

Egy bisz(akridino)-koronaéter előállítása és alkalmazása a spermin bioszintézis oligoaminjainak felismerésére

KISFALUDI Péter^{a,*}, SPÁTAY Sára^{a,b}, KREKÓ Marcell^{b,c}, VEZSE Panna^a, TÓTH Tünde^{a,d},
HUSZTHY Péter^a, GOLCS Ádám^{a,b,c}

^a Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,
1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3

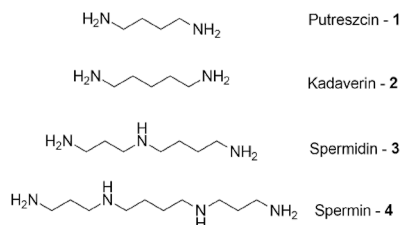
^b Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Semmelweis Egyetem, 1092 Budapest, Högyes Endre utca 9.

^c Farmakológiai és Gyógyszerkutatási Központ, Gyógyszerészi Kémia Tanszék, Semmelweis Egyetem,
1092 Budapest, Högyes Endre utca 9.

^d HUN-REN Energiatudományi Kutatóközpont, 1121 Budapest, Konkoly-Thege Miklós utca 29-33

1. Az alifás oligoaminok és biológiai szerepük

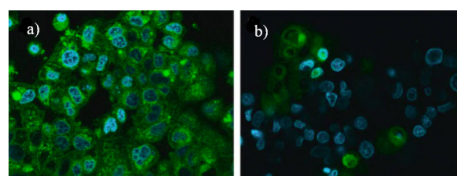
A biogén aminok megtalálhatók különféle élőlényekben, sejtekben, élelmiszerekben és italokban is. Az aminocsoportok száma szerint monoaminokra, oligoaminokra és poliaminokra csoportosíthatóak. Ezeket a vegyületeket jellemzően élő szervezetek szintetizálják, aminosavak enzimatis dekarboxilezésével¹⁻³. A biogén alifás oligoaminok, mint például a spermin (4), spermidin (3), putreszcin (1) és kadaverin (2) (1. Ábra) a legfontosabbak közé tartoznak, amelyek szinte minden élő szervezetben megtalálhatók. Az élő szervezetekben jellemzően protonált formában vannak jelen, és fontos szerepet játszanak különböző biológiai folyamatokban, mint a sejtnövekedés, génszabályozás, és sejtosztódás⁴⁻⁶.



1. Ábra. Példák biológiailag fontos alifás oligoaminokra (1–4)

A gerincesekben a spermidin (3) és a spermin (4) valamint prekursoruk, a putreszcin (1) található meg. A normál oligoaminszint hiánya jelentős hatással lehet a sejtműködésre, beleértve a differenciálódást, az apoptózist, a motilitást, valamint az oxidatív és egyéb stresszekkel szembeni ellenálló képességet^{7,8}. Ezen oligoaminok jelentőségét nemcsak a hiányuk okozta következmények, hanem számos diagnosztikai célú felhasználásuk is jól szemlélteti. Kimutatták, hogy a megemelkedett sperminszint rákos sejtek jelenlétére utalhat, így a spermin (4) biomarkerként is alkalmazható⁹. Ugyanakkor a normál szint alatti koncentrációk összekapcsolhatók többek közt az öregedés során előforduló betegségekkel is, mint például a Parkinson-kór¹⁰.

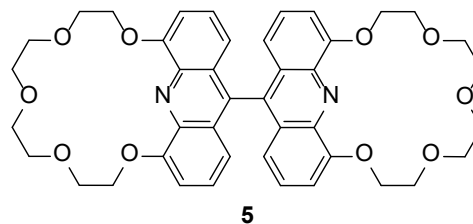
Mivel a legtöbb daganat fokozott oligoamin-transzportot mutat¹¹, az erre a rendszerre tervezett kémiai szenzorok alkalmazásak lehetnek a ráksejtek célzott kemoterápiás kezelésének elősegítésére, valamint diagnosztikai képalkotásra is¹² (2. Ábra).



