EREDMÉNYEK ÉS INNOVÁCIÓK

Radioaktív elemek, illetve egyéb szennyező mérgező nehézfémek eltávolítása az emberi szervezetből és a környezetből ipari nukleáris katasztrófák vagy terrortámadások során a katonaság és a lakosság védelme érdekében

TKP2021-NVA-14

MISKOLCI EGYETEM
UNIVERSITY OF MISKOLC

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Készült

a

Radioaktív elemek, illetve egyéb szennyező mérgező nehézfémek eltávolítása az emberi szervezetből és a környezetből ipari nukleáris katasztrófák vagy terrortámadások során a katonaság és a lakosság védelme érdekében

című

TKP2021-NVA-14

azonosítószámú projekt keretében

Miskolc, 2025

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

TARTALOM

A beszámoló rövid összefoglalója 4
Előzmények 11
A kutatás stratégiája 12
A komplexképző molekulák szintézise 14
A biológiai modellkísérlet leírása 20
Az ITC mérések eredményei 31
Az elméleti számítások eredményei 36
Fontosabb publikációk 51

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

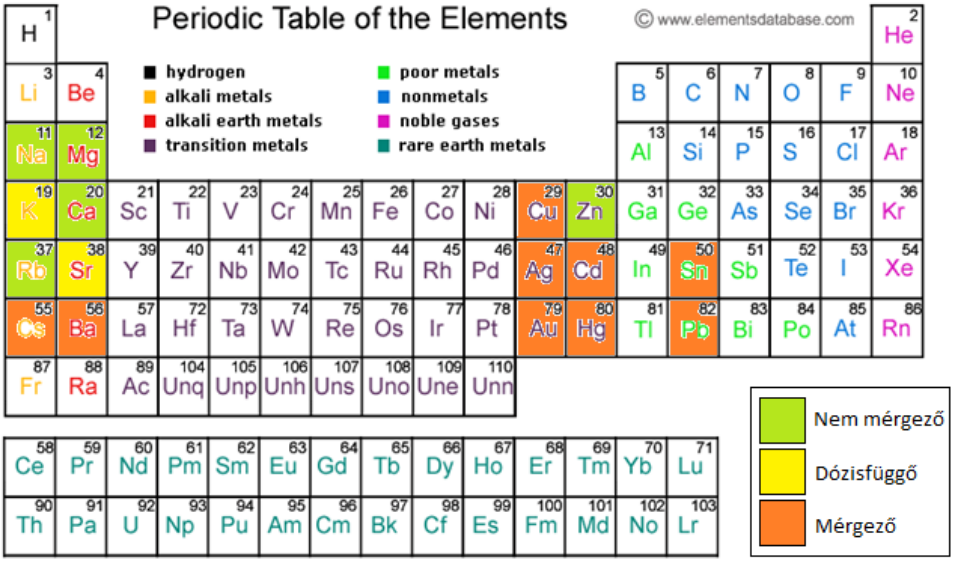
A beszámoló rövid összefoglalója

A nukleáris balesetek egyik legveszélyesebb öröksége a csontokban felhalmozódó radioaktív stroncium-90. Magyar kutatók egyedülálló molekulát fejlesztették ki, amely képes ezt az alattomos izotópot célzottan megkötni és eltávolítani a szervezetből – minimális mellékhatások mellett vészhelyzetben is bevethető módon.

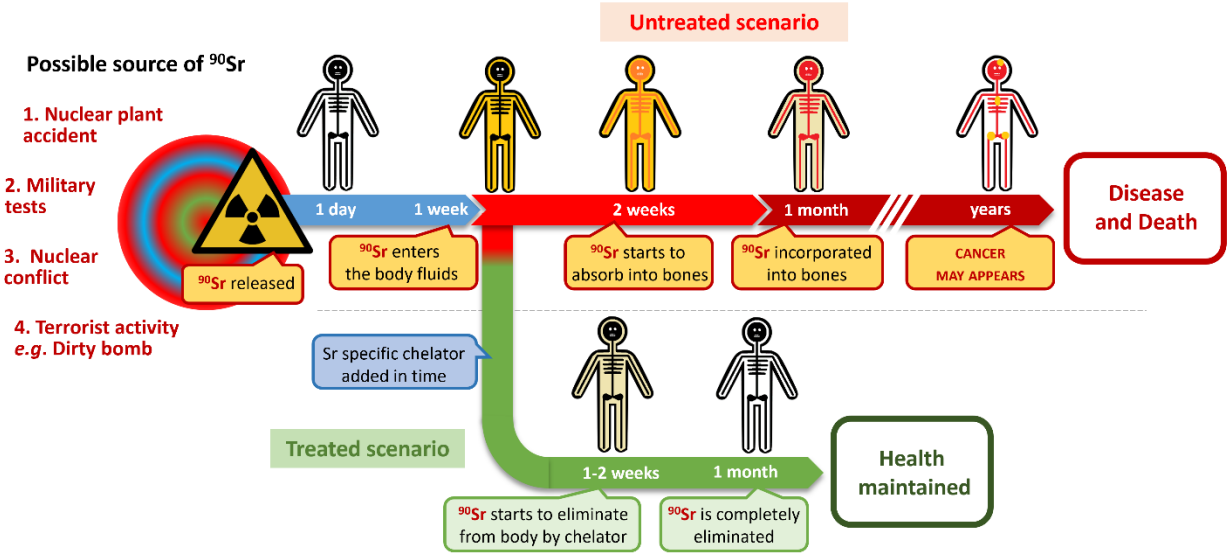
A nukleáris energia és a radioaktív izotópok alkalmazása napjainkban számos előnyt kínál az energiatermelésben, az orvosi diagnosztikában és terápiában, valamint a tudományos kutatásban. Ugyanakkor ezen izotópok melléktermékei komoly környezet- és egészségügyi kockázatot jelentenek, különösen vészhelyzet esetén, amikor radioaktív anyag kerülhet a környezetbe és az emberi szervezetbe. A nukleáris balesetek és a szándékos nukleáris események száma az elmúlt évtizedekben korántsem elhanyagolható: a Nemzetközi Atomenergia Ügynökség adatai szerint az elmúlt 60 évben több mint 200 ilyen eseményt regisztráltak világszerte. Mindez hangsúlyossá teszi a felkészülés és a hatékony dekontaminációs módszerek fejlesztésének fontosságát.
A radioaktív stroncium-90 (^{90}Sr) kiemelt veszélyt jelent a nukleáris események során. A periódusos rendszerben a stroncium közvetlenül a kalcium alatt helyezkedik el, ezért biokémiai viselkedése szinte azonos a kalciuméval. A szervezet ennek megfelelően nem képes megkülönböztetni a két iont, így a stroncium ugyanazokat a biológiai útvonalakat használva épül be a csont- és fogszövetbe. A ^{90}Sr közel 30 éves felezési ideje miatt a beépülést követően évtizedekig károsíthatja a csontvelőt, a vérképzést és a környező szöveteket, nagymértékben növelve a csontrák és más hematológiai daganatok kialakulásának kockázatát. A hosszú távú genetikai károsodások pedig akár következő generációk egészségét is érinthetik. A csernobili baleset után Ukrajna és Fehéroroszország jelentős részén mértek ^90Sr-szennyezést, ami jól példázza az izotóp közegészségügyi relevanciáját. Míg más, hasonlóan veszélyes radioizotópokra – például a ^{131}I esetében – létezik hatékony megelőző eljárás (a pajzsmirigy nem radioaktív jóddal való telítése), addig a stroncium esetén jelenleg nincs olyan széles körben elfogadott, mellékhatásmentes módszer, amely alkalmas lenne a szervezet gyors és szelektív tehermentesítésére. A jelenleg alkalmazott kelátképző szerek (EDTA, DTPA, EGTA, BAPTA, EGTA koronaéterek és egyéb kelátképzők) ugyan képesek megkötni a stronciumot, de szelektivitásuk csekély. A létfontosságú kalciumot és magnéziumot is hasonló erővel kötik, ami súlyos mellékhatásokhoz vezethet. A biztonságos és célzott stroncium-eltávolítás ezért mindmáig megoldatlan tudományos és egészségügyi probléma.

A jövő
A hosszú távú cél az, hogy a Decorporol és rokon vegyületei engedélyezett gyógyszerként álljanak rendelkezésre, amelyet nukleáris baleset vagy katonai incidens esetén azonnal be lehet vetni. Ehhez a következő lépés a vegyületek nagyüzemi gyártásának előkészítése és a hatósági engedélyeztetési folyamat megindítása. Ez a magyar innováció nemcsak hazai, hanem nemzetközi szinten is áttörést hozhat a nukleáris biztonság területén. Jelenleg ugyanis nincs a világon olyan széles körben elfogadott, mellékhatásmentes gyógyszer, amely képes lenne a ^{90}Sr-t szelektíven és biztonságosan eltávolítani az emberi szervezetbő (2. ábra)l.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



1. ábra. A periódusos rendszer elemei biológiai toxicitás szerint osztályozva: zölddel jelölve az esszenciális, nem mérgező fémek, sárgával a dózisfüggően mérgező elemek, pirossal pedig a kifejezetten mérgezőek.



2. ábra. A ^{90}Sr szervezetbe kerülésének lehetséges forrásai és a kezelés nélküli, illetve kezelt kimenetel összehasonlítása. Kezelés nélkül a radioaktív stroncium néhány napon belül a testfolyadékokba kerül, két héten belül megkezdődik a csontokba való beépülése, egy hónap után pedig stabilan raktározódik a csontszövetben, ami évek alatt súlyos betegségekhez, akár daganatokhoz vezethet. Időben alkalmazott stroncium-specifikus kelátképző szer esetén a ^{90}Sr kiürülése már az első hét során megindul, majd egy hónapon belül gyakorlatilag teljes eltávolítás érhető el, így az egészségi állapot fenntartható.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Egy magyar kutatási irány újraéledése

Magyarországon mintegy 35 éve indult el egy korai kutatási vonal, amely egy új típusú, stronciumra szelektív kelátképző molekulacsalád fejlesztését célozta. E munkából született meg a DECORPOROL® első generációja, amely szerkezeti sajátosságainak köszönhetően a korabeli vizsgálatok szerint ígéretes stroncium-szelektivitást mutatott. Bár az akkori prototípus kémiai stabilitása korlátozott volt, a koncepció – makrociklusos, több donoratomot tartalmazó kelátképzők alkalmazása – rendkívül előremutató megközelítésnek bizonyult.

A Miskolci Egyetem kutatócsoportjaként több évtized kihagyás után új lendülettel élesztettük újjá ezt a korai magyar innovációt. A projekt kezdetén széles körű kvantumkémiai előszűrést végeztünkk: több mint 50 különböző makrociklusos és polifunkcionális molekula szerkezeti és termodinamikai tulajdonságait modelleztükk nagy pontosságú DFT-módszerekkel. Ezekben az összehasonlításokban a kalcium–stroncium ioncsere Gibbs-energiáját vettük alapul, amely a szelektivitás egyik legfontosabb indikátora. A számítások alapján a Decorporol-koncepció kiemelkedően ígéretesnek bizonyult, mivel a stroncium preferált megkötését jelezte.

A kutatócsoportunk ezt követően megkezdte az új generációs molekulák laboratóriumi előállítását és analitikai vizsgálatát. Az elmúlt három évben nyolc új szerkezetet fejlesztettünk ki, amelyek a kelátképző funkciók finomhangolásával – például donoratomok számának, elhelyezkedésének és konformációs flexibilitásának módosításával – még kedvezőbb stroncium-szelektivitást és biológiai kompatibilitást ígérnek.

Elméleti és kísérleti módszerek integrálása

A molekulák értékeléséhez a kutatócsoportunk olyan metodikát dolgozott ki, amely a magas szintű kvantumkémiai számításokat kiterjedt kísérleti validációval kombinálja. A DFT-vizsgálatok során a nagyon pontos r²SCAN-3c kompozit módszert alkalmazták, amelyet előzőleg etilén-diamintetraecetsav (EDTA) Ca^{2+} és Sr^{2+} komplexeivel validáltak. A számítások eredménye (ΔΔG_DFT ≈ 15,4 kJ/mol) jól egyezett az irodalmi értékekkel. A módszer párjaként alkalmazott izotermális titrációs kalorimetria (ITC) mérések szintén szinte teljes egyezést mutattak a szakirodalommal, megerősítve a modell megbízhatóságát.

A vizsgálatok középpontjában a (7,16-bisz-malonát)-1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazaciklooktadekán-bisz-maloninsav – röviden Decorporol – állt. A kelátképzés termodinamikai elemzése alapján a $Ca^{2+} \rightarrow Sr^{2+}$ ioncsere Decorporollal exergonikus folyamat (ΔΔG_DFT = −14,1 kJ/mol). A kísérleti ITC-mérések még kedvezőbb értéket adtak (ΔΔG = −34,5 ± 1,1 kJ/mol), ami egyértelmű szelektív stronciumkötést jelez. A hőmérsékletfüggő mérések kimutatták, hogy fiziológiás körülmények között a kelátképződés stabil marad, így a molekula potenciális in vivo alkalmazása reális és tudományosan megalapozott.

In vitro és in vivo tesztrendszer kialakítása

A stronciumkelátok értékelésére egy olyan komplex tesztrendszer került kialakításra, amely egyszerre vizsgálja a molekulák hatékonyságát sejtkultúrában és élő szervezetben. A kifejlesztett in vitro modell különösen érzékeny: képes kimutatni, hogy a kelátképzők milyen mértékben akadályozzák meg a stroncium – nem radioaktív $SrCl_2$ formájában – extracelluláris mátrixba történő beépülését.

Ezzel párhuzamosan egy biztonságos, nem radioaktív stronciumizotópot alkalmazó in vivo egérmodellt is optimalizáltunk, amely alkalmas a stroncium kinetikájának és a kelátképzők biológiai hatásosságának vizsgálatára. A publikált eredmények (Scientific Reports) igazolták, hogy a Decorporol hatékonyan támogatja a stroncium szervezetből történő kiürítését, nem hátráltatja a normál kalcium-homeosztázist, és nem mutat kimutatható toxicitást – ez kulcsfontosságú követelmény egy jövőbeli gyógyszerjelölt esetében.

A jövő perspektívái

A kutatás hosszú távú célja, hogy a Decorporol és továbbfejlesztett változatai engedélyezett, biztonságos, széles körben alkalmazható gyógyszerré váljanak nukleáris balesetek, radioaktív szennyeződések vagy katonai radiológiai incidensek esetére. Jelenleg nem létezik olyan globálisan elfogadott készítmény, amely szelektíven, hatékonyan és mellékhatások nélkül képes lenne eltávolítani a ^90Sr-et az emberi szervezetből. A magyar fejlesztés ezért nemzetközi léptékben is áttöréshez vezethet. A következő lépés a vegyületek nagyüzemi gyártásának előkészítése, valamint a hatósági engedélyeztetés tudományos és technológiai megalapozása. A kifejlesztett tesztrendszer ugyanakkor nemcsak a Decorporol, hanem bármely más jövőbeli stronciumkelát vizsgálatára is alkalmazható, így a kutatás szélesebb körben hozzájárulhat a nukleáris biztonság növeléséhez és az emberi egészség védelméhez.

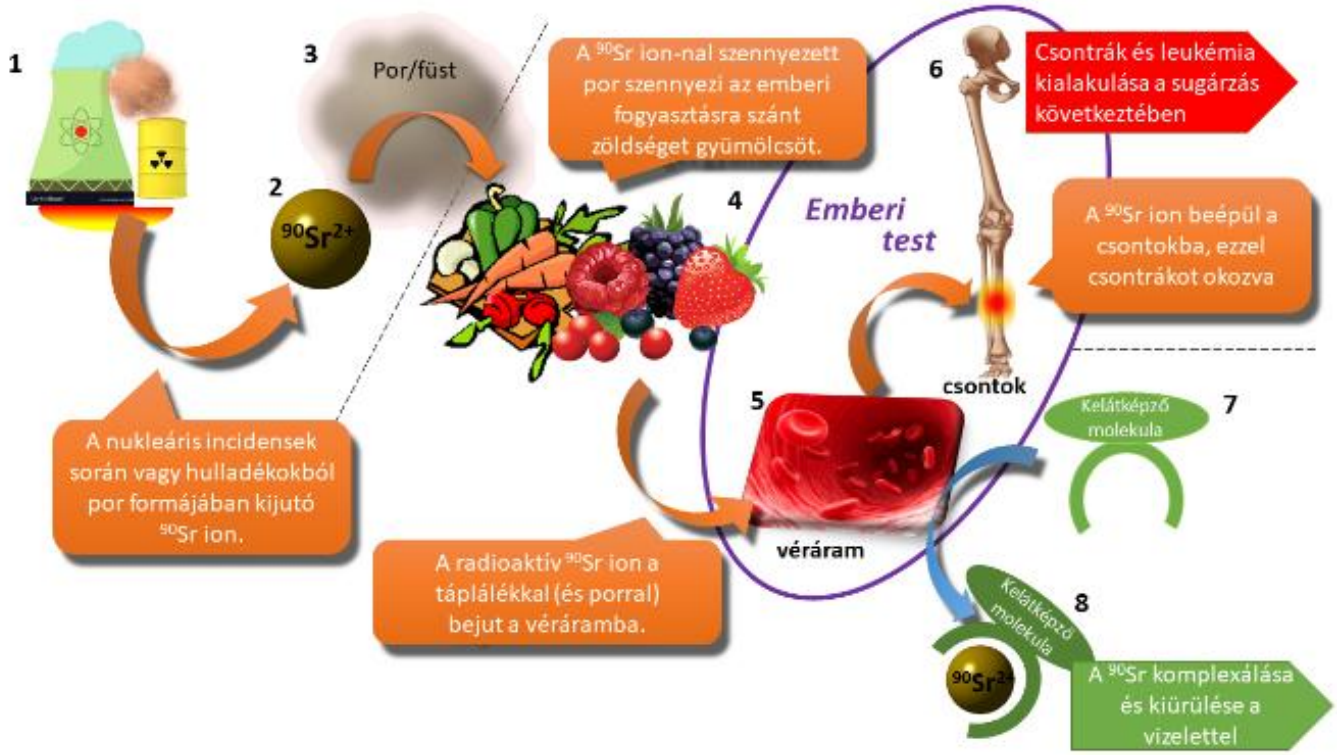
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Nukleáris vészhelyzet során a radióaktív stroncium eltávolítására szolgáló gyógyszerfejlesztési terve

A jelenlegi nemzetközi energia válságban az atomerőművek jelentősége felértékelődött a stabil és független, nem fosszilis alapú, valamint hosszútávon garantáltan olcsó energiatermelési kapacitásuk révén. Ugyanezen szituációban sajnos a veszélyességük jelentősége is fokozódott, amelynek az elhárításában oroszlánrészt tudna vállalni az alábbiakban részletezett magyar projekt, amely egy a nemzetközi piacon is határtalan nagyságrendben értékesíthető és ennek megfelelő pénzügyi sikert is magában hordozó sugárvédelmi hatóanyag ipari fejlesztését célozza meg. A korábbi szabadalmaztatott hatóanyag képes a nukleáris balesetek/katasztrófák során a környezetből az emberi szervezetbe jutó veszélyes radioaktív stroncium megkötésére, majd eltávolításra. (1. ábra)
Az atomerőművekben bekövetkező balesetek, mint amilyen a csernobili vagy a fukusimai katasztrófa volt, valamint a nukleáris fegyverek alkalmazása különböző radionuklidokat juttathat a légkörbe és az óceánokba. Jelenleg is zajlanak fegyveres konfliktusok olyan térségekben, ahol nukleáris erőművek találhatók, és a harcokban nukleáris fegyverekkel rendelkező államok is érintettek. További kockázatot jelent a kis méretű, modulárisan telepíthető, hasadáson alapuló kisméretű atomreaktorok (SMR-ek) elterjedése, amelyeket már Argentínában, Kínában és Oroszországban is alkalmaznak. Ezek az SMR-ek kompakt nukleáris reaktorok hozzávetőleg 300 MW villamos teljesítménnyel és moduláris felépítéssel rendelkeznek. Kis méretük miatt mérsékelhetik a lakossági ellenállást a hagyományos nagy atomerőművekkel szemben, amelyek kiépítése lassú és költséges. Az Egyesült Államokban, Japánban és az Egyesült Királyságban hasonló rendszerek már engedélyezési folyamatban vannak, ami az SMR-technológia közeljövőbeli széles körű alkalmazását vetíti előre.

E fejlemények növelik az olyan radioaktív izotópok (radionuklidok) expozíciójának kockázatát, mint a stroncium-90, cézium-134 és -137, vagy a jód-131.[3] Ezek közül a stroncium-90 (^{90}Sr) különösen veszélyes az emberi szervezetre nézve, elsősorban élettani hatásai miatt, mivel a stroncium képes a kalciumot helyettesíteni a csontvázban. Ennek oka a két ion hasonló tulajdonsága, például az ionrádiusz: $Sr^{2+} \approx 118$ pm, $Ca^{2+} \approx 94$ pm.
A stroncium kihasználja ugyanazokat a sejtes transzportmechanizmusokat, mint a kalcium, beleértve a kalciumraktárak kiürülése által aktivált útvonalakat. Emiatt a stroncium bizonyos élettani folyamatokban részben helyettesítheti a kalciumot. Ennek következtében a stroncium jelentős része a csontokban halmozódik fel, elsőként a csontfelszínen megkötődve – ezt Sonawane és munkatársai is kimutatták.
Mivel a csont tömegének akár 70 tömegszázaléka módosult hidroxiapatitból ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$) épül fel, a kalcium stronciummal történő helyettesítése ebben a kristályszerkezetben már korábban is vizsgálat tárgyát képezte. A stabil stronciumizotópok bizonyos dózisban még kedvező élettani hatásúak is lehetnek: növelhetik a csontsűrűséget és csökkenthetik az osteoporosis kockázatát.
A radioaktív stroncium beépülése ugyanakkor rendkívül aggasztó. A ^{90}Sr béta-sugárzással bomlik ^{90}Y izotóppá, amelynek felezési ideje 28,79 év, és 0,546 MeV energiájú β^--részecskét bocsát ki. A radioaktív stroncium-90 béta-bomlással ^{90}Y izotóppá alakul át, amelynek felezési ideje 28,79 év, és a bomlás során 0,546 MeV energiájú β^--részecskét bocsát ki. Ezt követően a ^{90}Y izotóp további béta-bomlást szenved, amelynek eredményeként stabil cirkónium-90 (^{90}Zr) keletkezik 64,1 órás felezési idővel és 2,28 MeV energiájú nagyenergiájú β-sugárzással.

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



3. ábra. A radioaktív stroncium elterjedésének teljes folyamata. A ^{90}Sr egy baleseti esemény folytán kijut a környezetbe (1–2) és bejut a légköri por és füst felszínére (3), majd a por természetes ülepedése vagy csapadék következtében a táplálékként fogyasztott zöldségekre és gyümölcsökre kerül. A táplálkozás során (4) a ^{90}Sr bejut véráramba (5), majd beépül a csontokba (6), ahol csontrákot és/vagy leukémiát okozhat. Terápiaként vagy megelőzésként alkalmazható egy célzott kelátor (7) a veszélyes iont eltávolítja a vérből a veséken keresztül (8), így az emberi szervezet egészsége megőrizhető.

Az ^{235}U bomlástermékékei

A radioaktív stroncium beépülése ugyanakkor rendkívül aggasztó. A ^{90}Sr béta-sugárzással bomlik ^{90}Y izotóppá, amelynek felezési ideje 28,79 év, és 0,546 MeV energiájú β^--részecskét bocsát ki. Ezt követően a ^{90}Y izotóp további béta-bomlást szenved, amelynek eredményeként stabil cirkónium-90 (^{90}Zr) keletkezik 64,1 órás felezési idővel és 2,28 MeV energiájú nagyenergiájú β-sugárzással.

A hasadási folyamat azonban nem kizárólag stronciumot eredményez. A ^{235}U bomlása során számos más, eltérő veszélyességű radioizotóp is keletkezik, amelyek mindegyike saját bomlási útvonalon halad.

Az ^{131}I bomlási lánca: ^{131}I → ^{131}Xe

A másik közismert és veszélyes hasadási termék az ^{131}I, amely 8 napos felezési idejével viszonylag gyorsan bomlik. Béta-sugárzással stabil ^{131}Xe izotóppá alakul át. Bár gyorsabban eliminálódik, mint a stroncium, biológiai viselkedése – elsősorban pajzsmirigy-felhalmozódása – rendkívüli egészségügyi kockázatot jelent. A radioaktív jód elleni védekezés (nem radioaktív jód beadása) azonban hatékonyan csökkenti a felvételét, szemben a stronciummal, amely esetén ilyen közvetlen megelőzés nem létezik.

