, hogy milyen összegképlet rendelhető az egyes intenzitás csoportokhoz, alátámasztva más vizsgálati módszerek által meghatározott szerkezetet.

Az előállított ligandumok és a képződő fémkomplexek azonosítására és összetételük igazolására kiváló módszer a tömegspektrometria. A vizsgálat gázfázisban történt, a vizes oldatokat elektroporlasztásos ionizáció segítségével alakították gáz halmazállapotúvá. A képződő részecskék lágy ionizáción mentek keresztül, a fragmentáció így igen kismértékű, tehát a komplex molekulatömegének ismeretében hozzárendelhetők a direkt jelek. A vizsgált komplexképződési folyamatokban a képződött részecskék töltésétől függően a méréseket pozitív és/vagy negatív módban is elvégeztük. Vizsgálatainkhoz a fémiont 0,10–1,00 mM koncentrációban tartalmazó mintákat állítottunk össze vizes közegben, melyeket a vizsgálat tárgyától függően különböző pH értékeken, különböző fémion–ligandum arányok mellett tanulmányoztunk. A méréseket a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén Bruker *micrOTOF-Q ESI-TOF* készüléken végezték. Kalibráló oldatként nátrium-trifluoracetát oldatot

használtak. A tömegspektrumokban a háttércsúcsokat (n-butil-benzénszulfonamid +H⁺: 214 m/z; +Na⁺: 236 m/z, illetve annak fragmensei: 158 és 141 m/z-nél) x-el jelöltük.

3.10 Kvantumkémiai számítások (DFT)

Nemzetközi együttműködés keretében a sűrűségfunkcionál-elmélet (DFT, Density Functional Theory) számításokban Dr. *Eugenio Garribba* és *Valeria Ugone* (Department of Chemistry and Pharmacy, University of Sassari, Via Vienna 1, I-07100 Sassari, Italy), illetve *Lihi Norbert* (Debreceni Egyetem) nyújtott segítséget. Ezzel a módszerrel az $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ és három hisztidin aminosavat tartalmazó oligopeptidek (Ac-HAHAH-NH₂ és Ac-HAHH-NH₂), továbbá a hisztidint tartalmazó dipeptidek ruténium(II)-fémiont is tartalmazó rendszerében keletkező komplexek geometriájának teljes optimalásához a *Gaussian 09 (rev. C.01)*²³⁵ szoftvert használták, azon belül is a B3P86 funkcionált alkalmazták.²³⁶ A számításokban a ruténium esetében az ECP SDD (Effective Core Potential's Stuttgart-Dresden)²³⁷ és a LANL2DZ²³⁸, míg a ligandumra a 6-311g báziskészlet együttesét és frekvencia analízist használtak. A komplex izomerjeinek és azok különböző konformációjának a relatív szabad energiája a B3P86/6-311g funkcionállal számolták vizes oldatban az SMD modellt használva. Ez a modell jó eredménnyel jósolja meg a szolvatációs szabadenergiát ($\Delta G_{\text{aq}}^{\text{tot}} = \Delta E^{\text{ele}} + \Delta G^{\text{therm}} + \Delta(\Delta G^{\text{solv}})$).²³⁹ Példaként: egy 'A' molekula akkor stabilabb a 'B' molekulánál, ha az $A \rightleftharpoons B$ reakciót nézve a relatív szabadenergia érték nagy pozitív számot ad, míg az a $B \rightleftharpoons A$ reakciót nézve nagy negatív $\Delta G_{\text{aq}}^{\text{tot}}$ értéket kapunk.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK

4.1 Új peptid ligandumok szintézise és pH-potenciometriás vizsgálata

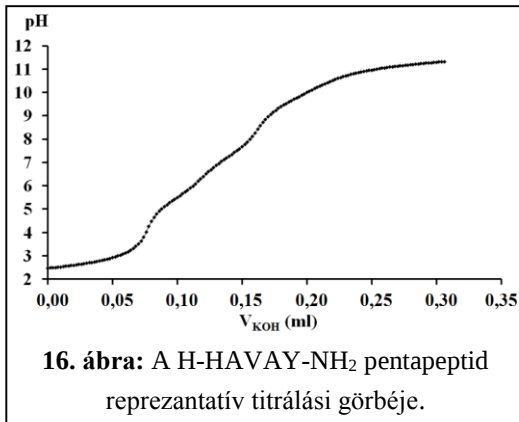
Szilárdfázisú peptidszintézissel (3.4 fejezet) új, N-terminálisan védett három hisztidint (Ac-His-His-His-NH₂, Ac-His-Ala-His-His-NH₂, Ac-His-Ala-His-Ala-His-NH₂, Ac-His*-Ala-His*-Ala-His*-NH₂), valamint N-terminálisan szabad hisztidil-alanil-valinil szekvenciát tartalmazó (H-His-Ala-Val-Ala-His-His-His-NH₂, H-His-Ala-Val-Ala-Tyr-NH₂) oligopeptideket (15. ábra: III.A.-IV.B.) állítottunk elő. A szintetizált oligopeptidek tisztaságát és azonosságát HPLC, ESI-MS, valamint NMR módszerrel ellenőriztük. pH-potenciometriás titrálással – az N3-metilezett Ac-His*-Ala-His*-Ala-His*-NH₂ kivételével – meghatároztuk a deprotonálódási állandóikat 0,20 mol/dm³ KNO₃ ionerősség mellett. A számolt deprotonálódási állandó (pK) értékeket az 2. táblázatban tüntettük fel.

2. táblázat: Szilárdfázisú peptidszintézissel előállított oligopeptidek pH-potenciometriásan meghatározott deprotonálódási állandói (pK),
I = 0,20 mol/dm³ KNO₃, t = 25,0°C

	Ac-HHH-NH ₂	Ac-HAHH-NH ₂	Ac-HAHAH-NH ₂	H-HAVAHHH-NH ₂	H-HAVAY-NH ₂
pK ₁	5,61(1)	5,71(1)	5,80(1)	5,22(5)	5,44(1)
pK ₂	6,32(1)	6,34(1)	6,33(1)	5,63(4)	7,27(2)
pK ₃	6,95(1)	6,94(1)	7,02(1)	6,35(5)	9,52(3)
pK ₄	-	-	-	6,83(3)	-
pK ₅	-	-	-	7,91(4)	-
ΣpK	18,88	18,99	19,15	31,94	22,23

Az 2. táblázatban szereplő három hisztidin aminosavat tartalmazó oligopeptidek értékeit összehasonlítva elmondható, hogy a pK értékek száma és értéke megfelel a szekvenciában elhelyezkedő három imidazol egységnek, ezzel is bizonyítva a peptid azonosságát. A számított deprotonálódási állandók jó egyezést mutatnak az azonos körülmények között meghatározott értékekkel, az 5,6–7,0 tartományba esnek, mely a kis tagszámú hisztidin egységet tartalmazó peptidekre jellemző.^{76,79,240} A pK₁ értékek Ac-HHH-NH₂-től az Ac-HAHAH-NH₂-felé történő

kismértékű növekedése utalhat az egymástól a szekvenciában egyre távolabb elhelyezkedő imidazol egységek között kialakuló hidrogén kötések hiányára. Az N-terminálison szabad aminos csoportot tartalmazó H-HAVAHHH-NH₂ heptapeptid esetében az 5,2–6,8 közötti pK értékek a hisztidil egységhez, míg a 7,91-es érték a szabad ammóniumcsoporthoz rendelhető. A H-HAVAY-NH₂-nél a pK₁ = 5,44 az imidazólium oldallánchoz, a pK₂ = 7,27 a szabad ammóniumcsoporthoz, míg a pK₃ = 9,52 érték a tirozin fenolos hidroxilcsoportjához rendelhető. A 16. ábrán példaként feltüntetett titrálási görbén jól látható a H-HAVAY-NH₂ pentapeptid három deprotonálódási lépcsője.



4.2 A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kation kölcsönhatása His-modell kismolekulákkal

Részletesen tanulmányoztuk a modellül választott félszendvics $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kation kölcsönhatását a kis molekulatömegű N-donoratomú N-metilimidazollal (Meim) és N-acetil-hisztaminnal (AcHm), melyek a His-tartalmú peptidek modellvegyületeinek tekinthetőek. A kereskedelmi forgalomban kapható ligandumok szerkezeti képlete a 15. ábra: I.A-B-n látható.

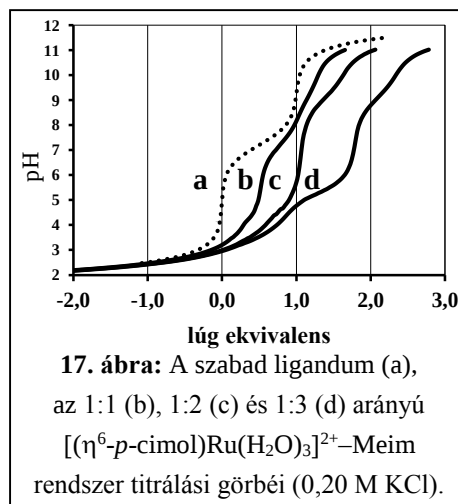
A komplexképződés során az N-metilimidazol a 3-as helyzetben lévő nitrogén donoratomján keresztül tud koordinálódni a félszendvics szerkezetű ruténium(II) kationhoz, míg az N-acetil-hisztaminnál a tautomerizációs folyamatnak köszönhetően, az N1-es és az N3-as nitrogénen is bekövetkezhet a deprotonálódás vagy a fémion koordinálódása. Ezeknek a ligandumoknak a protonálódási állandóit már korábban meghatározták, azonban ezt mi is elvégeztük, hogy a kísérleti körülményeink mellett is rendelkezésre álljanak ezek az adatok. A 3. táblázatban feltüntetett két ligandum esetében, $I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$ KNO₃ és KCl ionerősség mellett meghatározott protonálódási állandók ($\log K_{\text{HL}}$) jó egyezést mutattak az irodalmi értékekkel.²⁴¹ Az oldategyensúlyi vizsgálatok során különböző fémion–ligandum arányoknál pH-potenciometriás titrálásokat végeztünk a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ –Meim és a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ –AcHm rendszerekben. A szokásos pH-potenciometriás mérések során azonban

nem állt be az egyesúly, ezért egyedi mintákat készítettünk. A 3. táblázat az egyedi mintás $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ –Meim rendszernél számított stabilitási állandó

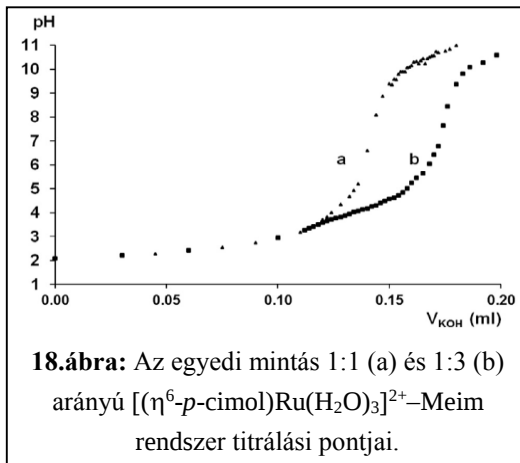
3. táblázat: A ligandumok pH-potenciometriásan meghatározott protonálódási állandói ($\log K$) és az egyedi mintás, 1:1 és 1:3 arányú M:L rendszer ($M = [(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}]^{2+}$ és $L = \text{Meim}$) komplexeinek stabilitási állandó ($\log \beta$) értékei, $I = 0,20$ mol/dm³ KNO₃/KCl, $t = 25,0^\circ\text{C}$. ^a NMR, ^b UV-Vis

	$\log K$	
	Mért érték	Irodalmi érték ²⁴¹
	KNO ₃	KCl
AcHm	7,06(1)	-
Meim	7,12(1)	7,11(1)
	7,53(1) ^a	7,06
	$\log \beta$	
	KNO ₃	KCl
$[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	7,22(6)	-
$[\text{ML}_2(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	13,7(1)	-
$[\text{ML}_3]^{2+}$	19,3(1)	16,8(1)
	18,6(1) ^b	-
$[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^+$	2,7(1)	-
$[\text{ML}_2(\text{OH})]^+$	7,9(2)	-
$[\text{ML}(\text{Cl})_2]$	-	9,10(5)
$[\text{ML}_2(\text{Cl})]^+$	-	13,71(9)
Illesztési paraméter	0,00284	0,00235
Illesztett pontok száma	114	88
pH tartomány	2,0–8,0	2,0–11,0
$\text{p}K_{\text{ML}}$	4,52	
$\text{p}K_{\text{ML}_2}$	5,8	
$\log K_{\text{ML}_2}$	6,5	
$\log K_{\text{ML}_3}$	5,6	

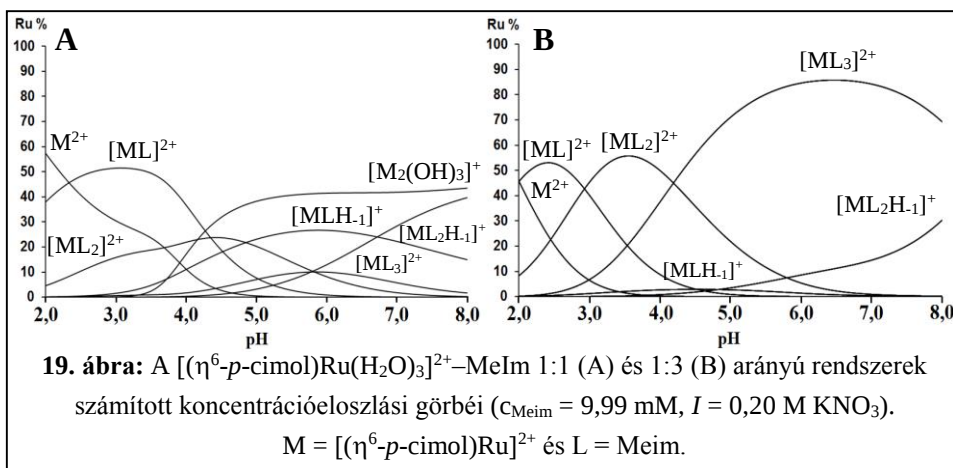
értékeket tartalmazza. A nem egyedi mintás, pH-potenciometriás mérések során kapott titrálási görbék lúgekvivalensre való átszámolása után kapott ábráin együtt látszik a ligandum (a), illetve az 1:1 (b), 1:2 (c) és az 1:3 (d) arányú rendszerek görbéi, (17. ábra). Megfigyelhető, hogy már pH 3 felett elválnak a fémiont is tartalmazó minták görbéi a csak ligandumot tartalmazó



minta titrálási görbájától, ami azzal magyarázható, hogy már ilyen savas közegben is van komplexképződés. Az egyensúly lassú beállását az UV-látható és ^1H NMR spektroszkópiai módszerekkel kapott eredmények is alátámasztották. Ezért a részletesen vizsgált $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ –Meim rendszerben képződő komplexek stabilitási állandóinak



meghatározására 1:1 és 1:3 arányú egyedi minták pH-mérésével kapott titrálási pontokból határoztuk meg az egyensúlyi modellt és a rendszerekben képződő komplexek stabilitási szorzat értékeit (18. ábra, 3. táblázat). A rendszert jellemző koncentráció-eloszlási görbéket a 19. ábrán tüntettük fel. Ahogy azt az 1:3 arányú számított koncentráció eloszlási görbék is alátámasztják, a fémionnak mind a három szabad koordinációs helyére az Meim ligandum kötődik fiziológias pH-n.



A fémion koncentrációjának növelésével (1:1 aránynál), illetve a pH emelésével vegyes hidroxidokomplexek, $[\text{MLH}_{-1}]^+$ és $[\text{ML}_2\text{H}_{-1}]^+$ jelennek meg KNO_3 ionerősségnél. A biológiailag relevánsabb KCl ionerősség mellett a hidrolízis visszaszorulását és vegyes $[\text{MLCl}_2]$ és $[\text{ML}_2\text{Cl}]^+$ kloridokomplexek képződését tapasztaltuk.

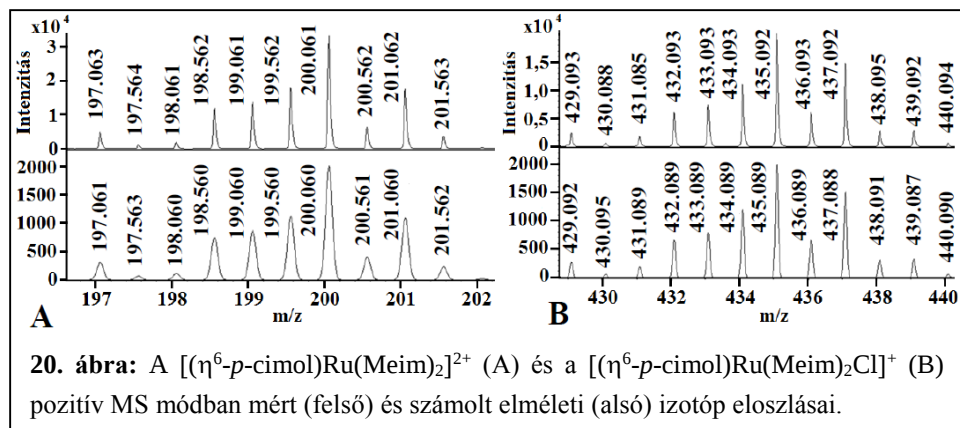
A vizsgált rendszerekben képződő komplexek összetételének igazolására, kloridion jelen- és távollétében ESI-MS méréseket is végeztünk. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-}$

cimol)Ru(H₂O)₃]²⁺–Meim és a [(η⁶-*p*-cimol)Ru(H₂O)₃]²⁺–AcHm rendszerekben képződő részecskék mért és számolt *m/z* értékeit a 4. táblázatban gyűjtöttük össze.

4. táblázat: Az M : L rendszerek (M = [(η⁶-*p*-cimol)Ru]²⁺; L = Meim vagy AcHm) különböző pH-értékeken felvett ESI-MS spektrumainak mért és számolt elméleti *m/z* értékei.

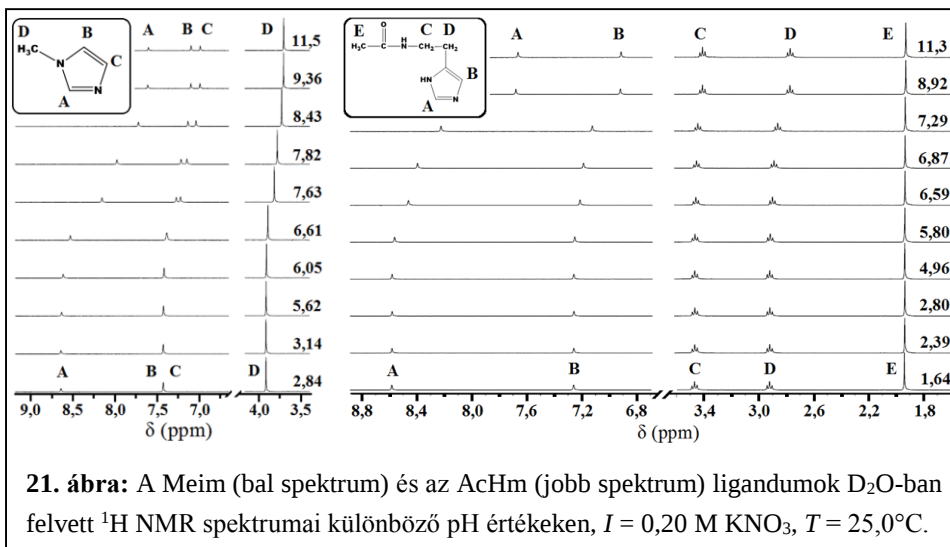
Ligandum (L):	Meim		AcHm	
	Mért (<i>m/z</i>)	Elméleti (<i>m/z</i>)	Mért (<i>m/z</i>)	Elméleti (<i>m/z</i>)
[ML(NO ₃)] ⁺	380,056	380,055	451,089	451,092
[ML(H ₂ O)(OH)] ⁺	353,043	353,080	424,074	424,117
[ML(OH)] ⁺	335,073	335,070	406,108	406,107
[ML ₂ (Cl)] ⁺	435,088	435,089	577,138	577,163
[ML ₂ (NO ₃)] ⁺	-	-	604,158	604,182
[ML ₂ (H ₂ O)] ²⁺	-	-	280,101	280,102
[ML ₂ (OH)] ⁺	417,124	417,123	559,186	559,197
[ML ₃] ²⁺	241,086	241,086	347,652	347,642
[M ₂ (O)(OH)] ⁺	505,024	505,026	505,023	505,026
[M ₂ (OH) ₃] ⁺	523,041	523,037	523,042	523,037

A detektált részecskéknél minden esetben a számolt izotóp eloszlással való összevetést is elvégeztük, ahol jó egyezést kaptunk. Reprezentatív példaként az 20. ábrán tüntettük fel a [(η⁶-*p*-cimol)Ru(Meim)₂]²⁺ és a [(η⁶-*p*-cimol)Ru(Meim)₂Cl]⁺ összetételű részecskének a mért és a természetes izotópeloszlást figyelembe vevő

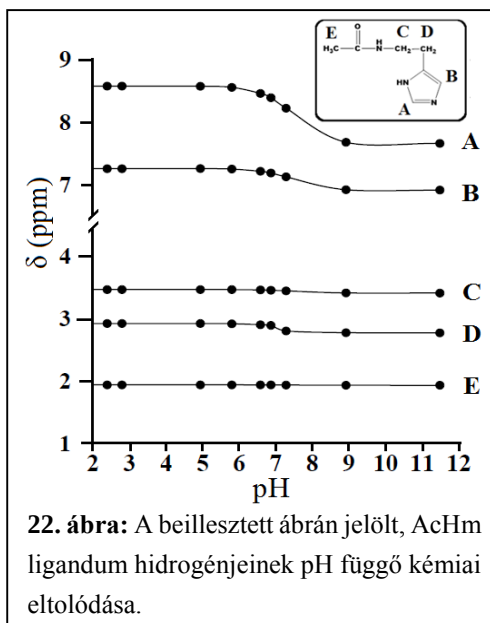


számolt tömegspektrumát. Megállapítottuk, hogy a pH függő ESI-MS vizsgálatok során detektált, a [(η⁶-*p*-cimol)Ru(H₂O)₃]²⁺–Meim és a [(η⁶-*p*-cimol)Ru(H₂O)₃]²⁺–AcHm rendszerekben képződő részecskék összetétele megegyezik. A pH-potenciometriás titrálások mellett ¹H NMR spektroszkópiás módszerrel is meghatároztuk a ligandum protonálódási állandóját. A Meim esetén ezt a 3.

táblázatban láthatjuk együtt. A két módszerrel meghatározott $\log K_{HL}$ értékek nem

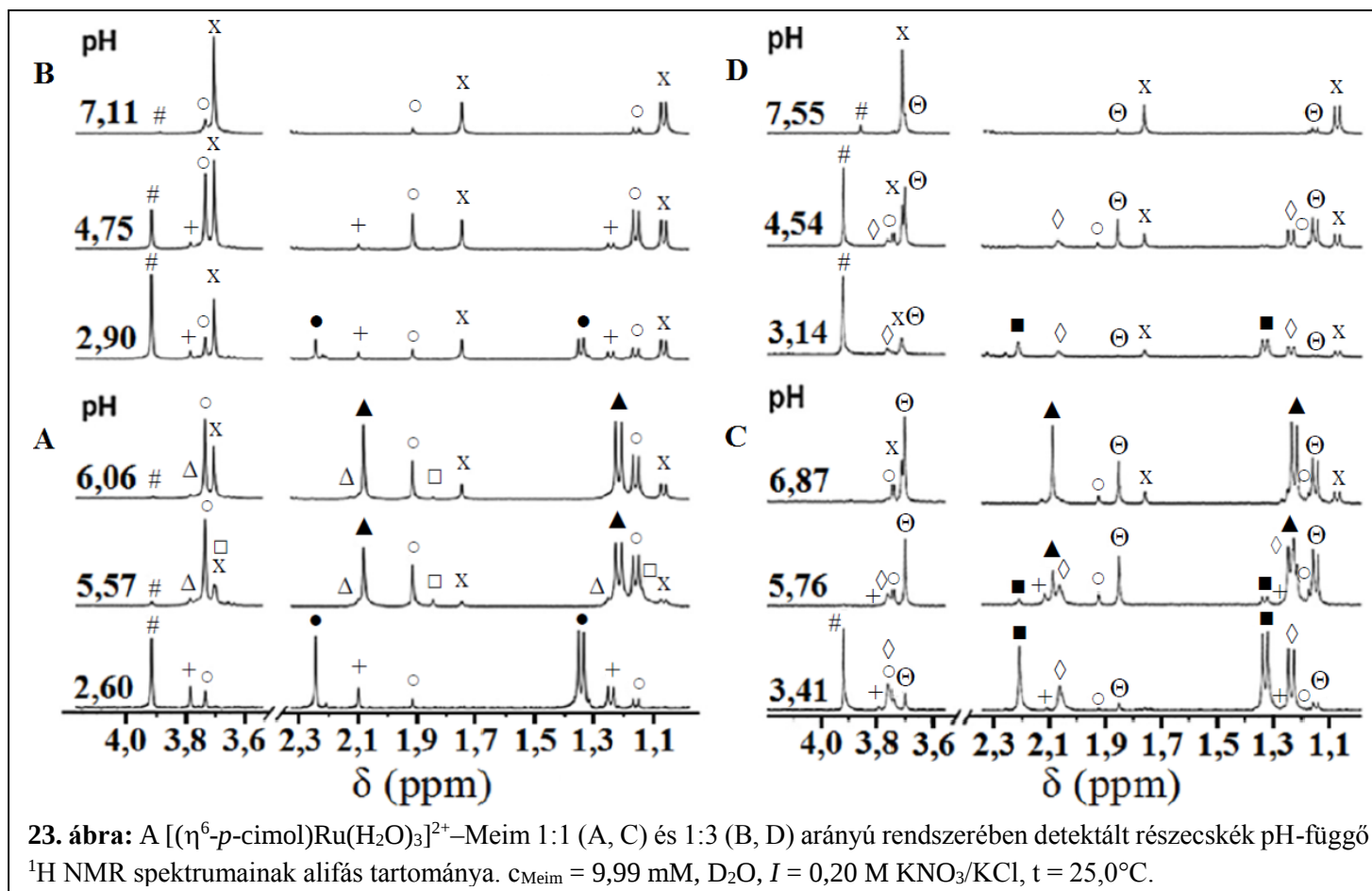


pontos egyezésének magyarázata a különböző oldószer (H₂O és D₂O) hatásában keresendő. A 21. ábra bal felső sarkában a vegyület szerkezetében található protonokhoz hozzárendeltük a mért jeleket. Természetesen a savas pH-n a protonált, míg a lúgos pH-tartományban a ligandum p*K* értékének megfelelő pH fölött, a deprotonált forma van jelen. Az N-metilimidazol esetében a savas pH-n feltehetően a gyors csere miatt jelösszeolvadás történt, ezért kezdetben egy szingulettet kapunk. A 7,4 ppm kémiai eltolódásnál lévő szingulettet integrálva két protonnak adódott, mely a B és C jelnek felel meg (21. ábra). Mind a két ligandum esetében az alifás jelekhez viszonyítva, az aromás tartományban lévő hidrogén jelek mutattak nagyobb kémiai eltolódást. Az AcHm molekula viszonylag kisméretű, így a (de)protonálódás hatással lehet valamennyi hidrogénjének kémiai eltolódására (22. ábra). Amíg az E-vel jelölt acetyl CH₃-csoportján lévő három hidrogénre hat legkevésbé a pH



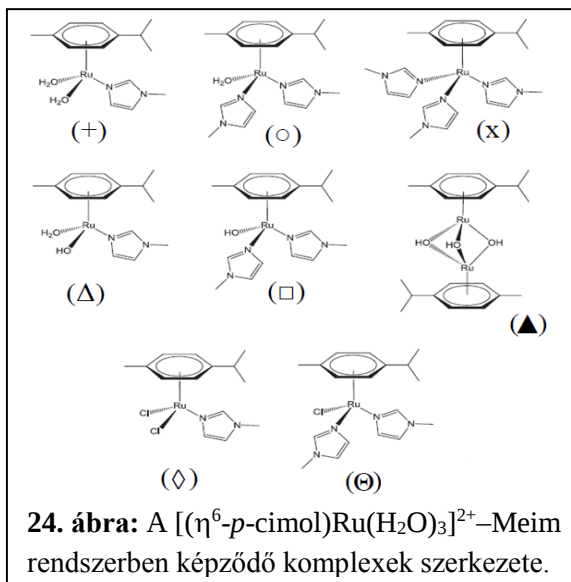
növelés, azaz a molekula deprotonálódása, illetve komplexbe való kötődése, addig az imidazolilgyűrű deprotonálódása ($pK = 7,06$) miatt a két nitrogén közötti, A-val és B-vel jelölt hidrogének kémiai környezete jobban megváltozik, ezért nagyobb eltolódást szenved. Ha nincs zavaró tényező, például a jelek egymásba tolódása, akkor a komplexképződés jól megfigyelhető lenne a gyűrűhidrogének aromás jelein, a 7,0–9,0 ppm tartományban. Mint azt a későbbiekben is látni fogjuk, a fémionnal való kölcsönhatás NMR vizsgálata során a Meim esetében (23. ábra) célszerűbb volt a spektrum alifás tartományának kiértékelése. A 3,7–4,0 ppm tartományban a Meim gyűrűmetilje, a 1,8–2,3 ppm között a *p*-cimol gyűrűmetilje (3. ábra/B), valamint az 1,0–1,4 ppm tartományban a *p*-cimol izopropil metiljeinek (3. ábra/A) dublettjei jelentek meg.³¹

A 23. ábrán az 1:1 és 1:3 arányú minták pH függő ^1H NMR spektrumának alifás tartományát tüntettük fel KNO_3 és KCl ionerősség mellett. A 23. ábra/A és B spektrumsorozatán, pH = 2,60 (1:1 arány) és pH = 2,90 (1:3 arány) esetén, savas pH-n a $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ (●) akvakation mellett három új részecske *p*-cimol jelei jelennek meg az $1,05 < \delta < 1,30$ (3. ábra/A) és a $1,75 < \delta < 2,25$ (3. ábra/B) tartományban. Összevetve az 1:1 és 1:3 arányú minták spektrumait, a savas pH tartományban még nincs jelen a fémion hidrolízise, és az akvakomplex mellett detektált jelek az $[\text{ML}]^{2+}$ (+), $[\text{ML}_2]^{2+}$ (○) és az $[\text{ML}_3]^{2+}$ (x) komplexekhez rendelhetők. Összhangban a pH-potenciometriás eredményekkel (19. ábra/B) a pH növelésével, 1:3 aránynál a $[\text{ML}_2]^{2+}$ részecske rezonancia jeleinek intenzitása növekszik, majd csökken. A fémion hidrolízisekor képződő $[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$ (▲) mellett megjelennek a vegyes hidroxidokomplexek is, $[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^+$ (Δ); $[\text{ML}_2(\text{OH})]^+$ (□) 1:1 aránynál, összhangban a pH-potenciometriás eredményekkel (19. ábra/A). A $3,7 < \delta < 4,0$ ppm tartományban a Meim ligandum (23. ábra/D) D-vel jelölt szingulettje jelenik meg. Savas pH-n a szabad ligandum (#) mellett 1:1 aránynál két, míg 1:3 aránynál három új jel jelenik meg, mely szintén alátámasztja az $[\text{ML}]^{2+}$ (+), $[\text{ML}_2]^{2+}$ (○) és az $[\text{ML}_3]^{2+}$ (x) összetételű komplexek jelenlétét. Az NMR eltolódásokból és jelintegrálokból meghatározott komplexek összetételét tömegspektrometriás mérésekkel is alátámasztottuk. A kálium-klorid ionerősségnél felvett spektrumokban (23. ábra/C és D) megjelentek az $[\text{MLCl}_2]$ (◇) és az $[\text{ML}_2\text{Cl}]^+$ (Θ) vegyes kloridokomplexek. Azt, hogy az $[\text{MLCl}_2]$ -ről vagy $[\text{MLCl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ részecskéről van szó, $0,20 < c_{\text{KCl}} < 2,00$ M ionerősség tartományban végzett NMR vizsgálatokkal döntöttük el. A spektrumokon nem tapasztaltunk $\text{H}_2\text{O}-\text{Cl}^-$ kicserélődést, így az elméletileg képződő $[\text{MLCl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ kation helyett az 1:1 összetételű $[\text{MLCl}_2]$ (◇) komplex van jelen.



