

Rákellenes gallium(III)komplexek oldategyensúlyi jellemzése és szérumfehérjékkel való kölcsönhatásuk vizsgálata

DÖMÖTÖR Orsolya,^a BALI Krisztina,^a HETÉNYI Anasztázia,^b és ENYEDY Éva Anna^{a,c,*}

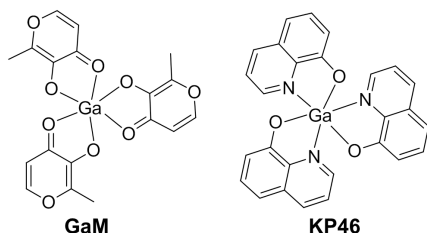
^aSzegedi Tudományegyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Dóm tér 7., 6720, Szeged, Magyarország

^bSzegedi Tudományegyetem, Orvosi Vegytani Intézet, Dóm tér 8., 6720, Szeged, Magyarország

^cSzegedi Tudományegyetem, MTA Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport, Dóm tér 7., 6720, Szeged, Magyarország

1. Bevezetés

A rákellenes terápiában már évtizedek óta az egyik leggyakrabban alkalmazott szer a *ciszplatin*. Mindezek ellenére a klinikai felhasználhatóságát erősen behatárolják a kezeléskor fellépő súlyos mellékhatások, valamint a vele szemben fennálló, vagy a kezelések során kialakuló rezisztencia.¹ A gallium(III)ion a platina után másodikként került felhasználásra a klinikumban. Diagnosztikai leképezésre használnak ⁶⁷Ga és ⁶⁸Ga izotópokat. Maga a Ga(NO₃)₃ is rendelkezik rákellenes hatással főként limfómás, ill. leukémiás esetekben, ugyanakkor rákos megbetegedéseket kísérő hiperkalcémia kezelésében is alkalmazzák (citráttal stabilizálva: GaniteTM).² A Ga(NO₃)₃ farmakokinetikája azonban kedvezőtlen, mert a só hidrolizál és a képződő hidroxido komplexek gyorsan kiürülnek a szervezetből. Gyors infúzióban adva a só vesekárosító volt, lassú infúzióban látóideg károkat okozott.² A legoptimálisabb a tartósan alacsony Ga(III) koncentráció fenntartása lenne a vérplazmában, ezt pedig alkalmas komplexekkel lehet biztosítani. Az oktaéderez *trisz*-ligandumú Ga(III)-komplexek ígéretes csoportját képezik ezen vegyületeknek; ilyen komplexek a *trisz*(3-hidroxi-2-metil-4H-pirán-4-onáto)Ga(III) (GaM) és a *trisz*(8-kinolinoláto)Ga(III) (KP46). Az előbbi és az utóbbi fémkomplex ligandumait a továbbiakban maltoként és oxinként fogjuk említeni.



1. Ábra. A két fémkomplex képlete.

A két fémkomplex jelenleg klinikai fázis I/II tesztelés alatt áll. Mindkét komplex szájon át adagolható, mérsékelt mellékhatásokkal rendelkezik, és nem mutatnak kereszt-rezisztenciát a Ga(NO₃)₃-tal.^{3,4} Feltételezett hatásmódjuk azon alapul, hogy a Ga(III) sok szempontból hasonlít a Fe(III)-ionra; például töltés, ionsugár, elektronegativitás és koordinációs kémiai sajátosságuk tekintetében, így képes elfoglalni a Fe(III) helyét számos fehérjében; ugyanakkor redoxi folyamatokban nem vesz részt, mert a Ga(III) fiziológiás körülmények között nem vegyértékváltó, ellenben a Fe(III/II) rendszerrel. Első számú támadáspontként a ribonukleotid redukált tartják számon, ami a DNS szintézisben játszik szerepet. Az enzim gátlása a sejtek

apoptózisához vezet.⁵ A fém(komplexek) szállítását irodalmi adatok szerint a vérben feltételezhetően a Fe(III) szállító transzferrin (Tf) végzi.^{6,7} A humán szérum albumin (HSA) szerepe ezek szerint igen csekély, ugyanakkor figyelembe kell venni az albumin nagy szérum koncentrációját, valamint kiemelkedő kapacitását különféle anyagok szállításában.

