

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Makrociklusos vegyületek biokompatibilitása és szintézise

Róka Eszter

Témavezetők:

Dr. Bácskay Ildikó

Dr. Florent Perret



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2017

Makrociklusos vegyületek biokompatibilitása és szintézise

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Róka Eszter okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Bácskay Ildikó, PhD

Dr. Florent Perret, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

tagok: Dr. Corinne Fruit, PhD

Dr. Regdon Géza, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára,
2017. február 21. 11 óra.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Zelkó Romána, az MTA doktora

Prof. Dr. Marc Le Borgne, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

tagok: Dr. Corinne Fruit, PhD

Prof. Dr. Zelkó Romána, az MTA doktora

Prof. Dr. Marc Le Borgne, PhD

Dr. Regdon Géza, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme,
2017. február 21. 13 óra.

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések	3
2	Bevezetés és célkitűzések	4
3	Anyagok és módszerek	6
3.1	Anyagok	6
3.2	Caco-2 sejtvonala	6
3.3	Hemolízis teszt	6
3.4	MTT teszt	7
3.5	Real-Time Cell Electronic Sensing	7
3.6	Statisztikai analízis	7
3.7	Transzport kísérlet	8
3.8	α -ciklodextrin származékok szintézise	8
3.9	Közreműködések	8
4	Az értekezés új tudományos eredményei	10
4.1	α - ciklodextrinek	10
4.2	Kalixarének	15
4.3	Eredményeink újdonsága és gyakorlati alkalmazhatósága	16
5	Összefoglalás	17
6	Köszönetnyilvánítás	18
7	Publikációk jegyzéke	20

1 Rövidítések

ACD	α -ciklodextrin
BCS	biofarmáciai osztályozási rendszer
C4S	<i>para</i> -szulfonáto-kalix[4]arén
C6S	<i>para</i> -szulfonáto-kalix[6]arén
C8S	<i>para</i> -szulfonáto-kalix[8]arén
CD	ciklodextrin
CMBCD	karboximetil β -ciklodextrin
CnS	<i>para</i> -szulfonáto-kalix[n]arén
DIMEA	hexakis (2,3-di-O-metil)- α -ciklodextrin
DIMEB	heptakis (2,3-di-O-metil)- β -ciklodextrin
DS	szubsztitúciós fok
HBSS	Hank-féle puffer sóoldat
HC ₅₀	50% hemolízist kiváltó koncentráció
HPACD	hidroxipropil α -ciklodextrin
i.v.	intravénás
IC ₅₀	félhatásos gátló koncentráció
LY	Lucifer Yellow
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
PARMEA	részlegesen metilált α -ciklodextrin
PARMEB	részlegesen metilált β -ciklodextrin
PBS	foszfát-puffer oldat
RAMEA	random metilált α -ciklodextrin
RAMEB	random metilált β -ciklodextrin
RT-CES	real-time cell electronic sensing
SuACD	szukcinil α -ciklodextrin
TEER	transzepitheliális elektromos ellenállás
THF	tetrahidrofurán
TRIMEA	hexakis (2,3,6-tri-O-metil)- α -ciklodextrin
TRIMEB	heptakis (2,3,6-tri-O-metil)- β -ciklodextrin
VVT	vörösvértest

2 Bevezetés és célkitűzések

A gyógyszerhatóanyag-jelöltek lipofilitásának és méretének növekvő tendenciája nagy kihívás elé állítja a gyógyszerformulálást, ráadásul a biológiai aktivitás és a vízdékonyság egymással fordított arányban állnak. A Biofarmáciai Osztályozási Rendszer a hatóanyag molekulákat oldékonyságuk és permeabilitásuk alapján csoportosítja. Egy szájon át bejuttatott hatóanyag megfelelő biohasznosulásának feltétele a molekula oldódása a gasztrointesztinális rendszerben, továbbá egy bizonyos szintű lipofil karakter is szükséges a membránokon keresztül történő átjutáshoz.

A makrociklusos vegyületek ismétlődő alegységekből felépülő, gyűrű alakú molekulák, amelyek közös jellemzője a belső, viszonylag hidrofób üreg jelenléte. Egyedi szerkezetüknek köszönhetően alkalmasak lipofil vendégmolekulák komplexálására. A vízdékonny makrociklusok jó választásnak bizonyulnak BCS II és IV osztályok hatóanyagaival történő zárványkomplexek képzésére, ezáltal azok vízdékonyságának és biohasznosulásának növelésére.

A makrociklusos vegyületek legfőbb képviselői a ciklodextrinek, kalixarének, korona éterek és kukurbiturilok. A CD-ek tekintenek vissza a legnagyobb múltra, széleskörű vizsgálatuknak és népszerűségüknek köszönhetően pedig ma már nem csupán bejegyzett oldékonyságnövelő segédanyagokként, hanem aktív hatóanyagként is funkcionálnak.

A CD-ek sokféleképpen módosíthatók a hidroxilcsoportjaikon keresztül, azonban a gyógyszerkészítményekben csak néhány jól ismert származékkal találkozhatunk, főként a natív β -CD-el vagy ennek származékaival. A Debreceni Egyetem Gyógyszertechológiai Tanszék munkatársai már számos egyéb β -CD biokompatibilitását vizsgálták. Az α -CD-ek alkalmazásának leginkább méretük szab határt, ugyanis a β -CD-hez viszonyított kisebb üregük behatárolja a komplexálható hatóanyagok körét. Kutatásunk célja olyan α -CD származékok vizsgálata volt, amelyek hasonló módosításokon estek át, mint a korábban jellemzett β -származékok. A biokompatibilitás vizsgálatok *in vitro* sejttétlétkéességi és hemolízis tesztekben tevődtek össze. Meglátásunk szerint a szerkezeti módosítások és a toxikus hatás közötti kapcsolat elemzésével olyan információkra tehetünk szert, amelyek segítségül szolgálnak a makrociklusok szerkezete és biztonságossága közötti összefüggések megértésében.

