

STUDIUM KOMPLEXACE METALLAKARBORANŮ S CYKLODEXTRINY POMOCÍ NMR SPEKTROSKOPIE

JAKUB RAK^{a,*}, MARCELA TKADLECOVÁ^a,
PETR CÍGLER^{a,b}, VLADIMÍR KRÁL^{a,c}

^a Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Výzkumné centrum ÚOCHB a Gilead Sciences, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ^c Zentiva a.s. Praha, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10 jakub.rak@vscht.cz

Došlo 31.5.07, přijato 22.1.08.

Klíčová slova: cykloextrin, metallakaboran, komplex, NMR

Úvod

V této práci byla sledována interakce vybraného zástupce ikosahedrálních metallakaboranů se třemi cykloextriny (dále CD) lišícími se velikostí vnitřní kavity.

Metallakaborany jsou nově objevenou skupinou inhibitorů HIV-1 proteasy zodpovědné za replikaci viru a představují tedy potenciální virostatika pro léčbu HIV infekce¹. Mezi významné vlastnosti metallakaboranů patří vysoká stabilita, rigidita skeletu a delokalizace náboje po jejich povrchu. Hydrofobní charakter metallakaboranů způsobuje jejich nízkou rozpustnost a spontánní agregaci ve vodném prostředí², s čímž souvisí problémy při testování i potenciálním farmaceutickým využití.

Nezbytnou podmínkou pro léčbu je především transport účinné látky do buněk. Jednou z možností solubilizace inhibitorů a zlepšení transportu je vytvoření optimálně stabilního komplexu s látkami schopnými procházet buněčnou stěnou. Tento komplex má být natolik stabilní, aby zároveň zabránil vzniku nežádoucího komplexu metallakaboranu se sérovým albuminem přítomným v relativně vysokých koncentracích v krvi. Vhodnými stericky a tvarově komplementárními ligandy pro komplexaci metallakaboranů jsou právě CD. Jsou to obecně cyklické oligosacharidy tvořené několika jednotkami α -D-glukopyranosy (obr. 1) spojenými vazbou α -1,4. Mají tvar dutého kornoutu s relativně lipofilnější kavitou ve srovnání s vnějším hydrofilním povrchem. Jejich dalšími, z farmaceutického

hlediska výhodnými, vlastnostmi jsou nízká toxicita a snadná odbouratelnost.

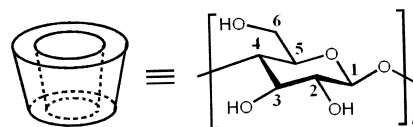
Vazba metallakaboranu (obr. 2) do lipofilních kavit CD je umožněna díky interakcím mezi opačně nabitými vodíky³ (dále H-H můstky), které stabilizují vznikající inkluzní komplexy. Polarizované H-H můstky obsahují vždy vodík z CD s kladným parciálním nábojem a vodík se záporným parciálním nábojem vázaný na elektropozitivní bor.

Experimentální část

Všechna spektra ¹H NMR byla měřena na NMR spektrometru Varian, model Mercury Plus (pracovní frekvence 300 MHz). Spektra byla vztažena vůči methylovému signálu *tert*-butanolu umístěnému v uzavřené kapiláře vložené do NMR kyvety s měřeným roztokem. Jako rozpouštědlo byla použita deuterovaná voda (99,8 %-D Sigma Aldrich). Měření byla prováděna za konstantní teploty 298 K, v případě γ -CD při 323 K kvůli urychlení chemické výměny.

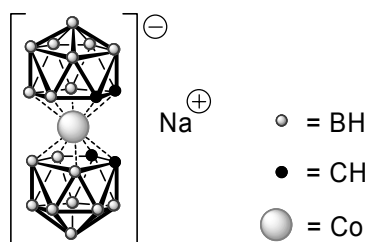
Použité chemikálie: kobalt(3+) bis(1,2-dikarbolid) sodný (obr. 2), 18,2 hm.% vody (určeno termogravimetrií, ověřeno metodou Karla Fishera a elementární analýzou), rozměry – průměr 0,51 nm, délka 0,91 nm. α -CD (6 glukosových jednotek), 10,0 hm.% vody (určeno elementární analýzou), rozměry – vnitřní průměr kavity 0,52–0,57 nm a hloubka kavity 0,80 nm. β -CD (7 glukosových jednotek), 13,7 hm.% vody (určeno elementární analýzou), rozměry – vnitřní průměr kavity 0,64–0,78 nm a hloubka kavity 0,80 nm. γ -CD (8 glukosových jednotek), 8,9 hm.% vody (určeno elementární analýzou), rozměry – vnitřní průměr kavity 0,75–0,95 nm a hloubka kavity 0,80 nm.