A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ –Meim rendszerben képződő komplexek (24. ábra) kémiai eltolódás értékeit az 5. táblázatban tüntettük fel.

^1H NMR módszerrel kimutattuk, hogy a MeIm és az AcHm ligandumok stabilan kötődnek a fémionhoz és képesek megakadályozni a fémion hidrolízisét az 1:3 arányú mintában, pH 7,4-nél.



5. táblázat: A különböző pH-kon detektált szabad és komplexben kötött $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}]^{2+}$ (M; 3. ábra) és Meim (L; 21. ábra) jelek ^1H NMR kémiai eltolódás értékei (ppm).

	Jelölés	<i>p</i> -cimol; δ (ppm)				Meim; δ (ppm)			
		A	B	C	D	D	C	B	A
LH^+	#	-	-	-	-	3,91	7,43	7,43	8,64
L		-	-	-	-	9,70	6,99	7,10	7,60
$[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$	● ^b	1,34	2,24	5,73	5,98	-	-	-	-
$[(\text{M})_2(\text{OH})_3]^+$	▲ ^b	1,22	2,08	5,17	5,38	-	-	-	-
$[\text{M}(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$	■ ^b	1,33	2,21	5,63	5,85	-	-	-	-
$[(\text{M})_2(\text{Cl})_3]^+$	ω ^b	1,33	2,19	5,53	5,72	-	-	-	-
$[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	+	1,24	2,10	5,73	5,98	3,78	7,10	7,24	7,86
$[\text{ML}_2(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	○	1,16	1,91	5,70	5,96	3,73	6,96	7,20	7,69
$[\text{ML}_3]^{2+}$	X	1,06	1,75	5,70	5,96	3,70	6,81	7,16	7,58
$[\text{ML}(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^+$	Δ	1,26	2,12	5,53	5,78	3,74	7,01	7,15	7,71
$[\text{ML}_2(\text{OH})]^+$	□	1,08	1,84	5,41	5,66	3,69	6,98	7,10	7,61
$[\text{ML}(\text{Cl})_2]$	◇	1,23	2,06	5,6	5,8	3,76	- ^a	7,18	7,84
$[\text{ML}_2(\text{Cl})]^+$	Θ	1,15	1,85	5,59	5,85	3,70	7,04	7,13	7,73

^aA jelek átfednek egymással. ^bHiv.³¹

4.3 A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kölcsönhatása hisztidint tartalmazó oligopeptidekkel

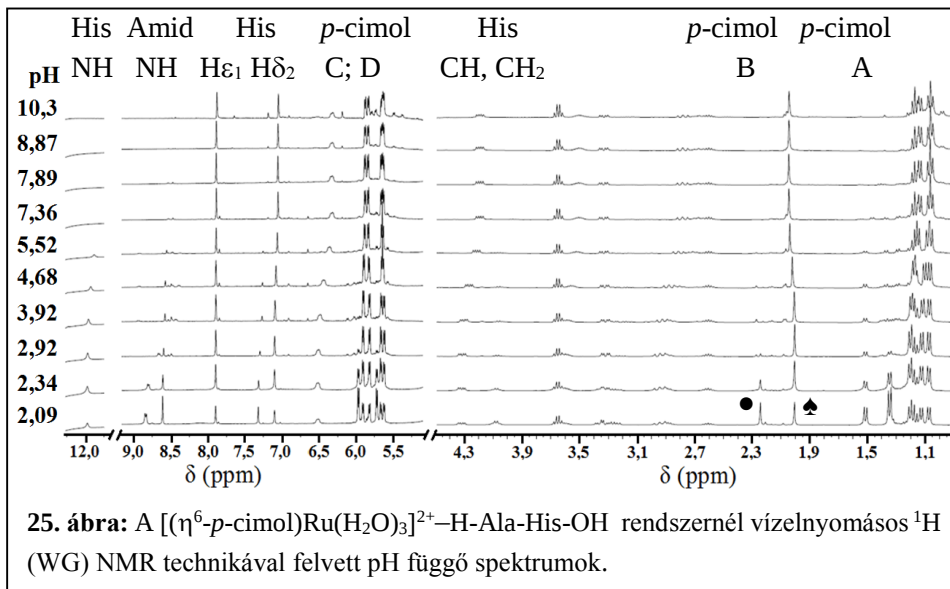
A potenciálisan koordinálódni képes hisztidin imidazolilcsoportot különböző szekvenciában és távolságban tartalmazó oligopeptidok – két hisztidint tartalmazó nem védett dipeptidok (15. ábra: **II.A-C**), valamint három hisztidin aminosavat tartalmazó, mindkét végén védett oligopeptidok (15. ábra: **III.A-D**) – kölcsönhatását vizsgáltuk a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kationnal.

4.3.1 Egy és két hisztidin aminosavat tartalmazó dipeptidok ruténium(II)komplexei

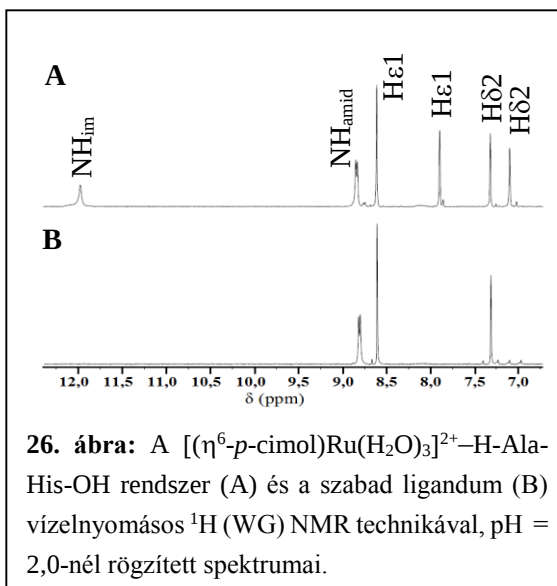
A szabad N- és C-terminálisú, különböző pozícióban egy vagy két hisztidin aminosavat tartalmazó dipeptidok (H-Ala-His-OH, H-His-Ala-OH és H-His-His-OH) (15. ábra: **II.A-C**) kölcsönhatását vizsgáltuk a *p*-cimol aromás ligandumot tartalmazó félszendvics típusú ruténium(II)-fémionnal, hogy modellezhessük a fémion és az imidazolil oldallánc közötti kölcsönhatást.

Az oldategyensúlyi vizsgálatok során mind a három ligandum ruténium(II)-fémiont is tartalmazó 1:1 arányú rendszerében lassú komplexképződés volt megfigyelhető, ezért minden esetben egyedi mintákat készítettünk. A H-Ala-His-OH és H-His-Ala-OH ligandumban négy potenciálisan koordinálódni képes donoratom található: a szabad N-terminális aminocsoport (N_{amino}), az imidazol nitrogénjei (*N1* vagy *N3*), az amidcsoport nitrogénje (N_{amid}^-) és a C-terminális karboxilátcsoport oxigénje ($\text{O}_{\text{karboxilát}}^-$), míg a H-His-His-OH dipeptidnél az előbb felsoroltakhoz képest plusz egy további imidazol (*N1* vagy *N3*) tud koordinálódni a fémionhoz. Annak kiderítésére, hogy a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ fémion három szabad koordinációs helyét mely donoratomok foglalják el, különböző vizsgálati módszereket használtunk. Mivel a kloridion is egy potenciális koordinálódni képes donoratom, ezért minden esetben megvizsgáltuk a mintákat KCl ionerősség mellett. Azonban az NMR és MS eredmények alapján megállapítottuk, hogy a Cl^- -ion nem vesz részt a koordinációban.

A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -H-Ala-His-OH rendszernél vízelnyomásos ^1H (WG) NMR technikával felvett pH függő spektrumok (25. ábra) azt mutatták, hogy már savas pH-n az akvakomplex ($\bullet$; 2.24 ppm)³¹ mellett egy fő részecske van jelen ($\spadesuit$, 2,00 ppm). A *p*-cimol protonjait a 3. ábra szerint jelöltük. A 25. ábrán a *p*-cimol gyűrűmetil jelének tartományában (1,9–2,3 ppm) a pH növelésével a fő jel ($\spadesuit$) csak kis eltolódást mutat, azaz feltehetően nem történik nagy változás a



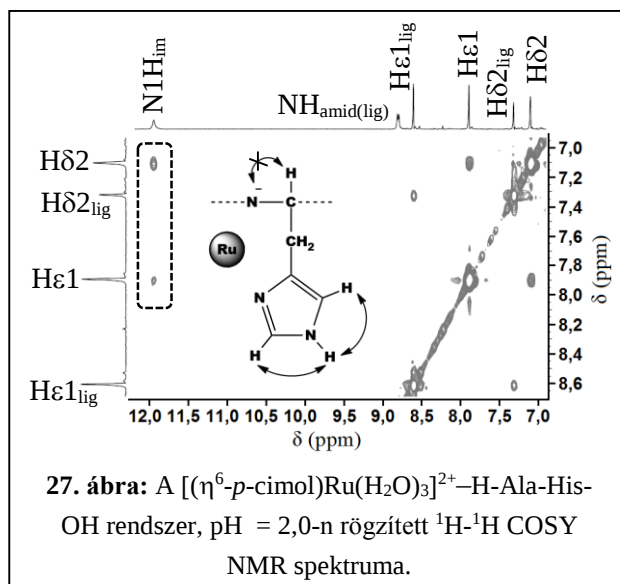
komplex szerkezetében. Az aromás tartományban az (5,5–6,0 ppm) a *p*-cimol gyűrűprotonjai, míg az a fölötti tartományban az imidazolgyűrűn lévő protonok ($\text{H}\epsilon_1$ és $\text{H}\delta_2$, NH_{im}) és az amidcsoport protonja adnak jelet (26. ábra). Összehasonlítva savas pH-n a szabad és a komplexben kötött ligandum NMR jeleit, megfigyelhető, hogy az imidazol jelek eltolódnak a nagyobb térerő felé (6. táblázat), illetve 12,0 ppm-nél megjelenik további jel az 1:1 arányú savas mintában (26./A ábra).



A jelek hozzárendeléséhez vízelnyomásos ^1H - ^1H COSY NMR technikát használtunk (27. ábra). A ^1H - ^1H COSY NMR spektrumon jól látható, hogy a H-Ala-His-OH ligandumban lévő hisztidin imidazolgyűrűjén lévő két proton ($\text{H}\epsilon_1$ és $\text{H}\delta_2$) mind a szabad ligandumban, mind a komplexben kötött ligandumban csatol egymással (27. ábra, 6. táblázat). Továbbá, a 12,0 ppm-nél lévő jelet adó proton

csatol a komplexben kötött ligandum H ϵ 1 (12,0 ppm – 7,89 ppm) és H δ 2 (12,0 ppm – 7,10 ppm) protonjaival. Ez arra utalhat, hogy az N1-nitrogénen helyezkedik el a proton, azaz az N3-as nitrogén koordinálódik a fémionhoz. A szabad ligandumnál ez az NH_{im} jel a tautomerizációnak köszönhetően nem jelenik meg. Megfigyelhető továbbá az is, hogy 8,81

ppm-nél csak a szabad ligandum α CH_{His}-val csatoló NH_{amid} protonjának dublettje jelenik meg (26. ábra/A), mely igazolja az 1:1 arányú mintában Ru(II)-fémion indukált amidcsoport deprotonálódást és koordinációt. Hiszen ha a fémion az amid nitrogénhez kötődik, akkor az amidnitrogénen lévő proton leszorul, így az α CH-val már nem ad keresztcsúcsot az NMR spektrumban.

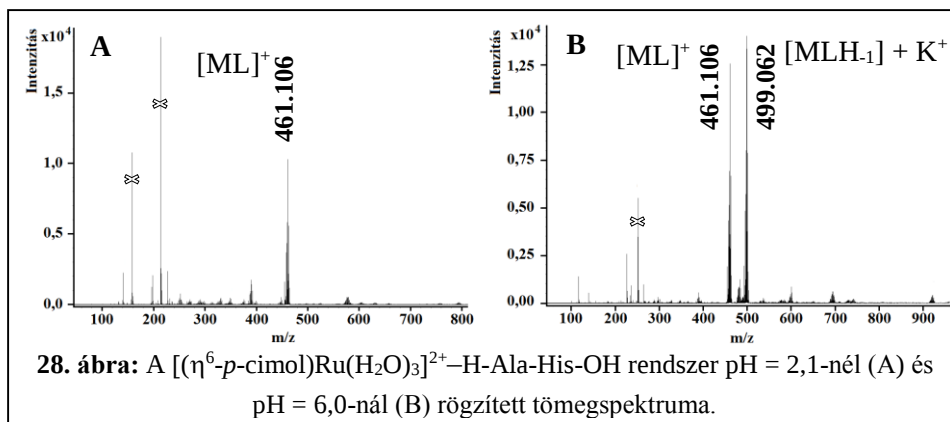


6. táblázat: A komplexben nem kötött dipeptidek, illetve a

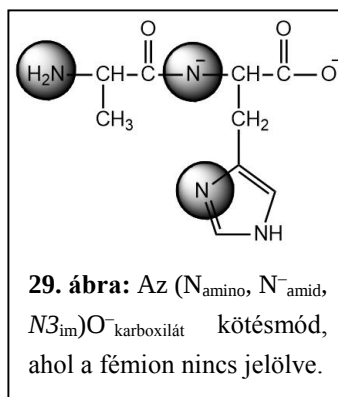
$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -H-Ala-His-OH / H-His-Ala-OH / H-His-His-OH rendszerekben pH = 2-nél rögzített kémiai eltolódás értékek aromás tartománya.

^1H (WG) NMR δ (ppm)	H-Ala-His-OH			H-His-Ala-OH			H-His-His-OH		
	H ϵ 1	H δ 2	NH amid	H ϵ 1	H δ 2	NH amid	H ϵ 1	H δ 2	NH amid
komplexben nem kötött, pH = 2,0	8,60	7,31	8,81	8,68	7,45	8,83	8,66	7,42	8,95
komplexben kötött, pH = 2,0	7,89	7,10	-	8,59	6,98	9,81	8,62	7,07	10,1
$\Delta\delta$ (ppm)	+0,71	+0,21	-	+0,09	+0,47	-0,98	+0,04	+0,35	-1,14
							+0,00	+0,34	

Tömegspektrometriás méréseket is végeztünk 2,1-es és 6,0-s pH-nál. Ahogy azt a 28. ábrán lévő tömegspektrumok is mutatják, savas pH-n egy fő jel van

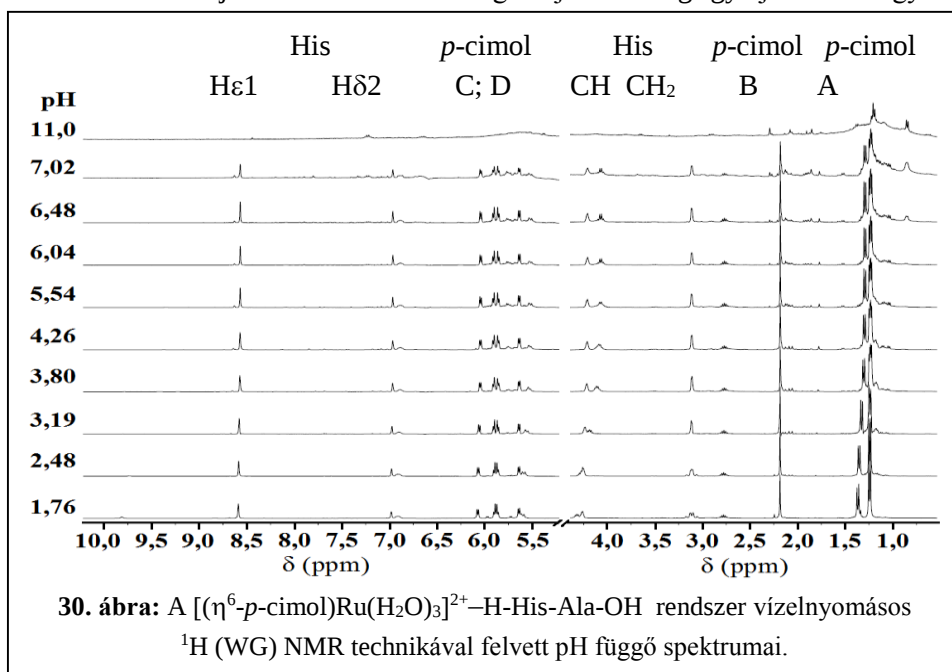


461,106 m/z értéknél, mely az $[\text{ML}]^+$ komplexhez rendelhető (ahol az $\text{M} = [(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}]^{2+}$). Ebben az $[\text{ML}]^+$ összetételű komplexben, NMR adatok alapján az imidazol- és az amidnitrogén koordinálódik a fémionhoz. Erre az egy pozitív töltésű, 1:1 összetételű komplexre két szerkezetet írhatunk fel: $(\text{N}_{\text{amino}}, \text{N}^{\text{-amid}}, \text{N3}_{\text{im}})\text{OH}_{\text{karboxil}}$ vagy $(\text{N}^{\text{-amid}}, \text{N3}_{\text{im}}, \text{O}^{\text{-karboxilát}})\text{NH}_3^+$ (ahol a zárójelen kívül a nem koordinálódó csoportot értjük). Mivel a 461,106 m/z $[\text{ML}]^+$ komplex megjelenik pH 2,1 és 6,0-nál is, ebből adódik, hogy csak a karboxilátcsoport koordinálódhat a harmadik szabad koordinációs helyre, mert ha az aminocsoport kötődne a fémionhoz, akkor a $(\text{N}_{\text{amino}}, \text{N}^{\text{-amid}}, \text{N3}_{\text{im}})\text{OH}_{\text{karboxil}}$ komplexből $(\text{N}_{\text{amino}}, \text{N}^{\text{-amid}}, \text{N3}_{\text{im}})\text{O}^{\text{-karboxilát}}$ válna a pH növelésével, ami már egy semleges komplexet eredményezne. Így valószínűsíthető, hogy savas pH-n az $[\text{ML}]^+$ összetételű $(\text{N}^{\text{-amid}}, \text{N3}_{\text{im}}, \text{O}^{\text{-karboxilát}})\text{NH}_3^+$ koordinációs módú komplex van jelen. Mint azt már a fentiekben említettük, a ^1H NMR spektrumokban (25. ábra) ezen komplex jelének a folyamatos eltolódását figyeltük meg. Az NMR adatok alapján az ebből számolható pK_s értéke 4,8(1), mely nem rendelhető a NH_3^+ csoport (pK értéke 8 körüli) deprotonálódásához. Azaz, egy új koordinációs módú komplex alakul ki, mely gyors cserében van az $(\text{N}^{\text{-amid}}, \text{N}_{\text{im}}, \text{O}^{\text{-karboxilát}})\text{NH}_3^+$ kötésmódú komplexszel. pH 6,0-nál a 461,106 m/z tömegű $[\text{ML}]^+$ mellett még megjelenik 499,062 m/z -nél egy $[\text{MLH}_{-1}]$ semleges komplex, mely káliumionnal repül. Ebben a semleges $[\text{MLH}_{-1}]$ komplexben a disszociálisan protonok leszakadnak a ligandumról. A ^1H NMR spektrumok (25. ábra) azt sugallják, hogy az imidazol végig a koordinációs szférában marad. ESI-MS-sel detektált, $[\text{MLH}_{-1} + \text{K}]^+$ összetételű komplexet csak



egyetlen, a 29. ábrán feltüntetett (N_{amino} , N_{amid}^- , $N3_{\text{im}}$) O^- karboxilát kötés móddal tudjuk leírni. Ez az eredmény összhangban van a síknégyszetes Pd(II)-fémion H-Ala-His-OH és H-Gly-His-OH rendszereinél megfigyelttel, ahol szintén (N_{amino} , N_{amid}^- , $N3_{\text{im}}$) kötés módú komplexet írtak le (29. ábra).²⁴² DFT számításokat is végeztünk a komplexek szerkezetének igazolására, ahol a számítási eredmények a mért NMR és ESI-MS eredményekkel összhangban azt mutatták, hogy a (N_{amid}^- , N_{im} , O^- karboxilát) kötés módú komplexnél az a stabilabb kötési izomer, amelyikben az imidazolnitrogének közül az $N3$ koordinálódik a fémionhoz.

A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}\text{-H-His-Ala-OH}$ 1:1 arányú rendszert is vizsgáltuk NMR technikával. Az oldategyensúlyi vizsgálatok során különböző pH-kon vettük fel a vízelnyomásos ^1H (WG) NMR spektrumokat (30. ábra). Összehasonlítva a H-Ala-His-OH ruténium(II)-fémiont is tartalmazó rendszerével (25. ábra), jól látható, hogy széles pH tartományban (pH 1,76-tól 7,02-ig) egy komplex van jelen, melyben az imidazolcsoport koordinálódik a fémionhoz. Ezt a szabad ligandum (31. ábra/B) és a komplexben kötött ligandum (31. ábra/A) $\text{H}\epsilon 1$ és $\text{H}\delta 2$ imidazol jeleinek eltolódása is igazolja. Ha megfigyeljük a felnagyított

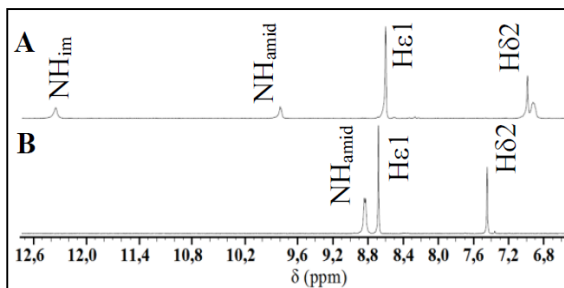


1,76-os pH-n felvett spektrumot és a szabad ligandum spektrumát (31. ábra), akkor láthatjuk, hogy 9,81 ppm-nél megjelenik az amidnitrogén protonjának a jele. Ellentétben a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}\text{-H-Ala-His-OH}$ rendszerrel, ebben az esetben nem történik meg az amidcsoport fémion indukált deprotonálódása és

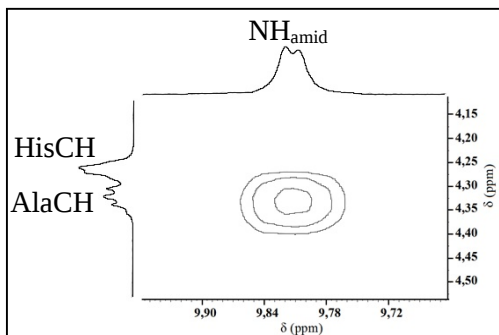
koordinációja (6. táblázat, 32. ábra). Ha az amidnitrogén nem koordinálódik a fémionhoz akkor az (N_{amino} , N_{im} , O^- karboxilát) NH_{amid} kötésmód alakul ki. ^{13}C NMR módszerrel 174,96 ppm, illetve 181,17 ppm-nél detektáltuk a két $C=O$ karbonilcsoport jelét, ez a szabad ligandum jeléhez képest (189,57 ppm) kisebb térerő felé történő eltolódást mutatott. Az

N-terminus felőli $C=O$ karbonilcsoport mutatott nagyobb kémiai eltolódást, mely az N-terminusú aminoscsoport és a mellette lévő hisztidin imidazolnitrogén között kialakuló hattagú kelát képződésére utalhat. Kimutattuk, hogy a pH 1,76-on a C-terminus felőli karboxilcsoport deprotonált formában van jelen, mely csak akkor lehetséges, ha az koordinálódik a fémionhoz. Ahogy azt az NMR spektrumok (30. ábra) lúgos tartománya (pH 11,0) is mutatja, a jelek kiszélesedtek, azaz feltehetően többmagvú komplexek képződtek.

A H-His-His-OH dipeptid vizsgálata során először pH-potenciometriával meghatároztuk a ligandum protonálódási állandóit 0,2 M-os KCl ionerősség mellett (33. ábra/a). A negatív lúg ekvivalens érték a mintához adott extra savra vonatkozik. A $\log\beta$ értékek rendre a következők voltak: 7,78(1); 14,52(1); 19,88(2) és 22,12(3). Az ebből számolt pK érték, kémiai evidencia alapján, az amino- (7,78), imidazol- (6,74 és 5,36) és a karboxilátsoporthoz (2,24) rendelhető. Az 1:1 arányú $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})Ru(H_2O)_3]^{2+}$ -H-His-His-OH rendszert vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a szokásos módon végzett titrálás során (33. ábra: b) nem történik valódi pH egyensúly beállása, amit az egyedi mintás görbék adatai (33. ábra: c, d) támasztanak alá. Az egyedi mintás KCl (c) és a KNO_3 (d) ionerősség mellett kapott

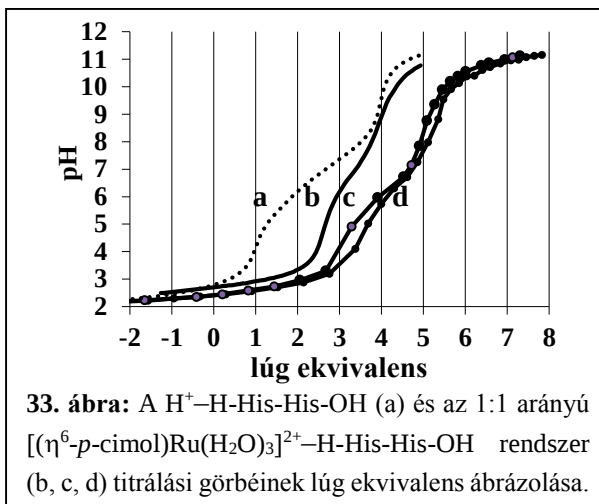


31. ábra: A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})Ru(H_2O)_3]^{2+}$ -H-His-Ala-OH rendszer (A) és a szabad ligandum (B) vízelnyomásos 1H (WG) NMR technikával, pH = 1,76-nál rögzített spektrumai.