Mindkét fémkomplex klinikai tesztelése igen előre-haladott, ennek ellenére stabilitásukról, a vérplazmában feltételezhető formájukról, ill. a szérumalkotókkal kialakított esetleges kölcsönhatásokról kevés és hiányos információ található az irodalomban. Korábbi közleményünkben⁸ a két fémkomplex oldategyensúlyi viselkedését jellemeztük. Kutatásainkat folytatva vizsgáltuk a komplexek lehetséges kölcsönhatásait kis molekulatömegű vszérum alkotókkal, valamint HSA-nal és apo-transzferrinnel (apoTf). A vizsgálatokhoz pH-potenciometriát, UV-, fluoreszcencia-, valamint ¹H NMR spektroszkópiát és ultraszűrési technikát alkalmaztunk.

2. Eredmények és értékelésük

2.1. Oldategyensúlyi vizsgálatok

A komplexképzési folyamatok vizsgálata előtt a ligandumok protondiszociációs állandóit határoztuk meg pH-potenciometriás módszerrel (1. Táblázat). A maltol egyetlen deprotonálódási folyamattal jellemezhető, ami a hidroxilcsoporthoz köthető folyamat. Az oxin kisebb pK_a-ja feltehetőleg a kinolin NH⁺ deprotonálódásához tartozik, míg a pK₂ a fenolos OH-hoz köthető. Az értékek jó egyezést mutattak az UV fotometriás mérésekkel és irodalmi adatokkal.^{9,10}

A Ga(III) és a maltol közti komplexképzési folyamatokat elsősorban pH-potenciometrián követtük, a meghatározott komplex stabilitási szorzatokat (lgβ) az 1. táblázat tartalmazza. Mindez jó egyezést mutat a spektrofotometriás mérések eredményeivel. A pH 2-11,5 tartományban [GaL]²⁺, [GaL₂]⁺, valamint [GaL₃] sztöchiometriájú komplexek képződése figyelhető meg vizes oldatban. Ezt az ¹H NMR spektrumokon külön megjelenő jelek is igazolták. Az állandók segítségével számolt koncentrációeloszlási görbék alapján 7,4-es pH-n mM-os koncentrációtartományban a semleges töltésű [GaL₃] forma az uralkodó részecske (95%) vizes oldatban.

Az oxin és a Ga(III) komplexképződési folyamatainak tanulmányozása tisztán vizes oldatban a pH-metriához

* Tel.: +36 62/544 334; fax: +36 62/433 053; e-mail: enyedy@chem.u-szeged.hu

szükséges mM-os koncentrációtartományban nem volt lehetséges, mivel a képződő $[\text{GaL}_3]$ komplex vízdoldhatósága igen rossz. Ezért 30, ill. 60% (m/m) DMSO/víz közegben határoztuk meg pH-potenciometriásan a stabilitási állandókat. A méréseket az oxin egy származékával a szulfoxinnal (8-kinolinol-5-szulfonát) is elvégeztük. A két ligandum komplexképzési sajátosságai igen hasonlóak, viszont a szulfoxin komplexek vízdoldhatósága jóval nagyobb, ezért itt tisztán vizes közegben is lehetséges volt a stabilitási szorzatok meghatározása. A különböző közegben meghatározott állandók lineáris összefüggést mutattak az oldószer(elegyek) relatív permittivitásának reciprokával, így az oxin Ga(III) komplexek stabilitási állandóit a DMSO tartalmú mérések, valamint a szulfoxinra számolt értékek meredeksége alapján extrapoláltuk. Az így számolt állandók viszonylag jó egyezést mutattak a fotometriásan (nagy úthossz mellett) meghatározott állandókkal (1. táblázat).

1. Táblázat. A ligandumok savi disszociációs állandói ($\text{p}K$), valamint Ga(III)-ionnal képzett komplexek stabilitási szorzatai ($\text{lg}\beta$) pH-potenciometriás és más technikákkal meghatározva ($t = 25,0^\circ\text{C}$, $I = 0,2\text{ M KCl}$)^a

	Oxin	Maltol
$\text{p}K_1$	4,99	8,45
$\text{p}K_2$	9,51(1)	-
$\text{lg}\beta[\text{GaL}]^{2+}$	13,13 ^b	10,63 ^b
	13,09 ^c	
$\text{lg}\beta[\text{GaL}_2]^+$	25,54 ^d	21,07
	25,76 ^c	
$\text{lg}\beta[\text{GaL}_3]$	36,79 ^d	28,77
	36,64 ^c	

^a A 8. hivatkozásból vett értékek.

^b UV spektroszkópia, egyedi minták (pH 1-2).

