

STUDIUM KOMPLEXACE METALLAKARBORANŮ S CYKLODEXTRINY POMOCÍ NMR SPEKTROSKOPIE

Jakub Rak

Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská, VŠCHT Praha,
Technická 5, 166 28 Praha 6.
E-mail: jakub.rak@vscht.cz

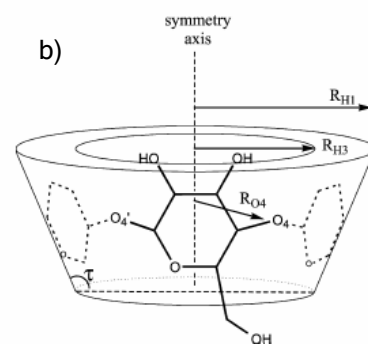
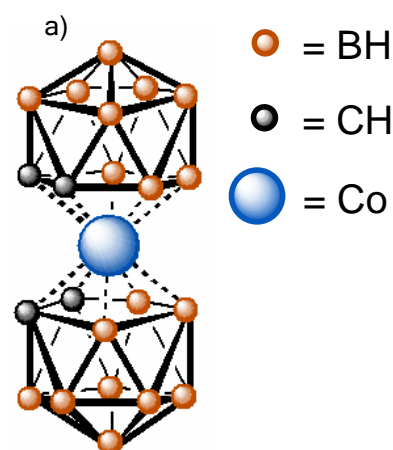
Úvod

Cílem studie je analyzovat pomocí NMR spektroskopie a dalších analytických metod fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných zástupců ikosahedrálních metallakarboranů (dále karboranů) a jejich komplexů s cyklohextriny (dále CD) s důrazem na stabilitu a rozpustnost komplexů za fyziologických podmínek.

Karborany a jejich deriváty jsou nově objevenou skupinou inhibitorů HIV-1 proteasy (zodpovědná za replikaci viru) a představují potenciální virostatika pro léčbu HIV infekce¹. Mezi významné vlastnosti této skupiny látek patří široké možnosti exoskeletálních modifikací, vysoká stabilita, delokalizace náboje a vysoká hydrofobicita. Hydrofobní charakter karboranů způsobuje jejich nízkou rozpustnost a spontánní agregaci ve vodném prostředí², s čímž souvisí problémy při testování i potenciálním farmaceutickém využití.

Nezbytnou podmínkou pro aplikaci inhibitorů je především transport do buněk. Jednou z možností jejich solubilizace a zefektivnění transportu je vytvoření optimálně stabilního komplexu s látkami schopnými procházet buněčnou stěnou, který zároveň zabrání vzniku nežádoucího relativně stabilního komplexu karboranu se sérovým albuminem přítomným v relativně vysokých koncentracích v krvi. Vhodnými stericky a tvarově komplementárními ligandy pro komplexaci karboranů jsou CD

studované v této práci (cyklické oligosacharidy tvořeny šesti a více jednotkami α -D-glukopyranosy spojenými vazbou α -1,4 ve tvaru dutého kornoutu s relativně lipofilnější kavitou ve srovnání s vnějším hydrofilním povrchem), jejichž dalšími z farmaceutického hlediska výhodnými vlastnostmi jsou nízká toxicita a snadná odbouratelnost. Silně hydrofobní karborany se nekovalentně vážou do



a) ikosahedrální metallakarboran
b) cyklohextrin

lipofilních kavit CD a tento inkluzní komplex je stabilizován interakcí mezi opačně nabitými vodíky³ (dále H-H můstky), tj. kladným parciálním nábojem na vodíkách CD a parciálním záporným nábojem na vodíkách vázaných na elektropositivní bor karboranů.

Experimentální část

Interakce karboranu s CD byla sledována pomocí NMR titrace* v D₂O jako závislost změny chemického posunu CD** (pro signál ¹H-3 nacházející se na širším vnitřním okraji kavity) na přidávacích karboranu**, přičemž celková koncentrace CD byla udržována konstantní. U některých NMR titrací byly měřeny i změny chemického posunu jádra ¹³C-1 nacházejícího se rovněž na širším vnitřním okraji kavity CD. Bylo zjištěno, že pozorovaná změna chemického posunu je časově nezávislá.