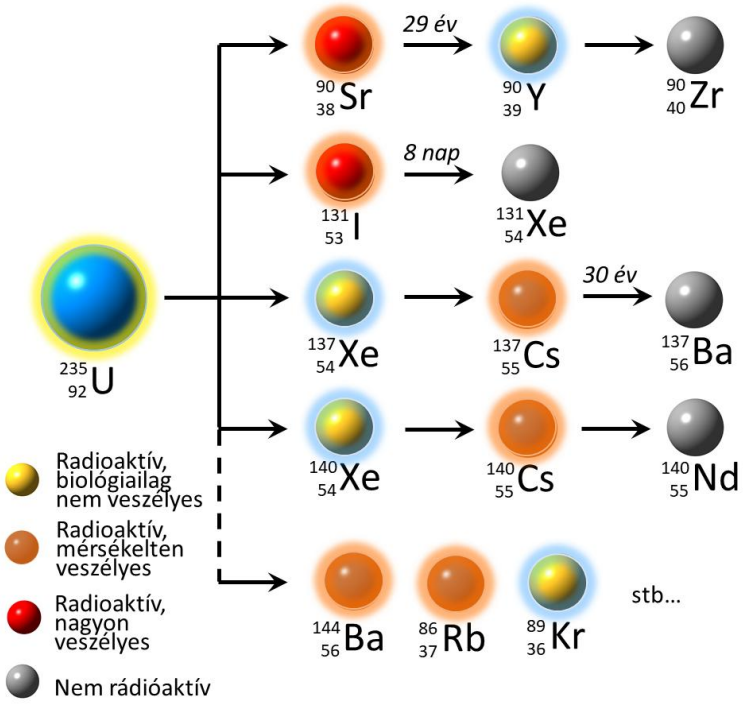
A ^{137}Cs eredete: ^{137}Xe → ^{137}Cs → ^{137}Ba

Szintén kiemelt jelentőségű hasadási termék a ^{137}Cs, amely nem közvetlenül a maghasadásból keletkezik, hanem a rövid életű ^137Xe béta-bomlásaként. A ^{137}Cs felezési ideje 30 év, vagyis a stronciumhoz hasonlóan *hosszú távú környezeti és biológiai kockázatot* jelent. A cézium biológiailag a káliumot utánozza, ezért izomszövetben és lágy részekben halmozódik fel. A ^{137}Cs stabil ^{137}Ba izotóppá alakul át béta-kibocsátás kíséretében.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

A ^{140}Cs képződése: ^{140}Xe → ^{140}Cs → ^{140}Nd
A ^{235}U bomlása során további rövid életű izotópok is képződnek, például a ^{140}Xe, amely béta-bomlással ^140Cs-sá alakul. A ^{140}Cs néhány napos felezési idővel rendelkezik, majd további béta-bomlással ^{140}Nd keletkezik. Mivel bomlási idejük rövid, ezek az izotópok gyorsabban veszítik el radioaktivitásukat, biológiai kockázatuk mérsékeltebb, ugyanakkor a frissen felszabaduló sugárzás intenzív.

Egyéb hasadási termékek: Ba, Rb, Kr stb.
A ^{235}U maghasadásának termékei szerkezetileg sokfélék, a könnyebb inert gázoktól (pl. ^{89}Kr) a közepes tömegű fémekig (pl. ^{144}Ba, ^{86}Rb; lásd 4. ábra). Ezek változó veszélyességűek: egyes izotópok gyorsan bomlanak stabil elemekké, míg mások – a stronciumhoz és céziumhoz hasonlóan – évtizedekig megmaradó sugárforrások lehetnek. A hasadási termékek összetett bomlási hálózata jól mutatja, hogy a nukleáris balesetek következményei igen sokrétűek lehetnek. A stroncium-90 azonban különleges figyelmet igényel, mivel hosszú élettartama és a csontokba való preferenciális beépülése révén egyedülálló, hosszan tartó egészségkárosodást okozhat.

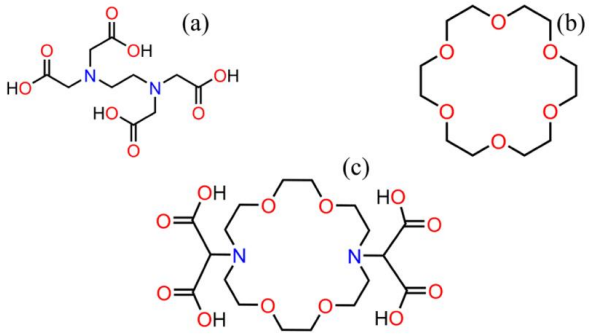


4. ábra. A ^{235}U maghasadásából származó főbb radioaktív hasadási termékek és bomlási útvonalak. A színkód jelzi az egyes izotópok biológiai veszélyességét (sárga: radioaktív, de biológiailag kevéssé veszélyes; narancs: mérsékelten veszélyes; piros: kiemelten veszélyes). A legfontosabb hosszú felezési idejű izotópok közé tartozik a stroncium-90 (^{90}Sr → ^{90}Y → ^{90}Zr), a jód-131 (^{131}I → ^{131}Xe), valamint a cézium-137 (^{137}Xe → ^{137}Cs → ^{137}Ba). A rövidebb élettartamú izotópok (pl. ^{140}Xe → ^{140}Cs → ^{140}Nd) gyorsabban stabil elemmé bomlanak.

A radioaktív stroncium felszívódása után az Sr^{2+} ionok szétoszlanak a szervezetben, és könnyen be- és kiáramlanak a sejtekből. Ez azzal a következménnyel jár, hogy a test számos sejtje folyamatos radioaktív sugárzásnak van kitéve, ami leukémiához és csontdaganatok kialakulásához vezethet. Emiatt kiemelten fontos a stroncium gyors eltávolítása a szervezetből, amely vizelettel, széklettel vagy izzadással történhet.
Az olyan vegyületek megtalálása, amelyek képesek eltávolítani ezt az iont expozíció esetén, az egyik legfontosabb feladat a nukleáris biztonság és a nukleáris energiatermelés fejlődése szempontjából. A fent említett radionuklidok eltávolítására

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

kelátképző vegyületek alkalmazhatók, amelyek a veszélyes radioaktív ionokat komplex formában tartják, és megakadályozzák, hogy beépüljenek a csontokba. Ezek a komplexek ezt követően vizelettel kiürülhetnek a szervezetből. Az International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Gold Book definíciója szerint a kelátképzés két vagy több különálló kötőhelyet tartalmazó ligandum és egyetlen központi atom között kialakuló kötések (vagy más vonzó kölcsönhatások) létrejötte vagy jelenléte. Az ilyen kötést tartalmazó molekulát kelátnak nevezzük.
Az etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA, 5. ábra, (a)) hatékony kalciumkelátor, amelyet számos gyógyszerkészítményben tartósítószerként és stabilizátorként alkalmaznak. Széles körben használják két- és háromértékű fémionok kelátképzésére, főként ivóvízből történő nehézfém-eltávolításra.
Az EDTA-nak azonban több mellékhatása is ismert, ezért a kelátterápiát EDTA-val általában csak akkor alkalmazzák, ha a toxikus fémkoncentráció már klinikailag releváns (pl. ólom esetén >45 μg/dL). A mellékhatások a dózistól, a vesefunkciótól és az alkalmazás gyakoriságától függnek. A toxikus hatások megnyilvánulhatnak akut tubularis nekrózisként, veseelégtelenségként, anuriaként vagy proteinuriaként. Emellett cinkhiányt is okozhat, mivel az EDTA nagy affinitással köti a cinket.
A Ca^{2+}–EDTA-komplexképzés az izoterm titrációs kaloriméterek (ITC) kalibrálásának egyik standard validációs módszere is. A készülékgyártók ehhez megfelelő oldatkészleteket forgalmaznak, és a kapott kötési paramétereket a kritikus stabilitási állandó ismert értékéhez viszonyítva validálják, igazolva ezzel a kalibrációs eljárás helyességét.



5. ábra. Pár valós kelátor EDTA (a), 18-korona-6 (b), és a Decorporol (c)

A radiostroncium kelátképzésével és eltávolításával kapcsolatban több korábbi kutatás is született. Például Noshkin és Mott a ciklohexándiamin-tetraecetsavval (CyDTA) olyan ioncserélő eljárást fejlesztettek ki, amellyel a ^{90}Sr izotópot tengervízből lehetett kinyerni. Az acetilamino-propilidén-difoszfonsav (APDA) is hatékonynak bizonyult: az orálisan alkalmazott Ca-APDA jelentős mértékben csökkentette a laboratóriumi patkányok combcsontjának radioaktivitását.[21] Ugyanakkor felmerült az is, hogy a patkány mennyire megfelelő modell az emberre nézve, különösen azért, mert a csontanyagcseréje lényegesen eltér az emberétől.

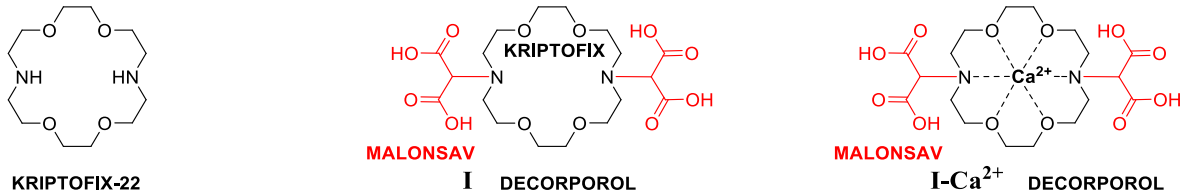
A koronaétereket szintén vizsgálták komplexképző tulajdonságaik és fémionokkal szembeni szelektív megkötőképességük miatt. A koronaéterek olyan monciklikus ligandumok, amelyek legalább három kötőhelyet tartalmaznak, és képesek egy „vendég" kationt a gyűrű központjába koordinálni. A koronaétereket potenciális kelátképző anyagokként is tanulmányozták vízben oldott fémionok eltávolítására. A legismertebb makrociklusos poliéterek közé tartozik az „18-crown-6" (5. ábra), amely jól ismert módon erősen komplexálja a káliumiont.
Kimutatott egyértelmű képességet a Sr^{2+} koordinálására is; ugyanakkor Glendening és munkatársai rámutattak, hogy a kation hidratációja jelentősen befolyásolja az 18-crown-6 szelektivitását. Mivel a kalcium és a stroncium egyaránt nyolc vízmolekulát koordinál hasonló térkitöltésű, torzult antiprizmás geometriában, a 18-crown-6 nem mutat szelektivitást stronciumra. Ezzel szemben a koronaéterek gyűrűszerkezetének módosítása vagy funkciós csoportok hozzáadása növelheti a kelátképzés szelektivitását és a komplexek stabilitását.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

A magyar MSZ 209386 szabadalom szerint a Decorporol (5. ábra), (IUPAC-név: 7,16-bis(malonát)-1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazaciklooktadekán-bisz-maloninsav) alkalmas lehet a stroncium szervezetből történő eltávolítására. Egérmodellben végzett in vivo kísérletek alapján a vegyület erősebben köti a stronciumot, mint a kalciumot.
A vegyület hátránya viszont, hogy a malonsav részlet lebomlik, ami gátolja a stronciumürítést. A Decorporol dekarboxileződése során malonsav szabadul fel, amely citotoxikus; ez a folyamat nehézfémek jelenlétében fel is gyorsul. Emiatt stabilabb nátriumsókat lehet előállítani, amelyekben a végső szerkezet már kalciumot tartalmaz a koronakomplex központjában. Kalcium–nátriumsó formában (Ca-Na_2-Decorporol) a vegyület stabilabbá, könnyebben kristályosíthatóvá és kevésbé higroszkópossá válik.
A pályázat során izoterm titrációs kalorimetriát (ITC) és nagy pontosságú sűrűségfunkcionál-elméleti (DFT) számításokat kombinálva vizsgáljuk a Sr^{2+} és Ca^{2+} Decorporolhoz való kötődésének termodinamikáját. A DFT-számítások a számítási kémia egyik legelterjedtebb módszercsaládját jelentik, mivel jó pontosságot nyújtanak mérsékelt számítási igény mellett a kvantumkémiai számítások mintegy 90%-a DFT-alapú.

Előzmények

Az egyik ismert és már a szabadalmi védettségen túljutott hatóanyag a DECORPOROL (6. ábra), mely vegyület esetében korábban mind fizikai-kémiai, mind egereken végzett *in vivo* kísérletekben igazolták a nagyobb affinitást a stronciumionhoz a kalciumionnal szemben. Az *in vivo* kísérletekben az élő szervezetből, a mesterségesen bevitt eltérő dózisú stronciumiont az intravénásan beadott DECORPOROL a kalciumion mellől szelektíven el tudta távolítani és a vizelettel távozott, megelőzve a csontokba történő beépülést. Ez alapján ki lehet jelenteni, hogy egy DECORPOROL által bevitt, kötött Ca^{2+} ion kicserélhető egy Sr^{2+} ionra, így a DECORPOROL feleslege a továbbiakban nem csökkenti ki a szervezet Ca^{2+} ion tartalmát. Az állatkísérletek továbbá nem jeleztek számottevő toxicitást, ezért a DECORPOROL nukleáris katasztrófa esetén azonnal, további emberkísérletek nélkül is alkalmazható. Ráadásul, *in vitro* mérésekkel más, toxikus fémionokkal szembeni affinitást is kimutattak, ami tovább erősítette a vegyület alkalmazhatóságát. A DECORPOROL-t nemzetközileg védő szabadalom lejárt, a vegyületnek már nincs védettsége, ezért piaci lehetőségei erősen korlátozottak.



6. ábra. KRIPTOFIX-22 és a DECORPOROL alapváza (**I**) illetve a Ca-ion-komplexe (**I-Ca^{2+}**).

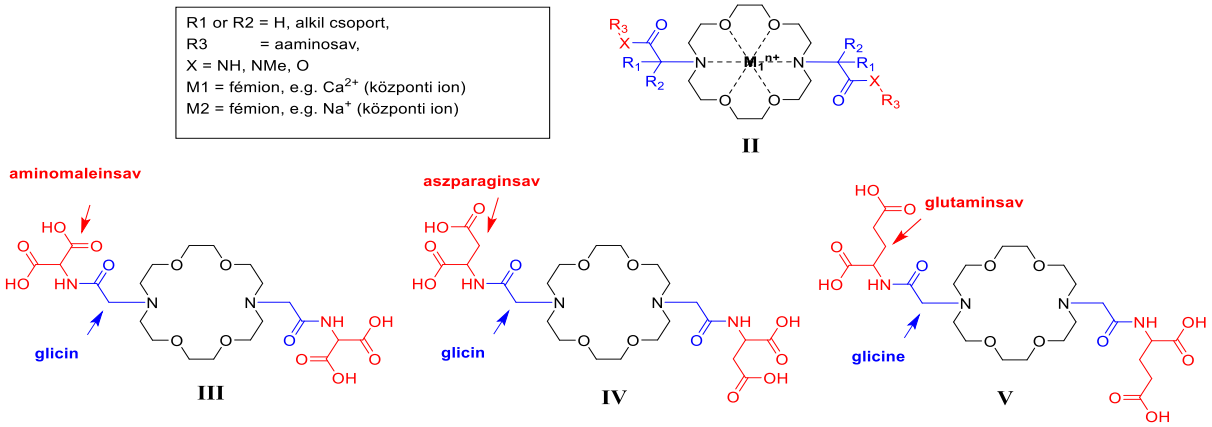
Korábbi mérések alapján a DECORPOROL ionmegkötő specificitása a következő sorrendet adta:

$$Fe^{2+} < Mg^{2+} < Zn^{2+} < Mn^{2+} < \mathbf{Ca^{2+}} < Sr^{2+} < Ce^{2+} < Cd^{2+} < Pb^{2+}$$

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

A kutatás stratégiája

Célkitűzés: A beadott pályázat célja, hogy egy új termékcsoportot vizsgáljunk meg (7. ábra). Egy másik korábbi termékszabadalom egy új vegyületcsaládot is bevont a kutatás körébe, ennek kifejlesztése és kémiai biológiai vizsgálata azonban ennek a pályázatnak lett a feladata, amelyektől azt vártuk, hogy erősebben és szelektívebben kötik a stronciumot vagy az egyes mérgező fémionokat.



7. ábra. KRIPTOFIX valamint referenciamolekula (**I**) és a három tanulmányozott komplexképző (**III**, **IV** és **V**). KRIPTOFIX-szel

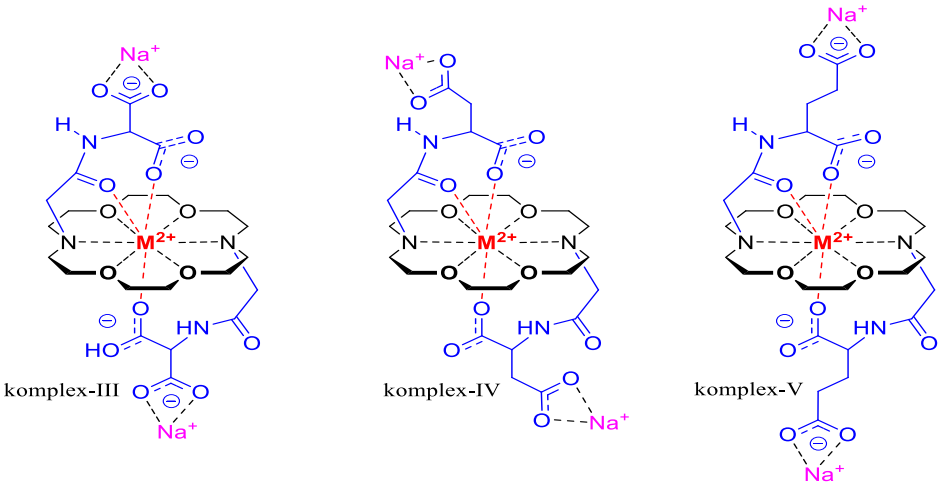
A projekt kutatási témája részben új kémiai szerkezetei a **II**-es (általános szerkezet) új kelátképző makrociklusos szerves vegyületek és/vagy ezek szervetlen vegyületekkel alkotott sói előállítása és ezek felhasználása egyes toxikus és nem toxikus, egyszeresen vagy többszörösen töltött fémionok semlegesítésére és eltávolítására a talajból, vizekből, kőolajból vagy egyéb ásványi anyagokból és az élő szervezetből. Ezen vegyületek komplex formái a 8. ábrán kerül bemutatásra.

Az új molekulacsalád várható előnye:
1. A nehézfémeket, mint például a stronciumot a DECORPOROL-nál erősebben köti meg.
2. A vízben való oldhatóságuk lényegesen nagyobb, mint a korábbi vegyületeké.
3. A élő szervezetben való metabolizmusa során csak természetes aminosavak szabadulhatnak fel.

Az elvégzendő kutatási feladatok:
1. Egy új oltalmi kör bővítése céljából néhány tucat új molekula szintézise.
   a. Az előállított származékok szintézise 1-3 g-os méretben.
   b. Az előállított származék különböző fémekkel alkotott komplexek komplexációs állandóinak meghatározása.

2. A három, aminosav-oldalláncú kriptofix-származék (**III**, **IV**, **V**) reszintézise (reszintézis batch I, 2–3 hónap):
   a. A három, aminosav-oldalláncú kriptofix-származék (**III**, **IV**, **V**) szintézise 10–20 g-os méretben (három reszintézis batch I).
   b. A három reszintézis batch I segítségével a különböző fémekkel alkotott komplexek komplexációs állandóinak meghatározása.

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



8. ábra. A fémkomplexek sematizált 3D szerkezete

3. A három, aminosav-oldalláncú kriptofix-származék (**III**, **IV**, **V**) méretnövelése és a reszintézis batchek II előállítása, majd a végső vegyület kiválasztása:

a. A három, aminosav-oldalláncú kriptofix-származék (**III**, **IV**, **V**) szintézisének optimálása pár grammos méretben (a végtermékek minőségtől függően előzetes biológiai vizsgálatokra küldhető).

b. A három, aminosav-oldalláncú kriptofix-származék (**III**, **IV**, **V**) reszintézise az optimált szintézisúttal 10 grammos méretben (reszintézis batch II).

c. A három reszintézis batch II segítségével a preklinikai vizsgálatok tervezése és hatékonyságvizsgálat ('proof of concept', toxicitás, 'terápiás ablak', esetleg metabolizmus).

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

A komplexképző molekulák szintézise

A Decorporol szintézise

A korábbi szabadalomban az alábbi szintézisút került publikálásra, ahol a kriptofix (**3**) bázikus körülmények között kerül alkilezésre Br-malonsavval (**4**, ahol X = Br). A második lépésben a komplexképző esetében Ca sót képeznek, amely elvezet a Decorporol (**1**) vegyülethez. A feltüntetett alkilezőszer (Br-malonsav, **4a**) nem áll rendelkezésre az elérhető beszállítóknál. Ennek okán az eredeti szintézisutat nem volt módunkban kipróbálni, de más kisebb beszállítókat is megvizsgálunk a továbbiakban (pl. ABCR, Alfa, DougChem).

A Decorporol (1) előállítása a **WO 91/10655 szabadalomban** [40] leírt eredeti módszeren alapul (1. séma).
Az első lépésben a **1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazaciklooktadekán** (Kriptofix, 2) **alkilezése** történik **2-bromomalonsavval (3) vizes NaOH-oldatban**, 60–65 °C-on, amelynek eredményeképpen a **tétranát-só (4)** keletkezik. A keletkezett intermediert nem izolálják: lehűtés után, szobahőmérsékleten **1 ekvivalens $CaCl_2$** kerül a reakcióelegyhez, amely hatására a **koronaéter dinátrium-monokalcium sója** (Decorporol, 1) **kikristályosodik**, majd szűréssel leválasztható.

Alternatív szintézisútként a Br-malonsav (4a) alkilezőszer helyett a dietil bromomalonát alkilezőszert (4b) alkalmaztuk, mely egy működő alternatíva lehet, azonban egy plusz, védőcsoport eltávolítási lépést is igényel a folyamat.
A feladat szintetikus kivitelezéséhez a 2. táblázatban felsorol kiindulási anyagokat szereztük be. A reagensek, bázisok (K2CO3, NaHCO3) és oldószerek (THF, EtOH, MeOH, MeCN, AcOH, DMF, DMSO) a laboratóriumban rendelkezésre álltak megfelelő minőségben és mennyiségben. A szintézishez szükséges anyagokat megrendeltük, azok be is érkeztek a kémiai munkához, azonban ezek mennyisége csak a szintézisút felderítéséhez elegendő.

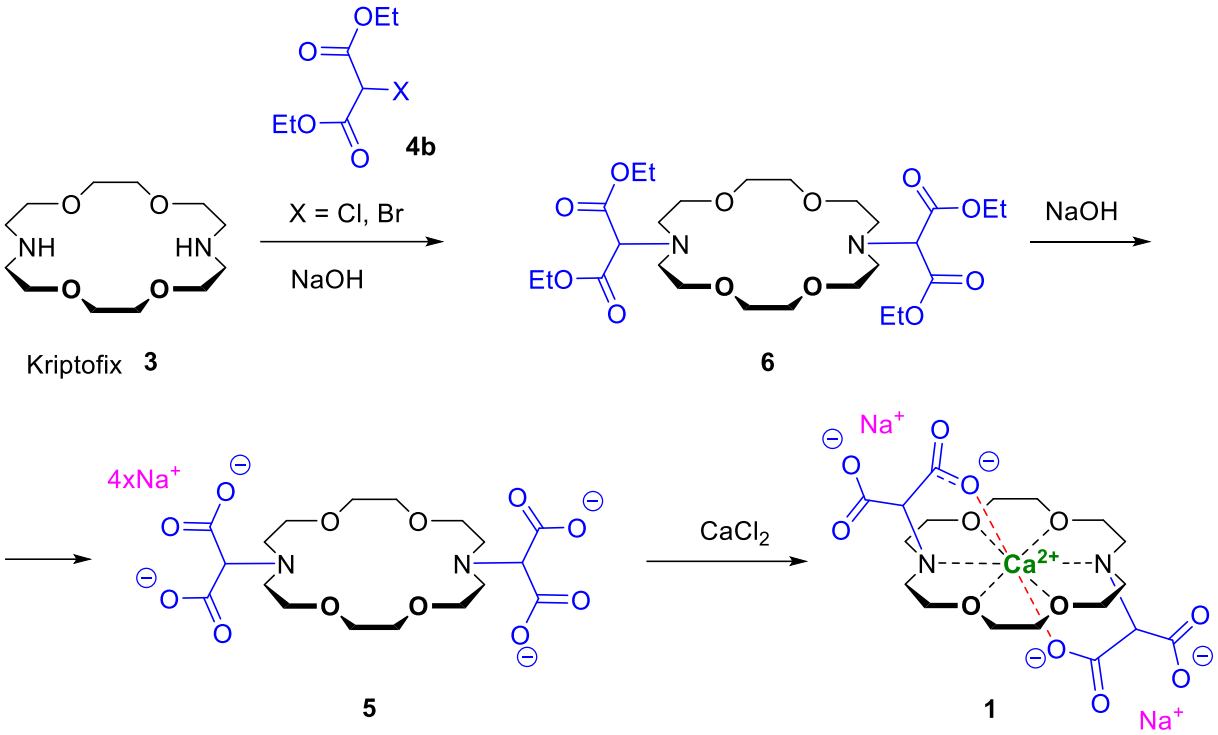
1. séma. A brommalonsav szintézise (3) malonsavból (2).

A Decorporol dinátrium-monokalcium sójának előállítása (1) (2. séma)

Kezdésként készen vásároltuk meg a Decorporol központi gyűrűjét, a diazakoronaétert. A megvalósítandó feladata diazakoronaéter dietil malonáttal történő alkilezése, majd az észtercsoportok hidrolízise. Az alkilezést többféle képpen is próbáltuk végrehajtani: szervetlen (Na2CO3, K2CO3) és szerves (DIPEA) bázis jelenlétében, és többféle oldószerben (ACN, DMF, NMP).