Az α -CD-ek iránti elkötelezettségünket tovább erősítették a lyoni Claude Bernard Egyetem Alkalmazott Szupramolekuláris Kémia kutatócsoport (CSAp) meggyőző eredményei.

Kimutatták ugyanis, hogy az α -módosulatokból képzett nanopartikulumok ígéretes gyógyszerhordozó rendszerek, stabilitásuknak és nyújtott hatóanyagleadásuknak köszönhetően. Együtműködésünk célja olyan alkil-éter α -CD-ek szintézise volt, amelyek szerkezete pontosan ismert, ugyanis a kereskedelmi forgalomban kapható CD-ek nagy része csak átlagos szubsztitúciós fokkal jellemzett. A primer, szekunder, vagy mind a két oldalon alkilezett származékok vizsgálatával szerettünk volna információt kapni a szabad hidroxilcsoportok száma és a toxikusság közötti kapcsolatról, továbbá a növekvő szénatom számú alkil-szubsztituensek hatásáról.

Az elvégzett kísérletes munka megoszlásával összhangban a disszertáció nagyobb része a CD-ekkel, kisebb része pedig kalixarénekkal foglalkozik. A két vegyületcsalád sok hasonlóságot mutat egymással. Mivel a CD-ek esetében a szulfatálás jótékony hatással volt mind az oldékonyságra, mind a toxicitásra, célunk a szintén szulfát csoportokkal módosított *para*-szulfonáto-kalix[n]arénekek vizsgálata volt. Ezeket a vegyületeket már széles körben tanulmányozták részben saját biológiai aktivitásuk, részben pedig oldékonyságnövelésre alkalmas szerkezetük miatt, azonban biokompatibilitási profiljuk továbbra is hiányos. Célunk ezen hiányosságok pótlása volt a paracelluláris anyagtranszportra kifejtett hatásuk jellemzésével.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Anyagok

A kereskedelmi forgalomban kapható α -CD származékok, valamint a RAMEA-foszfatidilkolin komplex a Cyclolab Kft. nagylelkű felajánlásai voltak. A további α -CD származékok szintézise a disszertációban részletezett módon történt a lyoni Claude Bernard Egyetem CSAp kutatócsoportjában. A vizsgált *para*-szulfonáto-kalix[n]aréneket Florent Perret és Anthony W. Coleman szintetizálta a vonatkozó irodalomban leírtak alapján.

A szintézis során használt reagensek és a metanol a Sigma Aldrichtől (Franciaország), a további oldószerek pedig a VWR-től (Franciaország) kerültek beszerzésre. A vízmentes oldószereket PureSolv oldószertisztító berendezés (Innovative Technology) használatával biztosítottuk. A vízmentes THF-et frissen desztilláltuk Na és benzofenon jelenlétében. A reakciók inert N₂ atmoszférában mentek végbe, kivéve a hidrogénezést, amely H₂ gázban történt.

3.2 Caco-2 sejtvonala

Vizsgálatainkat az ECACC-tól (The European Collection of Cell Cultures, Egyesült Királyság) származó Caco-2 sejtvonalon végeztük. A sejteket 3.7g/L NaHCO₃-at, 10%(v/v) inaktivált foetális szarvasmarha szérumot, 1% (v/v) nem esszenciális aminosavat, 1%(v/v) L-glutamint, 100IU/mL penicillint és 100µg/mL sztreptomocint tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) tenyésztő folyadékban növesztettük 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában. A sejtvonalat rendszeres passzálassal tartottuk fent és a tápoldatot minden 72 órában cseréltük. A vizsgálatokat 20-40-es passzázsszámú sejteken végeztük.

3.3 Hemolízis teszt

Az α -CD-ek hemolitikus aktivitásának meghatározásához egészséges humán donorok vérért használtuk. A citrátos csőbe vett mintából a vér alakos elemeit centrifugálással szeparáltuk (2500×g, 10 perc), majd PBS-el háromszor mostuk. A PBS-ben oldott, különböző koncentrációjú α -CD oldatokhoz (pH 7,2) 5×10^7 db VVT-t adtunk. 10 percig, 37°C-on inkubáltuk a mintákat, majd magas fordulatszámon centrifugáltuk (5000×g). A hemolízis során szabaddá váló és a felülúszóba kerülő hemoglobin abszorbanciáját 540 nm-en mértük FLUOstar Optima microplate olvasóval (BMG LABTECH, Németország). Kontroll kísérlet

gyanánt az VVT-ket desztillált vízben inkubáltuk 10 percig, amely alatt teljes hemolízis ment végbe. Az eredményeket a teljes hemolízis során mért abszorbancia értékekhez viszonyítottuk, és az származékok HC_{50} értékét meghatároztuk.

3.4 MTT teszt

A Caco-2 sejteket 96 lyukú tenyésztőedénybe helyeztük (10^4 sejt/lyuk), és 7 napig tenyésztési körülmények között tartottuk őket. Ezt követően különböző koncentrációjú, PBS-el készült α -CD és kalixarén oldatot helyeztünk a sejtekre. 30 perc elteltével ezt PBS-el készült, 0,5 mg/mL koncentrációjú MTT oldatra (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid) cseréltük, amelyet 3 órán át tartó és 37°C-on történő inkubálás követett. A folyadék eltávolítása után a lila színű formazán kristályokat 100 μ L sósavas izopropanolban (1:25) oldottuk fel. Az oldatok abszorbanciáját FLUOstar Optima microplate olvasóval határoztuk meg, 570 nm-en. Az értékeket 690nm-en mért háttérabszorbanciával korrigáltuk. A korrigált értékeket a kezeletlen kontroll minta abszorbancia értékéhez viszonyítottuk, és az egyes IC_{50} értékeket meghatároztuk.

