

Indukált cirkuláris dikroizmus spektroszkópia  
alkalmazási lehetőségei gyógyszer-makromolekula  
komplexek vizsgálatára

Doktori értekezés

**Dr. Kiss Eszter**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Horváth Péter, egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Fenyvesi Éva, vezető kutató

Dr. Schay Gusztáv, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Klebovich Imre, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Mándity István, egyetemi docens

Csörgeiné Dr. Kurin Krisztina, egyetemi docens

Budapest

2020

## 1. Bevezetés

Makromolekuláknak nevezzük azokat a vegyületeket, amelyek egy kis molekulatömegű építőelem (monomer) ismétlődő egységeiből épülnek fel. Ide soroljuk többek között a természetben előforduló nukleinsavakat, peptideket és fehérjéket, de a különféle műanyagok és makrociklusos vegyületek, mint a ciklodextrinek is makromolekulának tekinthetők.

A különböző kismolekulák, mint például a gyógyszerek is kölcsönhatásba léphetnek makromolekulákkal. Ez megtörténhet az emberi szervezetben is (pl.: gyógyszerek fehérjekötése, DNS támadáspontú citotoxikus szerek), valamint a gyógyszertechnológiában is kihasználható a segédanyagok megválasztásakor.

Az ilyenfajta kölcsönhatások könnyen vizsgálhatók cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával. Amennyiben egy kromofór csoporttal rendelkező, akirális kismolekula valamilyen módon kölcsönhatásba lép egy királis makromolekulával, úgy a kromofór királisan zavarttá válik és a ligandum abszorpciós tartományában egy indukált CD (ICD) jel jelenik meg,

amely szelektív a kialakult komplexre. Az ICD jel alakját és nagyságát a kötődési mód meghatározására és a kötődés erősségének jellemzésére lehet felhasználni.

## **2. Célkitűzések**

A doktori munka célkitűzése volt, hogy megvizsgáljuk a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia egy sajátos ágának, az indukált cirkuláris dikroizmus spektroszkópiának a felhasználási lehetőségeit. Az ICD jelensége régóta ismert, azonban sem a gyógyszerkutatókban, sem a gyógyszeranalitikában nem alkalmazzák, annak ellenére, hogy fontos információt szolgáltat a hatóanyag és különféle makromolekulák vagy biopolimerek kölcsönhatásairól.

Célkitűzéseink között szerepelt hatóanyagok DNS-sel, valamint fehérjével történő kölcsönhatásainak vizsgálata, továbbá a gyógyszerészetben széles körben felhasznált ciklodextrinek komplexképző tulajdonságainak vizsgálata.

A hatóanyagok DNS-kölcsönhatásának vizsgálata alapjául szolgálhat egy *in vitro* genotoxicitási előszűrésnek, a fehérjékkel való komplexképzés pedig

újonnan fejlesztett hatóanyagok esetében előre jelezheti a plazmafehérjékhez való kötődés mértékét. Ciklodextrinek esetén az adott hatóanyag számára leginkább megfelelő ciklodextrin kiválasztásához kívántunk gyors és informatív módszert fejleszteni.

### **3. Módszerek**

A DNS-, illetve a fehérjekötődés meghatározása és a ciklodextrin komplexek vizsgálata CD spektroszkópiával történt. DNS-kötődési vizsgálatoknál kiegészítésként végeztünk differencia frekvencia szaturáció transzfer differencia NMR méréseket, valamint CD-melting kísérleteket is.

A pUC18 plazmid DNS előállítását és tisztítását a Semmelweis Egyetem Orvosi Biokémia Intézetében végezték a megfelelő protokoll szerint.

A ciklodextrin és a fehérje komplexek stabilitási állandóit nemlineáris paraméterillesztéssel számoltuk, Origin Pro 8.5 programot használva.

## **4. Eredmények**

### **4.1. DNS-kötődési vizsgálatok**

A munka során többféle kismolekula DNS-kötődését vizsgáltuk. Ezekhez a vizsgálatokhoz felhasználtunk természetes eredetű lineáris DNS-eket, illetve bakteriális eredetű plazmid DNS-t, amely cirkuláris szerkezettel rendelkezik.