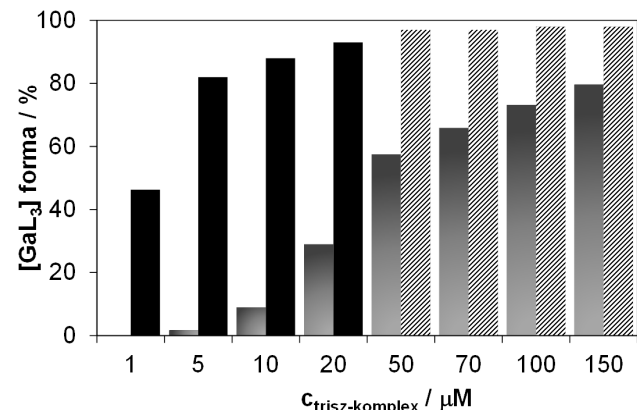
^c Extrapolált adatok a 30 és 60% (m/m) DMSO/H₂O mérések $\text{lg}\beta$ értékei alapján.

^d Fluorimetriás titrálások (pH > 2).

Az oxin esetében egy további módszer is kínálkozott komplex stabilitási állandók meghatározására tisztán vizes közegben, ugyanis az egyébként csak gyengén fluoreszkáló oxin fluorogén aktivitással rendelkezik, és Al(III) vagy Ga(III)-ionokhoz koordinálódva megsokszorozódik az emissziója. A fluorimetria jellemzően híg oldatokat (μM -os koncentrációk) igénylő technika, így alkalmas rossz oldhatóságú anyagok vizsgálatára. A fentieket kihasználva határoztunk meg stabilitási szorzatokat fluorimetriás módszerrel is. Az így kapott értékek összevethetőek az előbbi két technikával számoltakkal. Az oxin esetében is azt találtuk, hogy pH = 7,4-n a $[\text{GaL}_3]$ forma, tehát a KP46 komplex a szinte kizárólagosan jelenlévő részecske.

A két ligandum Ga(III)-kötő képességétől függ, hogy mennyire képesek megakadályozni a fémion hidrolizisét. Az oxinnal képzett triszkomplex stabilitási szorzata ~8 nagyságrenddel nagyobb, mint a maltol esetében. Ez azt vonja maga után, hogy igen híg – ugyanakkor fiziológiás szempontból releváns – koncentrációtartományban az oxin képes megakadályozni a komplex disszociációját, míg a maltol csak részben (2. ábra). Ennek következtében a két

komplex várható vérszérumbeli eloszlása eltérő, hiszen a KP46 komplex nagy stabilitása révén kevésbé képes ligandumcsere folyamatokban részt venni, mint a trisz-maltolato komplex.



2. Ábra. A Ga(III) maltollal (szürke oszlopok) és oxinnal (fekete oszlopok) képzett triszkomplexének stabilitása az analitikai komplex koncentráció függvényében 7,4-es pH-n. Az átlósan csíkozott oszlopok a komplex vízdoldhatatlan koncentrációtartományát jelölik. ($t = 25,0^\circ\text{C}$, $I = 0,20\text{ M (KCl)}$)

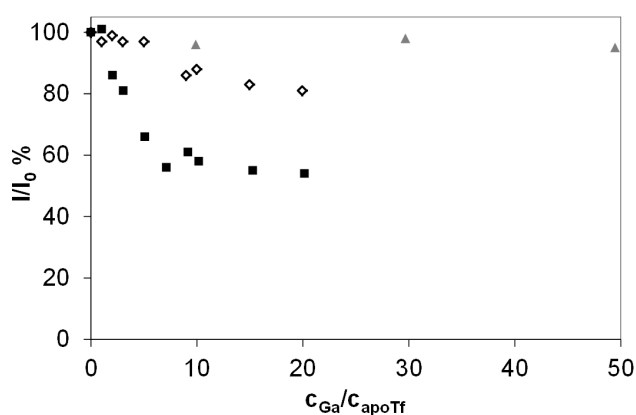
A KP46 intenzív fluoreszcens tulajdonságát kihasználva fluoreszcens mikroszkópos technikával sikerült a komplex sejtekbe jutását is követni. Az SW480 vastagbélrák sejteken végzett vizsgálatok tanúsága szerint a komplex több órán keresztül stabilis maradt sejtes környezetben. Az is megfigyelhető volt, hogy a komplex percek alatt felhalmozódott a sejtekben, majd idővel a sejtmag körüli lemezes képletekben, feltehetően az endoplazmás retikulumban, ill. annak fehérje összetevőiben dúsult fel.