Pro různé koncentrace jednotlivých CD byly měřeny ¹H NMR titrační křivky, tj. sledovány změny chemických posunů po přidávání metallakaboranu, přičemž celková koncentrace CD byla udržována konstantní. U všech CD byl sledován především signál ¹H-3 (obr. 3) nacházející se na širším vnitřním okraji kavity, který vykazuje největší změny chemického posunu. U signálu ¹H-5 jsou změny

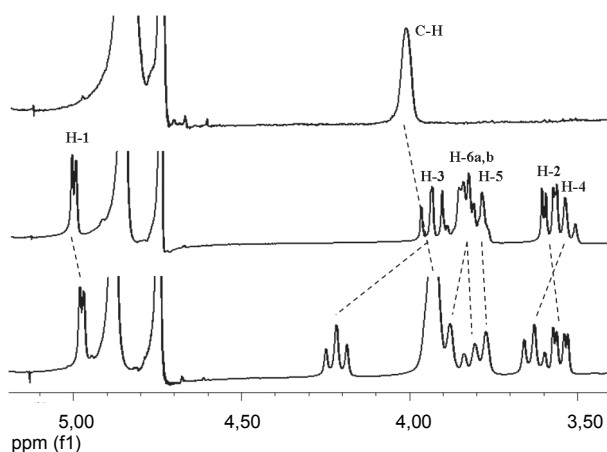


Obr. 1. Tvar molekuly α -, β -, γ -CD ($n = 6,7,8$) s číslováním atomů

* Jakub Rak získal za tuto práci zvláštní cenu poroty v soutěži O cenu firmy Merck 2007 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.



Obr. 2. Ikosahedrální metallakarboran - kobalt(3+) bis(1,2-dikarbolid) sodný



Obr. 3. ^1H NMR spektra metallakarboranu (nahore), α -CD (uprostřed) a jejich směsi (dole); měření prováděno v D_2O s vnitřní kapilárou pro referencování, spektra obsahují zbytkové signály rozpouštědla

chemického posunu podstatně menší a nelze je sledovat v průběhu celé titrace, protože nastává překryv se signálem ^1H -6. Změny chemických posunů pro další vodíky CD jsou pro vyhodnocení příliš malé a signály vodíků z OH skupin nelze sledovat v deuterované vodě kvůli probíhající chemické výměně s jádry deuteria z rozpouštědla.

Roztoky byly vždy připravovány bezprostředně před vlastním měřením a byly sonifikovány pro zajištění homogenity. Bylo ověřeno, že pozorovaná změna chemického posunu je časově nezávislá v rámci několika hodin. Po několikadenním stání se roztoky stávají nehomogenními – zřejmě v důsledku agregace obou složek samotných a pravděpodobně i vzniku směsných agregátů CD a metallakarboranu.

Výsledky a diskuse

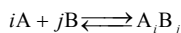
Největší změny chemického posunu α -CD, β -CD i γ -CD byly pozorovány vždy na signálu ^1H -3 nacházejícím se na širším vnitřním okraji kavity. S rostoucí vzdále-

ností od širšího okraje změny chemických posunů ostatních ^1H signálů klesají, z čehož lze usuzovat na vnořování metallakarboranu do kavity CD širším hrdlem. Analogicky největší změny chemických posunů signálů ^{13}C byly pozorovány při širším okraji CD. Vzhledem k nejvyšší citlivosti ke komplexaci byly pro vyhodnocení vybrány signály ^1H -3. Příklad pozorovaných změn ve spektru při titraci α -CD je uveden na obr. 3.

Pro vyhodnocení titračních křivek a určení parametrů bylo využito matematického modelování, tj. navržení možných produktů komplexačních rovnováh v souladu s teoretickými předpoklady a naměřenými daty a nalezení parametrů tohoto modelu.