2,62 g (10 mmol; 262,35 g/mol) diaza-18-korona-6-ot (Kryptofix/Merck, 4) 100 mL vízben oldottunk. Ezután hozzáadtunk 2,40 g nátrium-hidroxidot (6 ekvivalens; 60 mmol; 40,06 g/mol) és 3,68 g bromomalonsavat (2,05 ekvivalens; 20,1 mmol; 182,96 g/mol). A keveréket 60–65 °C-on 72 órán át kevertük, így keletkezett a tetrasó formájú intermedier (5). A reakcióelegyet nem izoláltuk, hanem lehűtés után szobahőmérsékletre 1,1 g $CaCl_2$-t (1 ekvivalens; 10 mmol) adtunk hozzá. Ekkor a koronaéter dinátrium-monokalcium sója (Decorporol, 1) kristályosodott ki, amelyet leszűrtünk, majd vákuumban egy éjszakán át szárítottunk. A kapott termék: 2,0 g világosbarna por (1), dinátrium-monokalcium só formájában.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



2. séma. A Dekorporol (1) szintézise kriptofixból.

A 1,7,10,16-Tetraoxa-4,13-diazacyclooctadecane (Kriptofix 22) szintézise.

A Kriptofix, mint kiindulási anya.

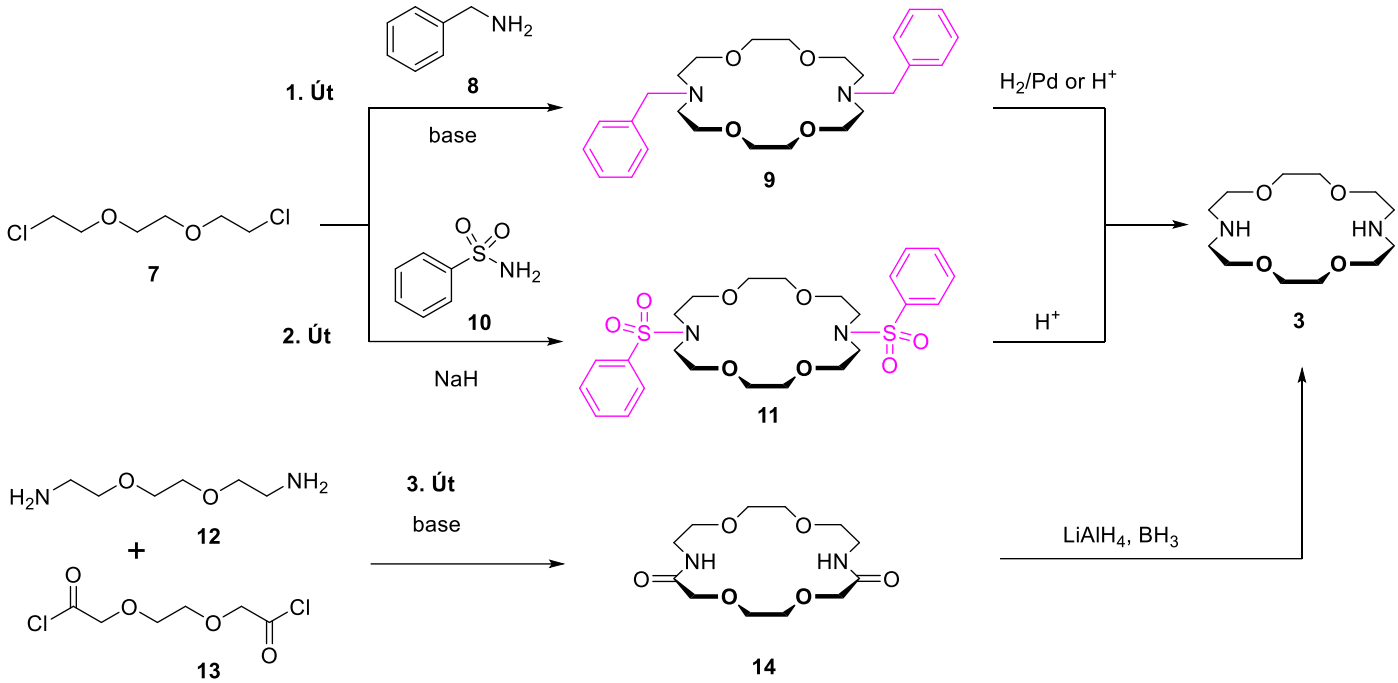
A Kriptofix (**3**) szintézisére fókuszáló részfeladat esetében számos előrehaladás történt. A termék előállítására 3 szintézisút került felvázolásra, 1. út, 2. út és 3. út (3-6 séma).

- Az 1. út a benzil amin (**8**) egyszerű alkilezési reakciója az 1,2-bis(2-kloroetoxi)etán (**7**), mely a kriptofix di-benzil származékát adja (**9**). Itt egyértelműen fennáll a polimerizáció veszélye. A termékhez egy hidrogénezésen alapuló védőcsoport eltávolítással jutunk el. Alternatíva lehet még egy savas elfőzés.
- A 2. út ugyanezt az alkilezőszert (**7**) alkalmazza benzoszulfonilamid (**10**) alkilezéséhez NaH jelenlétében. A szulfonamid bontását erős sav jelenlétében végeznénk.
- A 3. út egy alternatíva, ahol a **12**-es diamine ciklikus acilezése a **13** disavkloriddal adja a gyűrűs diamidot, amely erős redukálószer mellet szolgáltatja a terméket.

Mind a három utat szisztematikusan teszteltük.

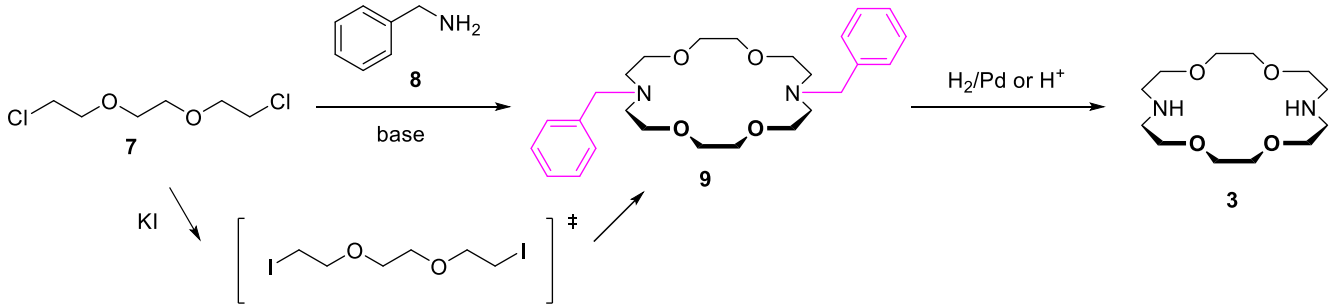
1. szintézisút: A benzilamin alkilezése a 7-es bis-klórszármazékkal DMF-ban szerves bázis mellett (TEA) meglehetősen lassan megy (3. séma). A reakcióelegy igen komplex, amely a sok oligomerizációnak köszönhető. A termék aránya igen alacsony. Második lépésben a reakcióelegyhez $CaCl_2$ -ot adagoltunk mint templát. Ebben az esetben a termék képződése már a kedvező irányba tolódott. A termékelegyet szilikagélen tisztítottuk. A hidrogénezés során a két benzil védőcsoport 1 óra alatt lehasadt.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



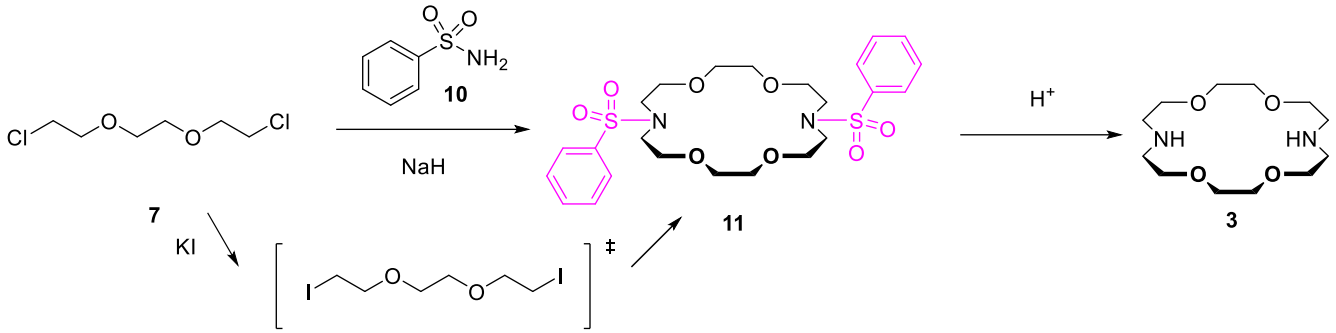
3. séma. Kriptofix szintézis (méretnövelés, jelenleg grammos méret van)

A benzofulfonamid alkilezése gyenge bázissal (TEA) nem játszódik le (4. séma). Ha NaH bázist alkalmazunk, akkor a reakció beindul és a termék illetve ezek oligomerei megjelennek. A CaCl2 templát a reakcióre ebben az esetben nincs jelentős hatással, feltehetően annkatudható be, mert a N elveszítette nemkötő elektronpárját.
A terméket oszlopkromatográfiával lehetett izolálni. A védőcsoport eltávolítását erős szervetlen savval kíséreltük meg, pl HCl és HBr vizes oldatával forralva, azonban ez igen nehézkesen ment. A védőcsoport eltávolítást tömény vizes NaOH-dal is megkíséreltük, de ez sem javította a konverziót.



4. séma. Kriptofix szintézis (méretnövelés, jelenleg grammos méret van)

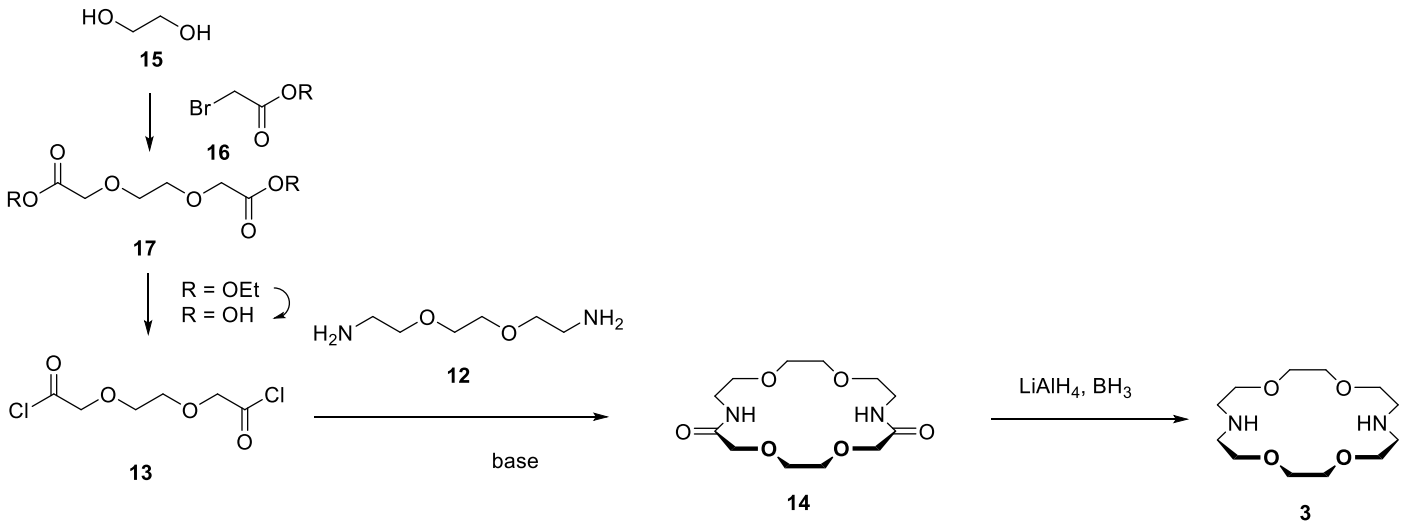
Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



5. séma. Kriptofix méretnövelt szintézise 2.

- Koronaéter-szintézis (1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane): A diazakoronaéter makrociklus szintézise során a 2,2'-(etán-1,2-diylbisz(oxi))di-ecetsavat metanolban, kénsav segítségével dimetil 2,2'-(etán-1,2-diylbisz(oxi))di-acetáttá alakítjuk. A keletkezett diésztert 2,2'-(etán-1,2-diylbisz(oxi))bisz(etán-1-amin)-nal reagáltatjuk nátrium-metoxid (NaOMe) jelenlétében, metanolban. A reakció eredményeként létrejövő 1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazaciklooktadekán-6,17-dion terméket az izolálást követően boránnal redukáljuk, hogy a végső amin-származékot kapjuk meg.
A decorporol gyártása egy diazakoronaéter szintézisével indul, amelyet de novo eljárásban állítunk elő olcsó kiindulási anyagokból, hogy a gyártás költséghatékony és skálázható legyen. Erre a korábbi jelentésekben már beszámoltunk, jelenleg már több grammos méretben tudjuk gyártani.
- Koronaéter-szintézis (1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecane): A diazakoronaéter makrociklus szintézise során a 2,2'-(etán-1,2-diylbisz(oxi))di-ecetsavat metanolban, kénsav segítségével dimetil 2,2'-(etán-1,2-diylbisz(oxi))di-acetáttá alakítjuk. A keletkezett diésztert 2,2'-(etán-1,2-diylbisz(oxi))bisz(etán-1-amin)-nal reagáltatjuk nátrium-metoxid (NaOMe) jelenlétében, metanolban. A reakció eredményeként létrejövő 1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazaciklooktadekán-6,17-dion terméket az izolálást követően boránnal redukáljuk, hogy a végső amin-származékot kapjuk meg.

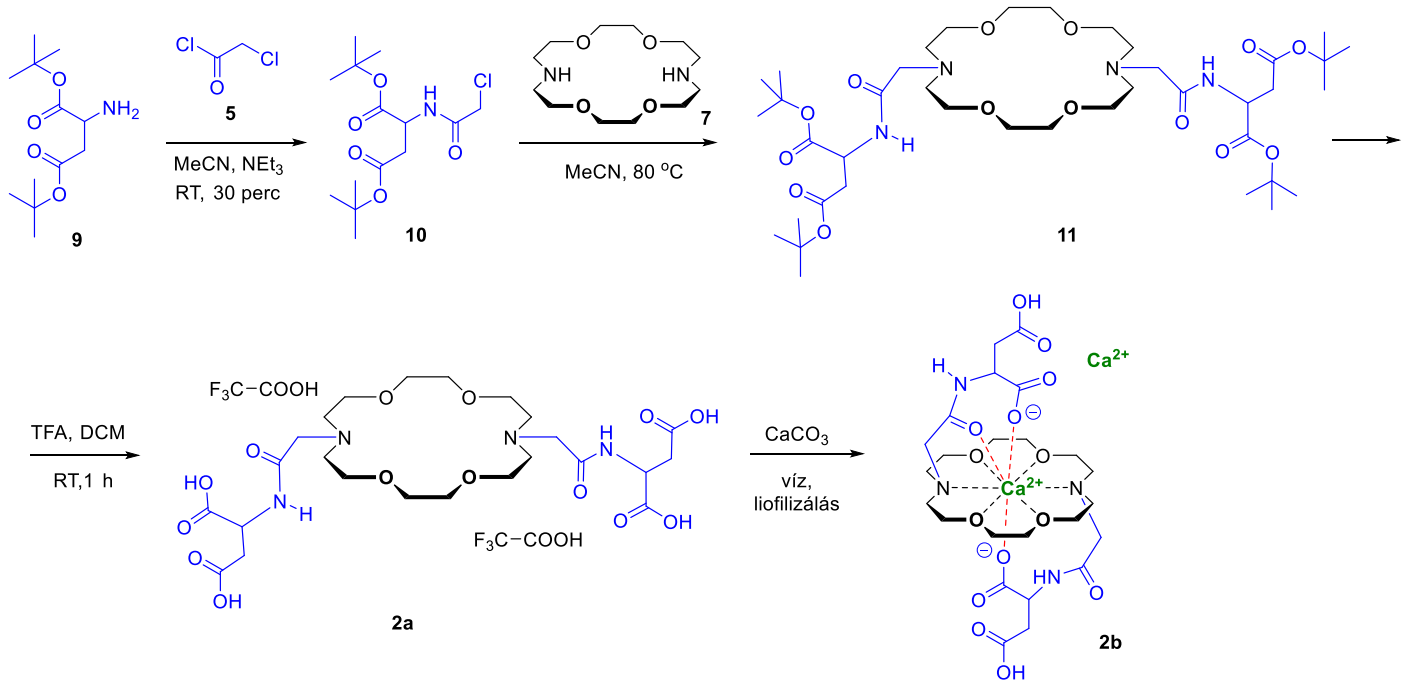
A 3. szintézisúton is megkíséreltük a szintézist. A dikarbonsav kloridot az alábbi szintézisúttal állítottuk elő (6. séma; **15** + **16** → **17** → **13**) relatíve jó termeléssel (össz 35%). Az aminovegyülettel az acilezés meglehetősen jól adta a kívánt 14-es intermediert (75%). A redukciós lépés viszont LiAlH4-del a szokásos módon zajlódott le, amely inkább alacsony termeléssel jellemezhető (kb 20%).



6. séma. Kriptofix méretnövelt szintézise 3.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

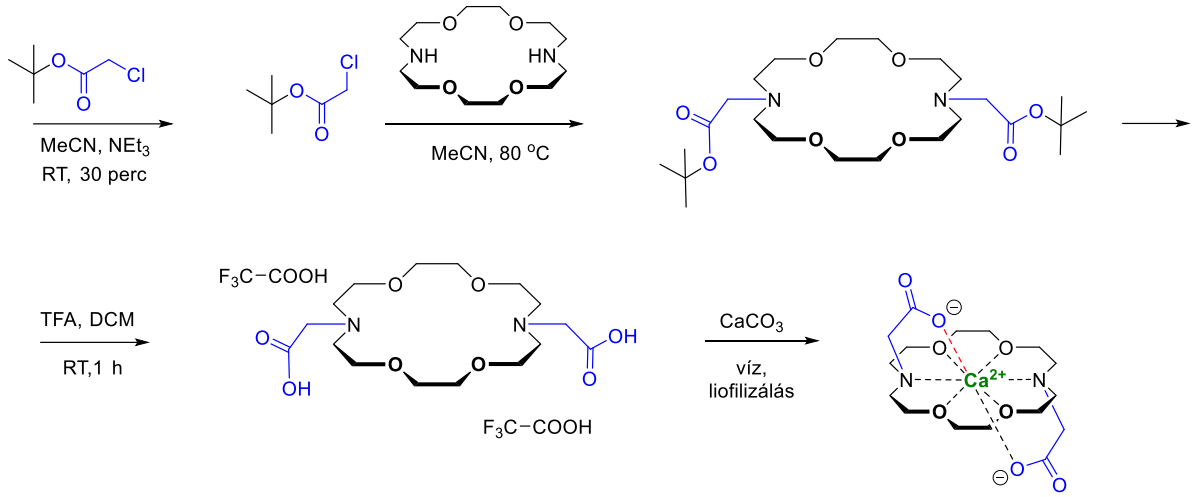
A Kryptofix 22 Gly-Asp (**1**) szintézisútja (**7. séma**): A kiindulási H-Asp(tBu)-OtBu-t (**9**) klórecetsav kloriddal (**5**, Cas: 79-04-9) alkilezzük acetonitrilben. Az oldószer bepárlása után és etilacetátos kirázást követően jó kitermelés mellett kaptuk a terméket (**10**). A következő lépésben a kapott termékkel (**10**) a kriptofixet (**7**) alkilezzük szintén acetonitrilben szerves bázis mellett (Et_3N), amely melegen is lassan játszódik le. Az oldószer bepárlása és a termék extrakcióját követően (etilacetát) kapjuk a védett terméket (**11**) jó termeléssel. A védett terméket (**11**) prep HPLC-vel tisztítottuk. A harmadik lépésben terc-butil védőcsoportot TFA-dal lefőzzük és a védetlen terméket (**2a**) szintén prep HPLC-vel izoláltuk az egyszerűség kedvéért. Végül reakcióelegyhez $CaCO_3$ -ot adagoltunk vizes oldatban, majd liofilizálom (**2b**), amely fehér por.



7. séma. A Kryptofix 22 Gly-Asp (**2**) szintéziséhez alkalmazott reakciósor

A Kryptofix 22 Gly-Glu (**1**) szintézisútja (**8. ábra**): A kiindulási H-Glu(tBu)-OtBu-t (**12**) klórecetsav kloriddal (**5**, Cas: 79-04-9) alkilezzük acetonitrilben. Az oldószer bepárlása után és etilacetátos kirázást követően jó kitermelés mellett kaptuk a terméket (**13**). A következő lépésben a kapott termékkel (**13**) a kriptofixet (**7**) alkilezzük szintén acetonitrilben szerves bázis mellett (Et_3N), amely melegen is lassan játszódik le. Az oldószer bepárlása és a termék extrakcióját követően (etilacetát) kapjuk a védett terméket (**14**) jó termeléssel. A védett terméket (**14**) prep HPLC-vel tisztítottuk. A harmadik lépésben terc-butil védőcsoportot TFA-dal lefőzzük és a védetlen terméket (**3a**) szintén prep HPLC-vel izoláltuk az egyszerűség kedvéért. Végül reakcióelegyhez $CaCO_3$ -ot adagoltunk vizes oldatban, majd liofilizálom (**3b**), amely fehér por.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



8. séma. A Kryptofix 22 Gly-Glu (**3**) szintéziséhez alkalmazott reakciósor

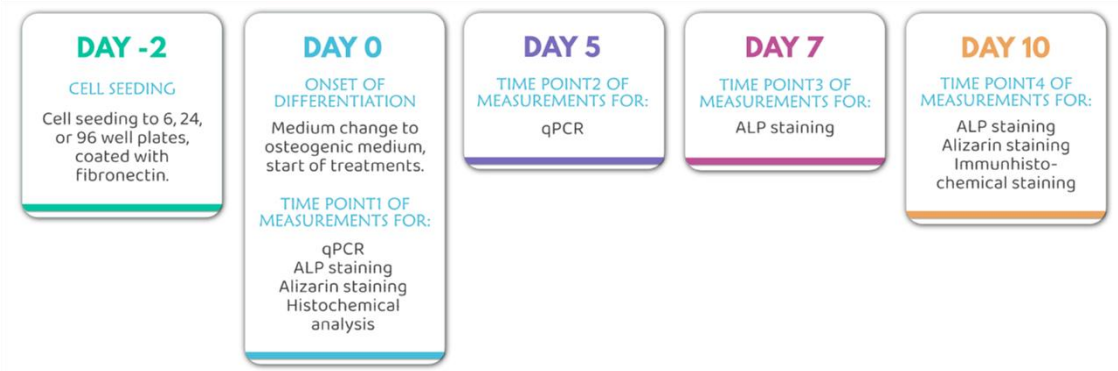
A szintetikus munka összefoglalása:

A Decorporol egy dinátrium–monokalcium só formájában alkalmazott, nagy szelektivitású komplexképző molekula, amely alkalmas kétértékű kationok – kiemelten a stroncium és kalcium – megkötésére és biológiai eliminációjának elősegítésére. Előállítása központi elemét képezi projektünknek, azonban az irodalomban közzétett eljárás egy kritikus reagens (2-bromomalonsav) elérhetetlensége miatt módosítást igényelt.
A WO 91/10655 szabadalomban közölt eredeti szintézisút szerint a diaza-18-korona-6 (Kriptofix) 2-bromomalonsavval történő bázikus alkilezése vezet a komplexképző intermedierhez, amely vizes közegben $CaCl_2$ hozzáadására kristályosodik, így a Decorporol dinátrium–monokalcium sója közvetlenül előállítható. A kereskedelmi úton nem elérhető bromomalonsav miatt ezt a módszert nem tudtuk reprodukálni, azonban alternatív beszállítók felkutatása folyamatban van.
Alternatív szintézisútként dietil-bromomalonátot alkalmaztunk alkilezőszerként, amely működő eljárásnak bizonyult, azonban egy további észterhidrolízises lépést igényel a kívánt savformáig. A reakciókhoz szükséges diazakoronaétert készen szereztük be, míg a bázisok (NaOH, K_2CO_3, $NaHCO_3$) és az oldószerek (MeCN, DMF, NMP, EtOH, THF, MeOH) laboratóriumi körülmények között is rendelkezésre álltak.
A Decorporol előállításánál 2,62 g diazakoronaétert oldottunk vizes közegben, majd 6 ekvivalens NaOH és 2,05 ekvivalens bromomalonsav jelenlétében 60–65 °C-on 72 órán keresztül reagáltattuk. Az intermediert izolálás nélkül $CaCl_2$-vel reagáltattuk, így a kívánt Decorporol só kristályos formában kivált és szűréssel leválasztható volt. A szárítást követően világosbarna port kaptunk dinátrium-monokalcium só formájában.
A Decorporol központi egységeként szolgáló diazakoronaéter szintézisével párhuzamos vizsgálatokat is indítottunk, három alternatív útvonalat tesztelve. Az **első út** benzil-amin alkilezési reakcióján alapult bis-klóretiléterrel, amely bár terméket adott, jelentős oligomerizációval és alacsony hozammal járt. A $CaCl_2$ templát hatása kedvező volt, azonban a védőcsoport eltávolítást további hidrogénezéses lépés igényelte.
A **második szintézisút** benzoszulfonil-amiddal indult, amely NaH jelenlétében alkilezhetőnek bizonyult, de a szulfonamid védőcsoport eltávolítása savas körülmények között nehézkesnek bizonyult. Erős savakkal és lúggal is próbálkoztunk, de a konverzió korlátozott maradt.
A **harmadik útvonal** ciklikus acilezésre épült dikarbonsav-kloriddal, amely jó hozammal adta az amid intermediert. Az ezt követő redukció $LiAlH_4$-del végbement, azonban csak mérsékelt (20%-os) termeléssel.
Mindhárom útvonalat tovább finomítjuk a termelések és tisztíthatóság javítása érdekében. A diazakoronaéter nagyobb léptékű szintézise folyamatban van, jelenleg grammszinten reprodukálható, a cél a többgrammos méretnövelés.
Összességében, a Decorporol előállítására alkalmas reakcióút hozzáférhető és reprodukálható, azonban fejlesztése – különösen a diazakoronaéter alternatív hozzáférése és a bromomalonsav hiányának kezelése – továbbra is aktív kutatási feladat.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

A biológiai modellkísérlet leírása

Az irodalomban ismert osteogén differenciációs technikák közül azt a módszert alkalmaztuk, amelyet korábban csoportunk írt le és validált, hogy vizsgáljuk a csontvelő-eredetű (BM-MSC) és zsírszövet-eredetű mesenchymális őssejtek (Ad-MSC) csontképző potenciálját. Ezzel a technikával az MSC-k irányított differenciációja a csont irányába megbízhatóan elvégezhető. A differenciációs folyamat sematikus ábrája a 9. ábrán látható.