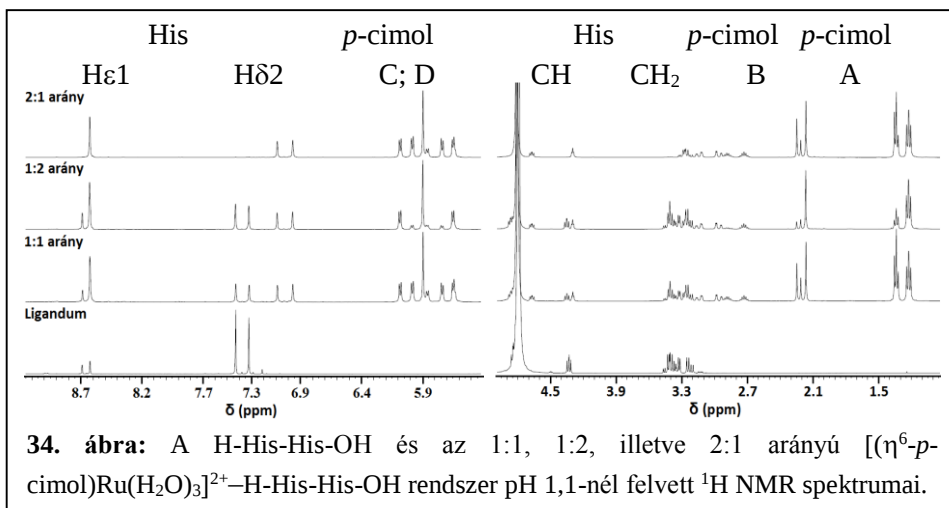


32. ábra: A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})Ru(H_2O)_3]^{2+}$ -H-His-Ala-OH rendszer pH = 2,0-n rögzített 1H - 1H (WG) COSY NMR spektruma.

titrálási görbék hasonló lefutásából megállapítottuk, hogy a Cl^- -ion nem vesz részt a koordinációban. Ezt ESI-MS és különböző NMR technikák használatával is alátámasztottuk. Az ESI-MS mérések azt mutatták, hogy az $[\text{MLH}]^{2+}$ komplexből a pH növelésével $[\text{ML}]^+$ összetételű komplex alakul ki. ^1H NMR módszerrel 1:1, 1:2 és 2:1 arányú mintákat vizsgáltunk pH 1,1-nél (34. ábra). A kiértékeléshez az hisztidin imidazol H δ 2, valamint a *p*-cimol CH_3 jelének intenzitását

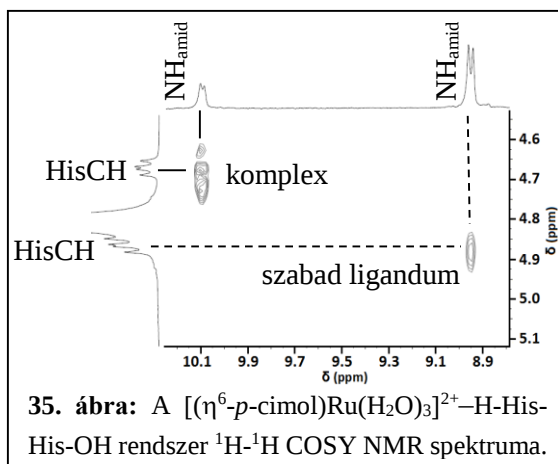


köveztük, és a szabad ligandumhoz és fémionhoz, illetve komplexhez tartozó jelek arányából meghatároztuk, hogy egy 1:1 arányú $[\text{MLH}]^{2+}$ komplex van jelen ezen a pH-n, összhangban az MS eredményekkel. A molekula összetételének ismeretében kísérletet tettünk a komplex stabilitási állandójának meghatározására. A minták pontos M, L, H^+ koncentrációjának, a ligandum protonálódási állandójának, illetve a szabad fémionhoz és a ligandumhoz tartozó jelek



intenzitásarányának ismeretében az $[\text{MLH}]^{2+}$ összetételű részecske stabilitási állandójára $\log\beta_{[\text{MLH}]^{2+}} = 21,6(2)$ értéket számoltunk. Összehasonlítva a három imidazolt tartalmazó, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{Meim})_3]^{2+}$ komplex $\log\beta = 19,3(1)$ (3.

táblázat) értékével, látható, hogy valamilyen extra stabilitást okozó kötés mód alakulhat ki az $[\text{MLH}]^{2+}$ komplexben, feltehetően a képződő makrokelátok miatt. A H-His-Ala-OH rendszerhez hasonlóan (6. táblázat, 31. ábra), a H-His-His-OH ruténium(II)-fémiont tartalmazó rendszerében ^1H - ^1H COSY NMR technikával, pH 1,1-nél, a szabad ligandumban és a komplexben lévő protonált amidnitrogén proton jelét detektáltuk, azaz az nem koordinálódik a fémionhoz (35. ábra). A karboxilátcsoport koordinációja is kizárható, hiszen az $[\text{MLH}]^{2+}$ összetételű komplex pH 5-ig az egyedülként jelenlévő komplex a pH-potenciometriás (33. ábra/c,d) és különböző pH-kon végzett NMR vizsgálatok alapján. Ezek alapján a lehetséges kötési izomerjeit vizsgálva az valószínűsíthető, hogy a pH 5-ig egyedülként jelenlévő $[\text{MLH}]^{2+}$ komplex (N_{amino} , N_{im} , N_{im}) koordinációjú. Az $[\text{MLH}]^{2+}$ komplex szerkezetének felderítésére DFT számításokat is végeztünk, melyek eredményei összhangban voltak az oldategyensúlyi mérések eredményeivel: a



35. ábra: A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -H-His-His-OH rendszer ^1H - ^1H COSY NMR spektruma.

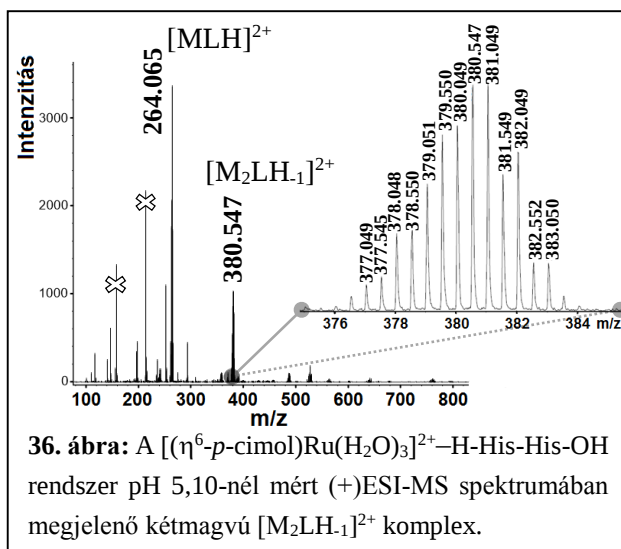
7. táblázat: Az $[\text{MLH}]^{2+}$ összetételű komplex különböző (N_{amino} , N_{im} , N_{im}) kötési izomerjeire kapott DFT számítási adatok. M: $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}]^{2+}$; L: H-His-His-OH

		$(N_{\text{amino}}, N1_{\text{im}}, N1_{\text{im}}) \rightarrow (N_{\text{amino}}, N3_{\text{im}}, N1_{\text{im}}) \Delta G = -242 \text{ kJ/mol}$	
Kötési izomerek:		$N_{\text{amino}}, N1_{\text{im}}, N1_{\text{im}}$	$N_{\text{amino}}, N3_{\text{im}}, N1_{\text{im}}$
Kötéstávolság (Å)	M- N_{amino}	2,212	2,198
	M-His1($N1/N3$)	2,107	2,118
	M-His2($N1$)	2,281	2,149
Kötésszög (°)	N_{amino} -M-His1($N1/N3$)	86,5	81,4
	His1($N1/N3$)-M- His2($N1$)	91,9	85,3
	His2($N1$)-M- N_{amino}	91,6	88,9

(N_{amino} , N_{im} , N_{im}) koordináció stabilabb, mint a ($O^-_{\text{karboxilát}}$, N_{im} , N_{im}). Kimutattuk, hogy az (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$, $N3_{\text{im}}$), (N_{amino} , $N1_{\text{im}}$, $N1_{\text{im}}$) és (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$, $N1_{\text{im}}$) kötőmódok közül az utóbbi a stabilabb szerkezet, amikor az N-terminus felőli imidazolcsoport $N3_{\text{im}}$, (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$: hisztaminszerű koordináció), míg a C-terminus felőli hisztidin az $N1$ -es nitrogénnel koordinálódik a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}]^{2+}$ kationhoz. Az (N_{amino} , $N1_{\text{im}}$, $N1_{\text{im}}$) $\rightarrow$ (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$, $N1_{\text{im}}$) átalakulást figyelembe véve, a számítások szerint a (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$, $N1_{\text{im}}$) izomer szerkezete stabilabb ($\Delta G = -242$ kJ/mol), mint a (N_{amino} , $N1_{\text{im}}$, $N1_{\text{im}}$) kötési izomeré. A különböző kötési izomerek számolt kötéstávolság és kötősszög értékeit a 7. táblázat tartalmazza.

A pH 5 fölött megfigyelhető újabb légfogyasztó folyamat (33. ábra: c, d), valamint az ESI-MS-ben 380,547 m/z-nél detektálható kétmagvú $[\text{M}_2\text{LH}_1]^{2+}$ részecske (36. ábra) közvetett bizonyítékaul szolgálnak a peptid amidcsoportjának deprotonálódására és koordinációjára. Ebben az $[\text{M}_2\text{LH}_1]^{2+}$ összetételű komplexben a két $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}]^{2+}$ -nak összesen hat szabad kötőhelye van, míg a teljesen deprotonált ligandumban öt koordinálódni képes donortom (N_{amino} , N_{im} , N_{im} , N^-_{amid} , $O^-_{\text{karboxilát}}$) áll rendelkezésre.

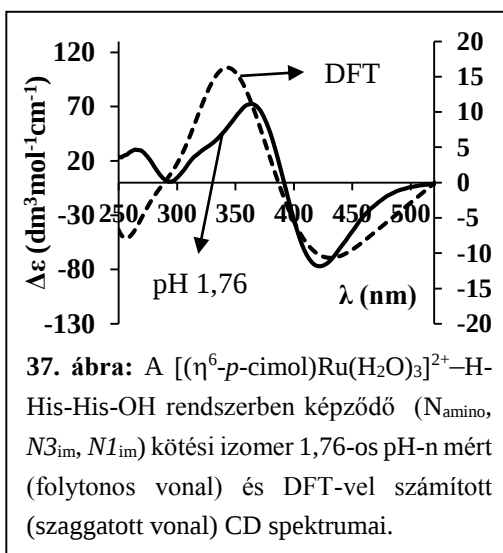
Az ESI-MS vizsgálatok azt mutatták, hogy a ruténium fémionokhoz csak a ligandum donortomjai koordinálnak. Így két lehetséges esetet vehetünk figyelembe: a) hasonlóan, mint a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -Meim rendszernél gázfázisban képződő $[\text{ML}(\text{OH})]^+$ komplex, ahol az ESI-MS



körülmények miatt nem található donortom a harmadik koordinációs helyen (4. táblázat); b) vagy, imidazolátó hídligandum köt össze két ruténium egységet. A két esetet figyelembe véve, az utóbbi kizárható, hiszen akkor a komplex töltése megváltozna +2-ről +1-re. Így az a) esetet feltételezhetjük, ahol több kötési izomer is képződhet. Ezek közül a legvalószínűbbnek tartjuk azt a kötési izomert, amikor az egyik félszendvics $\text{Ru}(\text{II})$ -höz a H-His-His-OH ligandum N_{amino} , $N3_{\text{im}}$ koordinálódik, és a harmadik koordinációs helyen, MS körülmények között nem

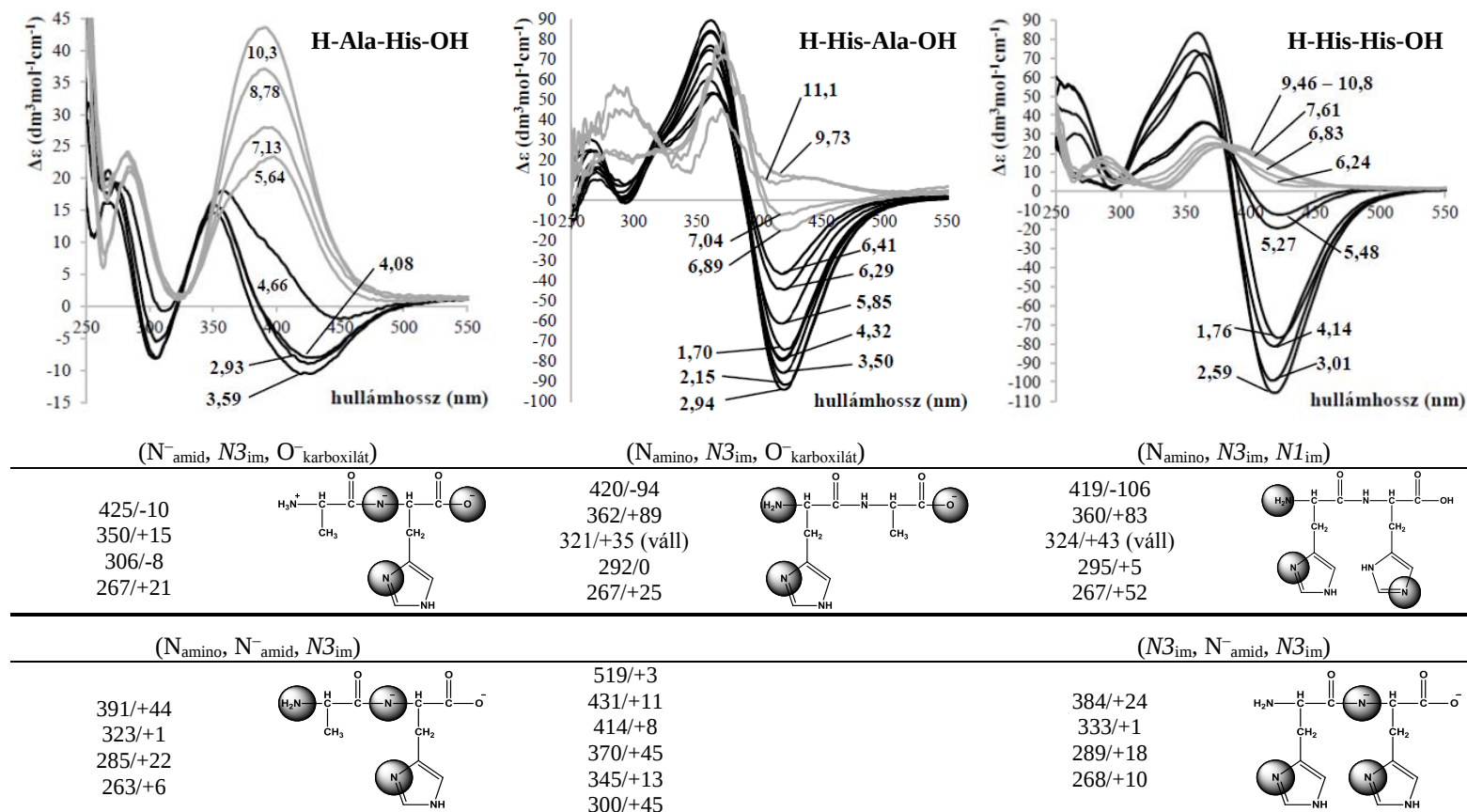
található donoratom, míg a másik Ru(II)-egységhez a dipeptid N^-_{amid} , $N3_{\text{im}}$, O^- karboxilát donoratomja kapcsolódik.

Ismert az irodalomból, hogy ha három eltérő donoratom koordinálódik egy félszendvics szerkezetű fémionhoz, akkor az kiralitáscentrummá válik^{66–69} és lassú cserefolyamatok esetén cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával vizsgálható. Noha a királis molekulák hasznos vizsgálómódszere lehet a CD, ennek ellenére nagyon kevés vizsgálati eredmény található félszendvics ruténium(II)-fémiont tartalmazó komplexekre. Ezért a H-Ala-His-OH, H-His-Ala-OH és a H-His-His-OH dipeptidek $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ fémionnal való kölcsönhatását CD spektroszkópiával is vizsgáltuk, különböző pH-kon, vizes oldatban (38. ábra). A 38. ábrán szereplő mért adatokat összehasonlítva hasonlóság figyelhető meg az egyes ligandumokat tartalmazó kötési izomereknél. Ha a H-His-Ala-OH és a H-His-His-OH dipeptidek szerkezetét megnézzük, akkor látható, hogy a szabad N-terminális aminocsoport mellett kelátképző helyzetben egy imidazolcsoport található, ellentétben a H-Ala-His-OH dipeptiddel. A H-His-Ala-OH ligandum fémiont is tartalmazó rendszerének CD spektrumában kb. 420 nm-nél nagy negatív, illetve 360 nm-nél megjelenő nagy pozitív Cotton-effektus a hisztaminszerű N_{amino} , $N3_{\text{im}}$ hattaágú kelát kialakulását igazolja. Összevetve a kapott eredményeket elmondható, hogy a H-His-Ala-OH és H-His-His-OH rendszerek hasonlóságot mutattak 1,7–5,5-ös pH tartományban. DFT számításokat is végeztek a H-His-His-OH dipeptidet tartalmazó (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$, $N1_{\text{im}}$) kötési izomer CD spektrumának kiszámítására (37. ábra). A mért adatokkal összevetett, számított CD spektrum jó egyezést mutatott a 300–500 nm-es tartományban, ezzel is igazolva a (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$, $N1_{\text{im}}$) kötési izomer kötésmódját. A H-His-Ala-OH és a H-His-His-OH ligandumok esetében a pH növelésével ezek a jellegzetes CD sávok átalakulnak. A pH 5,5 fölötti tartományban is megfigyelhető hasonlóság a H-Ala-His-OH és H-His-His-OH dipeptidek CD spektrumában. Ekkor mind a két komplexben N^-_{amid} , $N3_{\text{im}}$ hattaágú kelát kialakulása okozhatja a hasonló CD sávok megjelenését (38. ábra). Ahogy azt a $[(\eta^6\text{-}p\text{-}$



37. ábra: A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -H-His-His-OH rendszerben képződő (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$, $N1_{\text{im}}$) kötési izomer 1,76-os pH-n mért (folytonos vonal) és DFT-vel számított (szaggatott vonal) CD spektrumai.

cimol) $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ –H-His-Ala-OH rendszer 30. ábrán látható pH függő ^1H NMR spektrumának pH 7 fölötti tartománya is alátámasztja, a kezdetben (N_{amino} , N3_{im} , $\text{O}^-_{\text{karboxilát}}$) kötési izomerű komplex szerkezete jelentősen megváltozik. Ezt az NMR-ben megjelenő, gyors cserefolyamatok miatt kiszélesedett jelek, valamint a CD spektrumban megjelenő zajos spektrumok is alátámasztják. Ezen CD görbék $\Delta\epsilon(\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1})$ és $\lambda(\text{nm})$ adatai nem vethetők össze a H-Ala-His-OH és H-His-His-OH ligandumoknál kapott adatokkal. A 38. ábrán szereplő $\Delta\epsilon(\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1})$ és $\lambda(\text{nm})$ adatpárokból jól látható, hogy a H-His-Ala-OH (N_{amino} , N3_{im} , $\text{O}^-_{\text{karboxilát}}$) kötési izomere a H-His-His-OH (N_{amino} , N3_{im} , N1_{im})-val, illetve a H-Ala-His-OH (N_{amino} , N^-_{amid} , N3_{im}) a H-His-His-OH (N3_{im} , N^-_{amid} , N3_{im}) kötési izomerével mutat hasonlóságot. Azaz, amikor a hisztidin aminosav az N-terminális aminocsoport mellett van, akkor az N_{amino} , N3_{im} , míg ha nem közvetlen az N-terminális mellett helyezkedik el a szekvenciában, akkor N^-_{amid} , N3_{im} hattagú kelátra jellemző Cotton-effektus látható a CD spektrumokban.

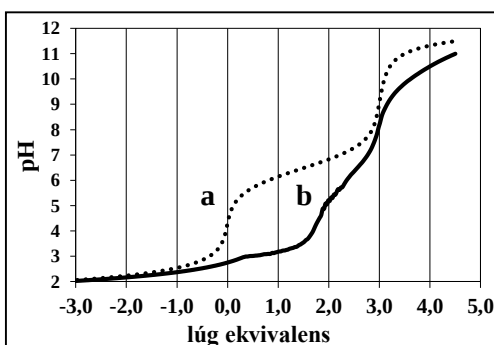


38. ábra: A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -H-Ala-His-OH / H-His-Ala-OH / H-His-His-OH rendszerek különböző pH-kon mért CD spektrumai. A $\Delta\epsilon$ ($\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) és λ (nm) adatpárok mellett a feltételezett kötési izomer ligandumjának koordinálódó donortomjait jelöltük.

4.3.2 A három hisztidint tartalmazó oligopeptidek ruténium(II)komplexei

A nagy molekulatömegű, több hisztidint tartalmazó vérszérum komponensek fémionmegkötő képességét modellező, mindkét végén védett, három hisztidin aminosavat tartalmazó tri- (Ac-HHH-NH₂), tetra- (Ac-HAHH-NH₂) és pentapeptidek (Ac-HAHAH-NH₂ és Ac-H*AH*AH*-NH₂) (15. ábra: **III.A.-D.**) kölcsönhatását vizsgáltuk a *p*-cimol aromás ligandumot tartalmazó, félszendvics típusú ruténium(II)-fémionnal.

Az oldategyensúlyi vizsgálatok során pH-potenciometriás módszerrel meghatároztuk az oligopeptidek deprotonálódási állandóit, melyet a 2. táblázat első három oszlopában tüntettünk fel. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -t és különböző oligopeptidet tartalmazó 1:1 arányú rendszerek pH-potenciometriás titrálásakor, az N-metilimidazol és N-acetil-hisztaminhoz és a hisztidint tartalmazó dipeptidekhez hasonlóan, igen lassú komplexképződési folyamatok játszódtak le. Ennek oka, a tautomerizációs folyamatnak köszönhető különböző kötési izomerek képződése. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -Ac-HHH-NH₂ rendszer pH-potenciometriás titrálása során már pH 2-nél finom eloszlású, sárga színű csapadék jelent meg az oldatban. Ezért, és az igen kis hozamú peptidszintézis miatt, további pH-potenciometriás vizsgálatokat nem végeztünk az Ac-HHH-NH₂ ligandummal. A csapadékképződés utalhat polimer molekulák képződésre. A tetra- és pentapeptideknél nem tapasztaltunk csapadék kiválást. pH 4 körül fémion indukált imidazolil deprotonálódásra és koordinációra utaló jeleket detektáltunk, mely a 39. ábrán lévő lúg ekvivalens titrálási görbén jól látható. (A negatív lúg ekvivalens érték a mintához adott extra savra vonatkozik.) A 39. ábráról mindemellett leolvashatjuk azt is, hogy feltehetően kezdetben, egy lépésben két imidazolcsoport, majd ezt követően, a pH 7-8 tartományban a harmadik imidazolcsoport is kapcsolódik, elkülönült folyamatban a fémionhoz. A titrálási görbe lefutásából további lúgfogyasztó folyamat figyelhető meg pH 9 fölött, ami valószínűleg valamilyen hidroxidokomplex



39. ábra: Az H^+ -Ac-HAHAH-NH₂ (a) és az 1:1 arányú $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -Ac-HAHAH-NH₂ (b) rendszer titrálási görbéi.

képződéséhez rendelhető. Ahhoz, hogy tovább tudjuk vizsgálni az előbb említett rendszereket, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}]^{2+}$ fémiont és ligandumot tartalmazó egyedi minták készítésére, valamint

ESI-MS, NMR és CD

spektroszkópiás

módszerek kombinált

alkalmazására volt

szükség. A 40. ábrán

példaként tüntettük

fel a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ –

Ac-HAHAH-NH₂

rendszer pH-függő ¹H

NMR spektrumának

aromás tartományát,

0,20 M-os KNO₃

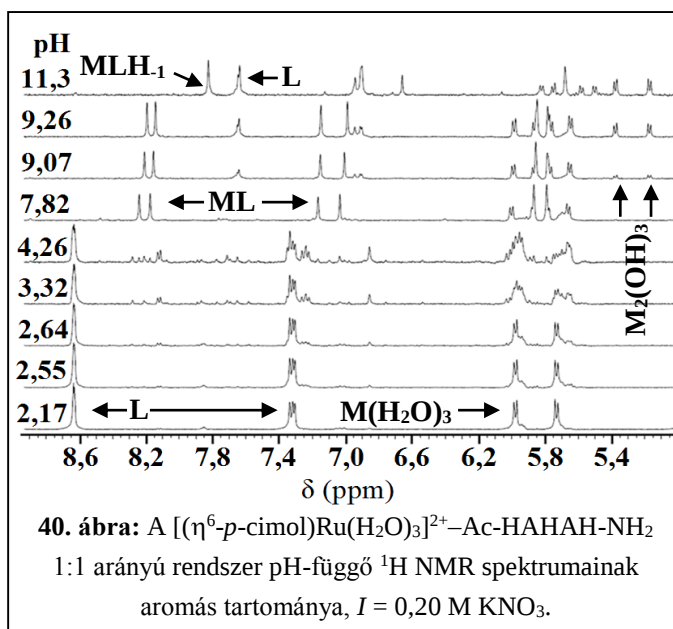
ionerősség mellett.

Az ábrán, pH 2,17–

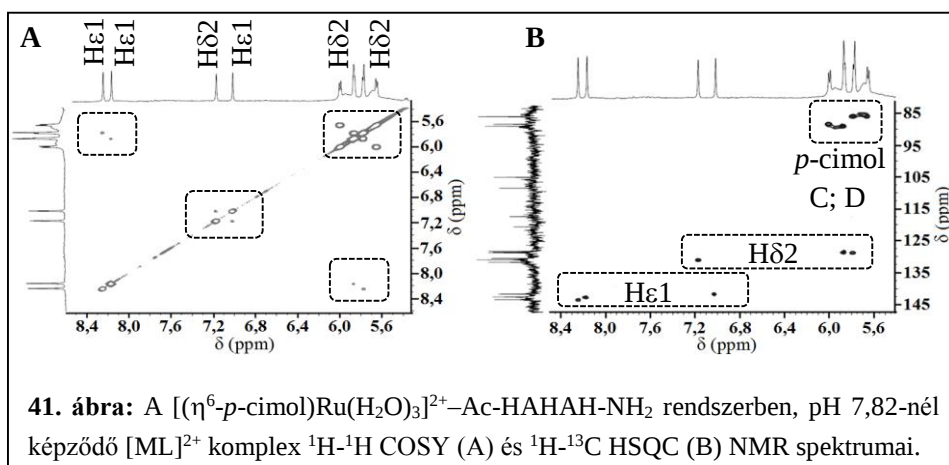
nél három jelcsoportot láthatunk, melyek a szabad, komplexben nem kötött $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kation aromás *p*-cimol gyűrűhidrogénjei (5,73 és 5,98 ppm-nél két dublettet),³¹ az Ac-HAHAH-NH₂ ligandumban lévő hisztidin aminosavak

imidazolilgyűrűjén lévő Hδ2 (7,32 ppm), és a Hε1 (8,63 ppm) protonokhoz rendelhetőek. A pH növelésével, pH 2,6-nál, az előbb említett jelek mellett újabbak detektálhatóak, ami a komplexképződésre utal. Míg pH 4 körül kötési izomerekre utaló jeleket láthatunk, addig a pH 7,82-nél már egyszerűbbé válik a spektrum, és egyféle fémionhoz tartozó *p*-cimol, valamint imidazol Hδ2 és Hε1 jelei látszódnak.

A pH további növelésével, a fémion hidrolízisekor keletkező $[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$ hidroxidokomplex az 5,17 és 5,38 ppm-nél két dublettet adott,³¹ és megjelent a szabad, deprotonált ligandum jele is 6,90 és 7,64 ppm-nél. A 7,82-es pH-n képződő komplex szerkezetének azonosítására ¹H-¹H COSY (41. ábra/A) és ¹H-¹³C HSQC (41. ábra/B) NMR méréseket is végeztünk. A ¹H-¹H COSY spektrumból beazonosítottuk az imidazolgyűrűn lévő Hδ2 és Hε1 jelpárokat, továbbá az ¹H-¹³C HSQC technika segítségével (41. ábra/B) beazonosítottuk az egyes jelcsoportokat, nevezetesen a *p*-cimol (¹³C: 85–90 ppm), a Hδ2 (¹³C: 125–130 ppm) és a Hε1 (¹³C: 140–145 ppm) típusú protonokhoz tartozó jeleket. Ahogy az 41. ábra/B ¹H spektrumának 5,6–6,1 ppm tartománya mutatja, a *p*-cimol gyűrűhidrogénjeinek



jelei közzé tolódtak a komplexben kötött ligandum két imidazolgyűrűjén lévő $\delta 2$ protonok jelei.