2. Ábra. A kemoszenzorral detektált seprminfelvételt folytató sejtek (a) és az ugyanígy kezelt, de seprminfelvételükben akadályozott sejtek (b)

2. A tervezett gazdamolekula

Az általunk előállított új bisz(akridino)-koronaéter (5) (3. Ábra) érzékeny szenzormolekulaként funkcionál protonált alifás biogén oligoaminok kimutatására és képes szelektíven megkülönböztetni a rövid és hosszú láncú oligoaminokat.



3. Ábra. Az új bis(akridino)-koronaéter szerkezete

A gazdamolekula (5) két 18-korona-6-éter-típusú makrogyűrűt tartalmaz, amelyek mérete pontosan illeszkedik a protonált primer aminocsoportokhoz (rendre $r(18K6) = 1,4 \text{ Å}$ és $r(-NH_3^+) = 1,42 \text{ Å}$)^{13,14}. Ez lehetővé teszi a stabil koordinációt, hidrogénkötések révén az elektrofil ammóniumion és a gazdamolekula nukleofil heteroatomjainak magános elektronpárjai között¹⁵. A molekula kedvező fluoreszcens

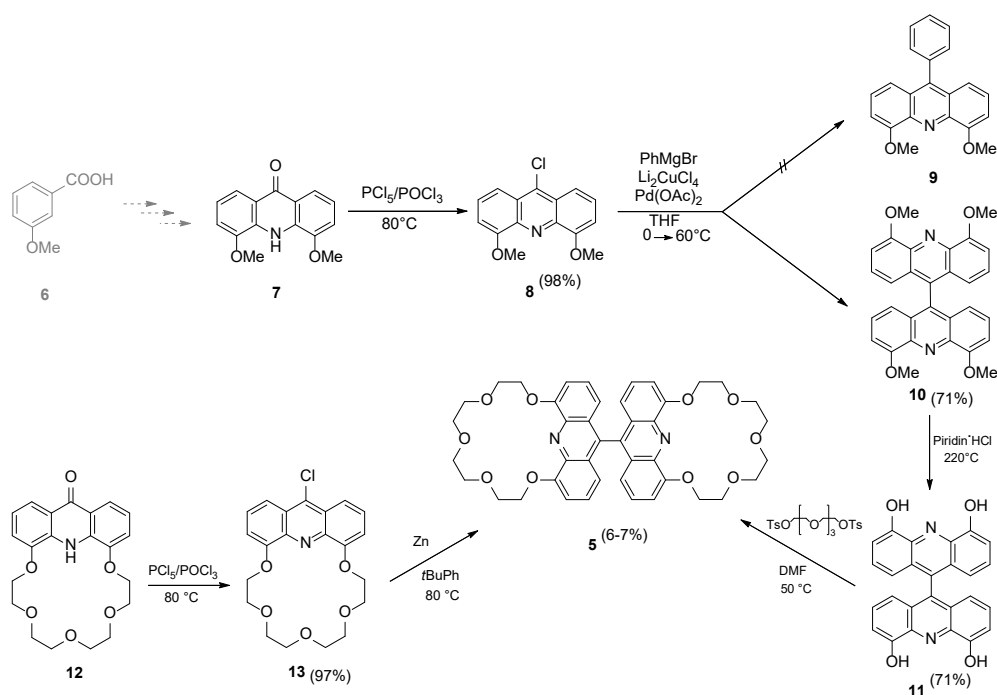
* Tel.: +36 30 970 8281, e-mail: kisfaludi.peti@edu.bme.hu

tulajdonságokkal rendelkezik az akridinegységeinek köszönhetően, és az elektronkonjugáció révén már egy makrociklus üreg betöltése is fluoreszcens intenzitásnövekedéssel járó optokémiai választ vált ki.

3. Az új gazdamolekula szintézise

Az új makrociklus (**5**) szintézisét a kereskedelmi forgalomban kapható, viszonylag olcsó 3-metoxibenzoesavból kiindulva végeztük, amelyet több lépésben 4,5-dimetoxi-akri-

donná (7) alakítottunk a szakirodalomban már korábban ismertetett módon¹⁶, kisebb változtatásokkal. A 4,5-dimetoxiakridont (7) foszfor-pentakloriddal és foszforil-kloriddal a megfelelő klórakridin-származékká (8) alakítottuk egy korábban leírt módszer alapján¹⁷, azonban javított feldolgozással. A klórakridin-származékot (8) ezt követően *Kharasch*-típusú keresztkapcsolási reakciónak vetettük alá, dilítium-tetrakloro-kuprát és palládium-acetát katalizátorok jelenlétében, fenil-magnézium-bromiddal. A várt főtermék a 9-fenil-származék (9) volt (4. Ábra).



