

Teza de doctorat: *Cercetări privind separarea chirală a unor substanțe medicamentoase utilizate în terapia cardiovasculară*

Doctorand: Cârțu-Dobrin Melania

Coordonator științific: Conf. Dr. Hancu Gabriel

Chiralitatea este o caracteristică a lumii vii care ne guvernează existența. Această proprietate o regăsim și în cazul unor substanțe medicamentoase, cu implicații deosebite asupra profilului farmacologic al acestora, efectul terapeutic urmărit fiind în general limitat la unul dintre enantiomeri numit **eutomer**, celălalt enantiomer numit **distomer**, putând fi “inactiv”, cu potență mai scăzută decât eutomerul, sau uneori poate prezenta efecte farmacologice diferite sau chiar să fie responsabil pentru efectele adverse ale amestecului racemic.

Medicamentele cardiovasculare reprezintă una dintre cele mai prescrise clase de produse farmaceutice, bolile cardiovasculare fiind una dintre principalele cauze de morbiditate și mortalitate la nivel global. Un număr ridicat de substanțe medicamentoase utilizate în tratamentul afecțiunilor cardiovasculare prezintă cel puțin un centru chiral în moleculă, iar în unele cazuri enantiomerii acestora diferă din punct de vedere al activității farmacologice.

Ținând cont de aceste aspecte elaborarea de noi metode enantioselective pentru separarea chirală a enantiomerilor substanțelor de interes farmaceutic reprezintă o provocare și o necesitate stringentă a cercetării farmaceutice moderne.

În lucrarea de față am ales trei substanțe chirale model utilizate în tratamentul afecțiunilor cardiovasculare: o dihidropiridină asimetrică (**amlodipina - AML**), un derivat arilalchilamină (**verapamil - VER**), și un derivat de dimetilfenoxi propan amină (**mexiletina - MXL**). Substanțele au fost selectate pe baza proprietăților stereochemice particulare ale acestora; toate cele trei substanțe sunt utilizate în terapie ca și amestecuri racemice, dar există diferențe dovedite între profilele farmacocinetice și farmacodinamice ale enantiomerilor.

Ca și metodă de separare chirală am ales **electroforeza capilară (CE)**, bazându-ne pe avantajele acesteia legate de eficiența ridicată a separărilor, dezvoltarea rapidă a metodei analitice, consumul scăzut de analiți, reactivi și selectori chirali și flexibilitatea deosebită în alegerea și utilizarea selectorilor chirali. Datorită consumului relativ redus de solvenți organici, această metodă se pretează cu succes pe conceptul de „green chemistry”. Ca și selectori chirali am utilizat **derivați de ciclodextrine (CD)** (naturali și derivatizați, neutri și ionizați), aceștia fiind cei mai eficienți selectori chirali în CE, cu avantaje legate de disponibilitatea lor comercială, afinitatea ridicată față de un număr ridicat de substanțe medicamentoase, solubilitatea acceptabilă în soluții apoase și absorbția scăzută în UV.

Metodele au fost optimizate utilizând diferite abordări în funcție de particularitățile metodei: abordarea univariată (“One Factor A Time”) respectiv **designuri experimentale (DoE)** (DoE de screening, DoE de optimizare).

Pentru studierea interacțiunilor complexe și a geometriei complexelor formați între CD și enantiomerii substanțelor analizate am aplicat tehnici de modelare moleculară.

Obiectivul principal al lucrării a vizat dezvoltarea unor noi metode de analiză chirală rapide și eficiente pentru separarea enantiomerilor substanțelor model, optimizarea condițiilor analitice, verificarea performanțelor analitice a metodelor optimizate și a aplicabilității lor pe forme farmaceutice tipizate.

Studiul I a urmărit dezvoltarea unei metode simple și eficiente de separare a AML prin CE utilizând CD ca și selectori chirali. În urma unui screening inițial de CD la patru nivele de pH, CM- β -CD, o CD derivatizată anionică, a fost selectată ca selector chiral optim la un pH 9,0 al soluției tampon. Utilizarea unei soluții tampon bazice și a unei CD anionice ca și selector chiral pentru o substanță având caracter bazic a generat un timp de analiză scurt și rezoluție chirală ridicată. Valorile concentrației și pH-ului tamponului, concentrației CD, temperaturii, voltajului aplicat și presiunii de injectare au fost optimizate prin utilizarea unui DoE ortogonal urmărind influența acestora asupra rezoluției chirale. Utilizând condițiile electroforetice optimizate s-a realizat o separare a enantiomerilor AML cu o rezoluție chirală de 2,65 într-un timp de analiză de sub 5 minute. Performanțele analitice ale metodei au fost verificate în ceea ce privește precizia, reproductibilitatea, liniaritatea, acuratețea, sensibilitatea și robustețea. Metoda elaborată a fost utilizată cu succes pentru determinarea raportului enantiomeric a AML în mai multe preparate farmaceutice comerciale.

