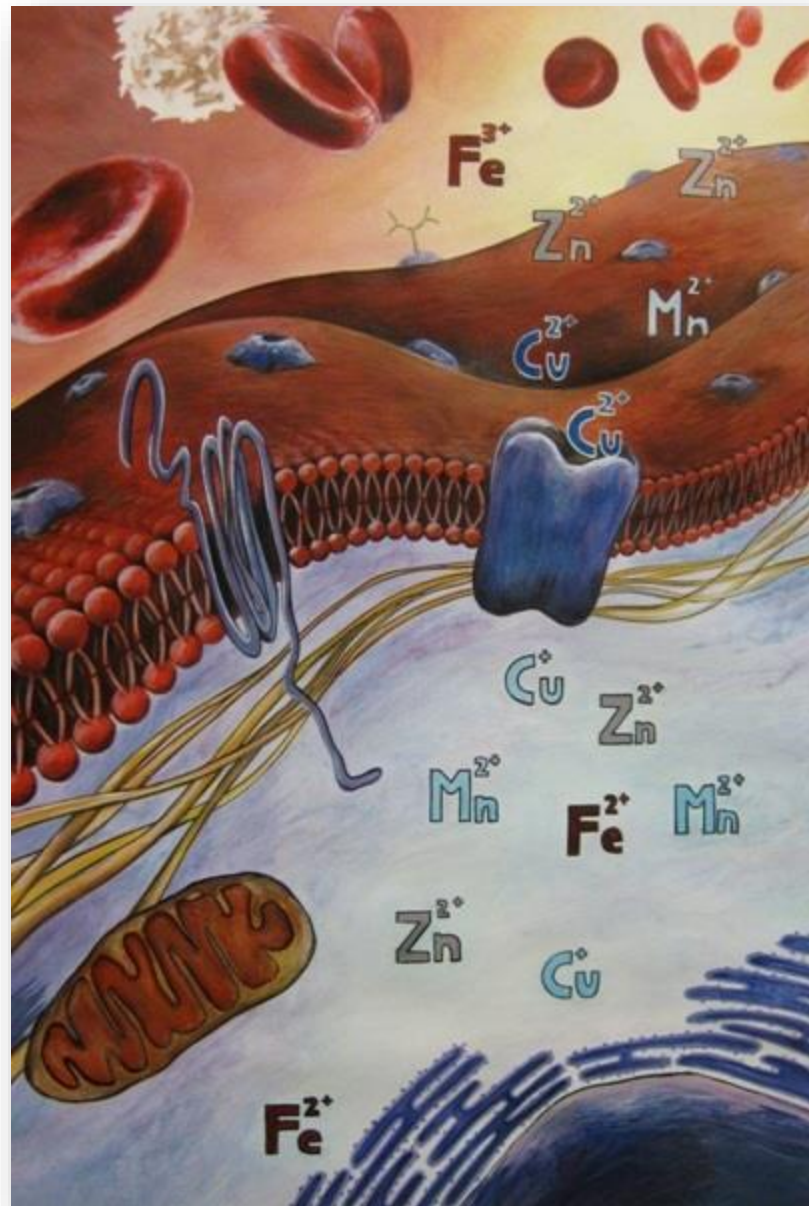


# Osnove bioorganometalne kemije

Prof. dr. sc. Lidija Barišić

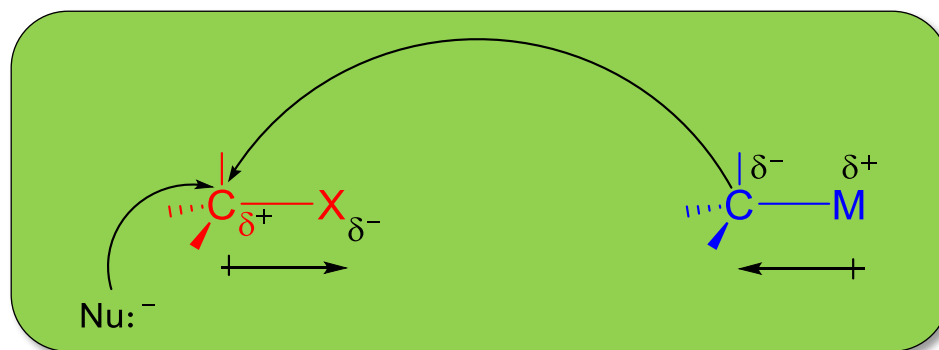
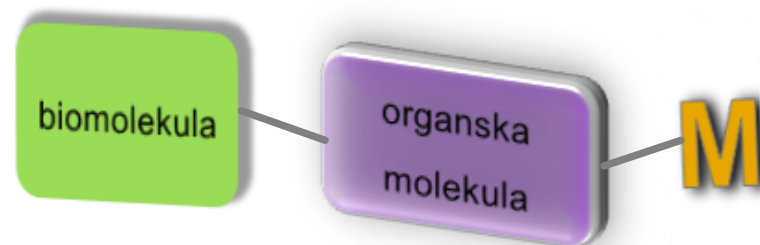




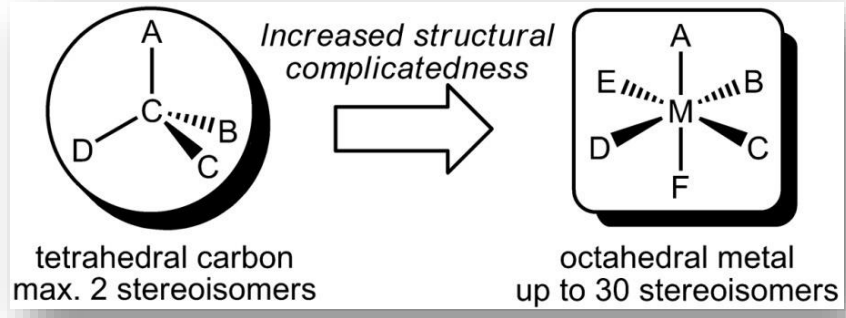
## Literatura:

1. G. Jaouen (Editor), *Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine*, John Wiley & Sons, Weinheim, 2006.
2. G. Simonneaux (Editor), *Bioorganometallic Chemistry (Topics in Organometallic Chemistry)*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
3. P. Štepička (Editor), *Ferrocenes: Ligands, Materials and Biomolecules*, John Wiley & Sons, Chichester, 2008.
4. D. R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, *Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene*, *Chem. Rev.* 104 (2004) 5931-5985.
5. V. Rapić, M. Čakić Semenčić I. *Organometalna i bioorganometalna kemija*, *Kem. Ind.* 60 (2011) 61-79.
6. E. A. Hillard, G. Jaouen, *Bioorganometallics: Future Trends in Drug Discovery*, *Analytical Chemistry and Catalysis*, *Organometallics* 30 (2011) 20-27.
7. G. Jaouen and M. Salmain (Editors), *Bioorganometallic Chemistry. Applications in Drug Discovery, Biocatalysis, and Imaging*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany, 2015.

- **Bioorganometalna** kemija: sinteza i studij konjugata organometalnih spojeva i biomolekula (steroida, šećera, aminokiselina, peptida, DNA, vitamina i enzima).
- Organometalni spojevi sadrže bar jednu C–M vezu.
- Nukleofilni ugljikov atom iz **organometalnog spoja** u reakciji s **elektrofilnim ugljikovim atomom** (iz alkil-halogenida, estera, aldehida, ketona) stvara novu C–C vezu  $\Rightarrow$  mogućnost sinteze kompleksnih molekula iz manjih polaznih molekula!



- Tetraedarski atom ugljika može se javiti u dva enantiomerna oblika, dok atom metala sa svojih 6 supstituenata može imati i do 30 različitih stereoizomera (strukturna raznolikost!) ⇒ prednost organometalnih kompleksa u odnosu na čiste organske spojeve!

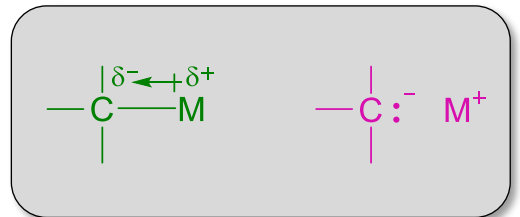


- U kinetički inertnim kompleksima prijelaznih metala (Ru, Os i Ir) ne opaža se racemizacija, što znači da su njihovi kompleksi stereokemijski stabilni te se često koriste u medicinskim istraživanjima.



- C–M veza izvor je različitih elektronskih i steričkih efekata kojima se može kontrolirati biološka aktivnost.

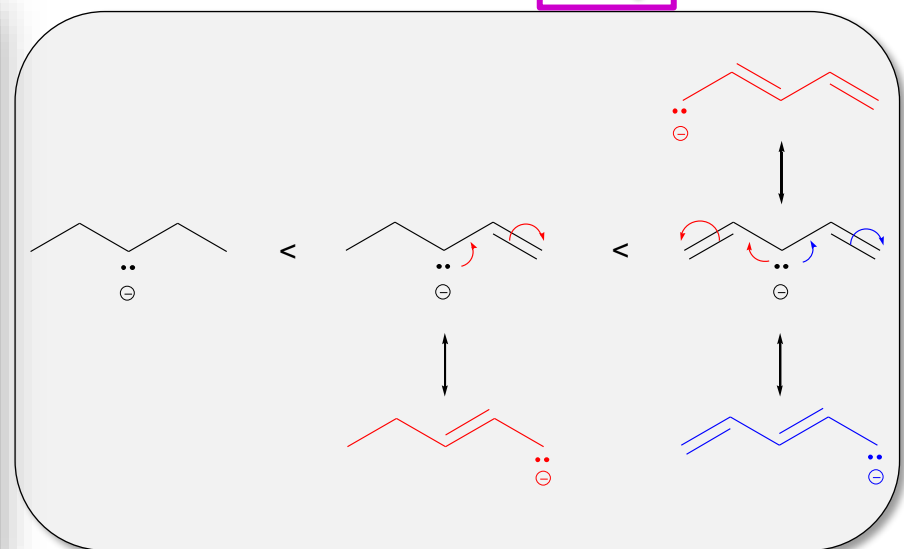
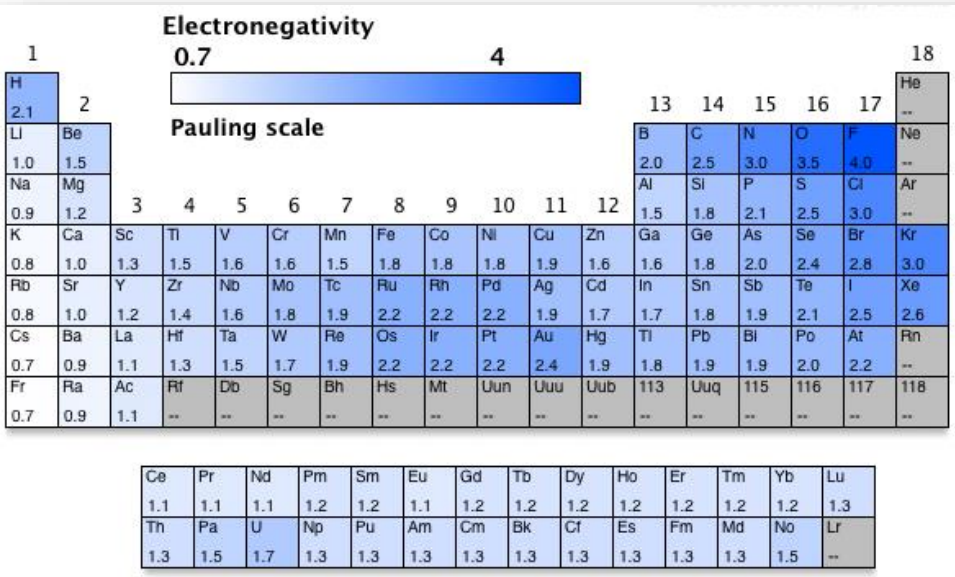
- Organometalni spojevi dijele se, ovisno o karakteru C–M veze, na **kovalentne** i **ionske** (indeks postotnog udjela ionskog karaktera!).



- Veća razlika u elektronegativnosti atomâ ugljika i metala pridonosi porastu ionskog karaktera veze te većoj reaktivnosti organometalnog spoja.

$$\frac{E_C - E_M}{E_C} \times 100$$

- Elektronegativniji C-atom tvori ionske veze s atomima izrazito elektropozitivnih elemenata.
- Osim elektronegativnosti metala, na karakter C–M veze utječe i struktura organskog dijela molekule; ionski karakter raste ukoliko se karbanion može stabilizirati rezonancijskom delokalizacijom ili utjecajem elektron-odvlačećih supstituenata.



- Većina organometalnih spojeva sadrži polarnu kovalentnu C–M vezu.

**Ionski karakter**

veza	C–Li	C–Mg	C–Al	C–Zn	C–Sn	C–Cu	C–Hg
razlika u elektronegativnosti	1,5	1,3	1,0	0,9	0,7	0,6	0,55

postotni udio ionskog karaktera	60	52	40	36	28	24	24
---------------------------------	----	----	----	----	----	----	----

**Nukleofilnost**

ORGANOMETALNI  
SPOJEVI

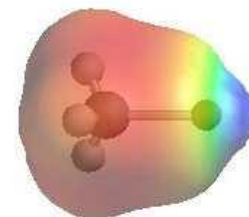
Tip veze

Primjeri



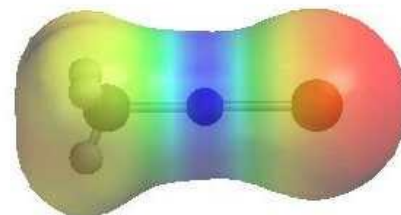
R-M

CH<sub>3</sub>-Li



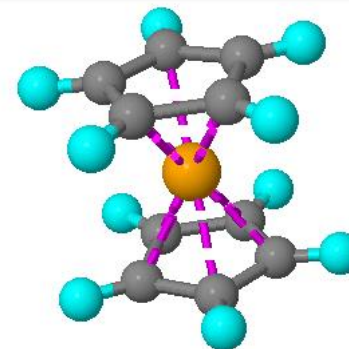
R-M-X

CH<sub>3</sub>-Mg-Br



R-M-R

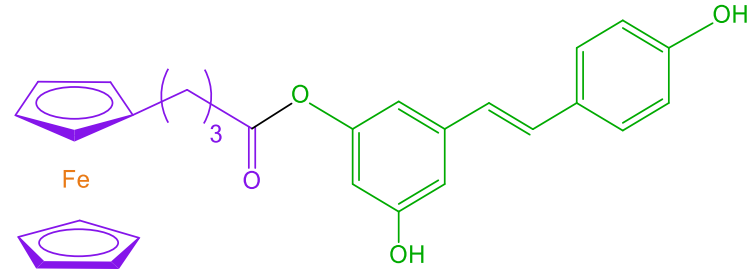
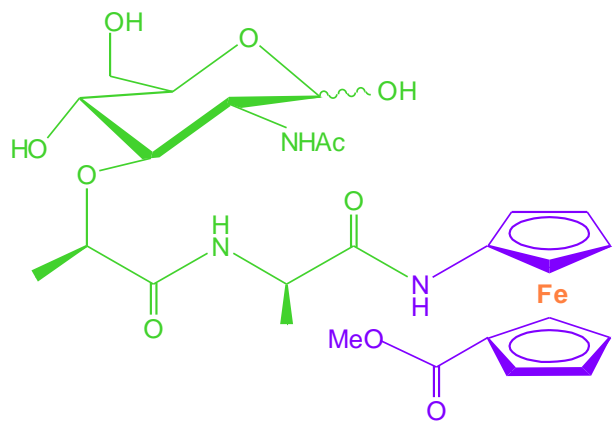
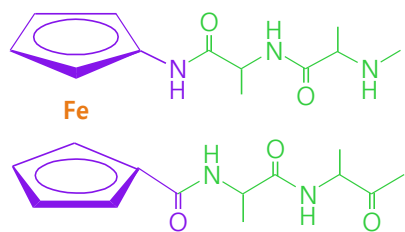
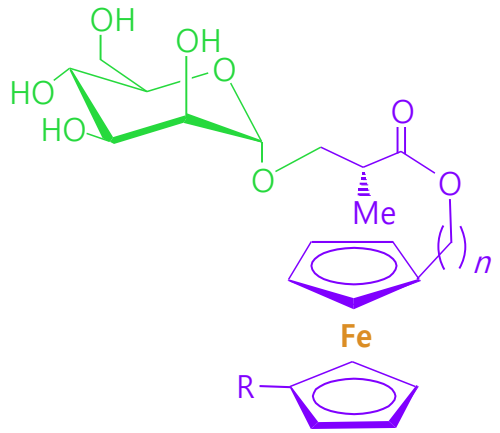
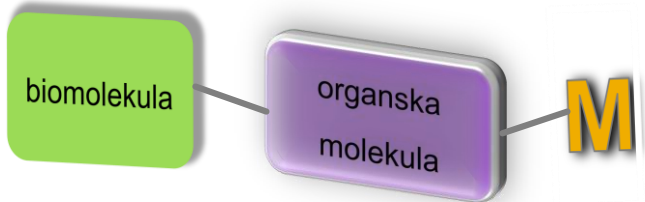
C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>-Fe-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>



- Pet glavnih područja koja objedinjuje bioorganometalna kemija:



◦ Primjeri bioorganometalnih spojeva sintetiziranih u  
Laboratoriju za organsku kemiju PBF-a:



L. Barišić et al, *Chemistry A European Journal* 12 (2006) 4965.

L. Barišić et al, *Organometallics* 31 (2012) 3683.

L. Barišić et al, *Applied Organometallic Chemistry* 26 (2012) 74

L. Barišić et al, *Croatica Chemica Acta*. 89 (2016) 339.

L. Barišić et al, *Carbohydrate Research* 346 (2011) 678.



# Metali u biološkim sustavima

- Od 60 kemijskih elemenata nađenih u ljudskom organizmu, samo je 25 odgovorno za njegovu normalnu funkciju.



Key	Biologically relevant elements colored
<span style="background-color: yellow;"> </span>	Major, essential, all life
<span style="background-color: pink;"> </span>	Major anions, all life
<span style="background-color: orange;"> </span>	Major cations, all life
<span style="background-color: lightorange;"> </span>	Essential, trace, all life
<span style="background-color: green;"> </span>	Major biological transition metals
<span style="background-color: brown;"> </span>	Specialized uses, some life
<span style="background-color: blue;"> </span>	May be bound, transported, reduced, and/or methylated
<span style="background-color: lightgrey;"> </span>	Inert or unknown biological function

1 H	
3 Li	4 Be
11 Na	12 Mg
19 K	20 Ca
37 Rb	38 Sr
55 Cs	56 Ba
87 Fr	88 Ra

5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne										
13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar										
21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
71 Lu	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn

57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb
89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No

- Na i K prisutni su u ljudskom tijelu u visokim koncentracijama (oko 112 g Na i 160 g K). Imaju esencijalnu ulogu o održavanju stanične homeostaze. Također, sudjeluju u održavanju osmotskog tlaka i distribuciji vode, održavanju odgovarajućih pH-vrijednosti, regulaciji rada srca i mišića, u transportu elektrona, te kao enzimski kofaktori sudjeluju u katalizi. Kroz staničnu membranu transportiraju se posredovanjem proteinskih pumpi specifičnih za ova dva metala (Na/K ATP-aze). Na/K ATP-aze kontroliraju transport triju Na-iona iz stanice te transport dvaju K-iona u stanicu uslijed čega dolazi do separacije naboja kroz membranu pri čemu se ostvaruje električni potencijal odgovoran za živčane impulse.



- Po zastupljenosti u organizmu (25 g), Mg se nalazi na 4. mjestu. Ima ulogu esencijalnog kofaktora u mehanizmima replikacije, transkripcije i translacije. Sudjeluje u stabilizaciji lipidne membrane, nukleinskih kiselina i ribosoma, te u regulaciji enzimske aktivnosti.
- Ca je u ljudskom organizmu prisutan u velikoj količini (1,1 kg). Sudjeluje u regulaciji mišićno-koštanog sustava.

- U ljudskom organizmu prisutno je oko 4,8 g Fe. Fe je esencijalan element za gotovo sve žive organizme jer sudjeluje u različitim metaboličkim procesima (prijenos kisika i elektrona, sintezi DNA). U tijelu se Fe javlja kao kompleks s proteinima (hemoglobin ili mioglobin), u obliku hemenzima ili flavin-Fe enzima i feritina.
- Zn (2,6 g u ljudskom tijelu) uključen je u sve aspekte molekularne i stanične biologije. Poznato je preko 3000 fiziološki aktivnih Zn-proteina. Značajno doprinosi normalnoj funkciji imunološkog sustava.
- Unatoč niskoj zastupljenosti u organizmu (1,6 mg), Co ima vitalnu funkciju u koenzimu vitamina B12. Manjak vitamina B12 uzrokuje megaloblastičnu anemiju i neurološka oboljenja.
- Ni je u tijelu prisutan u maloj količini (8 mg). Esencijalan je za bakterije. Dva Ni-enzima ključna su za kolonizaciju želučanog patogena *Helicobacter pylori*. Ni je jedan od najčešćih alergena. Ni-ioni vezuju se na površinu MHC (*Major Histocompatibility Complex*; molekule glavnog kompleksa histokompatibilnosti nalaze se u središtu imunološkog sustava i pomažu u razlikovanju vlastitih stanica i tkiva od onih koji ne pripadaju vlastitom tijelu), nakon čega dolazi do imunološkog odgovora.

---

D. E. Fenton, *Biocoordination Chemistry*, Oxford University Press Inc, New York, 1995.

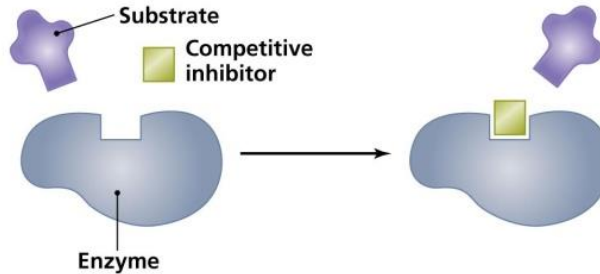
A. Arbuse et al, *Inorg. Chem.* 2009, 48, 11098-11107

S. S. Leonard et al, *Molecular and Cellular Biochemistry* 255 (2004) 3.

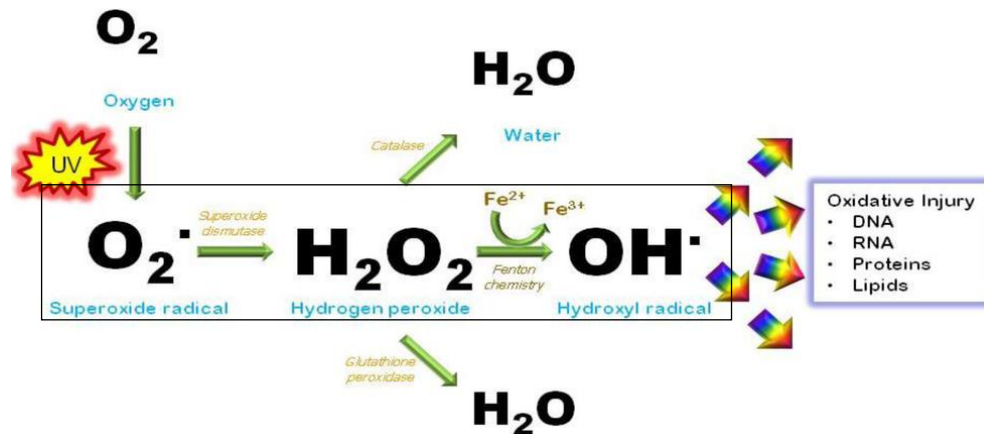


# Mehanizmi trovanja metalima

Inhibicija enzima (najčešće vezivanjem za sulfhidrilne skupine u aktivnim mjestima)



Porast udjela reaktivnih kisikovih spojeva ROS (oksidoredukcijom metalnih iona, inhibicijom antioksidacijskih enzima)

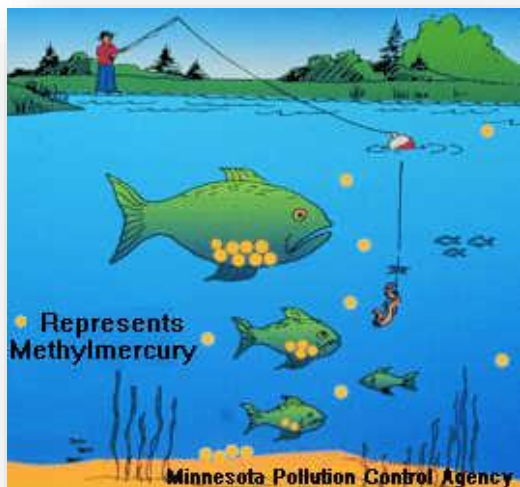


Karcinogeneza (oksidacija DNA baza, inhibicija enzima za popravak DNA)

- Minamata bolest: 1953. trovanje stanovnika u japanskom zaljevu Minamata organo-živinim spojevima ( $\text{CH}_3\text{-Hg}^+\text{X}^-$ ;  $\text{X}=\text{SCH}_3$ ).



- Trovanje *dietil-kositar-dijodidom* ( $\text{Sn}(\text{I})_2(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ): u Francuskoj je zbog posljedica korištenja lijeka stalinona u liječenju stafilokoknih infekcija umrlo 102 ljudi, a mnogi su trajno oboljeli od neuroloških poremećaja. Fatalne posljedice korištenja ovoga lijeka pripisuju se dietil-kositar-dijodidu, snažnom neurotoksičnom agensu.



MARCH 1, 1958

"STALINON": A THERAPEUTIC DISASTER

BRITISH  
MEDICAL JOURNAL

515

### "STALINON": A THERAPEUTIC DISASTER

*In a Paris court last December a French pharmacist, the inventor and vendor of a remedy against boils called "stalinon," was sentenced to two years' imprisonment and fined 1 million francs (about £850). Stalinon, it was alleged, had killed 102 people and left at least 100 others permanently affected. Damages of 643 million francs (£514,000) were awarded to the victims and their families. They had been poisoned in 1954.\* Our distinguished French contemporary "La Semaine des Hôpitaux" has devoted the whole of its latest therapy supplement† to an extended account (177 pages) of the stalinon trial. We are indebted to a medical correspondent in Paris for the following note on some of the toxicological and administrative implications of the case.*

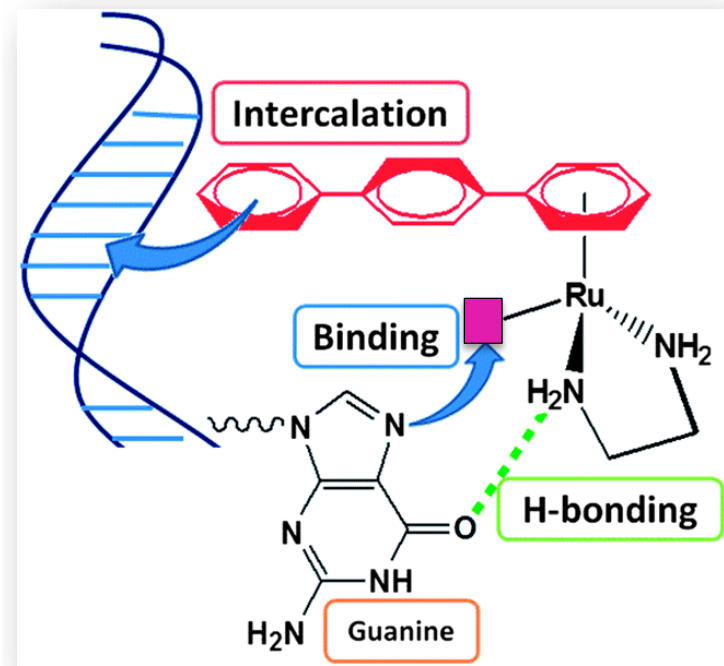
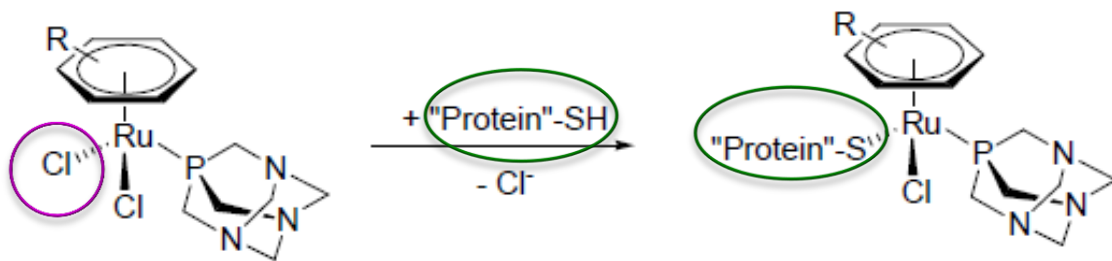
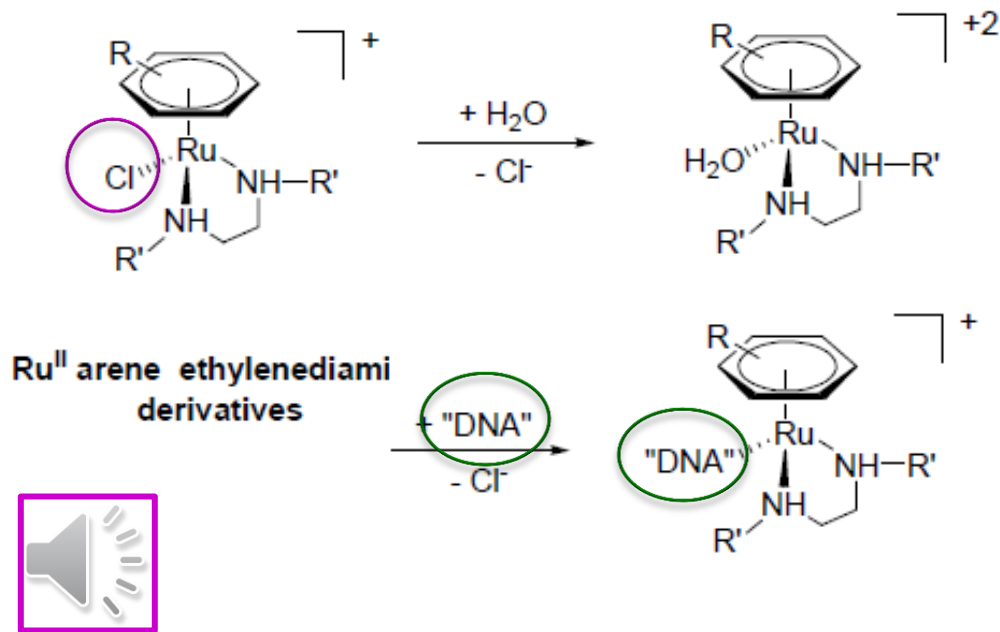
#### The Trial

Stalinon was marketed as an oral preparation for the treatment of staphylococcal infections. It was dispensed in capsules, each containing 15 mg. of diiododiethyl tin and

—toxic symptoms were produced only with doses 3–10 times greater than those which had proved dangerous to man. Man therefore seems more sensitive to stalinon than animals.

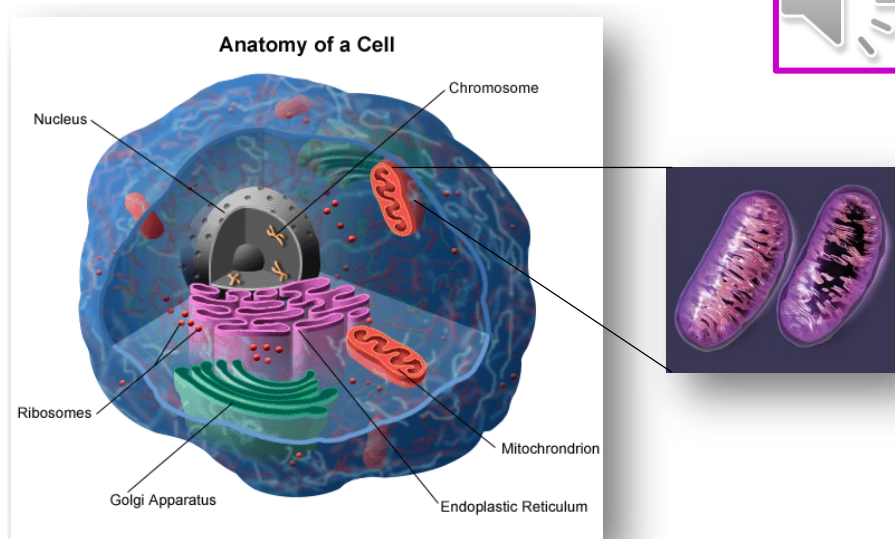
Professor G.-M. Tréfoüel and Dr. J. Matti, two chemists from the Pasteur Institute, explained the poisoning by showing that originally the capsules contained monobromodiethyl tin and monoiododiethyl tin but no diiodo derivative, and that the capsules would have been toxic only after the makers succeeded in really producing a diiodo compound. However, in animals the toxic effects of the monoiodo and the diiodo derivatives are identical. There was also some speculation on whether a toxic substance might have resulted from contact with oxidation products of isolinoleic acid. Finally, another unproved theory was that a triiodoethyl derivative might have been produced, for recently British workers have reported<sup>4</sup> oedema of the central nervous system in rats given such compounds. Their work, however, is too recent to have been confirmed. Thus, as in so many therapeutic disasters, some doubt remains about the exact explanation.

- Smatra se da je citotoksičnost posljedica direktnog vezivanja fragmenta metalnog kompleksa na biološku metu pri čemu se jedan ili više metalnih liganada supstituira s biomolekulom.
- Pojednostavljeni prikazi supstitucije **liganda** Ru-kompleksâ s **biomolekulama** (DNA, proteinima); rezultirajući bioorganometalni kompleksi ostvaruju antikancerogeni učinak!

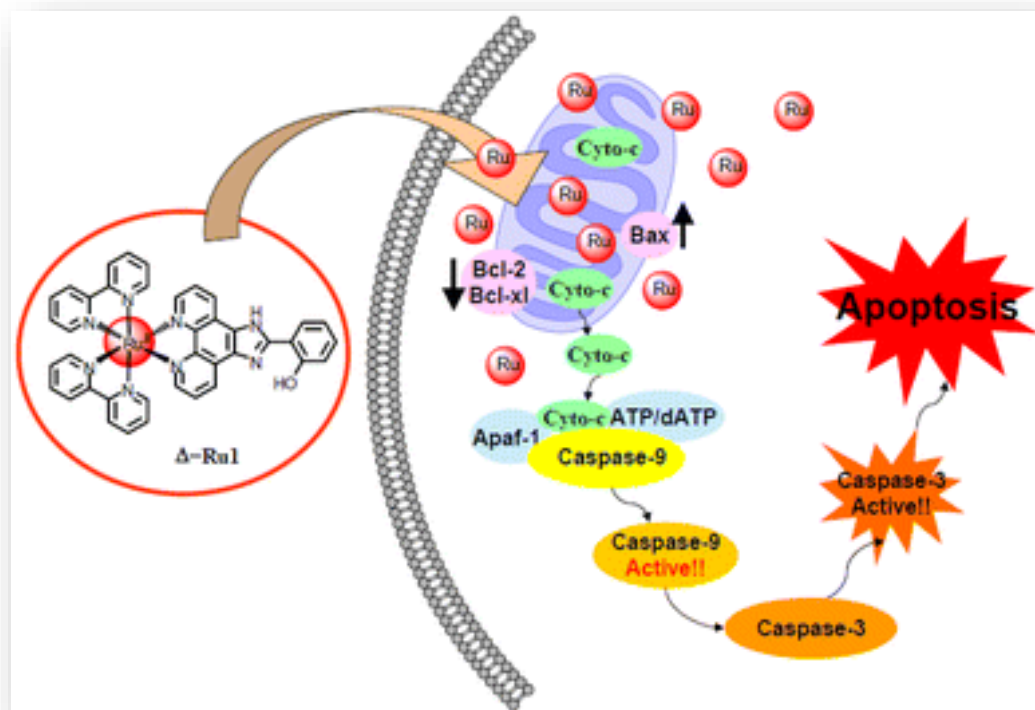


Interkaliranje: molekule domaćina tvore rešetku u koju ulaze molekule gosta pri čemu se struktura domaćina može djelomično promijeniti, a gost može lagano ulaziti i izlaziti iz te strukture.

- Kemoterapeutski mehanizam Ru-kompleksa uključuje razaranje mitohondrija.
- Mitohondriji kanceroznih stanica (*desno*) strukturno i funkcionalno razlikuju se od mitohondrija normalnih stanica (*lijevo*) (u zdravim se stanicama ATP stvara oksidativnom fosforilacijom, dok ga tumorske stanice generiraju glikolizom, te imaju viši mitohondrijski membranski potencijal).



- Razaranjem mitohondrija oslobađaju se proapoptotski proteini i aktiviraju mehanizmi programirane stanične smrti.



**Table 1** Metals with biomedical applications (or potential applications)

Metal	Applications	Metal	Applications
Arsenic	Syphilis, ulcers, parasitic disease, acute promyelocytic leukaemia	Molybdenum	Menkes disease
Aluminium	Antacid, dermatology, hyperphosphataemia	Palladium	Photodynamic therapy, cancer, HIV
Antimony	Leishmaniasis	Platinum	Cancer, photodynamic therapy, microbial infections, viral infections including AIDS
Barium	Diagnostic agents	Rhodium	Leishmaniasis, radiotherapy, bacterial infections
Bismuth	Gastrointestinal disorders, syphilis, angina, adenotonsillectomy	Ruthenium	Malaria, cancer, Chagas' disease, bacterial infections, septic shock, HIV
Copper	Diagnostic and imaging agents, radiopharmaceuticals, photodynamic therapy, Menkes disease	Rhenium	Diagnostic and imaging agents, radiotherapy
Chromium	Diagnostic agent, diabetes	Silver	Microbial infections, fungal infections, dermatology, diagnosis and imaging agents
Calcium	Hyperphosphataemia	Strontium, Radium, Plutonium, Samarium	Radiopharmaceuticals
Cobalt	Diagnostic and imaging agents, photodynamic therapy	Tin	Radiopharmaceuticals, photodynamic therapy
Iron	Photodynamic therapy, hypotensive, hyperphosphatemia	Thallium	Diagnostic and imaging agents
Gadolinium	Diagnostic and imaging agents	Technetium	Diagnostic and imaging agents
Gallium	Diagnostic and imaging agents, cancer	Vanadium	Insulin mimics
Germanium	Cancer	Yttrium	Diagnostic and imaging agents, radio-immunotherapy
Gold	Rheumatoid arthritis, bronchial asthma, malaria, bacterial infections, cancer, viral infections including AIDS	Zinc	Photodynamic therapy, Menkes disease, dermatology, HIV
Holmium	Radiopharmaceuticals		
Indium	Diagnostic and imaging agents		
Lead	Ulcer treatment		
Lithium	Manic depressive psychoses and viral infections including AIDS		
Magnesium	Antacid, laxative, hyperparathyroidism		
Manganese	Photodynamic therapy		
Mercury	Diuretic, microbial infections, dermatology (syphilis), heart failure		



• [METALS IN MEDICINE AND THE ENVIRONMENT](#)



## U čemu je značaj bioorganometalnih spojeva?

- Funkcija našeg organizma zasniva se na transportu tvari i energije u čemu krucijalnu ulogu imaju metali zahvaljujući sudjelovanju u reakcijama oksidacije i redukcije.



- Bioorganometalni spojevi mogu apsorbirati naboj i stvarati ionske veze što omogućava odvijanje reakcija koje su bez njihovog sudjelovanja teško izvedive ili neizvedive.
- Primjenjuju se kao receptori za biološki važne molekule te kao kalupi za stvaranje foldamera, osjetljivih sondi, kromofora, redoks-aktivnih spojeva i kemosenzora. Istražuju se i kao potencijalni terapeutici za kancerogena oboljenja te gljivične, bakterijske i parazitske infekcije.

Half Reaction	potential
<b>F<sub>2</sub></b> + 2e <sup>-</sup> ⇌ 2F <sup>-</sup>	+2.87 V
<b>Pb<sup>4+</sup></b> + 2e <sup>-</sup> ⇌ Pb <sup>2+</sup>	+1.67 V
<b>Cl<sub>2</sub></b> + 2e <sup>-</sup> ⇌ 2Cl <sup>-</sup>	+1.36 V
<b>Ag<sup>+</sup></b> + 1e <sup>-</sup> ⇌ Ag	+0.80 V
Fe <sup>3+</sup> + 1e <sup>-</sup> ⇌ Fe <sup>2+</sup>	+0.77 V
Cu <sup>2+</sup> + 2e <sup>-</sup> ⇌ Cu	+0.34 V
<b>2H<sup>+</sup></b> + 2e <sup>-</sup> ⇌ <b>H<sub>2</sub></b>	<b>0.00 V</b>
Fe <sup>3+</sup> + 3e <sup>-</sup> ⇌ Fe	-0.04 V
Pb <sup>2+</sup> + 2e <sup>-</sup> ⇌ Pb	-0.13 V
Fe <sup>2+</sup> + 2e <sup>-</sup> ⇌ Fe	-0.44 V
Zn <sup>2+</sup> + 2e <sup>-</sup> ⇌ <b>Zn</b>	-0.76 V
Al <sup>3+</sup> + 3e <sup>-</sup> ⇌ <b>Al</b>	-1.66 V
Mg <sup>2+</sup> + 2e <sup>-</sup> ⇌ <b>Mg</b>	-2.36 V
Li <sup>+</sup> + 1e <sup>-</sup> ⇌ <b>Li</b>	-3.05 V

↑ increasing strength as an oxidizing agent

↓ increasing strength as an reducing agent

- Dizajn metalnih antikancerogenih spojeva podrazumijeva odgovor na pitanje koji je dio aktivnog spoja esencijalan za njegovu aktivnost (sam metal? metal i koordinirani ligand? ligand?, itd.).
- Razmatranje odgovora na to pitanje vodi k podjeli metalnih antikancerogenih spojeva u 5 kategorija:

## ***Podjela metalnih antikancerogenih spojeva prema načinu djelovanja***



**I. Metal ima funkcionalnu ulogu**

**II. Metal ima strukturnu ulogu**

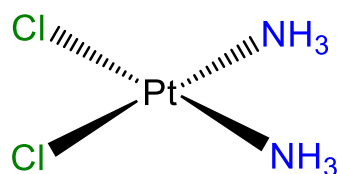
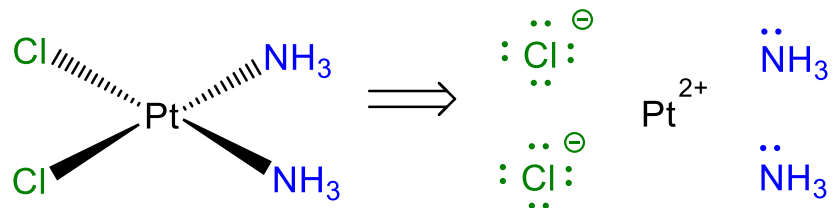
**III. Metal je prijenosnik aktivnih liganada koji se dopremaju *in vivo***

**IV. Metal je katalizator**

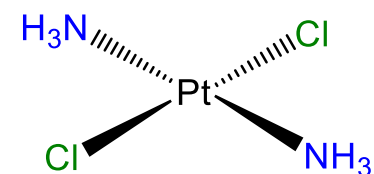
**V. Metalni spoj je fotoaktivan**

# I. Funkcionalni spojevi čija je aktivnost posljedica direktnog vezivanja metalnog fragmenta na biološku metu

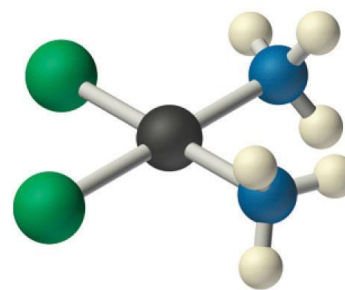
- Funkcionalni spojevi su najčešće prolijekovi koji se aktiviraju hidratacijom. Moraju imati bar jedan ligand koji podliježe supstituciji, odnosno bar jedno mjesto pogodno za vezivanje s biološkom metom.
- Prvi, a ujedno i najefikasniji metalni anti-kancerogeni lijek je cisplatin, neutralni kvadratno-planarni metalni kompleks (4 liganda smještena su u kutovima kvadrata ili pravokutnika, odnosno nalaze se u istoj ravnini). Dva Cl-liganda su u *cis*-konfiguraciji, kao i dva NH<sub>3</sub>-liganda.
- Najdjelotvorniji je prema karcinomima testisa, jajnika, glave, vrata i mjehura.
- Nuspojave kod terapije cisplatinom su mučnina, alopecija, mijelosupresija (oštećenje funkcije koštane srži), te nefrotoksičnost (oštećenje bubrega).



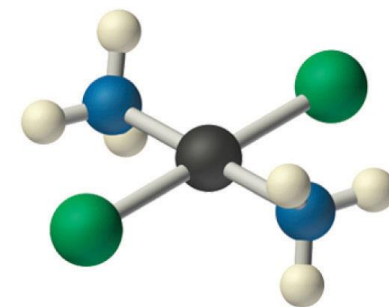
cisplatin



transplatin

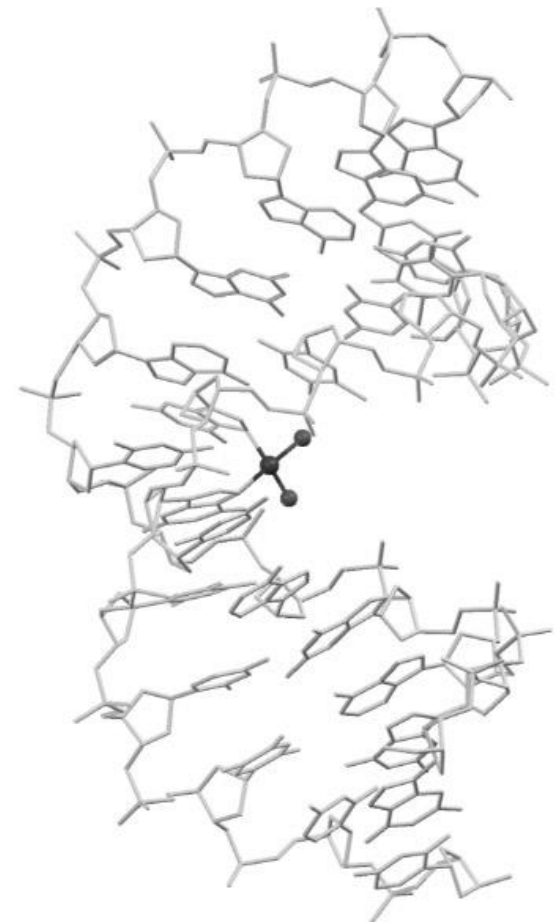
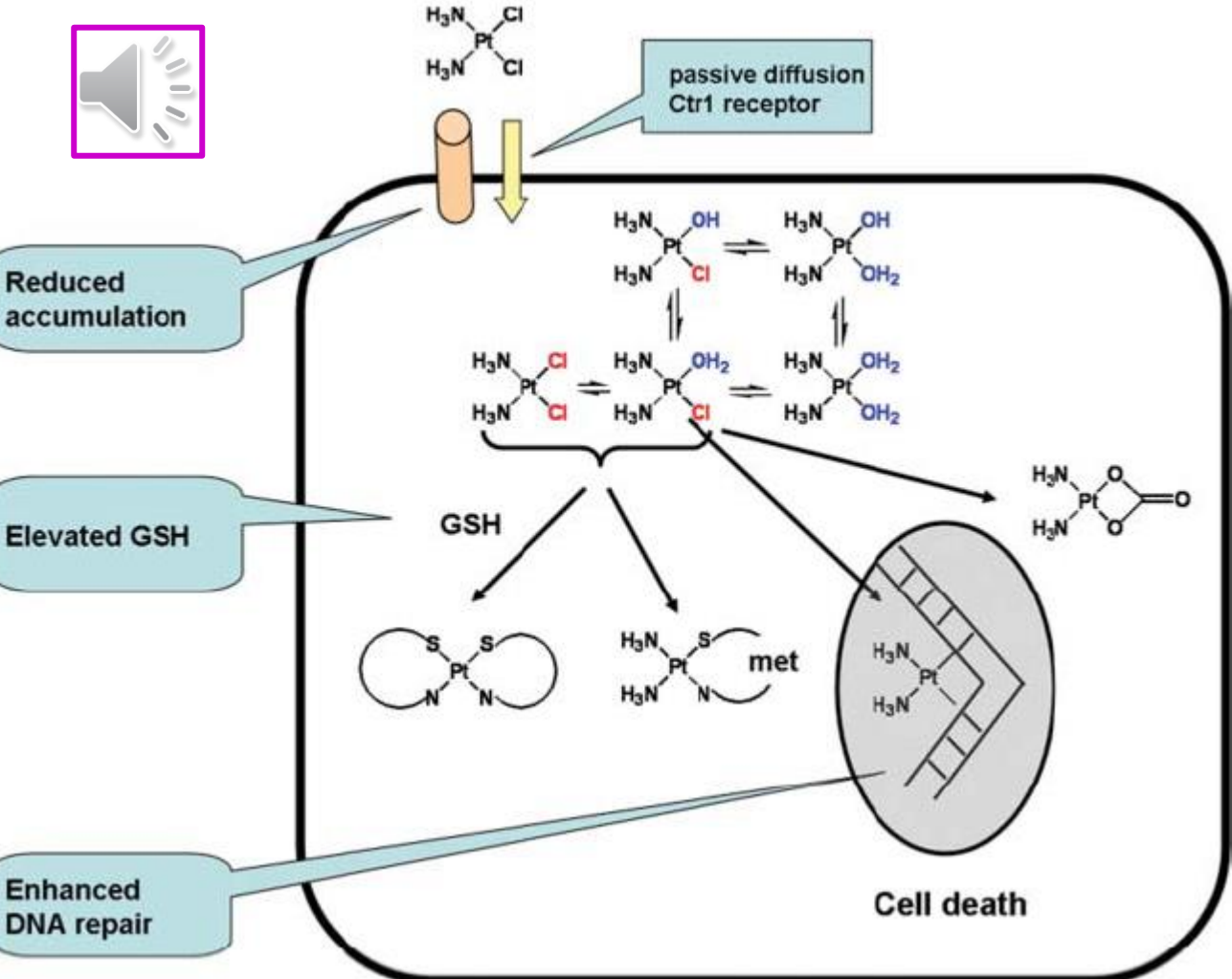


*cis*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>



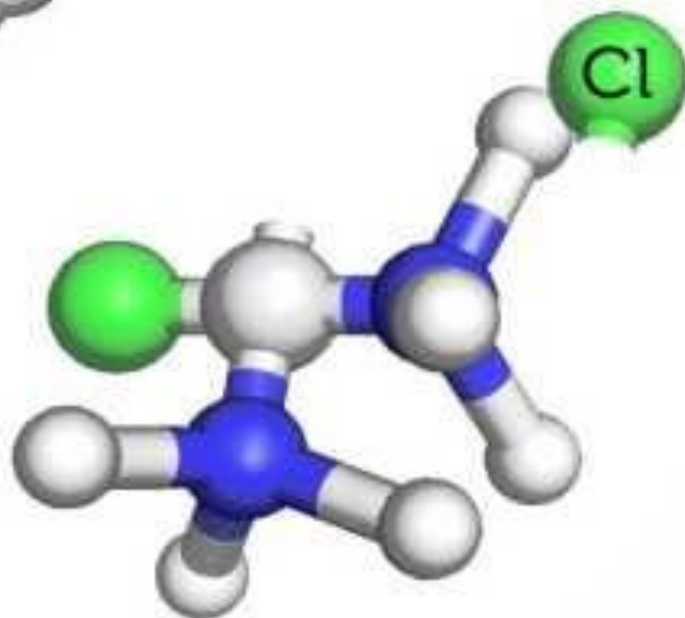
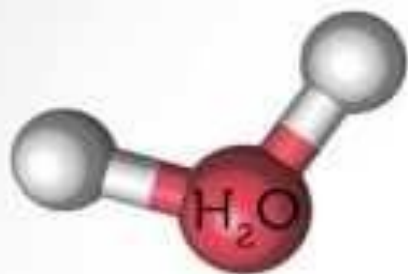
*trans*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

- Nakon intravenoznog unosa, neutralni se cisplatin otapa u vodi iz krvožilnog sustava te pasivnom difuzijom dopire u stanicu. Potom dolazi do zamjene Cl-liganada s vodom, pri čemu neutralni cisplatin postaje nabijen (2+). Nabijena DNA-fosfatna okosnica privlači kationski, nabijeni hidratirani cisplatin te se Pt vezuje na gvanin i(li) adenin, uz oslobađanje vode, što dovodi do distorzije DNA, te rezultira inhibicijom replikacije i transkripcije, pa čak i apoptozom.



*D. Gibson, Dalton Trans., 2009, 10681*

*D. Gibson, Dalton Trans. 2009, 48, 10629.*



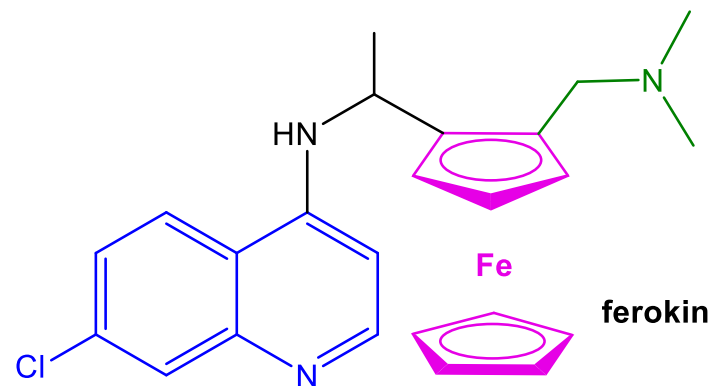
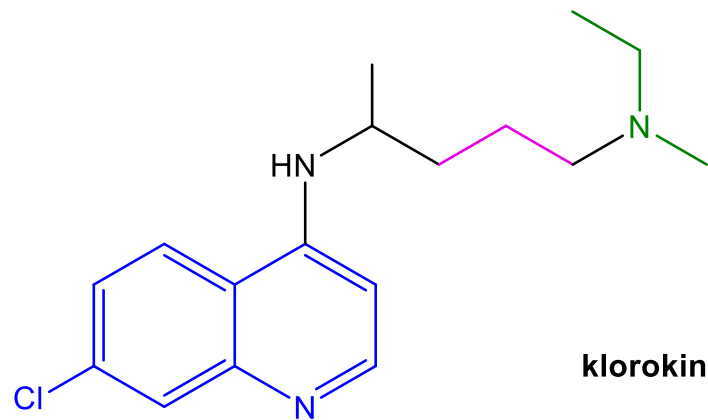
cisplatin

- Hidrolizom transplatina oba se Cl-liganda zamjenjuju s vodom, nakon čega bi trebala uslijediti zamjena vode s gvaninom. Međutim, samo se jedan H<sub>2</sub>O-ligand zamjenjuje s N<sup>2</sup> iz gvanina, dok drugi H<sub>2</sub>O-ligand nije povoljno orijentiran i do željene supstitucije ne dolazi → transplatin je inaktivan.

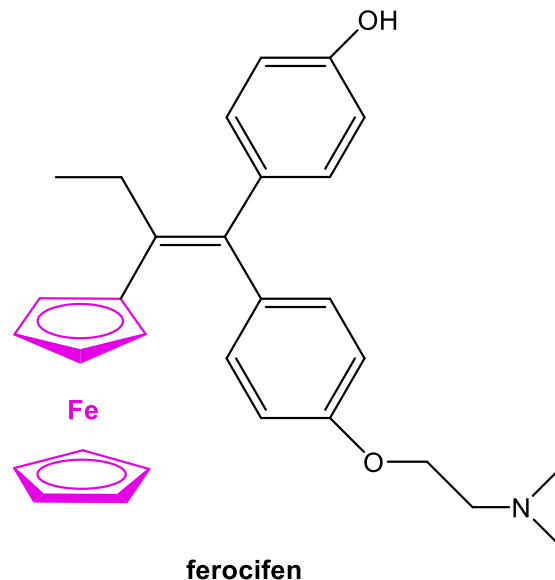
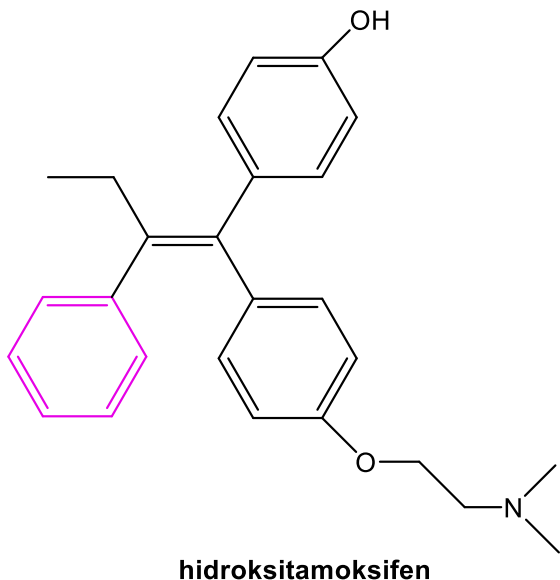
## II. Strukturni metalni antikancerogeni lijekovi



- Metal iz strukturnih spojeva ne vezuje se s biološkom metom. U odnosu na funkcionalne spojeve, dizajn strukturnih lijekova je jednostavniji, a i toksičnost je znatno manja.
- U najjednostavnijim primjerima strukturnih spojeva metalni se fragment ugrađuje u organsku okosnicu etabliranih lijekova.
- **Ferokin**, ferocenski analog antimalarijskog lijeka klorokina, jedan je od najpoznatijih i najsuspešnijih primjera strukturnih lijekova; aktivan je i prema klorokin-rezistentnim sojevima. **4-Amino-kinolinski fragment** omogućuje nakupljanje u vakuolama, **amino-skupina** u bočnom ogranku osigurava jaku anti-plazmodijsku aktivnost, a **ferocenska** je skupina odgovorna za lipofilna i redoks-svojstva.



- Umetanje metalnog fragmenta u organsku molekulu može dovesti i do neočekivanih rezultata; za razliku od tamoksifena koji se koristi u liječenju ER+ tumora dojke, ferocenski analog **ferocifen** citotoksičan je prema ER+ i ER- staničnim linijama.

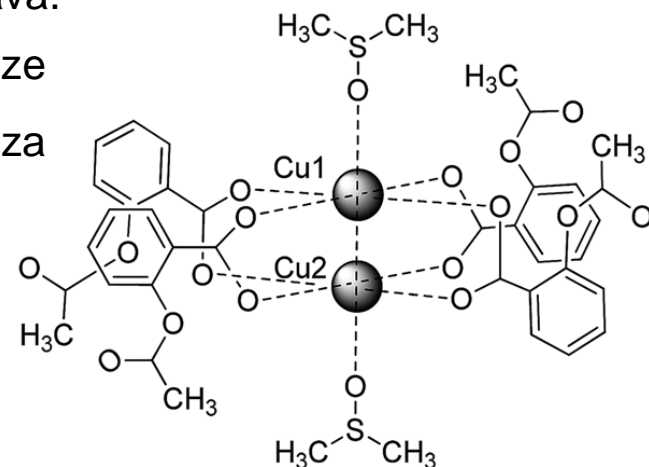
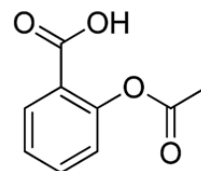


### III. Metalni ioni kao prenosioci aktivnih liganada



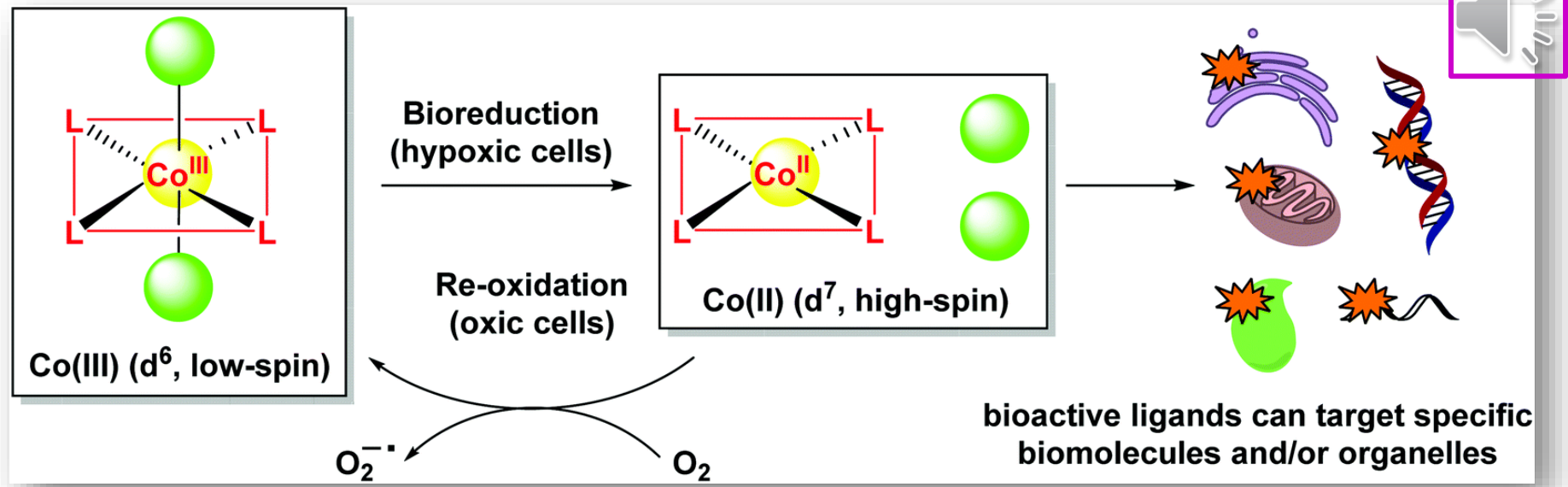
- Fizikalno-kemijska i farmakološka svojstva etabliranih organskih lijekova moguće je poboljšati njihovim koordiniranjem s metalnim ionima, a nastali kompleks mora biti stabilan i inertan da bi se izbjeglo prebrzo otpuštanje nakon unosa.
- Kompleksiranje s metalima može stabilizirati konformere ili tautomere organskih lijekova koji se javljaju u slobodnim molekulama.

- Vežanjem bioaktivne komponente organskog lijeka (fragment uključen u interakciju s biološkom metom) za inertni metal moglo bi se očekivati smanjenje ili gubitak aktivnosti. Međutim, odgovarajući metal može ostvariti protektivnu ulogu ukoliko se otpuštanje lijeka opaža u odgovarajućoj vremenskoj i prostornoj domeni. U tom se slučaju ne očekuje aktivnost samog metala, a i toksičnost nakon otpuštanja s lijeka je zanemarljiva.
- Koordiniranje bioaktivnih molekula s metalnim ionima uobičajena je strategija za poboljšanje terapijskog potencijala i(li) smanjenje toksičnosti. Rezultirajući metalni kompleks često se odlikuje superiornim lipofilnim profilom u usporedbi sa slobodnim ligandom (bioaktivnom molekulom), što mu omogućava lakši prolazak kroz staničnu membranu uz povećanu biološku aktivnost.
- Cu(II)-kompleksi nesteroidnih antiinflatarnih lijekova (aspirina i ibuprofena) pokazuju poboljšanu aktivnost, uz smanjenje gastrointestinalnih nuspojava.
- Njihov se anti-inflatarni učinak postiže inhibicijom sinteze prostaglandina, i to ireverzibilnom inhibicijom ciklo-oksigenaza (COX).
- Cu-aspirin kompleks prikazan na slici ostvaruje čak 7 puta bolji anti-inflatarni učinak u odnosu na aspirin.

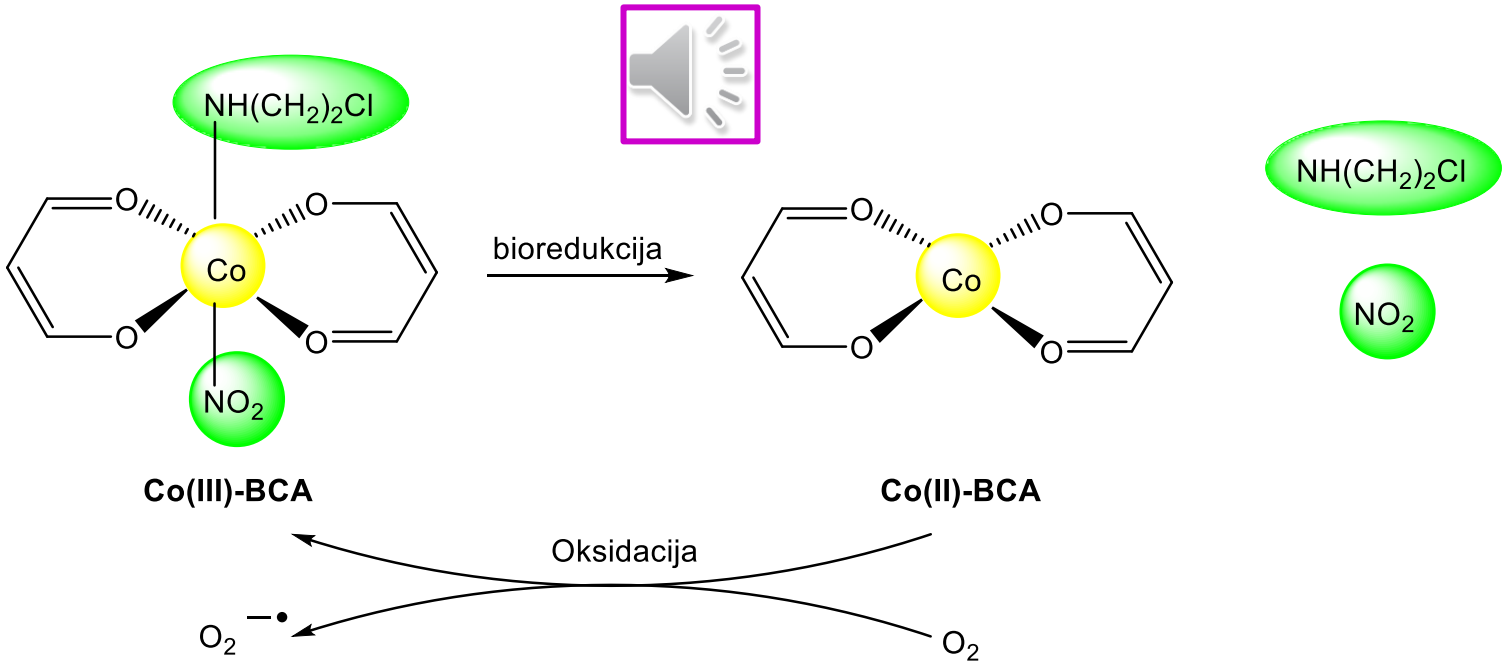




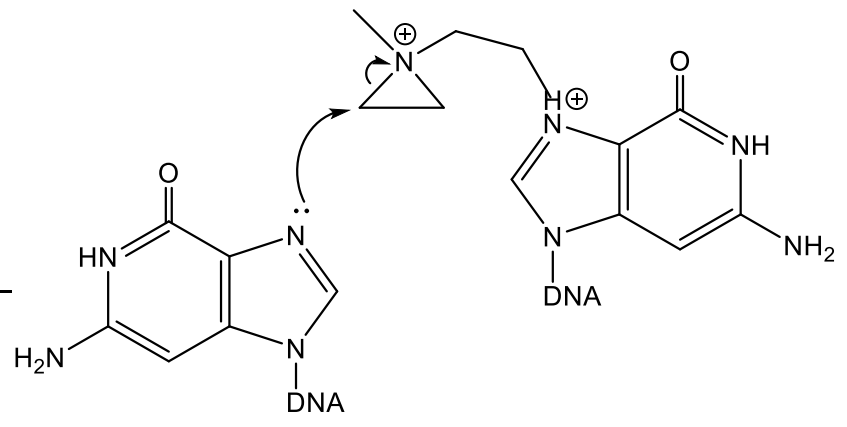
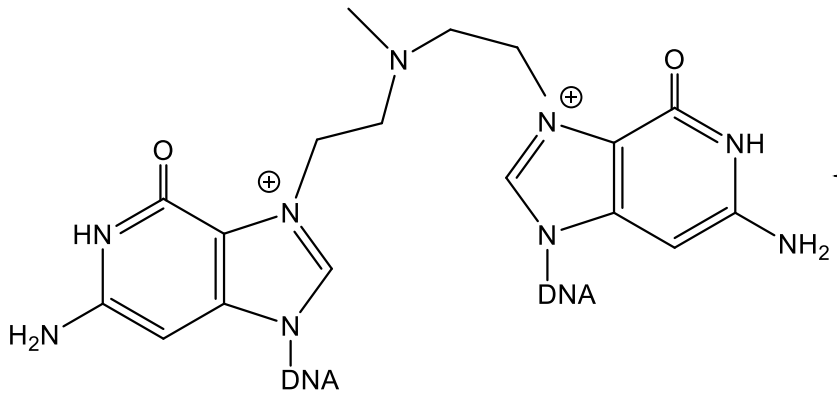
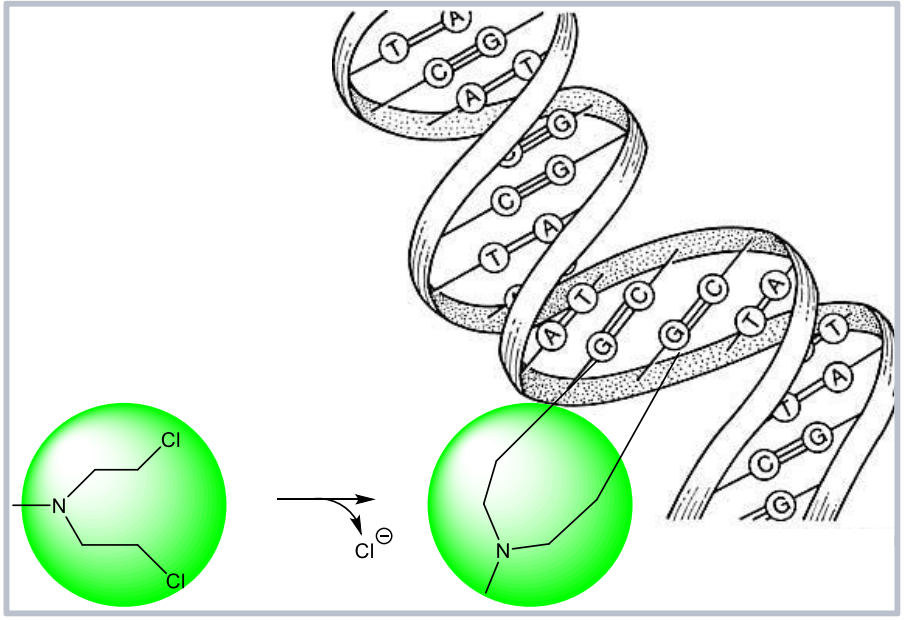
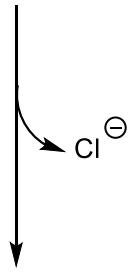
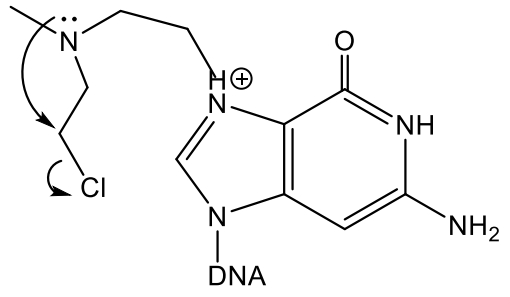
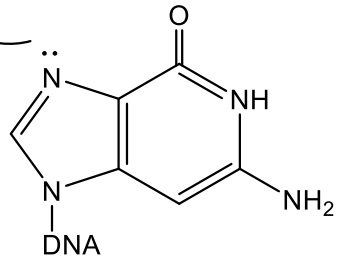
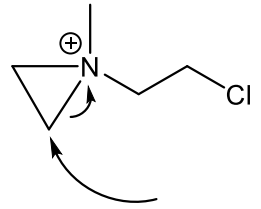
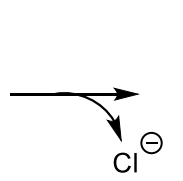
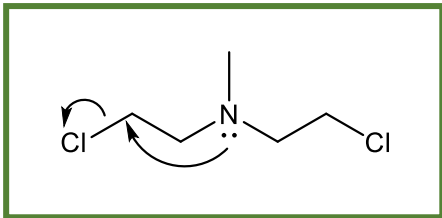
- S obzirom na rezistenciju hipoksičnih tumorskih stanica na radio- i kemoterapiju, mogućnost primjene hipoksijom aktiviranih prolijekova (inertnih agenasa koji se mogu aktivirati vanjskim podražajem, npr. svjetlom, ionizirajućim zračenjem ili u reducirajućem okruženju) izaziva veliku pozornost.
- Razlika u reaktivnosti dvaju dostupnih oksidacijskih stanja kobalta [Co(II) i Co(III)] omogućila je razvoj Co(III)-prolijekova koji podliježu bioreducirajućoj aktivaciji u hipoksičnim tumorskim stanicama. Bioreducirajuća aktivacija je proces u kojem inertni agens podliježe redukciji nakon ulaska u stanicu i pri tom otpušta jedan ili više **bioaktivnih liganada**, a opaža se po uvjetom da reducirajući potencijal inicijalnog kompleksa kompatibilan s reducirajućim potencijalom u staničnom citosolu (-200 mV do -400 mV). Intracelularna redukcija Co(III)-prolijekova upravljana je endogenim intracelularnim reduktazama, a nastali Co(II)-kompleksi nestabilniji su u odnosu na Co(III)-komplekse te stoga lakše otpuštaju bioaktivne ligande.



- Najveći izazov u primjeni hipoksijom aktiviranih prolijekova je selektivna aktivacija u kanceroznim stanicama. Naime, tradicionalni hipoksijom aktivirani prolijekovi se reoksidiraju u zdravim stanicama i prelaze iz aktivnog u inertni oblik. Međutim, i zdrava tkiva mogu biti hipoksična i u tom će slučaju podlijetati neželjenom toksičnom učinku lijeka.
- Dušikovi spojevi poput **bis(2-kloretil)amina (BCA)** pokazali su se vrlo djelotvornima protiv mišjih tumorskih stanica. Co-kompleks s BCA je inertan u oksidiranom stanju, jer dušikov slobodni elektronski par sudjeluje u koordiniranju s Co te je nedostupan za intramolekulsku tvorbu aziridinijskog iona, što je preduvjet za alkiliranje DNA. U reduciranom stanju, alkilirajući ligand BCA otpušta se iz Co-BCA kompleksa, što omogućava citotoksični učinak.

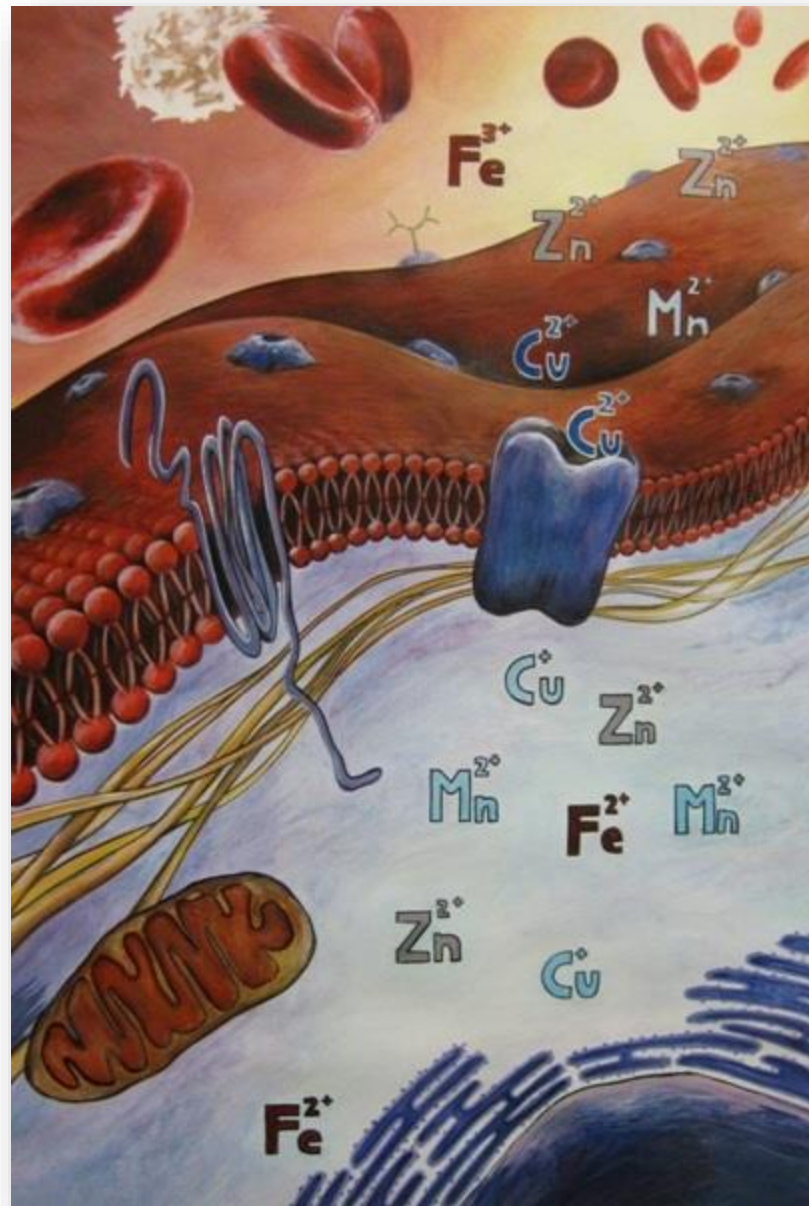


• Alkilirajući agensi reagiraju s dušikovom bazom što za posljedicu ima mutacije i staničnu smrt.



# Osnove bioorganometalne kemije

Prof. dr. sc. Lidija Barišić



## IV. Metalni kompleksi kao katalizatori

- Metalno-lijekovi s katalitičkim svojstvima mogu se administrirati u malim dozama i s manjom toksičnošću. Zahvaljujući mehanizmima pomoću kojih ostvaruju svoju aktivnost, njihovom je primjenom moguće nadvladati rezistenciju na lijekove. Istražuju se 4 glavne skupine katalitičkih metalnih antikancerogenih spojeva: (i) sudjeluju u tvorbi C–C veze, (ii) omogućuju deprotekciju i modifikaciju zaštitnih skupina, (iii) uključeni su u degradaciju biomolekula, (iv) sudjeluju u redoks-modulaciji.



**Table 1**

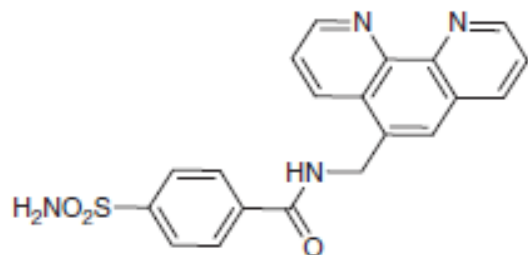
### Examples of metal catalysis studied *in cellulo* or *in vivo*

Metal complex	Reaction	Function/use	Cell system
<i>C–C bond formation</i>			
Cu(I)-TBTA (or similar)	Azyl–alkyne cycloadditions	Labelling of modified proteins containing alkyne or azyl groups	<i>E. coli</i> , HeLa, CHO, Jurkat cells, Zebra fish
[Pd(OAc) <sub>2</sub> (ADHP) <sub>2</sub> ]	Suzuki–Miyaura cross coupling	Fluorescence labelling of cell-surface proteins	<i>E. coli</i>
[Pd(OAc) <sub>2</sub> (DMDHP) <sub>2</sub> ]	Cu-free Sonogashira	Labelling of alkyl-containing proteins	<i>E. coli</i>
Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Cu-free Sonogashira	Labelling of alkyl-containing proteins	Shigella cells
Pd <sup>0</sup> nanoparticles	Suzuki–Miyaura cross coupling	Fluorescence labelling	HeLa cells
<i>Deprotection and functional group modifications</i>			
Pd <sup>0</sup> nanoparticles (PET microspheres)	Carbamate cleavage	Activation of pro-fluorophores protected by carbamates	HeLa cells
Pd <sup>0</sup> nanoparticles (PET macrospheres)	Carbamate cleavage	Activation of pro-fluorophores or pro-drugs	Zebra fish
[Pd(dba) <sub>2</sub> ], [(Allyl)PdCl] <sub>2</sub>	Dealkylation of amines Carbamate cleavage	Activation of pro-fluorophores protected by carbamates; selective activation of proteins containing lysine protected aminoacids	HeLa, HEK293T, CHO, CaCo-2, A549, NIH3T3 cells
[Fe(TPP)Cl]	Reduction of aromatic azides	Activation of azides/fluorescence imaging	HeLa cells, zebra fish, <i>Caenorhabditis elegans</i>
[Cp*Ru(η <sup>6</sup> -pyrene)]PF <sub>6</sub>	Carbamates cleavage	Activation of pro-fluorophores protected by allyl-carbamates	HeLa cells

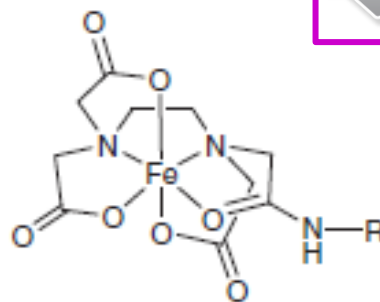
**Table 1****Examples of metal catalysis studied *in cellulo* or *in vivo***

Metal complex	Reaction	Function/use	Cell system
<i>Degradation of biomolecules</i>			
Cu(II)-ATCUN-R	Cleavage of RNA	Hepatitis C and HIV	Huh7 cells (Hepatitis C) Jurkat cells (HIV)
Ni(II)-ATCUN-R	Cleavage of RNA	Hepatitis C and HIV	Huh7 cells (Hepatitis C) Jurkat cells (HIV)

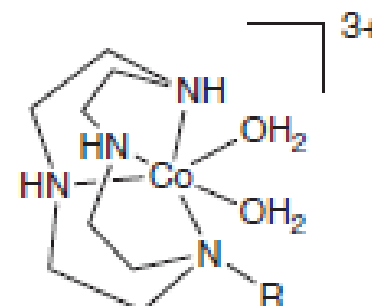
- Razvoj katalitičkih lijekova za hidrolitičko i oksidativno cijepanje peptida i proteina urodio je metalnim kompleksima kao potentnim terapijskim agensima. Primjerice, kompleks Cu i OP-CBSA cilja ugljičnu anhidrazu i katalizira hidrolitičko cijepanje proteina. Kompleks Fe i EDTA-biotin katalizira oksidativno cijepanje streptavidina. Nadalje, prikazani Co-kompleks u fiziološkim uvjetima cijepa peptidnu deformilazu što ga čini mogućim antibiotskim agensom. Pokazano je da uspješno cijepa amiloide (netopljive peptidne ili proteinske agregate koji se javljaju kod Alzheimerove i Parkinsonove bolesti te kod dijabetesa) pri 310 K i pH 7,4.