3.5 Real-Time Cell Electronic Sensing

A 96 lyukú sejttenyésztő edényeket 20 percen keresztül 37°C-on 0,2% patkány farok kollagénnel kezeltük. A háttér méréséhez 60 μ L médiumot mértünk lyukanként, majd 100 μ L Caco-2 sejtszuspenziót úgy, hogy minden lyukban $1,5 \times 10^4$ sejt kerüljön. A konfluens réteg kialakulásáig növesztettük a sejteket. A tenyésztő médiumot a vizsgálandó anyag oldatára cseréltük, és 8 órán keresztül 37°C-on inkubátorban tartottuk, mialatt az impedancia értékek 5 percenként rögzítésre kerültek. A CI értékeket a $(R_n - R_b)/15$ képlettel számítottuk ki, ahol R_n a sejteket tartalmazó rendszer impedancia értéke, míg R_b a háttér impedancia.

3.6 Statisztikai analízis

A nyers adatok Geisser-Greenhouse korrekcióval kiegészített egyszempontos ANOVA-t követő Tukey-tesztel kerültek összehasonlításra (mivel az adatok teljesítették a D'Agostino és Pearson-féle normalitás-teszt feltételeit). Az átlagok különbségének szignifikancia-szintjét öt csoportba soroltuk: $p > 0.05$ (nem szignifikáns), $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ és $p < 0.0001$. A statisztikai analízist GraphPad Prism 6.05 szoftverrel végeztük, egyes számítások esetében pedig Microsoft Excel 2013 szoftvert használtunk.

3.7 Transzport kísérlet

A sejteket 12 kamrás Transwell (Corning Costar, USA) polikarbonát inzertre helyeztük (3 μm pórusméret, 2×10^5 sejt/inzert). Az inzerteken minden 3. napon cseréltünk médiumot. A monolayer kialakulását TEER érték mérésével végeztük a médiumcserékkel megegyező napokon (Millicell-ERS voltohmmeter, Millipore, USA). Az inzerteket akkor használtuk fel transzport kísérletekre, amikor a TEER érték elérte az $1000\Omega \times \text{cm}^2$ értéket (25-35 nap). A vizsgálatok előtt az inzerteket HBSS oldatban mostuk. A monolayer integritásának ellenőrzésére a kísérlet kezdete előtt, és végezte után is megmértük a TEER értékeket. A permeabilitás vizsgálat két módon zajlott. Előkezelés esetén a monolayereket a CnS-mintákkal 30 percen keresztül, 37°C -on kezeltük, ezt követően a sejteket mostuk HBSS oldattal, és az apikális kamrákba 500 μL LY oldatot (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) adagoltunk. A bazális kamrából meghatározott időközönként mintát vettünk, amelyet tiszta HBSS oldattal azonnal pótolunk. Az előkezelés nélküli vizsgálat során a kívánt CnS és LY mennyiségeket HBSS-ben oldva azonos időpontban helyeztük a sejtrétegre, majd a mintavétel a korábbival megegyező módon zajlott. A minták abszorbanciáját 450nm-en FLUOstar Optima microplate olvasóval mértük.

3.8 α -ciklodextrin származékok szintézise

Az elvégzett kémiai módosítások között szelektív primer és szekunder per-szubsztitúció, valamint teljes per-szubsztitúció szerepelt, célunk kivétel nélkül alkil-éter származékok képzése volt. A szubsztituens csoportok típusát tekintve metil-, etil-, propil- és butil-csoportokat alkalmaztunk. A per-6 és teljes per-szubsztitúció alacsony hozamának köszönhetően csupán a 2,3-di-O-alkil származékok kerültek további *in vitro* tesztelésre. A növekvő hosszúságú alkilcsoportok jelenléte azonban csökkentette a vízdékonyságot, így további szerkezeti módosításokra volt szükség. A szabad primer hidroxilcsoportokat anionos szulfát, illetve szulfopropil csoportokkal szubsztituáltuk, amelyek jelentősen növelték a származékok oldékonyságát.

3.9 Közreműködések

Az RT-CES vizsgálatok Dr. Bocsik Alexandra segítségével és Dr. Deli Mária jóváhagyásával készültek. A RAMEA és RAMEA-foszfadilkolin komplex toxicitásának vizsgálata Dr. Ujhelyi Zoltánnal készült. Dr. Gesztelyi Rudolf készítette a statisztikai analízist. Dr. Bácskay Ildikó felügyelte a biokompatibilitási tesztek kiértékelését. Dr. Florent Perret felügyelte az

NMR spektrumok elemzését. Prof. Anthony W. Coleman értékelte ki a kalixaréneken végzett transzport vizsgálatokat.

A kísérletes munka további részeit, beleértve a sejttéletképességi teszteket, hemolízis tesztet, transzport kísérletet és α -CD szintézist a szerző végezte.

4 Az értekezés új tudományos eredményei

4.1 α - ciklodextrinek

Az α -CD iránti tudományos érdeklődés napjainkban megnövekedett, köszönhetően a vér lipid-szintre és testsúlyra kifejtett kedvező hatásának. Meglátásunk szerint a β -CD-ekhez hasonló kémiai módosításokon átesett, kereskedelmi forgalomban kapható alfa származékok *in vitro* vizsgálata fontos szerkezet-hatásbeli összefüggésekre vezethetnek. Vizsgálataink az alábbiakról szolgáltatottak fontos információkat:

- egyes szubsztituens csoportok biokompatibilitásra kifejtett hatása az anyamolekulához viszonyítva,
- a CD-gyűrű méretének hatása a toxicitásra,
- az adott származékok eltérő hatása három különböző rendszerben.