Elsőként azt kívántuk feltérképezni, hogy a plazmid DNS alkalmazható-e kötődési vizsgálatokra. Ehhez először összehasonlítottuk a plazmid DNS CD spektrumát a többi DNS-ével. Ezután választottunk két olyan molekulát, amelynek jól ismert a kötődési módja a lineáris DNS-ekhez: az interkaláló etidium-bromidot és a kisárokba kötődő berenilt. A különböző DNS típusokkal kapott spektrumokat összehasonlítottuk, az eredmények alapján pedig azt a következtetést vonhattuk le, hogy a plazmid DNS-t fel lehet használni kötődési vizsgálatokhoz.

A kísérletek során felhasznált kismolekulák között szerepelt a természetes eredetű kurkumin és 28 db kurkuminoid, a szintén a természetben is előforduló arisztolochiasav I, illetve a jelenleg kináz-gátlóként

forgalomban lévő szunitinib. Az arisztolochiasav I és a szunitinib esetében végeztünk plazmid DNS-kötődési vizsgálatokat, a kurkuminoidok esetében csak a természetes eredetű csirke eritrocita (ChE) DNS-hez történő kötődést kívántuk feltérképezni. A szunitinib méréseket a CD spektrumok felvételén túl még CD-melting és NMR kísérletekkel egészítettük ki.

Kurkumin esetében a regisztrált CD spektrumok kimutatták a DNS kötődést, ugyanakkor a vizsgált kurkuminoidok közül mindössze 5 esetben figyeltünk meg ICD jelet, a többi esetben a kötődési vizsgálatok negatívnak adódtak.

Az arisztolochiasav I esetében nem tudtunk kölcsönhatást kimutatni a természetes DNS-hez, azonban a molekula képes a plazmidhoz kötődni, mert a spektrumban a DNS sávok jelentős változást szenvedtek, amely utal a kölcsönhatásra. Feltételezhetően az arisztolochiasav I a plazmid szuperhélix szerkezetét bontja meg.

A szunitinib bázis esetében tudtunk DNS-kötődést kimutatni mind a természetes, mind a plazmid DNS-hez. Előbbi esetben nem lehetett részletes titrálásokat

elvégezni, mert alacsony ligandum koncentrációnál is anyagkiválás történt. A plazmidnál a CD- és az NMR-mérések alapján kettős kötődési módot feltételezünk, amelyre utal az ICD jel koncentrációfüggő kettőssége, illetve az NMR mérésekből számolt 1,1-es kötődési index, amely az interkaláció és a kisárok kötődés határán van.

## **4.2. Ciklodextrin komplexek vizsgálata**

A doktori munka során ötféle antifungális azol natív és szintetikus CyD-ekkel való komplexképzését vizsgáltuk. Választásunk azért esett ezekre a vegyületekre, mert vízben rosszul oldódnak, illetve pár vegyület már forgalomban van CyD komplexként. Az ötféle azol közül egy triazol-, a többi imidazol-származék volt. A natív CyD-ek közül mindhárom, az ACyD ( $\alpha$ -ciklodextrin), a BCyD ( $\beta$ -ciklodextrin) és a GCyD ( $\gamma$ -ciklodextrin), szintetikus származékaik közül pedig a CMBCyD (karboximetil- $\beta$ -ciklodextrin), a DMBCyD (dimetil- $\beta$ -ciklodextrin), a TMBCyD (trimetil- $\beta$ -ciklodextrin), a SBBCyD (szulfobutiléter- $\beta$ -ciklodextrin),

valamint a HPBCyD (hidroxipropil- $\beta$ -ciklodextrin) komplexképzését vizsgáltuk.

Az egyetlen triazol-származék, a flukonazol esetében nem detektáltunk ICD jelet, így komplex stabilitási állandókat nem tudunk számítani. A többi négy vegyület (bifonazol-BIZ, klotrimazol-CLZ, mikonazol-MIZ, tiokonazol-TIZ) állandóit az 1. táblázat foglalja össze.