Studiul II a urmărit dezvoltarea unei metode simple și eficiente de separare a VER prin CE utilizând CD ca și selectori chirali. În urma unui screening inițial de CD la patru nivele de pH, TM- β -CD, o CD derivatizată neutră a fost aleasă ca și selectorul chiral optim la un pH 5,0 al soluției tampon. Pentru optimizarea parametrilor analitici, am aplicat inițial o tehnică univariată (One Factor A Time), câte un parametru fiind variat individual, în timp ce ceilalți au fost menținuți nemodificați. După identificarea parametrilor semnificativi care afectează enantiosepararea (concentrația CD, temperatura, voltajul), a fost aplicat un DoE Box-Behnken, pentru a stabili condițiile analitice optime. Aplicând metoda optimizată, s-a realizat separarea chirală a enantiomerilor VER cu o rezoluție chirală de 1,58 și un timp de migrare de aproximativ 4 min, ordinea de migrare fiind *R*-VER urmat de *S*-VER. Performanțele analitice ale metodei au fost evaluate în ceea ce privește precizia, reproductibilitatea, liniaritatea, acuratețea, sensibilitatea și robustețea prin aplicarea unui DoE Plackett-Burman. Studiile de modelare moleculară au fost utilizate pentru caracterizarea interacțiunilor complexe enantioselective selector chiral-enantiomeri. Aplicabilitatea metodei a fost verificată prin determinarea raportului enantiomeric dintr-un produs farmaceutic tipizat.

Studiul III a avut ca obiectiv dezvoltarea unei metode simple și eficiente de separare a MXL prin CE utilizând CD ca și selectori chirali. Pe baza unui screening complex de CD la trei nivele de pH, TM- β -CD, o CD derivatizată neutră, a fost aleasă ca și selector chiral optim la un pH 5,0 al soluției tampon. Pentru a identifica parametrii semnificativi care interferează cu enantiosepararea, s-a aplicat un DOE de screening factorial fracționat; clasificarea

parametrilor semnificativi asupra separării chirale a fost realizată cu ajutorul diagramelor Pareto, precum și prin analiza statistică ANOVA. Concentrația soluției tampon, concentrația CD și voltajul s-au dovedit a fi factori semnificativi, fiind introduși într-un DoE de tip Face Centered Composite Design, utilizat pentru optimizarea condițiilor analitice. Separarea chirală în condiții optimizate a enantiomerilor MXL a fost realizată cu o rezoluție chirală de 1,52 și un timp de migrare de sub 5 minute. Performanțele analitice ale metodei au fost evaluate în ceea ce privește precizia, reproductibilitatea, liniaritatea, acuratețea, sensibilitatea și robustețea prin aplicarea unui DoE Plackett-Burman. Aplicabilitatea metodei a fost verificată prin determinarea raportului enantiomeric dintr-un produs farmaceutic tipizat. Ordinea de migrare a enantiomerilor (*S*-MXL migrează prima, urmată de *R*-MXL) și mecanismul de discriminare chirală au fost elucidate prin aplicarea calculelor de modelare moleculară.

Teza descrie dezvoltarea a trei noi metode de separare chirală prin CE a unor compuși optic activi utilizați în terapie, ce pot fi utilizați cu succes în analiza enantiomerică preliminară a acestora.

Pe tot parcursul prezentei teze au fost utilizate abordările DoE în dezvoltarea metodelor de separare chirală prin CE; studiile efectuate încadrându-se în tendințele actuale privind aplicarea abordărilor multivariate în domeniul analizei substanțelor medicamentoase. Teza prezintă trei abordări diferite în optimizarea unor metode de CE chirală: utilizarea unui singur design de screening (design factorial ortogonal) – AML, utilizarea tehnicii „One Factor A Time” urmată de un design de optimizare (Box-Behnken) – VER și utilizarea unui design de screening (design factorial fracționat) urmat de un design de optimizare (face centered composite design) – MXL.

De asemenea studiile de modelare moleculară CD-analit chiral utilizate pentru a stabili ordinea de migrare a enantiomerilor și a caracteriza interacțiunile stereoselective aduc un plus de valoare metodelor elaborate.