Modelování

Pro vyhodnocení titračních křivek a určení parametrů bylo využito matematického modelování, tj. navržení možných produktů a dějů v souladu s pozorováním a teorií a optimalizace tohoto modelu pro naměřená data. Model byl tvořen soustavou rovno vah, kde každý produkt komplexace je popsán dvěma parametry: konstantou stability komplexu a tzv. complexation induced shift, CIS, tj. rozdílem chemického posunu daného signálu v komplexu oproti posunu nekomplexovaného CD. Kromě vzniku různých typů komplexů je třeba uvažovat agregaci karboranu, jejíž kvalitativní průběh je znám². K intenzivní agregaci dochází paradoxně při velmi nízkých koncentracích karboranu. Agregaci lze potlačit přidávkem methanolu. V této práci však bylo pozorováno, že už 10 % methanolu ve vodě zcela zabrání tvorbě komplexu s CD.

α-CD: Model vzniku komplexu 1:1 umožňuje dobré proložení každé jednotlivé titrační křivky (ovšem s velmi odlišnými parametry), avšak již nikoliv všech zároveň. Model vzniku komplexů 1:1 a 2:1 již dává výrazně lepší proložení, které lze ještě zlepšit zahrnutím agregace karboranu do modelu (viz graf 1).

Použitý model poukazuje na vznik komplexu karboranu s jedním a dvěma CD, tj. symetricky z druhé strany karboranu. U α-CD je kavita jen o málo větší než průměr molekuly karboranu, uplatní se tedy pravděpodobně sterické efekty, bránící hlubšímu zanoření karboranu. Ty mají za

* Všechna spektra byla měřena na NMR spektrometru Varian, model Mercury Plus (pracovní frekvence 300 MHz). Byla použita 99,8% deuterovaná voda Sigma Aldrich. Všechna spektra byla referencována vůči signálům *terc*-butanolu v kapiláře. Měření byla prováděna za konstantní teploty 298 K, vyjma γ-CD.

** **kobalt(3+) bis(1,2-dikarbolid) sodný** (GB-18), 18,2 hm.% vody (určeno termogravimetrií, ověřeno metodou Karla Fishera a elementární analýzou), rozměry - průměr 5,1 Å, délka 9,1 Å **α-CD** (6 glukosových jednotek), 10,0 hm.% vody (určeno elementární analýzou), rozměry - vnitřní průměr kavity 5,2-5,7 Å a hloubka kavity 8,0 Å **β-CD** (7 gluk. jedn.), 13,7 hm.% vody (určeno elementární analýzou), rozměry - vnitřní průměr kavity 6,4-7,8 Å a hloubka kavity 8,0 Å **γ-CD** (8 gluk. jedn.), rozměry - vnitřní průměr kavity 7,5-9,5 Å a hloubka kavity 8,0 Å

následek slabou interakci prostřednictvím H-H můstků a s ní související nízkou hodnotou konstanty stability komplexu ($\sim 10^2$). Tato hodnota byla ověřena také isothermální titrační mikrokolorimetrií.

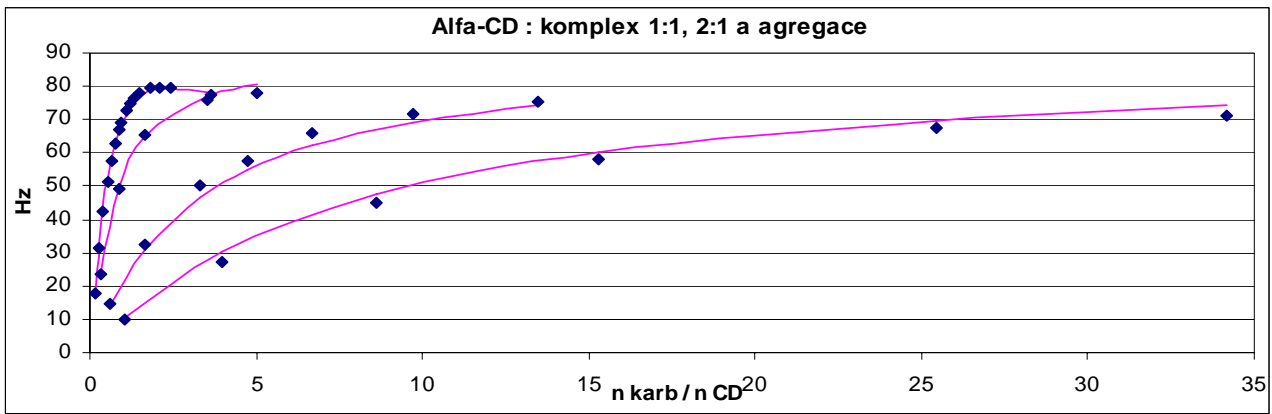
β -CD: Průběh titračních křivek vylučuje, že by se mohlo jednat výhradně o komplex 1:1. Jednotlivé titrační křivky lze sice celkem uspokojivě proložit modelem použitým u α -CD (tj. 1:1, 2:1 a agregace), avšak teprve model popisující vznik produktů se stechiometrií 1:1, 2:1, 1:2, 2:2 a zahrnující agregaci splňuje všechny nezbytné podmínky a vztahy mezi jednotlivými parametry (viz. graf 2).