Az alkalmazott *in vitro* tesztek úgy választottuk ki, hogy modellezni tudjuk a *per os* és intravénás adminisztráció eseteit. Az *i.v.* adagolt hatóanyagok tökéletes vízdékonysága nélkülözhetetlen feltétele a biztonságos gyógyszerelésnek. Amikor ez csak segédanyagok jelenlétében (pl. CD) biztosítható, az egyes komponensek biológiai rendszerekben kifejtett hatásának ismerete elengedhetetlen. Fontos tudni, hogy pl. a hatóanyagfelszívódás növekedését csupán az endothelium-integritás megszűnése eredményezi, vagy valós felszívódásnövelő hatással állunk szemben. Továbbá, intravénás adagolás esetén a hemolízis lehetőségét ki kell zárni. Munkánk célja az alkalmazott segédanyagok által kiváltott mellékhatások csökkentése azáltal, hogy meghatároztuk az egyes α -CD származékokra vonatkozó biztonságosan használható koncentrációtartományokat.

A biokompatibilitási vizsgálatokat Caco-2 sejteken és vörösvértesteken végeztük. Az MTT és RT-CES módszerek segítségével meghatároztuk az IC_{50} értékeket, míg a hemolízis teszt a HC_{50} koncentrációk definiálására volt alkalmas. Az MTT teszt mitokondriális dehidrogenáz enzimek funkcióján alapszik, a hemolízis teszt pedig gyors módszere a hemolitikus aktivitás meghatározásának. Mindkét vizsgálati típus úgynevezett végpont jelzésű, tehát vizualizálja a sejtlízis/sejthalál, ill. hemolízis bekövetkeztét, azonban kinetikus információval egyik sem szolgál. Az RT-CES módszer ezekkel ellentétben nem csupán a toxikus koncentrációk meghatározására alkalmas, hanem a toxikus folyamat kinetikájáról is hasznos információt nyújt. A kapott eredmények biológiai szempontból relevánsabbak, ugyanis jelzőanyag hiányában a sejtek környezete közelebb áll a fiziológiás állapotokhoz, mint MTT teszt során.

Az vizsgált α -CD származékok sejtelétképességre kifejtett hatásának, valamint hemolitikus aktivitásának vizsgálata során az alábbi következtetéseket vontuk le:

- 1 A szabad hidroxilcsoportok kémiai módosítása hatást gyakorol a toxicitásra. Minden vizsgált anyag esetében elmondhatjuk, hogy az anyamolekulához viszonyítva akár pozitív, akár negatív irányban, de határozott változást eredményeztek mind az IC_{50} mind pedig a HC_{50} értéken. Mindkét Caco-2 sejten végzett kísérlet típus igazolta, hogy három metilcsoport (TRIMEA), foszfát- illetve szukcinil-csoport (SuACD) jelenlétében alacsonyabb IC_{50} értékek voltak mérhetőek, tehát a citotoxikus hatás nőtt. Ezzel ellenben a HPACD illetve AcACD származékok nem mutattak mérhető IC_{50} értéket 100mM-ig.
- 2 A toxikus hatás függ az CD-gyűrű méretétől. Összevetve az azonos kémiai módosításokkal rendelkező α - és β -CD-eket azt tapasztaltuk, hogy míg egyes szubsztitúciós minták mindkét esetben ugyan azon irányba tolják el az anyamolekula toxikusságát, addig más mintázatok ellentétes hatást eredményeznek az α és β gyűrűk esetén. Például mindkét hidroxipropil származék biztonságosnak bizonyult Caco-2 sejteken, azonban a HPBCD HC_{50} értéke 57mM értéken meghatározható volt, míg a HPACD nem mutatott hemolitikus aktivitást 100mM-ig. Ezzel ellentétben, a TRIMEA jelentősebb citotoxikus és hemolitikus aktivitást mutatott a RAMEA-nál, míg béták esetében a TRIMEB bizonyult biztonságosabbnak a RAMEB-bel szemben.
- 3 A toxikusság mértéke függ a kezelés időtartamától. Általánosságban elmondható, hogy RT-CES módszerrel alacsonyabb IC_{50} értékeket kaptunk, mint MTT teszttel, kivéve a HPBCD és AcACD származékokat, amelyek mindkét rendszerben ártalmatlannak bizonyultak. Az egyik legfőbb különbség a két módszer között a kezelés időtartama (30 perc MTT, 8 óra RT-CES esetén), valamint az, hogy az RT-CES folyamán a kezelő anyag folyamatos kontaktusban van a sejtekkel. A RAMEA IC_{50} értéke meglehetősen magas volt (78mM) az MTT rendszerben, azonban a másik módszer már 25mM-nál jelezte a toxikus hatást. A szulfatált ACD esetében MTT rendszerben nem tudtunk IC_{50} értéket meghatározni, míg RT-CES-el már 10mM-tól mutatkoztak a káros hatások.
- 4 A CD-ek hatása függ a sejtmembrán felépítésétől. Az IC_{50} és HC_{50} értékeket összevetve azt tapasztaltuk, hogy a hemolitikus aktivitás alacsonyabb koncentrációknál jelentkezett, azonban HPACD és AcACD ebben az esetben is kivételt képeztek, ugyanis egyik rendszerben sem mutattak sejtkárosító hatást. Ezekkel ellentétben a foszfátált alfa CD bár nem mutatott hemolitikus aktivitást, az MTT rendszerben már alacsony koncentráción is

toxikusnak bizonyult. Továbbá, a RAMEA IC_{50} értéke meglehetősen magas, azonban HC_{50} koncentrációja 15mM, tehát szignifikánsan alacsonyabb volt. A HC_{50} koncentrációk általánosan alacsonyabb értéke azt interpretálja, hogy az α -CD-ek affinitása nagyobb a VVT-k membránalkotóihoz, mint a Caco-2 sejtekéhez. Számos publikáció igazolja az egyes CD-származékok eltérő hatását különböző rendszerekben. Matilainen és mtsi. arról számoltak be, hogy a hidroxipropil CD-ek, valamint a γ -CD a legbiztonságosabbak tüdő eredetű sejtvonalon. Kiss és mtsi. a következő sorrendet határozták meg béta CD-ek esetében Caco-2 sejtvonalon: RAMEB > TRIMEB > DIMEB > PARMEB > HPBCD ~ CMBCD. Az alfa CD-ek toxikussága pedig még a DIMEB-nél is erősebbnek bizonyult cornea eredetű sejtvonalon. Mindezen eredmények az általunk publikáltakkal egyetértésben azt igazolják, hogy az egyes CD-származékok eltérő hatást fejtenek ki a membránösszetételtől függően.

