

NHC-átmenetifém-komplexek szintézise biológiai vizsgálatokra

TDK dolgozat

Fekecs Fanni

Témavezető:

Szlávik Márton

Dr. Paczal Attila

Belső konzulens:

Dr. Novák Zoltán



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest
Természettudományi Kar, Kémiai Intézet
Szerves Kémia Tanszék
2022

Lezárva: 2023. január 11.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
2. Felhasznált rövidítések.....	5
3. Irodalmi áttekintés.....	6
3.1. A karbének általános jellemzése.....	6
3.2. A karbének történelmi háttere	6
3.3. Az NHC-k általános tulajdonságai	7
3.4. Az NHC-k szerkezeti sajátosságai és stabilitása	8
3.5. Az NHC-k koordinációs tulajdonságai.....	9
3.6. NHC-k alkalmazási területei	10
3.7. Az NHC komplexek általános biológiai tulajdonságai és alkalmazásuk	11
3.7.1. Ezüst-komplexek.....	11
3.7.2. Arany-komplexek	12
3.8. Fém-NHC komplexek az onkológiában	13
3.8.1. Ciszplatin, oxaliplatin és karboplatin.....	13
3.8.2. Ezüst-NHC komplexek	15
3.8.3. Arany-NHC komplexek	15
3.8.4. Platina-NHC komplexek	16
3.8.5. Réz-NHC komplexek.....	16
3.9. A kemoterápia és a gyógyszerrezisztencia	18
3.9.1. Kemoterápia	18
3.9.2. A rezisztencia lehetséges útvonalai	19
3.9.3. Rezisztencia legyőzése.....	19
4. Célkitűzés	21
5. Saját kutatási eredmények	22
5.1. Módszerek	22
5.1.1. Sejtvonalak.....	22
5.2. A fém-NHC komplexek előállítása	23
5.2.1. Vázak előállítása	23
5.2.2. Réz-NHC komplexek előállítása.....	24
5.2.3. Ezüst-NHC komplexek előállítása	25
5.2.4. Arany-NHC komplexek előállítása	26

5.2.5. Platina-NHC komplexek előállítására.....	27
5.3. A biológiai adatok értékelése	28
6. Összefoglalás.....	38
7. Kitekintés	40
8. Köszönetnyilvánítás	41
9. Kísérleti eredmények.....	42
9.1. Általános információk	42
9.2. Általános eljárás az ezüst-NHC komplexek előállítására.....	43
9.2.1. [1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)imidazol-2-ilidin]-kloro-ezüst (49)	43
9.2.2. [1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)imidazol-2-ilidin]-kloro-ezüst (50)	43
9.3. Általános eljárás a platina-NHC komplexek előállítására	43
9.3.1. bisz[1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)imidazol-2-ilidin]-dikloro-platina (56)	44
9.3.2. bisz[1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)imidazol-2-ilidin]-dikloro-platina (57)	44
9.4. Általános eljárás a réz-komplexek előállítására ^[36]	44
9.4.1. [(4S)-4-terc-butyl-3-(2,6-diizopropilfenil)-1-[(1S)-1-feniletil]imidazolidin-2-ilidin]- réz-klorid (39)	45
9.4.2. [(4S)-4-terc-butyl-3-(2,6-diizopropilfenil)-1-[(1R)-1-feniletil]imidazolidin-2-ilidin]- réz-klorid (40)	45
9.4.3. [(4S)-4-terc-butyl-3-(2,6-diizopropilfenil)-1-[(1S)-1-naftiletil]imidazolidin-2- ilidin]-réz-klorid (44)	45
9.4.4. [(4S)-4-terc-butyl-3-(2,6-diisopropilfenil)-1-[(1S)-1,2,2-trimetilpropil]imidazolidin- 2-il] réz-klorid (43)	46
9.4.5. [1,3-bisz(2,6-diisopropilfenil)imidazolidin-2-il] réz-klorid (41)	46
9.5. Általános eljárás az arany-NHC komplexek előállítására	46
9.5.1. [1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)imidazolidin-2-ilidin]-kloro-arany (55)	47
10. Irodalomjegyzék.....	48

1. Bevezetés

A laboratóriumi kutatómunkát 2021 őszén a Servier Kutatóintézetben kezdtem, ahol már több, mint egy évtizedes múltja van a Nukleofil Heterociklusos Karbén (NHC)-átmenetifém-komplexek előállításának és katalizátorként való felhasználásának. A kutatócsoport munkájának fókuszában a kiralitást hordozó NHC vázak szintézise, illetve az ezekkel katalizált aszimmetrikus reakciók állnak. Az irodalomban az NHC-átmenetifém-komplexek a katalitikus aktivitásuk mellett a biológiai aktivitásukról is ismertek, azonban a csoporthoz való csatlakozásomig az előállított komplexek biológiai hatásának vizsgálatával nem foglalkoztak. Éppen ezért a feladatom az volt, hogy a kutatásainkat ebbe az irányba is kiterjesszük. Az ELKH-TTK Gyógyszerrezisztencia Kutatócsoportjával együttműködve az NHC-átmenetifém-komplexek citotoxikus hatását vizsgáltuk különböző rákos sejtvonalakon és az eredmények alapján újabb NHC komplexeket állítottunk elő. Elsődleges célunk az volt, hogy feltérképezzük a témában rejlő lehetőségeket és a kapott eredmények fényében újabb komplexeket tervezzünk.

2. Felhasznált rövidítések

ABCB1 - ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1

CTX – kemoterápia

DACH – diamino-ciklohexán-platina család

DCM – diklórmétán

DNS – dezoxiribonukleinsav

Dx5 - Doxorubicin szelektált sejtvonalvonal

GC – gázkromatográfia

HPLC – magas nyomású folyadékkromatográfia

IPr – 1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)-4,5-dihidroimidazol-2-ilidin, telítetlen gyűrű

MDR transzporter – multidrog-transzporter

MeOH – metanol

NHC – nukleofil heterociklusos karbén

NMR – mágneses magrezonancia spektroszkópia

P-gp – P-glikoprotein

SIPr – 1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)imidazol-2-ilidin, telített gyűrű

VRK – vékonyréteg-kromatográfia

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A karbének általános jellemzése

Témavezetőm, Paczal Attila 2008-ban megvédett doktori munkájában részletesen számol be a karbénokról.^[1] Karbének azok az elektromos szempontból semleges szerves molekulák, melyek egy – a külső vegyértékhéján hat elektront hordozó – elektronhiányos szénatomot tartalmaznak. A legegyszerűbb a metilénkarbén (1), illetve a kloroformból generált diklórbkarbén (2).



1. ábra: A legegyszerűbb karbének

A karbének stabilitását két fő tényező határozza meg. A karbén szénatomhoz kapcsolódó szubsztituensek elektronikus hatása (*termodinamikai stabilizáció*), valamint a karbén szénatomhoz kapcsolódó szubsztituensek szterikus tulajdonságai (*kinetikai stabilizáció*).

3.2. A karbének történelmi háttere

A karbének az 1800-as évek végén kerültek a köztudatba, mint rövid élettartamú instabil köztitermékek. Felfedezésüket nagy érdeklődés kísérte, melynek köszönhetően számos kutatás irányult alaposabb megismerésükre. Ezen a területen az első jelentős kutatásokat *Curtius*^[2] és *Staudinger*^[3] végezte az 1880-as években, azonban az analitikai módszerek fejletlensége miatt az áttörés még az 1950-es évekig váratott magára. Első szintetikus alkalmazásuk *Doering* és *Hoffmann*^[4] nevéhez fűződik, akik először használtak diklórbkarbént olefinaddícióban. A következő jelentős lépés az 1960-as években történt, amikor *Fischer* és *Maasböl*^[5] rávilágított a karbének kiváló komplexképző képességére. Ekkor állították elő az első átmentifém-karbén komplexet, amelyek a szabad karbénéknél már jóval stabilabbnak bizonyultak. Az általuk előállított karbének sajátossága, hogy egy elektrofil karbén szenet hordoznak. Az ilyen karbénéket, felfedezőjük után *Fischer*-karbénéknak nevezzük. Ez a felfedezés ismét nagy lendületet adott a karbének kutatásának, *Wanzlick* és *Schönherr*^[6], valamint *Öfele*^[7], egymástól függetlenül számoltak be, N-heterociklusos karbénéket tartalmazó fém-komplexeiről 1968-

ban. A karbének egy új családjáról *Schrock*^[8] számolt be 1974-ben, melyek *Schrock*-karbén néven váltak ismertté a köz tudatban. A különbség a *Fischer*-karbénekkel szemben abban mutatkozott meg, hogy a *Schrock*-karbénekben a karbén szén nukleofil jelleggel rendelkezik. Az eddig említett vegyületeknek azonban volt egy lényeges közös pontja, hogy kizárólag komplexek formájában voltak stabilak, ami nagy mértékben megnehezítette a kutatók munkáját. Az első stabil szabad karbének felfedezésére hosszú ideig várni kellett. 1988-ban *Bertrand*^[9] és munkatársai elsőként állítottak elő foszfinozilil-karbént (3), amely még a desztilláció során alkalmazott magas hőmérsékleten (80-85°C/10⁻² Torr) is stabilnak bizonyult, azonban nem mutatott koordinációs készséget fémekkel. Az igazán nagy áttörést ezen a téren *Arduengo*^[10] és munkatársai érték el 1991-ben, ugyanis ők számoltak be elsőként stabil karbénokról. Az *Arduengo*^[10] által 1991-ben – a megfelelő imidazólium sóból – izolált heterociklusos karbén (4) sokoldalú koordinációs tulajdonságokkal rendelkezik. Magas olvadáspontú (240-241°C) fehér kristályos anyag, amely inert körülmények között stabil, átkristályosítással tisztítható.



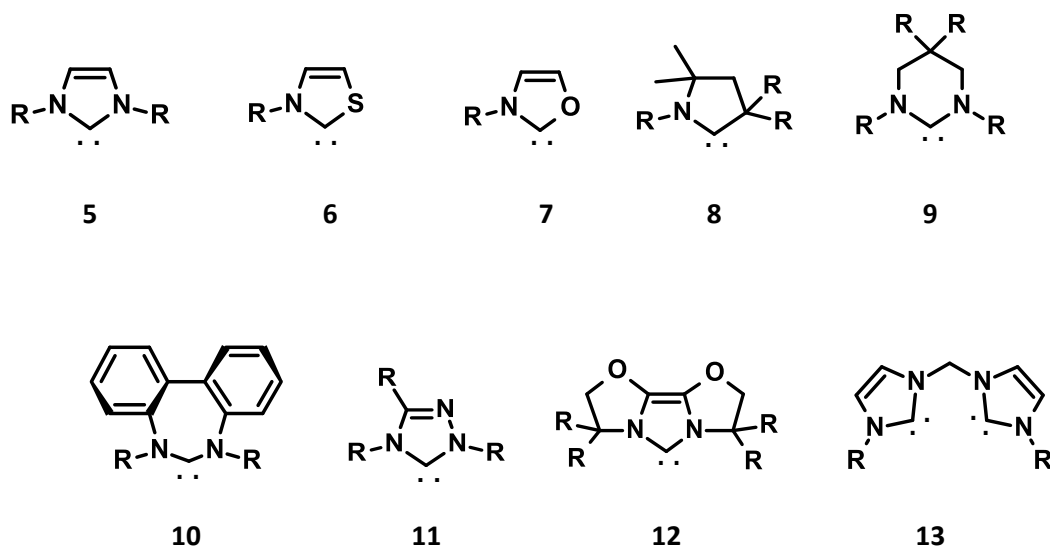
2. ábra: Elsőként izolált stabil karbének

A felfedezés a karbén kémia újjáéledését eredményezte, mivel bebizonyosodott, hogy a karbének nemcsak rövid élettartamú intermediereként jelennek meg a kémiai átalakulások során, hanem megfelelő körülmények között izolálhatók is.

3.3. Az NHC-k általános tulajdonságai

Az előző fejezetekben a karbénokról általánosságban esett szó, a továbbiakban csak az NHC-kkel foglalkozunk, mivel a kutatásunk során is ilyen vegyületeket vizsgáltunk. Az NHC-k olyan semleges, gyűrűs szerves vegyületek, amelyekben a gyűrűben legalább egy nitrogénatom és egy *Fischer* típusú karbén szénatom található. Ezért az általánosabb *Fischer*-karbének speciális alosztályának tekinthetők. Ezen feltételek mellett változatos karbéneket lehet előállítani, gyűrűtagszámtól, stabilizáló heteroatomoktól és szubsztituensektől függően.

Az NHC-k a foszfánok mellett a leggyakrabban alkalmazott ligandumok az átmenetifém katalízisben, valamint sok esetben kiválóan alkalmazhatóak organokatalizátorként is. Az első ilyen karbén *Arduengo* nevéhez köthető, az általa izolált adamantil-karbénnek (4) köszönhetően a karbén kémia rohamos fejlődésnek indult. Ezt követően sorra jelentek meg a változatosabbnál változatosabb szerkezetű és tulajdonságú karbének.^[11,12]



3. ábra: Néhány jellegzetes heterociklusos karbén (R = alkil, aril)

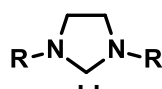
A 3. ábrán látható karbének közül az öttagú *N,N'*-diarilkarbének, illetve *Enders*^[13] triazol alapú karbénjei (11) a legelterjedtebbek az irodalomban. Széleskörű felhasználásukat a következő pozitív tulajdonságaiknak köszönhetik:

- relatív egyszerű előállíthatóság,
- széleskörű szerkezeti variálhatóság a nitrogénatomokon és a gyűrű 4-es és 5-ös helyzeteiben egyaránt,
- kiváló koordinációs készség,
- a nukleofil jellegből eredően organokatalizátorként való alkalmazhatóság.

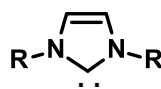
Ezen tulajdonságok részletesebb tárgyalására a következő fejezetekben kerül sor.

3.4. Az NHC-k szerkezeti sajátosságai és stabilitása

A számos előállított karbén közül, leggyakrabban az öttagú ciklusos diaminokarbéneket használják, melyeknek két fő típusát különböztetjük meg, a telített és telítetlent (4. ábra).



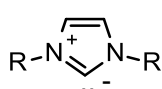
14



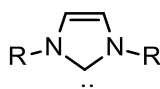
15

4. ábra: Telített és telítetlen diaminokarbén

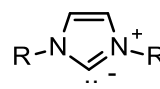
Az NHC-k lehetséges határszerkezetei közül az a leggyakoribb ábrázolási mód, melynél a töltés nélküli karbén szénatom egy nemkötő elektronpárt hordoz (17).^[14]



16



17



18

5. ábra: Az NHC-k határszerkezetei

3.5. Az NHC-k koordinációs tulajdonságai

Koordinációs szempontból sok hasonlóságot mutatnak a foszfán típusú ligandumokkal, melyek szintén erős σ -donor tulajdonsággal rendelkeznek. Lényeges különbség azonban, hogy a foszfánok esetében a ligandumok közvetlenül a foszforatomhoz kapcsolódnak, így lehetetlen a sztérikus és elektronikus hatások szétválasztása. Az NHC-k esetében a ligandumok nem közvetlenül a karbén szénhez kapcsolódnak, ezért az előbb említett hatások egymástól függetlenül befolyásolhatók. A fémekhez való koordinációjuk szempontjából egy másik lényeges különbség, hogy míg a foszforatomon elhelyezkedő szubsztituensek a fémtől „távolodva” helyezkednek el, addig az NHC-ligandum szubsztituensei zsebszerűen körülölelik a fémet, melynek révén könnyebben tudnak sztérikus hatást kifejteni a katalízis során.^[15] Szubsztituensek bevitele a heterociklus 4-es és 5-ös helyzetébe szintén egy lehetséges módja a ligandum természet megváltoztatásának, mivel egyrészt befolyással lehetnek az NHC-fém kötés erősségére, másrészt méretüktől függően hatással lehetnek a nitrogén szubsztituenseinek mozgásszabadságára.

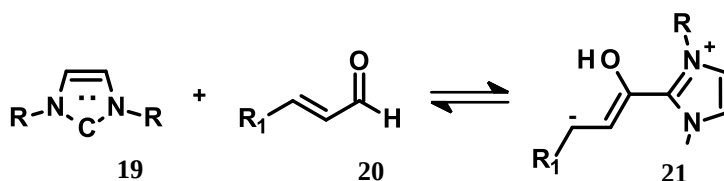


6. ábra: Foszfán-, illetve NHC-ligandumok szerkezete

3.6. NHC-k alkalmazási területei

Fontos, hogy szót ejtsünk az NHC-kről, mint katalizátorokról, mivel rendkívül széleskörű az alkalmazhatóságuk ezen a területen. Az olyan átalakulásokat, melyekben a katalizátor szerepét valamilyen szerves egység tölti be (ionos vagy semleges), *organokatalízisnek* nevezzük. Az első organokatalizált reakciót az 1880-as években végezték,^[2,16] ám a terület robbanásszerű fejlődése csak jóval később indult meg.