Kromě produktů vznikajících v případě α -CD lze navíc předpokládat vznik dalších dvou typů komplexů – 1:2 a 2:2 (viz. obr. 1). Komplex 1:1 tedy komplexuje další volný karboran a vzniká tak komplex 1:2. Komplex 2:2 si lze představit jako neinkluzní komplex dvou inkluzních komplexů 1:1. Pravděpodobně dojde k přiblížení volných (tj. bez CD) subklastrů karboranů tak, že se parciálně záporně nabitě vodíky na borech překrývají s parciálně kladně nabitými vodíky na uhlících.

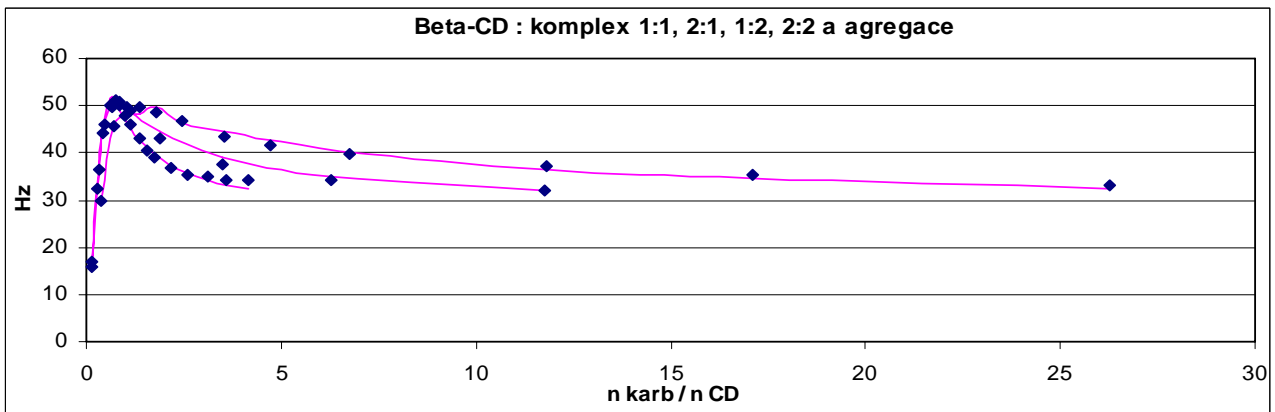
Hlubší zanoření karboranu do širší kavity β -CD oproti α -CD posílí stabilizaci H-H můstky, což vede k vyšším hodnotám konstant stability komplexů ($\sim 10^4$). Druhý karboran v komplexech 1:2 a 2:2 ovlivní svojí přítomností konstanty stability komplexů, avšak ne příliš, neboť sám do kavity nezasahuje a pouhá jeho blízkost vůči CD nebude mít ani výrazný stabilizační (vznik dalších H-H můstků) ani rušivý účinek (kavita je dostatečně široká a dovoluje případnou optimalizaci polohy nakloněním karboranu vzhledem k ose symetrie CD).

γ -CD: Jednotlivé křivky mají podobný průběh jako v případě β -CD (viz graf 3) a stejně jako v předešlých případech lze jednotlivě prokládat. Celkově však ani model využitý u β -CD (tj. 1:1, 2:1, 1:2, 2:2 a agregace) není schopen uspokojivého proložení. Je možné, že vzniká ještě více typů komplexů. Složitější modely svojí náročností ovšem přesahují možnosti stolních počítačů, a proto bude k jejich výpočtům použita speciální výpočetní technika. 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 pousnu, proto byla měření prováděna při teplotě 323 K. U komplexace β -CD bylo ověřeno, že průběh titrační křivky touto změnou teploty není výrazně ovlivněn.