Eltérő szubsztitúciós fokkal definiált α -CD származékok Caco-2 sejtelétképességre kifejtett hatásának MTT tesztel történő vizsgálata fontos szerkezet-hatás összefüggésekre derített fényt. A metil-csoportok számának növekedése, tehát a szabad hidroxilcsoportok számának csökkenése csökkenő IC_{50} koncentrációkat, így növekvő citotoxicitást eredményezett. Míg a TRIMEA, amely 18 metil-csoporttal rendelkezik, már alacsony koncentrációban is (1,8mM) káros hatást fejtett ki, addig a 12, ~11 és ~9 metil-csoporttal módosított DIMEA, RAMEA és PARMEA egyre növekvő IC_{50} értékeket adott. Ezen észrevételek két fő konklúzióhoz vezetnek. A növekvő metil-csoport szám növeli a származékok toxicitását, illetve az anyavegyület toxikus-profiljának javításához szabad hidroxilcsoportok jelenléte szükséges. Míg a 12 metil-csoporttal rendelkező DIMEA hozzávetőlegesen azonos IC_{50} értékkel jellemezhető, mint a natív CD, addig a ~11 csoporttal definiált RAMEA jelentősen kedvezőbb hatással volt a Caco-2 sejtekre.

A hexakis (2,3-di-O-metil-6-O-szulfát)- α -CD (**12**) és hexakis (2,3-di-O-etil-6-O-szulfát)- α -CD (**13**) a C-2 és C-3 pozícióban jelen levő alkil szubsztituensek szénatomszámában különböznek. A **12**-es vegyületet összevetve a kiindulási vegyületével (DIMEA), sokkal alacsonyabb IC_{50} értéket kaptunk. Ezt a jelenséget egyrészt a szabad hidroxilcsoportok hiányával magyarázhatjuk, illetve a C-6 pozícióban megjelenő szulfátcsoportok jelenlétével. A **13**-as vegyület toxicitási profilja jobb, mint a **12**-esé, tekintettel arra, hogy magasabb IC_{50} érték volt mérhető az MTT rendszerben. A toxikus hatás csökkenése egyrészt az alkil-szubsztituens hosszának növekedésével magyarázható, továbbá mivel a **13**-as vegyület esetében a szulfát csoportokra vonatkoztatott DS érték nem érte el a 6-ot (5.5), így szabad hidroxilcsoportok

jelenléte feltételezhető. A szabad hidroxilok pedig a fentiekben leírtakkal egyetértésben, valószínűleg szükségesek a kedvező biokompatibilitás eléréséhez.

A β -CD-ek koleszterinkomplexáló hatását már korábban publikálták. Ezen tulajdonság magyarázatot ad citotoxicitásukra, ugyanis képesek a koleszterin kivonására a sejt és VVT membránjából, ami a sejtintegritás megszűnését eredményezi. Az alfa származékok mechanizmusa azonban nem magyarázható ugyanezzel a jelenséggel, annál az egyszerű oknál fogva, hogy üregük túl kicsi ahhoz, hogy zárványkomplexet képezzenek a koleszterinnel. A sejtmembrán foszfolipid komponenseinek (pl. foszfatidilkolin, foszfatidilinozitol, foszfatidilszerin) acil-csoportja azonban bizonyítottan jól illeszkedik az α -CD üregébe. Kísérleteink során indirekt módon bizonyítottuk az α -CD-ek foszfolipid komplexáló hatását. Az „üres”, valamint a foszfatidilkolinnal töltött RAMEA-t vizsgáltuk MTT módszerrel. Tapasztalataink alapján a CD-komplex nem mutatott mérhető IC_{50} értéket 100mM koncentrációig, ellentétben a töltetlen RAMEA-val. Ennek értelmében az alfa CD-ek valószínűleg a sejtmembrán foszfolipid komponenseinek komplexálásával eredményezik a membránintegritás elvesztését, amely sejtlízishez (hemolízishez) vezet. Eredményeink egyetértésben vannak más kutatócsoportok álláspontjával, például Leroy-Lechat és mtsi. is úgy találták, hogy a hidroxipropilezés jelentősen csökkenti az anyavegyületek hemolitikus aktivitását mind α -, β - és γ -CD-ek esetén.

Szintézis

Általánosan elfogadott tény, hogy a legtöbb kereskedelmi forgalomban lévő CD származék eltérő szerkezetű komponensek keveréke, és a jellemző DS értékek általában nem egész számok. Az eltérő DS-el jellemzett, de azonos kémiai módosításon átesett anyagok eltérő hatását, így a DS fontosságát már korábban is hangsúlyozták. Irie és Uekama eltérő DS-el jellemzett metil és hidroxipropil CD származékokat vizsgált, amelyek hemolitikus aktivitása különbözött. Mosher és Thompson szulfobutiléter béta CD-ek hemolitikus aktivitását összehasonlítva azt tapasztalták, hogy a szubsztituens csoportok számának növekedésével csökken a toxikus hatás.