**1. táblázat: A vizsgált antifungális azolok ciklodextrin komplexeinek számított stabilitási állandóinak logaritmusa ( $M^{-1}$ )**

	<b>BIF</b>	<b>CLZ</b>	<b>MIZ</b>	<b>TIZ</b>
<b>ACyD</b>	2,74	-	-	3,12
<b>BCyD</b>	3,40	2,65	2,70	3,18
<b>GCyD</b>	4,04	-	3,37	3,71
<b>DMBCyD</b>	4,21	3,23	3,68	3,86
<b>TMBCyD</b>	2,95	1,48	-	-
<b>CMBCyD</b>	3,40	2,91	2,96	2,85
<b>HPBCyD</b>	4,46	2,09	2,71	3,30
<b>SBBCyD</b>	4,72	3,47	3,18	3,97

### 4.3. Fehérjekötődési vizsgálatok

A nimeszulid a nem szteroid gyulladáscsökkentők csoportjába tartozó vegyület, amely szulfonamid csoportjának köszönhetően savas karakterrel rendelkezik, így képes kötődni a humán szérum albuminhoz (HSA). A



cél a kötődési állandó meghatározása volt a regisztrált ICD spektrumok alapján. A három párhuzamos kísérletből számított állandókat a 2. táblázat tartalmazza.

**2. táblázat: A nimeszulid-HSA komplex számolt logK ( $M^{-1}$ ) értékei (és regressziós koeficiensei)**

I. mérés	4,63 (0,9971)
II. mérés	4,75 (0,9959)
III. mérés	4,71 (0,9990)
<b>Átlag</b>	<b>4,70±0,06</b>

## 5. Következtetések

Doktori munka során számos kismolekula kötődését vizsgáltuk biopolimer makromolekulákhoz CD spektroszkópiás módszerrel. A vizsgált hatóanyagok vagy hatóanyag jelölt molekulák akirális vagy racém molekulák voltak, míg a biopolimerek mindegyike királis.

A CyD-ek esetében a komplexálódás során mérhető ICD jel nagyon szelektíven csak a komplexálódás eredményét képes detektálni. A regisztrált ICD spektrumok sokkal informatívabbak, mint pl. az UV spektrumok, és alig marad el az információ tartalma az NMR spektroszkópiától, ugyanakkor

érzékenységben esetenként felül is múlja azt. A szelektivitás különösen a stabilitási állandók számításánál jelent nagy előnyt. Más módszerek esetén általában a mért jel a szabad ligandum vagy vendégmolekula és a komplex móltörttekkel súlyozott átlagjelétől származik, míg az ICD jel csak a komplextől ered. A módszer alapjául szolgálhat egy olyan gyors és szelektív információt nyújtó eljárásnak, melynek segítségével számos CyD próbálható ki egy adott vendégmolekulával, és az ICD mérések alapján kiválasztható az adott célra leginkább megfelelő CyD. Méréseink során meghatároztunk 27 db állandót, amelyeket az 1. táblázatban foglalunk össze. Ezek között vannak olyanok, amelyek az irodalomban még nem találhatóak meg, illetve vannak olyan állandók, amelyek az irodalomban fellelhetők, de más módszer alapján számított értékek. Számos ezek közül jól korrelál a mi eredményeinkkel, azonban vannak jelentős eltérést mutató esetek is. Az eltéréseknek számos oka lehet. Ilyen okok lehetnek a CyD-ek különböző mértékű szubsztitúciójából adódó eltérések, vagy a jelentősen eltérő kísérleti körülmények. A CyD-ekkel végzett

kísérletek eredményei alapján tervezzük a kölcsönhatások vizsgálatának kiterjesztését más poliszacharid jellegű segédanyagokra is.

A fentiekben leírt szelektivitásra utaló megállapítás érvényes a saját CD spektrummal rendelkező DNS és fehérje esetén is, amikor a makromolekulák abszorpciós sávjaival nem átfedő átmenettel rendelkező molekulák ICD jelét értékeljük. Ezenél a makromolekuláknál ugyanakkor a saját CD spektrumuk változása a ligandum kötődésének hatására szintén a komplex kialakulását jelzi. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a CD spektroszkópia érzékeny módszer az ilyesfajta kölcsönhatások vizsgálatára.

A kísérletek során sikerült igazolni, hogy a bakteriális eredetű plazmid DNS alkalmazható kötődési vizsgálatokra, azonban figyelembe kell venni, hogy az eltérő szuperhelikális szerkezete miatt a kapott spektrumokban eltéréseket lehet felfedezni a nyílt láncú DNS-ek spektrumával összevetve.