Uvažované komplexy jsou schematicky znázorněny na obr. 4. Nejjednodušší komplex 1:1 spočívá v inkluzi metallakarboranu do kavity CD, relativně mělké zanoření dané velikostmi obou látek umožňuje vznik symetrického komplexu 2:1. Komplex 1:1 může komplexovat další volný metallakarboran a vzniká tak komplex 1:2. Komplex 2:2 si lze představit jako neinkluzní komplex dvou inkluzních komplexů 1:1. Očekávaná interakce mezi dvěma metallakarborany v komplexech 1:2 a 2:2 by mohla vzniknout přiblížením volných (tj. bez CD) subklástrů metallakarboranů, mezi nimiž by se nacházel solvovaný sodný kation.

Vznik různých typů komplexů A_iB_j (A značí cyklo-dextrin a B metallakarboran) podle rovnic



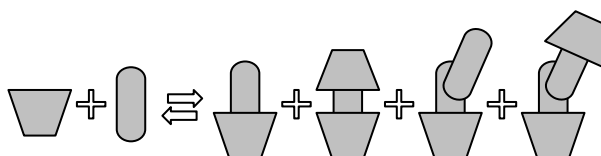
lze popsat rovnovážnými konstantami

$$K_{ij} = \frac{[A_iB_j]}{[A]^i[B]^j}$$

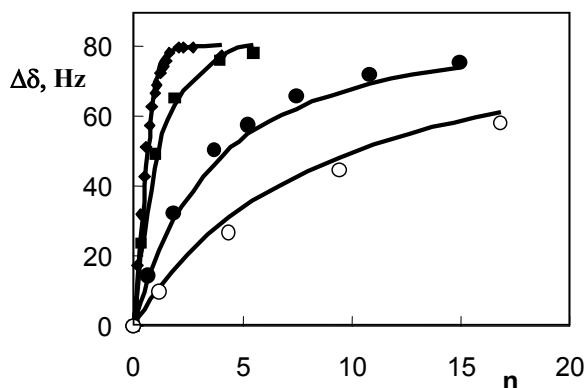
Pro pozorovanou změnu chemického posunu signálu ^1H -3 cyklo-dextrinu jako sledované látky platí v případě rychlé chemické výměny vztah

$$\Delta\delta_{\text{obs}} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m i\Delta\delta_{ij}[A_iB_j]}{c(A)}$$

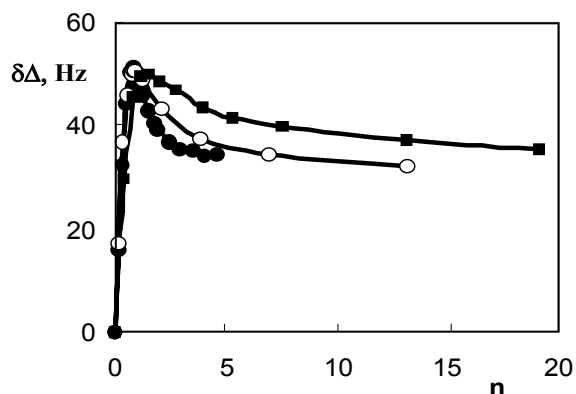
kde $c(A)$ je celková analytická koncentrace cyklo-dextrinu, jehož signál je sledován. Minimalizací sumy kvadrátů odchylek experimentálních a modelovaných hodnot $\Delta\delta_{\text{obs}}$ se získají optimalizované hodnoty parametrů matematického modelu.



Obr. 4. Schematické znázornění možných typů komplexů CD (lichoběžník) s metallakarboranem (ovál): 1:1, 2:1, 1:2, 2:2



Obr. 5. Závislost změny chemického posunu signálu ^1H -3 α -CD, $\Delta\delta_{\text{obs}}$, na poměru látkových koncentrací metallakarboranu vůči α -CD, n , při teplotě 298 K; koncentrace α -CD v mmol l^{-1} : 0,15 (●); 0,38 (○); 2,3 (■); 8,5 (◆). Proložení křivek pomocí modelu 1:1 s konstantou stability 899 a hodnotou $\Delta\delta_{11} = 89,2$ Hz



Obr. 6. Závislost změny chemického posunu signálu ^1H -3 β -CD, $\Delta\delta_{\text{obs}}$, na poměru látkových koncentrací metallakarboranu vůči β -CD, n , při teplotě 298 K; koncentrace β -CD v mmol l^{-1} : 0,16 (■); 0,47 (○); 1,5 (●). Data propojena pro lepší přehlednost

