



**DTPA-amid származék ligandumok lantanida(III)-, réz(II)-
és cink(II)-ionokkal képzett komplexeinek egyensúlyi,
szerkezeti és kinetikai sajátosságai**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Jászberényi Zoltán

Témavezető: Dr. Brücher Ernő

Debreceni Egyetem
Debrecen, 2005.

I. Bevezetés és célkitűzések

Napjainkban, a ritkaföldfémek koordinációs kémiájának kutatása során az egyik legfontosabb terület a lantanidák kelátképző ligandumokkal alkotott komplexeinek *in vivo* alkalmazása. Ennek eredményeképpen a lantanida(III)-poliaza-polikarboxilát és -polifoszfónát komplexek alkalmazása biológiai vizsgálatokban, az orvosi diagnosztikában és terápiában jelentősen megnőtt. Az egyik leghatékonyabb orvos-diagnosztikai képalkotó eljárásban, a mágneses rezonanciás képalkotásban (Magnetic Resonance Imaging, MRI), Gd^{3+} -poliaza-polikarboxilát komplexeket alkalmaznak a kép élességét növelő ún. kontrasztanyagként. Továbbá kutatások folynak olyan lantanida(III)-komplexek előállítására, melyek segítségével *in vivo* körülmények között enzimaktivitást, az oxigén parciális nyomását, hőmérsékletet és pH-t tudnak mérni mágneses rezonancia tomográfias módszerekkel, valamint a szervspecifikus kontrasztanyagok kifejlesztése is egy igen fontos kutatási irány.

A lantanida(III)-komplexeknek egy másik jelentős diagnosztikai alkalmazása a fluoreszcenciás immunanalízis, mely módszerrel igen nagy érzékenységgel és szelektivitással határoznak meg antigéneket, biológiai és szintetikus vegyületeket, a fémkomplexek fluoreszcenciás tulajdonságait felhasználva.

A diagnosztikai alkalmazások mellett vizsgálják a lantanida komplexek terápiás alkalmazásainak lehetőségeit is. A poliaza-polikarboxilátok ^{90}Y -nel vagy ^{177}Lu -tel képzett komplexeit monoklonális antitestekhez vagy fehérjékhez kötve, azok eljuttathatók meghatározott szervekbe, ahol β -sugárzásuk roncsoló hatást fejt ki a rosszindulatú daganatos sejtekre.

Legújabbán ígéretes kísérletek történnek a mágneses rezonanciás képalkotás (MRI), mint diagnosztika és a gadolínium neutronbefogásos rákterápia (Gd-NCT) összekapcsolására. Ennek során a tumorhoz eljuttatott $^{157}Gd^{3+}$ -komplexet lassú neutronokkal sugározzák be. A lejátszódó magreakció hatására a tumoros szövetek elpusztulnak, és a terápia hatásosságát MRI vizsgálatokkal lehet nyomon követni.

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén már régóta folynak kutatások nyíltláncú poliamino-polikarboxilát ligandumok ritkaföldfém(III)-ionokkal képzett komplexei szerkezeti, egyensúlyi és kinetikai sajátosságainak tanulmányozására. Az utóbbi években a vizsgált ligandumok köre kiterjedt a karboxilát helyett amidcsoportot tartalmazó származékokra is, melyek közül néhányat már rutinszerűen alkalmaznak a klinikai gyakorlatban. Ezek a vizsgálatok elsősorban a Gd^{3+} -komplexek MRI kontrasztanyagként való alkalmazhatóságának koordinációs kémiai problémáira vonatkoznak, de az esetleges gyakorlati alkalmazási lehetőségektől függetlenül is érdekesek, mivel a fémkomplexek koordinációs kémiai viselkedésére vonatkozóan új információkat kapunk. A munkám is ezen területhez kapcsolódik, melyen belül a DTPA-amid származék komplexek tulajdonságainak részletes vizsgálatát tűztük ki célul:

Tanulmányoztuk a GdDTPA-bisz- és $-$ trisz(amid) származék komplexek termodinamikai és kinetikai stabilitását, mivel ezek határozzák meg elsődlegesen az *in vivo* toxicitást. Kíváncsiak voltunk, hogy hogyan befolyásolja az amidcsoport szubsztituáltsági foka, az amidcsoporton található stabilis nitroxid szabadgyökök és a DTPA-trisz(amid) ligandumban lévő harmadik amidcsoport a termodinamikai és kinetikai stabilitáson túl a komplexek relaxációsebesség növelő hatását, ami az MRI kontrasztanyagok „hatékonyságát” jellemzi. Választ kívántunk kapni olyan koordinációs kémiai kérdésekre is, mint hogy hogyan változik meg a Gd^{3+} -komplexek vízcseresebessége az amidcsoport szubsztituáltsági fokának illetve a komplex töltésének függvényében, valamint oldatban milyen izomerjei léteznek a legegyszerűbb GdDTPA-bisz(amid) komplexnek.