Összevetésre került a kurkuminnak és néhány kurkuminoid származékának a DNS kötődése. Ebben az

esetben láthatóvá vált, hogy míg a kurkumin mutat DNS-kötődést, a vizsgált, mintegy 30 kurkuminoid esetében ez elvértve volt kimutatható. Az ICD jel és a szerkezetek alapján kurkumin kisárokba kötődő vegyület, míg a kurkuminoidok aspecifikusan kötődnek a DNS cukorfoszfát láncához. Kijelenthető továbbá, hogy a kurkuminoidok esetében tapasztalt sejtosztódást gátló hatás nem a DNS-kötődés eredményeként jön létre.

CD és NMR mérések alapján megállapítottuk, hogy a szunitinib molekula képes a heterogén, természetes eredetű és a bakteriális plazmid DNS-hez is kötődni. A plazmid DNS-kötődés két lépésben zajlik le, első lépésként a szuperhelikális polinukleotid lánc kitekeredik, majd ez után interkaláció zajlik le.

Az arisztolochiasav I estében feltártuk, hogy a molekula természetes eredetű nyílt láncú DNS-ekhez nem kötődik, ellenben bakteriális eredetű cirkuláris DNS-hez igen. A különbség a plazmid cirkuláris szerkezetének eredménye. Ez a jelenség alapja lehet olyan gyógyszerek fejlesztésének, melyek a baktériumok plazmidhoz köthető tulajdonságainak (pl.: rezisztencia) gátlásával fejtik ki hatásukat.

A fentiek alapján elmondható, hogy az ICD jel, igen jól használható különféle DNS kölcsönhatások kimutatására in vitro, valamint lehetőséget nyújt a kötődési mód megállapítására. Az egyébként kináz-gátló hatású szunitinib DNS-kötődése szerepet játszhat az orális adagolás során tapasztalható mellékhatások kialakulásában is, mivel a bélhám sejtek osztódását befolyásolhatja.

Az ICD spektroszkópia szintén alkalmas gyógyszerek fehérjekötődésének vizsgálatára. A módszert az irodalomból már ismert nimeszulid-HSA kötődés igazolásával validáltuk. Amennyiben a vizsgált molekula rendelkezik olyan kromofórral, amely kívül esik a fehérjék abszorpciós tartományán ( $\lambda > 280$  nm), úgy az ICD spektrum segítségével lehetőség van a kötődés igazolásán túlmenően a stabilitási állandó számítására is. Továbbá lehetőséget biztosít receptorok vagy más célfehérjék hatóanyag-kötésének gyors detektálására is.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### 6.1. A disszertáció alapját képező publikációk

**Kiss E**, Mirzahosseini A, Hubert Á, Ambrus A, Órfi L, Horváth P. (2018) DNA binding of sunitinib: Spectroscopic evidence via circular dichroism and nuclear magnetic resonance. *J Pharm Biomed Anal*, 150: 355–361.

**Kiss E**, Szabó VA, Horváth P. (2019) Simple circular dichroism method for selection of the optimal cyclodextrin for drug complexation. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 95: 223–233.

Huber I, Zupkó I, Gyovai A, Horváth P, **Kiss E**, Gulyás-Fekete G, Schmidt J, Perjési P. (2019) A novel cluster of C5-curcuminoids: design, synthesis, in vitro antiproliferative activity and DNA binding of bis(arylidene)-4-cyclanone derivatives based on 4-hydroxycyclohexanone scaffold. *Res Chem Intermed*, 45: 4711–4735.

Huber I, Rozmer Z, Gyöngyi Z, Budán FC, Horváth P, **Kiss E**, Perjési P. (2020) Structure activity relationship analysis of antiproliferative cyclic C5-curcuminoids without DNA binding: Design, synthesis, lipophilicity and biological activity. *J Mol Struct*, 1206: 127661.

## **6.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk**

Papp LA, Foroughbakhshfasaei M, Fiser B, Horváth P, **Kiss E**, Sekkoum K, Gyéresi Á, Hancu G, Noszál B, Szabó ZI, Tóth G. (2019) Reversed-phase HPLC enantioseparation of pantoprazole using a teicoplanin aglycone stationary phase—Determination of the enantiomer elution order using HPLC-CD analyses. *Chirality*, 1–10.

Kerényi M, Sámuel Bartha G, Horváth P, **Kiss E**, Papp N. (2019) Analysis of aristolochic acids and evaluation of antibacterial activity of *Aristolochia clematitis* L. *Biol Futur*, 70: 323–329.