

A töltésállapot hatása ciklodextrinek és bioaktív vendégmolekulák intermolekuláris kölcsönhatásaira

Doktori tézisek

Várnai Bianka

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Gyógyszertudományok és Egészségügyi Technológiák
Tagozat



Témavezető: Dr. Szabolcs Béni, Ph.D.,
egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Mirzahosseini Arash, Ph.D.,
egyetemi adjunktus

Dr. Fülöp Zoltán, Ph.D., szenior kutató vegyész

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Antal István, Ph.D., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Mazákné Dr. Kraszni Márta, Ph.D.,
egyetemi docens

Dr. Fenyvesi Éva, Ph.D., laborvezető

Budapest
2024

1. Bevezetés

A ciklodextrinek (CD) széles körben alkalmazott segédanyagok, melyeket a gyógyszeriparban is nagy számban felhasználnak. A különböző CD-ek sajátos szerkezetüknek köszönhetően nem kovalens, másodlagos kötések (H-kötés, hidrofób, van der Waals erők) által képesek zárványkomplexeket képezni megfelelő tulajdonságokkal rendelkező molekulákkal. A komplexképződés során nem csak a hatóanyag oldhatóságának növelése, hanem biológiai hasznosíthatóságának fokozása és a molekulák stabilizálása is lehetséges.

A CD-t felépítő glükopiranoz egységek első- és másodrendű alkoholos funkciójának szubsztitúciója számos lehetőséget kínál különböző felszintetikus CD-származékok előállítására. A származékok a szubsztituensek száma (mono- vagy polifunkciós), a szubsztituensek helyzete (perszubsztituált vagy random szubsztituált) és az

ionizálhatóság (semleges, töltéssel nem rendelkező vagy ionizálható, pozitív vagy negatív töltésű származékok) alapján osztályozhatók.

A gazda- és vendégmolekula között kialakuló kölcsönhatásokat és azok erősségét a molekulák sav-bázis tulajdonsága és ionizáltsági állapota is alapvetően befolyásolni képes. Ezáltal a kialakuló szupramolekuláris rendszerek stabilitása is változik. A mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia kulcsfontosságú szerepet játszik a CD-komplexek tanulmányozásában, atomi szintű betekintést nyújtva a gazda- és vendégmolekulák közötti kölcsönhatásokba. Az ^1H NMR mérések, elsősorban a kémiai eltolás változásának követésével, lehetővé teszik a komplexstabilitási állandók meghatározását, míg a NOE-típusú mérések részletes szerkezeti információt biztosítanak.

2. Célkitűzés

Munkánk során három bioaktív molekula – a COVID-19 terápiában alkalmazott antivirális remdezivir (REM), az μ -opioid receptorokon ható növényi alkaloid mitraginin (MTR) és az antikoaguláns, szintetikus pentaszacharid fondaparinux (FDPX) – különböző ciklodextrin-származékokkal képzett komplexeit vizsgáltuk, NMR spektroszkópiai segítségével. Célunk volt, hogy minél pontosabban jellemezni tudjuk a kialakuló komplexekben fellépő molekuláris kölcsönhatásokat, meghatározzuk a komplexek sztöchiometriáját, stabilitási állandóikat és jellemezzük a szerkezetüket.

Célul tűztük ki a REM töltésfüggő komplexképződésének részletes jellemzését β - illetve γ CD-származékok felhasználásával, amelyhez a REM pontos pK_a értékének meghatározását is el kellett végeznünk.

Továbbá vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a CD üreghézagának, valamint töltöttségi állapotának változása a MTR komplexképzését.

A FDPX savas közegű degradációja során tanulmányoztuk a per6-NH₂-βCD stabilizáló hatását, valamint célunk volt a kialakuló bomlástermék szerkezetének meghatározása 2D NMR mérések segítségével.

3. Módszerek

Az NMR méréseket egy 600 MHz-es Varian DDR NMR spektrométeren (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 5 mm IDPFG mérőfejjel végeztük el. Az adatgyűjtés VnmrJ 3.2C szoftverrel történt, a ChemPack 5.1-ben szereplő standard pulzusprogramok használatával. A spektrumok kiértékelését MestReNova 12.0.2. szoftver segítségével végeztük.

Munkánk során a kialakuló szupramolekuláris rendszerek sztöchiometriáját

Job-módszere szerint, ^1H NMR titrálással határoztuk meg. Ehhez a gazda- és vendégmolekulák összkoncentrációját állandó értéken tartottuk, miközben minden lépésben változtattuk a molarányukat. A titrálás során leolvastuk néhány, jól követhető jel ^1H kémiai eltolódását ($\delta^{\text{mért}}$) és a szabad komponens kémiai eltolódásához (δ^i) képest mutatott elmozdulásából $\Delta\delta^{\text{mért}} = |\delta^{\text{mért}} - \delta^i|$ módon számítottuk ki a kémiai eltolódásváltozás abszolútértékét. Utóbbi mennyiségeket az anyag móltörtjével szorozva ($\Delta\delta^{\text{mért}} \cdot x$) és a móltört (x) függvényében ábrázolva szerkeszthetők meg a Job görbék, melyek szélsőértéke kijelöli a komplexre jellemző sztöchiometriát.