Az NHC-ket kiterjedten alkalmazzák szerves katalitikus átalakításokban, különösen kondenzációs reakciókban nukleofil természetük miatt, amely lehetővé teszi, hogy ezek az NHC-k különböző típusú elektrofilekkel reagáljanak. A leggyakrabban tanulmányozott kondenzációs reakciók NHC-vel a benzoin kondenzáció, a *Stetter*-reakció, valamint a homoenolátok felhasználásával végzett reakciók.^[17]

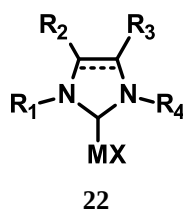


7. ábra: A homoenolátok szintézise.^[18]

A fém-NHC komplexek elsősorban a katalizátorként betöltött szerepük miatt váltak ismertté. Egy gyakori alkalmazás a ruténium alapú *Grubbs*-katalizátor az olefin metatézisben,^[18] illetve az NHC-palládium-komplexek használata keresztkapcsolási reakciókban.^[17] Természetesen a különböző fém-komplexek megjelenésével megkezdődött biológiai aktivitásuknak vizsgálata is. Napjainkban azonban már számos fém-komplexét vizsgálják különböző hatásterületeken. Talán ezek közül az onkológia területén elért eredmények a legfontosabbak.^[19]

3.7. Az NHC komplexek általános biológiai tulajdonságai és alkalmazásuk

Napjainkban az orvoslásban már számos fém-komplexet alkalmaznak, illetve intenzív kutatásuknak köszönhetően a szakirodalomban újabbnál újabb területeken ismerjük fel ezen átmenetifém-komplexek biológiai aktivitását.^[20] A legelterjedtebb komplex vegyületek (például a platina-komplexek: ciszplatin, $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{ONO}_2)_2$, $\text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH})\cdot\text{H}_2\text{O}$)^[21] közös tulajdonsága, hogy a ligandum és a fém között koordinatív kötés van, mely sok esetben a sejtben, vagy már a fiziológiás közegben felbomlik. Ezekkel a vegyületekkel szemben az NHC komplexeknek nagy előnye, hogy a váz kvázi kovalensen kötődik a fémhez, amely kiemelkedő stabilitást biztosít számukra. A karbén vázak másik nagy előnye a jó variálhatóságuk.



8. ábra: Karbén váz

A legelterjedtebb ötagú gyűrűs alapváz is igen nagy szabadsággal változtatható, ennek köszönhetően az irodalomban már számos változatosan szubsztituált komplex ismert és napról napra jelennek meg új komplexek.^[22] Emellett a karbének rendelkeznek még egy nagyon kedvező tulajdonsággal, hogy szinte az összes átmenetifémekkel képesek stabil komplexet képezni. Az irodalomban található számos, színesen szubsztituált váz mellett, találhatunk példát több átmeneti fémmel képzett komplexükre és a biológiai aktivitásukra. Azonban a következőkben, terjedelmi okokból csak az általunk vizsgált fémek irodalmát mutatjuk be röviden.

3.7.1. Ezüst-komplexek

Az ezüst-NHC komplexeket több, mint 100 éve használják orvosi alkalmazásra, többek közt sebkezelésre, antiszeptikumokként, illetve fertőzések kezelésére. Az már a 17-18. század óta ismert, hogy az ezüst-nitrát antimikrobiális hatással rendelkezik, viszont használata visszaszorult a penicillin és más antibiotikumok megjelenésével.^[23] Később az ezüst újra visszakerült a gyógyászatba az ezüst-szulfadiazin 1968-ban való felfedezésével.^[23] Az ezüst-szulfadiazin egy olyan antibiotikum, melyet harmad- és negyedfokú égési sérülések fertőzéseinek megelőzésére, illetve kezelésére használnak. Mivel az ezüstsók jó antimikrobiális

szerek voltak, továbbá alacsony toxicitást mutattak az emberre nézve, ezért jó alapot képeztek az NHC-kel való kutatásra. Eredményességük túlszárnyalta az ezüst antibiotikumokét. A vízben oldódó „pincer” Ag(I)-NHC komplex jobb antibakteriális aktivitást mutatott az ezüst-nitráthoz képest, így elsőként igazolta, hogy az NHC-k alkalmas ligandumok lehetnek az ezüst antibakteriális szerek számára. Alkalmazásukkor elemi ezüst és oldhatatlan ezüstsók (pl. AgCl) keletkeznek. Ezenkívül az ezüst disszociáció hatására imidazólium só keletkezik, ami akut toxicitást okoz. A stabilitásukat a kovalens jellegű Ag-C_(NHC) kötésüknek köszönhetik, mely hatására csökken az ezüst disszociáció, ezzel lehetővé téve az aktív ezüstionok hosszabb jelenlétét a szervezetben. Az antimikrobiális hatás az oldható ezüstionokból adódik. A kovalens jellegnek köszönhetően tehát jobb lesz a stabilitás, illetve jobb lesz az antimikrobiális aktivitás is. Az Ag-NHC komplexeket a megfelelő imidazólium sóból állítják elő Ag₂O/Ag₂CO₃/AgOAc segítségével.^[17] Az imidazólium sóknak szerkezettől függően moderált toxicitása van, alacsony a vízzoldhatóságuk, magasabb dózis mellett sem állapítottak meg káros hatást, illetve nem befolyásolják a DNS transzkripciót. A komplexeket nanoszálakba csomagolva növelni lehet a stabilitást és az aktivitást, ezért tervezik beépíteni őket biológiailag lebomló nanorészecskébe. A komplexek stabilitásának mértékét nagyban lehet növelni még az imidazolgyűrű 4-es, 5-ös pozíciójában elektronszívó csoportokkal.^[23-25]

3.7.2. Arany-komplexek

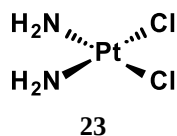
Az ezüst mellett az aranyat is régóta használják orvosi kezelésekre. Gyógyászati alkalmazása több ezeréves múltra tekint vissza. Az alkalmazások Kr.e. 2500-ra, a kínai orvosláshoz vezethetők vissza,^[26] emellett az arany központi szerepet játszott az alkímiában és a reneszánsz korszakban egyaránt. A 19. században vált ismertté a Na(AuCl₄), amit a szifilisz kezelésére használtak. 1890-ben a híres bakteriológus, *Robert Koch*^[23,27] első tudományos jelentései az arany komplexeinek terápiás alkalmazásáról leírják antibakteriális hatásukat. Felfedezte a K(Au[CN]₂)-t, amit a tuberkulózis elleni védelemre kívánt használni, ám ez az arany terápia 1920-ban elbukott, *in vivo* körülmények között nem volt hatékony az arany-cianid.^[27] Később az arany-komplexek utat találtak a jelenlegi gyógyszeriparba. 1985-ben felfedezték az auranofint, egy olyan arany tartalmú sót, amit a rheumatoid arthritis kezelésére használnak orálisan, *Ridaura* márkannévvel. Az arany tartalmú vegyületeket máig használja az orvostudomány, például a malária, a rák, vagy a HIV kezelésére. Az Au-NHC komplexeket már 1989 óta ismerik. Előállításukban fontos szerepet játszanak az Ag-NHC komplexek, ugyanis ezekből szintetizálják őket.^[25]

3.8. Fém-NHC komplexek az onkológiában

3.8.1. Ciszplatin, oxaliplatin és karboplatin

Mielőtt áttérünk az általunk is vizsgált fém-komplexek onkológiai jelentőségére, először szükséges bemutatnunk három gyakori rákellenes gyógyszert, melyekhez az általunk előállított molekulákra mért eredményeket hasonlítottuk.

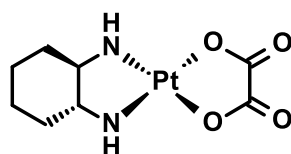
A ciszplatin (**23**) rákellenes hatását *Rosenberg* és munkatársai fedezték fel 1965-ben,^[19] mely később a platina citosztatikumok osztályának kialakulásához vezetett. 1971-től van klinikai használatban, azóta számos kemoterápiás rendszerben alkalmazták, és még a mai napig fontos szerepet játszik a daganatkezelésben (intravénás injekció formájában). A ciszplatin, illetve a Pt(II)-komplexek a DNS-hez kötődnek, ezáltal gátolják a sejtek osztódását, ami végül erős citotoxikus hatáshoz vezet. Az extracelluláris környezethez képest alacsonyabb intracelluláris kloridszint hatására a ciszplatin a sejtbe való bejutását követően pozitív töltésű akvakomplexeke képezve hidrolizál, amelyek a sejtmagba szállítódnak, ahol a DNS-hez kötődnek. A ciszplatin alapú platina-DNS adduktok többsége egyazon DNS-szálon két szomszédos guaninbázisnak a szálon belüli keresztkötéseiből áll. Ezzel a tulajdonsággal a platina-DNS adduktok jelentősen eltérnek az alkilezőszerektől, amelyek szálak közötti keresztkötéseket alakítanak ki a két ellentétes DNS-szál között. Magas klinikai hatékonyságuk ellenére a platina rákellenes gyógyszereknek súlyos hátrányai vannak, az erős toxikus mellékhatások és a gyógyszerrezisztencia kialakulása tekintetében. Annak ellenére, hogy a molekula szelektív a tumorsejtekre, terápiás ablaka szűk, így hiába fejt ki tumorelles hatást, az egészséges sejtek is sérülnek, gyakori mellékhatás a neurotoxicitás és a nefrotoxicitás. Sok esetben a kezelt személy élete során kialakul az úgynevezett másodlagos rák. Mindezek fényében láthatjuk, hogy igen nagy igény lenne további aktív molekulák előállítására, melyek szelektívebbek a rákos sejtekre.^[19,28]



9. ábra: Ciszplatin

A ciszplatinnak egyéb platina analógjai is klinikai használatban vannak, mint az oxali-, illetve karboplatin. Annak érdekében, hogy megoldják a ciszplatinra kialakuló rezisztencia problémáját, előállították a diamino-ciklohexán-platina családot (DACH), melybe az

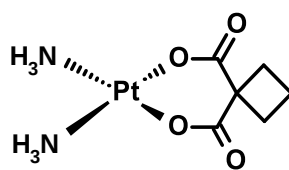
oxaliplatin (**24**) is tartozik. 1972-ben, Connors^[25] a ciszplatin amin gyökeket szubsztituálta DACH gyökkel, mely jó antitumor aktivitással eredményezett stabil komplexeket. A vízdoldhatóság javítása érdekében több DACH platina származékot állítottak elő, ezekben a klorid távozócsoportokat anionos távozócsoportokra cserélték le. Kidaninak sikerült^[25] elválasztani a *cisz* és a *transz* geometriai izomereket, ezt követően pedig a *transz* izomernek két további optikai izomerét, a *transz-L* és a *transz-D* izomert is sikerül előállítania. Ez a *transz-L* izomer, más néven az oxaliplatin, melyről kiderült, hogy aktív a ciszplatin rezisztens tumorokra.^[28]



24

10. ábra: Oxaliplatin

A karboplatin 1972-ben szabadalmaztatták és 1989-től van klinikai használatban. A molekula kétfogú dikarboxilátot tartalmaz a klorid ligandumok helyett. Használatának előnye, hogy a ciszplatinhoz képest csökkent a mellékhatások súlyossága, kisebb az esély a nefrotoxicitásra. Továbbá alacsonyabb reaktivitással rendelkezik, ami a korlátozott fehérje-karboplatin komplex kiválasztódását eredményezi, ezáltal több marad a szervezetben és így hosszabb ideig tartó hatás érhető el. Ez a számokban is megmutatkozik, ugyanis a karboplatin felezési ideje 30 óra, ehhez képest a ciszplatiné 1,5-3,6 óra.^[28]



25

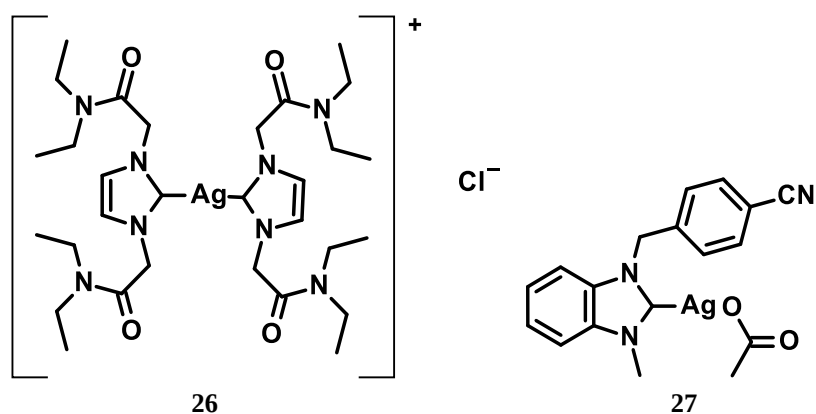
11. ábra: Karboplatin

Az ismertetett három molekula egyike sem a legoptimálisabb a rákos megbetegedések kezelésére, ezért a kevesebb mellékhatással és ígéretesebb rezisztenciaprofillal rendelkező fém-komplexek előállítására hatalmas igény mutatkozik.

A továbbiakban négy fém-NHC komplex onkológiai tulajdonságait szemléltetjük: az ezüst-, arany-, réz-, illetve platina-komplexeket, melyekre kutatásunkat alapoztuk.

3.8.2. Ezüst-NHC komplexek

Ígéretes antibakteriális tulajdonságaikon kívül az ezüst-NHC komplexek rákellenes gyógyszerként való potenciáljukat is bebizonyították. A komplexek számos rákos sejtvonalra toxikusnak bizonyultak, csökkentették a mitokondriális membránpotenciált és apoptózist indukáltak. A hidrofíl oldalláncokkal rendelkező bisz-NHC komplex (26) volt a legerősebb rákellenes hatású származék a rokon vegyületek sorozatából. Egy másik komplex (27) – melynél a benzimidazol vázhoz metil- és benzil-cianid-csoport, illetve a fém kapcsolódik, a fémhez pedig egy acetoxi-csoport – erős citotoxikus hatást váltott ki több rákos sejtvonalon, és nem mutatott keresztrezisztenciát a platina rákellenes gyógyszerekkel. Azonban annak ellenére, hogy megerősítették a DNS-hez való erős kötődését is, a daganatos egerekben nem volt megfigyelhető a tumor növekedésének gátlása. Ami a működést illeti, az ezüst-NHC komplexeknek jelenleg nincs tisztázott hatásmechanizmusa.^[19,25]



12. ábra: Példa az ezüst-NHC komplexekre

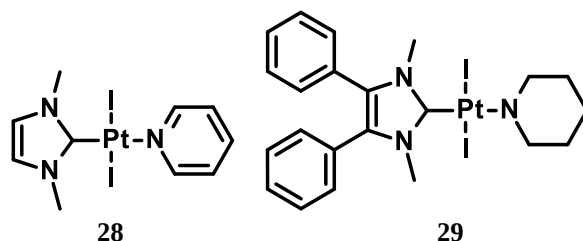
3.8.3. Arany-NHC komplexek

Számos arany-komplex esetében megfigyelték a tumorsejtek proliferációjának gátlását,^[19] illetve a rákos elváltozás kemoterápiás kezelése szempontjából releváns egyéb hatásokat. Ennek megfelelően manapság az arany-komplexeket is potenciális új rákellenes gyógyszerjelölteknek tekintik. Ezenkívül az arany I-es és III-as oxidációs állapotában stabilan koordinálható az NHC-ligandumokhoz, ami egy újabb okot ad az arany-NHC komplexek, mint rákellenes szerek vizsgálatára. Az irodalomban megjelentek olyan munkák, melyek rávilágítottak olyan kulcsfontosságú tulajdonságokra, mint a tioredoxin-reduktáz gátlása vagy a mitokondriális tulajdonságok megváltoztatása. Mechanizmusát tekintve, az arany-NHC komplexek, specifikusan a mitokondriumot célozzák, hogy sejthalált indukáljanak. Az Au(I)-NHC komplexek kémiai és biológiai tulajdonságai módosíthatóak a koordinált ligandum

változtatásával. A biodisztribúciós tanulmányok alapján a kationos komplexek magasabb intracelluláris arany koncentrációt eredményeznek, és az akkumuláció a mitokondriumban a legnagyobb. Ezért magasabb biológiai aktivitással rendelkeznek a sejtproliferáció gátlása, az apoptózis indukciója, illetve a tumorsejtekre gyakorolt általános hatást illetően.^[19,23,25]

