

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ, FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI TEHNOLOGIE
„GEORGE EMIL PALADE” DIN TÎRGU MUREȘ

ȘCOALA DE STUDII DOCTORALE

Studiul complexșilor cu ciclodextrine

Rezumatul tezei de doctorat

Doctorand **Kopacz-Bucur Pálma**

Conducător de doctorat **prof. dr. Sipos Emese**

TÎRGU MUREȘ 2022



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ,
FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI TEHNOLOGIE
„GEORGE EMIL PALADE”
DIN TÂRGU MUREȘ

Introducere

Ciclodextrinele (CD) sunt oligozaharide ciclice, cu distribuție unică a zonelor hidrofobe/hidrofile, rezultând o amfifilie topologică bine definită. Această proprietate conferă CD-ilor avantaje distinctive în formarea complexelor de incluziune cu molecule lipofile mici, care sunt incluse în întregime sau parțial în cavitatea CD-nei, sau cu partea lipofilă a unei proteine, care este inclusă parțial în cavitatea CD-ei. În acest mod pot fi îmbunătățite stabilitatea și solubilitatea moleculei oaspete, sau molecula oaspete țintă poate fi captată sau mascată, îmbogățind domeniul de aplicare a CD-ei.

Insulina este medicamentul cel mai eficient în tratamentul diabetului; este o proteină, alcătuită din două lanțuri peptidice, lanțul A și lanțul B, legate prin două legături disulfurice. Modificări structurale pot apărea în timpul depozitării și utilizării sale, ele putând fi clasificate ca modificări fizice sau chimice ale moleculei. Degradarea insulinei rezultă în agregarea, precipitarea și formarea fibrelor insolubile care are ca consecință inactivarea substanței active. Pentru rezolvarea acestei probleme, în literatura de specialitate, se pot găsi mai multe încercări în care se formează complexi ai insulinei cu folosirea diferitelor tipuri de excipienți, inclusiv CD.

În ultimii zece ani se poate observa o tendință de creștere în cercetarea nanofibrelor polimerice care sunt funcționalizate cu CD sau sunt obținute doar din ciclodextrină, fără polimeri. Aceste nanofibre au proprietăți deosebite, fiindcă pot forma complexi de incluziune cu o substanță activă, prin care au capacitatea de a crește solubilitatea, biodisponibilitatea, rezistența termică și stabilitatea substanței active, încorporată în nanofibrele respective.

Obiective

În cadrul acestei cercetări ne-am propus dezvoltarea unei metode simple și cost-eficiente pentru formarea nanofibrelor cu CD și încorporarea insulinei în nanofibre de CD cu scopul creșterii solubilității a moleculei de insulină, la un pH mai ridicat. Partea experimentală este structurată în 3 capitole în care sunt prezentate cei trei pași parcurși pentru obținerea nanofibrelor de insulină-CD: complexarea insulinei cu 5 grupe de CD, dezvoltarea unei metode pentru obținerea nanofibrelor de CD și formarea și studiul nanofibrelor de insulină-CD.

Studiul 1: Complexarea CD-ilor cu insulina folosind modelarea moleculară

Scopul acestui studiu este obținerea de diferiți complexi ai insulinei cu fiecare ciclodextrină utilizată ca excipient farmaceutic (CD native: α -CD, β -CD, γ -CD; și CD substituite: metil- α -ciclodextrină, metil- β -ciclodextrină, hidroxietil- β -ciclodextrină, hidroxipropil- β -ciclodextrină (HP β CD), sulfobutilet- β -ciclodextrină (SBE β CD), cu diferite grad de substituție (DS)). Această complexare s-a efectuat, *in silico*, prin modelare moleculară, prin andocarea insulinei în programul AutoDock, pentru a găsi ciclodextrinele optime utile pentru formarea complexelor cu un monomer de insulină.

În concluzie, conform datelor obținute folosind modelarea moleculară, putem afirma că insulina poate forma complexi stabili cu: CD native, cu HP β CD (DS 1-4) și cu SBE β CD (DS 1-3). De obicei, acești complexi se formează într-un raport molar insulină:ciclodextrină de 1:5-7.