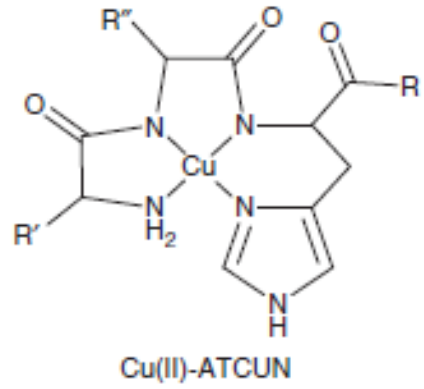
OP-CBSA



[Fe(EDTA-R)]

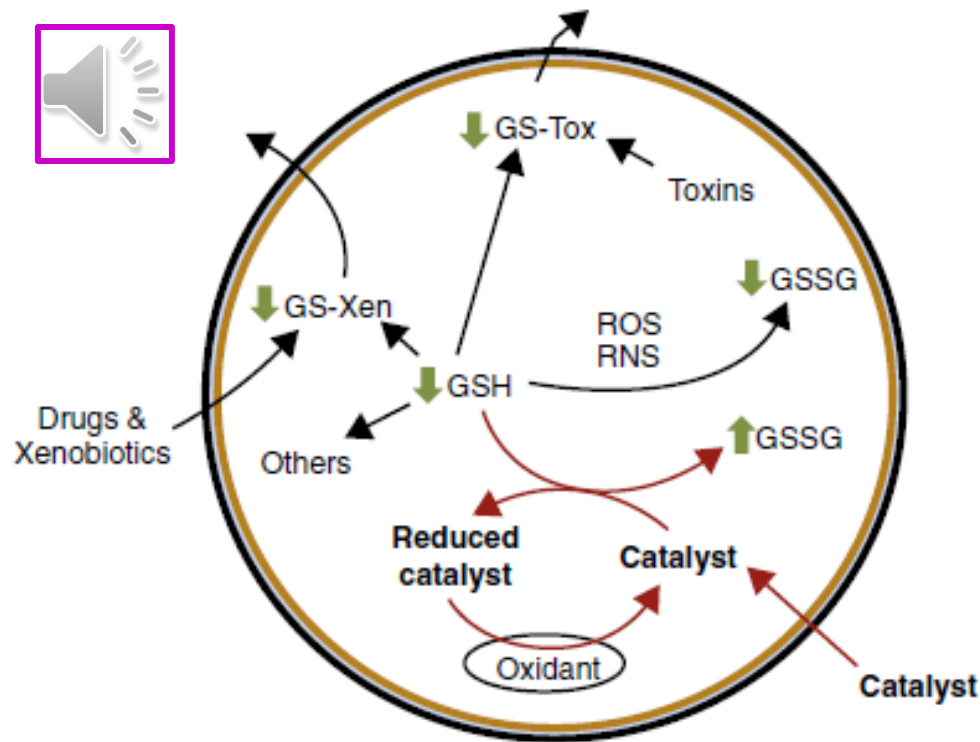
[Co(cyclen-R)(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>

- Ni- i Cu-kompleksi s ATCUN-motivom (amino-terminalni Cu(II)- i Ni(II)-vezujući motiv) katalitički cijepaju proteine (npr. ACE, angiotenzin-konvertirajući protein). Ti kompleksi mogu cijepati i lance nukleinskih kiselina (opisan je Cu(II)-ATCUN kompleks dizajniran tako da cilja hepatitis C i potom cijepa njegovu RNA kao i Ni(II)-ATCUN kompleks koji prepoznaje i cijepa HIV1 RNA).

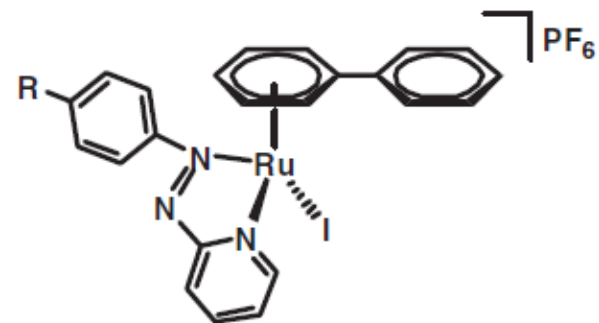
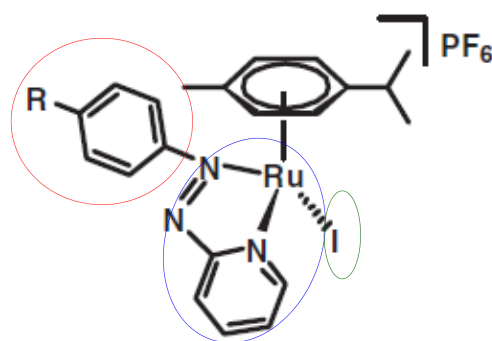


- Tiolne skupine, koje imaju ključnu ulogu u nabiranju i stabilizaciji proteina i enzima kao i u kontroli i održavanju stanične homeostaze, predstavljaju mete pri razvoju katalitičkih lijekova. Primjerice, antikancerogeni polu-sendvič Ru-kompleks koji sadrži azopiridinski (Azpy) kelirajući ligand provodi katalitičku oksidaciju glutationa (GSH) u GSSG. GSH je tripeptid koji osim Glu i Gly sadrži i Cys, a ima

krucijalan značaj za održavanje redoks-homeostaze stanica. Djeluje kao antioksidans i prevenira oštećenja koja uzrokuju ROS i RNS (*reactive nitrogen species*). Tretiranjem kanceroznih stanica s Ru(II)-Azpy polu-sendvič kompleksom, udio GSH u tim stanicama se smanjuje i narušava se redoks-ravnoteža stanice. Osim toga, potrošnja GSH može utjecati na druge stanične procese s obzirom da je GSH involviran u detoksifikaciju.



- Organometalni spojevi mogu ostvarivati kemijsku reaktivnost koja nije svojstvena individualnim metalnim ili organskim ligandima, a ta se reaktivnost može podešavati izmjenama elektronskih i stereokemijskih svojstava vezanih liganada ili variranjem metala i njegovog oksidacijskog stanja. Time se stvara platforma za dizajn lijekova.
- Organometalni polu-sendvič Ru(II)-kompleksi koji sadrže kelirajuće diaminske ligande i Cl-atom pokazuju antikancerogenu aktivnost *in vivo* i *in vitro*, a primarna im je meta DNA.
- U radu su opisani Ru(II)-kompleksi koji sadrže **arenske** i **azopiridinske** ligande te **iodid** kao odlazeću skupinu.



1: R = NMe<sub>2</sub>

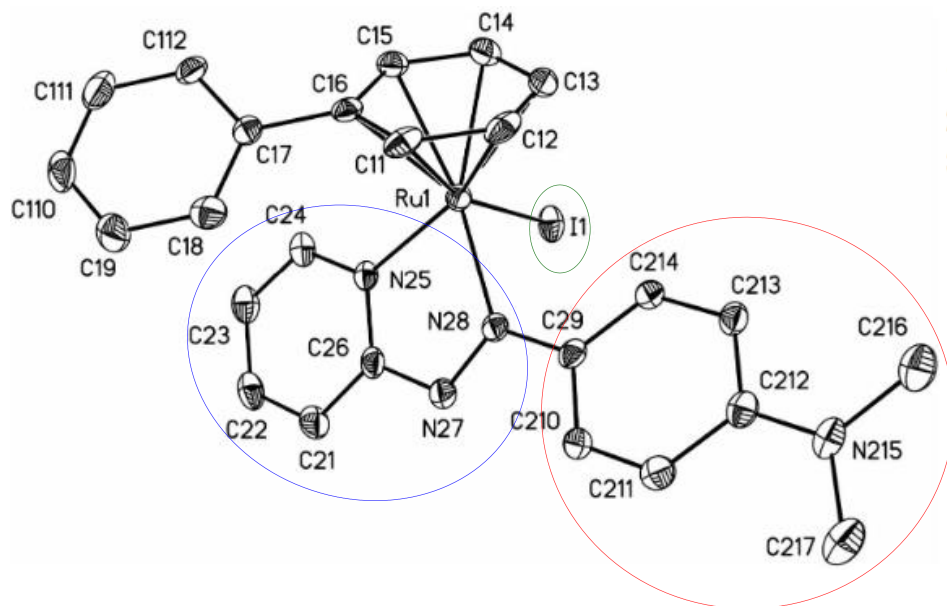
2: R = OH

3: R = H

4: R = NMe<sub>2</sub>

5: R = OH

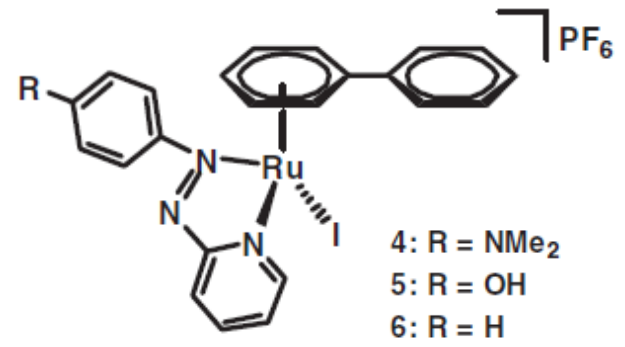
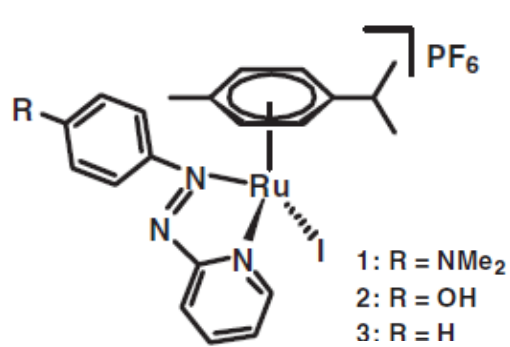
6: R = H



X-ray structure of the cation in [η<sup>6</sup>-bip)Ru(azpy-NMe<sub>2</sub>)]PF<sub>6</sub>-MeOH (4xMeOH)



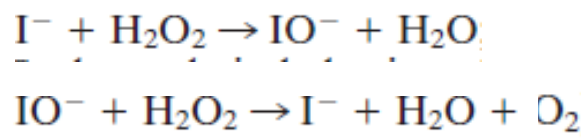
- Kompleksi **1**, **2**, **4** i **5** sa supstituiranim fenilazopiridinskim ligandima Azpy (sadrže elektron-donirajuće OH ili NMe<sub>2</sub> skupine) pokazali su visoku citotoksičnost protiv A2780 (jajnici) i A549 (pluća) kanceroznih staničnih linija s niskim IC<sub>50</sub>-vrijednostima (2 i 6 μM). Kompleksi **3** i **6** čiji Azpy ligandi nisu supstituirani pokazuju puno slabiju citotoksičnost (imaju visoke IC<sub>50</sub>-vrijednosti). Sam Azpy ligand nije toksičan, s izuzetkom Azpy-NMe<sub>2</sub> koji je citotoksičan protiv A549 stanične linije. Zamjena iodida s kloridom dovela je do naglog pada citotoksičnog kapaciteta



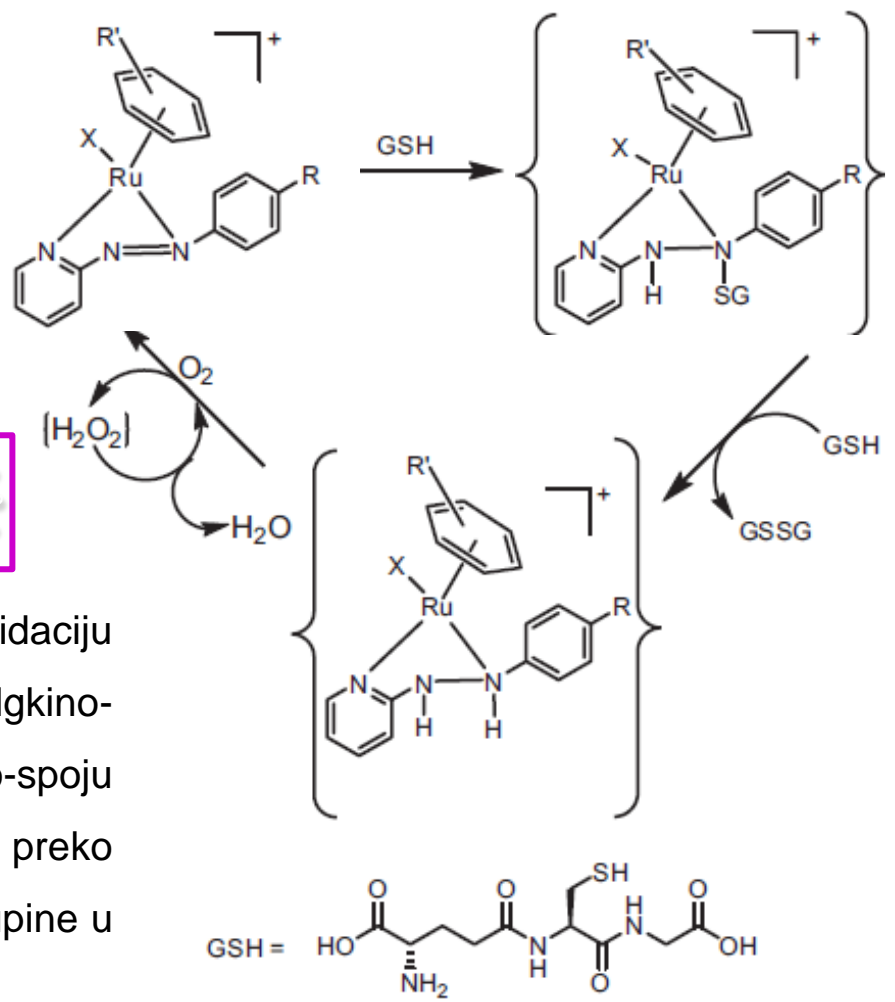
- Ranija istraživanja pokazala su da se antikancerogeni lijekovi koji sadrže vezu M-X (X = halogeni atom) u stanici aktiviraju hidrolizom te se potom vežu za DNA. Ovdje opisani Ru(II)-Azpy kompleksi inertni su prema hidrolizi, a ipak ostvaruju citotoksičnu aktivnost.

Complex*	IC <sub>50</sub> , μM	
	A2780	A549
1 (1-Cl)	4 (>100)	3 (>100)
4 (4-Cl)	3 (44)	2 (49)
Azpy-NMe <sub>2</sub>	>100	14
2 (2-Cl)	4 (58)	4 (>100)
5 (5-Cl)	5 (18)	6 (56)
Azpy-OH	>100	>100
3 (3-Cl)	>100 (>100)	>100 (>100)
6 (6-Cl)	39 (>100)	51 (>100)
Azpy	>100	>100

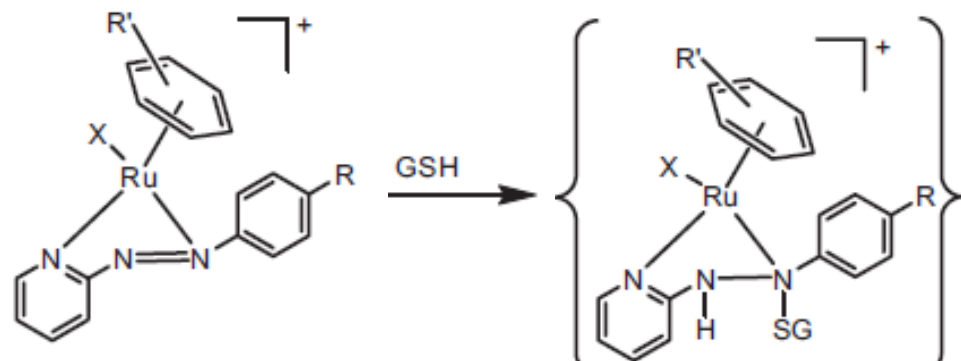
- Ru-kompleksi **4** i **5**, za razliku od slobodnih Azpy-NMe<sub>2</sub> i Azpy-OH liganda, oksidiraju GSH u GSSG. (Koordiniranjem Azpy liganda s Ru(II) azo-dušikov atoma postaje dovoljno pozitivan za stupanje u redoks-reakciju). Inicijalni korak predstavlja konjugiranje GSH s azo-dvostrukom vezom te redukcija azo-skupine (N=N) u hidrazino-skupinu uz popratnu oksidaciju GSH. S obzirom da nije opažena tvorba H<sub>2</sub> tijekom reakcije smatra se da 2. korak, u kojem se regenerira azo-skupina i kojim se završava katalitički ciklus, uključuje i hidrogeniranje otopljenog O<sub>2</sub> pri čemu nastaje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. S obzirom da se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne opaža u reakcijskoj smjesi, opravdana je pretpostavka da jodid otpušten s Ru tijekom inicijalne supstitucije s GSH uzrokuje raspad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uslijeg čega se uočavaju mjehurići kisika:



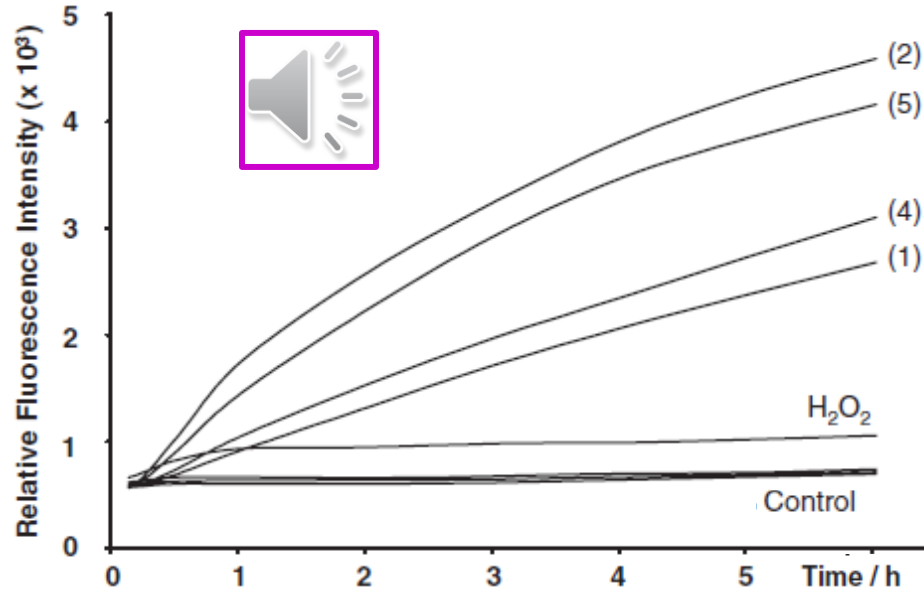
- Literaturni primjer azo-skupine koja omogućuje oksidaciju GSH jest Prokarbazin, lijek koji se koristi kod Hodgkinovog i ne-Hodgkinovog limfoma. Riječ je o hidrazino-spoju koji se lako oksidira u azo-spoj i ponovno reducira preko oksidacije GSH u GSSG. Reoksidaciju hidrazino-skupine u stanici omogućava O<sub>2</sub> koji se hidrogenira u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



- Reakcija Ru-kompleksa s GSH praćena je pomoću HPLC i ESI-MS. Pri tom je utvrđeno da je inicijalni korak u reakciji kompleksa **4** i GSH tvorba intermedijarnog kationa ( $m/z$  788). Osim toga, dodatni pik nove metilenske skupine iz GSSG u njegovom NMR-spektru potvrđuje da je u prisutnosti Ru-Azpy kompleksa došlo do oksidacije GSH.



- Detekcija reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u A549 stanicama raka pluća provedena je DCF-testom (diklorodihidroksifluorescein se uobičajeno koristi kao fluorescentni indikator tvorbe ROS). Kompleksi **1**, **2**, **4** i **5** uzrokuju porast DCF-fluorescencije s vremenom, što indicira da svi ti spojevi uzrokuju nagomilavanje ROS (superoksid, hidroperoksi-radikal, hidroksilni radikal i vodikov peroksid) unutar A549 stanica. ROS se kontinuirano generiraju u malim količinama tijekom normalnih staničnih procesa, ali njihovo nagomilavanje unutar stanice je opasno jer dovodi do oksidativnog stresa. Ovdje do oksidativnog stresa dolazi uslijed smanjenja udjela GSH i porasta udjela ROS. Stanice raka u odnosu na zdrave stanice osjetljivije su na izlaganje ROS, što upućuje na njegovu terapijsku primjenu. Tako nekolicina antikancerogenih lijekova poput adriamicina (doksorubicina), arsenovog trioksida i cisplatina generiraju ROS.





- Jedinstvena svojstva metala (redoks-aktivnost, koordiniranje različitih liganada s metalima te reaktivnost prema organskim supstratima) omogućuju dizajn metalnih kompleksa koji se selektivno vežu na biološke mete uzrokujući pritom promjene u mehanizmima stanične proliferacije.
- Terapeutski potencijal metalnih kompleksa u liječenju karcinoma temelji se na sljedećim svojstvima prijelaznih metala:
  - 1) Varijacija naboja: u vodenim su otopinama metalni ioni pozitivno nabijeni te se vezuju na negativno nabijene biološke molekule. Ovisno o koordinacijskom okruženju (koordinacijski broj predstavlja broj najbližih susjednih atoma za zadani atom odnosno ion u kristalu), naboj se modificira i generiraju se kationske, anionske ili neutralne vrste.
  - 2) Struktura i veze: metalni kompleksi mogu biti strukturno modificirani tako da tvore raznolike molekulske vrste sa širokim rasponom koordinacijskih brojeva i geometrije, te s kinetičkim svojstvima koja se ne mogu ostvariti s organskim spojevima. Pritom duljina veze, vezni kutevi i koordinacijski broj ovise o metalu i njegovom oksidacijskom stanju.
  - 3) Metal-ligand interakcije: termodinamička i kinetička svojstva metal-ligand interakcija utječu na izmjenu liganada. Mogućnost izmjene liganada omogućuje metalu interakciju i koordinaciju s biološkim molekulama.

- 4) Svojstva Lewisovih kiselina: s obzirom na visok afinitet za elektrone (metalni kationi privlače elektrone i imaju najmanje jednu praznu orbitalu za smještanje elektrona), većina metala može s lakoćom polarizirati grupe s kojima su koordinirani, što olakšava njihovu hidrolizu.
- 5) Djelomično popunjena d-podljuska: različiti broj elektrona u d-podljuskama prijelaznih metala određuje različita elektronska i magnetska svojstva kompleksa prijelaznih metala.
- 6) Redoks-aktivnost: mnogi prijelazni metali podliježu reakcijama oksidacije i redukcije. Njihovo je oksidacijsko stanje važan faktor kojeg treba razmotriti prilikom dizajna koordiniranog spoja. U biokemijskim redoks-reakcijama, metalni ioni često služe kao aktivatori koordiniranih supstrata te sudjeluju u akumulaciji naboja u redoks-aktivnim regijama.

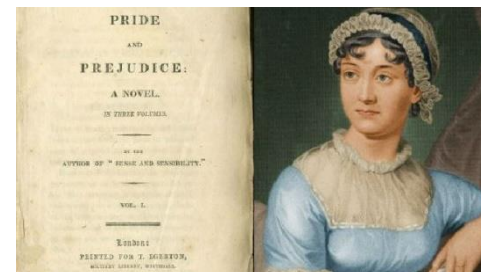


- Metalni kompleksi odlikuju se sposobnošću koordiniranja liganada u 3D-konfiguraciji, odnosno oblikovanja prema željenoj biološkoj meti.

IA		Filling Shells										Non-metals					VIII
1	2											III	IV	V	VI	VII	2
1s1	2s2											2p1	2p2	2p3	2p4	2p5	1s2
1 H	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 He
3 Li	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
11 Na	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
19 K	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
37 Rb	88 Ra	89 Ac	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Uun	111 Uuu	112 Uub	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
55 Cs	66 Ba	67 La	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
87 Fr	88 Ra	89 Ac	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Uun	111 Uuu	112 Uub	Metals					
7s1	7s2	6d1	6d2	6d3	6d4	6d5	6d6	6d7	6d8			6p1	6p2	6p3	6p4	6p5	6p6

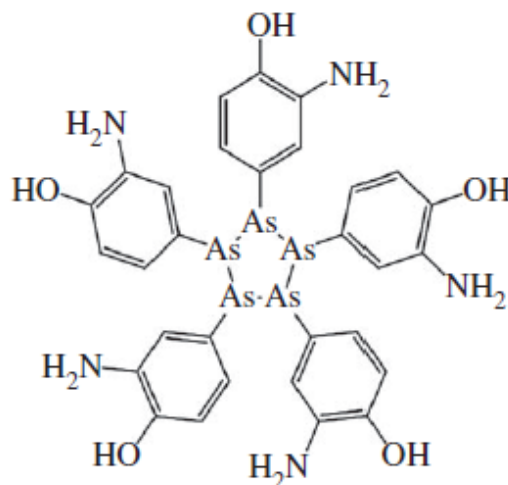
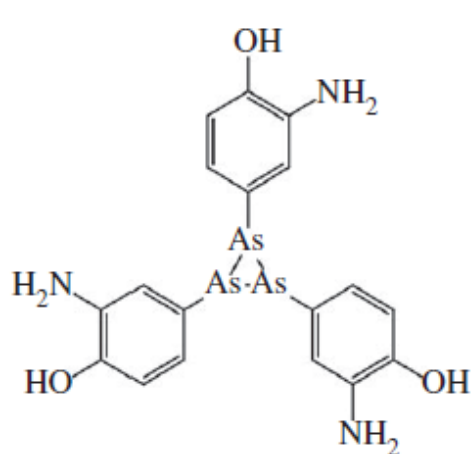
- Najstariji zapisi o terapijskoj primjeni metala potječu iz drevnog Egipta u kojem su prije 5000 godina zlato i bakar korišteni za liječenje mentalnih i fizičkih bolesti.

- Terapijska primjena metala u novijem dobu započela je s **arsenovim** spojevima. Iako je arsen prvenstveno poznat po svojoj toksičnosti, u 18.-om stoljeću započelo se s liječenjem različitih bolesti primjenom Fowlerove otopine [otopina arsenovog trioksida ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) u  $\text{KHCO}_3$ ].

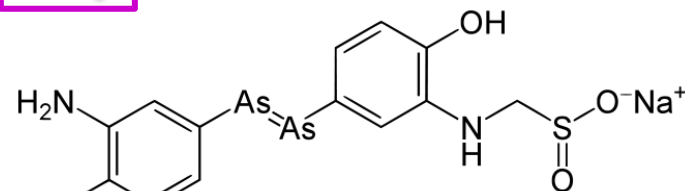


*"I am considerably better now and am recovering my looks a little, which have been bad enough, black and white and every wrong colour."*

- Salvarsan i neosalvarsan početkom 19.-og stoljeća korišteni su kao antibiotici za liječenje sifilisa.



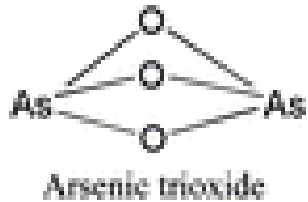
Salvarsan: mixture of trimer and pentamer



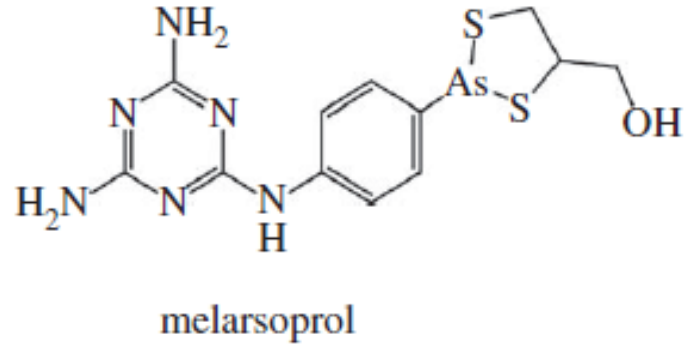
Neosalvarsan

- Za medicinsku primjenu organoarsenovih spojeva kao antiparazitika 1908. dodijeljena je Nobelova nagrada.

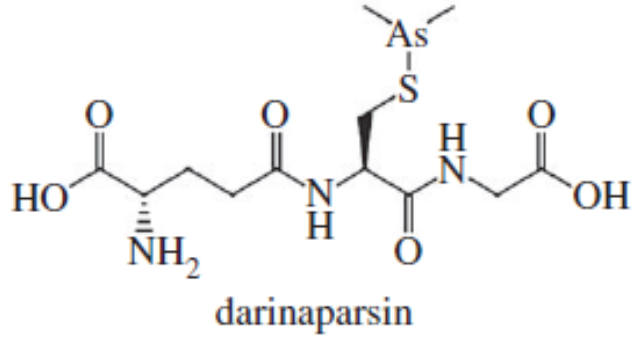
- Arsenov trioksid (ATO) je odobreni lijek za promijelocitnu leukemiju. U tijeku su klinička ispitivanja za liječenje nekoliko vrsta karcinoma. Primjenjuje se kao antiseptik, te za liječenje reumatoidnog artritisa i psorijaze.



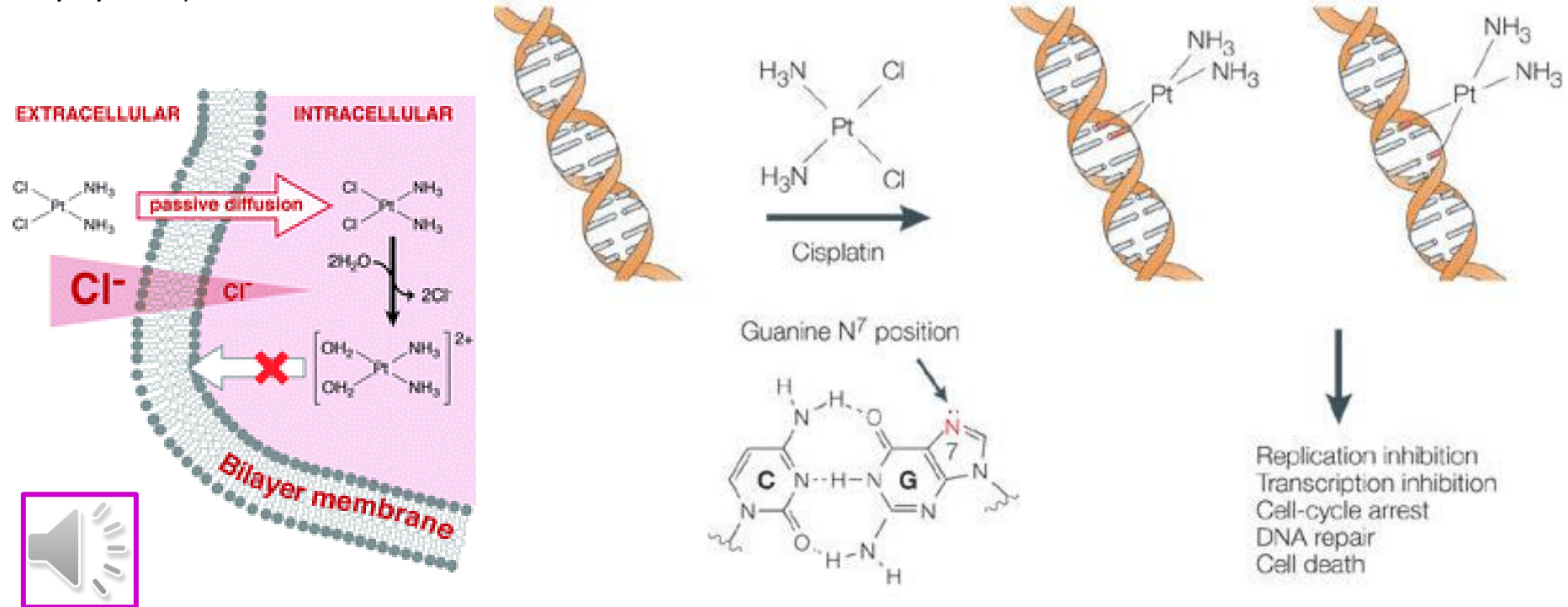
- Melarsoprol se koristi za liječenje afričke tripanosomoze, glavne nametničke bolesti ljudi i životinja na afričkom kontinenu.



- U tijeku su klinička ispitivanja citotoksičnog učinka darinaparsina (derivata GSH), pri čemu se pokazalo da omogućava akumulaciju arsena i smrt stanica *in vitro* uz smanjenu sistemsku toksičnost u odnosu na ATO.

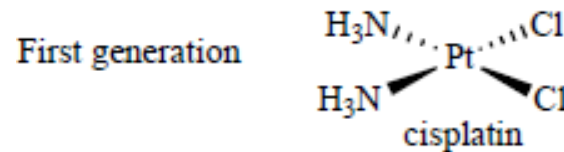


- Nakon Rosenbergova otkrića antitumorskog djelovanja kompleksâ **platine** (1965.), o njima je objavljeno preko 20000 znanstvenih publikacija.
- Atom platine iz cisplatina kovalentno se veže na purinski N<sup>7</sup> tvoreći 1,2- ili 1,3-unakrsne veze; adukti cisplatin-DNA uzrokuju različite stanične odgovore (inhibicija replikacije i transkripcije, te apoptoza).

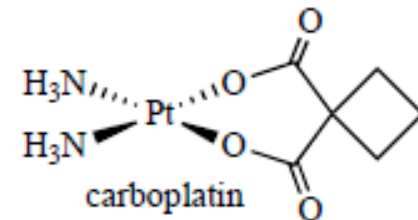
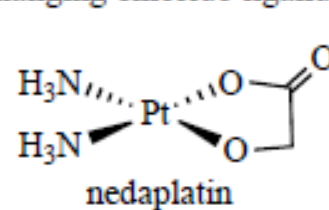


- Klinička djelotvornost cisplatina (primjenjuje se od 1971.) značajno je ograničena neželjenim nuspojavama (ototoksičnost, nefrotoksičnost, neurotoksičnost). Rezistencija na cisplatin javlja se uslijed reduciranog unosa platine, intracelularne detoksifikacije djelovanjem glutationa, popravka DNA, modulacije signalnih putova, itd.





Second generation  
Changing chlorido ligands



- U cilju prevladavanje rezistencije na cisplatin te smanjenja negativnih nuspojava dizajniraju se Pt-kompleksi novije generacije. Početni korak u pripravi takvih Pt-kompleksa bio je zamjena Cl-liganada s drugim anionskim ligandima; zamjenom s glikolatom pripremljen je nedaplatin, dok je zamjenom s ciklobutan-dikarboksilatom pripremljen karboplatin.

- Karboplatin sadrži odlazeću skupinu koja pogoduje sporijoj reakciji s glutationom (u usporedbi s cisplatinom). Klinički se primjenjuje od 1989. U usporedbi s cisplatinom pokazuje slabiju učinkovitost prema karcinomima vrata, glave i mjehura, dok je njegova djelotvornost prema karcinomima jajnika i pluća usporediva s cisplatinom. Iako je njegova toksičnost smanjena u odnosu na cisplatin, karboplatin nije aktivan prema cisplatin-rezistentnim karcinomima, niti je spektar njegovog djelovanja širi u odnosu na cisplatin.

- Nedaplatin je treći Pt-lijek s kliničkom primjenom. U Japanu je registriran je za liječenje karcinoma glave, vrata, jajnika, testisa, pluća, cerviksa. Iako nije dokazana njegova superiornost u odnosu na cisplatin ili karboplatin, utvrđeno je da izaziva smanjenu nefrotoksičnost i gastrointestinalnu toksičnost.

- Treća generacija analoga cisplatina pripravljena je supstitucijom NH<sub>3</sub>-liganada s različitim aminskim ligandima. Promjena oksidacijskog stanja platine iz II u IV dovela je do kinetički inertnog kompleksa satraplatina.

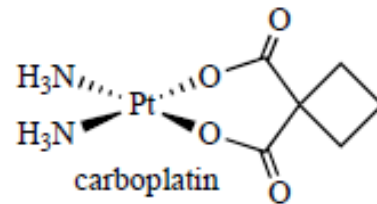
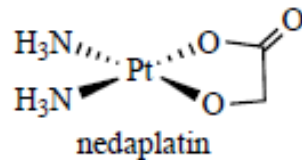


- Klinička ispitivanja satraplatina su u tijeku; pretpostavlja se da će djelovati kao prvi oralno administrirani Pt-lijek u terapiji karcinoma prostate i uznapredovalog karcinoma dojke. Zasad se ne navode moguće nuspojave.

- Oksaliplatin (sadrži oksalatnu odlažeću skupinu) u kliničkoj je primjeni od 2004. Ostvaruje poboljšani terapijski učinak u liječenju kolorektalnih tumora u odnosu na karboplatin i cisplatin. Negativne terapijske nuspojave su neurotoksičnost i gastrointestinalna toksičnost.

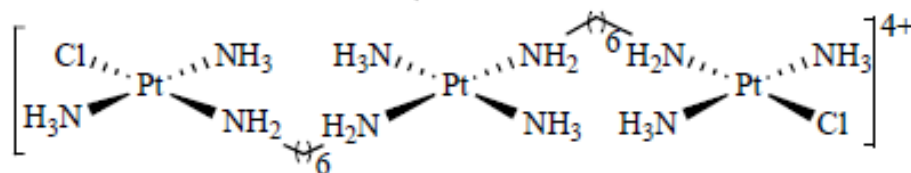
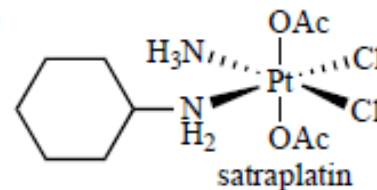
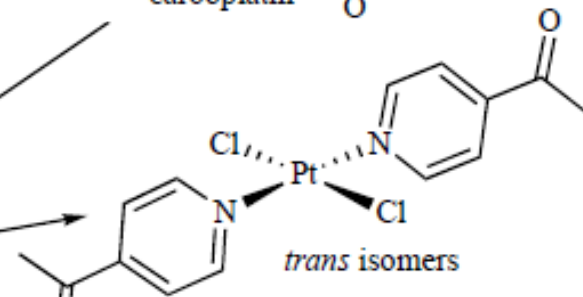
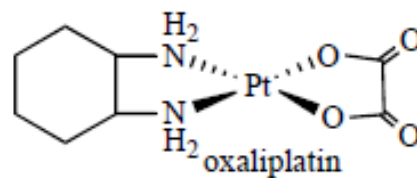
Second generation

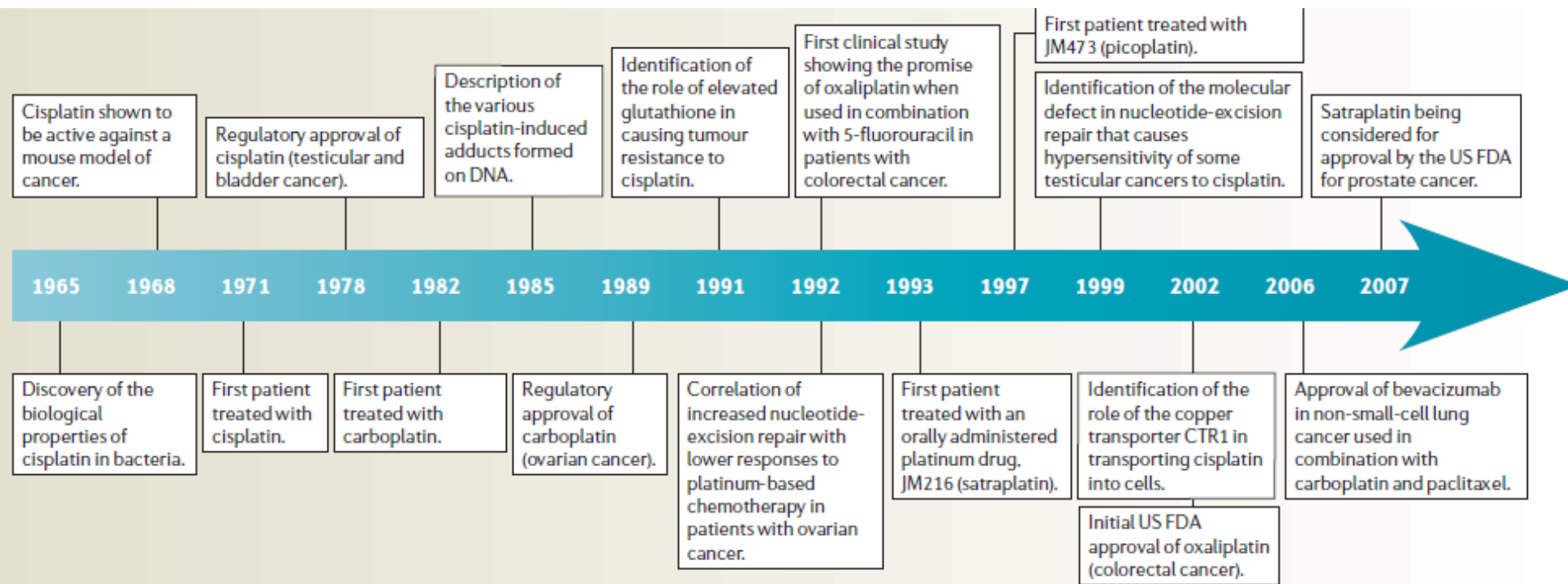
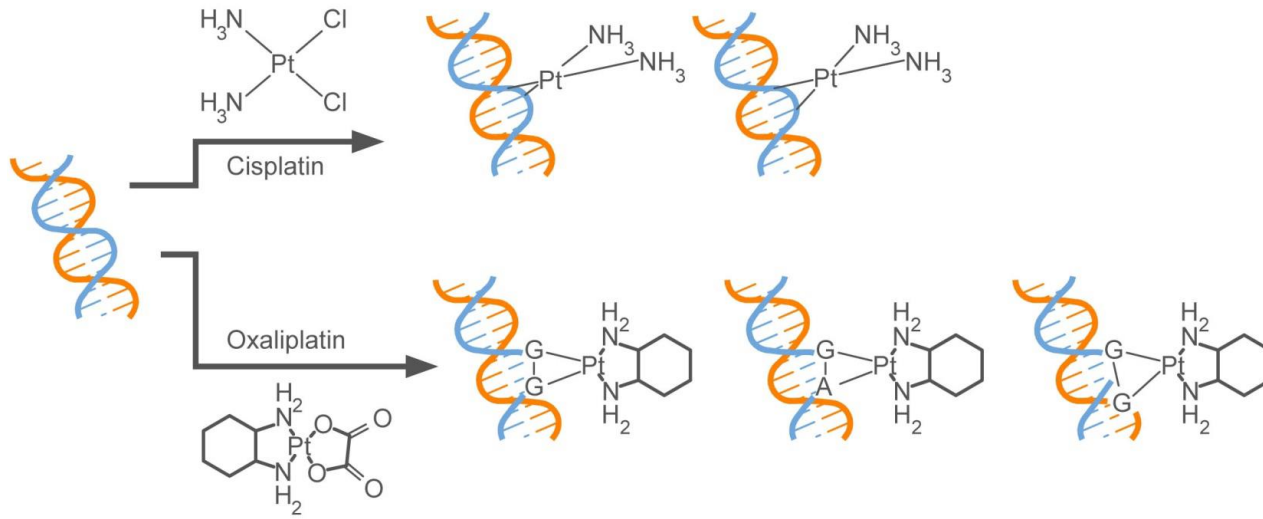
Changing chlorido ligands



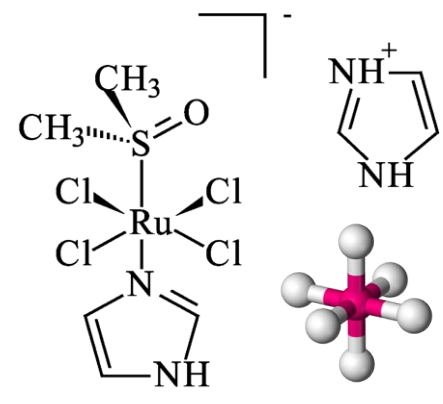
Third generation

Changing ammine ligands and other variations

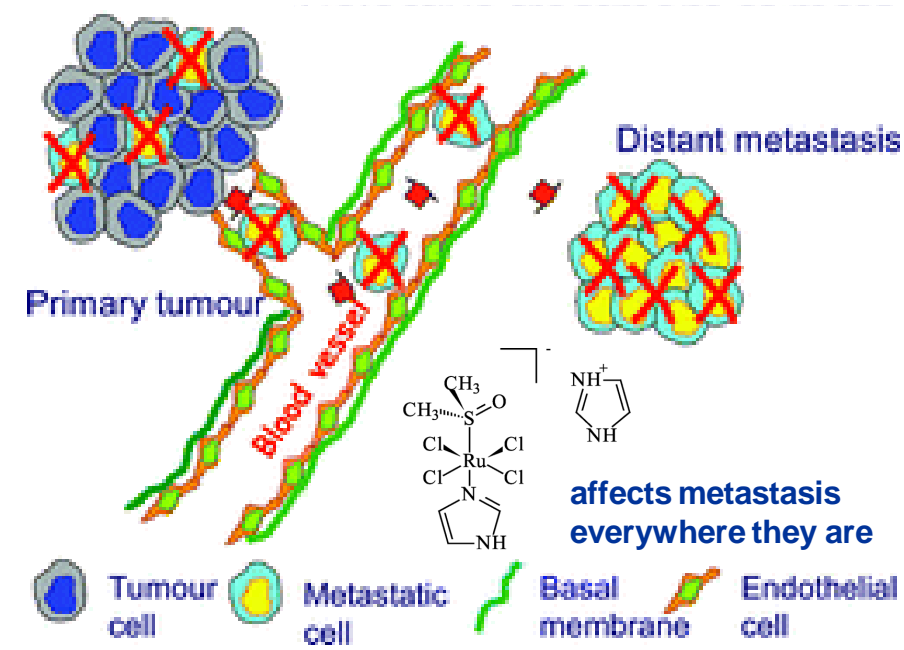




- Prvi **rutenijski** kompleks koji je prošao 1. fazu kliničkih ispitivanja bio je NAMI-A ( $[\text{ImH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO-S})(\text{Im})]$  (Im = imidazol). Riječ je anionskom kompleksu u kojem je oktaedarski Ru(III)-centar vezan na imidazolni- i DMSO-ligand te četiri Cl-liganda. NAMI-A nije pokazao značajnu aktivnost protiv stanica raka, ali se pokazao vrlo potentnim protiv metastatskih tumora.

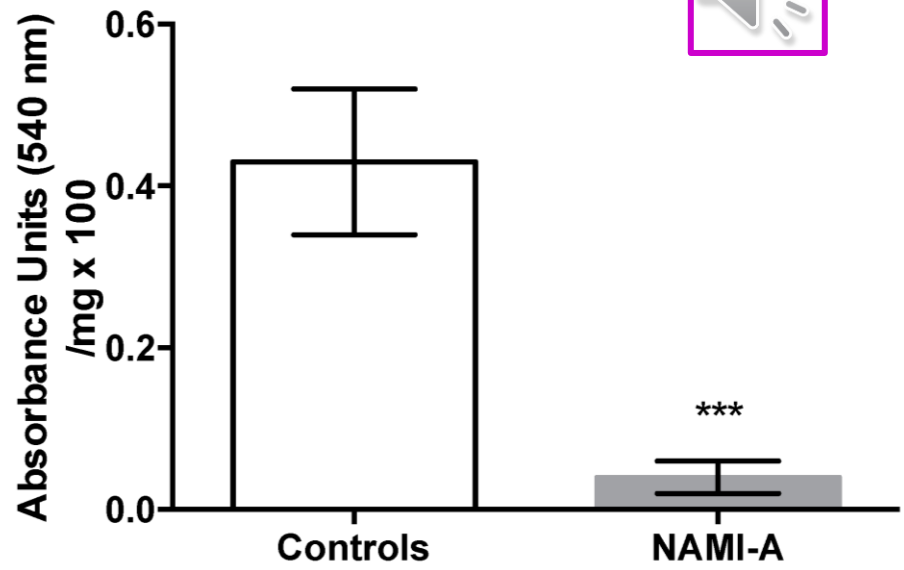
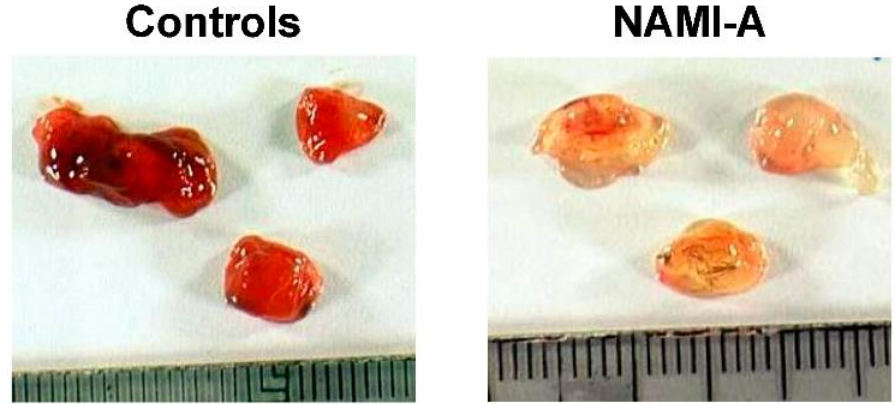


- Dok je veliki napredak ostvaren u liječenju primarnih karcinoma (kirurško liječenje, radio- i kemoterapija), liječenje sekundarnih, metastatskih karcinoma još uvijek predstavlja veliki izazov, pa je stoga aktivnost NAMI-A izuzetno važna. Iako se NAMI-A može vezati na DNA, njegova je biološka aktivnost posljedica anti-angiogenih (angiogenezom tumorske stanice stvaraju mrežu krvnih žila kroz koje se hrane) i anti-invazivnih svojstava. Anti-angiogena svojstva NAMI-A vezana su uz njegovu sposobnost pročišćavanja dušikovog oksida kojeg stvaraju epitelne stanice, dok su anti-invazivna svojstva rezultat interakcija ekstracelularnih membranskih proteinskih receptora.

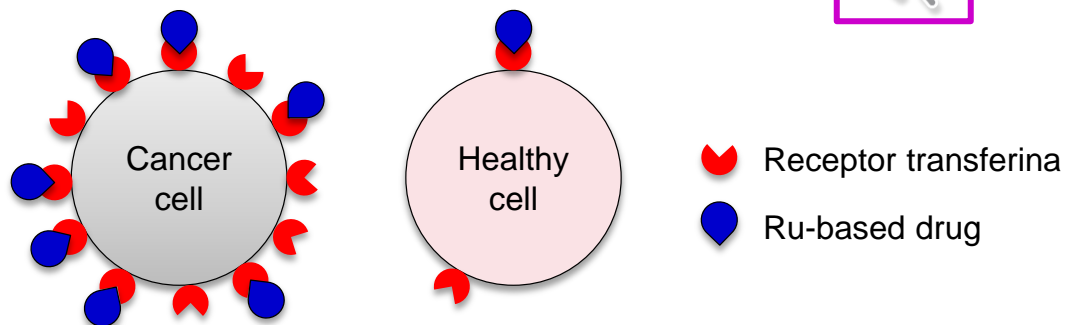
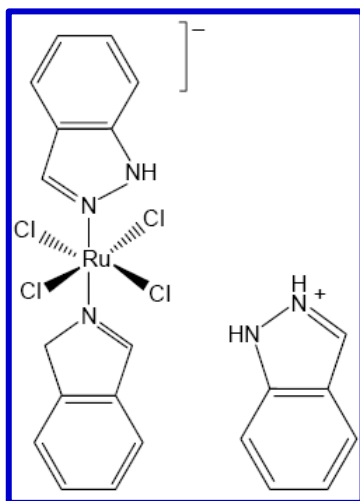


- NAMI-A vezuje se na proteine ili RNA, utječući tako na ekspresiju proteina što dovodi do zadebljanja proteinskog omotača oko metastaza. Uslijed toga, tumor postaje izoliran te se smanjuje protok krvi.

- Na slici je prikazana morfološka analiza Matrigel peleta koji sadrže VEGF (vaskularni endotelni faktor rasta), heparin i puferiranu fiziološku otopinu kao kontrolu. Lijevo su prikazani peleti sa izraženom angiogenom aktivnošću, karakterizirani vidljivom mrežom krvnih žila (jarko crvene boje), dok su lijevo prikazani peleti tretirani s NAMI-A čija blijeda boja ukazuje na smanjenu prisutnost krvnih žila. Kvantitativna analiza sadržaja hemoglobina ukazala je da je u peletima tretiranim s NAMI-A koncentracija hemoglobina smanjena za 90%.



- Rutenijski kompleks **KP1019 (FFC14A)** je drugi Ru-kompleks koji je prošao 1. fazu kliničkih ispitivanja. Unatoč strukturalnoj sličnosti s NAMI-A, ostvaruje citotoksični učinak na stanice primarnih tumora.
- Ru se odlikuje sposobnošću oponašanja Fe prilikom vezivanja na različite biomolekule, uključujući albumin i transferin. Inficirane i kancerozne stanice brzo se dijele i imaju veću potrebu za Fe, te se na njihovim površinama povećava broj **receptora transferina** u odnosu na zdrave stanice. Uslijed toga **Ru-lijek** ciljano se usmjerava na **receptore transferina** prisutne na površini kanceroznih stanica (u puno manjem omjeru vezuje se na zdrave stanice), što rezultira smanjenom toksičnošću. Nakon transporta u stanicu, dolazi do indukcije apoptoze i to uslijed (i) vezivanja Ru-kompleksa na gvanin ili adenin iz DNA što dovodi do pucanja DNA-lanaca ili (ii) vezivanja na histidinske proteinske ostatke.

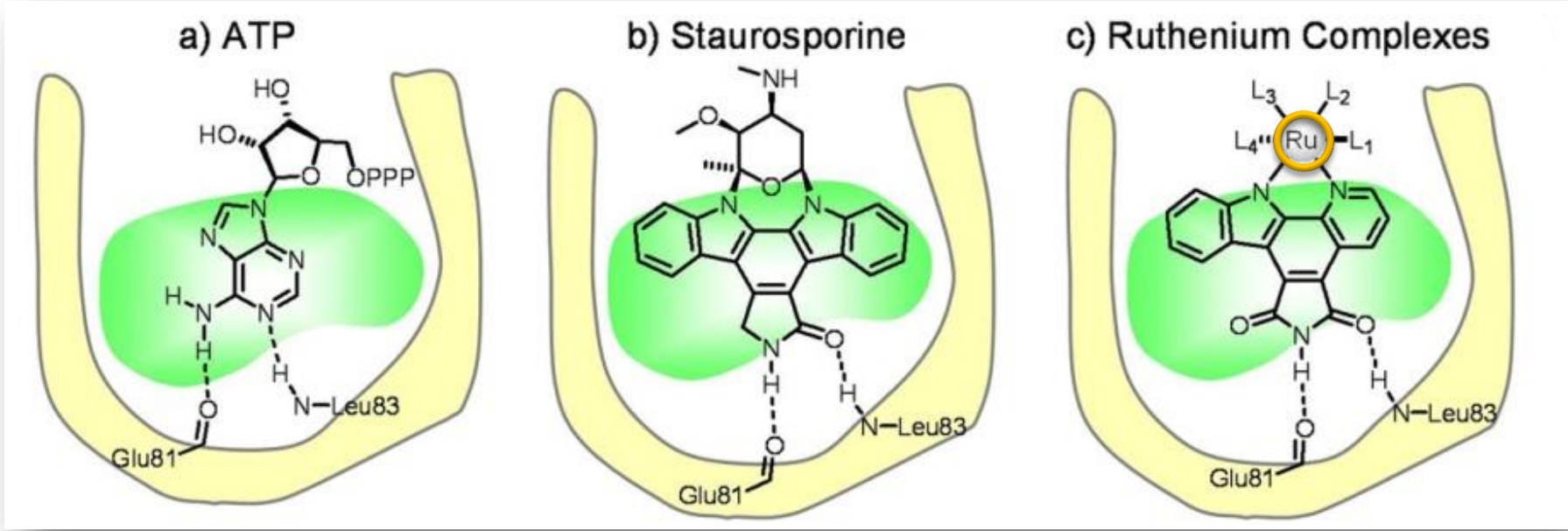


C. S. Allardyce, *Platinum Metals Rev.*, 2001, 45, 62.

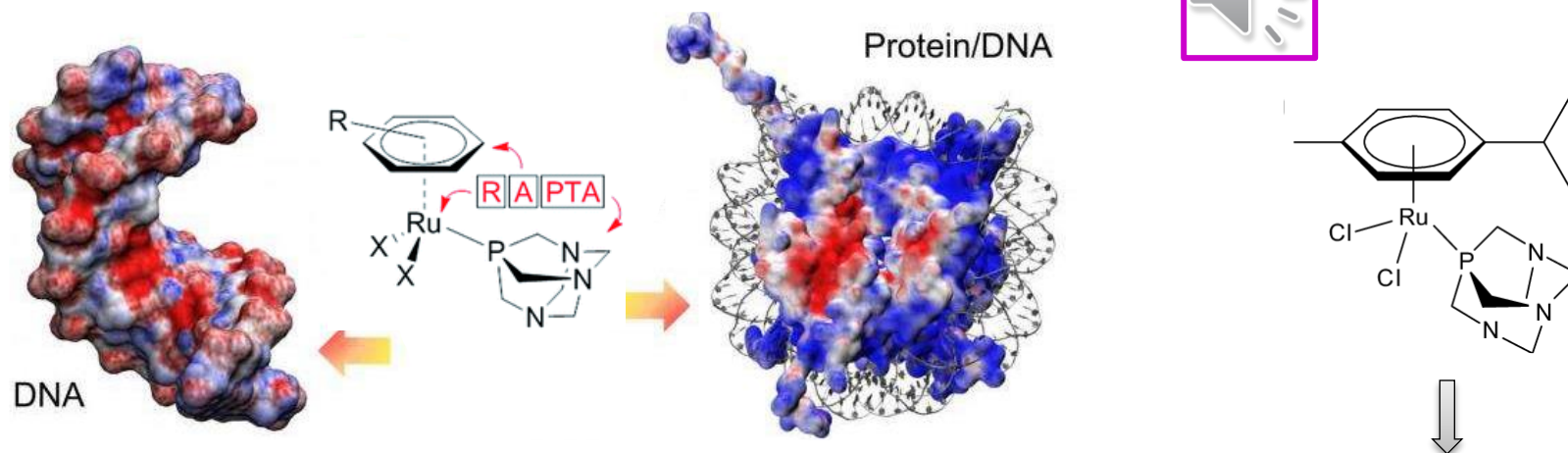
M. A. Jakupec et al, *Dalton Trans.*, 2008, 183.

G. Sava, *Dalton Trans.*, 2011, 40, 7817

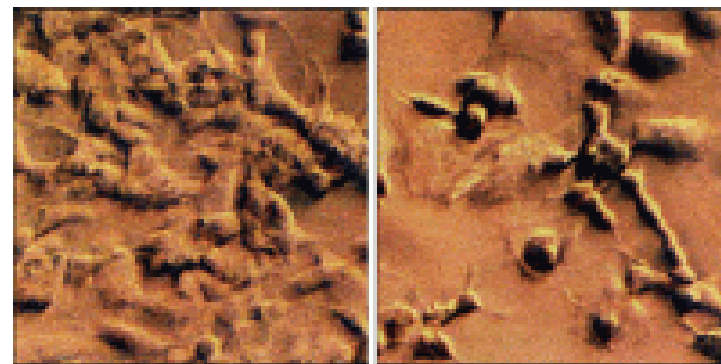
- Rutenijsko-arenski kompleksi istražuju se kao inhibitori apsorpcije  $\text{Ca}^{2+}$ , antikancerogeni agensi, imunosupresanti, radiofarmaceutici te mimetici (inhibitori) enzima.
- Staurosporin je poznat kao začetnik apoptoze u brojnim staničnim linijama. Njegova biološka aktivnost očituje se u inhibiciji kinaze, enzima aktivnog u stanicama karcinoma prostate, zahvaljujući visokom afinitetu za ATP-vezno mjesto. Staurosporin poslužio je kao strukturna inspiracija za dizajn rutenijskih organometalnih inhibitora (c) koji za biološku metu imaju jednu od 518 različitih kinaza enkodiranih u ljudskom genomu.



- RAPTA-kompleksi inhibiraju metastatske procese *in vitro* i pokazuju izraženu antimetastatsku aktivnost *in vivo*; ipak, njihova je antiproliferativna aktivnost niska. Isprva se smatralo da je njihova meta DNA, ali recentna istraživanja pokazuju da se RAPTA preferentno vezuje na proteine.
- Pripravljena je serija RAPTA-C spojeva te je istražena uloga liganada vezanih na Ru u pasivnoj difuziji kroz staničnu membranu.

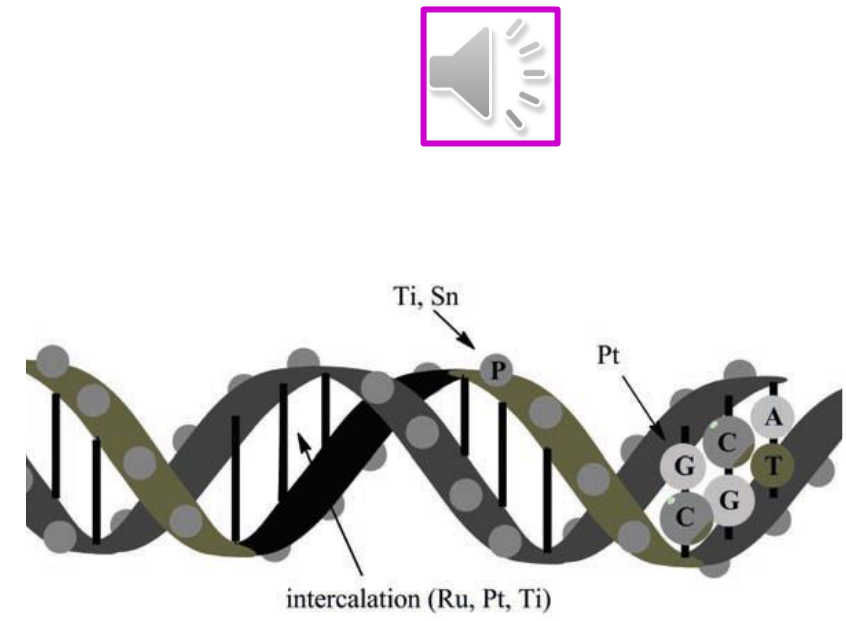
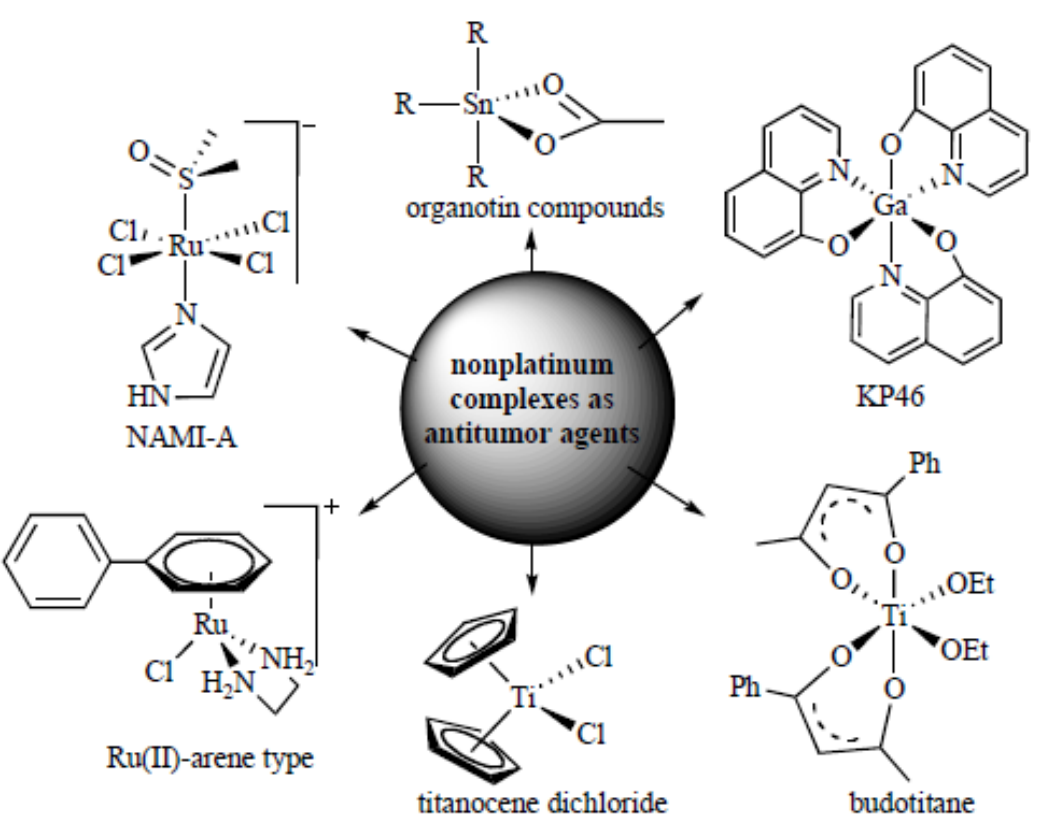


- Na slici lijevo prikazana je kultura stanica neuroblastoma (stanice su mnogobrojne i nepravilnog oblika). Nakon inkubacije (desno) s 1,3  $\mu\text{M}$  RAPTA-C, u kulturi je zaostalo svega nekoliko stanica koje su glatkog i sfernog oblika, što je karakteristično za apoptotska tijela, čime je potvrđena stanična smrt.





- Primjena Pt- i Ru-kompleksa kao antikancerogenih lijekova potaknula je istraživanja drugih metalnih kompleksa kao terapeutika. Njihova je glavna namjena prevladati nedostatke Pt-lijekova (ograničena učinkovitost, rezistencija i toksičnost), zahvaljujući drugačijim kemijskim svojstvima i mehanizmima njihove aktivnosti.



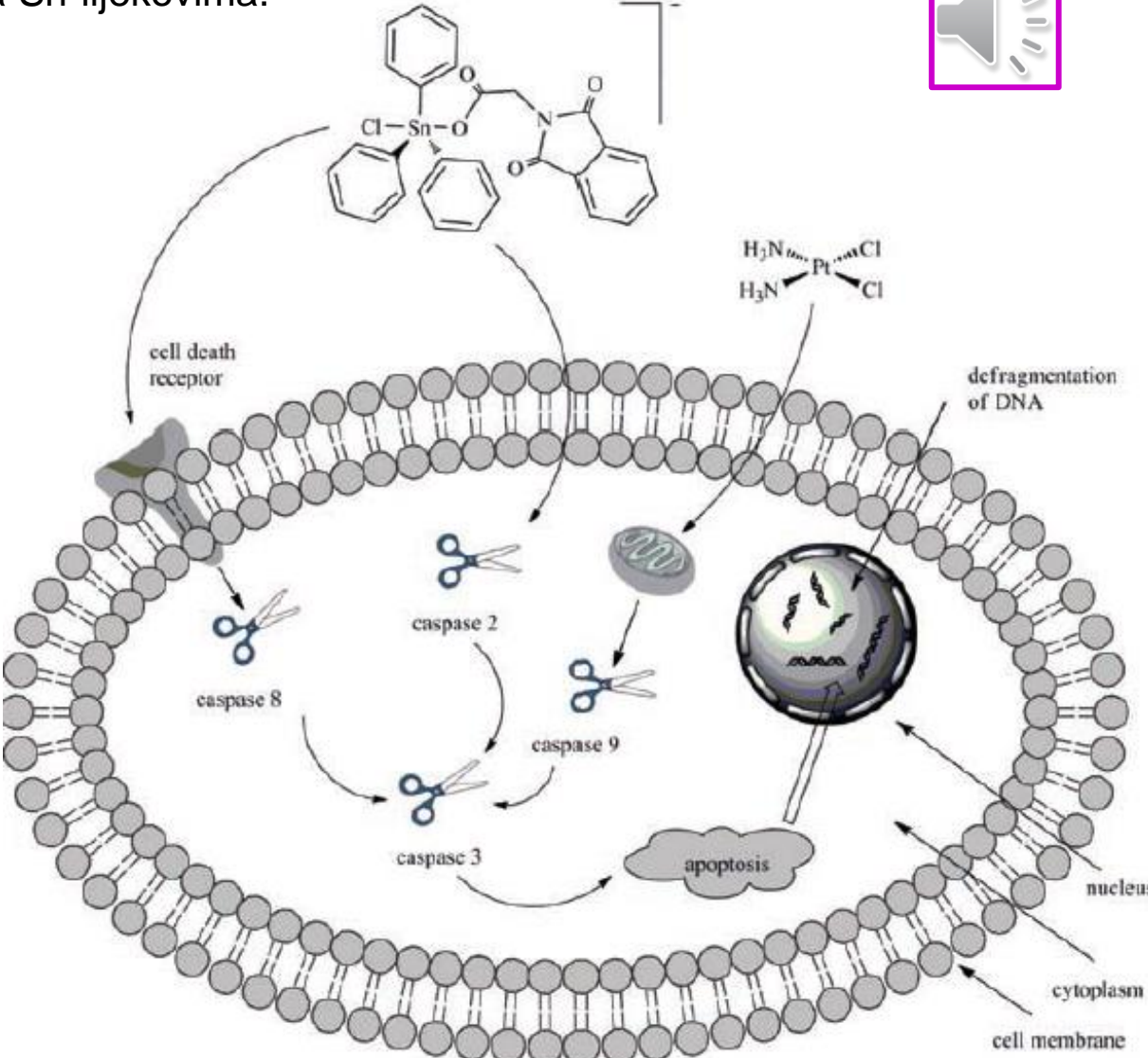
M. A. Jakupec et al, *Dalton Trans.*, 2008, 183.  
 A. M. Pizarro et al, *Top. Organomet. Chem.* 32, 2010, 21.

G. N. Kaluđerović et al, *Current Medicinal Chemistry*, 2011, 18, 4738  
 M. E. Soliman et al, *Drug. Des. Devel. Ther.* 2017, 11, 599.

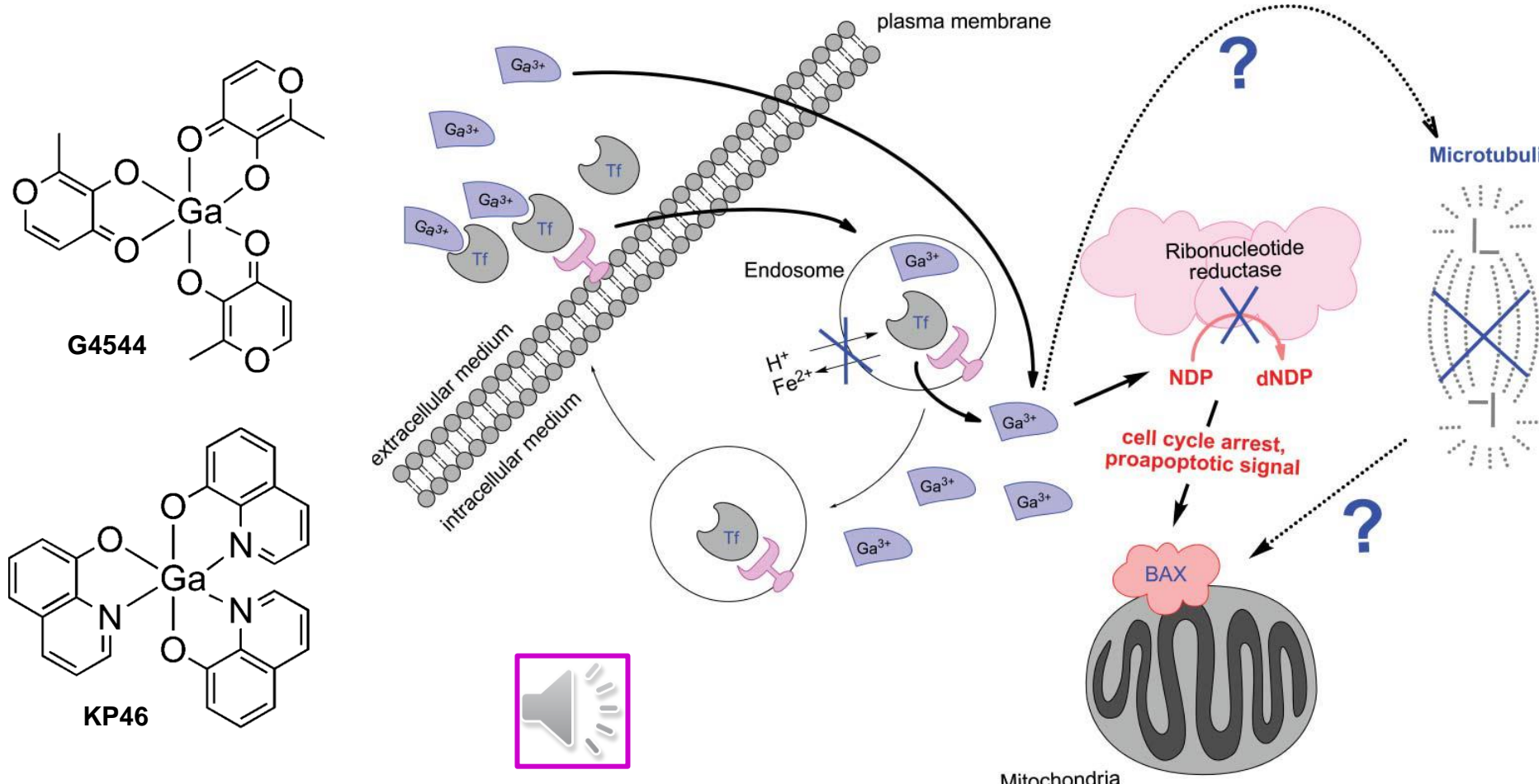
- **Organokositreni** spojevi odlikuju se povećanom topljivošću u vodi, smanjenom toksičnošću u odnosu na Pt-lijekeve, lakšim uklanjanjem iz organizma i malobrojnijim nuspojavama. Najvažnije, nije zabilježena rezistencija prema Sn-lijekovima.



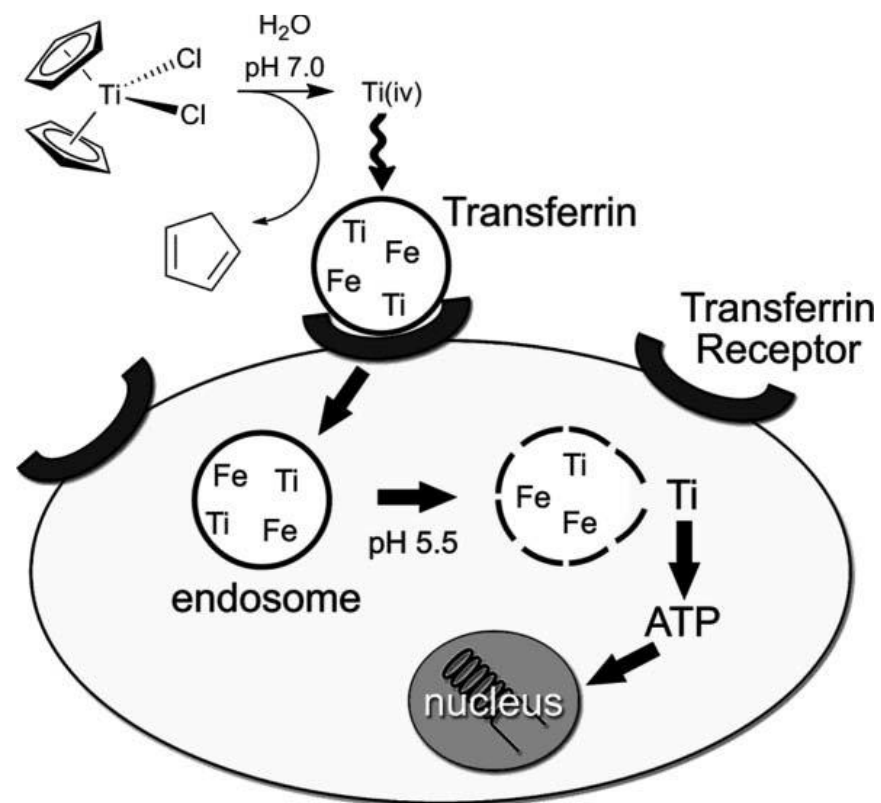
- Dokazano je da se Sn vezuje na membranske proteine (ili glikoproteine), te na stanične proteine ili direktno stupa u interakciju s fosfatnom DNA-okosnicom.
- Najaktivnijim se pokazao Sn(IV)-spoj s N-ftaloglicinskom (P-Gly) skupinom (50 puta aktivniji od cisplatina!).

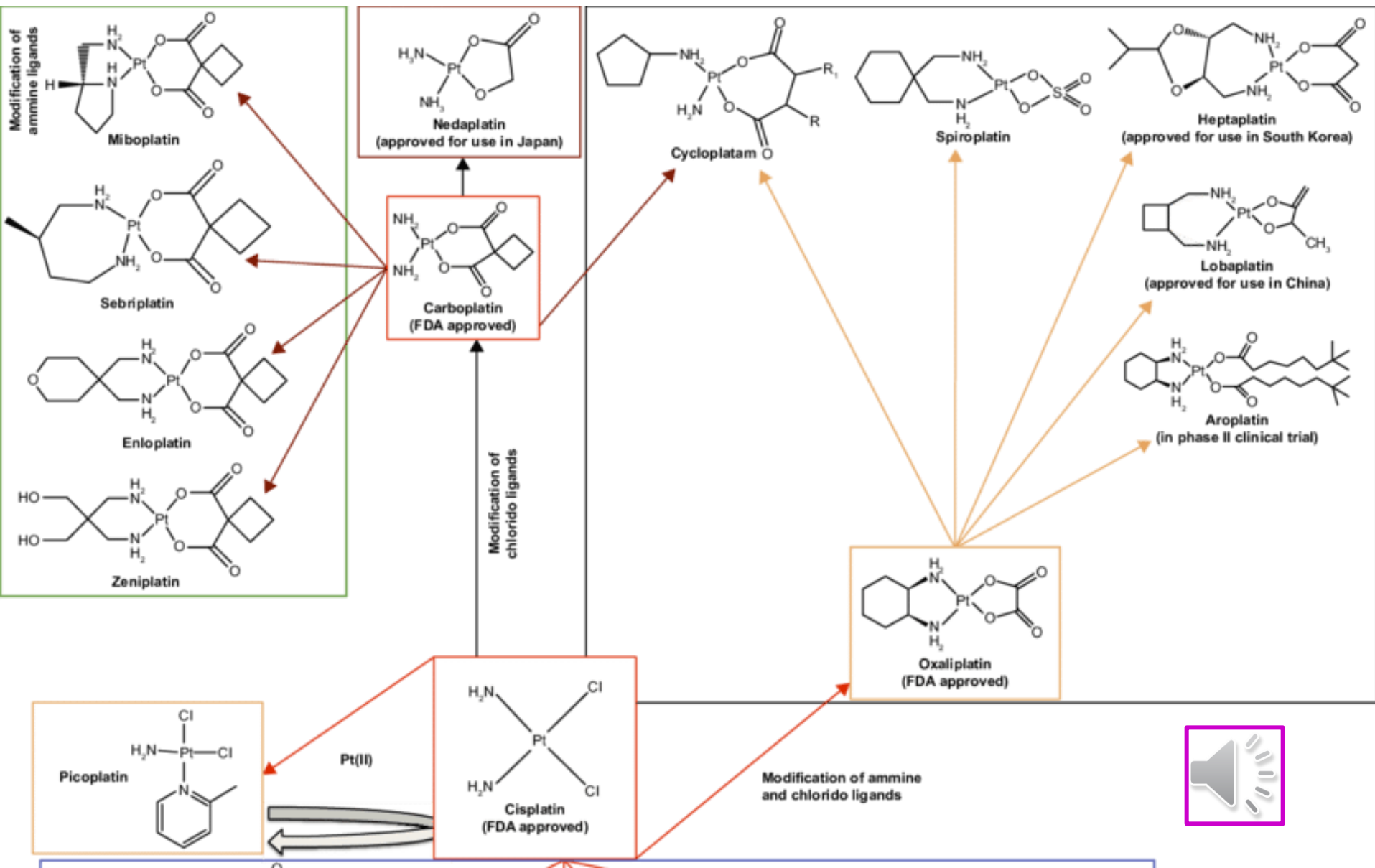


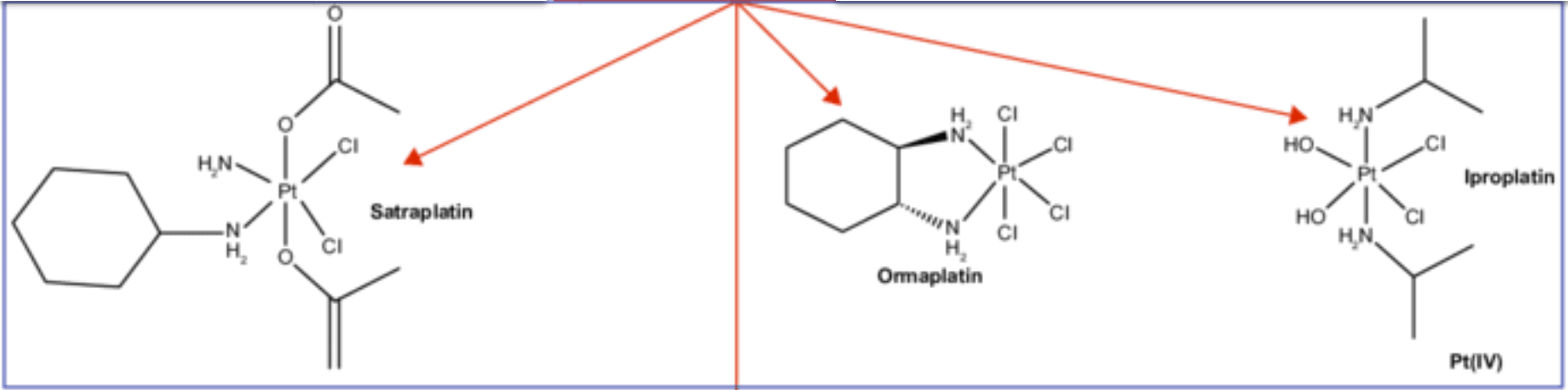
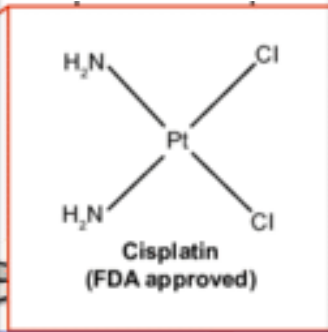
- Antitumorska aktivnost **Ga(III)-kompleksa** po prvi puta je opisana 1971. Pretpostavlja se da se Ga veže na receptore transferina na površini stanice, te da je njegova biološka meta ribonukleotid-reduktaza. Mehanizam njegovog djelovanja uključuje indukciju apoptoze.
- Prvi Ga(III)-kompleksi podvrgnuti kliničkim ispitivanjima bili su G4544 i KP46. G4544 testira se za liječenju metastaza u kostima te metaboličkih bolesti kostiju, dok je KP46 pokazao sposobnost indukcije apoptoze u širokom spektru malignih stanica.