2.1. Vizsgálatok vérszérum komponensekkel

Vizsgálatainkat a vérplazma alkotókkal való kölcsönhatások tanulmányozásával folytattuk fiziológiás pH-n. A kis molekulatömegű szérumkomponensek közül a citrát, az oxalát és a foszfát, mint lehetséges komplexképzők a vérben lévő koncentrációjuk mellett nem tudták kiszorítani sem a maltolt, sem az oxint a Ga(III) koordinációs szférájából ($c_{\text{KP46}} = 20\ \mu\text{M}$, $c_{\text{GaM}} = 80\ \mu\text{M}$).

A HSA 630 μM -os koncentrációjával a vérplazma fehérjetartalmának ~60%-át teszi ki. Számos vegyület típus (zsírsavak, szteroidok, gyógyszer hatóanyagok) nem specifikus megkötésére és szállítására alkalmas. Az exogén szerves anyagok megkötése elsősorban két hidrofób zsebben (I. és II. kötőhely) történhet. Mivel a HSA elsősorban a teljes fémkomplex (és nem a Ga(III)ion) megkötésére lehet alkalmas, ami a ligandumokkal való másodlagos kölcsönhatások kialakításán alapul, így kézenfekvő volt a ligandumok és a HSA kölcsönhatását is vizsgálni. Korábbi eredményünk alapján a maltol csak gyengén kötődik a HSA II-es kötőhelyén.¹¹ Az I-es kötőhelyen fluorimetriás vizsgálatok alapján nincs mérhető kölcsönhatás; ugyanez elmondható volt a GaM komplexről is. ¹H NMR-es kísérleteink és ultraszűrési méréseink is azt bizonyították, hogy a GaM komplex és a fehérje között nem alakul ki számottevő kölcsönhatás.

További kölcsönható partnerként az apoTf-t vizsgáltuk. Az egyébként két Fe(III) szállítására alkalmas fehérje képes megkötni a Ga(III)-iont is ($\lg K'_1 = 20,3$, $\lg K'_2 = 19,3$),¹² miközben a fém koordinációs szférája részben vagy egészben a fehérje donatoratomjaira cserélődik. A maltol kötődését a fehérjéhez előzetes vizsgálatok alapján kizártuk. A ¹H NMR mérések azt mutatták, hogy a komplexben kötött maltol jelei mellett a fehérje jelenlétében megjelenik a szabad, fémkomplexben nem kötött maltol is, amelynek mennyisége még nagyobb lesz, ha a kötődést elősegítő szinergista HCO₃⁻ is jelen van a rendszerben. A kölcsönhatás tényét UV fotometriás mérésekkel és fluorimetriásan is követtük. Az utóbbi technika azt használja ki, hogy a Tf vaskötő helyén két Tyr aminosav található, melyek 280 nm-en gerjesztve intenzíven emittálnak, a fémion bekötődésével ez az emisszió kioltódik.

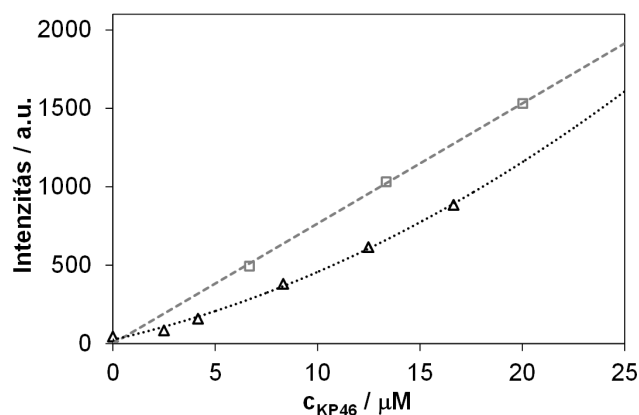


3. Ábra. Az apoTf fluoreszcens intenzitásának százalékos változása GaM (■), KP46 (◇), ill. GaCl₃ (▲) hozzáadásának hatására az apoTf saját intenzitásához (I_0) vonatkoztatva. ($\lambda_{\text{EX}} = 280$ nm; $\lambda_{\text{EM}} = 340$ nm; $c_{\text{apoTf}} = 0,2$ vagy 2 μM ; $c_{\text{komplex}} = 0,2-4$ μM vagy $c_{\text{GaCl}_3} = 20-100$ μM ; pH = 7,4 (HEPES); $t = 25,0$ °C)