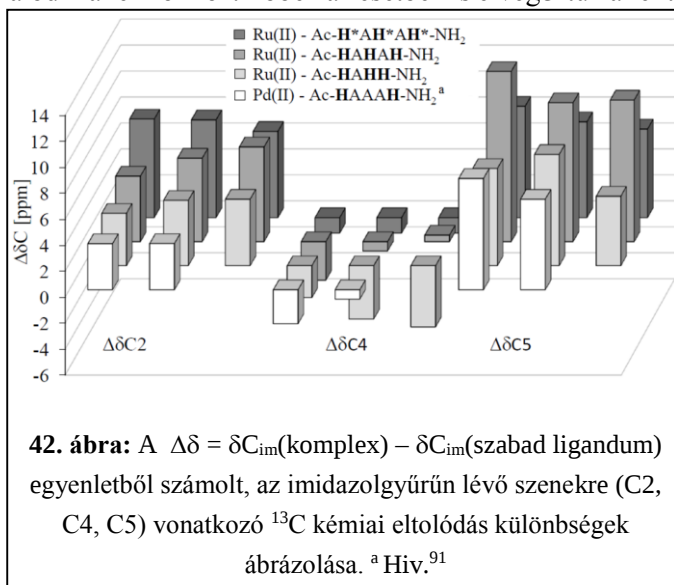
A komplexben kötött imidazol jelek hasonló kémiai eltolódásának trendje figyelhető meg a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}\text{-Ac-His-Ala-His-His-NH}_2$ rendszerénél, ahol a KCl-ionerősség mellett felvett spektrumokban nem jelent meg a fémion hidrolízisekor keletkező, $[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$ hidroxidokomplex. A beazonosított, komplexben nem kötött, illetve komplexben kötött imidazol és a fémionhoz tartozó $p\text{-cimol}$ jelek kémiai eltolódás értékeit a 8. táblázatban tüntettük fel. A különböző NMR technikák, illetve tömegspektrometriás módszerek kombinált alkalmazásával kapott eredmények azt mutatták, hogy a fiziológiás pH-nál képződő, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{L})]^{2+}$ (L: Ac-HAHH-NH₂ vagy Ac-HAHAH-NH₂) összetételű komplexben mind a három imidazolnitrogén koordinálódik a fémionhoz. A tautomerizációnak köszönhetően azonban több kötési izomerként is előfordulhat a fent említett komplex. Ennek kiderítésére ^{13}C NMR méréseket végeztünk, hasonlóan, mint ahogy azt már a Pd(II)-Ac-HAAA-H-NH₂ rendszer esetében megtették.⁹¹ ^{13}C NMR technikával felvettük az Ac-HAHH-NH₂, Ac-HAHAH-NH₂ ligandumok és a $[\text{ML}]^{2+}$ ruténium-komplexeik spektrumát. Az irodalmi bevezetőben leírt $\Delta\delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{komplex}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{ligandum}}$ összefüggés alapján,⁹¹ a szabad ligandum és az 1:1 arányú ruténium-komplex $\delta^{13}\text{C}$ -imidazol (C2, C4, C5) kémiai eltolódásaiból számított $\Delta\delta^{13}\text{C}$ kémiai eltolódás különbségek felhasználásával, az irodalmival⁹¹ való analóg viselkedés alapján az valószínűsíthető, hogy az imidazolgyűrűn lévő két nitrogén közül az N1 koordinálódik a ruténium(II)-fémionhoz. Ezt a 42. ábrán megjelenő pozitív,

8. táblázat: A szabad protonált (pH 2,0) és deprotonált (pH 11,0) Ac-HAHH-NH₂ és Ac-HAHAH-NH₂ ligandumok, illetve a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{oligopeptid})]^{2+}$ komplex (pH 7,8) NMR spektrumaiban mért egyes kémiai eltolódás értékek (ppm).

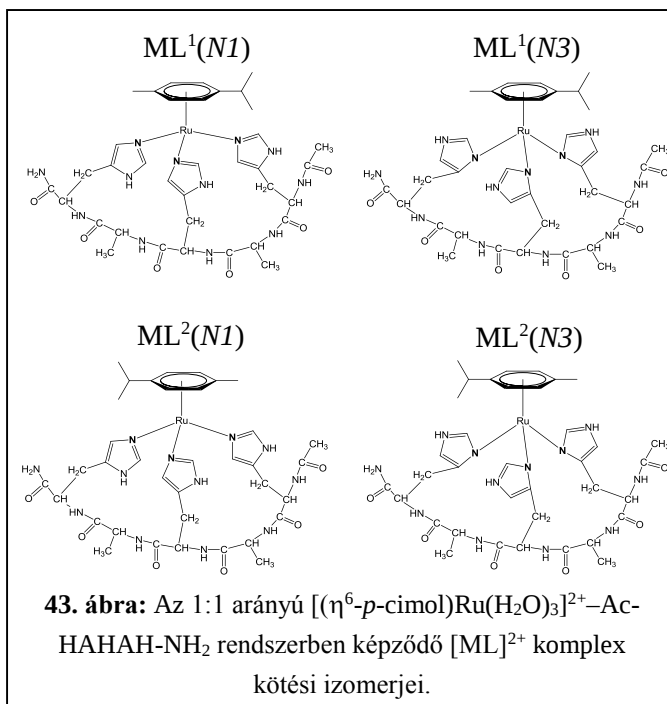
¹ H δ (ppm)	Ac-HAHH-NH ₂			Ac-HAHAH-NH ₂		
	His	His	<i>p</i> -cimol	His	His	<i>p</i> -cimol
	Hε1	Hδ2	C; D	Hε1	Hδ2	C; D
komplexben nem kötött, pH = 2,0	8,61	7,29	5,73 ^a	8,69	7,33	5,73 ^a
	8,61	7,29	5,98 ^a	8,69	7,32	5,98 ^a
	8,61	7,28		8,68	7,30	
komplexben nem kötött, pH = 11,0	7,65	6,91	5,17 ^b	7,65	6,94	5,17 ^b
	7,64	6,88	5,38 ^b	7,64	6,91	5,38 ^b
	7,63	6,87		7,64	6,90	
komplexben kötött, pH = 7,8	8,51 – 4,72		6,01 – 5,70	8,24 – 5,77		6,01 – 5,64
	8,19 – 5,51		5,90 – 5,78	8,17 – 5,87		5,87 – 5,77
	8,17 – 6,38			7,02 – 7,17		

^a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$; ^b $\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}\}_2(\text{OH})_3\}^+$

negatív és pozitív oszlopok jelzik. Szintetizáltunk egy N3-metilezett, három hisztidint tartalmazó pentapeptidet (15. ábra, III.D) is, mely csak az N1-es nitrogénjével tud koordinálódni a fémionhoz. Ebben az esetben is elvégeztük a fent említett számításokat (42. ábra), és ugyanazt a tendenciát kaptuk az imidazolgyűrűn lévő szenek kémiai eltolódás értékeire, ami ugyancsak alátámasztja, hogy mind a három imidazol az N1-es nitrogénnel koordinálódik, kialakítva az $[\text{ML}]^{2+}$ összetételű komplexet.



Az elmúlt években számos fémkomplex relatív stabilitását sikerült kiszámolni DFT módszer segítségével. A kötési izomerek energiakülönbségének tisztázására *E. Garribba és munkatársai*, nemzetközi együttműködés során, DFT számításokat végeztek, hogy kiderítsük melyik imidazolnitrogén (*N1* vagy *N3*) koordinálódik a fémionhoz (4. ábra). A kiindulópontot az irodalomból már ismert, $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kristályszerkezete alapján meghatározott kötesszög és kötéstávolság adatok jelentették. DFT számítások során két esetet tanulmányoztak a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}\text{-Ac-HAHAH-NH}_2$ rendszerben képződő $[\text{ML}]^{2+}$ összetételű komplexszel. Az egyik eset, mely az irodalomban ismert, hogy a *p*-cimol aromás ligandumot tartalmazó félszendvics szerkezetű komplexek esetében a *p*-cimol aromás gyűrűn lévő gyűrűmetil, valamint *iPr*-csoport orientációját felcseréljük, akkor különböző konformereket kaphatunk.²⁴³ A másik eset, amikor az imidazolgyűrű tautomerizációjának köszönhetően *N1*, illetve *N3* kötési izomerek képződhetnek. Ezt a két esetet figyelembe véve az Ac-HAHAH-NH₂ ligandumot tartalmazó $[\text{ML}]^{2+}$ komplexnél négy szerkezet relatív energiáját számolták ki: $\text{ML}^1(\text{N1})$, $\text{ML}^1(\text{N3})$, $\text{ML}^2(\text{N1})$ és $\text{ML}^2(\text{N3})$ (43. ábra). A felső indexben lévő szám a *p*-cimol



ellentétes helyzetére, míg a zárójelben lévő *N1* vagy *N3*, az imidazolgyűrűben lévő nitrogén donortom helyzetére utal. A négy optimált szerkezetű komplex relatív stabilitásának a meghatározásához a következő egyenleteket kellett felhasználni, és összehasonlítani a $\Delta G^{\text{tot}}_{\text{aq}}$ értékeket, hogy megkapjuk az energetikailag stabilabb komplexet.



A DFT számítások azt mutatták, hogy a vizsgált négy izomer közül az *N1* koordinációjú két konformer, az $\text{ML}^1(\text{N1})$ és a $\text{ML}^2(\text{N1})$ az energetikailag legstabilabb komplex. A szabadenergia különbség közöttük nagyon kicsi, mindössze 5,7 kJ/mol. Ellentétben az *N3* kötési izomerekkel, melyek szignifikánsan kevésbé stabilak; az *N1*-kötésmódú komplexekhez képest majdnem 240 kJ/mol a különbség (9. táblázat). A nyert eredmények hasonló trendet mutattak, mint azt a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}\text{-H-His-His-OH}$ rendszerben képződő (N_{amino} , N3_{im} , N1_{im}) kötési izomernél megállapítottunk (7. táblázat).

9. táblázat: A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{L})]^{2+}$ komplex $\text{ML}^1(\text{N1})$ -hez viszonyított, DFT-vel számított relatív szabadenergia értékei.

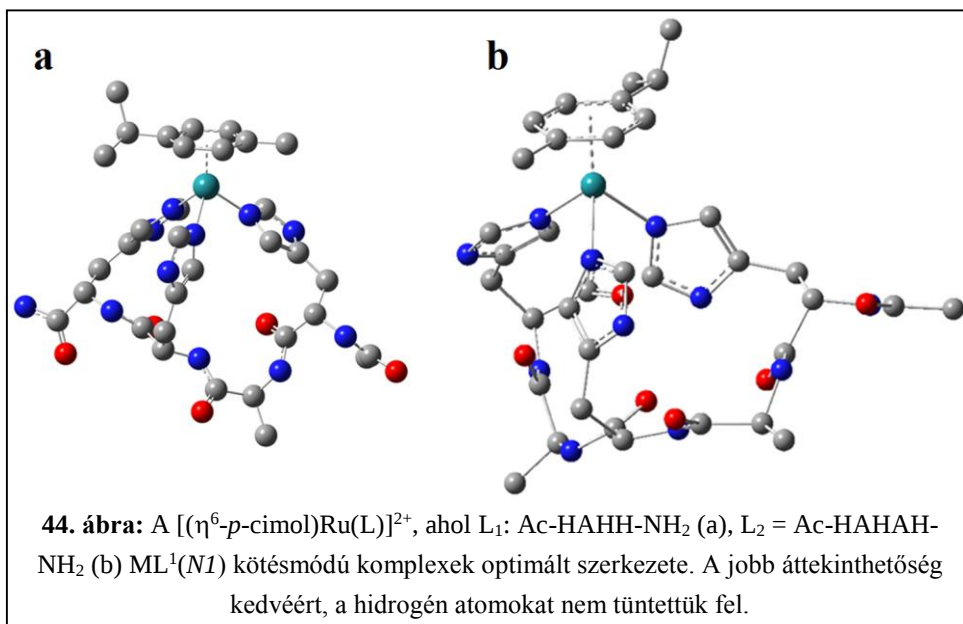
Ligandum / Reakció	ΔE^{ele}	ΔG^{therm}	$\Delta G^{\text{tot}}_{\text{gas}}$	$\Delta(\Delta G^{\text{solv}})$	$\Delta G^{\text{tot}}_{\text{aq}}$
L₁ = Ac-HAHAH-NH₂					
$\text{ML}^1(\text{N1}) \rightleftharpoons \text{ML}^2(\text{N1})$	-1,0	4,0	3,0	2,7	5,7
$\text{ML}^1(\text{N1}) \rightleftharpoons \text{ML}^1(\text{N3})$	314,1	11,7	325,8	-89,3	236,5
$\text{ML}^1(\text{N1}) \rightleftharpoons \text{ML}^2(\text{N3})$	319,4	11,0	330,4	-93,2	237,2
L₂ = Ac-HAHH-NH₂					
$\text{ML}^1(\text{N1}) \rightleftharpoons \text{ML}^1(\text{N3})$	247,5	8,1	255,6	-75,3	180,3

Az Ac-HAHH-NH₂ ligandummal is végeztek számításokat, a 2-es egyenlet szerint (9. táblázat), és hasonló értékeket kapták, 180 kJ/mol különbség van az *N1* koordinációjú komplex javára. Az eredmények azt mutatták, hogy az *N1*-es nitrogén koordinálódásával energetikailag stabilabb (9. táblázat) komplex jön létre, mint hogyha az *N3*-nitrogén kötődne a fémionhoz. Meghatározták mind a két ligandum $\text{ML}^1(\text{N1})$ és $\text{ML}^1(\text{N3})$ kötési izomerjében megvalósuló különböző M–N, M–C és M–Ct kötéstávolságokat (Å), valamint Ct–M–N és N–M–N kötésszögeket (°), ahol a Ct a fémion és a hexahapto kötésmódú aromás *p*-cimol síkja közötti távolságot jelenti (10. táblázat). Az $\text{ML}^1(\text{N1})$ komplexek, ahol az M: $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}]^{2+}$ és az L₁: Ac-HAHH-NH₂ (a) és L₂: Ac-HAHAH-NH₂ (b), optimált szerkezetét a 44. ábra mutatja.

10. táblázat: Az $ML^1(N1)$ és $ML^1(N3)$ kötési izomerekre DFT-vel számolt optimált szerkezetben lévő kötéstávolságok (Å) és szögek ($^\circ$). M: $[(\eta^6-p\text{-cimol})Ru]^{2+}$; L: Ac-HAHH-NH₂ vagy Ac-HAHAH-NH₂. A kiemelt értékek a stabilabb izomerre utalnak.

Kötéstávolság/ kötésszög	Ac-HAHH-NH ₂		Ac-HAHAH-NH ₂	
	$ML^1(N1)$	$ML^1(N3)$	$ML^1(N1)$	$ML^1(N3)$
M–N (Å)	2,074	2,107	2,100	2,149
	2,080	2,122	2,123	2,180
	2,091	2,232	2,126	2,222
M–C (Å)	2,259-2,318	2,258-2,461	2,216-2,263	2,185-2,323
M–Ct (Å)	1,767	1,749	1,723	1,740
	123,3	116,0	124,8	120,9
	130,1	123,0	130,0	121,2
Ct–M–N ($^\circ$)	130,5	134,5	130,9	133,8
	83,2	79,7	79,5	79,3
	86,3	88,9	87,6	81,4
N–M–N ($^\circ$)	88,8	106,2	88,7	109,4

A 10. táblázatban szereplő $ML^1(N1)$ komplexekre vonatkozó DFT számítással kapott kötéstávolság (Å) és kötésszög ($^\circ$) értékek jó egyezést mutatnak az irodalomban található félszendvics szerkezetű ruténium(II)-fémiont és az egy, kettő, valamint három imidazol ligandumot tartalmazó komplexeknél meghatározott adatokkal (11. táblázat).

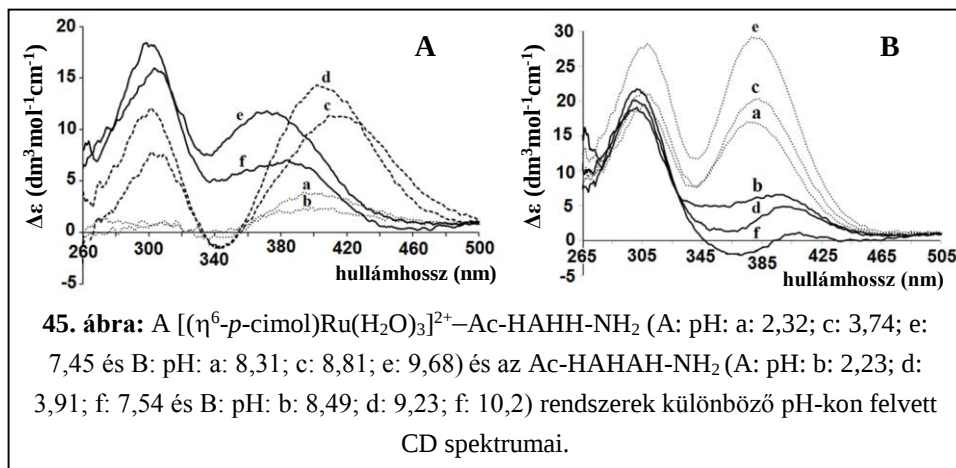


11. táblázat: Az irodalomban fellelhető $[ML]^{n+}$ komplexek (ahol M: $[(\eta^6\text{-arén})Ru]^{2+}$; L: N_{im} -t tartalmaz) kötéstávolság (Å) és kötésszög (°) értékei.

Ligandum (L):		2 x N-Meim ⁵¹	3 x N-Meim ⁵¹	PN ligandum ⁵⁶	L-His metilészter ⁷³	Apoferitin ¹²² (His49, His173)	Lizozim enzim ²⁴⁵ (His15)
kötéstávolság (Å)	M–N _{im}	2,121	2,107	2,096	2,063	2,06	2,21
		2,131	2,108	2,087	-	2,21	-
		-	2,110	-	-	-	-
	M–Cl	2,432	-	2,400	2,413	-	2,34
		-	-	-	-	-	2,43
	M–Ct	1,684	1,678	-	2,160	2,570	2,300
Kötésszög (°)	N _{im} –M–N _{im}	83,0	82,1	84,3	-	-	-
		86,6	85,5	-	-	-	-
		-	90,7	-	-	-	-
	Cl–M–N _{im}	87,4	-	85,5	-	-	-
	Ct–M–N _{im}	128,9	125,4	-	-	-	-
		130,0	127,7	-	-	-	-
		-	131,2	-	-	-	-
	Ct–M–Cl	126,0	-	-	-	-	-

A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})Ru(H_2O)_3]^{2+}$ –Ac-HAHAH-NH₂ rendszer pH 7,8 fölött felvett ¹H NMR spektrumaiban (40. ábra) a komplexben kötött ligandum jelek nagyobb térerő felé történő kémiai eltolódása figyelhető meg. Ez feltehetően valamilyen hidroxidokomplex képződésére, vagy akár amidcsoport deprotonálódására és koordinációjára is utalhat. Ez figyelhető meg a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})Ru(H_2O)_3]^{2+}$ –Ac-HAHH-NH₂ esetében is. A képződő komplex(ek) szerkezetének felderítésére további ESI-MS és CD méréseket végeztünk. Először felvettük pH 2,0-nál a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})Ru(H_2O)_3]^{2+}$ akvakomplex, valamint pH 11,0-nál a $\{[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})Ru]_2(OH)_3\}^+$ hidroxidokomplex CD spektrumait. Ahogy azt vártuk, ligandum távollétében nem tapasztaltunk CD aktivitást. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})Ru(H_2O)_3]^{2+}$ –Ac-HAHH-NH₂ és a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})Ru(H_2O)_3]^{2+}$ –Ac-HAHAH-

NH₂ rendszerek CD spektrumait a $2,2 < \text{pH} < 7,5$ (45. ábra/A), illetve $8,3 < \text{pH} < 10,2$ tartományban (45. ábra/B) vettük fel. Az NMR eredményekkel összhangban



már pH 2,2 körül komplexképződés játszódik le, melyre a CD spektrumban megjelenő pozitív Cotton-effektus utal. pH 4 körül a CD jelek (45. ábra/A) eltolódást mutatnak, ami arra enged következtetni, hogy kötési izomerek képződnek ezen a pH-n (40. ábra, pH 4,26). Fiziológiás pH-nál, mind az Ac-HAHH-NH_2 és Ac-HAHAH-NH_2 esetben pozitív Cotton-effektus látható a 300, illetve 370 nm-nél (45. ábra/B). Ekkor alakul ki a $[\text{ML}]^{2+}$ összetételű komplex,

12. táblázat: A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{L})]^{2+}$, ahol L_1 : Ac-HAHH-NH_2 (a), L_2 = Ac-HAHAH-NH_2 rendszerekben különböző pH tartományokban (szaggatott vonallal jelölve) képződő komplexek mért és számított m/z értéke.

Ac-HAHH-NH ₂					
pH:	2,18	2,84	5,72	8,59	10,3
[ML] ²⁺	388.60 (388.632)				
[MLH ₁] ⁺	776.255 (776.257)				
[MLH ₂] + K ⁺	814.213 (814.213)				
[M ₂ (OH) ₃] ⁺	523.038 (523.037)				
Ac-HAHAH-NH ₂					
pH:	1,98	3,36	6,47	8,95	10,9
[ML] ²⁺	424.152 (424.151)				
[MLH ₁] ⁺	847.294 (847.294)				
[MLH ₂] + 2K ⁺	462.104 (462.108)				
[MLH ₂] + K ⁺	885.247 (885.250)				
[M ₂ (OH) ₃] ⁺	523.038 (523.037)				

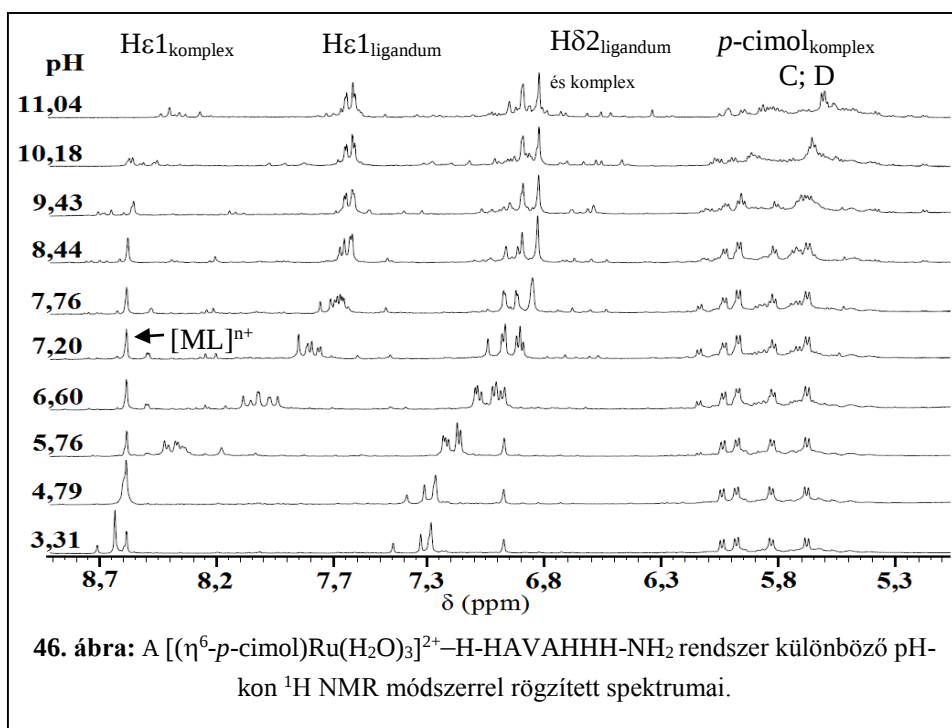
melyben mind a három imidazolnitrogén koordinálódik a fémionhoz. A pH 2 – 8-as tartományban hasonló CD görbéket kaptunk, azonban a pH további növelésével (45. ábra/B) 385 nm-nél megjelenő sáv az Ac-HAHH-NH₂-nél a növekszik (45. ábra/B/a, c, e), míg az Ac-HAHAH-NH₂ esetében csökken és hipszokróm eltolódást mutat (45. ábra/B/b, d, f). A képződő komplex azonosítására pH függő ESI-MS méréseket is végeztünk, és a detektált részecskék mért és elméleti m/z értékeit a 12. táblázatban gyűjtöttük össze. A tömegspektrumokban széles pH tartományban, fő részecskéként jelent meg az [ML]²⁺ összetételű komplex. A pH növelésével, a [M₂(OH)₃]⁺ hidroxidokomplex mellett, kis intenzitással megjelentek az [MLH₁]⁺ és [MLH₂] összetételű komplexek is, melyben feltehetően fémion indukált amidcsoport deprotonálódás és koordináció játszódik le.

4.4. HAV szekvenciát tartalmazó peptid ruténium(II)komplexei

A sejtadhéziós molekulákat felismerő, konzervált hisztidil-alanil-valinil (HAV) szekvenciát tartalmazó szintetikus kadherin peptidok különböző rákos sejtvonalakon mutattak rákellenes hatást, valamint a sejtek közötti adhéziós folyamatok megváltoztatása révén elősegíthetik a gyógyszermolekulák könnyebb átjutását a biológiai membránokon.^{160,161} Ilyen HAV szekvenciát és potenciálisan rákellenes ruténium(II) kationt is tartalmazó fél- és teljes szendvics típusú komplexek előállítása volt a célunk. A félszendvics szerkezetű komplex előállításához $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]^{2+}$ -t, a teljes szendvics típusúéhoz $[(\eta^5\text{-Cp})\text{Ru(II)}]^+$ -t használtunk.

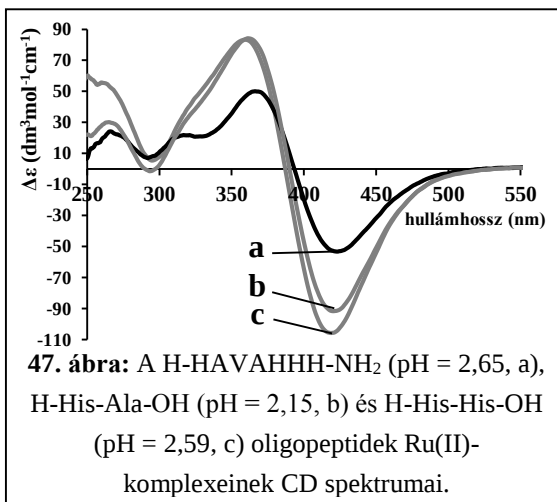
4.4.1 HAV szekvenciát tartalmazó félszendvics Ru(II)-komplex

A félszendvics szerkezetű peptidkonjugátum komplex előállításához az N-terminálison szabad, H-HAVAHHH-NH₂ oligopeptidet szintetizáltunk, melynek a szerkezete a 15. ábrán látható. A heptapeptid N-terminusán His-Ala-Val, míg C-terminusán az Ac-HHH-NH₂-hez hasonlóan, egymás mellett helyezkedik el három hisztidin aminosav. A vizsgálatokhoz használt peptid tisztaságát HPLC és pH-potenciometriás módszerekkel ellenőriztük. A meghatározott deprotonálódási



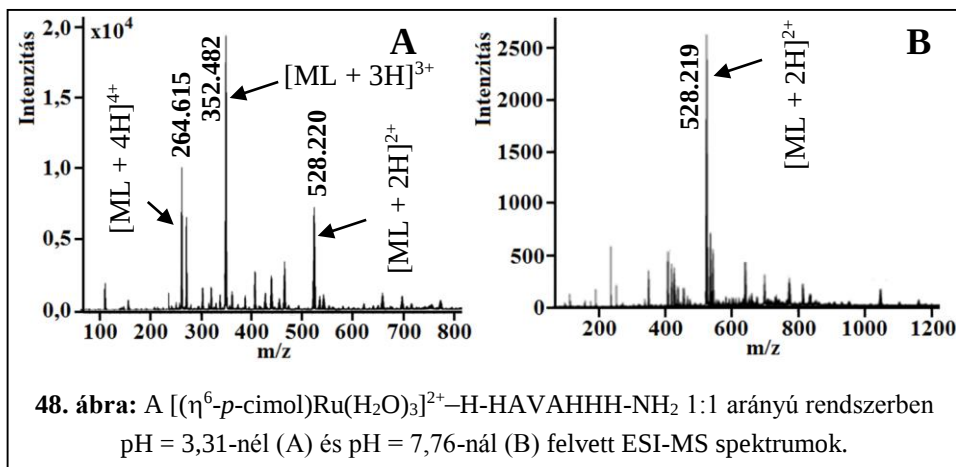
46. ábra: A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(H}_2\text{O)}_3]^{2+}$ -H-HAVAHHH-NH₂ rendszer különböző pH-kon ¹H NMR módszerrel rögzített spektrumai.