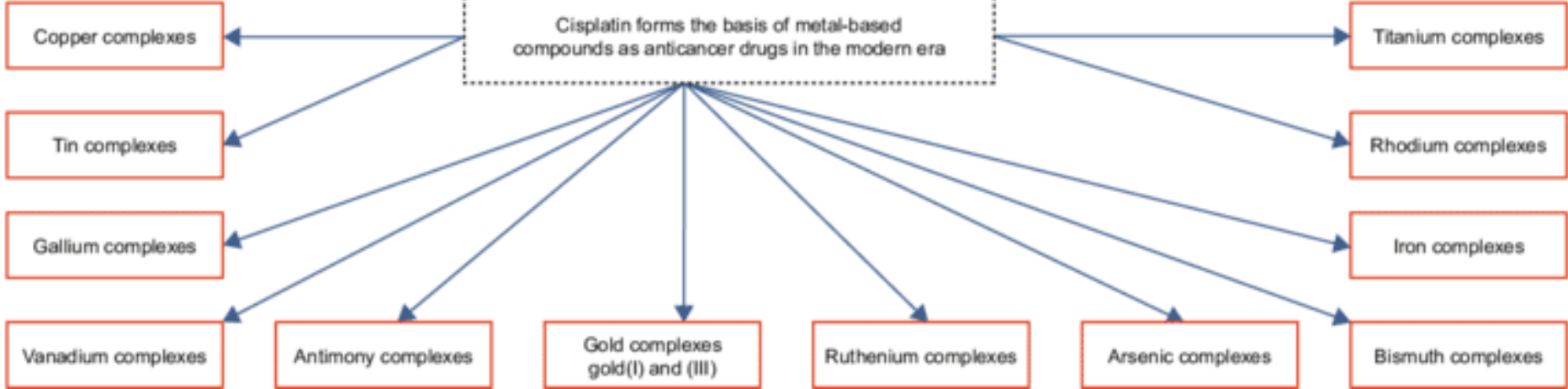
- Dvije vrste **Ti(IV)-kompleksa**, titanocen-diklorid i budotitan, podvrgnute su biološkoj evaluaciji.
- Budotitan je prvi neplatinski kompleks čija je aktivnost prema stanicama kolorektalnog karcinoma klinički testirana. Ustanovilo se da njegova aktivnost ovisi o planarnosti supstituenata, što indicira da mehanizam uključuje interkaliranje s DNA. Nažalost, njegovu primjenu ograničava smanjena topljivost i hepatotoksičnost.
- Titanocen-diklorid pokazao je visoku *in vivo* aktivnost prema cisplatin-rezistentnim stanicama. Njegova je struktura analogna cisplatinu, ali mehanizam djelovanja nije do kraja razjašnjen. Smatra se da se u stanicu doprema nakon vezivanja na receptore transferina, te da je njegova biološka meta DNA.
- Oba su se spoja pokazala neuspješnima u kliničkim istraživanjima zbog nezadovoljavajućeg omjera aktivnosti i toksičnosti. Pretpostavlja se da je takav rezultat posljedica brze hidrolize na neidentificirane agregate.



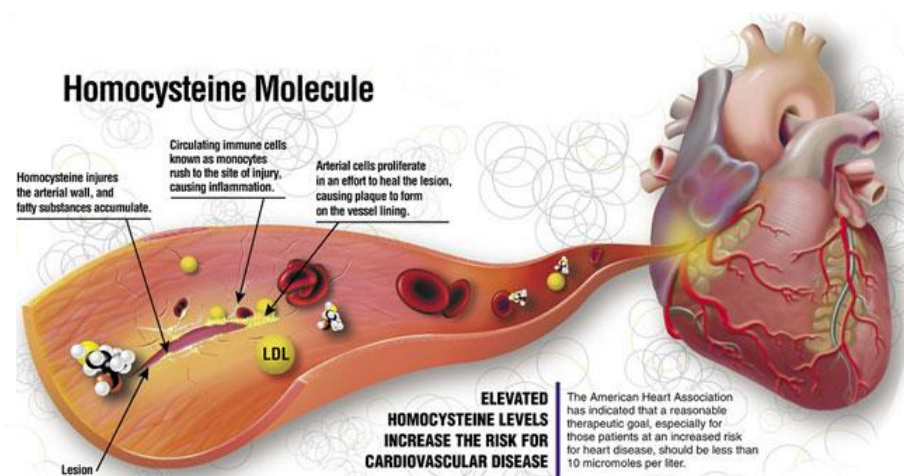
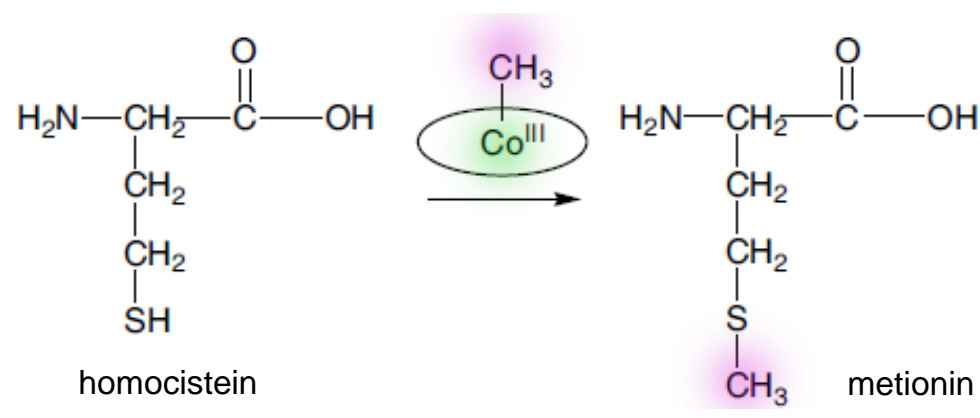
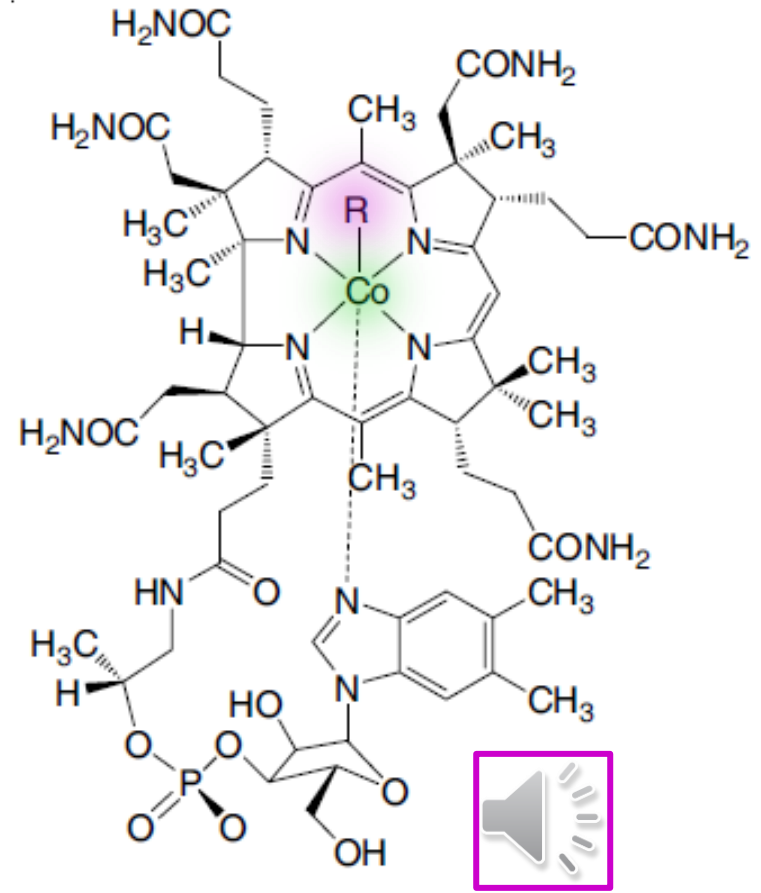




Cisplatin forms the basis of metal-based compounds as anticancer drugs in the modern era



- Povijesni primat u istraživanjima veze C-M u prirodnim sustavima pripada vitaminu B<sub>12</sub> (R = CN), njegovom koenzimu (R = 5'-deoksiadenozil) i metil-kobalaminu (R = CH<sub>3</sub>).
- Vitamin B<sub>12</sub> ima ključnu ulogu u funkciji mozga i živčanog sustava, te tvorbi eritrocita. Nužan je za odvijanje triju važnih metaboličkih reakcija:
  - i. Izomerizacija metil-malonil-CoA u sukcinil-CoA te α-leucina u β-leucin.
  - ii. Metiliranje (npr. konverzija homocisteina u metionin).
  - iii. Pretvorba riboze u deoksiribožu.



## Strategije u dizajnu metalnih lijekova

- Najvažnija prednost lijekova baziranih na metalima u odnosu na lijekove izvedene iz organskih molekula leži u njihovoj sposobnosti variranja koordinacijskog broja (2-9), geometrije (trigonalna planarna, trigonalna piramidalna, skverna planarna, tetraedarska, oktaedarska) i redoks-stanja. Stoga metali mogu koordinirati s organskim lijekovima stvarajući komplekse izmijenjenih farmakoloških svojstava.

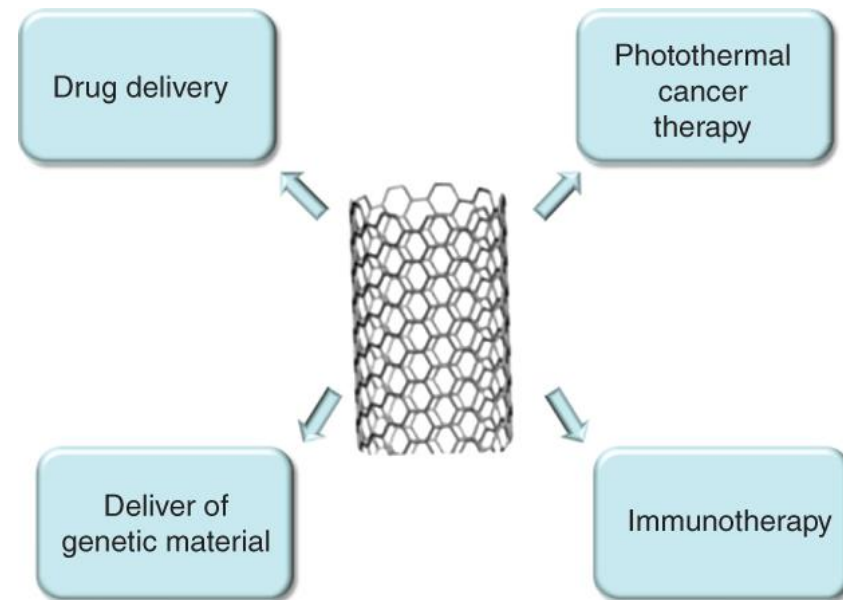


- Dvije su strategije u dizajnu metalnih lijekova:

I. Strategija ciljanja: bazira se na selektivnom transportu funkcionaliziranih molekula lijeka prepoznatih od strane receptora na površini stanica karcinoma.

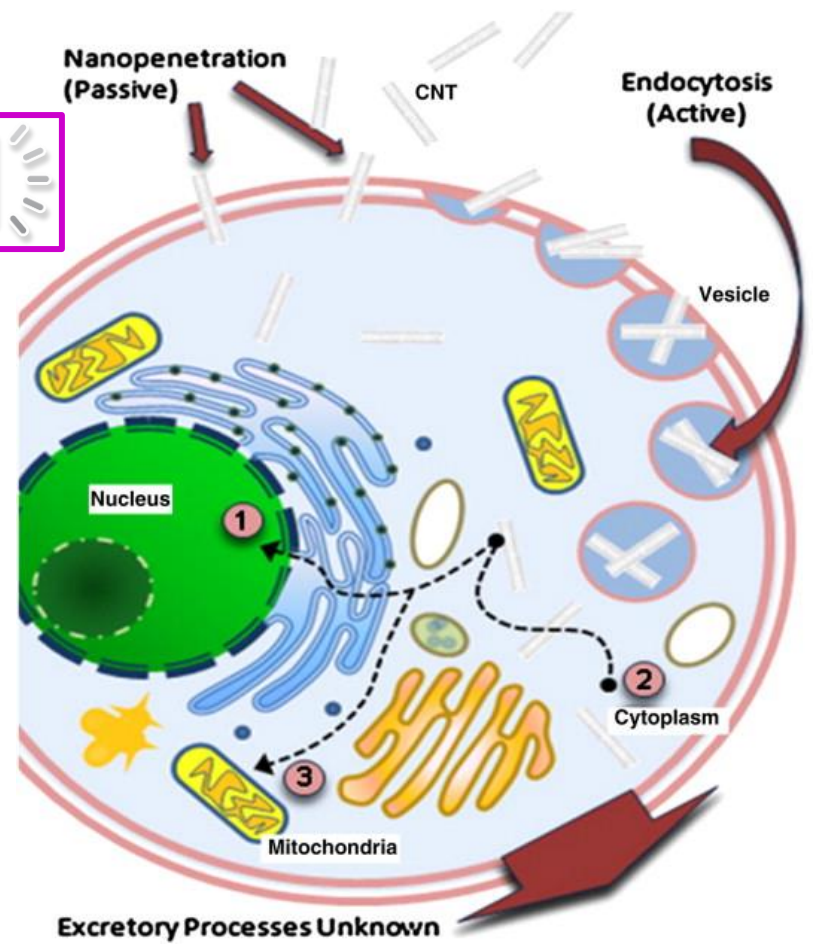
II. Strategija prolijekova: inaktivni prolijek aktivira se u uvjetima prisutnima u ciljnom tkivu ili stanici.

- Jedan od brojnih pristupa u provođenju strategije ciljanja uključuje ugljikove nanocijevi (Carbon Nanotubes, CNT).

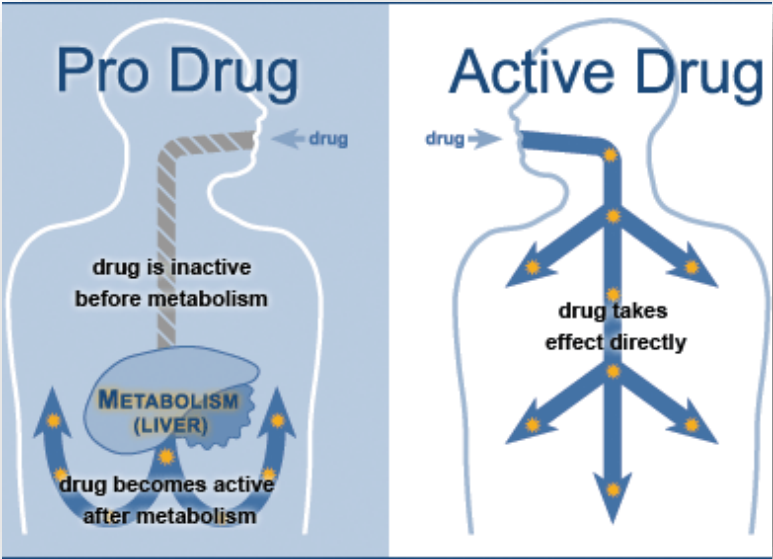




- Nanomaterijali, objekti nm dimenzija, od ogromne su strukturne i funkcionalne važnosti u biotehnologiji i medicini. Nanotehnologija omogućuje ranu detekciju bolesti, dijagnozu, liječenje i prevenciju.
- Nanocijevi se istražuju zbog njihove potencijalne uloge u biologiji i medicini. Veličina, velika unutarnja površina, inertni kemijski sastav i jedinstvena fizikalna svojstva omogućuju njihovu uporabu u transportu nukleinskih kiselina, lijekova i različitih proteinskih terapeutika. Pri tom se biomolekule za CNT vezuju kovalentnim i nekovalentnim vezama. Najveća zapreka u korištenju CNT za dopremu lijekova je mogućnost da u krvotoku budu prepoznate kao strana tijela, zbog čega se djelovanjem makrofaga u svega nekoliko sekundi uklanjaju iz krvotoka. Modifikacijom površine ugljikovih nanocijevi uz pomoć neutralnih molekula (hidrofilnih polimera i anionskih surfaktanata) moguće je prevladati spomenuti problem.

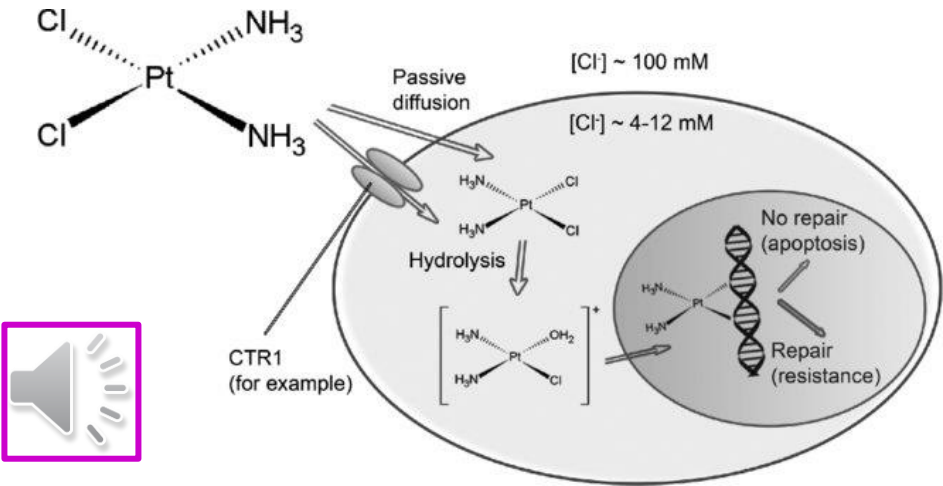


- Prolijekovi su derivatizirani lijekovi koji se *in vivo* podvrgavaju biotransformaciji (uz pomoć enzima) ili kemijskoj pretvorbi pri čemu se oslobađa bioaktivni agens koji potom ostvaruje željeni biološki učinak. (Zbog velike reaktivnosti, biološki aktivni agens iz prolijeka ne može se do ciljne stanice dopremiti samostalno).



- Strategija prolijekova usmjerena je na poboljšanje fizikalno-kemijskih i farmakokinetičkih svojstava farmakološki aktivnih agenasa. Posebnu ulogu ima u terapiji malignih bolesti jer omogućava dopremu inaktivnog prolijeka do tumorske stanice u kojoj se oslobađa citotoksični agens, a pri čemu se izbjegava toksični učinak na zdravim stanicama.

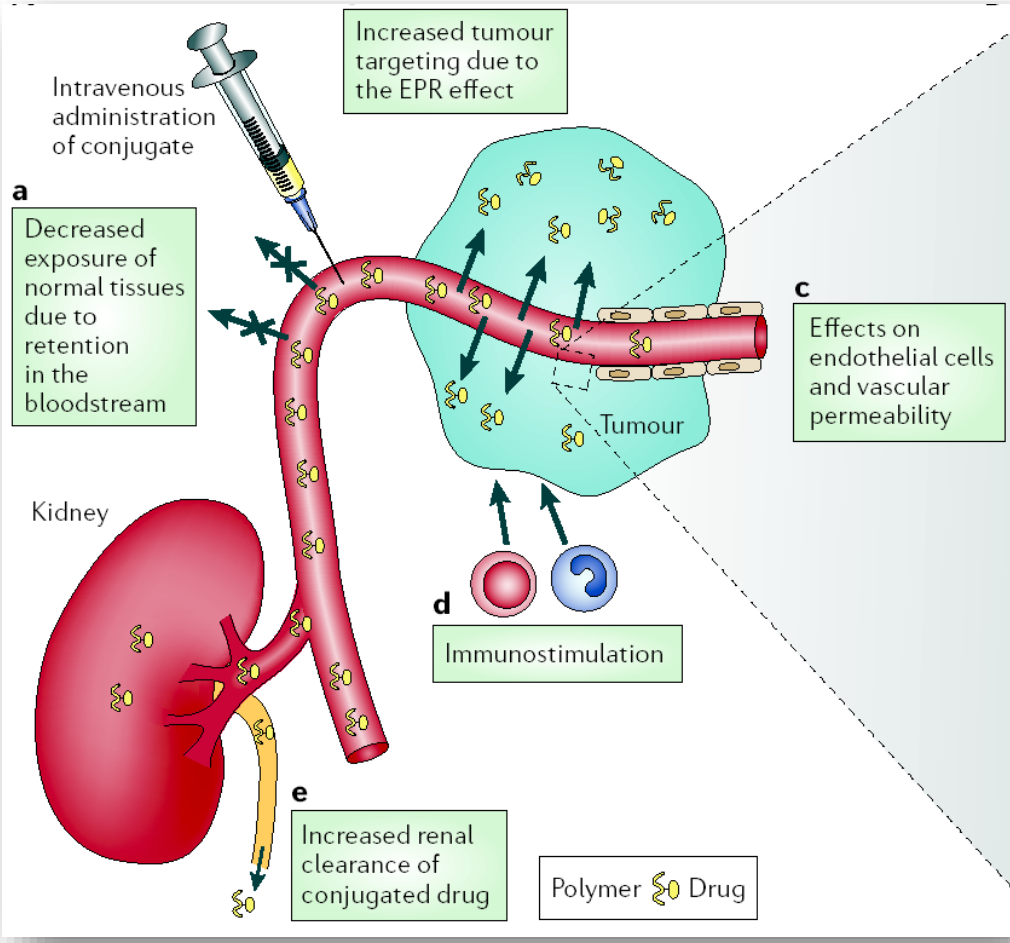
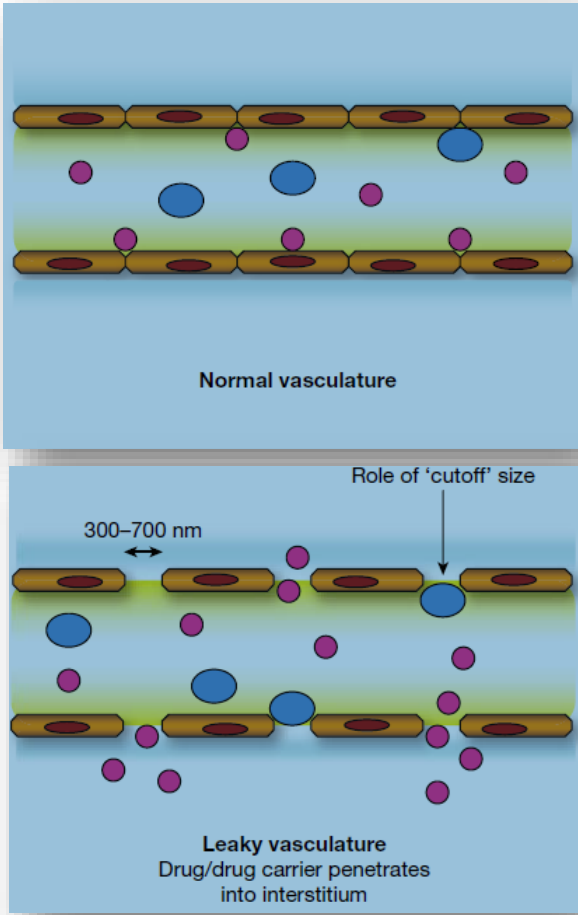
- Prolijekovi bazirani na metalima najčešće se aktiviraju supstitucijom liganada, promjenom oksidacijskog stanja, fotokemijskim procesima ili kombinacijom tih postupaka.



- Supstitucijom liganada metal se aktivira za vezivanje s biološkom metom.

Advances in Inorganic Chemistry, Eds. R. van Eldik and C. D. Hubbard, 2009.  
 S. J. Lippard et al, Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci., 2015, 373, 20140185  
 R. J. Browning et al, ASC Nano 2017, 11, 8560.

- Selektivno dopremanje metalnih prolijeakova do stanica raka ostvarivo je pomoću nanočestica. Kombiniranjem Pt(IV)-prolijeakova s nanočesticama otvara se mogućnost njihovog transporta kao i prevencije preuranjene redukcije u krvotoku.
- Krvne žile u tumoru propusnije su nego u zdravom tkivu što otvara mogućnost za selektivni ulazak nanočestica lijeka u bolesno tkivo.



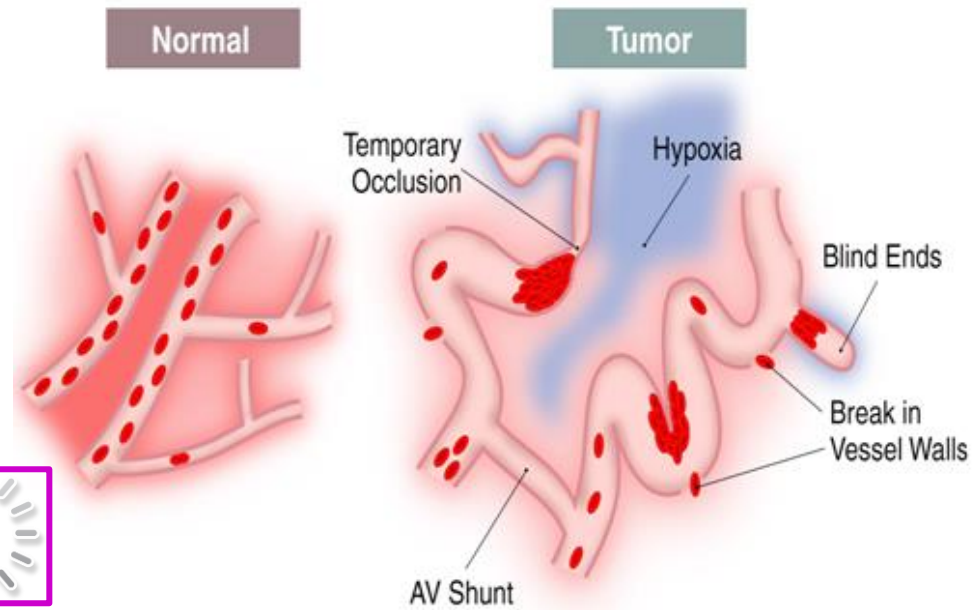
T. E. Mallouk, *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 7937.

R. Cavalli et al, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 21 (2010) 53.

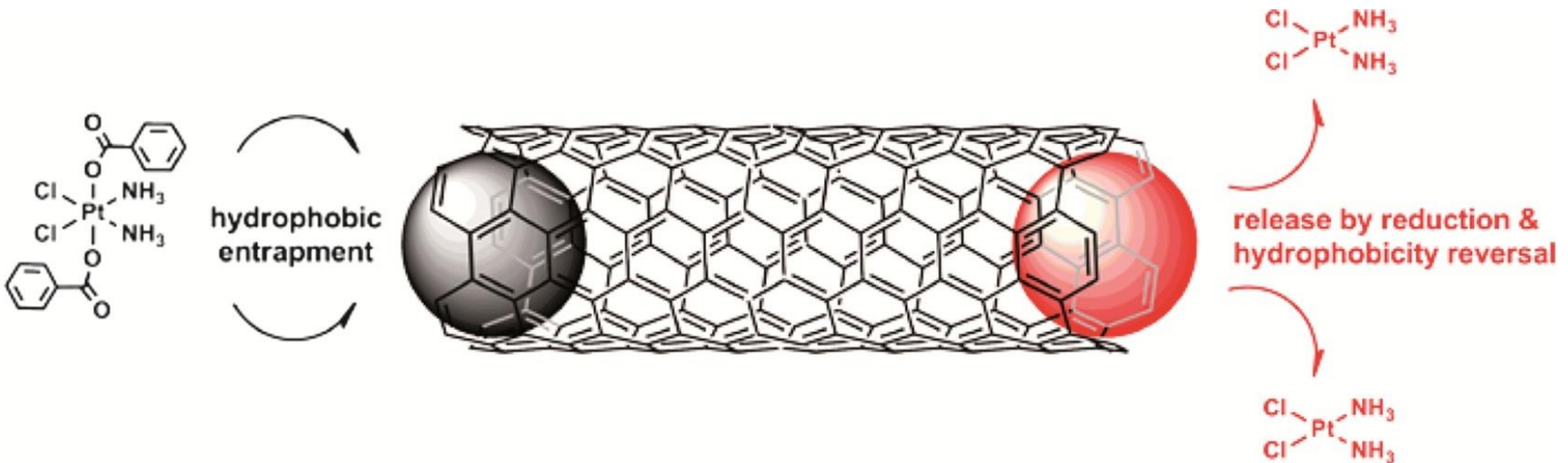
P. N. Yaron et al, *Journal of Nanobiotechnology* 9 (2011) 45

O. Regev et al, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 17 (2012) 360.

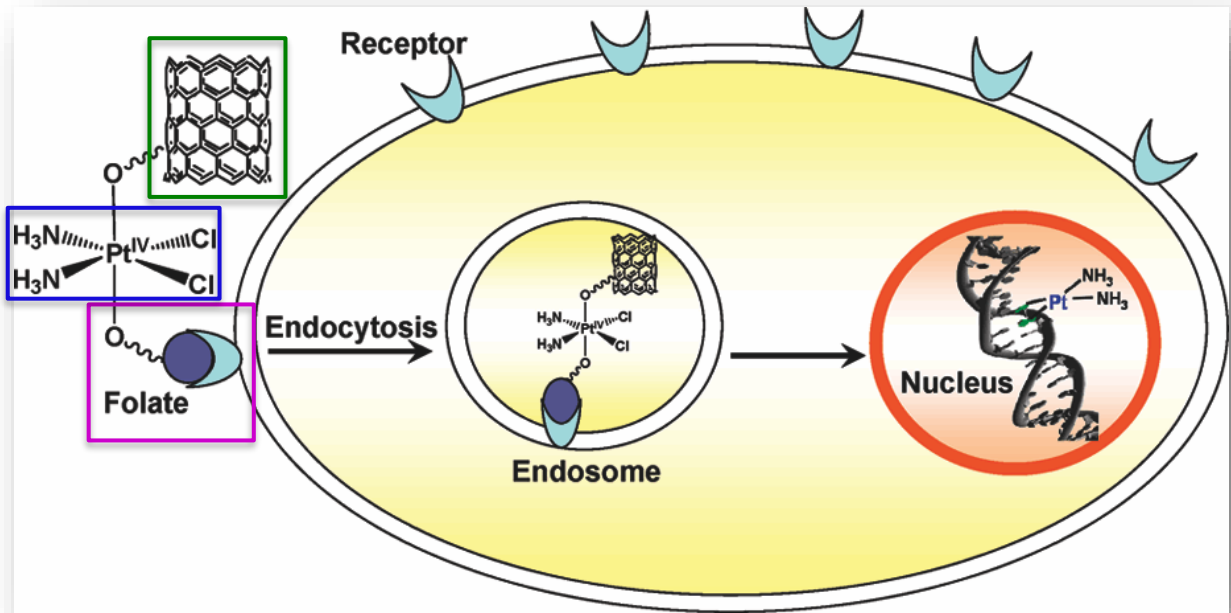
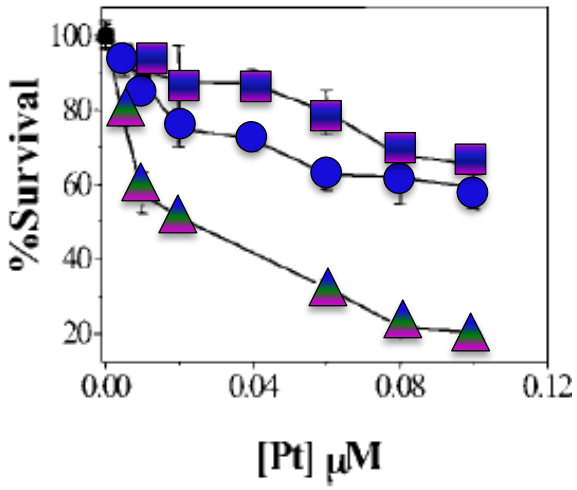
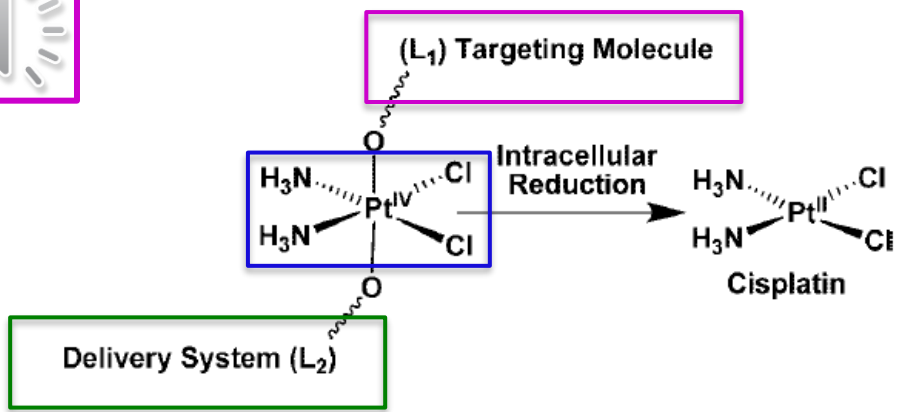
- Tumori su u odnosu na zdravo tkivo slabije opskrbljeni kisikom, što za posljedicu ima povećanu otpornost prema kemo- i radioterapiji kao i sklonost bržem razvoju metastaza.
- Primjenom hipoksija-aktiviranih (bio-reduktivnih) proliješkova takvo stanje je moguće iskoristiti za ciljano tretiranje tumora.



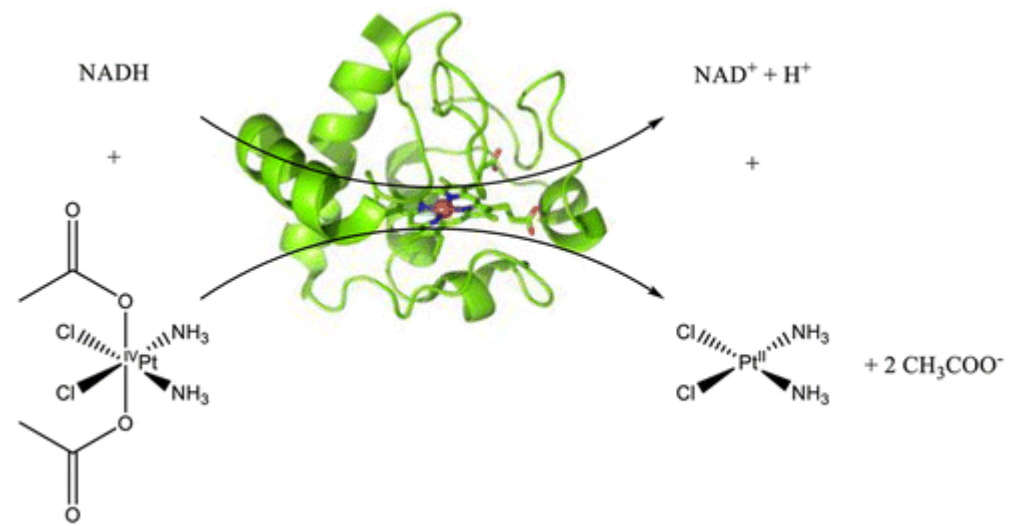
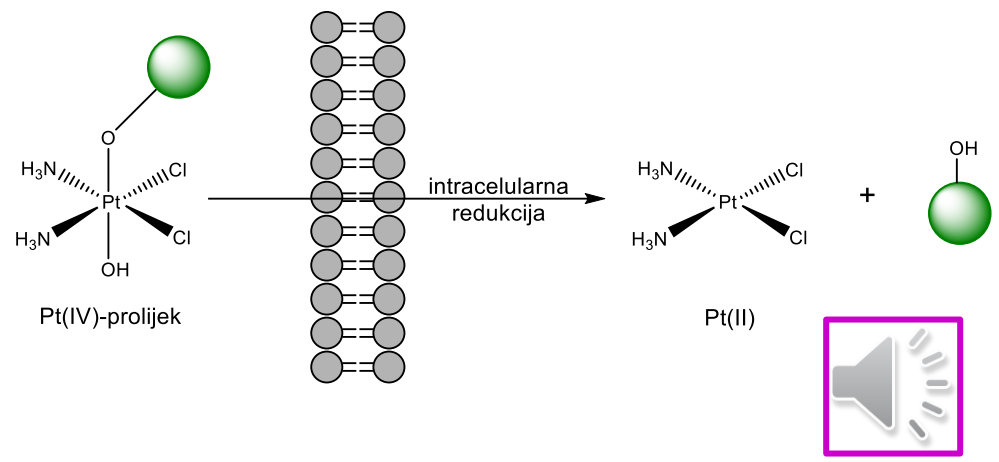
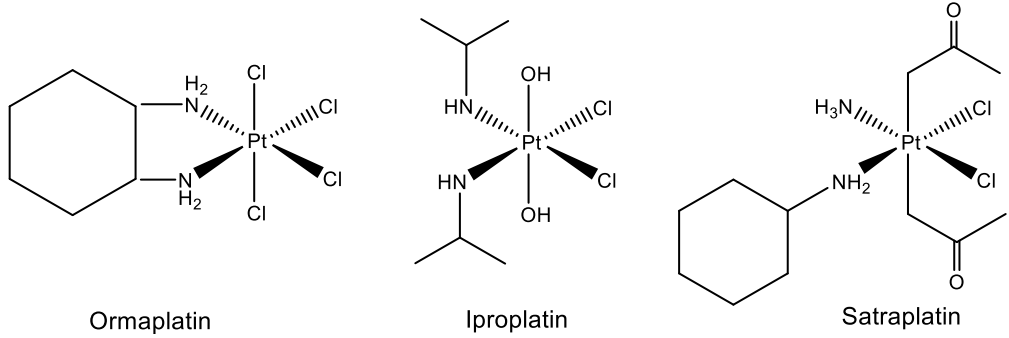
- Metalni proliješkovi do ciljnih se stanica dopremaju u inertnom oksidiranom stanju, bez prethodne redukcije, te metaboliziraju nakon dospjeća u reduktivno okruženje tumorskih stanica.



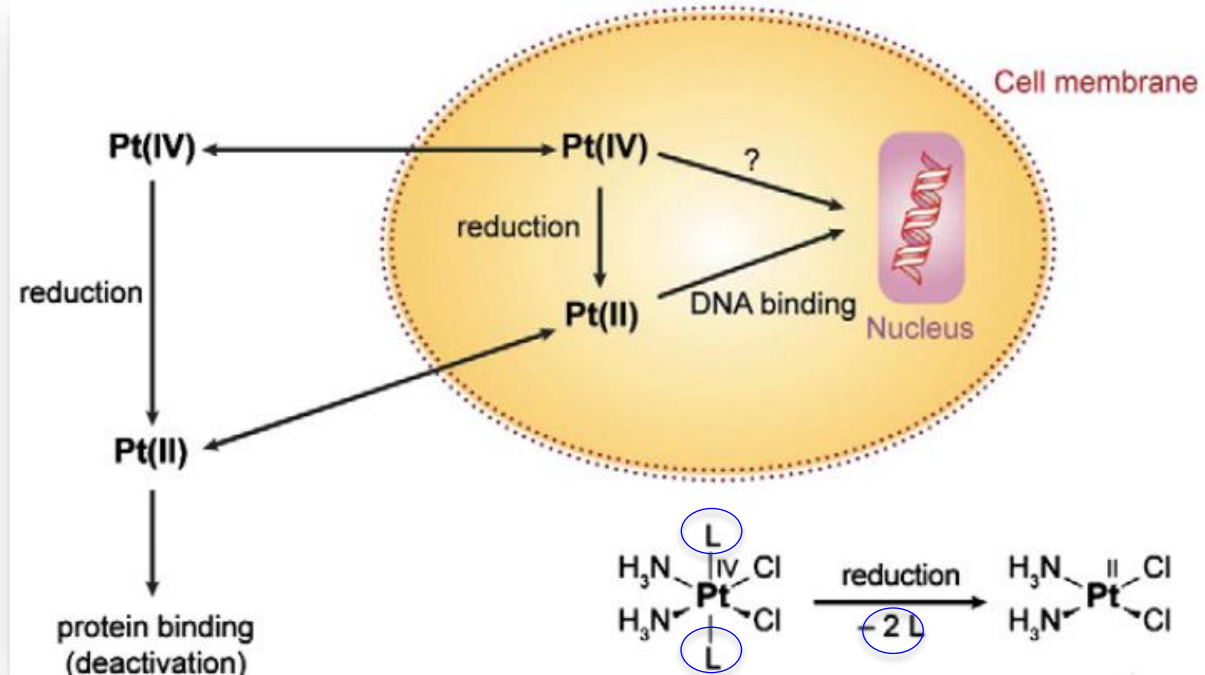
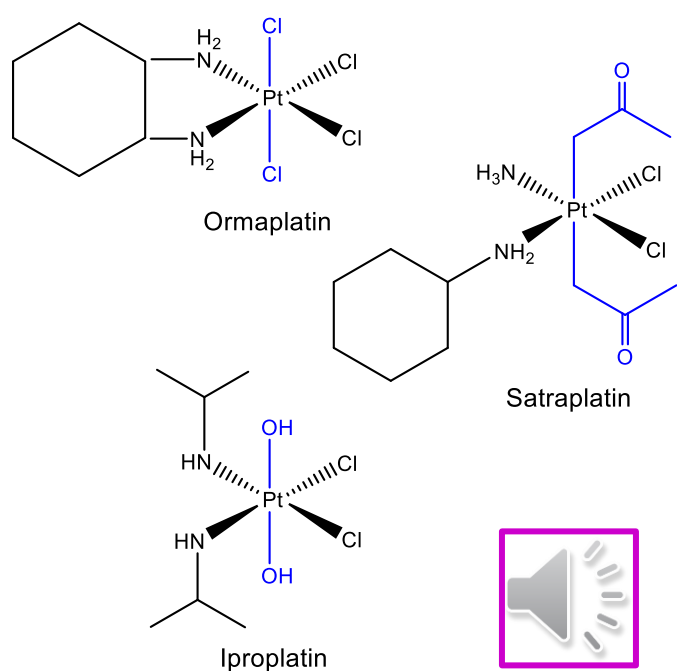
- Većina stanica raka na svojoj površini sadrži receptore za folnu kiselinu. Nakon vezivanja Pt(IV)-prolijeka obilježenog folnom kiselinom (L<sub>1</sub>, Targeting Molecule) za CNT (L<sub>2</sub>, Delivery System) slijedi unos u stanicu raka procesom endocitoze; rezultira povećana citotoksičnost CNT-funkcionaliziranih Pt(IV)-prolijekova u usporedbi s cisplatinom.



- Tri Pt(IV)-prolijeka podvrgnuta su kliničkim ispitivanjima. Njihov je dizajn baziran na pretpostavci da će se netoksični Pt(IV)-prolijekovi nakon ulaska u reduktivni medij tumorske stanice (u prisutnosti staničnih reducirajućih agenasa glutationa i aksorbinske kiseline) aktivirati (primiti  $2e^-$ ) i formirati citotoksične planarno-kvadratne Pt(II)-komplekse uz gubitak **aksijalnih liganada**. Ipak, pokazalo se da geometrija nastalog reduciranog kompleksa ovisi o prirodi liganda koordiniranog s Pt(IV) kao i o samom tipu tumorske stanice.
- Recentna istraživanja pokazala su da elektron-donirajući NADH i cyt c kao prijenosnik elektrona imaju krucijalnu ulogu u redukciji Pt(IV)-prolijekova.



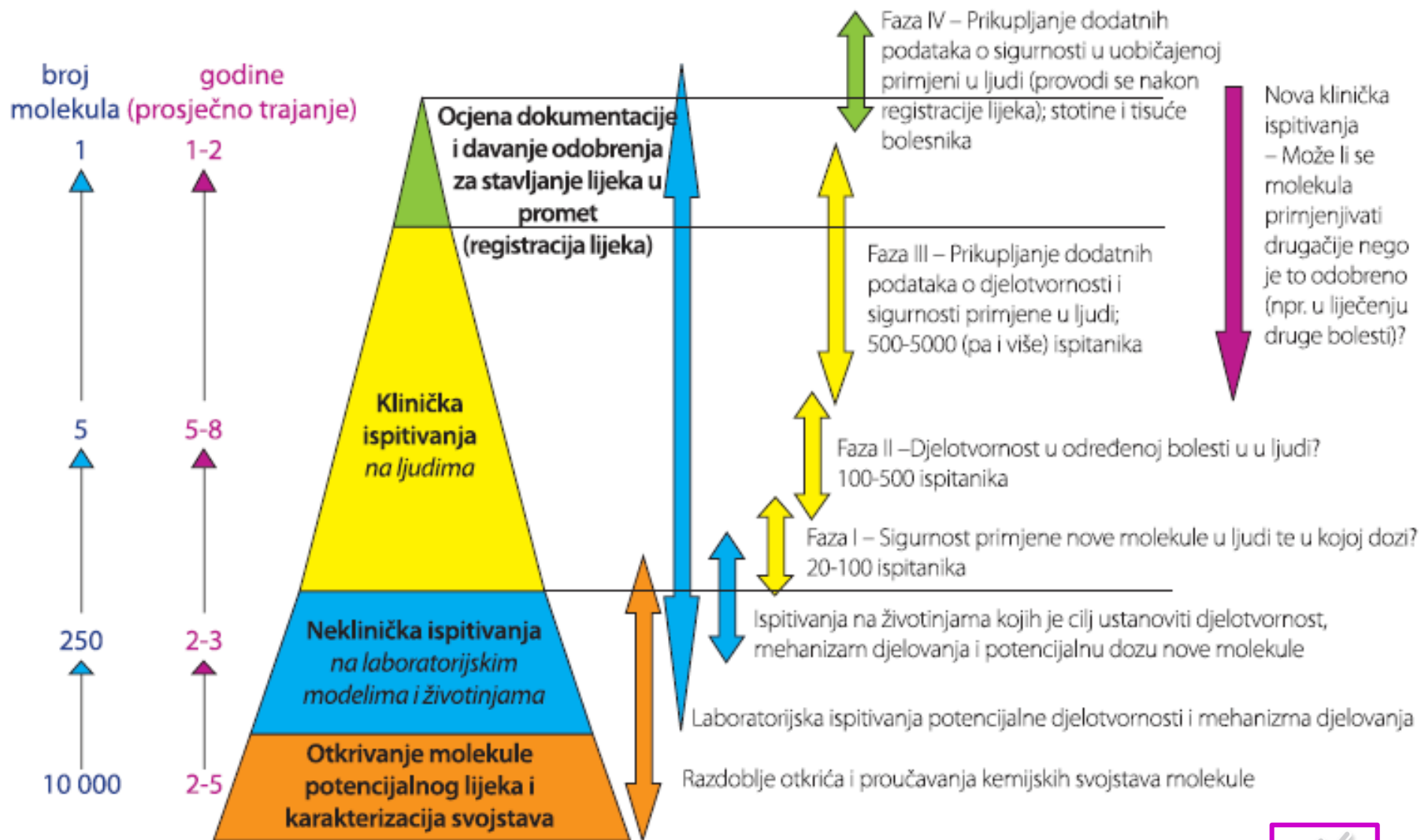
C. J. Marmion et al, *Eur. J. Inorg. Chem* 2017 (12) 1596.  
 F. Arnesano et al, *Mol. Pharmaceutics*, 2016 (13) 3216.



- Ormaplatin nije podvrgnut 2. fazi kliničkih ispitivanja zbog pokazane visoke toksičnosti.
- Iproplatin je u 38 kliničkih ispitivanja (od 1. do 3. faze) pokazao manju toksičnost, ali se odustalo od kliničke upotrebe jer nije pokazao bolju učinkovitost u odnosu na cisplatin i karboplatin.
- Satraplatin, oralno administrirani Pt(IV)-prolijek, podvrgnut je brojnim testiranjima u sklopu 1., 2. i 3. faze [samostalno (na pacijentima oboljelima od karcinoma pluća, glave, vrata i grlića maternice) ili u kombinaciji s drugim bioaktivnim agensima (u kombinaciji s prednisonom pokazao je dobre rezultate u terapiji karcinoma prostate)].

- [http://www.almp.hr/upl/publikacije/Prirucnik\\_klinicko\\_ispitivanje.pdf](http://www.almp.hr/upl/publikacije/Prirucnik_klinicko_ispitivanje.pdf)

## OTKRIVANJE I RAZVOJ LIJEKOVA – OD NOVE MOLEKULE DO ODOBRENOG LIJEKA



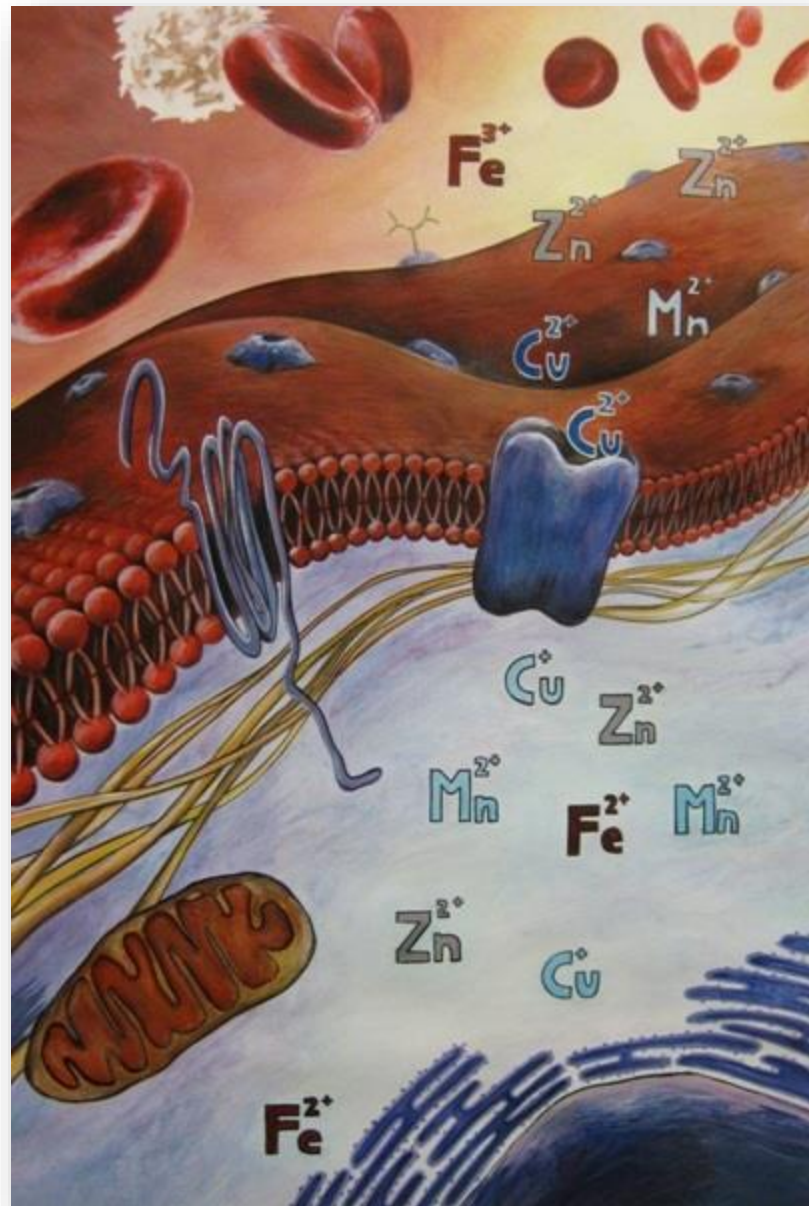
- Almp (agencija za lijekove i medicinske proizvode)





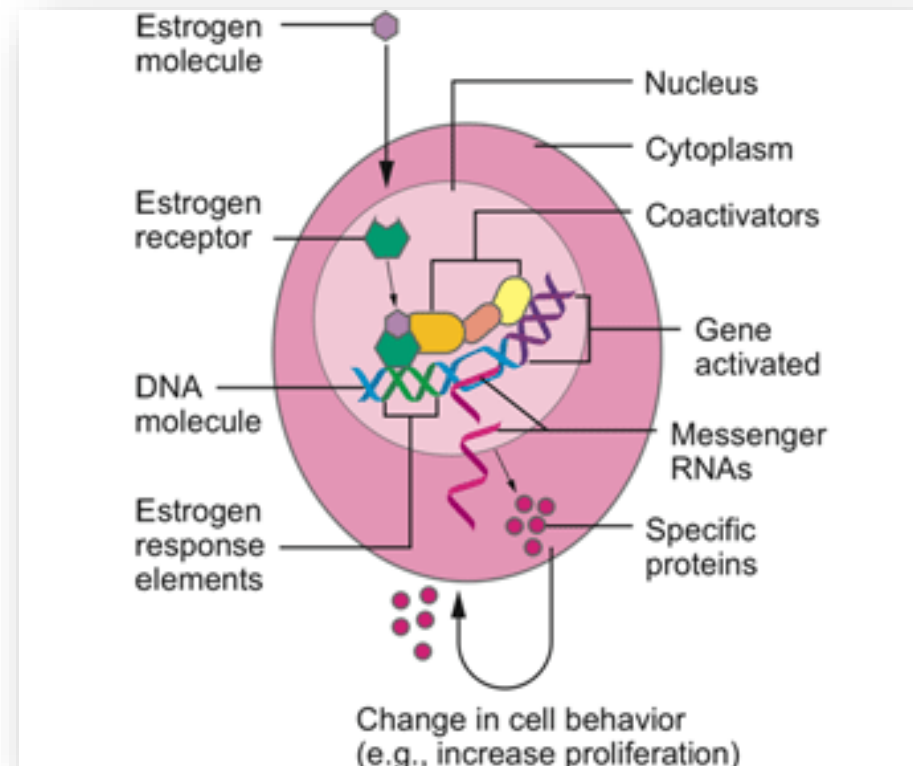
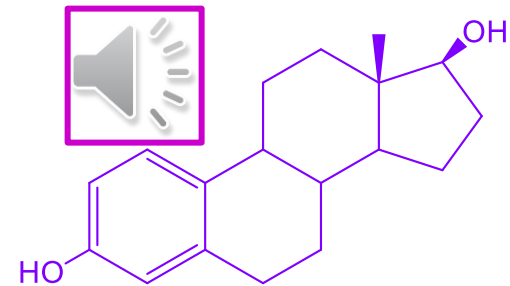
# Osnove bioorganometalne kemije

Prof. dr. sc. Lidija Barišić

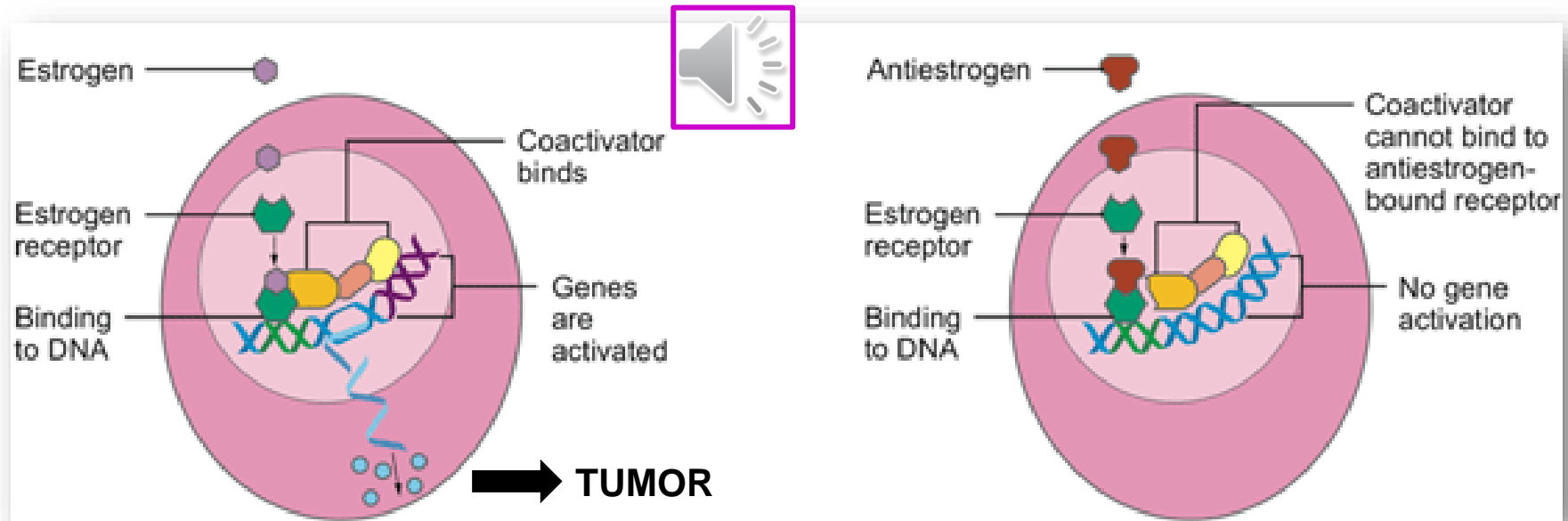


## Metalni kompleksi selektivnih modulatora estrogenskih receptora (SERMs)

- Rast  $\frac{2}{3}$  stanica karcinoma dojke stimuliran je estrogenom. Tkiva koja su pod utjecajem **estrogena** sadrže **estrogenske receptore** koji su, uz molekule DNA, smješteni u staničnoj jezgri. U odsutnosti estrogena, njihovi su receptori inaktivni i ne utječu na DNA.
- Nakon vezivanja estrogena na receptor, mijenja se oblik receptora te se nastali kompleks **estrogen-receptor** veže na **specifične DNA-sekvence ERE (estrogen response element)** koje su locirane blizu gena i kontrolirane estrogenom. Potom se kompleks **estrogen-receptor** vezuje na **koaktivator proteina** te **bliži geni** postaju aktivni. Aktivni geni proizvode **mRNA** koja upravlja sintezom proteina. Nastali proteini mogu utjecati na stanice (npr. uzrokovati proliferaciju epitela).

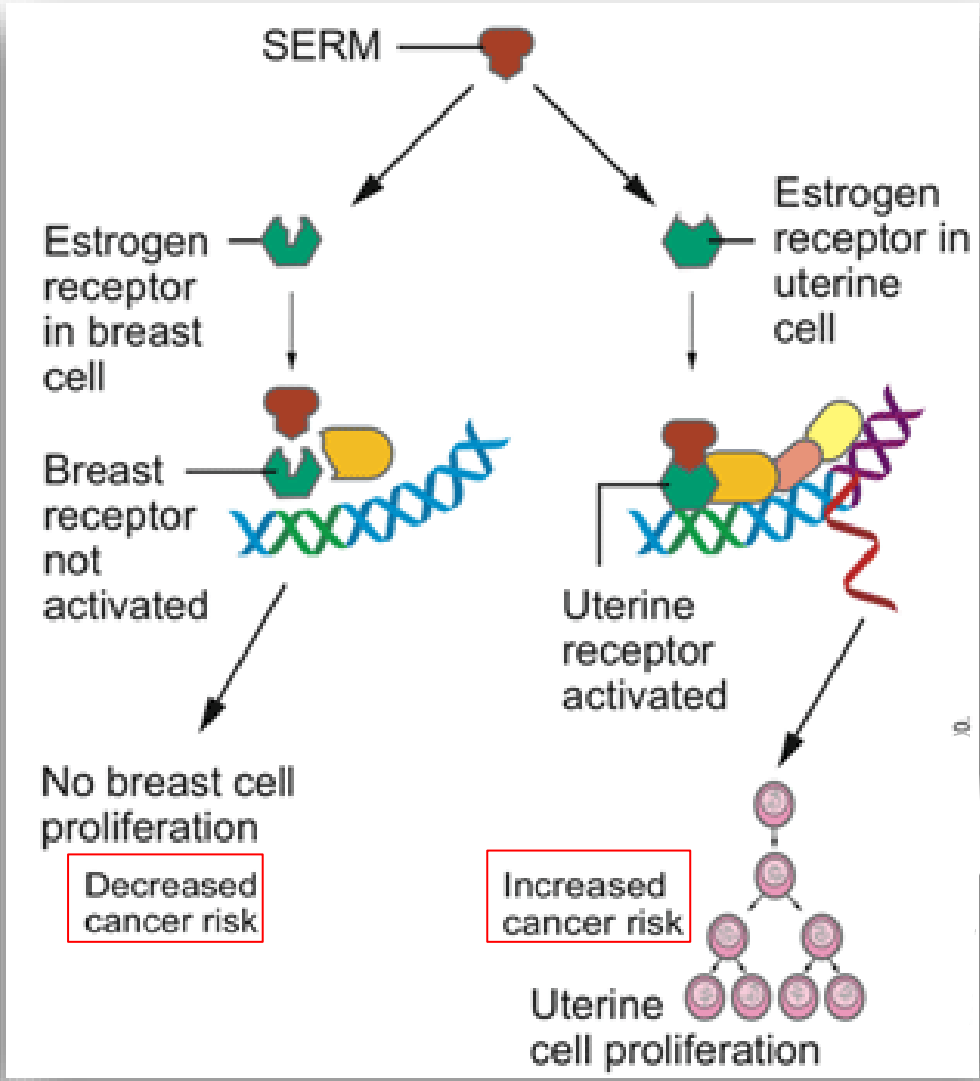
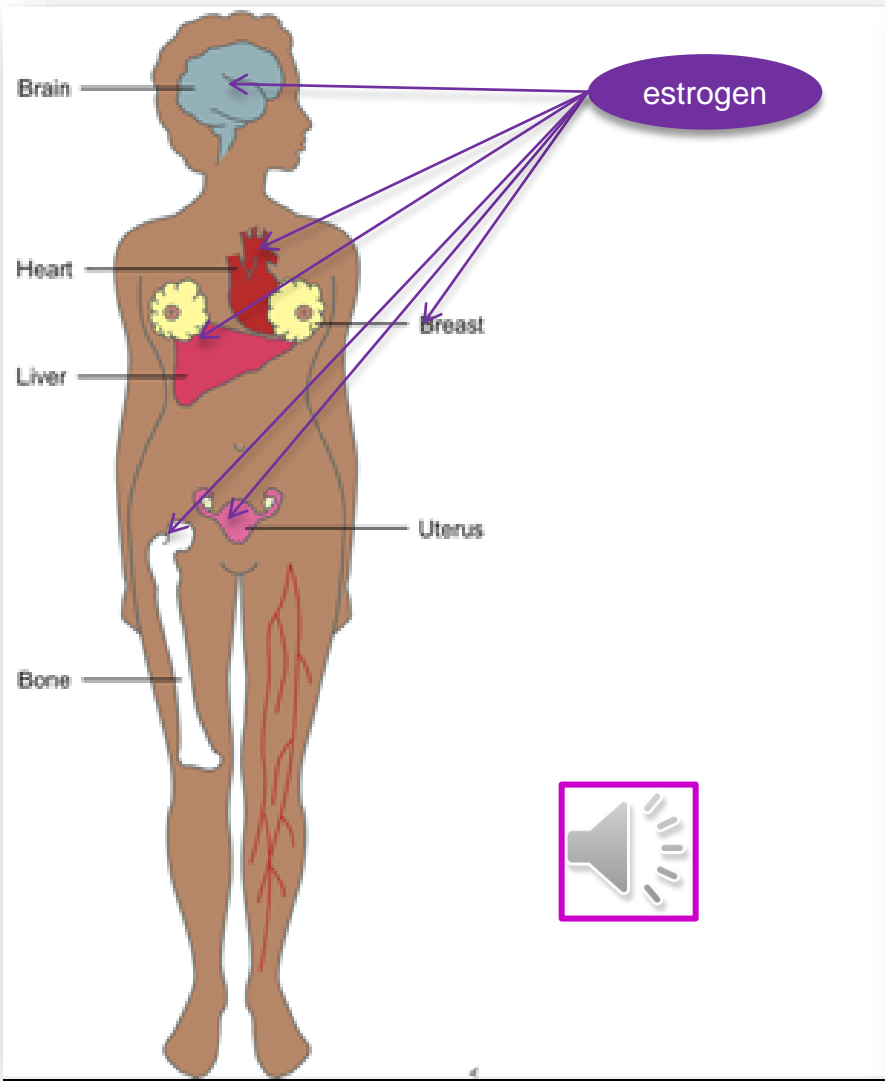


- **Antiestrogeni:** lijekovi koji vezivanjem na **estrogenske receptore** blokiraju aktivnost **estrogena** (aktivaciju gena odgovornih za sintezu proteina koji mogu uzrokovati nekontroliran rast stanica) i preveniraju proliferaciju kanceroznih stanica u dojci i uterusu.

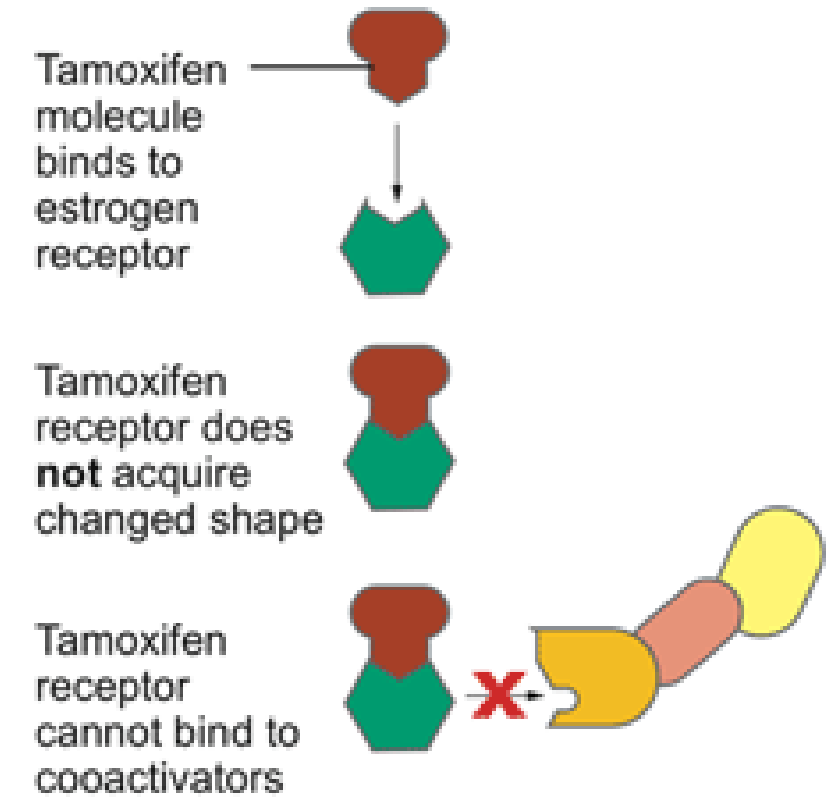
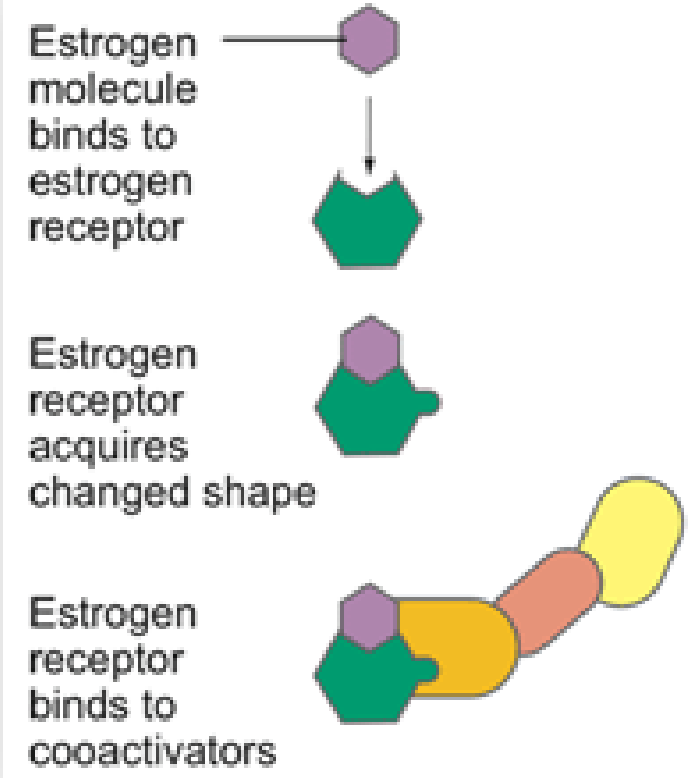
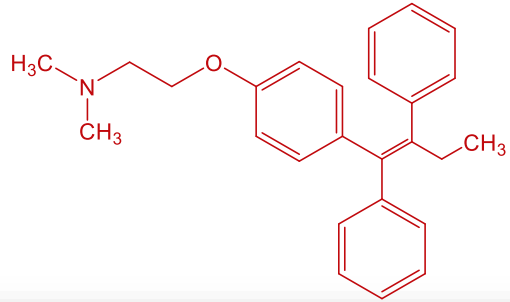
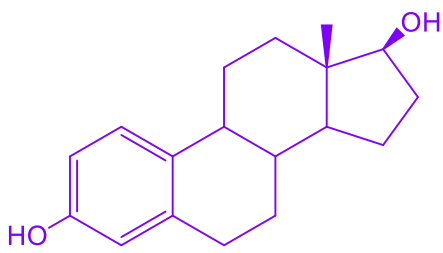


- Neke molekule mogu istovremeno blokirati aktivnost estrogena u jednoj vrsti tkiva i oponašati njegovu aktivnost u drugom tkivu. Selektivnost molekula SERMs (selective estrogen receptor modulators) uzrokovana razlikama u kemijskoj strukturi estrogenskih receptora u različitim tkivima zbog čega SERMs u stanicama dojke djeluju kao antagonisti estrogena (blokiraju njegovu aktivnost) dok u drugim stanicama (kostima, jetri, uterusu) djeluju kao agonisti estrogena (ponašaju se kao estrogen).

- Estrogenski se receptori u različitim tkivima razlikuju po svojoj kemijskoj strukturi uslijed čega ih **SERMs (selective estrogen receptor modulators)** selektivno ili inhibiraju ili stimuliraju [npr. inhibiraju estrogenski receptor u dojci (inhibiraju proliferaciju) i istovremeno aktiviraju estrogenski receptor u maternici (aktiviraju proliferaciju)].



- Istraživanja antikancerogenih svojstava SERMs-a započela su s **tamoksifenom** (blokira estrogen vezujući se na njegove receptore u stanicama dojke; pri tom se ne mijenja oblik receptora što onemogućava vezivanje koaktivatora te se geni koji stimuliraju proliferaciju stanica ne mogu aktivirati).



- Aktivno se radi na razvoju novih SERMs-a s kojima bi se ostvarili povoljni i izbjegli štetni učinci.

# The Need for Better SERMs


**Tamoxifen**

*Good effects*

- Reduces breast cancer risk
- Lowers LDL cholesterol
- Strengthens bones

*Bad effects*

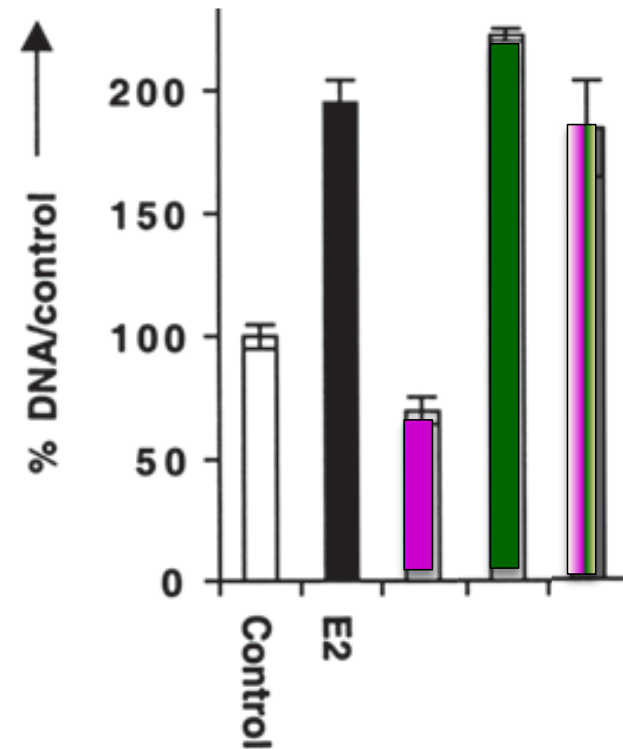
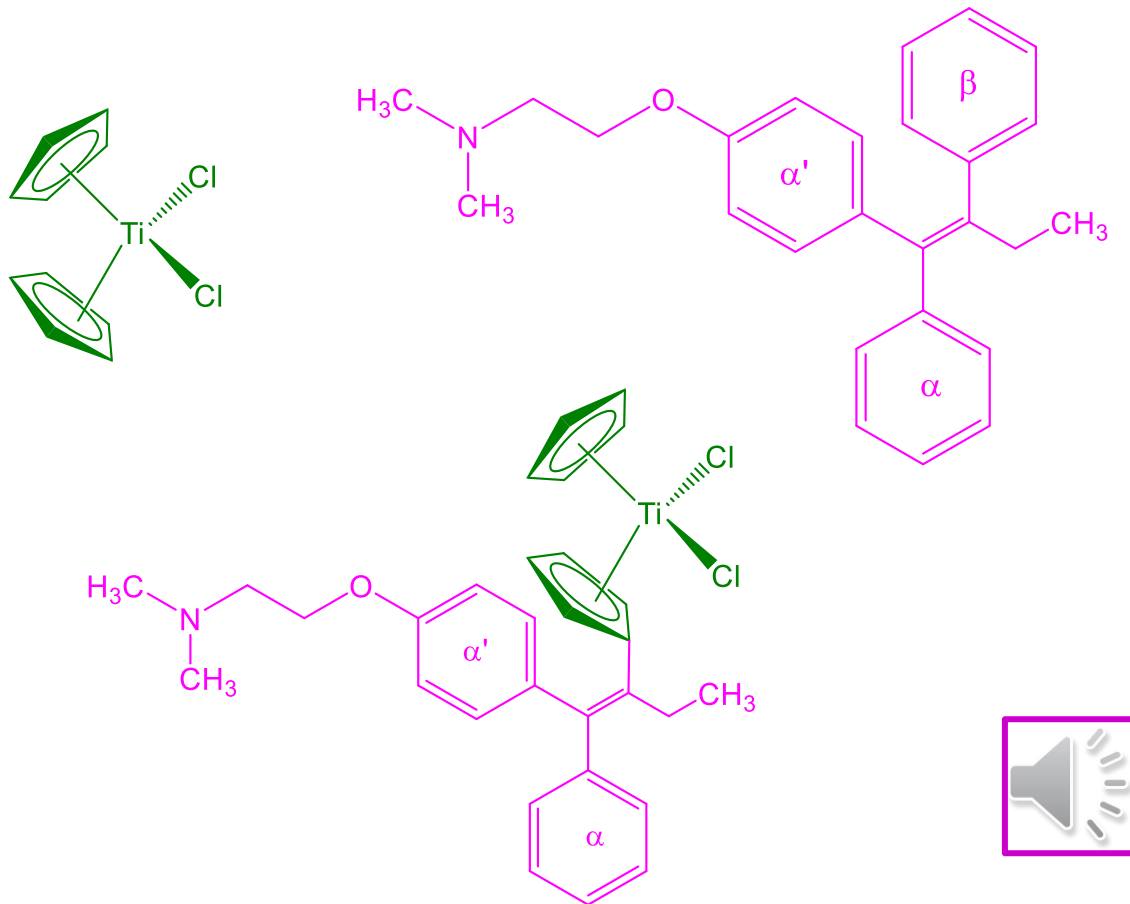
- Increases uterine cancer risk
- Increases blood clot risk



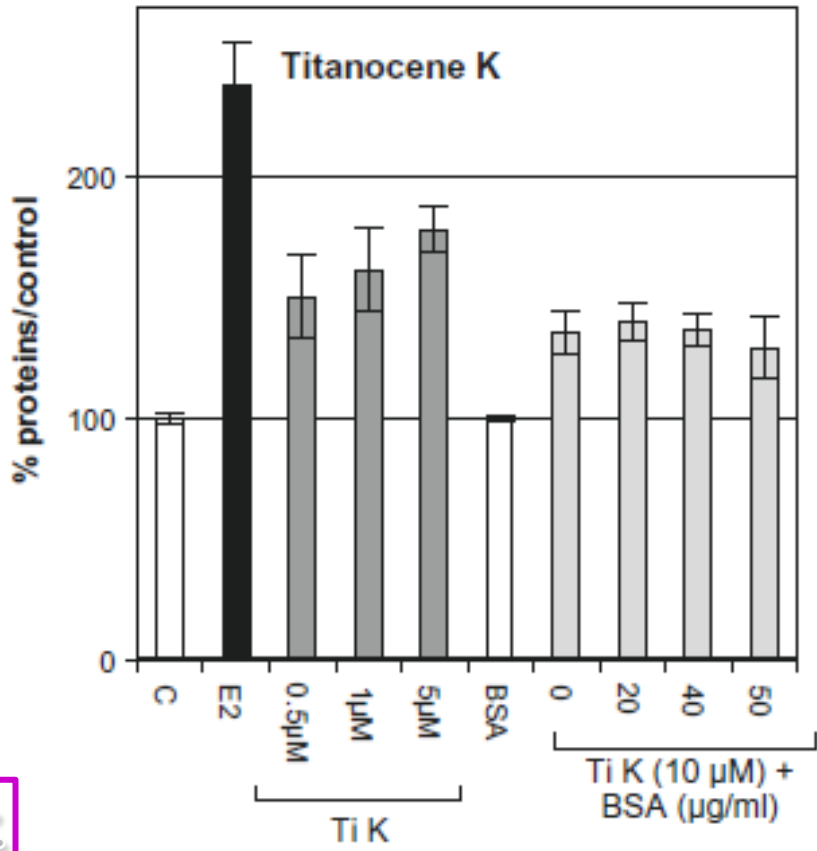
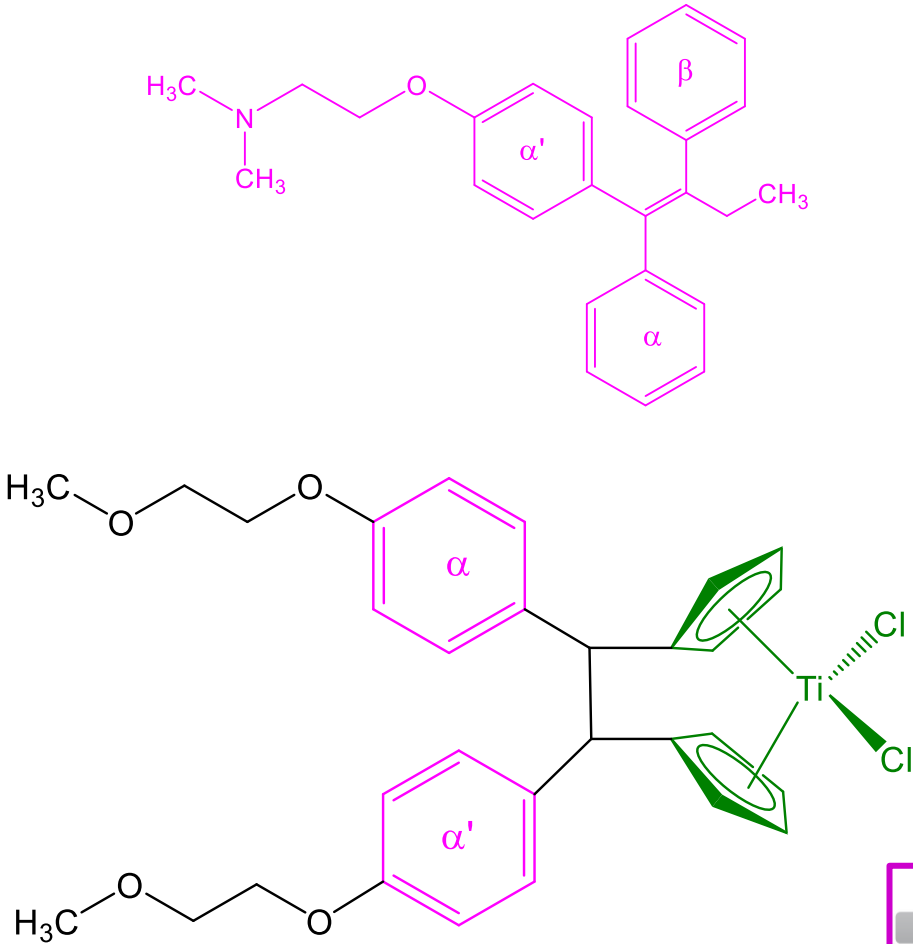
Adapted by Joanne Kelly © 2016.

## Titanocen-dikloridni analozi tamoksifena

- Pripravom kompleksa titanocen-diklorida i tamoksifena očekivala se povećana antiproliferativna aktivnost prema MCF7 stanicama karcinoma dojke. Međutim, supstitucija  $\beta$ -aromatske podjedinice tamoksifena s titanocen-dikloridom rezultirala je neočekivanim estrogenim (proliferativnim) učinkom (usporedivim s učinkom estradiola E2) na hormonski ovisne MCF7 stanice rezultirajućeg titanocen-tamoksifena.

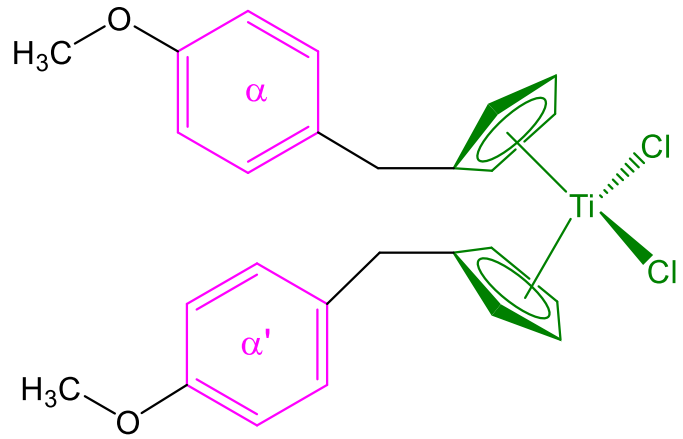
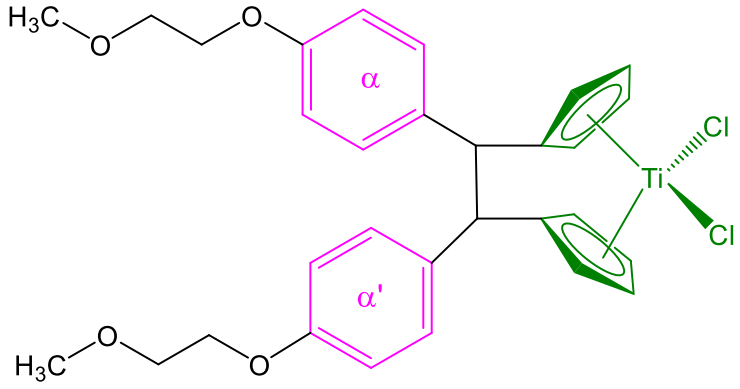
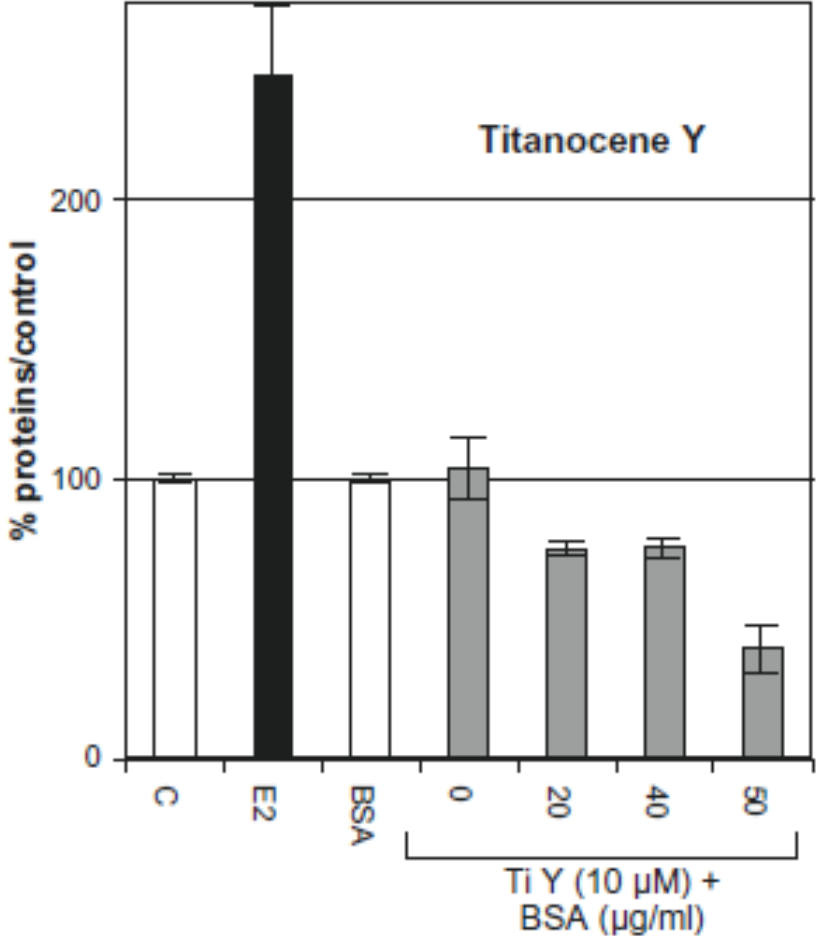
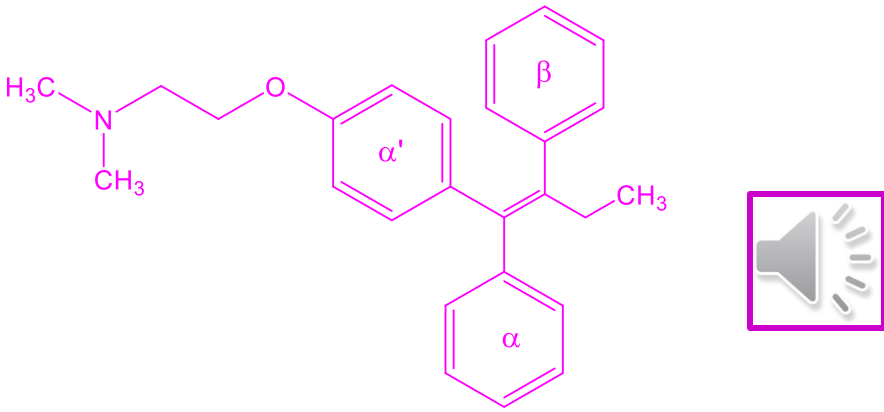


- Da bi se utvrdilo je li opaženi proliferativni učinak svojstven i drugim titanocenskim derivatima, pripravljena su titanocen K i titanocen Y.
- Titanocen K pokazao se visoko-proliferativnim prema MCF7 stanicama čak i pri vrlo niskim koncentracijama (0,5  $\mu\text{M}$ ). Takav proliferativni učinak, koji odgovara estrogenom učinku samog titanocen-diklorida, opažen je i u prisutnosti BSA (bovine serum albumin).