4. Ábra. Az új gazdamolekula (5) szintézise két különböző úton

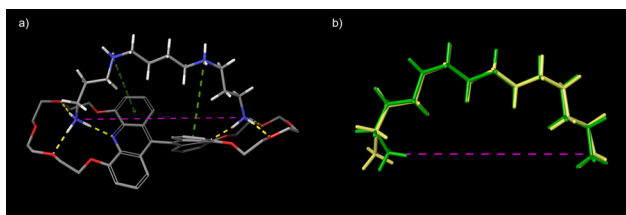
Azt tapasztaltuk, hogy a várt termék helyett, 4,4',5,5'-tetrametoxi-9,9'-biakridin képződik (**10**). A tetrametoxi-biakridin (**10**) metilcsoportjait piridínium-kloriddal eltávolítva a tetrahydroxi-biakridint (**11**) kaptuk. A tetrahydroxi-szár-mazékot (**11**) tetraetilén-glikol-ditoziláttal makrociklizáci-ós reakcióba vittük dimetilformamidban, kálium-karbonát bázis jelenlétében, aminek eredményeként a biszmakrocik-lus (**5**) képződött. Az izolálás utáni hozam alacsony volt (6%), ami gyakori az ilyen típusú reakciónál, különösen ebben az esetben, ugyanis a makrociklus gyűrűi többféle-képpen záródhatnak.

A második szintézisútnál kiindulási anyagként egy korábban már előállított akridono-koronaétert (**12**) használtuk¹⁸. Az akridino-koronaétert (**12**) foszfor-pentakloriddal foszforil-kloridban reagáltattuk, melynek eredményeként a klórakridino-koronéter (**13**) képződött. A klórakridino-koronétert (**13**) cinkporral, *tert*-butilbenzolban végzett kapcsolási reakcióval alakítottuk a biszmakrociklussá (**5**), 7%-os termeléssel.

4. A komplexképzés vizsgálata

A gazdamolekula és a vizsgált oligoaminok közötti kölcsönhatások megértése érdekében molekulamodellézést alkalmaztunk. Az **5** molekula spermin analógokkal alkotott komplexekének optimális konformációját sűrűség-funkcionál-elméleti (DFT) számításokkal határoztuk meg.

A bisz(koronaéter) (**5**) molekula sperminnel (**4**) alkotott komplexének optimalizált szerkezete (**5. Ábra, a**) négypon-
tos kölcsönhatást feltételez. A koronaéter gyűrűi a spermin
(**4**) protonált primer aminocsoportjaival lépnek kölcsönha-
tásba, hidrogénkötéseket kialakítva a heteroatomokkal. A
protonált szekunder aminok az akridinegységek közelében
helyezkednek el, és mindkét rész kation- π kölcsönhatáso-
kat alakít ki az akridingyűrűkkel. A modell alapján a sper-
min (**4**) láncossza ideális a komplexképzéshez (**5. Ábra
b**)), mivel az **5** molekula megőrzi nyújtott konformációját,
ahol mindkét koronaéter-gyűrű az akridinegységek aromás
síkjaiban fekszik.



5. Ábra. A spermin terminális protonált primer aminocsoportjai közötti távolság az **5** bisz(koronaéterrel) alkotott komplexben, amelyet lila szaggatott vonal jelöl: a) a spermin **5** gazdamolekulához (sárga) kötött konformációja és a spermin lokális energiaminimumához tartozó konformere, amely a Schrödinger „MacroModel Minimization” funkciójával készült (zöld): b).

A rövidebb láncú oligoaminoknál 1:1 kezdeti sztöchiometria esetén gyors részleges dekomplexálódás játszódik le nanoszekundumos időskálán, a dinamikus szimulációk szerint. Ennek eredményeként felszabadul az egyik kötőhely,

aminek köszönhetően lehetőség nyílik egy 1:2 (gazda-vendég) arányú komplex képződésére, konszekutív komplexképzési folyamat során.