állandó értékeket a 2. táblázat tartalmazza. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}\text{-H-HAVAHHH-NH}_2$ rendszert ^1H NMR módszerrel is tanulmányoztuk különböző pH-kon (46. ábra). A szabad ligandum jeleit különböző pH-kon rögzített, független ^1H NMR mérésekből határoztuk meg. A 46. ábrán már a 3,31-es pH-jú mintában a szabad ligandum mellett, új, a komplexképződésre utaló jelek figyelhetők meg 8,6 ppm-nél (imidazol H ϵ 1), valamint *p*-cimol (3. ábra, C, D jelű protonok) gyűrű protonjainak tartományában. Utóbbi esetében, a 3,31-es pH-n jelenlévő négy dublett egyféle *p*-cimol gyűrűhöz tartozik, azaz fémközpontú kiralitás alakul ki három különböző ligandum koordinálódásával. Ezt, a 41. ábrán lévő $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}\text{-Ac-HAHAH-NH}_2$ rendszerhez hasonlóan, ^1H - ^1H COSY és ^1H - ^{13}C HSQC mérésekből állapítottuk meg. Ilyen savas pH-n a három hisztidint tartalmazó (4.3.2. fejezet: Ac-HAHH-NH $_2$, Ac-HAHAH-NH $_2$) oligopeptideknél ruténium(II)komplex még nem alakult ki és az Ac-HHH-NH $_2$ fémiont is tartalmazó rendszerrel ellentétben nem tapasztaltunk csapadék kiválást. Az NMR spektrumokban tapasztalt kiralitás miatt CD spektroszkópiával is vizsgáltuk az 1:1 arányban fémiont is tartalmazó mintát. A H-His-His-OH és H-His-Ala-OH-hoz hasonlóan, a heptapeptid ligandumnak is az N-terminusán szabad N $_{\text{amino}}$ és közvetlen mellett lévő hisztidin aminosav helyezkedik el. Ahogy azt a 47. ábrán lévő CD spektrumok mutatják, mind a három oligopeptid félszendvics ruténium(II)-fémiont is tartalmazó rendszerében a 420 nm-nél megjelenő intenzív negatív Cotton-effektus, illetve a 360 nm-nél megjelenő pozitív



sáv is arra enged következtetni, hogy (N $_{\text{amino}}$, N3 $_{\text{im}}$) hisztaminszerű koordináció alakul ki. A 48. ábrán/A látható, pH 3,31-nél rögzített tömegspektrumban megjelenő három fő csúcs (m/z: 264,615; 352,482 és 528,220) egyazon komplex különböző protonáltságához rendelhető. Ez a komplex, pH = 7,76-nál (48. ábra/B) csak abban az esetben lehet az 1:1 arányú rendszerben $[\text{ML}]^{2+}$ összetételű és töltésű (m/z: 528,219), ha az aminocsoport koordinálódik a fémionhoz, és az összes imidazolcsoport deprotonált formában van jelen. Ez is alátámasztja az NMR-rel és

CD-vel megállapított hisztaminszerű koordinációt. Valószínűsíthetőleg, ez a kötésmód stabilabb komplexet eredményez, mint ha három imidazolgyűrű koordinálna a fémionhoz.

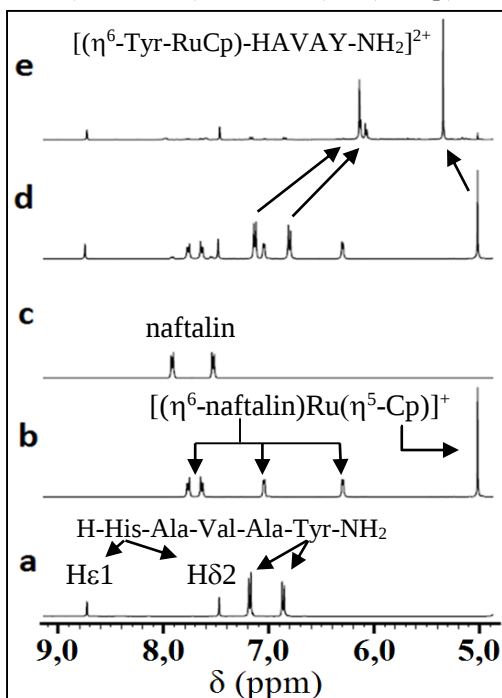


A peptidkonjugátum kialakításához a H-HAVAHHH-NH₂ heptapeptid szabad N-terminálisán lévő aminocsoportot triaza-makrociklussal (NODA-GA) reagáltattuk DIEA/DMF elegyében szobahőmérsékleten, nitrogén atmoszféra alatt. A kapcsolást többszöri próbálkozásra sem sikerült véghezvinni. Emiatt, illetve a fentiekben említett hisztaminszerű koordináció kialakulása miatt további vizsgálatot nem végeztünk a heptapeptid ligandummal. A vizsgálatok a H-HAVAY-NH₂ szekvenciát tartalmazó pentapeptidre fókuszálódtak, melynek eredményeit a 4.4.2. fejezetben tárgyaljuk.

4.4.2. HAV szekvenciát tartalmazó teljes szendvics típusú Ru(II)-komplex szintézise, jellemzése és biológiai vizsgálata

Először állítottunk elő Ru(II)- és Ga(III)-fémionokat is tartalmazó teljes szendvics szerkezetű peptidkonjugátum komplexet, melyet ^1H , ^{13}C , ^{71}Ga és ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HSQC NMR, ESI-MS technikákkal vizsgáltunk és jellemeztünk. A teljes szendvics típusú komplex kialakításához szükséges, szabad N-terminusán aminocsoportot tartalmazó H-His-Ala-Val-Ala-Tyr-NH₂ peptidet szilárdfázisú peptidszintetizáló készülékkel állítottuk elő és különböző módszerekkel jellemeztük (2. táblázat). A $[(\eta^6\text{-naftalin})\text{Ru}(\eta^5\text{-Cp})]\text{PF}_6$

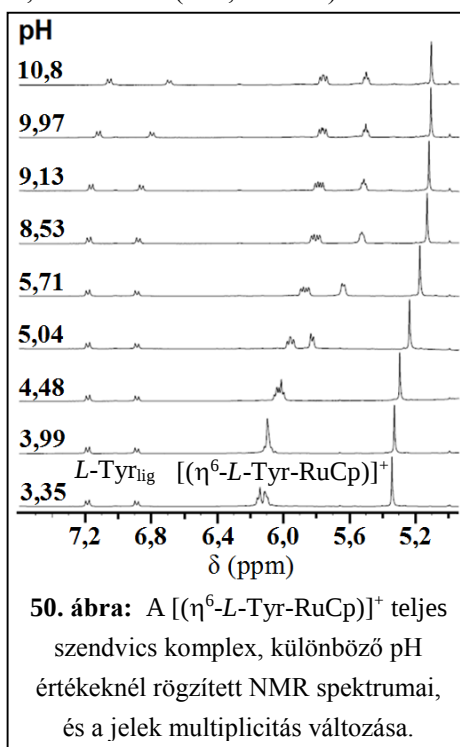
prekursorból (49. ábra/b, 56. ábra/a) kiindulva látható-fény besugárzással vizes közegben kialakítottuk a teljes szendvics típusú $[(\eta^6\text{-Tyr-RuCp})\text{-HAVAY-NH}_2]^{2+}$ komplexet (49. ábra/e, 56. ábra/b), ahol a ruténiumot a H-HAVAY-NH₂ oligopeptid oldalláncában található tirozin (Tyr) aminosav fenilgyűrűjéhez kapcsoltuk. A teljes szendvics kialakítását először nehézvízben végeztük, ugyanis így lehetőségünk nyílt a reakció lejátszódásának a követésére ^1H NMR technikával. A 49. ábrán az a-val a szabad, H-HAVAY-NH₂ ligandum; b-vel a $[(\eta^6\text{-naftalin})\text{Ru}(\eta^5\text{-Cp})]^+$ prekursor; c-vel a szabad naftalin; d-vel az 1 órás és e-vel a 90 órás bevilágítás után képződő $[(\eta^6\text{-Tyr-RuCp})\text{-HAVAY-NH}_2]^+$ komplex savas pH-n rögzített spektrumának aromás tartományát láthatjuk. A $[(\eta^6\text{-Tyr-RuCp})\text{-HAVAY-NH}_2]^{2+}$ komplexben a RuCp egység a pentapeptidben lévő tirozin aminosavhoz (Tyr, Y) koordinálódik. Az ^1H NMR spektrumban a szabad ligandum (a) hisztidin és tirozin aminosavjainak jelei, míg a ruténium(II)-prekuzornál (b) a



49. ábra: A H-HAVAY-NH₂ (a), $[(\eta^6\text{-naftalin})\text{Ru}(\eta^5\text{-Cp})]^+$ (b), naftalin (c) és a $[(\eta^6\text{-naftalin})\text{Ru}(\eta^5\text{-Cp})]^+$ -H-HAVAY-NH₂ rendszer 1 h (d) és 90 h (e) bevilágítás után kapott ^1H NMR spektrumának aromás tartománya.

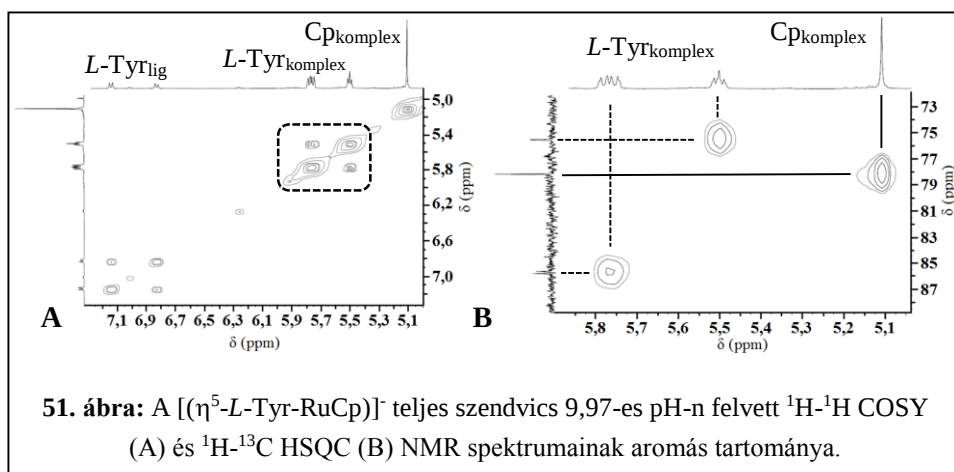
komplexben kötött naftalin és Cp ligandum jelei jelennek meg. A reakcióelegy 90 órás bevilágítása után felvett spektrumban új jelként volt detektálható a ruténium(II)-höz kötődő tirozin (6,14; 6,08 ppm) és Cp gyűrű (5,34 ppm), valamint a reakció során felszabadult szabad naftalin (7,55; 7,92 ppm-né; c és d spektrumok) kis intenzitással, ugyanakkor a hisztidin imidazol H ϵ 1 és H δ 2 gyűrűprotonjai (4. ábra) nem mutattak eltolódást. Az irodalomban a $[(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh}]^{2+}$ és a tirozint tartalmazó leu enkefalin rendszerében képződő teljes szendvics típusú komplex esetében találtunk példát a tirozin és Cp NMR jelek ilyen irányba történő eltolódására.¹⁹¹ A szabad naftalint vákuum-line-on távolítottuk el a minákból, majd ezt követően liofilizáltuk. A teljes szendvics komplex kialakulásának igazolására tömegspektrometriás méréseket is végeztünk, ahol a mért (363,112 m/z) és számolt (363,121 m/z) izotópeloszlás jó egyezést mutatott egymással. A $[(\eta^6\text{-Tyr-RuCp})\text{-HAVAY-NH}_2]^{2+}$ komplex pH-függő NMR spektrumaiban megjelenő szokatlan multiplicitású Tyr-jelek megértése céljából *L*-fenilalanin (*L*-Phe) és *L*-tirozin (*L*-Tyr) aminosavakkal is kialakítottuk látható-fény besugárzással a teljes szendvics komplexet, és különböző pH-kon vizsgáltuk a mintákat. Az *L*-tirozinnal kialakított teljes szendvics komplex jelei pH függésének vizsgálatakor hasonló jelváltozásokat tapasztaltunk, azaz a tirozingyűrűn lévő fenolos OH csoport hatásához rendelhető a jelek ily módon történő változása. Az *L*-Tyr ligandummal kialakított teljes szendvics

komplex ^1H NMR spektrumainak pH függését az 50. ábrán láthatjuk. Megfigyelhető már savas pH-n, hogy nem a várt, para szubsztituált aromás gyűrű multiplicitását mutatják a tirozin gyűrűn lévő aromás protonok a 6,0–6,2 ppm tartományban. A Tyr aromás protonjainak, valamint a Cp protonok pH-függő eltolódásának változásából a Scientist programmal²³⁶ számolt, a komplex deprotonálódására jellemző pK_s értékek jó egyezése (Tyr: 5,08(3) és 5,11(7)); Cp: 5,09(11)) is alátámasztja, hogy ezek a jelek ugyanahhoz a komplexhez tartoznak.

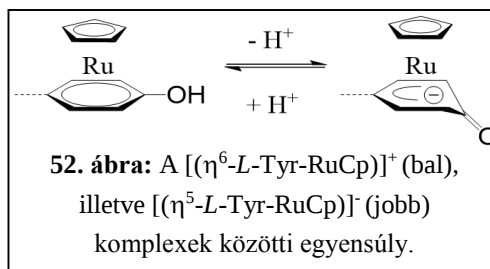


komplex ^1H NMR spektrumainak pH függését az 50. ábrán láthatjuk. Megfigyelhető már savas pH-n, hogy nem a várt, para szubsztituált aromás gyűrű multiplicitását mutatják a tirozin gyűrűn lévő aromás protonok a 6,0–6,2 ppm tartományban. A Tyr aromás protonjainak, valamint a Cp protonok pH-függő eltolódásának változásából a Scientist programmal²³⁶ számolt, a komplex deprotonálódására jellemző pK_s értékek jó egyezése (Tyr: 5,08(3) és 5,11(7)); Cp: 5,09(11)) is alátámasztja, hogy ezek a jelek ugyanahhoz a komplexhez tartoznak.

A 9,97-es pH-jú mintának a ^1H - ^1H COSY (51. ábra/A) és ^1H - ^{13}C HSQC (51. ábra/B) spektrumai is azt igazolták, hogy a hattagú Tyr-gyűrű és az öttagú Cp-



gyűrű teljes szendvics formában kötve megváltoztatja a Tyr aminosav fenilgyűrűjén lévő protonok kémiai környezetét. Az irodalomban ismert oxociklohexadienil koordináció²⁴⁴ alakul ki, azaz a ruténium(II)-fémion és a tirozinyűrűn lévő szenek között kötések száma hatról (η^6) ötre (η^5) változik (52. ábra). A komplexek kialakulásának igazolására pozitív és negatív módban pH függő ESI-MS méréseket is végeztünk, ahol a mért és számolt izotópeloszlás ($[(\eta^6\text{-L-Tyr-RuCp})]^+$: mért 348,006 m/z, számolt 348,017 m/z; $[(\eta^5\text{-L-Tyr-RuCp})]^-$: mért 346,001 m/z, számolt 346,002 m/z) jó egyezést mutatott. A H-HAVAY-NH₂ peptid, valamint a fénybesugárzással kialakított $[(\eta^6\text{-Tyr-RuCp})\text{-HAVAY-NH}_2]^{2+}$ teljes



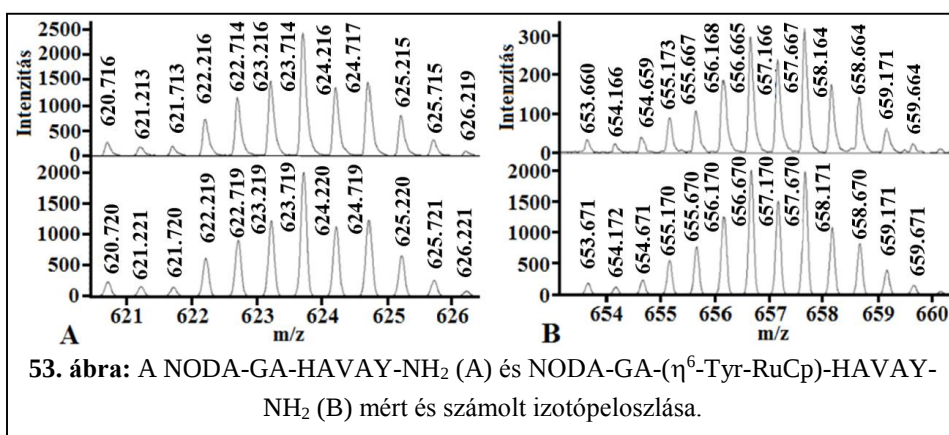
szendvics peptid komplexben lévő Tyr és Cp jelek ^1H és ^{13}C kémiai eltolódás értékeit a 13. táblázatban tüntettük fel. A teljes szendvics komplex kialakulása, valamint a fémion és ligandum körüli elektronsűrűség megváltozása miatt a $[(\eta^6\text{-naftalin})\text{Ru}(\eta^5\text{-Cp})]\text{PF}_6$ prekursorban lévő aromás ciklopentadienil gyűrű $\text{H}\alpha$ protonjaihoz képest a $[(\eta^6\text{-Tyr-RuCp})\text{-HAVAY-NH}_2]^{2+}$ komplexben kötött Cp a kisebb térerő felé mutatott eltolódást, ellentétben a komplexben kötött tirozin jelével, ahol a nagyobb térerő felé történt a jelek kémiai eltolódása. A peptidkonjugátum kialakításához a H-HAVAY-NH₂-t és a $(\eta^6\text{-Tyr-RuCp})\text{-HAVAY-NH}_2$ peptid komplexet izotiocianát funkciós csoportot tartalmazó triaza-

13. táblázat: A H-HAVAY-NH₂, a [(η^6 -naftalin)Ru(η^5 -Cp)]⁺ valamint a [(η^6 -Tyr-RuCp)-HAVAY-NH₂]³⁺ teljes szendvics komplex ¹H és ¹³C NMR kémiai eltolódás értékei, pH = 2,0.

Cp-H ^{Ar}	[(η^6 -naftalin)Ru(η^5 -Cp)] ⁺	[(η^6 -Tyr-RuCp)-HAVAY-NH ₂] ²⁺	$\Delta\delta$ (ppm)
H α	5,02	5,34	+0,32
Tyr-H ^{Ar}	[H-HAVAY-NH ₂] ³⁺	[(η^6 -Tyr-RuCp)-HAVAY-NH ₂] ²⁺	$\Delta\delta$ (ppm)
H δ	7,14	6,14	-1,00
H ϵ	6,83	6,08	-0,75
Tyr-C ^{Ar}	[H-HAVAY-NH ₂] ³⁺	[(η^6 -Tyr-RuCp)-HAVAY-NH ₂] ²⁺	$\Delta\delta$ (ppm)
C δ	130,5	85,5	-45,0
C ϵ	115,4	84,9	-30,5

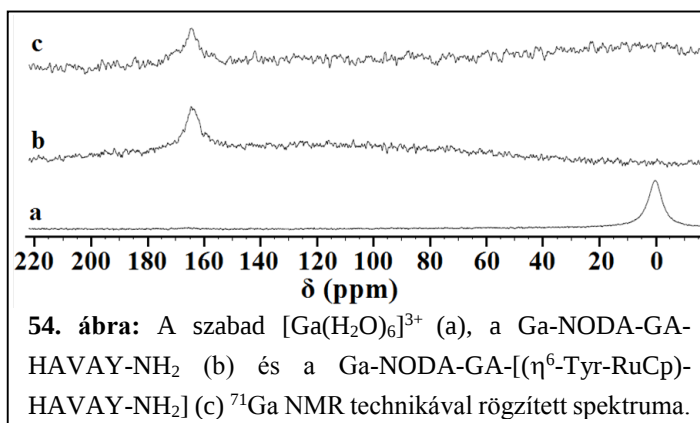
makrociklussal (NODA-GA) reagáltattuk DIEA/DMF elegyében szobahőmérsékleten, nitrogén atmoszféra alatt (14. ábra, reakció egyenlet).

A reakciót HPLC-vel követtük, és ecetsav/víz eleggyel állítottuk le. A kapott nyerterméket HPLC-vel tisztítottuk, majd ESI-MS technikával azonosítottuk. A kialakított NODA-GA-HAVAY-NH₂ (53. ábrán/A) és NODA-GA-(η^6 -Tyr-RuCp)-HAVAY-NH₂ (53. ábrán/B) mért izotópeloszlása jó egyezést mutatott az elméletivel.



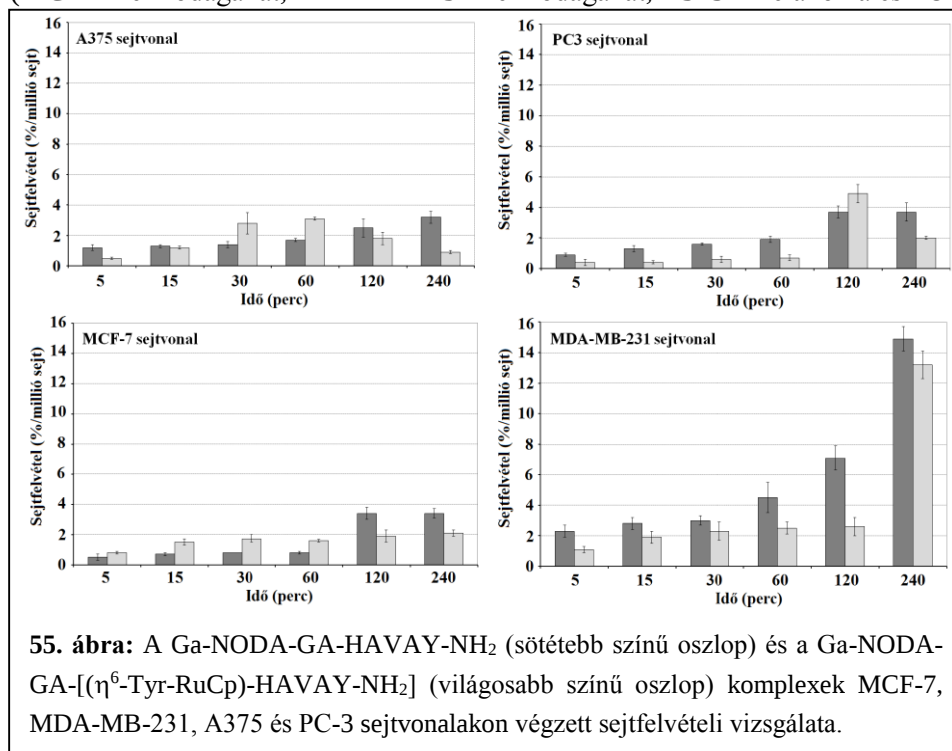
A 56. ábrán lévő reakcióút alapján a tiszta peptidkonjugátumokhoz (56. ábra/c, d) nem radioaktív ^{nat}Ga(III)(NO₃)₃ fémiont adtunk feleslegben, pH ~ 5-ös acetát pufferben. A nyers reakcióterméket szintén HPLC-vel tisztítottuk. A nem radioaktív Ga(III)-fémionnal való komplexképzéssel kialakított teljes szendvics szerkezetű peptidkonjugátumot (56. ábra/e, f) ⁷¹Ga NMR technikával is vizsgáltuk és jellemeztük (54. ábra). Ahogy a 54. ábrán lévő ⁷¹Ga NMR spektrum (b, c)

mutatja, a
 $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, 0
 ppm-jéhez (a)
 képest a Ga-
 NODA-GA-
 HAVAY-NH₂ (b)
 164,7 ppm, míg a
 Ga-NODA-GA-
 [(η^6 -Tyr-RuCp)-
 HAVAY-NH₂] (c)
 164,5 ppm kémiai

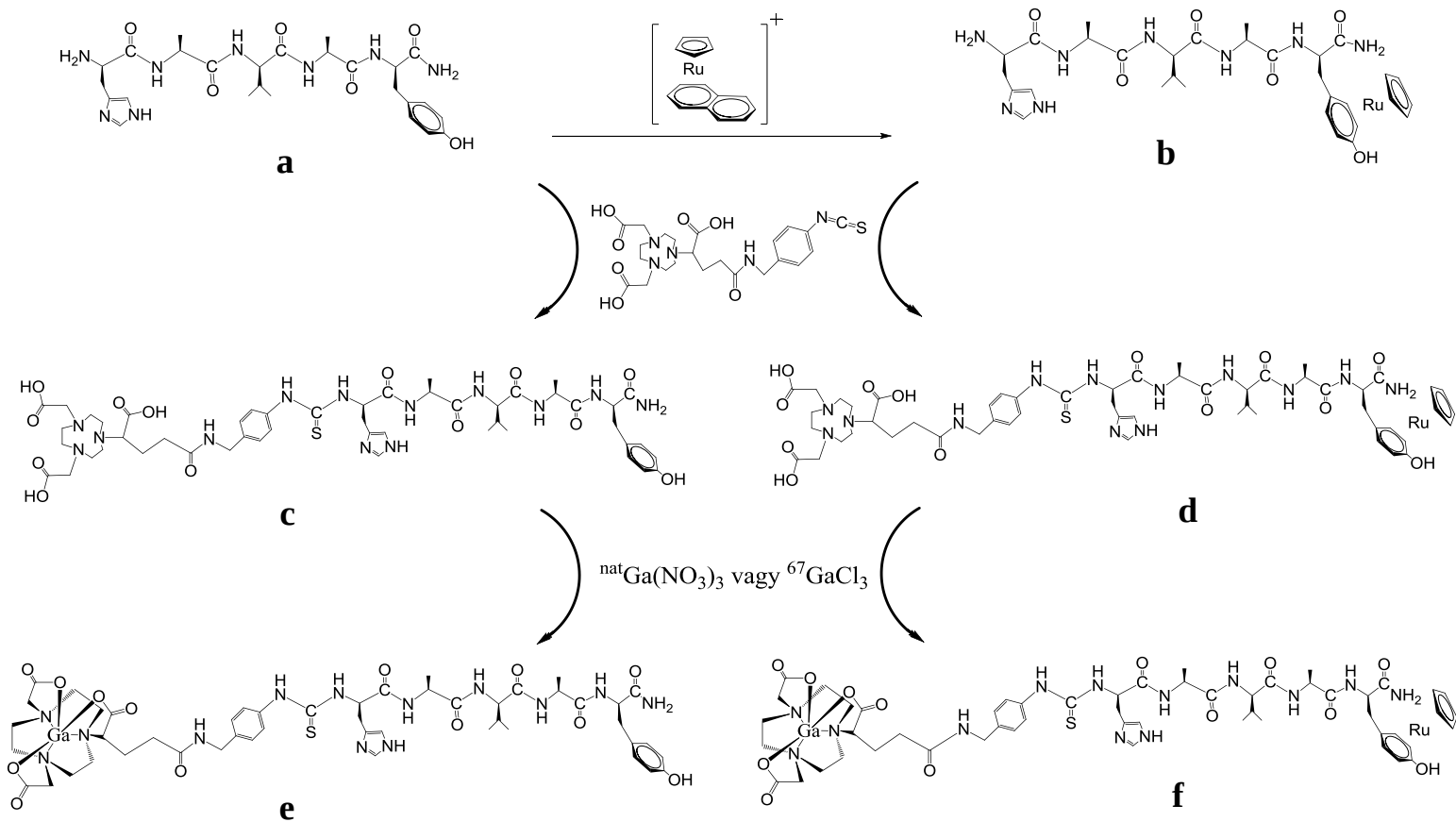


eltolódás értékénél jelent meg, $t = 40^\circ\text{C}$ -on. Ez az eredmény jó egyezést mutatott hasonló Ga-NOTA makrociklusos rendszereknél mért ⁷¹Ga NMR kémiai eltolódásokkal (NOTA: 171, NOTAC6: 165,5, NOTAC8: 165,8 ppm).²²³

Egy nemzetközi együttműködés keretében, J.D.G. Correia és munkatársai segítségével a NODA-GA triaza-kelátorhoz kapcsolt pentapeptidhez radioaktív ⁶⁷Ga(III)Cl₃-at adtunk. A peptidkonjugátum komplex képződését γ -detektorral felszerelt HPLC-vel követtük, majd a terméket tisztítottuk. Több rákos sejtvonalon (MCF-7 - emlődaganat, MDA-MB-231 - emlődaganat, A375 - melanóma és PC-3



– prosztata rákos sejtvonal) végeztünk biológiai vizsgálatokat. Ahogy azt az 55. ábra is mutatja, a MDA-MB-231-es sejtvonalon nagyobb mértékű sejtfelvételt figyeltünk meg. Ennek ellenére a vizsgált komplexek nem mutattak jelentős citotoxicitást a MCF-7, MDA-MB-231, A375 és PC-3 sejtvonalakon a 0,1–200 μ M-os koncentráció tartományban. A kismértékű sejtfelvétel, illetve citotoxicitás hiánya több dolog miatt is lehetséges, például a teljes szendvics szerkezetű peptidkonjugátum molekula több egységből épül fel. Azonban a konzervált aminosav szekvencia mellett lévő aminosavak minőségének és számának; a fémion és a hozzá kapcsolt ligandum minőségének; a kelátor és a peptid közötti összekötő lánc hosszának finomhangolásával elvileg befolyásolhatjuk a sejtfelvételt és a molekula citotoxikusságát, ami azonban további vizsgálatokat igényel.



56. ábra: A Ga-NODA-GA-HAVAY-NH₂ (**e**) és a Ga-NODA-GA-(η^6 -Tyr-RuCp)-HAVAY-NH₂ (**f**) szintézisének útvonala.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A félszendvics szerkezetű $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{L})]^{n+/-}$ komplexek a szervezetbe kerülve, biotranszformációs folyamatokon keresztül disszociálhatnak $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ akvakationná, mely a biológiai rendszerekben igen nagy számban előforduló hisztidin imidazolnitrogén donoratomot tartalmazó ligandumokkal kölcsönhatásba léphet.