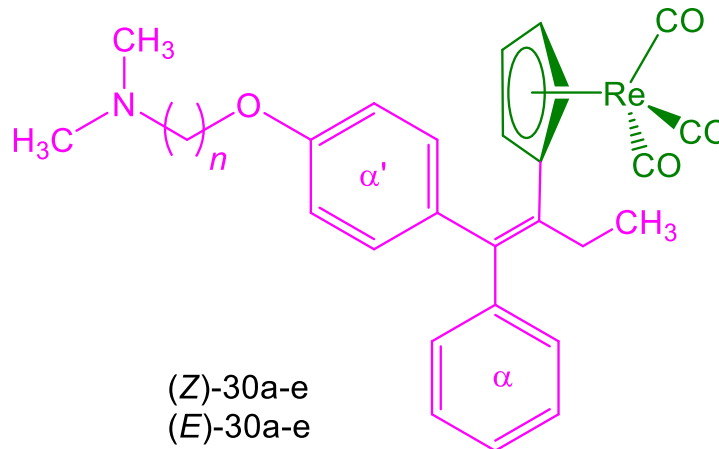
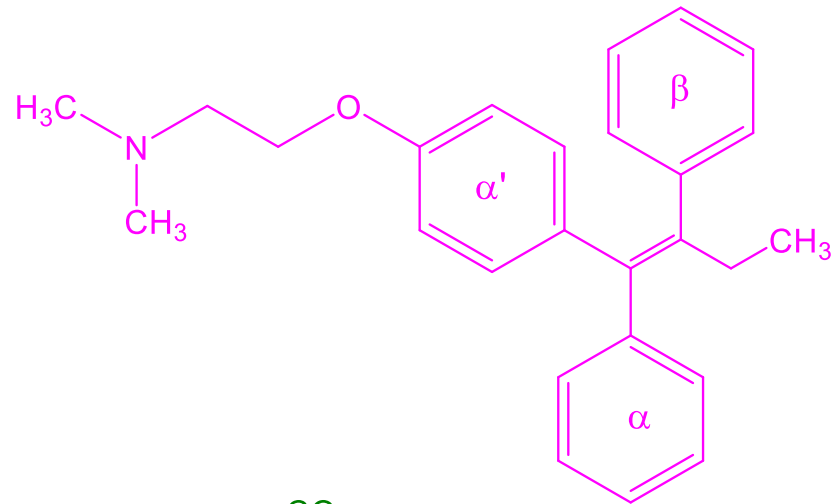
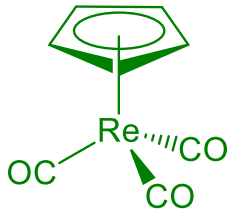


- Za razliku od derivata K, titanocen Y pri 10  $\mu\text{M}$  koncentraciji nema citotoksični učinak protiv MCF7 stanica. Dodatkom BSA njegova se citotoksičnost povećava do 50%. Ovi rezultati upućuju na krucijalnu ulogu serumskih proteina u ekspresiji citotoksičnog učinka titanocenskih kompleksa *in vivo*.



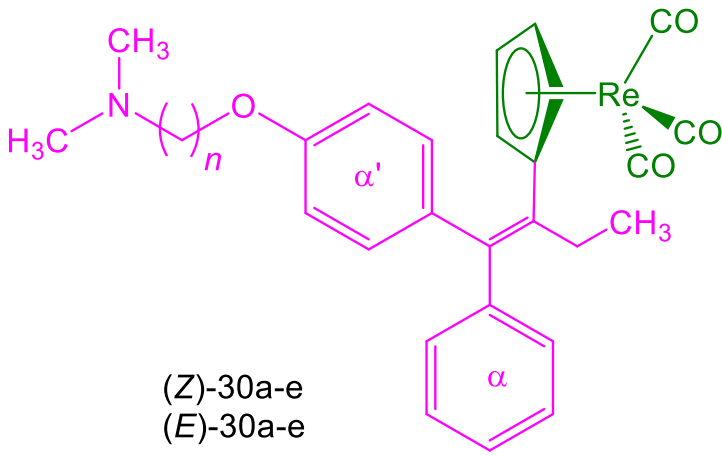
## Ciklopentadienil-renij-trikarbonilni analozi tamoksifena

- Očekivalo se da će supstitucija  $\beta$ -aromatske podjedinice iz tamoksifena s voluminoznijim  $\text{CpRe}(\text{CO})_3$  utjecati na interakcije dimetilaminskog ogranka, odgovornog za antiestrogeni učinak, s veznim mjestom receptora. U tu su svrhu pripremljeni kompleksi s različitim duljinama metilenskih razmaknica ( $n = 2 - 5$  i  $8$ ).

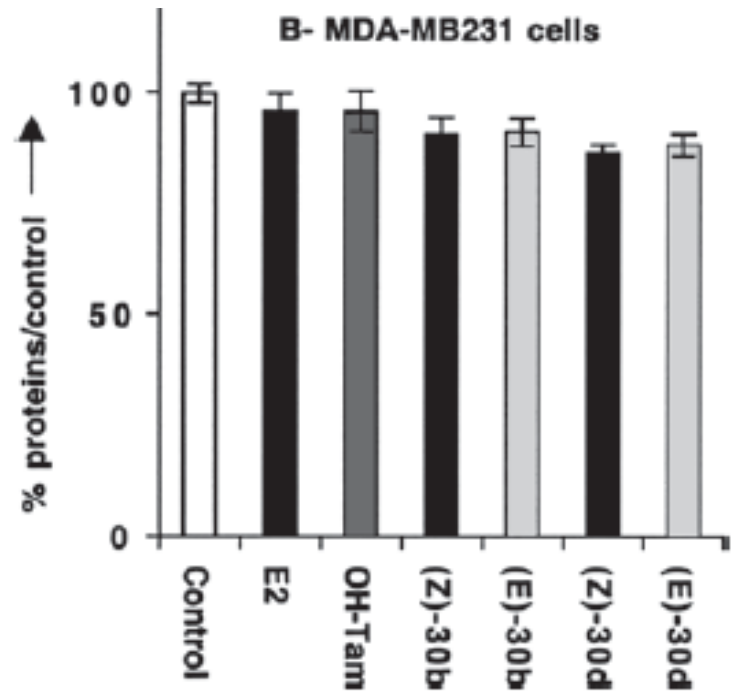
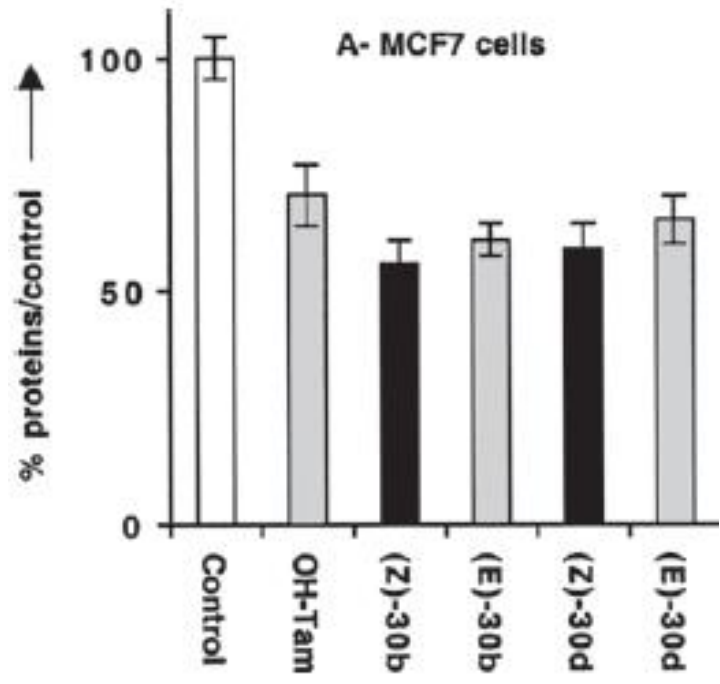


(Z)-30a-e  
(E)-30a-e

- Antiproliferativni učinak na estrogen-ovisne MCF7 stanice ne ovisi o duljini metilenske razmaknice kao niti o izomeru (*E* ili *Z*) i nešto je viši u odnosu na učinak standardnog antiestrogenskog agensa tamoksifena. Antiproliferativni učinak Re-kompleksa (koji je nešto bolji od tamoksifena) pripisuje se njegovoj povećanoj lipofilnosti u odnosu na tamoksifen, te boljoj permeabilnosti kroz staničnu membranu MCF7 stanica.

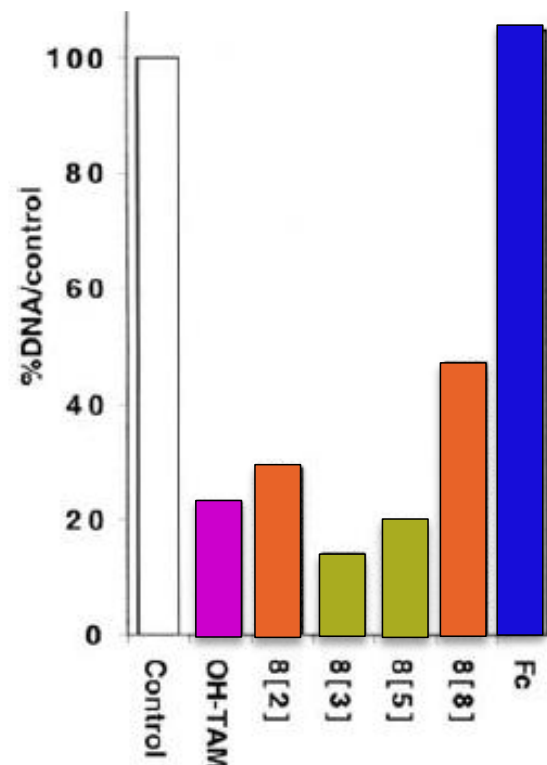
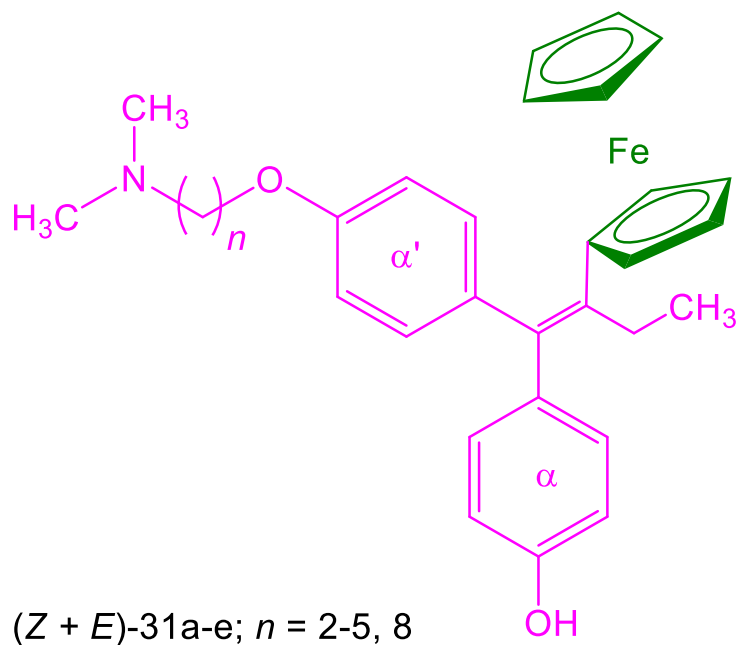


- Stanice estrogen-neovisnog karcinoma dojke MDAMB231 pokazale su se rezistentnima prema estradiolu i tamoksifenu. Osim toga, i antiproliferativni učinak Re-kompleksa je zanemarljiv.

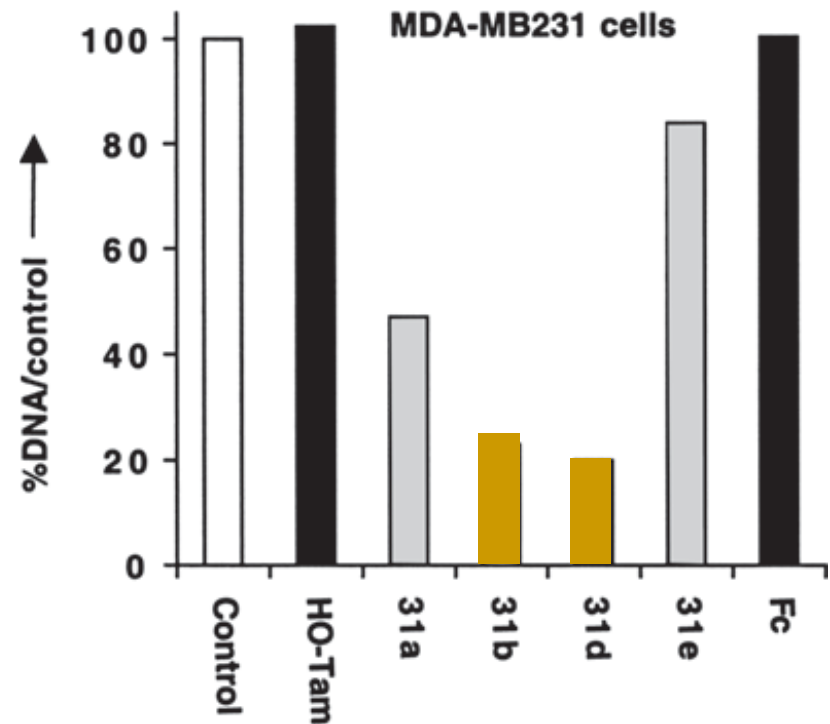
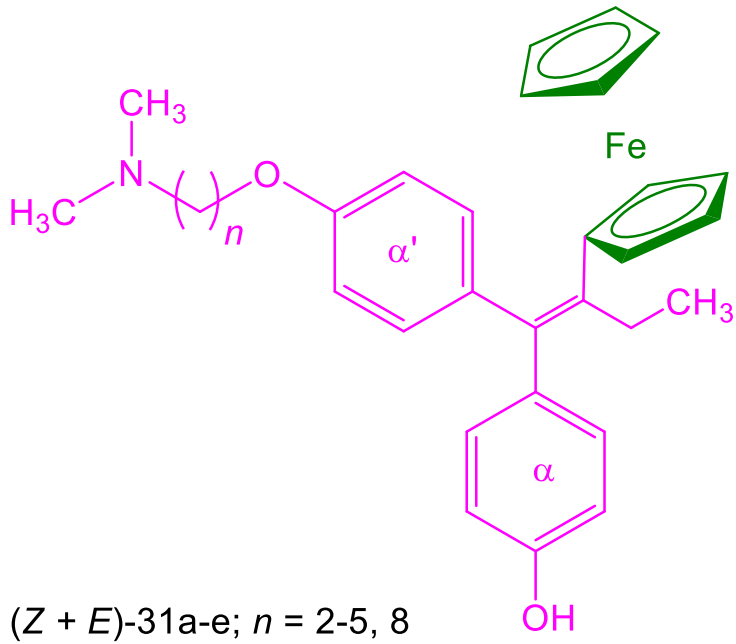




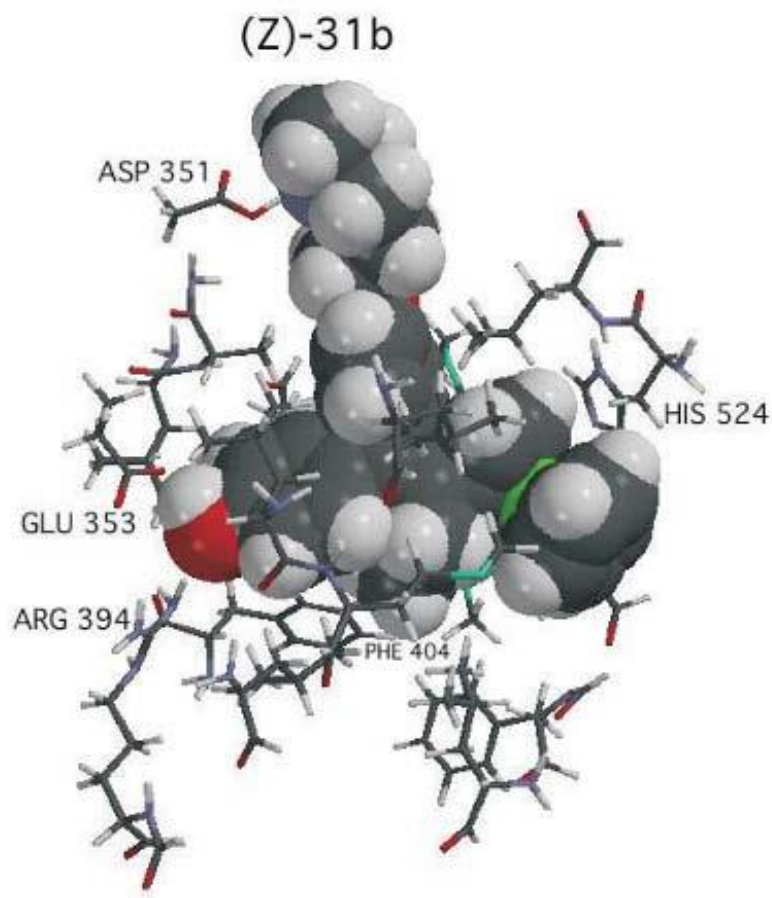
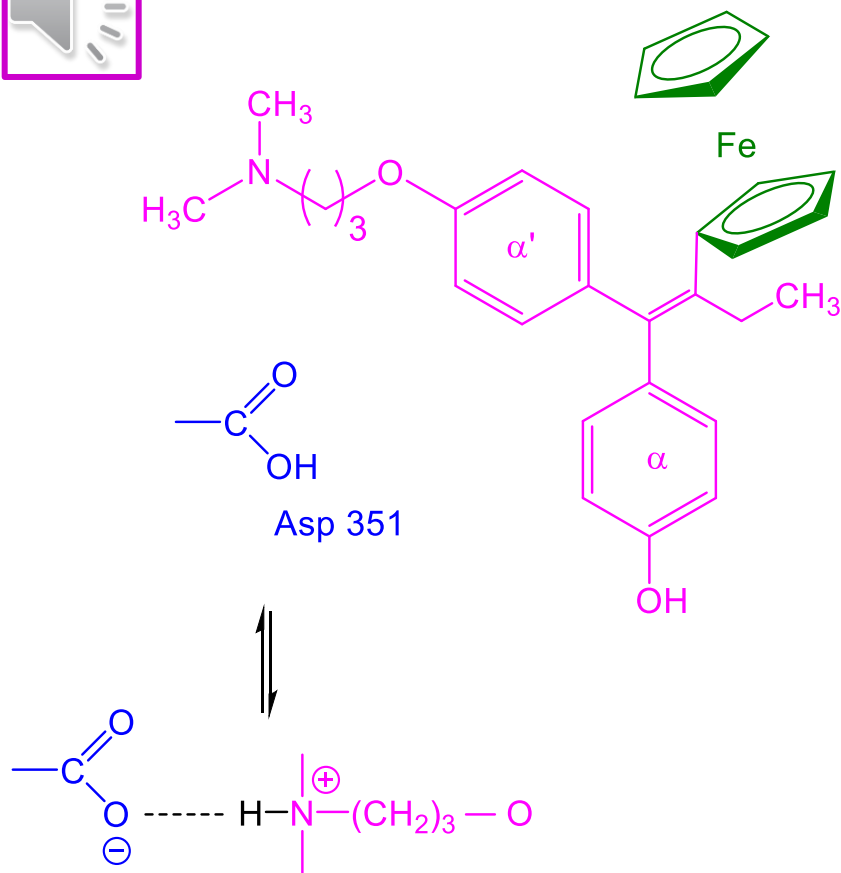
- Zamjena  $\beta$ -aromatske skupine iz tamoksifena s lipofilnijim ferocenom, te umetanje produljenje metilenske razmaknice doveli su značajnog povećanja lipofilnosti rezultirajućeg kompleksa u odnosu na tamoksifen.
- Antiproliferativni učinak testiranih kompleksâ (1  $\mu$ M) na hormonski ovisne tumorske stanice MCF7 ovise o duljini ugljikova lanca: za  $n = 2$  i  $8$  antiproliferativni učinak slabiji je u odnosu na tamoksifen, dok su rezultati za  $n = 3 - 5$  usporedivi s tamoksifenom ili čak i bolji; sam ferocen nema nikakav antiproliferativni učinak.



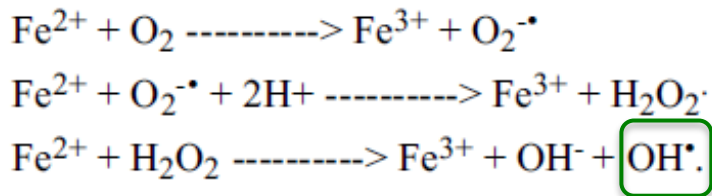
- Za razliku od tamoksifena koji ne utječe na hormonski neovisne tumorske stanice MDAMB231, ferocenski SERMs-i s 3 - 5 metilenskih razmaknica ostvaruju jak citotoksični učinak ( $IC_{50} = 0,5 \mu M!$ ).
- Prikazani ferocenski SERMs-i predstavljaju po prvi puta opisane SERMs-e koji su istodobno aktivni i prema ER(+) i ER(-) tumorskim staničnim linijama!



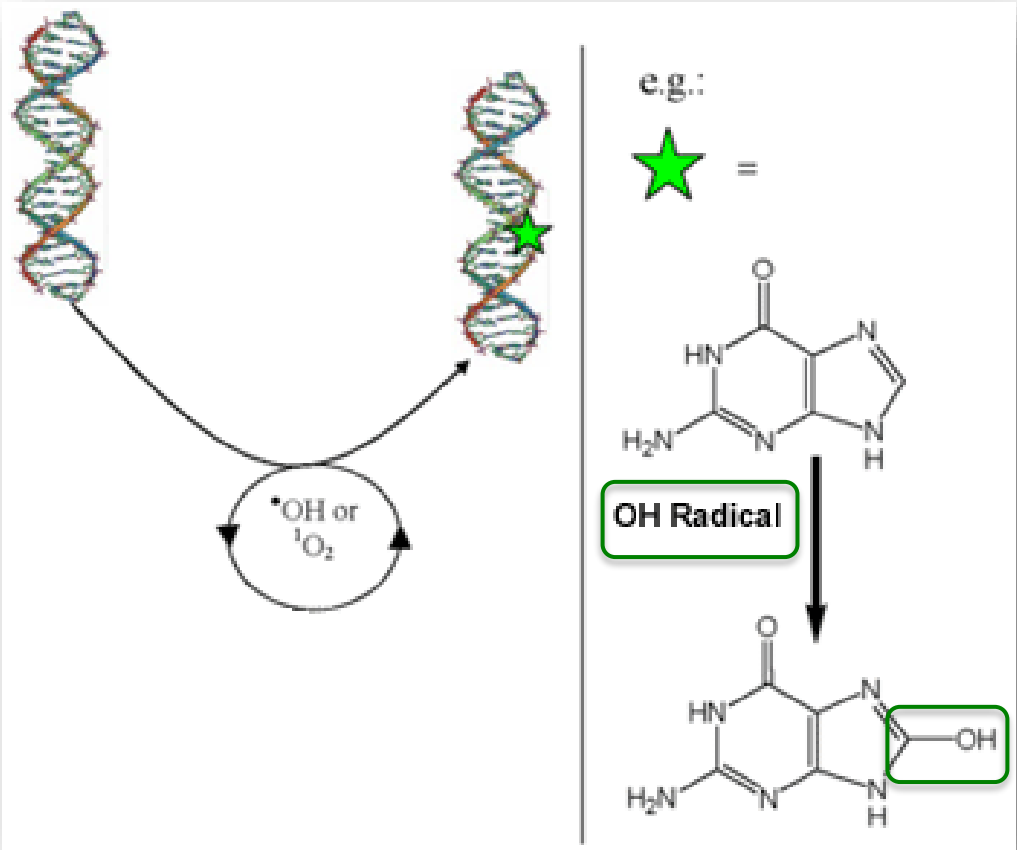
- Mehanizam antiproliferativnog utjecaja ferocenskih SERMs-a nije do kraja razjašnjen. Na temelju molekuskog modeliranja može se pretpostaviti da se ferocifeni vežu u aktivno mjesto estrogenskog receptora koje svojom veličinom više odgovara ferocenilnoj (572Å) nego fenilnoj skupini (413Å). Pri tom interakcije His524 i ferocenilne grupe, te Asp351 i dušika iz bočnog ogranka (odgovornog za antiestrogeni učinak) osigurava povoljno vezivanje.



- Genotoksičnost ferocifena posljedica je Fentonove oksidacije ferocena ( $\text{Fe}^{2+}$ ) u citotoksični fericenijev ion ( $\text{Fe}^{3+}$ ).



- Nastali superoksid radikal slabo je reaktivan prema DNA, ali dovodi do nastanka vrlo reaktivnog **hidroksidnog radikala** koji može uzrokovati leziju DNA (oštećenje baze) i apoptozu.

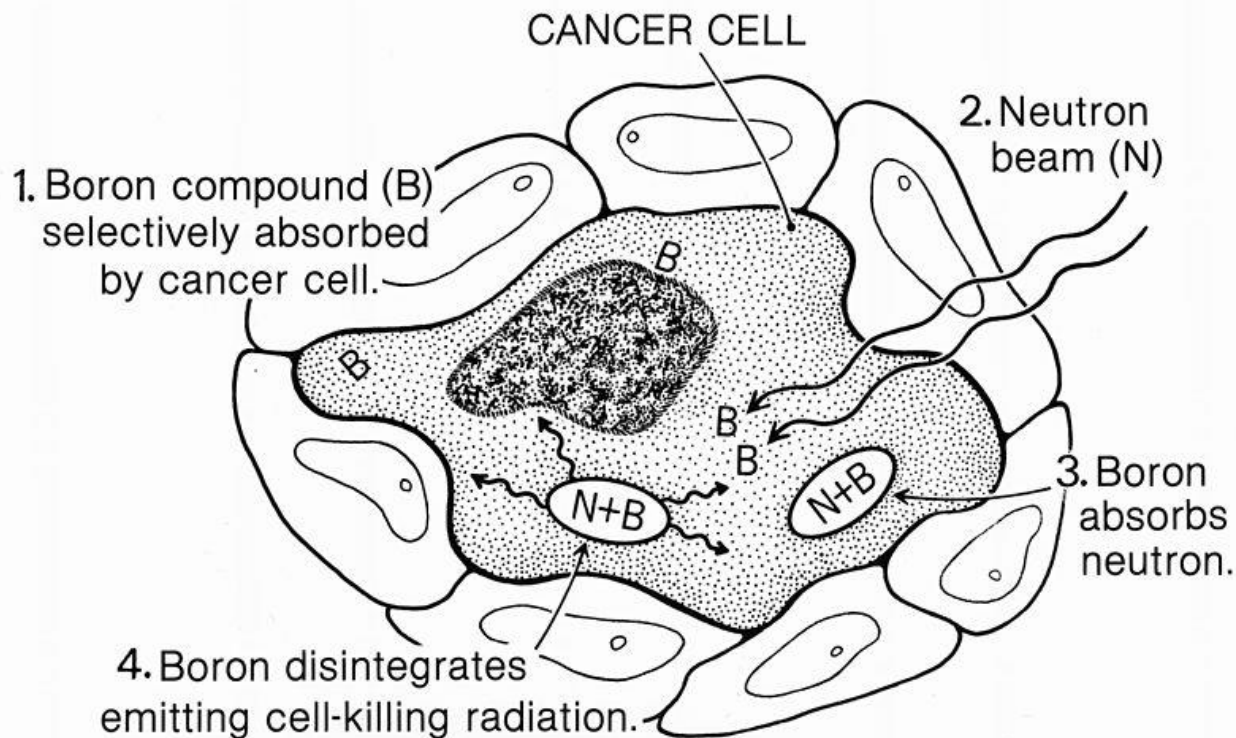


## Karboranski derivati s estrogenskim svojstvima

- Terapija karcinoma zračenjem u prisutnosti bora (BNCT, boron neutron capture therapy): kad se stanice tumora u koje je ugrađen veliki broj atoma bora izlože zračenju neutronima dolazi do njihovog uništenja, bez negativnih posljedica na okolno zdravo tkivo.

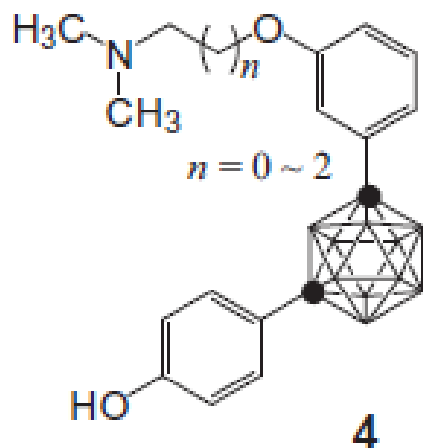


### Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)





- Opisan je *m*-karboranski kavez kao hidrofobna struktura za pripravu ER (estrogenski receptor) agonista **4** koji sadrži alkilamino-skupinu. ER-vezni afinitet spoja **4a** koji sadrži *N,N*-dimetilaminoetoksi-skupinu 5 je puta veći u odnosu na tamoksifen **1**. Daljnjim produljenjem alkilamino-lanca vezni afinitet za ER u spoju **4c** povećan je 55 puta u odnosu na tamoksifen **1** i 11 puta u odnosu na **4a**. Time je indicirano da se alkilamino-lanac u *m*-položaju dobro uklapa u šuplinu veznog mjesta iz ER. Osim toga, terminalna tercijarna amino-skupina iz **4c** uspostavlja vodikove veze s aminokiselinskim ostacima iz veznog mjesta ER.



**Table 1**

Relative binding affinity (RBA) of test compounds versus specific [<sup>3</sup>H]estradiol (4 nM) binding with human recombinant ER $\alpha$

Compound	Position	Substituent	RBA <sup>a</sup>
<b>1</b>	<i>p</i> -	-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.5
<b>4a</b>	<i>m</i> -	-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	7.4
<b>4b</b>	<i>m</i> -	-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	8.4
<b>4c</b>	<i>m</i> -	-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	83



• Biološka aktivnost testiranih spojeva evaluirana je testom proliferacije MCF-7 estrogen-ovisne stanične linije. U tablici su prikazane  $EC_{50}$ - i  $IC_{50}$ -vrijednosti kao parametri agonističke i antagonističke aktivnosti. Agonistički učinak pokazan je relativnom maksimalnom učinkovitošću ( $E_{max}$ ), u odnosu na 100%-tnu učinkovitost estradiola. Spoj **4a** koji ima isti aminoalkilni lanac kao i tamoksifen **1**, i to na *m*-položaju, pokazao je potentnu ER-agonističku aktivnost ( $EC_{50}=4,7$  nM) te nisku  $E_{max}$ -vrijednost (63%). Spoj **4b** s dimetilaminopropilnom skupinom pokazao je najnižu  $EC_{50}$ - i  $E_{max}$ -vrijednost među testiranim spojevima. Osim toga, pokazao je i 10 puta bolju ER-antagonističku aktivnost u odnosu na tamoksifen **1**. Iako je spoj **4c** pokazao najveći vezni afinitet za ER, parametri njegove biološke aktivnosti ( $EC_{50}$ ,  $E_{max}$  i  $IC_{50}$ ) slični su onima kod **4a**. Tim je rezultatima pokazano da je dimetilaminopropilna skupina iz **4b** najpogodnija za indukciju agonističkog učinka u ovoj seriji spojeva, a njegove niske  $IC_{50}$ -vrijednosti sugeriraju da dimetilaminopropilna skupina



na inhibira koaktivator gena jer pomiče uzvojnici iz ER na neodgovarajući položaj. Spoj **4b** pokazao je i najnižu  $E_{max}$ -vrijednost. Svi ovi rezultati izuzetno su korisni za molekularni dizajn budućih karboranskih ER-modulatora.

**Table 2**

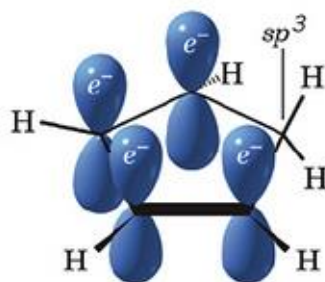
Biological activities of the test compounds on MCF-7 cell proliferation

Compound	Position	Substituent	$EC_{50}$ <sup>a</sup> (nM)	$E_{max}$ <sup>b</sup> (%)	$IC_{50}$ <sup>c</sup> ( $\mu$ M)
<b>1</b>	<i>p</i> -	-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	8.2	78	4.4
<b>4a</b>	<i>m</i> -	-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4.7	63	6.5
<b>4b</b>	<i>m</i> -	-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> - N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.4	50	0.4
<b>4c</b>	<i>m</i> -	-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	2.6	62	4.3

# Bioorganometalna kemija ferocena

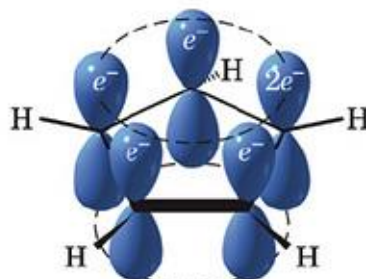
- Metaloceni, “sendvič-molekule”: atom metala (M = Fe, Co, Cr, Ni, V,...) smješten je između dvaju ciklopentadienilnih (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>) prstena.

- Ferocen (M = Fe) sastoji se iz dvaju aniona (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub><sup>-</sup>) i jednog kationa Fe<sup>2+</sup> (4s<sup>2</sup>3d<sup>4</sup>):

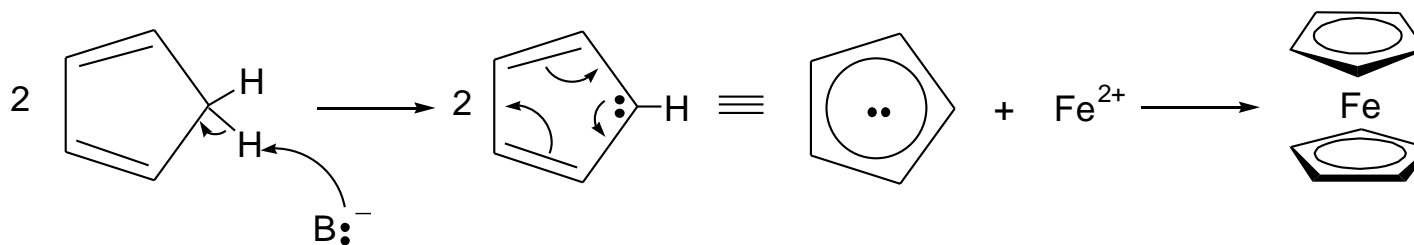
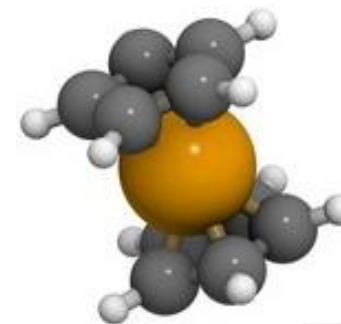
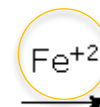


Cyclopentadiene

strong base  
→



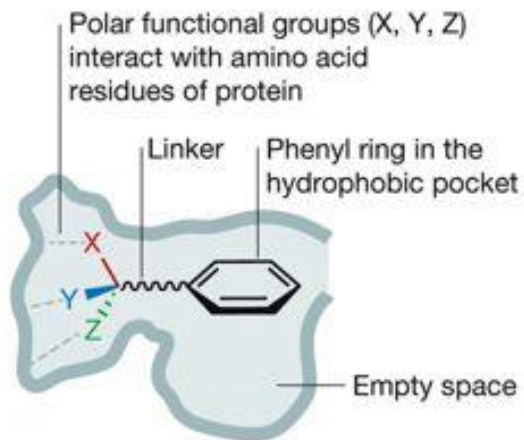
Cyclopentadienyl anion



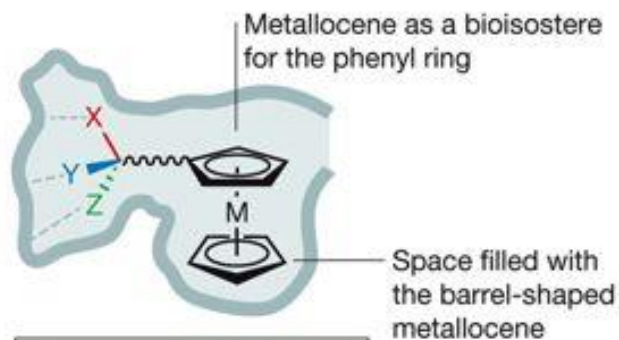
- Svoju veliku stabilnost duguje prisutnosti 18 valentnih elektrona [Fe(0) = 8 valentnih elektrona (4s<sup>2</sup>3d<sup>6</sup>) + 2 Cp<sup>•</sup> = 2 × 5 valentnih elektrona] što mu daje konfiguraciju plemenitog plina.
- 1973. Nobelova nagrada G. Wilkinsonu i E. O. Fischeru za utvrđivanje strukture ferocena i rezultate na području organometalnih sendvič-spojeva.



## a Ferrocene (and metallocene) as a bioisostere



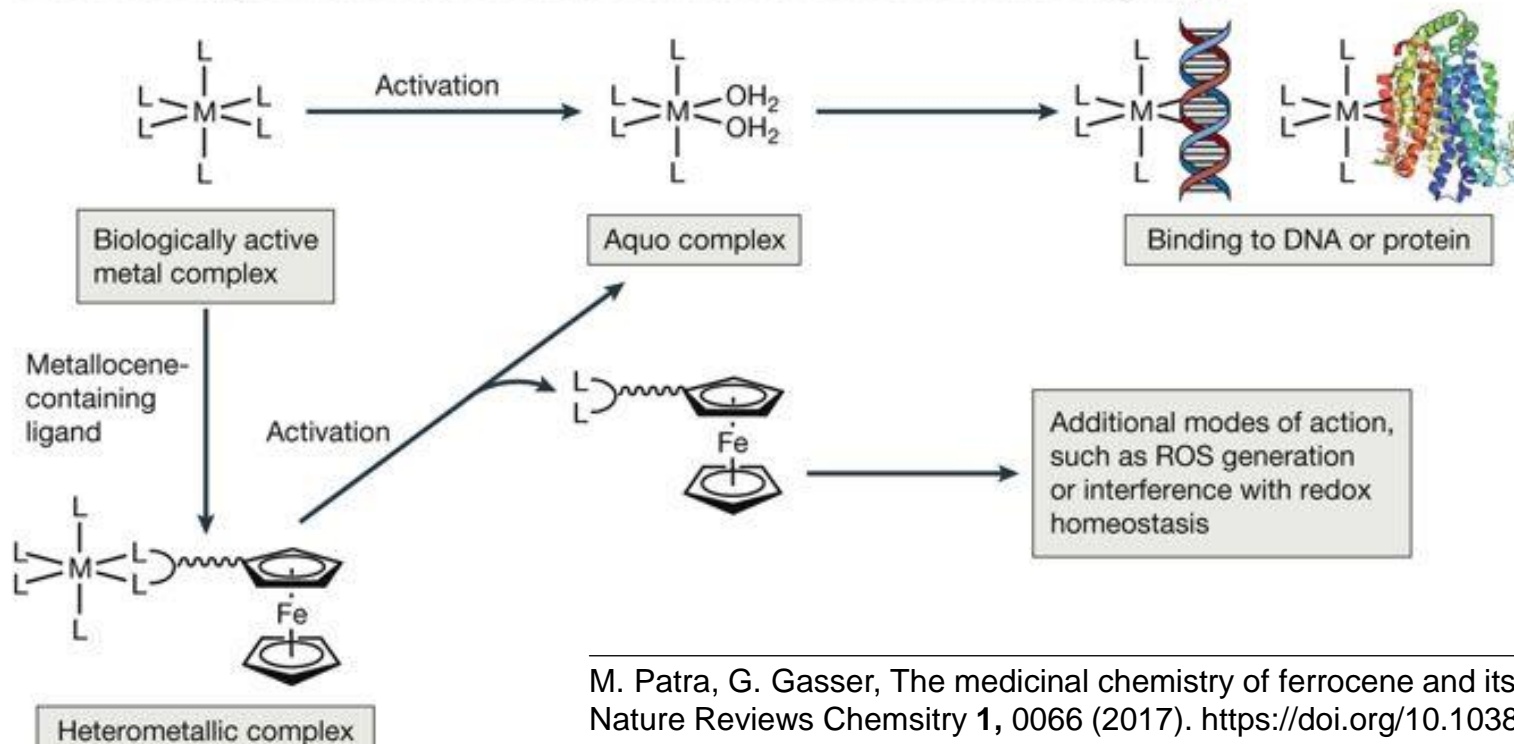
Organic inhibitor bound to a target protein



Organometallic inhibitor bound to a target protein

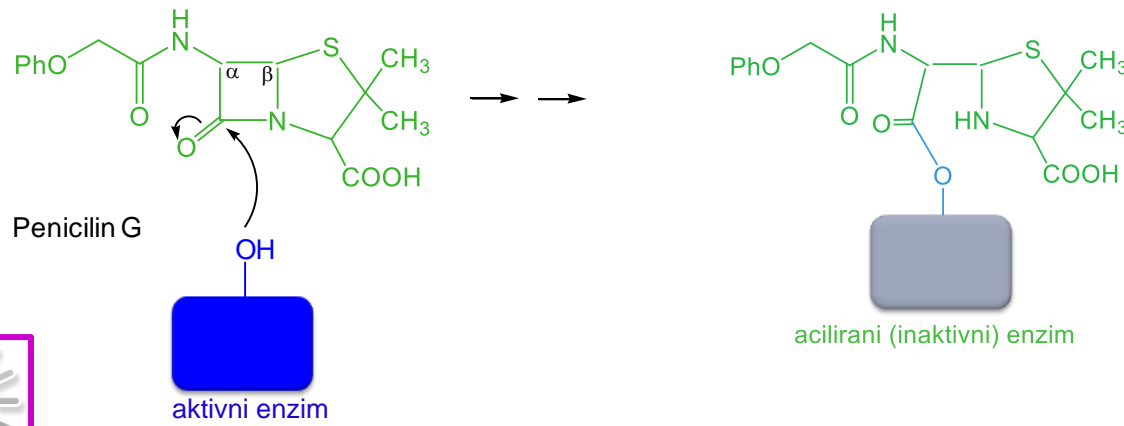


## b Ferrocene-appended heterometallic compounds for multi-modal targeting

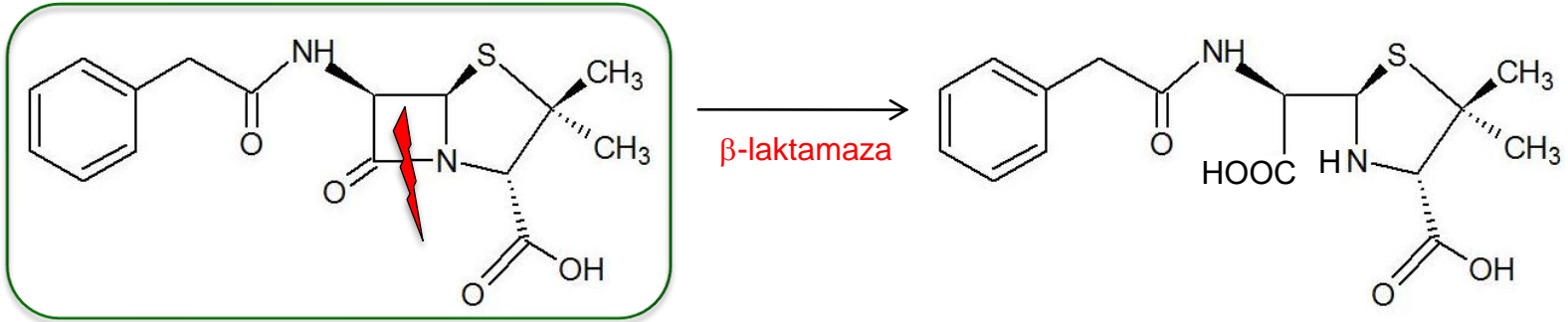


- Metaloceni su male, rigidne, redoks-aktivne, aromatske i lipofilne molekule koje lako prolaze kroz staničnu membranu. Stoga se uobičajeno aromatska komponenta bioaktivne molekule zamjenjuje se aromatskom metalocenskom jedinicom, u cilju unapređenja biološke aktivnosti nastalog konjugata. Takav je pristup primijenjen u pokušaju rješavanja problema antibiotske rezistencije bakterija koje proizvode  $\beta$ -laktamazu.

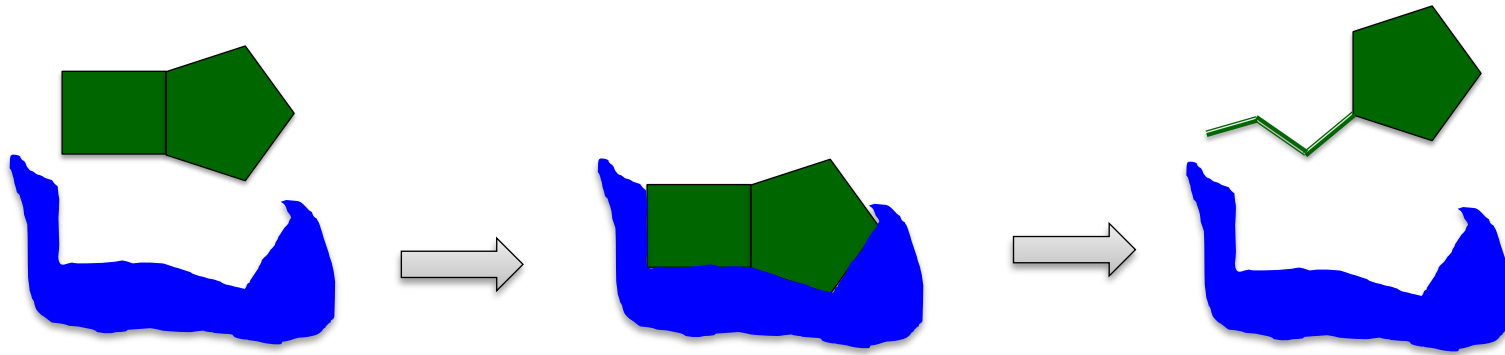
- $\beta$ -Laktami: ciklički amidi nađeni u tri važne skupine antibiotika (penicilinu, cefalosporinu i karbapenemu); inhibiraju sintezu stanične stijenke aciliranjem **odgovornog enzima** (inaktivacija)!



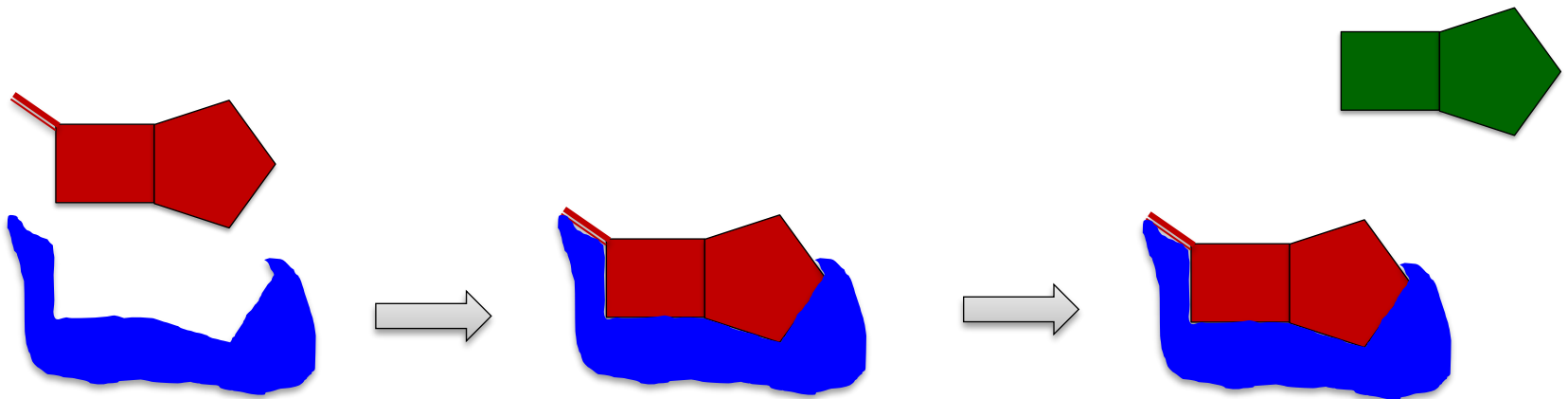
- $\beta$ -Laktamaza razgrađuje  $\beta$ -laktamski prsten prisutan u penicilinu i cefalosporinu. Zamjenom aromatske podjedinice iz penicilina i cefalosporina s ferocenom pripravljena je serija potencijalnih organometalnih inhibitora  $\beta$ -laktamaze.



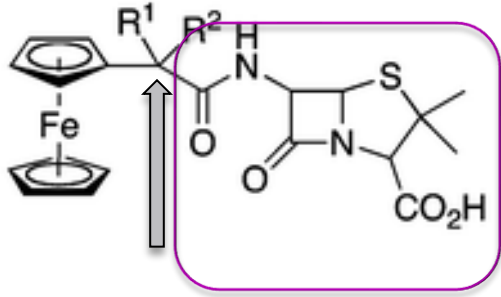
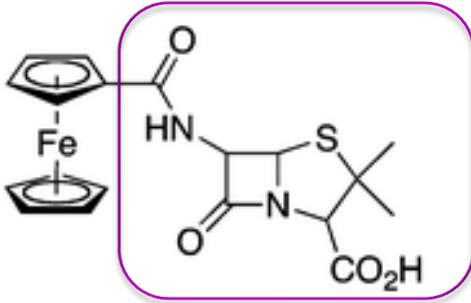
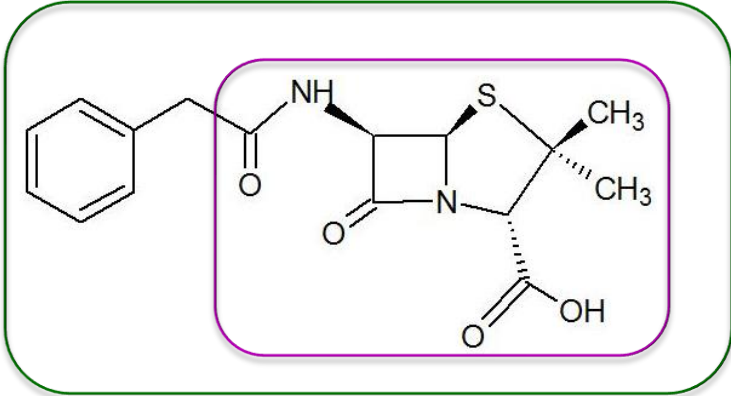
## Hidroliza $\beta$ -laktama djelovanjem $\beta$ -laktamaze



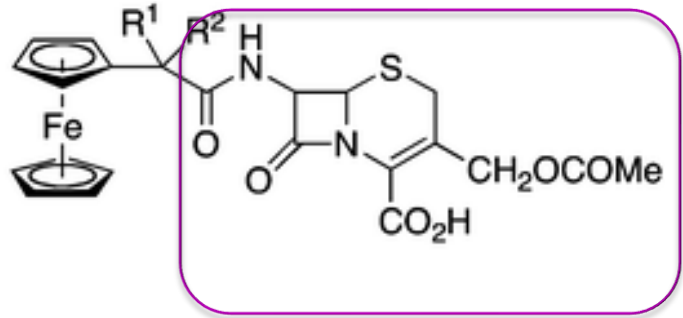
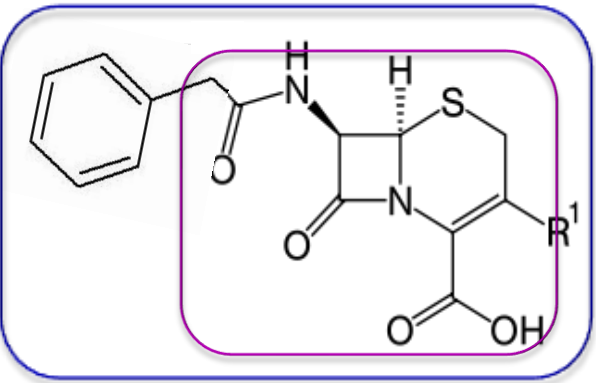
Vezivanje **inhibitora**  $\beta$ -laktamaze sprječava hidrolizu  $\beta$ -laktama



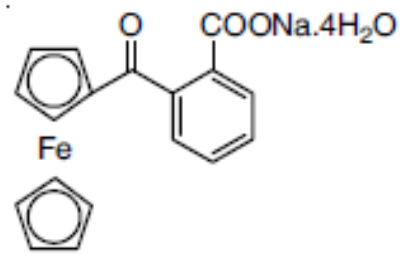
- Direktno vezani ferocenski analozi **penicilina** nisu pokazali inhibitorni učinak, dok je umetanjem metilenskih razmaknica u ferocenskom inhibitoru antimikrobna aktivnost penicilina obnovljena.



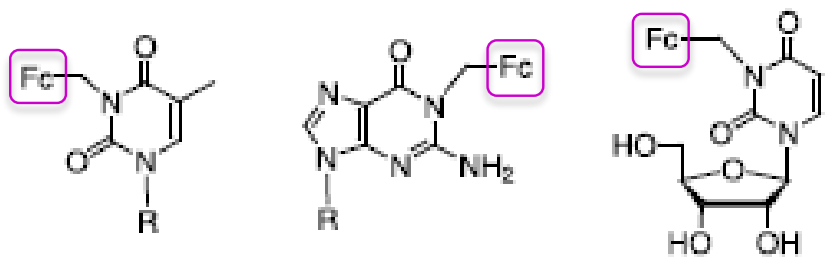
- Unatoč pokazanoj inhibitornoj aktivnosti, ferocenski analozi penicilina i **cefalosporina** kao inhibitori  $\beta$ -laktamaze nisu komercijalizirani.



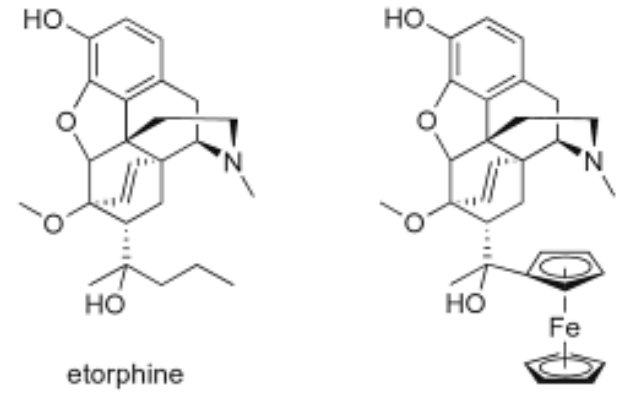
- Primjer komercijalno dostupnog ferocenskog lijeka je feroceron koji je razvijen 1971. u tadašnjem Sovjetskom Savezu gdje se koristio za liječenje anemije i bolesti zubnog mesa.



- Testovi na HIV-1, HBV (virus hepatitisa B), YFV (virus žute groznice) nisu pokazali značajnu antiviralnu ili citotoksičnu aktivnost ferocenskih (Fc) derivata purinskih i pirimidinskih baza.

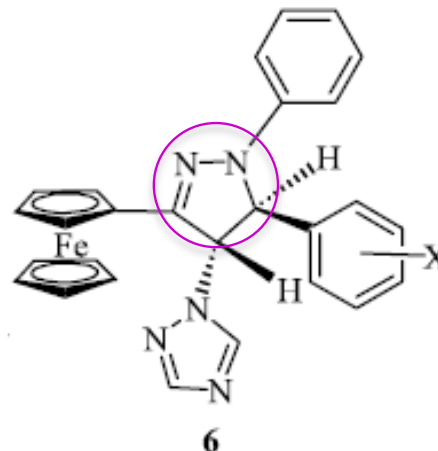


- Ferocenski analog opioida etorfina inhibiraju proliferaciju stanica karcinoma dojke.





- Ferocenski analozi **dihidropirazola**, male bioaktivne molekule koja je kao strukturni motiv prisutna u brojnim farmakološki aktivnim spojevima, testirani su kao antibakterijski agensi, ali nisu dali ohrabrujuće rezultate.



Antibacterial activity of ferrocenyl-substituted dihydropyrazole derivatives

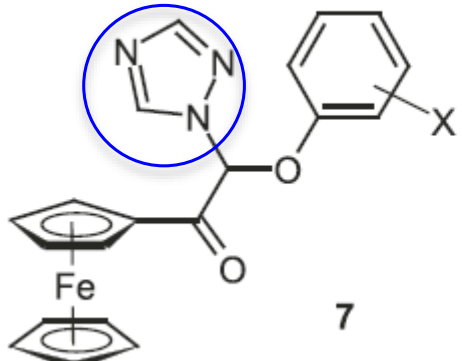
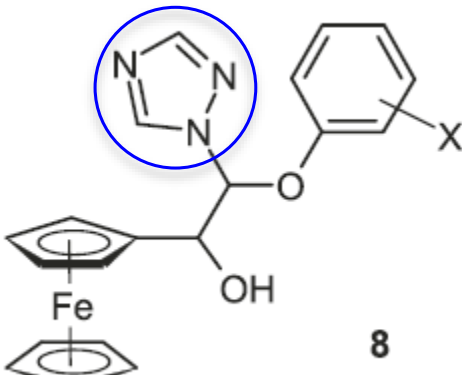
Entry	Substituent X	Relative inhibitory ratio (%)		
		<i>I. clavispora</i>	<i>B. lactucae</i>	<i>C. fulvum</i>
6a	H	6.7	22.2	4.5
6b	2-Cl	0	0	13.6
6c	3-Cl	13.3	22.2	9.1
6d	4-Cl	0	0	13.6
6e	2,4-Cl <sub>2</sub>	6.7	0	0
6f	4-CH <sub>3</sub>	13.3	0	4.5
6g	4-OCH <sub>3</sub>	6.7	11.1	9.1

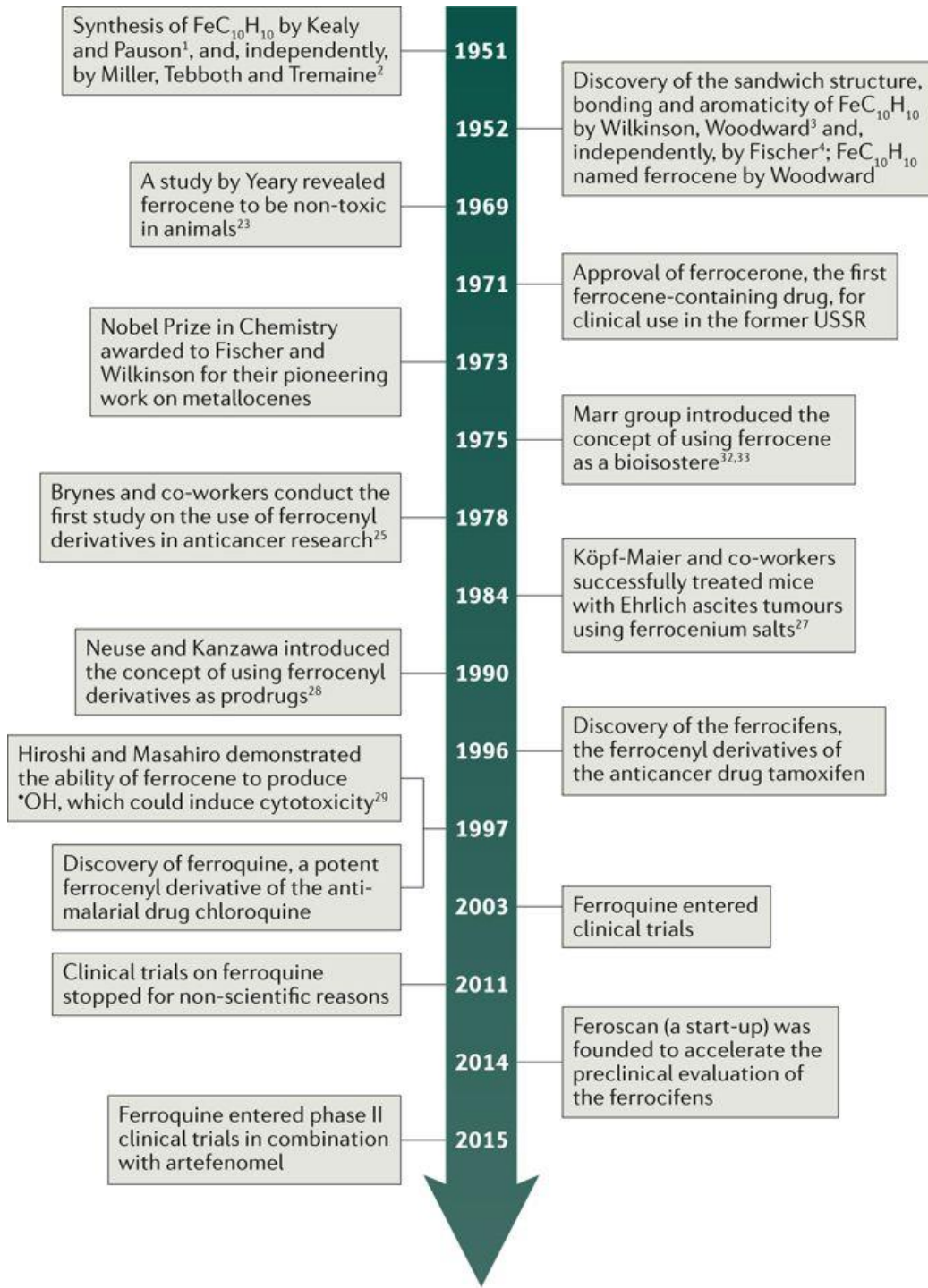
- Ispitivana je i moguća primjena ferrocenskih analoga **triazola** u agronomiji za suzbijanje gljivičnih infekcija i stimulaciju rasta biljaka.



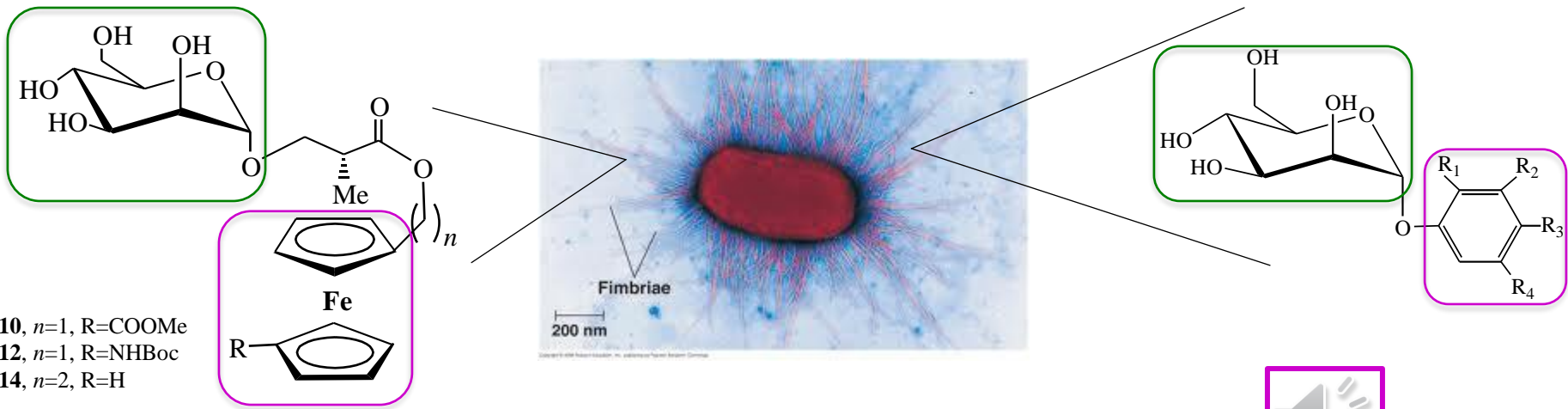
**Table 1 Selected biological activities of 1H-1,2,4-triazole based ferrocenyl agrochemicals**

Entry	Ferrocene derivative	X	Fungicidal activity, %		Plant-growth regulation activity, %
			Powdery mildew	Brown soil	

			<i>I. davispora</i>	<i>A. mali</i>	
 <p style="text-align: center;"><b>7</b></p>	4-Cl	15.6	20.0	+60.0	
	4-NO <sub>2</sub>	23.3	20.0	+68.1	
	2-naphth <sup>a</sup>	15.6	20.0	+98.2	
 <p style="text-align: center;"><b>8</b></p>	H	0	0	+309.4	
	4-Cl	33.3	20.0	+118.9	
	4-NO <sub>2</sub>	25.0	0	+266.3	
	2-naphth <sup>a</sup>	10.0	0	+279.3	



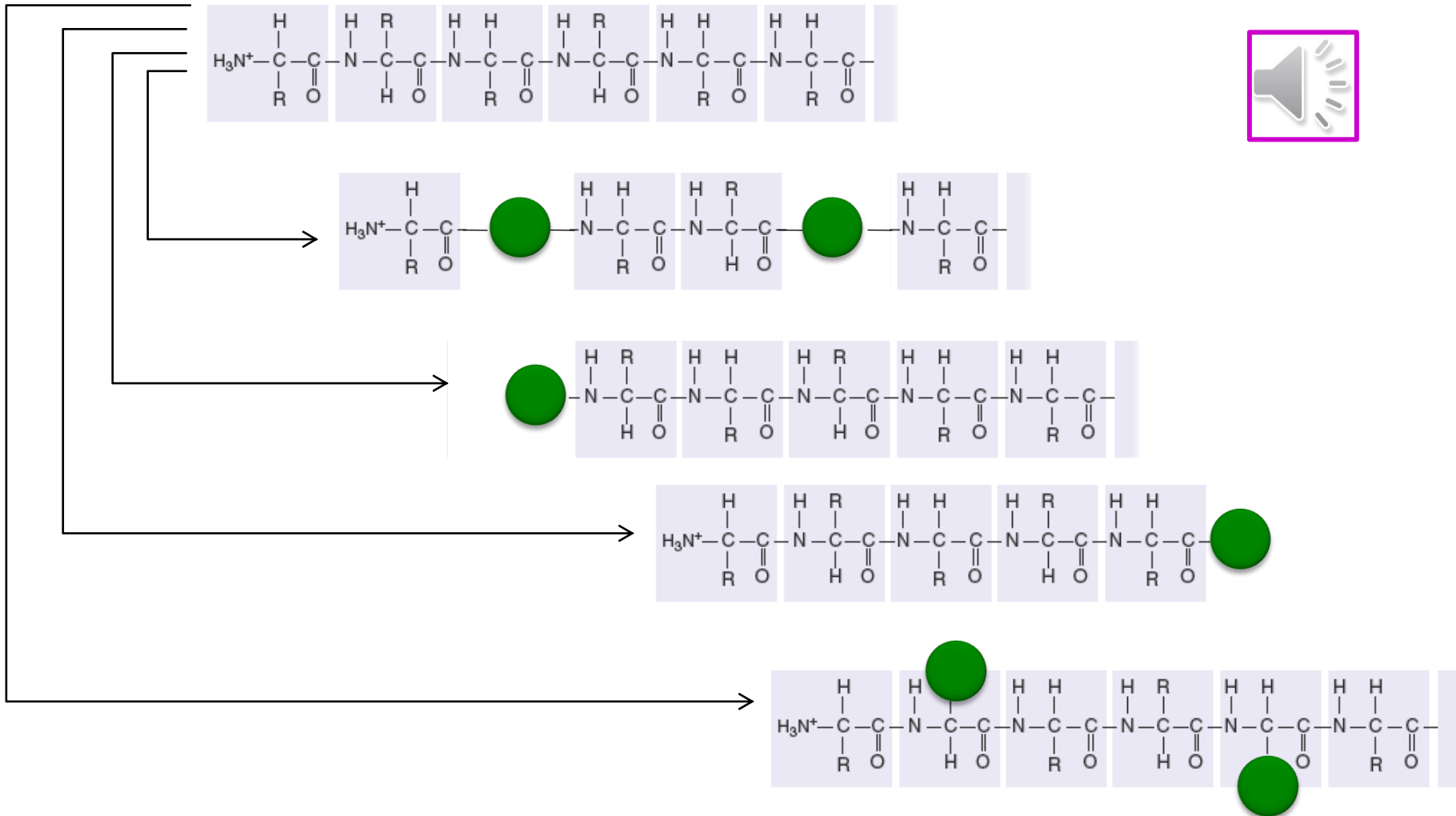
- Ferocenski konjugati s manozom testirani su kao inhibitori hemaglutinacije uropatogene E. coli.
- Infekcija E. coli posljedica je hemaglutinacije uzrokovane prepoznavanjem bakterijskih proteina (lektina, lat. *legere, birati*) i **manoze** s površine stanice. Vezno mjesto bakterijskog lektina ograđeno je dvama tirozinskim ostacima (“tyrosine gate”), te se uvođenjem **aromatskog aglikona** induciraju  $\pi-\pi$  interakcije čime se afinitet aromatskog manozida za bakterijski lektin povećava i do 600 puta.



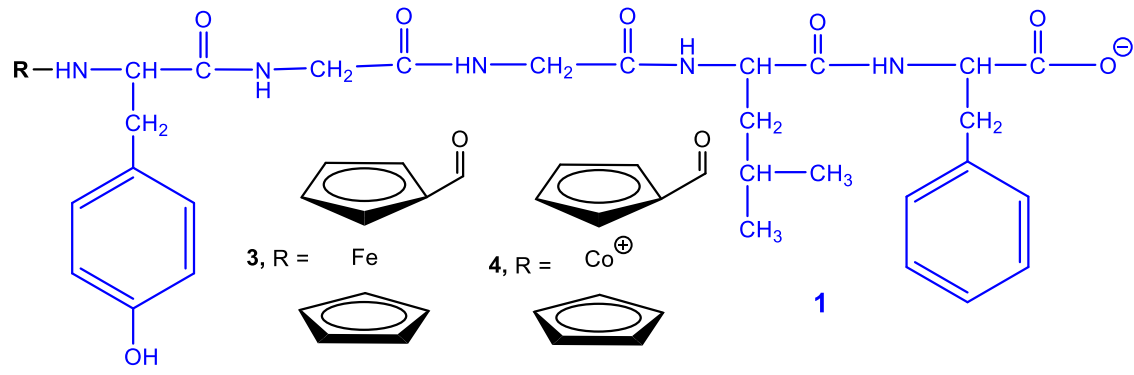
- Ferocenom modificirani konjugati s manozom ostvaruju (skromniji) inhibicijski učinak na hemaglutinaciju E. coli!

## Organometalni konjugati s peptidima

- Organometalni spojevi koriste se za obilježavanje prirodnih peptida i proteina. Pri tom se jedna ili više aminokiselina iz peptidne sekvencije supstituira se **organometalnim derivatom** ili se **organometalni fragment** ugrađuje se na *C*- ili *N*-terminus peptida ili u bočni ogranak.



- Prvi biogeni peptid podvrgnut modifikacijama s organometalnim spojevima je [Leu<sup>5</sup>]-enkefalin (**1**), penta-peptid prisutan u različitim tkivima koji uslijed velike polarnosti ne može savladati krvno-moždanu barijeru. Njegova je lipofilnost povećana konjugiranjem s lipofilnim organometalnim spojevima (ferocenom i kobaltocenom) na *N*-terminusu prirodnog peptida (*N*-terminus je ključan za vezivanje s receptorom).

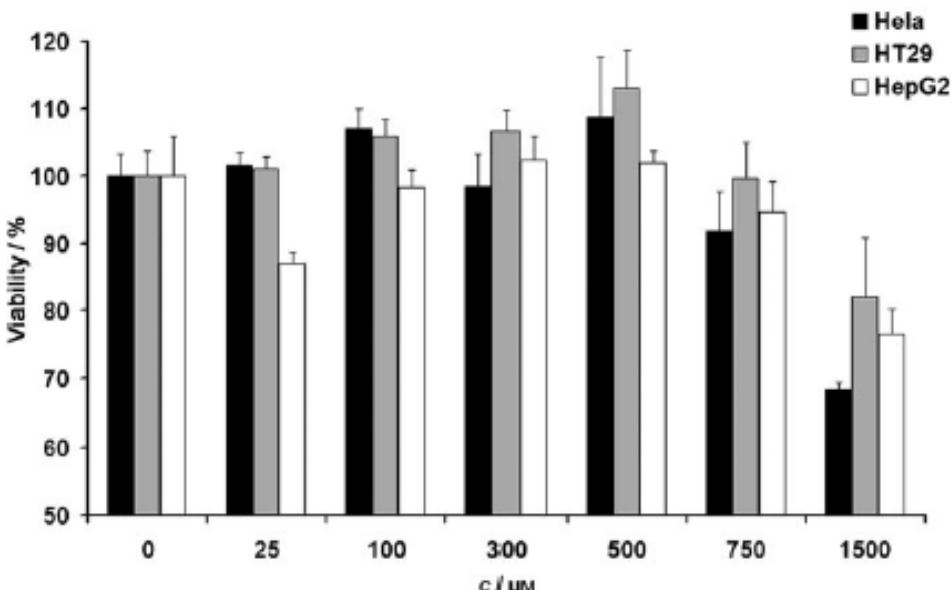


**Table 2.** Apparent permeation coefficients ( $P_{app}$  values). All values were determined in triplicate (mean value and standard error).

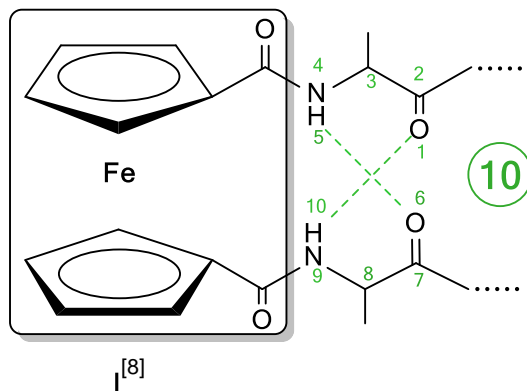
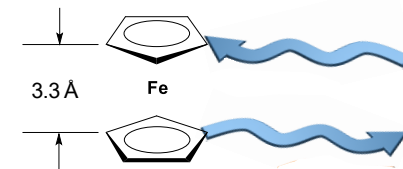
Compound	$P_{app}$ [cm s <sup>-1</sup> ]	Error [cm s <sup>-1</sup> ]	Compound	$P_{app}$ [cm s <sup>-1</sup> ]	Error [cm s <sup>-1</sup> ]
<b>1</b>	$0.38 \times 10^{-5}$	$0.04 \times 10^{-5}$	<b>2</b>	$0.57 \times 10^{-5}$	$0.17 \times 10^{-5}$
<b>3</b>	$0.68 \times 10^{-5}$	$0.13 \times 10^{-5}$	<b>4</b>	$0.52 \times 10^{-5}$	$0.12 \times 10^{-5}$



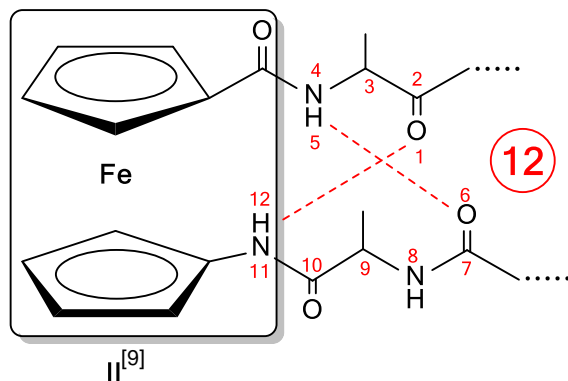
- Očekivana citotoksičnost konjugata **3** protiv triju kanceroznih staničnih linija (HeLa, HT29 i HepG2) je izostala. Citotoksična aktivnost opažena je tek pri vrlo visokim koncentracijama (mM) i pripisuje se Fentonovoj oksidaciji koja izaziva oštećenja staničnih membrana.



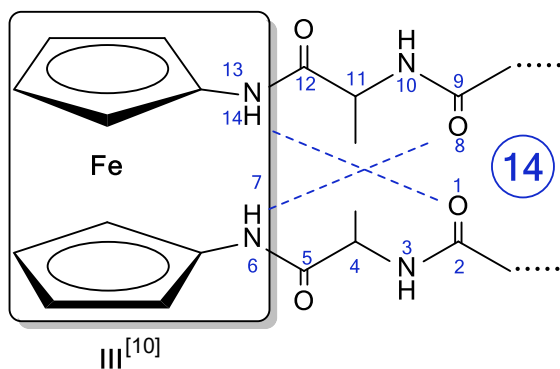
- Ferocenski kalupi tipa I-III sintetizirani su i testirani kao začetnici okreta u izvedenim konjugatima s malim peptidima.



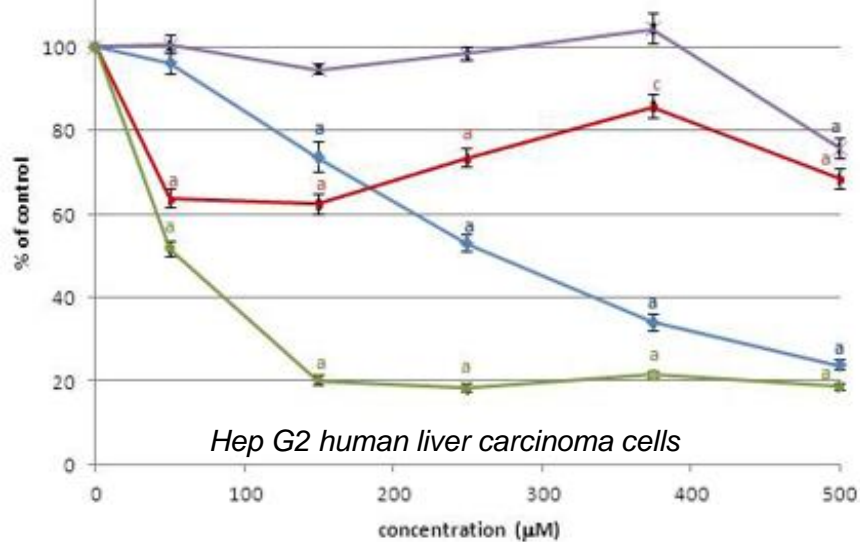
- <sup>[8]</sup> (a) T. Hirao et al, *Chem. Commun.*, 1998, 1963-1964.; (b) T. Hirao et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 68-75.; (c) T. Hirao et al, *Organometallics*, 2001, **20**, 1008-1013.; (d) T. Hirao et al, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 5265-5268.; (e) T. Hirao et al, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 31-34.; (f) T. Hirao et al, *J. Organomet. Chem.*, 2009, **694**, 806-811.; (g) T. Hirao et al, *Acc. Chem. Res.*, 2010, **43**, 1040-1051.



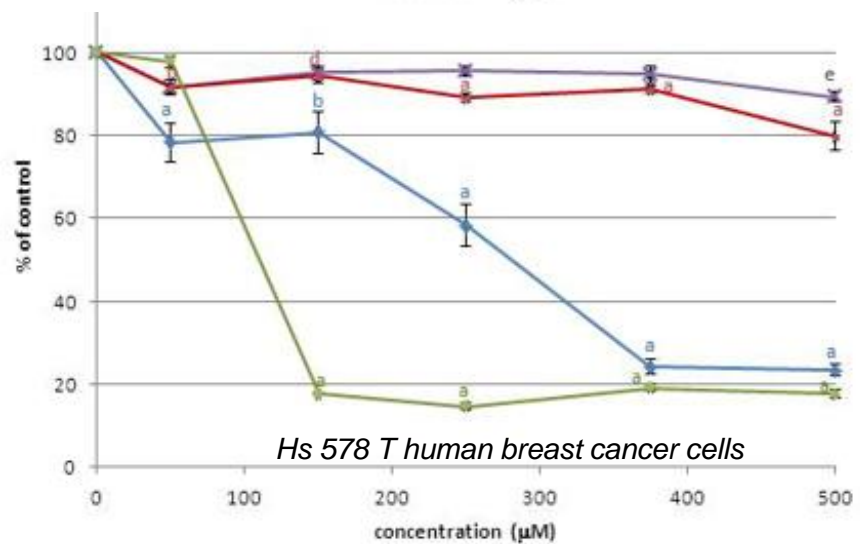
- <sup>[9]</sup> (a) L. Barišić et al, *Chem. Commun.*, 2004, 2004-2005.; (b) L. Barišić et al, *Chem. Eur. J.* 2006, **12**, 4965-4980.; (c) L. Barišić et al, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 4019-4021.; (d) V. Rapić et al, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2007, **14**, 2014-2024.; (e) V. Rapić et al, *Organometallics*, 2009, **28**, 2028-2037.; (f) V. Rapić et al, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2010, 1089-1097.; (g) L. Barišić et al, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2012, **11**, 1810-1822.; (h) L. Barišić et al, *Molecules*, 2014, **19**, 12852-12880.