9. ábra. – A mesenchymális őssejtek in vitro csontdifferenciációs modelljének sematikus ábrázolása.

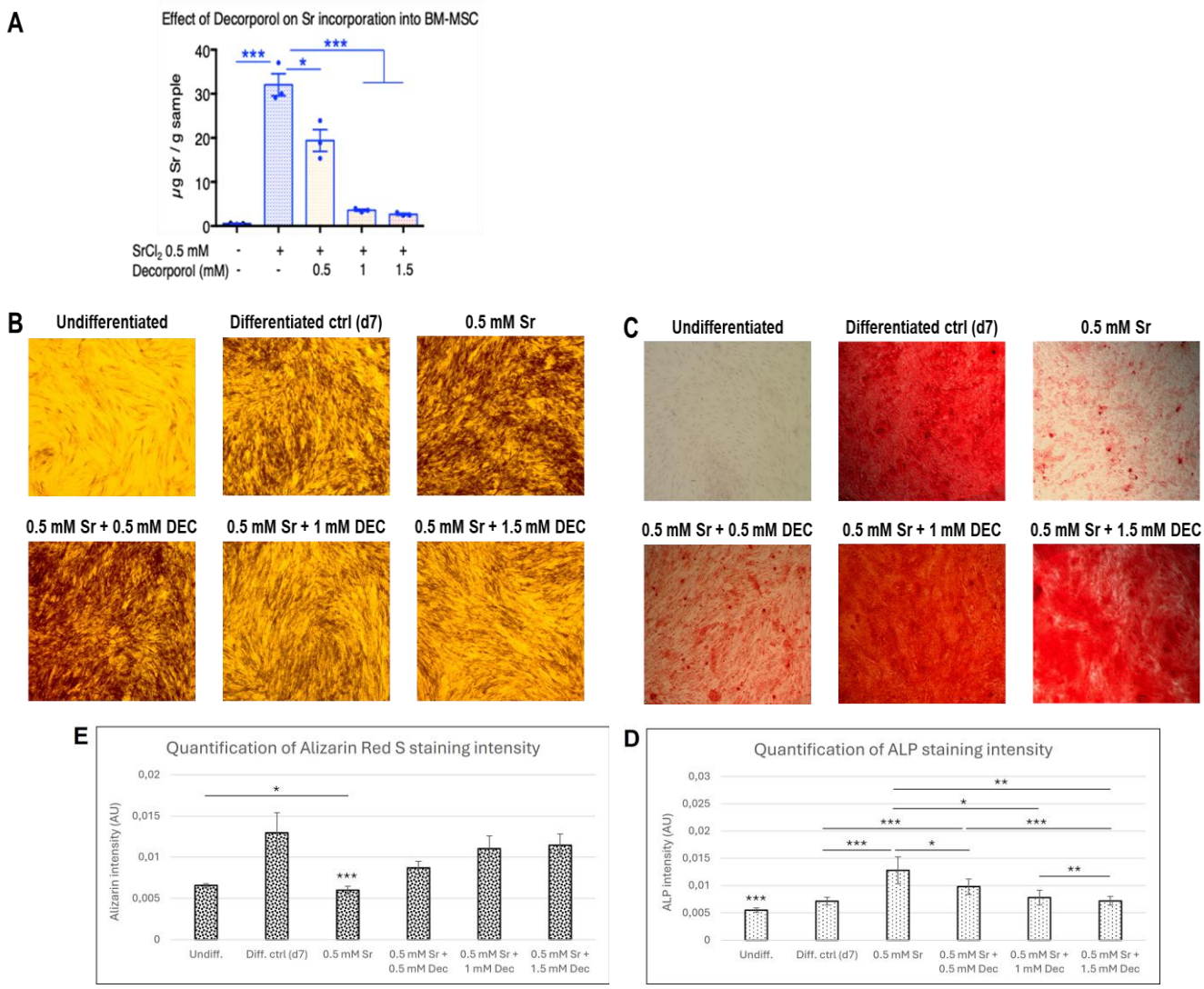
A stroncium kimutatására optimalizált osteogén differenciációs modell ICP-AES technikával
Első lépésként optimalizáltuk az in vitro differenciációs modellt oly módon, hogy a sejteket hatlyukas tenyésztőedényeken differenciáltuk. Ez a felületi méret biztosította az ICP-AES mérésekhez legmegbízhatóbb differenciációt és mintagyűjtést. Mivel az alkalikus foszfatáz (ALP) a csontdifferenciáció egyik legfontosabb markere, 0., 5. és 7. napon megvizsgáltuk az ALP mRNS-expresszióját és enzimaktivitását. Eredményeink alapján a 7. nap biztosította az ALP kimutatásának optimális időpontját mind mRNS-, mind fehérjeszinten, így a további kísérletekben erre a napra fókuszáltunk (10. ábra).

A differenciációs protokollok optimalizálása után megvizsgáltuk a stroncium beépülését az in vitro csontképződés során. A mesenchymális őssejtek osteogén táptalajban kerültek tenyésztésre, különböző $SrCl_2$-koncentrációk (0,5 mM; 1 mM; 2 mM) jelenlétében. A differenciáció 10. napján az ICP-AES technikával meghatároztuk a sejtek extracelluláris mátrixába beépült stroncium mennyiségét. Az eredmények egyértelműen igazolták, hogy a stroncium különböző koncentrációi megbízhatóan kimutathatók a csontképző sejtek extracelluláris mátrixában (10. ábra).

A $SrCl_2$ beépülésének megakadályozása a humán mesenchymális őssejtek osteogén differenciációja során Decorporol alkalmazásával
A Decorporol korábbi adatai alapján megvizsgáltuk, hogy a vegyület képes-e megakadályozni a stroncium csontsejtekbe történő beépülését in vitro modellünkben. Kísérleteinkben csontvelő-eredetű (BM-MSC) és zsírszövet-eredetű (Ad-MSC) MSC-ket differenciáltunk osteogén irányba a korábban ismertetett protokoll alkalmazásával. A differenciálódó sejteket 0,5 mM stronciummal kezeltük, majd párhuzamosan különböző koncentrációjú Decorporollal is.

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

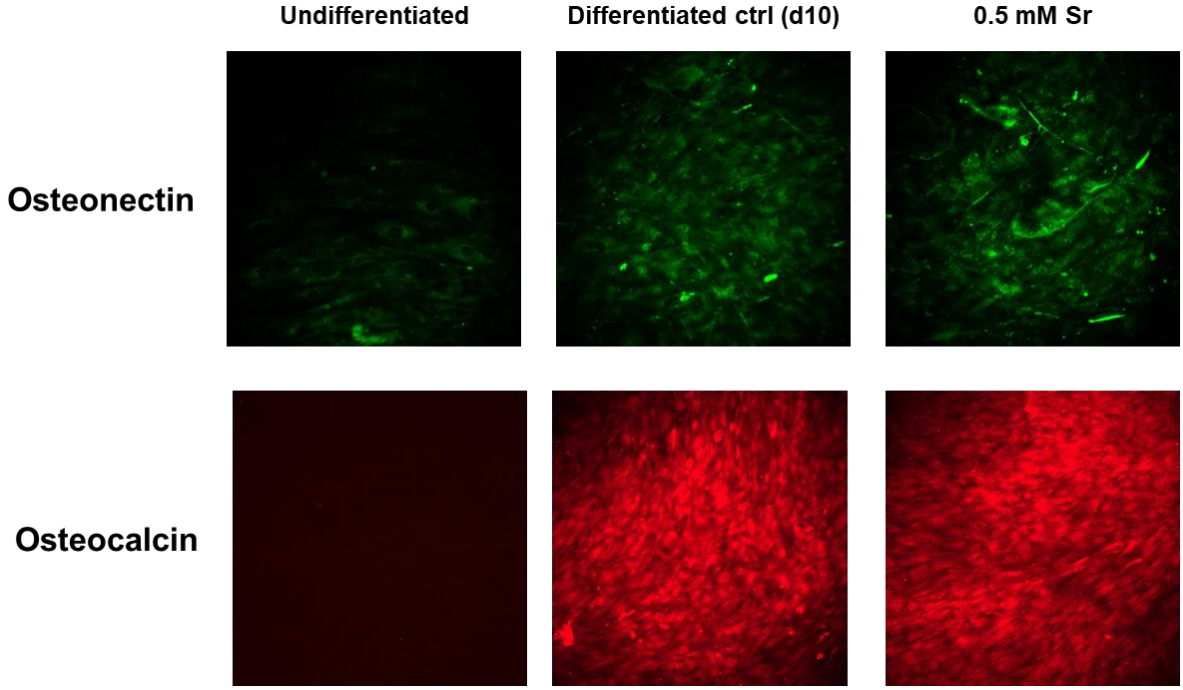
Az eredmények egyértelműen mutatták, hogy BM-MSC-k esetében a 0,5; 1 vagy 1,5 mM Decorporol jelentősen gátolta a stroncium beépülését a csontsejtekbe (10. ábra). Ezeket az eredményeket zsírszövet-eredetű MSC-ken is megerősítettük (11. ábra), bár e sejtek osteogén potenciálja gyengébb volt.
A stroncium és a Decorporol kezelések nem befolyásolták az osteogén differenciációt: ezt az ALP-festés és az Alizarin Red S-festés igazolta mind BM-MSC (2B, 2C ábra), mind Ad-MSC esetében (10. ábra).



10. ábra. A csontvelő-eredetű mesenchymális őssejteket (BM-MSC) a differenciációs folyamat során 0,5 mM stronciummal (Sr) kezeltük, és ezzel párhuzamosan Decorporolt (DEC) adtunk a sejtekhez 1:1, 1:2 és 1:3 arányban (vagyis 0,5; 1; illetve 1,5 mM koncentrációban). (A) A stroncium beépülését az osteogén differenciáció 10. napján vizsgáltuk ICP-AES technikával. Az Y-tengely a beépült stroncium abszolút mennyiségét mutatja mikrogrammban [µg Sr]. (B) Az osteogén marker ALP fehérje aktivitását ALP-festéssel detektáltuk a differenciáció 7. napján. (C) Alizarin Red S festéssel szemléltettük a 10 napos osteogén indukció után létrejött, megérett csontmátrix kalcium-lerakódását (piros jelölés). A képek fénymikroszkóppal, 4× nagyítással készültek. (D) Az ALP-festés intenzitásának kvantifikálását RGB-komponensekre bontott képek alapján végeztük MATLAB szoftverrel. A $SrCl_2$ kezelést követően az ALP expresszió jelentősen nőtt, ezt a Decorporol visszafordította. (E) Az Alizarin Red S festés intenzitásának kvantifikálása kimutatta, hogy a $SrCl_2$-kezelés csökkentette a kalcium lerakódását, amelyet a Decorporollal történő együttkezelés helyreállított. A statisztikai szignifikancia jelölése: *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

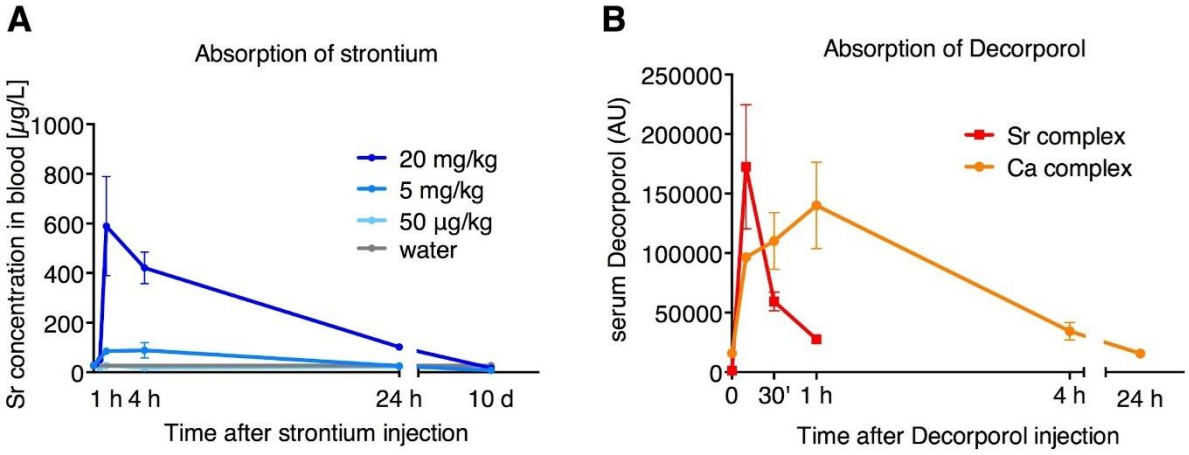
Alizarin Red S festésünk során 0,5 mM stronciummal kezelt mintákban gyenge festődést figyeltünk meg, noha ICP-AES alapján stroncium beépülés történt, és az ALP-eredmények szerint a sejtek differenciálódtak. Ennek tisztázására a BM-MSC mintákon osteogén markerek (osteonectin – zöld; osteocalcin – piros) immunfestését is elvégeztük a 10. differenciációs napon (11. ábra), amely megerősítette a csontirányú differenciációt.
A következő lépésben az in vitro eredmények megerősítésére in vivo modellt kívántunk alkalmazni a stroncium csontszövetbe való beépülésének mérésére és a Decorporol védőhatásának vizsgálatára. Célunk egy egérmodell kialakítása volt, amelyben optimalizáltuk a stroncium és a Decorporol adagolását, beadási módját és kezelési időtartamát.



11. ábra. Osteonectin és osteocalcin immunfestés BM-MSC mintákban.

A stroncium és a Decorporol felszívódása egérben
Elsőként a stroncium vérkeringésbe történő felszívódását vizsgáltuk egerekben három dózis mellett: 50 μg/kg, 5 mg/kg és 20 mg/kg. A stronciumot orális gavage technikával adtuk be (a szájon át történő expozíció modellezésére). A stroncium mennyiségét különböző időpontokban vett vérmintákból ICP-AES módszerrel határoztuk meg. Eredményeink szerint a stroncium egy órán belül felszívódott és a felszívódás dózisfüggő volt (12A ábra). A vizelet és széklet vizsgálata azt mutatta, hogy a stroncium 24 órán belül teljesen kiürült (12. ábra).
A Decorporolt 40 μmol/kg dózisban, intraperitoneálisan juttattuk be az egereknek, 30 perccel a stroncium beadása után. UPLC-MS technikával kimutattuk a Decorporolt a vérben, és elkülöníthető volt a kalcium-, illetve stroncium-komplex formája. Eredményeink szerint a stronciumhoz kötött Decorporol hamarabb jelent meg a keringésben, mint a kalciumhoz kötött forma (12B ábra), ami a stroncium iránti nagyobb affinitást jelzi. A WO 91/10655 szabadalom szerint a Decorporol Sr^{2+}/Ca^{2+} kötési aránya 1,2. A Decorporol 4 órán belül kiürült a keringésből.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



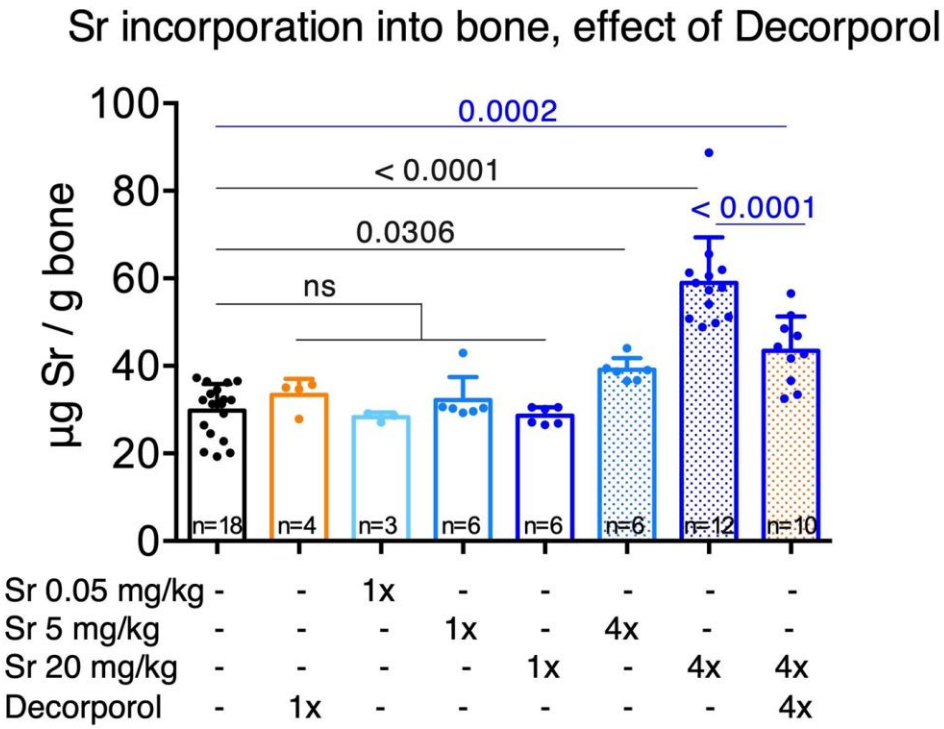
12. ábra. Stroncium és Decorporol felszívódási kinetikája egerekben. Orális gavage alkalmazásával beadott stronciumot ICP-AES technikával detektáltuk, amely egy órán belül dózisfüggő felszívódást és 24 órán belüli teljes kiürülést mutat (A). A stroncium beadása után 30 perccel intraperitoneálisan beadott 40 µmol/kg Decorporolt UPLC-MS technikával detektáltuk (B). A stronciumkötött Decorporol hamarabb jelent meg, mint a kalciumkötött forma, megerősítve a stroncium iránti nagyobb affinitást. (n=3).

Stroncium beépülése a csontszövetbe és a Decorporol hatása

Egyetlen dózis (0,05 mg/kg, 5 mg/kg vagy 20 mg/kg) beadása **nem eredményezett jelentős stroncium-beépülést** a csontszövetbe. Ezzel szemben, amikor a stronciumot naponta egyszer, 4 egymást követő napon át adagoltuk, a stroncium mennyisége a femurban **~34%-kal (5 mg/kg)**, illetve **~88%-kal (20 mg/kg)** nőtt (13. ábra).

A csontszövetbe történő stroncium-beépülés további vizsgálatához a **20 mg/kg-os, 4 napon át ismételt adagolási protokollt** választottuk. Amikor Decorporol kezelést adtunk az egereknek 30 perccel a stroncium beadása után, a Decorporol **~26%-kal csökkentette** a csontszövetben felhalmozódó stroncium mennyiségét a 4 napos kezelés után (a kizárólag stronciumot kapó állatokhoz viszonyítva) (13. ábra).

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



13. ábra. Egyszeri stronciumadag (teli kék oszlopok) nem eredményezett csontszöveti beépülést, azonban a 4 egymást követő napon át beadott 5 vagy 20 mg/kg dózis jelentős stroncium-integrációt okozott (kék, pontozott oszlopok). A Decorporol kezelés hatékonyan megakadályozta a stroncium csontszövetbe épülését (kék oszlop narancssárga jelöléssel). Az adatok átlag ± SD formájában szerepelnek, az egyedi biológiai minták ponttal jelölve. Az állatok száma az oszlopok alatt található. A szignifikanciavizsgálat egyutas ANOVA + Dunnett-féle többszörös összehasonlítás, a kontrollokhoz (fekete számok) vagy a 4× stroncium + 4× Decorporol kezeléshez viszonyítva (kék számok).

Diszkusszió

Az ICRP 134-es kiadványban leírt új biokinetikai modellek szerint a stroncium nemcsak a csontszövetben halmozódik fel, hanem más szövetekben is jellegzetes akkumulációt mutat. Amint ^{90}Sr beépül a csontba, rendkívül jelentős radiotoxikus kockázatot jelent hosszú, 29 éves felezési ideje miatt. A csontban és csontvelőben folyamatosan leadott sugárzás kumulatív károsodást okoz, és növeli a malignus elváltozások kialakulásának esélyét.

Korábbi vizsgálatok in vivo állatkísérletekben már kimutatták, hogy bizonyos komplexképző molekulák képesek eltávolítani a radioaktív stronciumot a szervezetből, mielőtt az beépülne a csontokba. A kihívás olyan kelátorok létrehozása, amelyek kellően szelektívek, és hatékonyabban segítik elő a stroncium kiürülését. A korábban alkalmazott nyílt láncú kelátorok (pl. EDTA és rokonai) nem specifikusak: nemcsak stronciumot, hanem a szervezet számára esszenciális ionokat (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, $Fe^{2+/3+}$) is eltávolítanak. Ez egyrészt súlyos mellékhatásokhoz vezethet, másrészt csökkenti a kezelés hatékonyságát is, mivel ezek az ionok versenyeznek a stronciummal a kelátor kötőhelyeiért. Ezzel szemben a jelenleg vizsgált makrocyklikus kelátor szerkezeti paraméterei kifejezetten stronciumhoz optimalizáltak.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Ebben a vizsgálatban célunk olyan **in vitro és in vivo** modellek kialakítása és optimalizálása volt, amelyek alkalmasak a stroncium csontba való beépülésének mérésére, valamint a kelátorok hatékonyságának értékelésére. Mivel a stroncium expozíció az egész szervezetre kihat, elengedhetetlen az in vivo modellek alkalmazása, ám etikai és költségbeli megfontolások miatt első lépésként in vitro rendszerek használata javasolt. Ennek megfelelően érzékeny in vitro rendszert hoztunk létre, amelyben vizsgálható volt az $SrCl_2$ hatása mezenchimális sejtek osteogén differenciációjára. A mesenchymális őssejtek egészséges állapotuk, proliferációs képességük és csont irányú differenciálódási potenciáljuk miatt ideálisak stroncium-szelektív kelátorok vizsgálatához.

Korábbi szakirodalmi adatokkal összhangban azt találtuk, hogy az $SrCl_2$ jelenléte fokozta az MSC-k osteogén differenciációját, amit az ALP-expresszió növekedése is igazolt. A Decorporol és $SrCl_2$ együttes alkalmazása azonban (1:2 és 1:3 arányban) gátolta ezt a hatást, megerősítve, hogy a kelátor képes csökkenteni a stroncium differenciációt serkentő hatását. Mindezek mellett kimutattuk, hogy 0,5 mM $SrCl_2$ jelenlétében a kalcium-depozíció csökkent, míg a Decorporol visszaállította azt a kontrollszintre, ami azt jelzi, hogy a kelátor hatékonyan csökkenti a stroncium mineralizációt gátló hatását.

Noha az MSC-k differenciációs képessége donor- és szöveti eredetfüggően jelentős variabilitást mutathat, jelen vizsgálatban egy BM-MSC és egy AD-MSC donorsorból származó sejtvonalon is igazoltuk a Decorporol hatékonyságát. Bár ez a szűkített in vitro megközelítés gyakori a transzlációs kutatásban, az eredmények konzisztenciája arra utal, hogy a megfigyelt hatások **nem sejtvonal-specifikusak**. Ezt az in vitro eredményeket egy 59 állatból álló kísérleti in vivo kohorsz adatai is alátámasztották, ahol szintén kimutattuk a stroncium felhalmozódás csökkenését. A két rendszer közötti magas fokú egyezés alátámasztja eredményeink transzlációs érvényességét.

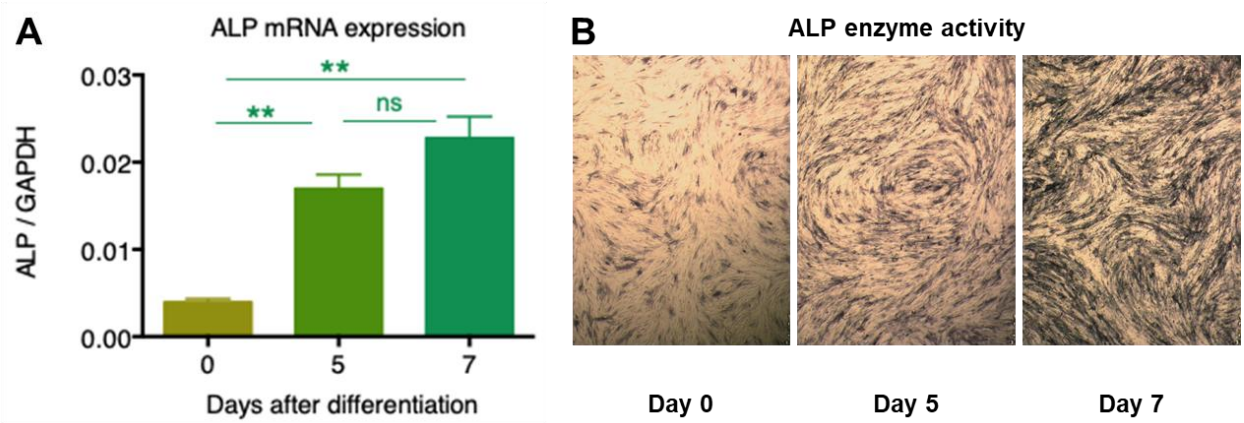
Az ICP-AES analitikai módszer alkalmazását vér- és csontminták stronciumtartalmának vizsgálatára korábbi kutatások is megerősítették. A pályázati munka során bemutattuk, hogy egy stroncium-szelektív kelátor képes megakadályozni a stroncium döntő hányadának beépülését a mineralizált csontmátrixba – vagyis oda, ahol a stroncium túlnyomórészt felhalmozódik. Ennek vizsgálatához Decorporolt alkalmaztunk, egy olyan szintetikus kelátképzőt, amelyet a 1980-as években fejlesztettek ki radiostroncium eltávolítására.