II. Alkalmazott vizsgálati módszerek

Oldatszerkezeti vizsgálataink során egydimenziós ^1H , ^{13}C -NMR és kétdimenziós NMR spektroszkópiát alkalmaztunk. Az NMR spektrumok felvétele Bruker Avance 360 spektrométen történt. A spektrumok kiértékelését a Bruker Winnmr[®] szoftvercsomaggal végeztük.

Az egyensúlyi vizsgálatok során pH-potenciometriás titrálásokat végeztünk, Radiometer PHM 93 Reference pH-mérő, PHG 211 üveg- és K401 telített kalomel elektród, Radiometer ABU 80 autamata bűretta alkalmazásával. A titrálásokat inert atmoszféra alatt, állandó kevertetés és termosztálás ($25 \pm 0,2$ °C) mellett végeztük. A H^+ -ionok koncentrációját a leolvasott pH adatokból az Irving és munkatársai által javasolt módon állapítottuk meg. A protonálódási és a stabilitási állandókat a PSEQUAD program segítségével számítottuk.

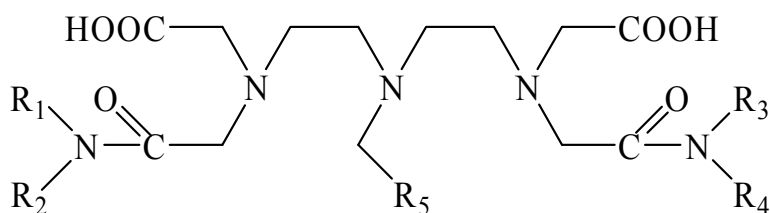
GdDTPA-bisz és -trisz(amid) komplexek **relaxivitása vizsgálatokor**, a vízprotonok longitudinális relaxációs idejét (T_1) MS-4 típusú NMR spektrométerrel (Josef Stephan Institut, Ljubljana) 9 MHz protonrezonancia frekvencián, mágneszettség inverzió módszerrel (inversion recovery) határoztuk meg.

A vízcseresebesség meghatározások során a különböző hőmérsékleten végzett ^{17}O -NMR mérések Bruker AM-400 (9,4 T, 54,2 MHz) spektrométeren történtek. A longitudinális relaxációs időket (T_1) mágneszettség inverzió módszerrel, míg a transzverzális relaxációs időket (T_2) Carr-Purcell-Meiboom-Gill-féle spin-echo technikával mértük. A változó nyomású méréseket (1-200 MPa) Bruker ARX-400 spektrométerrel végeztük, ahol a nagynyomású mérésre alkalmas mérőfejet folyadék termosztálással tartottuk állandó hőmérsékleten. Az ESR spektrumokat Bruker ESP 300E spektrométeren (9,425 GHz, 0,34 T) vettük fel az X-sávon. Az ESR jelek félértékszéleségét MATLAB programmal határoztuk meg. Az ^{17}O -NMR és ESR adatok illesztését a Scientist® program 2,0 verziójával végeztük.

A Gd^{3+} -DTPA-bisz- és -trisz(amid) származék komplexek **fémcsere kinetikájának** vizsgálatokor az Eu^{3+} vagy Cu^{2+} -ionokkal lejátszódó cserereakciókat spektrofotometrián követtük 250 vagy 300 nm-en Cary 1E spektrofotométerrel. A Lu^{3+} - és Zn^{2+} -ionokkal végmenő reakciókat longitudinális relaxációsebesség ($1/T_1$) mérésével vizsgáltuk, mivel sem a kiindulási anyagoknak, sem pedig a termékeknek nincs jól mérhető fényelnyelése a látható és UV-tartományban, viszont a kiindulási anyag (GdL) és a termék (Gd^{3+} .aq) relaxitásban jól mérhető különbség van.

III. A vizsgált ligandumok

A DTPA-bbBA és a DTPA-tra ligandumokat korábban még nem állították elő, míg a DTPA-bA és DTPA-bBA előállítását az irodalom alapján történt. A három vizsgált, stabilis nitroxid szabadgyököt tartalmazó ligandumot (DTPA-bNOPA, DTPA-bNOPMA, DTPA-bbNOPMA) Dr. Hideg Kálmán professzor, a Pécsi Egyetem Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetéből bocsátotta rendelkezésünkre.