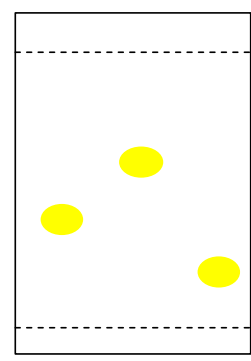
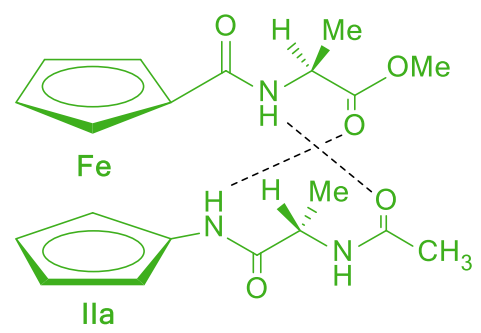
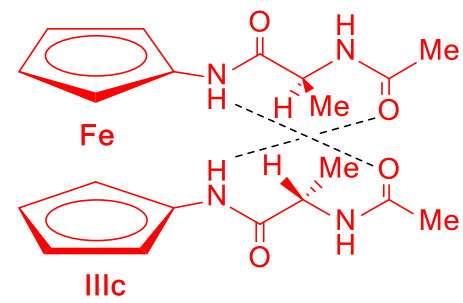
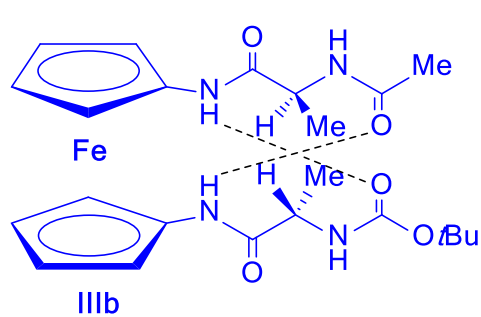
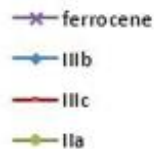
- <sup>[10]</sup> (a) H.-B. Kraatz et al, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 3018-3023.; (b) L. Barišić et al, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 16405-16420.; (c) L. Barišić et al, *Chem. Eur. J.*, 2017, **23**, 1037-10395.



*Hep G2 human liver carcinoma cells*



*Hs 578 T human breast cancer cells*



IIa IIIb IIIc



- Najvišu citotoksičnost pokazao je biokonjugat **IIa** stabiliziran 12-članim IHB-prstenom.
- Povećana lipofilnost peptida **IIa** i **IIIb** u usporedbi s polarnijim peptidom **IIIc** ⇒ **poboljšana bioaktivnost.**



- CARPs (*cationic arginine-rich proteins*) pokazuju vrlo zanimljiva neuroprotektivna svojstva, a odlikuju se i sposobnošću lakog prolaska kroz staničnu membranu, inhibiraju proteolitičke enzime, reduciraju oksidativni stres te pokazuju antiinflamatornu, antimikrobnu i antikancerogenu aktivnost.
- Pripravljene su konjugate ferocencarbonsilne (I) i ferocencakrilne kiseline (III) s oligoargininom (4, 6 ili 8 Arg-ostataka) kao i konjugat ferocencarbonsilne kiseline s Arg-bogatim peptidom TRGRSRGRSGR kojima je ispitana citotoksična aktivnost protiv HL-60 stanica (leukemija).

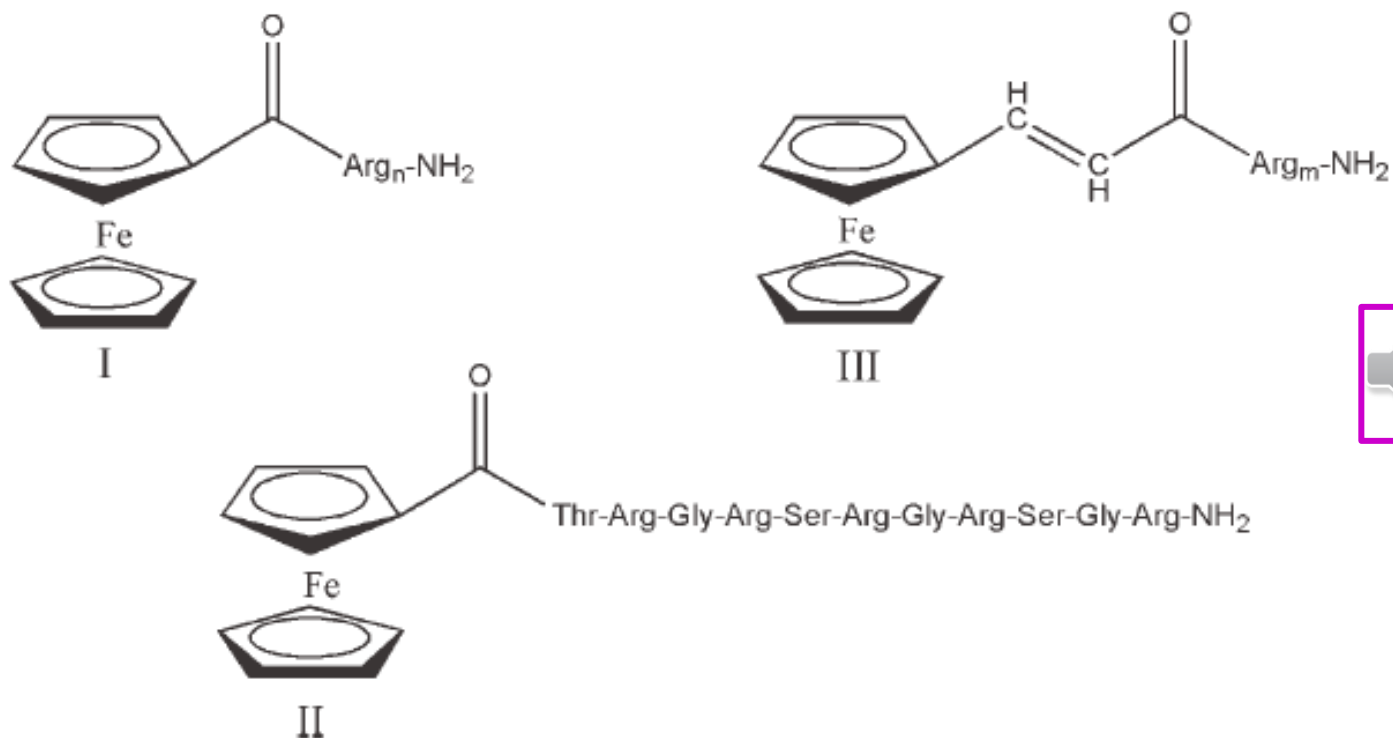


FIGURE 1 Structure of ferrocenecarboxylic acid conjugates with oligoarginine peptides (I,  $n = 4, 6, 8$ ) or TRGRSRGRSGR (II) and ferrocenylacrylic acid conjugates with oligoarginines (III,  $m = 6, 8$ ).

- U odnosu na ferocenkarboksilnu kiselinu, njezini oligoargininski konjugati Fc-CO-Arg<sub>6</sub> i Fc-CO-Arg<sub>8</sub> pokazuju niže IC<sub>50</sub>-vrijednosti (65 odn. 85 μM), čime je indicirano povećanje citotoksičnog potencijala nakon konjugiranja s oligoargininom i to 10 odn. 8 puta (slobodni oligoarginin nema nikakav utjecaj na testirane stanice). Takav rezultat pripisuje se svojstvu Arg da lako prolazi kroz staničnu membranu uslijed čega se povećava intracelularna koncentracija ferocenskog konjugata u odnosu na Fc-COOH koja jedino difuzijom može ući u stanicu. Konjugiranjem Fc-COOH s Arg<sub>4</sub>- ili TRG-sekvencijom nije došlo do unapređenja citotoksičnog kapaciteta (IC<sub>50</sub> = 353 odn. 1247 μM).



- U odnosu na Fc-COOH i njezine spomenute konjugate, ferocenakrilna kiselina ima puno bolji antiproliferativni učinak protiv HL-60 stanica (IC<sub>50</sub> = 9,4 μM), što se može pripisati enonskoj skupini (-CH=CH-CO-). Ipak, konjugiranjem ferocenakrilne kiseline s heksa- i oktaargininom, za razliku od analognih konjugata s Fc-COOH, nije ostvareno dodatno poboljšanje citotoksične aktivnosti (IC<sub>50</sub> = 106 odn. 39 μM).

Compounds	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>c</sup>
Fc-COOH	694
Fc-CO-RRRR-NH <sub>2</sub>	353
Fc-CO-RRRRRR-NH <sub>2</sub>	65
Fc-CO-RRRRRRRR-NH <sub>2</sub>	85
Fc-CO-TRGRSRGRSGR-NH <sub>2</sub>	1247
Fc-CH=CH-COOH	9.4
Fc-CH=CH-CO-RRRRRR-NH <sub>2</sub>	106
Fc-CH=CH-CO-RRRRRRRR-NH <sub>2</sub>	39
H-RRRRRRRR-NH <sub>2</sub>	>10,000
H-TRGRSRGRSGR-NH <sub>2</sub>	n.t.

# Osnove bioorganometalne kemije

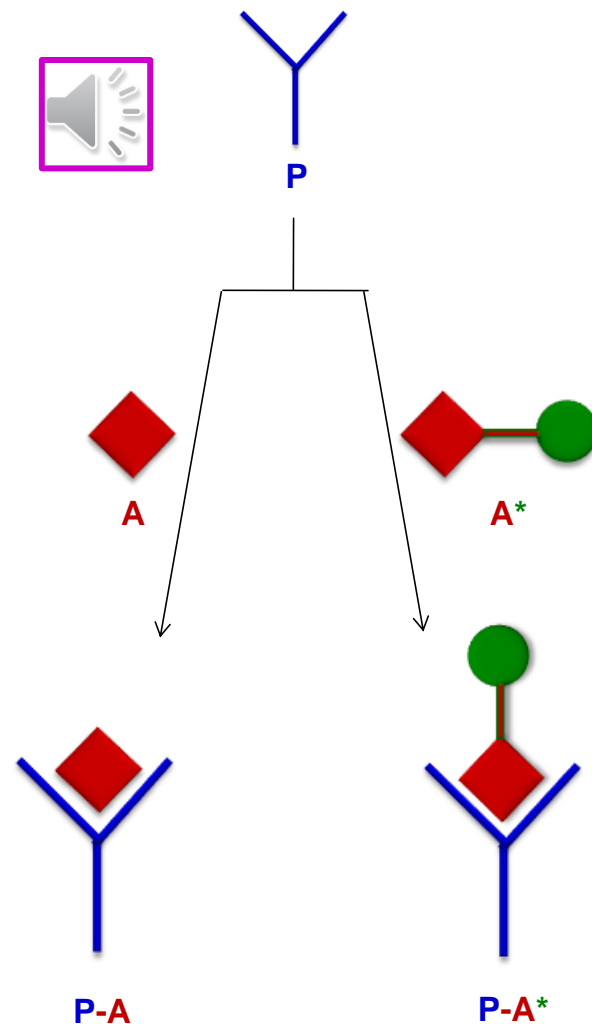
Prof. dr. sc. Lidija Barišić



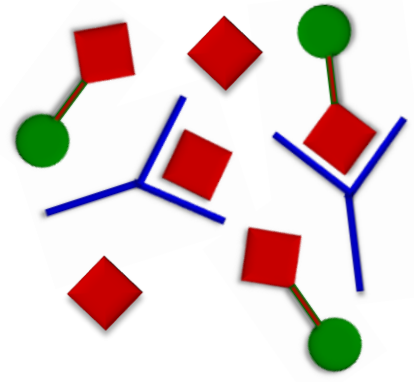
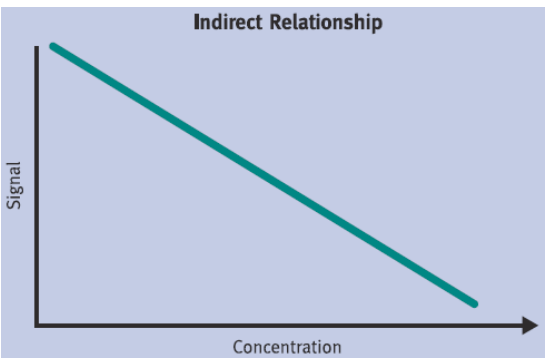
## Bioanalitičke metode bazirane na svojstvima organometalnih kompleksa

Biosonde su funkcionalizirane molekule koje pružaju informaciju o biološkom sustavu na temelju molekuskog prepoznavanja. Ključni element biosondi je odzivna molekula koju u bioorganometalnim sondama predstavlja organometalni fragment koji se može detektirati i identificirati pomoću IR- ili elektrokemijskog signala. 1977. uveden je pojam metalo-imunotest [(MIA, metallo immuno assay); imunotest u kojem se kao obilježivač (odzivna molekula) koristi metalni kompleks]. Najraniji metalo-imunotestovi bazirali su se na trima različitim analitičkim tehnikama: atomskoj apsorpciji (nedovoljno osjetljiva zbog kontaminacije otapala metalima u tragovima), elektrokemijskim mjerenjima (visokoosjetljiva i jeftina) i FT-IR-spektroskopiji.

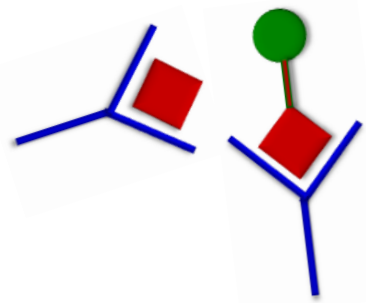
Princip metalo-imunotesta: nakon priprave specifičnog protutijela (P), koje ima jednaki afinitet za antigen (A, analit) i antigen obilježen organometalnim spojem (A\*), nastupa kompeticija tih analita za vezna mjesta na protutijelu uz tvorbu kompleksa P-A i P-A\*. Budući da je koncentracija protutijela P i obilježenog antigena A\* poznata, iz izmjerenog se analitičkog signala P-A\* (FT-IR, elektrosignal) indirektno određuje količina imuno-kompleksa P-A, odn. analita A.



- Dva su glavna tipa imunotestova:
  - Kompetitivni imunotest: **neobilježeni analit** iz uzorka određuje se na temelju njegove sposobnosti da se s **obilježenim analitom** (poznate koncentracije) natječe za vezno mjesto na **antitijelu** (poznate koncentracije); pri tomu **neobilježeni analit** zauzima vezno mjesto na **antitijelu** onemogućujući vezivanje **obilježenog analita**.
  - Izmjerena količina vezane frakcije obilježenog analita obrnuto je proporcionalna koncentraciji vezane frakcije neobilježenog analita iz uzorka (manje vezanog obilježenog analita znači više vezanog neobilježenog analita!),



1. inkubacija

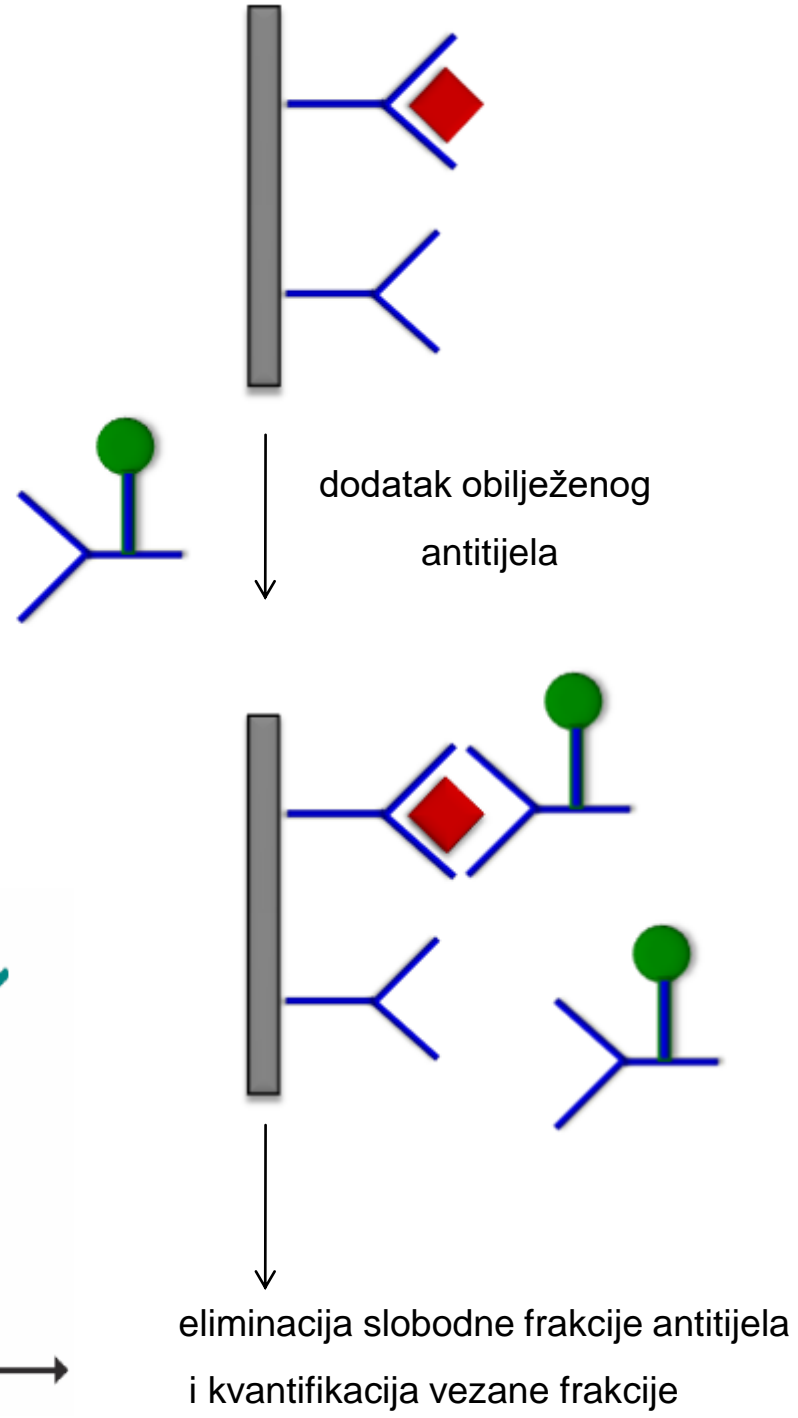


2. separacija vezane i slobodne frakcije obilježenog analita

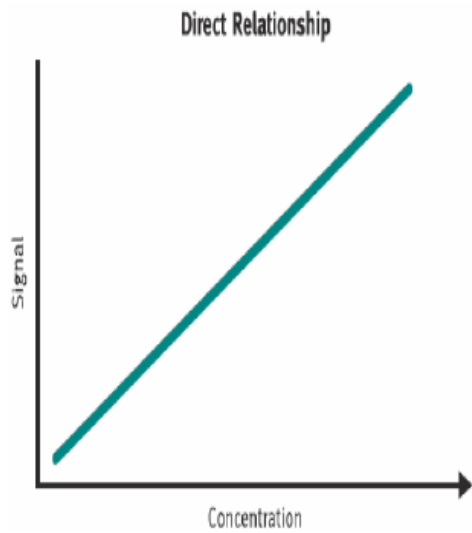


3. kvantifikacija vezane ili slobodne frakcije obilježenog analita

- Nekompetitivni imunotest: suvišak specifičnog **antitijela** vezan je na čvrstu fazu npr. (stijenka pločice za mikrotitraciju), nakon čega se doda otopina **analita**. Nakon inkubacije doda se drugo, **obilježeno antitijelo** poznate koncentracije; slijedi druga inkubacija, te se slobodna frakcija **obilježenog antitijela** ukloni, a vezana se frakcija **obilježenog antitijela** kvantificira – direktno je proporcionalna količini prisutnoga analita (obilježeno antitijelo neće se vezati ukoliko nije prisutan analit).



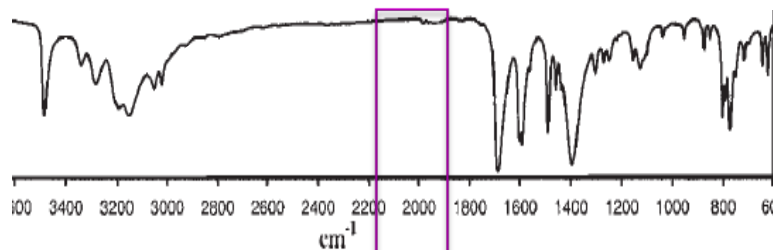
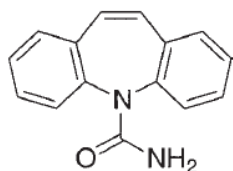
- ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ubraja se u ovu kategoriju.



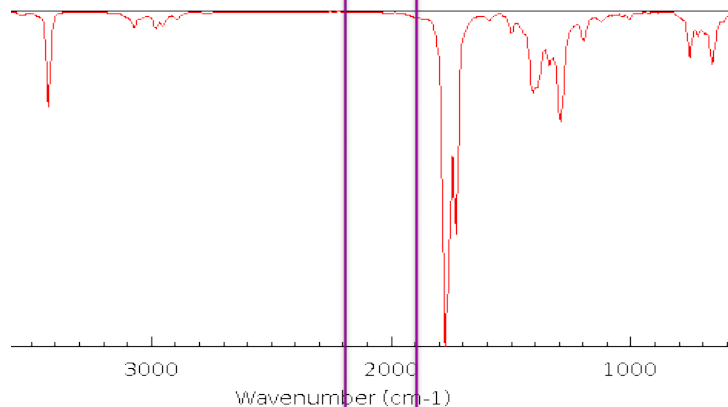
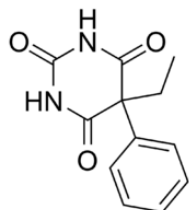
- Organske funkcijske skupine u području 1800-2100  $\text{cm}^{-1}$  ne pokazuju apsorpcijske vrpce. Međutim, jedinstveno svojstvo kompleksa CO-M (karbonil-metal) je prisutnost jake apsorpcijske vrpce pri  $\sim 2000$   $\text{cm}^{-1}$ . Pridruživanjem karbonil-metalne komponente organskim ligandima moguće ih je detektirati IR-spektroskopijom.



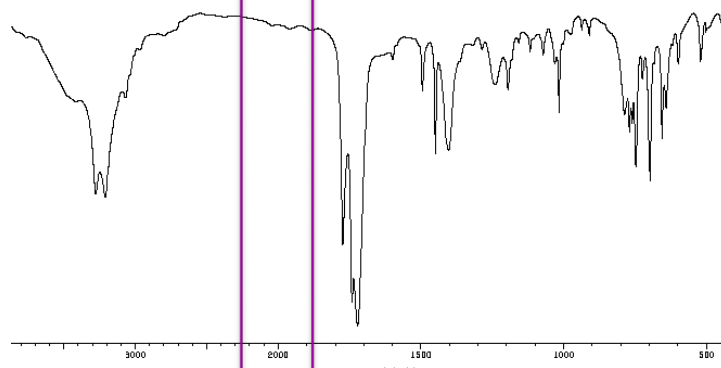
karbamazepin, antiepileptik



fenobarbital, antikonvulziv

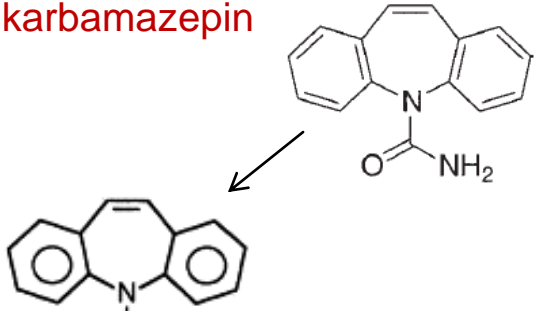


difenilhidantoin, antiepileptik



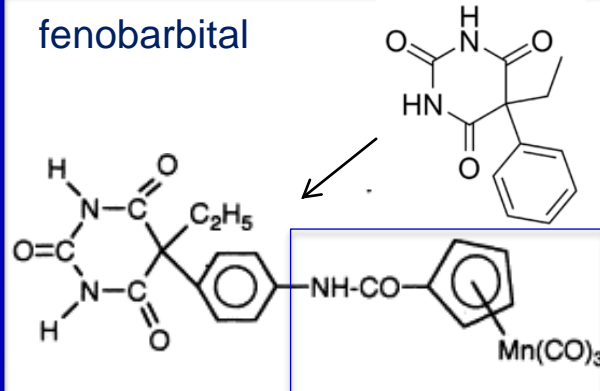
Područje 2100 – 1800  $\text{cm}^{-1}$  bez apsorpcije!

karbamazepin



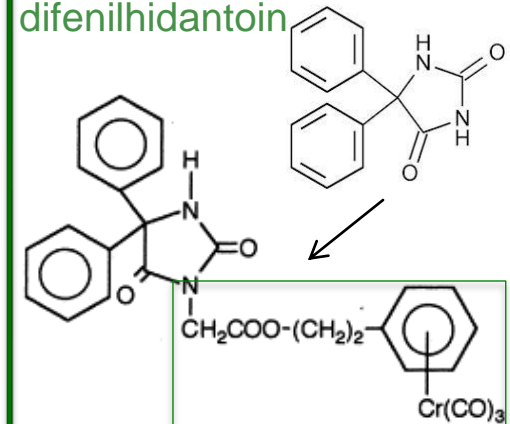
$\text{Co}_2(\text{CO})_6$ -carba ;  $\epsilon = 3355$

fenobarbital

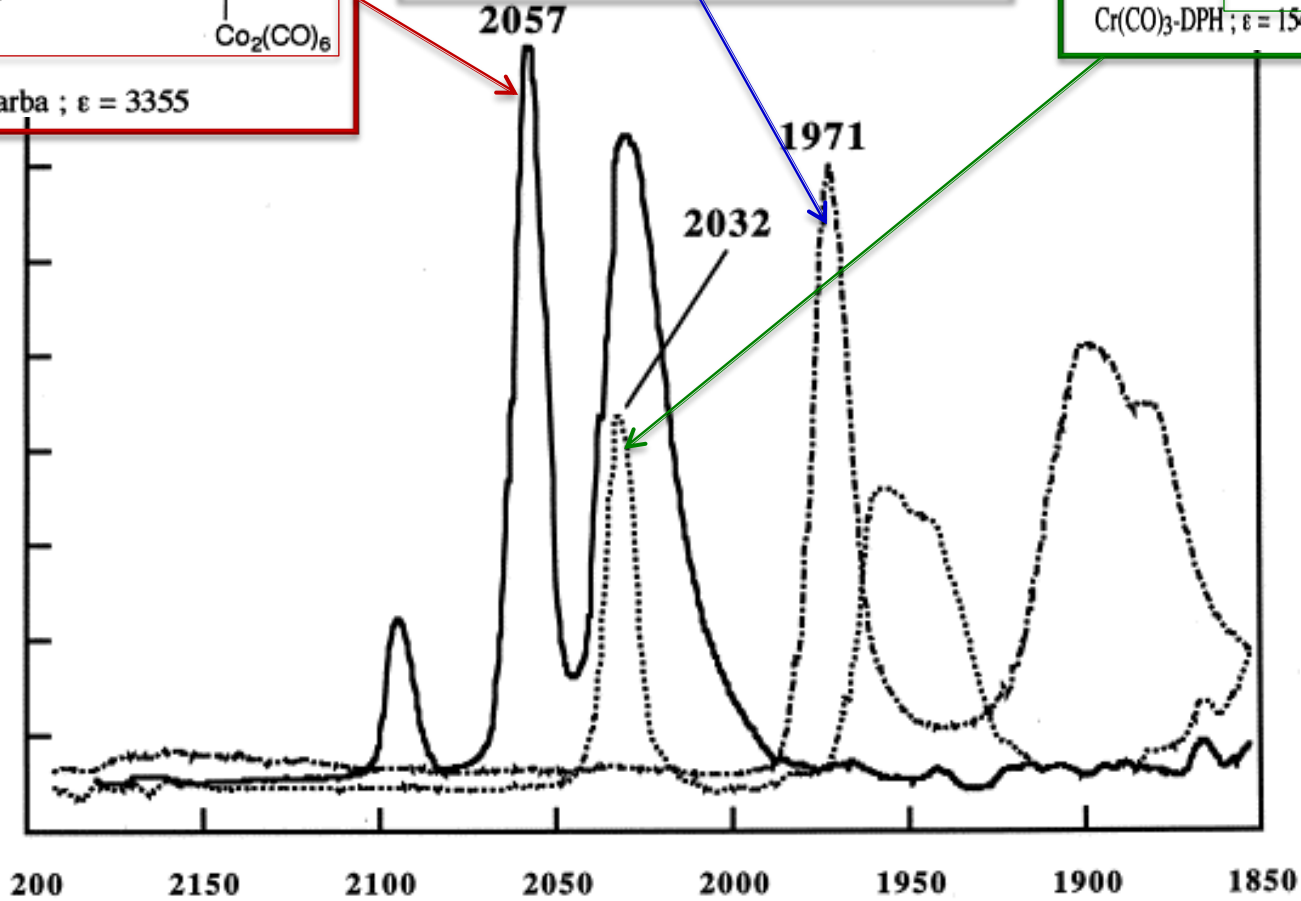


$\text{Mn}(\text{CO})_3$ -pheno ;  $\epsilon = 1212$

difenilhidantoin

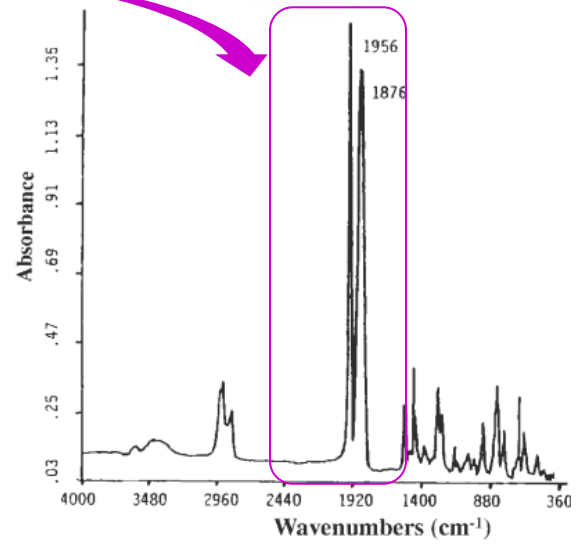
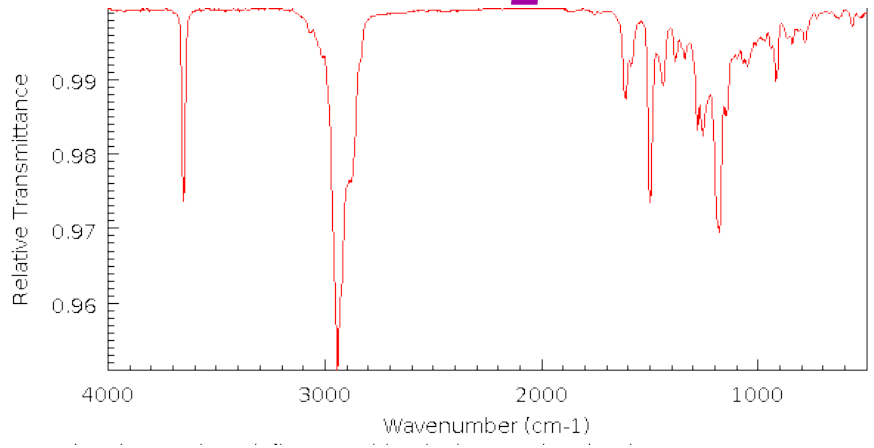
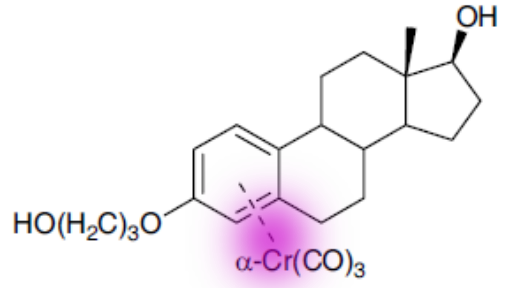
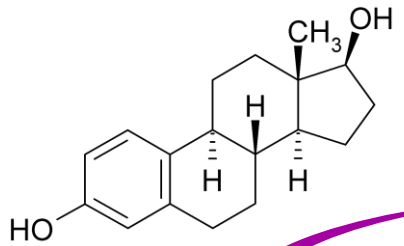


$\text{Cr}(\text{CO})_3$ -DPH ;  $\epsilon = 1542$

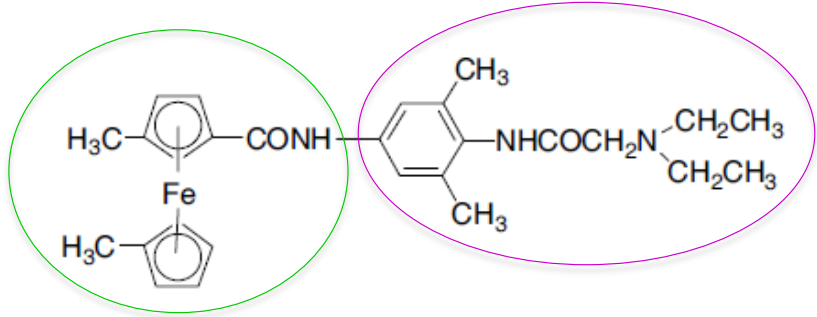




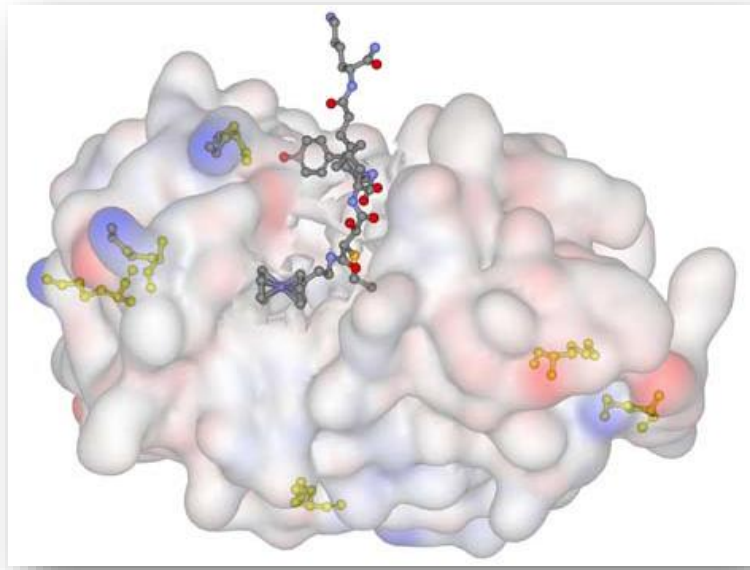
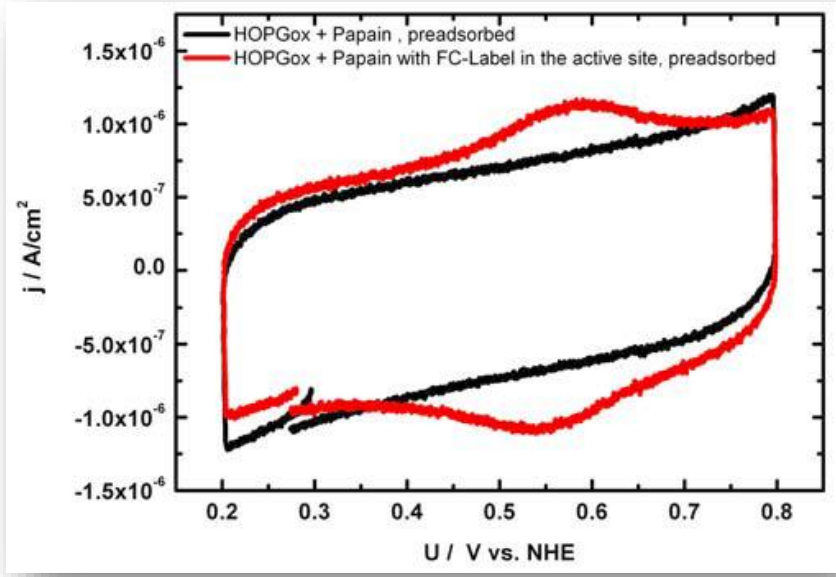
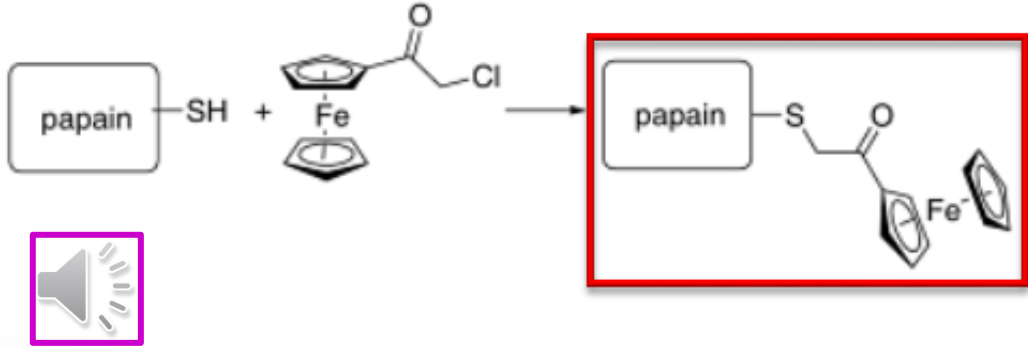
- Razvoj IR-spektroskopije (1980. godina) označava tehnološku revoluciju u području analitičkih tehnika, zahvaljujući jedinstvenom svojstvu karbonilnih organometalnih spojeva: pokazuju rastezne vibracije M–CO veze pri  $\sim 1800\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$  (u području u kojemu nisu vidljive druge organske funkcionalne skupine!).
- Bez obzira na male količine estradiola u tkivima (uterus, određeni estrogen-ovisni tumori), nakon obilježavanja organometalnim spojem  $[\text{Cr}(\text{CO})_3]$  moguće ga je detektirati zahvaljujući karakterističnim signalima pri  $\sim 2000\text{ cm}^{-1}$ .



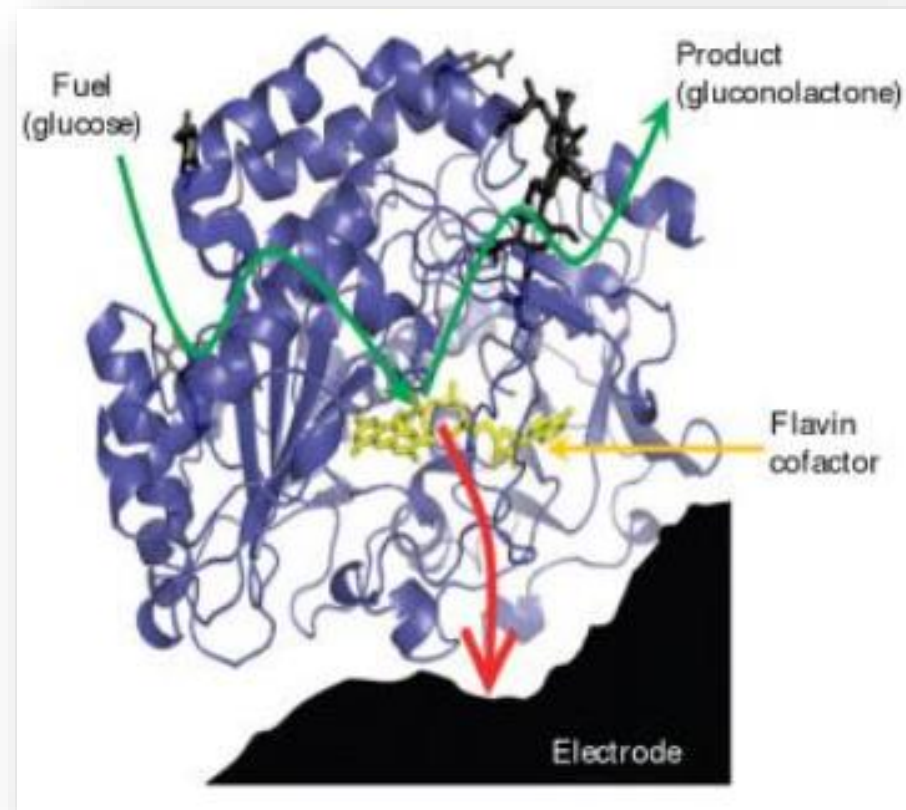
- Elektrokemijski inaktivni lidokain (lijek za srčanu aritmiju) moguće je detektirati cikličkom voltametrijom nakon obilježavanja elektroaktivnim ferocenom.



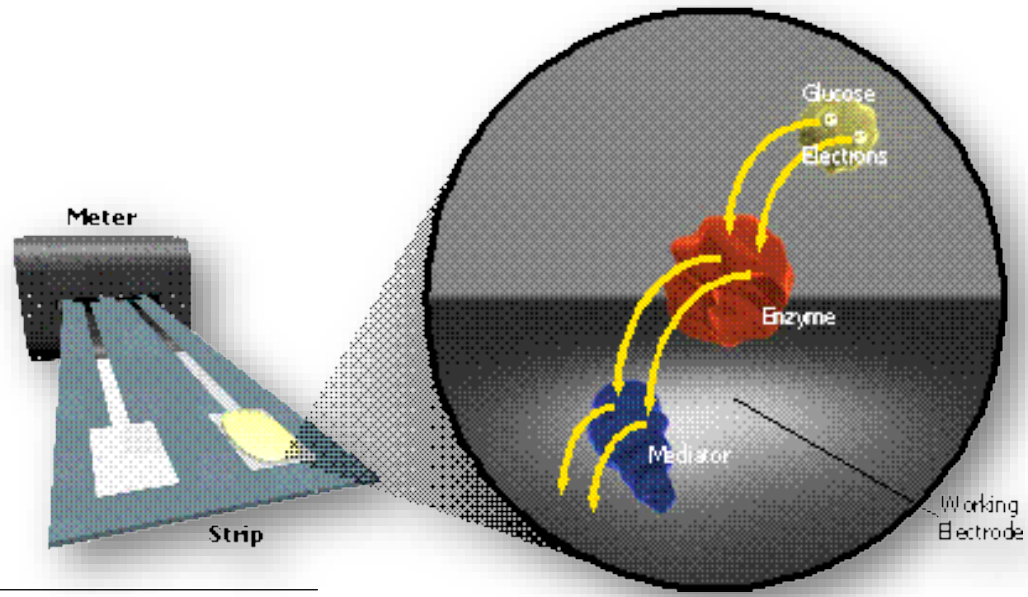
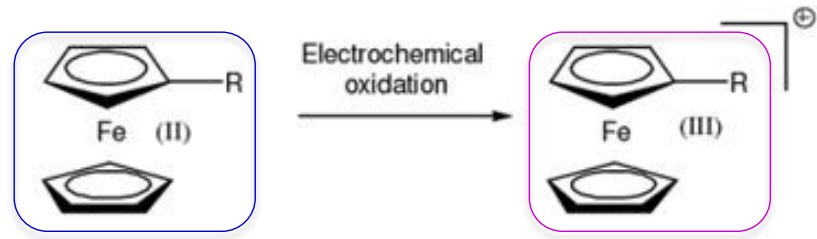
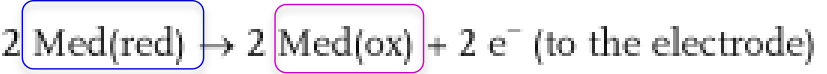
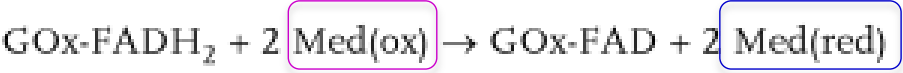
- Nakon obilježavanja redoks-aktivnim ferocenom, moguće je elektrokemijski detektirati enzime koji su redoks-inaktivni.



- Kod većine redoks-enzima redoks-centar (kofaktor) je elektronski nedostupan i elektrokemijski neupotrebljiv – lociran je predaleko od površine proteina („ukopan” u unutrašnjosti proteinske molekule) što onemogućava izravni prijenos elektrona između enzima i elektrode.
- Obilježavanje “redox-silent” proteina elektroaktivnom komponentom [redoks-medijatorom (posrednikom) koji brzo izmjenjuje elektrone s elektrodom] čini ih pogodnima za elektrokemijske analize.
- Glukoza-oksidaza ( $GO_x$ ) oksidira glukozu pri čemu se FAD reducira u  $FADH_2$ ; direktno mjerenje prijenosa elektrona s FAD na elektrodu otežava njegova lokacija u  $GO_x$  (protein zasjenjuje FAD čineći ga gotovo nedostupnim).
- Posredovanje u prijenosu naboja između redoks-enzima  $GO_x$  i elektrode postiže se korištenjem posrednika, redoks-para ferocen/fericenijev ion.

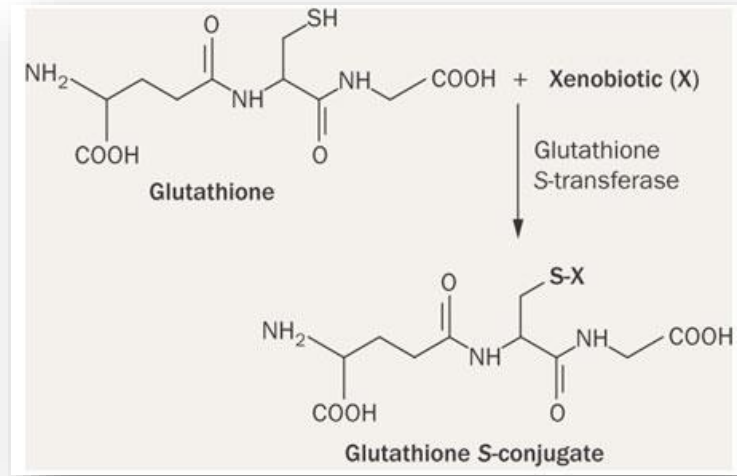


- 1987., ExacTech trake za mjerenje razine glukoze u krvi: nakon oksidacije glukoze,  $GO_x$  preuzima  $2e^-$  i predaje ih fericenijevu kationu koji se reducira u ferocen, potom se ferocen oksidira i elektrone predaje elektrodi; **uređaj mjeri struju elektrona i pretvara signal u  $\mu\text{mol}$  glukoze/ litri krvi.**



M.F. Burritt, *Clin. Chem.* 36 (1990) 1562.  
 D. Ross et al, *Res. Clin. Pract.* 10 (1990) 281.

- Glutation (GSH), intracelularni nukleofil i antioksidans, ima zaštitnu i detoksifikacijsku ulogu u organizmu („hvata” slobodne radikale i reaktivne kisikove spojeve).
- Glutation S-transferaza (GST) katalizira pretvorbu GSH u različite elektrofilne spojeve. Rezistencija na antikancerogene terapeutike, insekticide, herbicide i mikrobne antibiotike direktno je povezana s povećanom razinom GST u malignim stanicama u odnosu na njegovu koncentraciju u zdravom tkivu ⇒ GST se koristi kao biomarker.
- Rezistencija na lijekove u prisutnosti GST posljedica je direktne detoksifikacije kao i inhibirajućeg učinka na MAP (mitogenom aktivirani protein) kinaze.
- Razvojem inhibitora i senzora GST moguće je smanjiti rastuću kemorezistenciju tumorskih stanica. U literaturi su opisani brojni inhibitori GST, uključujući analoge GSH, GSH-konjugate, male organske molekule i prirodne produkte.



**Table 3** Anticancer agents associated with increased levels of GST and resistance

*Substrates of GST*

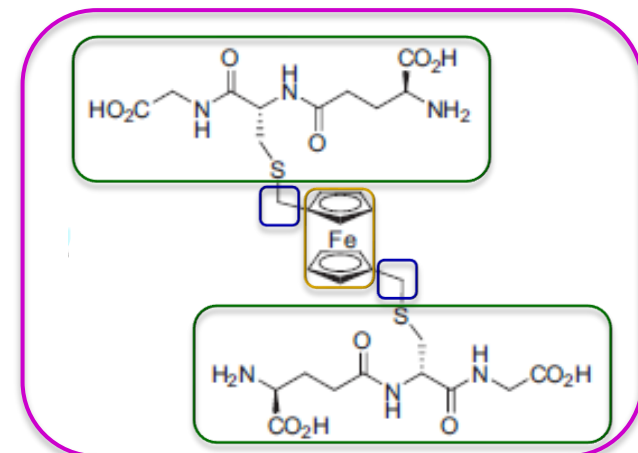
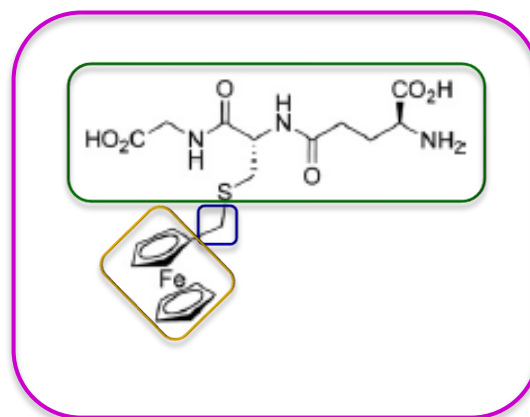
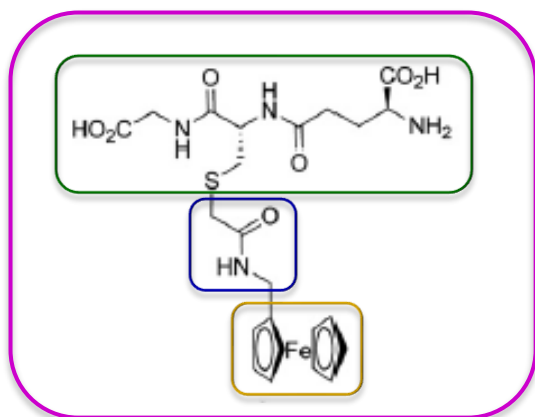
- Chlorambucil
- Melphalan
- Nitrogen mustard
- Phosphoramidate mustard
- Acrolein
- Carmustine
- Hydroxyalkenals
- Ethacrynic acid
- Steroids



*Not characterized as substrates*

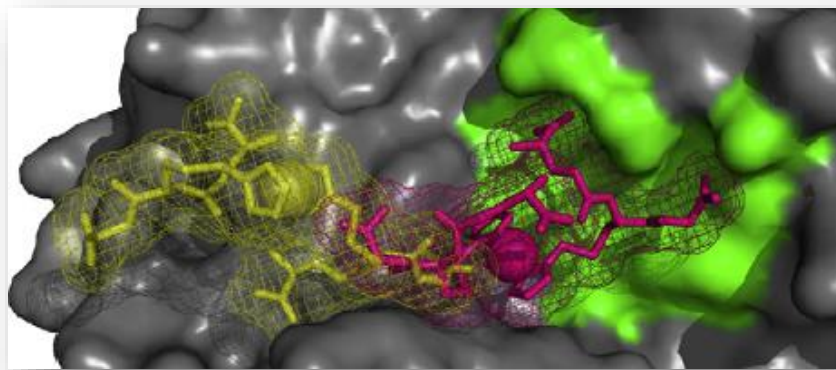
- Antimetabolites\*
- Antimicrotubule drugs\*
- Topoisomerase I & II inhibitors\*
- Bleomycin
- Hepsulfam
- Mitomycin C\*
- Adriamycin\*
- Cisplatin\*
- Carboplatin

- Organometalni senzori i inhibitori GST pripremljeni su umetanjem **razmaknica** različite duljine i strukture između **ferocenske** i **peptidne glutationske jedinice**.

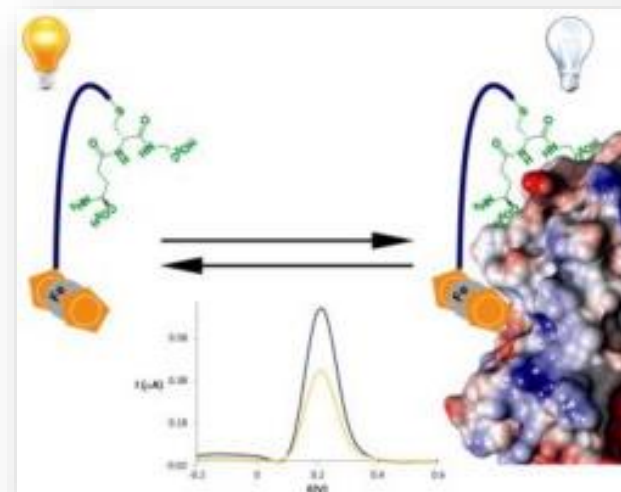


- Takvi su **konjugati** vrlo efikasni kompetitivni inhibitori **GST** (inhibitorski učinak raste s povećanjem duljine razmaknice što se objašnjava porastom entropije uslijed vezanja).

- Porast oksidacijskog potencijala nakon vezivanja Fc-GSH konjugata za vezno mjesto GST indicira mogućnost njegove primjene kao elektrokemijskog senzora GST.



M. C. Martos-Maldonado et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 7256.  
M. C. Martos-Maldonado et al, *Biochimie* 94 (2012) 541.

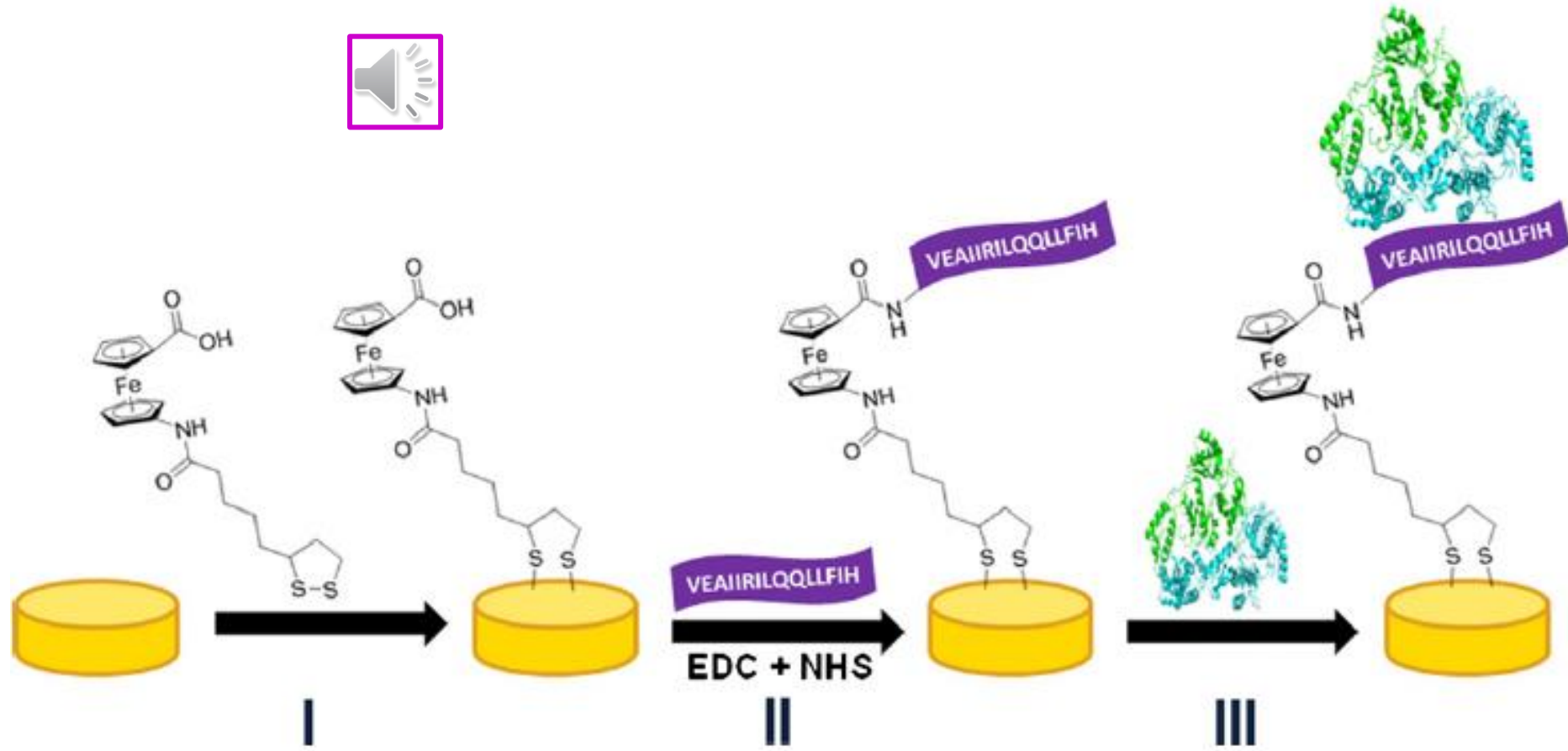


• Elektrokemijsko određivanje HIV-1 reverzne transkriptaze (HIV-1 RT), katalizatora konverzije viralnog genoma iz jednostruke RNA u dvostruku DNA, koristi se u detekciji infekcije HIV-om.

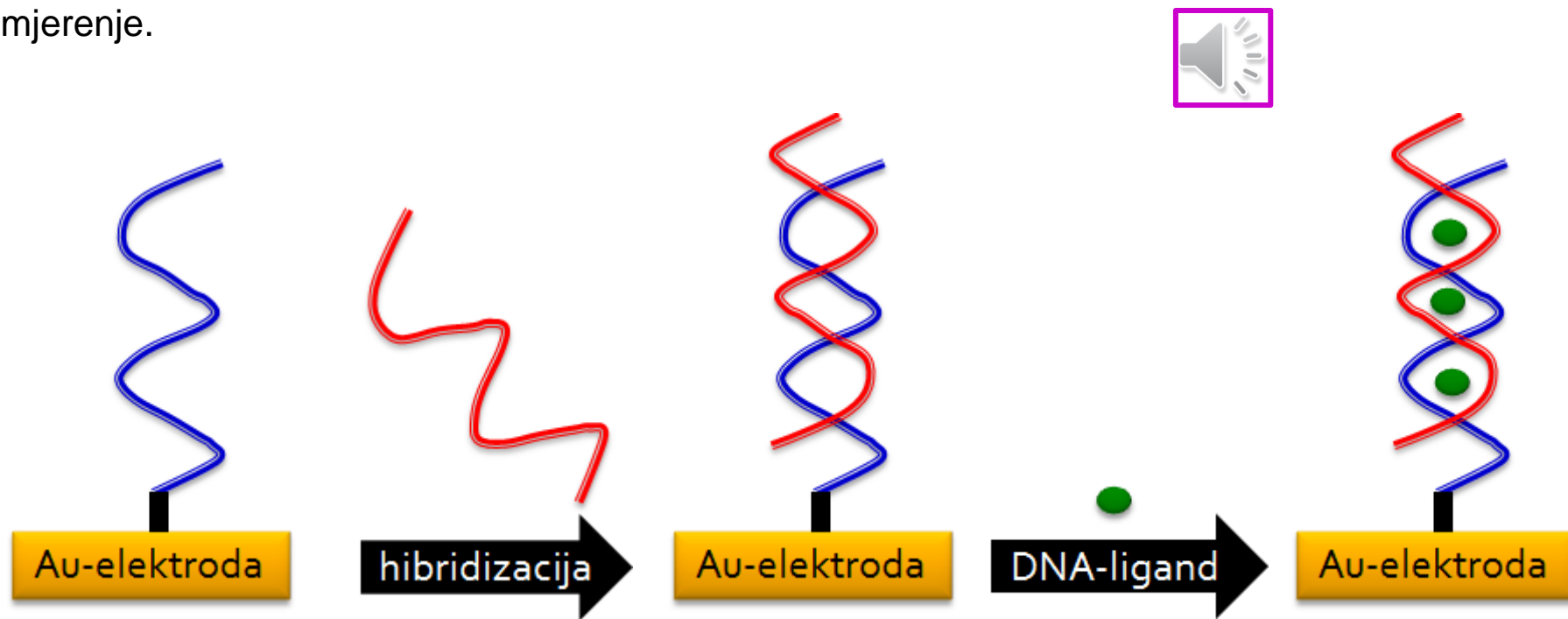
I. Ferocenom obilježena lipoična kiselina imobilizira se na **zlatnoj elektrodi**.

II. **Kratki RT-specifični peptid VEAIRILQQLFIH** kovalentno se veže na C-terminus ferocenom obilježene lipoične kiseline.

III. "Hvatanje" **HIV-1 RT** pomoću **RT-specifičnog peptida** imobiliziranog na površini elektrode.



- Elektrokemijski indikatori hibridizacije: **DNA-sonda** imobilizira se na površini zlatne elektrode nakon čega slijedi hibridizacija s **DNA ispitivanog uzorka**; nakon hibridizacije elektroda se uroni u otopinu elektrolita koji sadrži **DNA-vezujući metalni kompleks** te se provede elektrokemijsko mjerenje.

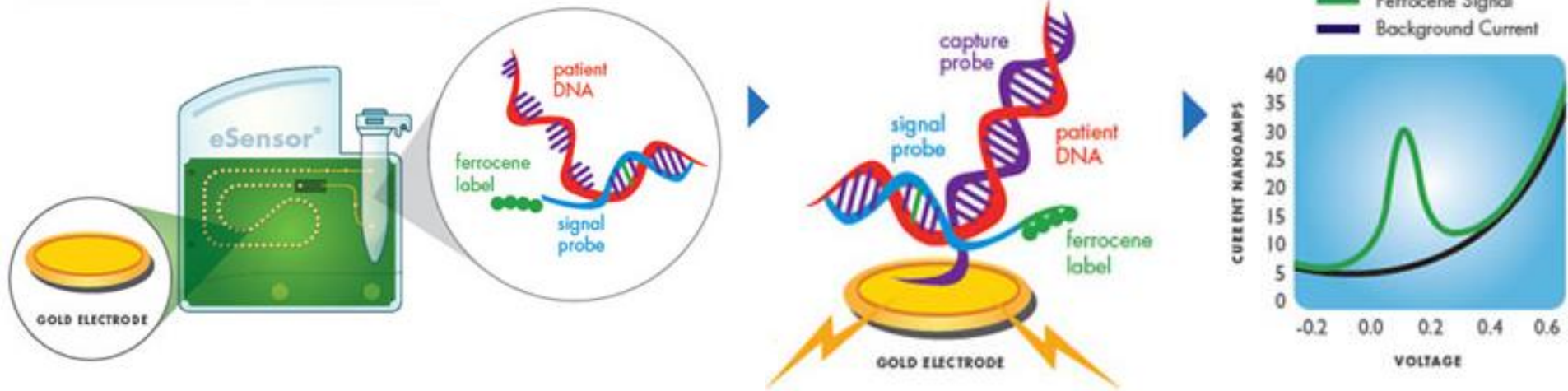


- **Metalni kompleks** mora razlikovati jednolančanu DNA (ssDNA, single-strand) i dvostruku uzvojnica DNA (dsDNA, double-strand); nakon vezivanja za dsDNA dolazi do koncentriranja metala na površini elektrode uslijed čega se stvara elektrokemijski signal iz čije se magnitude može odrediti ispitivani gen.

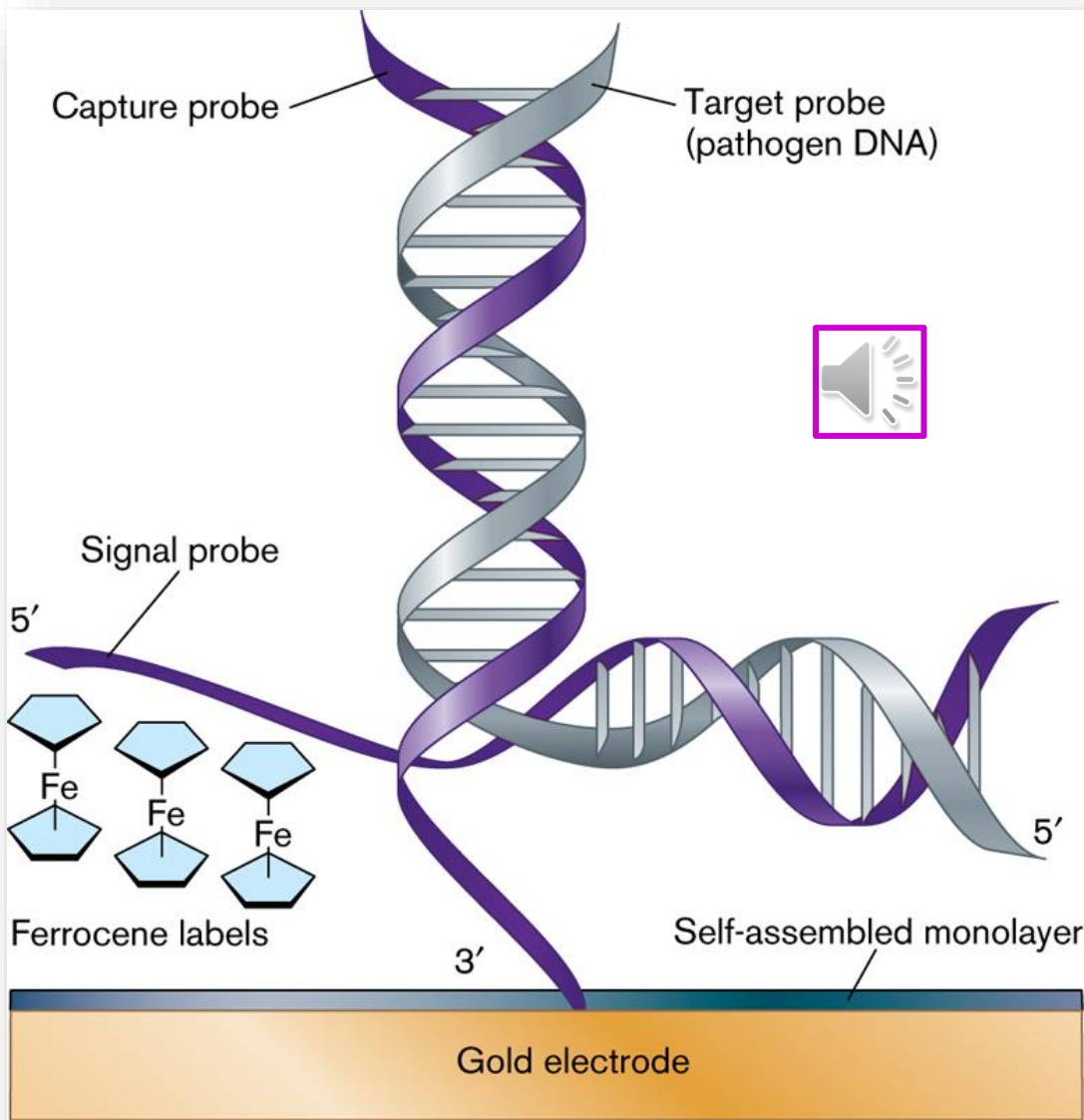


- Postoje brojne laboratorijske metode za identifikaciju patogena, a zahtijevaju veliki oprez pri rukovanju uzorcima i podrazumijevaju uporabu skupih kemikalija i opreme.
- Idealni sustavi za identifikaciju patogena zamišljen je tako da omogući istovremeno procesuiranje uzorka i njegovu karakterizaciju korištenjem jedinstvenog automatiziranog uređaja.
- Bioelektronska detekcija nukleinskih kiselina na minijaturnom čvrstom nosaču prvi je korak u razvoju integriranih detekcijskih uređaja.
- Bioelektronska detekcija DNA uključuje stvaranje elektroničkog sklopa posredstvom hibridizacije nukleinskih kiselina te predstavlja bazu za DNA-detekcijske sustave (eSensor™).



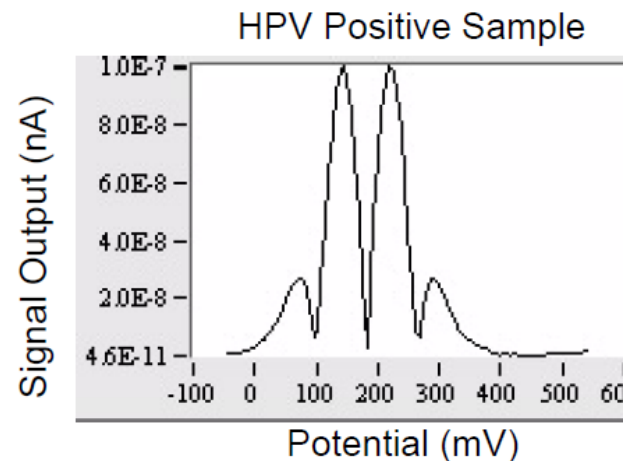


- 1) Ciljana DNA (target DNA) izmiješa se s otopinom signalne sonde (signal probe) obilježene elektroaktivnim ferocenom; ukoliko je ciljana DNA prikladna (sadrži komplementarne baze) odmah će doći do njezine hibridizacije s obilježenom signalnom sondom.
- 2) Otopina koja sadrži hibridizirani kompleks ispitivane i obilježene signalne DNA pumpa se kroz uređaj koji sadrži elektrode s DNA-vezujućom sondom (DNA capture probe); dolazi do hibridizacije ciljane DNA i vezujuće DNA, odnosno do uspostavljanja kontakta između DNA vezane za elektrodu i ferocena – stvara se strujni tok.

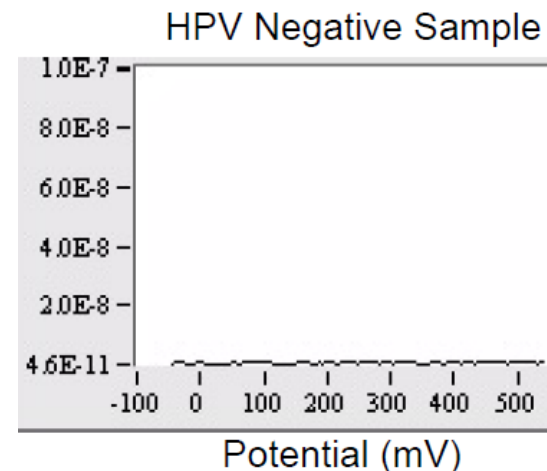


Elektrokemijska detekcija humanog papiloma virusa (HPV)

S. D. Vernon et al, BMC Infectious Diseases 3 (2003) 1.



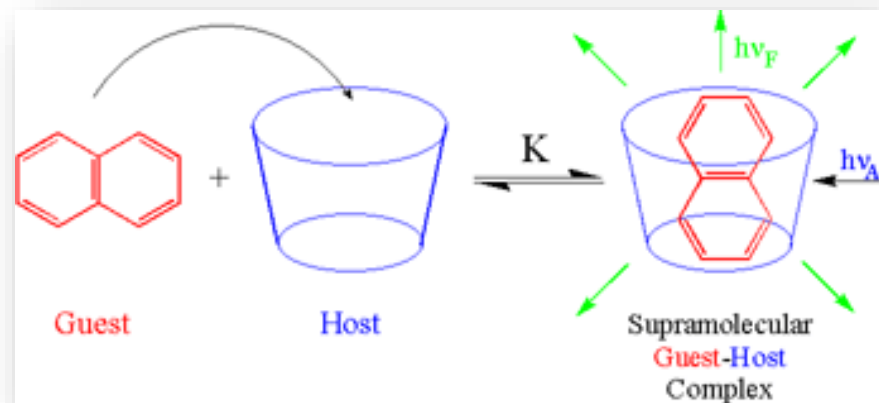
- Elektrokemijski signal generira se nakon što DNA iz HPV hibridizira s ferocenom obilježenom signalnom sondom i sondom vezanom za elektrodu.



- U slučaju da u uzorku nema HPV ne registrira se signal!

## Supramolekulske interakcije organometalnih spojeva

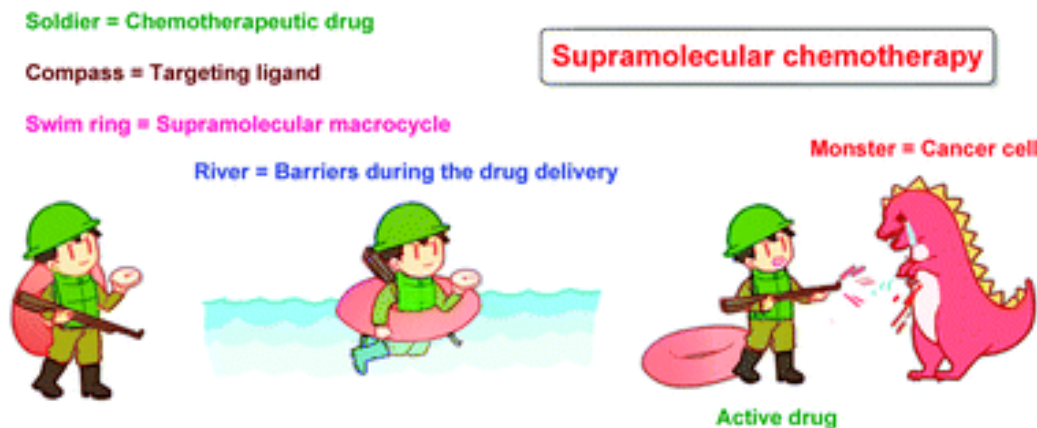
- Jean-Marie Lehn, Nobel lecture, 1987:  
“Supramolecular chemistry is the chemistry of the intermolecular bond, covering the structures and functions of the entities formed by association of two or more chemical species”.



- Supramolekulske interakcije (prepoznavanje, reaktivnost, transport...) predstavljaju fundamentalne fenomene u biološkim sustavima uključene u brojne procese između biološki važnih molekula (DNA, RNA) s proteinima, lijekovima, sondama koje sadrže metalni ion, itd.

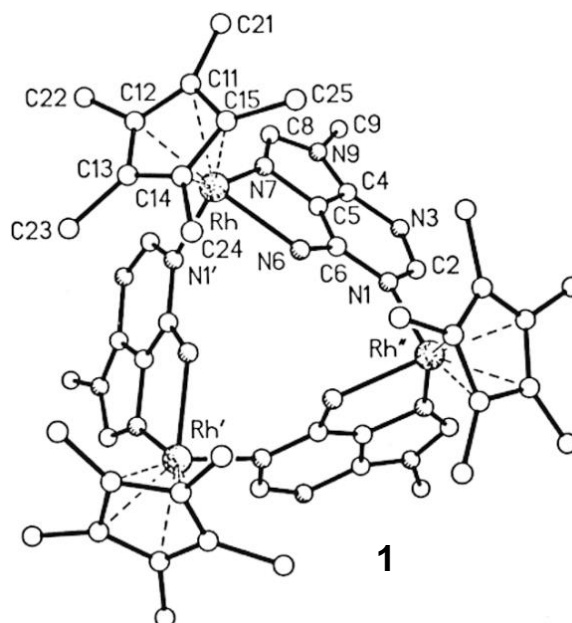
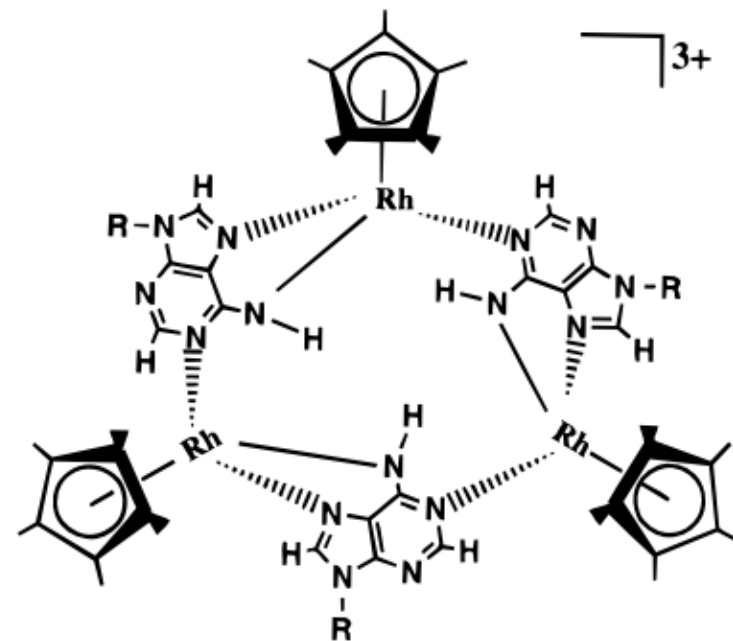


- Organski kemičari pripremaju brojne supramolekulske domaćine koji sudjeluju u molekulskom prepoznavanju s molekulama gostima (nukleozidi, nukleotidi, aminokiseline, peptidi i male organske molekule) i to putem nekovalentnih vodikovih veza,  $\pi$ - $\pi$ - i hidrofobnih interakcija.

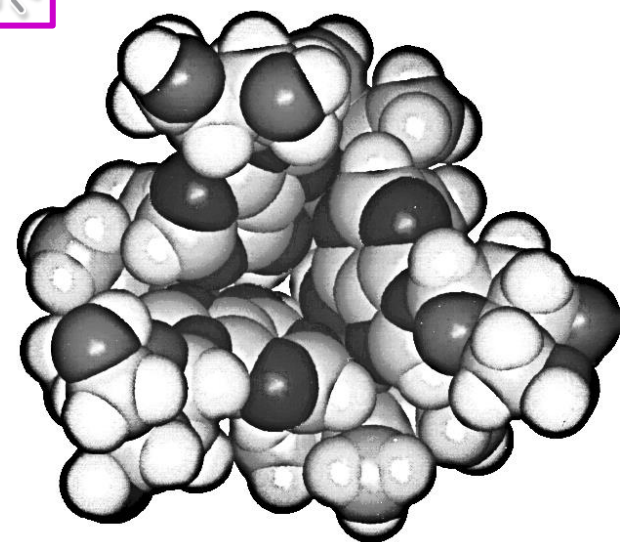


## Bioorganometalne supramolekule kao domaćini

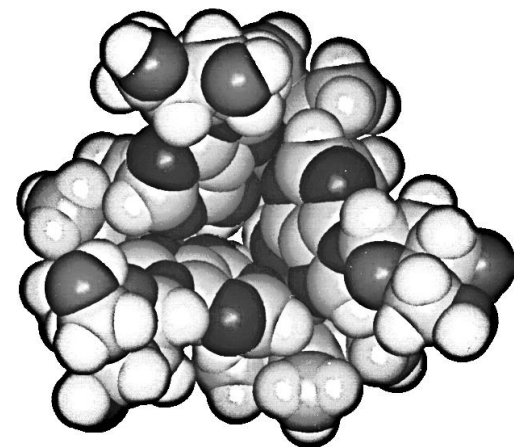
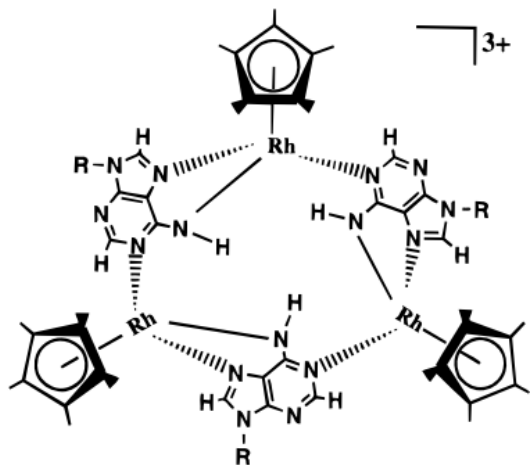
- Opisane su bioorganometalne molekule koje kao domaćini prepoznaju molekule goste (aromatske i alifatske amino- i karboksilne kiseline) u vodenom mediju pri pH 7. Takvo prepoznavanje u vodenom mediju može se smatrati jednostavnim modelom za proučavanje interakcija između nukleinskih kiselina i proteina koji reguliraju gene.
- Procesi molekuskog prepoznavanja aromatskih i alifatskih aminokiselina s bioorganometalnim domaćinom **1** proučavani su  $^1\text{H}$  NMR-spektroskopskim metodama. Kompleksiranje molekula domaćina i gosta inducira kemijski pomak molekula gosta u više polje. Ciklički trimer  $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\mu\text{-}\eta^1(\text{N}1):\eta^2(\text{N}_6,\text{N}_7)\text{-9-metiladenin})_3(\text{OTf})_3]$  (**1**) odlikuje se stabilnošću u vodi te velikim promjerom unutarnje šupljine što su osnovni parametri “host-guest” kemije.



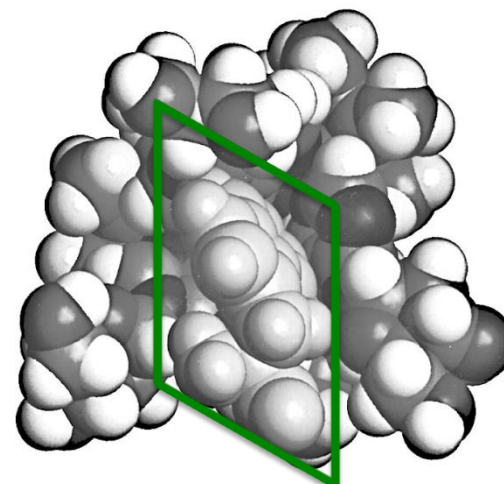
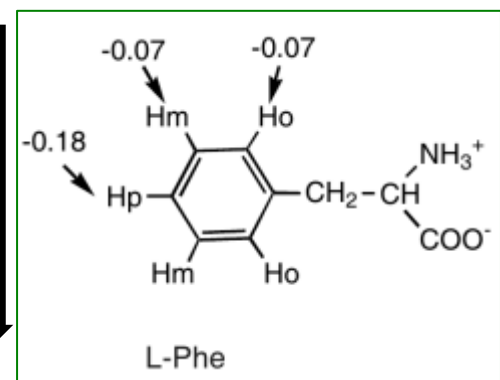
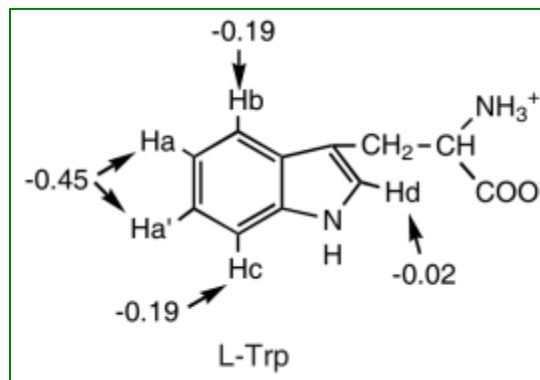
1



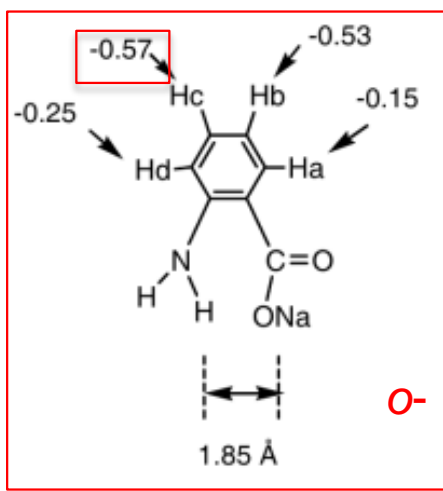
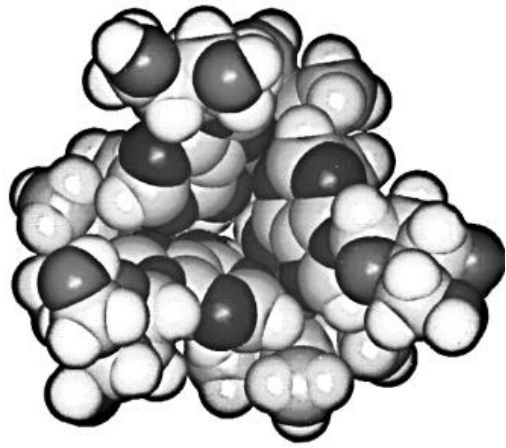
- Utvrđeno je da variranjem koncentracije molekule domaćina **1** (0-1 eq.) u prisutnosti odgovarajuće molekule gosta (Phe, Trp, Leu, Ile; konst. konc. 1 eq.) nakon kompleksiranja dolazi do pomaka NMR signala molekula gosta u više polje (CICS, *complexation induced chemical shift*).