Munkánk során részletesen tanulmányoztuk a fehérjék felületi hisztidin aminosav imidazolilcsoportjának fémionmegkötését modellező, különböző számú és pozícióban elhelyezkedő imidazolgyűrűt tartalmazó ligandumok kölcsönhatását a fenti félszendvics ruténium(II)-fémionnal. A vizsgálatokhoz modellül az N-metilimidazolt, N-acetil-hisztamint, H-Ala-His-OH-t, H-His-Ala-OH-t és H-His-His-OH-t, valamint az Ac-His-His-His-NH₂, Ac-His-Ala-His-His-NH₂ és Ac-His-Ala-His-Ala-His-NH₂, Ac-His(N3-Me)-Ala-His(N3-Me)-Ala-His(N3-Me)-NH₂ oligopeptideket használtuk. Az új, három hisztidint tartalmazó peptideket szilárdfázisú peptidszintézissel állítottuk elő és pH-potenciometriás módszerrel meghatároztuk a deprotonálódási állandóikat. A lassú komplexképződési folyamatok miatt, a pH-potenciometriás mérések helyett, több kiindulási anyagot igénylő egyedi mintákat készítettünk és megmértük azok pH-ját. A fémiont és imidazolil ligandumot tartalmazó rendszereket NMR, ESI-MS, UV-látható és CD spektroszkópia kombinált alkalmazásával tanulmányoztuk.

Az 1:3 arányú $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ –Meim rendszernél, hasonlóan az AcHm-hez, fiziológiás pH-n az uralkodó részecske az $[\text{ML}_3]^{2+}$ ($\text{M} = [(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}]^{2+}$) összetételű komplex volt. Ezen a pH-n az $[\text{ML}_3]^{2+}$ komplex mellett vegyes hidroxidokomplexek ($[\text{MLH}_{-1}]^+$ és $[\text{ML}_2\text{H}_{-1}]^+$) jelentek meg, míg a biológiailag inaktív $[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$ hidroxidokomplex képződése visszaszorult. A biológiailag relevánsabb KCl ionerősség mellett $[\text{ML}_x\text{Cl}_{(3-x)}]^{(x-1)+}$ (L: Meim, AcHm; x: 1-2) összetételű komplexek voltak jelen a kisebb mennyiségben képződő $[\text{ML}_3]^{2+}$ mellett. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ –Meim rendszerben képződő komplexek stabilitási állandó értékeit egyedi mintás mérésekből határoztuk meg KNO₃ és KCl ionerősség mellett.

A hisztidin aminosavat tartalmazó dipeptidek $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -t tartalmazó rendszereit NMR, CD és ESI-MS kombinált alkalmazásával tanulmányoztuk, és különböző kötési izomerek képződését figyeltük meg. Mind a három (H-Ala-His-OH; H-His-Ala-OH; H-His-His-OH) ligandumnál a

komplexxépződés már pH 2 alatt megindult, fémion központú kiralitáscentrum kialakulása közben, amit az ^1H NMR spektrumokban megjelenő *p*-cimol aromás gyűrű protonjainak multiplicitás változása mutatott. A királis komplexek tanulmányozásához CD spektroszkópiás vizsgálatokat végeztünk. Mivel az irodalomban a félszendvics szerkezetű ruténium(II)komplexek CD aktivitásának meghatározására irányuló vizsgálatokat még nem végeztek, ezért a saját mérési eredményeinket hasonlítottuk egymáshoz és DFT számításokkal igazoltuk a mérési eredményeinket. Az NMR vizsgálatokkal összhangban, az N-terminuson hisztidin imidazolt tartalmazó dipeptideknél (H-His-Ala-OH és H-His-His-OH) a CD spektrumban 420 nm-nél lévő intenzív negatív, illetve a 360 nm-nél lévő intenzív pozitív Cotton-effektus az N-terminuson kialakuló hisztaminszerű, (N_{amino} , N3_{im}) kötémódot igazolta. Összehasonlítva az N- és/vagy C-terminuson hisztidin aminosavat tartalmazó dipeptidek rendszereit megállapítottuk, hogy a képződő kötési izomerekben az imidazol minden esetben koordinálódott a fémionhoz hattagú kelát (N_{amino} , N3_{im}) vagy (N^-_{amid} , N3_{im}) kialakulása közben, illetve a vizsgált pH tartományban a fémion hidrolízise teljesen visszaszorult.

A szabad N-terminális aminocsoportot tartalmazó H-His-Ala-Val-Ala-His-His-His-NH₂ [$(\eta^6\text{-p-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -vel való kölcsönhatásának vizsgálata során – a H-His-Ala-OH és a H-His-His-OH-hez hasonlóan – (N_{amino} , N3_{im}) hattagú kelát alakult ki, a C-terminuson lévő három hisztidin imidazoljainak koordinációja helyett, a pH 2–8 tartományban. Ezt a hasonló lefutású CD görbék is alátámasztották. Az előbb említett megfigyelés, valamint a három N-metilimidazollal kialakuló komplex ($\log\beta_{[\text{ML}_3]^{2+}} = 19,3(1)$) és a H-His-His-OH-nál kialakult (N_{amino} , N3_{im} , N1_{im}) kötési izomer ($\log\beta_{[\text{MLH}]^{2+}} = 21,6(2)$) stabilitási állandójának összehasonlítása alapján elmondható, hogy a szabad N-terminális aminocsoport mellett közvetlenül elhelyezkedő hisztidin imidazolnitrogénnel kialakuló N_{amino} , N3_{im} hattagú kelát stabilabb komplexet eredményez, mint a három imidazolos koordináció.

Szilárdfázisú peptidszintézissel előállított, új, három hisztidint tartalmazó oligopeptidek kölcsönhatását is vizsgáltuk [$(\eta^6\text{-p-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kationnal. A kis hozammal szintetizált Ac-His-His-His-NH₂ tripeptiddel már pH 2-nél csapadék képződött, ezért azt nem vizsgáltuk tovább. Az Ac-His-Ala-His-His-NH₂ és Ac-His-Ala-His-Ala-His-NH₂ esetén kimutattuk, hogy fiziológias pH-n [$(\eta^6\text{-p-cimol})\text{Ru}(\text{L})]^{2+}$ összetételű komplex képződik, ahol mind a három imidazolnitrogén koordinálódik a fémionhoz. *N3*-metilezett hisztidint tartalmazó Ac-His(*N3*-Me)-Ala-His(*N3*-Me)-Ala-His(*N3*-Me)-NH₂ pentapeptidet is

szintetizáltunk, majd az NMR és MS eredményeket összevetettük a nem metilezett hisztidint tartalmazó oligopeptidekre vonatkozókkal. ^{13}C NMR mérésekkel igazoltuk, hogy a képződő $[\text{ML}]^{2+}$ összetételű komplexben az imidazol ligandum *N1*-es nitrogénjével koordinálódik a fémionhoz. A mérési eredményeinket DFT számításokkal is alátámasztottuk, ahol az *N1*-es nitrogén koordinációja az *N3*-sal szemben, energetikailag stabilabb kötési izomert eredményezett.

Noha vizsgálataink alap kutatás jellegűek, a kapott eredmények lehetővé tehetik a potenciálisan rákellenes hatású, félszendvics szerkezetű ruténium(II)komplexek biotranszformációja során képződő kationok és N-donoratomot tartalmazó bioligandumok közötti kölcsönhatások számszerű jellemzését és speciációs modellek felállítását.

Munkánk második szakaszában új, teljes szendvics típusú peptidkonjugátum komplexet állítottunk elő. Szintetizáltunk egy biológiailag fontos His-Ala-Val szekvenciát tartalmazó oligopeptidet ($\text{H-His-Ala-Val-Ala-Tyr-NH}_2$), melynek tirozin aromás gyűrűjéhez fénybesugárzással való aktiválással kapcsoltuk a ($\eta^5\text{-Cp}$)ruténium(II)-t. ^1H NMR és MS technikákkal különböző pH-kon vizsgáltuk a teljes szendvics komplexet, és a pH növelésével oxociklohexadienil koordináció (a Ru és Tyr közötti haptocitás 6-ról 5-re változik) kialakulását tapasztaltuk. A komplex a teljes vizsgált pH tartományban stabil maradt. Nemzetközi együttműködés keretében, a teljes szendvics peptid komplex N-terminusán lévő szabad aminocsoporthoz NODA-GA típusú triaza-kelátort kapcsoltunk. A biodisztribúciós vizsgálatokhoz szükséges, nem radioaktív és radioaktív Ga(III)-fémionnal kialakítottuk a két fémiont is tartalmazó teljes szendvics típusú peptidkonjugátum komplexet. A ^{67}Ga (III) fémiont tartalmazó komplex szerkezetét ^{71}Ga NMR módszerrel is alátámasztottuk. A szintetizált komplexek sejtfelvételét, citotoxikus aktivitását négy rákos sejtvonalon (MCF-7, MDA-MB-231, A375 és PC-3) vizsgáltuk. Az MDA-MB-231-es emlődaganat sejtvonalon mutatott szelektivitás ellenére azonban a 0,1–200 μM -os koncentráció tartományban nem tapasztaltunk jelentős rákellenes hatást.

Ezen eredményeink felhasználása, valamint a fenti vegyületek szerkezeti egységeinek módosítása hozzájárulást jelenthet új és rákellenes hatásukat tekintve hatékonyabb fémkomplexek tervezéséhez.

6. SUMMARY

The half-sandwich type $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{L})]^{n+/-}$ complexes may undergo various biotransformation reactions in the blood serum resulting in the formation of the $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ cation, that can interact with histidine imidazolyl nitrogen donoratoms of high and low molecular mass components of biofluids.

In the light of the above information, the aim of our work was to study in detail the interaction between half-sandwich type ruthenium(II) aqua ion and surface accessible histidyl imidazole model peptides containing histidyl residues in various positions. In order to model the metal ion binding capabilities N-methylimidazole, N-acetylhistamine, H-Ala-His-OH, H-His-Ala-OH and H-His-His-OH dipeptides, and Ac-His-His-His-NH₂, Ac-His-Ala-His-His-NH₂, Ac-His-Ala-His-Ala-His-NH₂, Ac-His(N3-Me)-Ala-His(N3-Me)-Ala-His(N3-Me)-NH₂ terminally protected peptides containing three histidyl residues in different sequences were studied. We determined the stepwise deprotonation constants of the novel, three histidine-containing oligopeptides that were obtained by solid-phase peptide synthesis. To overcome the slow complex formation processes individual samples requiring much more starting materials were prepared and equilibrated for several days before the measurements. Stability constant of the metal complexes were determined using these samples, while the protonation constants of the studied ligands were estimated by pH-potenciometry. Evaluation of the metal ion and imidazole ligand containing systems was carried out by the combined use of NMR, ESI-MS, UV-Vis and CD spectroscopic techniques.

Comparing the the $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ –Meim or –AcHm systems at 1:3 metal ion to ligand ratio it can be stated that the $[\text{ML}_3]^{2+}$ is the major species at physiological pH. Beside the $[\text{ML}_3]^{2+}$ complex, $[\text{MLH}_{-1}]^+$ and $[\text{ML}_2\text{H}_{-1}]^+$ minor mixed hydroxido complexes are also identified and formation of the biologically inactive $[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$ species was found to be hindered at pH = 7.4. In the biologically more relevant chloride-containing medium these complex formation processes are slightly altered, as the aqua ligands are replaced by Cl[–] ions resulting in the formation of mixed ligand $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{RuL}_x\text{Cl}_{(3-x)}]^{(x-1)+}$ species (L: Meim or AcHm; x: 1-2). Stability constants of the complexes that formed in the individual samples of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ –Meim system at KNO₃ and KCl ionic strength were calculated.

We have also studied in detail the formation of chiral-at-metal complexes between $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ and one or two histidyl containing dipeptides by the combined use of NMR, CD and ESI-MS techniques. The results supported the

intensive complex formation with all the three dipeptides (H-Ala-His-OH; H-His-Ala-OH; H-His-His-OH) even below pH 2. In these complexes the imidazole nitrogen was always found to coordinate to the metal ion and the NMR signals of the *p*-cymene ring protons revealed the formation of a chiral-at-metal center. In order to obtain more information about the structure of chiral complexes CD spectroscopy was also applied. Since there is no information about the CD activity of half-sandwich type ruthenium(II) complexes in the literature, therefore we compared our data obtained from the various systems and we also used DFT calculations to provide further proof on the most likely binding mode of the complexes. In agreement with the NMR studies, in the case of the dipeptides (H-His-Ala-OH és H-His-His-OH) containing histidyl residues at the N-termini the CD spectra showed an intensive negative at 420 nm and a positive Cotton-effect at 360 nm indicating complex formation with „histamine-type” (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$) binding mode of the ligands. Comparison of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -dipeptide systems with the N and/or C terminus histidine amino acids, we have demonstrated that the imidazole is always coordinated in the binding isomers and formed six-membered (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$ or N_{amide}^- , $N3_{\text{im}}$) chelates, while the hydrolysis of the metal ion hindered in the studied pH range.

We have shown that there is a strong interaction between the N-terminally free H-HAVAHHH-NH₂ heptapeptide and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ moiety in the range pH 2–8. Like H-His-Ala-OH and H-His-His-OH, in this system the CD spectra also indicated the „histamin-type” N_{amino} , $N3_{\text{im}}$ binding mode over the three imidazole nitrogen coordination at the C-termini. If the $\log\beta_{[\text{MLH}]^{2+}} = 19,3(1)$ for Meim and $\log\beta_{[\text{MLH}]^{2+}} = 21,6(2)$ for H-His-His-OH dipeptide are compared and the above mentioned informations are taken into account, it can be stated that the N-terminal histidyl residue of the N-terminally free oligopeptides is more likely to form (N_{amino} , $N3_{\text{im}}$) chelate, than the three imidazole nitrogens.

The complex formation was also monitored between the metal ion and novel, three histidine-containing peptides obtained by solid-phase peptide synthesis. For Ac-His-His-His-NH₂ the formation of a yellow precipitate as low as pH 2.0 and the very limited solubility of complex(es) even at elevated pH hindered subsequent solution equilibrium studies with this ligand. Under biologically relevant conditions, for the tetrapeptide and pentapeptide slow complex formation processes were detected with the formation of 1:1 $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{L})]^{2+}$ (L: N_{im} , N_{im} , N_{im} binding mode of oligopeptides) type complexes as major species. Due to tautomerization at the imidazole ring of the histidyl side chain both the N1 and N3

nitrogen donors can coordinate to the metal ion. In order to obtain further proof on this binding mode a model pentapeptide, Ac-H*AH*AH*-NH₂ with three *N*3-methylated His units was also synthesized and its NMR and MS results were compared with those of the non-methylated oligopeptides. We have also undertaken the ¹³C NMR study of the [ML]²⁺ complexes to clarify the most likely (*N*1 or *N*3) binding mode of the imidazole units. Based on the NMR spectra the Δδ values for the imidazole carbons in our system showed identical trend with those obtained for the (*N*1, *N*1) binding mode in the Pd(II)-Ac-HAAAH-NH₂ system in the literature. This provides, therefore, a strong support for the identical *N*1 coordination of imidazolyl moieties of the ligands in the [ML]²⁺ complexes. DFT calculations were also carried out on the likely binding isomers of the [ML]²⁺ complex with Ac-HAHH-NH₂ and Ac-HAHAH-NH₂ supporting the preference of *N*1 over *N*3 coordination in the optimized structures.

Although our work is an academic research, our results may help to build up speciation models and help to characterize the complex formation between the half-sandwich type ruthenium(II) with anticancer potential and bioligands containing imidazolyl N-donoratoms.

On the second part of our work, we have prepared and fully characterized a novel, full-sandwich type peptidconjugate ruthenium(II) complex. To the best of our knowledge, this was the first heterobimetallic complex containing a histidyl-alanyl-valinyl (HAV) sequence for targeting, a full sandwich Ru(II) unit with potential anticancer activity and a ^{nat}Ga-or ⁶⁷Ga-NODA-GA moiety to monitor biodistribution. First, we have synthesized a novel, H-His-Ala-Val-Ala-Tyr-NH₂ pentapeptide by solid-phase peptide synthesis and we have conjugated the (η⁵-Cp)Ru unit to the aromatic side chain of Tyr of it using visible-light irradiation. Detailed pH-dependent NMR and MS experiments indicated the change in hapticity from η⁶ to η⁵ during the formation of an oxocyclohexadienyl coordination. This full sandwich type complex was found to be stable in the whole studied pH-range. In the framework of an international cooperation we have conjugated the above mentioned, peptide-containing full sandwich type complex with NODA-GA bifunctional chelator suitable to coordinate the non-radioactive and radioactive Ga(III). To confirm the identity of the non-radioactive Ga(III) containing complexes ⁷¹Ga NMR spectroscopy and ESI-MS techniques were used. Cellular uptake of the ⁶⁷Ga-compounds was studied in four human derived cancer cell lines, MCF-7, MDA-MB-231 (breast), A375 (melanoma) and PC-3 (prostate). The results from these studies indicated moderate cellular uptake of the radioactive

complexes. Although, the highest uptake was found in breast MDA-MB-231 cells, the inhibition of the cell proliferation was not relevant in the 0.1–200 μM concentration range studied.

The use of our results and the modification of the structural units of the studied compounds may provide with information for the design and synthesis of novel metal complexes with improved antiproliferative potential.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. N.N. Greenwood; A. Earnshaw. 'Az elemek kémiája I-III. 1999: Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest'
2. W.S. Bernard; P.W. Christopher. 'World Cancer Report. 2014, WHO: International Agency for Research on Cancer'
3. I. Bratsos; S. Jedner; T. Gianferrara; S. Alessio; 'Ruthenium Anticancer Compounds: Challenges and Expectations' *CHIMIA Internat. J. Chem.* **61**, 692–697
4. P.B. Rosenberg; T. Krigas; L.V. Camp. 'Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode' *Nature* **205**, 698–699 (1965).
5. B. Rosenberg; L. Vancamp; J.E. Trosko; V.H. Mansour. 'Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents' *Nature* **222**, 385–386 (1969).
6. A.W. Han; P.J. Dyson. 'Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: Towards Targeted Chemotherapy' *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 4003–4018 (2006).
7. E. Wong; C.M. Giandomenico. 'Current status of platinum-based antitumor drugs' *Chem. Rev.* **99**, 2451–2466 (1999).
8. M. Galanski; M.A. Jakupec; B.K. Keppler. 'Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches.' *Curr. Med. Chem.* **12**, 2075–2094 (2005).
9. C.S. Allardyce; P.J. Dyson. 'Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects' *Platin. Met. Rev.* **45**, 62 (2001).
10. J. Kostova. 'Ruthenium complexes as anticancer agents' *Curr. Med. Chem.* **13**, 1085–1107 (2006).
11. S.P. Fricker. 'Metal based drugs: from serendipity to design' *Dalt. Trans.* 4903–4917 (2007).
12. E. Baulieu; D.T. Forman; M. Ingelman-Sundberg; L. Jaenicke; J.A. Kellen; Y. Nagai; L. Träger; L. Will-Shahab; J.L. Wittliff. 'Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy. Radioruthenium-Labeled Compounds for Diagnostic Tumor Imaging' *Prog. Clin. Biochem. Med.* **10**, (1989).
13. L.J. Anghileri. 'The in vivo inhibition of tumor growth by ruthenium red: its relationship with metabolism of calcium in the tumor' *Z. Krebsforsch Klin. Onkol. - Cancer Res. Clin. Oncol.* **83**, 213–217 (1975).
14. R. Trondl; P. Heffeter; C.R. Kowol; M.A. Jakupec; W. Berger; B.K. Keppler. 'NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application' *Chem. Sci.* **5**, 2925–2932 (2014).
15. B.K. Keppler; W. Rupp. 'Antitumor activity of imidazolium-bisimidazole-tetrachlororuthenate (III)' *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **111**, 166–168 (1986).
16. P.J. Dyson; G. Sava. 'Metal-based antitumour drugs in the post genomic era' *Dalt. Trans.* 1929–1933 (2006).
17. C.S. Allardyce; A. Dorcier; C. Scolaro; P.J. Dyson. 'Development of organometallic (organo-transition metal) pharmaceuticals' *Appl. Organomet. Chem.* **19**, 1–10 (2005).
18. A.D. Kelman; M.J. Clarke; S.D. Edmonds; H.J. Peresie. 'Biological Activity of Ruthenium Purine Complexes' *J. Clin. Hematol. Oncol.* **7**, 274–288 (1977).
19. M.J. Clarke. 'Ruthenium metallopharmaceuticals' *Coord. Chem. Rev.* **236**, 209–

- 233 (2003).
20. M.J. Clarke. 'Ruthenium Metallopharmaceuticals' *Coord. Chem. Rev.* **236**, 207–231 (2003).
21. F. Piccioli; S. Sabatini; L. Messori; P. Orioli; C.G. Hartinger; B.K. Keppler. 'A comparative study of adduct formation between the anticancer ruthenium(III) compound HInd trans-[RuCl₄(Ind)₂] and serum proteins' *J. Inorg. Biochem.* **98**, 1135–1142 (2004).
22. A.R. Timerbaev; L.S. Foteeva; A.V. Rudnev; J. K. Abramski; K. Polec-Pawlak; C.G. Hartinger; M. Jarosz; B.K. Keppler. 'Probing the stability of serum protein-ruthenium(III) drug adducts in the presence of extracellular reductants using CE' *Electrophoresis* **28**, 2235–2240 (2007).
23. D. Frasca; J. Ciampa; J. Emerson; R. S. Umans; M.J. Clarke. 'Effects of hypoxia and transferrin on toxicity and DNA binding of ruthenium antitumor agents in hela cells' *Met. Based Drugs* **3**, 197–209 (1996).
24. P. Schluga; C.G. Hartinger; A. Egger; E. Reisner; M. Galanski; M.A. Jakupec; B.K. Keppler. 'Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP' *Dalt. Trans.* 1796–1802 (2006).
25. C. Bartel; A.E. Egger; M.A. Jakupec; P. Heffeter; M. Galanski; W. Berger; B.K. Keppler. 'Influence of ascorbic acid on the activity of the investigational anticancer drug KP1019' *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 1205–1215 (2011).
26. P.J. Dyson. 'Systematic Design of a Targeted Organometallic Antitumour Drug in Pre-clinical Development' *CHIMIA Internat. J. Chem.* **61**, 698–703 (2007).
27. S.J. Dougan; P.J. Sadler. 'The Design of Organometallic Ruthenium Arene Anticancer Agents' *CHIMIA Internat. J. Chem.* **61**, 704–715 (2007).
28. M. Stebler-Roethlisberger; W. Hummel; P.A. Pittet; H.B. Buergi; A. Ludi; A.E. Merbach. 'Triaqua(benzene)ruthenium(II) and triaqua(benzene)osmium(II): synthesis, molecular structure, and water-exchange kinetics' *Inorg. Chem.* **27**, 1358–1363 (1988).
29. U. Koelle. 'Organometallic aqua ions of the transition metals' *Coord. Chem. Rev.* **135**, 623–650 (1994).
30. P.C.A. Bruijninx; P.J. Sadler. in (ed. R. van Eldik; C.D. Hubbard - *Adv.Inorg.Chem.*) **61**, 1–62 (Academic Press, 2009).
31. L. Bíró; E. Farkas; P. Buglyó. 'Hydrolytic behaviour and chloride ion binding capability of [Ru(η⁶-p-cym)(H₂O)₃]²⁺: a solution equilibrium study' *Dalt. Trans.* **41**, 285–291 (2012).
32. L. Bíró; A.J. Godó; Zs. Bihari; E. Garribba; P. Buglyó. 'Tuning the Hydrolytic Properties of Half-Sandwich-Type Organometallic Cations in Aqueous Solution' *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 3090–3100 (2013).
33. P. Köpf-Maier; H. Köpf. in (ed. S.P. Fricker) (Chapman & Hall, London, 1994).
34. R.E. Morris; R.E. Aird; P. del S. Murdoch; H. Chen; J. Cummings; N.D. Hughes; S. Parsons; A. Parkin; G. Boyd; D.I. Jodrell; P.J. Sadler. 'Inhibition of Cancer Cell Growth by Ruthenium(II) Arene Complexes' *J. Med. Chem.* **44**, 3616–3621 (2001).
35. R.E. Aird; J. Cummings; A.A. Ritchie; M. Muir; R.E. Morris; H. Chen; P.J. Sadler; D.I. Jodrell. 'In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium(II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer' *Br J Cancer* **86**, 1652–1657 (2002).

36. C.S. Allardyce; P.J. Dyson; D.J. Ellis; S.L. Heath. '[Ru(η^6 -p-cymene)Cl(pta)] (pta = 1,3,5-triaza-7-phosphatricyclo- [3.3.1.1]decane): a water soluble compound that exhibits pH dependent DNA binding providing selectivity for diseased cells' *Chem. Commun.* 1396–1397 (2001).
37. L. Glans; A. Ehnbon; C. de Kock; A. Martinez; J. Estrada; P.J. Smith; M. Haukka; R.A. Sanchez-Delgado; E. Nordlander. 'Ruthenium(II) arene complexes with chelating chloroquine analogue ligands: Synthesis, characterization and in vitro antimalarial activity' *Dalt. Trans.* **41**, 2764–2773 (2012).
38. M. Adams; Y. Li; H. Khot; C. de Kock; P.J. Smith; K. Land; K. Chibale; G.S. Smith. 'The synthesis and antiparasitic activity of aryl- and ferrocenyl-derived thiosemicarbazone ruthenium(II)-arene complexes' *Dalt. Trans.* **42**, 4677–4685 (2013).
39. Y. Li; C. de Kock; P.J. Smith; H. Guzgay; D.T. Hendricks; K. Naran; V. Mizrahi; D.F. Warner; K. Chibale; G.S. Smith. 'Synthesis, Characterization, and Pharmacological Evaluation of Silicon-Containing Aminoquinoline Organometallic Complexes As Antiplasmodial, Antitumor, and Antimycobacterial Agents' *Organometallics* **32**, 141–150 (2013).
40. L.D. Dale; J.H. Tocher; T.M. Dyson; D.I. Edwards; D.A. Tocher. 'Studies on DNA damage and induction of SOS repair by novel multifunctional bio-reducible compounds. II. A metronidazole adduct of a ruthenium-arene compound' *Anticancer Drug. Des.* **7**, 3–14 (1992).
41. M.J. Clarke; F. Zhu; D.R. Frasca. 'Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals' *Chem. Rev.* **99**, 2511–2534 (1999).
42. L. Bíró; E. Balogh; P. Buglyó. 'Interaction between [Ru(η^6 -p-cym)(H₂O)₃]²⁺ and DL-serine or DL-isoserine: the role of the side chain alcoholic OH group in metal ion binding' *J. Organomet. Chem.* **734**, 61–68 (2013).
43. L. Bíró; D. Hüse; A.Cs. Bényei; P. Buglyó. 'Interaction of [Ru(η^6 -p-cym)(H₂O)₃]²⁺ with citrate and tricarballate ions in aqueous solution; X-ray crystal structure of novel half-sandwich Ru(II)-citrate complexes' *J. Inorg. Biochem.* **116**, 116–125 (2012).
44. L. Bíró; E. Farkas; P. Buglyó. 'Complex formation between [Ru(η^6 -p-cym)(H₂O)₃]²⁺ and (O,O) donor ligands with biological relevance in aqueous solution' *Dalt. Trans.* **39**, 10272–10278 (2010).
45. E. Giralt; M.D. Ludevid; E. Pedroso. 'The relevance of imidazole tautomerism for the hormonal activity of histidine-containing peptides' *Bioorg. Chem.* **14**, 405–416 (1986).
46. S. Li; M. Hong. 'Protonation, Tautomerization, and Rotameric Structure of Histidine: A Comprehensive Study by Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR' *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 1534–1544 (2011).
47. Y. Miao; T.A. Cross; R. Fu. 'Differentiation of histidine tautomeric states using ¹⁵N selectively filtered ¹³C solid-state NMR spectroscopy' *J. Magn. Reson.* **245**, 105–109 (2014).
48. J.L. Sudmeier; E.M. Bradshaw; K.E.C. Haddad; R.M. Day; C.J. Thalhauser; P.A. Bullock; W.W. Bachovchin. 'Identification of Histidine Tautomers in Proteins by 2D ¹H/¹³C_{δ2} One-Bond Correlated NMR' *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8430–8431 (2003).
49. J.H. Jones. 'A short guide to abbreviations and their use in peptide science' *J. Pept. Sci.* **5**, 465–471 (1999).