R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	Ligandumok
H	H	H	H	COOH	H₃DTPA-bA
H	n-Bu	H	n-Bu	COOH	H₃DTPA-bBA
n-Bu	n-Bu	n-Bu	n-Bu	COOH	H₃DTPA-bbBA
n-Bu	n-Bu	n-Bu	n-Bu	CONH-Me	H₂DTPA-tra
H		H		COOH	H₃DTPA-bNOPA
H		H		COOH	H₃DTPA-bNOPMA
				COOH	H₃DTPA-bbNOPMA

[**H₃DTPA-bA**: DTPA-N,N''-bisz(amid), **H₃DTPA-bBA**: DTPA-N,N''-bisz(n-butilamid), **H₃DTPA-bbBA**: DTPA-N,N''-bisz[bisz(n-butilamid)], **H₂DTPA-tra**: DTPA-N,N''-bisz[bisz(n-butilamid)]-N'-metilamid, **H₃DTPA-bNOPA**: DTPA-N,N''-bisz(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-pirolidin)amid, **H₃DTPA-bNOPMA**: DTPA-N,N''-bisz(1-oxil-2,2,5,5-tetra-metil-3-pirolin-3-metilén)amid, **H₃DTPA-bbNOPMA**: DTPA-N,N''-bisz(bisz(1-oxil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirolin-3-metilén)amid)]

IV. Új tudományos eredmények

A munkám során DTPA-amid származék ligandumok lantanida(III), réz(II) és cink(II)-ionokkal képzett komplexeinek egyensúlyi, szerkezeti és kinetikai tulajdonságait vizsgáltam. Az elért új tudományos eredmények a következők:

Az Y(DTPA-bA) komplex NMR spektroszkópiás szerkezetvizsgálata során, a komplex oldatában 323 K-en 4 diasztereomer párt lehet megkülönböztetni (anti, cisz, transz és szin), melyek közelítőleg azonos mennyiségben vannak jelen.

A DTPA-bisz(amid) ligandumoknál az amidcsoport szubsztituensei számának növelésével (DTPA-bA, DTPA-bBA, DTPA-bbBA) jelentősen nő a Gd^{3+} -komplexek stabilitási állandója, hasonló a helyzet a szabadgyököt tartalmazó ligandumok esetében is (DTPA-bNOPA, DTPA-bNOPMA és DTPA-bbNOPMA), mivel a diszubsztituált ligandumok összázicitása ($\sum \log K_i^H$) nagyobb, mint a nem- vagy monoszubsztituált ligandumoké.

Hasonló tendencia figyelhető meg a Cu^{2+} és Zn^{2+} -komplexek esetében, amikor az amid szubsztituensek számának növekedésével szintén nő a komplexek stabilitási állandója. A Cu^{2+} - és Zn^{2+} -komplexek egyensúlyi vizsgálata során meghatároztuk a korábban nem ismert kétmagvú komplexek stabilitási állandóit is.

A DTPA harmadik karboxilát csoportjának amidcsoportra történő cseréje tovább csökkenti az amin nitrogének bázicitását, így a DTPA-bbBA ligandum komplexeihez képest, a DTPA-*tra* Gd^{3+} -mal, Cu^{2+} -vel és Zu^{2+} -vel képzett komplexei kisebb stabilitási állandókkal rendelkeznek.

A DTPA-bBA és DTPA-bbBA ligandumok szelektivitása fiziológias körülmények között Gd^{3+} -ra nézve, Cu^{2+} és Zn^{2+} -ionokkal szemben nagyobb, ill. a DTPA-*tra* ligandumra lényegesen nagyobb, mint a DTPA esetén. Azaz a Gd^{3+} -komplexeik az egyensúlyi adatok alapján biztonságosan alkalmazhatók lennének *in vivo* körülmények között, hasonlóan a GdDTPA-bisz(metilamid), (Gd(DTPA-BMA)) komplexhez, mely már a gyakorlatban is használt MRI kontrasztanyag.