3.8.4. Platina-NHC komplexek

A ciszplatin sikerességét követően az új platina-komplexek létrehozásának koncepcióját az NHC komplexekre is alkalmazták, kedvező kinetikai stabilitásuk és szerkezeti sokoldalúságuk miatt. A transzgeometriával rendelkező Pt(II) (NHC)PtI₂(amin)-komplexek^[19] hatékony rákellenes szerekeknek bizonyultak (13. ábra). Ezért kiterjesztették azokra az analógokra is, amelyek két *transz*-konfigurációjú Pt(II)-NHC központot tartalmaznak. Egy ilyen, lipofil oldalláncokat tartalmazó komplex hatékonyabb sejt akkumulációt mutatott, mint a ciszplatin. Azonban a platina DNS-hez való kötődése viszonylag lassú ütemben ment végbe, ami a *transz*-platina-komplexekre jellemző. Ezenkívül nem befolyásolta a sejtciklust, viszont apoptózist indukált. Az erősen lumineszcens Pt(II)-komplexek kétfogú NHC-ligandumokkal szelektíven lokalizálódtak az endoplazmatikus retikulumban, stresszt és apoptózist váltva ki a sejtekben, valamint fototoxikusak voltak. Ezeknek a komplexeknek sík koordinációs környezete van a platina(II) központban, és tartalmaznak egy kelátképző ligandumot, így hasznos vázakká téve őket a biológiai célpontokkal való nem kovalens jellegű kötési kölcsönhatásokhoz. Azokat a Pt(II)-NHC komplexeket, amelyek koordinált „spectator” ligandumaikban és összetöltésükben különböznek egymástól, citotoxicitásuk, DNS kölcsönhatásuk és egyéb biológiai hatásaik szempontjából vizsgálták. Az eredmények alapján azt találták, hogy a citotoxicitás fokozódik a platina központ térbeli árnyékolásának növekedésével.^[19]

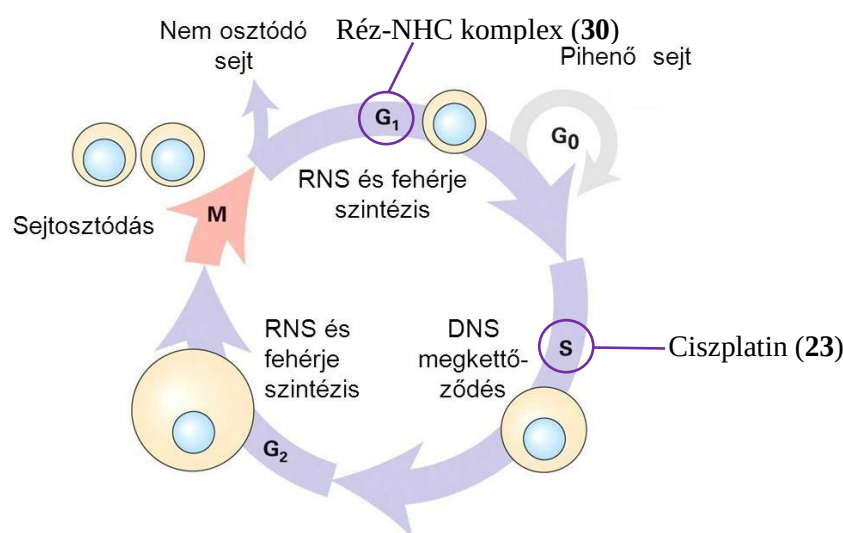


13. ábra: Transz geometriával rendelkező Pt(II) (NHC)PtI₂(amin)-komplexek^[19]

3.8.5. Réz-NHC komplexek

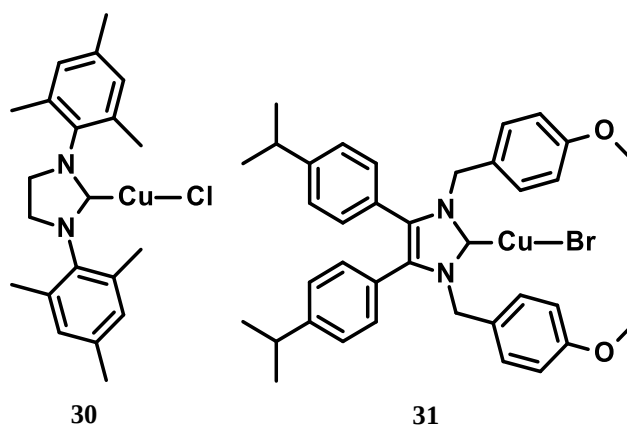
Annak ellenére, hogy a réz már régóta fontos szerepet tölt be a kémiában, a réz-NHC rendszerek csak az elmúlt 20 évben kerültek előállításra és kezdték őket használni a szerves

kémiai átalakításokban. Az első ilyen komplex *Arduengo* és munkatársai nevéhez fűződik, akik 1993-ban számoltak be az első réz-NHC rendszerről.^[29] Azóta a réz-NHC kémia folyamatosan bővül új komplexek szintézisével és különféle alkalmazások fejlesztésével. A réz-komplexek oxidatív és hidrolitikus módon is képesek DNS károsodást okozni, mely a legtöbb esetben *in vitro* szabályozható. A hatékonyságuk egyenesen arányosan nő a DNS-hez való kötődési affinitással. Hatásmechanizmusukat tekintve kémiai nukleázként viselkednek. Néhány komplex 360 nm-es hullámhosszal gerjesztve intenzív fluoreszcenciát mutat, így fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálva használhatóak az intracelluláris célpontok lokalizálására. Az adatok alátámasztották, hogy ami a halogént (mint ligandumot) illeti, nincs szignifikáns különbség a klorid és a bromid között, valamint a szerkezetileg leárnnyékolt komplexeken kívül az összesnek nagyobb volt a citotoxicitása a ciszplatinénál.



14. ábra: Illusztráció a sejtciklusról^[30]

Mérések alapján a Cu-komplex (30) több rákos sejtvonalon citotoxikusabb volt, mint a referencia ciszplatin és apoptózist indukált. A megfigyelt citotoxicitásért feltételezhetően egy DNS-szál szakadásához vezető aerob gyökfolyamat felelős, azonban a ciszplatinnal ellentétben a komplex leállítja a sejtciklus progresszióját már a G₁ fázisban (14. ábra). A rokon réz-NHC-bromid komplexek sora közül a Cu (31) volt a leginkább citotoxikus származék. További *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok azt mutatták, hogy aktív a különböző típusú daganatok széleskörű csoportja ellen, nanomoláris tartományba eső IC₅₀ értékekkel, és jó aktivitást mutat az egér xenograft modellben, tolerálható toxicitás mellett.^[19,25]



15. ábra: Példák réz-NHC komplexekre^[19]

3.9. A kemoterápia és a gyógyszerrezisztencia

A rákos megbetegedések ellen folytatott küzdelemben használt terápiákat sok tényező befolyásolja, ám mindegyiknek ugyanaz a célja, az összes rákos sejt elpusztítása az egészséges sejtek minimális károsodásával. Ez többféle terápiával is megvalósítható, a legtöbb esetben elsőként műtéthez fordulnak, feltéve, hogy a tumor mérete még nem túlzottan kiterjedt. További lehetőség a radioterápia vagy a gyógyszeres kezelés. Ezeket lehet egyedüli vagy kombinált, valamint szimultán vagy szekvenciális terápia formájában is alkalmazni.

3.9.1. Kemoterápia

Annak következtében, hogy a rákos és a normál sejteket ugyanazon folyamatok vezérlik, a gyógyszerek hatása nem kizárólagos a rákos sejtekre és ebből adódóan nem kívánt mellékhatásokat okoznak. A használatban lévő citotoxikus gyógyszerek, így csak rövid ideig történő használatra alkalmasak. A kezelhetőbb mellékhatások mellett (vérszegénység, sápadt bőr, hajhullás, rosszullétek, stb.) a kezelés ideje alatt, vagy jóval annak befejeztével végleges károsodás is kialakulhat a szervekben. Mindezek ellenére a kemoterápia (CTX) a leggyakoribb gyógyszeres kezelési forma az onkológiában.

A kemoterápia megfelelő kivitelezése igen összetett, mivel a tumorok nem egyenlő mértékben érzékenyek az alkalmazott gyógyszerekre. Vannak célpontok, amiket nehéz a citotoxikus gyógyszerekkel kezelni, és ha még az elején megfelelően reagált is, a legtöbb esetben az idő elteltével kevésbé reagál az adott beteg a kezelésre, így a tumor végeredményben visszanő. Ennek alapvetően két feltételezett oka lehet; az első, hogy a daganatsejtek eredendően rezisztensek lehetnek a gyógyszerre, valamilyen genetikai jellemző miatt, a második pedig, hogy a daganatsejtek a gyógyszerrel való érintkezést követően rezisztenciát szerezhetnek.^[31]

3.9.2. A rezisztencia lehetséges útvonalai

A leggyakoribb ok egy gyógyszer használatának félbeszakítására a gyógyszer rezisztencia kialakulása, ezért kiemelt figyelmet kell rá fordítani a potenciális gyógyszer-molekulák fejlesztése során. A kezelés során a rezisztencia kialakulhat genetikai elváltozások révén; a terápia által kiváltott mutációk következtében vagy a kezelés kezdetekor már kis számban jelen lévő rezisztens sejtek szelekciójával, esetleg a genetikai mutációktól független adaptív mechanizmusokon keresztül is. A következőkben a rezisztencia egy lehetséges útvonalát, a multidrogrezisztenciát vizsgáljuk.

A membránfehérjék egy csoportja citotoxikus molekulákat távolít el a sejtéből, hogy a xenobiotikumok intracelluláris koncentrációját az adott küszöb alatt tartsa, így megelőzve a sejtpusztító hatást. Ezek közül a legelterjedtebbek az ATP-függő multidrog (MDR)-transzporterek, melyek az ATP-kötő 'kazettás' (ABC) fehérjék szupercsaládjába tartoznak. Ezek a fehérjék számos farmakológiai vegyület felszívódását, eloszlását és kiválasztását modulálják. Az ABC fehérjéket 48 gén kódolja és 7 alosztályuk van ABCA-ABCG jelöléssel. A gyógyszerrezisztencia kialakulásában ezek közül az MDR-transzporterek, a B, C és G család tagjai, játszanak a legjelentősebb szerepet. Az MDR-transzportereknek széles és átfedő a szubsztrátspecifitásuk. Egészséges sejtek sejtmembránjában is jelen vannak, és fontos szerepet játszanak a sejtek xenobiotikumok elleni védelmében. Különösen nagy jelentőségük van a különböző szöveti határokon (pl. placenta, véragy-gát), de részt vesznek őssejtek védelmében és a máj méregtelenítő funkciójában is. Rákos sejtekben az expressziójuk sokszorosára emelkedhet, a transzporter gének kópia számának és/vagy expressziós szintjének megemelkedésén keresztül, így védve meg a sejteket a betegség kezelésre kifejlesztett gyógyszerek hatásától. Az MDR-transzporterek közül az MDR1 gén által kódolt ABCB1 (P-glikoprotein (P-gp) vagy MDR1) a legszéleskörűbben vizsgált transzporter. A P-gp nagy, hidrofób, semleges vagy gyengén pozitív töltésű vegyületeket transzportál, funkcióját „hidrofób porszívóként” írták le. Jelenléte a rákos sejteken kialakíthatja a drogrezisztenciát, ezért a citosztatikumok fejlesztésénél mindenképpen érdemes megvizsgálni, hogy a fejlesztendő molekula szubsztrátja-e ennek a transzporternek.^[31]

3.9.3. Rezisztencia legyőzése

A rezisztencia kialakulásának legyőzésére a leggyakoribb megoldás a gyógyszerek kombinálása a terápia során, melynek a következők az alapszabályai:

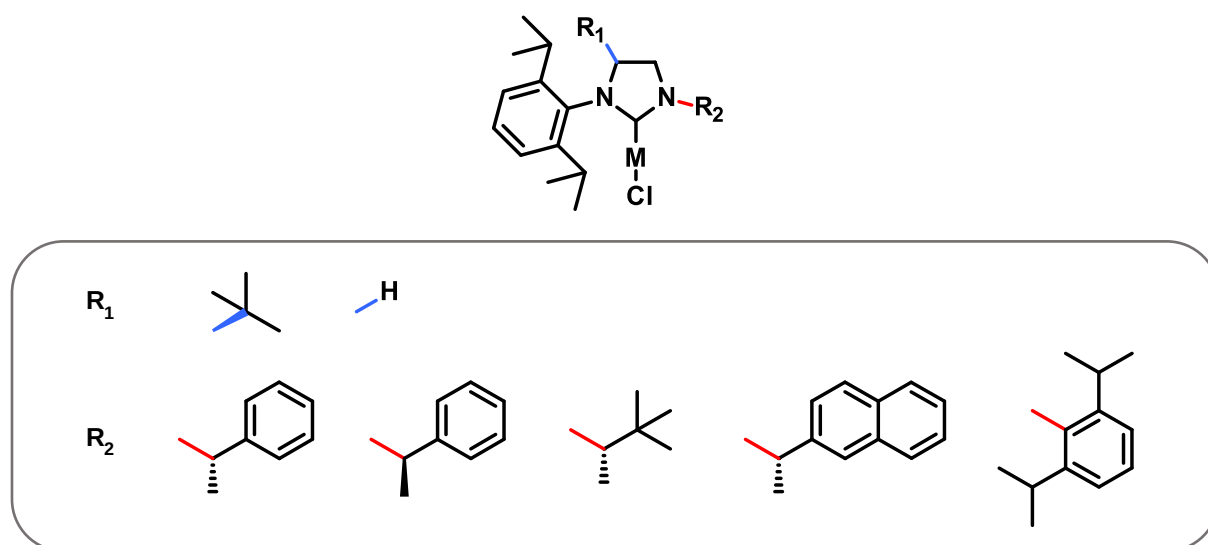
- Olyan gyógyszerek használata, amelyek önmagukban is aktívak a tumorra szemben.

- Különböző hatásmódokkal és hatáshelyekkel rendelkező gyógyszerek kombinálása, hogy ne csak additív, hanem komplementer vagy szinergikus hatást is kifejtsenek.
- Minimálisan átfedő toxicitás, ami lehetővé teszi az egyes hatóanyagok maximálisan hatásos dózisának beadását az egyes hatóanyagok optimális ütemezéséhez.
- A csontvelő helyreállításához szükséges lehető legrövidebb ciklusintervallumú gyógyszerek alkalmazása.

Összességében tehát láthatjuk, hogy a hatásos kemoterápia minden beteg esetében eltérő lehet. Néhány tumor rezisztens a legtöbb citotoxikus gyógyszerre, míg mások szenzitívek. Ezen tapasztalatok alapján igazán hasznos lehetne néhány olyan teszt vagy azon tényezők azonosítása, amelyek előre jelezhetik az esetleges rezisztencia kialakulását annak klinikai megnyilvánulása előtt.^[31]

4. Célkitűzés

Munkánkat tudományos együttműködés keretein belül végezzük az ELKH-TTK Gyógyszerrezisztencia Kutatócsoportjával, akiknek a szakterülete a különböző gyógyszerrezisztens rákos sejtvonalak és kifejezetten a ciszplatin rezisztens vonalak vizsgálata. Velük együtt célul tűztük ki, a kutatócsoportunk által kifejlesztett szintetikus úton előállított NHC-átmenetifém komplexek vizsgálatát különböző rezisztens sejtvonalakon, illetve ezek továbbfejlesztését a rezisztencia leküzdése érdekében.



16. ábra: Az előállított fém-NHC komplexek általános szerkezete

5. Saját kutatási eredmények

A korábban tárgyaltak alapján látjuk, hogy milyen fontos szerepet játszik a rezisztencia a rákos megbetegedések ellen kifejlesztett gyógyszerek szempontjából. Egyrészt ennek okán, másrészt, mivel az eddigiekben az irodalom főleg a gyógyszerjelöltek toxicitására fókuszált, azt gondoltuk, hogy az általunk előállított molekulák esetében érdemes lenne megvizsgálni a viselkedésüket rezisztens sejtvonalakon is. A ELKH-TTK-val való együttműködés keretén belül fém-NHC-eket állítottunk elő biológiai vizsgálatokra, melyeknek Dr. Szakács Gergely csoportja (Dr. Füredi András, Dr. Tóth Szilárd) megvizsgálta a citotoxicitását egy parentális MES-SA és két rezisztens sejtvonalon.