Az **5** gazdamolekula és a protonált oligoaminok közötti molekuláris felismerést fluoreszcens spektrofotometriás titrálásokkal is vizsgáltuk kereskedelmi forgalomban kapható mono- és oligoamin származékokon. Az aminok felismerése során a gazdamolekula szerkezeti preferenciájának és komplex-sztöchiometriájának meghatározása és a stabilitási állandók kiszámítása érdekében globális nemlineáris regressziót alkalmaztunk a titrálási adatsorokon. Az elemzések alapján kapott komplex-sztöchiometria és a stabilitási állandók számításának eredményeit az **1. Táblázatban** foglaltuk össze. Minden esetben 1:1 arányú, majd egy következő lépésben 1:2 arányú (gazda-vendég) komplexek képződése volt megfigyelhető.

1. Táblázat. A számított komplexstabilitási állandók és a kötődésbeli kooperativitás a konszekutív amin-koordinációhoz tartozó 1:1 és 1:2 (gazda-vendég)-komplexek kialakulása során

Amin vendégmolekula	$\log K_1$	$\log K_2$	Kooperativitási effektus a komplexképzés során
butil-amin	$2,1 \pm 0,2$	$<<2,0$	nem-kooperatív
putreszcin (1)	$2,6 \pm 0,2$	$<<2,0$	nem-kooperatív
<i>N,N'</i> -bisz(2-aminoetil)-1,3-propándiamin	$3,7 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,2$	nem-kooperatív
norspermidin	$5,1 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$	nem-kooperatív
spermin (4)	$5,3 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	negatív kooperativitás ($\alpha = 0,6$)
spermidin (3)	$5,5 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,1$	nem-kooperatív

5. Az eredmények összefoglalása

A DFT-alapú modellezés jól megjósolta a kísérletileg meghatározott komplexstabilitásokat. A gazdamolekula preferenciasorrendje a molekuláris felismerés során a következő volt: spermin (**4**)~spermidin (**3**) > norspermidin > *N,N'*-bisz(2-aminoetil)-1,3-propándiamin > putreszcin (**1**) > butil-amin. A spermin (**4**) és a spermidin (**3**) komplexek közötti stabilitásbeli különbség nem bizonyult jelentősnek.

Összességében a spermin (**4**) koordinációja tekinthető a legkedvezőbbnek, mivel ebben az esetben a legkisebb a gazdamolekula szerkezeti torzulása a kezdeti konformációhoz képest. Ráadásul itt alakul ki a legtöbb független vonzó kölcsönhatás, valamint az összetett kötési modellben negatív kooperativitás is fellép. A gyakorlatban a komp-

lexstabilitási állandók közötti legalább egy nagyságrendbeli különbségre van szükség ahhoz, hogy az elválasztás vagy érzékelés során hatékony molekuláris megkülönböztetést lehessen elérni. Ennek megfelelően a tri- és tetraamin-típusú spermin analogonok szelektíven felismerhetők a di- és monoszármazékok jelenlétében. Az általunk bemutatott gazdamolekula ígéretes az oligoamin-központú folyamatok vizsgálatához és számos alkalmazás kidolgozásához járulhat hozzá a későbbiekben.

Köszönetnyilvánítás

A kutatást az EKÖP-24-4-II-BME-63 Egyetemi Kutatói Ösztöndíjprogram, valamint a Varga József Alapítvány támogatta.