Complexul cel mai avantajos s-a format cu SBE β CD (DS 2), iar energia de legătură cea mai avantajoasă (mică) s-a obținut pe lanțul B al insulinei, în jurul resturilor B:LYS29 și B:THR30, ea având o valoare de -18,70 kcal/mol. Resturile menționate, au intrat în cavitatea ciclodextrinelor în majoritatea cazurilor, împreună cu alte 4 resturi: A:LEU13, B:PHE1, B:HIS10, B:TYR16.

Luând în considerare numărul legăturilor de hidrogen detectate în complexi și energiile de legătură calculate folosind programul AutoDock, se poate prezice că insulina formează un complex stabil cu 5-7 molecule de HP β CD sau SBE β CD. În urma acestei complexări, CD-le menționate au un potențial ridicat de a preveni sau de a amâna formarea fibrelor insolubile al insulinei, crescând stabilitatea insulinei prin acest efect.

Studiul 2: Obținerea și studiul nanofibrelor din CD

Scopul cercetării noastre a fost obținerea de nanofibre, fără conținut de polimeri, din HP β CD și SBE β CD. În acest scop s-au preparat câte patru soluții de concentrații diferite din ambele tipuri de CD. Din HP β CD s-au folosit următoarele concentrații: 170%, 180%, 190% și 200% (v/w - soluții apoase) iar din SBE β CD s-au preparat următoarele concentrații: 210%, 220%, 230% și 240% (v/w - soluții apoase).

Pe baza rezultatelor se poate declara că am reușit, folosind aparatul pentru electrospinning dezvoltat „in house”, obținerea nanofibrelor de HPβCD și SBEβCD la un randament de 1,5 ml/h, în prezența unei tensiuni de 25 kV, la o temperatură de 25-28°C, la o umiditate de 45-50%, folosind un ac de seringă 24G în cazul HPβCD-ei și un ac de seringă 22G în cazul SBEβCD-ei. Fibrele au fost colectate pe o folie de aluminiu, iar distanța între ac și colector a fost de 13-15 cm în cazul soluțiilor de HPβCD și 9-11 cm în cazul soluțiilor de SBEβCD. Nanofibrele de HPβCD obținute au o calitate satisfăcătoare, iar nanofibrele de SBEβCD au o calitate bună.

În cazul nanofibrelor obținute din HPβCD, concentrația ideală pentru soluția de electrospinning este de 200%. Din soluții cu concentrații cuprinse între 170-180% s-au format mai puține fibre pe unitatea de timp, aceste fibre nu aveau un aspect corespunzător, adică conțineau picături din soluția pentru electrospinning. Acest fenomen a fost observabil mai ales în timpul testelor de dizolvare și dezintegrare, influențând negativ calitatea fibrelor obținute. Din soluțiile cu o concentrație de 200% s-au format fibre în cantitate mare în unitatea de timp (comparativ cu celelalte concentrații), sub forma unor filme voluminoase, în straturi groase cu parametri de dizolvare și dezintegrare corespunzători.

În cazul nanofibrelor de SBEβCD formarea nanofibrelor n-a fost atât de eficientă ca în cazul nanofibrelor de HPβCD. Formarea nanofibrelor s-a realizat intermitent, cauza fiind, probabil, tensiunea insuficientă. Acest fapt este menționat și în literatura de specialitate, din date reieșind că pentru formarea nanofibrelor de SBEβCD, tensiunea folosită a fost de minim 40 kV. Folosind o tensiune de 25 kV în studiul nostru, se pot obține nanofibre, dar cu un aspect necorespunzător. Aceste nanofibre sunt umede, aderente, fapt ce face dificilă manevrarea lor. Totodată, aceste fibre conțin în cantități mari picături din soluția pentru electrospinning, astfel încât proprietățile de dizolvare și dezintegrare a fibrelor devin necorespunzătoare.