Célkitűzéseink között olyan alkil-éter α -CD-ek szintézise szerepelt, amelyek az alkil szubsztituensek számában és pozíciójában különböznek. Az alkilcsoportok hossza egy (metil) és négy (butil) szénatom között változott, amelyek vagy a primer, vagy a szekunder, vagy mindkét oldalon szimultán helyezkednek el. A primer és szekunder per-szubsztitúciót az úgynevezett hosszú szintetikus útvonalon értük el, amikor is az ellentétes oldal

hidroxilcsoportjait védőcsoporttal védtük. A teljes per-szubsztitúciót pedig magasabb reagens ekvivalens használatával, a C2, C-3 és C-6 pozíciók egyidejű módosításával végeztük.

A 2,3-di-O-alkil származékok tizenkettő metil-, etil-, propil- vagy butil-csoporttal rendelkeznek, míg a primer hidroxilok szabadon maradtak. Ennek ellenére a metil származék kivételével ezek a vegyületek rossz vízdékonysággal rendelkeznek, szolubilizálásuk csak szerves kszolvens jelenlétében volt sikeres, amely megakadályozta az *in vitro* vizsgálatokat. Ennek a problémának a kiküszöbölésére további szerkezeti módosításokat eszközöltünk a primer hidroxilcsoportokon, vagyis anionos szulfát, illetve szulfopropil csoportok szubsztitúcióját hajtottuk végre. Mindkét csoport jelenléte jelentősen növelte a vízdékonyságot. Szulfatálás esetében magasabb DS értékeket kaptunk (6-5.1), mint szulfopropilezéskor (4.6-2.9). A szulfatált származékok közül komplett szubsztitúciót csak a metil α -CD esetében értünk el, és a DS érték csökkent az alkilcsoportok hosszának növekedésével. A szulfopropil származékok képzése során két probléma merült fel. Az egyik az alacsony DS érték, a másik pedig a bonyolult tisztítási folyamat. Számos különböző technika alkalmazása ellenére sem sikerült teljes mértékben megszabadulni a szulfopropil sók jelenlététől, amelyek nagy valószínűséggel a CD üregében komplexálódtak.

A primer hidroxilok módosítását öt lépésből álló kísérletsorozattal végeztük, amelyek bár egyénileg jó kitermeléssel jellemezhetők, de nagyon alacsony végső kitermelést eredményeztek. A termékek mennyisége így megakadályozta a további *in vitro* vizsgálatok véghezvitelét. A komplett perszubsztitúció eredménye minden esetben különböző DS-sel (1-18) rendelkező termékek keveréke lett. Az oszlopkromatográfiás eljárás bár biztosította a végtermék rögzös úton történő elválasztását, azonban hasonlóan a fentebb említettekhez, az alacsony végső kitermelés megakadályozta a termékekkel történő további vizsgálatok elvégzését, továbbá a szabad hidroxilcsoportok hiányában ezen termékek vízdékonysága is csekély volt.

4.2 Kalixarének

A szulfát csoportok látszólag kedvező hatású jelenléte (mind oldékonyság, mint biokompatibilitás szempontjából) vezetett minket a *para*-szulfonáto-kalix[n]arénekhez. Célunk ezen vegyületek hatásának feltárása volt Caco-2 rendszerekben.

Korán nyilvánvalóvá vált, hogy a kalixarének nem csak egyedi szerkezetük, hanem önálló biológiai aktivitásuk miatt is nagy potenciált rejtenek magukban. A CD-ekkel szemben elhanyagolható hemolitikus aktivitásuk további előnyt jelent. A Coleman és mtsi. által vizsgált CnS származékok egyöntetűen ártalmatlannak bizonyultak 50mM koncentrációig VVT-ken. Az *in vitro* rendszerben leírt számos hatásuk (pl. Ames teszt, humán fibroblasztok, neutrofil granulociták) pedig kétségtelenül kedvezőek.

Caco-2 rendszerben, azon belül is a paracelluláris anyagtranszportra kifejtett hatásuk azonban még nem volt korábban vizsgálva, így célunk ezen hiány pótlása volt annak érdekében, hogy elősegítsük a CnS-ek gyógyszerészeti segédanyagokként való jövőbeni alkalmazását.

A C4S, C6S és C8S vegyületek IC₅₀ értékét MTT teszttel határoztuk meg Caco-2 sejteken. Érdekes módon mindhárom kalixarén meglehetősen toxikusnak bizonyult, alacsony IC₅₀ értékkel. Az IC₅₀ meghatározása azt a célt szolgálta, hogy a transzport kísérletekben szubtoxikus koncentrációkban tudjuk vizsgálni az esetleges transzportnövelő hatásokat, mintegy kizárva a sejtréteg károsodásának eredményeként bekövetkező anyagátjutás-növekedést.

A transzport kísérlet során Lucifer Yellow-t használtunk paracelluláris markerként. Kétféle rendszerben vizsgáltuk a kalixaréneket, előkezeléssel és anélkül. Az első esetben egy fél órás CnS kezelést követett a LY marker transzportjának vizsgálata. A második esetben pedig a kalixarént és a LY-t szimultán alkalmaztuk. Érdekes módon a C6S egyik esetben sem növelte a paracelluláris LY transzportot, míg a C4S és C8S határozottan növelte a LY felszívódását, de csak egyidejű kezelés esetében. A TEER értékek változása is figyelemre méltó, ugyanis míg előkezelés során a kísérlet végeztével is 1000Ωxcm² körüli értékeket mértünk, addig a CnS-ek és LY egyidejű expozíciója jelentős TEER-csökkenést eredményezett a kísérlet végeztével.

A C4S és C8S, valamint a C6S vegyületek közötti hatáskülönbség további kérdéseket vet fel, és feltételezi, hogy a kalixarének makrociklusos gyűrűjének méretváltozásával egyúttal változik a sejtmembránon kifejtett hatásuk is.