50. C.A. Vock; C. Scolaro; A.D. Phillips; R. Scopelliti; G. Sava; P.J. Dyson. 'Synthesis, Characterization, and in Vitro Evaluation of Novel Ruthenium(II) η^6 -Arene Imidazole Complexes' *J. Med. Chem.* **49**, 5552–5561 (2006).
51. C.M. Standfest-Hauser; R. Schmid; K. Kirchner; K. Mereiter. 'Formation of a hydroxo-bridged dinuclear Ru(III)/Ru(III) complex from N-methylimidazole and $[\text{RuCp}(\text{CH}_3\text{CN})_3]^+$ ' *Monatshefte für Chemie* **135**, 911–917 (2004).
52. S.K. Singh; M. Trivedi; M. Chandra; A.N. Sahay; D.S. Pandey. 'Luminescent Piano-Stool Complexes Incorporating 1-(4-Cyanophenyl)imidazole: Synthesis, Spectral, and Structural Studies' *Inorg. Chem.* **43**, 8600–8608 (2004).
53. C.A. Vock; W.H. Ang; C. Scolaro; A.D. Phillips; L. Lagopoulos; L. Juillerat-Jeanneret; G. Sava; R. Scopelliti; P.J. Dyson. 'Development of Ruthenium Antitumor Drugs that Overcome Multidrug Resistance Mechanisms' *J. Med. Chem.* **50**, 2166–2175 (2007).
54. W.H. Ang; A. De Luca; C. Chapuis-Bernasconi; L. Juillerat-Jeanneret; M. Lo Bello; P.J. Dyson. 'Organometallic Ruthenium Inhibitors of Glutathione-S-Transferase P1-1 as Anticancer Drugs' *ChemMedChem* **2**, 1799–1806 (2007).
55. W. Huber; P. Bröhler; W. Wätjen; W. Frank; B. Spingler; P.C. Kunz. 'Cytotoxicity of ruthenium(II) piano-stool complexes with imidazole-based PN ligands' *J. Organomet. Chem.* **717**, 187–194 (2012).
56. G. Jaouen. 'Bioorganometallics' (Wiley-CH: Weinheim, 2006).
57. K. Severin; R. Bergs; W. Beck. 'Bioorganometallic Chemistry - Transition Metal Complexes with α -Amino Acids and Peptides' *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 1634–1654 (1998).
58. M.L.H. Green; L.C. Mitchard; W.E. Silverthorn. 'Arene molybdenum chemistry: arene(π -allyl)molybdenum derivatives containing carboxylate, aminocarboxylate, and related ligands' *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.* 1403–1408 (1973).
59. A.A. Ioganson. 'Metal Carbonyl Complexes with Ligands of Biological Origin' *Russ. Chem. Rev.* **54**, 277–292 (1985).
60. R. Krämer; K. Polborn; H. Wanjek; I. Zahn; W. Beck. 'Chirale Halbsandwich-Komplexe von Rhodium(III), Iridium(III), Iridium(I) und Ruthenium(II) mit α -Aminosäure-Anionen' *Chem. Ber.* **123**, 767–778 (1990).
61. W.S. Sheldrick; E. Hauck; S. Korn. 'Preparation and structural characterization of η^5 -pentamethylcyclopentadienylcobalt(III) complexes of α -amino acids with coordinating side chains' *J. Organomet. Chem.* **467**, 283–292 (1994).
62. A.E. Folake; E.H.P. Lydia; T. Bruno; F. Julien. 'Synthesis, Characterization and Cytotoxicity of (η^6 -p-cymene)ruthenium(II) Complexes of α -Amino Acids' *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 1174–1184 (2014).
63. I.A. Baidina; O.P. Slyudkin; S.V. Borisov. 'Crystal and molecular structures of platinum(II) diiodo-L-histidinate' *J. Struct. Chem.* **26**, 955–958 (1985).
64. T.G. Appleton; F.B. Ross. 'Reactions of the cis-diamminediaqua-platinum(II) cation with histidine and related molecules' *Inorg. Chim. Acta* **252**, 79–89 (1996).
65. M.J. Romero; P.J. Sadler. in *Bioorganomet. Chem.* 85–116 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014).
66. H. Brunner. 'Optisch aktive Übergangsmetall-Komplexe XII. Konfigurationsumkehr am asymmetrischen Eisenatom' *J. Organomet. Chem.* **36**, (1972).
67. H. Brunner. 'Stability of the Metal Configuration in Chiral-at-Metal Half-Sandwich Compounds' *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 905–912 (2001).

68. H. Brunner. 'Optically Active Organometallic Compounds of Transition Elements with Chiral Metal Atoms' *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1194–1208 (1999).
69. Ganter, C. 'Chiral organometallic half-sandwich complexes with defined metal configuration' *Chem. Soc. Rev.* **32**, 130–138 (2003).
70. M. Saporita; G. Bottari; G. Brancatelli; D. Drommi; G. Bruno; F. Faraone. 'Asymmetric Induction and Configurational Stability at the Metal Centre in Half-Sandwich (η^6 -p-Cymene)ruthenium(II) and (η^5 -C₅Me₅)rhodium(III) Complexes Containing Chiral N-N* Ligands with Different Rigidity and Flexibility' *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 59–72 (2008).
71. R. Ruzziconi; G. Bellachioma; G. Ciancaleoni; S. Lepri; S. Superchi; R. Zanasi; G. Monaco. 'Cationic half-sandwich quinolinophaneoxazoline-based (η^6 -p-cymene)ruthenium(II) complexes exhibiting different chirality types: synthesis and structural determination by complementary spectroscopic methods' *Dalt. Trans.* **43**, 1636–1650 (2014).
72. W.S. Sheldrick; S. Heeb. 'Synthesis and structural characterization of η^6 -arene-ruthenium(II) complexes of α -amino acids with coordinating side chains' *J. Organomet. Chem.* **377**, 357–366 (1989).
73. F. Wang; J. Bella; J.A. Parkinson; P.J. Sadler. 'Competitive reactions of a ruthenium arene anticancer complex with histidine, cytochrome c and an oligonucleotide.' *J. Biol. Inorg. Chem.* **10**, 147–155 (2005).
74. G. Süss-Fink. 'Arene ruthenium complexes as anticancer agents' *Dalt. Trans.* **39**, 1673–1688 (2010).
75. M. Hahn; D. Wolters; W.S. Sheldrick; F.B. Hulsbergen; J. Reedijk. '„[Pt(dien)]²⁺ migrates intramolecularly from methionine S to imidazole N_z 2 in the peptides H-His-Gly-Met-OH and Ac-His-Ala-Ala-Ala-Met-NHPh' *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**, 412–420 (1999).
76. P. Tsiveriotis; N. Hadjiliadis; G. Stavropoulos. 'NMR study of the interaction of platinum(II) and palladium(II) complex ions with His-Ala and His-Gly-Ala' *Inorganica Chim. Acta* **261**, 83–92 (1997).
77. S.U. Milinkovic; T.N. Parac; M.I. Djuran; N.M. Kostic. 'Dependence of hydrolytic cleavage of histidine-containing peptides by palladium(II) aqua complexes on the co-ordination modes of the peptides' *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 2771–2776 (1997).
78. I. Sóvágó. 'Biocoordination Chemistry, Coordination Equilibria in Biologically Active System' (1990).
79. P. Tsiveriotis; N. Hadjiliadis. 'Sequence dependence of the reactivity of histidyl containing peptides with palladium(II) and platinum(II) complex ions. An NMR study' *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 459–466 (1999).
80. E.M.A. Ratilla; H.M. Brothers; N.M. Kostic. 'A transition-metal chromophore as a new, sensitive spectroscopic tag for proteins. Selective covalent labeling of histidine residues in cytochromes c with chloro(2,2':6'2"-terpyridine)platinum(II) chloride' *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 4592–4599 (1987).
81. H.M. Brothers; N.M. Kostic. 'Noninvasive tagging of proteins with an inorganic chromophore. Selectivity of chloro(terpyridine)platinum(II) toward amino acids, peptides, and cytochromes c' *Inorg. Chem.* **27**, 1761–1767 (1988).
82. D. Lazic; A. Arsenijevic; R. Puchta; Z.D. Bugarcic; A. Rilak. 'DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium(II) terpyridine complexes' *Dalt. Trans.* **45**, 4633–4646 (2016).
83. J.P. Laussac; M. Padeloup; N. Hadjiliadis. 'NMR studies on binary and ternary

- Pd(II) complexes formed by the growth-modulating tripeptide glycylhistidyllysine and nucleotides' *J. Inorg. Biochem.* **30**, 227–238 (1987).
84. A. Yokoyama; H. Aiba; H. Tanaka. 'Acid Dissociation Constants of Some Histidine-containing Peptides and Formation Constants of Their Metal Complexes' *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **47**, 112–117 (1974).
85. H. Aiba; A. Yokoyama; H. Tanaka. 'Copper(II) Complexes of L-Histidylglycine and L-Histidylglycylglycine in Aqueous Solution' *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **47**, 136–142 (1974).
86. C.E. Livera; L.D. Pettit; M. Bataille; B. Perly; H. Kozlowski; B. Radomska. 'A thermodynamic and spectroscopic study of the proton and copper(II) complexes of L-prolyl-L-histidine, D-prolyl-L-histidine, L-histidyl-L-histidine, and D-histidyl-L-histidine' *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 661–666 (1987).
87. M.R. McDonald; W.M. Scheper; H.D. Lee; D.W. Margerum. 'Copper(III) Complexes of Tripeptides with Histidine and Histamine as the Third Residue' *Inorg. Chem.* **34**, 229–237 (1995).
88. H. Sigel; R.B. Martin. 'Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands' *Chem. Rev.* **82**, 385–426 (1982).
89. R.P. Agarwal; D.D. Perrin. 'Stability constants of complexes of copper(II) ions with some histidine peptides' *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 268–272 (1975).
90. G. Brookes; L.D. Pettit. 'Thermodynamics of formation of complexes of copper(II) and nickel(II) ions with glycylhistidine, β -alanylhistidine, and histidylglycine' *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 2112–2117 (1975).
91. H.N. Hoang; G.K. Bryant; M.J. Kelso; R.L. Beyer; T.G. Appleton; D.P. Fairlie. 'Linkage isomerism in the binding of pentapeptide Ac-His(Ala)₃His-NH₂ to (ethylenediamine)palladium(II): effect of the binding mode on peptide conformation.' *Inorg. Chem.* **47**, 9439–9449 (2008).
92. Y. Ma; J. Jia; R. Cao; X. Wang; H. Fei. 'Histidine–Iridium(III) Coordination-Based Peptide Luminogenic Cyclization and Cyclo-RGD Peptides for Cancer-Cell Targeting' *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 17734–17737 (2014).
93. M. Dik-Lung; W. Wing-Leung; C. Wai-Hong; C. Fung-Yi; S. Pui-Kin; L. Tat-Shing; Z. Zhong-Yuan; L. Yun-Chung; W. Kwok-Yin. 'A Highly Selective Luminescent Switch-On Probe for Histidine/Histidine-Rich Proteins and Its Application in Protein Staining' *Angew. Chem.* **120**, 3795–3799 (2008).
94. T.G. Appleton; F.J. Pesch; M. Wienken; S. Menzer; B. Lippert. 'Linkage isomerism in square-planar complexes of platinum and palladium with histidine and derivatives' *Inorg. Chem.* **31**, 4410–4419 (1992).
95. M.J. Kelso; H.N. Hoang; W. Oliver; N. Sokolenko; D.R. March; T.G. Appleton; D.P. Fairlie. 'A Cyclic Metallopeptide Induces α Helicity in Short Peptide Fragments of Thermolysin' *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 421–424 (2003).
96. R.L. Beyer; H.N. Hoang; T.G. Appleton; D.P. Fairlie. 'Metal Clips Induce Folding of a Short Unstructured Peptide into an α -Helix via Turn Conformations in Water. Kinetic versus Thermodynamic Products' *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15096–15105 (2004).
97. M.T. Ma; H.N. Hoang; C.C.G. Scully; T.G. Appleton; D.P. Fairlie. 'Metal clips that induce unstructured pentapeptides to be alpha-helical in water.' *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 4505–4512 (2009).
98. D. Wolters; W.S. Sheldrick. ' κ^2 N(imidazole), S(thioether) Macrochelation of

- [Pt(en)]²⁺ (en=H₂NCH₂CH₂NH₂) by terminal histidine and methionine side-chains in tri-, tetra- and penta-peptides' *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 1121–1130 (1999).
99. M. Hahn; M. Kleine; W.S. Sheldrick. 'Interaction of cisplatin with methionine- and histidine-containing peptides: competition between backbone binding, macrochelation and peptide cleavage' *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 556–566 (2001).
 100. T.N. Parac; N.M. Kostic. 'Regioselective Cleavage by a Palladium(II) Aqua Complex of a Polypeptide in Different Overall Conformations' *Inorg. Chem.* **37**, 2141–2144 (1998).
 101. T.N. Parac; G.M. Ullmann; N.M. Kostić. 'New Regioselectivity in the Cleavage of Histidine-Containing Peptides by Palladium(II) Complexes Studied by Kinetic Experiments and Molecular Dynamics Simulations' *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 3127–3135 (1999).
 102. I. Khalaila; C.S. Allardyce; C.S. Verma; P.J. Dyson. 'A mass spectrometric and molecular modelling study of cisplatin binding to transferrin' *Chem. Bio. Chem.* **6**, 1788–1795 (2005).
 103. J. Will; D.A. Wolters; W.S. Sheldrick. 'Characterisation of cisplatin binding sites in human serum proteins using hyphenated multidimensional liquid chromatography and ESI tandem mass spectrometry' *Chem. Med. Chem.* **3**, 1696–1707 (2008).
 104. M.C. Cox; K.J. Barnham; T.A. Frenkiel; J.D. Hoeschele; A.B. Mason; Q.Y. He; R.C. Woodworth; P.J. Sadler. 'Identification of platination sites on human serum transferrin using ¹³C and ¹⁵N NMR spectroscopy' *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**, 621–631 (1999).
 105. F. Kratz; M. Hartmann; B. Keppler; L. Messori. 'The binding properties of two antitumor ruthenium(III) complexes to apotransferrin' *J. Biol. Chem.* **269**, 2581–2588 (1994).
 106. M. Pongratz; P. Schluga; M.A. Jakupec; V.B. Arion; C.G. Hartinger; G. Allmaier; B.K. Keppler. 'Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy' *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 46–51 (2004).
 107. M. Sulyok; S. Hann; C.G. Hartinger; B.K. Keppler; G. Stingeder; G. Koellensperger. 'Two dimensional separation schemes for investigation of the interaction of an anticancer ruthenium(III) compound with plasma proteins' *J. Anal. At. Spectrom.* **20**, 856–863 (2005).
 108. A.C. Smith; J.A. Sutherland-Smith; F. Kratz; N.E. Baker; B.K. Keppler. 'Binding of ruthenium(III) anti-tumor drugs to human lactoferrin probed by high resolution X-ray crystallographic structure analyses' *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 424–431 (1996).
 109. I. Berger; M. Hanif; A.A. Nazarov; C.G. Hartinger; R.O. John; M.L. Kuznetsov; M. Groessl; F. Schmitt; O. Zava; F. Biba; V.B. Arion; M. Galanski; M.A. Jakupec; L. Juillerat-Jeanneret; P.J. Dyson; B.K. Keppler. 'In Vitro Anticancer Activity and Biologically Relevant Metabolization of Organometallic Ruthenium Complexes with Carbohydrate-Based Ligands' *Chem. Eur. J.* **14**, 9046–9057 (2008).
 110. A.R. Timerbaev; C.G. Hartinger; S.S. Aleksenko; B.K. Keppler. 'Interactions of Antitumor Metallodrugs with Serum Proteins: Advances in Characterization Using Modern Analytical Methodology' *Chem. Rev.* **106**, 2224–2248 (2006).
 111. F. Kratz. '*Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*' (Weinheim VCH, 1993).

112. H. Sun; H. Li; P.J. Sadler. 'Transferrin as a metal ion mediator' *Chem. Rev.* **99**, 2817–2842 (1999).
113. D.M. Martin; N.D. Chasteen; J.K. Grady. 'Fluorescence and kinetic properties of Ru(III)(NH₃)₅ modified transferrin' *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 252–258 (1991).
114. P. Aisen. *The Transferrins. Inorg. BioChem.* (Elsevier, NY, 1973).
115. Clarke, M. J. 'Ruthenium metallopharmaceuticals' *Coord. Chem. Rev.* **232**, 69–93 (2002).
116. F. Kratz; B.K. Keppler; L. Messori; C. Smith; E.N. Baker. 'Protein-binding Properties of two Antitumour Ru(III) Complexes to Human Apotransferrin and Apolactoferrin' *Met. Based. Drugs* **1**, 169–173 (1994).
117. W. Guo; W. Zheng; Q. Luo; X. Li; Y. Zhao; S. Xiong; F. Wang. 'Transferrin Serves As a Mediator to Deliver Organometallic Ruthenium(II) Anticancer Complexes into Cells' *Inorg. Chem.* **52**, 5328–5338 (2013).
118. C.R. Chitambar; J.P. Wereley; S. Matsuyama. 'Gallium-induced cell death in lymphoma: role of transferrin receptor cycling, involvement of Bax and the mitochondria, and effects of proteasome inhibition' *Mol. Cancer Ther.* **5**, 2834–2843 (2006).
119. A.E.V. Leeuwen-Stok; G.J. Schuurhuis; A.M. Dräger; A.W. Visser-Platier; G.J. Teule; P.C. Huijgens. 'Effect of modulation of the transferrin receptor on gallium-67 uptake and cytotoxicity in lymphoma cell lines' *Br. J. Cancer* **74**, 619–624 (1996).
120. L.R. Bernstein; J.J.M. van der Hoeven; R.O. Boer. 'Hepatocellular Carcinoma Detection by Gallium Scan and Subsequent Treatment by Gallium Maltolate: Rationale and Case Study' *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents* **11**, 585–590 (2011).
121. M.A. Jakupec; M. Galanski; V.B. Arion; C.G. Hartinger; B.K. Keppler. 'Antitumour metal compounds: more than theme and variations' *Dalt. Trans.* 183–194 (2008).
122. Y. Takezawa; P. Bockmann; N. Sugi; Z. Wang; S. Abe; T. Murakami; T. Hikage; G. Erker; Y. Watanabe; S. Kitagawa; T. Ueno. 'Incorporation of organometallic Ru complexes into apo-ferritin cage' *Dalt. Trans.* **40**, 2190–2195 (2011).
123. I.W. McNae; K. Fishburne; A. Habtemariam; T.M. Hunter; M. Melchart; F. Wang; M.D. Walkinshaw; P.J. Sadler. 'Half-sandwich arene ruthenium(ii)-enzyme complex' *Chem. Commun.* 1786–1787 (2004).
124. D. Valensin; P. Anzini; E. Gaggelli; N. Gaggelli; G. Tamasi; R. Cini; C. Gabbiani; E. Michelucci; L. Messori; H. Kozłowski; G. Valensin. 'fac-{Ru(CO)₃}²⁺ Selectively Targets the Histidine Residues of the β -Amyloid Peptide 1-28. Implications for New Alzheimer's Disease Treatments Based on Ruthenium Complexes' *Inorg. Chem.* **49**, 4720–4722 (2010).
125. Z. Yang; X. Wang; H. Diao; J. Zhang; H. Li; H. Sun; Z. Guo. 'Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin' *Chem. Commun.* 3453–3455 (2007).
126. R. Xing; X. Wang; C. Zhang; Y. Zhang; Q. Wang; Z. Yang; Z. Guo. 'Characterization and cellular uptake of platinum anticancer drugs encapsulated in apoferritin' *J. Inorg. Biochem.* **103**, 1039–1044 (2009).
127. W. Wu; S.C. Hsiao; Z.M. Carrico; M.B. Francis. 'Genome-free viral capsids as multivalent carriers for taxol delivery' *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 9493–9497 (2009).

128. H.B. Gray; J.R. Winkler. 'Electron transfer in proteins' *Ann. Rev. Biochem.* **65**, 537–561 (1996).
129. L. Messori; V.F. Gonzales; R. Vilaplana; F. Piccioli; E. Alessio; B.K. Keppler. 'Binding of Antitumor Ruthenium(III) Complexes to Plasma Proteins.' *Met. Based. Drugs* **7**, 335–342 (2000).
130. L. Messori; P. Orioli; D. Vullo; E. Alessio; E. Iengo. 'A spectroscopic study of the reaction of NAMI, a novel ruthenium(III)anti-neoplastic complex, with bovine serum albumin' *Eur. J. Biochem.* **267**, 1206–1213 (2000).
131. J. Reedijk. 'Why does Cisplatin reach Guanine-N7 with competing s-donor ligands available in the cell?' *Chem. Rev.* **99**, 2499 (1999).
132. S. Meier; M. Hanif; Z. Adhireksan; V. Pichler; M. Novak; E. Jirkovsky; M. Jakupec; V. Arion; C. Davey; B.K. Keppler; C.G. Hartinger. 'Novel metal(II) arene 2-pyridinecarbothioamides: a rationale to orally active organometallic anticancer agents' *Chem. Sci.* **4**, 1837–1846 (2013).
133. A. Casini; G. Mastrobuoni; W.H. Ang; C. Gabbiani; G. Pieraccini; G. Moneti; P.J. Dyson; L. Messori. 'ESI-MS Characterisation of Protein Adducts of Anticancer Ruthenium(II)-Arene PTA (RAPTA) Complexes' *ChemMedChem* **2**, 631–635 (2007).
134. WHO. 'World malaria report 2015' 1–280 (2015).
135. C.S. Rajapakse; A. Martínez; B. Naoulou; A.A. Jarzecki; L. Suárez; C. Deregnacourt; V. Sinou; J. Schrével; E. Musi; G. Ambrosini; G.K. Schwartz; R.A. Sánchez-Delgado. 'Synthesis, characterization, and in vitro antimalarial and antitumor activity of new ruthenium(II) complexes of chloroquine' *Inorg. Chem.* **48**, 1122–1131 (2009).
136. T.E. Wellems; R.J. Howard. 'Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of *Plasmodium falciparum*' *Proceed. Nat. Acad. Sci.* **83**, 6065–6069 (1986).
137. A.L. Jones; M.D. Hulett; C.R. Parish. 'Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems' *Immunol Cell Biol* **83**, 106–118 (2005).
138. D.J. Sullivan; I.Y. Gluzman; D.E. Goldberg. 'Plasmodium Hemozoin Formation Mediated by Histidine-Rich Proteins' *Science (80-.)*. **271**, 219–222 (1996).
139. B. Séraphin. 'The HIT protein family: a new family of proteins present in prokaryotes, yeast and mammals' *DNA Seq.* **3**, 177–179 (1992).
140. C. Brenner; P. Bieganowski; H.C. Pace; K. Huebner. 'The histidine triad superfamily of nucleotide-binding proteins' *J. Cell Physiol.* **181**, 179–187 (1999).
141. H. Köpf; P. Köpf-Maier. 'Titanocen-dichlorid - das erste Metallocen mit cancerostatischer Wirksamkeit' *Angew. Chem.* **91**, 509 (1979).
142. M. Schachschneider. '[103Ru]-markierte ruthenocen-derivate biogener amine' *J. Label. Compd. Radiopharm.* **20**, 1061–1071 (1983).
143. R.M. Moriarty; U.S. Gill; Y.Y. Ku. 'η6-Arene-η5-cyclopentadienylruthenium complexes and related systems' *J. Organomet. Chem.* **350**, 157–190 (1988).
144. B.T. Loughrey; P.C. Healy; P.G. Parsons; M.L. Williams. 'Selective cytotoxic Ru(II) arene Cp* complex salts [R-PhRuCp*](+)(-)(-) for X = BF4(-), PF6(-), and BPh4(-)' *Inorg. Chem.* **47**, 8589–8591 (2008).
145. M. Garcia; A. Valente; P. Florindo; T. Morais; M. Fátima; M. Piedade; M. Duarte; V. Moreno; F. Avilés; J. Loreno. 'New ruthenium(II) mixed metallocene derived complexes: Synthesis, characterization by X-ray diffraction and evaluation on

- DNA interaction by atomic force microscopy' *Inorganica Chim. Acta* **363**, 3765–3775 (2010).
146. B.T. Loughrey; B.V. Cuning; P.C. Healy; C.L. Brown; P.G. Parsons; M.L. Williams. 'Selective, Cytotoxic Organoruthenium(II) Full-Sandwich Complexes: A Structural, Computational and In Vitro Biological Study' *Chem. – An Asian J.* **7**, 112–121 (2012).
147. W.S. Sheldrick; A. Gleichmann. 'η⁵-Pentamethylcyclopentadienylruthenium(II) complexes containing η⁶-coordinated α-amino acids' *J. Organomet. Chem.* **470**, 183–187 (1994).
148. A.J. Gleichmann; J.M. Wolff; W.S. Sheldrick. 'η⁵-Pentamethylcyclopentadienylruthenium(II) complexes containing η⁶-co-ordinated dipeptides with aromatic side chains' *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 1549–1554 (1995).
149. R.M. Moriarty; Y.Y. Ku; U.S. Gill. 'Synthesis and characterization of cyclopentadienylruthenium(II) complexes of aromatic amino acid derivatives' *J. Organomet. Chem.* **362**, 187–191 (1989).
150. R.M. Moriarty; Y.Y. Ku; U.S. Gill. 'Novel cyclopentadienyl ruthenium(II) complexes of biologically important compounds' *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **24**, 1837–1838 (1987).
151. J.M. Wolff; W.S. Sheldrick. '(η⁶-Arene)ruthenium(II) Labeling of Amino Acids and Peptides with Aromatic Side-Chains' *Chem. Ber.* **130**, 981–988 (1997).
152. J.M. Wolff; W.S. Sheldrick. 'Bis(arene) ruthenium(II) complexes containing η⁶-coordinated phenylalanine derivatives' *J. Organomet. Chem.* **531**, 141–149 (1997).
153. M. Moriarty; Y.Y. Ku; U.S. Gill. 'Novel cyclopentadienyl ruthenium(II) complexes of biologically important compounds' *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1837–1838 (1987).
154. H.B. Albada; F. Wieberneit; I. Dijkgraaf; J.H. Harvey; J.L. Whistler; R. Stoll; N. Metzler-Nolte; R.H. Fish. 'The Chemoselective Reactions of Tyrosine-Containing G-Protein-Coupled Receptor Peptides with [Cp*Rh(H₂O)₃](OTf)₂, Including 2D NMR Structures and the Biological Consequences' *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 10321–10324 (2012).
155. F. Wieberneit; A. Korste; H.B. Albada; N. Metzler-Nolte; R. Stoll. 'Structural and biological implications of the binding of Leu-enkephalin and its metal derivatives to opioid receptors' *Dalt. Trans.* **42**, 9799–9802 (2013).
156. I. Efremenko; R.H. Fish. 'Quantum Chemical and Molecular Docking Studies of [(η⁶-Cp*Rh-Tyr1)-Leu-enkephalin]₂⁺ to G-Protein-Coupled μ-, δ-, and κ-Opioid Receptors and Comparisons to the Neuropeptide [Tyr1]-Leu-enkephalin: Conformations, Noncovalent Amino Acid Binding Sites, Bindin' *Organometallics* **34**, 4117–4126 (2015).
157. S.M. Meier; M. Novak; W. Kandiolle; M.A. Jakupiec; V.B. Arion; N. Metzler-Nolte; B.K. Keppler; C.G. Hartinger. 'Identification of the Structural Determinants for Anticancer Activity of a Ruthenium Arene Peptide Conjugate' *Chem. Ber.* **19**, 9297–9307 (2013).
158. A.D. Frankel; C.O. Pabo. 'Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus' *Cell* **55**, 1189–1193 (1988).
159. D. Derossi; A.H. Joliot; G. Chassaing; A. Prochiantz. 'The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes' *J. Biol.*

- Chem* **269**, 10444–10450 (1994).
160. M. Zhao; R. Weissleder. 'Intracellular cargo delivery using tat peptide and derivatives' *Med. Res. Rev.* **24**, 1–12 (2004).
 161. E.A. Goun; T.H. Pillow; L.R. Jones; J.B. Rothbard; P.A. Wender. 'Molecular Transporters: Synthesis of Oligoguanidinium Transporters and Their Application to Drug Delivery and Real-Time Imaging' *Chem. Bio. Chem.* **7**, 1497–1515 (2006).
 162. B. Gupta; T.S. Levchenko; V.P. Torchilin. 'Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides' *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 637–651 (2005).
 163. A. Joliot; A. Prochiantz. 'Transduction peptides: from technology to physiology' *Nat Cell Biol* **6**, 189–196 (2004).
 164. E.L. Snyder; S.F. Dowdy. 'Cell penetrating peptides in drug delivery' *Pharm. Res.* **21**, 389–393 (2004).
 165. K.M. Stewart; K.L. Horton; S.O. Kelley. 'Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine' *Org. Biomol. Chem.* **6**, 2242–2255 (2008).
 166. C.A. Puckett; J.K. Barton. 'Targeting a ruthenium complex to the nucleus with short peptides' *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 3564–3569 (2010).
 167. G. Gasser; A.M. Sosniak; N. Metzler-Nolte. 'Metal-containing peptide nucleic acid conjugates' *Dalt. Trans.* **40**, 7061–7076 (2011).
 168. D.R.V. Staveren; N. Metzler-Nolte. 'Bioorganometallic chemistry of ferrocene' *Chem. Rev.* **104**, 5931–5985 (2004).
 169. A. Gross; N. Hüsken; J. Schur; L. Raszeja; I. Ott; N. Metzler-Nolte. 'A Ruthenocene-PNA Bioconjugate – Synthesis, Characterization, Cytotoxicity, and AAS-Detected Cellular Uptake' *Bioconjug. Chem.* **23**, 1764–1774 (2012).
 170. M. Fani; D. Psimadas; C. Zikos; S. Xanthopoulos; G.K. Loudos; P. Bouziotis; A.D. Varvarigou. 'Comparative evaluation of linear and cyclic 99mTc-RGD peptides for targeting of integrins in tumor angiogenesis' *Anticancer Res.* **26**, 431–434 (2006).
 171. J. Chen; Z. Cheng; N.K. Owen; T.J. Hoffman; Y. Miao; S.S. Jurisson; T.P. Quinn. 'Evaluation of an ¹¹¹In-DOTA-rhenium cyclized alpha-MSH analog: a novel cyclic-peptide analog with improved tumor-targeting properties' *J. Nucl. Med.* **42**, 1847–1855 (2001).
 172. E. Williams; G. Williams; B.J. Gour; O.W. Blaschuk; P. Doherty. 'A novel family of cyclic peptide antagonists suggests that N-cadherin specificity is determined by amino acids that flank the HAV motif' *J. Biol. Chem* **275**, 4007–4012 (2000).
 173. Y. Ye; X. Chen. 'Integrin targeting for tumor optical imaging' *Theranostics* **1**, 102–126 (2011).
 174. S. Dufort; L. Sancey; A. Hurbin; S. Foillard; D. Boturyn; P. Dumy; J.L. Coll. 'Targeted delivery of a proapoptotic peptide to tumors in vivo' *J. Drug. Target* **19**, 582–588 (2011).
 175. H.M. Ellerby; W. Arap; L.M. Ellerby; R. Kain; R. Andrusiak; G.D. Rio; S. Krajewski; C.R. Lombardo; R. Rao; E. Ruoslahti; D.E. Bredesen; R. Pasqualini. 'Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides' *Nat. Med.* **5**, 1032–1038 (1999).
 176. E. Rouoslahti; S.N. Bhatia; M.J. Sailor. 'Targeting of drugs and nanoparticles to tumors' *J. Cell Biol.* **188**, 759–768 (2010).
 177. R.-Y. Lin; K. Dayananda; T.-J. Chen; C.-Y. Chen; G.-C. Liu; K.-L. Lin; Y.-M. Wang. 'Targeted RGD nanoparticles for highly sensitive in vivo integrin receptor