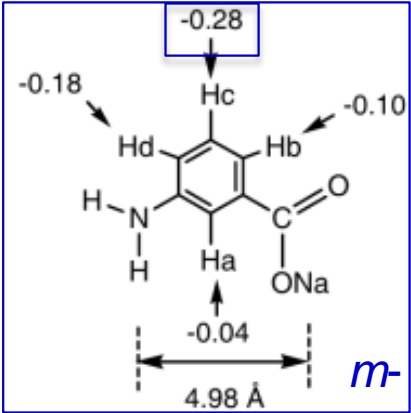
- Bioorganometalni domaćin **1** prepoznaje aromatske aminokiseline kao i aminokiseline s duljim hidrofobnim bočnim ograncima zahvaljujući steričkim, elektronskim i hidrofobnim utjecajima



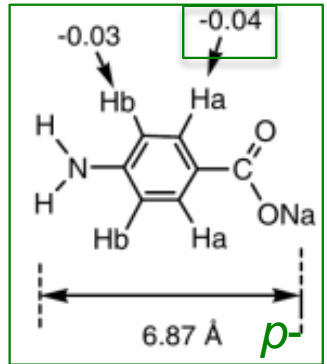
- Ciklički trimer **1** korišten je u studijama molekuskog prepoznavanja s neproteinogenom *o*-, *m*- ili *p*-aminobenzojevom kiselinom.



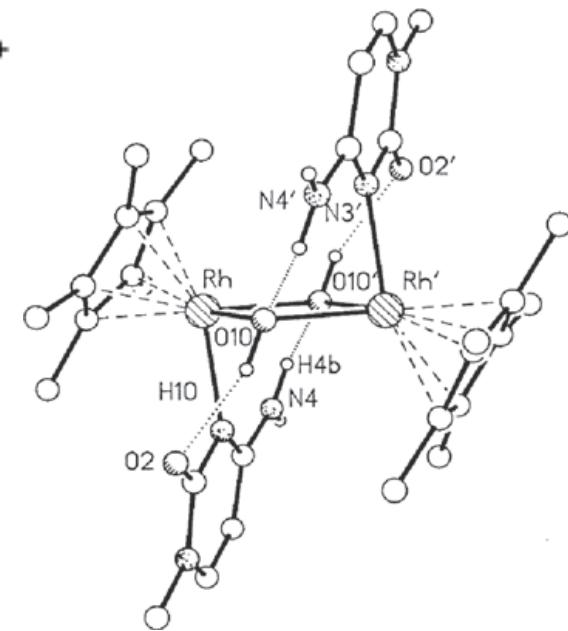
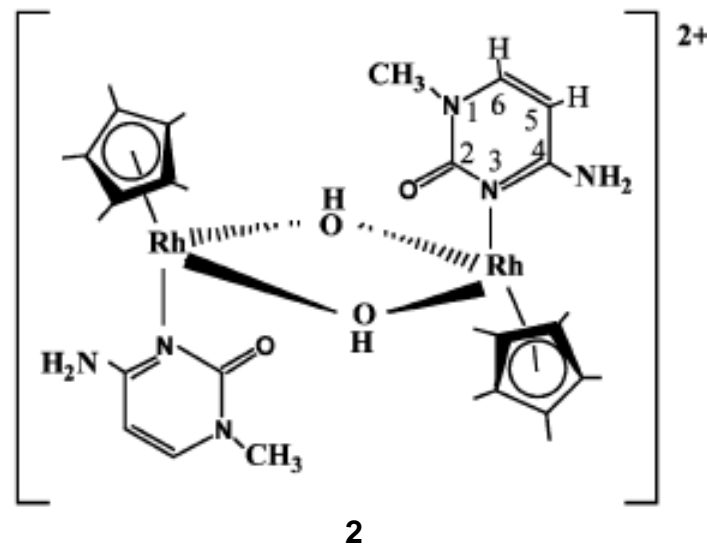
- *o*-Aminobenzojeva kiselina (vitamin L) prekursor je Trp, a rabi se kao intermedijar u sintezi bojila te u proizvodnji parfema i farmaceutika,
- *m*-amino-benzojeva kiselina umetanjem u ciklo(peptide) potiče tvorbu β-ploče i β-okreta,
- *p*-aminobenzojeva kiselina (vitamin B<sub>x</sub>) intermedijar je u bakterijskoj sintezi folatâ koji sprječavaju kardiovaskularne bolesti i neke tipove karcinoma.



- Pozicija supstituenata značajno utječe na molekulsko prepoznavanje; najviše vrijednosti CICS za *o*- (H<sub>c</sub>) i *m*- (H<sub>c</sub>) su 14 odn 7 puta veće nego za *p*- (H<sub>a</sub>) što se pripisuje steričkim utjecajima: hidrofobni dijelovi molekula gostiju trebaju se smjestiti u hidrofobnu šupljinu domaćina; udaljenost između hidrofilnih skupina i sterička ometanja rastu od *o*- prema *p*-gostu; time se izloženost hidrofobnih skupina smanjuje što rezultira slabijim prepoznavanjem.



- Molekulsko prepoznavanje temeljeno na selektivnim vodikovim vezama između bioorganometalnog domaćina *trans*-[Cp\*Rh( $\eta^1$ (N<sub>3</sub>)-1-metilcitozin)( $\mu$ -OH)]<sub>2</sub>(OTf)<sub>2</sub> (**2**) i Trp ispitano je primjenom CICS-metode.



- Kompleksiranjem domaćina **2** s Trp dolazi do njegove desimetrizacije što se očituje prisutnošću dvaju setova signala; pri tomu jedan set signala kompleksa odgovara signalima slobodnog domaćina, dok su u drugom setu signala zabilježeni značajni pomaci u više polje.
- CICS izmjereni za jedan metil-citozinski ligand tumače se njegovim nekovalentnim interakcijama s Trp.

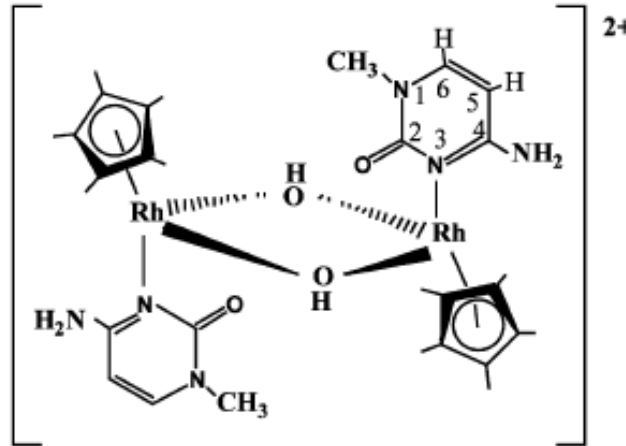


Slobodni domaćin <b>2</b>		S gostom L-Trp			
		$\Delta\delta$		$\Delta\delta$	
N-CH <sub>3</sub>	3.24	2.83	-0.41	3.22	-0.02
H <sub>6</sub>	7.44	7.26	-0.18	7.41	-0.03
H <sub>5</sub>	5.83	5.52	-0.31	5.81	-0.02
Cp*	1.46	1.35	-0.12	1.35	-0.12

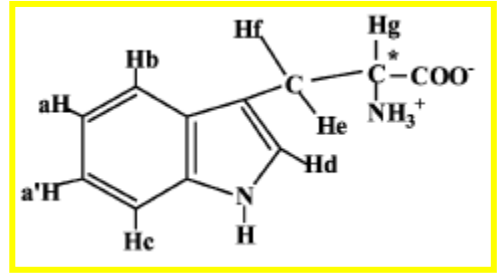
<sup>a</sup> <sup>1</sup>H-NMR shifts at pH 7.0, 300 MHz, 1:1 host-guest ratio.



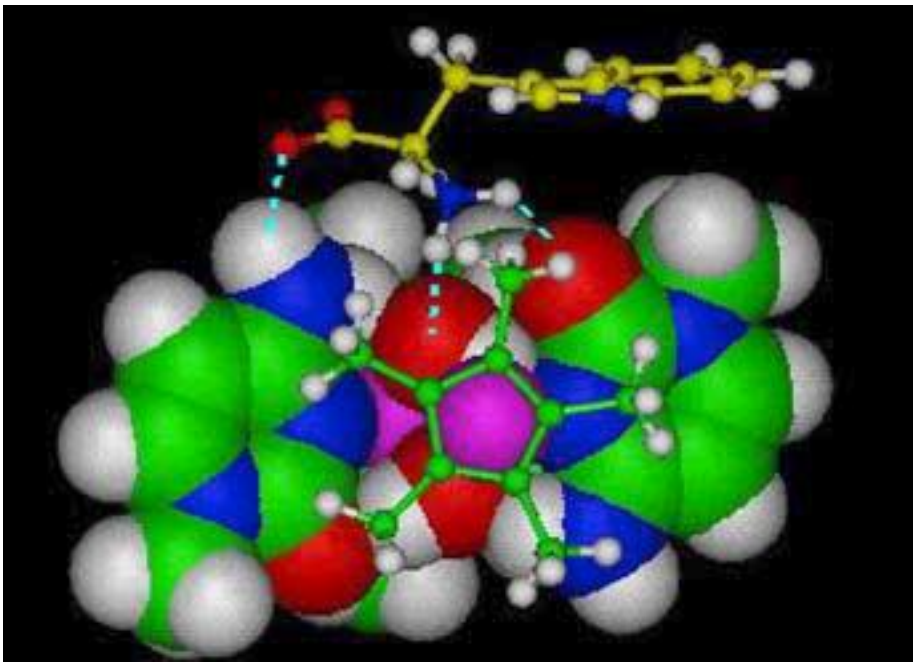
- Nadalje, kompleksiranje **Trp** s bioorganometalnim domaćinom **2** indicirano je i pomacima Trp-protona u više polje. Bioorganometalno prepoznavanje temelji se na vodikovim vezama NH<sub>3</sub><sup>+</sup> skupine iz Trp s O-atomom iz jednog od dvaju Rh(μ-OH) liganada te s CO-skupinom iz jednog od dvaju metil-citozinskih liganada; COO-skupina iz Trp tvori vodikovu vezu s NH<sub>2</sub> skupinom drugog metil-citozinskog liganda.



- Opisani domaćin-gost proces razmatra se kao model za studiju povezivanja molekula gostiju s metalo-enzimima i DNA/ RNA.**

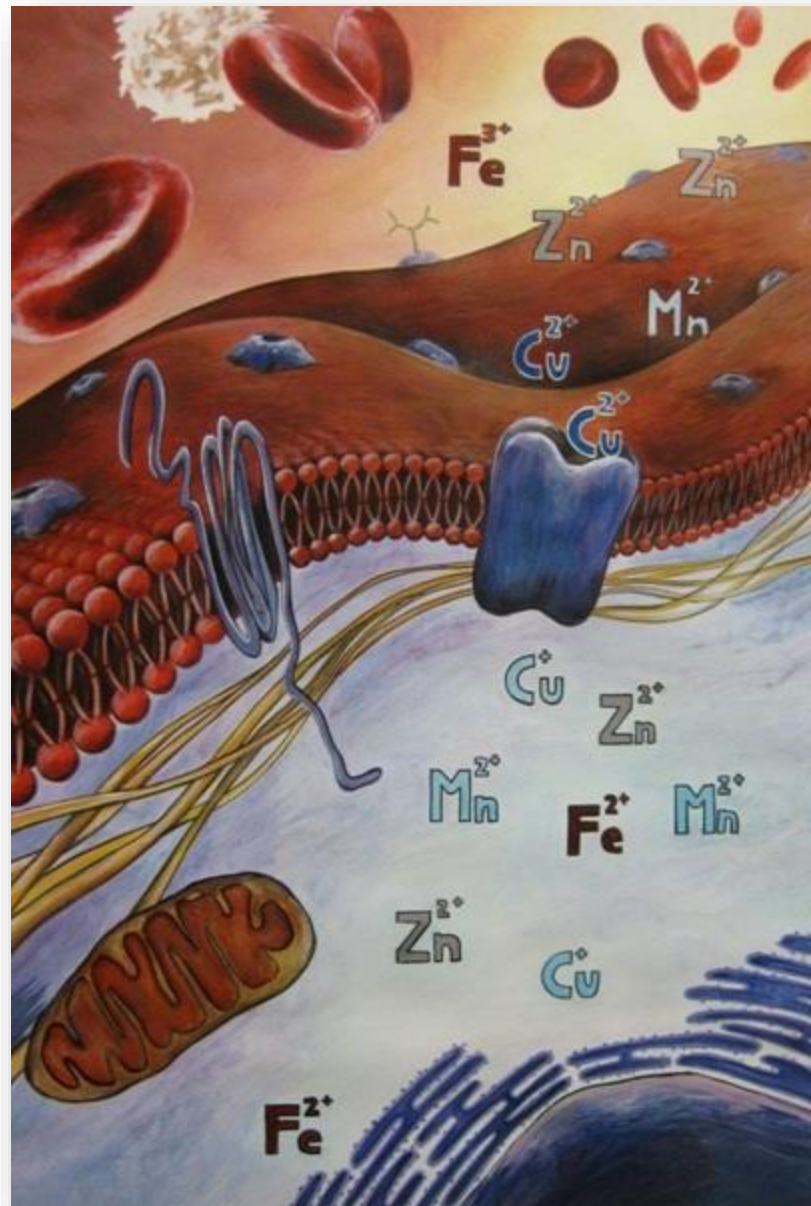


	Slobodni gost L-Trp	Kompleks gost-domaćin	$\Delta\delta$
a	7.13	7.02	-0.11
a'	7.05	6.89	-0.16
b	7.58	7.16	-0.42
c	7.39	7.14	-0.25
d	7.16	6.82	-0.34
e	3.15	3.00	-0.15
f	3.34	3.26	-0.07
g	3.90	3.77	-0.12



# Osnove bioorganometalne kemije

Prof. dr. sc. Lidija Barišić



## Metaloenzimi

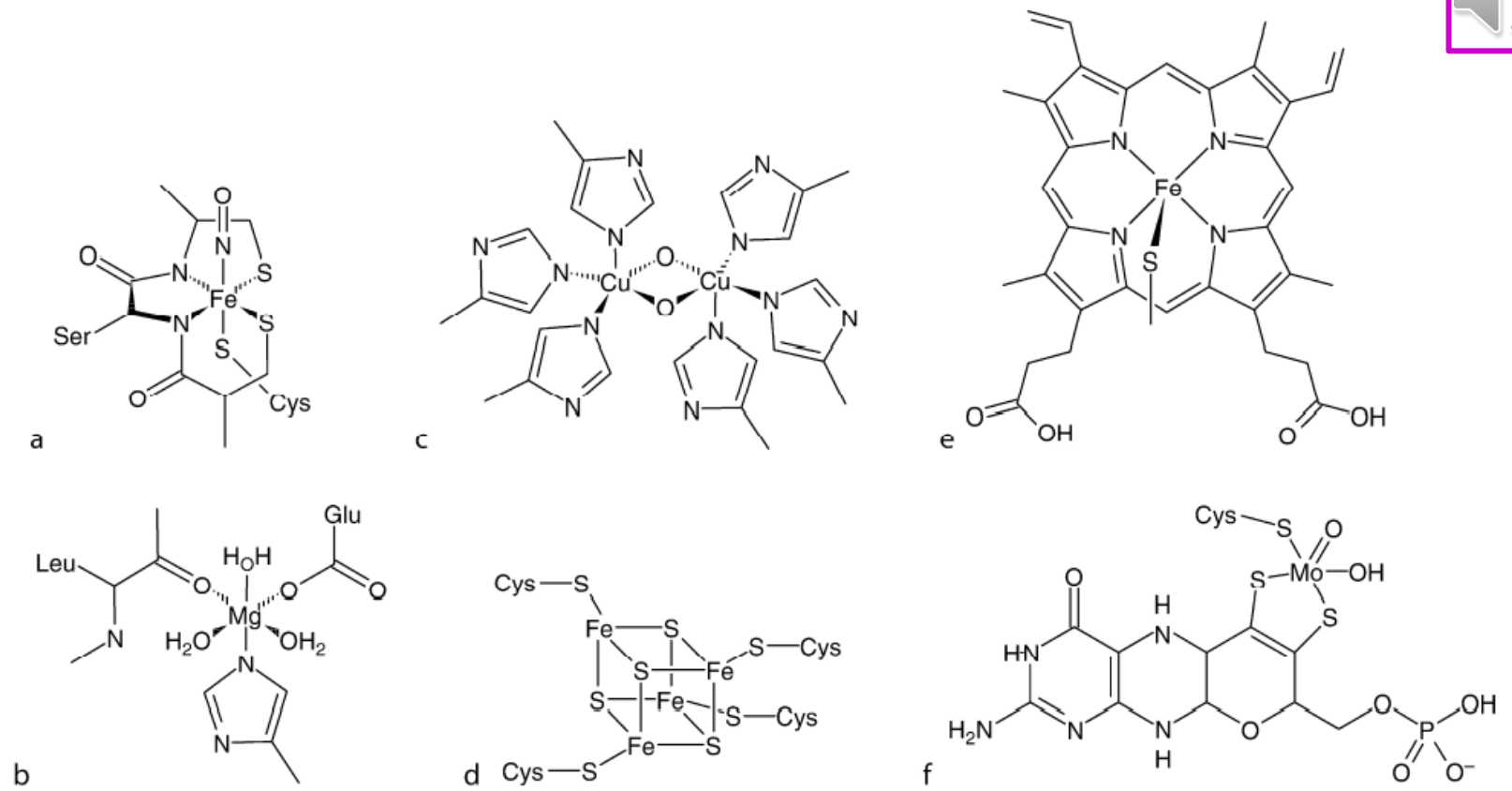


- Metaloenzimi (širi pojam metaloproteini) su enzimski proteini koji sadrže jedan ili više metalnih iona (metalnih kofaktora) koji su izravno vezani za proteine ili enzimski-vezane neproteinske prostetičke skupine. Trećina svih poznatih enzima ubraja se u metaloenzime. Osim enzimske uloge (biokataliza biokemijskih reakcija), metaloproteini mogu biti uključeni u neenzimske reakcije transfera elektrona (citokromi), mogu služiti za pohranu (npr. feritin za skladištenje željeza) ili kao transportni proteini (transferin za željezo). U enzimskoj katalizi od posebnog su značaja prijelazni metali zahvaljujući svojoj redoks-aktivnosti i/ili visokoj gustoći naboja što omogućava polarizaciju enzimskih supstrata. Vanadij, molibden, volfram, mangan, željezo, kobalt, nikal i bakar prisutni su u mono-, di- i polinuklearnim metalnim centrima i vezani su za kisikov, dušikov ili sumporov atom iz polipeptidnih liganada.

**Metalloenzymes, Table 1** Abundance of some metals in bacterial and algal organisms in g/100 g (dry weight) and some important key functions in enzymes (Barton et al., 2007)

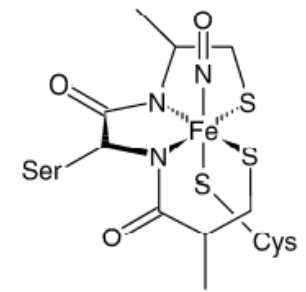
Element	Algae	Bacteria	Some specific roles in enzymes
K	1.81	1.7	Protein stabilization
Ca	0.55	0.1	Protein stabilization
Mg	0.35	0.25	Protein stabilization
Fe	0.011	0.015	O <sub>2</sub> transport, storage and/or activation; electron transport; superoxide breakdown
Mn	0.006	0.005	O <sub>2</sub> evolution; peroxide and superoxide breakdown
Zn	0.001	0.005	Protein stabilization; hydrolytic cleavage
Cu	0.0007	0.001	O <sub>2</sub> transport, storage and/or activation; electron transport; superoxide breakdown
Mo	0.0001	0.001	Oxygen transfer; N <sub>2</sub> activation
Co	0.0003	0.001	Free radical reactions; nucleophil

- Podjela metaloenzima zasniva se na bioanorganskim obrascima, odnosno metalu i njegovom ligandu. Metalni centri klasificiraju se prema broju vezanih metalnih atoma kao mononuklearni (jedan metalni centar, slike a i b) ili polinuklearni (više od jednog metalnog atoma, slike c i d). Vezani ligandi mogu biti endogeni [unutarnjeg podrijetla-stvara se u organizmu (polipeptidi)] ili egzogeni [vanjskog podrijetla (neproteinske komponente poput hema ili molibdopterina), slike e i f]. Pri tom različiti metali (Co, Cu, Fe, Mg i Ni) mogu biti vezani za iste ili slične bioorganske komponente.

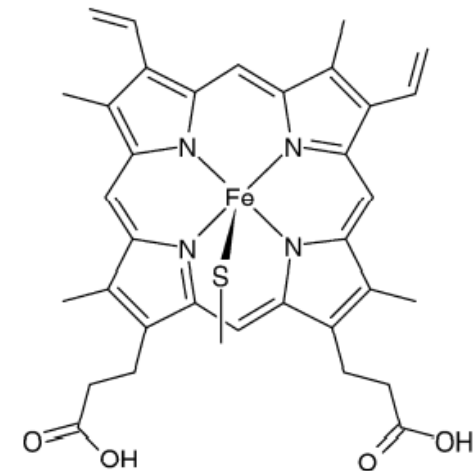


**Metalloenzymes, Figure 1** Various metal centers (from Degtyarenko, 2000) (a) mononuclear iron center (nitrile hydratase), (b) mononuclear magnesium center (Ni-Fe-hydrogenase from *Desulfovibrio*), (c) dinuclear copper center (oxyhemocyanin), (d) polynuclear iron-sulfur center, (e) heme iron coordination (cytochrome P450), and (f) molybdopterin (sulfite oxidase).

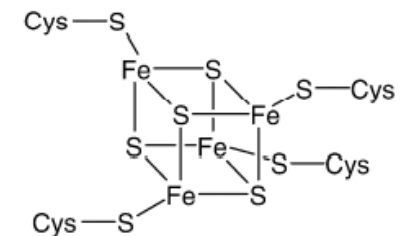
- Mononuklearni Fe-proteini su oksidoreduktaze ili su uključeni u prijenos elektrona. Njihovi aminokiselinski ligandi najčešće su His i/ili Cys (nitrilhidrataza s tri Cys-ostatka i dva amidna N-atoma).



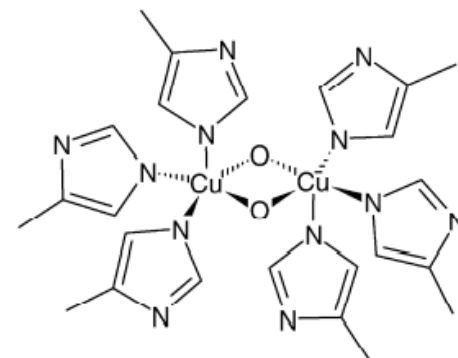
- Hemoproteini karakterizirani su Fe-porfirinom kao prostetičkom skupinom. Dok su četiri Fe-liganda okupirana porfirinskim prstenom, preostala dva su raspoloživa za vezanje s proteinima. U hemoproteine ubrajaju se oksidoreduktaze (katalaze, peroksidaze), proteini prijenosnici elektrona (citokromi) i proteini koji prenose i skladište kisik (globini).



- Fe-S proteini karakterizirani su prisutnošću Fe-S klastera koji sadrže sulfid-vezane di-, tri- i tetra-Fe centre u različitim oksidacijskim stanjima. Takvi su klasteri nađeni u feredoksinima, NADH-hidrogenazama, dehidrogenazama, citokrom c reduktazama, nitrogenazama. Ovi proteini imaju ključnu ulogu u gotovo svim respiratornim lancima. Njihove ostale uloge uključuju katalizu i stereospecifičnu izomerizaciju citrata u izocitrat u ciklusu limunske kiseline kao i u redoks-ovisnoj regulaciji gena. Najjednostavniji klaster sastoji se iz dva Fe-iona premoštena dvama sulfidnim ionima, a koordiniran je s četiri Cys-liganda ili s dva Cys i dva His.



- Cu-proteini su, poput Fe-proteina, uključeni u prijenos kisika i elektrona. *Tip I Cu-proteina* sadrži jedan Cu koordiniran s dva Hys-ostatka i Cys-ostatkom u trigonalnoj planarnoj strukturi i s varijabilnim aksijalnim aminokiselinskim ligandima (npr. askorbat-oksidge, lakaze, nitrit-reduktaze). *Tip II Cu-proteini* su kvadratno-planarno koordinirani s N ili N/O ligandama (kao, primjerice, u galaktoza-oksidgezi). *Tip III Cu-proteina* sastoji se iz dva Cu-atoma koji su koordinirani s tri His-ostatka (katehol-oksidgeza, hemocijanini, tirozinaza).

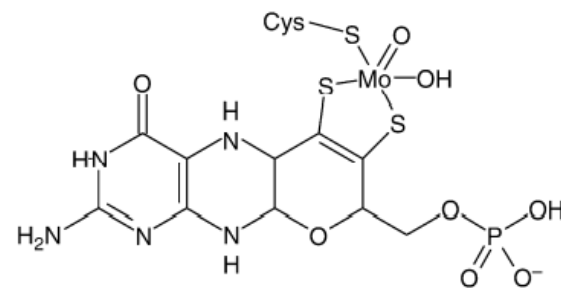


- Zn-proteini predstavljaju treću veliku skupinu metaloproteina, a sadrže jedan, dva ili tri Zn-iona. Zn-ioni u tim proteinima klasificirani su kao katalitički, kokatalitički te strukturni. Pri tom je Zn izravno uključen u cijepanje ili tvorbu kemijskih veza, sudjeluje u katalitičkim reakcijama zajedno s drugim metalnim ionima ili je zadužen za očuvanje strukturnog integriteta pripadajućeg enzima (pri čemu je koordiniran s četiri aminokiselinska bočna ogranka u tetraedarskoj geometriji). Zn-ioni u katalitičkim mjestima općenito su koordinirani s bočnim ograncima triju aminokiselinskih ostataka i molekulom vode. Zn ima popunjenu *d*-orbitalu te ne sudjeluje u redoks-reakcijama, ali djeluje kao Lewisova kiselina (akceptor elektrona) u reakcijama proteolize i hidriranja CO<sub>2</sub>.
- Važni Zn-enzimi su alkohol-dehidrogenaza (Zn je odgovoran za vezanje hidroksilnog O-atoma iz alkohola), metaloproteaze, ugljikova anhidraza. Kokatalitički Zn nalazi se u super-oksidge dismutazi, fosfataza-aminopeptidazi, β-laktamazi.

- Mn u metaloenzimima djeluje kao Lewisova kiselina. Mn(II) može biti oksidiran u (III)-ili (IV)-stanje, što omogućuje redoks-reakcije u biološkim sustavima. Mn-centri mogu biti mono-, di-, tri- i tetra-nuklearni. Mn-superoksid-dismutaze (SODs) sadrže mononuklearni centar i predstavljaju antioksidacijske metaloenzime koji kataliziraju redoks-disproporcioniranje (razgradnju) super-oksid radikala u  $H_2O_2$ . Aktivno Mn-mjesto je pentakoordinirano, a metalni su ligandi raspoređeni u trigonalnoj bipiramidalnoj geometriji. Mn-enzimi s dinuklearnim centrima su arginaza (katalizira konverziju Arg u ureu i ornitin), Mn-katalaza, aminopeptidaza P iz *E. coli*. Jedna od najvažnijih biokemijskih katalitičkih reakcija u našoj biosferi jest fotoliza vode kojom se tvori kisik, a odvija se u prisutnosti tetranuklearnog Mn-klastera pri fotosintezi u cijanobakterijama, eukariotskim algama i višim biljkama.



- Mo- i W-enzimi kataliziraju osnovne metaboličke reakcije. Mo je najčešće asociran s heterocikličkim pterinskim derivatom koji sadrži mononuklearni centar koordiniran s tiolnom skupinom. W ima kemijska svojstva slična Mo te je kompleksiran s pterinskim kofaktorima slično kao Mo. Zbog osjetljivosti prema visokom redoks-potencijalu, W-enzimi nađeni su u termofilnim anaerobnim bakterijama.



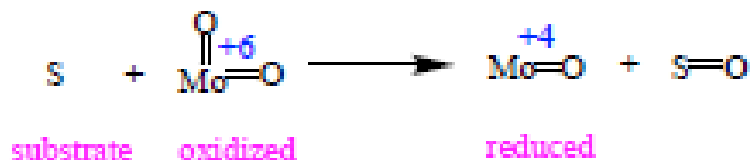
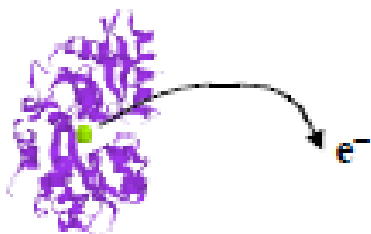
- Co je središnji metalni ion u tetrapirrolnom prstenu u koenzimu  $B_{12}$ . Co-enzimi kataliziraju prijenos metilne skupine u reakcijama izomerizacije kao i preraspodjelu vodikovih atoma između susjednih ugljikovih atoma u reakcijama pregradnje.

## Aktivna mjesta u metaloenzimima

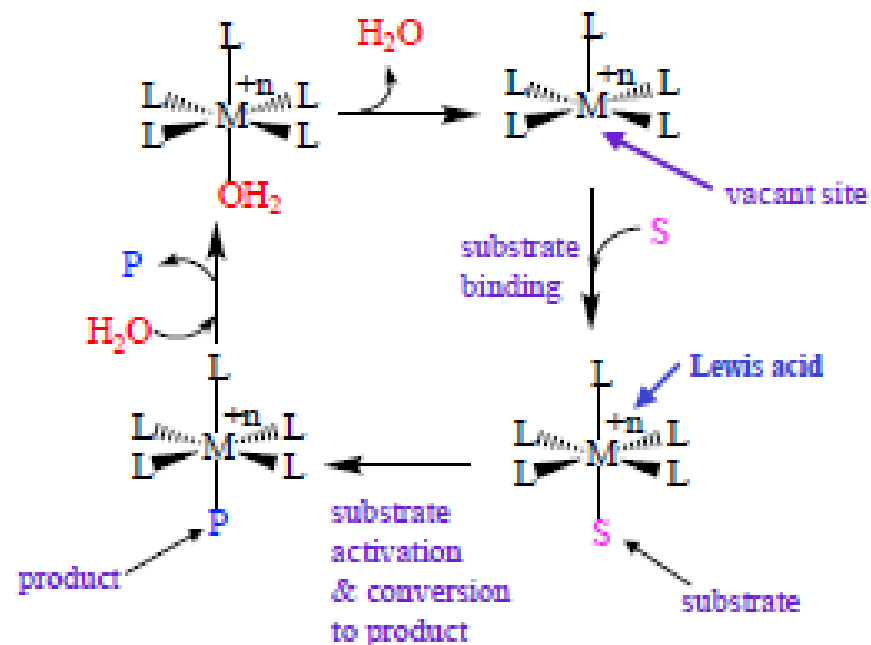


- Metaloenzimi kao prirodni biološki sustavi bazirani su na ionima prijelaznih metala okruženih proteinima. Brojne fundamentalne biološke reakcije upravljane su proteinima s metalnim kofaktorom. Takvi procesi uključuju redukciju inertnog  $N_2$  u biološki esencijalni  $NH_3$ , oksidaciju i tvorbu molekuskog vodika, različite oksidacijske reakcije koje uključuju  $O_2$  i korištenje  $CO_2$  i  $CO$  kao izvora ugljika. Metalni ioni imaju svojstvo Lewisovih kiselina te sudjeluju u brojnim fundamentalnim reakcijama koje obični enzimi ne mogu katalizirati. Trećina poznatih enzima sadrži metalni ion koji sudjeluje u reakcijama prijenosa elektrona i malih molekula, cijepanja i tvorbe veza, nabiranja proteina, itd.

### Redox reactions and electron transport

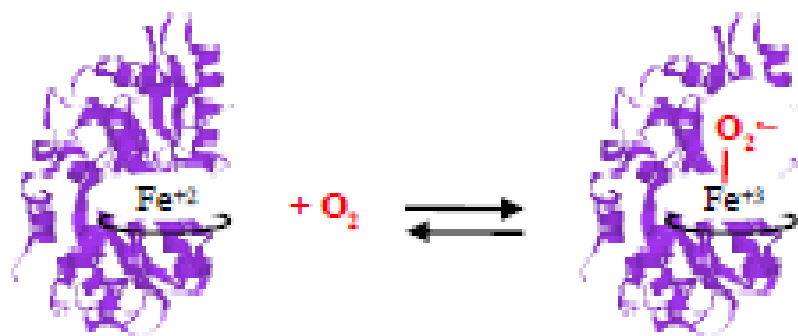


### Substrate binding and activation

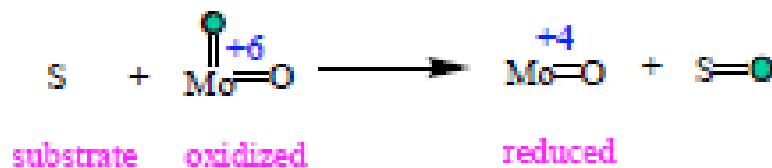




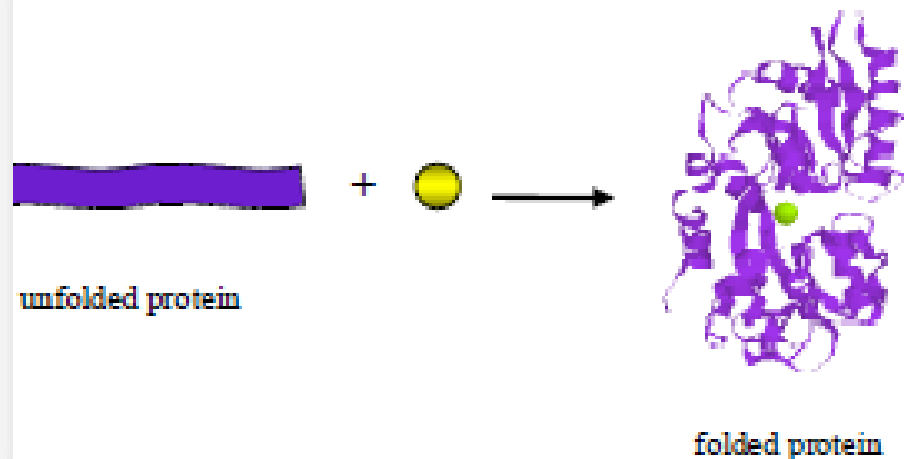
## Small molecule transport



## atom transfer

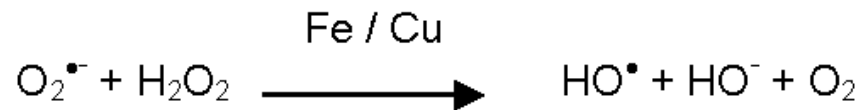


## Protein folding (structural role)

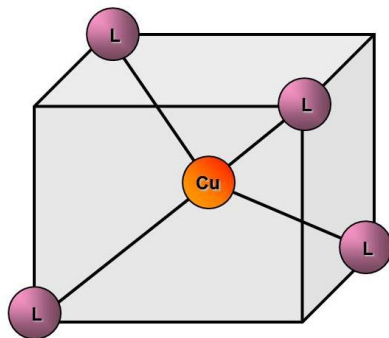


## Bakar

- Bakar je i esencijalan i toksičan, a njegov nepravilni metabolizam dovodi do različitih patoloških stanja (Alzheimerova bolest).
- Esencijalna uloga u mnogim staničnim procesima: antioksidacija, pigmentacija, disanje, sinteza neurotransmitera, tvorba vezivnog tkiva, metabolizam željeza, itd. Njegova je toksičnost posljedica Haber-Weissove reakcije Cu-iona s  $\text{H}_2\text{O}_2$  pri čemu nastaju ROS (patološka stanja):

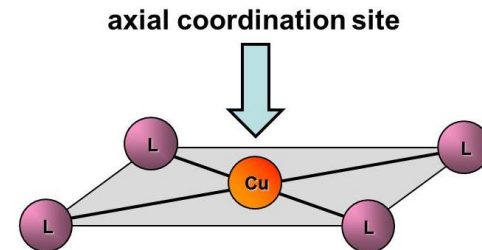


- Njegova biološki dostupna stanja su Cu(I) i Cu(II). Cu(I) preferira cisteinske i metioninske ostatke ostvarujući tetraedarsku koordinaciju, dok je Cu(II) uglavnom koordiniran s histidinom, serinom, treoninom ili tirozinom i vodom i stvara planarnu kvadratnu geometriju.



Cu(I) :  $d^{10}$

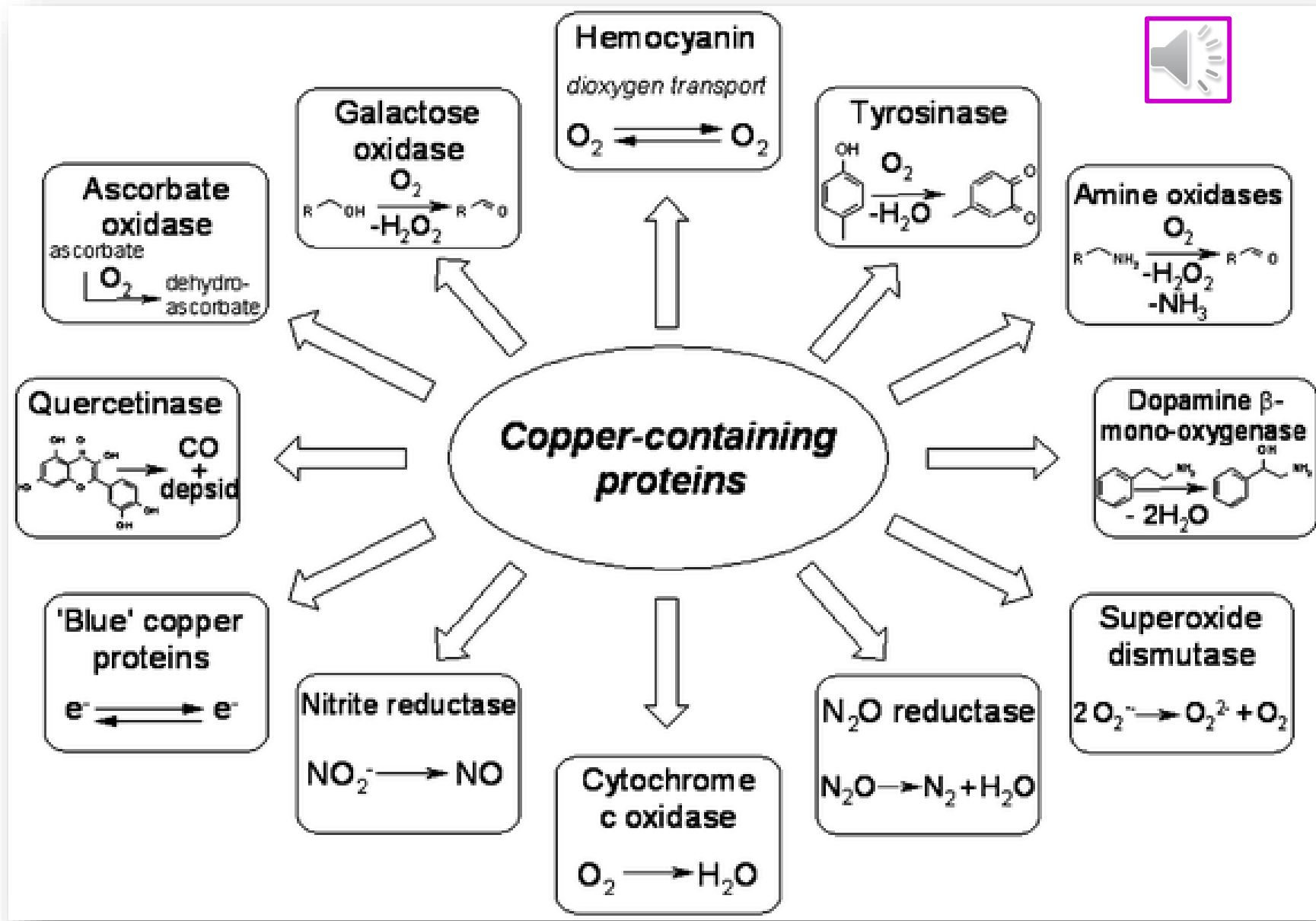
Pseudo-tetrahedral



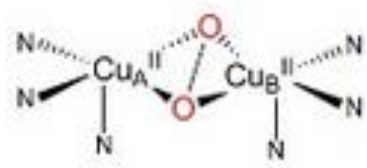
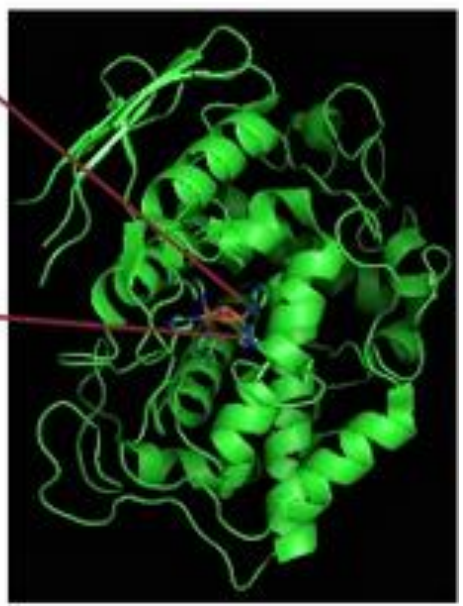
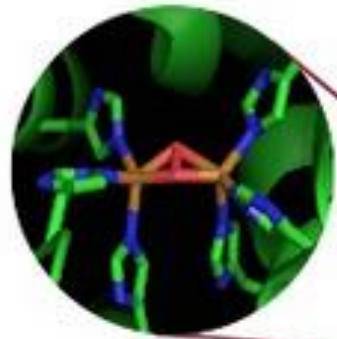
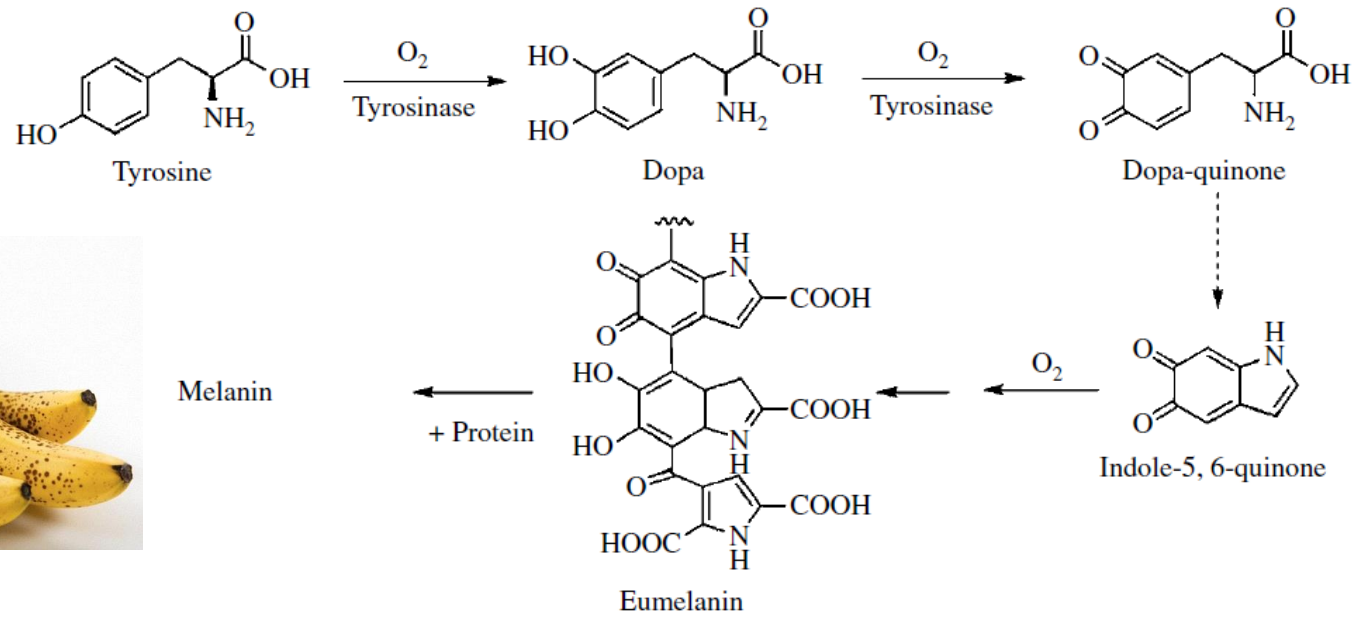
Cu(II) :  $d^9$

Planar geometry

- Bakar se nalazi se u aktivnim mjestima brojnih enzima.



- **Tirozinaza** sudjeluje u tvorbi melanina, zacjeljivanju rana i imunoodgovoru.



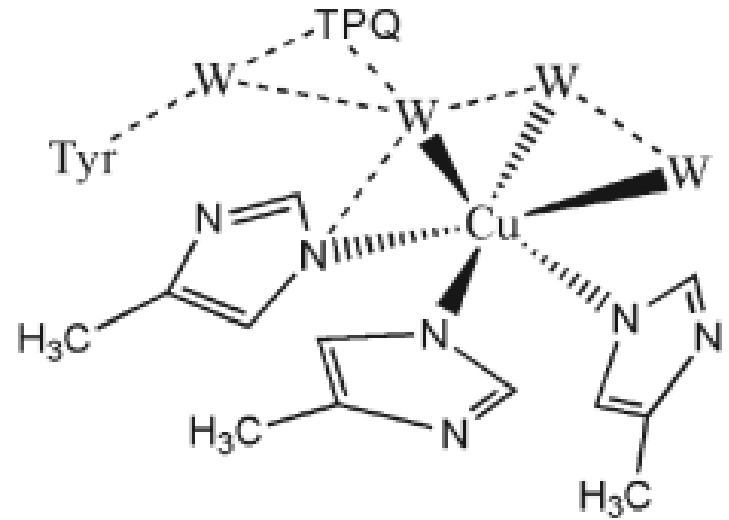
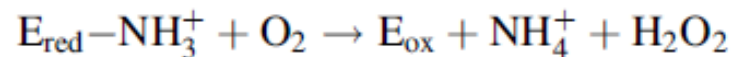
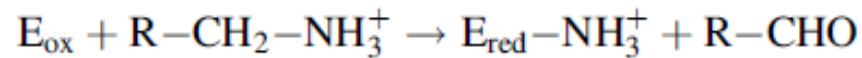
- Ispituje se kao mogući biomarker za melanom.

- Enzimsko aktivna mjesta koja sadrže Cu razlikuju se po svojim spektroskopskim svojstvima, te se dijele na tri tipa:



	Mononuclear		Dinuclear		Tetranuclear
Type	Type 1	Type 2	Type 3	Cu <sub>A</sub>	Cu <sub>Z</sub>
<b>UV-vis Spectrum</b>	Strong absorption ~ 600 nm and (in some proteins) 450 nm	Weak absorption ~ 700 nm	Weak absorption ~ 700 nm	Strong absorption ~ 480 and 530 nm	Strong absorption ~ 640 nm
<b>EPR spectrum</b>	4-line ( $A_{  } < 80 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ )	4-line ( $A_{  } \sim (130-180) \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ )	non-detectable	7-line ( $A_{  } \sim 30-40 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ )	2x4-line ( $A_{  } \sim 61 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ & $A_{\perp} \sim 24 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ )
<b>Common ligands</b>	His, Cys, (Met)	His, Asp, (Tyr)	His, (Tyr)	His, Cys, (Met)	His, S <sup>2-</sup>
<b>Active site geometry</b>	Distorted tetrahedral	Distorted tetragonal	Tetragonal	Trigonal planar	m <sub>4</sub> -S <sup>2-</sup> tetracopper cluster
<b>Examples</b>	Azurin Plastocyanin Stellacyanin Nitrite reductase Laccase	Superoxide dismutase Galactose oxidase Amine oxidase Nitrite reductase Laccase	Hemocyanin Tyrosinase Catechol oxidase Laccase	Cyt c oxidase N <sub>2</sub> O reductase Menaquinol NO-reductase	N <sub>2</sub> O reductase

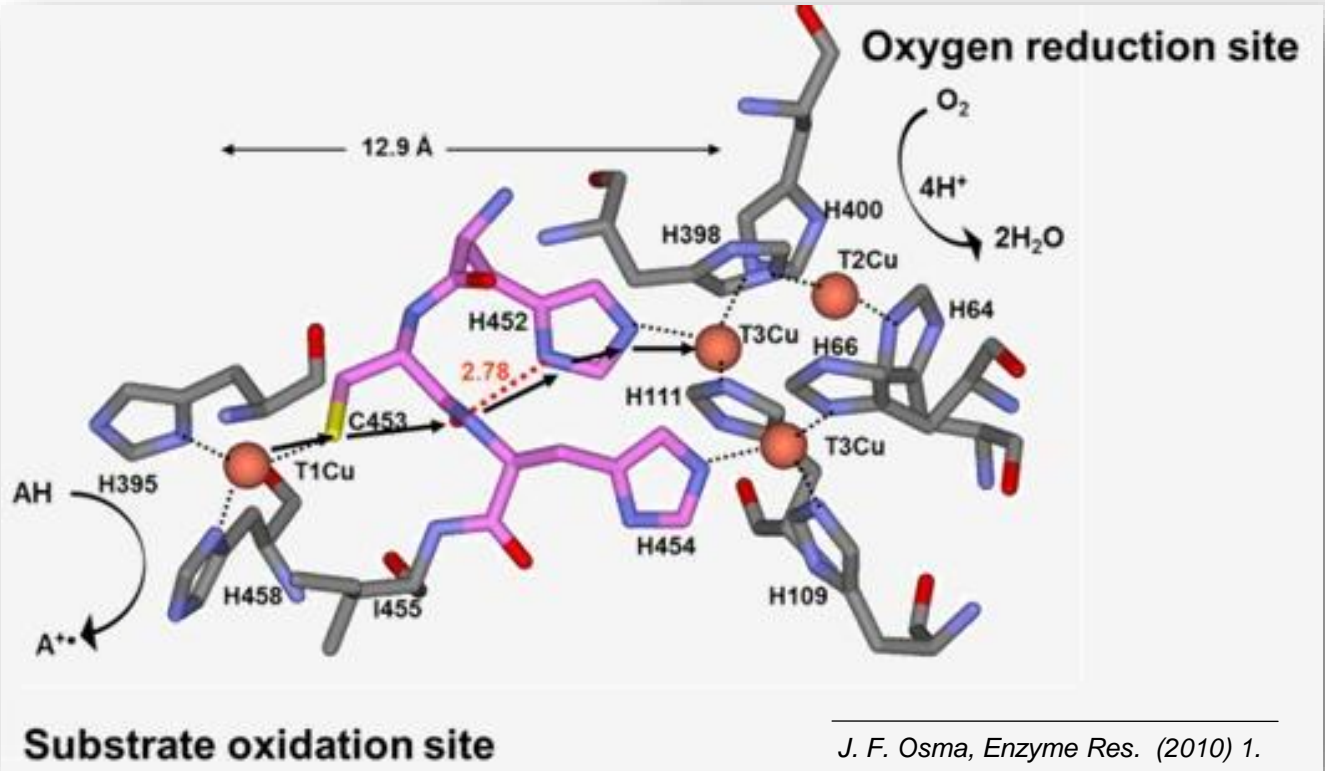
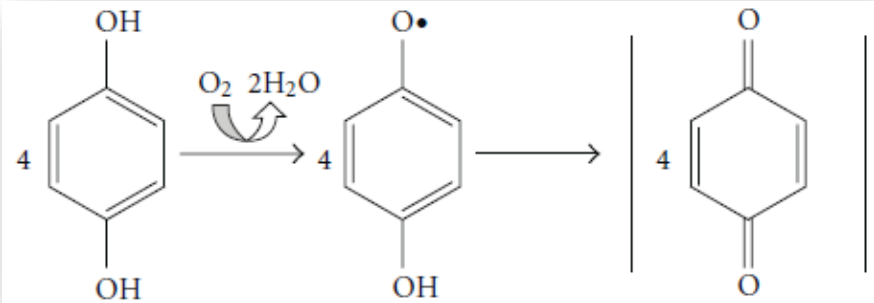
- **Amin-oksidadza** prisutna je u prokariotskim i eukariotskim organizmima; sadrži Cu-ion i redoks-aktivni kofaktor topakinon (TPQ; 2,4,5-trihidroksi-fenilalanin); Cu(II) ion koordiniran je s tri histidinska ostatka i tri molekule vode (W).
- Katalizira oksidativno deaminiranje primarnih amina u (i) odgovarajuće aldehide uz (ii) popratnu redukciju kisika u vodikov peroksid:



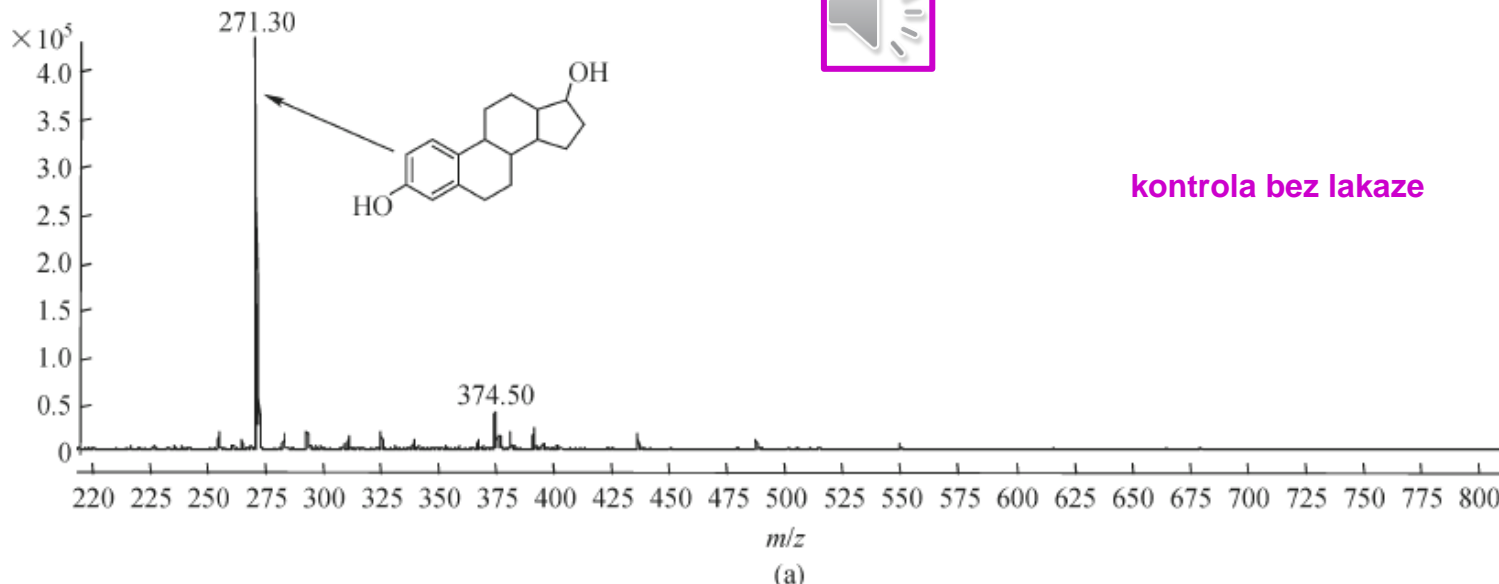
- Amin-oksidadze reguliraju nivo mono- i poliamina (spojeva čija je koncentracija povećana u tumorskim tkivima) tvorbom citotoksičnih metabolita (aldehida i vodikova-peroksida). Novi terapijski pristup u liječenju karcinoma zasniva se na dopremi amin-oksidadze u stanicu raka nakon čega bi uslijedila intracelularna tvorba toksičnih oksidacijskih produkata koji bi selektivno ubijali samo stanicu u kojoj su nastali, tj. malignu stanicu.

- **Lakaza** je široko rasprostranjena među biljkama, insektima i fungima. Sadrži četiri atoma bakra u aktivnom mjestu (ubraja se u plave oksidaze). Katalizira oksidaciju različitih fenolnih spojeva, diamina i aromatskih amina uz popratnu redukciju kisika u vodu u čemu sudjeluju četiri Cu-iona. Oksidira supstrat zahvaljujući elektron-akceptorskim svojstvima bakra; u potpuno reduciranom stanju sadrži 4 elektrona

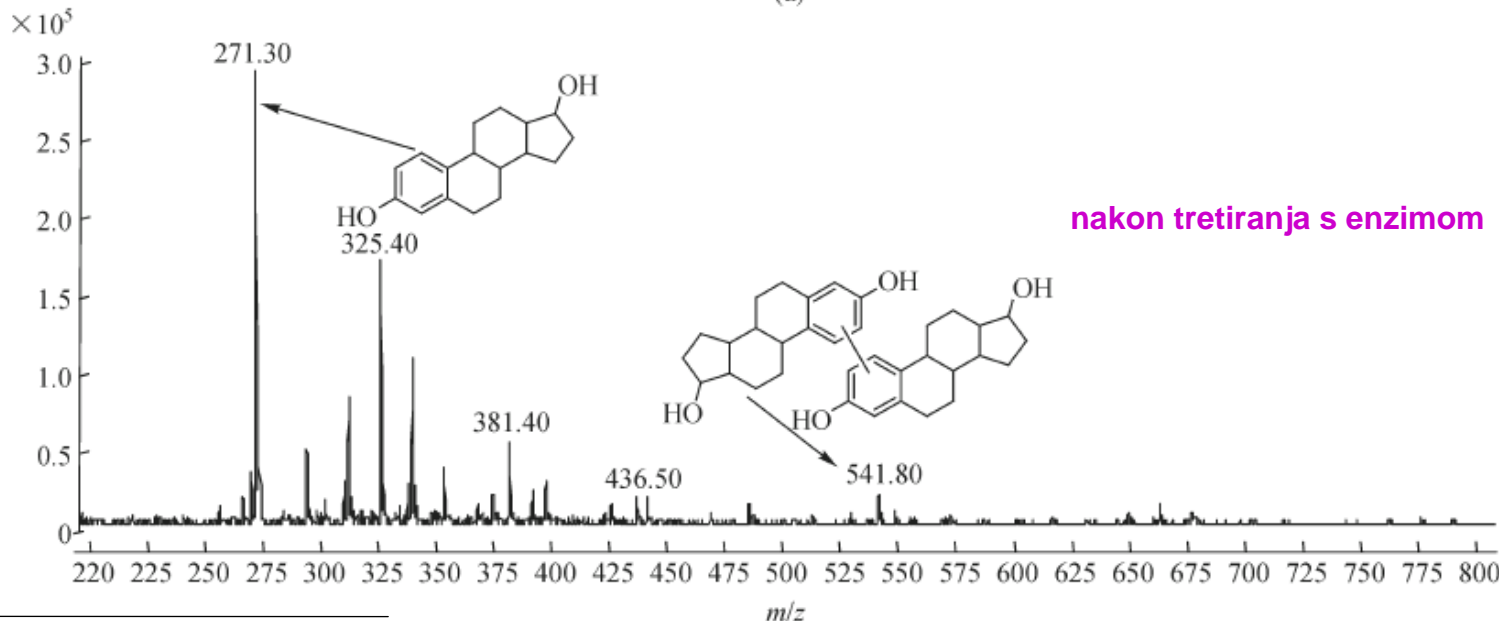
kojima kisik reducira u vodu. Primjena u prehrambenoj industriji: aditiv u preradi hrane i pića, stabiliziranje vina i piva, pekarstvo,...



- Lakaza katalizira oksidativnu dimerizaciju 17 $\beta$ -estradiola  $\Rightarrow$  na takvoj bi se kopulaciji mogla temeljiti strategija kontrole steroidnih estrogena.



kontrola bez lakaze

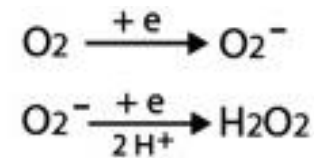


nakon tretiranja s enzimom

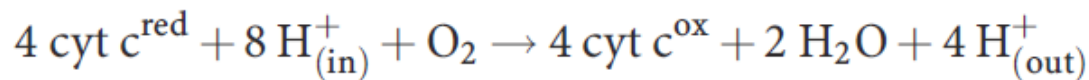


## Željezo

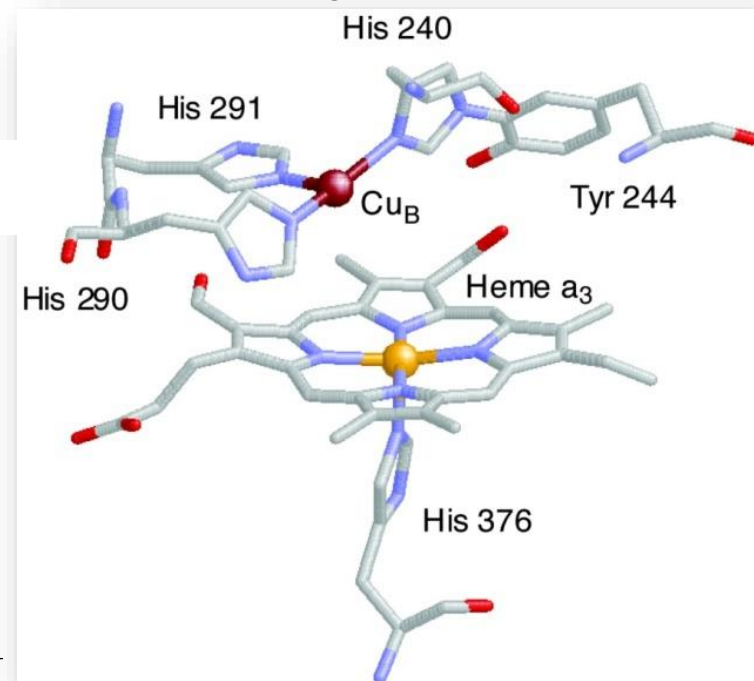
- Željezo igra ključnu ulogu u metabolizmu svih stanica (replikacija DNA, fotosinteza, proliferacija, itd.). Najzastupljeniji je metal u tragovima. U reducirajućem okruženju zdrave stanice, željezo može katalizirati jedno-elektronsku redukciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  u visokoreaktivni oksidant – hidroksilni radikal. Takva se nepoželjna reakcija može spriječiti vezivanjem željeza za proteine.



- **Citokrom c oksidaza (COX)** terminalni je enzim u respiratornim lancima mitohondrija i aerobnih bakterija te u oksidaciji hrane; katalizira prijenos elektrona s reduciranog citokroma c na kisik reducirajući ga u vodu:



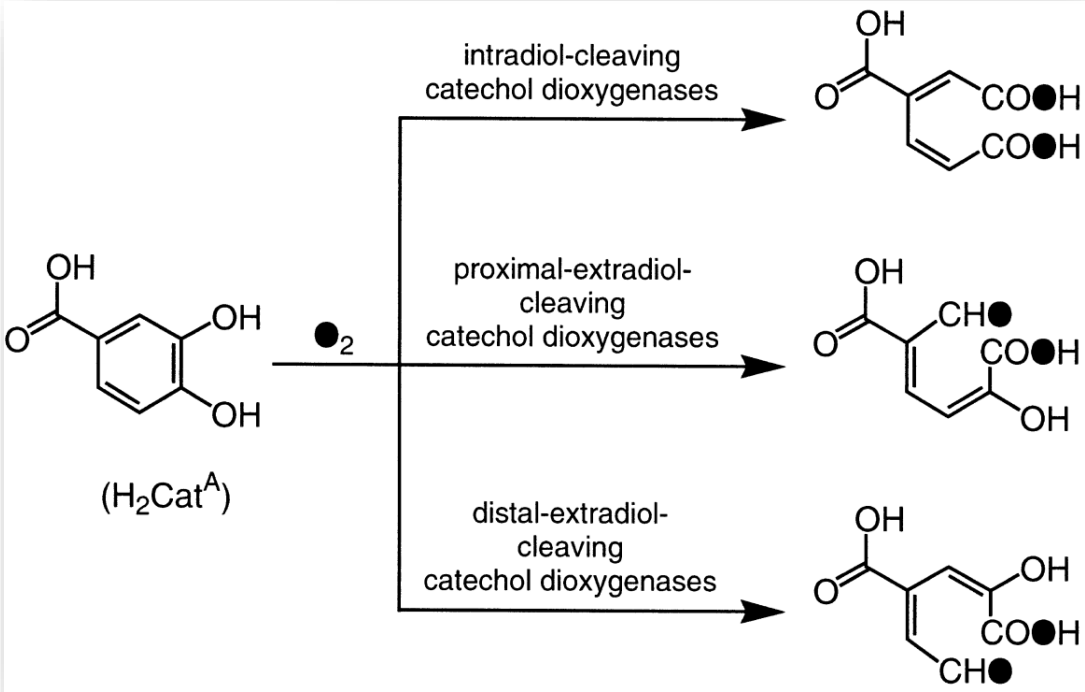
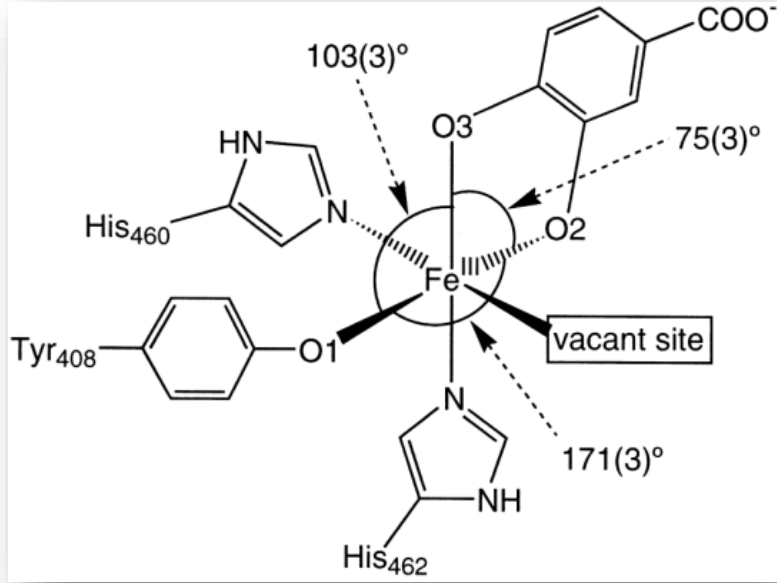
- Sadrži dvije hem skupine (prostetičke skupine u kojima je Fe smješten u središte porfirinskog prstena) i tri iona bakra; jedna hem skupina i jedan ion bakra izgrađuju katalitički centar (hem  $\text{a}_3/\text{Cu}_\text{B}$ ).



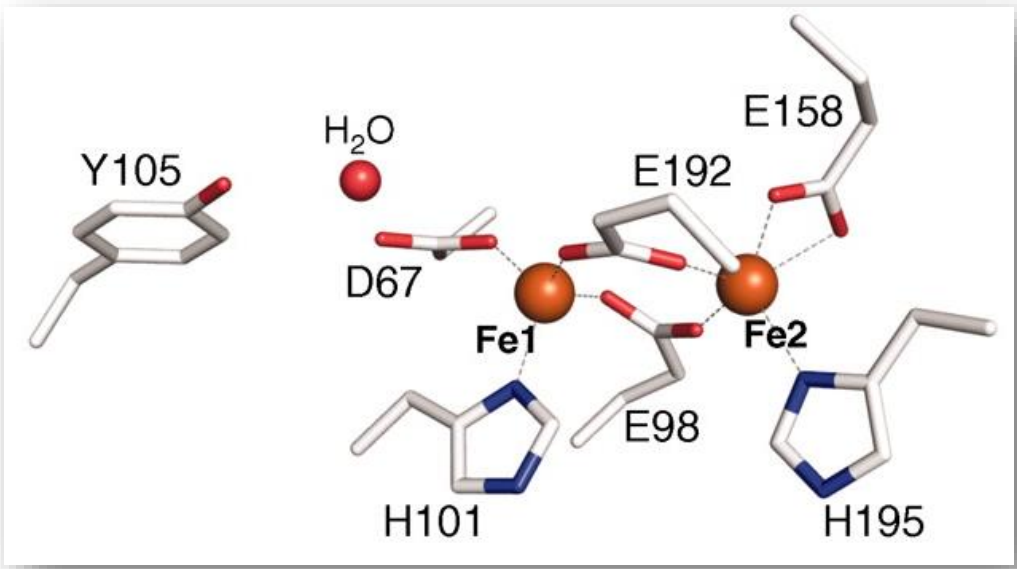
- **Oksigenaze:** dvije vrste Fe-enzima kataliziraju reakciju kisika s organskim supstratima. Dioksidogene ugrađuju oba atoma kisika u produkt, dok monooksigenaze jedan atom kisika ugrađuju u produkt, dok se drugi atom eliminira redukcijom u vodu.



- Metabolička konverzija aromatskih spojeva u alifatske od fundamentalnog je značaja u biologiji. Katehol-dioksidogena: katalizira oksigenaciju katehola u alifatske kiseline uz cijepanje aromatskog prstena.
- Stoga oksigenaze igraju važnu ulogu u razgradnji lignina i terpena, kao i u katabolizmu Trp i Tyr.

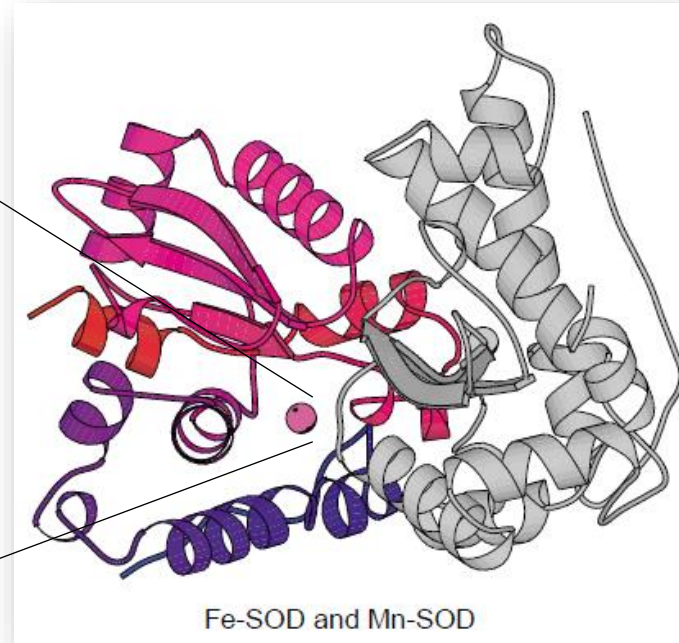
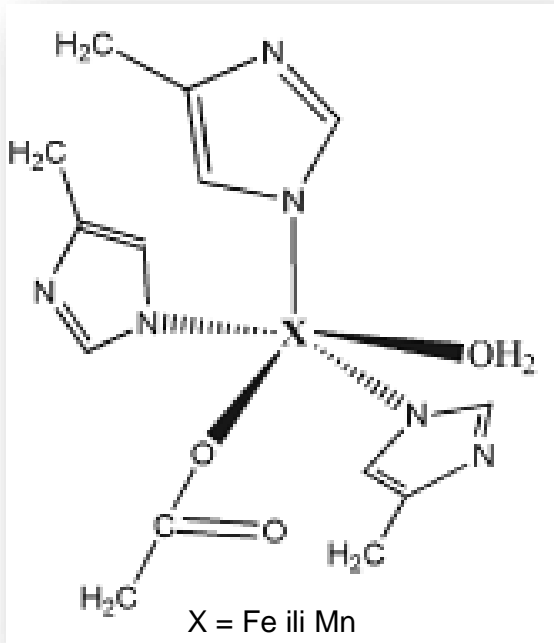
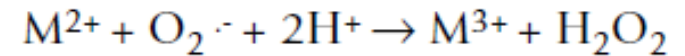
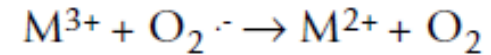


- **Ribonukleotid-reduktaza (RR)** katalizira ključni korak u sintezi DNA – redukciju ribonukleotida. Reakcija uključuje supstituciju C2'-hidroksilne skupine iz riboze s vodikom.

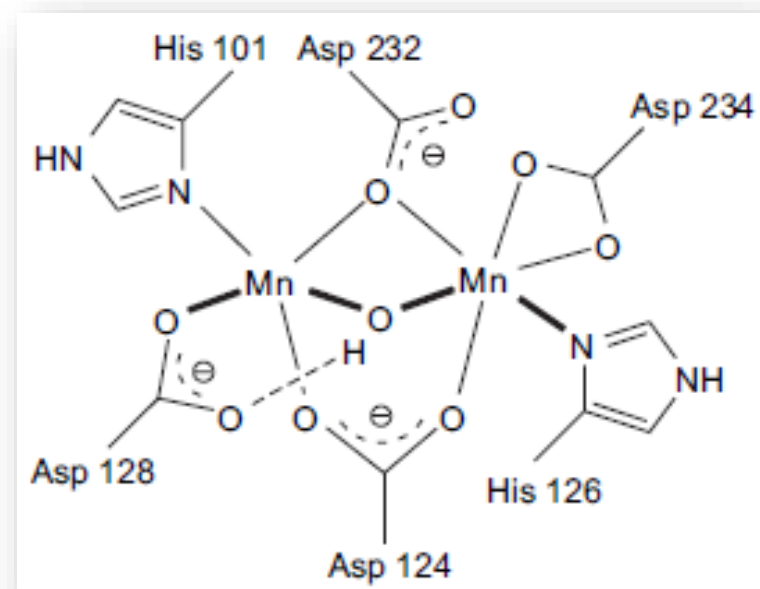
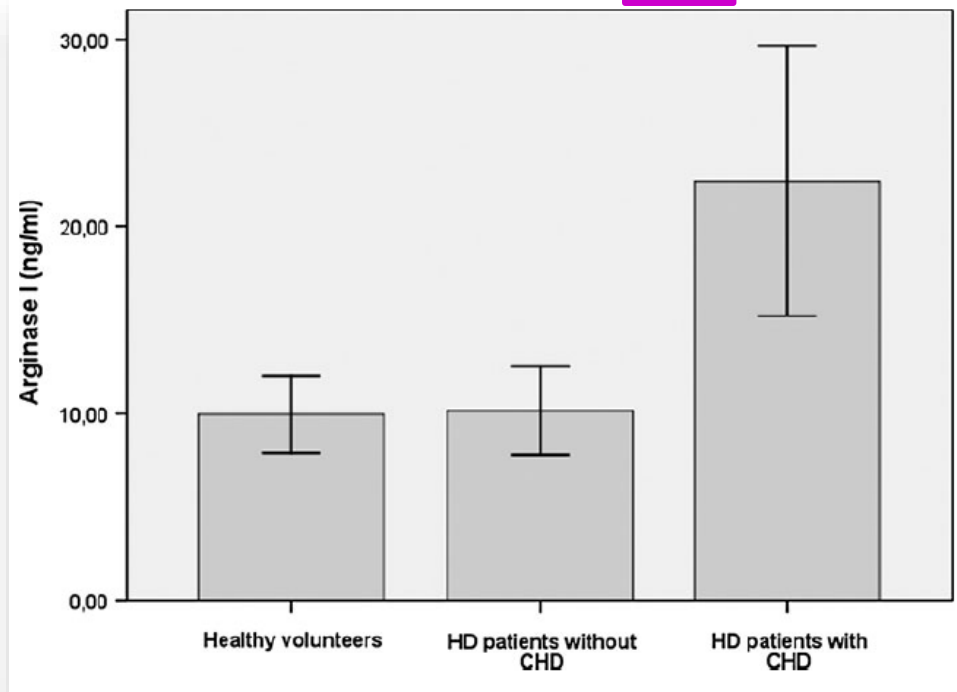
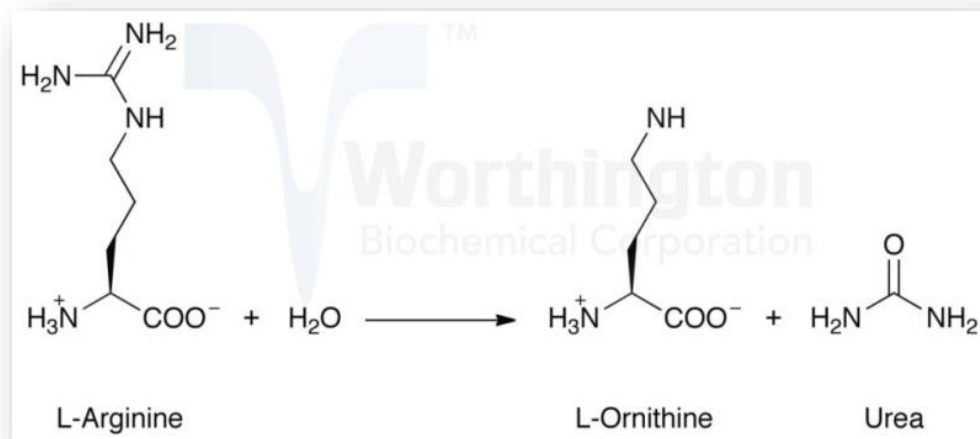


# Mangan

- Mangan je prisutan u biljnim i životinjskim tkivima. Ima ulogu kofaktora enzima uključenih u fosforilaciju, hidrolizu, dekarboksilaciju i transaminiranje.
- **Superoksid-dismutaza** je ključni enzim; katalizira dismutaciju (disproporcioniranje) superoksid-radikala u vodikov peroksid i kisik.
- Superoksid-radikal nastaje u stanici kao posljedica enzimske i spontane oksidacije; toksičan je za stanicu i razgrađuje biološke molekule (lipide i proteine).

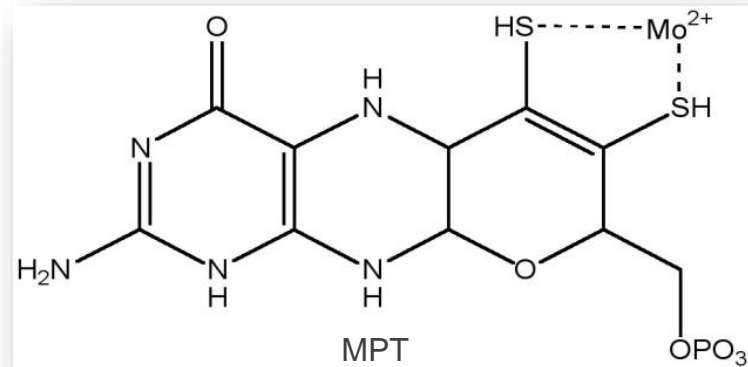


- **Arginaza** katalizira hidrolizu Arg u Orn i ureu. Aktivno mjesto sadrži dva iona Mn koordinirana s po jednim His- i trima Asp-ostacima. Ioni Mn polariziraju i usmjeravaju premošteni hidroksidni ion u nukleofilni napad na gvanidinijev [HNC(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] C atom (iz supstrata).
- Arginaza I može se koristiti kao biomarker za koronarne srčane bolesti (snižava razinu vazodilatatora NO te izravno pridonosi razvoju ateroskleroze).



## Molibden

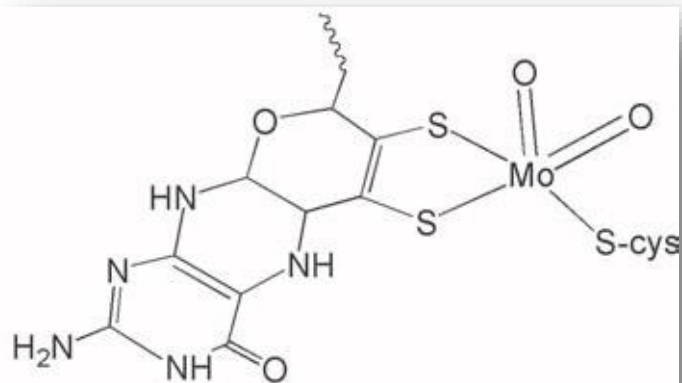
- Molibden je prisutan u katalitičkom centru nitrogenaza, te kao kofaktor u brojnim enzimima. Mo-kofaktori sastoje se iz mononuklearnog metalnog iona i organskog dijela molibdopterina (MPT).



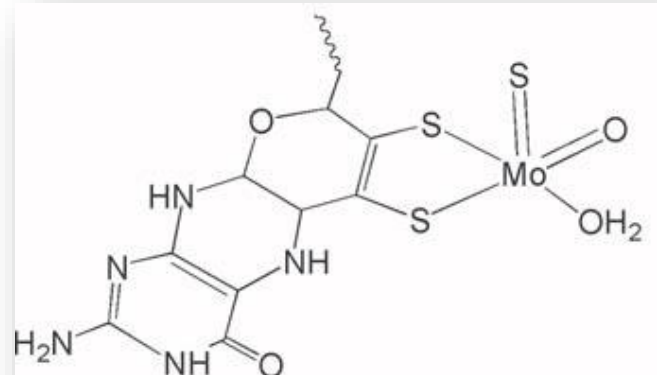
- MPT-enzimi dijele se u dvije skupine:

- medijatori prijenosa kisika (DMSO-reduktaze i SO-oksidge),

- katalizatori hidroksiliranja aromatskih heterocikličkih spojeva (ksantin-oksido-reduktaze) i aldehida.