A komplexstabilitási állandók pontos meghatározására külön titrálásokat végeztünk. A kiértékelés során minden titrálási pontban regisztráltuk a vendégmolekula szénkötésű protonjainak $\delta^{\text{mért}}$ kémiai eltolódását. Ezeket a két

komponens összkoncentrációjával együtt bemeneti adatként adtuk az OPIUM kiértékelő programnak, a feltételezett egyensúlyi modellel együtt, szimultán több NMR mag adatsorára. Eredményül megkaptuk a részecskespecifikus határeltolódási értékeket, valamint a látszólagos stabilitási állandó logaritmusát, hibabecslésekkel együtt.

A komplexek térbeli szerkezetének meghatározása és a kölcsönhatásban résztvevő molekularészek azonosítása érdekében nukleáris Overhauser-effektus (NOE) típusú méréseket (2D NOESY, 2D ROESY) végeztünk különböző molarányú mintákon.

A REM pK_a értékét UV-pH titrálással határoztuk meg. Az UV-Vis spektrumokat 220-400 nm tartományban regisztráltuk Unicam UV2 UV/Vis spektrofotométerrel. A nemlineáris regressziót OPIUM programmal végeztük.

4. Eredmények

Mivel az irodalomban kizárólag prediktált pK_a értékek álltak rendelkezésünkre a REM esetében, munkánkat a molekula UV-pH titrálásával kezdtük. Elsőként határoztuk megkísérletes módon a REM pontos pK_a értékét (3,56), mely alapján az általunk végzett kísérletekben (pH 2,0) a REM molekulák minimum 97%-a protonált állapotban van jelen. A REM komplexképzése során hat különböző szupramolekuláris rendszert vizsgáltunk (a felhasznált CD-ek: β CD, γ CD, SBE β CD, SBE γ CD, per-6-SBE β CD, sugammadex), és mindegyik rendszerben Job módszere alapján 1:1 komplex-sztöchiometriát határoztunk meg. A titrálási görbéket is ennek megfelelően illesztettük, és a látszólagos stabilitási állandókat (1. Táblázat) összevetve megállapítottuk, hogy a natív CD-ek esetén tízszeres stabilitáscsökkenés tapasztalható a nagyobb üregméretű γ CD alkalmazása esetén.

1. Táblázat A vizsgált CD-REM komplexek stabilitási állandói pH 2,0 közegben.

	β CD	γ CD	SBE β CD (DS ~ 6,5)	per-6-SBE β CD (DS = 7,0)	sugammadex (DS = 8,0)	SBE γ CD (DS ~ 5,7)
logK	3,06	2.08	3,99	4,35	3,65	2,70
	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,04$	$\pm 0,01$

Az anionos szulfobutiléter-oldalláncok bevezetése minden CD-származék esetén jelentős stabilitásnövekedést eredményezett (γ CD esetében több mint ötszörös-, míg a β CD esetében tízszeres növekedést tapasztaltunk). Továbbá az is megállapítható, hogy a komplexstabilitás növekedését nagymértékben befolyásolja a CD-ek primer nyílásán található anionos oldalláncok száma. A per-6-SBE β CD (primer nyílásán 7 anionos szulfobutiléter-lánccal szubsztituált) esetén további kétszeres stabilitásnövekedés figyelhető meg a random szubsztituált SBE β CD-hez képest. A komplexek szerkezetmeghatározását 2D ROESY spektrumok alapján végeztük. A β CD-származékok esetén a

REM etilbutil-oldallánca a primer nyílás irányából merül az üregbe, míg a γ CD-szármezekoknál az alifás oldallánc mellett immerzióra utaló keresztcsúcsokat azonosítottunk a REM fenilcsoportja és a CD hidrofób ürege között.

Mitraginin esetén a natív β CD-nel történő komplexképzés során 1:1 sztöchiometriát és csupán $\log K = 0.8$ stabilitási állandót határoztunk meg, amely kifejezetten gyenge interakcióra utal. A random szubsztituált SBE β CD-nel történő titrálás során a titrálási görbék megfelelő illesztését csak egy összetettebb szupramolekuláris rendszer feltételezésével sikerült pontosan leírunk. A MTR-SBE β CD és 2MTR-SBE β CD részecskék együttes jelenlétének feltételezésével illesztve a titrálási görbéket, kiemelkedően nagy növekedést figyeltünk meg a komplexek stabilitásában ($\log \beta_{21} = 6,87$ and $\log \beta_{11} = 3,68$). Ennek oka, hogy az általunk vizsgált pH 4,5-ös értéknél a MTR molekulák teljesen protonált állapotban vannak jelen, így erős

elektrosztatikus kölcsönhatások alakulhatnak ki a CD anionos csoportjaival. A β CD szulfobutiléter-oldalláncokkal történő szubsztitúciója tehát 750-szeres stabilitásnövekedést eredményez a MTR-nel történő komplexképzés során.