A 3. ábrán jól látható a fehérje emissziójának csökkenése a növekvő GaM komplex koncentrációjának függvényében. A kísérletet GaCl₃-dal is elvégeztük, ahol azonban a termodinamikai alapon várt kvantitatív kötődés helyett nem tapasztaltunk kioltást, még több tízszeres fémfelesleg esetén sem. Feltehetőleg a fiziológiás körülmények közt GaCl₃-ból képződő Ga-hidroxido komplexek inertségének tudható be, hogy kioltást még 4 óra elteltével sem tapasztaltunk. A rendelkezésre álló termodinamikai állandók ismeretében a Ga(III) szérumbeli eloszlására próbáltunk következtetni figyelembe véve, hogy a maltoláto komplex nem kötődik a HSA-hoz, ill. hogy a Tf kötőhelyek a vérben átlagosan 31%-ban Fe(III)-ionnal telítettek. Azt találtuk, hogy a Ga(III) ~30 μM -os komplex koncentrációig szinte kizárólag a Tf-hez kötődik, majd az ettől nagyobb koncentrációk esetén megjelenik a disszociálatlan szabad komplex. Hidroxido komplexek nem képződnek a rendszerben.

A KP46 komplex sokkal stabilisabb, mint a GaM, ahogyan a 2. ábra is mutatja. Ennek megfelelően a koordinált oxin Tf donatoratomokra való cseréje is feltehetően kisebb mértékben játszódik le, mint a maltoláto komplex esetében (3. ábra). A Tyr kioltásos vizsgálatokon kívül itt lehetőség volt a fémkomplex saját emisszióján keresztül is követni a ligandumcsere folyamatokat. 367 nm-es gerjesztésnél az apoTf távollétében a komplex emissziós intenzitása lineárisan nő a komplex koncentrációjával (4. ábra). A

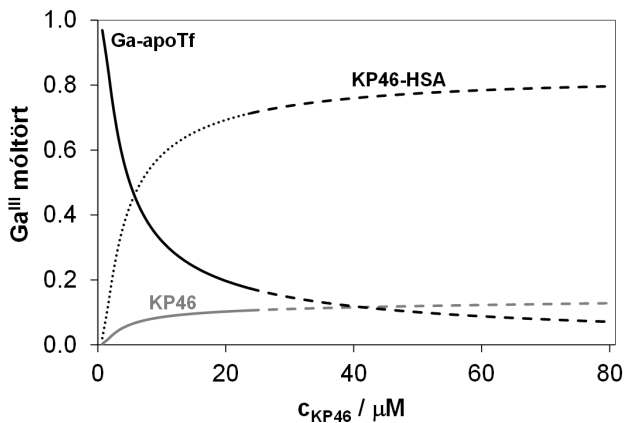
fehérje jelenlétében ez a növekedés az előbb említett kalibráció alatt fut, később pedig párhuzamossá válik vele. Ez azzal magyarázható, hogy a Tf megköti a Ga(III)-iont, a szabadon maradó oxin pedig gyengén emittál.



4. Ábra. Az apoTf-KP46 rendszer fluorimetriás emissziós intenzitásai: KP46 kalibrálás (□), apoTf+KP46 (Δ) ($\lambda_{\text{EX}} = 367$ nm; $\lambda_{\text{EM}} = 532$ nm; $c_{\text{apoTf}} = 25$ μM ; $c_{\text{KP46}} = 2,5-17$ μM ; pH = 7,4 (HEPES); $t = 25,0$ °C)

Ebből a feltételezésből kiindulva a mérési pontok alapján kiszámoltuk a Tf-hez kötött Ga mennyiségét, ez pedig igen jó egyezést mutatott a termodinamikai alapon vártakkal. Ezeket az eredményeket UV fotometriás és STD NMR mérésekkel is alátámasztottuk. Utóbbi módszerrel sikerült a ~10 μM -os koncentrációtartományban igazolni a szabad oxin megjelenését apoTf-t és KP46-ot tartalmazó mintákban. A megjelenő szabad ligandum mennyisége szintén nem mond ellent a modellszámításoknak. Ezek szerint [Ga₂-Tf] komplex alig, a [Ga-Tf] pedig kb. 30%-ban van jelen egy olyan rendszerben, amely fiziológiás mennyiségű apoTf-t és 20 μM KP46-ot tartalmaz.