5.1. Módszerek

5.1.1. Sejtvonalak

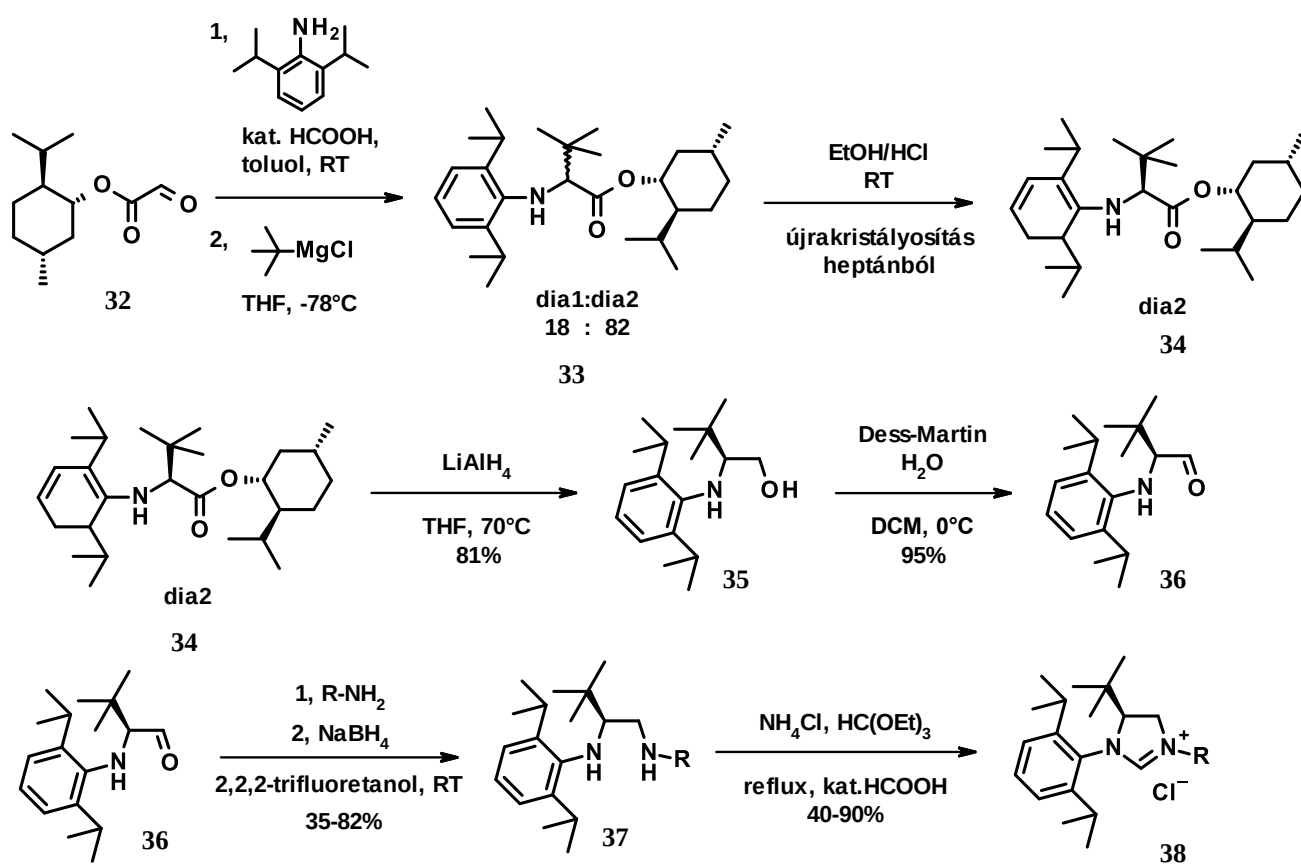
Az általunk előállított molekulák toxicitását, illetve rezisztenciáját tumoros és multidrogrezisztens sejtvonalakon vizsgálták együttműködő partnereink. Három sejtvonalon mértek; a kiindulási (parentális) MES-SA egy humán uterusz szarkoma sejtvonal, amely jelző fehérjeként egy mCherry (piros fluoreszcencia) fehérjét is tartalmaz, de nem multidrogrezisztens. A második a MES-SA-MDR1 multidrogrezisztens sejtvonal, amely az ABCB1 (MDR1) transzportert és az mOrange (narancssárga fluoreszcencia) jelző fehérjét túlexpresszálja. A harmadik pedig a Dx5 sejtvonal, amelyet az eredeti MES-SA vonal doxorubicinnel történt szelektálásból nyertek és az eGreen Fluoreszcens Proteint (zöld fluoreszcencia) fejezi ki. A Dx5 sejtvonal is jelöli az ABC1-es transzportert, de más rezisztencia mechanizmusok is megjelenhettek benne a doxorubicinnel történő szelekció során. Az együttműködő partnerünk kifejlesztett egy olyan automatizált rendszert, amelyben a legkülönbözőbb hatóanyagok vizsgálhatóak ezen sejtvonalak felhasználásával.^[32] A mérés technika egy fluoreszcens fehérjealapú assay-vel végezték, ami nem elterjedten használt, ezért a csoport tagjai PrestoBlue viability assay-vel validálták a mérést. A PrestoBlue reagens egy sejttápláló vegyületet tartalmaz, amely kék színű és gyakorlatilag nem fluoreszcens. Amikor a sejtekhez adják, a reagenst az életképes sejt redukáló környezete módosítja, melytől vörös színűvé és erősen fluoreszkálóvá válik. Az eredmények alapján a fluoreszcens fehérje alapú assay reprodukálhatónak és reprezentatívnak bizonyult.

5.2. A fém-NHC komplexek előállítása

A munkát a karbének prekursoraként szolgáló imidazolin vázak szintézisével kezdtük, melyekből később a komplexeinket állítottuk elő.

5.2.1. Vázak előállítása

A karbénprekursorok előállítására a kutatócsoportunk által kidolgozott szintetikus eljárást használtuk.^[28] Az eljárás egyedisége abban rejlik, hogy a nitrogénatomok szubsztituensei rendkívül sokoldalúan változtathatóak a szintézis során, illetve nagy tisztaságban előállíthatók a különböző karbénprekursorok.



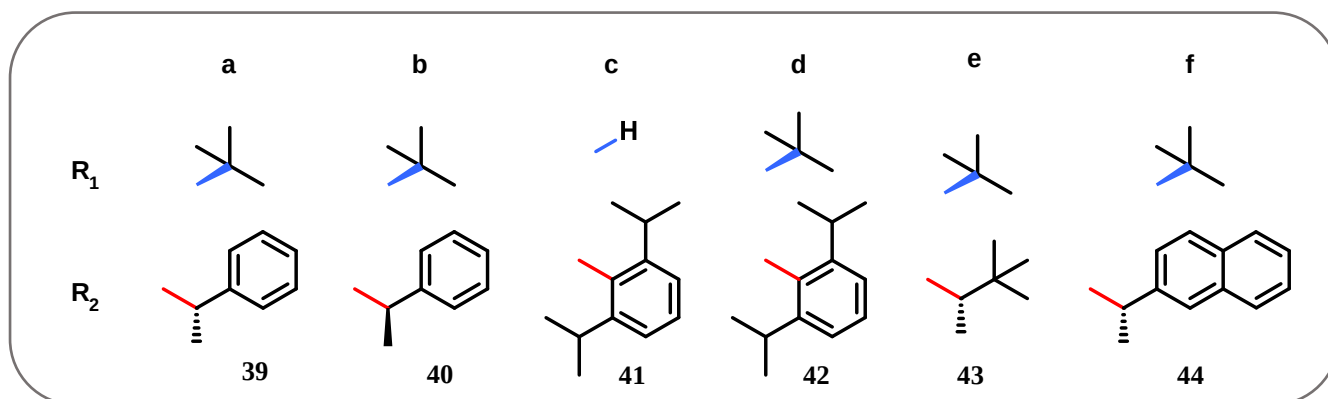
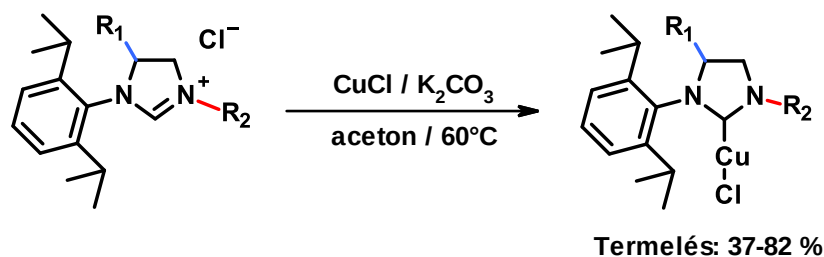
17. ábra: A prekursorok szintézise

A reakció első lépésében egy kondenzációs reakciót hajtunk végre, melynek terméke egy imin (33), amelyet azonnal tovább is alakítunk egy tercbutil Grignard–reagens addíciós reakciójában. Fontos megjegyezni, hogy abban az esetben, ha *L*-mentil-észtert használunk az első lépésben, az addíció során a diasztereomereink 18:82 arányban keletkeznek az *S* konfigurációjú tercbutil-csoporttal ellátott termék javára. Ezt követi egy sóképzés, amelyben előállítjuk a keletkező diasztereomerjeink hidroklorid sóját, majd az elegyből heptán

segítségével kikristályosítjuk a diasztereomer többletünket (**34**, termelés: 60%). Ezt követően egy lítium-alumínium-hidrides redukció következik, amelyben a kívánt alkoholunk (**35**) mellett mentol is keletkezik, amit vákuumdesztilláció segítségével távolítunk el a feldolgozott reakcióelegyből. A desztillációt követően a kívánt aminoalkoholt (**35**, termelés: 81%) nagy tisztaságban kapjuk meg. A következő lépés egy Dess–Martin reagenssel történő oxidáció, mely tisztítása igen egyszerű. A reakcióelegyhez hexánt adva kicsapjuk a Dess–Martin reagensből visszamaradt származékokat, így a bepárlást követően tisztán jutunk a termékhez (**36**, termelés: 95%). A reakciósorozat eddig a pontig minden váz esetében megegyezik, ezért a **36**-os aldehidet tekintjük a reakciónk kulcsintermedierének. Ezen a ponton dönthetjük el, hogy milyen oldalláncot szeretnénk a másik nitrogénatomra bevinni és ennek megfelelően ezzel azonos funkciós csoporttal rendelkező aminnal reagáltatjuk. Ez a lépés is, mint az első lépésben, újból egy kondenzációs reakcióval indul, azonban ebben az esetben a keletkező imint egy úgynevezett one-pot reakcióban, nátrium-borohidrid segítségével azonnal aminná redukáljuk (**37**, termelés: 57-69%). A keletkezett diamint (**37**) trietil-ortoformiáttal ammónium-klorid jelenlétében gyűrűbe zárjuk, mely reakció termékeként megkapjuk a karbénjeink prekursorait (**38**, termelés: 80-90%).

5.2.2. Réz-NHC komplexek előállítása

A réz-komplexeket a megfelelő imidazolin sóikból állítottuk elő, egy a Nolan^[33] és munkatársai által kidolgozott módszer szerint. Ezt a módszert eredetileg arany-NHC komplexek szintézisére alkalmazták, azonban a réz-NHC-k szintézise ezekkel analóg módon kivitelezhető volt. Egy klasszikus *in situ* karbén generáláson keresztül történik szervesetlen bázis jelenlétében, gázmentesített acetont használva oldószerként. A reakció kivitelezése inert körülményeket igényel, mivel a keletkező szabad karbén érzékeny a levegő oxigénjére és páratartalmára (18. ábra).



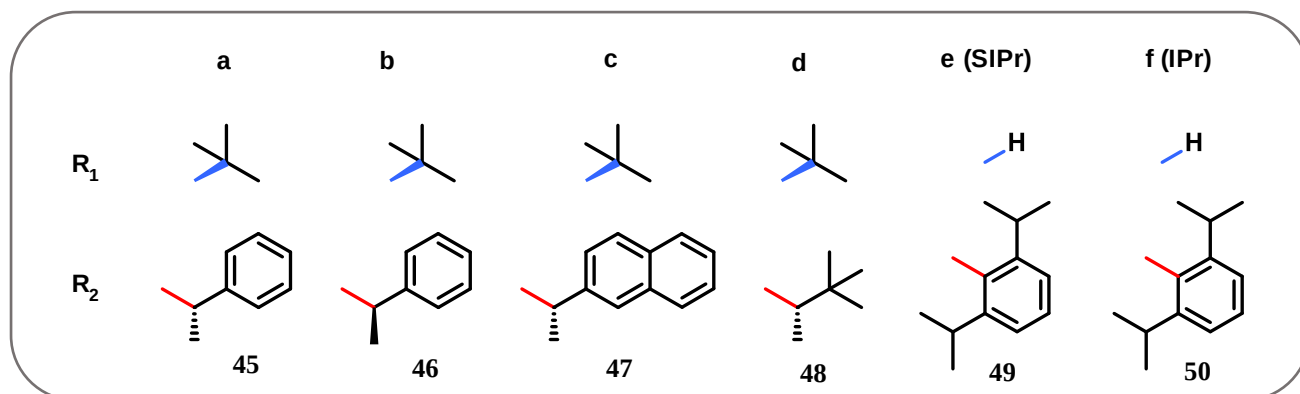
18. ábra: A réz-NHC komplexek előállítása

Egy *Schlenk*-edénybe bemértük az imidazolinium sót (**38**), a réz(I)-kloridot, illetve a kálium-karbonátot, majd vákuum és nitrogén áram váltogatásával inertté tettük. Ezt követően szeptumon keresztül hozzáadtuk az acetont, amelyből előtte intenzív kevertetés mellett csökkentett nyomáson eltávolítottuk az oldott oxigént. Az elegyet 60 °C-ra fűtöttük, és az imidazolidinium só reaktivitásától függően a teljes konverzió eléréséig kevertettük. Mivel a reakció követését gázkromatográfiás (GC) módszerrel nem lehet mérni és folyadékkromatográfiás (HPLC) körülmények között sem tudtuk vizsgálni, mert a komplexek ezen körülmények között nem stabilak, ezért a reakciókövetésre mágneses magrezonancia spektroszkópiát (NMR), valamint vékonyréteg-kromatográfiát (VRK) használtunk (heptán-EtOAc; 9:1). A kiindulási só 2-es helyzetében lévő protonjának kémiai eltolódása 8-10 ppm közé esik az NMR mérésekben, melynek eltűnésével jól követhető a kiindulási anyag átalakulása. A teljes konverzió elérése után a terméket már nem szükséges inert körülmények közt tartani, így a reakció végén az elegyhez *Celitet* adtunk és oszlopkromatográfia segítségével tisztítottuk, diklórmetánt és metanolt használva eluensként. A nagy tisztaságú, fehér kristályos termékeket 37-82 %-os termeléssel sikerült izolálni.

5.2.3. Ezüst-NHC komplexek előállítása

Az ezüst-komplexek előállítását szintén irodalmi analógiák alapján végeztük.^[34] A reakciót először a kereskedelemben kapható 2,6-diizopropilfenil dihidroimidzólum sóval optimáltuk. A reakcióban használt körülmények a saját karbénprekursoraink esetében is

megbízhatónak bizonyultak. Az ezüst-komplexek előállítása gyors és könnyen kivitelezhető eljárás, nem igényel inert körülményeket, továbbá már szobahőmérsékleten lejátszódik.

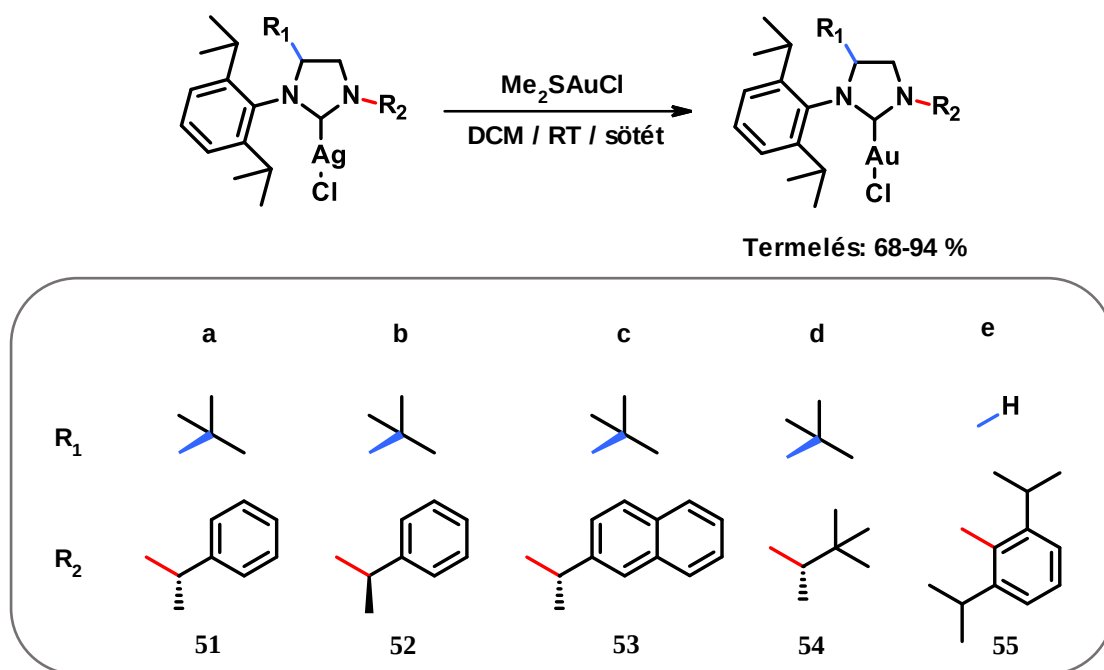


19. ábra: Az ezüst-NHC komplexek előállítása

A karbénprekuzort és az ezüst-oxidot diklórmétánban kevertetjük szobahőmérsékleten, fénytől elzárva. Reakciókövetéshez NMR spektroszkópiát alkalmaztunk. A reakció lejátszódása után a reakcióelegyet leszűrtük, majd a szűrletet bepároltuk, végül dietil-éterből átkristályosítottuk. Ezzel a módszerrel 82-97 %-os termeléssel tudtuk előállítani a különböző ezüst-komplexeket.