A $Gd(DTPA-bNOPA)$, $Gd(DTPA-bNOPMA)$ és $Gd(DTPA-bbNOPMA)$ komplexek relaxivitása valamivel nagyobb mint a $Gd(DTPA-BMA)$ -é, amit a nitroxid

szabadgyökök GdDTPA-bisz(amid) komplexekhez történő hozzákapcsolódása eredményez. Ez a növekedés csekély mértékű, mert a szabadgyökök és a Gd^{3+} -ion párosítatlan elektronjai között a kölcsönhatás elhanyagolható, mivel a szabadgyökök nem koordinálódnak a Gd^{3+} -ion belső koordinációs szférájához.

A vizsgált komplexek relaxivitásának hőmérséklet függése alapján a $\text{Gd}(\text{DTPA-bA})$, $\text{Gd}(\text{DTPA-bBA})$, $\text{Gd}(\text{DTPA-bbBA})$ és $\text{Gd}(\text{DTPA-tra})^+$ komplexek vízcseresebessége némileg nagyobb, mint a nitroxid szabadgyököt tartalmazó komplexek vízcseréje.

A DTPA-bisz- és -trisz(amid) származékok Gd^{3+} -komplexei esetén a relaxitás értékek pH-függéséből megállapítható, hogy a komplexek és az oldószer víz között megvalósuló protoncserében elsődleges szerepet a komplexek belső koordinációs szférájában található vízmolekula protonjai játszanak.

A $\text{GdDTPA-bisz}(\text{amid})$ származékok esetén az amidcsoporton a hidrofób szubsztituensek (n-butil) számának növelésével valamelyest nő a relaxitás humán szérumban (HSA), ami a plazmafehérjével kialakuló gyenge kölcsönhatásra utal.

A $[\text{Gd}(\text{DTPA-bbBA})(\text{H}_2\text{O})]$ és a $[\text{Gd}(\text{DTPA-tra})(\text{H}_2\text{O})]^+$ vízcseresebességét jellemző állandók kisebbek, mint a $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ komplex esetében. Ennek okát a kötött víz helyén bekövetkező negatív töltés és a szterikus zsúfoltság csökkenésével magyarázhatjuk. A $[\text{Gd}(\text{DTPA-tra})(\text{H}_2\text{O})]^+$ komplex esetén a harmadik amidcsoport bevitele tovább csökkenti a vízcseresebességet. A vízcserét jellemző aktiválási térfogat értékek tisztán disszociatív vízcseré mechanizmusra utalnak a $[\text{Gd}(\text{DTPA-bbBA})(\text{H}_2\text{O})]$, és disszociatív interchange mechanizmusra a $[\text{Gd}(\text{DTPA-tra})(\text{H}_2\text{O})]^+$ esetén.

A fémcseré reakciók kinetikai vizsgálatának eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy mivel az amidcsoportok nem protonálódnak, továbbá csak gyenge kölcsönhatásba lépnek a támadó fémionokkal (Ln^{3+} , Cu^{2+} vagy Zn^{2+}), ezért a komplex reaktivitását lényegesen csökkentik, azaz az amidcsoportok számának növelése a kinetikai stabilitást növeli, melyhez azonban a harmadik amidcsoport bevitele már lényegesen nem járul hozzá. Az amidcsoportok kinetikai stabilitásnövelő hatását tovább lehet jelentősen fokozni az amidhidrogének nagy térkitöltésű csoportra történő cseréjével, melyek szterikusan gátolják a fémcseré reakciók gyors lejátszódását (fiziológias körülmények között is).

V. Az eredmények várható gyakorlati alkalmazása

Vizsgálataink eredményei elsősorban a fémkomplexek koordinációs kémiai viselkedésére vonatkoznak és alap kutatás jellegűek, de az MRI kontrasztanyagok fejlesztése, *in vivo* viselkedésük, elsősorban disszociációjuk becslése szempontjából is érdekesek, hasznosak.

A kinetikai vizsgálatok eredményei alapján azt állapíthattuk meg, hogy különösen a diszubsztituált amidcsoportot tartalmazó Gd^{3+} -DTPA-bisz- és -tris(amid) komplexek fémcsere reakciói lassabban folynak le, mint a hasonló donoratomokat tartalmazó és a klinikai gyakorlatban már rutinszerűen alkalmazott, Gd^{3+} -komplexek reakciói. Továbbá a stabilitási állandók értékeiből következő, a Gd^{3+} -ionra vonatkozó nagy szelektivitások is azt mutatják, hogy különösen a $Gd(DTPA-bbBA)$, $Gd(DTPA-tra)^+$ és a $Gd(DTPA-bbNOPMA)$ komplexek koordinációs kémiai tulajdonságaik alapján alkalmasak lehetnek MRI kontrasztanyagként történő felhasználásra vagy előnyös tulajdonságaikat kihasználva más orvosi vagy biológiai *in vivo* alkalmazások molekuláinak építőköveiként használhatók. (Publikált és konferenciákon bemutatott eredményeinket figyelembe véve az egyik amerikai fejlesztő cég az orvosi terápiában használt ^{90}Y komplexbe vitelére alkalmas DTPA-bbBA típusú ligandumok előállítását már meg is kezdte.)