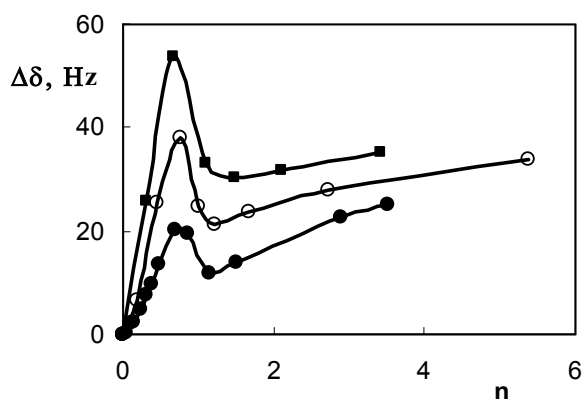
Pro zkoumanou soustavu rovnováh byl vytvořen model, kde každý produkt je popsán dvěma parametry: konstantou stability komplexu K_{ij} a tzv. „complexation induced shift“ $\Delta\delta_{ij}$, tj. rozdílem chemického posunu daného signálu v komplexu oproti posunu nekomplexovaného CD. V případě nesymetrických komplexů obsahujících více než jednu molekulu sledované látky (cyclodextrinu) odpovídá $\Delta\delta_{ij}$ zprůměrované hodnotě $\Delta\delta$ všech molekul sledované látky z komplexu. Snahou bylo použít pro daný systém minimální počet vznikajících komplexů – v této práci $i, j \in \{1, 2\}$. Používání víceparametrových modelů je obecně nežádoucí, protože hrozí vzájemná korelace mezi parametry.

Naměřené titrační křivky pro systém α -CD + metallakarboran odpovídají kvalitativně komplexaci se stechiometrií 1:1, jak lze očekávat podle zlomu na křivce získané pro nejvyšší koncentraci α -CD. Pro vyhodnocení konstanty stability jsou vhodné křivky změřené při dvou nižších koncentracích. Hodnotu konstanty stability komplexu a proložení titračních křivek je vidět na obr. 5. Hodnota konstanty stability byla nezávisle ověřována pomocí isothermální kalorimetrie (ITC). Získaná hodnota konstanty stability pro vznik komplexu se stechiometrií 1:1 se sice poměrně dobře shoduje s hodnotou získanou z NMR, ale s ohledem na rozpustnost látky ležela tato hodnota na hranici měřitelnosti ITC. Model předpokládající vznik komplexů 1:1 a 2:1 dává lepší proložení všech čtyř křivek najednou, což ovšem může být i důsledek většího počtu nastavitelných parametrů. Na druhou stranu takový model vychází z velikosti a symetrie metallakarboranu a velikosti kavity CD a z analogie s výsledky u systému β -CD + metallakarboran.

Průběh titračních křivek u systému β -CD + metallakarboran na obr. 6 vylučuje, že by se mohlo jednat výhradně o komplex 1:1. Jednotlivé titrační křivky lze prolo-

žit modelem 1:1 a 2:1, pro současné proložení všech křivek však tento model selhává. Teprve model zahrnující vznik produktů se stechiometrií 1:1, 2:1, 1:2, 2:2 splňuje všechny nezbytné podmínky a vztahy mezi jednotlivými parametry a výstižně prokládá naměřená data. Komplexace je určitě výrazně silnější, což odpovídá hlubšímu zanoření metallakarboranu do větší kavity CD. Rovněž průběh křivek ITC svědčí o vzniku více typů komplexů a o řádově silnější komplexaci ve srovnání s α -CD. Pro průkaznější popis komplexace u tohoto systému bude třeba současně vyhodnotit výsledky z více analytických metod, což bude předmětem dalšího studia.

Jednotlivé křivky γ -CD + metallakarboran (obr. 7) mají sice podobný průběh jako v případě β -CD, ale



Obr. 7. Závislost změny chemického posunu signálu ^1H -3 γ -CD, $\Delta\delta_{\text{obs}}$, na poměru látkových koncentrací metallakarboranu vůči γ -CD, n , při teplotě 323 K; koncentrace γ -CD v mmol l^{-1} : 1,9 (●); 4,3 (○); 14 (■). Data propojena pro lepší přehlednost

k vystižení jejich průběhu se dvěma extrémy nestačí model 1:1 a 2:1. Celkově však ani model využitý u β -CD (tj. 1:1, 2:1, 1:2, 2:2) není schopen uspokojivého proložení všech naměřených dat najednou. Je možné, že vzniká ještě více typů komplexů, také zde může díky větší velikosti kavity docházet ke vzniku složitějších směsných agregátů. Přesto lze předpokládat srovnatelné konstanty stability s β -CD vzhledem k velikosti kavity (větší oproti α -CD i β -CD, ale umožňující ještě efektivní tvorbu H-H můstků). Za laboratorní teploty je ve spektrech pozorována pomalá chemická výměna znemožňující odečet změn chemického posunu, proto byla měření prováděna při teplotě 323 K. U komplexace β -CD bylo však ověřeno, že průběh titrační křivky touto změnou teploty není výrazně ovlivněn.