5.2.4. Arany-NHC komplexek előállítása

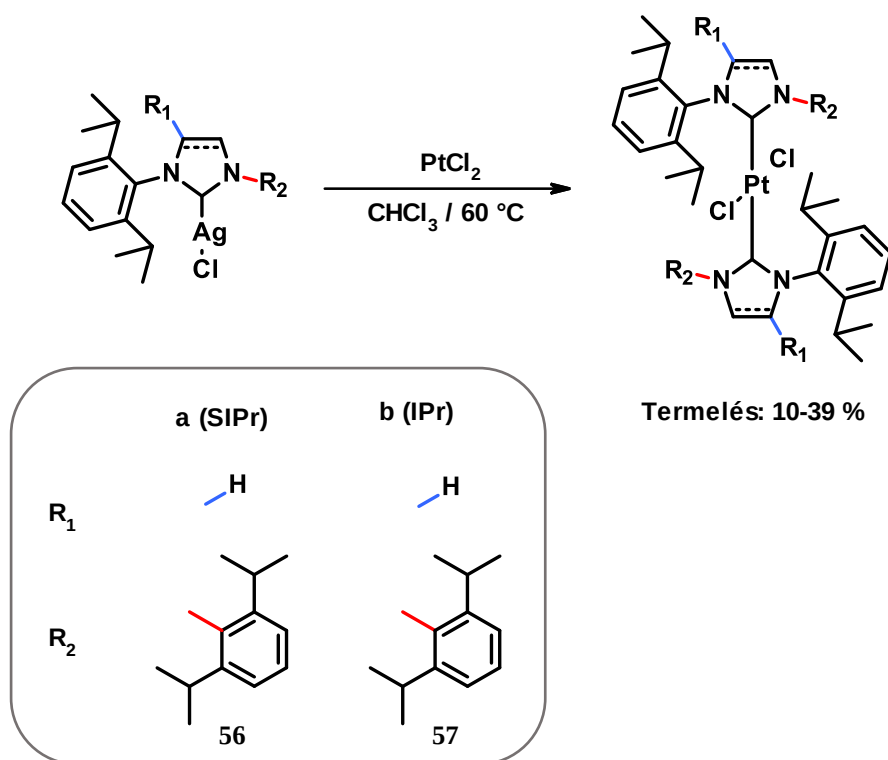
Az arany-komplexek transzmetallálással állíthatóak elő az ezüst-komplexekből. A kiindulási ezüst-komplexet barna üvegben, diklórmétánban oldottuk és hozzáadtuk a dimetil-szulfid-arany-kloridot, majd szobahőmérsékleten kevertettük, amíg el nem értük a teljes konverziót. A reakciót NMR-rel és VRK-val (heptán-EtOAc 3:7) is követtük és késznek tekintettük, amikor a VRK-n eltűnt az ezüst-komplexet jelző folt és már csak az NHC-arany-komplex volt észlelhető. A feldolgozásuk egy *Celiten* való szűrésből és dietil-éterből történő átkristályosításból állt. Szűrést követően megkaptuk a szilárd, fehér terméket, 68-94 %-os termeléssel.



20. ábra: Az arany-NHC komplexek előállítása

5.2.5. Platina-NHC komplexek előállítása

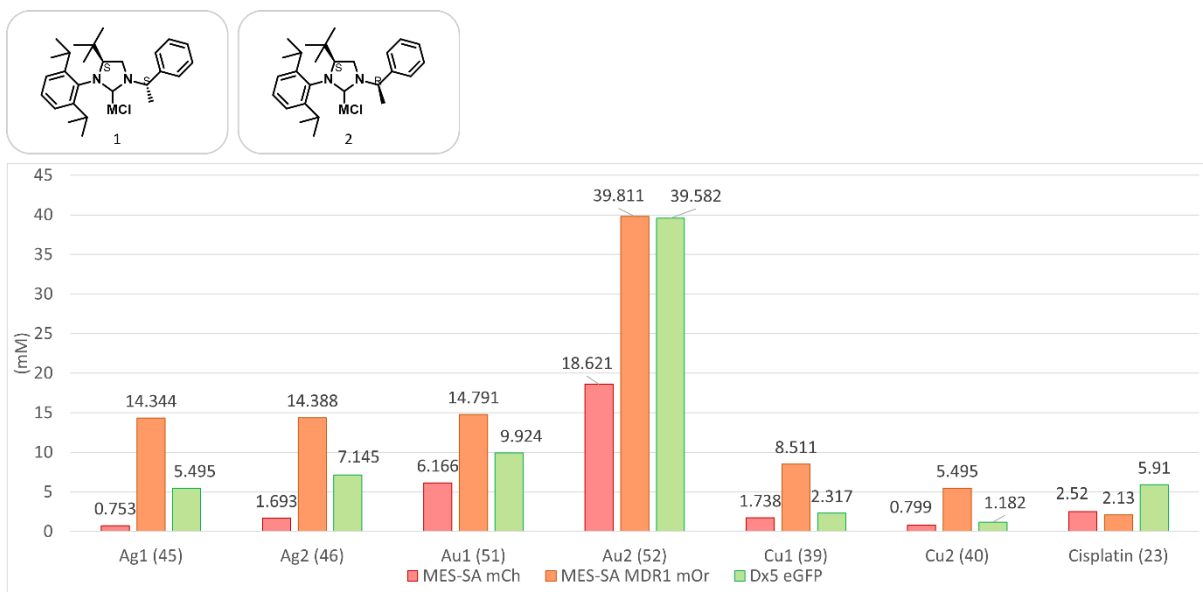
A platina-komplexeket szintén az ezüst-komplexek transzmetallálásával állítjuk elő. A kiindulási anyagot feloldottuk kloroformban és hozzáadtuk a platina-kloridot. A reakció 60°C-on megy végbe, amely NMR-rel és VRK-val (heptán-EtOAc 1:1) is nyomon követhető. A komplexeket oszlopkromatográfiával tisztítottuk (heptán-EtOAc). A platina esetében sajnos az előzőeknél jóval alacsonyabb 10-39 %-os termelést tudtunk csak elérni. Ebben az esetben végül csak dimer komplexeket sikerült előállítanunk.



21. ábra: A platina-NHC komplexek előállítása

5.3. A biológiai adatok értékelése

A méréseink kiindulópontjának egy olyan vázat, illetve annak egy diasztereomer párját választottunk, amelyet új katalitikus reakciók vizsgálatokor gyakran használunk a kutatócsoportunkban. Ezek a vázak jó kiindulási pontot adtak, hogy a későbbiekben, milyen változtatásokat érdemes elvégezni a molekulák fejlesztésénél. Az általunk választott vázak az imidazolidin gyűrű 4-es pozíciójában egy *S* konfigurációjú *tert*-butil-csoportot, a 3-as nitrogénen egy diizopropil-fenil, az 1-es nitrogénen pedig egy *S* vagy *R* konfigurációjú fenetil-csoportot tartalmaztak. Az első mérésekben ezüst-, arany- és réz-komplexek toxicitását vizsgáltuk, amelyek mellé kontrollként ciszplatint használtunk.



23. ábra: Fém-NHC vegyületek citotoxicitása. A grafikonon a különböző vegyületek IC₅₀ értékeit ábrázoltuk.

A grafikonon a különböző vegyületek IC₅₀ értékeit ábrázoltuk a fenetil szubsztituenst hordozó NHC komplexek esetében. Az ábrán a pirossal jelölt oszlop jelöli a nem rezisztens, parentális sejtvonalat, a sárga az MDR1 multidrogrezisztens sejtvonalat, a zöld pedig a Dx5, doxorubicinnel szelektált, rezisztens sejtvonalat. A ciszplatinhoz hasonlítva az arany kivételével mindegyik fém-komplexnek jobb a toxicitása a parentális sejtvonalon.

	Parent-MDR1	Parent-Dx5	MDR1-Dx5
Ag1 (45)	19.05	7.30	0.38
Ag2 (46)	8.50	4.22	0.50
Au1 (51)	2.40	1.61	0.67
Au2 (52)	2.14	2.13	0.99
Cu1 (39)	4.90	1.33	0.27
Cu2 (40)	6.88	1.48	0.22
Cisplatin (23)	0.85	2.35	2.77

1. táblázat: ABCB1-es sejtek rezisztenciája (úgy számoltuk ki, hogy elosztottuk az MDR1-re kapott értéket a parentális értékével, Dx5/Parent és Dx5/MDR1)

Az ábrán a pirossal jelölt oszlop jelöli a nem rezisztens, parentális sejtvonalat, a sárga az MDR1 multidrogrezisztens sejtvonalat, a zöld pedig a Dx5 doxorubicinnel szelektált,

rezisztens sejtvonalat. Az 1. táblázat összefoglalja a sejtvonalak közt mért citotoxicitás hányadosokat, ebből megkapjuk, hogy mekkora egymáshoz képest a toxicitásuk. A ciszplatinhoz hasonlítva az arany kivételével mindegyik fém-komplexnek jobb a toxicitása a parentális sejtvonalon. A rezisztens sejtvonalak esetében, az MDR1-es vonalra számottevő rezisztenciát tapasztaltunk, mind a három fém esetében amelynek köszönhetően a toxicitásuk erre a sejtvonalra nagyságrendekkel kisebb volt, mint a ciszplatiné. Ezzel szemben a Dx5-ös multidrogrezisztens vonalnál amellet, hogy a rezisztencia összemérhető volt a ciszplatinével, egy érdekes jelenségre lettünk figyelmesek. A várttól eltérően a Dx5 sejtvonalra a molekuláink jóval toxikusabbnak bizonyultak, mint az MDR1-es vonalra. A mérések eredményeiből levonhatjuk még azt a konklúziót is, hogy ebben az esetben a nitrogén szubsztituensének kiralitása a toxicitás és a rezisztencia szempontjából lényegében elhanyagolható.

Az első mérések után elkezdtek lépésről lépésre körüljárni a lehetséges változtatásokat a molekulánkon. A változtatásokat a kiindulási alapvázon az 1-es nitrogén szubsztituenseinek cseréjével kezdtünk. Először olyan komplexeket szintetizáltunk, melyek ebben a pozícióban egy *S* konfigurációjú *terc*-butil-etil-csoportot hordoztak, mivel kíváncsiak voltunk, milyen eltérést mutat egy alifás oldallánc egy benzil típusúval szemben.



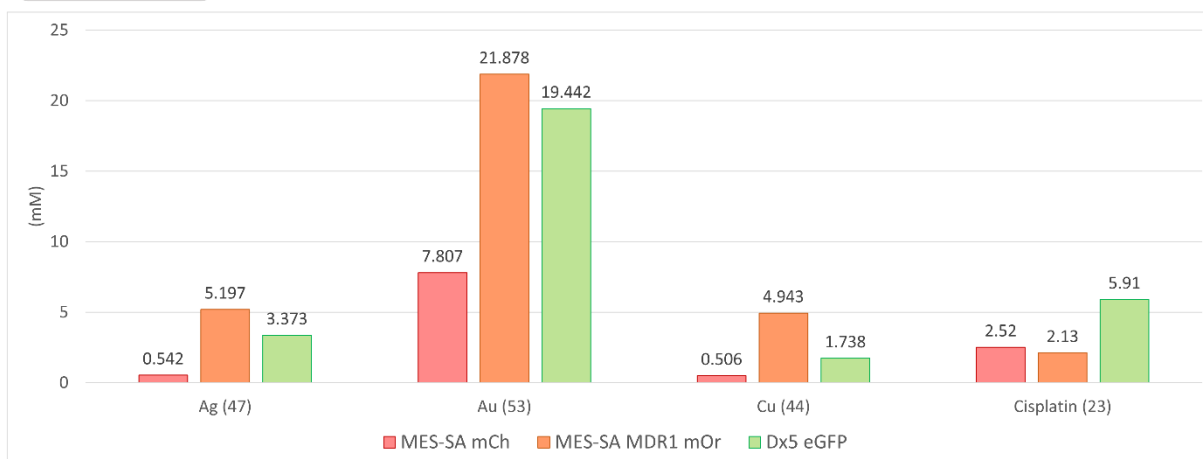
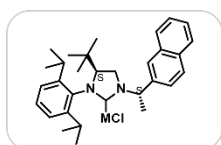
24. ábra: Fém-NHC vegyületek citotoxicitása. A grafikonon a különböző vegyületek IC₅₀ értékeit ábrázoltuk

	Parent-MDR1	Parent-Dx5	MDR1-Dx5
Ag (48)	5.09	1.85	0.36
Au (54)	1.63	1.21	0.74
Cu (43)	2.68	1.38	0.52
Cisplatin (23)	0.85	2.35	2.77

2. táblázat: ABCB1-es sejtek rezisztenciája (úgy számoltuk ki, hogy elosztottuk az MDR1-re kapott értéket a parentális értékével, Dx5/Parent és Dx5/MDR1)

A mérési eredmények alapján megállapítható, hogy a tendencia hasonló az előbbihez, az ezüst és a réz esetében magasabb a toxicitás, az arany esetében kiugróan magas IC50 értékeket kaptunk. A kialakuló rezisztencia mértéke azonban az MDR1-es vonalra nagymértékben csökkent a fenetiles vázakkal mutatott rezisztenciával szemben. A legnagyobb különbséget mindkét esetben az ezüst-komplexek esetében mértük, azonban míg a fenetiles molekulánál ez 19.05-szörös IC50 különbség volt, ebben az esetben csak 5.09-szeresnek adódott.

Emellett kíváncsiak voltunk még, mi történik, ha egy nagyobb térkitöltésű csoportot választunk az 1-es pozíció szubsztituensének, amely ebben az esetben egy naftil-etil-csoport volt.



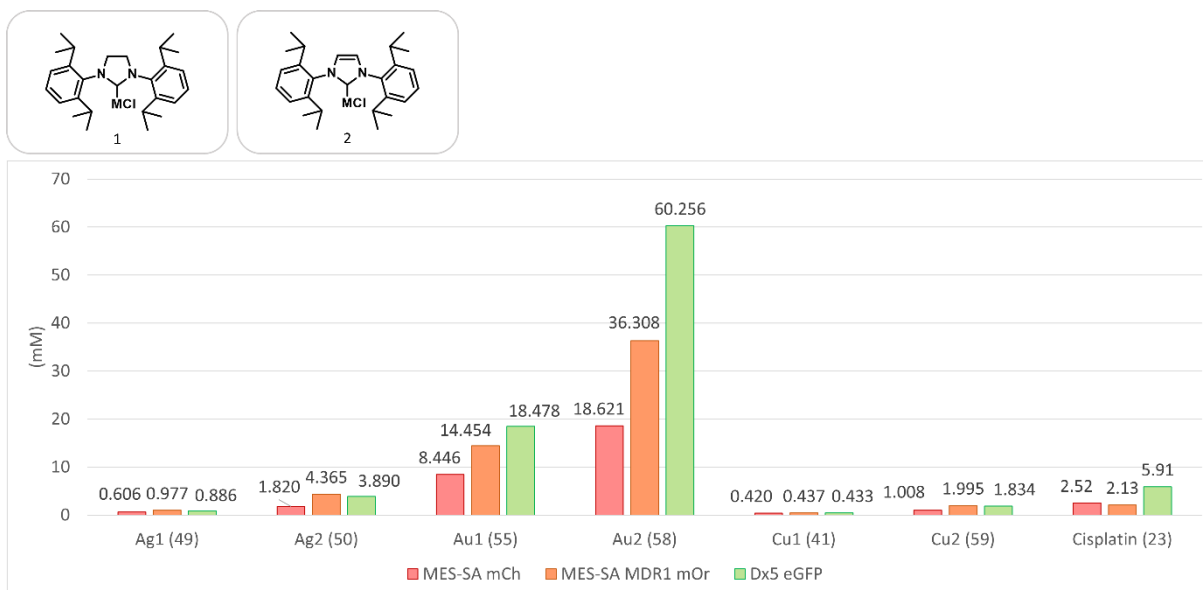
25. ábra: Fém-NHC vegyületek citotoxicitása. A grafikonon a különböző vegyületek IC50 értékeit ábrázoltuk

	Parent-MDR1	Parent-Dx5	MDR1-Dx5
Ag (47)	9.59	6.22	0.65
Au (53)	2.80	2.49	0.89
Cu (44)	9.77	3.43	0.35
Cisplatin (23)	0.85	2.35	2.77

3. táblázat: ABCB1-es sejtek rezisztenciája (úgy számoltuk ki, hogy elosztottuk az MDR1-re kapott értéket a parentális értékével, Dx5/Parent és Dx5/MDR1)

Az ezüst és a réz esetében hasonló IC50 értékeket kaptunk, az arany ismét alacsonyabb toxicitást ért el, illetve az előzőekben is megfigyelt tendencia a rezisztens vonalakra itt is fennáll. Összehasonlítva az előzőekben mértékkel elmondhatjuk, hogy a parentális vonalon ezek a vegyületek toxikusabbak voltak a fenetil és *terc*-butil-etil részletet hordozóknál, azonban a kialakult rezisztencia a két másik váznál mérték közé esik.

Az eddigiekben vizsgált alifás és aromás, benzil analóg szubsztituensekkel ellátott vegyületeket szeretnénk volna kiegészíteni olyan vázakkal is, ahol a váz mindkét nitrogénen egy fenil analógot hordoz, mivel ennek az elektronikus, illetve szterikus hatása is nagyban eltér az előbbiektől. Az ilyen típusú vázakra az irodalomban már vannak jól ismert példák, melyek kereskedelmi forgalomban is kaphatóak. A választásunk egy C2 szimmetriával rendelkező, mindkét nitrogénjén diizopropil-fenil-csoportot tartalmazó molekulára esett (26. ábra: 1), illetve mivel ennek a kereskedelmi forgalomban szintén kapható telítetlen formáját (26. ábra: 2) sem vizsgáltuk, így ezeket is belevettük a sorozatba.