- imaging' *Contrast Media Mol. Imaging* **7**, 7–18 (2012).
178. D.B. Grotjahn. 'Arene-selective peptide and protein derivatization' *Coord. Chem. Rev.* **192**, 1125–1141 (1999).
179. K. Schlotter; F. Boeckler; H. Hübner; P. Gmeiner. 'Fancy Bioisosteres: Metallocene-Derived G-Protein-Coupled Receptor Ligands with Subnanomolar Binding Affinity and Novel Selectivity Profiles' *J. Med. Chem.* **48**, 3696–3699 (2005).
180. A. Gross; N. Metzler-Nolte. 'Synthesis and characterisation of a ruthenocenoyl bioconjugate with the cyclic octapeptide octreotate' *J. Organomet. Chem.* **694**, 1185–1188 (2009).
181. L.J. Ming. 'Structure and function of "metalloantibiotics' *Med. Res. Rev.* **23**, 697–762 (2003).
182. A. Vessieres; S. Top; W. Beck; E. Hillard; G. Jaouen. 'Metal complex SERMs (selective oestrogen receptor modulators). The influence of different metal units on breast cancer cell antiproliferative effects' *Dalt. Trans.* 529–541 (2006).
183. A.J. Pearson; K. Lee. 'A Formal Total Synthesis of the ACE Inhibitor K-13. An Application of Arene-Ruthenium Chemistry to Complex Chemical Synthesis' *J. Org. Chem.* **59**, 2304–2313 (1994).
184. R. Krämer. 'Application of π -Arene–Ruthenium Complexes in Peptide Labeling and Peptide Synthesis' *Angew. Chemie Int. Ed. English* **35**, 1197–1199 (1996).
185. D.S. Perekalin; E.E. Karslyan; P.V. Petrovskii; Y.V. Nelyubina; K.A. Lyssenko; A.S. Kononikhin; E.N. Nikolaev; A.R. Kudinov. 'Simple Synthesis of Ruthenium π Complexes of Aromatic Amino Acids and Small Peptides' *Chem. – A Eur. J.* **16**, 8466–8470 (2010).
186. T.P. Gill; K.R. Mann. 'Photochemical properties of the cyclopentadienyl(η 6-benzene)ruthenium(II) cation. The synthesis and reactions of a synthetically useful intermediate: the cyclopentadienyltris(acetonitrile)ruthenium(II) cation' *Organometallics* **1**, 485–488 (1982).
187. A.M. McNair; K.R. Mann. 'Synthesis and reactivity of ruthenium cyclopentadienyl $[(\eta^5\text{-C}_5\text{R}_5)\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})]\text{PF}_6$ (R = H, CH₃) complexes of naphthalene, anthracene, pyrene, chrysene and azulene. Kinetic studies of arene displacement reactions in acetonitrile solutions' *Inorg. Chem.* **25**, 2519–2527 (1986).
188. J.L. Schrenk; A.M. McNair; F.B. McCormick; K.R. Mann. 'Effect of arene methylation on photochemical arene replacement reactions of the iron and ruthenium complexes $[(\eta^5\text{-C}_5(\text{CH}_3)_5)\text{M}(\eta^6\text{-arene})]^+$ (M = Fe, Ru) complexes' *Inorg. Chem.* **25**, 3501–3504 (1986).
189. A.M. McNair; J.L. Schrenk; K.R. Mann. 'Effect of arene substituents and temperature on the arene replacement reactions of $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Fe}(\eta^6\text{-arene})]^+$ and $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})]^+$ ' *Inorg. Chem.* **23**, 2633–2640 (1984).
190. D.S. Perekalin; V.V. Novikov; A.A. Pavlov; I.A. Ivanov; N.Y. Anisimova; A.N. Kopylov; D.S. Volkov; I.F. Seregina; M.A. Bolshov; A. Kudinov. 'Selective Ruthenium Labeling of the Tryptophan Residue in the Bee Venom Peptide Melittin' *Chem. – A Eur. J.* **21**, 4923–4925 (2015).
191. J. Zagermann; M.C. Kuchta; K. Merz; N. Metzler-Nolte. 'Ruthenium-based bioconjugates: Synthesis and X-ray structure of the mixed ligand sandwich compound $\text{RuCpiPr}(\text{p}-(\text{CO}_2\text{H})\text{C}_6\text{H}_4\text{Tp})$ and labelling of amino acids and the neuropeptide enkephalin' *J. Organomet. Chem.* **694**, 862–867 (2009).

192. M. Patra; G. Gasser; D. Bobukhov; K. Merz; A.V. Shtemenko; N. Metzler-Nolte. 'Sequential insertion of three different organometallics into a versatile building block containing a PNA backbone' *Dalt. Trans.* **39**, 5617–5619 (2010).
193. E. Koren; V.P. Torchilin. 'Drug carriers for vascular drug delivery' *IUBMB Life* **63**, 586–595 (2011).
194. T. Kammertoens; T. Schöler; T. Blankenstein. 'Immunotherapy: target the stroma to hit the tumor' *Trends Mol. Med.* **11**, 225–231 (2005).
195. M.J. Wheelock; Y. Shintani; M. Maeda; Y. Fukumoto; K.R. Johnson. 'Cadherin switching' *J. Cell Sci.* **121**, 727–735 (2008).
196. C.K. Augustine; Y. Yoshimoto; M. Gupta; P.A. Zipfel; M.A. Selim; P. Febbo; A.M. Pendergast; W.P. Peters; D.S. Tyler. 'Targeting N-cadherin enhances antitumor activity of cytotoxic therapies in melanoma treatment.' *Cancer Res.* **68**, 3777–3784 (2008).
197. M.T. Nieman; R.S. Prudoff; K.R. Johnson; M.J. Wheelock. 'N-Cadherin Promotes Motility in Human Breast Cancer Cells Regardless of Their E-Cadherin Expression' *J. Cell Biol.* **147**, 631–644 (1999).
198. N.L. Tran; R.B. Nagle; A.E. Cress; R.L. Heimark. 'N-Cadherin Expression in Human Prostate Carcinoma Cell Lines: An Epithelial-Mesenchymal Transformation Mediating Adhesion with Stromal Cells' *Am. J. Pathol.* **155**, 787–798 (1999).
199. L.D. Derycke; M.E. Bracke. 'N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling' *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 463–476 (2004).
200. O.W. Blaschuk. 'N-cadherin antagonists as oncology therapeutics' *Phil. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* **370**, 1661 (2015).
201. F.V. Roy. 'Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer' *Nat. Rev. Cancer* **14**, 121–134 (2014).
202. K. Hatta; A. Nose; A. Nagafuchi; M. Takeichi. 'Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family' *J. Cell Biol.* **106**, 873–881 (1988).
203. O.J. Harrison; X. Jin; S. Hong; F. Bahna; G. Ahlsen; J. Brasch; Y. Wu; J. Vendome; K. Felsovalyi; C.M. Hampton; R.B. Troyanovsky; A. Ben-Shaul; J. Frank; S.M. Troyanovsky; L. Shapiro; B. Honig. 'The Extracellular Architecture of Adherens Junctions Revealed by Crystal Structures of Type I Cadherins' *Structure* **19**, 244–256 (2011).
204. J. Brasch; O.J. Harrison; B. Honig; L. Shapiro. 'Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion' *Trends Cell Biol.* **22**, 299–310 (2012).
205. P. Kiptoo; E. Sinaga; A.M. Calcagno; H. Zhao; N. Kobayashi; U.S.F. Tambunan; T.J. Siahaan. 'Enhancement of Drug Absorption through the Blood–Brain Barrier and Inhibition of Intercellular Tight Junction Resealing by E-Cadherin Peptides' *Mol. Pharm.* **8**, 239–249 (2011).
206. V. Noe; J. Willems; J. Vandekerckhove; F.V. Roy; E. Bruyneel; M. Mareel. 'Inhibition of adhesion and induction of epithelial cell invasion by HAV-containing E-cadherin-specific peptides' *J. Cell Sci.* **112**, 127–135 (1999).
207. O.W. Blaschuk. 'Discovery and development of N-cadherin antagonists' *Cell Tissue Res.* **348**, 309–313 (2012).
208. N.H. On; P. Kiptoo; T.J. Siahaan; D.W. Miller. 'Modulation of Blood–Brain Barrier Permeability in Mice Using Synthetic E-Cadherin Peptide' *Mol. Pharm.*

- 11, 974–981 (2014).
209. G.M. Beasley; J.C. Riboh; C.K. Augustine; J.S. Zager; S.N. Hochwald; S.R. Grobmyer; B. Peterson; R. Royal; M.I. Ross; D.S. Tyler. ‘Prospective Multicenter Phase II Trial of Systemic ADH-1 in Combination With Melphalan via Isolated Limb Infusion in Patients With Advanced Extremity Melanoma’ *J. Clin. Onc.* **29**, 1210–1215 (2011).
210. N. Yarom; D. Stewart; L. Avruch; R. Malik; J. Wells; D.J. Jonker. ‘ADH-1 in the treatment of metastatic adrenocortical carcinoma--case report.’ *Anticancer Res.* **31**, 3921–3925 (2011).
211. I.T. Makagiansar; M. Avery; Y. Hu; K.L. Audus; T.J. Siahaan. ‘Improving the selectivity of HAV-peptides in modulating E-cadherin-E-cadherin interactions in the intercellular junction of MDCK cell monolayers’ *Pharm. Res.* **18**, 446–453 (2001).
212. C.F. Meares; T.G. Wensel. ‘Metal chelates as probes of biological systems’ *Acc. Chem. Res.* **17**, 202–209 (1984).
213. C.J. Broan; J.L. Cox; A.S. Craig; R. Kataký; D. Parker; A. Harrison; A.M. Randall; G. Ferguson. ‘Structure and solution stability of indium and gallium complexes of 1,4,7-triazacyclononanetriacetate and of yttrium complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclododecanetetraacetate and related ligands: kinetically stable complexes for use in imaging and radioimmuno’ *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 87–99 (1991).
214. M. Jamous; U. Haberkorn; W. Mier. ‘Synthesis of Peptide Radiopharmaceuticals for the Therapy and Diagnosis of Tumor Diseases’ *Molecules* **18**, 3379–3409 (2013).
215. L. Lang; Y. Ma; D.O. Kiesewetter; X. Chen. ‘Stability Analysis of Glutamic Acid Linked Peptides Coupled to NOTA through Different Chemical Linkages’ *Mol. Pharm.* **11**, 3867–3874 (2014).
216. E.T. Clarke; A.E. Martell. ‘Stabilities of the Fe(III), Ga(III) and In(III) chelates of N,N',N''-triazacyclononanetriacetic acid’ *Inorganica Chim. Acta* **181**, 273–280 (1991).
217. W.R. Harris; W.L. Pecoraro. ‘Thermodynamic binding constants for gallium transferrin’ *Biochemistry* **22**, 292–299 (1983).
218. J.D.G. Correia; A. Paulo; P.D. Raposinho; I. Santos. ‘Radiometallated peptides for molecular imaging and targeted therapy’ *Dalt. Trans.* **40**, 6144–6167 (2011).
219. M.A. Green; M.J. Welch; C.J. Mathias; K.A. Fox; R.M. Knabb; J.C. Huffman. ‘Gallium-68 1,1,1-tris (5-methoxysalicylaldehydimethyl) ethane: a potential tracer for evaluation of regional myocardial blood flow’ *J. Nucl. Med.* **26**, 170–180 (1985).
220. A. de Sá; Á.A. Matias; M.I.M. Prata; C.F.G.C. Geraldes; P.M.T. Ferreira; J.P. André. ‘Gallium labeled NOTA-based conjugates for peptide receptor-mediated medical imaging’ *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 7345–7348 (2010).
221. J. Choi; J.M. Jeong; B.C. Yoo; M.K. Hong; Y.J. Kim; Y.-S. Lee; D.S. Lee; J.-K. Chung. ‘Ga-68-labeled neolactosylated human serum albumin (HSA) for PET imaging of hepatic asialoglycoprotein receptor’ *Nucl. Med. Biol.* **42**, 53–58 (2015).
222. A.S. Craig; D. Parker; H. Adams; N.A. Bailey. ‘Stability, ⁷¹Ga NMR, and crystal structure of a neutral gallium(III) complex of 1,4,7-triazacyclononanetriacetate: a potential radiopharmaceutical?’ *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1793–1794 (1989).
223. J.P. André; H.R. Mäcke. ‘NMR spectroscopy of Group 13 metal ions: biologically

- relevant aspects' *J. Inorg. Biochem.* **97**, 315–323 (2003).
224. L.R. Bernstein. 'Mechanisms of therapeutic activity for gallium' *Pharmacol. Res.* **50**, 665–682 (1998).
 225. D.E. Reichert; J.A. Lewis; C.J. Anderson. 'Metal complexes as diagnostic tools' *Coord. Chem. Rev.* **184**, 3–66 (1999).
 226. Q. Zhou; C. Henoumont; L.V. Elst; S. Laurent; R.N. Muller. 'NMR determination of free gallium(III) ions in aqueous solutions of Ga complexes, "cold" analogs of PET/SPECT tracers' *Contrast Media Mol. Imaging* **6**, 165–167 (2011).
 227. R.B. Merrifield. 'Solid phase peptide synthesis I.: The synthesis of a tetrapeptide' *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154 (1963).
 228. L.A. Carpino; G.Y. Han. 'The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group' *J. Org. Chem.* **37**, 3404–3409 (1972).
 229. E. Atherton; D.L.J. Clive; R.C. Sheppard. 'Polyamide supports for polypeptide-synthesis' *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 6584–6585 (1975).
 230. P. Gans; A. Sabatini; A. Vacca. 'SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data' *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1195–1200 (1985).
 231. L. Zékány; I. Nagypál. 'Computational Methods for the Determination of Stability Constants' in *Computational Methods for the Determination of Formation Constants* (Plenum Press, New York, USA, 1985).
 232. H.M. Irving; M.G. Miles; L.D. Pettit. 'A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode' *Anal. Chim. Acta* **38**, 475–488 (1967).
 233. G. Eriksson. 'An algorithm for the computation of aqueous multicomponent, multiphase equilibria' *Anal. Chim. Acta* **112**, 375–383 (1979).
 234. G. Gran. 'Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II' *Analyst* **77**, 661–671 (1952).
 235. Hada M.J. Frisch; G.W. Trucks; H.B. Schlegel; G.E. Scuseria; M.A. Robb; J.R. Cheeseman; G. Scalmani; V. Barone; B. Mennucci; G.A. Petersson; H. Nakatsuji; M. Caricato; X. Li; H.P. Hratchian; A.F. Izmaylov; J. Bloino; G. Zheng; J.L. Sonnenberg; M. Hada; M. 'Gaussian 09, revision C.01' (2009).
 236. 'MicroMath Scientist Handbook Rev. 7EEF' 467 (1995).
 237. M. Dolg; U. Wedig; H. Stoll; H. Preuss. 'Energy-adjusted abinitio pseudopotentials for the first row transition elements' *J. Chem. Phys.* **86**, 866–872 (1987).
 238. P.J. Hay; W.R. Wadt. 'Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals' *J. Chem. Phys.* **82**, 299–310 (1985).
 239. A.V. Marenich; C.J. Cramer; D.G. Truhlar. 'Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions' *J. Phys. Chem. B* **113**, 6378–6396 (2009).
 240. P. Tsiveriotis; N. Hadjiliadis. 'Studies on the interaction of histidyl containing peptides with palladium(II) and platinum(II) complex ions' *Coord. Chem. Rev.* **190–192**, 171–184 (1999).
 241. J.A. Dean. 'Lange's Handbook of Chemistry 15th ed.' (1979).
 242. U. Rychlewski; B. Warżajtis; B.Đ. Glišić; M.D. Živković; S. Rajković; M.I. Djuran. 'Monocationic gold(III) Gly-L-His and L-Ala-L-His dipeptide complexes:

- crystal structures arising from solvent free and solvent-containing crystal formation and structural modifications tuned by counter-anions' *Dalt. Trans.* **39**, 8906–8913 (2010).
243. Y. Fu; R. Soni; M.J. Romero; A.M. Pizarro; L. Salassa; G.J. Clarkson; J.M. Hearn; A. Habtemariam; M. Wills; P.J. Sadler. 'Mirror-Image organometallic osmium arene iminopyridine halido complexes exhibit similar potent anticancer activity' *Chem. – A Eur. J.* **19**, 15199–15209 (2013).
244. U. Koelle; M.H. Wang; G. Raabe. 'Bis(phenol) adduct of Cp*Ru(η -5-oxocyclohexadienyl), a doubly symmetrical hydrogen-bridged ruthenium complex' *Organometallics* **10**, 2573–2577 (1991).
245. I.W. McNae; K. Fishburne; A. Habtemariam; T.M. Hunter; M. Melchart; F. Wang; M.D. Walkinshaw; P.J. Sadler. 'Half-sandwich arene ruthenium(II)-enzyme complex' *Chem. Commun.* 1786–1787 (2004).

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működése országos program című kiemelt projekt által nyújtott személyi támogatással valósult meg. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

A kutatáshoz a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 (ENVIKUT) projekt is hozzájárult.

A kutatás egy része a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

8. FÜGGELÉK

Az értekezés alapját képező közlemények:

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények (3):

1. Zsolt Bihari, Valeria Ugone, Eugenio Garribba, Norbert Lihi, Péter Buglyó: Complex formation between $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ and oligopeptides containing three histidyl moieties.
Journal of Organometallic Chemistry, 823, 116-125 (2016)
IF: 2,336 (2015)
2. Zsolt Bihari, Filipe Vultos, Célia Fernandes, Lurdes Gano, Isabel Santos, João D. G. Correia, Péter Buglyó: Synthesis, characterization and biological evaluation of a ^{67}Ga -labeled $(\eta^6\text{-Tyr})\text{Ru}(\eta^5\text{-Cp})$ complex with the HAV motif.
Journal of Inorganic Biochemistry, 160, 189-197(2016)
IF: 3,205 (2015)
3. Zsolt Bihari, Zoltán Nagy, Péter Buglyó: $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ binding capability of N-methylimidazole to model the interaction between the metal ion and surface histidine residues of peptides.
Journal of Organometallic Chemistry, 782, 82-88 (2015)
IF: 2,336 (2015)

Konferencia kötetben megjelent tanulmány (1):

1. Bihari Zsolt, Bíró Linda, Buglyó Péter: A potenciálisan rákellenes hatású félszendvics típusú $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kölcsönhatása hisztidintartalmú oligopeptidekkel és modelljeikkel, XXXVI. Kémiai Előadói Napok, 2013, Szeged, Magyarország, 288. oldal, JATEPress, (ISBN 978-963-315-145-7).

Tudományos kötetben megjelent fejezet (1):

1. Bihari Zsolt: A potenciálisan rákellenes hatású félszendvics típusú $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kölcsönhatása hisztidintartalmú oligopeptidekkel és modelljeikkel. **Hatvani István Szakkollégium, Mi tendenciánk II. tanulmánykötet**, 2013, Debrecen, Magyarország, 111-126. oldal, (ISNN 2063-6059).

Az értekezés anyagából készült előadások (lectures) (13):

1. Zsolt Bihari, Filipe Vultos, João D. G. Correia, Célia Fernandes, Lurdes Gano, Isabel Santos, Péter Buglyó: *Synthesis, characterization and biological evaluation of radiometallated $Ru(\eta^5-Cp)(\eta^6-Tyr)$ peptide with HAV motif*, **COST meeting, 2015. szeptember 2, Varsó, Lengyelország**
2. Bihari Zsolt, Filipe Vultos, João D. G. Correia, Isabel Santos, Buglyó Péter: *^{67}Ga jelzett, HAV szekvenciát tartalmazó, potenciálisan rákellenes $Ru(\eta^5-Cp)(\eta^6-Tyr)$ peptid konjugátum szintézise, jellemzése és biológiai vizsgálata*, **MKE 2. Nemzeti Konferencia, 2015. augusztus 31.-szeptember 2., Hajdúszoboszló, Magyarország, 18. oldal**
3. Zsolt Bihari, Filipe Vultos, João D. G. Correia, Célia Fernandes, Lurdes Gano, Isabel Santos, Péter Buglyó: *Synthesis, characterization and biological evaluation of $Ru(\eta^5-Cp)(\eta^6-Tyr)$ peptide conjugates with the HAV motif*, **13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Flash Presentation, 2015. június 12-15, Galway, Írország, 105. oldal**
4. Zsolt Bihari, Filipe Vultos, João D. G. Correia, Célia Fernandes, Lurdes Gano, Isabel Santos, Buglyó Péter: *Synthesis, characterization and biological evaluation of $Ru(\eta^5-Cp)(\eta^6-Tyr)$ peptide conjugates with the HAV motif*, **49. Komplexkémiái Kollokvium, 2015. május 26-28., Siófok, Magyarország, 22. oldal, E12**
5. Zsolt Bihari: *^{67}Ga jelzett, HAV szekvenciát tartalmazó, potenciálisan rákellenes $Ru(\eta^5-Cp)(\eta^6-Tyr)$ peptid konjugátum szintézise, jellemzése és biológiai vizsgálata*, **Hatvani István Szakkollégium - Tavaszi Konferencia, 2015. május 7., MTA DAB Székház, Debrecen, Magyarország, 3. oldal**
6. Linda Bíró, Dániel Hüse, János Patalenszki, Zsolt Bihari, Edina Balogh, Attila Cs. Bényei, Péter Buglyó: *Interaction between half-sandwich platinum metal ions and bioligands capable of tridentate coordination*, **VII. International Symposium on Bioorganometallic Chemistry, 2014. július 22-25., Bécs, Ausztria, 26. oldal**

7. Bihari Zsolt, Nagy Zoltán, Buglyó Péter: *Félszendvics szerkezetű $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ kölcsönhatása több hisztidint tartalmazó oligopeptidekkel*, **48. Komplexkémiái Kollokvium, 2014. május 28-30., Siófok, Magyarország, E16**
8. Bihari Zsolt, Bíró Linda, Buglyó Péter: *A potenciálisan rákellenes hatású félszendvics típusú $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ kölcsönhatása hisztidintartalmú oligopeptidekkel és modelljeikkel*, **XXXVI. Kémiai Előadói Napok, 2013. október 28-30., Szeged, Magyarország, 288-290. oldal**
9. Bihari Zsolt, Bíró Linda, Buglyó Péter: *A potenciálisan rákellenes hatású félszendvics típusú $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ kölcsönhatása hisztidintartalmú oligopeptidekkel és modelljeikkel*, **47. Komplexkémiái Kollokvium, 2013. május 29-31., Mátraháza, Magyarország, E1**
10. Bihari Zsolt: *A potenciálisan rákellenes hatású félszendvics típusú $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ kölcsönhatása hisztidintartalmú oligopeptidekkel és modelljeikkel*, **Hatvani István Konferencia, 2013. május 2-3., MTA DAB székház, Debrecen, Magyarország, 3. oldal**
11. Bihari Zsolt: *A $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ kölcsönhatása l-metilimidazollal és N-acetil-hisztaminnal*, **XXXI. OTDK, Kémiai és vegyipari Szekció, Koordinációs kémiai tagozat, 2013. április 4-6., Eger, Magyarország, 171. oldal**
12. Bihari Zsolt: *A $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ kölcsönhatása l-metilimidazollal és N-acetil-hisztaminnal*, **Hatvani István Konferencia, 2012. december 7, MTA DAB székház, Debrecen, Magyarország, 9. oldal**
13. Bihari Zsolt: *A $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ kölcsönhatása l-metilimidazollal és N-acetil-hisztaminnal*, **DE TTK - TDK Konferencia, 2012. november 20-23, Debrecen, Magyarország**

Az értekezés anyagából készült poszterek (posters) (7):

1. Zsolt Bihari, Filipe Vultos, João D. G. Correia, Célia Fernandes, Lurdes Gano, Isabel Santos, Buglyó Péter: *Synthesis, characterization and biological evaluation of $Ru(\eta^5\text{-Cp})(\eta^6\text{-Tyr})$ peptide conjugates with the*

HAV motif, **13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 2015. június 12-15, Galway, Írország, 105. oldal**

2. Zsolt Bihari, Zoltán Nagy and Péter Buglyó: *Interaction between half-sandwich type $[Ru(\eta^6\text{-p-cym})(H_2O)_3]^{2+}$ with potential proliferative effect and multihistidine containing oligopeptides*, **Chemistry of Metals in Biological System, Summer School, 2014. szeptember 7-14, Louvain-la-Neuve, Belgium, 66-67. oldal**
3. Zsolt Bihari, Zoltán Nagy and Péter Buglyó: *Interaction between half-sandwich type $[Ru(\eta^6\text{-p-cym})(H_2O)_3]^{2+}$ with potential proliferative effect and multihistidine containing oligopeptides*, **12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2014. augusztus 24-28., Zürich, Svájc, 142. oldal, P183**
4. Zsolt Bihari, Zoltán Nagy and Péter Buglyó: *Half-sandwich type $[Ru(\eta^6\text{-p-cym})(H_2O)_3]^{2+}$ complexes of short multihistidine containing oligopeptides*, **VII. International Symposium on Bioorganometallic Chemistry, 2014. július 22-25., Bécs, Ausztria, 52. oldal, P04**
5. Bihari Zsolt, Nagy Zoltán, Bíró Linda és Buglyó Péter: *Hisztidintartalmú oligopeptidek szintézise és kölcsönhatásuk oldategyensúlyi vizsgálata a rákellenes hatású $[Ru(\eta^6\text{-p-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ kationnal*, **XIX. Bolyai Konferencia, 2014. március 21-23., Budapest, Magyarország, 22. oldal**
6. Zsolt Bihari, Linda Bíró and Péter Buglyó: *$[Ru(\eta^6\text{-p-cym})(H_2O)_3]^{2+}$ binding capability of N-Methyl-imidazole to model the interaction between the metal ion and surface histidine residues of peptides*. **XII. International Symposium on Inorganic Biochemistry, 2013. augusztus 28. – szeptember 1., Wroclaw, Lengyelország, 51. oldal, P3**
7. Bihari Zsolt, Bíró Linda, Godó Attila József és Buglyó Péter: *A $[Ru(\eta^6\text{-p-cimol})(H_2O)_3]^{2+}$ kölcsönhatása 1-metil-imidazollal és N-acetil-hisztaminnal*, **XVIII. Bolyai Konferencia, 2013. május 23-24., Budapest, Magyarország, 26. oldal**

Az értekezésben nem tárgyalt közlemények (2):

1. Linda Bíró, Attila J. Godó, Zsolt Bihari, Eugenio Garribba, Péter Buglyó: *Tuning the Hydrolytic Properties of Half-Sandwich-Type Organometallic Cations in Aqueous Solution*. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 17, 3090-3100 (2013) **IF: 2.942 (2014)**
2. Veres Péter, Ditrói Tamás, Bogdándi Virág, Búzás Eszter Biborka, Bihari Zsolt: *Hegyközkovácsi felszín alatti vizeinek hidrokémiai vizsgálata*. **Debrecen-Nagyvárad, Magyarország-Románia, 2013, 131-151. oldal, (ISBN 978-963-473-632-5).**

Az értekezésben nem tárgyalt előadások (2):

1. Péter Buglyó, Linda Bíró, Eugenio Garribba, Zsolt Bihari: *Tuning the Hydrolytic Properties of Half-Sandwich Type Organometallic Cations in Aqueous Solution*. **International Symposium on Metal Complexes, 2012. június 18-22., Lisszabon, Portugália, 122-123. oldal, OC33**
2. Bíró Linda, Bihari Zsolt, Eugenio Garribba, Buglyó Péter: *Félszendvics $[(\eta^6/\eta^5\text{-arén})M(H_2O)_3]^{2+}$ kationok hidrolitikus sajátságainak szabályozása*. **46. Komplexkémiái Kollokvium, 2012. május 21-23., Mátrafüred, Magyarország, 40. oldal**

Az értekezésben nem tárgyalt poszterek (1):

1. Linda Bíró, Renáta Nagy, Zsolt Bihari, Etelka Farkas and Péter Buglyó: *Hydrolytic behaviour and chloride ion binding strengths of $[Ru(\eta^6\text{-arene})(H_2O)_3]^{2+}$ cations – Model studies for the biospeciation of ruthenium complexes with potential anticancer activity*, **4th European Conference on Chemistry Life Science, 2011. augusztus 31.- szeptember 3., Budapest, Magyarország, 257. oldal**