A KP46 HSA-nal való kölcsönhatását már vizsgálták korábban is, de azt igen gyengének, – éppen ezért a Tf-hez hasonlítva – szinte elhanyagolhatónak találták.^{6,7} A HSA Tf-hez viszonyított közel hússzoros szérumbeli koncentráció többletét figyelembe véve azonban egy viszonylag gyenge kölcsönhatás is jelentősen befolyásolhatja a Ga(III) szérumbeli eloszlását. Vizsgálatainkat az oxin és a HSA kölcsönhatásának tanulmányozásával folytattuk. A fluorimetriás mérések és az UV fotometriás különbségspektrumok tanúsága szerint az oxin képes kötődni a fehérjéhez, az eredmények azonban nem voltak alkalmasak mennyiségi kiértékelésre. Az STD NMR mérések is az oxin kötődését mutatták a fehérjéhez. Ugyanezzel a technikával a KP46 komplex kötődése is követhető volt a HSA-hoz. Fluorimetriásan a KP46 saját emisszióját követve azt tapasztaltuk, hogy komplex rögzített koncentrációja mellett az egyre növekvő HSA mennyiségével az intenzitás nem additív módon növekszik, a görbe telítési jellegű. Ezekből a mérésekből egy közepes értékű ($\lg K' = 4,04$) látszólagos kötési állandót számoltunk. A megfelelő állandók ismeretében modelleztük a Ga(III) eloszlását fiziológiás HSA és Tf koncentrációk mellett (5. ábra). Látható, hogy a HSA-hoz való kötődés KP46 komplexként igen jelentős, 20 μM -os komplex koncentrációnál a Ga(III) 65%-a található ilyen formában, míg 20-25% Tf-hez kötődik. A fennmaradó mennyiség pedig szabad KP46-ként található a rendszerben.



5. Ábra. A KP46 komplex koncentrációeloszlási görbéi fiziológias pH-n 37 μM -os apoTf, 630 μM -os HSA és a komplex változó analitikai koncentrációja mellett

3. Összefoglalás

Vizsgálataink révén bizonyítottuk, hogy fiziológias pH-n a mM-os koncentrációtartományban mindkét ligandummal a $[\text{GaL}_3]$ összetételű komplexek az uralkodó részecskék. Az oxin esetében ez a tendencia még 10 μM -os komplex koncentrációnál is érvényesül, míg a maltol esetében ugyanilyen koncentrációban már a Ga(III) 90%-ban hidroxido komplexeket képez. A KP46 esetében sikerült követni a komplex sejtekbe jutását és az endoplazmás retikulumban való felhalmozódását. A vérszérum kis molekulatömegű alkotói közül a citrát, az oxalát és a foszfát nem képes kiszorítani a maltolt vagy az oxint Ga(III)-komplexéből. A GaM komplex és a HSA között nem volt mérhető kölcsönhatás, az apoTf-hez viszont ligandumcsere révén kötődött a Ga(III), így a fémion felvétele a sejtbe Tf receptorokon keresztül valósulhat meg. A KP46 szintén ligandumcsere folytán lép reakcióba az apoTf-nel, a kötődés mértéke megfelel a termodinamikai alapon vártaknak. Mérsékelt kötődést találtunk a KP46 és a HSA között, ami a fehérje szérumbeli nagy részarányát figyelembe véve nem elhanyagolható, itt a Tf-független sejtekbe való felvétel lehetősége is felvetődik.

4. Kísérleti rész

Az oldategyensúlyi vizsgálatok részletes kísérletes leírása a 8. hivatkozásban található meg. A vérszérum alkotókkal végzett vizsgálatok pH 7,4-n pufferelt közegben 20 mM HEPES (apoTf esetén további 25 mM szinergista NaHCO_3 hozzáadásával) 25 °C-on készültek.

A fehérjék emisszióján keresztül követett fluorimetriás vizsgálatok (Hitachi F4500 fluoriméter) 0,2-2 μM fehérjekoncentráció és 0-20 ekv. fémkomplex/ligandum összetétellel készültek. $\lambda_{\text{EX}} = 280 \text{ nm}$ (apoTf, Tyr); $\lambda_{\text{EX}} = 295 \text{ nm}$ (HSA, Trp), $\lambda_{\text{EM}} = 290\text{-}400 \text{ nm}$ résszélesség: 5 nm/5 nm. A KP46 oldaláról vizsgálva a komplex koncentráció 0-30 μM , a fehérje koncentráció pedig 0-100 μM közt változott; $\lambda_{\text{EX}} = 367 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 450\text{-}650 \text{ nm}$, résszélesség: 10 nm/10 nm. A minták önabszorpcióját figyelembe vettük a kiértékelés során. Kvantitatív kiértékeléshez a PSEQUAD programot¹³ használtuk, a számolás alapjául szolgáló összefüggések a 8. hivatkozás mellékletében található meg.