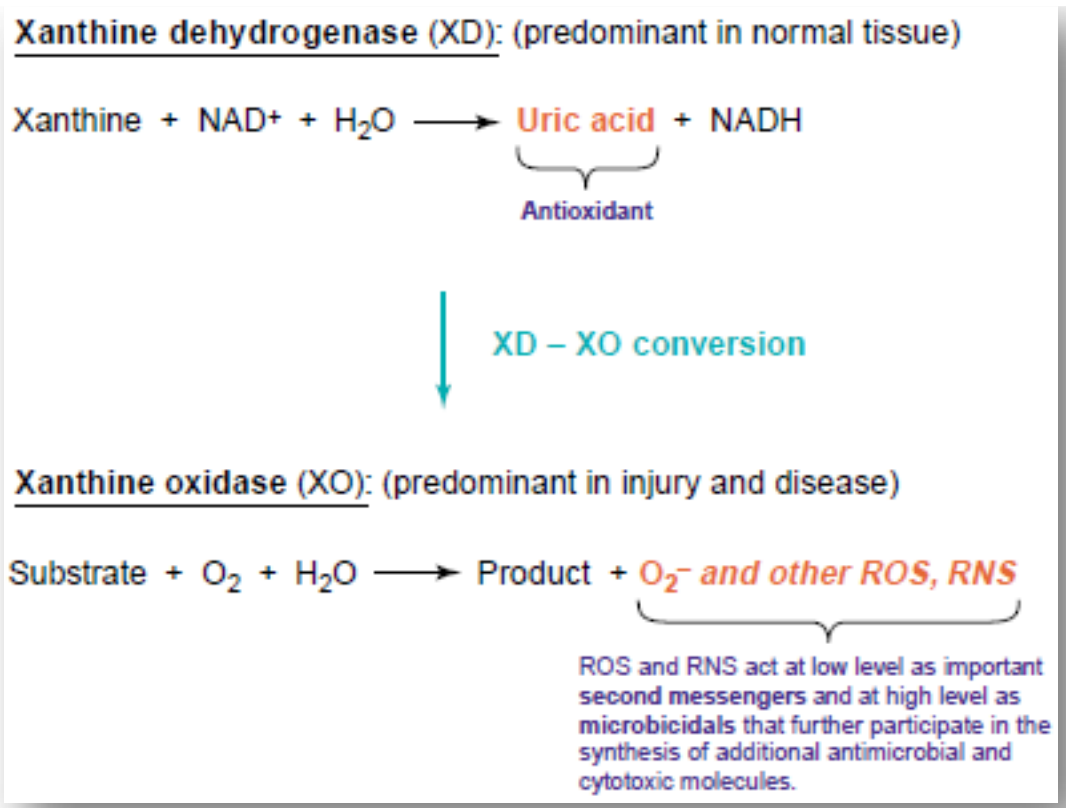
Sulfite dehydrogenase family



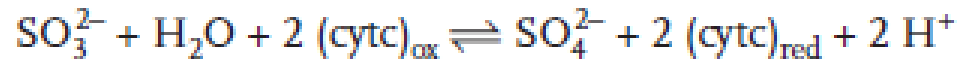
Xanthine dehydrogenase family



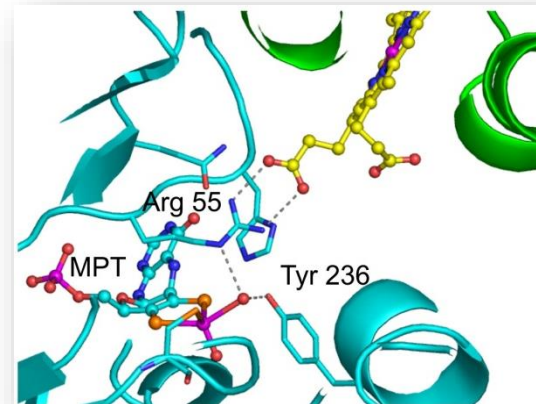
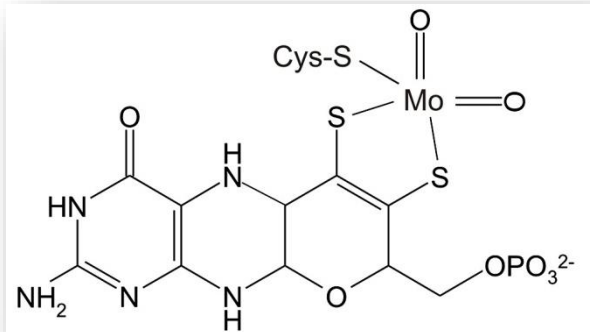
- **Ksantin-oksidoreduktaza (XOR)** ima ulogu u katabolizmu purina, detoksifikaciji i regulaciji staničnog redoks-potencijala. Javlja se u dva oblika:
  - ksantin-dehidrogenaza (XD): dovodi do nastanka antioksidansa mokraćne kiseline,
  - ksantin-oksidaza (XO): sinteza velikih količina ROS i RNS molekula.
- Tokom ishemijskog napada (smanjenog dotoka kisika u tkivo) aktiviraju se proteaze koje kataliziraju brzu konverziju XD u XO pri čemu se generira superoksid radikal koji uzrokuje vazodilataciju. Mogućnost brze konverzije XD u XO uslijed različitih ozljeda i oštećenja tkiva čini XOR idealnom komponentom imunostava.



- Sulfiti su prisutni u okolišu zahvaljujući različitim metaboličkim procesima koji dovode do njihove tvorbe. Visoko su reaktivni. Mogu reagirati s vitalnim staničnim komponentama, npr. s DNA i proteinima uzrokujući njihovo oštećenje. Nakupljanje sulfita može dovesti do oštećenja središnjeg živčanog sustava (mentalne retardacije) i povećanja oksidativnog stresa. Stoga i prokariotske i eukariotske stanice izložene sulfitima moraju razviti mehanizme detoksifikacije. Jedan od tih mehanizama uključuje direktnu oksidaciju sulfit-oksidadzama.
- **Sulfit-oksidadza (SO)** katalizira biološki esencijalnu oksidaciju sulfita u sulfate (terminalnu reakciju u oksidativnoj razgradnji Met i Cys).



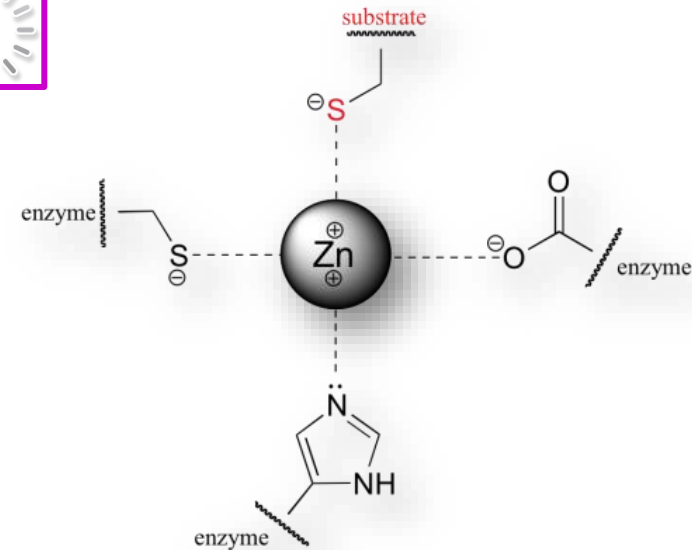
- Centralni Mo-atom u aktivnom mjestu koordiniran je s ditiolenskom skupinom iz MPT, jednim Cys-ostatom i dvjema okso-skupinama što rezultira kvadratno-piramidalnom geometrijom. U blizini Mo-centra nalazi se i jedan Tyr-ostatak i do tri Arg-ostatka koji podržavaju pravilnu orijentaciju sulfitnih aniona prema Mo-veznom mjestu enzima.





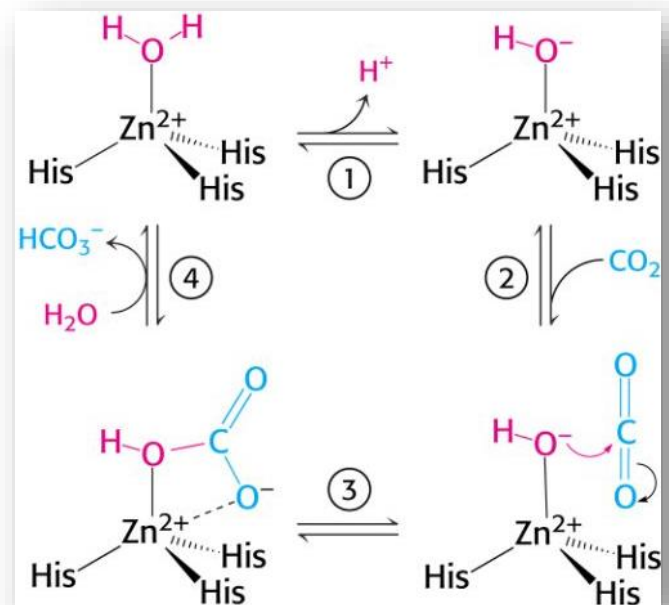


- Esencijalan za rast svih živih organizama,
- prisutan u više od 300 različitih enzima u kojima ima ulogu Lewisove kiseline (vezuje vodu koja deprotoniranjem prelazi u nukleofilni OH<sup>-</sup> ion); u proteinima je najčešće vezan za dušik iz His, kisik iz Asp i Glu te sumpor iz Cys,
- doprinosi katalitičkoj moći i stabilnosti pripadajućih proteina.



## Ugljična anhidraza (CA, carbonic anhydrase)

- Sudjeluje u disanju, fotosintezi i transportu iona,
- katalizira reverzibilno hidratiranje CO<sub>2</sub> iz eritrocita u ugljičnu kiselinu, odnosno hidrogenkarbonatni ion,
- terapijska primjena (diuretik, liječenje glaukoma, infekcija i karcinoma).

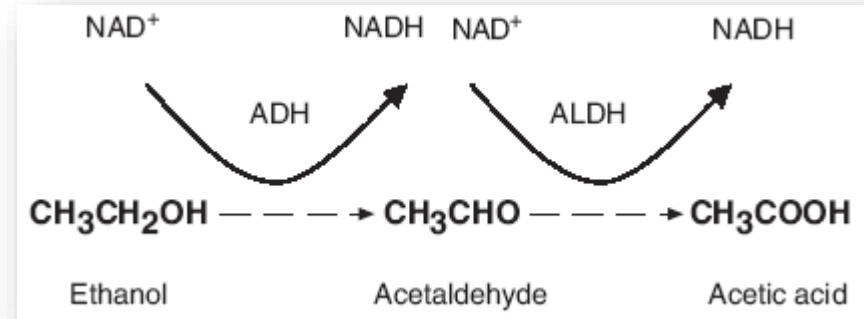
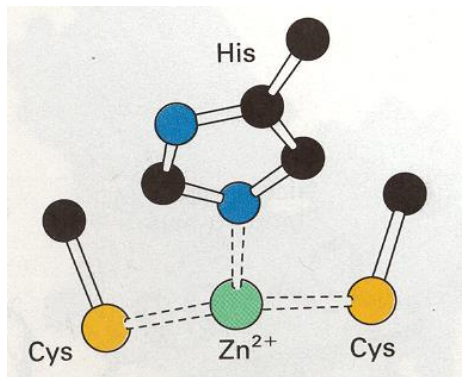


<sup>55</sup> K. A. McCall et al, Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes, J. Nutr. 130 ( 2000) 1437S.

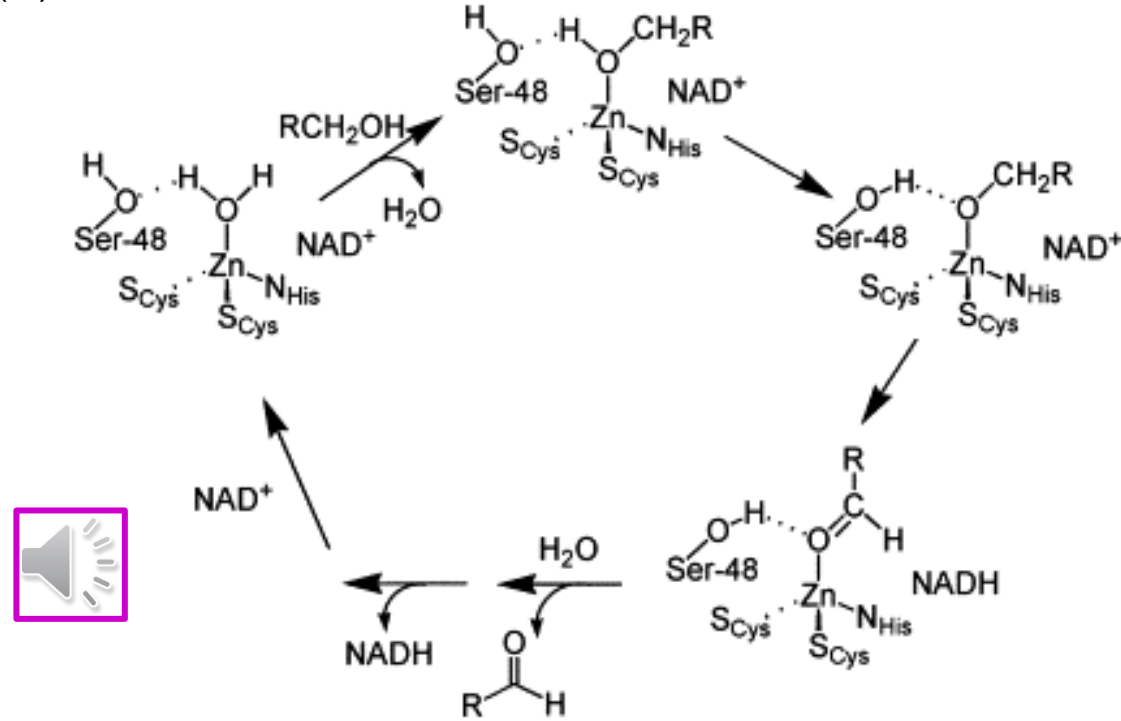
<sup>56</sup> C.T. Supuran, Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, Nat. Rev. Drug. Discov. 7 (2008) 168.

## Alkohol-dehidrogenaza (ADH)<sup>57</sup>

- Oksidacijom alkohola u acetaldehid (koji se djelovanjem aldehid-dehidrogenaze prevodi u acetat), ADH razgrađuje toksične spojeve na molekule koje stanice mogu koristiti,
- kao koenzime koristi NAD(H) ili NADP(H),
- jetrena ADH (LADH, liver alcohol dehydrogenase) u aktivnom mjestu sadrži Zn(II)-ion koji koordinira s alkoholom, dvama Cys- i jednim His-ostatom:

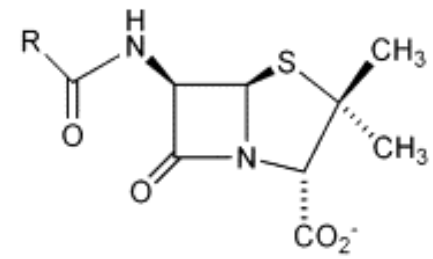


### o katalitički ciklus LADH

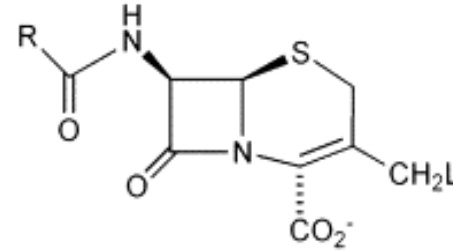


<sup>57</sup> L. M. Berreau et al., Kinetic and mechanistic studies of the reactivity of Zn-OH<sub>n</sub> (n=1 or 2) species in small molecule analogs of zinc-containing metallo-enzymes, *Advances in Physical Organic Chemistry* 41 (2006) 79.

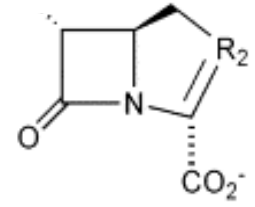
## Metalo- $\beta$ -laktamaza<sup>58-62</sup>



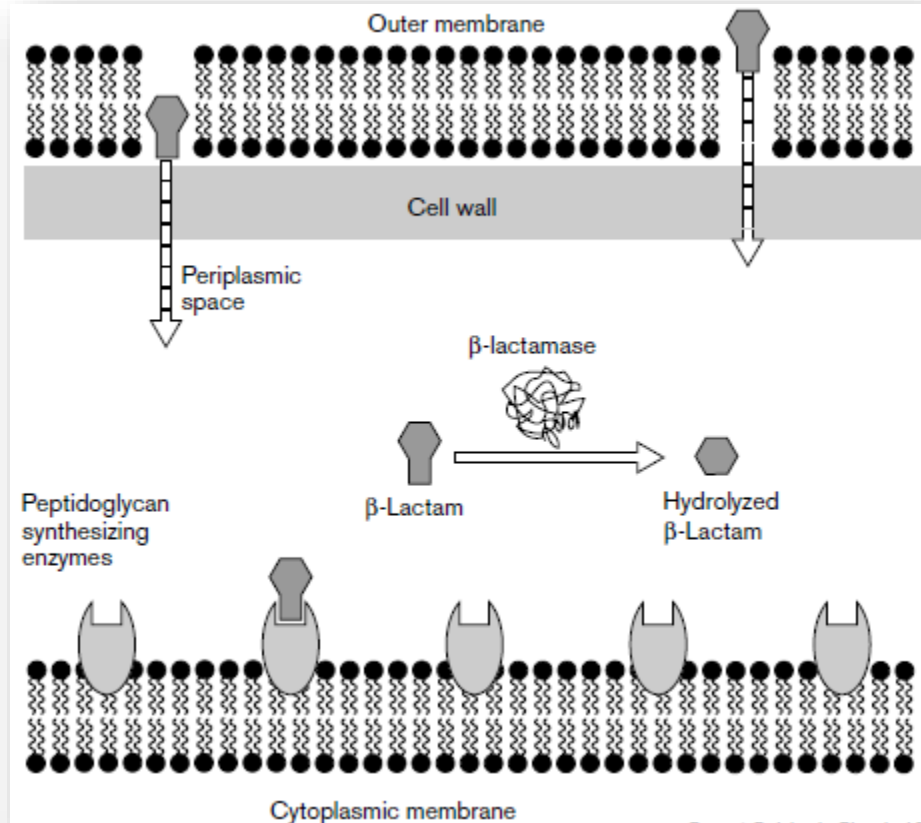
penicillins



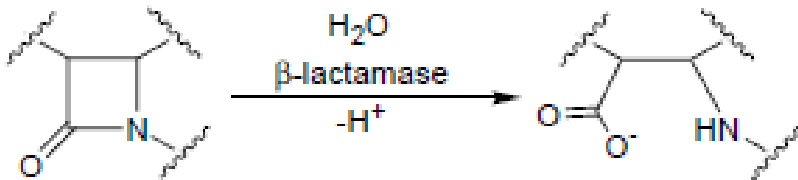
cephalosporins



carbapenems

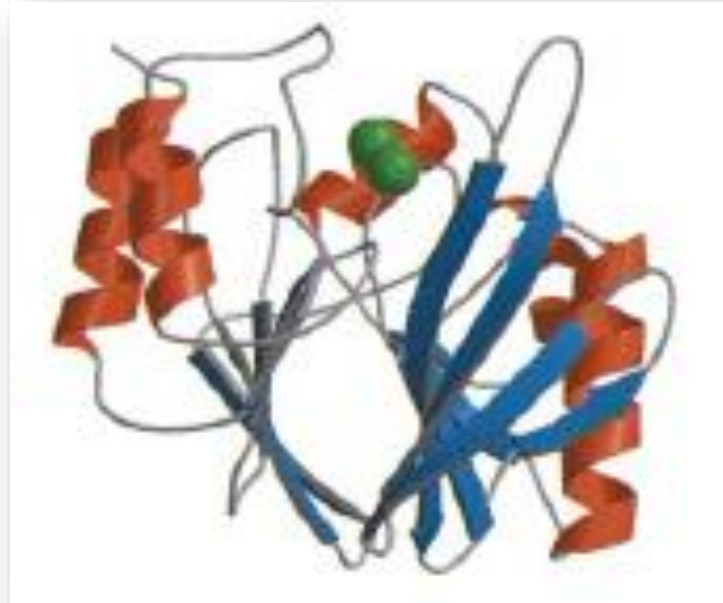


- $\beta$ -Laktami čine više od polovine antibiotika prisutnih na tržištu,
- nakon prolaska kroz staničnu membranu inaktiviraju bakterijske transpeptidaze uključene u biosintezu stanične stijenke,
- gram-negativne bakterije se protiv ovih antibiotika bore pomoću  $\beta$ -laktamaza, enzima koji cijepaju laktamski prsten hidrolizom C–N veze,



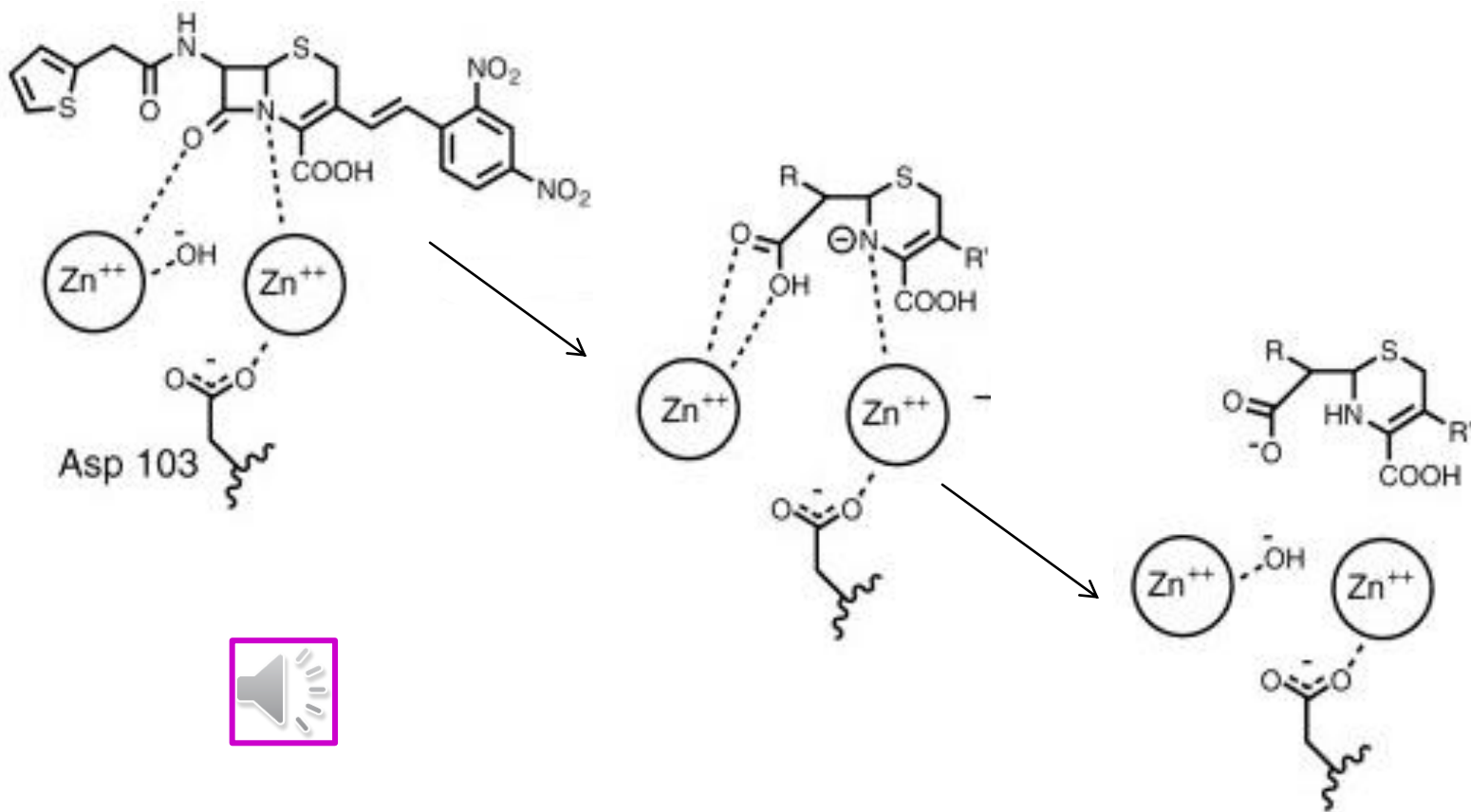
- laktamaze se dijele u 4 skupine; skupine A, C i D koriste aktivni Ser kao nukleofil, dok skupina B (koju čine metalo- $\beta$ -laktamaze) koristi jedan ili dva Zn-iona za hidrolitički učinak,

- metalo- $\beta$ -laktamaze doprinose porastu rezistencije na postojeće antibiotike, zbog čega se provode brojna istraživanja čiji je cilj što bolje shvatiti njihovu strukturu i mehanizam djelovanja:
  - 3D-struktura metalo- $\beta$ -laktamaze iz *B. cereus* (Zn-ioni)



- binuklearni Zn-centar smješten je na dnu lako dostupne plitke, široke brazde između dviju  $\beta$ -ploča,
- sadrži tetraedarski koordinirani Zn1-ion, te trigonalno bipiramidalno koordinirani Zn2-ion međusobno premoštene  $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$  ionom,

- Zn1-ion polarizira karbonilnu skupinu β-laktamskog prstena iz supstrata tvoreći oksianionsku šupljinu čime se olakšava hidroliza; Zn2-ion lociran je u neposrednoj blizini β-laktamskog dušikova atoma čime se dodatno polarizira amidna veza i stabilizira odlazeća skupina:



<sup>58</sup> Z.Wang et al, Metallo-β-lactamase: structure and mechanism, Current Opinion in Chemical Biology 3 (1999) 614.

<sup>59</sup> T.R. Walsh et al, Metallo-β-Lactamases: the Quiet before the Storm? Clin. Microbiol. Rev. 18 (2005) 306.

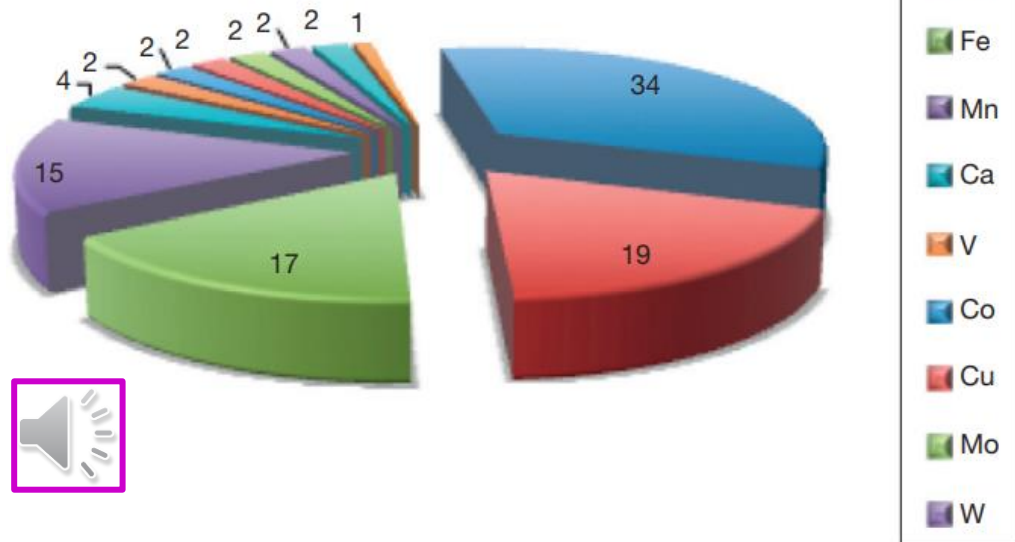
<sup>60</sup> V. Gupta, Metallo beta lactamases in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter species, Expert Opin Investig Drugs 17 (2008) 131.

<sup>61</sup> F. Kaleem et al, Frequency and susceptibility pattern of metallo-beta-lactamase producers in a hospital in Pakistan J Infect Dev Ctries 4 (2010) 810.

<sup>62</sup> C. R. Bethel et al, Exploring the Inhibition of CTX-M-9 by β-Lactamase Inhibitors and Carbapenems, Antimicrob Agents Chemother. 55 (2011) 3465.

- Na slici je prikazana distribucija metala u enzimima poznate i opisane 3D-strukture.

- Distribucija metala nije simetrična s obzirom na tip enzimske aktivnosti, a neke reakcije su preferentno katalizirane specifičnim metalima. Primjerice, prijenos elektrona uglavnom je posredovan metalima poput Fe, Cu, Mo i W, dok je Co najčešće asociran s vitaminom B12 gdje sudjeluje u tvorbi C-Co veze, izomerizaciji i reakcijama prijenosa skupina.



- Izbor metala nije određen samo njegovom reaktivnošću već i njegovom dostupnošću u određenom staničnom okruženju. Metalni ioni mogu imati utjecati na povećanje kiselosti, elektrofilnosti, nukleofilnosti supstrata te sudjeluju u prijenosu elektrona. Svojstva katalitičkih metala u proteinima modulirana s

**Table 1** Use of metals in enzymes from different classes<sup>2</sup>

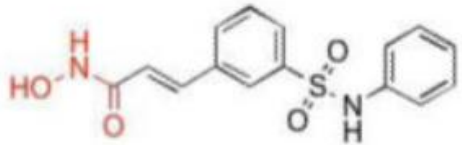
<i>EC class</i>	<i>Proportion of enzymes using metals (%)</i>	<i>Most abundant metal in enzyme class</i>
1. Oxidoreductase	44	Fe, Cu, Mo + W
2. Transferase	40	Mg, Mn, Co
3. Hydrolase	39	Ca, Zn, Co
4. Lyase	36	Ca, Mn, Mg
5. Isomerase	36	Co, Mn, Mg
6. Ligase	59	Mg, Mn, Zn

njihovim koordinacijskim brojem, o čemu ovisi broj liganada i okruženje aktivnog mjesta. Brojni metaloenzimi kataliziraju medicinski važne reakcije, te se stoga istražuju pri razvoju novih terapeutika.

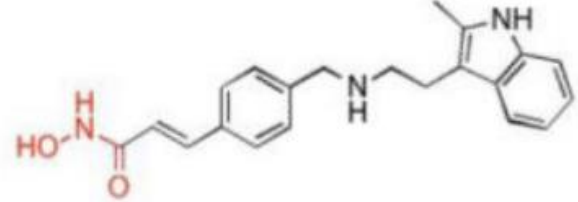
- Brojnim proteinima metalni ioni nužni su za normalnu funkciju. Metalni ioni u takvim metaloproteinima imaju strukturnu ili funkcijsku ulogu.
- Strukturni metalni ioni nužni su za pravilno nabiranje proteina [primjerice, u cinkovom prstu (*zinc finger protein*, mali proteinski strukturni motiv na čije je Cys- ili His-ostatke vezan jedan ili više Zn-iona što pridonosi stabilnosti proteina)  $Zn^{2+}$  služi za transformaciju neuređenog polipeptida u nabranu konformaciju koja može ostvarivati interakcije s nukleinskim kiselinama i drugim proteinima]. Stoga strukturni ioni, koji utječu na nabiranje proteina, imaju važan regulatorni potencijal.
- Funkcijski metalni ioni nalaze se u enzimskim aktivnim mjestima gdje imaju važnu biološku funkciju (prijenos elektrona, prepoznavanje i interakcija sa supstratom te kataliza). U slučaju kad metalni ion omogućuje katalitičku reakciju, pripadajuće metaloproteine kategoriziramo kao metaloenzime.
- Metaloenzimi sudjeluju u esencijalnim biološkim reakcijama, poput modifikacije nukleinskih kiselina, degradacije proteina, itd. Njihova uloga u esencijalnim biološkim procesima podrazumijeva i sudjelovanje u progresiji mnogih bolesti, zbog čega su metaloenzimi atraktivne mete za različite terapijske intervencije, što uključuje i inhibiciju.
- Većinom su inhibitori metaloenzima male molekule koje sadrže funkcijske skupine tzv. metal-vezujuće farmakofore (MBP, *metal-binding pharmacophore*) pomoću kojih se vežu u aktivno mjesto.



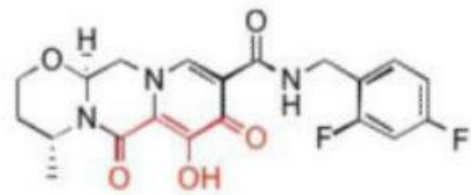
- U razdoblju 2013.-2017. od strane FDA bio je odobren 181 lijek, od čega 13 cilja metaloenzime, a ubrajaju se u nove molekulske entitete [NMEs, *new molecular entities* (prema FDA, NME je lijek koji ne sadrži aktivnu supstancu koju je FDA odobrila u bilo kojoj drugoj prijavi)].



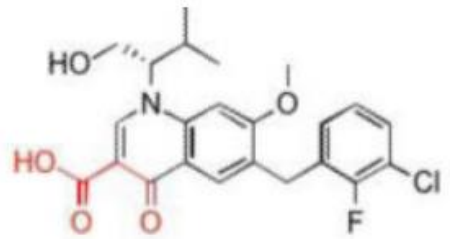
**Belinostat**  
*HDAC*



**Panobinostat**  
*HDAC*



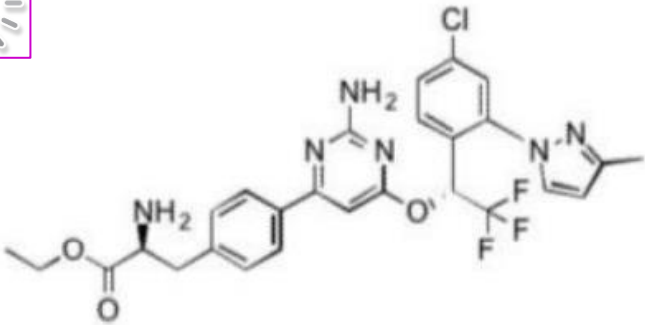
**Dolutegravir**  
*HIV IN*



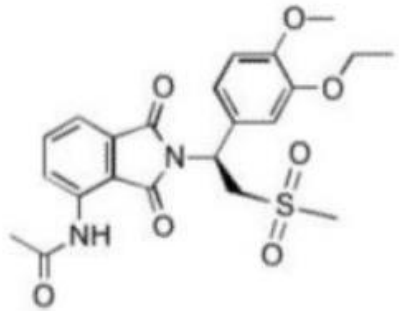
**Elvitegravir**  
*HIV IN*



FDA-approved inhibitors of metalloenzyme between 2013 and 2017. MBPs are shown in red.

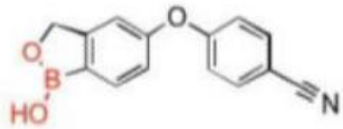


**Telotristat ethyl**  
*Tryptophan Hydroxylase*  
(not metal-binding)



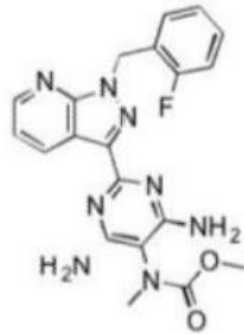
**Apremilast**  
*Phosphodiesterase 4*  
(not metal-binding)





**Crisaborole**

*Phosphodiesterase 4*



**Riociguat**

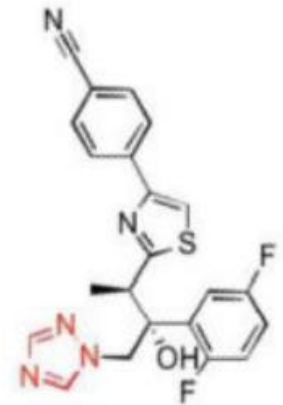
*Soluble guanylate cyclase*

(not metal-binding, stimulator)



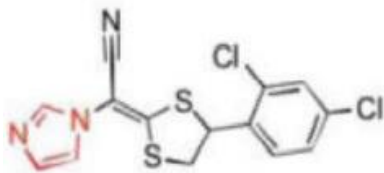
**Efinaconazole**

*Lanosterol 14  $\alpha$ -demethylase*



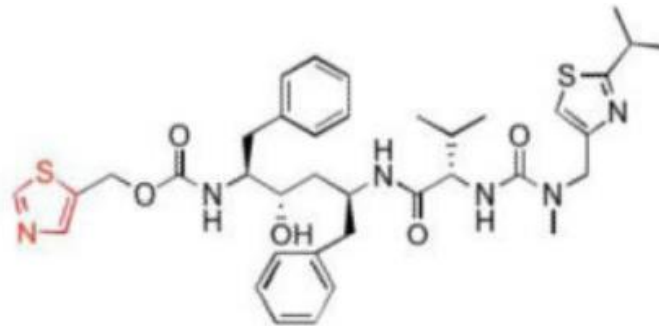
**Isavuconazole**

*Lanosterol 14  $\alpha$ -demethylase*



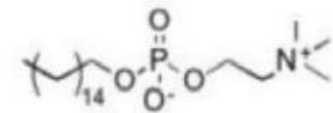
**Luliconazole**

*Lanosterol 14  $\alpha$ -demethylase*



**Ritonavir**

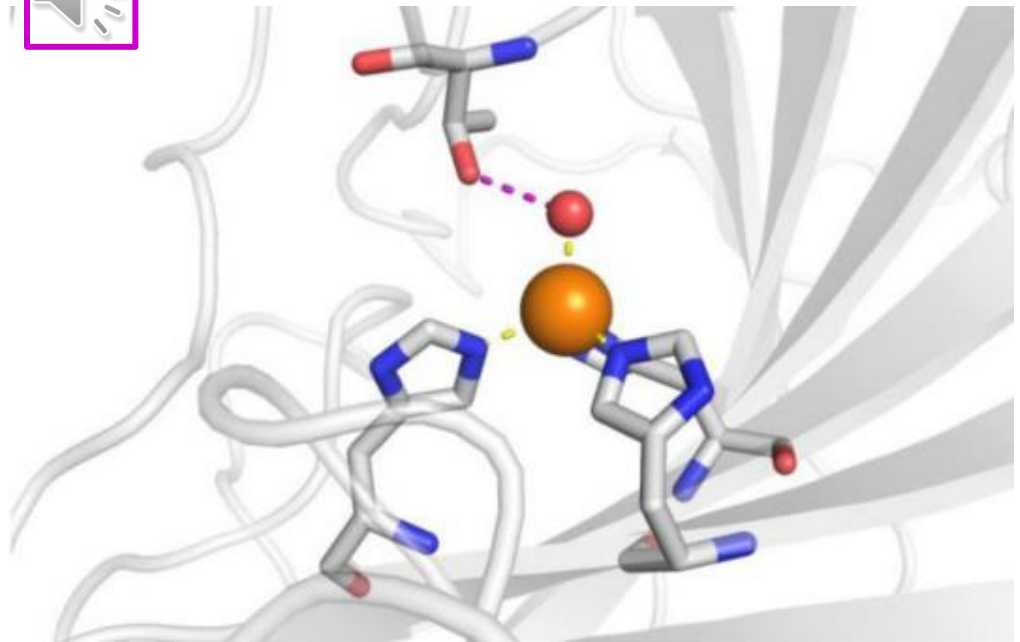
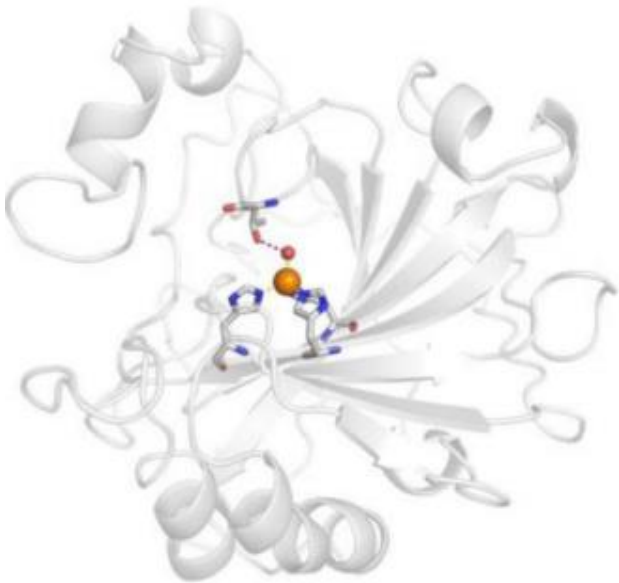
*Cytochrome P4503A4*



**Miltefosine**

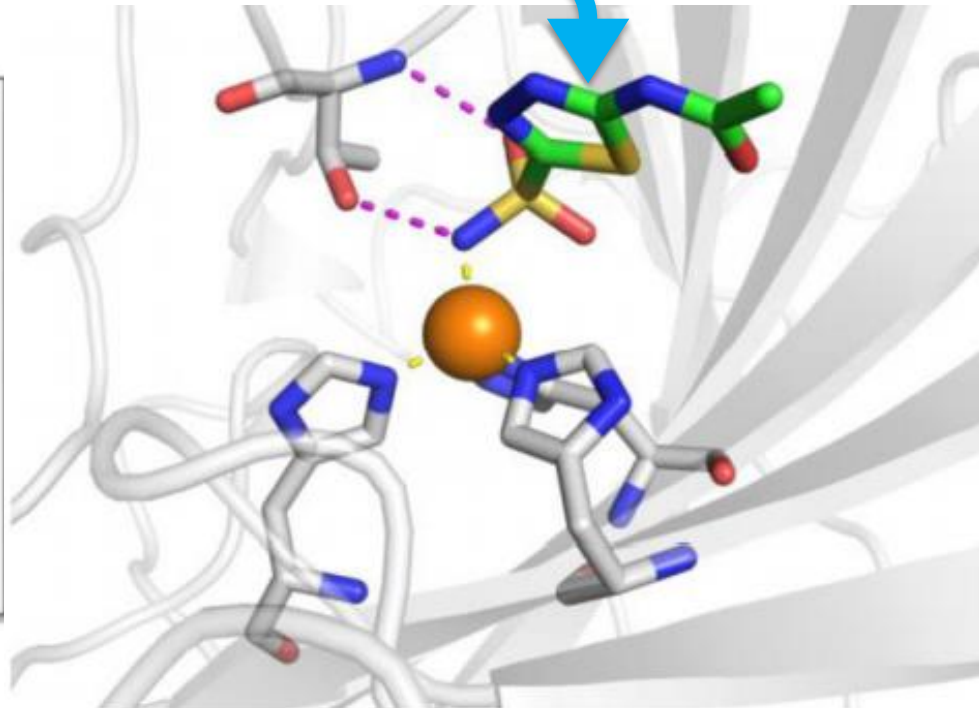
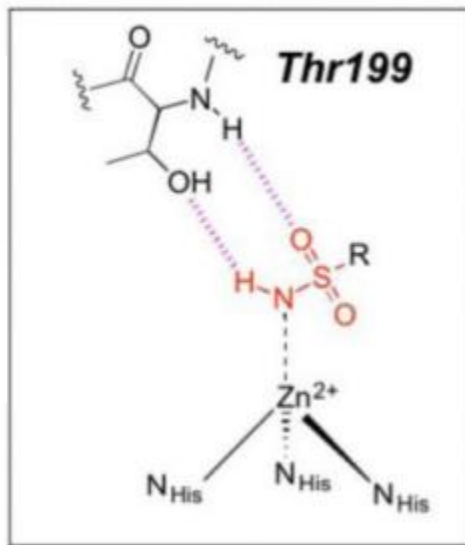
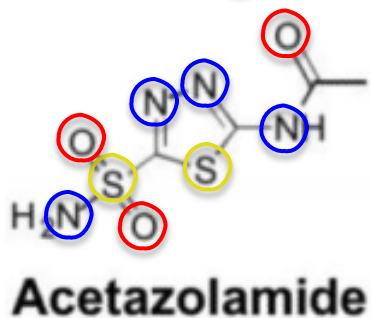
*Cytochrome C Oxidase*  
(not metal-binding)

- Istraživanja inhibitora metaloenzima započela su s razvojem inhibitora ugljične anhidraze (CA, *carbonic anhydrase*). Radi se o prvom karakteriziranom Zn-enzimu koji katalizira reverzibilnu hidrataciju  $\text{CO}_2$  pri čemu nastaje hidrogenkarbonatni anion. Ta je reakcija važna za brojne biološke procese, uključujući regulaciju pH u krvi kao i udjela  $\text{CO}_2$ . Inhibitori CA istražuju se kao diuretici i antikancerogeni agensi.
- CA-aktivno mjesto sadrži  $\text{Zn}^{2+}$  ion **vezan** za tri His-ostatka i jednu molekulu **vode**, u tetraedarskoj geometriji. Ta molekula vode istovremeno je **vodikovom vezom** vezana za susjedni ostatak Thr<sup>199</sup>, što je važno za katalitičko djelovanje enzima.



"The protein backbone is shown in a ribbon style, with coordinating residues and the hydrogen-bonding Thr<sup>199</sup> shown in sticks and colored by element (carbons in gray). The Zn<sup>2+</sup> ion is shown as an orange sphere and the coordinated water molecule is shown as a red sphere. Metal-ligand coordination bonds are shown as dashed yellow lines and hydrogen bonds as dashed magenta lines."

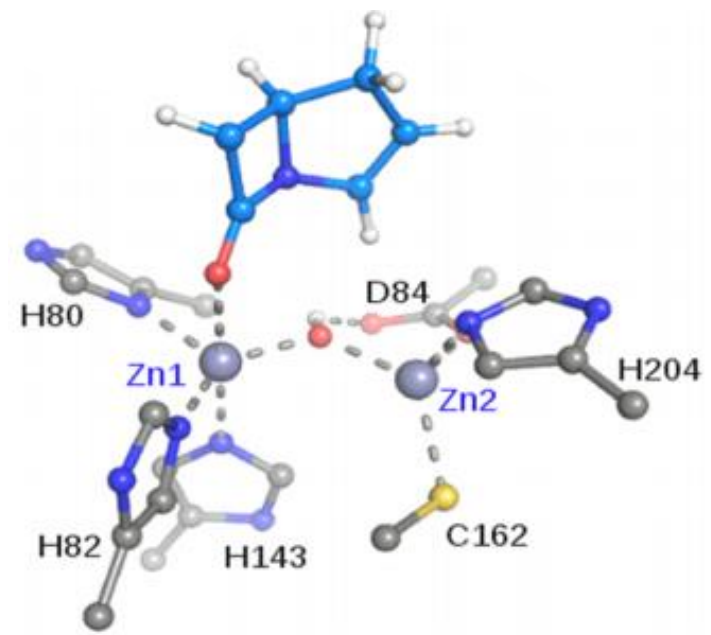
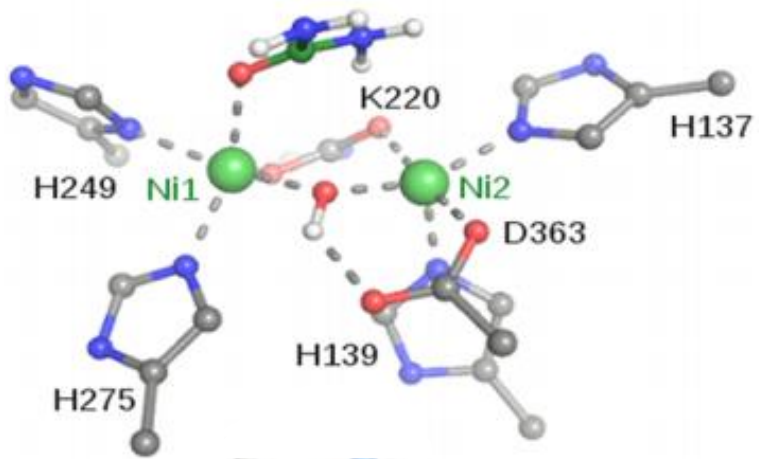
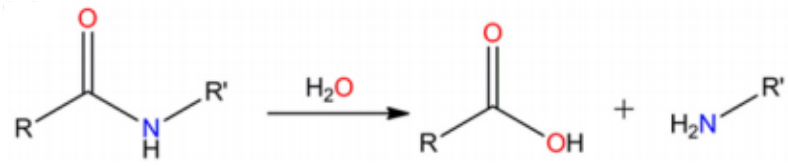
- Najaktivniji i klinički najuspješniji CA-inhibitori zasnivaju se na sulfonamidnom MBP-kalupu, kakav je prisutan u FDA-odobrenom lijeku acetazolamidu. (U okviru je prikazan način vezanja katalitičkog Zn-iona za sulfonamid (MBPs označeni su crvenom bojom).
- Acetazolamid (prikazan štapićastim modelom) zamjenjuje molekulu vode koja je inače vezana za Zn-ion i vezuje se Zn-ion preko deprotoniranog dušikovog atoma iz sulfonamidnog MBP. Takvim načinom vezanja zadržava se tetraedarska geometrija aktivnog mjesta. Istovremeno, N- i O-atom iz sulfonamida ostvaruju jake vodikove veze u blizini Thr<sup>199</sup>. Zahvaljujući interakcijama u kojima sudjeluje anionski donorski N-atom te stabilizaciji putem vodikovih veza, sulfonamidni kalupi ostvaruju inhibicijski učinak.



- Prirodni metaloenzimi svrstavaju se među najučinkovitije katalizatore zahvaljujući svojoj aktivnosti, selektivnosti i mogućnosti djelovanja pri blagim uvjetima. Kemičari istražuju mogućnost pripreve idealnog katalizatora zamjenom metala. Primjerice, prirodna histonska deacetilaza sadrži  $Zn^{2+}$  u aktivnom mjestu, a njegovom zamjenom s  $Fe^{2+}$  unapređuje se katalitički učinak. Isto tako, smatra se da zamjena nativnog  $Zn^{2+}$  s  $Ni^{2+}$  povećava aktivnost  $\beta$ -laktamaze. Iako su obje metalne forme aktivne, jedan od metala preferiran je u svakodnevnim uvjetima, dok je drugi inaktivan sve dok se ne dogodi neka vrste ugroze za stanicu. Stoga se postavlja pitanje kada je odabir metala uzrokovan evolucijom, a kada je izbor metala pod utjecajem drugih faktora u samoj stanici. Drugim riječima, postavlja se pitanje može li se katalitički učinak enzima poboljšati upotrebom uobičajenih građevnih blokova prisutnih u stanici.
- Metal-ovisne hidrolaze (peptidaze, fosfataze, ATPaze) kataliziraju hidrolizu. Sadrže dva ili više metalnih centara koji aktiviraju nukleofil ( $H_2O$  ili  $OH^-$ ) i/ili supstrat za nukleofilni napad kao ključni reakcijski stupanj. Metali pri tom imaju ulogu Lewisovih kiselina. Dok mnoge hidrolaze koriste  $Zn^{2+}$ , neke su inhibirane upravo  $Zn^{2+}$ , a aktivirane  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ili  $Ca^{2+}$ . Nadalje, ponekad metaloenzimi hidroliziraju vrlo slične supstrate, ali uz pomoć različitih metala. Postavlja se pitanje je li vrlo učestala prisutnost  $Zn^{2+}$  posljedica njegove velike dostupnosti, odnosno koriste li enzimi najdostupnije metale umjesto onih koji bi bili katalitički optimalniji. Drugim riječima, upitno je jesu li prirodni enzimi zaista savršeni katalizatori, odnosno je li moguće pripremiti maksimalno učinkovite kvazi-prirodne enzime koji bi katalizirali reakcije od visokog interesa za čovječanstvo.

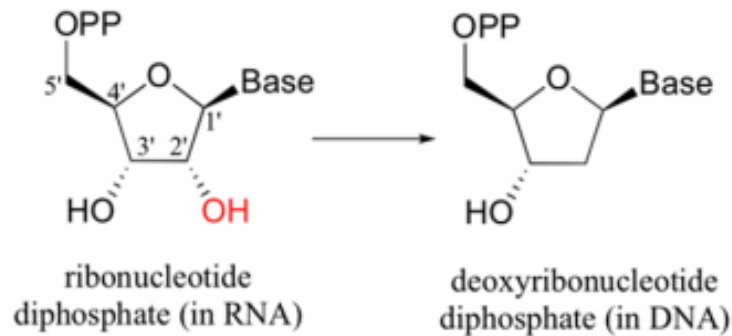


- Fokusirat ćemo se na bimetalne amidaze, ureaze (sadrže dva  $Ni^{2+}$  u aktivnom mjestu) i  $\beta$ -laktamaze (sadrže dva  $Zn^{2+}$  u aktivnom mjestu), koje hidroliziraju amide.



- Ta dva enzima imaju bimetalno aktivno mjesto sa sličnim prostornim rasporedom liganada. Zašto jedan enzim bira  $Ni^{2+}$ , a drugi  $Zn^{2+}$ ? Za razliku od  $\beta$ -laktamskih antibiotika, ureu koja podliježe rezonancijskoj stabilizaciji teže je hidrolizirati: prema rezultatima komputacijskih studija, ureaza lako hidrolizira  $\beta$ -laktam, dok  $\beta$ -laktamaza ne može hidrolizirati ureu. Pokazalo se da se zamjenom dvaju  $Zn^{2+}$  iona u  $\beta$ -laktamazi s  $Ni^{2+}$  ionima značajno povećao katalitički kapacitet, što znači da Zn u  $\beta$ -laktamazi ne osigurava maksimalnu učinkovitost enzima, odnosno enzim je učinkovitiji nakon supstitucije s Ni. Razlog zbog kojeg stanica ipak koristi Zn najvjerojatnije je uvjetovan drugim faktorima u samoj stanici, primjerice toksičnošću i niskom dostupnošću Ni.

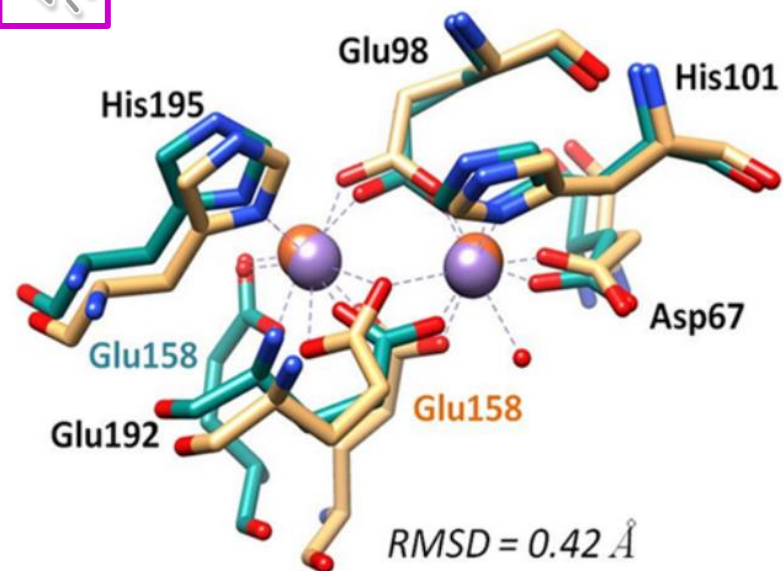
- Drugi primjer odnosi se na zamjenu Mn s Fe u ribonukleotid-reduktazi (RNRs).
- Enzimski procesi u mnogim organizmima (od transporta elektrona do stanične replikacije) ovise o Fe. U uvjetima ekstremnog oksidativnog stresa (u prisutnosti velikih količina  $H_2O_2$ ),  $Fe^{2+}$  se oksidira i uklanja iz enzima Fentonovom reakcijom. Većina organizama razvila je enzime za uklanjanje peroksida, katalaze i peroksidaze, koji brzo uklanjaju  $H_2O_2$  iz stanica. Odnedavno je poznato da neki organizmi za preživljavanje u uvjetima oksidativnog stresa koriste Mn umjesto Fe u određenim ključnim enzimima. Takav enzim je bakterijska RNR, binuklearni  $Fe^{2+}$  redoks-enzim koji katalizira konverziju ribonukleotida u deoksiribonukleotid omogućavajući tako replikaciju DNA.



- Njegova  $\beta$ -podjedinica odgovorna je za tvorbu tirozil-radikala koji oksidira Cys-ostatak udaljen 35 Å od  $\alpha$ -podjedinice na kojoj se odvija prikazana reakcija. Genom *E. coli* enkodira dvije klase RNR: NrdAB (Fe-ovisan enzim esencijalan za aerobni rast) te NrdEF čija je uloga dugo bila nepoznata.
- Odnedavno se zna da NrdEF postaje aktivan u uvjetima oksidativnog stresa. Preferentno vezuje Fe u prisutnosti suviška Fe, ali njegova je aktivnost nedovoljna za pokretanje replikacije DNA. U slučaju manjka Fe, NrdEF vezuje Mn pri čemu se njegova aktivnost povećava 5 puta. Istovremeno, NrdAB gubi katalitičku moć ukoliko mu je Fe zamijenjen s Mn.



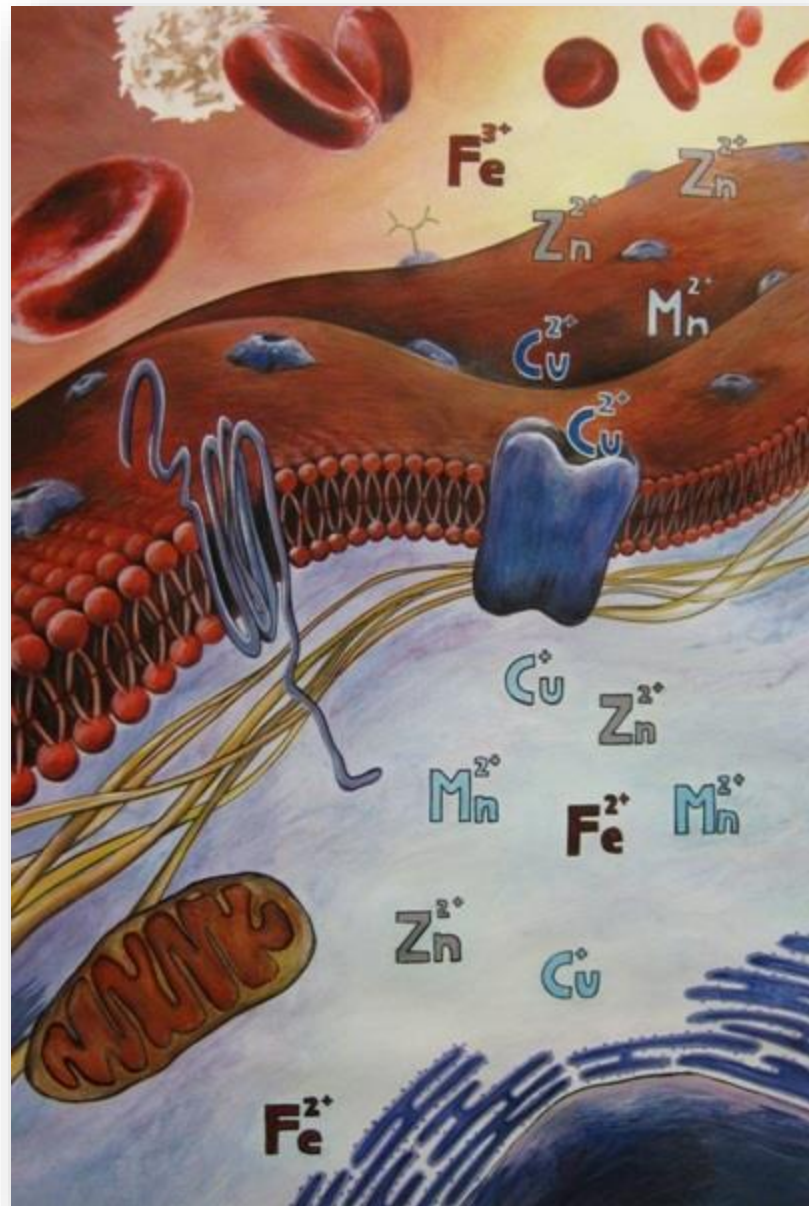
- Koji faktori čine jedan oblik RNR aktivnim, a drugi inaktivnim ukoliko sadrže Mn kao kofaktor?
- Elektronske razlike između Fe i Mn kao i razlika u geometriji pripadajućih aktivnih mjesta mogu uzrokovati razlike u redukcijskom potencijalu. Iako se strukture NrdEF s Fe ili Mn uglavnom tijesno preklapaju, ipak aktivno mjesto ima značajan RMSD (Root Mean Square Deviation, kvantitativna mjera sličnosti između dvije preklopljene strukture), vezan uz ostatke Glu158.



*"In summary, the discussion presented here further emphasizes that natural enzymes are not necessarily perfect catalysts but rather optimized within a broader evolutionary context. The enzyme design community aims to prepare maximally efficient quasi-natural enzymes for catalysis, with few examples of enzymes used by pharmaceutical manufacturers. Metalloenzyme design specifically is unprecedented and provides a largely unexplored frontier for chemists, where roles of metals are extremely important but characterization can be problematic. These natural limitations provide an exciting opportunity for research into the improvement of metalloenzymes and their catalytic properties in vitro."*

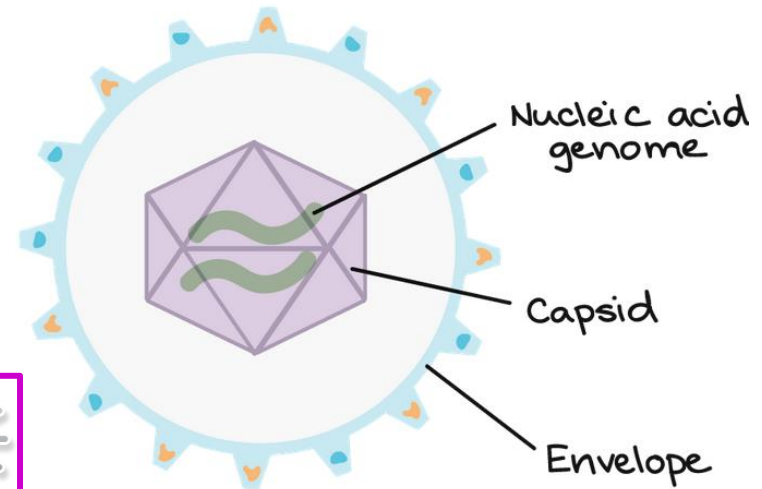
# Osnove bioorganometalne kemije

Prof. dr. sc. Lidija Barišić



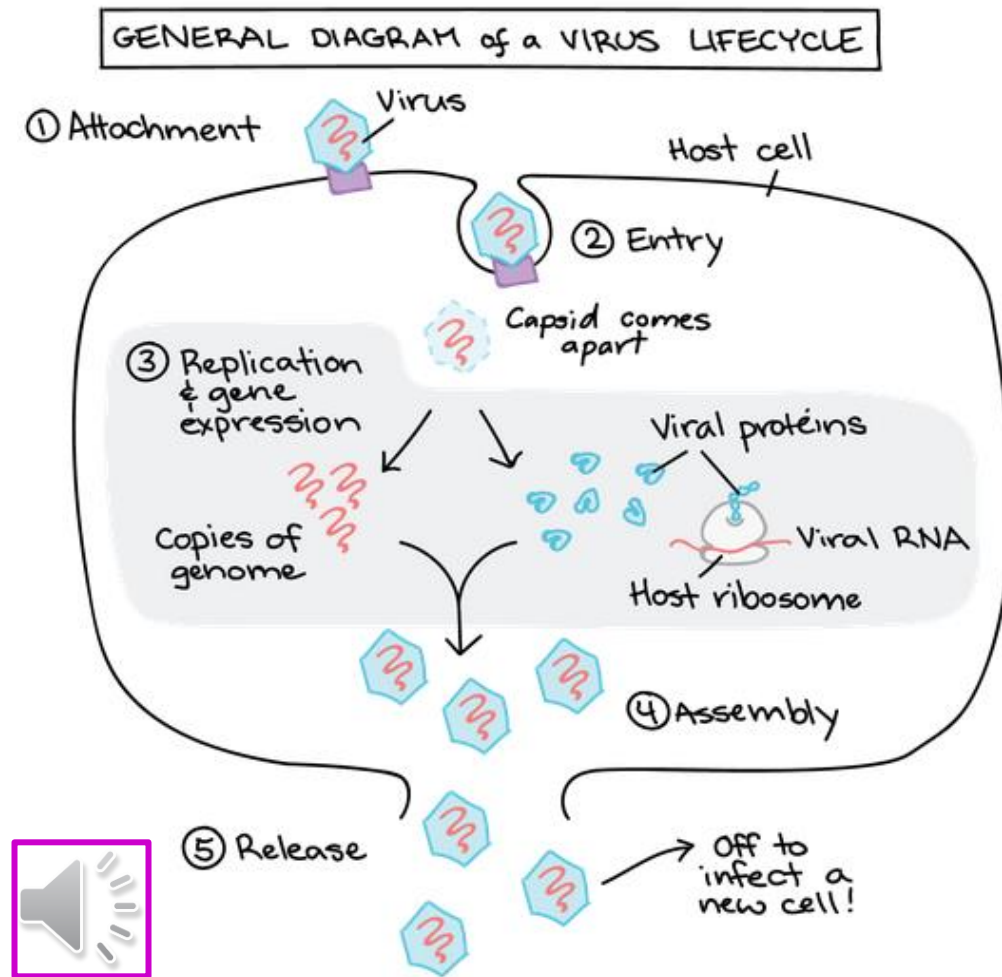


- Virusi su čestice na granici između živog i neživog; ne sastoje se iz stanica, nemaju metabolizam, ne reagiraju na vanjske podražaje, ali mogu se razmnožavati za što koriste žive stanice domaćina (bakterija, biljaka, životinja i ljudi). Izvan žive stanice domaćina postoje u obliku čestica koje se nazivaju virioni, a građeni su iz nukleinske kiseline zaštićene proteinskim omotačem koji se naziva kapsida. Osim proteinske kapside, neki virusi koriste i proteinske membrane za interakciju s proteinskim receptorima na površini stanica domaćina (protein-protein interakcije!).



- Virus gripe se svojim H-proteinom (hemaglutinin) vezuje na neuraminsku kiselinu izraženu na epitelu respiratornog sustava, a nakon toga virus pomoću N-proteina (neurominidaza) iz svoje ovojnice enzimatski cijepa neuraminsku kiselinu i ulazi u stanicu (Tamiflu blokira enzim neuroaminidazu i tako sprječava ulazak virusa u stanicu i infekciju). Poznato je 16 izoformi H-proteina i 9 izoformi N-proteina, po čemu virusi gripe dobivaju svoja serotipska imena (npr. H1N1). Svaka od tih izoformi različito se prikazuje u našem imunskom sustavu, zbog čega se cijepimo trovalentnim ili tetravalentnim cjepivima koja pokrivaju više virusnih izoformi.

- Kod koronavirusa, membranski S-protein ima visok afinitet za receptore na stanicama dišnog epitela, odn. molekule angiotenzin-II pretvorbenog enzima (ACE2), što omogućava sidrenje virusa na membranu ciljne stanice i prodor u stanicu. Stoga je jedan od terapijskih pristupa u borbi s koronavirusom usmjeren na sprječavanje ove interakcije.
- Koronavirusi za ulazak u stanicu osim ACE2-receptora koriste i membranske serinske proteaze. Nakon ulaska u stanicu, virusi raspakiravaju svoju kapsidu i oslobađaju jednolančanu RNA koja se kao glasnička RNA počinje prepisivati na ribosomima domaćina u veliki poli-protein i nekoliko virusnih proteaza koje ga cijepaju na virusne regulacijske proteine. Virus pomoću regulacijskih proteina preuzima i sebi prilagođava metabolizam stanice tako da stanične resurse koristi za proizvodnju novih virusa, što često rezultira smrću tako zaražene stanice. Među regulacijskim proteinima ističe se kimotripsinu slična proteaza (3CL<sup>pro</sup>), čijom bi se inhibicijom mogla ograničiti replikacija virusa.



- Koronavirusi poznati su od 1960., a u novije vrijeme počeli su se pojavljivati novi koronavirusi koji sa životinja prelaze na ljude i potom se dalje šire što je u Kini 2002. dovelo do pojave SARS-a (teški akutni respiratorni sindrom, engl. *severe acute respiratory syndrome*, 774 umrla), te 2012. do MERS-a (bliskoistočni respiratorni sindrom, engl. *middle east respiratory syndrome*, 858 umrlih)]. Koronavirus uzročnik SARS-a nazvan je SARS-CoV, a o antivirusnim agensima usmjerenima protiv SARS-CoV do 2016. objavljeno je preko 3500 publikacija.
- S obzirom da je za virusnu replikaciju odgovoran njegov enzim glavna proteaza (*chymotrypsin-like protease*, 3CL<sup>pro</sup> ili M<sup>pro</sup>), **istraživanja antivirusnih terapeutika usmjerena su na inhibitore tog enzima**. Lijekovi dizajnirani za tretiranje SARS-CoV-3CL<sup>pro</sup> dijele se na dvije skupine:

i. peptidni inhibitori koji oponašaju prirodne peptidne supstrate,

ii. inhibitori bazirani na malim molekulama, a koji se dobivaju modifikacijom postojećih inhibitora

proteaza, studijama molekularnog pristajanja baziranima na strukturi ili izolacijom iz prirodnih produkata. Pored navedenih, opisani su i

**metalni konjugati kao inhibitori** virusnih proteaza.



T. Pillaiyar et al, An Overview of Severe Acute Respiratory Syndrome–Coronavirus (SARS-CoV) 3CL Protease Inhibitors: Peptidomimetics and Small Molecule Chemotherapy. *J. Med. Chem.* 2016, 59, 6595–6628.

- \*Među malim molekulama kao inhibitorima proteina esencijalnih za patogenost virusa (SARS-CoV-2-S, 3CL<sup>pro</sup>, PL<sup>pro</sup> (*papain-like protease*, “Ahilova tetiva virusa”) i RdRp (*RNA dependent RNA polymerase*, enzim uključen u replikaciju i transkripciju SARS-CoV-2-genoma) valja istaknuti i prirodne produkte:”

**Table 1** Summary of the anti-CoVs effects of natural compounds and their possible action mechanisms.

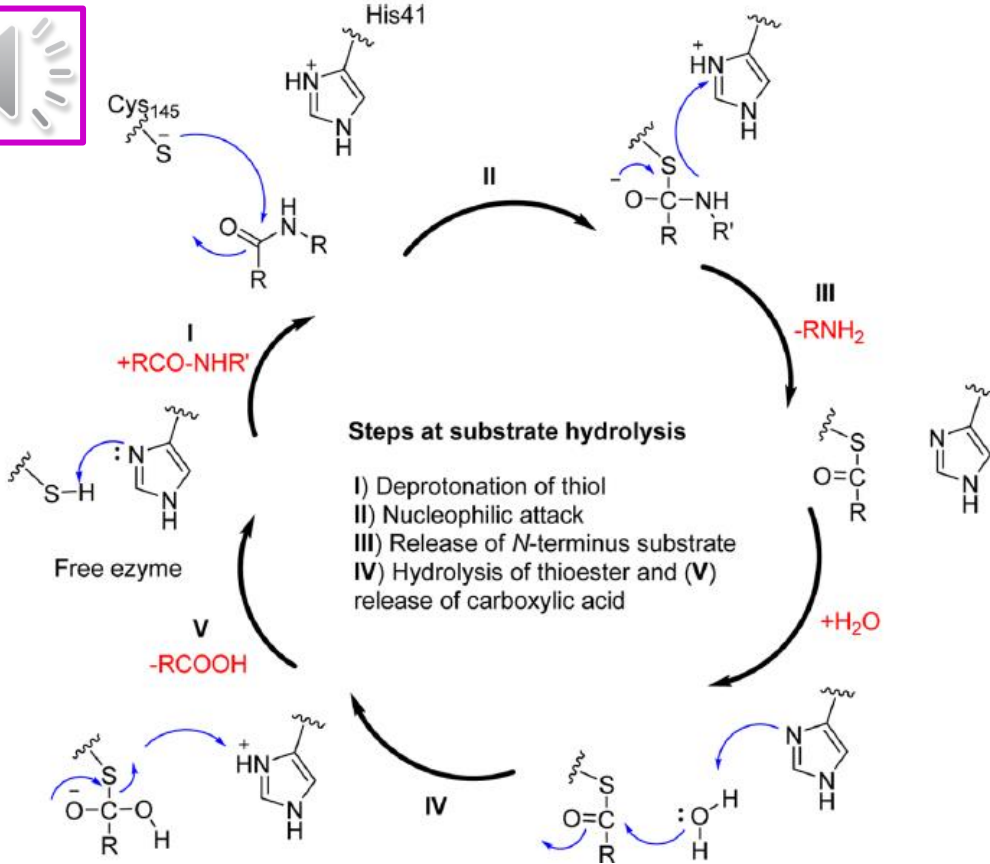
Plant	Compound	Virus acting on	IC <sub>50</sub> value	Reported antiviral mechanism
<i>Licorice root</i>	Glycyrrhizin	SARS-CoV	300 mg/L	Upregulates nitrous oxide synthase and nitrous oxide production
<i>Polygonum cuspidatum</i>	Resveratrol	MERS-CoV	—	—
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenoside-Rb1	SARS-CoV	100 µmol/L	Inhibits glycoprotein activity
<i>Rauvolfia serpentina</i>	Reserpine	SARS-CoV	6.0 µmol/L	—
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Aescin	SARS-CoV	3.4 µmol/L	—
<i>Boenninghausenia sessilicarpa</i>	Leptodactylone	SARS-CoV	100 µg/mL	—
<i>Lycoris radiata</i>	Lycorine	SARS-CoV	15.7 ± 1.2 nmol/L	—
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Dihydrotanshinone	MERS-CoV	1 µg/mL	—
<i>Bupleurum chinense</i>	Saikosaponin B <sub>2</sub>	HCoV-229E	1.7 ± 0.1 µmol/L	Interferes with events of early viral entry
<i>Stephania tetrandra</i>	Tetrandrine	HCoV-OC43	0.33 ± 0.03 µmol/L	Inhibits p38 MAPK pathway
<i>Stephania japonica</i>	Cepharanthine	SARS-CoV-2	0.98 µmol/L	ACE inhibitor
<i>Rheum palmatum</i>	Emodin	SARS-CoV	200 µmol/L	Blocks the binding of S protein to ACE2
<i>Triterygium regelii</i>	Celastrol	SARS-CoV	10.3 µmol/L	Inhibits SARS-CoV 3CL <sup>pro</sup>
<i>Triterygium regelii</i>	Pristimererin	SARS-CoV	5.5 µmol/L	Inhibits SARS-CoV 3CL <sup>pro</sup>
<i>Triterygium regelii</i>	Tingenone	SARS-CoV	9.9 µmol/L	Inhibits SARS-CoV 3CL <sup>pro</sup>
<i>Triterygium regelii</i>	Iguesterin	SARS-CoV	2.6 µmol/L	Inhibits SARS-CoV 3CL <sup>pro</sup>
<i>Ginkgo biloba</i>	Quercetin-3-β-galactoside	SARS-CoV	42.79 ± 4.97 µmol/L	Competitively inhibits SARS-CoV 3CL <sup>pro</sup>
<i>Salvia miltiorrhiz</i>	Tanshinones I–VII	SARS–CoV	0.7–30 µmol/L	Inhibits PL <sup>pro</sup> activity
<i>Alnus japonica</i>	Hirsutenone	SARS-CoV	4.1 µmol/L	Inhibits PL <sup>pro</sup> activity
Black tea	Theaflavin	SARS-CoV-2	—	Inhibits RdRp activity
<i>Myrica rubra</i>	Myricetin	SARS-CoV	2.71 ± 0.19 µmol/L	Inhibits ATPase activity
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Scutellarein	SARS-CoV	0.86 ± 0.48 µmol/L	Inhibits ATPase activity
<i>Angelica keiskei</i>	Chalcones I–IX	SARS–CoV	11.4–129.8 µmol/L	Competitively inhibits SARS-CoV 3CL <sup>pro</sup>

—IC<sub>50</sub> value or the mechanism of antiviral activity of these active compounds is not clear.



- Nakon vezanja SARS-CoV-S-proteina s ACE2-receptorom na površini stanice domaćina, virus ulazi u stanicu nakon čega se njegova RNA veže na domaćinove ribosome omogućavajući translaciju odn. biosintezu dvaju poliproteina koji se u prisutnosti 3CL<sup>pro</sup> i PL<sup>pro</sup> cijepaju u komponente potrebne za sastavljanje novih viriona. 3CL<sup>pro</sup> (glavna proteaza, M<sup>pro</sup>) neophodna je za virusnu replikaciju i infekciju i stoga je idealna meta za antivirusnu terapiju. U aktivnom mjestu tog enzima nalaze se Cys<sup>145</sup> i His<sup>41</sup>, pri čemu Cys-tiolna skupina ima ulogu nukleofila u u reakciji hidrolize poliproteina na odsječku koji obuhvaća najmanje 11 ostataka, a koji obavezno uključuju sekvenciju Leu-Gln-Ser ili Leu-Gly-Ala. Mehanizam hidrolize peptidne veze:

- I. Deprotoniranje Cys-tiolne skupine (pri čemu se N-atom iz imidazolnog His-ostatka protonira), a generira se nukleofilni sumporov anion.
- II. Nukleofilni napad sumporovog aniona na karbonilnu amidnu skupinu; u nastalom produktu cijepa se C-N veza pri čemu nastaje tioester, te se oslobađa slobodni amin uz deprotoniranje imidazolnog prstena.
- III. Slijedi hidroliza nastalog tioestera u karboksilnu kiselinu (voda stječe nukleofilni karakter deprotoniranjem u prisutnosti His-imidazolne skupine). Pri tom se regenerira Cys-tiolna odn. His-imidazolna skupina, odn. enzim se regenerira za sljedeći ciklus.



- Krajem 2019. u Kini je otkriven novi koronavirus kojeg je Međunarodni odbor za taksonomiju virusa nazvao SARS-CoV-2, a bolest koju uzrokuje WHO je nazvao COVID-19 (Coronavirus disease-2019) te je 11.3.2020. proglasio pandemiju\* te bolesti. Genomi SARS-CoV i novog koronavirusa SARS-CoV-2 vrlo su slični (dijele ~80% genoma), što sugerira i sličnost njihovih interakcija s domaćinom.

- \* Prema Hrvatskoj enciklopediji, pandemija se odnosi na širenje neke bolesti na velika prostranstva (na više država, cijeli kontinent ili cijeli svijet. U prošlosti su poznate pandemije kuge u 6.-om stoljeću, kolere u 19.-om i 20.-om stoljeću te španjolske (H1N1, 1918., 50 milijuna umrlih) i svinjske gripe (2009., 18 tisuća umrlih)].

<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>



8.10.2020.



28.11.2020.

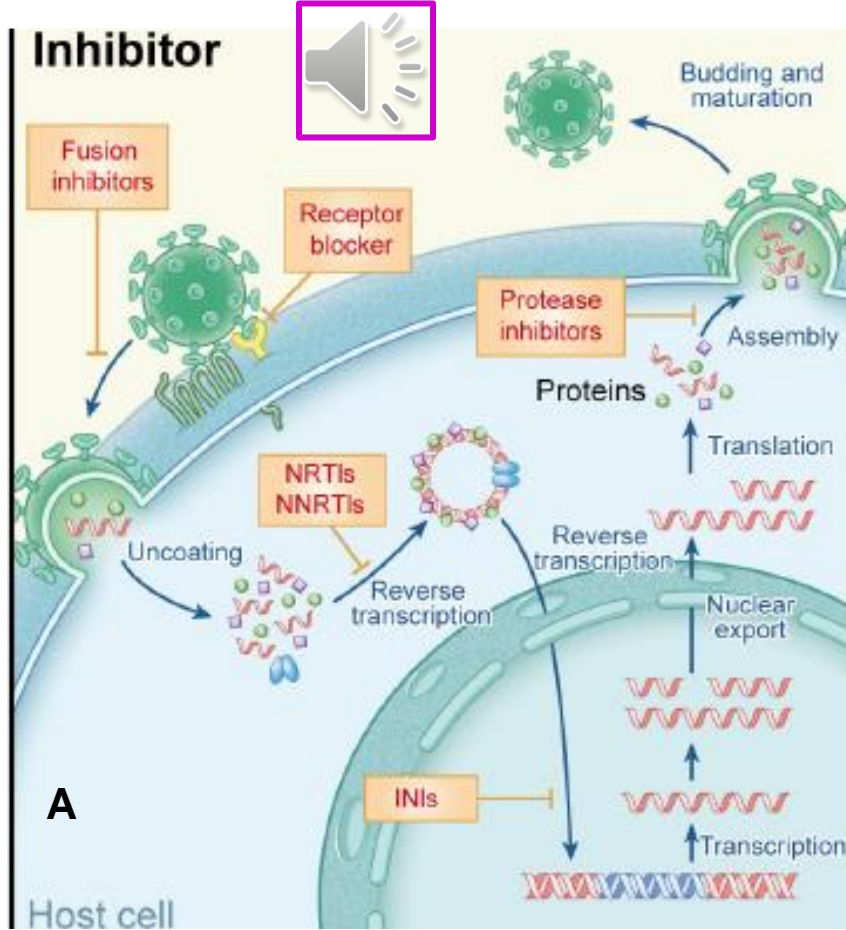


14.1.2021.

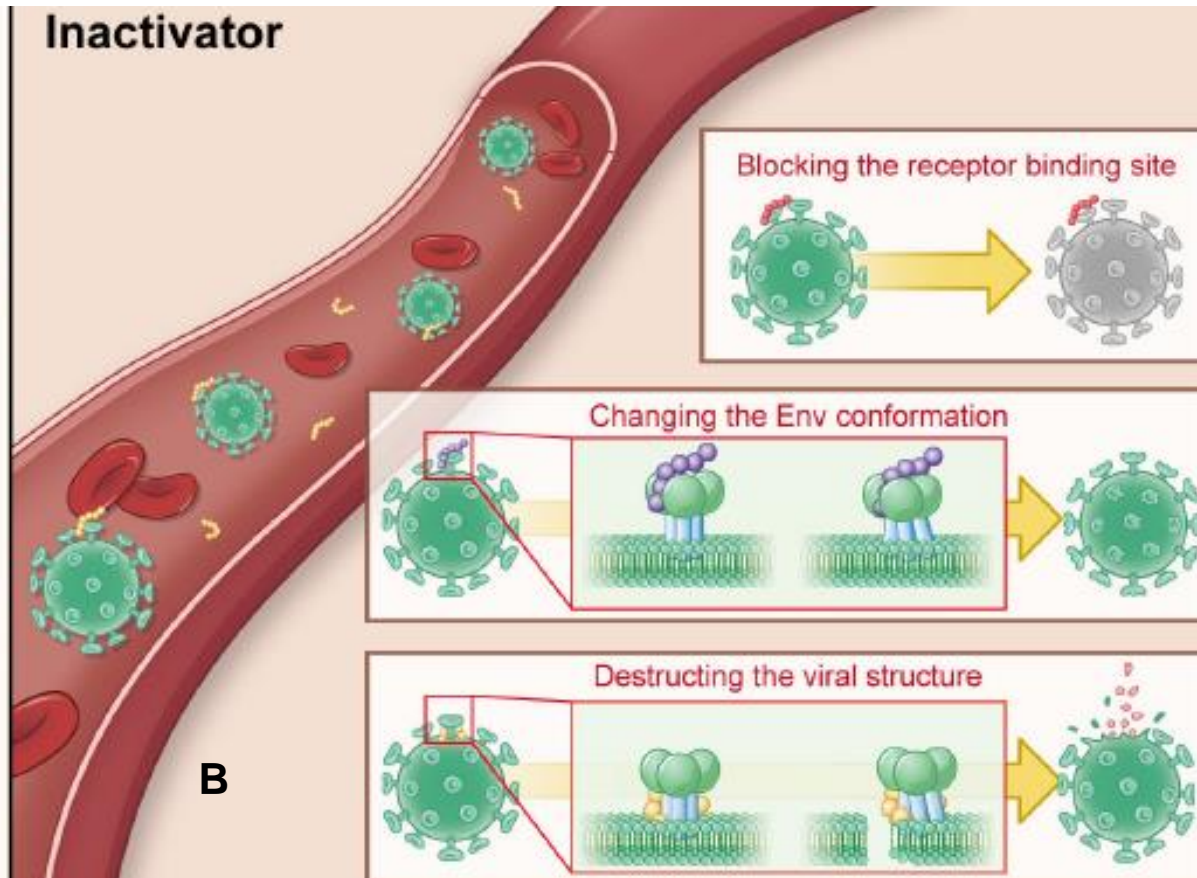


- Pojava infektivnih bolesti uzrokovanih visokopatogenim virusima s proteinskom ovojnicom (Env, *envelope*), nametnula je potrebu za sigurnim i učinkovitim antivirusnim lijekovima. Od otkrića prvog antivirusnog lijeka za liječenje HIV-a (1987.), od strane FDA odobreno je preko 80 antivirusnih lijekova namijenjenih za liječenje i prevenciju infekcija. Većina tih lijekova smatra se “pasivnom obranom” zato što moraju ući u zaraženu stanicu da bi inhibirali virusnu replikaciju u toj stanici. Stoga takvi lijekovi moraju imati sposobnost prolaska kroz staničnu membranu bez narušavanja normalne funkcije intracelularnih proteina. U suprotnom, glavina lijeka ostat će izvan stanice i neće inhibirati virusnu replikaciju.

- Za razliku od “pasivne obrane”, neki antivirusni agensi služe kao “čuvari ulaza” (*gate keepers*) koji se bore s virusom izvan stanice. Lijekovi koji čuvaju ulaz dijele se u tri skupine: (i) inhibitori koji blokiraju vezanje virusne čestice na stanicu (inaktivatori virusa), (ii) antagonisti receptora koji se vežu na receptore na površini stanice i tako blokiraju vezanje viriona za receptor te (iii) inhibitori fuzije koji blokiraju membransku fuziju (fuziju membrana virusa i napadnute stanice). Za razliku od inhibitora fuzije i antagonista receptora za čiju je aktivnost nužna prisutnost ciljnih stanica, inaktivatori virusa napadaju i inaktiviraju virusne čestice u krvotoku i to interakcijom s virusnim proteinima ovojnice.