4.3 Eredményeink újdonsága és gyakorlati alkalmazhatósága

Ciklodextrinek

- Az α -CD gyűrűn végzett módosítások csökkenthetik (hidroxipropilezés, acetilezés, metilezés), vagy növelhetik (foszforilálás, szukcinilezés) az anyamolekulához viszonyított toxicitást.
- Ugyanazon szerkezeti módosítás eltérő hatást eredményezhet az α - és β -CD gyűrűkön.
- A metil csoportok jelenléte javíthatja a CD-ek biokompatibilitását a szubsztitúciós foktól függően, de a teljes per-metilezés növeli a toxikus hatást.
- A szabad hidroxilcsoportok jelenléte feltételezhetőleg szükséges a biztonságos toxicitási profil kialakításához.
- Az α -CD-ek már alacsonyabb koncentráción is hemolízist okoznak, míg a Caco-2 sejtekre kifejtett negatív hatásuk csak magasabb koncentrációknál észlelhető.
- A RT-CES mérések értelmében az α -CD-ek toxikussága a kezelési idővel nő.
- Mind a hidroxipropil, mind az acetil származékok olyan toxikussági profillal rendelkeznek, amely még a parenterális alkalmazásukat is lehetővé teszi.

Kalixarének

- A kalixarén gyűrűk szulfonálása nem csupán a biohasznosulást növeli, hanem látszólag a felszívódás növelő hatásukat is.
- *Para*-szulfonáto-kalix[n]arénekkel (n=4,6 vagy 8) történő előkezelés során azok nincsenek hatással az alkalmazott jelölő molekula intesztinális felszívódásra.
- A C4S és C8S származékok növelik a Lucifer Yellow paracelluláris jelölő molekula felszívódását, amennyiben azzal egyidőben érintkeznek a sejtekkel.
- A C6S származék előkezeléssel és előkezelés nélkül sem növelte a felszívódást.
- A paracelluláris felszívódásra kifejtett eltérő hatások a molekula méretével változó hatásmechanizmusokra engednek következtetni.

5 Összefoglalás

A gyógyszerhatóanyagok rossz vízdékonysága nagy kihívást jelent formulálásuk során, ugyanis a vízdékonyság elengedhetetlen feltétele a megfelelő biohasznosulásnak. A makrociklusos vegyületek belső ürege viszonylag hidrofób, ez alkalmassá teszi őket vendégmolekulákkal való komplexképzésre. A ciklodextrinek és kalixarének széles körben tanulmányozott vegyületek, egyes CD-ek bejegyzett oldékonyságnövelő segédanyagok. A makrociklusok felépítése számos kémiai módosításra ad lehetőséget, amelyek nem csupán a fiziko-kémiai tulajdonságok változását eredményezik, hanem az élő organizmusokra kifejtett hatásokat is módosítják. Ezen származékok biokompatibilitás vizsgálata tehát elengedhetetlen.

Számos β -CD származék biokompatibilitása ismert már, így kutatásunk célul tűzte ki ezen vizsgálatok α -CD-ekre történő kiterjesztését. Az α -CD-ek alkalmazása ritkább, azonban vannak származékok, amelyek *in vitro* vizsgálata még nem történt meg, de jelentőségük a nanopartikulum-képzésben már igazolt. A szerkezet-toxicitás összefüggések feltárása érdekében olyan alkil-éter CD származékokat szintetizáltunk, amelyek növekvő szénatomszámú alkilcsoportokkal rendelkeznek, eltérő pozíciókban. A para-szulfonátok kalix[n]aréneket hatóanyag-komplexáló tulajdonságuk, valamint sokoldalú biológiai aktivitásuk miatt széles körben tanulmányozták már, azonban a paracelluláris anyagtranszportra gyakorolt hatásuk ezidáig még nem volt ismert.

A sejtleletképeségi és hemolízis vizsgálatok hozzásegítettek az egyes α -CD-ek rangsorolásához, továbbá a vegyületek különböző rendszerekben mért toxikussága is összevethetővé vált. A megegyező kémiai módosításokon átesett α - és β -CD-ek biokompatibilitása rávilágított a CD-gyűrű mértékének jelentőségére. Egyértelmű összefüggést fedeztünk fel a toxicitás és a szabad hidroxilcsoportok száma között. A hosszú alkilcsoporttal rendelkező CD-ek rossz oldékonysága további kémiai módosításokat tett szükségsszerűvé; a szulfát csoportok jelenléte jótékony hatással volt az oldhatóságra, és a citotoxicitásra is. A szulfatálás a kalixarének oldékonyságát is növelte. A C4S és C8S vegyületek növelték a paracelluláris felszívódás mértékét szubtoxikus koncentrációban, azonban a C6S nem mutatott hasonló hatást. Ezen eredmények további kérdéseket vetnek fel a pontos hatásmechanizmusról.

Eredményeink rávilágítanak a makrociklusok szerkezetének és biokompatibilitásának összefüggéseire, valamint ezen ismeretek fontosságára annak érdekében, hogy minden formulációban a legbiztonságosabb segédanyagok legyenek alkalmazhatóak.

6 Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőimnek, Dr. Bácskay Ildikónak és Dr. Florent Perretnek szeretném köszönetemet kifejezni folyamatos támogatásukért, türelmükért, gyakorlati és elméleti útmutatásaikért, amelyekkel segítették munkámat mind a kísérletes munkavégzés mind a disszertációírás folyamatában.

Köszönettel tartozom Prof. Zelkó Románának, Dr. Corinne Fruitnak, Prof. Marc Le Borgne-nak, valamint a bírálóbizottság valamennyi tagjának, amiért hasznos tanácsaikkal és javaslataikkal elősegítették disszertációm tökéletesítését.