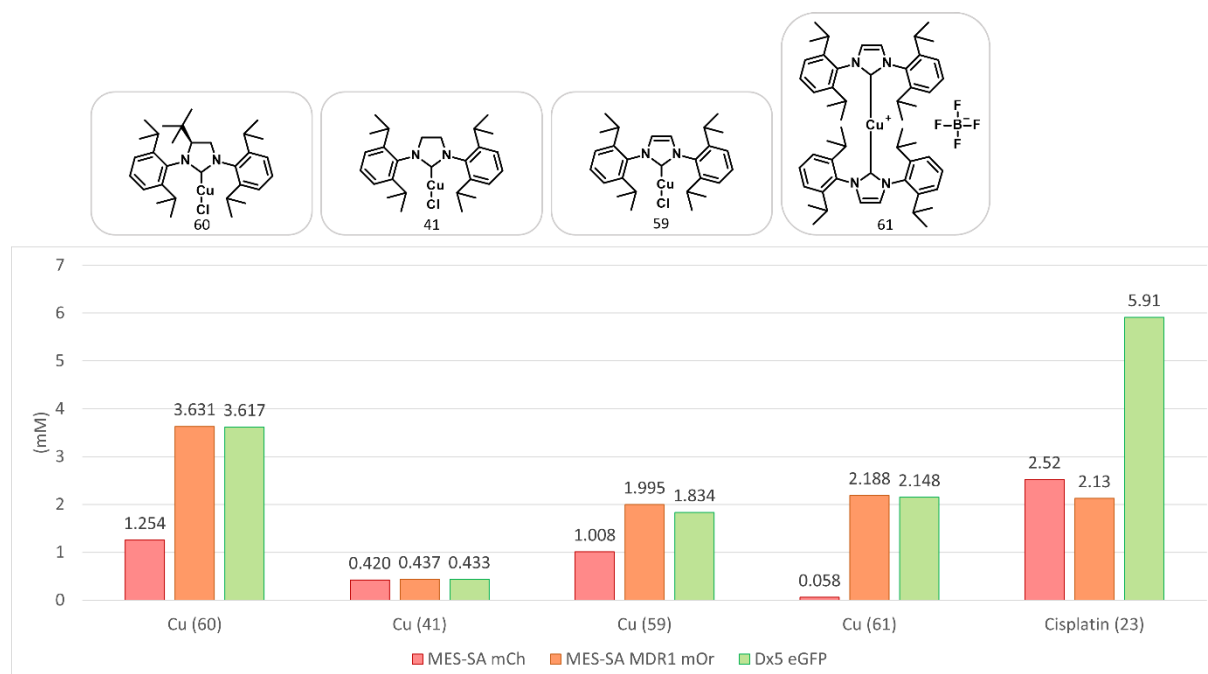
26. ábra: Fém-NHC vegyületek citotoxicitása. A grafikonon a különböző vegyületek IC₅₀ értékeit ábrázoltuk

	Parent-MDR1	Parent-Dx5	MDR1-Dx5
Ag1 (49)	1.61	1.46	0.91
Ag2 (50)	2.40	2.14	0.89
Au1 (55)	1.71	2.19	1.28
Au2 (58)	1.95	3.24	1.66
Cu1 (41)	1.04	1.03	0.99
Cu2 (59)	1.98	1.82	0.92
Cisplatin (23)	0.85	2.35	2.77

4. táblázat: ABCB1-es sejtek rezisztenciája (úgy számoltuk ki, hogy elosztottuk az MDR1-re kapott értéket a parentális értékével, Dx5/Parent és Dx5/MDR1)

Mindegyik esetben elmondható, hogy a telített molekulák szerepeltek jobban, azon belül is ismét az ezüst és a réz, melyeknek a toxicitása nagyobb. Azonban az előzőekben tapasztalt tendencia, hogy az MDR1-es vonalra kialakuló rezisztencia jócskán meghaladja a Dx5-ös vonalét, ebben az esetben már nem volt igaz. A sejtvonalakon mért IC₅₀ értékek hányadosa a legtöbb esetben 1-hez igenközeli érték volt. Az ezüsthöz és rézhez mindhárom sejtvonalon hasonló mértékű toxicitást mértek, a sorozatból csak a két arany-komplex lógott ki, melyeket illetően nagyjából kétszeres toxicitás különbség volt tapasztalható a parentális és az MDR1 vonalak között és nagyjából háromszoros a Dx5-ös vonallal szemben.

A szimmetrikus vázakon mért eredményektől fellelkesülve, elvégeztünk egy méréssorozatot különböző, a legjobb eredményeket mutató diizopropilfeniles réz-komplexek analógjaival, mely a telített és telítetlen, egy telítetlen dimer és egy a 4-es pozícióban tercbutil-csoportot hordozó vázából állt.



27. ábra: Réz-NHC vegyületek citotoxicitása. A grafikonon a különböző vegyületek IC₅₀ értékeit ábrázoltuk

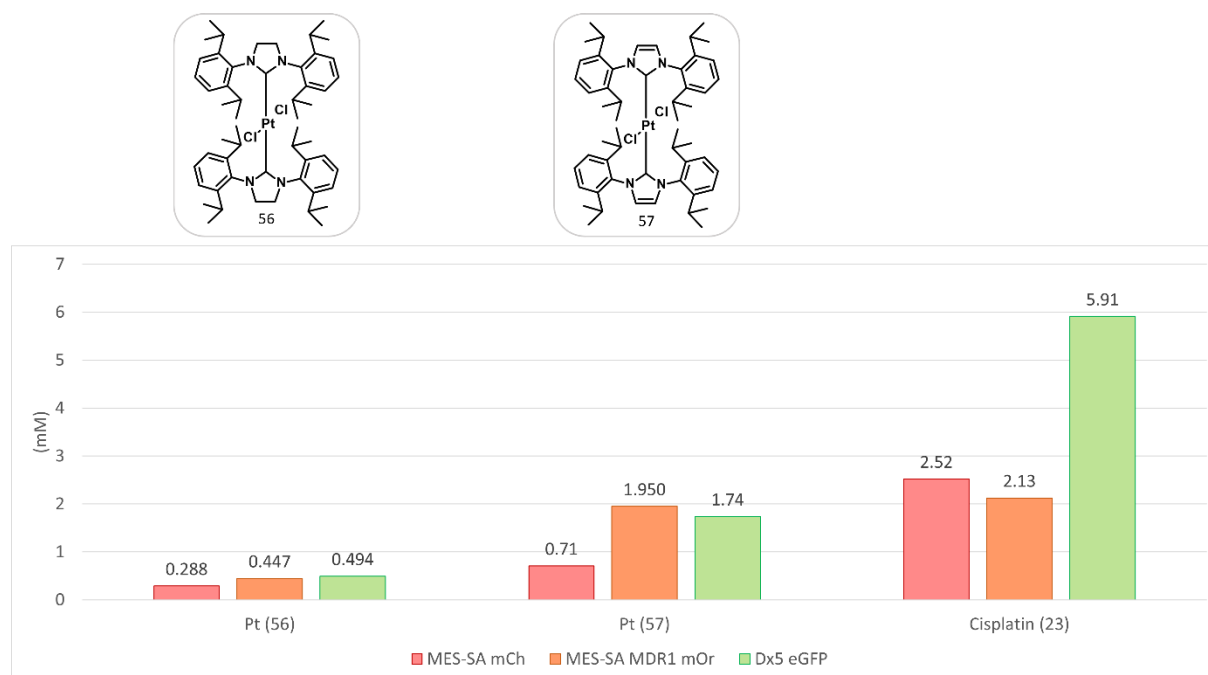
	Parent-MDR1	Parent-Dx5	MDR1-Dx5
Cu (60)	2.90	2.88	1.00
Cu (41)	1.04	1.03	0.99
Cu (59)	1.98	1.82	0.92
Cu (61)	37.72	37.03	0.98
Cisplatin (23)	0.85	2.35	2.77

5. táblázat: ABCB1-es sejtek rezisztenciája (úgy számoltuk ki, hogy elosztottuk az MDR1-re kapott értéket a parentális értékével, Dx5/Parent és Dx5/MDR1)

Az ábrán egyértelműen látszik, hogy a telített réz-NHC komplex esetén mérték a legjobb eredményeket a toxicitást és a rezisztenciát is figyelembe véve. A telített és telítetlen gyűrűt összehasonlítva láthatjuk, hogy a telítetlen imidazolin gyűrű esetében csökken a toxicitás és nagyobb a rezisztencia. Az utolsó komplexet tekintve érdekes eredményt kaptunk,

a dimer-réz-komplex rendkívül alacsony IC₅₀ értéket ért el, tehát nagyon nagy a toxicitása a parentális sejtvonalon, a két rezisztens vonalra nézve azonban nagyságrendekkel nagyobb, majdnem 40-szeres az IC₅₀. A fenti mérések alapján, azt a következtetést vontuk le, hogy a 4-es pozícióban található *terc*-butil-csoport hátrányosan befolyásolja mind a parentális, mind a rezisztens vonalakra gyakorolt toxicitást, ezen kívül az MDR1 szubsztát jellegét is nagy mértékben növeli a molekulának, ezért a rezisztencia értékek is magasabbak a szubsztituálatlan változatánál. Hasonló jelenséget figyelhettünk meg a telítetlen vázat összehasonlítva a telített vázzal, bár jóval kisebb mértékben. Ezek alapján úgy véljük a további fejlesztéseket, telített szimmetrikusan szubsztituált vázakon érdemes elvégezni, illetve a dimer által elért meglepően alacsony IC₅₀ érték alapján érdemes a dimerek szintézisével is foglalkozni.

A platina-NHC komplexek megvizsgálására később került sor, így itt már a korábban legjobb értékeket mutató vázakat néztük csak meg, a szimmetrikus, kétoldalt diizopropilfenil-csoportot tartalmazó komplexeket. Sajnos a dolgozat megírásáig nem sikerült monomer komplexet előállítanunk, azonban a későbbiekben szeretnénk ezekkel kiegészíteni a méréssorozatot.



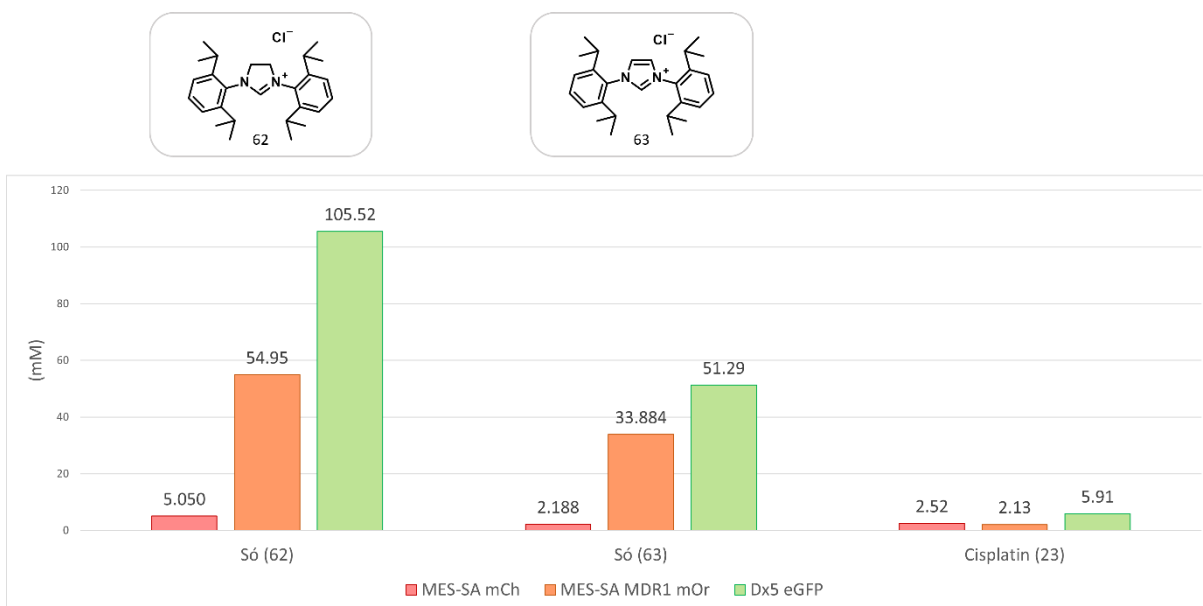
28. ábra: Platina-NHC vegyületek citotoxicitása. A grafikonon a különböző vegyületek IC₅₀ értékeit ábrázoltuk

	Parent-MDR1	Parent-Dx5	MDR1-Dx5
Pt (56)	1.55	1.72	1.11
Pt (57)	2.75	2.45	0.89
Cisplatin (23)	0.85	2.35	2.77

6. táblázat: ABCB1-es sejtek rezisztenciája (úgy számoltuk ki, hogy elosztottuk az MDR1-re kapott értéket a parentális értékével, Dx5/Parent és Dx5/MDR1)

A platina-komplexek estében is viszonylag magas toxicitást tapasztaltunk mindhárom sejtvonalra. A mérésorozat érdekességét az adja, hogy jóval alacsonyabb rezisztencia értékeket kaptunk az előzőekben vizsgált réz-dimer-komplexhez viszonyítva, mind a telített, mind a telítetlen vázak esetében. Ami részben igazolta, hogy érdemes a dimer szerkezetekkel is foglalkozni.

A vizsgált molekulák sorából nem maradhattak ki a fémet nem komplexáló alapvázak sem. A vázak közül ismét a legeredményesebb telített és telítetlen, diizopropil-fenil-csoportot tartalmazó szimmetrikus vázakat választottuk.



29. ábra: Sók citotoxicitása. A grafikonon a különböző vegyületek IC₅₀ értékeit ábrázoltuk

	Parent-MDR1	Parent-Dx5	MDR1-Dx5
Só (62)	10.88	20.90	1.92
Só (63)	15.49	23.44	1.51
Cisplatin (23)	0.85	2.35	2.77

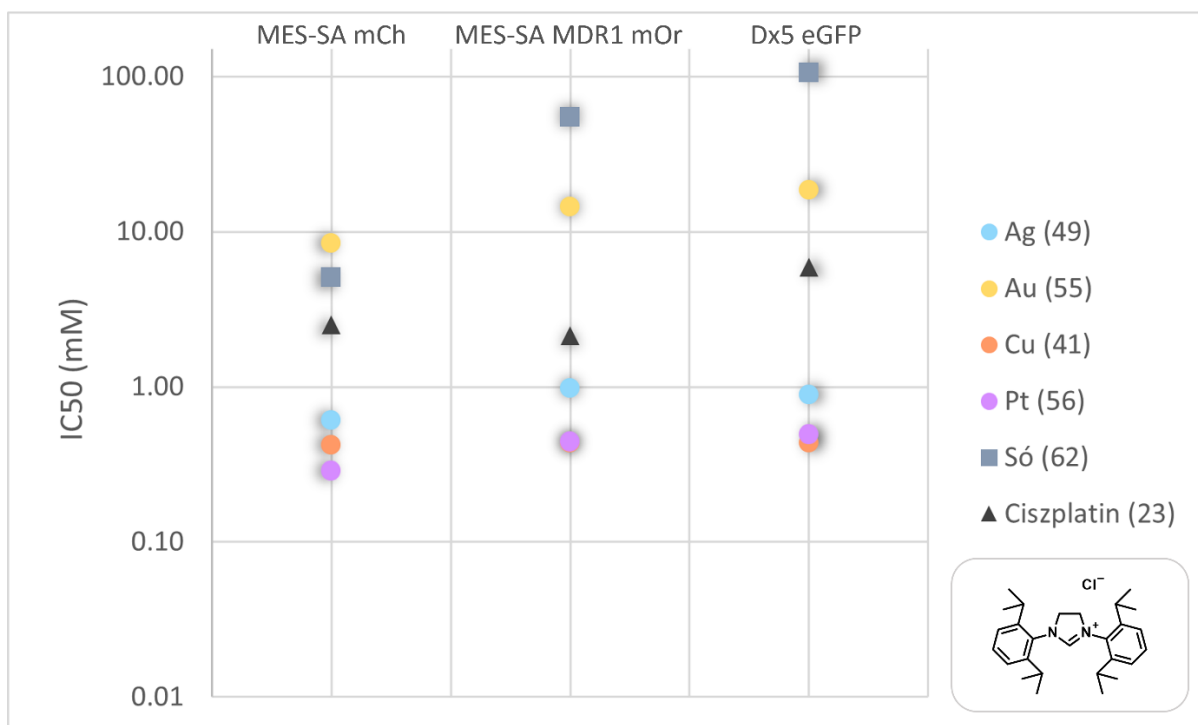
7. táblázat: ABCB1-es sejtek rezisztenciája (úgy számoltuk ki, hogy elosztottuk az MDR1-re kapott értéket a parentális értékével, Dx5/Parent és Dx5/MDR1)

A mérések alapján elmondható, hogy mindkét molekula nagy mértékben toxikus a parentális MES-SA sejt vonalon, azonban a rezisztens vonalakon – mivel szubsztrátként viselkednek – nagyságrendekkel magasabb IC₅₀-értékeket mértünk, amely jól szemlélteti a fém centrum fontosságát, hiszen a komplexek esetében nagyságrenddel kisebb a rezisztencia.