Hivatkozások

1. M.H.S.Santos: *Int. J. Food Microbiol.*, **1996** (29), 213–231. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)
2. S. Givanoudi, M. Heyndrickx, T. Depuydt, M. Khorshid, J. Robbins, P.A. Wagner: *Sensors*, **2023** (23), 613. <https://doi.org/10.3390/s23020613>
3. J. Davidek: *Natural Toxic Compounds of Foods*, CRC Press: Boca Raton, FL, USA **2018**
4. F. Schuber: *Biochem. J.*, **1989** (260), 1–10. <https://doi.org/10.1042/bj2600001>
5. E. Agostinelli, G. Arancia, L.D. Vedova, F. Belli, M. Marra, M. Salvi, A. Toninello: *Amino Acids*, **2004** (27), 347–358. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0114-4>
6. W. Ma, K. Chen, Y. Li, N. Hao, X. Wang, P. Ouyang: *Engineering*, **2017** (3), 308–317. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.012>
7. A.E. Pegg: *IUBMB Life*, **2014** (66), 8–18. <https://doi.org/10.1002/iub.1237>
8. A.E. Pegg: *J. Biol. Chem.*, **2016** (291), 14904–14912. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.731661>
9. Q. Peng, C.Y.-P. Wong, I.W. Cheuk, J.Y.-C. Teoh, P.K.-F. Chiu, C.-F. Ng: *Int. J. Mol. Sci.*, **2021** (22), 4382. <https://doi.org/10.3390/ijms22094382>
10. S. Saiki, Y. Sasazawa, M. Fujimaki, K. Kamagata, N. Kaga, H. Taka, Y. Li, S. Souma, T. Hatano, Y. Imamichi: *Ann. Neurol.*, **2019** (86), 251–263. <https://doi.org/10.1002/ana.25516>
11. W. Han, H. Li, B. Chen: *Pharmaceutics*, **2022** (14), 1500. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071500>
12. W. Marku, B.W. Ulrike, P. Rüdiger, E. Helmut, E. Michael: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006** (16), 3193. [20] H.J. Issaq: *Electrophoresis*, **1999** (20), 3190–3202. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19991001\)20:15/16<3190::AID-ELPS3190>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19991001)20:15/16<3190::AID-ELPS3190>3.0.CO;2-K)
13. H.J. Buschmann, L. Mutihac, R. Mutihac: *Sep. Sci. Technol.*, **1999** (34), 331–341. <https://doi.org/10.1081/SS-100100653>
14. H.J. Buschmann, E. Schollmeyer, L. Mutihac: *Supramol. Sci.*, **1998** (5), 139–142. [https://doi.org/10.1016/S0968-5677\(98\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S0968-5677(98)80005-9)
15. P. Vezse, B. Benda, A. Fekete, Á. Golcs, T. Tóth, P. Huszthy, *Molecules*, **2022** (27), 2838. <https://doi.org/10.3390/molecules27092838>
16. P. Huszthy, B. Vermes, N. Báthori, M. Czugler: *Tetrahedron*, **2001** (57), 4967–4975. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00408-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00408-2)
17. Á. Golcs, B.Á. Ádám, P. Vezse, P. Huszthy, T. Tóth: *Eur. J. Org. Chem.*, **2021** (2021), 2485–2497. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202100291>
18. T. Németh, T. Tóth, G.T. Balogh, P. Huszthy: *Period. Polytech. Chem. Eng.*, **2017** (61), 249–257. <https://doi.org/10.3311/PPch.11277>

A Bis(Acridino)-Crown Ether for Recognizing Oligoamines in Spermine Biosynthesis

Biogenic aliphatic oligoamines such as putrescine, cadaverine, spermidine, and spermine are naturally occurring compounds synthesized by enzymatic decarboxylation of amino acids. These molecules play vital roles in biological systems, including cell proliferation, gene expression, and nucleic acid stabilization. Abnormal levels of these oligoamines are associated with various diseases; for example, elevated spermine levels can be linked to the presence of cancer cells, while decreased levels are observed in aging-related illnesses like *Parkinson's* disease.

A new bis(acridino)-crown ether was designed to selectively detect protonated oligoamines based on their chain length. The receptor contains two 18-crown-6-type macrocycles and two acridine units that provide strong fluorescence signaling upon guest binding. The design enables it to distinguish between short- and long-chain oligoamines through fluorescence intensity shifts. Two synthetic strategies were developed to produce the host molecule,

both starting from commercially available compounds and resulting in low but usable yields. Structural and functional characterization was performed using DFT-based molecular modelling and fluorescence titrations. These studies confirmed selective binding of oligoamines, with spermine and spermidine forming the most stable complexes.

Both the modelling and the titration experiments revealed sequential 1:1 and 1:2 host–guest complex formation. Binding constants and cooperativity effects were calculated using global non-linear regression of the titration data. Spermine showed strong binding and negative cooperativity which made it the preferred analogue for coordination, while spermidine exhibited the highest overall stability in binding but no cooperativity effect. The receptor's molecular recognition behaviour suggests potential for use in bioimaging, diagnostics, or targeted drug delivery applications—particularly in cancer research.