VI. Tudományos közlemények

VI.1. Az értekezés témájához kapcsolódó publikációk

Közlemények:

3. Z. Jászberényi, I. Bányai, E. Brücher, K. Hideg, T. Kálai and R. Király, *Equilibrium and NMR spectroscopic studies on the gadolinium(III), copper(II) and zinc(II) complexes formed with the DTPA-N,N''-bis(amide), -bis(butylamide) and -bis(bis-butylamide) ligands. Kinetic stabilities of the gadolinium(III) complexes*

Közlésre összeállítva

2. Z. Jászberényi, É. Tóth, T. Kálai, R. Király, L. Burai, E. Brücher, A. E. Merbach and K. Hideg; *Synthesis and complexation properties of DTPA-N,N'-bis[bis(butyl)]-N'-methyl-tris(amide). Kinetic stability and water exchange of its Gd³⁺ complex*
Dalton Transactions, 2005, 694 – 701
1. Z. Jászberényi, E. Brücher, J. Jekő¹, K. Hideg, T. Kálai, R. Király; *Synthesis, equilibrium and kinetic properties of the Gd³⁺ complexes of three DTPA-bis(amide) derivatives containing stable nitroxide free radical substituents*
European Journal of Inorganic Chemistry, 2003, 3601-3608.

Konferenciaanyagok:

6. E. Brücher, R. Király, Z. Jászberényi and L. Sarka: *Substituent effects on the thermodynamic and kinetic stabilities of the complexes of Gd³⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ formed with DTPA-mono(amide), -bis(amide) and -tris(amide) derivative ligands* (Előadás).
5th International Conference on f-elements, Genf, 2003. augusztus 24-29.
5. Jászberényi Z., Brücher E., Király R., Hideg K., Kálai T.: *DTPA-bisz(amid) és -trisz(amid) származék ligandumok gadolínium(III), réz(II) és cink(II) komplexeinek egyensúlyi és kinetikai sajátossága* (Előadás). XXXVIII. Komplexkémiai Kollokvium, Gyula, 2003. május 21-23.
4. E. Brücher, Z. Jászberényi, R. Király and L. Sarka: *Equilibrium and kinetic parameters for the prediction of in vivo stability of Gadolinium(III) complexes formed with DTPA derivative ligands.* (Előadás) 10. International Conference on Bioinorganic Chemistry, Firenze, 2001. aug. 26-31.

3. Jászberényi Z., Brücher E., Hideg K., Kálai T., Király R. és Sár P. C.: *Néhány DTPA-bisz(amid) származék Gd^{3+} -komplexének egyensúlyi és kinetikai sajátosságai* (Előadás). XXXVI. Komplexkémiai Kollokvium, Pécs, 2001. május 23-25.
2. Z. Jászberényi, E. Brücher, R. Király, K. Hideg, T. Kálai, C. P. Sár: *Equilibrium and kinetic properties of the Gd^{3+} -complexes formed with some DTPA-bis(amide) derivative ligands* (Poszter). Cost D8 Final Workshop, Dublin, 2001. március 29-31.
1. Z. Jászberényi, E. Brücher, R. Király, K. Hideg, T. Kálai, C. P. Sár: *Equilibrium and kinetic properties of the Gd^{3+} -complexes formed with some spin labeled DTPA-bis(amide) derivatives* (Előadás). Cost D8/D18 European Workshop, Prága, 2000. szept. 14-17.

VI.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk

Konferenciaanyagok:

2. Z. Jászberényi, A. Sour, R. Ruloff, É. Tóth, A. E. Merbach: *Optimization of the water exchange rate on DOTA- and DTPA-type $Gd(III)$ complexes* (Poszter). Fall meeting of the Swiss Chemical Society, Zürich, 2004. október 7.
1. Z. Jászberényi, A. Sour, R. Ruloff, É. Tóth, A. E. Merbach: *Effect of steric crowding on the physico-chemical properties of $Gd(III)$ chelates* (Poszter). COST D18 Annual Workshop (“Lanthanide Chemistry for Diagnosis and Therapy”), A Coruña, 2004. szeptember 23-25.