Hálával tartozom Dr. Vecsernyés Miklósnak, Prof. Julien Leclaire-nek és Prof. Hélène Parrot-Lopeznek, amiért lehetővé tették számomra, hogy csatlakozzak kutatócsoportjukhoz, és hozzáférést biztosítottak laboratóriumaikhoz és a felszerelésekhez.

Köszönettel tartozom Prof. Tósaki Árpádnak, Prof. Stéphane Daniele-nek és Dr. Caroline Félixnek amiért lehetőséget biztosítottak arra, hogy PhD kutatásomat két egyetemen végezhessem.

Külön köszönettel tartozom Prof. Szente Lajosnak, Dr. Fenyvesi Évának és a Cyclolab-csoportnak, akiktől a legtöbbet tanultam a ciklodextrinekről. Támogatásuk és mintáik nélkül a jelen kutatás nem jöhetett volna létre, messze földön ismert profizmusukkal pedig minden felmerülő kérdésemre bármikor készséggel válaszoltak.

Hálás köszönetemet fejezem ki a szakmai segítségért Prof. Anthony W. Colemannak, Dr. Deli Máriának, Dr. Bocsik Alexandrának, Dr. Borbás Anikónak, Dr. Mező Erikának, Dr. Gesztelyi Rudolfnak, Dr. Varga Balázsnak, Dr. Juhász Bélának, Horányiné Körei Máriának és Szabó Katalinnak.

Hálával tartozom Bob Kaba Loembának, amiért minden lehetséges módon támogatta előremeneteletemet a Francia Intézet keretein belül.

Mérhetetlen hálával tartozom a CSAp csoport posztdoktorainak, doktoranduszainak és hallgatóinak a folyamatos segítségért, és hogy nem hagyták, hogy elveszek a kémiai laboratóriumokban. Név szerint: Geoffroy Germain, Emeric Jeamet, Guillaume Poisson, Yoann Pascal és Mélissa Dumartin.

Hálás vagyok a 4. Európai Ciklodextrin Konferencián, valamint a 3. Nemzetközi Ciklodextrin Nyári Egyetemen való részvételi lehetőségemért, ahol megismerkedhettem a ciklodextrinokban rejlő kimeríthetetlen lehetőségekkel.

Végül, de nem utolsó sorban a legnagyobb köszönettel Édesapámnak, Édesanyámnak és Nővéremnek tartozom, akik minden körülmények között támogattak egészen a kezdetektől. Hálás köszönettel tartozom Katona Csetének a támogatásáért és a stilisztikai korrekciókért.

Jelen kutatás a Campus France kettős témavezetésű doktori programjának keretein belül, valamint a TÉT-14-FR-2015-0031-Balaton projekt támogatásával valósult meg. Munkánkat továbbá a GINOP-2.3.2-15 számú, valamint a Kutatási infrastruktúra megerősítése – nemzetköziesedés, hálózatosodás című, GINOP-2.3.3-15-2016-00021 számú pályázatok is támogatták.

7 Publikációk jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/285/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Róka Eszter
Neptun kód: VRH6VE
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10052077

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Róka, E.**, Ujhelyi, Z., Deli, M. A., Bocsik, A., Fenyvesi, É., Szente, L., Fenyvesi, F., Vecsernyés, M., Váradi, J., Fehér, P., Gesztelyi, R., Félix, C., Perret, F., Bácskay, I.: Evaluation of the Cytotoxicity of [alfa]-Cyclodextrin Derivatives on the Caco-2 Cell Line and Human Erythrocytes.
Molecules. 20, 20269-20285, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules201119694>
IF: 2.465
2. **Róka, E.**, Vecsernyés, M., Bácskay, I., Félix, C., Rhimi, M., Coleman, A. W., Perret, F.: para-Sulphonato-calix[n]arenes as selective activators for the passage of molecules across the Caco-2 model intestinal membrane.
Chem. Commun. 51, 9374-9376, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C5CC01777G>
IF: 6.567





További közlemények

3. Fehér, P., Ujhelyi, Z., Váradi, J., Fenyvesi, F., **Róka, E.**, Juhász, B., Varga, B., Bombicz, M., Priksz, D., Bácskay, I., Vecsernyés, M.: Efficacy of Pre- and Post-Treatment by Topical Formulations Containing Dissolved and Suspended Silybum marianum against UVB-Induced Oxidative Stress in Guinea Pig and on HaCaT Keratinocytes.
Molecules. 21 (10), 1269, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21101269>
IF: 2.465 (2015)
4. Réti-Nagy, K., Malanga, M., Fenyvesi, É., Szenté, L., Vámosi, G., Váradi, J., Bácskay, I., Fehér, P., Ujhelyi, Z., **Róka, E.**, Vecsernyés, M., Balogh, G., Vasvári, G., Fenyvesi, F.: Endocytosis of fluorescent cyclodextrins by intestinal Caco-2 cells and its role in paclitaxel drug delivery.
Int. J. Pharm. 496, 509-517, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.049>
IF: 3.994
5. Ujhelyi, Z., Kalantari, A., Vecsernyés, M., **Róka, E.**, Fenyvesi, F., Póka, R., Kozma, B., Bácskay, I.: The Enhanced Inhibitory Effect of Different Antitumor Agents in Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems on Human Cervical Cancer HeLa Cells.
Molecules. 20, 13226-13239, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules200713226>
IF: 2.465
6. Ujhelyi, Z., **Róka, E.**, Fenyvesi, F., Fehér, P., Váradi, J., Réti-Nagy, K., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Assessment of the hemolytic activity and cytotoxicity of different PEG-based solubilizing agents.
Pharmazie. 68, 383-384, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2013.2207>
IF: 1.003

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,959

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,032

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetria ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.10.28.