^1H NMR vizsgálatokhoz (Bruker Ultrashield 500 Plus készülék) 1 mM GaM és 0,5 mM fehérje tartalmú mintákat használtunk. Az STD NMR mérések (Bruker AV600 készülék, cryo probe) nagy scan szám mellett 20 μM KP46 vagy 60 μM oxin és 5 μM HSA vagy 20 μM apoTf jelenlétében készültek. Minden minta 10% D_2O -t tartalmazott.

UV fotometriás mérésekhez (Hewlett Packard 8452A diódasoros fotométer) 10 μM fehérje és 0-5 ekv. komplex tartalmú minták készültek 1 vagy 2 cm-es úthosszt használva. Ultraszűrős-UV méréseket 100 μM -os koncentrációtartományban végeztünk Microcon YM-10, Amicon, Millipore membránszűrőket használva.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak az alábbi támogatásokért: OTKA PD103905 és PD83600; A kutatás az EU és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával 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 működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg.

Hivatkozások

- Jung, Y.; Lippard, S.J. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1387–1407.
- Collery, P.; Keppler, B.K.; Madoulet, C.; Desoize, B. *Critic. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *42*, 283–296.
- Jakupec, M.A.; Keppler, B.K. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1575–1583.
- Jakupec, M.A.; Galanski, M.; Arion, V.B.; Hartinger, C.G.; Keppler, B.K. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2008**, 183–194.
- Narasimhan, J.; Antholine, W.E.; Chitambar, C.R. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 2403–2408.
- Groessl, M.; Bytzek, A.; Hartinger, C.G. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 2720–2727.
- Bernstein, L.R. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 665–682.
- Enyedy, É.A.; Dömötör, O.; Varga, E.; Kiss, T.; Trondl, R.; Hartinger, C.G.; Keppler, B.K. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *117*, 189–197.
- Enyedy, É.A.; Horváth, L.; Gajda-Schrantz, K.; Galbács, G.; Kiss, T. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1936–1945.
- Tsakovski, S.; Benkhedda, K.; Ivanova, E.; Adams, F.C. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *453*, 143–154.
- Enyedy, É.A.; Horváth, L.; Hetényi, A.; Tuccinardi, T.; Hartinger, C.G.; Keppler, B.K.; Kiss, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4202–4210.
- Harris, W.R.; Pecoraro, V.L. *Biochem.* **1983**, *22*, 292–299.
- Zékány, L.; Nagypál, I. *Computational Methods for the Determination of Stability Constants*; Leggett, D.L., Ed.; Plenum Press: New York, **1985**; pp 291–353.

Solution studies of antitumor gallium(III) complexes and their interactions with human serum proteins

Platinum complexes are used in therapy but serious side effects and resistance of tumors led to extensive investigation of non-platinum antitumor agents.¹ Gallium was the second metal ion after platinum to be administered to cancer patients in various clinical trials. Remarkably, the simple salt $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ exerts antineoplastic activity in particular against lymphoma and bladder cancer and showed therapeutic effect in the treatment of cancer

related hypercalcemia (Ganite™ in clinical use).² However, the bioavailability of Ga(NO₃)₃ as an anticancer drug is restricted by formation of hydroxido complexes. Six-coordinated tris-ligand Ga(III) complexes are a promising group of compounds. Tris(3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-onato)Ga(III) (GaM) and tris(8-hydroxyquinolinato)Ga(III) (KP46) are the most promising Ga-anticancer complexes undergoing clinical trials. The mode of action of Ga(III) anticancer drugs is probably related to the similarity of Ga(III) to Fe(III) in terms of charge, ionic radius, electronegativity, electron affinity and coordination geometry. At the same time Ga(III) is redox inactive in physiological conditions, hence it can interfere with the cellular iron metabolism but cannot participate in biologically important redox processes. According to literature data Ga(III) is able to bind to the iron sites of transferrin (Tf), which promotes the cellular absorption of Ga(III), in particular in proliferating cancer cells with elevated iron demand.^{6,7} The role of human serum albumin (HSA) supposed to be negligible, although it has to be considered the high amount and extraordinary binding capacity of HSA in blood plasma. Our investigations are focused on the solution equilibrium behavior of these complexes and on their interaction with serum components such as HSA and Tf. These studies were carried out using pH-potentiometry, UV spectrophotometry, ¹H-NMR spectroscopy, spectrofluorometry and ultrafiltration-UV techniques.

The proton dissociation constants of 3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-on (maltol) and 8-hydroxyquinoline (oxine) ligands were determined by pH-potentiometry and UV spectrophotometry (Table 1). Complex formation between Ga(III) and maltol was followed mainly by pH-potentiometry in pure aqueous phase. Calculated stability constants (logβ; see Table 1.) are in good agreement with UV spectrophotometric results. In the pH range 2-11.5 the formation of [GaL]²⁺, [GaL₂]⁺ and [GaL₃] complexes can be observed. It is noteworthy that in millimolar concentration range the tris-ligand complex predominates at physiological pH (95%).