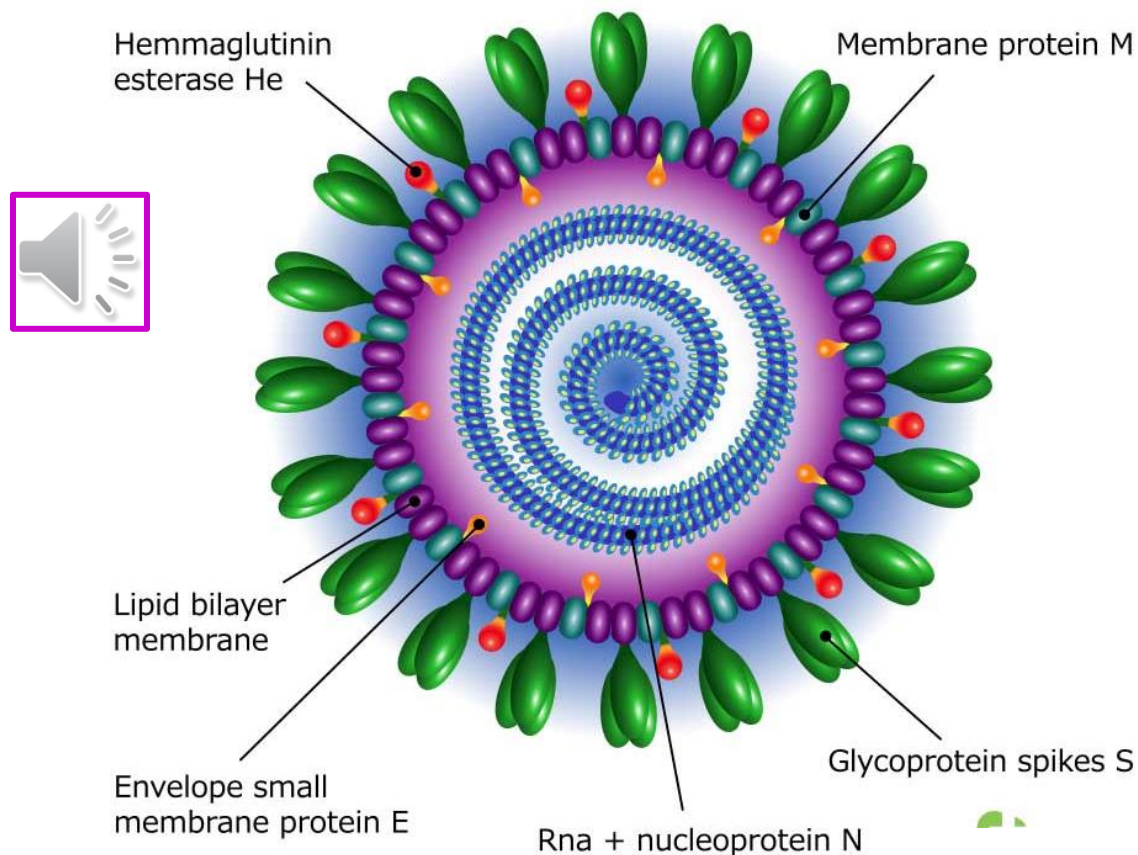


- Mehanizmi inaktivacije virusa mogu biti različiti: (i) inaktivatori se vežu na receptorska vezna mjesta (RBS, *receptor-binding site*), (ii) inaktivatori induciraju konformacijske promjene Env-proteina uslijed čega virusne čestice gube sposobnost ulaska u stanicu, (iii) inaktivatori se vežu na virusnu lipidnu membranu uzrokujući tako razaranje membrane i curenje virusnog genetičkog materijala.
- Takvi PPVIs (*protein or peptide-based virus inactivators*) opisani su za HIV, gripu, ZIKV (zika virus), DENV (denga virus) i HSV (herpes virus)], a sigurniji su za *in vivo* primjenu na ljudima u odnosu na npr. deterdžente koji provode nespecifičnu lizu lipidnih membrana i virusa i stanica domaćina.





- Koronavirusi često su prisutni kod sisavaca i ptica. Kao i ostali virusi, a za razliku od organizama, nemaju staničnu građu već su njihove čestice (promjera 120-160 nm) kompleksi makromolekula [RNA, proteinski omotač ili kapsida (kapsida i nukleinske kiseline čine nukleokapsidu) te vanjska lipidna ovojnica iz koje strše glikoproteinski izdanci].
- Jednolančana pozitivna RNA s oko 30000 nukleotidnih sekvenci čini genom SARS-CoV-2, a prisutna su i 4 glavna strukturna proteina: površinski šiljak protein ili protein šiljastih izdanaka (S, engl. *spike*), mali protein ovojnice (E, engl. *envelope*), membranski protein (M, engl. *membrane*) i nukleokapsidni protein (N, engl. *nucleocapsid*) protein. Površinski šiljak protein (S) izlazi iz virusne lipidne ovojnice zbog čega virus oblikom nalikuje na krunu (*lat. corona*).

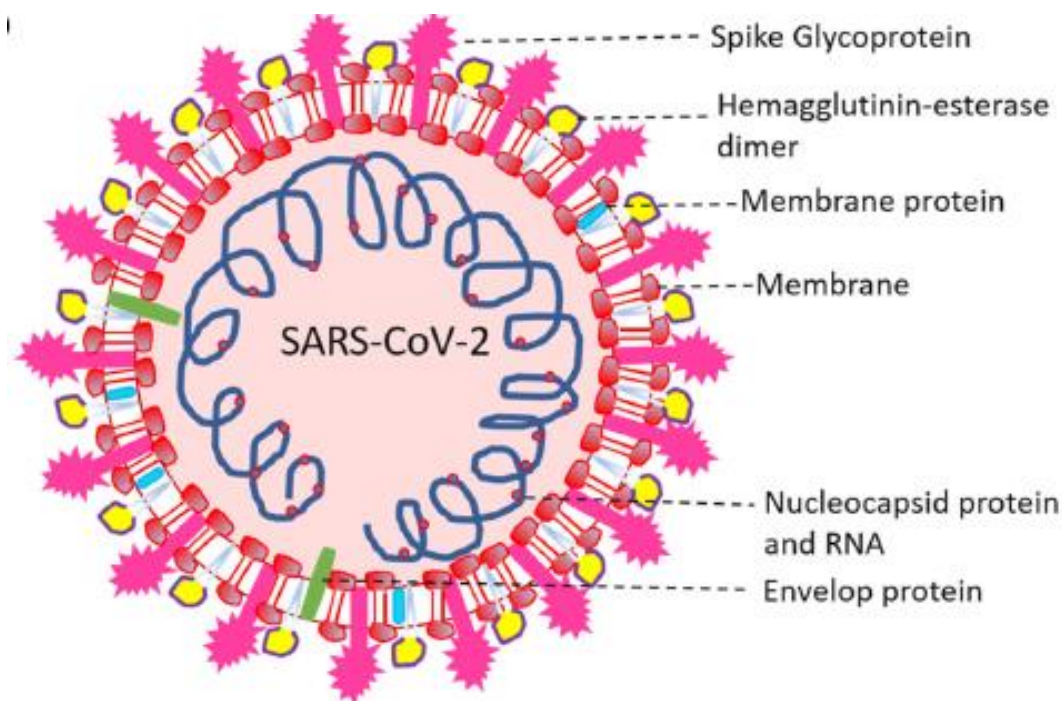


[Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate WIV07, complete genome](#)

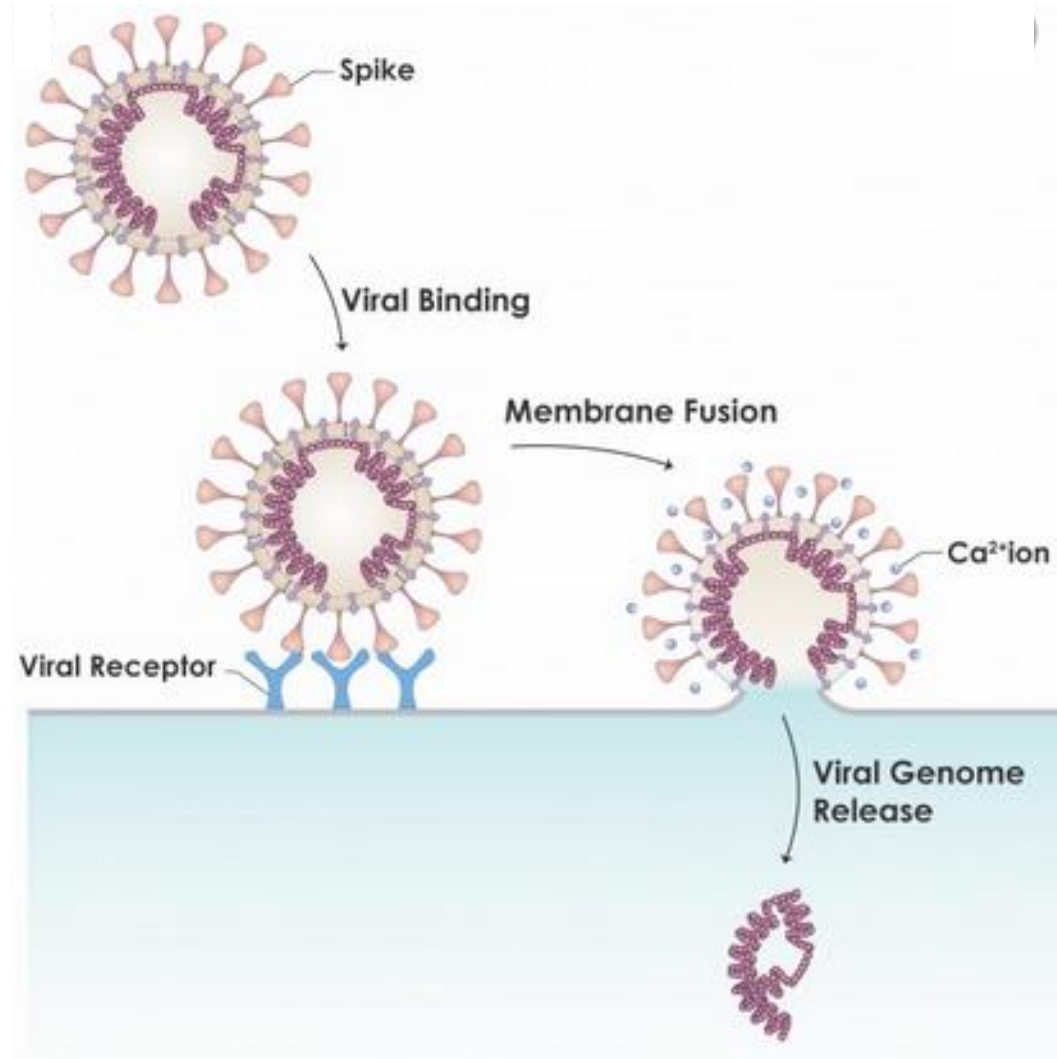
- Unutar proteinskog omotača (kapside) nalazi se nukleokapsida (N-protein) čiji se *N*-terminus vezuje za virusnu RNA, omogućujući virusnu replikaciju i transkripciju. Stoga se nameće potreba pronalaženja lijeka koji će spriječiti kontakt između *N*-terminusa N-proteina i virusne jednolančane pozitivne RNA.
- M-protein najzastupljeniji je na površini virusne čestice (sudjeluje u sastavljanju virusa) gdje se nalazi i S-protein koji upravlja interakcijom virusa s receptorima na površini stanice domaćina kao i fuzijom virusa i stanične membrane domaćina kako bi se olakšao ulazak virusa u stanicu domaćina.
- E-protein, mali membranski protein izgrađen od 76-109 aminokiselina, ključan je za sastavljanje virusa, permeabilnost membrane domaćina i interakciju virusa i domaćina.
- Lipidna ovojnica enkapsulira genetski materijal.



- Dimer hemaglutinin-esteraza (HE), lociran na površini virusa, važan je za inficiranje stanica domaćina. S-protein sadrži tri identična lanca građena iz 1273 aminokiseline, a sadrži i 2 dobro definirane domene S1 i S2 uključene u stanično prepoznavanje i fuziju virusa sa staničnom membranom domaćina pri čemu dolazi do još uvijek nerazjašnjenih konformacijskih promjena.



- Virusni S-protein (Spike) specifično prepoznaje angiotenzin-konvertirajući enzim (ACE2, *Angiotensin-converting enzyme*), receptor prisutan na površini brojnih humanih stanica, uključujući i stanice pluća. Slijedi cijepanje S-proteina djelovanjem proteaza iz domaćina što je okidač za aktivaciju mehanizama membranske fuzije (krucijalni biološki proces stapanja dviju odvojenih lipidnih membrana u jednu). Fuzija membrana domaćina i virusa omogućava ulazak virusa u stanicu nakon čega dolazi do replikacije virusa u citoplazmi stanice i ispoljavanja njegovog citotoksičnog učinka.



T. Tanga, M. Bidona, J. A. Jaimesb, G. R. Whittakerb, S. Daniela, **Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development.** *Antiviral Research* 178 (2020) 104792



- Domaćinov receptor ACE2 jest transmembranski glikoprotein, a djeluje kao enzim monokarboksi-peptidaza.
- Raspoloživi podaci ne podržavaju ideju o testiranju ACE2 supstrata, npr. angiotensina, kao kandidata za potencijalne SARS-terapeutike.
- S druge strane, terapijama usmjereni na ciljanje interakcija ACE2 i S-proteina zasada pokazuju obećavajuće rezultate.

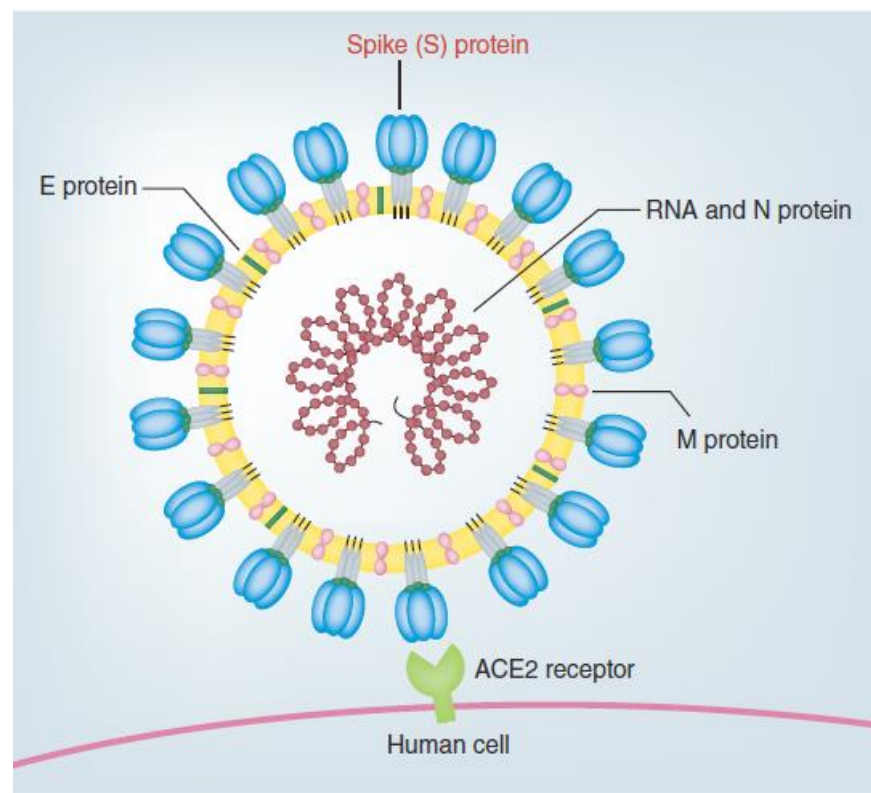


Figure 2. Representation of general structure of SARS-CoV's and host cell entry receptor ACE2. The major viral proteins and RNA strand are illustrated, these include the envelope (E) protein, nucleocapsid (N) protein, membrane (M) protein and spike (S) protein, along with the host entry receptor ACE2. The S protein-ACE2 interaction is a crucial mechanism of SARS-CoV entry into host cells.

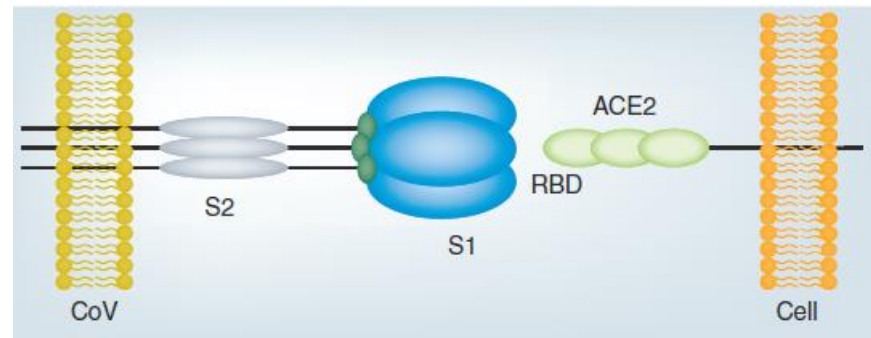
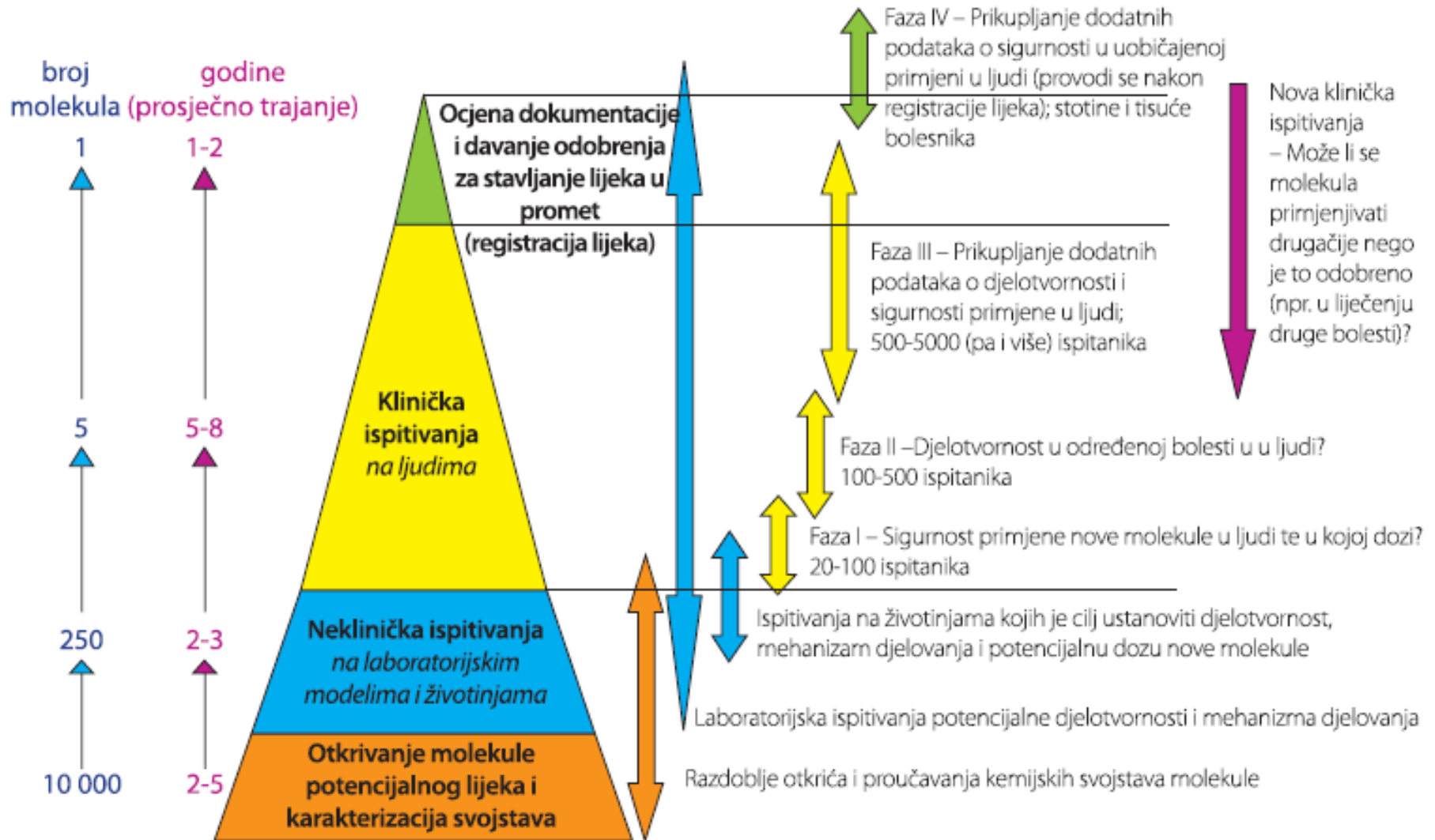


Figure 3. A close-up depiction of the S protein and host ACE2 receptor. The viral S protein (composed of S1 and S2 subunits) is a trimeric membrane-embedded glycoprotein. The RBD of the S1 region mediates initial binding with the host entry receptor ACE2, a transmembrane protein is represented in light green. The phospholipid bilayer of the viral particle is represented in yellow while host membrane phospholipid bilayer is represented in orange. RBD: Receptor-binding domain.



## OTKRIVANJE I RAZVOJ LIJEKOVA – OD NOVE MOLEKULE DO ODOBRENOG LIJEKA

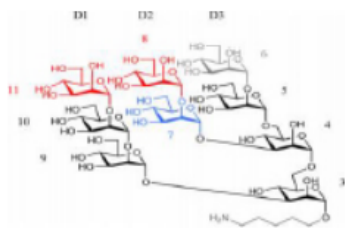
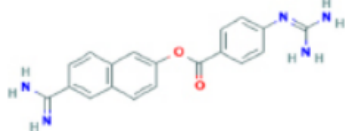
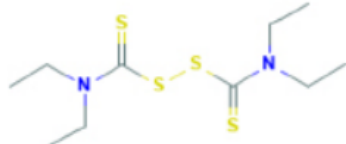



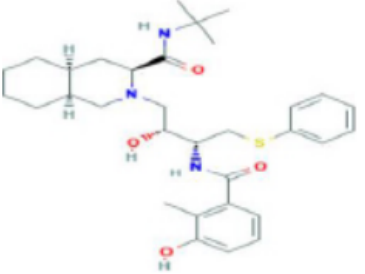
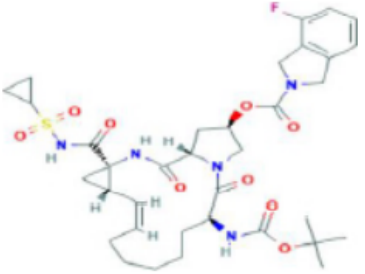
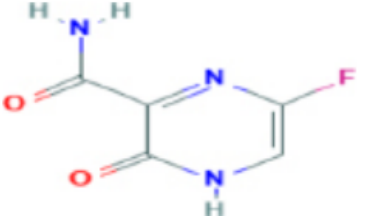


- Visoki i rastući troškovi razvoja novih lijekova pripisuju se velikom broju spojeva koji se podvrgavaju prekliničkim testiranjima te visokom udjelu randomiziranih kontrola koje zbog toksičnosti ne nalaze kliničku primjenu. Stoga se istražuju mogućnosti poboljšanja učinkovitosti postojećih lijekova, za koje se zna da imaju minimalne i prihvatljive nuspojave. (Nobelovac sir James Black: „Najplodniju bazu za otkriće novih lijekova čine stari lijekovi.”)
- Prenamjena lijekova (drug repurposing, drug repositioning, reprofiling, re-tasking) je strategija ispitivanja djelovanja odobrenih lijekova za nove terapijske indikacije ili ispitivanje lijekova koji nisu još odobreni. S obzirom da je sigurnost tih lijekova i kandidata za lijekove već utvrđena u kliničkim ispitivanjima za neke druge bolesti, njihovom prenamjenom skraćuje se vrijeme do početka primjene na pacijentima, a i troškovi su puno niži u odnosu na troškove razvoja novih lijekova.
- U tu svrhu provodi se probir iz knjižnica postojećih lijekova koji se podvrgavaju različitim testovima kako bi se otkrila moguća nova primjena, odnosno kako bi se lijek dizajniran za liječenje jedne bolesti mogao primijeniti za liječenje druge bolesti. Među najpoznatijim primjerima takvih prenamijenjenih lijekova nalaze se talidomid (multipli mijelom) te remdesivir (Covid-19).
- Rastući broj prenamijenjenih lijekova nameće ideju da bi se sistematskim probirom svih poznatih lijekova moglo doći do spoznaja o novim terapijskim primjenama.

- Još uvijek nije pronađen lijek protiv Covida-19, a razvoj novih lijekova dugotrajan je proces. Stoga bi se učinkovita strategija za brzi odgovor na pandemiju mogla temeljiti na prenamjeni postojećih antivirusnih i antimikrobnih lijekova. U citiranoj reviji opisani su brojni antivirusni lijekovi koji su evaluirani kao potencijalni inhibitori virusne replikacije, a koji su usmjereni na SARS-CoV-2-proteine ključne za njegovu patogenezu i preživljavanje: S-protein, RdRp, 3CL<sup>pro</sup> i PL<sup>pro</sup>.

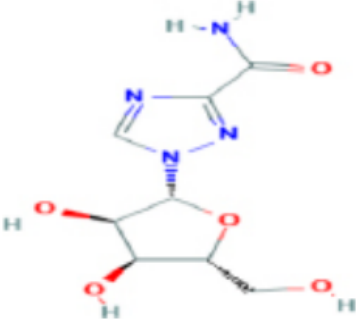
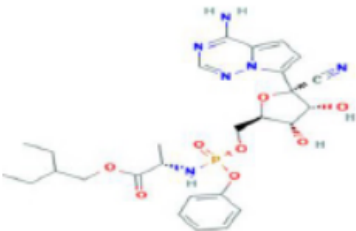
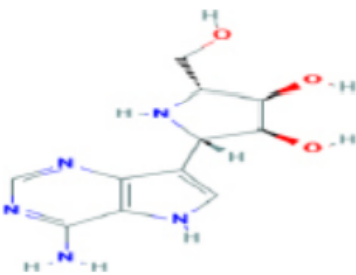
**Table 1. Repurposing antivirals with potential ability to inhibit the SARS-CoV-2 replication via targeting the viral structural and nonstructural proteins.**

Existing antivirals	Chemical structure	Primary use	Potential efficacy on other viruses	Mechanism of action	Study (year)
Griffithsin	 <p>PubChem SID: 163672929</p>	An alga-derived lectin against HIV	Broad-spectrum antiviral activity against HIV, SARS and MERS	Viral entry inhibition by attachment to the virus surface glycoproteins such as HIV gp120 and SARS-CoV-2 S protein	Lee <i>et al.</i> (2019) [; Fischer <i>et al.</i> (2019) Ziółkowska <i>et al.</i> (2006) Millet <i>et al.</i> (2016)
Nafamostat	 <p>PubChem CID: 4413</p>	A drug for acute pancreatitis	Inhibition the MERS and SARS-CoV-2 life cycle	Inhibiting the host cells protease (TMPRSS2) and virus membrane fusion	Yamamoto <i>et al.</i> (2016)
Disulfiram	 <p>PubChem CID: 3117</p>	A drug for chronic alcoholism	Potential treatment for HIV and inhibition ability for MERS and SARS-CoV-2	Inhibit the viral polyprotein cleavage	Lin <i>et al.</i> (2018) [; Anand <i>et al.</i> (2003) Lee <i>et al.</i> (2016)

Existing antivirals	Chemical structure	Primary use	Potential efficacy on other viruses	Mechanism of action	Study (year)
Lopinavir/ritonavir (Kaletra)	 <p>PubChem CID: 92727 PubChem CID: 392622</p>	A drug to treat HIV	Inhibit the replication of the SARS, MERS and SARS-CoV-2	Inhibiting the viral replication by high binding affinity to the viral protease	Chu <i>et al.</i> (2004) Yao <i>et al.</i> (2020) Cao <i>et al.</i> (2020)
Nelfinavir	 <p>PubChem CID: 64143</p>	Approved antiretroviral drug against HIV-1	Inhibit the replication of the SARS and SARS-CoV-2	Potential inhibitor against the viral protease such as 3CLpro	Xu <i>et al.</i> (2020) Yamamoto <i>et al.</i> (2004) Ohashi <i>et al.</i> (2020)
Danoprevir	 <p>PubChem CID: 11285588</p>	A drug for noncirrhotic genotype 1b HCV	Therapeutic potential against SARS-CoV-2	Potential inhibitor against the viral protease such as 3CLpro	Chen <i>et al.</i> (2020)
Favipiravir (Avigan)	 <p>PubChem CID: 492405</p>	A guanine analog flu drug	Activity against many RNA viruses such as influenza virus, yellow fever virus, enterovirus, SARS-CoV-2, ...	Selectively inhibit the viral RdRp via tightly binding to the RdRp	Furuta <i>et al.</i> (2009) Furuta <i>et al.</i> (2013) Cai <i>et al.</i> (2020)



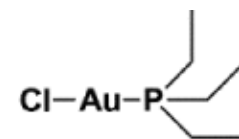
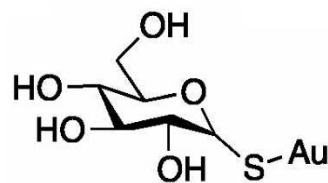
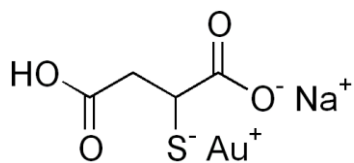


Existing antivirals	Chemical structure	Primary use	Potential efficacy on other viruses	Mechanism of action	Study (year)
Ribavirin	 <p>PubChem CID: 37542</p>	An approved drug against HCV and RSV	Activity against of MERS and SARS-CoV-2	Inhibition the viral RNA synthesis by viral mRNA capping termination via targeting the viral RdRp	Stockman <i>et al.</i> (2006) Arabi <i>et al.</i> (2020)
Remdesivir	 <p>PubChem CID: 121304016</p>	An adenosine analog developed in response to the Ebola virus	Broad-spectrum antiviral activity against a wide range of ssRNA viruses such as SARS, MERS, Marburg, RSV, SARS-CoV-2, etc.	Binds to the viral RdRp and acts as an RNA-chain terminator	Wang <i>et al.</i> (2020) Sheahan <i>et al.</i> (2017) Holshue <i>et al.</i> (2020)
Galidesivir	 <p>PubChem CID: 10445549</p>	An adenosine analog developed in response to the HCV	Antiviral activity against a wide range of RNA viruses such as SARS-CoV, MER-CoV, Ebola and Marburg	Inhibition the viral RNA polymerase and premature termination of RNA transcription	Westover <i>et al.</i> (2018)

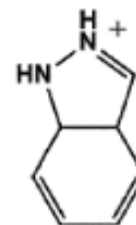
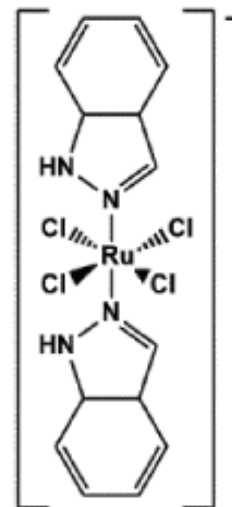
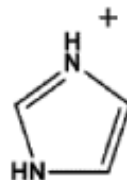
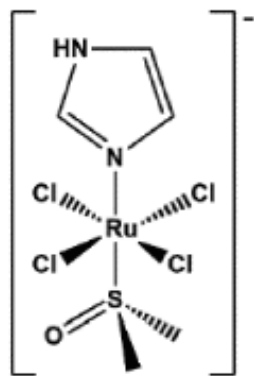




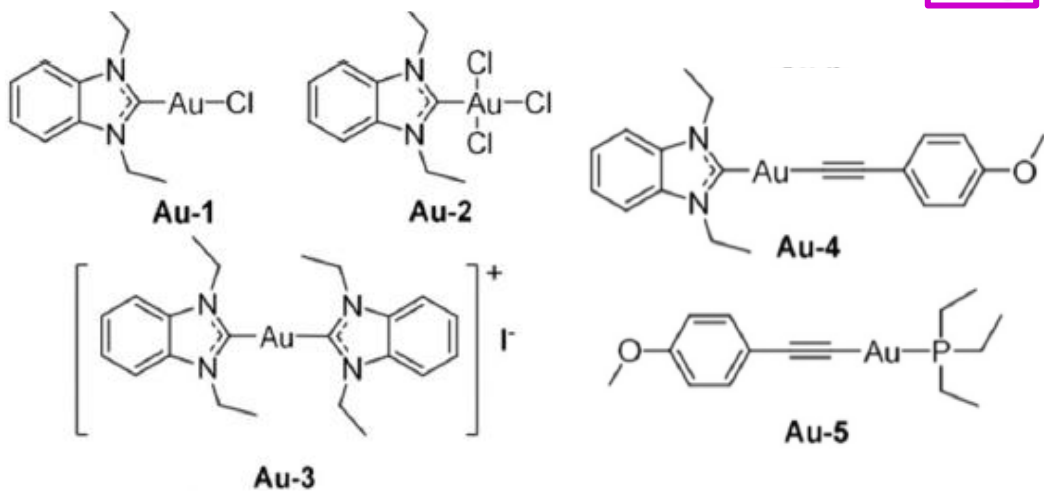
- Osim **AF**, razmišlja se i o prenamjeni drugih klinički primijenjivanih lijekova za reumatoidni artritis na bazi Au, poput aurotiomalata i aurotioglukoze. **AF-Cl** u kojem je tiošećerna skupina zamijenjena s Cl, a sadrži farmakološki aktivni kation  $[Et_3PAu]^+$  također se razmatra kao obećavajući kandidat za liječenje COVID-19.



- Antikancerogeni Ru-kompleksi NAMI-A i KP1019 koji su se pokazali sigurnima za primjenu čak i pri višim koncentracijama, a trenutno se provode testiranja njihovog inhibitory učinka na replikaciju SARS-CoV-2 virusa.

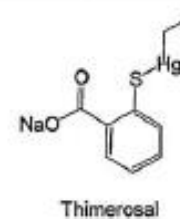
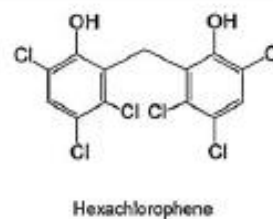
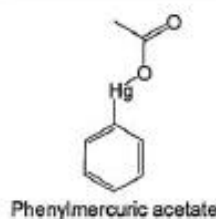
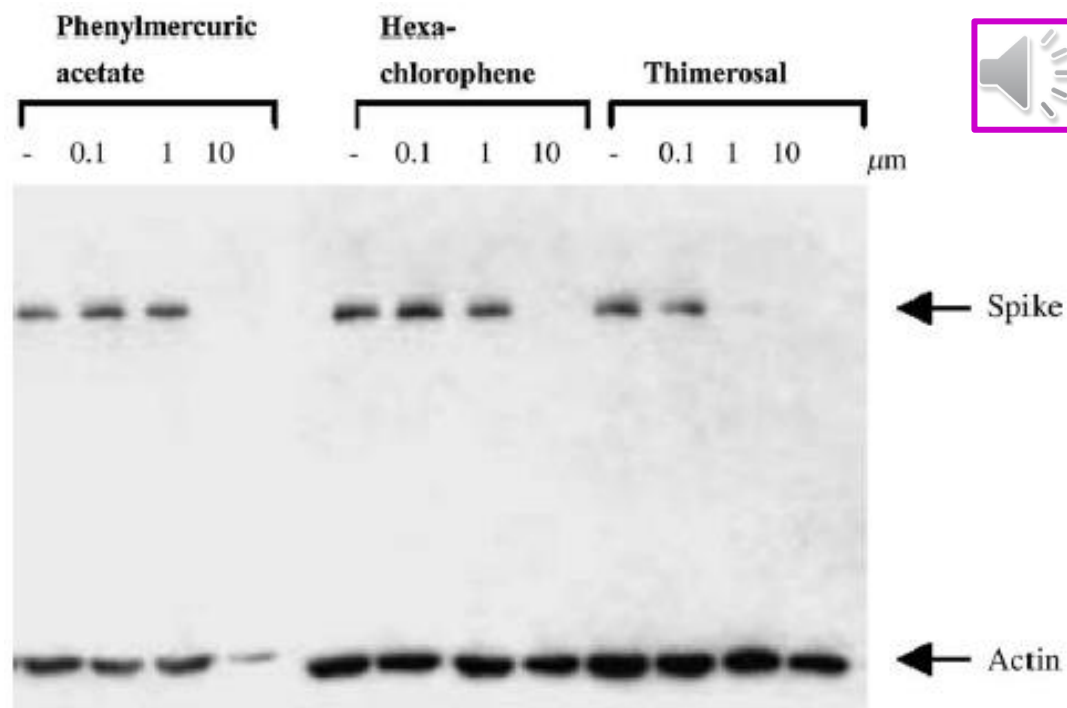


- Drugi pristup u pripravi metalo-lijekova kao inhibitora SARS-CoV-2-proteaze zasniva se probiru iz biblioteke spjeva koji sadrže metal. Tako je testiran kapacitet panela od 5 Au-spojeva da inhibiraju interakciju SARS-CoV-2-S i ACE2-receptora.
- Au-kompleksi imaju dugu povijest primjene u medicini, a vodeći spoj **AF** izaziva veliku pozornost zbog svoje antikancerogene i antiinfektivne aktivnosti. **Au-1** - **Au-5** sadrže ili *N*-heterociklički karben (NHC) ili alkinilni ligand, a takvi kompleksi pokazuju vrlo obećavajuću biološku aktivnost. Svi testirani Au-spojevi pokazuju niske IC<sub>50</sub>-vrijednosti (16 – 25 μM), i to niže u odnosu na klorokin.
- Au-spojevima određena je inhibitorna aktivnost prema SARS-CoV-2-PLpro. IC<sub>50</sub>-vrijednosti **Au-1**, **Au-2** i **Au-5** (5 – 7 μM) odgovaraju onima za referentni inhibitor Disulfiram. Inhibitorna aktivnost kompleksa **Au-3** i **Au-4** nešto je niža (IC<sub>50</sub>~14 μM), a najnižu aktivnost pokazao je **AF** (IC<sub>50</sub>= 25,5 μM). (Benzimidazol korišten je negativna referenca).



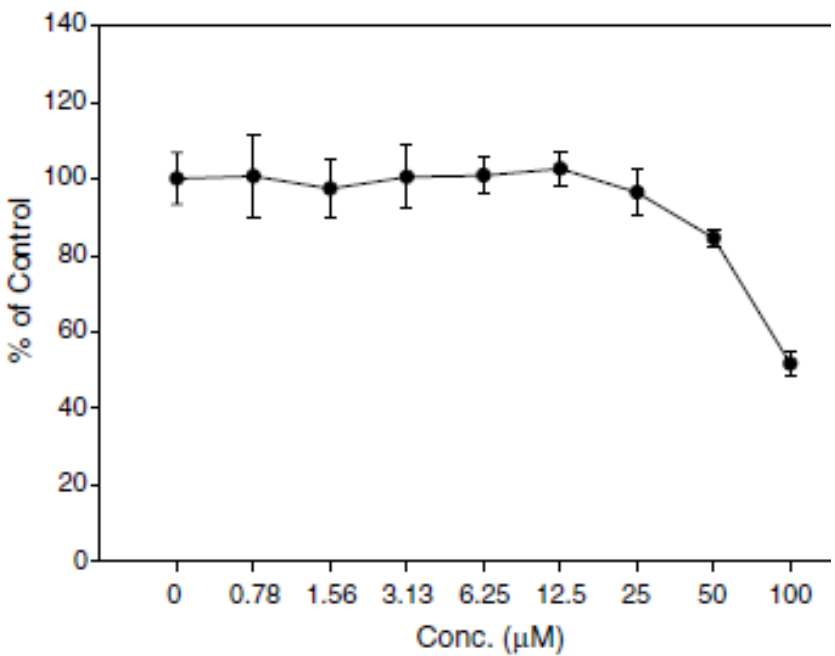
	spike-ACE2 (IC <sub>50</sub> , μM)	PLpro (IC <sub>50</sub> , μM)
benzimidazole	> 100	> 100
Chloroquine	31.9 ± 5.4	n.d.
Disulfiram	n.d.	6.5 ± 0.4
Auranofin	22.2 ± 2.8	25.5 ± 1.2
<b>Au-1</b>	19.4 ± 5.7	6.3 ± 1.6
<b>Au-2</b>	20.0 ± 2.3	5.5 ± 0.5
<b>Au-3</b>	21.3 ± 6.8	14.2 ± 0.3
<b>Au-4</b>	25.0 ± 4.2	14.1 ± 2.1
<b>Au-5</b>	16.2 ± 2.4	6.7 ± 0.9

- Biblioteka od 960 komercijalno dostupnih lijekova i biološki aktivnih spojeva [među kojima i organometalni spojevi fenilživin acetat i timerosal (farmaceutske pomoćne tvari, antimikrobni konzervansi) te heksaklorofen (antimikrobni spoj, inhibitor kolinesteraze)] podvrgnuta je probiru putem kompjuterskog modeliranja i bioloških testova u cilju identifikacije inhibitora SARS-CoV-3CL-proteaze.
- Western blots analiza pokazala je da u prisutnosti 10  $\mu\text{M}$  fenilživinog acetata nije detektiran virusni S-protein. Udio aktina, koji služi kao indikator citotoksičnosti primijenjenog spoja, u Vero E6 stanicama tretiranima s 10  $\mu\text{M}$  fenilživinog acetata i potom zaraženima sa SARS-CoV se snizio, što je indikacija njegove toksičnosti prema stanicama. Prisutnost 10  $\mu\text{M}$  timerosala smanjuje detektabilnu količinu S-proteina > 90%. Slični rezultati dobiveni su djelovanjem 10  $\mu\text{M}$  heksaklorofena. Ova dva spoja nisu pokazala toksičnost prema aktinu (njegov je udio u njihovoj prisutnosti nepromijenjen).

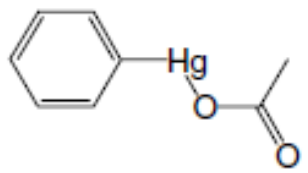
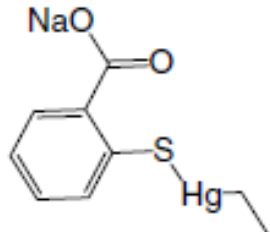
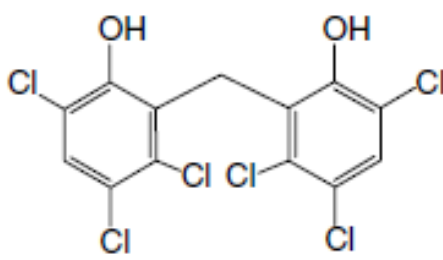


- Djelovanjem 10  $\mu\text{M}$  heksaklorofena na Vero E6 stanice (koncentracija koja osigurava anti-SARS-CoV-aktivnost) nije uzrokovana stanična toksičnost. Dapače, pri vrlo visokim koncentracijama heksaklorofena (100  $\mu\text{M}$ ) preživljava ~ 50% Vero E6 stanica.

- Na temelju niskih  $K_i$ -vrijednosti može se zaključiti da su testirani spojevi kompetitivni inhibitori SARS-CoV-3CL-proteaze.



$K_i$  values and the structures of some inhibitors of SARS-CoV 3CL protease

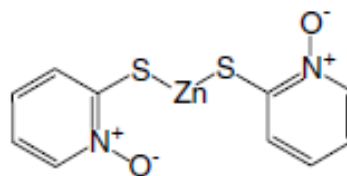
Inhibitor	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
Phenylmercuric acetate <sup>a</sup>	$0.7 \pm 0.3$
	
Thimerosal <sup>a</sup>	$2.4 \pm 0.2$
	
Hexachlorophene <sup>a</sup>	$13.7 \pm 0.4$
	



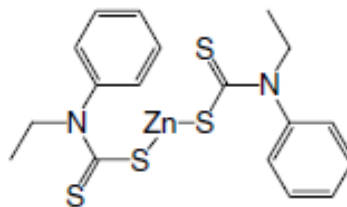
- S obzirom da spojevi koji sadrže Hg mogu biti potencijalno opasni za ljude, pripravljena je serija Zn-konjugata kojima je određen inhibitorski potencijal. Dok se Zn-spoj **1** pokazao kompetitivnim inhibitorom ( $K_i = 0,12 \mu\text{M}$ ), sam  $\text{Zn}^{2+}$  ne pokazuje inhibitorski učinak (njegova je  $K_i$ -vrijednost povećana 6 puta). Tako indicirani utjecaj organskog dijela molekule odn. piridinskih skupina na inhibitorsku aktivnost potkrijepljen je visokim  $K_i$ -vrijednostima preostalih dvaju Zn-spojeva (njihove  $K_i$ -vrijednosti odgovaraju onima opaženima za  $\text{Zn}^{2+}$ ).
- S obzirom da su poznati Zn-spojevi koji se koriste kao dodaci određenim lijekovima, vjeruje se da je Zn-ion siguran za upotrebu kod ljudi. Stoga visok inhibitorski učinak Zn-spoja **1** predstavlja solidnu bazu za daljnja istraživanja lijekova protiv Covid-19.

$K_i$  values and the structures of some inhibitors of SARS-CoV 3CL protease

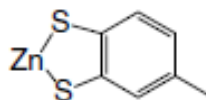
Inhibitor	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
1-Hydroxypyridine-2-thione zinc (1)	$0.17 \pm 0.07$



*N*-Ethyl-*N*-phenyldithiocarbamic acid zinc  $1.0 \pm 0.1$



Toluene-3,4-dithiolato zinc  $1.4 \pm 0.2$



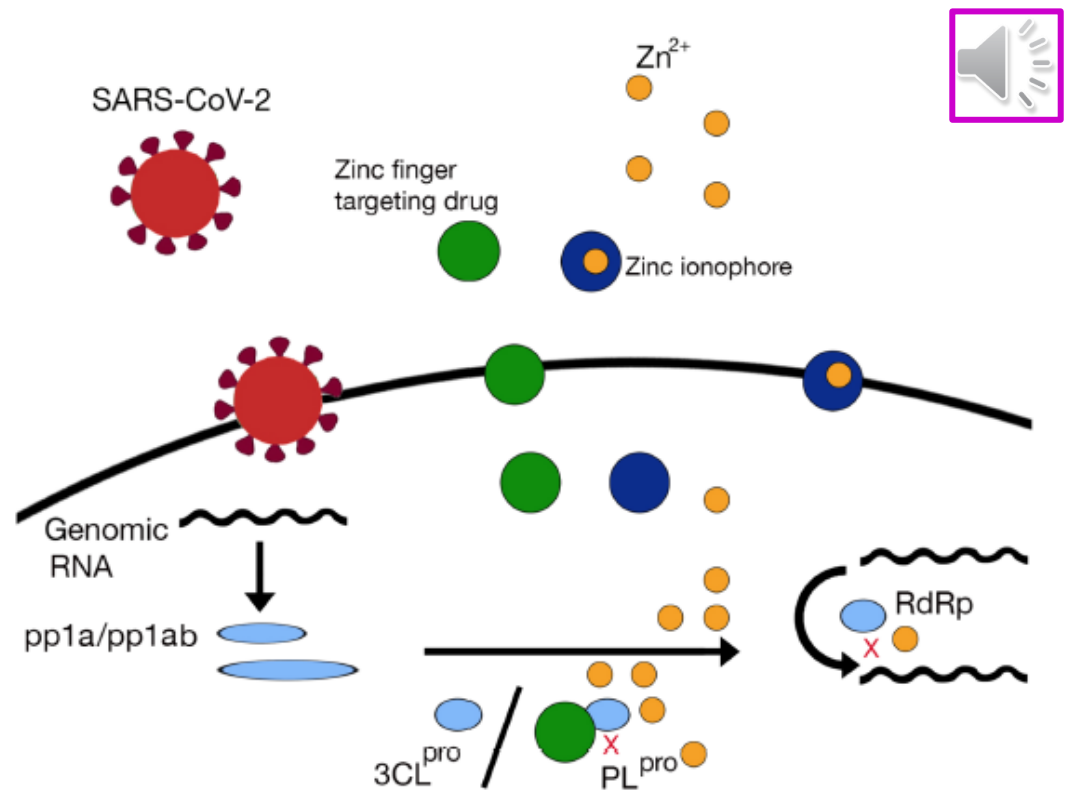
$K_i$  values of three metal ions in inhibiting the SARS-CoV 3CL protease

Metal ion	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
$\text{Hg}^{2+}$	$0.5 \pm 0.1$
$\text{Zn}^{2+}$	$1.1 \pm 0.4$
$\text{Cu}^{2+}$	$4.9 \pm 1.3$

- Poznato je da se disfunkcionalnost imunog sustava može korigirati suplementacijom cinkom. Vezano za Covid-19, a zahvaljujući svojim antiinflamatornim svojstvima, smatra se da Zn može ograničiti citokinsku oluju koja izaziva zatajenje organa i fatalni ishod.
- Zn ima važnu ulogu u funkciji ne samo humanih proteina i enzima (ACE2-receptori ubrajaju se u Zn-metaloenzime), već i virusnih. Zn-prst prisutan je u mnogim virusnim proteinima gdje ima ulogu u njihovoj stabilizaciji, te stoga predstavlja važnu metu pri dizajnu antivirusnih terapeutika.
- Na slici je predložen mehanizam djelovanja lijeka čija je meta Zn-prst: lijek se vezuje za Zn-prst iz

esencijalne virusne proteaze (3CL<sup>pro</sup> ili Plp<sup>ro</sup>) uslijed čega dolazi do uklanjanja Zn iz enzima, a što dovodi do destabilizacije enzima i povećanja intracelularne koncentracije Zn-iona.

- Intracelularni Zn vezat će se i inhibirati virusnu RNA-ovisnu RNA-polimerazu (RdRp) i tako onemogućiti virusnu replikaciju.



U. Doboszevska et al, **Targeting zinc metalloenzymes in coronavirus disease 2019**, *British Journal of Pharmacology* 2020 <https://doi.org/10.1111/bph.15199>



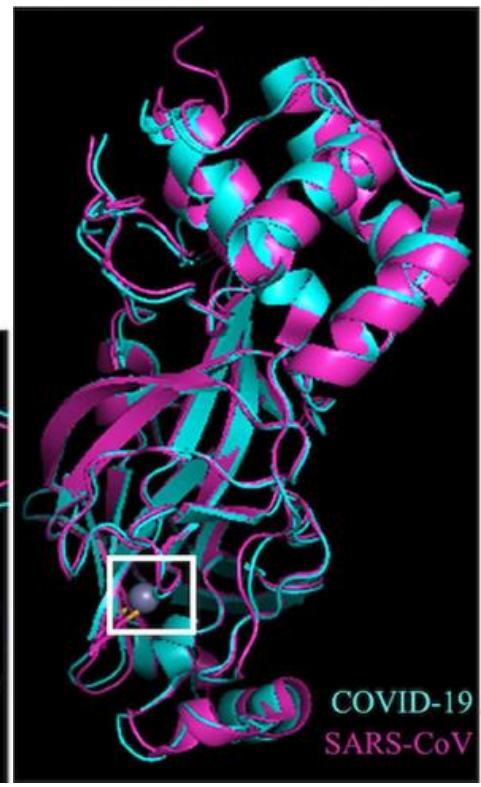
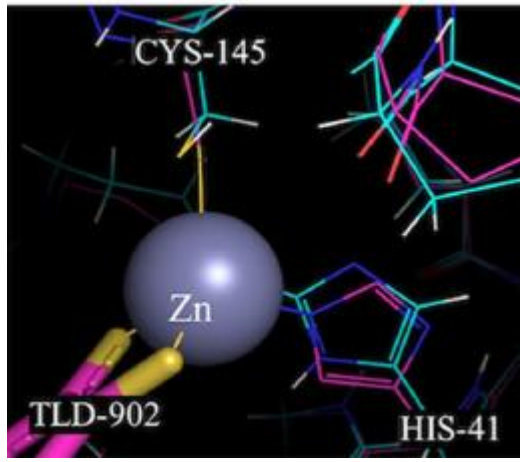
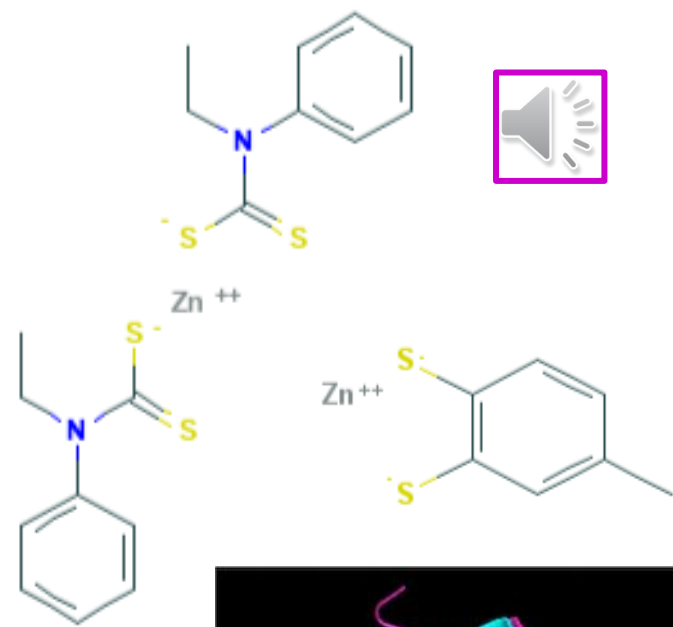
- Funkcija imunog sustava ovisi o Zn kao integralnom dijelu signalnih puteva uključenih u regulaciju urođenog i stečenog imunog odgovora. Manjak Zn uzrokuje veću podložnost infekcijama, a suplementacija ojačava imunitet. Zn utječe na virusnu replikaciju, sintezu proteina, fuziju membrana i aktivnost RdRp.

Table 1. The influence of zinc, zinc conjugates and zinc ionophores on respiratory viruses.

Virus family	Strain	Antiviral mechanism	Zinc formulation and effective concentration
Coronaviruses	SARS-CoV	Reduced viral replication (11) Inhibited RNA synthesis and RdRp activity and template binding (11) Inhibition of 3CL <sup>pro</sup> activity (13)	2 $\mu$ M ZnOAc <sub>2</sub> + 2 $\mu$ M PT 50 $\mu$ M to 6 mM ZnOAc <sub>2</sub>
		Inhibition of 3CL <sup>pro</sup> activity (12)	Zinc conjugated TDT (K <sub>i</sub> =1.4 $\mu$ M), EPDTC (K <sub>i</sub> =1.0 $\mu$ M), JMF1600 (K <sub>i</sub> =0.32 $\mu$ M) and JMF1586 (K <sub>i</sub> =0.05 $\mu$ M) Zn <sup>2+</sup> ions (K <sub>i</sub> =1.1 $\mu$ M), 1-hydroxypyridine-2-thione zinc (K <sub>i</sub> =0.17 $\mu$ M)
Picornavriuses	CVB3	Reduced viral replication and disrupt polyprotein processing (14,15)	0.1-10 $\mu$ M ZnCl <sub>2</sub> + 125 $\mu$ M PDTC or 10 $\mu$ M PT, 125 $\mu$ M PDTC or 125 $\mu$ M HK allowing Zn <sup>2+</sup> cell influx
	Mengovirus	Reduced viral replication and disrupt polyprotein processing (14,15)	0.1-10 $\mu$ M ZnCl <sub>2</sub> + 125 $\mu$ M PDTC or 10 $\mu$ M PT, 125 $\mu$ M PDTC or 125 $\mu$ M HK allowing Zn <sup>2+</sup> cell influx
	HRV	Slight reduction in viral replication (16) Inhibition of RdRp activity (17)	0.1 mM Zn gluconate or Zn lactate ZnCl <sub>2</sub> (IC <sub>50</sub> =0.6 $\mu$ M for PolyA/T template or 4.0 $\mu$ M for sshRNA template)
	HRV	Reduced viral replication and disrupt polyprotein processing (14,18)	10 $\mu$ M PT, 125 $\mu$ M PDTC or 125 $\mu$ M HK allowing Zn <sup>2+</sup> cell influx
Paramyxoviridae	RSV	Reduced viral replication and penetration (19)	0.1-10 mM of Zn acetate, Zn sulfatate or Zn lactate
Influenza	Influenza A	Reduced viral-induced DNA fragmentation and caspase-3 activity (20)	0.15 mM ZnSO <sub>4</sub>
	H1N1	Reduced virus titer post-infection (21)	25-200 $\mu$ g/ml PEGylated ZnO-NPs 75 $\mu$ g/ml ZnO-NPs

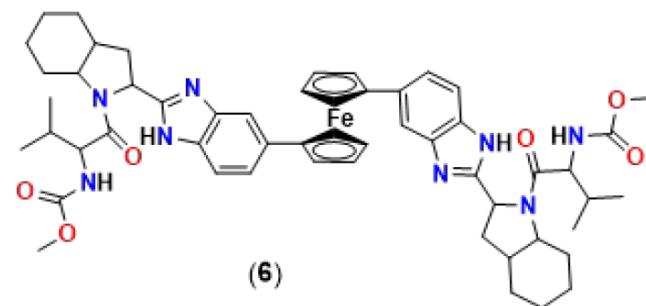
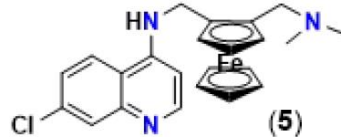
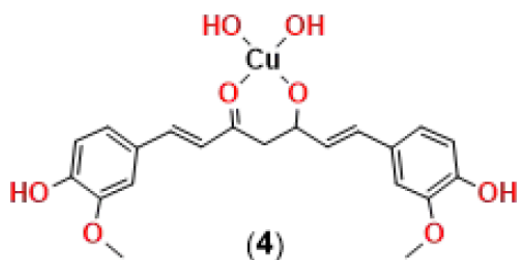
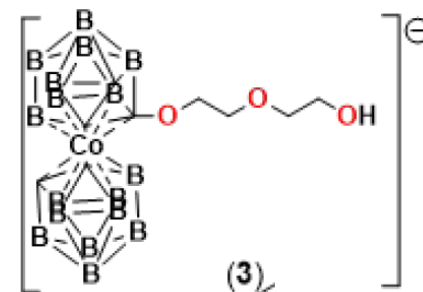
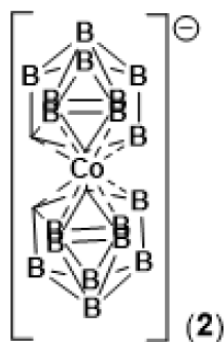
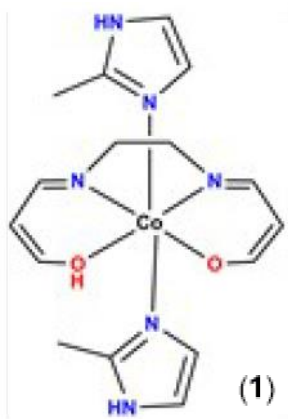


- Zn se najčešće doprema kao kompleks s *N*-etil-*N*-fenilditio-karbaminskom kiselinom (EPDTC) ili toluen-3,4-ditioatom (TLD). Ovi organski ligandi pomažu kod koordiniranja Zn u katalitičko mjesto 3CL<sup>pro</sup> što uzrokuje inhibiciju proteolitičke aktivnosti. Alternativno, smatra se da organski ligandi olakšavaju ulazak Zn u stanicu nakon čega Zn-ioni inhibiraju RdRp.
- Na temelju  $K_i$ -vrijednosti ( $\mu\text{M}$ ) može se zaključiti da je Zn sâm ili koordiniran s organskim ligandima (prema studijama molekuskog pristajanja specifično cilja katalitičku dijadu Cys<sup>145</sup> i His<sup>41</sup>) učinkovit inhibitor 3CL<sup>pro</sup>: 1,1 (Zn), 1,4 (Zn-TLD) odn. 1,0 (Zn-EPDTC). Ovi rezultati su obećavajući, ali zasada nije postignut konsenzus o tome je li Zn pomaže u prevenciji i liječenju Covida-19.
- Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se egzaktno utvrdio mehanizam kojim Zn utječe na interakciju stanice i virusa, učinkovita koncentracija kao i formulacija za dostavu Zn.



A. Pormohammad et al, **Zinc and SARS-CoV-2: A molecular modeling study of Zn interactions with RNA-dependent RNA-polymerase and 3C-like proteinase enzymes.** *Int. J. Mol. Med.* 2021 Jan;47(1):326-334.

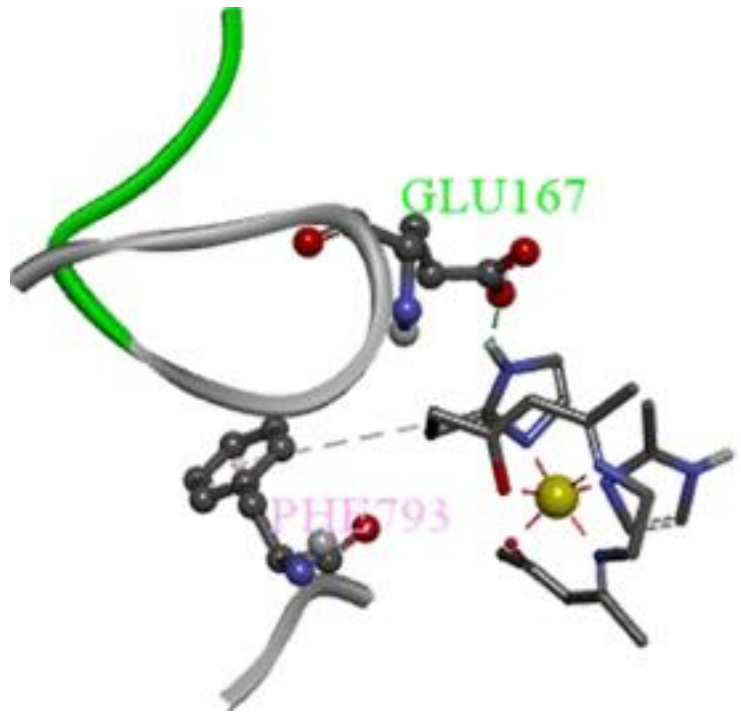
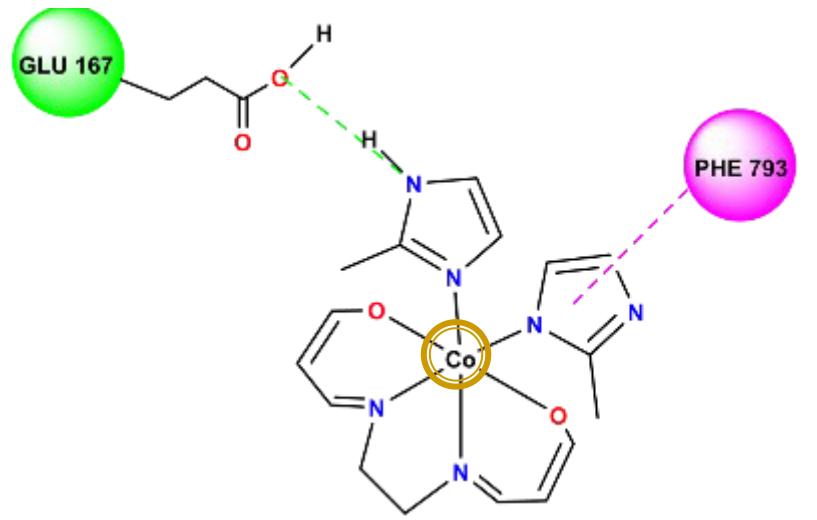
- Kompleksi prijelaznih metala, koji se odlikuju širokim rasponom oksidacijskih brojeva, koordinacijskih brojeva, geometrije, formalnih naboja, svojstvima Lewisovih kiselina, podešavajućim redoks-svojstvima te termodinamičkim i kinetičkim svojstvima, predstavljaju perspektivne alate za medicinsku primjenu.
- Kompleksi V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Pd, Pt, Ru, Au, itd. pokazuju obećavajuću aktivnost protiv virusa HIV, Ebole, gripe i SARS i to inhibicijom ulaska virusa u stanicu domaćina i replikacije virusne RNA. Co(III)-imidazolni kompleks **1** djelotvoran je protiv keratokonjunktivitisa. B-Co kompleksi **2** i **3** inhibiraju HIV-proteaze. Kurkumin-Cu kompleks **4** inhibira HSV virus. Ferokin i njegovi derivati **5** i **6** pokazuju dobru aktivnost protiv virusa hepatitisa C i SARS-CoV *in vitro*.





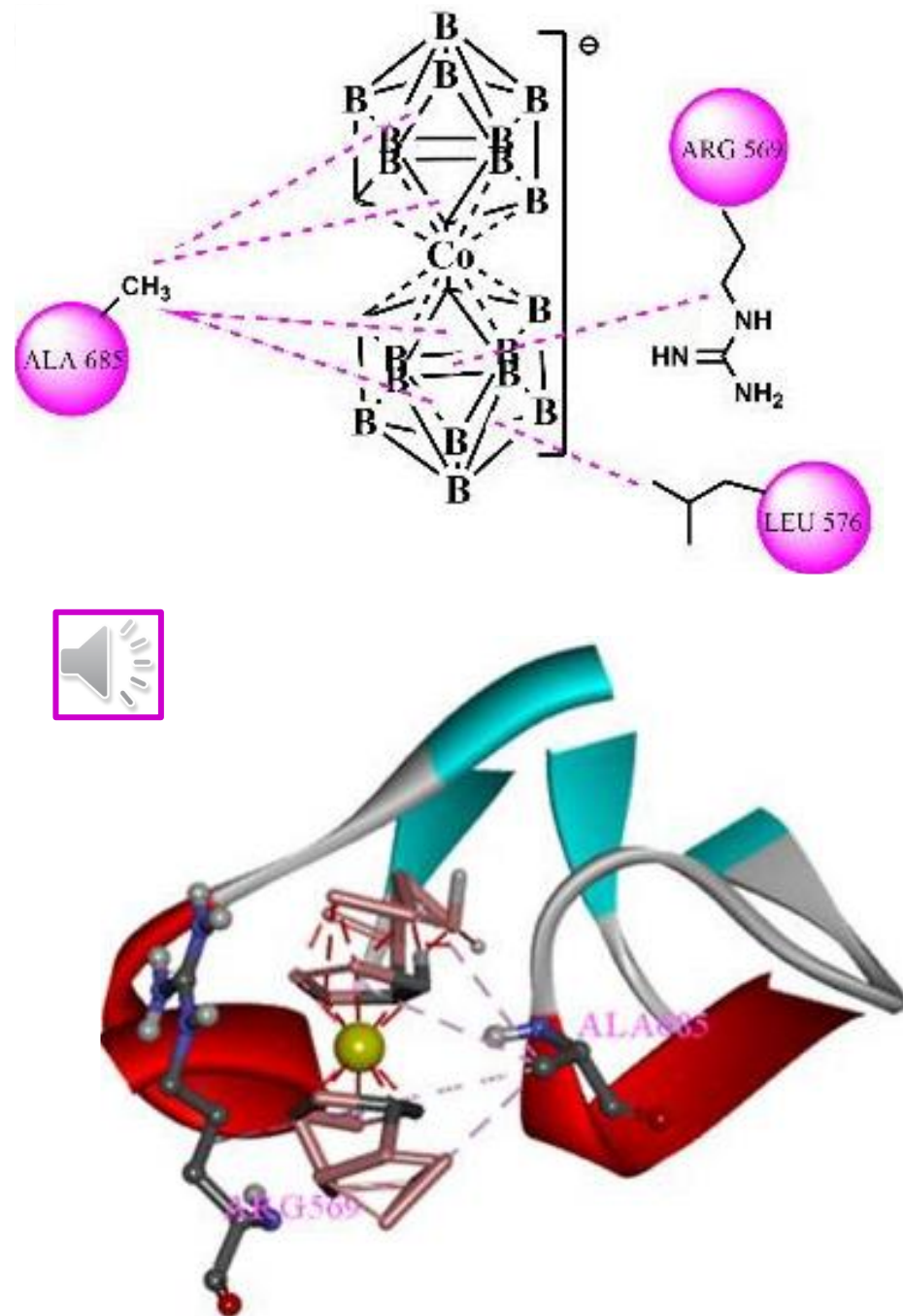
- Co-imidazolni spoj **1**, doksovir, je FDA-odobreni lijek koji inhibira humani adenovirus. Studijama molekuskog pristajanja sugerirana je tvorba kompleksa spoja **1** s SARS-CoV-2-RdRp i to putem vodikove veze  $H^{53}(1)\dots O$  (Glu<sup>167</sup> iz RdRp) kao i hidrofobnih interakcija između  $\pi$ -orbitala iz spoja **1** i aromatskog prstena iz Phe<sup>793</sup> iz RdRp. Slične nekovalentne interakcije i vezni parametri prethodno su određeni u studijama inhibicije adenovirusa u prisutnosti spoja **1** čime je indiciran njegov inhibitorni potencijal protiv SARS-CoV-2-RdRp.

**Figure 1.** (a) Schematic representation of potential non-covalent interactions between **1** and the RdRp of SARS-CoV-2 in the binding domain of RdRp. (b) The docked pose showing the interactions between complex **1** and the Glu 167, Phe 793 residue of RdRp complex.

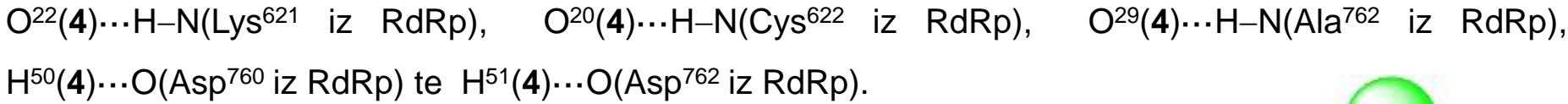


- Kompleks **2** je Co(III)-bazirani B–N klasteru koji inhibira HIV-proteazu. Studijama molekuskog pristajanja sugeriran je nešto umjereniji inhibitorni kapacitet kompleksa **2** protiv SARS-CoV-2-RdRp. Pri tom su detektirane hidrofobne alkil-alkil interakcije između alkilnih orbitala organometalnog kompleksa **2** i Arg<sup>569</sup>, Ala<sup>695</sup> i Ala<sup>685</sup> iz RdRp te sigma-interakcije između C–H iz kompleksa **2** i O-atoma iz Asp<sup>760</sup>. (Među svim testiranim organometalnim kompleksima **1-11**, jedino kompleks **2** ne uspostavlja vodikove veze s RdRp.)

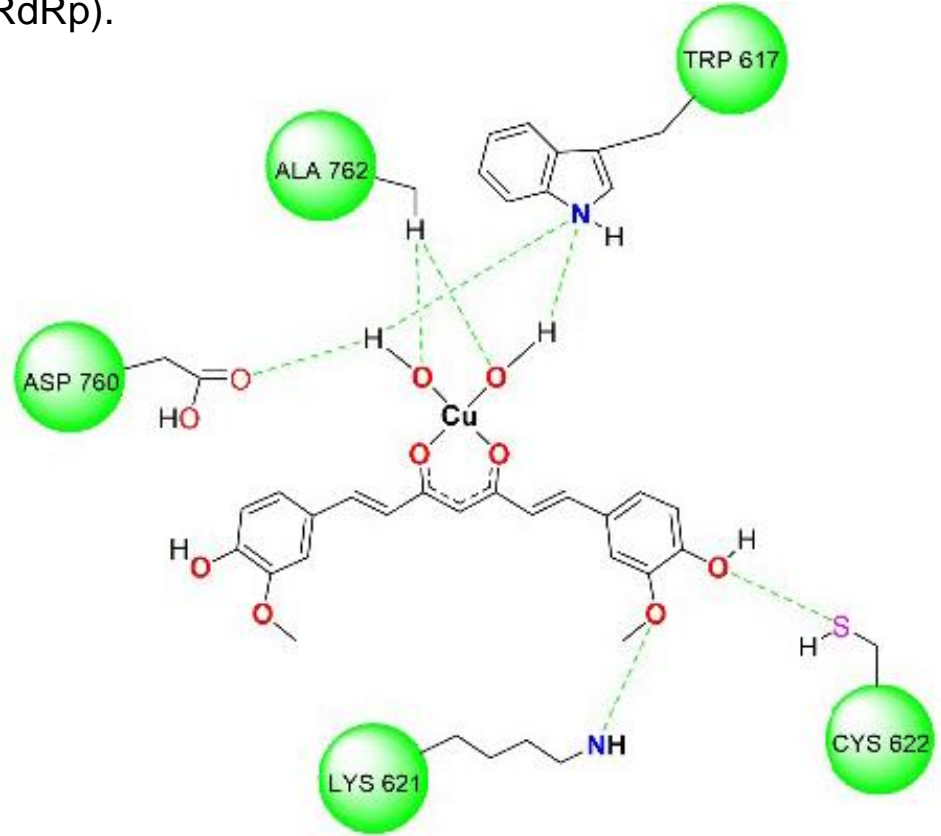
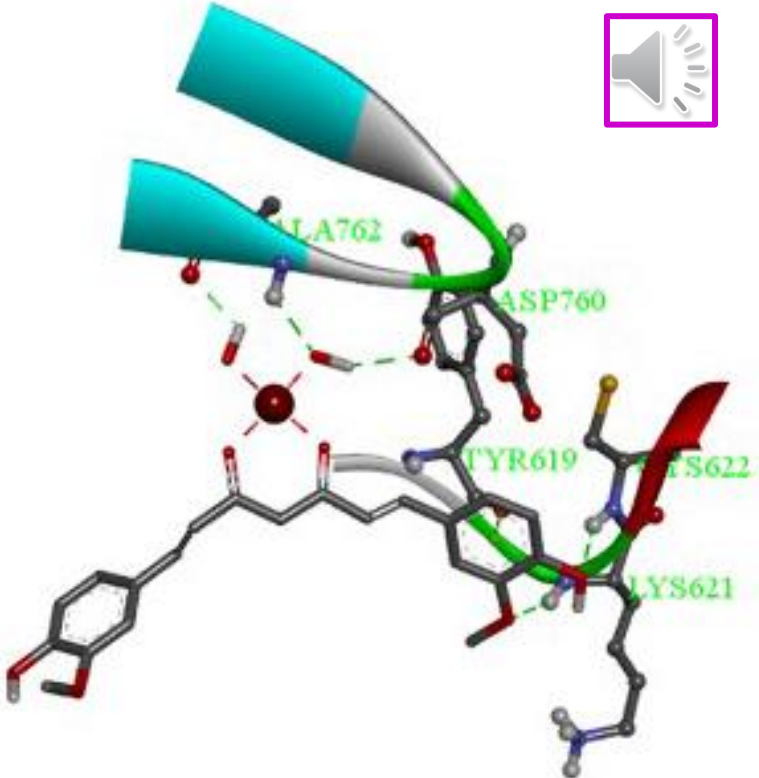
**Figure 2.** (a) Schematic diagram showing the probable non-covalent interactions between the complex **2** and RdRp of SARS-CoV-2 in the binding pocket of RdRp. (b) Dock pose exhibiting the interactions between the complex **2** and the Ala 685, Arg 569, Leu 576 residues of RdRp.



- Spoj 4, Cu(II)-kurkumin kompleks i inhibitor HSV-protein, uspostavlja pet vodikovih veza s SARS-CoV-2-RdRp:



- Iako te vodikove veze doprinose visokoj energiji vezanja spoja 4 za RdRp, njegov inhibični potencijal slabiji je u odnosu na inhibični kapacitet kompleksa 4 protiv HSV.



**Figure 4.** (a) Schematic diagram showing the probable non-covalent interactions between the complex 4 and RdRp of SARS-CoV-2 in the binding pocket of RdRp. (b) Dock pose exhibiting the interactions between the complex and the Asp760, Ala762, Trp617, Lys621, Cys622 residues of RdRp complex.

- Studije molekuskog pristajanja ferokinskog derivata **6**, poznatog inhibitora HSV-proteina, sa SARS-CoV-2-RdRp sugeriraju njegov najbolji inhibični potencijal u odnosu na komplekse **1-11**.

Tome doprinose vodikove veze:

O<sup>56</sup>(**6**)...H–N(Cys<sup>622</sup> iz RdRp),

O<sup>52</sup>(**6**)...H–N(Asp<sup>623</sup> iz RdRp),

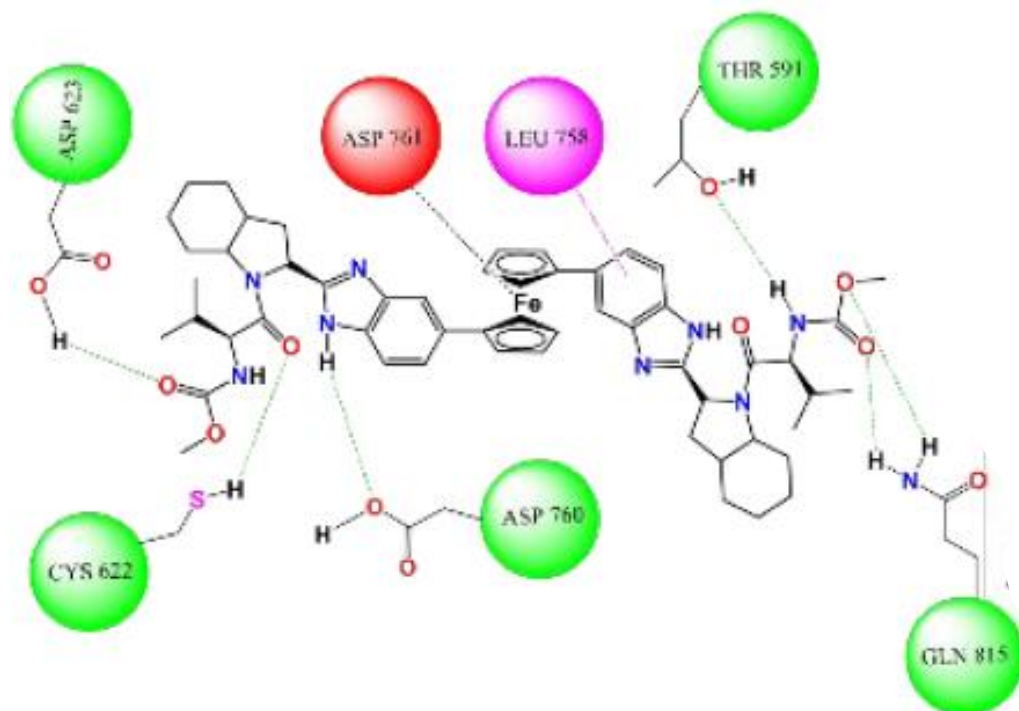
O<sup>30</sup>(**6**)...H–N(Gln<sup>815</sup> iz RdRp),

O<sup>28</sup>(**6**)...H–N(Gln<sup>815</sup> iz RdRp),

C<sup>102</sup>–H(**6**)...O(Asp<sup>760</sup> iz RdRp),

C<sup>75</sup>–H(**6**)...O(Thr<sup>591</sup> iz RdRp) te

C<sup>44</sup>–H(**6**)...O(Tyr<sup>619</sup> iz RdRp).



- Osim tih vodikovih veza, uspostavljaju se nekova-lentne interakcije između  $\pi$ -orbitala iz kompleksa **6** i S-atoma iz Cys<sup>813</sup> iz RdRp, te dolazi do koordiniranja između Fe-atoma iz kompleksa **6** i Asp<sup>761</sup> iz RdRp.

- Nadalje, kompleks **6** odlikuje se boljim inhibičnim potencijalom u odnosu na druge prenamijenjene lijekove (klorokin, galidesivir, remdesivir, tenofovir, sofosbuvir, ribavirin, itd. ).

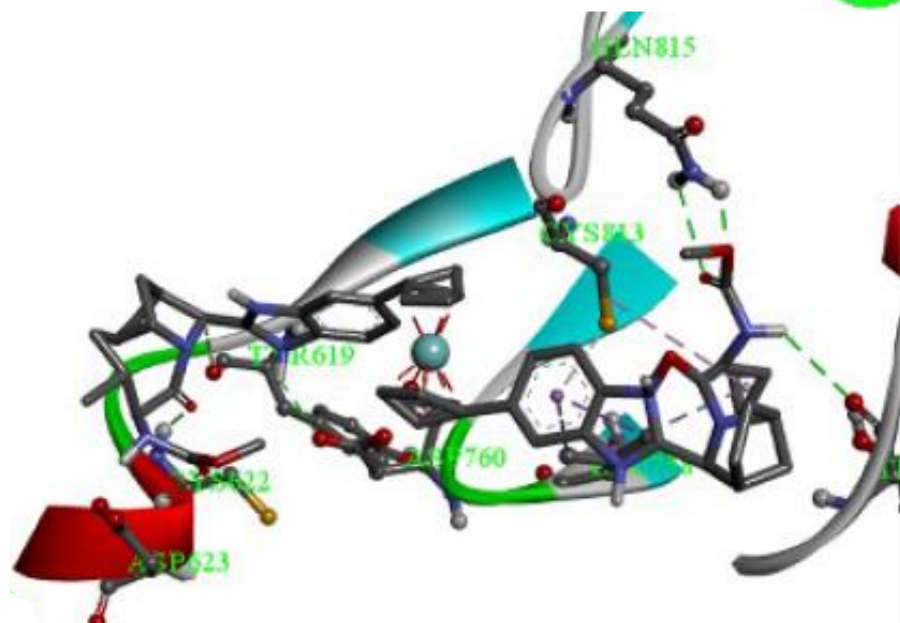




Table 1: The potential interactions between the complexes (1-11) and RdRp of SARS-CoV-2 determined from the docking calculations. View Article  
DOI: 10.1039/D0JA00000A

Complex	Binding Energy	Ligand efficiency	Inhibition constant ( $\mu\text{M}$ )	Inter-molecular energy	vdw Desolvation energy	HB Electrostatic energy	Total energy	internal	Torsional energy
1	-6.29	-0.22	24.47	-6.59	-6.34	-0.25	19		0.3
2	-4.79	-0.21	310.72	-8.96	-9.19	0.23	0		4.18
3	-4.4	-0.15	595.58	-10.66	-10.77	0.1	1.91		6.26
4	-7.06	-0.24	6.63	-10.05	-10.06	0.02	-3.23		2.98
5	-6.19	-0.21	28.88	-8.58	-7.06	-1.52	-1.05		2.39
6	-10.24	-0.16	0.03128	-13.82	-12.67	-1.15	-4.3		3.58
7	-5.45	-0.17	101.7	-6.94	-6.38	-0.56	-1.42		1.49
8	-6.65	-0.25	13.26	-7.55	-7.26	-0.29	-0.66		0.89
9	-8.95	-0.24	0.27655	-10.14	-10.13	-0.01	-0.76		1.19
10	-8.09	-0.32	1.18	-9.28	-9.16	-0.12	-0.58		1.19
11	-8.6	-0.34	0.49316	-9.2	-8.96	-0.24	0.2		0.6



- Na temelju studija molekuskog pristajanja sugerirano je da se među testiranim organometalnim kompleksima **1-11**, ferokinski kompleks **6**, Ni-kompleks **9** te Pt-kompleksi **10** i **11** odlikuju najvećim veznim afinitetom za RdRp iz SARS-CoV-2. Osim toga, njihov vezni afinitet za RdRp viši je u odnosu na vezne afinitete konvencionalnih prenamijenjenih lijekova klorokina, remdesivira i ribavirina (-4 do -7 Kcal/mol).
- Dobiveni rezultati od iznimnog su značaja jer opravdavaju daljnja istraživanja kompleksa prijelaznih metala kao mogućih terapeutika u borbi protiv Covid-19.