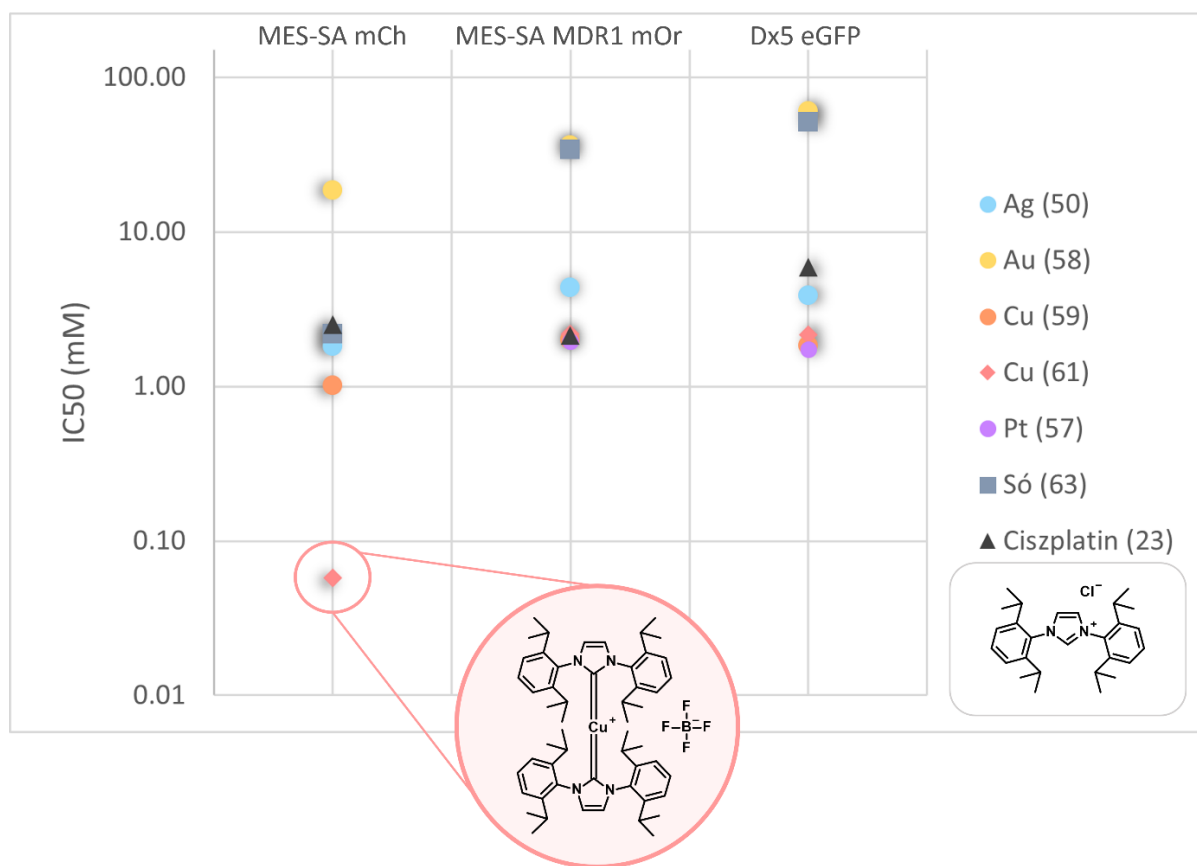
6. Összefoglalás

Munkánk során különböző, változatos szerkezetű NHC-átmenetifém-kompleket teszteltünk, hogy feltérképezzük biológia hatásukat egy MES-SA (humán méhnyakrák) és két rezisztens rákos sejtvonalon. A rezisztens vonalak közül az egyik, egy az ABCB1 multidrog-transzportert overexpresszáló sejtvonal volt, a másik pedig egy doxorubicinnel szelektált sejtvonal, amelyben az ABCB1 overexpresszióin kívül más rezisztenciát előidéző mechanizmusok is megjelentek a doxorubicinnel történő kezelése következtében. Elvégeztük egy arany-, ezüst-, platina- és réz-komplexekeket tartalmazó molekulacsald szintézisét, melyeket egy együttműködés keretein belül, egy az ELKH-TTK Gyógyszerrezisztencia Kutatócsoportja által fejlesztett citotox assay-ben vizsgáltunk.

A mérések azt mutatták, hogy a toxicitás és a rezisztencia szempontjából a 4-es pozícióban szubsztituens nem hordozó molekulák kedvezőbb eredményeket értek el. Továbbá a nitrogén szubsztituensek közül a fenil analógok alkalmasabbak lehetnek mind a benzil analógokkal, mind az alifás származékokkal szemben. A mérések során megállapításra került még, hogy az előállított molekulák közül a telített szimmetrikus komplexek voltak a legtoxikusabbak, illetve ezek viselkedtek legkevésbé ABCB1 szubsztrátként. (30. ábra). Emellett a telítetlen réz dimer komplex kiemelkedő toxicitással rendelkezett a MES-SA sejtvonalon (31. ábra).



30. ábra: A telített gyűrűs molekulákra kapott értékek összehasonlítása

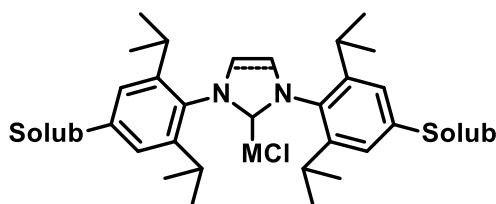


31. ábra: A telítetlen gyűrűs molekulákra kapott értékek összehasonlítása

Fontos eredmény még, hogy a komplexeink prekurzoraként szolgáló imidazolinium és imidazolidinium sók, habár toxikusak a parentális MES-SA sejtvonalon, a rezisztens vonalakon a toxicitásuk több mint egy nagyságrenddel alacsonyabb, amely jól szemlélteti a fém centrumok szükségességét.

7. Kitekintés

A mérésorozat alapján elmondható, hogy a szimmetrikusan szubsztituált telített molekuláknak vannak a legkiemelkedőbb eredményei, ezért ezen molekulákat lenne célszerű elsősorban tovább alakítani. Ezt a fenil-csoport *para*-pozíciójában tervezzük, először oldhatóságot növelő csoportok bevitelével, mivel a vizsgált vegyületeket, a legtöbb esetben gyenge vízoldhatóság jellemezte. Továbbá tervezzük a gyűrű 4-es pozícióját szubsztituálni különböző elektronszívó, ezáltal stabilitást növelő csoportokkal. Emellett tekintve, hogy egyes dimer komplex igen alacsony IC50 értéket ért el – alacsony rezisztencia értéke mellett – így érdemes lehet a jövőben a monomereket dimerekké alakítani és azok biológiai hatásait is vizsgálni. A jövőben tervezzük még kiegészíteni a vizsgált sejtvonalakat is egy – az ELKH-TTK Gyógyszerrezisztencia Kutatócsoportja által kifejlesztett – kifejezetten ciszplatin rezisztens sejtvonallal, amelyen a később általunk vélt legjobb molekuláinkat szeretnénk tesztelni.



Solub: oldhatóságot növelő csoportok

32. ábra: A C2 szimmetriával rendelkező komplexek tervezett módosításai

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki valamilyen formában hozzájárult a dolgozat elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Kotschy András intézetigazgatónak, amiért lehetővé tette számomra, hogy a Servier Kutatóintézetben végezhessem kutatásaimat.

Rendkívül hálás vagyok a témavezetőimnek, Szilávik Mártonnak és Dr. Paczal Attilának, akik hozzáállásának köszönhetően megtanultam elfogadni, hogy a hibaejtés a fejlődés része, ezáltal már bátrabban hozok meg önálló döntéseket. Továbbá köszönöm, hogy mindig számíthattam a segítségükre.

Köszönet illeti az együttműködő partnereinket, Dr. Tóth Szilárdot, Dr. Füredi Andrást és Dr. Szakács Gergelyt, a biológiai vizsgálatok elvégzéséért.

Külön szeretném megköszönni Dr. Apáti Ágotának, hogy segített megérteni a dolgozat biológiai részében megfogalmazott információkat.

Valamint köszönöm Galgóczy Grétának a helyesírás ellenőrzését, és a motiváló beszélgetéseket.

9. Kísérleti eredmények

9.1. Általános információk

A kiindulási anyagok és a reagensek, amennyiben ezt külön nem jelzem, kereskedelembe kaphatóak és további tisztítás nélkül kerültek felhasználásra. A reakciókat GC-MS, HPLC-MS és NMR mérések segítségével követtük.

A GC-MS vizsgálatokhoz Agilent 6850 gázkromatográfot (15 m x 0.25 mm oszlop, 0.25 mm HP-5MS bevonat, He vivőgáz) és Agilent 5975C tömegspektrométert (Ionforrás: EI+, 70 eV, 230°C, quadrupole: 150°C, interface: 300°C) használtunk. A HPLC-MS vizsgálatokat Agilent Technologies 1200 típusú folyadék-kromatográfval kapcsolt kvadrupol tömeganalizátorral és kombinált APCI/ESI ionforrással végeztük, mellyel negatív és pozitív módban is képesek voltunk mérni. Eluensek: A víz, 5% acetonitril, 0,05% TFA; B acetonitril, 5% víz, 0,075% TFA. A készülék DAD 190-400 nm detektorral is rendelkezett, mellyel 210 és 254 nm-en detektáltunk. Az NMR spektroszkópiás vizsgálatokat Bruker UltraShield Plus 500 és automata mintaváltóval felszerelt Bruker UltraShield Plus 400 készüléken végeztük. Oldószerként CDCl₃-t és DMSO-d₆-ot használtunk. A kémiai eltolódásokat (δ) ppm-ben adtuk meg belső standardként az oldószer jeleit felhasználva; CDCl₃ (1H δ 7.26 ppm, 13C δ 77.16 ppm), DMSO-d₆ (1H δ 2.50 ppm, 13C δ 39.52 ppm). A csatolási állandókat (J) Hertz-ben (Hz) adtuk meg. A felhasadások jelölésére a következőket alkalmaztuk: s (szingulet), d (dublett), t (triplett), q (quintet), sp (septet), m (multiplett), br s (széles szingulet), br d (széles dublett), dd (dublett dublett), td (triplett dublettje), dt (dublett tripllettje), tm (triplett multiplettje).

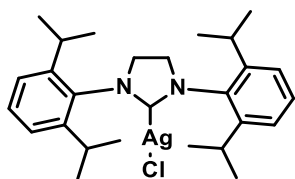
Az oszlop-kromatográfiás elválasztásokat Teledyne Isco CombiFlash® Rf típusú flash-kromatográfiás készülék segítségével végeztük, Teledyne Isco RediSep® típusú, normál fázisú szilikával töltött oszlopok felhasználásával.

A HR-MS méréseket Agilent Technologies 1200 típusú folyadék-kromatográfval kapcsolt ESI ionforrással rendelkező Agilent Technologies 6230 TOF LC/MS típusú tömeganalizátorral végeztük.

9.2. Általános eljárás az ezüst-NHC komplexek előállítására

A megfelelő imidazolidinium sót beoldottuk 5 ml/mmol diklórmétánba és 0.55 ekvivalens ezüst-oxidot adtunk hozzá. A reakciót 30 percet kevertettük sötétben szobahőmérsékleten. A reakciókövetés NMR segítségével történt. A reakcióelegyet szűrtük, majd a szűrletet bepároltuk vákuum bepárlóval. Dietil-éterből kristályosítottuk, majd kiszűrtük a terméket.

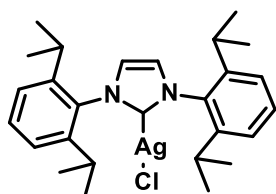
9.2.1. [1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)imidazol-2-ilidin]-kloro-ezüst (49)



Felhasznált anyagok: 1500 mg (3.512 mmol) (37), 17.6 ml (23269 mg, 274.0 mmol) diklórmétán, 448 mg (1.932 mmol) ezüst-oxid. Termelés: 1344 mg (2.517 mmol, 72%) (49). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.41 (t, J = 7.7 Hz, 2 H), 7.25 (d, J = 7.7 Hz, 4 H),

4.07 (s, 4 H), 3.10-3.01 (m, 4 H), 1.35/1.34 (d+d, J = 6.8 Hz, J = 6.9 Hz, 24 H) ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 207.8, 146.5, 134.5, 130.1, 124.7, 53.9, 28.9, 25.5/24.1 HRMS Számolt tömeg: 532.1774 mért = 538.2346

9.2.2. [1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)imidazol-2-ilidin]-kloro-ezüst (50)



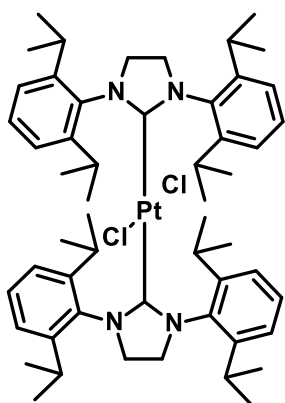
Felhasznált anyagok: 1000 mg (2.353 mmol) (38), 11.8 ml (15 590 mg, 183.5 mmol) diklórmétán, 300 mg (1.294 mmol) ezüst-oxid. Termelés: 1252 mg (2.062 mmol, 88%) (50). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.52 (t, 2 H), 7.31 (d, 4 H), 7.23 (d, 2 H), 2.55 (sp, 2

H), 1.29 (d, 6 H), 1.24 (d, 6 H) ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 184.4, 145.5, 134.5, 130.8, 124.4, 123.6, 28.7, 24.8, 24 HRMS: Számolt tömeg: 530.1618 [M-Cl+C₂H₃N]⁺ mért = 536.2190

9.3. Általános eljárás a platina-NHC komplexek előállítására

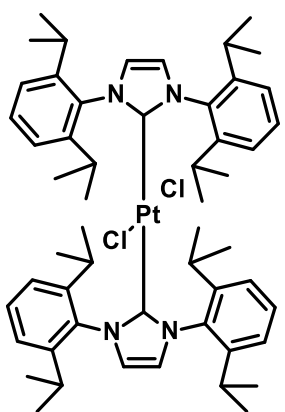
A kiindulási ezüst-komplexet feloldottuk 10 ml/mmol kloroformban és hozzáadtuk a 1.1 ekvivalens platina-dikloridot. A reakciót egy éjszakán át kevertettük 60°C-on. A reakció nyomon követése NMR-rel és VRK-val történt. A tisztítást flash oszlopkromatográfiával végeztük, heptánt és etil-acetátot használva eluensként.

9.3.1. bisz[1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)imidaz-2-ilidin]-dikloro-platina (56)



Felhasznált anyagok: 200 mg (0.375 mmol) (49), 109 mg (0.412 mmol) platina-diklorid, 3.7 mL (5589 mg, 46.82 mmol) kloroform. Termelés: 152 mg (0.145 mmol, 39%) (56). ^1H NMR (500 MHz, dms -d_6) δ ppm 7.45 (t, $J = 7.7$ Hz, 4 H), 7.35 (d, $J = 7.7$ Hz, 8 H), 4.14 (s, 8 H), 3.15-3.05 (m, 8 H), 1.32/1.24 (d+d, $J = 6.8$ Hz, $J = 6.8$ Hz, 48 H) ^{13}C NMR (500 MHz, dms -d_6) δ ppm 205.7, 147, 135.2, 130.2, 124.9, 54.3, 28.6, 25.7/24 HRMS Számolt tömeg: 1045.5095

9.3.2. bisz[1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)imidazol-2-ilidin]-dikloro-platina (57)



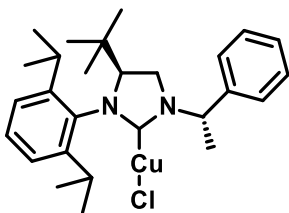
Felhasznált anyagok: 230 mg (0.4324 mmol) (50), 4.3 ml (6452 mg, 54.042 mmol) kloroform, 127 mg (0.4756 mmol) platina-diklorid. Termelés: 45 mg (0.0431 mmol, 10%) (57). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.50 (t, $J = 7.7$ Hz, 4 H), 7.30 (d, $J = 7.8$ Hz, 8 H), 7.21 (d, $J = 1.8$ Hz, 4 H), 2.60-2.47 (m, 8 H), 1.28/1.22 (d+d, $J = 6.8$ Hz, $J = 6.8$ Hz, 48 H) ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 184.5, 145.6, 134.5, 130.8, 124.4, 123.6, 28.7, 24.8/24 HRMS Számolt tömeg: 1041.4781

9.4. Általános eljárás a réz-komplexek előállítására^[36]

A megfelelő imidazolidinium sókat (38), 1 ekvivalens réz(I)-kloriddal és 2 ekvivalens kálium-karbonáttal egy Schlenk edénybe mértük, majd az edényt, vákuum és nitrogén áram bevezetésével inertizáltuk. Ezt követően 5 mL/mmol acetont adtunk a keverékhez fecskendő segítségével, szeptumon keresztül, majd az elegyet 60°C-ra fűtöttük és az azólium só reakciókészségétől függően a teljes konverzió eléréséig kevertettük. A reakciókat NMR spektroszkópia segítségével követtük.