Az általunk optimalizált in vivo modellben – amely magasabb dózisú $SrCl_2$-t és Decorporolt alkalmazott, de jóval az LD_{50} érték alatt – megbízhatóan mérhető volt a stroncium csontba való beépülése és annak csökkenése kelátor hatására. Emellett in vitro citotoxicitási vizsgálatokat is végeztünk (MDCKII, HepG2 és primer humán MSC sejteken), ahol sem az $SrCl_2$, sem a Decorporol, sem azok együttes alkalmazása nem okozott citotoxicitást 2 mM-ig. Eredményeink azt mutatják, hogy sem a kelátor szabad formája, sem a stroncium-komplex nem toxikus biológiailag releváns koncentrációkban.
A jelenleg használt kelátképzőkhez viszonyítva a Decorporol kedvezőbb biztonsági profilt mutat. A tradicionális kelátorok – mint az EDTA – oxidatív stresszt és szövetkárosodást okozhatnak széles körű fémion-megkötésük miatt. A DMSA és a DMPS ugyan alacsonyabb toxicitásúak, de nem szelektívek az alkáliföldfémekre, így stronciumra sem. A klinikumban alkalmazott kalcium-glükonát pedig nem valódi kelátor, hatása elsősorban ionos versengésen alapul.
Ezzel szemben a Decorporol szerkezetileg optimalizált, kétértékű kationokhoz nagy affinitással rendelkező kelátor, amely a jelen vizsgálat alapján **magas szelektivitást** és **kedvező biztonságossági profilt** mutat. Bár részletes toxikológiai és farmakokinetikai jellemzés szükséges, a jelen munka egyértelműen igazolja a célzott, biokompatibilis kelátalapú megközelítés létjogosultságát. Tanulmányunk célja nem egy kész terápiás protokoll kidolgozása volt, hanem egy olyan **megbízható vizsgálati rendszer létrehozása**, amely alkalmas kelátorjelöltek előzetes értékelésére.

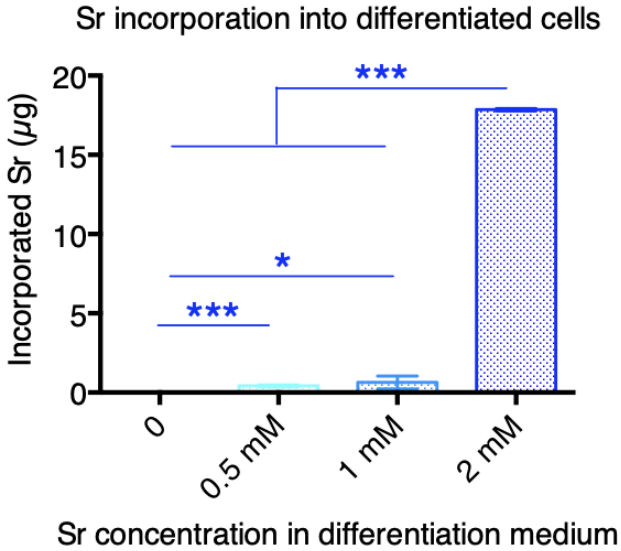
Vizsgálati felállásunkban egyszeri és kumulatív dózisprotokollt is alkalmaztunk (4 egymást követő napon adott $SrCl_2$ és Decorporol). A 4-szeri dózis egyértelmű stronciumbeépülést eredményezett, amely mellett a Decorporol hatása jól mérhetővé vált. Az ICP-AES nagy érzékenysége lehetővé tette a radioaktív izotópok elhagyását. A stronciumot orálisan adtuk be, míg a kelátort – hogy elkerüljük az előzetes Sr–Decorporol komplex kialakulását – egy másik útvonalon, intraperitoneálisan juttattuk be. A Decorporol a stronciumterhelést követő 30 perces időablakban hatékonyan csökkentette a csontok stronciumtartalmát mellékhatások nélkül.

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Eredményeink alapján a jövőben további vizsgálatok szükségesek annak meghatározására, hogy stronciumexpozíció után milyen időablakban hatékony még a kelátorkezelés, illetve milyen adagolási módok és útvonalak lehetnek optimálisak. Ugyancsak vizsgálandó a hosszú távú biztonság, beleértve a kalcium-homeosztázisra gyakorolt esetleges hatásokat is. Tudomásunk szerint **korábban még nem vizsgálták kelátorképző molekulák együttes in vitro (egészséges sejtvonal) és in vivo (állatmodell) hatékonyságát ugyanabban a tanulmányban (14-17. ábra)**, így eredményeink újdonságértéke jelentős.

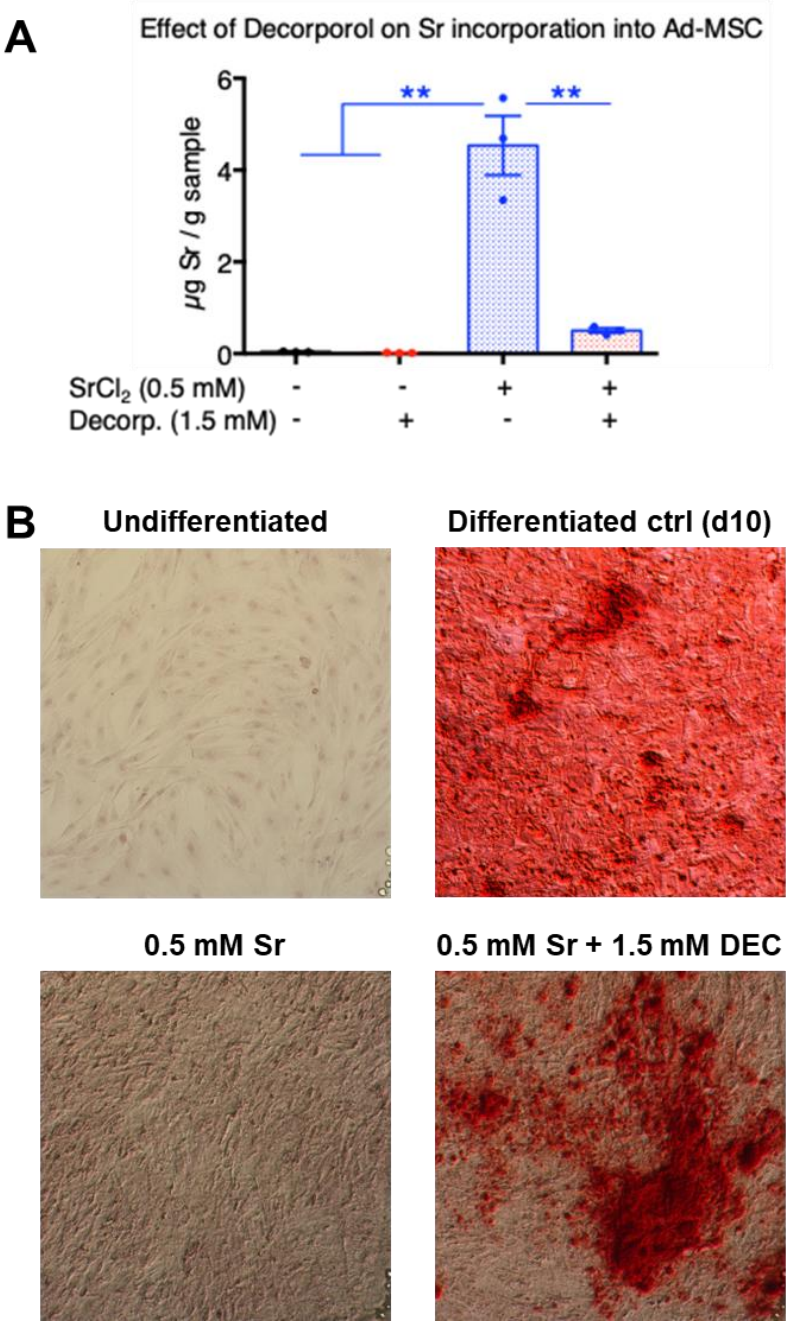


14. ábra. Az ALP gén mRNS-expressziós szintjét a differenciált mintákban RT-qPCR méréssel határoztuk meg (A), míg az ALP enzimaktivitást a csontvelő-eredetű MSC-k osteogén differenciációjának 0., 5. és 7. napján mértük (B).



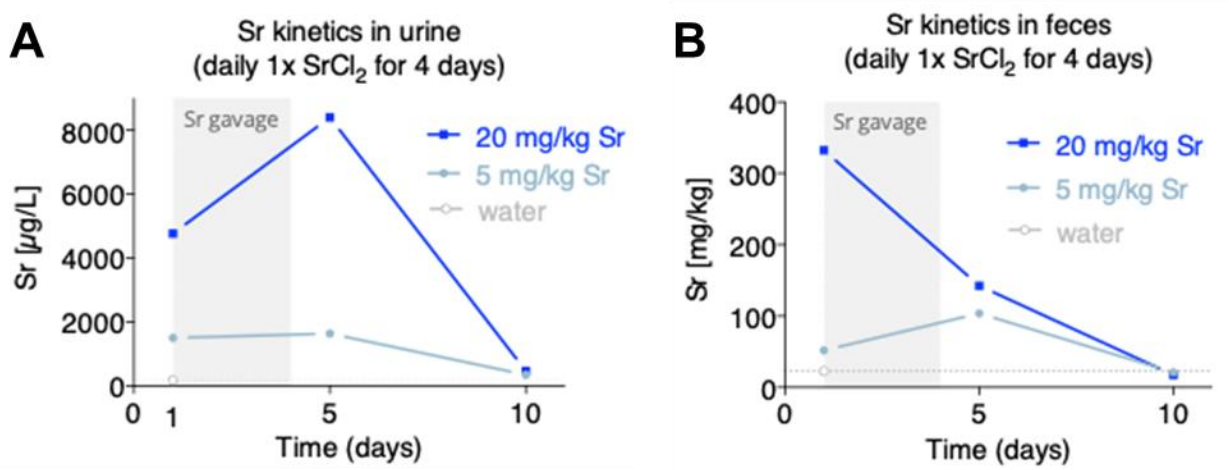
15. ábra. A stroncium (Sr) beépülését primer csontvelő-eredetű MSC-k osteogén differenciációjának 10. napján detektáltuk ICP-AES technikával. A sejteket különböző koncentrációjú $SrCl_2$-vel kiegészített differenciáló közegben tenyésztettük. Az Y-tengely a MSC-kbe beépült stroncium abszolút mennyiségét mutatja mikrogrammban [μg Sr].

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



16. ábra. A stroncium (Sr) beépülésének kimutatása, valamint a stroncium-lerakódás gátló hatásának vizsgálata ICP-AES technikával zsíreredetű MSC-k (Ad-MSC-k) osteogén differenciációjának 10. napján (A). Alizarin Red S festés az Ad-MSC sejteken az osteogén differenciáció 10. napján; a képek 4× nagyítással, fénymikroszkóppal készültek (B).

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



17. ábra. A stroncium kiürülésének kinetikája egerekben: A stronciumot (Sr) orális gavage alkalmazásával juttattuk be, majd ICP-AES technikával detektáltuk. A stroncium kiürült a keringésből és a szervezetből vizelettel és széklettel távozott (A, B).

A biológiai modellkísérletek módszerei

MSC izolálása, tenyésztése, differenciálása és stroncium/Decorporol kezelése

Mesenchymális őssejtek (MSC-k) izolálása és tenyésztése

A vizsgálatban felhasznált valamennyi mintát önkéntes, egészséges donoroktól szereztük be, az Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT) Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével (engedélyszám: 24083-3/2013/HER). A csontvelőből származó MSC-ket (n = 1 donor) és a zsírleszívásból származó zsírszöveti MSC-ket (n = 1 donor) korábban publikált protokollok szerint izoláltuk.

A sejteket DMEM/F-12 (1:1) + GlutaMAX-I (Thermo Fisher Scientific, Cat: 31331-028) tápoldatban tenyésztettük, amelyet 10% FBS-sel (Thermo Fisher Scientific, Cat: A5256701), 50 µg/mL gentamicinnel (Thermo Fisher Scientific, Cat: 15750-045) és 1 ng/mL humán bFGF-fel (Peprotech, Cat: 100-18B-100 UG) egészítettünk ki. A sejtkultúrákat 80–90% konfluenciánál passzáltuk 0,25% tripszinnel (3 perc). A kísérletekben a 6–12. passzázsból származó MSC-ket használtuk.

Osteogén differenciálás: A sejtek differenciálási kísérleteihez fibronectinbevonatú 6 lyukú tenyésztőlemezekre vetettük ki őket (Hu plasma fibronectin, Millipore, Cat: FC010), 140 000 sejt/well sűrűségben. Ezeket a mintákat ICP-AES méréshez, valamint Alizarin Red S- és ALP-festéshez használtuk. A differenciálási idő 10 nap volt, 2 naponta friss tápoldatcserével.

Az osteogén differenciálást az alábbi differenciáló közeggel indítottuk: 250 ml KnockOut-DMEM (Thermo Fisher Scientific, Cat:10829-018); 25 ml FBS; 2.5 ml L-glutamin; 2.5 ml MEM NEAA; 0.25 ml 2-mercaptoethanol; 0.25 ml gentamicin; 540 mg β-glicerofoszfát (Sigma, G9422-504); 12.5 mg 2-foszfó-L-aszkorbinsav-trinátrium-só (Sigma, 49752-10G); 100 nM dexametazon (Sigma, D1756-100MG)

Stroncium és Decorporol kezelés: A kezeléseket a differenciálás 1. napján indítottuk, 0,5 mM $SrCl_2$ (Sigma-Aldrich, Cat: 255521) végkoncentrációval, önmagában vagy 0,5; 1 vagy 1,5 mM Decorporollal kombinálva. A stroncium-oldatot frissen készítettük 200 mM-es törzsoldatból, és minden tápoldatcserekor frissítettük. Minden kísérletet három párhuzamos mintában végeztünk.

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Mintapreparálás ICP-AES méréshez: A stroncium osteogén differenciáció során történő beépülésének vizsgálatához a sejteket kétszer desztillált vízzel mostuk, majd cell scraperrel leválasztottuk és Eppendorf-csövekben 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a pelletet 300 µl 65%-os salétromsavval kezeltük. A mintákat egy órán keresztül szellőztetett elszívófülkében hagytuk, majd lezártuk.

Alizarin Red S festés: A sejteket 4% paraformaldehiddel (PFA, Fluka, Cat: 76240) fixáltuk 15 percig, majd kétszer PBS-sel, háromszor desztillált vízzel mostuk. Ezt követően 1 órán át inkubáltuk őket Alizarin Red S oldattal (Sigma-Aldrich, Cat: A5533-25G), majd háromszor óvatosan desztillált vízzel mostuk.

Alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitásmérés: A sejteket 4% PFA-val fixáltuk, majd háromszori PBS-mosás után 1 órán át BCIP/NBT ALP-szubsztráttal inkubáltuk (Sigma-Aldrich, Cat: SLCN3462). A mintákról fénymikroszkópos felvételeket készítettünk [42].

Immunocitokémia: A sejteket 4% PFA-val fixáltuk 15 percig, majd 1 órán át inkubáltuk őket a csontdifferenciációs markerekhez tartozó primer antitestekkel:

- osteonektin (R&D Systems, MAB941)
- oszteokalcin (Abcam, ab93876)

A fluoreszcens jelöléshez a következő másodlagos antitesteket alkalmaztuk:

- Alexa Fluor 488 (Life Technologies, A21202)
- Alexa Fluor 568 (Invitrogen, A11004)

A sejtmagokat DAPI-val festettük (Sigma, D8417).

Képanalízis: Az osteonektin-, oszteokalcin-, Alizarin Red S- és ALP-festéseket MATLAB szoftverrel elemeztük. A JPEG képeket RGB szétbontás után csatornánkénti átlagintenzitás alapján értékeltük. A kapott adatokat Student-féle t-próbával vizsgáltuk, és oszlopdiagramokon ábrázoltuk.

Génexpressziós vizsgálatok: Az összes RNS izolálása és cDNS-szintézis után a tissue-nonspecific alkaline phosphatase (ALP) gén expresszióját TaqMan™ qPCR-rel határoztuk meg (Assay ID: Hs01029144_m1). Referencia génként a GAPDH-t alkalmaztuk (Assay ID: Hs99999905_m1). Az expressziós értékelés a $2^{-\Delta Ct}$ módszerrel történt.

Állatkísérletes modell: Az in vivo vizsgálatokhoz 3 hónapos hím BALB/c egereket alkalmaztunk (Országos Onkológiai Intézet, SPF állatház). Az állatkísérleteket a HUN-REN RCNS telepén végeztük (engedélyszám: PE/EA/00204-2/2023), a hatályos nemzeti irányelveknek megfelelően.

$SrCl_2$ beadása: A stroncium-kloridot szájon át (oral gavage) alkalmaztuk. A kísérletben három dózist vizsgáltunk: 0,05 mg/kg, 5 mg/kg és 20 mg/kg (150 µl térfogatban). Az egerek egyszeri vagy 4 egymást követő napon át tartó napi dózist kaptak.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Decorporol beadása: A Decorporolt 50 mM HEPES pufferezett fiziológiás sóoldatban oldottuk, majd intraperitoneálisan adtuk be 40 µmol/kg dózisban, önmagában vagy 30 perccel a stroncium beadását követően.
Mindkét szer dózisa jóval az LD_{50} érték alatt volt.

Mintagyűjtés: Vérminták: A kinetikai vizsgálatokhoz K_3EDTA-val antikoagulált vért vettünk a farokvénából. A stronciumot 65% HNO_3-os feltárás után ICP-AES-sel mértük. Decorporol-méréshez a plazmát 10 kDa membránszűrőn tisztítottuk.

Combcsont (femur): A stroncium csontba épülését az utolsó $SrCl_2$-adag beadása után 24 órával értékeltük. A femurcsontokat 65% HNO_3-ban oldottuk, majd 100 ml-re hígítottuk ICP-AES analízishez.

Vizelet és széklet: Az ürített stroncium mennyiségét metabolikus ketrecekben gyűjtött mintákból határoztuk meg. A székletmintákat mikrohullámú feltárással (65% HNO_3, 170°C, 20 perc) oldottuk.

Stroncium ICP-AES mérése: Az analízishez 720 ES típusú Varian ICP spektrométert használtunk. A stroncium legérzékenyebb ionvonalait (407,771 nm és 421,552 nm) alkalmaztuk. A kalibrációt 1000 mg/L-es monoelement referenciaoldatokkal végeztük. A minták mátrixhatását rendszeresen ellenőriztük (90–110% visszanyerés).

Decorporol MS vizsgálata: A Decorporol-komplexeket Waters Acquity UPLC rendszerrel és Xevo G2-S qTOF tömegspektrométerrel analizáltuk. A méréshez BEH Glycan oszlopot, ACN–ammónium-formiát gradiens elúciót, 2.2 kV ESI feszültséget és 100–1000 m/z tartományt használtunk. A fragmentumokat 45 kV ütközési energiával határoztuk meg.

Statisztikai elemzés: Az in vitro kísérletekben Student-féle t-próbát alkalmaztunk. Az in vivo kísérletek értékelésénél egyutas ANOVA-t és Dunnett-féle többszörös összehasonlítást használtunk. A kontrollokkal való összehasonlítás p-értékei feketével, a Decorporol-hatás értékelésének p-értékei kékkel szerepelnek. A statisztikai számításokat és ábrákat GraphPad Prism 6 szoftverrel készítettük.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

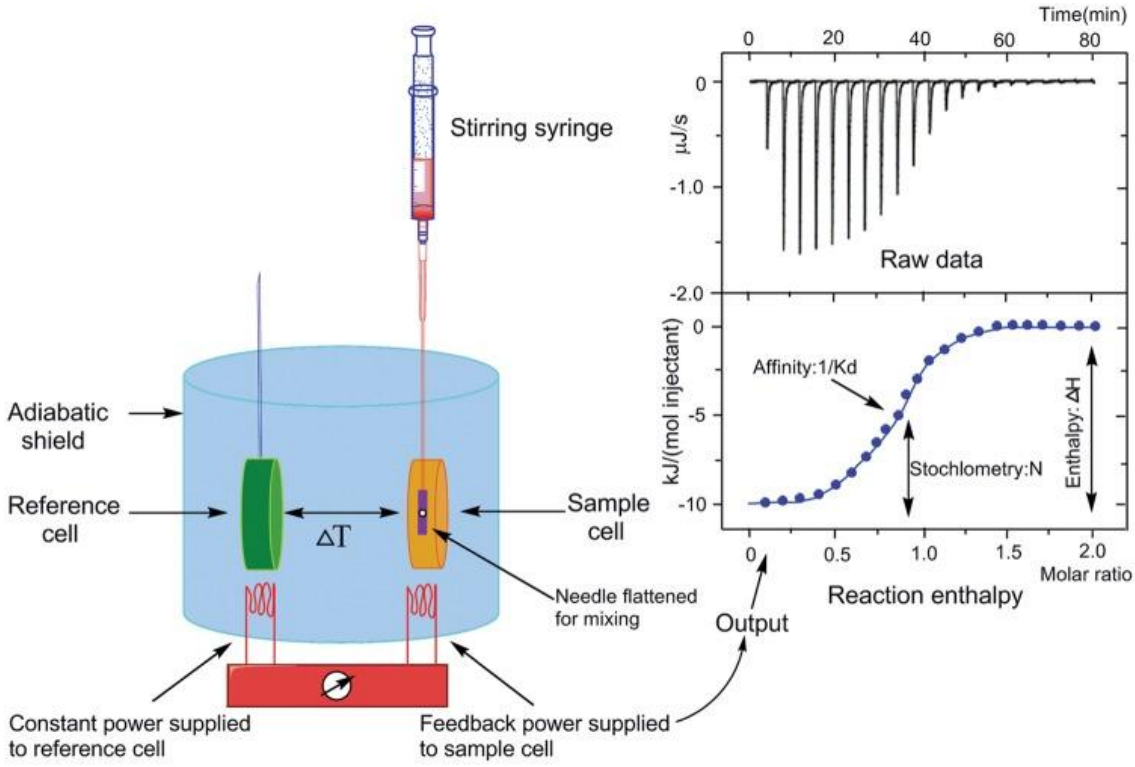
Az ITC mérések eredményei

Az izotermális titrációs kalorimetria (ITC) az egyik legfontosabb és legmegbízhatóbb módszer a molekulák közötti kölcsönhatások, különösen a kötési folyamatok, kvantitatív vizsgálatára. Ennek vázlatos működése a 18. ábrán látható. Alkalmazása azért kiemelt jelentőségű, mert **közvetlenül méri a reakció során felszabaduló vagy elnyelt hőt**, így közvetlen információt nyújt a kötés termodinamikájáról. A módszer legnagyobb előnye, hogy a teljes termodinamikai profilt egyetlen kísérletből szolgáltatja: meghatározza a kötési állandót (K), az entalpiaváltozást (ΔH), az entrópia-hozzájárulást (ΔS) és a Gibbs-szabadenergiát (ΔG).

Az ITC működési elve egyszerű: egy nagy érzékenységű kaloriméter két cellát tartalmaz, egy minta- és egy referenciakamrát. A kísérlet során a titrálószert kis adagokban adják a mintához, és a berendezés folyamatosan méri, mennyi energia szükséges ahhoz, hogy a két cella hőmérséklete azonos maradjon. A hőváltozások közvetlenül arányosak a molekulák közötti kölcsönhatás intenzitásával.

A módszer különösen alkalmas **fémion–ligandum kölcsönhatások**, így a kalcium- és stronciumkelátképzés vizsgálatára, mivel független bármilyen fluoreszcens vagy kromofór tulajdonságtól, és a kölcsönhatást natív, oldatfázisú környezetben méri. Az ITC alkalmazása a jelen kutatásban lehetővé teszi, hogy a kelátképző molekulák – például az EDTA vagy Decorporol – kötődési erősségét, szelektivitását és termodinamikai stabilitását objektív módon értékeljük.

Ennek révén pontosan meghatározható, hogy egy adott kelátor mennyire preferálja a stronciumot a kalciummal szemben, ami kulcsfontosságú a potenciális gyógyszerjelöltek fejlesztésében és a fiziológiás környezetben történő viselkedésük megértésében.



18. ábra. Az ITC készülék működési elve és a mérések vázlata.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Ionkelátképzés EDTA-val

A **19. ábra** egy reprezentatív kötődési izotermát mutat be, amely során **EDTA-t (0,1 mM)** titráltunk **$CaCl_2$ oldattal (1 mM)**, pH 7,3 értéken. A mérést **25 °C-on**, légköri nyomáson végeztük. Összesen három egymást követő mérés történt a reprodukálhatóság és a hibabecslés érdekében.