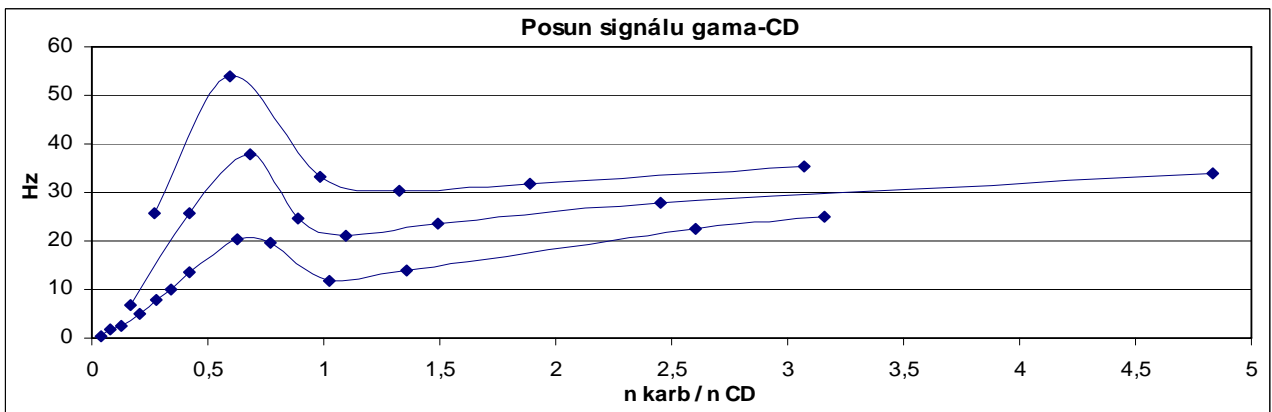
Agregace karboranu: Zahrnutím agregace karboranu do modelu lze kvantifikovat její koncentrační závislost. Z nezávislých proložení křivek u α -CD i β -CD byly získány srovnatelné výsledky, zároveň korespondující s kvalitativním popisem tohoto jevu².



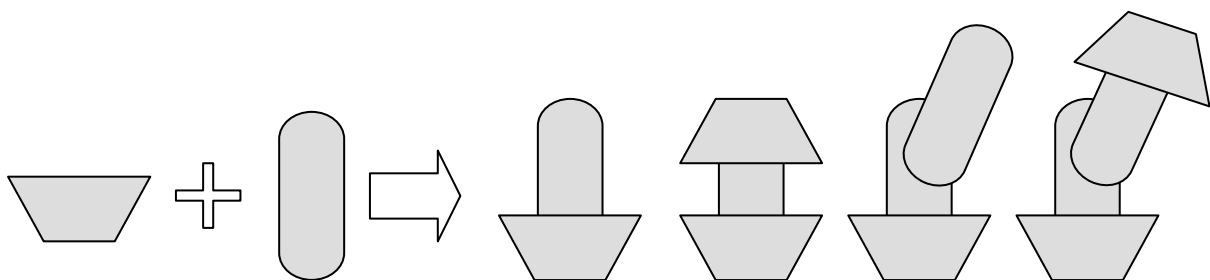
Graf 1: Naměřené chem. posuny v závislosti na složení a jejich proložení matematickým modelem



Graf 2: Naměřené chem. posuny v závislosti na složení a jejich proložení matematickým modelem



Graf 3: Naměřené chem. posuny v závislosti na složení (tři titrační křivky)



Obrázek 1: Schematické znázornění produktů komplexace CD (lichoběžník) + karboran (ovál) a jejich komplexy o stechiometriích 1:1, 2:1, 1:2 a 2:2

Závěr

V práci bylo ukázáno, že cyklodextriny mohou sloužit pro komplexaci ikosahedrálních metallakboranů a že lze velikostí kavity modulovat stabilitu komplexu. Tento fakt je důležitým kritériem v dalším testování matallakboranů pro uvedené farmakologické aplikace.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MŠMT č. 6046137307.

Literatura

- [1] Cígler P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 102, 15394-15399 (2005)
- [2] Matějčec P., Cígler P., Procházka K., Král V., Langmuir 22, 575-581 (2006)
- [3] Fanfrlík J., Lepšík M., Horinek D., Havlas Z., Hobza P., Chem.Phys.Chem.7, 1100-1105 (2006)