Studiul 3: Prepararea și studiul nanofibrelor obținute din complexi ai CD cu insulina

Studiul de față a avut ca scop dezvoltarea unei metode electrospinning cost-eficiente pentru încorporarea insulinei în nanofibre de HPβCD fără folosirea polimerilor ca substanțe adjuvante, examinarea nanofibrelor obținute din punct de vedere morfologic, efectuarea de teste de dizolvare și dezintegrare, respectiv studiul formării complexilor de incluziune și determinarea conținutului de insulină din nanofibrele obținute. Pentru evaluarea calității nanofibrelor de insulină-CD, s-au studiat comparativ proprietățile nanofibrelor cu insulină cu nanofibrele de CD necomplexată.

Costul metodei era redus în mare parte prin folosirea aparatului pentru electrospinning construit de mine. Acesta era confecționat din plexiglas și are componente ieftine, ușor accesabile. Inovațiile aduse au avut o influență importantă asupra metodei electrospinning care a fost modificată prin eliminarea tubului conector, aflat între seringă și ac, simplificând astfel metoda în etapele de pornire și de curățare a aparatului.

Ca substanță de bază a nanofibrelor am folosit cu succes HPβCD. HPβCD are capacitatea de a forma complexi de bună calitate cu insulina, deoarece aceasta se încorporează complet în nanofibre și nu se poate observa nici o diferență morfologică între nanofibrele „goale” și nanofibrele cu insulină. Cu ajutorul HPβCD-nei, insulina rezistă procesului de electrofilare, iar în timpul procesului nu se pierde din cantitatea încorporată în soluție. HPβCD ajută la dizolvarea insulinei în apă, precum și la dizolvarea insulinei în soluția tampon fosfat cu pH=6,8.

Originalitatea tezei

Teza de doctorat are trei aspecte importante din punctul de vedere al originalității. Primul aspect este elaborarea metodei de andocare a moleculei de insulină cu mai multe molecule de ciclodextrină, cu formarea unui complex constituit din 6-8 molecule. Al doilea aspect este dezvoltarea metodei electrospinning pentru obținerea nanofibrelor de HPβCD cu construirea, în formă îmbunătățită, a aparatului pentru electrospinning. Al treilea aspect este obținerea complexilor de incluziune între HPβCD și insulină și transformarea lor în nanofibre.

În studiul 1 am obținut, prin modelare moleculară, complexi ai insulinei cu CD native și CD substituite cu diverse grupări funcționale și grade de substituție. Procesul de andocare a fost realizat în 3 pași inovativi, prin care s-au eliminat limitările programului AutoDock, deoarece acest program în decursul andocării poate prelucra un număr limitat de legături flexibile și poate cupla printr-o andocare

doar un ligand. Acești pași realizați prin andocare oarbă, andocare scurtă, andocare flexibilă, salvarea complexilor pentru utilizare în următorul proces de andocare scurtă a dus la obținerea de complexi ai insulinei cu multiple molecule de ciclodextrină.

În studiul 2 s-a dezvoltat un aparat inovativ pentru electrospinning, potrivit pentru obținerea nanofibrelor de HP β CD, eventual SBE β CD. Acest aparat s-a confecționat din componente simple, cost-eficiente, rezolvând cu soluții simple problemele metodei electrofilării, cum ar fi monitorizarea temperaturii sau controlul umidității. Cu ajutorul noului design al aparatului am simplificat procesul de electrospinning și am obținut cu succes nanofibre de HP β CD și SBE β CD.

În studiul 3 am realizat complexi de incluziune insulină-HP β CD pe care l-am transformat în nanofibre folosind metoda electrospinning, fără a utiliza substanțe auxiliare. Complexii de incluziune sub formă de nanofibre au fost studiate din punct de vedere morfologic, prin studii de dezintegrare, de dizolvare, respectiv prin studii termale pentru demonstrarea existenței complexilor de incluziune, iar cu electroforeza capilară s-a determinat cantitatea de insulină încorporată în nanofibre.