A **negatív entalpiaértékek** az **exoterm** kötődést jelzik, ami összhangban van az irodalmi adatokkal.
Ugyanezeket a méréseket **Sr^{2+}–EDTA** rendszerrel is elvégeztük. A kapott izoterma a **19. ábrán** látható. A stroncium–EDTA kelátképzés szintén exoterm folyamat.
A mért termodinamikai paramétereket a **1. táblázat** foglalja össze, és összevetettük őket azonos feltételek mellett végzett, irodalmi ITC mérésekkel.

Az EDTA erősen köt a kalciumhoz, amit alacsony *K*d értékek igazolnak. A méréseink jól egyeznek az irodalmi adatokkal:

- **1:1 sztöchiometria** (N ≈ 1)
- **exergonikus kötődés** (negatív ΔG°).

Az Sr^{2+}–EDTA esetén a sztöchiometria szintén ~1, de a disszociációs állandó nagyobb, vagyis **a stroncium gyengébben kötődik EDTA-hoz**, mint a kalcium. Ezt alátámasztják a ΔG° értékek is.
Az EDTA ioncsere-természetét a ΔΔG° érték mutatja.

- Az irodalmi kritikus stabilitási állandók alapján: $\Delta\Delta G° = 11{,}02$ **kJ/mol**
- Saját ITC méréseink alapján: $\Delta\Delta G° = 8{,}73 \pm 0{,}92$ **kJ/mol**

Ez a különbség kémiai pontosságon belüli, így az ITC és DFT eredmények konzisztensen egyeznek (1. táblázat).

Ioncsere $CaNa_2$–Decorporol és stroncium között
A Decorporol csak **kalcium–nátriumsó** formájában kristályosítható és tárolható, amelyben a gyűrű középpontjában Ca^{2+} található. Emiatt az ioncsere-folyamat **közvetlenül mérhető** ITC-vel úgy, hogy a Decorporolt $SrCl_2$ oldattal titráljuk.

A kísérleti paraméterek megegyeztek az EDTA mérésekkel:

- 1 mM Sr^{2+} a fecskendőben
- 10 mM HEPES, pH 7,3
- 25 °C
- légköri nyomás

A három ismétlés nyers adatai és izotermái az **19. ábrán** találhatók.
Mivel nincs irodalmi adat a kötési affinitásra, a Decorporol koncentrációját **0,15 mM** értékre választottuk (legtöbb ismeretlen rendszerben ez javasolt titrálandó koncentráció).
A mért c-értékek 1–1000 között voltak minden hőmérsékleten és fiziológiás körülmény mellett, ami optimális ITC mérési tartomány.
A stronciumkötés **egyértelműen exoterm**, jelentős negatív ΔH° értékkel (**19. ábra**). A fitted izotermából származó termodinamikai értékeket a **3. táblázat** tartalmazza, amelyek alapján:

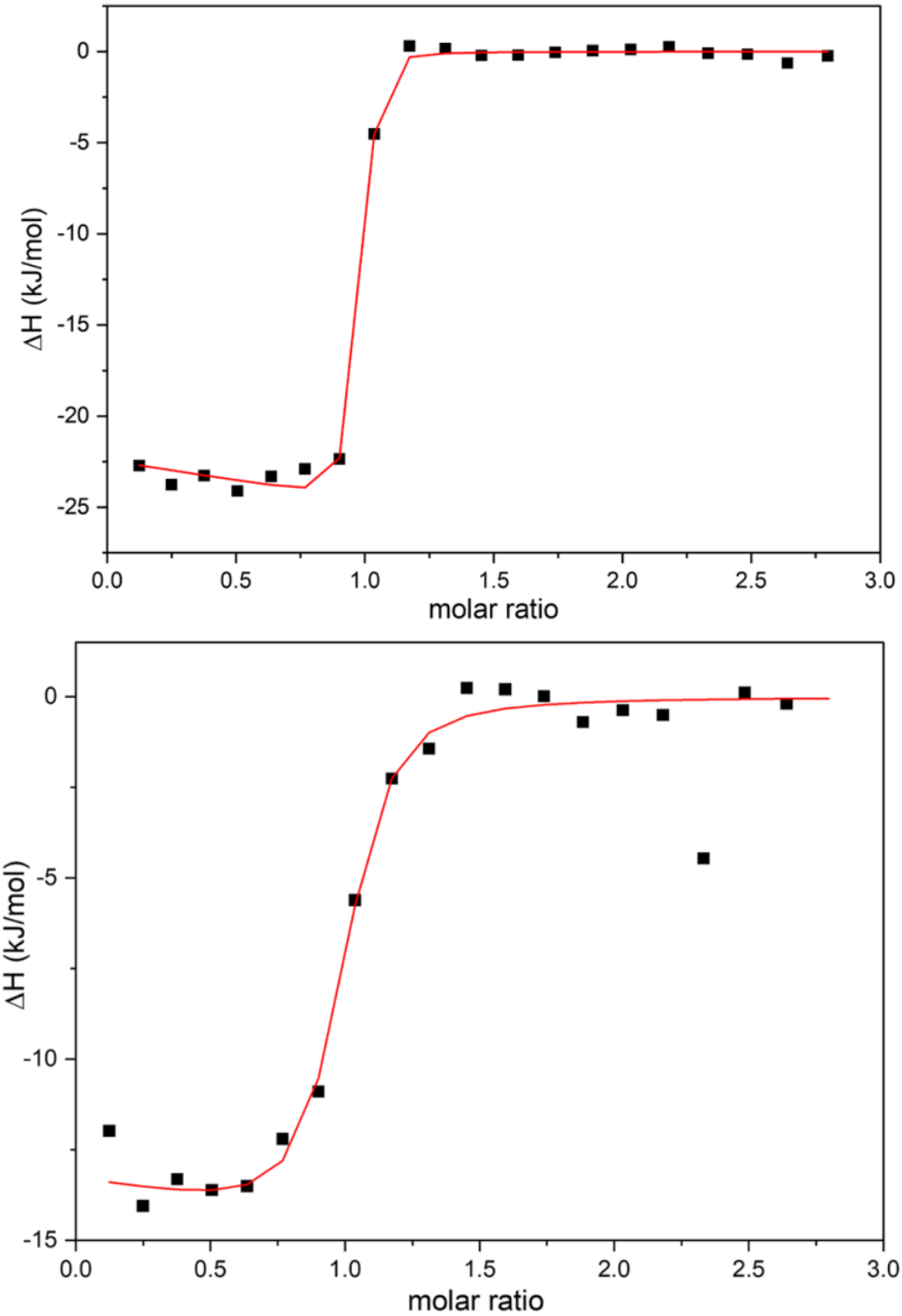
- A kötési sztöchiometria **N = 0,90 ± 0,03**, ami **1:1 kötődést** jelez.
- Mért entalpia: **ΔH° = −16,77 kJ/mol**, amely kiválóan egyezik a DFT-vel (**ΔH°DFT = −16,62 kJ/mol**).
- A Gibbs szabadenergia: **ΔG° = −34,5 ± 1,1 kJ/mol**, ami sokkal kedvezőbb, mint a Ca^{2+} kötődése.

Ez megerősíti, hogy **a Decorporol nagyobb affinitással köti a stronciumot, mint a kalciumot**.

A hőmérséklet hatása a stronciumkelát-képzésre
A stroncium kelátképzését Decorporollal három hőmérsékleten vizsgáltuk:

- 25 °C (standard)
- 30 °C
- 37 °C (fiziológiás)

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



19. ábra. A Ca^{2+}- és Sr^{2+}-kelátképzés reprezentatív kötési izotermája EDTA-val.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

A reprezentatív izotermák a **20. ábrán** láthatók. Mindhárom esetben:

- exoterm entalpia-változás figyelhető meg,
- a kötési folyamat jellegében nem történik lényeges változás.

37 °C-on a sztöchiometria kismértékben csökkenhet — ezt a Decorporol konformációs változása okozhatja. Ez azonban **nem befolyásolja a kelátképző képességet**.
A ΔH° és ΔG° értékek közel azonosak minden hőmérsékleten, így kijelenthető:
A hőmérséklet-emelkedés nem rontja a stronciumkelátképzést.

Sr^{2+} kelátképzés Decorporollal fiziológiás körülmények között (20. ábra)
A kelátképzés hatékonyságát nagyban befolyásolják fiziológiás paraméterek:

- pH 7,4
- 37 °C
- 100 mM NaCl (ionerősség)

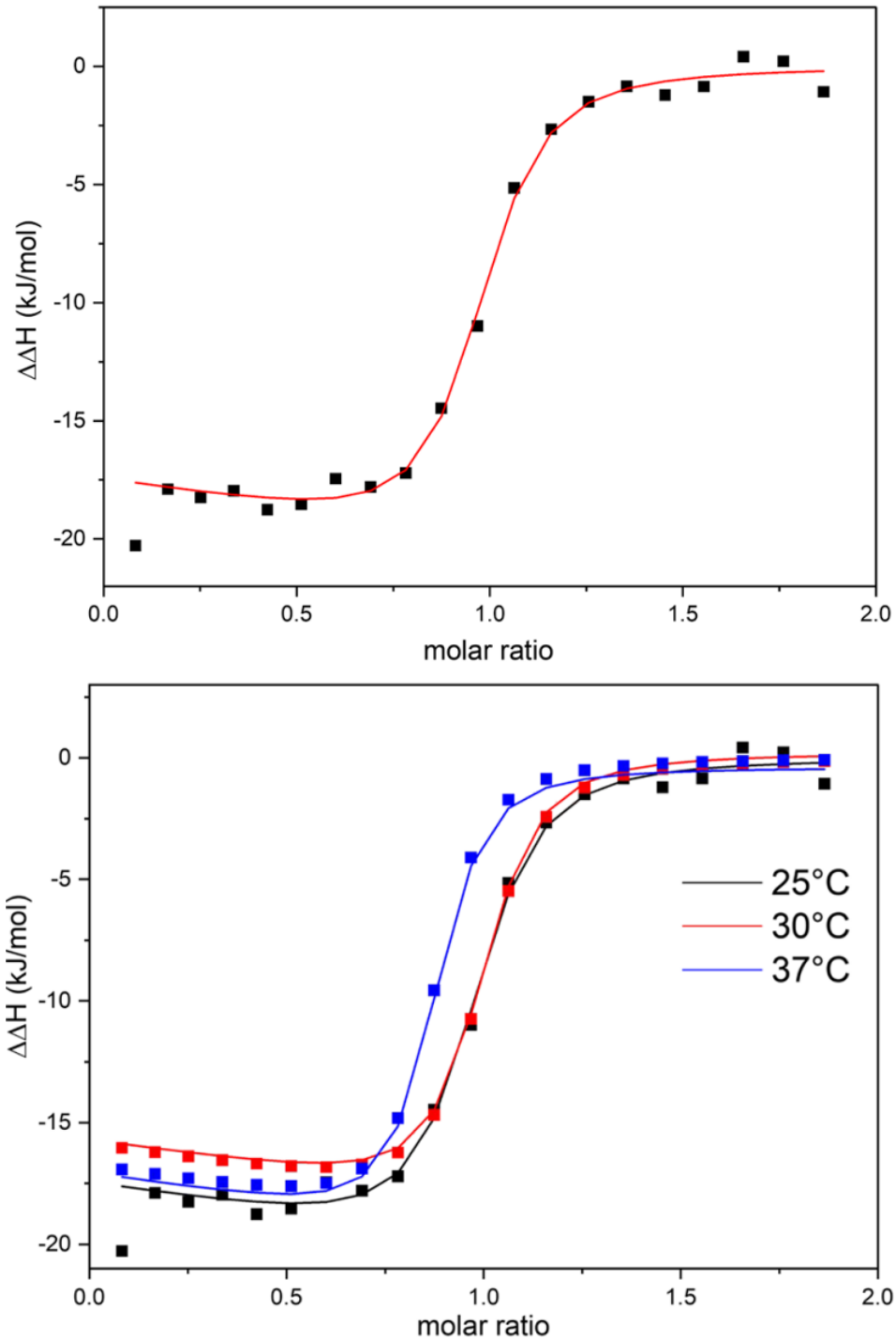
A méréseket ezen feltételek mellett is elvégeztük.

Eredmények:

- a ΔG° érték **szinte azonos** a sómentes közegben mért értékkel,
- a kelátképzés továbbra is hatékony,
- a sztöchiometria csak minimálisan csökken.

Ez azt mutatja, hogy: **Decorporol fiziológiás környezetben is hatékony stronciumkelátor,** ezért **alkalmas lehet humán alkalmazásokra**.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



20. ábra. A stroncium(II)-ion $CaNa_2$-Decorporollal történő kelátképzésének kötődési izotermája. A $CaNa_2$-Decorporol és Sr^{2+} közötti kölcsönhatás különböző hőmérsékleteken mért kötődési izotermái.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Összefoglalás:

Ebben a munkában **izoterm titrációs kalorimetriát (ITC)** és **sűrűségfunkcionál-elméleti (DFT)** számításokat kombináltunk annak vizsgálatára, hogy milyen termodinamikai feltételek mellett megy végbe a **stroncium kelátképzése Decorporollal**, amely egy potenciális kelátképző szer. Tekintettel arra, hogy a **radiostroncium súlyos egészségügyi kockázatot jelent**, mivel felhalmozódik a csontokban és képes **helyettesíteni a kalciumot az idegrendszerben**, elengedhetetlenül fontos olyan stabil és szelektív kelátképző molekulák azonosítása, amelyek alkalmasak a gyors eltávolítására.

A számítási és kísérleti módszerek validálása érdekében először az **EDTA kalcium- és stronciumkötését** vizsgáltuk, és az eredmények jó egyezést mutattak az irodalmi adatokkal. Ezután meghatároztuk a **$CaNa_2$–Decorporol és Sr^{2+} közötti ioncsere** termodinamikáját: a folyamat **exergonikusnak** bizonyult ($\Delta\Delta G = -14{,}13$ kJ/mol), amelyet az ITC-mérések is megerősítettek ($\Delta\Delta G = -34{,}5 \pm 1{,}1$ kJ/mol). Bár a Decorporol esetében a számított Gibbs-szabadenergia-változás eltér a kísérleti értékektől, a $\Delta\Delta H$ értékek nagyon közeli egyezése (1 kJ/mol-on belül) arra utal, hogy a különbség elsősorban az entrópia becslésének pontatlanságából ered.

A magasabb hőmérsékleten és fiziológiás körülmények között végzett mérések hasonló kötődési profilt mutattak. Összességében eredményeink **alátámasztják a Decorporol alkalmasságát stroncium-szelektív kelátképző szerként**, és demonstrálják az ITC és DFT kombinációjának értékét a kelátképző molekulák tervezésében és értékelésében.

Az elméleti számítások eredményei

A kalcium (Ca^{2+}) és a stroncium (Sr^{2+}) a periódusos rendszer alkáliföldfémjei közé tartoznak, és rendkívül hasonló kémiai tulajdonságokat mutatnak. Ez a hasonlóság különösen hangsúlyos a komplexképzés során, mivel mindkét ion preferálja az oxigén-donor atomokat, hasonló koordinációs geometriákat alakít ki, és közel azonos keménységű Lewis-savnak tekinthető. Biológiai szempontból a Ca^{2+} esszenciális elem, míg a Sr^{2+} – bár kémiailag rokon – már kis mennyiségben is képes felborítani a kalciumionokra épülő élettani folyamatokat. E tulajdonságok miatt kiemelt jelentőségű annak megértése, hogy a különböző ligandumok milyen szelektivitást mutatnak a két ion között.

A modellvegyületek szerkezeteit a III., IV. és V. számú ábrák mutatják be. E molekulák olyan szerkezeti elemeket tartalmaznak, amelyek alkalmasak lehetnek szelektív Ca^{2+}/Sr^{2+} komplexképzésre, azonban jelenleg nem áll rendelkezésre olyan kísérleti analitikai módszer, amellyel a komplexképzési állandók teljes pontossággal meghatározhatók lennének. A stroncium különösen problematikus, mivel biológiai mintákban alacsony koncentrációban van jelen, izotópjai részben radioaktívak, és ex vivo környezetben nehezen vizsgálhatók.

E korlátok miatt a komplexképzés termodinamikai tulajdonságait magas szintű kvantumkémiai számolásokkal határoztuk meg. Célunk az volt, hogy meghatározzuk a stronciumionhoz viszonyított relatív komplexstabilitást és a kalciumhoz képest fellépő kötési energia-különbséget, amely közvetlen indikátora a szelektivitásnak.

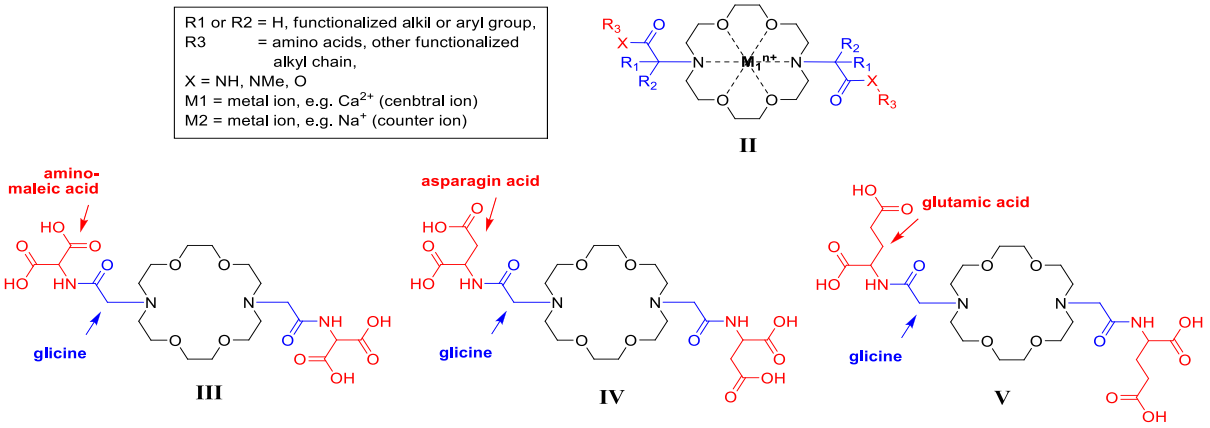
A számításokat a Gaussian programcsomaggal, a B3LYP/LANL2DZ elméleti szinten végeztük, amely jól bevált módszer átmenetifémek és nehéz elemek kölcsönhatásainak modellezésére. A szerkezetoptimalizálást követően frekvenciaszámításokat is végeztünk, amelyek lehetővé tették a rezgési módusok, valamint a hőmérséklet-, entalpia- és entrópia-hozzájárulások meghatározását. Ezekből a termodinamikai adatokból számítottuk ki a komplexképzés Gibbs-szabadenergia-változását (ΔG), amelyből közvetlenül meghatározható a komplexképzési állandó és a Ca^{2+}/Sr^{2+} szelektivitás mértéke.

A kvantumkémiai megközelítés így megbízható és kísérletileg nehezen elérhető információt nyújt a modellvegyületek komplexképzési tulajdonságairól, és lehetővé teszi új, stronciumra szelektív kelátképzők racionális tervezését.

A tanulmányozott modellvegyületek szerkezetei **III**, **IV** és **V**-ös szerkezetek mutatják be. Mivel jelenleg nincs megfelelő analitikai módszer, amellyel a komplexképző tulajdonágai pontosan mérhetőek lennének, ezért magas szintű kvantumkémiai számolásokkal határoztuk meg a kalciumionhoz viszonyított komplexképzési állandót. A számításokat

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Gaussian programmal végeztük B3LYP/LANL2DZ elméleti szinten. A számítások során frekvenciaszámításokat is végeztünk, amelyből a termodinamikai adatokat is meg tudtuk határozni (21. ábra).



21. ábra. KRIPTOFIX valamint referenciamolekula (**I**) és a három tanulmányozott komplexképző (**III**, **IV** és **V**). KRIPTOFIX-szel

Négy alkáliföldfém-ion (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+} és Ba^{2+}) komplexének stabilitását vizsgáltuk négy makrociklusos vegyülettel. Az négy vegyületből egy standard makrociklust, a DECORPOROL-t (**I**) valamint három új analóg vegyületet **III**, **IV** és **V** tanulmányoztunk. A három új vegyület különböző, az azonos makrociklus mellett dipeptideket (glicil-aminomalonsavat (**III**), glicil-aszparaginsavat (**IV**) és glicil-glutaminsavat (**V**) tartalmaznak, lásd **22. ábra**). A tanulmányban az általunk tanulmányozott makrociklusok Ca^{2+} komplexéhez viszonyított relatív komplexstabilitásokat határoztuk meg elméleti módszerrel, mely adatokból az alábbi egyenlőtlenségeket lehetet megállapítani, amelyeket részletesebben az 1-4 táblázatban foglaltuk össze.

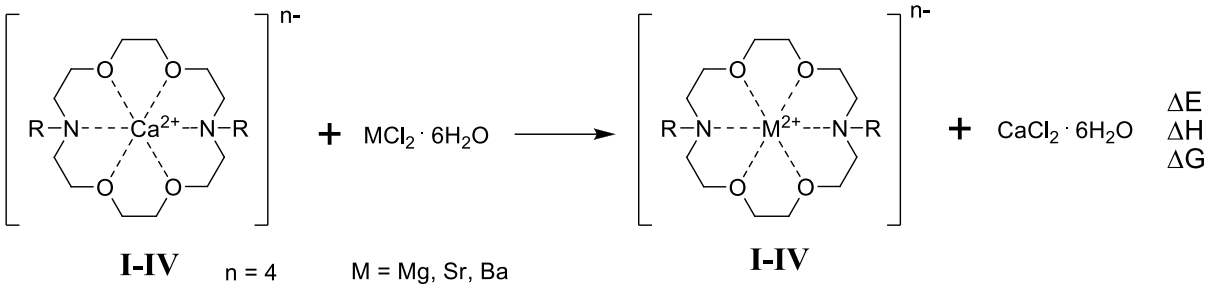
A következő három vegyületre **I**, **III**, **IV** az alábbi szekvenciájú egyenlőtlenséget kaptuk:
$Mg^{2+} < Ca^{2+} < Ba^{2+} < \mathbf{Sr^{2+}}$.

A **V** makrociklus azonban a következő egyenlőtlenséggel jellemezhető:
$Mg^{2+} < Ba^{2+} < Ca^{2+} < \mathbf{Sr^{2+}}$.

Az négy makrociklus vegyület között a Sr^{2+} ionra vonatkozó komplexképzési preferencia a következő:
III ≥ **IV** > **I** > **V**

Mivel az elméleti modellezés során a Decorporol kísérletileg mért komplexképzési szekvenciáját reprodukálni tudjuk, ezért az új vegyületek esetében kapott eredményeket is tudományosan megalapozottnak tekintjük és a III és IV molekulákra számolt szelektívebb stronciumion-kötést ténynek tekintjük.

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



22. ábra. A termodinamikai energetikai paraméterek meghatározására alkalmazott komplexképzési reakció.

A termodinamikai értékeket (ΔE, ΔH, ΔG) a következő matematikai egyenletekkel számoltuk ki (1-3).

$$\Delta E[komplex\text{-}M] = E[komplex\text{-}M] + E[CaCl_2.6H_2O] - \{E[komplex\text{-}Ca] + E[MCl_2.6H_2O]\} \quad [1]$$
$$\Delta H[komplex\text{-}M] = H[komplex\text{-}M] + H[CaCl_2.6H_2O] - \{H[komplex\text{-}Ca] + H[MCl_2.6H_2O]\} \quad [2]$$
$$\Delta G[komplex\text{-}M] = G[komplex\text{-}M] + G[CaCl_2.6H_2O] - \{G[komplex\text{-}Ca] + G[MCl_2.6H_2O]\} \quad [3]$$

A Ca^{2+}-ionhoz viszonyított relatív komplexképzés egyensúlyi állandó (R_G) a következő egyenlettel számítható (4).

$$R_G = \frac{K_{M^{2+}}}{K_{Ca^{2+}}} = \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right) \quad [4]$$

Mivel a hányadosképzés miatt az entrópiatagok kiesése várható, ezért a következő egyenletet használtuk, melynek gyakorlatiassága kedvezőbb, a számított entrópiatag fluktuációja miatt.

$$R_H = \exp\left(\frac{-\Delta H}{RT}\right) \quad [5]$$

A komplexált formák kvantumkémiai módszerekkel meghatározott szerkezeteit a 23. és 24. ábrán kerültek bemutatásra.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Az eredmények röviden adatokban reprezentálva:

1. táblázat. A Decorporol (**I**) Ca^{2+}-ion kicserélési folyamatának számolt termodinamikai értékei (kJ mol^{-1}).

M	**Δ*E'***	**Δ*H'***	**Δ*G'***
Mg^{2+}	150.70	146.47	121.64
Ca^{2+}	0.00	0.00	0.00
Sr^{2+}	-2.75	-4.40	-3.23
Ba^{2+}	-0.22	-3.66	1.18
Zn^{2+}	-28.71	-24.66	-38.77
Cd^{2+}	-6.975	-5.020	-14.42
Hg^{2+}	-54.97	-54.823	-54.02
Sn^{2+}	-114.18	-107.49	-127.47
Pd^{2+}	-80.91	-77.47	-89.61
Cu^{2+}	-127.03	–*	–*
Cu^{+}	502.06	506.55	492.79
Ag^{+}	490.33	–*	–*
Na^{+}	566.31	574.01	548.41
K^{+}	464.85	459.29	477.76
Rb^{+}	464.55	458.04	480.78
Cs^{+}	482.20	475.02	502.32

*Frekvenciaszámolás nem történt.