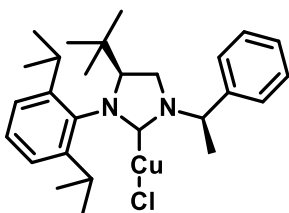
A reakcióelegyeket hagytuk szobahőmérsékletre hűlni és oszlopkromatográfia segítségével tisztítottuk. A tisztításhoz diklórmetánt és metanolt használtunk eluensnek.

9.4.1. [(4S)-4-terc-butil-3-(2,6-diizopropilfenil)-1-[(1S)-1-feniletil]imidazolidin-2-ilidin]-réz-klorid (39)



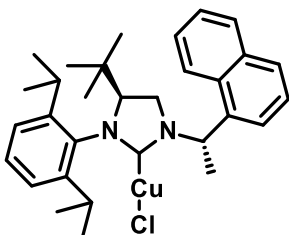
Felhasznált anyagok: 1g (2.3 mmol) **(38)**, 231 mg (2.3 mmol) réz-klorid, 647 mg (4.6 mmol) kálium-karbonát, 11.7 mL aceton. Kitermelés: 740 mg (1.5 mmol, 64.5%) **(39)**; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.48-7.37 (m, 5 H), 7.36 (t, $J = 7.4$ Hz, 1 H), 7.27 (dd, $J = 13.2, 1.6$ Hz, 1 H), 7.25 (dd, $J = 13.0, 1.6$ Hz, 1 H), 5.42 (q, $J = 7.1$ Hz, 1 H), 3.90 (dd, $J = 12.0, 10.0$ Hz, 1 H), 3.65/3.52 (dd+t, $J = 12.0, 9.8$ Hz, $J = 12.0$ Hz, 2 H), 3.48-3.42 (m, 1 H), 2.71-2.64 (m, 1 H), 1.75 (d, $J = 7.1$ Hz, 3 H), 1.39 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.29 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.26 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.11 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H), 0.73 (s, 9 H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 202.4, 146.1, 146.1, 139.6, 137.2, 129.0, 125.0, 124.8, 75.1, 58.1, 46.8, 34.6, 28.4, 27.7, 26.9, 26.0, 25.7, 23.0, 22.9, 17.9.

9.4.2. [(4S)-4-terc-butil-3-(2,6-diizopropilfenil)-1-[(1R)-1-feniletil]imidazolidin-2-ilidin]-réz-klorid (40)



Felhasznált anyagok: 1g (2.3 mmol) **(38)**, 231 mg (2.3 mmol) réz-klorid, 647 mg (4.6 mmol) kálium-karbonát, 11.7 mL aceton. Kitermelés: 790 mg (1.6 mmol, 68.7%) **(40)**; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.49-7.33 (m, 5 H), 7.39-7.37 (m, 1 H), 7.29-7.26 (m, 1 H), 7.26-7.23 (m, 1 H), 5.32 (q, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 4.01-3.91 (m, 1 H), 4.01-3.91/3.27 (m+m, 2 H), 3.43-3.34 (m, 1 H), 2.86-2.74 (m, 1 H), 1.78 (d, $J = 7.1$ Hz, 3 H), 1.38/1.26 (d+d, $J = 6.8$ Hz, $J = 6.8$ Hz, 6 H), 1.32/1.15 (d+d, $J = 6.9$ Hz, $J = 6.7$ Hz, 6 H), 0.63 (s, 9 H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 202.2, 128.1, 125.0, 124.8, 74.6, 58.1, 47.6, 28.3, 27.7, 26.8/23.0, 26.0, 25.8/23.2, 18.7.

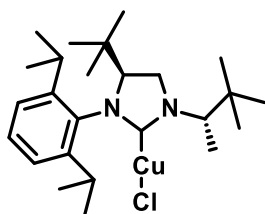
9.4.3. [(4S)-4-terc-butil-3-(2,6-diizopropilfenil)-1-[(1S)-1-naftiletil]imidazolidin-2-ilidin]-réz-klorid (44)



Felhasznált anyagok: 200 mg (0.42 mmol) **(38)**, 41.5 mg (0.42 mmol) réz(I)-klorid, 116 mg (0.84 mmol) kálium-karbonát, 2.1 mL aceton. Kitermelés: 126 mg (0.23 mmol, 55.7%) **(44)**; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.36 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H), 7.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H), 7.89 (d, $J = 10.5$ Hz, 1 H), 7.62-7.50 (m, 4 H), 7.32 (t, $J = 7.7$ Hz, 1 H), 7.19 (dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1 H), 7.14 (dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1 H), 6.23 (q, $J = 6.9$ Hz, 1 H), 3.89 (dd, $J = 12.0, 9.9$ Hz, 1 H), 3.60/2.71 (t+dd, $J = 11.7$ Hz, $J =$

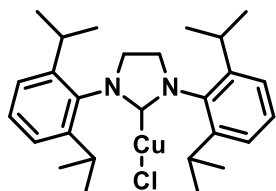
11.5, 10.0 Hz, 2 H), 3.48-3.40 (m, 1 H), 2.79-2.71 (m, 1 H), 1.97 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H), 1.61/1.25 (d+d, $J = 6.8$ Hz, $J = 6.8$ Hz, 6 H), 1.32/1.22 (d+d, $J = 6.9$ Hz, $J = 6.8$ Hz, 6 H), 0.40 (s, 9 H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm 203.8, 146.1, 145.4, 133.6, 133.1, 130.9, 129.2, 128.4, 128.7, 126.2, 125.8, 124.8, 124.7, 124.5, 123.9, 123.2, 74.5, 54.7, 46.6, 28.6, 27.7, 27.1/22.8, 25.8, 25.6/23.1, 18.3.

9.4.4. [(4*S*)-4-tercbutil-3-(2,6-diisopropilfenil)-1-[(1*S*)-1,2,2-trimetilpropil]imidazolidin-2-il] réz-klorid (**43**)



Felhasznált anyagok: 250 mg (0.61 mmol) (**38**), 60.8 mg (0.61 mmol) réz(I)-klorid, 169.8 mg (1.22 mmol) kálium-karbonát, 3.0 mL acetone. Kitermelés: 154 mg (0.33 mmol, 53.4%) (**43**); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.33 (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H), 7.19 (dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 1 H), 7.14 (dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1 H), 4.27 (q, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 4.03 (dd, $J = 11.8, 10.3$ Hz, 1 H), 3.85/3.60 (t+t, $J = 11.6, J = 10.8$ Hz, 2 H), 3.45 (sp, $J = 6.9$ Hz, 1 H), 2.72 (sp, $J = 6.8$ Hz, 1 H), 1.48 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.37 (d, $J = 7.1$ Hz, 3 H), 1.35 (d, $J = 7.1$ Hz, 3 H), 1.32 (d, $J = 7.1$ Hz, 3 H), 1.22 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H), 1.08 (s, 9 H), 0.82 (s, 9 H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ ppm 205.5, 146.4, 145.5, 136.5, 128.7, 124.6, 124.6, 75.3, 64.8, 48.1, 35.1, 34.3, 28.6, 27.8, 27.5, 26.7, 26.3, 25.6, 23.2, 22.8, 13.6.

9.4.5. [1,3-bisz(2,6-diisopropilfenil)imidazolidin-2-il] réz-klorid (**41**)

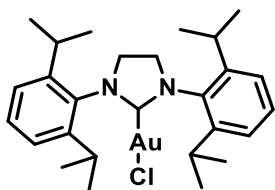


Felhasznált anyagok: 1 g (2.34 mmol) 1,3-bisz(2,6-diisopropil)-4,5-dihydroimidazolium klorid (**62**), 232 mg (2.34 mmol) réz(I)-klorid, 647 mg (4.68 mmol) kálium-karbonát, 11.7 mL acetone. Kitermelés: 701 mg (1.43 mmol, 61.2%) (**41**); ^1H NMR (500 MHz $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 7.46-7.41 (m, 2 H), 7.33 (d, $J = 7.3$ Hz, 4 H), 4.07 (s, 4 H), 3.09 (sp, $J = 6.8$ Hz, 4 H), 1.31 (d, $J = 6.8$ Hz, 12 H), 1.26 (d, $J = 6.8$ Hz, 12 H); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 200.9, 146.6, 134.7, 129.6, 124.4, 53.7, 28.2, 25.3, 23.5.

9.5. Általános eljárás az arany-NHC komplexek előállítására

A kiindulási ezüst-komplexet beoldottuk 5 ml/mmol diklórmétánba és hozzáadtunk 1 ekvivalens dimetil-szulfid-arany-kloridot. A reakciót szobahőmérsékleten kevertettük egy éjszakán át. Feldolgozása során celiten szűrtük, majd az elegyet vákuum bepárló segítségével bepároltuk, dietil-éterből kikristályosítottuk, végül pedig kiszűrtük a terméket.

9.5.1. [1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)imidazolidin-2-ilidin]-kloro-arany (55)



Felhasznált anyagok: 500 mg (1.1708 mmol) 1,3-bisz(2,6-diizopropilfenil)-4,5-dihidroimidazol-1-ium-klorid (**62**), 345 mg (1.1708 mmol) dimetil-szulfid arany-klorid, 324 mg (2.3416 mmol) kálium-karbonát, 5.85 ml (79.73 mmol) aceton. Kitermelés: 493 mg (0.7913 mmol, 68%) (**55**). ^1H NMR (400 MHz, dmso- d_6) δ ppm 7.46 (m, 2 H), 7.33 (d, 4 H), 4.12 (s, 4 H), 3.08 (sp, 4 H), 1.32 (d, 12 H), 1.31 (d, 12 H) ^{13}C NMR (400 MHz, dmso- d_6) δ ppm 194.1, 130.2, 124.9, 53.9, 28.7, 25.3, 25.2

10. Irodalomjegyzék

- [1] Paczal Attila Róbert, Heterociklusos Karbénprekurzorok szintézise és alkalmazásuk szerves szintézisekben, **2007**, URL: http://teo.elte.hu/minosites/ertekezes2008/paczal_a.pdf
- [2] Buchner, E.; Curtius, T. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, 8, 2377.
- [3] Staudinger, H.; Kupfer, O. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1912**, 45, 501.
- [4] Doering, W. v. E.; Hoffmann, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 6162.
- [5] Fischer, E. O.; Maasböl, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1964**, 3, 580.
- [6] Wanzlick, H.-W.; Schönherr, H.-J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, 7, 141.
- [7] Öfele, K. *J. Organomet. Chem.* **1968**, 12, P42.
- [8] Schrock, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 6796.
- [9] Igau, A.; Grutzmacher, H.; Baceiredo, A.; Bertand, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6463.
- [10] Arduengo, A. J., III; Harlow, R. L.; Kline, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 361.
- [11] Han Vinh Huynh, General Properties of Classical NHCs and Their Complexes, *The Organometallic Chemistry of N-heterocyclic Carbenes*, **2017**, 17-51. DOI: **10.1002/9781118698785.ch2**
- [12] Hermann, W. A.; Kocher, C.; Goossen, L. J.; Artus, G. R. *J. Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 1627.
- [13] Enders, D.; Breuer, K.; Raabe, G.; Runsink, J.; Teles, J. H.; Madler, J. P.; Ebel, K.; Brode, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1021.
- [14] Dixon, D. A.; Arduengo, A. J. *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 4180.
- [15] Fortman, G. C.; Nolan, S.P. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5151.
- [16] Buchner, E.; Curtius, T. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, 8, 2371.
- [17] Mohammed Jalal, Belkheir Hammouti, Rachid Touzani, Abdelouhaed Aouniti, Ismail Ozdemir, Metal-NHC heterocycle complexes in catalysis and biological applications:

Systematic review, *Materials Today: Proceedings*, **2020**, 68, 2. DOI: **10.1016/j.matpr.2020.06.398**

[18] Robert H. Grubbs, Tina M. Trnka and Melanie S. Sanford, Transition Metal-Carbene Complexes in Olefin Metathesis and Related Reactions, *Current Methods in Inorganic Chemistry*, **2003**, 3.

[19] I. Ott, Medicinal Chemistry of Metal N-Heterocyclic Carbene (NHC) Complexes, *Inorganic and Organometallic Transition Metal Complexes with Biological Molecules and Living Cells*, **2017**, 147-179. DOI: **10.1016/B978-0-12-803814-7.00005-8**

[20] Khadijah M. Hindi, Matthew J. Panzner, Claire A. Tessier, Carolyn L. Cannon, and Wiley J. Youngs, The Medicinal Applications of Imidazolium Carbene-Metal Complexes, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 3859–3884.

[21] Bernhard Lippert, Impact of Cisplatin on the recent development of Pt coordination chemistry: a case study, *Coordination Chemistry Reviews*, **1999**, 182, 263–295. DOI: **10.1016/S0010-8545(98)00192-1**

[22] Hopkinson, M., Richter, C., Schedler, M. et al., An overview of N-heterocyclic carbenes, *Nature*, **2014**, 510, 485–496. DOI: **10.1038/nature13384**

[23] Siddappa A Patil, Shivaputra A Patil, Renukadevi Patil, Rangappa S Keri, Srinivasa Budagumpi, Geetha R Balakrishna & Matthias Tacke, N-heterocyclic carbene metal complexes as bio-organometallic antimicrobial and anticancer drugs, *Future Med. Chem.*, **2015**, 7, 10, 1305-1333.

[24] Laszlo Mercs, Martin Albrecht, Beyond catalysis: N-heterocyclic carbene complexes as components for medicinal, luminescent, and functional materials applications, *Chemical Society Reviews*, **2010**, 39, 6. DOI: **10.1039/b902238b**

[25] Marie-Laure Teyssot, Anne-Sophie Jarrousse, Michele Manin, Aurelien Chevry, Stephane Roche, Frederic Norre, Claude Beaudoin, Laurent Morel, Damien Boyer, Rachid Mahiou, and Arnaud Gautier, Metal-NHC complexes: a survey of anti-cancer properties, *Dalton Transactions*, **2009**, 35, 6894. DOI: **10.1039/b906308k**

[26] Parish RV. Gold in medicine-chrysotherapy. *Interdisc. Sci. Rev.* **1992**, 17, 3, 221–228.

- [27] Thomas G. Benedek, The History of Gold Therapy for Tuberculosis, *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, 2004, 59, 1, 50-89. DOI: **10.1093/jmas/jrho42**
- [28] Olivier Rixe, Waldo Ortuzar, Manuel Alvarez, Ricardo Parker, Eddie Reed, Ken Paul and Tito Fojo, Oxaliplatin, Tetraplatin, Cisplatin, and Carboplatin: Spectrum of Activity in Drug-Resistant Cell Lines and in the Cell Lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen Panel, *Biochemical Pharmacology*, **1996**, 52, 1855-1865.
- [29] Faïma Lazreg and Catherine S. J. Cazin, NHC–Copper Complexes and their Applications, *N-Heterocyclic Carbenes: Effective Tools for Organometallic Synthesis*, **2014**, 8, 199-242.
- [30] <https://slideplayer.hu/slide/1985353/> utolsó megtekintés: 2022.11.12. 21:13
- [31] M. R. Chorawala, P. M. Oza, G. B. Shah, Mechanisms of Anticancer Drugs Resistance: An Overview, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, **2012**, 4, 1, 01-09.
- [32] Tímea Windt, Szilárd Tóth, Izabel Patik, Judit Sessler, Nóra Kucsma, Áron Szepesi, Barbara Zdrazil, Csilla Özvegy-Laczka, Gergely Szakács, Identification of anticancer OATP2B1 substrates by an in vitro triple-fluorescence-based cytotoxicity screen, *Archives of Toxicology*, **2018**, DOI: **10.1007/s00204-019-02417-6**
- [33] P. de Fremont, N. M. Scott, E. D. Stevens, S. P. Nolan, *Organometallics* **2005**, 24, 2411.
- [34] Ichraf Slimania, Lamjed Mansour, Nael Abutaha, Abdel Halim Harrath, Jameel AlTamimi, Nevin Gürbüz, I. Özdemir, and Naceur Hamdi, Synthesis, structural characterization of silver(I)-NHC complexes and their antimicrobial, antioxidant and antitumor activities, *Journal of King Saud University*, **2020**, 32, 2, 1544-1554. DOI: **10.1016/j.jksus.2019.12.010**
- [35] Z. Szabó, M. Timári, R. Kassai, B. Szokol, A. C. Bényei, T. Gáti, A. Paczal, A. Kotschy. *Organometallics*, **2020**, 39, 3572-3589.
- [36] Szilávik Márton Ferenc, Királis NHC-réz-komplexek szintézise és alkalmazása aszimmetrikus átalakításokban, **2020**, URL: <http://hdl.handle.net/10831/71813>
- [37] Zita Szabo, Matyas Timari, Rudolf Kassai, Bianka Szokol, Attila C. Benyei, Tamás Gáti, Attila Paczal, and Andras Kotschy, Modular Synthesis of Chiral NHC Precursors and Their Silver and Gold Complexes, *Organometallics*, **2020**, 39, 3572–3589.