Kromě vzniku inkluzních komplexů CD může rovnováhu ovlivňovat také agregace metallakarboranu, jejíž průběh je však znám pouze na kvalitativní úrovni². K intenzivní agregaci dochází paradoxně při velmi nízkých koncentracích metallakarboranu a potom především při velmi vysokých koncentracích. Je známo, že agregaci metallakarboranu lze potlačit přidávkem methanolu. V této práci však bylo pozorováno, že už 10 % methanolu ve vodě zcela zabrání tvorbě komplexu s CD (data nejsou ukázána). Rovnovážný proces může dále ovlivnit také agregace CD, která se uplatňuje při koncentracích vyšších než 3 mM (cit.⁴). Zahnutí těchto fenoménů do popisu rovnováhy sice způsobí zlepšení průběhu proložení experimentálních dat, avšak za cenu dalšího nárůstu počtu optimalizovaných parametrů matematického modelu.

Závěr

V práci bylo ukázáno, že cyklodextriny mohou sloužit pro komplexaci ikosahedrálních metallakarboranů a že lze velikostí kavity modulovat stabilitu komplexu. Tento fakt je důležitým kritériem v dalším testování metallakarboranů pro uvedené farmakologické aplikace. Tvorba stabilních inkluzních komplexů otevírá možnost formulační strategie pro potenciální léčiva.

Tato práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MŠMT ČR č. 6046137307, Centra pro výzkum nových antivirotik a cytostatik IM0508 MŠMT ČR a Centra LC 512.

LITERATURA

1. Cígler P., Kožíšek M., Řezáčová P., Brynda J., Otwinowski Z., Pokorná J., Plešek J., Grüner B., Dolečková-Marešová L., Máša M., Sedláček J., Bodem J., Kräusslich H.-G., Král V., Konvalinka J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 15394 (2005).
2. Matějčík P., Cígler P., Procházka K., Král V.: *Langmuir* 22, 575 (2006).
3. Fanfrlík J., Lepšík M., Horinek D., Havlas Z., Hobza P.: *Chem. Phys. Chem.* 7, 1100 (2006).
4. Bonini M., Rossi S., Karlsson G., Almgren M., Nostro P., Baglioni P.: *Langmuir* 22, 1478 (2006).
5. Havlíček J., Tkadlecová M., Vyhánková M., Pinkhassik E., Stibor I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61, 1783 (1996).

J. Rak^a, M. Tkadlecová^a, P. Cígler^{a,b}, and V. Král^{a,c} (^a Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague, ^b Gilead Sciences Research Center, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, ^c Zentiva Co. Prague): **NMR Study of Complexation of Metallacarboranes with Cyclodextrins**

Metallacarboranes and their derivatives are the recently discovered inhibitors of HIV protease. The main goal of this work was to study the interaction of parent metallacarborane derivatives with cyclodextrins (CD) differing in the inner cavity size. This interaction can improve the drug solubility and its transport to the cells. For α -, β - and γ -CD, NMR titrations with sodium cobalt(III) bis(1,2-dicarbollide) were performed at various CD concentrations. It was found that the greatest change in the ¹H NMR chemical shift is observed at position 3 of CD on the inner broader rim of the cone-shaped molecule of CD. For α -CD, the NMR titration curves correspond to the 1:1 stoichiometry and to the stability constant ca. 900. For β -CD, simultaneous formation of 1:1 and 2:1 complexes and higher stability constants at least by two orders of magnitude follow from the titration curves. For γ -CD, more than two types of complexes are present. It was shown for β -CD that the increased temperature does not significantly influence the titration curves. The model, consisting of a high number of adjustable parameters, for the determination of stability constants of the complexes must be confirmed by independent analytical methods such as isothermal calorimetry and X-ray structure determination.