(Na^{+}, K^{+}, Rb^{+}, Cs^{+}, Ag^{+}, Cu^{+}) <<< Mg^{2+} < Ca^{2+} < Ba^{2+} < Sr^{2+} < Cd^{2+} < Zn^{2+} << Hg^{2+} < < Pd^{2+} << Sn^{2+} < Cu^{2+}.

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

2. táblázat. A **III**-makrociklus Ca^{2+}-ion kicserélési folyamatának számolt termodinamikai értékei (kJ mol^{-1}).

M	Δ*E'*	Δ*H'*	Δ*G'*
Mg^{2+}	33.50	33.61	19.05
Ca^{2+}	0.00	0.00	0.00
Sr^{2+}	-7.53	-7.88	-5.87
Ba^{2+}	-1.38	-2.65	-1.84
Zn^{2+}	5.41	9.41	-3.75
Cd^{2+}	1.70	3.63	-4.40
Hg^{2+}	-16.54	-14.92	-20.33
Sn^{2+}	-63.88	-56.71	-73.36
Pd^{2+}	-46.33	-43.13	-49.61
Cu^{2+}	-22.33	–*	–*
Cu^{+}	463.93	468.16	458.56
Ag^{+}	468.82	472.64	460.31
Na^{+}	495.51	503.41	481.15
K^{+}	400.03	394.90	411.30
Rb^{+}	400.30	394.27	414.17
Cs^{+}	392.49	384.54	416.26

*Frekvenciaszámolás nem történt.

(Na^{+}, K^{+}, Rb^{+}, Cs^{+}, Ag^{+}, Cu^{+}) <<< Mg^{2+} < Zn^{2+} < Cd^{2+} < Ca^{2+} < Ba^{2+} < Sr^{2+}.< Hg^{2+} < Cu^{2+} < < Pd^{2+} < Sn^{2+}

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

3. táblázat. A **IV**-makrociklus Ca^{2+}-ion kicserélési folyamatának számolt termodinamikai értékei (kJ mol^{-1}).

M	Δ*E'*	Δ*H'*	Δ*G'*
Mg^{2+}	37.49	37.06	21.91
Ca^{2+}	0.00	0.00	0.00
Sr^{2+}	-6.56	-7.49	-4.81
Ba^{2+}	0.38	-0.61	1.84
Zn^{2+}	15.42	20.30	20.30
Cd^{2+}	-1.19	1.26	-8.40
Hg^{2+}	-33.45	-32.69	-30.12
Sn^{2+}	-132.16	-125.75	-142.45
Pd^{2+}	-41.21	-37.06	-48.87
Cu^{2+}	-0.19***	–*	–*
Cu^{+}	**		
Ag^{+}	**		
Na^{+}	486.60	–*	–*
K^{+}	374.09	368.94	382.41
Rb^{+}	372.71	–*	–*
Cs^{+}	409.71	402.90	428.75

*Frekvenciaszámolás nem történt; **Nem számoltuk, ***Megerősítés kéne,

(Na^{+}, K^{+}, Rb^{+}, Cs^{+}) <<< Mg^{2+} < Zn^{2+} < Ca^{2+} < Cu^{2+} < Cd^{2+} < Ba^{2+} < **Sr^{2+}** << Hg^{2+} < < Pd^{2+} < Sn^{2+}

4. táblázat. A **V**-makrociklus Ca^{2+}-ion kicserélési folyamatának számolt termodinamikai értékei (kJ mol^{-1}).

M	Δ*E'*	Δ*H'*	Δ*G'*
Mg^{2+}	37.46	43.76	31.85
Ca^{2+}	0.00	0.00	0.00
Sr^{2+}	-2.89	1.59	2.47
Ba^{2+}	-5.25	6.56	2.43

*Frekvenciaszámolás nem történt; **Nem számoltuk, ***Megerősítés kéne,

Mg^{2+} << Ca^{2+} ≈ Ba^{2+} ≈ **Sr^{2+}**

A három makrocikusos vegyület fémmegkötési szekvenciája.

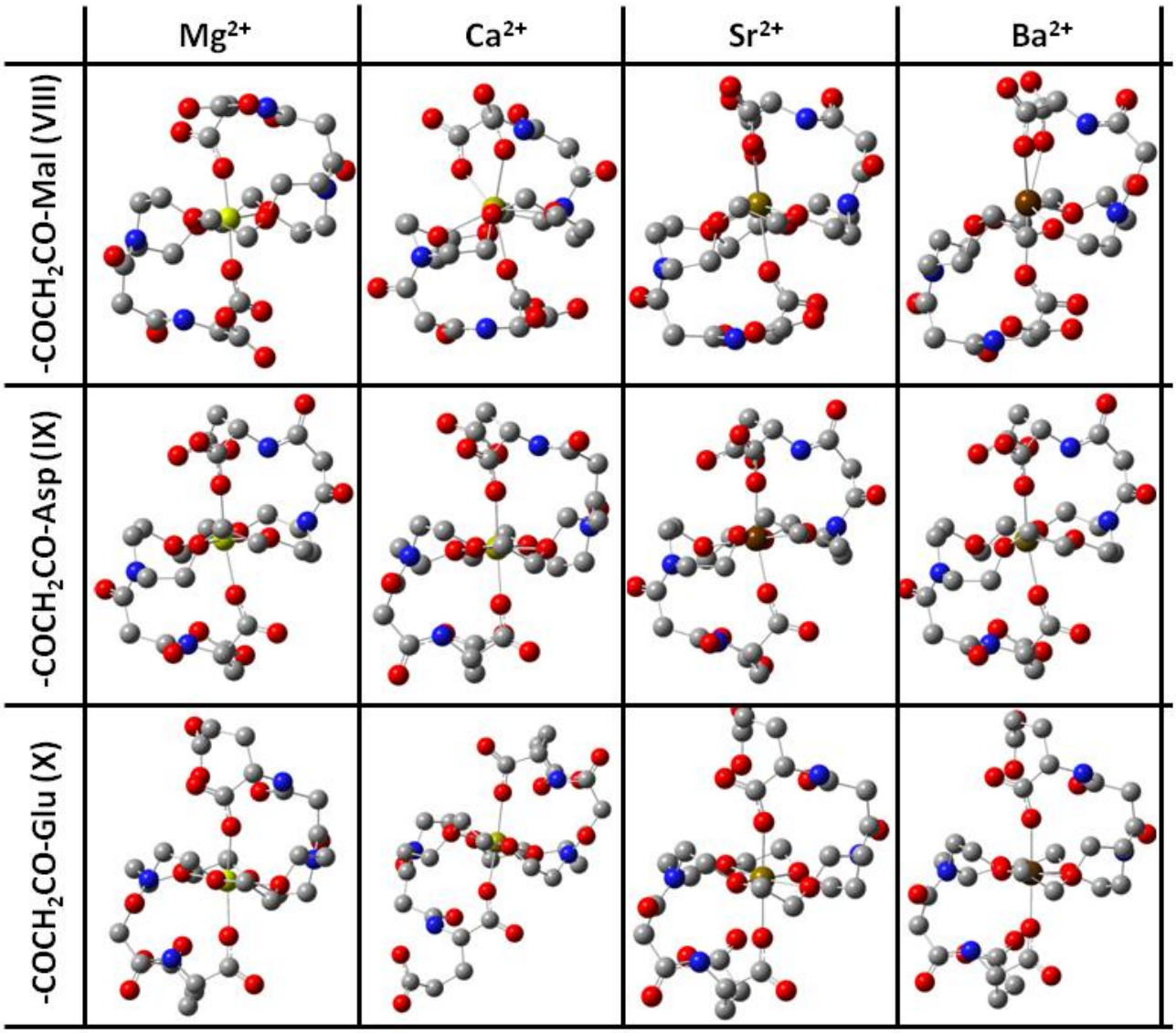
I: Mg^{2+} < **Ca^{2+}** < Ba^{2+} < **Sr^{2+}** < Cd^{2+} < Zn^{2+} < Hg^{2+} < Pd^{2+} < Sn^{2+} < Cu^{2+}

III: Mg^{2+} < Zn^{2+} < Cd^{2+} < **Ca^{2+}** < Ba^{2+} < **Sr^{2+}** < Hg^{2+}. < Cu^{2+}.< Pd^{2+} < Sn^{2+}

IV: Mg^{2+} < Zn^{2+} < **Ca^{2+}** < Cu^{2+} < Cd^{2+} < Ba^{2+} < **Sr^{2+}** < Hg^{2+} < Pd^{2+} < Sn^{2+}

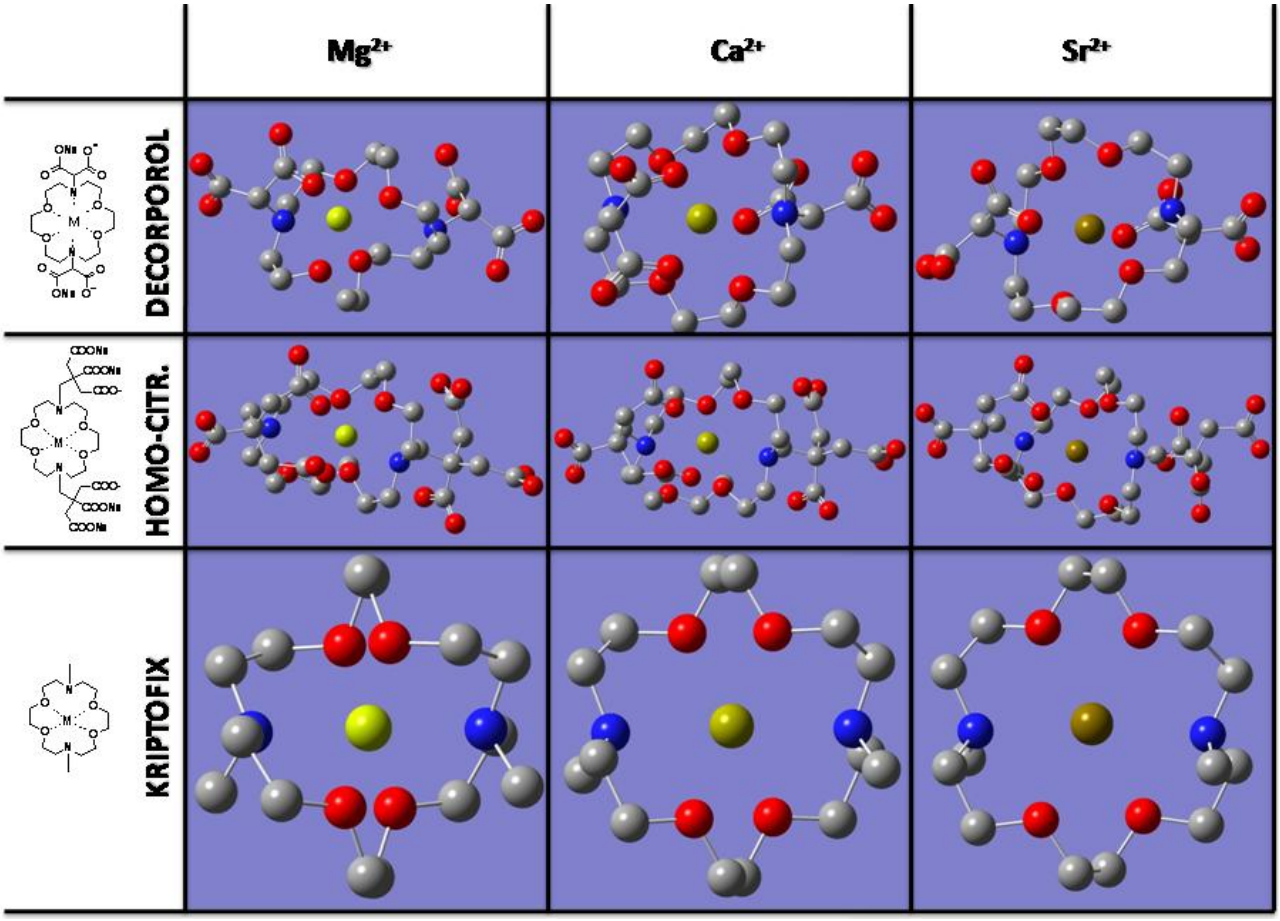
V: Mg^{2+} < **Ca^{2+}** ≈ Sr^{2+} ≈ Ba^{2+}

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



23. ábra. Az elméleti módszerrel vizsgált komplexképzők fémkomplexeinek az optimált 3D képe (a hidrogének nélkül).

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



24. ábra. Az elméleti módszerrel vizsgált komplexképzők fémkomplexeinek az optimált 3D képe egy másik perspektívából (a hidrogének nélkül).

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

A Ca^{2+} és Sr^{2+} kelátképzés dinamikai és magasabb szintű számításon alapuló becslése

A Ca^{2+} és Sr^{2+} hidratációjának és kelátképzésének szerkezeti és energetikai összehasonlítása

Kelátképzés során a kelátképző molekula kötőhelyei a fémion koordinációs szférájában lévő vízmolekulákat helyettesítik. Mivel a kelátképzés kiindulási állapotát az oldatbeli fém–aqua komplex ($M^{n+}(H_2O)m$) jelenti, ennek szerkezete nagyban befolyásolja a makrociklusos ligandumok szelektivitását. Ezért kulcsfontosságú a megfelelő fém–aqua komplexek szerkezetének meghatározása.

Stronciumra és kalciumra vonatkozóan nagy pontosságú kísérleti adatok állnak rendelkezésre. A hidratált kalciumion koordinációs száma (CN) az irodalomban széles tartományban szerepel, általában **6 és 8 között**. Ugyanakkor Persson és munkatársai **LAXS** és **EXAFS** módszerekkel kimutatták, hogy a Ca^{2+} **nyolc koordinációs számú**, átlagos Ca–O kötéstávolsága **2,48 Å**, szerkezete pedig **torzult antiprizmás**.

A stronciumion oldatbeli hidratációs vizsgálatai hasonlóképpen **8-as koordinációs számot**, **torzult antiprizmás geometriát**, és **2,62 Å** átlagos Sr–O kötéstávolságot mutattak.

Az általunk végzett DFT-optimalizált szerkezetek mind a $Ca^{2+}(H_2O)_8$, mind a $Sr^{2+}(H_2O)_8$ esetében kiválóan egyeztek a kísérleti adatokkal, igazolva a választott számítási módszerszint pontosságát.

Ionok koordinációs száma

Ahogy korábbi kutatásunkban ismertettük, az ionok vizes komplexeinek szerkezete (Mn+(H_2O)m) erősen befolyásolja a makrociklusos ligandumok szelektivitását. Ezért kulcsfontosságú a megfelelő fémion–akvakomplex struktúrák meghatározása.
Persson és munkatársai — nagy szögű röntgenszórás (LAXS) és kiterjesztett röntgenabszorpciós finomszerkezet-spektroszkópia (EXAFS) alapján — korábban meghatározták több fémion akvakomplexének szerkezetét és koordinációs számát, köztük Ca^{2+}-ét és Sr^{2+}-ét is. Eredményeik szerint mindkét ion **nyolc koordinációs számú, négyzetes antiprizma** geometriájú komplexet alkot vízben. Az átlagos Ca–O kötéstávolság **2,48 Å**, míg az Sr–O **2,62 Å**.
A ,iDFT-optimalizált szerkezeteink teljesen megegyeznek az irodalmi adatokkal (5. táblázat).

5. táblázat. A Ca^{2+} és Sr^{2+} akvakomplexek kísérleti és DFT-vel számított szerkezeti paramétereinek összehasonlítása

	Ca^{2+} – Kísérlet [32]	Ca^{2+} – DFT	Sr^{2+} – Kísérlet [32]	Sr^{2+} – DFT
Koordinációs szám	8	8	8	8
$\bar{r}$ (Å)	2,48	2,47 ± 0,002	2,62	2,61 ± 0,01

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Az EDTA komplexképzés referenciaértékei

Mivel a Ca^{2+}–EDTA és Sr^{2+}–EDTA komplexképzés termodinamikáját jól ismerjük, ez szolgált a számítások referencia-rendszereként, amelyet később kísérletileg is validáltunk.

Az EDTA-komplexek a következő reakció során képződnek:

$$[M(H_2O)_n]^{2+} + \mathrm{EDTA}^{4-} \rightarrow \mathrm{MEDTA}^{2-} + n\,H_2O$$

A kötési affinitások kiszámításához Glendening et al. és Gajewski et al. módszerét alkalmaztuk. Ennek lényege, hogy **ioncsere-reakció** segítségével határozzuk meg, melyik kation kötődik erősebben a ligandumhoz. Előnye, hogy csökkenti a báziskészletből eredő hibákat.

Az irodalmi stabilitási állandók (log K_a):

- $CaEDTA^{2-}$: **10,65**
- $SrEDTA^{2-}$: **8,72** [52]

Ezekből számítható a két komplex közötti Gibbs-energia különbsége:

$$\Delta\Delta G^\circ = 11.02 \text{ kJ/mol}$$

A számításaink eredménye:

$$\Delta\Delta G^\circ = 15.40 \text{ kJ/mol}$$

A különbség a kémiai pontosság határain belül van, így a módszer megfelelően reprodukálja a kísérleti trendeket.

Ioncsere-reakciók Decorporol esetében

Az EDTA-rendszerhez hasonlóan meghatároztuk a **Ca^{2+} és Sr^{2+} Decorporol általi kelátképzésének** viselkedését is. A Ca-$Decorporol^{2-}$ és $Sr^{2+}(H_2O)_8$ közötti ioncsere Gibbs-energia változása:

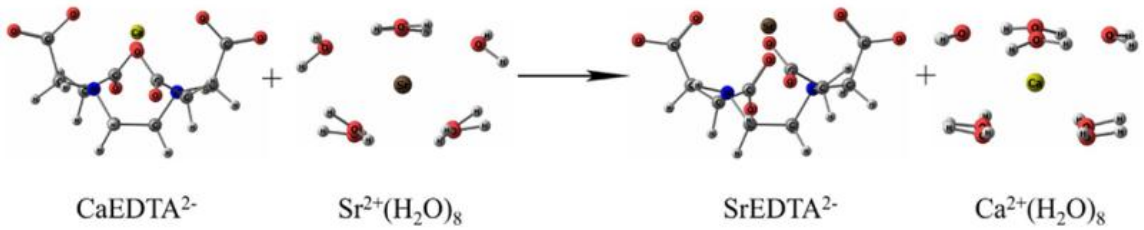
$$\Delta G^\circ = -14.13 \text{ kJ/mol}$$

Ez azt jelenti, hogy:

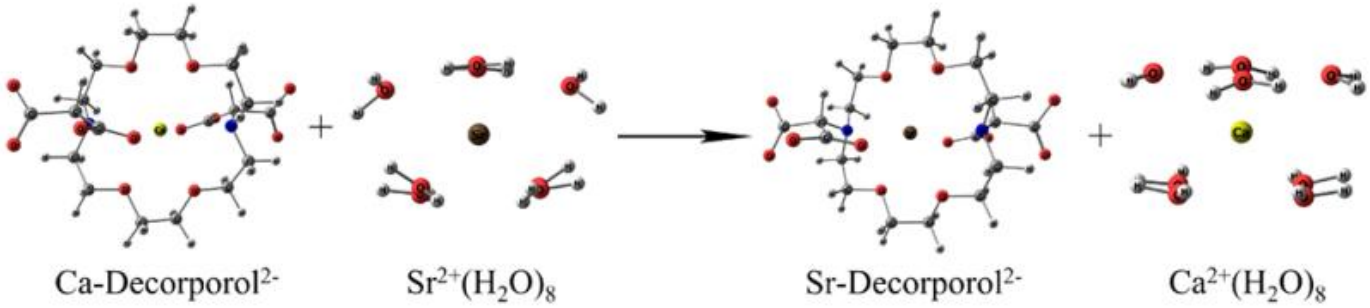
- a stroncium **előnyben részesíti a Decorporolt** a kalciummal szemben,
- **a Sr–Decorporol komplex stabilabb**, mint a Ca–Decorporol komplex,
- a stroncium kelátképzése energetikailag **lényegesen kedvezőbb**.

Magyarán **a Decorporol erősebben köti a stronciumot, mint a kalciumot, ez a szelektív radiostroncium-megkötés szempontjából kedvező.**

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



25. ábra. A Ca^{2+} (balra) és Sr^{2+} akvakomplexek optimalizált szerkezete a megadott elméleti szinten.



26. ábra. Ioncsere-reakció Ca-Decorporol^{2-} és $Sr^{2+}(H_2O)_8$ között. A Decorporol Sr^{2+}-preferenciájának meghatározására használt izodezmikus ioncsere-reakció. A reakció során a Ca-Decorporol komplex a nyolc vízmolekulával hidratált Sr^{2+} ionnal reagál, így Sr-Decorporol képződik, miközben a Ca^{2+} ion veszi át a hidratációs burkot.

Sűrűségfunkcionál-számítások (DFT): A rendszerek elektronikus szerkezetének számítógépes elemzésével termodinamikai adatok is nyerhetők. A sűrűségfunkcionál-elméleti (DFT) számításokat az **ORCA 6.0.1** programcsomaggal végeztük. A geometriaoptimalizálásokat és frekvenciaszámításokat, valamint a termodinamikai stabilitás meghatározását, az **r2SCAN-3c** elméleti szinten hajtottuk végre, **298,15 K** (25 °C) hőmérsékleten és **1 bar** nyomáson.

Az **r2SCAN-3c módszer** egy összetett (composite) DFT-megközelítés, amely kombinálja:

- az **r2SCAN meta-GGA** funkcionált (mGGA),
- a módosított **triple-ζ def2-mTZVPP** báziskészletet,
- a **Grimme-féle D4 diszperziót**,
- valamint geometriai alapú **counterpoise-korrekciókat**.

Ez a módszer olyan pontosságot nyújt, amely összevethető a magasabb szintű DFT/QZ számításokéval (például PBE-D4 és BLYP-D4 funkcionálok def2-QZVP bázissal), miközben azoknál lényegesen gyorsabb. Alanís-Manzano és munkatársai kimutatták, hogy az r2SCAN-3c **nagyon jól reprodukálja a lantanoidák vízkomplexeinek koordinációs számait**, így a módszer különösen alkalmas fém–ligandum kölcsönhatások oldatfázisú vizsgálatára. A szerkezetek megjelenítéséhez **Chemcraft 1.8** programot használtunk. A víz oldószerhatását (ε_r = 78,4) a **Truhlar és munkatársai által fejlesztett SMD polarizálható kontinuum modell** alkalmazásával vettük figyelembe.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

A sűrűségfunkcionál-elméleti (DFT) számítások népszerűségüket, általános pontosságuknak és alacsony számítási költségüknek köszönhető. Bemutattuk azt is, hogy a vizsgált rendszerek elektronikus szerkezetének elemzésével termodinamikai adatok is meghatározhatók. Korábbi kutatásaink során a hibrid DFT-módszerek egyik legelterjedtebb változatát, a Becke és munkatársai által kidolgozott B3LYP-módszert alkalmaztuk. A $CaEDTA^{2-}$ és $Sr^{2+}(H_2O)_8$ közötti ioncsere azonban ezzel a módszerrel pontatlan eredményt adott (24,6 kJ/mol a 11,0 kJ/mol helyett), még akkor is, ha empirikus diszperziós korrekciókat és triple-zeta bázisszettet alkalmaztunk. Emiatt korábban egy drágább, összetett coupled-cluster kompozit módszerrel finomítottuk az energiát.

Ennek a módszernek azonban a **számítási költsége túl magas**, ezért a későbbiekben az lett a cél, hogy megtaláljunk egy olyan módszert, amely lényegesen gyorsabb, mégis elég pontos a vizsgált rendszerek termodinamikájának leírására.
A **r²SCAN-3c** módszer egy kompozit DFT-eljárás, amely az r²SCAN meta-GGA funkcionált ötvözi egy módosított triple-ζ Gaussian bázissal, D4 diszperziós korrekcióval [16], valamint geometriai ellenpólus-korrekciókkal. Ez a módszer összevethető pontosságot ad a magasabb szintű DFT/QZ módszerekkel (PBE-D4 és BLYP-D4 def2-QZVP bázissal), miközben számottevően gyorsabb. Korábbi eredmények alapján az r²SCAN-3c nagyon jól reprodukálja a lantanoidák akvakomplexeinek kísérleti koordinációs számait, ezért alkalmas fém–ligandum kölcsönhatások vizsgálatára oldatfázisban.
A geometriai optimalizálásokat és frekvenciaszámításokat az **ORCA 6.0.1** programcsomaggal végeztük r²SCAN-3c/def2-mTZVPP szinten, 298,15 K (25 °C) hőmérsékleten, 1 bar nyomáson. A víz oldószer hatását a Truhlar és munkatársai által fejlesztett **SMD poláris kontinuum modell** segítségével vettük figyelembe. A modellezett szerkezeteket a Chemcraft 1.8 programmal szemléltettük [20].
A DFT-módszer validálásához ugyanazt a protokollt alkalmaztuk, mint korábbi kvantumkémiai vizsgálataink során:

1. először meghatároztuk az ionok vízkoordinációját r²SCAN-3c szinten, és összevetettük irodalmi adatokkal;
2. ezután elemeztük a kalcium és stroncium EDTA-komplexeinek keletkezését és összehasonlítottuk a számításokat a kísérleti eredményekkel;
3. végül, a validált módszert felhasználva kiszámítottuk a Ca-Decorporol^{2-} és $Sr^{2+}(H_2O)_8$ közötti ioncsere reakció termodinamikai paramétereit.