The low aqueous solubility of the neutral [Ga(III)(oxine)₃] complex hindered the application of pH-potentiometry for stability constant determination in water; therefore complexation was studied by pH-potentiometry in 30% and 60% (w/w) DMSO/H₂O solvent mixtures. Additionally, the complex formation of the reference compound 8-hydroxyquinoline-5-sulfonate (sulfoxine) was studied under the same conditions and in water as well, due to its much better water solubility. The fluorogenic property of oxine allowed us to determine stability constants in pure aqueous phase in highly diluted solution, since coordination to Ga(III) enhances fluorescence intensity. These values are in a good agreement with the extrapolated values. In case of oxine we have found that at pH 7.4 [GaL₃] (i.e. KP46) is the predominant form in aqueous solution.

The ability of the ligands to prevent the metal ion from hydrolysis depends on their Ga(III) binding ability. KP46 possess ca. 8 orders of magnitude higher stability constant than GaM; therefore it is able to preserve its original composition without appreciable dissociation at very low (but physiological relevant) concentrations (Figure 2). Accordingly, different biodistribution and ligand exchange processes are presumable.

Our research included also the investigation of the possible interactions with low and high molecular mass (LMM and HMM) components of blood serum. The most feasible LMM competitors like phosphate, oxalate and citrate are not able to displace coordinated oxine or maltol from its tris-complexes under physiological concentrations ($c_{\text{KP46}} = 20 \mu\text{M}$, $c_{\text{GaM}} = 80 \mu\text{M}$)

Since HSA is the main binding protein (630 μM) for many endogenous and exogenous substances in blood serum it is worth examining the binding ability of both complexes to this protein. Previous results denoted that interaction of HSA with maltol alone is not significant.¹¹ The same results were found in case of GaM using ¹H-NMR, ultrafiltration-UV and spectrofluorometric techniques. It is well known, that Tf is able to bind and transport Ga(III). ¹H-NMR measurements showed the appearance of the free maltol besides the bound ligand to Ga(III) in the presence of apoTf. Spectrofluorometric quenching study could confirm the presumed ligand exchange process (Figure 3.). Quenching experiment was achieved also with simple GaCl₃ salt, although no quenching effect was presented. The most probable reason is the formation of kinetically inert Ga-hydroxido complexes at physiological pH. Using thermodynamic stability constants model calculations were performed. Considering that GaM does not bind to HSA and 31% of Tf is saturated by Fe(III) in human blood, it was found that up to 30 μM complex concentration Ga is bound almost exclusively to Tf, at higher concentrations the free GaM complex is presented too and no hydroxido species appears.

Complex stability of KP46 is much higher compared to GaM; therefore ligand exchange processes expected to be less extended. This tendency can be observed by the quenching studies (Figure 3). The intense fluorescence of KP46 allowed us to follow the interaction with Tf at the excitation of 367 nm. In presence of Tf the measured intensities fall below the calibration points of KP46, that can be explained by the binding of Ga(III) to Tf while remaining oxine ligand is weakly fluorescent (Figure 4.). UV photometry and STD NMR results can confirm this phenomenon. Interaction with HSA was investigated by the same techniques. Binding of oxine alone was proved, however no quantitative data evaluation was possible. Fluorescence experiments followed via the emission of KP46 showed saturation like shape when KP46 concentration was kept constant. From this type of measurements a moderately strong conditional binding constant (logK[?] = 4.04) could be calculated. Model calculations using physiological HSA and Tf concentrations show that binding of KP46 to HSA is an important issue in its biodistribution.

Our results show that Ga(III) forms [ML₃] complexes with both ligands at physiological pH in the millimolar concentration range. In case of KP46 this tendency is retained in 10 μM concentration as well, however GaM complex is dissociated in 90%. We have found that low molecular mass serum compounds such as oxalate, phosphate or citrate cannot compete with the original ligands for the Ga(III) at pH 7.4. GaM complex shows no interaction with HSA, at the same time it can interact with Tf via ligand exchange processes. KP46 can interact with Tf in the same manner and can bind to HSA with moderate affinity. The later interaction should be taken into account considering the high amount of HSA in the blood serum. The possible transport by HSA suggests that Tf-independent Ga(III) uptake in cells can be a feasible alternative.