A FDPX vizsgálata során közepes affinitású ($\log\beta_{11}= 3,65$) rendszert határoztunk meg az FDPX-per-6-NH₂ β CD komplex esetén fiziológiás pH értéken (pD 7,4). Savas, pD 2,0 körülmények között a molekulák azonban eltérő protonáltsági állapotban vannak így egy termodinamikailag nagyobb stabilitású, nagyaffinitású rendszer alakulhat ki, melyben egyszerre van jelen FDPX-per-6-NH₂ β CD ($\log\beta_{11} \geq 4,9$) és FDPX-2per-6-NH₂ β CD ($\log\beta_{12} \geq 8$) komplex is. A 2 CD 1 vendégmolekula sztöchiometriájú komplexek kialakulása meglehetősen egyedülálló, csakúgy, mint a két oligoszacharid által képzett nagyaffinitású rendszer jelenléte vizes körülmények között. A kialakuló komplexek esetén csupán külsőszerűs

komplekképzésről beszélhetünk, azonban 2D NOESY és ROESY méréseink alapján nem sikerült pontos szerkezetet meghatározni. A FDPX savas közegű bomlástermékének szerkezetmeghatározása során megállapítottuk, hogy a bomlás elsősorban a pentaszacharid deszulfatációját jelenti. A 2D NMR mérések és a ^1H NMR spektrumokban megfigyelt jeletolódásváltozások alapján a fő bomlástermék a triszulfatált (GlcNS3S6S) alegység *N*-deszulfatációjának eredménye. Bizonyítottuk továbbá, a heptakationos per-6-NH 2β CD erős elektrosztatikus kölcsönhatások révén hatékonyan akadályozza meg a FDPX szulfátvesztését savas közegben.

5. Következtetések

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy mind a gazda-, mind pedig a vendégmolekulák töltésállapota nagymértékben befolyásolni képes a ciklodextrinek és különböző gyógyszerek, illetve

bioaktív természetes vegyületek közötti komplexképződést. Ez a hatás túlmutat a komplexek stabilizálásának kizárólagos szerepén; jelentős hatással van a komplexek sztöchiometriájára és általános szerkezetükre is. Eredményeink segítséget nyújthatnak ezen hatóanyagok formulációs lépéseinél, illetve analitikai szempontból is jelentősek. Kibővítik a CD-ek felhasználási lehetőségeinek területét, ígéretes és innovatív megoldást nyújtva a hatóanyag-stabilizálás és tisztítás vonatkozásában egyaránt.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció kapcsolódó közlemények:

Várnai B., Grabarics M, Szakács Z, Pagel K, Malanga M, Sohajda T, Béni S. Structural characterization of fondaparinux interaction with per-6-amino-beta-cyclodextrin: An NMR and MS study. J Pharm Biomed Anal. 2021;197.

Várnai B., Malanga M, Sohajda T, Béni S. Molecular interactions in remdesivir-cyclodextrin systems. J Pharm Biomed Anal 2022;209:114482;

Várnai B., Zsila F, Szakács Z, Garádi Z, Malanga M, Béni S. Sulfobutylation of Beta-Cyclodextrin Enhances the Complex Formation with Mitragynine: An NMR and Chiroptical Study. Int J Mol Sci. 2022;23(7).

Egyéb közlemények:

Varga E, Benkovics G, Darcsi A, **Várnai B.**, Sohajda T, Malanga M, Béni S. Comparative analysis of the full set of methylated β -cyclodextrins

as chiral selectors in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2019;40(21):2789–98.

Szente L, Puskás I, Sohajda T, Varga E, Vass P, Nagy ZK, Farkas A, **Várnai B**, Béni S, Hazai E. Sulfobutylether-beta-cyclodextrin-enabled antiviral remdesivir: Characterization of electrospun- and lyophilized formulations. *Carbohydr Polym*. 2021 Jul 15;264:118011.

Fejős I, Tóth G, **Várnai B**, Szabó ZI, Köteles I, Malanga M, Béni S. Enantioseparation of solriamfetol and its major impurity phenylalaninol by capillary electrophoresis using sulfated gamma cyclodextrin. *Electrophoresis* 2021;42(17–18):1818–25.

Valiyeva A, Felegyi-Tóth CA, **Várnai B**, Garaev E, Béni S, Kursinszki L. Characterization of alkaloid profile of *Hyoscyamus reticulatus* L. and *Atropa belladonna* subsp. *caucasica* (Kreyer) Avet by LC-MS and NMR. *Nat Prod Res*. 2023; 37(19):3357–62.