A Ca^{2+} és Sr^{2+} komplexképzésének számítási becslése

A DFT-módszer validálásához első lépésben megvizsgáltuk a Ca és Sr EDTA-komplexek kialakulását. Mint korábban megállapítottuk, az EDTA-komplexek úgy képződnek, hogy a hidratált kation ($[M(H_2O)n]^{2+}$) reagál a deprotonált $EDTA^{4-}$ ligandumokkal.
A Ca^{2+}, és Sr^{2+}–EDTA affinitások számításához Glendening et al. és Thompson et al. módszerét használtuk, ugyanazt, amelyet korábbi munkáinkban is alkalmaztunk. A módszer előnye, hogy **ioncsere-reakciót** vizsgál: így a két ion relatív affinitása meghatározható, miközben a báziskészlet-hibák nagyrészt kiesnek.

A $CaEDTA^{2-}$ és $SrEDTA^{2-}$ stabilitási állandói ($logK_a$) a következők:

- **$CaEDTA^{2-}$: $logK_a$ = 10,65**
- **$SrEDTA^{2-}$: $logK_a$ = 8,72**

Ezekből a szabadentalpia változások kiszámíthatók, majd kivonással megkapjuk az ioncsere reakció ΔΔG értékét:

- **ΔΔG = 11,02 kJ/mol (kísérlet alapján)**
- **ΔΔG = 15,40 kJ/mol (DFT alapján)**

A két érték közti eltérés kémiai pontosságon belül van.
Korábbi ITC-méréseink (6. táblázat) megerősítették:

- az EDTA sokkal erősebben köt Ca^{2+}-ot, mint Sr^{2+}-ot,
- mindkét esetben **1:1 sztöchiometria** érvényesül,
- a reakciók erősen **exergonikusak**.

Az ioncsere ΔΔG értéke ITC alapján: **8,73 ± 0,92 kJ/mol**, amely szintén összhangban van az irodalommal és a DFT-vel (6. táblázat).

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

6. táblázat. A Ca^{2+} és Sr^{2+} EDTA-komplexeinek termodinamikája (25 °C, 1 atm, 10 mM HEPES pH 7,3)
A r²SCAN-3c számított értékei.

Paraméter	$CaEDTA^{2-}$	Irodalom	$SrEDTA^{2-}$	Ioncsere ΔΔG (kJ/mol)
Kd (M)	$2{,}65\times10^{-8}$	$2{,}64\times10^{-8}$	$7{,}92\times10^{-7}$	
n (–)	0,97	1,01	0,89	
ΔH (kJ/mol)	–22,20	–21,70	–14,08	
ΔG (kJ/mol)	–43,64	–43,23	–34,91	8,73 ± 0,92
ΔS (J/mol·K)	71,85	72,21	69,85	

Ioncsere reakciók Decorporollal

Az EDTA-hoz hasonlóan a Decorporol esetén is elvégeztem a $Ca^{2+} \rightarrow Sr^{2+}$ ioncsere-reakció számítását. A számított Gibbs-szabadenergia változás:

- **ΔΔG = –14,13 kJ/mol (DFT)**

A kísérleti ITC-mérés szerint:

- **ΔΔG = –34,5 ± 1,1 kJ/mol (kísérlet)**

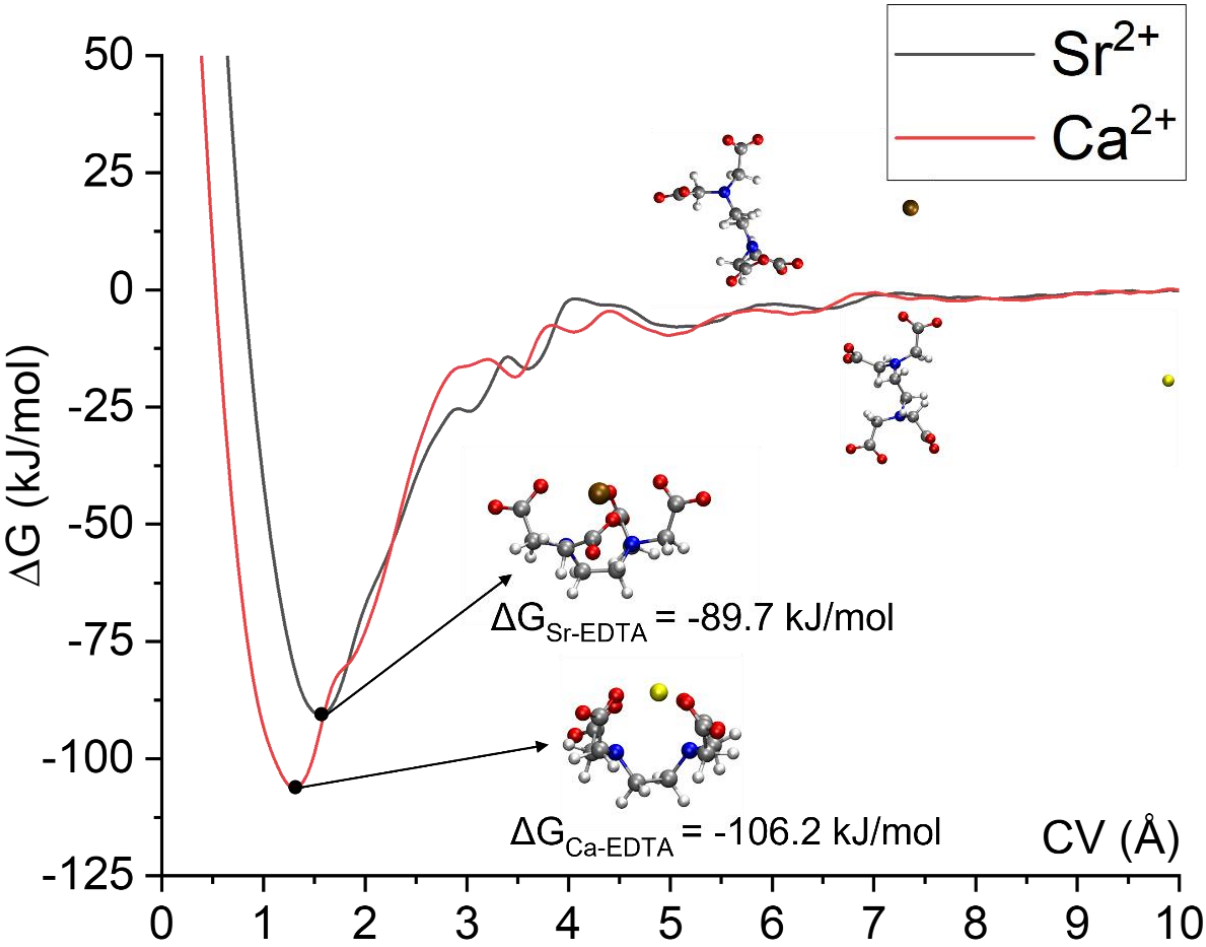
A DFT-számítás kisebb affinitást jelez, de a reakció entalpiaváltozása:

- **ΔΔH (DFT): –16,62 kJ/mol**
- **ΔΔH (ITC): –16,77 kJ/mol**

szinte **tökéletes egyezést** mutat.

Ez arra utal, hogy az r²SCAN-3c módszer **az entrópiát becsüli rosszabbul**, de a **kötésenergiák és entalpiák megbízhatóak**, ezért a Decorporol-jellegű kelátok vizsgálatára találó (27. és 28. ábra; 7. táblázat).

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

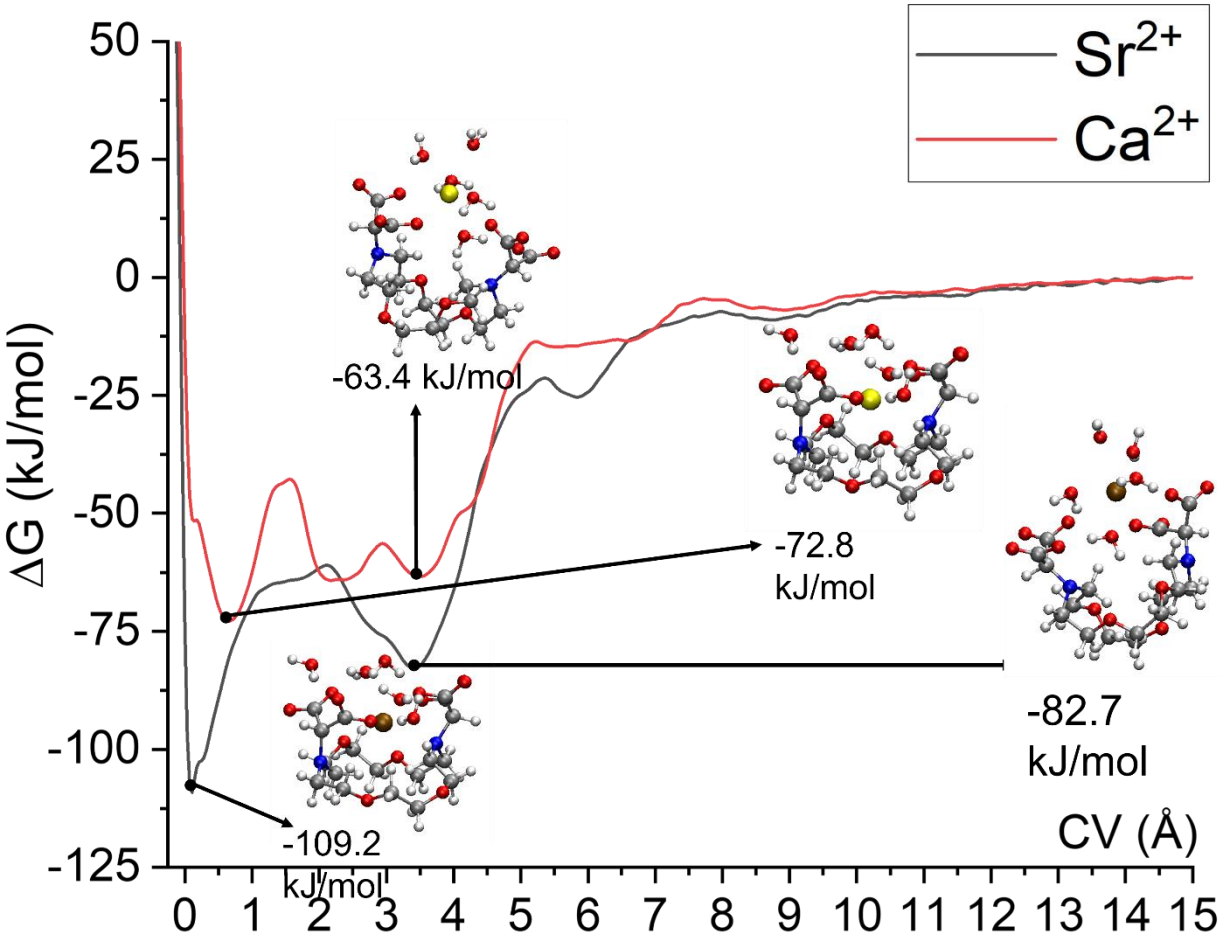


27. ábra. A Ca^{2+} (piros) és Sr^{2+} (fekete) kelátképzésének szabadenergia-profílja EDTA-val

7. táblázat. A szimulált kötési szabadenergiák és az irodalmi értékek összehasonlítása

	Fun-MetaD (ΔG, kJ/mol)	Irodalmi (ΔG, kJ/mol)	Különbség (kJ/mol)
Ca-EDTA	-106.2	-60.8	45.4
Sr-EDTA	-89.7	-49.8	39.9
ion exchange ($\Delta\Delta G$, kJ/mol)	16.5	11.0	5.5

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT



28. ábra. Free energy profiles of Ca^{2+} (red) and Sr^{2+} (black) chelation by Decorporol

Későbbiekben tovább lett részletezve a kalcium- és stronciumkelátképzés kísérleti és számítógépes jellemzése EDTA-val és Decorporollal. Ebben a munkában validáltuk és alkalmaztuk az r²SCAN-3c módszerre, és ezzel kiváltottuk a korábbi kvantumkémiai megközelítést, a coupled-clusterrel korrigált B3LYP/def2TZVP számítást. Bár ez utóbbi általában pontos a kalcium- és stroncium–EDTA ioncsere-reakciók modellezésében, rendkívül számításigényes, és nagyobb rendszerekre nem alkalmazható. A $CaNa_2$-Decorporol potenciális gyógyszerészeti alkalmazhatóságát is vizsgáltuk stronciumkelátképzés mérésével fiziológiás hőmérsékleten (37 °C), pH-n (7,3) és ionerősségen (100 mM NaCl). Az eredmények hasonló kötődési profilt és csak kismértékű ΔΔG-változást mutattak, ami arra utal, hogy a $CaNa_2$-Decorporol stabil fiziológiás körülmények között. A QC-számításokkal és ITC-kísérletekkel párhuzamosan folytattam a molekuladinamikai szimulációkat is, hogy jobban megértsük a kelátképzők kötődési mechanizmusait. Ehhez Funnel-Metadynamics módszert alkalmaztuk, amely ígéretesebbnek bizonyult, mint a korábban leírt módszerek. Bár a kémiai pontosságot még nem sikerült elérni, a Ca- és Sr-EDTA ioncsere-energiák jól egyeznek az irodalmi értékekkel. A Decorporol esetében erőtér-újraparaméterezést is végeztünk, ahol a részleges töltéseket r²SCAN-3c szinten számított töltésekre cseréltük, hogy megfelelő mintavételezést biztosítsunk. Ennek eredményeként a Ca-Decorporol → Sr ioncsere ΔΔG értéke −36,4 kJ/mol lett, amely jól összevethető az ITC-kísérletekből kapott értékkel (−34,5 ± 1,1 kJ/mol).

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Fontosabb publikációk

Felhasznált irodalmak

Dominici, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8, 315-317.

Pittenger, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **1999**, 284, 143-147.

Szepesi, Á., Matula, Z., Szigeti, A., Várady, G., Szabó, G., Uher, F., Sarkadi, B. & Német, K. ABCG2 is a selectable marker for enhanced multilineage differentiation potential in periodontal ligament stem cells. *Stem Cells Dev.* **2015**, 24, 244-252. https://doi.org/10.1089/scd.2014.0177.

Noshkin, V. E.; Mott, N. S. Separation of strontium from large amounts of calcium, with application to radiostrontium analysis. *Talanta* **1967**, 14 (1), 45−51.

Glendening, E. D.; Feller, D. Dication−Water Interactions: M Clusters for Alkaline Earth Metals M = Mg, Ca, Sr, Ba, and Ra. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100 (12), 4790−4797

Persson, I. Structures of Hydrated Metal Ions in Solid State and Aqueous Solution. *Liquids* **2022**, 2 (3), 210−242.

Jalilehvand, F.; Spångberg, D.; Lindqvist-Reis, P.; Hermansson, K.; Persson, I.; Sandström, M. Hydration of the Calcium Ion. An EXAFS, Large-Angle X-ray Scattering, and Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (3), 431−441.

Neese, F.; Wennmohs, F.; Becker, U.; Riplinger, C. The ORCA quantum chemistry program package. *J. Chem. Phys.*, **2020**, 152, 22.

Furness, J. W.; Kaplan, A. D.; Ning, J.; Perdew, J. P.; Sun, J. Accurate and Numerically Efficient r2 SCAN Meta-Generalized Gradient Approximation. *J. Phys. Chem. Lett.* **2020**, 11 (19), 8208− 8215.

Caldeweyher, E.; et al. A generally applicable atomic-charge dependent London dispersion correction. *J. Chem. Phys.* **2019**, 150 (15), 154122

Kruse, H.; Grimme, S. A geometrical correction for the interand intra-molecular basis set superposition error in Hartree-Fock and density functional theory calculations for large systems. *J. Chem. Phys.* 2012, 136 (15), 154101.

Grimme, S.; Hansen, A.; Ehlert, S.; Mewes, J.-M. r2SCAN-3c: A 'Swiss army knife' composite electronic-structure method. *J. Chem. Phys.* **2021**, 154 (6), 064103.

Alanís-Manzano, E. I.; León-Pimentel, C. I.; Maron, L.; Ramírez-Solís, A.; Saint-Martin, H. Exploring the Dynamic Coordination Sphere of Lanthanide Aqua Ions: Insights from r 2 SCAN-3c Composite-DFT Born−Oppenheimer Molecular Dynamics Studies. *ACS Omega* **2024**, 9 (52), 50978−50991.

Zhurko, G. Chemcraft - graphical software for visualization of quantum chemistry computations. Version 1.8, build 682. Chemcraft 2025. https://www.chemcraftprog.com.

Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113 (18), 6378−6396.

Gajewski, M.; Klobukowski, M. DFT studies of complexes between ethylenediamine tetraacetate and alkali and alkaline earth cations. *Can. J. Chem.* **2009**, 87 (10), 1492−1498

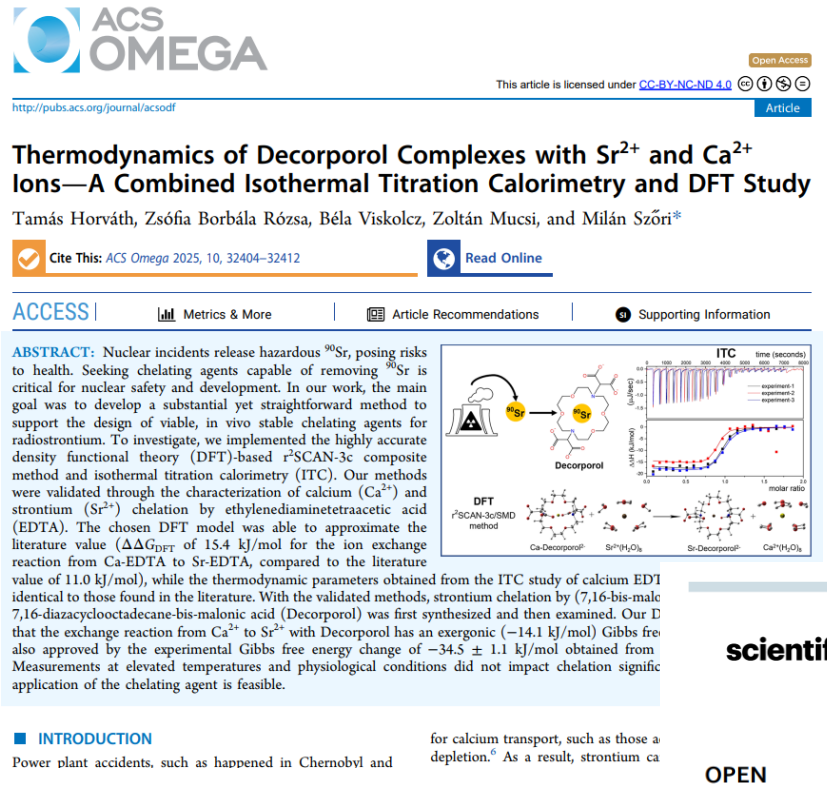
Glendening, E. D.; Feller, D. Dication−Water Interactions: M Clusters for Alkaline Earth Metals M = Mg, Ca, Sr, Ba, and Ra. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100 (12), 4790−4797.

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

A pályázat során benyújtott és elfogadott publikációk:

Tamás Horváth, Zsófia Borbála Rózsa, Béla Viskolcz, Zoltán Mucsi, and Milán Szőri, "Thermodynamics of Decorporol Complexes with Sr2+ and Ca2+ Ions. A Combined Isothermal Titration Calorimetry and DFT Study." *ACS Omega* **2025**, 10, 32404−32412. https://doi.org/10.1021/acsomega.5c04726

Varga, N., Pomozi, V., Kozák, E. *et al.* "Development and validation of combined in vitro and in vivo assays for evaluating the efficacy of strontium-chelating compounds." *Sci Rep* **2025**. https://doi.org/10.1038/s41598-025-06618-1



ACS OMEGA

Open Access

This article is licensed under CC-BY-NC-ND 4.0

http://pubs.acs.org/journal/acsodf

Article

Thermodynamics of Decorporol Complexes with Sr^{2+} and Ca^{2+} Ions—A Combined Isothermal Titration Calorimetry and DFT Study

Tamás Horváth, Zsófia Borbála Rózsa, Béla Viskolcz, Zoltán Mucsi, and Milán Szőri*

Cite This: *ACS Omega* 2025, 10, 32404−32412

Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations | Supporting Information

ABSTRACT: Nuclear incidents release hazardous ^{90}Sr, posing risks to health. Seeking chelating agents capable of removing ^{90}Sr is critical for nuclear safety and development. In our work, the main goal was to develop a substantial yet straightforward method to support the design of viable, in vivo stable chelating agents for radiostrontium. To investigate, we implemented the highly accurate density functional theory (DFT)-based r^{2}SCAN-3c composite method and isothermal titration calorimetry (ITC). Our methods were validated through the characterization of calcium (Ca^{2+}) and strontium (Sr^{2+}) chelation by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The chosen DFT model was able to approximate the literature value ($\Delta\Delta G_{DFT}$ of 15.4 kJ/mol for the ion exchange reaction from Ca-EDTA to Sr-EDTA, compared to the literature value of 11.0 kJ/mol), while the thermodynamic parameters obtained from the ITC study of calcium EDT identical to those found in the literature. With the validated methods, strontium chelation by (7,16-bis-malc 7,16-diazacyclooctadecane-bis-malonic acid (Decorporol) was first synthesized and then examined. Our D that the exchange reaction from Ca^{2+} to Sr^{2+} with Decorporol has an exergonic (−14.1 kJ/mol) Gibbs fre also approved by the experimental Gibbs free energy change of −34.5 ± 1.1 kJ/mol obtained from Measurements at elevated temperatures and physiological conditions did not impact chelation signific application of the chelating agent is feasible.

■ INTRODUCTION

Power plant accidents, such as happened in Chernobyl and

for calcium transport, such as those a depletion.[6] As a result, strontium ca

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

Check for updates

OPEN

Development and Validation of Combined In Vitro and In Vivo Assays for Evaluating the Efficacy of Strontium-Chelating Compounds

*Nóra Varga[1,2], *Viola Pomozi[2], *Eszter Kozák[1,2], Zsuzsa Erdei[1], Szilárd Tóth[2], Adriána Kutás[3], Zoltán Mucsi[3], Zsolt Rapi[4], Beatrix Kovács[2], Anett Matuscsák[5], Olivér Bánhídi[3], Csaba Váradi[3], Tamás Rácz[5], Katalin Német[1], **Béla Viskolcz[3], **Áron Szepesi[5]

[1]Creative Cell Ltd., 1119 Budapest, Hungary.

[2]Institute of Molecular Life Sciences, HUN-REN Research Centre for Natural Sciences, 1117 Budapest, Hungary.

[3]Advanced Materials and Intelligent Technologies Higher Education and Industrial Cooperation Centre, University of Miskolc, 3515 Miskolc, Hungary.

[4]Department of Organic Chemistry and Technology, Faculty of Chemical Technology and Biotechnology, Budapest University of Technology and Economics, Műegyetem rkp. 3., H-1111 Budapest, Hungary

[5]Laboratory of 3D Functional Network and Dendritic Imaging, HUN-REN Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungary.

[6]Stratoxer(s) Ltd., 8100 Várpalota, Hungary

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

A pályázat során benyújtott, de elfogadás alatt álló publikáció:

Gram-scale synthesis of alkaline phosphatase inhibitor SBI-425

Zsolt Rapi, Krisztina Fülöp, Béla Viskolcz, Zoltán Mucsi*

KEYWORDS

alkaline phosphatase, inhibitor, synthesis, scalability

ABSTRACT

Alkaline phosphatase (ALP) is present in most living organisms. This family of metalloenzymes catalyzes transphosphorylation and the hydrolysis of phosphate monoesters. Alkaline phosphatase enzymes have significant roles in several physiological conditions and diseases. By inhibiting them, certain diseases can be prevented or treated, and their role in a healthy body can also be examined. Several inhibitors can be used, with various structures. One of them, marketed as SBI-425, has a very low IC_{50} value (16 nM). As its synthesis has not been described in detail yet, a scalable method was elaborated to prepare SBI-425 in larger amounts. In three simple steps, 4-chloroanisole was transformed to the appropriate sulfonyl acid chloride, which was used to acylate 3-aminonicotinamide. Without any chromatography or crystallization, the purity of the desired SBI-425 was above 90%. The synthesis could also be carried out on a tenfold scale, giving the same result. The final product was subjected to biological testing, and it was found to be effective

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Berendezések

UPLC-FLR-MS készülék

Waters Acquity ultra-performance liquid chromatography (UPLC) rendszer fluoreszcens detektorral és Xevo-G2S qTOF tömegspektrométerrel

A Waters Acquity UPLC rendszer egy nagy érzékenységű, ultra-teljesítményű folyadékkromatográfiás berendezés, amely gyors és nagy felbontású elválasztást tesz lehetővé. Fluoreszcens detektorral felszerelve kiválóan alkalmas kis koncentrációjú, fluoreszcens tulajdonságú analitok kimutatására. A rendszerhez kapcsolt Xevo G2-S qTOF tömegspektrométer pontos tömegmérést és nagy dinamikatartományt biztosít. A qTOF technológia lehetővé teszi ismeretlen vegyületek azonosítását, fragmentációs vizsgálatát és kvantifikálását. Az UPLC–qTOF kombináció ideális komplex biológiai minták, környezetanalitikai és gyógyszerkutatási vizsgálatok elvégzésére.

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

**A TKP2021-NVA-14
számú projekt a Kulturális és Innovációs
Minisztérium Nemzeti Kutatási
Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott
támogatásával, a TKP2021, Tématerületi
Kiválósági Program 2021 pályázati program,
Nemzetvédelem,
nemzetbiztonság alprogram finanszírozásában
valósult meg.**

MISKOLCI EGYETEM

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT